

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 921 235**

51 Int. Cl.:

A61K 9/08	(2006.01)
A61K 9/19	(2006.01)
A61K 47/26	(2006.01)
A61K 47/18	(2007.01)
A61K 47/12	(2006.01)
A61K 47/10	(2007.01)
A61K 38/21	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 37/00	(2006.01)
A61P 31/12	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2017 PCT/KR2017/010826**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2018 WO18066891**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2017 E 17858685 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2022 EP 3524231**

54 Título: **Preparación estabilizada de variante de interferón beta**

30 Prioridad:

06.10.2016 KR 20160129208

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.08.2022

73 Titular/es:

**ABION INC. (100.0%)
(Gaepo-dong) room 202 Changwon Bldg. 5
Gaepo-ro 34-gil Gangnam-gu
Seoul 06309, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, HEEJUNG y
KIM, NAM AH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 921 235 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Preparación estabilizada de variante de interferón beta

5 [Campo técnico]

La presente invención se relaciona con una preparación farmacéutica estabilizada de R27T, la preparación que comprende una variante de interferón beta humano (R27T), un regulador de acetato, arginina, trehalosa, poloxámero 188 y metionina.

10

[Antecedentes de la técnica]

15

Los interferones (IFN) exhiben actividad antiviral como un tipo de citocina y tienen la función de suprimir la proliferación celular y regular las respuestas inmunitarias innatas. Los IFN se clasifican en IFN- α , IFN- β e IFN- γ de acuerdo con su origen celular (leucocitos, fibroblastos, células T).

20

Entre ellos, el interferón-beta (IFN- β) es una proteína esférica que tiene 5 alfa-hélices (α -hélices), que tiene un tamaño de 22 kD, y el tamaño llega a 18 kD cuando se elimina la cadena de azúcar. Se han realizado activamente estudios sobre la aplicación clínica de IFN- β , IFN- β se ha destacado particularmente como un agente para mitigar, reducir o tratar los síntomas de la esclerosis múltiple y, además, a través de diversos estudios, los resultados de los estudios indican que IFN- β es eficaz para tratar el cáncer, enfermedades autoinmunes y enfermedades infecciosas virales, enfermedades asociadas con el VIH, hepatitis C, artritis reumatoide y similares; con diversas actividades inmunológicas tales como actividad antiviral, supresión del crecimiento celular, actividad de aumento de la citotoxicidad de linfocitos, actividad inmunorreguladora, actividad de inducción o supresión de la diferenciación de células diana, activación de macrófagos, actividad para aumentar la producción de citocinas, actividad para aumentar los efectos de las células T citotóxicas y actividad para aumentar las células asesinas naturales.

25

30

El IFN- β humano también es un tipo de glicoproteína, y dado que la unidad estructural de la cadena de azúcar unida a la proteína juega un papel importante en la actividad de la proteína, en el caso de una glicoproteína, la actividad de la proteína puede aumentar cuando se agrega una cadena de azúcar. Es decir, se sabe que la glicosilación de proteínas puede afectar muchas características bioquímicas como estabilidad, solubilidad, actividad de tráfico intracelular, farmacocinética y antigenicidad.

35

Por lo tanto, se ha informado de un ejemplo en el que se introduce una cadena de azúcar en IFN- β humano natural como una glicoproteína para preparar una variante de IFN- β humano cuya actividad o función se incrementa o mejora (Patente coreana No. 10-0781666). La variante de IFN- β humano R27T utilizada en la presente invención es una variante de IFN- β humano recombinante (en lo sucesivo denominada rhINF- β) diseñada sustituyendo la arginina (Arg) en la posición 27 con treonina (Thr) para la glicosilación adicional de la posición 25 de IFN- β 1a, y exhibe efectos de aumento de la estabilidad, disminución de la tendencia a la agregación de proteínas y aumento de la vida media en comparación con el INF- β 1a de tipo salvaje (Rebif). Es decir, R27T es un biomejorador de rhINF- β producido para glicosilación adicional a través de mutagénesis sitio dirigida.

40

45

Mientras tanto, uno de los principales problemas en el desarrollo de fármacos proteicos es producir un producto que tenga una vida útil prolongada de 24 meses o más impartiendo suficiente estabilidad química, física y biológica. Sin embargo, debido a diversas susceptibilidades intrínsecas en una ruta de degradación de proteínas, la complejidad de las estructuras de proteínas que tienen diversos niveles, como macromoléculas y estructuras de proteínas secundarias, terciarias y cuaternarias, lograr una alta estabilidad sigue siendo un problema difícil.

50

Han pasado 30 años o más desde la primera aprobación y producción exitosa de insulina como la primera hormona peptídica recombinante en 1982 y, posteriormente, hasta ahora se han informado numerosos casos exitosos de fármacos de proteínas/péptidos recombinantes. Sin embargo, en el proceso de desarrollo de productos biofarmacéuticos, particularmente en la formulación de productos biofarmacéuticos, aún se enfrentan dificultades debido a diversos factores como agregación de proteínas, inestabilidad fisicoquímica, vida media baja, solubilidad baja y propiedades farmacocinéticas.

55

60

En particular, la agregación de proteínas es fácilmente uno de los principales problemas que ocurren en casi todos los procesos biofarmacéuticos, pero la razón es que las proteínas terapéuticas son estructuralmente/termodinámicamente inestables en solución durante el almacenamiento. Dado que las proteínas terapéuticas son susceptibles a cambios estructurales causados por diversos factores durante la purificación, procesamiento y almacenamiento, los problemas antes mencionados pueden exacerbarse cuando las proteínas se exponen a altas temperaturas, pH máximo/mínimo, tensión de corte y adsorción superficial. Además, dado que los productos biofarmacéuticos a base de proteínas tienen la posibilidad de degradación física, como la formación de partículas insolubles debido al despliegue, agregación y agregación no nativa, se requiere la optimización de un sistema de preparación, como un intervalo de pH estable, un sistema regulador apropiado, y el desarrollo de excipientes para evitar la agregación de proteínas o la degradación física y maximizar la estabilidad.

65

Por lo tanto, los presentes inventores intentaron desarrollar una preparación farmacéutica estabilizada con almacenamiento mejorado y estabilidad termodinámica/estructural de la variante de IFN-β humano.

[Divulgación]

5

[Problema técnico]

Con el fin de resolver los problemas de la técnica relacionada, como resultado de estudios intensivos para desarrollar una preparación farmacéutica capaz de mejorar la estabilidad de R27T, que es una variante del interferón beta humano, los presentes inventores desarrollaron una preparación de R27T estabilizada que tiene una composición nueva en la que se mejoran el almacenamiento y la estabilidad termodinámica/estructural y se reduce la formación de un agregado de proteína R27T en comparación con las preparaciones existentes, completando así la presente invención en base a este hallazgo.

15 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una preparación farmacéutica estabilizada de una variante de interferón beta humano (R27T) que tenga una composición nueva.

Sin embargo, un problema técnico a resolver por la presente invención no se limita al problema mencionado anteriormente, y las personas experimentadas en la técnica pueden entender claramente otros problemas que no se mencionan a partir de la siguiente descripción.

20

[Solución técnica]

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

25

En un aspecto, la presente invención proporciona una preparación farmacéutica estabilizada de una variante de interferón beta humano, que comprende lo siguiente: (a) una variante de interferón beta humano, (b) un regulador de acetato en una concentración de 5 a 100 mM, (c) arginina en una concentración de 10 a 150 mM, (d) trehalosa en una concentración de 150 a 250 mM, (e) poloxámero 188 a una concentración de 0.1 a 10 mg/ml, y (f) metionina a una concentración de 0.5 a 5 mM.

30

En otro aspecto, la presente invención proporciona la preparación farmacéutica estabilizada de la invención para uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple, cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas virales, enfermedades infecciosas por VIH, hepatitis C, y artritis reumatoide.

35

Como una realización de la presente invención, la variante de interferón beta humano (R27T) puede incluir una cadena de azúcar unida a N en un residuo de asparagina que es el aminoácido 25, al sustituir la arginina, que es el aminoácido 27 del interferón beta humano con treonina.

40

Como otra realización de la presente invención, el regulador de acetato se puede incluir a una concentración de 10 a 30 mM.

Todavía como otra realización de la presente invención, el regulador de acetato puede tener un pH dentro de un intervalo de 3.6 a 4.4.

45

Como otra realización más de la presente invención, la arginina se puede incluir en una concentración de 50 a 100 mM.

Como otra realización más de la presente invención, el poloxámero 188 se puede incluir en una concentración de 0.1 a 1 mg/ml.

50

Como otra realización más de la presente invención, la metionina se puede incluir en una concentración de 0.5 a 2 mM.

55

Como otra realización más de la presente invención, la preparación farmacéutica estabilizada puede tener un índice de concentración de iones de hidrógeno (pH) dentro de un intervalo de 3.6 a 4.4.

Como otra realización más de la presente invención, la preparación farmacéutica estabilizada puede ser para la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple, cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas virales, enfermedades infecciosas por VIH, hepatitis C y artritis reumatoide.

60

Como otra realización más de la presente invención, la preparación farmacéutica estabilizada puede ser para administración oral o parenteral.

65

Como otra realización más de la presente invención, la preparación farmacéutica estabilizada puede ser una formulación líquida o liofilizada.

5 Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar una o más enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en esclerosis múltiple, cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas virales, enfermedades infecciosas por VIH, hepatitis C y artritis reumatoide, comprendiendo la composición una cantidad farmacéuticamente eficaz de la preparación estabilizada.

10 Además, la presente invención proporciona la preparación farmacéutica estabilizada de la invención para uso en la prevención o el tratamiento de una o más enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en esclerosis múltiple, cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas virales, enfermedades infecciosas por VIH, hepatitis C y artritis reumatoide, comprendiendo el método una etapa de administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de la preparación estabilizada a un individuo.

15 Además, la presente invención proporciona la preparación farmacéutica estabilizada de la invención para uso en la prevención o el tratamiento de una o más enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en esclerosis múltiple, cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas virales, enfermedades infecciosas por VIH, hepatitis C y artritis reumatoide.

20 [Efectos ventajosos]

La preparación farmacéutica R27T estabilizada de acuerdo con la presente invención se obtiene mediante el desarrollo de una preparación que tiene una composición nueva mediante la sustitución de manitol por trehalosa en la composición de una preparación que contiene manitol, que fue previamente estudiada por los presentes inventores.
25 Se confirmó que la preparación puede remediar una desventaja del aumento del agregado proteico debido a la mezcla y adición de manitol y arginina HCl y puede mejorar la estabilidad termodinámica/estructural y la estabilidad resultante durante el almacenamiento a largo plazo y, por lo tanto, se espera que la preparación se puede usar ventajosamente en la prevención, alivio y tratamiento de esclerosis múltiple, cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas virales, enfermedades infecciosas por VIH, hepatitis C, artritis reumatoide y similares.

30 [Descripción de los dibujos]

Figura 1 ilustra genes y secuencias de proteínas de una variante de interferón beta humano (R27T).

35 Figura 2 es el resultado de evaluar la estabilidad de almacenamiento de una preparación midiendo una cantidad de un monómero residual mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) después de un total de 10 preparaciones de una preparación R27T (preparación a la que se le agregaron excipientes de manitol 250 mM, arginina HCl 50 mM, 0.5 mg/ml de poloxámero 188 y metionina 1 mM) preparados añadiendo manitol y las preparaciones preparadas añadiendo trehalosa, sacarosa o xilitol a una concentración de 150, 200 y 250 mM, respectivamente, en lugar de manitol, son refrigerados a una concentración de 0.1 mg/ml y 4 ° C por 0, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas y 3 meses.

45 Figura 3 es el resultado de evaluar la estabilidad de almacenamiento de una preparación realizando SEC para medir una cantidad de un monómero residual después de un total de 5 preparaciones de la preparación R27T preparada agregando el mismo manitol que en la figura 2 y las preparaciones preparadas añadiendo trehalosa o xilitol a una concentración de 200 o 250 mM en lugar de manitol se almacenan a una temperatura alta de 37 ° C durante 0, 14, 21 y 28 días.

50 Figura 4 es para verificar la estabilidad de R27T de acuerdo con si se agrega arginina HCl a una preparación que tiene una composición que comprende manitol o trehalosa que es la misma que en las figuras 2 y 3, y es el resultado de medir el grado de agregación de proteínas a través del análisis SEC después de que cada preparación se almacene a una concentración baja (0.1 mg/ml) o una concentración alta (0.64 mg/ml) y una temperatura alta de 37 ° C durante 1, 7, 14 y 28 días.

55 [Modos de la invención]

La presente invención se relaciona con una preparación farmacéutica estabilizada de R27T, la preparación que comprende una variante de interferón beta humano (R27T), un regulador de acetato, arginina, trehalosa, poloxámero 188 y metionina.

60 A continuación, la presente invención se describirá en detalle.

Los presentes inventores seleccionaron un regulador de acetato 20 mM con un pH de 3.8 ± 0.2 usando un sistema regulador fundamental que está optimizado para R27T a través de estudios previos para desarrollar una preparación farmacéutica estabilizada de una variante R27T de interferón beta humano, y confirmado a través de experimentos en los que se agregaron diversos excipientes para mejorar la estabilidad de R27T a una preparación preparada

agregando manitol, arginina HCl, poloxámero 188 y metionina podría mejorar la estabilidad de R27T en comparación con las preparaciones existentes. Sin embargo, la composición mixta de manitol y arginina HCl tiene la desventaja de que cuando la composición mixta se almacena a alta concentración y alta temperatura, la estabilidad disminuye como con las preparaciones existentes, y para superar la desventaja, los presentes inventores desarrollaron una preparación farmacéutica estabilizada de R27T que tiene una nueva composición capaz de mejorar la estabilidad de R27T mediante la selección de un excipiente capaz de reemplazar el manitol.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una preparación farmacéutica estabilizada de una variante de interferón beta humano (R27T), que comprende una variante de interferón beta humano (R27T), un regulador de acetato en una concentración de 5 a 100 mM, arginina en una concentración de 10 a 150 mM, trehalosa en una concentración de 150 a 250 mM, poloxámero 188 en una concentración de 0.1 a 10 mg/ml y metionina en una concentración de 0.5 a 5 mM.

Después de preparar una preparación de R27T que tiene la misma composición utilizando trehalosa, sacarosa y xilitol, para encontrar un sustituto de manitol capaz de mejorar la estabilidad de almacenamiento de R27T en comparación con la preparación de R27T antes mencionada preparada agregando manitol, la estabilidad de cada preparación se determinó después de que cada preparación se almacenó a baja concentración. Como resultado, se confirmó que cuando se usó trehalosa, la estabilidad al almacenamiento y la reversibilidad aumentaron significativamente, y que incluso cuando se usaron sacarosa y xilitol, la reversibilidad de la preparación aumentó relativamente (ver ejemplo 2).

Como resultado de la determinación de estabilidad y actividad antiviral de la preparación de R27T a la que se añadió trehalosa o xilitol como excipiente reemplazando el manitol en base al resultado del ejemplo 2, se confirmó que una preparación preparada añadiendo trehalosa durante el almacenamiento a temperatura alta tenía la mejor estabilidad frente al calor y la mejor estabilidad de acuerdo con un aumento en concentración, y exhibió estabilidad termodinámica/estructural y actividad antiviral similar a las de una preparación que usa manitol (ver ejemplo 3).

Como resultado del análisis de la estabilidad de la preparación a través del cambio de agregado proteico en una composición en la que se mezclaba manitol o trehalosa con arginina, se confirmó que el manitol aumentaba la agregación proteica cuando se mezclaba con arginina en comparación con el caso donde la arginina no estaba presente, mientras que la trehalosa disminuía más bien la agregación de proteínas en una composición mixta con arginina (véase el ejemplo 4).

Se confirmó que la nueva preparación farmacéutica estabilizada con R27T de la presente invención que usa trehalosa como excipiente tiene una estabilidad excelente en comparación con las preparaciones existentes de R27T que usan manitol y, por lo tanto, la nueva preparación farmacéutica estabilizada con R27T puede usarse de manera útil para el tratamiento de diversas enfermedades mediante el uso de interferón beta.

Como se usa aquí, el término "interferón-beta (IFN- β)" se refiere no solo a un interferón de fibroblastos de origen humano obtenido por aislamiento de un fluido biológico u obtenido de células huésped eucariotas o procariotas mediante una técnica recombinante de ADN, sino también a sales, derivados funcionales, variantes, análogos y fracciones activas de los mismos. Preferiblemente, IFN- β pretende significar Interferón beta-la.

Como se usa aquí, la trehalosa utilizada como sustituto del manitol se refiere a un disacárido no reductor donde dos moléculas de D-glucosa están unidas a través de un enlace alfa 1 \rightarrow 1 y, químicamente, hay tres tipos de un tipo α,α , un tipo α,β y tipo β,β , y la trehalosa que se puede obtener de manera natural es de tipo α,α . La trehalosa se descubrió por primera vez en el cornezuelo de centeno, está presente en grandes cantidades en bacterias o levaduras y se observó incluso en fluidos corporales y huevos de insectos, y se sabe que desempeña un papel importante como fuente de energía o carbohidrato de almacenamiento en insectos.

Como se usa aquí, el término "preparación estabilizada" es una preparación tal que el grado de degradación, desnaturalización, agregación y pérdida de actividad biológica de las proteínas contenidas en el mismo se controla en un grado aceptable y con el tiempo no aumenta a un nivel inaceptable. Preferentemente, la preparación mantiene la actividad de R27T en al menos aproximadamente 60 %, preferentemente al menos aproximadamente 70 % y más preferentemente al menos aproximadamente 80 % durante un máximo de 24 meses.

Como se usa aquí, el término "regulador" se refiere a una solución de un compuesto que tiene el efecto de ajustar o mantener el pH de una preparación de modo que el pH de la preparación se encuentre dentro de un intervalo de pH preferido. En la presente invención, el regulador es un regulador de acetato a una concentración de 5 a 100 mM, y preferentemente puede incluirse a una concentración de 10 a 30 mM, más preferentemente 20 mM.

La preparación farmacéutica estabilizada de R27T de la presente invención se puede preparar incluyendo: etapas de dializar una solución que incluye una variante de interferón humano R27T usando una solución que incluye un regulador de acetato a una concentración de 5 a 100 mM y un excipiente; y filtrar el dializado.

Como excipiente se adiciona arginina en una concentración de 10 a 150 mM, trehalosa en una concentración de 150 a 250 mM, poloxámero 188 en una concentración de 0.1 a 10 mg/ml y metionina en una concentración de 0.5 a 5 mM

y más preferiblemente, se puede añadir arginina en una concentración de 50 a 100 mM, poloxámero 188 en una concentración de 0.1 a 1 mg/ml y metionina en una concentración de 0.5 a 2 mM.

5 Cuando la preparación farmacéutica estabilizada de R27T de la presente invención se prepara como una "formulación líquida", un disolvente preferido es agua o agua estéril para inyección, y puede ser una monodosis o multidosis. Se prefiere que la preparación líquida de R27T para multidosis de la presente invención incluya un agente bacteriostático como fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabenos (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal. El agente bacteriostático se usa en un contenido que puede producir una concentración que es eficaz para mantener una
10 preparación esencialmente libre de bacterias (adecuada para inyección) durante el período de inyección multidosis, que es de aproximadamente 12 o 24 horas a aproximadamente 12 días, preferiblemente de aproximadamente 6 a 12 días. Se prefiere que el agente bacteriostático esté presente a una concentración de aproximadamente 0.1 % a aproximadamente 2.0 % (masa de agente bacteriostático/masa de disolvente).

15 La preparación de la presente invención puede incluir además opcionalmente no solo un diluyente, un excipiente y un portador, sino también un aditivo fisiológicamente/farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un agente fluidificante libre, un emulsionante, un estabilizador, un conservante, un colorante, un agente antiespumante y un agente antiaglomerante.

20 El portador farmacéuticamente aceptable no está particularmente limitado, pero puede incluir solución salina fisiológica, polietilenglicol, etanol, aceite vegetal, miristato de isopropilo y similares.

Además, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad como esclerosis múltiple, cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas virales, enfermedades infecciosas por VIH, hepatitis C y artritis reumatoide mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de una preparación esterilizada a un individuo.

25 Como se usa aquí, el "individuo" se refiere a un sujeto que necesita tratamiento para una enfermedad, y más específicamente, se refiere a un mamífero tal como un primate humano o no humano, un ratón, una rata, un perro, un gato, un caballo y una vaca.

30 Con respecto a la "cantidad farmacéuticamente eficaz", es obvio para las personas experimentadas en la técnica que el intervalo de la misma se puede ajustar de diversas formas dependiendo del peso corporal del paciente, edad, sexo, estado de salud, dieta, tiempo de administración, método de administración y rata de excreción, gravedad de la enfermedad, y similares.

35 Una dosificación preferida de la preparación de la presente invención varía según la condición y peso corporal del paciente, el grado de la enfermedad, la forma del fármaco, la vía de administración y la duración, pero puede ser seleccionada apropiadamente por las personas experimentadas en la técnica. Sin embargo, la preparación se administra preferiblemente de 0.001 a 100 mg/kg de peso corporal al día, y más preferiblemente de 0.01 a 30 mg/kg de peso corporal al día. La dosis puede administrarse una vez al día o puede dividirse en varias dosis.

40 La preparación de la presente invención se puede administrar a un mamífero tal como una rata, un ratón, ganado y un humano a través de diversas vías. El método de administración no está limitado y la preparación de la presente invención puede administrarse mediante inyecciones orales, rectales o intravenosas, intramusculares, hipodérmicas, intrauterinas o intracerebroventriculares.

45 A continuación, se sugerirán ejemplos preferidos para ayudar a la comprensión de la presente invención. Sin embargo, los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente para comprender más fácilmente la presente invención, y el contenido de la presente invención no está limitado por los siguientes ejemplos.

[Ejemplos]

55 Ejemplo 1. Método experimental

1-1. Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

60 Se analizó una muestra de R27T utilizando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución Agilent (Agilent HPLC 1260, Santa Clara, CA, EE. UU.) equipado con una columna TSK-GEL G3000SWXL SEC (TOSOH Bioscience, PA, EE. UU.) y un detector de diodo (DAD). Para aislar partículas R27T solubles en agua, la fase móvil A (una solución acuosa de ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1 %, NaCl 100 mM) y la fase móvil B (acetoneitrilo TFA al 0.1 %, NaCl 100 mM) se hicieron fluir a una rata de flujo de 0.5 ml/min en una proporción de 4:6. Se calculó una región analizada como un pico del multímero en la muestra junto con una región del agregado acuoso. Se definió que la diferencia en el área total de la muestra R27T entre la primera medición y las mediciones posteriores (suma de las áreas de todas las regiones de pico en el resultado del cromatograma) se debe a la formación de un agregado insoluble durante las mediciones. Las proporciones restantes de los tipos respectivos (agregados insolubles, monómeros y fragmentos de
65

proteínas) se calcularon como un área pico en comparación con el tiempo inicial, y el período de almacenamiento se representó gráficamente como el eje X. En este caso, la ecuación para calcular la proporción restante es la siguiente.

$$\text{Cantidad restante (\%)} = (a_t \div A_0) \times 100$$

5 En la ecuación, a_t se refiere al área del pico de proteína en cada momento, y A_0 se refiere al área inicial de cada pico de proteína. La barra de error se refiere a una desviación estándar (SD) para tres mediciones.

1-2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

10 Para realizar la evaluación de la estabilidad termodinámica de la muestra R27T, se utilizó un Microcalorímetro VP-DSC (Microcal, Northampton, MA, EE. UU.). El experimento se realizó a una tasa de calentamiento de 1 ° C por minuto de 15 ° C a 120 ° C y se repitió tres veces en total. Los resultados experimentales de DSC se estandarizaron restando una línea de base medida utilizando un regulador medido al final y calculando la concentración de proteína presente en la muestra.

15 Los resultados de la medición del R27T establecen una línea de base para el ajuste cero del resultado a través de un ajuste de línea de base lineal. En este caso, el procedimiento de establecer la línea base para el ajuste a cero de la muestra es complicado porque el procedimiento se ve perturbado por el fenómeno de agregación y precipitación causado por el calentamiento, y la presente invención permitió obtener el resultado más estable independientemente del tipo de muestra o la determinación del usuario en los experimentos repetidos seleccionando una opción de línea de base previa.

20 El registro calorimétrico final se trazó con el exceso de calor específico (cal/° C mol) en el eje Y y la temperatura en el eje X (° C). A partir de estos resultados, fue calculada la temperatura de transición de la proteína (T_m).

1-3. Ensayo de efecto citopático (CPE)

30 Con el fin de evaluar el efecto antiviral de cada preparación estabilizada con R27T, las células A549 como una línea celular de cáncer de pulmón se dividieron en alícuotas de 3×10^5 células/ml en una placa de 96 pozos, se trataron 100 µl de un medio que incluía las células con 100 µl de cada preparación y las células se cultivaron a 37 ° C durante 22 horas. Después de retirar el sobrenadante en el día 2 y tratar las células con 100 ul de virus de la encefalomiocarditis (EMCV) a una concentración de 1000 TCID50/ml y cultivarlas a 37 ° C durante 22 horas, se calculó el título en comparación con el estándar eliminando el sobrenadante el día 3 y tificando las células viables para medir la absorbancia a 570 nm.

Ejemplo 2. Comparación y análisis de estabilidad del preparado R27T de acuerdo con los excipientes

2-1. Preparación de la preparación R27T

40 Los presentes inventores prepararon una preparación para mejorar la estabilidad de una variante de interferón beta R27T mediante la adición de excipientes de regulador de acetato 20 mM con un pH de 3.8, manitol, arginina HCl, poloxámero 188 y metionina a la variante de interferón a través de estudios previos. Además, la presente invención pretende desarrollar una preparación que sea más estable que una preparación mixta a la que se añaden manitol y arginina HCl descubriendo un excipiente capaz de sustituir al manitol utilizado como estabilizador de interferón existente.

50 Para ello, como se muestra en la siguiente Tabla 1, se prepararon un total de 10 tipos de preparaciones de R27T utilizando la misma composición y concentración que las de los demás excipientes junto con la composición (1(F5)) del preparado que incluye manitol preparado en estudios previos, agregando diversas concentraciones (150, 200 o 250 mM) de trehalosa que se sabe que está presente en grandes cantidades en bacterias o levaduras y observado incluso en fluidos corporales y huevos de insectos como un disacárido no reductor donde dos moléculas de D-glucosa se unen a través de un enlace alfa 1→1 en lugar de manitol, o se agregan diversas concentraciones (150, 200 o 250 mM) de sacarosa o xilitol que se determina que sustituyen al manitol en estudios previos y se realizaron experimentos para comparar y analizar la estabilidad de la preparación.

[Tabla 1]

Formulación	pH 3.8 regulador de acetato de sodio 20 mM			
	Diluyente	Supresor de agregación	Tensioactivo	Antioxidante
1(F5)	Manitol 250 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM
2	Trehalosa 150 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM
3	Trehalosa 200 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM
4	Trehalosa 250 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM
5	Sacarosa 150 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM
6	Sacarosa 200 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM
7	Sacarosa 250 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM
8	Xilitol 150 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM
9	Xilitol 200 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM
10	Xilitol 250 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM

2-2. SEC: Análisis de la cantidad de monómero

5 Para evaluar la estabilidad de almacenamiento de cada preparación de R27T preparada en el ejemplo 2-1, después de que las 10 preparaciones se refrigeraron a una concentración de 0.1 mg/ml y 4 ° C durante 0, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas y 3 meses, respectivamente, se midió la cantidad de un monómero residual utilizando el método de cromatografía de exclusión por tamaño del ejemplo 1-1.

10 Como resultado, como se ilustra en la figura 2, se confirmó que, a pesar de la misma concentración inicial, el contenido de un monómero se mostró diferente de acuerdo con cada preparación (formulación). Cuando se añadió trehalosa en lugar de manitol, la reversibilidad aumentó significativamente y, en consecuencia, se confirmó que la estabilidad al almacenamiento aumentó significativamente. Además, cuanto mayor era la concentración de trehalosa utilizada, mayor era la reversibilidad, y se puede ver que, especialmente cuando se añadió trehalosa a una concentración de 200 y 250 mM, el cambio en la cantidad de monómero fue muy pequeño incluso después de almacenamiento en frío durante 3 meses. Mientras tanto, se confirmó que incluso en el caso de la preparación a la que se añadieron sacarosa y xilitol a 150 o 200 mM, la reversibilidad de la preparación aumentó relativamente.

20 Ejemplo 3. Verificación de la estabilidad y actividad antiviral de la preparación de R27T de acuerdo con la adición de trehalosa

3-1. SEC: Análisis de la cantidad de monómero

25 En base a los resultados del ejemplo 2, se realizó un análisis de estabilidad adicional principalmente en la preparación que usaba trehalosa y se confirmó que mejoraba la estabilidad en almacenamiento en frío de la preparación R27T en comparación con el caso donde se usó manitol. Más específicamente, la preparación de R27T se preparó agregando manitol a una concentración de 250 mM, o agregando trehalosa o xilitol a una concentración de 200 o 250 mM, y las composiciones detalladas de las preparaciones se muestran en la siguiente tabla 2.

[Tabla 2]

No.	Formulación	pH 3.8 Regulador de acetato de sodio 20 mM		
		Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM
1	Manitol 250 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM
2	Trehalosa 200 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM
3	Trehalosa 250 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM
4	Xilitol 200 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM
5	Xilitol 250 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM

35 Primero, para evaluar la estabilidad de almacenamiento de las 5 preparaciones de R27T, después de almacenar cada preparación a una concentración alta de 0.64 mg/ml y a una temperatura alta de 37 ° C durante 0, 14, 21 y 28 días, la cantidad de un monómero se midió por el método del Ejemplo 1-1.

Como resultado, como se ilustra en la figura 3, se demostró que, en comparación con las otras preparaciones, la preparación No. 2, es decir, el caso donde se añadió trehalosa a 200 mM, tuvo la mejor estabilidad frente al calor.

Además, se confirmó que la preparación también tenía la mayor estabilidad de acuerdo con un aumento de la concentración, en comparación con las otras preparaciones.

3-2. DSC: Análisis de estabilidad termodinámica

Además del análisis de la estabilidad en almacenamiento del ejemplo 3-1, se evaluó la estabilidad termodinámica/estructural del R27T realizando un análisis DSC en las 5 preparaciones de R27T por el método del ejemplo 1-2.

Como resultado, como se ilustra en la siguiente tabla 3, puede verse que en las preparaciones Nos. 1 a 3 a las que se añadió manitol o trehalosa, se exhibieron valores T_m más altos que los de las preparaciones Nos. 4 y 5 a las que se agregó xilitol, las preparaciones Nos. 1 a 3 exhibieron valores T_m similares, y por lo tanto, la estabilidad termodinámica o estructural de R27T fue alta en las 3 preparaciones de R27T.

[Tabla 3]

Formulación	Concentración (mg/ml)	T_m más alta (° C)
1	0.64	60.60
2	0.64	60.46
3	0.64	60.28
4	0.64	50.77
5	0.64	47.77

3-3. Ensayo CPE: Análisis de actividad antiviral

Además de los análisis de estabilidad en los ejemplos 3-1 y 3-2, se realizó el ensayo de CPE por el método del ejemplo 1-3 para comparar las actividades antivirales de las respectivas preparaciones de R27T.

Como resultado, como se ilustra en la siguiente Tabla 4, se confirmó que en el caso de la preparación No. 2 a la que se le añadió trehalosa 200 mM, se mostró una actividad antiviral similar a la de la preparación a la que se le añadió manitol.

A través de los resultados del ejemplo, se confirmó que cuando la preparación de R27T preparada agregando trehalosa 200 mM se comparó con la preparación preparada agregando manitol 250 mM, la estabilidad de almacenamiento, estabilidad estructural y actividad antiviral fueron similares o mejoradas, y se puede ver que la trehalosa a la concentración anterior tenía una ventaja suficiente para reemplazar al manitol.

[Tabla 4]

Formulación		pH 3.8 Regulador de acetato de sodio 20 mM			Regulación del ensayo CPE (IU/ml)
1	Manitol 250 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM	114,255,875
2	Trehalosa 200 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM	104,797,451
3	Trehalosa 250 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM	92,340,782
4	Xilitol 200 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM	88,066,849
5	Xilitol 250 mM	Arginina HCl 50 mM	Poloxámero 188 0,5 mg/mL	Metionina 1 mM	93,848,676

Ejemplo 4. Comparación y análisis de estabilidad de acuerdo con la presencia o ausencia de mezcla de arginina HCl

En la preparación R27T usando trehalosa 200 mM finalmente seleccionada como excipiente capaz de sustituir al manitol mediante los Ejemplos 2 y 3, se analizó si existe diferencia en la estabilidad al almacenamiento de la preparación de acuerdo con la presencia o ausencia de arginina HCl. Para ello, como se ilustra en la siguiente Tabla 5, se utilizaron como controles una preparación (control-1) que utilizaba únicamente un regulador de acetato y una preparación R27T (control-2) a la que se le añadió manitol 250 mM sin añadir arginina HCl, y una preparación (3) a la que se añadieron juntos arginina HCl 50 mM y manitol 250 mM y preparaciones (4 y 5) a las que se añadió trehalosa 200 mM con o sin la adición de arginina HCl 50 mM como grupos experimentales. Después de almacenar cada

preparación a una concentración baja (0.1 mg/ml) o una concentración alta (0.64 mg/ml) a una temperatura alta de 37 ° C durante 1, 7, 14 y 28 días, se determinó el grado de agregación de proteínas medido a través del análisis SEC del ejemplo 1-1.

5 [Tabla 5]

Formulación (F)	pH	Regulador de acetato de sodio 20 mM			
1 (Control-1)	3.8	Regulador de acetato de sodio 20 mM			
2 (Control-2)	3.8		Manitol 250 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM
3	3.8	Arginina HCl 50 mM	Manitol 250 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM
4	3.8		Trehalosa 200 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM
5	3.8	Arginina HCl 50 mM	Trehalosa 200 mM	Poloxámero 188 0.5 mg/ml	Metionina 1 mM

10 Como resultado, como se ilustra en la figura 4, se confirmó que en el caso de la preparación preparada mediante la adición de manitol, la agregación de proteínas aumentó tanto en la concentración baja como en la concentración alta mediante la adición de arginina HCl (comparación entre F2 y F3), mientras que en el caso de la preparación preparada mediante la adición de trehalosa, la agregación de proteínas disminuyó en comparación con el caso donde se añadió arginina HCl (comparación entre F4 y F5).

15 A través del resultado, se puede ver que la preparación a la que se añadieron juntos trehalosa y arginina HCl tenía mejor estabilidad que la preparación a base de manitol.

20 Debe entenderse que los ejemplos descritos anteriormente son ilustrativos solo en todos los aspectos y no son restrictivos.

20 Aplicabilidad industrial

25 La preparación farmacéutica R27T estabilizada proporcionada por la presente invención es una preparación que tiene una composición nueva a través de la sustitución de manitol por trehalosa en la composición de una preparación que contiene manitol, que fue estudiada previamente por los presentes inventores. Se confirmó que la preparación puede remediar una desventaja del aumento del agregado de proteína debido a la mezcla y adición de manitol y arginina HCl y puede mejorar la estabilidad termodinámica/estructural y la estabilidad resultante durante el almacenamiento a largo plazo y, por lo tanto, la preparación puede ser ventajosamente utilizada en la prevención, alivio y tratamiento de esclerosis múltiple, cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas virales, enfermedades infecciosas por VIH, hepatitis C, artritis reumatoide y similares.

30 Texto libre del listado de secuencias

<210> 1

<211> 600

35 <212> ADN

<213> Secuencia de ADN de IFN-beta tipo R27T

40 <400> 1

atgaccaaca agtgtctcct ccaaattgct ctctgttgt gcttctccac tacagctctt 60

tccatgagct acaacttgc tggattccta caaagaagca gcaatttca gtgcagaag 120

ctcctgtggc aattgaatgg gacgctttaa tattgcctca aggacaggat gaactttgac 180

atccctgagg agattaagca gctgcagcag ttccagaagg aggacgccgc attgaccatc 240

ES 2 921 235 T3

tatgagatgc tccagaacat ctttgctatt ttcagacaag attcatctag cactggctgg 300

aatgagacta ttgttgagaa cctcctggct aatgtctatc atcagataaa ccatctgaag 360

acagtctcctg aagaaaaact ggagaaagaa gattttacca ggggaaaact catgagcagt 420

ctgcacctga aaagatatta tgggaggatt ctgcattacc tgaaggccaa ggagtacagt 480

cactgtgcct ggaccatagt cagagtggaa atcctaagga acttttactt cattaacaga 540

cttacaggtt acctccgaaa ctgaagatct cctagcctgt ccctctggga ctggacaatt 600

600

<210> 2

5

<211> 187

<212> PRT

10 <213> Secuencia de proteína IFN-beta tipo R27T

<400> 2

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

1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg

15

ES 2 921 235 T3

20 25 30

Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr

35 40 45

Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser

85 90 95

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

100 105 110

Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu

115 120 125

Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys

130 135 140

Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser

ES 2 921 235 T3

145 150 155 160

His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr

165 170 175

Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn

180 185

<110> ABION INC.

5 <120> Formulaciones estabilizadas de mutante de interferón beta

<130> MPCT17-067

<150> KR 10-2016-0129208

10

<151> 2016-10-06

<160> 2

15 <170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 600

20

<212> ADN

<213> Secuencia de ADN de IFN-beta tipo R27T

25 <400> 1

```
atgaccaaca agtgtctcct ccaaattgct ctctgttgt gcttctccac tacagctctt      60
tccatgagct acaacttgct tggattccta caaagaagca gcaattttca gtgtcagaag      120
ctctgtggc aattgaatgg gacgctttaa tattgcctca aggacaggat gaactttgac      180
atccctgagg agattaagca gctgcagcag ttccagaagg aggacgccgc attgaccatc      240
tatgagatgc tccagaacat ctttgctatt ttcagacaag attcatctag cactggctgg      300
aatgagacta ttgttgagaa cctcctggct aatgtctatc atcagataaa ccatctgaag      360
acagtcctgg aagaaaaact ggagaaagaa gattttacca ggggaaaact catgagcagt      420
ctgcacctga aaagatatta tgggaggatt ctgcattacc tgaaggccaa ggagtacagt      480
cactgtgcct ggaccatagt cagagtggaa atcctaagga acttttactt cattaacaga      540
cttacagggtt acctccgaaa ctgaagatct cctagcctgt ccctctggga ctggacaatt      600
600
```

<210> 2

30

<211> 187

<212> PRT

ES 2 921 235 T3

<213> Secuencia de proteína IFN-beta tipo R27T

<400> 2

5

```

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

```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una preparación farmacéutica estabilizada de una variante de interferón beta humano, que comprende lo siguiente:
(a) una variante de interferón beta humano, (b) un regulador de acetato a una concentración de 5 a 100 mM, (c) arginina a una concentración de 10 a 150 mM, (d) trehalosa a una concentración de 150 a 250 mM, (e) poloxámero 188 a una concentración de 0.1 a 10 mg/ml, y (f) metionina a una concentración de 0.5 a 5 mM.
- 10 2. La preparación farmacéutica estabilizada de la reivindicación 1, en donde la variante de interferón beta humano comprende una cadena de azúcar unida a N en un residuo de asparagina que es el aminoácido 25 sustituyendo la arginina, que es el aminoácido 27 del interferón beta humano con treonina.
- 15 3. La preparación farmacéutica estabilizada de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el regulador de acetato está comprendido en una concentración de 10 a 30 mM.
- 20 4. La preparación farmacéutica estabilizada de cualquier reivindicación precedente, en donde el regulador de acetato tiene un pH dentro de un intervalo de 3.6 a 4.4.
- 25 5. La preparación farmacéutica estabilizada de cualquier reivindicación precedente, en donde la arginina está comprendida en una concentración de 50 a 100 mM.
- 30 6. La preparación farmacéutica estabilizada de cualquier reivindicación precedente, en donde el poloxámero 188 está comprendido en una concentración de 0.1 a 1 mg/ml.
- 35 7. La preparación farmacéutica estabilizada de cualquier reivindicación precedente, en donde la metionina está comprendida en una concentración de 0.5 a 2 mM.
- 40 8. La preparación farmacéutica estabilizada de cualquier reivindicación precedente, en donde la preparación farmacéutica estabilizada tiene un índice de concentración de iones de hidrógeno (pH) dentro de un intervalo de 3.6 a 4.4.
9. La preparación farmacéutica estabilizada de cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple, cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas virales, enfermedades infecciosas por VIH, hepatitis C y artritis reumatoide.
10. La preparación farmacéutica estabilizada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la preparación farmacéutica estabilizada es para administración oral o parenteral.
11. La preparación farmacéutica estabilizada para uso de la reivindicación 9, en donde la preparación farmacéutica estabilizada es para administración oral o parenteral.

FIG. 1

```

1  ATG ACC AAC AAG TGT CTC CTC CAA ATT GCT CTC CTG TTG TGC TTC TCC ACT ACA GCT CTT
   M  T  N  K  C  L  L  Q  I  A  L  L  L  C  F  S  T  T  A  L

      1
61  TCC ATG AGC TAC AAC TTG CTT GGA TTC CTA CAA AGA AGC AGC AAT TTT CAG TGT CAG AAG
   S  M  S  Y  N  L  L  G  F  L  Q  R  S  S  N  F  Q  C  Q  K

      20
121 CTC CTG TGG CAA TTG AAT GGG AGG CTT GAA TAT TGC CTC AAG GAC AGG ATG AAC TTT GAC
   L  L  W  Q  L  N  G  R  L  E  Y  C  L  K  D  R  M  N  F  D
      |
      27
      |
      40
181 ATC CCT GAG GAG ATT AAG CAG CTG CAG CAG TTC CAG AAG GAG GAC GCC GCA TTG ACC ATC
   I  P  E  E  I  K  Q  L  Q  Q  F  Q  K  E  D  A  A  L  T  I

      60
241 TAT GAG ATG CTC CAG AAC ATC TTT GCT ATT TTC AGA CAA GAT TCA TCT AGC ACT GGC TGG
   Y  E  M  L  Q  N  I  F  A  I  F  R  Q  D  S  S  S  T  G  W

      80
301 AAT GAG ACT ATT GTT GAG AAC CTC CTG GCT AAT GTC TAT CAT CAG ATA AAC CAT CTG AAG
   N  E  T  I  V  E  N  L  L  A  N  V  Y  H  Q  I  N  H  L  K

      100
361 ACA GTC CTG GAA GAA AAA CTG GAG AAA GAA GAT TTT ACC AGG GGA AAA CTC ATG AGC AGT
   T  V  L  E  E  K  L  E  K  E  D  F  T  R  G  K  L  M  S  S

      120
421 CTG CAC CTG AAA AGA TAT TAT GGG AGG ATT CTG CAT TAC CTG AAG GCC AAG GAG TAC AGT
   L  H  L  K  R  Y  Y  G  R  I  L  H  Y  L  K  A  K  E  Y  S

      140
481 CAC TGT GCC TGG ACC ATA GTC AGA GTG GAA ATC CTA AGG AAC TTT TAC TTC ATT AAC AGA
   H  C  A  W  T  I  V  R  V  E  I  L  R  N  F  Y  F  I  N  R

      160
541 CTT ACA GGT TAC CTC CGA AAC TGA AGA TCT CCT AGC CTG TCC CTC TGG GAC TGG ACA ATT
   L  T  G  Y  L  R  N  Parar

```

FIG. 2

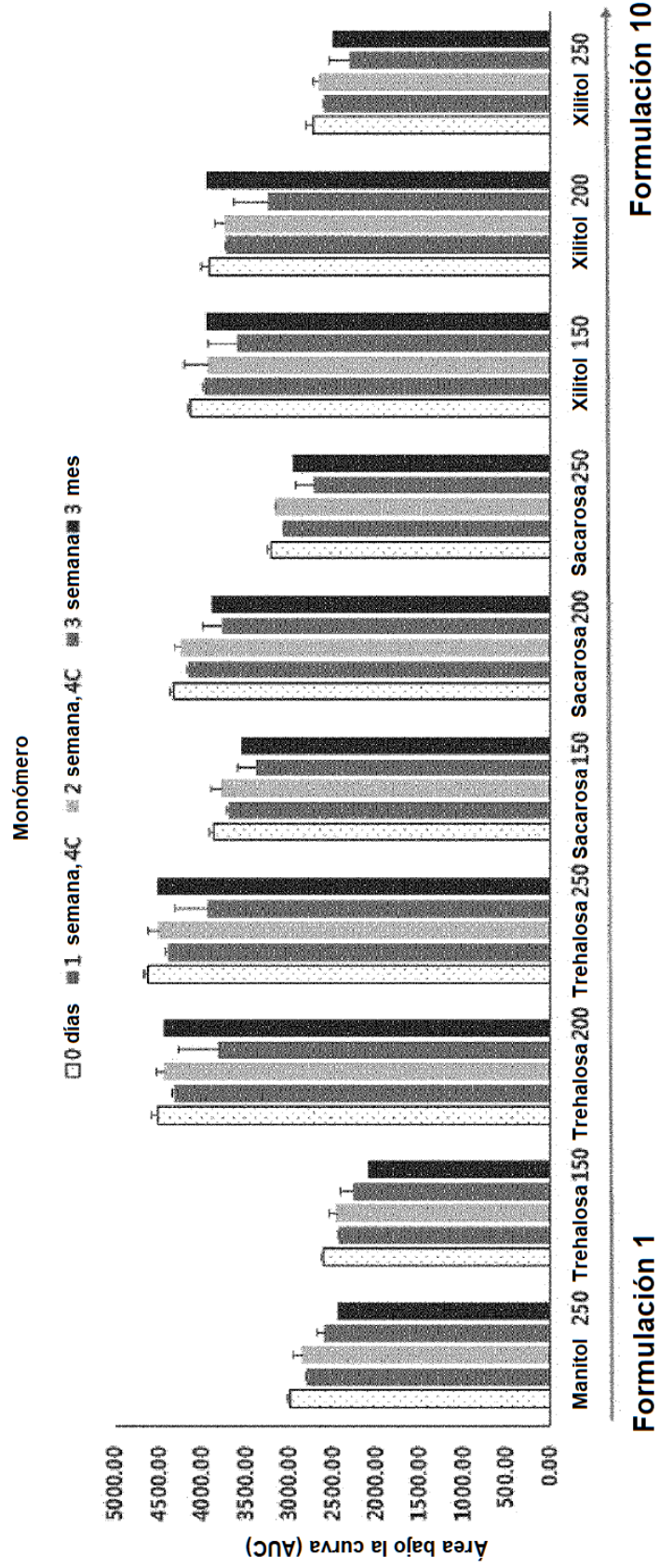


FIG. 3

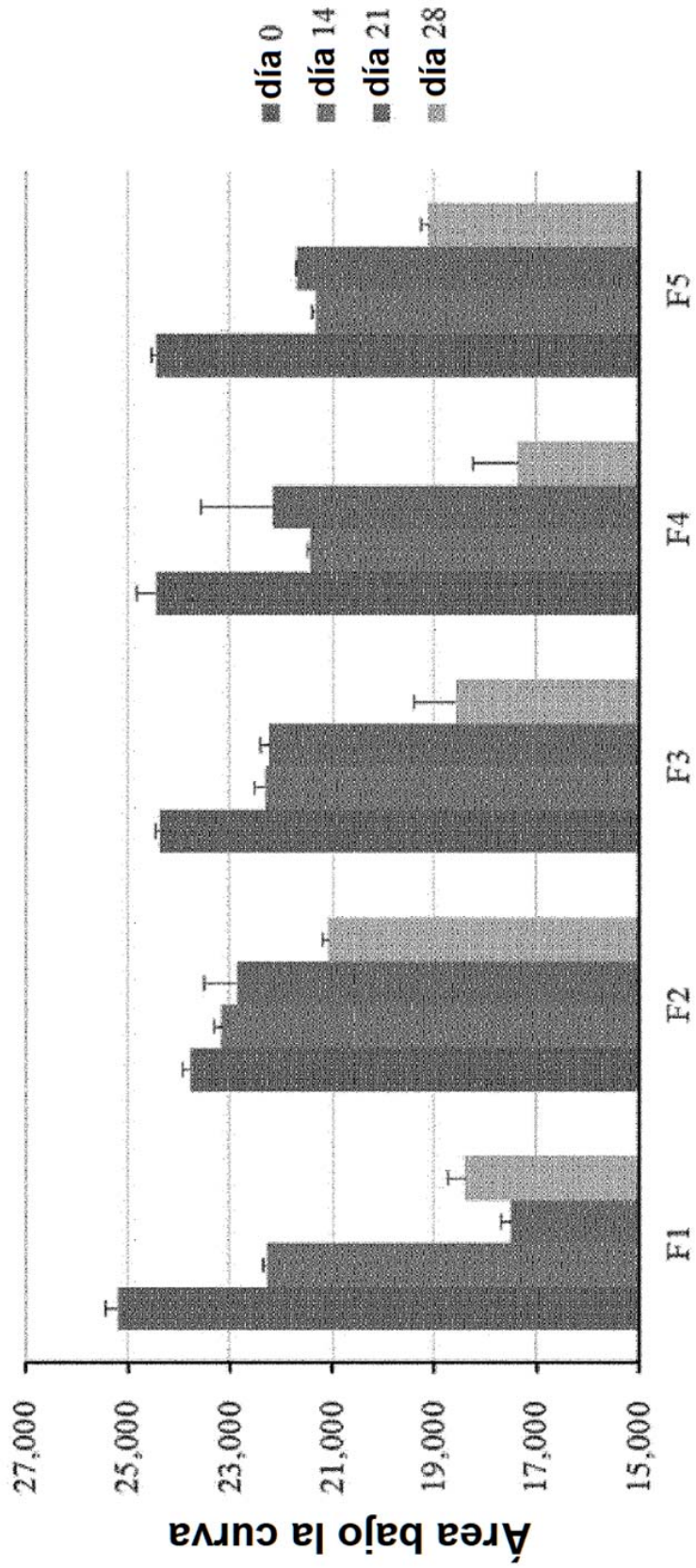


FIG. 4

