



(11) 공개번호 10-2016-0105928

(43) 공개일자 2016년09월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/00 (2006.01) *C07K 14/755* (2006.01)
C07K 17/08 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/00 (2013.01)
C07K 14/755 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7023706 (분할)
- (22) 출원일자(국제) 2005년11월14일
 심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2014-7018134
 원출원일자(국제) 2005년11월14일
 심사청구일자 2014년07월30일
- (85) 번역문제출일자 2016년08월29일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2005/041205
- (87) 국제공개번호 WO 2006/053299
 국제공개일자 2006년05월18일
- (30) 우선권주장
 60/627,277 2004년11월12일 미국(US)

- (71) 출원인
바이엘 헬스케어 엘엘씨
미국 뉴저지주 07981 워패니 피오 박스 915 바이
엘 불러바드 100
- (72) 발명자
판, 클라크, 큐.
미국 94552 캘리포니아주 카스트로 밸리 프린스턴
플레이스 22362
머피, 존, 이.
미국 94707 캘리포니아주 버클리 더알라메다 1139
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 1 항

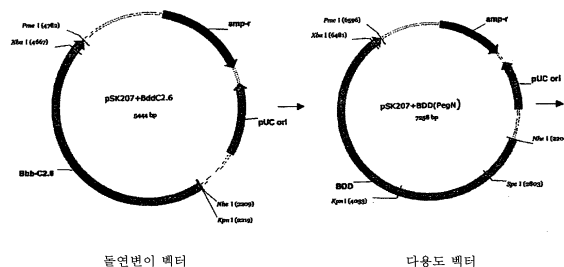
(54) 발명의 명칭 F V I I I의 부위 지향 변형

(57) 요약

본 발명은 N-말단이 아닌 소정의 부위에서 폴리에틸렌 글리콜과 같은 1종 이상의 생체적합성 중합체에 공유적으로 결합되는 제VIII 인자에 관한 것이다. 이 뮤테인 컨쥬게이트는 FVIII 응고촉진 활성을 유지하고, 향상된 약물동태학적 특성을 갖는다.

대표도 - 도1a

BDD-PegN의 돌연변이 및 하위클로닝



(52) CPC특허분류

C07K 17/08 (2013.01)

C07K 19/00 (2013.01)

(72) 발명자

메이, 베이중

미국 94506 캘리포니아주 덴빌 힐리 코트 42

스트라우스, 조나단, 에스.

미국 94597 캘리포니아주 월넛 크리크 채터 오크
서클 250

탄드라, 헨드리

미국 94587-5503 캘리포니아주 유니온 시티 진 드
라이브 32713

첸, 지안민

미국 94518 캘리포니아주 콘코드 셸폴라워 코트
4524

바넷, 토마스

미국 27514 노쓰 캐롤라이나주 채플 힐 반힐 플레
이스 101

탕, 리앙

미국 94806 캘리포니아주 리치몬드 에이퍼터. 2711
리치몬드 파크웨이 3400

왕, 드키안

미국 94521 캘리포니아주 콘코드 워터 오크 코트
4400

명세서

청구범위

청구항 1

폴리펩티드 상의 하나 이상의 소정의 부위에서 1종 이상의 생체적합성 중합체에 공유적으로 부착되는 관능성 제VIII 인자 폴리펩티드를 포함하며, 소정의 부위가 N-말단 아민이 아닌, 제VIII 인자의 응고촉진 활성을 갖는 컨쥬게이트의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 1종 이상의 생체적합성 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜에, 한정된 부위에서 결합할 수 있게 하는 제VIII 인자(FVIII) 뮤테인에 관한 것이다. 또한, 관련 제제, 투여량 및 치료 목적을 위한 이의 투여 방법이 제공된다. 이들 변형 FVIII 변이체, 및 관련 조성물 및 방법은 A형 혈우병에 걸린 개체에 대하여 감소된 주사 빈도 및 감소된 면역원성 반응의 치료 옵션을 제공하는데 유용하다.

배경 기술

[0002] A형 혈우병은 5000명의 남성 당 1명의 추정 발생빈도를 갖는 가장 통상적인 유전 응고 장애이다. 이는 혈액 응고의 내인 경로의 중요한 성분인 FVIII의 결핍 또는 구조적 결함에 의해 유발된다. A형 혈우병에 대한 현재의 치료는 인간 FVIII의 정맥내 주사를 수반한다. 인간 FVIII는 대략 300 kD의 단일쇄 분자로서 재조합되어 생성되었다. 이는 A1-A2-B-A3-C1-C2의 구조적 도메인으로 이루어진다(문헌 [Thompson, 2003, Semin. Hematol. 29, pp. 11-22]). 전구체 생성물은 골지체에서 200 kD(중) 및 80 kD(경)의 2가지 폴리펩티드쇄로 처리되며, 급속 이온으로 2가지 쇄를 결합시킨다(문헌 [Kaufman et al., 1988, J. Biol. Chem. 263, p. 6352]; [Andersson et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. 83, p. 2979]).

[0003] B-도메인 결실 FVIII (BDD, 90 kD A1-A2 중쇄 및 80 kD 경쇄) 또한 A형 혈우병에 대한 대체 요법으로서 효과적임을 나타냈기 때문에, FVIII의 B-도메인은 필수적이지 않은 것으로 보인다. B-도메인 결실 FVIII 서열은 B-도메인의 14 아미노산 대부분의 결실을 함유한다.

[0004] A형 혈우병 환자는 현재 필요시 또는 일주일에 수차례 투여되는 예방적 요법으로서 FVIII의 정맥내 투여에 의해 치료된다. 예방적 요법을 위해, 일주일에 3차례 15 내지 25 IU/kg(체중)의 제VIII 인자가 주어진다. 환자에게는 일정하게 요구된다. 인간에서의 이의 짧은 반감기로 인하여, FVIII은 자주 투여되어야 한다. 전체 길이의 단백질에서의 300 kD보다 큰 이의 크기에도 불구하고, FVIII은 단지 약 11시간의 인간에서의 반감기를 갖는다(문헌 [Ewenstein et al., 2004, Semin. Hematol. 41, pp.1-16]). 빈번한 정맥내 주사의 필요는 환자의 순응도에 대한 중대한 장벽을 형성한다. 만일 FVIII 생성물이 더 긴 반감기를 가져서 덜 빈번한 투여를 필요로 하게 개발되었다면, 환자에게 보다 편할 수 있다. 게다가, 치료 비용도, 반감기가 증가되었다면, 더 적은 투여량이 필요할 수 있으므로, 감소될 수 있다.

[0005] 현재의 요법에 대한 추가적인 단점은 약 25 내지 30%의 환자가 FVIII 활성을 억제하는 항체를 발달시키고 있다는 것이다(문헌 [Saenko et al., 2002, Haemophilia 8, pp. 1-11]). 억제 항체의 주된 에피토프는 잔기 484-508에서 A2 도메인, 잔기 1811-1818에서 A3 도메인 및 C2 도메인 내에 위치하고 있다. 항체의 발달은 대체 요법으로서의 FVIII을 사용하지 못하게 하며, 이러한 환자군으로 하여금 고비용량의 재조합 제VIIa 인자 및 면역내성 요법을 사용하는 훨씬 더 고가의 치료를 갖게 한다.

[0006] 이하의 연구는 억제 항체의 FVIII 에피토프를 식별하였다. 25개의 억제 혈장 샘플의 연구에서, 11개는 트롬빈 생성 73 kD 경쇄 분획 A3C1C2에 결합하고, 4개는 A2 도메인에, 10개는 양쪽 모두에 결합하는 것으로 발견되었다(문헌 [Fulcher, C. et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. 2(22), pp. 7728-32]). 또다른 연구에서, 환자로부터의 8개의 A2 도메인 억제제 중 6개가 재조합 A2 폴리펩티드에 의해 중화되었다(문헌 [Scandella, D. et al., 1993, Blood 82(6), pp.1767-75]). 환자로부터의 9개의 억제제 중 6개에서의 에피토프가 A2 잔기 379-

538에 맵핑되었다(문헌 [Scandella, D. et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. 85(16), pp. 6152-6]). 18개의 중쇄 억제제 중 한 에피토프가 A2 도메인의 동일한 N-말단 18.3 kD 영역에 국소화되었다(문헌 [Scandella, D. et al., 1989, Blood 74(5), pp.1618-26]).

[0007] 인간 A2 도메인 잔기 387-604를 동종 돼지 서열로 대체하여 생성된, 활성 재조합 하이브리드 인간/돼지 FVIII 분자는 인간 A2 억제제에 내성이 있고(문헌 [Lubin, I. et al., 1994, J. Biol. Chem. 269(12), pp. 8639-41]), A2에 결합하기 위한 환자의 A2 억제제와 경쟁하는 마우스 모노클로날 항체 mAB 413 IgG에 내성이 있다(문헌 [Scandella, D. et al., 1992, Thromb Haemost. 67(6), pp.665-71]). 이 A2 도메인 에피토프는, 실험이 mAB 413 IgG 및 4개의 환자 억제제가 A2 도메인 잔기 484-508이 돼지의 것으로 대체된 하이브리드 인간/돼지 FVIII를 억제하지 못했을 때, A2 도메인 잔기 484-508에 추가로 국소화되었다(문헌 [Healey, J. et al., 1995, J. Biol. Chem. 270(24), pp.14505-9]). 또한, 이 하이브리드 FVIII는 스크리닝된 23의 환자 혈장 중 반 이상에 대하여 더 내성을 가졌다(문헌 [Barrow, R. et al., 2000, Blood 95(2), pp. 564-8]). 돌연변이 유발을 스캐닝하는 알라닌은 시험된 5 모두의 환자 억제제에 결합하는데 중요한 잔기 487을 식별하였고, 잔기 484, 487, 489 및 492는 모두 mAB 413 IgG와의 상호작용에 모두 중요하였다(문헌 [Lubin, I., J. Biol. Chem. 272(48), pp. 30191-5]). R484A/R489A/P492A 돌연변이주를 수용하지만 R484A/R489A 돌연변이주를 수용하지 않은 마우스에서의 억제 항체가는 대조 인간 BDD FVIII를 수용한 마우스에서보다 현저하게 낮았다(문헌 [Parker, E. et al., 2004, Blood 104(3), pp. 704-10]). 요약하면, A2 도메인의 484-508 영역이 FVIII 활성의 억제제를 위한 결합 부위로 여겨진다.

[0008] FVIII에 대한 면역 반응의 발달 이외에, 통상의 요법의 또다른 문제는 생체내 FVIII의 짧은 반감기로 인하여 빈번한 투여가 필요하다는 것이다. 순환으로부터 FVIII의 제거 메카니즘이 연구되었다.

[0009] 순환으로부터 FVIII 제거는, 폭넓은 리간드 특이성을 갖는 간의 제거 수용체인 저밀도 지단백질 수용체 관련 단백질(LRP)으로의 특이적인 결합에 부분적으로 기인한다(문헌 [Oldenburg et al., 2004, Haemophilia 10 Suppl 4, pp. 133-139]). 최근, 저밀도 지단백질(LDL) 수용체 또한 FVIII의 혈장 수준을 조절하는데 LRP와 함께 작용하는 것과 같이 FVIII 제거에서 중요한 역할을 한다는 점이 드러났다(문헌 [Bovenschen et al., 2005, Blood 106, pp. 906-910]). 양쪽 모두의 상호작용은 세포 표면 헤파린 황테이트 프로테오글리칸(HSPG)에 결합하여 촉진된다. 마우스에서 혈장의 반감기는, LRP가 차단될 때 3.3배로, 또는 LRP 및 세포 표면 HSPG 모두가 차단될 때 5.5배로 연장될 수 있다(Sarafanov et al., 2001, J. Biol. Chem. 276, pp. 11970-11979]). HSPG는 세포 표면 상의 FVIII를 농축시키고 이를 LRP로 전달하는 것으로 여겨진다. FVIII 상에서의 LRP 결합 부위는 A2 잔기 484-509(문헌 [Saenko et al., 1999, J. Biol. Chem. 274, pp. 37685-37692]), A3 잔기 1811-1818(문헌 [Bovenschen et al., 2003, J. Biol. Chem. 278, pp. 9370-9377]) 및 C2 도메인에서의 에피토프(문헌 [Lenting et al., 1999, J. Biol. Chem. 274, pp. 23734- 23739])로 국소화되었다.

[0010] 또한, FVIII는 단백질분해효소의 작용에 의해 순환으로부터 제거된다. 이 효과를 이해하기 위해서는 FVIII가 혈액 응고에 관여하는 메카니즘을 이해하여야 한다. FVIII는 vWF에 결합된 중쇄 및 경쇄의 헤테로다이머(heterodimer)로서 순환한다. vWF 결합은 FVIII 잔기 1649-1689(문헌 [Foster et al., 1988, J. Biol. Chem. 263, pp. 5230-5234]) 및 C1 도메인의 일부(문헌 [Jacquemin et al., 2000, Blood 96, pp. 958-965]) 및 C2 도메인의 일부(문헌 [Spiegel, P. et al., 2004, J. Biol. Chem. 279(51), pp. 53691-8])와 관련된다. FVIII는 트롬빈에 의해 활성화되며, 이는 잔기 372, 740 및 1689 이후의 펩티드 결합을 절단하여 A1, A2 및 A3-C1-C2 도메인의 헤테로트리머를 생성시킨다(문헌 [Pittman et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 276, pp. 12434-12439]). 활성화되었을 때, FVIII는 vWF로부터 해리되고, 인지질로의 결합에 의해 혈소판의 세포 표면에 농축된다. 인지질 결합은 FVIII 잔기 2199, 2200, 2251 및 2252와 관련된다(문헌 [Gilbert et al., 2002, J. Biol. Chem. 277, pp. 6374-6381]). 여기서 FVIII 잔기 558-565(문헌 [Fay et al., 1994, J. Biol. Chem. 269, pp. 20522-20527]) 및 1811-1818(문헌 [Lenting et al., 1996, J. Biol. Chem. 271, pp. 1935- 1940])과의 상호작용을 통해 FIX에, 그리고 FVIII 잔기 349-372(문헌 [Nogami et al., 2004, J. Biol. Chem. 279, pp. 15763-15771])와의 상호작용을 통해 FX에 결합하고, 내인 응고 경로의 필수 성분인 FX의 FIX 활성화에 대한 공동인자로서 작용한다. 활성화된 FVIII (FVIIIa)는 FVIII 잔기 336 및 562 이후의 절단을 통해 단백질분해효소 활성화 단백질 C(APC)에 의해 부분적으로 불활성화된다(문헌 [Regan et al., 1996, J. Biol. Chem. 271, pp. 3982-3987]). 그러나, 불활성화의 주된 결정인자는 A1 및 A3-C1-C2로부터의 A2 도메인의 해리이다(문헌 [Fay et al., 1991, J. Biol. Chem. 266, pp. 8957-8962]).

[0011] 단백질의 생체내 반감기를 증가시킬 수 있다고 증명된 한가지 방법은 PEG화이다. PEG화는 장쇄 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 분자의 단백질 또는 다른 분자로의 공유적인 부착이다. PEG는 선형 또는 분지형일 수 있어서 상이한

특징을 갖는 상이한 분자를 생성시킬 수 있다. 펩티드 또는 단백질의 반감기를 증가시키는 것 이외에, PEG화는 항체 발달을 감소시키고, 단백질분해효소의 소화로부터 단백질을 보호하고, 신장 여과물로부터 물질을 유지하는데 사용되었다(문헌 [Harris et al., 2001, Clinical Pharmacokinetics 40, pp. 539-51]). 또한, PEG화는 단백질의 전체적인 안정성 및 가용성을 증가시킬 수도 있다. 마지막으로, PEG화된 단백질의 지속적인 혈장 농도는 약물의 피크 수준으로 저점을 감소시켜서 초기 시점에서 단백질의 초생리화적인 수준을 도입할 필요를 제거하여, 유해한 부작용 정도를 감소시킬 수 있다.

[0012] PEG 및 텍스트란과 같은 거대 중합체로 일차 아민(N-말단 및 라이신)을 표적화하는 것에 의한 FVIII의 랜덤 변형은 여러가지의 성공도로 시도되었다(WO 94/15625, US 특허 4970300, US 특허 6048720). 가장 극적인 향상은, 1994년 특허출원에서 공개되었고(WO 94/15625), 4배의 반감기 향상을 나타내지만, 전체 길이의 FVIII를 50배의 물과량의 PEG와 반응시킨 후 2배의 활성 손실의 대가를 나타낸다. WO 2004/075923은 랜덤 변형을 통해 생성되는 FVIII 및 폴리에틸렌 글리콜의 컨쥬게이트를 개시한다. 랜덤하게 PEG화된 단백질, 예컨대 인터페론-알파(문헌 [Kozlowski et al, 2001, BioDrugs 15, pp. 419-429])는 과거에 치료제로서 허용되었다.

[0013] 그러나, 이러한 랜덤 접근법은 헤테로다이어머 FVIII에 대해서는 보다 더 문제가 있다. FVIII는 158개의 라이신, 2개의 N-말단, 및 다수의 히스티딘, 세린, 트레오닌 및 티로신을 비롯한 수백개의 잠재적인 PEG화 부위를 가지며, 이들 모두는 일차 아민을 우선적으로 표적으로 하는 시약으로 잠재적으로 PEG화될 수 있다. 예를 들어, PEG화된 인터페론 알파-2b에 대한 주된 위치 이성질체는 히스티딘임을 보였다(문헌 [Wang et al., 2000, Biochemistry 39, pp. 10634-10640]). 게다가, 전체 길이의 FVIII의 불균일 처리는 PEG화된 생성물에서의 더 심한 복잡함을 유발하는 출발 물질의 혼합물을 유발할 수 있다. FVIII 상에서의 PEG화 부위를 조절하지 않는 것에 대한 부가적인 단점은, PEG가 결정적인 활성 부위에서 또는 그 주위에 부착되어 있다면, 특히 하나 보다 많은 PEG 또는 단일의 거대 PEG가 FVIII에 컨쥬게이션되어 있다면, 잠재적인 활성 감소이다. 랜덤 PEG화가 다량의 다수의 PEG화된 생성물을 늘 생성할 수 있기 때문에, 단지 모노-PEG화된 생성물을 얻기 위한 정제는 극적으로 총 수율을 낮추게 할 수 있다. 마지막으로, 생성물 프로파일에서 막대한 불균일성은 각각의 무리의 일정한 합성 및 특징화를 거의 불가능하게 할 수 있다. 우수한 제조는 일정하고 잘 특징화된 생성물을 필요로 하기 때문에, 생성물 불균일성은 상업화에 대한 장벽이 된다. 이러한 모든 이유로, 보다 특이적인 FVIII의 PEG화 방법이 요구된다.

[0014] 다양한 부위 지향 단백질 PEG화 전략은 최근의 리뷰에서 요약되었다(문헌 [Kochendoerfer, G., Curr. Opin. Chem. Biol. 2005], 2005년 10월 15일 다이렉트 오브젝트 아이덴티파이어 (direct object identifier) doi:10.1016/j.cbpa.2005.10.007로 온라인으로 입수가능함). 한 접근법은 화학적 합성 또는 재조합 발현에 의한 단백질로의 비천연 아미노산의 도입 후, 비천연 아미노산과 특이적으로 반응할 수 있는 PEG 유도체의 부가와 관련된다. 예를 들어, 비천연 아미노산은 천연 단백질에서 발견되지 않는 케토기를 함유하는 것일 수 있다. 그러나, 단백질의 화학적 합성은 FVIII와 같이 거대한 단백질에 대해서는 실행가능하지 않다. 펩티드 합성의 현재의 한계는 약 50 잔기이다. 몇가지 펩티드가 결합되어 더 큰 폴리펩티드 조각을 형성할 수 있지만, B-도메인 결실 FVIII를 생성하기 위해서는 20 결합보다 더 많은 것이 필요할 것이며, 이는 이상적인 반응 조건 하에서도 1% 화복률 미만을 야기할 것이다. 비천연 아미노산을 사용한 단백질의 재조합 발현은 주로 비포유동물 발현계로 아직까지는 제한되어 있다. 이러한 접근법은 포유동물계에서 발현될 필요가 있는 FVIII와 같은 거대하고 복잡한 단백질에 대해서는 문제가 있는 것으로 예측된다.

[0015] 단백질의 부위 특이적 PEG화에 대한 또다른 접근법은 N-말단 골격의 아민을 PEG-알데히드로 표적화하는 것이다. 그러나, 다른 아민기에 대한 특이성을 달성하기 위해 이 방법 하에서 요구되는 낮은 pH는 FVIII의 안정화에 필요한 좁은 거의 중성의 pH 범위와는 적합하지 않다(문헌 [Wang et al., 2003, International J. Pharmaceutics 259, pp. 1-15]). 게다가, FVIII의 N-말단 PEG화는, 이 영역이 혈장 제거에 관련되지 않는다면, 증가된 혈장 반감기를 유도할 수 없을 것이다. 실제로, FVIII 경쇄의 N-말단 영역은, 순환에서 FVIII 생존에 결정적인 캐리어 단백질인 폰빌레브란드 인자(von Willebrand factor; vWF)에 결합하는데 관련되어 있다. 제VIII 인자의 N-말단 변형에 의해, 결정적으로 중요한 vWF와의 연관이 붕괴되거나 약해질 수 있다. 따라서, FVIII의 N-말단 PEG화는 FVIII의 혈장 반감기를 감소시키는 반대 효과를 가질 수 있다.

[0016] WO 90/12874는 또다른 아미노산에 시스테인을 삽입하거나 또는 아미노산을 시스테인으로 치환한 후, 술폰히드릴 반응기를 갖는 리간드를 부가하여 인간 IL-3, 과립구집락자극인자 및 적혈구생성인자 폴리펩티드의 부위 특이적 변형을 개시한다. 리간드는 시스테인 잔기에 선택적으로 결합한다. FVIII의 변형 또는 이의 임의의 변이체는 개시되어 있지 않다.

[0017] 상기 언급한 이유로, 생체내에서 보다 긴 작용 기간 및 감소된 면역원성을 가지면서 관능 활성을 유지하는 향상된 FVIII 변이체에 대한 필요가 존재한다. 게다가, 이러한 단백질이 일정한 방식으로 균일한 생성물로서 생성되는 것이 바람직하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] <발명의 요약>

[0019] 본 발명의 목적은 향상된 약물동태학적 특성 및 치료 특성을 갖는 생체적합성 중합체 컨쥬게이션된 관능성 FVIII 폴리펩티드를 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 또다른 목적은 향상된 약물동태학적 특성을 갖는 생체적합성 중합체 컨쥬게이션된 B 도메인 결실 FVIII 단백질을 제공하는 것이다.

[0021] 본 발명의 또다른 목적은 저밀도 지단백질 수용체 관련 단백질(LRP), 저밀도 지단백질(LDL) 수용체, 헤파린 술페이트 프로테오글리칸(HSPG) 및/또는 FVIII에 대한 억제 항체에 대한 감소된 결합을 갖는 생체적합성 중합체 컨쥬게이션된 관능성 FVIII 폴리펩티드를 제공하는 것이다.

[0022] 본 발명의 또다른 목적은 생체내에서 보다 긴 작용 기간 및 감소된 면역원성을 가져서 일정한 방식으로 균일한 생성물로서 생성될 수 있는 향상된 FVIII 변이체를 제공하는 것이다.

[0023] 본 발명의 한 측면에서, 폴리펩티드 상의 하나 이상의 소정의 부위에서 1종 이상의 생체적합성 중합체에 공유적으로 부착된 관능성 제VIII 인자 폴리펩티드를 포함하는 제VIII 인자 응고촉진 활성을 갖는 컨쥬게이트가 제공되며, 여기서 소정의 부위는 N-말단 아민이 아니다. 또한, 본 발명은, 소정의 부위에서 시스테인 잔기에 대한 코딩 서열로 치환하기 위해 관능성 제VIII 인자 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 돌연변이시키는 단계; 시스테인 강화 뉴테인을 생성하기 위해 돌연변이된 뉴클레오티드 서열을 발현시키는 단계; 뉴테인을 정제하는 단계; 컨쥬게이트가 형성되도록 실질적으로 도입된 시스테인 잔기에서만 폴리펩티드와 반응하도록 활성화된 생체적합성 중합체와 뉴테인을 반응시키는 단계; 및 컨쥬게이트를 정제하는 단계를 포함하는 이러한 컨쥬게이트의 제조 방법을 포함한다. 또한, 본 발명은 컨쥬게이트 및 제약적으로 허용가능한 보강제를 포함하는 제약 조성물 및 상기 조성물을 이를 필요로 하는 포유류에 치료 유효량만큼 투여하여 혈우병을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0024] 또한, 본 발명은, (a) 제VIII 인자 뉴테인의 노출 표면 상의 아미노산 잔기에 대한 시스테인 대체물을 갖는 부위 지향 제VIII 인자 뉴테인을 발현시키는 단계 (시스테인은 캡핑되어 있음); (b) 시스테인 뉴테인을 서서히 환원시키고 캡을 배출시키는 조건 하에서 시스테인 뉴테인을 환원제와 접촉시키는 단계; (c) 시스테인 뉴테인으로 부터 캡 및 환원제를 제거하는 단계; 및 (d) 환원제의 제거로부터 약 5 분 이상 후에 PEG화 제VIII 인자 뉴테인이 생성되는 조건 하에서 술폰히드릴 결합 잔기를 포함하는 PEG로 시스테인 뉴테인을 처리하는 단계를 포함하는 제VIII 인자 뉴테인의 부위 지향 PEG화 방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0025] 본 발명은 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드가 N-말단 아민에서가 아닌 소정의 부위에서 생체적합성 중합체에 공유적으로 부착될 수 있고, 이러한 폴리펩티드가 실질적으로 이의 응고 활성을 유지한다는 발견에 기초한 것이다. 게다가, 이들 폴리펩티드 컨쥬게이트는 향상된 순환 시간 및 감소된 면역원성을 갖는다. 본 발명의 컨쥬게이트는 FVIII에 랜덤 중합체 부착 또는 N-말단에서의 부착을 갖는 종래 기술의 컨쥬게이트에 비해 유리한 것이다. 부위 지향 부착은 생물학적 활성에 필요한 영역을 피해서 실질적인 FVIII 활성을 유지하는 변형을 디자인할 수 있게 한다. 또한, FVIII 제거에 관련된 부위에서의 결합을 막기 위해 중합체를 부착시키도록 디자인할 수 있게 한다. 또한, 부위 지향 부착은 랜덤 중합체 결합에 의해 종래 기술에서 생성된 불균일한 컨쥬게이트에 비해 균일한 생성물을 가능케 한다. 경쇄의 N-말단 아민에서의 부착을 피해서, 본 발명의 컨쥬게이트는 FVIII 폴리펩티드의 활성 부위에서 리간드를 부착하는 것으로부터의 활성의 가능한 손실을 피한다. 경쇄의 N-말단 영역은 순환에서 안정화와 관련된 FVIII의 vWF 인자와 관련된 것으로 여겨진다.

[0026] <정의>

[0027] 생체적합성 중합체. 생체적합성 중합체로는 폴리알킬렌 옥사이드, 예컨대 (이로 제한되지 않음) 폴리에틸렌 글

리콜 (PEG), 텍스트란, 콜로민산 또는 다른 카르보하이드레이트계 중합체, 아미노산 중합체, 비오틴 유도체, 폴리비닐 알콜(PVA), 폴리카르복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모르폴린, 헤파린, 알부민, 셀룰로스, 키토산 가수분해물, 전분, 예컨대 히드록시에틸-전분 및 히드록시프로필-전분, 글리코겐, 아가로스 및 이의 유도체, 구아검, 풀루란, 이눌린, 크산탄검, 카라기난, 펙틴, 알긴산 가수분해물, 다른 생체중합체 및 이의 임의의 등가물을 들 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜이 바람직하고, 메톡시폴리에틸렌 글리콜(mPEG)이 보다 바람직하다. 다른 유용한 폴리알킬렌 글리콜 화합물은 폴리프로필렌 글리콜(PPG), 폴리부틸렌 글리콜(PBG), PEG-글리시딜 에테르(Epoxy-PEG), PEG-옥사카르보닐이미다졸(CDI-PEG), 분지 폴리에틸렌 글리콜, 선형 폴리에틸렌 글리콜, 분기된 폴리에틸렌 글리콜 및 여러 갈래 또는 "초분지" 폴리에틸렌 글리콜(star-PEG)이다.

[0028] 폴리에틸렌 글리콜(PEG). 본원에서 사용되는 "PEG" 및 "폴리에틸렌 글리콜"은 상호교환가능하며 임의의 수용성 폴리(에틸렌 옥사이드)를 포함한다. 전형적으로, 본 발명에 따라 사용하기 위한 PEG는 다음의 구조 $-(OCH_2CH_2)_n-$ (여기서, n 은 2 내지 4000임)를 포함한다. 또한, 본원에 사용되는 바와 같이, 말단 산소가 치환되는지 여부에 따라, PEG는 $-CH_2CH_2-O(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$ 및 $-(OCH_2CH_2)_nO-$ 도 포함한다. 명세서 및 청구범위 전체에서, 용어 "PEG"는 다양한 말단기 또는 "말단 캡핑"기, 예컨대 (이로 제한되지 않음) 히드록실 또는 C_{1-20} 알콕시기를 갖는 구조를 포함한다. 또한, 용어 "PEG"는 대다수, 즉 50% 초과로 $-OCH_2CH_2-$ 반복 하위단위를 함유하는 중합체를 의미한다. 구체적인 형태와 관련하여, PEG는 임의의 수의 다양한 분자량 뿐만 아니라 구조 또는 기하형태, 예컨대 분지, 선형, 분기 및 다관능성을 가질 수 있다.

[0029] PEG화(PEGylation). PEG화는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 단백질과 같은 분자에 공유적으로 부착되는 과정이다.

[0030] 활성화 또는 활성 관능기. 생체적합성 중합체와 같은 관능기가 활성화된 것으로 기술된 경우, 관능기는 또다른 분자 상의 친전자체 또는 친핵체와 쉽게 반응한다.

[0031] B 도메인 결실 FVIII (BDD). 본원에 사용되는 바와 같이, BDD는 FVIII의 B-도메인의 거의 모든 14 아미노산의 결실을 함유하는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다. B-도메인의 처음의 4개의 아미노산 (SFSQ, 서열번호:1)은 B-도메인의 10개의 이후의 잔기 (NPPVLRHQQR, 서열번호:2)에 연결되어 있다(문헌 [Lind, P. et al, 1995, Eur. J. Biochem. 232, pp. 19-27]). 본원에 사용되는 BDD는 서열번호:3의 아미노산 서열을 갖는다.

[0032] FVIII. 혈액 응고 제VIII 인자 (FVIII)는 간에 의해 합성되어 혈류 내로 배출된 글리코단백질이다. 순환 혈액에서, 이는 폰빌레브란트 인자(vWF, 제VIII 인자 관련 항원으로도 알려짐)에 결합되어 안정한 복합체를 형성한다. 트롬빈에 의해 활성화되면, 이는 복합체로부터 해리되어 응고 연속반응에서 다른 응고 인자와 상호작용하며, 궁극적으로 혈전 형성에 이르게 한다. 전체 길이의 인간 FVIII는, 대립 변이체가 가능하지만, 서열번호:4의 아미노산 서열을 갖는다.

[0033] 관능성 제VIII 인자 폴리펩티드. 본원에 사용되는 바와 같이, 관능성 제VIII 인자 폴리펩티드는 예를 들어 A형 혈우병의 특징인 인간 제VIII 인자의 결핍을 생체내 또는 시험관내에서 교정할 수 있는 관능성 폴리펩티드 또는 폴리펩티드의 조합을 나타낸다. 제VIII 인자는 자연 상태에서 다중 분해 또는 처리 형태를 갖는다. 이들은 본원에 나타낸 바와 같이 전구체인 일쇄 단백질로부터 단백질분해효소에 의해 유도된다. 관능성 제VIII 인자 폴리펩티드는 이러한 단일쇄 단백질을 포함하며, 인간 제VIII 인자 결핍을 교정하는 생물학적 활성을 갖는 이들의 다양한 분해 생성물도 제공한다. 대립 변이도 존재한다. 관능성 제VIII 인자 폴리펩티드는, 인간 제VIII 인자의 관능성 구역을 함유하고 필수적이고 특징적인 인간 제VIII 인자의 관능 활성이 본질적으로 영향받지 않는 한, 제VIII 인자의 유도체를 생성하는 모든 이러한 대립 변이, 글리코실화 형태, 변형 및 분획을 포함한다. 필수적인 관능 활성을 갖는 제VIII 인자의 이들 유도체는 본원에 기술된 직접적인 시험관내 시험에 의해 쉽게 식별될 수 있다. 게다가, 관능성 제VIII 인자 폴리펩티드는 제IXa 인자, 칼슘 및 인지질의 존재 하에 제X 인자의 제Xa 인자로의 전환에 촉매 작용을 할 수 있을 뿐만 아니라 A형 혈우병을 앓는 개체로부터 유도된 혈장에서의 응고 결함을 교정할 수 있다. 인간 제VIII 인자 아미노산 서열 및 관능 영역의 본원에서의 개시로부터, DNA의 제한 효소 절단 또는 인간 제VIII 인자 단백질의 단백질분해효소적 또는 다른 분해를 통해 유도될 수 있는 분획은 당업자에게 명확할 것이다.

[0034] FIX. 본원에 사용되는 바와 같이, FIX는 인간 응고 제IX 인자 또는 혈장 트롬보플라스틴 성분으로도 알려진 응고 제IX 인자를 의미한다.

[0035] FX. 본원에 사용되는 바와 같이, FX는 인간 응고 제X 인자 또는 에포넴 스튜어트-프라우(Stuart-Prower) 인자

로도 알려진 응고 제X 인자를 의미한다.

- [0036] 약물동태학. "약물동태학" ("PK")는 신체에서 약물의 흡수, 분배, 대사 및 제거 특성을 기술하는데 사용되는 용어이다. 약물의 약물동태학에서의 향상은 약물을 치료제로서 생체내에서 보다 더 효과적으로 하는 이의 특징, 특히 신체에서 이의 유용한 지속시간에서의 향상을 의미한다.
- [0037] 뮤테인. 뮤테인은 단백질 또는 폴리펩티드로의 실험적으로 유도된 돌연변이의 결과로서 발생한 유전적으로 처리된 단백질이다.
- [0038] 단백질. 본원에 사용되는 바와 같이, 단백질 및 폴리펩티드는 동의어이다.
- [0039] FVIII 제거 수용체. 본원에 사용되는 바와 같이 FVIII 제거 수용체는 순환으로부터 FVIII를 제거하는 1종 이상의 다른 분자와 결합하거나 또는 이와 연관되는 관능성 FVIII 폴리펩티드 상의 수용체 영역을 의미한다. 제 VIII 인자 제거 수용체는, 이에 제한되지 않지만, LRP, LDL 수용체 및/또는 HSPG와 결합하는 FVIII 분자의 영역을 들 수 있다.
- [0040] <검토>
- [0041] 임의의 관능성 제VIII 인자 폴리펩티드는 소정의 부위에서 돌연변이된 후, 본 발명의 방법에 따라 그 부위에서 생체적합성 중합체에 공유적으로 부착될 수 있다는 점이 고려된다. 유용한 폴리펩티드로는, 이로 제한되지 않지만, 서열번호:4에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 전체 길이의 제VIII 인자 및 서열번호:3에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 BDD FVIII를 들 수 있다. BDD FVIII이 바람직하다.
- [0042] 본 발명의 컨주게이트에 사용되는 생체적합성 중합체는 상기 언급된 임의의 중합체일 수 있다. 생체적합성 중합체는 약물동태학에 있어서 바람직한 향상을 제공하도록 선택된다. 예를 들어, 활성에서의 허용가능하지 않은 감소 없이 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드의 순환 반감기를 향상시키거나 폴리펩티드의 면역원성을 감소시키도록 중합체의 동질성, 크기 및 구조가 선택된다. 바람직하게는, 중합체는 PEG를 포함하며, 보다 더 바람직하게는 이의 분자량의 50% 이상이 PEG이다. 한 실시태양에서, 중합체는 히드록실, 알콕시, 치환 알콕시, 알켄옥시, 치환 알켄옥시, 알킨옥시, 치환 알킨옥시, 아릴옥시 및 치환 아릴옥시와 같은 말단-캡핑 잔기로 말단이 캡핑된 폴리에틸렌 글리콜이다. 메톡시폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 중합체가 보다 더 바람직하다. 3 kD 내지 100 kD, 보다 바람직하게는 5 kD 내지 64 kD 또는 5 kD 내지 43 kD 범위의 크기를 갖는 메톡시폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 중합체가 더 바람직하다.
- [0043] 바람직하게는, 중합체는 반응성 잔기를 갖는다. 예를 들어, 한 실시태양에서, 중합체는 관능성 제VIII 인자 폴리펩티드 상의 자유 시스테인과 반응할 수 있는 술포히드릴 반응성 잔기를 가져서 공유 결합을 형성할 수 있다. 이러한 술포히드릴 반응성 잔기로는, 티올, 트리플레이트, 트레실레이트, 아지리딘, 옥시란, S-피리딜 또는 말레이미드 잔기를 들 수 있다. 말레이미드 잔기가 바람직하다. 한 실시태양에서, 중합체는 선형이고, 술포히드릴에 대해 강하게 반응성이 아닌 한 말단(예컨대, 메톡시)에서 "캡"을 갖고, 다른 말단에서 술포히드릴 반응성 잔기를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 컨주게이트는 PEG-말레이미드를 포함하고, 5 kD 내지 64 kD 범위의 크기를 갖는다.
- [0044] 유용한 생체적합성 중합체를 선택하기 위한 추가의 설명이 이하의 실시예에 제공된다.
- [0045] FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 부위 지향 돌연변이는 당업계에서 알려진 방법에 의해 이루어질 수 있다. 바람직한 방법은 중합체의 공유적인 부착을 위해 선택된 부위에서 시스테인 코돈을 도입하여 돌연변이를 발생시키는 것을 포함한다. 이는 상업적으로 입수가 가능한 부위 지향 돌연변이 발생 키트, 예컨대 스트라타진 씨퀵체인지(Stratagene cQuickChange™) II 부위 지향 돌연변이 발생 키트, 클론테크 트랜스포머(Clontech Transformer) 부위 지향 돌연변이 발생 키트 번호 K1600-1, 인비트로젠 젠테일러(Invitrogen GenTaylor) 부위 지향 돌연변이 발생 시스템 번호 12397014, 프로메가 얼터드 사이트(Promega Altered Sites) II 시험관내 돌연변이 발생 키트 번호 Q6210, 또는 타카라 미루스 바이오(Takara Mirus Bio) LA PCR 돌연변이 발생 키트 번호 TAK RR016을 사용하여 달성될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 컨주게이트는, 먼저 관능성 FVIII 폴리펩티드 표면 상의 하나 이상의 아미노산에 대한 코돈을 시스테인에 대한 코돈으로 대체하고, 재조합 발현 시스템에서 시스테인 뮤테인을 생성하고, 뮤테인을 시스테인 특이적 중합체 반응물과 반응시키고, 뮤테인을 정제하여 제조될 수 있다.
- [0047] 이 시스템에서, 시스테인 부위에서 중합체의 부가는 중합체의 말레이미드 활성 관능을 통해 달성될 수 있다.

이 기술의 예는 아래에 제공되어 있다. 사용되는 술포히드릴 반응성 중합체의 양은 유도되는 시스테인의 몰량과 등몰량 이상이어야 하며, 바람직하게는 과량으로 존재한다. 바람직하게는, 술포히드릴 반응성 중합체의 5배 이상의 몰 과량이 사용되고, 보다 더 바람직하게는, 이 중합체의 10배 이상의 과량이 사용된다. 공유적인 부착에 유용한 다른 조건은 당업자의 기술 범위 내에 있다.

[0048] 이하의 실시예에서, 뮤테인은 당업계에 통상적인 방식으로 명명된다. 돌연변이를 명명하는 관례는 서열번호:4에 제공된 바와 같은 성숙한 전체 길이의 제VIII 인자에 대한 아미노산 서열에 기초한다. 분비된 단백질과 같이, FVIII은 번역 과정 동안 단백질분해효소에 의해 절단된 신호 서열을 함유한다. 19개의 아미노산 신호 서열의 제거 후, 분비된 FVIII 생성물의 제1 아미노산은 알라닌이다.

[0049] 통상적으로 그리고 본원에 사용되는 바와 같이, BDD FVIII에서 돌연변이되는 아미노산을 지칭하는 경우, 돌연변이되는 아미노산은 전체 길이의 FVIII의 서열에서 이의 위치로 나타낸다. 예를 들어, 이하에 논의되는 PEG6 뮤테인은, 전체 길이의 서열에서 1808와 유사한 위치에서 라이신(K)을 시스테인(C)으로 변화시키기 때문에, K1808C로 나타낸다.

[0050] 중합체의 공유 결합을 위한 소정의 부위는, FVIII 활성화 또는 vWF로의 결합과 같이 생체내에서 FVIII를 안정화시키는 다른 메카니즘에 관련되지 않는 폴리펩티드의 표면 상에 노출된 부위로부터 최선으로 선택된다. 또한, 이러한 부위는 FVIII가 불활성화되거나 순환으로부터 제거되는 메카니즘에 관련된다고 알려진 부위로부터 최선으로 선택된다. 이들 부위의 선택은 이하에서 상세하게 설명된다. 바람직한 부위는 (a) 저밀도 지단백질 수용체 관련 단백질, (b) 헤파린 술페이트 프로테오글리칸, (c) 저밀도 지단백질 수용체 및/또는 (d) 제VIII 인자 억제 항체에 대한 결합 부위 또는 그 부근의 아미노산 잔기를 포함한다. "결합 부위 또는 그 부근"이란 그 부위에 대한 생체적합성 중합체의 공유적인 부착이 결합 부위의 입체 장애를 야기할 수 있도록 결합 부위에 충분히 근접한 잔기를 의미한다. 이러한 부위는 예를 들어 결합 부위의 20 Å 이내에 있을 것으로 여겨진다.

[0051] 본 발명의 한 실시태양에서, 생체적합성 중합체는, (a) 위에서 정의된 바와 같은 제VIII 인자 제거 수용체, (b) 제VIII 인자를 분해할 수 있는 단백질분해효소에 대한 결합 부위 및/또는 (c) 제VIII 억제 항체에 대한 결합 부위 또는 그 부근의 아미노산 잔기에서 관능성 제VIII 인자 폴리펩티드에 공유적으로 부착되어 있다. 단백질분해효소는 활성화 단백질 C(APC)일 수 있다. 또다른 실시태양에서, 생체적합성 중합체는 폴리펩티드에 대한 저밀도 지단백질 수용체 관련 단백질의 결합이 컨쥬게이션되지 않았을 때의 폴리펩티드에 대한 것보다 적게 되도록, 바람직하게는 2배 초과로 더 적게 되도록 관능성 제VIII 인자 폴리펩티드 상의 소정의 부위에 공유적으로 부착되어 있다. 한 실시태양에서, 생체적합성 중합체는 폴리펩티드에 대한 헤파린 술페이트 프로테오글리칸의 결합이 컨쥬게이션되지 않았을 때의 폴리펩티드에 대한 것보다 적게 되도록, 바람직하게는 2배 초과로 더 적게 되도록 관능성 제VIII 인자 폴리펩티드 상의 소정의 부위에 공유적으로 부착되어 있다. 추가의 실시태양에서, 생체적합성 중합체는 폴리펩티드에 대한 제VIII 인자 억제 항체의 결합이 컨쥬게이션되지 않았을 때의 폴리펩티드에 대한 것보다 적게 되도록, 바람직하게는 2배 초과로 더 적게 되도록 관능성 제VIII 인자 폴리펩티드 상의 소정의 부위에 공유적으로 부착되어 있다. 또다른 실시태양에서, 생체적합성 중합체는 혈장 단백질분해효소가 폴리펩티드가 컨쥬게이션되지 않았을 때보다 적게 폴리펩티드를 분해하도록 관능성 제VIII 인자 폴리펩티드 상의 소정의 부위에서 공유적으로 부착되어 있다. 추가의 실시태양에서, 혈장 단백질분해효소에 의한 폴리펩티드의 분해가 동일 조건 하에서 동일 기간에 걸쳐 측정될 때 컨쥬게이션되지 않았을 때의 폴리펩티드의 분해보다 2배 초과로 더 적다.

[0052] FVIII에 대한 LRP, LDL 수용체 또는 HSPG의 결합 친화도는 표면 플라즈몬(plasmon) 공명 기술(바이아코어(Biacore))을 사용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, FVIII는 직접적으로 또는 FVIII 항체를 통해 간접적으로 바이아코어(BiacoreTM) 칩에 코팅될 수 있고, 다양한 농도의 LRP를 칩 상으로 통과시켜 상호작용이 이루어지는 비율 및 이루어지지 않은 비율 모두를 측정할 수 있다(문헌 [Bovenschen N. et al., 2003, J. Biol. Chem. 278(11), pp. 9370-7]). 두가지 비율의 비는 친화도의 측정치를 나타낸다. PEG화했을 때 친화도에서 2배, 바람직하게는 5배, 보다 바람직하게는 10배, 더 바람직하게는 30배 감소가 바람직할 수 있다.

[0053] 단백질분해효소 APC에 의한 FVIII의 분해는 당업자에게 알려진 임의의 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0054] 한 실시태양에서, 생체적합성 중합체는 제VIII 인자 아미노산 위치 81, 129, 377, 378, 468, 487, 491, 504, 556, 570, 711, 1648, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911, 2091, 2118 및 2284 중 하나 이상에서 폴리펩티드에 공유적으로 부착된다. 또다른 실시태양에서, 생체적합성 중합체는 제VIII 인자 아미노

산 위치 377, 378, 468, 491, 504, 556, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911 및 2284 중 하나 이상에서 폴리펩티드에 공유적으로 부착되고, (1) 저밀도 지단백질 수용체 관련 단백질에 대한 컨쥬게이트의 결합이 저밀도 지단백질 수용체 관련 단백질에 대한 컨쥬게이션되지 않은 폴리펩티드의 결합보다 적거나; (2) 저밀도 지단백질 수용체에 대한 컨쥬게이트의 결합이 저밀도 지단백질 수용체에 대한 컨쥬게이션되지 않은 폴리펩티드의 결합보다 적거나; 또는 (3) 저밀도 지단백질 수용체 관련 단백질 및 저밀도 지단백질 수용체 모두에 대한 컨쥬게이트의 결합이 저밀도 지단백질 수용체 관련 단백질 및 저밀도 지단백질 수용체에 대한 컨쥬게이션되지 않은 폴리펩티드의 결합보다 더 적다.

[0055] 추가의 실시태양에서, 생체적합성 중합체는 제VIII 인자 아미노산 위치 377, 378, 468, 491, 504, 556 및 711 중 하나 이상에서 폴리펩티드에 공유적으로 부착되고, 헤파린 술페이트 프로테오글리칸에 대한 컨쥬게이트의 결합이 헤파린 술페이트 프로테오글리칸에 대한 컨쥬게이션되지 않은 폴리펩티드의 결합보다 더 적다. 추가의 실시태양에서, 생체적합성 중합체는 제VIII 인자 아미노산 위치 81, 129, 377, 378, 468, 487, 491, 504, 556, 570, 711, 1648, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911, 2091, 2118 및 2284 중 하나 이상에서 폴리펩티드에 공유적으로 부착되고, 컨쥬게이트가 컨쥬게이션되지 않은 폴리펩티드보다 제VIII 인자 억제항체에 더 적게 결합한다. 추가의 실시태양에서, 생체적합성 중합체는 제VIII 인자 아미노산 위치 81, 129, 377, 378, 468, 487, 491, 504, 556, 570, 711, 1648, 1795, 1796, 1803, 1804, 1808, 1810, 1864, 1903, 1911, 2091, 2118 및 2284 중 하나 이상에서, 바람직하게는 위치 377, 378, 468, 491, 504, 556 및 711 중 하나 이상에서 폴리펩티드에 공유적으로 부착되고, 컨쥬게이트가 컨쥬게이션되지 않은 폴리펩티드보다 제VIII 인자를 분해할 수 있는 혈장 단백질분해효소에 의해 더 적게 분해된다.

[0056] 추가의 실시태양에서, 생체적합성 중합체는 아미노산 위치 129, 491, 1804 및/또는 1808에서, 보다 바람직하게는 491 또는 1808에서 B-도메인 결실 제VIII 인자에 공유적으로 부착된다. 추가의 실시태양에서, 생체적합성 중합체는 제VIII 인자 아미노산 위치 1804에서 폴리펩티드에 부착되고, 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 바람직하게는, 생체적합성 중합체의 부착을 위한 하나 이상의 소정의 부위는 부위 특이적 시스테인 돌연변이에 의해 조절된다.

[0057] 관능성 제VIII 인자 폴리펩티드 상의 하나 이상, 바람직하게는 하나 또는 둘이 중합체 부착을 위한 소정의 부위일 수 있다. 특정 실시태양에서, 폴리펩티드는 모노PEG화되거나 디PEG화된다.

[0058] 또한, 본 발명은, 소정의 부위에서 시스테인 잔기에 대한 코딩 서열로 치환하기 위해 관능성 제VIII 인자 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 돌연변이시키는 단계; 시스테인 강화 뮤테인을 생성하기 위해 돌연변이된 뉴클레오티드 서열을 발현시키는 단계; 뮤테인을 정제하는 단계; 컨쥬게이트가 형성되도록 실질적으로 감소된 시스테인 잔기에서만 폴리펩티드와 반응하도록 활성화된 생체적합성 중합체와 뮤테인을 반응시키는 단계; 및 컨쥬게이트를 정제하는 단계를 포함하는 컨쥬게이트의 제조 방법에 관한 것이다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은, (a) 제VIII 인자 뮤테인의 노출 표면 상의 아미노산 잔기에 대한 시스테인 대체물을 갖는 부위 지향 제VIII 인자 뮤테인을 발현시키는 단계 (시스테인은 캡핑되어 있음); (b) 시스테인 뮤테인을 서서히 환원시키고 캡을 배출시키는 조건 하에서 시스테인 뮤테인을 환원제와 접촉시키는 단계; (c) 시스테인 뮤테인으로부터 캡 및 환원제를 제거하는 단계; 및 (d) 환원제의 제거로부터 약 5 분 이상, 바람직하게는 15 분 이상, 더 바람직하게는 30분 이상 후에 PEG화 제VIII 인자 뮤테인이 생성되는 조건 하에서 술프히드릴 결합 잔기를 포함하는 PEG로 시스테인 뮤테인을 처리하는 단계를 포함하는 제VIII 인자 뮤테인의 부위 지향 PEG화 방법을 제공한다. PEG의 술프히드릴 결합 잔기는 티올, 트리플레이트, 트레실레이트, 아지리딘, 옥시란, S-피리딜 및 말레이미드 잔기로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 말레이미드이다.

[0059] 또한, 본 발명은 치료 유효량의 본 발명의 컨쥬게이트 및 제약적으로 허용가능한 보강제를 포함하는 비경구 투여를 위한 제약 조성물에 관한 것이다. 제약적으로 허용가능한 보강제는 활성 성분에 첨가되어 제제화를 돕거나 제제를 안정화시키고 환자에 심각한 해로운 독소 효과를 일으키지 않을 수 있는 성분이다. 이러한 보강제의 예는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 물, 당, 예컨대 말토스 또는 수크로스, 알부민, 염제 등을 들 수 있다. 다른 보강제는 예를 들어 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martin]에 기술되어 있다. 이러한 조성물은 유효량의 본원의 컨쥬게이트를, 호스트에 대한 효과적인 투여에 적합한 제약적으로 허용가능한 조성물을 제조하기 위한 적합한 양의 비히클과 함께 함유할 수 있다. 예를 들어, 컨쥬게이트는 출혈 경력의 심각도에 따라 변할 수 있는 용량으로 A형 혈우병을 앓는 대상에 비경구로 투여될 수 있다. 정맥내로 투여되는 평균 용량은 시술전 징후에 대해서는 40 단위/kg, 경증 출혈에 대해서는 15 내지 20 단위/kg 및 유지 용량을 위한 8시간 기간에 걸쳐 투여되는 20 내지 40 단위/kg의 범위이다.

[0060] 한 실시태양에서, 본 발명의 방법은 하나 이상의 표면 BDD 아미노산을 시스테인으로 대체하고, 포유동물의 발현 시스템에서 시스테인 류테인을 생성하고, 성장 배지로부터 시스테인에 의해 발현되는 동안 캡핑된 시스테인을 환원시키고, BDD 디술폰화이드를 재형성시키기 위해 환원제를 제거하고, 시스테인 특이적 생체적합성 중합체 반응물, 예컨대 PEG-말레이미드와 반응시키는 것을 포함한다. 이러한 반응물의 예는 넥타 셰라퓨틱스(Nektar Therapeutics; 미국 캘리포니아주 샌카를로스)로부터 각각 넥타 카탈로그 번호 2D2MOH01 mPEG-MAL MW 5,000 Da, 2D2MOP01 mPEG-MAL MW 20 kD, 2D3XOP01 mPEG2-MAL MW 40 kD로 입수가 가능한 5, 22 또는 43 kD와 같은 PEG 크기, 또는 노프 코포레이션(NOF Corporation, 일본 도쿄)으로부터 각각 노프 카탈로그 번호 선브라이트(Sunbright) ME-120MA 및 선브라이트 ME-300MA로 입수가 가능한 12 또는 33 kD와 같은 PEG 크기를 갖는 PEG-말레이미드이다. PEG화 생성물은 이온교환 크로마토그래피를 사용하여 정제되어 비반응된 PEG를 제거하고, 크기배제 크로마토그래피를 사용하여 비반응된 BDD를 제거한다. 이 방법은 임의의 바람직하지 않은 FVIII과의 상호작용, 예컨대 수용체 매개 제거, 억제 항체 결합 및 단백질분해효소에 의한 분해를 식별하고 선택적으로 막는데 사용될 수 있다. 본 발명자들은 넥타 또는 노프에 의해 5 kD로 공급되는 PEG 반응물은 본 발명자들의 실험에서 6 kD로 시험되었고, 유사하게 선형 20 kD로 공급된 PEG 반응물을 22 kD로 시험되었고, 40 kD로 공급된 것은 43 kD로 시험되었고, 60 kD로 공급된 것은 64 kD로 시험되었음을 유의하였다. 혼란을 피하기 위해, 본 발명자들이 제조업자가 확인한 바와 같이 5 kD로 기록된 5 kD PEG를 제외하고, 본 발명자들은 본원에서의 설명에서 본 발명자들의 실험에서 시험된 바와 같은 분자량을 사용한다.

[0061] BDD의 위치 419 및 1808에서의 시스테인 돌연변이 (상기에 개시됨) 이외에, 위치 487, 496, 504, 468, 1810, 1812, 1813, 1815, 1795, 1796, 1803 및 1804를 시스테인으로 돌연변이시켜서 PEG화했을 때 잠재적으로 LRP 결합의 차단을 가능케 하였다. 또한, 위치 377, 378 및 556을 시스테인으로 돌연변이시켜서 PEG화했을 때 LRP 및 HSPG 결합 모두의 차단을 가능케 하였다. 위치 81, 129, 422, 523, 570, 1864, 1911, 2091 및 2284를 BDD 상에서 동일하게 이격되도록 선택하여, 본래의 글리코실화 부위 (41, 239 및 2118) 및 LRP 결합 부위에서의 PEG화 함께 이들 위치에서 거대한 PEG (> 40 kD)를 이용한 부위 지향 PEG화가 BDD 표면을 완전히 덮고 BDD에 대한 새로운 제거 메카니즘을 식별하도록 하였다.

[0062] 한 실시태양에서, 세포 배양 배지는 디술폰화이드 결합을 형성하여 류테인 상에서의 시스테인 잔기를 "캡핑"하는 시스테인을 함유한다. 컨쥬게이트의 제조시, 제조합 시스템에서 생성된 시스테인 류테인은 배지로부터의 시스테인으로 캡핑되고, 이 캡은 시스테인 특이적 중합체 반응물을 첨가하기 전에 캡을 배출하는 온화한 환원에 의해 제거된다. FVIII의 부위 특이적 돌연변이에 대하여 당업계에 알려진 다른 방법 또한 사용될 수 있으며, 이는 당업자에게 명백할 것이다.

발명의 효과

[0063] 본 발명은 향상된 약물동태학적 특성 및 치료 특성을 갖는 생체적합성 중합체 컨쥬게이션된 관능성 FVIII 폴리펩티드를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0064] 도 1. PEG 류테인에 대한 벡터 맵 및 돌연변이 유발 전략.
- 도 2. 모노클로날 FVIII 항체 크로마토그래피 칼럼 상에서 정제된 PEG2 단백질에 대한, 시간에 대한 280 nm에서의 UV 흡수 프로파일. 크로마토그래피는 아머삼 바이오사이언스(Amersham Bioscience)로부터의 AKTA(등록상표) 익스플로러(Explorer) 100 크로마토그래피 시스템을 사용하여 수행되었다.
- 도 3. 3단계 부위 지향 PEG화 방법. PEG는 PEG-말레이미드와 같이 시스테인 반응성 PEG를 나타낸다. 폐쇄된 막대기는 디술폰화이드 형성을 나타내고, 열린 막대기는 환원된 시스테인을 나타낸다.
- 도 4. PEG2의 부위 지향 PEG화.
- 도 5. PEG6의 부위 지향 PEG화.
- 도 6a. BDD, PEG2, 4, 5 및 6의 부위 지향 PEG화. 위쪽 패널은 중쇄(H) 항체로 염색되었고, 아래쪽 패널은 경쇄(L) 항체로 염색되었다. "U"는 H 및 L 모두를 함유하는 처리되지 않은 물질이다.
- 도 6b. 대조군으로서의 PEG2 및 PEG6이 있는 PEG15 및 PEG7의 PEG화. 정제된 출발 PEG 류테인("S")은 TCEP로 환원되고, 환원제("R")의 제거 후 12 kD("12") 또는 22 kD("22") PEG로 PEG화된다. 샘플은 6% 트리스-글리신 SDS PAGE 상에서 실행되었고, 좌측 패널에서는 중쇄("HC") 항체로 또는 우측 패널에서는 경쇄("LC") 항체로 염

색되었다. "U"는 HC 및 LC 모두를 함유하는 처리되지 않은 물질이다. PEG화 밴드는 점들로 표시되어 있다.

도 6c. 대조군으로서의 PEG2 및 PEG6이 있는 PEG2+6의 PEG화. PEG2, PEG6 또는 PEG2+6은 TCEP로 환원되고, 환원제("R")의 제거 후 5 kD("5") 또는 43 kD("43") PEG로 PEG화된다. 또한, PEG2+6은 12, 22 및 33 kD PEG로 PEG화된다. 샘플은 6% 트리스-글리신 SDS PAGE 상에서 실행되었고, 좌측 상의 단백질에 대해서는 쿠마시로, 또는 중쇄(H) 또는 경쇄(L) 항체로 염색되었다. "U"는 H 및 L 모두를 함유하는 처리되지 않은 물질이다. PEG화 밴드는 점들로 표시되어 있다.

도 6d. 대조군으로서 PEG2가 있는 전체 길이의 야생형 FVIII (KG-2)의 PEG화. 좌측 겔은 단백질에 대한 쿠마시 염료로 염색되었고, 우측 겔은 PEG에 대한 요오드로 염색되었다. "BDD U"는 H 및 L 모두를 함유하는 처리되지 않은 BDD 물질이다. PEG화 밴드는 점들로 표시되어 있다.

도 7. PEG화된 PEG2의 트롬빈 절단. A2 도메인의 N-말단 절반부는 청색으로 C-말단 절반부는 녹색으로 착색되었으며, R8B12 항체 에피토프는 암녹색으로 표시되어 있다(우측 FVIII 모델). PEG2 (1번 레인) 및 22 kD PEG화 PEG2 (2번 레인)는 트롬빈으로 처리되었고(각각 3번 및 4번 레인), 그 후 7% 트리스-아세테이트 겔(인비트로젠) 상에서 실행되었고, R8B12 항체로 염색되었다. 각각의 레인은 약 50 ng의 FVIII를 함유한다.

도 8. 전체 길이의 PEG화된 야생형 FVIII (KG-2)의 트롬빈 절단. "S" = 출발 KG-2 물질. "R" = 환원된 KG-2 및 제거된 환원제. "P" = 43 kD PEG로 PEG화된 "R". "순수" = 과량의 PEG로부터 정제된 "P". "L" = 경쇄. PEG화 밴드는 점들로 표시되어 있다.

도 9. PEG화 PEG2의 요오드 염색. 22 또는 43 kD PEG화 PEG2를 6% 트리스글리신 겔 상에서 실행하고, R8B12 FVIII 항체 (1번 및 2번 레인) 또는 요오드 (3번 및 4번 레인)로 염색하였다. 2가지 염료는 이의 분자량 마커 레인에 따라 정렬되었다. 1번 및 2번 레인 각각은 약 30 ng의 FVIII를 함유하고, 3번 및 4번 레인은 약 2 μ g를 함유한다.

도 10. PEG화 및 비PEG화 PEG2의 MALDI 질량 분석법에 의한 분석. MALDI 질량 분석을 PEG2 (도 10a) 또는 22 kD PEG화 PEG2 (도 10b) 상에서 수행하였다. PEG화된 때, PEG2의 중쇄(H) 피크는 크게 감소되고, 111 kD에 중심을 둔 (22 kD PEG + 89 kD 중쇄) 새로운 피크(H+PEG)가 나타난다. 100 kD (22 kD PEG + 83 kD 경쇄)에 중심을 둔 것으로 예상되는 PEG화 경쇄(L) 피크는 탐지되지 않는다.

도 11. 트롬빈 절단 후의 PEG화 및 비PEG화 PEG2의 MALDI 질량 분석법에 의한 분석.

도 12. 트롬빈 절단 전후의 PEG화 PEG6의 MALDI 질량 분석법에 의한 분석.

도 13. 크기배제 칼럼 상에서 정제된 PEG화 PEG2의 280 nm에서의 UV 흡수 프로파일.

도 14. 양이온교환 칼럼 상에서 정제된 PEG화 및 비PEG화 PEG6의 280 nm에서의 UV 흡수 프로파일.

도 15. 크기배제 칼럼 상에서 정제된 PEG화 및 비PEG화 PEG6의 280 nm에서의 UV 흡수 프로파일.

도 16. 발색 분석 및 응고 분석에 의해 측정되어 PEG화 단백질의 활성을 비PEG화 단백질의 활성과 대비하고 있다. 정제된 전체 길이의 FVIII는 KG-2로 나타나 있다. 기록된 %활성은 환원 및 환원제 제거 후에 PEG로 처리된 샘플 값을 PEG화 수율을 고려한 버퍼 대조군으로 처리된 샘플 값으로 나누어 측정되었다.

도 17. PEG2와 대비한 PEG화 PEG2의 토끼 PK 연구.

도 18. BDD 및 PEG2와 대비한 PEG화 PEG2의 토끼 PK 연구. P-값은 PEG화 PEG2 및 BDD 간의 대비치이다.

도 19. BDD 및 PEG6와 대비한 PEG화 PEG6의 토끼 PK 연구.

도 20. 변형되지 않은 전체 길이의("f1") FVIII와 대비한 전체 길이의 PEG화된 야생형 FVIII의 토끼 PK 연구.

도 21. PEG6 및 BDD와 대비한 PEG화 PEG6의 혈우병 마우스 PK 연구.

도 22. BDD와 대비한 22 및 43 kD PEG화 PEG2의 정상 마우스 PK 연구.

도 23. 전체 시간 과정에서 BDD와 대비한 22 kD PEG화 PEG2의 정상 마우스 PK 연구.

도 24. 혈우병 마우스 분석에서 2종의 BDD 제VIII 인자의 반감기의 약물동태학적 평가를 나타내는 혈우병 마우스(BDD) 제VIII 인자 회복 막대그래프.

도 25. BDD와 대비한 22 kD PEG화 PEG2의 혈우병 마우스 신장 열상 연구. 비히클 처리 마우스는 25 μ l/g(체

중)의 혈액 손실을 갖는다.

도 26. 증가량의 FVIII 항체의 존재 하에서의 PEG화 PEG2 및 BDD의 발색 활성. 항체 에피토프는 팔호에 나타나 있다.

도 27. 증가량의 FVIII mAB 413 항체의 존재 하에서의 PEG화 PEG2의 발색 활성.

도 28. FVIII에 대한 발달된 억제제를 갖는 환자로부터 유도된 인간 혈장에 존재하는 BDD, 43 kD PEG화 PEG2, 33 kD PEG화 PEG6, 및 33 kD 디PEG(diPEG)화 PEG2+6의 발색 활성. 억제제 역가 및 혈액 수집 일자는 상부에 기록되어 있다. 위의 두개의 패널은 5 내지 405배의 환자 혈장 희석에서 수집되었다. 아래에서 왼쪽 패널은 환자의 HRF-828 혈장에 대해 1:15배 희석에 초점을 맞춘 것이다. 아래에서 오른쪽 패널은 위의 두개의 패널 중 각각의 FVIII 샘플에 사용된 0.064 IU/mL가 포화 용량이 아니었음을 확인하게 한다.

도 29. PEG화 스크리닝 방법 및 확인. 위쪽 패널은 일시적으로 발현된 PEG 뮤테인의 PEG화 스크리닝을 개략적으로 나타낸다. 아래쪽 패널은 중쇄("H") 특이적 항체(왼쪽) 또는 경쇄("L") 특이적 항체(오른쪽)를 사용하는 PEG화 생성물의 웨스턴 분석을 나타낸다. PEG화 밴드는 점들로 표시되어 있다. "U"는 H 및 L을 모두 함유하는 처리되지 않은 물질이다.

도 30. PEG 15-17의 PEG화 스크리닝. 중쇄("H") 특이적 항체 (R8B12 및 58.12) 또는 경쇄("L") 특이적 항체 (C7F7 및 GM)를 사용하는 PEG화 생성물의 웨스턴 분석. 모든 3가지 뮤테인이 PEG15~PEG16>PEG17의 상대적인 PEG화 효율로 중쇄에 대해 선택적이다. PEG화 밴드는 점들로 표시되어 있다. "U"는 H 및 L을 모두 함유하는 처리되지 않은 물질이다.

도 31. 환원제 농도의 함수로 PEG2+14의 PEG화를 나타내는 겔. PEG2+14를 4℃에서 30분 동안 67 내지 670 μ M의 TCEP로 처리하였다. 환원제를 스핀 칼럼에 의해 제거한 후, 12 kD PEG로 PEG화하였다. 중쇄 및 경쇄 FVIII를 각각 "H" 및 "L"로 표시하였다. 2개의 점들은 PEG화된 중쇄 및 경쇄를 나타낸다.

도 32. 67 내지 670 μ M의 TCEP로 처리한 후 환원제를 제거한 PEG2+14의 역콘볼루션(deconvolution)된 질량 스펙트럼.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

FVIII의 구조 활성 관계 분석. FVIII 및 BDD FVIII는 생물학적 반응에 관련된 다수의 상이한 부위를 갖는 매우 거대한 복합 분자이다. 이들을 공유적으로 변형하여 약물동태학적 특성을 향상시키고자 하는 이전의 시도들은 여러 결과를 나타냈다. 이 분자들은 특이적으로 변형된 후 중합체가 부위 특이적인 방식으로 부가될 수 있었던 점은 놀라웠다. 게다가, 이전의 중합체 컨쥬게이트가 비특이적인 부가 및 감소된 활성을 일으키는 문제가 있었다는 점을 고려하면, 향상된 약물동태학적 특성 및 유지된 활성의 결과 또한 놀라웠다.

한 실시태양에서, 본 발명은 PEG-말레이미드와 같은 시스테인 특이적 리간드를 사용한 부위 지향 돌연변이 발생에 관한 것이다. 비돌연변이된 BDD는 PEG-말레이미드와 반응할 수 있는 임의의 이용가능한 시스테인을 갖지 않으며, 따라서 돌연변이된 시스테인 위치만이 PEG화 부위일 수 있다. 보다 구체적으로, BDD FVIII는 19개 시스테인을 가지며, 이 중 16개는 디설파이드를 형성하고, 이 중 다른 3개는 자유 시스테인이다(문헌 [McMullen et al., 1995, Protein Sci. 4, pp. 740-746]). BDD의 구조적인 모델은 모든 3개의 자유 시스테인이 숨겨지는 것을 제안한다(문헌 [Stoliová-McPhie et al., 2002, Blood 99, pp. 1215-1223]). 산화된 시스테인이 PEG-말레이미드에 의해 PEG화될 수 없기 때문에, BDD에서 디설파이드를 형성하는 16개의 시스테인은 먼저 환원되지 않으면 PEG화될 수 없다. BDD의 구조적인 모델에 기초하여, BDD 중 3개의 자유 시스테인은, 이들 시스테인을 PEG 반응물에 노출시키기 위해 단백질을 먼저 변형시키지 않으면, PEG화될 수 없다. 따라서, 이의 기능을 거의 대부분 파괴할 수 있는 BDD 구조를 극적으로 변화시키지 않으면, 본래의 시스테인 잔기에서 PEG화에 의해 BDD의 특이적 PEG화를 달성하는 것이 실행가능한 것으로 보이지 않는다.

전체 길이의 FVIII의 B 도메인 중 4개의 시스테인의 산화환원 상태는 알려져 있지 않다. B 도메인 중 4개의 시스테인의 PEG화는, 이들이 디설파이드를 형성하지 않고 표면 노출되어 있다면, 가능할 수 있다. 그러나, 전체 길이의 FVIII 및 BDD는 유사한 약물동태학(PK) 프로파일 및 유사한 생체내 반감기를 갖기 때문에(문헌 [Gruppo et al., 2003, Haemophilia 9, pp. 251-260]), B 도메인 PEG화는, PEG가 B 도메인이 아닌 영역 또한 보호하게 되지 않는다면, 향상된 혈장 반감기를 야기하지 않을 것이다.

- [0069] 제VIII 인자 활성을 유지하고 약물동태학적 특성을 향상시킬 수 있는 중합체 부착을 위한 FVIII 활성을 갖는 폴리펩티드 상의 소정의 부위를 결정하기 위해, 이하의 가이드라인이 BDD FVIII에 기초하여 제공된다. 변형은 LRP, HSPG, APC 및 억제 항체 결합 부위와 같은 제거, 불활성 및 면역원성 메카니즘을 대상으로 하여야 한다. 문헌 [Stoilova-McPhie. S. et al., 2002, Blood 99(4), pp. 1215-23]는 BDD의 구조를 나타낸다. 예를 들어, 반감기를 연장하기 위해, 단일 PEG가 A2 잔기 484-509 및 A3 잔기 1811-1818에서 LRP 결합 부위 또는 그 부근의 특이적인 위치에 도입될 수 있다. 이들 부위에서 거대한 PEG의 도입이 LRP를 결합시키는 FVIII의 능력을 붕괴시키고, 순환으로부터의 FVIII의 제거를 감소시켜야 한다. 또한, 활성에 심각하게 영향을 끼치지 않으면서 반감기를 연장시키기 위해, PEG가 잔기 1648 위치에 도입될 수 있으며, 이는 전체 길이의 분자 중 그리고 A2 및 A3 도메인 사이의 BDD의 14 아미노산 중의 B 도메인 및 A3 도메인의 접합이다.
- [0070] PEG화의 특이성은 재조합 DNA 돌연변이 유발 기술을 사용하여 A2 또는 A3 도메인 내로 단일 시스테인 잔기를 처리한 후, PEG-말레이미드와 같은 시스테인 특이적인 PEG 반응물로 도입된 시스테인의 부위 특이적 PEG화를 시켜서 달성될 수 있다. 484-509 및 1811-1818에서의 PEG화의 또다른 장점은 이들 2개의 에피토프가 환자의 억제 항원 부위 중 3개의 주요군 중 2개를 나타낸다는 것이다. 향상된 순환 반감기 및 면역원성 반응의 감소의 최대 효과를 달성하기 위해, A2 및 A3 LRP 결합 부위 모두가 PEG화되어 디PEG화 생성물을 산출할 수 있다. 1811-1818 영역 내에서의 PEG화는, 이 영역 또한 FIX 결합에 관련되기 때문에, 활성의 심각한 손실을 일으킬 수 있음을 유의하여야 한다. 558-565 내에서의 부위 지향 PEG화는 HSPG 결합을 파괴하여야 하지만, 이 영역 또한 FIX에 결합하기 때문에 활성도 감소시킬 수 있다.
- [0071] 추가적인 표면 부위가 FVIII의 새로운 제거 메카니즘을 식별하기 위해 PEG화될 수 있다. A2 도메인의 PEG화는 A2 도메인이 활성화되면 FVIII로부터 해리되고 순환으로부터 이의 보다 작은 크기로 인하여 FVIII 분자의 다른 것보다 빠르게 제거될 수 있다는 추가의 장점을 제공할 수 있다. 다르게는, PEG화 A2는 신장 제거를 피할 수 있도록 충분히 크고 FVIII의 나머지에 비해 상당한 혈장 반감기를 가지므로, 생체내에서 활성화 FVIII를 재구성할 수 있다.
- [0072] A2 및 A3 영역에서 PEG화 부위의 식별. 잠정 A2 LRP 결합 영역 또는 그 부근의 5개의 위치(PEG 1-5 위치에 대응하는 Y487, L491, K496, L504 및 Q468)는 이들의 C α 에서 C β 케도로의 외부 방향 및 높은 표면 노출에 기초하여 부위 지향 PEG화에 대한 예로 선택되었다. 게다가, 이들 잔기는 분자의 3차원 구조에서 서로 개략적으로 등거리에 있어서, 이들 모두 이의 전체 영역을 나타낼 수 있다. 잠정 A3 LRP 결합 영역 또는 그 부근의 8개의 위치(PEG6-14에 대응하는 1808, 1810, 1812, 1813, 1815, 1795, 1796, 1803, 1804)는 부위 지향 PEG화에 대한 예로 선택되었다. PEG6(K1808)은 1811-1818 및 1810에서의 천연 N-연결 글리코실화 부위 주위에 있다. 위치 1810(PEG7)에서의 PEG화는 당을 PEG로 대체할 수 있다. PEG8 위치 T1812에서의 돌연변이 또한 글리코실화 부위를 파괴할 수 있다. PEG9 위치(K1813)가 내부를 겨냥하는 것으로 예측되지만, 구조 모델이 정확하지 않은 경우 선택되었다. PEG 10(Y1815)는 LRP 결합 루프 내에서 거대한 소수성 아미노산이고, 소수성 아미노산이 전형적으로 단백질-단백질 상호작용의 중심에서 발견되기 때문에, 중요한 상호작용 잔기일 수 있다. 1811-1818 영역이 LRP 및 FIX 결합 모두에 관련되어 있다고 보고되었기 때문에, 이 루프 내에서의 PEG화는 감소된 활성을 야기할 수 있는 것으로 고려되었다. 따라서, PEG11-PEG14(1795, 1796, 1803, 1804)는 1811-1818 루프 부근에 있지만 이 루프 내에 있지 않도록 디자인되어서 상이한 PEG 크기를 갖는 LRP 및 FIX 결합을 해리할 수 있게 한다.
- [0073] LRP 결합 부위들을 동시에 차단하기 위해, 예를 들어 PEG2 및 PEG6 위치에서의 이중 PEG화를 생성할 수 있다.
- [0074] 558-565 영역이 HSPG 및 FIX 모두에 결합하는 것으로 나타났으므로, 어떠한 부위도 이 영역 내로 디자인되지 않았다. 대신에, PEG15-PEG17(377, 378 및 556)은 A2 LRP 및 HSPG 결합 영역 사이로 디자인되어서, 부착된 PEG가 양쪽의 상호작용을 간섭하고 이들 사이의 가능한 상호작용을 붕괴시킬 수 있다. 표면 노출되어 있고 외부를 겨냥하는 추가의 부위 또한 LRP 및 HSPG 결합 영역 내 또는 그 부근에서 선택될 수 있다. 새로운 제거 메카니즘을 식별하기 위해, FVIII는 계통적으로 PEG화될 수 있다. PEG1-17에 더하여, 3가지 다른 천연 글리코실화 부위, 즉 PEG18-20에 대응하는 N41, N239 및 N2118가, 이들이 표면 노출되어야 하므로, PEG화에 대한 구속점으로서 사용될 수 있다. PEG2, PEG6 및 4개의 글리코실화 부위의 C β 원자로부터 20 Å 반경 이내의 표면 구역이, vWF, FIX, FX, 인지질 및 트롬빈에 대한 관능성 상호작용 부위에 더하여, BDD 모델 상으로 맵핑되었다.
- [0075] 그 다음에, Y81, F129, K422, K523, K570, N1864, T1911, Q2091 및 Q2284에 대응하는 PEG21-29가, 이들의 C β 원자 각각으로부터 20 Å 반경을 갖는 전체 잔여 BDD 표면을 거의 뒤덮을 수 있는 이들의 능력에 기초하여 선택되었다. 또한, 이들 위치는, 이들이 전체적으로 노출되고, 외부를 겨냥하고, 가능한 부정확한 디스파이드 형성을 최소화하기 위해 천연 시스테인으로부터 이격되어 있기 때문에, 선택되었다. 20 Å 반경은, 거대한 PEG, 예

컨대 64 kD 분자 PEG가 약 20 Å 반경을 갖는 구체를 뒤덮을 수 있는 능력을 갖는 것으로 기대되기 때문에, 선택된다. 글리코실화 부위 PEG18, 19 및 20 및 PEG2 및 PEG6와 PEG21-29의 PEG화는 FVIII의 전체의 비관능화 표면을 거의 보호할 수 있다.

[0076] 향상된 PK 프로파일, 더 높은 안정성 또는 감소된 면역원성과 같은 증강된 특성을 유도하는 PEG화 위치들은 조합되어 최대 증강된 특성을 갖는 다중 PEG화 생성물을 생성할 수 있다. PEG30 및 PEG31은 A2 및 A3 도메인에 각각 노출된 디설파이드를 제거하여 디자인되었다. PEG30 또는 C630A는 PEG화를 위한 이의 디설파이드 파트너인 C711을 자유롭게 해야 한다. 유사하게, PEG31, C1899A는 C1903을 PEG화하게 해야 한다.

[0077] 돌연변이 발생. FVIII의 부위 지향 PEG화를 위한 기질은 PEG화를 위해 선택된 부위에서 시스테인 코돈을 도입하여 생성될 수 있다. 스트라타진 씨퀵체인지 II 부위 지향 돌연변이 발생 키트를 사용하여 모든 PEG 돌연변이를 만들었다(스트라타진 코포레이션(미국 캘리포니아주 라졸라)으로부터의 스트라타진 키트 200523). 씨퀵체인지 부위 지향 돌연변이 발생 방법은 푸 터보(Pfu Turbo)(등록상표) DNA 중합효소 및 온도 순환기를 사용하여 수행된다. 바람직한 돌연변이를 함유하는 2개의 우수한 올리고뉴클레오타이드 프라이머를, 프라이머를 치환하지 않는 푸 터보를 사용하여 연장시킨다. 야생형 FVIII 유전자를 함유하는 dsDNA는 주형으로서 사용된다. 다수 연장 사이클 이후, 생성물은 메틸화 DNA에 특이적인 DpnI 핵속핵산분해효소로 소화된다. 돌연변이를 함유하는 새로이 합성된 DNA는 메틸화되지 않지만, 모체 야생형 DNA는 메틸화되어 있다. 그 다음에, 소화된 DNA를 사용하여 XL-1 블루 초적격세포를 형질전환시킨다.

[0078] 돌연변이 발생 효율은 거의 80%이다. 돌연변이 발생 반응은 pSK207+BDD C2.6 또는 pSK207+BDD에서 수행되었다(도 1). 성공적인 돌연변이 발생이 DNA 서열분석에 의해 확인되었고, 돌연변이를 함유하는 적절한 분획을 포유동물 발현 벡터 pSS207+BDD 중의 FVIII 골격 내로 전달하였다. 전달 후, 모든 돌연변이에 대해 다시 서열을 확인하였다. A3 뮤테인 PEG 6, 7, 8, 9 및 10에 대해, 돌연변이 발생을 벡터 pSK207+BDD C2.6에서 수행하였다. 서열분석에 의해 확인한 후, 돌연변이 분획 KpnI/Pme을 pSK207+BDD 내로 서브클로닝하였다. 그 다음에, BDD 뮤테인을 pSS207+BDD 발현 벡터 내로 서브클로닝하였다. A3 뮤테인 PEG 11, 12, 13, 14에 대해, 돌연변이 발생을 직접 벡터 pSK207+BDD에서 수행하였고, 그 다음에 서열 확인된 돌연변이 BDD를 pSS207+BDD 내로 서브클로닝하였다. A2 뮤테인 PEG 1, 2, 3, 4, 5에 대해, 돌연변이 발생을 pSK207+ BDD C2.6 벡터에서 수행하였다. 서열 확인된 돌연변이를 pSK207+BDD 내로 서브클로닝한 후, pSS207+BDD로 서브클로닝하였다.

[0079] 돌연변이 발생을 위해 사용된 프라이머(인식된 것만)가 각각의 반응에 대하여 열거되어 있음:

PEG1, Y487C: GATGTCCGTCCTTTGTGCTCAAGGAGATTACCA (서열 번호:5)

PEG2, L491C: TTGTATTCAAGGAGATGCCCAAAAGGTGTAAAAC (서열 번호:6)

PEG3, K498C: TTACCAAAAGGTGTATGCCATTTGAAGGATTTTC (서열 번호:7)

PEG4, L504C: AAGGATTTTCCAATTTGCCAGGAGAAATATTC (서열 번호:8)

PEG5, Q468C: GATTATATTTAAGAATTGCGCAAGCAGACCATAT (서열 번호:9)

PEG6, K1808C: TAGAAAAAAGCTTTGTCTGCCCTAATGAAACCAAAAC (서열 번호:10)

PEG7, N1810C: AACTTTGTCAAGCCTTGCGAAACCAAACTTAC (서열 번호:11)

PEG8, T1812C: GTCAAGCCTAATGAATGCAAACTTACTTTTGGA (서열 번호:12)

PEG9, K1813C: CAAGCCTAATGAAACCTGCACTTACTTTTGGAAG (서열 번호:13)

PEG10, Y1815C: CTAATGAAACCAAACTTGCTTTTGAAAGTGCAAC (서열 번호:14)

PEG11, D1795C: ATTTCTTATGAGGAATGCCAGAGGCAAGGAGCA (서열 번호:15)

PEG12, Q1796C: TCTTATGAGGAAGATTGCAGGCAAGGAGCAGAA (서열 번호:16)

PEG13, R1803C: CAAGGAGCAGAACCTTGCAAAACTTTGTCAAGCCT (서열 번호:17)

PEG14, K1804C: GGAGCAGAACCTAGATGCAACTTTGTCAAGCCT (서열 번호:18)

PEG15, K377C: CGCTCAGTTGCCAAGTGTCTCCTAAAACCTTGG (서열 번호:19)

PEG16, H378C: TCAGTTGCCAAGAAGTGTCTAAAACCTTGGGTA (서열 번호:20)

[0080]

PEG17, K558C: CTCCTCATCTGCTACTGCGAATCTGTAGATCAA (서열 번호:21)

PEG18, N41C: CAAAATCTTTTCCATTCTGCACCTCAGTCGTGTAC (서열 번호:22)

PEG19, N239C: GTCAATGGTTATGTATGCAGGTCTCTGCCAGGT (서열 번호:23)

PEG20, N2118C: CAGACTTATCGAGGATGTTCCACTGGAACCTTA (서열 번호:24)

PEG21, Y81C: ATCCAGGCTGAGGTTTGTGATACAGTGGTCATT (서열 번호:25)

PEG22, F129C: GAAGATGATAAAGTCTGCTCGGTGGAAGCCAT (서열 번호:26)

PEG23, K422C: CAGCGGATTGGTAGGTGTACAAAAAGTCCGA (서열 번호:27)

PEG24, K523C: GAAGATGGGCCAACTTGCTCAGATCCTCGGTGC (서열 번호:28)

PEG25, K570C: CAGATAATGTCAGACTGCAGGAATGTCATCCTG (서열 번호:29)

PEG26, N1864C: CACACTAACACACTGTGCTCCTGCTCATGGGAGA (서열 번호:30)

PEG27, T1911C, CAGATGGAAGATCCCTGCTTTAAAGAGAATTAT (서열 번호:31)

PEG28, Q2091C: ACCCAGGGTGCCCGTTGCAAGTTCTCCAGCCTC (서열 번호:32)

PEG29, Q2284C: AAAGTAAAGGTTTTTTCGGGAAATCAAGACTCC (서열 번호:33)

PEG30, C630A: TTGCAGTTGTGAGTTGCTTTGCATGAGGTGGCA (서열 번호:34)

PEG31, C1899A: AATATGGAAAGAAACGCTAGGGCTCCCTGCAAT (서열 번호:35)

[0081]

[0082]

뮤테인 발현. 하이그로마이신 B에 대한 내성을 부여하는 벡터에 삽입한 후, PEG 뮤테인을 제조업자의 지시에 따라 293 팩틴 트랜스펙션 리에전트(Fectin Transfection Reagent)(인비트로젠 코프(Invitrogen Corp.) Cat#12347-019)로 복합화된 HKB11 세포(미국 특허 6,136,599) 내로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 후 3일에서의 FVIII 발현을 코우테스트(Coatest) 발색 분석(크로모제닉스 코프(Chromogenix Corp.) Cat#821033, 실시예 12 발색 분석 참조)에 의해 분석하였다 (표 1). 그 다음에 트랜스펙션된 세포를 5% FBS로 보충된 성장 배지에 Hyg B의 50 μ g/ml와 함께 선택적인 압력 하에 위치시켰다. Hyg B-내성 세포군이 나타났을 때, 이들을 손으로 집어내어 코우테스트 발색 분석에 의해 FVIII 발현에 대해 스크리닝하였다. 그 다음에, FVIII 발현 안정 세포를 HPPS 보충물을 함유하는 배지에 적합하게 하였다. 세포를 새로운 배지를 갖는 혼합 플라스크에 1×10^6 세포/ml에서 확장시키고 시딩하였다. 3일 후 얻은 조직 배양액(TCF)을 FVIII BDD 뮤테인의 정제에 사용하였다. TCF의 FVIII 활성을 코우테스트에 의해 분석하였다(표 1).

표 1

PEG 뮤테인가의 요약

돌연변이	뮤테인 ID	역가 (IU/ml)	
		과도기	안정 세포
Y487C	PEG1	0.07	N/A
L491C	PEG2	0.60	1.96
K496C	PEG3	0.45	N/A
L504C	PEG4	0.38	5.57
Q468C	PEG5	0.69	8.14
K1808C	PEG6	0.54	2.73
N1810C	PEG7	0.21	0.5
T1812C	PEG8	0.16	N/A
K1813C	PEG9	0.35	7.74
Y1815C	PEG10	0.09	N/A
D1795C	PEG11	0.27	N/A
Q1796C	PEG12	0.29	N/A
R1803C	PEG13	0.11	N/A
K1804C	PEG14	0.18	1.14
L491C/K1808C	PEG2+6	0.11	2.48
L491C/K1804C	PEG2+14	0.13	7.19
K377C	PEG15	0.11	12.58
H378C	PEG16	0.15	0.97
K556C	PEG17	0.09	0.15
N41C	PEG18	0.05	N/A
N239C	PEG19	0.16	N/A
N2118C	PEG20	0.13	N/A
Y81C	PEG21	0.36	N/A
F129C	PEG22	0.25	2.55
K422C	PEG23	0.28	N/A
K523C	PEG24	<0.05	N/A
K570C	PEG25	<0.05	N/A
N1864C	PEG26	0.15	N/A
T1911C	PEG27	0.28	N/A
Q2091C	PEG28	0.20	N/A
Q2284C	PEG29	0.17	N/A
C630A	PEG30	<0.05	0.20
C1899A	PEG31	0.30	1.80

과도기 및 안정 트랜스팩션 에서 PEG 뮤테인의 발현 수준

[0083]

[0084]

뮤테인 정제. 선택된 뮤테인 FVIII 단백질을 함유하는 세포 배양 상청액을 수집할 때, 상청액을 임의의 잔류 세포를 제거하기 위해 0.2 μ m 막 필터를 통해 여과시킨다. 그 다음에, 상청액을 초미세여과 또는 이온교환에 의해 농축시킨다. 그 다음에, 세포 배양 배지 성분 및 다수의 호스트 세포 단백질 불순물이 제거되는 면역친화 칼럼으로 적용된다. 그 다음에, 면역친화 칼럼 용출물이 수크로스 및 냉동물을 함유하는 제제 버퍼 내로의 여과에 의해 버퍼 교환된다. 모노클로날 FVIII 항체 칼럼에 걸친 단백질의 수율 및 회복률을 발색 분석에 의해 평가하였다. 하중, 관류, 다양한 용출 분획, 스트립 및 크로마토그래피 실행의 여과된 용출물의 샘플을 FVIII 활성에 대해 평가하였다(표 2). 표 2는 모노클로날 항체 칼럼으로부터의 PEG2 뮤테인의 회복률을 나타낸다. 항체는 C7F7 항체이다. 표 2에서 %회복률은 발색 분석에 의해 결정되었다. 최종 수율은 73%였다. 도 2에 모노클로날 FVIII 항체 크로마토그래피 칼럼에서 정제된 PEG2 단백질에 대한 시간에 대한 280 nm에서의 UV 흡수도의 플롯을 나타내었다. 크로마토그래피를 아머삼 바이오사이언스로부터의 AKTA(등록상표) 익스플로러 100 크로마토그래피 시스템을 사용하여 수행하였다. 이 기기는 다중 파장 UV-가시광 모니터 및 2 mm 유동 세포를 사용한다. PEG2 뮤테인을 고염의 존재 하에 칼럼으로부터 용출시키고, 용출 피크를 280 nm에서의 흡수도 및 FVIII 활성 분석 모두에 의해 나타내었다.

표 2

단계	% 외분할
C7F7 하중	100
C7F7 관류	1.1
C7F7 세척	0.2
C7F7 용출물	88
C7F7 스트림	0.0
UF/DF 이후	73

[0085]

[0086]

PEG화. 천연의 전체 길이의 FVIII 또는 BDD는 100배가 넘는 과량의 PEG:단백질 비(데이타는 나타내지 않음)에서의 환원 및 변성 없이 시스테인 특이적 PEG에 의해 PEG화될 수 없으며, 이는 모든 천연 시스테인이 디설파이드를 형성하거나 또는 FVIII 내에 숨겨지는 BDD 구조 모델에 기초한 가설을 확인시킨다. 상기 열거된 표준 프로토콜을 사용하여 발현되고 정제된 FVIII 시스테인 뮤테인은 시스테인 특이적 PEG 말레이미드 반응물로 PEG화될 수 없었으며, 이는 도입된 FVIII 시스테인이 세포 성장 배지에 존재하는 시스테인 및 β -머캅토에탄올과 같은 술포히드릴기와 반응하여 "캡핑"되기 때문으로 추정된다. 이 조직은 배양 배지로부터 시스테인 및 β -머캅토에탄올을 제거하여 잠재적으로 용해될 수 있지만, 이는 더 낮은 FVIII 생성을 유발하고, 도입된 FVIII 시스테인을 차단하는 것으로부터 세포에 의해 배출되는 술포히드릴을 막을 수는 없다.

[0087]

본 발명의 또다른 측면에서, 3단계 방법이 FVIII의 부위 특이적 PEG화를 하는데 개발되었다(도 3). 단계 1에서, 약 1 μ M에서 정제된 FVIII 시스테인 뮤테인이 약 0.7 mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP) 또는 0.07 mM 디티오프레이톨(DTT)과 같은 환원제로 4°C에서 30분 동안 서서히 환원되어 "캡"을 배출한다. 단계 2에서, 환원제가 샘플을 스핀 칼럼(바이오래드(BioRad)(등록상표))을 통해 실행하는 것과 같은 크기배제 크로마토그래피(SEC) 방법에 의해 "캡"과 함께 제거되어, 도입된 시스테인을 유리되게 그리고 감소되도록 하는 동안 FVIII 디설파이드를 재형성시킬 수 있다. 단계 3에서, 환원제의 제거 후 30분 이상 유리된 FVIII 시스테인 뮤테인을 4°C에서 1 시간 이상 동안 5 내지 64 kD의 크기를 갖는 10배 이상의 몰과량의 PEG 말레이미드(벡타 셰라퓨틱스 및 노프 코포레이션)로 처리하였다. 이 방법은 상이한 개체에 의해 반복되는 다수의 반응에서 재현가능한 데이타를 갖는 매우 일관적인 생성물 프로파일을 산출한다.

[0088]

TCEP의 제거를 위한 스핀 칼럼 방법은 측정할 수 있지 않기 때문에, 겔 여과 탈염 크로마토그래피를 선택하였다. 그러나, TCEP 스파이크 샘플을 사용하는 이 방법으로 시험하는 경우, TCEP가 칼럼 공간에서 측정 가능한 수준에서 용출되고, 이의 저분자량을 갖는 분자로부터 기대되는 것과 같은 염 분획에서는 용출되지 않았다. 웨스턴 블롯 분석은 아마 TCEP의 불완전한 제거로 인하여 심각한 배경 PEG화를 나타냈다. 그런데, 다른 실험은 C7F7 정제 물질이 염 구배를 갖는 음이온교환 크로마토그래피 배지를 사용하여 다른 단백질 불순물로부터 더 현저하게 정제될 수 있음을 나타냈다. 그 다음에, 상기에 기술된 바와 같이 TCEP로 C7F7 물질을 환원시킨 후 음이온교환 칼럼 상에서 이 물질을 처리하는 것으로 결정하였다. 전하의 차이로 인하여, FVIII 단백질은 TCEP가 칼럼을 관류하고 유지되지 않는 동안 유지될 수 있었다. 염 구배 용출과 동시에 FVIII 단백질을 대다수의 잔류 단백질 불순물로부터 정제하여 제거할 수 있었다. 이는 이후 발생하는 PEG화가 더 순수한 출발 물질을 갖는 이론적으로 보다 균일한 것이라는 점을 의미하였다. 그러나, TCEP의 스파이크 샘플로 시험한 경우, 측정 가능한 수준의 TCEP는 FVIII를 갖는 구배에서 용출되는 것이 발견되었음을 나타냈다. 따라서, 음이온교환 크로마토그래피 이후의 겔 여과 탈염 크로마토그래피를 실시하도록 결정하여, 순차적으로 사용하는 경우 이 2단계가 완전한 TCEP의 제거 및 비특이적 PEG화의 제거를 나타낼 수 있었다.

[0089]

SDS PAGE 및 웨스턴 블롯에 의한 PEG화 분석. PEG화 생성물을 환원 6% 트리스글리신 SDS 폴리아크릴아미드 겔(인비트로젠) 상에서의 전기영동에 의해 분석할 수 있다. 전기영동 이후, 겔을 쿠마시 블루(Coomassie Blue)로 염색하여 모든 단백질을 식별하거나 또는 표준 웨스턴 블롯 프로토콜을 수행하여 FVIII의 상이한 영역 상의 PEG화 패턴을 식별할 수 있다. FVIII 중쇄의 C-말단 영역 또는 VIII 경쇄의 N-말단 영역 각각에 수행한 마우스 모노클로날 R8B12 또는 C7F7 항체를 사용한 블롯의 염색은 각각의 쇄의 PEG화를 식별하여야 한다. FVIII의 484-509 영역에 대한 413 항체를 사용한 염색은 PEG화가 실제로 비특이적이거나 또는 PEG1-4와 같은 뮤테인에 대한 것이 아닌지 여부를 결정할 수 있다. 유사하게, FVIII의 1801-1823 영역을 인식하는 CLB-CaA 항체를 사용한 염색은 PEG화가 부위 특이적인지 또는 PEG6-10과 같은 뮤테인에 대한 것이 아닌지 여부를 결정할 수 있다.

[0090]

PEG2 (L491C) PEG화는 경쇄에 비해 중쇄에 선택적이고, 특히 484-509 영역에 대해 선택적임을 나타내었고(도 4), PEG6 (K1808C)는 중쇄에 비해 경쇄에 선택적임을 나타내었다(도 5).

[0091]

도 4에 나타난 연구에서, PEG2 뮤테인(1번 및 8번 레인)을 TCEP로 환원시킨 후, TCEP를 제거하고(2번 및 9번 레

인), 5, 12, 22, 33 또는 43 kD PEG-말레이미드로 처리하였다(3-7번 및 10-14번 라인). 비PEG화된 FVIII는 비처리된(H+L) 그리고 처리된 중쇄(H) 및 경쇄(L) 밴드와 같이 실행되었다. 모든 세가지 밴드가 쿠마시 블루로 염색된 겔(아래에서 오른쪽) 상에서 탐지될 수 있었지만, 쇠-특이적 항체를 사용한 웨스턴 염색은 단지 비처리되고 대응하는 쇠를 나타내었다. R8B12 염색(위에서 왼쪽)을 사용하여, PEG2를 PEG-말레이미드로 처리하였을 때, 중쇄(H) 밴드가 극적으로 강도가 감소하였고, 새로운 밴드가 PEG의 크기에 비례하는 모체 H 밴드 보다 더 크게 실행하도록 생성되었다. C7F7 염색(아래에서 왼쪽)을 사용하여, 경쇄(L) 밴드 (불균일한 글리코실화로 인한 다중 밴드)는 강도가 변하지 않았다. 양쪽 염색에 대하여 비처리된 H+L 밴드는 H쇄가 비처리된 FVIII의 일부이기 때문에 이동되었다. 또한, 쿠마시 염색은 경쇄보다 중쇄의 더 많은 PEG화, 즉 H 밴드 강도의 감소를 확인하였다. 마지막으로, PEG화 밴드는, 아마도 413 항체의 484-509로의 결합을 차단하는 491의 부위 특이적 PEG화로 인해 PEG 크기 의존적인 방식으로 R8B12 염색보다 413 항체 염색(위에서 오른쪽) 상에서 상대적으로 더 많은 강도를 손실하였다. 라인 당 하중된 FVIII의 양은 2개의 왼쪽 겔에 대해서는 약 30 ng이고, 위에서 오른쪽 겔에 대해서는 약 1000 ng이고, 아래에서 오른쪽 겔에 대해서는 약 2000 ng이다.

[0092] 환원제의 제거 후의 환원은 FVIII의 이동을 변화시키지 않았다(1번 라인 대 2번 라인, 및 8번 라인 대 9번 라인). 22 kD PEG의 PEG2로의 부가는 413 항체의 결합을 차단하고, 491 위치에서의 특이적 PEG화와 연관되었다(도 4 위에서 오른쪽 겔). 또한, 이는 PEG화 PEG2가, 413 항체가 인간 A2 억제 항체와 동일한 에피토프를 갖는 것으로 나타났기 때문에 인간에서 더 낮은 면역원성을 가질 수 있음을 제시한다(문헌 [Scandella et al., 1992, *Thromb. Haemost.* 67, pp. 665-71]).

[0093] 도 5에 나타난 연구에서, PEG6 뮤테인을 TCEP로 환원한 후, TCEP를 제거하고(1번 라인 및 6번 라인), 5, 12, 22 또는 33 kD PEG-말레이미드로 처리하였다(2-5번 라인 및 7-10번 라인). 비PEG화된 FVIII는 비처리된(H+L) 그리고 처리된 중쇄(H) 및 경쇄(L) 밴드와 같이 실행되었다. PEG6 (K1808) 돌연변이가 경쇄 상에 존재하기 때문에, PEG화는 단지 경쇄 상에서만 탐지되었고, 중쇄 상에서는 탐지되지 않았다. 라인 당 하중된 FVIII의 양은 왼쪽 겔에 대해서는 약 100 ng이고, 오른쪽 겔에 대해서는 약 30 ng이다.

[0094] 대조군으로서 실행된 BDD는 상기에 기술된 환원 및 환원제 제거 절차 이후에도 100배보다 많은 몰과량의 PEG-말레이미드로 처리하였을 때 어떠한 중요한 PEG화를 나타내지 않았다(도 6a). 또한, 동일한 방법을 PEG4 및 PEG6에 적용하였다(도 6a). PEG2와 대비하면, 이들 뮤테인은 효율적으로 PEG화되지 않았지만, 이들은 PEG2(L491C)와 유사한 중쇄에 대해 선택적이었다. PEG6 (K1808C) PEG화 효율은 상대적으로 낮았고, 이는 아마도 위치 1808에서 PEG화를 차단할 수 있는 N1810에서의 N-연결 글리코실화 부위와 매우 밀접하기 때문이다. 따라서, 본 발명자들은 1810에서 천연 글리코실화 부위를 제거하도록 PEG7 (N1810C)을 디자인하였다. PEG7이 머리-대-머리(head-to-head) 대비시 PEG6에 비해 향상된 PEG화 효율을 나타낸다(도 6b). 유사하게 PEG15는 PEG2보다 약간 우수한 PEG화 효율을 나타낸다. BDD의 이중 돌연변이인 PEG2+6은, PEG2가 중쇄 시스테인 돌연변이이고 PEG6이 경쇄 돌연변이이므로 중쇄 및 경쇄 모두에서 PEG화될 수 있다(도 6c). 또한, 이 방법은 전체 길이의 야생형 FVIII에 적용되었다(도 6d). PEG화는 A1, A2 및 대부분의 B 도메인을 포함하는 중쇄의 가장 거대한 분획에서 탐지되었다. PEG화 패턴은 모노PEG화를 제시하였고, 여기에는 단일 시스테인 PEG화만이 있었다.

[0095] 트롬빈 절단 및 웨스턴 블롯에 의한 PEG화 분석. PEG화 생성물을 37°C에서 30분 동안 트롬빈(40 IU/ μ g FVIII)으로 처리할 수 있다. 또한, 사용된 트롬빈은 오염물로서 APC를 함유한다. 트롬빈 절단은 중쇄로부터 50 kD A1 및 43 kD A2 도메인을 생성하고, APC 절단은 A2 도메인을 21 및 22 kD 분획으로 더 분할시킬 수 있다(도 7). 중쇄의 C-말단을 인식하는 R8B12 항체를 사용한 염색은 손상되지 않은 A2 도메인 및 21 kD C-말단 분획(FVIII 562-740)만을 식별할 수 있다. 따라서, PEG2 PEG화가 위치 491에 특이적이라면, 43 kD A2 도메인은 PEG화되어야 하지만 21 kD C-말단 분획은 그렇지 않다. 이는 실제로 도 7에 나타난 22 kD PEG화 PEG2에 대한 웨스턴 블롯에 의해 확인되었다. 따라서, 제거에 의해, PEG2 PEG화는 A2 도메인의 N-말단 22 kD 분획(FVIII 373-561)에 국소화되었다. PEG-말레이미드가 pH 6.8에서 시스테인에 완전하게 선택적이고 단지 373-561 내의 천연 FVIII 시스테인만이 528 및 554 사이의 숨겨진 디설파이드로부터 오기 때문에, PEG2는 위치 491에서 도입된 시스테인 상에서 거의 PEG화될 수 있다. FVIII 중쇄 N-말단 항체로 트롬빈-처리된 PEG화된 PEG2의 웨스턴 염색은 A1 도메인의 어떠한 PEG화를 나타내지 않았다(테이타는 나타내지 않음). 트롬빈 절단 방법을 사용한 PEG2의 선택적 PEG화 또한 5, 12, 33 및 43 kD의 PEG에 대해 확인되었다(테이타는 나타내지 않음). PEG화된 전체 길이의 야생형 FVIII의 트롬빈 절단은 B 도메인만이 PEG화되는 것을 나타낸다(도 8).

[0096] 요오드 염색에 의한 PEG화 분석. 쿠마시 블루 및 웨스턴 염색시 새로 생성된 밴드는 실제로 PEG 밴드임을 확인하기 위해, PEG에 특이적인 바륨-요오드 염색을 사용하였다(도 9). PEG화 PEG2를 6% 트리글리신 겔(인비트로젠) 상에서 수행하고, R8B12 중쇄 항체 또는 바륨-요오드 용액으로 염색하였다(문헌 [Lee et al, *Pharm Dev*

Technol. 19994:269-275]). 이들을 정렬하기 위해 분자량 마커를 사용하여 2개의 염료 사이의 PEG화 밴드를 맞춰보고, FVIII 중쇄 PEG화를 확인하였다.

[0097] MALDI-질량 분석법에 의한 PEG화 분석. 중쇄 중의 A2 도메인의 PEG화를 확인하기 위해, PEG화 전후의 rFVIII 샘플을 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화(MALDI) 질량 분석법에 의해 분석하였다. 샘플을 30% 아세토니트릴, 0.1% TFA 중의 시나핀산 매트릭스를 갖는 MALDI 표적 플레이트 상에 혼합하고 결정화시켰다. 그 다음에, 이들을 포지티브 선형 모드에서 보이저(Voyager) DE-PRO 분광계에서 분석하였다. 도 10에 나타난 결과는 83 kD에 중심이 있는 PEG2의 경쇄 및 89 kD에 중심이 있는 중쇄(HC)를 나타냈다. PEG화 샘플에 대해 얻은 스펙트럼은 HC 피크에서의 감소 및 111 kD에 중심을 둔 새로운 피크가 형성되었음을 나타냈다. 이는 중쇄의 PEG화를 확인한다. PEG화 경쇄(105 kD)는 상기 탐지 한계에서 관찰되지 않았다.

[0098] 그 다음에, 샘플에 37°C에서 30분 동안 20 단위 트롬빈/mg FVIII에서 트롬빈 소화를 모두 수행한 후, 아미노산 분석(커먼웰스 바이오테크놀로지스 인크(Commonwealth Biotechnologies, Inc))에 의해 FVIII 농도 측정을 하였다. 중쇄를 46 kD (A1) N-말단 분획 및 43 kD (A2) 분획으로 절단하였다. PEG화 샘플에 대해 얻은 MALDI 스펙트럼(도 11)은 43 kD 피크의 손실 및 새로운 65 kD 피크의 발달을 나타내고, 이는 PEG화 A2 도메인에 기인한 것이다. LC의 PEG화는 상기 탐지 한계에서 역시 관찰되지 않았다. 이들 결과는 FVIII의 A2 도메인의 PEG화를 다시 확인한다. 동일한 분석을 PEG화 PEG6에 적용하였고, 경쇄 A3C1C2 분획의 PEG화를 확인하였다(도 12).

[0099] 활성 측정

[0100] 응고 분석. 응고 FVIII:C 시험 방법은 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT)에 기초한 1단계 분석이다. FVIII는 제X 인자에서 제Xa 인자로의 효소 변환에서 제IXa 인자, 칼슘 및 인지질의 존재 하에 공인자로서 작용한다. 이 분석에서, 희석된 시험 샘플을 FVIII 결핍 혈장 기질 및 aPTT 반응물의 혼합물과 함께 37°C에서 배양한다. 염화칼슘을 배양된 혼합물에 첨가하고, 응고를 개시한다. 역관계가 응고가 형성되는데 걸리는 시간(초) 및 FVIII:C의 농도의 로그 사이에 존재한다. 활성이 알려진 표준 물질의 일련의 희석물로부터 구성된 커브와 시험 물질의 다양한 희석물의 응고 시간을 비교하여 알려지지 않은 샘플에 대한 활성 수준을 삽입하고, mL 당 국제 단위 (IU/mL)로 기록하였다.

[0101] 발색 분석. 발색 분석 방법은 2가지 연속 단계로 이루어지며, 여기서 색상의 강도가 FVIII 활성에 비례한다. 1단계에서, 제X 인자는 최적량의 칼슘 이온 및 인지질의 존재 하에 이의 공인자인 FVIIIa와 함께 FIXa에 의해 FXa로 활성화된다. 과량의 제X 인자는 제X 인자의 활성화 속도가 FVIII의 양에만 의존하도록 존재한다. 2단계에서, 제Xa 인자는 발색 기질을 가수분해하여 발색단을 산출하고, 색상 강도는 405 nm에서 광도계로 측정된다. 알려지지 않은 것의 강도가 계산되며, 분석의 유효성은 슬로프-비율 통계법으로 확인된다. 활성은 mL 당 국제 단위(IU/mL)로 기록된다.

[0102] 1811-1818 루프는 FIX으로의 결합에 관련되지만, 이 루프 내에서의 개별 위치의 중요성은 결정되지 않았다. PEG7-10 뮤테인은 천연 FVIII에 대해 거의 동일한 발색 비활성을 나타낸다(표 3). 표 3은 BDD에 대한 PEG 뮤테인 및 PEG화 PEG2 또는 PEG6의 % 비활성(S.A.)을 나타낸다. S.A.는 발색, 응고 또는 vWF 결합 활성을 총 항원 ELISA (TAE) 값으로 나누어서 결정되었다. 그 다음에, PEG화 뮤테인의 S.A.는 BDD의 S.A.(8 IU/ μ g 발색, 5 IU/ μ g 응고 및 1 vWF/TAE)로 나누고, 100을 곱하여 표제의 발색, 응고 및 vWF/TAE로 표 3에 열거된 %S.A.를 얻었다.

표 3

	돌연변이	발색	응고	vWF/TAE
BDD		100	100	100
PEG1	Y487C			
PEG2	L491C	125	130	138
PEG2 레드	L491C	137	141	98
PEG2-5 kD PEG	L491C	124	93	125
PEG2-12 kD PEG	L491C	118	25	71
PEG2-22 kD PEG	L491C	103	13	87
PEG2-33 kD PEG	L491C	130	17	59
PEG2-43 kD PEG	L491C	91	9	57
PEG3	K496C			
PEG4	L504C			
PEG5	Q468C	92		
PEG6	K1808C	83	60	100
PEG6-33 kD PEG	K1808C	42	6	90
PEG7	N1810C	100		
PEG8	T1812C	100		
PEG9	K1813C	83		
PEG10	Y1815C	75		
PEG11	D1795C			
PEG12	Q1798C			
PEG13	R1803C			
PEG14	K1804C			
PEG2+6	491C/1808C			
PEG15	K377C	82		
PEG16	H378C	126		
PEG17	K556C	43		
PEG18	N41C	80		
PEG19	N239C			
PEG20	N2118C	127		
PEG21	Y81C			
PEG22	F129C	83		
PEG23	K422C			
PEG24	K523C			
PEG25	K570C			
PEG26	N1864C			
PEG27	T1911C			
PEG28	Q2091C			
PEG29	Q2284C			

PEG류테인 및 PEG화된 PEG2 및 PEG6의 BDD에 대한 퍼센트 비활성 (S.A.)

[0103]

[0104]

표 3에 사용된 바와 같이, "PEG2 레드"는 환원제로 처리된 후 환원제를 제거한 PEG2 류테인이다. 이 환원 절차는 FVIII의 3가지 관능 활성을 중대하게 변화시키지 않았다. 5 kD(PEG2-5kD) 내지 43 kD(PEG2-43kD) 범위의 PEG로 컨쥬게이션된 PEG2 류테인은 상당량의 발색 활성을 손실하지 않았지만, 5 kD 보다 크게 PEG 크기가 증가할 수록 훨씬 더 낮게 응고 활성을 가졌다. 또한, 보다 큰 크기의 PEG화 PEG2에 대한 vWF 결합에서의 가장 온화한 감소가 있을 수 있다.

[0105]

총 항원 ELISA (TAE). FVIII를 폴리클로날 FVIII 항체로 코팅된 미량 역가판 상에 포획하였다. 결합된 FVIII를 비오틴화 폴리클로날 rFVIII 항체 및 스트렙타비딘 당근과산화효소(HRP) 컨쥬게이트로 탐지하였다. 과산화효소-스트렙타비딘 복합물은 테트라메틸벤지딘(TMB) 기질의 첨가시 색상 반응을 산출한다. 샘플 농도는 4가지 파라미터 적합 모델을 사용하여 표준 커브로부터 삽입한다. FVIII 결과는 $\mu\text{g/mL}$ 로 기록된다.

[0106]

vWF 결합 ELISA. 심각한 혈우병 혈장 용액에서 FVIII이 vWF에 결합하게 하였다. 그 다음에, FVIII-vWF 복합물을 vWF 특이적 모노클로날 항체로 코팅된 미세 역가판 상에 포획시켰다. vWF에 결합된 FVIII를 FVIII 폴리클로날 항체 및 당근과산화효소-항토키 컨쥬게이트로 탐지하였다. 과산화효소 컨쥬게이션된 항체 복합물은 기질의 첨가시 색상 반응을 산출한다. 샘플 농도는 4가지 파라미터 적합 모델을 사용하여 표준 곡선으로부터 삽입된다. FVIII 결합 결과는 $\mu\text{g/mL}$ 로 기록된다. PEG화시 어떠한 활성에 대한 중대한 영향은 없었으며, 이는 B 도메인에서의 PEG화와 일관될 수 있다.

표 4

	TAE ug/mL	응고 분석			발색 분석			vWF ELISA		
		IU/mL	IU/ug	%출발	IU/mL	IU/ug	%출발	ug/mL	vWF/TAE	%출발
KG-2 출발	1.31	4.8	3.6	100	5.60	4.3	100	0.42	0.32	100
환원만 수행	0.93	3.1	3.4	93	4.08	4.4	103			
KG-2-5kD PEG	0.71	2.5	3.5	96	3.09	4.3	102			
KG-2-12kD PEG	0.59	2.3	3.9	107	2.99	5.0	118			
KG-2-22kD PEG	0.63	2.5	3.9	108	3.06	4.8	113	0.19	0.30	94
KG-2-30kD PEG	0.59	2.5	4.1	114	3.01	5.1	119	0.19	0.32	100
KG-2-43kD PEG	0.52	2.4	4.6	128	2.86	5.5	129			

상기한 크기의 PEG로 PEG화되 이전 및 후의 전체 길이의 야생형 FVIII(KG-2)의 비활성 (S.A.)

[0107]

- [0108] 이온교환 크로마토그래피에 의한 PEG화 FVIII의 정제. 단백질이 칼럼에 결합하고 임의의 과량의 자유 PEG 반응물은 결합하지 않고 관류에서 제거되는 음이온교환 칼럼 또는 양이온교환 칼럼에 PEG화 FVIII를 적용한다. 그 다음에, PEG 뮤테인을 염화나트륨 구배를 갖는 칼럼으로부터 용출시킨다. 하중, 관류 및 구배 분획의 바륨-요오드 염색 4-12% 비스-트리스 겔을 사용하여 칼럼 용출 분획이 PEG화 뮤테인을 갖는 것을 확인하였다.
- [0109] 크기배제 크로마토그래피에 의한 PEG화 FVIII의 정제. 다수의 PEG 뮤테인을 함유하는 음이온교환 분획을 모으고, 초미세여과로 농축한 후, 크기배제 칼럼에 적용한다. 그 다음에, 칼럼을 제제화 버퍼를 사용하여 용출시킨다. PEG가 단백질에 결합되어 있는지 여부에 따라 단백질의 크기 및 형상에서의 차이로 인해, 이 칼럼은 PEG화되지 않은 임의의 잔류 PEG2로부터 PEG화 PEG2 뮤테인을 분리한다. PEG화 뮤테인 FVIII 분획을 대부분의 FVIII 활성을 갖는 것에 기초하여 모은 후, 후속 동물 연구 및 분자 특성화를 위해 냉동시킨다. 도 13은 비PEG화 PEG2 뮤테인의 용출물을 43 kD PEG화 PEG2 뮤테인에 대하여 비교한다. PEG화 PEG2는 상당히 빨리 용출되고, 이는 공유적으로 부착된 PEG로부터의 이의 크기 및 형상에서의 증가를 나타낸다.
- [0110] PEG화의 더 낮은 효율, 즉 50% 미만을 나타내는 PEG6과 같은 뮤테인으로는, 매우 순수한 모노-PEG화 생성물을 산출하기 위한 가장 효율적인 정제 체계는 양이온교환 크로마토그래피 후 크기배제 크로마토그래피를 조합하여 사용하는 것이다. 예를 들어, PEG6으로는, 양이온교환 크로마토그래피로 다수의 비PEG화 PEG6(도 15, 후에 용출되는 분획)으로부터 PEG화 PEG6(도 14, 조기에 용출되는 분획)을 정제하는 것이다. 그 다음에, 크기배제 크로마토그래피로 잔류 비PEG화 단백질(도 15, 후에 용출되는 분획)로부터 PEG화 단백질(도 15, 조기에 용출되는 분획)을 마무리하는 것이다.
- [0111] 활성에 대한 PEG 크기의 효과. PEG 크기가 PEG화시 FVIII의 응고 및 발색 활성 모두에 효과를 갖는 것인지 여부를 시험하기 위해, 정제된 전체 길이의 FVIII, PEG2, PEG6 및 PEG14를 TCEP로 환원시킨 후, 환원제를 제거하고, 6 kD 내지 64 kD 범위의 PEG 또는 버퍼 대조군과 반응시켰다. 생성된 PEG화 FVIII를 과량의 PEG 또는 비PEG화 FVIII의 제거 없이 직접 분석하였다. 대조 실험은 과량의 PEG가 FVIII의 활성에 아무런 효과를 갖지 않음을 나타내었다.
- [0112] 도 16은 본 연구의 결과를 나타낸다. 정제된 전체 길이의 FVIII는 도 16에서 KG-2로 나타나 있다. 도 16에 기록된 %활성은 환원 및 환원제 제거 후 PEG로 처리된 샘플의 값을 PEG화 수율을 고려한 버퍼 대조군으로 처리된 샘플의 값으로 나누어서 결정되었다. PEG화 수율은 임의의 소정의 FVIII 구조물에 대한 모든 PEG에 걸쳐 상당한 것이었다. 이는 KG-2, PEG2 및 PEG14에 대해 약 80%이고, PEG6에 대해 약 40%이다. 예를 들어, 처리된 PEG14 버퍼 대조군은 6.8 IU/mL의 응고 활성을 가졌고, 12 kD PEG화 PEG14 샘플에서는 3.2 IU/mL였다. 그러나, PEG화 효율은 약 80%였으며, 이는 3.2 IU/mL가 약 80% PEG화 및 약 20% 비PEG화의 응집 활성을 나타냄을 의미한다. 비PEG화 샘플이 버퍼 대조군으로 처리된 PEG14와 동일한 활성을 갖는다고 가정하면, PEG화 PEG14에 대한 비PEG화의 %활성은 34%로 나온다($(3.2-6.8 \times 20\%) / (6.8 \times 80\%)$).
- [0113] BDD의 PEG2, PEG6 또는 PEG14 위치에서의 A2 또는 A3 도메인 내에서의 PEG화는 PEG 크기가 6 kD보다 크게 증가할 때 응고 활성의 급격한 손실로 유도하였다. 그러나, 전체 길이의 FVIII의 천연 B-도메인 시스테인에서 B 도메인 내에서의 PEG화는 응고 활성에 아무런 효과를 갖지 않았다. 흥미롭게도, 발색 활성은 모든 PEG화 구조물에 영향을 끼치지 않았다. 이는 분석의 차이점에 기인할 수 있다. 작은 발색 펩티드 기질이 응고 분석에 사용된 더 큰 단백질 기질보다 PEG화 FVIII/FIX/FX 복합물에 더 빠른 접근을 가질 수 있다. 다르게는, PEG는 뮤테인의 활성에 영향을 끼칠 수 있다. 이는 2단계 발색 분석보다 1단계 응고 분석에 의해 보다 쉽게 탐지될 수 있다.
- [0114] PEG2, 6 및 14의 응고 활성에 대한 PEG 효과의 관찰을 확인하기 위해, 몇 개의 PEG화 구조물을 과량의 PEG 및 비PEG화된 것으로부터 정제하였다. PEG가 발색 활성에 아무런 효과를 갖지 않으므로, 발색 대 응고 활성 비는 응고 활성에 대한 PEG의 상대적인 효과에 대한 좋은 평가이다(표 5). PEG2와 같은 소정의 위치에서의 더 거대한 PEG 및 PEG2+6 구조물을 갖는 경우에서와 같은 더 많은 수의 PEG가 응고 활성의 더 큰 손실을 유발한다.

표 5

PEG 화 BDD		발색 IU/mL / 응고 IU/mL	
샘플 ID	PEG	처리되지 않은 비율	BDD에 대한 비율
BDD	PEG 없음	1.7	1
PEG2 (폴2)	22kD 491	9	5
PEG2	43kD* 491	25	15
PEG6	12kD 1808	5	3
PEG6 (old)	33kD 1808	13	7
PEG6 (new)	33kD 1808	8	5
PEG2+6 (LSP25)	33kD at 491, 모노	10	6
PEG2+6 (LSP22)	33kD at 491/1808, 디	24	14
PEG2+6 (ESP)	33kD at 491/1808/A3, 트리	60	35
PEG22	64kD* 129	14	8
PEG14	12kD 1804	3.2	1.9
PEG14	20kD* 1804	4.2	2.5
PEG14	33kD 1804	5	2.9
PEG2+14 (ESP19)	33kD at 491/1804, 디	21	12

정제된 PEG화 BDD에 대한 발색 대 응고 비율

*분지 PEG

[0115]

[0116]

토끼 PK 연구. FVIII의 약물동태학(PK)에 대한 PEG화의 효과를 이해하기 위해, PK 연구를 다수의 종에 수행하였다. NZW SPF 토끼를 이 연구를 위해 사용하였다: 10마리의 암컷, 그룹당 5마리의 토끼, 2 그룹(PEG2 FVIII 및 22 kD PEG화 PEG2). 샘플을 100 IU/mL (발색 단위)의 최종 농도를 갖는 무균 PBS로 희석시켰다. 각각의 토끼는 귀 모서리 정맥을 통해 희석된 시험 또는 대조군 기질 1 mL/kg (100 IU/kg)의 용량을 받았다. 다양한 주사후 시간에서, 혈액 샘플(1 mL)을 투여 후 소정의 시간 지점에서 귀 중심 동맥으로부터 1 mL 주사기(3.8% Na-시트레이트 100 μ L로 채워짐)로 취하였다. 혈장 샘플을 투여된 인간 FVIII를 특이적으로 포획하기 위한 96-웰 플레이트 상에 코팅된 R8B12 중쇄 항체로 배양하였다. 포획된 FVIII의 활성을 발색 분석에 의해 측정하였다 (도 17). 또한, PEG화 PEG2 및 PEG화 PEG6를 BDD와 함께 대비하였으며(도 18 및 19), PEG화 뮤테인은 BDD에 비해 혈장 회복률에서의 향상을 나타내었다. PEG화 전체 길이의 야생형 FVIII는 많은 향상을 나타내는 것으로 보이지 않았다 (도 20).

[0117]

마우스 PK 연구. 두번째 종으로서, ICR 정상 또는 혈우병, FVIII 결핍, 마우스(타코닉(Taconic), 미국 뉴욕주 허드슨)를 PK 연구에 사용하였다. 정상 마우스를 연구에 사용하였고, 시간 지점 당 그룹 당 5마리의 마우스였다. 시험 물질을 25 IU/mL의 공칭 최종 농도로 제제화 버퍼 내로 희석시켰다. 각각의 마우스에 대정맥을 통해 희석 시험 물질 4 mL/kg (~0.1 mL 총 부피)을 투여하였다. 혈액 샘플(정상 또는 혈우병 마우스 연구 각각에서 0.45 또는 0.3 mL)을 정해진 시간 지점에서 하대정맥으로부터 1 mL 주사기(정상 또는 혈우병 마우스 연구 각각에서 50 또는 30 μ L의 3.8% Na-시트레이트로 채워짐)로 취하였다 (샘플당 하나의 동물). 혈장 샘플을 상기 기술된 발색 분석 방법을 사용하여 FVIII 농도에 대해 분석하였다. PEG화 PEG6는 BDD 또는 PEG6에 비해 더 높은 혈장 회복률을 나타낸다(도 21). PEG화 PEG2는 BDD에 비해 더 높은 혈장 회복률을 나타낸다(도 22 및 23).

표 6

구성물	반감기, hr	종
BDD	6.6	정상 토끼
PEG2	4.8	정상 토끼
PEG2-22kD PEG	7.5	정상 토끼
PEG2-43kD PEG	8.0	정상 토끼
PEG6-12kD PEG	8.2	정상 토끼
PEG6-33kD PEG*	9.6	정상 토끼
PEG6-33kD PEG	17.4	정상 토끼
BDD	4.5	정상 마우스
PEG2-22kD PEG	7.3	정상 마우스
PEG6-12kD	5.3	정상 마우스
PEG14-33kD PEG	7.3	정상 마우스
PEG14-12kD PEG	5.5	정상 마우스
PEG22-64kD	8.2	정상 마우스

시간 단위의 혈장 반감기를 나타낸 PEG화 FVIII의 PK 연구 요약

*토끼중 9.6 hr의 반감기를 갖는 33kD PEG화 PEG6의

초기 프레프는 17.4 hr을 산출한 후자의 프레프만큼 순수하지 않았다

[0118]

표 7

뮤테인	PEG	배수
PEG 6	12 kD	2.9
PEG 6	33 kD	2.9
PEG 2+6	33 kD	3.3
PEG 14	33 kD	2.5
PEG 2+6	33 kD	4.4
PEG 2+14	33 kD	2.1
PEG22	64 kD	3.2

혈우병 마우스 중 PEG화 PEG 뮤테인의 혈장 회복.
동일한 기간에 수행된 BDD 대조군에 비해 16시간 주사 후에서의
혈장 회복에서의 배적 향상이 보고되었음

[0119]

[0120]

혈우병 마우스(BDD) 제VIII 인자 회복률. 도 24에 나타난 혈우병 마우스(BDD) 제VIII 인자 회복률 막대그래프는 혈우병 마우스 분석에서 BDD 제VIII 인자의 2 종의 반감기의 약물동태학적(PK) 평가를 도시한다. 이 분석은 BDD 제VIII 인자(도 24에서 "wt" 또는 야생형 BDD 제VIII 인자로 나타냄) 및 BDD 제VIII 인자의 PEG2+6 이중 PEG화 변이체(BDD 제VIII 인자의 L491C, K1808C 이중 변이체로서 본원에서 달리 나타냄) 모두의 혈장 농도를 마우스 모델 중 정맥내 투여 후 3가지 시간 지점에서 측정하도록 디자인되었다. 0.8 및 4 시간 지점 모두에서의 PK 평가가 대비될만 하지만, 16시간 평가는 특히 주목만할 만하다. 16시간에서, 이중으로 PEG화된 BDD 제VIII 인자 변이체(PEG2+6) 만큼 대략 4배(400%)가 비PEG화 분자에 비해 투여후 16시간 마우스 혈장에 남아 있었다.

[0121]

신장 열상 모델. PEG화 FVIII 뮤테인이 혈우병 마우스에서의 출혈을 정지시키는데 효율적인지 여부를 측정하기 위해, 신장 열상 모델을 사용하였다. 혈우병 마우스(붕괴된 FVIII 유전자를 갖는 C57/BL6)를 이소플루오란 하에서 마취시키고 칭량하였다. 하대정맥을 노출시키고, 100 μ l의 염수 또는 FVIII을 31 게이지 바늘을 사용하여 주사하였다. 바늘을 조심스럽게 제거하고, 출혈을 방지하기 위해 30-45초 동안 주사 측에 압력을 가하였다. 2분 후, 오른쪽 신장을 노출시키고, 수직축을 따라 집게 사이로 유지시켰다. #15 스캘펠을 사용하여, 신장을 3mm의 깊이로 수평으로 절단하였다. 환부의 균일한 깊이를 보장하기 위해, 신장을 약간 가운데로 유지하여 집게의 양쪽 측면에 동일한 조직을 노출하게 하였다. 신장의 노출된 표면을 집게의 깊이로 절단하였다. 혈액 손실을 상기에 기술된 바와 같이 정량화하였다. FVIII의 상이한 투여량을 마우스에 대하여 시험하여 신장 출혈에 대한 FVIII의 투여량 반응 관계를 특징화하였다. PEG화 PEG2는 마우스 신장 손상 이후 혈액 손실 감소에서 BDD에 상당하는 능력을 나타낸다(도 25). 따라서, PEG화 PEG2의 응고 활성이 BDD보다 낮지만, 이 신장 열상 모델은 PEG화 PEG2의 생체내 효율이 BDD에 비해 측정가능하게 감소되지 않는 것으로, 발색 분석 데이터와 일관되게 나타났다.

[0122]

항체 억제 분석. 구체적으로 위치 491(즉, PEG2)에서 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 고분자량 중합체를 부가하는 것은, 다수의 환자가 동일한 mAB 413 에피토프에 대한 억제 항체를 발달시키기 때문에, 확대하면 환자의 억제 항체의 큰 비율로, mAB 413에 대한 결합 및 민감도를 감소시켜야 한다. 이를 시험하기 위해, 증가량의 mAB 413을 비포화량(0.003 IU/mL)의 BDD 또는 43 kD PEG화 PEG2로 배양시키고, 발색 분석에서의 관능 활성에 대해 시험하였다(도 26). 비억제 항체 R8B12 및 C2 도메인을 표적으로 하는 억제 항체 ESH4를 대조군으로서 사용하였다. 실제로 PEG화 PEG2는 BDD보다 mAB 413 억제에 더 내성이며, 491 위치 부근에서 결합하지 않는 대조 항체의 존재 하에 유사한 억제 패턴을 나타낸다. 게다가, mAB 413 억제에 대한 PEG의 보호 효과는 PEG 크기에 의존하며, 더 큰 PEG가 더 큰 효과를 갖는다(도 27). PEG화 FVIII이 환자로부터의 억제 항체에 대해 더 내성을 갖는지 여부를 시험하기 위해, 발색 활성을 FVIII에 대한 억제제를 발달시킨 A형 혈우병 환자로부터 유도된 혈장 패널의 존재 하에 측정하였다. 시험된 8 환자의 혈장 중 43 kD PEG화 PEG2가 4 환자의 혈장 샘플 중의 BDD보다 환자의 혈장 억제에 더 내성을 가졌다. 예를 들어, PEG화 PEG2, PEG6 또는 PEG2+6는 한 환자 혈장에서 BDD보다 더 큰 잔류 활성을 나타냈지만 다른 혈장에서는 그렇지 않았다(도 28). 디PEG화된 PEG2+6는 모노PEG화

된 PEG2 또는 PEG6보다 더 내성을 갖는 것으로 나타난다. 이들 결과는 PEG화 PEG 뮤테인이 FVIII에 대한 억제제를 발달시킨 환자를 치료하는데 더 효과적일 수 있음을 제시한다.

[0123] 고속 PEG화 스크리닝. 특정 PEG 뮤테인의 PEG화 효율은, 특히 BDD의 직접적인 구조 정보가 없어서 예측가능하지 않다. 예를 들어, BDD의 구조적인 모델에 기초하여, PEG4 및 PEG5의 PEG화 효율이 PEG2 및 PEG15와 유사하게 모든 세개의 위치가 표면 노출되어 있고 구조에 따라 외부로 겨냥하고 있으므로 매우 높을 것으로 예측할 수 있다. 따라서, PEG를 계통적인 PEG화를 통해 새로운 제거 메커니즘에 대한 탐색에 사용하는 것은 스크리닝되는 상당량의 뮤테인을 필요로 할 수 있다.

[0124] 빠르게 상당량의 PEG 뮤테인을 스크리닝하기 위해, 새로운 고속 방법이 일시적으로 트랜스펙션된 뮤테인으로부터 PEG화 생성물의 PEG화 효율 및 관능 활성을 시험할 수 있도록 개발되었다. 0.1 내지 0.2 IU/mL만큼 낮은 FVIII 발색치를 갖는 일시적으로 발현된 PEG 뮤테인의 5 내지 10 mL와 같이 적은양을 아미콘-센트라 울트라 (Amicon-centra Ultra) 장치 MWCO 30K를 사용하여 약 50배까지 농축시켜서, FVIII의 농축이 FVIII 상호작용에 대한 항체의 친화 범위 부근의 약 1 nM보다 높이 도달하게 한다. 농축된 PEG 뮤테인(~300 μ l)을 4°C에서 밤새 C7F7 FVIII 항체 수지 ~30 μ l로 배양하고, 세척하고, 용출하고, 투석하고, 환원시켰다. 환원제를 제거하고, 환원된 PEG 뮤테인을 PEG화시키고, 상기에 기술된 바와 같이 웨스턴 분석을 실행하였다(도 29 및 30). 일시적으로 발현된 PEG 뮤테인의 상대적인 PEG화 효율을 정확하게 정제된 PEG 뮤테인과 맞추었다.

[0125] 다수의 PEG 뮤테인을 한달 내지 두달에 이 방법에 의해 스크리닝할 수 있다. 예를 들어, PEG 14 (K1804C BDD)는 12 kD PEG를 갖는 경쇄의 약 80% 이상의 PEG화 및 중쇄의 비PEG화를 가져서(테이타는 나타내지 않음) 경쇄에 위치한 K1804C 돌연변이와 일치하였다. K1804 및 K1808(PEG6 위치) 사이의 C α 내지 C α 의 거리는 BDD 구조에 기초하여 단지 8.4 Å이며, 이는 이 위치에서의 43 kD PEG의 도입이 보다 많은 PEG 수용의 장점을 가지면서 33 kD PEG화 PEG6과 같은 PK에서의 유사한 향상을 가질 것임을 제시한다. 모든 PEG 뮤테인에 대한 상대적인 PEG화 수용이 표 8에 요약되어 있다. PEG화는 시스테인 돌연변이가 도입되는 특정 FVIII 쇠에 매우 선택적이었고, 여기서 중쇄에 시스테인을 갖는 모든 뮤테인은 중쇄에서만 PEG화를 갖는 반면, 경쇄에 시스테인을 갖는 모든 뮤테인은 경쇄에 PEG화를 갖는다. 뮤테인 번호 2 내지 31은 열거된 위치에서 본래의 아미노산을 시스테인으로 대체한 BDD의 시스테인 돌연변이를 나타낸다. PEG2+6은 위치 491 및 1808이 시스테인으로 치환된 BDD의 이중 뮤테인이다. A1 및 A2 (및 전체 길이의 FVIII인 KG-2에 대한 B 도메인)는 중쇄에 속하지만, A3, C1 및 C2는 경쇄에 속한다. PEG화 효율은 SDS PAGE 상의 PEG화 생성물을 비PEG화 밴드를 갖는 PEG 밴드의 강도를 비교하여 평가하였다: +++ ~>80% PEG화 수용, ++ ~30-70% 수용, + ~10-30% 수용 및 - ~<10% 수용.

표 8

PEG 뮤테인	위치	도메인	H-PEG	L-PEG
2	491	A2	+++	-
4	504	A2	+	-
5	468	A2	+	-
6	1808	A3	-	++
7	1810	A3	-	++
8	1812	A3	-	-
9	1815	A3	-	-
11	1795	A3	-	+
12	1796	A3	-	+
13	1803	A3	-	++
14	1804	A3	-	+++
15	377	A2	+++	-
16	378	A2	+++	-
17	556	A2	++	-
20	2118	A3	-	+
21	81	A1	++	-
22	129	A1	++	-
23	422	A2	-	-
25	570	A2	-	-
26	1864	A3	-	++
27	1911	A3	-	+++
28	2091	C1	-	++
29	2284	C2	-	+
30	711	A2	+	-
31	1903	A3	-	++
2+6	490/1808	A2/A3	+++	++
2+14	490/1804	A2/A3	+++	+++
KG-2		B	+++	-

다양한 PEG화 FVIII 에 대한 PEG화 효율

[0126]

[0127]

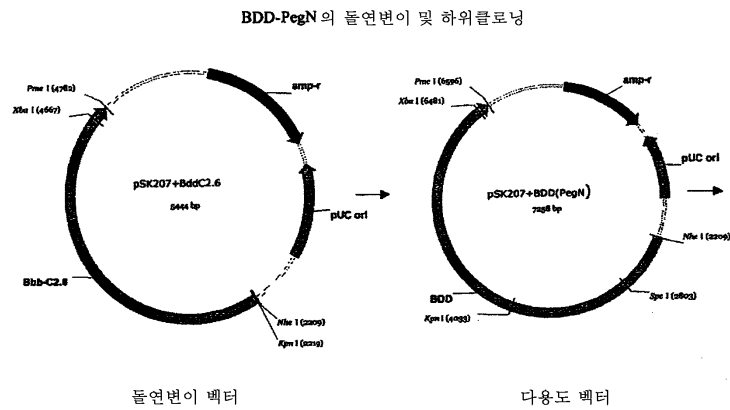
환원된 PEG 뮤테인의 질량 분석법에 의한 분석. PEG 뮤테인 또는 전체 길이의 FVIII의 직접 PEG화를 방지하는 "캡"의 동일성을 결정하기 위해, PEG2+14를 TCEP로 67 μ M 내지 670 μ M 범위의 농도에서 환원시켰다. PEG화 수율은 증가량의 TCEP에 비례하여 증가하였다(도 31). 또한, 동일한 샘플을 PEG화 이전에 질량 분석법에 의해 분석하였다(도 32). 직접 연구할 수 있는 단백질 도메인을 갖기 위해, 샘플을 37°C에서 30분 동안 20 단위/mg FVIII의 비율에서 트롬빈으로 소화시켰다. 트롬빈 절단은 채워지지 않은 글리코실화 부위 및 잔기 372 내지 740을 포함하는 A2 분획을 산출한다. 소화된 샘플을 C4 역상 액체 크로마토그래피 시스템 상으로 주입하고, 칼럼으로부터의 용출물을 전자스프레이 인터페이스를 통해 사중극자 비행시간형 질량 분광계 내로 직접 도입하였다. A2 도메인에 대응하는 크로마토그래피 피크로부터의 질량 스펙트럼을 역콘볼루션하여 단백질의 완전한 질량치를 제공하였다. 환원 이전에, PEG2+14의 A2 도메인은 이론적으로 예측된 것보다 더 큰 118 달톤인 질량을 산출한다. TCEP 농도가 증가할 수록, A2 도메인의 정확히 예측된 질량을 갖는 새로운 피크가 나타난다. 이 새로운 피크의 비율은 TCEP 농도가 증가할 수록 증가한다. 118 달톤의 차이는 시스테인을 갖는 디설파이드 형성을 통한 잔기 Cys 491 (119 Da)에서의 시스테인화 및 산업적인 정확도로 설명될 수 있다. 따라서, 이는 PEG 뮤테인이 직접 PEG화를 방지하는 시스테인에 의해 캡핑되어 있음을 보여준다.

[0128]

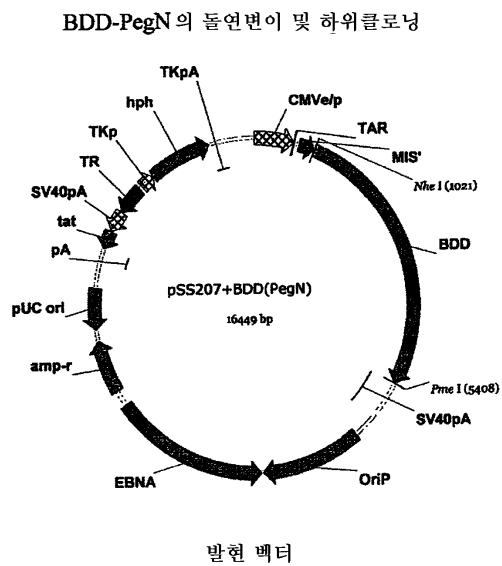
본원에 개시된 모든 참고문헌은 그 전체가 본원에 인용된다.

도면

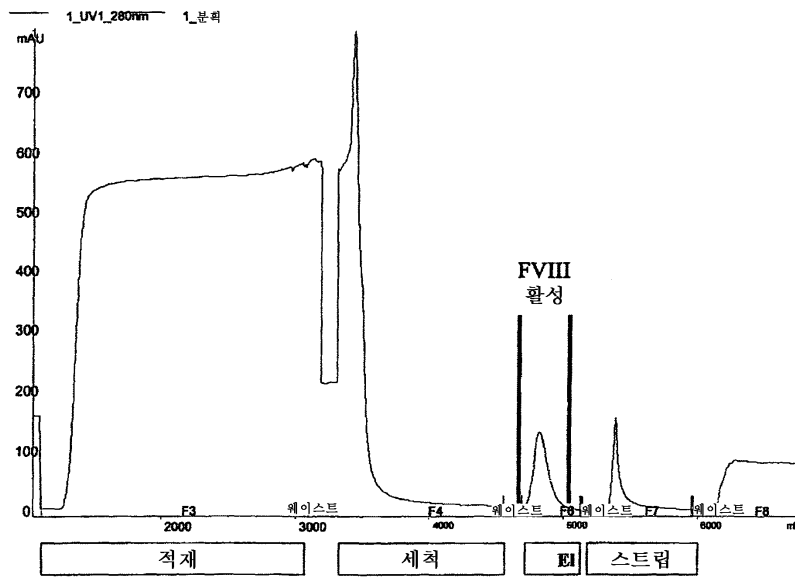
도면1a



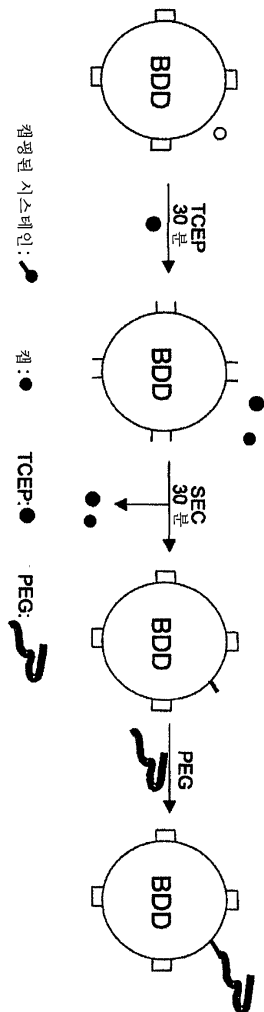
도면1b



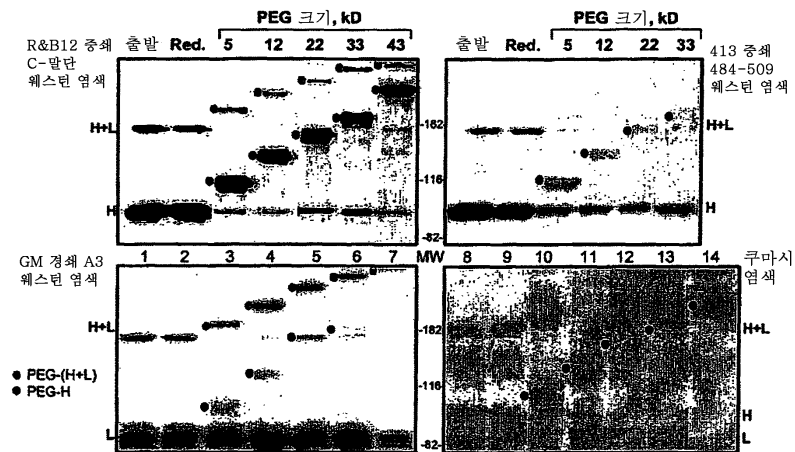
도면2



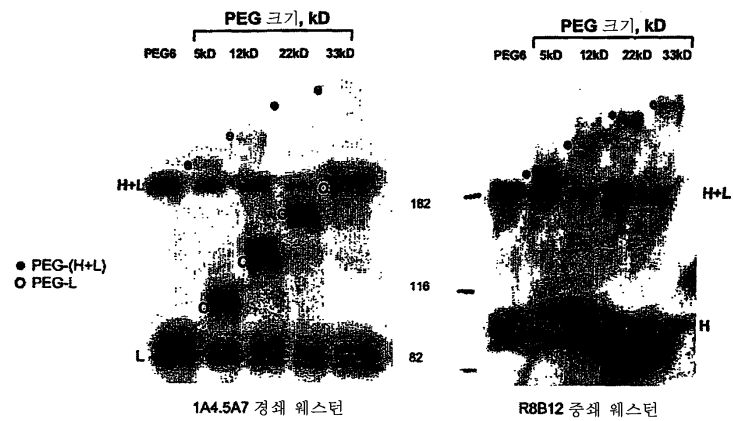
도면3



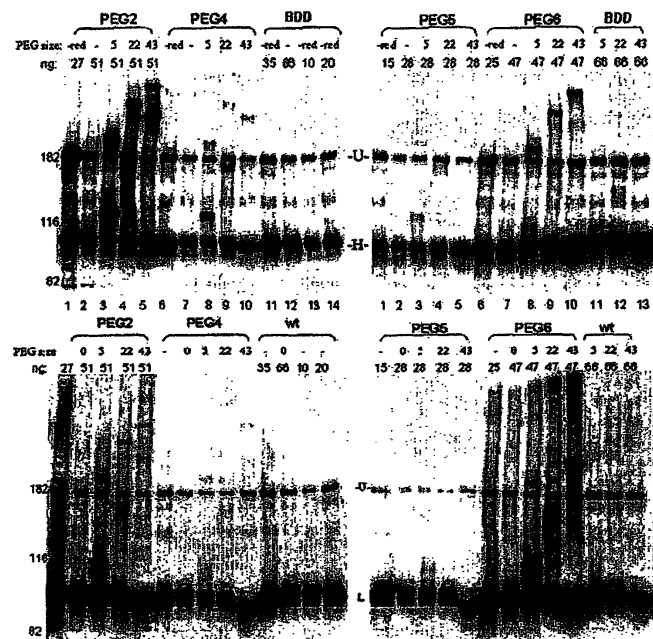
도면4



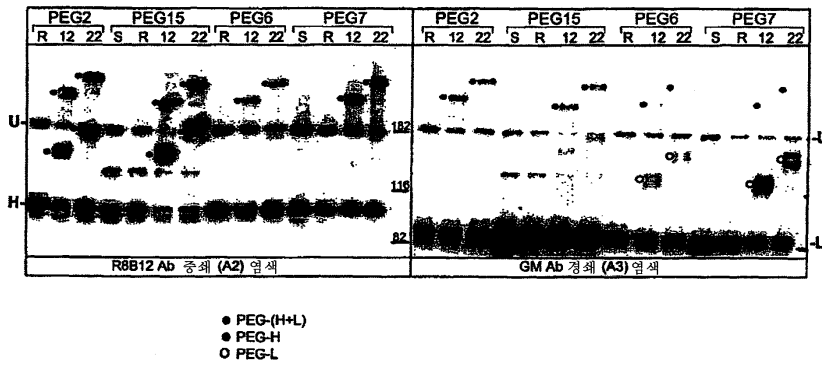
도면5



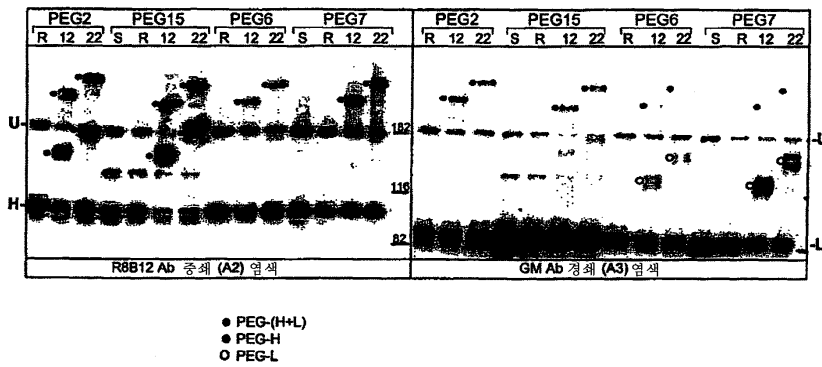
도면6a



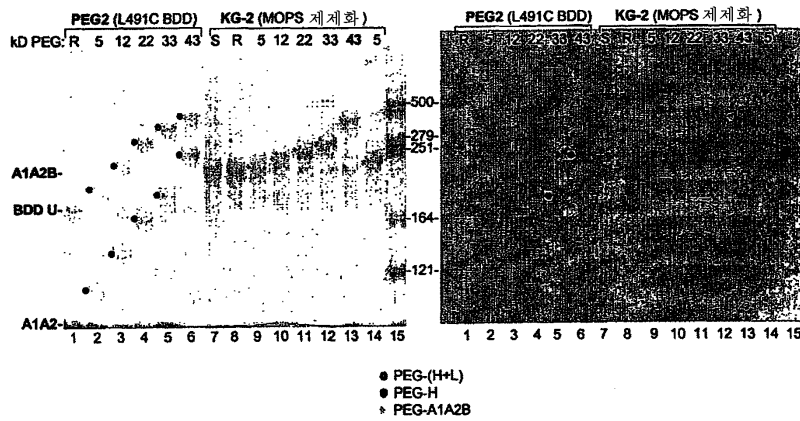
도면6b



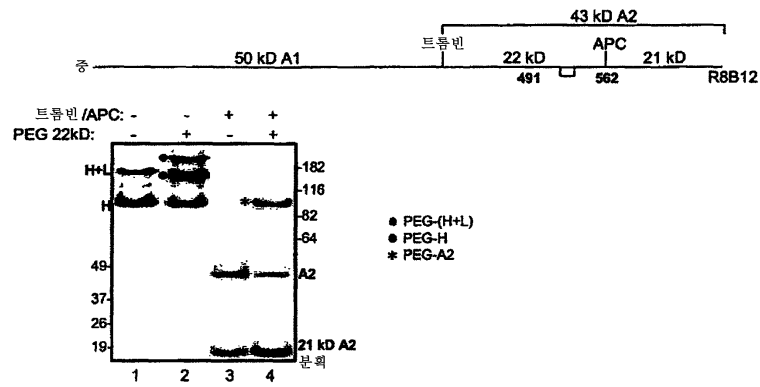
도면6c



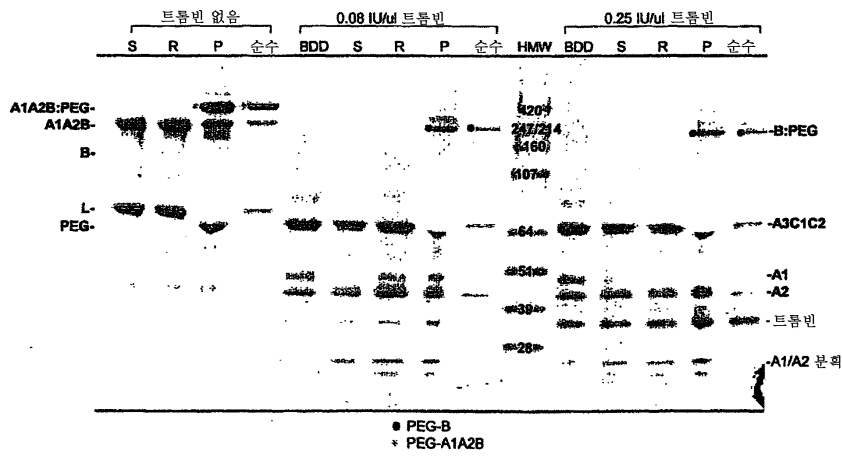
도면6d



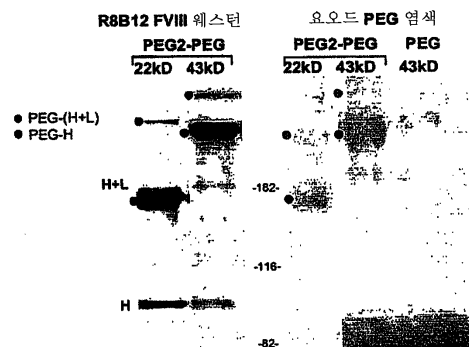
도면7



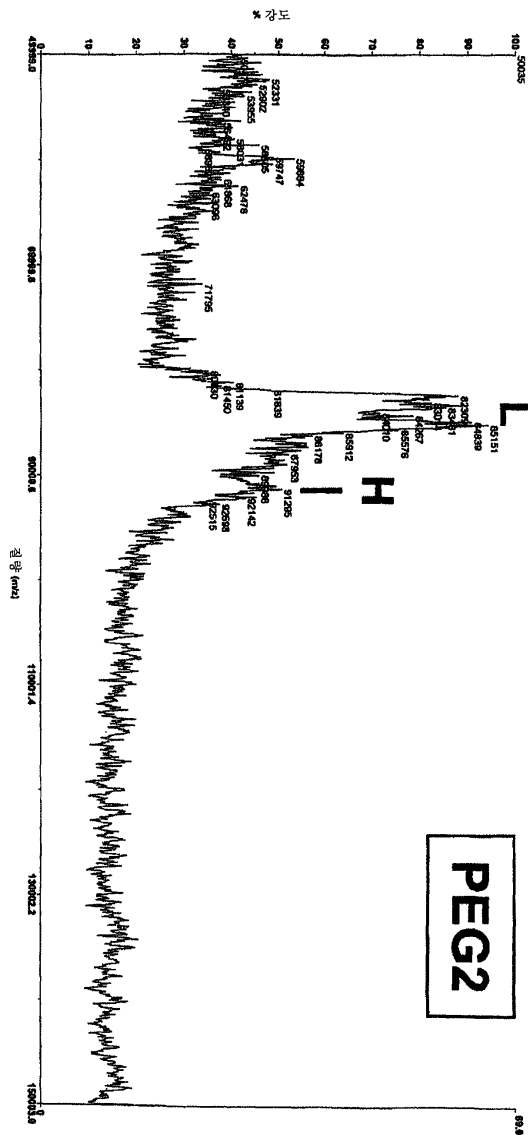
도면8



도면9



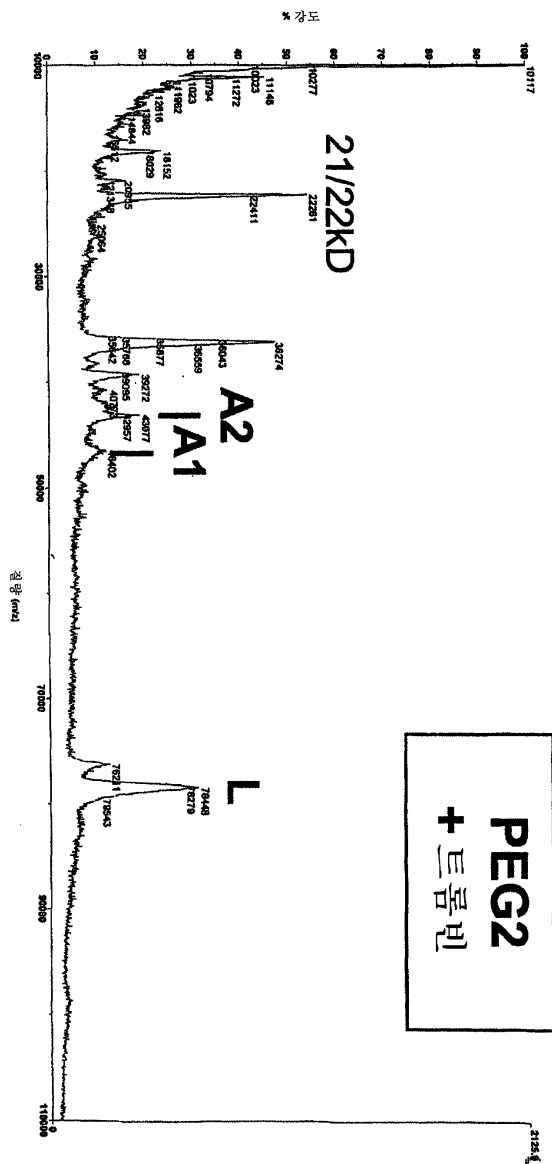
도면10a



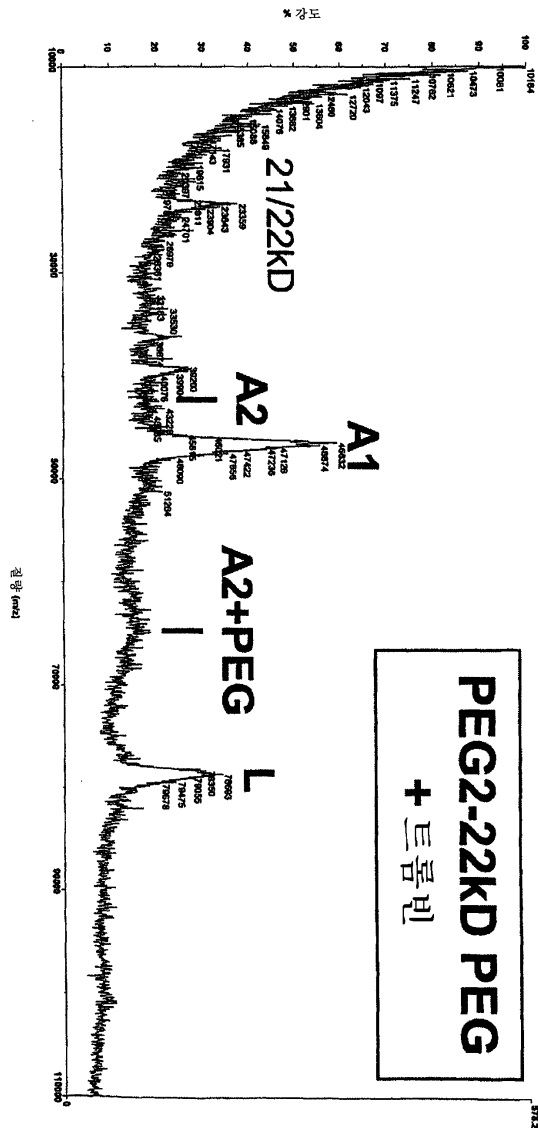
도면10b



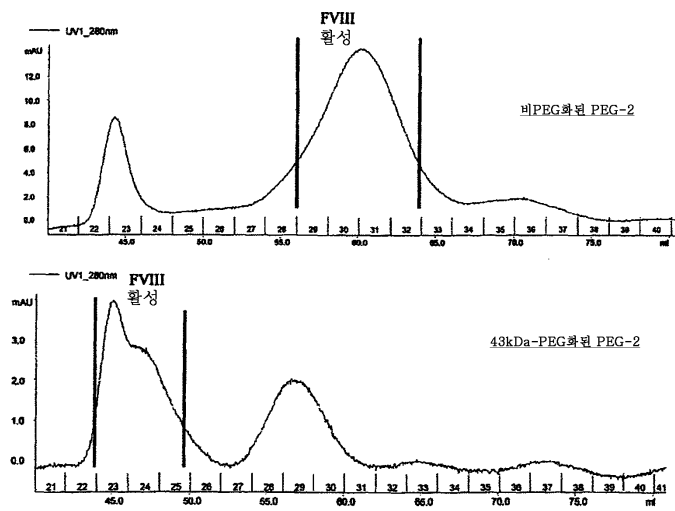
도면11a



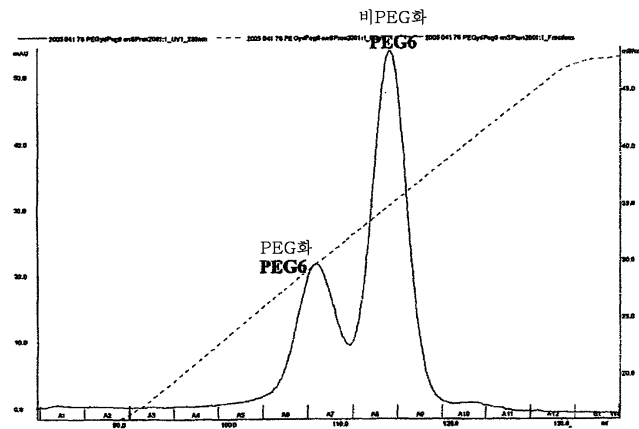
도면11b



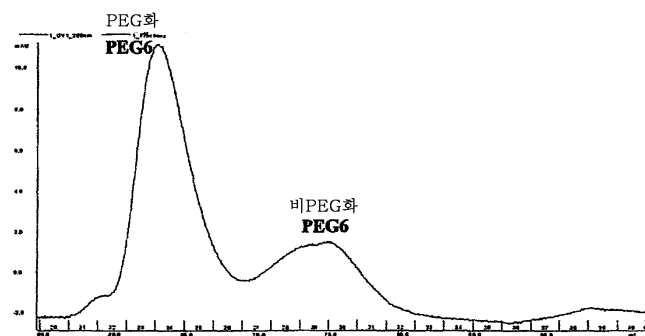
도면13



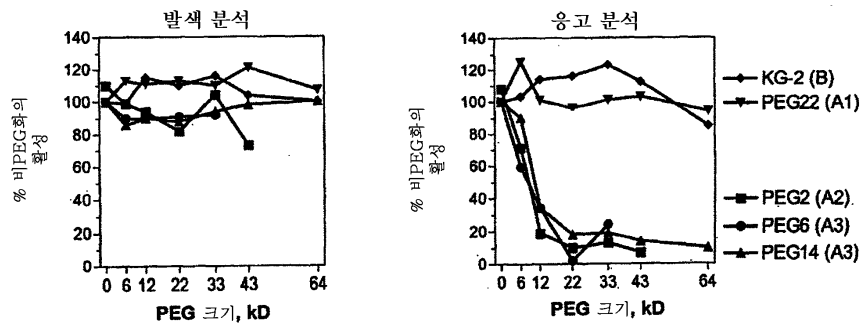
도면14



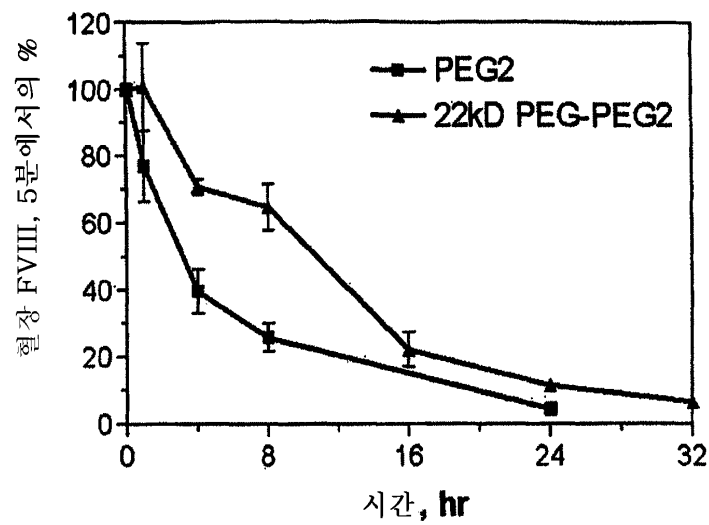
도면15



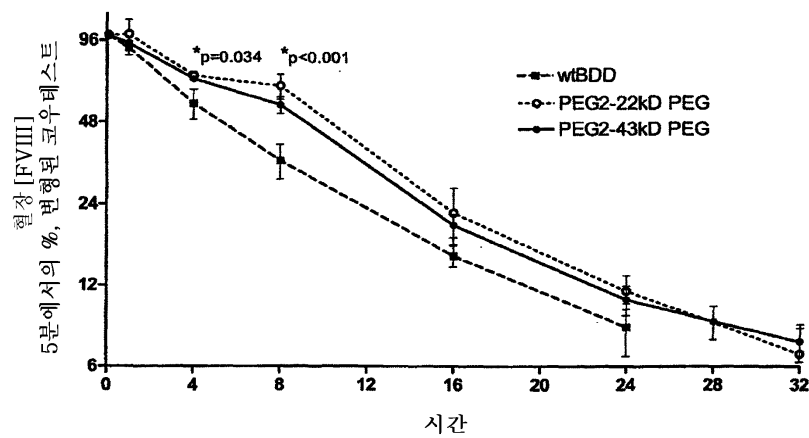
도면16



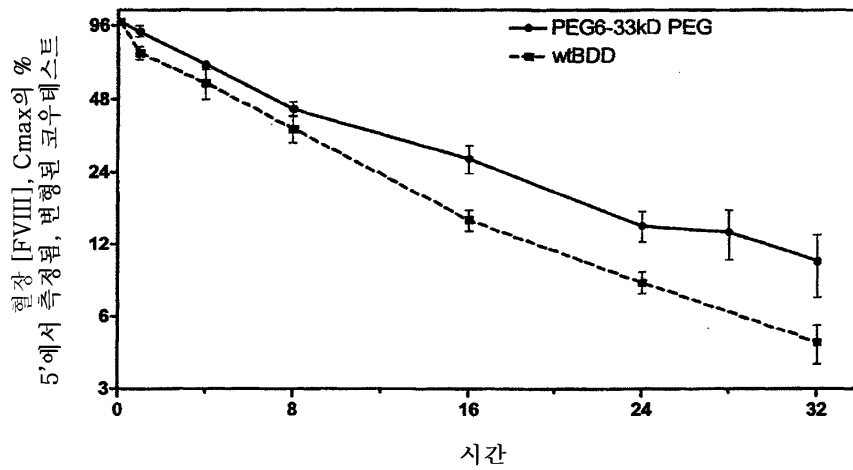
도면17



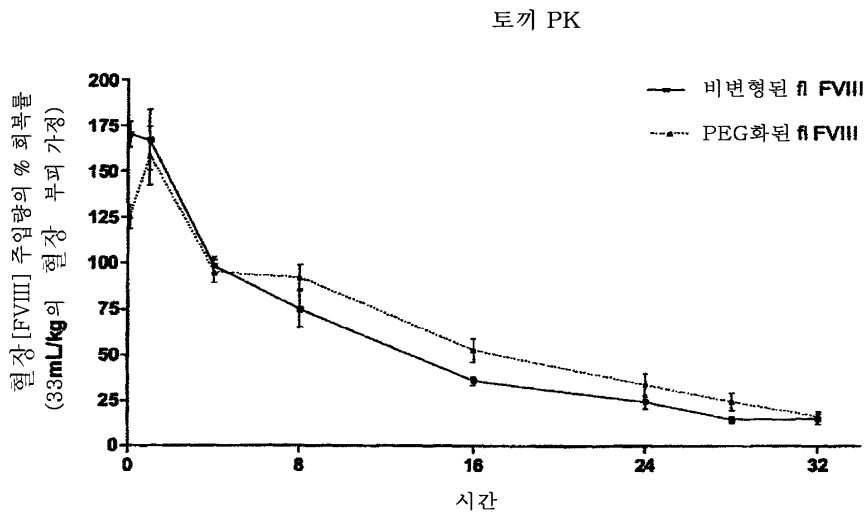
도면18



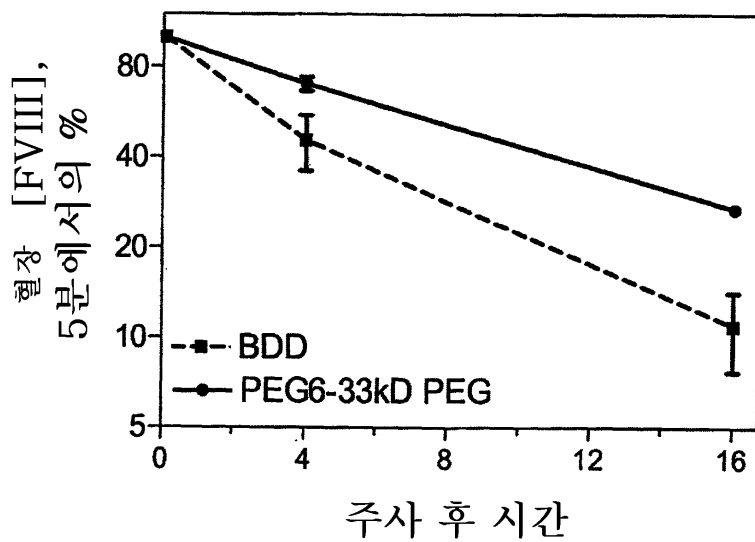
도면19



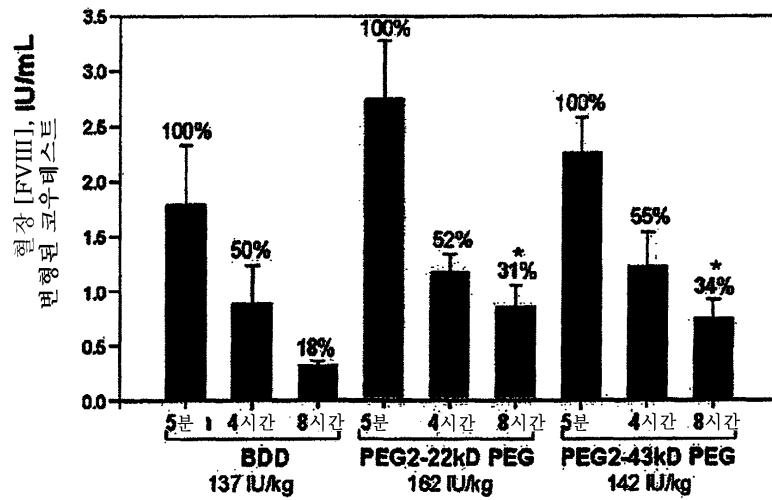
도면20



도면21

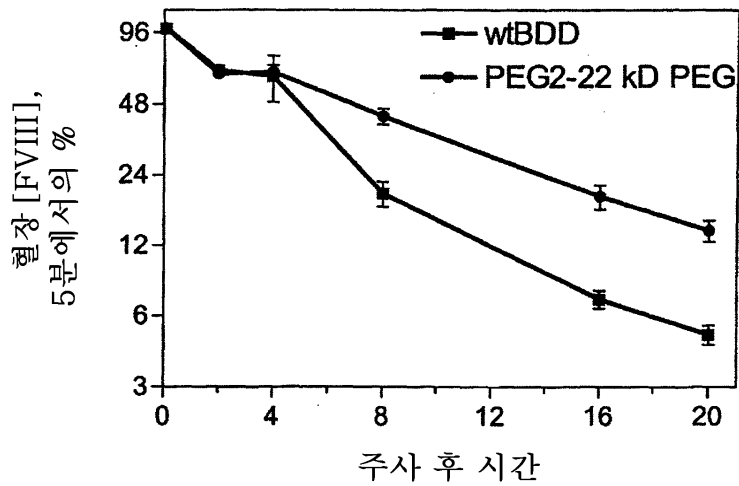


도면22

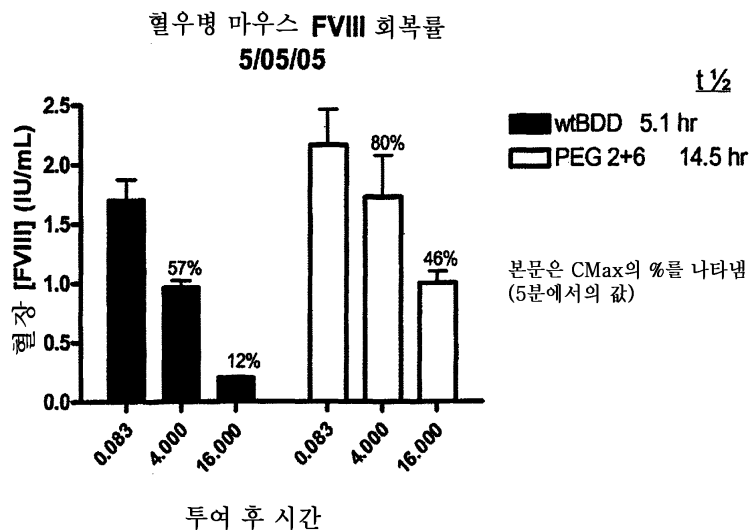


PEG화된 PEG2는 wtBDD보다 우수한 혈장 회복률을 갖는다. p=8시간에서 0.05

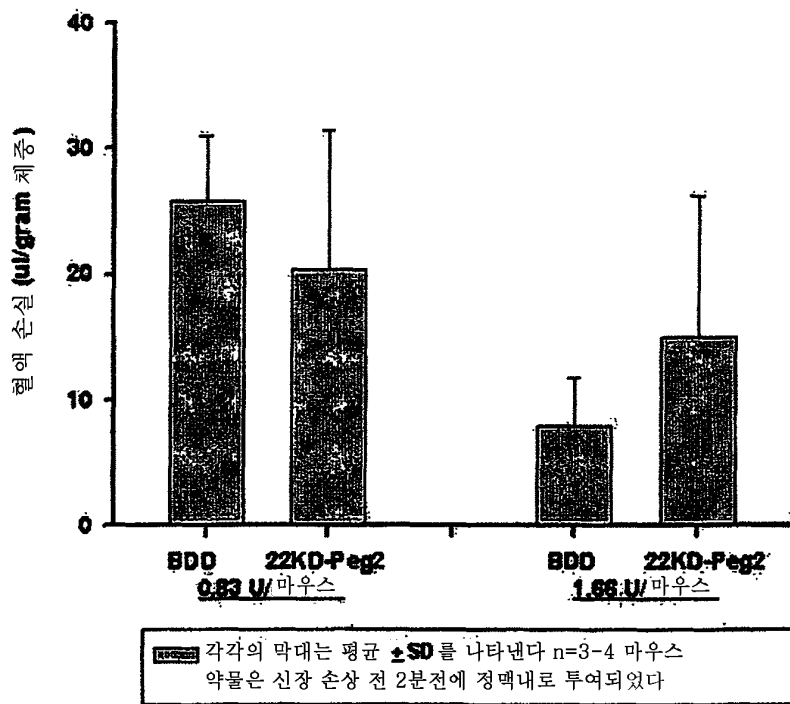
도면23



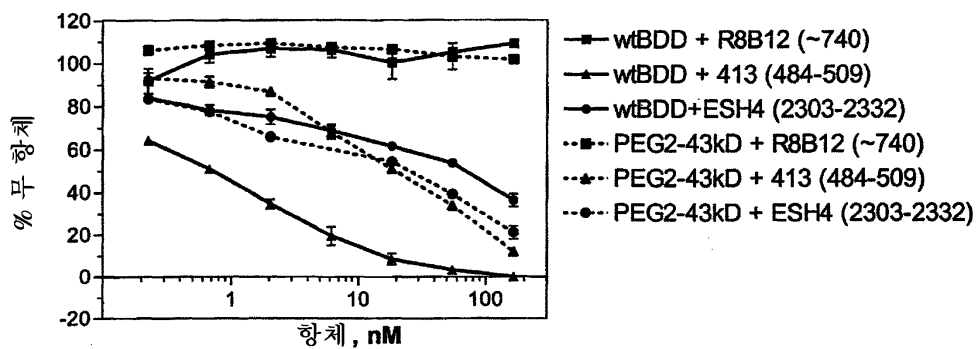
도면24



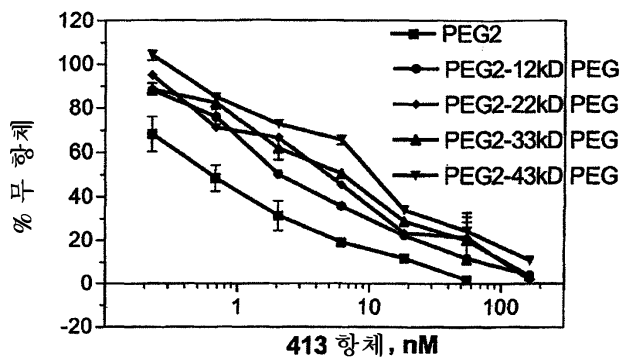
도면25



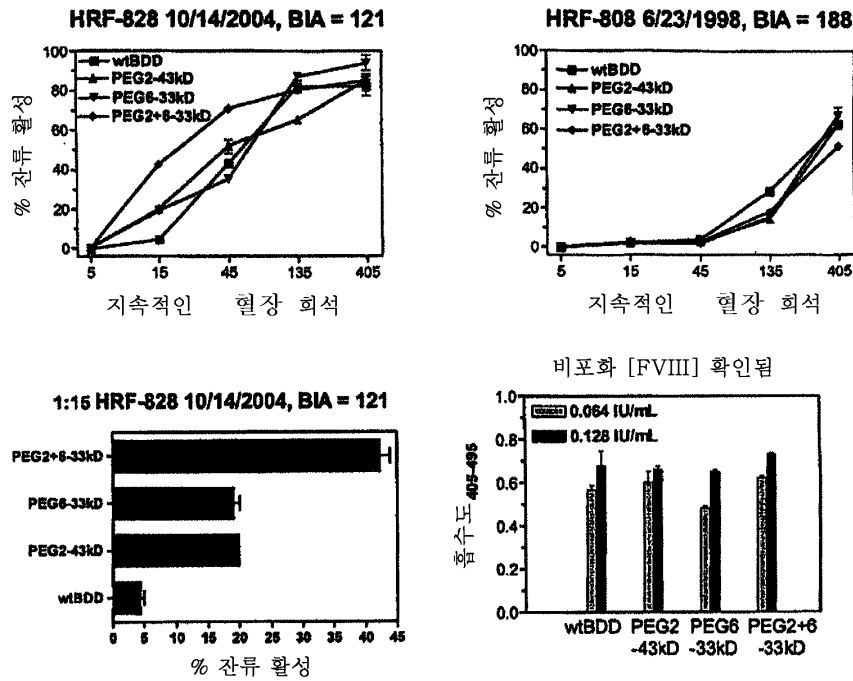
도면26



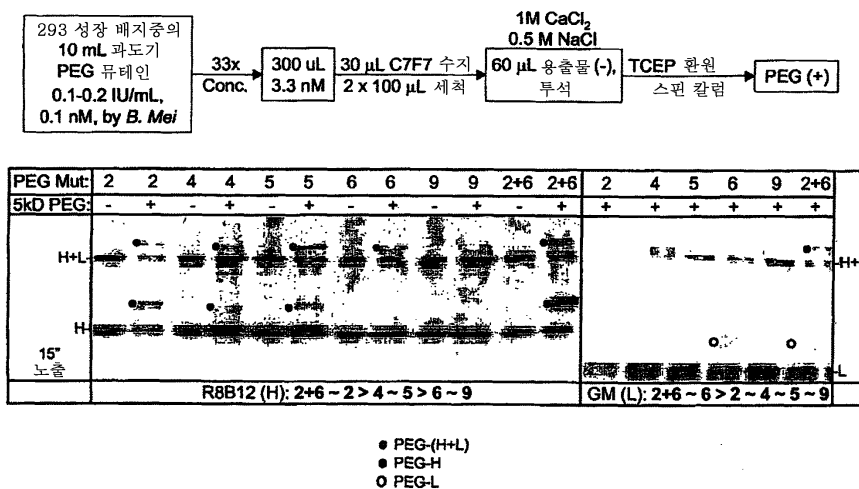
도면27



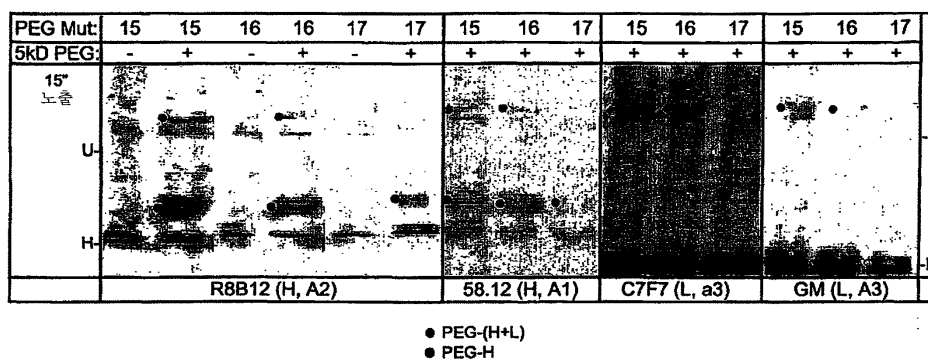
도면28



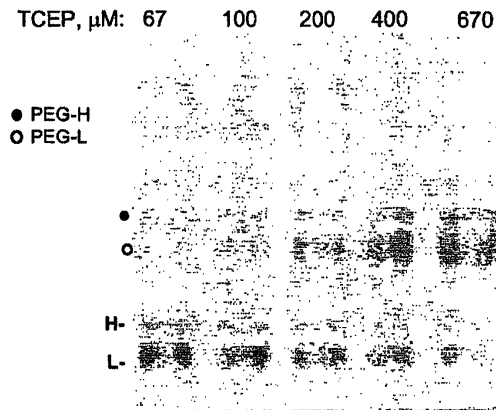
도면29



도면30

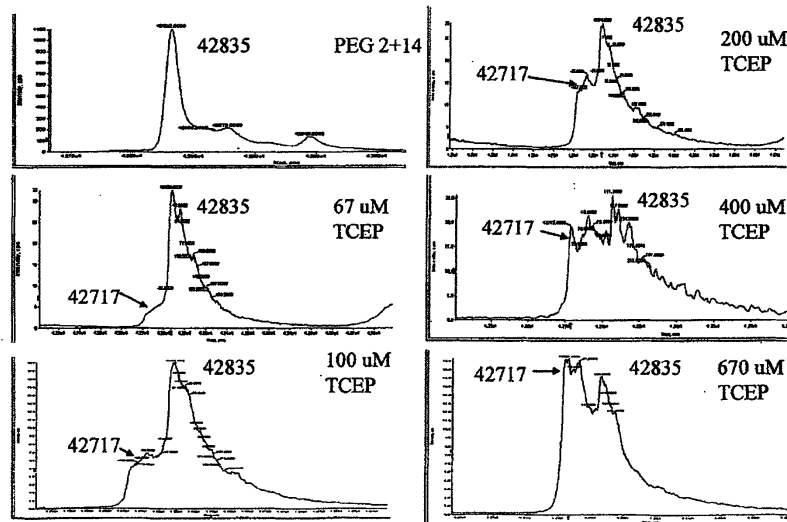


도면31



도면32

분획 A2 (45KD) 상에서의 예비 요약



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Clark, Pan
- <120> Site-Directed Modification of FVIII
- <130> US 07430-00236
- <150> US 60/627277
- <151> 2004-11-12
- <160> 35
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 4
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The first four amino acids for the B-domain of Human Factor VIII
Sequence

<400> 1

Ser Phe Ser Gln

1

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The last ten amino acids for the B-domain of Human Factor VIII

Sequence

<400> 2

Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg

1 5 10

<210> 3

<211> 1457

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Derived from human factor VIII sequence

<400> 3

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg

35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln

85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser

100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser

115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp

130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu

145 150 155 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser

165 170 175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile

180 185 190

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr

195 200 205

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly

210 215 220

Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp

225 230 235 240

Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr

245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val

260 265 270

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile

275 280 285

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser

290 295 300

Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met

305 310 315 320

Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His

325 330 335

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro

340 345 350
 Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp

 355 360 365
 Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
 370 375 380
 Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400
 Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415
 Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn

 420 425 430
 Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445
 Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460
 Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480
 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro

 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510
 Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540
 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg

 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
595 600 605
Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
610 615 620
Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
625 630 635 640
Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
645 650 655
Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
660 665 670
Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
675 680 685
Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
690 695 700
Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
705 710 715 720
Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
725 730 735
Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
740 745 750
Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu
755 760 765
Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln
770 775 780
Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu
785 790 795 800
Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe
805 810 815
Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp
820 825 830
Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln

835 840 845
 Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr
 850 855 860
 Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His

 865 870 875 880
 Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile
 885 890 895
 Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser
 900 905 910
 Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg
 915 920 925
 Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val

 930 935 940
 Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp
 945 950 955 960
 Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu
 965 970 975
 Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His
 980 985 990
 Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe

 995 1000 1005
 Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn
 1010 1015 1020
 Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys
 1025 1030 1035
 Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr
 1040 1045 1050
 Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr

 1055 1060 1065
 Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe
 1070 1075 1080

Ser Gly	His Val Phe Thr Val	Arg Lys Lys Glu Glu	Tyr Lys Met
1085	1090	1095	
Ala Leu	Tyr Asn Leu Tyr Pro	Gly Val Phe Glu Thr	Val Glu Met
1100	1105	1110	
Leu Pro	Ser Lys Ala Gly Ile	Trp Arg Val Glu Cys	Leu Ile Gly
1115	1120	1125	
Glu His	Leu His Ala Gly Met	Ser Thr Leu Phe Leu	Val Tyr Ser
1130	1135	1140	
Asn Lys	Cys Gln Thr Pro Leu	Gly Met Ala Ser Gly	His Ile Arg
1145	1150	1155	
Asp Phe	Gln Ile Thr Ala Ser	Gly Gln Tyr Gly Gln	Trp Ala Pro
1160	1165	1170	
Lys Leu	Ala Arg Leu His Tyr	Ser Gly Ser Ile Asn	Ala Trp Ser
1175	1180	1185	
Thr Lys	Glu Pro Phe Ser Trp	Ile Lys Val Asp Leu	Leu Ala Pro
1190	1195	1200	
Met Ile	Ile His Gly Ile Lys	Thr Gln Gly Ala Arg	Gln Lys Phe
1205	1210	1215	
Ser Ser	Leu Tyr Ile Ser Gln	Phe Ile Ile Met Tyr	Ser Leu Asp
1220	1225	1230	
Gly Lys	Lys Trp Gln Thr Tyr	Arg Gly Asn Ser Thr	Gly Thr Leu
1235	1240	1245	
Met Val	Phe Phe Gly Asn Val	Asp Ser Ser Gly Ile	Lys His Asn
1250	1255	1260	
Ile Phe	Asn Pro Pro Ile Ile	Ala Arg Tyr Ile Arg	Leu His Pro
1265	1270	1275	
Thr His	Tyr Ser Ile Arg Ser	Thr Leu Arg Met Glu	Leu Met Gly
1280	1285	1290	
Cys Asp	Leu Asn Ser Cys Ser	Met Pro Leu Gly Met	Glu Ser Lys
1295	1300	1305	
Ala Ile	Ser Asp Ala Gln Ile	Thr Ala Ser Ser Tyr	Phe Thr Asn

1310 1315 1320
Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln
1325 1330 1335
Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu
1340 1345 1350
Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val

1355 1360 1365
Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys
1370 1375 1380
Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu
1385 1390 1395
Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp
1400 1405 1410
Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr

1415 1420 1425
Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala
1430 1435 1440
Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
1445 1450 1455

<210> 4

<211> 2332

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220><223> Human factor VIII sequence

<400> 4

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr

1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro

20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys

35 40 45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro

50 55 60
 Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
 65 70 75 80

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

 Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
 145 150 155 160
 His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
 165 170 175
 Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
 180 185 190
 His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp
 195 200 205

 His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
 210 215 220
 Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg
 225 230 235 240
 Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
 245 250 255
 Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
 260 265 270

 Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile
 275 280 285
 Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
 290 295 300

Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
 305 310 315 320
 Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
 325 330 335

Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
 340 345 350
 Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
 355 360 365
 Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
 370 375 380
 Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu
 385 390 395 400

Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
 405 410 415
 Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
 420 425 430
 Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
 435 440 445
 Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
 450 455 460

Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
 465 470 475 480
 Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
 485 490 495
 His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
 500 505 510
 Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
 515 520 525

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
 530 535 540
 Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp

545 550 555 560
 Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
 565 570 575
 Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
 580 585 590

 Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
 595 600 605
 Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
 610 615 620
 Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
 625 630 635 640
 Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
 645 650 655

 Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
 660 665 670
 Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
 675 680 685
 Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
 690 695 700
 Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
 705 710 715 720

 Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
 725 730 735
 Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Arg
 740 745 750
 Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys
 755 760 765
 Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn
 770 775 780

 Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro
 785 790 795 800

His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe
805 810 815
Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser
820 825 830
Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val
835 840 845

Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly
850 855 860
Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser
865 870 875 880
Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala
885 890 895
Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His
900 905 910

Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro
915 920 925
Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp
930 935 940
Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp
945 950 955 960
Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys
965 970 975

Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys
980 985 990
Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala
995 1000 1005
Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu
1010 1015 1020
Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu
1025 1030 1035

Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp

1040	1045	1050
Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg	Leu Asn His Met Ser	Asn Lys Thr
1055	1060	1065
Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu	Met Val Gln Gln Lys	Lys Glu Gly
1070	1075	1080
Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln	Asn Pro Asp Met Ser	Phe Phe Lys
1085	1090	1095
Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser	Ala Arg Trp Ile Gln	Arg Thr His
1100	1105	1110
Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser	Gly Gln Gly Pro Ser	Pro Lys Gln
1115	1120	1125
Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu	Lys Ser Val Glu Gly	Gln Asn Phe
1130	1135	1140
Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val	Val Val Gly Lys Gly	Glu Phe Thr
1145	1150	1155
Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu	Met Val Phe Pro Ser	Ser Arg Asn
1160	1165	1170
Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp	Asn Leu His Glu Asn	Asn Thr His
1175	1180	1185
Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln	Glu Glu Ile Glu Lys	Lys Glu Thr
1190	1195	1200
Leu Ile Gln Glu Asn Val Val	Leu Pro Gln Ile His	Thr Val Thr
1205	1210	1215
Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys	Asn Leu Phe Leu Leu	Ser Thr Arg
1220	1225	1230
Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr	Asp Gly Ala Tyr Ala	Pro Val Leu
1235	1240	1245
Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn	Asp Ser Thr Asn Arg	Thr Lys Lys
1250	1255	1260
His Thr Ala His Phe Ser Lys	Lys Gly Glu Glu Glu	Asn Leu Glu
1265	1270	1275

Gly Leu	Gly Asn Gln Thr Lys	Gln Ile Val Glu Lys	Tyr Ala Cys
1280	1285	1290	
Thr Thr	Arg Ile Ser Pro Asn	Thr Ser Gln Gln Asn	Phe Val Thr
1295	1300	1305	
Gln Arg	Ser Lys Arg Ala Leu	Lys Gln Phe Arg Leu	Pro Leu Glu
1310	1315	1320	
Glu Thr	Glu Leu Glu Lys Arg	Ile Ile Val Asp Asp	Thr Ser Thr
1325	1330	1335	
Gln Trp	Ser Lys Asn Met Lys	His Leu Thr Pro Ser	Thr Leu Thr
1340	1345	1350	
Gln Ile	Asp Tyr Asn Glu Lys	Glu Lys Gly Ala Ile	Thr Gln Ser
1355	1360	1365	
Pro Leu	Ser Asp Cys Leu Thr	Arg Ser His Ser Ile	Pro Gln Ala
1370	1375	1380	
Asn Arg	Ser Pro Leu Pro Ile	Ala Lys Val Ser Ser	Phe Pro Ser
1385	1390	1395	
Ile Arg	Pro Ile Tyr Leu Thr	Arg Val Leu Phe Gln	Asp Asn Ser
1400	1405	1410	
Ser His	Leu Pro Ala Ala Ser	Tyr Arg Lys Lys Asp	Ser Gly Val
1415	1420	1425	
Gln Glu	Ser Ser His Phe Leu	Gln Gly Ala Lys Lys	Asn Asn Leu
1430	1435	1440	
Ser Leu	Ala Ile Leu Thr Leu	Glu Met Thr Gly Asp	Gln Arg Glu
1445	1450	1455	
Val Gly	Ser Leu Gly Thr Ser	Ala Thr Asn Ser Val	Thr Tyr Lys
1460	1465	1470	
Lys Val	Glu Asn Thr Val Leu	Pro Lys Pro Asp Leu	Pro Lys Thr
1475	1480	1485	
Ser Gly	Lys Val Glu Leu Leu	Pro Lys Val His Ile	Tyr Gln Lys
1490	1495	1500	
Asp Leu	Phe Pro Thr Glu Thr	Ser Asn Gly Ser Pro	Gly His Leu

1505	1510	1515
Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu	Leu Gln Gly Thr Glu	Gly Ala Ile
1520	1525	1530
Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg	Pro Gly Lys Val Pro	Phe Leu Arg
1535	1540	1545
Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala	Lys Thr Pro Ser Lys	Leu Leu Asp
1550	1555	1560
Pro Leu Ala Trp Asp Asn His	Tyr Gly Thr Gln Ile	Pro Lys Glu
1565	1570	1575
Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys	Ser Pro Glu Lys Thr	Ala Phe Lys
1580	1585	1590
Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser	Leu Asn Ala Cys Glu	Ser Asn His
1595	1600	1605
Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu	Gly Gln Asn Lys Pro	Glu Ile Glu
1610	1615	1620
Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly	Arg Thr Glu Arg Leu	Cys Ser Gln
1625	1630	1635
Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg	His Gln Arg Glu Ile	Thr Arg Thr
1640	1645	1650
Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu	Glu Ile Asp Tyr Asp	Asp Thr Ile
1655	1660	1665
Ser Val Glu Met Lys Lys Glu	Asp Phe Asp Ile Tyr	Asp Glu Asp
1670	1675	1680
Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser	Phe Gln Lys Lys Thr	Arg His Tyr
1685	1690	1695
Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg	Leu Trp Asp Tyr Gly	Met Ser Ser
1700	1705	1710
Ser Pro His Val Leu Arg Asn	Arg Ala Gln Ser Gly	Ser Val Pro
1715	1720	1725
Gln Phe Lys Lys Val Val Phe	Gln Glu Phe Thr Asp	Gly Ser Phe
1730	1735	1740

Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu

1745 1750 1755

Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val
1760 1765 1770

Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser
1775 1780 1785

Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg

1790 1795 1800

Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys
1805 1810 1815

Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys
1820 1825 1830

Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His
1835 1840 1845

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu

1850 1855 1860

Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu
1865 1870 1875

Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu
1880 1885 1890

Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu

1895 1900 1905

Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly

1910 1915 1920

Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln
1925 1930 1935

Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile
1940 1945 1950

His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys

1955 1960 1965

Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe

1970	1975	1980
Glu Thr Val Glu Met Leu Pro	Ser Lys Ala Gly Ile	Trp Arg Val
1985	1990	1995
Glu Cys Leu Ile Gly Glu His	Leu His Ala Gly Met	Ser Thr Leu
2000	2005	2010
Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys	Cys Gln Thr Pro Leu	Gly Met Ala
2015	2020	2025
Ser Gly His Ile Arg Asp Phe	Gln Ile Thr Ala Ser	Gly Gln Tyr
2030	2035	2040
Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu	Ala Arg Leu His Tyr	Ser Gly Ser
2045	2050	2055
Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys	Glu Pro Phe Ser Trp	Ile Lys Val
2060	2065	2070
Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile	Ile His Gly Ile Lys	Thr Gln Gly
2075	2080	2085
Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser	Leu Tyr Ile Ser Gln	Phe Ile Ile
2090	2095	2100
Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys	Lys Trp Gln Thr Tyr	Arg Gly Asn
2105	2110	2115
Ser Thr Gly Thr Leu Met Val	Phe Phe Gly Asn Val	Asp Ser Ser
2120	2125	2130
Gly Ile Lys His Asn Ile Phe	Asn Pro Pro Ile Ile	Ala Arg Tyr
2135	2140	2145
Ile Arg Leu His Pro Thr His	Tyr Ser Ile Arg Ser	Thr Leu Arg
2150	2155	2160
Met Glu Leu Met Gly Cys Asp	Leu Asn Ser Cys Ser	Met Pro Leu
2165	2170	2175
Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile	Ser Asp Ala Gln Ile	Thr Ala Ser
2180	2185	2190
Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe	Ala Thr Trp Ser Pro	Ser Lys Ala
2195	2200	2205

Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val
2210 2215 2220

Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met
2225 2230 2235

Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr
2240 2245 2250

Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly
2255 2260 2265

His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe
2270 2275 2280

Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp
2285 2290 2295

Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp
2300 2305 2310

Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala
2315 2320 2325

Gln Asp Leu Tyr
2330

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG1 used for Mutagenesis

<400> 5

gatgtccgtc ctttgtgtc aaggagatta cca

33

<210> 6

<211>

> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer PEG2 used for Mutagenesis

<400> 6

ttgtattcaa ggagatgccc aaaaggtgta aaac 34

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG3 used for Mutagenesis

<400> 7

ttaccaaag gtgtatgcca tttgaaggat tttc 34

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG4 used for Mutagenesis

<400> 8

aaggattttc caatttgccc aggagaaata ttc 33

<210> 9

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG 5 used for Mutagenesis

<400> 9

gatttatattt aagaattgcg caagcagacc atat 34

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG6 used for Mutagenesis

<400> 10

tagaaaaaac tttgtctgcc ctaatgaaac caaaac 36

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG7 used for Mutagenesis

<

400> 11

aactttgtca agccttgcca aacccaaact tac 33

<210> 12

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG8 used for Mutagenesis

<400> 12

gtcaagccta atgaatgcaa aacttacttt tgga 34

<210> 13

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEG9 Primer used for Mutagenesis

<400> 13

caagccta at gaaacctgca cttacttttg gaaag 35

<210> 14

<211> 36

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG10 used for Mutagenesis

<400> 14

ctaataaag caaaacttgc ttttggaag tgcaac 36

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG11 used for Mutagenesis

<400> 15

atttcttatg aggaatgcca gaggcaagga gca 33

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG12 used for Mutagenesis

<400> 16

tccttatgagg aagattgcag gcaaggagca gaa 33

<210> 17

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG13 used for Mutagenesis

<400> 17

caaggagcag aaccttgcaa aaactttgtc aagcct 36

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG14 used for Mutagenesis

<400> 18

ggagcagaac ctagatgcaa ctttgtcaag cct 33

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG15 used for Mutagenesis

<400> 19

cgctcagttg ccaagtgta tcctaaaact tgg 33

<210> 20

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG16 used for Mutagenesis

<400> 20

tcagttgcc agaagtgcc taaaacttgg gta 33

<210> 21

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG17 used for Mutagenesis

<400> 21

ctcctcatct gctactgcga atctgtagat caa 33

<210> 22

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG18 used for Mutagenesis

<400> 22

caaaatcttt tccattctgc acctcagtcg tgtac 35

<210> 23

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG19 used for Mutagenesis

<400> 23

gtcaatgggt atgtatgcag gtctctgccca ggt 33

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG20 used for Mutagenesis

<400> 24

cagacttatc gaggatgttc cactggaacc tta 33

<210> 25

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG21 used for Mutagenesis

<400> 25

atccaggctg aggtttgtga tacagtggtc att 33

<210> 26

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG22 used for Mutagenesis

<400> 26

gaagatgata aagtctgtcc tgggtgaagc cat 33

<210> 27

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG23 used for Mutagenesis

<400> 27

cagcggattg gtaggtgtta caaaaaagtc cga 33

<210> 28

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG24 used for Mutagenesis

<400> 28

gaagatgggc caacttgctc agatcctcgg tgc 33

<210> 29

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG25 used for Mutagenesis

<400> 29

cagataatgt cagactgcag gaatgcatc ctg 33

<210> 30

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG26 used for Mutagenesis
 <400> 30
 cacactaaca cactgtgtcc tgctcatggg aga 33
 <210> 31
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer PEG27 used for Mutagenesis
 <400> 31
 cagatggaag atccctgctt taaagagaat tat 33
 <210> 32
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer PEG28 used for Mutagenesis
 <400> 32
 acccaggggtg cccgttgcaa gttctccagc etc 33
 <210> 33
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer PEG29 used for Mutagenesis
 <400> 33
 aaagtaaagg ttttttgcgg aaatcaagac tcc 33
 <210> 34
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer PEG30 used for Mutagenesis
 <400> 34
 ttgcagttgt cagttgcttt gcatgaggtg gca 33
 <210> 35
 <211> 33
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer PEG31 used for Mutagenesis

<400> 35

aatatggaaa gaaacgctag ggctccctgc aat

33

7