



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월07일
(11) 등록번호 10-1954945
(24) 등록일자 2019년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/81 (2006.01) A61K 38/48 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/8121 (2013.01)
A61K 38/482 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7018756
(22) 출원일자(국제) 2014년12월15일
심사청구일자 2018년07월12일
(85) 번역문제출일자 2016년07월12일
(65) 공개번호 10-2016-0092025
(43) 공개일자 2016년08월03일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2014/077783
(87) 국제공개번호 WO 2015/086854
국제공개일자 2015년06월18일
(30) 우선권주장
1322091.8 2013년12월13일 영국(GB)
(56) 선행기술조사문헌
J. Bio.l Chem. (2009), Vol 284, No.51,
pp35652-35682.*
WO2008045108 A1
WO2006090282 A1
Journal of Biological Chemistry, Vol. 277,
No. 33, pp29927-29935(2002)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
캠브리지 엔터프라이즈 리미티드
영국 캠브리지셔 씨비2 1티엔 캠브리지 트리니티
레인 더 올드 스쿨스
(72) 발명자
헌팅톤, 제임스, 앤드류
영국, 캠브리지 캠브리지셔 씨비2 0엑스와이, 힐
스 로드, 웰컴 트러스트/엠알씨 빌딩, 캠브리지
인스티튜트 포 메디컬 리서치, 디파트먼트 오브
히머톨로지, 유니버시티 오브 캠브리지
폴데르디스크, 스테파니
영국, 캠브리지 캠브리지셔 씨비2 0엑스와이, 힐
스 로드, 웰컴 트러스트/엠알씨 빌딩, 캠브리지
인스티튜트 포 메디컬 리서치, 디파트먼트 오브
히머톨로지, 유니버시티 오브 캠브리지
베이글린, 트레버
영국, 캠브리지 캠브리지셔 씨비2 0엑스와이, 힐
스 로드, 웰컴 트러스트/엠알씨 빌딩, 캠브리지
인스티튜트 포 메디컬 리서치, 디파트먼트 오브
히머톨로지, 유니버시티 오브 캠브리지
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 8 항

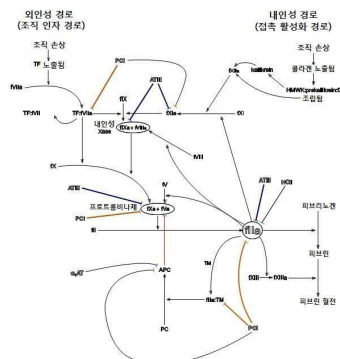
심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 출혈 장애를 치료하기 위한 변형된 세르핀

(57) 요약

본 발명은 항응고 프로테아제에 대한 증가된 특이성을 나타내는, 반응성 중심 루프(RCL)내 P4, P2, P1 및/또는 P1' 잔기들의 변형에 의해 조작된 응고촉진 세르핀 분자들에 관한 것으로서, 상기 변형된 세르핀 분자들은 예를 들면, 출혈을 치료하기 위한 응고촉진제로서, 치료법에 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C07K 14/8125 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 변형된 세르핀:

- (i) SEQ ID NO: 12의 25-418 잔기에 대한 아미노산 서열;
- (ii) 256 잔기에서 C에서 S로의 돌연변이를 갖는 SEQ ID NO: 12의 25-418 잔기에 대한 아미노산 서열;
- (iii) 25 잔기에서 E에서 S로의 돌연변이를 갖는 SEQ ID NO: 12의 25-418 잔기에 대한 아미노산 서열; 및
- (iv) 25 잔기에서 E에서 S로의 돌연변이를 가지며, 256 잔기에서 C에서 S로의 돌연변이를 갖는 SEQ ID NO: 12의 25-418 잔기에 대한 아미노산 서열.

청구항 2

제1항의 변형된 세르핀을 코딩하는 핵산.

청구항 3

제1항의 변형된 세르핀을 코딩하는 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 4

제1항의 변형된 세르핀을 발현하는 벡터를 포함하는, 재조합 세포.

청구항 5

제1항의 변형된 세르핀 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 출혈장애 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 변형된 세르핀은 개체 내 출혈을 예방 또는 치료하거나 지혈을 촉진하는 것인, 출혈장애 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 개체는 혈우병을 가진 개체인, 출혈장애 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 개체는 트라우마를 가진 개체인, 출혈장애 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 변경된 특이성을 갖는 변형된 세르핀 분자들, 특히 항응고 프로테아제에 대하여 증가된 특이성을 갖도록 변형된 세르핀 분자들, 예컨대 활성화 단백질 C(APC)에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 혈우병은 순환성 혈장 fVIII(혈우병 A, HA) 또는 fIX(혈우병 B, HB)의 결핍에 의해 유발되는, 출혈 장애이다 (Bolton-Maggs & Pasi, 2003에서 검토됨). 이 질병은 고유 테나제(Xase)의 활성을 감소시켜서, 조직 손상이 발생할 때 생성되는 트롬빈의 양을 감소시킨다. 이는 관절 및 연조직으로 자발적으로 출혈될 뿐만 아니라 손상 후 출혈이 제어되지 않도록 한다.
- [0003] 혈우병은 사람 5,000명 중 1명꼴로 발병된다. 세계혈우연맹 전체조사에서 확인된 170,000명의 환자들은 전세계 건강부담을 적게 추정된 것이다(세계혈우연맹, 2011). 치료비용은 매우 비싸며, 치료가 빈번하고, 평생 치료해야 한다.
- [0004] 혈우병을 위한 표준 치료법은 재조합 또는 혈장-유도 인자들을 사용하여, 감염된 응혈인자를 대체하는 것을 수반한다(Mannucci, 2003; 2008에서 검토됨). 그러나, 본 방법으로 치료받은 환자들의 대부분이 보충된 응고인자에 대한 억제 항체들을 발달시킬 것이며, 이는 치료가 비효과적이 되도록 한다(Brettler, 1996에서 검토됨). 치료받은 혈우병 환자들 중 30%에서 억제인자들이 발생하지만(Teitel & Sholzberg 2013에서 검토됨), 전체적인 추정치는 많은 국가에서 치료받지 않은 억제인자 환자들에 있어서의 높은 사망률 및 낮은 억제인자 보급율로 인해 낮으며, 인자 VIII 대체요법이 적용될 수 없다. 종래 치료방법들의 또다른 단점은 그의 비용 뿐만 아니라, 빈번한 치료를 필요하게 하는, 주입된 응혈인자의 짧은 반감기이다(Lee *et al*, 2006에서 검토됨).
- [0005] 환자들이 억제 항체들을 생성하는 경우, 출혈 질병을 치료하기 위해 우회약제가 사용된다((Negrier *et al*, 2006)에서 검토됨). 우회약제는 감염된 응혈인자를 직접 공급하지 않으면서 출혈을 감소시키며; 이들은 테나제 복합체의 활성을 '우회'시킨다. 현 우회약제들의 예들은 재조합 fVIIa 및 FEIBA(Factor Eight Bypassing Activity, 8인자 우회활성), 프로트롬빈 복합체 농축물을 포함한다. 이러한 대체 치료법들은 매우 비싸며(Bohn *et al*, 2004; Di Minno *et al*, 2010; Gringeri *et al*, 2003; Escobar, 2010), 및 두 생성물들의 짧은 반감기로 인해 높은 투여량으로, 종래의 치료법보다 더 빈번하게 제공될 필요가 있다(Haya *et al*, 2007에서 검토됨). 게다가, 환자 반응은 다양하고, 예측불가능한 것으로 나타났다(Berntorp, 2009에서 검토됨).
- [0006] 게다가, 인자 농축물들의 짧은 반감기는 혈우병 차선책의 표준 대체치료법이 되도록 한다. 인자 VIII이 12시간 미만의 반감기를 가지므로, 이는 혈우병 A에서 특히 눈에 띈다. 결과적으로, 혈우병 A 및 B를 위한 치료의 유용성에도 불구하고, 혈우병 A에서 출혈률이 더 높으며, 만성 혈우병성 관절증이 훨씬 흔하다. 이는 인자 VIII의 짧은 반감기 및 결과적으로 인자 VIII의 지혈수준을 유지하는데 있어서의 어려움과 관련될 수 있다(Escobar and Sallah 2013). 치료법을 국가적으로 검토하는데 있어서, 억제인자 없이 심각한 혈우병 A를 갖는 환자들에서 연간 출혈빈도는 혈우병 B를 갖는 환자들에 있어서의 9회와 대조되는, 14회이었다(Nagel, *et al* 2011). 근골격 수술의 필요성은 혈우병 A를 갖는 환자들에서 3배 더 높았다. Tagariello와 다수는 혈우병 A를 갖는 환자들에서 혈우병 B를 갖는 환자들보다 3배 더 자주 관절치환을 필요로 했음을 발견하였다(Tagariello, *et al* 2009). Lowe와 다수는 혈우병 B와 대조적으로 혈우병 A를 갖는 환자들에서 3배 더 빈번하게 입원을 필요로 했음을 발견하였다(Lowe and Ludlam 2008).
- [0007] 그러므로, 혈우병과 같은 출혈 장애들에 대한 현 치료법들은 다양한 단점들을 가진다.
- [0008] 요약
- [0009] 본 발명자들은 세르핀 분자들의 특이성이 반응성 중심 루프(RCL)내 잔기들의 변형에 의해 조작될 수 있음을 인식하였으며, 및 변형된 세르핀 분자들이 항응고 프로테아제들에 대하여 증가된 특이성을 가짐을 확인하였다. 이러한 변형된 세르핀 분자들은 예를 들면, 출혈을 치료하기 위한 치료법에 사용될 수 있다.
- [0010] 본 발명의 양태는 그의 반응성 중심 루프(RCL)내에 잔기들 P4, P2, P1 및 P1' 중 하나 또는 그 이상에서 돌연변이들을 갖는 변형된 세르핀을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 다른 양태는 그의 반응성 중심 루프(RCL)내에 잔기들 P1' 및 P2 및 선택적으로 잔기들 P4 및/또는 P1 중 하나 또는 둘다에서 돌연변이들을 갖는 변형된 세르핀을 제공한다.
- [0012] 돌연변이는 트롬빈의 억제와 관련하여, 활성화된 단백질 C의 억제를 증가시킬 수 있다.
- [0013] 돌연변이들은 또한, 다른 응고촉진 프로테아제, 예컨대 fVIIa, fIXa, fXa 및 fXIa의 억제와 관련하여, 활성화된 단백질 C의 억제를 증가시킬 수 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 양태는 출혈, 예를 들면 유전성 출혈 장애 및 트라우마, 수술을 포함한 후천적 출혈을 갖는 환

자들, 및 항혈액응고 치료를 받은 환자들에서의 출혈을 치료하기 위해, 본 명세서에 설명된 변형된 세르핀들을 사용하는 것에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 응고 캐스케이드 및 본 캐스케이드에서 세르핀의 조절역할을 나타낸다.

도 2는 21개의 잔기 N-말단 절단(N-말단 잔기는 프로펩티드의 잔기 1을 성숙 단백질의 잔기 1로서 카운팅할때, 야생형 서열의 A22임)을 갖고, 조직인자 경로(외인성)를 통한 응고시에 RCL내 P2 및 P1' 위치의 K 잔기들(A22 P2KP1'K PCI)을 갖는 단백질 C 억제인자(PCI)의 효과를 측정하기 위한 프로트롬빈 시간(PT) 분석의 결과들을 나타낸다. 3개의 별도의 혈장들로부터의 풀링된 정상 혈장이 PCI가 없거나(흑색 막대, -) 또는 5 μ M A22 야생형(WT) PCI(회색 막대, WT), 또는 5 μ M A22 P2KP1'K PCI(흰색 막대, P2KP1'K)와 함께 배양되었다. 혈전 형성이 측정될때까지의 시간 및 외인성 경로를 통해 응고를 개시하기 위해, PT 제제를 첨가하여 응고가 개시되었다. 분석을 3회 수행하였으며, 오차 막대들은 표준편차를 나타낸다. 응고를 억제인자에 대한 분석의 민감도를 증가시키기 위해, 2-배 희석된 혈장을 사용하였다. A22 P2KP1'K PCI는 상기 프로트롬빈 시간(PT) 분석에서 응고에 어떠한 효과도 가지지 않는다. 이 결과는 A22 P2KP1'K PCI에 의해 TF: fVIIa, 트롬빈 및 다른 응고촉진 프로테아제가 크게 억제되지 않음을 나타낸다.

도 3은 접촉 활성화 경로(내인성)를 통한 응고에 A22 P2KP1'K PCI가 미치는 효과를 측정하기 위한 활성화 부분적 트롬보플라스틴 시간(aPTT) 분석의 결과들을 나타낸다. 도 3A는 PCI가 없거나(흑색 막대, -) 또는 5 μ M A22 야생형(WT) PCI(회색 막대, WT), 또는 A22 P2KP1'K PCI(흰색 막대, P2KP1'K)와 함께 배양된, 3개의 별도의 혈장들로부터의 풀링된 정상 혈장을 나타낸다. aPTT 제제가 첨가되고, 샘플들이 37°C에서 5분간 배양되었다. 그후, CaCl₂를 가함으로써 응고가 개시되어, 내인성 경로를 통해 응고를 개시하고, 혈전 형성까지의 시간이 측정되었다. 막대는 적어도 3개의 측정치들의 평균들을 나타내며, 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. 분석을 300초에서 정지하였다. 300초에서 샘플들은 실험시간내에 혈전을 형성하지 않았으며, 별표로 표시한다. 도 3B는 혈전 형성 시간에 미치는 작은 효과를 나타내기 위해, A22 WT PCI 샘플들 없는 A로부터의 데이터를 나타낸다.

도 4는 RCL(FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K)내에 C232S 돌연변이 및 P357K(P2) 및 S359K(P1'K) 돌연변이를 추가로 포함하는 전장(FL) α_1 -항트립신 피츠버그(Pitts) 돌연변이체(M358R=P1R)가 조직인자 경로(외인성)를 통한 응고에 미치는 효과를 측정하는 프로트롬빈 시간 분석(PT)의 결과를 나타낸다. 3개의 별도의 혈장들로부터의 풀링된 정상 혈장을 α_1 AT가 없거나(-, 흑색 막대) 또는 5 μ M FL α_1 AT Pitts C232S(Pitts, 회색 막대), 또는 5 μ M FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K(P2KP1'K, 흰색 막대)와 함께 배양하였다. PT 제제를 첨가하여 응고가 개시되고, 혈전 형성까지의 시간이 측정되었다. 막대는 적어도 3개의 측정치들의 평균들을 나타내며, 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. 응고의 억제인자에 대한 분석의 민감도를 증가시키기 위해, 2-배 희석된 혈장을 사용하였다. FL α_1 AT Pitts C232S와 달리 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K는 PT를 연장시키지 않는다. 이는 TF-fVIIa, 트롬빈 또는 fXa를 포함하는, 임의의 응고촉진 프로테아제에 대한 큰 억제효과가 없음을 가리킨다.

도 5는 접촉 활성화 경로(내인성)를 통한 응고에 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K가 미치는 효과를 측정하기 위한 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간 분석(aPTT)의 결과들을 나타낸다. 도 5A는 α_1 AT(흑색 막대)가 없거나, 또는 증가된 농도의 FL α_1 AT Pitts C232S(회색 막대) 또는 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K(흰색 막대)와 함께 배양된 3개의 별도의 혈장들로부터의 풀링된 정상 혈장을 나타낸다. aPTT 제제가 첨가되고, 샘플들을 37°C에서 5분간 배양했다. 그후, CaCl₂ 첨가에 의해 응고가 개시되고, 혈전형성까지의 시간이 측정되었다. 막대들은 적어도 3개의 측정치들의 평균들을 나타내며, 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. 분석을 300초에 정지했다. 300초에 보여진 샘플들은 실험시간내에 혈전을 형성하지 않았으며, 별표로 표시한다. 도 5B는 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K에 의해 응혈 시간에 미치는 작은 효과를 나타내기 위해, FL α_1 AT Pitts C232S 샘플들 없는 A로부터의 데이터를 나타낸다. 그러나, 이 효과는 용량-의존적으로 증가하지 않는다.

도 6은 FL α_1 AT Pitts C232S가 정상인 혈장(NP)에서 트롬빈 생성을 억제함을 보여준다. 도 A-C는 (A)트롬보모듈린(TM)이 없음, (B)1.25nM 트롬보모듈린(TM) (C)10nM 트롬보모듈린(TM)의 존재하에 증가된 농도의 FL α_1 AT Pitts C232S를 함유하는 반응을 위한 대표적인 트롬빈 생성곡선들을 나타낸다. 곡선들은 2회의 평균을

나타낸다. 모든 분석들은 George King Biomedical로부터의 폴링된 정상인 혈장(NP)에서 수행하였다. CaCl_2 및 TF/인지질(RB 낮은 TF 및 인지질 제제 #5006210, Technoclone GmbH)의 첨가에 의해 외인성 경로를 통해 응고를 활성화시켜서, 응고가 개시되었다. 트롬빈 생성은 플루오로제닉 기질(Z-Gly-Gly-Arg-AMC)의 제거를 통해 측정하였다. Technothrombin 보정 키트(Technoclone)을 사용하여, 공지된 트롬빈 농축물에 대한 형광 유닛들을 보정함으로써, 형광 유닛들이 트롬빈 농축물로 전환되었다. 도 6D는 반응동안 생성되는 트롬빈의 총 양을 나타내는, 평균 ETP(내인성 트롬빈 포텐셜)를 나타낸다. 막대들은 2회 수행된 2개의 독립적 실험들의 평균을 나타낸다. 오차 막대들은 표준 편차를 나타낸다. 사용된 트롬보모듈린(TM)은 HEK-EBNA 세포들로부터 재조합 제조되었으며, TM의 세포외 도메인으로 구성된다.

도 7은 FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2KP1'K가 정상인 혈장(NP)내 TM의 항응고 효과를 억제한다는 것을 보여준다. 도 7A-C는 (A)TM 없음, (B)1.25nM TM, (C)10nM TM의 존재하에서 증가 농도의 FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2KP1'K를 함유하는 반응들을 위한 대표적인 트롬빈 생성곡선을 나타낸다. 곡선들은 2회의 평균을 나타낸다. 모든 분석들은 George King Biomedical제 폴링된 정상인 혈장(NP)에서 수행되었다. 외인성 경로를 통해 응혈을 활성화하기 위해, CaCl_2 및 TF/인지질(RB 낮은 TF 및 인지질 제제 #5006210 Technoclone GmbH)을 첨가함으로써 응혈을 개시하였다. 트롬빈 생성은 플루오로제닉 기질(Z-Gly-Gly-Arg-AMC)의 제거를 통해 측정하였다. Technothrombin 보정 키트(Technoclone GmbH)을 사용하여, 공지된 트롬빈 농축물에 대한 형광 유닛들을 보정함으로써, 형광 유닛들은 트롬빈 농축물로 전환되었다. 도 7D는 반응동안 생성되는 트롬빈의 총 양을 나타내는, 평균 ETP(내인성 트롬빈 포텐셜)를 나타낸다. 막대들은 2회 수행된 2개의 독립적 실험들의 평균을 나타낸다. 오차 막대들은 표준 편차를 나타낸다.

도 8은 인간 혈우병 A 혈장(HA, fVIII-결핍) 및 인간 혈우병 B 혈장(HB, fIX-결핍)에서 FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S가 트롬빈 생성을 없앴을 나타낸다. 그래프들은 지시량의 첨가된 트롬보모듈린(TM)을 갖는, (A)fVIII-결핍 혈장(1% 미만 fVIII 활성) 또는 (B)fIX-결핍 혈장(1% 미만 fIX 활성)내 증가 농도의 FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S에 의해 스파이크된 트롬빈 생성 실험으로부터의 평균 ETP를 나타낸다. 모든 혈장들은 George King Biomedical제였다. 외인성 경로를 통해 응혈을 활성화하기 위해, Dade Innovin(Siemens)의 1:4,000 최종 희석과 함께 CaCl_2 및 TF/인지질(RB 낮은 TF 및 인지질 제제 #5006210, Technoclone GmbH)를 가함으로써, 반응을 개시하였다. 트롬빈 생성은 플루오로제닉 기질(Z-Gly-Gly-Arg-AMC)의 제거를 통해 측정하였다. Technothrombin 보정 키트(Technoclone)를 사용하여, 공지된 트롬빈 농축물에 대한 형광 유닛들을 보정함으로써, 형광 유닛들은 트롬빈 농축물로 전환되었다. 평균 ETP는 2회 수행된 적어도 2개의 독립적인 실험들로부터 보여진다. 오차 막대들은 표준 편차를 나타낸다.

도 9는 인간 HA 혈장(fVIII-결핍 혈장)에 대한 TM의 효과를 FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2KP1'K가 억제함을 나타낸다. 도 9A-C는 (A)TM 없음, (B)1.25nM TM, (C)5nM TM의 존재하에 증가 농도의 FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2KP1'K를 함유하는 반응에 대한 대표적인 트롬빈 생성곡선들을 나타낸다. 곡선들은 2회의 평균을 나타낸다. 모든 분석들은 George King Biomedical제 fVIII-결핍 혈장(1% 미만 fVIII 활성)에서 수행되었다. 외인성 경로를 통해 응혈을 활성화하기 위해, CaCl_2 및 TF/인지질(RB 낮은 TF 및 인지질 제제 #5006210, Technoclone GmbH) 및 1:4,000 Dade Innovin(Siemens)을 가함으로써, 응혈을 개시하였다. 트롬빈 생성은 플루오로제닉 기질(Z-Gly-Gly-Arg-AMC)의 제거를 통해 측정하였다. Technothrombin 보정 키트(Technoclone)를 사용하여, 공지된 트롬빈 농축물에 대한 형광 유닛들을 보정함으로써, 형광 유닛들은 트롬빈 농축물로 전환되었다. 도 9D는 반응동안 생성된 트롬빈의 총 양을 나타내는, 평균 ETP(내인성 트롬빈 포텐셜)를 나타낸다. 막대들은 2회 수행된 2개의 독립적인 실험들의 평균을 나타낸다. 오차 막대들은 표준 편차를 나타낸다.

도 10은 인간 HB 혈장(fIX-결핍 혈장)에 대한 TM의 효과를 FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2KP1'K가 억제함을 나타낸다. (A-C)대표적인 트롬빈 생성곡선은 (A)TM 없음, (B)1.25nM TM, (C)5nM TM의 존재하에 증가 농도의 FL $\alpha_1\text{AT}$ Pitts C232S P2KP1'K를 함유하는 반응에 대하여 나타낸다. 곡선들은 2회의 평균을 나타낸다. 모든 분석들은 George King Biomedical제 fIX-결핍 혈장(1% 미만 fIX 활성)에서 수행되었다. 외인성 경로를 통해 응혈을 활성화하기 위해, CaCl_2 및 TF/인지질(RB 낮은 TF 및 인지질 제제 #5006210 Technoclone GmbH) 및 1:4,000 Dade Innovin(Siemens)을 가함으로써, 응혈을 개시하였다. 트롬빈 생성은 플루오로제닉 기질(Z-Gly-Gly-Arg-AMC)의 제거를 통해 측정하였다. Technothrombin 보정 키트(Technoclone)을 사용하여, 공지된 트롬빈 농축물에 대한 형광 유닛들을 보정함으로써, 형광 유닛들은 트롬빈 농축물로 전환되었다. 도 10D는 반응동안 생성된 트롬빈의 총

양을 나타내는, 평균 ETP(내인성 트롬빈 포텐셜)를 나타낸다. 막대들은 2회 수행된 2개의 독립적인 실험들의 평균을 나타낸다. 오차 막대들은 표준 편차를 나타낸다.

도 11은 HB 마우스 혈장에서 FL α_1 AT Pitts C232S 및 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K의 효과를 나타낸다. 도 11A-D는 (A 및 C) TM 없음, (B 및 D) 750nM 가용성 인간 TM의 존재하에서, 증가 농도의 (A-B) FL α_1 AT Pitts C232S 또는 (C-D) FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K를 함유하는 반응물에 대한 대표적인 트롬빈 생성곡선을 나타낸다. 모든 분석들은 시트레이트로 꼬리 채혈에 의해 수집된 HB 마우스 혈장에서 수행하고, 적혈구를 제거하기 위해 원심분리하고, -80℃에서 동결시켰다. 외인성 경로를 통해 응혈을 활성화하기 위해, CaCl₂, TF/인지질(RB 낮은 TF 및 인지질 제제, Technoclone) 및 1:12,000 Dade Innovin(Siemens)을 가함으로써, 응혈을 개시하였다. 트롬빈 생성은 플루오로제닉 기질(Z-Gly-Gly-Arg-AMC)의 제거를 통해 측정하였다. Technothrombin 보정 키트(Technoclone)을 사용하여, 공지된 트롬빈 농축물에 대한 형광 유닛들을 보정함으로써, 형광 유닛들은 트롬빈 농축물로 전환되었다. 도 11E는 반응동안 생성된 트롬빈의 총 양을 나타내는, 평균 ETP(내인성 트롬빈 포텐셜)를 나타낸다. 막대들은 4개의 독립적인 실험들의 평균을 나타낸다. 오차 막대들은 표준 편차를 나타낸다. 모든 분석들은 33℃에서 수행되었다.

도 12는 꼬리 클립 분석에서, FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K가 HB 마우스내 출혈을 감소시킴을 보여준다. 꼬리 클립 결과는 WT 마우스 또는 HB 마우스에 대하여 3mm 직경에서 꼬리 절개후, 10분 수집기간동안 총 혈액손실을 보여준다. 마우스에 200 μ l의 총 주입용량에서 지시된 투여량으로 PBS, FL α_1 AT Pitts C232S 또는 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K를 주사하였다. 단백질 용액은 PBS를 사용하여 200 μ l까지 제조되었다. 총 혈액손실은 꼬리로부터의 혈액을 14ml 식염수에 수집하여 측정되었다. 수집된 혈액을 스핀다운시키고, 적혈구 세포들을 분리한 후, 575nm에서 흡광도를 측정하였다. 공지 용량의 수집된 혈액을 사용하여, 적혈구 세포를 분리한 후, 575nm에서 흡광도를 측정하여, 표준 곡선을 작성하였다. 그후, 실험 샘플내 혈액 손실을 본 표준으로부터 계산하였다. 도시된 각 지점은 단일 마우스로부터의 데이터를 가리키며, 가로선은 그룹당 모든 동물들의 평균을 나타낸다. P 값들은 짝없는 t-테스트를 사용하여 계산하였다. 원들은 PBS가 주사된 WT 마우스를 가리키며, 사각형들은 PBS가 주사된 HB 마우스를 가리키며, 삼각형들은 7.5mg/kg FL α_1 AT Pitts C232S가 주사된 HB 마우스를 가리키며, 역삼각형들은 7.5mg/kg FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K가 주사된 HB 마우스를 가리키며, 및 다이아몬드들은 15mg/kg FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K가 주사된 HB 마우스를 가리킨다.

도 13은 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K가 거고근 세동맥 레이저 손상 모델에서 HB 마우스내 안정적인 혈전 형성을 증가시킴을 보여준다. 경정맥 캐놀러를 통해 혈소판을 표지하기 위해, HB 마우스에 형광태그된 α -피브린 항체 및 형광태그된 항체를 주입하였다. 대조군들은 항체들만 주입된 마우스에서 손상후 혈전형성의 기준선 수준을 가리킨다. m은 조건당 마우스의 수를 가리키며, n은 이 조건에 대하여 수행된 손상들의 수를 가리킨다. 연회색은 혈전이 없음을 가리키며, 암회색은 혈소판만의 혈전을 가리키며, 및 흑색은 혈소판 및 피브린을 함유하는 혈전을 나타낸다.

도 14는 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K가 거고근 세동맥 레이저 손상 모델에서 HB 마우스내 안정적인 혈전 형성을 증가시킴을 보여준다. 도 14는 도 13에 도시된 결과들의 대표적인 기초 데이터를 나타낸다. 각 조건에 대하여 모든 손상들로부터 전체 시간동안 형광을 정량화하였다. 그래프들은 지시된 조건에서 모든 손상들로부터의 중간값을 나타낸다. 마우스 수 및 총 손상 수는 하기와 같았다: 대조군: 마우스 5마리, 8개의 손상들; 7.5mg/kg의 FL α_1 AT Pitts C232S: 마우스 1마리, 7개의 손상들; 7.5mg/kg의 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K: 마우스 4마리, 18개의 손상들; 15mg/kg의 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K: 마우스 3마리, 20개의 손상들.

도 15는 fXa 억제제를 위해 캐스크리닝된 트롬빈 이상으로 APC에 대하여 특이적인 α_1 AT의 돌연변이체에 의한 트롬빈 및 fXa의 억제를 나타낸다. 트롬빈 또는 fXa를 억제하지 않은 APC-특이적 돌연변이체들을 제조하는데 있어서 스크리닝이 성공적인지를 측정하기 위해, 감소된 fXa 억제를 가져야 하는, 얻은 4개의 돌연변이체들이 (A) 트롬빈 및 (B) fXa의 억제에 대하여 시험되었다. 1 μ M 세르핀을 다른 시간량동안 12.5nM 프로테아제와 함께 배양하였다. 지시된 시간지점에서, 과량의 q발색 기질(트롬빈에 대하여 S2238, fXa에 대하여 S2222)을 첨가하여, 반응을 정지시켰다. 잔류 효소 활성은 초기 효소 활성 및 시간에 대하여 플롯팅된 본 값의 자연 로그로 나뉘었다. 이 플롯들의 기울기는 관찰 비율 상수(k_{obs})이다. 2차 비율 상수(k_2)의 추정값을 얻기 위해, k_{obs} 를 세르핀 농도로 나누었다. fXa(P2RP1'Q)를 실질적으로 억제하지 않은 돌연변이체 단독에 대한 값 뿐만 아니라, 트롬빈

및 fXa의 최고 억제제를 설명하기 위해, 도면에 선택된 값들을 도시한다. 도시된 돌연변이체들은 모두 Pitts(M358R, P1R) 돌연변이를 가진다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명은 다른 응혈 프로테아제에 관한 APC에 대하여 그들의 특이성을 증가시키기 위해 세르핀을 변형시키는 것에 관한 것이다. APC에 대하여 특이적인 변형된 세르핀 돌연변이체들은 예를 들면, 응고촉진제로서 사용될 수 있다.
- [0017] 이들은 APC에 대하여 특이적이므로, 본원에 설명된 변형된 세르핀들은 오프-타겟 효과들을 거의 가지지 않거나 가지지 않은 것으로 기대되며, 손상시에 활성화되는 경로들에 대하여 특이적이다. 이는 변형된 세르핀들이 치료적으로 및 예방적으로 뿐만 아니라 응급 상황, 즉 트라우마에서 적용되도록 한다. 변형된 세르핀의 투여는 자살 억제인자이므로 예측가능하며, 이는 세르핀의 1분자가 프로테아제의 1분자 이상을 억제할 수 없음을 의미한다. 게다가, 유효한 자연적인 청소 메카니즘이 세르핀 단독보다 세르핀:프로테아제 복합체에 대하여 특이적이기 때문에, 변형된 세르핀의 혈장 반감기는 현 우회제제들의 혈장 반감기를 초과할 가능성이 있다. 예를 들면, 본원에 설명된 변형된 세르핀의 반감기는 약 5일일 수 있다.
- [0018] 단백질 C(유전자 ID 5624)는 트롬빈-트롬보모듈린 복합체에 의해, 그의 활성화된 형태(활성화된 단백질 C, APC)로 분해(cleave)되는 비타민 K-의존성 혈장 당단백질이다. 인간 단백질 C는 NP_000303.1 GI: 4506115의 참조 아미노산 서열을 가지며, NM_000312.3 GI: 270483720의 참조 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩될 수 있다. APC는 fVa 및 fVIIIa를 단백질분해적으로 분해하여(도 1), 트롬빈의 생성을 감소시키는 항응혈제 프로테아제이다.
- [0019] 본원에 설명된 변형된 세르핀은 그의 반응성 중심 루프(RCL)에 하나 또는 그 이상의 돌연변이들을 가질 수 있다. 예를 들면, 변형된 세르핀은 그의 RCL내에 1개, 2개, 3개, 4개 또는 4개 이상의 돌연변이들을 가질 수 있다. 위치들 P4, P2, P1 및 P1' 중 1개, 2개, 3개 또는 4개 모두에서의 잔기들이 돌연변이될 수 있다. 예를 들면, 위치들 P1' 및 P2 및 선택적으로 P1 및/또는 P4의 하나 또는 둘다에서의 잔기들이 돌연변이될 수 있다.
- [0020] RCL 잔기들은 세린 프로테아제의 기질 및 억제인자들에 대하여 Schechter-Berger 명명법에 따라 본원에서 넘버링된다(Schechter & Berger, 1967). 이 표준 명명법은 RCL내 특정 위치들, 예컨대 위치들 P1', P1, P2 및/또는 P4에서의 잔기가 임의의 세르핀 서열에서 쉽게 확인되도록 한다.
- [0021] 바람직하게는, 하나 또는 그 이상의 돌연변이들은 변형된 세르핀의 RCL내 유일한 돌연변이들이다. 예를 들면, RCL은 위치들 P1' 및 P2 중 하나 또는 둘다, 및 선택적으로 P1 및/또는 P4에서 돌연변이들을 갖는 야생형 세르핀의 RCL의 서열로 구성될 수 있다.
- [0022] 변형된 세르핀의 RCL은 P1' 및 P2 위치에서의 돌연변이들; P1', P2 및 P1 위치에서의 돌연변이들; P1', P2 및 P4 위치에서의 돌연변이들 또는 P1', P2, P1 및 P4 위치에서의 돌연변이들; P1' 위치에서의 돌연변이; P1' 및 P1 위치에서의 돌연변이들; P1' 및 P4 위치에서의 돌연변이들 또는 P1', P1 및 P4 위치에서의 돌연변이들; P2 위치에서의 돌연변이; P2 및 P1 위치에서의 돌연변이들; P2 및 P4 위치에서의 돌연변이들, P2, P1 및 P4 위치에서의 돌연변이들, P1 위치에서의 돌연변이, P4 위치에서의 돌연변이; 또는 P1 및 P4 위치에서의 돌연변이들을 가질 수 있다. RCL내 다른 위치에서의 잔기들은 돌연변이되지않은 야생형 잔기들일 수 있다.
- [0023] 바람직하게는, RCL의 위치 P1'; 위치들 P1' 및 P2; 위치들 P1', P1 및 P2; 위치들 P2 및 P1; 위치들 P1 및 P1'; 위치들 P1', P2 및 P4 또는 위치들 P1', P1, P2 및 P4에서의 잔기들이 돌연변이된다. 일부 바람직한 구현예에서, 위치들 P1', P1 및 P2에서의 잔기들이 돌연변이된다.
- [0024] 세르핀의 반응성 중심 루프(RCL)는 전형적으로 길이가 약 20개의 잔기들이며, 타겟 프로테아제에 의해 분해되는 잘라지기 쉬운 P1-P1' 결합을 함유한다. RCL은 세르핀의 베타 시트 A의 가닥 5로부터 베타 시트 C의 가닥 1로 확장한다. 잔기들 P17 Glu, P15 Gly 및 P14 Thr이 세르핀내에 보존된다. 예를 들면, 세르핀의 RCL은 컨센서스 서열 P17 E, P16 E/K/R, P15 G, P14 T/S, P12-P9(A/G/S)₄를 포함할 수 있다(Hopkins et al. 1993; Irving et al. 2000). RCL은 잔기 P17에서 출발하며, 보통 잔기 P3'에서 끝난다. RCL은 일부 세르핀, 예컨대 PCI에서 P'쪽 상에서 추가의 잔기들에 의해 확장될 수 있다. 예를 들면, α_1 -항트립신의 RCL은 잔기들 P17-P3'으로 구성되며, 및 PCI의 RCL은 잔기들 P17-P6'으로 구성된다. 하이라이트표시된 잔기들 P1', P1, P2 및 P4를 갖는 세르핀들의 예들은 하기 SEQ ID NOS: 1 내지 11에 나타나 있다. 성숙 세르핀 서열들을 구성하는 잔기들도 또한 표시되어 있다.

- [0025] 세르핀내 RCL의 다른 위치에서의 잔기들은 변형될 수 없으며, 즉 이들은 야생형 세르핀 서열의 천연 잔기들일 수 있다. 따라서, 변형된 세르핀은 상기 설명된 위치들 P1, P1', P2 및/또는 P4에서 돌연변이들을 갖는 야생형 서열을 갖는 RCL을 포함할 수 있다.
- [0026] 변형된 세르핀의 반응성 중심 루프(RCL)내 하나 또는 그 이상의 돌연변이들은 P1' 위치에서의 돌연변이를 포함하거나 구성될 수 있다. 바람직하게는, 돌연변이는 치환이다. 야생형 세르핀의 RCL내 천연 P1' 잔기는 변형된 세르핀내 비-천연 잔기에 의해 치환될 수 있다. 예를 들면, α_1 AT 또는 PCI의 야생형 서열내 P1' 위치에서의 천연 S 잔기는 변형된 세르핀내 S와 다른 잔기에 의해 치환될 수 있다.
- [0027] 야생형 세르핀의 RCL내 천연 P1' 잔기는 대형 극성 잔기, 예컨대 Q, N, Y; 대형 소수성 잔기, 예컨대 I, M 및 V; 양하전된 잔기, 예컨대 R, H 또는 K; 또는 다른 잔기, 예컨대 C, A, S 및 E에 의해 치환될 수 있다.
- [0028] 일부 바람직한 구현예에서, P1' 잔기는 대형 극성 잔기, 예컨대 Q, N, Y; 대형 소수성 잔기, 예컨대 V; 또는 양하전된 잔기, 예컨대 R, H 또는 K; 보다 바람직하게는, 양하전된 또는 대형 극성 잔기, 예컨대 H, K, R 또는 Q; 가장 바람직하게는 K로 변형될 수 있다.
- [0029] 다른 구현예에서, P1' 잔기는 변형된 세르핀에서 변형되지 않을 수 있다. 예를 들면, 변형된 세르핀의 RCL내 P1' 위치에서의 잔기는 야생형 세르핀 서열내 P1' 잔기에 존재하는 잔기일 수 있다.
- [0030] 변형된 세르핀의 반응성 중심 루프(RCL)내 하나 또는 그 이상의 돌연변이들은 P2 잔기에서의 돌연변이를 포함하거나 구성될 수 있다. 바람직하게는, 돌연변이는 치환이다. 예를 들면, 야생형 세르핀의 RCL내 천연 P2 잔기는 변형된 세르핀내 비-천연 잔기에 의해 치환될 수 있다.
- [0031] 야생형 세르핀의 RCL내 천연 P2 잔기는 대형 극성 잔기, 예컨대 D, Q, N, Y, 대형 소수성 잔기, 예컨대 W, L, I, V 및 F, 양하전된 잔기, 예컨대 R, H 또는 K 또는 다른 잔기, 예컨대 C, A, T, S 또는 P에 의해 치환될 수 있다.
- [0032] 일부 구현예들에서, 변형된 세르핀내 P2 잔기는 P와 다를 수 있다.
- [0033] 일부 바람직한 구현예에서, P2 잔기는 대형 극성 잔기, 예컨대 Q, N, Y, 대형 소수성 잔기, 예컨대 W 또는 양하전된 잔기 예컨대 R, H 또는 K, 가장 바람직하게는 양성 잔기, 예컨대 H, K 또는 R, 바람직하게는 K로 변형될 수 있다.
- [0034] 일부 구현예들에서, P2 잔기는 변형된 세르핀내에서 변형되지 않을 수 있다. 예를 들면, 변형된 세르핀의 RCL내 P2 위치의 잔기는 야생형 세르핀 서열내 P2 잔기에 존재하는 잔기일 수 있다.
- [0035] 변형된 세르핀의 RCL내 하나 또는 그 이상의 돌연변이들은 P1' 및/또는 P2 잔기들에서의 치환들을 포함하거나 구성될 수 있으며, 즉 야생형 세르핀 서열의 RCL내 P1' 및/또는 P2 위치에 위치한 잔기들이 변형된 세르핀내 다른 잔기들에 의해 치환될 수 있다.
- [0036] 바람직한 구현예들에서, 변형된 세르핀은 RCL의 P2 및 P1' 위치들 모두에서 돌연변이들을 가진다.
- [0037] 변형된 세르핀의 P2 및 P1' 위치들의 적당한 잔기들은 위에 설명되어 있다.
- [0038] 본원에 설명된 일부 변형된 세르핀들에서, P1' 및 P2 잔기 중 적어도 하나는 양하전된 잔기, 예컨대 R, H 또는 K, 또는 대형 극성 잔기, 예컨대 D, Y, Q 또는 N; 대형 소수성 잔기, 예컨대 W, L, F, V, M 또는 I; 또는 다른 잔기, 예컨대 L, C, A, E, T, S 또는 P일 수 있다. 바람직하게는, P1' 및 P2 잔기 중 적어도 하나는 양하전된 잔기, 예컨대 R, H 또는 K; 대형 극성 잔기, 예컨대 Y, Q, 또는 N; 또는 대형 소수성 잔기, 예컨대 W, L, F, V 또는 I이다.
- [0039] 본원에 설명된 변형된 세르핀내에서 P2 및 P1' 잔기들의 예들은 각각 KK, FK, RK, VK, LK, QK, CK, PK, FR, HR, IR, SR, TR, VR, YR, AR, PR, RS, KS, QV, RV, RI, RH, KH, TH, RC, RA, LY, QY, TY, DM, TM, WN, RN, HN, TN, KN, NN, PE, RQ, KQ 및 TQ를 포함한다.
- [0040] 일부 바람직한 구현예들에서, P1' 및 P2 잔기 모두 양하전된 잔기들, 예컨대 K, H 또는 R, 가장 바람직하게는 K로 변형될 수 있다.
- [0041] 일부 구현예들에서, 본원에 설명된 변형된 세르핀내 P2 및 P1' 잔기들은 각각 PN, FS, QS, AS, TS, HS, TA, PT, CC, PS, PT, PM, PH, PA 또는 PC와 다를 수 있다. 예를 들면, P2 및 P1' 잔기들은 PCI 스캐폴드내 PN, FS,

QS, AS, TS, HS, TA, PT, CC 또는 PC와 다르거나, α_1 AT 스캐폴드내 PS, PT, PM, PH 또는 PA와 다를 수 있다.

- [0042] 일부 구현예들에서, P1 잔기는 변형된 세르핀내에서 변형되지 않을 수 있다. 예를 들면, 변형된 세르핀의 RCL내 P1 위치에서의 잔기는 야생형 세르핀 서열내 P1 잔기에 존재하는 잔기일 수 있다. 예를 들면, 변형된 PCI내 P1 잔기는 R 잔기일 수 있다.
- [0043] 다른 구현예들에서, P1 잔기는 변형된 세르핀내에서 돌연변이될 수 있다. 예를 들면, 변형된 세르핀의 반응성 중심 루프(RCL)내 하나 또는 그 이상의 돌연변이들은 P1 잔기에서 돌연변이를 추가로 포함한다. 바람직하게는, 돌연변이는 치환이다. 야생형 세르핀의 RCL내 천연 P1 잔기는 변형된 세르핀내 비-천연 잔기에 의해 치환될 수 있다.
- [0044] 일부 구현예들에서, P1 잔기는 양하전된 잔기, 예컨대 H, K 또는 R, 바람직하게는 R로 돌연변이 또는 변형될 수 있다.
- [0045] 바람직하게는, 야생형 세르핀의 P1 위치에서 비-양하전된 천연 잔기는 변형된 세르핀내 양하전된 잔기에 의해 치환될 수 있다. 예를 들면, 야생형 α_1 AT의 P1 위치에서의 M은 변형된 α_1 AT내 양하전된 잔기, 예컨대 R에 의해 치환될 수 있다. α_1 AT의 피츠버그(Pitts) 변종은 P1 위치의 M 잔기를 R 잔기에 의해 치환하는 잔기 358에서의 돌연변이를 가진다.
- [0046] 일부 구현예들에서, P4 잔기는 변형된 세르핀내에서 변형되지 않을 수 있다. 예를 들면, 변형된 세르핀의 RCL내 P4 위치에서의 잔기는 야생형 세르핀 서열내 P4 잔기에 존재하는 잔기일 수 있다. 예를 들면, PCI 스캐폴드내 P4 잔기는 F일 수 있으며, α_1 AT 스캐폴드내 P4 잔기는 A일 수 있다.
- [0047] 다른 구현예들에서, P4 잔기는 변형된 세르핀내에서 돌연변이될 수 있다. 예를 들면, 변형된 세르핀의 반응성 중심 루프(RCL)내 하나 또는 그 이상의 돌연변이들은 P4 잔기에서의 돌연변이를 추가로 포함한다.
- [0048] 바람직하게는, 돌연변이는 치환이다. 야생형 세르핀의 RCL내 P4 잔기에서의 잔기는 변형된 세르핀내 다른 잔기에 의해 치환될 수 있다. 예를 들면, 변형된 PCI내 P4 잔기는 F와 다른 잔기로 돌연변이 또는 변형될 수 있으며, 변형된 α_1 AT내 P4 잔기는 A와 다른 잔기로 돌연변이 또는 변형될 수 있다.
- [0049] 변형된 세르핀의 RCL의 P4 위치내 적당한 잔기들은 S, R, V, C, W, K, G, L, H, F, T, Q 및 A를 포함한다.
- [0050] 본원에 설명된 변형된 응고촉진 세르핀들의 예들에서,
- [0051] (1) P4 잔기는 Q이며, P2 잔기는 R이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 N이다;
- [0052] (2) P4 잔기는 K이며, P2 잔기는 R이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 H이다;
- [0053] (3) P4 잔기는 S이며, P2 잔기는 L이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 K이다;
- [0054] (4) P4 잔기는 H이며, P2 잔기는 R이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 V이다;
- [0055] (5) P4 잔기는 F이며, P2 잔기는 K이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 K이다;
- [0056] (6) P4 잔기는 F이며, P2 잔기는 R이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 K이다;
- [0057] (7) P4 잔기는 F이며, P2 잔기는 V이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 K이다;
- [0058] (8) P4 잔기는 C이며, P2 잔기는 L이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 K이다;
- [0059] (9) P4 잔기는 F이며, P2 잔기는 F이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 R이다;
- [0060] (10) P4 잔기는 S이며, P2 잔기는 H이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 R이다;
- [0061] (11) P4 잔기는 G이며, P2 잔기는 I이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 R이다;
- [0062] (12) P4 잔기는 R이며, P2 잔기는 Q이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 V이다;
- [0063] (13) P4 잔기는 T이며, P2 잔기는 R이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 V이다;
- [0064] (14) P4 잔기는 R이며, P2 잔기는 R이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 I이다;
- [0065] (15) P4 잔기는 V이며, P2 잔기는 R이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 I이다;

- [0066] (16) P4 잔기는 L이며, P2 잔기는 R이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 I이다;
- [0067] (17) P4 잔기는 T이며, P2 잔기는 L이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 Y이다;
- [0068] (18) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 Q이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 Y이다;
- [0069] (19) P4 잔기는 K이며, P2 잔기는 D이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 M이다;
- [0070] (20) P4 잔기는 W이며, P2 잔기는 W이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 N이다;
- [0071] (21) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 K이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 S이다;
- [0072] (22) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 R이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 S이다;
- [0073] (23) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 P이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 E이다;
- [0074] (24) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 P이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 R이다;
- [0075] (25) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 P이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 K이다;
- [0076] (26) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 T이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 M이다;
- [0077] (27) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 T이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 H이다;
- [0078] (28) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 T이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 Q이다;
- [0079] (29) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 T이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 N이다;
- [0080] (30) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 T이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 Y이다;
- [0081] (32) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 T이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 R이다;
- [0082] (33) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 R이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 A이다;
- [0083] (34) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 R이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 H이다;
- [0084] (35) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 R이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 C이다;
- [0085] (36) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 R이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 N이다;
- [0086] (37) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 S이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 R이다;
- [0087] (38) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 K이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 N이다;
- [0088] (39) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 K이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 H이다;
- [0089] (40) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 K이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 K이다;
- [0090] (41) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 V이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 R이다;
- [0091] (42) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 Y이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 R이다;
- [0092] (43) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 A이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 R이다;
- [0093] (44) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 C이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 K이다;
- [0094] (45) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 W이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 N이다;
- [0095] (46) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 H이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 N이다;
- [0096] (47) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 Q이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 K이다; 또는,
- [0097] (48) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 N이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 N이다.
- [0098] (49) P4 잔기는 F이며, P2 잔기는 F이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 K이다.
- [0099] (50) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 K이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 Q이다,
- [0100] (51) P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 R이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 Q이다.
- [0101] 일부 바람직한 변형된 세르핀에서, P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 K이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 K이다.

- [0102] 일부 구현예들에서, 본원에 설명된 변형된 응고촉진 세르핀내 P4, P2 및 P1' 위치에서의 잔기들은 각각 HPN, DKN, HPE, FFS, LQS, HAS, YTS, AHS, ATA, LPT, ACC, APT, APA, APM, APH, APS 및 VPC와 다를 수 있다. 예를 들면, 변형된 PCI는 P4, P2 및 P1' 위치들에서 HPN, DKN, HPE, FFS, LQS, HAS, YTS, AHS, ATA, LPT, ACC 및 VPC와 다른 잔기들을 가질 수 있으며, 및 변형된 α_1 AT는 P4, P2 및 P1' 위치들에서 APT, APA, APM 또는 APH와 다른 잔기들을 가질 수 있다. 일부 구현예들에서, 본원에 설명된 변형된 응고촉진 세르핀내 P4, P2 및 P1' 위치들에서의 잔기들의 조합은 비-자연 발생일 수 있으며, 즉 P4, P2 및 P1' 위치들에서의 잔기들의 조합이 모 야생형(즉, 변형되지않음) 세르핀 또는 다른 야생형 세르핀들내에서 발견되지 않는다.
- [0103] 본원에 설명된 변형된 세르핀은 상기 설명된 바와 같이 그의 RCL내에 하나 또는 그 이상의 돌연변이들, 및 선택적으로 RCL 외부에 하나 또는 그 이상의 추가의 돌연변이들을 갖는, 야생형(즉, 변형되지않음) 세르핀, 바람직하게는 성숙 야생형 세르핀의 서열을 포함할 수 있다.
- [0104] 야생형 세르핀들의 서열들은 당 분야에 잘 알려져 있으며, 본원에 개시된 바와 같이 SEQ ID NOS: 1 내지 11을 포함할 수 있다. 야생형 세르핀의 서열들은 성숙 야생형 단백질들의 서열을 포함할 수 있다.
- [0105] 그의 프로펩티드를 포함하는 성숙 단백질 C 억제인자(PCI) 서열은 SEQ ID NO: 1의 잔기들 20 내지 406에 대응한다. 성숙 α_1 -항키모트립신은 SEQ ID NO: 2의 잔기들 26 내지 423에 대응한다. 성숙 C1-에스터라제 억제인자 서열은 SEQ ID NO: 3의 잔기들 23-500에 대응한다. 성숙 α_2 -항플라스민 서열은 SEQ ID NO: 4의 잔기들 28-491에 대응한다. 성숙 항트롬빈(ATIII) 서열은 SEQ ID NO: 5의 잔기들 33-464에 대응한다. 성숙 헤파린 보조인자 II 서열은 SEQ ID NO: 6의 잔기들 20-499에 대응한다. 성숙 α_1 -항트립신(α_1 AT) 서열은 SEQ ID NO: 7의 잔기들 25-418에 대응한다. 성숙 칼리스타틴(kallistatin) 서열은 SEQ ID NO: 8의 잔기들 21-427에 대응한다. 성숙 플라스미노겐 활성화제 억제인자 서열은 SEQ ID NO: 9의 잔기들 24-402에 대응한다. 성숙 단백질 Z 의존성 억제인자 서열은 SEQ ID NO: 10의 잔기들 22-444에 대응한다. 성숙 프로테아제 넥신(nexin) 1 동형 서열은 SEQ ID NO: 11의 잔기들 20-398에 대응한다.
- [0106] 상기 설명된 바와 같이 RCL내 잔기들의 돌연변이들과 달리, 변형된 세르핀은 야생형 세르핀 아미노산 서열(예를 들면, SEQ ID NOS 1 내지 11, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1 또는 7 중 하나의 성숙 세르핀 서열)에 대하여 변경된 50개 또는 그 이하의 아미노산 잔기들, 바람직하게는 45개 또는 그 이하의, 40개 또는 그 이하의, 30개 또는 그 이하의, 20개 또는 그 이하의, 15개 또는 그 이하의, 10개 또는 그 이하의, 5개 또는 그 이하의, 또는 3개 또는 그 이하의 아미노산 잔기들을 가질 수 있다. 예를 들면, 변형된 세르핀은 상기 설명된 바와 같이 돌연변이 또는 변경된 세르핀의 RCL내 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 잔기들(즉, 위치들 P' 및/또는 P2 및 선택적으로 P1 및/또는 P4)에 더해, 돌연변이 또는 변경된 50개 또는 그 이하의, 45개 또는 그 이하의, 40개 또는 그 이하의, 30개 또는 그 이하의, 20개 또는 그 이하의, 15개 또는 그 이하의, 10개 또는 그 이하의, 5개 또는 그 이하의, 또는 3개 또는 그 이하의, 아미노산 잔기들을 갖는 야생형 세르핀의 서열을 포함할 수 있다.
- [0107] 야생형 아미노산 서열내 아미노산 잔기는 삽입, 결실 또는 치환, 바람직하게는 다른 아미노산 잔기에 대한 치환에 의해 변경 또는 돌연변이될 수 있다. 상기 변경들은 인코딩 핵산내 하나 또는 그 이상의 뉴클레오타이드들의 부가, 삽입, 결실 또는 치환 중 하나 또는 그 이상에 의해 야기될 수 있다.
- [0108] 예를 들면, 변형된 세르핀은 50개 또는 그 이하의 돌연변이들을 갖는 SEQ ID NO: 12의 잔기들 25-418의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 상기 돌연변이들은 P4, P2, P1 및 P1'와 다른 위치에 있으며, 즉 변형된 세르핀의 RCL내 P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 K이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 K이다.
- [0109] SEQ ID NO: 12의 변형된 세르핀내 P4 잔기는 위치 379(성숙 단백질의 355)에 위치되며, P2 잔기는 위치 381(성숙 단백질의 357)에 위치되며, P1 잔기는 위치 382(성숙 단백질의 358)에 위치되며, 및 P1' 잔기는 위치 383(성숙 단백질의 359)에 위치된다.
- [0110] 변형된 세르핀은 야생형 세르핀의 야생형 아미노산 서열, 예를 들면 SEQ ID NOS: 1 내지 11, 바람직하게는 SEQ ID NOS: 1 또는 7 중 어느 하나의 성숙 세르핀 서열과 적어도 50% 서열 상동성, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 약 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 상동성을 공유할 수 있다.
- [0111] 예를 들면, 변형된 세르핀은 SEQ ID NO: 12의 잔기들 25-418에 대하여 적어도 50% 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 변형된 세르핀의 RCL내 P4 잔기는 A이며, P2 잔기는 K이며, P1 잔기는 R이며, 및 P1' 잔기는 K이다.

- [0112] 서열 상동성은 알고리즘 GAP(Wisconsin GCG package, Accelrys Inc, San Diego USA)를 참고하여 일반적으로 정의된다. GAP는 일치의 수를 최대화하고, 갭(gap)의 수를 최소화하는 2개의 완전한 서열들을 정렬하기 위해 Needleman 및 Wunsch 알고리즘을 사용한다. 일반적으로, 디폴트 변수들이 사용되며, 갭 형성 페널티=12이며, 및 갭 연장 페널티=4이다. GAP를 사용하는 것이 바람직할 수 있지만 다른 알고리즘들, 예를 들면, (Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 405-410의 방법을 사용하는) BLAST, (Pearson and Lipman (1988) *PNAS USA* 85: 2444-2448의 방법을 사용하는) FASTA, 또는 Smith-Waterman 알고리즘(Smith and Waterman (1981) *J. Mol Biol.* 147: 195-197), 또는 일반적으로 디폴트 변수들을 사용하는 상기 Altschul *et al.* (1990)의, TBLASTN 프로그램이 사용될 수 있다. 특히, psi-Blast 알고리즘이 사용될 수 있다(Nucl. Acids Res. (1997) 25 3389-3402). 서열 상동성 및 유사도도 또한 GenomequestTM 소프트웨어(Gene-IT, Worcester MA USA)를 사용하여 측정될 수 있다.
- [0113] 서열 대조는, 바람직하게 본원에 설명된 관련 서열의 전체 길이에 대하여 이루어진다.
- [0114] 바람직하게는, 본원에 설명된 변형된 응고촉진 세르핀은 RCL 컨센서스 P17 E, P16 S/E/K/R, P15 G, P14 T/S, P12-P9 (A/G/S)₄를 포함한다.
- [0115] 변형된 세르핀은 야생형 세르핀 서열들내에 보존된 하나 또는 그 이상의 잔기들을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면, 변형된 세르핀은 하기 잔기들(α_1 AT내 그의 위치에 따라 넘버링됨): 33F, 49N, 53S, 54P, 56S, 61L, 67G, 72T, 80L, 130F, 147F, 157I, 158N, 161V, 165T, 167G, 169I, 180T, 184L, 186N, 190F, 191K, 192G, 194W, 198F, 203T, 208F, 218V, 220M, 221M, 277Y, 254L, 255P, 289P, 290K, 299L, 303L, 307G, 312F, 316A, 327L, 334H, 342E, 344G, 347A, 369P, 370F, 383L, 384F, 386G, 및 391P 중 일부 또는 전부를 포함할 수 있다(Irving *et al* 2008). 다른 세르핀 서열들내 대응하는 보존된 잔기들은 정기적인 서열 분석을 사용하여 쉽게 결정될 수 있다.
- [0116] 변형된 세르핀의 RCL 외부에서의 돌연변이들 또는 변화들은 디설파이드 브릿지 형성 또는 다른 변형들을 폐지하기 위한, 변형된 세르핀내 하나 또는 그 이상의 Cys 잔기들, 예컨대 α_1 AT의 C232(성숙 서열에 따라 넘버링) 잔기의 치환; 예를 들면 발현을 용이하게 하기 위한, 야생형 서열의 N 말단에서의 잔기의 결실 또는 치환; 또는 변형된 세르핀의 헤파린 결합 활성을 변경하기 위한, 변형된 세르핀의 헤파린 결합부위들(즉, 헬릭스(helix) D 또는 헬릭스 H)에서 잔기들의 돌연변이 또는 변형을 포함할 수 있다.
- [0117] 일부 구현예들에서, 변형된 세르핀은 야생형 세르핀에 대하여 N 말단 절단을 가질 수 있다. 예를 들면, 변형된 세르핀은 N 말단에서 10 내지 30개의 잔기 절단, 바람직하게는 약 20개의 잔기들 절단을 가질 수 있다.
- [0118] 변형된 세르핀내 하나 또는 그 이상의 잔기들은 비-천연 아미노산들, 변형된 아미노산들 또는 D-아미노산들일 수 있다. 상기 아미노산들의 용도는 당 분야에 통상의 기술을 가진 자들에게 잘 알려져 있다.
- [0119] 본원에 설명된 변형된 세르핀은 야생형 세르핀의 2차 구조를 나타낼 수 있으며, 예를 들면 변형된 세르핀은 3 베타 시트들, 8-9 알파 헬릭스들 및 약 20개의 잔기들의 플렉서블 RCL을 포함하는 구조를 나타낼 수 있다.
- [0120] 일부 바람직한 구현예들에서, 변형된 세르핀은 본원에 설명된, 그의 반응성 중심 루프(RCL)내 하나 또는 그 이상의 돌연변이들을 갖는 야생형 세르핀의 아미노산 서열로 구성될 수 있다.
- [0121] 바람직하게는, 변형된 세르핀은 인간내에서 비-면역성이다. 예를 들면, 야생형 세르핀은 인간 세르핀, 바람직하게는 인간 혈장 세르핀일 수 있다.
- [0122] 야생형 세르핀은 α_1 -항키모트립신(SERPINA3), α_2 -항플라스민(SERPINF2) 항트롬빈(ATIII)(SERPINC1), 헤파린 보조인자 II(HCII)(SERPIND1), 단백질 C 억제인자(PCI)(SERPINA5), α_1 -항트립신(α_1 AT)(SERPINA1), 칼리스타틴(SERPINA4), 플라스미노겐 활성화제 억제인자-1(SERPINE1), C1-에스터라제 억제인자(SERPING1), 프로테아제 벡신 1(SERPINE2) 또는 단백질 Z-의존성 억제인자(SERPINA10)일 수 있다(Whisstock *et al* JBC. 285 32 24307-24312, Rau *et al* Journal of Thrombosis and Hemostasis, 5 (Suppl. 1): 102-115, Huntington, Journal of Thrombosis and Hemostasis, 9 (Suppl. 1): 26-34).
- [0123] 바람직하게는, 야생형 세르핀은 ATIII, HCII, PCI 또는 α_1 AT, 가장 바람직하게는 PCI 또는 α_1 AT이다(Huntington *et al* Cell. Mol. Life Sci. 66 (2009) 113-121; Li *et al* JBC. 283 51 36039-36045; and Li *et al* PNAS 2008 105 4661-4666).

- [0124] α_1 -항키모트립신(SERPINA3; 유전자 ID 12)은 NP_001076.2 GI:50659080의 참조 아미노산 서열(SEQ ID NO: 2)을 가질 수 있으며, 및 NM_001085.4 GI:73858562의 참조 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩될 수 있다.
- [0125] C1-에스터라제 억제인자(SERPING1; 유전자 ID 710)는 NP_000053.2 GI: 73858568의 참조 아미노산 서열(SEQ ID NO: 3)을 가질 수 있으며, 및 NM_000062.2 GI:73858567의 참조 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩될 수 있다.
- [0126] α_2 -항플라스민(SERPINF2 유전자 ID 5345)은 NP_000925.2 GI:115583663의 참조 아미노산 서열(SEQ ID NO: 4)을 가질 수 있으며, 및 NM_001165920.1 GI:260064047의 참조 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩될 수 있다.
- [0127] 항트롬빈(ATIII)(SERPINC1 유전자 ID 462)은 NP_000479.1 GI: 4502261의 참조 아미노산 서열(SEQ ID NO: 5)을 가질 수 있으며, NM_000488.3 GI:254588059의 참조 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩될 수 있다.
- [0128] 헤파린 보조인자 II(HCII)(SERPIND1 유전자 ID3053)는 NP_000176.2 GI: 73858566의 참조 아미노산 서열(SEQ ID NO: 6)을 가질 수 있으며, 및 NM_000185.3 GI:73858565의 참조 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩될 수 있다.
- [0129] 단백질 C 억제인자(PCI)(SERPINA5 유전자 ID 5104)는 NP_000615.3 GI: 194018472의 참조 아미노산 서열을 가질 수 있으며, 및 NM_000624.5 GI:401782581의 참조 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩될 수 있다. 일부 바람직한 구현예들에서, 단백질 C 억제인자(PCI)는 SNP rs6115, VAR_013081에서의 치환으로부터 얻고, 및 SEQ ID NO: 1에 도시된 서열을 가진 대립유전자 돌연변이체(S45N 돌연변이체, 프로펩티드를 포함하는 성숙 단백질에 따라 넘버링)일 수 있다. SEQ ID NO: 1의 잔기들 1-19는 신호 서열에 대응한다. 혈장에서, PCI는 SEQ ID NO: 1의 잔기들 20-25(즉, SEQ ID NO: 1의 잔기들 20-406)의 프로펩티드를 포함하는 전장 형태, 또는 프로펩티드가 없는 N 말단 제거된 형태(즉 SEQ ID NO: 1의 잔기들 26-406)로 존재할 수 있다.
- [0130] α_1 -항트립신(α_1 AT)(SERPINA1 유전자 ID 5265)은 NP_000286.3 GI:50363217(SEQ ID NO: 7)의 참조 아미노산 서열을 가질 수 있으며, 및 NM_000295.4 GI:189163524의 참조 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩될 수 있다.
- [0131] 칼리스타틴(SERPINA4 유전자 ID 5267)은 NP_006206.2 GI: 21361302의 참조 아미노산 서열(SEQ ID NO: 8)을 가질 수 있으며, 및 NM_006215.2 GI: 21361301의 참조 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩될 수 있다.
- [0132] 플라스미노겐 활성화제 억제인자-1(SERPINE1 유전자 ID 5054)은 NP_000593.1 GI: 10835159의 참조 아미노산 서열(SEQ ID NO: 9)을 가질 수 있으며, 및 NM_000602.4 GI: 383286745의 참조 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩될 수 있다.
- [0133] 단백질 Z-의존성 억제인자(PZI)(Serpina10; 유전자 ID 51156)는 NP_057270.1 GI: 7705879의 참조 아미노산 서열(SEQ ID NO: 10)을 가질 수 있으며, 및 NM_016186.2 GI: 154759289의 참조 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩될 수 있다.
- [0134] 프로테아제 넥신 1(PN1)(Serpine2; 유전자 ID 5270)은 NP_001130000.1 GI: 24307907, NP_001130002.1 GI: 211904152 또는 NP_006207.1 GI: 211904156의 참조 아미노산 서열(SEQ ID NO: 11)을 가질 수 있으며, 및 NM_001136528.1 GI: 211904151, NM_001136530.1 GI: 211904155 또는 NM_006216.3 GI: 211904150의 참조 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩될 수 있다.
- [0135] 상기 설명된 바와 같이 돌연변이될 수 있는 P1', P1, P2 및 P4 잔기들은 SEQ ID NOS: 1 내지 11에서 볼드체로 강조되어 있다.
- [0136] RCL내 하나 또는 그 이상의 돌연변이들은 변형되지 않은 야생형 세르핀에 대하여 변형된 세르핀의 특이성을 변경시킨다. 변형된 세르핀은 야생형 세르핀과 대조되는, 응고촉진 프로테아제 이상으로 항응혈 프로테아제들에 대한 증가된 선택성을 나타낸다.
- [0137] 바람직하게는, RCL내 하나 또는 그 이상의 돌연변이들은 다른 응고 프로테아제들, 특히 트롬빈, fXa, fVIIa, fIXa 및 fXIa 외의 하나 또는 그 이상의 응고촉진 프로테아제들의 억제와 관련된, 변형된 세르핀에 의한 APC의 억제를 증가시킨다.
- [0138] 예를 들면, 변형된 세르핀의 RCL내 하나 또는 그 이상의 돌연변이들은 트롬빈의 억제와 관련된 변형된 세르핀에 의한 APC의 억제를 증가시킨다. 트롬빈과 관련된 APC의 선택적인 억제는 헤파린의 존재 또는 부재하에 증가될 수 있다.
- [0139] 게다가, 변형된 세르핀의 RCL내 하나 또는 그 이상의 돌연변이들은 응고촉진 프로테아제들 fXa, fVIIa, fIXa 및

fXIa 중 1, 2, 3 또는 모든 4개의 억제와 관련된 변형된 세르핀에 의해 APC의 억제를 증가시킬 수 있다.

- [0140] 본원에 설명된 바와 같이 변형된 세르핀은 변형되지않은 야생형 세르핀보다, 트롬빈 및 다른 응고촉진 프로테아제와 관련된 APC의 더 큰 억제를 나타낸다.
- [0141] 변형된 세르핀은 트롬빈의 억제보다 더 큰 APC의 억제를 나타낼 수 있다. 예를 들면, 변형된 세르핀에 의한 APC의 억제는 변형된 세르핀에 의한 트롬빈의 억제보다 적어도 5배 이상, 적어도 10배 이상, 적어도 100배 또는 적어도 1000배 이상일 수 있다. 일부 구현예들에서, 변형된 세르핀은 트롬빈의 억제를 위한 2차 비율 상수보다 적어도 5배 이상, 적어도 10배 이상, 적어도 100배 이상 또는 적어도 1000배 이상인 2차 비율 상수(k_2)를 갖는 APC를 억제할 수 있다. 바람직하게는, APC를 위한 변형된 세르핀의 억제 화학량은 1이다.
- [0142] 바람직하게는, 본원에 설명된 바와 같은 변형된 세르핀은 APC를 결합 및 억제할 수 있지만, 트롬빈의 결합 또는 억제를 나타내지 않거나, 또는 실질적으로 결합 및 억제를 나타내지 않는다.
- [0143] RCL내 하나 또는 그 이상의 돌연변이들은 또한, fVIIa, fIXa, fXa 및 fXIa 중 1개, 2개, 3개 또는 4개 모두의 억제와 관련하여 APC의 억제를 증가시킬 수 있다. fVIIa, fIXa, fXa 및/또는 fXIa와 관련된 APC의 억제는 해파린의 존재 또는 부재하에 증가될 수 있다.
- [0144] 예를 들면, 변형된 세르핀은 야생형 세르핀보다 fVIIa, fIXa, fXa 및 fXIa 중 1개, 2개, 3개 또는 4개 모두와 관련된 APC의 더 큰 억제를 나타낼 수 있다.
- [0145] 변형된 세르핀은 fVIIa를 억제하는 것 이상으로 APC를 억제할 수 있다. 예를 들면, 변형된 세르핀에 의한 APC의 억제는 변형된 세르핀에 의한 fVIIa의 억제보다 적어도 2배 이상, 적어도 10배 이상, 적어도 100배 이상, 또는 적어도 1000배 이상일 수 있다. 변형된 세르핀은 fVIIa의 억제를 위한 2차 비율 상수보다 적어도 2배 이상, 적어도 10배 이상, 적어도 100배 이상, 또는 적어도 1000배 이상인 2차 비율 상수(k_2)로 APC를 억제한다.
- [0146] 변형된 세르핀은 fIXa를 억제하는 것 이상으로 APC를 억제할 수 있다. 예를 들면, 변형된 세르핀에 의한 APC의 억제는 변형된 세르핀에 의한 fIXa의 억제보다 적어도 2배 이상, 적어도 10배 이상, 적어도 100배 이상, 또는 적어도 1000배 이상일 수 있다. 변형된 세르핀은 fIXa의 억제를 위한 2차 비율 상수보다 적어도 2배 이상, 적어도 10배 이상, 적어도 100배 이상, 또는 적어도 1000배 이상인 2차 비율 상수(k_2)로 APC를 억제한다.
- [0147] 변형된 세르핀은 fXa를 억제하는 것 이상으로 APC를 억제할 수 있다. 예를 들면, 변형된 세르핀에 의한 APC의 억제는 변형된 세르핀에 의한 fXa의 억제보다 적어도 1.5배 이상, 적어도 2배 이상, 적어도 10배 이상, 적어도 100배 이상, 또는 적어도 1000배 이상일 수 있다. 변형된 세르핀은 fXa의 억제를 위한 2차 비율 상수보다 적어도 1.5배 이상, 적어도 2배 이상, 적어도 10배 이상, 적어도 100배 이상, 또는 적어도 1000배 이상인 2차 비율 상수(k_2)로 APC를 억제한다.
- [0148] 변형된 세르핀은 fXIa를 억제하는 것 이상으로 APC를 억제할 수 있다. 예를 들면, 변형된 세르핀에 의한 APC의 억제는 변형된 세르핀에 의한 fXIa의 억제보다 적어도 2배 이상, 적어도 10배 이상, 적어도 100배 이상, 또는 적어도 1000배 이상일 수 있다. 변형된 세르핀은 fXIa의 억제를 위한 2차 비율 상수보다 적어도 2배 이상, 적어도 10배 이상, 적어도 100배 이상, 또는 적어도 1000배 이상인 2차 비율 상수(k_2)로 APC를 억제한다.
- [0149] 본원에 설명된 변형된 세르핀은 변형된 세르핀 서열에 대하여 부가적인 하나 또는 그 이상의 이종성 아미노산 서열들을 함유하는 융합 단백질의 일부일 수 있다. 예를 들면, 변형된 세르핀을 포함하는 융합 단백질은 변형된 세르핀의 안정성, 약동학적, 타겟팅, 친화도, 정제 및 제조 특성들을 개선하는 하나 또는 그 이상의 추가의 도메인들을 추가로 포함할 수 있다.
- [0150] 적당한 추가의 도메인들은 면역글로불린 Fc 도메인들을 포함한다. 면역글로불린 Fc 도메인들은 당 분야에 잘 알려져 있으며, 인간 IgG1 Fc 도메인을 포함한다. 인간 면역글로불린 Fc 도메인은 변형된 세르핀의 N-말단 또는 C-말단에 위치될 수 있다.
- [0151] 본원에 설명된 바와 같은 변형된 세르핀은 당 분야에서 표준인 합성 또는 재조합 기술들을 사용하여 제공될 수 있다.
- [0152] 일부 구현예들에서, 변형된 세르핀은 예를 들면 정제를 위해 사용될 수 있는 친화도 태그를 추가로 포함하는 융합 단백질로서 제공될 수 있다. 친화도 태그는 특이적 결합쌍의 한 멤버를 형성하는 이종성 펩티드 서열이다. 태그를 함유하는 폴리펩티드는 예를 들면 친화도 컬럼에서 폴리펩티드에 특이적 결합쌍 중 다른 멤버를 결합시

김으로써 정제될 수 있다. 예를 들면, 태그 서열은 항체 분자에 의해 결합되는 에피토프를 형성할 수 있다.

[0153] 적당한 친화도 태그들은 예를 들면 글루타티온-S-트랜스퍼라제, (GST), 말토스 결합 도메인(MBD), MRGS(H)₆, DYKDDDDK(FLAGTM), T7-, S-(KETAAAKFERQHMDS), 폴리-Arg(R₅₋₆), 폴리-His(H₂₋₁₀), 폴리-Cys(C₄) 폴리-Phe(F₁₁) 폴리-Asp(D₅₋₁₆), SUMO 태그(Invitrogen Champion pET SUMO 발현 시스템), Strept-태그 II(WSHPQFEK), c-myc(EQKLISEEDL), 인플루엔자-HA 태그(Murray, P. J. et al (1995) *Anal Biochem* 229, 170-9), Glu-Glu-Phe 태그(Stammers, D. K. et al (1991) *FEBS Lett* 283, 298-302), Tag.100(Qiagen; 포유동물 MAP 키나아제 2로부터 유도된 12 aa 태그), Cruz 태그 09TM(MKAEFRRQESDR, Santa Cruz Biotechnology Inc.) 및 Cruz 태그 22TM(MRDALDRLDRLA, Santa Cruz Biotechnology Inc.)를 포함한다. 공지 태그 서열들은 Terpe (2003) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60 523-533에 검토되어 있다. 바람직한 구현예들에서, 폴리-His 태그, 예컨대 (H)₆, His-SUMO 태그(Invitrogen Champion pET SUMO 발현 시스템), 또는 MRGS(H)₆이 사용될 수 있다.

[0154] 친화도 태그 서열은 예를 들면, 부위-특이적 프로테아제를 사용하여, 정제후 변형된 세르핀으로부터 분리될 수 있다.

[0155] 일부 구현예들에서, 변형된 세르핀은 세포로부터 배양 배지에 용해 폴리펩티드를 직접 분비하기 위해 적당한 신호 리더 펩티드에 결합될 수 있다. 적당한 신호 리더 펩티드들의 범위는 당 분야에 공지되어 있다. 신호 리더 펩티드는 세르핀 신호 서열일 수 있거나, 변형된 세르핀에 대하여 이중성일 수 있으며, 즉 비-세르핀 신호 서열일 수 있다. 예를 들면, α-인자 분비 신호 또는 BiP 신호 서열이 사용될 수 있다. 바람직하게는, 신호 펩티드는 폴리펩티드의 발현후 후-해독 과정에 의해 제거된다.

[0156] 본원에 설명된 변형된 세르핀은 변형되지않은 세르핀 및 다른 폴리펩티드들 및/또는 혈청 성분들과 같은 오염원들로부터 유리된다는 의미로 분리될 수 있다.

[0157] 본원에 설명된 변형된 세르핀은 활성화 단백질 C(APC)의 하나 또는 그 이상의 활성들을 억제할 수 있다. 예를 들면, 본원에 설명된 변형된 세르핀은 하나 또는 그 이상의 APC 기질들, 예컨대 fVa 또는 fVIIIa의 단백질분해적 분열을 나타낼 수 있다. 예를 들면, APC에 변형된 세르핀을 결합하면, fVa, fVIIIa 및/또는 다른 APC 기질의 단백질분해적 분열을 적어도 5-배, 적어도 10-배, 또는 적어도 15-배 감소시킬 수 있다. 일부 구현예들에서, 변형된 세르핀에 의해 APC를 결합시키면, APC에 의한 fVa 또는 fVIIIa 기질의 검출가능한 분열이 없을 수 있다.

[0158] 예를 들면, *시험관내* APC 기질들의 단백질분해적 분열을 측정함으로써 APC 활성을 측정하는 기술은 당 분야에서 표준이며, 본원에 설명되어 있다. APC 활성을 측정하는데 사용하기 위해 적당한 분석들은 예를 들면, 비율 상수를 측정하기 위한 표준 키네틱 분석들, 및 트롬빈 생성 분석들(TGA)을 포함하는 응고 분석들을 포함한다.

[0159] 예를 들면, *시험관내* 발색 기질의 단백질분해적 분열을 측정함으로써 응고촉진 프로테아제의 활성을 측정하는 기술은 당 분야에서 표준이며, 본원에 설명되어 있다. 프로테아제 활성을 측정하는데 사용하기 위한 적당한 분석법들은 예를 들면 비율 상수들을 측정하는, 표준 키네틱 분석들, 및 트롬빈 생성 분석들(TGA), 프로트롬빈 시간 분석들(PT) 및 활성화 부분적 트롬보플라스틴 시간 분석들(aPTT)을 포함하는, 응고 분석들을 포함한다.

[0160] 일부 구현예들에서, 본원에 설명된 변형된 세르핀들은 화학적 변형, 예를 들면, 폐길화(PEGylation), 또는 예를 들면, *생체내* 반감기를 증가시킴으로써, 그들의 약물학적 특성들을 개선하기 위한 리포좀내 혼입에 의해, 추가로 변형될 수 있다.

[0161] 본원에 설명된 변형된 세르핀은 변형된 세르핀의 *생체내* 반감기를 증가시키기 위해, 하나 또는 그 이상의 폴리 에틸렌 글리콜(PEG) 또는 다른 모이어티들에 부착될 수 있다(Cantin et al. 2002, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27; 659-665). 예를 들면, 변형된 세르핀은 모노-폐길화되거나 (예를 들면, 2-6개의 PEG 모이어티들과 함께) 폴리-폐길화될 수 있다. 적당한 폐길화 방법들은 당 분야에 잘 알려져 있다.

[0162] 응고 및 출혈에 변형된 세르핀이 미치는 효과가 측정될 수 있다. 적당한 기술들은 당 분야에서 표준이다. 예를 들면, 트롬빈 생성에 미치는 변형된 세르핀의 효과는 트롬빈 생성 분석(TGA) 또는 활성화 부분적 트롬보플라스틴 시간 분석 또는 본원에 설명된 프로트롬빈 시간 분석을 사용하여 측정될 수 있다. 적당한 *생체내* 모델들은 거고근 세동맥 레이저 손상 모델들, FeCl3 경동맥 모델들 및 본원에 설명된 말단 클립(tail clip) 분석들을 포함한다. 다른 적당한 응고 모델들은 당 분야에 잘 알려져 있다.

[0163] 본 발명의 다른 양태들은 상기 설명된 변형된 세르핀을 인코딩하는 핵산 및 상기 핵산을 포함하는 벡터를 제공

한다.

- [0164] 프로모터 서열, 종결자 단편, 폴리아데닐화 서열, 인헨서 서열, 마커 유전자들 및 다른 적당한 서열들을 포함하는, 적당한 조절 서열들을 함유하는, 적당한 벡터들이 선택 또는 구조될 수 있다. 바람직하게는, 벡터는 포유동물 세포에서 핵산의 발현을 이끄는 적당한 조절 서열들을 함유한다. 벡터는 또한, E. coli와 같은 세균 숙주에서 그의 선별, 발현 및 복제를 허용하는 복제기원, 프로모터 영역들 및 선별가능한 마커들과 같은 서열들을 포함할 수 있다.
- [0165] 벡터들은 적당하게, 플라스미드, 바이러스, 예를 들면 파지, 또는 파지미드일 수 있다. 보다 상세히 참조하기 위해서는, 예를 들면, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3rd edition, Russell et al., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press를 참조한다. 핵산의 조작, 예를 들면 핵산 구조물들의 제조, 돌연변이생성, 시퀀싱, 세포로의 DNA 도입 및 유전자 발현을 위한 많은 공지 기술들 및 프로토콜들은 Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. eds. John Wiley & Sons, 1992에 상세히 설명되어 있다.
- [0166] 본원에 설명된 핵산 또는 벡터는 숙주 세포에 도입될 수 있다.
- [0167] 본 발명의 다른 양태는 상기 설명된 변형된 세르핀을 포함하거나 구성된 폴리펩티드를 발현하는 핵산 또는 벡터를 포함하는 제조합 세포를 제공한다.
- [0168] 제조합 변형된 세르핀들의 제조에 적당한 숙주세포들의 범위는 당 분야에 공지되어 있다. 적당한 숙주세포들은 원핵세포들, 특히 세균, 예컨대 대장균(*Escherichia coli*) 및 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) 및, 포유동물 세포들, 예컨대 CHO 및 CHO-유도된 세포주들(Lec 세포들), HeLa, COS, HEK293 및 HEK-EBNA 세포들, 양서류 세포들, 예컨대 제노퍼스 난모세포, 곤충 세포들, 예컨대 트리코플루시아 니(*trichoplusia ni*), Sf9 및 Sf21 및 효모세포들, 예컨대 피히아 파스토리스(*pichia pastoris*)를 포함하는 원핵 세포들을 포함할 수 있다.
- [0169] 세포에 핵산을 도입하기 위한 기술은 당 분야에 잘 정립되어 있으며, 특정 상황에 따라, 임의의 적당한 기술이 사용될 수 있다. 원핵 세포들에 대하여, 적당한 기술들은 인산칼슘 트랜스펙션 및 DEAE-텍스트란, 전기영동, 리포좀-매개 트랜스펙션 및 레트로바이러스 또는 다른 바이러스, 예를 들면 아데노바이러스, AAV, 렌티바이러스 또는 백시니아를 사용한 형질도입을 포함할 수 있다. 세균 세포들에 대하여, 적당한 기술들은 염화칼슘 형질전환, 전기천공법 및 박테리오파지를 사용한 트랜스펙션을 포함할 수 있다.
- [0170] 마커 유전자들, 예컨대 항생제 내성 또는 감수성 유전자들은 당 분야에 잘 알려져 있는 바와 같이, 주된 핵산을 함유하는 클론들을 확인하는데 사용될 수 있다.
- [0171] 도입된 핵산은 세포내 여분-염색체 벡터(extra-chromosomal vector) 상에 있거나, 핵산이 숙주세포의 게놈내에 통합될 수 있다. 표준 기술에 따라, 게놈과의 제조합을 촉진하는 핵산 또는 벡터내에 서열들을 포함시킴으로써, 통합이 촉진될 수 있다.
- [0172] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 변형된 세르핀을 인코딩하는 핵산은 예를 들면, 유전자 치료용도를 위한 개체에 투여하기에 적당한 벡터내에 포함될 수 있다. 적당한 벡터들은 레트로바이러스 벡터들, 렌티바이러스 벡터들, 아데노바이러스 벡터들 및 AAT 벡터들을 포함한다.
- [0173] 도입후, 핵산을 발현하여, 인코딩된 변형된 세르핀을 생성할 수 있다. 일부 구현예들에서, (세포들이 형질전환된 세포들의 후손들일 것이라도 실제로 형질전환되는 세포들을 포함할 수 있는) 숙주 세포들이 핵산 발현을 위한 조건하에 시험관내 배양될 수 있어서, 인코딩된 세르핀 폴리펩티드가 생성된다. 유도성 프로모터가 사용될때, 발현은 유도성 프로모터의 활성화를 필요로 할 수 있다.
- [0174] 변형된 세르핀을 포함하거나 구성된, 발현된 폴리펩티드는 제조후 분리 및/또는 정제될 수 있다. 이는 당 분야에 공지된 임의의 편리한 방법을 사용하여 이뤄질 수 있다. 제조합 폴리펩티드의 정제 기술들은 당 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들면 HPLC, FPLC 또는 친화도 크로마토그래피를 포함한다. 일부 구현예들에서, 상기 설명된 바와 같이, 폴리펩티드 상에서 친화도 태그를 사용하여 정제가 수행될 수 있다.
- [0175] 본 발명의 다른 양태는 숙주 세포내에서 상기 설명된 변형된 세르핀을 인코딩하는 핵산을 발현하는 단계, 및 선택적으로 상기 제조된 변형된 세르핀을 분리 및/또는 정제하는 단계를 포함하는, 변형된 세르핀의 제조 방법을 제공한다.
- [0176] 상기 설명된 바와 같이 제조된 변형된 세르핀을 포함하거나 구성된 폴리펩티드들이 추가로 조사될 수 있으며, 예를 들면, 약동학적 특성들 및/또는 활성이 측정될 수 있다. 단백질 분석의 방법 및 수단들은 당 분야에 잘 알

려져 있다.

- [0177] 본원에 설명된 변형된 세르핀, 변형된 세르핀을 인코딩하는 핵산, 또는 변형된 세르핀을 발현하는 재조합 세포가 치료에 사용될 수 있다. 예를 들면, 본원에 설명된 변형된 세르핀, 변형된 세르핀을 인코딩하는 핵산, 또는 변형된 세르핀을 발현하는 재조합 세포가 출혈 치료를 위해 개체에 투여될 수 있다.
- [0178] 변형된 세르핀이 단독으로 투여될 수 있는 동안, 변형된 세르핀은 일반적으로 약학적 조성물의 형태로 투여될 것이며, 이는 변형된 세르핀에 더해 적어도 하나의 성분, 예를 들면 변형된 세르핀을 인코딩하는 핵산 또는 변형된 세르핀을 발현하는 재조합 세포를 포함할 수 있다. 따라서, 약학적 조성물은 변형된 세르핀에 더해, 핵산 또는 세포, 약학적으로 허용되는 부형제, 담체, 버퍼, 안정화제, 또는 당 분야에 통상의 기술을 가진 자들에게 잘 알려진 다른 물질들을 포함할 수 있다. 본원에 사용되는 용어 "약학적으로 허용되는"은 적절한 의학적 판단의 범주내에서, 합리적인 이익/위험 비율에 비례하여, 과도한 독성, 과민증, 알레르기 반응, 또는 다른 문제점 또는 합병증없이 피험자(예를 들면, 인간)의 조직과 접촉하는데 사용하기에 적당한 화합물, 물질들, 조성물, 및/또는 투여 형태들을 의미한다. 각 담체, 부형제 등은 또한, 제형의 다른 성분들과 호환성인 관점에서 "허용가능"해야 한다. 담체 또는 다른 물질의 정확한 성질은 볼러스, 주입, 주사 또는 이하에 논의되는 다른 투여경로일 수 있는, 투여경로에 따라 다를 것이다.
- [0179] 일부 구현예들에서, 변형된 세르핀들, 핵산들 또는 세포들은 투여하기전 재구성을 위한 동결건조 형태로 제공될 수 있다. 예를 들면, 동결건조된 세르핀은 멸균수내에서 재구성될 수 있으며, 개체에 투여하기 전에 식염수와 혼합될 수 있다.
- [0180] 비경구적인, 예를 들면 주사에 의한 피하 또는 정맥내 투여를 위해, 변형된 세르핀, 핵산 또는 세포를 포함하는 약학적 조성물은 무-발열원인 비경구적으로 허용되는 수용액의 형태로 있을 수 있으며, 적당한 pH, 등장성 및 안정성을 가진다. 당 분야에 관련 기술을 가진 자들은 예를 들면, 등장성 부형제들, 예컨대 염화나트륨 주사, 링거 주사, 락테이트 링거 주사를 사용하여 적당한 용액들을 제조할 수 있다. 버퍼, 예컨대 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산들; 항산화제들, 예컨대 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제(예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 핵사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3'-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 폴리펩티드들; 단백질들, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 폴리머, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 당당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이트제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 카운터-이온, 예컨대 나트륨; 금속 복합물(예를 들면, Zn-단백질 복합물); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 TWEENTM, PLURONICSTM 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하는, 방부제, 안정화제, 버퍼, 항산화제 및/또는 다른 첨가제들이 필요에 따라 사용될 수 있다. 적당한 담체들, 부형제들 등은 표준 약학 지침서, 예를 들면 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990에서 찾아볼 수 있다.
- [0181] 약학적 조성물 및 제형은 단위 투여형태로 편리하게 제공될 수 있으며, 약학분야에 잘 알려진 임의의 방법들에 의해 제조될 수 있다. 상기 방법들은 변형된 세르핀을 하나 또는 그 이상의 보조성분들을 구성하는 담체와 연합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 조성물은 활성 화합물을 액체 담체들 또는 미세분할된 고체 담체들 또는 둘다와 균일하게 및 친밀하게 연합시키고, 그후 필요하다면 생성물을 성형함으로써 제조된다.
- [0182] 바람직하게는, 본원에 설명된 변형된 세르핀, 핵산 또는 세포들은 정맥내 또는 피하 투여를 위한 약학 조성물에 배합된다.
- [0183] 변형된 세르핀, 핵산 또는 세포를 포함하는 약학 조성물은 처리 조건에 의존하여, 동시에 또는 순차적으로, 단독으로, 또는 다른 치료법들과 조합하여 투여될 수 있다.
- [0184] 본원에 설명된 변형된 세르핀, 핵산 또는 세포는 치료적 및 예방적 또는 방지 치료(예를 들면, 개체내에서 발생하는 질환의 위험을 감소시키기 위해 개체내 질환이 발병하기 전에 치료; 그의 발병을 지연시키거나; 또는 발병 후 그의 심각성을 감소시키는 치료)를 포함하는 인간 또는 동물 신체의 치료방법에 사용될 수 있다. 치료방법은 필요로 하는 개체에 변형된 세르핀을 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0185] 상기 설명된 치료에 적당한 개체는 포유동물, 예컨대 설치류(예를 들면, 기니아 피그, 햄스터, 래트, 마우스), 쫓과(예를 들면, 마우스), 개(예를 들면, 개), 고양이과(예를 들면, 고양이), 말과(예를 들면, 말), 영장류, 원숭이과(예를 들면, 원숭이 또는 유인원), 멍키(예를 들면, 마모셋, 비비), 유인원(예를 들면, 고릴라, 침팬지,

오랑우탄, 긴팔원숭이), 또는 인간일 수 있다.

- [0186] 일부 바람직한 구현예들에서, 개체는 인간이다. 다른 바람직한 구현예들에서, 비-인간 포유동물, 특히 인간에게서 치료적 효능을 증명하기 위한 모델로서 관습적으로 사용되는 포유동물들(예를 들면, 쥐과, 영장류, 돼지 또는 토끼 동물들)이 사용될 수 있다. 인간 또는 쥐과 트롬빈의 억제없이 변형된 세르핀에 의한 인간 및 쥐과 APC의 억제는 이하에 나타나 있다.
- [0187] 투여는 보통, "치료적으로 효과적인 양" 또는 "예방적으로 효과적인 양"으로 되며, 이는 환자에게 유익을 나타내기에 충분하다. 상기 유익은 적어도 하나의 증상이 적어도 경감될 수 있는 것이다. 투여되는 실제 양, 및 투여의 비율 및 시간-과정은 치료되는 병의 성질 및 심각도, 치료받는 특정 포유동물, 각 환자의 임상 조건, 질병의 원인, 조성물의 전달부위, 투여방법, 투여계획 및 의사들에게 공지된 다른 요소들에 따라 다를 것이다.
- [0188] 조성물은 치료받는 개체의 상황에 의존하여, 동시에 또는 순차적으로, 단독으로 또는 다른 치료와 조합하여 투여될 수 있다.
- [0189] 치료 처방전, 예를 들면 투여량에 대한 결정 등은 일반적인 의사들 및 다른 의학박사들의 책임하에 있으며, 치료받는 질병의 증상의 심각도 및/또는 진행에 따라 다를 수 있다. 치료적 폴리펩티드들의 적당한 투여량은 당 분야에 잘 알려져 있다(Ledermann J.A. et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664; Bagshawe K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922). 구체적인 투여량은 본원 또는, Physician's Desk Reference (2003)에 명시되어 있으며, 투여되는 약제의 타입이 사용될 수 있는지 적당함에 따라 사용될 수 있다. 변형된 세르핀의 치료적으로 효과적인 양 또는 적당한 투여량은 동물 모델에서 시험관내 활성 및 생체내 활성을 대조함으로써 결정될 수 있다. 마우스 및 다른 시험 동물들에 있어서 효과적인 투여량을 인간들에게 외삽하기 위한 방법들은 알려져 있다. 정확한 투여량은 변형된 세르핀이 예방 또는 치료를 위한 것인지 여부를 포함하는 요소들의 수, 치료되는 영역의 크기 및 위치, 변형된 세르핀의 정확한 성질 및 변형된 세르핀에 부착된 임의의 검출가능한 라벨 또는 다른 분자의 성질에 따라 다를 것이다.
- [0190] 전형적인 변형된 세르핀 투여량은 0.1mg/kg 내지 100mg/kg, 예를 들면 1 내지 80mg/kg의 범위내에 있을 것이다. 예를 들면, 범위 100 μ g 내지 1g내 투여량은 전신 용도에 사용될 수 있으며, 1 μ g 내지 1mg은 국소 용도에 사용될 수 있다. 초기 높은 도입 투여량후 하나 또는 그 이상의 낮은 투여량이 투여될 수 있다. 이는 성인 환자의 단일 처리를 위한 투여량이며, 아동 및 유아를 위해서는 비례하여 조정될 수 있으며, 또한, 분자량에 비례하여 다른 변형된 세르핀 포맷에 대하여 조정될 수 있다. 치료들은 의사의 재량으로 매일, 주2회, 매주 또는 매월 간격으로 반복될 수 있다. 개인을 위한 치료일정은 변형된 세르핀 조성물의 약동학적 및 약역학적 특성들, 투여경로 및 치료받는 질환의 성질에 따라 다를 수 있다.
- [0191] 치료는 주기적일 수 있으며, 투여들 사이의 기간은 약 1주 또는 그 이상, 예를 들면 약 2주 또는 그 이상, 약 3주 또는 그 이상, 약 4주 또는 그 이상, 1개월에 약 1회 또는 그 이상, 약 5주 또는 그 이상, 또는 약 6주 또는 그 이상일 수 있다. 예를 들면, 치료는 격2주 내지 4주, 또는 격4주 내지 8주일 수 있다. 치료는 수술전 및/또는 수술후 받을 수 있으며, 및/또는 트라우마의 해부부위, 수술치료 또는 침습적 처치시에 직접 투여 또는 적용될 수 있다. 적당한 투여제형 및 투여경로는 상기 설명된다.
- [0192] 일부 구현예들에서, 본원에 설명된 변형된 세르핀이 피하 주사로 투여될 수 있다. 예를 들면, 장시간 예방/치료를 위한, 자기-주사기를 사용하여 피하 주사가 투여될 수 있다.
- [0193] 일부 바람직한 구현예들에서, 변형된 세르핀의 치료효과는 투여량에 의존하여, 여러 반감기동안 지속할 수 있다.
- [0194] 본원에 설명된 변형된 세르핀은 트롬빈과 같은 응고촉진 인자들을 억제하거나 실질적으로 억제하지 않으면서 APC를 억제하며, 및 출혈 및 출혈장애; 특히 감소된 트롬빈 생성 또는 증가된 APC 응고촉진 경로 활성화에 의해 야기된 장애들을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0195] 지혈은 손상에 대한 정상적인 응고 반응, 즉 예를 들면, 손상된 혈관으로부터 출혈(bleeding) 또는 출혈(hemorrhage)을 막는 것이다. 지혈은 체내 혈관으로부터 출혈(bleeding) 및 출혈(hemorrhage)을 막는다. 변형된 세르핀은 지혈을 촉진할 수 있으며, 즉 이들은 출혈 장애 또는 트라우마를 갖는 개인에서, 체내 혈관으로부터 출혈(bleeding) 및 출혈(hemorrhage)의 저지를 촉진 또는 증가시킬 수 있다.
- [0196] 본 발명의 다른 양태들은 인간 또는 동물 신체의 치료방법에 사용하기 위해 본원에 설명된 변형된 세르핀; 출혈의 치료방법 또는 지혈의 촉진방법에 사용하기 위해 본원에 설명된 변형된 세르핀; 출혈의 치료 또는 지혈의 촉진

진을 위한 약제를 제조하는데 있어서 본원에 설명된 변형된 세르핀을 사용하는 것; 및 필요로 하는 개인에게 본원에 설명된 변형된 세르핀을 투여하는 단계를 포함하는, 출혈의 치료 또는 지혈의 촉진 방법을 제공한다.

- [0197] 출혈은 체내 혈관으로부터의 출혈(bleeding) 또는 출혈(hemorrhage)을 포함할 수 있다.
- [0198] 본원에 설명된 변형된 세르핀에 의한 치료에 적당한 개인은 출혈 장애를 가질 수 있다.
- [0199] 출혈 장애는 감소된 트롬빈 생성 또는 APC 항응고 경로의 증가된 활성화에 의해 야기되거나 이와 관련될 수 있다.
- [0200] 출혈 장애는 감소된 트롬빈 생성, 감소된 피브리노겐 형성 또는 감소된 혈전 안정성이 있는 임의의 유전적 또는 후천적 출혈 장애를 포함할 수 있다. 예를 들면, 출혈 장애들은 인자들 VII, VIII, X, IX, XI 및 XIII의 선천적인 결핍; 조합된 V 및 VIII 결핍; 프로트롬빈 결핍; 피브리노겐 결핍; 및 다른 응고인자들의 희귀한 결핍들; 혈우병 A, B 및 C; 섬유용해항진과 관련된 증가된 출혈; 감소된 혈소판 카운트 또는 감소된 혈소판 기능으로 인한 증가된 출혈; 및 폰빌레브란트병(von Willebrand Disease)을 포함할 수 있다.
- [0201] 후천적인 출혈 장애들은 주요 혈액 손실과 관련된 획득성 응고장애, 트라우마 및 수술로 얻은 출혈 및 항응고 치료의 효과들을 포함할 수 있다.
- [0202] 일부 구현예들에서, 개체는 외인성 fVIII 또는 fIX와 같은 외인성 응고 인자들에 대하여 내성일 수 있다. 예를 들면, 외인성 fVIII 또는 fIX는 개체내 면역반응, 예를 들면 억제적 동종항체의 생성을 끌어낼 수 있다.
- [0203] 본원에 설명된 바와 같이 변형된 세르핀으로 치료하는데 적당한 개체는 후천적 출혈 장애, 예컨대 트라우마, 수술 또는 항-응고 치료와 관련된 출혈을 가질 수 있다. 예를 들면, 본원에 설명된 바와 같이 변형된 세르핀으로 치료하는데 적당한 개체는 트라우마로 고통받을 수 있거나; 또는 수술 또는 항-응고 치료를 겪거나 겪을 수 있다. 적당한 개체들은 체내 하나 또는 그 이상의 혈관들로부터 출혈 또는 출혈될 위험이 있을 수 있다.
- [0204] 일부 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 변형된 세르핀은 i)응혈인자 동종항체들을 갖는 환자들의 출혈; ii)예를 들면, 동종항체들의 발생을 피하기 위해, 억제인자 발생의 큰 위험을 갖는 환자들의 출혈; iii)억제인자의 부재하에 인자 VIII 결핍을 갖는 환자들의 출혈; iv)선천적 출혈장애, 예를 들면 현재 재조합 최선의 대체 치료법이 없는 선천적 출혈장애, 예컨대 심각한 인자 VII 결핍, 인자 XI 결핍, 조합된 VIII & V 결핍, 인자 X 결핍 및 인자 V 결핍을 갖는 환자들의 출혈; v)혈우병 환자, 예를 들면, 대체 치료법이 부적합하거나 이용불가능한 환자들의 출혈; 또는 vi)트라우마, 수술 및 혈액응고 치료법과 관련된 출혈을 포함하는, 후천적 출혈의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [0205] 본 발명의 다른 양태들은 본원에 설명된 변형된 세르핀을 응고촉진제로 사용하는 것 및 출혈을 치료하는데 있어서 APC를 억제하기 위해 변형된 세르핀을 사용하는 것을 제공한다.
- [0206] 본 발명의 다양한 추가 양태들 및 구현예들은 본 발명의 관점에서 당 분야에 통상의 기술을 가진 자들에게 분명할 것이다.
- [0207] 본 발명의 다른 양태들 및 구현예들은 용어 "구성된"으로 대체된 용어 "포함하는"으로 상기 설명된 양태들 및 구현예들, 및 용어 "기본적으로 구성된"으로 대체된 용어 "포함하는"으로 상기 설명된 양태들 및 구현예들을 제공한다.
- [0208] 문맥이 다르게 요구하지 않는한, 본 명세서는 상기 설명된 양태들 및 구현예들 중 어느 하나를 서로 조합하는 것들을 모두 개시하고 있음을 이해하여야 한다. 이와 유사하게, 본 명세서는 문맥이 다르게 요구하지 않는한, 바람직한 및/또는 선택적인 특징들을 단독으로 또는 다른 양태들 중 어느 하나와 함께 조합하는 것들을 모두 개시하고 있다.
- [0209] 상기 구현예들의 변형들, 그들의 추가 구현예들 및 변형예들은 당업자가 본 명세서를 읽을때 분명할 것이며, 이들은 본 발명의 범주내에 있다.
- [0210] 본 명세서에 언급된 모든 문헌들 및 서열 데이터베이스 항목들은 모든 목적을 위해 여기에 참조로 전문통합된다.
- [0211] 본원에 사용되는 경우 "및/또는"은 다른 것들과 함께 또는 없이, 2개의 명시된 특징들 또는 성분들 각각의 구체적인 내용들로 고려된다. 예를 들면, "A 및/또는 B"는 (i)A, (ii)B 및 (iii)A 및 B 각각의 구체적인 내용들로 고려되며, 각각은 본원에 개별적으로 나타낸다.
- [0212] 본 발명의 특정 양태들 및 구현예들은 실시예로, 및 상기 설명된 도면들 및 이하에 설명되는 표들을 참조하여

설명될 것이다.

- [0213] 표 1은 A22 PCI(N-말단 절단을 갖는 PCI, Ala22에서 개시, 넘버링은 프로펩티드를 포함하는, 성숙 단백질 서열을 사용함), FL α_1 AT Pitts(P1R Pittsburgh(Pitts) 돌연변이를 갖는 전장 α_1 AT) 및 그들의 변종들에 의한 트롬빈 및 APC의 억제를 위한 2차 비율 상수를 나타낸다. 표준 오차가 개시되어 있다. * PCI의 P2KP1' 변종에 의한 트롬빈 억제제의 비율 상수는 초기 억제후 추정치이며, 반응은 잠재적으로 세르핀이 기질 경로, 또는 공유 세르핀:프로테아제 억제 복합물의 분리를 섣다운시키는 것에 의해, 완전한 억제에 접근하는 것으로 나타나지 않는다.
- [0214] 표 2는 헤파린의 존재하에 PCI 및 변종에 의해 트롬빈 및 APC를 억제하기 위한 2차 비율 상수를 나타낸다. 표준 오차가 개시되어 있다. * PCI의 P2KP1'K 변종에 의해 트롬빈에 대한 억제제의 비율 상수는 잔류 트롬빈 활성 대 시간의 플롯의 초기 기울기로부터의 추정치이다. 잠재적으로 세르핀이 기질 경로, 또는 공유 세르핀:프로테아제 억제 복합물의 분리를 섣다운시키는 때문에, 완전한 억제가 이루어지지 않는다.
- [0215] 표 3은 α_1 AT Pitts 및 PCI 및 이들의 변종들에 의한 fXIa의 억제를 위한 2차 비율 상수를 나타낸다. 표준 오차가 개시되어 있다.
- [0216] 표 4는 PCI 및 PCI P2KP1'K 변종에 의해 fXIa를 억제하기 위한 2차 비율 상수를 나타낸다. APC 억제는 (표 1과) 비교하기 위해 개시되어 있다. 표준 오차가 개시되어 있다.
- [0217] 표 5는 타겟팅된 무작위 돌연변이생성에 의해 생성되는 PCI 변종들에 의해 트롬빈 및 APC를 억제하기 위한 2차 비율 상수를 나타낸다. 표준 오차가 개시되어 있다. WT 및 P2KP1' PCI를 위한 상수들이 비교를 위해 나타나 있다. * PCI의 P2KP1' 변종에 의한 트롬빈 억제제의 비율 상수는 초기 억제후 추정치이며, 반응은 잠재적으로 세르핀이 기질 경로, 또는 공유 세르핀:프로테아제 억제 복합물의 분리를 섣다운시키는 것에 의해, 완전한 억제에 접근하는 것으로 나타나지 않는다.
- [0218] 표 6은 FL α_1 AT Pitts C232S 및 그의 P2KP1'K 변종에 의한 fXIa의 억제를 위한 2차 비율 상수들을 나타낸다. APC 억제는 (표 1과) 비교하기 위해 개시되어 있다. 표준 오차가 개시되어 있다.
- [0219] 표 7은 트롬빈 억제 이상으로 APC 억제에 대하여 특이적인 타겟팅된 무작위 돌연변이생성에 의해 결정되는 PCI 돌연변이체들의 RCL 서열들의 부분을 나타낸다. 개시된 서열들은 88개의 돌연변이체들이 평가되는 초기 실험으로부터 나온다. 본 실험에서 돌연변이된 P4, P2 및 P1' 잔기들은 볼드체로 개시되어 있다. WT PCI 및 P2KP1'K PCI 서열들은 비교를 위해 개시되어 있다.
- [0220] 표 8은 트롬빈 억제 이상으로 APC 억제에 대하여 특이적인 타겟팅된 무작위 돌연변이생성에 의해 결정되는 PCI 변종들의 RCL 서열들의 부분을 나타낸다. 개시된 서열들은 460개의 돌연변이체들이 평가되는 더 큰 실험으로부터 나온다. 본 실험에서 변화된 P4, P2 및 P1' 잔기들은 볼드체로 개시되어 있다. WT PCI 및 P2KP1'K PCI 서열들은 비교를 위해 개시되어 있다.
- [0221] 표 9는 트롬빈 억제 이상으로 APC 억제에 대하여 특이적인 타겟팅된 무작위 돌연변이생성에 의해 결정되는 α_1 AT 변종들의 RCL 서열들의 부분을 나타낸다. 서열들은 WT α_1 AT 및 α_1 AT Pitts 모두와 대조되는 것으로 개시되어 있다. P2 및 P1' 잔기들은 볼드체로 개시되어 있으며, P1 잔기들은 밑줄쳐있다. 접두사는 특정 돌연변이체에 대한 기원의 라이브러리를 나타내며, 돌연변이체들은 P2 변종 라이브러리로부터 생성된 P2.nr. P1' 변종 라이브러리로부터 생성된 P1'.nr. 및 P2P1' 변종 라이브러리의 플레이트 1-5로부터 생성된 돌연변이체 표시된 1-5.nr.을 표시한다.
- [0222] 표 10은 트롬빈에 대한 것보다 APC에 대하여 더 특이적인 타겟팅된 무작위 돌연변이생성에 의해 결정된 α_1 AT의 변종들의 서브셋에 의해 트롬빈 및 APC를 억제하기 위한 2차 비율 상수를 나타낸다. 표준오차가 제공되어 있다. FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K 및 FL α_1 AT Pitts C232S에 의해 트롬빈 및 APC를 억제하기 위한 2차 비율 상수가 비교를 위해 제공된다.
- [0223] 표 11은 FL α_1 AT Pitts C232S 배경 상에서 무작위 돌연변이생성으로부터 히트(hit)에 의해 응고촉진 프로테아제의 억제를 조사하기 위한 PT 및 aPTT 분석들의 결과를 나타낸다. 2회 수행되는, FL α_1 AT Pitts C232S P2RP1'C에 대하여 나타난 반응들을 제외하면서, PT 분석들은 분석의 민감도를 증가시키기 위해 1/4 희석된 혈장을 사용하여 수행되며, 3회 수행되었다. 개시된 오차는 표준 오차이다. aPTT 분석은 1회 실험이었으며, 오차가 나타나

지 않았다. PT 및 aPTT 모두에 대하여, 버퍼가 오로지 대조군이며, 단백질 대신 버퍼(TBS)가 혈장에 첨가되는 경우, 대조군으로서 사용되었다. 대조군에 대하여, PT 또는 aPTT가 증가하는 것은 응고촉진 프로테아제가 억제됨을 나타낸다. PT 및 aPTT 분석들 모두에 대하여, 세르핀 변종은 5 μ M 농도로 사용되었다. 대조를 위해, P2K 및 P1'K 돌연변이체들은 3회의 평균으로 개시되어 있다. 표 1 및 3에서 억제 비율 상수로부터 알 수 있는 바와 같이 상기 돌연변이체들은 트롬빈 이상으로 APC에 대하여 높은 특이성을 나타내지만, fXa를 유의미하게 억제한다. 따라서, 이들은 트롬빈 외의 응고촉진 프로테아제를 억제하기 위한 양호한 비교장치이다. ND는 측정되지 않음을 나타낸다.

[0224] 표 12는 타겟팅된 무작위 돌연변이생성으로부터 α_1 AT 변종에 의해 fXa를 억제하기 위한 2차 비율 상수를 나타낸다. 본원에서 평가된 돌연변이체들은 트롬빈 이상으로 APC에 대하여 특이성, 실질적인 APC 억제를 나타냈으며, PT의 연장을 나타내지 않았다. 대부분은 또한, 그저 적은 aPTT 연장만 나타냈다. 이러한 특징들 때문에, 이들이 추가 분석을 위해 선택되었다. 비교를 위해, FL α_1 AT Pitts C232S 및 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K에 의한 fXa 억제도 또한 나타나 있다(표 3으로부터).

[0225] 표 13은 합리적인 및 무작위 돌연변이생성으로부터 정보를 조합하여 발견된 α_1 AT의 둘 이상의 돌연변이체들의 특징화 요약을 나타낸다. FL α_1 AT Pitts C232S 및 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K C232S는 비교를 위해 개시되어 있다(표 1 및 3 및 도 5의 데이터). P2RP1'Q 및 P2KP1'Q를 위한 aPTT는 4개의 별도의 측정값들의 평균이며, 개시된 오차는 표준 편차이다. 오차로 개시된 표준편차와 함께, 버퍼와 함께 혈장에 대해 얻은 값이 괄호안에 개시되어 있다. Pitts 및 P2KP1'K에 대해 개시된 aPTT는 적어도 3개의 별도의 측정들의 결과이며, 개시된 오차는 표준편차이다. 괄호안의 값은 오차로서 표준편차와 함께 나타낸, 버퍼와 함께 혈장에 대하여 얻은 값이다. 모든 aPTT들은 5 μ M 세르핀의 최종 농도를 사용하여 얻어졌다. 본 농도에서 FL α_1 AT Pitts C232S는 혈장이 응고할 수 없게 한다. 개시된 300s의 값은 분석에 대하여 컷-오프(cut-off)이다. 변종들에 의한 트롬빈, APC 및 fXa의 억제를 위한 2차 비율 상수는 표준 오차와 함께 개시되어 있다.

[0226] 실험예들

[0227] 응고 캐스케이드 및 본 캐스케이드에서 세르핀의 조절 역할은 도 1에 도시되어 있다. 두 경로들이 응고 캐스케이드, 외인성 캐스케이드(또는 조직 인자 경로) 및 내인성 경로(접촉 활성화 경로)를 활성화시킨다. 활성화의 주요 생리적 경로는 외인성 경로인 것으로 믿어진다. 본 경로에서, 조직 인자(TF)는 손상 혈관의 표면 상에 노출된다. 그후, TF는 fVIIa 및 fVII와 결합할 수 있다. TF:fVIIa는 fVII를 활성화시킬 뿐만 아니라 TF:fVII는 자발적으로 TF:fVIIa로 활성화한다. TF:fVIIa는 fX를 fXa로 활성화시키며, 및 이는 프로트롬빈을 트롬빈(fIIa); 응고 캐스케이드의 중심 프로테아제로 활성화시킨다. 프로테아제 활성화된 수용체(PAR)를 분열시켜, 트롬빈이 혈소판을 활성화시키고, 피브리노겐을 피브린으로 쪼갬다. 피브린은 fXIIIa에 의해 가교되고, 이는 트롬빈에 의해 자체 활성화되어, 안정한 피브린 응괴를 형성한다. 트롬빈은 게다가, 그의 형성을 강화하기 위해, 포지티브 피드백 메커니즘을 활성화한다. 이는 fVIII를 fVIIIa로 활성화하며, 및 fV를 fVa로 활성화한다. fVIIIa는 fIXa에 결합하여, 내인성 데나제(Xase) 복합체를 형성한다. 내인성 Xase는 fX를 보다 활성화한다. 이 fXa는 fVa에 결합하여 프로트롬비나아제를 형성할 수 있다. 프로트롬비나아제는 프로트롬빈을 트롬빈으로 활성화하며, 응고 개시한후 생성된 대부분의 트롬빈에 대하여 반응성이다. 트롬빈의 긍정적인 피드백 기작에 더해, 트롬빈은 부정적인 피드백 기작을 통해 그 자체의 활성화를 셧다운시킬 수도 있다. 그것이 그의 보조인자 트롬보모듈린(TM)과 결합할때, 트롬빈:TM 복합체는 단백질 C(PC)를 활성화 단백질 C(APC)로 활성화할 수 있다. APC는 fVIIIa 및 fVa 둘다 쪼개고 불활성화시켜서, 트롬빈 생성을 효과적으로 셧다운시킨다. 세르핀은 응고 캐스케이드의 중요한 억제인자이다. 세르핀 단백질 C 억제인자(PCI), 항트롬빈(ATIII), 헤파린 보조인자 II(HCII) 및 α_1 -항트립신(α_1 AT)의 억제 작용들은 도 1에 도시되어 있다.

[0228] 이하에 본 발명은 혈우병과 같은 출혈장애를 치료하는데 응고촉진 제제로서 사용(치료, 예방, 우회 또는 상승)하기 위해 세르핀을 APC의 특정 억제인자로 전환시키는 것을 설명한다. PCI 및 α_1 AT 모두에 대하여 본원에 설명된 변형들은 상기 단백질들의 적은 변화들이 특정 APC 억제인자들을 생성하는데 사용될 수 있다는 원칙의 증거로서 도시된다.

[0229] PCI는 먼저 APC의 생리학적 억제인자로서 설명되며, 따라서, 상기 조사들을 위한 출발점으로 제공되었다(Suzuki *et al*, 1983; 1984). 그러나, PCI는 불규칙하며, 또한 트롬빈, 트롬빈:TM, fXIa, fXa 및 TF:fVIIa를 억제한다(Elisen *et al*, 1998; Mosnier *et al*, 2001; Suzuki *et al*, 1984; Fortenberry *et al*, 2011; Meijers *et al*,

1988). 결과적으로, PCI는 응고촉진 및 항응고제 모두로 기능할 수 있다. 그의 활성은 헤파린 및 헤파린 설페이트와 같은, 글리코사미노글리칸에 결합시킴으로써 조절된다(Pratt & Church, 1992; Pratt *et al*, 1992; Li & Huntington, 2008). 응고 캐스케이드에서 PCI 역할의 개요를 위해, 도 1을 참조한다.

[0230] α_1 AT는 호중구 엘라스타제의 천연 억제인자이다(Kalsheker, 1989). P1에서 Arg 또는 Leu를 갖는 응고 캐스케이드내 다른 세르핀들과 달리, α_1 AT는 대신에 Met를 가진다. 이는 응고 프로테아제의 매우 나쁜 억제인자로 되게 한다. 그럼에도 불구하고, 혈장내 α_1 AT의 최고 농도때문에, APC를 생리적으로 유의미한 정도로 억제하는 것으로 믿어진다(Heeb & Griffin, 1988). P1 잔기의 돌연변이생성은 P1에서 Arg 또는 Leu를 사용하면, α_1 AT에 의한 응고 프로테아제의 억제가 극적으로 개선됨을 보여준다(Heeb *et al*, 1990). 이는 심각한 출혈 장애를 유발하는 α_1 AT의Pittsburg(M358R(P1R); Pitts) 변종에 의해 예시된다(Owen *et al*, 1983).

[0231] 응고촉진 프로테아제 이상으로 APC를 억제하는데 특이적인 세르핀을 개발하기 위해, 주형 세르핀 스캐폴드로서 PCI 및 α_1 AT Pittsburgh(P1R, α_1 AT Pitts)를 사용하였다. 본 연구에서 사용된 모든 단백질들은 pETSUMO 발현 벡터(Invitrogen)를 사용하여, *Escherichia coli* 배양액들(Rosetta2(DE3)pLysS, Novagen)로부터 발현되었으며, 및 Ni-크로마토그래피, 음이온-교환 및 PCI의 경우, 헤파린 친화도 크로마토그래피의 조합을 사용하여 정제하였다. SUMO 프로테아제 분열에 의해 SUMO-tag를 이후에 제거하고, 및 α_1 AT Pittsburgh(Pitts, P1R)에 대하여 탠덤(tandem) Ni-음이온 교환 크로마토그래피 및 PCI에 대하여 탠덤 음이온 교환-헤파린 크로마토그래피에 의해 태그를 제거하였다. PCI 구조물은 Ala22(A22, 성숙 단백질 서열에 따라 넘버링, 프로펩티드에 의해 개시)에서 출발하여, N-말단 절단된다. α_1 AT Pitts(P1R) 구조물은 전장(FL)이며, 및 발현 및 정제하는 동안, 분자간 디설파이드 결합 형성 및 다른 변형들을 폐지하기 위해 추가의 C232S 돌연변이를 가진다(Yamasaki *et al*, 2011). 사용된 발현 벡터로 인해, α_1 AT Pitts 구조물은 Glu(E) 대신에 그의 제1 잔기로서 Ser(S)을 가진다. C232S 및 E1S 돌연변이들은 α_1 AT의 활성을 변경시키는 것으로 기대되지 않는다.

[0232] PCI 및 α_1 AT Pittsburgh의 RCL내에 다른 위치에 Lys 잔기들을 도입하고, 얻은 돌연변이체를 트롬빈 및 APC의 억제를 위해 시험하였다. 본 연구의 초기 단계에서, 트롬빈 억제가 한번 APC 억제에 유리하게 폐지되는 경우, 다른 응고 프로테아제에 대한 유의미한 잔류 억제 활성을 가진다면, 억제인자가 잠재적으로 추가로 변형될 수 있었다는 전제하에, 억제인자는 그들의 다른 응고 프로테아제의 억제를 위해 선별 또는 시험되지 않았다. RCL 잔기들은 세르핀에 대한 Schechter-Berger 명명법에 따라 넘버링된다(Schechter & Berger, 1967).

[0233] 프로테아제 이상으로 과량의 세르핀을 사용하여, 모조-제1-순서 조건하에, 트롬빈 및 APC 억제의 비율 상수들을 측정하였다(표 1). 세르핀 및 프로테아제는 시간 길이를 다양화하기 위해, 함께 배양되었으며, 잔류 활성은 프로테아제에 대한 과량의 발색 기질을 가하여 측정하였다(트롬빈에 대하여 S2238 및 APC에 대하여 S2366). 그 후, 405nm의 흡광도에 의해 잔류 프로테아제 활성을 측정하였다. 시간에 대한 잔류 프로테아제 활성의 플롯들은 관찰된 비율 상수 k_{obs} 를 제공하였다. 2차 비율 상수(k_2)는 k_{obs} 대 세르핀 농도의 플롯(선형회귀모델을 사용하여 피팅됨)의 기울기이다. 기울기의 표준 오차가 개시되어 있다.

[0234] P2 및 P1'에서 도입된 리신 돌연변이들은 표 1에 도시된 모든 변종들에 대하여, APC에 대한 PCI 및 α_1 AT의 특이성을 트롬빈 이상으로 증가시키는데 매우 효과적이었다. 일반적으로 트롬빈 억제는 모든 경우에 크게 감소되었다. APC 억제는 또한, 모든 돌연변이들에 대하여 감소되었지만, 같은 정도에 가깝지 않았다. 세르핀은 초기에 APC보다 트롬빈을 더 억제하였다. 이는 시험된 모든 돌연변이체들에 대하여 반대였다.

[0235] PCI는, α_1 AT와 달리, 헤파린과 결합하며, 및 이 결합은 트롬빈 및 APC의 억제를 크게 증가시킨다(Pratt & Church, 1992). 따라서, 본 발명자들은 표 1에서 관찰된 특이성 교대가 지속되는지를 관찰하기 위해, 헤파린의 존재하에 P1'K 및 P2KP1'K PCI 돌연변이체들에 의한 트롬빈 및 APC 억제를 시험하였다. 프로테아제이상으로 과량의 PCI를 사용하여, 모조-제1-순서 조건하에, 비율상수를 측정하였다. 실험하기전 30분동안 PCI를 균등물 농도의 미분획된 헤파린과 사전배양하였다. PCI:헤파린 및 프로테아제를 다양한 시간길이동안 함께 배양하고, 헤파린에 결합하기 위해 폴리브렌과 혼합된 프로테아제에 대한 과량의 발색 기질을 가하여, 특정 시간지점후 잔류 활성을 측정하였다. 시간 경과에 대한 잔류 프로테아제 활성의 플롯은 관찰된 비율 상수(k_{obs})를 제공하였다. 2차 비율 상수(k_2)는 k_{obs} 대 세르핀 농도의 플롯(선형회귀모델을 사용하여 피팅됨)의 기울기이다. 기울기의 표준 오차가 개시되어 있다. P2KP1'K PCI에 의해 트롬빈을 억제하기 위해 계산된 값은 잔류 트롬빈 활성 대 시간의

플롯의 초기 기울기로부터의 추정값이었으며, 그래프는 완전한 억제에 이루어지지 않음을 제시해준다. 이는 기질 경로 또는 복합물 해리로 인한 것이다. 2차 비율 상수들은 표 2에 도시되어 있다. 헤파린의 부재하에 억제를 위해, PCI의 P1'K 및 P2KP1'K 돌연변이체들은 WT 단백질과 달리, 트롬빈 이상으로 APC에 대하여 특이적이었다(표 2).

[0236] 상기 실험들은 세르핀 RCL내에 1개 또는 2개의 변형들만 도입하는 것이 보조인자의 존재 및 부재하에, 트롬빈의 억제를 폐지하거나 크게 감소시키기에 충분하였음을 보여주었다. APC의 억제는 감소하였지만, 여전히 헤파린의 존재하에 α_1 AT의 변종 및 PCI 변종에 대하여는 특히 상당했다. 그러나, PCI 및 α_1 AT Pitts의 특이성은 트롬빈 및 APC에 제한되지 않는다. 상기 세르핀들은 또한, fXa, 다른 응고촉진 프로테아제를 억제한다. 응고를 억제하지 않기 위해, 본 발명의 돌연변이체들은 또한, fXa보다 APC에 대하여 특이적일 필요가 있다. 따라서, 본 발명자들은 또한, PCI 및 α_1 AT 및, fXa에 대한 그들의 변종들의 억제의 비율상수를 측정하였다(표 3). 비율상수들은 프로테아제 이상으로 과량의 세르핀을 사용하여 모조-제1-순서 조건하에 측정하였다. 프로테아제에 대하여 과량의 발색 기질(S2222)을 가하여 측정된 잔류 활성 및 시간 길이를 변화시키기 위해 세르핀 및 프로테아제를 함께 배양하였다. 시간 경과에 따른 잔류 프로테아제 활성의 플롯들은 관찰된 비율 상수(k_{obs})를 제공하였다. 2차 비율 상수(k_2)는 k_{obs} 대 세르핀 농도의 플롯(선형회귀모델을 사용하여 피팅됨)의 기울기이다. 기울기의 표준 오차가 개시되어 있다(표 3).

[0237] 트롬빈에 대하여 이전에 알아낸 바와 같이, WT PCI는 APC보다 양호하게 fXa를 억제하였다. α_1 AT Pitts는 fXa보다 양호하게 APC를 억제했지만, fXa의 억제는 여전히 상당했다. fXa의 억제는 P1K PCI, P2K α_1 AT Pitts 및 P1K α_1 AT Pitts에 대하여 여전히 상당했다(표 3). α_1 AT Pitts 및 PCI의 P2KP1K 돌연변이체들은 fXa의 부재 또는 무시해도될 정도의 억제에 의해, APC에 대하여 모두 매우 특이적이었으며, 따라서, 낱 후보물질로 여겨졌다. fXa의 억제가 헤파린의 부재하에 매우 느리기 때문에, PCI의 P1'K 돌연변이체도 또한, 흥미있다. 헤파린의 존재는 APC 억제를 크게 가속시키며, 이는 APC에 유리한 특이성 비율을 잠재적으로 왜곡할 수 있었다.

[0238] PCI 낱 화합물들을 먼저 논의할 것이며, 이후 α_1 AT 낱 화합물을 논의할 것이다.

[0239] 보다 복잡한 혈장 시스템내 A22 P2KP1'K PCI의 비율을 조사하고, 응고촉진 프로테아제에 미치는 임의의 부정적인 효과들을 배제하기 위해, 프로트롬빈 시간 분석(PT)을 수행하였다. 이 분석은 외인성 경로를 통해 응고 후 혈장내 혈전 형성이 개시될때까지의 시간을 측정한다. A22 WT PCI는 응혈 시간의 작은 증가를 나타낸 반면, P2KP1'K는 응고촉진 프로테아제를 향한 감소된 억제 활성화와 일치된다(도 2).

[0240] 게다가, 본 발명자들은 응고의 접촉 활성화 경로에 PCI 돌연변이체가 미치는 임의의 효과를 배제하고자 했다. 그렇게 하기 위해, fXIa의 억제를 위한 억제의 비율상수를 측정하고, 및 aPTT 분석을 실시하였다. 이 분석은 내인성 경로를 통해 응고를 측정한 것 외에는, PT와 유사하다.

[0241] 프로테아제 이상으로 과량의 세르핀을 사용하여, 모조-제1-순서 조건하에, PCI 및 P2KP1'K 돌연변이체에 의한 fXIa 억제를 위한 억제의 2차 비율 상수들을 측정하였다. 프로테아제에 대하여 과량의 발색 기질(S2366)을 가하여 측정된 잔류 활성 및 시간 길이를 변화시키기 위해 세르핀 및 프로테아제를 함께 배양하였다. 시간 경과에 따른 잔류 프로테아제 활성의 플롯들은 관찰된 비율 상수(k_{obs})를 제공하였다. 2차 비율 상수(k_2)는 k_{obs} 대 세르핀 농도의 플롯(선형회귀모델을 사용하여 피팅됨)의 기울기이다. 기울기의 표준 오차가 개시되어 있다. A22 P2KP1'K PCI에 의한 fXIa 억제는 프로테아제에 의한 세르핀 분열로 인해, 잠재적으로 실험과정동안 완료되지 않았다. WT와 대조적으로, P2KP1'K 돌연변이체는 fXIa를 향해 크게 감소된 억제를 나타냈으며, 및 fXIa에 대한 것보다 APC에 대하여 더 큰 특이성을 나타냈다(표 4).

[0242] aPTT 분석은 WT PCI가 fXIa 또는 fXIIa의 억제로 인해 잠재적으로, 접촉 활성화 경로의 강력한 억제인자였음을 보여주었다(도 3). P2KP1'K 돌연변이체는 aPTT가 적게 증가했음을 나타냈다. 그러나, 접촉 활성화 경로가 fIXa 활성화를 통해 주로 응고를 활성화하기 때문에, 접촉 활성화를 적은 정도로 억제하는 것은 접촉 활성화의 주요 타겟(fIX) 또는 그의 보조인자(fVIII)가 부족하므로 혈우병에 미미한 것 같다.

[0243] 따라서, 본원에서 어느 정도까지 개시된 결과들은 A22 P1'K PCI 및 A22 P2KP1'K PCI 모두 혈우병을 치료하기 위한 우회 제제들로 개발하기 위한 유망하고 APC-특이적인 낱 화합물들을 보여준다.

[0244] 트롬빈 이상으로 APC에 대한 특이성을 갖는 추가의 PCI 돌연변이체들을 생성하기 위해, 타겟팅된 무작위 돌연변이 생성 전략을 PCI 스캐폴드 상에 사용하였다. 타겟팅된 잔기들은 P4, P2 및 P1'였다. 96-웰 포맷에서 PCI 발현

한 후, 무작위 접근법은 세균성 분해물의 억제활성을 시험함으로써, APC 억제를 위한 선택 및 트롬빈 억제에 대한 선택에 근거를 두고 있다.

[0245] 상기 서술된 특이성에 대한 시험과 조합된 합리적인 돌연변이생성으로부터 가장 특정한 PCI 돌연변이체; A22 P2KP1'K PCI를 사용하여 본 분석을 보정하였다. WT PCI를 추가 대조군으로 사용하였다. 트롬빈 억제에 대한 부정적인 선택은 A22 WT PCI가 작은 억제에 대하여 선택하는 시간지점으로부터 연장된 배양기간 및 완전한 억제를 나타내도록 하는 시간동안 세균성 분해물을 배양함으로써 이루어졌다. APC 억제를 위한 긍정적인 선택은 억제를 증가 뿐만 아니라 감소시키는 것을 결정할 수 있도록 APC 억제 활성의 중간 범위에 WT 및 P2KP1'K PCI가 속하도록 보정되었다.

[0246] 초기 분석에서, 트롬빈 및 APC 억제 활성을 위해 88개의 변종들을 선별하였다. 배양물들을 재배하고, 유도하고, 96-웰 플레이트에서 단백질 발현하였다. 트롬빈에 대하여 1시간동안 및 APC에 대하여 30분동안 분해물을 프로테아제와 함께 배양함으로써, 트롬빈 및 APC에 대한 억제활성을 위해 분석된 분해 버퍼 및 분해물을 가하여, 세포들을 분해하였다. 그후, 프로테아제에 발색 기질을 가하여, 잔류 프로테아제 활성을 읽었다. A22 WT PCI 및 A22 P2KP1'K PCI를 대조군으로 사용하였다. P2KP1'K PCI와 대조되는, 높거나 균등한 잔류 트롬빈 활성 및 낮거나 균등한 잔류 APC 활성을 갖는 임의의 분해물은 유망한 APC-특이적 후보물질로 고려되었다. 이러한 서열들은 표 7에 개시되어 있다. P4, P2 및 P1' 위치들은 볼드체로 개시되어 있다.

[0247] 본 실험 셋트로부터의 가장 큰 APC 억제 활성을 갖는 돌연변이체(D8; P4QP2RP1'N)를 예비 방식으로 특징화하고, 및 P2KP1'K와 다른 돌연변이들을 사용하는 중에, 트롬빈보다 APC의 억제에 대하여 더 특이적인 것으로 나타났다(표 5). 이는 세르핀 RCL내에 추가의 돌연변이들을 가능하게 하며, 이미 설명된 돌연변이들과 균등한 효과들을 가짐을 보여주었다.

[0248] 더 큰 데이터셋을 생성하기 위해, 추가 460개의 돌연변이체들을 긍정적 및 부정적인 선택 분석들에서 선별하였다. 배양액들을 5개의 96-웰 플레이트내에서 배양, 유도 및 단백질 발현시켰다. 분해 버퍼를 가하여 세포들을 분해하고, 트롬빈에 대하여 1시간 및 APC에 대하여 30분동안 분해물을 프로테아제와 함께 배양함으로써, 트롬빈 및 APC에 대한 억제활성에 대하여 분해물들을 분석하였다. 프로테아제에 발색 기질을 가하여, 잔류 프로테아제 활성을 읽었다(트롬빈에 대하여 S2238, APC에 대하여 S2366). A22 WT PCI 및 A22 P2KP1'K PCI를 대조군으로 사용하였다. P2KP1'K PCI와 대조되는 높거나 균등한 잔류 트롬빈 활성 및 낮거나 균등한 잔류 APC 활성을 갖는 임의의 분해물을 유망한 APC-특이적 후보물질일 것으로 고려하였다. 이러한 데이터셋으로부터, 콜로니들을 선택하고, 세르핀에 대하여 시퀀싱하였으며, 이는 P2KP1'K보다 양호한 APC 억제 및 나쁘거나 균등한 트롬빈 억제를 나타냈으며, 이들이 정말 진실이고, 거짓 긍정이 아닌지를 확인하기 위해 같은 분석법으로 3회 재시험하였다. 본 재시험으로부터, 초기 스크린내에서 발견된 17개의 돌연변이체들 중 15개의 셋트가 P2KP1'K보다 APC를 억제하는데 있어서 더 양호하거나 균등하고, 트롬빈을 억제하는데 있어서 더 나쁘거나 균등한 것으로 측정되었다(표 8). 재시험후 긍정적인 돌연변이체들의 서열들은 표 8에 개시되어 있다. 흥미롭게도, 무작위 돌연변이생성은 P2 및 P1' 위치들에서 양화된 잔기들의 유익한 효과들을 확인하였다. 그러나, 대체 RCL 조성물도 또한 발견되었다.

[0249] 무작위 돌연변이생성 PCI 돌연변이체들에 의한 트롬빈 및 APC 억제를 위한 예비 2차 비율 상수는 프로테아제 이상으로 과량의 세르핀을 사용하여 모조 1차 조건들하에 측정되었다. 프로테아제에 대한 과량의 발색 기질을 가하여 측정된 시간 길이 및 잔류 활성을 변화시키기 위해, 세르핀 및 프로테아제를 함께 배양하였다. 시간에 대한 잔류 프로테아제 활성의 플롯들은 관찰된 비율 상수(k_{obs})를 제공하였다. 2차 비율 상수(k_2)는 k_{obs} 대 세르핀 농도의 플롯(선형 회귀 모델을 사용하여 피팅됨)의 기울기이다. WT 및 P2KP1'K는 대조를 위해 개시되어 있다. 비율 상수들은 표 5에 개시되어 있다. 개시된 오차는 기울기의 표준 오차이다.

[0250] 무작위 돌연변이생성 분석으로부터 상기 선택된 돌연변이체들 중 일부의 예비 특징화는 선택된 돌연변이체들이 P2KP1'K PCI와 적어도 기능적으로 균등하고, 및 일부가 약간 개선된 APC 억제율을 가졌음을 보여줬다(표 5). 이러한 실험들은 P2KP1'K가 APC-특이적 세르핀을 생성하기 위해 사용될 수 있는 유일한 조성물이 아님을 강하게 제시하고 있다.

[0251] 표 1 및 3에 개시된 비율 상수들로부터의 α_1 AT Pitts에 근거한 주요 납 화합물은 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K이었다. 이 돌연변이체는 트롬빈을 억제하지 않고, fXa를 오직 느리게 억제하였지만, APC 억제를 보유하는 것으로 나타나 있다(표 1 및 3).

[0252] 보다 복잡한 혈장 시스템에서 본 돌연변이체의 특성들을 조사하고, 응고촉진 프로테아제에 미치는 임의의 부정적인 효과들을 배제하기 위해, 프로트롬빈 시간 분석(PT)을 수행했다. 이 분석은 외인성 경로를 통해 응고가 개

시된후, 혈전이 형성될때 까지의 시간을 측정한다. 예상한 바와 같이, 항응고 α_1 AT Pitts는 트롬빈 및 fXa의 억제제로 인해 응고 시간이 증가되었음을 보여주었다(도 4). 이와 대조적으로, α_1 AT Pitts의 P2KP1K 돌연변이체는 응고 시간이 증가되지 않아서, 본 분석에서 정상적인 응고를 방해하지 않았음을 보여주었다.

[0253] 데이터는 α_1 AT Pitts의 P2KP1'K 돌연변이체가 외인성(조직 인자) 경로 또는 일반적인 응고 경로에서 응고촉진 프로테아제를 방해하지 않았음을 어느 정도까지 보여줬다. 게다가, 본 발명자들은 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K가 내인성(접촉 활성화) 경로에 영향을 미치는지의 여부를 측정하고자 했다. 프로테아제 이상으로 과량의 세르핀을 사용하여, 모조 1차 조건하에서 FL α_1 AT Pitts C232S 및 P2KP1'K 돌연변이체에 의한 fXIa 억제의 2차 비율 상수를 측정하였다. 프로테아제에 대한 과량의 발색 기질(S2366)을 가하여 측정된 시간 길이 및 잔류 활성을 변화시키기 위해, 세르핀 및 프로테아제를 함께 배양하였다. 시간 경과에 따른 잔류 프로테아제 활성의 플롯들은 관찰된 비율 상수(k_{obs})를 제공하였다. 2차 비율 상수(k_2)는 k_{obs} 대 세르핀 농도의 플롯(선형 회귀 모델을 사용하여 핏팅됨)의 기울기이다. 기울기의 표준 오차들이 제공된다.

[0254] fXI는 접촉 활성화 경로동안 활성화되며, 및 fIX를 활성화시킴으로써 일반적인 응고 경로로 공급한다. 게다가, fXI가 한번 활성화되면, 응고가 트롬빈에 의해 개시된다. fXIa는 FL α_1 AT Pitts C232S에 의해 상당한 정도까지 억제되었지만, 이러한 억제는 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K에 대하여 크게 감소되었다(표 6).

[0255] α_1 AT Pitts의 P2KP1'K 돌연변이체에 의한 fXIa의 작은 억제 정도가 검출되고, fXIIa에 미치는 임의의 잠재적인 부정적인 효과를 측정하기 때문에, 본 발명자들은 aPTT 분석을 추가로 수행하였다. 이 분석은 내인성 응고 경로를 통해 개시된 응고를 측정하는 것 외에는 PT 분석과 유사하다. 따라서, aPTT는 fXIa 및 응고의 접촉 활성화 경로에 미치는 임의의 부정적인 효과를 검출하기 위해 사용될 수 있었다. 본 분석에서, FL α_1 AT Pitts C232S와 함께 배양된 혈장은 $0.67 \mu\text{M}$ 세르핀과의 반응을 제외한 분석시간내에 응고되지 않았다(도 5A). FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1K는 응고시간이 조금 증가했음을 보여줬지만, 투여량-의존성 증가는 없었다(도 5B). 이는 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K의 fXIa 억제 활성이 접촉 활성화 경로에 크게 영향을 미치기에는 너무 느리다는 사실을 보여준다. 게다가, 접촉 활성화 경로는 fIXa의 활성화를 통해 응고 캐스케이드를 활성화시킨다. 혈우병환자에게는 fIX 또는 그의 필수 보조인자 fVIII가 없으므로, 혈우병환자의 접촉 활성화 경로를 작은 정도로 억제하는 역할이 최소화되기 쉽다.

[0256] α_1 AT Pitts의 P2KP1'K 돌연변이체가 혈장 시스템내 APC를 억제할 수 있는지를 조사하기 위해, 본 발명자들은 변형된 트롬빈 생성 분석(TGA)을 사용하였다. 트롬빈 생성은 재조합 가용성 트롬보모듈린(TM)의 존재 및 부재하에 인간 풀링된 정상 혈장(NP)내에서 측정되었다. 상기 TM이 발현되고, HEK-EBNA 발현 시스템으로부터 정제되었으며, 및 가용성 세포외 도메인을 포함한다. TM은 생리적으로 막관통 단백질이고, 내피세포막 상에 존재하고, 및 대부분 혈장으로부터 부재하기 때문에, TGA내에 정상적으로 존재하지 않는다. 따라서, 정상 TGA 또는, 혈장을 사용하는 다른 응고 분석들, 예컨대 PT 및 aPTT 분석들에서 PC 경로는 활성화되지 않는다. 이 분석에 TM을 가하여, PC 활성화를 가능하게 함으로써, 생체내 트롬빈 생성을 보다 사실화할 수 있게 되었다. 도 6 및 7에 도시된 분석들은 George King Biomedical제 풀링된 정상 인간 혈장(NP)에서 수행하였다. 외인성 경로를 통해 응고를 활성화하기 위해, CaCl_2 및 TF/인지질(RB 낮은 TF 및 인지질 제제, Technoclone)을 첨가하여, 응고를 개시하였다. 플루오로제닉 기질(Z-Gly-Gly-Arg-AMC)을 분열시켜, 트롬빈 생성을 측정하였다. Technothrombin 보정 키트(Technoclone)를 사용하여, 공지 농도의 트롬빈에 대한 형광 유닛을 보정하여, 형광 유닛들을 트롬빈 농축물로 전환하였다.

[0257] 풀링된 정상 혈장에 TM을 가하면 농도-의존성 방법에서 트롬빈 생성이 감소되었다. 이 실험으로부터, 본 발명자들은 트롬빈 생성을 중간 수준(최종 분석 농도 1.25nM TM) 또는 낮은 수준(최종 분석 농도 10nM TM)으로 낮추기 위해, 2개의 TM 농축물을 선택하였다. 혈장내 APC를 억제하기 위한 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K의 능력을 평가하기 위해, 상기 농축물을 이후 분석들에 사용하였다.

[0258] 정상 인간 혈장(NP)에 FL α_1 AT Pitts C232S를 첨가하면, 트롬빈 뿐만 아니라 fXa의 억제제로 인해, 사용된 모든 농도에서 트롬빈 생성이 감소되었다(도 6). 이와 대조적으로, FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K는 TM의 부재하에 NP에 어떠한 영향도 미치지 않았다(도 7A). 그러나, TM의 존재하에, FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K는 트롬빈 생

성을 투여량-의존적으로 억제하였다(도 7B-D). 이 효과는 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K에 의해 APC를 특이적으로 억제한 결과이다.

[0259] 기준선 조건(오로지 RB 촉발제만)에서, 인자 결핍 혈장에서 트롬빈 생성이 검출될 수 없었기 때문에, fVIII- 또는 fIX-결핍 혈장에서 같은 실험들을 수행하기 위해, 분석을 개시하는데 사용되는 조직 인자(TF)의 양을 증가시킬 필요가 있다. 트롬빈 생성에 TF 증가가 미치는 효과를 입증하기 위해, 기준선 조건에서 분석을 촉발시키기 위해 사용된 RB 제제에 더해, TF 제제(Dade Innovin, Siemens)의 다른 희석액을 반응들에 첨가(spike)했다. Innovin 제제내 TF의 농도는 제조사에 의해 개시되지 않지만, 종래의 측정들은 약 7.36nM인 것으로 나타났다(Duckers *et al*, 2010). TF 촉발제를 증가시키면, 지체-시간이 단축되고, 인간 NP, fVIII-결핍(HA) 및 fIX-결핍(HB) 혈장내 트롬빈 및 내인성 트롬빈 포텐셜(ETP) 모두 증가된다. 상기 실험들로부터, 본 발명자들은 트롬빈 생성을 개시하기 위한 최종 반응에서, 1:4,000의 Innovin 희석을 선택하였다. 분석에 인지질을 첨가할 필요성 때문에, 인지질 및 TF를 모두 함유하는, RB 제제들을 가하였다.

[0260] 인자-결핍 혈장을 사용하는 데는 분석 변수를 변형시킬 필요가 있으므로, 본 발명자들은 1:4,000 Innovin을 첨가함으로써 인간 HA 혈장내 인간 정상 풀링된 혈장에 대하여 TM 적정 실험을 반복하였다. George King Biomedical 제 인간 fVIII-결핍 혈장(1% 미만의 fVIII 활성)에서 분석을 수행하였다. 외인성 경로를 통해 응고를 활성화하기 위해, Dade Innovin(Siemens)의 1:4,000 최종 희석된 CaCl_2 및/또는 TF/인지질(RB 낮은 TF 및 인지질 제제, Technoclone)을 가함으로써, 응고가 개시되었다. 플루오로제닉 기질(Z-Gly-Gly-Arg-AMC)을 분열시킴으로써, 트롬빈 생성을 측정하였다. Technothrombin 보정 키트(Technoclone)를 사용하여, 공지된 농도의 트롬빈에 대하여 형광 유닛들을 보정함으로써, 형광 유닛들을 트롬빈 농축물로 전환시켰다. 트롬보모듈린(TM)은 fVIII-결핍 혈장(HA)내 트롬빈 생성 분석(TGA)에서 트롬빈 생성을 감소시키는 것으로 밝혀졌다.

[0261] 본 실험으로부터, 이후 실험들을 위해 1.25nM 및 5nM TM을 선택하였다. 사용된 분석조건하에 HA 혈장내 총 트롬빈 생성이 주로 낮아졌기 때문에, 사용된 높은 TM 농도는 NP에 대한 것보다 낮아졌다.

[0262] HA 및 HB 혈장에 FL α_1 AT Pitts C232S 및 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K 모두 미치는 효과들은 풀링된 NP로부터 얻은 결과에 필적했다. HA(fVIII-결핍) 및 HB 혈장(fIX-결핍)모두에서 TM의 존재 및 부재하에, FL α_1 AT Pitts는 트롬빈 생성을 억제하였다(도 8). fVIII- 및 fIX-결핍 혈장 모두에서 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K는 트롬빈 생성에 TM이 미치는 효과를 억제할 수 있었으며, TM의 부재하에는 어떠한 효과도 없었다(도 9 및 10). 이는 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K가 APC를 억제할 수 있고, 및 인자-결핍 혈장에서 응고촉진 효과를 가짐을 가리킨다. 이는 그것이 혈전 형성을 잠재적으로 촉진할 수 있고, 혈우병 환자들의 출혈을 감소시킬 수 있음을 의미한다. 본 응고촉진 효과의 규모는 단백질 C 시스템이 생체내 트롬빈 생성 감소에 대한 상대적 기여도에 의해 측정될 것이다. 본원에 설명된 시험관내 실험들은 상기 생체내 돌연변이체의 유사 효과를 예측하는데 사용될 수 없지만, 이들은 복잡한 혈장시스템에서, FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K가 APC를 억제할 수 있고, 및 응고촉진 경로를 방해하지 않고, 상기 효과들이 fIX 및 fVIII의 존재 또는 부재와 무관하다는 점을 보여준다.

[0263] 본 발명의 시험관내 데이터를 확인하기 위해, 혈우병의 생체내 마우스 모델들을 사용하고자 했다. 그러나, 마우스 혈장에 미치는 인간 α_1 AT의 효과가 본 발명자들이 인간 혈장에서 나타난 효과와 대조가능함을 확인하기 위해, 마우스 혈장내에서 TGA를 첫번째로 수행하였다. 이는 변형된 TGA 프로토콜을 사용하여 수행되었다(Bunce *et al*, 2011; Ivanciu *et al*, 2011). 표준 조건하에서, TGA 분석들을 방해하는 마우스 혈장내 억제 단백질들의 증가된 농도때문에, 이러한 변형들은 필수였다(Tchaikovski *et al*, 2007; Bunce *et al*, 2011; Ivanciu *et al*, 2011). 인간 시스템과 필적하여, 분석의 기준선 조건하에 HB 마우스 혈장내 트롬빈 생성이 없었다. 따라서, 본 발명자들은 다른 농도의 Innovin에서 적정 스파이킹(titration spiking)을 실시하였다. 1:12,000 Innovin의 농도를 이후 분석을 위해 선택하였다.

[0264] 첫과 TM은 사용할 수 없기 때문에, 본 발명자들은 마우스 TGA 분석에서 APC 형성을 촉진하기 위해 인간 혈장 TGA에 사용되었던 가용성 인간 TM을 사용하였다. HB 마우스 혈장에서 인간 TM의 임의의 효과를 보기 위해 요구되는 농도는 인간 혈장내에서 보여지는 것보다 ~ 100-배 이상이었다. 이는 마우스내에 주입된 인간 TM이 첫과 PC를 활성화할 수 있는 능력을 축소시킴을 보여준다는 관찰에 의해 설명될 수 있었다.(Raife *et al*, 2011). 이는 인간 TM이 첫과 TM보다 첫과 PC 활성화를 촉진한다는 점에서 덜 강력하다는 것을 가리켰다. 750nM 인간 TM의 농도를 이후 실험에 사용하였다.

[0265] 그후, 마우스 혈장내 상기 돌연변이체들의 효과와 인간 혈장내 이전 TGA 결과를 대조하기 위해, TM의 부재 및

존재하에, 다른 농도의 FL α_1 AT Pitts C232S 및 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K 모두 마우스 HB 혈장내 결정된 조건으로 첨가되었다.

[0266] 인간 혈장내에서 보여지는 바와 같이 TM의 부재하에, FL α_1 AT Pitts C232S는 마우스 HB 혈장내 트롬빈 생성을 감소시켰다(도 11A). 그러나, 최저 α_1 AT 농도에서 TM의 존재하에, 트롬빈 생성의 일부 구제가 있었다(도 11B). 이는 인간에서 보여지는 비율들과 대조되는 FL α_1 AT Pitts에 의한 췌장과 트롬빈 및 췌장과 APC의 상대 억제 비율에 있어서의 차이로 인해 잠재적일 수 있으며, 상기 생성된 APC는 트롬빈 억제 이전에 억제된다. FL α_1 AT Pitts C232S의 농도가 모든 APC가 억제된 수준으로 증가될때, 트롬빈도 또한 억제된다. 이는 도 11B에 도시된 결과들을 설명할 수 있지만, 추가로 조사되지는 않았다. FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K는 인간 혈장내에 했던 것과 같이, TM 첨가에 의해 녹다운된 트롬빈 생성을 구제하였다(도 11D). 그러나, FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K가 TM의 부재하에 HB 마우스 혈장에 첨가될때, 트롬빈 생성 증가가 또한 관찰되었다(도 11C). 이 효과는 이러한 실험들에 대하여 사용된 혈액 수집 방법과 관련있을 수 있다. 혈장을 수집하기 위해, 꼬리를 절단하고, 혈액을 시트레이트로 수집하였다. 그후, 이를 스핀다운시키고, 혈장을 제거하고, 동결시켰다. 혈액수집을 위해 가해진 손상은 응고 시스템을 활성화시키고, 실험 이전에 혈장내 APC의 생성을 일으킬 수 있다. 또한, 마우스는 그의 혈장내에 PCI를 가지지 않으며(Zechmeister-Machhart et al, 1996), 이는 APC의 순환 반감기를 증가시켜서, TGA 분석전에 불활성화되지 않는다. 본 발명에서 배제될 수 없는 대체 설명은 마우스 혈장내 오프-타겟 응고촉진 효과였다. 그러나, 이러한 효과는 인간 혈장내에서 보여지지 않기 때문에, 이는 마우스-특이적 항응고 프로테아제의 억제를 포함하였다.

[0267] FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K의 잠재적인 생체내 효과를 조사하고, 혈우병에 대한 예방제 또는 치료제로서 잠재적으로 사용될 수 있는지를 결정하기 위해, 본 발명자들은 2개의 생체내 마우스 분석들; 꼬리 클립 및 거고근 세동맥 레이저 손상 모델을 사용했다. 사용된 마우스는 BALB/c 배경의 수컷, FIX 녹아웃 마우스였다(Lin et al, 1997; Ivanciu et al, 2011).

[0268] 꼬리 클립 분석에서, 꼬리 정맥을 통해 단백질 또는 버퍼를 주입하고, 5분 배양기간후, 꼬리를 직경 3mm로 절단하고, 37°C 수조내 14ml 37°C 식염수 용액에 넣었다. 혈액을 10분간 수집하고, 및 575nm에서 흡광도를 측정함으로써, 적혈구 분해후 총 헤모글로빈을 측정함으로써, 얻은 혈액 손실을 정량화하였다(Ivanciu et al, 2011). 꼬리 절단에 의해 수집된 공지 용량의 혈액을 꼬리 클립 샘플과 유사한 방법으로 처리하는 표준 곡선을 생성함으로써, 총 혈액 손실을 계산하였다. 적혈구 분해후, 575nm에서의 흡광도를 측정하고, 용량 혈액 손실에 대하여 플롯팅하여, 표준 곡선을 생성하였다. 꼬리 클립 분석들은 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K의 강력한 응고촉진 효과를 나타냈다(도 12). 15mg/kg의 투여량에서, HB 마우스내 혈액 손실을 PBS 주입된 WT 마우스의 레벨로 회복하였다(도 12). 낮은 투여량의 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K는 또한, 통계적으로 중요하지 않더라도, HB 마우스에 관해 출혈 감소 경향을 나타냈다. FL α_1 AT Pitts C232S는 7.5mg/kg에서 혈액 손실에 중요한 효과를 나타내지 않았다.

[0269] 응혈촉진제를 평가하기 위해 사용된 다른 생체내 모델은 생체내 거고근 세동맥 레이저-유도 손상 모델이다(Falati et al, 2002). 본 시스템에서, 캐놀라가 마우스 경정맥에 삽입되어, 치료 단백질 뿐만 아니라 형광-태그된 항체들을 피브린 및 혈소판에 주입시킨다. 그후, 이미징을 위해 거고근 근육을 넓게 찢었다. 형광 현미경 검사법을 사용하여 세동맥에 레이저-유도 손상후 혈전 형성을 이미징하고, 정량화한다.

[0270] 전체적인 질적 평가를 위해, 손상들을 3개의 카테고리로 분류하였다: 혈전 없음(형광이 검출되지 않음), 혈소판 혈전(혈소판만 볼 수 있음, 이러한 혈전들은 일반적으로 불안정하며, 및 이미징 과정동안 용해됨) 및 혈소판 + 피브린(혈소판 및 피브린 형광을 볼 수 있으며, 이미징 과정동안 혈전이 안정적으로 남아있음). 이는 증가된 농도의 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K에 의해 안정적인 혈소판 및 피브린 혈전 형성이 투여량-의존적으로 증가되었음을 보여주었다(도 13). 혈소판 및 피브린 형광에 대하여 모든 이미지들을 정량화하였다. 각 시간지점에 대한 중간값을 계산하고, 그 결과를 도 14에 플롯팅하였다. 도 13에 개시된 이들의 카테고리과 무관하게, 상기 데이터는 모든 이미지들로부터의 정량화를 포함했다. 중간값의 플롯들은 대조군 또는 FL α_1 AT Pitts C232S 주입된 마우스가 혈전형성을 나타내지 않은 반면, 고투여량 및 저투여량 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K가 손상부위에서의 혈소판 응집 및 피브린 퇴적을 나타냈다는 것을 보여준다. 혈소판 응집의 관점에서 두 투여량사이에 차이점이 검출될 수 없었다. 피브린에 대하여, FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K에 대한 피브린 퇴적이 투여량-의

존적으로 증가하고, 대조군 또는 FL α_1 AT Pitts C232S 주입된 마우스에 대한 피브리노겐이 없었다(도 14).

[0271] 이를 종합하면, 상기 결과들은 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K가 혈우병의 *시험관내* 분석 및 *생체내* 모델 모두에서 응혈촉진 효과를 가짐을 보여준다. *생체내* 실험들은 모두 혈우병 B의 마우스 모델에서 수행하였지만, 인간 혈장(도 9 및 10) 및 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K의 제시된 작용기작에 있어서 TGA 결과들은 그의 응혈촉진 효과가 fIX 또는 fVIII 결핍과 관계없어야 하고, 따라서 혈우병 A 및 B 모두에 사용될 수 있어야 함을 나타낸다. *생체내*에서 보여지는 응혈촉진 효과는 출혈을 WT 마우스에서 보여지는 것과 같은 레벨로 감소시키기에 충분했으며(도 12) 이는 APC를 억제하는 세르핀이 기존 치료에 대한 예방제 또는 보조제 뿐만 아니라, 출혈 장애의 치료에 사용될 수 있음을 가리킨다.

[0272] α_1 AT 스캐폴드 상에 잠재적인 추가의 APC 특이적 돌연변이체를 분석하기 위해, 타겟팅된 무작위 돌연변이생성 전략도 또한, α_1 AT 스캐폴드 상에 사용하였다.

[0273] FL α_1 AT Pitts C232S 배경 상에서 3개의 다른 α_1 AT 변종 라이브러리들이 생성되었다: P2에서의 하나의 임의 라이브러리, P1'에서의 하나의 임의 라이브러리 및 P2 및 P1'에서의 제3 임의 라이브러리. 얻은 플라스미드 라이브러리들은 Rosetta2(DE3)pLysS 발현 균주로 형질전환되었으며, 및 96-웰 플레이트에서 단백질이 발현되었다. 세균이 분해되고, 트롬빈 및 APC 억제에 대하여 분해물을 분석하였다.

[0274] 단일 변종 라이브러리에 대하여, 라이브러리당 88개의 콜로니들이 분석되었다. 이중(P2P1') 변종 라이브러리에 대하여, 460개의 콜로니들이 분석되었다. FL α_1 AT Pitts 및 FL α_1 AT Pitts P2KP1'K(납 APC 특이적 변종들)가 참고로서 모든 분석 플레이트 상에 발현되었다. P2KP1'K α_1 AT와 대조적으로, 높거나 또는 같은 APC 억제활성(낮거나 또는 같은 잔류 APC 활성) 및 낮거나 또는 같은 트롬빈 억제 활성(높거나 또는 같은 잔류 트롬빈 활성)은 트롬빈 이상으로 APC에 대하여 특이적인 변종들에 대한 후보물질로 간주되었다. 후보물질 변종들의 서브셋을 선택하여, 같은 설정에서 재-분석하여, 제1 스크린으로부터의 결과를 확인하였다. 그후 두 분석들에서 유사한 특성들을 나타내는 돌연변이체들을 서열화하였다. 얻은 서열들은 표 9에 도시되어 있다. 트롬빈 이상으로 APC에 대하여 특이적인, 돌연변이체들을 선택할 수 있는 본 분석의 능력을 확인하기 위해, 표 9에서 확인된 9개의 변종들은 *E. coli*에서 대규모로 발현되고, 정제되었다. 그후, 트롬빈 및 APC와 관련된 억제의 2차 비율 상수를 각 돌연변이체에 대하여 측정하였다. 결과들은 표 10에 개시되어 있다. 이러한 결과들은 시험된 모든 변종들이 FL α_1 AT Pitts C232S 변종과 달리 트롬빈에 대한 것보다 APC에 대하여 더 높은 특이성을 가졌음을 확인하였다.

[0275] 두 P2 및 P1' 위치들에서 특정 종류의 잔기들이 α_1 AT Pitts 스캐폴드에 유리했다(표 9). 특이성은 주로, P2 및 P1'에서 벌키 극성(Q, N, Y) 벌키 소수성(W) 또는 양하전된 잔기들(R, H, K)의 존재에 의해 수여되었다. 상기 위치들에서 보여지는 다른 잔기들은 C, A, T, S 및 V를 포함했다. 상기 중간 내지 작은 잔기들은 다른 위치에서, 상보적 큰 양하전된 잔기(R, K) 또는 큰 극성 잔기(Y, N, Q)에 의해 이중 변종 라이브러리에 동반되었으며, 이는 비슷하게 특이성 교체에 큰 영향을 미쳤다. 그러나, 특히 P1'이 R인 경우 마찬가지로 상기 돌연변이들의 협력 효과가 있을 수 있다. P1'R은 단일 변종 라이브러리 스크린에서 다양한 결과들을 나타냈으며, 및 일부 잔류 트롬빈 억제활성을 가질 수 있다. P2 P는 기질의 트롬빈 분열에 중요한 것으로 알려져 있다(Gallwitz *et al.*, 2012). P1'에서 특이성 교체 변이에 결합된 상기 잔기를 간단하게 제거하는 것은 적은 잔류 트롬빈 억제활성을 갖는 APC 특이성 억제인자를 생성하기에 충분할 수 있다. 특히, P2에서 T는 P1'에서의 동반 잔기들(Q, N, Y, R)외에 그 자체로 일부 효과를 가지며, R만 그 자체를 특이적으로 교체하기에 충분한 단일 잔기 P1' 변종 라이브러리로 확인되었다.

[0276] 흥미롭게도, α_1 AT Pitts 대조군 주위에서 클러스터링된 비-특이적 돌연변이체들은 대부분 α_1 AT Pitts인 것으로 나타났다. 모두 트롬빈 억제활성을 유지하는데 중요함을 보여주는 P2 P를 보유하였다. P1'은 보다 가변적이었으며, P1' 변종 라이브러리내 돌연변이체들의 분포와 일치된다. P2 및 P1' 라이브러리들 내 변종들의 확산을 비교하면, 트롬빈은 P2 돌연변이보다 P1'에 보다 관용적인 것 같다. 그러나, 단일 변종 라이브러리내에 존재하지 않는 이중 변종 라이브러리내 유리한 잔기들의 외관은 상기 잔기들이 특이성에 미치는 효과들이 협력적일 수 있으며, 증가된 특이성으로 이중 돌연변이가 단일 돌연변이보다 더 효과적일 수 있음을 보여준다.

[0277] 위에 나타난 무작위 돌연변이생성 결과들은 이미 확인된 리신 돌연변이체들과 다른 트롬빈 이상으로 APC에 대하여 특이성을 나타낸 돌연변이체들을 생성시킬 수 있었음을 보여주었다. 지금까지, 무작위 돌연변이 생성 전략이 사용되었으며, 트롬빈 이상으로 특이성을 한번 얻었다는 가정하에, 상기 돌연변이체들은 또한 다른 응고촉진 프

로테아제 이상으로 APC에 대한 특이성 정도를 나타냈다. 이것을 시험하기 위해, 표 10의 무작위 돌연변이체들의 PT 및 aPTT를 시험하였다. 이러한 결과들은 표 11에 나타나 있다. FL α_1 AT Pitts C232S에 대하여 이전에 나타난 것과 달리, 어떤 돌연변이체들도 PT에 대하여 큰 효과를 가지지 않았다(도 4). 이는 돌연변이체들이 응고촉진 프로테아제에 대한 그들의 억제활성을 크게 손실했다는 의미를 제공한다. 그러나, aPTT는 억제인자의 존재에 대하여 보다 민감하다. 따라서, aPTT를 측정하면, 더 적은 잔류 억제를 보다 정확하게 나타낼 수 있었다. 이전의 실험들(도 5)은 FL α_1 AT Pitts C232S가 aPTT 분석에서 혈장을 응고될 수 없게 한다는 것을 보여주었다. 이와 대조적으로, 본원에서 평가된 돌연변이체들 중 하나만 이러한 효과를 나타냈다(P2TP1'N). 일부 돌연변이체들, 예컨대 P2KP1'H 및 P2KP1'N은 aPTT의 비교적 작은 연장만 나타냈으므로, 잠재적으로 중요하다.

[0278] 이러한 결과들로부터, 본 발명자들은 4개의 돌연변이체들 P2R, P2QP1'K, P2KP1'H and P2KP1'N을 선택하였다(모두 Pitts 상에서, P1R 배경). 이들은 트롬빈보다 높은 APC 억제(표 10) 및 aPTT의 낮은 연장(P2KP1'H 및 P2KP1'N)을 나타냈다. 이들은 PT를 연장하지 않았기 때문에, TF:fVIIa를 억제하지 않을 것 같다. aPTT를 연장하기 위한 가장 가능성이 큰 후보들은 fXIa 또는 fXa의 억제이다. 이들 중에서, fXa 억제는 초기 응고단계들을 가장 억제했으며, 따라서 성공적인 억제인자를 위한 보다 중요한 장벽인 것으로 고려된다. 따라서, 상기 4개의 돌연변이체들에 의해 fXa를 억제하기 위한 억제 상수들은 위에 설명한 바와 같이 측정되었다(표 12). P2R은 fXa의 큰 억제를 나타냈으며, 이는 aPTT의 연장이유가 될 수 있다. 다른 3개의 돌연변이체들은 더 낮은 fXa 억제를 나타냈지만, 그 어떤 돌연변이체들도 이전에 확인된 P2KP1'K 돌연변이체로서 특이적이지 않았다. 그럼에도 불구하고, P2KP1'N, P2QP1'K 및 P2KP1'H는 트롬빈 및 fXa보다 APC에 대하여 특이성을 나타내므로 추가 개발을 위한 추가의 유망한 후보물질들을 대표한다. 게다가, APC의 억제는 초반에 설명된 P2KP1'K 돌연변이체에 관하여 거의 2배 증가된다. 이는 약간 감소된 특이성에 대한 부분적인 보상으로 억제를 더 빠르게 한다.

[0279] 그러나, 이러한 결과들은 트롬빈보다 APC에 대한 특이성을 선택하는 것이 fXa 및 다른 응고촉진 프로테아제에 대한 특이성을 나타내는 억제인자를 디자인하기에 완전히 충분하지 않다. 따라서, 무작위 돌연변이생성 전략이 더 확대되었다. 트롬빈 이상으로 APC에 대한 특이성을 위해 이전에 선택된 돌연변이체들은 낮은 트롬빈 억제 및 APC 억제를 유지하면서, 선택된 fXa 및 돌연변이체들에 대하여 제스크리닝되고, fXa 억제를 감소시켰다.

[0280] 본 추가의 스크린으로부터 4개의 추가 돌연변이체들을 확인하였다. 이들은 모두 P1R 돌연변이를 가졌으며, 게다가 P2RP1'A, P2RP1'Q, P2WP1'I 또는 P2WP1'H를 가졌다. 상기 돌연변이체들의 특이성을 확인하기 위해, 오직 하나의 세르핀 농축물을 사용하고, 그의 트롬빈 및 fXa 억제를 시험하여, 초기 실험을 수행하였다. 트롬빈 및 fXa의 낮은 억제에 기초하여 돌연변이체들이 선택되었기 때문에, 본 단계에서 APC 억제는 고려되지 않았다. 세르핀 및 프로테아제를 다른 시간동안 지시된 시간지점에서 배양하고, 과량의 발색 기질을 가하여 반응을 정지시켰다. 잔류 프로테아제 활성을 초기 프로테아제 활성 및, 시간에 대하여 플롯팅된 이 값의 자연 로그로 세분화되었다(도 15). 세르핀 농도로 나눈 이 선의 기울기는 억제체의 2차 비율 상수의 추정치를 제공한다. 이러한 분석들은 모든 돌연변이체들이 트롬빈을 거의 억제하지 않은 반면, (FL α_1 AT Pitts C232S의 억제 상수, $2.928 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 와 대조되는) $\sim 50.3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 2차 비율 상수를 갖는 가장 빠른 억제인자, P2WP1'H를 가졌음을 보여주었다. 그러나, P2RP1'A, P2WP1'I 및 P2WP1'H는 fXa의 큰 억제를 나타냈다. 2차 비율 상수는 FL α_1 AT Pitts C232S와 대조되는 상기 돌연변이체들에 대하여 ~ 10 -배만 감소되었다(FL α_1 AT Pitts C232S에 대한 $4.13 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 와 대조되는, P2RP1'A에 대한 $4,070.1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). P2RP1'A, P2WP1'I 및 P2WP1'H는 서로 유사한 fXa 억제를 나타냈다.

[0281] 1개의 돌연변이체만 트롬빈 및 fXa 모두에 대하여 큰 선택성을 나타냈다. 이 돌연변이체는 Pitts(P1R) 돌연변이에 더해, P2RP1'Q를 가졌다. 그의 선택성 때문에, 보다 철저한 조사가 흥미있었다. 무작위 및 합리적인 돌연변이생성 연구들로부터의 종래 결과들은 R 및 K가 상당히 유사하게 수행됨을 가리킨다. 따라서, 본 발명자들은 본 명세서에 유사한 특성들을 갖는 것으로 개시된 결과들로부터 기대되는 것처럼 P1R 배경 상에서 P2KP1'Q 돌연변이체를 생성하였다. 두 돌연변이체들에 대한 억제상수 및 aPTT(상기 설명된 바와 같이 수행된 실험)의 측정들의 결과들은 표 13에 개시되어 있다. P2KP1'K 돌연변이체는 대조를 위해 개시되어 있다. 두 P2KP1'Q 및 P2RP1'Q는 트롬빈 및 fXa의 매우 낮은 억제를 나타냈다. 게다가, aPTT에 거의 어떠한 효과도 있지 않았다. APC 억제는 크며, P2KP1'K와 비교하여 약간만 감소되었다. 따라서, 이들 두 돌연변이체들은 P2KP1'K와 유사하게 수행될 것으로 기대되었으며, 추가 개발을 위한 다른 잠재적으로 유망한 대체 분자들을 대표할 수 있다.

[0282] 본 발명자들은 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K에 의한 쪼개 트롬빈 및 APC의 억제를 평가하였다. 트롬빈 및 APC는 재조합 공급원으로부터 얻었다. APC(Gla-도메인없는 APC)에 대한 EGF2-프로테아제 도메인 및 트롬빈에 대한

프로테아제 도메인만을 포함하는, 사용된 프로테아제를 혈장 버전에 관해 절단하였다. 따라서, 본 발명자들은 또한 임의의 차이가 구성 차이보다는 종류 차이로 인한 것임을 확신하기 위해 상기 프로테아제들의 인간 버전들을 시험하였다. 인간 및 췌장 트롬빈은 SDS-PAGE에 의한 FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K와 거의 없거나 매우 작은 반응성을 나타냈으며, 이는 이와 관련하여, 모델 시스템으로부터의 결과가 인간 시스템과 관련되어 있음을 가리킨다. 억제제의 2차 비율 상수는 인간 혈장 APC에 대하여 $(14.88 \pm 1.87) \times 10^3 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 인 것과 대조적으로, 인간 Gla-도메인없는 APC에 대하여, $(8.14 \pm 0.58) \times 10^3 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 이고, 췌장 Gla-도메인없는 APC에 대하여 $(3.80 \pm 0.37) \times 10^3 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 이었다. 이러한 결과들은 마우스 모델내 돌연변이체의 반응성이 인간에서보다 낮기 쉽고, 즉 같은 효과를 위한 상대적인 투여량이 더 높을 필요가 있고, 프로테아제 억제제의 관점에서 효과가 유사하기 쉽다는 의미를 제공하였다.

[0283]

현 데이터는 매우 적은 돌연변이만을 사용하여, 특이적 APC 억제인자를 생성하는데 세르핀 스캐폴드가 사용될 수 있고, 이러한 억제인자들이 *시험관내* 및 *생체내*에서 응고촉진 활성을 가질 수 있는 점을 원리-증명으로서 나타내며, 혈우병과 같은 출혈 장애의 치료 및 예방을 위한 응고촉진 제제로서 유망함을 보여준다.

[0284]

참고문헌

Berntorp E (2009) *Haemophilia* 15: 3-10
 Bertina RM, et al (1994) *Nature* 369: 64-67
 Bohn RL et al (2004) *Haemophilia* 10: 63-68
 Bolton-Maggs PHB & Pasi KJ (2003) *Lancet* 361: 1801-1809
 Brettler DB (1996) *Baillieres Clin. Haematol.* 9: 319-329
 Brummel-Ziedins KE et al (2011) *J. Thromb. Haemost.* 9: 2262-2267
 Bunce MW et al (2011). *Blood* 117: 290-298
 Butenas S et al (2006) *J. Thromb. Haemost.* 4: 2411-2416
 Carrell R et al (1985) *Trends in Biochemical Sciences* 10: 20-24
 Chuansumrit A et al (2000) *Haemophilia* 6: 61-65
 De Nanteuil G et al (2006) *J. Med. Chem.* 49: 5047-5050
 Di Minno MND et al (2010) *Haemophilia* 16: e190-201
 DiMichele D (2007) *J. Haematol.* 138: 305-315
 Duckers C et al (2010) *Blood* 115: 879-886
 Elisen MGLM et al (1998) *Blood* 91: 1542-1547
 Escobar MA (2010) *Haemophilia* 16 Suppl 3: 29-34
 Escobar M & Sallah S et al (2013) *J. Thromb. Haemost.* 11, 1449-1453.
 Falati S et al (2002) *Nat. Med.* 8: 1175-1181
 Fortenberry YM et al (2011) *J. Thromb. Haemost.* 9: 861-863
 Franchini M & Lippi G (2010) *Thrombosis Research* 125: 119-123
 Fukudome K et al (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 17491-17498
 Gallwitz et al (2012) *PLoS ONE* 7(2): e31756
 Gettins PGW (2002) *Chem. Rev.* 102: 4751-4803
 Gringeri A et al (2003) *Blood* 102: 2358-2363
 Haya S et al (2007) *Haemophilia* 13 Suppl 5: 52-60
 Heeb MJ & Griffin JH (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 11613-11616
 Heeb MJ et al (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 2365-2369
 Hopkins et al (1993) *Biochemistry* 32: 7650-7657
 Hua B et al (2009) *Haematologica* 94: 881-884
 Huntington JA et al (2000) *Nature* 407: 923-926
 Irving et al (2000) *Genome Res.* 10: 1845-1864
 Ivanciu L et al (2011) *Nat. Biotechnol.* 29: 1028-1033
 Kalsheker N (1989) *Biosci. Rep.* 9: 129-138
 Laurell CB et al (1977) *Clin Sci Mol Med* 52: 457-461
 Laurell M et al (1990) *Blood* 76: 2290-2295
 Lee M et al (2006) *Haemophilia* 12 Suppl 3: 1-7
 Li W & Huntington JA (2008) *J. Biol. Chem.* 283: 36039-36045
 Li W et al (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 4661-4666
 Lin HF et al 1997) *Blood* 90: 3962-3966
 Lowe, G.D. & Ludlam, C.A. (2008) *J. Thromb. Haemost.* 6, 1982-1983.
 Lu D et al (1996) *Blood* 87: 4708-4717
 Mannucci PM (2003) *J. Thromb. Haemost.* 1: 1349-1355
 Mannucci PM (2008) *Haemophilia* 14 Suppl 3: 10-18
 Mather T et al (1996) *EMBO J* 15: 6822-6831
 Meijers JC et al 1988) *Biochemistry* 27: 4231-4237
 Mosnier LO et al (2001) *Thromb. Haemost.* 86: 1057-1064
 Nagel K. et al (2011) *Haemophilia*, 17, 872-874.
 Negrier C et al (2006) *Haemophilia* 12 Suppl 6: 48-52- discussion 52-3
 Owen MC et al (1983) *N. Engl. J. Med.* 309: 694-698
 Pratt CW & Church FC (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 8789-8794
 Pratt CW et al (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 8795-8801
 Raife TJ et al (2011) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31: 2509-2517
 Schechter I et al (1967) *Biochem Biophys Res Comm* 27: 157-162
 Stearns-Kurosawa DJ et al (1996) *PNAS. U.S.A.* 93: 10212-10216
 Suzuki K et al (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 163-168

[0285]

Suzuki K et al (1984) *Journal of Biochemistry* 95: 187-195
 Tagariello, G et al (2009) *Blood*, 114, 779-784.
 Tchaikovski SN et al (2007) *J. Thromb. Haemost.* 5: 2079-2086
 Teitel JM (1999) *Haemophilia* 5 Suppl 3: 43-49
 Teitel, JM & Sholzberg, M (2013) *Blood Reviews* 27 103-109
 Turecek PL, et al (2004) *Haemophilia* 10 Suppl 2: 3-9
 Ullman M et al (2006) *Haemophilia* 12 Suppl 6: 74-9; discussion 79-80
 World Federation of Hemophilia (2011) 2010 WFH Global Survey Report
 Yamasaki M et al (2011) *EMBO Rep.* 12: 1011-1017
 Zechmeister-Machhart M et al (1996) *Immunopharmacology* 32: 96-98

[0286]

표 1

[0287]

억제의 2차 비율 상수 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			
변종	트롬빈	APC	억제 배율 APC/트롬빈
A22 WT PCI	28.21 ± 1.51	0.68 ± 0.032	0.02
A22 P1'K PCI	0.022 ± 0.0024	0.88 ± 0.074	40
A22 P2KP1'K PCI	$\sim 0.03^*$	0.28 ± 0.013	9.3
FL α_1 AT Pitts C232S	292.76 ± 17.60	108.16 ± 7.086	0.4
FL α_1 AT Pitts C232S P2K	0.051 ± 0.0028	64.82 ± 7.14	1,271
FL α_1 AT Pitts C232S P1'K	0.17 ± 0.017	95.66 ± 13.70	563
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K	4 h후 억제 없음	15.14 ± 1.68	트롬빈 억제 없음

표 2

[0288]

억제의 2차 비율 상수 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			
변종	트롬빈 + 헤파린	APC + 헤파린	억제 배율 APC/트롬빈
A22 WT PCI	1310.32 ± 218.72	564.47 ± 71.29	0.4
A22 P1'K PCI	0.017 ± 0.0019	321.54 ± 31.94	18914
A22 P2KP1'K PCI	$0.11 \pm 0.040^*$	146.38 ± 18.85	1331.7

표 3

[0289]

억제의 2차 비율 상수 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)		
변종	fXa	폴드 억제 APC/fXa
A22 WT PCI	10.31 ± 0.73	0.07
A22 P1'K PCI	0.52 ± 0.079	1.7
A22 P2KP1'K PCI	검출가능한 억제 없음	fXa 억제 없음
FL α ₁ AT Pitts C232S	41.33 ± 2.36	2.6
FL α ₁ AT Pitts C232S P2K	3.93 ± 0.31	16.5
FL α ₁ AT Pitts C232S P1'K	4.89 ± 0.16	19.6
FL α ₁ ATPitts C232S P2KP1'K	0.12 ± 0.010	126.2

표 4

[0290]

억제의 2차 비율 상수 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			
변종	fXIa	APC	APC/fXIa의 억제
A22 WT PCI	8.59 ± 0.43	0.68 ± 0.032	0.08
A22 P2KP1'K PCI	0.023 ± 0.0052	0.28 ± 0.013	12.2

표 5

[0291]

억제의 2차 비율 상수 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			
변종	트롬빈	APC	APC/트롬빈의 억제
A22 WT PCI	28.21 ± 1.51	0.68 ± 0.032	0.02
A22 P2KP1'K PCI	$\sim 0.03^*$	0.28 ± 0.013	9.3
A22 D8 PCI (P4QP2RP1'N)	0.084 ± 0.0016	1.00 ± 0.15	11.9
A22 4.H11 PCI (P4KP2RP1'H)	0.021 ± 0.0012	0.45 ± 0.15	21.4

A22 2.B10 PCI (P4SP2LP1'K)	0.016 ± 0.00090	0.43 ± 0.0086	26.9
A22 5.E12 PCI (P4HP2RP1'V)	0.023 ± 0.0021	0.26 ± 0.035	11.3

표 6

[0292]

억제의 2차 비율 상수 (mM ⁻¹ .s ⁻¹)			
변종	fXIa	APC	APC/fXIa의 억제
FL α ₁ AT Pitts C232S	398.88 ± 13.012	108.16 ± 7.086	0.3
FL α ₁ AT Pitts C232S P2KP1'K	0.47 ± 0.037	15.14 ± 1.68	32.2

표 7

[0293]

	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
WT	T	I	F	T	F	R	S	A	R	L
P2KP1'K	T	I	F	T	K	R	K	A	R	L
E7	T	I	S	T	H	R	R	A	R	L
E10	T	I	R	T	Q	R	V	A	R	L
E11	T	I	T	T	L	R	Y	A	R	L
D8	T	I	Q	T	R	R	N	A	R	L
H11	T	I	A	T	Q	R	Y	A	R	L

표 8

	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
WT	T	I	F	T	F	R	S	A	R	L
P2KPl'K	T	I	F	T	K	R	K	A	R	L
2.B10	T	I	S	T	L	R	K	A	R	L
3.B11	T	I	F	T	F	R	R	A	R	L
3.C3	T	I	V	T	R	R	I	A	R	L
3.E8	T	I	F	T	R	R	K	A	R	L
3.G10	T	I	C	T	L	R	K	A	R	L
3.G11	T	I	W	T	W	R	N	A	R	L
3.H11	T	I	W	T	W	R	N	A	R	L
4.E4	T	I	K	T	D	R	M	A	R	L
4.F7	T	I	F	T	V	R	K	A	R	L
4.F10	T	I	R	T	R	R	I	A	R	L
4.H7	T	I	G	T	I	R	R	A	R	L
4.H11	T	I	K	T	R	R	H	A	R	L
5.D2	T	I	T	T	R	R	V	A	R	L
5.E7	T	I	L	T	R	R	I	A	R	L
5.E12	T	I	H	T	R	R	V	A	R	L

표 9

	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
α_1 AT WT	L	E	A	I	P	M	S	I	P	P
α_1 AT Pitts	L	E	A	I	P	R	S	I	P	P
P2.G11	L	E	A	I	K	R	S	I	P	P
P2.F10	L	E	A	I	R	R	S	I	P	P
P2.D8	L	E	A	I	K	R	S	I	P	P
P2.G8	L	E	A	I	R	R	S	I	P	P
P2.E7	L	E	A	I	R	R	S	I	P	P
P2.D10	L	E	A	I	R	R	S	I	P	P
P2.G4	L	E	A	I	R	R	S	I	P	P
P2.F4	L	E	A	I	R	R	S	I	P	P
P1'.H8	L	E	A	I	P	R	E	I	P	P
P1'.A11	L	E	A	I	P	R	R	I	P	P
P1'.F10	L	E	A	I	P	R	E	I	P	P
P1'.F9	L	E	A	I	P	R	K	I	P	P
P1'.F4	L	E	A	I	P	R	E	I	P	P
4.G9	L	E	A	I	T	R	N	I	P	P
4.G4	L	E	A	I	Q	R	K	I	P	P
3.E5	L	E	A	I	R	R	A	I	P	P
3.B6	L	E	A	I	S	R	R	I	P	P
3.B2	L	E	A	I	K	R	N	I	P	P
3.A10	L	E	A	I	T	R	Y	I	P	P
2.H1	L	E	A	I	R	R	H	I	P	P
2.C6	L	E	A	I	T	R	R	I	P	P
1.H10	L	E	A	I	V	R	R	I	P	P
1.B11	L	E	A	I	R	R	C	I	P	P
1.A12	L	E	A	I	K	R	H	I	P	P
2.E5	L	E	A	I	T	R	R	I	P	P
3.G9	L	E	A	I	Y	R	R	I	P	P
3.F4	L	E	A	I	A	R	R	I	P	P
3.C9	L	E	A	I	C	R	K	I	P	P
2.H5	L	E	A	I	K	R	N	I	P	P
2.E7	L	E	A	I	W	R	N	I	P	P
1.B2	L	E	A	I	S	R	R	I	P	P
5.C12	L	E	A	I	H	R	N	I	P	P
5.A6	L	E	A	I	R	R	N	I	P	P
4.E1	L	E	A	I	P	R	K	I	P	P
4.C12	L	E	A	I	N	R	N	I	P	P
3.F8	L	E	A	I	T	R	M	I	P	P
3.C10	L	E	A	I	T	R	H	I	P	P
2.E8	L	E	A	I	K	R	S	I	P	P
1.H9	L	E	A	I	T	R	Q	I	P	P

[0295]

표 10

[0296]

억제의 2차 비율 상수 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			
변종	트롬빈	APC	APC/트롬빈의 억제
FL α_1 AT Pitts C232S	292.76 \pm 17.60	108.16 \pm 7.086	0.4
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K	4 h후 억제 없음	15.14 \pm 1.68	트롬빈 억제 없음
FL α_1 AT Pitts C232S P2R	0.042 \pm 0.0024	61.12 \pm 6.26	1455.2
FL α_1 AT Pitts C232S P1'R	0.68 \pm 0.068	131.57 \pm 13.32	193.5
FL α_1 AT Pitts C232S P1'E	0.15 \pm 0.015	2.99 \pm 0.29	19.9
FL α_1 AT Pitts C232S P2TP1'N	0.27 \pm 0.047	62.37 \pm 2.46	231.0
FL α_1 AT Pitts C232S P2TP1'Y	0.023 \pm 0.0014	5.70 \pm 0.83	247.8
FL α_1 AT Pitts C232S P2QP1'K	0.0038 \pm 0.0013	33.41 \pm 6.36	8792.1

FL α ₁ AT Pitts C232S P2KP1'H	2 h후 억제 없음	28.84 ± 3.05	트롬빈 억제 없음
FL α ₁ AT Pitts C232S P2KP1'N	0.015 ± 0.0026	37.80 ± 2.48	2520.0
FL α ₁ AT Pitts C232S P2RP1'C	0.034 ± 0.0094	24.55 ± 2.15	722.1

표 11

[0297]

변종	PT (s)	aPTT (s)
혈장	27.2 ± 0.8	60.3
FL α ₁ AT Pitts C232S P2K	27.0 ± 0.5	107.2
FL α ₁ AT Pitts C232S P1'K	27.1 ± 0.4	228.1
FL α ₁ AT Pitts C232S P2R	27.8 ± 0.4	111.6
FL α ₁ AT Pitts C232S P1'R	28.1 ± 0.5	287
FL α ₁ AT Pitts C232S P1'E	27.2 ± 0.4	84
FL α ₁ AT Pitts C232S P2TP1'N	29.5 ± 0.9	>300
FL α ₁ AT Pitts C232S P2TP1'Y	28.3 ± 0.8	185.4
FL α ₁ AT Pitts C232S P2QP1'K	27.9 ± 0.3	111.5
FL α ₁ AT Pitts C232S P2KP1'H	27.4 ± 0.9	77.8
FL α ₁ AT Pitts C232S P2KP1'N	27.8 ± 0.3	81.9
FL α ₁ AT Pitts C232S P2RP1'C	28.5 ± 0.6	ND

표 12

억제의 2차 비율 상수 (mm ⁻¹ .s ⁻¹)		APC/FXa 의 억제
번호	FXa	
FL α ₂ AT Pitts C232S	41.33 ± 2.36	2.6
FL α ₂ AT Pitts C232S P2KPl'K	0.12 ± 0.010	126.2
FL α ₂ AT Pitts C232S P2R	4.79 ± 0.58	12.8
FL α ₂ AT Pitts C232S P2QPl'K	1.082 ± 0.15	30.9
FL α ₂ AT Pitts C232S P2KPl'H	0.62 ± 0.040	46.5
FL α ₂ AT Pitts C232S P2KPl'N	0.91 ± 0.13	41.5

표 13

번호		억제의 2차 비율 상수 (mm ⁻¹ ·s ⁻¹)			aPTT (s)
		트롬빈	APC	FXa	
FL α ₁ AT Pitts C232S	292.76 ± 17.60	108.16 ± 7.086	41.33 ± 2.36	>300 (55.0 ± 3.8)	
FL α ₁ AT Pitts C232S P2Kp1'K	4 h 후 억제 없음	15.14 ± 1.87	0.12 ± 0.010	62.1 ± 4.2 (55.0 ± 3.8)	
FL α ₁ AT Pitts C232S P2Rp1'Q	0.0054 ± 0.0011	8.30 ± 1.11	0.13 ± 0.0067	55.1 ± 2.8 (49.3 ± 2.5)	
FL α ₁ AT Pitts C232S P2Kp1'Q	0.0029 ± 0.0015	9.00 ± 0.67	0.17 ± 0.010	53.9 ± 3.0 (49.3 ± 2.5)	

[0299]

[0300] 서열들

1 mqlfllllclv llspqgaslh rhhpremkkr vedlhvgatv apssrrdftf dlyralasaa
61 psqniffspv sismslamls lgagsstkmq ileglglnlq kssekelhrq fqqllqelnq
121 prdgfqqlslg nalftdlvvd lqdtfvksamk tlyladtfpt nfrdsagamk qindyvakqt
181 kgkivdlkn ldsnavvimv nyiffkakwe tsfnhkgtqe qdfyvtsetv vrvpmsred
241 qyhylldrnl scrvvgvpyq gnatalfilp segkmqqven glsektlrkw lkmfkkrgle
301 lylpkfsieg syqlekvlp lgisnvftsh adlsgisnhs niqvsemvhk avvedesgt
361 raaaatgtif tfrsarlnsq rlvfnrpfml fivdnnilfl gkvnrp

[0301]

[0302] SEQ ID NO: 1 단백질 C 억제인자 (PCI)

[0303] 프로펩티드를 포함하는 성숙 단백질은 잔기들 20 내지 406에 대응한다. 신호 서열은 잔기들 1-19에 대응한다. 프로펩티드는 잔기들 20-25에 대응한다. RCL의 잔기들 P4, P2, P1 및 P1'은 볼드체이며, 밑줄이 그어져 있다.

1 mermplllal gllaagfcpa vlchpnspld eenltqenqd rgthvdlgla sanvdfafsl
61 ykqlvlkapd knvifspisi stalafslsg ahnttlteil kglkfnltet seaeihqsfq
121 hlrltlnqss delqlsmgna mfvkeqlsl1 drftedakrl ygseafatdf qdsaaakkli
181 ndyvkngrtg kitdlikdld sqtmmvlvny iffkakwemp fdpqdthqsr fylskkkwvm
241 vpmmslhhlt ipyfrdeels ctvvelkytg nasalfilpd qdkmeeveam llpetlkrwr
301 dslefrefeige lylpkfsisr dynlndillq lgieeaftsk adlsgitgar nlavsqvvhk
361 avldvfeegt easaatavki tllsalvetr tivrfnrpfl miivptdtqn iffmskvtnp
421 kqa

[0305] SEQ ID NO: 2 알파-1-항키모트립신

[0306] 성숙 단백질은 잔기들 26 내지 423에 대응한다. RCL의 잔기들 P4, P2, P1 및 P1'은 볼드체이며, 밑줄이 그어져 있다.

1 masrltlltl llllllagdra ssnpnatsss sqdpeslqdr gegkvattvi skmlfvepil
61 evsslpptns ttnsatkita nttdepttqp ttepttqpti qptqpttqlp tdsptqpttg
121 sfcpgpvtlc sdleshstga vlgdalvdffs lklyhafsam kkvetnmafs pfsiaslltg
181 vllgagentk tnlesilsyp kdftcvhqal kgfttkgvts vsqifhspdl airdtfvns
241 rtlysssprv lsnnsdanle lintwvaknt nnkisrlls lpsdtrlvll naiylsakwk
301 ttfdpkktm epfhfknsvi kvpmmskky pvahfidqtl kakvgqlqls hnslslvilvp
361 qnlkhrledm eqalspsvfk aimeklemsk fqptlltlpr ikvttsgdml simekleff
421 fsydlnlcgl tedpdqlqvs mghqtvlelt etgveaaaaa aisvartllv fevqqpflfv
481 lwdqqhkfpv fmgrvydpra

[0308] SEQ ID NO: 3 C1-에스테라제 억제인자

[0309] 성숙 단백질은 잔기들 23-500에 대응한다. RCL의 잔기들 P4, P2, P1 및 P1'은 볼드체이며, 밑줄이 그어져 있다.

1 mallwgl1vl swsclqgpcs vfspvsamep lgrqltsqpn qeqvsp1tl1 klgnqepggq
61 talkspgvc srdptpeqth rlarammaft adlflslvaqt stcpnlilsp lsvalalshl
121 algaqnhtlq rlqqvlhags gpcplhllsr lcqdlpggaf rlaarmylqk gfpikedfle
181 qseqlfgakp vsltgkqedd laningwvke ategkigefl sglpedtvll llnahfqqf
241 wrnkfdpslt qrdsfhldeg ftvpvemmqa rtyplrwfll eqpeiqvahf pfknnmsfvv
301 lvpthfenvv sqvlanlswd tlhpllvwer ptkvrlpkly lkhqmdlvat lsqglglqelf
361 qapdlrgise qslvvsgvqh qstlelseqv veaaaatsiamsrmslssfs vnrpflffif
421 eddtglplfv gsvrnpnpa prelkeqqds pgnkdflqsl kgfprgdklf gpdklvppm
481 eedypqfgsp k

[0311] SEQ ID NO: 4 α_2 -항플라스민

[0312] 성숙 단백질은 잔기들 28-491에 대응한다. 키모트립신의 억제를 위한 RCL의 잔기들 P4, P2, P1 및 P1'은 볼드체이며, 플라스민의 억제를 위한 잔기들은 밑줄이 그어져 있다.

1 mysnvigtvt sgkrkvyls llligfwdcv tchgspvdi takprdi pmciyrspek
61 katedegseq kipeatnrrv welskansrf attfyghlad skndndnifl splsistafa
121 mtklgacndt lqqlmevfkf dtisektsdq ihfffaklnc rlyrkankss klvsanrlfg
181 dksltfnety qdiselvyga klqpldfken aeqsraaink wvsnktegri tdvipseain
241 eltvllvnt iyfkgllwksk fspentrkel fykadgescs asmmvqegkf ryrrvaeqtg
301 vlelpfkgdd itmvlilpkp ekslakveke ltpevlqewl deleemmlvv hmprfriedg
361 fslkeqlqdm glvdlfspek sklpgivaeg rddlyvsdaf hkaflevnee gseaaastav
421 viagrslnpn rvtfkanrpf lvfirevpln tiifmgrvan pcvk

[0314] SEQ ID NO: 5 항트롬빈 (ATIII)

[0315] 성숙 단백질은 잔기들 33-464에 대응한다. RCL의 잔기들 P4, P2, P1 및 P1'은 볼드체이며, 밑줄이 그어져 있다.

```

1 mkhslnalli fliitsawgg skgpldqlek ggetaqsadp qweqlnnknl smpllpadfh
61 kentvtndwi pegeedddyl dlekifsedd dyidivdsls vsptdsdvs gnilqlfhgk
121 sriqrlniln akfafnlrv lkdqvntfdn ifiapvgist amgmislglk getheqvhsi
181 lhfkdfvnas skyeitthn lfrklthrlf rrrfgytlrs vndlyiqkqf pilldfktkv
241 reyyfaeaqi adfsdpafis ktnnhimklt kglikdalen idpatqmmil nciyfkgsww
301 nkfpvemthn hnfrlnerev vkvsmmgtkg nflaandgel dcdilqleyv ggismliwv
361 hkmsgmktle aqltprvver wqksmtnrtr evllpkfkle knynlveslk lmgirmldfk
421 ngnmagisdq riaidlfkhq gtitvneegt gattvtvtvgf mplstqvrft vdrpfllfliy
481 ehrtscillfm grvanpsrs

```

[0316]

[0317] SEQ ID NO: 6 헤파린 보조인자 II

[0318] 성숙 단백질은 잔기들 20-499에 대응한다. RCL의 잔기들 P4, P2, P1 및 P1'은 볼드체이며, 밑줄이 그어져 있다.

```

1 mpssvswgil llaqlcclvp vslaedpqqd aaqktdtshh dqdhptfnki tpnlaefafs
61 lyrqlahqsn stniffspvs iatafamsls gtkadthdei leglnfnlte ipeaqihgff
121 qellrtlnqp dsqqltltgn glflseglkl vdkfledvkk lyhseaftvn fgdtteakkq
181 indyvekgtd gkivdlvkel drdtvfalvn yiffkgkwer pfevkdteee dfhvdqvtv
241 kvpmmkrlgm fniqhckkls swvllmkylg nataiffllpd egklqhlene lthdiitkfl
301 enedrrsas1 hlpklsitgt ydlksvlgql gitkvfsnga dlsgvteeap lklskavhka
361 vltidekgte aagamfleaai pmsippevkf nkpfvflmie qntksplfmg kvvnptqk

```

[0319]

[0320] SEQ ID NO: 7 α_1 -항트립신 (α_1 AT)

[0321] 성숙 단백질은 잔기들 25-418에 대응한다. RCL의 잔기들 P4, P2, P1 및 P1'은 볼드체이며, 밑줄이 그어져 있다.

```

1 mhlidyllll lvglallshg qlhvehdges csnsqhqqil etgegspslk iapanadfaf
61 rfyyliaaset pgkniffspl sisaayamls lgacshsrsq ileglgfnlt elsesdvhrq
121 fqhlhlhtnl pghgletrvg salflshnlk flakflndtm avyeaklfht nfydtvgtiq
181 lindhvkket rgkivdlvse lkkdvmlvly nyiyfkalwe kpfissrttp kdfyvdtnt
241 vrvpmmldqg ehwhylhdry lpcsvlrmly kgdatvffil pnqgkmreie evltpemlmr
301 wnnllrkrnf ykklehlhpk fsisgsvvld qilprlgtfd lfskwadlsg itkqqkleas
361 ksfhkatldv deagteaaaa tsfaikffsa qtnrhilrln rpflvlfist stqsvlflgk
421 vvdptkp

```

[0322]

[0323] SEQ ID NO: 8 칼리스타틴

[0324] 성숙 단백질은 잔기들 21-427에 대응한다. RCL의 잔기들 P4, P2, P1 및 P1'은 볼드체이며, 밑줄이 그어져 있다.

```

1 mqmispaltcl vlglalvfge gsavhhppsy vahlasdfgv rvfqgvaqas kdrnvvfspy
61 gvasvlamlq lttggetqqq iqaamgfkid dkgmapalrh lykelmgpwn kdeisttdai
121 fvqrldklvg gfmphffrlf rstvkqvdfs everarfiin dwvkthtkgm isnllgkav
181 dqltrlvlnv alyfngqwt pfpdssthr lfhsdsgstv svpmmagtnk fnytefttpd
241 ghyydilelp yhgdtlsmfi aapyekvpl saltnilsaq lishwkgnmt rlprllvlpk
301 fsletevdlr kplenlgmt mfrqfqadft slsdgeplhv aqalqkvkie vnesgtvass
361 stavivvsarm apeeimdrp flfvvrhnpt gtvlfmgqvm ep

```

[0325]

[0326] SEQ ID NO: 9 플라스미노겐 활성화제 억제인자

[0327] 성숙 단백질은 잔기들 24-402에 대응한다. RCL의 잔기들 P4, P2, P1 및 P1'은 볼드체이며, 밑줄이 그어져 있다.

```

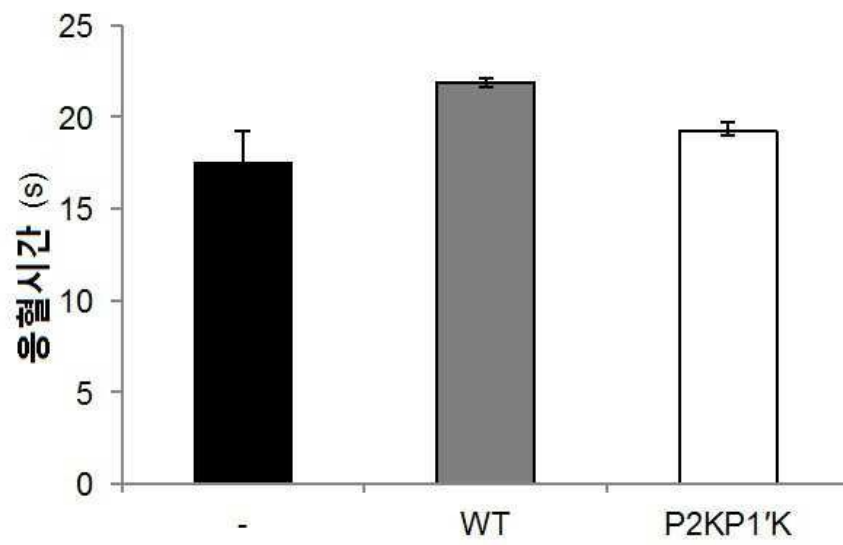
1 mkvvpsllls vllaqvvlvp glaspqspe tpapqnqtsr vvqapkeeee deqeaseeka
61 seeekawlma srqqlakets nfgfslrki smrhgdgmvf spfgmslamt glmlgatgpt
121 etqikrglhl qalkptkpgl lpslfkglre tlnrnllelgl tqgsfafihk dfdvketffn
181 lskryfdtec vpmnfrnasg akrlnmhyin ketrqkipkl fdeinpetkl ilvdyilfkq
241 kwltfpdpvf tevdtfhldk yktikvpmm y gagkfastfd knfrchvkl pyqgnatmlv
301 vlmekmgdhl aledylttld vetwlrnmkt rnmevffpkf kldqkyemhe llrqmgirri
361 fspfadlsl satgrnlqvs rvlqrtviev dergteavag ilseitaysm ppvikvdrpf
421 hfmiyeetsg mllflgrvvn ptll

```

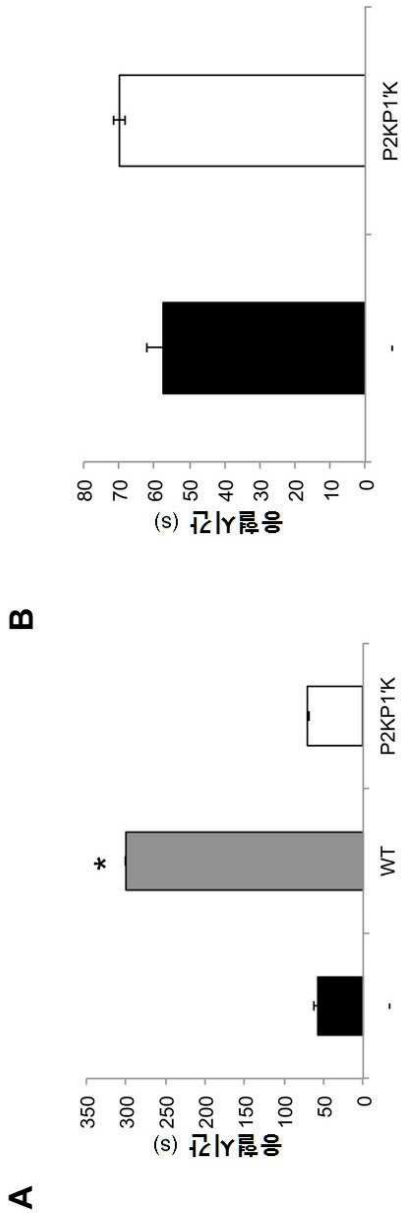
[0328]

[0329] SEQ ID NO: 10 단백질 Z 의존성 억제인자

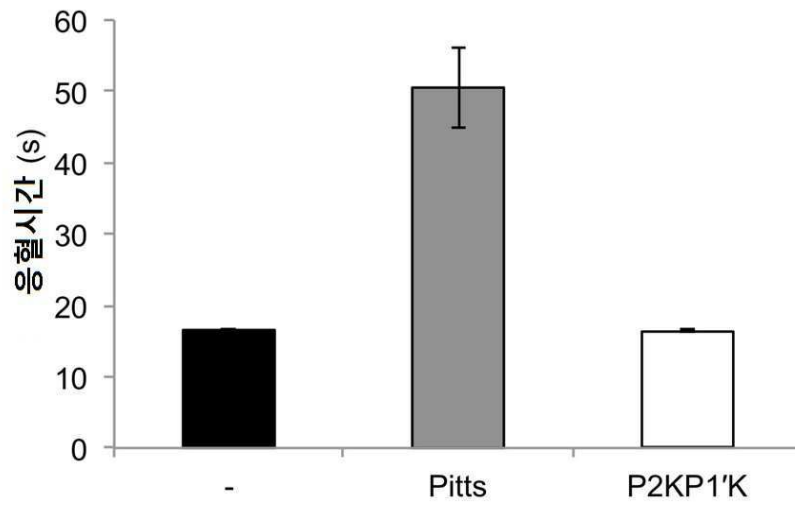
도면2



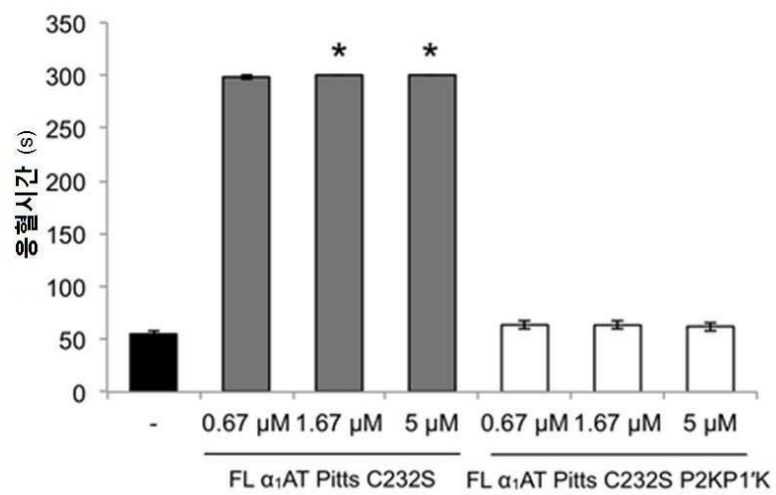
도면3



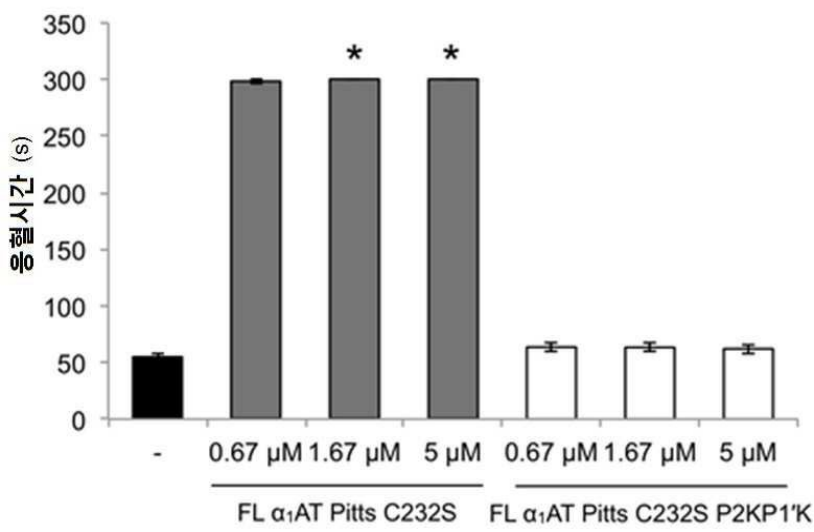
도면4



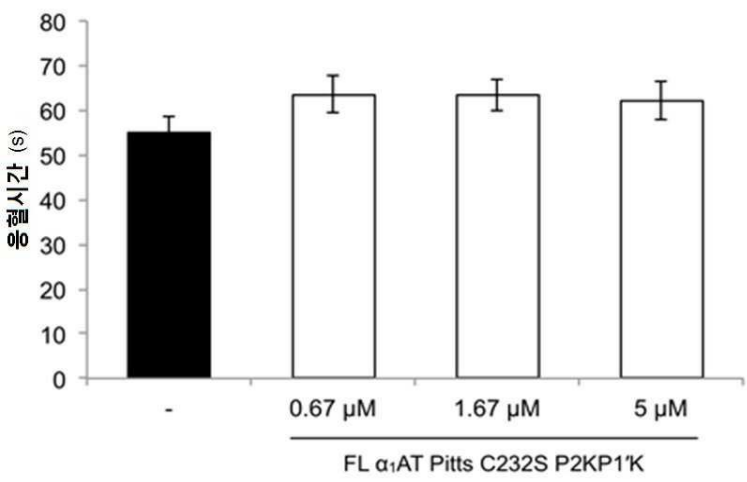
도면5



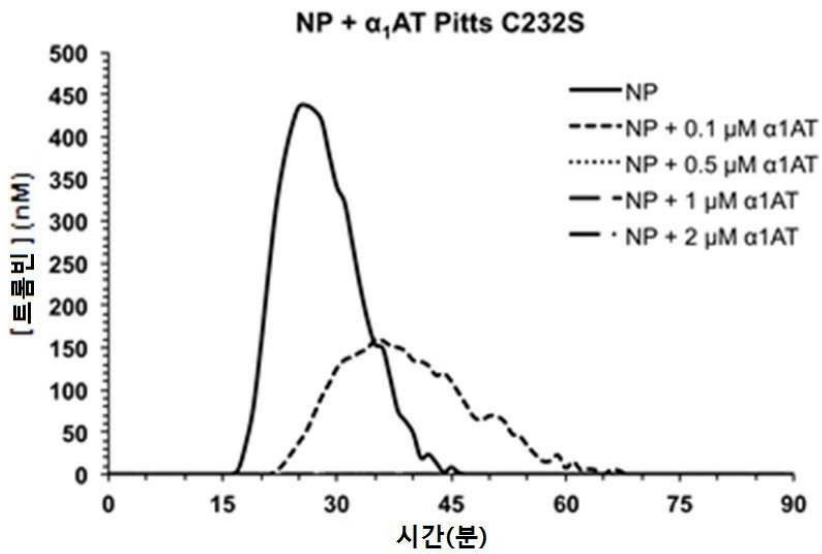
도면5a



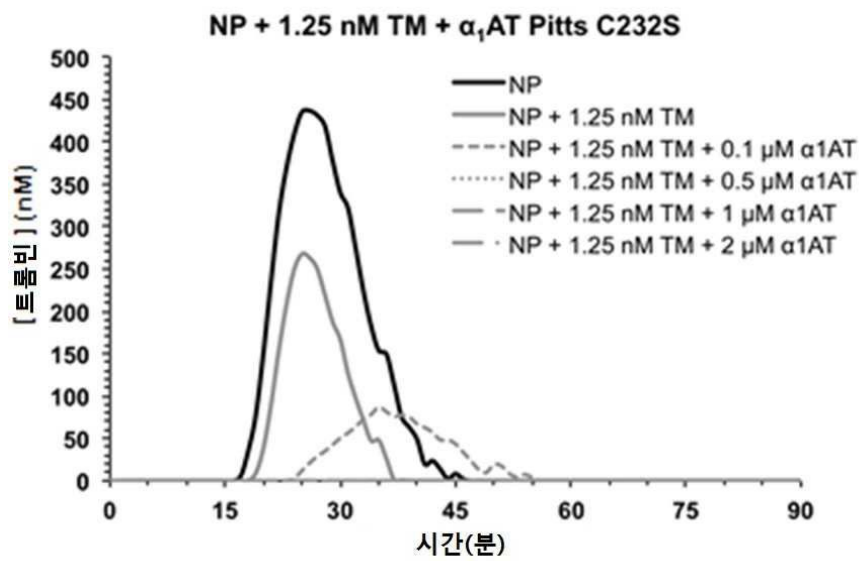
도면5b



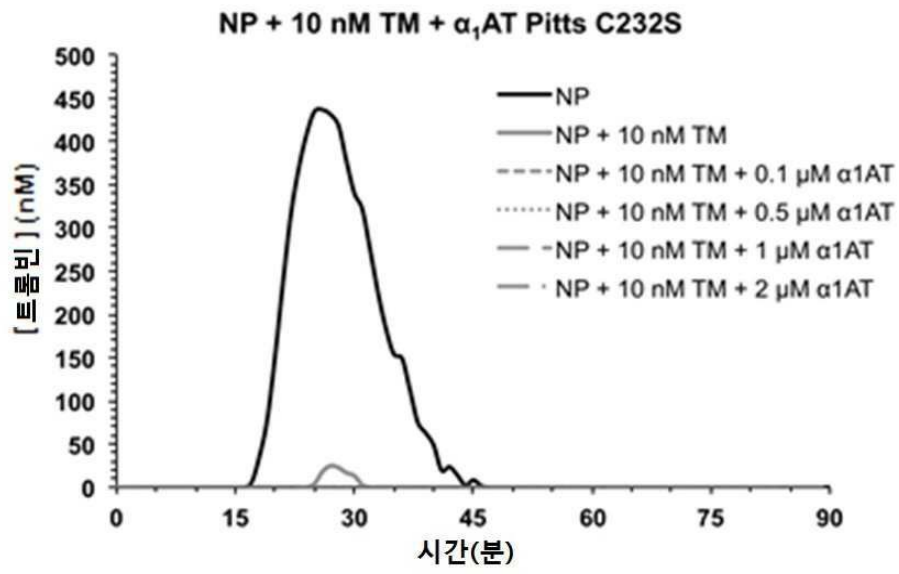
도면6a



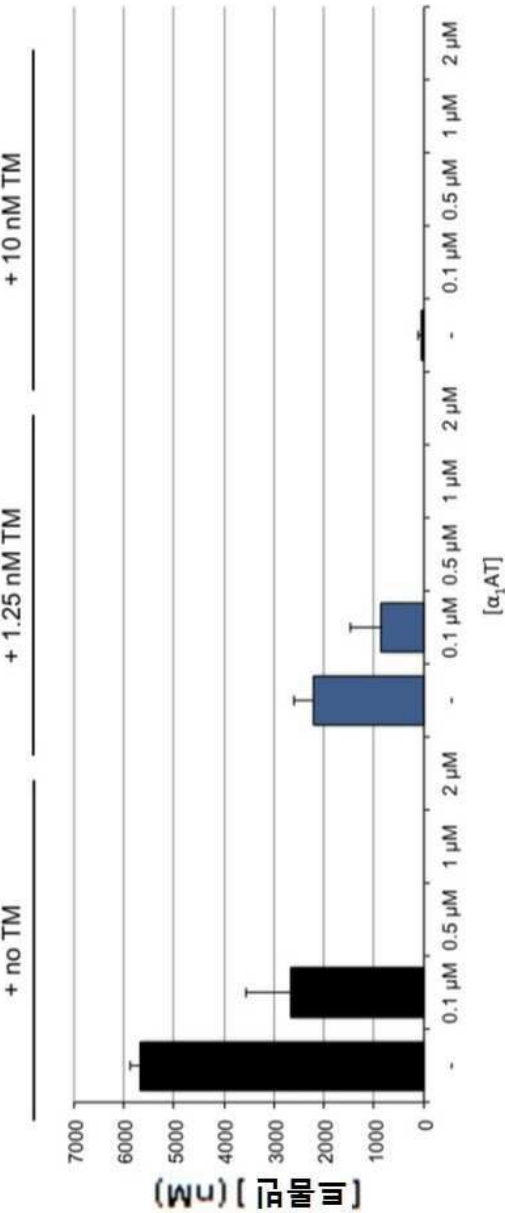
도면6b



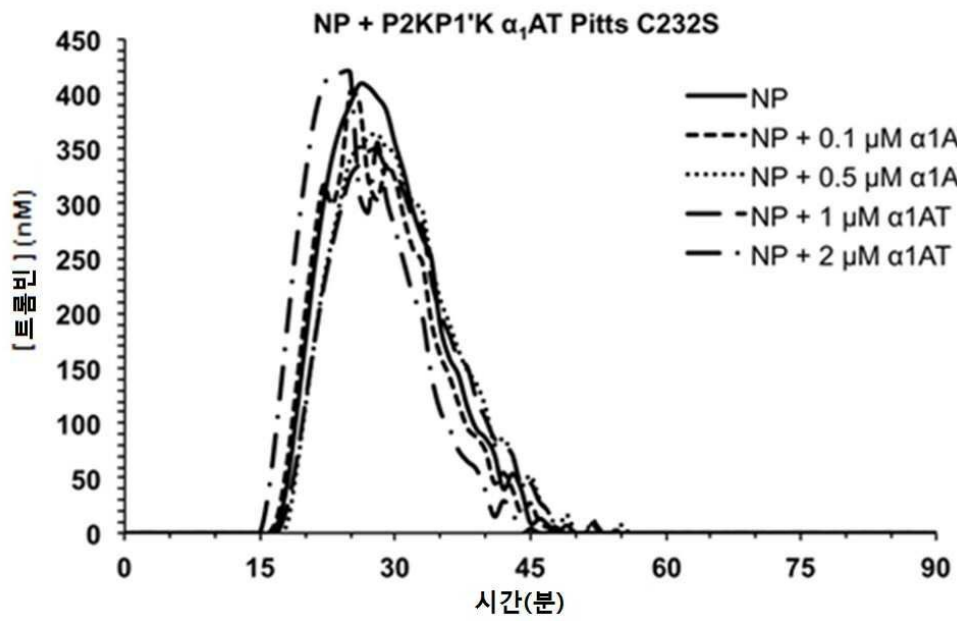
도면6c



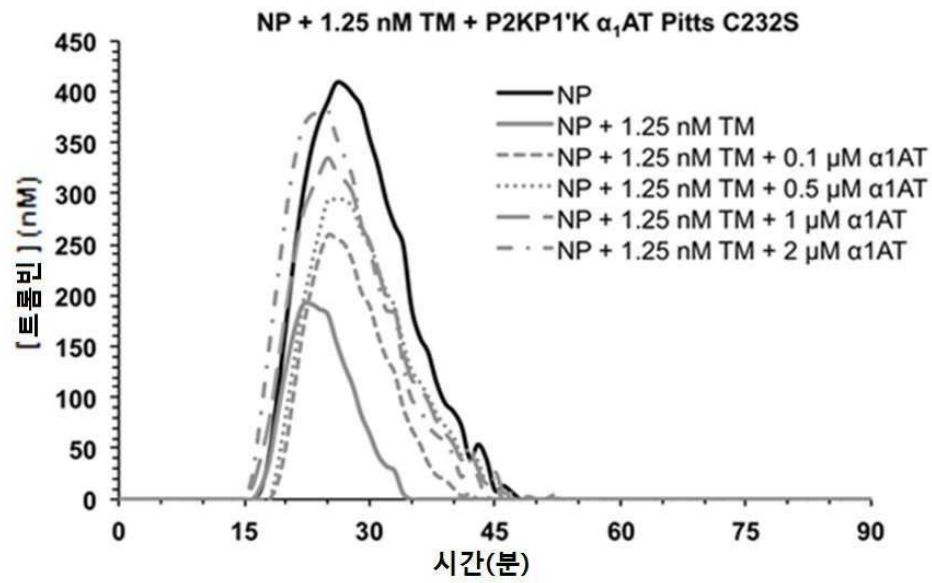
도면6d



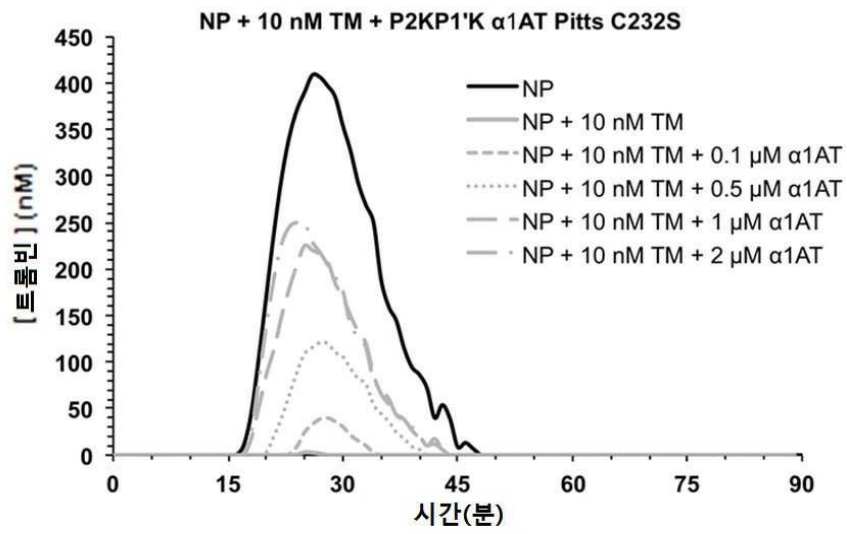
도면7a



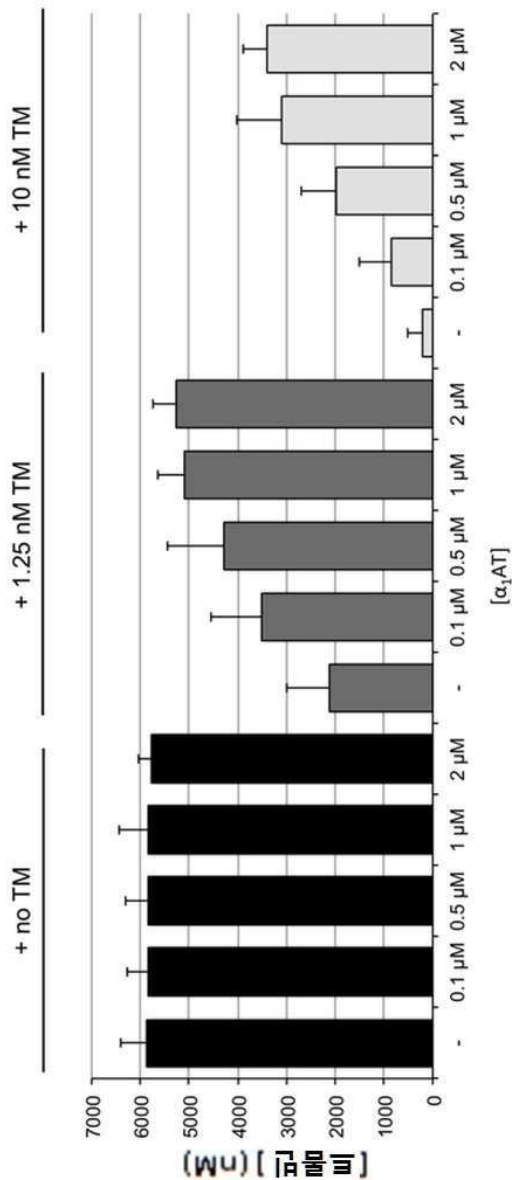
도면7b



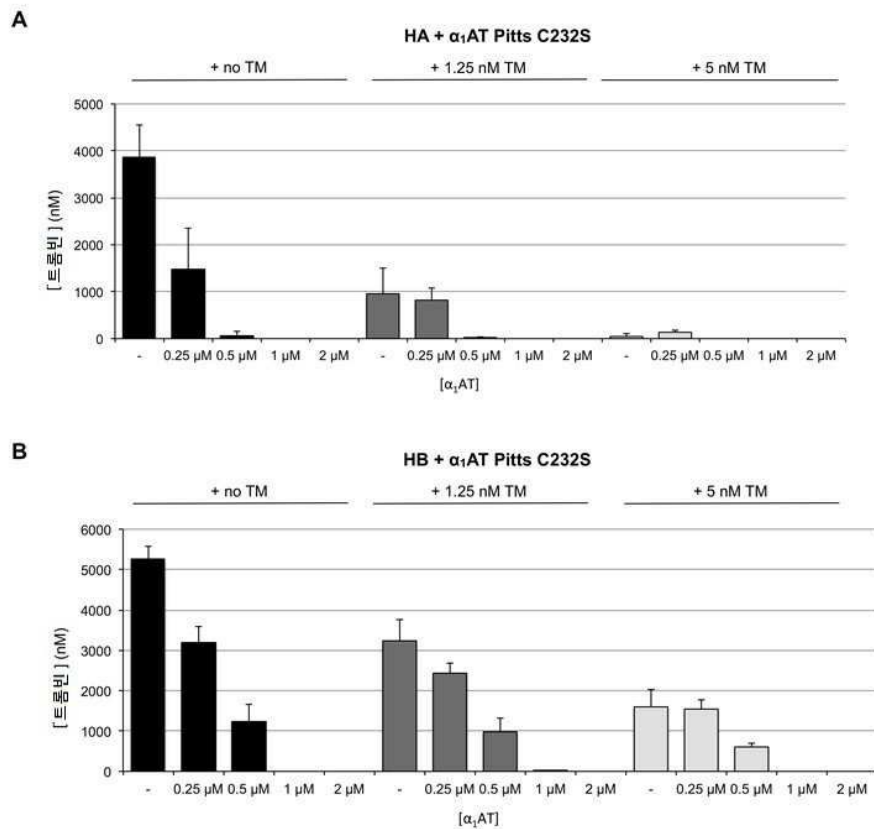
도면7c



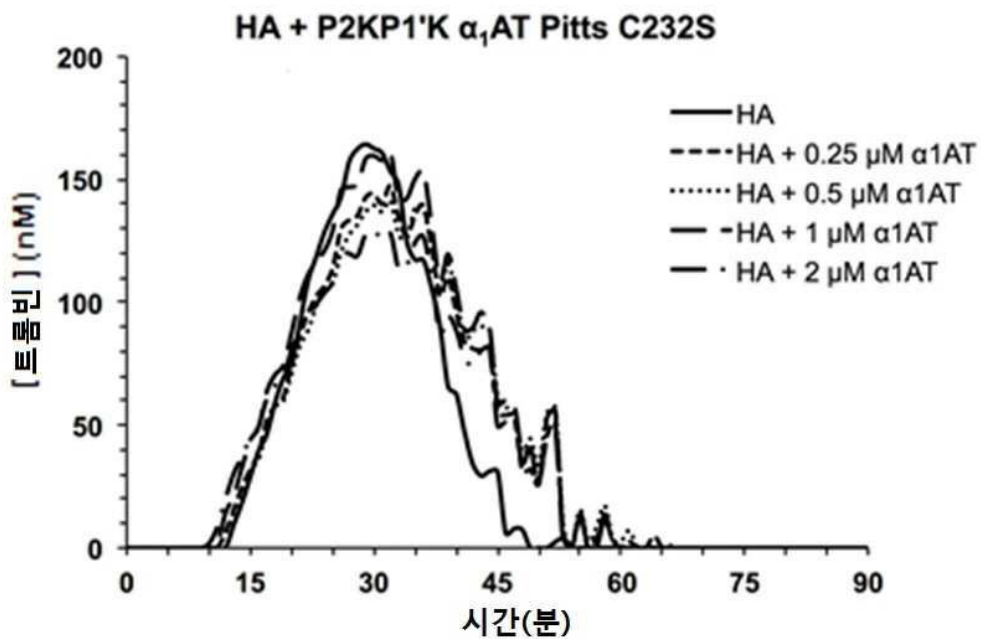
도면7d



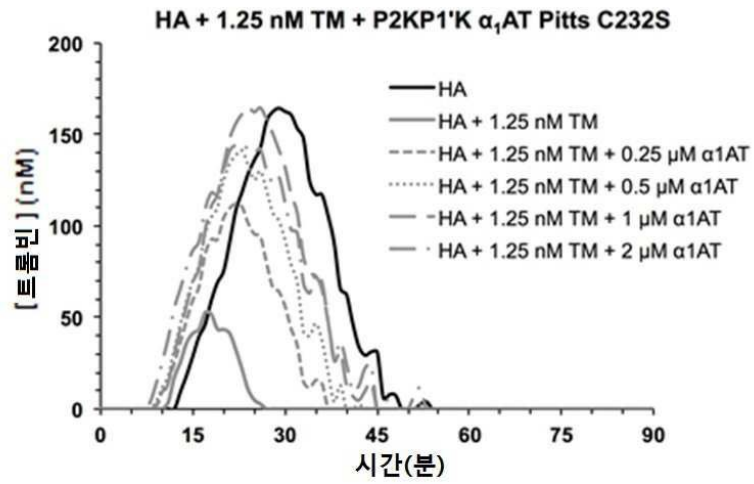
도면8



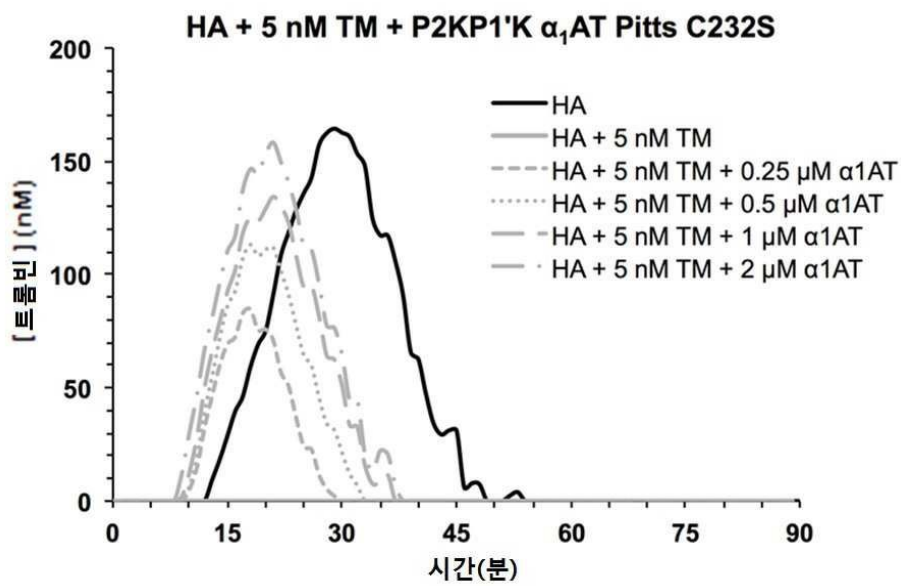
도면9a



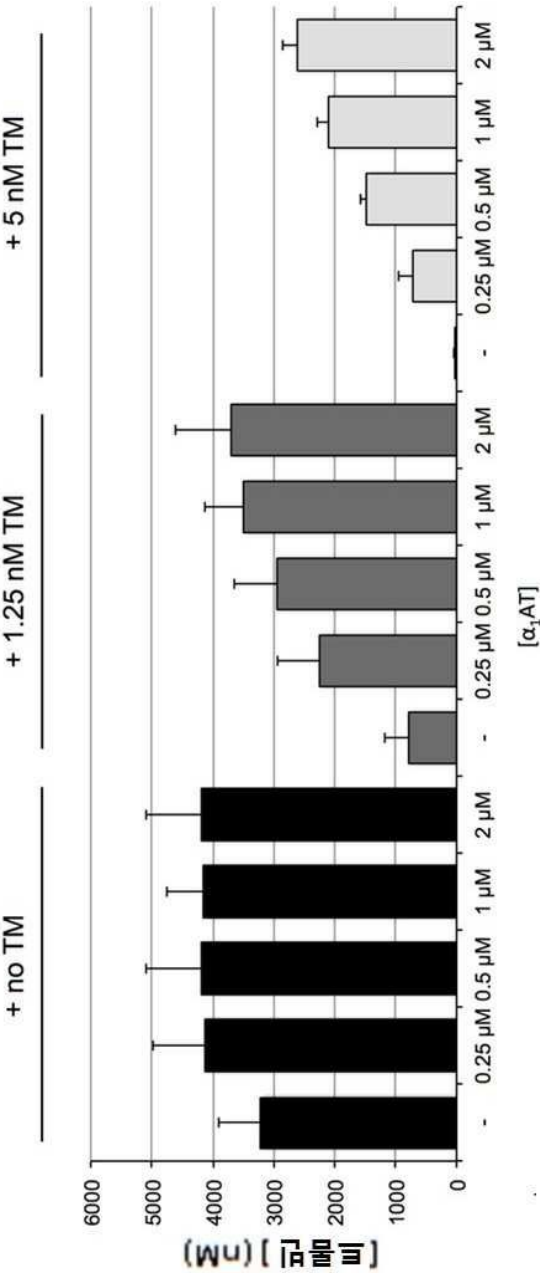
도면9b



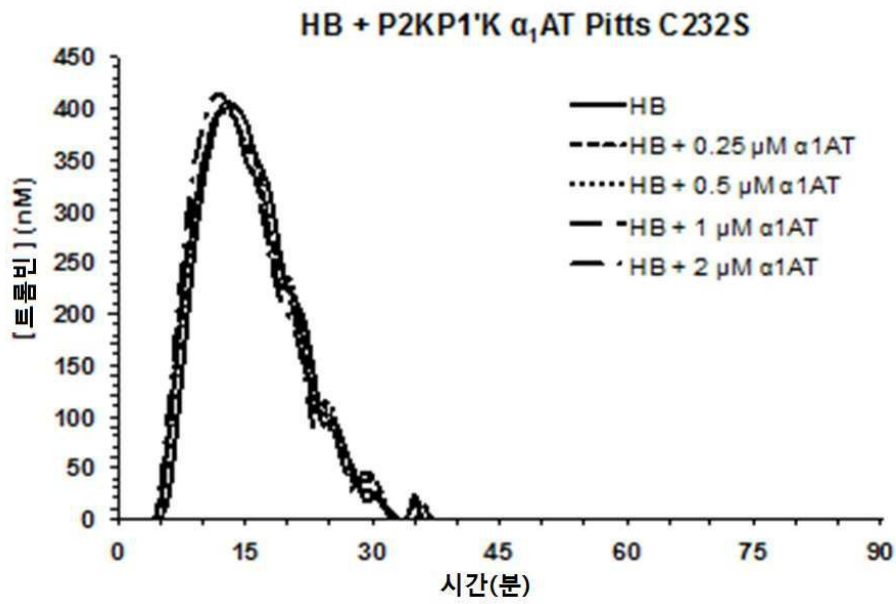
도면9c



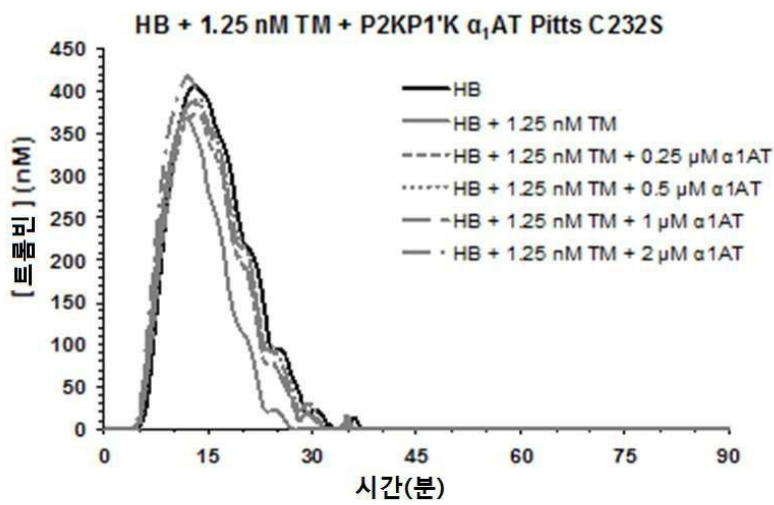
도면9d



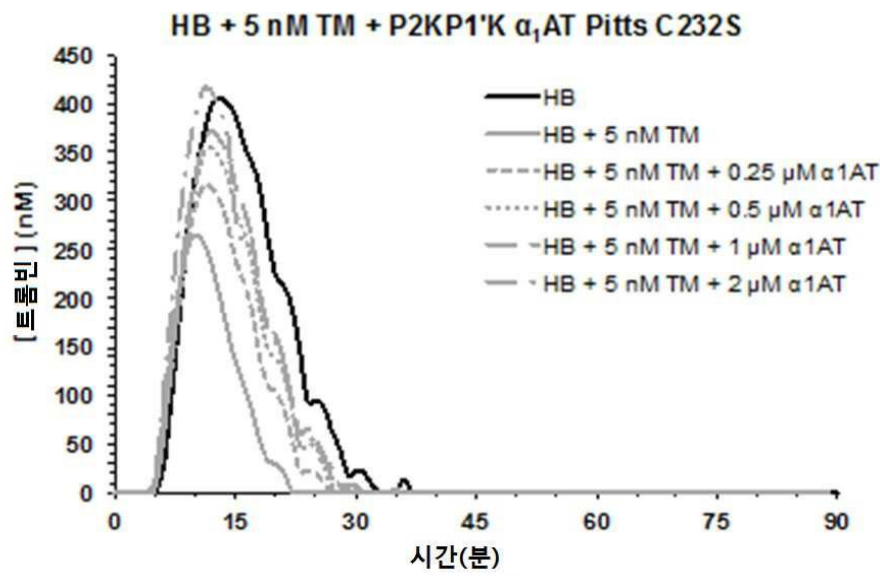
도면10a



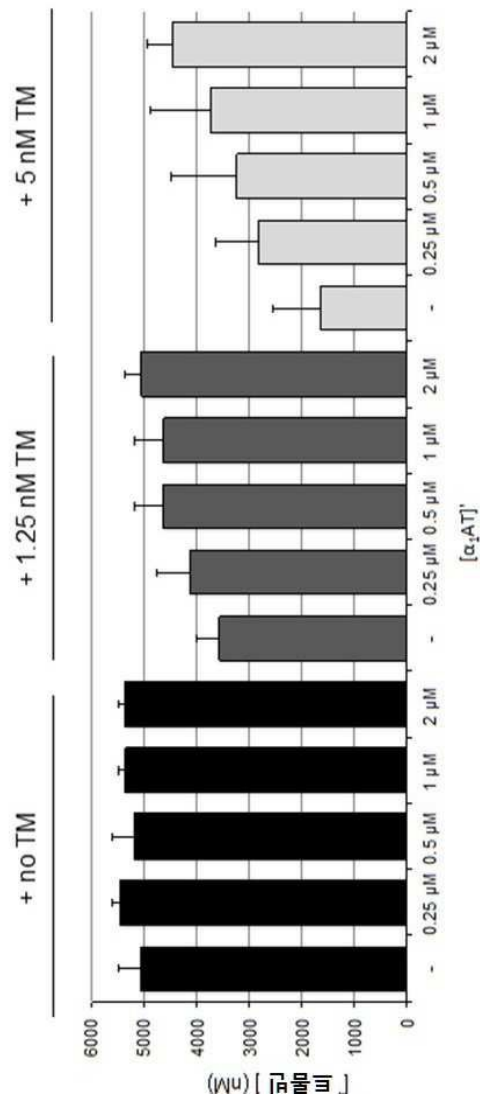
도면10b



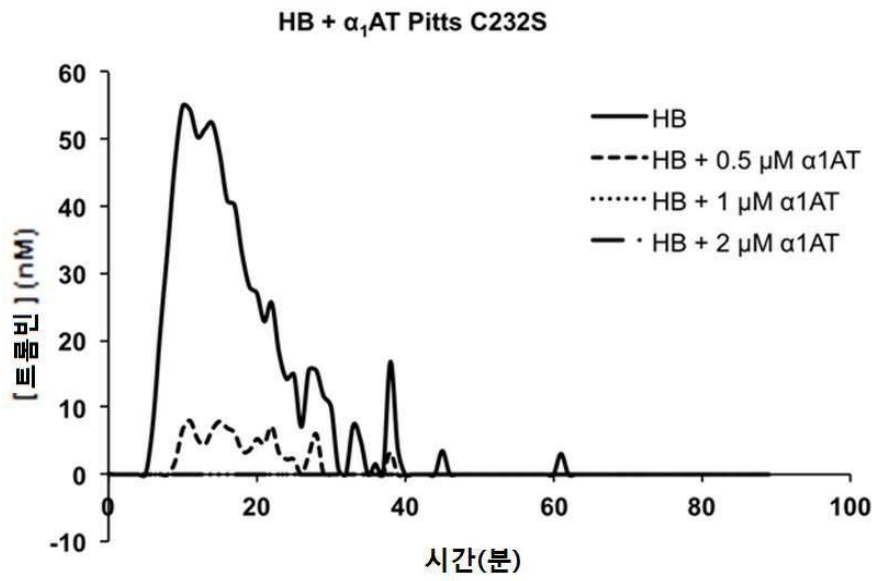
도면10c



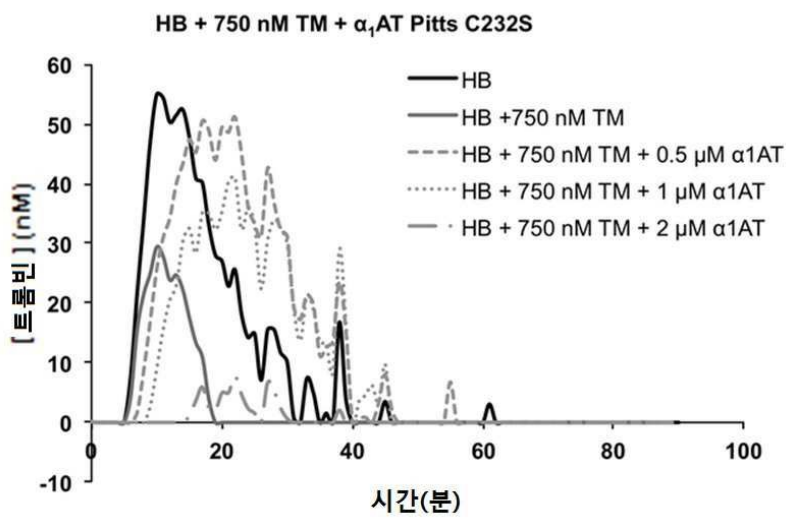
도면10d



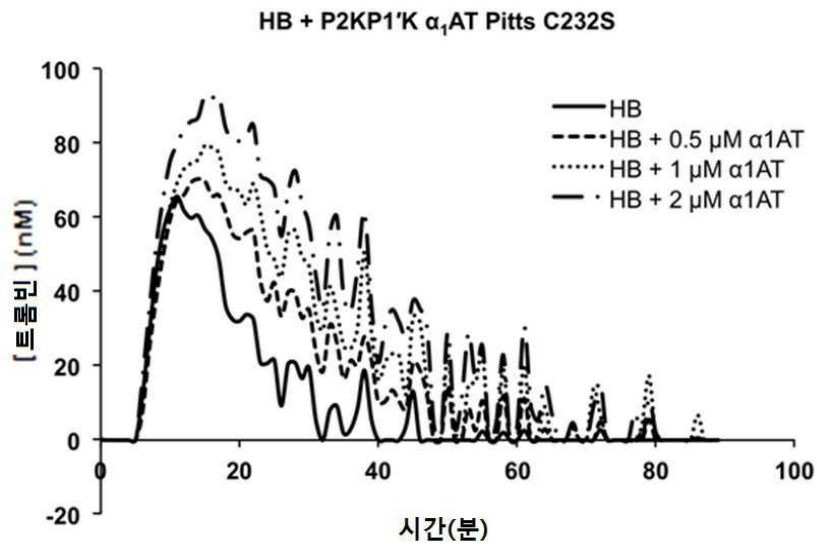
도면11a



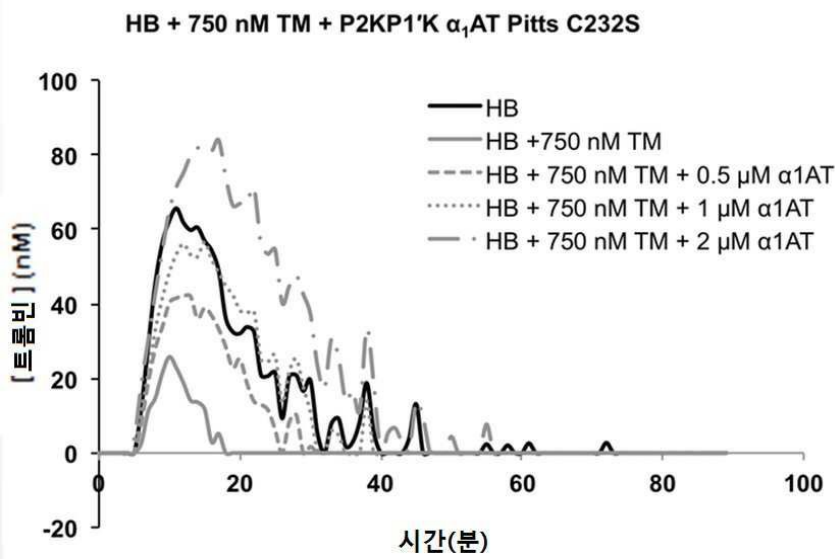
도면11b



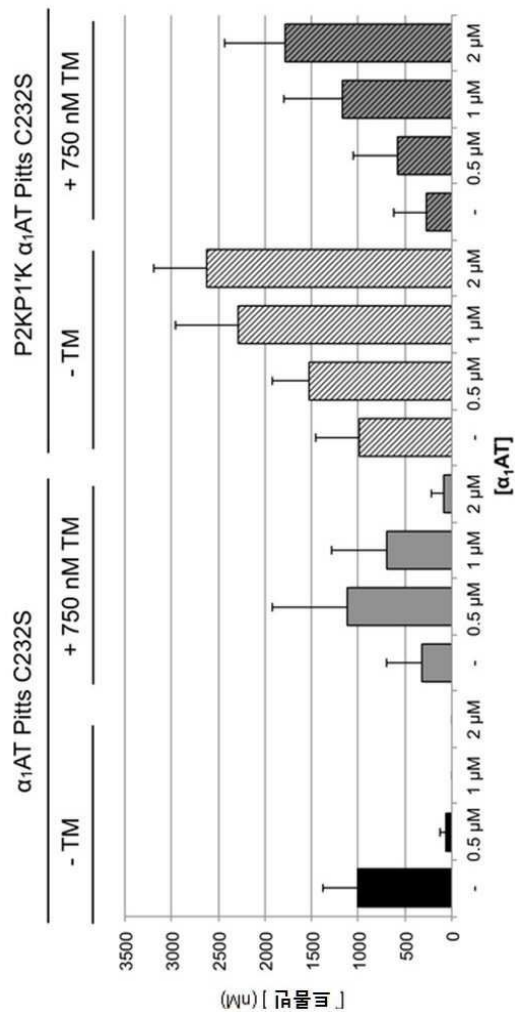
도면11c



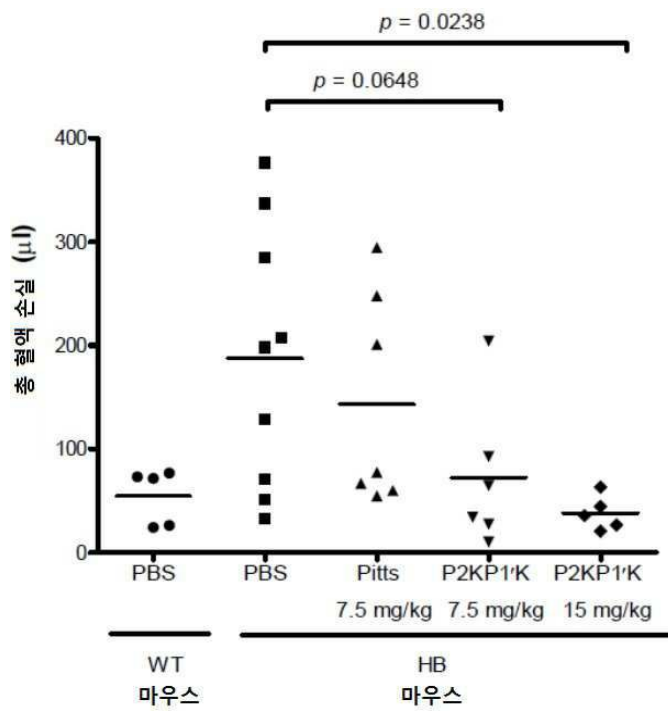
도면11d



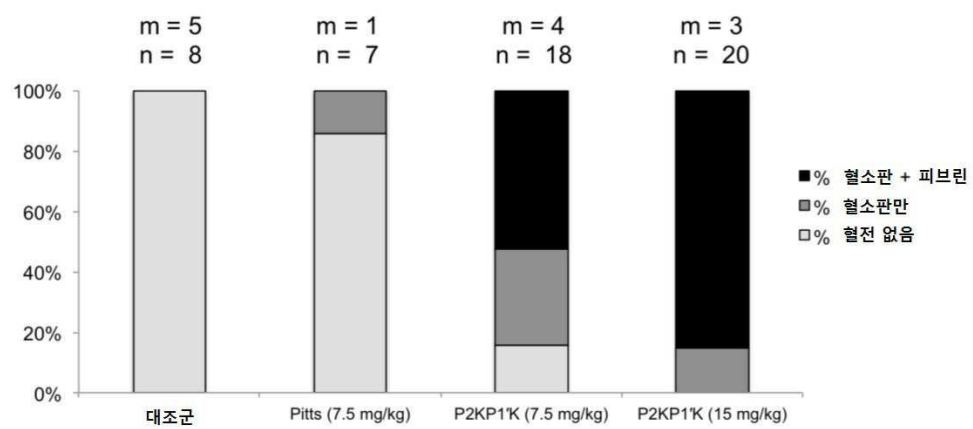
도면11e



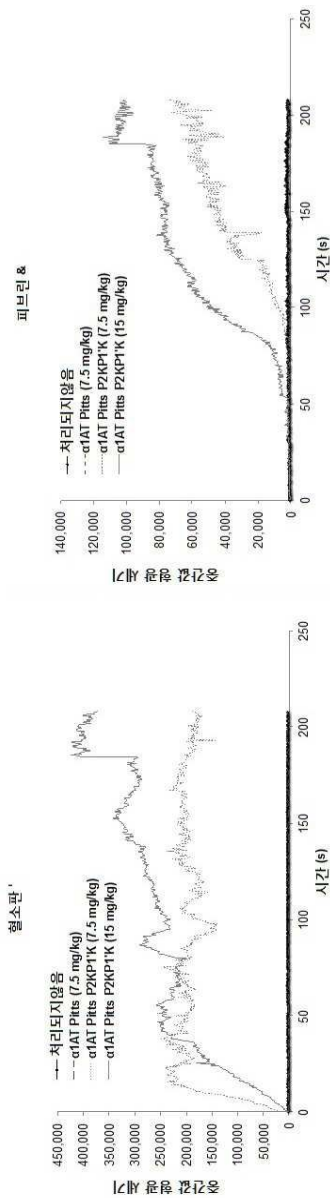
도면12



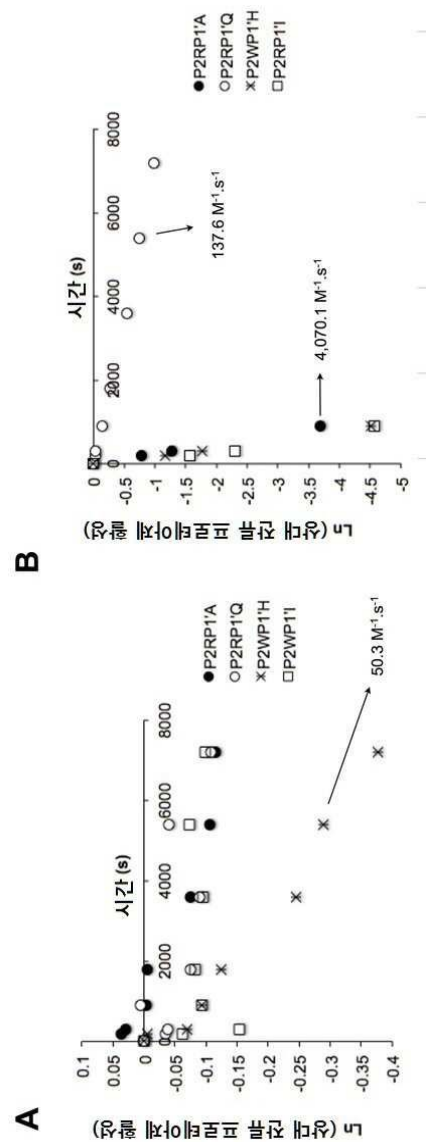
도면13



도면14



도면15



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Cambridge Enterprise Limited
- <120> Modified Serpins for the Treatment of Bleeding Disorders
- <130> NRS/CP7089444
- <140> PCT/EP2014/077783
- <141> 2014-12-15
- <150> GB 1322091.8
- <151> 2013-12-13
- <160> 93
- <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 406

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Leu Phe Leu Leu Leu Cys Leu Val Leu Leu Ser Pro Gln Gly

1 5 10 15

Ala Ser Leu His Arg His His Pro Arg Glu Met Lys Lys Arg Val Glu

20 25 30

Asp Leu His Val Gly Ala Thr Val Ala Pro Ser Ser Arg Arg Asp Phe

35 40 45

Thr Phe Asp Leu Tyr Arg Ala Leu Ala Ser Ala Ala Pro Ser Gln Asn

50 55 60

Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser Ile Ser Met Ser Leu Ala Met Leu Ser

65 70 75 80

Leu Gly Ala Gly Ser Ser Thr Lys Met Gln Ile Leu Glu Gly Leu Gly

85 90 95

Leu Asn Leu Gln Lys Ser Ser Glu Lys Glu Leu His Arg Gly Phe Gln

100 105 110

Gln Leu Leu Gln Glu Leu Asn Gln Pro Arg Asp Gly Phe Gln Leu Ser

115 120 125

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

130 135 140

Phe Val Ser Ala Met Lys Thr Leu Tyr Leu Ala Asp Thr Phe Pro Thr

145 150 155 160

Asn Phe Arg Asp Ser Ala Gly Ala Met Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val

165 170 175

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

180 185 190

Ser Asn Ala Val Val Ile Met Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Ala Lys

195 200 205

Trp Glu Thr Ser Phe Asn His Lys Gly Thr Gln Glu Gln Asp Phe Tyr
 210 215 220
 Val Thr Ser Glu Thr Val Val Arg Val Pro Met Met Ser Arg Glu Asp
 225 230 235 240
 Gln Tyr His Tyr Leu Leu Asp Arg Asn Leu Ser Cys Arg Val Val Gly
 245 250 255
 Val Pro Tyr Gln Gly Asn Ala Thr Ala Leu Phe Ile Leu Pro Ser Glu
 260 265 270

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

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

Gly Lys Val Asn Arg Pro
 405

<210> 2

<211> 423

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Arg Met Leu Pro Leu Leu Ala Leu Gly Leu Leu Ala Ala Gly

1	5	10	15
Phe Cys Pro Ala Val Leu Cys His Pro Asn Ser Pro Leu Asp Glu Glu			
	20	25	30
Asn Leu Thr Gln Glu Asn Gln Asp Arg Gly Thr His Val Asp Leu Gly			
	35	40	45
Leu Ala Ser Ala Asn Val Asp Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Lys Gln Leu			
	50	55	60
Val Leu Lys Ala Pro Asp Lys Asn Val Ile Phe Ser Pro Leu Ser Ile			
65	70	75	80
Ser Thr Ala Leu Ala Phe Leu Ser Leu Gly Ala His Asn Thr Thr Leu			
	85	90	95
Thr Glu Ile Leu Lys Gly Leu Lys Phe Asn Leu Thr Glu Thr Ser Glu			
	100	105	110
Ala Glu Ile His Gln Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln			
	115	120	125
Ser Ser Asp Glu Leu Gln Leu Ser Met Gly Asn Ala Met Phe Val Lys			
	130	135	140
Glu Gln Leu Ser Leu Leu Asp Arg Phe Thr Glu Asp Ala Lys Arg Leu			
145	150	155	160
Tyr Gly Ser Glu Ala Phe Ala Thr Asp Phe Gln Asp Ser Ala Ala Ala			
	165	170	175
Lys Lys Leu Ile Asn Asp Tyr Val Lys Asn Gly Thr Arg Gly Lys Ile			
	180	185	190
Thr Asp Leu Ile Lys Asp Leu Asp Ser Gln Thr Met Met Val Leu Val			
	195	200	205
Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Ala Lys Trp Glu Met Pro Phe Asp Pro Gln			
	210	215	220
Asp Thr His Gln Ser Arg Phe Tyr Leu Ser Lys Lys Lys Trp Val Met			
225	230	235	240
Val Pro Met Met Ser Leu His His Leu Thr Ile Pro Tyr Phe Arg Asp			
	245	250	255

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

Phe Arg Glu Ile Gly Glu Leu Tyr Leu Pro Lys Phe Ser Ile Ser Arg
 305 310 315 320
 Asp Tyr Asn Leu Asn Asp Ile Leu Leu Gln Leu Gly Ile Glu Glu Ala
 325 330 335
 Phe Thr Ser Lys Ala Asp Leu Ser Gly Ile Thr Gly Ala Arg Asn Leu
 340 345 350
 Ala Val Ser Gln Val Val His Lys Ala Val Leu Asp Val Phe Glu Glu
 355 360 365

Gly Thr Glu Ala Ser Ala Ala Thr Ala Val Lys Ile Thr Leu Leu Ser
 370 375 380
 Ala Leu Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu
 385 390 395 400
 Met Ile Ile Val Pro Thr Asp Thr Gln Asn Ile Phe Phe Met Ser Lys
 405 410 415
 Val Thr Asn Pro Lys Gln Ala
 420

<210> 3

<211> 500

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Ser Arg Leu Thr Leu Leu Thr Leu Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Ala Ser Ser Asn Pro Asn Ala Thr Ser Ser Ser Ser Gln
 20 25 30
 Asp Pro Glu Ser Leu Gln Asp Arg Gly Glu Gly Lys Val Ala Thr Thr

35	40	45
Val Ile Ser Lys Met Leu Phe Val Glu Pro Ile Leu Glu Val Ser Ser		
50	55	60
Leu Pro Thr Thr Asn Ser Thr Thr Asn Ser Ala Thr Lys Ile Thr Ala		
65	70	75
Asn Thr Thr Asp Glu Pro Thr Thr Gln Pro Thr Thr Glu Pro Thr Thr		
85	90	95
Gln Pro Thr Ile Gln Pro Thr Gln Pro Thr Thr Gln Leu Pro Thr Asp		
100	105	110
Ser Pro Thr Gln Pro Thr Thr Gly Ser Phe Cys Pro Gly Pro Val Thr		
115	120	125
Leu Cys Ser Asp Leu Glu Ser His Ser Thr Glu Ala Val Leu Gly Asp		
130	135	140
Ala Leu Val Asp Phe Ser Leu Lys Leu Tyr His Ala Phe Ser Ala Met		
145	150	155
Lys Lys Val Glu Thr Asn Met Ala Phe Ser Pro Phe Ser Ile Ala Ser		
165	170	175
Leu Leu Thr Gln Val Leu Leu Gly Ala Gly Glu Asn Thr Lys Thr Asn		
180	185	190
Leu Glu Ser Ile Leu Ser Tyr Pro Lys Asp Phe Thr Cys Val His Gln		
195	200	205
Ala Leu Lys Gly Phe Thr Thr Lys Gly Val Thr Ser Val Ser Gln Ile		
210	215	220
Phe His Ser Pro Asp Leu Ala Ile Arg Asp Thr Phe Val Asn Ala Ser		
225	230	235
Arg Thr Leu Tyr Ser Ser Ser Pro Arg Val Leu Ser Asn Asn Ser Asp		
245	250	255
Ala Asn Leu Glu Leu Ile Asn Thr Trp Val Ala Lys Asn Thr Asn Asn		
260	265	270
Lys Ile Ser Arg Leu Leu Asp Ser Leu Pro Ser Asp Thr Arg Leu Val		
275	280	285

Leu Leu Asn Ala Ile Tyr Leu Ser Ala Lys Trp Lys Thr Thr Phe Asp

290 295 300

Pro Lys Lys Thr Arg Met Glu Pro Phe His Phe Lys Asn Ser Val Ile

305 310 315 320

Lys Val Pro Met Met Asn Ser Lys Lys Tyr Pro Val Ala His Phe Ile

325 330 335

Asp Gln Thr Leu Lys Ala Lys Val Gly Gln Leu Gln Leu Ser His Asn

340 345 350

Leu Ser Leu Val Ile Leu Val Pro Gln Asn Leu Lys His Arg Leu Glu

355 360 365

Asp Met Glu Gln Ala Leu Ser Pro Ser Val Phe Lys Ala Ile Met Glu

370 375 380

Lys Leu Glu Met Ser Lys Phe Gln Pro Thr Leu Leu Thr Leu Pro Arg

385 390 395 400

Ile Lys Val Thr Thr Ser Gln Asp Met Leu Ser Ile Met Glu Lys Leu

405 410 415

Glu Phe Phe Asp Phe Ser Tyr Asp Leu Asn Leu Cys Gly Leu Thr Glu

420 425 430

Asp Pro Asp Leu Gln Val Ser Ala Met Gln His Gln Thr Val Leu Glu

435 440 445

Leu Thr Glu Thr Gly Val Glu Ala Ala Ala Ala Ser Ala Ile Ser Val

450 455 460

Ala Arg Thr Leu Leu Val Phe Glu Val Gln Gln Pro Phe Leu Phe Val

465 470 475 480

Leu Trp Asp Gln Gln His Lys Phe Pro Val Phe Met Gly Arg Val Tyr

485 490 495

Asp Pro Arg Ala

500

<210> 4

<211> 491

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

1 5 10 15

Gly Pro Cys Ser Val Phe Ser Pro Val Ser Ala Met Glu Pro Leu Gly

20 25 30

Arg Gln Leu Thr Ser Gly Pro Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu Thr

35 40 45

Leu Leu Lys Leu Gly Asn Gln Glu Pro Gly Gly Gln Thr Ala Leu Lys

50 55 60

Ser Pro Pro Gly Val Cys Ser Arg Asp Pro Thr Pro Glu Gln Thr His

65 70 75 80

Arg Leu Ala Arg Ala Met Met Ala Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ser Leu

85 90 95

Val Ala Gln Thr Ser Thr Cys Pro Asn Leu Ile Leu Ser Pro Leu Ser

100 105 110

Val Ala Leu Ala Leu Ser His Leu Ala Leu Gly Ala Gln Asn His Thr

115 120 125

Leu Gln Arg Leu Gln Gln Val Leu His Ala Gly Ser Gly Pro Cys Leu

130 135 140

Pro His Leu Leu Ser Arg Leu Cys Gln Asp Leu Gly Pro Gly Ala Phe

145 150 155 160

Arg Leu Ala Ala Arg Met Tyr Leu Gln Lys Gly Phe Pro Ile Lys Glu

165 170 175

Asp Phe Leu Glu Gln Ser Glu Gln Leu Phe Gly Ala Lys Pro Val Ser

180 185 190

Leu Thr Gly Lys Gln Glu Asp Asp Leu Ala Asn Ile Asn Gln Trp Val

195 200 205

Lys Glu Ala Thr Glu Gly Lys Ile Gln Glu Phe Leu Ser Gly Leu Pro

210 215 220

Glu Asp Thr Val Leu Leu Leu Leu Asn Ala Ile His Phe Gln Gly Phe

225 230 235 240

Trp Arg Asn Lys Phe Asp Pro Ser Leu Thr Gln Arg Asp Ser Phe His
 245 250 255
 Leu Asp Glu Gln Phe Thr Val Pro Val Glu Met Met Gln Ala Arg Thr
 260 265 270
 Tyr Pro Leu Arg Trp Phe Leu Leu Glu Gln Pro Glu Ile Gln Val Ala
 275 280 285
 His Phe Pro Phe Lys Asn Asn Met Ser Phe Val Val Leu Val Pro Thr
 290 295 300
 His Phe Glu Trp Asn Val Ser Gln Val Leu Ala Asn Leu Ser Trp Asp
 305 310 315 320
 Thr Leu His Pro Pro Leu Val Trp Glu Arg Pro Thr Lys Val Arg Leu
 325 330 335
 Pro Lys Leu Tyr Leu Lys His Gln Met Asp Leu Val Ala Thr Leu Ser
 340 345 350
 Gln Leu Gly Leu Gln Glu Leu Phe Gln Ala Pro Asp Leu Arg Gly Ile
 355 360 365
 Ser Glu Gln Ser Leu Val Val Ser Gly Val Gln His Gln Ser Thr Leu
 370 375 380
 Glu Leu Ser Glu Val Gly Val Glu Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ile Ala
 385 390 395 400
 Met Ser Arg Met Ser Leu Ser Ser Phe Ser Val Asn Arg Pro Phe Leu
 405 410 415
 Phe Phe Ile Phe Glu Asp Thr Thr Gly Leu Pro Leu Phe Val Gly Ser
 420 425 430
 Val Arg Asn Pro Asn Pro Ser Ala Pro Arg Glu Leu Lys Glu Gln Gln
 435 440 445
 Asp Ser Pro Gly Asn Lys Asp Phe Leu Gln Ser Leu Lys Gly Phe Pro
 450 455 460
 Arg Gly Asp Lys Leu Phe Gly Pro Asp Leu Lys Leu Val Pro Pro Met
 465 470 475 480
 Glu Glu Asp Tyr Pro Gln Phe Gly Ser Pro Lys

485 490

<210> 5

<211> 464

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Tyr Ser Asn Val Ile Gly Thr Val Thr Ser Gly Lys Arg Lys Val

1 5 10 15

Tyr Leu Leu Ser Leu Leu Leu Ile Gly Phe Trp Asp Cys Val Thr Cys

20 25 30

His Gly Ser Pro Val Asp Ile Cys Thr Ala Lys Pro Arg Asp Ile Pro

35 40 45

Met Asn Pro Met Cys Ile Tyr Arg Ser Pro Glu Lys Lys Ala Thr Glu

50 55 60

Asp Glu Gly Ser Glu Gln Lys Ile Pro Glu Ala Thr Asn Arg Arg Val

65 70 75 80

Trp Glu Leu Ser Lys Ala Asn Ser Arg Phe Ala Thr Thr Phe Tyr Gln

85 90 95

His Leu Ala Asp Ser Lys Asn Asp Asn Asp Asn Ile Phe Leu Ser Pro

100 105 110

Leu Ser Ile Ser Thr Ala Phe Ala Met Thr Lys Leu Gly Ala Cys Asn

115 120 125

Asp Thr Leu Gln Gln Leu Met Glu Val Phe Lys Phe Asp Thr Ile Ser

130 135 140

Glu Lys Thr Ser Asp Gln Ile His Phe Phe Phe Ala Lys Leu Asn Cys

145 150 155 160

Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Asn Lys Ser Ser Lys Leu Val Ser Ala Asn

165 170 175

Arg Leu Phe Gly Asp Lys Ser Leu Thr Phe Asn Glu Thr Tyr Gln Asp

180 185 190

Ile Ser Glu Leu Val Tyr Gly Ala Lys Leu Gln Pro Leu Asp Phe Lys

195 200 205

Glu Asn Ala Glu Gln Ser Arg Ala Ala Ile Asn Lys Trp Val Ser Asn

210

215

220

Lys Thr Glu Gly Arg Ile Thr Asp Val Ile Pro Ser Glu Ala Ile Asn

225

230

235

240

Glu Leu Thr Val Leu Val Leu Val Asn Thr Ile Tyr Phe Lys Gly Leu

245

250

255

Trp Lys Ser Lys Phe Ser Pro Glu Asn Thr Arg Lys Glu Leu Phe Tyr

260

265

270

Lys Ala Asp Gly Glu Ser Cys Ser Ala Ser Met Met Tyr Gln Glu Gly

275

280

285

Lys Phe Arg Tyr Arg Arg Val Ala Glu Gly Thr Gln Val Leu Glu Leu

290

295

300

Pro Phe Lys Gly Asp Asp Ile Thr Met Val Leu Ile Leu Pro Lys Pro

305

310

315

320

Glu Lys Ser Leu Ala Lys Val Glu Lys Glu Leu Thr Pro Glu Val Leu

325

330

335

Gln Glu Trp Leu Asp Glu Leu Glu Glu Met Met Leu Val Val His Met

340

345

350

Pro Arg Phe Arg Ile Glu Asp Gly Phe Ser Leu Lys Glu Gln Leu Gln

355

360

365

Asp Met Gly Leu Val Asp Leu Phe Ser Pro Glu Lys Ser Lys Leu Pro

370

375

380

Gly Ile Val Ala Glu Gly Arg Asp Asp Leu Tyr Val Ser Asp Ala Phe

385

390

395

400

His Lys Ala Phe Leu Glu Val Asn Glu Glu Gly Ser Glu Ala Ala Ala

405

410

415

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

420

425

430

Thr Phe Lys Ala Asn Arg Pro Phe Leu Val Phe Ile Arg Glu Val Pro

435

440

445

Leu Asn Thr Ile Ile Phe Met Gly Arg Val Ala Asn Pro Cys Val Lys

450 455 460

<210> 6

<211> 499

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Lys His Ser Leu Asn Ala Leu Leu Ile Phe Leu Ile Ile Thr Ser

1 5 10 15

Ala Trp Gly Gly Ser Lys Gly Pro Leu Asp Gln Leu Glu Lys Gly Gly

 20 25 30

Glu Thr Ala Gln Ser Ala Asp Pro Gln Trp Glu Gln Leu Asn Asn Lys

 35 40 45

Asn Leu Ser Met Pro Leu Leu Pro Ala Asp Phe His Lys Glu Asn Thr

50 55 60

Val Thr Asn Asp Trp Ile Pro Glu Gly Glu Glu Asp Asp Asp Tyr Leu

65 70 75 80

Asp Leu Glu Lys Ile Phe Ser Glu Asp Asp Asp Tyr Ile Asp Ile Val

 85 90 95

Asp Ser Leu Ser Val Ser Pro Thr Asp Ser Asp Val Ser Ala Gly Asn

 100 105 110

Ile Leu Gln Leu Phe His Gly Lys Ser Arg Ile Gln Arg Leu Asn Ile

115 120 125

Leu Asn Ala Lys Phe Ala Phe Asn Leu Tyr Arg Val Leu Lys Asp Gln

130 135 140

Val Asn Thr Phe Asp Asn Ile Phe Ile Ala Pro Val Gly Ile Ser Thr

145 150 155 160

Ala Met Gly Met Ile Ser Leu Gly Leu Lys Gly Glu Thr His Glu Gln

 165 170 175

Val His Ser Ile Leu His Phe Lys Asp Phe Val Asn Ala Ser Ser Lys

180 185 190

Tyr Glu Ile Thr Thr Ile His Asn Leu Phe Arg Lys Leu Thr His Arg

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

Gly Thr Gln Ala Thr Thr Val Thr Thr Val Gly Phe Met Pro Leu Ser
 450 455 460
 Thr Gln Val Arg Phe Thr Val Asp Arg Pro Phe Leu Phe Leu Ile Tyr
 465 470 475 480
 Glu His Arg Thr Ser Cys Leu Leu Phe Met Gly Arg Val Ala Asn Pro
 485 490 495
 Ser Arg Ser

<210> 7

<211> 418

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys

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

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

130 135 140
 Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys

145 150 155 160
 Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val Asn Phe Gly Asp Thr Glu Glu
 165 170 175
 Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val Glu Lys Gly Thr Gln Gly Lys
 180 185 190
 Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu

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

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

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

 385 390 395 400

Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr

405 410 415

Gln Lys

<210> 8

<211> 427

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met His Leu Ile Asp Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Val Gly Leu Leu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Ser Ser His Gln Gln Ile Leu Glu Thr Gly Glu Gly Ser Pro Ser

35 40 45

Leu Lys Ile Ala Pro Ala Asn Ala Asp Phe Ala Phe Arg Phe Tyr Tyr

50 55 60

Leu Ile Ala Ser Glu Thr Pro Gly Lys Asn Ile Phe Phe Ser Pro Leu

65 70 75 80

Ser Ile Ser Ala Ala Tyr Ala Met Leu Ser Leu Gly Ala Cys Ser His

85 90 95

Ser Arg Ser Gln Ile Leu Glu Gly Leu Gly Phe Asn Leu Thr Glu Leu

100 105 110

Ser Glu Ser Asp Val His Arg Gly Phe Gln His Leu Leu His Thr Leu

115 120 125

Asn Leu Pro Gly His Gly Leu Glu Thr Arg Val Gly Ser Ala Leu Phe

130 135 140

Leu Ser His Asn Leu Lys Phe Leu Ala Lys Phe Leu Asn Asp Thr Met

145 150 155 160

Ala Val Tyr Glu Ala Lys Leu Phe His Thr Asn Phe Tyr Asp Thr Val

165 170 175

Gly Thr Ile Gln Leu Ile Asn Asp His Val Lys Lys Glu Thr Arg Gly

180	185	190
Lys Ile Val Asp Leu Val Ser Glu Leu Lys Lys Asp Val Leu Met Val		
195	200	205
Leu Val Asn Tyr Ile Tyr Phe Lys Ala Leu Trp Glu Lys Pro Phe Ile		
210	215	220
Ser Ser Arg Thr Thr Pro Lys Asp Phe Tyr Val Asp Glu Asn Thr Thr		
225	230	235
Val Arg Val Pro Met Met Leu Gln Asp Gln Glu His His Trp Tyr Leu		
245	250	255
His Asp Arg Tyr Leu Pro Cys Ser Val Leu Arg Met Asp Tyr Lys Gly		
260	265	270
Asp Ala Thr Val Phe Phe Ile Leu Pro Asn Gln Gly Lys Met Arg Glu		
275	280	285
Ile Glu Glu Val Leu Thr Pro Glu Met Leu Met Arg Trp Asn Asn Leu		
290	295	300
Leu Arg Lys Arg Asn Phe Tyr Lys Lys Leu Glu Leu His Leu Pro Lys		
305	310	315
Phe Ser Ile Ser Gly Ser Tyr Val Leu Asp Gln Ile Leu Pro Arg Leu		
325	330	335
Gly Phe Thr Asp Leu Phe Ser Lys Trp Ala Asp Leu Ser Gly Ile Thr		
340	345	350
Lys Gln Gln Lys Leu Glu Ala Ser Lys Ser Phe His Lys Ala Thr Leu		
355	360	365
Asp Val Asp Glu Ala Gly Thr Glu Ala Ala Ala Ala Thr Ser Phe Ala		
370	375	380
Ile Lys Phe Phe Ser Ala Gln Thr Asn Arg His Ile Leu Arg Phe Asn		
385	390	395
Arg Pro Phe Leu Val Val Ile Phe Ser Thr Ser Thr Gln Ser Val Leu		
405	410	415
Phe Leu Gly Lys Val Val Asp Pro Thr Lys Pro		
420	425	

<210> 9

<211> 402

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Gln Met Ser Pro Ala Leu Thr Cys Leu Val Leu Gly Leu Ala Leu

1 5 10 15

Val Phe Gly Glu Gly Ser Ala Val His His Pro Pro Ser Tyr Val Ala

20 25 30

His Leu Ala Ser Asp Phe Gly Val Arg Val Phe Gln Gln Val Ala Gln

35 40 45

Ala Ser Lys Asp Arg Asn Val Val Phe Ser Pro Tyr Gly Val Ala Ser

50 55 60

Val Leu Ala Met Leu Gln Leu Thr Thr Gly Gly Glu Thr Gln Gln Gln

65 70 75 80

Ile Gln Ala Ala Met Gly Phe Lys Ile Asp Asp Lys Gly Met Ala Pro

85 90 95

Ala Leu Arg His Leu Tyr Lys Glu Leu Met Gly Pro Trp Asn Lys Asp

100 105 110

Glu Ile Ser Thr Thr Asp Ala Ile Phe Val Gln Arg Asp Leu Lys Leu

115 120 125

Val Gln Gly Phe Met Pro His Phe Phe Arg Leu Phe Arg Ser Thr Val

130 135 140

Lys Gln Val Asp Phe Ser Glu Val Glu Arg Ala Arg Phe Ile Ile Asn

145 150 155 160

Asp Trp Val Lys Thr His Thr Lys Gly Met Ile Ser Asn Leu Leu Gly

165 170 175

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

180 185 190

Tyr Phe Asn Gly Gln Trp Lys Thr Pro Phe Pro Asp Ser Ser Thr His

195 200 205

Arg Arg Leu Phe His Lys Ser Asp Gly Ser Thr Val Ser Val Pro Met

210 215 220
 Met Ala Gln Thr Asn Lys Phe Asn Tyr Thr Glu Phe Thr Thr Pro Asp
 225 230 235 240

 Gly His Tyr Tyr Asp Ile Leu Glu Leu Pro Tyr His Gly Asp Thr Leu
 245 250 255
 Ser Met Phe Ile Ala Ala Pro Tyr Glu Lys Glu Val Pro Leu Ser Ala
 260 265 270
 Leu Thr Asn Ile Leu Ser Ala Gln Leu Ile Ser His Trp Lys Gly Asn
 275 280 285
 Met Thr Arg Leu Pro Arg Leu Leu Val Leu Pro Lys Phe Ser Leu Glu
 290 295 300

 Thr Glu Val Asp Leu Arg Lys Pro Leu Glu Asn Leu Gly Met Thr Asp
 305 310 315 320
 Met Phe Arg Gln Phe Gln Ala Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asp Gln Glu
 325 330 335
 Pro Leu His Val Ala Gln Ala Leu Gln Lys Val Lys Ile Glu Val Asn
 340 345 350
 Glu Ser Gly Thr Val Ala Ser Ser Ser Thr Ala Val Ile Val Ser Ala
 355 360 365

 Arg Met Ala Pro Glu Glu Ile Ile Met Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val
 370 375 380
 Val Arg His Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Phe Met Gly Gln Val Met
 385 390 395 400
 Glu Pro

<210> 10

<211> 444

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Lys Val Val Pro Ser Leu Leu Leu Ser Val Leu Leu Ala Gln Val
 1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Pro Gln Asn Gln Thr Ser Arg Val Val Gln Ala Pro Lys Glu Glu

35 40 45

Glu Glu Asp Glu Gln Glu Ala Ser Glu Glu Lys Ala Ser Glu Glu Glu

50 55 60

Lys Ala Trp Leu Met Ala Ser Arg Gln Gln Leu Ala Lys Glu Thr Ser

65 70 75 80

Asn Phe Gly Phe Ser Leu Leu Arg Lys Ile Ser Met Arg His Asp Gly

85 90 95

Asn Met Val Phe Ser Pro Phe Gly Met Ser Leu Ala Met Thr Gly Leu

100 105 110

Met Leu Gly Ala Thr Gly Pro Thr Glu Thr Gln Ile Lys Arg Gly Leu

115 120 125

His Leu Gln Ala Leu Lys Pro Thr Lys Pro Gly Leu Leu Pro Ser Leu

130 135 140

Phe Lys Gly Leu Arg Glu Thr Leu Ser Arg Asn Leu Glu Leu Gly Leu

145 150 155 160

Thr Gln Gly Ser Phe Ala Phe Ile His Lys Asp Phe Asp Val Lys Glu

165 170 175

Thr Phe Phe Asn Leu Ser Lys Arg Tyr Phe Asp Thr Glu Cys Val Pro

180 185 190

Met Asn Phe Arg Asn Ala Ser Gln Ala Lys Arg Leu Met Asn His Tyr

195 200 205

Ile Asn Lys Glu Thr Arg Gly Lys Ile Pro Lys Leu Phe Asp Glu Ile

210 215 220

Asn Pro Glu Thr Lys Leu Ile Leu Val Asp Tyr Ile Leu Phe Lys Gly

225 230 235 240

Lys Trp Leu Thr Pro Phe Asp Pro Val Phe Thr Glu Val Asp Thr Phe

245 250 255

His Leu Asp Lys Tyr Lys Thr Ile Lys Val Pro Met Met Tyr Gly Ala

260 265 270
Gly Lys Phe Ala Ser Thr Phe Asp Lys Asn Phe Arg Cys His Val Leu

275 280 285
Lys Leu Pro Tyr Gln Gly Asn Ala Thr Met Leu Val Val Leu Met Glu

290 295 300
Lys Met Gly Asp His Leu Ala Leu Glu Asp Tyr Leu Thr Thr Asp Leu

305 310 315 320
Val Glu Thr Trp Leu Arg Asn Met Lys Thr Arg Asn Met Glu Val Phe

325 330 335
Phe Pro Lys Phe Lys Leu Asp Gln Lys Tyr Glu Met His Glu Leu Leu

340 345 350
Arg Gln Met Gly Ile Arg Arg Ile Phe Ser Pro Phe Ala Asp Leu Ser

355 360 365
Glu Leu Ser Ala Thr Gly Arg Asn Leu Gln Val Ser Arg Val Leu Gln

370 375 380
Arg Thr Val Ile Glu Val Asp Glu Arg Gly Thr Glu Ala Val Ala Gly

385 390 395 400
Ile Leu Ser Glu Ile Thr Ala Tyr Ser Met Pro Pro Val Ile Lys Val

405 410 415
Asp Arg Pro Phe His Phe Met Ile Tyr Glu Glu Thr Ser Gly Met Leu

420 425 430
Leu Phe Leu Gly Arg Val Val Asn Pro Thr Leu Leu

435 440
<210> 11

<211> 398
<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 11

Met Asn Trp His Leu Pro Leu Phe Leu Leu Ala Ser Val Thr Leu Pro
1 5 10 15

Ser Ile Cys Ser His Phe Asn Pro Leu Ser Leu Glu Glu Leu Gly Ser

20 25 30
 Asn Thr Gly Ile Gln Val Phe Asn Gln Ile Val Lys Ser Arg Pro His
 35 40 45
 Asp Asn Ile Val Ile Ser Pro His Gly Ile Ala Ser Val Leu Gly Met
 50 55 60
 Leu Gln Leu Gly Ala Asp Gly Arg Thr Lys Lys Gln Leu Ala Met Val
 65 70 75 80
 Met Arg Tyr Gly Val Asn Gly Val Gly Lys Ile Leu Lys Lys Ile Asn

 85 90 95
 Lys Ala Ile Val Ser Lys Lys Asn Lys Asp Ile Val Thr Val Ala Asn
 100 105 110
 Ala Val Phe Val Lys Asn Ala Ser Glu Ile Glu Val Pro Phe Val Thr
 115 120 125
 Arg Asn Lys Asp Val Phe Gln Cys Glu Val Arg Asn Val Asn Phe Glu
 130 135 140
 Asp Pro Ala Ser Ala Cys Asp Ser Ile Asn Ala Trp Val Lys Asn Glu

 145 150 155 160
 Thr Arg Asp Met Ile Asp Asn Leu Leu Ser Pro Asp Leu Ile Asp Gly
 165 170 175
 Val Leu Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Val Tyr Phe Lys Gly Leu
 180 185 190
 Trp Lys Ser Arg Phe Gln Pro Glu Asn Thr Lys Lys Arg Thr Phe Val
 195 200 205
 Ala Ala Asp Gly Lys Ser Tyr Gln Val Pro Met Leu Ala Gln Leu Ser

 210 215 220
 Val Phe Arg Cys Gly Ser Thr Ser Ala Pro Asn Asp Leu Trp Tyr Asn
 225 230 235 240
 Phe Ile Glu Leu Pro Tyr His Gly Glu Ser Ile Ser Met Leu Ile Ala
 245 250 255
 Leu Pro Thr Glu Ser Ser Thr Pro Leu Ser Ala Ile Ile Pro His Ile
 260 265 270

Ser Thr Lys Thr Ile Asp Ser Trp Met Ser Ile Met Val Pro Lys Arg

275 280 285

Val Gln Val Ile Leu Pro Lys Phe Thr Ala Val Ala Gln Thr Asp Leu

290 295 300

Lys Glu Pro Leu Lys Val Leu Gly Ile Thr Asp Met Phe Asp Ser Ser

305 310 315 320

Lys Ala Asn Phe Ala Lys Ile Thr Thr Gly Ser Glu Asn Leu His Val

325 330 335

Ser His Ile Leu Gln Lys Ala Lys Ile Glu Val Ser Glu Asp Gly Thr

340 345 350

Lys Ala Ser Ala Ala Thr Thr Ala Ile Leu Ile Ala Arg Ser Ser Pro

355 360 365

Pro Trp Phe Ile Val Asp Arg Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg His Asn

370 375 380

Pro Thr Gly Ala Val Leu Phe Met Gly Gln Ile Asn Lys Pro

385 390 395

<210> 12

<211> 418

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Modified Serpin in alpha1AT scaffold

<400> 12

Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn

35 40 45

Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln

50 55 60

Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser

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

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

370 375 380
Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu
385 390 395 400
Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr
405 410 415
Gln Lys

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 13

Met Arg Gly Ser His His His His His His

1 5 10

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 14

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 15

Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser

1 5 10 15

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 16

Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 17

Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 18

His His His His

1

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 19

His His His His His

1 5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 20

His His His His His His

1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 21

His His His His His His His

1 5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 22

His His His His His His His His

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 23

His His His His His His His His His

1 5

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 24

His His His His His His His His His His

1 5 10

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 25

Cys Cys Cys Cys

1

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 26

Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe

1 5 10

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 27

Asp Asp Asp Asp Asp

1 5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 28

Asp Asp Asp Asp Asp Asp

1 5

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 29

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

1 5

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 30

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 31

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

1 5

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 32

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

1 5 10

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 33

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

1 5 10

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 34

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

1 5 10

<210> 35

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 35

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

1 5 10

<210> 36

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 36

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

1 5 10

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 37

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

1 5 10 15

<210> 38

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 38

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

1 5 10 15

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 39

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 40

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 41

Met Lys Ala Glu Phe Arg Arg Gln Glu Ser Asp Arg

1 5 10

<210> 42

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Affinity Tag

<400> 42

Met Arg Asp Ala Leu Asp Arg Leu Asp Arg Leu Ala

1 5 10

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Thr Ile Phe Thr Phe Arg Ser Ala Arg Leu

1 5 10

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant

<400> 44

Thr Ile Phe Thr Lys Arg Lys Ala Arg Leu

1 5 10

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant

<400> 45

Thr Ile Ser Thr His Arg Arg Ala Arg Leu

1 5 10

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant

<400> 46

Thr Ile Arg Thr Gln Arg Val Ala Arg Leu

1 5 10

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant

<400> 47

Thr Ile Thr Thr Leu Arg Tyr Ala Arg Leu

1 5 10

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant

<400> 48

Thr Ile Gln Thr Arg Arg Asn Ala Arg Leu

1 5 10

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant

<400> 49

Thr Ile Ala Thr Gln Arg Tyr Ala Arg Leu

1 5 10

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant

<400> 50

Thr Ile Ser Thr Leu Arg Lys Ala Arg Leu

1 5 10

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant

<

<400> 51

Thr Ile Phe Thr Phe Arg Arg Ala Arg Leu

1 5 10

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant

<400> 52

Thr Ile Val Thr Arg Arg Ile Ala Arg Leu

1 5 10

<210> 53

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant
 <400> 53

Thr Ile Phe Thr Arg Arg Lys Ala Arg Leu
 1 5 10

<210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant
 <400> 54

Thr Ile Cys Thr Leu Arg Lys Ala Arg Leu
 1 5 10

<210> 55
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant
 <400> 55

Thr Ile Trp Thr Trp Arg Asn Ala Arg Leu
 1 5 10

<210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant
 <400> 56

Thr Ile Lys Thr Asp Arg Met Ala Arg Leu
 1 5 10

<210> 57
 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant

<400> 57

Thr Ile Phe Thr Val Arg Lys Ala Arg Leu

1 5 10

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant

<

400> 58

Thr Ile Arg Thr Arg Arg Ile Ala Arg Leu

1 5 10

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant

<400> 59

Thr Ile Gly Thr Ile Arg Arg Ala Arg Leu

1 5 10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant

<400> 60

Thr Ile Lys Thr Arg Arg His Ala Arg Leu

1 5 10

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant

<400> 61

Thr Ile Thr Thr Arg Arg Val Ala Arg Leu

1 5 10

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant

<400> 62

Thr Ile Leu Thr Arg Arg Ile Ala Arg Leu

1 5 10

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of PCI variant

<400> 63

Thr Ile His Thr Arg Arg Val Ala Arg Leu

1 5 10

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alpha1 AT variant

<400> 65

Leu Glu Ala Ile Pro Arg Ser Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 66

Leu Glu Ala Ile Lys Arg Ser Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 67

Leu Glu Ala Ile Arg Arg Ser Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 68

Leu Glu Ala Ile Pro Arg Glu Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 69

Leu Glu Ala Ile Pro Arg Arg Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alpha1 AT variant

<400> 70

Leu Glu Ala Ile Pro Arg Lys Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alpha1 AT variant

<400> 71

Leu Glu Ala Ile Thr Arg Asn Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alpha1 AT variant

<400> 72

Leu Glu Ala Ile Gln Arg Lys Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alpha1 AT variant

<400> 73

Leu Glu Ala Ile Arg Arg Ala Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 74

Leu Glu Ala Ile Ser Arg Arg Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 75

Leu Glu Ala Ile Lys Arg Asn Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 76

Leu Glu Ala Ile Thr Arg Tyr Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 77

Leu Glu Ala Ile Arg Arg His Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 78

Leu Glu Ala Ile Thr Arg Arg Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 79

Leu Glu Ala Ile Val Arg Arg Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 80

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 80

Leu Glu Ala Ile Arg Arg Cys Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 81

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 81

Leu Glu Ala Ile Lys Arg His Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 82

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 82

Leu Glu Ala Ile Tyr Arg Arg Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 83

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 83

Leu Glu Ala Ile Ala Arg Arg Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 84

Leu Glu Ala Ile Cys Arg Lys Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 85

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 85

Leu Glu Ala Ile Trp Arg Asn Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 86

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 86

Leu Glu Ala Ile Ser Arg Arg Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 87

Leu Glu Ala Ile His Arg Asn Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 88

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 88

Leu Glu Ala Ile Arg Arg Asn Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 89

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alphas AT variant

<400> 89

Leu Glu Ala Ile Pro Arg Lys Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 90

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alpha1 AT variant

<400> 90

Leu Glu Ala Ile Asn Arg Asn Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 91

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alpha1 AT variant

<400> 91

Leu Glu Ala Ile Thr Arg Met Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 92

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alpha1 AT variant

<400> 92

Leu Glu Ala Ile Thr Arg His Ile Pro Pro

1 5 10

<210> 93

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: RCL sequence of alpha1 AT variant

<400> 93

Leu Glu Ala Ile Thr Arg Gln Ile Pro Pro

1 5 10