(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년09월25일
(11) 등록번호 10-2025442
(24) 등록일자 2019년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) *A61P 7/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7019066
(22) 출원일자(국제) 2011년12월16일
심사청구일자 2016년12월14일
(85) 번역문제출일자 2013년07월19일
(65) 공개번호 10-2013-0129254
(43) 공개일자 2013년11월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/065591
(87) 국제공개번호 WO 2012/087838
국제공개일자 2012년06월28일
(30) 우선권주장
61/426,356 2010년12월22일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20030069170 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
박스알타 인코퍼레이티드
미국, 일리노이즈 60015, 배녹번, 1200 레이크사이드 드라이브
박스앨타 게엠베하
스위스 6300 추크 제흐러벡 4
(72) 발명자
지크만 위르겐
오스트리아 아-1210 비엔나 게라스도르퍼 스트라쎄 153/209
샤이넥커 리하르드
오스트리아 아-1180 비엔나 바흐링거 스트라쎄 133/16
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 류현경

전체 청구항 수 : 총 46 항 심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 **단백질에 수용성 지방산 유도체를 접합하기 위한 물질 및 방법**

(57) 요 약

본 발명은 치료학적 단백질에 수용성 지방산 유도체를 접합하는 물질 및 방법에 관한 것이며, 이는 접합을 허용하는 조건 하에 활성화 수용성 지방산 유도체와 치료학적 단백질을 접촉시키는 단계를 포함한다.

(72) 발명자

로텐스타이너 한스페터

오스트리아 아-1020 비엔나 하이드가쎄 10/17

투레첵 페터

오스트리아 아-3400 클로스터노이부르크 바이들링 하웁트스트라쎄 59게

명 세 서

청구범위

청구항 1

수용성 연결자에 부착된 지방산 또는 지방산 에스테르를 포함하는 수용성 지방산 유도체이되, 상기 지방산 유도체는 안정한 옥심 결합에 의해 치료학적 단백질에 안정하게 부착되며,

상기 수용성 연결자는, 수용성 폴리머, 치료학적 단백질에 부착되는 하나의 제1 작용기(여기서, 제1 작용기는 아미노옥시기임), 및 지방산 또는 지방산 에스테르에 부착되는 제2 작용기(여기서, 제2 작용기는 아미노옥시기임)를 포함하고,

상기 지방산은 C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22, 및 C24로 구성된 군에서 선택되는 사슬 길이를 포함하고,

상기 지방산 에스테르는 메틸 에스테르 또는 에틸 에스테르이고,

상기 치료학적 단백질은 글리코단백질 또는 시험관내에서 글리코실화된 치료학적 단백질이고,

상기 치료학적 단백질은 인자 VIII (FVIII), 인자 IX (FIX), 인자 VIIa (FVIIa), EPO (Erythropoietin), 과립구 집락 자극 인자 (G-CSF), 인슐린, 및 A1PI (Alpha-1-proteinase inhibitor)로 이루어진 군으로부터 선택되고,

상기 수용성 폴리머는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이고,

상기 옥심 결합은 수용성 연결자 상의 제1 작용기 및 치료학적 단백질 상의 산화된 탄수화물의 알데하이드기 사이에서 형성되는 것인 수용성 지방산 유도체.

청구항 2

제1항에 있어서, 시험관내 또는 생체내 인간 혈청 알부민 (HSA)을 결합시키는 것을 특징으로 하는 지방산 유도체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 자연형(native) 치료학적 단백질에 비해 증가된 반감기를 갖는 것을 특징으로 하는 지방산 유도체.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서, 지방산은 C14, C16 및 C18로 구성된 군에서 선택되는 사슬 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 지방산 유도체.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 지방산은 말단 카르복실기 및 ω-기로 구성된 군에서 선택되는 지방산의 기에서 수

용성 연결자에 부착되는 것을 특징으로 하는 지방산 유도체.

청구항 10

제9항에 있어서, 지방산은 ω-기에서 수용성 연결자에 부착되는 것을 특징으로 하는 지방산 유도체.

청구항 11

제10항에 있어서, ω-기는 하이드록실, 아미노, 티오, 및 카르복실로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 지방산 유도체.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 지방산은 16-하이드록시헥사데칸산인 것을 특징으로 하는 지방산 유도체.

청구항 13

삭제

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 지방산 에스테르는 16-하이드록시헥사데칸산 메틸 에스테르인 것을 특징으로 하는 지방산 유도체.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

제1항 또는 제2항에 있어서, 수용성 폴리머는 03, 05, 07, 09, 011, 013 및 015로 구성된 군에서 선택되는 사슬 길이를 포함하는 것을 특징으로 하는 지방산 유도체.

청구항 21

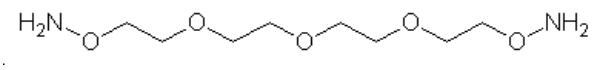
제1항 또는 제2항에 있어서, 수용성 연결자는 하기로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 지방산 유도체:

a) 하기 화학식의 3-옥사펜탄-1,5-디옥시아민:



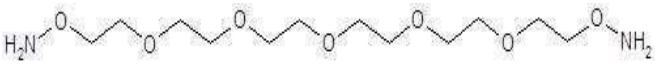
;

b) 하기 화학식의 3,6,9-트리아옥사운데칸-1,11-디옥시아민:



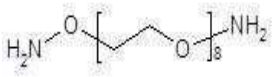
;

c) 하기 화학식의 3,6,9,12,15-펜타옥사헵타데칸-1,17-디옥시아민:



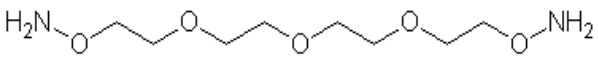
; 및

d) 하기 화학식의 3,6,9,12,15,18,21-헵타옥사트리코산-1,23-디옥시아민:



청구항 22

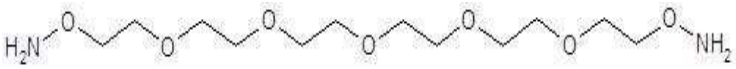
제21항에 있어서, 수용성 연결자는 하기 화학식의 3,6,9-트리아옥사운데칸-1,11-디옥시아민인 것을 특징으로 하는 지방산 유도체:



.

청구항 23

제21항에 있어서, 수용성 연결자는 하기 화학식의 3,6,9,12,15-펜타옥사헵타데칸-1,17-디옥시아민인 것을 특징으로 하는 지방산 유도체:



.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

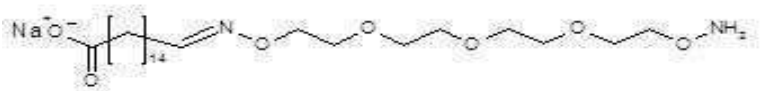
청구항 27

삭제

청구항 28

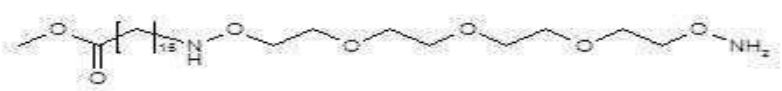
제1항 또는 제2항에 있어서, 지방산 유도체는 하기로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 지방산 유도체:

a) 하기 화학식의 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시이미노)-헥사데칸산 나트륨 염:



; 및

b) 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시아미노)-헥사데칸산 메틸 에스테르,



.

청구항 29

삭제

청구항 30

제1항에 있어서, 치료학적 단백질은 FVIIa인 것을 특징으로 하는 지방산 유도체.

청구항 31

제1항에 있어서, 치료학적 단백질은 FVIII인 것을 특징으로 하는 지방산 유도체.

청구항 32

제1항에 있어서, 치료학적 단백질은 FIX인 것을 특징으로 하는 지방산 유도체.

청구항 33

하기 단계를 포함하는 제1항에 따른 지방산 유도체를 제조하는 방법:

a) 지방산 상의 ω-하이드록시기를 산화하여 지방산 상에 알데하이드기를 발생시키는 단계; 및

b) 활성 아미노옥시기를 포함한 수용성 연결자를 알데하이드기에 커플링시켜 안정한 옥심 결합을 형성하는 단계;

여기서 상기 지방산 유도체는 수용성임.

청구항 34

제33항에 있어서, ω-하이드록시기는 하기로 구성된 군에서 선택되는 산화 시약에 의해 산화되는 것을 특징으로 하는 방법: 데스 마틴 퍼아이오디난 시약(Dess Martin periodinane reagent), 템포 시약(Tempo reagent), 옥살릴 클로라이드/DMSO, 테트라프로필암모늄퍼루테네이트 (TPAP) 및 크롬 VI 시약 (콜린스 시약(Collins reagent), 피리디니움 클로로 크로메이트(PCC) 및 피리디니움 디크로메이트).

청구항 35

제34항에 있어서, 산화 시약은 데스 마틴 퍼아이오디난인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

제33항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 지방산은 C14, C16 및 C18로 구성된 군에서 선택되는 사슬 길이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 지방산은 16-하이드록시헥사데칸산인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

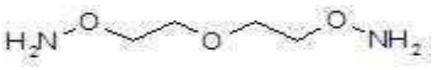
청구항 45

제33항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 수용성 폴리머는 05, 07, 09, 011, 013 및 015로 구성된 군에서 선택되는 사슬 길이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46

제33항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 수용성 연결자는 하기로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법:

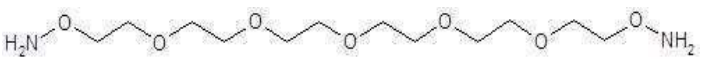
a) 하기 화학식의 3-옥사펜탄-1,5-디옥시아민:


;

b) 하기 화학식의 3,6,9-트리아옥사운데칸-1,11-디옥시아민:


;

c) 하기 화학식의 3,6,9,12,15-펜타옥사헵타데칸-1,17-디옥시아민:

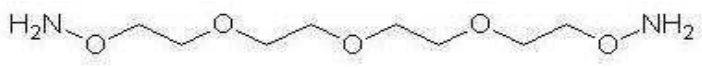

; 및

d) 하기 화학식의 3,6,9,12,15,18,21-헵타옥사트리코산-1,23-디옥시아민:



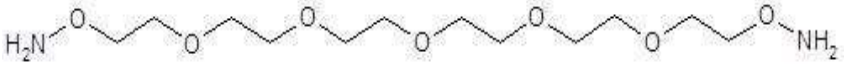
청구항 47

제46항에 있어서, 수용성 연결자는 하기 화학식의 3,6,9-트리아옥사운데칸-1,11-디옥시아민인 것을 특징으로 하는 방법:


.

청구항 48

제46항에 있어서, 수용자 연결자는 하기 화학식의 3,6,9,12,15-펜타옥사헵타데칸-1,17-디옥시아민인 것을 특징으로 하는 방법:


.

청구항 49

하기 단계를 포함하는 제1항에 따른 지방산 유도체를 제조하는 방법:

a) 지방산 상의 카르복실기를 에스테르화하여 지방산 상에 에스테르를 발생시키는 단계;

b) 지방산 상의 ω-하이드록시기를 활성화하여 단계 a)의 지방산 상에 메실기를 발생시키는 단계; 및

c) 단계 b)의 메실기를 치환시킴으로써 활성화 아미노옥시기를 포함한 수용성 연결자를 커플링시키고 그렇게 함으로써 안정한 옥시이민-메틸렌 결합을 형성하는 단계;

여기서 상기 지방산 유도체는 수용성임.

청구항 50

제49항에 있어서, 카르복실기는 아세틸 클로라이드, 산의 존재에서 메탄올, 산의 존재에서 에탄올, 디아조메탄, 및 메틸아이오다이드로 구성된 군에서 선택되는 에스테르화제에 의해 에스테르화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 에스테르화제는 아세틸 클로라이드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 52

제49항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, ω-하이드록시기는 메실 클로라이드, 토실 클로라이드 및 노실 클로라이드로 구성된 군에서 선택되는 활성화제에 의해 활성화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 활성화제는 메실 클로라이드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

제49항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 지방산은 C14, C16 및 C18로 구성된 군에서 선택되는 사슬 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 지방산은 16-하이드록시헥사데칸산인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

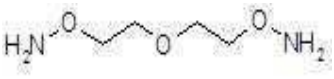
청구항 63

제49항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 수용성 폴리머는 03, 05, 07, 09, 011, 013 및 015로 구성된 군에서 선택되는 사슬 길이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 64

제49항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 수용성 연결자는 하기로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법:

a) 하기 화학식의 3-옥사펜탄-1,5-디옥시아민:


;

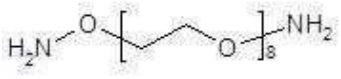
b) 하기 화학식의 3,6,9-트리아옥사운데칸-1,11-디옥시아민:


;

c) 하기 화학식의 3,6,9,12,15-펜타옥사헵타데칸-1,17-디옥시아민:

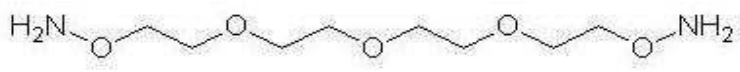

; 및

d) 하기 화학식의 3,6,9,12,15,18,21-헵타옥사트리코산-1,23-디옥시아민:



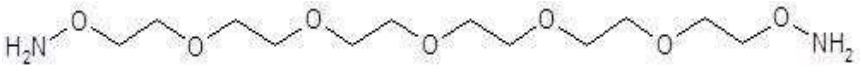
청구항 65

제64항에 있어서, 수용성 연결자는 하기 화학식의 3,6,9-트리아옥사운데칸-1,11-디옥시아민인 것을 특징으로 하는 방법:


.

청구항 66

제64항에 있어서, 수용성 연결자는 하기 화학식의 3,6,9,12,15-펜타옥사헵타데칸-1,17-디옥시아민인 것을 특징으로 하는 방법:


.

청구항 67

치료학적 단백질 상의 산화된 탄수화물 모이어티를 제1항에 따른 지방산 유도체와 접촉시키는 단계를 포함하는 접합된 치료학적 단백질을 제조하는 방법이되,

상기 탄수화물 모이어티는 나트륨 퍼아이오데이트 ($NaIO_4$), 납 테트라아세테이트 ($Pb(OAc)_4$) 및 칼륨 퍼루테네이트 ($KRuO_4$)로 구성된 군에서 선택되는 산화제를 포함하는 완충액과 인큐베이션에 의해 산화되고;

그리고 여기서 상기 옥심 결합 형성은 아닐린, o-아미노 벤조산, m-아미노 벤조산, p-아미노 벤조산, 설파닐산, o-아미노벤즈아미드, o-톨루이딘, m-톨루이딘, p-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, 및 p-아니시딘으로 구성된 군에서 선택되는 친핵성 촉매에 의해 촉매되는 방법.

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

제67항에 있어서, 치료학적 단백질은 FVIIa인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 71

제67항에 있어서, 치료학적 단백질은 FVIII인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 72

제67항에 있어서, 치료학적 단백질은 FIX인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 73

제67항에 있어서, 산화제는 나트륨 퍼아이오데이트 ($NaIO_4$)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 74

제67항에 있어서, 친핵성 촉매는 m-톨루이딘인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 75

제67항에 있어서, 접합된 치료학적 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 76

제67항에 있어서, 지방산 유도체는 제33항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 77

제67항에 있어서, 지방산 유도체는 제49항 내지 제51항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **본 발명의 분야**

[0002] 본 발명은 단백질에 수용성 지방산 유도체를 접합하기(conjugating) 위한 물질 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] **본 발명의 배경**

[0004] 환자에게 투여 후 접합된 치료학적 단백질의 반감기를 증가시키기 위하여 치료학적 단백질에 접합하는 것에 대하여 다양한 분자 및/또는 화합물이 설명되었다 (Veronese FM and Mero A, BioDrugs 2008;22:315-29;

Gregoriadis G et al., Int J Pharm 2005; 300:125-30; 및 Shechter Y et al.; International Journal of Peptide Research and Therapeutics 2007; Vol 13 :105-17).

[0005] 지방산 (FA)은 치료학적 단백질에 접합되어 더 긴-활성 유도체를 형성할 수 있다. 단백질 또는 펩티드 반감기의 연장을 위한 이러한 원리는 FA가 인간 혈청 알부민 (HSA; 알부민 결합 프로브라고도 또한 불림)에 결합할 수 있다는 사실에 기반한다. 치료학적 단백질이 신생아 Fc 수용체를 통하여 알부민과 함께 재순환할 것이기 때문에 혈류내 인간 혈청 알부민과의 FA의 연관성은 치료학적 단백질 반감기의 실질적인 연장을 야기할 수 있다. FA 및 이의 유도체 (가령, 상응하는 메틸 에스테르)는 유사한 알부민-결합 특성을 보였다 (Spector AA, J Lipid Res 1975;16:165-79).

[0006] 이러한 더 긴-활성 원리에 대한 한 가지 현저한 예시는 Novo Nordisk로부터의 인슐린 디터머(insulin detemir) (Levemir®)이다. 인슐린 디터머에서, FA의 카르복실기는 인슐린 단백질의 리신 잔기의 ε-아미노기에 공유결합으로 커플링된다 (가령, US 5,866,538; US 6,011,007; 및 US 6,869,930을 참고). 다른 연구 그룹이 유사한 기법을 설명했다 (Shechter Y et al., Bioconj Chem 2005;16:913-20; 및 Sasson K et al., J Control Release 2010;142:214-20). 예를 들어, 이들 그룹은 단백질의 아미노기에 커플링시키기 위한 활성 NHS 에스테르를 함유한 방출가능한 FMOC 시스템을 설명한다. 하지만, 차이점은 이러한 개념에서 FA는 ω-위치내 작용기(functional group)를 통하여 단백질에 연결되고 그렇게 됨으로써 온전한 카르복실기는 만든다는 점이다. 따라서, 연장된-활성 프로드러그(prodrug)는 인간 혈청 알부민에 결합하지만 생리학적 조건 하에 FMOC 시스템이 느린 가수분해를 겪는 동안 시간이 지남에 따라 분리되는 것으로 제조될 수 있다 (Sasson K et al., J Control Release 2010;142:214-20).

[0007] 지방산뿐만 아니라, 수용성 폴리머(polymer) 및 치료학적 단백질 사이의 공유결합 형성에 의한 접합체(conjugate)의 제조가 다양한 화학적 방법에 의해 수행될 수 있다. 폴리펩티드 약물의 페길화(PEGylation)는 순환에서 폴리펩티드 약물을 보호하고 그들의 약역학적 및 약동학적 프로파일을 향상시킨다 (Harris and Chess, Nat Rev Drug Discov. 2003;2:214-21). 페길화 과정은 에틸렌 글리콜 (폴리에틸렌 글리콜 (PEG))의 반복하는 유닛을 폴리펩티드 약물에 부착한다. PEG 분자는 큰 유체역학적 부피 (구형 단백질 크기의 5-10배)를 가지고, 매우 수용성이고 수화되고, 비-독성, 비-면역성이며 그리고 신체로부터 빠르게 제거된다. 분자의 페길화는 효소적 분해에 대한 약물의 증가된 내성, 생체내 증가된 반감기, 감소된 투약 빈도, 감소된 면역원성, 증가된 물리적 및 열 안정성, 증가된 용해도, 증가된 액체 안정성 및 감소된 집합성을 야기할 수 있다. 첫번째 페길화 약물은 1990년대 초반에 FDA에 의해 승인되었다. 그 이후로, FDA는 경구, 주사가능한 및 국부적 투여를 위한 여러 가지 페길화 약물을 승인하였다.

[0008] 콜로민산 (CA)이라고도 불리는, 폴리시알산 (PSA)은 자연적으로 발생한 다당류이다. 이는 α(2→8) 케토시딕 결합(ketosidic linkage)을 가진 N-아세틸뉴라민산의 동종폴리머이고 이의 비-환원 말단에서 인접한 디올기를 함유한다. 이는 음전하이고 인체의 자연 성분이다. 이는 박테리아로부터 많은 양으로 그리고 사전-결정된 물리적 특성을 가지고 쉽게 생성될 수 있다 (미국 특허 번호 제5,846,951호). 박테리아에 의해-생성된 PSA는 신체에서 생성된 PSA와 화학적으로 그리고 면역학적으로 동일하기 때문에, 박테리아성 PSA는 심지어 단백질에 커플링될 때에도, 비-면역성이다. 일부 폴리머와는 다르게, PSA 산은 생분해성이다. 카탈라아제 및 아스파라기나아제에 콜로민산의 공유결합은 단백질 분해효소 또는 혈장의 존재에서 효소의 안정성을 증가시키는 것으로 나타났다. 폴리시알릴화된 그리고 비변형된 아스파라기나아제를 이용한 생체내 비교연구는 폴리시알릴화가 효소의 반감기를 증가시켰다는 것으로 밝혀졌다 (Fernandes and Gregoriadis, Int J Pharm. 2001;217:215-24).

[0009] 펩티드 또는 단백질에 PEG-유도체의 커플링은 Roberts et al. (Adv Drug Deliv Rev 2002;54:459-76)에 의해 검토된다. 치료학적 단백질에 수용성 폴리머를 커플링시키기 위한 한 가지 기법은 단백질의 탄수화물 모이어티(moiety)를 통한 폴리머의 접합이다. 단백질내 탄수화물의 인접한 하이드록실 (OH)기는 나트륨 퍼아이오데이트(NaIO4)로 쉽게 산화되어 활성 알데하이드기를 형성할 수 있다 (Rothfus and Smith, J Biol Chem 1963; 238:1402-10; van Lenten and Ashwell, J Biol Chem 1971;246:1889-94). 차후에 폴리머는 예를 들어, 활성 하이드라지드기를 함유한 시약의 사용에 의해 탄수화물의 알데하이드기에 결합할 수 있다 (Wilchek M and Bayer EA, Methods Enzymol 1987;138:429-42). 더욱 최근의 기술은 알데하이드와 반응하여 옥심 결합을 형성하는 아미노옥시기를 함유한 시약의 사용이다 (WO 96/40662, WO2008/025856).

[0010] 치료학적 단백질에 수용성 폴리머의 접합을 설명하는 추가적인 예시는 폰 빌레브란트 인자내 탄수화물 모이어티의 산화 및 하이드라지드 화학을 이용하여 PEG에 차후 커플링을 교시하는 WO 06/071801; rFVIII의 산화 및 하이드라지드 화학을 이용하여 PEG 및 기타 수용성 폴리머 (가령, PSA, HES, 덱스트란)에 차후 커플링을 교시하는

미국 공개공보 번호 제2009/0076237호; 상이한 응고 인자, 가령, rFIX, FVIII 및 FVIIa의 산화 및 옥심 결합을 형성함으로써 아미노옥시를 이용하여, 가령, PEG에 차후 커플링을 교시하는 WO 2008/025856; 및 FIX의 산화 및 하이드라지드 화학을 이용하여 PEG에 차후 커플링을 교시하는 미국 특허 번호 제5,621,039호에서 설명된다.

[0011] 단백질 접합을 위한 상기 물질 및 방법에도 불구하고, 예를 들어, 안정한 단백질 접합체의 조작 및 제조를 허용하는 새로운 물질 및 방법이 요구된다. 지방산이 HAS를 결합하는 혜택을 제공할 수 있지만, 지방산은 종종 수성 환경에서 조작하기가 어렵고 시간이 지남에 따라 이의 단백질 결합 파트너로부터 방출되거나 제거될 수 있다.

[0012] **본 발명의 개요**

[0013] 본 발명은 단백질에 폴리머 및 수용성 지방산 유도체를 접합하기 위한 물질 및 방법을 제공하며, 이는 다양한 시약과 연관된 비용 및 접합 반응이 친핵성 촉매에 의해 촉매될 때 환자 수혜자에 대한 건강 위험요소를 최소화하는 반면, 단백질의 약역학적 및/또는 약동학적 특성을 향상시킨다. 본 발명은 수성 용액에서 단백질에 수용성 지방산 유도체를 접합하기 위한 물질 및 방법을 제공하고, 그렇게 함으로써 안정한 단백질 접합체를 생성하며, 여기서 지방산 유도체는 시간이 지남에 따라 방출되지 않는다.

[0014] 본 발명의 한 가지 구체예에서, 수용성 지방산 유도체는 수용성 연결자(linker)에 부착된 지방산 또는 지방산 에스테르를 포함하여 제공되고, 상기 지방산 유도체는 치료학적 단백질에 안정하게 부착된다. 또 다른 구체예에서, 지방산 유도체는 시험관내 또는 생체 내에서 인간 혈청 알부민 (HSA)과 결합한다. 또 다른 구체예에서, 지방산 유도체 - 치료학적 단백질 접합체는 자연형(native) 치료학적 단백질에 비해 증가된 반감기를 갖는다. 또 다른 구체예에서, 전술한 지방산 유도체는 포화된 지방산 또는 불포화된 지방산을 포함한다. 관련된 구체예에서, 지방산은 포화된 지방산이다. 또 다른 구체예에서, 지방산은 분지형 사슬 지방산이다.

[0015] 지방산 유도체에서 다양한 길이의 지방산이 고려된다. 한 가지 구체예에서 전술한 지방산 유도체가 제공되며 여기서 지방산은 홀수의 탄소수를 가진 합성 지방산을 포함하여, C10 내지 C24의 사슬 길이를 포함한다. 한 가지 구체예에서, 전술한 지방산 유도체가 제공되며 여기서 지방산은 C10, C12, C14, C16, C18, C20, C20, C22 및 C24로 구성된 군에서 선택되는 사슬 길이를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 지방산은 C14, C16 및 C18로 구성된 군에서 선택되는 사슬 길이를 갖는다. 또 다른 구체예에서, 지방산은 C13, C15 및 C17로 구성된 군에서 선택되는 사슬 길이를 갖는다.

[0016] 또 다른 구체예에서, 전술한 지방산 유도체가 제공되며 여기서 지방산은 말단 카르복실기 및 ω기로 구성된 군에서 선택되는 지방산의 기에서 수용성 연결자에 부착된다. 또 다른 구체예에서, 지방산은 ω기에서 수용성 연결자에 부착된다. 또 다른 구체예에서, ω기는 하이드록실, 아미노, 티오, 및 카르복실로 구성된 군에서 선택된다.

[0017] 본 발명의 한 가지 구체예에서, 전술한 지방산 유도체가 제공되며 여기서 지방산은 16-하이드록시헥사데칸산이다.

[0018] 다른 구체예에서, 지방산 유도체가 제공되며 여기서 지방산 에스테르는 메틸 에스테르 및 에틸 에스테르로 구성된 군에서 선택된다. 또 다른 구체예에서, 지방산 에스테르는 16-하이드록시헥사데칸산 메틸 에스테르이다.

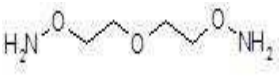
[0019] 다양한 수용성 연결자가 본 발명에서 고려된다. 한 가지 구체예에서, 전술한 지방산 유도체가 제공되며 여기서 수용성 연결자는 치료학적 단백질에 부착되는 수용성 폴리머 및 적어도 하나의 작용기를 포함한다. 한 가지 구체예에서, 치료학적 단백질에 부착되는 작용기는 음성 또는 양성 전하를 주는 능력을 가지며, 그렇게 함으로써 연결자 수용성을 만든다. 또 다른 구체예에서, 작용기는 설포기, 카르복실기, 하이드록실기, 아미노기, 아미도기, 말레이미도기, 아미노옥시기 및 하이드라지드기로 구성된 군에서 선택된다. 한 가지 구체예에서, 작용기는 아미노옥시기이다.

[0020] 수많은 수용성 폴리머가 본 발명에서 고려된다. 한 가지 구체예에서, 전술한 지방산 유도체가 제공되며 여기서 연결자의 일체화된 부분(integral part)인 수용성 폴리머는 하기 군에서 선택된다: 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 분지형 PEG, 폴리시알산 (PSA), 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록시에틸 전분 (HES), 탄수화물, 다당류, 플루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트, 데르마탄 설페이트, 전분, 덱스트란, 카르복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글리콜 (PAG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모르폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카르복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록실메틸에킬렌 하이드록시메틸포르말) (PHF), 및 2-메타아크릴로일옥시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC). 또 다른 구체예에서, 수용성 폴리머는 PEG이다. 다양한 길이의 수용성 폴리머가 또한 본 명세서에서 고려된다. 한 가지 구체예에서, 지방산 유

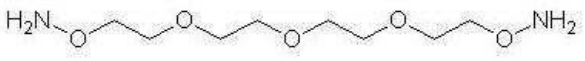
도체가 제공되며 여기서 수용성 폴리머는 03, 05, 07, 09, 011, 013 및 015로 구성된 군에서 선택되는 사슬 길이를 포함한다.

[0021] 한 가지 구체예에서, 지방산 유도체가 제공되며 여기서 수용성 연결자는 하기로 구성된 군에서 선택된다:

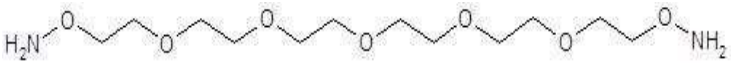
[0022] 3-옥사펜탄-1,5-디옥시아민

[0023] ;

[0024] 3,6,9-트리아옥사운데칸-1,11-디옥시아민

[0025] ;

[0026] 3,6,9,12,15-펜타옥사헵타데칸-1,17-디옥시아민;

[0027] ; 및

[0028] 3,6,9,12,15,18,21-헵타옥사트리코산-1,23-디옥시아민

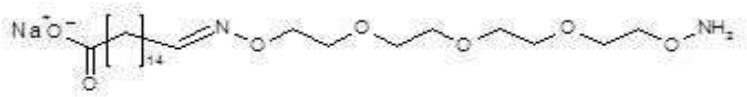
[0029] .

[0030] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 지방산 유도체가 제공되며 여기서 지방산 유도체는 옥심 결합에 의해 치료학적 단백질에 안정하게 부착된다. 또 다른 구체예에서, 옥심 결합은 수용성 연결자 상의 옥심기 및 치료학적 단백질 상의 산화된 탄수화물의 알데하이드기 사이에서 형성된다.

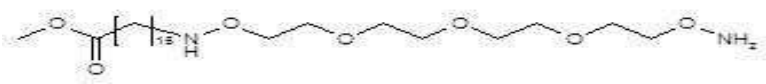
[0031] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 지방산 유도체가 제공되며 여기서 지방산 유도체는 수용성 연결자 상의 말레이미드기에 의해 치료학적 단백질 상의 유리 설프하이드릴기에 부착되어 상기 치료학적 단백질에 안정하게 부착된다. 또 다른 구체예에서, 지방산 유도체는 수용성 연결자 상의 N-하이드록시석신이미드 에스테르에 의해 치료학적 단백질 상의 유리 아미노기에 부착되어 상기 치료학적 단백질에 안정하게 부착된다.

[0032] 본 발명의 한 가지 구체예에서, 지방산 유도체가 제공되며 여기서 지방산 유도체는 하기로 구성된 군에서 선택된다:

[0033] a) 하기 화학식의 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시이미노)-헥사데칸산 나트륨 염:

[0034] ; 및

[0035] b) 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시아미노)-헥사데칸산 메틸 에스테르,

[0036] .

[0037] 다양한 치료학적 단백질이 본 발명에서 고려된다. 한 가지 구체예에서, 전술한 지방산 유도체가 제공되며 여기서 치료학적 단백질은 하기로 구성된 군에서 선택된다: 인자 IX (FIX), 인자 VIII (FVIII), 인자 VIIa (FVIIa), 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF), ADAMTS 13 프로테아제, IL-1 알파, IL-1 베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, 집락 자극 인자-1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, 과립구 집락 자극 인자 (G-CSF), EPO, 인터페론-알파 (IFN-알파), 컨센서스 인터페론(consensus interferon), IFN-베타, IFN-감마, IFN-오메가, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 알파, IL-33, 트롬보포이에틴 (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 1 (ANGPTL1), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 2 (ANGPTL2), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 3 (ANGPTL3), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 4 (ANGPTL4), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티

드 5 (ANGPTL5), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 6 (ANGPTL6), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 7 (ANGPTL7), 비트로넥틴, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 안지오제닌, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 골 형성 단백질-1, 골 형성 단백질-2, 골 형성 단백질-3, 골 형성 단백질-4, 골 형성 단백질-5, 골 형성 단백질-6, 골 형성 단백질-7, 골 형성 단백질-8, 골 형성 단백질-9, 골 형성 단백질-10, 골 형성 단백질-11, 골 형성 단백질-12, 골 형성 단백질-13, 골 형성 단백질-14, 골 형성 단백질-15, 골 형성 단백질 수용체 IA, 골 형성 단백질 수용체 IB, 골 형성 단백질 수용체 II, 뇌 유래 신경영양 인자, 카디오트로핀-1, 섬모 신경영양 인자, 섬모 신경영양 인자 수용체, 크립토, 크립틱, 사이토카인-유도 중성구 주화성 인자 1, 사이토카인-유도 중성구, 주화성 인자 2α, 사이토카인-유도 중성구 주화성 인자 2β, β 내피세포 성장 인자, 엔도텔린 1, 상피 성장 인자, 에피겐, 에피레귤린, 상피-유래 중성구 유인물질, 섬유아세포 성장 인자 4, 섬유아세포 성장 인자 5, 섬유아세포 성장 인자 6, 섬유아세포 성장 인자 7, 섬유아세포 성장 인자 8, 섬유아세포 성장 인자 8b, 섬유아세포 성장 인자 8c, 섬유아세포 성장 인자 9, 섬유아세포 성장 인자 10, 섬유아세포 성장 인자 11, 섬유아세포 성장 인자 12, 섬유아세포 성장 인자 13, 섬유아세포 성장 인자 16, 섬유아세포 성장 인자 17, 섬유아세포 성장 인자 19, 섬유아세포 성장 인자 20, 섬유아세포 성장 인자 21, 산성 섬유아세포 성장 인자, 염기성 섬유아세포 성장 인자, 신경교 세포주-유래 신경영양 인자 수용체 α1, 신경교 세포주-유래 신경영양 인자 수용체 α2, 성장 관련 단백질, 성장 관련 단백질 α, 성장 관련 단백질 β, 성장 관련 단백질 γ, 헤파린 결합 상피 성장 인자, 간세포 성장 인자, 간세포 성장 인자 수용체, 간암-유래 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자 I, 인슐린-유사 성장 인자 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 II, 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질, 케라틴세포 성장 인자, 백혈병 저해 인자, 백혈병 저해 인자 수용체 α, 신경 성장 인자 신경 성장 인자 수용체, 뉴로포이에틴,뉴트로핀-3, 뉴트로핀-4, 온코스타틴 M (OSM), 태반 성장 인자, 태반 성장 인자 2, 혈소판-유래 내피세포 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자 A 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 AA, 혈소판 유래 성장 인자 AB, 혈소판 유래 성장 인자 B 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 BB, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 α, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 β, 전(pre)-B 세포 성장 자극 인자, 줄기세포 인자 (SCF), 줄기세포 인자 수용체, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, 형질전환 성장 인자 α, 형질전환 성장 인자 β, 형질전환 성장 인자 β1, 형질전환 성장 인자 β1.2, 형질전환 성장 인자 β2, 형질전환 성장 인자 β3, 형질전환 성장 인자 β5, 잠재적 형질전환 성장 인자 β1, 형질전환 성장 인자 β 결합 단백질 I, 형질전환 성장 인자 β 결합 단백질 II, 형질전환 성장 인자 β 결합 단백질 III, 흉선 기질 림포포이에틴 (TSLP), 종양 괴사 인자 수용체 유형 I, 종양 괴사 인자 수용체 유형 II, 우로키나아제-유형 플라스미노겐 활성자 수용체, 포스포리파아제-활성화 단백질 (PUP), 인슐린, 렉틴 리신, 프로락틴, 융모성 성선자극호르몬, 여포-자극 호르몬, 갑상선 자극 호르몬, 조직 플라스미노겐 활성자, IgG, IgE, IgM, IgA, 및 IgD, α-갈락토시다아제, β-갈락토시다아제, DNAse, 페투인, 황체형성 호르몬, 에스트로겐, 인슐린, 알부민, 리포단백질, 태아단백질, 트랜스페린, 트롬보포이에틴, 우로키나아제, 인테그린, 트롬빈, 렙틴, 휴미라(Humira) (안달리무맙), 프롤리아(Prolia) (데노수맙), 엔브렐(Enbrel) (에타너셉트), 표 1에서의 단백질, 또는 생물학적 활성 단편, 유도체 또는 이의 변이체. 또 다른 구체예에서, 치료학적 단백질은 FVIIa이다. 또 다른 구체예에서, 치료학적 단백질은 FVIII이다. 또 다른 구체예에서, 치료학적 단백질은 FIX이다.

[0038] 지방산 유도체를 제조하는 방법이 또한 본 명세서에서 고려된다. 구체예에서, 본 명세서에서 설명된 지방산 유도체를 제조하는 방법이 제공되며, 이는 하기 단계를 포함한다: a) 지방산 상의 ω-하이드록시기를 산화하여 지방산 상에 알데하이드기를 발생시키는 단계; 및 b) 활성 아미노옥시기를 포함한 수용성 연결자를 알데하이드기에 커플링시켜 안정한 옥심 결합을 형성하는 단계, 여기서 지방산 유도체는 수용성임. 한 가지 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 여기서 ω-하이드록시기는 하기로 구성된 군에서 선택되는 산화 시약에 의해 산화된다: 데스 마틴 퍼아이오디난 시약(Dess Martin periodinane reagent), 템포 시약(Tempo reagent), 옥살릴 클로라이드/DMSO, 테트라프로필암모늄퍼루테네이트 (TPAP)를 이용한 스원(Swern) 산화, 크롬 VI 시약, 가령 콜린스 시약(Collins reagent), 피리디니움 클로로 크로메이트(PCC), 및 피리디니움 디크로메이트. 또 다른 구체예에서, 산화 시약은 데스 마틴 퍼아이오디난이다.

[0039] 또 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 여기서 지방산은 포화된 지방산 또는 불포화된 지방산이다. 또 다른 구체예에서, 지방산은 포화된 지방산이다.

[0040] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 여기서 지방산은 분지형 사슬 지방산이다.

[0041] 또 다른 구체예에 따라서, 전술한 방법이 또한 제공되며 여기서 지방산은 홀수의 탄소수를 가진 합성 지방산을 포함하여, C10 내지 C24의 사슬 길이를 포함한다. 한 가지 구체예에서, 전술한 지방산 유도체가 제공되며 여기서 지방산은 C10, C12, C14, C16, C18, C20, C20, C22 및 C24로 구성된 군에서 선택되는 사슬 길이를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 지방산은 C14, C16 및 C18로 구성된 군에서 선택되는 사슬 길이를 갖는다. 또

다른 구체예에서, 지방산은 C13, C15 및 C17로 구성된 군에서 선택되는 사슬 길이를 갖는다.

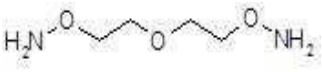
[0042] 또 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 여기서 수용성 연결자는 수용성 폴리머 및 적어도 하나의 아미노옥시기를 포함한다.

[0043] 수많은 수용성 폴리머가 전술한 방법에서 사용하기 위해 본 발명에서 고려된다. 한 가지 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 여기서 수용성 폴리머는 하기로 구성된 군에서 선택된다: 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 분지형 PEG, 폴리시알산 (PSA), 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록시에틸 전분 (HES), 탄수화물, 다당류, 플루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트, 데르마탄 설페이트, 전분, 덱스트란, 카르복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글리콜 (PAG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모르폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카르복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록실메틸에킬렌 하이드록시메틸포르말) (PHF), 및 2-메타아크릴로일옥시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC). 한 가지 구체예에서, 수용성 폴리머는 PEG이다.

[0044] 다양한 길이의 수용성 폴리머가 또한 고려된다. 한 가지 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 여기서 수용성 폴리머는 05, 07, 09, 011, 013 및 015로 구성된 군에서 선택되는 사슬 길이를 포함한다.

[0045] 또 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 여기서 수용성 연결자는 하기로 구성된 군에서 선택된다:

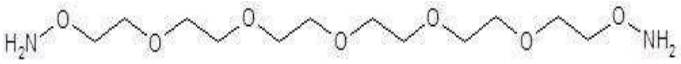
[0046] a) 하기 화학식의 3-옥사펜탄-1,5-디옥시아민:

[0047]  ;

[0048] b) 하기 화학식의 3,6,9-트리아옥사운데칸-1,11-디옥시아민:

[0049]  ;

[0050] c) 하기 화학식의 3,6,9,12,15-펜타옥사헵타데칸-1,17-디옥시아민:

[0051]  ; 및

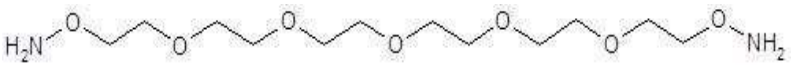
[0052] d) 하기 화학식의 3,6,9,12,15,18,21-헵타옥사트리코산-1,23-디옥시아민:

[0053]  .

[0054] 또 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 여기서 수용성 연결자는 하기 화학식의 3,6,9-트리아옥사운데칸-1,11-디옥시아민이다:

[0055]  .

[0056] 또 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 여기서 수용성 연결자는 하기 화학식의 3,6,9,12,15-펜타옥사헵타데칸-1,17-디옥시아민이다:

[0057]  .

[0058] 지방산 유도체를 만들기 위한 또 다른 방법이 본 명세서에서 고려된다. 한 가지 구체예에서, 전술한 지방산 유도체를 제조하는 방법이 제공되며 이는 하기 단계를 포함한다: a) 지방산 상의 카르복실기를 에스테르화하여 지방산 상에 에스테르를 발생시키는 단계; b) 단계 a)의 지방산 상의 메실기 도입에 의해 지방산 상의 ω-하이드록시기를 활성화하는 단계; 및 c) 단계 b)의 메실기를 치환시킴으로써 활성화 아미노옥시기를 포함한 수용성 연결자를 커플링시키고 그렇게 함으로써 안정한 옥시아민-메틸렌 결합을 형성하는 단계; 여기서 지방산 유도체는 수용성임.

[0059] 한 가지 구체예에서, 전술한 것이 제공되며 여기서 카르복실기는 아세틸 클로라이드, 산의 존재에서 메탄올, 산의 존재에서 에탄올, 디아조메탄, 및 메틸아이오다이드로 구성된 군에서 선택되는 에스테르화제에 의해 에스테르화된다. 또 다른 구체예에서, 에스테르화제는 아세틸 클로라이드이다.

[0060] 또 다른 구체예에서, 전술한 것이 제공되며 여기서 ω-하이드록시기는 메실 클로라이드, 토실 클로라이드 및 노실 클로라이드로 구성된 군에서 선택되는 활성화제에 의해 활성화된다. 한 가지 구체예에서, 활성화제는 메실 클로라이드이다.

[0061] 다양한 지방산이 전술한 방법에서 사용하기 위해 고려된다. 한 가지 구체예에서, 전술된 것이 제공되며 여기서 지방산은 포화된 지방산 또는 불포화된 지방산이다. 또 다른 구체예에서, 지방산은 포화된 지방산이다. 또 다른 구체예에서, 지방산은 분지형 사슬 지방산이다.

[0062] 또 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 여기서 지방산은 홀수의 탄소수를 가진 합성 지방산을 포함하여, C10 내지 C24의 사슬 길이를 포함한다. 한 가지 구체예에서, 전술한 지방산 유도체가 제공되며 여기서 지방산은 C10, C12, C14, C16, C18, C20, C20, C22 및 C24로 구성된 군에서 선택되는 사슬 길이를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 지방산은 C14, C16 및 C18로 구성된 군에서 선택되는 사슬 길이를 갖는다. 또 다른 구체예에서, 지방산은 C13, C15 및 C17로 구성된 군에서 선택되는 사슬 길이를 갖는다.

[0063] 다양한 수용성 폴리머가 또한 전술한 방법에서 사용하기 위해 고려된다. 한 가지 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 여기서 수용성 연결자는 수용성 폴리머 및 적어도 하나의 아미노옥시기를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 수용성 폴리머는 하기로 구성된 군에서 선택된다: 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 분지형 PEG, 폴리시알산 (PSA), 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록시에틸 전분 (HES), 탄수화물, 다당류, 플루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트, 데르마탄 설페이트, 전분, 덱스트란, 카르복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글리콜 (PAG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모르폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카르복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록실메틸에킬렌 하이드록시메틸포르말) (PHF), 및 2-메타아크릴로일옥시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC). 또 다른 구체예에서, 수용성 폴리머는 PEG이다.

[0064] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 여기서 수용성 폴리머는 03, 05, 07, 09, 011, 013 및 015로 구성된 군에서 선택되는 사슬 길이를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 수용성 연결자는 [0050]로 구성된 군에서 선택된다.

[0065] 접합된 단백질을 제공하는 방법이 또한 본 발명에서 고려된다. 한 구체예에서, 접합된 치료학적 단백질을 제조하는 방법이 제공되며 이는 접합을 허용하는 조건 하에 치료학적 단백질 상의 산화된 탄수화물 모이어티를 전술한 지방산 유도체 (또는 본 명세서에서 설명된 바와 같은 수용성 폴리머)와 접촉시키는 단계를 포함하고; 상기 탄수화물 모이어티는 나트륨 퍼아이오데이트 (NaIO4), 납 테트라아세테이트 (Pb(OAc)4) 및 칼륨 퍼루테네이트 (KRuO4)로 구성된 군에서 선택되는 산화제를 포함하는 완충액과 인큐베이션에 의해 산화되고; 여기서 옥심 결합은 지방산 유도체 상의 산화된 탄수화물 모이어티 및 활성 아미노옥시기 사이에서 형성되고; 그리고 여기서 상기 옥심 결합 형성은 o-아미노 벤조산, m-아미노 벤조산, p-아미노 벤조산, 설파닐산, o-아미노벤즈아미드, o-톨루이딘, m-톨루이딘, p-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, 및 p-아니시딘으로 구성된 군에서 선택되는 친핵성 촉매에 의해 촉매된다.

[0066] 또 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 여기서 치료학적 단백질이 하기로 구성된 군에서 선택된다: 인자 IX (FIX), 인자 VIII (FVIII), 인자 VIIa (FVIIa), 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF),ADAMTS 13 프로테아제, IL-1 알파, IL-1 베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, 집락 자극 인자-1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, 과립구 집락 자극 인자 (G-CSF), EPO, 인터페론-알파 (IFN-알파), 컨센서스 인터페론, IFN-베타, IFN-감마, IFN-오메가, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 알파, IL-33, 트롬보포이에틴 (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 1 (ANGPTL1), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 2 (ANGPTL2), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 3 (ANGPTL3), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 4 (ANGPTL4), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 5 (ANGPTL5), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 6 (ANGPTL6), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 7 (ANGPTL7), 비트로넥틴, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 안지오제닌, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 골 형성 단백질-1, 골 형성 단백질-2, 골 형성 단백질-3, 골 형성 단백질-4, 골 형성 단백질-5, 골 형성 단백질-6, 골 형성 단백질-7, 골 형성 단백질-8, 골 형성 단백질-9, 골 형성 단백질-10, 골 형성 단백질-11, 골 형성 단백질-

12, 골 형성 단백질-13, 골 형성 단백질-14, 골 형성 단백질-15, 골 형성 단백질 수용체 IA, 골 형성 단백질 수용체 IB, 골 형성 단백질 수용체 II, 뇌 유래 신경영양 인자, 카디오트로핀-1, 섬모 신경영양 인자, 섬모 신경영양 인자 수용체, 크립토, 크립틱, 사이토카인-유도 중성구 주화성 인자 1, 사이토카인-유도 중성구, 주화성 인자 2α, 사이토카인-유도 중성구 주화성 인자 2β, β 내피세포 성장 인자, 엔도텔린 1, 상피 성장 인자, 에피겐, 에피레귤린, 상피-유래 중성구 유인물질, 섬유아세포 성장 인자 4, 섬유아세포 성장 인자 5, 섬유아세포 성장 인자 6, 섬유아세포 성장 인자 7, 섬유아세포 성장 인자 8, 섬유아세포 성장 인자 8b, 섬유아세포 성장 인자 8c, 섬유아세포 성장 인자 9, 섬유아세포 성장 인자 10, 섬유아세포 성장 인자 11, 섬유아세포 성장 인자 12, 섬유아세포 성장 인자 13, 섬유아세포 성장 인자 16, 섬유아세포 성장 인자 17, 섬유아세포 성장 인자 19, 섬유아세포 성장 인자 20, 섬유아세포 성장 인자 21, 산성 섬유아세포 성장 인자, 염기성 섬유아세포 성장 인자, 신경교 세포주-유래 신경영양 인자 수용체 α1, 신경교 세포주-유래 신경영양 인자 수용체 α2, 성장 관련 단백질, 성장 관련 단백질 α, 성장 관련 단백질 β, 성장 관련 단백질 γ, 헤파린 결합 상피 성장 인자, 간세포 성장 인자, 간세포 성장 인자 수용체, 간암-유래 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자 I, 인슐린-유사 성장 인자 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 II, 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질, 케라틴세포 성장 인자, 백혈병 저해 인자, 백혈병 저해 인자 수용체 α, 신경 성장 인자 신경 성장 인자 수용체, 뉴로포이에틴,뉴트로핀-3, 뉴트로핀-4, 온코스타틴 M (OSM), 태반 성장 인자, 태반 성장 인자 2, 혈소판-유래 내피세포 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자 A 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 AA, 혈소판 유래 성장 인자 AB, 혈소판 유래 성장 인자 B 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 BB, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 α, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 β, 전-B 세포 성장 자극 인자, 줄기세포 인자 (SCF), 줄기세포 인자 수용체, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, 형질전환 성장 인자 α, 형질전환 성장 인자 β, 형질전환 성장 인자 β1, 형질전환 성장 인자 β1.2, 형질전환 성장 인자 β2, 형질전환 성장 인자 β3, 형질전환 성장 인자 β5, 잠재적 형질전환 성장 인자 β1, 형질전환 성장 인자 β 결합 단백질 I, 형질전환 성장 인자 β 결합 단백질 II, 형질전환 성장 인자 β 결합 단백질 III, 흉선 기질 림포포이에틴 (TSLP), 종양 괴사 인자 수용체 유형 I, 종양 괴사 인자 수용체 유형 II, 우로키나아제-유형 플라스미노겐 활성자 수용체, 포스포리파아제-활성화 단백질 (PUP), 인슐린, 렉틴 리신, 프로락틴, 융모성 성선자극호르몬, 여포-자극 호르몬, 갑상선 자극 호르몬, 조직 플라스미노겐 활성자, IgG, IgE, IgM, IgA, 및 IgD, α-갈락토시다아제, β-갈락토시다아제, DNAse, 페투인, 황체형성 호르몬, 에스트로겐, 인슐린, 알부민, 리포단백질, 태아단백질, 트랜스페린, 트롬보포이에틴, 우로키나아제, 인테그린, 트롬빈, 렙틴, 휴미라 (안달리무맙), 프롤리아 (데노수맙), 엔브렐 (에타너셉트), 또는 표 1에서의 단백질, 생물학적 활성 단편, 유도체 또는 이의 변이체.

[0067] 또 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 여기서 치료학적 단백질은 FVIIa이다. 또 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 여기서 치료학적 단백질은 FVIII이다. 또 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 여기서 치료학적 단백질은 FIX이다.

[0068] 또 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 여기서 산화제는 나트륨 퍼아이오데이트 (NaIO4)이다. 또 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 여기서 친핵성 촉매는 m-톨루이딘이다.

[0069] 또 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 이는 접합된 치료학적 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함한다.

[0070] 또 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며 여기서 지방산 유도체는 본 명세서에서 설명된 바와 같은 방법에 의해 제조된다.

[0071] 지방산 유도체를 제조하는 또 다른 방법이 본 발명에서 고려된다. 한 가지 구체예에서, 전술한 지방산 유도체를 제조하는 방법이 제공되며 이는 하기 단계를 포함한다: a) 지방산 상의 카르복실기를 에스테르화하여 지방산 상에 에스테르를 발생시키는 단계; 및 b) 활성 말레이미드기를 포함하는 수용성 연결자를 유리 설프하이드릴 (SH)기에 커플링시켜, 그렇게 함으로써 안정한 티오에테르 결합을 형성하는 단계; 여기서 지방산 유도체는 수용성임.

[0072] 또 다른 구체예에서, 전술한 지방산 유도체를 제조하는 방법이 제공되며 이는 하기 단계를 포함한다: a) 지방산 상의 카르복실기를 에스테르화하여 지방산 상에 에스테르를 발생시키는 단계; b) 단계 a)에서 기인한 지방산을 아지드 시약과 반응시켜, 그렇게 함으로써 상응하는 지방산 아지드를 생성하는 단계; c) 단계 b)의 지방산 아지드를 수소화하여 상응하는 지방산 아민을 생성하는 단계; 및 d) 활성 NHS기를 포함한 수용성 연결자를 유리 아민기에 커플링시켜, 그렇게 함으로써 안정한 결합을 형성하는 단계; 여기서 지방산 유도체는 수용성임.

[0073] **도면**

[0074] **도 1**은 수용성 연결자 3-옥사펜탄-1,5-디옥시아민의 합성을 나타낸다.

발명의 내용

[0075] **본 발명의 상세한 설명**

[0076] 치료학적 단백질의 약물학적 및 면역학적 특성은 화학적 변형 및 폴리머 화합물, 가령 본 발명에 따른 지방산 및 지방산 유도체와의 접합에 의해 향상될 수 있다.

[0077] 본 명세서에서 설명된 수용성 지방산 유도체의 첨가는 치료학적 단백질, 가령 혈액 응고 단백질 인자 IX (FIX), 인자 VIII (FVIII), 인자 VIIa (FVIIa), 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF) 또는 ADAMTS 13 프로테아제, 그리고 기타 공지된 단백질 또는 생물학적으로/치료학적으로 활성인 이의 단편의 특성을 향상시키는 한 가지 기법이다.

[0078] **치료학적 단백질**

[0079] 본 발명의 특정한 구체예에서, 전술한 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드는 다음 치료학적 단백질에 의해 예시화된다: 효소, 항원, 항체, 수용체, 혈액 응고 단백질, 성장 인자, 호르몬 및 리간드. 특정한 구체예에서, 치료학적 단백질은 혈액 응고 단백질, 가령 인자 IX (FIX), 인자 VIII (FVIII), 인자 VIIa (FVIIa), 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF) 또는 ADAMTS 13 프로테아제이다.

[0080] 특정한 구체예에서, 치료학적 단백질은 면역글로불린, 사이토카인 가령, IL-1 알파, IL-1 베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, 집락 자극 인자-1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, 과립구 집락 자극 인자 (G-CSF), EPO, 인터페론-알파 (IFN-알파), 컨센서스 인터페론, IFN-베타, IFN-감마, IFN-오메가, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 알파, IL-33, 트롬보포이에틴 (TPO), 안지오포이에틴, 예를 들면Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, 인간 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 ANGPTL1 내지 7, 비트로넥틴, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 안지오제닌, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 골 형성 단백질-1, 골 형성 단백질-2, 골 형성 단백질-3, 골 형성 단백질-4, 골 형성 단백질-5, 골 형성 단백질-6, 골 형성 단백질-7, 골 형성 단백질-8, 골 형성 단백질-9, 골 형성 단백질-10, 골 형성 단백질-11, 골 형성 단백질-12, 골 형성 단백질-13, 골 형성 단백질-14, 골 형성 단백질-15, 골 형성 단백질 수용체 IA, 골 형성 단백질 수용체 IB, 골 형성 단백질 수용체 II, 뇌 유래 신경영양 인자, 카디오트로핀-1, 섬모 신경영양 인자, 섬모 신경영양 인자 수용체, 크립토, 크립틱, 사이토카인-유도 중성구 주화성 인자 1, 사이토카인-유도 중성구, 주화성 인자 2α, 사이토카인-유도 중성구 주화성 인자 2β, β 내피세포 성장 인자, 엔도텔린 1, 상피 성장 인자, 에피겐, 에피레귤린, 상피-유래 중성구 유인물질, 섬유아세포 성장 인자 4, 섬유아세포 성장 인자 5, 섬유아세포 성장 인자 6, 섬유아세포 성장 인자 7, 섬유아세포 성장 인자 8, 섬유아세포 성장 인자 8b, 섬유아세포 성장 인자 8c, 섬유아세포 성장 인자 9, 섬유아세포 성장 인자 10, 섬유아세포 성장 인자 11, 섬유아세포 성장 인자 12, 섬유아세포 성장 인자 13, 섬유아세포 성장 인자 16, 섬유아세포 성장 인자 17, 섬유아세포 성장 인자 19, 섬유아세포 성장 인자 20, 섬유아세포 성장 인자 21, 산성 섬유아세포 성장 인자, 염기성 섬유아세포 성장 인자, 신경교 세포주-유래 신경영양 인자 수용체 α1, 신경교 세포주-유래 신경영양 인자 수용체 α2, 성장 관련 단백질, 성장 관련 단백질 , 성장 관련 단백질 β, 성장 관련 단백질 γ, 헤파린 결합 상피 성장 인자, 간세포 성장 인자, 간세포 성장 인자 수용체, 간암-유래 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자 I, 인슐린-유사 성장 인자 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 II, 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질, 케라틴세포 성장 인자, 백혈병 저해 인자, 백혈병 저해 인자 수용체 α, 신경 성장 인자 신경 성장 인자 수용체, 뉴로포이에틴, 뉴트로핀-3, 뉴트로핀-4, 온코스타틴 M (OSM), 태반 성장 인자, 태반 성장 인자 2, 혈소판-유래 내피세포 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자 A 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 AA, 혈소판 유래 성장 인자 AB, 혈소판 유래 성장 인자 B 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 BB, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 α, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 β, 전-B 세포 성장 자극 인자, 줄기세포 인자 (SCF), 줄기세포 인자 수용체, TNF0, TNF1, TNF2를 포함한 TNF, 형질전환 성장 인자 α, 형질전환 성장 인자 β, 형질전환 성장 인자 β1, 형질전환 성장 인자 β1.2, 형질전환 성장 인자 β2, 형질전환 성장 인자 β3, 형질전환 성장 인자 β5, 잠재적 형질전환 성장 인자 β1, 형질전환 성장 인자 β 결합 단백질 I, 형질전환 성장 인자 β 결합 단백질 II, 형질전환 성장 인자 β 결합 단백질 III, 흉선 기질 림포포이에틴 (TSLP), 종양 괴사 인자 수용체 유형 I, 종양 괴사 인자 수용체 유형 II, 우로키나아제-유형 플라스미노겐 활성자 수용체, 혈관 내피 성장 인자, 및 키메라 단백질 및 생

물학적으로 또는 면역학적으로 활성인 이의 단편이다.

[0081] 특정한 구체예에서, 치료학적 단백질은 알파-, 베타-, 및 감마-인터페론, 과립구 집락 자극 인자를 포함한 집락 자극 인자, 섬유아세포 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 포스포리파아제-활성화 단백질 (PUP), 인슐린, 식물 단백질, 가령 렉틴 및 리신, 종양 괴사 인자 및 관련된 대립형질, 종양 괴사 인자 수용체의 가용성 형태, 인터루킨 수용체 및 인터루킨 수용체의 가용성 형태, 성장 인자, 가령 조직 성장 인자, 가령 TGFα 또는 TGFβ 및 상피 성장 인자, 호르몬, 소마토메딘, 색소성 호르몬, 시상하부 방출 인자, 항이뇨 호르몬, 프로락틴, 융모성 성선자극호르몬, 여포-자극 호르몬, 갑상선 자극 호르몬, 조직 플라스미노겐 활성자, 및 면역글로불린, 가령 IgG, IgE, IgM, IgA, 및 IgD, 갈락토시다아제, α-갈락토시다아제, β-갈락토시다아제, DNAse, 페투인, 황체형성 호르몬, 에스트로겐, 코르코스테로이드, 인슐린, 알부민, 리포단백질, 태아단백질, 트랜스페린, 트롬보포이에틴, 우로키나아제, DNase, 인테그린, 트롬빈, 조혈 성장 인자, 렙틴, 글리코시다아제, 휴미라 (안달리무맙), 프롤리아 (데노수맙), 엔브렐 (에타너셉트), 및 이의 단편, 또는 상기 언급된 단백질 또는 이의 단편 중 하나를 포함하는 임의의 융합 단백질이다. 전술한 단백질뿐만 아니라, 다음 표 1은 본 발명에 의해 고려되는 치료학적 단백질을 제공한다:

표 1

여포 수지상 세포 관련 펩티드	안지오텐신-전환 효소	인터루킨-1 패밀리 멤버 6	허스타틴
더모카인	황트롬빈-III	전립선 및 고환 발현 단백질 2	류신-풍부 반복-함유 단백질 28
분비 프리즐드-관련 단백질 1	아포리포단백질 B-100	그룹 XIIA 분비성 포스포리파아제 A2	LRRN4 C-말단-유사 단백질
엑토디스플라신-A	아포리포단백질 D	콜라겐 알파-3(V) 사슬	Ly6/PLAUR 도메인-함유 단백질 2
분비 프리즐드-관련 단백질 2	아포리포단백질 E	알파-2-마크로글로불린-유사 단백질 1	막관통 단백질 81
레시스틴	베타-1,4-갈락토실트랜스퍼라아제 1	디마토폰틴	미엘린 단백질 제로-유사 단백질 3
오스테오폰틴	골 형성 단백질 7	연골-연관 단백질	단백질 배판(notum) 효모로그
분비 프리즐드-관련 단백질 5	보체 C1q 서브성분 서브유닛 B	데저트 헤지호그 단백질	UDP-글루쿠로노실트랜스퍼라아제 3A2
분비 프리즐드-관련 단백질 4	C4b-결합 단백질 알파 사슬	세포외 매트릭스 단백질 2	프로토카드헤린 알파-1
분비 인단백질 24	칼레티쿨린	위 내재 인자	포스포리파아제 D4
글리피칸-6	코르티코스테로이드-결합 글로불린	인터루킨-33	레티놀 탈수소효소 10
분비 프리즐드-관련 단백질 3	카르복시펩티다아제 A1	골 형성 단백질 2	시알산-결합 Ig-유사 렉틴 14
C-C 모티프 케모카인 4	카르복시펩티다아제 A2	골 형성 단백질 6	막관통 단백질 161A
멜라닌세포 단백질 Pmel 17	에오탁신	비특성화 단백질 KIAA0564	막관통 단백질 161B
분비 Ly-6/uPAR-관련 단백질 1	C-C 모티프 케모카인 13	세베루스	막관통 단백질 182
베타-마이크로세미노단백질	C-C 모티프 케모카인 18	탄수화물 설포트랜스퍼라아제 8	단백질 FAM24B
글리피칸-4	C-C 모티프 케모카인 20	컨택틴-연관 단백질-유사 3	막관통 단백질 62
종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 15	골수세포 2 에서 발현된 트리거링 수용체	그룹 XIIB 분비성 포스포리파아제 A2-유사 단백질	주요 촉진자 슈퍼패밀리 도메인-함유 단백질 4
레시스틴-유사 베타	C-C 모티프 케모카인 2	코르티콜베린	UDP-글루쿠로노실트랜스퍼라아제 2A3
종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 12	형질전환 성장 인자-베타-유도 단백질 Ig-h3	트롬보스폰딘 모티프 19 를 가진 디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제	지원성 에나멜아세포-연관 단백질 '
SPARC	CD40 리간드	UPF0556 단백질 C19orf10	신경분비 단백질 VGF
글리피칸-5	코르네오데스모신	C-X-C 모티프 케모카인 3	분비 인단백질 2, 24kDa
전방 구배 단백질 2 호모로그	보체 인자 D	시스타틴-M	단백질 FAM150B
단백질 캐노피 호모로그 2	크로모그라닌-A	디펜신-5	성장/분화 인자 9
글리피칸-1	콜라겐 알파-1(I) 사슬	디펜신-6	클리스테린-유사 단백질 1
폰 빌레브란트 인자 A 도메인-함유 단백질 2	디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제도메인-함유 단백질 18	트롬보스폰딘 모티프 18 을 가진 디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제	막관통 및 면역글로불린 도메인-함유 단백질 2
WNT1-유도성-신호전달 경로 단백질 1	시스테인-풍부 분비성 단백질 LCCL 도메인-함유 1	트롬보스폰딘 모티프 3 을 가진 디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제	C-유형 렉틴 도메인-함유 단백질 UNQ5810/PRO19627
C-C 모티프 케모카인 1	콜라겐 알파-4(IV) 사슬	Dickkopf-관련 단백질 4	부고환-특이적 리포칼린-10
SPARC-관련 모듈러 칼슘-결합 단백질 2	케라틴세포 분화-연관 단백질	트롬보스폰딘 모티프 5 를 가진 디스인테그린	트롬보스폰딘 모티프 8 을 가진

[0082]

[0083]

		및 메탈로프로테이나아제	디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제
C-유형 렉틴 도메인 패밀리 11 멤버 A	보체 C4-B	포유류 에페디민-관련 단백질 1	부고환-특이적 리포칼린-8
분비 Ly-6/uPAR-관련 단백질 2	콜라겐 알파-2(V) 사슬	피브릴린-3	염기성 프롤린-풍부 펩티드 P-E
글리피칸-3	보체 C5	페투인-B	추정상 비특성화 단백질 C10orf99
분비 및 막관통 단백질 1	콜라겐 알파-1(VII) 사슬	섬유아세포 성장 인자 6	비특성화 단백질 C17orf77
고환-발현 서열 264 단백질	보체 성분 C7	케라틴세포 성장 인자	아릴아세타미드 탈아세틸라아제-유사 2
글리피칸-2	보체 성분 C8 베타 사슬	성장/분화 인자 8	부고환-특이적 리포칼린-12
세린 프로테아제 23	보체 성분 C8 감마 사슬	위 억제 폴리펩티드	B 흑색종 항원 2
39S 리보솜 단백질 L55, 미토콘드리아성	콜라겐 알파-1(XV) 사슬	글리코단백질 호르몬 베타-5	B 흑색종 항원 3
단백질 NipSnap 호모로그 3A	콜라겐 알파-1(XVI) 사슬	그랜자임 M	소 정장(seminal plasma) 단백질 호모로그 1
피브로넥틴	콜라겐 알파-1(XVIII) 사슬	가스트린-방출 펩티드	보체 C1q-유사 단백질 3
뉴데신	콜라겐 알파-1(XIX) 사슬	세린 프로테아제 HTRA1	UPF0565 단백질 C2orf69
섬유아세포 성장 인자 수용체 2	연골 올리고머 매트릭스 단백질	인터페론 알파-4	UPF0669 단백질 C6orf120
탄산무수화효소 6	C-반응성 단백질	인터페론 알파-5	콜리파아제-유사 단백질 C6orf127
악성 뇌종양 1 단백질내 삭제	과립구 집락-자극 인자	인터페론 알파-7	비특성화 단백질 C7orf69
SPARC-관련 모듈러 칼슘-결합 단백질 1	과립구-대식세포 집락-자극 인자	트롬보스폰딘 모티프 7을 가진 디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제	혈소판-유래 성장 인자 수용체-유사 단백질
아밀로이드 베타 A4 단백질	단백질 CYR61	면역글로불린 슈퍼패밀리 멤버 10	콘드로이드헤린-유사 단백질
종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 6	보체 성분 수용체 1-유사 단백질	21 kDa 의 프로테아제-연관 도메인-함유 단백질	추정상 비특성화 단백질 UNQ6490/PRO21339
감마-아미노뷰티르산 유형 B 수용체 서브유닛 1	줄기세포 성장 인자; 림프구 분비 C-유형 렉틴	앱하이드로라아제 도메인-함유 단백질 FAM108A1	추정상 비특성화 단백질 UNQ6493/PRO21345
프로-뉴레귤린-1, 막-결합 이소폼	CMP-N-아세틸뉴라미네이트-베타-갈락토스아미드-알파-2,3-시알릴트랜스퍼라아제	트롬보스폰딘 모티프 9를 가진 디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제	추정상 비특성화 단백질 UNQ5815/PRO19632
글리코단백질 호르몬 알파-2	디펩티딜 펩티다아제 4	인터루킨-9 수용체	시스타틴-A
막 메탈로-엔도펩티다아제-유사 1	덴틴 시알로포스포단백질	인터루킨-9	펩티다아제 저해제 R3HDML
Fc 수용체-유사 A	엔도텔린-1	인히빈 베타 B 사슬	시스타틴-9
C-C 모티프 케모카인 4-유사	에프린-B1	세린 프로테아제 저해제 카잘-유형 2	DAN 도메인 패밀리 멤버 5
상피 디스코이딘도메인-함유수용체 1	표피-특이적 세린 프로테아제-유사 단백질	BMP-결합 내피 조절 단백질	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질-유사 1
뮤신-1	EMILIN-1	케라틴세포-연관 단백질 2	부고환 정자-결합 단백질 1
혈관 내피 성장 인자 A	엔도글라스민	라미닌 서브유닛 알파-1	엘라핀
피불린-1	에프린 유형-A 수용체 3	백혈구 세포-유래 케모탁신-2	단백질 FAM55A
프로락틴 수용체	에프린 유형-B 수용체 6	위 트리아실글리세롤 리파아제	성장/분화 인자 6
프로단백질 전환효소 서브틸리신/켁신	글리코실트랜스퍼라아제 1 도메인-함유 단백질	류신-풍부 반복 및 칼포닌 상동 도메인-함유	글루코오스-프럭토오스 산화환원효소

[0084]

유형 6	1	단백질 3	도메인-함유 단백질 1
CD209 항원	응고 인자 X	췌장 리파아제-관련 단백질 2	에리트로포이에틴
콜라겐 알파-2(XI) 사슬	응고 인자 VIII	부고환-특이적 알파-만노시다아제	글루타티온 퍼옥시다아제 6
과립구-대식세포 집락-자극 인자 수용체 서브유닛 알파	보체 C1q 종양 괴사 인자-관련 단백질 7	피브로넥틴 유형 III 도메인-함유 단백질 7	비특성화 단백질 UNQ511/PRO1026
엘라스틴	피브릴린-2	미세섬유성-연관 단백질 5	베타-디펜신 128
인터루킨-15 수용체 서브유닛 알파	알파-2-HS-글리코단백질	뮬러리안-저해 인자	인터루킨-31
미디카인	섬유아세포 성장 인자 10	메트릭스 메탈로프로테이나아제-21	인터루킨-34
인테그린 알파-7	피브로겐 알파 사슬	메트릭스 메탈로프로테이나아제-17	혈청 칼리크레인-유사 단백질 4
뮤신-4	피브로겐 베타 사슬	메트릭스 메탈로프로테이나아제-20	부고환-특이적 리포칼린-9
펩티딜-글리신 알파-아미드화 모노옥시게나아제	긴 구개, 폐 및 코 상피 암종-연관 단백질 1	N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스퍼라아제서브유닛 감마	cDNA FLJ60957, 분비 프리즐드-관련 단백질 4 와 매우 유사함
아포리포단백질 A-I	가스트린	멀티머린-2	리파아제 멤버 M
프로테오글리칸 4	글리코단백질 호르몬 알파 사슬	프로모틸린	CLECSF12
종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 25	N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스퍼라아제서브유닛 알파/베타	FRAS1-관련 세포외 매트릭스 단백질 3	추정상 불활성 그룹 IIC 분비성 포스포리파아제 A2
아트락틴	그랜자임 A	단백질 키나아제 C-결합 단백질 NELL1	세린 프로테아제 MPN2
전립선-연관 마이크로세미노단백질	간세포 성장 인자-유사 단백질	단백질 키나아제 C-결합 단백질 NELL2	네트린-5
알파-아밀라아제 1	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 1	뉴로트립신	NHL 반복-함유 단백질 3
뇌-유래 신경영양 인자	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 2	뉴로세르핀	올팩토메딘-유사 단백질 2B
C-유형 렉틴 도메인 패밀리 4 멤버 M	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 4	니도겐-2	오보키마아제-2
과립구 집락-자극 인자 수용체	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 10D	앱하이드로라아제 도메인-함유 단백질 FAM108B1	추정상 비특성화 단백질 UNQ3029/PRO9830
인슐린-유사 성장 인자 II	인터페론 알파-1/13	뉴트로핀-4	오보키마아제-1
암태아성 항원-관련 세포 부착 분자 1	인터페론-유도 헬리카아제 C 도메인-함유 단백질 1	부고환 분비성 글루타티온 퍼옥시다아제	추정상 임신-특이적 베타-1-글리코단백질 7
C-유형 렉틴 도메인 패밀리 7 멤버 A	인터페론 알파-2	그룹 10 분비성 포스포리파아제 A2	오보스타틴 호모로그 2
CMRF35-유사 분자 1	인터페론 베타	그룹 IID 분비성 포스포리파아제 A2	식욕증진 뉴로펩티드 QRFP
콜린 수송체-유사 단백질 4	인터페론 감마	락토페르옥시다아제	림프구 항원 6K
폐 계면활성제-연관 단백질 A1	인슐린-유사 성장 인자 IB	PMP-22 와 관련된 p53 아폽토시스 효과기	전립선 및 고환 발현 단백질 1
스페르민 옥시다아제	인디언 헤지호그 단백질	태반-특이적 단백질 1	추정상 포스포리파아제 B-유사 1
CMP-N-아세틸뉴라미네이트-베타-1,4-갈락토시드 알파-2,3-시알릴트랜스퍼라아제	신경 세포 부착 분자 L1-유사 단백질	39 잔기의 결절누두 펩티드	추정상 비특성화 단백질 FLJ42147
칼리크레인-8	인터루킨-13	프로라르긴	오토겔린
조직-유형 플라스미노겐 활성자	인터루킨-2	세크레토그라닌-2	리보뉴클레아제 8
퍼옥시좀 N(1)-아세틸-스페르민/스페르미딘	키모트립신-유사 엘라스타아제 패밀리	엔도뉴클레아제 도메인-함유 1 단백질	핵공 복합체-상호작용 단백질-유사 2

[0085]

옥시다아제	멤버 2A		
가능한 팔미토일트랜스퍼라아제 ZDHHC4	인히빈 베타 A 사슬	세마포린-3B	전활성체 폴리펩티드-유사 1
콜레스테릴 에스테르 전달 단백질	췌장 분비성 트립신 저해제	소마토스타틴	단백질 스핀스터 호모로그 2
HLA 클래스 I 조직적합성 항원, A-2 알파 사슬	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 21	탈수소효소/환원효소 SDR 패밀리 멤버 4-유사 2	폰 빌레브란트 인자 C 도메인-함유 단백질 2-유사
콜라겐 알파-1(II) 사슬	인터-알파-트립신 저해제 중쇄 H1	트랜스코발라민-1	우로텐신-2B
프로-인터루킨-16	인터-알파-트립신 저해제 중쇄 H2	트레포일 인자 2	테트라스파닌-18
렙틴 수용체	인터-알파-트립신 저해제 중쇄 H3	테스티칸-1	UPF0514 막 단백질 FAM159A
데코린	전립선-특이적 항원	혈청 파라옥소나아제/락토나아제 3	라테린
간질세포-유래 인자 1	칼리크레인-4	톨로이드-유사 단백질 2	메틸트랜스퍼라아제-유사 단백질 7B
테나신	혈청 칼리크레인	트립신-2	단백질 TEX261
디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제도메인-함유 단백질 12	칼슘-활성 클로라이드 채널 조절자 4	RING 핑거 및 SPRY 도메인-함유 단백질 1	알킬화 DNA 수선 단백질 alkB 호모로그 7
모티프 13 을 가진 디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제	살균/투과성-증가 단백질-유사 1	칼슘-결합 및 이중나선(coiled-coil) 도메인-함유 단백질 1	막관통 emp24 도메인-함유 단백질 6
T-세포 표면 글리코단백질 CD8 알파 사슬	렙틴	단백질 Wnt-2	XK-관련 단백질 5
EGFR-공동증폭 및 과발현 단백질	트롬보스폰딘 모티프 4 를 가진 디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제	액토뉴클레오시드 트리포스페이트 디포스포하이드로라아제 8	추정상 V-세트 및 면역글로불린 도메인-함유 단백질 7
오토파지-관련 단백질 16-1	간 트리아실글리세롤 리파아제	단백질 Wnt-8b	인슐린 성장 인자-유사 패밀리 멤버 3
유방암 항-에스트로겐 저항 단백질 3	림프구 항원 6 복합체 유전자자리 단백질 G6c	UDP-GlcNAc:베타 Gal 베타-1,3-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제 4	핵공 복합체-상호작용 단백질-유사 1
카드헤린-23	호산구 리소포스포리파아제	EMI 도메인-함유 단백질 1	분비 인단백질 1
대식세포 집락-자극 인자 1	루트로핀 서브유닛 베타	비특성화 단백질 C6orf15	콜라겐 알파-5(VI) 사슬
엽산 수용체 알파	미세섬유성-연관 단백질 1	콜렉틴-10	B 흑색종 항원 5
저-밀도 리포단백질 수용체-관련 단백질 8	중뇌 성상세포-유래 신경영양 인자	긴-사슬-지방-산--CoA 리가아제 ACSBG2	WAP 4-디설파이드 중심 도메인 단백질 10A
E3 유비퀴틴-단백질 리파아제 LRSAM1	매트릭스 Gla 단백질	종양형성단백질-유도 전사물 3 단백질	UPF0369 단백질 C6orf57
신경 세포 부착 분자 1	72 kDa 유형 IV 콜라게나아제	펩티다아제 저해제 15	추정상 비특성화 단백질 C10orf31
뉴로리긴-4, X-연결	스트로멜리신-1	프롤린-풍부 산성 단백질 1	추정상 비특성화 단백질 C11orf45
네트린-G1	중성구 콜라게나아제	우로코르틴	비특성화 단백질 C12orf28
GPI 트랜스아미다아제 성분 PIG-T	메소텔린	트립신-X3 (EC 3.4.21.4)	비특성화 단백질 C17orf67
키트(Kit) 리간드	뮤신-5AC	HHIP-유사 단백질 2	베타-디펜신 121
발작 6-유사 단백질	뮤신-6	프랙탈카인	베타-디펜신 130
SLAM 패밀리 멤버 7	노린	단백질 Wnt-11	히스티딘 트리아드 뉴클레오티드-결합 단백질 2
종양 괴사 인자	옥시토신-뉴로피신 1	단백질 Wnt-7a	아팰린

[0080]

우로모듈린	베타-신경 성장 인자	FCH 및 이중 SH3 도메인 단백질 1	태반-특이적 단백질 9
종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 13	종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 18	간암-유래 성장 인자-관련 단백질 2	간세포 암종-연관 단백질 TD26
단백질 CREG1	뉴트로핀-3	인터루킨-12 서브유닛 알파	페르세핀
EGF-유사 도메인-함유 단백질 8	혈소판-유래 성장 인자 서브유닛 A	UPF0577 단백질 KIAA1324	조절 내분비-특이적 단백질 18
아미노아실 tRNA 합성효소 복합체-상호작용 다기능성 단백질 1	포스포판토테노일시스테인 탈카르복실화효소	보체 C1q 종양 괴사 인자-관련 단백질 9	보체 C1q 종양 괴사 인자-관련 단백질 8
ADAMTS-유사 단백질 4	플라스미노겐 활성자 저해제 1	뮤신-17	골 형성 단백질 8A
응고 인자 XI	플라스미노겐 활성자 저해제 2	리소좀 단백질 NCU-G1	단백질 WFDC13
인터루킨-22 수용체 서브유닛 알파-2	프로콜라겐 C-엔도펩티다아제 인핸서 1	프롤릴 4-하이드록실라아제 서브유닛 알파-3	단백질 Wnt-8a
변형된 표피 자가조절 인자 1 효모로그	막관통 및 유비퀴틴-유사 도메인-함유 단백질 2	펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이성질화효소 SDCCAG10	Ig-유사 도메인-함유 단백질 ENSP00000270642
프로스타글란딘-H2 D-이성질화효소	단백질 디설파이드-이성질화효소	펩티다아제 저해제 16	앱하이드로라아제 도메인-함유 단백질 15
알파-1-항트립신	색소 상피-유래 인자	폴리오바이러스 수용체-관련 단백질 4	리보뉴클레아제-유사 단백질 9
알파-1-항키모트립신	펩신 A	용질 담체 패밀리 22 멤버 15	비특성화 단백질 C2orf66
아실-CoA-결합 단백질	가스트릭신	GPI 이노시톨-디아실라아제	비특성화 단백질 C17orf99
보체 인자 B	소닉 헤지호그 단백질	막관통 단백질 43	단백질 FAM150A
융모성성선자극호르몬 서브유닛 베타	펩티도글리칸 인식 단백질 I-알파	안지오포이에틴-관련 단백질 2	태반-특이적 1-유사 단백질
베르시칸 중심 단백질	비글리칸	안지오포이에틴-관련 단백질 6	비특성화 단백질 C18orf20
상피 성장 인자 수용체	프로락틴-유도성 단백질	아릴설파타아제 K	베타-디펜신 110
엑토-NOX 디설파이드-티올 교환체 2	혈소판 인자 4	아우구린	뉴리틴-유사 단백질
히알루로니다아제-1	플라스미노겐	뇌-특이적 세린 프로테아제 4	히스티딘-풍부 카르복실 말단 단백질 1
인터루킨-1 수용체 길항제 단백질	혈청 파라옥소나아제/아릴에스테라아제 1	DBH-유사 모노옥시게나아제 단백질 1	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 2 멤버 A
인터루킨-6 수용체 서브유닛 베타	알칼리 포스포타아제, 태반 I 유형	비특성화 단백질 C1orf56	류신-풍부 반복-함유 단백질 70
인터루킨-1 수용체-유사 1	펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이성질화효소 B	세레벨린-3	세르핀 A13
인슐린	골수 프로테오글리칸	세레벨린-4	BTB/POZ 도메인-함유 단백질 17
글리코델린	염기성 타액 프롤린-풍부 단백질 1	콜리파아제-유사 단백질 C6orf126	비특성화 단백질 C12orf53
부갑산성 호르몬-관련 단백질	폐 계면활성제-연관 단백질 C	비특성화 단백질 C11orf83	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 9 멤버 A
누림	부갑산성 호르몬	비특성화 단백질 C16orf89	보체 C1q-유사 단백질 4
프롤릴 4-하이드록실라아제 서브유닛 알파-2	혈청 아밀로이드 P-성분	카르복시펩티다아제-유사 단백질 X2	CMRF35-유사 분자 4
CD276 항원	세크레토그라닌-1	시스타틴-9-유사	단백질 FAM151B
EGF-유사 도메인 단백질 1을 가진 시스테인-풍부	기저막-특이적 헤파란 설페이트 프로테오글리칸 중심 단백질	탈수소효소/환원효소 SDR 패밀리 멤버 13	앱하이드로라아제 도메인-함유 단백질 FAM108A2/A3
CUB 및 스시(Sushi) 도메인-함유 단백질 1	황류코프로테이나아제	베타-디펜신 123	오스테오크린
피콜린-2	스타빌린-1	베타-디펜신 132	막관통 프로테아제, 세린 11E2
Fc 수용체-유사 단백질 5	세포외 슈퍼옥사이드 디스무타아제[Cu-Zn]	사이토카인-유사 단백질 1	막관통 단백질 14E

[0087]

단백질 GPR89	소마토트로핀	Dickkopf-관련 단백질 2	막관통 단백질 207
접합 부착 분자 A	세르핀 B5	Dickkopf-유사 단백질 1	TOMM20-유사 단백질 1
류신-풍부 반복-함유 단백질 8A	스푸딘-1	부고환 분비성 단백질 E3-베타	비특성화 단백질 C3orf41
다수의 이노시톨 폴리포스페이트 포스파타아제 1	염색체 단백질 3 의 구조 유지	EGF-유사 반복 및 디스코이딘 I-유사 도메인-함유 단백질 3	하악선 안드로겐-조절 단백질 3A
뉴로필린-1	신탁신-1A	단백질 FAM55D	B 흑색종 항원 1
플렉신-A4	테트라넥틴	섬유아세포 성장 인자 17	불활성 카르복실에스테라아제 4
플렉신-B1	형질전환 성장 인자 베타-1	섬유아세포 성장 인자 22	네개-관절 박스 단백질 1
페리오스틴	타이로글로불린	섬유아세포 성장 인자-결합 단백질 2	단백질 HSN2
단백질 RIC-3	메탈로프로테이나아제저해제 1	성장/분화 인자 3	휴마닌
SLIT 및 NTRK-유사 단백질 2	메탈로프로테이나아제저해제 2	GLIPR1-유사 단백질 1	키엘린/크로딘-유사 단백질
설파타아제-변형 인자 1	메탈로프로테이나아제저해제 3	세린 프로테아제 저해제 카잘-유형 6	UPF0624 단백질 C6orf186
설파타아제-변형 인자 2	우로키나아제-유형 플라스미노겐 활성자	인터루킨-17B	추정상 뉴로피브로민 1-유사 단백질 4/6
막관통 프로테아제, 세린 6	락토트랜스페린	인터루킨-17C	퍼옥시다신-유사 단백질
림포톡신-알파	트립신-1	인터루킨-17D	SCO-스푼딘
종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 10B	하악선 안드로겐-조절 단백질 3B	히알루로난 및 프로테오글리칸 연결 단백질 3	추정상 비특성화 단백질 UNQ9165/PRO28630
우로키나아제 플라스미노겐 활성자 표면 수용체	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 1A	난황막 외층 단백질 1 호모로그	칼슘-활성 클로라이드 채널 조절자패밀리 멤버 3
V-세트 도메인-함유 T-세포 활성화 저해제 1	혈관 내피 성장 인자 수용체 1	융모성성선자극호르몬 서브유닛 베타 변이체 1	가능한 세린 프로테아제 UNQ9391/PRO34284
글루카곤	비타민 D-결합 단백질	리소자임-유사 단백질 1	비특성화 단백질 C4orf26
N-아세틸무라모일-L-알라닌 아미다아제	비트로넥틴	메트릭스 메탈로프로테이나아제-28	비특성화 단백질 C4orf40
설프히드릴 옥시다아제 1	폰 빌레브란트 인자	네프로넥틴	비특성화 단백질 C5orf55
탈수소효소/환원효소 SDR 패밀리 멤버 4	림프구 항원 6 복합체 유전자자리 단백질 G5c	WAP 4-디설파이드 중심 도메인단백질 12	추정상 대식세포-자극 단백질 MSTP9
인터루킨-18-결합 단백질	징크-알파-2-글리코단백질	올팩토메딘-유사 단백질 1	비특성화 단백질 C15orf61
IRRE-유사 단백질 2 의 Kin	비특성화 단백질 C14orf93	올팩토메딘-유사 단백질 2A	키모트립시노겐 B2
골수-연관 분화 마커	레티노스키신	세린 프로테아제 27	베타-디펜신 108A
코르딘	알파-1,3-만노실트랜스퍼라아제 ALG2	세크레토글로빈 패밀리 3A 멤버 2	베타-디펜신 111
1-아실-sn-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라아제감마	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 11, 멤버 A, 이소폼 CRA_b	트롬보스폰딘 모티프 2 를 가진 디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제	추정상 V-세트 및 면역글로불린 도메인-함유 단백질 6
상급 글리코실화 최종 산물-특이적 수용체	주요 쪽진자 슈퍼패밀리 도메인-함유 단백질 7	디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제도메인-함유 단백질 28	세린 프로테아제 저해제 카잘-유형 5-유사 3
NLR 패밀리 CARD 도메인-함유 단백질 4	류신-풍부 반복 막관통 뉴런 단백질 1	살균/투과성-증가 단백질-유사 2	추정상 세린 프로테아제 저해제 카잘-유형 5-유사 2
프로-뉴레귤린-2, 막-결합 이소폼	NADH 탈수소효소 [유비퀴논] 1 베타	산 스핑고미엘리나아제-유사	탈수소효소/환원효소 SDR 패밀리 멤버

[8800]

	서브복합체 서브유닛 11, 미토콘드리아성	포스포디에스테라아제 3b	7C
정자-연관 항원 11A	UPF0546 막 단백질 C1orf91	세린 프로테아제 저해제 카잘-유형 7	베타-디펜신 131
난모세포-분비 단백질 1 호모로그	탄산무수화효소-관련 단백질 10	뉴렉소필린-4	베타-디펜신 134
혈청 알부민	콜레시스토키닌	단백질 Wnt-9b	베타-디펜신 136
코클린(Cochlin)	코다닌-1	자이모겐 과립 단백질 16 호모로그 B	베타-디펜신 116
혈장 프로테아제 C1 저해제	비특성화 단백질 C6orf89	세마포린-3D	단백질 FAM132A
인터루킨-7 수용체 서브유닛 알파	콘드로이틴 설페이트 글루쿠로닐트랜스퍼라아제	아포리포단백질 L4	단백질 FAM132B
인터-알파-트립신 저해제 중쇄 H5	키티나아제 도메인-함유 단백질 1	막관통 프로테아제, 세린 11D	베타-디펜신 115
혈소판-유래 성장 인자 D	막관통 단백질 C9orf7	스크래피-반응 단백질 1	베타-디펜신 114
단백질 S100-A7	CMRF35-유사 분자 9	추정상 아넥신 A2-유사 단백질	세린 프로테아제 저해제 카잘-유형 9
시알산-결합 Ig-유사 렉틴 10	사이토크롬 P450 2S1	골 형성 단백질 10	리파아제 멤버 N
세뇨관간질 신염 항원-유사	크럼스(Crumbs) 단백질 호모로그 3	세크레토그라닌-3	췌장 리파아제-관련 단백질 3
종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 13B	탈수소효소/환원효소 SDR 패밀리 멤버 7	보체 C1q 종양 괴사 인자-관련 단백질 4	고환, 전립선 및 태반-발현 단백질
긴-사슬-지방-산--CoA 리가아제 5	단백질 ENED	비특성화 단백질 C1orf54	뉴로메딘-S
클라우딘-14	보체 인자 H-관련 단백질 4	카르복시펩티다아제 A6	뉴로펩티드 S
류신-풍부 반복-함유 단백질 20	류신-풍부 반복 LGI 패밀리 멤버 3	C-C 모티프 케모카인 19	뉴런 펜트락신-유사 단백질 C16orf38
인터루킨-1 패밀리 멤버 7	글리오메딘	C-C 모티프 케모카인 25	오톨린-1
림프구 항원 6 복합체 유전자자리 단백질 G5b	글리세로포스포디에스테르 포스포디에스테라아제 도메인-함유 단백질 5	키모트립신-유사 엘라스타아제 패밀리 멤버 2B	철/징크 자주색 산 포스파타아제-유사 단백질
아세틸콜린에스테라아제	가능한 G-단백질 커플링된 수용체 113	단백질 CEI	오보스타틴 호모로그 1
아멜로게닌, X 이소폼	가능한 G-단백질 커플링된 수용체 114	비특성화 단백질 C6orf1	플라스미노겐-관련 단백질 A
안지오제닌	글리세롤-3-포스포페이트 아실트랜스퍼라아제 4	비특성화 단백질 C7orf34	폴리세라아제-3
탄저균 독소 수용체 2	그렘린-1	케라틴세포-연관 단백질 3	추정상 펩티드 YY-2
아넥신 A2	칼륨 채널 서브패밀리 K 멤버 17	비특성화 단백질 C9orf47	추정상 펩티드 YY-3
아포리포단백질 C-III	KDEL 모티프-함유 단백질 2	콜라겐 알파-1(VIII) 사슬	리보뉴클레아제-유사 단백질 10
아포리포단백질 L1	레일린	비특성화 단백질 C18orf54	리보뉴클레아제-유사 단백질 12
보체 C1q 서브성분 서브유닛 A	류신-풍부 반복-함유 단백질 8B	시스타틴-유사 1	리보뉴클레아제-유사 단백질 13
보체 C1q 서브성분 서브유닛 C	류신-풍부 반복-함유 단백질 8D	C2 도메인-함유 단백질 2	세르핀 A11
칼시토닌	시알산-결합 Ig-유사 렉틴 6	DDRGK 도메인-함유 단백질 1	쿠니츠-유형 프로테아제 저해제 4
용해성 칼슘-활성 뉴클레오티다아제 1	임신-특이적 베타-1-글리코단백질 2	단백질 FAM55C	메테오린-유사 단백질
C-C 모티프 케모카인 15	Ly6/PLAUR 도메인-함유 단백질 1	콜라겐 알파-1(XXVI) 사슬	추정상 고환 세린 프로테아제 2
CD97 항원 (	Ly6/PLAUR 도메인-함유 단백질 5	단백질 FAM19A2	베타-디펜신 112
컨택틴-4	MLN64 N-말단 도메인 호모로그	단백질 FAM5B	비특성화 단백질 FLJ37543
보체 C2	대식세포 이동 저해 인자	섬유아세포 성장 인자 5	단백질 FAM24A

[0089]

콜라겐 알파-6(IV) 사슬	2-아실글리세롤 O-아실트랜스퍼라아제 3	가능한 세린 프로테아제 HTRA3	분비 프리즐드-관련 단백질 4
콜라겐 알파-2(VI) 사슬	미토콘드리아성 담체 호모로그 1	인터루킨-1 패밀리 멤버 8	보체 C1q-유사 단백질 2
콜라겐 알파-1(XI) 사슬	아포리포단백질 L6	세린 프로테아제 저해제 카잘-유형 4	추정상 비특성화 단백질 C17orf69
크럼스 호모로그 1	프로토카드헤린 알파-6	오토스피랄린	추정상 시스타틴-13
시스타틴-C	프로토카드헤린 감마-A12	간-발현 항미생물 펩티드 2	베타-디펜신 109
중성구 디펜신 1	전압-개폐 수소 채널 1	리실 옥시다아제 호모로그 1	베타-디펜신 113
엔도텔린-3	모두-트랜스-레티놀 13,14-환원효소	리실 옥시다아제 호모로그 2	베타-디펜신 135
저 친화도 면역글로불린 엡실론 Fc 수용체	미세소관 역학 단백질 2 의 조절자	긴 구개, 폐 및 코 상피 암종-연관 단백질 4	펩티다아제 S1 도메인-함유 단백질 LOC136242
섬유아세포 성장 인자 수용체 3	R-스폰딘-4	리소자임 g-유사 단백질 2	성장/분화 인자 7
섬유아세포 성장 인자 수용체 4	긴-사슬 지방산 수송 단백질 3	엔도뮤신	IgA-유도 단백질 호모로그
성장 억제-특이적 단백질 6	소낭-트래픽킹(trafficking) 단백질 SEC22c	뉴로펩티드 B	추정상 리포칼린 1-유사 단백질 1
성장 호르몬 수용체	클라우딘-1	키네신-유사 단백질 KIF7	추정상 세린 프로테아제 29
이작용 UDP-N-아세틸글루코사민 2-에피머라아제/N-아세틸만노사민 키나아제	류신-풍부 반복 및 면역글로불린-유사 도메인 단백질 3	백혈구-연관 면역글로불린-유사 수용체 2	추정상 스캐빈저 수용체 시스테인-풍부 도메인-함유 단백질 LOC619207
면역글로불린 슈퍼패밀리 멤버 8	SLAM 패밀리 멤버 9	칼슘-의존 포스포리파아제 A2	세크레토글로빈-유사 단백질
인터루킨-4 수용체 알파 사슬	트랜스티레틴	프로아폽토틱 카파아제 적응 단백질	추정상 스테레오실린-유사 단백질
칼리크레인-14	세린/트레오닌-단백질 키나아제 32B	인테그린 베타-유사 단백질 1	인슐린 성장 인자-유사 패밀리 멤버 2
칼리크레인-6	혈소판-유래 성장 인자 서브유닛 B	톨로이드-유사 단백질 1	KIR2DL4
라미닌 서브유닛 베타-3	노긴	쿠니츠-유형 프로테아제 저해제 3	추정상 징크-알파-2-글리코단백질-유사 1
류실-시스티닐 아미노펩티다아제	트립타아제 알파-1	단백질 TMEM155	인슐린 성장 인자-유사 패밀리 멤버 4
만난-결합 렉틴 세린 프로테아제 1	테트라트리코펩티드 반복 단백질 14	프로살루신	비특성화 단백질 C2orf72
만난-결합 렉틴 세린 프로테아제 2	XTP3-전사측진 유전자 B 단백질	단백질 암니온레스(amnionless)	복제 개시-유사 단백질
중성구 젤라티나아제-연관 리포칼린	팔미토일트랜스퍼라아제 ZDHHC15	단백질 WFDC10B	전립선 및 고환 발현 단백질 3
뉴로펩티드 Y	투명대 정자-결합 단백질 3	WAP 4-디설파이드 중심 도메인 단백질 8	B 흑색종 항원 4
아그레칸 중심 단백질	류신-풍부 반복-함유 단백질 39	단백질 Wnt-5b	추정상 비특성화 단백질 C1orf191
폐 계면활성제-연관 단백질 B	췌장 트리아실글리세롤 리파아제	단백질 Wnt-7b	베타-디펜신 108B-유사
폴리오바이러스 수용체-관련 단백질 1	막관통 단백질 139	투명대-결합 단백질 2	비특성화 단백질 FLJ90687
레닌	백혈병 저해 인자	SH3 도메인-결합 단백질 5-유사	분비 프리즐드-관련 단백질 2
리보뉴클레아제 췌장	갈렉틴-1	지방세포 부착 분자	염기성 프롤린-풍부 펩티드 IB-1
세메노겔린-1	C-C 모티프 케모카인 21	비특성화 단백질 C12orf59	섬유아세포 성장 인자 16
신호전달 림프구 활성화 분자	CD5 항원-유사	아포리포단백질 A-I-결합 단백질	세린 프로테아제 저해제 카잘-유형 8
조직 인자 경로 저해제	탄수화물 설포트랜스퍼라아제 9	클라우딘-17	비특성화 단백질 KIAA0495
어셔린	리포다당류-결합 단백질	불활성 카스파아제-12	혈소판 염기성 단백질-유사 2

[0600]

섬유아세포 성장 인자 23	시스테인-풍부 윤동 뉴런 1 단백질	비특성화 단백질 C7orf58	세르핀 E3
인터루킨-23 서브유닛 알파	결합 조직 성장 인자	콜라겐 알파-1(XXVIII) 사슬	CR1 수용체
부고환 분비성 단백질 E1	단백질 아이즈 셧(eyes shut) 호모로그	덴틴 매트릭스 단백질 4	분비 인단백질 1
ADAMTS-유사 단백질 1	뮤신-유사 단백질 1	비특성화 단백질 C16orf48	스트레스 유발 분비 단백질 1
케모카인-유사 인자	섬유아세포 성장 인자 19	카르복실에스테라아제 3	단백질 Wnt
EGF-유사 도메인-함유 단백질 7	폴리스타틴-관련 단백질 3	단백질 FAM20B	단백질 Wnt (단편)
텍토닉-1	헤지호그-상호작용 단백질	GPN-루프 GTPase 3	추정상 세린 프로테아제 LOC138652
막관통 단백질 25	인터루킨-17 수용체 B	GRAM 도메인-함유 단백질 1B	TOM1
UDP-GalNAc:베타-1,3-N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라아제 1	FXYD 도메인-함유이온 수송 조절자 5	포스파티딜리노시톨 글리칸 고정 생합성 클래스 U 단백질	추정상 비특성화 단백질 FLJ46089
인터루킨-15 (IL-15)	내피 리파아제	인터루킨-27 서브유닛 알파	추정상 비특성화 단백질 C1orf134
다수의 상피 성장 인자-유사 도메인 11	EGF-함유 피불린-유사 세포외 매트릭스 단백질 2	프로-뉴레귤린-4, 막-결합 이소폼	UDP-GlcNAc:베타 Gal 베타-1,3-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제 9
뮤신 및 카드헤린-유사 단백질	오토라플린	류신-풍부 반복 뉴런 단백질 3	비특성화 단백질 C11orf44
리보뉴클레아제 4	그룹 3 분비성 포스포리파아제 A2	NMDA 수용체-조절 단백질 2	비특성화 단백질 C12orf73
SH2 도메인-함유 단백질 3C	그룹 XV 포스포리파아제 A2	NADH-사이토크롬 b5 환원효소 1	추정상 시스타틴-9-유사 2
CMP-N-아세틸뉴라미네이트-베타-갈락토스아미드-알파-2,3-시알릴트랜스퍼라아제	종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 14	파킨슨 병 7 도메인-함유 단백질 1	추정상 엡하이드로라아제 도메인-함유 단백질 FAM108A5
막관통 단백질 9	플렉신-A2	FK506-결합 단백질 11	베타-디펜신 133
WAP 4-디설파이드 중심 도메인 단백질 2	파필린	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 12 멤버 B	피브로신-1
아데노신 A3 수용체	프로키네티신-1	용질 담체 패밀리 35 멤버 F5	가능한 엽산 수용체 델타
감마-세크레타아제 서브유닛 APH-1A	리보뉴클레아제 7	시알산-결합 Ig-유사 렉틴 12	RPE-스폰딘
바시긴(Basigin)	쿠니츠-유형 프로테아제 저해제 1	단백질 FAM19A3	NPIP-유사 단백질 ENSP00000346774
바큘로바이러스 IAP 반복-함유 단백질 7	스폰딘-2	WD 반복-함유 단백질 82	추정상 고환-특이적 프리온 단백질
칼루메닌	테스티칸-2	지방세포 인핸서-결합 단백질 1	프롤린-풍부 단백질 1
알파-S1-카세인	불활성 세린 프로테아제 PAMR1	ADAMTS-유사 단백질 3	추정상 비특성화 단백질 FP248
사이클린-L1	토르신-2A	이중나선 도메인-함유 단백질 80	UPF0670 단백질 C8orf55
보체 인자 H	바소히빈-1	엑토-NOX 디설파이드-티올 교환체 1	추정상 징크-알파-2-글리코단백질-유사 2
용모성 성장촉진유선자극호르몬 호르몬	바소린	신경 성장 조절자 1	SPARC 단백질
콕삭키바이러스 및 아데노바이러스 수용체	자일로실트랜스퍼라아제 1	상호광수용체(Interphotoreceptor) 매트릭스 프로테오글리칸 1	오토페트린-1
엑토뉴클레오티드 피로포스파타아제/포스포디에스테라아제 패밀리 멤버 2	엑토뉴클레오티드 피로포스파타아제/포스포디에스테라아제 패밀리 멤버 6	cDNA FLJ36603 fis, 클론 TRACH2015180, 분비 프리즐드-관련 단백질 2과 매우 유사함	cDNA FLJ55667, 분비 단백질과 매우 유사함, 산성 및 시스테인에서 풍부

[0091]

ERO1-유사 단백질 알파	온코스타틴-M	리파아제 멤버 H	리파아제 멤버 K
응고 인자 IX	데를린-1	뮤신-19 (MUC-19)	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 18 멤버 C
저 친화도 면역글로불린 감마 Fc 영역 수용체 III-B	HERV-FRD_6p24.1 프로바이러스 원형의 Env 폴리단백질	건선 감수성 1 후보 유전자 2 단백질	추정상 비특성화 단백질 UNQ6125/PRO20090
피콜린-3	프로스타신	통합 막 단백질 2A	보체 C3
Fc 수용체-유사 단백질 2	막관통 프로테아제, 세린 11E	소낭 수송 단백질 SFT2B	콜라겐 알파-2(IV) 사슬
류신-풍부 반복 막관통 단백질 FLRT3	HLA 클래스 I 조직적합성 항원, Cw-16 알파 사슬	폰 빌레브란트 인자 A 도메인-함유 단백질 3A	비특성화 단백질 UNQ6126/PRO20091
겔솔린	Wnt 저해 인자 1	단백질 시사-2 호모로그	세르핀-유사 단백질 HMSD
그래뉼리신	C-유형 나트륨이뇨 펩티드	신호 펩티다아제 복합체 서브유닛 3	전립선 및 고환 발현 단백질 4
막관통 글리코단백질 NMB	안지오포이에틴-2	CD164 시알로뮤신-유사 2 단백질	콜라겐 알파-1(XXII) 사슬
그래뉼린스	데옥시리보뉴클레아제 감마	카드헤린-16	추정상 비특성화 단백질 C13orf28
헤파라나아제	카르복시펩티다아제 A5	카드헤린-19	시스타틴-S
Ig mu 사슬 C 영역	C-C 모티프 케모카인 14	세레벨린-2	R-스폰딘-1
인터루킨-1 알파	인터루킨-5	막관통 단백질 C3orf1	C8orf2
인터루킨-31 수용체 A	인터루킨-10	정자 적도 부분 단백질 1	착취제-결합 단백질 2a
접합 부착 분자 B	C-X-C 모티프 케모카인 2	비특성화 단백질 C6orf72	오피오르핀
리포칼린-1	C-X-C 모티프 케모카인 5	비특성화 단백질 C11orf24	신장 안드로겐-조절 단백질
류신-풍부 반복-함유 G-단백질 커플링된 수용체 6	트롬보스폰딘 모티프 6을 가진 디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제	아실-CoA 합성효소 패밀리 멤버 2, 미토콘드리아성	추정상 비특성화 단백질 UNQ5830/PRO19650/PRO19816
잠재-형질전환 성장 인자 베타-결합 단백질 1	폴리펩티드 N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라아제 1	가능한 UDP-당 수송체 단백질 SLC35A5	추정상 비특성화 단백질 UNQ6975/PRO21958
마트릴린-3	피블린-2	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 1 멤버 A	타키키닌-3
미엘린 단백질 제로-유사 단백질 1	피콜린-1	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 3 멤버 A	분비 인단백질 1
뉴로비친-유사 단백질 2	SL 사이토카인	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 4 멤버 E	스클레로스틴
니카스트린	폴리스타틴	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 4 멤버 G	ADAMTS-유사 단백질 2
ADP-리보오스 피로포스파타아제, 미토콘드리아성	FRAS1-관련 세포외 매트릭스 단백질 1	가능한 양이온-수송 ATPase 13A4	스캐빈저 수용체 시스테인-풍부 도메인-함유 단백질 LOC284297
프로토카드헤린-15	에나멜린	UPF0480 단백질 C15orf24	트립타아제 베타-1
태반 성장 인자	히알루로난 및 프로테오글리칸 연결 단백질 1	투명대 정자-결합 단백질 4	트립타아제 델타
단백질 O-연결-만노오스 베타-1,2-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제 1	백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀리 A 멤버 3	세포질 세망 상주(resident) 단백질 ERp27	추정상 묘안 증후군 임계 영역 단백질 9
가능한 하이드로라아제 PNKD	인터루킨-17F	막관통 단백질 C16orf54	플렉신 도메인-함유 단백질 1
플레이오트로핀	인터루킨-1 수용체 부속 단백질	사이토크롬 P450 4F12	MC51L-53L-54L 호모로그 (단편)
폴리오바이러스 수용체	세린 프로테아제 저해제 카잘-유형 5	사이토크롬 P450 4X1	COBW-유사 태반 I 단백질 (단편)

[0092]

레티쿨론-4 수용체	칼리크레인-15	사이토크롬 P450 4Z1	사이토카인 수용체-유사 인자 2
혈청 아밀로이드 A 단백질	인터페론 알파-14	단백질 CREG2	베타-디펜신 103
성 호르몬-결합 글로불린	임신-특이적 베타-1-글리코단백질 4	DnaJ 호모로그 서브패밀리 B 멤버 9	베타-디펜신 106
SLAM 패밀리 멤버 6	콜라게나아제 3	디펩티다아제 3	히알루로니다아제-3
근형질막-연관 단백질	메트릭스 메탈로프로테이나아제-16	막 단백질 FAM174A	인터루킨-28 수용체 알파 사슬
스시, 폰 빌레브란트 인자 유형 A, EGF 및 펜트락신 도메인-함유 단백질 1	뇌하수체 아데닐산 고리화효소-활성화 폴리펩티드	티오레독신 도메인-함유 단백질 15	글리코실트랜스퍼라아제 54 도메인-함유 단백질
타이록신-결합 글로불린	프로키네티신-2	단백질 FAM19A4	코르딘-유사 단백질 1
막관통 및 이중나선 도메인-함유 단백질 1	잠재-형질전환 성장 인자 베타-결합 단백질 3	아데노신 모노포스페이트-단백질 트랜스퍼라아제 FICD	추정상 비특성화 단백질 UNQ9370/PRO34162
막관통 프로테아제, 세린 3	소마톨리베린	프레닐시스테인 옥시다아제-유사	네트린 수용체 UNC5B
종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 10C	트롬보스폰딘 유형-1 도메인-함유 단백질 1	피타노일-CoA 하이드록실라아제-상호작용 단백질-유사	섬유아세포 성장 인자 수용체 FGFR-1 분비 형태 단백질 (단편)
종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 11B	G 패치 및 FHA 도메인 1 을 가진 혈관신생 인자	FXYD 도메인-함유이온 수송 조절자 4	비특성화 단백질 ENSP00000244321
세로트랜스페린	TGF-베타 수용체 유형 III	성장/분화 인자 11	ECE2
트립타아제 베타-2	타이로트로핀 서브유닛 베타	대뇌 도파민 신경영양 인자	EPA6
단백질 YIPF5	비특성화 단백질 C19orf36	GPN-루프 GTPase 2	추정상 용해성 인터루킨 18 수용체 1
소낭-연관 막 단백질-연관 단백질 B/C	보체 C1q 종양 괴사 인자-관련 단백질 2	성장 호르몬-유도성 막관통 단백질	추정상 엡하이드로라아제 도메인-함유 단백질 FAM108A6
cDNA, FLJ96669, 호모 사피엔스 분비 단백질과 매우 유사함, 산성, 시스테인-풍부 (오스테오넥틴)(SPARC), mRNA	엑토뉴클레오티드 피로포스파타아제/포스포디에스테라아제 패밀리 멤버 5	글리세로포스포디에스테르 포스포디에스테라아제 도메인-함유 단백질 2	추정상 V-세트 및 면역글로불린 도메인-함유-유사 단백질 ENSP00000303034
cDNA FLJ77519, 호모 사피엔스 분비 프리즐드 관련 단백질과 매우 유사함, mRNA	폴리펩티드 N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라아제-유사 단백질 2	WAP, 카잘, 면역글로불린, 쿠니츠 및 NTR 도메인-함유 단백질 1	B 세포 이동 항원 전사물 변이체 4 (종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 17)
T-세포 분화 항원 CD6	슬릿(Slit) 호모로그 1 단백질	KDEL 모티프-함유 단백질 1	UPF0672 단백질 C3orf58
피카추린	성장 호르몬 변이체	아디포필린	메틸티오리보오스-1-포스페이트 이성질화효소
피브로겐-유사 단백질 1	안지오포이에틴-관련 단백질 3	락타아제-유사 단백질	17-베타 하이드록시스테로이드 탈수소효소 13
인터루킨-32	안지오포이에틴-관련 단백질 7	콘드로모듈린-1	아미노펩티다아제 B
마트릴린-4	엑토-ADP-리보실트랜스퍼라아제 5	콜라겐 알파-6(VI) 사슬	뎀시딘
정자-연관 항원 11B	탄산무수화효소-관련 단백질 11	류신-풍부 반복-함유 단백질 33	메테오린
응고 인자 XII	가능한 리보뉴클레아제 11	MANSC 도메인-함유 단백질 1	메틸트랜스퍼라아제-유사 단백질 7A

[0093]

헵시딘	가능한 카르복시펩티다아제 X1	리포칼린-15	NL3
클로토	단백질 FAM3D	아릴설파타아제 I	N-아세틸트랜스퍼라아제 15
세르글리신	C-X-C 모티프 케모카인 14	중배엽 발달 후보자 2	에프린-A4
토모레귤린-2	베타-디펜신 127	Dickkopf-관련 단백질 1	단백질 Plunc
코르딘-유사 단백질 2	베타-디펜신 129	포도칸	칼리크레인-11
종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 6B	시스테인-풍부 분비성 단백질 LCCL 도메인-함유 2	피브로넥틴 유형 III 도메인-함유 단백질 1	WNT1 유도 분비 단백질 1 스플라이스 변이체 x (단편)
UPF0414 막관통 단백질 C20orf30	섬유아세포 성장 인자 21	뉴로트리민	인터루킨-1 패밀리 멤버 10
C-유형 렉틴 도메인 패밀리 4 멤버 C	혈장 알파-L-푸코시다아제	후각 수용체 10W1	PLA2G2D
UPF0317 단백질 C14orf159, 미토콘드리아성	가스트로카인-1	단백질 PARM-1	프로테오글리칸 3
네트린-G2	가스트로카인-2	PDZ 도메인-함유 단백질 2	인슐린-유사 펩티드 INSL5
메탈로환원효소 STEAP2	글루타티온 퍼옥시다아제 7	프로에피레귤린	올팩토메딘-유사 단백질 3
스시 도메인-함유 단백질 4	HHIP-유사 단백질 1	다낭성 신장 질병 단백질 1-유사 1	세포외 글리코단백질 라크리틴
단백질 YIF1B	인터페론 카파	WLPL514	레티놀 탈수소효소 13
아포리포단백질 M	아포리포단백질 C-I	메트릭스 메탈로프로테이나아제-26	중성구 디펜신 3
C4b-결합 단백질 베타 사슬	프로콜라겐 C-엔도펩티다아제 인헨서 2	RELT-유사 단백질 2	GLGQ5807
T-세포 표면 글리코단백질 CD8 베타 사슬	좌-우 결정 인자 1	용질 담체 패밀리 35 멤버 E3	TUFT1
C-C 모티프 케모카인 3-유사 1	류신-풍부 반복 LGI 패밀리 멤버 4	징크 수송체 ZIP9	DRLV8200
섬유아세포 성장 인자 8	BRCA1-A 복합체 서브유닛 아브락사스	노엘린-2	IDLW5808
시알로뮤신 중심 단백질 24	류신 지퍼 단백질 2	발작 6-유사 단백질 2	UBAP2
세포예정사 1 리간드 2	뉴렉소필린-3	세마포린-3A	C1q/TNF-관련 단백질 8
분비 및 막관통 1	오스테오모듈린	세마포린-4C	KIR2DL4 (단편)
보체 C1q 종양 괴사 인자-관련 단백질 6	카잘-유형 세린 프로테아제 저해제 도메인-함유 단백질 1	앱하이드로라아제 도메인-함유 단백질 14A	케모카인-유사 인자 슈퍼패밀리 2 전사물 변이체 2
EGF-유사 모듈-함유 뮤신-유사 호르몬 수용체-유사 3	정자 첨체 막-연관 단백질 3	안키린 반복 도메인-함유 단백질 36	케라틴세포 연관 막관통 단백질 1
노엘린-3	세크레토글로빈 패밀리 3A 멤버 1	단백질 시사-4	GKGM353
착취제-결합 단백질 2b	츠쿠신 (Tsukushin)	뉴로메딘-U	MATL2963
우로텐신-2	클라우딘-2 (SP82)	노달(Nodal) 호모로그	NINP6167
비트린	보체 인자 H-관련 단백질 2	시냅토기린-2	POM121-유사
WNT1-유도성-신호전달 경로 단백질 3	면역글로불린 슈퍼패밀리 함유 류신-풍부 반복 단백질	뇌-특이적 혈관형성 저해제 1-연관 단백질 2-유사 단백질 2	RTFV9368 (SLE-의존 상향조절 1)
cDNA FLJ75759, 호모 사피엔스 폴리스타틴-유사 3 (분비 글리코단백질) (FSTL3)과 매우 유사함, mRNA	류신-풍부 반복 및 면역글로불린-유사 도메인-함유 노고(nogo) 수용체-상호작용 단백질 1	이중나선 도메인-함유 단백질 104	류신-풍부 반복 및 면역글로불린-유사 도메인-함유노고 수용체-상호작용 단백질 4

[0094]

안지오텐신-전환 효소 2	IRRE-유사 단백질 3의 종류	막관통 4 L6 패밀리 멤버 20	KCNQ2
아디포넥틴	조혈 세포 신호 변환기	막관통 단백질 107	ELCV5929
안지오포이에틴-관련 단백질 4	폴리트로핀 서브유닛 베타	막관통 단백질 143	KVVM3106
아포리포단백질 A-V	흑색종 저해 활성도 단백질 3	막관통 단백질 178	ISPF6484
아스포린	류신-풍부 반복-함유 단백질 4	막관통 단백질 205	LKHP9428
삼균 투과성-증가 단백질	징크 수송체 5	막관통 단백질 41A	VNFT9373
CUB 도메인-함유 단백질 1	류신-풍부 반복 뉴런 단백질 1	막관통 단백질 50A	ACAH3104
연골 중간층 단백질 1	정단 엔도솜 글리코단백질	막관통 단백질 50B	RVLA1944
베타-Ala-His 디펩티다아제	혈청 아밀로이드 A-4 단백질	인터루킨-28B	Wpep3002
콜라겐 알파-1(V) 사슬	프로베타셀룰린	뉴런 펜트락신-2	ZDHHC11
콜라겐 알파-1(XXV) 사슬	베타-1,4-갈락토실트랜스퍼라아제 7	콜렉트린	AGLW2560
에스트라디올 17-베타-탈수소효소 11	3-하이드록시부티레이트 탈수소효소 유형 2	막관통 단백질 92	TSSP3028
DnaJ 호모로그 서브패밀리 C 멤버 10	C1GALT1-특이적 샤페론 1	막관통 단백질 95	RFVG5814
EGF-유사 도메인-함유 단백질 6	베타-카세인	막관통 단백질 9B	SHSS3124
응고 인자 XIII A 사슬	카파-카세인	가능한 카르복시펩티다아제 PM20D1	MMP19
글루코오스-6-포스페이트 이성질화효소	막관통 단백질 C2orf18	테트라스파닌-12	GSQS6193
식욕-조절 호르몬	카르복시펩티다아제 N 촉매 사슬	테트라스파닌-13	VGPW2523
인터루킨-12 서브유닛 베타	CD320 항원	테트라스파닌-15	LMNE6487
인터루킨-22	콘드로이틴 설페이트 생성효소 1	UPF0513 막관통 단백질	ALLA2487
인텔렉틴-1	콘드로이틴 설페이트 생성효소 2	미토콘드리아성 비커플링 단백질 4	GALI1870
류신-풍부 신경교종-불활성 단백질 1	CMRF35-유사 분자 7	플리세라아제-2	FRSS1829
림프구 항원 96	단백질 캐노피 호모로그 3	가능한 팔미토일트랜스퍼라아제 ZDHHC24	MRSS6228
매트릴리신	짧은-사슬 탈수소효소/환원효소 3	투명대 정자-결합 단백질 1	GRPR5811
뮤신-20	델타-유사 단백질 4	투명대 정자-결합 단백질 2	AVLL5809
프로단백질 전환효소 서브틸리신/켁신 유형 9	델타 및 노치(Notch)-유사 상피 성장 인자-관련수용체	보존된 올리고머 골지 복합체 서브유닛 7	CR1 C3b/C4b 수용체 SCR9 (또는 16) C-말단 엑손 SCR = 쇼트 컨센서스 리피트(short consensus repeat)
펩티도글리칸 인식 단백질	돌리콜 키나아제	아디포넥틴 수용체 단백질 2	PIKR2786
인터페론-유도 17 kDa 단백질	엔도텔린-전환 효소-유사 1	인히빈 베타 C 사슬	S100 칼슘 결합 단백질 A7-유사 3
단백질 Wnt-4	통합 막 단백질 2B	브로린	GTWW5826 (LP5085 단백질)
동종이식편 염증 인자 1-유사	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 5	세마포린-3C	KTIS8219 (HCG2020043)
아르마딜로 반복-함유 X-연관 단백질 3	내피 세포-선택성 부착 분자	헤파란 설페이트 글루코사민 3-O-설포트랜스퍼라아제 2	히알루로난 및 프로테오글리칸 연결 단백질 4
콘드로이틴 설페이트 N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라아제 1	신호 펩티드, CUB 및 EGF-유사 도메인-함유 단백질 1	렙틴 수용체 중복 전사물-유사 1	마이크로노벨

[0095]

키토트리오시다아제-1	보체 인자 H-관련 단백질 3	SPARC-유사 단백질 1	SAMK3000
클라우딘 도메인-함유 단백질 1	프로레락신 H1	피불린-7	VFLL3057
에틀린-2	폴리스타틴-관련 단백질 1	단백질 HEG 호모로그 1	CVWG5837
글리코실트랜스퍼라아제 8 도메인-함유 단백질 1	글로보시드 알파-1,3-N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라아제 1	피브로겐 C 도메인-함유 단백질 1	VGSA5840
골지 막 단백질 1	감마-글루타밀 하이드로라아제	포스포리파아제 A1 멤버 A	GHPS3125
가능한 G-단백질 커플링된 수용체 125	카드헤린-24	염기성 타액 프롤린-풍부 단백질 2	GRTR3118
인터루킨-20 수용체 알파 사슬	글리세롤-3-포스포페이트 아실트랜스퍼라아제 3	정자형성-연관 단백질 6	PAMP6501
갈렉틴-7	G-단백질 커플링된 수용체 56	스시 반복-함유 단백질 SRPX2	LTLL9335
NKG2D 리간드 4	히알루로난-결합 단백질 2	뒤틀린 낭배형성 단백질 호모로그 1	VCEW9374
L-아미노-산 옥시다아제	프로헤파린-결합 EGF-유사 성장 인자	토르신-1B	AHPA9419
프롤릴 3-하이드록실라아제 1	히스티딘-풍부 글리코단백질	단백질 Wnt-5a	MDHV1887
GPI 에탄올아민 포스페이트 트랜스퍼라아제 2	탄수화물 설포트랜스퍼라아제 14	아크로신-결합 단백질	HSAL5836
GPI 에탄올아민 포스페이트 트랜스퍼라아제 3	인터루킨-20 수용체 베타 사슬	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 18 멤버 B	LHLC1946
칼슘-결합 미토콘드리아성 담체 단백질 SCaMC-2 (작은 칼슘-결합 미토콘드리아성 담체 단백질 2)	엑토뉴클레오티드 피로포스파타아제/포스포디에스테라아제 패밀리 멤버 3	리소좀-연관 막관통 단백질 4A	긴 구개, 폐 및 코 상피 암종-연관 단백질 3 (리간드-결합 단백질 RYA3)
폐 계면활성제-연관 단백질 A2	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 7	세마포린-3E	LPPA601
스플라이싱 인자, 아르기닌/세린-풍부 16	칼리스타틴	아멜로블라스틴	PINK1
알파-N-아세틸갈락토사미니드 알파-2,6-시알릴트랜스퍼라아제 6	피브로넥틴 유형 III 도메인-함유 단백질 3B	주요 촉진자 슈퍼패밀리 도메인-함유 단백질 5	SERH2790
단일 Ig IL-1-관련수용체	백혈병 저해 인자 수용체	안지오포이에틴-1	FLFF9364
텍토닉-3	Lin-7 호모로그 B	안지오포이에틴-4	아펠린
종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 11	티오레독신-관련막관통 단백질 1	다수의 상피 성장 인자-유사 도메인 9	GLSH6409
종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 19	디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제도메인-함유 단백질 32	산 스핑고미엘리나아제-유사 포스포디에스테라아제 3a	SFVP2550
팔미토일트랜스퍼라아제 ZDHHC9	Ly6/PLAUR 도메인-함유 단백질 3	ADAMTS-유사 단백질 5	RRLF9220
피불린-5	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 14 멤버 A	스펙신	PTML5838
단백질 Z-의존 프로테아제 저해제	단백질 코니숀 호모로그	추정상 트립신-6	VLGN1945
알파-2-마크로글로불린	단백질 FAM151A	원-발암유전자 단백질 Wnt-1	AVPC1948
아고우티-관련 단백질	FK506-결합 단백질 14	골 형성 단백질 3b	AWQG2491
췌장 알파-아밀라아제	뉴로펠린 및 톨로이드-유사 단백질 2	골 형성 단백질 5	PSVL6168
나트륨이뇨 펩티드 B	프로토카드헤린 베타-13	골 형성 단백질 8B	LCII3035
심방 나트륨이뇨 인자	프레널시스테인 옥시다아제 1	단백질 FAM26D	PPRR6495
중성 세라미다아제	페플린	C1q-관련인자	RLSC6348

베타-2-마이크로글로불린	펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이성질화효소-유사 1	WAP 4-디설파이드 중심 도메인 단백질 1	CSRP2BP
골 형성 단백질 4	전립선 줄기세포 항원	세레벨린-1	GLLV3061
비오티니다아제	단백질 패치 호모로그 2	카르복시펩티다아제 O	GWSI6489
스캐빈저 수용체 시스테인-풍부 유형 1 단백질 M130	키토비오실디포스포돌리콜 베타-만노실트랜스퍼라아제	미엘린 단백질 제로-유사 단백질 2 (상피 V-유사 항원 1)	cDNA FLJ53955, 분비 프리즐드-관련 단백질 4 와 매우 유사함
카르복시펩티다아제 B2	단백질 sel-1 호모로그 1	세린 프로테아제 1-유사 단백질 1	PPIF
카르복시펩티다아제 Z	ProSAAS	이중나선 도메인-함유 단백질 70	VSSW1971
C-C 모티프 케모카인 5	시알산-결합 Ig-유사 렉틴 9	C-C 모티프 케모카인 28	KLIA6249
C-C 모티프 케모카인 7	SLIT 및 NTRK-유사 단백질 1	비특성화 단백질 C4orf29	ALLW1950
C-C 모티프 케모카인 8	스타테린	CUB 도메인-함유 단백질 2	GVEI466
CD59 글리코단백질	테스티신	트렘(Trem)-유사 전사물 4 단백질	ESFI5812
보체 인자 I	막관통 채널-유사 단백질 5	비특성화 단백질 C6orf58	GNNC2999
클러스테린	막관통 프로테아제, 세린 4	콘드로어드헤린	AAGG6488
콜라겐 알파-2(I) 사슬	전이-억제자 KiSS-1	연골 중간층 단백질 2	HHSL751
콜라겐 알파-1(III) 사슬	섬(Islet) 아밀로이드 폴리펩티드	비특성화 단백질 C10orf25	베타-디펜신 108B
콜라겐 알파-1(IV) 사슬	트렘-유사 전사물 2 단백질	이스민(Isthmin)-1	베타-디펜신 118
콜라겐 알파-3(IV) 사슬	티오레독신 도메인-함유 단백질 12	시스타틴-8	베타-디펜신 124
콜라겐 알파-5(IV) 사슬	혈관 내피 성장 인자 B	카디오트로핀-1 (CT-1)	베타-디펜신 125
콜라겐 알파-3(VI) 사슬	혈관 내피 성장 인자 C	키모트립시노겐 B	베타-디펜신 126
보체 성분 C6	레티쿨로칼빈-3	C-X-C 모티프 케모카인 9	데옥시리보뉴클레아제-1-유사 2
콜라겐 알파-1(IX) 사슬	피브릴린-1	C-X-C 모티프 케모카인 13	스타니오칼신-2
콜라겐 알파-1(X) 사슬	단백질 FAM3A	EMILIN-3	내피 세포-특이적 분자 1
콜라겐 알파-1(XVII) 사슬	단백질 G7c	세크레토고긴	카르복실에스테라아제 7
콜라겐 알파-1(XXI) 사슬	뉴로펠린 및 톨로이드-유사 단백질 1	부고환 분비성 단백질 E3-알파	단백질 NOV 호모로그
코아토머 서브유닛 알파	임신-특이적 베타-1-글리코단백질 11	에퍼피칸	UPF0528 단백질 FAM172A
보체 수용체 유형 1	세르핀 B4	단백질 FAM5C	인터루킨-27 서브유닛 베타
시스타틴-SN	ADAM DEC1	섬유아세포 성장 인자 20	단백질 FAM3C
데옥시리보뉴클레아제-1	ADP-의존 글루코키나아제	섬유아세포 성장 인자-결합 단백질 3	간질세포-유도 인자 2-유사 단백질 1
세포외 매트릭스 단백질 1	알파-아밀라아제 2B	막관통 단백질 204	부티로필린 서브패밀리 1 맴버 A1
저 친화도 면역글로불린 감마 Fc 영역 수용체 III-A	UDP-GlcNAc:베타 Gal 베타-1,3-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제 3	포스파티딜에탄올아민-결합 단백질 4	케라틴세포-연관 막관통 단백질 2
알파-태아단백질	칼시토닌 유전자-관련 펩티드 2	응고 인자 V	면역글로불린 알파 Fc 수용체
헤파린-결합 성장 인자 2	카르복시펩티다아제 E	응고 인자 VII	EMILIN-2
피브로겐 감마 사슬	카디오트로핀-유사 사이토카인 인자 1	프로-MCH	에프린 유형-A 수용체 10

[0097]

성장/분화 인자 5	콜라겐 알파-2(VIII) 사슬	엽산 수용체 감마	엑소스토신-유사 2
신경교 세포주-유래 신경영양 인자	크럼스 호모로그 2	뮤신-7	플리스타틴-관련 단백질 4
인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 3	텐틴 매트릭스 산성 포스포단백질 1	갈라닌-유사 펩티드	플리스타틴-관련 단백질 5
인슐린-유사 성장 인자 IA	다운 증후군 세포 부착 분자	헤미센틴-1	막관통 단백질 66
Ig 감마-1 사슬 C 영역	면역글로불린 슈퍼패밀리 멤버 1	인터루킨-6	성장/분화 인자 2
Ig 감마-2 사슬 C 영역	인터루킨-4	베아 성장/분화 인자 1	GDNF 패밀리 수용체 알파-4
Ig 감마-3 사슬 C 영역	인터루킨-6 수용체 서브유닛 알파	인터루킨-8	Ig 감마-4 사슬 C 영역
인슐린-유사 3	인터루킨-24	그렘린-2	림프구 항원 86
인터-알파-트립신 저해제 중쇄	라디닌-1	스트로멜리신-2	인히빈 베타 E 사슬
UPF0378 단백질 KIAA0100	리파아제 멤버 I	가능한 G-단백질 커플링된 수용체 171	GRAM 도메인-함유 단백질 1C
키니노겐-1	췌장 리파아제-관련 단백질 1	팹팔리신-2	인터페론 알파-10
라미닌 서브유닛 알파-2	류신-풍부 알파-2-글리코단백질	미세섬유-연관 글리코단백질 4	인터페론 알파-16
라미닌 서브유닛 알파-4	매트릭스-리모델링-연관 단백질 5	뉴로메딘-B	인터페론 알파-6
라미닌 서브유닛 베타-1	네트린-4	미메칸	면역글로불린 슈퍼패밀리 멤버 21
단백질-리신 6-옥시다아제	간세포 성장 인자 수용체	메트릭스 메탈로프로테이나아제-19	아그린
밀티머린-1	C-C 모티프 케모카인 22	인터루킨-11	프로락틴
바소프레신-뉴로피신 2-코펩틴	닉탈로핀	인터루킨-17A	켈치(Kelch)-유사 단백질 11
니도겐-1	오스테오칼신	인터루킨-18	단백질 Wnt-16
포스포리파아제 A2,	염기성 타액 프롤린-풍부 단백질 3	인터루킨-26	프로페르딘
퍼포린-1	임신-특이적 베타-1-글리코단백질 10	인터루킨-28A	칼리크레인-13
포스파티딜이노시톨-글리칸-특이적 포스포리파아제 D	류신-풍부 반복 막관통 단백질 FLRT2	막관통 emp24 도메인-함유 단백질 3	1-아실-sn-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라아제델타
피브로시스틴	R-스폰딘-3	인터루킨-29	칼리크레인-9
인지질 전달 단백질	시알르부착분자	인슐린-유사 펩티드 INSL6	비타민 K-의존 단백질 S
전립선 산 포스파타아제	트립신-3	단백질 Wnt-2b	부티로필린-유사 단백질 8
비타민 K-의존 단백질 Z	디펩티다아제 2	임신-특이적 베타-1-글리코단백질 1	라미닌 서브유닛 베타-4
타액 산성 프롤린-풍부 포스포단백질 1/2	콜라겐 및 칼슘-결합 EGF 도메인-함유 단백질 1	정자 첨체 막-연관 단백질 4	림프관 내피 히알루론산 수용체 1
임신 영역 단백질	생식 세포-특이적 유전자 1-유사 단백질	라미닌 서브유닛 감마-3	시스타틴-SA
프로레락신 H2	류신-풍부 반복-함유 단백질 31	리실 옥시다아제 호모로그 3	막관통 단백질 59
세마포린-4D	아포리포단백질 O	뉴로텐신/뉴로메딘 N	아포리포단백질 (a)-유사 단백질 2
슬릿(Slit) 호모로그 2 단백질	디스트로글리칸	MAM 도메인-함유 단백질 2	리소자임-유사 단백질 2
알파-텍토린	중성구 디펜신 4	미세섬유성-연관 단백질 2	리소자임-유사 단백질 4
테나신-X	암포테린-유도 단백질 3	흑색종 저해 활성도 단백질 2	레엘린
트레포일 인자 3	감마-세크레타아제 서브유닛 APH-1B	메트릭스 메탈로프로테이나아제-24	레티놀-결합 단백질 4

[8600]

트랜스페린 수용체 단백질 1	아포리포단백질 C-IV	메트릭스 메탈로프로테이나아제-25	탄산무수화효소 14
프로형질전환 성장 인자 알파	아릴설파타아제 G	네트린-1	세뇨관간질 신염 항원
형질전환 성장 인자 베타-2	아교-활성화 인자	네트린-3	뉴로펩티드 W
종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 6	카파아제 모집 도메인-함유 단백질 18	알파-N-아세틸갈락토사미니드 알파-2,6-시알릴트랜스퍼라아제 1	알파-1,3-만노실-글리코단백질 4-베타-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제 B
종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 1B	헤파란 설페이트 글루코사민 3-O-설포트랜스퍼라아제 3A1	알파-N-아세틸갈락토사미니드 알파-2,6-시알릴트랜스퍼라아제 3	막관통 emp24 도메인-함유 단백질 5
종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 5	타이로트로핀-방출 호르몬-감소 엑토엔자임	흑색종-유도 성장 조절 단백질	보체 C1q 종양 괴사 인자-관련 단백질 3
트롬보포이에틴	구아닐린	FMRF 아미드-관련 펩티드	포도칸-유사 단백질 1
VIP 펩티드	콜린 수송체-유사 단백질 3	오토코닌-90	임신-특이적 베타-1-글리코단백질 5
산성 포유류 키티나아제	17-베타-하이드록시스테로이드 탈수소효소 14	뉴투린	케라토칸
시스테인-풍부 분비성 단백질 2	면역글로불린 람다-유사 폴리펩티드 1	뉴렉소필린-1	그룹 IIE 분비성 포스포리파아제 A2
햅토글로빈-관련 단백질	DnaJ 호모로그 서브패밀리 B 멤버 14	뉴렉소필린-2	좌-우 결정 인자 2
C-C 모티프 케모카인 26	F-박스 유일한 단백질 8	혈소판 인자 4 변이체	NKG2D 리간드 2
룰렉틴-11	피브로류킨	노시엡틴	대식세포 메탈로엘라스타아제
EGF-유사 도메인 단백질 2를 가진 시스테인-풍부	메티오닌-R-설폭시드 환원효소 B3, 미토콘드리아성	V-세트 및 막관통 도메인-함유 단백질 1	골수 세포 1에서 발현되는 트리거링 수용체
C-X-C 모티프 케모카인 16	류신-풍부 반복 LGI 패밀리 멤버 2	프롤린-풍부 단백질 4	사이토카인 수용체-유사 인자 1
섬유아세포 성장 인자-결합 단백질 1	소낭 수송 단백질 GOT1B	프로락틴-방출 펩티드	세크레틴
인터루킨-1 패밀리 멤버 5	통합 막 단백질 GPR177	세린 프로테아제 33	간질세포-유도 인자 2
인터루킨-1 패밀리 멤버 9	가능한 G-단백질 커플링된 수용체 78	임신-특이적 베타-1-글리코단백질 8	리소자임-유사 단백질 6
칼리크레인-5	HEPACAM 패밀리 멤버 2	렛빈딘(Retbindin)	세르핀 A9
마트릴린-2	인터루킨-27 수용체 서브유닛 알파	FMRF 아미드-관련 펩티드	스클레로스틴 도메인-함유 단백질 1
세포 표면 글리코단백질 CD200 수용체 1	프로엔케팔린-A	리보뉴클레아제 K6	리소카르디올리핀 아실트랜스퍼라아제 1
리소포스파티드산 포스파타아제 유형 6	인테그린 알파-10	리보뉴클레아제 T2	혈장 글루타메이트 카르복시펩티다아제
뉴클레오티드 교환 인자 SIL1	KTEL 모티프-함유 단백질 1	레페틴	슬릿 호모로그 3 단백질
트롬보스폰딘 유형-1 도메인-함유 단백질 4	백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀리 A 멤버 5	보체 C1r 서브성분 -유사 단백질	C3 및 PZP-유사 알파-2-마크로글로불린 도메인-함유 단백질 8
WNT1-유도성-신호전달 경로 단백질 2	류신-풍부 반복 및 피브로넥틴 유형-III 도메인-함유 단백질 3	비특성화 글리코실트랜스퍼라아제 AER61	레티노산 수용체 응답 단백질 2
브로모도메인-함유 단백질 9	우테로글로빈	세마포린-3G	연골 산성 단백질 1
CD99 항원-유사 단백질 2	네트린-G1 리간드	세크레토글로빈 패밀리 1C 멤버 1	스타니오칼신-1
비특성화 단백질 C1orf159	파넥신-1	세크레토글로빈 패밀리 1D 멤버 1	베타-텍토린
탄수화물 설포트랜스퍼라아제 12	프로토카드헤린-12	세크레토글로빈 패밀리 1D 멤버 2	단백질 인자 3 으로의 포스트-GPI 부착

[0099]

가능한 세린 카르복시펩티다아제 CPVL	프로토카드헤린 알파-10	세르핀 A12	생식 세포-특이적 유전자 1 단백질
뮤신-3A	프로토카드헤린 베타-10	세르핀 I2	인터루킨-21 수용체
CUB 및 투명대-유사 도메인-함유 단백질 1	골화석증-연관 막관통 단백질 1	폰 빌레브란트 인자 C 및 EGF 도메인-함유 단백질	V-세트 및 면역글로불린 도메인-함유 단백질 4
폴리펩티드 N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라아제 14	베타-갈락토시드 알파-2,6-시알릴트랜스퍼라아제 1	트롬보스폰딘 모티프 15 를 가진 디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제	스캐빈저 수용체 시스테인-풍부 도메인-함유그룹 B 단백질
갈렉틴-9	GPI 트랜스아미다아제 성분 PIG-S	나트륨 채널 서브유닛 베타-2	프로티롤리베린
류신-풍부 반복-함유 단백질 17	프롤린-풍부 막관통 단백질 3	메탈로프로테이나아제저해제 4	세마포린-4A
류신-풍부 반복 뉴런 단백질 2	설프히드릴 옥시다아제 2	T-세포 면역조절 단백질	
이작용 헤파란 설페이트 N-탈아세틸라아제/N-설포트랜스퍼라아제 3	트롬보스폰딘 모티프 16 을 가진 디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제	트롬보스폰딘 모티프 10 을 가진 디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 27
루프텔린	SH2 도메인-함유 단백질 3A	흉선 기질 림포포이에틴	톨(Toll)-유사 수용체 7
뇌 미토콘드리아성 담체 단백질	SHC-변형 단백질 4	막관통 단백질 130	
신호 펩티드, CUB 및 EGF-유사 도메인-함유 단백질 3	디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제도메인-함유 단백질 23	고유의 연골 매트릭스-연관 단백질	티오레독신 도메인-함유 단백질 16
14-3-3 단백질 시그마	트랜스듀신 베타-유사 단백질 2	우로코르틴-2	알파-2-항플라스민
알파-1-산 글리코단백질 1	튜더 도메인-함유 단백질 10	우로코르틴-3 (	WAP 4-디설파이드 중심 도메인 단백질 3
알파-1-산 글리코단백질 2	막관통 9 슈퍼패밀리 멤버 3	단백질 AMBP	단백질 WFDC9
폰 빌레브란트 인자 A 도메인-함유 단백질 1	폰 빌레브란트 인자 D 및 EGF 도메인-함유 단백질	보체 C1q 종양 괴사 인자-관련 단백질 9-유사	트롬보스폰딘 모티프 14 를 가진 디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제
디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제도메인-함유 단백질 9	트롬보스폰딘 모티프 17 을 가진 디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제	성장 저해 및 분화-관련 단백질 88	지방세포 혈장 막-연관 단백질
안지오텐시노겐	막관통 채널-유사 단백질 2	단백질 Wnt-10a	퍼옥시다신 호모로그
아포리포단백질 A-II (Apo-AII) (ApoA-II)	임신-특이적 베타-1-글리코단백질 3	단백질 Wnt-3a	점진적 강직 단백질 호모로그
아포리포단백질 A-IV (Apo-AIV) (ApoA-IV)	테노모듈린	원-발암유전자 단백질 Wnt-3	키티나아제-3-유사 단백질 1
아포리포단백질 C-II (Apo-CII) (ApoC-II)	테트라스파닌-6	단백질 Wnt-6	UPF0672 단백질 CXorf36
베타-2-글리코단백질 1	티오레독신 도메인-함유 단백질 5	단백질 Wnt-9a	아릴설파타아제 J
아폽토시스-관련 단백질 3	혈관 내피 성장 인자 D	사이토카인 SCM-1 베타	코르티스타틴
베타-세크레타아제 2	임신-특이적 베타-1-글리코단백질 9	자이모겐 과립 막 단백질 16	세룰로플라스민
조직-혈액 그룹 ABO 시스템 트랜스퍼라아제	세마포린-3F	투명대-결합 단백질 1	안지오포이에틴-관련 단백질 5
카텝신 L2	산 포스파타아제-유사 단백질 2	전방 구배 단백질 3 호모로그	이중나선 도메인-함유 단백질 126
C-C 모티프 케모카인 3	아포리포단백질 O-유사	아멜로틴	CD177 항원
C-유형 렉틴 도메인 패밀리 1 멤버 B	베타-디펜신 119	비특성화 단백질 C5orf46	단백질 캐노피 호모로그 4
칼슘-활성 클로라이드 채널 조절자 1	트롬보스폰딘 모티프 12 를 가진 디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제	비특성화 aarF 도메인-함유 단백질 키나아제 1	피브로넥틴 유형-III 도메인-함유 단백질 C4orf31

[0100]

키마아제	단백질 FAM131A	드락신	단백질 FAM180A
콜라겐 알파-1(VI) 사슬	단백질 FAM3B	섬유아세포 성장 인자 18	혈소판 염기성 단백질
보체 성분 C8 알파 사슬	베타-갈락토시다아제-1-유사 단백질	C-X-C 모티프 케모카인 11	인터페론 엡실론
보체 성분 C9	리소자임 g-유사 단백질 1	Ly6/PLAUR 도메인-함유 단백질 6	인텔렉틴-2
글루코오스-프럭토오스 산화환원효소 도메인-함유 단백질 2	인터-알파-트립신 저해제 중쇄 H5-유사 단백질	키모트립신-유사 엘라스타아제 패밀리 멤버 1	알파-1,3-만노실-글리코단백질 4-베타-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제 A
DnaJ 호모로그 서브패밀리 B 멤버 11	정자 첨체-연관 단백질 5	에리트로포이에틴 수용체	매트릭스 세포외 포스포글리코단백질
엑토뉴클레오티드 피로포스파타아제/포스포디에스테라아제 패밀리 멤버 7	류신-풍부 반복 및 면역글로불린-유사 도메인-함유노고 수용체-상호작용 단백질 2	MAM 도메인-함유 글리코실포스파티딜이노시톨 고정 단백질 2	cDNA FLJ77863, 호모 사피엔스 분비 및 막관통 1 (SECTM1)과 매우 유사함, mRNA
세포질 세망 아미노펩티다아제 1	계면활성제-연관 단백질 2	메트릭스 메탈로프로테이나아제-27	부고환-특이적 리포칼린-6
수용체 타이로신-단백질 키나아제 erbB-3	아디포넥틴 수용체 단백질 1	불활성 세린 프로테아제 35	아파민
세포질 세망 상주 단백질 ERp44	다수의 상피 성장 인자-유사 도메인 6	이중나선 도메인-함유 단백질 134	가능한 양이온 -수송 ATPase 13A5
IgGFc-결합 단백질	신경내분비 단백질 7B2	서브라바신	글루타티온 퍼옥시다아제 3
보체 인자 H-관련 단백질 1	알파-1B-글리코단백질	세크레토글로빈 패밀리 1D 멤버 4	클라우딘-18
폴리펩티드 N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라아제 2	WAP, 카잘, 면역글로뷸린, 쿠니츠 및 NTR 도메인-함유 단백질 2	V-세트 및 막관통 도메인-함유 단백질 2A	추정상 살해 세포 면역글로불린-유사 수용체 유사 단백질 KIR3DP1
헤모핵신	아릴아세타미드 탈아세틸라아제-유사 1	ADM	분비성 포스포리파아제 A2 수용체
간세포 성장 인자 활성자	히스타틴-3	비특성화 단백질 C2orf82	헴토글로빈
주요 조직적합성 복합체 클래스 I-관련 유전자 단백질	프로-뉴레귤린-3, 막-결합 이소폼	인슐린 성장 인자-유사 패밀리 멤버 1	암태아성 항원-관련 세포 부착 분자 20
인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 6	아구오티-신호전달 단백질	카드헤린-유사 단백질 29	골 형성 단백질 3
Ig 델타 사슬 C 영역	클라우딘-8	골 형성 단백질 15	골수 기질 항원 2
인터루킨-1 베타	UPF0454 단백질 C12orf49	혈장 세린 프로테아제 저해제	사이토크롬 P450 20A1
저-밀도 리포단백질 수용체-관련 단백질 10	폰 빌레브란트 인자 A 도메인-함유 단백질 5B1	암태아성 항원-관련 세포 부착 분자 21	살균/투과성-증가 단백질-유사 3
접합 부착 분자 C	카드헤린-6	알파-락트알부민	단백질 dpy-19 호모로그 2
비특성화 단백질 KIAA0319	카텔리시딘 항미생물 펩티드	자매 염색분체 응집 단백질 DCC1	그룹 IIF 분비성 포스포리파아제 A2
라미닌 서브유닛 알파-5	라미닌 서브유닛 감마-1	갈렉틴-3-결합 단백질	카르복시펩티다아제 B
피브로넥틴 유형 III 도메인-함유 단백질 4	탈수소효소/환원효소 SDR 패밀리 멤버 7B	디네인 중쇄 도메인-함유 단백질 1	글리코실트랜스퍼라아제 8 도메인-함유 단백질 2
리포단백질 리파아제	C-C 모티프 케모카인 16	C-C 모티프 케모카인 17	단백질 FAM19A1
간질성 콜라게나아제	C-C 모티프 케모카인 24	지방 아실-CoA 환원효소 1	GDNF 패밀리 수용체 알파-유사
메트릭스 메탈로프로테이나아제-9	HEAT 반복-함유 단백질 C7orf27	핀 버드(Fin bud) 개시 인자 호모로그	가능한 글루타티온 퍼옥시다아제 8
뮤신-16	콜라겐 알파-2(IX) 사슬	폴리머 면역글로불린 수용체	시스타틴-D

[0101]

뮤신-2	콜라겐 알파-3(IX) 사슬	프리온-유사 단백질 도펠(doppel)	시스타틴-F
뮤신-5B	콜리파아제	C-X-C 모티프 케모카인 6	혈소판-활성화 인자 아세틸하이드로라아제
마이오실린	콜라겐 알파-1(XXVII) 사슬	C-X-C 모티프 케모카인 10	팹팔리신-1
산화 저-밀도 리포단백질 수용체 1	카르복시펩티다아제 N 서브유닛 2	베타-디펜신 1	용질 담체 패밀리 22 멤버 12
전립선 종양 과발현 유전자 1 단백질	류신-풍부 반복 막관통 뉴런 단백질 4	히알루로난 및 프로테오글리칸 연결 단백질 2	용모성 성장촉진유선자극호르몬 호르몬-유사 1
수용체-상호작용 세린/트레오닌-단백질 키나아제 2	콜라겐 삼중 나선 반복-함유 단백질 1	디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제도메인-함유 단백질 30	미세소관 역학 단백질 3 의 조절자
균형유지 뉴클레오시드 수송체 3	엔도텔린-2	융합된 호모로그의 억제자	레티놀 탈수소효소 14
셀레노단백질 P	피브로모듈린	엽산 수용체 베타	갈라닌
폐 계면활성제-연관 단백질 D	Fc 수용체-유사 B	세포외 설파타아제 설프-2	트랜스코발라민-2
레티노산 유전자 6 단백질 호모로그에 의해 자극됨	징크 핑커 RAD18 도메인-함유 단백질 C1orf124	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 14	카테콜-O-메틸트랜스퍼라아제도메인-함유 단백질 1
트레포일 인자 1	성장/분화 인자 15	아르테민	트리펩티딜-펩티다아제 1
조직 인자 경로 저해제 2	아교-유도 넥신	콜라겐 알파-1(XII) 사슬	트렘-유사 전사물 1 단백질
프로트롬빈	프로고나돌리베린-1	콜라겐 알파-1(XIV) 사슬	구아닐레이트 고리화효소 활성자 2B
톨-유사 수용체 9	그랜자임 K	베타-디펜신 2	유도성 T-세포 공동자극자
세포간 부착 분자 4	인터페론 알파-17	인터루킨-21	
인터루킨-19	인터페론 알파-21	인터루킨-3	
이스민-2	인터페론 알파-8	인터루킨-7	노치 호모로그 2 N-말단-유사 단백질
IRRE-유사 단백질 1 의 종류	인터페론 오메가-1	인히빈 알파 사슬	라미닌 서브유닛 베타-2
칼리크레인-10	초기 태반 인슐린-유사 펩티드	라미닌 서브유닛 알파-3	뉴로필린-2
잠재-형질전환 성장 인자 베타-결합 단백질 4	EGF, 래트로필린 및 일곱개 막관통 도메인-함유 단백질 1	염색체 X 상의 탈수소효소/환원효소 SDR 패밀리 멤버	EGF-함유 피볼린-유사 세포외 매트릭스 단백질 1
짝 지어진 면역글로불린-유사 유형 2 수용체 알파	피브로넥틴 유형 3 및 안키린 반복 도메인 단백질 1	FXYD 도메인-함유이온 수송 조절자 6	수용체-유형 타이로신-단백질 포스파타아제 카파
재생 섬-유도 단백질 3 알파	리실 옥시다아제 호모로그 4	세린 결합자 2	재생 섬-유도 단백질 4
E3 유비퀴틴-단백질 리파아제 RNF5	루미칸	스트로멜리신-3	타키키닌-4
프로타키키닌-1	아드로핀	분비 인단백질 1	메트릭스 메탈로프로테이나아제-23
분비 프리즐드-관련 단백질 1, 이소폼 CRA_a	류신-풍부 반복 막관통 단백질 FLRT1	세린 베타-락타마아제-유사 단백질 LACTB, 미토콘드리아성	보체 C1q 종양 괴사 인자-관련 단백질 5
플라스미노겐-관련 단백질 B	뉴클레오빈딘-2	갈렉틴-3	옵티신
가능한 팔미토일트랜스퍼라아제 ZDHHC16	포스포리파아제 A2	췌장 프로호르몬	이전에-작은/분비된 글리코단백질
안지오포이에틴-관련 단백질 1	프로엔케팔린-B	임신-특이적 베타-1-글리코단백질 6	펜트락신-관련 단백질 PTX3

[0102]

UPF0510 단백질 C19orf63	펩티도글리칸 인식 단백질 I-베타	Dickkopf-관련 단백질 3	카르복실에스테라아제 8
스캐빈저 수용체 시스테인-풍부 유형 1 단백질 M160	면역글로불린 슈퍼패밀리 함유 류신-풍부 반복 단백질 2	탈수소효소/환원효소 SDR 패밀리 멤버 11	티오레독신-관련막관통 단백질 4
ER 분해-증진 알파-만노시다아제-유사 2	V-세트 및 면역글로불린 도메인-함유 단백질 2	재생 섬-유도 단백질 3 감마	주요 촉진자 슈퍼패밀리 도메인-함유 단백질 2
베타-갈락토시다아제-1-유사 단백질 2	펩티드 YY	RING 핑거 단백질 43	칼리크레인-12
인터루킨-17 수용체 E	레티놀-결합 단백질 3	세메노겔린-2	브레비칸 중심 단백질
인터루킨-20	아테린	뮤신-15	포르이민
인터루킨-25	전좌 단백질 SEC63 호모로그	골 시알로단백질 2	토르신-1A
PDZ 도메인-함유 단백질 11	형질전환 성장 인자 베타-3	림포탁틴	C-C 모티프 케모카인 23
헬락신-3	단백질 Wnt-10b	성장-조절 알파 단백질	테스티칸-3
레티노이드-유도성 세린 카르복시펩티다아제	레날라아제	R-스폰딘-2	엄기성 타액 프롤린-풍부 단백질 4
짧은 구개, 폐 및 코 상피 암종-연관 단백질 2	프로단백질 전환효소 서브틸리신/켁신 유형 4	막관통 및 이중나선 도메인-함유 단백질 3	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 18
WAP 4-디설파이드 중심 도메인 단백질 5	카르복시펩티다아제 A4	VEGF 공동-조절 케모카인 1	CDO 의 형제
혈소판-유래 성장 인자 C	올팩토메딘-4	ADM2	베타-1,4-갈락토실트랜스퍼라아제 4
디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제도메인-함유 단백질 33	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 복합체 산 불안정 사슬	하이드록시스테로이드 11-베타-탈수소효소 1-유사 단백질	탈수소효소/환원효소 SDR 패밀리 멤버 9
BSD 도메인-함유 단백질 1	아멜로게닌, Y 이소폼	델타-유사 단백질 1	에펀
세포 부착 분자 3	아릴설파타아제 F	에프린-A1	오토안코린
CDC45-관련 단백질	융모성성선자극호르몬 서브유닛 베타 변이체 2	섬유아세포 성장 인자 수용체-유사 1	테나신-R
콘드로렉틴	베타-디펜신 104	GDNF 패밀리 수용체 알파-3	성장 인자
디아실 O-아실트랜스퍼라아제 2	베타-디펜신 105	혈소판 수용체 Gi24	단백질 TSPEAR
3-케토-스테로이드 환원효소	베타-디펜신 107	프로고나돌리베린-2	헤파에스틴
인터루킨-17 수용체 C	단백질 WFDC11	칼리크레인-7	부티로필린-유사 단백질 3
인터루킨-17 수용체 D	WAP 4-디설파이드 중심 도메인 단백질 6	아포리포단백질 F	부티로필린-유사 단백질 9
통합 복합체 서브유닛 1	에피겐	단백질 CASC4	라미닌 서브유닛 감마-2
접합 부착 분자-유사	단백질 FAM19A5	VIP36-유사 단백질	단백질 LMBR1L
E3 유비퀴틴-단백질 리파아제 LNX	클라우딘-6	마그네슘 수송체 단백질 1	뮤신-21
류신-풍부 반복 막관통 뉴런 단백질 3	암태아성 항원-관련 세포 부착 분자 19	아밀로라이드-민감성 아민 옥시다아제 [구리-함유]	세포질 세망 만노실-올리고당 1,2-알파-만노시다아제
메티오닌 아데노실트랜스퍼라아제 2 서브유닛 베타	트롬보스폰딘 모티프 1 을 가진 디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제	DNA 손상-조절 오토파지 조절자 단백질 2	췌장 분비성 과립 막 주요 글리코단백질 GP2
포도칼리신-유사 단백질 2	단백질 COQ10 A, 미토콘드리아성	막관통 단백질 C17orf87	세마포린-4B
프로미닌-2	비특성화 단백질 C19orf41	보체 인자 H-관련 단백질 5	세마포린-5B

플렉신 도메인-함유 단백질 2	비특성화 단백질 C21orf63	FK506-결합 단백질 7	엔살론-사르코글리칸
라운드어바웃(Roundabout)호모로그 4	단백질 멜타 호모로그 2	세린 결합자 1	구아닐레이트-결합 단백질 5
락토실세라미드 알파-2,3-시알릴트랜스퍼라아제	코카인- 및 암페타민-조절 전사물 단백질	막관통 및 유비퀴틴-유사 도메인-함유 단백질 1	엑토뉴클레오시드 트리포스페이트 디포스포하이드로라아제 6
SID1 막관통 패밀리 멤버 2	지방증 HMGIC 융합 파트너-유사 1 단백질	단백질 ERGIC-53-유사	세르핀 B3
스시 도메인-함유 단백질 1	류신-풍부 반복-함유 단백질 18	틀-유사 수용체 10	단백질 RMD5 호모로그 B
세린/트레오닌-단백질 키나아제 TAO2	류신-풍부 반복-함유 단백질 25	틀-유사 수용체 8	스캐빈저 수용체 클래스 A 멤버 5
막관통 프로테아제, 세린 2	류신-풍부 반복-함유 단백질 3B	셀레노단백질 T	세마포린-6B
UDP-글루쿠론산 틸카르복실화효소 1	류신-풍부 반복-함유 단백질 3	시알산-결합 Ig-유사 렉틴 11	막관통 단백질 108
비특성화 단백질 C10orf58	Ly6/PLAUR 도메인-함유 단백질 4	분류 넥신-24	스시 도메인-함유 단백질 3
티오레독신-관련막관통 단백질 2	비타민 K 에폭사이드 환원효소 복합체 서브유닛 1	보체 C1q 종양 괴사 인자-관련 단백질 1	잠재-형질전환 성장 인자 베타-결합 단백질 2
CMP-N-아세틸뉴라미네이트-베타-갈락토스아미드-알파-2,3-시알릴트랜스퍼라아제	트롬보스폰딘 모티프 20 을 가진 디스인테그린 및 메탈로프로테이나아제	추정상 비특성화 단백질 UNQ6494/PRO21346	추정상 비특성화 단백질 UNQ6190/PRO20217
추정상 비특성화 단백질 ENSP00000380674	추정상 비특성화 단백질 ENSP00000381830	분비 및 막관통 1 전구체변이체	분비 및 막관통 1 전구체변이체
막관통 단백질 119	묘안 증후군 임계 영역 단백질 1	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 18 멤버 A	콜라겐 알파-1(XX) 사슬
막관통 단백질 98	고환-발현 단백질 101	시스테인-풍부 분비성 단백질 3	네트린 수용체 UNC5D
전-B 림프구 단백질 3	자일로실트랜스퍼라아제 2	보체 C4-A	뮤신-13
추정상 비특성화 단백질 C14orf144	단백질 FAM20A	추정상 비특성화 단백질 PRO2829	ATP-의존 메탈로프로테아제 YME1L1
막-결합 전사 인자 뷰위-1 프로테아제	막관통 및 면역글로불린 도메인-함유 단백질 1	칼슘-활성 클로라이드 채널 조절자 2	프로단백질 전환효소 서브틸리신/켁신 유형 5
피콜린 (콜라겐/피브로겐 도메인 함유) 3 (하카타(Hakata) 항원) (NL3) (피콜린 (콜라겐/피브로겐 도메인 함유) 3 (하카타 항원), 이소폼 CRA_b)	추정상 살해 세포 면역글로불린-유사 수용체-유사 단백질 KIR3DX1 (백혈구 수용체 클러스터 멤버 12)	종양형성 1 의 신경아세포종 억제자	

[0103]

[0104] 본 명세서에서 제공된 치료학적 단백질을 유일한 것으로 간주해서는 안된다. 더 정확히 말하면, 본 명세서에서 제공된 개시로부터 명확한 것과 같이, 본 발명의 방법은 임의의 단백질에 적용가능하며 여기서 수용성 지방산 유도체의 부착은 본 발명에 따르는 것이 바람직하다. 예를 들어, 치료학적 단백질은 미국 2007/0026485에서 설명되며, 이는 이의 전체로 본 명세서에 참조로서 편입된다.

[0105] **혈액 응고 단백질**

[0106] 하나의 측면에서, 본 발명의 시작 물질은 혈액 응고 단백질이며, 이는 인간 혈장으로부터 파생될 수 있거나, 또는 미국 특허 번호 제4,757,006호; 미국 특허 번호 제5,733,873호; 미국 특허 번호 제5,198,349호; 미국 특허 번호 제5,250,421호; 미국 특허 번호 제5,919,766호; 및 EP 306 968에서 설명된 바와 같이, 재조합 공학 기술에 의해 생성될 수 있다.

[0107] 인자 IX (FIX), 인자 VIII (FVIII), 인자 VIIa (FVIIa), 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF) 및 ADAMTS 13 프로테아제를 포함하여 혈액 응고 단백질과 같은 치료학적 폴리펩티드는 신속하게 단백질분해 효소에

의해 분해되거나 항체에 의해 중성화된다. 이는 그들의 반감기 및 순환 시간을 감소시키고, 그렇게 함으로써 그들의 치료적 효과를 제한한다. 상대적으로 높은 용량 및 빈번한 투약이 이들 응고 단백질의 바람직한 치료적 또는 예방 효과에 도달하고 유지하는 데에 필요하다. 결과로서, 적절한 용량 조절을 얻기가 어렵고 빈번한 정맥내 투여의 필요성이 환자 삶의 방식에서 제한을 부과한다.

[0108] 본 명세서에서 설명된 바와 같이, 인자 IX (FIX), 인자 VIII (FVIII), 인자 VIIa (FVIIa), 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI, 인자 XII (FXII), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF) 및 ADAMTS 13 프로테아제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 혈액 응고 단백질은 본 발명에 의해 고려된다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "혈액 응고 단백질"은 임의의 인자 IX (FIX), 인자 VIII (FVIII), 인자 VIIa (FVIIa), 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XII (FXII), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF) 및 ADAMTS 13 프로테아제를 나타내고 이는 특정한 자연형 혈액 응고 단백질과 연관되는 생물학적 활성도를 나타낸다.

[0109] 혈액 응고 캐스캐이드(cascade)는 세 가지 분명한 부분으로 나뉜다: 내인성, 외인성, 및 일반적인 경로 (Schenone et al., Curr Opin Hematol. 2004;11:272-7). 캐스캐이드는 일련의 세린 프로테아제 효소 (자이모겐) 및 단백질 공동인자를 포함한다. 요구될 때, 불활성 자이모겐 전구체는 활성 형태로 전환되며, 이는 캐스캐이드에서 다음 효소를 전환시킨다.

[0110] 내재성 경로는 응고 인자 VIII, IX, X, XI, 및 XII를 요구한다. 내재성 경로의 개시는 프레칼리크레인, 고-분자-무게 키니노겐, 인자 XI (FXI) 및 인자 XII (FXII)가 음으로 전하된 표면에 노출될 때 발생한다. 또한 혈소판으로부터 분비된 칼슘 이온 및 인지질이 요구된다.

[0111] 외재성 경로는 혈관의 혈관 루멘(vascular lumen)이 손상될 때 시작된다. 막 글리코단백질 조직 인자가 노출되고 이후에 순환하는 인자 VII (FVII) 및 이미 존재하는 적은 양의 이의 활성화 형태 FVIIa에 결합한다. 이 결합은 FVIIa로의 FVII의 완전한 전환 및 차후에, 칼슘 및 인지질의 존재에서, 인자 IXa (FIXa)로의 인자 IX (FIX)의 전환, 및 인자 Xa (FXa)로의 인자 X (FX)의 전환을 촉진한다. 조직 인자와의 FVIIa의 연관성은 기질 (FIX 및 FX)에 대한 FVII의 결합 부위를 더 가까운 근거리로 이동시킴으로써 그리고 FVIIa의 효소 활성도를 증진시키는 구조형태 변화를 유도함으로써 단백질분해의 활성도를 증진시킨다.

[0112] FX의 활성화는 두 가지 경로의 공통 지점이다. 인지질 및 칼슘과 함께, 인자 Va (FVa) 및 Xa는 프로트롬빈을 트롬빈 (프로트롬비나아제 복합체)으로 전환시키며, 이는 이후 피브로겐을 절단하여 피브린 모노머(monomer)를 형성한다. 모노머를 폴리머화하여 피브린 가닥을 형성한다. 인자 XIIIa (FXIIIa)는 이들 가닥을 서로 공유결합시켜 단단한 망(mesh)을 형성한다.

[0113] 또한 FVIIa로의 FVII의 전환은 트롬빈, FIXa, FXa, 인자 XIa (FXIa), 및 인자 XIIa (FXIIa)를 포함한, 다수의 프로테아제에 의해 촉매된다. 캐스캐이드 초기 단계의 저해를 위하여, 조직 인자 경로 저해제는 FVIIa/조직 인자/FXa 산물 복합체를 표적한다.

[0114] 인자 VIIa

[0115] FVII (안정한 인자 또는 프로콘버틴(proconvertin)으로도 공지됨)는 지혈 및 응고에서 중추적인 역할은 하는 비타민 K-의존 세린 프로테아제 글리코단백질이다 (Eigenbrot, Curr Protein Pept Sci. 2002;3:287-99).

[0116] FVII는 간에서 합성되고 48 kD의 단일-사슬 글리코단백질로서 분비된다. FVII는 지질막과의 단백질의 상호작용의 원인이 되는 9-12 잔기를 가진 아미노-말단 감마-카르복시글루탐산 (Gla) 도메인으로 구성된 유사 단백질 도메인 구조, 카르복시-말단 세린 프로테아제 도메인 (촉매 도메인), 및 조직 인자와의 상호작용을 매개하는 칼슘 이온 결합 부위를 함유한 두 개의 상피 성장 인자-유사 도메인을 모든 비타민 K-의존 세린 프로테아제 글리코단백질과 공유한다. 감마-글루타밀 카르복실라아제는 분자의 아미노-말단 일부에서 Gla 잔기의 카르복실화를 촉매한다. 카르복실라아제는 이의 작용을 위해 환원된 형태의 비타민 K에 의존하며, 이는 에폭사이드 형태로 산화된다. 비타민 K 에폭사이드 환원효소는 비타민 K의 에폭사이드 형태를 환원된 형태로 다시 전환시키는 데에 요구된다.

[0117] FVII의 주요 부분은 자이모겐 형태로 혈장에서 순환하고, 이 형태의 활성화는 아르기닌 152 및 이소류신 153 사이의 펩티드 결합의 절단을 야기한다. 결과적 활성화 FVIIa는 단일 디설파이드 결합 (Cys 135 내지 Cys 262)을 통하여 연결된 NH2-유도 경쇄 (20 kD) 및 COOH 말단-유래 중쇄 (30 kD)로 구성된다. 경쇄는 막-결합 Gla 도메인을 함유하고, 반면에 중쇄는 촉매 도메인을 함유한다.

[0118] 유전적 및 환경적 인자에 의해 결정되는 FVII의 혈장 농도는 약 0.5 mg/mL이다 (Pinotti et al., Blood. 2000;95:3423-8). 상이한 FVII 유전자형은 평균 FVII 레벨에서 몇 배의 차이를 야기할 수 있다. 혈장 FVII 레벨은 건강한 여성의 임신 동안에 상승되고 또한 연령에 따라 증가하며 그리고 여성에서 및 고중성지방혈증이 있는 인간에서 더 높다. FVII는 모든 응혈촉진 인자 중 가장 짧은 반감기를 갖는다 (3-6 시간). FVIIa의 평균 혈장 농도는 건강한 개체에서 3.6 ng/mL이고 순환하는 FVIIa의 반감기는 기타 응고 인자와비교하여 상대적으로 길다 (2.5 시간).

[0119] 유전적인 FVII 결핍은 일반적인 인구 중 500,000명 당 1 사례로 추정되는 유병률을 가진 드문 상염색체 열성 출혈 질환이다 (Acharya et al., J Thromb Haemost. 2004;2248-56). 저해제로부터 후천적 FVII 결핍도 또한 매우 드물다. 약물 가령, 세팔로스포린, 페니실린, 및 경구 항응고제와 연관되어 발생하는 결핍 사례가 또한 보고되었다. 추가적으로, 후천적 FVII 결핍은 자발적으로 발생하거나 또는 기타 질환, 가령 골수종, 패혈증, 재생불량성 빈혈과 함께, 인터루킨-2 및 항흉선세포 글로불린 요법과 함께 발생하는 것으로 보고되었다.

[0120] 참고 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 가령, 게놈 서열을 위한 GenBank 수탁 번호 제J02933호, cDNA (Hagen et al. PNAS 1986; 83: 2412-6)를 위한 제M13232호, 및 폴리펩티드 서열 (이들 전체로 본 명세서에 편입된 참조문헌)을 위한 제P08709호를 포함한다. FVII의 다양한 다형성이 설명되었고, 예를 들어 Sabater-Lleal et al. (Hum Genet. 2006; 118:741-51) (이의 전체로 본 명세서에 편입된 참조문헌)를 참고한다.

[0121] 인자 IX

[0122] FIX는 칼슘 이온, 인지질 및 FVIIIa의 존재에서 FX를 이의 활성 형태로 전환시킴으로써 혈액 응고의 내재성 경로에서 참여하는 비타민 K-의존 혈장 단백질이다. FIX 의 우세한 촉매 능력은 FX 내의 특정한 아르기닌-이소류신 결합에 대한 특이성을 가진 세린 프로테아제와 같은 것이다. FIX의 활성화는 FXIa에 의해 발생하며, 이는 FIX로부터 활성화 펩티드의 제거를 야기하여 하나 이상의 디설파이드 결합에 의해 유지되는 두 개의 사슬을 포함한 활성화 FIX 분자를 생성한다. FIX의 결핍은 열성 X-연관 혈우병 B의 원인이다.

[0123] 혈우병 A 및 B는 각각, FVIII 및 FIX 폴리펩티드에서의 결핍에 의해 특징되는 유전적 질병이다. 결핍의 근본적인 원인은 흔히 FVIII 및 FIX 유전자내 돌연변이의 결과이며, 상기 유전자 둘 모두는 X 염색체 상에 위치한다. 혈우병에 대한 전통 요법은 종종 정상 개체로부터의 풀링된 혈장 또는 반-정제된 응고 단백질의 정맥내 투여를 수반한다. 이들 제조물은 병원체 또는 바이러스, 가령 감염성 프리온, HIV, 파르보바이러스, 간염 A, 및 간염 C에 의해 오염될 수 있다. 따라서, 인간 혈청의 이용이 요구되지 않는 치료제에 대한 필요성이 시급하다.

[0124] FIX 활성도에서 레벨 감소는 혈우병 B의 중증도와 직접적으로 비례한다. 혈우병 B의 현재 치료는 혈장-유도 또는 재조합 FIX에 의한 손실 단백질의 대체로 구성된다 (소위 FIX 치환 또는 대체 치료 또는 요법).

[0125] FIX의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열은 예를 들어 UniProtKB/Swiss-Prot 수탁 번호 제P00740호, 및 미국 특허 번호 제6,531,298호에서 찾을 수 있다.

[0126] 인자 VIII

[0127] 응고 인자 VIII (FVIII)은 혈장에서 매우 낮은 농도로 순환하고 폰 빌레브란트 인자 (VWF)에 비-공유결합으로 결합된다. 지혈 동안에, FVIII은 VWF로부터 분리되고 칼슘 및 인지질 또는 세포 막의 존재에서 활성화 속도를 증진시킴으로써 활성화 인자 IX (FIXa)-매개 FX 활성화를 위한 공동 인자로서 작용한다.

[0128] FVIII은 도메인 구조 A1-A2-B-A3-C1-C2를 지닌 대략적으로 270-330 kD의 단일-사슬 전구체로서 합성된다. 혈장으로부터 정제될 때 (가령, "혈장-유도" 또는 "혈장성"), FVIII은 중쇄 (A1-A2-B) 및 경쇄 (A3-C1-C2)로 구성된다. 경쇄의 분자 질량은 80 kD인 반면에, B 도메인 내의 단백질분해 때문에, 중쇄는 90-220 kD의 범위에 있다.

[0129] FVIII은 출혈 질환에서 치료학적 용도를 위한 재조합 단백질로서 또한 합성된다. 다양한 시험관내 분석은 치료학적 약물로서 재조합 FVIII (rFVIII)의 잠재적인 효능을 결정하기 위해 고안되었다. 이들 분석은 내생 FVIII의 생체내 효과를 모방한다. FVIII의 시험관내 트롬빈 치료는 시험관내 분석에 의해 측정된 바와 같이, 이의 응혈촉진 활성도에서의 빠른 증가 및 차후 감소를 야기한다. 이 활성화 및 불활성화는 특이적 제한 단백질분해와 함께 중쇄 및 경쇄 둘 모두에서 동시에 일어나며, 이는 FVIII내 상이한 결합 에피토프의 이용가능성을 변경한다, 가령 FVIII이 VWF로부터 분리되게끔 및 인지질 표면에 결합하게끔 허용하거나 또는 특정한 단일클론 항체에 결합하는 능력을 변경한다.

[0130] FVIII의 부족 또는 기능이상은 가장 빈번한 출혈 질환인, 혈우병 A와 연관된다. 혈우병 A의 관리를 위해 선택되

는 치료는 혈장 유래 또는 rFVIII 농축물로의 대체 요법이다. 1% 이하의 FVIII 레벨을 지닌 심각한 혈우병 A를 앓는 환자는 FVIII을 용량 사이에서 1% 이상으로 유지하는 것을 목표로 하여 일반적으로 예방 요법으로 치료한다. 순환에서 다양한 FVIII 산물의 평균 반감기를 고려하여, 이 결과는 일반적으로 주마다 FVIII을 2 내지 3배 제공함으로써 성취될 수 있다.

[0131] 참고 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열은 가령, UniProtKB/Swiss-Prot P00451 (FA8_HUMAN); Gitschier J et al., Characterization of the human Factor VIII gene, Nature, 312(5992): 326-30 (1984); Vehar GH et al., Structure of human Factor VIII, Nature, 312(5992):337-42 (1984); Thompson AR. Structure and Function of the Factor VIII gene and protein, Semin Thromb Hemost, 2003:29;11-29 (2002)를 포함한다.

[0132] 폰 빌레브란트 인자

[0133] 폰 빌레브란트 인자 (VWF)는 약 500 내지 20,000 kD 크기 범위에 있는 일련의 멀티머(multimer)로서 혈장에서 순환하는 글리코단백질이다. VWF의 멀티머 형태는 디설파이드 결합으로 함께 연결된 250 kD 폴리펩티드 서브유닛으로 구성된다. VWF는 손상된 혈관 벽의 내피-하층으로 초기 혈소판 부착을 매개한다. 오로지 더 큰 멀티머만 지혈 활성도를 나타낸다. 내피 세포는 VWF의 거대 폴리머 형태를 분비하고 낮은 분자량을 갖는 VWF의 이들 형태 (낮은 분자량 VWF)는 단백질분해 절단으로부터 발생하는 것으로 추정된다. 거대 분자 질량을 갖는 멀티머는 내피 세포의 바이벨-펠라드(Weibel-Pallade) 소체 에 저장되고 자극시 유리된다.

[0134] VWF는 광범위한 반복 도메인으로 구성되는 거대 프리프로(prepro)-VWF로서 내피 세포 및 거핵세포에 의해 합성된다. 신호 펩티드의 절단시, 프로-VWF는 이의 C-말단 영역에서 디설파이드 결합을 통하여 다이머화된다. 다이머(dimer)는 멀티머화를 위해 프로토머(protomer)로서 역할을 하며, 이는 유리 끝 말단 사이의 디설파이드 연결에 의해 좌우된다. 멀티머에 대한 조립 다음에 프로펩티드 서열의 단백질분해성 제거가 일어난다 (Leyte et al., Biochem. J. 274 (1991), 257-261).

[0135] VWF의 클로닝된 cDNA로부터 예측되는 일차 전사 산물은 2813-잔기 전구체 폴리펩티드 (프리프로-VWF)이다. 프리프로- VWF는 22 아미노산 신호 펩티드 및 741 아미노산 프로펩티드로 구성되며, 여기서 성숙 VWF는 2050 아미노산을 포함한다 (Ruggeri Z.A., and Ware, J., FASEB J., 308-316 (1993).

[0136] VWF에서의 결함은 대략 뚜렷한 출혈 표현형으로 특징되는 폰 빌레브란트 질병 (VWD)에 대한 원인이 된다. VWD 유형 3은 VWF가 완전하게 사라지는 가장 심각한 증상이고, VWD 유형 1은 VWF의 정량적 손실과 관련되고 이의 표현형은 매우 약할 수 있다. VWD 유형 2는 VWF의 질적인 결핍과 관련되고 VWD 유형 3만큼 심각할 수 있다. VWD 유형 2는 많은 하위-형태를 가지며, 몇 가지는 고분자량 멀티머의 손실 또는 감소와 연관된다. 폰 빌레브란트 질병 유형 2a (VWD-2A)는 중간체 및 거대 멀티머 둘 모두의 손실로 특징된다. VWD-2B는 가장 높은 분자량 멀티머의 손실로 특징된다. VWF와 관련된 기타 질병 및 질환은 해당분야에서 공지된다.

[0137] 프리프로-VWF의 폴리뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 각각, GenBank 수탁 번호 제NM_000552호 및 제NP_000543호에서 이용가능하다.

[0138] 본 발명에 따른 기타 혈액 응고 단백질은 해당 분야, 가령 Mann KG, Thromb Haemost, 1999;82:165-74에서 설명된다.

[0139] **A. 폴리펩티드**

[0140] 하나의 측면에서, 본 발명의 시작 물질은 단백질 또는 폴리펩티드이다. 본 명세서에서 설명된 바와 같이, 용어 치료학적 단백질은 임의의 치료학적 단백질 분자를 나타내며, 이는 치료학적 단백질과 연관된 생물학적 활성도를 나타낸다. 본 발명의 한 가지 구체예에서, 치료학적 단백질 분자는 전장(full-length) 단백질이다.

[0141] 치료학적 단백질 분자는 전장 단백질, 전장 단백질의 전구체, 전장 단백질의 생물학적 활성 서브유닛 또는 단편, 그리고 치료학적 단백질의 이들 형태 중 어느 하나의 생물학적 활성 유도체 및 변이체를 포함한다. 따라서, 치료학적 단백질은 (1) 본 명세서에서 설명된 참조 핵산 또는 아미노산에 의해 인코딩되는 폴리펩티드에 대하여, 적어도 약 25, 약 50, 약 100, 약 200, 약 300, 약 400개, 또는 이보다 더 많은 아미노산의 영역에 걸쳐, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 초과 또는 이보다 더 큰 아미노산 서열 동일성을 지닌 아미노산 서열을 갖는 것들; 및/또는 (2) 항체, 가령, 본 명세서에서 설명된 바와 같은 참고 아미노산 서열을 포함한 면역원, 이의 면역원성 단편, 및/또는 보존적으로 변형된 이의 변이체에 대항하여 발생시킨 다클론 또는 단일클론 항체에 특이적으로 결합하는 것들을 포함한다.

[0142] 본 발명에 따라서, 용어 "재조합 치료학적 단백질"은 재조합 DNA 기술을 통하여 얻은 임의의 치료학적 단백질을 포함한다. 특정한 구체예에서, 상기 용어는 본 명세서에서 설명된 단백질을 포함한다.

[0143] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "내생 치료학적 단백질"은 치료를 받는 것으로 의도된 포유류로부터 기원한 치료학적 단백질을 포함한다. 또한 상기 용어는 상기 포유류에서 존재하는 전이유전자 또는 임의의 기타 외래 DNA로부터 전사된 치료학적 단백질을 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "외생 치료학적 단백질"은 치료를 받는 것으로 의도된 포유류로부터 기원하지 않은 혈액 응고 단백질을 포함한다.

[0144] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "혈장-유도 혈액 응고 단백질" 또는 "혈장성"은 응고 경로에 참여하는 특성을 갖는 포유류로부터 얻은 혈액에서 발견되는 단백질의 모든 형태를 포함한다.

[0145] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "생물학적 활성 유도체" 또는 "생물학적 활성 변이체"는 상기 분자의 동일한 기능적 및/또는 생물학적 특성, 가령 결합 특성, 및/또는 동일한 구조적 기반, 가령 펩티드 백본 또는 염기성 폴리머 유닛을 실질적으로 갖는 분자의 임의의 유도체 또는 변이체를 포함한다.

[0146] "유사체(analog)", "변이체" 또는 "유도체"는, 비록 특정한 경우에는 정도가 상이하지만, 자연적으로-발생한 분자에 대해 구조에서 실질적으로 유사하고 그리고 동일한 생물학적 활성도를 갖는 화합물이다. 예를 들어, 폴리펩티드 변이체는 참조 폴리펩티드와 유사한 구조를 실질적으로 공유하는 및 동일한 생물학적 활성도를 갖는 폴리펩티드를 나타낸다. 변이체 또는 유사체는 유사체가 파생되는 자연적으로-발생한 폴리펩티드와 비교하여 이들의 아미노산 서열의 조성물에 있어 상이하며, 상기 변이체 또는 유사체는 (i) 하나 이상의 폴리펩티드 말단 및/또는 자연적으로-발생한 폴리펩티드 서열 (가령, 단편)의 하나 이상의 내부 영역에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 결실, (ii) 하나 이상의 폴리펩티드 말단 (전형적으로 "첨가" 또는 "융합") 및/또는 자연적으로-발생한 폴리펩티드 서열의 하나 이상의 내부 영역 (전형적으로 "삽입")에서 하나 이상의 아미노산의 삽입 또는 첨가 또는 (iii) 자연적으로 발생한 폴리펩티드 서열에서 기타 아미노산에 대한 하나 이상의 아마노산의 치환을 수반하는 하나 이상의 돌연변이에 기반한다. 예로써, "유도체"는 가령, 화학적으로 변형된 참고 폴리펩티드와 동일하거나 또는 실질적으로 유사한 구조를 공유하는 폴리펩티드를 나타낸다.

[0147] 다양한 구체예에서, 유사체, 변이체 또는 유도체는 예를 들어, 단백질 유사체, 변이체 또는 유도체에 또 다른 분자의 접합을 허용하도록 설계되고, 그렇게 됨으로써 본 발명에 따른 접합된 단백질을 형성한다.

[0148] 변이체 또는 유사체 폴리펩티드는 삽입 변이체를 포함하며, 여기서 하나 이상의 아미노산 잔기는 본 발명의 치료학적 단백질 아미노산 서열에 첨가된다. 삽입은 단백질의 어느 한쪽 또는 양쪽 말단에 위치될 수 있고, 및/또는 치료학적 단백질 아미노산 서열의 내부 영역 내에 위치될 수 있다. 어느 한쪽 또는 양쪽 말단에서 추가적인 잔기를 가진, 삽입 변이체는 예를 들어, 융합 단백질 및 아미노산 태그 또는 기타 아미노산 라벨을 포함한 단백질을 포함한다. 하나의 측면에서, 혈액 응고 단백질 분자는 특히 분자가 대장균(E. coli)과 같은 박테리아 세포에서 재조합적으로 발현될 때, N-말단 Met를 선택적으로 함유한다.

[0149] 결실 변이체에서, 본 명세서에서 설명된 바와 같은 치료학적 단백질 폴리펩티드내 하나 이상의 아미노산 잔기가 제거된다. 결실은 치료학적 단백질 폴리펩티드의 한쪽 또는 양쪽 말단에 영향을 줄 수 있다. 따라서, 결실 변이체는 치료학적 단백질 폴리펩티드 서열의 단편을 포함한다.

[0150] 치환 변이체에서, 치료학적 단백질 폴리펩티드의 하나 이상의 아미노산 잔기가 제거되고 대안적인 잔기로 대체된다. 하나의 측면에서, 치환은 자연에서 보존적이고 이 유형의 보존적 치환은 해당 분야에서 잘 공지된다. 대안적으로, 본 발명은 비-보존적인 치환도 또한 포함한다. 예시적인 보존적 치환은 [Biochemistry, 2nd Edition; Worth Publishers, Inc., New York (1975), pp.71-77]에서 설명되고 그리고 바로 아래에 배열된다.

보존적 치환

곁사슬 특징	아미노산
비-극성 (소수성):	
A. 지방족	A L I V P
B. 방향족	F W
C. 황-함유	M
D. 경계	G
전하되지 않은-극성:	
A. 하이드록실	S T Y
B. 아미드	N Q
C. 설프히드릴	C
D. 경계	G
양으로 전하 (염기성)	K R H
음으로 전하 (산성)	D E

[0151]

[0152] 대안적으로, 예시적인 보조적 치환은 바로 아래에 배열된다.

보존적 치환 II

최초(original) 잔기	예시적인 치환
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe,
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Phe, Ile
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

[0153]

[0154] **B. 폴리뉴클레오티드**

[0155] 본 발명의 치료학적 단백질을 인코딩하는 핵산은 예를 들어 그리고 제한 없이, 유전자, 전-mRNA, mRNA, cDNA, 다형성 변이체, 대립형질, 합성 및 자연적으로-발생한 돌연변이를 포함한다.

[0156] 또한 본 발명의 치료학적 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 제한 없이, (1) 엄격한 혼성화 조건 하에 본 명세서에서 설명된 바와 같은 참고 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산, 및 보존적으로 변형된 이의 변이체와 특이적으로 혼성화한 것들; (2) 본 명세서에서 설명된 바와 같은 참고 핵산에 대해 적어도 약 25, 약 50, 약 100, 약 150, 약 200, 약 250, 약 500, 약 1000개, 또는 이보다 더 많은 뉴클레오티드 (성숙 단백질의 1218개 뉴클레오티드의 최대 전장 서열까지)의 영역에 걸쳐, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 초과, 또는 이보다 더 높은 뉴클레오티드 서열 동일성을 지닌 핵산 서열을 갖는 것들을 포함한다. 예시적인 "엄격한 혼성화" 조건은 50% 포름아마이드내 42oC, 5X SSC, 20 mM Na·PO4, pH 6.8에서 혼성화; 그리고 30분 동안 55oC에서 1X SSC로 세척하는 것을 포함한다. 이들 예시적인 조건에서 변이체는 혼성화되어야 할 서열의 길이 및 GC 뉴클레오티드 함량에 기반하여 만들어질 수 있다는 점이 이해된다. 해당 분야내 화학식 기준은 적절한 혼성화 조건을 결

정하기 위해 적절하다. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) § § 9.47-9.51을 참고.

[0157] "자연적으로-발생하는" 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열은 영장류, 가령, 인간; 설치류, 가령, 랫트, 쥐, 햄스터; 소, 돼지, 말, 양, 또는 임의의 포유류를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 포유류부터 전형적으로 유래한 것이다. 본 발명의 핵산 및 단백질은 재조합 분자 (가령, 비상동 그리고 야생형 유형 서열 또는 이의 변이체, 또는 비-자연적으로 발생한 것을 인코딩)일 수 있다.

[0158] **C. 치료학적 단백질의 생성**

[0159] 치료학적 단백질의 생성은 (i) 유전자 조작에 의한 재조합 DNA의 생성, (ii) 예를 들어 그리고 제한 없이, 형질감염, 전기천공법 또는 미세주입법으로 원핵세포 또는 진핵세포 내로 재조합 DNA를 도입, (iii) 상기 형질변환된 세포를 재배, (iv) 가령, 본질적으로 또는 유도시, 치료학적 단백질을 발현, 및 (v) 정제된 치료학적 단백질을 얻기 위하여, 가령, 배양 배지로부터 또는 형질변환된 세포를 수확함으로써 상기 혈액 응고단백질을 분리하기 위한 해당 분야에서의 공지된 임의의 방법을 포함한다.

[0160] 기타 측면에서, 약물학적으로 허용되는 혈액 응고 단백질 분자를 생성함으로써 특징되는 적합한 원핵 또는 진핵 호스트 시스템(host system)내 발현에 의해 치료학적 단백질이 생성된다. 진핵세포의 예시는 포유류 세포, 가령 CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep, 및 HepG2이다.

[0161] 매우 다양한 벡터가 치료학적 단백질의 제조를 위해 사용되고 그리고 진핵 및 원핵 발현 벡터에서 선택된다. 원핵 발현을 위한 벡터의 예시는 플라스미드, 가령 제한 없이, pRSET, pET, 및 pBAD를 포함하며, 여기서 원형 발현 벡터에서 사용된 프로모터는 제한 없이, lac, trc, trp, recA, 또는 araBAD 중 하나 이상을 포함한다. 진핵 발현을 위한 벡터의 예시는 다음을 포함한다: (i) 효소에서 발현을 위해, 프로모터, 가령 제한 없이, AOX1, GAP, GAL1, 또는 AUG1을 이용한, 벡터, 가령 제한 없이, pAO, pPIC, pYES, 또는 pMET; (ii) 곤충 세포에서 발현을 위해, 프로모터, 가령 제한 없이, PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, 또는 polh를 이용한, 벡터, 가령 제한 없이, pMT, pAc5, pIB, pMIB, 또는 pBAC, 및 (iii) 포유류 세포에서 발현을 위해, 프로모터, 가령 제한 없이, CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV, 및 β-액틴을 이용한, 벡터, 가령 제한 없이 pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, 또는 pBPV, 및 하나의 측면에서, 바이러스 시스템, 가령 제한 없이, 우두 바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스 바이러스, 또는 레트로바이러스에서 유래된 벡터.

[0162] 본 발명의 다양한 구체예에서, 치료학적 단백질은 치료학적 단백질 상의 하나 이상의 탄수화물에 수용성 지방산 유도체 또는 수용성 연결자를 접합함으로써 변형된다. 따라서, 한 가지 구체예에서, 치료학적 단백질은 글리코단백질이고 그리고 글리코실화를 허용하는 숙주세포로부터 정제된다 (즉, 단백질은 생체 내에서 글리코실화되고 이후에 글리코단백질로서 정제된다.). 다양한 구체예에서, 숙주 세포로부터 정제 후 치료학적 단백질은 숙주 글리코단백질이거나 또는 아니고 그리고 시험관 내에서 글리코실화된다. 시험관내 글리코실화 방법은 해당 분야에서 잘 공지된다 (가령, Meynial-Salles I and Combes D, Journal of Biotechnology 1996, 46:1-14;/ Sola RJ and Griebenow K, BioDrugs 2010, 24:9-21을 참고). 물론, 해당 분야의 통상의 기술자는 (1) 치료학적 단백질을 정제; (2) 치료학적 단백질을 변형 (가령, 아미노산 결실/삽입/치환)하여 시험관 내에서 선택적으로 부위-특이적, 글리코실화를 허용; 및 (3) 해당 분야에서 공지된 절차에 따라서 시험관내 변형된 단백질을 글리코실화할 수 있다.

[0163] **D. 투여**

[0164] 한 가지 구체예에서, 본 발명의 접합된 치료학적 단백질은 주사, 가령, 정맥내, 근육내, 또는 복강내 주사로 투여될 수 있다.

[0165] 본 발명의 접합된 치료학적 단백질을 포함하는 조성물을 인간 또는 시험 동물에게 투여하기 위해, 하나의 측면에서, 상기 조성물은 하나 이상의 제약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 용어 "제약학적으로" 또는 "약물학적으로 허용되는"은 하기 설명된 바와 같이, 안정한 분자 독립체 및 조성물을 나타내고, 단백질 분해, 가령 집합체 및 절단 산물을 저해하고, 그리고 추가적으로 해당 분야에서 잘-공지된 경로를 이용하여 투여될 때 알러지성, 또는 기타 역반응을 유발하지 않는다. "제약학적으로 허용되는 담체"는 상기 개시된 이들 물질을 포함하여, 임상학적으로 유용한 용매, 분산 매체, 코팅제, 항박테리아 및 항균제, 등장성 및 흡수지연제 등을 모두 포함한다.

[0166] 본 명세서에서 설명된 바와 같이, "유효량"은 질병 또는 질환을 치료하기 위해 또는 질병 또는 질환의 증상을 개선시키기 위해 적합한 용량을 포함한다. 한 가지 구체예에서, "유효량"은 본 명세서에서 설명된 바와 같은 출

혈 질환을 가진 포유류를 치료하기 위해 적절한 용량을 포함한다.

[0167] 조성물은 경구로, 국부적으로, 경피로, 비경구로, 흡입 스프레이로, 질로, 직장으로, 또는 두개내 주사로 투여될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 비경구는 피하 주사, 정맥내, 근육내, 조내 주사, 또는 주입 기술을 포함한다. 정맥내, 피내, 근육내, 유방내, 복강내, 경막내, 안구후, 폐내 주사에 의한 투여 및 또는 특정 부위에서의 수술 이식이 또한 고려된다. 일반적으로, 조성물은 발열원, 그리고 수여자에서 유해할 수 있는 기타 불순물에 기본적으로 자유롭다.

[0168] 조성물의 단일 또는 다수 투여는 내과의사에 의해 선택되는 용량 레벨 및 양식으로 수행될 수 있다. 질병의 예방 또는 치료를 위해, 적절한 용량은 약물이 예방 또는 치료 목적, 이전(previous) 요법, 약물에 대한 반응 및 환자의 병력, 및 담당 의사의 재량에 따라 투여되는 것에 상관없이, 상기 설명된 바와 같이, 치료되어야할 질병의 유형, 질병의 중증도 및 전개에 의존할 것이다.

[0169] 본 발명은 본 명세서에서 설명된 바와 같은 접합된 치료학적 단백질의 유효량을 포함하는 제약학적 조성물과 또한 관련된다. 제약학적 조성물은 제약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 염, 완충액, 또는 부형제를 추가로 포함한다. 제약학적 조성물은 상기-정의된 출혈 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 제약학적 조성물은 용액 또는 동결건조 산물일 수 있다. 제약학적 조성물의 용액은 임의의 적절한 동결건조 공정을 겪을 수 있다. 추가적인 측면으로서, 본 발명은 개체에게 투여를 위한 이의 용도를 촉진하는 방식으로 포장된 본 발명의 조성물을 포함한 키트를 포함한다. 한 가지 구체예에서, 이러한 키트는 본 명세서에서 설명된 화합물 또는 조성물 (가령, 접합된 치료학적 단백질을 포함하는 조성물)을 포함하며, 이는 용기, 가령 용기에 부착된 라벨이 있는 봉인된 병 또는 관에 포장되거나 또는 방법을 실시하는 데에 있어 화합물 또는 조성물의 용도를 설명한 포장물에 포함된 다. 한 가지 구체예에서, 키트에는 접합된 치료학적 단백질을 포함한 조성물을 가진 첫 번째 용기 및 첫 번째 용기내 조성물을 위한 생리학적으로 허용되는 복원성 용액을 가진 두 번째 용기가 들어있다. 하나의 측면에서, 화합물 또는 조성물은 유닛 제형(dosage form)으로 포장된다. 키트는 투여의 특이적 경로에 따라 조성물을 투여하는 데에 적합한 장비를 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게, 키트에는 치료학적 단백질 또는 펩티드 조성물의 용도를 설명한 라벨이 들어있다.

[0170] **지방산, 지방산 유도체, 및 단백질-지방산 유도체 접합체**

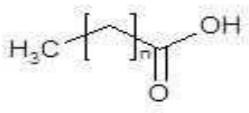
[0171] 하나의 측면에서, 본 명세서에서 제공된 치료학적 단백질 유도체 (즉, 접합된 치료학적 단백질) 분자는 수용성 지방산 유도체에 결합된다. 본 명세서에서 설명된 바와 같이, "수용성 지방산 유도체"는 본 명세서에서 설명된 바와 같은 수용성 연결자 (가령, 아미노옥시 연결자)에 접합된 지방산 (즉, 카르복실산)을 포함한다. 이러한 지방산 유도체는, 본 발명에 따라서, 안정하고 (즉, 단백질로부터 방출되지 않음), 수용성이며, 그리고 인간 혈청 알부민에 결합할 수 있다.

[0172] **A. 지방산**

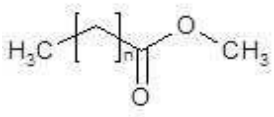
[0173] 지방산 (즉, FA 또는 FAs)은 본 발명에 따라 인간 혈청 알부민에 결합할 수 있는 포화된 지방산, 불포화된 지방산, 분지형 사슬 지방산 (Mukheriji et al., Prog Lipid Res 2003;42:359-76) 및 이의 유도체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0174] 예로써, 지방산은 다음의 일반적인 구조를 갖는다:

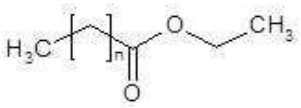
[0175] 포화된 FA: 일반적인 구조

[0176] 

[0177] 포화된 FA 메틸 에스테르: 일반적인 구조

[0178] 

[0179] 포화된 FA 에틸 에스테르: 일반적인 구조



[0180]

[0181] 본 발명의 다양한 구체예에 따라서, 지방산은 또한 다양한 대안적인 구조 (가령, 메틸- 또한 에틸 에스테르) 또는 기타 구조, 가령 ω-위치내 말단기 (가령, 하이드록실기, 아미노기, 티오기 및 카르복실기)를 함유한 것을 포함한다.

[0182] 한 가지 구체예에서, 지방산은 자연적으로-발생한 지방산이다. 다양한 구체예에서, 지방산은 짧은 사슬 지방산 (가령, 6개 미만의 탄소), 중간 사슬 지방산 (가령, 6-12개 탄소), 긴 사슬 지방산 (가령, 12개 탄소보다 더 긴), 또는 매우 긴 사슬 지방산 (가령, 22개 탄소보다 더 긴)이다. 또 다른 구체예에서, 지방산은 4 내지 28개 탄소를 갖는다. 한 가지 구체예에서, 지방산은 시스(cis) 구조형태로 있다. 또 다른 구체예에서, 지방산은 트랜스(trans) 구조형태로 있다.

[0183] 한 가지 구체예에서, 지방산은 12 내지 20개의 탄소 길이로 포화된 지방산이다. 이러한 지방산은 해당 분야에서 공지된다, 가령, C12 (도데칸산, 라우르산), C14 (테트라데칸산, 미리스트산), C16 (헥사데칸산, 팔미트산), C18 (옥타데칸산, 스테아르산) 및 C20 (에이코산산, 아라키드산). 불포화된 지방산의 예시는 미리스트올레산(C14:1), 팔미톨레산(C16:1), 올레산 (C18:1), 리놀레산 (C18:2) 및 아라키돈산 (C20:4)이다. 대부분의 지방산은 상업적으로 이용가능하고 상이한 화학적 방법에 의해 제조될 수 있다 (Recent Developments in the Synthesis of Fatty Acid Derivatives, Editors: Knothe G and Derksen JTB, AOCS Press 1999, ISBN 1-893997-00-6.)

[0184] 본 발명의 다양한 구체예에서, 지방산은 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 또는 50개 탄소를 포함한다.

[0185] **B. 지방산 유도체**

[0186] 본 발명은 인간 혈청 알부민에 결합할 수 있는 신규한 종류의 활성화 지방산 유도체 (FA 유도체)의 제조법을 제공한다. FA 유도체는 수용성 스페이서(spacer) 또는 연결자를 함유하며, 이는 수성 용액내 FA 유도체의 처리 및 조작을 허용한다 (즉, 본 발명에 따른 지방산 유도체는 그들이 유래한 상응하는 지방산과는 달리, 수용성임). 한 가지 구체예에서, FA 유도체는 활성 아미노옥시기를 함유하며, 이는 치료학적 단백질의 산화된 탄수화물 모이어티 (대개 N-글리칸)와의 FA 유도체의 커플링을 허용하여 안정한 옥심 결합을 형성한다. 본 명세서에서 설명된 바와 같이, "안정한" 결합은 공유결합이 "비-방출적인" 또는 비-가수분해적인 것으로 형성된다는 것을 의미한다.

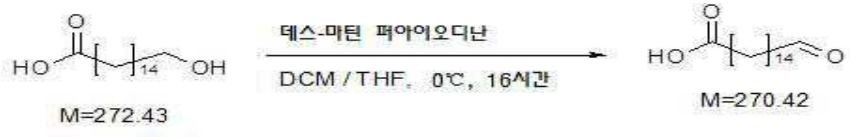
[0187] 탄수화물을 통한 화학적 변형은 높은 잔효성(residual activity)을 가진 접합체를 형성하기 위해 FVIII, FIX 및 FVIIa와 같은 응고 단백질을 위한 바람직한 선택일 수 있다.

[0188] 예로서 그리고 제한 없이, 다음 전략은 활성 아미노옥시기를 함유한 수용성 FA 유도체를 제조하기 위한 본 발명에 따른 한 가지 구체예를 나타낸다.

[0189] 전략 1:

[0190] FA 유도체 (가령, 16-하이드록시헥사데칸산)의 ω-하이드록시기를 데스 마틴 퍼아이오디난으로 산화하여 알데하이드기를 발생시킨다. 다음 단계에서, 수용성 PEG 사슬 (가령, 3,6,9-트리아옥사운데칸-1,11-디옥시아민)을 함유한 디아미노옥시 연결자를 이 알데하이드기에 커플링시켜 안정한 옥심 결합을 형성한다. 다음 도식은 전략 1에 따른 한 가지 예시를 나타낸다:

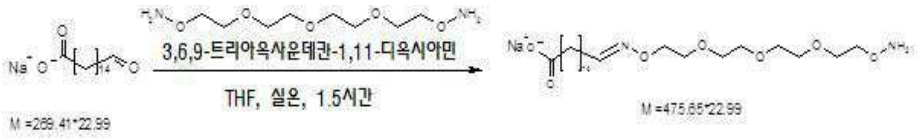
[0191] 단계 1: 16-하이드록시스테아르산을 데스-마틴 시약을 이용하여 선택적으로 산화하여 16-옥소스테아르산을 수득하였다. 분리제로서 실리카 겔을 이용하여 크로마토그래피로 미가공 산물을 정제하였다.



16-하이드록시헥사데칸산 16-옥소헥사데칸산

[0192]

[0193] 단계 2: 16-옥소스테아르산 나트륨 염의 16-옥소 모이어티를 3,6,9-트리아옥사운데칸-1,11-디옥시아민과 반응시켰다. 분리제로서 실리카 겔을 이용하여 크로마토그래피로 미가공 산물을 정제하였다.



16-옥소헥사데칸산 나트륨 염 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시아미노)-헥사데칸산 나트륨 염

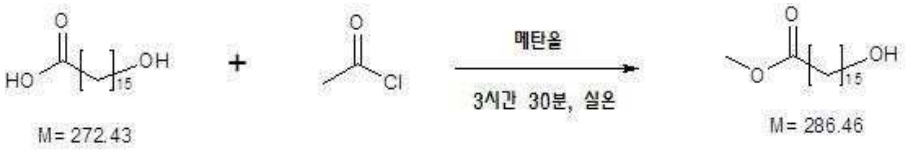
[0194]

[0195] 대안적으로, 또 다른 구체예에서, 다음 전략을 이용하여 활성 아미노옥시기를 함유한 수용성 FA 유도체를 제조한다.

[0196] 전략 2:

[0197] ω-하이드록시 지방산 (가령, 16-하이드록시헥사데칸산)의 카르복실기를 아세틸 클로라이드로 에스테르화한다. 이 메틸 에스테르 유도체의 ω-하이드록시기는 메실 클로라이드로 활성화하여 더 나은 이탈기를 도입한다. 이후 메실기는 수용성 PEG 사슬 (가령, 3,6,9-트리아옥사운데칸-1,11-디옥시아민)을 함유한 디아미노옥시 연결자와 반응시켜 안정한 아미노옥시-메틸렌 결합을 형성한다. 선택적으로 메틸 에스테르는 알칼리 용액에서 가수분해되어 유리 카르복실기를 발생시킬 수 있다. 다음 도식은 전략 2에 따른 한 가지 예시를 나타낸다:

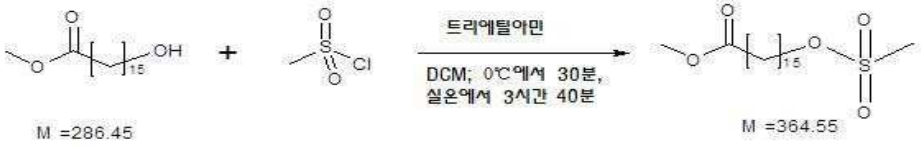
[0198] 단계 1: 메틸화 시약으로서 아세틸 클로라이드를 이용하여 메틸 에스테르를 형성함으로써 16-하이드록시헥사데칸산의 카르복실산 모이어티를 보호하였다.



16-하이드록시헥사데칸산 아세틸 클로라이드 16-하이드록시헥사데칸산 메틸 에스테르

[0199]

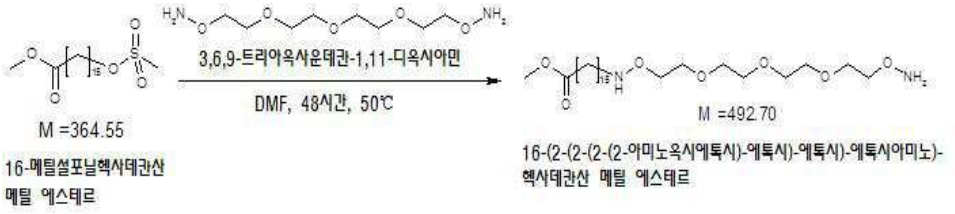
[0200] 단계 2: 더 나은 이탈기인, 메실로 하이드록시기를 치환함으로써 16-하이드록시헥사데칸산 메틸 에스테르의 16-하이드록시 모이어티를 활성화하였다.



16-하이드록시헥사데칸산 메틸 에스테르 메실 클로라이드 16-메틸설포닐헥사데칸산 메틸 에스테르

[0201]

[0202] 단계 3: 이작용(bifunctional) 3,6,9-트리아옥사운데칸-1,11-디옥시아민의 한 가지 아미나옥시 모이어티에 의해 16-메틸설포닐헥사데칸산 메틸 에스테르의 16-메실 모이어티를 치환하였다. 분리제로서 실리카 겔을 이용하여 크로마토그래피로 미가공 산물을 정제한다.

[0203] 

[0204] 또한 추가적인 전략이 본 발명에 의해 고려된다. 예를 들어, 본 발명은 산화된 탄수화물 잔기의 알데하이드기에 커플링시키기 위한 아미노옥시 화학으로 제한되지 않는다. 본 명세서에서 설명된 바와 같이, 알데하이드기에 커플링시키기 위한 하이드라지드, 아미노기에 커플링시키기 위한 NHS 에스테르 및 치료학적 단백질의 유리 SH-그룹에 커플링시키기 위한 말레이미드를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 기타 화학의 용도가 또한 고려된다.

[0205] 예로서, 상기 설명된 바와 같이 제조된 지방산 메틸 에스테르는 본 명세서에서 설명된 바와 같이 상업적으로-이용가능한 MAL-PEG-COOH (mal-PEG(12)-COOH / IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz, Germany)와 반응된다. 또 다른 예로서, 반응성 아미노기를 가진 지방산 에스테르는 본 명세서에서 설명된 바와 같이 상업적으로 이용가능한 NHS-PEG-NHS (NHS-dPEG(4)-NHS / IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz, Germany)와 반응된다.

[0206] 수용성 연결자는 수용성 폴리머 (가령, PEG)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 연결자는 이의 물 용해도를 증가시키는 하나 이상의 작용기를 함유한 임의의 화학 구조로 구성될 수 있다. 이들 작용기는 음성 또는 양성 전하를 형성하는 능력을 가질 수 있고, 그렇게 함으로써 연결자 수용성을 만든다. 한 가지 구체예에서 이러한 작용기는 설포기 또는 카르복실기를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 추가적으로 임의의 극성 작용기는 연결자를 더욱 수용성으로 만드는 데에 이용될 수 있다. 이를 위한 예시는 하이드록실기, 아미노기, 아미도기, 말레이미도기, 아미노옥시기 및 하이드라지드기 그리고 N-하이드록시 석신이미드 (NHS) 에스테르 및 설포 NHS 에스테르이다.

[0207] 다양한 구체예에서, 수용성 폴리머는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 분지형 PEG, 폴리시알산 (PSA), 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록시에틸 전분 (HES), 탄수화물, 다당류, 플루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트, 데르마탄 설페이트, 전분, 덱스트란, 카르복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글리콜 (PAG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모르폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카르복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록실메틸에킬렌 하이드록시메틸포르말) (PHF), 2-메타아크릴로일옥시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0208] 한 가지 구체예에서, 수용성 폴리머는 PEG이다. 본 발명의 다양한 구체예에서, 수용성 폴리머는 대략적으로 3 내지 25개 산소의 사슬 길이를 포함한다. 예를 들어, 수용성 폴리머는 본 발명에 따른 다양한 구체예에서, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 또는 25개 산소를 포함한다.

[0209] **C. 단백질-지방산 유도체 접합체**

[0210] 아미노옥시 연결자 시스템 (즉, 여기서 수용성 지방산 유도체는 아미노옥시 연결자를 포함함)은 본 발명에 의해 고려된다. 예를 들어, 본 발명의 한 가지 구체예에서, 옥심기를 형성하기 위해 (가령, 나트륨 퍼아이오데이트에 의한 산화 후 탄수화물 모이어티 상에서) 알데하이드와의 하이드록실아민 또는 하이드록실 아민 유도체의 반응이 단백질 접합체의 제조에 적용된다. 예를 들어, 글리코단백질 (가령, 본 발명에 따른 치료학적 단백질)은 산화제, 가령 나트륨 퍼아이오데이트 (NaIO4)로 일차 산화된다 (Rothfus JA et Smith EL., J Biol Chem 1963, 238, 1402-10; 및 Van Lenten L and Ashwell G., J Biol Chem 1971, 246, 1889-94). 글리코단백질의 퍼아이오데이트 산화는 활성 알데하이드기를 형성하기 위해 퍼아이오데이트를 이용한 인접한 디올의 산화인, 1928년에 설명된 고전적인 말라프레이드(Malaprade) 반응에 기반한다 (Malaprade L., Analytical application, Bull Soc Chim France, 1928, 43, 683-96). 이러한 산화제에 대한 추가적인 예시는 납 테트라아세테이트 (Pb(OAc)4), 망간 아세테이트 (MnO(Ac)3), 코발트 아세테이트 (Co(OAc)2), 탈륨 아세테이트 (TlOAc), 세륨 설페이트 (Ce(SO4)2) (US 4,367,309) 또는 칼륨 퍼루테네이트 (KRuO4) (Marko et al., J Am Chem Soc 1997,119, 12661-2)이다. "산화제"에 따르면, 약한 산화 화합물은 탄수화물내 인접한 디올을 산화하여, 그렇게 함으로써 생리학적 반응 조건 하에 활성 알데하이드기를 발생시킬 수 있는 것으로 의미된다.

[0211] 두 번째 단계는 옥심 결합을 형성하기 위한 산화된 탄수화물 모이어티에 아미노옥시기를 함유한 폴리머 (가령, 지방산 유도체)의 커플링이다. 본 발명의 한 가지 구체예에서, 이 단계는 친핵성 촉매 아닐린 또는 아닐린 유도

체의 촉매량의 존재에서 수행될 수 있다 (Dirksen A et Dawson PE, Bioconjugate Chem. 2008; Zeng Y et al., Nature Methods 2009;6:207-9). 아닐린 촉매는 매우 낮은 농도의 시약의 사용을 허용하는 옥심 결찰을 급격히 가속화한다. 본 발명의 또 다른 구체예에서 옥심 결합은 NaCNBH3을 이용한 환원에 의해 안정화되어 알콕시아민 결합을 형성한다. 추가적인 촉매는 하기 설명된다. 또 다른 구체예에서, 이 단계는 m-톨루이딘의 존재에서 수행된다.

[0212] 본 발명의 한 가지 구체예에서, 단백질에 수용성 연결자 (가령, 지방산 유도체)를 접합하기 위한 반응 단계는 별도로 및 연속적으로 수행된다 (즉, 시작 물질 (가령, 치료학적 단백질, 수용성 연결자, 등), 시약 (가령, 산화제, 아닐린, 등) 및 반응 산물 (가령, 치료학적 단백질 상의 산화된 탄수화물, 활성화 아미노옥시 수용성 연결자, 등)은 개별적인 반응 단계 사이에서 분리됨). 또 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 접합 반응을 완료하는 데에 필수적인 시작 물질 및 시약은 단일 관에서 수행된다. 한 가지 구체예에서, 자연형 단백질은 아미노옥시-폴리머 시약과 혼합된다. 이후에 산화 시약이 참가되고 접합 반응이 수행된다.

[0213] 아미노옥시 기술 상의 추가적인 정보는 다음 참고문헌에서 찾을 수 있으며, 이들 각각은 이들 전체로 편입된다: EP 1681303A1 (HAS화(HASylated) 에리트로포이에틴); WO 2005/014024 (옥심 연결기에 의해 연결된 폴리머 및 단백질의 접합체); WO96/40662 (아미노옥시-함유 연결자 화합물 및 접합체에서의 이들의 적용); WO 2008/025856 (변형된 단백질); Peri F et al., Tetrahedron 1998, 54, 12269-78; Kubler-Kielb J and Pozsgay V., J Org Chem 2005, 70, 6887-90; Lees A et al., Vaccine 2006, 24(6), 716-29; 및 Heredia KL et al., Macromolecules 2007, 40(14), 4772-9.

[0214] 가령, 단백질 상의 유리 설프히드릴기 또는 유리 아미노기를 통하여 또는 본 명세서에서 설명된 연결자 분자를 통하여, 단백질에 직접적으로 커플링시킴으로써 수용성 연결자의 커플링이 수행될 수 있다. 하나의 측면에서 접합은 안정한 결합의 형성 하에 치료학적 단백질에 수용성 연결자의 직접적인 커플링 (또는 연결자 시스템을 통하여 커플링)에 의해 수행된다.

[0215] 따라서, 본 발명의 다양한 구체예에서, 본 명세서에서 설명된 지방산 유도체는 치료학적 단백질에 접합을 허용하는 것으로 설계된다. 예를 들어, 지방산 유도체는 본 명세서에서 설명된 바와 같이, 다양한 말단 반응기를 포함하는 것으로 설계된다.

[0216] 특정한 측면에서, 치료학적 단백질은 다양한 화학적 방법 중 어느 하나에 의해 수용성 지방산 유도체에 접합된다 (Roberts JM et al., Advan Drug Delivery Rev 2002;54:459-76). 예를 들어, 한 가지 구체예에서 치료학적 단백질은 N-하이드록시석신이미드 (NHS) 에스테르를 이용하여 단백질의 유리 아미노기에 지방산의 유도체의 접합으로 변형된다. 또 다른 구체예에서 수용성 지방산 유도체는 말레이미드 화학을 이용하여 유리 SH 기에 커플링된다. 또 다른 구체예에서 수용성 지방산 유도체는 앞선 산화 후 하이드라지드 또는 아미노옥시 화학의 용도에 의해 치료학적 단백질의 탄수화물 모이어티에 커플링된다.

[0217] 본 발명의 한 가지 구체예에서, 치료학적 단백질은 N-하이드록시석신이미드 (NHS) 에스테르를 함유한 수용성 지방산 유도체의 이용에 의해 리신 잔기를 통하여 변형된다. 이 유도체는 안정한 아미드 결합을 형성함으로써 약한 조건 하에 치료학적 단백질의 리신 잔기와 반응한다.

[0218] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 단백질 또는 지방산 유도체 중 어느 하나의 카르복실기와 단백질 또는 지방산 유도체의 아민기 사이의 펩티드 결합을 통한 결합, 또는 단백질 또는 지방산 유도체의 카르복실기와 치료학적 단백질 또는 지방산 유도체의 하이드록실기 사이의 에스테르 결합이 고려된다. 치료학적 단백질이 지방산 유도체에 공유결합으로 결합되게 하는 또 다른 결합은 가령, 지방산의 말단 끝에서 형성된 알데하이드기와 반응하는 단백질 상의 유리 아미노기 사이의 쉬프(Schiff) 염기를 통해 일어난다. 발생된 쉬프 염기는 하나의 측면에서 NaCNBH3을 이용한 특이적 환원에 의해 안정화되어 이차 아민을 형성한다. 대안적인 기법은 앞선 산화 후 NH4Cl을 이용한 환원성 아민화에 의한 지방산 유도체내 말단 유리 아미노기의 발생이다. 두 개의 아미노기 또는 두 개의 하이드록실기를 연결하기 위해 이작용 시약이 사용될 수 있다. 예를 들어, 아미노기를 함유한 지방산 유도체는 BS3 (비스(설포석신이미딜)수버레이트 / Pierce, Rockford, IL)과 같은 시약을 가진 단백질의 아미노기에 커플링된다. 추가적으로 Sulfo-EMCS (N-ε-말레이디도카프로일옥시) 설포석신이미드 에스테르/ Pierce)와 같은 이종이작용(heterobifunctional) 가교 시약이 예를 들어 아민기 및 티올기를 연결하는 데에 사용된다.

[0219] 또 다른 기법에서, 활성 하이드라지드기를 가진 지방산 유도체는 제조되고 그리고 앞선 산화 및 알데하이드 기능의 발생 후 단백질의 탄수화물 모이어티에 커플링된다.

[0220] 상기 설명된 바와 같이, 치료학적 단백질의 유리 아민기는 지방산 유도체의 1-카르복실기와 반응하여 펩티딜 결

합을 형성하거나 또는 단백질 상의 1-카르복실산 기 및 하이드록실기 또는 기타 적합한 활성기 사이에서 에스테르 결합이 형성된다.

[0221] 다양한 구체예에서, 치료학적 단백질은 화학량적 양으로 지방산 유도체와 연결되거나 연관된다 (가령, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:7, 1:8, 1:9, 또는 1:10 등). 다양한 구체예에서, 1-6, 7-12 또는 13-20개 지방산 유도체는 단백질과 연결된다. 또 다른 구체예에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 지방산 유도체는 단백질과 연결된다.

[0222] 다양한 구체예에서, 치료학적 단백질은 변형되어 글리코실화 부위 (즉, 자연형 글리코실화 부위 외에 부위)로 도입된다. 이러한 변형은 해당 분야에서 공지된 표준 분자의 생물학적 기술을 이용하여 수행될 수 있다. 더욱이, 치료학적 단백질은, 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 통한 수용성 연결자와의 접합에 앞서, 생체내 또는 시험관 내에서 글리코실화될 수 있다. 이들 글리코실화 부위는 수용성 연결자와의 단백질의 접합을 위한 타겟으로서 역할할 수 있다 (미국 특허 출원 제20090028822호, 미국 특허 출원 제2009/0093399호, 미국 특허 출원 제2009/0081188호, 미국 특허 출원 제2007/0254836호, 미국 특허 출원 제2006/0111279호, 및 DeFrees S. et al., Glycobiology, 2006, 16, 9, 833-43).

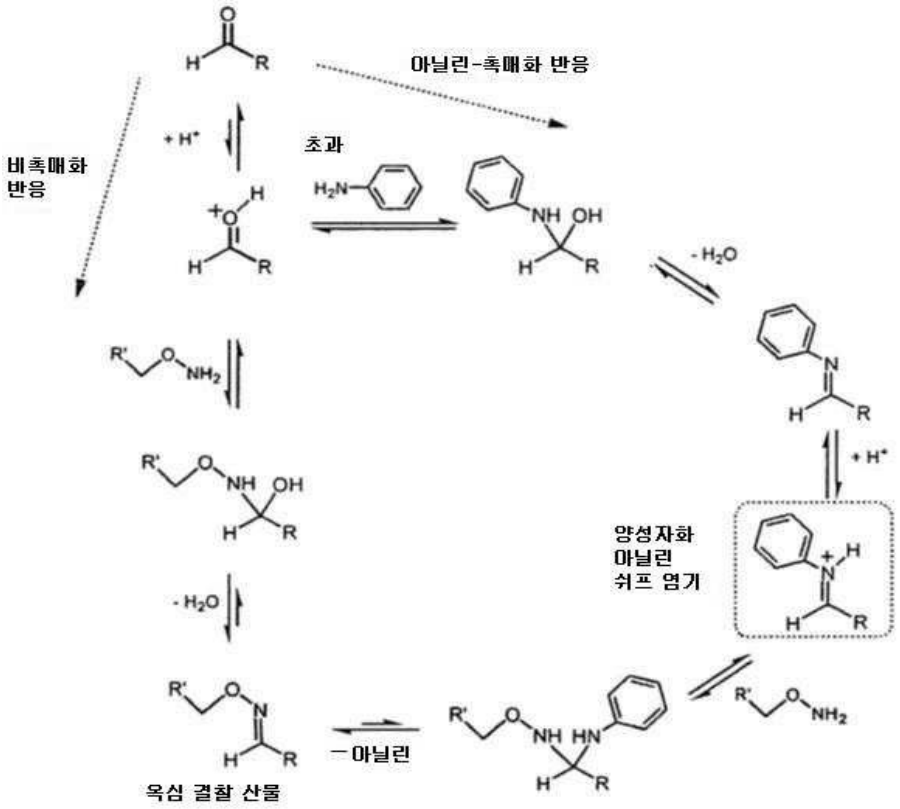
[0223] 한 가지 구체예에서, 접합된 단백질은 자연형 치료학적 단백질 산물의 전체 기능 활성도를 유지하고, 그리고 자연형 치료학적 단백질 산물과 비교하여, 생체 내에서 연장된 반감기를 제공한다. 또 다른 구체예에서, 접합된 단백질은 자연형 단백질에 비해 적어도 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44. 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56,57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 또는 150 퍼센트 (%) 생물학적 활성도를 보유한다.

[0224] 관련된 측면에서, 접합된 단백질 및 자연형 혈액 응고 단백질의 생물학적 활성도는 발색성 활성도 대 혈액 응고 인자 항원 값 (혈액 응고 인자:Chr: 혈액 응고 인자:Ag)의 비에 의해 결정된다.

[0225] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 접합된 단백질의 반감기는 자연형 치료학적 단백질의 생체내 반감기에 비해 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10-배 감소되거나 또는 증가된다.

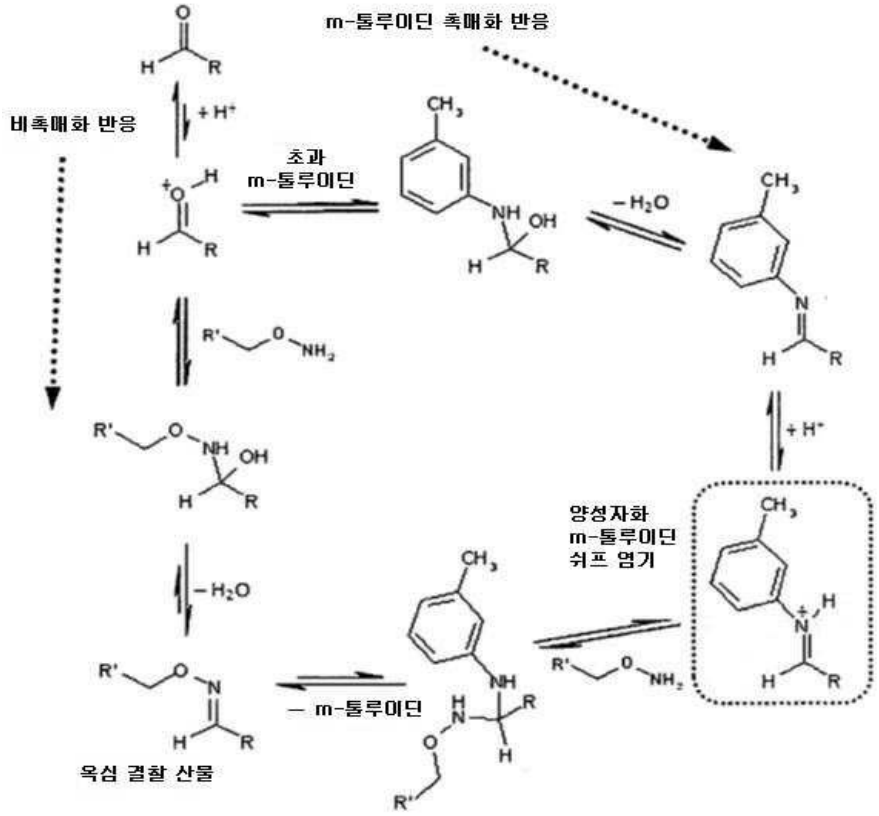
[0226] **친핵성 촉매**

[0227] 본 명세서에서 설명된 바와 같이, 치료학적 단백질에 수용성 지방산 유도체의 접합은 아닐린에 의해 촉매될 수 있다. 아닐린은 아민과의 알데하이드 및 케톤의 수성 반응을 강하게 촉매하여 하이드라존 및 옥심과 같은 안정한 이민을 형성한다. 다음 도식은 비촉매화 대 아닐린-촉매화 옥심 결찰 반응을 비교한다 (Kohler JJ, ChemBioChem 2009;10:2147-50으로부터 개작됨).



[0228]

[0229] 하지만, 아닐린과 연관된 수많은 건강 위험요소를 고려하면, 대안적인 촉매가 바람직하다. 본 발명은 대안적인 옥심 결찰 촉매로서 아닐린 유도체를 제공한다. 이러한 아닐린 유도체는 o-아미노 벤조산, m-아미노 벤조산, p-아미노 벤조산, 설파닐산, o-아미노벤즈아미드, o-톨루이딘, m-톨루이딘, p-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, 및 p-아니시딘을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 다음 도식은 비촉매화 대 m-톨루이딘-촉매화 옥심 결찰 반응을 비교한다 (PCT/US2011/45873):



Kohler JJ, ChemBioChem 2009;10:2147-50으로부터 개작됨

[0230]

[0231] 본 발명의 한 가지 구체예에서, m-톨루이딘 (메타-톨루이딘, m-메틸아닐린, 3-메틸아닐린, 또는 3-아미노-1-메틸벤젠으로도 알려짐)은 본 명세서에서 설명된 접합 반응을 촉매하는 데에 사용된다. M-톨루이딘 및 아닐린은 유사한 물리적 특성 및 본질적으로 동일한 pKa 값 (m-톨루이딘:pKa 4.73, 아닐린:pKa 4.63)을 갖는다.

[0232] 본 발명의 친핵성 촉매는 옥심 결찰 (가령, 아미노옥시 결합을 이용) 또는 하이드라존 형성 (가령, 하이드라지드 화학을 이용)을 위해 유용하다. 본 발명의 다양한 구체예에서, 친핵성 촉매는 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50 mM의 농도로 접합 반응에서 제공된다. 한 가지 구체예에서, 친핵성 촉매는 1 내지 10 mM로 제공된다. 본 발명의 다양한 구체예에서, 접합 반응의 pH의 범위는 4.0 내지 7.0, 4.5 내지 7.0, 5.0 내지 6.5, 5.0 내지 6.5이다. 다양한 구체예에서, 접합 반응의 pH는 pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 및 7.5이다. 한 가지 구체예에서, pH는 5.5 내지 6.5이다.

[0233] **접합된 단백질의 정제**

[0234] 다양한 구체예에서, 본 발명에 따라서 산화제와 인큐베이션되었던 단백질 및/또는 수용성 지방산 유도체와 접합되었던 치료학적 단백질의 정제가 바람직하다. 수많은 정제 기술은 해당 분야에서 공지되고 그리고 크로마토그래피 방법, 여과 방법, 및 침전 방법을 제한 없이 포함한다 (가령, Guide to Protein Purification, Meth. Enzymology Vol 463 (edited by Burgess RR and Deutscher MP), 2nd edition, Academic Press 2009를 참고).

[0235] 다음 실시예는 제한되는 것으로 의도된 것이 아니라 본 발명의 특정 구체예의 예시일 뿐이다.

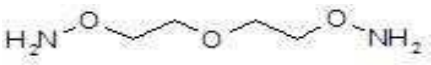
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0236] **실시예**

[0237] **실시예 1**

[0238] 동종이작용(homobifunctional) 연결자 $NH_2[OCH_2CH_2]_2ONH_2$의 제조

[0239] 동종이작용 연결자 $NH_2[OCH_2CH_2]_2ONH_2$

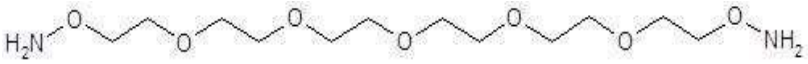
[0240] 

[0241] Boturyn et al. (Tetrahedron 1997;53:5485-92)에 따라 일차 아민의 변형된 가브리엘-합성법(Gabriel-Synthesis)을 활용한 두 단계의 유기 반응으로 두 개의 활성 아미노옥시기를 함유한 3옥사펜탄-1,5-디옥시아민을 합성하였다 (도 1). 첫 번째 단계에서, 2,2-디클로로디에틸에테르의 하나의 분자를 DMF내 엔도-N-하이드록시-5-노르보르넨-2,3-디카르복시미드의 두 개의 분자와 반응시켰다. 에탄올내 하이드라진분해에 의한 결과적 중간체로부터 바람직한 동종이작용 산물을 제조하였다.

[0242] **실시예 2**

[0243] 동종이작용 연결자 $NH_2[OCH_2CH_2]_6ONH_2$의 제조

[0244] 동종이작용 연결자 $NH_2[OCH_2CH_2]_6ONH_2$

[0245] 

[0246] Boturyn et al. (Tetrahedron 1997;53:5485-92)에 따라 일차 아민의 변형된 가브리엘-합성법을 활용한 두 단계의 유기 반응으로 두 개의 활성 아미노옥시기를 함유한 3,6,9,12,15-펜타옥사-헵타데칸-1,17-디옥시아민을 합성하였다. 첫 번째 단계에서, 헥사에틸렌 글리콜 디클로라이드의 하나의 분자를 DMF내 엔도-N-하이드록시-5-노르보르넨-2,3-디카르복시미드의 두 개의 분자와 반응시켰다. 에탄올내 하이드라진분해에 의한 결과적 중간체로부터 바람직한 동종이작용 산물을 제조하였다.

[0247] **실시예 3**

[0248] 동종이작용 연결자 $NH_2[OCH_2CH_2]_4ONH_2$의 제조

[0249] 

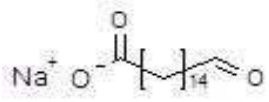
[0250] Boturyn et al. (Tetrahedron 1997;53:5485-92)에 따라 일차 아민의 변형된 가브리엘-합성법을 활용한 두 단계의 유기 반응으로 두 개의 활성 아미노옥시기를 함유한 동종이작용 연결자 $NH_2[OCH_2CH_2]_4ONH_2$ (3,6,9-트리아옥사운데칸-1,11-디옥시아민)를 합성하였다: 첫 번째 단계에서, 비스-(2-(2-클로로에톡시)-에틸)-에테르의 하나의 분자를 DMF내 엔도-N-하이드록시-5-노르보르넨-2,3-디카르복시미드의 두 개의 분자와 반응시켰다. 에탄올내 하이드라진분해에 의한 결과적 중간체로부터 최종 동종이작용 산물을 제조하였다.

[0251] **실시예 4**

[0252] 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시이미노)-헥사데칸산 나트륨 염의 제조

[0253] Halligan and Nair (Arkivoc 2006 (ii) 101-106) 및 Hubbs and Heathcock (J Am Chem Soc, 2003;125:12836-43)에 따라 두단계 반응으로 지방산-아미노옥시 연결자 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시이미노)-헥사데칸산 나트륨 염을 합성하였다.

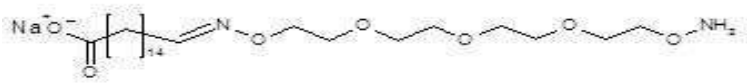
[0254] 중간체 1: 16-옥소헥사데칸산 나트륨 염

[0255] 

[0256] 디클로로메탄 (10ml) 및 테트라하이드로푸란 (20ml)내 16-하이드록시헥사데칸산 (800 mg, 2.9 mmol)의 냉각시킨 용액 (0℃)에 데스-마틴 퍼아이오디난 (1636 mg, 3.7 mmol)을 0℃에서 첨가하였다. 혼합물을 Ar-대기 (atmosphere) 하에 0℃에서 3.5시간 동안 그리고 실온에서 2.5시간 동안 교반하였다. 이후 포화된 나트륨 바이카르보네이트 용액내 나트륨 티오설페이트의 15%-용액을 첨가하였고, 혼합물을 1.5시간 동안 실온에서 교반하였다. 디에틸에테르로 중간체 1을 추출하였고, 나트륨 설페이트로 건조시킨 후 유기층을 건조상태까지 증발시켰고

그리고 분리제로서 실리카 겔 및 톨루엔 / 에틸아세테이드의 용매 혼합물을 이용한 칼럼 크로마토그래피로 정제하였다. 수득률: 34% (백색 고형).

[0257] 산물: 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시이미노)-헥사데칸산 나트륨 염



[0258]

[0259] 무수 테트라하이드로푸란 (3ml)내 3,6,9-트리아옥사운데칸-1,11-디옥시아민 (146mg, 0.65mmol)의 용액에 중간체 1 (19.1 mg, 0.07 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 Ar-대기 하에 실온에서 1.5시간 동안 교반하였다. 이후 혼합물을 건조상태까지 증발시켰고 그리고 분리제로서 실리카 겔 및 디클로로메탄 / 메탄올 / 후니그 염기의 용매 혼합물을 이용한 칼럼 크로마토그래피로 정제하였다. 수득률: 71% (백색 고형).

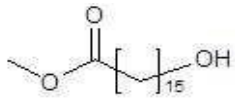
[0260] 질량 분석법 (ESI): m/z = $[M+2H]^+$에 대해 477,3529

[0261] **실시예 5**

[0262] 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시아미노)-헥사데칸산 메틸 에스테르의 제조

[0263] Hang et al. (J Am Chem Soc 2007;129:2744-5)에 따라 세 단계 반응으로 지방산 메틸 에스테르-아미노옥시 연결자 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시아미노)-헥사데칸산 메틸 에스테르를 합성하였다.

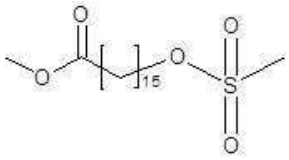
[0264] 중간체 1: 16-하이드록시헥사데칸산 메틸 에스테르



[0265]

[0266] 무수 메탄올 (27 ml)내 16-하이드록시헥사데칸산 (3000 mg, 10.79mmol)의 냉각된 용액 (0℃)에 아세틸 클로라이드 (3.837 ml, 53.96 mmol)를 2분 내에 0℃에서 점적하여 첨가하였고, 이후 혼합물을 Ar-대기 하에 3.5시간 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음에 혼합물을 건조상태까지 증발시켰고, 잔여물을 디클로로메탄 (100 ml)에서 용해시켰고, 포화된 나트륨 바이카르보네이트 용액 (2x50ml) 및 염수(Brine) 용액 (1x50 ml)으로 세척하였다. 나트륨 설페이트로 건조시킨 후 수집된 유기층을 건조상태까지 증발하였고 그리고 실온에서 진공 건조시켰다. 수득률: 92% (백색 고형).

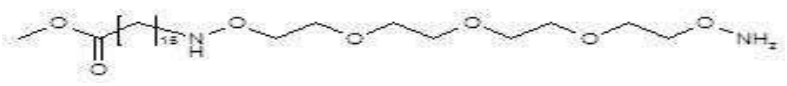
[0267] 중간체 2: 16-메틸설포닐헥사데칸산 메틸 에스테르



[0268]

[0269] 디클로로메탄 (40ml)내 중간체 1 (2807 mg, 9.80 mmol)의 냉각된 용액 (0℃)에 트리에틸아민 (1.502 ml, 10.78mmol)을 첨가하였고, 이후 디클로로메탄 (5ml)내 메실 클로라이드 (0.834ml, 10.78 mmol)의 사전냉각된 용액 (0℃)을 0℃에서 10분 내에 점적하여 첨가하였다. 혼합물을 0℃에서 30분 동안 및 실온에서 2.75시간 동안 교반하였다. 이후 혼합물을 디클로로메탄 (150 ml)으로 희석하였고, 물 (1x100 ml), 포화된 나트륨 바이카르보네이트 용액 (2x100 ml) 및 염수 용액(1x100 ml)으로 세척하였다. 나트륨 설페이트로 건조시킨 후 수집된 유기층을 건조상태까지 증발시켰고 그리고 실온에서 진공 건조시켰다. 수득률: 95% (백색 옅은 황색 고형).

[0270] 산물: 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시아미노)-헥사-데칸산 메틸 에스테르



[0271]

[0272] 무수 N,N-디메틸포름아미드 (22 ml)내 3,6,9-트리아옥사운데칸-1,11-디옥시아민 (517 mg, 2.30 mmol)의 용액에 무수 N,N-디메틸포름아미드 (7ml)내 중간체 2 (70 mg, 0.19mmol)의 용액을 Ar-대기 하에 실온에서 1시간 동안

점적하여 첨가하였고; 혼합물을 상이한 온도 (실온, 50℃, 80℃)에서 2일 동안 교반하여 반응을 완성시켰다. 이후 혼합물을 건조상태까지 증발시켰고, 분리제로서 실리카 겔 및 디클로로메탄 / 메탄올의 용매 혼합물을 이용한 칼럼 크로마토그래피로 미가공 산물을 정제하였다. 수득률: 31% (무색의 부분적으로 굳은 백색 오일).

[0273] 질량 분석법 (ESI): m/z = $[M+H]^+$에 대해 493,3824

[0274] **실시예 6**

[0275] 응고 인자 VIII의 탄수화물 모이어티에 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시아미노)-헥사-데칸산 메틸 에스테르의 커플링

[0276] 두-단계 절차를 이용함으로써 FA-rFVIII을 제조한다. 첫 번째 단계에서 rFVIII을 $NaIO_4$로 산화하고 음이온 교환 크로마토그래피 (AEC)로 정제한다. 그 다음에 산화된 rFVIII을 FA-아미노옥시 시약으로 변형시킨다.

[0277] rFVIII (45mg의 시작 물질)을 $NaIO_4$로 산화한다 (최종 농도 200 μM). 30분의 인큐베이션 시간 후 (22℃), 1 M 수성 L-시스테인 용액을 첨가함으로써 산화 반응을 중지시킨다 (최종 농도: 10 mM). 산화된 rFVIII을 EMD TMAE(M) 상에서 음이온 교환 크로마토그래피로 정제한다. 이후 DMSO내 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시아미노)-헥사-데칸산 메틸 에스테르의 10% (w/v) 용액 25 μl (실시예 3에 따라 제조됨)를 용출액 (단백질 농도 2 mg/ml)에 첨가하고 그리고 커플링 반응을 4℃에서 18시간 동안 수행한다. 이후 페닐 세파로오스(Phenyl Sepharose) 4 FF 상에서의 HIC로 FA-rFVIII 접합체를 추가 정제한다. 최종적으로 30kD 막(MILLIPORE)을 이용한 UF/DF로 용출액을 농축시킨다.

[0278] **실시예 7**

[0279] 응고 인자 IX의 탄수화물 모이어티에 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시아미노)-헥사-데칸산 메틸 에스테르의 커플링

[0280] 10 mg rFIX를 반응 완충액 (20 mM L-히스티딘, 5 mM $CaCl_2$, 150 mM NaCl, pH 6.0)에서 용해시켜 2.5 mg/ml의 최종 농도를 제공한다. 이 용액에 5mM 수성 $NaIO_4$ 용액을 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻는다. 어두운 곳에서 부드러운 교반 하에 4℃에서 1시간 동안 반응 혼합물을 인큐베이션하였다. 이후 초과 $NaIO_4$의 제거를 위해 사전-평형된 PD-10 탈염(desalting) 칼럼 상에 혼합물을 로딩한다. 이 혼합물에 DMSO내 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시아미노)-헥사-데칸산 메틸 에스테르의 10% (w/v) 용액 8 μl (실시예 3에 따라 제조됨)를 첨가하고 그리고 4℃에서 18시간 동안 pH 6.0에서 커플링 반응을 수행한다. 이후 Q-세파로오스 FF 상에서의 IEX로 접합체를 추가 정제한다. 최종적으로 비바스핀(Vivaspin) 장비를 이용한 UF/DF로 용출액을 농축시킨다.

[0281] **실시예 8**

[0282] 응고 인자 VIIa의 탄수화물 모이어티에 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시아미노)-헥사-데칸산 메틸 에스테르의 커플링

[0283] 10 mg rFVIIa를 반응 완충액 ((50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 칼슘 클로라이드, pH 6.0)에서 용해시켜 2.0 mg/ml의 최종 농도를 제공한다. 이 용액에 5 mM 수성 $NaIO_4$ 용액을 첨가하여 50 μM의 최종 농도를 얻는다. 어두운 곳에서 부드러운 교반 하에 4℃에서 1시간 동안 반응 혼합물을 인큐베이션한다. 이후 초과 $NaIO_4$의 제거를 위해 사전-평형된 PD-10 탈염 칼럼 상에 혼합물을 로딩한다. 이 혼합물에 DMSO내 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시아미노)-헥사-데칸산 메틸 에스테르의 10% (w/v) 용액 8 μl (실시예 3에 따라 제조됨)을 첨가하고 그리고 4℃에서 18시간 동안 pH 6.0에서 커플링 반응을 수행한다. 이후 Q-세파로오스 FF상에서의 IEX로 접합체를 추가 정제한다. 최종적으로 비바스핀 장비를 이용한 UF/DF로 용출액을 농축시킨다.

[0284] **실시예 9**

[0285] 응고 인자 VIII의 탄수화물 모이어티에 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시아미노)-헥사-데칸산 메틸 에스테르의 커플링

[0286] 10 mg rFVIII을 Hepes-완충액 (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM 칼슘 클로라이드, pH 6.0)에서 용해시켜 2 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이후 DMSO내 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시아미

노)-헥사-데칸산 메틸 에스테르의 10% (w/v) 용액 10㎕ (실시예 3에 따라 제조됨)를 FVIII 용액에 첨가한다. 그 다음에 친핵성 촉매 m-톨루이딘 (50 mM)의 수성 용액을 제조하고 그리고 15분 내에 혼합물에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻는다. 최종적으로 40 mM 수성 나트륨 퍼아이오데이트 용액을 첨가하여 400 ㎛M의 농도를 제공한다. 부드러운 교반 하에 22℃의 온도에서의 어두운 곳에서 120분 동안 반응 혼합물을 인큐베이션한다. 이후 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 첨가함으로써 반응을 중지시켜 반응 혼합물내 10 mM의 최종 농도 및 60분 동안의 인큐베이션을 제공한다. 그 다음에 Q-세파로오스 FF로 채워진 IEX 칼럼 (1.6 x 8 cm)상에 반응 혼합물을 로딩하였다. 칼럼을 20 칼럼 부피의 평형 완충액 (20 mM Hepes, 5 mM $CaCl_2$, pH 7.4)으로 세척하고 그리고 완충액 B (20 mM Hepes, 5. mM $CaCl_2$, 0.5 M NaCl, pH 7.4)로 FA-rFVIII 접합체를 용출한다. 최종적으로 정용여과 (diafiltration) 완충액으로서 Hepes 완충액, 7.4 (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, pH 7.4)을 이용하여 비바스핀 장비로 산물을 UF/DF 처리한다.

[0287] **실시예 10**

[0288] 응고 인자 IX의 탄수화물 모이어티에 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시아미노)-헥사-데칸산 메틸 에스테르의 커플링

[0289] 7 mg rFIX를 His - 완충액 (20 mM His, 150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, pH 6.0)에서 용해시켜 2 mg/ml의 단백질 농도를 얻는다. 이후 DMSO내 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시아미노)-헥사-데칸산 메틸 에스테르의 10% (w/v) 용액 7㎕ (실시예 3에 따라 제조됨)를 FIX 용액에 첨가한다. 이후 친핵성 촉매 m-톨루이딘 (50 mM)의 수성 용액을 제조하고 그리고 15분 내에 혼합물에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻는다. 최종적으로 40 mM 수성 나트륨 퍼아이오데이트 용액을 첨가하여 250 ㎛M의 농도를 얻는다. 부드러운 교반 하에 22℃의 온도에서의 어두운 곳에서 120분 동안 반응 혼합물을 인큐베이션한다. 그 다음에 실온에서 30분 동안 L-시스테인의 첨가로 반응을 퀀칭한다 (최종 농도: 5 mM).

[0290] 음이온 교환 크로마토그래피로 FA-rFIX 접합체를 정제한다. 반응 혼합물을 10 ml 완충액 A (50 mM Hepes, 5 mM $CaCl_2$, pH 7.5)로 희석하고 그리고 완충액 A로 평형된 5ml HiTrap Q FF 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩한다. 동일한 완충액을 이용한 5 CV로 칼럼을 세척한다. 이후 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM $CaCl_2$, pH 7.5)로 칼럼을 용출한다. 재생된 셀룰로오스로 만든 10 kD 막을 이용한 UF/DF로 접합체 함유 단편을 농축시킨다. 150 mM NaCl 및 5 mM $CaCl_2$를 함유한 20 mM Hepes 완충액, pH 7.2에 대해 최종 정용여과 단계를 수행한다.

[0291] **실시예 11**

[0292] 응고 인자 VIIa의 탄수화물 모이어티에 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시아미노)-헥사-데칸산 메틸 에스테르의 커플링

[0293] 10 mg rFVIIa를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 칼슘 클로라이드, pH 6.0)에서 용해시킨다. 이후 DMSO내 16-(2-(2-(2-(2-아미노옥시에톡시)-에톡시)-에톡시)-에톡시아미노)-헥사-데칸산 메틸 에스테르의 10% (w/v) 용액 10 ㎕ (실시예 3에 따라 제조됨)를 FVIIa에 첨가한다. 그 다음에 친핵성 촉매 m-톨루이딘 (50 mM)의 수성 용액을 제조하고 15분 내에 혼합물에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻는다. 최종적으로, 40 mM 수성 나트륨 퍼아이오데이트 용액을 첨가하여 250 ㎛M의 농도를 얻는다. 부드러운 교반 하에 22℃의 온도에서의 어두운 곳에서 120분 동안 반응 혼합물을 인큐베이션 한다. 그 다음 실온에서 30분 동안 L-시스테인의 첨가로 반응을 퀀칭한다 (최종 농도: 5 mM). 음이온 교환 크로마토그래피로 FA-rFVIIa 접합체를 정제한다. 반응물을 10 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 7.4)으로 희석하고 완충액 A로 평형된 5 ml HiTrap Q FF 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩한다. 동일한 완충액을 이용한 5 CV로 칼럼을 세척한다. 이후 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM $CaCl_2$, pH 7.4)로 칼럼을 용출한다. 재생된 셀룰로오스로 만든 10 kD 막을 이용한 UF/DF로 접합체 함유 단편을 농축시킨다. 150 mM NaCl 및 5 mM $CaCl_2$를 함유한 20 mM Hepes 완충액, pH 7.2에 대해 최종 정용여과 단계를 수행한다.

[0294] **실시예 12**

[0295] 친핵성 촉매의 존재에서 산화된 탄수화물 모이어티에 활성 아미노옥시기를 함유한 FA 유도체의 커플링

[0296] 산화된 치료학적 단백질 (가령, 본 명세서의 표 1에서 제시된 단백질)에 활성 아미노옥시기를 함유한 FA 유도체

의 커플링이 또한 제공된다.

[0297] 아미노옥시기를 함유한 FA 유도체의 커플링을 위하여, 치료학적 단백질 (가령, EPO, G-CSF, 또는 인슐린; 표 1을 참고; 농도: 0.5-3 mg/ml)의 탄수화물 모이어티 (대부분 N-글리칸)를 $NaIO_4$ (농도: 200 μM)로 일차 산화한다. 이후 L-시스테인의 첨가로 반응을 중지시키고 (최종 농도: 5 mM) 그리고 UF/DF로 시약을 분리한다. 정용여과 후 25 M 초과량을 이용하여 FA 아미노옥시 시약 (즉, FA 유도체)을 첨가하고 그리고 친핵성 촉매 m-톨루이딘 (농도: 10 mM)의 존재에서 부드러운 교반 하에 실온에서 1시간 동안 pH 6.0에서 커플링 반응을 수행한다. 그 다음 이온 교환 (IEX) 칼럼 상에 반응 혼합물을 로딩한다. > 5 CV 세척 완충액으로 칼럼을 세척하고 그리고 선형 NaCl 구배로 접합체를 용출한다. 최종적으로 접합체 함유 단편을 UF/DF 처리한다.

[0298] **실시예 13**

[0299] 친핵성 촉매의 존재에서 산화된 탄수화물 모이어티에 활성 아미노옥시기를 함유한 FA유도체의 커플링

[0300] 치료학적 단백질의 탄수화물 모이어티에 아미노옥시기를 함유한 FA 유도체의 커플링을 위하여, 친핵성 촉매 m-톨루이딘 (농도: 10 mM)의 존재에서 실온에서 1시간 동안 $NaIO_4$ (농도: 300 μM)와 pH 6.0에서 상기 단백질 (가령, EPO, G-CSF, 또는 인슐린; 표 1을 참고; 농도: 0.5-3 mg/ml)을 인큐베이션한다. 이후 L-시스테인의 첨가로 반응을 중지시키고 (최종 농도: 5 mM) 그리고 이온 교환 (IEX) 칼럼 상에 반응 혼합물을 로딩한다. > 5 CV 세척 완충액으로 칼럼을 세척하고 선형 NaCl 구배로 접합체를 용출한다. 최종적으로 접합체 함유 단편을 UF/DF 처리한다.

[0301] **실시예 14**

[0302] 친핵성 촉매의 존재에서 산화된 혈액 응고 단백질에 활성 아미노옥시기를 함유한 FA 유도체의 커플링

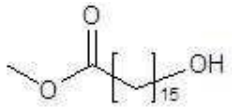
[0303] 2-20 mM의 농도 범위에서의 친핵성 촉매, 가령 m-톨루이딘의 존재에서 산화된 혈액 응고 단백질 (가령, 상기 실시예에서 설명된 바와 같은 FIX, FVIII 및 FVIIa)에 활성 아미노옥시기를 함유한 FA 유도체의 커플링을 수행할 수 있다.

[0304] **실시예 15**

[0305] 수용성 MAL 지방산 연결자의 제조

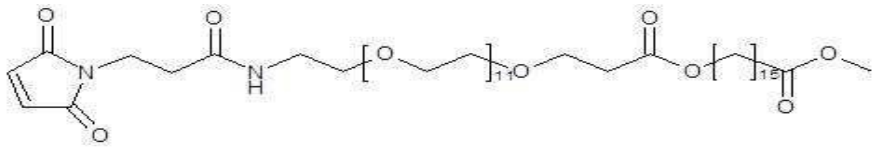
[0306] ω-위치내 수용성 PEG 사슬을 함유한 지방산 연결자 및 활성 MAL기를 두-단계 합성법으로 제조한다:

[0307] 단계 1: 16-하이드록시헥사데칸산 메틸 에스테르의 제조:

[0308] 

[0309] 실시예 3에 따라 실온에서 5시간 동안 메탄올내 아세틸 클로라이드로 상업적으로 이용가능한 16-하이드록시헥사데칸산을 에스테르화하여 상응하는 메틸 에스테르를 제공한다 (Hang et al., Chemical probes for the rapid detection of fatty-acylated proteins in mammalian cells, JACS 2007;129:2744-5).

[0310] 단계 2: MAL 지방산 연결자의 제조.

[0311] 

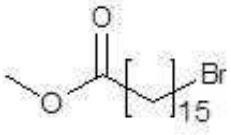
[0312] 하룻밤 동안 실온에서 THF내 츠노부(Mitsunobu) 반응을 활용하여 상업적으로 이용가능한 MAL-PEG-COOH (mal-Peg(12)-COOH / IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz, Germany)와 16-하이드록시헥사데칸산 메틸 에스테르를 반응시킨다 (Toyokuni et al., Synthesis of a New Heterobifunctional Linker, N-[4-(Aminooxy)butyl]-maleimide, for Facile Access to a Thiol-Reactive 18F-Labeling Agent, Bioconjugate Chem 2003;14:1253-9).

[0313] **실시예 16**

[0314] 수용성 NHS 지방산 연결자의 제조

[0315] ω-위치내 수용성 PEG 사슬을 함유한 지방산 연결자 및 말단 활성 NHS 에스테르를 네-단계 합성법의 이용으로 제조한다:

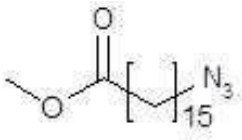
[0316] 단계1: 16-브로모헥사데칸산 메틸 에스테르의 제조



[0317]

[0318] 환류 온도에서 하룻밤 동안 메탄올 및 촉매량의 농축된 황산으로 상업적으로 이용가능한 16-브로모헥사데칸산을 에스테르화하여 상응하는 메틸 에스테르를 얻는다 (Zinic et al., Positionally Isomeric Organic Gelators: Structure-Gelation Study, Racemic versus Enantiomeric Gelators, and Solvation Effects, Chem Eur J 2010;16:3066-82).

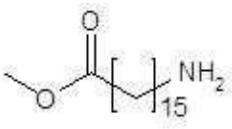
[0319] 단계 2: 16-아지도헥사데칸산 메틸 에스테르의 제조



[0320]

[0321] 환류 온도에서 4일 동안 아세토니트릴내 나트륨 아지드와 16-브로모헥사데칸산 메틸 에스테르를 반응시켜 상응하는 아지드를 제공한다 (Zinic et al., Positionally Isomeric Organic Gelators: Structure-Gelation Study, Racemic versus Enantiomeric Gelators, and Solvation Effects, Chem. Eur. J. 2010;16:3066-82).

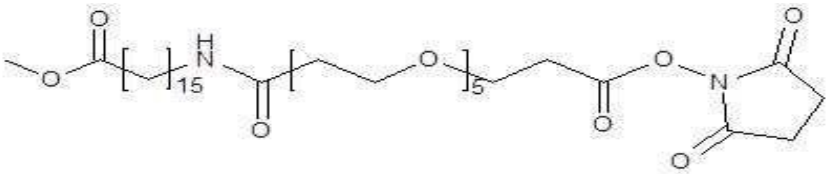
[0322] 단계 3: 16-아미노헥사데칸산 메틸 에스테르의 제조



[0323]

[0324] 3시간 동안 3bar에서 메탄올내 팔라듐 / 활성탄(activated charcoal)으로 16-아지도헥사데칸산 메틸 에스테르를 촉매적으로 수소화하여 상응하는 아민을 제공한다 (Zinic et al., Positionally Isomeric Organic Gelators: Structure-Gelation Study, Racemic versus Enantiomeric Gelators, and Solvation Effects, Chem. Eur. J. 2010;16:3066-82).

[0325] 단계 4: NHS 지방산 연결자의 제조



[0326]

[0327] 3일 동안 실온에서 1,4-디옥산내 상업적으로 이용가능한 NHS-PEG-NHS (NHS-dPEG(4)-NHS / IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz, Germany)와 16-아미노헥사데칸산 메틸 에스테르를 반응시켜 NHS 지방산 연결자를 제공한다 (Cline et al., The Aminolysis of N-Hydroxysuccinimide Esters. A Structure-Reactivity Study, JACS 1987;109:3087-91).

[0328] **실시예 17**

[0329] 단백질 FA 접합체의 분석 특징

[0330] 본 명세서의 실시예에 따라 제조된 FA-rFVIII, rFIX 또는 FVIIa 샘플의 알부민 결합 특성을 효소 결합 면역흡착 분석 (ELISA) 시스템을 이용함으로써 시험관 내에서 입증한다. 인간 혈청 알부민 (HSA)을 표적으로 하는 다클론

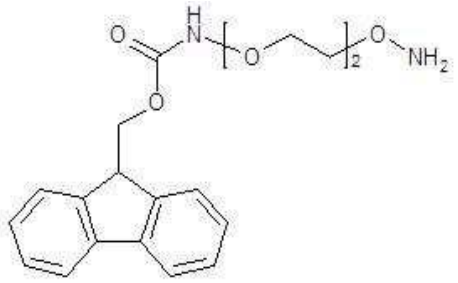
항체로 96 웰 플레이트를 코팅한다. 다음 단계는 PBS-젤라틴 완충액으로 ELISA 플레이트를 차단하는 단계이다. 이후 HSA를 항체에 결합시키고 그 다음 FA-단백질 샘플에 결합시키며, 이를 상이한 농도까지 희석한다. 최종적으로 항-VIII, 항-FIX 또는 항 FVIIa 항체가 표지된 퍼옥시다아제로 HSA-단백질을 검출한다. 기질로서 테트라메틸-벤지딘 (TMB)을 이용하여 퍼옥시다아제 활성도를 검출한다. 발달된 색 강도를 450 nm에서 ELISA 판독기로 측정한다. x-축 상에서 상이한 샘플 농도 및 y-축 상에서 이들의 상응하는 흡수 값을 플롯팅함으로써 HSA와의 FA-단백질 샘플의 결합을 평가한다.

[0331] **실시예 18**

[0332] 아미노옥시기를 함유한 수용성 페길화 지방산 연결자의 제조

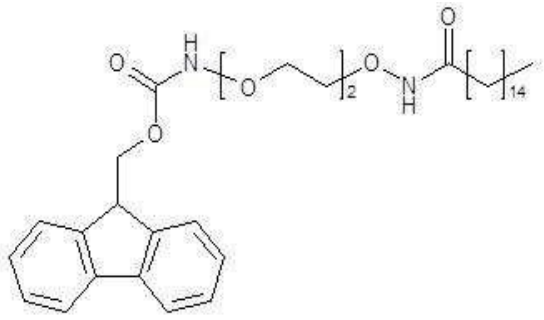
[0333] 지방산 카르복실기와 연결된 ω-위치에서의 아미노옥시 모이어티와 수용성 PEG 사슬을 함유한 지방산 연결자를 실시예 1에서 설명된 바와 같은 3-옥사펜탄-1,5-디옥시아민을 이용하여 세 단계 합성법으로 제조한다.

[0334] 단계 1: N-(9-플루오레닐메톡시카르보닐)-3-옥사펜탄-1,5-디옥시아민의 제조

[0335] 

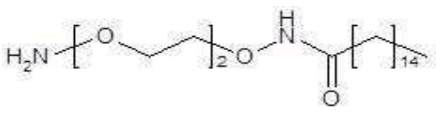
[0336] 1시간 동안 주위온도에서 1,4-디옥산내 9-플루오레닐메틸클로로포르메이트와 3-옥사펜탄-1,5-디옥시아민을 반응시켰다. 감소된 압력 하에 용액을 증발시켰고 그리고 용매 혼합물로서 디클로로메탄 / 메탄올 20/1 (v/v)로 실리카 겔 크로마토그래피를 활용하여 미가공 산물을 정제하여 순수한 모노-FMOC 보호된 디옥시아민을 얻었다 (Boturyn et al., Synthesis of Fluorescent Probes for the Detection of Abasic Sites in DNA, Tetrahedron 1997; Vol.53, No.15, 5485-92).

[0337] 단계 2: 헥사데칸산 (2-(2-(N-(9-플루오레닐메톡시카르보닐) 아미노옥시) 에톡시) 에톡시) 아미드의 제조

[0338] 

[0339] 하룻밤 동안 주위 온도에서 THF내 상업적으로 이용가능한 팔미트산 N-하이드록시석신이미드 에스테르와 N-(9-플루오레닐메톡시카르보닐)-3-옥사펜탄-1,5-디옥시아민을 반응시켜 모노-FMOC 보호된 아미노옥시-지방산 접합체를 얻는다 (Jong et al., Synthesis of ceramides using N-hydroxysuccinimide esters, Journal of Lipid Research 1972; Vol.13, 819-22).

[0340] 단계 3: 헥사데칸산 (2-(2-아미노옥시에톡시) 에톡시) 아미드의 제조

[0341] 

[0342] 주위 온도에서 디클로로메탄내 피페리딘과 모노-FMOC 보호된 아미노옥시-지방산 접합체를 반응시켜 최종 산물로서 탈보호된 아미노옥시-지방산 연결자를 얻는다 (Boturyn et al., Synthesis of Fluorescent Probes for the Detection of Abasic Sites in *DNA,* Tetrahedron 1997; Vol.53, No.15, 5485-92).

[0343] **실시예 19**

[0344] A1PI와의 MAL 지방산 연결자의 커플링

[0345] 실시예 15에서 설명된 바와 같이 미츠노부 반응을 활용하여 상업적으로 이용가능한 MAL-PEG-COOH (mal-Peg(12)-COOH / IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz, Germany)와의 16-하이드록시헥사데칸산 메틸 에스테르의 반응으로 MAL기를 함유한 지방산 연결자를 제조한다. 이 연결자를 A1PI의 유리 SH-기에 커플링시킨다.

[0346] 10 mg의 정제된 A1PI (농도: 1 mg/ml)를 반응 완충액 (20 mM 포스페이트, 5 mM EDTA, pH 7.0)에서 용해시키고 그리고 DMSO내 MAL 지방산 연결자의 5% (w/v) 용액 10 µL를 A1PI 용액에 첨가한다. 실온에서 2시간 동안 변형 반응을 수행하고 그 다음 L-시스테인을 이용하여 퀀칭 단계를 한다 (최종 농도: 10 mM). L-시스테인의 첨가 후 동일한 온도에서 추가로 한 시간 동안 부드러운 진탕 하에 반응 혼합물을 인큐베이션한다. 변형된 A1PI를 평형 완충액 (25 mM 포스페이트, pH 6.5)으로 희석하여 < 4.5 mS/cm까지 용액 전도율을 보정하고 그리고 5 ml의 칼럼 부피 (CV)를 가진 미리-포장된 HiTrap Q FF (GE-Healthcare) 상에 로딩한다. 이후 10 CV 평형 완충액 (유속: 2 ml/분)으로 상기 칼럼을 평형시킨다. 최종적으로 용출 완충액 (25 mM Na_2HPO_4. 1 M NaCl, pH 6.5)을 이용하여 선형 구배로 PEG-A1PI를 용출한다.

[0347] **실시예 20**

[0348] 응고 인자 VIII과의 NHS 지방산 연결자의 커플링

[0349] 실시예 16에서 설명된 바와 같이 상업적으로 이용가능한 NHS-PEG-NHS (NHS-dPEG(4)-NHS (IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz, Germany)와의 16-하이드록시헥사데칸산 메틸 에스테르의 반응으로 NHS 기를 함유한 지방산 연결자를 제조한다. 이 연결자를 응고 인자 VIII의 리신 잔기의 유리 아미노기에 커플링시킨다.

[0350] 10 mg rFVIII을 Hepes-완충액 (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM 칼슘 클로라이드, pH 6.0)에서 용해시켜 2 mg/ml의 단백질 농도를 제공한다. 이후 DMSO내 NHS 지방산 연결자의 10% (w/v) 용액 10 µl를 FVIII 용액에 첨가한다. 부드러운 교반 하에 22℃의 온도에서의 어두운 곳에서 120분 동안 반응 혼합물을 인큐베이션한다. 이후 수성 글리신 용액 (1M)의 첨가로 반응을 중지시켜 반응 혼합물에서 20 mM의 최종 농도를 제공한다. 부드러운 교반 하에 실온에서 15분 동안 혼합물을 인큐베이션하고 그 다음 Q-세파로오스 FF로 채워진 IEX 칼럼 (1.6 x 8 cm) 상에 로딩한다. 20 칼럼 부피의 평형 완충액 (20 mM Hepes, 5 mM $CaCl_2$, pH 7.4)으로 칼럼을 세척하고 그리고 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM $CaCl_2$, 0.5 M NaCl, pH 7.4)로 FA-rFVIII 접합체를 용출한다. 최종적으로 정용여과 완충액으로서 Hepes 완충액, 7.4 (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, pH 7.4)을 이용하여 비바스핀 장비로 산물을 UF/DF 처리한다.

도면

도면1

