



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월10일

(11) 등록번호 10-2373215

(24) 등록일자 2022년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/64 (2006.01) A61K 38/48 (2006.01)
 A61K 47/18 (2017.01) A61K 47/26 (2017.01)
 A61K 9/19 (2006.01) A61P 7/02 (2006.01)
 C07K 1/18 (2006.01) C07K 1/20 (2006.01)
 C07K 1/22 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 9/6432 (2013.01)
 A61K 38/4846 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7000840

(22) 출원일자(국제) 2017년06월19일

심사청구일자 2020년04월22일

(85) 번역문제출일자 2019년01월09일

(65) 공개번호 10-2019-0019134

(43) 공개일자 2019년02월26일

(86) 국제출원번호 PCT/US2017/038169

(87) 국제공개번호 WO 2017/219034

국제공개일자 2017년12월21일

(30) 우선권주장

62/351,841 2016년06월17일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20150025011 A1

WO2014116275 A1

US5589571 A

Protein Science, 2009, Vol.18, pp.1023-1032

(73) 특허권자

포틀라 파마슈티컬스, 인코포레이티드

미국 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 슈트 22 그랜드 애비뉴 270 이. (우편번호: 94080)

(72) 발명자

카바즈 마크

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 이스트 그랜드 애비뉴 270 스위트 22 포틀라 파마슈티컬스, 인코포레이티드 씨/오

콘리 파멜라 비

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 이스트 그랜드 애비뉴 270 스위트 22 포틀라 파마슈티컬스, 인코포레이티드 씨/오

루 건민

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 이스트 그랜드 애비뉴 270 스위트 22 포틀라 파마슈티컬스, 인코포레이티드 씨/오

(74) 대리인

특허법인코리아나

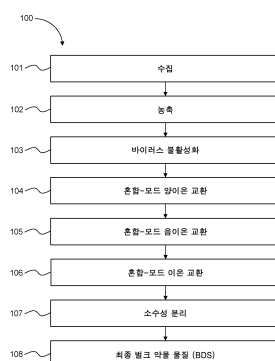
전체 청구항 수 : 총 39 항

심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 인자 Xa 유도체의 제조

(57) 요약

본 발명은 fXa 유도체 단백질을 대규모로 제조하여 고순도의 단백질 산물을 고효율로 얻을 수 있는 방법을 제공한다. 본 방법은 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 작제물을 함유하는 샘플에 계면활성제를 첨가하는 단계, 및 상기 단백질을 대두 트립신 저해제(STI)-계 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 및 혼합 모드 크로마토그래피 및 소수성 결합을 통하여 정제하는 단계를 포함할 수 있다.

대표도 - 도1

(52) CPC특허분류

A61K 47/183 (2013.01)

A61K 47/26 (2013.01)

A61K 9/19 (2013.01)

A61P 7/02 (2018.01)

C07K 1/18 (2013.01)

C07K 1/20 (2013.01)

C07K 1/22 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열 번호 7의 핵산 서열, 또는 서열 번호 7에 의해 암호화되는 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 작제물로부터 발현되는 폴리펩티드 산물의 제조 방법으로서,

상기 폴리뉴클레오타이드 작제물 및 상기 폴리뉴클레오타이드 작제물로부터 발현된 폴리펩티드 산물을 포함하는 샘플에 계면활성제를 첨가하는 단계;

상기 샘플을 대두 트립신 저해제 (STI)-계 친화성 크로마토그래피에 로딩하고, 상기 폴리펩티드를 제1 용출 버퍼로 용출하여 제1 용출된 샘플을 생성하는 단계로서, 상기 로딩된 샘플은 유기 용매를 포함하지 않는, 단계;

상기 제1 용출된 샘플을 이온 교환 및 혼합 모드 크로마토그래피에 로딩하고, 상기 폴리펩티드를 적어도 1M의 무기염을 포함하는 제2 용출 버퍼로 용출하여 제2 용출된 샘플을 생성하는 단계; 및

상기 제2 용출된 샘플을 소수성 결합 크로마토그래피에 로딩하고, 적어도 2mM 염화나트륨을 포함하는 제3 용출 버퍼로 상기 폴리펩티드를 용출하고, 이로 인하여 상기 폴리펩티드 산물을 포함하는 정제된 샘플을 제조하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 계면활성제는 트리톤 X-100 (폴리에틸렌 글리콜 p-(1,1,3,3-테트라메틸부틸)-페닐 에테르)를 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제1 용출 버퍼는 0.5M 내지 2M 아르기닌을 포함하는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 제1 용출 버퍼는 5 내지 5.4 의 pH를 갖는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 이온 교환 및 혼합 모드 크로마토그래피는 세라믹 히드로아파타이트 유형 I 크로마토그래피를 포함하는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 제2 용출 버퍼는 적어도 2M의 무기염을 포함하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 무기염은 염화나트륨인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 소수성 결합 크로마토그래피는 옥틸 세파로오스 크로마토그래피를 포함하는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 음이온 교환 크로마토그래피에 의한 정제 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 음이온 교환 크로마토그래피는 Sartobind™ 이온 교환막을 포함하는, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 하나 이상의 샘플을 나노플리스(nanofleece) 필터로 여과하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 나노플리스 필터에 의한 여과는 샘플을 STI-계 친화성 크로마토그래피에 로딩하기 전에 실시되는, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 정제된 샘플은 상기 폴리뉴클레오티드 작제물에 의해 발현되지 않는 오염 단백질을 적어도 1% 미만으로 포함하는, 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 폴리펩티드 산물은 상기 폴리뉴클레오티드 작제물을 포함하는 세포 내에서 발현되는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 세포는 배지 1리터 당 적어도 100mg의 폴리펩티드 산물을 생산하는 조건 하의 배지 중에서 성장하는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 세포는 배지 1리터 당 적어도 200mg의 폴리펩티드 산물을 생산하는 조건 하의 배지 중에서 성장하는, 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 정제된 샘플은 배지에서 생산된 폴리펩티드 산물의 50% 초과를 포함하는, 방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 정제된 샘플은 배지에서 생산된 각각의 1리터로부터 100mg 초과 폴리펩티드 산물을 함유하는, 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 폴리펩티드 산물은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 2-사슬 폴리펩티드인, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 정제된 샘플 중의 폴리펩티드 산물의 20% 내지 50%가 서열 번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄를 갖는, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 서열 번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄의 5%-95%가 2개의 0-연결 당화를 갖고, 서열 번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄의 5%-95%가 하나의 0-연결 당화를 갖는, 방법.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 정제된 샘플 중의 폴리펩티드 산물의 40%-80%가 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄를 갖는, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄의 적어도 90%는 하나의 0-연결 당화를 갖는, 방법.

청구항 24

제19항에 있어서, 상기 정제된 샘플 중의 폴리펩티드 산물의 2%-12%가 서열 번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄를 갖는, 방법.

청구항 25

제19항에 있어서, 상기 정제된 샘플 중의 폴리펩티드 산물의 0.1%-1.5%가 서열 번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄를 갖는, 방법.

청구항 26

제19항에 있어서, 상기 정제된 샘플 중의 폴리펩티드 산물의 2%-8%가 서열 번호 11의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄를 갖는, 방법.

청구항 27

제19항에 있어서, 상기 정제된 샘플 중의 폴리펩티드 산물의 35%-60%가 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄를 갖는, 방법.

청구항 28

경쇄 및 중쇄를 포함하는 복수의 2-사슬 폴리펩티드 및 치료적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 인자 Xa 저해제에 의한 항응고 치료를 받고 있는 환자에서 항응고를 역전시키거나 또는 저해하는데 사용하기 위한 약학적 조성물로서, 여기에서

경쇄는

35%-60% 의, 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄를 포함하고;

중쇄는

20%-60% 의, 서열 번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄;

20%-60% 의, 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄; 및

10% 미만의, 서열 번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 중쇄는 서열 번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 5% 미만으로 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 30

제28항에 있어서, 상기 중쇄는 서열 번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 3% 미만으로 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 31

제28항에 있어서, 상기 중쇄는 서열 번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 0.1%-1.5% 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 32

제28항에 있어서, 상기 중쇄는 서열 번호 11의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 2%-8% 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 33

제28항에 있어서, 서열 번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄의 30%-70%가 2개의 O-연결 당화를 갖는, 약학적 조성물.

청구항 34

제28항에 있어서, 서열 번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄의 30%-70%가 하나의 0-연결 당화를 갖는, 약학적 조성물.

청구항 35

제28항에 있어서, 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄의 적어도 90%가 하나의 0-연결 당화를 갖는, 약학적 조성물.

청구항 36

제28항에 있어서, 제제가 동결건조되는, 약학적 조성물.

청구항 37

제28항에 있어서, L-아르기닌 HCl 또는 L-아르기닌 아세테이트를 추가로 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 38

제28항에 있어서, 수크로오스를 추가로 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 39

제28항에 있어서, 만니톨을 추가로 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호-참고

[0002] 본 출원은 2016년 6월 17일자에 출원된 미국 가출원 일련번호 제62/351,841호의 이익을 주장하며, 이는 본 출원에 전체로서 참고된다.

배경 기술

[0003] fXa를 표적화하는 항응고제에 대한 해독제로서 유용한 인자 Xa (fXa) 단백질의 변형된 유도체가 개발되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 상기 유도체는 경구용 또는 주사용 인자 Xa 저해제에 의해 항응고되었으나 항응고 역전의 필요성이 있는 환자를 위한 보편적인 역전제(reversal agent)로서 개발 중이다.

과제의 해결 수단

[0005] 발명의 개요

[0006] 본 발명은 fXa 해독제 폴리펩티드를 대규모로 제조하여, 고순도 단백질 산물을 고수율로 제조하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 상기 방법은 서열 번호 7의 핵산 서열 또는 서열 번호 7에 의해 암호화되는 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 작제물로부터 발현되는 폴리펩티드 산물의 제조 방법을 제공한다. 상기 방법은 폴리뉴클레오티드 작제물을 포함하는

샘플에 계면활성제를 첨가하는 단계, 및 대두 트립신 저해제 (STI)-계 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 및 혼합 모드 크로마토그래피 및/또는 소수성 결합을 통해 상기 암호화된 해독제 단백질을 정제하는 단계를 포함할 수 있다.

- [0007] 일 구현예에서, 서열 번호 7의 핵산 서열 또는 서열 번호 7에 의해 암호화된 아미노산 서열에 적어도 90% 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 작제물로부터 발현되는 폴리펩티드 산물의 제조 방법을 제공하는데, 상기 방법은 폴리뉴클레오타이드 작제물 및 상기 폴리뉴클레오타이드 작제물로부터 발현된 폴리펩티드 산물을 함유하는 샘플에 계면활성제를 첨가하는 단계; 상기 샘플을 대두 트립신 저해제 (STI)-계 친화성 크로마토그래피에 로딩하고, 제1 용출 버퍼로 폴리펩티드를 용출하여 제1 용출 샘플을 생성하는 단계로서, 상기 로딩된 샘플은 유기 용매를 함유하지 않는 단계; 상기 제1 용출 샘플을 이온 교환 및 혼합 모드 크로마토그래피에 로딩하고, 적어도 1M의 무기염을 함유하는 제2 용출 버퍼로 상기 폴리펩티드를 용출하여, 제2 용출 샘플을 생성하는 단계; 및 상기 제2 용출 샘플을 소수성 결합 크로마토그래피에 로딩하고, 적어도 2mM 염화나트륨을 함유하는 제3 용출 버퍼로 상기 폴리펩티드를 용출함으로써, 상기 폴리펩티드 산물을 포함하는 정제된 샘플을 제조하는 단계를 포함한다.
- [0008] 일부 구현예에서, 면활성제는 트리톤 X-100 (폴리에틸렌 글리콜 p-(1,1,3,3-테트라메틸부틸)-페닐 에테르)를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 용출 버퍼는 0.5M 내지 2M 아르기닌을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 용출 버퍼는 약 5 내지 5.4의 pH를 갖는다. 일부 구현예에서, 이온 교환 및 혼합 모드 크로마토그래피는 세라믹 히드로아파타이트 유형 I 크로마토그래피를 포함한다.
- [0009] 일부 구현예에서, 제2 용출 버퍼는 적어도 2M의 무기염을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 무기염은 염화나트륨이다. 일부 구현예에서, 상기 소수성 결합 크로마토그래피는 옥틸 세파로오스 크로마토그래피를 포함한다.
- [0010] 일부 구현예에서, 상기 방법은 음이온 교환 크로마토그래피에 의한 정제 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 음이온 교환 크로마토그래피는 Sartobind™ 이온 교환막을 포함한다.
- [0011] 일부 구현예에서, 상기 방법은 하나 이상의 샘플을 나노플리스(nanofleece) 필터에 의해 여과시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 나노플리스 필터에 의한 여과는 샘플을 STI-계 친화성 크로마토그래피에 로딩하기 전에 이루어진다.
- [0012] 일부 구현예에서, 정제된 샘플은 폴리뉴클레오타이드 작제물에 의해 발현되지 않은 오염 단백질을 약 1% 미만으로 함유한다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드 산물은 폴리뉴클레오타이드 작제물을 함유하는 세포 내에서 발현된다. 일부 구현예에서, 세포는 배지 1 리터당 적어도 100mg의 폴리펩티드 산물을 생산하는 조건 하에 배지 중에서 성장한다. 일부 구현예에서, 세포는 배지 1 리터당 적어도 200mg의 폴리펩티드 산물을 생산하는 조건 하에 배지 중에서 성장한다. 일부 구현예에서, 정제된 샘플은 배지 중에 생산된 폴리펩티드 산물의 약 50% 초과를 함유한다. 일부 구현예에서, 정제된 샘플은 각각의 배지 1리터로부터 약 100mg 초과 폴리펩티드 산물을 함유한다.
- [0013] 일부 구현예에서, 폴리펩티드 산물은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 2-사슬 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 정제된 샘플 중의 폴리펩티드 산물의 약 20% 내지 50%는 서열 번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄를 갖는다. 일부 구현예에서, 서열 번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄의 약 5%-95%는 2개의 0-연결 당화를 갖고, 서열 번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄의 약 5%-95%가 하나의 0-연결 당화를 갖는다. 일부 구현예에서, 정제된 샘플 중의 폴리펩티드 산물의 약 40-80%이 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 갖는다. 일부 구현예에서, 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄의 적어도 약 90%는 하나의 0-연결 당화를 갖는다. 일부 구현예에서, 정제된 샘플 중의 폴리펩티드 산물의 약 2%-12%는 서열 번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 갖는다. 일부 구현예에서, 정제된 샘플 중의 폴리펩티드 산물의 약 0.1%-1.5%는 서열 번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 갖는다. 일부 구현예에서, 정제된 샘플 중의 폴리펩티드 산물의 약 2%-8%는 서열 번호 11의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 갖는다. 일부 구현예에서, 정제된 샘플 중의 폴리펩티드 산물의 약 35%-60%는 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 갖는다.
- [0014] 일 구현예에서는, 또한 구현예들 중 어느 하나의 방법에 의해 제조된 폴리펩티드도 제공된다.
- [0015] 일 구현예에서, 치료적으로 허용가능한 담체 및 2-사슬 폴리펩티드의 폴리펩티드 일부를 포함하는 약학적 조성물이 제공되며, 여기에서 2-사슬 폴리펩티드의 약 35%-60%는 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 갖고; 2-사슬 폴리펩티드의 약 20%-60%는 서열 번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 갖고; 2-사슬 폴리펩티드의 약 40%-60%는 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 갖고; 2-사슬 폴리펩티드의 10% 미만

이 서열 번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 갖는다.

[0016] 일부 구현예에서, 2-사슬 폴리펩티드의 5% 미만인 서열 번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 갖는다. 일부 구현예에서, 2-사슬 폴리펩티드의 3% 미만인 서열 번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 갖는다. 일부 구현예에서, 2-사슬 폴리펩티드의 약 0.1%-1.5%가 서열 번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 갖는다. 일부 구현예에서, 2-사슬 폴리펩티드의 약 2%-8%가 서열 번호 11의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 갖는다. 일부 구현예에서, 서열 번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄의 약 30%-70%는 2개의 0-연결 당화를 갖는다. 일부 구현예에서, 서열 번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄의 약 30%-70%는 하나의 0-연결 당화를 갖는다. 일부 구현예에서, 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄의 적어도 약 90%는 하나의 0-연결 당화를 갖는다.

[0017] 일부 구현예에서, 제제는 동결건조된다. 일부 구현예에서, 조성물은 추가로 L-아르기닌 HCl 또는 L-아르기닌 아세테이트를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 추가로 수크로오스를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 추가로 만니톨을 포함한다.

[0018] 일 구현예에서는, 또한 인자 Xa 저해제에 의한 항응고 치료 중인 환자에서 항응고를 역전시키거나 또는 저해시키는 방법으로서, 상기 방법이 본 발명의 구현예 중 어느 하나의 약학적 조성물을 상기 환자에 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0019] 발명의 상세한 설명

[0020] 정의

[0021] 이하의 설명은 본 발명의 용어의 예시적인 구현예로부터 출발한다. 그러나, 이러한 설명은 본 발명의 범위를 제한하려는 용도가 아니며, 대신 예시적인 구현예의 설명을 제공하는 의도로 인식되어야 할 것이다.

[0022] 범위를 포함하는 모든 숫자 지정, 예를 들어, pH, 온도, 시간, 농도 및 분자량은, 0.1 또는 10%의 증가에 의해 (+) 또는 (-)로 가변되는 대략적인 값이다. 항상 명확히 기재되지 않더라도 모든 숫자 지정시 용어 "약"을 앞에 붙이는 것으로 이해될 것이다. 또한, 항상 명확히 기재되지 않는더라도 본원에 기재된 시약은 단지 예시적이며, 이의 균등물이 당업계에 공지된 것으로 이해될 것이다.

[0023] 본원의 상세한 설명 및 청구항에 사용된, 단수형 "a", "an" 및 "the"은 명확히 달리 기재된 바 없는 경우 복수의 지시대상을 포함한다. 예를 들어, 용어 "치료적으로 허용가능한 담체"는 복수의 약제학적으로 허용가능한 담체들을 포함하며, 이들의 혼합물을 포함한다.

[0024] 본원에 사용된 용어 "포함하는(comprising)"은 조성물 및 방법이 언급된 요소를 포함하나 다른 것들을 배제하지 않는다는 의미로 의도된다. "로 본질적으로 이루어지는(consisting essentially of)"은 조성물 및 방법을 정의하기 위해 사용되는 경우, 의도하는 용도를 위한 조합에 본질적인 중요성을 갖는 다른 원소를 배제하는 것을 의미할 것이다. 따라서, 본원에서 정의된 요소로 본질적으로 이루어진 조성물은 분리 및 정제 방법으로부터의 미량의 오염물 및 약제학적으로 허용가능한 담체, 예컨대 인산염 완충 식염수, 보존제 등을 배제하지 않을 것이다. "로 이루어지는(Consisting of)"은 미량을 초과하는 다른 요소 및 본 발명의 조성물을 투여하는 실질적인 방법 단계를 배제하는 것을 의미할 것이다. 이들 번역 용어 각각에 의해 정의된 구현예는 본원의 범위 내에 있다.

[0025] 용어 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 상호교환적으로 사용되며, 넓은 의미에서 둘 이상의 서브유닛 아미노산, 아미노산 유사체 또는 펩티드유사체(peptidomimetic)로 된 화합물을 지칭한다. 서브유닛은 펩티드 결합에 의해 연결될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 서브유닛은 다른 결합, 예를 들어, 에스테르, 에테르 등에 의해 연결될 수 있다. 단백질 또는 펩티드는 적어도 2개의 아미노산을 포함해야 하며, 단백질의 또는 펩티드의 서열을 포함할 수 있는 아미노산의 최대 수에는 제한이 없다. 본원에 사용된 용어 "아미노산"은 자연적 및/또는 비자연적 또는 합성 아미노산 중 어느 것을 지칭하며, 글리신과 D 및 L 광학 이성질체 모두, 아미노산 유사체 및 펩티드유사체를 포함한다. 자연 발생적 아미노산의 한 글자 및 세 글자의 약어가 이하의 표에 나열되었다.

[0026] "인자 Xa" 또는 "fXa" 또는 "fXa 단백질"은 혈액 응고 경로 중의 세린 프로테아제인데, 이는 불활성 인자 X (fX, 서열 번호 1, 표 1)로부터 생산된다. 인간 인자 X ("fX")를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 GenBank 수탁 번호 "NM_000504"에서 찾을 수 있다. 중쇄의 첫번째 52개 잔기를 촉매 절단할 때, fX는 fXa를 활성화한다. fXa는 경쇄 및 중쇄를 포함한다. 경쇄의 첫번째 45개 아미노산 잔기 (서열 번호 1의 잔기 1-45)는 GlA 도메인이라고 불리는데, 이는 11개의 번역-후 변형된 γ-카르복시글루탐산 잔기 (Gla)를 포함하기 때문이다. 이는 또한 짧

은 (6개의 아미노산 잔기) 방향족 스택 서열 (서열 번호 1의 잔기 40-45)도 포함한다. 키모트립신 소화는 선택적으로 1-44개의 잔기를 제거하여, Glu-도메인이 없는 fXa를 생성한다. fXa의 세린 프로테아제 촉매 도메인은 C-말단 중쇄에 위치한다. fXa의 중쇄는 다른 세린 프로테아제, 예컨대 트롬빈, 트립신 및 활성화된 단백질 C에 대한 상동성이 높다.

[0027] "원래의(Native) fXa" 또는 "야생형 fXa"는 혈장에 자연적으로 존재하거나 또는 이의 원래의 변형되지 않은 형태로 분리된 fXa를 지칭하며, 이는 프로트롬빈을 활성화하는 생물학적 활성을 가공하여 혈병의 형성을 촉진한다. 상기 용어는 조직 샘플로부터 분리된 자연발생적 폴리펩티드, 뿐만 아니라 재조합 생산된 fXa를 포함한다. "활성 fXa"은 프로트롬빈을 활성화시키는 응혈 촉진 활성을 갖는 fXa를 지칭한다. "활성 fXa"은 응혈 촉진 활성을 유지하는 native fXa 또는 변형된 fXa일 수 있다.

[0028] 본원에 사용된 "fXa 해독제", "해독제", " 또는 "fXa 유도체"는 프로트롬비나아제 복합체로 조립될 때 fXa와 경쟁하지 않고, 응혈 촉진 또는 촉매 활성이 감소되거나 없으나, 항응고제, 예컨대 fXa 저해제에 결합하고 및/또는 이를 실질적으로 중화시키는 변형된 fXa 단백질을 지칭한다. fXa 단백질 또는 fXa 유도체의 "응혈 촉진 활성"은, 일부 측면에서, 야생형 활성 fXa 폴리펩티드가 갖는 효소 활성을 지칭한다. fXa 유도체의 예는 미국 특허 제8,153,590호, 및 PCT 출원 공보 W02009/042962 및 W02010/056765에서 제공되며, 그리고 본원에서 예컨대 서열 번호 2 및 3 그리고 이의 생물학적 균등물이 추가로 제공된다.

[0029] fXa 폴리펩티드 또는 이의 유도체의 "효소 활성"은 기질과의 직접 결합을 통한 기질과의 생물화학적 반응을 촉매화하는 폴리펩티드의 능력을 지칭한다.

[0030] 서열 번호 2는 야생형 fXa에 대한 3개의 돌연변이를 포함한다. 제1 돌연변이는 fX의 Glu-도메인 내의 6-39 aa의 결실이다. 제2 돌연변이는 활성화 펩티드 서열 143-194 aa가 -RKR-로 치환된 것이다. 이것은 경쇄 (서열 번호 4) 및 중쇄 (서열 번호 5)를 연결하는 -RKRKR- (서열 번호 6) 링커를 생성한다. 분비시, 이러한 링커는 절단되어, 2-사슬 폴리펩티드, 서열 번호 3 (r-해독제)을 생성한다. 제3 돌연변이는 활성 부위 잔기 S379가 A1a 잔기로 돌연변이된 것이다. 이러한 아미노산 치환은 각각 서열 번호 1 및 3의 아미노산 296 및 290에 해당한다.

[0031] 예시적인 해독제는 링커의 절단 이후, 서열 번호 2의 2-사슬 폴리펩티드 가공 산물을 지칭하는 "r-해독제"이다. 이것은 서열 번호 3으로 표시된다. r-해독제는 예를 들어, US 8,153,590에 기재되어 있고, 이는 그 내용이 본원에서 참조로 포함된다. r-해독제는 경쇄의 시스테인 98 (Cys98)과 중쇄의 시스테인 108 (Cys108) 사이가 단일 이황화 결합으로 연결된, 경쇄 (서열 번호 4) 및 중쇄 (서열 번호 5)를 포함한다. 야생형 fXa와 같이, 특정 생산 배치에서, r-해독제는 번역-후 변형되며, 그 결과 특정 아미노산 잔기, 예를 들어, 경쇄의 Ser56, Ser72, Ser76 및 Thr82, 및 중쇄의 Thr249, 및 변형된 잔기, 경쇄의 Asp29의 (3R)-3-히드록시Asp에서 당화가 생성된다. 추가로, 사슬간 이황화 결합 이외에, 경쇄의 시스테인 16과 27, 21과 36, 38과 47, 55와 66, 62와 75, 및 77과 90의 사이, 그리고 중쇄의 시스테인 7과 12, 27과 43, 156과 170, 및 181과 209 사이에 형성된 사슬간 이황화 결합이 존재할 수 있다.

표 1. 불활성 인간 인자 X의 폴리펩티드 서열(서열 번호 1)

1	ANSFLEEMKK GHLERECMEE TCSYEEAREV FEDSDKTNEF WNKYKDGDQC ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCs LDNGDCDQFC HEEQNSVVCs CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY PCGKQTLERR KRSVAQATSS SGEAPDSITW KPYDAADLDP TENPFDLLDF
181	NQTQPERGDN NLTRIVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETVD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPNVDNRNSC KLSSSFITQ
361	NMFCAGYDTK QEDACQGD SG PHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK

[0032]

표 2. -RKRRKR- (서열 번호 6) 링커의 제거에 앞선 r-해독제 전구체의 폴리펩티드 서열(서열 번호 2)

경쇄 (서열 번호 4)	
1 ANSFL	F WNKYKDGQDC ETSPCQNQGK
61 CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCs LDNGDCDQFC HEEQNSVVCs CARGYTLADN	
121 GKACIPTGPY PCGKQTLER	
링커 (서열 번호 6)	
RKRRKR	
중쇄 (서열 번호 5)	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241 AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP	
301 ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EPPYVDRNSC KLSSSFITQ	
361 NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK	
421 WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK	

[0033]

표 3. -RKRRKR- (서열 번호 6) 링커의 제거 후의 인간 인자 Xa 3 중 돌연변이의 폴리펩티드 서열(서열 번호 3)

경쇄 (서열 번호 4)	
1 ANSFL	F WNKYKDGQDC ETSPCQNQGK
61 CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCs LDNGDCDQFC HEEQNSVVCs CARGYTLADN	
121 GKACIPTGPY PCGKQTLER	
중쇄 (서열 번호 5)	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241 AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP	
301 ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EPPYVDRNSC KLSSSFITQ	
361 NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK	
421 WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK	

[0034]

표 4. r-해독제 전구체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 7)

ATGGGGCGCC CACTGCACCT CGTCTGCTC AGTGCCTCCC TGGCTGGCCT CCTGCTGCTC GGGGAAAGTC TGTTTCATCCG CAGGGAGCAG GCCAACAA CA TCCTGGCGAG GGTACAGAGG GCCAATTCCT TTCTTTCTG GAATAAATAC AAAGATGGCG ACCAGTGTGA GACCACTCT TGCCAGAAC AGGGCAAATG TAAAGACGGC CTCGGGGAAT ACACCTGCAC CTGTTAGAA GGATTCGAAG GCAAAACTG TGAATTATTC ACACGGAAGC TCTGCAGCCT GGACAACGGG GACTGTGACC AGTTCTGCCA CGAGGAACAG AACTCTGTGG TGTGCTCCTG CGCCCGCGGG TACACCTTGG CTGACAACGG CAAGGCCTGC ATTCACACAG GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGACCTGG AACGCAGGAA GAGGAGGAAG AGGATCGTGG GAGGCCAGGA ATGCAAGGAC GGGGAGTGTC CCTGGCAGGC CCTGCTCATC AATGAGGAAA ACGAGGGTTT CTGTGGTGGA ACCATTCTGA GCGAGTTCTA CATCTAACG GCAGCCCAT GTCTCTACCA AGCCAAGAGA TTCAAGGTGA GGTAGGGGA CCGGAACAG GAGCAGGAGG AGGGCGGTGA GGGCGTGCAC GAGGTGGAGG TGGTCATCAA GCACAACCGG TTCACAAAGG AGACCTATGA CTTGCACATC GCCGTGCTCC GGCTCAAGAC CCCCATCACC TTCCGCATGA ACGTGGCGCC TGCTGCTTC CCCGAGCGTG ACTGGGCGGA GTCCACGCTG ATGACGCAGA AGACGGGGAT TGTGAGCGGC TTGGGGCGCA CCCACGAGAA GGGCGGCGAG TCCACAGGC TCAAGATGCT GGAGGTGCC TACGTGGACC GCAACAGCTG CAAGCTGTCC AGCAGCTTCA TCATCACCCA GAACATGTT TGTGCCGGCT ACGACACCA GCAGGAGGAT GCCTGCCAGG GGGACGCGAG GGGCCCGCAC GTCACCCGCT TCAAGGACAC CTACTTCGTG ACAGGCATCG TCAGCTGGG AGAGGGCTGT GCCCGTAAGG GGAAGTACGG GATCTACACC AAGGTACCG CCTTCCTCAA GTGGATCGAC AGGTCCATGA AAACAGGGG CTGCCCCAAG GCCAAGAGCC ATGCCCGGA GGTCATAACG TCCTCTCCAT TAAAGTGA
--

[0035]

[0036]

다른 예시적인 해독제는 r-해독제 (또는 서열 번호 2에 의해 나타나는 이들의 전구체), 또는 대안적으로 서열 번호 3에 특정 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드의 생물학적 균등물일 수 있다. 일 측면에서, 상기 생물학적 균등물은 서열 번호 3의 구조적 특성, 즉, 변형된 활성 부위 및 결실 또는 변형된 Gla 도메인을 유지한다. 또 다른 측면에서, 상기 생물학적 균등물은 서열 번호 3의 기능적 특징을 유지하는데, 즉, 프로트롬비나아제 복합체로 조립할 때 fXa와 경쟁하지 않고, 응혈 촉진 (예를 들어, 효소 또는 촉매) 활성이 감소되거나 없다. 용어 "활성 부위"는 화학 반응이 일어나는 효소 또는 항체의 부분을 지칭한다. "변형된 활성 부위"는 화학적 반응성 또는 특이성이 증가 또는 감소한 활성 부위를 제공하기 위해 구조적으로 변형된 활성 부위이다. 활성 부위의 예에는 235-488 아미노산 잔기를 포함하는 인간 인자 X의 촉매 도메인, 및 195-448 아미노산 잔기를 포함하는 인간 인자 Xa의 촉매 도메인을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 변형된 활성 부위의 예로서는, Arg306, Glu310, Arg347, Lys351, Lys414, 또는 Arg424의 위치에 적어도 하나의 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 1의 195-448 아미노산 잔기를 포함하는 인간 인자 Xa의 촉매 도메인을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [0037] **해독제의 제조**
- [0038] 실험예 (실시에 1 및 2)는 fXa 해독제를 제조하기 위한 배양 및 정제 방법의 개발을 나타낸다. 배양된 세포는 서열 번호 7의 핵산 서열, 또는 서열 번호 7에 의해 암호화되는 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 상동성 (또는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 상동성)을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 작제물을 포함한다. 상기 세포는 통상 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포이다.
- [0039] 정제 방법 중 하나는 도 1에 도시되어 있다. 세포를 수집하고 (단계 101), 덤스 필터를 사용하여 고분자량 (HWM)의 불순물을 제거하여 정화하고, 상기 샘플은 (예를 들어, 약 10배) 농축된다 (단계 102). 농축 단계는 재생 셀룰로오스를 제한 없이 사용할 수 있다. 단계 103에서, (예를 들어, 계면활성제/용매; 예컨대 1% 트리톤 X-100, 0.3% 트리부틸 포스페이트 (최종 농도)에 의한) 바이러스 불활성화는 세포 배양액 중 외피 바이러스를 불활성화하기 위해 수행될 수 있다. 바이러스 제거 후, 단계 104 (혼합-모드 양이온 교환), 105 (혼합-모드 음이온 교환) 및 106 (혼합-모드 이온 교환)는 숙주 세포 단백질 및 DNA를 제거하고, 해독제를 포획하기 위해 수행된다. 단계 107에서, 소수성 결합 수지는 잔여 숙주 세포 단백질을 제거하기 위해 추가로 사용될 수 있다. 선택적으로, 이들 정제 단계 후, 최종 바이러스 제거 여과 단계는 잔여 바이러스를 제거하는데 사용될 수 있다.
- [0040] 또 다른 구현예에서, 정제 공정은 도 2에 도시된 바와 같고, 실시에 2에서 입증되었다. 일부 구현예에서, 방법은 폴리뉴클레오티드 작제물 (예를 들어, 서열 번호 7), 및 상기 폴리뉴클레오티드 작제물로부터 발현된 폴리펩티드 산물(예를 들어, 서열 번호 3)을 함유하는 샘플에 계면활성제를 첨가하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 계면활성제는 트리톤 X-100을 포함한다. 일부 구현예에서, 샘플에 추후의 친화성 정제를 실시하기 전에는, 샘플을 처리하기 위한 용매를 사용하지 않는다. 일부 구현예에서, 샘플이 추후 친화성 정제되기 전에는 유기 용매를 샘플에 처리하지 않는다. 일부 구현예에서, 샘플이 추후 친화성 정제되기 전에는 트리부틸 포스페이트를 샘플에 첨가하지 않는다.
- [0041] 일부 구현예에서, 샘플은 이후 대두 트립신 저해제 (STI)-계 친화성 크로마토그래피에 로딩되고, 용출 버퍼로 용출되어 용출 샘플을 생성한다. 일부 구현예에서, 로딩된 샘플은 유기 용매로 처리되지 않거나, 또는 유기 용매를 함유하지 않는다.
- [0042] "STI" 또는 "대두 트립신 저해제"는, 대두, 또는 이들의 생물학적 균등물로부터 분리된 트립신 저해제를 지칭한다. 트립신 저해제는 약 20 kDa 크기이며, 트립신 (단백질분해 효소) 뿐만 아니라 혈장 칼리크레인 (kallikrein), 인자 Xa 및 플라스민 활성을 감소시킨다. STI은 판매회사, 예컨대 Life Technologies (Grand Island, NY) 사로부터 상업적으로 입수할 수 있다. STI의 예는 글리신 맥스 (대두) 유래의 KTI3 쿠니츠(Kunitz) 트립신 저해제 (GenBank 수탁 번호 NP_001238611)이다.
- [0043] STI는 특정 단백질의 정제를 위해 고정 지지체 수지에 고정될 수 있다. 대두 트립신 저해제 이외에, 다른 트립신 저해제 단백질, 예컨대 혈청, 리마콩, 소 채장, 또는 오보뮤코이드(ovomucoid)로부터 분리된 것, 또는 이의 변형된 형태도 또한 사용될 수 있다. 특정 프로테아제 저해제, 특히 세린 프로테아제 저해제를 사용하여, 해독제를 정제할 목적으로 친화성 수지를 제조할 수 있는 것도 고려된다. 해독제는 이후 아르기닌을 포함하는 버퍼로 용출될 수 있다. 일부 구현예에서, 용출 버퍼는 적어도 0.2M, 0.5M, 0.6M, 0.7M, 0.8M, 0.9M, 1M, 1.1M, 1.2M, 1.3M, 1.4M, 1.5M, 또는 2M 아르기닌을 포함한다. 일부 구현예에서, 용출 버퍼는 약 0.5M 내지 2M 아르기닌, 또는 약 0.7M 내지 1.5M 아르기닌, 또는 0.8M 내지 1.2M 아르기닌을 포함한다. 일부 구현예에서, 용출 버퍼는 약 4.5 내지 6, 또는 4.6 내지 5.6, 또는 4.7 내지 5.5, 또는 4.8 내지 5.4, 또는 5 내지 5.4, 또는 5.1 내지 5.3, 또는 약 5.2의 pH를 갖는다. 일 구현예에서, 용출 버퍼는 pH 5.2에서 25mM 아세트산 나트륨 1.0M 아르기닌을 포함한다.
- [0044] 일부 구현예에서, 샘플은 이후 이온 교환 및 혼합 모드 크로마토그래피에 로딩된다. 이온 교환 및 혼합 모드 크로마토그래피의 비-제한적인 예는 세라믹 히드로아파타이트 유형 I 크로마토그래피를 포함한다. 샘플은 이후 무기염을 포함하는 용출 버퍼로 용출될 수 있다. 일부 구현예에서, 무기염은 염화나트륨 또는 염화칼륨이다. 일부 구현예에서, 용출 버퍼 중의 염 농도는 적어도 0.5M, 1M, 1.5M, 2M, 2.5M 또는 3M이다.
- [0045] 일부 구현예에서, 용출은 균질화 버퍼와 용출 버퍼 사이에 생성된 구배(gradient)의 사용을 수반한다. 균질화 버퍼는, 일부 구현예에서, 더 낮은 농도, 예를 들어, 0.2M 미만, 0.1M 미만, 50mM 미만, 20mM 미만, 10mM 미만의 염을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 구배는 염 농도의 적어도 5배, 또는 10배, 또는 20배, 또는 50배, 또는 100배 증가를 포함한다. 일부 구현예에서, 균질화 버퍼는 pH 7.0에서 50 mM MES (2-(N-모르폴리노)에탄설햐

폰산), 5 mM 인산나트륨을 포함한다. 일부 구현예에서, 용출 버퍼는 50mM MES, 5mM 인산나트륨, 2M 염화나트륨 (pH 7.0)을 포함한다. 일부 구현예에서, 구배는 약 90% 균질화 버퍼로 개시하고, 약 90% 용출 버퍼로 종료한다.

[0046] 일부 구현예에서, 샘플은 추가로 소수성 결합 크로마토그래피에 로딩된다. 일부 구현예에서, 소수성 결합 크로마토그래피는 옥틸 세파로오스 크로마토그래피를 포함한다. 일부 구현예에서, 샘플은 적어도 2mM 염화나트륨, 또는 대안적으로 적어도 1M, 1.5M, 2.5M, 3M, 4M 또는 5M 염화나트륨을 포함하는 용출 버퍼로 용출된다.

[0047] 일부 구현예에서, 상기 기재된 중간 샘플 중 하나는 음이온 교환 크로마토그래피에 의한 정제 단계를 추가로 거친다. 일부 구현예에서, 음이온 교환 크로마토그래피는 Sartobind™ 이온 교환막을 포함한다. 일부 구현예에서, 음이온 교환 크로마토그래피는 친화성 크로마토그래피 이후에 적용된다.

[0048] 일부 구현예에서, 상기 기재된 중간 샘플 중 하나는 나노플리스 필터에 의한 여과를 추가로 거친다. 일부 구현예에서, 나노플리스 여과는 샘플을 STI-계 친화성 크로마토그래피에 로딩하기 전에 적용한다.

[0049] 일부 구현예에서, 정제된 샘플은 폴리뉴클레오티드 작제물에 의해 발현되지 않은 약 1% 미만의 오염물 단백질, 즉 친화성 수지/컬럼으로부터 방출된 예컨대 숙주 세포 단백질 또는 STI를 포함한다.

[0050] 상기 구현예 중 어느 것의 정제 공정은 세포 배양액 중에서 발현된 해독제 단백질의 적어도 약 50% (또는 적어도 약 40%, 45%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 85%)를 회수할 수 있었다. 일부 구현예에서, 세포는 배지 1리터당 적어도 100mg의 폴리펩티드 산물을 생산하는 환경 하에서, 배지 중에서 성장한다. 일부 구현예에서, 세포는 배지 1리터당 적어도 120mg (또는 적어도 210mg, 220mg, 230mg, 240mg, 250mg, 270mg, 280mg, 290mg, 300mg, 310mg, 320mg, 330mg, 340mg, 또는 350mg)의 폴리펩티드 산물을 생산할 수 있는 환경 하에서, 배지 중에서 성장한다. 일부 구현예에서, 정제된 샘플은 배지에서 생산된 각각의 1리터당 약 50mg (또는 적어도 55mg, 60mg, 70mg, 80mg, 90mg, 100mg, 110mg, 120mg, 130mg, 140mg, 150mg, 160mg, 170mg, 180mg, 190mg 또는 200mg) 초과 폴리펩티드 산물을 포함한다.

[0051] 정제된 산물 중의 해독제 이성질체

[0052] 본원에 기재된 어느 구현예의 방법에 의한 정제된 해독제 산물은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 경향이 있다. 그러나, 배양 및 정제 공정은, 실제 단백질에 변형을 도입할 수 있다.

[0053] 실시예 3에서 입증된 바와 같이, 정제된 샘플 중의 폴리펩티드 산물의 약 20% 내지 50%는 손상되지 않은 중쇄 (서열 번호 5)를 갖는다. 손상되지 않은 중쇄를 갖는 것들 중에서, 약 5%-95%의 중쇄는 2개의 0-연결 당화를 갖고, 약 5%-95%의 중쇄는 하나의 0-연결 당화를 갖는다.

[0054] 일부 구현예에서, 정제된 샘플 중의 적어도 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40% 또는 45% 폴리펩티드 산물은 손상되지 않은 중쇄를 갖는다. 일부 구현예에서, 정제된 샘플 중 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 또는 80% 이하의 폴리펩티드 산물은 손상되지 않은 중쇄를 갖는다.

[0055] 일부 구현예에서, 정제된 샘플 중의 폴리펩티드 산물의 약 40-80%는 C-말단 리신의 결실을 갖는 중쇄(서열 번호 8)를 갖는다. 일부 구현예에서, 서열 번호 8은 정제된 샘플에서 적어도 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%를 구성한다. 일부 구현예에서, 서열 번호 8은 정제된 샘플에서 약 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 또는 90% 이하를 구성한다. 일부 구현예에서, 서열 번호 8의 중쇄의 적어도 약 90%는 하나의 0-연결 당화를 갖는다.

[0056] 일부 구현예에서, 정제된 샘플 중의 폴리펩티드 산물의 약 2%-12%는 13개의 C-말단 아미노산 잔기의 결실을 갖는 중쇄(서열 번호 9)를 갖는다. 일부 구현예에서, 서열 번호 9는 정제된 샘플에서 적어도 약 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3% 또는 5%를 구성한다. 일부 구현예에서, 서열 번호 9는 정제된 샘플에서 약 2%, 3%, 4%, 5%, 7%, 10%, 15%, 17% 또는 20% 이하를 구성한다.

[0057] 일부 구현예에서, 정제된 샘플 중의 폴리펩티드 산물의 약 0.1%-1.5%는 14개의 C-말단 아미노산 잔기의 결실을 갖는 중쇄(서열 번호 10)를 갖는다. 일부 구현예에서, 서열 번호 10은 정제된 샘플에서 적어도 약 0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.2%, 0.25%, 0.3% 또는 0.5%를 구성한다. 일부 구현예에서, 서열 번호 10은 정제된 샘플에서 약 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5% 또는 3%를 구성한다.

[0058] 일부 구현예에서, 정제된 샘플 중의 폴리펩티드 산물의 약 2%-8%는 15개의 C-말단 아미노산 잔기의 결실을 갖는 중쇄(서열 번호 11)를 갖는다. 일부 구현예에서, 서열 번호 11은 정제된 샘플에서 적어도 약 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3% 또는 5%를 구성한다. 일부 구현예에서, 서열 번호 11은 정제된 샘플에서 약 5%, 6%, 7%, 8%, 9%

또는 10% 이하를 구성한다.

- [0059] 실시예 3은, 또한 정제된 샘플 중의 폴리펩티드 산물의 약 35%-60%가 손상되지 않은 경쇄 (서열 번호 4)를 가지나, 일부 다른 것들은 변형 또는 절단될 수 있다는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 경쇄의 총 수 중 손상되지 않은 경쇄의 양은 적어도 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%이다. 일부 구현예에서, 경쇄의 총 수 중 손상되지 않은 경쇄의 양은 약 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80% 또는 90% 이하이다.
- [0060] 일부 구현예에서, 본 발명은 약제학적으로 허용가능한 담체 및 2-사슬 폴리펩티드의 폴리펩티드 일부를 포함하는 약학적 제제를 제공하는데, 여기에서 2-사슬 폴리펩티드의 약 35%-60%는 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄를 갖는다. 일부 구현예에서, 2-사슬 폴리펩티드의 약 20%-50%는 서열 번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 갖는다. 일부 구현예에서, 2-사슬 폴리펩티드의 약 40%-80%는 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 갖는다. 일부 구현예에서, 2-사슬 폴리펩티드의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4% 또는 3% 미만은 서열 번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 갖는다. 일부 구현예에서, 2-사슬 폴리펩티드의 약 0.1%-1.5%는 서열 번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 갖는다. 일부 구현예에서, 2-사슬 폴리펩티드의 약 2%-8%는 서열 번호 11의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄를 갖는다.
- [0061] 일부 구현예에서, 서열 번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄의 약 5%-95%는 2개의 0-연결 당화를 갖는다. 일부 구현예에서, 서열 번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄의 약 5%-95%는 하나의 0-연결 당화를 갖는다. 일부 구현예에서, 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄의 적어도 약 90%는 하나의 0-연결 당화를 갖는다.
- [0062] **제형화, 방법 및 투여량**
- [0063] 정제된 해독제 단백질 산물로 제조된 제제가 또한 제공된다. 일부 구현예에서, 동결 건조에 적합한 수성 제제가 제공된다. 일 구현예에서, 제제는 해독제와 함께 가용화제, 안정화제 (또는 안정제), 및 결정화제를 포함한다. 제제는 추가로 계면활성제 및/또는 버퍼를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 이들 제제의 각각의 존재는 동결 건조 동안, 예를 들어, 동결-건조 온도가 -40℃, -30℃, -20℃, -10℃, 0℃, 5℃, 10℃, 또는 15℃보다 높고, 20℃ 또는 25℃만큼 높은 경우, 해독제가 파괴되는 것을 방지한다.
- [0064] "결정 성분"은 동결 건조 공정 동안 폴리펩티드를 포함하는 제제 중에서 결정 매트릭스를 형성하는 분자를 지칭한다. 결정 성분의 비-제한적인 예는 만니톨 및 글리신을 포함한다.
- [0065] 일부 측면에서, 결정 성분은 만니톨 (예를 들어, 결정 만니톨)이다. 일 측면에서, 수성 제제 중의 결정 성분의 농도는 적어도 1% (w/v)이다. 일 측면에서, 수성 제제 중의 결정 성분의 농도는 적어도 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5% 또는 4% (w/v)이다. 일 측면에서, 수성 제제 중의 결정 성분의 농도는 8% 이하, 또는 대안적으로는 7%, 6.5%, 6%, 5.5%, 5%, 4.5% 또는 4% (w/v) 이하이다. 일 측면에서, 수성 제제 중의 결정 성분의 농도는 약 1% 내지 약 8%, 또는 약 2% 내지 약 6%, 또는 약 3% 내지 약 5.5%, 또는 약 4.5% 내지 약 5.5%, 또는 약 4.6% 내지 약 5.4%, 또는 약 4.7% 내지 약 5.3%, 또는 약 4.8% 내지 약 5.2%, 또는 약 4.9% 내지 약 5.1%, 또는 약 4%, 4.5%, 또는 5% (w/v)이다.
- [0066] 일부 측면에서, 가용화제가 수성 제제 중에 포함된다. 용어 "가용화제"는 용액 중에 존재할 때, 용액 중의 또 다른 분자(예를 들어, 활성 성분)의 용해도를 증가시키는 염, 이온, 탄수화물, 착화제, 중합체 및 다른 화합물을 지칭한다. 가용화제의 비-제한적인 예로서는, 아르기닌 및 시트레이트를 포함한다. 일 측면에서, 가용화제는 아르기닌이다. 일 측면에서, 가용화제는 시트레이트이다.
- [0067] 가용화제의 존재는 fXa 폴리펩티드를 제제에서 용해가능하고 안정하게 유지시키는데 유용할 수 있다. 일부 측면에서, 가용화제 (예를 들어, 아르기닌)의 농도는 적어도 10 mM, 또는 대안적으로 적어도 20 mM, 25 mM, 30 mM, 36 mM, 또는 40 mM이다. 일부 측면에서, 가용화제 (예를 들어, 아르기닌)의 농도는 100 mM, 96 mM, 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM 또는 50 mM 이하이다. 일부 측면에서, 가용화제의 농도는 약 10 mM 또는 20 mM 내지 약 60 mM, 약 10 mM 또는 20 mM 내지 약 55 mM, 약 35 mM 내지 약 55 mM, 약 40 mM 내지 약 50 mM, 약 41 mM 내지 약 49 mM, 약 42 mM 내지 약 48 mM, 약 43 mM 내지 약 47 mM, 약 44 mM 내지 약 46 mM, 또는 약 40 mM, 45 mM 또는 50 mM이다. 본원에 사용된 용어 아르기닌은 아미노산 뿐만 아니라 이의 염 (예를 들어, 아르기닌 HCl)을 지칭한다는 것을 유의한다. 아르기닌은 약 174.2 달톤의 분자량을 갖고, 아르기닌 HCl (예를 들어, L-아르기닌 HCl, L-아르기닌 아세테이트)은 약 210.7 달톤의 분자량을 갖는다.
- [0068] 일 구현예에서, 가용화제는 시트레이트 또는 이의 염이다. 시트레이트의 염은 소듐 시트레이트이다. 일 측면에서, 시트레이트는 약 1.0 mM 내지 약 200.0 mM의 농도를 포함한다. 추가적 측면에서, 시트레이트의 농도는 약

25 mM이다. 또다른 측면에서, 시트레이트의 농도는 약 50 mM이다. 추가적 구현예에서, 시트레이트의 농도는 약 5 mM, 10 mM, 또는 20 mM이다. 또 다른 구현예에서, 시트레이트는 약 0.05 M 내지 약 0.2 M의 농도를 포함한다.

[0069] 일부 측면에서, 안정제가 수성 제제 중에 포함된다. 용어 "안정제"는 제조, 저장 및 적용 동안 활성 성분 (예를 들어, fXa 유도체 폴리펩티드) 및/또는 제제를 화학적 및/또는 물리적 분해로부터 보호하는 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 말한다. 안정제의 예로는, 수크로오스, 아르기닌, 시트레이트, 만니톨, 트레할로오스, 글리신, 염화나트륨, 텍스트란 및 글루코오스를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 안정제는 수크로오스이다.

[0070] 일 측면에서, 수성 제제 중의 안정제(예를 들어, 수크로오스)의 농도는 적어도 약 0.5% (w/v)이다. 일 측면에서, 수성 제제 중의 안정제(예를 들어, 수크로오스)의 농도는 적어도 약 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.1%, 1.2%, 1.3%, 1.4%, 1.5%, 1.6%, 1.7%, 1.8%, 1.9% 또는 2% (w/v)이다. 일 측면에서, 수성 제제 중의 안정제(예를 들어, 수크로오스)의 농도는 약 5%, 4.5%, 4%, 3.5%, 3%, 2.5% 또는 2% (w/v) 이하이다. 일 측면에서, 수성 제제 중의 안정제(예를 들어, 수크로오스)의 농도는 약 1% 내지 약 5%, 또는 약 1% 내지 약 4%, 또는 약 1% 내지 약 3%, 또는 약 1.5% 내지 약 2.5%, 또는 약 1.6% 내지 약 2.4%, 또는 약 1.7% 내지 약 2.3%, 또는 약 1.7% 내지 약 2.2%, 또는 약 1.9% 내지 약 2.1%, 또는 약 1%, 1.5%, 2%, 2.5% 또는 3% (w/v)이다.

[0071] 일부 측면에서, 수성 제제는 계면활성제, 버퍼, 등장화제(tonicity agent), 동결보호제, 계면활성제, 동결건조 보호제, 보존제 또는 이들의 조합을 추가로 포함할 수 있다.

[0072] 일부 측면에서, 수성 제제는 6 이상, 또는 6.5 이상, 또는 7 이상, 또는 7.5 이상의 pH를 갖는다. 일부 측면에서, pH는 9, 8.5, 또는 8 이하이다. 일부 측면에서, pH는 6 내지 9, 6.5 내지 8.5, 7 내지 8.5, 7.5 내지 8.2, 7.6 내지 8.1, 7.7 내지 7.9, 또는 약 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9 또는 8이다.

[0073] 일 측면에서, 수성 제제는 약 45 mM 아르기닌, 약 2% 수크로오스 (w/v), 약 5% 만니톨 (w/v) 및 약 10 mg/mL의 2-사슬 r-해독제를 포함하며, 상기 제제는 약 7.8의 pH를 갖는다. 일 측면에서, 상기 수성 제제는 약 45 mM 아르기닌, 약 2% 수크로오스 (w/v), 약 5% 만니톨 (w/v) 및 약 20 mg/mL의 2-사슬 r-해독제를 포함하며, 상기 제제는 약 7.8의 pH를 갖는다. 일 측면에서, 상기 수성 제제는 약 45 mM 아르기닌, 약 2% 수크로오스 (w/v), 약 5% 만니톨 (w/v) 및 약 40 mg/mL의 2-사슬 r-해독제를 포함하며, 상기 제제는 약 7.8의 pH를 갖는다. 일 측면에서, 상기 수성 제제는 0.01%-0.02% (w/v) 폴리소르베이트 80 및 버퍼를 추가로 포함한다.

[0074] 일부 측면에서, 본 명세서에 기재된 수성 제제를 동결건조함으로서 제조되는 동결 건조된 조성물도 또한 제공된다. 수성 제제 중의 각 제제의 농도를 기준으로, 동결건조된 조성물 중의 제제의 상대적 함량도 용이하게 결정될 수 있다.

[0075] 일 측면에서, 상기 동결건조된 조성물은 fXa 해독제의 적어도 5%, 또는 대안적으로 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 또는 35% (w/w)를 포함한다. 이후, 다른 주요 성분들 중에서도, 예를 들어, L-아르기닌 HCl:수크로오스:만니톨에 대한 중량비는 (0.5-1.4):(1-3):(2-6)의 범위일 수 있다. 일부 측면에서, L-아르기닌 HCl:수크로오스:만니톨의 몰비는 (0.9-1):(1.5-2.5):(4.5-5.5), 또는 (0.91-0.99):(1.6-2.4):(4.6-5.4), 또는 (0.92-0.98):(1.7-2.3):(4.7-5.3), (0.93-0.97):(1.8-2.2):(4.8-5.2), 또는 (0.94-0.96):(1.9-2.1):(4.9-5.1)의 범위 내이다. 일부 측면에서, 상기 동결건조된 조성물은 계면활성제 및/또는 버퍼의 고형부를 추가로 포함한다.

[0076] 본 발명은 또한 fXa 저해제에 의해 항응고제 치료를 하고 있는 피험체에서 출혈을 치료, 예방 또는 감소시키는 치료 방법에 관한 것이기도 한데, 상기 방법은 적합한 용매에 용해되어 있는 유효량의 동결 건조 제제를 피험체에 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 해독제 또는 유도체는 긴급하지 않거나 또는 응급 상황에서 사용되는 단기-지속성 약일 수 있는데, 이는 해로운 혈류 역학적 부작용 또는 상처에 대한 증식성 혈관 반응의 악화를 유발하지 않고도 fXa 저해제의 종래의 항응고제 특성을 안전하고 특이적으로 중화할 수 있다는 것으로 고려되었다.

[0077] 본원에 사용된 용어 "치료하는", "치료" 등은 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 얻는 수단으로 사용된다. 효과는 질병 또는 이의 징후 또는 증상을 완전히 또는 부분적으로 방지하는 측면에서 예방적일 수 있고, 및/또는 질병 및/또는 질병에 의한 부작용에 대한 부분적 또는 완전한 치료의 측면에서 보면 치료적일 수 있다.

[0078] "치료하는"은 또한 포유류의 질병에 대한 어떠한 치료도 포함할 수 있으며, (a) 질병에 걸릴 가능성이 높을 수 있으나 아직 질병에 걸린 것으로 진단받지 않은 피험체에서 질병의 발생을 방지하는 것, 예를 들어, 환자에서 항응고제 과다 투여에 의해 출혈을 방지하는 것; (b) 질병을 저해하는 것, 즉, 이의 발달을 정지시키는 것, 예를 들어, 출혈의 저해; 또는 (c) 질병의 완화 또는 경감, 예를 들어, 출혈 감소를 포함한다.

- [0079] 본원에 사용된 "치료하는"은 병리학과 관련된 증상의 진신 완화 및/또는 증상의 개시에 대한 지연을 추가로 포함한다. "치료"의 임상적 및 반-임상적 증거들은 병리적 상태, 개인 및 치료에 따라서 달라질 것이다.
- [0080] "투여"는 1회의 투여시, 치료 과정 전체에서 계속적 또는 간헐적으로 영향을 미칠 수 있다. 가장 효과적인 수단 및 투여 용량을 결정하는 방법은 당업계의 통상의 기술자들에게 알려져 있고, 치료에 사용된 조성물, 치료 목적, 치료될 표적 세포, 및 치료되는 피험체에 따라 달라질 것이다. 단일 또는 다중 투여는 치료 의사에 의해 선택되는 투여 수준 및 패턴으로 수행될 수 있다. 적합한 투여 제제 및 제제를 투여하는 방법은 당업계에 알려져 있다. 진단 또는 치료의 "피험체"는 세포, 또는 인간을 포함하는 포유류이다. 진단 또는 치료에 대한 비-인간 동물 피험체는 예를 들어, 설치류, 예컨대 래트, 마우스, 개과(canine), 예컨대 개, 토끼과(leporids), 예컨대 토끼, 가축, 스포츠 동물, 및 애완동물을 포함한다.
- [0081] 본원에 기재된 제제 및 조성물은 의약 제제, 및 종래의 과정, 예컨대 약학적 조성물 중의 활성 성분에 따른 투여에 의한 인간 및 다른 동물의 치료에 사용될 수 있다.
- [0082] 본 발명의 제제는 적합한 어느 경로, 특히 (피하, 근육내, 정맥내 및 진피내를 포함하는) 비경구 투여에 의한 치료를 위해 투여될 수 있다. 또한 바람직한 경로가 수여자의 상태 및 연령, 및 치료될 질병에 따라 달라질 것이라는 것은 자명한 사실이다.
- [0083] 어구 "약제학적으로 허용가능한 중합체"는 본원에 기재된 폴리펩티드 중 하나 이상에 접합될 수 있는 화합물의 군을 지칭한다. 폴리펩티드에 대한 중합체의 접합으로 생체내 및 시험관내에서의 폴리펩티드 반감기 연장이 가능하게 되는 것이 고려된다. 비-제한적인 예는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐알콜, 셀룰로오스 유도체, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 당, 폴리올 및 이들의 혼합물을 포함한다.
- [0084] "항응고성 제제" 또는 "항응고제"는 혈병 형성을 저해하는 제제이다. 항응고성 제제의 예로서는, 트롬빈의 특이적인 저해제, 인자 IXa, 인자 Xa, 인자 XIa, 인자 XIIa 또는 인자 VIIa, 헤파린 및 그 유도체, 비타민 K 길항제, 및 항-조직 인자 항체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 트롬빈의 특이적인 저해제의 예로서는, 히루딘, 비발리루딘(bivalirudin)[안지오맥스(Angiomax)®], 아르가트로반(argatroban) 및 레피루딘(lepirudin)[레플루단(Refludan)®]을 포함한다. 헤파린 및 그 유도체의 예로서는, 미분획 헤파린(UFH), 저 분자량 헤파린(LMW), 예컨대 예녹사파린 [로베녹스(Lovenox)®], 달테파린(dalteparin)(프라그린®), 및 다나파로이드(danaparoid) [오르가란(Organon)®]; 및 합성 오탄당, 예컨대 폰다파리누스[아릭트라(Arixtra)®]를 포함한다. 비타민 K 길항제의 예로서는, 와파린 [코마딘(Coumadin)®], 페노쿠마롤(phenocoumarol), 아세노쿠마롤(acenocoumarol) [신트롬(Sintrom)®], 클로린디온(clorindione), 디쿠마롤(dicumarol), 디페나디온(diphenadione), 에틸 비스코마세테이트, 펜프로쿠몬(phenprocoumon), 페닌디온(phenindione), 및 티오클로마롤(tiocloamarol)을 포함한다. 일 구현예에서, 항응고제는 인자 Xa의 저해제이다. 일 구현예에서, 항응고제는 베트릭사반이다.
- [0085] "항응고제 치료"는 원치않는 혈병 또는 혈전을 방지하기 위해 환자에 투여되는 치료 요법을 지칭한다. 항응고제 치료는 항응고성 제제 중 하나 또는 둘 이상의 조합 또는 다른 제제를, 환자에서 원치않는 혈병 또는 혈전을 치료 또는 예방하기에 적합한 투여량 및 스케줄로 투여하는 것을 포함한다.
- [0086] 용어 "인자 Xa 저해제" 또는 "인자 Xa의 저해제"는 프로트롬빈의 트롬빈으로의 전환을 촉매화하는 응고 인자 Xa의 활성을 시험관내 및/또는 생체내에서 직접 또는 간접적으로 저해할 수 있는 화합물을 지칭한다.
- [0087] "직접적인 인자 Xa 저해제"는 fXa에 직접적으로 결합하며, 비-제한적인 예로는 NAP-5, rNAPc2, 조직 인자 경로 저해제(TFPI), DX- DX-9065a (예를 들어, Herbert, J.M. 등, *J Pharmacol Exp Ther.* 1996 276(3):1030-8에 기재됨), YM-60828 (예를 들어, Taniuchi, Y. 등, *Thromb Haemost.* 1998 79(3):543-8에 기재됨), YM-150 (예를 들어, Eriksson, B.I. 등, *Blood* 2005;106(11), 요약서 1865에 기재됨), 아피삭반, 리바록사반, TAK-442, PD-348292 (예를 들어, Pipeline Insight: Antithrombotics - Reaching the Untreated Prophylaxis Market, 2007에 기재됨), 오타믹사반, 에독사반 (예를 들어, Hylek EM, *Curr Opin Invest Drugs* 2007 8(9):778-783에 기재됨), LY517717 (예를 들어, Agnelli, G. 등, *J. Thromb. Haemost.* 2007 5(4):746-53에 기재됨), GSK913893, 라작사반(razaxaban), 베트릭사반 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 이들의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 직접적인 인자 Xa 저해제는 리바록사반(rivaroxaban)이다. 일부 측면에서, 직접적인 fXa 저해제는 소분자 화학적 화합물이다.
- [0088] "간접적인 인자 Xa 저해제"의 fXa 활성 저해는 하나 이상의 다른 인자에 의해 매개된다. 간접적인 인자 Xa 저해제의 비-제한적인 예는 폰다파리누스(fondaparinux), 이드라파리누스(idraparinux), 비오틴화 이드라파리누스,

에녹사파린, 프라그민(fragmin), 틴자파린(tinzaparin), 저 분자량 헤파린 ("LMWH"), 및 이들의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 간접적인 인자 Xa 저해제는 에녹사파린(enoxaparin)이다.

[0089] 일 구현예에서, 인자 Xa 저해제는 베트릭사반, 리바룩사반, LMWH, DX-9065a, YM-60828, YM-150, PD-348292, 오타믹사반(otamixaban), 에독사반(edoxaban), LY517717, GSK913893, 라작사반, 아픽사반(apixaban), 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0090] 용어 "베트릭사반(betrixaban)"은 화합물 "[2-(4-[(디메틸아미노)이미노메틸]페닐}카르보닐아미노)-5-메톡시페닐]-N-(5-클로로(2-피리딜))카르복사미드" 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 지칭한다. 베트릭사반은 미국 특허 제6,376,515호, 제6,835,739호 및 제7,598,276호에 기재되어 있다 (이들은 그 내용이 본원에 전체로서 참조된다). 베트릭사반은 인자 Xa의 특이적인 저해제인 것으로 알려져 있다.

[0091] fXa 저해제의 활성을 "중화하다", "역전시키다(reverse)" 또는 "상쇄시키다(counteract)" 또는 이와 유사한 어구는 fXa 저해제의 인자 Xa 저해 또는 항응고 작용을 저해 또는 차단하는 것을 지칭한다. 이러한 어구는 상기 기능의 부분적 저해 또는 차단, 뿐만 아니라, fXa 저해제 활성의 대부분 또는 모두를 시험관내 및/또는 생체내에서 저해 또는 차단하는 것을 지칭한다.

[0092] "유효량"은 원하는 생물학적 및/또는 치료적 결과를 유도하기에 충분한 유도체의 양을 지칭한다. 그 결과는 질병의 징후, 증상 또는 원인의 감소일 수 있거나, 또는 생물학적 시스템의 어느 다른 원하는 변형일 수 있다. 본원에서, 그 결과는 통상 이하의 것들 중 하나 이상과 관계될 것이다: 환자에 투여된 fXa 저해제의 중화, fXa 저해제의 항응고제 활성의 역전, 혈장으로부터의 fXa 저해제의 제거, 지혈의 회복, 및 출혈의 감소 또는 정지. 유효량은 사용된 특이적인 해독제, 피험체에 투여된 특이적인 fXa 저해제, fXa 저해제의 투여 요법, 해독제의 투여 시점, 치료받는 피험체 및 질병 상태, 피험체의 체중 및 연령, 질병 상태의 심각성, 투여 방식 등에 따라 달라질 것이며, 이 모든 것들은 당업계의 통상의 기술자 중 한 명에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0093] 특정 양태에서, 용액은 약 10 밀리그램 (mg) 내지 약 2 그램 (g)의 fXa 해독제의 양을 전달하도록 투여된다. 사용된 다른 r-해독제의 양은 약 100mg 내지 약 1.5g; 약 200mg 내지 약 1g; 및 약 400mg 내지 약 900 mg을 포함한다. 일부 측면에서, 사용된 r-해독제의 양은 약 400mg 또는 960mg이다. 일부 측면에서, 사용된 r-해독제의 양은 약 10mg 내지 약 100mg; 약 15mg 내지 약 95mg; 및 약 20mg 내지 약 80mg이다.

[0094] 제제는 투여될 때 인자 Xa 저해제를 적어도 약 20%, 또는 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 75%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 중화한다.

[0095] 방법, 즉 인자 Xa 저해제의 저해 또는 역전이 다수의 시험관내 에세이, 예컨대 트롬빈 생성 에세이, 및 임상적 응고 에세이, 예컨대 aPTT, PT 및 ACT에 의해 달성될 수 있는지 여부를 결정할 수 있다.

[0096] 본 발명의 하나의 측면은 fXa 저해제에 의한 항응고제 치료를 받고 있는 피험체에서 외인성으로 투여된 fXa 저해제에 선택적으로 결합하여 이를 저해하는 방법에 관한 것으로, 이는 피험체에 유효량의 동결건조된 제제의 용액을 투여하는 것을 포함한다. 이러한 치료에 적합한 환자는 이전에 항응고제 치료를 받았고, 예를 들어 하나 이상의 항응고제, 예컨대 fXa의 직접 또는 간접적인 저해제를 투여받았다.

[0097] 또 다른 측면에서, 본원에서 인자 Xa 저해제에 의한 항응고제 치료를 하고 있는 피험체에서 외인성으로 투여된 인자 Xa 저해제에 선택적으로 결합하여 이를 저해하는 방법이 제공되는데, 이는 피험체에 동결건조된 제제의 용액을 투여하는 것을 포함한다. 피험체는 세포 또는 포유류, 예컨대 인간일 수 있다.

[0098] 본원에 기재된 용해된 동결 건조 제제의 투여 및 이에 수반되는 방법으로부터 혜택을 받을 피험체는, 임상적 대량 출혈 사건 또는 임상적으로 유의미한 비-대량 출혈 사건을 경험하고 있거나, 또는 그럴 경향이 있는 이들을 포함한다. 임상적 대량 출혈의 예는 내출혈(hemorrhage), 중요 장기에서의 출혈, 재-조작 또는 새로운 치료적 과정을 요구하는 출혈로 이루어지는 군에서 선택되며, 명시적인 출혈과 관련된 출혈 지수 ≥ 2.0 이었다. (Turpie AGG 등, *NEJM*, 2001, 344: 619-625.) 추가로, 피험체는 상당한 양으로 지속 또는 재발하거나 또는 중재가 없이는 멈추지 않는 코피(epistaxis), 치료 과정을 요구할 정도로 증가되지 않은 직장 또는 요로 출혈, 주사 부위 또는 자발적으로 또는 그렇지 않으면 사소한 외상으로 발생하는 상당한 혈종(hematomas), 배약을 요구하지 않는 수술 과정과 통상 관련된 것 이상의 상당한 혈액 손실, 및 계획되지 않은 수혈을 요구하는 출혈로 이루어진 군으로부터 선택된 비-대량 출혈 사건을 경험하였거나, 또는 그 경향이 있을 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0099] 일부 구현예에서, 용해된 동결건조 제제는 과량의 fXa 저해제의 투여 후 또는 수술 전에 투여되며, 이는 피험체를 출혈의 위험에 노출시킬 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0100] 실시예

[0101] 이하의 실시예는 본원의 특이적인 구현예를 입증하기 위해 포함되었다. 당업계의 통상의 기술자는 이하의 실시예에 기재된 기술이 본 발명의 실시예에 잘 작용하는 기술을 나타내고, 따라서 이의 실시를 위한 특수 모드를 구성하는 것으로 간주될 수 있는 것은 자명한 사실이다. 그러나, 당업계의 통상의 기술자들은 본 발명의 기재 사항을 감안하여 기재된 구체적인 구현예에 많은 변화가 만들어질 수 있거나, 또는 본 발명의 사상 및 범주로부터 벗어나지 않고도 여전히 동일 또는 유사한 결과를 얻을 수 있는 것으로 이해할 것이다.

[0102] 실시예 1: 세포 배양액 유래의 r-해독제의 정제

[0103] 본 실시예는 r-해독제의 제조를 위한 배양 조건 및 하류 정제 공정의 개발을 입증하였다. CHO 세포에 맞는 상업적 배양 배지는 -RKRRKR- 링커 (서열 번호 6)의 제거시, 2-사슬 r-해독제 (서열 번호 3)를 생성하는 r-해독제 전구체 (서열 번호 2)를 암호화하는 핵산 서열 (서열 번호 7)을 포함하는 작제물로 형질감염된 CHO 세포에 대해 시험되었다. ProCHOTM 배지는, 적합한 조건 하에서, 75-95 mg/ℓ의 높은 역가를 생산할 수 있었다.

[0104] 하류 정제 공정 ("하류 공정")은 배양된 세포 유래의 해독제를 정제하기 위해 개발되었다. 몇몇 초기의 개발 전개시, 다양한 막 및 컬럼이 시험되었다.

[0105] 2개의 시험 전개에서, 정화된 산물이 한외여과 (UF)에 의해 농축되는 경우에 막을 오염시키거나, 또는 UF가 우회되고 산물이 제1 크로마토그래피 단계에 의해 농축되는 경우 크로마토그래피 매질을 오염시키는 것으로 밝혀졌다. 산물의 농도는 공정의 초기에 생각될 필요가 있으므로, 오염의 원인을 결정하고 이를 제거할 단계를 결정하기 위해 실험을 수행하였다.

[0106] 오염은 세포 배양 도중 배지로 분비되는 고분자량 (HMW)의 단백질 불순물에 의해 유발되는 것으로 추후 결정되었다. 이러한 HMW 단백질은 정화된 수집액에 단지 부분적으로만 용해될 수 있고, 농축시 더욱 더 불용성이 되어, UF 막 또는 크로마토그래피 컬럼에 허용불가능한 오염을 야기하였다.

[0107] 몇몇 텡스 필터, 이온 교환막, 및 크로마토그래피 배지의 평가 이후, 하나의 특별한 텡스 필터 (MilliporeTM X0HC 등급 필터)가 허용가능한 산물 수율을 달성하고, 다량의 불순물을 제거할 수 있는 것을 발견하였다. 산물은 이후 UF에 의해 최대 10배로 농축될 수 있었다. 이 필터는 정화 공정에서 원래의 필터 중 하나를 대체하여, 2회의 추가 전개를 위해 수행되었다.

[0108] 도 1은 이러한 개발 노력의 결과인 정제 공정 100을 도시한다. 세포가 수집되고 (단계 101), MilliporeTM X0HC 필터를 사용하여 HMW 불순물을 제거한 후, 샘플은 10배 농축된다 (단계 102). 상기 농축은 재생 셀룰로오스를 사용할 수 있다. 단계 103에서, (계면활성제/용매; 최종 농도: 1% 트리톤 X-100, 0.3% 트리부틸 포스페이트에 의한) 바이러스 불활성화가 수행되어, 세포 배양액 중의 외피 바이러스를 불활성화할 수 있다. 바이러스의 제거 이후, 단계 104 (혼합-모드 양이온 교환), 105 (혼합-모드 음이온 교환) 및 106 (혼합-모드 이온 교환)가 수행되어, 숙주 세포 단백질 및 DNA를 제거하고 해독제를 포획하였다. 단계 107에서, 소수성 결합 수지를 사용하여 잔여 숙주 세포 단백질을 추가로 제거할 수 있다. 선택적으로, 이들 정제 단계 이후, 최종 바이러스 제거 여과 단계를 사용하여 잔여 바이러스를 모두 제거할 수 있다.

[0109] 이러한 공정은 세포 배양액에서 발현되는 해독제의 약 30-35%를 회수하여, 세포 배양액 1리터당 각각 약 22-33 mg의 해독제 단백질을 생산할 수 있다.

[0110] 실시예 2: 대규모(scale-up) 제조 공정

[0111] 실시예 1에 나타난 공정에 기초하여, 변형된 공정은 생산 규모를 크게 하려는 목적으로 개발되었다.

[0112] 실시예 1의 배양 배지는 약 75-95 mg/ℓ의 역가를 생산할 수 있었다. 생산을 증가시키기 위해, 다른 다수의 CHO 배양 배지가 시험되었다. 이들 중 하나는 세포 성장 및 피크 세포 밀도에서 2-3배 증가를 보였고 (역가 = 200-225 mg/ℓ), 또한 10,000 ℓ까지 규모를 증가시킬 수 있었다.

[0113] 친화성 크로마토그래피는 해독제의 고-용적 추출을 위해 개발되었다. 친화성 리간드는 전체 대두 또는 분말로부

터 추출된 쿠니즈 트립신 저해제 (21 kDa; pI=4.5)에 포함되었다. 대두 트립신 저해제 (STI)은 해독제와의 1:1 복합체를 형성한다. 25 mM Na-아세테이트, 1M 아르기닌, pH 5.2를 포함하는, 비-경쟁적 저해제 용출 조건은 확장성(scalability) 및 상용성(compatibility)에 대해 확인되었다.

[0114] 실시예 1에서 개발된 공정에서, 탭스 필터에 의한 수집액 정화 단계가 사용되어 HMW 불순물을 제거한 후, 10배 농축되었다. 추가로, 바이러스 불활성화 단계는 계면활성제 (트리톤 X-100) 및 용매 (트리부틸 포스페이트)를 이용하였다. 이들 단계의 적합성 및 효율은 친화성 포획에 대해 평가되었다.

[0115] 데이터에서는, 탭스 여과는 요구되지 않으며, 용매 및 10x 농축 단계의 사용은 산물의 회수를 감소시키는 것으로 나타났다. 따라서, 추가의 개발을 위해, 탭스 여과 및 농축 단계는 생략되고, 용매 없이 계면활성제(트리톤 X-100)만을 사용한 바이러스 불활성화가 사용되었다. 바이러스 불활성화는 52.7 ml의 버퍼 대 매 1리터의 산물 (최종 농도: 0.5% 트리톤 X-100)의 비로 10% 트리톤 X-100을 첨가함으로써 달성되었다. 이러한 발견은 용매가 친화성 컬럼에 로딩하기 전에 샘플 제조에 통상 사용되기 때문에 예상치 못한 것이었다. 또한, 세포 배양액이 수집될 때, 원심 분리 단계의 통과를 사용하여 침전물을 제거한다는 것을 유의한다.

[0116] 15분 혼합 시간 및 실온에서 최소의 1시간 유지 시기(hold period) 이후, 처리된 산물은 통합 0.22 μ m 필터를 포함하는 500 l 용기로 연결된 Sartopore 2 (0.45/0.22 μ m 예비-필터로 연결된 Sartogruad NF 필터 (0.8/0.2 μ m) 예비-필터로 구성된 필터 트레인을 통하여 여과되며, 각 컬럼 로딩은 사용일에 여과된다.

[0117] STI 친화성 수지로부터 산물을 용출하기 위해서는, 아르기닌 (25 mM 아세트산 나트륨/1.0 M 아르기닌 pH 5.2)을 함유하는 용출 버퍼를 사용하였다.

[0118] 친화성 포획 이후, 몇몇 연마 단계가 이용되어 DNA, 숙주 세포 단백질 (HCP), 및 친화성 리간드의 침출수를 포함하는 잔여 불순물을 제거하였다. 양이온 교환 및 혼합-모드 이온 교환을 포함하는 2개의 크로마토그래피 선택 사항이 시험되었다. 그러나, 특성화에 이용가능한 공정-특이적인 숙주 세포 단백질 에세이가 없다. 따라서, 상업적인 ELISA가 대용품으로 사용되었고, 특이적인 HCP의 LC-MS/MS 정량화를 보충적 특성화를 위해 사용되었다. 추가로, 정성적 특성화를 위한 2D 은 염색 평가가 사용되었다.

[0119] 도 3은 3개의 잠재적인 하류 공정(DSP)의 평가를 나타낸다. 친화성 리간드 침출수의 정화에 기초하여, 3개의 DSP가 식별되었다. 산물 품질 및 공정-관련 불순물 정화물을 평가하기 위하여, 동일한 친화성 용출액 풀을 각각의 스트림에 대해 정방향 가공되었고, 산물 회수 및 CHO 숙주 세포 단백질 정화물 [HCP; 백만분의 일 (ppm)로 표현됨]에 대해 비교하였다. 각각의 DSP 공정으로부터 나온 용출액은 추가로 산물의 품질에 대해 시험되었다 (이하의 표).

IEX에 의한 피크 (%)

샘플	산성 피크	피크 1	피크 2	피크 3	염기성 피크
친화성 용출액	27.8%	17.8%	12.9%	16.6%	13.9%
양이온 교환 용출액	24.9%	14.5%	26.9%	20.8%	13.1%
혼합-모드 IEX 용출액 DSP-2	23.4%	15.7%	17.3%	20.4%	13.3%
혼합-모드 IEX 용출액 DSP-1	23.6%	15.2%	26.9%	20.0%	13.3%

SEC에 의한 단량체 (%)

샘플	HWP (%)	단량체 (%)
친화성 용출액	0.29%	99.71%
양이온 교환 용출액	4.30%	95.70%
혼합-모드 IEX 용출액 DSP-2	0.13%	99.87%
혼합-모드 IEX 용출액 DSP-1	0%	100%

RP에 의한 주요 피크 (%)

	전-주요 피크	주요 피크	베타 피크
친화성 용출액	0.8%	93.4%	5.7%
양이온 교환 용출액	1.2%	92.9%	5.9%
혼합-모드 IEX 용출액 DSP-2	0.5%	94.2%	5.3%
혼합-모드 IEX 용출액 DSP-1	0.9%	93.4%	5.8%

[0120]

[0121] 표는 3개의 평가된 하류 공정에서의 산물 품질 평가를 나타낸다. 3개의 DSP로부터 나온 용출액 (도 3)을 산물 품질 영향에 대해 평가하였다. 전하-기반 불균질도 (IEX) 또는 역상 (RP)에 대한 영향은 보이지 않았다.

그러나, DSP-2로부터의 샘플은, 양이온-교환 연마 단계에 의해 정제되었는데, 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의한 때 고분자량 응집체(%)의 증가를 나타내었다.

[0122] 시험에 기초하여, 대규모 하류 공정이 개발되었는데, 도 2에 도시되어 있다. 이러한 공정은 도 1에 도시된 것보다 더욱 간단하다. 그러나, 수율은 2-배 더 높았다. 실시예 2에 기재된 방법은, 단백질 생산을 2-3 배 증가시킬 수 있는 새로운 세포 배양 시스템과 조합하여, 전체 해독제 생산을 4 내지 6-배 증가시킬 수 있고, 적어도 10,000 L의 생산 규모가 가능해졌다.

[0123] 도 2에서, 하류 공정(200)은 바이러스 불활성화 단계 (202) 이후, 수집 (201)를 이용하였고, 용매없이 단지 계면활성제 (트리톤 X-100)만을 사용하였다. 친화성 포획 단계 203에서, STI 리간드를 갖는 수지가 사용되었고, 해독제는 아르기닌을 포함하는 용출 버퍼(pH 5)로 용출되었다. 선택적인 한외여과/정용 여과 (UF/DF) 단계는 친화성 포획 이후 사용될 수 있는데, 이는 단백질을 농축하여 pH를 약 7로 할 수 있다.

[0124] 단계 204에서, 음이온성 막이 사용되어 샘플로부터 특정 불순물 (예를 들어, DNA, HCP)을 제거하였다. 시험된 예시적인 음이온성 막은 Sartobind Q 막인데, 이는 해독제에 해로운 영향을 보이지 않았다.

[0125] 단계 205에서, 혼합-모드 이온 교환의 예시적 유형은 CHT (세라믹 히드로아파타이트)을 갖는 IEX-혼합 모드이다. 예시적인 용출 버퍼는 인산염 버퍼이다. 이러한 단계는 STI 침출수를 제거하는데 유용하다.

[0126] 단계 206에서, 소수성 분리는 예로서 옥틸 세파로오스 크로마토그래피에 의해 달성될 수 있으며, 단백질은 NaCl를 포함하는 버퍼에 의해 용출될 수 있다. 이러한 단계는 잔여 HCP를 제거하는데 유용하다. 이하의 표는 수회의 시험 전개에서의 정제 및 회수 수율을 나타낸다.

	벤치 규모 (10ℓ)	파일럿 1 (400ℓ)	파일럿 2 (400ℓ)
친화성 포획	178 mg/ℓ의 세포 배양물	122 mg/ℓ의 세포 배양물	150 mg/ℓ의 세포 배양물
정용 여과	95%	98%	99%
Sartobind-Q	-	-	95%
Iex-혼합 모드	92%	95%	93%
소수성 결합(옥틸)	100%	103%	99%
바이러스 여과	95%	92%	94%
최종 Uf/Df 벌크 약 물질	89%	91%	92%
누적 수율	60%	69%	66%

[0127]

[0128] 실시예 3: 제조된 단백질의 특성화

[0129] 이러한 실시예에서, 방법은 상기 개발된 공정들로부터 생산된 단백질 산물을 특성화하기 위해 개발되었다. 시험된 방법은 등전점 전기영동(IEF), 감소된 역상 (Red-RP), 및 감소된 펩티드 맵 (PMAP)을 포함한다.

[0130] 등전점 전기영동은 해독제 단백질의 전하 불균일성을 결정하는데 사용되었다. 등전점 전기영동은 이들의 등전점 (pI), 또는 단백질의 순 전하가 0인 pH에 기초한, 단백질 분리용 전기영동 기술이다. 등전점 전기영동은 Life Technologies 제조사의 지침을 따라 pH 3-10 겔(Novex IEF Gels) 및 시약을 사용하여 전기영동하고, 콜로이드성 청색 염색 키트 (Invitrogen)에 의해 염색하여 수행하였다. 그 결과를 Serva 3-10 pI 마커와 비교하였다.

[0131] 시험 룯트를 물에 1.6 mg/mL로 희석한 후, IEF pH 3 10 샘플 버퍼에 1:1로 희석하였다. 각각의 샘플을 10 μ ℓ (8.0 μ g) 로딩하였고, 100V에서 1시간 동안 전기영동을 실시한 후, 200V에서 1시간 및 500V에서 30분 동안 전기영동을 실시하였다. 겔은 고정 용액 (Sigma-Aldrich)에서 30분간 고정되고, 콜로이드성 청색 염색으로 1시간 동안 염색하고, 물에서 밤새 탈색하였다.

[0132] 환원된 역상은 단백질의 전장 및 절단 형태 모두의 탐지를 위해 역상 크로마토그래피 분리를 사용하는 HPLC 방법이다. 샘플은 6M 구아니딘-HCl/50 mM Tris pH 7.5으로 버퍼 교환하고, 50℃에서 30분 동안 항온 처리에 앞서 DTT로 환원시켰다. 이후, 샘플은 비닐피리딘을 사용하여 실온의 어두운 장소에서 90분 동안 알킬화시킨 후, 1M DTT에 의해 퀀칭하였다. 상기 방법은 Agilent Zorbax C18 HPLC 컬럼을 사용하여 단백질을 고정상, 및 15 내지

95% 구배로 극성이 감소하는 이동상(아세트니트릴 중의 0.1% 트리플루오로아세트산)에 결합시켜, 이들의 소수성에 기초하여 단백질을 분리하였다. UV 파장은 214nm이다.

[0133]

Lys-C 소화된 펩티드 맵은 Lys-C 소화물의 UPLC-UV/MS^E 분석을 이용하였다. 이러한 방법은 98% 서열 커버를 제공하고, 번역후 변형, 예컨대 당화, 아스파르트산 수산화, 및 C-말단 리신 절단을 특징으로 할 수 있었다. 이러한 방법은 또한 안정성-표지 마커, 예컨대 아스파라긴 탈아미드화 및 메티오닌 산화도 모니터링할 수 있었다. 샘플 루트는 각각 환원 및 알킬화되었고, 리실 엔도펩티다제(Lys-C)로 처리되었다. 효소 소화에 의해 생성된 펩티드는 RP-UPLC에 의해 분리되고, 질량 분광분석에 의해 분석되었다.

[0134]

이하의 표는 정제된 단백질 산물 및 이들의 백분율 및 서열로부터 탐지된 단백질 아이소폼의 유형을 나타낸다 (Lot #1: 실시예 1에서 개발된 하류 공정에 의함; Lot #1: 실시예 2에서 개발된 하류 공정에 의함). 실시예 1의 공정과 비교할 때, 실시예 2의 공정은 서열 번호 9의 백분율이 (9.0%에서 2.7%로) 상당히 감소하는 것에 유의하는 것은 흥미로운데, 이것은 증가된 정제 효율에 기인한다.

경쇄 아이소폼:

	Lot #1	Lot #2
손상되지 않은 경쇄 (서열 번호 4)	46.8%	37.9%
변형되거나 또는 절단된 경쇄	53.2%	62.1%

[0135]

중쇄 아이소폼:

	Lot #1	Lot #2
2 개의 0-연결 당화를 갖는 손상되지 않은 중쇄 (서열 번호 5)	10.2%	22.0%
1 개의 0-연결 당화를 갖는 손상되지 않은 중쇄 (서열 번호 5)	18.3%	22.6%
1 개의 0-연결 당화를 갖는 K 절단된 C-말단 (서열 번호 8)	57.8%	46.9%
13 개의 C-말단 잔기의 손실(서열 번호 9)	9.0%	2.7%
14 개의 C-말단 잔기의 손실(서열 번호 10)	0.6%	0.8%
15 개의 C-말단 잔기의 손실(서열 번호 11)	4.0%	5.0%

[0136]

C-말단 K가 없는 중쇄 (서열 번호 8)	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETD FDIIVLRLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EPPYVDRNSC KLSSEFIITQ
361	NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
	421 WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPL

[0137]

13 개의 C-말단 잔기가 없는 중쇄 (서열 번호 9)	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETD FDIIVLRLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EPPYVDRNSC KLSSEFIITQ
361	NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
	421 WIDRSMKTRG LPKAK

[0138]

14 개의 C-말단 잔기가 없는 중쇄 (서열 번호 10)	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETD FDIIVLRLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EPPYVDRNSC KLSSEFIITQ
361	NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
	421 WIDRSMKTRG LPKA

[0139]

15 개의 C-말단 잔기가 없는 중쇄 (서열 번호 11)	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAACHLYQ
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETDYD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSFITQ
361	NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
	421 WIDRSMKTRG LPK

실시예 4: 대규모 공정의 확인

본 실시예는 추가의 확인을 위한, 실시예 1 및 2에 나타난 공정을 기반으로 하는 공정을 기재하고 있다.

계면활성제에 의한 바이러스 불활성화

바이러스 불활성화 단계는 10% 트리톤 X-100을 수집된 단백질에 첨가함으로써 수행되었다. 1 Capto STI 주기 (이하 기재됨)에 해당하는 수집된 단백질은 예비-필터로서 사용되는 4x30" Sartoguard NF 필터를 통해 수집 탱크로부터 10% 트리톤 X-100 첨가 탱크로 여과된 후, 3x20" Sartoguard NF 필터 0.8/0.2 μ m를 통해 여과되었다. 10% 트리톤 X-100 첨가 후, 풀을 혼합한 후, 3x30" Sartoguard NF 0.8/0.2 μ m 필터를 통해 유지 탱크로 이송하였다. 일단 유지 시간이 종료되면, 불활성화된 풀을 6x30" Sartoguard NF 필터 0.8/0.2 μ m 필터 및 연속으로 3x30" Sartopore 2 0.45/0.2 μ m 필터를 통해 Capto STI 컬럼에 로딩하였다. 이러한 서열은 Capto STI 작동이 종료되는 동안 4개의 주기가 수행될 때까지 반복되었다. 6x30" Sartoguard NF 0.8/0.2 μ m 필터는 제2 주기가 로딩된 후, 교체되었다.

Capto STI 크로마토그래피

친화성 컬럼 크로마토그래피는 Capto STI 수지를 사용하여 주위 온도에서 수행되었다. 로딩 상 동안, 산물은 수지에 결합되나, 오염물은 이를 통과한다. 산물은 용출 버퍼 중에서 단백질과 고농도의 아르기닌의 상호작용을 파괴시킴으로써 회수되었다. 사용에 앞서, 컬럼은 주입수(water of injection, WFI)로 씻어내고, 100mM 인산 (pH 3.0)으로 정화하고, WFI로 씻어내었다. 컬럼은 초기에 예비-균질화 버퍼 (20 mM Tris-HCl, pH 7.4)로 예비-균질화된 후, 균질화 버퍼 (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7.4)로 균질화되고, 일단 컬럼의 pH 및 전도성이 설명서 이내인 경우, 트리톤-X 100 처리된 정화된 수집물 (HCCF)을 로딩하였다. HCCF 물질의 각 주기는 이의 바이러스 불활성화 유지 탱크로부터 컬럼으로 직접 이송되었다.

로딩한 후, 컬럼은 균질화 버퍼로 씻고, 고 아르기닌 저 pH 용출 버퍼 (용출 버퍼: 25mM 아세트산 나트륨 1.0M 아르기닌 pH 5.2)로 용출하였다. 상기 주기의 종점, 그리고 다음 주기 전에, 컬럼을 WFI로 씻어내고, 100mM 인산 (pH 3.0)로 다시 청정화시키고, WFI로 다시 씻어내었다. 몇몇 주기로부터 나온 모든 용출액은 함께 모았다. 최종 주기가 수집된 후, 용출되는 산물을 컬럼의 하류 라인으로부터 수집 용기로 쏟아내기 위해서, 컬럼을 우회함으로써 버퍼 추적을 실시하였다. 모든 주기가 완료된 후, 컬럼을 WFI로 씻어내고, 100mM 인산 pH 3.0으로 정화하고, WFI로 씻어내고, 예비 균질화 및 균질화 버퍼로 중화하고, 에탄올 저장 용액 중에 저장하였다.

Capto STI 용출액 풀은 100mM 아르기닌 HCl의 최종 농도가 될 때까지 1.0M 아르기닌 HCl (pH 7.0)와 혼합되어, 상기 풀을 안정화시켰다. 생성되는 풀은 이후 농축되고, 10 kDa Ultracel Pellicon 3 막 상에서 정용 여과되어, 대부분의 아르기닌을 제거하고, 이로 인하여 추후의 크로마토그래피 단계에 대한 로딩을 가능하게 하였다.

Sartobind Q 막 크로마토그래피

음이온 교환막 크로마토그래피는 Sartobind Q Jumbo 카트리지를 사용하여 주위 온도에서 수행되었다. 로딩 상 동안, 산물은 막을 통과하나, 오염물은 이에 결합한다. 사용에 앞서 상기 카트리는 균질화 버퍼로 씻어내어, 저장용 습윤제를 제거한다. 카트리지를 0.5M NaOH로 정화하였다. 이후, 상기 카트리는 균질화 버퍼로 균질화되고, 일단 카트리의 pH 및 전도성이 설명서의 범위 내이면, 이는 농축되고, Capto STI 용출액을 정용 여과하였다. 로딩 물질의 하나의 주기는 추후 UF/DF 수집 탱크로부터 직접적으로 로딩되었다. 로딩한 후, 카트리를 균질화 버퍼로 세척하였다. 산물을 수집한 후, 산물을 카트리지 하류의 라인으로부터 수집 용기로 쏟아내기 위해, 카트리를 우회함으로써 버퍼 추적을 실시하였다.

세라믹 히드로아파타이트 크로마토그래피 (CHT)

혼합 모드 컬럼 크로마토그래피는 CHT 유형 I 40 μ m 수지를 사용하여 주의 온도에서 실시하였다. 로딩 상 동안, 산물은 수지에 결합하나 일부 오염물은 이를 통과하였다. 산물은 나트륨 농도를 선형 기울기로 증가시킴으로써 회수하였다. 사용에 앞서, 컬럼은 1.0M NaOH로 정화하고, 소량의 균질화 버퍼로 씻어내었다. 컬럼은 초기에 예

비-균질화 버퍼로 예비-균질화된 후, 균질화 버퍼로 균질화되고, 일단 컬럼의 pH 및 전도성이 설명서 범위 내이면, Sartobind Q 용출액을 로딩하였다.

[0153] 로딩의 각 주기는 이의 수집 탱크로부터 컬럼으로 직접 이송되었다. 로딩한 후, 컬럼은 균질화 버퍼로 세척되었다. 이후, 구배는 90% 균질화 버퍼 (50 mM MES, 5 mM 인산나트륨, pH 7.0)로부터 90% 용출 버퍼 (50mM MES, 5mM 인산나트륨, 2M 염화나트륨 pH 7.0)로 전개되었다.

[0154] 주기의 종점, 및 다음 주기 이전에, 컬럼을 고 인산염 용출 후 세척 버퍼로 스트리핑하기 전에 균질화 버퍼로 씻어내고, 균질화 버퍼로 씻어내고, 1.0M NaOH로 다시 정화하고, 균질화 버퍼로 다시 씻어내었다. 몇몇 주기로부터 나온 모든 용출액은 함께 모았다. 마지막 주기를 수집한 후에, 용출된 산물을 컬럼 하류의 라인으로부터 수집 용기로 쏟아내기 위해 컬럼을 우회시킴으로서 버퍼 추적을 실시하였다. 모든 주기가 종료된 후, 컬럼을 균질화 버퍼로 씻어내고, 1.0M NaOH로 정화하고, 가성/인산염 저장 용액 중에 저장하였다.

[0155] 옥틸 세파로오스 4FF 크로마토그래피

[0156] 소수성 결합 크로마토그래피는 옥틸 세파로오스 FF 수지를 사용하여 주위 온도에서 수행되었다. 로딩 상 동안, 산물은 수지를 통과하나 오염물은 이에 결합하였다. 사용에 앞서, 컬럼을 1.0M NaOH로 정화하였다. 컬럼은 초기에 WFI로 예비-균질화된 후, 균질화 버퍼로 균질화되고, 일단 컬럼의 pH 및 전도성이 설명서 이내인 경우, 이에 CHT 용출액을 로딩하였다. 로딩의 각 주기는 이의 수집 탱크로부터 컬럼으로 직접 이송되었다. 로딩한 후, 컬럼을 균질화 버퍼로 세척하였다. 주기의 종점 및 다음 주기 이전에, 컬럼을 WFI로 스트리핑하고, 1.0M NaOH로 다시 정화하였다. 최종 주기가 수집된 후, 산물을 카트리지의 하류 라인으로부터 수집 용기로 쏟아내기 위해 컬럼을 우회시킴으로써 버퍼 추적을 실시하였다. 모든 주기가 완료되면, 컬럼을 WFI로 스트리핑하고, 1.0M NaOH로 정화하고, 가성 저장 용액 중에 저장하였다.

[0157] Planova 20N 바이러스 감소 여과 (VRF)

[0158] 바이러스 감소 여과는 Planova 20N 바이러스 감소 필터 상에서 수행되었다. 필터는 데드 엔드 모드(dead end mode)에서 작동되었고, 산물은 필터를 통과하였으나, 잔여 바이러스 입자는 섬유 내에 유지되었다. 필터는 사용 전에 옥틸 세파로오스 균질화 버퍼로 플러싱(flushing) 하였다. 이후, 산물은 필터를 통과한 후, 추가적인 균질화 버퍼로 플러싱하였다. 필터는 무결성에 대해 시험된 후, 사용 후 배치되었다.

[0159] VRF 여과물을 10 kDa Ultracel Pellicon 3 막 상에서 농축하였다. 부분 농축 이후, 이를 최종 제제로 정용 여과하였다. 이후, 산물은 최종 목표 농도로 농축되고, 회수되었다.

[0160] * * *

[0161] 달리 정의된 바 없는 경우, 본원에 사용된 모든 기술적 과학 용어는 본 발명이 속하는 당업계의 통상의 기술자 중 한 명에 의해 통상 이해되는 의미를 갖는다.

[0162] 본원에서 예시적으로 설명된 본 발명은 구체적으로 본원에 기재되지 않은 어느 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한들의 부재 하에 적합하게 실시될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 용어 "포함하는(comprising)", "포함하는(including)", "함유하는(containing)" 등은 제한없이 넓게 판독될 것이다. 추가로, 본원에서 채택된 용어 및 표현은 설명의 측면에서 제한없이 사용되었고, 도시된 특징의 어느 균등물 또는 이의 일부를 배제하면서 상기 용어 및 표현을 사용할 의도는 아니지만, 본 발명의 청구 범위 내에서 다양한 변형이 가능한 것으로 인식된다.

[0163] 따라서, 본 발명이 바람직한 구현예 및 선택적인 특징에 의해 구체적으로 기재되었더라도, 본원에서 이에 포함된 본 발명의 변형, 개선 및 변이는 당업계의 통상의 기술자에게 의지할 것이며, 이러한 변형, 개선 및 변형은 본 발명의 범주 내인 것으로 이해되어야 할 것이다. 본원에 제공된 물질, 방법, 및 예는 바람직한 구현예를 제시하며, 예시적이며, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0164] 본 발명은 본원에서 넓고 일반적으로 기재되었다. 일반적 기재에 속하는 더 좁은 종 및 하위 종류 그룹의 각각도 또한 본 발명의 일부를 형성한다. 이것은 본 발명의 일반적 기재를 포함하며, 삭제된 물질이 본원에 구체적으로 인용되었는지 여부를 불문하고, 종으로부터의 특정 물건을 제거하는 단서 또는 부정적인 제한의 일반적인 기재를 포함한다.

[0165] 또한, 본 발명의 특징 및 측면이 마쿠쉬 그룹의 용어로 기재된 경우, 당업계의 통상의 기술자들은 본 발명이 이로 인하여 마쿠쉬 그룹의 개별 멤버 또는 멤버들의 하위 그룹의 측면에서 기재된 것으로 인식할 것이다.

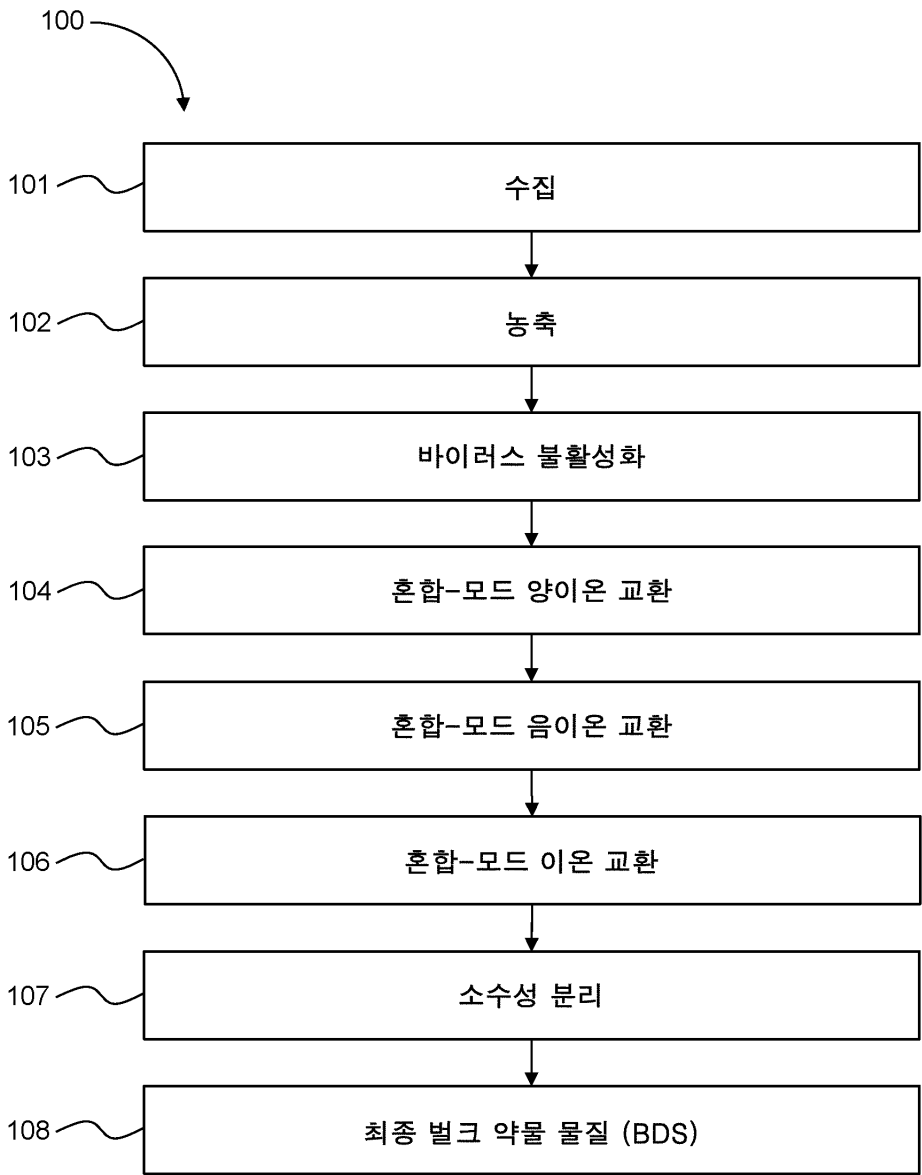
[0166] 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 다른 참고 자료는 명확히 전체로서 참고로 포함되며, 이는 각

각이 개별적으로 참고로서 포함되는 것과 동일한 정도이다. 논란이 있는 경우, 정의를 포함하는 본 발명의 상세한 설명은 조절될 것이다.

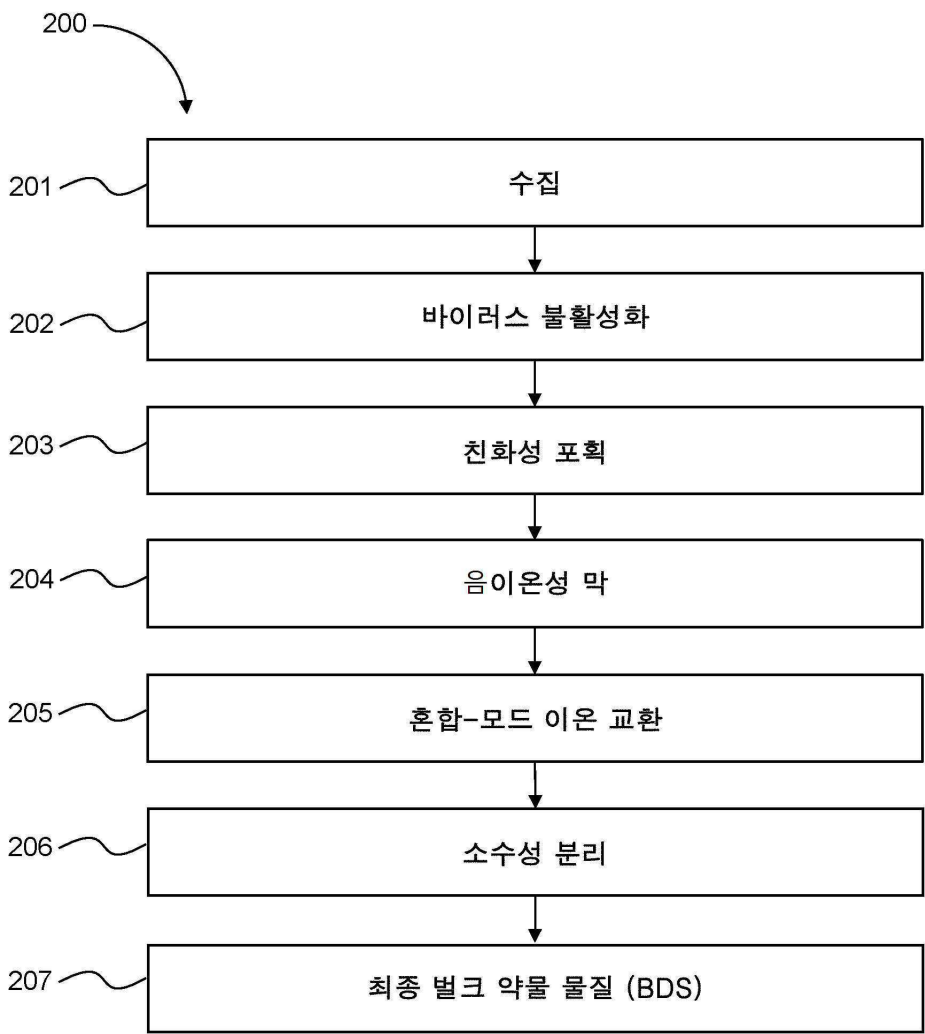
[0167] 기재 사항이 상기 구현예와 함께 기재되었으며, 상기 설명 및 예는 본원의 범위를 설명하고 이를 제한하지 않는 것으로 의도된다. 본원의 범위 내의 다른 측면, 장점 및 변형은 본 발명이 속하는 당업계의 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

도면

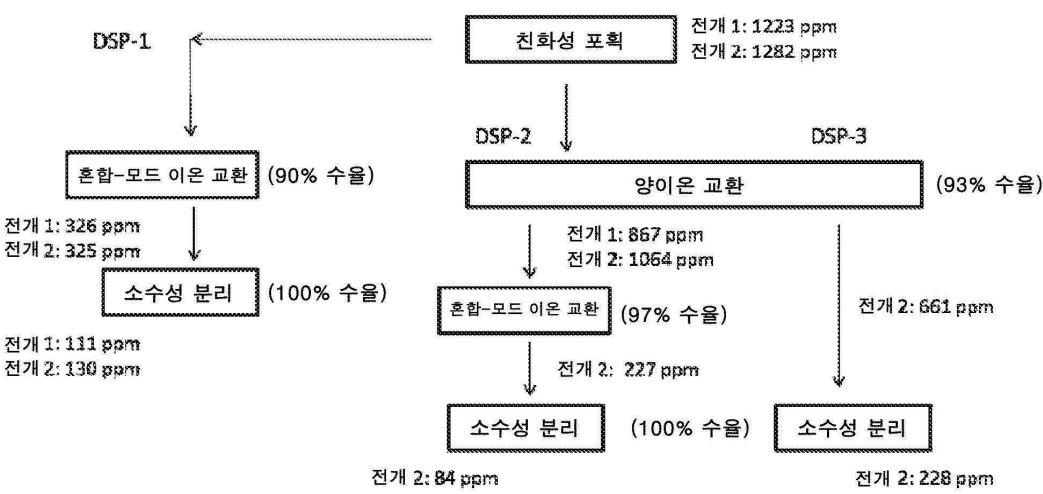
도면1



도면2



도면3



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> PORTOLA PHARMACEUTICALS, INC.

<120> PREPARATION OF FACTOR XA DERIVATIVES

<130> 37JE-225786-WO

<140> PCT/US2017/038169

<141> 2017-06-19

<150> 62/351,841

<151> 2016-06-17

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 448

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu

1 5 10 15

Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu

20 25 30

Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp

35 40 45

Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly

50 55 60

Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala

100 105 110

Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly

115 120 125

Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val

130 135 140

Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp

145 150 155 160

Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp

165 170 175

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

180 185 190

Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp

195 200 205

Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr

210 215 220

Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln

225 230 235 240

Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu

245 250 255

Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn

260 265 270

Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg

325 330 335

Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu

340 345 350

Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp

355 360 365

Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val

370 375 380

Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly

385 390 395 400
Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr

 405 410 415
Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro

 420 425 430
Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys

 435 440 445

<210> 2

<211> 365

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 2

Ala Asn Ser Phe Leu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys

1 5 10 15
Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly

 20 25 30
Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu

 35 40 45
Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln

 50 55 60
Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly

65 70 75 80
Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr

 85 90 95
Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys Arg Arg Lys Arg Ile

 100 105 110
Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu

 115 120 125
Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser

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

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

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

 325 330 335
 Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys
 340 345 350
 Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
 355 360 365
 <210> 3
 <211> 359
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 3

Ala Asn Ser Phe Leu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys

1 5 10 15

Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly

20 25 30

Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu

35 40 45

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

50 55 60

Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly

65 70 75 80

Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr

85 90 95

Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys

100 105 110

Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn

115 120 125

Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr

130 135 140

Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val Gly

145 150 155 160

Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu Val

165 170 175

Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe

180 185 190

Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn

195 200 205

Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu

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

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

325 330 335
Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu Val
340 345 350
Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
355

<210> 4

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 4

Ala Asn Ser Phe Leu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys
1 5 10 15

Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly
20 25 30
Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu
35 40 45

Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln
 50 55 60
 Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly
 65 70 75 80

Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr
 85 90 95
 Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg
 100 105

<210> 5

<211> 254

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 5

Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala
 1 5 10 15
 Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu

20 25 30
 Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys
 35 40 45

Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly
 50 55 60

Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe
 65 70 75 80

Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr

85 90 95
 Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg
 100 105 110

Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser
 115 120 125

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

130 135 140
Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser

145 150 155 160
Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys

165 170 175
Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ala Gly Gly Pro His Val Thr Arg

180 185 190
Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly

195 200 205
Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe

210 215 220
Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala

225 230 235 240
Lys Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys

245 250
<210> 6

<211> 6
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide
<400> 6

Arg Lys Arg Arg Lys Arg
1 5

<210> 7
<211> 1218

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 7
atggggcgcc cactgcacct cgtcctgctc agtgcctccc tggctggcct cctgctgctc

ggggaaagtc tgttcatccg caggagcag gccacaaca tcctggcgag ggtcacgagg 120
 gccaatcct ttttttctg gaataaatac aaagatggcg accagtgtga gaccagtcct 180
 tgccagaacc agggcaaatg taaagacggc ctcggggaat acacctgcac ctgttttagaa 240
 ggattcgaag gcaaaaactg tgaattattc acacggaagc tctgcagcct ggacaacggg 300

gactgtgacc agttctgccg cgaggaacag aactctgtgg tgtgctcctg ccccccgagg 360
 tacaccctgg ctgacaacgg caaggcctgc attccacag ggcctaccc ctgtgggaaa 420
 cagaccctgg aacgcaggaa gaggaggaag aggatcgtgg gaggccagga atgcaaggac 480
 ggggagtgtc cctggcaggc cctgtctatc aatgaggaaa acgagggttt ctgtggtgga 540
 accattctga gcgagttcta catcctaacg gcagccact gtctctacca agccaagaga 600
 ttcaaggtga gggtagggga ccggaacacg gacgaggagg agggcggtga ggcgggtcac 660
 gaggtggagg tggatcatca gcacaaccgg ttcacaaagg agacctatga cttcgacatc 720

gccgtgctcc ggctcaagac ccccatcacc ttccgcatga acgtggcgcc tgcctgcctc 780
 cccgagcgtg actgggccga gtccacgtg atgacgcaga agacggggat tgtgagcggc 840
 ttccggcgca cccacagaaa gggccggcag tccaccaggc tcaagatgct ggaggtgccc 900
 tacgtggacc gcaacagctg caagctgtcc agcagcttca tcatcacca gaacatgttc 960
 tgtgccggtc acgacaccaa gcaggaggat gcctgccagg gggacgcagg gggcccgcac 1020
 gtaccccgct tcaaggacac ctacttcgtg acaggcatcg tcagctgggg agagggtgt 1080
 gcccgtgaagg ggaagtacgg gatctacac aaggtcaccg ccttcctcaa gtggatcgac 1140

aggtccatga aaaccagggg cttgcccaag gccaaagacc atgccccgga ggtcataacg 1200
 tcctctccat taaagtga 1218

<210> 8

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 8

Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala

1 5 10 15

Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu

20 25 30

Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys
35 40 45

Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly
50 55 60

Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe
65 70 75 80

Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr
85 90 95

Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg
100 105 110

Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser
115 120 125

Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys
130 135 140

Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser
145 150 155 160

Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys
165 170 175

Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ala Gly Gly Pro His Val Thr Arg
180 185 190

Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly
195 200 205

Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe
210 215 220

Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala
225 230 235 240

Lys Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu
245 250

<210> 9

<211> 241

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 9

Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala

1 5 10 15

Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu

20 25 30

Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys

35 40 45

Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly

50 55 60

Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe

65 70 75 80

Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr

85 90 95

Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg

100 105 110

Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser

115 120 125

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

130 135 140

Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser

145 150 155 160

Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys

165 170 175

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

180 185 190

Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly

195 200 205

Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe

210 215 220

Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala
 225 230 235 240
 Lys

<210> 10

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 10

Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala
 1 5 10 15

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

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

Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser
 145 150 155 160
 Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys

165 170 175
 Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ala Gly Gly Pro His Val Thr Arg
 180 185 190
 Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly
 195 200 205

 Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe
 210 215 220
 Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala
 225 230 235 240
 <210> 11
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 11
 Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys
 130 135 140

Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser
 145 150 155 160

Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys
 165 170 175

Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ala Gly Gly Pro His Val Thr Arg
 180 185 190

Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly
 195 200 205

Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe
 210 215 220

Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys
 225 230 235