

명세서

청구범위

청구항 1

그의 보조인자의 부존재하에서 응고활성을 갖는 것을 특징으로 하는 인자 IX (F.IX) 또는 활성화된 인자 IX (F.IXa)의 변이체로서, 상기 보조인자가 인자 VIII (F.VIII) 또는 활성화된 인자 VIII (F.VIIIa)이고, 상기 인자 IX (F.IX) 또는 활성화된 인자 IX (F.IXa)의 변이체가 아미노산 치환 V181I과 조합된, 265 위치에서 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하며,

상기 265 위치에서 아미노산 치환이 K265T, K265A, K265D, K265E, K265F, K265G, K265H, K265I, K265N, K265S 및 K265V로부터 선택되고,

상기 인자 IX (F.IX) 또는 활성화된 인자 IX가 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 인간 유래 인자이며,

상기 아미노산의 번호매김은 Kurachi 및 Davie, 1982에 따른 F.IX 번호매김 시스템이 사용되고, 실제 번호매김은 -46(Met)에서 시작하는 것인 인자 IX (F.IX) 또는 활성화된 인자 IX (F.IXa)의 변이체.

청구항 2

제1항에 있어서,

383 위치에서 아미노산 치환인 I383V를 더 포함하는 것인 변이체 인자 IX.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 265 위치에서 아미노산 치환이 K265T, K265A, K265G, K265V, K265N 및 K265D로부터 선택된 것인 변이체 인자 IX.

청구항 5

삭제

청구항 6

제2항에 있어서,

338 및 377 위치 중 적어도 하나에서 아미노산 치환을 더 포함하며, 이들이 각각 R338A 및 S377W인 것인 변이체 인자 IX.

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 변이체 인자 IX가,

변이체 K265T / V181I,

변이체 K265T / V181I / I383V,

변이체 K265T / V181I / I383V / R338A / S377W,

변이체 K265A / V181I,

변이체 K265A / V181I / I383V, 또는

변이체 K265A / V181I / R338A / S377W로부터 선택된 것인 변이체 인자 IX.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 변이체 인자 IX가,

변이체 K265T / V181I / I383 V,

변이체 K265A / V181I / I383 V,

변이체 K265G / V181I / I383 V,

변이체 K265V / V181I / I383V,

변이체 K265N / V181I / I383V,

변이체 K265D / V181I / I383V,

변이체 K265E / V181I / I383V,

변이체 K265F / V181I / I383V,

변이체 K265H / V181I / I383V,

변이체 K265I / V181I / I383V, 또는

변이체 K265S / V181I / I383V로부터 선택된 것인 변이체 인자 IX.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 변이체에 공유적으로 부착된 추가의 화합물 또는 모이어티를 포함하는 것인 변이체 인자 IX.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 추가의 화합물 또는 모이어티가 단백질, 표지 및 중합체 중 적어도 하나인 것인 변이체 인자 IX.

청구항 12

프로모터 및 터미네이터 서열 중 적어도 하나에 작동가능하게 연결된, 제1항, 제2항, 제4항, 제6항, 제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 변이체 인자 IX를 코딩하는 핵산.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 핵산이 발현 플라스미드, 유전자 치료 구조체, 바이러스 또는 비바이러스 벡터, 또는 유전자 복구용 주형인 것인 핵산.

청구항 14

제1항, 제2항, 제4항, 제6항, 제8항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 인자 IX (F.IX)의 변이체를 포함하는 것인 출혈 질환 또는 출혈의 진단, 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 출혈 질환이 혈우병 A, 인자 F.VIII 또는 F.VIIIa 에 대한 억제성 항체에 의하여 야기되거나 복합화된 혈우병, 혈우병 B 인 것인 출혈 질환 또는 출혈의 진단, 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 출혈 질환 또는 출혈이 우회제 (by-passing agents)가 사용되는 출혈 질환인 것인 출혈 질환 또는 출혈의 진단, 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 출혈 질환 또는 출혈이 신생 응고병증; 중증 간질환; 고위험 외과 수술 과정; 외상성 혈액 손실; 골수 이식; 저혈소판증 및 혈소판 기능 질환; 경구 항응고의 긴급한 반전 (urgent reversal of oral anticoagulation); 인자 V, VII, X, 및 XI의 선천성 결핍; 및 폰 빌레브란트 인자에 대한 저해제를 갖는 폰 빌레브란트 질병, 큰 손상, 뇌출혈, 혈소판 기능 질환과 연관된 혈액손실을 포함하는 것인 출혈 질환 또는 출혈의 진단, 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 18

제14항에 있어서,

세포 치료, 유전자 치료, 단백질 주입 치료를 위한 것인 출혈 질환 또는 출혈의 진단, 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 19

제12항에 따른 핵산을 포함하는 것인 출혈 질환 또는 출혈의 진단, 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 출혈 질환이 혈우병 A, 인자 F.VIII 또는 F.VIIIa 에 대한 억제성 항체에 의하여 야기되거나 복합화된 혈우병, 혈우병 B 인 것인 출혈 질환 또는 출혈의 진단, 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서,

상기 출혈 질환 또는 출혈이 우회제 (by-passing agents)가 사용되는 출혈 질환인 것인 출혈 질환 또는 출혈의 진단, 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 22

제19항에 있어서,

상기 출혈 질환 또는 출혈이 신생 응고병증; 중증 간질환; 고위험 외과 수술 과정; 외상성 혈액 손실; 골수 이식; 저혈소판증 및 혈소판 기능 질환; 경구 항응고의 긴급한 반전 (urgent reversal of oral anticoagulation); 인자 V, VII, X, 및 XI의 선천성 결핍; 및 폰 빌레브란트 인자에 대한 저해제를 갖는 폰 빌레브란트 질병, 큰 손상, 뇌출혈, 혈소판 기능 질환과 연관된 혈액손실을 포함하는 것인 출혈 질환 또는 출혈의 진단, 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 23

제19항에 있어서,

세포 치료, 유전자 치료, 단백질 주입 치료를 위한 것인 출혈 질환 또는 출혈의 진단, 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 24

출혈 질환 또는 출혈의 진단, 예방 또는 치료에 사용하기 위한, 제1항, 제2항, 제4항, 제6항, 제8항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 인자 IX (F.IX)의 변이체.

청구항 25

제24항에 있어서,

상기 출혈 질환이 혈우병 A, 인자 F.VIII 또는 F.VIIIa 에 대한 억제성 항체에 의하여 야기되거나 복합화된 혈우병, 혈우병 B 인 것인 인자 IX (F.IX)의 변이체.

청구항 26

제24항에 있어서,

상기 출혈 질환 또는 출혈이 우회제 (by-passing agents)가 사용되는 출혈 질환인 것인 출혈 질환 또는 출혈의 진단, 예방 또는 치료를 위한 것인 인자 IX (F.IX)의 변이체.

청구항 27

제24항에 있어서,

상기 출혈 질환 또는 출혈이 신생 응고병증; 중증 간질환; 고위험 외과 수술 과정; 외상성 혈액 손실; 골수 이식; 저혈소판증 및 혈소판 기능 질환; 경구 항응고의 긴급한 반전 (urgent reversal of oral anticoagulation); 인자 V, VII, X, 및 XI의 선천성 결핍; 및 폰 빌레브란트 인자에 대한 저해제를 갖는 폰 빌레브란트 질병, 큰 손상, 뇌출혈, 혈소판 기능 질환과 연관된 혈액손실을 포함하는 것인 인자 IX (F.IX)의 변이체.

청구항 28

출혈 질환 또는 출혈의 진단, 예방 또는 치료에 사용하기 위한 제12항에 따른 핵산.

청구항 29

제28항에 있어서,

상기 출혈 질환이 혈우병 A, 인자 F.VIII 또는 F.VIIIa 에 대한 억제성 항체에 의하여 야기되거나 복합화된 혈우병, 혈우병 B 인 것인 핵산.

청구항 30

제28항에 있어서,

상기 출혈 질환 또는 출혈이 우회제 (by-passing agents)가 사용되는 출혈 질환인 것인 핵산.

청구항 31

제28항에 있어서,

상기 출혈 질환 또는 출혈이 신생 응고병증; 중증 간질환; 고위험 외과 수술 과정; 외상성 혈액 손실; 골수 이식; 저혈소판증 및 혈소판 기능 질환; 경구 항응고의 긴급한 반전 (urgent reversal of oral anticoagulation); 인자 V, VII, X, 및 XI의 선천성 결핍; 및 폰 빌레브란트 인자에 대한 저해제를 갖는 폰 빌레브란트 질병, 큰 손상, 뇌출혈, 혈소판 기능 질환과 연관된 혈액손실을 포함하는 것인 핵산.

청구항 32

제28항에 있어서,

세포 치료, 유전자 치료, 단백질 주입 치료를 위한 것인 출혈 질환 또는 출혈의 진단, 예방 또는 치료를 위한 핵산.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원발명은 혈액응고 캐스케이드의 비타민 K-의존성 세린 프로테아제의 변이체, 바람직하게는 인자 IX (F.IX)의 변이체로서, 상기 변이체는 그의 보조인자의 부존재하에서 응고활성을 갖는 것을 특징으로 하는 것에 관한 것이다. 본원발명은 또한 출혈 질환, 특히 혈우병 A 및/또는 혈우병 B 또는 F.VIII에 대한 억제성 항체에 의하여 야기되고 복합화된 혈우병의 치료 및/또는 예방을 위하여 이들 변이체를 사용하는 것에 관한 것이다. 본원발명은 또한 소망하는 특성을 가지고 있어 각 특이적 치료 적용에 맞게 만들어질 수 있는 인자 IX (F.IX)의 추가적 변이체에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 응고 인자 IX
- [0003] 혈액 응고 인자 IX (F.IX)는 혈액응고 캐스케이드에서 핵심적 역할을 한다. F.IX는 단일쇄 불활성 자이모겐 (single chain inactive zymogen)으로서 혈청 중에 순환하는 트립신-유사 비타민 K-의존성 세린 프로테아제이다 (DiScipio et al, 1977; Davie et al, 1991). 인자 IX는 인자 XIa 또는 인자 VIIa-조직인자에 의하여 Ca^{2+} 의존적 방식으로 활성화된다. 상기 활성화는 활성화된 인자 VII (F.VIIa)-조직인자 복합체 또는 활성화된 인자 XI (F.XIa)에 의하여 2개 펩티드 결합을 절단하여 (Fujikawa et al, 1974; Lindquist et al, 1978) 35-잔기의 활성화 펩티드를 제거하는 것을 필요로 한다.
- [0004] F.IX는 멀티-도메인 단백질이다. N-말단 γ -카르복시 글루탐산 (GLA) 도메인 다음에 2개의 상피세포성장인자-유사 (epidermal growth factor-like) (EGF) 반복단위 (repeats), 활성화 펩티드 (AP) 및 트립신-유사 활성화 부위를 가진 C-말단 세린 프로테아제 도메인이 뒤따른다 (DiScipio et al, 1978). 이 도메인 구조는 인자 II (F.II), 인자 VII (F. VII), 인자 X (F.X), 인자 XI (F.XI), 인자 XII (F.XII), 및 단백질 C (PC)를 포함한, 응고인자의 세린 프로테아제 패밀리를 정의한다 (Furie and Furie, 1988). 이 패밀리 내에서, F.IXa는 고유한 단백질 분해 특성을 갖는다. 인지질 표면 상에서 F.VIIIa와 F.IXa의 복합체 형성은 천연 기질 F.X에 대한 반응성을 10^6 -배 증가시키는 반면 (Duffy and Lollar, 1992), 대응되는 F.X 서열을 가진 펩티드 절단이 실질적으로 이루어지지 않는다는 것이 관찰되었다 (McRae et al, 1981).
- [0005] 활성화된 인자 IX (F.IXa)는 다음으로 칼슘 이온, 막 표면 (인지질), 및 비효소적 단백질 보조인자, 활성화된 인자 VIII (F.VIIIa)의 존재에 의존적인 반응에서 인자 X (F.X)을 활성화시킨다 (Davie et al, 1991).
- [0006] 지혈에 있어서 F.IXa의 중요성은 F.IX 유전자에 돌연변이를 가진 개체들에서 출혈 질환 혈우병 B의 발생에 의하여 반영된다 (Gianelli et al, 1998). F.IXa는 그의 보조인자 F.VIIIa의 부존재하에서 천연 또는 합성 기질에 대하여 아주 적은 단백질 분해 활성만을 나타낸다. F.VIIIa의 결합은 F.X에 대한 단백질 분해 활성을 10^6 -배 증가시키지만, 펩티드 기질에 대한 상기 활성은 영향을 받지 않고 유지된다 (Duffy and Lollar, 1992; McRae et al, 1981). 그들의 보조인자의 존재하에서 그들의 천연 기질에 대하여 유의한 활성 또는 특이성 변화를 달성하는, F.IXa 조절의 상기 후자의 기질-의존적 활성은 관련된 응고 효소 활성화된 PC (보조인자 단백질 S), F.Xa (보조인자 인자 Va), F.VIIa (보조인자 조직인자), 및 FIIa (보조인자 트롬보모듈린)에 대하여 비슷하게 관찰된다 (Mann et al 2003). 모든 응고 세린 프로테아제는 광범위한 구조적 및 기능적 상동성을 공유한다.
- [0007] 또한, 상기 응고인자 IXa (F.IXa) 및 Xa (F.Xa)는 둘다 인지질 표면에서 보조인자와 함께 하는 경우에만 효과적으로 천연기질을 절단한다. Hopfner et al (1997)는 대장균에서 절단된 (truncated) F.IXa (rf9a) 및 F.Xa (rf10a)의 변이체를 조사하여 F.Xa의 아미도기 분해활성 (amidolytic activity)보다 10^4 -배 더 낮은 F.IXa의 아미도기 분해활성의 차이를 유발하는 결정인자를 확인하였다. F.IXa 및 F.Xa의 결정구조에 기반하여, 4개의 특징적 활성 부위 성분 (즉, 키모트립신 번호매김에 기초하여, Glu219, 148-루프, Ile213, 99-루프)이 그 후 rf9a 및 rf10a 사이에 교환되었다. 더욱이, 4개 돌연변이 모두를 조합하는 것은 필수적으로 F.Xa 특성을 rf9a에 도입하였다, 즉, 상기 아미도기 분해활성은 F.Xa 기질 선택성과 함께 130-배 증가하였다.

[0008] 효소적으로, F.IXa는, 다른 모든 응고 인자로부터 F.IXa를 구별되게 하는, 보조인자, 인자 VIIIa (F.VIIIa)의 존재하에서 개선되지 않은 아주 낮은 아미도기 분해활성을 갖는 것이 특징이다. F.IXa-F.VIIIa 복합체의 활성화는 그의 거대분자 기질, 인자 X (F.X)을 필요로 한다. 활성화 부위 근처에 위치한 99-루프는 서브사이트 S2-S4에서 통상적 기질 결합을 방해하는 구조 (conformation)을 채용하기 때문에 F.IXa의 상기 낮은 활성화에 대하여 부분적으로 원인을 제공한다. Sichler et al. (2003)는 잔기 Lys-98 및 Tyr-99 (키모트립신 번호매김)가 F.IXa의 아미도기 분해활성과 결정적으로 연결되어 있다는 것을 개시한다. Tyr-99의 더 작은 잔기와의 교환은 전체적 감소된 활성화뿐만 아니라 S1에의 손상된 결합을 초래한다. Lys-98를 더 작고 전하를 띠지 않은 잔기로 치환하는 것은 활성을 증가시켰다. Lys-98, Tyr-177, 및 Tyr-94 (rf9- Y94F/K98T/Y177T, 키모트립신 번호매김)의 동시 돌연변이유발은 7000-배 증가된 활성 및 인자 Xa에 대한 변화된 특이도를 갖는 효소를 생산하였다. Sichler et al. (2003)는, 이들 잔기들은 상기 낮은 인자 IXa 활성화의 원인을 제공하는 것으로 결론을 내렸다. Sichler et al. (2003)는, 이 삼중돌연변이체 (triple mutant) rf9-Y94F/K98T/Y177T (키모트립신 번호매김)는 보조인자 및 기질 결합에 의하여 생리학적으로 유도된 구조변화를 아마도 흉내낼 것이라고 결론을 지었다.

[0009] 혈우병

[0010] 가장 잘 알려진 응고인자 질환은 혈우병이다. 혈우병은 신체가 혈액 응고 (blood clotting), 또는 응고 (coagulation)를 제어할 수 있는 능력을 손상시키는 유전성 유전자 질환 (hereditary genetic disorders)의 패밀리 이름이다. 가장 흔한 형태인 혈우병 A는, F.VIII이 결핍되게 하는 인자 VIII (F.VIII) 유전자의 돌연변이에 의하여 야기된다. 상기 유전은 X-연관된 열성이기 때문에, 남성은 영향을 받는 반면 여성은 보인자이거나 아주 드물게 약한 표현형을 나타낸다. 남성 5,000명 중 1명이 영향을 받는다. 인자 IX (F.IX) 결핍으로도 알려진 혈우병 B는 혈우병 중 두 번째로 흔한 형태이지만, 혈우병 B는 혈우병 A보다 훨씬 덜 흔하다.

[0011] 이들 유전적 결핍은 정상 응고 과정에 필요한 응고 인자의 혈장 응고인자 수준을 낮출 수 있다. 혈관이 손상되었을 때, 임시적 스캐브 (temporary scab)이 형성되지만, 상기 누락된 응고 인자로 인하여 상기 혈병 (blood clot)을 유지하는데 필요한 피브린 형성이 방해된다. 따라서, 혈우병 환자는 정상인 보다 더 강렬하게 피를 흘리지 않지만, 훨씬 더 긴 시간 동안 피를 흘린다. 중증 혈우병 환자에서, 사소한 손상조차도 수일, 수주 또는 전혀 완전하게 치유되지 않는 지속되는 혈액 손실을 초래할 수 있다. 여기서 결정적 위험은 누락된 F.VIII로 인하여 치유하는데 많은 시간이 걸리는 통상적으로 작은 출혈 (small bleeds)과 함께 한다. 뇌 또는 내부관절 (inside joint)과 같은 영역에서, 이는 치명적이거나 생명을 위협하는 것 (life debilitating)이다. 외상에 의한 출혈은 통상적이지만, 늦은 재출혈 (late re-bleeding) 및 내부 출혈의 발생, 특히 근육, 관절 내로의 출혈 또는 폐쇄된 공간으로 출혈이 증가된다. 주요한 합병증은 혈관절증 (hemarthrosis), 출혈 (hemorrhage), 위장관 출혈, 및 월경과다 (menorrhagia)를 포함한다.

[0012] 혈우병에 대한 치료제는 없지만, 혈우병은 결핍된 응고 인자, 즉, 혈우병 A의 F.VIII 또는 혈우병 B의 F.IX를 규칙적으로 주입함으로써 제어될 수 있다.

[0013] 서양 국가에서, 혈우병 관리의 통상적 표준은 2개 카테고리 중 하나에 해당한다: (i) 예방 또는 (ii) 요구에 따라 (on-demand). 예방은 자발적 출혈 에피소드를 방지하기 위해 충분히 높은 응고물 수준(clotting levels)을 유지하기 위하여 규칙적 스케줄로 응고인자를 주입하는 것과 관련된다. 요구에 따른 (on-demand) 치료는 일단 출혈이 발생한 후에 출혈 에피소드를 치료하는 것과 관련된다.

[0014]

[0015] 그러나, 일부 혈우병 환자는 그들에게 주어진 대체 인자에 대한 항체 (저해제)를 발생시키고, 그래서 상기 인자의 양은 증가되어야만 하거나, 폐지 F.VIII 또는 그들의 변형된 변이체와 같은, 비인간 대체 산물을 주어져야만 한다 (예를 들면, WO 01/68109A1, Emory University 참조).

- [0016] 순환하는 저해제의 결과로서 환자가 대체 응고인자에 불응성이 되어 가는 경우, 이는 재조합 인간 인자 VII (NovoSeven[®])에 의하여 극복될 수 있다 (또한, EP1282438B1 및 EP1282439B1 (Novo Nordisk) 참조). 지금까지 이 접근법의 한계는 각각 인자 VIII (10 내지 14 시간) 또는 인자 IX (18 내지 30 시간)에 비하여 인자 VIIa (2 내지 3 시간)의 짧은 반감기이고, 조제물 (preparation)에 의존적이어서, 인자 VIIa에 의한 예방적 치료를 어렵게 한다는 것이다. 또한, 지속된 시간 간격에 걸쳐서, 인자 VIIa와 같은, 이미 활성화된 프로테아제를 사용하는 위험은 혈전적 위험(thrombotic risks), 혈관내피의 일정한 활성화 및 혈관손상을 통한 위험, 종양성장 또는 전이 등을 촉진할 수 있는 응고촉진 신호전달 (pro-coagulant signalling)의 위험을 포함한, 위험을 가져올 수 있다는 것이다.
- [0017] WO 02/40544 A2는, 야생형 F.IX에 비하여 헤파린에 대한 돌연변이체 인간 F.IX의 친화성을 감소시키는 헤파린 결합 도메인에 돌연변이를 포함하는 돌연변이체 인간 인자 IX 및 혈우병 B의 치료적 중재에의 그들의 사용을 개시한다.
- [0018] 유전자 치료
- [0019] 필요로 하는 응고인자(required coagulation)가 혈류 중에 순환하고 그래서 체내의 기본적으로 모든 곳에서 발견될 수 있기 때문에 혈우병은 유전자 치료적 접근에 이상적이다. 또한, 중증 형태의 혈우병을 가진 환자의 예방적 치료에 의한 연구는 1% 이상의 순환하는 응고인자의 최소 상승은 이미 임상 결과를 개선할 수 있으며 상기 질병에 의하여 야기된 대부분의 상흔 (lesion), 즉 관절 파괴를 회피할 수 있다는 것을 증명하였다. 몇몇 유전자 치료 접근법이 개발되었으나, 시험은 여전히 초기 임상 단계에 있다. 가장 유망한 접근법은 현재로는 아데노-연관 바이러스 벡터 (AAV)를 사용한 혈우병 B의 치료에 대한 것이다.
- [0020] 혈우병 B를 가진 사람의 골격근에 근육내 주사 AAV는 안전하나, 더 높은 용량이 치료적 인자 IX 수준을 달성하기 위하여 필요하다. 그러나, 용량 증가는 이 접근법에서 가능하지 않는데, 이는 억제성 항체 형성의 위험은 주사부위 당 상기 근육에서 발견되는 F.IX 항원의 양에 의존하기 때문이다. 혈우병 B 개 모델에서의 추정치에 의하면, 400 회이상의 근육내 주사가 인간에서 약 1%의 F.IX 발현 수준을 얻기 위하여 필요할 것이라는 결론에 도달하였다 (Arruda et al, 2004). 그러므로, 이 과정은 인간에 적용가능하지 않다. 이 접근법의 효능은 근육 세포 외 공간에 F.IX의 보유(retention) 및 높은 발현 속도로 완전히 활성화된 F.IX를 합성하는 근육의 제한된 능력에 의하여 방해된다. 이들 한계를 극복하기 위하여, Schuettrumpf et al. (2005)는 혈우병 B 생쥐에서 근육- 또는 간-지향된 발현을 위하여 F.IX 변이체를 코딩하는 AAV 벡터를 제작하였다. AAV-F.IX-K5A/V10K (F.IX 변호매김), 세포외 매트릭스에 대하여 낮은 친화성을 갖는 변이체를 근육내 주사한 후 순환하는 F.IX 수준은, 야생형 (WT) F.IX에 비하여 2-5 배 더 높았지만, 상기 단백질-비활성(protein-specific activities)은 비슷하게 유지되었다. F.IX-R338A의 발현은 각각 골격근 또는 간에 벡터 전달 후, F.IX-WT에 비하여 2- 내지 6-배 더 높은 비활성을 가진 단백질을 생성하였다. F.IX-WT 및 변이체 형태는 꼬리-자르기 분석 (tail-clipping assay)에 의한 켈린지에 대하여 인 비보에서 효과적인 지혈을 제공하였다. 중요하게도, AAV-F.IX 변이체의 근육내 주사는 F.IX-WT에 관용적인 생쥐에서 F.IX에 대한 항체 형성을 유도하지 않았다. Chang et al. (1998)에 의하여 처음으로 기술된 상기한 R338A 변이체 외에, 더 높은 비 F.IX 활성을 가진 다른 변이체, V86A가 기술되었다 (Chang et al. 2002).
- [0021] 혈우병 A에 대한 유전자 치료 전략의 적용은 혈우병 B에 비교하여 더 높은 면역원성과 F.IX에 비하여 F.VIII의 더 큰 크기에 의하여 더 복잡화된다.
- [0022] 따라서, 출혈 질환, 특히 혈우병 A 및/또는 B의 치료 및/또는 예방을 위하여, 개선된 수단 및 방법을 제공하는 것에 대한 당업계의 요구가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0023] 따라서, 본원발명은 당업계에서 존재하는 출혈 질환의 치료 및/또는 예방을 위하여 상기 방법 및 수단을 개선시키는 것을 목적으로 하고, 따라서 본원발명의 목적은 출혈 질환, 특히 혈우병 A 및/또는 B의 효과적인, 특이적인 및 표적화된 치료 및/또는 예방을 가능하게 하는 개선된 방법 및 수단을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0024] 본원발명에 따르면, 이 목적은 혈액응고 캐스케이드의 비타민 K-의존적 세린 프로테아제의 변이체로서, 그의 보조인자의 부존재하에서 응고활성을 갖는 것을 특징으로 하는 변이체를 제공함으로써 해결된다.

[0025] 응고인자 VII (F.VII), IX (F.IX) 및 X (F.X) 및 보조인자 저해제 단백질 C (보조인자 F.Va 및 F.VIIIa를 분해하는) 및 트롬빈은 혈액응고 캐스케이드의 비타민 K-의존적 세린 프로테아제이다. 비타민 K는 인자 II (트롬빈), VII, IX 및 X, 단백질 S, 단백질 C 및 단백질 Z 상의 글루탐산 잔기 (Gla-도메인에서)에 카르복실기를 부가하는, 간 감마-글루타밀 카르복실라제에 대한 필수 인자이다.

[0026] 상기한 바와 같이, 상기 응고인자의 세린 프로테아제 패밀리는 인자 II (F.II), 인자 VII (F.VIII), 인자 IX (F.IX), 인자 X (F.X), 및 단백질 C (PC)를 포함하고, 특이적 도메인 구조에 의하여 정의된다 (Furie and Furie, 1988).

[0027] 세린 프로테아제는 효소의 활성 부위에 세린 잔기의 존재에 의하여 특징지어진다. 상기한 단백질들은 자이모겐 형태로 순환하고 활성화 부위의 절단에 의하여 활성화된다. 모든 비타민 K-의존적 응고 프로테아제 사이에 큰 상동성이 있다. 이들 중 몇몇은 상기 프로테아제, 보조인자 및 인지질 막으로 구성된 복합체로 조립되는 경우에 만 활성의 증가를 보인다. 보조인자 결합 및 결합 부위의 분자적 효과는 이들 단백질들 사이에서 비슷하다. F.IXa 조절의 상기 후자의 기질-의존적 활성화, 그들의 보조인자의 존재하에서, 유의한 활성 또는 그들의 천연 기질에 의한 특이도 변화를 달성하는 관련된 응고 효소인 활성화된 PC (보조인자 단백질 S), F.Xa (보조인자 인자 Va), F.VIIa (보조인자 조직인자), 및 F.IIa (보조인자 트롬보모듈린)에 대하여 비슷하게 관찰되었다 (Hockin et al. 2002).

[0028] 따라서, 혈액응고 캐스케이드의 비타민 K-의존적 세린 프로테아제의 변이체는 인자 VII (F.VII), 인자 IX (F.IX), 인자 X (F.X), 단백질 C 또는 트롬빈의 변이체로부터 바람직하게는 선택된다.

[0029] 용어 "변이체 (variants)"는 바람직하게는 천연에 존재하는 단백질의 아미노산 치환, 부가 (삽입) 또는 결실 변이체 또는 유도체를 나타낸다. 변이체는 변형된 아미노산(들), 비자연적(unnatural) 아미노산(들) 또는 펩티도메틱(스) 또는 펩티드 골격/구조를 모사하는 추가의 화합물을 포함하는 추가의 아미노산 서열을 포함한다. 변이체는 또한 다른 분자의 부분과의 치환 또는 결합 또는 다른 분자와의 결합을 포함할 수 있다.

[0030] 아미노산 치환은 다른 아미노산에 의한 또는 이소스테어 (isosteres) (단백질 아미노산에 가까운 구조 및 공간적 유사성을 가진 변형된 아미노산), 아미노산 부가 또는 이소스테어 부가에 의한 보존적 뿐만 아니라 비보존적 치환을 포함한다.

[0031] 보존적 아미노산 치환은 일반적으로 동일한 클래스의 아미노산 사이의 치환과 관련된다. 이들 클래스는, 예를 들면, 다음을 포함한다.

[0032] - 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌 및 티로신과 같은 전하를 띠지 않은 극성 측쇄를 가진 아미노산;

[0033] - 라이신, 아르기닌, 및 히스티딘과 같은 염기성 측쇄를 가진 아미노산;

[0034] - 아스파르트산 및 글루탐산과 같은 산성 측쇄를 가진 아미노산; 및

[0035] - 글리신, 알라닌, 발린, 루신, 이소루신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판 및 시스테인과 같은 비극성 측쇄를 가진 아미노산.

- [0036] 인자 IX의 변이체 단백질
- [0037] 본원발명의 바람직한 구체예에서, 상기 비타민 K-의존성 세린 프로테아제 인자 IX (F.IX) 또는 활성화된 인자 XI (F.IXa)의 변이체가 제공되며, 상기 F.IX의 변이체는 그의 보조인자의 부존재하에서 응고활성을 갖고, 상기 보조인자는 인자 VIII (F.VIII) 또는 활성화된 인자 VIII (F.VIIIa)인 것을 특징으로 한다.
- [0038] 본 특허 출원에서 인자 IX (F.IX)는 Kurachi and Davie, 1982에 의하여 기술된 인간 F.IX 단백질 및 cDNA를 나타낸다.
- [0039] mRNA/cDNA에 대하여 Refseq NM_000133 (서열번호 1), 및
- [0040] 단백질 서열에 대하여 Refseq NP_000124 (서열번호 2).
- [0041] 서열번호 2의 아미노산 서열은 F.IX의 신호 펩티드 및 프로-펩티드를 포함한다. 실제 번호매김은 -46(Met)에서 시작하고, +1은 Tyr이다.
- [0042] F.IX의 아미노산 서열뿐만 아니라 상기 유전자에도 여러 천연적으로 존재하는 다형이 있다. 혈우병 B 돌연변이 데이터베이스, 킹스 칼리지 런던(King's College London) (see <http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html>)으로부터의 목록을 아래 나타낸다. 예를 들면, 가장 흔한 다형은 트레오닌이 집단의 67%에서 발견되고 알라닌이 33%에서 발견되는 147번 위치이다. 흥미롭게도, 더 빈도가 낮은 알라닌이 유일하게 이용가능한 F.IX 치료제에 존재한다.

명칭	뉴클레오타이드 번호	염기변화	AA 변화	빈도
MseI BamHI(i)	-1186	C→T	-44, R→H -40, I→F	52%
	-793	G→A		44%
	-698	C→T		44%
	-561	T→G		6%
	25	A→G		1회 보고됨
	37	G→A		1회 보고됨
	48	A→T		1회 보고됨
	181	C→A		희귀(rare)
	192	A→G		19%
	353	C→T		희귀(rare)
	709	A→G		희귀(rare)
	1778	C→T		3/10
	2627	T→C		6/10
	3747	C→A		6/10
TaqI(iii)	3756	T→C		6/10
	3797	C→T		6/10
	3905	A→T		6/10
DdeI	5505	-50		76%
	6550	G→C		1회 보고됨
	6575	C→G		브라질의 다형
Pointe-a-Pitre (Guadeloupe)	6596	G→T		1회 보고됨
	XmnI	G→		71%
TaqI(ii)	7076	G→		1회 보고됨
	9731	?		5회 보고됨
TaqI(i)	10512	A→G		65%
	11111	T→		1/10
	13275	C→T		78%
MspI	15625	A→G		1/10
	17397	T→G		4/10
	20002	C→A		33%
MnII (Malmo)	20421	G→A	147, A→T 178, F→L	1회 보고됨
	20512	T→C		5/10
	27731	C→G		희귀(rare)
	28364	T→C	227, V→V	1/10
	29335	G→A		1/10
	29497	G→T		1/10
	29509	T→C	257, H→Y 297, N→N	희귀(rare)
	29532	C→T		4/10
	29648	G→A		4/10
	29650	A→G	324, Q→Q 328, V→I	희귀(rare)
	30134	T→C		7회 보고됨
	30802	+A		4회 보고됨
	30890	C→T	257, H→Y 297, N→N	3회 보고됨
	31012	C→T		1회 보고됨
	31093	G→A		1회 보고됨
	31103	G→A	324, Q→Q 328, V→I	1회 보고됨
	32770	T→C		19%
	32847	T→C		"c" allele 자주, "t" allele 4회 발견됨

[0043]

- [0044] 본 특허 출원에서 활성화된 인자 IX (F.IXa)는 상기한 바와 같은 35 아미노산 활성화 펩티드의 절단을 통한 상기 활성화된 F.IX를 나타낸다.
- [0045] 응고 인자 F.IX 및 F.VIII 모두는 항상 활성화된 후에 그들의 기능을 보일 수 있기 때문에 F.IX/F.IXa 또는 F.VIII/F.VIIIa는 동의어(synonym)으로 사용될 수 있다.
- [0046] 아미노산 잔기의 번호매김에 대하여, Kurachi 및 Davie, 1982에 따른 F.IX 번호매김 시스템이, 달리 지적되어 있지 않으면, 사용된다. 당업계 일부 저자에 의하여, 키모트립시노겐 번호매김이 세린 프로테아제 키모트립신에 상동성인 특정 아미노산의 기술을 위하여 사용된다. 본원발명에 대하여, 여기에 달리 언급이 없으면, 상기 키모트립신 번호매김만이 사용된다.
- [0047] F.IX의 "응고활성 (clotting activity)" 또는 "기능적 활성 (functional activity)"은 또한 일반적으로 단위/밀리그램 (U/mg)으로 보통 측정되는 비 F.IX 활성으로 나타낼 수 있다. F.IX의 1 단위 (1U)는 5000 ng F.IX에 해당하는, 통상적 인간 혈장 1ml 중의 F.IX의 양으로 나타내므로, 상기 통상적인 비활성 (specific activity)은 약 200 U/mg이다. F.IX의 상기 비활성은 F.VIII의 존재하에서 혈장에서 프로테아제 활성으로서 정의되기 때문에, 보조인자 F.VIII의 부존재하에서의 (응고) 활성에 대하여 당업계에 사용되고 있는 정의는 없다. 그러므로, 소위 "F.VIII-유사 활성 (F.VIII-like activity)"으로도 알려진, F.VIII 부존재하에서의 상기 응고활성은 동등량의 야생형 F.IX가 F.VIII의 존재하에서 보이게 될 활성의 백분율로서 본 명세서에서 표현된다.
- [0048] 따라서, F.IX 변이체는 그의 보조인자의 부존재하에서 "응고활성 (clotting activity)"을 갖고, 혈액 중의 응고 F.VIII의 부존재에 의하여 야기되는 혈액 응고 결핍을 교정한다. 상기 결핍은 질병의 경우, F.VIII 단백질의 부존재, 결함있는 F.VIII 단백질의 존재, 또는 예를 들면 억제성 항체에 의한, F.VIII 단백질의 저해로 인한 것일 수 있다.
- [0049] 혈액응고 캐스케이드의 비타민 K-의존성 세린 프로테아제의 변이체, 바람직하게는 F.IX 변이체의 "응고활성" 또는 "기능적 활성"을 결정하기 위하여 본원에서 사용된 분석 시스템은 aPTT에 기반한 일 단계 분석 (one stage assay)이다. 상기 활성화된 부분적 트로보플라스틴 시간 (activated partial thromboplastin time : aPTT 또는 APTT)은 "내재적 (intrinsic)" (현재는 접촉 활성화 경로라고 함) 및 공통 응고 경로를 측정하는 수행 지시자 (performance indicator)이다. 혈액 응고의 이상을 검출하는 것 외에, 그것은 주요 항응고제인 헤파린에 의한 치료 효과를 모니터링하는데 또한 사용될 수 있다. 치료 중의 F.VIII 또는 F.IX 활성 수준의 결정을 위하여, 상기 시험은 상기 시료를 각각 F.VIII 또는 F.IX 활성의 측정을 위한 F.VIII 또는 F.IX 결핍 혈장 중에 스파이킹함으로써 수행된다. 이 시험은 F.VIII 또는 F.IX 일 단계 분석으로 불린다. 현재, F.IX 변이체의 F.VIII 비의존성 활성은 일 단계 분석에 의하여 및 F.VIII 결핍 혈장을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0050] 간단하게 설명하면, 혈액은 칼슘을 결합함으로써 응고를 정지시키는 옥살레이트 또는 시트레이트와 함께 수집된다. 원심분리에 의하여 상기 혈액의 입자성 부분 (corpuscular parts)으로부터 혈장이 분리된다. 재조합적으로 발현되고 정제된 단백질의 경우에, 상기 단백질은 이미다졸 버퍼 중에 희석된다. 상기 시료는 표준화된 인자 (VIII 또는 IX) 결핍 혈장에 혼합되고 첨가된다. 상기 내재적 경로를 활성화시키기 위하여, 인지질, (실리카, 셀라이트, 카올린, 엘라긴산 (ellagic acid)과 같은) 활성화제 (activator), 및 칼슘 (상기 옥살레이트의 항응고 효과를 되돌리기 위하여)이 상기 혈장 시료 중에 혼합된다. 상기 시간은 혈전 (thrombus) (clot)이 형성될 때까지 측정된다. 상기 시험은 상기 반응 혼합물로부터 조직 인자의 부존재로 인하여 "부분적 (partial)"이라 명명되었다 (Langdell et al., 1953 참조).
- [0051] 바람직하게는, 본 발명에 따른 인자 IX의 변이체들은 임상적 관련된 응고활성 (또는 임상적 관련성을 가진 응고 활성), 즉 아래에 기술되는 바와 같이, 상기 변이체들을 임상 적용에 적합하도록 하는 응고활성을 갖는다.
- [0052] 임상적 관련성을 가진 바람직한 응고활성은 보조인자 F.VIII의 부존재하에서의 상기 변이체의 1% 이상의 응고 활성이다. 여기서 100%는 F.VIII 또는 F.VIIIa의 존재하에서 야생형 F.IX 보조인자의 활성을 나타낸다.
- [0053] 약 1% 지속된 인자 VIII 또는 인자 IX 수준은 중증 혈우병 환자의 주요 출혈 복합증을 예방하기 위한 예방적 치

료 체계 (regimens)에 충분하다. F.VIII의 부존재하에서 "1% F.VIII-유사" 활성을 가진 인자 IX 변이체에 의하여 중증 혈우병 A 환자에서 1% 수준에 도달하기 위하여, 이미 생리적으로 존재하는 F.IX에 더하여 정상 (약 5000 ng/ml)의 100%의 F.IX 변이체 수준은 필요할 것이다. 그러한 치료는 타당한 (feasible) 것처럼 보이므로 상기 임상적으로 관련된 "인자 VIII-유사" 활성은 1%에서 추정되었다.

- [0054] 일 구체예에서 본 발명의 상기 변이체 인자 IX는 99-루프의 변형, 바람직하게는 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실에 의한 변형을 포함한다. 상기 99-루프의 변형은 99-루프와 인접한 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실 또는 99-루프와 상호작용하는 잔기에 의하여 상기 루프 구조에 영향을 미침으로써 또한 달성될 수 있다.
- [0055] (키모트립시노겐 변호매김에 따른) 인자 IX의 99-루프 또는 삽입 루프 80-90은 아미노산 잔기 256 내지 268 (F.IX 변호매김)을 포함한다. 상기 99-루프는 활성 부위 근처에 위치하고 F.IX의 활성화에 역할을 한다. Sichler et al.(2003)에 따르면, Tyr-177은 생리적 복합체에서 보조인자 F.VIIIa에 의하여 방출되는, 불활성 구조 (conformation) 중에 상기 99-루프를 잠근다. 다음으로 F.X은 상기 잠기지 않은 99-루프를 재배열할 수 있고 뒤이어 활성 부위 틈 (cleft)에 결합할 수 있다.
- [0056] 본 발명에 따른 상기 변이체 인자 IX는 바람직하게는 265, 4, 338, 377, 259, 345, 1, 10, 37, 50, 85, 116, 119, 120, 181, 217, 235, 245, 253, 259, 301, 360, 383, 340, 86, 25, 34, 290, 291, 274, 353, 358, 375, 388, 35, 바람직하게는 K265T, G4Y, R338A, S377W, Y259F, Y345T, Y1A, V10K, R37T, Q50P, D85A, R116A, R119A, N120A, V181I, V217L, E235K, E245V, V253I, Y259F, K301I, S360A, I383V, T340S, V86A, F25Y, N34D, I290L, A291P, E274K, F353Y, R358A, G375F, E388G, T35D, 및/또는 상기 99-루프의 변형, 또는 바람직하게는 265, 4, 338, 377, 259, 345, 1, 10, 37, 50, 85, 116, 119, 120, 181, 217, 235, 245, 253, 259, 301, 360, 383, 340, 86, 25, 34, 290, 291, 274, 353, 358, 375, 388, 35, 277, 또는 바람직하게는 K265T, K265A, G4Y, R338A, R338L, S377W, Y259F, Y345T, Y1A, V10K, R37T, Q50P, D85A, R116A, R119A, N120A, V181I, V217L, E277A, E235K, E245V, V253I, Y259F, K301I, S360A, I383V, T340S, V86A, F25Y, N34D, I290L, A291P, E274K, F353Y, R358A, G375F, E388G, T35D, 및/또는 상기 99-루프의 변형으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0057] 바람직하게는, 본 발명에 따른 상기 변이체 인자 IX는 255 내지 269, 383, 181, 290, 388, 34, 25, 353, 358, 338, 377, 4, 86, 217, 277, 및/또는 상기 99-루프의 변형으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0058] 더 바람직하게는, 상기 변이체 인자 IX는 K265T, I383V, V181I, I290L, E388G, N34D, F25Y, F353Y, R358A, R338A, R338L, S377W, G4Y, V86A, V217L, E277A 및/또는 상기 99-루프의 변형으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0059] 바람직한 구체예에서, 상기 변이체 인자 IX는 265 위치의 아미노산 치환 (키모트립시노겐 변호매김에 따른 위치 98), 바람직하게는 K265T (키모트립시노겐 변호매김에 따른 K98T) 또는, 바람직하게는, K265T, K265A, K265G, K265V, K265N 및 K265D로부터 선택된 265 위치의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0060] 바람직한 구체예에서, 상기 변이체 인자 IX는 265 위치의 아미노산 치환 (바람직하게는 K265T, K265A, K265G, K265V, K265N 및 K265D로부터 선택된) 또는 추가의 아미노산 치환과 조합된 상기 아미노산 치환 K265T (키모트립시노겐 변호매김에 따른 K98T)을 포함한다.
- [0061] 상기 추가의 아미노산 치환은 4, 338, 377, 259, 345, 1, 10, 37, 50, 85, 116, 119, 120, 181, 217, 235, 245, 253, 259, 301, 360, 383, 340, 86, 25, 34, 290, 291, 274, 353, 358, 375, 388, 35 및/또는 277로 이루어진 군으로부터 선택된, 더 바람직하게는 383, 181, 290, 388, 34, 25, 353, 358, 338, 377, 4, 86, 217 및/또는 277로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 바람직하게는 (더 바람직하게는 하나 이상의) 아미노산 치환이다.

- [0062] 더 바람직하게는, 상기 변이체 인자 IX는 상기 아미노산 치환 K265T 및 I383V, V181I, I290L, E388G, N34D, F25Y, F353Y, R358A, R338A, R338L, S377W, G4Y, V86A, V217L 및/또는 E277A로부터 선택된 아미노산 치환을 포함한다.
- [0063] 더 바람직하게는, 상기 변이체 인자 IX는 265 위치의 아미노산 치환 또는 상기 아미노산 치환 K265T 및 (조합으로) I383V, V181I, I290L, E388G, N34D, F25Y, F353Y, R358A, R338A, R338L, S377W, G4Y, V86A, V217L 및/또는 E277A로부터 선택된 아미노산 치환을 포함한다.
- [0064] 본 발명의 더 바람직한 구체예에서, 상기 변이체 인자 IX는 아미노산 위치들 265, 4, 338, 377, 259, 345, 1, 10, 37, 50, 85, 116, 119, 120, 181, 217, 235, 245, 253, 259, 301, 360, 383, 340, 86, 25, 34, 290, 291, 274, 353, 358, 375, 388, 35, 277의 군으로부터 복수 개의 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 "복수 개의 아미노산 치환 (multiple amino acid substitutions)"은 2,3,4 또는 더 많은 위치들에서의 치환을 나타낸다.
- [0065] - 기본(basis) F.IX 변이체 (그룹 A)
- [0066] 본 발명자들은 출혈 질환의 F.VIII-비의존적 치료가 되도록 하는 F.IX 변이체: 265 위치의 아미노산 치환, 바람직하게는 K265T (키모트립신 번호매김에 따른 K98T)를 갖는 변이체를 발견하였다. K265T는 Sichler et al. 2003에서 다른 문맥 (context)으로 기술된 바 있다. Kolkman and Mertens (2000)는 K265A 변이체를 기술한다.
- [0067] 본 발명자들에 의하여 검사된 F.IX의 상기 돌연변이/변이들(variations)은 F.IXa가 F.Xa와 같은 다른 세린 프로테아제들에 비하여 낮은 활성을 갖는다는 관찰에 기반되어 있다. 사실, 펩티드 기질을 사용한 잘려진 재조합 F.IXa 변이체를 사용한 속도론적 연구에서 F.IX의 99-루프에 영향을 미치는 단지 몇 개 아미노산을 대응되는 F.X 서열과 교환함으로써 아미도기 분해활성의 극적인 개선 (수천-배까지)이 이루어졌다 (Hopfner et al, 1997 and Sichler et al, 2003 참조). 동시에 "F.X-유사" 기능으로의 특이성의 이동 (shift)이 관찰되었다. 이들 연구들은 내재적 테나제 복합체 (intrinsic tenase complex)에 조립되지 않은 형태의 F.IXa를 모델링하고 있기 때문에, 본 발명자들은 동일한 돌연변이를 가진 변이 단백질이 F.VIII 부존재하에서 혈전(clot) 형성의 내부적 전파를 가능하게 할 것이라는 가정을 하였다. 이를 시험하기 위하여 본 발명자들은 돌연변이 Y259F/K265T/Y345T (FTT)를 F.IX에 도입하고 조직 배양 중에 상기 단백질을 발현시켰다. 기본적으로 F.IX 비활성에 대하여는 어떠한 효과도 관찰되지 않았다; 그러나 F.VIII-결핍 혈장 중의 상기 활성은 현저하게 증가하였다. Kolkman and Mertens (2000)은 변이체 K265A가 F.VIII-비의존적 F.IX 활성을 20 배 증가시킬 수 있다는 것을 이미 언급하였다. 그러나, 상기 시험된 F.IX Y259F/K265T/Y345T는 F.VIII 부존재하에서 정상 (100%) 항원 수준에서 2% 활성을 보였다 (도 2). F.VIII의 존재는 F.IX 활성을 10^6 배 증가시킨다는 것을 고려하면, 상기 삼중 돌연변이체는 F.VIII-비의존적 활성에서 20,000-배 증가를 야기시켰다. 이것은 혈전 형성의 순간에서 또는 가능한 치료제로서 생리적 중요성을 또한 가질 수 있는, F.VIII의 부존재하에서 상기 변이체의 응고활성을 어떤 범위 내에 들게 한다. 이 활성은 F.VIII의 존재하에서 F.IX-비활성의 여전히 작은 분율이기 때문에 (F.IX 항원 100%는 "F.VIII-유사" 활성, 즉 "보조인자 F.VIII의 부존재하에서 응고활성" 2%에 대응한다), 본 발명자들은 다른 세린 프로테아제의 구조적 특성 및 상동성 비교에 의하여 추가적 돌연변이를 포함시켰다. 그들은 서로 독립적인 돌연변이 Y259F, K265T, 및 Y345T를 시험하였고 191% F.IX 및 6.7% "F.VIII-유사" 응고활성을 갖는 효소를 생성시킨 단일 아미노산 돌연변이 (K265T, 즉 키모트립신 번호매김의 K98T)를 확인할 수 있었고 상기 다른 단일 돌연변이들은 F.VIII의 존재 및 부존재하에서 상기 프로테아제 활성을 감소시키지만 한다는 것을 결정하였다 (도 1 참조).
- [0068] 따라서, 바람직한 구체예에서 상기 변이체 인자 IX는 보조인자 F.VIII의 부존재하에서 응고활성을 갖고 K265T 아미노산 치환을 갖는 것을 특징을 한다.
- [0069] 본 발명자들은 위치 265가 F.IX 변이체의 F.VIII 우회 활성 (bypassing activity)을 위한 주요 결정인자인 것을 밝혔다. 본 발명자들은 잔기 265를 T로부터 자연적으로 존재하는 K로 되돌리는 것 (V181I/265K/I383V, IKV)

은 F.VIII 비의존적 활성의 거의 완전한 손실을 초래한다는 것을 밝혔다. 놀랍게도, 다른 아미노산 치환들, 특히 변이체 K265A/V181I/I383V, K265G/V181I/I383V, K265V/V181I/I383V, K265N/V181I/I383V, 또는 K265D/V181I/I383V에서, K265T/V181I/I383V 보다 비슷한 F.VIII-우회 활성을 초래하였으며, K265A/V181I/I383V에 대하여 가장 높다. 종래 기술된 단일 K265A 치환을 가진 인자 IX 변이체에 대한 F.VIII 비의존적 활성이 훨씬 낮은 범위에 있었기 때문에, 이 결과는 예기치 않은 것이었다 (Kolkman and Mertens, 2000).

[0070] 그러므로, 추가적 바람직한 구체예에서, 상기 변이체 인자 IX는 보조인자 F.VIII의 부존재하에서 응고활성을 갖고 265 위치의 아미노산 치환, 바람직하게는 K265T, K265A, K265G, K265V, K265N 및 K265D로부터 선택된 아미노산 치환 또는 다른 아미노산을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0071] 그러나, 본원발명은 상기 아미노산 치환 K265A만을 갖는 변이체 인자 IX를 포함하지 않는다. 본원발명에 따르면, 아미노산 치환 K265A가 변이체 인자 IX에 존재한다면, 상기 변이체는 K265A와 조합된 추가 아미노산 치환을 갖는다는 것을 의미한다, 즉 그것은 위치 181 및/또는 383과 같은 추가 아미노산 치환을 포함한다.

[0072] 본 발명자들은 F.IX의 단백질 활성은 원하는 특성을 갖는 F.IX을 얻기 위하여 그룹 A의 아미노산 치환에 추가적 아미노산 치환의 도입에 의하여 더 변형될 수 있다는 것을 또한 밝혔다:

	아미노산 위치	아미노산 치환
그룹 A	265	K265T 또는 다른 아미노산 치환 (바람직하게는 K265T, K265A, K265G, K265V, K265N 및 K265D로부터 선택된) 그러나 K265A 단독은 아님
그룹 B	383, 181, 290	I383V, V181I, I290L
그룹 C	388, 34, 25, 353, 358, 383	E388G, N34D, F25Y, F353Y, R358A, I383V
그룹 D	338, 377, 4, 86, 217, 277	R338A, R338L, S377W, G4Y, V86A, V217L, E277A

[0073]

[0074] 상기 바람직한 아미노산 위치들의 변형 (예, 아미노산 치환에 의한)은 서로, 바람직하게는 아래의 방식으로 조합될 수 있다. 그러나, 추가의 조합이 가능하다.

[0075] 그룹 A 단독 - 야생형에 비하여 보조인자 F.VIII의 부존재하에서 응고활성

[0076] (F.VIII-비의존적 활성)이 증가하였다.

[0077] 그룹 D 단독 - 야생형에 비하여 보조인자 F.VIII의 존재하에서 응고활성

[0078] (F.VIII-의존적 활성)이 증가하였다.

[0079] 그룹 A+B - 보조인자 F.VIII의 부존재하에서 응고활성, 여기서 상기 F.VIII-비의존적 응고활성이 상기 기본 변이체 (그룹 A)의 각 응고활성에 비하여 증가되어 있다.

[0080] 그룹 A+C - 보조인자 F.VIII의 부존재하에서 응고활성 및 보조인자 F.VIII의 존재하에서 감소된 활성, 여기서 상기 F.VIII-의존적 활성이 야생형에 비하여 및 바람직하게는 상기 기본 변이체 (그룹 A)의 각 활성에 비하여 감소되어 있다.

[0081] 그룹 A+B+C - 보조인자 F.VIII의 부존재하에서 응고활성 및 보조인자 F.VIII의 존재하에서 감소된 응고활성, 여기서 상기 F.VIII-비의존적 응고활성은 상기 기본 변이체 (그룹 A)의 각 응고활성에 비하여 증가되어 있고 상기 F.VIII-의존적 활성은 야생형에 비하여 및 바람직하게는 상기 기본 변이체 (그룹 A)의 각 활성에 비하여 감소되어 있다.

[0082] 그룹 A+D - 보조인자의 부존재하에서 응고활성 및 보조인자의 존재하에서 증가된 응고활성, 여기서 상기 F.VIII-의존적 활성은 야생형에 비하여 및 바람직하게는 상기 기본 변이체 (그룹 A)의 각 활성에 비하여 증가되

어 있다.

- [0083] 그룹 A+B+D - 보조인자의 부존재하에서 응고활성 및 보조인자의 존재하에서 증가된 응고활성, 여기서 상기 F.VIII-비의존적 응고활성은 상기 기본 변이체 (그룹 A)의 각 응고활성에 비하여 증가되어 있고 상기 F.VIII-의존적 활성은 야생형 및 바람직하게는 상기 기본 변이체 (그룹 A)의 각 활성에 비하여 증가되어 있다.
- [0084] F.VIII의 부존재하에서 가장 높은 가능한 활성을 갖는 F.IX 변이체를 생성하기 위한 의도로, 본 발명자들은 두 개의 부가적인 아미노산 치환들 (그룹 B)을 더 부가하여 167% F.IX 및 16% "F.VIII 유사" 활성을 갖는 단백질 (V181I/K265T/I383V)을 얻었다. 따라서 상기 변이체는 야생형 단백질에 비하여 F.VIII의 부존재하에서 160,000-배 더 높은 응고활성을 갖는다. 이들 부가적인 아미노산 치환들은 상기 F.IX 비활성을 과도하게 증가시키지 않고 F.VIII 비의존적 F.IX 활성을 최대로 증가시키는 방식으로 선택되었다. 이 접근법의 근거는 F.VIII의 존재하에서의 너무 많은 F.IX 비활성은 혈전적 복잡증(thrombotic complications)의 위험을 증가시킬 수 있고, 그러므로, 치료제로서 상기 제안된 F.IX 변이체를 사용하는 것에 대한 우려를 제기할 수 있다는 것이었다. 또한 상기 열거된 아미노산 치환들의 다른 조합들이 가능하고, 예를 들면 그룹 C의 아미노산 치환은 F.VIII의 부존재하에서의 활성에는 단지 최소로 영향을 미치는 반면 F.VIII의 존재하에서 상기 변이체 단백질의 상기 활성을 더 제한할 수 있다. 비슷하게, F.VIII의 존재 및 부존재하 모두의 상기 활성은 그룹 D로부터의 아미노산 치환을 사용하여 개선될 수 있다. 이런 식으로, F.VIII의 부존재하에서 (야생형 F.IX 보다 220,000-배 더 높은 것에 해당하는 22% "F.VIII 유사" 활성) 및 F.VIII의 존재하에서 (야생형 F.IX에 비하여 16-배 더 높은) 증가된 활성을 보인, 5개 돌연변이들 V181I/K265T/R338A/S377W/I383V를 가진 변이체가 생성되었다. 시험된 변이체들의 상기 F.IX 및 "F.VIII 유사" 활성은 표 1에 예시되어 있다.
- [0085] 다음과 같은 특이적 적용을 위하여 F.IX 변이체를 설계 및 제작(tailoring)할 수 있도록 하기 때문에 이들 추가적 변형들의 가능성은 중요하다:
- [0086] (1) F.VIII의 존재하에서 낮은 F.IX 활성 (F.VIII-의존적 활성) 및 F.VIII의 부존재하에서 높은 F.IX 활성 (F.VIII-비의존적 활성) (즉 그룹 A+C)은 혈우병 A 또는 F.VIII에 대한 억제성 항체를 가진 환자를 치료하기 위한 치료제의 혈전유발성을 감소키는데 적절하다.
- [0087] (2) F.VIII 또는 F.IX의 존재와 비의존적으로 높은 프로테아제 활성을 가진 단백질은 모든 형태의 F.IX 또는 F.VIII 결핍을 치료하기 위한 가능성을 가질 수 있다 (즉 그룹 A+B+D).
- [0088] 상기 열거된 단일 아미노산 치환의 효과는 F.VIII의 부존재 또는 존재하에서 F.IX 활성에 대한 그들의 효과에 대하여 분화된 강도의 것이기 때문에, 다른 그룹들로부터의 아미노산 치환들도 또한 특이적 적용을 위한 F.IX 활성에 대한 원하는 전체 효과 (desired over all effect)를 달성하기 위하여 조합될 수 있다. 예를 들면, 상기 K265T 변이체 (그룹 A)를 상기 아미노산 치환 V181I 및 I383V (그룹 B)와 조합하면, 적용 (1)에 해당하는, F.VIII의 부존재하에서 높은 활성을 갖지만, F.VIII의 존재하에서 기본적으로 통상 활성 (normal activity)을 갖는 단백질이 생성된다. 상세한 내용은 표 1을 참조하여 주시기 바랍니다.
- [0089] 그룹 A 및 그룹 A와 조합된 모든 변이체는 혈우병 A, 억제성 항체 및 다른 출혈 치환을 가진 환자의 치료 및 혈우병 B의 치료에 특히 적합하다.
- [0090] 보다 상세하게 설명하면:
- [0091] - 상기 기본 변이체와 조합되어 F.VIII의 부존재하에서 응고활성을 더 증가시키는 F.IX 변이체들 (그룹 B와 조합된 그룹 A)
- [0092] 본 발명의 이 바람직한 구체예에서, 변이체 인자 IX는 보조인자 F.VIII의 부존재하에서 응고활성을 갖고, 265, 383, 181 및 290으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치의 하나이상의 아미노산 치환을 포함하는 것을 특징으로

한다.

- [0093] 바람직하게는, 상기 변이체 인자 IX는 상기 아미노산 치환 K265T 및 383, 181 및/또는 290 (그룹 B)의 군으로부터 선택된 위치에서 아미노산 치환(들)을 포함하고, 더 바람직하게는 상기 아미노산 치환 K265T 및 I383V, V181I 및/또는 I290L로부터 선택된 아미노산 치환(들)을 포함한다.
- [0094] 바람직하게는, 상기 변이체 인자 IX는 383, 181 및/또는 290 (그룹 B)의 군으로부터 선택된 위치에서의 아미노산 치환(들)과 조합된, 265 위치의 아미노산 치환 또는 상기 아미노산 치환 K265T를 포함하고, 더 바람직하게는 265 위치의 아미노산 치환 또는 상기 아미노산 치환 K265T 및 I383V, V181I 및/또는 I290L로부터 선택된 아미노산 치환(들)을 포함한다.
- [0095] 265 위치의 아미노산 치환은 바람직하게는 K265T, K265A, K265G, K265V, K265N 및 K265D로부터 선택된다.
- [0096] 그룹 A+B의 이들 F.IX 변이체는 상기 기본 변이체 (그룹 A)의 각 응고활성에 비하여 증가된 F.VIII-비의존적 응고활성을 갖는다.
- [0097] - 상기 기본 변이체와 조합되어 F.VIII의 존재하에서 상기 응고활성을 제한하는 F.IX 변이체 (그룹 C와 조합된 그룹 A)
- [0098] 본 발명의 이 바람직한 구체예에서, 변이체 인자 IX는 보조인자 F.VIII의 부존재하에서 응고활성을 갖지만, 보조인자 F.VIII의 존재하에서 감소된 활성을 갖고 265, 383, 388, 34, 25, 353 및/또는 358로 이루어진 군으로부터 선택된 위치의 하나이상의 아미노산 치환을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0099] 바람직하게는, 상기 변이체 인자 IX는 상기 아미노산 치환 K265T 및 388, 34, 25, 383, 353 및/또는 358 (그룹 C)의 군으로부터 선택된 위치에서 아미노산 치환(들)을 포함하고, 더 바람직하게는 상기 아미노산 치환 K265T 및 E388G, N34D, F25Y, F353Y, I383V 및/또는 R358A로부터 선택된 아미노산 치환(들)을 포함한다.
- [0100] 그룹 A+C의 이들 F.IX 변이체는 야생형에 비하여 및 바람직하게는 상기 기본 변이체 (그룹 A)의 각 활성에 비하여 감소된 (또는 바람직하게는 그룹 A+B의 변이체(들)에 비하여 감소된) F.VIII-의존적 활성을 갖는다. 따라서, 그룹 A+C의 이들 F.IX 변이체는 F.VIII-의존적 활성을 제한하고 가능한 혈전생성 위험을 최소화한다.
- [0101] - 상기 기본 변이체와 조합되어 F.VIII의 존재하에서 상기 응고활성을 제한할 뿐만 아니라 F.VIII의 부존재하에서 응고활성을 더 증가시키는 F.IX 변이체 (그룹 B 및 그룹 C와 조합된 그룹 A)
- [0102] 본 발명의 이 바람직한 구체예에서, 변이체 인자 IX는 보조인자 F.VIII의 부존재하에서 응고활성을 갖지만, 보조인자 F.VIII의 존재하에서 감소된 활성을 갖고 265, 383, 181, 290, 388, 34, 25, 353 및/또는 358로 이루어진 군으로부터 선택된 위치의 하나이상의 아미노산 치환을 포함하고,
- [0103] 바람직하게는, 상기 변이체 인자 IX는 상기 아미노산 치환 K265T 및 383, 181, 290, 388, 34, 25, 353 및/또는 358 (그룹 B+C)의 군으로부터 선택된 위치에서 아미노산 치환(들)을 포함하고,
- [0104] 더 바람직하게는 상기 아미노산 치환 K265T 및 I383V, V181I, I290L, E388G, N34D, F25Y, F353Y 및/또는 R358A로부터 선택된 아미노산 치환(들)을 포함한다.

- [0105]
- [0106] 그룹 A+B+C의 이들 F.IX 변이체들은 상기 3개 그룹들의 특징을 조합한다:
- [0107] - 그들은 F.VIII-비의존적 응고활성을 갖고,
- [0108] - 그들은 상기 기본 변이체 (그룹 A)의 각 응고활성에 비하여 증가된 F.VIII-비의존적 응고활성을 갖고,
- [0109] - 그들은 야생형에 비하여 및 바람직하게는 상기 기본 변이체 (그룹 A)의 각 활성에 비하여 감소된 (또는 바람직하게는 그룹 A+B의 변이체(들)에 비하여 감소된) F.VIII-의존적 활성을 갖는다.
- [0110] 따라서, 그룹 A+B+C의 이들 F.IX 변이체들은 F.VIII-비의존적 활성을 증가시키고, F.VIII-의존적 활성을 제한하고 가능한 혈전생성 위험을 최소화한다.
- [0111] - 보조인자 F.VIII의 존재하에서 증가된 응고활성을 갖는 인자 IX의 변이체 단백질 (그룹 D)
- [0112] 본원발명의 다른 양상에서, 인자 IX (F.IX)의 변이체는 야생형에 비하여 그의 보조인자의 존재하에서 (in presence of its cofactor) 증가된 응고활성을 갖고 상기 보조인자는 인자 VIII (F.VIII) 또는 활성화된 인자 VIII (F.VIIIa)인 것을 특징으로 한다.
- [0113] 본원발명의 이 양상에 따른 변이체 인자 IX는 338, 377, 4, 86, 217 및/또는 277의 군으로부터 선택된 위치에서 하나이상의 아미노산 치환을 포함하고,
- [0114] 더 바람직하게는 R338A, R338L, S377W, G4Y, V86A, V217L 및/또는 E277A로부터 선택된 하나이상의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0115] 그룹 D의 상기 변이체 및 그룹 D와 조합된 변이체는 혈우병 B의 치료에 특히 적합하다.
- [0116] F.VIII의 존재하에서 분리된 높은 F.IX 활성을 갖는 단백질은 F.IX 결핍의 치료를 위한 좋은 치료제이다. 이 목적을 위하여, F.VIII의 부존재하에서 어떠한 높은 활성도 없는 것, 즉 돌연변이 K265T와 같은 그룹 A가 필요하다. 그룹 D의 상기 아미노산 치환은 또한 상기 언급된 K265T 돌연변이 (그룹 A)의 부존재하에서 F.VIII의 존재하에서의 F.IX 활성을 증가시킨다. 상기 언급된 K265T 돌연변이의 도입 없이 이 목적을 위하여 시험된 변이체들의 목록은 표 2에 나타내었다.
- [0117] - 보조인자의 부존재하에서 응고활성을 갖고 보조인자의 존재하에서 증가된 응고활성을 갖는 인자 IX의 변이체 단백질 (그룹 D와 조합된 그룹 A)
- [0118] 본 발명의 이 바람직한 구체예에서, 변이체 인자 IX는 보조인자 F.VIII의 부존재하에서 응고활성을 갖고 야생형에 비하여 보조인자 F.VIII의 존재하에서 증가된 응고활성을 갖고, 265, 338, 377, 4, 86, 217 및/또는 277로 이루어진 군으로부터 선택된 위치의 하나이상의 아미노산 치환을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0119] 바람직하게는, 상기 변이체 인자 IX는 상기 아미노산 치환 K265T 및 338, 377, 4, 86, 217 및/또는 277 (그룹 D)의 군으로부터 선택된 위치에서 아미노산 치환(들)을 포함하고,
- [0120] 더 바람직하게는 상기 아미노산 치환 K265T 및 R338A, R338L, S377W, G4Y, V86A, V217L 및/또는 E277A로부터 선택된 아미노산(들)을 포함한다.

- [0121]
- [0122] 그룹 A+D의 이들 F.IX 변이체는 야생형의 각 F.VIII-의존성 응고활성, 및 바람직하게는 상기 기본 변이체 (그룹 A)의 각 F.VIII-의존성 응고활성에 비하여 증가된 F.VIII-의존성 응고활성을 갖는다. 그들은 또한 혈우병 B의 치료에 대한 증가된 가능성을 갖는다.
- [0123] - 보조인자의 존재하에서 뿐만 아니라 부존재하에서 증가된 응고활성을 갖는 인자 IX의 변이체 단백질 (그룹 B 및 그룹 D와 조합된 그룹 A)
- [0124] 본 발명의 이 바람직한 구체예에서, 변이체 인자 IX는 보조인자 F.VIII의 부존재하에서 (증가된) 응고활성 및 보조인자 F.VIII의 존재하에서 증가된 응고활성을 갖고 및 265, 383, 181, 290, 338, 377, 4, 86, 217 및/또는 277로 이루어진 군으로부터 선택된 위치의 하나이상의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0125] 바람직하게는, 상기 변이체 인자 IX는 상기 아미노산 치환 K265T 및 383, 181, 290, 338, 377, 4, 86, 217 및/또는 277의 군으로부터 선택된 위치에서 아미노산 치환(들)을 포함하고,
- [0126] 더 바람직하게는 상기 아미노산 치환 K265T 및 I383V, V181I, I290L, R338A, R338L, S377W, G4Y, V86A, V217L 및/또는 E277A로부터 선택된 아미노산 치환(들)을 포함한다.
- [0127] 그룹 A+B+D의 이들 F.IX 변이체는 상기 3개 그룹들의 특징들을 조합한다:
- [0128] - 그들은 F.VIII-비의존적 응고활성을 갖고,
- [0129] - 그들은 상기 기본 변이체 (그룹 A)의 각 응고활성에 비하여 증가된 F.VIII-비의존적 응고활성을 갖고, 및
- [0130] - 그들은 야생형에 비하여 및 바람직하게는 상기 기본 변이체의 상기 각 활성에 비하여 증가된 F.VIII-의존적 활성을 갖는다.
- [0131] 본 발명에 따른 상기 변이체 인자 IX는 더 바람직하게는
- [0132] 변이체 K265T,
- [0133] 변이체 K265T/V181I,
- [0134] 변이체 K265T/I383V,
- [0135] 변이체 K265T/V181I/I383V,
- [0136] 변이체 K265T/V181I/I383V/R338A/S377W,
- [0137] 변이체 K265T/V181I/I383V/E388G,
- [0138] 변이체 K265T/V181I/I290L/I383V,
- [0139] 변이체 K265T/V181I/I290L/I383V/E388G,
- [0140] R338A 및 S377W를 포함하는 변이체로부터 선택된다.
- [0141] 더 바람직하게는, 본 발명에 따른 상기 변이체 인자 IX는
- [0142] 변이체 K265T,
- [0143] 변이체 K265T/V181I,
- [0144] 변이체 K265T/I383V,
- [0145] 변이체 K265T/V181I/I383V, 또는

- [0146] 변이체 K265T/V181I/I383V/R338A/S377W이다.
- [0147] 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 상기 변이체 인자 IX는, 바람직하게는 181 및/또는 383 위치의 아미노산 치환 (바람직하게는 V181I 및/또는 I383V)과 조합된, 변이체 K265T 또는
- [0148] 265 위치의 아미노산 치환 (바람직하게는 K265T, K265A, K265G, K265V, K265N 및 K265D로부터 선택된)을 갖는 변이체로부터 선택된다.
- [0149] 더 바람직하게는, 본 발명에 따른 상기 변이체 인자 IX는
- [0150] 변이체 K265T/V181I/I383V,
- [0151] 변이체 K265A/V181I/I383V,
- [0152] 변이체 K265G/V181I/I383V,
- [0153] 변이체 K265V/V181I/I383V,
- [0154] 변이체 K265N/V181I/I383V, 또는
- [0155] 변이체 K265D/V181I/I383V이다.
- [0156] 상기 표현, 예를 들면, "K265T/V181I/I383V"는 조합으로 이들 아미노산 치환측, 조합으로 K265T 및 V181I 및 I383V를 포함하는 변이체를 나타낸다. 상기 표현 "K265T/V181I/I383V/R338A/S377W"는 조합으로 이들 아미노산 치환 측, 조합으로 K265T 및 V181I 및 I383V 및 R338A 및 S377W를 포함하는 변이체 등을 나타낸다.
- [0157] 포기 (Disclaimer):
- [0158] 본 발명은 상기 아미노산 치환 K265A만을 갖는 변이체 인자 IX를 포함하지 않는다. 본 발명에 따르면, 아미노산 치환 K265A이 변이체 인자 IX 중에 존재하는 경우, 이는 상기 변이체 K265A와 조합된 추가 아미노산 치환을 갖는다는 것 즉, 181 및/또는 383 위치에서와 같은 추가 아미노산 치환을 포함한다는 것을 의미한다.
- [0159] 또한, 본원발명은 다음의 아미노산 치환(들)만을 갖는 변이체 인자 IX를 포함하지 않는다:
- [0160] - FTT (Y259F/K265T/Y345T);
- [0161] - Y259F/K265T;
- [0162] - V181F;
- [0163] - R338A.
- [0164] 또한, 인자 IX의 다음 변이체는 본원발명에 의하여 포함되지 않는다:
- [0165] - Y259F/A261K/K265T/Y345F
- [0166] - Y259F/K265T/Y345F/I383V/E388G
- [0167] - Y259F/A261K/K265T/Y345F/I383V/E388G
- [0168] 99-루프의 변형은 F.IX 활성을 변형시키기 위한 전략으로서 반복적으로 시도되었다 (Hopfner et al, 1997, Sichler et al, 2003). 가장 유망한 변이체 Y259F (/A261K) 및 K265T)는 F.VIII의 부존재하에서 가능한 활성화에 대하여 더 연구되었다 (WO 2008/092644 및 WO 2008/092643 뿐만 아니라 Hartmann et al, 2007). 이 접근법의 근거가 되는 아이디어는 상기 루프의 양말단에 존재하는 잔기들을 변화시켜 F.IX 특이적 99-루프의 구조를 변형시키는 것이다. 본 발명자들의 연구에서 놀라운 발견은 F.IX가 부분적으로 잘려지고 및/또는 진행세포 대신 박테리아에서 생산된, 기술된 상기 F.IX 모델과 대조적으로, 상기 F.VIII 비의존적 활성화는 265 위치에서의 돌연변

이에만 의존한다는 것이었다. 더욱이, Y259F 위치에서의 상기 돌연변이는 상기 F.VIII 의존적 및 전체 활성(overall activity)을 방해하는 것이고 Y259F 위치에서의 상기 돌연변이를 제외시키는 것만으로 충분히 높은 F.VIII 의존성 활성이 얻어져 치료제로서 F.IX 변이체를 사용하는 접근법을 더 추구할 수 있었다.

[0169] 돌연변이 I383V 및 E388G의 경우에, 상기 경우는 비슷하였다. 두 돌연변이가 Hopfner et al. (1997)에 의한 첫 번째 기술 및 그 후 Baxter에 의한 기술(WO 2008/092644 및 WO 2008/092643 뿐만 아니라 Hartmann et al, 2007 참조)에서 일 단위(unit)로서 밝혀졌다. Hopfner et al.(1997)는 심지어 I383V는 박테리아 F.IX 발현 시스템에서 단지 중간 효과(moderate effect)만을 가졌으므로 E388G와 조합되어서만 증식되었다고까지 보고하였다. 본 발명자들의 실험은 그 반대 내용을 암시한다. 상기 돌연변이 I383V만이 F.VIII 의존성 F.IX 활성을 증가시킨 반면, E388G는 상기 활성을 방해하였다. 본 발명자들은 우회제(bypassing agent)에 기반한 새로운 F.IX의 잠재적 개발을 위하여 이들 차이점들은 핵심적이라고 믿는다. 먼저, 지혈을 개선하기 위하여 필요한 상기 활성은 이들 돌연변이를 제외하므로써 여러 배 개선되었고, 둘째로, F.IX에 대한 억제성 항체 형성의 위험은 아마 상기 단백질에 도입되는 변화의 양과 함께 증가할 것이기 때문에, F.IX에 도입된 돌연변이의 수는 주요 안전 관심사일 것이다.

[0170] - 접합체

[0171] 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 인자 IX의 상기 변이체는 상기 변이체에 바람직하게는 공유적으로 부착되어 있는, 추가의 화합물 또는 모이어티를 포함한다(접합체).

[0172] 바람직하게는, 상기 추가의 화합물 또는 모이어티는 아래로부터 선택된다.

[0173] - 알부민과 같은 단백질,

[0174] - 발색단(chromophor), 형광단(fluorophor), 동위원소와 같은 표지, 및/또는

[0175] - PEG와 같은 중합체.

[0176] 상기 F.IX 변이체의 핵산 및 약학적 조성물

[0177] 본원발명에 따르면, 상기 목적은 본 발명에 따른 상기 변이체 인자 IX를 코딩하는 핵산을 제공함으로써 더 해결된다.

[0178] "핵산(nucleic acid)"은 DNA, RNA 및 그들의 유도체, 변형된 뉴클레오타이드/뉴클레오시드를 포함하는 DNA 및/또는 RNA를 나타낸다.

[0179] 바람직하게는, 상기 핵산은 프로모터 및/또는 터미네이터 서열에 작동가능하게 연결되어 있다. 바람직한 프로모터 및/또는 터미네이터 서열은 인간 알파 1 안티-트립신 프로모터, 간 유전자좌 조절 영역(hepatic locus control region) 1, 또는 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 유인원바이러스40의 인간 또는 소 성장호르몬 유래의 폴리아데닐레이션 신호(polyadenylation signal vom human or bovine growth hormone of the Simianese Virus 40)이다.

[0180] 당업계 숙련자는 또한 적합한 프로모터 및/또는 터미네이터 서열을 선택할 수 있다.

[0181] 핵산은 상기 핵산의 전사/번역이 예를 들면, 코딩된 단백질이 상기 핵산으로부터 얻어질 수 있도록, 바람직하게는 세포 중에서, 각 프로모터/터미네이터에 의하여 및 세포 전사/번역 기구에 의하여 제어되고 있는 경우, 프로모터 및/또는 터미네이터 서열에 "작동가능하게 연결된(operably linked)" 것이다.

[0182] 바람직하게는, 상기 핵산은 발현 플라스미드, 유전자 치료 구조체, 유전자 전달 벡터 내에 인코딩된 서열, DNA 변형 또는 수복, 또는 비슷한 것을 위하여 사용된 유전자 서열이다.

[0183] 바람직한 유전자 치료 구조체는 예를 들면 (Schuettrumpf et al, 2005)에 기술된 바와 같은 아데노-연관 바이러스

스 벡터 (AAV), 플라스미드 벡터, 또는 미니서클 벡터와 같은 바이러스 및 비바이러스 벡터이다.

- [0184] 본 발명에 따르면, 상기 목적은 본 발명의 인자 IX (F.IX)의 하나이상의 변이체 또는 본 발명의 하나이상의 핵산, 및 선택적으로 약학적으로 허용가능한 담체(들) 및/또는 부형제(들)를 포함하는 약학적 조성물을 제공함으로써 더 해결된다.
- [0185] 적합한 약학적으로 허용가능한 담체(들) 및/또는 부형제(들)은 당업계에 알려져 있다. 당업계의 숙련자는 치료되어질 질병, 치료되어질 환자, 치료 요법(treatment regimen) 등과 같은 상기 약학적 조성물의 의도되는 적용에 따라 바람직한 약학적으로 허용가능한 담체(들) 및/또는 부형제(들)을 선택할 것이다.
- [0186] 의약적 용도
- [0187] 본 발명에 따르면, 상기 목적은 본원발명에서 기술된 바와 같은, 혈액응고 캐스케이드의 비타민 K-의존성 세린 프로테아제의 변이체, 가장 바람직하게는 인자 IX의 변이체, 또는 그들을 코딩하는 상기 핵산 또는 질병의 진단, 예방 및/또는 치료를 위한 본 발명의 상기 약학적 조성물을 제공함으로써 더 해결된다.
- [0188] 진단, 예방 및/또는 치료되어질 상기 질병은 바람직하게는 출혈 질환 (bleeding disorder) 또는 출혈 (bleeding)이다.
- [0189] "출혈 질환 (bleeding disorder)"은 바람직하게는 혈우병 A 및/또는 혈우병 B, 인자 VIII에 대한 억제성 항체에 의하여, 인자 VIII 또는 인자 IX의 결핍에 의하여 또는 비기능적 인자 VIII 또는 인자 IX 단백질의 존재에 의하여, 또는 임의의 다른 출혈 또는 출혈 경향에 의하여 야기되거나 복합화된 혈우병이다.
- [0190] 바람직하게는, 상기 출혈 질환은 혈우병 A, 인자 F.VIII 또는 F.VIIIa에 대한 억제성 항체에 의하여 야기되거나 복합화된 혈우병, 혈우병 B이다.
- [0191] 바람직하게는, 상기 출혈 질환 또는 출혈은 예를 들면, 신생 응고병증 (neonatal coagulopathies); 중증 간질환; 고위험 외과수술 과정 (high-risk surgical procedures); 외상성 혈액 손실; 골수이식; 저혈소판증 (thrombocytopenias) 및 혈소판 기능 질환; 경구 항응고의 긴급한 반전 (urgent reversal of oral anticoagulation); 인자 V, VII, X, 및 XI의 선천성 결핍; 및 폰 빌레브란트 인자에 대한 저해제를 갖는 폰 빌레브란트 질병 (von Willebrand disease), 큰 손상 (large injuries), 뇌 출혈, 혈소판 기능 질환 (thrombocyte function disorders)과 연관된 혈액 손실을 포함한, 우회제가 사용되는 출혈 질환이다.
- [0192]
- [0193] 본 발명에 따르면, 상기 목적은 출혈 질환 또는 출혈의 치료 및/또는 예방을 위한 약제의 제조를 위하여 본원발명에서 기술된 바와 같은, 혈액응고 캐스케이드의 비타민 K-의존성 세린 프로테아제의 변이체, 가장 바람직하게는 인자 IX의 변이체, 또는 그들을 코딩하는 상기 핵산을 사용함으로써 더 해결된다.
- [0194] 바람직하게는, 본 발명의 인자 IX (F.IX)의 상기 변이체, 상기 핵산 또는 상기 약학적 조성물은 출혈 질환 또는 출혈의 단백질 주입 치료, 세포 치료, 유전자 치료 및/또는 예방을 위하여 사용된다.
- [0195] 진단, 예방 및/또는 치료, 여기서 상기 질병은 혈우병 A 또는 인자 F.VIII 또는 F.VIIIa에 대한 억제성 항체에 의하여 야기되고 복합화된 혈우병: 바람직하게는 아래에 의한 진단, 예방 및/또는 치료
- [0196] - 그룹 A의 변이체, 더 바람직하게는 변이체 K265T
- [0197] - 그룹 B 및/또는 C 및/또는 D와 조합된 그룹 A의 변이체
- [0198] 본 명세서에 정의된 바와 같은 그룹 A+B

- [0199] 본 명세서에 정의된 바와 같은 그룹 A+C
- [0200] 본 명세서에 정의된 바와 같은 그룹 A+B+C
- [0201] 본 명세서에 정의된 바와 같은 그룹 A+D
- [0202] 본 명세서에 정의된 바와 같은 그룹 A+B+D
- [0203] - 상기 각 핵산, 약학적 조성물.
- [0204] 본 발명자들은 혈우병 A 또는 인자 F.VIII 또는 F.VIIIa에 대한 억제성 항체에 의하여 야기되고 복합화된 혈우병의 치료를 위하여 그룹 A의 변이체, 특히 K265T를 적용한 첫 번째 연구자들이다.
- [0205] F.VIII의 부존재하에서 더 높은 프로테아제/응고활성을 갖는 변이체 F.IX 분자는 손상 부위에서 직접적으로 활성화될 수 있다는 잇점을 가진, 통상적 우회제에 대한 대안일 수 있다. 이것은 생리적 혈전 (clot) 형성을 돕고, 현재 이용가능한 우회제 중의 보통사용되는 이미 활성화된 프로테아제의 주입을 방지하고, 치료를 더 안전하게 할 것이다.
- [0206] 자이모겐 F.IX 변이체는 아마 또한 훨씬 긴 반감기를 가져, 저해제 환자에서 또한 예방적 질환 치료를 가능하게 한다. 아주 흥미롭게도, F.VIII가 결여되어 있는 환자는, 현재 유전자 치료가 훨씬 더 가망성이 있는 더 적고 덜 면역원성인 F.IX를 사용한 유전자 전달 접근법에 훨씬 더 적합하였다. 상대적으로 적은 수의 환자와 혈우병에 대한 유전자 치료를 임상 활용으로 도입하는데 필요한 많은 노력을 고려하면, 상기 제안된 F.IX 변이체는 혈우병 A 및 혈우병 B를 가진, 또는 F.VIII에 대한 억제성 항체를 가진 환자에 대하여 치료를 원하는 노력을 추가로 줄 수 있다 (bundle the efforts offering therapy). 마지막으로, 상기 변이체는 다른 출혈 질환의 치료에 또한 유용할 것이다.
- [0207] 상기 기술된 변이체의 다른 양상은 F.VIIIa 및 F.X 절단 및 발색 기질 절단 둘 모두에 대한 더 높은 활성에 대한 요구 없이, 상기 변이체는 테나제 복합체로 조립되지 않고서는 F.IXa의 낮은 효능으로 인하여, 오래 동안 항응고제로서 요구되고 있지만 어떤 효과적인 탐색도 가능하지 않은, 직접적 F.IXa 저해 물질을 위한 진단 시험 시스템에 또는 개발 및 탐색하기 위하여 사용될 수 있다는 것이다.
- [0208] 본 명세서에 기술된 모든 변이체에 의한, 바람직하게는 아래에 의한 진단, 예방 및/또는 치료, 여기서 상기 질병은 혈우병 B이다:
- [0209] - 그룹 A의 변이체, 더 바람직하게는 변이체 K265T
- [0210] - 그룹 B 및/또는 C 및/또는 D와 조합된 그룹 A의 변이체
- [0211] 본 명세서에 정의된 바와 같은 그룹 A+B
- [0212] 본 명세서에 정의된 바와 같은 그룹 A+C
- [0213] 본 명세서에 정의된 바와 같은 그룹 A+B+C
- [0214] 본 명세서에 정의된 바와 같은 그룹 A+D
- [0215] 본 명세서에 정의된 바와 같은 그룹 A+B+D
- [0216] - 그룹 D의 변이체, 더 바람직하게는 변이체 K265T
- [0217] - 그룹 A 및/또는 B와 조합된 그룹 D의 변이체
- [0218] 본 명세서에 정의된 바와 같은 그룹 A+D
- [0219] 본 명세서에 정의된 바와 같은 그룹 A+B+D
- [0220] - 상기 각 핵산, 약학적 조성물.

- [0221] 출혈 질환 또는 출혈의 진단, 예방 및/또는 치료로서, 더 나아가 혈전생성 위험 (thrombogenic risks)이 최소화 된 것이고, 바람직하게는 아래에 의한 출혈 질환 또는 출혈의 진단, 예방 및/또는 치료
- [0222] - 그룹 C와 조합된 변이체
- [0223] 본 명세서에 정의된 바와 같은 그룹 A+C
- [0224] 본 명세서에 정의된 바와 같은 그룹 A+B+C
- [0225] - 상기 각 핵산, 약학적 조성물.
- [0226]
- [0227] 그룹 D 단독을 제외한 본 명세서에 기술된 모든 변이체에 의한 혈우병 A 및 B 둘 모두의 진단, 예방 및/또는 치료.
- [0228] 그룹 D 단독을 제외한 본 명세서에 기술된 모든 변이체에 의한 혈우병 A 또는 혈우병 B 뿐만 아니라 인자 F.VIII에 대한 억제성 항체에 의하여 야기되거나 또는 복합화된 혈우병의 진단, 예방 및/또는 치료.
- [0229] 본 발명의 상기 변이체는 단백질 투여, 또는 세포- 또는 유전자 치료적 투여 (바이러스의 DNA, RNA, 또는 다른 벡터)를 사용한 출혈 질환을 가진 환자를 치료하기 위한 적합한 도구이다. 출혈의 치료를 위한 및 예방적 치료를 위한, 치료를 위한 질병은 혈우병 A 및 B, 또한 F.VIII에 대한 억제성 항체에 의하여 야기되거나 또는 복합화된 혈우병 A 및 B이다.
- [0230] 본 발명자들은 본 발명의 상기 변이체는
- [0231] - F.VIII에 대한 억제성 항체의 존재하에서 응고 시간을 교정하고 (correct) (상기 시험된 F.IX 변이체의 기능을 또한 F.VIII 저해제의 고역가의 존재하에서 확인하는 것),
- [0232] - 인 비보 응고를 교정하고 (F.IX 변이체가 인 비보에서 지혈적으로 활성인 치료제로서 역할을 할 수 있다는 첫 번째 증거인),
- [0233] - F.VIII에 대한 억제성 항체의 존재하에서 출혈을 멈추게 한다는 것 (F.VIII에 대한 억제성 항체의 존재 및 부존재에서, F.IX 변이체의 기능성 (functionality)을 확인하는 것)을 밝혔다.
- [0234] 보다 상세한 내용에 대하여는, 실시예 6-8 및 도 4-7을 참조.
- [0235] 탐색 방법
- [0236] 본 발명에 따르면, 상기 목적은 항응고성 화합물 (항응고제), 바람직하게는 F.IXa를 직접적으로 억제하는 화합물을 탐색하기 위한 방법을 제공함으로써 더 해결된다.
- [0237] 그러한 방법은 본 명세서에 정의된 바와 같은, 본 발명의 하나이상의 변이체 인자 IX의 사용을 포함한다.
- [0238] 그러한 방법에서, 상기 테나제 복합체의 어떠한 추가적 성분도 필요하지 않다 (여기서 "테나제 (tenase)"는 활성화된 형태의 혈액 응고 인자들 인자 VIII (F.VIIIa) 및 인자 IX (F.IXa)의 복합체를 나타낸다. 그것은 칼슘의 존재하에서 인지질 표면 상에서 형성되고 인자 X의 활성화를 야기시킨다.).
- [0239] 상기 기술된 변이체의 이로운 양상은 F.VIIIa 및 F.X 절단 및 발색 기질 절단 둘 모두에 대한 더 높은 활성에 대한 요구 없이, 상기 변이체는 테나제 복합체로 조립되지 않고서는 F.IXa의 낮은 효능으로 인하여, 오래 동안 항응고제로서 요구되고 있지만 어떤 효과적인 탐색도 가능하지 않은, 직접적 F.IXa 저해 물질을 위한 진단 시험 시스템에 또는 개발 및 탐색하기 위한 적합한 도구이다.
- [0240] 본 발명에 따른 탐색 방법은 바람직하게는 본 발명의 변이체 인자 IX에 결합하고 및/또는 그 활성을 조절하는 화합물을 확인하기 위한 방법이고, 바람직하게는 다음 단계들을 포함한다:

- [0241] - 시험될 화합물/물질을 제공하는 단계,
- [0242] - 본 발명의 하나이상의 변이체 인자 IX를 제공하는 단계,
- [0243] - 시험될 화합물/물질을 본 발명의 하나이상의 변이체 인자 IX와 접촉시키는 단계,
- [0244] - 상기 화합물/물질이 상기 하나이상의 변이체 인자 IX와 결합하는지를 결정하는 단계,
- [0245] - 선택적으로, 상기 화합물/물질이 상기 하나이상의 변이체 인자 IX의 활성을 조절하는지를 결정하는 단계.
- [0246] 하기의 실시예 및 도면은 본 발명을 예시하지만, 본 발명을 거기에 한정하는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

- [0247] 도 1. 인자 IX 아미노산 및 뉴클레오티드 서열. 도입된 상기 돌연변이는 강조표시되어 있다.
- 도 2. 야생형 인자 IX (WT) 또는 F.IX-, F.X-, 및 F.VIII-결핍 혈장에서 FFT 치환을 포함하는 F.IX 변이체 (FFT)의 응고활성.
 - (A) F.IX-결핍 혈장.
 - (B) F.X-결핍 혈장.
 - (C) F.VIII-결핍 혈장.

값들은 F.IX (%)의 항원 수준에 의하여 나누어진 활성 (%)을 나타낸다 (+/- 표준 편차). 예상대로 야생형 F.IX는 활성이 F.IX 결핍 혈장 중에서 시험된 경우 몫 1을 가졌으나 (A 참조), FX- 또는 F.VIII-결핍 혈장 중에서는 활성이 없었다 (B 및 C 참조).

상기 FFT 치환을 포함하는 상기 변이체 (FTT)는 F.VIII-결핍 혈장 중에서 100% (5000 ng/ml) F.IX 항원 수준에서 2%의 활성을 보이지만 (C 참조), F.X-결핍 혈장 중의 상기 활성은 무시할만하다 (B 참조).
- 도 3. 조직배양에서 F.IX 발현을 위한 F.IX 발현 카세트 (A) 또는 생쥐에서 간-특이적 발현 (B). F.IX 변이체를 생성하기 위한 돌연변이는 K265T 아미노산 치환에 대하여 강조표시된 바와 같이 부위지향된돌연변이유발 (site directed mutagenesis)에 의하여 도입되었다.
- 도 4. F.VIII에 대한 고역가의 억제성 항체에 의하여 야기된 획득된 형태의 혈우병을 가진 환자의 혈장 중의 aPTT-기반된 일 단계 F.VIII 분석 (aPTT-based one stage F.VIII assay).

정상 대조군 혈장, F.IX WT, 또는 변이체 K265T (T) 또는 V181I/K265T/I383V (ITV)를 동일한 부피 (1:1)로 환자 혈장에 혼합하였다. 상기 혼합물을 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션한 다음 응고활성을 F.VIII 결핍 혈장 중에서 결정하였다. 정상 대조군 혈장은 응고 시간을 노말화하지 않거나 단지 불충분하게 노말화한 반면, 상기 F.IX 변이체 T 및 ITV는 각각 정상 인간 F.IX 항원 수준의 50% 또는 100%의 수준에서 응고 시간을 유의하게 단축시켰다. 억제성 항-F.VIII 항체의 존재하의 상기 관찰된 응고 기능은 F.VIII 결핍 혈장 중에서 종래에 열거된 값들과 잘 일치하였다. 상기 그래프는 에러 바로서 평균의 표준 오차를 갖는 평균 값을 나타낸다. * p<0.05을 갖는 F.IX WT에 대비한 스튜던트 t-테스트.

- 도 5. F.IX 변이체는 F.VIII K.O. 생쥐에서 응고 시간을 부분적으로 교정한다.

10 내지 50 μ g/생쥐의 용량으로 야생형 또는 변이체 [K265T (T), V181I/K265T/I383V (ITV) 또는 V181I/K265T/R338A/S377W/I383V (ITAWV)], F.IX의 간-유래 발현을 위한 비바이러스 미니서클 벡터를 수력학적 주사 기법에 의하여 F.VIII K.O.생쥐에 주사하였다. 주사 후 3일에, 생쥐 혈장 중의 F.IX 항원 (ELISA) 및 F.VIII 우회 활성 (F.VIII 결핍 혈장 중에서 일-단계 분석) 측정을 위하여 상기 생쥐로부터 혈액을 채취하였다. F.IX 야생형을 발현하는 생쥐는 모든 발현 수준에 걸쳐 기저선 근처의 우회활성을 보인 반면, 높은 수준의 발현에서 (약 20 μ g/ml) 상기 변이체에 대하여 정상 F.VIII의 35%까지의 F.VIII 우회 활성이 측정되었다. 가장 높은 F.VIII 우회 활성을 보이는 F.IX ITAWV 및 가장 낮은 F.VIII 우회 활성을 보이는 F.IX T를 가진 모든 변이체에 대하여 F.IX 항원 수준과 F.VIII 우회 활성 사이에 좋은 상관관계가 있었다. 각 데이터 지점은 단일 생쥐의 측정을 나타낸다.

- 도 6. F.IX 변이체는 F.VIII K.O.생쥐에서 출혈을 정지시킨다.

비바이러스 유전자 전달 후 F.IX WT 또는 변이체 [K265T (T), V181I/K265T/I383V (ITV) 또는

V181I/K265T/R338A/S377W/I383V (ITAWV)]를 발현하는 F.VIII K.O. 생쥐는 꼬리 자르기 분석 (tail clip assay)에 의하여 챌린지되었다. 간단하게 설명하면, 생쥐를 마취하고 꼬리를 염수 용액 중 37℃에서 미리 가열하였다. 다음으로, 상기 꼬리를 직경 1.5 mm (A) 또는 3 mm (B)로 절단하고 혈액을 따뜻한 염수 용액 중에 수집하였다. 10분 후 상기 생쥐의 꼬리를 봉합하고 소작하여 출혈을 정지시켰다. 혈액 손실은 상기 염수 용액 중 상기 손실된 헤모글로빈의 광밀도 (OD 492 nm) 측정에 의하여 정량되었다. 두 출혈 모델에서 F.IX 야생형 발현 또는 비백터 처리된 생쥐에 비하여 모든 F.IX 변이체 처리된 생쥐 군에 대하여 유의한 혈액 손실의 감소가 있었다. 지혈적으로 정상인 C57BL/6 생쥐 대비 더 확연한 (provocative) 3 mm 모델에서 밝혀진 바와 같이 이 개선은 부분적 교정 (partial correction)이었다. 생쥐의 수 및 평균 발현 수준은 그래프 아래의 생쥐의 각 군에 대하여 나타내었다. 각 열은 에러 바로서 평균의 표준 에러를 갖는 혈액 손실에 대한 평균 값을 나타낸다. * F.IX WT에 대비된 스튜던트 t-테스트 <0.05.

도 7. F.IX 변이체는 높은 역가의 F.VIII에 대한 억제성 항체를 갖는 F.VIII K.O. 생쥐에서 출혈을 정지시킨다.

F.VIII에 대한 억제성 항체는 플라스미드 백터에 의한 F.VIII 유전자 전달을 이용하여 간에 비바이러스 유전자 전달에 의하여 F.VIII K.O. 생쥐에서 유도되었다. 유전자 전달은 주사 3일 후 F.VIII 측정에 의하여 결정되었다. 6주 후 본 발명자들은 일-단계 및 ELISA 분석에 의하여 항-FVIII 항체의 높은 역가의 존재 (20,000 내지 100,000 ng/ml) 및 잔류 F.VIII 항원 및 활성의 부존재를 확인하였다. 다음으로 생쥐는 F.IX WT 또는 변이체 발현을 위한 미니썬클 유전자 전달에 의하여 처리하고 3일 후 꼬리 자르기 분석에 의하여 챌린지되었다. 각 군의 생쥐의 수 및 평균 F.IX 발현 수준은 그래프 아래에 나타내었다. 대조군 (무 백터 및 F.IX WT 처리된 생쥐) 중 혈액 손실의 얼마간 변이가 있을지라도, 모든 3개 변이체 그룹들 [K265T (T), V181I/K265T/I383V (ITV) 또는 V181I/K265T/R338A/S377W/I383V (ITAWV)]에서 혈액 손실은 현저하게 감소하였다. 각 열은 에러 바로서 평균의 표준 에러를 갖는 혈액 손실에 대한 평균 값을 나타낸다. * 스튜던트 t-테스트 <0.05.

도 8. 위치 265는 F.IX 변이체의 F.VIII 우회 활성의 주요한 결정인자 (determinant)이다.

F.VIII 비의존적 활성을 갖는 F.IX 변이체 중 265 위치의 역할을 조사하기 위하여, 모든 단백질생성 아미노산을 부가적인 V181I 및 I383V 치환을 가진 F.IX 분자 중의 이 위치에 도입하였다. 상기 변이체는 HEK 293 세포에서 발현되고, F.IX 항원 수준은 ELISA에 의하여 결정되고, 및 F.IX 결핍 및 F.VIII 결핍 혈장 중의 F.IX 활성은 상기한 바와 같이 일-단계 분석에 의하여 결정되었다. 각 점 (dot)은 에러 바로서 평균의 표준 에러를 갖는 단일 변이체에 대하여 평균 값을 나타낸다. 상기 실험은 3중(triplicate)으로 수행되었고 2회 이상 반복되었다.

야생형 (WT)은 V181/K265/I383, ITV는 V181I/K265T/I383V, IAV는 V181I/K265A/I383V를 나타낸다.

Y-축은 F.IX 비활성 (백분율로 F.IX 항원에 의하여 나누어진 F.IX 활성)을 나타내며, F.IX WT를 100%로서 설정하였다. X-축은 동일한 비율을 나타내지만, 이번에는 상기 활성 측정은 F.VIII 결핍 혈장 중에서 수행되었다. 잔기 265를 트레오닌으로부터 자연적으로 존재하는 라이신으로 되돌리는 것 (V181I/265K/I383V, IKV)에 의하여 F.VIII 비의존적 활성의 거의 완전한 손실이 야기되었다. 놀랍게도, 다른 아미노산 치환, 특히 변이체 K265A/V181I/I383V, K265G/V181I/I383V, K265V/V181I/I383V, K265N/V181I/I383V, 또는 K265D/V181I/I383V에서, K265T/V181I/I383V 보다 비슷한 F.VIII-우회 활성이 야기되었고 (similar F.VIII-bypassing activity than K265T/V181I/I383V), K265A/V181I/I383V에 대하여 가장 높았다. 종래 기술되었던 단일 K265A 치환을 가진 인자 IX 변이체에 대한 F.VIII 비의존적 활성은 훨씬 더 낮은 범위 내에 있었기 때문에, 이 결과는 예기치 않은 것이다 (Kolkman 및 Mertens, 2000).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0248]

실시에

[0249]

실시에 1

[0250]

본 발명자들은 테나제 복합체 중에 조립된 경우 더 관찰될 것 같은 상태로의 F.IX의 활성 부위 구조의 변형이 F.VIII의 부존재하에서 증가된 활성을 갖는 단백질을 생성할 것이라는 가설을 검토하였다.

[0251]

돌연변이는 문헌 (Hopfner et al, 1997; Sichler et al, 2003)에서 이용가능한 F.X에 의하여 F.IX의 잔기를 비교하고 치환시키는 구조적 연구에 기반하여 선택되었다.

[0252]

본 발명자들은 먼저 돌연변이 Y259F/K265T/Y345T (FTT)를 F.IX 중에 도입하고 조직 배양 중에 상기 단백질을 발현시켰다. 기본적으로 F.IX 비활성에 대하여 어떠한 영향도 나타나지 않았다; 그러나, F.VIII-결핍 혈장 중 상

기 활성은 현저하게 증가하였다. 이 활성은 상기 F.IX 비활성 (100%의 F.IX 항원은 2%의 "F.VIII-유사" 활성에 대응된다)의 여전히 작은 부분이기 때문에, 본 발명자들은 상기 변이체 단백질을 20,000 내지 40,000 ng/ml (정상 혈장 농도의 400-800%)까지 농축하였다. 이 농도에서 30% 이상까지의 "F.VIII-유사" 활성이 측정될 수 있었으며, 반면 WT F.IX 또는 음성 대조군에 대하여는 어떤 활성도 검출되지 않았다.

[0253] 야생형 단백질 (WT)에 대한 F.VIII-, F.IX-, 또는 F.X-결핍 혈장 중의 상기 FTT 변이체의 활성의 비교는 도 2에 나타내었다.

[0254] 실시예 2

[0255] 상기 FTT 변이체의 특성을 더 개선하기 위하여, 다른 특성을 가진 F.IX 분자를 생성하기 위하여 본 발명자들은 상기 FTT 변이체와 여러 다른 돌연변이를 조합하였다.

[0256] 표 1은 상기 시험된 돌연변이의 개괄 및 F-VIII- 또는 F-IX-결핍 혈장 중의 상기 변이체의 활성을 제공한다.

[0257] 실시예 3

[0258] (13)은 상기 FTT 변이체의 모든 3개 치환 (Y94F, K98T, 및 Y177T 키모트립신 번호매김)이 동시에 존재하는 경우에만 발색 기질에 대한 잘려진 F.IX (rf9)의 증가 효과를 기술하고 있기 때문에, 본 발명자들은 처음에 실험을 위하여 상기 조합된 변이체를 사용하였다.

[0259] 그러나, 본 발명자들은 또한 단일 돌연변이들을 시험하였고 필요한 유일한 치환은 K265T (즉, K98T) 변이체이고 및 다른 것들은 심지어는 F.VIII의 존재 및 부존재하에서 상기 프로테아제 활성을 악화시킨다는 것을 놀랍게도 발견하였다 (표 1).

[0260] 실시예 4

[0261] 본 발명자들은 변이체를 더 시험하였으며 그들을 조합하여 F.VIII의 존재하에서 높은 F.IX 활성을 갖는 분자들을 얻었다.

[0262] 표 3은 활성이 10-배이상 증가된 여러 변이체를 나타낸다. 이 표로부터 또한 분명한 것은 원하는 증가된 활성을 갖는 돌연변이의 조합에 의하여 가장 높은 활성 수준을 갖는 조합된 변이체가 생성된다는 사실이다. R338A/S377W와 같은 상기 변이체의 일부를 F.VIII의 부존재하에서 그 활성에 대하여 또한 시험하였다 (표 1). 그러나, 상기 K265T 변이체와의 조합에서만 상기 F.VIII 비의존성 F.IX 활성에 대한 증가된 효과를 관찰할 수 있었다.

[0263] 실시예 5

[0264] 원하는 특성을 가진 변이체를 제작하기 위하여, 본 발명자들은 원하는 효과를 가진 단일 돌연변이들을 조합하여 더 증가된 원하는 높은 활성을 가진 변이체를 얻었다. 예를 들면, 상기 K265T 변이체는 F.VIII의 부존재하에서 6.6% 활성 및 F.VIII의 존재하에서 191% 활성을 갖는다. F.VIII의 부존재하에서 가장 높은 가능한 활성이나 F.VIII의 존재하에서 증가가 없거나 중등 증가(moderate increase)만을 갖는 것을 얻기 위하여, 본 발명자들은 상기 K265T 돌연변이를 돌연변이 I383V 또는 V181I와 조합하였다. 그 결과 얻어진 변이체 V181I/K265T 및 K265T/I383V는 F.VIII의 부존재하에서 9.0% 및 8.7% 활성, 및 F.VIII의 존재하에서 219% 및 139% 활성을 가졌다. F.VIII의 부존재하에서 활성의 이 중등 증가는 상기 변이체 V181I/K265T/I383V로 모든 3개 돌연변이를 조합하여 F.VIII의 존재하에서 상기 활성을 증가시키지 않고 각각 16.4% 및 209%까지 현저하게 더 개선될 수 있다.

[0265] 표 1에 시험된 조합을 요약하여 나타내었으며 단일 변이체들의 영향은 표 2에 요약하였다.

[0266] 실시예 6

- [0267] F.IX 변이체는 억제성 항체의 존재하에서 응고시간을 교정한다.
- [0268] FVIII에 대한 억제성 항체의 존재하에서 F.IX 변이체의 기능성을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 후천성 형태 (acquired form)의 혈우병 A를 갖는 환자의 혈장에서 aPTT-기반된 한 단계 F.VIII 분석을 수행하였다 (도 4). 정상 대조군 혈장, F.IX WT, 또는 변이체 K265T (T) 또는 V181I/K265T/I383V (ITV)를 동일한 부피 (1:1)로 환자 혈장과 혼합하였다. 상기 혼합물을 2시간 동안 37℃에서 인큐베이션한 후, 응고활성을 F.VIII 결핍 혈장 중에서 결정하였다. 정상 대조군 혈장은 응고시간을 노말라이즈하지 않거나 단지 불충분하게 노말라이즈한 반면, 상기 F.IX 변이체 T 및 ITV는 각각 정상 인간 F.IX 항원 수준의 50% 또는 100%의 수준에서 상기 응고시간의 유의한 단축을 야기하였다. 억제성 항-F.VIII 항체의 존재하에서 상기 관찰된 응고 기능은 F.VIII 결핍 혈장 중의 종래 열거된 값과 잘 일치하였다 (표 1). 그러므로, 상기 결과는 높은 역가의 F.VIII 저해제의 존재하에서 또한 상기 시험된 F.IX 변이체의 기능을 확인한다.
- [0269] 실시예 7
- [0270] F.IX 변이체는 인 비보 혈액 응고를 교정한다.
- [0271] 다음의 실험에서 본 발명자들은 F.IX 변이체가 인 비보에서 실제로 지혈을 개선시켜 우회 치료제로서 F.IX 변이체를 사용하는 접근법이 타당하는 개념의 증거를 제공할 수 있는지를 시험 목적으로 하였다. 시험을 위하여 본 발명자들은 F.IX의 간-유래 발현을 위하여 비바이러스 미니서클 벡터 시스템을 사용하였다. WT 또는 변이체 F.IX [K265T (T), V181I/K265T/I383V (ITV) 또는 V181I/K265T/R338A/S377W/I383V (ITAWV)]를 위한 벡터는 유체역학적 주사 기법을 사용하여 F.VIII K.O. 생쥐의 꼬리 정맥에 주사하였다. 주사 후 3일에 혈액을 생쥐 혈장 중의 F.IX 항원 (ELISA) 및 F.VIII 우회 활성화 (F.VIII 결핍 혈장 중의 일-단계 분석) 측정을 위하여 생쥐로부터 채취하였다. F.IX WT를 발현하는 생쥐는 모든 발현 수준에서 기저선 근처에서 우회 활성을 보였으나, 상기 변이체에 대하여는 높은 발현 수준 (약 20 μ g/ml)에서 정상 F.VIII 활성화의 35%까지의 F.VIII 우회 활성화가 측정되었다. 가장 높은 F.VIII 우회 활성을 보이는 F.IX ITAWV 및 가장 낮은 F.VIII 우회 활성을 보이는 F.IX T를 갖는 모든 변이체에 대하여 F.IX 항원 수준 및 F.VIII 우회 활성화 사이에 좋은 상관관계가 있었다 (도 5). 이들 결과는 면역체계에서 또한 상기 변이체의 기능성을 확인한다. 다음으로 본 발명자들은 꼬리 자르기 분석에 의하여 다른 그룹의 생쥐에 대하여 챌린지하였다. 다음으로 상기 꼬리를 직경 1.5 mm (도 6 A) 또는 3 mm (도 6 B)로 자르고 혈액을 수집하였다. 10분 후 출혈을 정지시키고 혈액 손실을 정량하였다. 두 출혈 모델에서 F.IX 야생형 발현 생쥐 또는 벡터 처리되지 않은 생쥐에 비하여 모든 F.IX 변이체 처리된 그룹에 대하여 혈액 손실의 유의한 감소가 있었다. 이 개선은 혈우병에 걸리지 않은 (non-hemophilic) C57BL/6 생쥐에 비하여 더 자극적인 (provocative) 3mm 모델에서 밝혀진 바와 같은 부분적 교정이었다. 이는 F.IX 변이체가 인 비보에서 지혈적으로 활성인 치료제 (hemostatically active therapeutics)로서 역할을 할 수 있다는 첫 번째 증거이다.
- [0272] 실시예 8
- [0273] F.IX 변이체는 억제성 항체의 존재하에서 출혈을 정지시킨다.
- [0274] 다음으로, 높은 역가의 F.VIII에 대한 억제성 항체의 존재하에서 F.IX 변이체의 기능성을 확인하였다. 그래서, 항-F.VIII 항체를 C.Miao 및 공동연구자들 (Ye et al., 2004)에 의하여 소개된 저해제 유도 모델을 사용하여 F.VIII K.O. 생쥐에서 유도하였다. 초기 F.VIII 발현은 플라스미드 벡터를 사용하여 간으로의 비바이러스 F.VIII 유전자 전달을 이용하여 얻어졌다. 6주 후 본 발명자들은 일-단계 및 ELISA 분석에 의하여 고역가 (20,000 내지 100,000 ng/ml)의 항-F.VIII 항체의 존재 및 잔존 F.VIII 항원 및 활성화의 부존재를 확인하였다. 다음으로, 생쥐를 F.IX WT 또는 변이체 발현을 위하여 미니서클 유전자 전달로 처리하고 그 후 3일째에 꼬리 자르기 분석에 의하여 챌린지하였다 (도 7). 대조군 (벡터 처리되지 않거나 F.IX WT 처리된 생쥐) 중의 혈액 손실은 모든 3개 변이체 처리된 군 [K265T (T), V181I/K265T/I383V (ITV) 또는 V181I/K265T/R338A/S377W/I383V (ITAWV)]에서의 출혈에 비하여 유의하게 더 높았다. 그러므로, F.VIII에 대한 억제성 항체의 존재 및 부존재하 모두에서 F.IX 변이체의 기능성이 확인되었다.
- [0275] 실시예 9
- [0276] 추가의 실험에서, 본 발명자들은 위치 265에서 다른 아미노산들을 시험하였으며, 여기서 사용된 구조체는 181

및 383 위치 (즉 V181I 및 I383V)에서 돌연변이를 더 포함하였다. 사용된 상기 벡터 구조체는 pAAV-CMV-hF.IX이었다. 상기한 바와 같이, 상기 변이체는 HEK 293 세포에서 발현되었고, F.IX 항원 수준은 ELISA에 의하여 결정되었고, 및 F.IX 결핍 및 F.VIII 결핍 혈장에서 F.IX 활성은 일-단계 분석에 의하여 결정되었다. 잔기 265를 트레오닌으로부터 자연적으로 존재하는 라이신으로 되돌리는 것 (V181I/265K/I383V, IKV)에 의하여 F.VIII 비의존적 활성의 거의 완전한 손실이 초래되었다. 놀랍게도 다른 아미노산 치환, 특히 변이체 K265A/V181I/I383V, K265G/V181I/I383V, K265V/V181I/I383V, K265N/V181I/I383V, 또는 K265D/V181I/I383V에서 K265T/V181I/I383V보다 비슷한 F.VIII-우회 활성 (similar F.VIII-bypassing activity than K265T/V181I/I383V)이 초래되었으며, K265A/V181I/I383V에 대하여 가장 높았다. 결과를 표 4 및 도 8에 나타내었다. 나타낸 바와 같이, 265 위치에 작은 아미노산 잔기를 갖는 돌연변이가 더 높은 응고 활성을 보이며, 돌연변이 K265T 및 K265A가 응고활성의 가장 큰 증가를 보였다. 종래 기술된 단일 K265A 치환을 갖는 인자 IX 변이체에 대한 F.VIII 비의존적 활성은 훨씬 낮은 범위에 있었기 때문에 (Kolkman 및 Mertens, Biochemistry 2000, 39, 7398-7405), 이 결과는 예기치 않은 것이다.

[0277] 재료 및 방법

[0278] 플라스미드 구조체 및 비바이러스 벡터

[0279] F.IX 변이체를 위하여 두 개의 다른 발현 벡터를 실험에 사용하였다. 조직배양용 벡터 (도 3 A)는 종래 기술된 바와 같은 (Schuettrumpf et al, 2005), CMV 프로모터에 의하여 구동되는 1.4kb 잘려진 인트론1을 갖는 F.IX로 구성되었다. 원하는 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 변화는 표준 위치 지향적 돌연변이유발법에 의하여 이 플라스미드에 도입되었다.

[0280] 사소한 변형과 함께 종래 기술된 바 (Miao et al, 2000)와 같이, 간 지향적 유전자 전달을 위한 발현 벡터 (도 3 B)는 간 유전자 조절 영역 1(hepatic locus control region 1), 인간 알파-1 안티-트립신 프로모터, 잘려진 1.4kb 인트론1을 포함하는 F.IX 미니유전자(mini-gene), 및 소성장호르몬 폴리아데닐레이션 신호 (HCR/haAT-F.IX)로 구성되었다. 상기 발현 카세트는 Mark Kay (Chen et al, 2005)에 의하여 친절하게 제공된 미니서클 생산자 플라스미드 (mini-circle producer plasmid) 내로 도입하였다. 이 시스템은 원형 DNA 벡터를 위한 박테리아 플라스미드 골격 서열의 제거를 가능하게 한다. 간단하게 설명하면, 인테그라제 (integrase) 인지 서열에 의하여 인접된 (flanked) F.IX를 위한 상기 발현 카세트를 포함하는 전체 플라스미드를 대장균 박테리아에서 성장시켰다. 유도성 파지 ΦC31 인테그라제 및 유도성 엔도뉴클레아제 I-SceI을 그 인지 서열과 함께 상기 플라스미드의 다른 (모(parental)) 부분에 위치시켰다. 밤새 성장 후, 상기 인테그라제를 아라비노즈의 첨가에 의하여 활성화시켰다. 상기 인테그라제의 활성화에 의하여 두 개의 서클 즉, 상기 발현 카세트만을 포함하는 하나와 상기 플라스미드의 모든 다른 부분을 포함하는 다른 하나의 형성이 유도되었다. 다음으로, 조건 (pH, 온도, 및 소듐 함량)을 상기 아라비노즈에 의하여 비슷하게 유도되는 상기 엔도뉴클레아제를 위하여 조정하였다. 이 효소는 박테리아 플라스미드 골격은 자르지만 상기 미니서클에 포함된 상기 발현 카세트는 자르지 않아, 상기 미니서클은 상기 박테리아에 남고, 상기 플라스미드의 나머지 부분은 분해된다. 다음으로, 미니서클은 통상적 일단계 친화성 칼럼 (regular one-step affinity column)에서 정제되고 상기 준비물 (preparation) 중의 잔존 박테리아 DNA 오염물은 NruI 제한 효소 소화와 뒤이은 플라스미드-Safe ATP-Dependent DNase (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI)에 의한 엑소뉴클레아제적 분해에 의한 박테리아 골격의 선형화에 의하여 제거되었다. 마지막으로, 본 발명자들은 페놀-클로로포름 추출을 통하여 상기 소화물로부터 에피솜(episomal) DNA를 분리하여 고도로 순수한 미니서클 (MC-HCR/haAT-F.IX)을 회수하였다.

[0281] 상기 생쥐에서 간-지향적 유전자 전달 후 저해제 유도를 위한 상기 F.VIII 발현 벡터는 F.IX가 B-도메인 결실된 F.VIII 유전자와 교환된 것이 다른, 상기 HCR/haAT-F.IX 구조체와 유사하게 제작하였다. 또한, 미니서클 벡터 대신에 pSL1180 골격을 포함하는 플라스미드 벡터를 이용하였다.

[0282] 변이체 시험을 위한 인 비트로 F.IX의 발현

[0283] HEK-293을 표준 칼슘 포스페이트 형질도입법에 의하여 CMV-F.IX 플라스미드로 형질도입시키고 10 µg/ml 비타민

K가 첨가된 무혈청 배지에서 유지하였다. 형질도입 48 시간 후, 세포 상등액을 수집하고 세포를 채취하였다. 상기 상등액의 분액을 취하고 F.IX 항원 수준 및 활성에 대하여 시험하였다. 의심되는 F.VIII 활성을 가진 돌연변이체에 대하여, 상기 상등액의 나머지는 Vivaspin 20[®] (Viva Science AG, Hannover, Germany) 농축법을 사용하여 농축하였다. 이 방법에 의하여 농도 25,000 ng/ml (정상 혈장 활성의 500%)가 용이하게 얻어졌다. 이는 F.VIII 결핍 혈장 중의 프로테아제 활성을 정확하게 시험하도록 하였다. 상기 시험이 수행될 때마다, WT F.IX, F.IX S365R (활성 없음), 및 형질도입되지 않은 세포를 대조군으로 사용하였다. 모든 실험은 한번이상 반복되었고 3배수(triplicates)로 수행되었다.

[0284] F.VIII, F.IX, 및 F.VIII 저해제 분석

[0285] F.IX 농도는 효소-연결 면역흡착 분석(enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA)을 사용하여 결정하였으며, 상기 분석에서 인간 F.IX에 대한 단일클론 항체, 클론 HIX-I (Sigma, St Louis, MO)를 1:800으로 희석하여 포획 항체로서 사용하였고; 검출 항체로서 퍼옥시다제-접합된 염소 항-인간 F.IX (Affinity Biologicals, Hamilton, ON)를 1:1000으로 희석하여 사용하였다. F.IX 기능성 활성은, 25 μ l의 인간 F.IX 또는 F.VIII-결핍 혈장을 25 μ l 자동화된 활성화된 부분적 트롬보플라스틴 시간 (automated activated partial thromboplastin time: aPTT) 시약 (Dade Behring, Marburg, Germany), 및 희석되지 않은 (또는 필요한 경우, 시료를 37°C에서 3분 동안 이미다졸 버퍼 중에 희석한) 총 25 μ l의 시험 시료를 인큐베이션하는, 변형된 일-단계 인자 분석에 의하여 결정하였다. 다음으로, 25 μ l 25-mM CaCl₂을 첨가하고 혈전 (clot) 형성에 걸리는 시간을 섬유소측정기 (fibrometer)를 사용하여 측정하였다. F.VIII에 대한 항체를 1 μ g/ml 정제된 재조합 F.VIII (Cogenate, Bayer HealthCare, Leverkusen, Germany)로 플레이트를 코팅함으로써 사소한 변형을 가한 종래 기술된 바 (Schuettrumpf et al, 2005)와 같은 쥐 면역글로불린 G (IgG) 서브클래스 (IgG1 및 IgG2)에 대한 특이적 ELISA에 의하여 측정하였다. F.VIII 저해제 생쥐의 혈장 중 F.VIII-활성은 발색 F.VIII:C 분석 (Chromogenic F.VIII:C Assay) (Haemochrom Diagnostica, Essen, Germany)을 사용하여 결정하였다. F.VIII 항원 수준의 결정은 아메리칸 다이그노스틱스 (American Diagnostica) (Pfungstadt, Germany)의 ELISA 키트를 사용하여 수행하였다.

[0286] 생쥐 모델

[0287] 모든 동물 과정은 지방 동물 관리, 보호 및 사용 당국에 의하여 승인되었다.

[0288] F.VIII 결핍 생쥐는 더 잭슨 라보라토리 (The Jackson Laboratory) (Bar Harbour, Maine, USA)로부터 얻었다. C57B1/6 생쥐를 하르란(Harlan) (Indianapolis, Indiana)으로부터 구입하였다. 비바이러스 유전자 전달을 위하여 백터를 종래 기술된 바 (Schuettrumpf et al, 2008)와 같은 유체역학적 주사 기법 (hydrodynamic injection technique)에 의하여 투여하였다. 간단하게 설명하면, 2ml 생리적 염수 용액 중 생쥐 당 10 내지 50 μ g의 용량으로 비바이러스 백터를 5 내지 8초 내에 생쥐의 꼬리 정맥에 주사하였다. 그 후 다음의 실험 동안 혈액을 눈 뒤 출혈 (retro-orbital bleeding) 또는 꼬리 잘림 후 출혈에 의하여 생쥐로부터 채취하였다.

[0289] 혈액 손실 분석

[0290] 꼬리-출혈은 상기 주입된 백터에 대하여 알지 못하는 상태에서(blinded) 수행되었다. 생쥐를 마취시키고 원위 꼬리 (distal tail) (1.5 내지 3 mm의 직경)를 자르고 즉시 37°C 염수 용액 중에 담갔다. 혈액 손실은 Schuettrumpf et al, 2005에 보고된 바와 같이, 꼬리가 위치한 상기 염수 용액 중에서 헤모글로빈 (A492 nm)의 흡광도를 측정하여 결정하였다.

[0291]

[0292] 표 1. F.VIII의 존재 및 부존재하에서 인자 IX 변이체의 응고활성. 값들은 백분율로 나타내었으며, 여기서 F.IX 및 F.VIII의 정상 인간 수준을 갖는 정상 인간 풀(pool) 혈장 중의 야생형 인자 IX의 활성이 100%이다. 평균의 표준편차 (Standard error of mean:S.E.M.).

변이체	F.VIII 부재시		F.VIII 존재시	
	활성(%)	S.E.M.	활성(%)	S.E.M.
R338A+S377W	0,0	0,1	1086,6	125,5
야생형	0,0	0,1	100,0	3,7
Y259F	0,0	0,1	96,9	11,1
Y345T	0,0	0,0	50,9	8,1
S365R	0,0	0,0	0,0	0,3
E245K+K265T	0,2	0,1	21,6	7,1
G4Y+Y259F+K265T+Y345T	1,2	0,3	110,5	12,0
N34D+Y259F+K265T+Y345T	1,8	0,1	36,7	0,8
Y259F+K265T+Y345T+R358A	2,0	0,2	54,6	6,2
Y259F+K265T+Y345T	2,0	0,1	73,2	6,3
Y259F+K265T+Y345T+E388G	2,1	0,8	24,4	2,1
Y259F+K265T+Y345T+F353Y	2,1	0,4	57,1	6,8
F25Y+Y259F+K265T+Y345T	2,3	0,1	45,6	1,3
Y259F+K265T+Y345T+S377W	2,6	0,2	94,9	10,4
Y259F+K265T+I290L+Y345T	2,8	0,7	60,1	8,4
Y259F+K265T+Y345T+S360A	2,8	0,2	64,4	3,6
Y259F+K265T+Y345T+I383V+E388G	3,1	1,3	39,7	3,5
V217L+Y259F+K265T+Y345T	3,2	0,5	62,3	8,3
Y259F+K265T+Y345T+I383V	3,5	0,3	67,1	5,3
Y259F+K265T+R338A+T340S+Y345T	3,9	0,3	214,6	21,9
V181I+Y259F+K265T+Y345T	4,0	0,6	50,9	2,0
D85A+K265T	5,2	1,3	188,1	37,5
K265T+S360A+I383V	5,3	1,3	104,2	23,1
V253I+K265T	5,5	0,8	187,2	29,3
Y259F+K265T	5,9	0,9	141,0	20,5
K265T+S360A	5,9	0,5	187,0	19,8
V217L+K265T	6,0	0,9	259,9	39,2
K265T	6,6	0,7	191,1	14,0
R338A+K265T	7,1	0,6	658,2	86,4
K265T+R338A+I383V	8,1	1,4	480,2	80,9
K265T+I383V	8,7	1,1	138,7	15,8
V181I+K265T	9,0	0,8	219,2	22,4
V181I+K265T+I383V	16,4	2,1	204,9	28,9
V181I+K265T+R338A+S377W+I383V	21,9	3,9	1637,9	335,9

[0293]

[0294]

표 2. 혈우병 B의 치료를 위한 인자 IX 변이체. 단백질들은 변화된 인자 IX 비활성 (야생형 F.IX 대비 백분율)을 보인다 .

[0295]

F.VIII의 부존재하에서 F.IX 활성은 일-단계 분석 방법에 의한 검출 한계 미만이었다. 평균의 표준편차 (Standard error of mean:S.E.M.).

변이체	F.IX 활성 (%)	S.E.M.
G4Y+V10K	41	3
G4Y+R37T	54	4
S340T+R338A+Y345T	87	13
WT	100	5
G4Y	101	8
G4Y+Y1A	102	12
S377W	218	27
R338A	552	68
R338A+S377W	841	138
S360A+R338A+S377W	938	94
V86A+R338A+S377W	1076	77
G4Y+R338A+S377W	1284	335

[0296]

[0297]

표 3. K265T에 추가된 돌연변이가 F.VIII의 부존재 또는 존재하에서 F.IX 응고활성에 미치는 영향. U: 응고활성 증가(up); D: 응고활성 감소(down); N: 응고활성 변화 없음. 여기서 N(U): 증가 경향 또는 N(D): 감소경향

돌연변이	F.VIII 부존재시 활성	F.VIII 존재시 활성
R338A	U	U
V181I	U	N (U)
I383V	U	D
V86A	N (U)	U
S377W	N (U)	U
V217L	N (U)	N (U)
I290L	N (U)	N (D)
F25Y	N (U)	D
F353Y	N (U)	D
D85A	N (D)	N (D)
V253I	N (D)	N (D)
Y259F	N (D)	N (D)
E388G	N (D)	D
N34D	N (D)	D
R358A	N (D)	D
S360A	N	N (D)
T340S	N	N
Y345T	D	D
G4Y	D	U
E245K	D	D

[0298]

[0299]

표 4. F.VIII의 부존재 및 존재하에서 인자 IX 변이체의 응고활성 .

[0300]

값들은 백분율로 나타내었으며, 여기서 F.IX 및 F.VIII의 정상 인간 수준을 갖는 정상 인간 풀(pool) 혈장 중의 야생형 인자 IX의 활성이 100%이다. 평균의 표준편차 (Standard error of mean:S.E.M.).

Mutation	aPTT	
	F.IX 활성[%] ± SEM	F.VIII-우회 활성[%] ± SEM
WT	100 ± 3	0.52 ± 0.7
ITV	230 ± 14	10.4 ± 1.85
IAV	204 ± 7	12.51 ± 0.61
IKV	52 ± 3	1.49 ± 0.07
ICV	33 ± 6	1.97 ± 0.14
IDV	213 ± 27	7.63 ± 1.52
IEV	181 ± 19	5.8 ± 0.72
IFV	155 ± 18	6.42 ± 0.44
IGV	201 ± 12	7.96 ± 0.47
IHV	152 ± 8	7.66 ± 0.95
IIV	172 ± 10	5.51 ± 0.53
ILV	94 ± 11	2.41 ± 0.29
IMV	89 ± 20	2.78 ± 0.4
INV	184 ± 17	9.21 ± 0.62
IPV	29 ± 3	2.7 ± 0.5
IQV	105 ± 8	2.71 ± 0.25
IRV	46 ± 11	0.73 ± 0.2
ISV	112 ± 7	5.97 ± 0.77
IVV	134 ± 15	8.49 ± 1.23
IWV	16 ± 2	2.44 ± 0.37
IYV	83 ± 9	2.56 ± 0.29

[0301]

[0302]

야생형 (WT)은 V181/K265/I383, ITV는 V181I/K265T/I383V, IAV는 V181I/K265A/I383V 등을 나타낸다.

[0303]

F.IX 활성은 F.VIII 존재시의 활성을 나타낸다;

[0304]

F.VIII 우회 활성은 F.VIII 부존재시의 활성을 나타낸다.

[0305]

상기 기술 (description), 특허청구범위 및/또는 첨부된 도면에 개시된 상기 특징들은 개별적으로 및 임의의 그의 조합으로, 그의 다양한 형태로 본 발명을 실현하는데 중요할 것이다.

[0306]

참고문헌

[0307]

Arruda et al. Blood 2004, 104:85.

[0308]

Chang et al. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 277, No. 28, Issue of July 12, pp. 25393-25399, 2002.

[0309]

Chang et al. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 273, No. 20, Issue of May 15, pp. 12089-12094,

1998.

- [0310] Chen ZY, He CY, Kay MA. Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo. *Hum Gene Ther.* 2005; 16(1):126-31.
- [0311] Davie, E. W., Fujikawa, K., and Kiesel, W. (1991) *Biochemistry* 30, 10363-10370.
- [0312] DiScipio, R. G., Hermodson, M. A., Yates, S. G., and Davie, E. W. (1977) *Biochemistry* 16, 698-706.
- [0313] Di Scipio RG, Kurachi K and Davie EW (1978) Activation of human factor IX (Christmas factor). *J Clin Invest*, 61, 1528-1538.
- [0314] Duffy EJ and Lollar P (1992) Intrinsic pathway activation of factor X and its activation peptide-deficient derivative, factor Xdes-143-191. *J Biol Chem*, 267, 7821-7827.
- [0315] Fujikawa, K., Legaz, M. E., Kato, H., and Davie, E. W. (1974) *Biochemistry* 13, 4508-4516.
- [0316] Furie B and Furie BC (1988) The molecular basis of blood coagulation. *Cell*, 53, 505-518.
- [0317] Giannelli, F., Green, P. M., Sommer, S. S., Poon, M., Ludwig, M., Schwaab, R., Reitsma, P. H., Goossens, M., Yoshioka, A., Figueiredo, M. S., and Brownlee, G. G. (1998) *Nucleic Acids Res.* 26, 265-268.
- [0318] Hartmann R, Dockal M, Kammlander W, Panholzer E, Scheifflinger F (2007) *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) vol. 110 no. 11 : page 791 A, Abstract 2694.
- [0319] Hockin MF, Jones KC, Everse SJ, Mann KG. (2002) *J Biol Chem.* 277, 18322-33.
- [0320] Hopfner KP, Brandstetter H, Karcher A, Kopetzki E, Huber R, Engh RA, Bode W. (1997) *EMBO J.* 16(22):6626-35.
- [0321] Kolkman and Mertens, *Biochemistry* 2000, 39, 7398-7405 (K265A Mutante)
- [0322] Kurachi and Davie (1982) *PNAS* 79:6461-6464.
- [0323] Langdell RD, Wagner RH, Brinkhous KM (1953). "Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests; a presumptive test for hemophilia And a simple one-stage antihemophilic factor assay procedure". *J. Lab. Clin. Med.* 41 (4): 637-47.
- [0324] Lindquist, P. A., Fujikawa, K., and Davie, E. W. (1978) *J Biol. Chem.* 253, 1902-1909.
- [0325] Mann et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 ;23: 17-25.
- [0326] McRae BJ, Kurachi K, Heimark RL, Fujikawa K, Davie EW and Powers JC (1981) Mapping the active sites of bovine thrombin, factor IXa, factor Xa, factor XIa, factor XIIa, plasma kallikrein, and trypsin with amino acid and peptide thioesters: development of new sensitive substrates. *Biochemistry*, 20, 7196-7206.
- [0327] Miao CH, Ohashi K, Patijn GA, Meuse L, Ye X, Thompson AR, Kay MA. Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression in vivo but not in vitro. *Mol Ther.* 2000; 1(6):522-32.
- [0328] Schuettrumpf J, Herzog RW, Schlachterman A, Kaufhold A, Stafford DW, Arruda VR. (2005) *Blood.* 105(6):2316-23.
- [0329] Schuettrumpf J, Milanov P, Roth S, Seifried E, Tonn T. Non-viral gene transfer results in therapeutic factor IX levels in haemophilia B mice, *Haemost.* 2008;1:S92-95.
- [0330] Sichler K, Kopetzki E, Huber R, Bode W, Hopfner KP, Brandstetter H. Physiological F.IXa activation involves a cooperative conformational rearrangement of 99-loop. (2003) *J Biol Chem.* 278(6):4121-6.
- [0331] Ye et al. *MOLECULAR THERAPY* Vol. 10, No. 1, July 2004, p117.

도면

도면1

```

1   Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu
1   ATG CAG CGC GTG AAC ATG ATC ATG GCA GAA TCA CCA GSC CTC ATC ACC ATC TGC CTT TTA GGA TAT CTA CTC

25  Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Ala Asn
73  AGT GCT GAA TGT ACA GTT TTT CTT GAT CAT GAA AAC GCC AAC AAA ATT CTG AAT CGG CCA AAG AGG GCT AAT

49  Ser Tyr Lys Leu Glu Glu Phe Lys Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Tyr Glu
145 TCA TAT AAA TTG GAA GAG TTT AAG CAA GGG AAC CTT GAG AGA GAA TGT ATG GAA GAA AAG TGT AGT TAT GAA

73  Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Asp Glu Thr Thr Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Pro
218 GAA GCA CGA GAA GTT TTT GAA GAC GAT GAA ACG ACA ACT GAA TTT TGG AAG CAG TAT GTT GAT GGA GAT CCG

97  Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro
291 TGT GAG TCC AAT CCA TGT TTA AAT GGC GGC AGT TGC AAG GAT GAC ATT AAT TCC TAT GAA TGT TGG TGT CCC

121 Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Ala Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
364 TTT GGA TTT GAA GGA AAG AAC TGT GAA TTA GCT GCA ACA TGT AAC ATT AAG AAG GGC AGA TGC GAG CAG TTT

145 Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Ala Leu Ala Ala Ala Gln Lys
437 TGT AAA AAT AGT GCT GAT AAC AAG GTG GTT TGC TCC TGT ACT GAG GGA TAT GCA CTT GCA GCA GCC CAG AAG

169 Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
510 TCC TGT GAT GAA CCA GCA GGT CCA TTT CCA TGT GGA AGA GTT TCT GTT TCA CAA ACT TCT AAG CTC ACC CGT GCT

193 Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln
583 GAG ACT GTT TTT CCT GAT GTG GAC TAT GTA AAT TCT ACT GAA GCT GAA ACC ATT TTG GAT AAC ATC ACT CAA

217 Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Ile Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
656 AGC ACC CAA TCA TTT AAT GAC TTC ACG CGT ATT GTT GGT GGA GAA GAT GCC AAA CCA GGT CAA TTC CCT TGG

241 Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Leu Thr
729 CAG GTT GTT TTG AAT GGT AAA GTT GAT GCA TTC TGT GGA GGC TCT ATC GTT AAT GAA AAA TGG ATT TTA ACT

265 Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Lys His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
802 GCT GCC CAC TGT GTT GAA ACT GGT GTT AAA ATT ACA GTT GTC GCC GGC AAA CAT AAT ATT GAG GAG ACA GAA

289 His Thr Val Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Val Ile Pro His His Asn Phe Asn Ala Ala Ile Asn Thr Tyr
875 CAT ACA GTG CAA AAG CGA AAT GTG ATT CGA GTT ATT CCT CAC CAC AAC TTC AAT GCA GCT ATT AAT ACG TAC

313 Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Leu
948 AAC CAT GAC ATT GCC CTT CTG AAA CTG GAC GCA CCC TTA GTG CTA AAC AGC TAC GTT ACA CCT ATT TGC CTT

337 Pro Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Ile Phe Glu Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe
1021 CCT GAC AAG GAA TAC ACG AAC ATC TTC CTC ATA TTT GAA TCT GGC TAT GTA AGT GGC TGG GGA AGA GTC TTC

361 His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Ala
1094 CAC AAA GGG AGA TCA GCT TTA GTT CTT CAG TAC CTT AGA GTT CCA CTT GTT GAC CGA GCC ACA TGT CTT GCA

385 Ser Ser Lys Phe Thr Ile Thr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr His Glu Gly Gly Ala Asp Ala Cys Gln
1167 TCT TCA AAG TTC ACC ATC ACT AAC AAC ATG TTC TGT GCT GGC TAT CAT GAA GGA GGT GCA GAT GCA TGT CAA

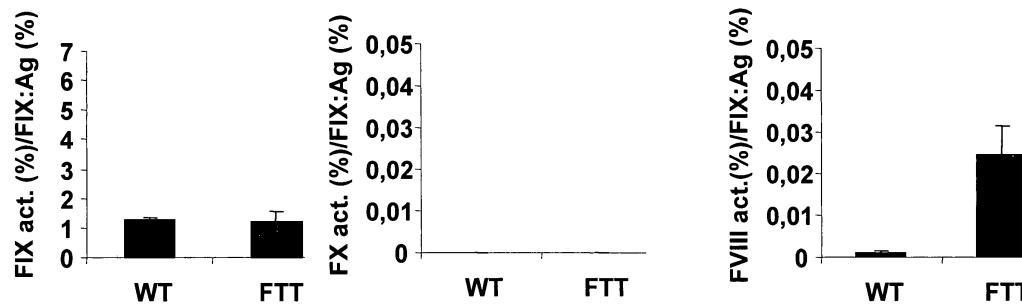
409 Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Phe Thr Trp Phe Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly
1240 GGA GAT AGT GGG GGA CCC CAT GTT ACT GAA GTG GAA TTC ACC TGG TTC TTA ACT GGA ATT GTT AGC TGG GGT

433 Glu Gly Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu
1313 GAA GGG TGT GCA ATG AAA GGC AAA TAT GGA ATA TAT ACC AAG GTA TCC CGG TAT GTC AAC TGG ATT AAG GAA

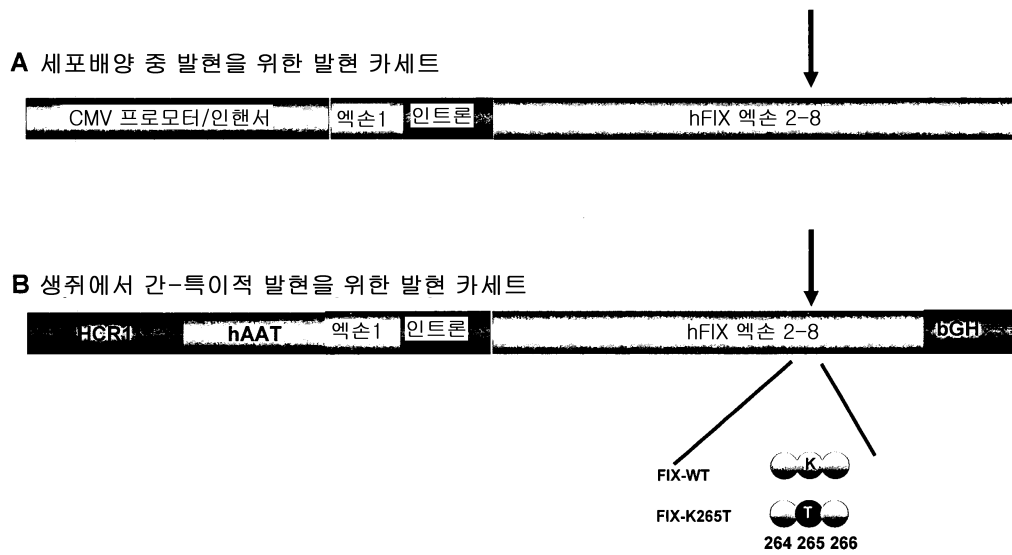
457 Lys Thr Lys Leu Thr ***
1386 AAA ACA AAG CTC ACT TAA

```

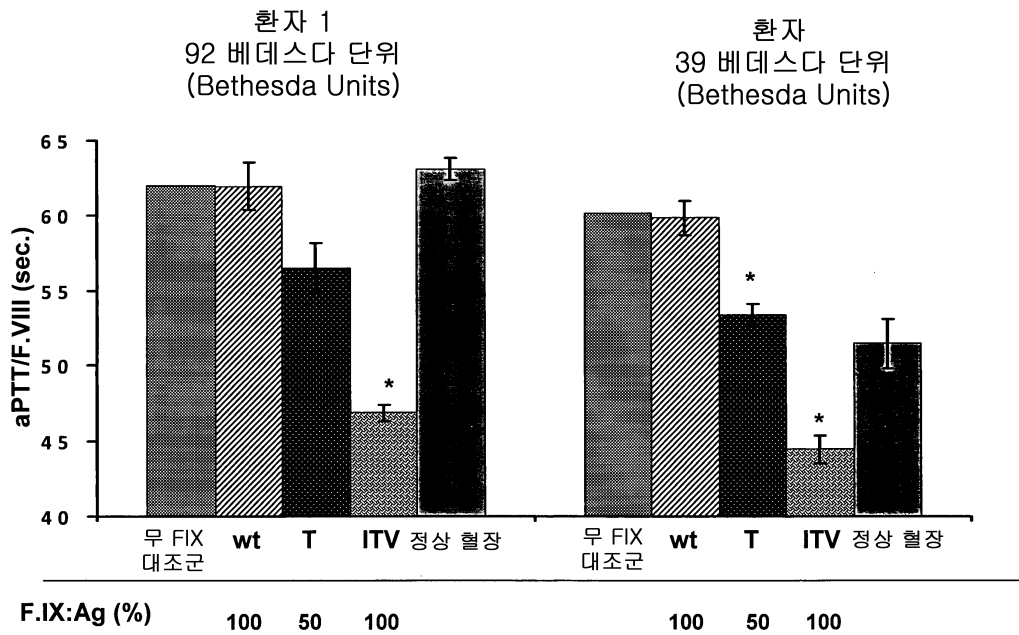
도면2



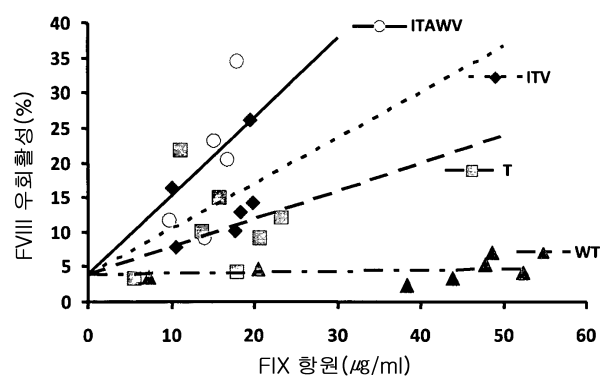
도면3



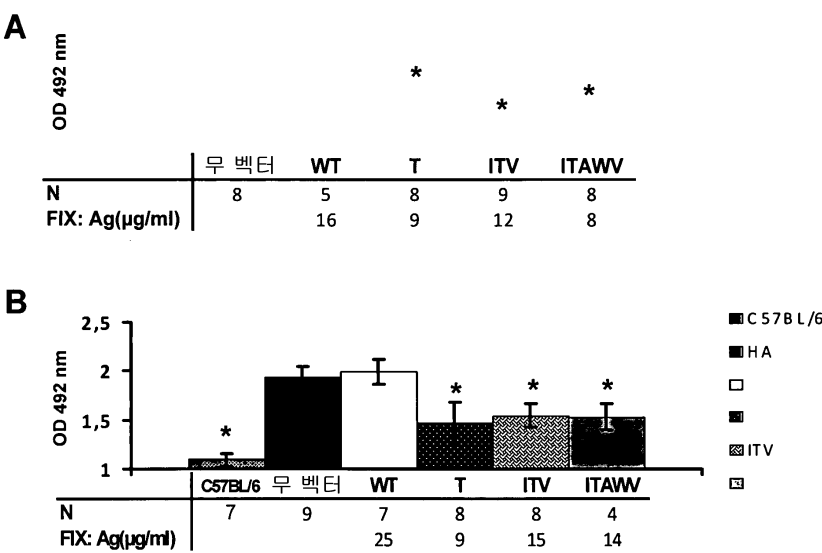
도면4



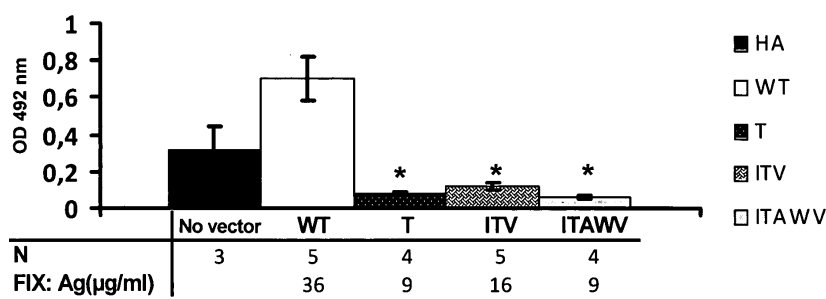
도면5



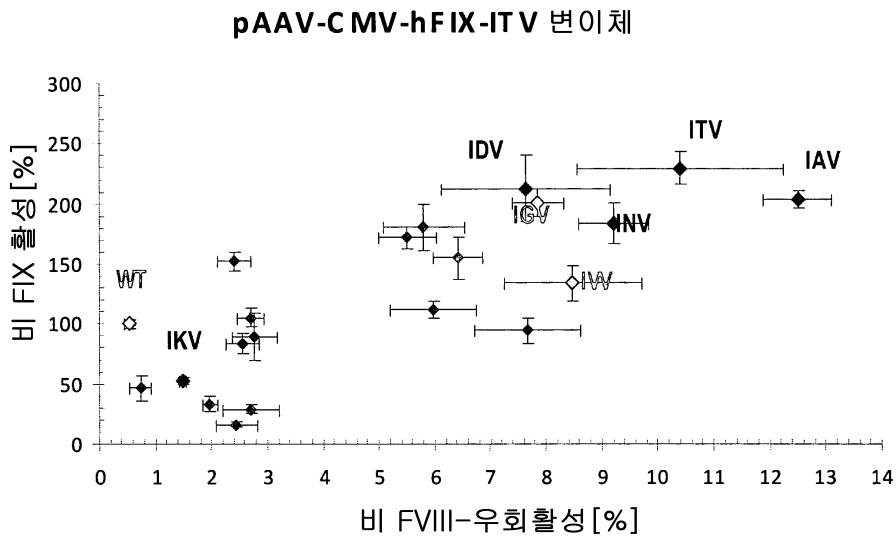
도면6



도면7



도면8



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg - Hessen gGmbH

<120> Factor IX variants with clotting activity in absence of their cofactor and their use for treating bleeding disorders

<130> B30821PCT

<150> EP 08013561.9

<151> 2008-07-28

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1386

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcacacccat ctgcctttta    60
ggatatctac tcagtgtcga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaaatt    120

ctgaatcggc caaagaggta taattcaggt aaattggaag agtttgttca agggaaacctt    180
gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt ttgaagaag cagagaagt ttttgaaaac    240
actgaaagaa caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgagtccaat    300
ccatgtttaa atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttggtgtccc    360

```

tttggatttg aaggaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga 420
 tgcgagcagt tttgtaaaaa tagtgctgat aacaagggtgg tttgctcctg tactgagga 480
 tatcgacttg cagaaaacca gaagtcctgt gaaccagcag tgccatttcc atgtggaaga 540

gtttctgttt cacaacttc taagtcacc cgtgctgaga ctgtttttcc tgatgtggac 600
 tatgtaaatt ctactgaagc tgaaccatt ttggataaca tctactaaag cacccaatca 660
 tttaatgact tcacgcgtgt tgttggtgga gaagatgcca aaccagggtca attcccttgg 720
 caggttggtt tgaatggtaa agttgatgca tttctgtggag gctctatcgt taatgaaaa 780
 tggattgtaa ctgctgcccc ctgtgttgaa actgggtgta aaattacagt tgcgccggc 840
 gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaaaagc gaaatgtgat tcgaattatt 900
 cctcaccaca actacaatgc agctattaat aagtacaacc atgacattgc ctttctggaa 960

ctggacgaac ccttagtgct aaacagctac gttacaccta tttgcattgc tgacaaggaa 1020
 tacacgaaca tcttctcaa atttggatct ggctatgtaa gtggctgggg aagagtcttc 1080
 cacaaggga gatcagcttt agttcttcag taccttagag ttccacttgt tgaccgagcc 1140
 acatgtcttc gatctacaaa gttcaccatc tataacaaca tgttctgtgc tggcttccat 1200
 gaaggaggta gagattcatg tcaaggagat agtgggggac cccatgttac tgaagtggaa 1260
 gggaccagtt tcttaactgg aattattagc tggggtgaag agtgtgcaat gaaaggcaaa 1320
 tatggaatat ataccaaggt atcccggtat gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagctc 1380

acttaa 1386

<210> 2

<211> 461

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn

35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys

50 55 60

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

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

 Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
 370 375 380
 Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
 385 390 395 400
 Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
 405 410 415
 Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
 420 425 430

 Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
 435 440 445
 Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
 450 455 460