(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년12월29일
(11) 등록번호 10-2483046
(24) 등록일자 2022년12월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 9/127* (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
*A61K 47/10* (2017.01) *A61K 47/18* (2017.01)
*A61K 47/24* (2017.01) *A61K 47/26* (2017.01)
*A61K 9/00* (2006.01) *A61K 9/19* (2006.01)
*A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A61K 9/127* (2013.01)
*A61K 38/17* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7006894(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년11월02일
심사청구일자 2022년03월28일
(85) 번역문제출일자 2022년02월28일
(65) 공개번호 10-2022-0034916
(43) 공개일자 2022년03월18일
(62) 원출원 특허 10-2020-7030474
원출원일자(국제) 2018년11월02일
심사청구일자 2021년08월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/059016
(87) 국제공개번호 WO 2019/182650
국제공개일자 2019년09월26일
(30) 우선권주장
62/647,058 2018년03월23일 미국(US)
62/678,668 2018년05월31일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2014078522 A1
WO2007127439 A1

(73) 특허권자
**벡션 파마슈티컬스 인크.**
미국 41011 켄터키주 커빙턴 러셀 스트리트 632
(72) 발명자
**몬슨 엘렌 케이**
미국 45220 오하이오주 신시내티 라파예트 써클 207
**웨이 크시아오첸**
미국 41017 켄터키주 포트 미첼 버드살 애비뉴 145
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**김진희, 김태홍**

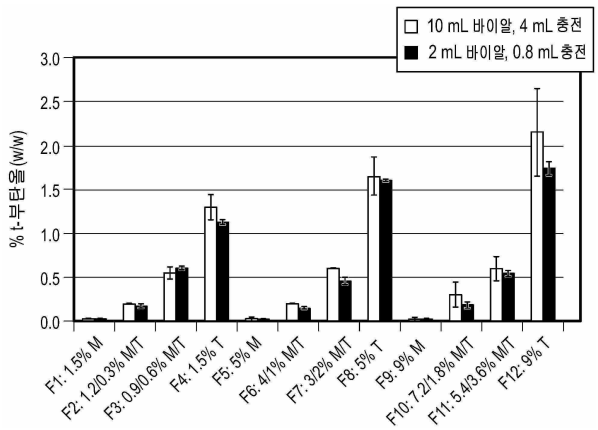
전체 청구항 수 : 총 18 항 심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 **사포신 C 약학 조성물 및 암 치료 방법**

## (57) 요 약

다양한 암들을 치료하는 데 유용한 사포신(saposin) C 및 포스파티딜세린을 함유하는 약학 조성물이 개시된다.

*대 표 도* - 도19



(52) CPC특허분류
*A61K 47/10* (2013.01)
*A61K 47/18* (2013.01)
*A61K 47/24* (2013.01)
*A61K 47/26* (2013.01)
*A61K 9/0019* (2013.01)
*A61K 9/19* (2013.01)
*A61P 35/00* (2018.01)
(72) 발명자
**타키기쿠 레이**
미국 41011 켄터키주 코빙턴 가라드 스트리트 202
**크루제 3세 찰스 에이**
미국 45069 오하이오주 웨스트 체스터 탱글우드 레인 7628
**와이즈 죠셉 더블유**
미국 40356 켄터키주 니콜라스빌 윈디 뷰 코트 104

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드;

포스파티딜세린 지질;

pH 5.0 내지 8.0의 완충제;

트레할로스; 및

물

을 포함하는 조성물로서, 상기 폴리펩타이드는 0.4 내지 5.0 mg/mℓ의 농도로 존재하고,

포스파티딜세린 지질 대 폴리펩타이드의 몰 비가 8:1 내지 20:1의 범위에 있고, 및

포스파티딜세린 지질 및 폴리펩타이드는 물에 현탁된 소포의 형태로 함께 회합되는 것인 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 조성물 중 소포는 동적 광 산란 기술에 의해 측정할 때, 100 nm 미만의 직경을 갖는 것인 조성물.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 트레할로스는 1.5 내지 9 %w/v의 농도로 존재하는 것인 조성물.

### 청구항 4

제2항에 있어서, 트레할로스는 (5±1) %w/v의 농도로 존재하는 것인 조성물.

### 청구항 5

제2항에 있어서, 포스파티딜세린 지질은 디올레오일 포스파티딜세린(DOPS), 디헥산오일 포스파티딜세린, 디옥탄오일 포스파티딜세린, 디데칸오일 포스파티딜세린, 디라우로일 포스파티딜세린, 디미리스토일 포스파티딜세린, 디팔미토일 포스파티딜세린, 팔미토일-올레오일 포스파티딜세린, 1-스테아로일-2-올레오일 포스파티딜세린 또는 디파이탄오일 포스파티딜세린 중 하나 이상을 포함하고, 포스파티딜세린 지질은 염 또는 비-염 형태인 조성물.

### 청구항 6

제2항에 있어서, 포스파티딜세린 지질은 염 형태의 DOPS를 포함하는 것인 조성물.

### 청구항 7

제2항에 있어서, 포스파티딜세린 지질은 양이온을 가진 염의 형태로 DOPS를 포함하는 것인 조성물.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 양이온은 나트륨 이온인 조성물.

### 청구항 9

제2항에 있어서, 2 %w/w 미만의 농도의 t-부틸 알코올을 추가로 포함하는 것인 조성물.

### 청구항 10

제9항에 있어서, t-부틸 알코올은 0.5 %w/w 미만의 농도로 존재하는 것인 조성물.

**청구항 11**

제6항에 있어서, 2 %w/w 미만의 농도의 t-부틸 알코올을 추가로 포함하는 것인 조성물.

**청구항 12**

제6항에 있어서, 트레할로스는 1.5 내지 9 %w/v의 농도로 존재하는 것인 조성물.

**청구항 13**

제6항에 있어서, 트레할로스는 (5±1) %w/v의 농도로 존재하는 것인 조성물.

**청구항 14**

제12항에 있어서, 폴리펩타이드는 1.9 내지 2.5 ㎎/㎖의 농도로 존재하고 DOPS는 2.0 내지 2.8 ㎎/㎖의 농도로 존재하는 것인 조성물.

**청구항 15**

제2항에 있어서, 완충제는 Tris 완충제, 구연산염 완충제 또는 아세트산염 완충제이고, 10 내지 50 ㎜의 농도로 존재하는 것인 조성물.

**청구항 16**

제7항에 있어서, 폴리펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고, 1.9 내지 2.5 ㎎/㎖의 농도로 존재하는 것인 조성물.

**청구항 17**

제16항에 있어서, DOP 대 폴리펩타이드의 몰 비가 11:1 내지 13:1 범위에 있는 것인 조성물.

**청구항 18**

사포신 C 및 음이온성 인지질을 포함하는 조성물의 효능을 어세이하기 위한 시험관내 방법으로서, 음이온성 인지질은 디올레오일 포스파티딜세린(DOPS)이고, 상기 방법은

조성물을 글루코세레브로시다제 및 4-메틸움벨리페릴-β-D-글루코피라노사이드(4-MUG)와 접촉시키는 것을 포함하는 제1 어세이를 수행하는 단계;

기준 표준 조성물을 글루코세레브로시다제 및 4-MUG와 접촉시키는 것을 포함하는 대조군 어세이를 수행하는 단계;

제1 어세이에서 4-MUG의 절단 결과로 형성된 4-메틸움벨리에론(4-MU)의 수준을 결정하는 단계;

대조군 어세이에서 4-MUG의 절단 결과로 형성된 4-MU의 수준을 결정하는 단계; 및

제1 어세이에서 형성된 4-MU의 수준을 대조군 어세이에서의 4-MU의 수준과 비교하여 조성물의 상대적 효능을 결정하는 단계를 포함하는 시험관내 방법.

**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

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 관련 출원의 교차참조

[0002] 본원은 2018년 3월 23일에 출원된 미국 가출원 제62/647,058호, 및 2018년 5월 31일에 출원된 미국 가출원 제62/678,668호의 이익을 주장한다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 사포신(saposin) C를 함유하는 조성물 및 다양한 암 병태들을 치료하기 위해 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0005] 작은(약 80개 아미노산) 열안정성 당단백질의 패밀리인 사포신은 당스핑고지질의 이화 경로에서 여러 라이소좀 효소들의 생체내 가수분해 활성에 필수적이다. 사포신 A, B, C 및 D는 미국 특허 제7,834,147호 및 제9,271,932호에 기재되어 있다.

[0006] 사포신 C("SapC") 및 디올레오일 포스파티딜세린(DOPS)을 포함하는 나노소포는 시험관내 및 생체내에서 포스파티딜세린 풍부 막에 대한 고친화성을 갖고, 표적 세포에서 아폽토시스 및/괴사를 유도할 수 있다(Qi et al. (2009), Clin Cancer Res 2009; 15: 5840-5851). SapC-DOPS 나노소포가 아폽토시스를 유도하는 제안된 기작은 캐스파제의 활성화를 유발하는, β-글루코시다제 및 산 스핑고미엘리나제(sphingomyelinase)(각각 글루코실세라마이드 및 스핑고미엘린을 후속적으로 분해함)의 활성화를 통한 세라마이드 상승을 통해 작용한다. 나노소포 제제는 시험관내 및 정위 뮤린 종양 모델에서 매우 다양한 종류의 종양들에 대한 효능을 갖는 것으로 발견되었다(Qi et al. (2009); Wojton et al. (2013), Mol Ther, 21: 1517-1525; Abu-Baker et al. (2012), J Cancer Ther, 3: 321-326; Chu et al. (2013), PLoS One; 8: e75507; 미국 특허 제7,834,147호).

### 발명의 내용

[0007] 본 개시는 사포신 C를 포함하는 수성 및 고체 조성물, 및 암의 치료에 있어서 이러한 조성물을 사용하는 방법에 관한 것이다.

[0008] 0개 내지 4개의 아미노산 삽입, 치환 또는 결실을 가진 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드; 포스파티딜세린 지질; pH 5.0 내지 8.0의 완충제; 1.5 내지 9 %w/w의 트레할로스; 0% 내지 35%의 t-부틸 알코올; 및 물을 포함하는 조성물이 기재된다. 상기 폴리펩타이드는 0.4 내지 5.0 ㎎/㎖의 농도로 존재하고, 포스파티딜세린 지질 대 폴리펩타이드의 몰 비는 8:1 내지 20:1의 범위에 있다. 일부 실시양태에서, 완충제는 10 내지 50 mM의 농도의 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(Tris)이고, 조성물의 pH는 pH 6.8 내지 7.6이다. 일부 실시양태에서, 완충제는 10 내지 50 mM의 농도의 구연산염 완충제이다. 일부 실시양태에서, 완충제는 10 내지 50 mM의 농도의 아세트산염 완충제이다. 일부 실시양태에서, 포스파티딜세린 지질은 디올레오일 포스파티딜세린(DOPS), 디헥산오일 포스파티딜세린 지질, 디옥탄오일 포스파티딜세린 지질, 디데칸오일 포스파티딜세린 지질, 디라우로일 포스파티딜세린 지질, 디미리스토일 포스파티딜세린 지질, 디팔미토일 포스파티딜세린 지질, 팔미토일-올레오일 포스파티딜세린 지질, 1-스테아로일-2-올레오일 포스파티딜세린 지질 또는 디파이탄오일 포스파티딜세린 지질 중 하나 이상을 포함한다. 포스파티딜세린 지질은 나트륨 염과 같은 염의 형태로 존재할 수 있는

바람직하게는 DOPS이다. 다양한 경우, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열, 또는 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 치환 또는 결실을 가진 서열번호 1의 서열을 포함하거나 이러한 서열로 구성된다. 바람직한 실시양태에서, 상기 조성물은 1.9 내지 2.5 ㎎/㎖의 농도의 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드; 2.0 내지 2.8 ㎎/㎖의 농도의 DOPS; 23 내지 27 ㎜M의 농도의 Tris; 4 내지 6 %w/w의 농도의 트레할로스; 및 약 15 내지 25 %w/w의 농도의 t-부틸 알코올을 포함하고, pH 6.8 내지 7.6의 범위의 pH를 가진다.

[0009] 0개 내지 4개의 아미노산 삽입, 치환 또는 결실을 가진 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드; 포스파티딜세린 지질; 완충제; 및 75 내지 90 %w/w의 트레할로스를 포함하는 고체 형태의 조성물, 예를 들면, 동결건조된 분말 조성물도 기재된다. 이 조성물 중의 상기 폴리펩타이드는 3.2 내지 4.4 %w/w의 농도로 존재하고, 포스파티딜세린 지질 대 폴리펩타이드의 몰 비는 8:1 내지 20:1의 범위에 있다. 일부 실시양태에서, 완충제는 5.6 내지 7.6 %w/w의 Tris이다. 일부 실시양태에서, 완충제는 9 내지 13 %w/w의 구연산염 완충제이다. 일부 실시양태에서, 완충제는 3 내지 5 %w/w의 아세트산염 완충제이다. 일부 실시양태에서, 포스파티딜세린 지질은 디올레오일 포스파티딜세린(DOPS), 디헥산오일 포스파티딜세린 지질, 디옥탄오일 포스파티딜세린 지질, 디데칸오일 포스파티딜세린 지질, 디라우로일 포스파티딜세린 지질, 디미리스토일 포스파티딜세린 지질, 디팔미토일 포스파티딜세린 지질, 팔미토일-올레오일 포스파티딜세린 지질, 1-스테아로일-2-올레오일 포스파티딜세린 지질, 또는 디파이탄오일 포스파티딜세린 지질 중 하나 이상을 포함한다. 다양한 경우, 상기 조성물은 서열번호 1의 폴리펩타이드 아미노산 서열을 포함하거나 이 서열로 구성되거나, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 치환 또는 결실을 가진 서열번호 1의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이 조성물은 3 %w/w 미만의 양으로 t-부틸 알코올을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 고체 조성물은 3.3 내지 4.3 %w/w의 농도의 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드; 3.4 내지 4.8 %w/w의 농도의 DOPS(예를 들면, 나트륨 염); 6.0 내지 7.2 %w/w의 농도의 Tris; 81 내지 87.3 %w/w의 농도의 트레할로스; 및 3 %w/w 미만의 농도의 t-부틸 알코올을 포함한다.

[0010] 0개 내지 4개의 아미노산 삽입, 치환 또는 결실을 가진 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드; 포스파티딜세린 지질; pH 5.0 내지 8의 완충제; 1.5 내지 9 %w/v의 트레할로스; 및 물을 포함하는 약학 조성물도 기재된다. 상기 폴리펩타이드는 0.4 내지 5 ㎎/㎖의 농도로 존재하고, 포스파티딜세린 지질 대 폴리펩타이드의 몰 비는 8:1 내지 20:1의 범위에 있다. 일부 실시양태에서, 완충제는 10 내지 50 ㎜M의 농도의 Tris이고, 조성물의 pH는 pH 6.8 내지 7.6이다. 일부 실시양태에서, 완충제는 10 내지 50 ㎜M의 농도의 구연산염 완충제이다. 일부 실시양태에서, 완충제는 10 내지 50 ㎜M의 농도의 아세트산염 완충제이다. 일부 실시양태에서, 포스파티딜세린 지질은 DOPS, 디헥산오일 포스파티딜세린 지질, 디옥탄오일 포스파티딜세린 지질, 디데칸오일 포스파티딜세린 지질, 디라우로일 포스파티딜세린 지질, 디미리스토일 포스파티딜세린 지질, 디팔미토일 포스파티딜세린 지질, 팔미토일-올레오일 포스파티딜세린 지질, 1-스테아로일-2-올레오일 포스파티딜세린 지질, 또는 디파이탄오일 포스파티딜세린 지질 중 하나 이상을 포함하고, 바람직하게는 DOPS, 예를 들면, DOPS의 나트륨 염이다. 다양한 경우, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하거나 이 서열로 구성되거나, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 치환 또는 결실을 가진 서열번호 1의 서열을 포함하거나 이 서열로 구성된다. 일부 실시양태에서, 이 조성물은 3% 미만의 양으로 t-부틸 알코올을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 상기 조성물은 1.9 내지 2.5 ㎎/㎖의 농도의 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드; 2.0 내지 2.8 ㎎/㎖의 농도의 DOPS(바람직하게는 이의 나트륨 염 형태); 23 내지 27 ㎜M의 농도의 Tris; 4 내지 6 %w/w의 농도의 트레할로스; 및 0.5 %w/w 미만의 양의 t-부틸 알코올을 포함하고; pH 6.8 내지 7.6(보다 바람직하게는 pH 7.0 내지 7.4, 또는 pH 7.1 내지 7.3)의 범위의 pH를 가진다. 고형 종양일 수 있는 암을 치료하는 방법도 기재된다. 이 방법에 의해 치료될 수 있는 암의 예는 신경교종, 뇌실막세포종 및 소화기암, 예컨대, 직장 선암종을 포함한다. 상기 방법은 본원에 기재된 약학 조성물을 인간 암 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 본원에 기재된 고체 조성물을 물 또는 식염수로 재구성하여 재구성된 조성물을 생성하는 단계, 및 재구성된 조성물의 용량을 환자에게 정맥내로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 0.4 ㎎/㎏ 내지 7 ㎎/㎏ SapC의 용량으로 정맥내로 전달되고, 상기 조성물에서 SapC 대 DOPS의 비는 1.8 내지 1:20의 범위에 있다. 또 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 2.3 내지 2.5 ㎎/㎏ SapC의 용량으로 정맥내로 전달되고, 상기 조성물에서 SapC 대 DOPS의 비는 1:11 내지 1:13의 범위에 있다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 다음과 같이 적어도 2 주기에 걸쳐 환자에게 반복적으로 투여된다:

[0011] 주기 1:

[0012] 제1주(week): 1일째 날부터 5일째 날까지 각각 1회 투여;

[0013] 제2주: 이틀마다 3회/주, 예를 들면, 8일째 날, 10일째 날 및 12일째 날 각각 1회 투여;

[0014] 제3주 및 제4주: 매주(7(+/-3)일마다) 1회 투여;

[0015] 주기 2:

[0016] 제5주 동안 1회 투여; 및

[0017] 임의의 후속 주기:

[0018] 가장 최근의 이전 투여 후 28(+/-3)일째 날 1회 투여.

## 도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 샘플 75312-F10의 DSC 분석의 결과를 도시하는 그래프이다.

도 2는 표 2에 나열된 샘플들의 CD 분석의 결과를 도시하는 그래프이다.

도 3은 표 2에 나열된 샘플들의 CD 분석의 결과로부터 추정된 α-나선 및 랜덤 코일의 퍼센트를 도시하는 그래프이다.

도 4는 표 4에 나열된 각각의 샘플에 대한 310 nm에서의 광학 밀도 값을 도시하는 그래프이다.

도 5는 t=0일 때 및 60℃에서 10일 후, 표 4에 나열된 샘플들에 대한 SapC 순도의 SE-HPLC 측정을 도시하는 그래프이다.

도 6은 t=0일 때 및 60℃에서 10일 후, 표 4에 나열된 샘플들에 대한 SapC 순도의 RP-HPLC 측정을 도시하는 그래프이다.

도 7은 t=0일 때 및 60℃에서 10일 후, 표 4에 나열된 샘플들에 대한 SapC 순도의 IEX-HPLC 측정을 도시하는 그래프이다.

도 8은 t=0일 때 및 60℃에서 10일 후, 각각의 표 8 조성물에 대해 310 nm에서 어세이하였을 때 광학 밀도를 도시하는 그래프이다.

도 9는 t=0일 때 및 60℃에서 10일 후, 표 8 조성물에 대한 SapC 순도의 RP-HPLC 측정을 도시하는 그래프이다.

도 10은 t=0일 때 및 60℃에서 10일 후, 표 8 조성물에 대한 SapC 순도의 SE-HPLC 측정을 도시하는 그래프이다.

도 11은 t=0일 때 및 60℃에서 10일 후, 표 8 조성물에 대한 SapC 순도의 IEX-HPLC 측정을 도시하는 그래프이다.

도 12는 실시예 4에서 각각의 샘플의 pH를 도시하는 그래프이다.

도 13은 실시예 4에서 각각의 샘플의 단백질 함량을 도시하는 그래프이다.

도 14는 t=0일 때 및 50℃에서 2주 동안 저장한 후, 표 14에 나열된 샘플들에 대한 재구성된 조성물에서의 SapC 순도 및 퍼센트 회수의 RP-HPLC 측정을 도시하는 그래프이다.

도 15a 및 15b는 t=0일 때(도 15a) 및 50℃에서 5주 후(도 15b), 샘플 76114-F5에 대한 동적 광 산란의 결과를 도시하는 그래프이다.

도 16a 및 16b는 t=0일 때(도 16a) 및 50℃에서 5주 후(도 16b), 샘플 76114-F6에 대한 동적 광 산란의 결과를 도시하는 그래프이다.

도 17은 t=0일 때 표 21에 나열된 샘플들에 대한 각각의 재구성된 샘플에 대한 동적 광 산란의 결과를 도시하는 그래프이다.

도 18은 표 21에 나열된 샘플들에 대한 각각의 재구성된 샘플에 대한 시간에 따른 동적 광 산란의 변화를 도시하는 그래프이다.

도 19는 표 22 조성물의 각각의 재구성된 샘플의 TBA 퍼센트를 도시하는 그래프이다.

도 20은 표 23 조성물의 각각의 재구성된 샘플의 TBA 퍼센트를 도시하는 그래프이다.

도 21a 내지 21d는 표 23 조성물들 중 일부에 대한 재구성된 액체의 3개의 레플리케이트(replicate)에 대한 입자 크기 분포를 보여주는 그래프이다.

도 22는 표 26에 나열된 샘플들에 대한, 2주 또는 4주 동안 25℃에서 저장된 동결건조된 분말로부터 제조된 각각의 재구성된 조성물에서의 SapC 순도의 RP-HPLC 측정을 도시하는 그래프이다.

도 23은 표 26에 나열된 샘플들에 대한, 2주 또는 4주 동안 25℃에서 저장된 동결건조된 분말로부터 제조된 각각의 재구성된 조성물에서의 SapC 순도의 IEX-HPLC 측정을 도시하는 그래프이다.

도 24는 표 26에 나열된 샘플들에 대한, 2주 또는 4주 동안 25℃에서 저장된 동결건조된 분말로부터 제조된 각각의 재구성된 조성물에서의 시간에 따른 평균 입자 크기를 도시하는 그래프이다.

도 25는 SapC-DOPS의 활성을 시험하는 GBA 효소 어세이의 결과를 보여주는 그래프이다.

도 26은 1a 상 인구통계자료 및 유해 사건을 투약군별로 보여주는 표이다.

도 27a 내지 27c는 고형 종양을 가진 환자에서 24시간마다 0.75시간에 걸쳐 BXQ-350의 다회 용량 정맥내 투여 시 1일째 날(도 27a), 4일째 날(도 27b) 및 22일째 날(도 27c) 평균 SapC 혈장 농도-시간 프로파일을 보여주는 3개 세트의 그래프이다(로그 선형).

도 28a 내지 28d는 좌측부터 우측까지 사후 조직학 및 육안 해부학 분석으로부터의 결과를 도시한다: (도 28a) 초기 수술 표본은 뇌실막 분화 및 풍부한 유사분열 모습의 증거를 거의 보여주지 않았다. 40배율의 H&E; (도 28b) 부검 시 육안 뇌 검사는 광범위한 종양 괴사를 보여주었고; (도 28c) 종양 박편의 현미경 검사는 약간의 생존 종양 및 괴사를 보여주었고(40배율의 삽도와 함께 4배율의 H&E); (도 28d) 부검 시, 종양이 수술적 결함 및 두피를 통해 확장되어 있는 부위에서 광범위한 연골모양 분화가 있었다.

도 29는 1A 상 임상시험의 환자 결과를 보여주는 스위머 플롯(swimmer plot)이다.

도 30a 및 30b는 치료 시작 시(도 30a) 및 12개월 초과의 치료 후(도 30b) 한 쌍의 양전자 방출 단층촬영(PET) 영상이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0020] 본 발명은 뇌암을 비롯한 고형 종양과 같은 암을 치료하는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 상기 조성물은 사포신 폴리펩타이드, 예컨대, 사포신 C(SapC), 및 포스파티딜세린 또는 이의 구조적 유사체, 예를 들면, 디올레오일포스파티딜세린(DOPS)을 포함한다.

[0021] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "아미노산" 또는 "아미노산 서열"은 올리고펩타이드, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질 서열, 또는 이들 중 임의의 서열의 단편, 및 천연 생성 또는 합성 분자를 지칭한다. "아미노산 서열"이 천연 생성 단백질 분자의 아미노산 서열을 지칭하기 위해 본원에서 언급되는 경우, "아미노산 서열" 및 유사 용어는 아미노산 서열을 언급된 단백질 분자와 관련된 완전한 천연 아미노산 서열로 제한하기 위한 것이 아니다.

[0022] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "결실"은 하나 이상의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 부재를 야기하는 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열의 변화를 지칭한다.

[0023] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "삽입" 또는 "추가"는 천연 생성 분자에서 발견되는 서열에의 하나 이상의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 추가를 야기하는, 각각 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열의 변화를 지칭한다.

[0024] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "융합유도 단백질 또는 폴리펩타이드"는 2개의 별도의 이중층 막에 첨가될 때 단일 막으로의 이들의 융합을 야기할 수 있는 단백질 또는 펩타이드를 지칭한다. 융합유도 단백질은 세포 또는 모델 막이 가까이 접촉하게 하고 이들이 융합되게 한다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 리소좀 융합유도 단백질 및 폴리펩타이드는 사포신 패밀리의 단백질들을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0025] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "사포신"은 (인간 또는 다른 동물 종, 예컨대, 마우스, 래트, 돼지 및 소로부터 유래한) 천연 생성 사포신 A, B, C 및 D(예를 들면, 문헌[Qi et al. (1996) J. Biol. Chem. 271(12):6874-6880](참고로 포함됨) 참조)뿐만 아니라, 융합유도 활성을 보이는 합성 사포신 유래 단백질 및 펩타이드 및 펩타이드 유사체도 포함하나, 이들로 제한되지 않는, 전구사포신 유래 단백질 및 폴리펩타이드의 패밀리를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 사포신 폴리펩타이드는 인간 SapC의 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 서열로 구성된

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

Thr Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys Thr Glu Lys Glu Ile Leu Asp Ala Phe Asp Lys Met Cys

Ser Lys Leu ProLys Ser Leu Ser Glu Glu Cys Gln Glu Val Val Asp Thr Tyr Gly Ser Ser Ile

Leu Ser Ile Leu Leu Glu Glu Val Ser Pro Glu Leu Val Cys Ser Met Leu His Leu Cys Ser Gly 다: (서열번호 1). 다른 실시양태에서, SapC 폴리펩타이드는 0개 내지 4개의 아미노산 삽입, 치환 또는 결실, 예를 들면, 총 1개, 2개, 3개 또는 4개의 이러한 변화를 가진 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, SapC 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 치환 또는 결실, 또는 이러한 변화의 조합을 가진 서열번호 1을 포함한다. 인간 SapC의 융합유도 활성을 어느 정도 가진 폴리펩타이드 유사체도 포함된다. "유사체"는 SapC의 아미노산 서열의 치환 또는 다른 변경을 가진 폴리펩타이드로서, 이러한 치환 또는 변경이 폴리펩타이드의 융합유도성에 불리한 영향을 미치지 않는 것인 폴리펩타이드를 의미한다. 따라서, 유사체는 서열번호 1과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖고 하나 이상의 아미노산 잔기가 화학적으로 유사한 아미노산으로 보존적으로 치환되어 있는 폴리펩타이드일 것이다. 보존적 치환의 예는 비-극성(소수성) 잔기, 예컨대, 이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌을 또 다른 비-극성 잔기로 치환시키는 것을 포함한다. 마찬가지로, 본 발명은 한 극성(친수성) 잔기, 예컨대, 아르기닌과 라이신 사이, 글루타민과 아스파라긴 사이, 및 글리신과 세린 사이의 치환을 고려한다. 염기성 잔기, 예컨대, 라이신, 아르기닌 또는 히스티딘을 또 다른 염기성 잔기로 치환시키는 것, 또는 한 산성 잔기, 예컨대, 아스파르트산 또는 글루탐산을 또 다른 산성 잔기로 치환시키는 것도 고려된다.

[0026] SapC 및 이로부터 유래한 폴리펩타이드는 임의의 유용한 방법, 예를 들면, 화학적, 효소적 또는 재조합적으로 생성될 수 있다. 폴리펩타이드 및 이의 단편을 제조하는 방법은 당분야에서 공지되어 있고, 화학적 펩타이드 합성, 시험관내 번역 시스템 및 재조합 숙주 유기체로부터의 발현(및 정제)을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0027] "지질 소포" 및 "리포좀"은 전형적으로 하나 이상의 동심원 층, 예를 들면, 이중층 형태의 양친매성 지질의 일반적으로 구형 클러스터 또는 응집체를 지칭하기 위해 교환 가능하게 사용된다.

[0028] 용어 "포스파티딜세린" 및 "포스파티딜세린 지질"은 글리세롤의 제1 탄소 및 제2 탄소에 에스테르 결합으로 부착된 2개의 지방산, 및 글리세롤의 제3 탄소에 포스포디에스테르 결합을 통해 부착된 세린 모이어티를 가진 지질을 지칭하기 위해 교환 가능하게 사용된다. 본 조성물과 함께 사용될 수 있는 포스파티딜세린 지질의 예는 하기 지질들을 포함하나 이들로 제한되지 않는다: 디올레오일 포스파티딜세린 지질(DOPS); 디헥산오일 포스파티딜세린 지질; 디옥탄오일 포스파티딜세린 지질; 디데칸오일 포스파티딜세린 지질; 디라우로일 포스파티딜세린 지질; 디미리스토일 포스파티딜세린 지질; 디팔미토일 포스파티딜세린 지질; 팔미토일-올레오일 포스파티딜세린 지질; 1-스테아로일-2-올레오일 포스파티딜세린 지질; 및 디파이탄오일 포스파티딜세린 지질, 이때 DOPS가 바람직하다. 중성 pH의 수성 조성물에서, 이러한 포스파티딜세린 지질은 전형적으로 양이온을 가진 염의 형태로 존재하므로, 본 조성물에서 사용된 DOPS 및 다른 포스파티딜세린 지질의 언급은 염 형태의 지질 및 비-염 형태의 지질 둘 다를 포함하기 위한 것이다. 적합한 양이온은 포스파티딜세린 지질과 염을 형성하는 임의의 약학적으로 허용 가능한 양이온, 예컨대, 하기 양이온들 중 임의의 양이온을 포함한다: 암모늄 이온; L-아르기닌 이온; 벤자틴 이온; 데아놀 이온; 디에탄올아민(2,2'-이미노디에탄올) 이온; 하이드라바민 이온; 라이신 이온; 칼륨 이온; 나트륨 이온; 트리에탄올아민(2,2',2''-니트릴로트리(에탄-1-올)) 이온; 및 트로메타민(2-아미노-2-(하이드록시메틸)프로판-1,3-디올 이온. 나트륨, 칼륨 및 암모늄 염이 바람직하다.

[0029] 본 발명의 조성물은 완충제를 함유할 수 있다. 예시적 완충제는 아세트산염, 구연산염, 히스티딘, 석신산염 및 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(Tris; 트로메타민으로서도 공지되어 있음)뿐만 아니라, Tris의 공지된 유도체, 예컨대, 아미노 기가 변형되어 있는 유도체도 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 본 수성 조성물은 10 내지 50 mM(바람직하게는 20 내지 30 mM, 예를 들면, 25 mM)의 농도로 Tris를 함유하고, 이 조성물의 pH는 pH 6.8 내지 7.6(예를 들면, pH 7 내지 7.4, 예를 들면, pH 7.1 내지 7.3)이다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 10 내지 50 mM의 농도로 구연산염 완충제 또는 아세트산염 완충제를 함유하고, 상기 조성물의 pH는 pH 5.0 내지 8.0이다.

[0030] 안정화 물질 및/또는 증량제로서 유용한 생체적합성 중합체는 천연, 반합성(변형된 천연) 또는 합성 유래 중합체일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 중합체는 2개 이상의 반복 단량체 유닛들, 바람직하게는 10개 이상의 반복 단량체 유닛들로 구성된 화합물을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 반합성 중합체(또는 변형된 천연 중합체)는 일부 방식으로 화학적으로 변형된 천연 중합체를 의미한다. 본 발명에서 사용하기에 적

합한 예시적 천연 중합체는 천연 생성 폴리사카라이드를 포함한다. 이러한 폴리사카라이드는 예를 들면, 아라비난, 프럭탄, 푸칸, 갈락탄, 갈락투로난, 글루칸, 만난, 자일란(예컨대, 이눌린), 레반, 푸코이단, 카라기난, 갈라토카롤로스, 펙트산, 펙틴, 아밀로스, 풀루란, 글리코겐, 아밀로펙틴, 셀룰로스, 덱스트란, 덱스트린, 덱스트로스, 폴리덱스트로스, 푸스툴란, 키틴, 아가로스, 케라탄, 콘드로이탄, 데르마탄, 히알루론산, 알긴산, 잔탄검, 전분, 및 다양한 다른 천연 단독중합체들 또는 이종중합체들, 예컨대, 하기 알도스, 케토스, 산 또는 아민 중 하나 이상을 함유하는 중합체를 포함한다: 에리쓰로스, 트레오스, 리보스, 아라비노스, 자일로스, 라이속스, 알로스, 알트로스, 루코스, 만노스, 굴로스, 이도스, 갈락토스, 탈로스, 에리티룰로스, 리불로스, 자일룰로스, 프시코스, 프럭토스, 소르보스, 타가토스, 만니톨, 소르비톨, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 말토스, 셀로비오스, 글리신, 세린, 쓰레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산, 글루탐산, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 글루쿠론산, 글루콘산, 글루카르산, 갈락투론산, 만누론산, 글루코사민, 갈락토사민 및 뉴라민산, 및 이들의 천연 생성 유도체. 예시적 반합성 중합체는 카르복시메틸셀룰로스, 하이드록시메틸셀룰로스, 하이드록시프로필메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스 및 메톡시셀룰로스를 포함한다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 예시적 합성 중합체는 폴리에틸렌(예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리옥시에틸렌 및 폴리에틸렌 테레프탈레이트), 폴리프로필렌(예를 들면, 폴리프로필렌 글리콜), 폴리우레탄(예를 들면, 폴리비닐 알코올(PVA), 폴리비닐 클로라이드 및 폴리비닐피롤리돈(PVP)), 나일론을 비롯한 폴리아미드, 폴리스티렌, 폴리젖산, 불소첨가된 탄화수소, 불소첨가된 탄소(예컨대, 폴리테트라플루오로에틸렌) 및 폴리메틸메타크릴레이트, 및 이들 중 임의의 물질의 유도체를 포함한다. 안정화 화합물로서 중합체를 사용하는 소포 조성물의 제조 방법은 본 개시가 당분야에서 공지된 정보, 예컨대, 미국 특허 제5,205,290호(이의 개시는 전체적으로 본원에 참고로 포함됨)에 기재되고 언급된 정보와 커플링될 때, 일단 본 개시로 무장되면, 당분야의 숙련된 자에게 용이하게 자명할 것이다. 바람직한 형태에서, 본 조성물은 만니톨, 락토스, 트레할로스, 수크로스, PEG, PVP, 소르비톨 또는 글루코스 중 하나 이상을 함유한다.

[0031] 청구된 조성물의 제조를 위해 매우 다양한 기법들이 이용될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, DOPS 또는 또 다른 포스파티딜세린 지질을 유기 용매로 가용화시킨 후, 5분 내지 15분 동안 주위 온도에서 SapC를 비롯한 수계 성분들과 조합한다. 이 목적을 위해 사용될 수 있는 예시적 유기 용매는 에탄올, DMSO, n-부탄올 및 t-부탄올(t-부틸 알코올 또는 TBA로서도 공지되어 있음)을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 유기 용매는 예를 들면, 98% 이상의 순도의 t-부탄올이다. 성분들이 혼합될 때, 지질과 SapC는 함께 수성 용액에 현탁된 소포를 형성한다. 혼합물의 동결건조는 물뿐만 아니라 대부분의 또는 모든 유기 용매도 제거한다. 바람직한 실시양태에서, 동결건조된 분말은 3 %w/w 미만의 TBA를 함유한다.

[0032] 당분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 공지된 매우 다양한 기법들이 리포좀 조성물을 제조하는 데 이용될 수 있다. 이 기법들은 예를 들면, 용매 투석, 프렌치 프레스(French press), (냉동-해동을 이용하거나 이용하지 않는) 압출, 역상 증발, 단순한 냉동-해동, 음파처리, 킬레이트 투석, 균질화, 용매 주입, 마이크로유화, 자연발생적 형성, 용매 기화, 용매 투석, 조절된 세제 투석 등을 포함한다. 예를 들면, 문헌[Madden et al., Chemistry and Physics of Lipids, 1990 53, 37-46](이의 개시는 전체적으로 본원에 참고로 포함됨)을 참조한다. 적합한 냉동-해동 기법은 예를 들면, 1989년 11월 8일에 출원된 국제 출원 제PCT/US89/05040호(이의 개시는 전체적으로 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다. 리포좀의 제조는 용액, 예컨대, 수성 식염수 용액, 수성 인산염 완충 용액 또는 멸균수에서 수행될 수 있다. 리포좀은 진탕 또는 볼텍싱을 수반하는 다양한 공정들에 의해 제조될 수 있다.

[0033] 소포 조성물의 제조에 사용하기에 알맞을 수 있는 많은 리포좀 제조 기법들은 예를 들면, 미국 특허 제4,728,578호; 영국 특허출원 제GB 2193095 A호; 미국 특허 제4,728,575호; 미국 특허 제4,737,323호; 국제 출원 제PCT/US85/01161호; 문헌[Mayer et al., Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 858, pp. 161-168 (1986)]; 문헌[Hope et al., Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 812, pp. 55-65 (1985)]; 문헌[Mayhew et al., Methods in Enzymology, Vol. 149, pp. 64-77 (1987)]; 문헌[Mayhew et al., Biochimica et Biophysica Acta, Vol 755, pp. 169-74 (1984)]; 문헌[Cheng et al, Investigative Radiology, Vol. 22, pp. 47-55 (1987)]; 국제 출원 제PCT/US89/05040호; 미국 특허 제4,533,254호; 미국 특허 제4,162,282호; 미국 특허 제4,310,505호; 미국 특허 제4,921,706호; 및 문헌[Liposome Technology, Gregoriadis, G., ed., Vol. 1, pp. 29-31, 51-67 and 79-108 (CRC Press Inc., Boca Raton, Fla. 1984)](이들 각각의 개시는 전체적으로 본원에 참고로 포함됨)에 논의되어 있다.

[0034] 당분야에서 숙련된 자가 인식할 바와 같이, 소포 조성물들 중 임의의 소포 조성물을 저장하기 위해 동결건조할 수 있고, 필요하다면 격렬한 교반의 도움을 받아, 예를 들면, 환자에게 투여하기에 적합한 멸균 수성 매질(예컨

대, 물, 인산염 완충 용액, Tris 완충 용액 또는 수성 식염수 용액)로 재구성할 수 있다. 리포좀은 문헌[Rey, L. (2010), Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products. ISBN 978143982575](이의 관련 부분은 참고로 포함됨)에 기재된 방법들을 비롯한, 당분야에서 공지된 방법들에 따라 동결건조될 수 있다. 예시적 동결건조 방법은 표 1에 개시된 파라미터에 따라 냉동, 일차 건조 및 이차 건조 단계를 이용한다.

[0035] [표 I]

**동결건조 파라미터의 예시적 범위**

| 주기 단계 | 온도, ℃ | 압력, mTorr | 지속시간, 분 |
|---|---|---|---|
| 냉동 | -40 내지 -50 (-40 보다 더 높지 않음) | - | 340 내지 960 |
| 일차 건조 | -15 내지 -25 | 30 내지 65 | 2200 내지 4300 |
| 이차 건조 | 25 내지 35 | 35 내지 65 | 500 내지 2300 |
| 총 주기 | - | - | 3040 내지 7560 |

[0036]

[0037] 동결건조로 인한 지질 및/또는 소포의 응집 또는 융합을 방지하기 위해, 이러한 융합 또는 응집이 일어나지 못하게 하는 첨가제를 포함시키는 것이 유용할 수 있다. 유용할 수 있는 첨가제는 소르비톨, 만니톨, 염화나트륨, 글루코스, 트레할로스, 폴리비닐피롤리돈(PVP) 및 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG), 예를 들면, PEG 400을 포함한다. 이 첨가제들 및 다른 첨가제들은 문헌, 예컨대, 미국 약전 위원회(United States Pharmacopeial Convention Inc.)(메릴랜드주 20852 록빌 트윈브룩 파크웨이 12601 소재)의 미국 약전, USP XXII, NF XVII, 미국 약전, 국내처방집(이들의 개시는 전체적으로 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0038] 소포에 적용될 때, 용어 "안정한" 및 "안정화된"은 소포가 예를 들면, 유용한 기간 동안 소포 구조, 또는 캡슐화된 기체 또는 기체성 전구체의 손실을 비롯한 분해에 대한 실질적인 내성을 가진다는 것을 의미한다. (동결건조 전, 또는 동결건조된 분말의 재구성 후) SapC/지질 소포를 함유하는 본 수성 조성물에 적용될 때 용어 "안정한" 및 "안정화된"은 단백질 또는 포스파티딜세린 지질의 함량 또는 순도의 유의미한 손실이 없고 물리적 성질의 유의미한 변화가 없음을 의미한다. 본 동결건조된 분말 조성물에 적용될 때 용어 "안정한" 및 "안정화된"은 주사용수로 재구성할 때, 단백질 및 포스파티딜세린 지질의 함량 또는 순도의 유의미한 손실이 없고 물리적 성질의 유의미한 변화가 없음을 의미한다.

[0039] 본 조성물에 의해 치료될 수 있는 암은 예를 들면, 임의의 고형 종양 또는 신경학적 암, 예를 들면, 전립선암, 간암, 폐암, 췌장암, 신장세포암종, 유방암, 난소암, 정소암, 뇌실막세포종, 뇌암, 예컨대, 다형성 교모세포종(GBM)을 비롯한 고등급 신경교종(HGG), 및 충수 및 대장을 포함하는 소화기(위장관)(GI: gastrointestinal)암을 포함한다. 상기 조성물은 일차 종양 종류 또는 이 일차 종양이 전이되는 장기와 관계없이 전이성 종양을 치료하는 데 유용하다. 전이성 종양은 전립선, 결장, 폐, 유방 및 간 유래 종양들을 포함하나, 이들로 제한되지 않는, 다수의 종류의 일차 종양들로부터 비롯될 수 있다. 용어 "암" 및 "신생물"은 다양한 장기 시스템들의 악성종양, 예컨대, 폐, 유방, 갑상선, 림프, 위장 또는 비뇨생식관에 영향을 미치는 악성종양뿐만 아니라, 대다수의 결장암, 신장세포암종, 전립선암 및/또는 정소 종양, 폐의 비-소세포암종, 소장암 및 식도암과 같은 악성종양들을 포함하는 선암종도 포함할 수 있다. 용어 "암종"은 당분야에서 인식되어 있고 호흡계암종, 위장계암종, 비뇨생식계암종, 정소암종, 유방암종, 전립선암종, 내분비계암종 및 흑색종을 비롯한, 상피 또는 내분비 조직의 악성종양을 지칭한다. 예시적 암종은 자궁경부, 폐, 전립선, 유방, 두경부, 결장 및 난소의 조직으로부터 형성된 암종들을 포함한다. 상기 용어는 암종성 조직 및 육종성 조직으로 구성된 악성 종양을 포함하는 암육종도 포함한다. "선암종"은 선상 조직으로부터 유래한 암종, 또는 종양 세포가 인식 가능한 선상 구조를 형성하는 암종을 지칭한다. 더 상세한 내용은 예를 들면, 전체적으로 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제7,834,147호에서 확인될 수 있다.

[0040] "환자" 또는 "대상체"는 포유동물, 바람직하게는 인간을 비롯한 동물을 지칭한다.

[0041] 조성물의 치료 유효 용량 또는 양은 환자의 암을 치료하는 데 유용한 양이다. 일반적으로, 본 조성물의 단일 치료 유효 용량은 약 0.01 내지 30 mg/체중 kg, 바람직하게는 약 0.05 내지 20 mg/체중 kg, 보다 바람직하게는 약 0.1 내지 15 mg/체중 kg, 훨씬 더 바람직하게는 약 0.5 내지 10 mg/kg의 범위의 양으로 SapC(또는 이의 유도

체)를 함유할 것이다. 예를 들면, 단일 정맥내 용량에서 SapC의 양은 약 0.7 mg/kg, 1.1 mg/kg, 1.4 mg/kg, 1.8 mg/kg, 2.4 mg/kg, 2.8 mg/kg, 3.0 mg/kg, 3.2 mg/kg 또는 3.6 mg/kg 이상일 수 있다. 소정의 환자는 1회 이상의 초기 투여를 위한 소정의 용량 수준, 및 추가 투여를 위한 상이한(더 낮거나 더 높은) 수준을 제공받을 수 있다. 전달은 임의의 적합한 주사 가능한 경로, 예를 들면, 정맥내, 동맥내, 피내, 근육내, 심장내, 두개내, 피하 또는 복막내 경로에 의한 전달일 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 조성물은 멸균 주사용수에 의해 재구성되고, 등장성 담체, 예컨대, 식염수, PBS 또는 덱스트로스 5 중량%(D5W)를 함유하는 IV 백을 통한 정맥내 주입에 의해 전달된다. 투여 경로에 관한 더 상세한 내용은 예를 들면, 미국 특허 제7,834,147호에서 발견될 수 있다.

[0042] 투여는 연속 수일 동안, 예를 들면, 연속 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일 또는 9일 이상 동안 하루에 적어도 1회 일어날 수 있거나, 예를 들면, 이틀마다 또는 주당 3회, 또는 7±3일마다 1회, 또는 14±3일마다 1회, 또는 28±3일마다 1회 일어날 수 있다. 투여 타이밍은 이러한 일정들 중 하나로 시작할 수 있고 적절한 치료 기간 후 더 또는 덜 빈번한 또 다른 일정으로 바뀔 수 있다. 치료의 전체 기간은 예를 들면, 8주, 12주 또는 16주 이내에, 또는 6개월까지 완료될 수 있으나, 보다 바람직하게는, 환자가 치료로부터 이익을 얻는 것으로 보이는 한, 계속될 것이다. 예를 들면, 투약 일정은 다음과 같을 것이다:

[0043] 주기 1:

[0044] 제1주: 1일째 날부터 5일째 날까지 각각 1회 투여;

[0045] 제2주: 이틀마다 3회/주, 예를 들면, 8일째 날, 10일째 날 및 12일째 날 각각 1회 투여;

[0046] 제3주 및 제4주: 매주(7(+/-3)일마다) 1회 투여;

[0047] 주기 2: 제5주 동안 1회 투여; 및

[0048] 임의의 후속 주기: 가장 최근의 이전 투여 후 28(+/-3)일째 날 1회 투여.

[0049] 본 발명의 조성물에서 SapC 폴리펩타이드 대 포스파티딜세린 지질의 몰 비는 1:2 내지 1:50, 예를 들면, 1:5 내지 1:30, 또는 1:8 내지 1:20, 또는 1:11 내지 1:13의 범위에 있을 수 있다. 적합한 몰 비는 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14 및 1:15를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 폴리펩타이드 대 포스파티딜세린 지질의 질량비는 약 1:0.18 내지 약 1:4.5, 또는 약 1:0.45 내지 약 1:2.7, 또는 약 1:0.72 내지 약 1:1.81, 또는 약 1:1 내지 약 1:1.2의 범위에 있다. 본 발명의 조성물에서 폴리펩타이드와 지질의 바람직한 비는 표적 세포 종류 및 전달 경로와 같은, 그러나 이들로 제한되지 않는, 특정 요인에 의해 영향을 받을 수 있다는 것이 인식된다.

[0050] 유용한 배경 정보 및 기술적 세부사항은 전체적으로 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제7,834,147호 및 제9,271,932호에서 확인될 수 있다.

[0051] 조성물 및 방법은 하기 실시예에서 제공된 정보에 의해 더 뒷받침된다. 실시예에 기재된 실시양태는 단지 예시하기 위한 것이고, 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될, 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것이 아니다.

[0052] **실시예**

[0053] **재료**

[0054] 하기 시약들을 상업적 판매회사로부터 구입하였다: 구연산나트륨 이수화물, 무수 구연산, 글리신, 인산나트륨 일염기성 일수화물(EMD), 인산나트륨 이염기성 칠수화물(Thermo Scientific), 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄("Tris;" J. T. Baker), L-히스티딘, 염화나트륨, HyClone™ 물(Thermo Scientific), 수산화나트륨, 무수 D-트레할로스(VWR International), D(+) 트레할로스 이수화물(Spectrum), 수크로스(BDH Chemicals), 만니톨(BDH Chemicals), 0.9% 염화나트륨, t-부탄올(Sigma Aldrich), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포-L-세린(DOPS 나트륨 염)(Avanti Polar Lipids).

[0055] 이. 콜라이 세포에서의 재조합 발현을 이용하여 표준 방법으로 사포신 C("SapC")를 제조하였다.

[0056] **실시예 1. 선택된 완충제가 SapC를 포함하는 조성물의 안정성에 어떻게 영향을 미치는지의 확인**

[0057] 완충제가 SapC 안정성에 어떻게 영향을 미치는지를 확인하기 위해, 표 1 및 2에 나열된 선택된 완충제들 중의 SapC의 조성물을 제조하였고 시차 주사 열량측정(DSC) 및 원편광 이색성(CD)으로 분석하였다.

[0058] **방법**

[0059] 표 1 및 표 2에 나열된 조성물들을 제조하였다.

표 1

DSC 분석을 위해 제조된 조성물

| UID | 설명 |
|---|---|
| 75312-F9 | 5 mg/㎖ SapC, 10 mM 구연산염 pH 6 |
| 75312-F10 | 5 mg/㎖ SapC, 10 mM 인산염 pH 7 |
| 75312-F11 | 5 mg/㎖ SapC, 10 mM Tris pH 7.5 |
| 75312-F12 | 5 mg/㎖ SapC, 10 mM Tris pH 8 |
| 75312-F13 | 5 mg/㎖ SapC, 10 mM 인산염 pH 7.5, 1.68 %w/v NaCl |
| 75312-F14 | 5 mg/㎖ SapC, 50 mM 인산염 pH 7.5, 1.20 %w/v NaCl |
| 75312-F15 | 5 mg/㎖ SapC, 10 mM 글리신 pH 9 |

[0060]

표 2

CD 분석을 위해 제조된 조성물

| UID | 설명 |
|---|---|
| 75312-F1 | 1 mg/㎖ SapC, 10 mM 구연산염 pH 6 |
| 75312-F2 | 1 mg/㎖ SapC, 10 mM 인산염 pH 7 |
| 75312-F3 | 1 mg/㎖ SapC, 10 mM Tris pH 7.5 |
| 75312-F4 | 1 mg/㎖ SapC, 10 mM Tris pH 8 |
| 75312-F5 | 1 mg/㎖ SapC, 10 mM 인산염, 1.68 %w/v NaCl, pH 7.5 |
| 75312-F6 | 1 mg/㎖ SapC, 50 mM 인산염, 1.20 %w/v NaCl, pH 7.5 |
| 75312-F7 | 1 mg/㎖ SapC, 10 mM 글리신 pH 9 |

[0061]

[0062] MicroCal™ VP-DSC 열량계(매사추세츠주 노샘프턴)를 이용하여 DSC 측정을 수행하였다. 실시 파라미터는 10℃ 내지 110℃의 온도 범위, 시간당 60℃의 스캔 속도, 및 16초의 여과 시간을 포함하였다. 각각의 스캔 전에 15분 동안 샘플을 미리 평형화시켰다. 최초 버전 7에 대한 MicroCal™ VP-DSC 열량계 애드-온(add-on) 모듈을 이용하여 온도기록도를 프로세싱하였다. DSC 용융은 사건과 관련된 엔탈피의 변화를 모니터링함으로써 단백질의 언폴딩(unfolding)을 검출한다. 단백질 언폴딩은 통상적으로 발열반응이고 온도기록도 판독에서 피크에 의해 표시되고, 이때 정점은 단백질 분자의 절반이 언폴딩되는 전이를 나타낸다. 높은 용융 온도(Tm)는 높은 고유 입체구조적 안정성을 의미한다.

[0063] 4-위치 펠티에(peltier) 온도 제어기를 갖춘 Chirascan™-플러스 분광편광계(영국 레더헤드 소재)를 이용하여 CD 측정을 수행하였다. 0.1 cm 경로 길이 큐벳을 이용하여 10℃에서 180 내지 260 nm의 파장 범위에 걸쳐 각각의 샘플의 원자외선 스펙트럼을 수득하였다. 상응하는 시험 샘플에 대한 스펙트럼으로부터 각각의 대조군 샘플의 스펙트럼을 공제하였다. 상기 기계에 구비된 CDNN 소프트웨어를 이용하여 이차 구조의 퍼센트를 추정하였다. 1 mg/㎖ SapC 농도를 가진 샘플은 CD 스펙트럼의 보다 낮은 파장에서 포화를 피하기 위해 희석될 필요가 있음을 확인하였다. 따라서, CD 측정 전에 각각의 샘플에 대해 6배 희석을 수행하였다.

[0064] **결과**

[0065] 도 1은 샘플 75312-F10의 DSC 분석의 결과를 도시하는 그래프이다. 샘플 75312-F10에 대한 온도기록도 및 또한 시험된 모든 샘플들에 대한 온도기록도(데이터는 표시되어 있지 않음)는 단백질 언폴딩에 대해 예상된 전이를

결여하였다. 특정 이론에 구속받고자 하는 것은 아니지만, 본 출원인은 (1) SapC 단백질이 삼차 구조(들)를 결여하거나 (2) SapC 단백질이 심지어 가장 높은 온도인 110℃까지 언폴딩되지 않는다는 가설을 세운다.

[0066] 도 2는 표 2에 나열된 샘플들의 CD 분석의 결과를 도시하는 그래프이다. 모든 샘플들의 CD 스펙트럼은 유의미한 α-나선 함량을 표시하는 특징인, 대략 208 및 220 nm에서 최소치를 나타내었다. 스펙트럼의 분석은 pH 7.0 > 7.5 ≈ 6.0 > 8.0 > 9.0의 순서로 스펙트럼의 크기의 pH 의존성을 보여주었다.

[0067] 당분야에서 공지된 방법을 이용하여 각각의 샘플에 대한 이차 구조의 퍼센트를 CD 스펙트럼으로부터 추정하였고, 이 퍼센트는 표 3에 보고되어 있다. 도 3은 표 2에 나열된 샘플들의 CD 분석으로부터 추정된 α-나선 및 랜덤 코일의 퍼센트를 도시하는 그래프이다. 특히, α-나선의 가장 높은 양 및 가장 낮은 양은 샘플 pH와 상관관계를 가졌는데, 이때 가장 높은 양은 75312-F2(pH 7)에서 확인되었고 가장 낮은 양은 75312-F7(pH 9)에서 확인되었다. 이 데이터들은 SapC가 pH 7의 인산염 또는 pH 7.6의 Tris에 저장된 경우, 이차 구조 성분의 보존으로부터 추측될 때, 활성을 보유할 가능성이 높음을 시사한다. 이 데이터들은 장성을 일정하게 유지하면서 변화하는 완충제 농도, 특히 10 또는 50 mM 인산염(75312-F5와 75312-F6의 비교)이 SapC의 이차 구조의 차이를 부여하지 않았다는 것도 시사한다.

*표 3*

각각의 조성물에서 추정된 퍼센트 이차 구조

[0068]

| UID | 나선 | 역평행 β-시트 | 평행 β-시트 | β-회전 | 랜덤 코일 | 총 합계 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 75312-F1 | 64.9 | 3.2 | 3.3 | 12.5 | 14.0 | 97.9 |
| 75312-F2 | 83.4 | 1.4 | 1.6 | 9.7 | 7.2 | 103.4 |
| 75312-F3 | 69.6 | 2.7 | 2.8 | 11.8 | 12.5 | 99.4 |
| 75312-F4 | 46.6 | 5.7 | 5.8 | 14.9 | 23.1 | 96.2 |
| 75312-F5 | 45.4 | 6.0 | 6.0 | 15.1 | 23.5 | 96.0 |
| 75312-F6 | 47.0 | 5.7 | 5.7 | 14.9 | 22.8 | 96.1 |
| 75312-F7 | 21.0 | 13.6 | 13.0 | 19.6 | 42.1 | 109.4 |

[0069] **실시예 2. 선택된 완충제(및 농도)가 60℃에서 저장된 SapC 조성물의 안정성 및 순도에 어떻게 영향을 미치는지의 확인**

[0070] 다양한 완충제들이 SapC를 포함하는 조성물의 안정성 및 순도에 어떻게 영향을 미치는지를 확인하기 위해, 표 4에 나열된 선택된 완충제들 중의 SapC의 조성물을 제조하고 60℃에서 저장하였고, 시각적 외관, 총 단백질 함량 및 단백질 함량의 순도로 분석하였다.

[0071] **방법**

[0072] 표 4에 나열된 조성물들을 제조하였다. 일부 샘플들을 제조 즉시 냉동시켰고(t=0일) 분석할 때까지 -70℃에서 유지하였고; 나머지 샘플들을 냉동시키기 전에 60℃에서 10일 동안 저장하였고(t=10일) 분석할 때까지 -70℃에서 유지하였다. 그 다음, 냉동된 샘플을 실온까지 해동시켰고, 하기 성질들을 어세이하였다: (1) 투명도, 색채, 및 샘플 중의 임의의 미립자 물질의 존재를 관찰하기 위해 밝은 빛 아래에서 액체의 시각적 특징규명에 의해 평가된 외관; (2) pH 측정기에 의해 정량된 pH; (3) 0.395 $mg^{-1}$ mℓ $cm^{-1}$의 흡광 계수를 이용함으로써 280 nm에서 UV 분석에 의해 정량된 총 단백질 함량; (4) 단백질 함량의 순도, 구체적으로 SE-HPLC, RP-HPLC 및 IEX-HPLC에 의해 평가된 샘플 중의 전체 길이 SapC의 퍼센트 및 SapC 분해 생성물의 존재(및 농도). SE-HPLC, RP-HPLC 및 IEX-HPLC는 각각 크기, 소수성 및 전하 변이체에 따라 피분석물을 분리하는 크로마토그래피 방법이다.

표 4

조성물들의 목록

| UID | 설명 |
|---|---|
| 183-001-01-095-F1 | 2 mg/㎖ SapC, 10 mM 히스티딘 pH 6 |
| 183-001-01-095-F2 | 2 mg/㎖ SapC, 50 mM 히스티딘 pH 6 |
| 183-001-01-095-F3 | 5 mg/㎖ SapC, 10 mM 히스티딘 pH 6 |
| 183-001-01-095-F4 | 5 mg/㎖ SapC, 50 mM 히스티딘 pH 6 |
| 183-001-01-095-F5 | 2 mg/㎖ SapC, 10 mM 인산염 pH 6.8 |
| 183-001-01-095-F6 | 2 mg/㎖ SapC, 50 mM 인산염 pH 6.8 |
| 183-001-01-095-F7 | 5 mg/㎖ SapC, 10 mM 인산염 pH 6.8 |
| 183-001-01-095-F8 | 5 mg/㎖ SapC, 50 mM 인산염 pH 6.8 |
| 183-001-01-095-F9 | 2 mg/㎖ SapC, 10 mM Tris pH 7.6 |
| 183-001-01-095-F10 | 2 mg/㎖ SapC, 50 mM Tris pH 7.6 |
| 183-001-01-095-F11 | 5 mg/㎖ SapC, 10 mM Tris pH 7.6 |
| 183-001-01-095-F12 | 5 mg/㎖ SapC, 50 mM Tris pH 7.6 |

[0073]

[0074] **결과**

[0075] 샘플들의 시각적 외관은 표 5에 요약되어 있다. t=0일에서, 183-001-01-095-F2, 183-001-01-095-F4, 183-001-01-095-F5, 183-001-01-095-F6 및 183-001-01-095-F7은 가시적 입자를 갖지 않은 반면, 183-001-01-095-F1, 183-001-01-095-F3, 183-001-01-095-F8, 183-001-01-095-F9, 183-001-01-095-F10, 183-001-01-095-F11 및 183-001-01-095-F12는 소수의 입자들을 가졌지만 대체로 투명하였다. 10일 동안 60℃에서 항온처리된 후, 모든 샘플들은 소수의 입자들을 가졌고, 이때 인산염 완충된 183-001-01-095-F5, 183-001-01-095-F6 및 183-001-01-095-F8은 "긴" 입자를 가졌다. 추가로, 일부 히스티딘 및 인산염 함유 샘플들, 구체적으로 183-001-01-095-F3, 183-001-01-095-F4, 183-001-01-095-F7 및 183-001-01-095-F8은 약간 황색을 띠었다.

표 5

t=0 일 및 t=10 일 후 각각의 조성물의 외관

| UID | t= 0 일 | t=10 일 |
|---|---|---|
| 183-001-01-095-F1 | 투명, 무색, 소수의 입자들 | 투명, 무색, 소수의 입자들 |
| 183-001-01-095-F2 | 투명, 무색, 가시적 입자 무함유 | 투명, 약간 황색 색조, 소수의 입자들 |
| 183-001-01-095-F3 | 투명, 무색, 소수의 입자들 | 투명, 약간 황색 색조, 소수의 입자들 |
| 183-001-01-095-F4 | 투명, 무색, 가시적 입자 무함유 | 투명, 약간 황색 색조, 소수의 입자들 |
| 183-001-01-095-F5 | 투명, 무색, 가시적 입자 무함유 | 투명, 무색, 소수의 긴 입자들 |
| 183-001-01-095-F6 | 투명, 무색, 가시적 입자 무함유 | 투명, 무색, 소수의 긴 입자들 |
| 183-001-01-095-F7 | 투명, 무색, 가시적 입자 무함유 | 투명, 약간 황색 색조, 소수의 입자들 |
| 183-001-01-095-F8 | 투명, 무색, 소수의 입자들 | 투명, 약간 황색 색조, 소수의 긴 입자들 |
| 183-001-01-095-F9 | 투명, 무색, 소수의 입자들 | 투명, 무색, 소수의 입자들 |
| 183-001-01-095-F10 | 투명, 무색, 소수의 입자들 | 투명, 무색, 소수의 입자들 |
| 183-001-01-095-F11 | 투명, 무색, 소수의 입자들 | 투명, 무색, 소수의 입자들 |
| 183-001-01-095-F12 | 투명, 무색, 소수의 입자들 | 투명, 무색, 소수의 입자들 |

[0076]

[0077] 각각의 샘플의 pH는 표 6에 보고되어 있다. 인산염에 의해 완충된 샘플들(183-001-01-095-F5, 183-001-01-095-F6, 183-001-01-095-F7, 183-001-01-095-F8)은 상기 두 시점들에서 그들의 목표 pH인 6.8보다 더 염기성 pH로 이동하였다. 특히, 10 mM 인산염에 의해 완충된 샘플들(183-001-01-095-F5 및 183-001-01-095-F7)의 pH는 50 mM 인산염에 의해 완충된 샘플들(183-001-01-095-F6 및 183-001-01-095-F8)보다 더 이동하였다. 히스티딘에 의해 완충된 모든 샘플들(183-001-01-095-F1, 183-001-01-095-F2, 183-001-01-095-F3 및 183-001-01-095-F4) 또는 Tris에 의해 완충된 모든 샘플들(183-001-01-095-F9, 183-001-01-095-F10, 183-001-01-095-F11 및 183-001-01-095-F12)은 그들의 초기 pH 값을 0.1 pH 유닛 내에서 유지하였다.

표 6

t=0 일 및 t=10 일 후 각각의 샘플의 pH

| UID | t=0 일 | t=10 일 |
|---|---|---|
| 183-001-01-095-F1 | 6.12 | 6.11 |
| 183-001-01-095-F2 | 5.98 | 5.96 |
| 183-001-01-095-F3 | 6.22 | 6.25 |
| 183-001-01-095-F4 | 6.01 | 6.01 |
| 183-001-01-095-F5 | 7.31 | 7.29 |
| 183-001-01-095-F6 | 7.10 | 7.09 |
| 183-001-01-095-F7 | 7.25 | 7.30 |
| 183-001-01-095-F8 | 7.08 | 7.09 |
| 183-001-01-095-F9 | 7.55 | 7.57 |
| 183-001-01-095-F10 | 7.54 | 7.54 |
| 183-001-01-095-F11 | 7.59 | 7.60 |
| 183-001-01-095-F12 | 7.52 | 7.53 |

[0078]

[0079] 각각의 샘플의 총 단백질 함량은 표 7에 보고되어 있다. t=0에서, 모든 샘플들은 목표 값인 2 또는 5 ㎎/㎖에 가까운 단백질 농도를 나타내었다. 그러나, t=10일에서, 샘플들 중 대다수는 증가된 단백질 농도를 가졌다. 이 증가된 수치는 아마도 샘플 중의 큰 입자의 증가로 인한 스펙트럼 산란의 인위적 결과일 것이다. 산란의 증가를 정량하기 위해, 각각의 샘플에 대한 광학 밀도 스캔(200 내지 400 ㎚)을 측정하여, 저장 시 산란 증가의 정도를 평가하였다. 도 4는 유의미한 흡수 신호를 결여하는 파장인 310 ㎚에서 각각의 샘플에 대한 광학 밀도 값을 도시하는 그래프이다(샘플 183-001-01-095-F11은 분석되지 않았음을 인지한다). pH 6의 히스티딘에 의해 완충된 샘플들(183-001-01-095-F1, 183-001-01-095-F2, 183-001-01-095-F3 및 183-001-01-095-F4) 및 pH 6.8의 인산염에 의해 완충된 샘플들(183-001-01-095-F5, 183-001-01-095-F6, 183-001-01-095-F7 및 183-001-01-095-F8)은 10일 후 증가된 산란을 나타내었다. 특히, pH 7.6의 Tris에 의해 완충된 샘플 183-001-01-095-F9, 183-001-01-095-F10 및 183-001-01-095-F12는 10일 후 산란의 최소 증가를 나타내었다.

표 7

t=0 일 및 t=10 일 후 조성물의 총 단백질 함량(mg/㎖)

| UID | t=0 일 | t=10 일 |
|---|---|---|
| 183-001-01-095-F1 | 2.01 | 2.34 |
| 183-001-01-095-F2 | 2.08 | 3.12 |
| 183-001-01-095-F3 | 4.82 | 5.57 |
| 183-001-01-095-F4 | 4.97 | 6.70 |
| 183-001-01-095-F5 | 2.08 | 2.36 |
| 183-001-01-095-F6 | 2.13 | 2.52 |
| 183-001-01-095-F7 | 4.99 | 5.53 |
| 183-001-01-095-F8 | 5.00 | 5.92 |
| 183-001-01-095-F9 | 2.07 | 2.09 |
| 183-001-01-095-F10 | 2.03 | 2.09 |
| 183-001-01-095-F11 | 5.05 | 5.18 |
| 183-001-01-095-F12 | 4.99 | 5.22 |

[0080]

[0081] 샘플 중의 SapC의 순도를 SE-HPLC, RP-HPLC 및 IEX-HPLC로 추정하였다. 샘플 중의 SapC의 순도는 전체 길이 SapC를 포함하는 용출 피크에서 검출된 단백질 함량의 퍼센트로서 정량되었다. 도 5는 t=0일 때 및 60℃에서 10

일 후 SapC 순도의 SE-HPLC 측정을 도시하는 그래프이다. 모든 샘플들은 SE-HPLC에 의해 검출되었을 때, 10일 후 95% 초과 순도의 SapC를 나타내었다. 특히, OD 310 nm에서 증가된 산란을 나타낸, pH 6의 히스티딘에 의해 완충된 샘플들(183-001-01-095-F1, 183-001-01-095-F2, 183-001-01-095-F3 및 183-001-01-095-F4) 및 pH 6.8의 인산염에 의해 완충된 샘플들(183-001-01-095-F5, 183-001-01-095-F6, 183-001-01-095-F7 및 183-001-01-095-F8)은 고차 분자량 종(즉, 응집체)을 함유할 것으로 예상되었으나; 이러한 종은 이 샘플들에서 SE-HPLC에 의해 관찰되지 않았다. 이 추정된 응집체들이 컬럼을 통과하기에 너무 큰 경우, (크로마토그래피 면적에 근거한) 단백질의 겉보기 농도는 감소되었을 것이다. 상기 샘플들에서 10일 후조차도 SapC 주 피크 회수가 높았을 때에도, 이것은 관찰되지 않았다. 특정 이론에 의해 구속받고자 하지는 않지만, 본 출원인은 이 결과들을 설명할 수 있는 가능성이, F1 내지 F8에서 관찰된 미립자 물질이 SapC 또는 SapC의 단편을 포함하지 않거나 무시할만한 양으로 포함한다는 점임을 인지한다.

[0082] 도 6은 t=0일 때 및 60℃에서 10일 후 SapC 순도의 RP-HPLC 측정을 도시하는 그래프이다. 모든 샘플들은 RP-HPLC에 의해 측정되었을 때, 10일 후 어느 정도 감소된 SapC 순도를 나타내었다. pH 6.8의 인산염에 의해 완충된 샘플들(183-001-01-095-F5, 183-001-01-095-F6, 183-001-01-095-F7 및 183-001-01-095-F8)은 SapC 순도의 가장 큰 감소를 나타내었다.

[0083] 도 7은 t=0일 때 및 60℃에서 10일 후 SapC 순도의 IEX-HPLC 측정을 도시하는 그래프이다. 모든 샘플들은 IEX-HPLC에 의해 측정되었을 때, 10일 후 어느 정도 감소된 SapC 순도를 나타내었다. 측정이 RP-HPLC에 의해 수행되었을 때와 마찬가지로(상기 참조), pH 6.8의 인산염에 의해 완충된 샘플들(183-001-01-095-F5, 183-001-01-095-F6, 183-001-01-095-F7 및 183-001-01-095-F8)은 SapC 순도의 가장 큰 감소를 나타내었다.

[0084] 종합하건대, 이 데이터들은 pH 7.6의 Tris를 포함하는 샘플이 pH 6의 히스티딘 또는 pH 6.8의 인산염을 포함하는 샘플에 비해 더 높은 안정성 및 순도를 나타내었음을 시사한다.

[0085] **실시예 3. pH 6.2의 선택된 농도의 구연산염이 60℃에 노출된 SapC를 포함하는 조성물의 안정성 및 순도에 어떻게 영향을 미치는지의 확인**

[0086] 구연산염이 SapC를 포함하는 조성물의 안정성 및 순도에 어떻게 영향을 미치는지를 확인하기 위해, pH 6.2의 구연산염 중의 SapC의 다양한 조성물들을 제조하고 60℃에서 저장하였고, 외관, pH, 단백질 함량 및 크로마토그래피 방법으로 분석하였다.

[0087] **방법**

[0088] 표 8에 나열된 조성물들의 샘플들은 t=0일 때(제조 즉시) 및 10일 동안 60℃에서 저장한 후 채취한 다음, 냉동시키고 분석할 때까지 -70℃에서 저장하였다. 냉동된 조성물을 실온까지 해동시켰고, 하기 성질들을 실시예 2에 기재된 바와 같이 어세이하였다: 시각적 외관, pH, 총 단백질 함량 및 단백질 함량의 순도.

*표 8*

구연산염 함유 조성물

[0089]

| UID | 설명 |
|---|---|
| 82014-F1 | 2 mg/㎖ SapC, 10 mM 구연산염 pH 6.2 |
| 82014-F2 | 2 mg/㎖ SapC, 50 mM 구연산염 pH 6.2 |
| 82014-F3 | 5 mg/㎖ SapC, 10 mM 구연산염 pH 6.2 |
| 82014-F4 | 5 mg/㎖ SapC, 50 mM 구연산염 pH 6.2 |
| 82014- 구연산염 대조군 1 | 10 mM 구연산염 pH 6.2 |
| 82014- 구연산염 대조군 2 | 50 mM 구연산염 pH 6.2 |

[0090] **결과**

[0091] 각각의 샘플의 시각적 외관 및 pH는 표 9에 보고되어 있다. 모든 샘플들은 상기 두 시점들에서 투명한 무색 액체이었다. 모든 샘플들의 pH를 60℃에서 10일 후 초기 pH 값의 0.2 pH 유닛 내에서 유지하였으나; 모든 샘플들

의 초기 pH는 목표 pH 6.2보다 더 염기성이었다.

표 9

t=0 일 및 t=10 일 후 각각의 샘플에 대한 시각적 외관 및 pH

| 샘플 # | 시점 | 외관 | pH |
|---|---|---|---|
| 82014-F1 | t=0 | 투명한 무색 용액 | 6.62 |
| | t=10 | 투명한 무색 용액 | 6.63 |
| 82014-F2 | t=0 | 투명한 무색 용액 | 6.32 |
| | t=10 | 투명한 무색 용액 | 6.26 |
| 82014-F3 | t=0 | 투명한 무색 용액 | 6.71 |
| | t=10 | 투명한 무색 용액 | 6.92 |
| 82014-F4 | t=0 | 투명한 무색 용액 | 6.31 |
| | t=10 | 투명한 무색 용액 | 6.32 |
| 82014-구연산염 대조군 1 | t=0 | 투명한 무색 용액 | 6.48 |
| | t=10 | 투명한 무색 용액 | 6.64 |
| 82014-구연산염 대조군 2 | t=0 | 투명한 무색 용액 | 6.29 |
| | t=10 | 투명한 무색 용액 | 6.31 |

[0092]

[0093] 도 8은 t=0일 때 및 60℃에서 10일 후 각각의 표 8 조성물에 대해 310 nm에서 분석하였을 때 광학 밀도를 도시하는 그래프이다. 10일 후 어느 조성물도 310 nm에서 광학 밀도의 유의미한 증가를 나타내지 않았다.

[0094] 도 9는 t=0일 때 및 60℃에서 10일 후 표 8 조성물의 SapC 순도의 RP-HPLC 측정을 도시하는 그래프이다. 이 측정 시 모든 조성물들은 10일 후 감소된 SapC 순도를 나타내었다.

[0095] 도 10은 t=0일 때 및 60℃에서 10일 후 표 8 조성물의 SapC 순도의 SE-HPLC 측정을 도시하는 그래프이다. 모든 조성물들은 10일 후 SapC 순도의 뚜렷한 변화를 나타내지 않았다.

[0096] 도 11은 t=0일 때 및 60℃에서 10일 후 표 8 조성물의 SapC 순도의 IEX-HPLC 측정을 도시하는 그래프이다. 이 측정 시 모든 조성물들은 10일 후 감소된 SapC 순도를 나타내었다.

[0097] 종합하건대, 이 데이터들은 목표 pH인 pH 6.2(최대 6.64의 실제 pH)에서 2 또는 5 mg/mℓ SapC 및 10 또는 50 mM 구연산염을 포함하는 샘플이 60℃에서 10일에 걸쳐 유사한 안정성 및 순도를 나타내었다는 것을 시사한다. 이 데이터들 및 이전 실시예들의 데이터에 근거할 때, SapC를 포함하는 조성물을 위한 잠재적 완충제는 대략 pH 6.2의 구연산염 및 대략 pH 7.6의 Tris를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0098] **실시예 4. 기계 또는 열 응력에 노출된 후 SapC 및 pH 7.2의 25 mM Tris를 포함하는 조성물의 안정성의 측정**

[0099] 기계 또는 열 응력에 노출된 후 SapC 및 pH 7.2의 25 mM Tris를 포함하는 조성물의 안정성을 정량하기 위해, 상기 조성물을 기계 또는 열 응력에 노출시키고 시각적 외관, pH 및 총 단백질 함량으로 분석하였다.

[0100] **방법**

[0101] 5 mg/mℓ SapC 및 pH 7.1 내지 7.2의 25 mM Tris를 포함하는 조성물 183-001-01-220-F1을 제조하였고, 이의 샘플을 냉동-해동 응력 또는 교반 응력에 노출시켰다. 각각의 샘플에 대해, 하기 성질들을 실시예 2에 기재된 바와 같이 어세이하였다: 시각적 외관, pH 및 총 단백질 함량.

[0102] 냉동-해동 응력 시험을 위해, 샘플을 5 mℓ PETG 바이알에 1.3 mℓ 분취액으로 나누고 5회 냉동-해동 주기에 노출시켰다. 각각의 주기를 위해, 상기 바이알을 -70℃에서 냉동시키고 실온까지 해동시켰다. 각각의 해동 후, 대략 5회 조심스럽게 뒤집음으로써 각각의 바이알의 내용물을 혼합한 후, 다음 주기를 위해 -70℃로 되돌려 보냈다.

[0103] 교반 응력 시험을 위해, 샘플을 8개의 PETG 바이알들에 1.3 mℓ 분취액으로 나누었다. 상기 바이알들 중 4개의 바이알들을 주위 온도에서 15시간 또는 24시간 동안 220 RPM에서 궤도 진탕기(Thermo Scientific, Model

#2309) 상에서 교반하였다. 동시에, 남은 4개의 바이알들을 정지 대조군으로서 진탕기 근처의 벤치 상단 상에 놓아두었다. 15시간 및 24시간에서, 시험군으로부터의 2개의 바이알들 및 대조군으로부터의 2개의 바이알들을 분석하였다.

[0104] **결과**

[0105] 모든 샘플들은 투명한 무색 액체이었다(데이터는 제시되어 있지 않음).

[0106] 각각의 샘플의 pH는 도 12에 보고되어 있다. 모든 샘플들의 pH는 초기 pH 값의 0.1 pH 유닛 내에서 유지되었다.

[0107] 각각의 샘플의 총 단백질 함량은 도 13에 보고되어 있다. t=0에서, 응력을 받은 모든 샘플들의 단백질 함량은 응력을 받지 않은 샘플의 총 단백질 함량의 3% 이내에 있었다.

[0108] 요약하건대, SapC 및 pH 7.1(실제 pH는 t=0에서 7.1이었고; 목표 pH는 7.2이었음)의 25 mM Tris를 포함하는 시험된 조성물은 시각적 외관, pH 및 총 단백질 함량에 의해 평가되었을 때 기계 또는 열 응력에 노출된 후 안정성을 나타내었다.

[0109] **실시예 5. t-부탄올(TBA)의 다양한 농도가 SapC 및 디올레오일 포스파티딜세린(DOPS)을 포함하는 조성물의 안정성 및 순도에 어떻게 영향을 미치는지의 확인**

[0110] DOPS를 다양한 SapC 조성물들 내로 혼입하기 전에 t-부탄올(또는 t-부틸 알코올; TBA)을 유기 용매로서 사용하여 DOPS를 용해시켰다. TBA의 다양한 농도가 SapC를 포함하는 조성물의 안정성 및 순도에 어떻게 영향을 미치는지를 확인하기 위해, 표 10에 나열된 농도의 TBA를 포함하는 조성물을 제조하고 여과하고 시각적 외관, 총 단백질 함량 및 DOPS 함량에 대해 분석하였다.

[0111] **방법**

[0112] 표 10에 나열된 조성물들을 제조하고 0.2 마이크론 필터를 통한 표준 멸균 여과 전 및 후에 평가하였다. 모든 퍼센트는 w/w이다. 각각의 조성물의 시각적 외관 및 총 단백질 함량을 실시예 2에 기재된 바와 같이 어세이하였다. 각각의 조성물 중의 총 DOPS 함량을 HPLC-ELSD로 어세이하였다.

*표 10*

TBA 를 함유하는 조성물

[0113]

| UID | 설명 |
|---|---|
| 183-001-01-050-F1 | 2.3 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 9% 트레할로스, 30% TBA, 50 mM Tris pH 7.2 |
| 183-001-01-050-F2 | 2.3 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 9% 트레할로스, 25% TBA, 50 mM Tris pH 7.2 |
| 183-001-01-050-F3 | 2.3 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 9% 트레할로스, 20% TBA, 50 mM Tris pH 7.2 |
| 183-001-01-050-F4 | 2.3 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 9% 트레할로스, 15% TBA, 50 mM Tris pH 7.2 |

[0114] **결과**

[0115] 각각의 샘플의 시각적 외관은 표 10에 기재되어 있다. 모든 샘플들은 여과 전 및 후 둘 다 투명한 무색 액체이었다.

표 11

여과 전 및 후 각각의 샘플의 시각적 외관

| UID | 여과 전 | 여과 후 |
|---|---|---|
| 183-001-01-050-F1 | 투명, 무색, 및 입자 무함유 | 투명, 무색, 및 입자 무함유 |
| 183-001-01-050-F2 | 투명, 무색, 및 입자 무함유 | 투명, 무색, 및 입자 무함유 |
| 183-001-01-050-F3 | 투명, 무색, 및 입자 무함유 | 투명, 무색, 및 입자 무함유 |
| 183-001-01-050-F4 | 투명, 무색, 및 입자 무함유 | 투명, 무색, 및 입자 무함유 |

[0116]

[0117] 각각의 샘플의 총 단백질 함량은 표 12에 보고되어 있다. 모든 샘플들은 여과 전 및 후 단백질 함량의 유의미한 변화를 나타내지 않았다.

표 12

여과 전 및 후 각각의 조성물의 총 단백질 함량(mg/㎖)

| UID | 여과 전 | 여과 후 |
|---|---|---|
| 183-001-01-050-F1 | 2.25 | 2.3 |
| 183-001-01-050-F2 | 2.59 | 2.55 |
| 183-001-01-050-F3 | 2.21 | 2.26 |
| 183-001-01-050-F4 | 2.49 | 2.51 |

[0118]

[0119] 각각의 샘플의 총 DOPS 함량은 표 13에 보고되어 있다. 조성물들은 여과 전 및 후 DOPS 함량의 유의미한 변화를 나타내지 않았다.

표 13

여과 전 및 후 각각의 조성물의 총 DOPS 함량(mg/㎖)

| UID | 여과 전 | 여과 후 |
|---|---|---|
| 183-001-01-050-F1 | 3.06 | 3.10 |
| 183-001-01-050-F2 | 2.98 | 3.04 |
| 183-001-01-050-F3 | 2.97 | 2.97 |
| 183-001-01-050-F4 | 3.00 | 2.94 |

[0120]

[0121] 종합하건대, 이 데이터들은 15% 내지 35%의 TBA를 포함하는 샘플들이 여과 전 및 후 유사한 시각적 외관, 단백질 함량 및 DOPS 함량을 나타내었음을 시사한다.

[0122] **실시예 6. 특정 부형제 및 완충제가 SapC 및 DOPS를 포함하는 조성물의 안정성 및 순도에 어떻게 영향을 미치는지의 확인**

[0123] 특정 부형제 및 완충제가 SapC를 포함하는 조성물의 안정성 및 순도에 어떻게 영향을 미치는지를 확인하기 위해, 표 14에 나열된 조성물들을 제조하였고, 각각의 조성물의 안정성 및 순도를 평가하였다.

[0124] **방법**

[0125] 표 14에 나열된 조성물들을 제조하였고, 표 15에 기재된 동결건조 절차에 따라 1.2 ㎖ 분취액을 동결건조하였다. 그 다음, 각각의 동결건조된 샘플을 1.2 ㎖의 HyClone™ 정제수로 재구성하였고, 동결건조된 케

이크가 완전히 용해되게 하였다.

[0126] 하기 성질들을 실시예 2에 기재된 바와 같이 어세이하였다: 시각적 외관; 총 단백질 함량; 및 단백질 함량의 순도. 각각의 동결건조된 샘플의 수분 함량을 전량분석 방법으로 측정하였다. 각각의 샘플의 TBA 퍼센트를 GC-MS 헤드 스페이스(head space) 방법으로 측정하였다. (샘플 중의 TBA는 동결건조 공정 동안 샘플로부터의 대부분의 TBA의 승화 후, DOPS를 위한 용매로서 사용된 TBA로부터 남은 것이었다.)

[0127] 추가 실험에서, 각각의 재구성된 조성물의 샘플을 2주 또는 5주 동안 50℃에서 저장하였고, 그의 안정성을 시각적 외관으로 평가하였고, 단백질 함량의 순도를 실시예 2에 기재된 바와 같이 RP-HPLC를 이용함으로써 측정된 순도 및 입자 크기 분포로 분석하였다. t=0주 및 t=5주에서 각각의 재구성된 액체 중의 입자의 크기를, 맬번(Malvern) 기구를 이용하여 동적 광 산란으로 측정하였다.

*표 14*

**동결건조 및 재구성을 위해 제조된 조성물**

| UID | 설명 |
|---|---|
| 76114-F1 | 0.4 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25% TBA, 9% 수크로스, 10 mM Tris pH 8 |
| 76114-F2 | 0.4 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25% TBA, 9% 트레할로스, 10 mM Tris pH 8 |
| 76114-F3 | 0.4 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25% TBA, 4% 만니톨, 1% 수크로스, 10 mM Tris pH 8 |
| 76114-F4 | 0.4 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25% TBA, 9% 수크로스, 10 mM Tris pH 7.2 |
| 76114-F5 | 0.4 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25% TBA, 9% 트레할로스, 10 mM Tris pH 7.2 |
| 76114-F6 | 0.4 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25% TBA, 4% 만니톨, 1% 수크로스, 10 mM Tris pH 7.2 |
| 76114-F7 | 0.4 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25% TBA, 9% 수크로스, 10 mM 히스티딘 pH 6.5 |
| 76114-F8 | 0.4 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25% TBA, 8% 트레할로스, 10 mM 히스티딘 pH 6.5 |
| 76114-F9 | 0.4 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25% TBA, 4% 만니톨, 1% 수크로스, 10 mM 히스티딘 pH 6.5 |

[0128]

표 15

동결건조된 조성물을 제조하는 데 이용된 동결건조 주기

| 목적 | 설명 |
|---|---|
| 로딩 | 5 ℃ 에서 유지 |
| 냉동 | 183 분 동안 0.3℃/분 상승; 60 분 동안 -50℃ 에서 유지; 133 분 동안 0.3℃/분 상승; 120 분 동안 -10℃ 에서 유지; 133 분 동안 0.3℃/분 상승; 180 분 동안 -50℃ 에서 유지 |
| 일차 건조 | 50 mTorr 에서 30 분 동안 -50 ℃ 에서 유지; 50 mTorr 에서 67 분 동안 0.3℃/분 상승; 50 mTorr 에서 2400 분 동안 -40℃ 에서 유지 |
| 이차 건조 | 50 mTorr 에서 120 분 동안 0.5℃/분 상승; 50 mTorr 에서 480 분 동안 30℃ 에서 유지 |

[0129]

[0130] **결과**

[0131] 각각의 샘플의 시각적 외관은 표 16에 요약되어 있다. 9%의 수크로스를 함유하는 모든 샘플들은 t=0에서 재구성 시 입자를 보인 반면, 트레할로스를 함유하는 모든 샘플들은 입자를 함유하지 않았는데, 이것은 주사 가능한 조성물을 위한 중요한 고려사항이다.

표 16

동결건조된 케이크, 및 t=0 에서 재구성된 액체의 시각적 외관

| UID | 동결건조된 케이크 | t=0 에서 재구성된 액체 |
|---|---|---|
| 76114-F1 | 백색 솜털 같음, 일부 균열 | 탁함, 관찰된 입자; 원심분리 시 펠렛화된 입자 |
| 76114-F2 | 백색 솜털 같음, 일부 균열 | 투명, 무색, 입자 무함유 |
| 76114-F3 | 백색 솜털 같음, 일부 균열 | 약간 탁함, 입자 무함유 |
| 76114-F4 | 백색 솜털 같음, 일부 균열 및 수축 | 탁함, 관찰된 입자; 원심분리 시 펠렛화된 입자 |
| 76114-F5 | 백색 솜털 같음, 일부 균열 및 수축 | 투명, 무색, 입자 무함유 |
| 76114-F6 | 백색 솜털 같음, 일부 균열 | 약간 탁함, 입자 무함유 |
| 76114-F7 | 백색 솜털 같음, 일부 균열 및 수축 | 탁함, 관찰된 입자; 원심분리 시 펠렛화된 입자 |
| 76114-F8 | 백색 솜털 같음, 일부 균열 및 수축 | 투명, 무색, 입자 무함유 |
| 76114-F9 | 백색 솜털 같음, 일부 균열 | 투명, 무색, 입자 무함유 |

[0132]

[0133] 각각의 재구성된 조성물의 총 단백질 함량은 표 17에 보고되어 있다.

표 17

RP-HPLC 에 의해 평가되었을 때, t=0 에서 각각의 재구성된 조성물의 총 단백질 함량(mg/㎖)

| UID | 총 단백질 함량(mg/㎖) | 이론치에 비해 SapC 의 퍼센트 회수 |
|---|---|---|
| 76114-F1 | 0.38 | 91 |
| 76114-F2 | 0.37 | 87 |
| 76114-F3 | 0.37 | 88 |
| 76114-F4 | 0.37 | 87 |
| 76114-F5 | 0.36 | 87 |
| 76114-F6 | 0.37 | 89 |
| 76114-F7 | 0.36 | 86 |
| 76114-F8 | 0.36 | 85 |
| 76114-F9 | 0.38 | 91 |

[0134]

[0135] t=0에서 각각의 재구성된 조성물 중의 SapC의 순도는 표 18에 보고되어 있다.

표 18

t=0 에서 RP-HPLC 및 IEX-HPLC 에 의해 평가된 각각의 조성물의 SapC 순도

| UID | RP-HPLC 에 의한 퍼센트 SapC 순도 | IEX-HPLC 에 의한 퍼센트 SapC 순도 |
|---|---|---|
| 76114-F1 | 93.2 | 96.1 |
| 76114-F2 | 93.2 | 95.9 |
| 76114-F3 | 93 | 96 |
| 76114-F4 | 93.6 | 96 |
| 76114-F5 | 93.5 | 95.8 |
| 76114-F6 | 93.6 | 96 |
| 76114-F7 | 93.6 | 95.8 |
| 76114-F8 | 91.8 | 95.8 |
| 76114-F9 | 93.9 | 95.9 |

[0136]

[0137] 각각의 재구성된 조성물의 TBA 퍼센트는 표 19에 보고되어 있다. 9%의 수크로스를 포함하는 모든 재구성된 조성물들(F1, F4 및 F7)은 시험된 다른 조성물들에 비해 더 높은 수준의 잔류 TBA를 함유하였다.

표 19

t=0 에서 각각의 재구성된 조성물의 퍼센트 TBA

| UID | 퍼센트 TBA |
|---|---|
| 76114-F1 | 2.4 |
| 76114-F2 | 1.9 |
| 76114-F3 | 0.3 |
| 76114-F4 | 2.3 |
| 76114-F5 | 1.7 |
| 76114-F6 | 0.2 |
| 76114-F7 | 2.2 |
| 76114-F8 | 1.8 |
| 76114-F9 | 0.3 |

[0138]

표 20

각각의 동결건조된 조성물의 수분 함량

| UID | t=0 에서 퍼센트 물 |
|---|---|
| 76114-F1 | 0.3 |
| 76114-F2 | 0.4 |
| 76114-F3 | 2.1 |
| 76114-F4 | 0.4 |
| 76114-F5 | 0.3 |
| 76114-F6 | 1.1 |
| 76114-F7 | 0.4 |
| 76114-F8 | 0.3 |
| 76114-F9 | 1.0 |

[0139]

[0140] 도 14는 t=0일 때 및 50℃에서 2주 동안 저장한 후 재구성된 조성물에서의 SapC 순도 및 퍼센트 회수의 RP-HPLC 측정을 도시하는 그래프이다. 50℃에서 2주 후 SapC의 순도는 pH 6.5의 히스티딘으로 완충된 모든 샘플들(76114-F7, 76114-F8 및 76114-F9)뿐만 아니라 76114-F6 샘플(pH 7.2의 Tris로 완충됨)에서도 90% 초과의 수준으로 유지되었다. 모든 다른 샘플들은 50℃에서 2주 후 85% 미만의 SapC 순도를 나타내었다.

[0141] 9%의 수크로스를 포함하는 샘플들(76114-F1, 76114-F4, 76114-F7)에 대한 동결건조된 물질은 50℃에서 2주 후에 용융된 반면(데이터는 제시되어 있지 않음), 다른 동결건조된 샘플들은 50℃에서 2주 후 시각적 외관의 유의미한 변화를 나타내지 않았다.

[0142] 도 15는 t=0일 때(도 15a) 및 50℃에서 5주 후(도 15b) 샘플 76114-F5에 대한 동적 광 산란의 결과를 도시하는 그래프이다. 도 16은 t=0일 때(도 16a) 및 50℃에서 5주 후(도 16b) 샘플 76114-F6에 대한 동적 광 산란의 결과를 도시하는 그래프이다. 9%의 트레할로스를 포함하는 조성물들(F2, F5, F8)은 동적 광 산란 시 시험된 모든 다른 조성물들에 비해 가장 균일하고 재현 가능한 입자 크기 부피 분포를 보였다.

[0143] 요약하건대, 이 데이터들은 트레할로스가 수크로스 및 만니톨과 수크로스의 혼합물에 비해 바람직한 당 부형제임을 암시한다. 이것은 만니톨/수크로스 혼합물을 가진 조성물이 시험된 모든 조성물들 중 가장 낮은 퍼센트의 TBA를 나타내었음에도 불구하고 사실이다. 추가로, 이 데이터들은 SapC 및 DOPS를 포함하는 조성물이 pH 8의 10 mM Tris에 비해 pH 6.5 또는 pH 7.2의 10 mM Tris에서 더 안정함을 시사한다.

[0144] **실시예 7: (DOPS에 대한 SapC의 일정한 몰 비에서) SapC 및 DOPS의 선택된 농도가 SapC 및 DOPS를 포함하는 조성물의 안정성 및 순도에 어떻게 영향을 미치는지의 확인**

[0145] SapC 및 DOPS의 다양한 농도가 조성물의 안정성 및 순도에 어떻게 영향을 미치는지를 확인하기 위해, 표 21에 나열된 조성물들을 제조하였고, 각각의 조성물의 안정성 및 순도를 평가하였다.

[0146] **방법**

[0147] 표 21에 나열된 조성물들을 제조하였고, 1.2 ㎖ 분취액을 실시예 6에 기재된 동결건조 방법에 따라 동결건조하였다. 그 다음, 각각의 동결건조된 샘플을 1.2 ㎖의 HyClone™ 물로 재구성하였고, 동결건조된 케이크가 완전히 용해되게 하였다. t=0에서 각각의 재구성된 샘플 중의 입자의 크기를, 맬번 기구를 이용하여 동적 광 산란으로 측정하였다.

*표 21*

동결건조 전 조성물

[0148]

| UID | 설명 |
|---|---|
| 76733-F1 | 4.2 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25% TBA, 10 mg/㎖ 트레할로스, 25 mM 인산염 pH 7.4 |
| 76733-F2 | 2.2 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25% TBA, 10 mg/㎖ 트레할로스, 25 mM 인산염 pH 7.4 |
| 76733-F3 | 1.3 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25% TBA, 10 mg/㎖ 트레할로스, 25 mM 인산염 pH 7.4 |
| 76733-F4 | 0.82 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25% TBA, 10 mg/㎖ 트레할로스, 25 mM 인산염 pH 7.4 |
| 76733-F5 | 0.42 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25% TBA, 10 mg/㎖ 트레할로스, 25 mM 인산염 pH 7.4 |

[0149] **결과**

[0150] 도 17은 t=0에서 각각의 재구성된 샘플에 대한 동적 광 산란의 결과를 도시하는 그래프이다. 도 18은 각각의 재구성된 샘플에 대한 시간에 따른 동적 광 산란의 변화를 도시하는 그래프이다. 최고 농도인 4.2 ㎎/㎖의 SapC를 가진 조성물은 2.2 ㎎/㎖ 또는 더 낮은 농도의 SapC를 가진 조성물에 비해 더 높은 평균 입자 크기를 보였다. 모든 재구성된 조성물들은 4시간에 걸쳐 일관된 평균 입자 크기를 유지하였는데, 이는 안정한 재구성된 생성물을 암시한다. 이 결과들은 SapC 대 DOPS의 몰 비 1:12에서 SapC의 바람직한 농도가 2.2 ㎎/㎖ SapC 이하임을 암시한다.

[0151] **실시예 8: 만니톨 및 트레할로스의 다양한 농도가 DOPS를 포함하는 조성물의 안정성에 어떻게 영향을 미치는지의 확인**

[0152] 만니톨 및 트레할로스의 다양한 농도가 DOPS를 포함하는 조성물의 안정성 및 순도에 어떻게 영향을 미치는지를 확인하기 위해, 표 22 및 23에 기재된 조성물들을 제조하고 동결건조하고 물로 재구성하였다.

[0153] **방법**

[0154] 표 22에 나열된 조성물들을 제조하였고, 2 ㎖ 바이알 내의 0.8 ㎖ 분취액 또는 10 ㎖ 바이알 내의 4 ㎖ 분취액을 실시예 6에 기재된 동결건조 공정에 따라 동결건조하였다. 동결건조된 샘플의 각각의 바이알을 HyClone™ 물로 재구성하였고, 동결건조된 케이크가 완전히 용해되게 하였다. 동결건조된 케이크의 시각적 외관 및 각각의 재구성된 샘플의 TBA 퍼센트를 실시예 6에 기재된 바와 같이 어세이하였다.

표 22

동결건조 전 조성물

| UID | 설명 |
|---|---|
| 81494-F1 | 1.6 mg/㎖ DOPS, 10 mM 히스티딘 pH 6, 1.5% 만니톨 |
| 81494-F2 | 1.6 mg/㎖ DOPS, 10 mM 히스티딘 pH 6, 0.3% 트레할로스 |
| 81494-F3 | 1.6 mg/㎖ DOPS, 10 mM 히스티딘 pH 6, 0.9% 만니톨 |
| 81494-F4 | 1.6 mg/㎖ DOPS, 10 mM 히스티딘 pH 6, 1.5% 트레할로스 |
| 81494-F5 | 1.6 mg/㎖ DOPS, 10 mM 히스티딘 pH 6, 5% 만니톨 |
| 81494-F6 | 1.6 mg/㎖ DOPS, 10 mM 히스티딘 pH 6, 4% 만니톨, 1% 트레할로스 |
| 81494-F7 | 1.6 mg/㎖ DOPS, 10 mM 히스티딘 pH 6, 3% 만니톨, 2% 트레할로스 |
| 81494-F8 | 1.6 mg/㎖ DOPS, 10 mM 히스티딘 pH 6, 5% 트레할로스 |
| 81494-F9 | 1.6 mg/㎖ DOPS, 10 mM 히스티딘 pH 6, 9% 만니톨 |
| 81494-F10 | 1.6 mg/㎖ DOPS, 10 mM 히스티딘 pH 6, 7.2% 만니톨, 1.8% 트레할로스 |
| 81494-F11 | 1.6 mg/㎖ DOPS, 10 mM 히스티딘 pH 6, 5.4% 만니톨, 3.6% 트레할로스 |
| 81494-F12 | 1.6 mg/㎖ DOPS, 10 mM 히스티딘 pH 6, 9% 트레할로스 |

[0155]

[0156] 표 23에 나열된 조성물들을 제조하고 하나의 조건만이 변형된, 실시예 6에 기재된 동결건조 공정에 따라 동결건조하였다: -40℃에서 유지하는 대신에 -45℃에서 유지된 일차 건조 온도. 각각의 동결건조된 샘플을 1.2 ㎖의 HyClone™ 물로 재구성하였고, 동결건조된 케이크가 완전히 용해되게 하였다. 하기 성질들을 실시예 6에 기재된 바와 같이 어세이하였다: 동결건조된 케이크의 시각적 외관, 각각의 재구성된 샘플의 퍼센트 TBA, 및 각각의 재구성된 샘플의 입자 크기 분포.

표 23

변형된 동결건조 공정에서 사용된 동결건조 전 조성물

| UID | 설명 |
|---|---|
| 183-001-01-114-F1 | 2.2 mg/㎖ SapC, 2.4 mg/㎖ DOPS, 10 mM 구연산염 pH 6.2, 4% 만니톨, 1% 트레할로스 |
| 183-001-01-114-F2 | 2.2 mg/㎖ SapC, 2.4 mg/㎖ DOPS, 10 mM 구연산염 pH 6.2, 3.5% 만니톨, 1.5% 트레할로스 |
| 183-001-01-114-F3 | 2.2 mg/㎖ SapC, 2.4 mg/㎖ DOPS, 10 mM 구연산염 pH 6.2, 2% 트레할로스 |
| 183-001-01-114-F4 | 2.2 mg/㎖ SapC, 2.4 mg/㎖ DOPS, 10 mM 구연산염 pH 6.2, 7.2% 만니톨, 1.8% 트레할로스 |
| 183-001-01-114-F5 | 2.2 mg/㎖ SapC, 2.4 mg/㎖ DOPS, 10 mM 구연산염 pH 6.2, 6.3% 만니톨, 2.7% 트레할로스 |
| 183-001-01-114-F6 | 2.2 mg/㎖ SapC, 2.4 mg/㎖ DOPS, 10 mM 구연산염 pH 6.2, 5.4% 만니톨, 3.6% 트레할로스 |

[0157]

[0158] **결과**

[0159] 표 24 및 25는 케이크가 형성되었는지 아니면 형성되지 않았는지와, 케이크가 형성되었다면, 케이크의 무결성

및 품질을 비롯한, 동결건조된 조성물의 정성적 관찰결과를 포함한다.

표 24

표 22 조성물로부터의 동결건조된 케이크의 외관

| UID | 관찰결과 |
|---|---|
| 81494-F1 | 형성된 케이크 없음 |
| 81494-F2 | 형성된 케이크 없음 |
| 81494-F3 | 형성된 케이크 없음 |
| 81494-F4 | 형성된 케이크 없음 |
| 81494-F5 | 형성된 케이크 없음 |
| 81494-F6 | 형성된 케이크 없음 |
| 81494-F7 | 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크 |
| 81494-F8 | 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크 |
| 81494-F9 | 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크 |
| 81494-F10 | 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크 |
| 81494-F11 | 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크 |
| 81494-F12 | 일부 수축을 가진 치밀한 솜털 같은 케이크 |

[0160]

표 25

표 23 조성물로부터의 동결건조된 케이크의 외관

| UID | 관찰결과 |
|---|---|
| 183-001-01-114-F1 | 4 개의 바이알들 중 4 개의 바이알들은 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크를 나타내었음 |
| 183-001-01-114-F2 | 4 개의 바이알들 중 4 개의 바이알들은 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크를 나타내었음 |
| 183-001-01-114-F3 | 4 개의 바이알들 중 2 개의 바이알들은 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크를 나타내었음 |
| 183-001-01-114-F4 | 4 개의 바이알들 중 4 개의 바이알들은 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크를 나타내었음 |
| 183-001-01-114-F5 | 4 개의 바이알들 중 3 개의 바이알들은 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크를 나타내었음 |
| 183-001-01-114-F6 | 4 개의 바이알들 중 4 개의 바이알들은 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크를 나타내었음 |

[0161]

[0162] 도 19는 표 22 조성물의 각각의 재구성된 샘플의 TBA 퍼센트를 도시하는 그래프이다.

[0163] 도 20은 표 23 조성물의 각각의 재구성된 샘플의 TBA 퍼센트를 도시하는 그래프이다.

[0164] 도 21은 표 23 조성물에 대한 재구성된 액체의 3개의 레플리케이트에 대한 입자 크기 분포를 보여주는 그래프이다. 패널 A는 183-001-01-114-F1에 대한 데이터를 보여주고; 패널 B는 183-001-01-114-F4에 대한 데이터를 보여주고; 패널 C는 183-001-01-114-F5에 대한 데이터를 보여주고; 패널 D는 183-001-01-114-F6에 대한 데이터를

보여준다. 표 22의 조성물의 서브세트, 즉 81494-F7, 81494-F8, 81494-F9, 81494-F10, 81494-F11 및 81494-F12는 고품질 동결건조된 케이크를 형성하였다. 물로 재구성하였을 때, 모든 6개의 이 조성물들은 3% 미만의 TBA를 함유하였다. 재구성된 81494-F9 및 81494-F10 조성물들은 0.5% 미만의 최저 %의 TBA를 함유하였다. 이 데이터들은 81494-F7, 81494-F8, 81494-F9, 81494-F10 및 81494-F11 조성물들의 성분들이 동결건조된 케이크 및 재구성된 용액 둘 다에 유리한 성질을 부여할 수 있음을 시사한다.

[0165] 변형된 동결건조 공정에 의해 제조된 모든 조성물들(표 23 조성물들)에 대한 동결건조된 케이크의 품질 및 무결성은 높았고, 모든 이 조성물들은 재구성되었을 때 0.5% 미만의 TBA 수준을 가졌다. 이 결과들은 재구성된 조성물에서 더 높은 퍼센트의 만니톨이 더 낮은 수준의 TBA와 상관관계를 가짐을 보여준 이전 실험을 확인시켜준다. 그러나, 만니톨을 포함하는 조성물은 유일한 당 부형제로서 트레할로스를 포함하는 조성물의 경우 관찰된 것만큼 균일하고 재현 가능한 입자 크기 분포를 나타내지 않는다. 따라서, 트레할로스는 SapC 및 DOPS를 포함하는 조성물을 위한 바람직한 당 부형제이다.

[0166] **실시예 9. 다양한 조성이 SapC 및 DOPS를 포함하는 조성물의 안정성 및 순도에 어떻게 영향을 미치는지의 확인**

[0167] 이전 실시예들의 결과에 근거할 때, SapC-DOPS 약학 생성물을 위한 바람직한 조성은 2.2 ㎎/㎖ SapC, 2.4 ㎎/㎖ DOPS(1:12의 SapC:DOPS 몰 비), 25 mM Tris pH 7.2, 5% 트레할로스인 것으로 확인되었다. pH 및 성분들의 농도의 변화가 SapC 및 DOPS를 포함하는 조성물의 안정성 및 순도에 어떻게 영향을 미치는지를 확인하기 위해, 표 26에 나열된 조성물들을 제조하고 평가하였다.

[0168] **방법**

[0169] 표 26에 나열된 조성물들을 제조하였다. 4 ㎖ 분취액을 바이알에 넣고 하나의 조건이 변형된, 실시예 6에 기재된 동결건조 공정에 따라 동결건조하였다: 이차 건조 시간은 15시간 대신에 25시간이었다. 동결건조된 케이크를 분석 및 1.2 ㎖의 HyClone™ 물을 사용한 재구성 전에 4주 동안 50℃에서 저장하였다(또는 2주 또는 4주 동안 25℃에서 저장하였다). 하기 성질들을 실시예 2에 기재된 바와 같이 어세이하였다: 재구성된 샘플의 시각적 외관, pH, 총 단백질 함량 및 단백질 함량의 순도. 하기 성질들을 실시예 6에 기재된 바와 같이 어세이하였다: 동결건조된 케이크의 시각적 외관, 재구성된 샘플의 퍼센트 TBA, 및 각각의 재구성된 샘플의 입자 크기 분포.

*표 26*

동결건조 전 조성물

| UID | 설명 |
|---|---|
| 183-001-01-141-F1 | 2.2 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25 mM Tris pH 7.2, 5% 트레할로스 |
| 183-001-01-141-F2 | 3.4 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25 mM Tris pH 6.8, 7.5% 트레할로스 |
| 183-001-01-141-F3 | 1.0 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25 mM Tris pH 7.6, 7.5% 트레할로스 |
| 183-001-01-141-F4 | 3.4 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25 mM Tris pH 7.6, 2.5% 트레할로스 |
| 183-001-01-141-F5 | 1.0 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25 mM Tris pH 6.8, 2.5% 트레할로스 |
| 183-001-01-141-F6 | 2.2 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25 mM Tris pH 7.2, 5% 트레할로스 |
| 183-001-01-141-F7 | 2.2 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25 mM Tris pH 7.2, 5% 트레할로스 |
| 183-001-01-141-F8 | 3.4 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25 mM Tris pH 7.6, 7.5% 트레할로스 |
| 183-001-01-141-F9 | 1.0 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25 mM Tris pH 7.2, 2.5% 트레할로스 |
| 183-001-01-141-F10 | 3.4 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25 mM Tris pH 6.8, 2.5% 트레할로스 |
| 183-001-01-141-F11 | 1.0 mg/㎖ SapC, 1:12 의 SapC:DOPS 몰 비, 25 mM Tris pH 6.8, 7.5% 트레할로스 |

[0170]

[0171] **결과**

[0172] 표 27은 4주 동안 50℃에서 저장된 동결건조된 조성물, 및 저장된 동결건조된 조성물로부터 제조된 후 즉시 분석된 재구성된 조성물의 정성적 관찰결과를 포함한다. 각각의 재구성된 샘플의 pH는 표 28에 보고되어 있고, 퍼센트 TBA는 표 29에 제시되어 있다.

표 27

4주 동안 50℃에서 저장된 동결건조된 케이크의 외관 및 저장된 케이크로부터 제조된 재구성된 액체의 외관

| UID | 동결건조된 케이크 | 재구성된 용액 |
|---|---|---|
| 183-001-01-141-F1 | 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크 | 약간 탁함 |
| 183-001-01-141-F2 | 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크 | 약간 탁함 |
| 183-001-01-141-F3 | 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크 | 투명함 |
| 183-001-01-141-F4 | 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크 | 탁함 |
| 183-001-01-141-F5 | 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크 | 약간 탁함 |
| 183-001-01-141-F6 | 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크 | 약간 탁함 |
| 183-001-01-141-F7 | 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크 | 약간 탁함 |
| 183-001-01-141-F8 | 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크 | 약간 탁함 |
| 183-001-01-141-F9 | 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크 | 약간 탁함 |
| 183-001-01-141-F10 | 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크 | 탁함 |
| 183-001-01-141-F11 | 균열을 갖지 않은 치밀한 솜털 같은 케이크 | 투명함 |

[0173]

표 28

4 주 동안 동결건조된 샘플을 저장한 후 제조된 각각의 재구성된 조성물의 pH

| UID | pH |
|---|---|
| 183-001-01-141-F1 | 7.2 |
| 183-001-01-141-F2 | 6.8 |
| 183-001-01-141-F3 | 7.6 |
| 183-001-01-141-F4 | 7.6 |
| 183-001-01-141-F5 | 6.8 |
| 183-001-01-141-F6 | 7.2 |
| 183-001-01-141-F7 | 7.2 |
| 183-001-01-141-F8 | 7.6 |
| 183-001-01-141-F9 | 7.6 |
| 183-001-01-141-F10 | 6.8 |
| 183-001-01-141-F11 | 6.8 |

[0174]

*표 29*

4주 동안 동결건조된 샘플을 저장한 후 제조된 각각의 재구성된 조성물의 퍼센트 TBA

| UID | 퍼센트 TBA |
|---|---|
| 183-001-01-141-F1 | 1.85 |
| 183-001-01-141-F2 | 1.94 |
| 183-001-01-141-F3 | 1.81 |
| 183-001-01-141-F4 | 1.58 |
| 183-001-01-141-F5 | 1.62 |
| 183-001-01-141-F6 | 1.78 |
| 183-001-01-141-F7 | 1.74 |
| 183-001-01-141-F8 | 1.92 |
| 183-001-01-141-F9 | 1.38 |
| 183-001-01-141-F10 | 1.44 |
| 183-001-01-141-F11 | 1.79 |

[0175]

[0176] 도 22는 2주 또는 4주 동안 25℃에서 저장된 동결건조된 분말로부터 제조된 각각의 재구성된 조성물의 SapC 순도의 RP-HPLC 측정을 도시하는 그래프이다. 도 23은 2주 또는 4주 동안 25℃에서 저장된 동결건조된 분말로부터 제조된 각각의 재구성된 조성물의 SapC 순도의 IEX-HPLC 측정을 도시하는 그래프이다.

[0177] 도 24는 2주 또는 4주 동안 25℃에서 저장된 동결건조된 분말로부터 제조된 각각의 재구성된 조성물의 시간에 따른 평균 입자 크기를 도시하는 그래프이다.

[0178] 표 26 조성물들에 대한 상기 데이터는 하기 결과들을 시사한다:

[0179] (1) 모든 조성물들의 동결건조된 케이크는 희석제의 첨가 시 거의 즉시 재구성되었고;

[0180] (2) 모든 동결건조된 조성물들의 외관은 50℃에서 4주 저장 후 변화되지 않은 상태로 유지되었고;

[0181] (3) 재구성된 생성물의 외관은 2.2 ㎎/㎖ SapC, 1:12의 SapC:DOPS 몰 비를 야기하는 양의 DOPS, 25 ㎜ Tris(pH 7.2) 및 5% 트레할로스를 함유하는 조성물(바람직한 조성물)이 허용 가능할 정도로 낮은 탁도를 가짐을 보여주었고;

[0182] (4) pH는 2주 또는 4주 동안 50℃에서 유지된 모든 재구성된 조성물들에서 안정한 상태로 유지되었고;

[0183] (5) 보다 낮은 퍼센트의 트레할로스를 가진 재구성된 조성물은 더 낮은 퍼센트의 TBA를 가졌고;

[0184] (6) 재구성 후 바람직한 조성물(n=3; F1, F6 및 F7)의 평균 잔류 TBA는 1.8%이었고;

[0185] (7) 보다 높은 퍼센트의 트레할로스를 가진 조성물은 보다 낮은 평균 입자 크기 및 조성을 나타내었다.

[0186] 실시예 1 내지 9로부터의 모든 데이터들에 근거할 때, 8:1 내지 20:1의 범위의 폴리펩타이드에 대한 포스파티딜세린 지질의 몰 비, Tris 완충제, 트레할로스 및 TBA를 포함하는 조성물은 임상 조성물의 바람직한 물리적 및 화학적 성질을 제공하였다.

[0187] **실시예 10. SapC 및 DOPS를 포함하는 조성물의 활성의 평가**

[0188] 음이온성 인지질(DOPS)의 존재 하에서 사포신 C는 세레마이드와 글루코스로의 세레브로사이드의 가수분해를 촉매작용하는 효소인 글루코세레브로시다제(glucocerebrosidase)(GBA)를 활성화시키는 것으로 공지되어 있다. 시험관내에서 SapC-DOPS 화합물의 이 작용을 시험하기 위해, 재조합 인간 GBA 효소(R&D Systems, 카탈로그 #:7410-GHB-020)를 사용하고, 세레브로사이드 대신에 4-메틸움벨리페릴-β-D-글루코피라노사이드 또는 4-MUG(Sigma, 카탈로그 #:M3633)를 기질로서 사용한다. SapC-DOPS는 rhGBA를 활성화시켜 4-MUG를, 형광 신호를 방출하는 4-메틸움벨리에론(4-MU)과 글루코스로 절단할 것이다.

[0189] 하기 실시예에서, 양성 대조군 샘플은 기준(REF) 표준물의 102% 상대 효능을 가진 것으로 확인되었다. (이 어세

이의 통과 결과는 70% 내지 160% 상대 효능이다.) 특이성(SPEC) 샘플도 SapC가 어떤 방식으로든 손상되는 경우 감소된 활성을 보이는 것으로 시험되었다. SPEC 샘플은 48시간 동안 70℃에서 처리된 후 DOPS와 혼합된 SapC를 함유하였다. 상대 효능은 곡선들이 상이한 것으로 간주되기 때문에 SPEC 샘플에 대해 측정될 수 없었다. 그러나, SPEC 샘플의 베스트-피트(best-fit) 곡선의 정점은 REF 샘플의 베스트-피트 곡선의 정점의 79%이었다. 특이성에 대한 통과 결과는 <90%이다. 추가로, 어세이의 핵심 성분들의 전부는 아니지만 일부의 상이한 조합들을 포함하는 대조군들을 사용하였다. 이들 중에서 주목할 만한 것은 SapC-DOPS 없이 효소 플러스 기질(GBA + 4MU), SapC 없이 효소 플러스 기질 플러스 DOPS(DOPS만), 및 DOPS 없이 효소 플러스 기질 플러스 SapC(SapC만)이다. 이 대조군들 중 어느 대조군도 유의미한 형광 신호를 생성하지 않았는데, 이는 SapC 및 DOPS 둘 다가 효소를 활성화시켜 기질을 절단하는 데 필요함을 보여준다.

[0190] 도 25는 SapC-DOPS의 활성을 시험하는 GBA 효소 어세이의 결과를 보여주는 그래프이다.

[0191] **실시예 11. SapC 및 DOPS를 포함하는 약학 조성물을 사용한 치료를 위한 프로토콜**

[0192] 진행된 고형 종양 또는 재발성 고등급 신경교종(HGG)을 가진 18세 이상의 환자들은 BXQ-350으로서 명명된 SapC/DOPS 조성물의 1 상 개방-표지 용량 상승 임상시험에 등록되었다. 동결건조된 BXQ-350 생성물(바이알 내의 동결건조된 분말로서 공급됨)을 주사용 멸균수로 재구성하여, 2.2 mg/mℓ(+/-0.3 mg/mℓ)의 인간 SapC; 2.4 mg/mℓ (+/-0.4 mg/mℓ)의 DOPS의 나트륨 염; pH 7.2(+/-0.4)의 25 mM(+/-2 mM) Tris; 5 %w/v(+/-1%)의 트레할로스를 함유하는 수성 용액을 생성한다. t-부틸 알코올이 존재하는 경우, 이것은 2 %w/w 미만으로 존재한다.

[0193] 용량 상승 연구 후, 체중 kg당 2.4 mg의 SapC를 전달하는 BXQ-350 용량을 추가 연구를 위해 선택하였다. 투여 프로토콜은 적어도 1 주기의 치료를 포함한다. 치료는 예를 들면, 표 30에 기재된 바와 같이, 6 주기의 치료를 통해 또는 질환 진행까지 계속될 수 있다. BXQ-350은 유리 바이알 내의 동결건조된 분말로서 공급된다. 투여 전에, 고체 약물 생성물을 바이알 4 mℓ 주사용 멸균수(USP)에 첨가함으로써 바이알 내에서 재구성하여, 바이알에서 2.2 mg/mℓ의 SapC의 재구성된 약물 강도를 생성한다. 그 다음, 재구성된 약물 생성물을 IV 백 내의 멸균 0.9% 식염수로 목표 IV 투여 농도까지 희석한다. 각각의 용량을 대략 45±15분의 시간에 걸쳐 IV 주입으로 투여한다.

*표 30*

**투여 일정**

[0194]

| BXQ-350 의 투여 일정 | | | |
|---|---|---|---|
| 주기 1 - 1 주 | 주기 1 - 2 주 | 주기 1 - 3 주 및 4 주 | 주기 2 내지 6 |
| 1 일째 날 내지 5 일째 날 (연속 5 일) | 8 일째 날, 10 일째 날 및 12 일째 날 (이틀마다) | 15 일째 날 및 22 일째 날 (7±3 일마다 1 회) | 29 일째 날, 57 일째 날, 85 일째 날, 113 일째 날 및 141 일째 날 (28±3 일마다 1 회) |

[0195] 도 26은 1a 상 인구통계자료 및 유해 사건을 투약군별로 보여주는 표이다. 치료 관련 심각한 유해 사건은 보고되지 않았다.

[0196] 0.7 내지 2.4 mg/kg의 치료 용량에서 인간 PK 및 노출(곡선하면적(AUC))을 예측하기 위해 임상전 PK/TK를 상대 성장적으로 스케일링하였다. 인체 대상 첫 번째(First In Human)(FIH) 시험으로부터의 인체 제거율, 분포의 말기 부피(Vz), 반감기 및 AUC(0.7 내지 2.4 mg/kg 용량)는 다음과 같이 요약된다: 제거율(Cl) 57 내지 76 mℓ/kg/hr, Vz 314 내지 509 mℓ/kg, 및 반감기 3.5시간 내지 5시간. 상응하는 AUC는 10,020 내지 42,330 hr*ng/mℓ이었다. 효능은 전형적으로 4 내지 16 mg/kg의 용량 및 7,400 내지 29,600 hr*ng/mℓ의 상응하는 AUC에서 뮤린 모델에서 발생하였다. 마우스 데이터에 근거할 때, FIH 노출은 원하는 노출 범위에 포함된다. 도 27a 내지 27c는 1 상 시험의 1일째 날(도 27a), 4일째 날(도 27b) 및 22일째 날(도 27c) 약물동력학적 결과를 보여주는 3개 세트의 그래프들이다. 데이터는 반-로그(semi-log) 도표로서 제시된다(각각의 세트의 상부). 약물동력학은 용량에 비례하였다.

[0197] 도 29는 1a 상 시험의 환자 결과를 보여주는 스위머 도표이다. 개별 대상체들 중 일부는 하기 실시예 12 내지

14에 논의되어 있다.

[0198] **실시예 12. 두정부 역형성 뇌실막세포종으로 진단받은 환자를 치료하기 위한 SapC 및 DOPS를 포함하는 약학 조성물의 용도**

[0199] **방법**

[0200] 뇌실막세포종은 미국에서 성인 뇌종양의 약 3%를 차지하는 희귀 일차 신경계 종양이다. 표준 치료는 최대 수술적 절제 및 방사선 요법을 포함한다. FDA에 의해 승인받은 약물 요법은 없다.

[0201] 전립선암의 병력을 가진 67세 백인 남성은 2014년 10월에 좌측 두정부 역형성 뇌실막세포종으로 진단받았다. 그는 전절제를 받은 후, 보조 방사선 요법을 받았다. 2017년 4월 반복 뇌 MRI는 국소 재발을 보여주었다. 그는 반응 없이 3 주기의 테몰로조마이드(temolozomide)를 제공받았다. 그는 2017년 9월 BXQ-350 시험에 등록되었고; 등록 시, 그의 동부 협동 종양학 그룹(Eastern Cooperative Oncology Group)(ECOG) 수행 상태는 1이었고, 그의 주 증상은 실어증 및 우측 약화이었다. 환자는 주기 1(1일째 날 내지 5일째 날, 8일째 날, 10일째 날, 12일째 날, 15일째 날, 22일째 날에 BXQ-350 2.4 mg/kg IV 주입) 및 추가 3 주기(1x28일)를 제공받았고, 사망할 때까지 안전성, 반응, 개정된 신경종양학 평가(RANO) 및 ECOG 수행 상태에 대해 추적검사를 받았다.

[0202] **결과**

[0203] 기준에서, 두개골 및 두피 침습과 관련된 측두 병변은 6.4 x 3.2 cm이었다. 2 주기 후, 두개내 증강 성분의 크기의 미미한 감소가 보고되었다(RANO에 따를 때 전체적으로 안정한 질환). 환자는 관련 유해 사건 또는 독성 없이 총 4 주기의 BXQ-350을 제공받았다. 주기 5는 MRI 상에서의 부피 진행으로 인해 보류되었다. 그는 뇌종양 질량 효과로 인해 등록한 지 6개월 후 사망하였다. 사후 조직학 및 육안 해부학은 현미경관찰 시 연골모양 분화를 가진 광범위한 뇌종양 괴사, 및 흉부 및 요추에서의 괴사 질환의 징후를 보여주었다. 부검 시 관찰된 뇌종양 괴사는 치료와 관련된 것으로 보였고 약물이 종양 세포에 대한 독성을 나타냄을 시사한다.

[0204] 도 28a 내지 28d는 좌측부터 우측까지 사후 조직학 및 육안 해부학 분석으로부터의 결과를 도시한다: (도 28a) 초기 수술 표본은 뇌실막 분화 및 풍부한 유사분열 모습의 증거를 거의 보여주지 않았다. 40배율의 H&E; (도 28b) 부검 시 육안 뇌 검사는 광범위한 종양 괴사를 보여주었고; (도 28c) 종양 박편의 현미경 검사는 괴사 및 약간의 생존 종양을 보여주었고(40배율의 삽도와 함께 4배율의 H&E); (도 28d) 부검 시, 종양이 수술적 결함 및 두피를 통해 확장되어 있는 부위에서 광범위한 연골모양 분화가 있었다.

[0205] **실시예 13. 고등급 신경교종으로 진단받은 환자를 치료하기 위한 SapC 및 DOPS를 포함하는 약학 조성물의 용도**

[0206] 고등급 신경교종(HGG)을 가진 9명의 성인 환자들은 BXQ-350의 안전성을 연구하기 위한 용량 상승 시험에 포함되었다. 표 30 프로토콜에 따라 주기적으로 제공된 용량은 0.7 mg/kg 내지 2.4 mg/kg이었다. 9개의 HGG 환자들 중 8명의 환자들은 철회 전에 완전한 세트의 주기를 완료하였다(진행으로 인해 7명; 1명의 자발적 철회).

[0207] 0.7 mg/kg으로 시작하는 용량을 사용한 6 주기 초과(>12개월)의 치료를 완료한, GBM을 가진 1명의 환자는 안정한 질환, 병변 크기의 감소 및 유의미한 진행성 기능적 신경학적 결함의 부재를 나타내었다. HGG 환자들 중 6명의 환자들은 113일째 날 개선된 RANO/RECIST를 가졌다.

[0208] **실시예 14. 충수의 선암종으로 진단받은 환자를 치료하기 위한 SapC 및 DOPS를 포함하는 약학 조성물의 용도**

[0209] 충수의 국소적으로 진행된 점액성 선암종을 가진 62세 여성은 1a 상 시험의 부분으로서 치료받았다. 절제 및 수술 후 보조 화학요법(FOLFOX) 후, 난소를 수반하는 골반에서의 2007년 재발은 전체 복부 자궁절제술/양쪽 자궁관난소절제술을 포함하는 감량 수술에 이은 이리노테칸(irinotecan) 및 세툭시맙(cetuximab)을 사용한 전신 요법으로 이어졌다. 2009년, 재발은 완전한 관해와 함께 광범위한 감량 수술 및 복부내 온열관류로 이어졌다. 그녀는 2016년 재발에 대한 치료를 거절한 후, 2017년 7월에 BXQ-350을 시작하였다. 그녀는 1 상 프로토콜에 따라 IV로 2.4 mg/kg BXQ-350을 제공받았고, 11 주기를 완료한 후 1b 상 시험에서 계속 연구에 남으면서, BXQ-350에 기인할 수 있는 심각한 유해 사건 없이 부분적 반응을 경험하였다.

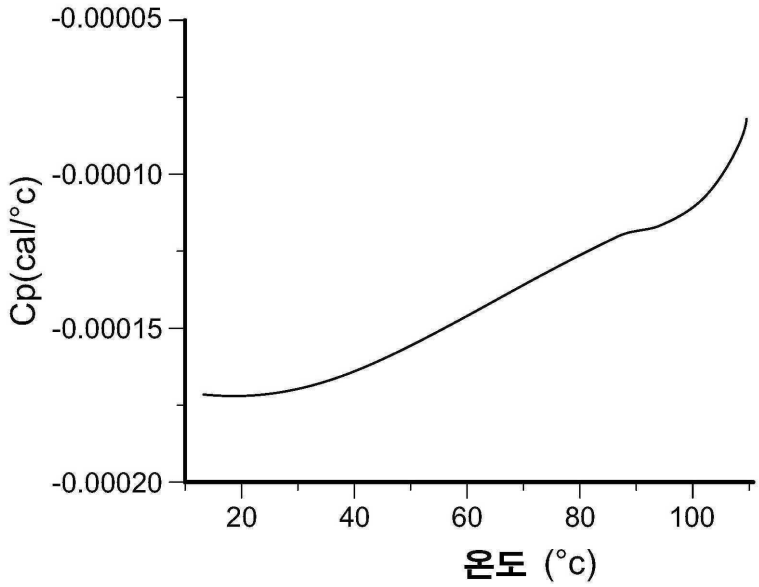
[0210] **실시예 15. 직장 선암종으로 진단받은 환자를 치료하기 위한 SapC 및 DOPS를 포함하는 약학 조성물의 용도**

[0211] 다양한 고형 종양들을 가진 성인 환자들은 BXQ-350의 안전성을 연구하기 위한 용량 상승 시험에 포함되었다. 표 30 프로토콜에 따라 주기적으로 제공된 용량은 0.7 mg/kg 내지 2.4 mg/kg이었다. 모든 환자들은 철회 전에 적어도 한 주기를 완료하였다.

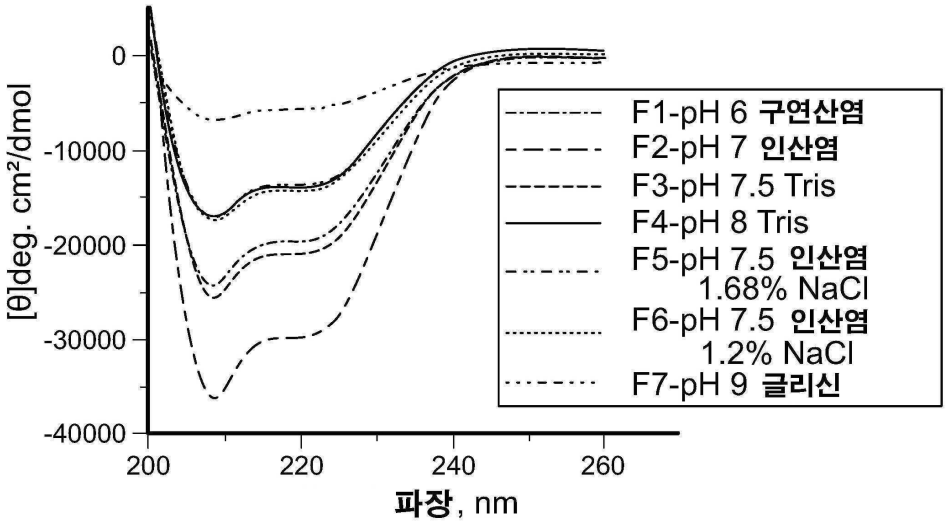
[0212] 전이성(스테이브(Stave) IV) 직장 선암종으로 진단받은 1명의 환자는 1.8 mg/kg으로 시작하는 용량을 사용한 12개월 초과의 치료를 완료하였고, 12개월 초과의 치료 후 플루로데옥시글루코스(F-18 FDG)를 사용한 양전자 방출 단층촬영(PET) 시 종양 대사 활성의 유의미한 감소에 대한 증거와 함께 안정한 질환을 나타내었다. 도 30a 및 30b를 참조한다.

## 도면

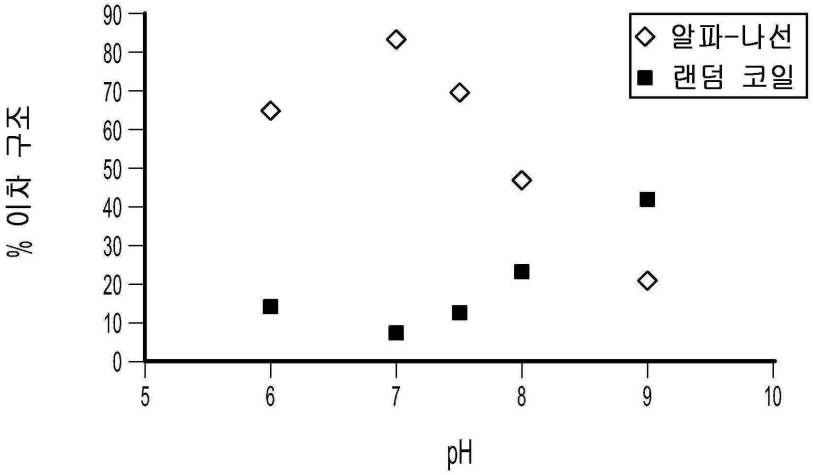
### 도면1



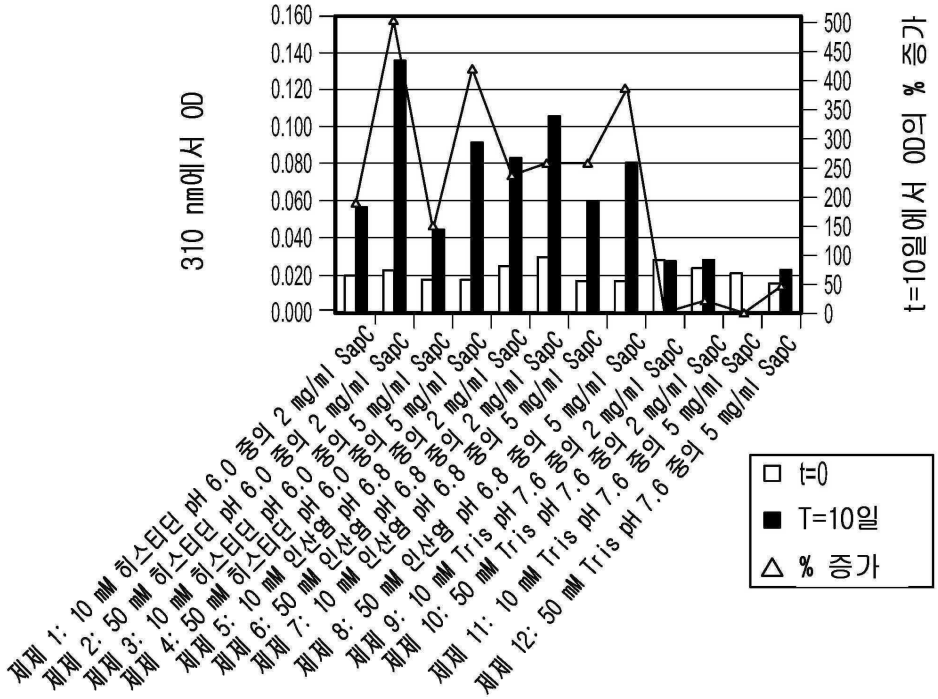

### 도면2



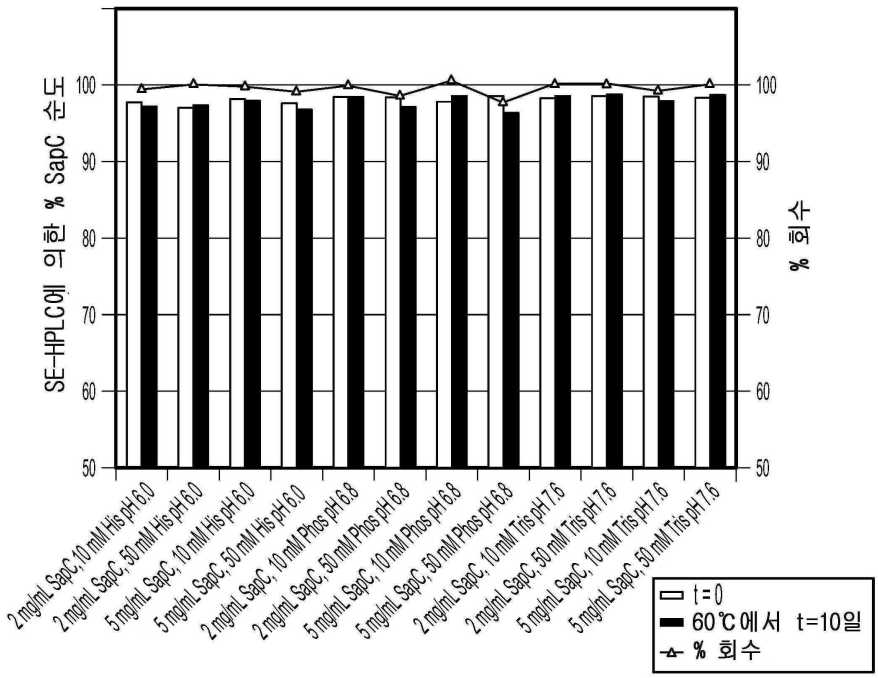
도면3


% 이차 구조
pH
◇ 알파-나선
■ 랜덤 코일

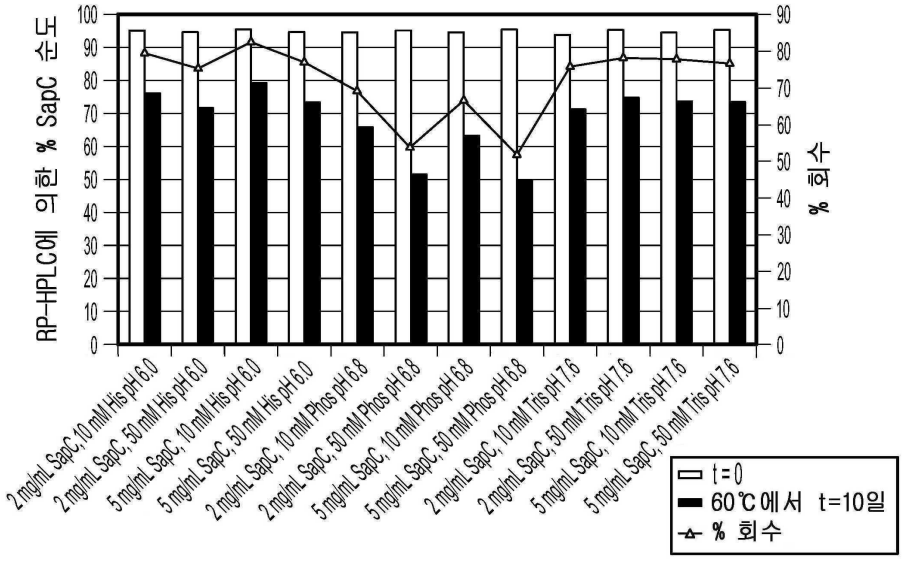
도면4


310 nm에서 OD
t=10일에서 OD의 % 증가
□ t=0
■ T=10일
△ % 증가
제제 1: 10 mM 히스티딘 pH 6.0 중의 2 mg/ml SapC
제제 2: 50 mM 히스티딘 pH 6.0 중의 2 mg/ml SapC
제제 3: 10 mM 히스티딘 pH 6.0 중의 5 mg/ml SapC
제제 4: 50 mM 히스티딘 pH 6.0 중의 5 mg/ml SapC
제제 5: 10 mM 인산염 pH 6.8 중의 2 mg/ml SapC
제제 6: 50 mM 인산염 pH 6.8 중의 2 mg/ml SapC
제제 7: 10 mM 인산염 pH 6.8 중의 5 mg/ml SapC
제제 8: 50 mM 인산염 pH 6.8 중의 5 mg/ml SapC
제제 9: 10 mM Tris pH 7.6 중의 2 mg/ml SapC
제제 10: 50 mM Tris pH 7.6 중의 2 mg/ml SapC
제제 11: 10 mM Tris pH 7.6 중의 5 mg/ml SapC
제제 12: 50 mM Tris pH 7.6 중의 5 mg/ml SapC

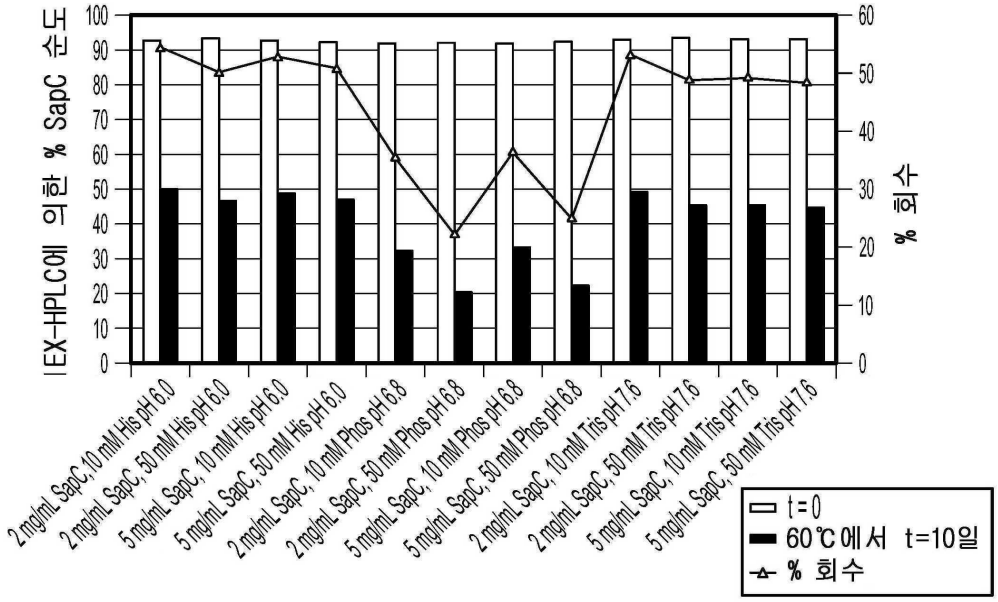
도면5


SE-HPLC에 의한 % SapC 순도
% 회수
100
90
80
70
60
50
2 mg/mL SapC, 10 mM His pH 6.0
2 mg/mL SapC, 50 mM His pH 6.0
5 mg/mL SapC, 10 mM His pH 6.0
5 mg/mL SapC, 50 mM His pH 6.0
2 mg/mL SapC, 10 mM Phos pH 6.8
2 mg/mL SapC, 50 mM Phos pH 6.8
5 mg/mL SapC, 10 mM Phos pH 6.8
5 mg/mL SapC, 50 mM Phos pH 6.8
2 mg/mL SapC, 10 mM Tris pH 7.6
2 mg/mL SapC, 50 mM Tris pH 7.6
5 mg/mL SapC, 10 mM Tris pH 7.6
5 mg/mL SapC, 50 mM Tris pH 7.6
t=0
60℃에서 t=10일
% 회수

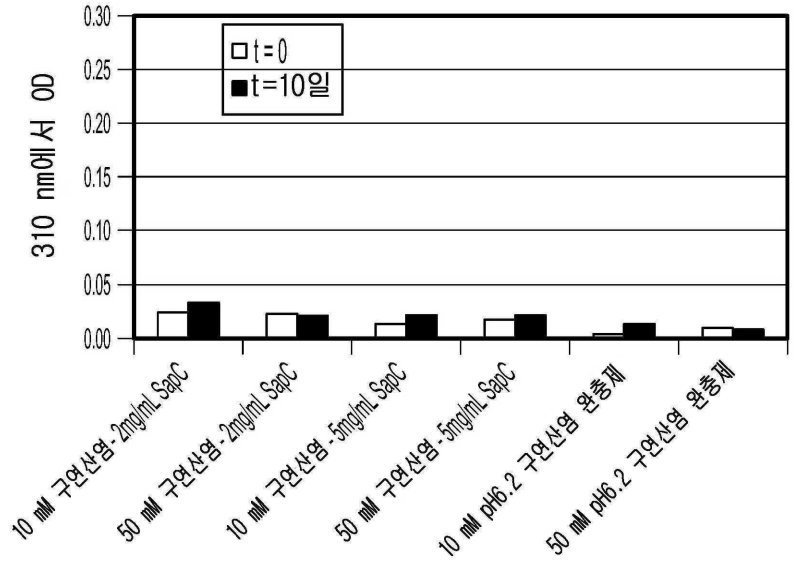
도면6


RP-HPLC에 의한 % SapC 순도
% 회수
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
2 mg/mL SapC, 10 mM His pH 6.0
2 mg/mL SapC, 50 mM His pH 6.0
5 mg/mL SapC, 10 mM His pH 6.0
5 mg/mL SapC, 50 mM His pH 6.0
2 mg/mL SapC, 10 mM Phos pH 6.8
2 mg/mL SapC, 50 mM Phos pH 6.8
5 mg/mL SapC, 10 mM Phos pH 6.8
5 mg/mL SapC, 50 mM Phos pH 6.8
2 mg/mL SapC, 10 mM Tris pH 7.6
2 mg/mL SapC, 50 mM Tris pH 7.6
5 mg/mL SapC, 10 mM Tris pH 7.6
5 mg/mL SapC, 50 mM Tris pH 7.6
t=0
60℃에서 t=10일
% 회수

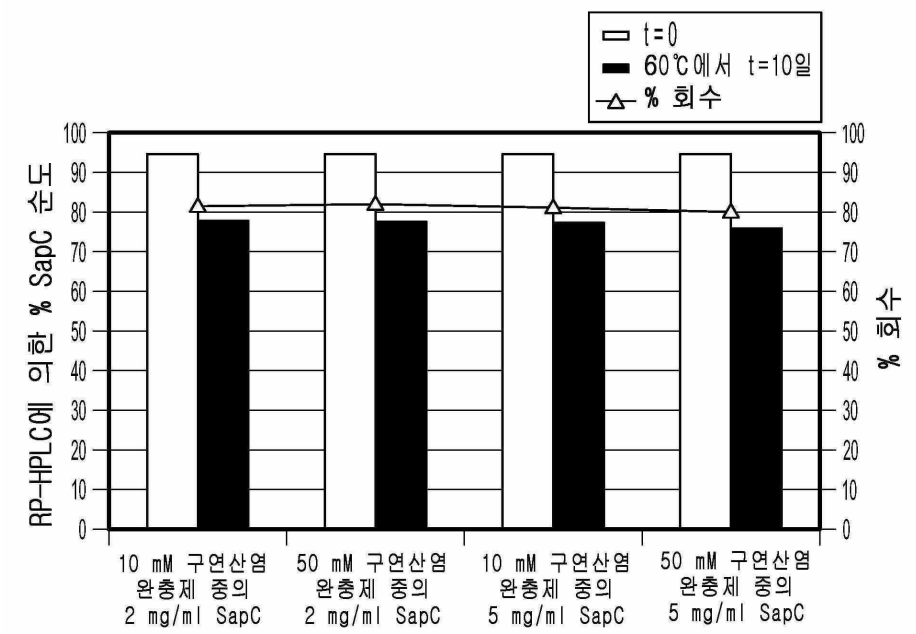
도면7


IEX-HPLC에 의한 % SapC 순도
% 회수
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
60
50
40
30
20
10
0
2 mg/mL SapC, 10 mM His pH 6.0
2 mg/mL SapC, 50 mM His pH 6.0
5 mg/mL SapC, 10 mM His pH 6.0
5 mg/mL SapC, 50 mM His pH 6.0
2 mg/mL SapC, 10 mM Phos pH 6.8
2 mg/mL SapC, 50 mM Phos pH 6.8
5 mg/mL SapC, 10 mM Phos pH 6.8
5 mg/mL SapC, 50 mM Phos pH 6.8
2 mg/mL SapC, 10 mM Tris pH 7.6
2 mg/mL SapC, 50 mM Tris pH 7.6
5 mg/mL SapC, 10 mM Tris pH 7.6
5 mg/mL SapC, 50 mM Tris pH 7.6
t=0
60℃에서 t=10일
% 회수

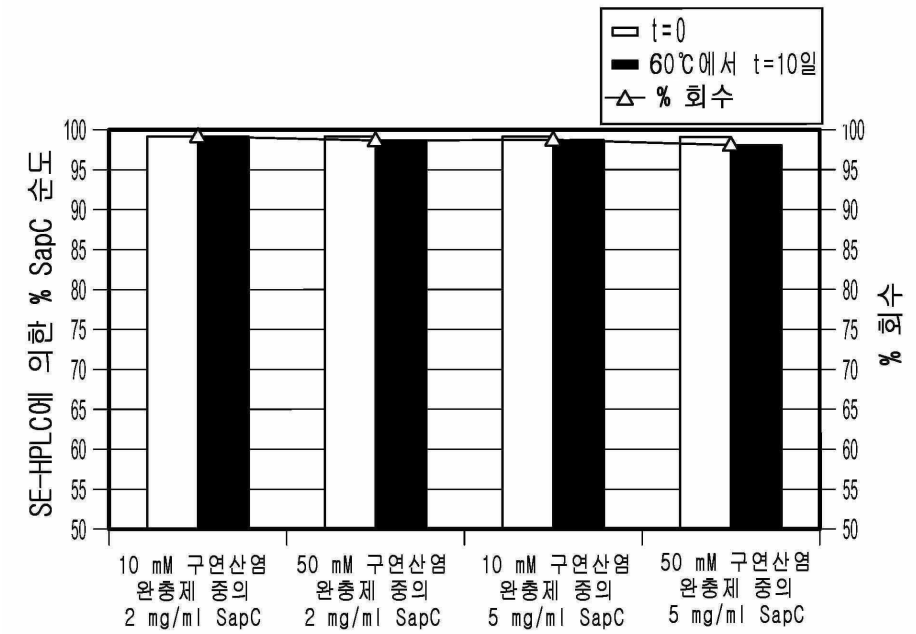
도면8


310 nm에서 OD
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
t=0
t=10일
10 mM 구연산염 - 2mg/mL SapC
50 mM 구연산염 - 2mg/mL SapC
10 mM 구연산염 - 5mg/mL SapC
50 mM 구연산염 - 5mg/mL SapC
10 mM pH6.2 구연산염 완충제
50 mM pH6.2 구연산염 완충제

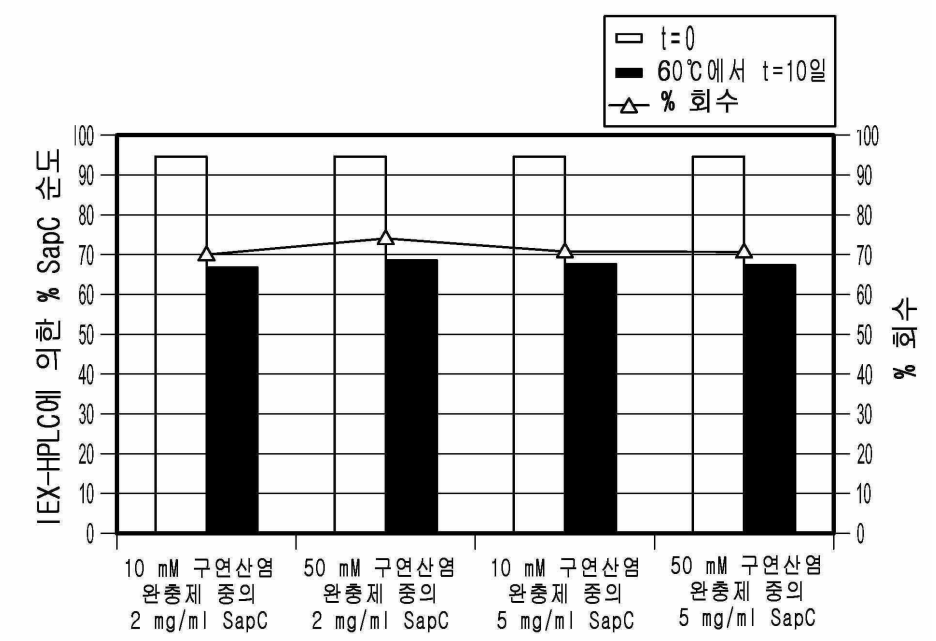
도면9


t=0
60℃에서 t=10일
% 회수
RP-HPLC에 의한 % SapC 순도
% 회수
10 mM 구연산염 완충제 중의 2 mg/ml SapC
50 mM 구연산염 완충제 중의 2 mg/ml SapC
10 mM 구연산염 완충제 중의 5 mg/ml SapC
50 mM 구연산염 완충제 중의 5 mg/ml SapC

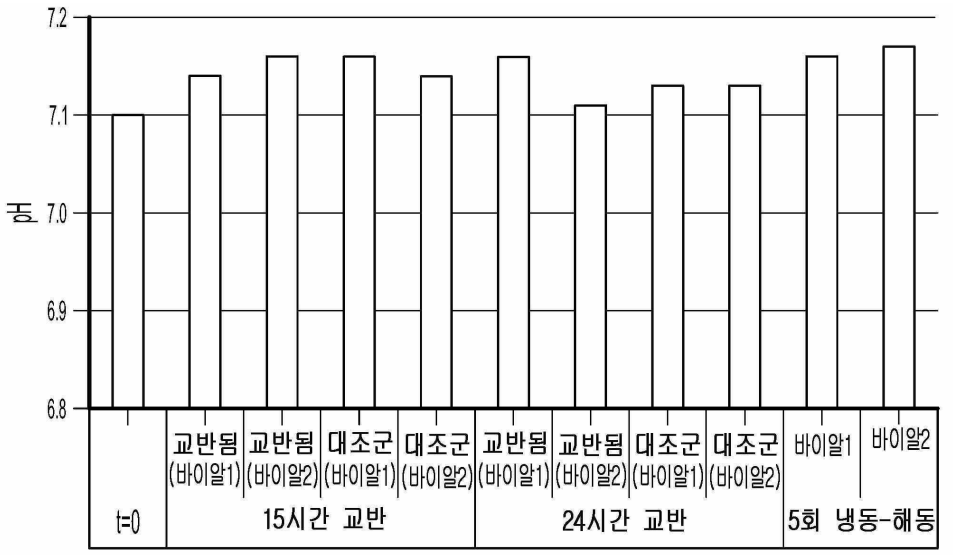
도면10


t=0
60℃에서 t=10일
% 회수
SE-HPLC에 의한 % SapC 순도
% 회수
10 mM 구연산염 완충제 중의 2 mg/ml SapC
50 mM 구연산염 완충제 중의 2 mg/ml SapC
10 mM 구연산염 완충제 중의 5 mg/ml SapC
50 mM 구연산염 완충제 중의 5 mg/ml SapC

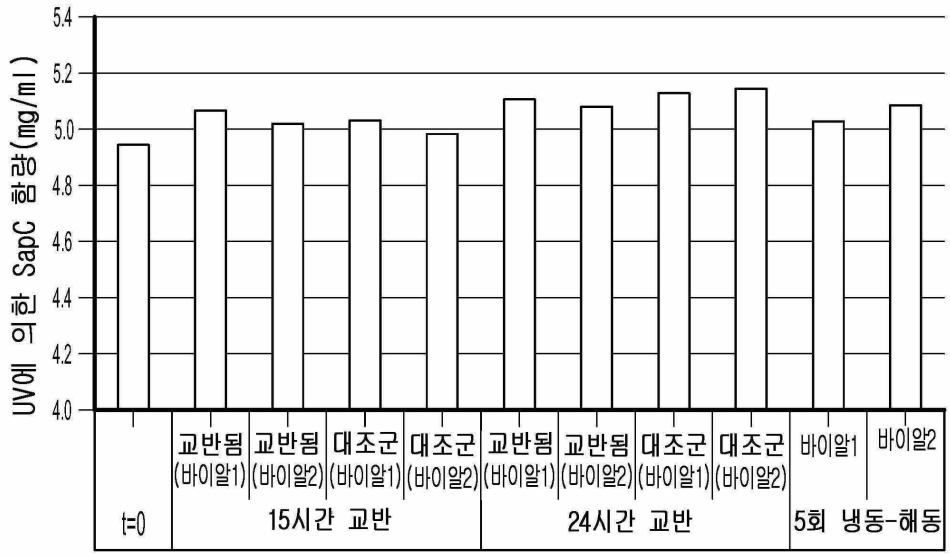
도면11


t=0
60℃에서 t=10일
% 회수
IEX-HPLC에 의한 % SapC 순도
% 회수
10 mM 구연산염 완충제 중의 2 mg/ml SapC
50 mM 구연산염 완충제 중의 2 mg/ml SapC
10 mM 구연산염 완충제 중의 5 mg/ml SapC
50 mM 구연산염 완충제 중의 5 mg/ml SapC

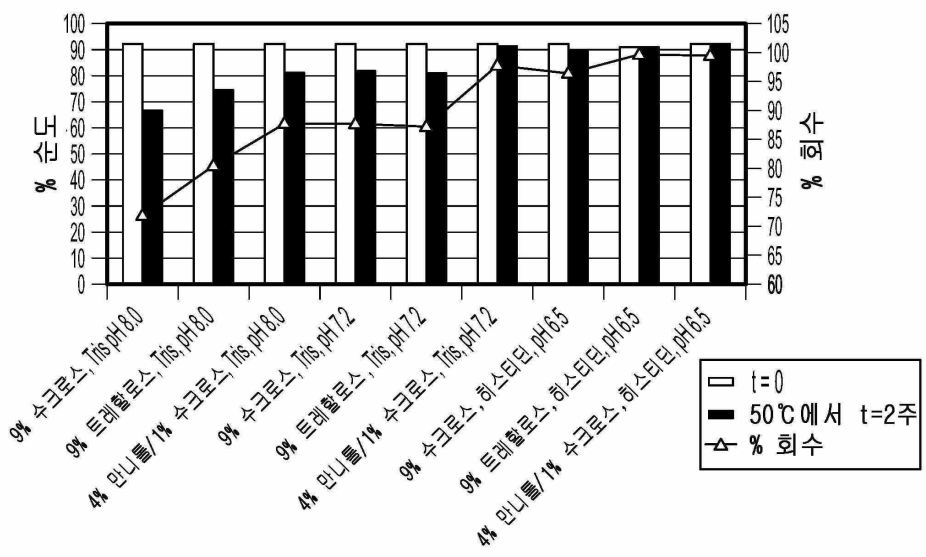
도면12


pH
t=0
교반됨 (바이알1)
교반됨 (바이알2)
대조군 (바이알1)
대조군 (바이알2)
15시간 교반
24시간 교반
바이알1
바이알2
5회 냉동-해동

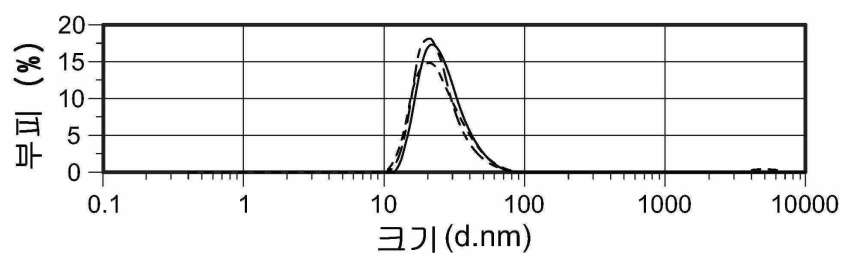
도면13



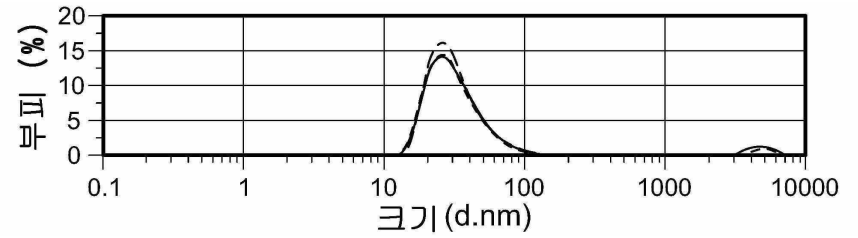

도면14



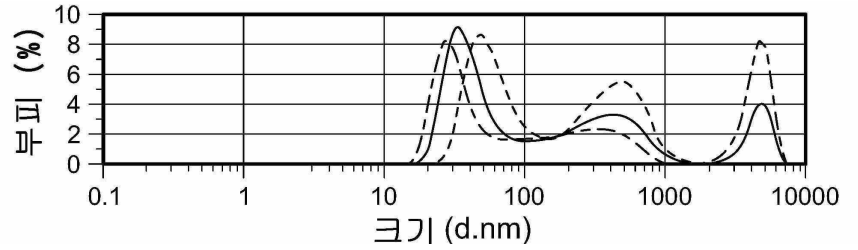

도면15a



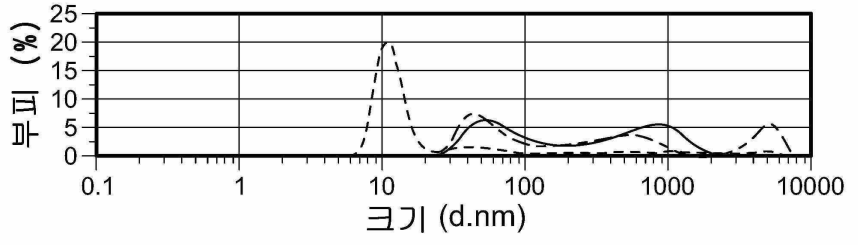
도면15b



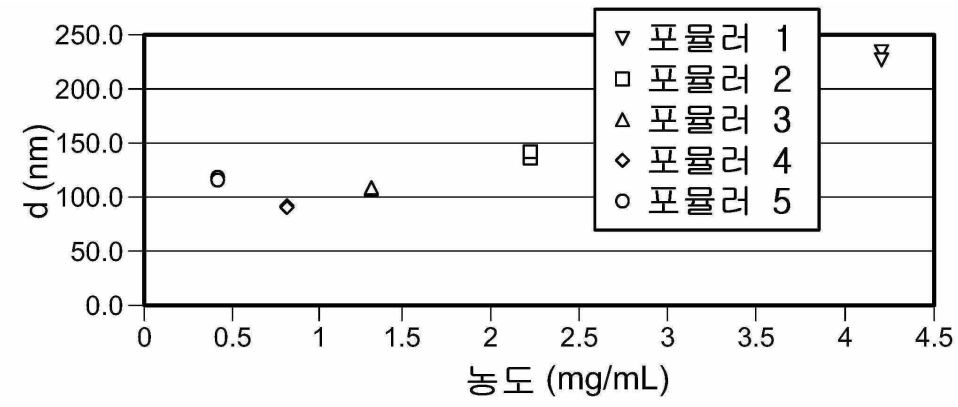

도면16a



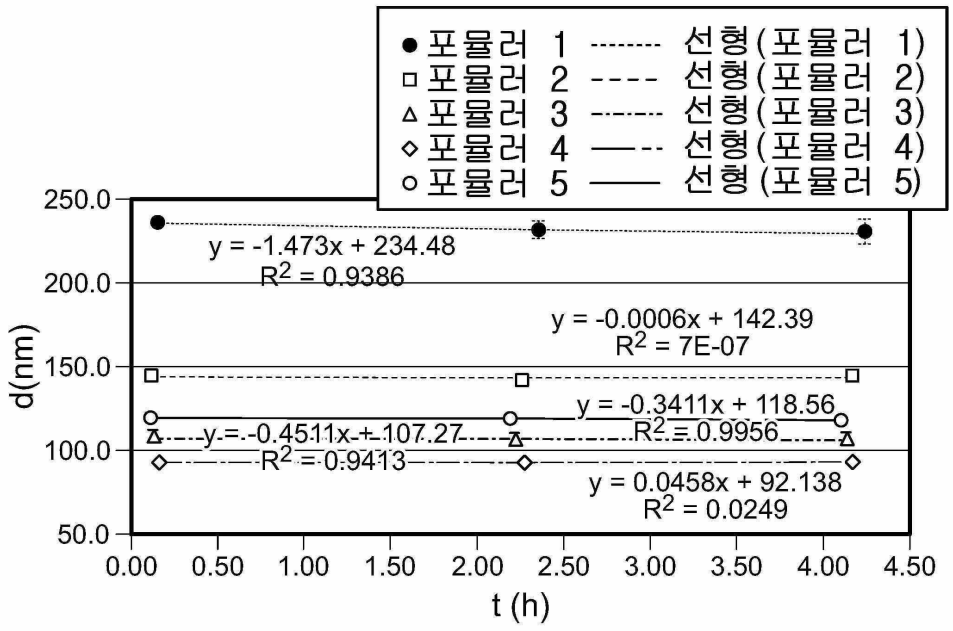

도면16b



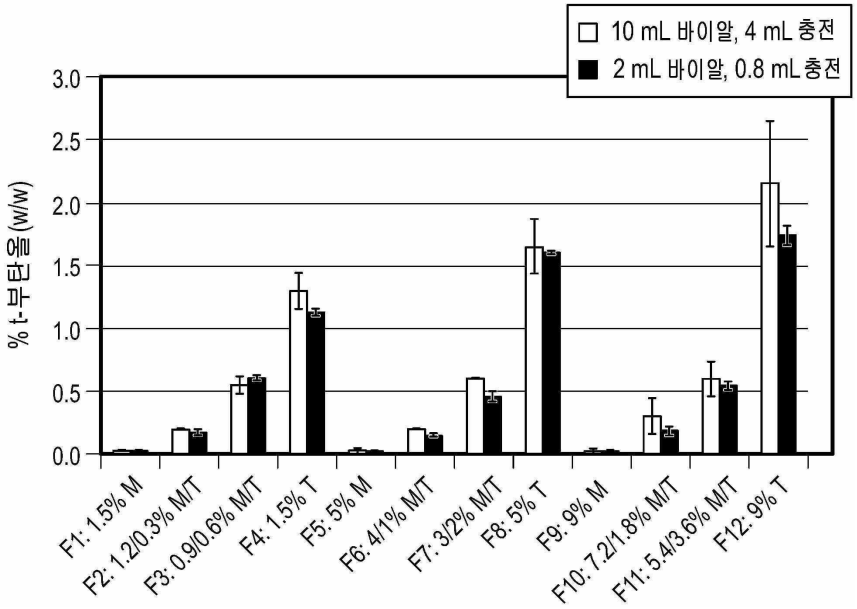

도면17



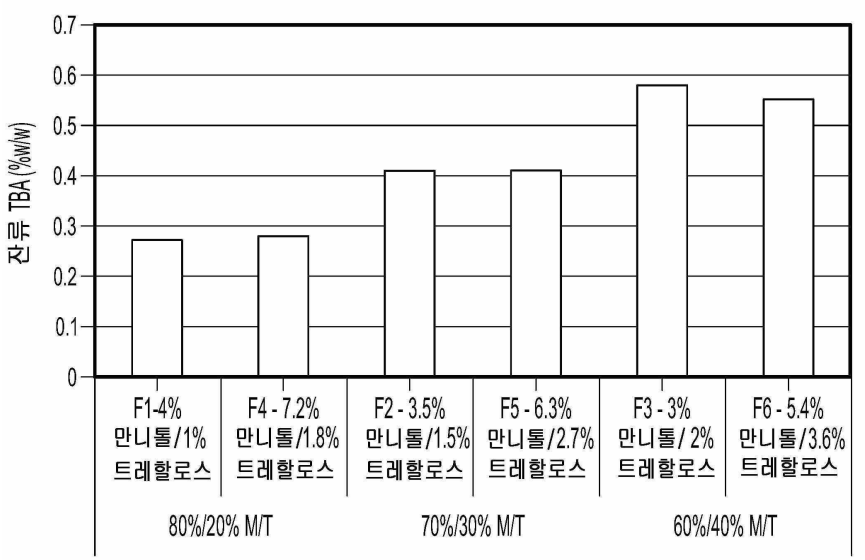
도면18


포뮬러 1
포뮬러 2
포뮬러 3
포뮬러 4
포뮬러 5
선형(포뮬러 1)
선형(포뮬러 2)
선형(포뮬러 3)
선형(포뮬러 4)
선형(포뮬러 5)
y = -1.473x + 234.48
R2 = 0.9386
y = -0.0006x + 142.39
R2 = 7E-07
y = -0.3411x + 118.56
R2 = 0.9956
y = -0.4511x + 107.27
R2 = 0.9413
y = 0.0458x + 92.138
R2 = 0.0249
d(nm)
t (h)
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00
2.50
3.00
3.50
4.00
4.50

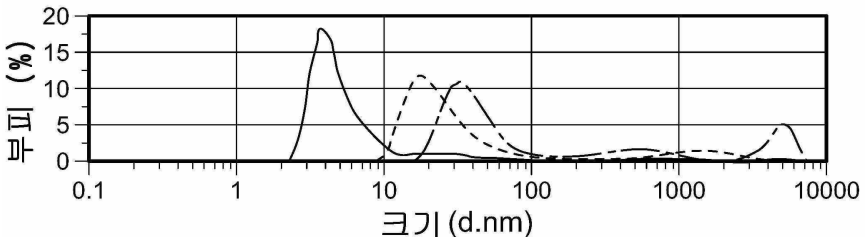
도면19


10 mL 바이알, 4 mL 충전
2 mL 바이알, 0.8 mL 충전
% t-부탄올 (w/w)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
F1: 1.5% M
F2: 1.2/0.3% M/T
F3: 0.9/0.6% M/T
F4: 1.5% T
F5: 5% M
F6: 4/1% M/T
F7: 3/2% M/T
F8: 5% T
F9: 9% M
F10: 7.2/1.8% M/T
F11: 5.4/3.6% M/T
F12: 9% T

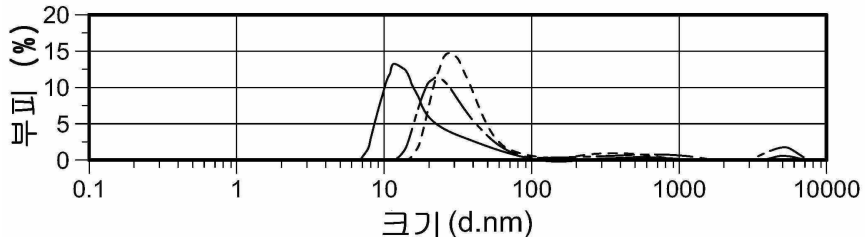
도면20



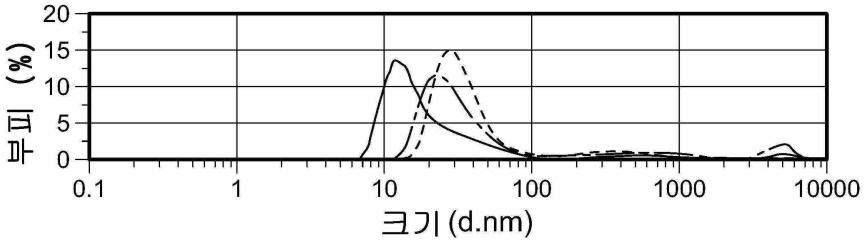

도면21a



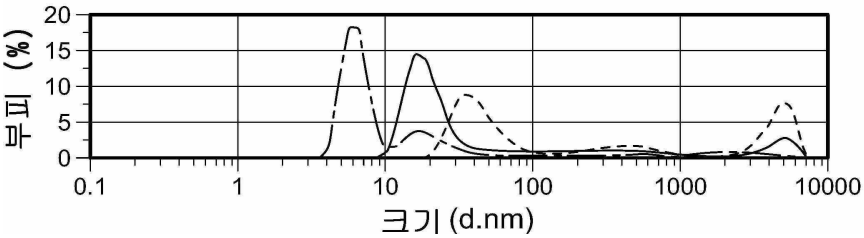

도면21b



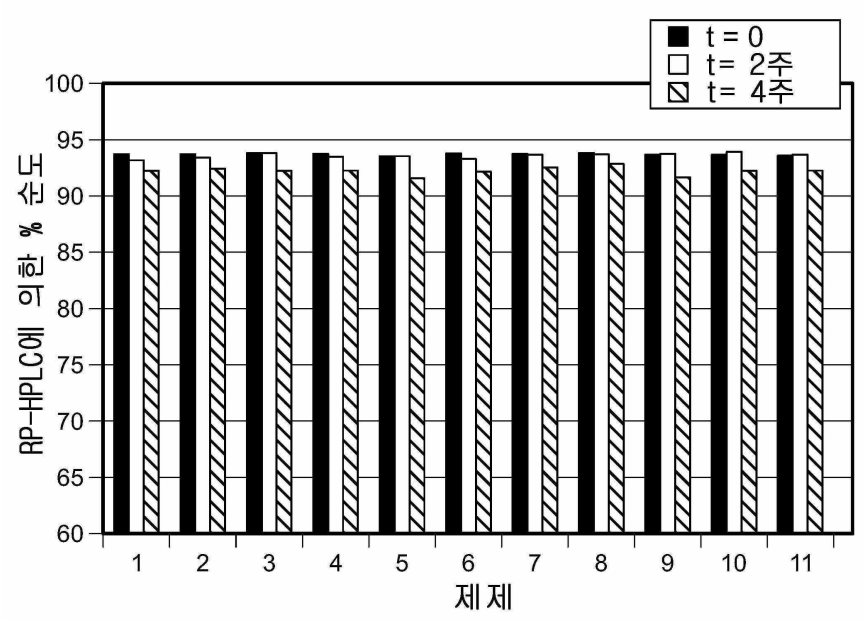

도면21c



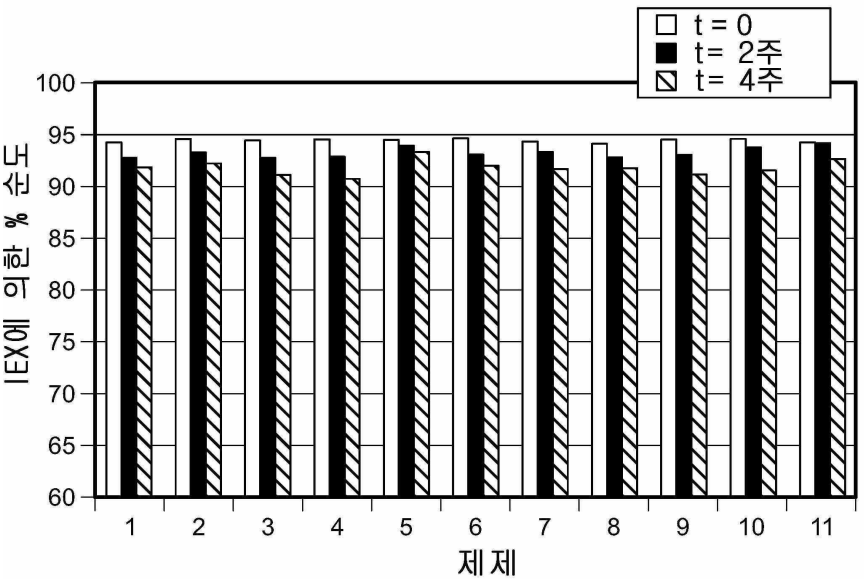
도면21d



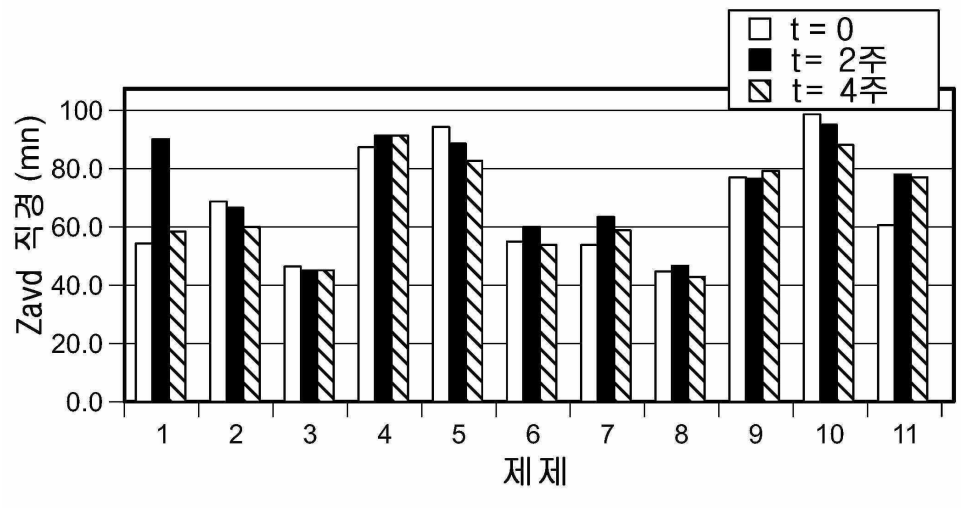

도면22



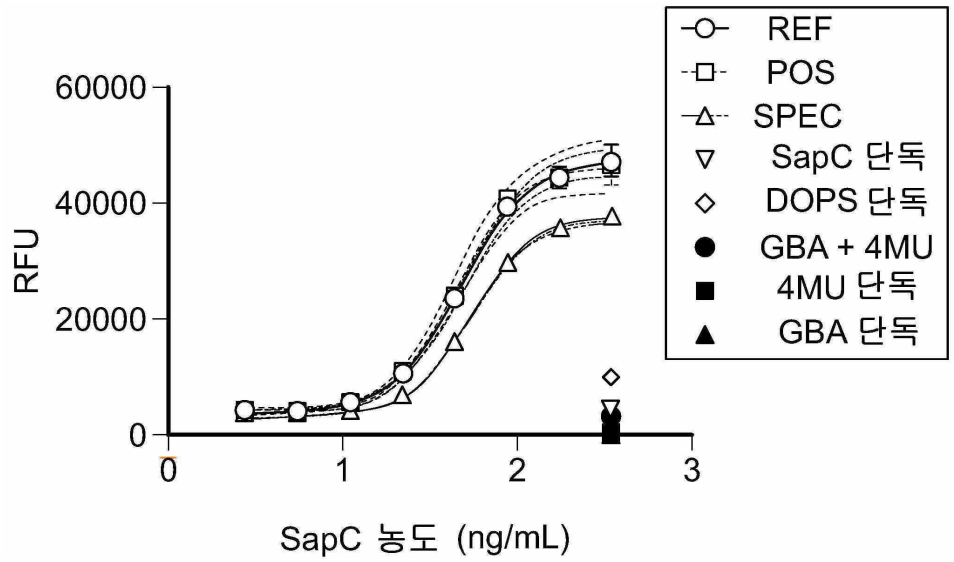

도면23



도면24


t = 0
t= 2주
t= 4주
Zavd 직경 (mn)
100
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
제 제

도면25

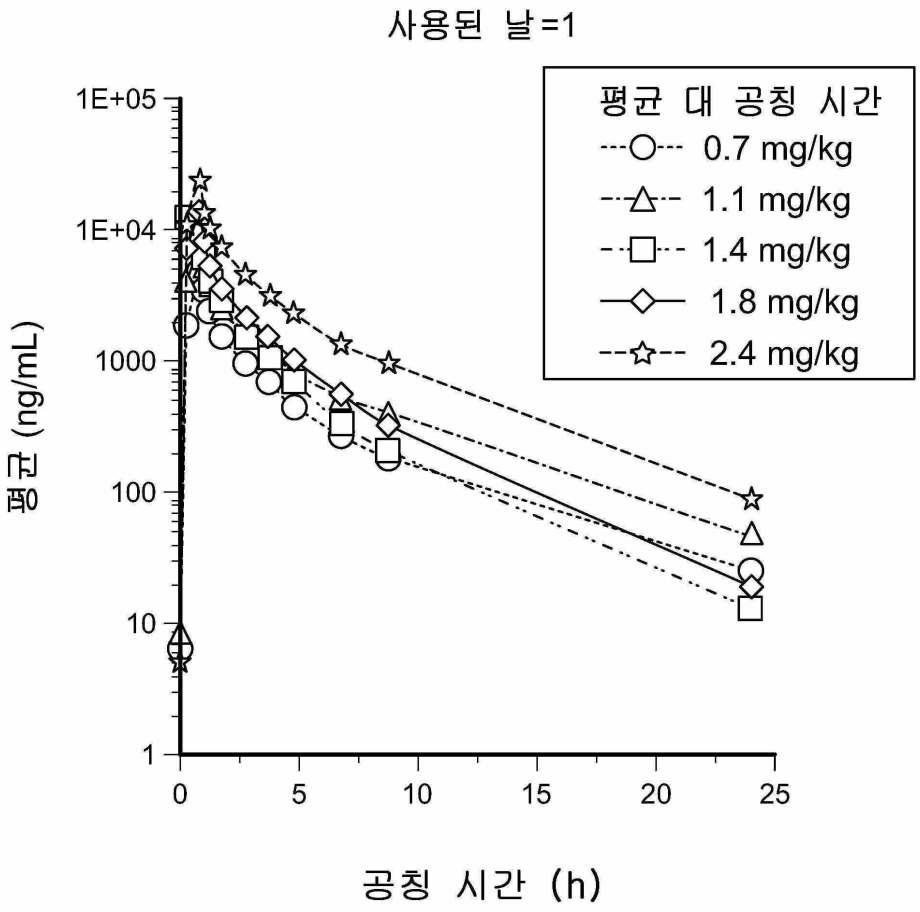

REF
POS
SPEC
SapC 단독
DOPS 단독
GBA + 4MU
4MU 단독
GBA 단독
RFU
60000
40000
20000
0
0
1
2
3
SapC 농도 (ng/mL)

도면26

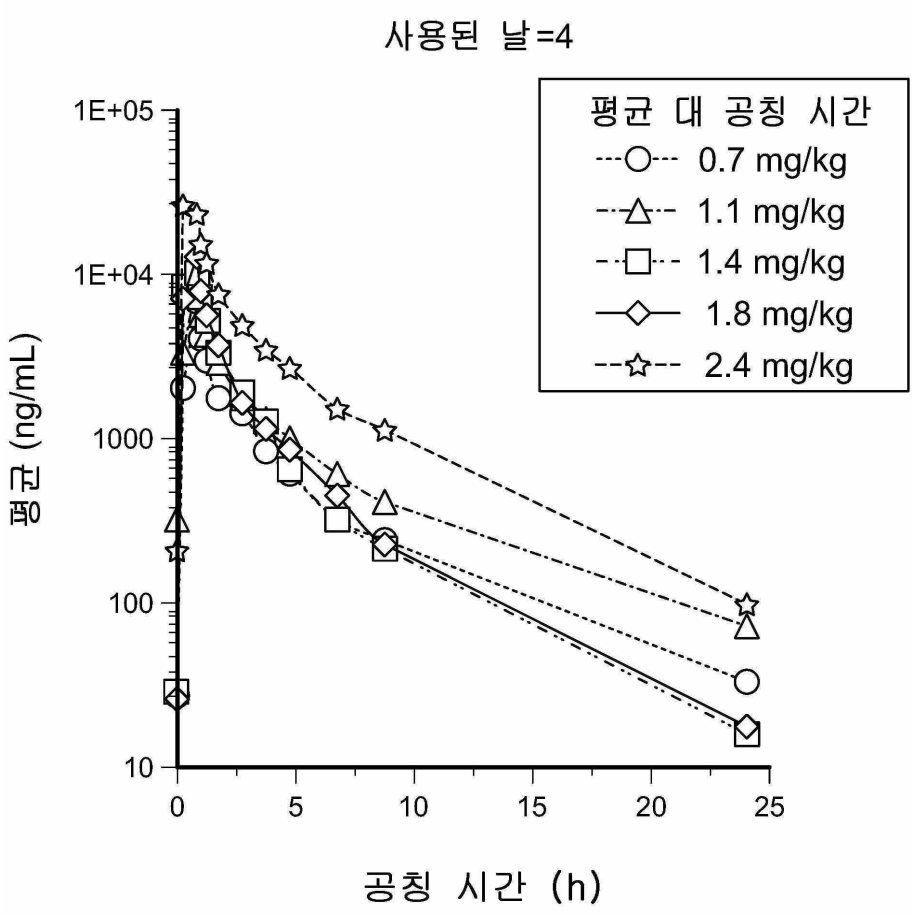
| 용량 (mg/kg) | 0.7 | 1.1 | 1.4 | 1.8 | 2.4 |
|---|---|---|---|---|---|
| N | 1 | 3 | 3 | 3 | 8 |
| 평균 연령 | 64 | 53 | 58 | 49 | 54 |
| F:M | 0:1 | 0:3 | 2:1 | 1:2 | 2:2 |
| 고형 종양 | 0 | 2 | 1 | 1 | 5 |
| 개선된 RANO (n/*N*DY113) 부분적 반응 | 1/1 | 1/1 | 1/2 | - | - |
| HGG | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 |
| 개선된 RECIST (n/*N*DY113) | 1/1 | | | | 2/2 |
| 관련 없는 중단 | | 3 | 3 | 2 | 7 |
| 유해 사건 *(n개의 사례,n개의 사건)* | 1,15 | 3,54 | 3,37 | 3,32 | 8,80 |
| 중등도의 중증도, 관련됨 | | 3,6 | 1,1 | 1,2 | 2,2 |
| 피로 | | 2,2 | | 1,2 | 1,1 |
| 호중구감소증 | | 1,1 | | | |
| EKG | | 1,2 | | | |
| 균형 | | 1,1 | | | |
| 신경 | | 1,1 | | | |
| 조음장애 | | 1,1 | | | |
| 비뇨기 | | | 1,1 | | |
| BP | | | | | 1,1 |
| 중증, 관련 없음 | 1,1 | 1,4 | 1,3 | 1,3 | 3,5 |
| GI | | 1,1 | 1,1 | | 1,3 |
| 저나트륨혈증 | | 1,1 | | | |
| 약화 | | | 1,1 | | |

HGG: 고등급 신경교종, RECIST : 고형 종양에서의 반응 평가 기준,
RANO: 신경종양학 기준에서의 반응 평가

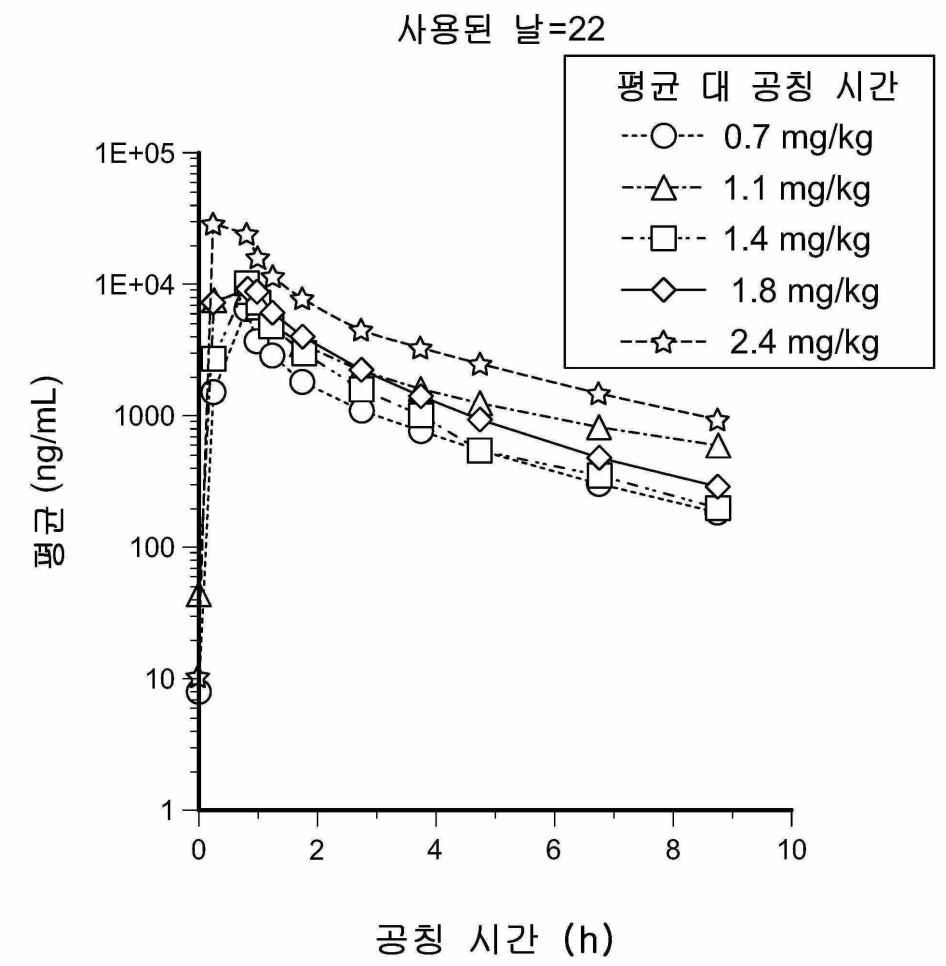
도면27a


사용된 날=1
평균 대 공칭 시간
0.7 mg/kg
1.1 mg/kg
1.4 mg/kg
1.8 mg/kg
2.4 mg/kg
1E+05
1E+04
1000
100
10
1
0
5
10
15
20
25
평균 (ng/mL)
공칭 시간 (h)

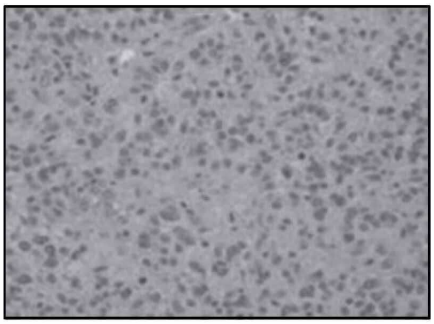
도면27b


사용된 날=4
평균 대 공칭 시간
0.7 mg/kg
1.1 mg/kg
1.4 mg/kg
1.8 mg/kg
2.4 mg/kg
1E+05
1E+04
1000
100
10
0
5
10
15
20
25
평균 (ng/mL)
공칭 시간 (h)

도면27c


사용된 날=22
평균 대 공칭 시간
0.7 mg/kg
1.1 mg/kg
1.4 mg/kg
1.8 mg/kg
2.4 mg/kg
1E+05
1E+04
1000
100
10
1
평균 (ng/mL)
0
2
4
6
8
10
공칭 시간 (h)

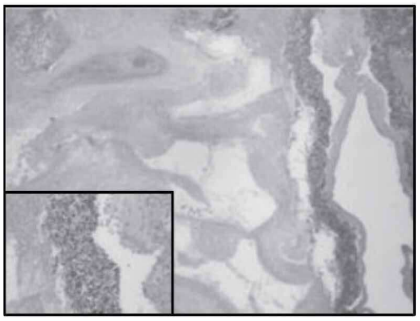
도면28a



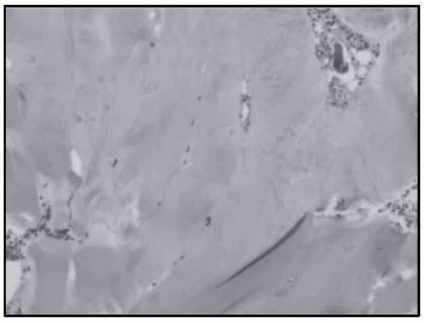
도면28b



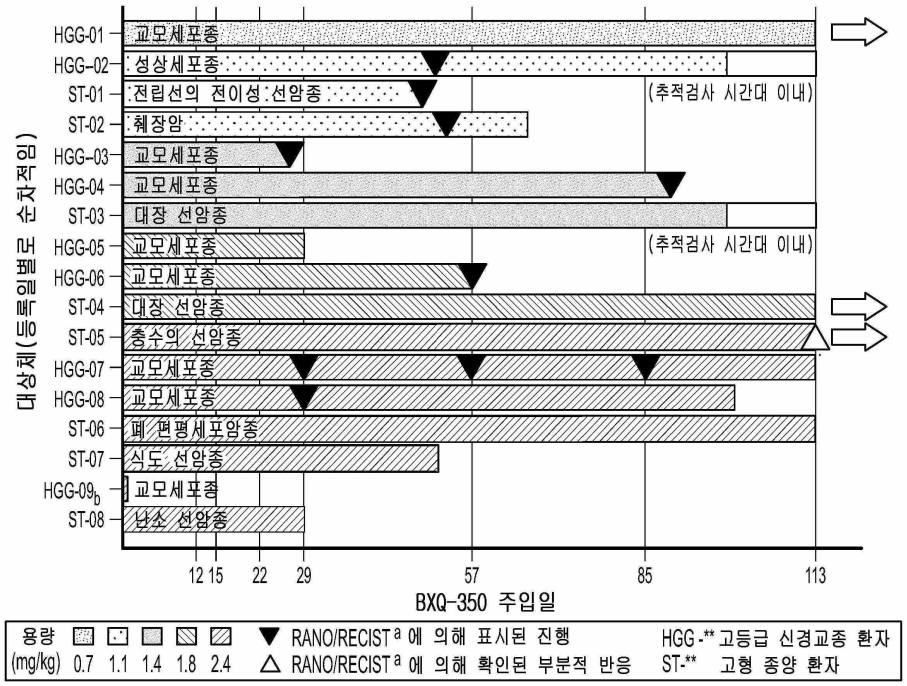
도면28c



도면28d



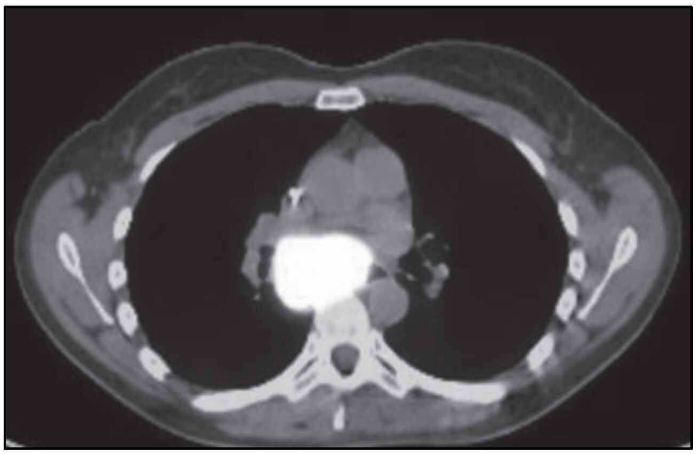
도면29




[a] 연구에서 수행된 RANO/RECIST에 따를 때 안정한 질환은 적색/녹색 화살표로 표시되어 있지 않은 한 유지되었고, 연구 영상화에 의해 확인되지 않은 다른 임상 악화 또는 진행의 징후/증상은 표시되어 있지 않다.

[b] 대상체 HGG-09는 제1 용량 후 연구 개입과 관련 없는 이유로 철회되었다.

도면30a



도면30b



## 서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Bexion Pharmaceuticals Inc.

<120> Saposin C Pharmaceutical Compositions and Methods of Treating Cancer

<130> 47144-0002WO1

<150> US 62/678,668

<151> 2018-05-31

<150> US 62/647,058

<151> 2018-03-23

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Asp Val Tyr Cys Glu Val Cys Glu Phe Leu Val Lys Glu Val Thr

1 5 10 15

Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys Thr Glu Lys Glu Ile Leu Asp Ala Phe

20 25 30

Asp Lys Met Cys Ser Lys Leu Pro Lys Ser Leu Ser Glu Glu Cys Gln

35 40 45

Glu Val Val Asp Thr Tyr Gly Ser Ser Ile Leu Ser Ile Leu Leu Glu

50 55 60

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

65 70 75 80