 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0071012 (43) 공개일자 2011년06월27일
<p>(51) Int. Cl. A61K 47/48 (2006.01) A61K 38/37 (2006.01) A61P 7/02 (2006.01) A61P 7/04 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2011-7011049</p> <p>(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년10월16일 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2011년05월16일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2009/061023</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2010/045568 국제공개일자 2010년04월22일</p> <p>(30) 우선권주장 61/106,424 2008년10월17일 미국(US)</p>	<p>(71) 출원인 백스터 인터내셔널 인코포레이티드 미국 일리노이주 60015 디어필드 원 백스터 파크웨이</p> <p>백스터 헬쓰케어 에스.에이. 스위스 8152 글라트파르크 (오프피콘) 투르가우 에르슈트라쎄 130</p> <p>(72) 발명자 투레캣 피터 오스트리아 에이-3400 클로스테르네우부르크 바이틀링 하우프트슈트라쎄 59지</p> <p>시에크만 위르겐 오스트리아 에이-1210 비엔나 게라스도르페르 슈트라쎄 153/209</p> <p>로텐스테이너 한스피터 오스트리아 에이-1020 비엔나 하이드가세 10/17</p> <p>(74) 대리인 김영, 장수길</p>

전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 낮은 수준의 수용성 중합체를 포함하는 개질된 혈액 인자

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 혈액 인자에 콘주게이션된 낮은 수준의 수용성 중합체 분자를 갖지만, 보다 다수의 수용성 중합체 잔기를 갖는 분자와 유사한 또는 그보다 우수한 생물학적 활성을 나타내는 개질된 혈액 인자의 제조 방법 및 그를 위한 물질에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

제조합 혈액 인자 및 혈액 인자 분자당 1개 이상 내지 10개 이하의 수용성 중합체 잔기를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 혈액 인자 분자당 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 또는 9개의 수용성 중합체 잔기를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 3

제1항에 있어서, 혈액 인자 분자당 8개의 수용성 중합체 잔기를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 4

제1항에 있어서, 혈액 인자 분자당 4 내지 8개의 수용성 중합체 잔기 (포괄적)를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 5

제1항에 있어서, 혈액 인자 분자당 1 내지 4개의 수용성 중합체 잔기 (포괄적)를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 6

제1항에 있어서, 혈액 인자 분자당 4 내지 6개의 수용성 중합체 잔기 (포괄적)를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 7

제1항에 있어서, 혈액 인자 분자당 1개 또는 2개의 수용성 중합체 잔기를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 8

제1항에 있어서, 혈액 인자 분자당 5개의 수용성 중합체 잔기를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 9

제1항에 있어서, 혈액 인자 분자당 4개의 수용성 중합체 잔기를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 수용성 중합체 잔기가 유리가능한 링커(linker)를 통해 혈액 인자 분자에 부착되는 것인 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 11

제10항에 있어서, 유리가능한 링커가 가수분해가능한 링커인 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 수용성 중합체 잔기가 안정한 링커를 통해 혈액 인자 분자에 부착되는 것인 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 수용성 중합체가 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리(프로필렌 글리콜) (PPG), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리에틸렌 옥사이드 (PEO), 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀 알콜), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트),

폴리(사카라이드), 폴리(α -히드록시산), 폴리(비닐 알콜), 폴리포스파스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리(N-아크릴로 일모르폴린), 폴리(알킬렌 옥시드) 중합체, 폴리(말레산), 폴리(DL-알라닌), 폴리사카라이드, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 전분 또는 전분 유도체, 히알루론산 키틴, 폴리(메트)아크릴레이트, 폴리시알산 (PSA) 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 14

제13항에 있어서, 수용성 중합체가 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)인 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 15

제14항에 있어서, PEG가 선형 PEG 잔기인 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 16

제14항에 있어서, PEG가 분지형 PEG 잔기인 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, PEG가 2 kD 내지 200 kD의 분자량을 갖는 것인 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 혈액 인자가 II 인자, III 인자, V 인자, VII 인자, VIIa 인자, VIII 인자, IX 인자, X 인자, XI 인자, 폰 빌레브란트(von Willebrand) 인자 및 피브리노겐으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 19

제18항에 있어서, 혈액 인자 분자가 인간의 것인 개질된 혈액 인자.

청구항 20

제18항에 있어서, 혈액 인자 분자가 VIII 인자인 개질된 혈액 인자.

청구항 21

제20항에 있어서, VIII 인자 분자당 4개 이상 내지 10개 미만의 PEG 잔기를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 22

제18항에 있어서, 혈액 인자 분자가 VIIa 인자인 개질된 혈액 인자.

청구항 23

제18항에 있어서, 혈액 인자 분자가 IX 인자인 개질된 혈액 인자.

청구항 24

제1항에 있어서, VIII 인자 분자당 4 내지 8개의 폴리에틸렌 글리콜 잔기 (포괄적)를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 25

제1항에 있어서, VIII 인자 분자당 4 내지 6개의 폴리에틸렌 글리콜 잔기 (포괄적)를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 26

제1항에 있어서, VIII 인자 분자당 1 내지 4개의 폴리에틸렌 글리콜 잔기 (포괄적)를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜 잔기가 유리가능한 또는 가수분해가능한 링커를 통해 부착되는 것인 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 28

제1항에 있어서, VIII 인자 분자당 1개 또는 2개의 폴리에틸렌 글리콜 잔기를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 29

제28항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜 잔기가 안정한 링커를 통해 부착되는 것인 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 30

제1항에 있어서, VIII 인자 분자당 4 내지 6개의 폴리시알산 잔기 (포괄적)를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 31

제1항에 있어서, VIII 인자 분자당 1 내지 4개의 폴리시알산 잔기 (포괄적)를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, 폴리시알산 잔기가 유리가능한 또는 가수분해가능한 링커를 통해 부착되는 것인 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 33

제1항에 있어서, VIII 인자 분자당 1개 또는 2개의 폴리시알산 잔기를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 34

제33항에 있어서, 폴리시알산 잔기가 안정한 링커를 통해 부착되는 것인 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 35

제1항에 있어서, VIIa 인자 분자당 1 내지 6개의 수용성 중합체 잔기 (포괄적)를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 36

제1항에 있어서, IX 인자 분자당 1 내지 6개의 수용성 중합체 잔기 (포괄적)를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서, 수용성 중합체 잔기가 유리가능한 또는 가수분해가능한 링커를 통해 부착되는 것인 개질된 혈액 인자.

청구항 38

제1항에 있어서, VIIa 인자 분자당 1개 또는 2개의 수용성 잔기를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 39

제1항에 있어서, IX 인자 분자당 1개 또는 2개의 수용성 잔기를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 40

제38항 또는 제39항에 있어서, 수용성 중합체 잔기가 안정한, 유리가능한 또는 가수분해가능한 링커를 통해 부착되는 것인 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 41

제35항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 수용성 중합체가 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 폴리시알산 (PSA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 개질된 혈액 인자 분자.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 개질된 혈액 인자를 포함하는 제약 조성물.

청구항 43

혈액 인자 분자에 1개 이상 내지 10개 미만의 수용성 중합체를 부착시키는 조건하에서 혈액 인자 분자를 혈액 인자 분자에 대해 30 M 과량 이하의 수용성 중합체인 몰과량의 수용성 중합체와 접촉시키는 것을 포함하는, 혈액 인자 분자에 콘주게이션(conjugation)된 소수의 수용성 중합체를 갖는 개질된 혈액 인자 분자의 제조 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 수용성 중합체의 몰과량이 2 M 과량 내지 30 M 과량인 방법.

청구항 45

제43항에 있어서, 수용성 중합체의 몰과량이 10 M 내지 25 M 과량인 방법.

청구항 46

제43항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 수용성 중합체가 폴리에틸렌 글리콜인 방법.

청구항 47

제43항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 혈액 인자가 VIII 인자인 방법.

청구항 48

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 개질된 혈액 인자의 치료 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 혈액 응고 장애를 앓고 있는 대상체의 치료 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 혈액 응고 장애가 A형 혈우병, B형 혈우병, 폰 빌레브란트 증후군, X 인자 결핍증, VII 인자 결핍증, 알렉산더병(Alexander's disease), 로젠탈(Rosenthal) 증후군 (C형 혈우병) 및 XIII 인자 결핍증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 50

제48항에 있어서, 혈액 응고 장애가 A형 혈우병이고 개질된 혈액 인자가 VIII 인자 분자를 포함하는 것인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 낮은 수준의 수용성 중합체 분자를 포함하지만, 보다 다수의 수용성 중합체 잔기를 갖는 분자와 유사한 생물학적 활성을 나타내는 개질된 혈액 인자의 제조 방법 및 그를 위한 물질에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 혈액 응고는 일련의 성분, 특히 피브리노겐, II 인자, V 인자, VII 인자, VIIa 인자, VIII 인자, IX 인자, X 인자, XI 인자, XII 인자 및 폰 빌레브란트 인자(von Willebrand)의 순차적인 상호작용을 포함하는 복잡한 과정이다. 이들 성분 중 어느 하나의 결손 또는 그의 기능의 억제 또는 혈액 응고 성향의 증가 또는 응고 불능을 초래할 수 있으며, 이는 몇몇 환자에게 치명적일 수 있다.

[0003] VIII 인자는 혈액 응고를 유도하는 반응 캐스케이드에서 X 인자를 Xa 인자로 전환시키는 IXa 인자에 대한 보조

인자이다. 혈액에서의 VIII 인자 활성 수준의 장애는, 주로 남성에게 나타나는 유전 질환인 응고 장애 A형 혈우병을 초래한다. A형 혈우병은 인간 혈장으로부터 유도되거나 또는 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조된 VIII 인자의 치료 제제를 이용하여 현재 치료하고 있다. 상기 제제는 출혈이 일어났을 때 또는 제어되지 않는 출혈을 방지하기 위해 (예방) 빈번한 규칙적인 간격으로 투여된다.

[0004] 폰 빌레브란트 인자 (VWF)는 VIII 인자와의 복합체로 혈장을 순환하며, VIII 인자 단백질을 안정화시키고 그것이 단백질가수분해되는 것을 방지한다. 혈소판 응집에서의 VWF의 기능 때문에, VWF는 또한 혈액 응고에 직접적으로 관여한다. 폰 빌레브란트 결핍증 (VWD) (폰 빌레브란트 증후군이라고도 함)은 VWF의 결핍 또는 과발현으로부터 초래된다. VWF의 결핍은 VWF 보조인자가 결여된 VIII 인자의 급속한 분해로 인해 혈우병과 유사한 질환을 초래한다.

[0005] A형 혈우병 및 폰 빌레브란트 증후군의 치료에서 정제된 VII 인자, VWF 또는 VIII 인자/VWF 복합체를 이용하여 환자를 치료하는 것에 대한 연구가 다수 있었다. 그러나, 투여된 외인성 단백질에 대한 항체의 발달이 치료법 효능을 감소시키는 것으로 나타났고 상기 환자의 치료법에 문제를 제기한다. 예를 들면, 항-FVIII 항체는 중증 및 중등도 혈우병 환자에게 특히 우세하게 나타나며, 50%의 빈도로 항-FVIII 항체가 발달한다 (문헌 [Gilles et al., Blood 82:2452-61, 1993]; 문헌 [Lacroix-Desmazes et al., J Immunol. 177:1355-63, 2006]). 생체내에서 뛰어난 효능을 갖는 치료 단백질을 낮은 투여량으로 투여하는 것은 투여된 혈액 인자에 대한 항체의 발생률을 감소시키거나 또는 제한하는 데에 도움이 될 것이다.

[0006] 치료 단백질의 약물동력학적 및 면역학적 특징은 폴리에틸렌글리콜 (PEG)과 같은 수용성 중합체와의 콘주게이션 (conjugation)에 의해 개선될 수 있다. 특히, 생리학적으로 활성인 단백질의 생리학적으로 허용되는 중합체 분자에의 결합은 생체내 반감기를 실질적으로 연장시킬 수 있다. 분자의 PEG화(PEGylation)는 또한 효소 분해에 대한 약제 내성 증가, 투여 빈도 감소, 면역원성 감소, 물리적 및 열적 안정성 증가, 용해도 증가, 액체 안정성 증가 및 응집 감소를 유도할 수 있다.

[0007] 미국 특허 제4,970,300호에 중합체 분자 (텍스트란)의 VIII 인자 (FVIII)에의 콘주게이션은 트롬빈에 의해 활성화 가능하고, 포유동물의 혈류에서의 실질적으로 연장된 생체내 체류 시간 및 실질적으로 감소된 항원성 및 면역 반응성을 갖는 FVIII 단백질을 초래함이 개시되어 있다. 국제 특허 출원 WO 94/15625호에 FVIII의 생리학적으로 허용되는 중합체 분자에의 콘주게이션은 (i) 생체내 가수분해에 대한 내성을 증가시켜 투여 후의 활성을 연장시킴으로써, (ii) 비개질 단백질에 비해 생체내 순환 수명을 유의하게 연장시킴으로써, 또한 (iii) 혈류로의 흡수 시간을 연장시킴으로써 FVIII의 생체내 기능을 개선함이 개시되어 있다. 미국 특허 제6,037,452호에 단백질이 단백질 내의 카르보닐기를 통해 폴리(알킬렌 옥사이드)에 공유 결합된 FVIII 및 IX 인자 (FIX) 콘주게이트가 개시되어 있다. 또한, 생리학적으로 허용되는 중합체 분자, 특히 폴리(에틸렌 글리콜) ("PEG")에의 콘주게이션에 의해 FIX의 생체내 기능을 개선하는 것은 국제 특허 공보 WO 94/29370호에 개시되어 있다. 비활성을 유지하는 PEG화된 FVIII는 국제 특허 공보 WO 2007/126808호에 개시되어 있다.

[0008] 수용성 중합체의 단백질과 같은 활성제에의 콘주게이션은 수용성 중합체가 유리가능한 공유 결합 (프로드럭 개념)을 통해, 즉 가수분해가능한, 분해가능한 또는 유리가능한 링커(linker)를 통해 단백질에 부착된, 중합체-단백질 콘주게이트 또는 안정한 중합체-단백질 콘주게이트를 제조함으로써 수행가능하다. 예를 들면, 유리가능한 PEG 잔기는 2개의 PEG 사슬을 함유하는 9-플루오레닐메톡시카르보닐 (FMOC) 콘주게이션 시스템을 사용하여 개발되었다 (미국 알라바마주 헨즈빌 소재의 넥타르 인코포레이티드(Nektar Inc.)). 또한, 단백질의 리신 잔사의 화학적 개질에 유용한 N-히드록시숙신이미드 에스테르기 (NHS)는 메톡시카르보닐기를 통해 플루오렌 고리계에 연결되어 유리가능한 PEG 잔기를 생성할 수 있다. 국제 특허 공보 WO 2008/082669호 (본원에 참조로 인용됨)에 유리가능한 PEG 개념을 기반으로 하는 일련의 PEG화된 재조합 FVIII 변이체가 개시되어 있다.

[0009] 치료 단백질에 대하여 비교적 높은 수준의 개질 및 수용성 중합체 함량을 유도하는 화학적 공정은 제조에 다량의 시약이 필요하기 때문에 경제적이지 않다. 또한, 높은 수준의 수용성 중합체, 예컨대 PEG는 다량의 중합체 및 링커 때문에 독물학적 또는 면역학적 위험성 증가를 초래한다.

[0010] 따라서, 당분야에서는 최종적으로 독성 또는 면역학적 영향 없이 치료 단백질의 반감기 및 안정성을 개선시키는 수용성 중합체를 포함하는 치료 조성물이 여전히 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 소량의 수용성 중합체를 포함하는 혈액 인자 변이체의 제조 방법 및 그를 위한 물질에 관한 것이다. 한 측면에서, 본 발명은 재조합 혈액 인자 및 혈액 인자 분자당 1개 이상 내지 10개 이하의 수용성 중합체 잔기를 포함하는 개질된 혈액 인자 분자를 제공한다. 한 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 혈액 인자 분자당 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 또는 9개의 수용성 중합체 잔기를 포함한다.
- [0012] 추가의 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 혈액 인자 분자당 4 내지 8개의 수용성 중합체 잔기 (포괄적 (즉, 4개, 5개, 6개, 7개 및 8개의 중합체 잔기를 포함함))를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 혈액 인자는 혈액 인자 분자당 1 내지 4개의 수용성 중합체 (포괄적)를 포함한다. 다른 실시양태에서, 혈액 인자는 혈액 인자 분자당 4 내지 6개의 수용성 중합체 (포괄적)를 포함한다. 다른 실시양태에서, 혈액 인자는 혈액 인자 분자당 1 내지 2개의 중합체를 포함한다.
- [0013] 관련 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 혈액 인자 분자당 8개의 수용성 중합체 잔기를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 혈액 인자 분자당 5개의 수용성 중합체 잔기를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 혈액 인자 분자당 4개의 수용성 중합체 잔기를 포함한다. 관련 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 혈액 인자 분자당 2개의 수용성 중합체 잔기를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 혈액 인자 분자당 1개의 수용성 중합체를 포함한다.
- [0014] 수용성 중합체 잔기는 안정한 링커를 통해 또는 유리가능한 또는 분해가능한 링커를 통해 혈액 인자 분자에 부착되는 것이 고려된다. 한 실시양태에서, 유리가능한 링커는 가수분해가능한 링커이다.
- [0015] 한 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리(프로필렌 글리콜) (PPG), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리에틸렌 옥사이드 (PEO), 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀 알콜), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카라이드), 폴리(α -히드록시산), 폴리(비닐 알콜), 폴리포스파스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리(N-아크릴로일모르폴린), 폴리(알킬렌 옥사이드) 중합체, 폴리(말레산), 폴리(DL-알라닌), 폴리사카라이드, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 전분 또는 전분 유도체, 히알루론산 키틴, 폴리(메트)아크릴레이트, 폴리시알산 (PSA) 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0016] 관련 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이다. 또한 PEG 분자는 선형 PEG 잔기 또는 분지형 PEG 잔기인 것이 고려된다.
- [0017] 또다른 실시양태에서, PEG는 3 kD 내지 200 kD의 분자량을 갖는다. 관련 실시양태에서, PEG의 평균 분자량은 약 3 내지 200 킬로달톤 ("kDa"), 약 5 kDa 내지 약 120 kDa, 약 10 kDa 내지 약 100 kDa, 약 20 kDa 내지 약 50 kDa, 약 10 kDa 내지 약 25 kDa, 약 5 kDa 내지 약 50 kDa, 또는 약 5 kDa 내지 약 10 kDa의 범위일 것이다.
- [0018] 본 발명은 개질된 혈액 인자가 II 인자, III 인자, V 인자, VII 인자, VIIa 인자, VIII 인자, IX 인자, X 인자, XI 인자, 폰 빌레브란트 인자 및 피브리노겐으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 고려한다. 한 실시양태에서, 혈액 인자 분자는 VIII 인자이다. 한 실시양태에서, 혈액 인자 분자는 VIIa 인자이다. 한 실시양태에서, 혈액 인자 분자는 IX 인자이다. 추가의 실시양태에서, 혈액 인자 분자는 인간의 것이다.
- [0019] 한 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 VIII 인자 분자당 4개 이상 내지 10개 미만의 PEG 잔기를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 VIII 인자 분자당 4 내지 8개의 PEG 잔기 (포괄적)를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 VIII 인자 분자당 1 내지 4개의 PEG 잔기 (포괄적)를 포함한다. 또다른 실시양태에서 개질된 혈액 인자는 VIII 인자 분자당 4 내지 6개의 PEG 잔기 (포괄적)를 포함한다. 또다른 실시양태에서 개질된 혈액 인자는 VIII 인자 분자당 1 또는 2개의 PEG 잔기를 포함한다.
- [0020] 또다른 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 VIII 인자 분자당 1 내지 4개의 PSA 잔기 (포괄적)를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 VIII 인자 분자당 4 내지 6개의 PSA 잔기 (포괄적)를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 VIII 인자 분자당 1 또는 2개의 PSA 잔기를 포함한다.
- [0021] 또다른 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 VIII 인자 분자당 4 내지 6개의 PEG 또는 PSA 잔기 (포괄적)를 포함하며, 여기서 중합체는 유리가능한 또는 가수분해가능한 링커에 의해 연결된다. 또다른 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 VIII 인자 분자당 1 또는 2개의 PEG 또는 PSA 잔기를 포함하며, 여기서 중합체는 안정한, 유리가능한 또는 가수분해가능한 링커를 통해 연결된다.
- [0022] 또다른 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 FVIIa 분자당 1 내지 6개의 수용성 중합체 잔기 (포괄적)를

포함한다. 관련 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 FVIIa 분자당 1 또는 2개의 수용성 중합체 잔기를 포함한다. 관련 실시양태에서, 수용성 중합체는 PEG 또는 PSA로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 중합체는 안정한, 유리가능한 또는 가수분해가능한 링커를 통해 연결된다.

[0023] 또다른 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 FVIIa 분자당 1 내지 6개의 수용성 중합체 잔기 (포괄적)를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 FIX 분자당 1 또는 2개의 수용성 중합체 잔기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 수용성 중합체는 PEG 또는 PSA로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 중합체는 안정한, 유리가능한 또는 가수분해가능한 링커를 통해 연결된다.

[0024] 추가의 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된, 개질된 혈액 인자를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0025] 또다른 측면에서, 본 발명은, 혈액 인자 분자에 1개 이상 내지 10개 미만의 수용성 중합체를 부착시키는 조건하에서 혈액 인자 분자를 혈액 인자 분자에 대해 30 M 과량 이하의 수용성 중합체인 몰과량의 수용성 중합체와 접촉시키는 것을 포함하는, 혈액 인자 분자에 콘주게이션된 소수의 수용성 중합체를 갖는 개질된 혈액 인자 분자의 제조 방법을 고려한다.

[0026] 한 실시양태에서, 수용성 중합체의 몰과량은 2 M 과량 내지 30 M 과량이다. 또다른 실시양태에서, 수용성 중합체의 몰과량은 10 M 내지 25 M 과량이다. 또다른 실시양태에서, 수용성 중합체의 몰과량은 약 2 M, 약 5 M, 약 10 M, 약 15 M, 약 20 M, 약 25 M 또는 약 30 M 과량이다.

[0027] 또다른 측면에서, 본 발명은 치료 유효량의 본원에 기재된, 개질된 혈액 인자를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 혈액 응고 장애를 앓고 있는 대상체의 치료 방법을 제공한다.

[0028] 한 실시양태에서, 혈액 응고 장애는 A형 혈우병, B형 혈우병, 폰 빌레브란트 증후군, X 인자 결핍증, VII 인자 결핍증, 알렉산더병(Alexander's disease), 로젠탈(Rosenthal) 증후군 (C형 혈우병) 및 XIII 인자 결핍증으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0029] 관련 실시양태에서, 혈액 응고 장애는 A형 혈우병이고 개질된 혈액 인자는 VIII 인자 분자를 포함한다.

[0030] 추가의 실시양태에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 수용성 중합체는 상기 기재된 수용성 중합체이다. 관련 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜이다.

[0031] 또다른 실시양태에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 혈액 인자는 II 인자, III 인자, V 인자, VII 인자, VIIa 인자, VIII 인자, IX 인자, X 인자, XI 인자, 폰 빌레브란트 인자 및 피브리노겐으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 혈액 인자 분자는 VIII 인자이다. 또다른 실시양태에서, 혈액 인자는 FVIIa이다. 추가의 실시양태에서, 혈액 인자는 FIX이다. 추가의 실시양태에서, 혈액 인자 분자는 인간의 것이다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 적은 몰과량의 PEG를 사용하여 제조된 낮은 수준으로 PEG화된 VIII 인자의 SDS-PAGE 겔을 도시한다. 도 1a는 항-FVIII 항체로 염색하였고, 도 1b는 항-PEG 항체로 염색하였다.

도 2는 FVIII 결핍 마우스 모델에서 생체내 검출된 낮은 수준으로 PEG화된 FVIII의 약물동력학적 프로파일을 도시한다. 데이터는 200 U/kg으로 조정된 투여량이다.

도 3은 FVII 결핍 마우스 모델에서 생체내 검출된, PEG화 단백질의 AUC (도 3a), 반감기 (HL, 도 3b) 및 평균 내성 시간 (MRT, 도 3c)에 대한 FVIII의 PEG화 수준의 비교를 도시한다.

도 4는 FVIII 결핍 마우스 모델에서 생체내 검출된 낮은 수준으로 폴리시알화된 rFVIII의 약물동력학적 프로파일을 도시한다. 데이터는 200 U/kg으로 조정된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본 발명은 소량의 수용성 중합체를 포함하며, 수용성 중합체, 예컨대 PEG의 양은 분자의 반감기를 연장시키는 충분한 혈액 인자 변이체의 제조 방법 및 그를 위한 물질에 관한 것이다. 소량의 수용성 중합체를 포함하는 개질된 혈액 인자는 표준 제조 프로토콜을 사용하여 제조된 혈액 인자 분자와 비교하여 감소된 독성을 나타낸다는 것이 고려된다.

[0034] 달리 명시하지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 당분야의 당업자에 의해 통상 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 하기 참조문헌이 본 발명에서 사용된 여러 용어들의 일반적인

정의를 당업자에게 제공한다: 문헌 [Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (2d ed. 1994)]; 문헌 [THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker ed., 1988)]; 문헌 [THE GLOSSARY OF GENETICS, 5TH ED., R. Rieger, et al. (eds.), Springer Verlag (1991)]; 및 문헌 [Hale and Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991)].

- [0035] 본원에서 인용된, 각각의 공보, 특허 출원, 특허 및 기타 참조문헌은 본 명세서와 상충되지 않는 정도로 그 전문이 참조로 인용된다.
- [0036] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 사용된, 단수형 "한", "하나의" 및 "그"는 문맥에서 명확히 다르게 명시하지 않는 한 복수형을 포함함을 알아야 한다.
- [0037] 본원에서 사용된 하기 용어들은 달리 언급하지 않는 한, 그에 부여된 의미를 갖는다.
- [0038] 용어 "개질된 혈액 인자"는 수용성 중합체와의 콘주게이션, 또다른 탄수화물 잔기에의 콘주게이션 또는 천연 또는 야생형 혈액 응고 인자로부터의 개질과 같은 하나 이상의 개질이 일어난 혈액 인자를 말한다. 본원에서 사용된 "혈액 인자" 또는 "혈액 응고 인자"는 응고 캐스케이드에 관여하는 것들을 포함하는, 대상체에서의 혈액 응고에 관여하는 단백질을 말한다. 혈액 인자는 II 인자, III 인자, V 인자, VII 인자, VIIa 인자, VIII 인자, IX 인자, X 인자, XI 인자, 폰 빌레브란트 인자 및 피브리노겐을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0039] 용어 "단백질"은 펩티드 결합을 통해 연결된 아미노산 잔사로 이루어진 폴리펩티드, 단백질 복합체 및 재조합 단백질을 포함하는, 임의의 단백질, 단백질 복합체 또는 폴리펩티드를 말한다. 단백질은 생체내 공급원으로부터의 단리에 의해 (즉, 자연 발생), 인공적인 방법에 의해, 또는 재조합 DNA 기술에 의해 수득된다. 합성 폴리펩티드는, 예를 들면 자동화된 폴리펩티드 합성장치를 사용하여 합성된다. 본 발명에 따라 사용되는 재조합 단백질은 본원 하기에 기재된, 당분야에 알려진 임의의 방법에 의해 생산된다. 한 실시양태에서, 단백질은 치료 단백질 또는 그의 생물학적 활성 유도체를 포함하는, 생리학적 활성 단백질이다. 용어 "생물학적 활성 유도체"는 어느 한 단백질과 실질적으로 동일한 기능적 및/또는 생물학적 특징을 갖는 상기 단백질의 유도체를 말한다. 용어 "단백질"은 통상적으로 큰 폴리펩티드를 말한다. 용어 "펩티드"는 통상적으로 짧은 폴리펩티드를 말한다. 차이점에 상관없이, 본원에서 사용된 폴리펩티드, 단백질 및 펩티드는 교체 사용이 가능하다.
- [0040] 폴리펩티드의 "단편"은 전장 폴리펩티드 또는 단백질 발현 산물보다 작은 폴리펩티드의 임의의 부분을 말한다. 한 측면에서, 단편은 하나 이상의 아미노산 잔사가 전장 폴리펩티드의 아미노 말단 및/또는 카르복시 말단으로부터 제거된, 전장 폴리펩티드의 결실 유사체이다. 따라서, "단편"은 하기 기재된 결실 유사체의 하위군이다.
- [0041] 화합물, 예를 들어 펩티드의 "유사물", "유사체" 또는 "유도체"는 자연 발생 분자와 그 구조가 실질적으로 유사하고, 특정한 경우에는 상이한 수준이기는 하지만, 동일한 생물학적 활성을 갖는 폴리펩티드를 말한다. 유사체는 (i) 자연 발생 폴리펩티드 서열의 하나 이상의 내부 구역 및/또는 폴리펩티드의 하나 이상의 말단에서 하나 이상의 아미노산 잔사의 결실, (ii) 자연 발생 폴리펩티드 서열의 하나 이상의 내부 구역 (통상적으로 "삽입" 유사체) 및/또는 폴리펩티드의 하나 이상의 말단 (통상적으로 "부가" 유사체)에서 하나 이상의 아미노산의 삽입 또는 부가, 또는 (iii) 자연 발생 폴리펩티드 서열에서 다른 아미노산에 의한 하나 이상의 아미노산의 치환을 포함하는 하나 이상의 돌연변이를 기반으로 하여, 유사체가 유도된 자연 발생 폴리펩티드와 비교하여 아미노산 서열 조성이 상이하다.
- [0042] 한 측면에서, 유사체는 주어진 화합물, 예를 들면 펩티드와 약 70% 서열 유사성 내지 100% 미만 서열 유사성을 나타낸다. 한 측면에서, 그러한 유사체 또는 유도체는, 예를 들어 호모아르기닌, 오르니틴, 페니실라민, 및 노르발린을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는 비-자연 발생 아미노산 잔사, 및 자연 발생 아미노산 잔사로 이루어진다. 또다른 측면에서, 그러한 유사체 또는 유도체는 하나 또는 복수 개의 D-아미노산 잔사로 이루어지거나, 또는 2개 이상의 아미노산 잔사 사이의 비-펩티드 상호연결을 함유한다. 본원에서 사용된 용어 "로부터 유도된"은 야생형 또는 자연 발생 폴리펩티드 또는 펩티드 서열의 개질 (아미노산 치환 또는 결실을 포함함)인, 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 가져 유도체 서열이 야생형 또는 자연 발생 서열과 약 70% 내지 100% 미만의 서열 유사성을 공유하는 폴리펩티드 또는 펩티드 서열을 말한다. 한 실시양태에서, 유도체는 야생형 폴리펩티드의 적어도 5개, 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개 또는 50개 아미노산 길이에 걸쳐서 실질적으로 상동성인 (즉, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 상동성), 폴리펩티드의 단편일 수 있다.
- [0043] 서열 비교에 있어서, 통상적으로 어느 한 서열이 시험 서열을 비교하는 참조 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용할 경우에, 시험 서열 및 참조 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요에 따라 부분열 좌표를 지정하고,

서열 알고리즘 프로그램 파라미터를 지정한다. 그 후에 서열 비교 알고리즘이 지정된 프로그램 파라미터를 기반으로 하여 참조 서열에 대한 시험 서열(들)의 서열 동일성 (%)을 계산한다.

[0044] 비교용 서열의 최적의 정렬은, 예를 들어 문헌 [Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)]의 국부 상동성 알고리즘에 의해, 문헌 [Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리즘에 의해, 문헌 [Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)]의 유사성 검색 방법에 의해, 상기 알고리즘의 컴퓨터 실행 (미국 위스콘신주 매디슨 575 사이언스 드라이브 소재의 제네틱스 컴퓨터 그룹 (Genetics Computer Group)의 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지(Wisconsin Genetics Software Package)의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA)에 의해, 또는 육안 검사에 의해 수행가능하다. 유용한 알고리즘의 한 예는 문헌 [Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 (1987)]의 연쇄 정렬 방법의 단순화된 방법을 사용하며 문헌 [Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-153 (1989)]에 개시된 방법과 유사한 PILEUP이다. 서열의 다중 정렬에 유용한 또다른 알고리즘은 Clustal W (문헌 [Thompson, et al., Nucleic Acids Research 22: 4673-4680 (1994)])이다. 서열 동일성 및 서열 유사성 (%)을 측정하는 데에 적합한 알고리즘의 예는 BLAST 알고리즘 (문헌 [Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)]; 문헌 [Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)]; 문헌 [Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)])이다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립 바이오테크놀로지 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)를 통해 공개적으로 이용가능하다.

[0045] 치환은 대체되는 아미노산 및 그것을 대체하는 아미노산의 물리화학적 또는 기능적 관련성을 기준으로 하였을 때 보존적 또는 비보존적이다. 이러한 유형의 치환은 당분야에 널리 알려져 있다. 별법으로, 본 발명은 또한 비보존적인 치환을 포함한다. 보존적 치환의 예는 문헌 [Lehninger, Biochemistry, 2nd Edition; Worth Publishers, Inc., New York (1975), pp. 71-77]에 개시되어 있으며 하기 상술되었다.

보존적 치환	
측제 특성	아미노산
비극성 (소수성)	
A. 지방족	A L I V P
B. 방향족	F W
C. 황 함유	M
D. 경계성	G
비하전 극성	
A. 히드록실	S T Y
B. 아미드	N Q
C. 술폰히드릴	C
D. 경계성	G
양으로 하전됨 (염기성)	K R H
음으로 하전됨 (산성)	D E

[0046]

[0047] 또다른 보존적 치환의 예가 바로 다음에 상술되었다.

보존적 치환 II

원래 잔사	예시 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

[0048]

[0049] 용어 "변이체"는 보통은 분자의 일부가 아닌 추가의 화학 잔기를 포함하도록 개질된 단백질 또는 그의 유사체를 말한다. 그러한 잔기는 분자의 용해도, 흡수도 및 생물학적 반감기를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는 다양한 측면에서 개선시킨다. 잔기는 다르게는 분자의 독성을 감소시키고 분자의 임의의 원치않는 부작용 등을 제거하거나 약화시킬 수 있다. 그러한 효과를 매개할 수 있는 잔기는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences (1980)]에 개시되어 있다. 그러한 잔기를 분자에 커플링시키는 방법은 당분야에 널리 알려져 있다. 특정 측면에서, 변이체는 글리코실화, PEG화 또는 폴리시알화에 의해 개질된 폴리펩티드이며, 이들로 제한되지는 않는다.

[0050] 단백질 또는 폴리펩티드에 사용되는 용어 "자연 발생"은 자연계에서 발견되는 단백질을 말한다. 예를 들면, 자연계에 존재하는 공급원으로부터 단리된 유기체 (바이러스 포함)에 존재하고 실험실에서 인간에 의해 의도적으로 개질되지 않은 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 자연 발생적이다. 용어 "자연 발생" 및 "야생형"은 교체 사용이 가능하다.

[0051] 단백질 또는 폴리펩티드에 사용되는 용어 "혈장 유도된"은 대상체의 혈장 또는 혈청에서 발견되는 자연 발생 폴리펩티드 또는 그의 단편을 말한다.

[0052] 용어 "수용성 중합체"는 수용액에서 실질적으로 가용성이거나 현탁액의 형태로 존재하고 제약학적 유효량으로 상기 중합체에 콘주게이션된 단백질의 투여시에 포유동물에 실질적으로 부정적 영향을 주지 않으며 생체적합성으로 간주될 수 있는 중합체 분자를 말한다. 한 실시양태에서, 생리학적으로 허용되는 분자는 약 2 내지 약 300개의 반복 단위를 포함한다. 수용성 중합체의 예는 폴리(알킬렌 글리콜), 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리(프로필렌 글리콜) ("PPG"), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체 등, 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀 알콜), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카라이드), 폴리(α -히드록시산), 폴리(비닐 알콜), 폴리포스파스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리(N-아크릴로일모르폴린), 폴리(알킬렌 옥시드) 중합체, 폴리(말레산), 폴리(DL-알라닌), 폴리사카라이드, 예컨대 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 전분 또는 전분 유도체, 히알루론산 및 키틴, 폴리(메트)아크릴레이트, 및 상기의 조합물을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0053] 수용성 중합체 분자는 특정 구조로 제한되지 않으며, 특정 측면에서 분지형 또는 멀티암형(multi-armed), 수지상이거나, 분해가능한, 유리가능한 또는 가수분해가능한 링커를 갖는다. 또한 또다른 측면에서, 중합체 분자의 내부 구조는 여러 상이한 패턴으로 조직화되고 단독중합체, 교호 공중합체, 랜덤 공중합체, 블록 공중합체, 교호 삼원공중합체, 랜덤 삼원공중합체 및 블록 삼원공중합체로 이루어진 군으로부터 선택되나, 이들로 제한되지는 않는다.

- [0054] 용어 "PEG화된"이란 하나 이상의 PEG 잔기에 결합된 단백질, 단백질 복합체 또는 폴리펩티드를 말한다. 본원에서 사용된 용어 "PEG화"는 하나 이상의 PEG를 단백질에 결합시키는 방법을 말한다. 한 실시양태에서, 상기 PEG의 분자량은 2 내지 200 kDa, 5 내지 120 kDa, 10 내지 100 kDa, 20 내지 50 kDa, 10 내지 25 kDa, 5 kDa 내지 10 kDa, 또는 2 kDa 내지 5 kDa 범위이다.
- [0055] 용어 "폴리시알화된"이란 하나 이상의 폴리시알산 (PSA) 잔기에 결합된 단백질, 단백질 복합체 또는 폴리펩티드를 말한다. 본원에서 사용된 용어 "폴리시알화"는 하나 이상의 PSA 잔기를 단백질에 결합시키는 방법을 말한다. 한 실시양태에서, 상기 PSA의 분자량은 2 내지 80 kDa, 5 내지 60 kDa, 10 내지 40 kDa, 또는 15 내지 25 kDa 범위이다.
- [0056] 용어 "링커"는 수용성 중합체를 생물학적 활성 분자에 연결하는 분자 단편을 말한다. 단편은 통상적으로 커플링 또는 활성화되어 또다른 링커와 반응하거나 또는 생물학적 활성 친핵체와 직접 반응할 수 있는 2개의 관능기를 갖는다. 예를 들면, 리신과 같은 ω -아미노알칸산이 통상 사용된다. 본 발명에서, 링커는 안정한, 유리가능한, 분해가능한, 또한 가수분해가능한 링커를 포함한다.
- [0057] 용어 "제약 조성물"은 인간 및 포유동물을 포함하는, 대상체 동물에 제약학적으로 사용하기에 적합한 조성물을 말한다. 제약 조성물은 약리학적 유효량의 중합체-폴리펩티드 콘주게이트를 포함하며, 또한 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 제약 조성물은 활성 성분(들), 및 제약상 허용되는 담체를 구성하는 비활성 성분(들) 뿐만 아니라, 직접적으로 또는 간접적으로 임의의 2종 이상의 성분의 조합, 복합체 형성 또는 응집으로부터 초래되는 임의의 생성물을 포함하는 조성물을 포괄한다. 따라서, 본 발명의 제약 조성물은 본 발명의 화합물 또는 콘주게이트 및 제약상 허용되는 담체를 혼합함으로써 제조된 임의의 조성물을 포괄한다.
- [0058] 용어 "제약상 허용되는 담체"는 임의의 및 모든 임상학적으로 유용한 용매, 분산 매체, 코팅물, 항박테리아성 및 항진균성 제제, 등장성 및 흡수 지연 제제, 완충제, 및 부형제, 예컨대 포스페이트 완충 식염수, 5% 텍스트로스 수용액, 및 에멀전, 예컨대 오일/물 또는 물/오일 에멀전, 및 다양한 유형의 습윤제 및/또는 보조제를 포함한다. 적합한 제약학적 담체 및 제형은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1995)]에 개시되어 있다. 조성물에 유용한 제약학적 담체는 활성제의 의도하는 투여 방식에 좌우된다. 통상적인 투여 방식은 장내 (예를 들면, 경구) 또는 비경구 투여 (예를 들면, 피하, 근육내, 정맥내 또는 복강내 주사; 또는 국소, 경피 또는 경점막 투여)를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. "제약상 허용되는 염"은 예를 들어 금속염 (나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등) 및 암모니아 또는 유기 아민의 염을 포함하는, 제약학적 용도를 위한 화합물 또는 콘주게이트로 제형화가능한 염이다.
- [0059] 용어 "제약상 허용되는" 또는 "약리학적으로 허용되는"은 생물학적으로 또는 다르게는 바람직하지 않은 것이 아닌 물질을 의미한다. 즉, 상기 물질은 임의의 바람직하지 않은 생물학적 영향을 유발하거나 또는 물질이 함유된 조성물의 임의 성분과 유해한 방식으로 상호작용하지 않으면서 하기 기재된 바와 같이, 분야에 널리 알려진 경로를 사용하여 개체에 투여가능하다.
- [0060] 용어 "혈액 응고 장애" 또는 "출혈 장애"는 대상체에서 혈액이 효율적으로 혈괴를 형성할 수 없게 하고, 그에 따라 비정상적인 출혈을 유도하는 혈액 응고 인자의 임의의 다수의 유전적 또는 후천적 결핍증을 말한다. 혈액 응고 장애는 A형 혈우병, B형 혈우병, 폰 빌레브란트 증후군, X 인자 결핍증, VII 인자 결핍증, 알렉산더병, 로젠탈 증후군 (C형 혈우병) 및 XIII 인자 결핍증을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 혈액 응고 장애의 치료는 예방적 처치 또는 치료적 처치를 말한다.
- [0061] "치료"는 예방적 처치 또는 치료적 처치를 말한다. "예방적" 처치는 질환의 징후를 나타내지 않거나 또는 단지 초기 징후를 나타내는 대상체에 병리학적 이상이 발생할 위험성을 감소시키기 위해 실시되는 치료이다. 본 발명의 화합물 또는 콘주게이트는 병리학적 이상이 발생할 가능성을 낮추거나 또는, 발생하였다면, 병리학적 이상의 중증도를 최소화하기 위한 예방적 처치로서 제공될 수 있다. "치료적" 처치는 병리학적 이상의 징후 또는 증상을 나타내는 대상체에 징후 또는 증상을 감소 또는 제거하기 위해 실시되는 치료이다. 징후 또는 증상은 생화학적, 세포학적, 조직학적, 기능적, 주관적 또는 객관적일 수 있다. 본 발명의 조성물은 치료적 처치로서 또는 진단을 위해 제공될 수 있다.
- [0062] 본원에서 사용된 용어 "대상체"는 포유동물 및 비포유동물을 포괄한다. 포유동물의 예는 포유강의 임의의 구성원: 인간, 비인간 영장류, 예컨대 침팬지, 및 기타 유인원 및 원숭이 종; 농장 동물, 예컨대 소, 말, 양, 염소, 돼지; 가축, 예컨대 토끼, 개 및 고양이; 설치류, 예컨대 래트, 마우스 및 기니 피그를 포함하는 실험 동물 등을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 비포유동물의 예는 조류, 어류 등을 포함하나, 이들로 제한되지는 않

는다. 상기 용어는 특정 연령 또는 성을 의미하지 않는다.

[0063] 용어 "유효량"은 대상체의 건강 상태, 병리학적 이상 및 질환에 대하여 목적하는 결과를 초래하거나 또는 진단 목적에 충분한 투여량을 의미한다. 목적하는 결과는 투여량의 수용체에서의 주관적인 또는 객관적인 개선을 포함할 수 있다. "치료 유효량"은 건강에 의도했던 유익한 효과를 초래하는 효과적인 제제의 양을 말한다. 임의의 각각의 사례에서 적절한 "유효량"은 일상적인 실험을 사용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0064] **단백질 및 단백질 복합체**

[0065] 제약 조성물에서의 사용을 위해 고려되는 단백질은 대상체에 투여하는 데에 유용한 생리학적 활성 혈액 응고 인자를 포함한다. 혈액 응고 인자는 단백질 또는 상기 단백질의 일부, 또는 실질적으로 모든, 또는 모든 치료학적 또는 생물학적 활성을 여전히 유지하는 그의 임의의 단편, 유사체 또는 변이체이다. 몇몇 실시양태에서, 혈액 응고 인자는 발현 또는 생산되지 않거나, 또는 발현 또는 생산이 실질적으로 감소한다면 질환을 초래하게 될 것들이다. 한 측면에서, 혈액 응고 인자는 포유동물로부터 유도되거나 또는 그로부터 수득된다.

[0066] 본 발명의 다양한 실시양태에서, 수용성 중합체에 콘주게이션된 혈액 응고 인자는 혈액 응고 인자 또는 상기 단백질의 생물학적 활성을 갖는 그의 단편이며, 인간 또는 포유류 단백질의 상응하는 부분에 대한 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 다른 실시양태에서, 콘주게이트의 혈액 응고 인자는 인간 또는 포유동물 종의 천연의 단백질이다. 다른 실시양태에서, 혈액 응고 인자 또는 그의 단편은 상응하는 인간 또는 포유동물 단백질의 천연 서열과 실질적으로 상동성이다 (즉, 활성제의 적어도 10개, 25개, 50개, 100개, 150개 또는 200개 아미노산 길이, 또는 전장에 걸쳐서 아미노산 서열이 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 보다 바람직하게는 98%, 가장 바람직하게는 99% 동일함).

[0067] **단백질의 생산 방법**

[0068] 재조합 단백질의 생산 방법은 당분야에 널리 알려져 있다. 재조합 단백질을 코딩하는 DNA 또는 RNA를 발현하는, 포유류 세포를 포함하는 세포의 생산 방법은 미국 특허 제6,048,729호, 미국 특허 제5,994,129호 및 미국 특허 제6,063,630호에 개시되어 있다. 상기 출원 각각의 교시내용은 그 전문이 본원에 참조로 인용됨을 분명히 나타낸다.

[0069] 폴리펩티드 또는 그의 단편, 변이체 또는 유사체를 발현시키는 데에 사용되는 핵산 구조물은, 한 측면에서, 형질감염된 포유류 세포에서 염색체의 (에피솜) 발현되는 것 또는 상동 재조합을 통해 예정된 표적화된 부위에서 또는 무작위로 수용체 세포의 게놈으로 통합되는 것이다. 염색체의 발현되는 구조물은 폴리펩티드 코딩 서열 이외에도 세포에서의 단백질의 발현에, 또한 임의로는 구조물의 복제에 충분한 서열을 포함한다. 상기 구조물은 프로모터, 폴리펩티드 코딩 DNA 서열 및/또는 폴리아데닐화 부위를 임의로 포함한다. 단백질을 코딩하는 DNA는 그의 발현이 프로모터의 조절하에 있도록 하는 방식으로 구조물에 위치한다. 임의로, 구조물은 스플라이스 부위, 인핸서 서열, 적절한 프로모터의 조절하의 선별가능한 마커 유전자, 및 적절한 프로모터의 조절하의 증폭가능한 마커 유전자 중 하나 이상과 같은 추가 성분을 함유한다.

[0070] DNA 구조물이 세포의 게놈으로 통합되는 실시양태에서, 한 측면에서, 상기 구조물은 단지 폴리펩티드 코딩 핵산 서열만을 포함할 필요가 있다. 임의로, 구조물은 프로모터 및 인핸서 서열, 폴리아데닐화 부위 또는 부위들, 스플라이스 부위 또는 부위들, 선별가능한 마커 또는 마커들을 코딩하는 핵산 서열, 증폭가능한 마커를 코딩하는 핵산 서열 및/또는 게놈에서의 선별된 부위의 DNA의 통합을 표적화하기 위한 (DNA 또는 DNA 서열 표적화) 수용체 세포에서의 게놈 DNA에 상동성인 DNA를 포함한다.

[0071] **숙주 세포**

[0072] 재조합 단백질의 생산에 사용되는 숙주 세포는, 제한하지 않고 예를 들면, 박테리아, 효모, 곤충, 비포유류 척추동물 또는 포유류 세포이고, 포유류 세포는 햄스터, 원숭이, 침팬지, 개, 고양이, 소, 돼지, 마우스, 래트, 토끼, 양 및 인간 세포를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 숙주 세포는 불멸화 세포 (세포주) 또는 비불멸화 (1차 또는 2차) 세포이고 매우 다양한 세포형, 예컨대 섬유아세포, 케라틴세포, 상피 세포 (예를 들면, 유방 상피 세포, 장 상피 세포), 난소 세포 (예를 들면, 차이니즈 햄스터 난소 또는 CHO 세포), 내피 세포, 교질 세포, 신경 세포, 혈액의 유형 성분 (예를 들면, 림프구, 골수 세포), 근육 세포, 간세포 및 상기 체세포형의 전구체 (이들로 제한되지는 않음) 중 어느 하나이다. 통상 사용되는 숙주 세포는 원핵 세포, 예컨대 그람 음성 또는 그람 양성 박테리아, 즉 임의 계통의 이. 콜라이(*E. coli*), 바실루스(*Bacillus*), 스트렙토미세스(*Streptomyces*), 사카로미세스(*Saccharomyces*), 살모넬라(*Salmonella*) 등; 진핵 세포, 예컨대 CHO (차이니즈 햄스터 난소) 세포; 베이비 햄스터 신장 (BHK) 세포; 인간 신장 293 세포; COS-7 세포; 곤충 세포, 예컨대 D.

Mel-2, Sf4, Sf5, Sf9 및 Sf21 및 High5; 식물 세포 및 다양한 효모 세포, 예컨대 사카로미세스 (*Saccharomyces*) 및 피키아(*Pichia*)를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0073] 폴리펩티드 코딩 DNA 또는 RNA를 함유하는 숙주 세포는 세포 성장 및 DNA 또는 RNA 발현에 적절한 조건하에서 배양된다. 폴리펩티드를 발현하는 세포는 알려진 방법, 및 알려진 방법을 사용하여 단리 및 정제된 재조합 단백질질을 사용하여, 폴리펩티드 생산을 증폭시키거나 또는 폴리펩티드 생산의 증폭 없이 동정된다. 동정은, 제한하지 않고 예를 들면, 단백질을 코딩하는 DNA 또는 RNA의 존재를 지시하는 표현형을 나타내는 유전자 변형된 포유류 세포의 스크리닝, 예컨대 PCR 스크리닝, 서던 블롯(Southern blot) 분석법에 의한 스크리닝, 또는 단백질의 발현에 대한 스크리닝을 통해 수행된다. 도입된 단백질 코딩 DNA를 갖는 세포의 선별은, 예를 들면, 선별가능한 마커를 DNA 구조물에 포함시키고 선별가능한 마커 유전자를 함유하는, 형질감염 또는 감염된 세포를 선별가능한 마커 유전자를 발현하는 세포만이 생존하는 적절한 조건하에서 배양함으로써 달성된다. 도입된 DNA 구조물의 추가 증폭은 유전자 변형된 세포를 증폭에 적절한 조건하에서 배양함으로써 (예를 들면, 증폭가능한 마커 유전자를 함유하는, 유전자 변형된 세포를 증폭가능한 마커 유전자의 다수의 카피(copy)를 함유하는 세포만이 생존할 수 있는 약물 농도의 존재하에서 배양함으로써) 수행된다.

[0074] 생리학적 활성 단백질 또는 치료 단백질인 재조합 단백질은 시토킨, 성장 인자, 혈액 응고 인자, 효소, 케모카인, 가용성 세포 표면 수용체, 세포 부착 분자, 항체, 호르몬, 세포골격 단백질, 기질 단백질, 샤페론 단백질, 구조 단백질, 대사 단백질 및 당업자에게 알려진 다른 치료 단백질을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0075] 치료제로 사용되는 재조합 혈액 응고 인자의 예는 II 인자, III 인자, V 인자, VII 인자, VIIa 인자, VIII 인자, IX 인자, X 인자, XI 인자, 폰 빌레브란트 인자 및 피브리노겐을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 관련 실시양태에서, 단백질 복합체는 1종 이상의 혈액 인자를 포함하는 복합체이다.

[0076] 혈액 인자

[0077] VIII 인자 (FVIII)는 포유동물의 간에서 생산되는 분자 질량 약 260 kDa의 혈장 당단백질이다 (진뱅크(Genbank) 등록 번호 NP_000123). 상기 인자는 혈액 응고를 유도하는 응고 반응의 캐스케이드의 중요한 성분이다. 상기 캐스케이드에는 IXa 인자가 FVIII와 함께 X 인자 (진뱅크 등록번호 NP_000495)를 활성화된 형태인 Xa 인자로 전환시키는 단계가 있다. FVIII은 상기 단계에서 IXa 인자의 활성을 위해 칼슘 이온 및 인지질과 함께 요구되는 보조인자로서 작용한다. 2가지의 가장 일반적인 혈우병성 장애가 기능적 FVIII (A형 혈우병, 모든 사례의 약 80%) 또는 기능적 IXa 인자 (B형 혈우병 또는 크리스마스 인자(Christmas Factor) 질환)의 결핍에 의해 초래된다. FVIII은 혈장에서 매우 낮은 농도로 순환하고 폰 빌레브란트 인자 (VWF)에 비공유 결합한다. 지혈 동안에, FVIII은 VWF로부터 분리되어 칼슘 및 인지질 또는 세포막의 존재하에 활성화 속도를 향상시킴으로써 활성화된 IX 인자 (FIXa) 매개 X 인자 (FX) 활성화를 위한 보조인자로서 작용한다.

[0078] FVIII은 도메인 구조 A1-A2-B-A3-C1-C2를 갖는 대략 270 내지 330 kD의 단백질 전구체로서 합성된다. 혈장으로부터 정제시에, FVIII은 중쇄 (A1-A2-B) 및 경쇄 (A3-C1-C2)로 이루어진다. 경쇄의 분자 질량은 80 kD이고, B 도메인 내에서의 단백질가수분해 때문에 중쇄는 90 내지 220 kD 범위이다.

[0079] FVIII은 또한 출혈 장애에 치료를 위해 사용되는 재조합 단백질로서 합성된다. 다양한 시험관내 분석법이 치료 의약으로서의 재조합 FVIII (rFVIII)의 잠재적인 효능을 측정하기 위해 고안되었다. 이들 분석법은 내인성 FVIII의 생체내 효능을 모방한다. FVIII의 시험관내 트롬빈 처리는 시험관내 분석법에 의해 측정하였을 때, 전구응고인자 활성의 급속한 증가 및 후속 감소를 초래한다. 이러한 활성화 및 불활성화는 중쇄 및 경쇄에서의 특별한 제한된 단백질가수분해와 동시에 일어나며, 이는 FVIII에서의 상이한 결합 에피토프의 이용가능성을 변화시키는데, 예를 들면 FVIII이 VWF로부터 해리되어 인지질 표면에 결합하도록 하거나 또는 특정한 단일클론 항체의 결합 능력을 변화시킨다.

[0080] 최근까지, A형 혈우병의 표준 치료법은 인간 공여자의 혈장으로부터 유도된 FVIII 농축물 제제의 빈번한 주입을 포함하였다. 상기 대체 요법은 대체적으로 효과적이지만, 상기 치료법은 환자가 간염 및 AIDS와 같은 바이러스 전염성 질환에 걸릴 위험에 처하게 한다. 그러한 위험성은 단일클론 항체를 사용하는 면역정제로 혈장으로부터의 FVIII을 추가 정제함으로써, 또한 유기 용매 또는 열 처리로 바이러스를 불활성화시킴으로써 감소되었지만, 상기 제제는 치료 비용을 현저히 상승시키고 위험성이 없는 것도 아니다. 그러한 이유로, 환자는 예방용보다는 일화적으로 치료받았다. 또다른 합병증은 환자의 약 15%에서 혈장 유도된 FVIII에 대한 억제성 항체가 발달한다는 것이다. FVIII 수준이 1% 미만인, 중증 A형 혈우병 환자는 일반적으로 투여 간격 사이에 FVIII을 1%보다

높게 유지하기 위한 예방적 요법을 실시한다. 순환계에서의 다양한 FVIII 산물의 평균 반감기를 고려하여, 이는 통상적으로 1주일에 2회 내지 3회 FVIII를 제공함으로써 달성될 수 있다.

[0081] A형 혈우병 치료에 있어서 중요한 진일보는 인간 FVIII의 완전한 2,351개 아미노산 서열을 코딩하는 cDNA 클론의 단리 (문헌 [Wood et al, Nature, 312:330 (1984)] 및 미국 특허 제4,757,006호 참조), 및 인간 FVIII 유전자 DNA 서열 및 그의 생산을 위한 재조합 방법의 제공이다. 혈우병의 치료를 위한 FVIII 산물은 ADVATE® (항혈우병 인자 (재조합체), 혈장/알부민 무함유 방법, rAHF-PFM), 재조합 항혈우병 인자 (BIOCLATE™, GENARC®, HELIXATE FS®, KOATE®, KOGENATE FS®, RECOMBINATE®), MONOCLATE-P® (VIII 인자:C의 정제 제제), 항혈우병 인자/폰 빌레브란트 인자 복합체 (인간) HUMATE-P® 및 ALPHANATE® (항혈우병 인자/폰 빌레브란트 인자 복합체 (인간)), 및 HYATE C® (정제된 돼지 VIII 인자)를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. ADVATE®은 CHO 세포에서 생산되고 백스터 헬스케어 코포레이션(Baxter Healthcare Corporation)에 의해 제조된다. 인간 또는 동물 혈장 단백질 또는 알부민이 세포 배양 공정, 정제 또는 ADVATE®의 최종 제형화에서 첨가되지 않는다.

[0082] 폰 빌레브란트 인자는 분자량 1×10^6 내지 20×10^6 달톤의 일련의 다합체 형태로 혈장에 존재한다. VWF (진뱅크 등록 번호 NP_000543)는 포유동물의 내피 세포에서 주로 형성된 후에 순환계로 분비되는 당단백질이다. 이와 관련하여, 대략 220 kD의 분자량을 갖는 폴리펩티드 사슬로부터 출발하여, 550 kD의 분자량을 갖는 VWF 이합체가 다수의 황 결합의 형성에 의해 세포에서 생산된다. 2천만 달톤까지 분자량이 증가된 VWF의 추가 중합체는 VWF 이합체의 연결에 의해 형성된다. 특히 고분자 VWF 다합체는 혈액 응고에 있어서 본질적인 중요성을 갖는 것으로 생각된다.

[0083] VWF 증후군은 VWF가 저생산 또는 과생산될 때 임상학적으로 발현된다. VWF의 과생산은 증가된 혈전증 (혈류를 방해하는, 혈관 내부에서의 혈괴 또는 혈전의 형성)을 초래하고, 반면 VWF의 고분자 형태의 감소된 수준 또는 결여는 혈소판 응집 및 상처 봉합의 억제제로 인해 출혈 시간의 연장 및 증가된 출혈을 초래한다.

[0084] VWF 결핍은 또한 VWF가 기능적 VIII 인자의 필수 성분이기 때문에 표현형 A형 혈우병을 초래할 수 있다. 이러한 경우에, VIII 인자의 반감기는 혈액 응고 캐스케이드에서의 그의 기능이 저해될 정도로 감소된다. 폰 빌레브란트 질환 (VWD) 또는 VWF 증후군을 앓고 있는 환자는 흔히 VIII 인자 결핍을 나타낸다. 이들 환자의 경우에, 감소된 VIII 인자 활성은 X 염색체 유전자의 결함 때문이 아니라, 혈장내 VWF의 정량적 및 정성적 변화의 간접적인 결과이다. A형 혈우병과 VWD는 보통 VWF 항원을 측정함으로써 또는 리스토세틴 보조인자 활성을 측정함으로써 구분할 수 있다. VWF 항원 함량 및 리스토세틴 보조인자 활성은 둘다 대부분의 VWD 환자에서 감소하고, 반면 A형 혈우병 환자에서는 보통 수준이다. VWF 증후군의 치료를 위한 VWF 산물은 HUMATE-P, IMMUNATE®, INNOBRAND® 및 8Y®을 포함하나, 이들로 제한되지는 않으며, 이들은 혈장으로부터의 FVIII/VWF 농축물을 포함하는 치료제이다.

[0085] 세린 프로테아제 효소인 VII 인자 (프로콘버틴(proconvertin))는 혈액 응고 캐스케이드에서의 핵심 단백질 중 하나이다 (진뱅크 등록 번호 NP_000122). VII 인자 (FVII)의 주요 역할은 조직 인자 (TF)와 함께 응고 과정을 개시하는 것이다. 혈관이 손상되었을 때, TF는 혈액 및 순환하는 VII 인자에 노출된다. TF에 결합되면, FVII은 상이한 프로테아제, 특히 트롬빈 (IIa 인자), 활성화된 X 인자 및 FVIIa-TF 복합체 자체에 의해 FVIIa로 활성화된다. 재조합 인간 VIIa 인자 (NOVOSEVEN®)는 대체 응고 인자에 대한 억제제가 발달한 혈우병 환자의 제어 불가능한 출혈에 사용하기 위해 도입되었다.

[0086] IX 인자 (FIX, 크리스마스 인자) (진뱅크 등록 번호 NP_000124)는 XIa 인자 또는 VIIa 인자 (조직 인자 경로)에 의해 활성화되지 않는 한, 불활성 상태인 세린 프로테아제이다. IXa 인자로 활성화되면, 이는 X 인자의 아르기닌-이소류신 결합을 가수분해하여 Xa 인자를 형성하는 작용을 한다. VIII 인자는 FIX 프로테아제 활성을 위해 요구되는 보조인자이다 (문헌 [Lowe GD, Br. J. Haematol. 115: 507-13, 2002]). IX 인자의 결핍은 B형 혈우병 또는 크리스마스 질환을 초래한다.

[0087] 또다른 혈액 인자에는, 그의 결핍이 혈전증 및 이상프로트롬빈혈증을 초래하는 II 인자 (트롬빈) (진뱅크 등록 번호 NP_000497); 그의 결핍이 출혈성 소질 또는 임의 유형의 혈전성향증 (활성화된 단백질 C 내성으로도 알려짐)을 초래하는 V 인자 (진뱅크 등록 번호 NP_000121); 그의 결핍이 로젠탈 증후군 (C형 혈우병)을 초래하는 XI 인자 (진뱅크 등록 번호 NP_000119); 그의 결핍이 제I형 결핍증 (A 및 B 서브유닛 둘다의 결핍) 및 제II형 결핍증 (A 서브유닛 단독의 결핍) (두 가지 모두 평생 동안의 출혈 성향, 불완전한 상처 치유 및 습관성 유산을 초

래할 수 있음)으로서 특성화되는 XIII 인자 서브유닛 A (진뱅크 등록 번호 NP_000120) 및 서브유닛 B (진뱅크 등록 번호 NP_001985)가 포함된다.

[0088] **폴리펩티드 유사체 또는 변이체**

[0089] 폴리펩티드 단편, 변이체 또는 유사체의 제조 방법은 당분야에 널리 알려져 있다. 폴리펩티드의 단편은 효소 분열 (예를 들면, 트립신, 키모트립신)을 포함하는 방법을 사용하고 또한 특정 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 단편을 생성하는 재조합 수단을 사용하여 제조된다. 한 측면에서, 단편은 리간드 결합 도메인, 수용체 결합 도메인, 이합체화 또는 다합체화 도메인, 또는 당분야에 알려진 임의의 다른 동정가능한 도메인을 포함하도록 생성된다.

[0090] 특정 측면에서, 유사체는 유사체가 유도된 자연 발생 폴리펩티드와 실질적으로 상동성이거나 또는 실질적으로 동일하며, 본 발명에 의해 고려되는 유사체는 상기 기재된 바와 같이 자연 발생 폴리펩티드의 생물학적 활성을 적어도 일부 유지하는 것이다.

[0091] 치환 유사체는 통상적으로 단백질 내의 하나 이상의 부위에서 야생형의 한 아미노산을 또다른 것으로 교환하고, 폴리펩티드의 하나 이상의 특징, 예컨대 단백질가수분해 분열에 대한 안정성을 다른 기능 또는 특징의 결손 없이 조절하도록 고안될 수 있다. 이러한 종류의 치환은 일반적으로 보존적이다. "보존적 아미노산 치환"이란 유사한 화학적 특성의 측쇄를 갖는 아미노산으로 한 아미노산을 치환하는 것을 의미한다. 보존적 치환을 위한 유사한 아미노산은 산성 측쇄 (글루탐산, 아스파르트산); 염기성 측쇄 (아르기닌, 리신, 히스티딘); 극성 아미드 측쇄 (글루타민, 아스파라긴); 소수성 지방족 측쇄 (류신, 이소류신, 발린, 알라닌, 글리신); 방향족 측쇄 (페닐알라닌, 트립토판, 티로신); 작은 측쇄 (글리신, 알라닌, 세린, 트레오닌, 메티오닌); 또는 지방족 히드록실 측쇄 (세린, 트레오닌)를 갖는 것들을 포함한다.

[0092] 폴리뉴클레오티드 유사체 및 단편은 자연 발생 분자와 동일한 또는 유사한 생물학적 활성을 갖는, 자연 발생 분자의 생물학적 활성 단편 또는 유사체를 코딩하도록 숙련인에 의해 용이하게 제조된다. 일상적으로 실시되는 방법은 PCR 기술, 단백질 분자를 코딩하는 DNA의 효소 절단 및 이중성 폴리뉴클레오티드 서열에의 리게이션 (ligation) 등을 포함한다. 예를 들면, PCR 및 당분야에 널리 알려진 다른 기술을 사용하는 점 돌연변이유발을 사용하여 특히 어느 아미노산 잔사가 단백질 활성과 관련된 특정한 활성에서 중요한지를 동정할 수 있다. 따라서, 당업자라면 DNA 가닥에서 단일 염기 변화를 일으켜 변경된 코돈 및 미스센스(missense) 돌연변이를 초래할 수 있을 것이다.

[0093] 또한, 단백질 또는 폴리펩티드는 폴리펩티드인 제2 체제를 더 포함하는 본원에 기재된 단백질, 즉 융합 단백질인 유사체를 제조하도록 개질된다는 것이 고려된다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드인 제2 체제는 시토카인, 성장 인자, 혈액 인자, 효소, 케모카인, 가용성 세포 표면 수용체, 세포 부착 분자, 항체, 호르몬, 세포골격 단백질, 기질 단백질, 사포닌 단백질, 구조 단백질, 대사 단백질 및 당업자에게 알려진 다른 치료 단백질, 또는 상기 기재된 단백질 또는 당분야에 알려진 임의의 다른 유형의 단백질의 단편 또는 활성 도메인이다. 관련 실시양태에서, 제2 체제는 II 인자, III 인자, V 인자, VII 인자, VIIa 인자, VIII 인자, IX 인자, X 인자, XI 인자, 폰 빌레브란트 인자 및 피브리노겐과 같은 혈액 응고 인자이다. 고려되는 융합 단백질은 당분야에 널리 알려진 화학적 또는 재조합 기술에 의해 제조된다.

[0094] 고려되는 단백질 변이체는 유비퀴틴화, 글리코실화, 치료 또는 진단 체제에의 콘주게이션, 표지 (예를 들면, 방사성 핵종 또는 다양한 효소 이용), 공유 중합체 부착, 예컨대 PEG화 (폴리에틸렌 글리콜에 의한 유도체화), 비가수분해성 결합의 도입 및 인간 단백질에서 보통 발생하지 않는 오르니틴과 같은 아미노산의 화학적 합성에 의한 삽입 또는 치환과 같은 기술에 의해 화학적으로 개질된 폴리펩티드를 포함한다. 변이체는 본 발명의 비개질 분자의 결합 특징을 유지한다.

[0095] 본 발명의 방법에서 유용한 추가의 폴리펩티드 변이체는 폴리시알화된 (PSA) 잔기를 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 폴리시알화된 폴리펩티드의 제조 방법은 미국 특허 공보 제20060160948호 및 문헌 [Saenko et al., Haemophilia 12:42-51, 2006]에 개시되어 있다.

[0096] **수용성 중합체**

[0097] 한 실시양태에서, 본 발명은 단백질 또는 폴리펩티드의 생산, 생존도에 유리한 영향을 제공하는 화학 잔기에 연결된, 화학적으로 개질된 단백질 또는 폴리펩티드를 고려한다. 예를 들면, 수용성 중합체, 예를 들면 PEG 또는 PEO의 폴리펩티드에의 비특이적 또는 부위 특이적 (예를 들면, N-말단) 콘주게이션은 당분야에서 면역원성, 신장 청소율을 잠재적으로 감소시키고/시키거나 프로테아제 내성을 향상시킴으로써 반감기를 향상시키는 것으로

알려져 있다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명에서 사용하기 위한 폴리펩티드는 분자의 반감기 및/또는 안정성을 증가시키기 위해 펩티드 N- 또는 C-말단에 공유 연결된 수용성 중합체, 예컨대 PEG를 포함한다.

- [0098] 폴리(알킬렌 글리콜), 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리(프로필렌 글리콜) ("PPG"), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체 등, 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀 알콜), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카라이드), 폴리(α -히드록시산), 폴리(비닐 알콜), 폴리포스파스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리(N-아크릴로일모르폴린), 폴리(알킬렌 옥시드) 중합체, 폴리(말레산), 폴리(DL-알라닌), 폴리사카라이드, 예컨대 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 전분 또는 전분 유도체, 히알루론산 및 키틴, 폴리(메트)아크릴레이트, 및 폴리시알산 (PSA), 및 상기 임의의 조합물을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는 수용성 중합체가 통상적으로 단백질 또는 펩티드에 콘주게이션되어 단백질 또는 펩티드의 안정성 또는 크기를 증가시킨다.
- [0099] 한 측면에서, 거대분자 화학적 개질은 비특이적 방식으로 (유도체화된 화학종의 혼합물을 유도함) 또는 부위 특이적 방식으로 (야생형 거대분자 반응성 지정 유도체화 및/또는 부위 지정 돌연변이유발 및 화학적 개질의 조합을 사용하는 부위 선택적 개질을 기반으로 함), 또는 별법으로 발현된 단백질 리게이션 방법 (문헌 [Curr Opin Biotechnol. 13(4):297-303 (2002)])을 사용하여 수행된다.
- [0100] 본 발명은 유형, 콘주게이션, 연결 및 길이에 있어서 다양한 수용성 중합체, 예를 들면 PEG 또는 PEO 분자의 사용을 고려한다. 특정 실시양태에서, PEG-단백질 콘주게이트는 선형 또는 분지형 콘주게이트, NHS (N-히드록시숙신이미드) 또는 알데히드 기반 화학법에 의해 연결된 중합체-단백질 콘주게이트, 수용성 중합체 사슬과 콘주게이션 부위 사이의 상이한 화학 연결을 갖는 변이체, 및 길이가 상이한 변이체를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서, 수용성 중합체가 PEG인 경우에, PEG의 평균 분자량은 약 2 내지 200 킬로달톤 ("kDa"), 약 5 kDa 내지 약 120 kDa, 약 10 kDa 내지 약 100 kDa, 약 20 kDa 내지 약 50 kDa, 약 10 kDa 내지 약 25 kDa, 약 5 kDa 내지 약 50 kDa, 약 5 kDa 내지 약 10 kDa, 또는 약 2 kDa 내지 5 kDa의 범위일 것이다.
- [0101] 한 측면에서, 본 발명은 NHS-콘주게이션되고 길이 범위가 $-(CH_2-CH_2-O)_n-$ (여기서, n 은 10 내지 2000임)인 선형 PEG-단백질 콘주게이트, 알데히드-콘주게이션되고 길이 범위가 $-(CH_2-CH_2-O)_n-$ (여기서, n 은 10 내지 2000임)인 선형 PEG-단백질 콘주게이트, NHS-콘주게이션되고 길이 범위가 10 내지 2000인 2암 분지형 및 멀티암 PEG-단백질 콘주게이트, 및 NHS-콘주게이션된 3암 분지형 PEG-단백질 콘주게이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 PEG-단백질 콘주게이트를 고려한다. 본 발명은 또한 그의 콘주게이션 부위 및 PEG 사슬 사이에 상이한 화학 연결, 예를 들면 $-CO(CH_2)_n-$ 및 $-(CH_2)_n-$ (여기서, n 은 1 내지 5임)을 함유하는 PEG-단백질 콘주게이트를 고려한다. 본 발명은 또한 카르복실화, 술페이트화 및 포스포릴화 화합물 (음이온성)을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는 신장 청소율을 감소시키기 위한 하전된 음이온성 PEG-단백질 콘주게이트를 고려한다 (문헌 [Caliceti, Adv Drug Deliv Rev 55:1261-77, 2003]; 문헌 [Perlman, J Clin Endo Metab 88:3227-35, 2003]; 문헌 [Pitkin, Antimicrob Ag Chemo 29:440-44, 1986]; 문헌 [Vehaskari, Kidney Intl 22:127-135, 1982]. 추가의 실시양태에서, 펩티드는 임의로 비스포스포네이트, 탄수화물, 지방산 또는 추가의 아미노산을 포함하는 잔기에 콘주게이션된다.
- [0102] PEG 및 PEO는 분자량 분포를 갖는, 즉 다분산성인 분자를 포함한다. 크기 분포는 통계학적으로 중량 평균 분자량 (M_w) 및 수평균 분자량 (M_n)에 의해 특성화될 수 있고, 그의 비율은 다분산성 지수 (M_w/M_n)라 한다. M_w 및 M_n 은 질량분석법에 의해 측정가능하다. 대부분의 PEG-단백질 콘주게이트, 특히 1 KD 초과 PEG에 콘주게이션된 것은 PEG 모분자의 다분산성 때문에 분자량 범위를 나타낸다. 예를 들면, mPEG2K (Sunbright ME-020HS, NOF)의 경우에, 실제 분자 질량은 1.5 내지 3.0 KD 범위에 걸쳐서 분포되고, 다분산성 지수는 1.036이다. 독립적인 사슬 길이 및 한정된 분자량을 갖는 단일분산성 혼합물로서 특수 제조된, MS(PEG) $_n$ (여기서, n 은 4, 8, 12 또는 24임, 예를 들면 PE04, PE012) 기재 시약 (피어스(Pierce))에 콘주게이션된 단백질은 예외로 한다.
- [0103] 펩티드의 생체내 치료 반감기가 PEG화로부터 이점을 얻는지를 결정하기 위해, 매우 다양한 상이한 PEG-단백질 콘주게이트가 합성되고, 약물동력학에 대해 시험관내 및 생체내 특성화된다.
- [0104] 본 발명의 PEG화된 단백질의 제조 방법은 일반적으로 (a) 해당 단백질을, PEG가 단백질의 N-말단/C-말단에 부착되는 조건하에 폴리에틸렌 글리콜과 반응시키고, (b) 반응 생성물(들)을 수득하는 단계를 포함한다. 단백질을 PEG화하는 것은 단백질의 고유 활성을 유의하게 변화시키기 때문에, 상이한 유형의 PEG가 연구된다. 단백질의 PEG화를 위해 사용할 수 있는 화학법은 메톡시-PEG의 NHS-에스테르 ($O-[(N-숙신이미딜옥시카르보닐)-메틸]-O'$ -메틸폴리에틸렌 글리콜)를 사용하여 단백질의 1차 아민을 아실화하는 것을 포함한다. 메톡시-PEG-NHS 또는 메톡시-PEG-SPA에 의한 아실화는 원래 1차 아민으로부터 전하를 제거하는 아마이드 연결을 초래한다 (또한 C-말단

의 경우에는 Boc-PEG). 리보솜 단백질 합성과 달리, 합성 펩티드 합성은 C-말단에서 N-말단으로 진행된다. 따라서, Boc-PEG는 PEG를 펩티드의 C-말단에 부착시키는 한 방법이다 (즉, tert-부틸 옥시 카르보닐 (Boc, t-Boc) 합성법을 사용함) (문헌 [R. B. Merrifield (1963). "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide". J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154]). 별법으로, 플루오레닐-메톡시-카르보닐 (FMOC) 화학법 (문헌 [Atherton, E.; Sheppard, R. C. (1989). Solid Phase peptide synthesis: a practical approach. Oxford, England: IRL Press.])은 측쇄 보호기를 제거하기 위해 유해한 히드로플루오르산을 사용할 필요가 없기 때문에 이 또한 사용된다.

[0105] 한 실시양태에서, 수용성 중합체가 PSA인 경우에, PSA의 평균 분자량은 약 2 내지 80 kDa, 5 내지 60 kDa, 10 내지 40 kDa 또는 15 내지 25 kDa 범위일 것이다.

[0106] 수용성 중합체의 해당 폴리펩티드에의 콘주게이션을 용이하게 할 수 있는 안정한 링커의 예는 아마이드, 아민, 에테르, 카르바메이트, 티오우레아, 우레아, 티오카르바메이트, 티오카르보네이트, 티오에테르, 티오에스테르 및 디티오카르바메이트 링커, 예컨대 ω, ω -아미노알칸, N-카르복시알킬말레이미드 또는 아미노알칸산, 말레이미도 벤조일 술포숙신이미드 에스테르, 글루타르알데히드 또는 숙신산 무수물, N-카르복시메틸말레이미드 N,N'-디숙신이미딜 옥살레이트 및 1,1'-비스[6-(트리플루오로메틸)벤조-트리아졸릴]옥살레이트를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0107] 다른 실시양태에서, 수용성 중합체는 유리가능한, 분해가능한 또는 가수분해가능한 링커를 사용하여 폴리펩티드에 콘주게이션된다. 가수분해가능한 결합은 생리학적 조건하에서 물과 반응하는 (즉, 가수분해되는) 비교적 약한 결합이다. 수중에서 가수분해되는 결합의 성향은 2개의 중심 원자를 연결하는 링커의 일반적인 유형 뿐만 아니라, 상기 중심 원자에 부착된 치환체에 좌우될 것이다. 가수분해가능한 링커를 갖는 수용성 중합체를 포함하는 콘주게이트의 제조 방법은 미국 특허 제7,259,224호 (넥타르 테라퓨틱스(Nektar Therapeutics)) 및 미국 특허 제7,267,941호 (넥타르 테라퓨틱스 및 미국 국립보건원(National Institutes of Health))에 개시되어 있다. 예를 들면, 가수분해되는 중합체 백본 내의 에스테르 링커를 갖는 PEG를 제조할 수 있다. 상기 가수분해는 중합체의 저분자량 단편으로의 분열을 초래한다. 적절한 가수분해에 불안정한, 유리가능한, 또는 분해가능한 링커는 카르복실레이트 에스테르, 포스페이트 에스테르, 무수물, 아세탈, 케탈, 아실옥시알킬 에테르, 이민, 오르토에스테르, 펩티드 및 올리고뉴클레오티드, 티오에스테르, 티올에스테르 및 카르보네이트를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 중합체 백본 내에 함유될 수 있는 가수분해에 의해 분해가능한 링커는 카르바메이트, 카르보네이트, 술페이트 및 아실옥시알킬 에테르 링커; 예를 들어 아민과 알데히드의 반응으로부터 초래되는 이민 링커 (예를 들면, 문헌 [Ouchi et al., Polymer Preprints, 38(1):582-3 (1997)] 참조); 카르바메이트, 포스페이트 에스테르, 히드라존, 아세탈, 케탈 또는 오르토에스테르 링커, 예컨대 아세톤-비스-(N-말레이미도에틸)케탈 링커 (MK)를 포함한다.

[0108] 본 발명의 방법은 중합체-단백질 콘주게이트의 실질적으로 균질한 혼합물을 제공한다. 본원에서 사용된 "실질적으로 균질한"은 중합체-단백질 콘주게이트 분자만이 관찰되는 것을 의미한다. 중합체-단백질 콘주게이트는 생물학적 활성을 갖고 본 발명의 "실질적으로 균질한" PEG화 단백질 제제는 균질한 제제의 이점, 예를 들면 다양한 약물동력학이 예측가능한 상태에서 임상학적 적용에서의 용이함을 나타내기에 충분하게 균질한 것이다.

[0109] 본원에 기재된 부착 방법에 사용하기 위해 고려되는 중합체 분자는 수용성 중합체 또는 그의 혼합물로부터 선택될 수 있다. 중합체는 아실화의 경우에는 활성 에스테르, 또는 알킬화의 경우에는 알데히드와 같은 단일 반응성기를 가질 수 있으므로, 중합도를 조절할 수 있다. 수용성 중합체, 또는 필요에 따라 그의 혼합물은, 예를 들면 PEG, 모노메톡시-PEG, PEO, 텍스트란, 전분 또는 전분 유도체, 폴리-(N-비닐 피롤리돈), 프로필렌 글리콜 단독중합체, 지방산, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들면, 글리세롤), HPMA, FLEXIMAR™ 및 폴리비닐 알콜, 모노-(C1-C10)알콕시-PEG, 아릴옥시-PEG, 트레실 모노메톡시 PEG, PEG 프로피온알데히드, 비스-숙신이미딜 카르보네이트 PEG, 셀룰로스, 다른 탄수화물 기재 중합체 또는 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 선택된 중합체는, 그것이 부착된 단백질이 수성 환경, 예컨대 생리학적 환경에서 침전되지 않도록 수용성이어야 한다. 중합체는 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 바람직하게는, 최종 제품 제제의 치료 용도를 위해, 중합체는 제약상 허용되는 것일 것이다. PEG 잔기를 포함하는 펩티드의 제조 방법은 당분야에 널리 알려져 있다. 예를 들어 미국 특허 제5,824,784호를 참조한다.

[0110] 용어 "PEG"는 다른 단백질을 유도체화하는 데에 사용되는 임의 형태의 PEG, 예컨대 모노-(C1-C10) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜을 포함시킨다. PEG 중합체는 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 바람직하게는, 최종 제품 제제의 치료 용도를 위해, 중합체는 제약상 허용되는 것일 것이다. 한 실시양태에서, 반응성 알데히드

는 수중에서 안정한 PEG-프로피온알데히드, 또는 그의 모노-C1-C10 알콕시 또는 아릴옥시 유도체이다 (미국 특허 제5,252,714호 참조).

- [0111] 본 발명은 10 내지 2000개의 반복 단위 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$)를 포함하나, 이로 제한되지는 않는 길이의 다수의 상이한 선형 PEG 중합체 또는 2암 분지형 PEG 중합체의 콘주게이트를 고려한다. 12 내지 50개 단위를 갖는, NHS- 또는 알데히드-기재 PEG- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 또한 고려된다. 일반적으로, 본원에서 고려되는 PEG화 반응을 위해, 부가되는 PEG 잔기의 평균 분자량은 약 1 kDa 내지 약 60 kDa이다 (용어 "약"은 ± 1 kDa를 나타냄). 보다 바람직하게는, 평균 분자량은 약 10 내지 40 kDa이다.
- [0112] 본 발명은 개질된 단백질, 예컨대 단백질에 콘주게이션된 낮은 수준의 수용성 중합체를 갖는 혈액 인자를 제공한다. 단백질의 낮은 수준으로 PEG화된 형태는 콘주게이션 반응에서 단백질에 대해 감소된 몰과량의 수용성 중합체를 사용하여 제조된다. 예를 들어, 단백질을 PEG화하는 통상적인 방법은 해당 단백질에 대하여 61.8 M 과량의 PEG를 사용한다. 본원에 기재된, 낮은 수준으로 PEG화된 단백질은 표준 기술에서 사용되는 것보다 적은 몰과량을 반응에서 사용하여 제조하는 것이 고려된다. 한 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이다. PEG는 선형 또는 분지형 PEG이고, 본원에 기재된 분자량 및 특징을 가질 수 있는 것이 고려된다.
- [0113] 추가적으로, 본원에 기재된, 낮은 수준으로 PEG화된 단백질은 혈액 인자 분자당 1개 이상 내지 10개 이하의 수용성 중합체 잔기를 포함하는 것이 고려된다. 한 실시양태에서, 개질된 단백질은 단백질 분자당 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 또는 9개의 수용성 중합체 잔기를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 개질된 단백질은 단백질 분자당 4 내지 8개의 수용성 중합체 잔기 (포괄적 (즉, 4개, 5개, 6개, 7개 및 8개의 중합체 잔기를 포함함))를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 개질된 단백질은 혈액 인자이다. 추가의 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 단백질 분자당 1 내지 4개의 수용성 중합체 잔기 (포괄적)를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 단백질 분자당 4 내지 6개의 수용성 중합체 잔기 (포괄적)를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 단백질 분자당 1개 또는 2개의 수용성 중합체 잔기를 포함한다.
- [0114] 본원에서 사용된 용어 "내지"는, 예를 들어 "4 내지 8개의 수용성 중합체를 포함한다"와 같이 수용성 중합체의 개수에 관한 문맥에서 사용될 때, 인용된 숫자 및 인용된 숫자 사이의 숫자를 포괄한다. 예를 들어, 4 내지 8개의 수용성 중합체란 4개, 5개, 6개, 7개 및 8개의 수용성 중합체를 말한다.
- [0115] 관련 실시양태에서, 혈액 인자는 II 인자, III 인자, V 인자, VII 인자, VIIa 인자, VIII 인자, IX 인자, X 인자, XI 인자, 폰 빌레브란트 인자 및 피브리노겐으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 실시양태에서, 혈액 인자 분자는 VIII 인자이다. 또다른 추가의 실시양태에서, 혈액 인자 분자는 인간의 것이다. 관련 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 VIII 인자 분자당 4개 이상 내지 10개 미만의 PEG 잔기를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 VIII 인자 분자당 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 수용성 중합체 잔기를 포함한다.
- [0116] 또다른 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 VIII 인자 분자당 4 내지 8개의 PEG 잔기, 4 내지 6개의 PEG 잔기, 또는 1 내지 4개의 PEG 잔기 (포괄적)를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 VIII 인자 분자당 1개 또는 2개의 PEG 잔기를 포함한다. PEG 분자는 안정한, 유리가능한 또는 가수분해가능한 링커를 통해 혈액 인자에 연결 또는 콘주게이션되는 것이 고려된다.
- [0117] 또다른 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 VIII 인자 분자당 1 내지 4개의 PSA 잔기 (포괄적)를 포함한다. 또다른 실시양태에서 개질된 혈액 인자는 VIII 인자 분자당 4 내지 6개의 PSA 잔기 (포괄적)를 포함한다. 또다른 실시양태에서 개질된 혈액 인자는 VIII 인자 분자당 1개 또는 2개의 PSA 잔기를 포함한다. PSA 분자는 안정한, 유리가능한 또는 가수분해가능한 링커를 통해 혈액 인자에 연결 또는 콘주게이션되는 것이 고려된다.
- [0118] 또다른 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 FVIIa이다. 관련 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 FVIIa 분자당 1 내지 6개의 수용성 중합체 잔기 (포괄적)를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 FVIIa 분자당 1개 또는 2개의 수용성 중합체 잔기를 포함한다. 관련 실시양태에서, 수용성 중합체는 PEG 또는 PSA로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 중합체는 안정한, 유리가능한 또는 가수분해가능한 링커를 통해 연결된다.
- [0119] 또다른 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 FIX이다. 한 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 FIX 분자당 1 내지 6개의 수용성 중합체 잔기 (포괄적)를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 개질된 혈액 인자는 FIX 분자당 1개 또는 2개의 수용성 중합체 잔기를 포함한다. 관련 실시양태에서, 수용성 중합체는 PEG 또는 PSA로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 중합체는 안정한, 유리가능한 또는 가수분해가능한 링커를 통해 연결된다.

[0120] 제약 조성물

[0121] 본 발명은 유효량의 본 발명의 단백질 또는 유도체 산물을, 제약상 허용되는 희석제, 안정화제, 보존제, 가용화제, 유화제, 보조제 및/또는 담체와 함께 포함하는 제약 조성물을 고려한다. 상기 조성물은 다양한 완충제 함량 (예를 들면, 트리스-HCl, 포스페이트), pH 및 이온 강도의 희석제; 첨가제, 예컨대 디터전트 및 가용화제 (예를 들면, 폴리소르베이트(Polysorbate) 20, 폴리소르베이트 80), 산화방지제 (예를 들면, 아스코르브산, 나트륨 메타비술파이트), 보존제 (예를 들면, 티메로솔(Thimerosal), 벤질 알콜) 및 증량 물질 (예를 들면, 락토스, 만니톨)을 포함하며, 예를 들어 본원에 참조로 인용되는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa.) pages 1435:1712]을 참조한다. 활성 성분의 유효량은 당업자에 의해 체중, 연령 및 치료 목적과 같은 요인을 고려하여 용이하게 결정될 수 있는, 치료적, 예방적 또는 진단적 유효량이다.

[0122] 본 발명의 중합체-단백질 조성물은 또한 완충제를 포함하여 용액의 pH를 목적하는 범위 내에서 유지할 수 있다. 바람직한 제제는 나트륨 아세테이트, 나트륨 포스페이트 및 나트륨 시트레이트를 포함한다. 상기 완충제의 혼합물 또한 사용가능하다. 조성물에 유용한 완충제의 양은 대체적으로 사용된 특정 완충제 및 용액의 pH에 따라 크게 달라진다. 예를 들면, 아세테이트는 pH 6에서보다 pH 5에서 보다 효과적인 완충제이므로, pH 6에서보다 pH 5인 용액에서 보다 소량의 아세테이트를 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물의 바람직한 pH 범위는 pH 3.0 내지 7.5이다.

[0123] 본 발명의 조성물은 등장성 조정 제제를 추가로 포함하여 용액이 주사하기에 보다 적합하고 등장성을 갖도록 할 수 있다. 가장 바람직한 제제는 0 내지 150 mM 농도 범위의 염화나트륨이다.

[0124] 본원에 기재된 방법은 상기 기재된 분자를, 1종 이상의 제약상 허용되는 부형제 또는 비히클, 및 임의로는 다른 치료 및/또는 예방 성분과 함께 포함하는 제약 조성물을 사용한다. 상기 부형제는 액체, 예컨대 물, 식염수, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜, 히알루론산, 에탄올, 시클로텍스트린, 개질된 시클로텍스트린 (즉, 술포부틸 에테르 시클로텍스트린) 등을 포함한다. 비액체 제형을 위한 적합한 부형제는 또한 당업자에게 알려져 있다.

[0125] 제약상 허용되는 염은 본 발명의 조성물에 사용가능하고, 예를 들면 무기산 염, 예컨대 히드로클로라이드, 히드로브로마이드, 포스페이트, 술페이트 등; 및 유기산 염, 예컨대 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트, 벤조에이트 등을 포함한다. 제약상 허용되는 부형제 및 염에 관한 자세한 논의는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990)]에서 찾아볼 수 있다.

[0126] 추가적으로, 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제, 생물학적 완충 물질, 계면활성제 등이 그러한 비히클에 존재할 수 있다. 생물학적 완충제는 실질적으로 약리학적으로 허용되고, 또한 목적하는 pH, 즉 생리학적으로 허용되는 범위의 pH를 갖는 제형을 제공하는 임의의 용액일 수 있다. 완충제 용액의 예는 식염수, 포스페이트 완충 식염수, 트리스 완충 식염수, 행크(Hank) 완충 식염수 등을 포함한다.

[0127] 키트

[0128] 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 방법을 실시하기 위한 그의 사용을 용이하게 하는 방식으로 패키징된 1종 이상의 화합물 또는 조성물을 포함하는 키트를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 키트는 본 발명의 방법을 실시할 때의 화합물 또는 조성물의 사용을 설명하는, 용기에 부착되거나 또는 패키지에 포함된 라벨과 함께 용기, 예컨대 밀봉된 병 또는 용기에 패키징된 본원에 기재된 화합물 또는 조성물 (예를 들면, 개질된 혈액 인자, 예컨대 낮은 수준으로 PEG화된 VIII 인자를 포함하는 조성물)을 포함한다. 바람직하게는, 상기 화합물 또는 조성물은 단위 투여 형태로 패키징된다. 키트는 특정 투여 경로에 따라 조성물을 투여하기에 적합한 장치를 더 포함할 수 있다. 바람직하게는, 키트는 개질된 혈액 인자 조성물의 사용을 설명하는 라벨을 함유한다.

[0129] 본 발명의 추가 측면 및 상세 내용은 제한적이기 보다는 예시적인 하기 실시예로부터 자명해질 것이다.

[0130] 실시예

[0131] 실시예 1

[0132] 낮은 수준으로 PEG화된 VIII 인자의 합성

[0133] 치료 단백질로서 투여되는 분자의 안정성을 개선하고 반감기를 연장하기 위해 수용성 중합체의 부가에 의한 혈

액 응고 인자의 개질을 수행하였다. 그러나, 수용성 중합체의 높은 수준의 부착은 생체내에서 보다 큰 독성을 유도할 수 있다. 따라서, 치료 분자의 효능을 개선하기 위해, 수용성 중합체의 콘주게이션 수준을 낮추기 위한 실험을 수행하였다.

[0134] 온전한 B 도메인을 함유하는 PEG화 rFVIII의 합성은 미국 특허 공보 제20070244301호 및 국제 특허 공보 WO 2007/126808호에 개시되어 있다. 온전한 B 도메인을 함유하는 상기 PEG화 rFVIII는 실험 조건하에서 개선된 시험관내 및 생체내 특성을 나타냈고, rFVIII 분자의 적어도 부분적으로 PEG화된 경쇄 (A3-C1-C2)를 생성하였다.

[0135] 그러나, 치료 단백질의 비교적 높은 수준의 개질을 유도하는 화학적 공정은 다량의 시약이 필요하기 때문에 경제적이지 않다. 또한 높은 PEG화 수준은 다량의 중합체 및 링커로 인해 독물학적 위험성 증가를 초래한다. 따라서, 낮은 수준의 PEG 잔기를 갖는 분자를 제조하기 위해, 제조 공정에서의 시약 농도를 감소시켰고, 시약 농도를 61.8 M 과량 (표준)에서 각각 30 M, 25 M, 20 M 및 15 M 과량으로 감소시켰으로써 상이한 PEG-rFVIII를 제조하였다.

[0136] 당분야에 개시된 PEG화 변이체는 다양한 방출 특성 및 상이한 분자량의 PEG 사슬을 갖는다. 예를 들어 WO 2008082669호 및 US20080234193호 (넥타르 테라퓨틱스 및 백스터 헬스케어)를 참조한다. 장기 방출 특성을 나타내며, PEG 사슬 분자량 20 kD의 분지 (Lys 20 K 분지 길이)를 갖는 PEG화 rFVIII 변이체를 61.8 M 과량의 유리가능한 PEG 시약을 사용하여 제조하였다. 상기 PEG화 rFVIII는 시험관내 및 생체내 측정된 분자 데이터를 토대로 PEG화 수준을 개량하기 위한 본보기가 되는 후보물질로서 선택되었다. 초기 PEG화 rFVIII 후보물질의 경우에, 콘주게이트를 61.8 M 과량의 PEG를 사용하여 제조하였을 때, 당분야에 개시된 HPLC 방법 (예를 들면, 문헌 [Chen et al., Bioconjug Chem. 18:371-8, 2007] 참조)을 사용하여 11.1 PEG/rFVIII (몰/몰)의 PEG 수준이 측정되었다.

[0137] rFVIII의 PEG화 방법은 다음과 같다: 2시간 동안 실온 및 pH 7.2 +/- 0.2 (c = 2 mg/ml)에서의 rFVIII의 PEG화; 시약 농도 (시약 3.9 mg/단백질 1 mg - 61.8 M 과량); 글리신의 첨가에 의한 반응의 중단/퀵칭; Q-세파로스 HP에서의 정제; 약 0.5 M NaCl에 의한 용리; UF/DF 및 PEG화된 분자의 최종 제형화. 낮은 수준의 PEG 콘주게이트를 정해진 몰과량의 PEG 중합체를 사용하여 상기와 같이 제조하였다. 사용된 PEG-rFVIII 샘플은 다음과 같다: 15 M 과량: VIEHLUFB08007PHR; 20 M 과량: VIEHLUFB08016PHR; 25 M 과량: VIEHLUFB08017PHR; 30 M 과량: VIEHLUFB08008PHR, VIEHLUFB08009PHR, VIEHLUFB07029PHR; 61.8 M 과량 (당분야에서의 표준 프로토콜) 및 천연 FVIII: VIEHLUFB08018PHR, ORHLUFB07016PHR, ORHLUFB07017PHR, ORHLUFB08001PHR, ORHLUFB08002PHR.

[0138] 재합성된 후보물질의 경우에 8 PEG/rFVIII의 수준이 측정되었다. 낮은 수준의 PEG-FVIII는 또한 하기 실시예에 기재된 바와 같이 시험관내 및 생체내에서 특성화되었다.

[0139] 실시예 2

[0140] 낮은 수준으로 PEG화된 혈액 인자 분자의 시험관내 분석

[0141] 한 측면에서, 낮은 수준의 PEG 샘플을 분자량 및 PEG-FVIII 분자의 일반 구조 뿐만 아니라, PEG 콘주게이션된 FVIII 분자의 비활성에 대해 분석하였다. PEG-FVIII 구조체의 SDS-PAGE 분석을 WO 2007/126808호에서와 같이 수행하였다. 간략하게 설명하면, 천연 rFVIII을, 인비트로젠(Invitrogen; 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재) 제조의 4-12% 폴리아크릴아미드 구매 겔을 제조업자의 지침에 따라 사용하여 환원 조건하의 SDS PAGE에 의해 특성화하였다. 분자량 마커 (MW)로서 바이오-라드(Bio-Rad; 미국 캘리포니아주 허큘레스 소재) 제조의 프리시전 플러스(Precision Plus) 마커 (10 kD - 250 kD)를 사용하였다. 이어서 단백질을 일렉트로블로팅(electroblotting)에 의해 바이오-라드 (미국 캘리포니아주 허큘레스 소재) 제조의 PVDF 막 상에 옮긴 후에 세다란(Cedarlane; 캐나다 온타리오주 호튼바이 소재) 제조의 다중클론 양 항 인간 FVIII:C 항체와 함께 인큐베이션하였다. 면역염색 과정의 최종 단계는 애큐리트(Accurate; 미국 뉴욕주 웨스트베리 소재) 제조의 알칼린 포스파타제 (ALP) 콘주게이션 항-양 항체와의 인큐베이션이고, 이어서 ALP 기제 키트 (미국 캘리포니아주 허큘레스 소재의 바이오-라드)를 사용하여 최종적으로 시각화하였다.

[0142] 추가적으로, FVIII 분자의 비활성을, FVIII 비색법 (문헌 [Rosen S, Scand J Haematol 33: (Suppl 40): 139-45, 1984])을 사용하여 WO 2007/126808호에 개시된 바와 같이 분석하였다. 상기 방법은 문헌 [Ph. Eur. 5th edition (5.05) 2.7.4 Assay of Blood Coagulation Factor VIII]에 따른다. VIII 인자를 함유하는 샘플을 칼슘 함유 완충액 중에서 트롬빈, 활성화된 IX 인자 (FIXa), 인지질 및 X 인자 (FX)와 혼합하였다. FVIII는 트롬빈에 의해 활성화된 후에, 인지질, FIXa 및 칼슘 이온과 복합체를 형성하였다. 상기 복합체는 X 인자를 Xa 인자로 활성화하고, 이는 색원체 기질 FXa-1 (AcOH*CH3OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA)를 분열시켰다. 방출된 파라-니트

로아닐린 (pNA)의 시간 곡선을 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 사용하여 405 nm에서 측정하였다. 반응의 기울기는 샘플 내의 VIII 인자 농도에 비례한다. FVIII 항원 값을 시판되는 ELISA 시스템 (캐나다 온타리오주 호른바이 소재의 세다란)을 약간 개량하여 사용함으로써 측정하였다. 상기 값으로부터 FVIII 색원체/FVIII 항원 비율을 계산하였다. 280 nm에서의 광학 밀도를 측정함으로써 제제 내의 단백질 함량을 측정하였다. 상기 데이터로부터 단백질 함량을 계산하였다.

[0143] SDS-PAGE 결과를 도 1에 나타냈다. FVIII 특이적 항체를 사용하는 FVIII 함량의 SDS-PAGE 평가로부터 적은 몰과량의 PEG 분자 (15, 20, 25 및 30 M 과량)와 조합된 FVIII는 천연 FVIII와 비교하여 저분자량의 분자를 생산하지만, 검출된 FVIII 분자는 보다 많은 몰과량의 PEG 분자 (61.8 M 과량)를 사용할 때 나타나는 것과 유사함이 확인되었다. PEG-특이적 항체에 의한 SDS-PAGE의 프로빙(probing)은 시험한 모든 PEG 샘플에서 PEG-FVIII의 보다 고분자량의 화학종을 검출하였다.

[0144] 낮은 수준으로 PEG화된 FVIII의 비활성 분석 (및 관련 산물 데이터)을 표 1에 나타냈다. 그 결과로부터 낮은 수준으로 PEG화된 FVIII는 많은 몰과량을 사용하여 제조된 PEG-FVIII보다 천연 FVIII에 더 유사함을 알 수 있었다. 예를 들면, 단지 15 M 과량의 PEG를 사용하여 제조된 PEG-FVIII 샘플은 3706 IU/mg의 천연 FVIII 비활성과 비교하여 2221 IU/mg의 비활성을 나타냈다. 이와 달리, 61.8 M 과량의 PEG를 갖는 통상의 PEG화 프로토콜을 사용하여 제조된 샘플은 398 IU/mg 정도의 높은 비활성 내지 104 IU/mg 정도의 낮은 비활성을 나타냈다. 따라서, 15 M 과량의 PEG를 사용하여 제조된 PEG-FVIII는 표준 프로토콜을 사용하여 제조된 (61.8 M 과량) PEG-FVIII의 최대 활성보다 대략 5.5배 더 큰 활성을 나타냈다. 마찬가지로, 20 M 과량의 PEG를 사용하여 제조된 FVIII는 표준 프로토콜을 사용하여 제조된 FVIII보다 적어도 3.8배 더 큰 활성을 나타냈고, 25 M 과량의 PEG-FVIII 분자는 표준 제조 프로토콜보다 적어도 3.2배 더 큰 활성을 나타냈고, 30 M 과량의 PEG-FVIII (969 IU/ml)은 표준 (61.8 M 과량의 PEG) 제조 프로토콜보다 적어도 2.4배 더 큰 활성을 나타냈다.

[0145] 상기 결과는 FVIII에 대하여 적은 몰과량의 PEG 비율을 사용하여 PEG화된 FVIII 단백질이, 천연 FVIII보다 대략 9배 더 낮은 비활성을 나타내는 많은 몰과량의 PEG를 사용하여 제조된 PEG-FVIII에 비해 천연 FVIII 단백질의 생물학적 활성에 가까운 생물학적 활성을 갖는 낮은 수준의 PEG-FVIII를 생성함을 설명한다. 증가된 비활성 및 감소된 개수의 PEG 분자는 독성 부작용의 가능성이 감소된, 보다 효과적인 치료 분자를 제공한다.

[0146] 실시예 3

[0147] 낮은 수준으로 PEG화된 분자의 생체내 약물동력학

[0148] 낮은 수준으로 PEG화된 rFVIII의 생체내 약물동력학을 측정하기 위해, FVIII 결핍 녹아웃(knock out) 마우스 모델을 사용하였다. 문헌 [Bi et al., (Nat Genet 1995; 10:119-21)]에 개시된 FVIII 결핍 마우스를 중증 인간 A형 혈우병 모델로서 사용하였다.

[0149] 마우스 (n = 6)에 실시예 1에 따라 제조된 낮은 수준의 PEG-FVIII 또는 천연 rFVIII를 체중 1 kg 당 20 내지 30 μ g의 투여량으로 꼬리 정맥을 통해 볼루스 주사하였다. 사용된 PEG-rFVIII 샘플은 다음과 같다: 297 μ g/kg에서 rFVIIIPEGH07001FC (8.5 PEG 수준 - 몰/몰, 결합 PEG); 144 μ g/kg에서 VIEHLUFB07029PHR (7.9 PEG 수준 - 몰/몰, 결합 PEG); 66 μ g/kg에서 VIEHLUFB08007PHR (4.4 PEG 수준 - 몰/몰, 결합 PEG). 각각의 그룹으로부터, 주사 후 5분, 3시간, 6시간, 9시간, 16시간, 24시간 및 32시간, 및 몇몇 경우에는 48시간, 56시간 및 72시간의 간격으로 마취 후에 심장 천자에 의해 시트레이트 혈장을 준비하였다. FVIII 활성 수준을 혈장 샘플에서 측정하였다. 약물동력학 라이브러리로부터의 마이크로매쓰 사이언티스트(MicroMath Scientist) 모델 1 (미국 미주리주 세인트루이스 소재의 마이크로매쓰)에 의해 반감기를 계산하였다.

[0150] 상기 실험의 결과는 도 2 및 도 3과 표 2에 요약하였다. 그 결과로부터 최종 반감기는 4.4 내지 8.5 PEG화 수준을 갖는 PEG-rFVIII에 대하여 유사함을 알 수 있었다 (도 3 및 표 2). 표 2는 낮은 수준으로 PEG화된 rFVIII의 반감기 (HL) 및 평균 체류 시간 (MRT)이 천연 FVIII에 비해 증가하였음을 설명한다. 또한, 곡선 아래 면적 (AUC)은 천연 FVIII에 비해 낮은 수준으로 PEG화된 FVIII에서 증가하였고, 이는 천연 rFVIII에 비해 낮은 수준으로 PEG화된 FVIII 변이체의 개선된 약물동력학을 시사한다. 또한, 목적하는 FVIII 활성을 달성하기 위한 단백질 로딩 투여량은 낮은 PEG화 수준을 갖는 PEG-rFVIII 변이체에서 보다 적었다.

[0151] PEG화 수준에 대한 AUC, 반감기 및 MRT 데이터의 플롯팅 (도 4)으로부터 AUC 및 MRT는 대략 8 PEG/FVIII 이하의 PEG화 수준에서 선형 상관관계를 갖고, 보다 높은 수준의 PEG화에서 추가 증가가 없음을 알 수 있었다. 최종 반감기는 FVIII 당 PEG 분자의 개수가 5 PEG/FVIII보다 클 때 약간 증가하였다.

[0152] 요약하면, 상기 데이터는 15 M, 20 M, 25 M 및 30 M 과량의 PEG를 사용하여 제조된, 낮은 수준으로 PEG화된

rFVIII 변이체가 표준 방법 (61.8 M 과량의 PEG)에 따라 제조된 PEG-rFVIII에 비해 개선된 생체내 및 시험관내 특징을 가짐을 시사한다. FVIII의 낮은 수준으로 PEG화된 형태의 활성은 기존의 높은 수준의 PEG-FVIII 제제보다 천연 분자의 활성에 더 유사하였고, 이는 낮은 수준의 PEG 혈액 인자가 요법 실시 중에 낮은 투여량으로 사용가능하므로, 혈액 인자에 대한 중화 항체가 발달될 가능성을 줄이고 조성물의 독성을 감소시킴을 시사한다.

[0153] 실시예 4

[0154] 낮은 수준으로 PEG화된 rFIX의 제조

[0155] 다른 혈액 인자 단백질이 본원에 기재된 바와 같이 수용성 중합체에 콘주게이션되는 것이 고려된다. 예를 들어, 재조합 FIX (rFIX)를 NHS 기를 함유하는 선형 20 kD PEG화 시약을 사용하여 PEG화하였다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF (일본 도쿄 소재의 NOF 코포레이션) 제조의 SUNBRIGHT® ME 씨리즈이다. rFIX를 pH 7.4의 Hepes 완충액 (20 mM Hepes, 150 mM NaCl) 중에서, 2 mg/ml의 단백질 농도 및 5 mg/ml의 시약 농도에서 PEG화하였다. PEG화 반응을 실온에서 2시간 동안 부드럽게 진탕하면서 수행하였다. 그 후에, 글리신 (최종 농도: 10 mM)을 첨가하여 반응을 중단시키고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서 혼합물을 Q-세파로스 HP 컬럼 (GE-헬스케어(GE-Healthcare); 스웨덴 업살라 소재)에 적용하여 정제하고 천연 rFIX 및 미량의 디- 및 트리-PEG화 rFIX로부터 1개의 PEG 잔사만을 함유하는 모노 PEG화 rFIX를 분리하였다. 최종적으로, 모노 PEG화 rFIX를 함유하는 분획을 수집하고 재생 셀룰로스로 제조된 30 kD 막 (밀리포어(Millipore))을 사용하여 한외여과/정용여과 (UF/DF)하였다.

[0156] 실시예 5

[0157] 낮은 수준으로 PEG화된 rFVIIa의 제조

[0158] 재조합 FVIIa (rFVIIa)를 NHS 기를 함유하는 선형 20 kD PEG화 시약을 사용하여 PEG화하였다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF (일본 도쿄 소재의 NOF 코포레이션) 제조의 SUNBRIGHT® GS 씨리즈이다. rFVIIa를 pH 7.4의 Hepes 완충액 (20 mM Hepes, 150 mM NaCl) 중에서, 2 mg/ml의 단백질 농도 및 5 mg/ml의 시약 농도에서 PEG화하였다. PEG화 반응을 실온에서 2시간 동안 부드럽게 진탕하면서 수행하였다. 글리신 (최종 농도: 10 mM)을 첨가하여 반응을 중단시키고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 최종적으로 PEG-rFVIIa 콘주게이트를 Q-세파로스 FF (GE-헬스케어) 상에서의 이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 용액을 pH 7.4의 1 mM CaCl₂ 함유 20 mM Hepes 완충액으로 예비평형화된 컬럼에 로딩하였다 (로딩 용량: 단백질 1.5 mg/겔 1 ml). 콘주게이트를 1 mM CaCl₂ 및 500 mM 염화나트륨을 함유하는 20 mM Hepes 완충액을 사용하여 용리시켰다. 용리물은 주로 모노 PEG화 rFVIIa를 함유하였다. 최종적으로 용리물을 폴리에테르술폰으로 제조된 30 kD 막 (밀리포어)을 사용하여 UF/DF에 의해 농축시켰다.

[0159] 실시예 6

[0160] 낮은 수준으로 폴리시알화된 rFVIII의 제조

[0161] PEG화 뿐만 아니라, 혈액 인자 단백질은 다른 수용성 중합체에도 콘주게이션된다.

[0162] 세럼 인스티튜트 오브 인디아(Serum Institute of India; 인도 폰 소재) 제조의, 좁은 크기 분포 ($PD \leq 1.1$) 및 20 kD의 MW를 갖는 산화된 폴리시알산 (PSA)을 사용하는 환원성 아미노화에 의해 rFVIII을 폴리시알화하였다.

[0163] PSA의 rFVIII과의 콘주게이션을 +4℃의 저온실에서 수행하였다. 콘주게이션은 2 mg/ml의 rFVIII 농도 및 200배 몰과량의 산화된 PSA에서 수행하였다. PSA는 Hepes 완충액 (50 mM Hepes 완충액, 5 mM CaCl₂, 350 mM NaCl, pH 7.4)에 용해시켜 PSA 200 mg/ml의 최종 농도를 제공하였다. PSA 용액을 rFVIII 용액에 첨가하고 필요한 양의 NaCNBH₃를 pH 7.4의 Hepes 완충액 중의 80 mg/ml 용액으로 첨가하여 50 mM의 최종 농도를 제공하였다. 반응 혼합물을 부드럽게 혼합하고 pH 7.4까지 0.5 M NaOH를 적가하여 pH를 7.4로 조정하였다. 반응 혼합물을 16시간 동안 +4℃의 저온 암실에서 부드럽게 진탕하였다. 이어서 콘주게이트를 페닐-세파로스 FF (GE 헬스케어) 상에서의 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)에 의해 정제하였다. 화학 반응 후에 반응 혼합물을 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 6.9) 중의 8 M NH₄Ac로 희석시켜 2.5 M의 최종 농도를 제공하고 pH 6.9까지 0.5 M NaOH를 첨가하여 pH를 보정하였다. 그 후에 샘플을 HIC 컬럼에 로딩하였다. 컬럼을 대략 2.5 컬럼 부피 (CV)의 세척 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ 중의 2.5 M NH₄Ac, pH 6.9)으로 세척하

고, 이어서 대략 10 CV의 세척 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl_2 중의 3 M NaCl; pH 6.9)으로 세척하였다. 컬럼을 6 CV의 용리 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl_2 , pH 7.4) 안에서 용리시켰다. 콘주게이트 함유 분획을 30 kD 막 (재생 셀룰로스/밀리포어)을 사용하여 UF/DF에 적용하였다.

[0164] 실시예 7

[0165] 낮은 수준으로 폴리시알화된 rFVIII의 시험관내 및 생체내 특성화

[0166] 실시예 7에 따라 환원성 아미노화에 의해 제조된, 낮은 수준으로 폴리시알화된 PSA-rFVIII 콘주게이트를 단백질 활성에 대해 시험관내 및 생체내 분석하였다.

[0167] PSA-rFVIII 제제를 단백질 함량 (BCA 분석법) 및 FVIII 색원체 활성을 측정함으로써 분석하여 특성화하였다. 2469 IU/mg의 비활성이 상기 제제에 대하여 계산되었다. 이는 rFVIII 출발 물질의 44%였다. 레조르시놀 분석법 (문헌 [Svennerholm L, Biochim Biophys Acta 24:604-11; 1957])을 사용하여 폴리시알화 수준을 측정하였다. 2.1 PSA 분자/단량체 FVIII의 폴리시알화 수준이 측정되었다.

[0168] PSA-rFVIII을 또한 혈우병 마우스를 이용한 약물동력학 (PK) 연구에 사용하였다. 6 마리의 혈우병 마우스 그룹에 체중 1 kg 당 FVIII 200 IU의 투여량으로 꼬리 정맥을 통해 볼루스 주사하였다. 각각의 그룹으로부터, 주사 후 5분, 3시간, 6시간, 9시간, 16시간, 24시간, 32시간, 및 몇몇 경우에는 42시간에 마취 후에 심장 천자에 의해 시트레이트 혈장을 준비하였다. FVIII 활성 수준을 혈장 샘플에서 측정하였다. 반감기 및 곡선 아래 면적 (AUC)을 MS 엑셀을 사용하여 계산하였다. 상기 실험의 결과를 도 4에 나타냈다. 상기 제거 곡선에서 FVIII의 경우에는 0.054 (IU x h/ml)/(IU/kg) 및 PSA-rFVIII 콘주게이트의 경우에는 0.076 (IU x h/ml)/(IU/kg)의 조정 투여량이 측정되었다. 상기 결과로부터 PSA-rFVIII은 천연 rFVIII보다 장기간 순환하고 PSA-rFVIII의 상응하는 AUC는 1.4 지수만큼 증가하였음을 알 수 있었다.

[0169] 실시예 8

[0170] 낮은 수준으로 폴리시알화된 rFIX의 제조

[0171] 세럼 인스티튜트 오브 인디아 (인도 폰 소재) 제조의, 좁은 크기 분포 ($\text{PD} \leq 1.1$) 및 20 kD의 MW를 갖는 산화된 폴리시알산 (PSA)을 사용하는 환원성 아미노화에 의해 재조합 FIX (rFIX)를 폴리시알화하였다.

[0172] PSA의 rFIX와의 콘주게이션을 +4°C의 저온실에서 수행하였다. 콘주게이션은 2 mg/ml의 rFIX 농도 및 160배 몰과량의 산화된 PSA를 사용하여 수행하였다. PSA는 Hepes 완충액 (50 mM Hepes 완충액, 5 mM CaCl_2 , 350 mM NaCl, pH 7.4)에 용해시켜 PSA 200 mg/ml의 최종 농도를 제공하였다. PSA 용액을 rFIX 용액에 첨가하고 필요한 양의 NaCNBH_3 를 pH 7.4의 Hepes 완충액 중의 80 mg/ml 용액으로 첨가하여 50 mM의 최종 농도를 제공하고 0.5 M NaOH를 적가하여 수득된 용액의 pH를 pH 7.4로 조정하였다. 반응 혼합물을 16시간 동안 +4°C의 저온 암실에서 부드럽게 진탕하였다. 이어서 콘주게이트를 부틸 세파로스 FF (GE 헬스케어) 상에서의 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)에 의해 정제하였다. 화학 반응 후에, 반응 혼합물을 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl_2 , pH 6.9) 중의 5 M NaCl로 희석시켜 3 M의 최종 농도를 제공하고 0.5 M NaOH를 사용하여 pH를 pH 6.9로 조정하였다. 샘플을 HIC 컬럼에 로딩하고 10 컬럼 부피 (CV)의 평형 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl_2 중의 3.0 M NaCl, pH 6.9)으로 세척하였다. 이어서 PSA-rFIX 콘주게이트를 6 CV의 용리 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl_2 , pH 7.4)으로 용리시켰다. 콘주게이트 함유 분획을 30 kD 막 (재생 셀룰로스/밀리포어)을 사용하여 UF/DF에 적용하였다. 상기 제제는 주로 모노- 및 디-PSA화 rFIX를 함유하는 것으로 예상된다.

[0173] 실시예 9

[0174] 낮은 수준으로 폴리시알화된 rFVIIa의 제조

[0175] 세럼 인스티튜트 오브 인디아 (인도 폰 소재) 제조의, 좁은 크기 분포 ($\text{PD} \leq 1.1$) 및 20 kD의 MW를 갖는 산화된 폴리시알산 (PSA)을 사용하는 환원성 아미노화에 의해 rFVIIa를 폴리시알화하였다.

[0176] PSA의 rFVIIa와의 콘주게이션을 +4°C의 저온실에서 수행하였다. 콘주게이션 반응은 2 mg/ml의 rFVIIa 농도 및 125배 몰과량의 산화된 PSA를 사용하여 수행하였다. PSA는 Hepes 완충액 (50 mM Hepes 완충액, 5 mM CaCl_2 , 350 mM NaCl, pH 7.4)에 용해시키고 2 M NaOH를 적가함으로써 pH를 7.4로 조정하여 150 mg/ml의 최종 농도를 제공하였다. PSA 용액을 rFVIIa 용액에 첨가하고 필요한 양의 NaCNBH_3 를 pH 7.4의 Hepes 완충액 중의 80 mg/ml

용액으로 첨가하여 50 mM의 최종 농도를 제공하였다. 반응 혼합물을 부드럽게 혼합하고 pH를 다시 7.4로 조정하였다. 반응 혼합물을 16시간 동안 암실에서 부드럽게 진탕하였다. 이어서 콘주게이트를 부틸 세파로스 FF (GE 헬스케어) 상에서의 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)에 의해 정제하였다. 화학 반응 후에, 반응 혼합물을 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 6.9) 중의 5 M NaCl로 희석시켜 3 M의 최종 농도를 제공하였다. 이어서 샘플을 HIC 컬럼에 로딩하고 10 컬럼 부피 (CV)의 평형 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂ 중의 3.0 M NaCl, pH 7.4)으로 세척하였다. 이어서 PSA-rFVIIa 콘주게이트를 10 CV의 용리 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.4)으로 용리시켰다. 콘주게이트 함유 분획을 합쳐서 30 kD 막 (재생 셀룰로스/밀리포어)을 사용하여 UF/DF에 적용하였다. 최종적으로 용리물을 폴리에테르술폰으로 제조된 30 kD 막 (밀리포어)을 사용하여 UF/DF에 의해 농축시켰다. 상기 제제는 주로 모노- 및 디-PEG화 rFVIIa를 함유하는 것으로 예상된다.

[0177] **실시예 10**

[0178] **낮은 수준의 수용성 중합체로 개질된 혈액 인자를 사용하는 혈액 응고 장애의 치료**

[0179] 혈액 응고 인자가 결핍된 대상체를 본원에 기재된, 개질된 혈액 인자 조성물로 치료하였다. 혈액 장애를 앓고 있는 인간을 치료하는 당분야에 알려진 프로토콜을 사용하고 낮은 수준의 수용성 중합체를 갖는 개질된 혈액 인자(들)를 혈액 응고 장애의 동물 모델에 투여하는 것이 본원에 기재된, 개질된 혈액 인자(들)를 단독으로 또는 다른 치료제, 예를 들면 화학요법제 또는 방사선요법제, 시토카인, 성장 인자 및 다른 통상 사용되는 치료제와 함께 대상체에 투여하는 것에 대한 기준을 제공한다.

[0180] 예를 들면, FVIII이 결핍된 A형 혈우병 환자를 치료 의사에 의해 용이하게 결정된 치료 유효량의 낮은 수준으로 PEG화된 FVIII로 치료하였다. 예를 들어, 대체 FVIII의 2가지 상이한 제제를 중증 혈우병 환자에게 투여하고 비교하는 것에 대해 개시하고 있는 문헌 [Di Paola et al., Haemophilia. 13:124-30, 2007]을 참조한다.

[0181] 추가의 실시양태에서, FVIII 단백질이 결핍될 수 있거나 또는 결핍되지 않을 수 있는 혈우병 환자 (예를 들면, B형 또는 C형 혈우병 환자)를 또한 다른 개질된 혈액 인자, 예컨대 개질된 VWF, FVII, FIX, FXI 또는 질환 상태에 따라 적절한 것으로 치료하였다. 예를 들어, FVIII 및 FIX에 대한 억제제가 발달된 혈우병 환자를 정제된 FVIIa로 치료하는 것에 대해 개시하고 있는 문헌 [Konkle et al., J Thromb Haemost. 5:1904-13, 2007]을 참조한다.

[0182] 정제된 VWF를 사용하여 폰 빌레브란트 질환을 앓고 있는 환자를 치료하였다 (문헌 [Majumdar et al., Blood Coagul Fibrinolysis. 4:1035-7, 1993]). 본원에 기재된, 낮은 수준의 수용성 중합체를 갖는 개질된 VWF는 대체 VWF로부터 이점을 얻을 환자를 치료하기 위해 당업자에게 알려진 치료법에 사용된다.

[0183] 추가적으로, 당분야에 알려진 다른 혈액 응고 장애, 예를 들면 X 인자 결핍증, VII 인자 결핍증, 알렉산더병 및 XIII 인자 결핍증을 치료 유효량의 적절한 개질된 혈액 인자(들)로 치료할 수 있다.

[0184] 개질된 혈액 인자의 투여는 1 내지 24시간 이상 지속될 수 있고, 일상적인 실험을 사용하여 최적화되도록 변경 가능하다. 개질된 혈액 인자는 또한 장기 치료를 요하지 않는 소정의 기간 동안 제공될 수 있다. 추가적으로, 개질된 혈액 인자 조성물은 매일, 매주, 주 2회, 또는 당업자에 의해 결정될 수 있는 다른 효과적인 빈도로 투여가능하다.

[0185] 개질된 혈액 인자를 다른 치료제, 예컨대 다른 화학요법제 또는 방사선요법제, 또는 성장 인자 또는 시토카인과 함께 환자에게 투여하는 것이 고려된다. 또다른 제제와 함께 제공될 경우에, 개질된 혈액 인자의 양은 그에 따라 감소할 수 있다. 제2 제제는 인간 질환을 완화시키는 데에 효과적이고 안전한 것으로 판단되는 양으로 투여된다.

[0186] 시토카인 또는 성장 인자, 및 화학요법제 또는 방사선요법제가 개질된 혈액 인자와 동일한 제형으로 투여되고 동시에 제공되는 것이 고려된다. 별법으로, 상기 제제는 또한 별도의 제형으로 투여가능하고 개질된 혈액 인자와 동시에 투여가능하다. 본원에서 사용된 "동시에"란 서로 30분 이내에 제공되는 제제를 말한다. 제2 제제는 또한 개질된 혈액 인자를 투여하기 전에 투여가능하다. "선행 투여"란 개질된 혈액 인자로 치료하기 1주일 전 내지 개질된 혈액 인자를 투여하기 30분 전까지의 범위 이내에 제제를 투여하는 것을 말한다. 또한 제2 제제를 개질된 혈액 인자를 투여한 이후에 투여하는 것이 고려된다. 후속 투여는 개질된 혈액 인자로 치료한지 30분 후 내지 개질된 혈액 인자를 투여한지 1주일 이후까지의 투여를 말한다. 개질된 혈액 인자 조성물은 또한 혈액 응고 장애 및 임의 유형의 암에 걸린 대상체에 방사선 치료요법과 함께 투여가능하고, 상기 요법은 치료 의사의 처방에 따라 수행된다.

[0187] 상기 예시 실시예에 설명된 본 발명에 대한 다수의 수정 및 변형이 당업자에 의해 가능할 것이라고 생각된다. 따라서 첨부된 특허청구범위에서 나타난 제한만이 본 발명에 적용되어야 한다.

[0188] [표 1]

제제	AUC 조정 투여량	증가	HL (hrs) (95% CI)	증가	MRT (hrs)	증가
rFVIIIPEGH07001FC (8.5 PEG)	0.142	3.0 x	12.6 (8.7-18.7)	1.8 x	19.5	2.6 x
VIEHLUFB07029PHR (7.9 PEG)	0.211	4.4 x	10.8 (8.0-16.5)	1.5 x	15.5	2.0 x
VIEHLUFB08007PHR (4.4 PEG)	0.130	2.7 x	10.3 (8.5-14.1)	1.4 x	12.3	1.6 x
rFVIII 평균 (n=15 실험)	0.048	=1	7.2 (3.0-53.3)	=1	7.6	=1

[0189]

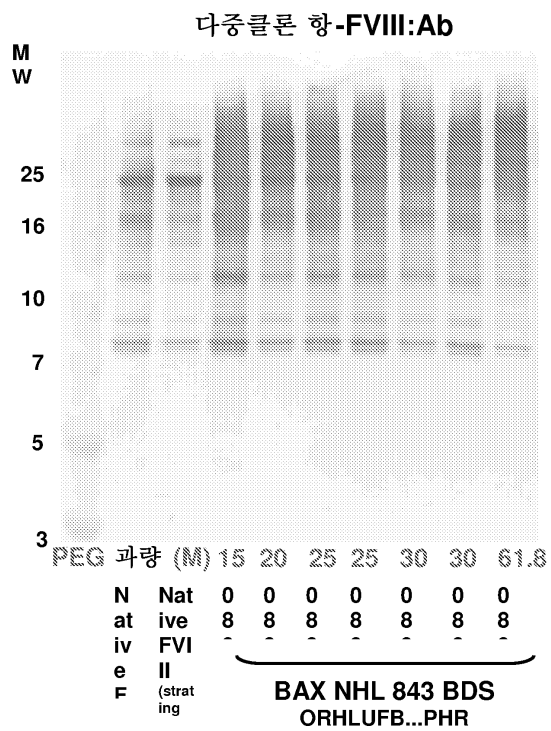
[0190] [표 2]

PEG 물과량	배치 #	PEG 수준 {mol/mol} (결합 PEG)	유리 PEG {%}	유리 FVIII {%}	비 FVIII chr 활성 {IU/mg}
	천연 rFVIII (PEG화를 위한 출발 물질, PHS #8007-8018) 평균, n=7				3706 범위: 3381-4147
15 M	VIEHLUFB08007PHR	4.4	8.8	45.4	2221
20 M	VIEHLUFB08016PHR	5.3	10.5	25.2	1525
25 M	VIEHLUFB08017PHR	6.2	12.2	22.2	1301
30 M	VIEHLUFB08008PHR	8.8	6.8	15.0	789
	VIEHLUFB08009PHR	8.6	8.7	15.6	816
	VIEHLUFB07029PHR	7.9	8.8	14.8	969
61.8 M (실험실용)	VIEHLUFB08018PHR	12.8	9.1	5.3	398
61.8 M (전임상 배치)	ORHLUFB07016PHR	19.4	9.6	4.2	116
	ORHLUFB07017PHR	10.5	15.9	<2	153
	ORHLUFB08001PHR	18.0	10.4	3.7	104
	ORHLUFB08002PHR	15.2	10.5	6.5	336

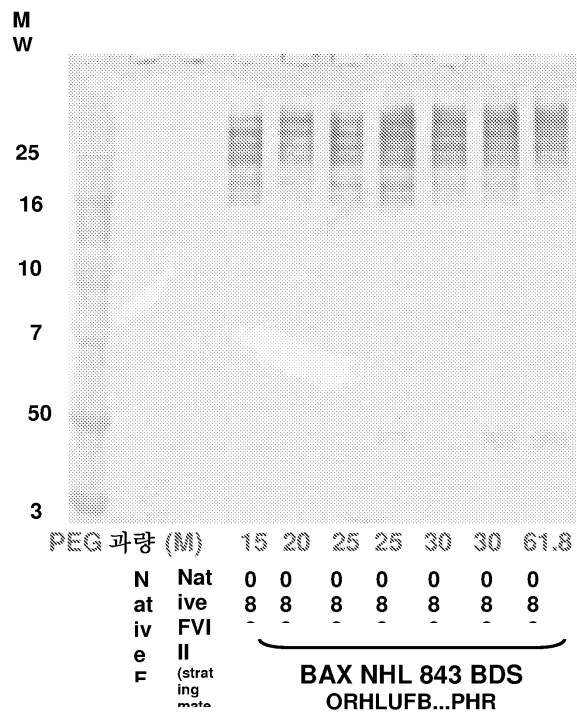
[0191]

도면

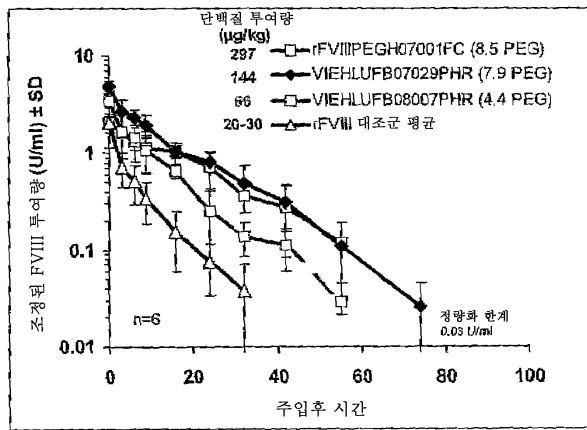
도면1a



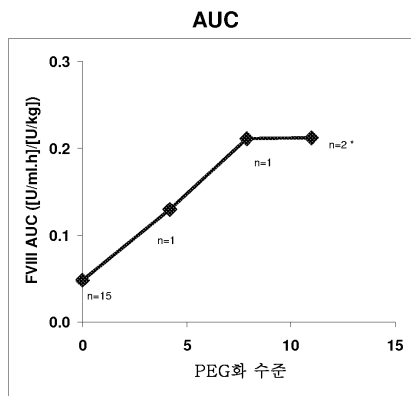
도면1b



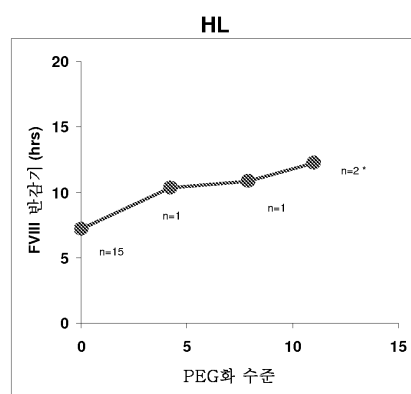
도면2



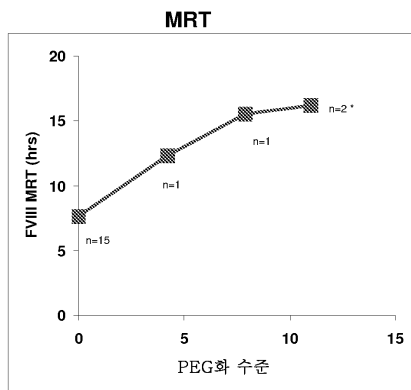
도면3a



도면3b



도면3c



도면4

