



등록특허 10-2575788



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년09월08일

(11) 등록번호 10-2575788

(24) 등록일자 2023년09월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/755 (2006.01) **A61K 38/37** (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/755 (2013.01)
A61K 38/37 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7034852
- (22) 출원일자(국제) 2019년05월16일
 심사청구일자 2020년12월03일
- (85) 번역문제출일자 2020년12월03일
- (65) 공개번호 10-2021-0005248
- (43) 공개일자 2021년01월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2019/087156
- (87) 국제공개번호 WO 2019/219049
 국제공개일자 2019년11월21일
- (30) 우선권주장
 201810481941.X 2018년05월18일 중국(CN)
- (56) 선행기술조사문헌
 WO2011101284 A1*
 CN106279437 A*
 WO2013106787 A1
 WO2017117631 A1
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 정저우 첸사이언시스 인코포레이티드
 중국 허난 451162 정저우 정저우 에어포트 이코노
 미 존 크로싱 오브 후양하이 로드 앤 더 세컨드
 바이오테크놀로지 스트리트 라이프 정저우 파크
 빌딩 20
- (72) 발명자
 수 홍성
 중국 베이징 100176 이코노믹 앤 테크놀로지컬 디
 벨롭먼트 존 룽창 동 스트리트 7 룽성 인더스트리
 얼 파크 빌딩 5 5층
 왕 시아오산
 중국 베이징 100176 이코노믹 앤 테크놀로지컬 디
 벨롭먼트 존 룽창 동 스트리트 7 룽성 인더스트리
 얼 파크 빌딩 5 5층
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 10 항

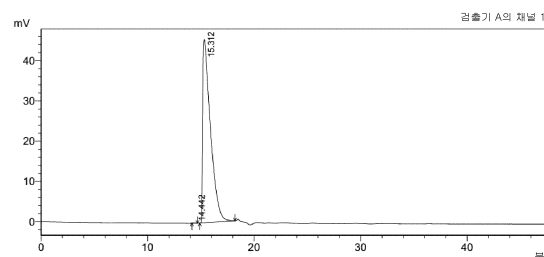
심사관 : 윤재욱

(54) 발명의 명칭 개선된 FVIII 융합 단백질 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 폴리알킬렌 글리콜과 접합되고 연장된 사이클 반감기를 갖는 응고 인자 VIII 융합 단백질, 이의 제조 방법 및 용도에 관한 것이고, 이때 응고 인자 VIII의 활성 모이어티는 펩티드 연결기에 의해 융합 파트너에 직접적으로 연결되거나 간접적으로 연결되고, 융합 단백질은 또한 폴리알킬렌 글리콜에 접합된다. 반감기는 폴리알킬렌 글리콜 없이 변형된 FVIII 융합 단백질과 비교하여 유의하게 증가된다.

대표도 - 도1f



(52) CPC특허분류

A61P 7/04 (2018.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

(72) 발명자

리우 빈

중국 베이징 100176 이코노믹 앤 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존 룡창 동 스트리트 7 룡성 인더스트리얼 파크 빌딩 5 5층

천 시안

중국 베이징 100176 이코노믹 앤 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존 룡창 동 스트리트 7 룡성 인더스트리얼 파크 빌딩 5 5층

리 시앙

중국 베이징 100176 이코노믹 앤 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존 룡창 동 스트리트 7 룡성 인더스트리얼 파크 빌딩 5 5층

주 루안

중국 베이징 100176 이코노믹 앤 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존 룡창 동 스트리트 7 룡성 인더스트리얼 파크 빌딩 5 5층

왕 쉬야

중국 허난 475000 카이펑 위난 스트리트 1

왕 쉬앙

중국 베이징 100176 이코노믹 앤 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존 룡창 동 스트리트 7 룡성 인더스트리얼 파크 빌딩 5 5층

왕 원원

중국 허난 475000 카이펑 위난 스트리트 1

후앙 령리

중국 허난 475000 카이펑 위난 스트리트 1

왕 치레이

중국 허난 475000 카이펑 위난 스트리트 1

후 하이타오

중국 허난 475000 카이펑 위난 스트리트 1

장 리리

중국 허난 475000 카이펑 위난 스트리트 1

가오 지에

중국 허난 475000 카이펑 위난 스트리트 1

런 즈지아

중국 허난 475000 카이펑 위난 스트리트 1

시아오 춘펑

중국 베이징 100176 이코노믹 앤 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존 룡창 동 스트리트 7 룡성 인더스트리얼 파크 빌딩 5 5층

왕 알리

중국 베이징 100176 이코노믹 앤 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존 룡창 동 스트리트 7 룡성 인더스트리얼 파크 빌딩 5 5층

명세서

청구범위

청구항 1

응고 인자 VIII 활성 모이어티(FVIII)가 펩티드 연결기에 의해, 반감기를 연장하기 위한 융합 파트너에 직접적으로 또는 간접적으로 연결되어 융합 단백질을 형성하고, 상기 융합 파트너가 상기 융합 단백질의 C-말단에 존재하며, 상기 응고 인자 VIII 활성 모이어티가 서열번호 1 또는 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 융합 단백질이 또한 폴리알킬렌 글리콜에 접합되며, 상기 폴리알킬렌 글리콜이 40 kD의 분자형 폴리에틸렌 글리콜이고, 상기 융합 파트너가 면역글로불린 Fc 단편인, 폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서,

융합 파트너가 (i) 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열, (ii) 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열, 및 (iii) 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 IgG Fc 단편인, 폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서,

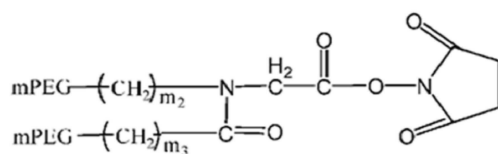
융합 단백질 및 폴리에틸렌 글리콜의 접합이 무작위 또는 특정 위치에 존재하고, 접합 위치가 유리 아미노 기, 설프하이드릴 기, 당 기 및/또는 카복실 기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서,

변형제가 접합에 사용되고, 상기 변형제가 하기 화학식 2의 변형제로부터 선택되는, 폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질:

[화학식 2]



[상기 식에서,

$0 \leq m_2 \leq 6$ 이고;

$0 \leq m_3 \leq 6$ 이고;

mPEG는 모노메톡시-종결된 폴리에틸렌 글리콜 기이다].

청구항 5

제1항에 있어서,

응고 인자 VIII 활성 모이어티가 펩티드 연결기에 의해 융합 파트너에 연결되고, 상기 펩티드 연결기가 가요성 펩티드 분절 및 강직성 펩티드 분절을 포함하는, 폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질.

청구항 6

제5항에 있어서,

가요성 펩티드 분질이 구조식 $(GS)_a(GGS)_b(GGG)_c(GGGG)_d$ 를 갖고, 이때 a, b, c 및 d 는 0 이상의 정수이고, $a+b+c+d \geq 1$ 인, 폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질.

청구항 7

제6항에 있어서,

가요성 펩티드 분질이

- (i) GSGGSGGGSGGGGS(서열번호 6);
- (ii) GSGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS(서열번호 7);
- (iii) GGGSGGGSGGGSGGGGS(서열번호 8);
- (iv) GSGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS(서열번호 9); 및
- (v) GGGSGGGSGGGSGGGGS(서열번호 10)

로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는,

폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질.

청구항 8

제5항에 있어서,

강직성 펩티드 분질이 인간 융모성 생식선 자극호르몬(chorionic gonadotropin) β 아단위의 카복시-종결된 펩티드이고;

상기 강직성 펩티드 분질이

- (i) PRFQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ(서열번호 11);
- (ii) SSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ(서열번호 12);
- (iii) SSSSKAPPS(서열번호 13); 및
- (iv) SRLPGPSDTPILPQ(서열번호 14)

로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는,

폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질.

청구항 9

제5항에 있어서,

펩티드 연결기가 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질을 포함하는, FVIII의 선천적 또는 후천적 결핍을 갖는 환자의 출혈성 질환, 및 혈우병 A를 갖는 환자에서의 자발적 또는 외과적 출혈로부터 선택되는 출혈성 질환을 예방하고/거나 치료하기 위한 약학 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호참고

[0002] 본원은 발명의 명칭이 "개선된 FVIII 용합 단백질 및 이의 용도"이고 2018년 5월 18일자 출원된 중국 특허출원 제201810481941.X호(이의 전문은 본원에 참고로 혼입됨)를 우선권 주장한다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 개시내용은 재조합 인간 응고 인자 VIII 용합 단백질, 특히 연장된 반감기를 갖는 용합 폴리펩티드, 및 이의 제조 방법 및 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 혈우병 A는 응고 인자 VIII(FVIII)의 불충분한 활성 또는 기능장애에 의해 유발되는 유전성 출혈 장애이고, 활성 FVIII의 보충이 효과적인 치료적 처치이다. FVIII 유전자는 지금까지 클로닝된 가장 긴 유전자 중 하나이고, FVIII 분자는 임상 실무에서 사용되는 가장 큰 분자량을 가진 단백질 약물이다. FVIII 단백질은 6개의 도메인을 포함한다: 3개의 A 도메인(A1, A2, A3), 비-필수 중심 도메인(B-도메인) 및 2개의 C 도메인(C1, C2). 재조합 FVIII의 시험관내 발현 수준은 유사한 특성을 가진 다른 유전자보다 현저히 낮다. 예를 들어, FVIII의 발현 수준은 FIX의 단지 1%이다. 또한, 혈액내 FVIII의 짧은 반감기가 단지 8 내지 12시간이므로, 중증 혈우병 A 환자는 예방적 치료를 받아야 하고, 매주 약 3회 정맥내 주사(i.v.) 되어야 한다.

[0006] 바이오베라티브(Bioverativ, 미국)에서 개발한 단량체-이량체 하이브리드 재조합 FVIII-Fc 용합 단백질[엘록테이트(Eloctate)]는 2014년 6월에 미국 FDA의 시판 승인을 받았다. 임상 데이터는 인체 내의 반감기가 단지 1.5 내지 1.7배 연장됨을 나타내고(문헌[Dumont JA et al., Blood, 2012, 119: 3024-3030; Powell JS et al., Blood, 2012, 119: 3031-3037]), 3 내지 5일마다 주사되었다. 그러나, rFVIII Fc, 및 바이오베라티브에 의해 구축된 Fc의 이중 발현 벡터로 형질감염된 HEK-293 세포에서, rFVIIIFc 동종이량체가 예상되는 발현 산물에서 검출되지 않았고, 단지 단량체-이량체 하이브리드 rFVIIIFc 용합 단백질 및 Fc 이량체가 발현되었다. 이에 대해, 회사의 연구진은 숙주 세포가 동종이량체의 과도한 분자량으로 인해 약 400 kDa의 분자량을 갖는 rFVIIIFc 동종이량체 단백질을 분비하지 못했거나, 입체 장애로 인해 rFVIIIFc 단량체가 중합에 실패했다고 추측했다(문헌[Peters RT et al., J Thromb Haemost, 2013, 11(1): 132-41]). 동종이량체 형태의 FVIII 용합 단백질의 생산이 매우 어렵다는 것을 알 수 있다.

[0007] 단백질 약물의 장기-작용 제형의 제조를 위해, 높은 용해도를 갖는 중합체[예컨대, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)]가 단백질 약물의 표면을 화학적으로 변형시키기 위해 통상적으로 사용된다. 일반적으로, 변형률이 높을수록, 단백질 항원성 및 활성의 감소가 더 분명해진다. FVIII의 반감기를 연장하기 위해 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 사용하는 예가 보고되었고, 예를 들어, 노보노르디스크(Novonordisk, N8-GP), 바이엘(Bayer, BAY94-9027) 및 박스터(Baxter, Bax 855)는 모두 임상 연구에 진입한 개발된 폐길화된(PEGylated) 장기-작용 FVIII 제품이다. 그러나, 약동학 연구 데이터는 폐길화된 FVIII이 상당히 연장된 반감기를 얻지 못함을 나타냈다(문헌[Tiede A et al., J Thromb Haemost. 2013; 11: 670-678]; 문헌[Coyle T et al., Haemophilia. 2012; 18(Suppl 3): 22]; 문헌[Turecek PL et al., Haemostaseologie, 2012, 32 Suppl 1: S29-38]).

[0008] 장기-작용 단백질 약물을 개발하기 위한 전략은 글리코실화, 폐길화, 알부민, 트랜스페린, Fc, XTEN 등과의 용합 단백질 형성을 포함한다. 현재, 시판 중인 장기-작용 약물은 단백질의 반감기를 연장하기 위해 상기 전략

중 하나만 사용한다. 상기 전략 중 2개 이상의 조합, 특히 폐길화 및 단백질과의 융합의 조합에 대한 문헌은 존재하지 않고, 2개 이상의 전략이 단일 전략이 채택된 경우보다 반감기를 길게 만들 수 있다고 보고하는 문헌은 존재하지 않는다.

[0009] 혈우병 환자는 출혈을 멈추고 출혈을 예방하기 위해 응고 인자의 평생 수혈이 필요하다. 따라서, 연구자들은 투여 횟수를 줄이기 위해 반감기가 긴 응고 인자를 지속적으로 찾고 있다. 또한, 반감기를 연장하면서 양호한 생물학적 활성을 유지하는 방법은 연구자들이 직면한 어려운 문제이다.

발명의 내용

[0010] 수년간의 연구와 장기간의 실험 끝에, 본 발명자들은 응고 인자 VIII이 융합 파트너(예컨대, Fc 분질, 알부민, XTEN 또는 트랜스페린)와 융합되고, 생성된 융합 단백질이 중합체, 예컨대 폴리알킬렌 글리콜, 예를 들어 PEG, 예컨대 생체 내에서 mPEG와 추가로 접합될 때, 특히 접합된 파트가 분지 구조를 가질 때 및 접합된 파트의 분자량이 35 kDa 이상, 예컨대 40 kDa일 때, 단백질의 안정성을 효과적으로 개선할 수 있음을 발견하였다. 이를 바탕으로, 본 개시내용이 완성되었다.

[0011] 본 개시내용은 다음과 같은 기술적 해법을 제공한다:

[0012] 1. 활성 모이어티로서 응고 인자 VIII(FVIII)이 펩티드 연결기에 의해, 반감기를 연장하기 위한 융합 파트너에 직접적으로 연결되거나 간접적으로 연결되어 융합 단백질을 형성하고, 상기 융합 단백질이 또한 폴리알킬렌 글리콜에 접합되는, 폴리알킬렌 글리콜과 접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질인 폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질.

[0013] 2. 활성 모이어티인 응고 인자 VIII이 인간, 예컨대 전장 또는 절두된 인간 응고 인자 VIII(예를 들어, 인간 B-도메인 결실된 응고 인자 VIII)로부터 유래하고; 상기 전장 또는 절두된 인간 응고 인자 VIII이 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 함유할 수 있되, 여전히 FVIII 활성을 보유하고, 예를 들어, 상기 활성 모이어티인 응고 인자 VIII이 서열번호 1 또는 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 1 또는 2에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 또는 95% 이상의 동일성을 갖는, 한 양태에 따른 폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질.

[0014] 3. 융합 파트너가 면역글로불린 Fc 단편, 알부민, 트랜스페린 또는 XTEN이고, 상기 융합 파트너가, 예를 들어, 인간으로부터 유래하고, 바람직하게는 IgG Fc 단편, 예를 들어, 감소된 ADCC 효과 및/또는 CDC 효과 및/또는 FcRn 수용체에 대한 강화된 결합 친화도를 갖는 IgG Fc 단편, 더욱 바람직하게는 (i) 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열, (ii) 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열, 및 (iii) 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 IgG Fc 단편인, 다른 양태에 따른 폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질.

[0015] 4. 폴리알킬렌 글리콜이 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜이고;

[0016] 상기 폴리알킬렌 글리콜이 말단-캡핑(end-capping)될 수 있고, 예를 들어, 알콕시 기, 예컨대 메톡시에 의해 말단-캡핑될 수 있고;

[0017] 상기 폴리알킬렌 글리콜이 선형 또는 분지형, 바람직하게는 분지형, 예를 들어 분지형 폴리에틸렌 글리콜, 특히 분지형 메톡시-종결된 폴리에틸렌 글리콜이고;

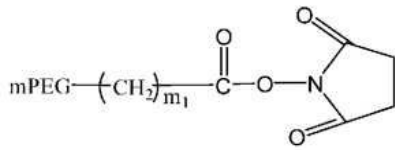
[0018] 상기 폴리알킬렌 글리콜의 분자량이 ≥ 1 , ≥ 10 , ≥ 20 , ≥ 30 , ≥ 40 , ≥ 50 , ≥ 60 , ≥ 70 , ≥ 80 , ≥ 90 , ≥ 100 , ≥ 110 , ≥ 120 , ≥ 130 , ≥ 140 , ≥ 150 또는 ≥ 160 kDa, 예를 들어 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 kDa, 또는 이들 중 임의의 2개의 값 사이의 범위일 수 있는,

[0019] 일부 양태에 따른 폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질.

[0020] 5. 융합 단백질 및 폴리알킬렌 글리콜의 접합 부분이 무작위 또는 특정 위치에 존재하고, 접합 위치가 유리 아미노 기, 설프하이드릴 기, 당 기 및/또는 카복실 기로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 유리 아미노 기인, 일부 양태에 따른 폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질.

[0021] 6. 변형체, 즉 본원의 폴리알킬렌 글리콜 또는 변형된 폴리알킬렌 글리콜이 접합에 사용되고, 상기 변형체가 활성화된 에스터의 형태일 수 있고, 예를 들어, 상기 변형체가 하기 화학식 1, 2 및 3의 변형체로부터 선택되는, 다른 양태에 따른 폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질:

[0022] [화학식 1]



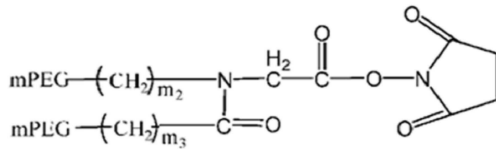
[0023]

[0024] [상기 식에서,

[0025] $0 \leq m1 \leq 6$ 이고, $m1$ 은 바람직하게는 5이고;

[0026] mPEG는 모노메톡시-종결된 폴리에틸렌 글리콜 기이다]

[0027] [화학식 2]



[0028]

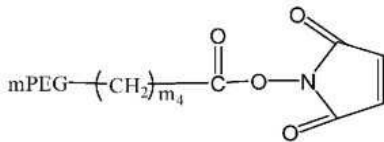
[0029] [상기 식에서,

[0030] $0 \leq m2 \leq 6$ 이고, $m2$ 는 바람직하게는 2이고;

[0031] $0 \leq m3 \leq 6$ 이고, $m3$ 은 바람직하게는 1이고;

[0032] mPEG는 모노메톡시-종결된 폴리에틸렌 글리콜 기이다]

[0033] [화학식 3]



[0034]

[0035] [상기 식에서,

[0036] $0 \leq m4 \leq 6$ 이고, $m4$ 는 바람직하게는 2이고;

[0037] mPEG는 모노메톡시-종결된 폴리에틸렌 글리콜 기이다].

[0038] 7. 응고 인자 VIII 활성 모이어티가 펩티드 연결기에 의해 융합 파트너에 연결되고, 상기 펩티드 연결기가 가요성 펩티드 분절 및/또는 강직성 펩티드 분절, 예를 들어 1, 2, 3, 4 또는 5개 이상의 강직성 펩티드 분절을 포함하는, 일부 양태에 따른 폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질.

[0039] 8. 가요성 펩티드 분절이 글리신, 세린, 알라닌 및 트레오닌으로부터 선택되는 2개 이상의 아미노산 잔기를 포함하고;

[0040] 바람직하게는, 상기 가요성 펩티드 분절이 구조식 $(GS)_a(GGS)_b(GGGS)_c(GGGGS)_d$ 를 갖고, 이때 a, b, c 및 d 는 0 이상의 정수이고, $a+b+c+d \geq 1$ 이고;

[0041] 더욱 바람직하게는, 상기 가요성 펩티드 분절이

[0042] (i) GSGGSGGGSGGGGS(서열번호 6);

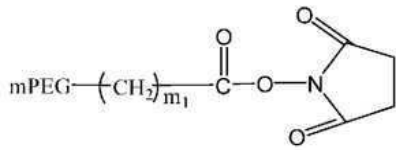
[0043] (ii) GSGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS(서열번호 7);

[0044] (iii) GGGSGGGSGGGSGGGGS(서열번호 8);

[0045] (iv) GSGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS(서열번호 9); 및

- [0046] (v) GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS(서열번호 10)
- [0047] 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는,
- [0048] 다른 양태에 따른 폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질.
- [0049] 9. 강직성 펩티드 분질이 인간 융모성 생식선 자극호르몬(chorionic gonadotropin) β 아단위의 카복시-종결된 펩티드이거나, 강직성 펩티드 분질이 인간 융모성 생식선 자극호르몬 β 아단위의 카복시-종결된 펩티드와 적어도 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 동일성을 갖고;
- [0050] 상기 강직성 펩티드 분질이 1 또는 2개 이상의 글리코실화 부위를 포함할 수 있고;
- [0051] 바람직하게는, 상기 강직성 펩티드 분질이
- [0052] (i) PRFQSSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ(서열번호 11);
- [0053] (ii) SSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ(서열번호 12);
- [0054] (iii) SSSSKAPPS(서열번호 13); 및
- [0055] (iv) SRLPGPSDTPILPQ(서열번호 14)
- [0056] 로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고;
- [0057] 더욱 바람직하게는, 펩티드 연결기가 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는,
- [0058] 일부 양태에 따른 폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질.
- [0059] 10. 효과량의 본 개시내용의 접합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0060] 11. 본 개시내용의 접합체 또는 약학 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여함을 포함하는, 출혈성 질환을 예방하고/거나 치료하는 방법으로서, 상기 출혈성 질환이 바람직하게는 FVIII의 선천적 또는 후천적 결핍을 갖는 환자의 출혈성 질환, 및 혈우병 A를 갖는 환자에서의 자발적 또는 외과적 출혈로부터 선택되는, 방법.
- [0061] 12. 응고 인자 VIII 활성 모이어티가 펩티드 연결기에 의해, 반감기를 연장하기 위한 융합 파트너에 직접적으로 연결되거나 간접적으로 연결되고, 이어서 폴리알킬렌 글리콜에 또한 접합되는, 응고 인자 VIII의 반감기를 개선하는 방법.
- [0062] 13. 융합 파트너가 면역글로불린 Fc 단편, 알부민, XTEN 또는 트랜스페린이고, 상기 융합 파트너가, 예를 들어, 인간으로부터 유래하고, 바람직하게는 IgG Fc 단편, 예를 들어, 감소된 ADCC 효과 및/또는 CDC 효과 및/또는 FcRn 수용체에 대한 강화된 결합 친화도를 갖는 IgG Fc 단편, 더욱 바람직하게는 (i) 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열, (ii) 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열, 및 (iii) 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 IgG Fc 단편인, 한 양태에 따른 방법.
- [0063] 14. 폴리알킬렌 글리콜이 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜이고; 상기 폴리알킬렌 글리콜이 말단-캐핑될 수 있고, 예를 들어, 알콕시 기, 예컨대 메톡시로 말단-캐핑될 수 있고; 상기 폴리알킬렌 글리콜이 선형 또는 분지형, 바람직하게는 분지형, 예를 들어 분지형 폴리에틸렌 글리콜, 특히 분지형 메톡시-종결된 폴리에틸렌 글리콜이고; 상기 폴리알킬렌 글리콜의 분자량이 ≥ 1 , ≥ 10 , ≥ 20 , ≥ 30 , ≥ 40 , ≥ 50 , ≥ 60 , ≥ 70 , ≥ 80 , ≥ 90 , ≥ 100 , ≥ 110 , ≥ 120 , ≥ 130 , ≥ 140 , ≥ 150 또는 ≥ 160 kDa, 예를 들어 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 kDa일 수 있거나, 이들 중 임의의 2개의 값 사이의 범위일 수 있는, 일부 양태에 따른 방법.
- [0064] 15. 융합 단백질 및 폴리알킬렌 글리콜의 접합이 무작위 또는 특정 위치에 존재하고, 접합 위치가 유리 아미노기, 설프하이드릴 기, 당 기 및 카복실 기로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 유리 아미노기인, 일부 양태에 따른 방법.
- [0065] 16. 변형체, 즉 본원의 폴리알킬렌 글리콜 또는 변형된 폴리알킬렌 글리콜이 접합에 사용되고, 바람직하게는 상기 변형체가 활성화된 에스터의 형태일 수 있고, 더욱 바람직하게는 상기 변형체가 하기 화학식 1, 2 및 3의 변형체로부터 선택되고, 이때 임의의 활성화된 에스터 형태 변형체가 접합에 사용되고, 예를 들어, 상기 변형체가 하기 화학식 1, 2 및 3의 변형체로부터 선택되는, 일부 양태에 따른 방법:

[0066] [화학식 1]



[0067]

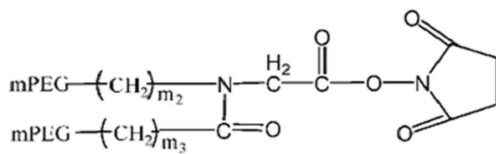
[0068] [상기 식에서,

[0069] $0 \leq m_1 \leq 6$ 이고, m_1 은 바람직하게는 5이고;

[0070] mPEG는 모노메톡시-종결된 폴리에틸렌 글리콜 기이고;

[0071] 화학식 1의 변형제의 분자량은 5 내지 60 kDa이다]

[0072] [화학식 2]



[0073]

[0074] [상기 식에서,

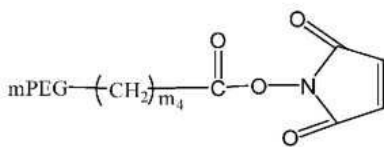
[0075] $0 \leq m_2 \leq 6$ 이고, m_2 는 바람직하게는 2이고;

[0076] $0 \leq m_3 \leq 6$ 이고, m_3 은 바람직하게는 1이고;

[0077] mPEG는 모노메톡시-종결된 폴리에틸렌 글리콜 기이고;

[0078] 화학식 2의 변형제의 분자량은 5 내지 100 kDa, 바람직하게는 40 kDa, 50 kDa, 60 kDa, 더욱 바람직하게는 40 kDa이다]

[0079] [화학식 3]



[0080]

[0081] [상기 식에서,

[0082] $0 \leq m_4 \leq 6$ 이고, m_4 는 바람직하게는 2이고;

[0083] mPEG는 모노메톡시-종결된 폴리에틸렌 글리콜 기이고;

[0084] 화학식 3의 변형제의 분자량은 5 내지 100 kDa이다].

[0085] 17. 응고 인자 VIII이 펩티드 연결기에 의해 융합 파트너에 연결되고, 상기 펩티드 연결기가 가요성 펩티드 분절 및/또는 강직성 펩티드 분절, 예를 들어 1, 2, 3, 4 또는 5개 이상의 강직성 펩티드 분절을 포함하는, 일부 양태에 따른 방법.

[0086] 18. 가요성 펩티드 분절이 글리신, 세린, 알라닌 및 트레오닌으로부터 선택되는 2개 이상의 아미노산 잔기를 포함하고, 바람직하게는 상기 가요성 펩티드 분절인 구조식 $(GS)_a(GGS)_b(GGGS)_c(GGGGS)_d$ 를 갖고, a, b, c 및 d가 0 이상의 정수이고, $a+b+c+d \geq 1$ 이고, 더욱 바람직하게는 상기 가요성 펩티드 분절이 하기 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는, 한 양태에 따른 방법:

[0087] (i) GSGGSGGGSGGGGS(서열번호 6);

[0088] (ii) GSGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS(서열번호 7);

- [0089] (iii) GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 8);
- [0090] (iv) GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 9); 및
- [0091] (v) GGGSGGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 10).

[0092] 19. 강직성 펩티드 분절이 인간 융모성 생식선 자극호르몬 β 아단위의 카복시-종결된 펩티드이거나, 강직성 펩티드 분절이 인간 융모성 생식선 자극호르몬 β 아단위의 카복시-종결된 펩티드와 적어도 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 동일성을 갖고; 상기 강직성 펩티드 분절이 1 또는 2개 이상의 글리코실화 부위를 포함할 수 있고; 바람직하게는 상기 강직성 펩티드 분절이 하기 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 더욱 바람직하게는, 펩티드 연결기가 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 일부 양태에 따른 폴리알킬렌 글리콜-접합된 응고 인자 VIII 융합 단백질:

- [0093] (i) PRFQSSSSKAPPPSLPSRLPGPSDTPILPQ(서열번호 11);
- [0094] (ii) SSSSKAPPPSLPSRLPGPSDTPILPQ(서열번호 12);
- [0095] (iii) SSSSKAPPPS(서열번호 13); 및
- [0096] (iv) SRLPGPSDTPILPQ(서열번호 14).

도면의 간단한 설명

[0097] 본 개시내용의 양태 및 종래 기술의 기술적 해법을 보다 명확히 설명하기 위해, 이하 상기 양태 및 종래 기술에서 이용되어야 할 도면을 간략히 소개한다. 명백하게, 명세서의 하기 도면은 본 개시내용의 일부 양태만을 나타낸다. 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 이러한 도면에 기초하여 창의적인 작업 없이 다른 양태를 얻을 수 있다.

도 1a는 mPEG 변형이 없는 FVIII-Fc(FF-0)의 SEC-HPLC 검출의 결과를 도시한다.

도 1b는 5 kDa 분자량의 mPEG로 변형된 FVIII-Fc(FF-5L)의 SEC-HPLC 검출의 결과를 도시한다.

도 1c는 10 kDa 분자량의 mPEG로 변형된 FVIII-Fc(FF-10L)의 SEC-HPLC 검출의 결과를 도시한다.

도 1d는 20 kDa 분자량의 mPEG로 변형된 FVIII-Fc(FF-20L)의 SEC-HPLC 검출의 결과를 도시한다.

도 1e는 30 kDa 분자량의 mPEG로 변형된 FVIII-Fc(FF-30L)의 SEC-HPLC 검출의 결과를 도시한다.

도 1f는 40 kDa 분자량의 mPEG로 변형된 FVIII-Fc(FF-40L)의 SEC-HPLC 검출의 결과를 도시한다.

도 2a는 mPEG 변형이 없는 FVIII-연결기 1-Fc(FL1F-0)의 SEC-HPLC 검출의 결과를 도시한다(순도 > 99%, 응집체 < 1%).

도 2b는 20 kDa 분자량의 mPEG로 변형된 FVIII-L1-Fc(FL1F-20L)의 SEC-HPLC 검출의 결과를 도시한다(순도 > 95%, 응집체 < 5%, 비-가교결합 < 1%).

도 2c는 선형 30 kDa mPEG로 변형된 FVIII-L1-Fc(FL1F-30L)의 SEC-HPLC 검출의 결과를 도시한다(순도 > 95%, 응집체 < 5%, 비-가교결합 < 1%).

도 2d는 선형 40 kDa mPEG로 변형된 FVIII-L1-Fc(FL1F-40L)의 SEC-HPLC 검출의 결과를 도시한다(순도 > 95%, 응집체 < 5%, 비-가교결합 < 1%).

도 2e는 선형 50 kDa mPEG로 변형된 FVIII-L1-Fc(FL1F-50L)의 SEC-HPLC 검출의 결과를 도시한다(순도 > 95%, 응집체 < 5%, 비-가교결합 < 1%).

도 2f는 Y-형 40 kDa mPEG로 변형된 FVIII-L1-Fc(FL1F-40Y)의 SEC-HPLC 검출의 결과를 도시한다(순도 > 95%, 응집체 < 5%, 비-가교결합 < 1%).

도 3a는 G25와의 교환 전 및 후에 mPEG 변형이 없는 hFVIII-Fc(FF-0)의 저장 용액의 SDS-PAGE 검출의 결과를 도시한다(H는 환원 조건을 나타내고, F는 비-환원 조건을 나타냄).

도 3b는 상이한 분자량을 갖는 mPEG와 가교결합된 hFVIII-Fc(FF-5L 내지 FF-40L)의 SDS-PAGE 검출(비-환원)의 결과를 도시한다.

도 3c는 상이한 분자량을 갖는 mPEG와 가교결합된 hFVIII-Fc(FF-5L 내지 FF-40L)의 SDS-PAGE 검출(환원)의 결과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0098] 본 개시내용의 목적, 기술적 해법 및 이점을 보다 명확하게 하기 위해, 이하 도면 및 양태를 참고하여 본 개시내용을 더욱 상세히 설명한다. 명백하게, 기술된 양태는 모든 양태가 아니라 본 개시내용의 양태의 일부일 뿐이다. 본 개시내용의 양태에 기초하여, 창조적인 작업 없이 당업자에 의해 수득된 다른 모든 양태는 본 개시내용의 보호 범위에 속한다.
- [0099] 용어 "응고 인자 VIII"(인자 VIII 또는 FVIII로도 지칭됨)은 주로 간 세포에 의해 생성되는 크고 복잡한 당단백질을 지칭한다. 용어 "응고 인자 VIII 활성 모이어티"는 FVIII 활성을 나타내는 본 개시내용의 융합 단백질의 모이어티를 지칭한다. 천연 인간 FVIII은 신호 펩티드를 비롯한 2,351개의 아미노산, 및 상동성에 의해 정의된 여러 상이한 도메인으로 구성된다: NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH의 순서로 3개의 A 도메인, 1개의 B 도메인 및 2개의 C 도메인. 혈액에서, FVIII은 2가 금속 이온에 의해 연결된 2개의 쇠(B-A3의 경계에서 절단됨)로 구성되어 이종이량체로서 분비된다. A1-A2-B 쇠는 중쇄(HC)로 지칭되고, A3-C1-C2 쇠는 경쇄(LC)로 지칭된다.
- [0100] 내인성 인자 VIII 분자는 상이한 크기의 B 도메인을 갖는 분자의 풀로 체내에서 순환한다. B 도메인의 점진적인 효소 절단은 생체 내에서 발생할 수 있고, 상이한 크기의 B 도메인을 갖는 분자의 풀을 생성한다. 일반적으로, 위치 740에서의 절단의 발생(B 도메인의 마지막 부분이 이때 절제됨)은 트롬빈의 활성화와 관련되는 것으로 여겨진다.
- [0101] 본 개시내용의 "응고 인자 VIII"은 천연 야생형 서열(예컨대, 서열번호 1) 및 이의 변이체, 예를 들어 응고 인자 VIII의 활성을 유지하면서 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실 또는 삽입에 의해 수득된 변이체 단백질을 지칭할 수 있다.
- [0102] 한 양태에서, 응고 인자 VIII은 B-도메인 결실된 분자이고, 이때 나머지 도메인은 서열번호 1의 아미노산 1 내지 745 및 1640 내지 2332에 실질적으로 대응한다. 또한, 본 개시내용의 B-도메인 결실된 분자는 서열번호 2에 제시된 서열과 약간의 차이를 가질 수 있고, 즉 나머지 도메인(즉, 3개의 A 도메인 및 2개의 C 도메인)은 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 기초한 하나 이상의 아미노산의 치환, 부가 또는 결실을 가질 수 있고, 예를 들어 서열번호 2에 제시된 서열과 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 이상의 아미노산 차이 또는 약 1%, 2%, 3%, 4% 또는 5% 차이를 가질 수 있다. 이러한 차이는 인자 VIII의 기본 활성을 유지하면서, 인자 VIII의 다양한 다른 성분(예컨대, LRP, 다중 수용체, 다른 응고 인자, 세포 표면)에 대한 결합 능력을 변화시킬 수 있거나, 글리코실 기를 도입하고/거나 제거할 수 있다.
- [0103] 용어 "융합 파트너"는 표적 폴리펩티드(반감기가 연장되는 것이 요구되는 폴리펩티드)와 융합된 폴리펩티드를 지칭한다. 융합 파트너는 다양한 상이한 기전, 예컨대 생체 내에서 표적 폴리펩티드의 반감기의 연장을 통해 융합 단백질의 특성을 변화시킬 수 있다.
- [0104] 한 양태에서, 융합 파트너는 신생아 Fc 수용체(FcRn)와 상호작용함으로써 FVIII의 생체내 제거를 지연시킨다. 한 양태에서, 융합 파트너는 면역 글로불린 Fc 영역(Fc 영역), 알부민, 트랜스페린, XTEN 또는 이의 일부이다. 바람직한 양태에서, IgG Fc는 비교적 긴 반감기에 기인하여 바람직하다.
- [0105] Fc 도메인은 또한 이의 기능, 예컨대 보체 결합 및/또는 특정 Fc 수용체에 대한 결합을 변화시키도록 변형될 수 있다. IgG Fc 도메인의 위치 234, 235 및 237에서의 돌연변이는 통상적으로 FcγRI 수용체에 대한 결합을 감소시키고, 또한 FcγRIIa 및 FcγRIII 수용체에 대한 결합을 감소시킬 수 있다. 이러한 돌연변이는 FcRn 수용체에 대한 결합을 변화시키지 않고, 이는 엔도시토시스 및 재순환 경로를 통해 긴 순환 반감기를 촉진한다. 바람직하게는, 본 개시내용에서 융합 단백질의 변형된 IgG Fc 도메인은 이러한 돌연변이 중 하나 이상을 함유하고, 일부 돌연변이(L234A, L235E 및 G237A)는 특정 Fc 수용체에 대한 감소된 친화도를 야기하고, 다른 것(A330S 및 P331S)은 감소된 C1q-매개 보체 결합을 야기한다.
- [0106] 용어 "폴리알킬렌 글리콜"은 본 개시내용에서 응고 인자 VIII 및/또는 융합 파트너 상의 특정 위치에서 접합된 친수성 중합체이다. 폴리알킬렌 글리콜은 선형 또는 분지형일 수 있고, 하나 이상의 독립적으로 선택되는 중합체 모이어티를 함유할 수 있다. 바람직하게는, 폴리알킬렌 글리콜은 폴리에틸렌 글리콜(이의 메톡시-종결된 형태 m-PEG를 포함함), 폴리프로필렌 글리콜(mPPG를 포함함) 등이다.
- [0107] 본 개시내용의 폴리알킬렌 글리콜은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)일 수 있고, 선형 또는 분지형일 수 있다. 분지형

중합체의 골격은 당해 분야에 주지되어 있다. 일반적으로, 분지형 중합체는 중심 분지형 코어 부분 및 상기 중심 분지형 코어에 연결된 하나 이상의 선형 중합체 쇄를 갖는다. 본 개시내용은 바람직하게는 PEG의 분지형 형태를 사용한다. 한 양태에서, 분지형 폴리에틸렌 글리콜은 구조식 R(-PEG-OH)_m으로 표시될 수 있고, 이때 R은 코어 파트, 예컨대 글리세롤 또는 펜타에리트리톨을 나타내고, m은 아암/분지의 수를 나타낸다.

[0108] 한 양태에서, 분지형 PEG(예컨대, mPEG)의 분지의 수는 2개이므로, "Y-형" PEG(예컨대, mPEG)로 지칭되고, 즉 분지형 PEG는 2개의 PEG를 함유하거나, 분지형 PEG는 선형 메톡시 PEG를 함유한다.

[0109] 다른 적합한 중합체의 예는 비제한적으로 다른 폴리알킬렌 글리콜(예컨대, 폴리프로필렌 글리콜(PPG), 에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜의 공중합체), 폴리옥시에틸화된 폴리올, 올레핀계 알코올, 폴리비닐피롤리돈, 폴리하이드록시프로필메타크릴아미드, 폴리([α]-하이드록시산), 폴리비닐 알코올, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리 N-아크릴로일모폴린 및 공중합체, 삼원 공중합체 및 이들의 혼합물을 포함한다.

[0110] 본 개시내용의 한 양태에서, PEG 변형(즉, 접합), 더욱 바람직하게는 mPEG 변형이 사용되며, 이때 변형은 무작위 또는 특정 위치에 존재하고, 변형 위치는 유리 아미노 기, 설프하이드릴 기, 당 기 및/또는 카복실 기로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 유리 아미노 기이다.

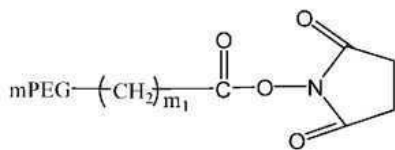
[0111] 본 개시내용의 특정 양태에서, 유리 아미노 기에서 무작위 변형을 위해 사용되는 변형제, 본 명세서의 폴리알킬렌 글리콜 또는 변형된 폴리알킬렌 글리콜은 mPEG-SS(메톡시 폴리에틸렌 글리콜-석신이미딜 석신에이트), mPEG-SC(메톡시 폴리에틸렌 글리콜-석신이미딜 카보네이트), mPEG-SPA(메톡시 폴리에틸렌 글리콜-석신이미딜 프로피오네이트) 및 mPEG-SG(메톡시 폴리에틸렌 글리콜-석신이미딜 글루타레이트) 등으로부터 선택된다. N-말단 변형의 경우, mPEG-ALD(메톡시 폴리에틸렌 글리콜-아세트알데하이드), mPEG-pALD(메톡시 폴리에틸렌 글리콜-프로피온알데하이드) 및 mPEG-bALD(메톡시 폴리에틸렌 글리콜-부티르알데하이드) 등 중 하나가 선택된다. 변형제 mPEG-SS, mPEG-SC, mPEG-SPA, mPEG-SG, mPEG-ALD, mPEG-pALD, mPEG-bALD는 선형 또는 분지형이다.

[0112] 본 개시내용의 특정 양태에서, 유리 설프하이드릴 기에서 무작위 변형에 사용되는 변형제는 mPEG-mal(메톡시 폴리에틸렌 글리콜-말레이미드), mPEG-OPSS(메톡시 폴리에틸렌 글리콜-오르토펜리딜 다이설파이드), mPEG-비닐설펜(메톡시 폴리에틸렌 글리콜-비닐설펜) 및 mPEG-티올(메톡시 폴리에틸렌 글리콜-티올) 등이다.

[0113] 본 개시내용의 특정 양태에서, 당 기 및/또는 카복실 기에서 무작위 변형에 사용되는 변형제는 mPEG-ZH(메톡시 폴리에틸렌 글리콜-하이드라자이드)이다.

[0114] 본 개시내용의 한 양태에서, 변형을 위한 변형제는 하기 화학식 1의 구조를 갖는다:

[0115] [화학식 1]



[0116]

[0117] 상기 식에서,

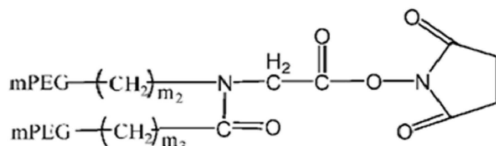
[0118] $0 \leq m1 \leq 6$ 이고, m1은 바람직하게는 5이고;

[0119] mPEG는 모노메톡시-종결된 폴리에틸렌 글리콜 기이다.

[0120] 화학식 1의 변형제는 분자량이 5 내지 60 kDa(킬로달톤), 바람직하게는 40 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직하게는, 본 개시내용의 한 양태에서, 화학식 1의 변형제는 유리 아미노 기에서 무작위 mPEG 변형을 위해 사용된다.

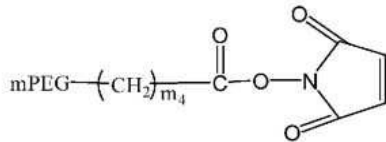
[0121] 본 개시내용의 한 양태에서, 변형을 위한 변형제는 하기 화학식 2의 구조를 갖는다:

[0122] [화학식 2]



[0123]

- [0124] 상기 식에서,
- [0125] $0 \leq m_2 \leq 6$ 이고, m_2 는 바람직하게는 2이고;
- [0126] $0 \leq m_3 \leq 6$ 이고, m_3 는 바람직하게는 1이고;
- [0127] mPEG는 모노메톡시-종결된 폴리에틸렌 글리콜 기이다.
- [0128] 화학식 2의 변형체는 5 내지 60 kDa, 바람직하게는 40 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직하게는, 본 개시내용의 한 양태에서, 화학식 2의 변형체는 유리 아미노 기에서 무작위 mPEG 변형을 위해 사용된다.
- [0129] 본 개시내용의 한 양태에서, 변형을 위한 변형체는 하기 화학식 3의 구조를 갖는다:
- [0130] [화학식 3]



- [0131]
- [0132] 상기 식에서,
- [0133] $0 \leq m_4 \leq 6$ 이고, m_4 는 바람직하게는 2이고;
- [0134] mPEG는 모노메톡시-종결된 폴리에틸렌 글리콜 기이다.
- [0135] 화학식 3의 변형체는 5 내지 60 kDa, 바람직하게는 40 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직하게는, 본 개시내용의 한 양태에서, 화학식 3의 변형체는 유리 설프하이드릴 기에서 무작위 mPEG 변형을 위해 사용된다.
- [0136] 중합체 골격의 크기는 다양할 수 있지만, 중합체(예컨대, PEG, mPEG, PPG 또는 mPPG)의 전형적인 크기 범위는 약 0.5 내지 약 160 kDa, 예를 들어 약 1 내지 약 100 kDa이다. 더욱 구체적으로, 본 개시내용에서 접합된 각각의 친수성 중합체의 크기는 주로 하기 범위 내에서 변한다: 약 1 내지 약 80 kDa, 약 2 내지 약 70 kDa; 약 5 내지 약 70 kDa; 약 10 내지 약 60 kDa, 약 20 내지 약 50 kDa; 약 30 내지 약 50 kDa 또는 약 30 내지 약 40 kDa. 이러한 크기는 당해 분야에서 인식되는 바와 같이 정확한 측정이 아닌 근사치를 나타냄이 이해되어야 한다.
- [0137] 특정 양태에서, 본 개시내용에 사용되는 PEG 또는 mPEG의 크기는 35 kDa 이상, 바람직하게는 40 kDa 이상, 45 kDa 이상, 50 kDa 이상, 55 kDa 이상, 60 kDa 이상, 65 kDa 이상 또는 70 kDa 이상이고, 예를 들어 분자량은 구체적으로 40 kDa, 50 kDa, 60 kDa, 70 kDa, 80 kDa, 90 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa, 130 kDa, 140 kDa, 150 kDa 또는 160 kDa이다.
- [0138] 용어 "개선된 순환 반감기"는 본 개시내용의 분자가 변경된 순환 반감기(혈장 반감기), 바람직하게는 야생형 인자 VIII에 비해 증가된 순환 반감기를 갖는 것을 의미한다. 순환 반감기는 바람직하게는 10% 이상, 바람직하게는 15% 이상, 바람직하게는 20% 이상, 바람직하게는 25% 이상, 바람직하게는 30% 이상, 바람직하게는 35% 이상, 바람직하게는 40% 이상, 바람직하게는 45% 이상, 바람직하게는 50% 이상, 바람직하게는 55% 이상, 바람직하게는 60% 이상, 바람직하게는 65% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 바람직하게는 75% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 바람직하게는 100% 이상, 더욱 바람직하게는 125% 이상, 더욱 바람직하게는 150% 이상, 더욱 바람직하게는 175% 이상, 더욱 바람직하게는 200% 이상, 가장 바람직하게는 250% 또는 300% 이상만큼 증가된다. 더욱 더 바람직하게는, 분자는 400%, 500%, 600% 또는 심지어 700% 이상만큼 증가된 순환 반감기를 갖는다.
- [0139] 용어 "약학적으로 허용되는 담체"는 비제한적으로 식염수, 완충액, 글루코스, 물, 글리세롤, 에탄올 및 이들의 조합을 포함한다. 일반적으로, 약학 제제는 투여 방식에 적합해야 한다. 본 개시내용의 약학 조성물은, 예를 들어, 생리 식염수, 또는 글루코스 및 기타 보조제를 함유하는 수용액을 사용하는 통상적인 방법에 의해 주사 형태로 제조될 수 있다. 약학 조성물은 무균 조건 하에 제조되어야 한다. 투여되는 활성 성분의 양은 치료 효과량이다. 본 발명의 약학 제제는 또한 서방성 제제로 제조될 수 있다.

[0140] **실시예**

[0141] 실시예 1

[0142] mPEG-변형된 hFVIII 융합 단백질의 제조 및 정제

[0143] 1.1. mPEG-변형된 hFVIII 융합 단백질의 제조

[0144] 1.1.1. 일련의 hFVIII 융합 단백질 발현 플라스미드를 당업자에게 주지된 분자 클로닝 기술에 따라 구축하고, 발현 플라스미드를 각각 DHFR-결합 CHO 세포(미국 특허공보 제4,818,679호 참고)로 형질감염시켜 각각의 hFVIII 융합 단백질을 발현시켰다(표 1). 융합 단백질의 특정 제조 단계에 대해서는 중국 특허공보 제 ZL201610692838.0호(이의 전문이 본원에 참고로 혼입됨)를 참고한다.

[0145] [표 1]

[0146] 융합 단백질의 조성 및 구조

hFVIII 융합 단백질의 명칭 및 약어	hFVIII 파트	융합 파트너	연결기
hFVIII-Fc (FF-0)	B-도메인 결실된 hFVIII* (서열번호 2)	천연 인간 IgG 2의 Fc 단편	없음
hFVIII-L1-Fc (FL1F-0)	B-도메인 결실된 hFVIII (서열번호 2)	서열번호 3	서열번호 7 - 서열번호 12**
hFVIII-L2-Fc (FL2F-0)	B-도메인 결실된 hFVIII (서열번호 2)	서열번호 3	서열번호 6 - 서열번호 11**
hFVIII(전장)-L1-Fc' , F(전장)L1F' -0	전장 hFVIII (서열번호 1)	서열번호 4	서열번호 7 - 서열번호 12
hFVIII(전장)-L2-Fc" , F(전장)L2F" -0	전장 hFVIII (서열번호 1)	서열번호 5	서열번호 7 - 서열번호 12

주: *B-도메인 결실된 hFVIII 은 BDD FVIII 로 약칭되고, 90kD A1-A2 중쇄 및 80kD 경쇄로 이루어진다.

**서열번호 7-서열번호 12 는 연결기가 서열번호 12 에 제시된 강직성 펩티드 분절을 서열번호 7 에 제시된 가요성 펩티드 분절의 C-말단에 연결함으로써 형성됨을 의미하고; 서열번호 6-서열번호 11 은 연결기가 서열번호 11 에 제시된 강직성 펩티드 분절을 서열번호 6 에 제시된 가요성 펩티드 분절의 C-말단에 연결함으로써 형성됨을 의미한다.

[0147]

[0148] 1.1.2. 1.1.1.에서 각각의 융합 단백질의 발효액을 원심분리하고, 여과하고, 이어서 친화도 크로마토그래피/소수성 상호작용 크로마토그래피/이온-교환 크로마토그래피/크기 배제 크로마토그래피를 수행하여 5개의 hFVIII 융합 단백질 FF-0, FL1F-0, FL2F-0, F(전장)L1F'-0 및 F(전장)L2F"-0를 수득하고, SEC-HPLC 검출은 응집체가 5% 미만인 것으로 나타났다. 5개의 hFVIII 융합 단백질을 각각 0.95 mg/mL의 단백질 농도를 갖는 hFVIII 융합 단백질 저장 용액으로 제형화시켰다.

[0149] 1.1.3. 1.1.2.에서 제조된 5개의 hFVIII 융합 단백질 저장 용액 각각 5 mL를 G25[지이 헬스케어(GE Healthcare)] 분자체 크로마토그래피에 적용하였다. 구체적인 공정은 다음과 같다.

[0150] 완충액 제조: 20 mM 헤페스(Hepes), 0.1 M NaCl, 5.0 mM CaCl₂, 0.02% 트윈(Tween) 8.0, pH 7.0.

[0151] 크로마토그래피

[0152] (1) 평형: 크로마토그래피 컬럼을 pH 및 전도도가 완충액과 동일하게 될 때까지 컬럼 부피의 3배의 결합 완충액으로 평형화시켰고, 유량은 150 cm/시간으로 안정하였다.

[0153] (2) 샘플 로딩: 유량을 150 cm/시간으로 제어하였다.

[0154] (3) 평형: 크로마토그래피 컬럼을 pH 및 전도도가 완충액과 동일하게 될 때까지 컬럼 부피의 3배의 결합 완충액

으로 평형화시켰고, 유량은 150 cm/시간으로 안정하였다.

- [0155] (4) 평형: 크로마토그래피 컬럼을 완충액으로 평형화시키고, 1.8보다 큰 A280/A260을 갖는 피크를 수집하였다.
- [0156] (5) 크로마토그래피 컬럼의 동일 반응계 세척: 컬럼을 컬럼 부피의 1.5배의 0.2 M NaOH로 60 cm/시간의 유량으로 역으로 세척하고, 완충액으로 중화시켰다.
- [0157] (6) 크로마토그래피 컬럼의 보관: 실험 후, 컬럼을 컬럼 부피의 3배의 정제수로 100 cm/시간의 유량으로 세척하고, 이어서 컬럼 부피의 2배의 20% 에탄올로 보관하였다.
- [0158] 한외여과 농도: G25 교환 후 5개의 hFVIII 융합 단백질(FF-0, FL1F-0, FL2F-0, F(전장)L1F'-0 및 F(전장)L1F"-0) 저장 용액을 50 kDa 한외여과 필터 튜브로 한외여과에 의해 농축하고, 바람직하게는 1.5 mg/mL의 단백질 농도까지 3,800 rpm으로 4℃에서 원심분리에 의해 농축하였다.
- [0159] 1.1.4. 원하는 mPEG-SC(각각 분자량 5 kDa, 10 kDa, 20 kDa, 30 kDa 또는 40 kDa의 분자량을 갖고 화학식 1의 구조를 갖는 선형 L-형 mPEG-SC, 및 40 kDa의 분자량을 갖고 화학식 2의 구조를 갖는 분지형 Y-형 mPEG-SC)[베이징 젠켄 테크놀로지 캄파니 리미티드(Beijing jenkem Technology Co., Ltd.)]를 1:10 내지 1:100의 hFVIII 융합 단백질 대 mPEG-SC의 몰비에 따라 칭량하였다. 1.1.3.에서 한외여과 후 농축된 hFVIII 융합 단백질에 첨가하고, 4시간 동안 반응시켰다. 이어서, 기질 hFVIII 융합 단백질에 대해 10배 몰비의 히스티딘을 첨가하여 반응을 종료하고, 상이한 분자량을 갖는 mPEG-SC 변형된 hFVIII 융합 단백질을 수득하였다. 일부 변형된 생성물의 수 및 조성은 하기 표 2에 제시된다.

[0160] [표 2]

명칭/약어	mPEG-SC 의 분자량 및 형상	융합 단백질 파트
FF-0	변형되지 않음	hFVIII-Fc
FF-5L	5 kDa, 선형	hFVIII-Fc
FF-10L	10 kDa, 선형	hFVIII-Fc
FF-20L	20 kDa, 선형	hFVIII-Fc
FF-30L	30 kDa, 선형	hFVIII-Fc
FF-40L	40 kDa, 선형	hFVIII-Fc
FL1F-0	변형되지 않음	hFVIII-L1-Fc
FL1F-10L	10 kDa, 선형	hFVIII-L1-Fc
FL1F-20L	20 kDa, 선형	hFVIII-L1-Fc
FL1F-30L	30 kDa, 선형	hFVIII-L1-Fc
FL1F-30Y	30 kDa, Y-형	hFVIII-L1-Fc
FL1F-40L	40 kDa, 선형	hFVIII-L1-Fc
FL1F-40Y	40 kDa, Y-형	hFVIII-L1-Fc
FL1F-50L	50 kDa, 선형	hFVIII-L1-Fc
FL1F-60L	60 kDa, 선형	hFVIII-L1-Fc
FL2F-0	변형되지 않음	hFVIII-L2-Fc
FL2F-10L	10 kDa, 선형	hFVIII-L2-Fc
FL2F-20L	20 kDa, 선형	hFVIII-L2-Fc
FL2F-30L	30 kDa, 선형	hFVIII-L2-Fc
FL2F-30Y	30 kDa, Y-형	hFVIII-L2-Fc

[0161]

FL2F-40L	40 kDa, 선형	hFVIII-L2-Fc
FL2F-40Y	40 kDa, Y-형	hFVIII-L2-Fc
FL2F-50L	50 kDa, 선형	hFVIII-L2-Fc
FL2F-60L	60 kDa, 선형	hFVIII-L2-Fc
F(전장)L1F' -0	변형되지 않음	hFVIII(전장)-L1-Fc'
F(전장)L1F' -40L	40 kDa, 선형	hFVIII(전장)-L1-Fc'
F(전장)L1F' -40Y	40 kDa, Y-형	hFVIII(전장)-L1-Fc'
F(전장)L1F' -50L	50 kDa, 선형	hFVIII(전장)-L1-Fc'
F(전장)L2F'' -0	변형되지 않음	hFVIII(전장)-L2-Fc''
F(전장)L2F'' -40L	40 kDa, 선형	hFVIII(전장)-L2-Fc''
F(전장)L2F'' -40Y	40 kDa, Y-형	hFVIII(전장)-L2-Fc''
F(전장)L2F'' -50L	50 kDa, 선형	hFVIII(전장)-L2-Fc''

[0162]

- [0163] 1.2. mPEG-변형된 hFVIII 융합 단백질의 정제
- [0164] 1.2.1. 실시예 1의 1.1.4.에서 제조된 각각의 mPEG-변형된 hFVIII 융합 단백질을 각각 S200(지이 헬스케어) 분자체 크로마토그래피에 적용하였다. 구체적인 공정은 다음과 같다.
- [0165] 완충액 제조: 20 mM 히스티딘, 0.1 M NaCl, 5.0 mM CaCl₂, 0.02% 트윈 8.0, pH 7.0.
- [0166] 크로마토그래피
- [0167] (1) 평형: 크로마토그래피 컬럼을 pH 및 전도도가 완충액과 동일하게 될 때까지 3 컬럼 부피의 결합 완충액으로 평형화시키고, 유량을 150 cm/시간으로 제어하였다.
- [0168] (2) 샘플 로딩: 샘플 유량을 150 cm/시간으로 제어하였다.
- [0169] (3) 평형: 크로마토그래피 컬럼을 pH 및 전도도가 완충액과 동일하게 될 때까지 컬럼 부피의 3배의 완충액으로 평형화시키고, 유량을 150 cm/시간으로 제어하였다.
- [0170] (4) 평형: 크로마토그래피 컬럼을 완충액으로 평형화시키고, 1.8보다 큰 A280/A260을 갖는 피크를 수집하였다.
- [0171] (5) 크로마토그래피 컬럼의 동일 반응계 세척: 컬럼을 컬럼 부피의 1.5배의 0.2 M NaOH로 60 cm/시간의 유량으로 역으로 세척하고, 완충액으로 중화시켰다.
- [0172] (6) 크로마토그래피 컬럼의 보관: 실험 후, 컬럼을 컬럼 부피의 3배의 정제수로 100 cm/시간의 유량으로 세척하고, 이어서 컬럼 부피의 2배의 20% 에탄올로 보관하였다.
- [0173] 1.2.2. 1.2.1.에서 획득된 크로마토그래피 생성물을 소스(Source) 15Q(지이 헬스케어) 음이온 크로마토그래피에 적용하였다.
- [0174] 완충액 제조
- [0175] 결합 완충액: 20 mM 히스티딘, 0.1 M NaCl, 5.0 mM CaCl₂, 0.02% 트윈 8.0, pH 7.0; 용리 완충액: 20 mM 히스티딘, 2.0 M NaCl, 5.0 mM CaCl₂, 0.02% 트윈 8.0, pH 7.0; CIP: 0.5 M NaOH.
- [0176] 크로마토그래피
- [0177] (1) 평형: 크로마토그래피 컬럼을 pH 및 전도도가 완충액과 동일하게 될 때까지 3 컬럼 부피의 결합 완충액으로 평형화시키고, 유량을 150 cm/시간으로 제어하였다.
- [0178] (2) 샘플 로딩: 유량은 균일하게 150 cm/시간였다.
- [0179] (3) 평형: 크로마토그래피 컬럼을 pH 및 전도도가 완충액과 동일하게 될 때까지 컬럼 부피의 3배의 완충액으로 평형화시키고, 유량을 150 cm/시간으로 제어하였다.
- [0180] (4) 용리: 샘플을 컬럼 부피의 20배의 완충액 B로 100 cm/시간의 균일한 유량으로 0 → 100% 선형 구배로 용리하였다. 1.8보다 큰 A280/A260을 갖는 용리 피크를 별도의 튜브에 수집하고, SEC-HPLC 검출을 수행하였다.
- [0181] (5) 크로마토그래피 컬럼의 동일 반응계 세척: 컬럼을 컬럼 부피의 1.5배의 0.5 M NaOH로 60 cm/시간의 유량으로 역으로 세척하고, 결합 완충액으로 중화시켰다.
- [0182] (6) 크로마토그래피 컬럼의 보관: 실험 후, 컬럼을 컬럼 부피의 3배의 정제수로 100 cm/시간의 유량으로 세척하고, 이어서 컬럼 부피의 2배의 20% 에탄올로 보관하였다.
- [0183] 1.2.3. SEC-HPLC 검출
- [0184] 1.2.2.에서 획득된 크로마토그래피 생성물을 SEC-HPLC 검출에 적용하였다.
- [0185] 컬럼: G3000/G4000; 유량: 0.5 mL/분; 검출 파장: 280 nm; 컬럼 온도: 25℃; 주입 부피: 100 μL(주입량: 20 μg); 이동상: 0.30 M 나트륨 클로라이드, 0.02 M 이미다졸, 0.01 M 칼슘 클로라이드, 25 ppm 트윈 80, 10% 에탄올, pH 7.0; 실행 시간: 35 내지 50분.
- [0186] FF-0 내지 FF-40L의 검출 결과는 도 1a 내지 1f에 도시된다. FL1F-0 내지 FL1F-50L 및 FL1F-40Y의 검출 결과는 도 2a 내지 2f에 도시된다. 이러한 결과는 FL1F-0 내지 FL1F-60L의 경우 순도가 95% 초과이고, 중합체가 5% 미만이고, 비-가교결합이 1% 미만임을 나타낸다.

- [0187] 1.2.4. SDS-PAGE 겔 전기영동 검출
- [0188] 1.2.2.에서 수득된 생성물을 SDS-PAGE 검출에 적용하였다.
- [0189] (1) 겔 제조. 1x 트리스-글리신 전기영동 완충액: SDS 0.4 g, 트리스 베이스 1.21 g, 글리신 7.5 g, 및 400 mL로 구성하기 위한 이중-중류수.
- [0190] 5% 적층 겔: 이중-중류수 4.1 mL, 1 M 트리스-HCl(pH 6.8) 0.75 mL, 30% (w/v) 폴리아크릴아미드 1 mL, 10% (w/v) 암모늄 퍼설페이트 60 μ L, 10% (w/v) SDS 60 μ L, TEMED 6 μ L.
- [0191] 6% 분리 겔: 이중-중류수 4.9 mL, 1.5 M 트리스-HCl(pH 8.8) 3.8 mL, 30% (w/v) 폴리아크릴아미드 6 mL, 10%(w/v) 암모늄 퍼설페이트 150 μ L, 10% (w/v) SDS 150 μ L, TEMED 6 μ L.
- [0192] (2) 5x 단백질 로딩 완충액: 글리세롤 5 mL, 1 M 트리스-HCl(pH 6.8) 2.5 mL, 브로모페놀 블루 0.05 g, SDS 1 g, 10 mL로 구성하기 위한 이중-중류수, 4°C에서 보관하고, β -머캅토에탄올 0.5 mL를 사용하기 전에 첨가하였다.
- [0193] (3) 샘플 제조: 시험할 샘플을 동일한 부피의 로딩 완충액과 혼합하였다. 환원 SDS-PAGE의 경우, 0.1 mg/mL 2-머캅토에탄올을 샘플과 동일한 부피로 첨가하고, 비-환원 SDS-PAGE의 경우 2-머캅토에탄올을 첨가하지 않았다. 샘플을 로딩 완충액과 혼합한 후, 끓는 물에서 10분 동안 가열하였다.
- [0194] (4) 전기영동: 10 μ L의 시험할 샘플 및 단백질 마커를 각각 겔의 웰에 로딩하고, 60 V 전압에서 전기영동하였다. 브로모페놀 블루 염료를 분리 겔에 도입한 후, 브로모페놀 블루 염료가 분리 겔의 바닥에 도달할 때까지 전압은 120 V로 증가하였고, 이어서 전원을 켜었다.
- [0195] (5) 염색: SDS-PAGE 겔을 조심스럽게 제거하고, 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie Brilliant Blue) 염색 용액을 함유하는 플라스틱 상자에 위치시키고, 이어서 상기 상자를 마이크로파 오븐에 위치시켜 1분 동안 가열하였다.
- [0196] (6) 탈색: 염색된 SDS-PAGE 겔을 탈색 용액에 위치시키고, 진탕 하에 탈색하고, 탈색 용액을 2시간마다 교체하고, 육안으로 보이는 투명한 밴드가 나타난 후 중단하였다.
- [0197] (7) 기록: 완성된 SDS-PAGE 겔을 촬영하거나 건조하고 보관하였다. 도 3a 내지 3c는 FF-5L 내지 FF-40L의 SDS-PAGE 검출의 결과를 도시한다.
- [0198] **실시예 2**
- [0199] 색원체 기질 검정에 의한 mPEG-변형된 hFVIII 융합 단백질의 시험관내 활성의 간접 측정
- [0200] 색원체 기질 검정은 실시예 1에서 제조된 mPEG-변형된 hFVIII 융합 단백질의 활성을 측정하기 위해 사용되었다. 크로모제닉스코티스트(ChromogenixCoatest) FVIII 키트(크로모제닉, 참고번호 K824086)를 사용하였다. 검출 원리는 트롬빈에 의해 활성화된 후 인지질 및 칼슘 이온의 존재 하에 FVIIIa가 FIXa와 결합하여 효소 복합체를 형성하고, 이는 인자 X를 활성화시켜 활성 형태 Xa로 전환하고, 이어서 활성 Xa가 다시 특정 색원체 기질(S-2765)을 절단하고, 발색단 pNA를 방출할 수 있다. 405 nm에서 pNA의 양을 측정함으로써, FIXa의 양에 정비례하는 FIXa의 활성을 측정할 수 있다. 시스템에서 인자 IXa 및 인자 X의 함량이 과도하므로, FIXa의 활성은 FVIIIa의 함량과 단지 직접적인 관련이 있다. 색원체 기질 검정에 의한 FVIII 생물학적 활성의 간접 측정 결과는 표 3에 제시된다.
- [0201] [표 3]

[0202] 색원체 기질 검정에 의한 FVIII의 생물학적 활성의 간접 측정

명칭	색원체 기질 검정에 의한 FVIII의 생물학적 활성 (IU/mg)	엘록테이트의 상대 활성
엘록테이트	8460	100%
FF-0	8500	100%
FF-5L	7800	92.23%
FF-10L	7300	86.3%
FF-20L	6500	76.8%
FF-30L	6000	70.9%
FF-40L	5000	59.1%
FF1F-0	8500	100%
FF2F-0	8520	100.7%
FF1F-10L	3187	37.7%
FF2F-10L	3287	38.9%
FF1F-20L	4038	47.7%
FF2F-20L	4042	47.8%
FF1F-30L	4641	54.9%
FF2F-30L	4621	54.6%
FF1F-40L	3995	47.2%
FF2F-40L	3925	46.4%
FF1F-40Y	3145	37.2%
FF2F-40Y	3245	38.2%

[0203]

FF1F-50L	3230	38.4%
FF2F-50L	3830	45.3%
FF1F-60L	2720	32.2%
FF2F-60L	2920	34.5%
F(전장)L1F' -40L	3900	46.1%
F(전장)L1F' -40Y	3400	40.2%
F(전장)L1F' -50L	3010	35.6%
F(전장)L2F" -40L	3800	44.9%
F(전장)L2F" -40Y	3500	41.4%
F(전장)L2F" -50L	3100	36.6%

주: 엘록테이트는 마이오퍼타티브에 의해 시판 중인 제조합 VIII Fc 융합 단백질이다.
이것은 mPEG에 의해 변형되지 않는다.

[0204]

[0205] 실시예 3

[0206] 인간 인자 VIII의 역가 측정

[0207] 본 개시내용에서 사용되는 응고 인자 VIII 역가의 측정을 위한 검정은 또한 1-단계 응고 검정으로 지칭된다. 구체적인 단계는 중국 약전(2010년 버전)의 제2 파트를 참고한다. FVIII 생물학적 활성에 대한 1-단계 응고 분석은 응고 시간을 연장하기 위해 FVIII-결핍 혈장을 교정하는 능력에 기초한다. 지멘스(Siemens) 사(독일)의 키트 응고 인자 VIII 결핍 플라스마(카탈로그 번호 OTXW17)를 사용하였다. 검정은 다음과 같이 수행되었다: 먼저, 공지된 역가를 가진 표준 물질 WHO 국제 표준 제8 국제 표준 표준 인자 VIII 농축물(카탈로그 번호 07/350)을 4 IU/mL로 희석하고, 이어서 구매 희석하여 상이한 역가(IU/mL)에 도달하고; 이들의 표준 샘플을 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간(APTT)을 측정하기 위해 FVIII 결핍 혈장과 혼합하고; 상응하는 응고 시간(초)의 로그에 대한 FVIII 활성 표준 용액의 역가(IU/mL)의 로그의 선형 회귀를 사용하여 표준 곡선을 설정하고; 이어서, 시험할 샘플을 희석하고, FVIII 결핍 혈장과 혼합하고, APTT 측정을 수행하였다. 표준 곡선에 정합함으로써, FVIII 샘플의 효능을 측정할 수 있고, FVIII 샘플의 IU/mg 단위의 특정 활성을 계산할 수 있다. 결과는 표 4에 제시된다.

[0208] [표 4]

[0209] 1-단계 응고 검정에 의한 생물학적 활성의 직접 측정

명칭	1-단계 응고에 의해 측정된 FVIII의 생물학적 활성 (IU/mg)	엘록테이트에 대한 상대 활성
엘록테이트	7933	100%
FF-0	8200	103%
FF-5L	7400	93.3%
FF-10L	7000	88.2%
FF-20L	6400	80.7%
FF-30L	5800	73.1%
FF-40L	4800	60.5%
FF1F-0	8200	103.4%
FF2F-0	8300	104.6%
FF1F-10L	3075	38.8%
FF2F-10L	3075	38.8%
FF1F-20L	4046	51.0%
FF2F-20L	4026	50.8%
FF1F-30L	4590	57.9%
FF2F-30L	4520	57.0%
FF1F-40L	3995	50.4%
FF2F-40L	3925	49.5%
FF1F-40Y	3145	39.6%
FF2F-40Y	3245	40.9%

[0210]

FF1F-50L	3230	40.7%
FF2F-50L	3220	40.6%
FF1F-60L	2720	34.3%
FF2F-60L	3220	40.6%
F(전장)L1F' -40L	3900	49.2%
F(전장)L1F' -40Y	3200	40.3%
F(전장)L1F' -50L	3100	39.1%
F(전장)L2F" -40L	3800	47.9%
F(전장)L2F" -40Y	3000	37.8%
F(전장)L2F" -50L	3200	40.3%

[0211]

[0212]

표 3 및 표 4는 색원체 기질 검정에 의해 측정된 FL1F-40Y, FL2F-40Y, F(전장)L1F'-40Y 및 F(전장)L2F"-40Y의 생물학적 활성을 나타낸다. 1-단계 응고 검정은 mPEG 변형이 없는 엘록테이트/FL1F-0/FL2F-0보다 낮다. 이는 변형된 단백질의 공간 구조에 대한 mPEG 변형의 효과에 기인하고, 종래 기술의 다른 mPEG-변형된 단백질(예컨대, PEG-INTRON, 페그필그라스팁)은 유사한 결과를 나타낸다. 예기치 않게, 40 kD 이상의 mPEG로 변형된 FVIII Fc 융합 단백질은 여전히 상대적으로 높은 활성을 유지할 수 있다. 또한, 후속 실험은 이러한 단백질의 반감기가 크게 연장됨을 추가로 확인하였다.

[0213]

실시예 4

[0214]

혈우병 A 마우스의 꼬리 정맥 절개 출혈 모델을 사용하는 약력학 시험

[0215]

본 실시예에서, 혈우병 A 마우스(HA 마우스)에서 mPEG-변형된 hFVIII 융합 단백질 각각의 반감기를 꼬리 정맥 절개(TVT) 실험에 의해 비교하였다.

[0216]

4.1. 문헌에 보고된 방법에 따라서, 10 내지 12주령의 수컷 HA 마우스[상하이 서던 모델 바이오로지컬 리서치 센터(Shanghai Southern Model Biological Research Center)에서 구입함]를 무작위로 군 당 12마리 마우스의 군으로 나누었다. 마우스에 각각 15 IU/kg의 투약량으로 꼬리 정맥을 통해 약물, 즉 본 개시내용의 mPEG-변형된 융합 단백질 또는 양성 대조군 엘록테이트를 투여하였다. 약물 투여 48시간 후, 꼬리를 측정하여 2.7 mm 내径의 캐놀라로 표시하고, 좌측 정맥을 11개의 직선형 수술용 칼날로 절개하였다. 절개 후, 꼬리를 미리 데운 13 mL의 식염수를 함유하는 튜브에 즉시 넣고, 출혈 시간을 기록하였다. 출혈이 멈춘 후(절개로 인한 혈류가 뚜렷하지 않음), 식염수 튜브에서 마우스의 꼬리를 제거하고, 이어서 마우스를 37℃의 가열 패드에 위치시켜 상처를 건드리지 않도록 주의하면서 체온을 유지하였다. 마우스가 깨어난 후, 바닥에 흰 종이가 있는 우리에 넣고, 각각의 동물을 단일 우리에 넣었다. 출혈 정도를 측정하기 위해 각각의 관찰 후 백지 또는 우리를 교체하였다. 꼬리 절개 후 48시간 이내의 마우스의 생존율 및 12시간 이내의 재출혈 횟수를 계수하였다(총 12시간 계수하고, 1시간 이내의 다중 출혈을 1회 출혈로 계수함). 결과는 표 5에 제시된다.

[0217]

재출혈률은 실험 기간 동안 재출혈이 발생한 마우스의 비율을 지칭한다. 중증 출혈률은 12시간 내에 중증 출혈(+++) 또는 다중 중등도 출혈(++)이 있는 마우스의 비율을 지칭한다. 이들 중 중등도 출혈(++)은 30% 이상의 도포 면적을 갖는 백지 상의 많은 혈액 얼룩이 존재하지만, 큰 면적(면적 > 3 cm²)의 혈액 풀이 존재하지 않는 경우를 지칭하고, 중증 출혈(+++)은 30% 이상의 도포 면적을 갖는 백지 상의 많은 혈액 얼룩이 존재하고, 혈액 얼룩의 색이 진하고, 큰 면적의 혈액 풀이 존재하는 경우를 지칭하고; 일부 경우에, 도포 면적이 적더라도, 마우스가 많은 혈액을 잃고 운동 범위가 감소되고 백지가 심각하게 피로 젖은 경우, 중증 출혈을 갖는 것으로 계수할 수 있다.

[0218]

[표 5]

[0219] 약물 투여 48시간 후 TVT 실험에서 48시간 생존율 및 12시간 재출혈률

명칭	12 시간 재출혈률	중증 출혈률	48 시간 생존률
엘록테이트	66.7% (8/12)	16.7% (2/12)	75.0% (9/12)
FL1F-0	83.3% (10/12)	33.3% (4/12)	25.0% (3/12)
FL1F-20L	83.3% (10/12)	33.3% (4/12)	41.7% (5/12)
FL1F-40L	66.7% (8/12)	16.7% (2/12)	75.0% (9/12)
FL1F-40Y	58.3% (7/12)	8.3% (1/12)	83.3% (10/12)
FL1F-50L	75.0% (9/12)	25.0% (3/12)	58.3% (7/12)
FL1F-60L	66.7% (8/12)	25.0% (3/12)	66.7% (8/12)
FL2F-0	83.3% (10/12)	33.3% (4/12)	33.3% (4/12)
FL2F-20L	75.0% (9/12)	25.0% (3/12)	41.6% (5/12)
FL2F-40L	75.0% (9/12)	16.7% (2/12)	66.7% (8/12)
FL2F-40Y	63.3% (7/11)	9.1% (1/11)	81.8% (9/11)
FL2F-50L	66.7% (8/12)	16.7% (2/12)	58.3% (7/12)
FL2F-60L	66.7%(8/12)	25.0% (3/12)	50.0% (6/12)
F(전장)L1F' -40L	75.0% (9/12)	16.7% (2/12)	66.7% (8/12)
F(전장)L1F' -40Y	66.7 (8/12)	8.3% (1/12)	83.3% (10/12)
F(전장)L1F' -50L	66.7% (8/12)	25.0% (3/12)	50.0% (6/12)
F(전장)L2F'' -40L	75.0% (9/12)	8.3% (1/12)	58.3% (7/12)
F(전장)L2F'' -40Y	58.3% (7/12)	8.3% (1/12)	83.3% (10/12)
F(전장)L2F'' -50L	75.0% (9/12)	16.7% (2/12)	58.3% (7/12)

[0220]

[0221] 결과는 mPEG 변형이 없는 엘록테이트/FL1F-0/FL2F-0 군과 비교하여 FL1F-40Y 군, FL2F-40Y 군, F(전장)L1F'-40Y 군 및 F(전장)L2F''-40Y 군이 각각 다른 군보다 유의하게 높은 83.3%, 75.0%, 83.3% 및 83.3%의 생존율을 가짐을 나타낸다. 또한, 이러한 군은 다른 군에 비교하여 유의하게 낮은 12시간 재출혈률 및 낮은 중증 출혈률을 갖는다. 따라서, FL1F-40Y, FL2F-40Y, F(전장)L1F'-40Y 및 F(전장)L2F''-40Y는 혈우병 A 마우스의 꼬리 정맥 절개 모델에서 더 긴 보호 시간을 제공한다.

[0222] 4.2. 4.1.에 기술된 동일한 방법을 사용하여 약물 투여 84시간 후에 10 내지 12주령 수컷 HA 마우스(군 당 12 마리 마우스)에 대해 TVT 실험을 수행하였다. 결과는 표 6에 제시된다.

[0223] [표 6]

[0224] 약물 투여 48시간 후 TVT 실험에서 48시간 생존율 및 12시간 재출혈률

명칭	48 시간 생존률	12 시간 재출혈률
엘록테이트	66.7% (8/12)	83.3% (10/12)
FL1F-40L	50% (6/12)	83.3% (10/12)
FL2F-40L	58.3% (7/12)	91.7% (11/12)
FL1F-40Y	66.7% (8/12)	75.0% (9/12)
FL2F-40Y	75.0% (9/12)	75.0% (9/12)
FL1F-50L	50% (6/12)	100% (12/12)
FL2F-50L	33.3% (4/12)	100% (12/12)
FL1F-60L	58.3% (7/12)	83.3% (10/12)
FL2F-60L	41.7% (5/12)	83.3% (10/12)
F(전장)L1F' -40L	66.7% (8/12)	75.0% (9/12)
F(전장)L1F' -40Y	75.0% (9/12)	66.7% (8/12)
F(전장)L1F' -50L	58.3% (7/12)	91.7% (11/12)
F(전장)L2F'' -40L	41.7% (5/12)	91.7% (11/12)
F(전장)L2F'' -40Y	75.0% (9/12)	75.0% (9/12)
F(전장)L2F'' -50L	58.3% (7/12)	91.7% (11/12)

[0225]

[0226] 결과는 엘록테이트 및 PEG 변형이 없는 다른 군과 비교하여 FL1F-40Y 군, FL2F-40Y 군, F(전장)L1F'-40Y 군 및 F(전장)L2F''-40Y 군이 각각 다른 군보다 유의하게 높은 66.7%, 75.0%, 75.0% 및 75.0%의 생존율을 갖고, 재출혈률이 유의하게 감소됨을 나타낸다. 따라서, FL1F-40Y, FL2F-40Y, F(전장)L1F'-40Y 및 F(전장)L2F''-40Y는 약물 투여 84시간 후 혈우병 A 마우스의 꼬리 정맥 절개 모델에서 출혈을 예방하는 데 특정 효과를 여전히 나타낸다.

[0227] 4.3. 4.1.에 기술된 동일한 방법을 사용하여 약물 투여 90시간 후에 10 내지 12주령 HA 마우스 20마리(10마리 수컷, 10마리 암컷)/군에 대해 TVT 실험을 수행하였다. 결과는 표 7에 제시된다.

[0228] [표 7]

[0229] 약물 투여 90시간 후 TVT 실험에서 48시간 생존율 및 12시간 재출혈률

명칭	48 시간 생존률	12 시간 재출혈률
엘록테이트	70%	80%
FL1F-40L	55%	70%
FL2F-40L	63.2%	73.68%
FL1F-50L	84.2%	68.4%
FL2F-50L	40%	90%

[0230]

[0231] 결과는 FL1F-50L이 PEG 변형이 없는 엘록테이트 군과 비교하여 유사한 생존율 및 재출혈률을 가짐을 나타낸다. 실험 동물은 단일 성별이 아니므로, 실험 결과는 다른 단일 성별 실험과 비교되지 않는다.

[0232] 4.4. 4.1.에 기술된 동일한 방법을 사용하여 약물 투여 96시간 후에 10 내지 12주령 수컷 HA 마우스, 12마리

마우스/군에 대한 TVT 실험을 수행하였다. 결과는 표 8에 제시된다.

[표 8]

약물 투여 96시간 후 TVT 실험에서 48시간 생존율 및 12시간 재출혈률

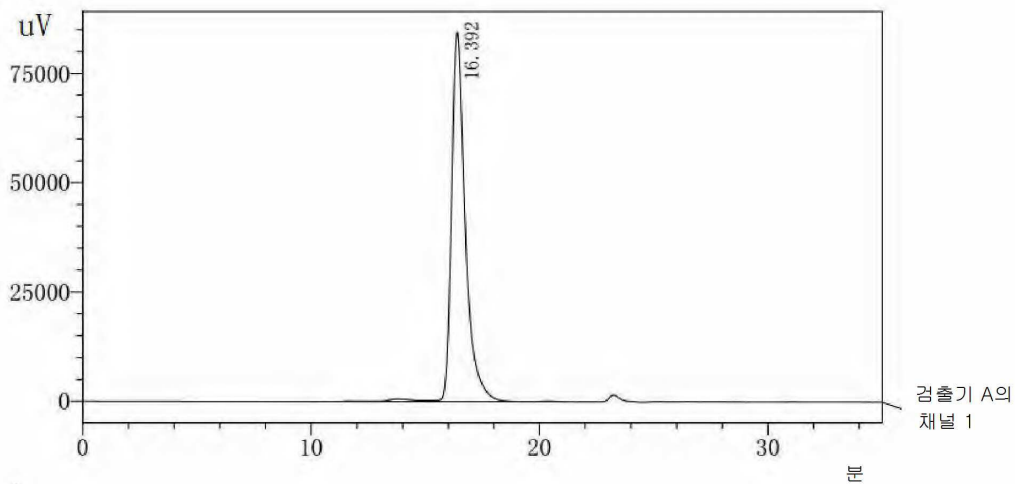
명칭	48 시간 생존율	12 시간 재출혈률
엘록테이트	50%	91.7%
FL1F-30Y	8.3%	91.7%
FL2F-30Y	16.7%	83.3%
FL1F-40Y	63.6%	54.5%
FL2F-40Y	54.5%	54.5%
FL1F-50L	16.7%	91.7%
FL2F-50L	25.0%	83.3%

결과는 PEG 변형이 없는 엘록테이트 군과 비교하여 FL1F-40Y/FL2F-40Y는 약간 개선된 생존율을 갖고, 12시간 재출혈률을 유의하게 감소시켰다. FL1F-40Y/FL2F-40Y는 다른 군과 비교하여 유의하게 개선된 생존율 및 다른 군과 비교하여 유의하게 감소된 12시간 재출혈률을 가졌다. 따라서, FL1F-40Y/FL2F-40Y 군은 혈우병 A 마우스의 꼬리 정맥 절개 모델에서 다른 군보다 긴 예방 시간을 가진다.

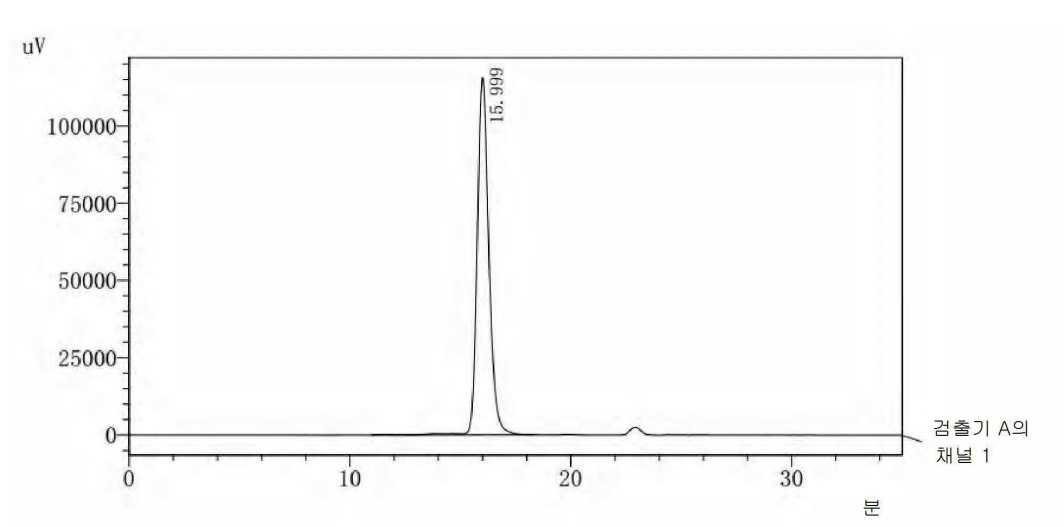
상기 내용은 본 개시내용의 바람직한 양태일 뿐이고, 본 개시내용을 제한하려는 의도는 아니다. 본 개시내용의 사상 및 원리 내에서 이루어진 모든 변형, 동등한 대체 또는 개선은 본 개시내용의 보호 범위에 포함되어야 한다.

도면

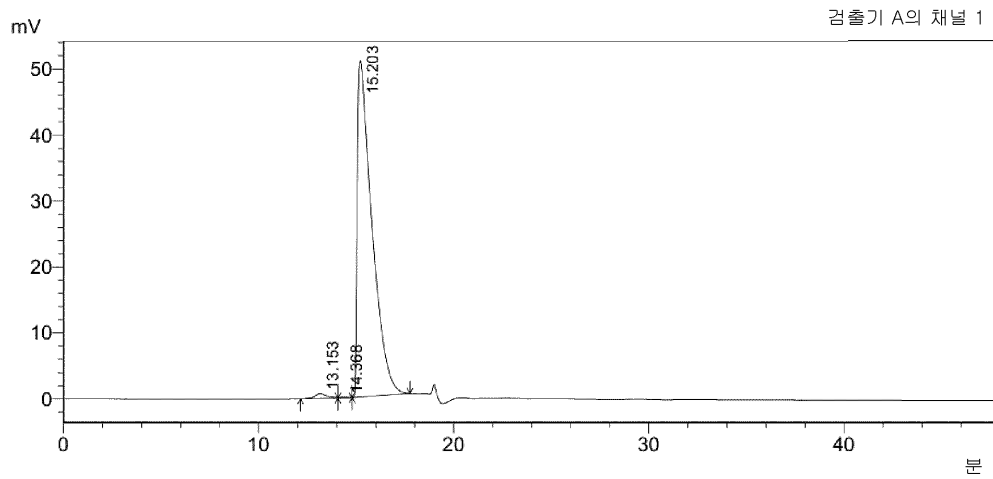
도면1a



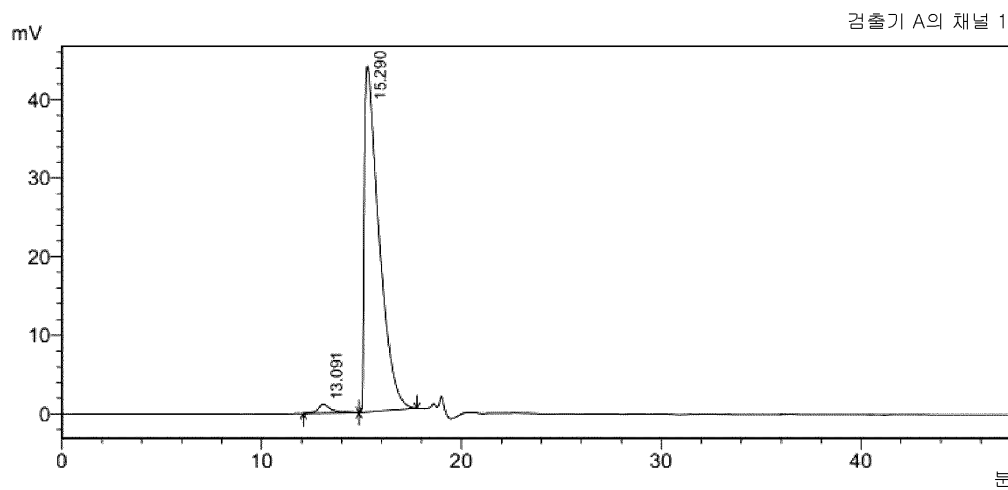
도면1b



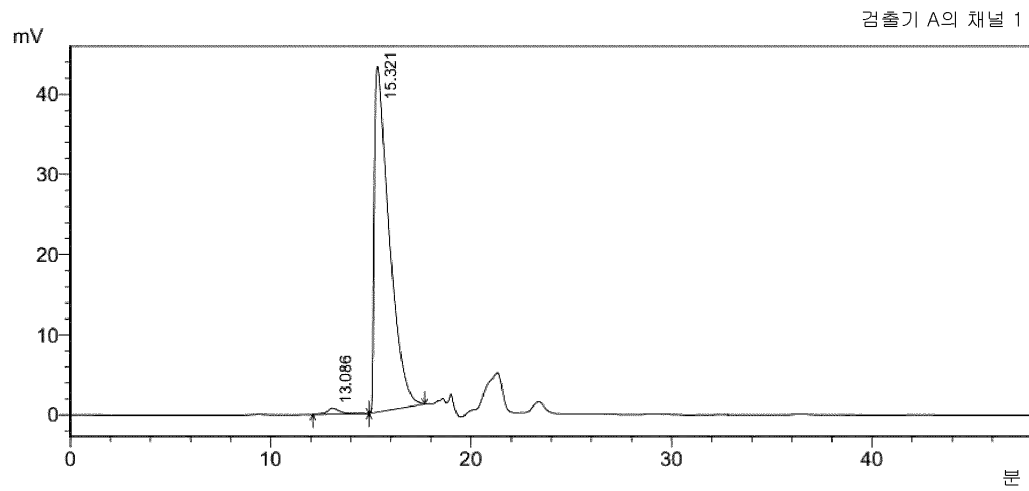
도면1c



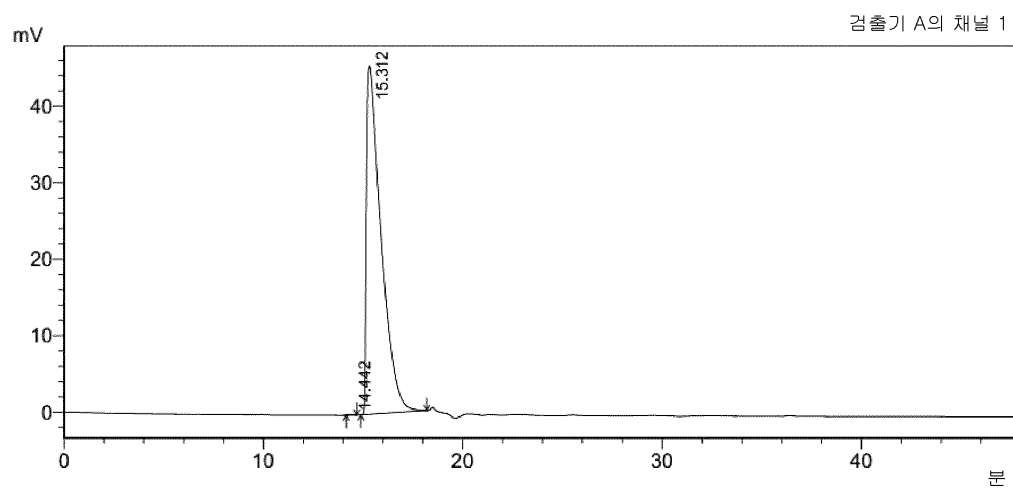
도면1d



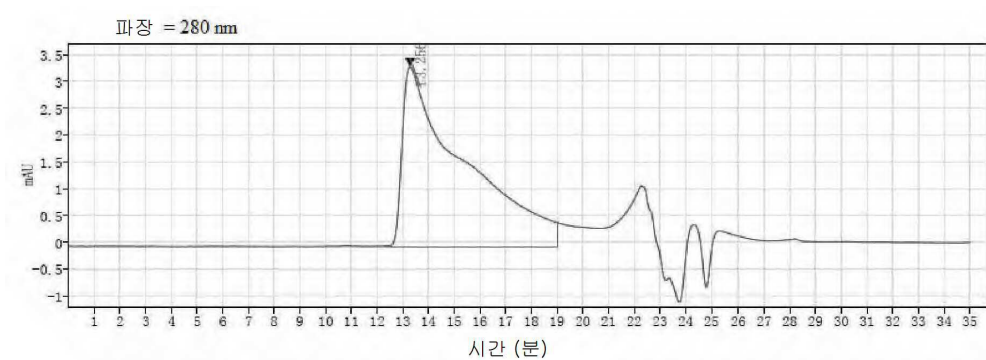
도면1e



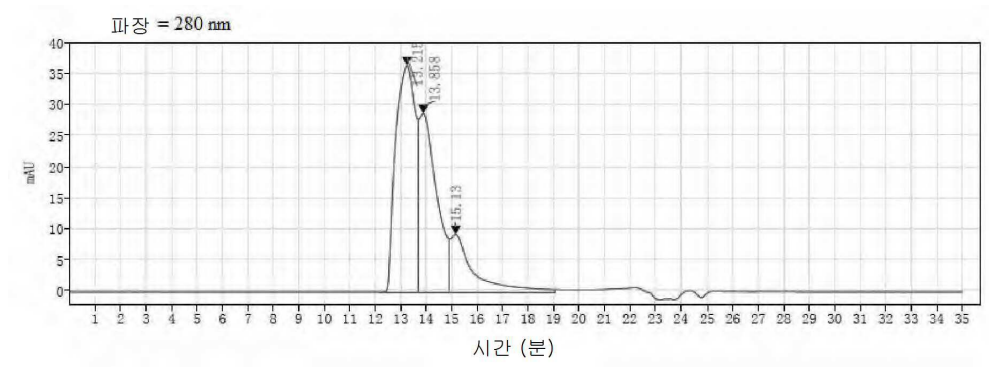
도면1f



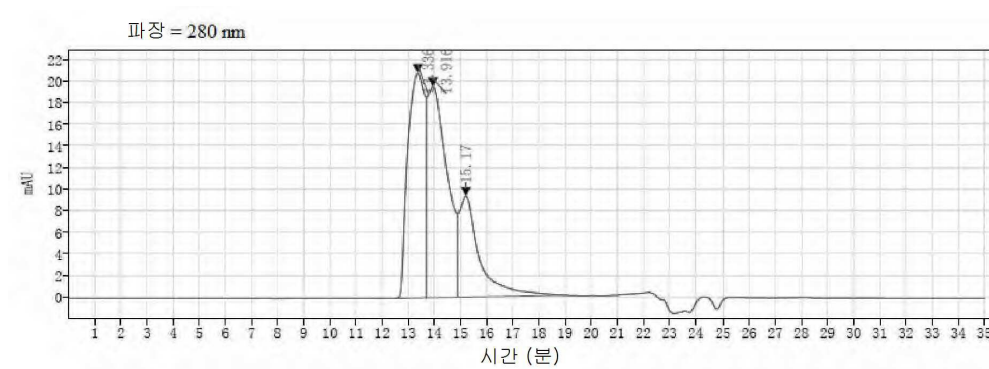
도면2a



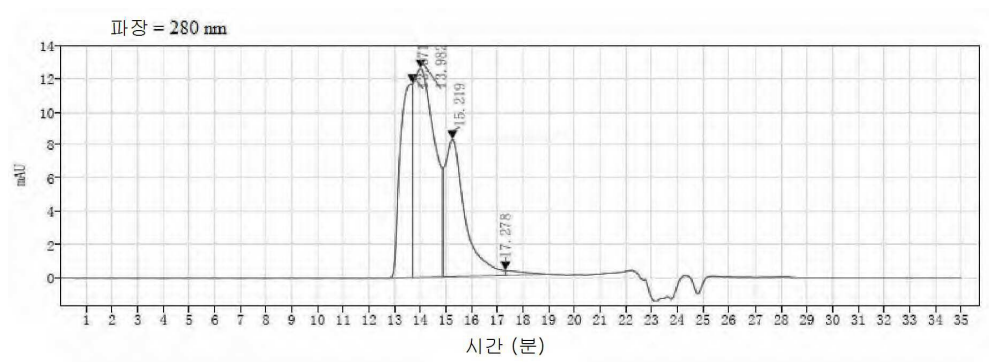
도면2b



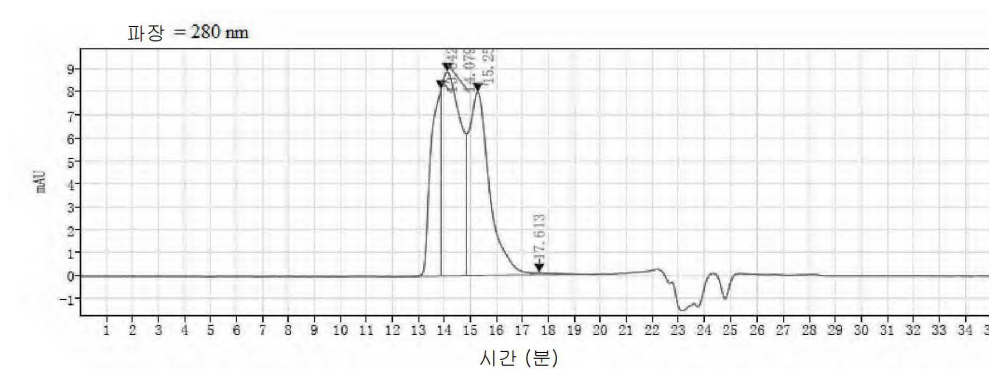
도면2c



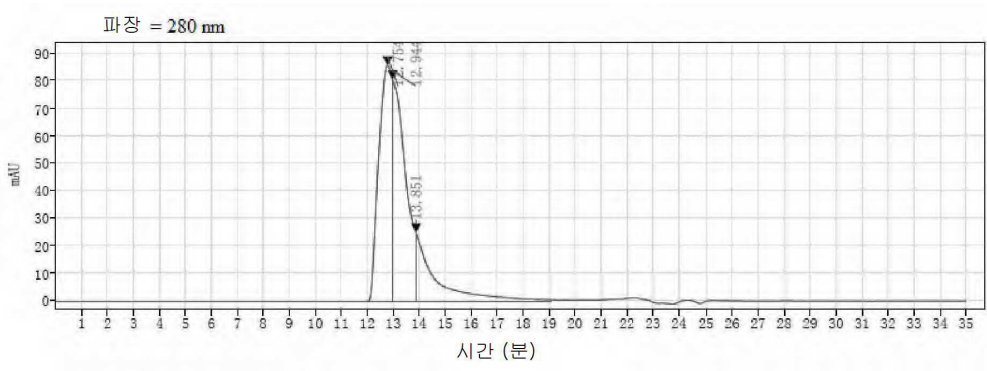
도면2d



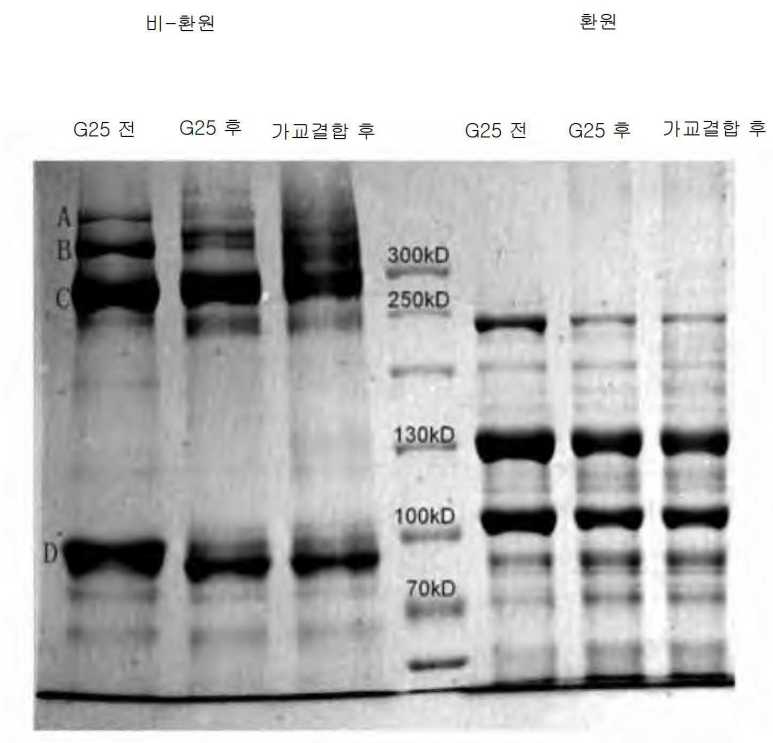
도면2e



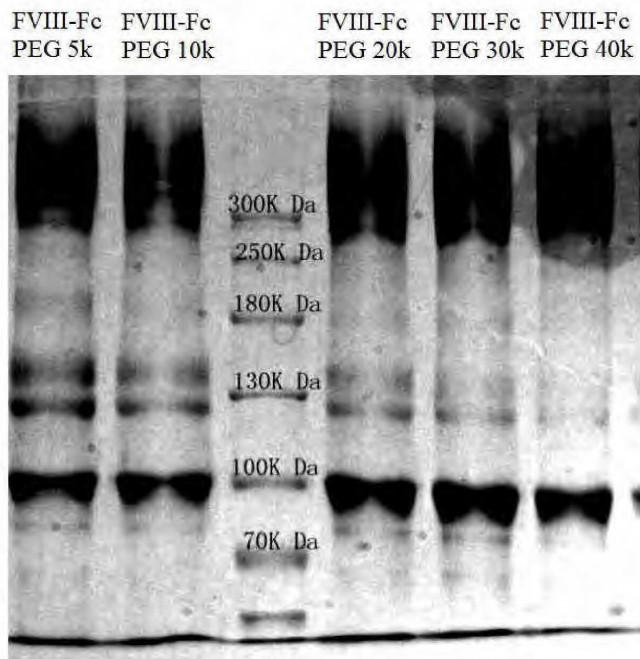
도면2f



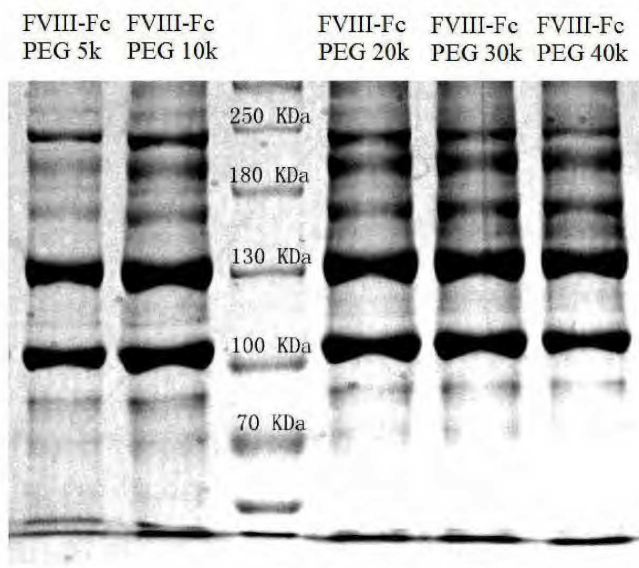
도면3a



도면3b



도면3c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ZHENGZHOU GENSCIENCES INC.

<120> IMPROVED FVIII FUSION PROTEIN AND USE THEREOF

<130> OP2019-XX-0320

<140> PCT/CN2019/087156

<141> 2019-05-16

<150> CN 201810481941.X

<151> 2018-05-18

<160> 15

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 2332

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr

1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro

20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys

35 40 45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala

100 105 110

Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val

115 120 125

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn

130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190
His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp

195 200 205
His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser

210 215 220
Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg

225 230 235 240
Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His

245 250 255
Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu

260 265 270
Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile

275 280 285
Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly

290 295 300
Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met

305 310 315 320
Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg

325 330 335
Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp

340 345 350
Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe

355 360 365
Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His

370 375 380
Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu

385 390 395 400
Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro

405 410 415
Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr

420 425 430

Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
 435 440 445
 Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
 450 455 460
 Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile

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

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

 595 600 605
 Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
 610 615 620
 Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
 625 630 635 640
 Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
 645 650 655
 Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro

 660 665 670
 Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp

675 680 685
 Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
 690 695 700
 Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
 705 710 715 720
 Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala

725 730 735
 Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Arg
 740 745 750
 Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys
 755 760 765
 Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn
 770 775 780
 Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro

785 790 795 800
 His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe
 805 810 815
 Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser
 820 825 830
 Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val
 835 840 845
 Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly

850 855 860
 Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser
 865 870 875 880
 Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala
 885 890 895
 Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His
 900 905 910
 Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro

915 920 925

Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp
 930 935 940
 Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp
 945 950 955 960
 Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys
 965 970 975
 Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys
 980 985 990
 Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala
 995 1000 1005
 Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu
 1010 1015 1020
 Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu
 1025 1030 1035
 Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp
 1040 1045 1050
 Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr
 1055 1060 1065
 Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly
 1070 1075 1080
 Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys
 1085 1090 1095
 Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His
 1100 1105 1110
 Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln
 1115 1120 1125
 Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe
 1130 1135 1140
 Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr
 1145 1150 1155
 Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn

1160	1165	1170
Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp	Asn Leu His Glu Asn	Asn Thr His
1175	1180	1185
Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln	Glu Glu Ile Glu Lys	Lys Glu Thr
1190	1195	1200
Leu Ile Gln Glu Asn Val Val	Leu Pro Gln Ile His	Thr Val Thr
1205	1210	1215
Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys	Asn Leu Phe Leu Leu	Ser Thr Arg

1220	1225	1230
Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr	Asp Gly Ala Tyr Ala	Pro Val Leu
1235	1240	1245
Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn	Asp Ser Thr Asn Arg	Thr Lys Lys
1250	1255	1260
His Thr Ala His Phe Ser Lys	Lys Gly Glu Glu Glu	Asn Leu Glu
1265	1270	1275
Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys	Gln Ile Val Glu Lys	Tyr Ala Cys

1280	1285	1290
Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn	Thr Ser Gln Gln Asn	Phe Val Thr
1295	1300	1305
Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu	Lys Gln Phe Arg Leu	Pro Leu Glu
1310	1315	1320
Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg	Ile Ile Val Asp Asp	Thr Ser Thr
1325	1330	1335
Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys	His Leu Thr Pro Ser	Thr Leu Thr

1340	1345	1350
Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys	Glu Lys Gly Ala Ile	Thr Gln Ser
1355	1360	1365
Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr	Arg Ser His Ser Ile	Pro Gln Ala
1370	1375	1380
Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile	Ala Lys Val Ser Ser	Phe Pro Ser
1385	1390	1395

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

1400 1405 1410

Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val

1415 1420 1425

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

1430 1435 1440

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

1445 1450 1455

Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys

1460 1465 1470

Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr

1475 1480 1485

Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys

1490 1495 1500

Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu

1505 1510 1515

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

1520 1525 1530

Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg

1535 1540 1545

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

1550 1555 1560

Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu

1565 1570 1575

Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys

1580 1585 1590

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

1595 1600 1605

Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu

1610 1615 1620

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

1625 1630 1635
Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr

1640 1645 1650
Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile

1655 1660 1665
Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp

1670 1675 1680
Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr

1685 1690 1695
Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser

1700 1705 1710
Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro

1715 1720 1725
Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe

1730 1735 1740
Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu

1745 1750 1755
Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val

1760 1765 1770
Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser

1775 1780 1785
Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg

1790 1795 1800
Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys

1805 1810 1815
Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys

1820 1825 1830
Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His

1835 1840 1845
Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu

1850 1855 1860

Asn Pro	Ala His Gly Arg Gln	Val Thr Val Gln Glu	Phe Ala Leu
1865	1870	1875	
Phe Phe	Thr Ile Phe Asp Glu	Thr Lys Ser Trp Tyr	Phe Thr Glu
1880	1885	1890	
Asn Met	Glu Arg Asn Cys Arg	Ala Pro Cys Asn Ile	Gln Met Glu
1895	1900	1905	
Asp Pro	Thr Phe Lys Glu Asn	Tyr Arg Phe His Ala	Ile Asn Gly
1910	1915	1920	
Tyr Ile	Met Asp Thr Leu Pro	Gly Leu Val Met Ala	Gln Asp Gln
1925	1930	1935	
Arg Ile	Arg Trp Tyr Leu Leu	Ser Met Gly Ser Asn	Glu Asn Ile
1940	1945	1950	
His Ser	Ile His Phe Ser Gly	His Val Phe Thr Val	Arg Lys Lys
1955	1960	1965	
Glu Glu	Tyr Lys Met Ala Leu	Tyr Asn Leu Tyr Pro	Gly Val Phe
1970	1975	1980	
Glu Thr	Val Glu Met Leu Pro	Ser Lys Ala Gly Ile	Trp Arg Val
1985	1990	1995	
Glu Cys	Leu Ile Gly Glu His	Leu His Ala Gly Met	Ser Thr Leu
2000	2005	2010	
Phe Leu	Val Tyr Ser Asn Lys	Cys Gln Thr Pro Leu	Gly Met Ala
2015	2020	2025	
Ser Gly	His Ile Arg Asp Phe	Gln Ile Thr Ala Ser	Gly Gln Tyr
2030	2035	2040	
Gly Gln	Trp Ala Pro Lys Leu	Ala Arg Leu His Tyr	Ser Gly Ser
2045	2050	2055	
Ile Asn	Ala Trp Ser Thr Lys	Glu Pro Phe Ser Trp	Ile Lys Val
2060	2065	2070	
Asp Leu	Leu Ala Pro Met Ile	Ile His Gly Ile Lys	Thr Gln Gly
2075	2080	2085	
Ala Arg	Gln Lys Phe Ser Ser	Leu Tyr Ile Ser Gln	Phe Ile Ile

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

Gln Asp Leu Tyr

2330

<210> 2

<211> 1438

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr

1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro

20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys

35 40 45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala

100 105 110

Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val

115 120 125

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn

130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp

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

Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
 450 455 460
 Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
 465 470 475 480

 Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
 485 490 495
 His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
 500 505 510
 Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
 515 520 525
 Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
 530 535 540

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

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

 Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
 675 680 685
 Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala

690	695	700	
Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu			
705	710	715	720
Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala			
725	730	735	
Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His			
740	745	750	
Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile			
755	760	765	
Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp			
770	775	780	
Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys			
785	790	795	800
Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly			
805	810	815	
Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser			
820	825	830	
Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser			
835	840	845	
Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu			
850	855	860	
Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr			
865	870	875	880
Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile			
885	890	895	
Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe			
900	905	910	
Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His			
915	920	925	
Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe			
930	935	940	

Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro
945 950 955 960
Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln
965 970 975
Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr
980 985 990

Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro
995 1000 1005
Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg
1010 1015 1020
Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu
1025 1030 1035
Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met
1040 1045 1050

Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val
1055 1060 1065
Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn
1070 1075 1080
Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys
1085 1090 1095
Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His
1100 1105 1110

Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln
1115 1120 1125
Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile
1130 1135 1140
Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg
1145 1150 1155
Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro
1160 1165 1170

Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His

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

Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu

1415 1420 1425

Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr

1430 1435

<210> 3

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 4

<211> 223

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

50 55 60
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 85 90 95
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 100 105 110
 Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

115 120 125
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
165 170 175
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
180 185 190
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu
195 200 205
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220
<210> 5
<211> 229
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45
Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

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

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide segment

<400> 6

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 7

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide segment

<400> 7

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide segment

<400> 8

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 9

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide segment

<400> 9

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser

35

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide segment

<400> 10

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 11

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rigid peptide segment

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln

<210> 12

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rigid peptide segment

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rigid peptide segment

<400> 13

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser

1 5 10

<210> 14

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rigid peptide segment

<400> 14

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

1 5 10

<210> 15

<211> 55

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Lys

20 25 30

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser

35 40 45

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

50 55