



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0080081
(43) 공개일자 2008년09월02일

(51) Int. Cl.

C07K 14/745 (2006.01) C12P 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7006691

(22) 출원일자 2008년03월19일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년03월19일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/032649

국제출원일자 2006년08월21일

(87) 국제공개번호 WO 2007/022512

국제공개일자 2007년02월22일

(30) 우선권주장

60/709,983 2005년08월19일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

네오스 테크놀로지스, 인크.

미국 19044 펜실바니아주 홀삼 락 로드 102

(72) 발명자

디프리스, 손

미국 펜실바니아 19454, 노우스 웨일스, 필리 드 라이브 126

조프, 대비드, 에이.

미국 펜실바니아 19087, 웨인, 비치트리 레인 560

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

박천배

전체 청구항 수 : 총 35 항

(54) 글리코페닐화 인자 VII 및 인자 VII에이

(57) 요약

본 발명은 인자 VII 또는 인자 VIIa 펩티드와 PEG 성분 사이에서 콘주게이트(conjugates)를 제공한다.

그 콘주게이트는 그 펩티드와 그 변형기 사이에 삽입되어 공유 결합하는 하나의 무손상(intact) 글리코실 결합기에 의해 결합되어 있다.

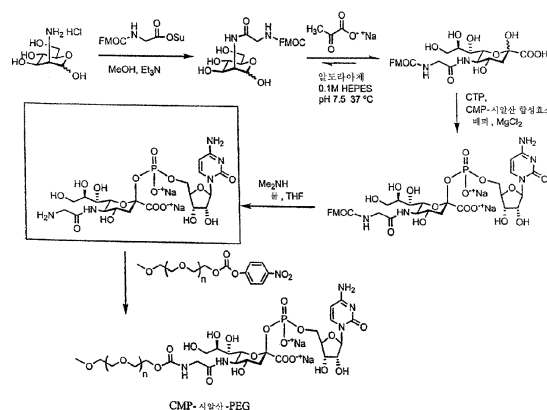
그 콘주게이트는 하나의 글리코실 전이효소의 작용에 의해 글리코실화 및 비글리코실화(unglycosylated) 펩티드로부터 형성된다.

그 글리코실 전이효소는 그 펩티드 상에서의 아미노산 또는 글리코실 잔기에 하나의 변형당 성분을 결합(ligation) 한다.

또, 상기 콘주게이트를 함유한 의약제제를 제공한다.

상기 콘주게이트의 제조방법은 또 본 발명의 범위 내에 존재한다.

대표도



(72) 발명자

타우드테, 수산

미국 펜실바니아 18073, 펜스버그, 이스트 버크 로드 3374

윌렛, 더블유., 스코트

미국 펜실바니아 18901, 도일레스타운, 콤리 서클 3820

베이어, 로버트, 제이.

미국 캘리포니아 92122, 샌디에이고, 디락 스트리트 6105

칼로, 마튜

미국 캘리포니아 92104, 샌디에이고, 샵 110, 루이 시아나스트리트 3649

(30) 우선권주장

60/725,894 2005년10월11일 미국(US)

60/730,607 2005년10월26일 미국(US)

60/733,649 2005년11월04일 미국(US)

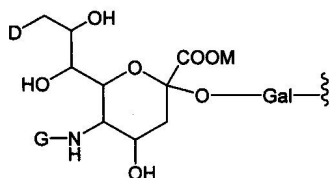
60/746,868 2006년05월09일 미국(US)

60/756,443 2006년01월05일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

다음에 나타낸 구조식을 가진 하나의 변형시알릴 잔기로 이루어진 하나의 글리코실링커를 구성하는 하나의 인자(factor) VII/인자VIIa 펩티드 콘주게이트의 제조 방법에 있어서,



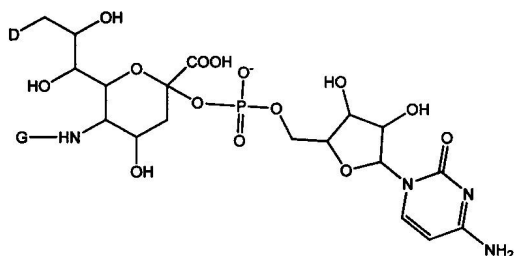
(위 구조식에서,

D는 -OH와 $R^1-L-NH-$ 에서 선택한 하나의 멤버(member)이고; G는 R^1-L- 과 $-C(0)(C_1-C_6)알킬-R^1$ 에서 선택한 하나의 멤버이며; R^1 은 하나의 직쇄폴리(에틸렌글리콜) 잔기와 하나의 분기폴리(에틸렌글리콜) 잔기에서 선택한 하나의 멤버로 이루어진 하나의 성분이고; M은 H, 하나의 금속 및 하나의 단일 음전하에서 선택한 하나의 멤버이며; L은 하나의 결합, 치환 또는 비치환 알킬 및 치환 또는 비치환 헤테로알킬에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 링커(link)이고; D가 OH인 경우 G는 R^1-L- 이고, G가 $-C(0)(C_1-C_6)알킬$ 인 경우 D는 $R^1-L--NH$ 이다.)

상기 제조방법은 (a) 다음에 나타낸 글리코실 성분으로 이루어진 하나의 인자 VII/인자VIIa 펩티드를



다음에 나타낸 구조식을 가진 하나의 PEG-시알산도너 성분과

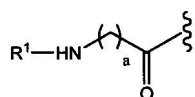


상기 PEG-시알산도너 성분을 상기 글리코실 성분의 Gal상에서 전이하는 하나의 효소와 함께 상기 전이에 적합한 조건하에서 접촉하는 것으로 이루어짐을 특징으로 하는 상기 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

$L-R^1$ 은 아래에 나타낸 구조식을 가지는 것을 특징으로 하는 제조방법.



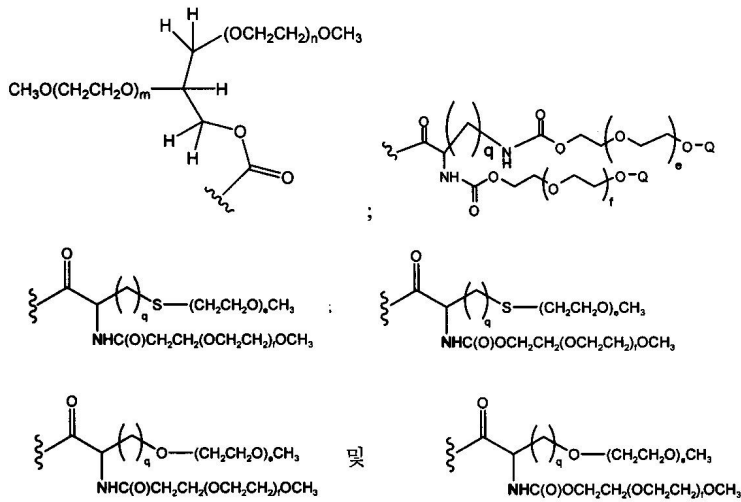
위 구조식에서,

a는 0~20에서 선택한 하나의 정수이다.

청구항 3

제 1항에 있어서,

R^1 은 아래에 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 구성체를 가짐을 특징으로 하는 제조방법.



위 구조식에서,

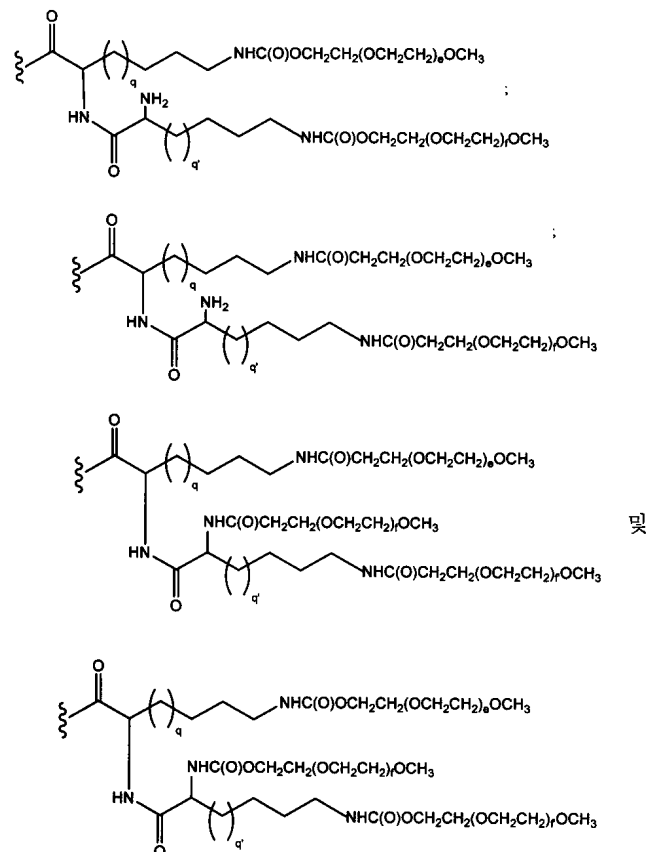
e, f, m 및 n은 1~2500에서 독립하여 선택한 정수이고;

q는 0~20에서 선택한 하나의 정수이다.

청구항 4

제 1항에 있어서,

R^1 은 다음에 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 구성체를 가짐을 특징으로 하는 제조방법.



위 구조식에서,

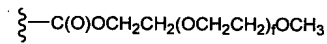
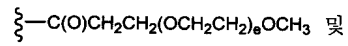
e, f 및 f'는 1~2500에서 독립하여 선택한 정수이고;

q 및 q'는 1~20에서 독립하여 선택한 정수이다.

청구항 5

제 1항에 있어서,

R¹은 아래에 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 구성체를 가지며,

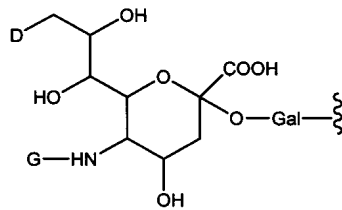


e 및 f는 1~2500에서 독립하여 선택한 정수임을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

제 1항에 있어서,

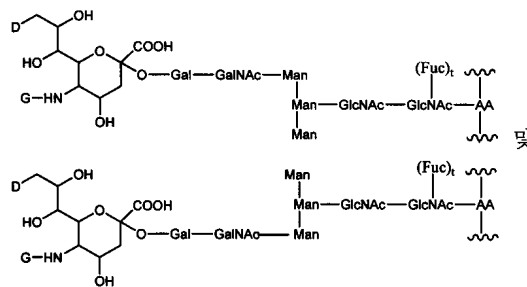
상기 글리코실 링커는 아래에 나타낸 구조식을 가지는 것을 특징으로 하는 제조방법.



청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 펩티드 콘주게이트는 아래에 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 구조식에 의해 상기 글리코실 링커 중 최소 하나로 이루어지는 것을 특징으로 하는 제조방법.



위 구조식에서,

AA는 상기 펩티드 콘주게이트의 하나의 아미노산 잔기이고,

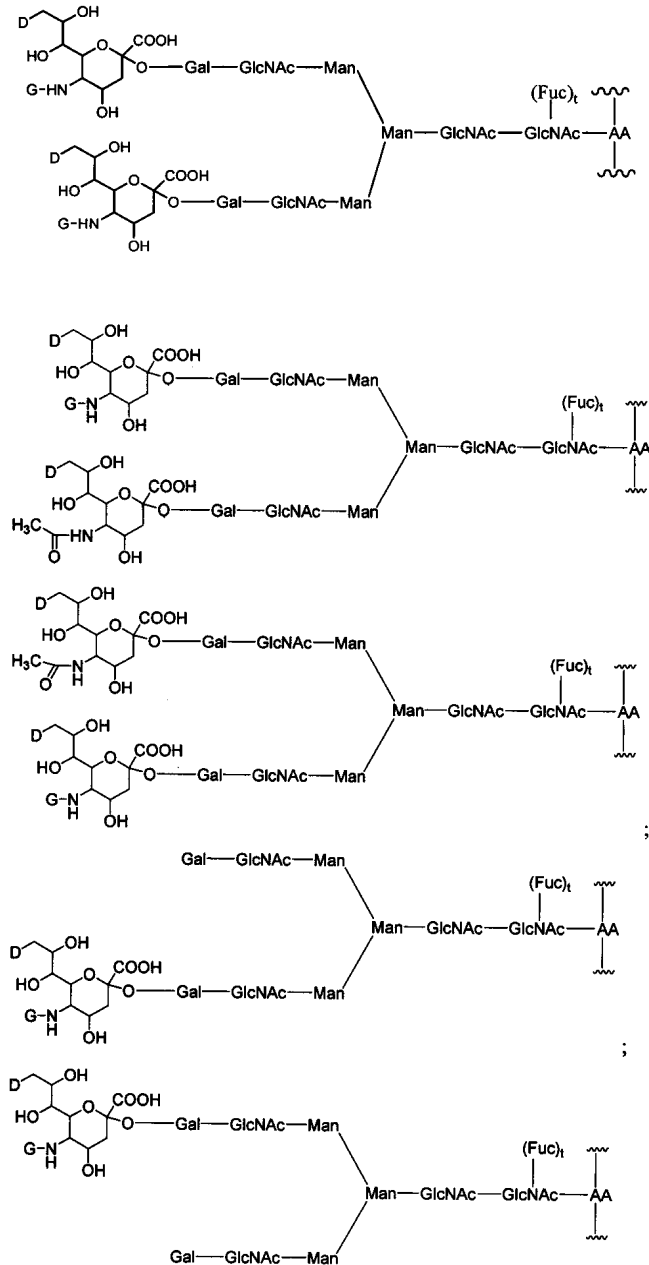
t는 0과 1에서 선택한 하나의 정수이다.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 펩티드 콘주게이트는 최소 하나의 상기 글리코실 링커로 이루어지며, 상기 글리코실 링커의 각각은 아래에

나타낸 구조식에서 독립하여 선택한 하나의 멤버인 하나의 구조체를 가지는 것을 특징으로 하는 제조방법.



위 구조식에서,

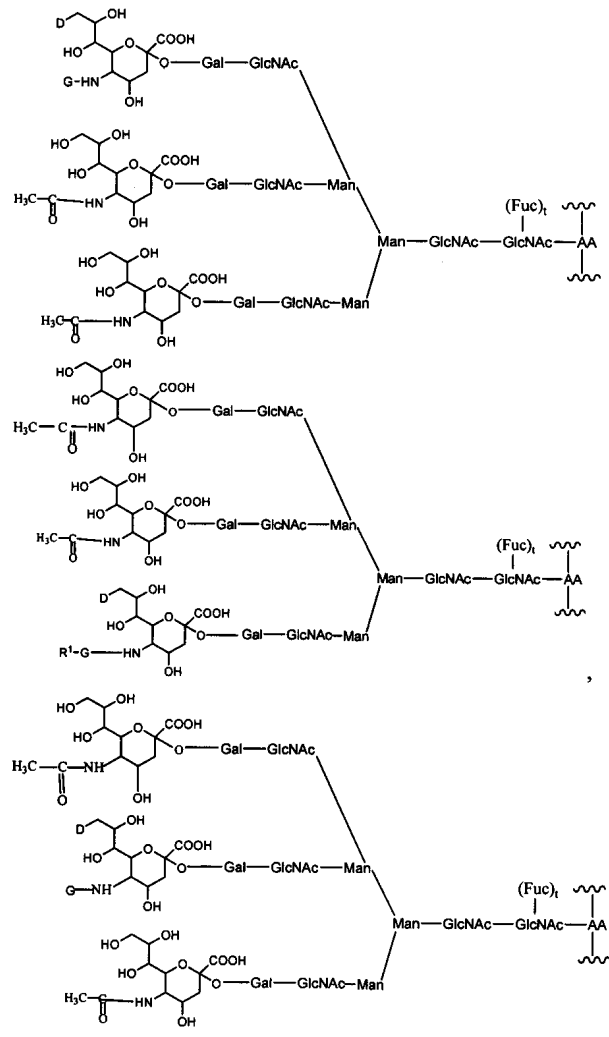
AA는 상기 펩티드 콘주게이트의 하나의 아미노산 잔기이고,

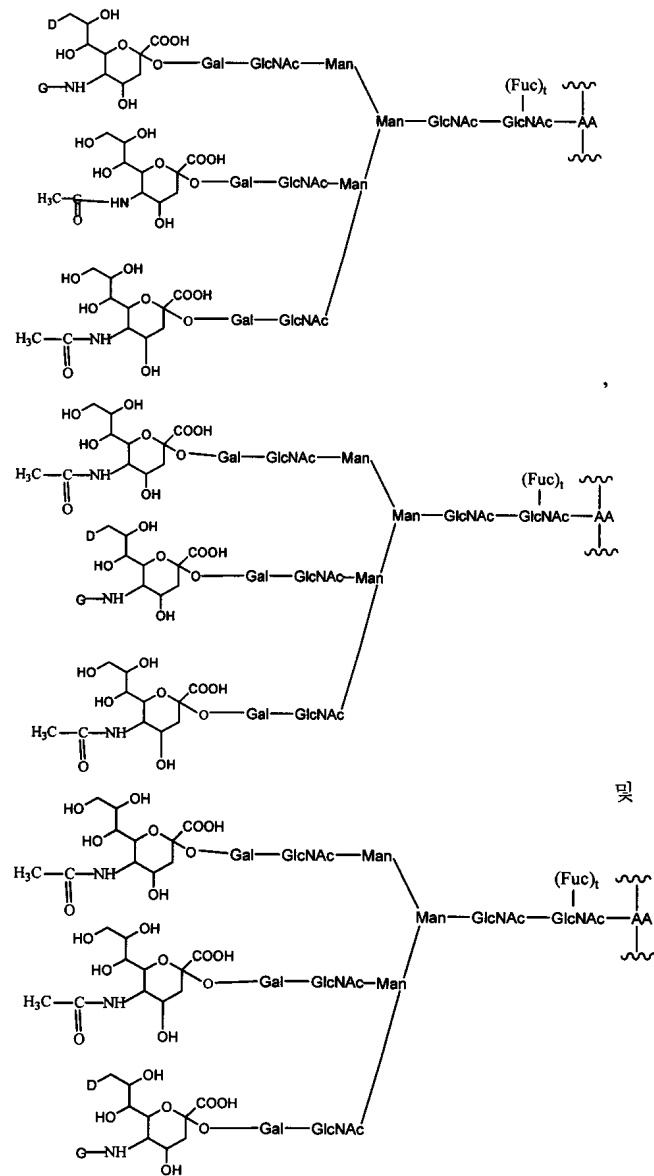
t는 0과 1에서 선택한 하나의 정수이다.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 펩티드 콘주게이트는 아래에 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 구조식에 의한 최소 하나의 상기 글리코실 링커로 이루어지는 것을 특징으로 하는 제조방법.





위 구조식에서,

AA는 상기 펩티드 콘주게이트의 하나의 아미노산 잔기이고,

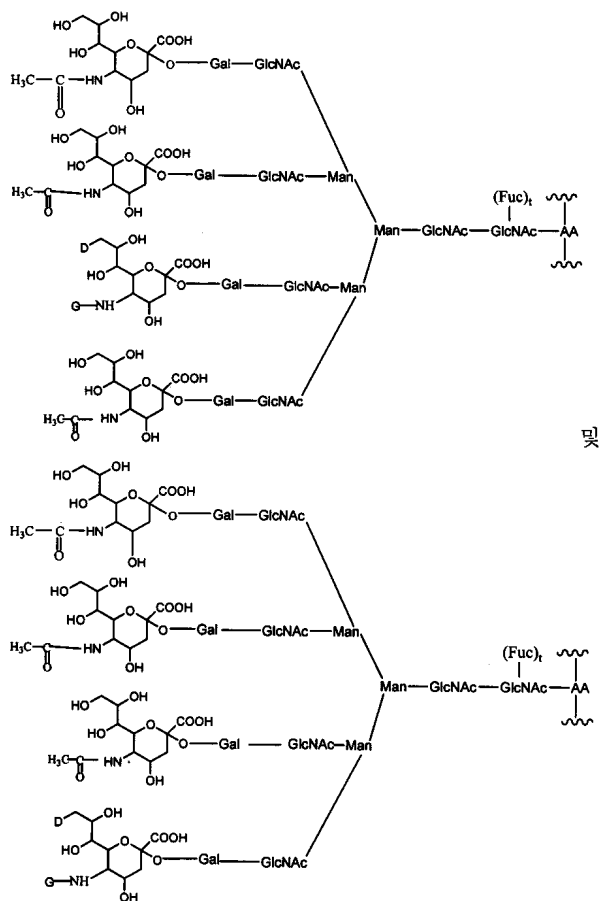
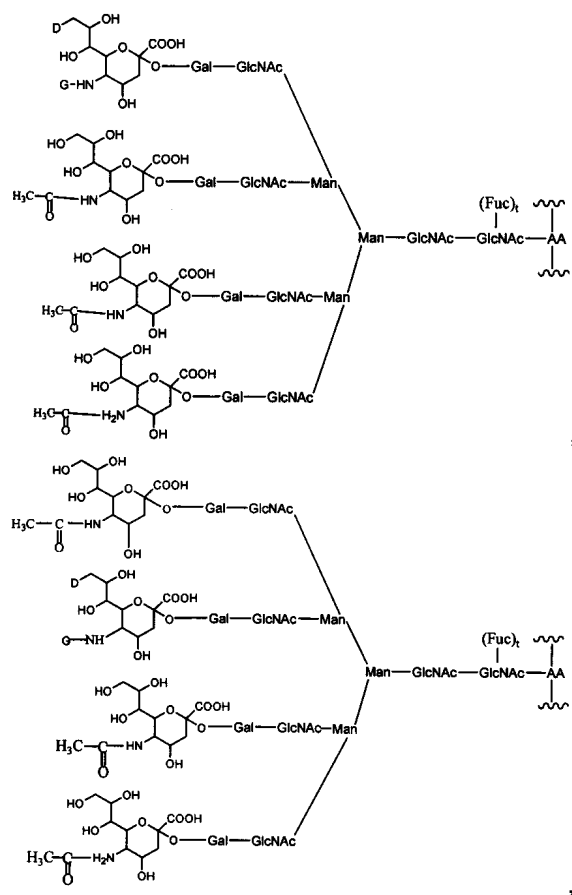
t는 0과 1에서 선택한 하나의 정수이며,

G로 구성하지 않은 시알릴 성분들 중 0~2종의 성분에서 선택한 하나의 멤버는 존재하지 않는다.

청구항 10

제 1항에 있어서,

상기 펩티드 콘주게이트는 아래에 나타난 구조식에서 선택한 하나의 구조식에 의한 최소 하나의 상기 글리코실 링커로 이루어지는 것을 특징으로 하는 제조방법.



위 구조식에서,

AA는 상기 펩티드 콘주게이트의 하나의 아미노산 잔기이고,

t는 0과 1에서 선택한 하나의 정수이며;

G로 구성되지 않은 시알릴 성분 중 0~2 종의 성분에서 선택한 하나의 멤버는 존재하지 않는다.

청구항 11

제 1항에 있어서,

상기 인자 VII/인자 VIIa 펩티드는 아미노산 서열 SEQ. ID. NO: 1을 가짐을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 12

제 1항에 있어서,

상기 글리코실 링커는 세린 및 트레오닌에서 선택한 하나의 아미노산 잔기에 의해 상기 인자 VII/인자 VIIa 펩티드에 결합되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 13

제 1항에 있어서,

상기 글리코실 링커는 하나의 아스파라긴 잔기인 하나의 아미노산 잔기에 의해 상기 인자 VII/인자 VIIa 펩티드에 결합하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 아스파라긴 잔기는 N152, N322 및 그 조합에서 선택한 하나의 멤버인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 15

제 1항에 있어서,

상기 인자 VIIa 펩티드는 하나의 바이오 활성(bioactive) 인자 VIIa 펩티드인 것을 특징으로 하는 상기 제조방법.

청구항 16

제 1항에 있어서,

상기 스텝(a) 전에, (b) 상기 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를 하나의 적합한 숙주(host)에서 발현하는 스텝을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 17

제 16항에 있어서,

상기 숙주(host)는 하나의 포유동물 발현계(mammalian expression system)인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 18

필요할 때 응고(응혈) 잠재력 절충(compromised clotting potency)에 특징이 있는 피검자의 상태를 치료하는 방법에 있어서,

상기 피검자의 상태를 개선하는데 효과적인, 제 1항의 제조방법에 의해 제조된 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 소정량을 피검자에 투여하는 스텝을 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

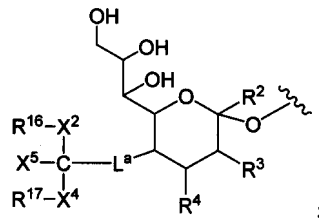
청구항 19

포유동물의 응고(응혈) 잠재력을 촉진하는 방법에 있어서,

제 1항의 제조방법에 의해 제조된 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 소정량을 포유동물에 투여하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

다음에 나타낸 구조식을 가진 하나의 변형 시알릴 잔기로 이루어진 하나의 글리코실 링커를 함유한 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 제조방법에 있어서,



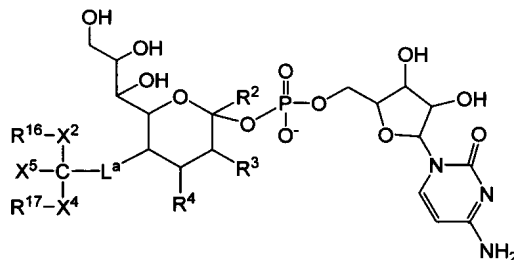
(위 구조식에서,

R^2 는 H, CH_2OR^7 , $COOR^7$ 또는 OR^7 이고, 여기서 R^7 은 H, 치환 또는 비치환 알킬 또는 치환 또는 비치환 헤테로 알킬이며; R^3 및 R^4 는, H, 치환 또는 비치환 알킬, OR^8 , $NHC(O)R^9$ 에서 독립하여 선택한 멤버이고, 여기서 R^8 과 R^9 는 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬 또는 시알산에서 독립하여 선택되며; R^{16} 및 R^{17} 은 독립하여 폴리머 암(polymeric arms)을 선택하며, X^2 및 X^4 는 C에 폴리머 성분 R16 및 R17을 결합하는 결합 프라그멘트를 독립하여 선택하고; X^5 는 하나의 비반응성(non-reactive)기 이고; L^a 는 하나의 기이다.)

상기 제조방법은 (a) 아래에 나타낸 글리코실 성분으로 이루어진 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를



아래에 나타낸 구조식을 가진 하나의 PEG-시알산 도너 성분 및

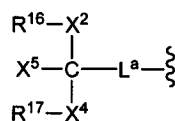


상기 글리코실 성분의 Gal 상에서 PEG-시알산을 전이하는 하나의 효소와 함께 상기 전이에 적합한 조건하에서 접촉하는 것을 포함함을 특징으로 하는 제조방법.

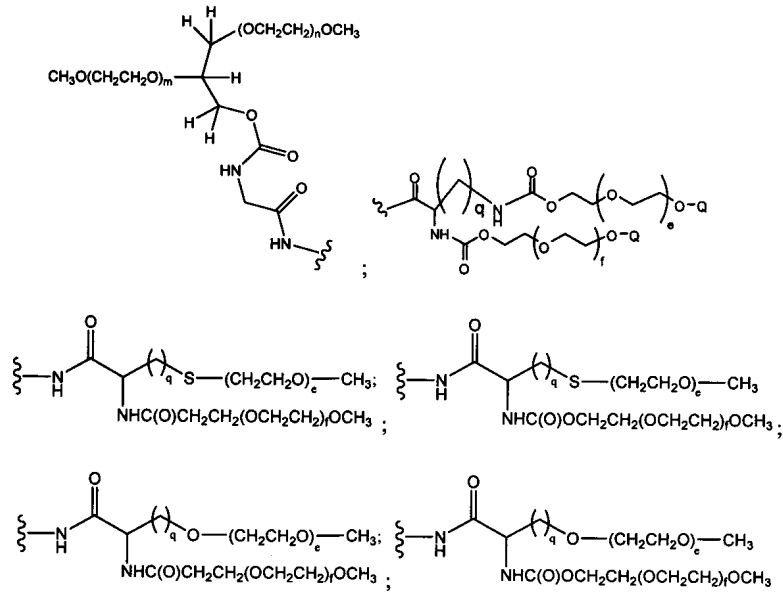
청구항 21

제 20항에 있어서,

다음에 나타낸 상기 성분은



아래에 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 구조식을 가짐을 특징으로 하는 제조방법.



위 구조식에서,

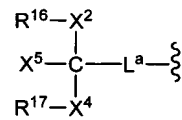
e, f, m 및 n은 1~2500에서 독립하여 선택한 정수이고,

q는 0~20에서 선택한 하나의 정수이다.

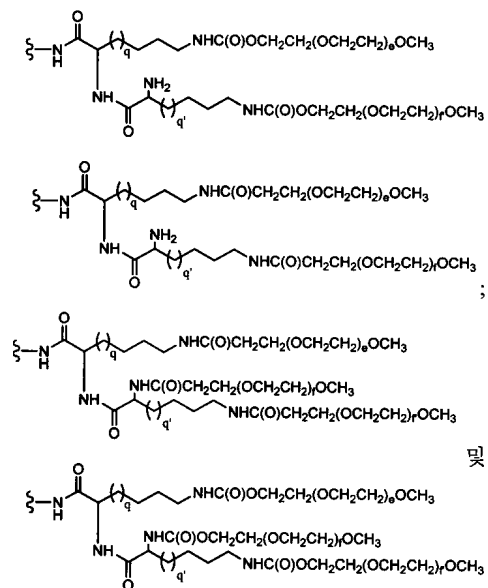
청구항 22

제 20항에 있어서,

다음에 나타낸 상기 성분은



아래에 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 구조식을 가짐을 특징으로 하는 제조방법.



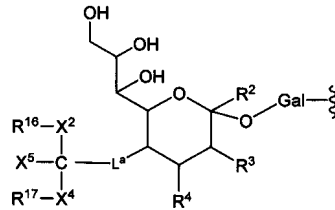
위 구조식에서,

e, f 및 f'는 1~2500에서 독립하여 선택한 정수이고,
q 및 q'는 1~20에서 독립하여 선택한 정수이다.

청구항 23

제 20항에 있어서,

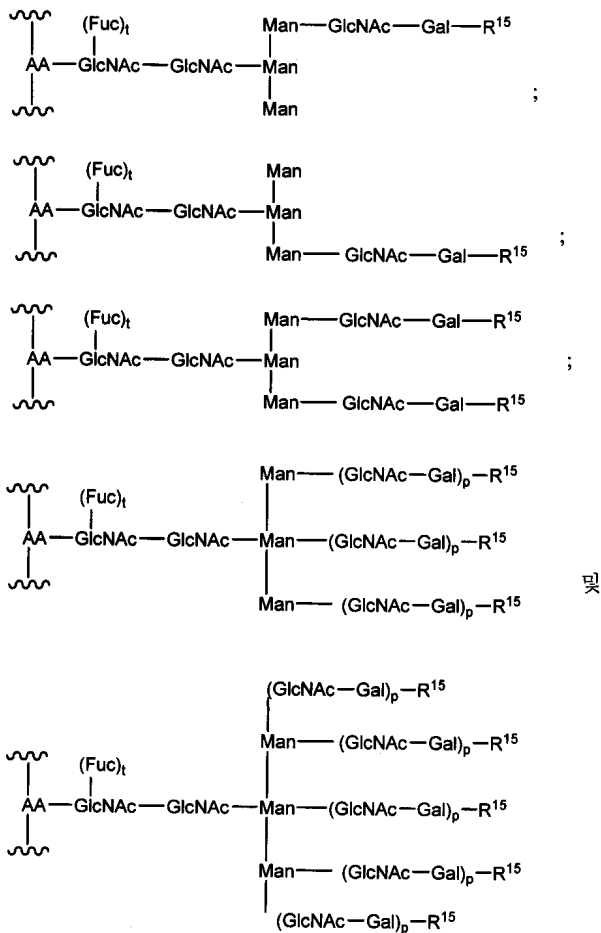
상기 글리코실 링커는 다음에 나타낸 구조식으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 제조방법.



청구항 24

제 20항에 있어서,

상기 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트는 아래에 나타낸 구조식을 가진 최소 하나의 글리코실 링커로 이루어지는 것을 특징으로 하는 제조방법.



위 구조식에서,

AA는 상기 펩티드의 하나의 아미노산 잔기이고;

t는 0과 1에서 선택한 하나의 정수이며;

R¹⁵는 변형 시알릴 성분이다.

청구항 25

제 20항에 있어서,

상기 인자 VII/인자 VIIa 펩티드는 아미노산 서열 SEQ. ID. NO: 1을 가지는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 26

제 20항에 있어서,

상기 글리코실 링커는 하나의 아스파라긴 잔기인 하나의 아미노산 잔기에 의해 상기 인자 VII/인자 VIIa 펩티드에 결합하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 27

제 26항에 있어서,

상기 아스파라긴 잔기는 N152, N322 및 그 조합에서 선택한 하나의 멤버인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 28

제 20항에 있어서,

상기 인자 VIIa 펩티드는 하나의 바이오 활성(bioactive) 인자 VIIa 펩티드인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 29

제 20항에 있어서,

상기 스텝 (a)전에 (b) 하나의 적합한 숙주에서 상기 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를 발현하는 것을 더 포함함을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 30

제 29항에 있어서,

상기 숙주는 하나의 포유동물 발현계(mammalian expression system)인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 31

피검자의 응고(응혈) 잠재력 절충(compromised clotting potency)을 특징으로 하는 상태를 필요시에 치료하는 방법에 있어서,

상기 피검자의 상태를 개선하는데 효과적인, 제 20항의 제조방법에 의해 제조된 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 소정량을 피검자에 투여하는 스텝을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

하나의 포유동물의 응고(응혈) 잠재력을 촉진하는 방법에 있어서,

제 20항의 제조방법에 의해 제조된 상기 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 소정량을 상기 포유동물에 투여하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 합성방법에 있어서,

a) 시알리다아제,

b) 글리코실 전이효소, 엑소글리코시다아제 및 엔도글리코시다아제에서 선택한 하나의 멤버인 효소,

c) 변형당/변형 시알릴 전기,

d) 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를 배합하여,

상기 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트를 합성하는 것을 특징으로 하는 합성방법.

청구항 34

제 33항에 있어서,

상기 배합(combining)은 10시간 이하의 시간 동안인 것을 특징으로 하는 합성방법.

청구항 35

제 33항에 있어서,

하나의 캐핑 스텝(capping step)을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 합성방법.

명세서

<1> 관련 특허출원

<2> 본 특허출원은 미국 가특허출원 60/746,868(2006.05.09출원), 미국 가특허출원 60/756,443(2006.01.05출원), 미국 가특허출원 60/733,646(2005.11.04출원), 미국 가특허출원 60/730,607(2005.10.26출원), 미국 가특허출원 60/725,894 (2005.10.11출원), 미국 가특허출원 60/709,983(2005.08.19출원)에 관한 것으로, 모두 참고로 편집한 것이다.

<3> (발명의 요지)

<4> 하나 이상의 폴리(에틸렌글리콜) 성분을 가진 인자 VII 또는 인자 VIIa의 제어변경(controlled modification)은 그 대응하는 원(미페질화:un-pegylated)인자 VII 또는 VIIa에 대하여 강화 향상시킨 약물 동태성을 가진 하나의 새로운 인자 VII 또는 인자 VIIa 펩티드 콘주게이트(peptide conjugate)를 제공한다는 것을 발견하였다.

<5> 본 발명의 예에서, 본 발명의 "글리코페질화"(glycopegylated) 인자 VII 또는 인자 VIIa는 글리코실화 또는 미글리코실화 인자 VII 또는 인자 VIIa 펩티드와, 폴리머 변형기(폴리(에틸렌글리콜)등) 등 하나의 변형기를 포함하는 효소에 의해 전이할 수 있는 사카틸 성분 사이에서 하나의 콘주게이트(conjugate)의 효소 중개형(enzyme mediated formation)에 의해 그 구조체 내에서 제조한다.

<6> 그 PEG 성분은 사카틸 성분에 직접 결합하거나(즉, 2개의 반응성기의 반응에 의해 형성된 하나의 단일기를 통해) 또는 하나의 링커 성분(inker moiety), 즉 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬 등에 의해 결합된다.

<7> 이와 같이, 본 발명의 하나의 국면(aspect)에서, 본 발명은 하나의 PEG 성분, 즉 PEG와 유사한 생체내 활성을 갖거나, 또는 종래에 공지된 인자 VII 또는 인자 VIIa와 유사한 하나의 펩티드 사이에 하나의 콘주게이트(conjugate)를 제공한다.

<8> 본 발명의 콘주게이트에서, 그 PEG 성분은 무손상(intact)의 글리코실 결합기에 의해 그 펩티드에 공유 결합되어 있다.

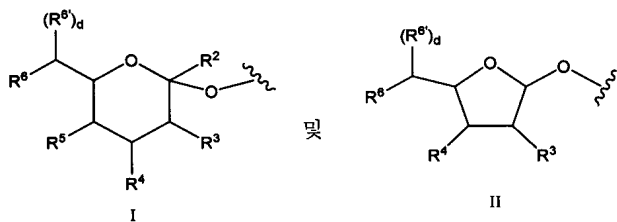
<9> 본 발명의 예에서 무손상의 글리코실 결합기에는 PEG로 유도화시킨 시알산 성분을 포함한다.

<10> 그 폴리머 변형기는 인자 VII 또는 인자 VIIa의 글리코실 성분의 어느 위치에 결합시킬 수 있다.

<11> 또, 그 폴리머 변형기는 야생타입의 아미노산 서열 또는 변이(mutant) 인자 VII 또는 VIIa 펩티드에서의 어느 위치에서 글리코실잔기에 결합시킬 수 있다.

<12> 본 발명의 예에서, 본 발명은 글리코실 결합기를 통해 폴리머 변형기에 콘주게이팅(conjugating)시킨 하나의 인자 VII 또는 인자 VIIa를 제공한다.

<13> 본 발명의 예에서의 인자 VII 또는 인자 VIIa 펩티드 콘주게이트에는 다음 구조식 I 과 II에서 선택한 하나의 구조식을 가진 하나의 글리코실 결합기를 포함한다.



<14>

<15>

구조식 I 및 II에서,

<16>

R^2 는 H, CH_2OR^7 , $COOR^7$, COO^- 또는 OR^7 이다(여기서, R^7 은 H, 치환 또는 비치환 알킬 또는 치환 또는 비치환 헤테로알킬이다).

<17>

부호 R^3 , R^4 , R^5 , R^6 및 $R^{6'}$ 는 각각 H, 치환 또는 비치환 알킬, OR^8 , $NHC(O)R^9$ 이다.

<18>

지수 d는 0 또는 1이다.

<19>

R^8 및 R^9 는 각각 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬 또는 시알산이다.

<20>

R^3 , R^4 , R^5 , R^6 및 $R^{6'}$ 중 최소 하나에는 폴리머 변형기, 즉 PEG를 포함한다.

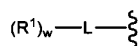
<21>

본 발명의 예에서, 결합되어 있는 탄소를 함께 가진 R^6 및 $R^{6'}$ 는 시알릴 성분의 측쇄 성분이다.

<22>

본 발명의 예에서, 그 폴리머 변형기는 일반적으로 글리코실 코어(core) 상의 헤테로 원자(즉, N,O)를 통해 아래에서 나타낸 바와 같이 하나의 링커 L를 통해 글리코실 결합기에 결합되어 있다.

<23>



<24>

상기 링커에서,

<25>

R^1 은 폴리머 변형기이고, L은 하나의 결합(bond)과 하나의 결합기에서 선택한다.

<26>

지수 w는 1~6, 바람직하게는 1~3, 더 바람직하게는 1~2에서 선택한 지수를 나타낸다.

<27>

본 발명의 예에서의 결합기에는 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬 성분 및 시알산을 포함한다.

<28>

그 링커의 하나의 예로서의 성분은 아실 성분이다.

<29>

또 다른 예로서의 결합기는 아미노산잔기(즉, 시스테인, 세린, 라이신 및 길이가 짧은 올리고 펩티드, 즉 Lys-Lys, Lys-Lys-Lys, Cys-Lys, Ser-Lys 등)이다.

<30>

L이 하나의 결합(bond)일 경우 이것은 R^1 의 전구물질 상에서의 반응성 작용기와 그 글리코실 결합기의 전구물질 상에서의 반응성이 상보적인 반응성 작용기의 반응에 의해 형성된다.

<31>

L이 비영 오더(non-zero order) 결합기인 경우, L은 R^1 전구물질과의 반응 전에 글리코 성분 상에서 위치할 수 있다.

<32>

또, R^1 과 L의 전구물질은 그 글리코실 성분에 후 결합시키는 하나의 사전에 형성된 카세트(cassette) 내에 결합시킬 수 있다.

<33>

여기서 설명한 바와 같이, 적합한 반응성 작용기와 전구물질의 제조 및 선택은 이 분야의 기술자의 능력 범위 내에서 할 수 있다.

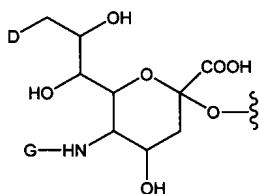
<34>

또, 그 전구물질의 커플링(coupling)은 이 분야에서 충분히 이해할 수 있는 화학적 특성에 의해 처리할 수 있다.

<35>

본 발명의 예에서, L은 하나의 치환 알킬 링커를 통해 폴리머 변형 성분이 결합되어 있는 하나의 변형당을 제공하는 아미노산 또는 소형 펩티드(small peptide)(즉, 1~4 아미노산잔기)에서 형성된다.

- <36> 본 발명의 예에서서의 링커에는 글리신, 라이신, 세린 및 시스테인을 포함한다.
- <37> 아미노산 아날로그(analog)는 여기서 정의한 바와 같이, 링커 성분으로 유용하다.
- <38> 그 아미노산은 아미노산잔기의 아민 성분을 통해 형성된 아실결합, 예로서 아마이드 또는 우레탄에 의해 공유 결합되어 있는 하나의 링커, 즉 알킬, 헤테로알킬의 추가성분으로 변형시킬 수 있다.
- <39> 본 발명의 예에서, 글리코실 결합기를 상기 구조식 I 에 의해 하나의 구조체를 가지며, R^5 에는 폴리머 변형기를 포함한다.
- <40> 또 다른 예에서, R^5 에는 폴리머 변형기와 링커 L을 모두 포함하여, 글리코실 코어에 폴리머 변형기를 결합한다.
- <41> L은 하나의 선상 또는 분기상 구조체로 할 수 있다.
- <42> 동일하게, 그 폴리머 변형기는 분기상 또는 선상으로 할 수 있다.
- <43> 폴리머 변형기는 수용성이거나 또는 수중에서 불용성으로 할 수 있는 2이상의 반복 단위로 이루어진다.
- <44> 본 발명의 화합물에서 유용한 수용성 폴리머의 예에는 PEG, 즉 m-PEG, PEG, 즉 m-PPG, 폴리시알산, 폴리글루타메이트, 폴리아스파르페이트, 폴리라이신, 폴리에틸렌이민, 생분해성 고분자(즉, 폴리락티드, 폴리글리세리드) 및 기능성화 PEG, 즉 말단 기능성화 PEG를 포함한다.
- <45> 상기 인자 VII 또는 VIIa 펩티드 콘주게이트에서 유용한 글리코실 결합기의 글리코실 코어는 천연(natural) 및 비천연 푸라노오스 및 피라노오스 양자로부터 선택한다.
- <46> 상기 비천연 사카리드에는 알킬화 또는 아실화히드록실 및/또는 아민성분, 즉 그 링(ring) 상에서 에테르, 에스테르 및 아마이드 치환체를 선택적으로 포함한다.
- <47> 다른 비천연(unnatural) 사카리드에는 H, 히드록실, 에테르, 에스테르 또는 아마이드 치환체를 이들 치환체 중 하나가 상기 천연 사카리드에 존재하지 않은 링(ring) 상의 하나의 위치에 포함한다.
- <48> 또, 그 카르보히드레이트는 유도되는 카르보히드레이트, 즉 테옥시당에서 확인되는 하나의 치환기를 상실한다.
- <49> 발명의 또 다른 예에서 비천연 당에는 산화(즉, -온산 및 -우론산) 및 환원(당 알코올) 카르보히드레이트를 모두 포함한다.
- <50> 그 당 성분은 모노-, 올리고- 또는 폴리-사카리드로 할 수 있다.
- <51> 본 발명에서 글리코실 결합기의 성분으로서 유용한 천연당에는 글루코오스, 글루코사민, 갈락토오스, 갈락토사민, 푸코오스, 만노오스, 만노사민, 키실로오스, 리보오스, N-아세틸 글루코오스, N-아세틸 글루코사민, N-아세틸 갈락토오스, N-아세틸 갈락토사민 및 시알산을 포함한다.
- <52> 본 발명의 하나의 예에서, 본 발명은 다음 구조식 성분으로 이루어진 인자(factor) VII 또는 인자 VIIa 펩티드 콘주게이트를 제공한다.

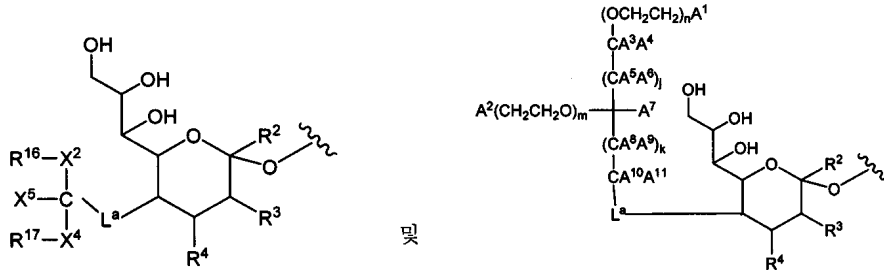


- <53>
- <54> 위 구조식에서, D는 -OH와 R^1 -L-HN-에서 선택한 하나의 멤버이고;
- <55> G는 H 및 R^1 -L- 및 -C(O)(C_1 - C_6) 알킬에서 선택한 하나의 멤버이며,
- <56> R^1 은 하나의 직쇄 또는 분기 폴리(에틸렌글리콜)잔기로 이루어진 하나의 성분(moiety)이고;
- <57> L은 하나의 링커(link), 즉 하나의 결합("영 오더": "zero order"), 치환 또는 비치환 알킬 및 치환 또는 비치환 헤테로알킬이다.

<58> 본 발명의 예에서, D가 OH인 경우 G는 R¹-L이고, G가 -C(O)(C₁~C₆) 알킬인 경우 D는 R¹-L-NH-이다.

<59> 본 발명의 또 다른 국면에서, 본 발명은 인자 VII 또는 인자 VIIa로 할 수 있는 하나의 펩티드로 이루어진 하나의 인자 VII 또는 인자 VIIa 펩티드 콘주게이트를 제공한다.

<60> 또, 그 콘주게이트는 상기 펩티드의 하나의 아미노산 잔기에 결합되고, 아래에서 나타낸 2개의 구조식에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 구조식을 가진 하나의 시알릴 결합기로 이루어진 하나의 글리코실 결합기를 구성한다.



<61> 위 식에서, $\begin{matrix} R^{16}-X^2 \\ | \\ X^5-C-L^a \\ | \\ R^{17}-X^4 \end{matrix}$ 는 변형기(modifying groups)이다.

<62> R²는 H, CH₂OR⁷, COOR⁷, COO⁻ 및 OR⁷에서 선택한 하나의 멤버이다.

<63> R⁷는 H, 치환 또는 비치환 알킬 및 치환 또는 비치환 헤테로알킬에서 선택한 하나의 멤버이다.

<64> R³ 및 R⁴는 H, 치환 또는 비치환 알킬, OR⁸ 및 NHC(O)R⁹에서 독립하여 선택한 멤버이다.

<65> R⁸ 및 R⁹는 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬 및 시알릴에서 독립하여 선택한다.

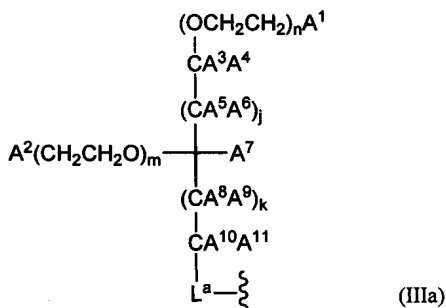
<66> L^a는 하나의 결합(bond), 치환 또는 비치환 알킬 및 치환 또는 비치환 헤테로알킬에서 선택한 하나의 링커이다.

<67> X⁵, R¹⁶ 및 R¹⁷은 미반응성기 및 폴리머암(arms)(즉, PEG)에서 독립하여 선택한다.

<68> X² 및 X⁴는 폴리머 성분 R¹⁶ 및 R¹⁷을 C에 결합하는 결합 프라그먼트(linkage fragments)를 독립하여 선택한다.

<69> 지수 j는 1~15에서 선택한 정수이다.

<70> 또 다른 예에서, 그 폴리머 변형기는 다음에 나타낸 구조식 IIIa에 의한 하나의 구조체를 가진다.



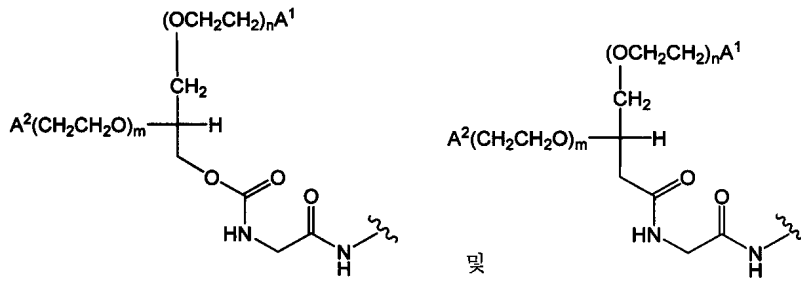
<71> 위 구조식에서,

<72> 지수 m 및 n은 0~5000에서 독립하여 선택한 정수이다.

<73> A¹, A², A³, A⁴, A⁵, A⁶, A⁷, A⁸, A⁹, A¹⁰ 및 A¹¹은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 시클로알킬, 치환 또는 비치환 헤테로시클로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테

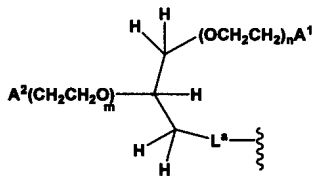
로아릴에서 독립적으로 선택한 멤버들이다.

<76> 본 발명의 하나의 예에서, 그 폴리머 변형기는 다음에 나타낸 2개의 구조식에 의한 하나의 구조체를 가진다.



<77>

<78> 위 구조식에 의한 또 다른 예에서, 그 폴리머 변형기는 아래에 나타낸 하나의 구조식에 의한 하나의 구조체를 가진다.

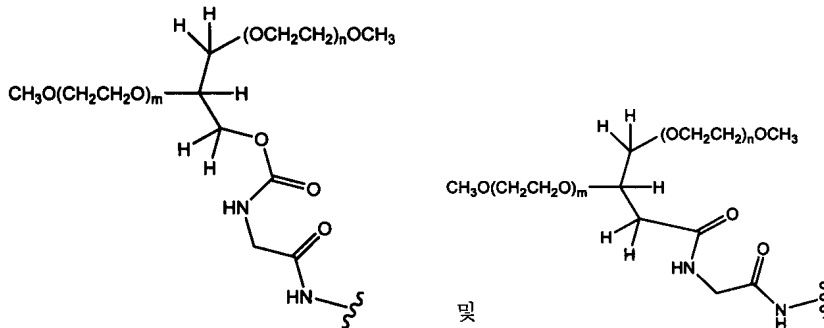


<79>

<80> 위 구조식에서,

<81> A¹ 및 A²는 -OH 및 -OCH₃에서 선택한 각각의 멤버이다.

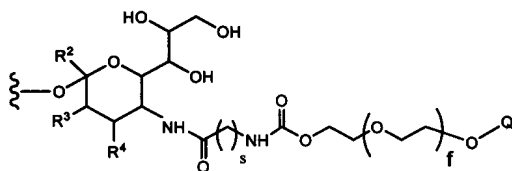
<82> 이 예에 의한 폴리머 변형기들은 아래에 나타낸 2개의 구조식을 포함한다.



<83>

<84> 본 발명은 인자 VII와 인자 VIIa에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 펩티드로 이루어진 하나의 인자 VII 또는 인자 VIIa 펩티드 콘주게이트를 제공한다.

<85> 또, 그 콘주게이트는 그 펩티드의 하나의 아미노산잔기에 결합되고, 다음에 나타낸 구조식을 가진 하나의 시알릴 결합기로 이루어진 하나의 글리코실 결합기로 이루어진다.



<86>

위 식에서, 는 하나의 변형기이다.

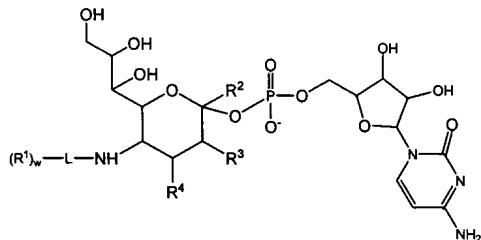
<87>

<88> 지수 s는 1~20에서 선택한 정수이다.

<89> 지수 f는 1~2500에서 선택한 정수이다.

<90> Q는 H 및 치환 또는 비치환 $C_1\sim C_6$ 알킬에서 선택한 하나의 멤버이다.

<91> 본 발명의 예에서, 본 발명은 아래에 나타낸 구조식을 가진 하나의 변형당(modified sugar)을 제공한다.



<92>

<93> 본 발명은 인자 VII 펩티드, 즉 인자 VII 또는 인자 VIIa의 콘주게이트를 형성하는 방법을 제공한다.

<94> 이들의 방법에는 하나의 당(sugar)에 공유 결합한 하나의 변형기를 가진 하나의 변형당 도너(donor)에 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를 접촉하는 것을 포함한다.

<95> 그 변형당 성분은 상기 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 아미노산 또는 글리코실잔기 상의 상기 도너에서 효소의 작용에 의해 전이시킨다.

<96> 대표적인 효소에는 글리코실 전이효소, 즉 시알릴 전이효소를 포함하나, 한정되어 있는 것은 아니다.

<97> 그 방법에는 상기 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를

<98> a) 하나의 변형당 도너에, 그리고

<99> b) 그 펩티드의 아미노산 또는 글리코실잔기 상의 상기 변형당 도너에서 변형당 성분을 전이할 수 있는 효소에,

<100> 그 도너에서의 하나의 변형당 성분을 그 펩티드의 아미노산 또는 글리코실잔기로 전이하는데 적합한 조건하에서 접촉함으로써 상기 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트를 합성하는 것을 포함한다.

<101> 하나의 바람직한 예에서, 상기 공정(a) 처리 전에,

<102> 그 펩티드는 시알리다아제(sialidase)로 접촉함으로써 그 펩티드 상에서 시알산의 최소 일부분을 제거한다.

<103> 또 다른 바람직한 예에서, 상기 인자 VII/인자 VIIa 펩티드는 시알리다아제, 글리코실 전이효소 및 변형당 도너로 접촉한다.

<104> 이 예에서, 그 펩티드는 여러 가지의 성분의 첨가순서와 관계 없이 시알리다아제, 글리코실 전이효소 및 변형당 도너와 동시에 접촉한다.

<105> 그 반응은 시알리다아제에 적합한 조건하에서 실시하여 그 펩티드에서 시알산잔기를 제거하며; 글리코실 전이효소에 의해 그 변형당 도너에서의 변형당 성분을 그 펩티드의 아미노산 또는 글리코실 잔기로 전이한다.

<106> 또 다른 바람직한 예에서, 탈 시알릴화(desialylation) 및 콘주게이션(conjugation)은 동일한 레벨에서 실시하며, 그 탈 시알릴화 펩티드는 그 콘주게이팅 처리공정 전에 정제하지 않는 것이 바람직하다.

<107> 또 다른 예에서, 그 방법은 그 펩티드 콘주게이트의 시알릴화를 포함하는 "캐핑공정"(capping step)으로 이루어진다.



<108> 이 공정은 사전정제 없이 시알리다아제, 시알릴 전이효소 및 변형당 도너를 함유하는 동일한 반응 용기 내에서 실시한다.

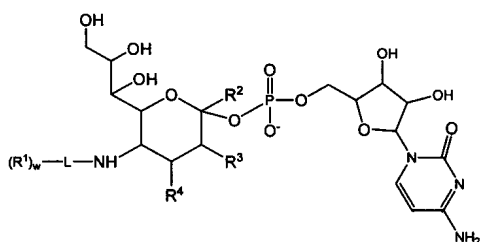
<109> 또 다른 바람직한 예에서, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 탈 시알릴화를 실시하여, 아시알로(asialo) 펩티드를 정제한다.

<110> 그 다음, 정제된 아시알로 펩티드는 콘주게이션 반응조건에 따라 처리한다.

<111> 또 다른 예에서, 그 방법은 펩티드 콘주게이트의 시알릴화를 포함하는 "캐핑"(capping)공정을 더 구성한다.

- <112> 이 공정은 사전(prior) 정제 없이, 시알리다아제, 시알리전이효소 및 변형당 도너를 포함하는 동일한 반응용기 내에서 실시한다.
- <113> 그 캐핑공정의 또 다른 예에서, 그 펩티드 콘주게이트의 시알릴화는 시알리다아제, 시알릴전이효소 및 변형당 도너를 사전 정제 없이 함유하는 동일한 반응용기 내에서 실시한다.
- <114> 하나의 예에서, 그 접촉처리(contacting)는 20시간 이하의 시간, 바람직하게는 16시간 이하의 시간, 더 바람직하게는 12시간 이하의 시간, 더욱더 바람직하게는 8시간 이하의 시간, 가장 바람직하게는 4시간 이하의 시간이다.
- <115> 본 발명의 또 하나의 국면에서, 본 발명은 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트 반응 혼합물을 제공한다.
- <116> 그 반응 혼합물은 a) 하나의 시알리다아제; b) 글리코실전이효소, 엑소(exo) 글리코시다아제 및 엔도(endo) 글리코시다아제에서 선택한 하나의 멤버인 효소; c) 하나의 변형당; 및 d) 하나의 인자 VII/ 인자 VIIa 펩티드로 이루어진다.
- <117> 또 다른 예에서, 시알리다아제와 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 비는 0.1U/L:2mg/mL~10U/L:1mg/mL, 바람직하게는 0.5U/L:2mg/mL, 더 바람직하게는 1.0U/L:2mg/mL, 더욱더 바람직하게는 10U/L:2mg/mL, 또 바람직하게는 0.1U/L:1mg/mL, 더 바람직하게는 0.5U/L:1mg/mL, 더욱더 바람직하게는 1.0U/L:1mg/mL 및 가장 바람직하게는 10U/L:1mg/mL에서 선택한다.
- <118> 본 발명의 예에서, 상기 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 최소 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80%에는 대부분 2개의 PEG 성분을 포함한다.
- <119> 그 PEG 성분은 1-팟(pot) 프로세스에서 첨가할 수 있거나, 또는 이들은 아시알로 인자 VII/인자 VIIa를 정제한 후에 첨가할 수 있다.
- <120> 또 다른 예에서, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 최소 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80%는 대부분 하나의 PEG 성분을 포함한다.
- <121> 그 PEG 성분은 하나의 1-팟 프로세스에서 첨가할 수 있거나, 또는 그 아시알로 인자 VII/인자 VIIa를 정제시킨 후 첨가할 수 있다.
- <122> 또 다른 예에서, 그 방법은 그 펩티드 콘주게이트에 시알산을 "캐핑"(capping) 또는 첨가하는 것을 더 포함한다.
- <123> 또 다른 예에서, 시알리다아제를 첨가한 다음에, 이어서 30분, 1시간, 1.5시간 또는 2시간 동안 지연(delay)시킨 후 이어서 글리코실전이효소, 엑소글리코시다아제 또는 엔도글리코시다아제를 첨가한다.
- <124> 또 다른 예에서, 시알리다아제를 첨가하고, 이어서 30분간, 1시간, 1.5시간 또는 2시간 지연시킨 후, 글리코실전이효소, 엑소글리코시다아제 또는 엔도글리코시다아제를 첨가한다.
- <125> 본 발명의 다른 목적 및 이점은 다음의 구체적 설명에서 당업자에 의해 이해할 수 있다.

- <126> 또 다른 예에서, 그 방법에는 (a) 다음에 나타낸 기  와  에서 선택한 하나의 글리코실기로 이루어진 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를 다음에 나타낸 구조식을



- <127>
- <128> 가진 하나의 변형당과, 상기 글리코실기의 GalNAc, Gal 및 Sia에서 선택한 하나의 멤버상에서 글리코실 결합기를 전이하는 하나의 적합한 전이효소와 함께 전이에 적합한 조건하에서, 접촉하는 것을 포함한다.

- <129> 하나의 예의 변형당은 하나의 링커 성분을 통해 하나의 폴리머, 즉 하나의 직쇄 또는 분기 폴리머(에틸렌글리콜) 성분으로 변형시킨 CMP-시알산이다.
- <130> 그 펩티드는 위에서 설명한 바와 같이 변형하기 전에 하나의 예에서 어느 소오스(source)에서 얻어지나, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드는 하나의 적합한 숙주(host)에서 발현된다.
- <131> 포유동물(즉, BHK, CHO), 세균(즉, 예. 콜리) 및 곤충 세포(즉, Sf-9)는 여기서 설명한 조성물과 방법에서 유용한 인자(Factor) VII 또는 인자(Factor) VIIa를 제공하는 대표적인 발현 시스템이다.
- <132> 발명의 예에서, 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트는 궤혈(ischemia), 트라우마(trauma), 염증 또는 독성물질과의 접촉 등 조직 손상의 치료를 위해 환자에 투여할 수 있다.
- <133> 또 다른 예에서, 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트는 혈우병(Hemophilia) A를 보유한 환자, 혈우병 B를 보유한 환자, 인자-VIII에 항체를 가진 혈우병 A를 보유한 환자, 인자 IX에 항체를 가진 혈우병 B를 보유한 환자 및 간경변(liver cirrhosis)을 가진 환자의 치료를 위해 환자에 투여할 수 있다.
- <134> 또 다른 예에서, 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트는 긴급시의 출혈, 선택적 수술, 심장수술, 척수수술, 간이식, 부분간 절개, 골반-관절구 골절 재구성 및 동종 줄기세포이식의 치료를 위해 환자에 투여할 수 있다.
- <135> 또 다른 예에서, 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트는 급성 뇌내출혈, 외상성 뇌손상, 배리실(Variceal)출혈 및 상부위장관, 출현의 치료용으로 환자에 투여할 수 있다.
- <136> 본 발명의 또 다른 국면에서, 본 발명은 하나의 인자(Factor) VII/인자(Factor) VIIa 펩티드 콘주게이트와 하나의 의약적으로 허용할 수 있는 캐리어(carrier)를 함유한 의약제제를 제공한다.
- <137> 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트에 있어서, 글리코실 결합기 또는 변형기가 결합되어 있는 아미노산잔기 각각은 주로 동일한 구조를 가진다.
- <138> 예로서, 하나의 펩티드가 하나의 Thr 결합 글리코실잔기를 포함할 경우 그 개체조에서 최소 약 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%, 99.2%, 99.4%, 99.6% 또는 더 바람직하게는 99.8%의 펩티드는 동일한 Thr 잔기에 공유 결합된 동일한 글리코실 결합기를 가진다.
- <139> 본 발명의 다른 목적과 이점은 다음의 구체적 설명에서 이 분야의 기술자에 의해 알 수 있다.

실시예

- <1662> 실시예 1
- <1663> 인자(Factor) VIIa의 탈시알릴화(desialylation)
- <1664> 혈청 없는 배지(serum-free media)에서 발현한 인자 VIIa, 혈청 함유 배지에서 생성한 인자 VIIa는 3종의 인자 VIIa 변이체 N145Q, N322Q 및 유사체(analogue) DVQ(V158D/E296V/M298Q)를 가한다.
- <1665> 효소에 의한 탈시알릴화 제조에서, 인자 VIIa는 10KDa의 MWC를 튜브에 넣은 스네이크 스킨(Snakeskin) 투석(dialysis)에서, 4℃에서 하룻밤 MES, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, 50mM MES, pH 6으로 하여 투석하였다.
- <1666> 인자 VIIa(1mg/mL)의 탈시알릴화는 그 교환 버퍼(exchanged buffer) 중에서 18시간 동안 32℃로 하여 아르트로박터 우레아파시엔스(Arthrobacter ureafaciens)(Calbiochem)로부터 10U/L의 가용성 시알리다아제를 실시하였다.
- <1667> 실시예 2
- <1668> 인자 VIIa의 시알릴-페질화(sialyl-PEGylation)
- <1669> 시알릴-페질화("글리코 페질화": GlycoPEGylation)는 2~6시간 동안 탈시알릴화 버퍼 중에서 온도 32℃로 하여 아시알로(asialo)-인자 VIIa(1mg/mL) 상에서 100U/L ST3Gal-III과 200 μM CMP-시알산-PEG(40KDa, 20KDa, 10KDa, 5KDa 및 2KDa)로 실시하였다.
- <1670> 적합한 반응시간이 완료된 후에, 그 페질화 샘플을 즉시 정제시켜 글리코 페질화를 더 최소화 하였다.
- <1671> 시알산으로 캐핑(capping)한 샘플로 글리코 페질화 인자 VII/인자 VIIa를 캐핑하기 위하여, 아래에서 나타낸 바와 같이 아미노 교환 크로마토그래피에 의해 그 아시알로-인자 VIIa로부터 그 시알리다아제를 1차적으로

제거하였다.

<1672> 과잉의 CMP-시알산(5mM)을 첨가하여 2시간 동안 32℃에서 배양하여, 시알산으로 글리코 페질화 인자 VIIa를 캐핑하였다.

<1673> 인자 VIIa의 시알릴-페질화 형(forms)은 인비트로젠(Invitrogen)에 의해 기술되어 있는 바와 같이 비환원성(non-reducing) SDS-PAGE(트리스-글리신 겔 및/또는 NuPAGE 겔)와 콜로이달 블루 스테이닝 키트(Colloidal Blue Staining Kit)에 의해 분석하였다.

<1674> 실시예 3

<1675> 페질화 인자 VIIa의 정제(Purification of PEGylated Factor VIIa)

<1676> 인자 VIIa의 글리코 페질화 샘플을 하나의 아니온-교환 변형방법으로 정제하였다.

<1677> 샘플(samples)을 5℃에서 처리하였다.

<1678> 그 컬럼에 로딩(loading)하기 직전에, 100mL의 인자 VIIa 용액 당 1g의 켈렉스(Chelex) 100(BioRad)을 리모델링한(remodeled) 샘플에 첨가하였다.

<1679> 10분간 교반 후에 그 현탁액을 진공 시스템으로 셀룰로오스 아세테이트 막(0.2μm) 상에서 여과하였다.

<1680> 그 필터 상에 잔류된 킬레이터 수지(chelator resin)을 100mL 벌크(bulk) 당 1~2mL의 물로 1회 세척하였다.

<1681> 그 얻어진 여액(filtrate)의 전도율은 온도 5℃에서 10mS/cm로 조정하였으며, 필요할 경우, pH 8.6으로 조정하였다.

<1682> 아니온 교환은 8~10℃에서 실시하였다.

<1683> Q 세파로오스(Sepharose) FF 함유 컬럼은 로딩(loading) 전에 1M NaOH(10 컬럼 용량), 물(5 컬럼 용량), 2M NaCl, 50mM HOAc, pH 3(10 컬럼 용량)으로 세척하고, 175mM NaCl, 10mM 글리실 글리신, pH 8.6(10 컬럼 용량)으로 평형화시켜 조제하였다.

<1684> 각각의 페질화 반응에 있어서, 15~20mg의 인자 VIIa는 유속(flow rate) 100cm/h로 하여 10mL의 Q Sepharose FF(1mL 수지당 2mg 이하의 단백질)를 가진 XK 16 컬럼(Amersham Biosciences) 상에 로딩하였다.

<1685> 2KDa의 선상 PEG에 있어서, 20mg의 인자 VIIa는 유속 100cm/h에서 40mL의 Q Sepharose FF(1mg의 수지당 0.5mg의 단백질)를 가진 XK 26컬럼(Amersham Biosciences) 상에 로딩하였다.

<1686> 로딩(loading) 후에, 그 컬럼을 175mM NaCl, 10mM 글리실 글리신, pH 8.6(10컬럼 용량)과 50mM NaCl, 10mM 글리실 글리신, pH 8.6(2 컬럼 용량)으로 세척하였다.

<1687> 50mM NaCl, 10mM 글리실 글리신, 15mM CaCl₂, pH 8.6(5 컬럼 용량)을 사용하여 15mM CaCl₂의 하나의 스텝 증감액(step gradient)으로 용출을 실시하였다.

<1688> 그 다음 그 컬럼을 1M NaCl, 10mM 글리실 글리신, pH8.6(4 컬럼 용량)으로 세척하였다.

<1689> 그 용출액(effluent)은 280nm에서의 흡광도(absorbance)에 의해 모니터링(monitring)하였다.

<1690> 프랙션(fractions)(5mL)은 병류(flow-through)와 2회 세척할 때 수집하였고, 2.5mL의 프랙션은 CaCl₂와 1M 염 용출할 때 수집하였다.

<1691> 인자 VIIa 함유 프랙션은 비환원성 SDS-PAGE(트리스-글리신 겔 및/또는 NUPAGE 겔)와 콜로이달 블루 스테이닝 키트(Colloidal Blue Staining Kit)에 의해 분석하였다.

<1692> 인자 VIIa를 가진 적합한 트랙션은 풀링(pooling) 하였으며, 4M HCl를 사용하여 그 pH를 7.2로 조정하였다.

<1693> 인자 VIIa-SA-PEG-10KDa는 다음 변경사항을 제외하고 위에서 설명한 바와 같이 정제하였다.

<1694> EDTA(10mM)를 그 페질화 인자 VIIa 용액에 첨가하여, 그 pH를 pH 6으로 조정하였으며, 그 전도율은 5℃에서 5mS/cm로 조정하였다.

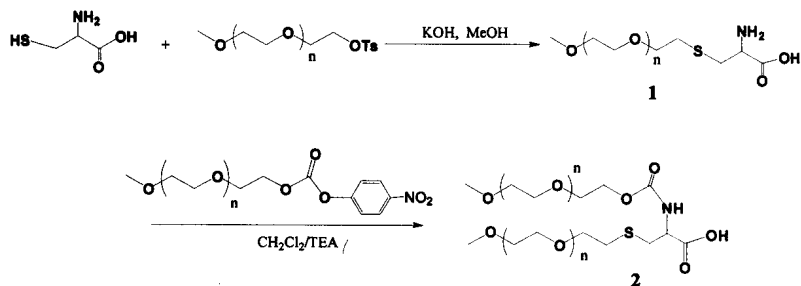
<1695> 약 20mg의 인자 VIIa-SA-PEG-10KDa는 유속 10cm/h로 하여 10mL의 포로소(Poros) 50마이크론(Micron) HQ 수지(수지 1mL당 2mg 이하의 단백질)를 가진 XK 16컬럼(Amersham Bioscience) 상에 로딩하였다.

- <1696> 로딩한 후, 그 컬럼을 175mM NaCl, 10mM 히스티딘, pH 6(10 컬럼 용량)과 50mM, NaCl, 10mM 히스티딘, pH 6(2 컬럼 용량)으로 세척하였다.
- <1697> 50mM NaCl, 10mM 히스티딘, pH 6(5 컬럼 용량) 중에서 20mM CaCl₂의 스텝 증감액(step gradient)으로 용출을 실시하였다.
- <1698> 그 다음 그 컬럼을 1M NaCl, 10mM 히스티딘, pH 6(5컬럼 용량)으로 세척하였다.
- <1699> 인자 VIIa-SA-PEG-10KDa 함유 아ни온-교환 용출액(eluate)(25mL)은 원심분리 필터 디바이스(centrifugal filter device)(Amicon Ultra-15 10K)를 사용하여, 제조업자의 사용지침(Millipore)에 따라 5-7mL로 농축하였다.
- <1700> 농축시킨 다음, 사이즈배제 크로마토그래피를 실시하였다.
- <1701> 그 샘플(5-7mL)은 Superdex 200(HiLoad 16/60, 프레프 그레이드(prepare grade); Amersham Biosciences) 함유 컬럼 상에서 로딩하였으며, 그 폐질화 변이체 대부분에 대하여 50mM NaCl, 10mM 글리실 글리신, 15mM CaCl₂, pH 7.2에서 정형화 하였다.
- <1702> 인자 VIIa-SA-PEG-10KDa는 유속 1mL/min에서 변형되지 않은 아시알로(asialo)-인자 VIIa로부터 분리하였으며, 그 흡광도는 280nm에서 모니터링(monitoring)하였다.
- <1703> 인자 VIIa 함유 프랙션(fraction)(1mL)을 수집하여 비환원성 SDS-PAGE(트리스-글리신 겔 및/또는 NUPAGE 겔)와 콜로이드 블루 스테이닝 키트(Colloidal Blue Staining Kit)에 의해 분석하였다.
- <1704> 표적 폐질화 이소형(isoform)을 함유하며 변형되지 않은 아시알로-인자 VIIa가 없는 프랙션을 풀링(pooling)하였으며, 원심분리 필터 디바이스(Amicon Ultra-15 10K)를 사용하여 1mg/mL까지 농축하였다.
- <1705> 단백질 농도는 흡광계수(extinction coefficient) 1.37(mg/mL)⁻¹cm⁻¹를 사용하여 280nm에서의 흡광도로부터 측정하였다.
- <1706> 실시예 4
- <1707> 역상 HPLC 분석에 의한 폐질화 이소형 측정(determination of PEGylated isoforms by reversed phase HPLC analysis)
- <1708> 폐질화 인자 VIIa는 역상 컬럼(Zorbax 300SB-C3, 5 μ m 파티클 사이즈, 2.1 \times 150mm) 상에서 HPLC에서 분석하였다.
- <1709> 그 용리액 (A)은 수중에서 0.1% TFA와 용리액 (B)는 아세토니트릴 중에서 0.09% TFA 이었다. 검출은 214nm에서 실시하였다.
- <1710> 그 구배(gradient)(증감액), 유속 및 컬럼 온도는 그 PEG 길이(40KDa, 20KDa 및 10KDa PEG: 30분, 0.5mL/min, 45 $^{\circ}$ C에서 35~65% B; 10KDa PEG: 30분, 0.5mL/min, 45 $^{\circ}$ C에서 35~60% B; 5KDa PEG: 40분, 0.5mL/min, 45 $^{\circ}$ C에서 40~50% B; 2KDa PEG: 67분, 0.6mL/min, 55 $^{\circ}$ C에서 38~43% B)에 따라 좌우된다.
- <1711> 각각의 피크(peak)의 동정(identity)은 4가지의 다른 다음 기술사항 중 2가지 이상을 기준으로 하여 정하였다:
- <1712> 미변성(native) 인자 VIIa의 공지된 보유시간, 각각 분리된 피크의 SDS-PAGE 이동(migration), 각각 분리된 피크의 MALDI-TOF 매스스펙트럼 및 결합 PEG의 수의 증가에 대한 각각의 피크의 보유시간의 순차적인 진행.
- <1713> 실시예 5
- <1714> 역상 HPLC에 의한 PEG 결합 부위 측정(determination of site of PEG attachment by reversed phase HPLC)
- <1715> 인자 VIIa와 폐질화 인자 VIIa 변이체는 샘플(1mg/mL의 농도에서 10 μ L)과 환원성 버퍼(buffer)(40 μ L, 50mM NaCl, 10mM 글리실 글리신, 15mM EDTA, 8M 우레아, 20mM DTT, pH 8.6)를 15분간 실온에서 혼합하여 환원시켰다.
- <1716> 물(50 μ L)을 첨가시키고, 그 샘플을 그 HPLC(<12시간) 상에서 주입(injected)할 때까지 4 $^{\circ}$ C로 냉각하였다.
- <1717> 그 HPLC 컬럼, 용출액 및 검출은 그 비환원성 샘플에 대하여 위에서 설명한 것과 같이 하였다.
- <1718> 그 유속은 0.5mL/min 이었고, 그 구배(증감액)는 90분에서 30~55% B 이었으며, 그 다음으로 간단한 세척 사이클에서는 90% B 이내이었다.

- <1719> 각각의 피크의 동정은 실시예 4에서와 같이 하여 정하였다.
- <1720> 실시예 6
- <1721> 인자 VIIa 응고 아세이(clotting assay)
- <1722> 폐질화 샘플과 표준품을 2 반복 테스트하여, 100mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0.1% BSA(wt/vol), 50mM Tris, pH 7.4에서 희석하였다.
- <1723> 그 표준품과 샘플을 0.1~10ng/mL의 범위에 걸쳐 분석 실험하였다.
- <1724> 동일 용량의 희석 표준품과 샘플을 인자 VIIa 결핍 플라즈마(Diagnostica Stago)와 혼합시켜, 분석실험 전 4시간 이내에 얼음(ice) 상에서 저장하였다.
- <1725> 응고시간(clotting times)은 STart 4 응고계(coagulometer)(Diagnostica Stago)로 측정하였다.
- <1726> 샘플 큐벳(sample cuvette) 내에서 하나의 자석볼의 약한 전후운동의 정지에 의해 나타내는 것과 같이, 생체 외혈병(in vitro clot)이 형성될 때까지 경과시간을 그 응고계에 의해 측정하였다.
- <1727> 각각의 큐벳(cuverte)내에 하나의 자석볼(magnetic ball)을 침착시키고(deposited), 100 μL의 인자 VIIa 샘플/결핍 혈장과 100 μL의 희석시킨 랫(rat) 뇌 세팔린 용액(4시간 이하 동안 얼음에서 보관하였음)을 가하였다.
- <1728> 각각의 시약을 각각의 웰(well) 사이에서 5초 동안 첨가하였으며, 최종 혼합액을 37℃에서 300초간 배양하였다.
- <1729> 희석시킨 랫 뇌(rat brain) 세팔린(RBC) 용액을 2mL의 RBC 원액(stock solution)(10mL의 150mM NaCl를 가한 1 바이얼(vial) RBC 원액, Haemachem에서 조제)과 4mL의 100mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0.1% BSA(wt/vol), 50mM Tris, pH 7.4로 조제하였다.
- <1730> 100mM NaCl, 12.5mM CaCl₂, 0.1 BSA(wt/vol), 50mM Tris, pH 7.4에서 가용성 조직인자(2 μg/mL; 아미노산 1~209)의 예열(37℃) 용액 100 μL를 첨가시켜 300초에, 그 아세이(assay)를 개시하였다.
- <1731> 다시, 그 다음 용액을 샘플간의 간격을 5초로 하여 첨가하였다.
- <1732> 그 희석한 표준품에서의 응고시간을 사용하여 하나의 표준 커브(standard curve)(log 인자 VIIa 농도 대(versus) log 응고시간)를 형성하였다
- <1733> 그 결과 커브에서 얻어진 직선 회귀(linear regression)를 사용하여 폐질화 변이체의 상대응고 활성을 측정하였다.
- <1734> 폐질화 인자 VIIa 변이체는 인자 VIIa의 분취량 원액(aliquotted stock)과 비교하였다.
- <1735> 실시예 7
- <1736> BHK 세포 중에서 생성한 재조합 인자 VIIa의 글리코 폐질화(GlycoPEGylation of Recombinant Factor VIIa produced in BHK cells)
- <1737> 이 실시예는 BHK 세포 중에서 생성된 재조합 인자 VIIa의 폐질화를 설명한 것이다.
- <1738> 아시알로-인자 VIIa의 제조
- <1739> 재조합 인자 VIIa는 BHK 세포(boby hamster kidney cells)에서 생성하였다.
- <1740> 인자 VIIa(14.2mg)는 버퍼용액(pH 7.4, 0.05M Tris, 0.15M NaCl, 0.001M CaCl₂, 0.5% NaN₃) 중 1mg/mL에서 용해시켜, 3일간 32℃에서 300mU/mL의 시알리다아제(비브리오 콜레라: Vibrio cholera)-아가로오스 콘주게이트와 함께 배양하였다.
- <1741> 그 반응을 모니터링(monitoring) 하기 위하여, 그 반응액의 소량의 분취량을 적합한 버퍼용액과 IEF 겔로 희석시켜 인비트로젠(Invitrogen) 처리공정(도 157)에 의해 실시하였다.
- <1742> 그 혼합액을 3,500rpm으로 원심분리시켜 그 상층액을 수집하였다.
- <1743> 그 수지를 3회(3×2mL) 상기 버퍼용액(pH 7.4, 0.05M Tris, 0.15M CaCl, 0.05% NaN₃)으로 세척하였으며, 그 합친 세척액을 센트리콘-플러스(Centricon-Plus)-20의 농축장치 내에서 농축하였다.

- <1744> 그 남아있는 용액을 버퍼용액(0.05M Tris(pH 7.4), 0.15M NaCl, 0.05% NaN₃)으로 최종 용량 14.4mL로 될 때까지 버퍼 교환하였다.
- <1745> 인자 VIIa-SA-PEG-1KDa와 인자 VIIa-SA-PEG-10KDa의 제조
- <1746> 인자 VIIa 용액의 탈시알릴화 반응에서는 2개의 동일한 7.2mL의 샘플로 분할하였다.
- <1747> 각각의 샘플에 CMP-SA-PEG-1KDa(7.4mg) 또는 CMP-SA-PEG-10KDa(7.4mg)를 첨가하였다.
- <1748> 두개의 튜브에 ST3Gal3(1.58U)을 첨가하여, 그 반응 혼합액을 32℃에서 96시간 동안 배양하였다.
- <1749> 인비트로젠(Invitrogen)에 의해 설명한 시약과 조건을 사용하여 그 반응을 SDS-PAGE 겔에 의해 모니터링 하였다.
- <1750> 그 반응이 완료되었을 때, 그 반응 혼합액은 PBS 버퍼(pH 7.1)를 사용하는 Toso Haas Tsk-3000의 조제용 컬럼을 사용하여 정제하였으며, UV 흡수를 기준으로 한 프랙션을 수집하였다.
- <1751> 그 생성물을 함유한 합친 프랙션(fractions)을 Centricon-Plus-20의 원심분리 필터(제조업자: Millipore, Bedford, MA, USA)에서 4℃로 하여 농축하였다.
- <1752> 그 농축 용액을 재제제하여(reformulated), 인자 VIIa-SA-PEG 1.97mg을 얻었다(비신코닌산 단백질 아세이, BCA 아세이, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA).
- <1753> 그 반응 생성물은 인비트로젠(Invitrogen)에 의해 공급한 시약과 그 처리공정에 의한 SDS-PAGE 및 IEF 분석을 사용하여 분석하였다.
- <1754> 샘플은 물로 투석(dialyzed) 하였으며 MALDI-TOF에 의해 분석하였다.
- <1755> 도 7은 미변성(native) 인자 VIIa의 MALDI 결과를 나타낸다. 도 8은 인자 VIIa-SA-PEG-1KDa의 MALDL 결과가 포함되어 있는 것을 나타낸다.
- <1756> 도 9는 인자 VIIa-SA-PEG-10KDa의 MALDI 결과가 포함되어 있는 것을 나타낸다.
- <1757> 도 10은 그 반응 생성물 전체의 SDS-PAGE 분석을 나타낸 것으로, 여기서 인자 VIIa-SA-PEG-10KDa의 밴드(band)가 선명하다(evident).
- <1758> 실시예 8
- <1759> 인자 VIIa-SA-PEG-10KDa: 원뿔방법(one pot method)
- <1760> 인자 VIIa(최종 농도 1mg/mL의 생성물의 제제 버퍼 중에서 희석한 5mg), CMP-SA-PEG-10KDa(10mM, 60 μL) 및 아. 니거(A. niger) 효소 ST3Gal3(33U/L) 및 10mM 히스티딘, 50mM NaCl, 20mM CaCl₂를 하나의 반응 용기 내에서 10U/L, 1U/L, 0.5U/L 또는 0.1U/L의 시알리다아제(CalBiochem)와 함께 배양하였다.
- <1761> 이들의 성분을 혼합시켜 32℃에서 배양하였다.
- <1762> 1차로 4시간 동안 30분 간격으로 분취량을 분석하여 진행되는 반응을 측정하였다.
- <1763> 그 다음 20시간이 되는 시점에서 분취량을 옮겨 SDS-PAGE에 처리하였다.
- <1764> 폐질화 정도는 1.5시간, 2.5시간 및 3.5시간이 되는 시점에서 분취량 1mL을 채취하여 측정하였으며 그 샘플을 Poros 50HQ의 컬럼 상에서 정제하였다.
- <1765> 10U/L의 시알리다아제 함유 반응조건에서, 상당량의 인자 VIIa-SA-PEG 생성물이 생성되지 않았다.
- <1766> 1U/L의 시알리다아제 함유 반응조건에서, 그 반응 혼합물 중에서 약 17.6%의 그 인자 VIIa가 1.5시간 후에 모노(mono) 또는 디(di) 폐질화 되었다.
- <1767> 이것은 2.5시간 후에 29%로 증가되었고, 3.5시간 후에 40.3%로 증가되었다.
- <1768> 0.5U/L의 시알리다아제 함유 반응조건에 있어서, 그 반응 혼합물 중에서 약 44.5%의 그 인자 VIIa가 3시간 후에 모노 또는 디폐질화 되었고, 0.8% 또는 그 이상이 트리 폐질화 되었다. 20시간 후에 69.4%가 모노 또는 디폐질화 되었고, 18.3% 또는 그 이상이 트리 폐질화 되었다.

<1769> 0.1U/L의 시알리다아제 함유 반응조건에 있어서,
 <1770> 그 반응 혼합물 중에서 약 29.6%의 인자 VIIa가 3시간 후에 모노 또는 디페질화 되었다.
 <1771> 20시간 후에 71.3%가 모노 또는 디페질화 되었고, 15.1% 또는 그 이상이 트리페질화 되었다.
 <1772> 그 결과를 도 11 및 도 12에 나타낸다.
 <1773> 실시예 9
 <1774> 시스테인-PEG₂ (2)의 제조



<1775>
 <1776> a. 혼합물 1의 합성
 <1777> 포타슘히드록시드(분말로서 84.2mg, 1.5mmol)을 무수메타놀(20L)에 용해시킨 용액에 첨가하였다.
 <1778> 얻어진 혼합액을 30분간 실온에서 교반시킨 다음, 분자량 20KDa의 mPEG-O-토실레이트(Ts; 1.0g, 0.05mmol)를 수
 회 조금씩 나누어 2시간에 걸쳐 첨가하였다.
 <1779> 얻어진 혼합액을 실온에서 5일간 교반시키고, 회전식 증발에 의해 농축하였다. 그 잔류물(residue)을 물(30m
 L)로 희석시켜, 실온에서 2시간 동안 교반하여 과잉의 20KDa를 가진 mPEG-O-토실레이트를 파괴하였다.
 <1780> 그 다음, 얻어진 용액을 아세트산으로 중화시키고, 그 pH를 pH 5.0로 조정하여 역상 크로마토그래피(C-18 실리
 카) 컬럼 상에서 로딩(loading) 하였다.
 <1781> 그 컬럼을 메타놀/물의 증감액(gradient)으로 용출시켜(그 생성물은 약 70%의 메타놀에서 용출하였음), 생성물
 용출은 증발용 광산란(evaporative light scattering)에 의해 모니터링 하였으며, 그 적합한 프랙션을 수집하여
 물(500mL)로 희석하였다.
 <1782> 얻어진 이 용액을 크로마토그래피에 의해 처리하였으며(이온교환, XK 50 Q, BIG Beads, 300mL, 히드록시드형;
 물과 물/아세트산 -0.75N의 증감액), 적합한 프랙션의 pH는 아세트산을 사용하여 pH 6.0으로 저하시켰다.
 <1783> 그 다음, 이 용액을 역상 컬럼(C-18 실리카) 상에서 포집(capturing)하고, 위에서 설명한 바와 같이, 메타놀/물
 의 증감액(gradient)으로 용출하였다.
 <1784> 그 생성물 프랙션을 푸링(pooling)하고, 농축하며, 수증에서 재용해하고 냉동 건조시켜 백색고체(1) 453mg(44
 %)을 얻었다.
 <1785> 그 화합물의 구조 데이터는 다음과 같다: ¹H-NMR(500 MHz; D₂O) δ 2.83(t, 2H, O-C-CH₂-S), 3.05(q, 1H, S-CHH-
 CHN), 3.18(q, 1H, S-CHH-CHN), 3.38(s, 3H CH₃O), 3.7(t, OCH₂CH₂O), 3.95(q, 1H, CHN).
 <1786> 그 생성물의 순도는 SDS-PAGE에 의해 확인하였다.
 <1787> b. 시스테인-PEG₂ (2)의 합성
 <1788> 무수 CH₂Cl₂(30mL) 중에 화합물 1(440mg, 22 μmol)을 용해시킨 용액이 염기성으로 될 때까지 그 용액에 트리에틸
 아민(~0.5mL)을 적가하였다.
 <1789> CH₂Cl₂(20mL) 중에 20KDa의 mPEG-O-p-니트로페닐 카르보네이트(660mg, 33 μmol)와 N-히드록시숙신이미드(3.6μg,
 30.8 μmol)를 용해한 용액을 실온에서 1시간에 걸쳐 수회 조금씩 첨가하였다.

- <1790> 얻어진 그 반응 혼합액을 실온에서 24시간 동안 교반하였다.
- <1791> 그 다음 용제를 회전식 증발에 의해 제거하였으며, 얻어진 그 잔류물을 물(100mL)에 용해시키고, 그 pH는 1.0N NaOH를 사용하여 pH 9.5로 조정하였다.
- <1792> 그 얻어진 염기성 용액을 실온에서 2시간 동안 교반시킨 다음, 아세트산으로 중화시켜 pH 7.0으로 하였다.
- <1793> 그 다음, 그 얻어진 용액을 역상 크로마토그래피(C-18 실리카) 컬럼 상에서 로딩(loading) 하였다.
- <1794> 그 컬럼은 메타놀/물의 증감액(gradient)으로 용출시켰다(그 생성물은 약 70%의 메타놀에서 용출하였음).
- <1795> 생성물 용출은 증발용 광산관에 의해 모니터링 하였으며, 적합한 프랙션을 수집하여 물(500mL)로 희석하였다.
- <1796> 얻어진 이 용액을 크로마토그래피에 의해 처리하여(이온교환, XK 50 Q, BIG Beads, 300mL, 히드록시드형; 물과 물/아세트산-0.75N의 구배(증감액)) 적합한 프랙션의 pH는 아세트산을 사용하여 pH 6.0으로 저하하였다.
- <1797> 그 다음, 이 용액을 역상 컬럼(C-18 실리카) 상에서 포집하여, 위에서 설명한 바와 같이 메타놀/물의 증감액(gradient)으로 용출하였다.
- <1798> 그 생성물 프랙션을 푸링(pooling)하고, 농축시키며, 수 중에서 재용해시키고, 동결 건조시켜 백색고체(2) 575 mg(70%)을 얻었다.
- <1799> 상기 화합물의 구조 데이터는 다음과 같다: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz; D_2O) δ 2.83(t, 2H, O-C-CH₂-S), 2.95(t, 2H, O-C-CH₂-S), 3.12(q, 1H, S-CHH-CHN), 3.39(s, 3H CH₃O), 3.71(t, OCH₂CH₂O).
- <1800> 실시예 10
- <1801> 인자(Factor) VIIa-SA-PEG-40KDa
- <1802> 인자 VIIa의 글리코 페질화(glycoPEGylation)(캐핑을 가진 원 폿 : one pot with capping)
- <1803> 인자 VIIa의 글리코 페질화는 하나의 원 폿 반응(one pot reaction)에서 얻어진다. 여기서, 탈시알화(desialation)와 페질화는 동시에 발생하며, 그 다음 이어서 시알산으로 캐핑된다.
- <1804> 그 반응은 재순환하는 수조(waterbath)에 의해 32℃에서 조절하는 하나의 재킷형 글라스제 용기(jacked glass vessel) 내에서 실시하였다.
- <1805> 1차적으로, 상기 용기내에 농축시켜 0.2μm로 여과한 인자 VIIa를 도입시켜, 20분간 교반바(stir bar)에 의해 혼합시키면서 32℃로 가열하였다.
- <1806> 시알리다아제 용액은 농도 4,000U/L에서 10mM 히스티딘/50mM NaCl/20mM CaCl₂, pH 6.0 버퍼 중에 건조 분말로부터 조제하였다.
- <1807> 그 인자 VIIa가 일단 온도 32℃에 도달될 경우, 그 시알리다아제 용액을 그 인자 VIIa에 첨가시켰으며, 얻어진 그 반응액을 약 5분간 혼합하였다.
- <1808> 그 혼합을 정지시킨 후에는 균일한 용액을 확보하도록 하였다.
- <1809> 32℃에서 1.0시간 동안 처리하여 탈시알화(desialation) 반응을 하도록 하였다.
- <1810> 그 탈시알화 반응을 할 때 그 CMP-SA-PEG-40KDa는 10mM 히스티딘/502mM NaCl/20mM CaCl₂, pH 6.0 버퍼 중에서 용해시켜, 그 농도는 271nm에서의 UV 흡광도에 의해 측정하였다.
- <1811> 그 CMP-SA-PEG-40KDa를 용해시킨 후에, 그 CMP-SA-PEG-40KDa를 그 반응액과 그 ST3Gal3에 첨가하였으며, 그 반응액을 약 15분간 교반바(stir bar)로 혼합시켜, 균일한 용액을 확보하였다. 버퍼 85mL를 추가하여 반응액 1.0 L를 조제하였다.
- <1812> 얻어진 그 반응액을 CMP-SA를 첨가하기 전에 24시간 동안 교반 없이 농도 4.3mM으로 될 때까지 처리하도록 하여 그 반응액을 급냉하고 그 잔류되어 있는 말단 갈락토오스 잔기를 시알산으로 캐핑하였다.
- <1813> 그 급냉(quenching)은 그 반응액을 32℃에서 30분간 혼합시키면서 처리하도록 하였다.
- <1814> 그 반응액의 전량은 급냉 전에 1.0 L이었다.

- <1815> 처리과정 시점에 있는 샘플(timepoint samples)(1mL)을 0시간, 4.5시간, 7.5시간 및 24시간에 얻어 CMP-SA와 함께 급냉시키고 RP-HPLC와 SDS-PAGE에 의해 분석하였다.
- <1816> 인자 VIIa-SA-PEG-40KDa의 정제
- <1817> 캐핑 후에, 그 용액은 4℃에 하룻밤 저장한 10mM 히스티딘(pH 6.0) 2.0 L로 희석하였으며, 그 샘플은 Millipak 60의 0.2 μ m 필터를 통해 여과하였다.
- <1818> 그 결과 얻어진 로드 용량(load volume)은 3.1 L이었다.
- <1819> AEX2의 크로마토그래피를 Akta Pilot의 시스템 상에서 20~25℃ (실온)에서 실시하였다.
- <1820> 로딩(loading) 후에, 평형 버퍼(equilibrium buffer)로 10컬럼 용량 세척을 실시하여, 생성물은 MgCl₂의 10컬럼 용량 증감액(gradient)을 사용하여 상기 컬럼에서 용출되었다.
- <1821> 여기서, 그 결과 비페질화(unPEglyated) 인자 VIIa로부터 페질화 인자 VIIa 종의 분해능(resolution)을 얻었다.
- <1822> 이 컬럼의 로딩은 < 2mg 인자 VIIa/mL 수지의 낮은 표적화(targeting)을 유지하도록 하였다.
- <1823> 벌크 생성물(bulk product)의 풀(pool)을 형성하기 위하여 선택된 프랙션과 프랙션 풀(pools)의 RP-HPLC 분석 이외에, SDS-PAGE 겔을 실시하였다.
- <1824> 풀 프랙션(pooled fractions)은 1M NaOH를 사용하여 pH를 pH 6.0으로 조정하여 하룻밤 동안 온도 2~8℃의 냉방(cold room) 중에서 저장하였다.
- <1825> 최종 농축/다이하필트레이션(diafiltration), 무균(aseptic) 여과 및 분취(aliquoting)
- <1826> 상기 풀 프랙션은 Millipak 20의 0.2 μ m 필터를 통하여 여과시켜 온도 2~8℃에서 하룻밤 저장하였다.
- <1827> 상기 농축/다이하필트레이션을 실시하기 위하여, Millipore의 재생 셀룰로오스막(0.1m²의 30KDa)을 하나의 연동 펌프(peristaltic pump)와 실리콘제 튜빙(tubing)으로 장착한 하나의 시스템 내에서 사용하였다.
- <1828> 그 시스템을 조립시켜 물로 플러싱(flushing) 시킨 다음, 최소 1시간 동안 0.1M NaOH로 위생처리한 다음, 사용 직전에 10mM 히스티딘/5mM CaCl₂/100mM NaCl pH 6.0 다이하필트레이션 버퍼(diafiltration buffer)로 균형화(equilibration)할 때까지 0.1M NaOH 중에 저장하였다.
- <1829> 그 생성물을 약 400mL로 농축시킨 다음, 약 5 다이어 보륨(diavolumes)의 버퍼를 사용하여 일정한 용량으로 다이하필터링(diafiltering)을 하였다.
- <1830> 그 다음, 그 생성물을 약 300mL로 농축시키고, 5분간 저압 재순환(low pressure recirculation) 후에 회수하였으며, 그 막은 5분간 재순환에 의해 다이하필트레이션 버퍼 200mL로 린싱(rinsing) 하였다.
- <1831> 그 세척액을 생성물과 함께 회수하였으며, 또 다른 50mL의 버퍼를 최종 세척액에 대하여 또 5분간 재순환시켰다.
- <1832> 그 결과 얻어진 벌크(bulk)는 약 510mL 이었으며, 이것은 0.2 μ m PES막(Millipore)으로 장착한 하나의 1L용 진공 필터를 통해 여과하였다.
- <1833> 그 다음, 무균여과 벌크(aseptically-filtered bulk)를 50mL용 무균팔콘 튜브(sterile falcon tubes) 중에서 25mL의 분취량으로 분취하여 -80℃에서 냉동하였다.
- <1834> HPLC에 의한 페질화 반응액의 분석(실시에 10)
- <1835>

	콘주게이션 반응시간				정제
	0시간	4.5시간	7.5시간	24시간	크로마토그래피 후
비페질화 %	94.7	76.1	66.6	51.0	0.6
모노페질화 %	0.9	17.9	26.1	39.1	85.6
디페질화 %	0.1	0.9	1.9	5.1	5.1
트리페질화 %	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2

- <1836> 24시간 후, 그 벌크 생성물 PEG-상태 분포는 다음과 같다:

- <1837> 비페질화(unpegylated) 0.7%, 모노페질화(mono-pegylated) 85.3%,
- <1838> 디페질화(di-pegylated) 11.5%, 트리-페질화(tri-pegylated) 0.3%
- <1839> 컬럼 크로마토그래피는 모노-및 디-페질화 중에서 비페질화제를 주로 제거하여 그 생성물의 분포를 형성하는 프로세스에서 주 스텝(main step)이다.
- <1840> 실시예 11
- <1841> 인자 VIIa-SA-PEG-10KDa
- <1842> 다음 실시예에서는 인자 VIIa-SA-PEG-10KDa의 L 및 H사슬에 변형당의 결합수를 역상 HPLC에 의해 측정하는 하나의 처리공정을 설명한다.
- <1843> 인자 VIIa-SA-PEG-10KDa는 L사슬에서 H사슬을 분리하기 위해 환원상태로 처리하였다.
- <1844> 분리 후, 그 H사슬과 L사슬을 역상 HPLC 실험으로 처리하였다.
- <1845> 피크(peaks)는 무변성(native) 인자 VIIa 대조(control)의 크로마토그램(chromatograms)에서 무변성 인자 VIIa 피크에 대한 위치(position)를 기준으로 하여 배정하였다.
- <1846> 다음 표에서는 L사슬에 대한 HPLC 용제 구배 파라미터를 설명한 것이다. 그 컬럼의 온도는 39℃이었다.
- <1847> HPLC의 L사슬에 대한 용제 구배 파라미터
- <1848>
- | 시간, 분 | 용제 B, % | 유속, mL/min | 비고 |
|-------|---------|------------|--------|
| 0 | 30 | 0.5 | 초기상태 |
| 60 | 47 | 0.5 | 구배용출 |
| 60.2 | 90 | 0.5 | 개시 세척액 |
| 70 | 90 | 0.5 | 세척액 |
- <1849> L사슬 인자 VIIa-SA-PEG-10KDa의 크로마토그램(상부)과 무변성(native) L사슬 인자VIIa의 크로마토그램(하부)을 도 14A에서 나타낸다.
- <1850> 다음 표에는 H사슬에 대한 HPLC 용제 구배 파라미터를 설명한 것이다. 그 컬럼의 온도는 52℃이었다.
- <1851> HPLC의 H사슬에 대한 용제 구배 파라미터
- <1852>
- | 시간, 분 | 용제 B, % | 유속, mL/min | 비고 |
|-------|---------|------------|--------|
| 0 | 42.5 | 0.5 | 초기상태 |
| 36 | 52.5 | 0.5 | 구배용출 |
| 36.1 | 90 | 0.5 | 개시 세척액 |
| 41 | 90 | 0.5 | 세척액 |
- <1853> H사슬 인자 VIIa-SA-PEG-10KDa의 크로마토그램(상부)과 무변성(native) H사슬 인자 VIIa의 크로마토그램(하부)을 도 14B에서 나타낸다.
- <1854> 실시예 12
- <1855> 인자 VIIa-SA-PEG-40KDa
- <1856> 다음 실시예에서는 인자 VIIa-SA-PEG-40KDa의 L사슬과 H사슬에 대한 변형당 결합수를 역상 HPLC에 의해 측정하는 하나의 처리공정을 설명한 것이다.
- <1857> 인자 VIIa-SA-PEG-40KDa는 L사슬에서 H사슬을 분리하기 위하여 환원상태로 처리하였다.
- <1858> 분리 후, 그 H사슬과 L사슬은 역상 HPLC 실험에 위해 분리하였다.
- <1859> 피크(peaks)는 그 무손상(native) 인자 VIIa 대조의 크로마토그램에서 비변형당 피크에 대한 위치를 기준으로 하여 배정하였다.
- <1860> 아래의 표는 L사슬에 대한 HPLC의 용제 구배 파라미터를 설명한 것이다. 그 컬럼온도는 25℃이었다.

<1861>

HPLC의 L사슬에 대한 용제 구배 파라미터

<1862>

시간(분)	용리액 B(%)	비고
0	30	초기상태
60	47	구배용출
60.5	90	개시 세척액
65.5	90	종료 세척액
66	42.5	H사슬방법 개시, 평형
70	42.5	실시 종료

<1863>

L사슬 인자 VIIa-SA-PEG-4KDa의 크로마토그램(하부)과 무변성(native) L사슬 인자 VIIa의 크로마토그램(상부)을 도 15A에 나타낸다.

<1864>

다음 표는 H사슬에 대한 HPLC 용제 구배 파라미터를 설명한 것이다. 그 컬럼온도는 40℃이었다.

<1865>

HPLC의 H사슬에 대한 용제 구배 파라미터

<1866>

시간(분)	용리액 B(%)	비고
0	42.5	초기상태
36	52.5	구배용출
36.5	90	개시 세척액
41.5	90	종료 세척액
42	30	H사슬방법 개시, 평형
47	30	실시 종료

<1867>

H사슬 인자 VIIa-SA-PEG-4KDa의 크로마토그램(하부)과 무변성(native) H사슬 인자 VIIa의 크로마토그램(상부)을 도 15B에 나타낸다.

<1868>

여기서 설명한 실시예와 예는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것에 불과하며, 본 발명의 목적에서 볼 때 통상의 기술자에 의해 여러 가지로 변형 또는 변경할 수 있다는 것을 교시하며, 그 변형 또는 변경은 첨부된 청구범위와 본원 발명의 구체적 설명 범위내에 포함된다는 것을 알 수 있다.

<1869>

여기서 인용한 모든 참고문헌의 간행물 및 특허문헌은 본 발명을 참조하기 위하여 여기에 인용하여 기재한다.

도면의 간단한 설명

<140>

도 1은 본 발명의 실시예에서 유용한 변형 시알산 뉴클레오타이드의 예를 나타낸다. 도 1A는 분기(즉, 30KDa, 40KDa)CMP-시알산-PEG당 뉴클레오타이드의 구조체이고, 도 1B는 선상 인자(Factor) VII-SA-PEG-10KDa의 구조체이다.

<141>

도 2는 본 발명의 콘주게이트를 제조할 때 유용한 하나의 예로서 PEG-글리코실 결합기 전구물질(변형당)의 합성 제조공정(스킴:Scheme)을 나타낸다.

<142>

도 3은 본 발명의 글리코 콘주게이트를 형성하는데 유용한 시알릴전이효소를 나타낸 표이다[즉, 변형 시알산을 가진 글리코페질레이트(glycoPEGylate) 펩티드]/

<143>

도 3은 도 3A, 도 3B, 도 3C, 도 3D, 도 3E, 도 3F, 도 3G, 도 3H, 도 3I, 도 3J, 도 3K, 도 3L, 도 3N을 포함하여 각각 나타낸다.

<144>

도 4는 인자 VII 및 인자 VIIa 상에서 글리칸 구조를 재 모델링(remodeling)하는 공정예를 설명한 도 4A ~ 도 4E를 포함한다.

<145>

도 4A는 재 모델링하는데 예측하는 글리칸(glycans)에 결합되어 있는 잔기를 표시한 인자 VII 및 인자 VIIa 펩티드의 설명도이다.

<146>

도 4B는 재 모델링하는데 예측되는 글리칸에 결합되어 있는 잔기를 표시한 인자 VII 및 인자 VIIa 펩티드 A(실선) 및 B(점선)의 설명도와 글리칸의 식을 나타낸다.

- <147> 도 4C ~ 도 4E는 펩티드가 발현되는 세포타입에 의한 도 4B의 펩티드의 글리칸의 재 모델링 공정과 소정의 재 모델링한 글리칸 구조의 설명도이다.
- <148> 도 5A와 도 5B를 포함하는 도 5는 하나의 예로 나타낸 뉴클레오티드가 그 대응하는 인자 VIIa의 아미노산 서열 (SEG ID NOS:1 및 2, 각각)을 나타낸다.
- <149> 도 6은 아시알로-인자 VIIa의 등전점 분획 전기영동겔(isoelectric focusing gel)(pH 3-7)에 대한 영상(image)이다. 레인(lane) 1은 인자 VIIa이고, 레인 2-5는 아시알로-인자 VIIa이다.
- <150> 도 7은 인자 VIIa의 MALDI 스펙트럼의 그래프이다.
- <151> 도 8은 인자 VIIa-SA-PEG-1KDa의 MALDI 스펙트럼의 그래프이다.
- <152> 도 9는 인자 VIIa-SA-PEG-10KDa의 MALDI 스펙트럼의 그래프이다.
- <153> 도 10은 폐질화(PEGylated) 인자 VIIa의 SDS-PAGE 겔의 영상(image)이다. 레인(lane) 1은 아시알로-인자 VIIa이다. 레인(lane) 2는 아시알로-인자 VIIa 및 CMP-SA-PEG-1KDa를 ST3Gal3과 반응시켜 48시간 후 얻은 생성물이다. 레인(lane) 3은 아시알로-인자 VIIa 및 CMP-SA-PEG-1KDa를 ST3Gal3과 반응시켜 48시간 후 얻은 생성물이다. 레인(lane) 4는 아시알로-인자 VIIa 및 CMP-SA-PEG-10KDa를 ST4Gal3과 반응하여 96시간에서 얻은 생성물이다.
- <154> 도 11A ~ 도 11B는 시알리다아제를 적게하여 탈시알릴화와 피질화(PEGylation)를 동시에 실시한 반응을 나타낸다. 이들 도면에서는 시알리다아제의 존재하에서 캐핑(capping)이 효과적인 것을 나타내는 부분이 가장 밝은 부분이다.
- <155> 도 11A는 시알리다아제가 0.5U/L의 레벨일 경우 반응과정을 나타낸다. 레인 1은 미변성(native) 인자 VIIa에 대응하나, 레인 2는 아시알로 인자 VIIa이다. 레인 3에서 레인 7까지는 시간 진행에 따라 폐질화 생성물의 양이 증가한다. 레인 3에서는 주생성물이 모노폐질화 되고[64에서 스폿(spot)을 참조할 수 있음], 소정기간 후 검정할 일정부분에서는 디(di)(97 바로 아래 스폿 참조), 트리(tri)(97 바로 위 스폿 참조) 및 더 높은 폐질화 생성물의 양 증가와 생성을 나타낸다. 레인 8 및 9는 반응에서 시알산의 "캐핑"(capping) 또는 첨가 결과를 나타낸다. 그 반응이 캐핑될 경우, 레인 5, 8 및 9에서 확인된 동일한 폐질화 생성물 분포에서 알 수 있는 바와 같이 그 반응이 정지된다.
- <156> 도 11B는 시알리다아제가 0.1U/L인 경우 반응과정을 나타낸다.
- <157> 도 12A는 시알리다아제가 글리코실전이효소를 동시에 첨가할 경우의 상태를 나타낸다.
- <158> 도 12B는 시알리다아제를 1차로 첨가시킨 다음, 30분간의 지연 후에 글리코실전이효소를 첨가할 때의 상태를 나타낸다.
- <159> 도 13은 하나 이상의 글리코실 결합기가 별첨 도면의 순서(order)에 따라 첨부되어 본 발명의 펩티드 콘주게이트를 형성하는 펩티드의 표이다(도 13에서는 도 13A, 도 13B, 도 13C, 도 13D, 도 13E, 도 13F, 도 13G, 도 13H, 도 13I, 도 13J, 도 13K, 도 13L, 도 13M, 도 13N, 도 13O, 도 13P, 도 13Q, 도 13R, 도 13S, 도 13T, 도 13U, 도 13V, 도 13W, 도 13X, 도 13Y, 도 13Z, 도 13AA, 도 13BB, 도 13CC가 포함되어 있는 각각의 표를 나타냄).
- <160> 도 14A 및 도 14B는 HPLC 실험결과를 표시하는 크로마토그램을 나타낸다,
- <161> 도 14A는 L사출방법(light chain method)에 의해 분석한 인자 VIIa-SA-PEG-10KDa(도면 상부)와 미변성(native) 인자 VIIa 대조(도면 하부)의 라벨링한 크로마토그램을 나타낸다. 다른 생성물로부터 LC(L사슬), 1×10KDa-PEG-LC, 2×10KDa-PEG-LC 및 3×10KDa-PEG-LC의 분리를 나타낸다.
- <162> 도 14B는 H사슬방법(heavy chain method)에 의해 분석한 인자 VIIa-SA-PEG-10LDa(도면 상부)와 미변성(native) 인자 VIIa 대조(도면 하부)의 라벨링한 크로마토그램을 나타낸다. 다른 생성물로부터 HC(heavy chain), 1×10KDa-PEG-LC, 2×10KDa-PEG-LC 및 3×10KDa-PEG-LC의 분리를 나타낸다.
- <163> 도 15A 및 도 15B는 HPLC 실험결과를 표시한 크로마토그램을 나타낸다.
- <164> 도 15A는 L사슬법에 의해 분석한 축소된 미변성(native) 인자 VIIa 대조(도면 상부)와 축소된 인자 VIIa-SA-PEG-40KDa(도면 하부)의 라벨링(labeled)한 크로마토그램을 나타낸다. 다른 생성물에서 LC(light chain), 1×

40KDa-PEG-LC, 2×40KDa-PEG-LC 및 3×40KDa-PEG-LC의 분리를 나타낸다.

<165> 도 15B는 H사슬방법(heavy chain method)에 의해 분석한 축소된 미변성 인자 VIIa 대조(도면 상부)와 인자 VIIa-SA-PEG-40KDa(도면 하부)의 라벨링한 크로마토그램을 나타낸다. 다른 생성물로부터 HC(heavy chain), 1×40KDa-PEG-LC, 2×40KDa-PEG-LC 및 3×40KDa-PEG-LC의 분리를 나타낸다.

<166> 약어

<167> PEG는 폴리(에틸렌글리콜)의 약어이고; PPG는 폴리(프로필렌글리콜)의 약어이며; Ara는 아라비노실의 약어고; Fru는 프루코실의 약어이며; Fuc는 푸코실의 약어이고; Gal은 갈락실의 약어이며; GalNAc는 N-아세틸갈락토사미닐의 약어이고; Glc는 글루코실의 약어이며; GlcNAc는 N-아세틸글루코사미닐의 약어이고; Man은 만노실의 약어이며; ManAc는 만노사미닐아세테이트의 약어고; Xyl은 키실로실의 약어이며; NeuAc는 시알릴 또는 N-아세틸뉴라미닐의 약어이고; Sia는 시알릴 또는 N-아세틸뉴라미닐의 약어이며; 이들의 유도체 및 동족체이다.

<168> 정의

<169> 특별한 정의가 없는 경우, 여기서 사용되는 모든 과학적 용어는 일반적으로 본 발명에 속한 기술에서 기술자에 의해 통상적으로 이해할 수 있는 동일한 의미를 가진다.

<170> 일반적으로, 여기서 사용된 명칭, 세포배양, 분자 유전학, 유기화학 및 핵산화학에서의 실험 처리공정 및 혼성화는 이 기술분야에서 통상적으로 사용되고, 공지된 것이다.

<171> 핵산 및 펩티드 합성에서는 표준기술을 사용한다.

<172> 기술과 처리공정은 일반적으로 통상의 방법과 여러 가지의 일반적인 참고문헌에 따라 실시한다[일반적으로, Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 참고로 여기서 인용함].

<173> 여기서 사용한 명칭과 분석화학에서의 실험 처리공정 및 아래에서 설명한 유기합성은 이 기술분야에서 공지되고, 관용된 것이다. 표준기술 또는 그 변형기술은 화학적 합성 및 화학적 분석에 사용한다.

<174> 여기서 기재된 모든 올리고사카리드는 비환원 사카리드(즉, Gal)의 명칭 또는 약어로, 그 다음 글리코시드 결합 구성(α 또는 β), 링결합(1 또는 2), 결합(2, 3, 4, 6 또는 8)에 포함된 환원 사카리드의 링 위치에 따라, 그 다음 환원 사카리드의 명칭 또는 약어(즉, GlcNAc)로 기재한다. 각각의 사카리드는 하나의 피라노오스가 바람직하다. 글리코(glyco) 생물학 명칭을 참조할 수 있다[Essentials of Glycobiology Varki 등, eds. CSHL Press(1999) 참조].

<175> 올리고사카리드는 하나의 환원단(reducing end)을 가진 그 사카리드가 실제로 하나의 환원당인지의 여부에 관계없이 하나의 환원단과 하나의 비환원단을 가진 것으로 한다.

<176> 허용되는 명칭에 따라, 올리고사카리드는 그 좌측에 비환원단과 그 우측에 환원단을 가진 것으로 여기서 나타낸다.

<177> 용어 "시알산" 또는 "시알릴"은 9개 탄소의 카르복실화당의 하나의 패밀리(family) 중 어느 멤버이다.

<178> 그 시알산 패밀리의 가장 통상적인 멤버는 N-아세틸뉴라민산[2-케토-5-아세트아미도-3,5-디데옥시-D-글리세로-D-갈락토노놀로피라노오스-1-온산(약어로, Neu5Ac, NeuAc 또는 NANA로 기재함)]이다.

<179> 그 패밀리의 제 2멤버는 N-글리코실-뉴라민산(Neu5Gc 또는 NeuAc)이며, 여기서 NeuAc의 N-아세틸기는 가수분해한다.

<180> 패밀리 멤버의 제 3 시알산은 2-케토-3-데옥시-노놀로손산(KDN)이다(Nadano 등, (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori 등, Biol. Chem. 265: 21811-21819(1990)).

<181> 또, 9-0-락틸-Neu5Ac 또는 9-0-아세틸-Neu5Ac, 9-데옥시-9-플루오로-Neu5Ac 및 9-아지도-9-데옥시-Neu5Ac와 같은 하나의 9-0-C₁-C₆아실-Neu5Ac 등 9-치환 시알산이 포함된다.

<182> 시알산 패밀리에 대해서는 다음 참고문헌을 참조할 수 있다.

<183> Varki, Glycobiology 2:25-40(1992);

<184> Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, New York (1992)).

- <185> 시알릴화 처리공정에서 시알산 화합물의 합성 및 사용은 국제출원 공개문헌 WO 92/16640(1992.10.01자 공개되었음)에서 개시되었다.
- <186> "펩티드"(peptide)는 하나의 폴리머를 말하며, 여기서 그 모노머는 아미노산이며, 아미드결합을 통해 함께 결합되어 있어, 또 하나의 폴리 펩티드이다.
- <187> 또, 비천연(unnatural) 아미노산, 예로서, β -알라닌, 페닐글리신 및 호모아르기닌이 포함된다.
- <188> 본 발명에서는 또 유전자 엔코딩(gene-encoding)되지 않은 아미노산도 사용할 수 있다.
- <189> 또, 본 발명에서는 변형시켜 반응성기, 글리코실화 부위, 폴리머, 치료성분, 바이오 분자 등을 포함하는 아미노산을 사용할 수 있다.
- <190> 본 발명에서 사용되는 모든 아미노산은 D-또는 L-이성체(isomer)로 할 수 있다.
- <191> 그 L-이성체가 일반적으로 바람직하다. 또, 다른 펩티드 유사물(peptidomimetics)이 본 발명에서 유용하다.
- <192> 여기서 사용된 바와 같이, "펩티드"는 글리코실화 및 언글리코실화(unglycosylated) 펩티드 모두를 포함한다.
- <193> 그 펩티드를 나타내는 하나의 시스템(system)에 의해 불충분하게 글리코실화된 펩티드를 포함한다.
- <194> 일반적인 참고문헌으로 다음 문헌을 참조할 수 있다.
- <195> Spatola, A. F., in CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267(1983).
- <196> 본 발명의 펩티드의 리스트(list)는 도 13에서 제공한다.
- <197> 용어 "펩티드 콘주게이트"(peptide conjugate)는 본 발명의 특징을 말하며, 여기서 하나의 펩티드가 여기서 설명한 바와 같이 하나의 변형당(modified sugar)으로 콘주게이팅(conjugating)되어 있는 것을 말한다.
- <198> 용어 "아미노산"은 천연 및 합성 아미노산과, 아미노산 아날로그(analogo) 및 아미노산 유사체(mimetics)(천연 아미노산과 동일하게 작용함)를 말한다.
- <199> 천연 아미노산은 유전자 코드에 의해 엔코딩되는 아미노산과, 후 변형시킨 아미노산, 즉 히드록피롤린, γ -카르복시글루타메이트 및 O-포스포세린이다.
- <200> 아미노산 아날로그는 천연 아미노산과 동일한 기본적인 화학구조를 가진 화합물, 즉 하나의 수소, 하나의 카르복실기, 하나의 아미노기 및 하나의 R그룹(group)에 결합된 α 탄소, 즉 호모세린, 노르류신, 메티오닌술포시드, 메티오닌 메틸술포늄을 말한다.
- <201> 이와 같은 아날로그는 변형 R그룹(즉, 노르류신) 또는 변형 펩티드 골격을 가지나, 천연 아미노산과 동일한 기본적인 화학구조를 보유한다.
- <202> 아미노산 유사물은 아미노산의 일반적인 화학구조와 다르나 천연 아미노산과 동일하게 작용하는 구조를 가진 화학적 화합물을 말한다.
- <203> 여기서 사용되는 용어 "변형당(modified sugar) 또는 "변형당 잔기"(modified sugar residue)는 본 발명의 하나의 프로세스에서 아미노산 또는 펩티드의 글리코실잔기에 효소에 의해 첨가되는 천연 또는 비천연 카르보히드레이트를 말한다.
- <204> 그 변형당은 당뉴클레오타이드(모노, 디 및 트리-포스페이트), 활성화당(즉, 글리코실할라이드, 글리코실메실레이트) 및 활성화하지 않으며 뉴클레오타이드가 아닌 당(sugars)을 포함하나 한정되지 않은 효소 기질에서 선택한다.
- <205> 그 "변형당"은 변형기(modifying groups)로 공유 결합에 의해 기능화한다.
- <206> 유용한 변형기에는 PEG 성분, 치료성분, 진단성분, 바이오 분자 등을 포함하나, 한정되어 있는 것은 아니다.
- <207> 그 변형기는 천연 카르보히드레이트 또는 비변형카르보히드레이트가 아닌 것이 바람직하다.
- <208> 그 변형기로 기능화하는 부위(locus)는 그 변형당이 펩티드에 효소에 의해 첨가하는 것을 방해하지 않도록 선택한다.
- <209> 용어 "수용성"(water-soluble)은 수중에서 검출할 수 있는 용해도를 가진 성분을 말한다.

- <210> 물 용해도를 검출 및/또는 정량하는 방법은 이 분야기술에서 공지되었다.
- <211> 수용성 폴리머의 예로는 펩티드, 사카리드, 폴리(에테르), 폴리(아민), 폴리(카르복실산) 등이 있다.
- <212> 펩티드는 하나의 단순 아미노산(simple amino acid)으로 이루어진 혼합 서열(mixed sequences), 즉 폴리(라이신)을 가진다.
- <213> 하나의 예의 폴리사카리드는 폴리(시알산)이다.
- <214> 하나의 예의 폴리(에테르)는 폴리(에틸렌글리콜)이다.
- <215> 폴리(에틸렌 이민)은 하나의 예의 폴리 아민이며, 폴리(아크릴)산은 하나의 대표적인 폴리(카르복실산)이다.
- <216> 그 수용성 폴리머의 폴리머 골격은 폴리(에틸렌 글리콜)(즉, PEG)로 할 수 있다.
- <217> 그러나, 다른 관련된 폴리머는 또 본 발명의 실시에서 사용에 적합하고, 그 용어 PEG 또는 폴리(에틸렌 글리콜)의 사용이 이 발명에서 포함할 수 있도록 하며 제외하지 않도록 하는 것을 이해할 필요가 있다.
- <218> 용어 PEG에는 알콕시 PEG, 2기능성 PEG, 다중암(multiarmed) PEG, 포크상(forked) PEG, 분기 PEG, 현수(pendent) PEG(즉 PEG 또는 폴리머 골격에 현수된 하나 이상의 작용기를 가진 관련 폴리머), 또는 분해성 연결을 가진 PEG를 포함하여, 여러 형태들 중 어느 하나의 폴리(에틸렌 글리콜)를 포함한다.
- <219> 그 폴리머 골격은 선상 또는 분기상으로 할 수 있다.
- <220> 분기 폴리머 골격은 일반적으로 이 분야기술에서 공지되었다.
- <221> 일반적으로, 하나의 분기 폴리머는 하나의 중심 분기 코어(central branch core) 성분과 그 중심 분기 코어에 결합된 다수의 선상 폴리머 사슬을 포함한다.
- <222> PEG는 글리세롤, 펜타에리트리톨 및 소르비톨 등 여러 가지의 폴리올에 에틸렌옥사이드를 부가시켜 제조할 수 있는 분기형태로 통상 사용된다.
- <223> 그 중심 분기성분은 또 라이신 등 수개의 아미노산에서 유도시킬 수 있다.
- <224> 그 분기 폴리(에틸렌 글리콜)은 $R(-PEG-OH)_m$ (여기서, R은 글리세롤 또는 펜타에리트리톨 등 코어성분을 나타내며, m은 암(arm)의 수를 나타낸다.)과 같이 일반형태로 나타낼 수 있다.
- <225> 여기서 인용한 특허문헌 USP 5,932,462에서 기재된 PEG 분자 등 다 암(multi-armed) PEG 분자는 또 폴리머 골격으로서 사용할 수 있다.
- <226> 다수의 다른 폴리머도 본 발명에 적합하다.
- <227> 결합부위(loci) 약 2 ~ 약 300개 이내에서 수용성이며, 비펩티드 형상인 폴리머 골격은 특히 본 발명에서 유용하다.
- <228> 적합한 폴리머의 예로는 여기서 참고로 인용한 특허문헌 USP 5,629,384 명세서에서 기재된 바와 같이, 폴리(프로필렌글리콜)("PPG"), 에틸렌글리콜과 프로필렌글리콜의 코폴리머 등 다른 폴리(알킬렌글리콜), 폴리(옥시에틸렌화 폴리올), 폴리(올레핀 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시프로필메타크릴아미드), 폴리(α -히드록시산), 폴리(비닐알코올), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리(N-아크릴로모르폴린) 및 이들의 코폴리머, 테르폴리머 및 혼합물이 포함되나, 한정되어 있는 것은 아니다.
- <229> 그 폴리머 골격의 각각의 사슬의 분자량은 변동할 수 있으나, 일반적으로 약 100Da ~ 약 100,000Da의 범위이며, 주로 약 6,000Da ~ 약 80,000Da이다.
- <230> 환자에 펩티드 약제를 투여할 때, 여기서 사용되는 바와 같이 "곡선 하부영역"(area under the curve) 또는 "AUC"는 0에서 무한대(infinity)의 시간함수로서 환자의 전신순환에서의 약제의 농도를 기술하는 곡선하의 전체 영역으로 정의한다.
- <231> 환자에 펩티드 약제 투여시에, 여기서 사용되는 용어 "반감기" 또는 " $t_{1/2}$ "은 환자에서 약제의 혈장농도가 1/2로 감소하는데 필요로 하는 시간으로 정의한다.
- <232> 멀티플 클리어런스(multiple clearance) 메카니즘, 재분배 및 공지된 다른 메카니즘에 따라, 펩티드 약제와 관련된 반감기는 1이상 이다.

- <233> 통상적으로, 알파 및 베타 반감기는 알파상(phase)이 재분배와 관련되고 베타상이 클리어런스에 관련되도록 한다.
- <234> 그러나, 대부분 혈류(blood stream)에 한정되어 있는 단백질 약제에서는 최소 2의 클리어런스 반감기로 할 수 있다.
- <235> 글리코실화 펩티드에 있어서, 신속한 베타상 클리어런스는 마크로파이지, 또는 말단갈락토오스, N-아세틸갈락토사민, N-아세틸글루코사민, 만노오스 또는 푸코오스를 인식하는 내피 세포상에서 리셉터(recaptors)에 의해 중개할 수 있다.
- <236> 더 느린 베타상 클리어런스는 유효 반경 < 2nm(약 68KD)을 가진 분자에 대한 신장사구체여과(renal glomerular filtration) 및/또는 조직 내에서 특이 또는 비특이 흡수(uptake) 및 대사에 발생할 수 있다.
- <237> 글리코페질화(glycoPEGylation)는 말단당(즉, 갈락토오스 또는 N-아세틸갈락토사민)을 캐핑(capping)할 수 있어, 이들의 당을 인식하는 리셉터에 의해 신속한 알파상 클리어런스를 차단한다.
- <238> 또, 이것은 더 큰 유효 반경을 참조할 수 있으므로 분배 및 조직 흡수의 용량(volume)을 감소시켜 느린 베타상을 연장한다.
- <239> 이와 같이, 알파상 및 베타상 반감기에 있어서, 글리코페질화의 정밀한 영향력(impact)은 그 크기, 글리코실화의 상태 및 이 기술분야에서 공지된 기타 파라미터에 따라 변동할 수 있다.
- <240> 또, "반감기"의 설명은 다음 참고문헌에서 기재되어 있다[Pharmaceutical Biotechnology(1997, DFA Crommelin and RD Sindelar, eds., Harwood Publishers, Amsterdam, pp 101-120)].
- <241> 여기서 사용되는 용어 "글리코 콘주게이션"(glycoconjugation)은 본 발명의 폴리 펩티드, 즉 G-CSF 펩티드의 아미노산 또는 글리코실 잔기에 변형당 종(modified sugar species)의 효소에 의해 중개한 콘주게이션(conjugation)을 말한다.
- <242> "글리코콘주게이션"의 이차적인 용어(subgenus)는 "글리코페질화"(glycoPEGylation)로서, 그 변형당의 변형기(modifying group)가 폴리(에틸렌 글리콜)과, 그 알킬 유도체(즉, m-PEG) 또는 반응성 유도체(즉, H₂N-PEG, HOOC-PEG)이다.
- <243> 용어 "대규모"(large-scale) 및 "산업상 규모"(industrial-scale)는 혼용하며, 단일 반응 사이클이 완료될 때 글리코콘주게이트 최소 약 250mg, 바람직하게는 최소 약 500mg, 더 바람직하게는 최소 약 1gr을 생산하는 반응 사이클을 말한다.
- <244> 여기서 사용되는 용어 "글리코실 결합기"(glycosyl linking group)는 하나의 변형기(즉, PEG 성분, 치료성분, 바이오 분자)가 공유 결합되는 하나의 글리코실 잔기를 말한다.
- <245> 그 글리코실 결합기는 그 콘주게이트의 잔부(remainder)에 그 변형기를 결합한다.
- <246> 본 발명의 방법에서, 그 "글리코실 결합기"는 글리코실화 또는 언글리코실화(unglycosylated) 펩티드에 공유 결합되므로, 그 펩티드 상에서 아미노산 및/또는 글리코실 잔기에 그 약제(agent)를 결합한다.
- <247> "글리코실 결합기"는 그 펩티드의 아미노산 및/또는 글리코실잔기에 "변형당"의 효소에 의한 결합에 의해 "변형당"으로부터 일반적으로 유도된다.
- <248> 그 글리코실 결합기는 변형기-변형당 카세트의 형성 중에 분해되는 하나의 사카리드 유도 구조로 할 수 있거나(즉, 산화→수프염기 형성→환원), 또는 그 글리코실 결합기는 무손상(intact)으로 할 수 있다.
- <249> "무손상 글리코실 결합기"는 글리코실 성분에서 유도된 하나의 결합기를 말하며, 여기서 사카리드 모노머는 변형기를 결합하며, 그 콘주게이트의 잔부는 분해되지 않는다. 즉, 소듐 메타퍼아이오데이트에 의해 산화되지 않는다.
- <250> 본 발명의 "무손상 글리코실 결합기"는 하나의 모(parent) 사카리드 구조에서 글리코실 단위의 부가 또는 하나 이상의 글리코실 단위의 제거에 의해 하나의 천연 올리고 사카리드에서 유도할 수 있다.
- <251> 여기서 사용되는 용어 "비-글리코시드 변형기"는 글리코실 결합기에 직접 결합된 천연당을 함유하지 않은 변형기를 말한다.

- <252> 여기서 사용되는 용어 "표적성분"(targeting moiety)은 신체(body)의 특정조직 또는 부위에 선택적으로 위치 설정하는 종(species)을 말한다.
- <253> 그 위치설정은 표적제 또는 콘주게이트의 분자 결정인자(molecular determinants), 분자크기, 이온 상호작용, 소수성 상호작용 등의 특수인식에 의해 매개(mediation)된다.
- <254> 특수조직 또는 부위에 하나의 약제를 표적으로 하는(targeting) 다른 메카니즘은 이 기술분야에서 이 기술자에 의해 공지되었다.
- <255> 표적성분(targeting moiety)의 예로는 항체, 항체 프라그먼트, 트랜스 페린(transferrin), HS-글리코 단백질, 응집인자(coagulation factors), 혈청 단백질(serum proteins), β -글리코 단백질, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO 등이 있다.
- <256> 여기서 사용되는 "치료성분(therapeutic moiety)은 항생제, 항염증제, 항종양제, 사이토톡신(cytotoxins) 및 방사성제를 포함하나 한정되지 않는 치료에 유용한 처리제를 말한다.
- <257> "치료성분"에는 바이오 활성제(bioactive agents)의 프로드러그(prodrugs), 하나의 치료성분이 하나의 캐리어에 결합되어 있는 구성물, 즉 다가약제(multivalent agent)를 포함한다.
- <258> 또, 치료제에는 단백질 및 단백질을 함유한 구성물을 포함한다.
- <259> 단백질의 예에는 그라눌로사이트 콜로니 자극 인자(Granulocyte Colony Stimulating Factor)(GCSF), 그라눌로사이트 마크로파아지 콜로니 자극인자(Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor)(GMCSF), 인터페론(Interferon)(즉, 인터페론- α , - β , - γ , 인터류킨(Interleukin)(즉, 인터류킨 II), 혈청 단백질(Serum proteins)(즉 인자 VII, VIIa, VIII, IX 및 X), 휴먼 코리온 고나도트로핀(Human Chorionic Gonadotropin)(HCG), 폴리클 자극 호르몬(Follicle Stimulating Hormone(FSH) 및 루테니징 호르몬(Lutenizing Hormone)(LH), 항체 융합 단백질(antibody fusion proteins)[즉, 종양 괴사 인자 리넵터(Tumor Necrosis Factor)(TNF)/Fc도 메인 융합 단백질]을 포함하나 한정되어 있는 것은 아니다.
- <260> 여기서 사용되는 "의약적으로 허용할 수 있는 캐리어"에는 어느 재료라도 포함한다. 여기서, 콘주게이트와 배합할 경우 콘주게이트의 활성을 보유하며, 피검자의 면역 시스템과 미반응성(non-reactive)이다.
- <261> 그 캐리어의 예에는 포스페이트 버퍼 식염 수용액, 물, 오일/물 에멀션 등 에멀션 및 여러 가지 종류의 습윤제 등 표준이 되는 의약품 캐리어 중 어느 것이라도 포함하며, 한정되어 있는 것은 아니다.
- <262> 또, 다른 캐리어에는 멸균용액, 피복정제를 포함하는 정제와 캡슐을 포함할 수 있다. 일반적으로 이와 같은 캐리어에는 전분, 우유, 당, 어느 종류의 점토, 젤라틴, 스테아린산 또는 그 염, 마그네슘 또는 칼슘 스테아레이트, 탈크, 식물성 유지, 검, 글리콜 등 부형제 또는 다른 공지의 부형제를 포함한다.
- <263> 또, 이와 같은 캐리어에는 향미(flavor) 및 착색 첨가제 또는 다른 성분을 포함할 수 있다.
- <264> 이와 같은 캐리어를 함유하는 조성물은 공지의 통상의 방법에 의해 제제한다.
- <265> 여기서 사용되는 "투여"(administering)는 피검자에 경구투여, 좌약(suppository)투여, 국소접촉투여, 정맥내투여, 복강내투여, 근육내투여, 병소내(lesional)투여, 비강내투여 또는 피하투여 또는 서방디바이스(slow-release device), 즉 소형 삼투압 펌프(mini-osmotic pump)의 체내이식을 말한다.
- <266> 투여는 비경구와 경점막(transmucosal)(즉, 경구, 비강, 질, 직장 또는 경피)를 포함하는 어느 루트에 의해 행하여진다.
- <267> 비경구 투여에는 즉 정맥내투여, 근육내투여, 소동맥(arteriole)투여, 피내투여, 피하투여, 복강내투여, 심실내투여 및 두개내(intracranial)투여를 포함한다.
- <268> 더욱이, 종양을 치료하기 위하여 주사하여 세포사멸(apoptosis)을 유발할 경우, 종양 및/또는 그 종양을 둘러싼 조직 내에 직접 투여할 수 있다.
- <269> 투여의 다른 방식에는 리포솜 제제(liposomal formulations), 정맥내 주입, 경피패치 등의 사용을 포함하나 한정된 것은 아니다.
- <270> 용어 "개선(회복)"(ameliorating) 또는 "개선(회복)하다"(ameliorate)는 환자의 신체적 또는 정신적 건강에서 개선 또는 증상의 감퇴, 완화 또는 점감(diminishing) 등 객관적 또는 주관적 파라미터를 포함하여 병리상태의

치료에서의 성공표시(indicia)를 말한다.

- <271> 증상의 회복(개선)은 신체검사 및/또는 정신 의학적 평가의 결과를 포함하여 객관적 또는 주관적 파라미터를 기준으로 할 수 있다.
- <272> 용어 "치료"(therapy)는 질병에 걸리기 용이하나 그 질병의 증상을 경험하지 않았거나 나타낸 바 없는 동물에서 그 질병 또는 상태의 발생을 예방하며(예방치료) 그 질병을 억제하며(그 질병발생의 지연 또는 정지), 그 질병의 증상 또는 부작용에서의 경감(완화)을 제공하며(고식적 치료 포함), 그 질병을 경감하는 (그 질병의 퇴행발생) 것을 포함하는 질병 또는 상태의 치료를 말한다.
- <273> 용어 "유효량" 또는 "...에 유효한 량" 또는 "치료 유효량" 또는 어느 동일한 의미의 용어는 질병치료를 위해 동물에 투여할 때 그 질병을 치료하는데 충분한 양을 의미한다.
- <274> 용어 "분리"(isolated)는 재료를 제조하기 위하여 사용되는 성분들로부터 유리하는 하나의 재료를 말한다.
- <275> 본 발명의 펩티드 콘주게이트에 있어서, 그 용어 "분리"는 그 펩티드 콘주게이트를 제조하는데 사용되는 혼합물 중에서 재료를 정상적 상태에서 동반하는 성분에서 유리하는 재료를 말한다.
- <276> "분리"(isolated) 및 "순수"(pure)는 혼용한다.
- <277> 일반적으로, 본 발명의 분리된 펩티드 콘주게이트는 어느 범위에서 바람직하게 나타낸 순도(purity)의 레벨을 가진다.
- <278> 그 펩티드 콘주게이트의 순도 레벨의 하한(lower end)은 약 60%, 약 70% 또는 약 80%이고, 그 순도 레벨의 상한(upper end)은 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 95% 이상이다.
- <279> 그 펩티드 콘주게이트가 순도 약 90% 이상인 경우, 이들의 펩티드 콘주게이트의 순도는 어느 범위에서 바람직하게 나타낸 것이다. 그 순도범위의 하한은 약 90%, 92%, 약 94%, 약 96% 또는 약 98%이다. 그 순도범위의 상한은 약 92%, 약 94%, 약 96%, 약 98% 또는 100% 순도이다.
- <280> 순도는 어느 공지된 분석방법(즉, 은 염색 겔 상에서의 밴드강도, 폴릴아크릴아미드겔 전기영동, HPLC 또는 동일한 수단)에 의해 측정한다.
- <281> 여기서 사용되는 "개체군의 각각의 멤버"는 하나의 펩티드에 부가한 선택%의 변형당을 그 펩티드 상에서의 다중의 동일한 수용체부위에 부가하는 본 발명의 펩티드 콘주게이트의 하나의 개체군의 특성을 기술한 것이다.
- <282> "그 개체군의 각각의 멤버"는 변형당에 콘주게이팅된 펩티드 상에서 부위(sites)의 "균질성"(homogeneity)을 나타내며, 본 발명의 콘주게이트로서, 이들의 콘주게이트는 균질성이 최소 약 80%, 바람직하게는 최소 약 90%, 더 바람직하게는 최소 약 95%이다.
- <283> "균질성"(균일성)은 그 변형당이 콘주게이팅되는 수용체성분(acceptor moieties)의 하나의 개체군에 걸친 구조적인 컨시스턴시(structural consistency)를 말한다.
- <284> 이와 같이, 모든 다른 변형당이 콘주게이팅되는 수용체부위와 동일한 구조를 가진 하나의 수용체부위에 각각의 변형당 성분이 콘주게이팅되는 본 발명의 하나의 펩티드 콘주게이트에 있어서, 그 펩티드 콘주게이트는 균질성이 약 100%이다.
- <285> 균질성은 일반적으로 하나의 범위로 나타낸다. 그 펩티드 콘주게이트에 대한 균질성 범위의 하한은 약 60%, 약 70% 또는 약 80%이고, 그 순도범위의 상한은 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 90% 이상이다.
- <286> 그 펩티드 콘주게이트는 균질성이 약 90% 또는 그 이상인 경우, 이들의 균질성은 또 하나의 범위로 나타내는 것이 바람직하다.
- <287> 그 균질성 범위의 하한(lower end)은 약 90%, 약 92%, 약 94%, 약 96% 또는 98%이다. 그 순도범위의 상한은 약 92%, 약 94%, 약 96%, 약 98% 또는 약 100% 균질성이다.
- <288> 그 펩티드 콘주게이트의 순도는 일반적으로 이 분야 기술의 기술자에 의해 공지된 하나 이상의 방법, 즉 액상 크로마토그래피-매스(mass) 스펙트로메트리(LC-MS), 플라이트 스펙트로메트리의 매트릭스 협조레이저 탈착 매스 시간(matrix assisted laser desorption time), 모세관 전기영동법 등에 의해 측정한다.
- <289> 하나의 글리코펩티드종에 대하여 말할 때, "거의 균일한 글리코폼")substantially uniform glycoform) 또는 거의 균일한 글리코실화패턴"은 관련된 글리코실전이효소(즉, 푸코실전이효소)에 의해 글리코실화한 수용체 성분

의 %를 말한다.

- <290> 예로서, α 1,2푸코실전이효소의 경우, 거의 균일한 푸코실화패턴은 Gal β 1,4-GlcNAc-R과 그 시알릴화아날로그의 거의 전부(아래에서 정의한 것과 같음)가 본 발명의 펩티드 콘주게이트에서 푸코실화할 경우 존재한다.
- <291> 여기서 설명한 푸코실화구조에 있어서 그 Fuc-GlcNAc 결합은 일반적으로 α 1,6 또는 1,3이며, α 1,6이 일반적으로 바람직하다.
- <292> 그 출발재에는 글리코실화 수용체 성분(즉, 푸코실화Gal β 1,4-GlcNAc-R 성분)을 함유할 수 있다는 것은 이 기술 분야의 기술자에 의해 이해할 수 있다.
- <293> 이와 같이, 상기 계산 %의 글리코실화에는 본 발명의 방법에 의해 글리코실화한 수용체 성분과, 그 출발재에서 이미 글리코실화한 수용체 성분을 포함한다.
- <294> "거의 균일한"(substantially uniform)의 상기 정의에서 용어 "거의"는 하나의 특정의 글리코실전이효소의 수용체 성분의 최소 약 40%, 최소 약 70%, 최소 약 80%, 또는 더 바람직하게는 최소 약 90%, 가장 더 바람직하게는 최소 약 95%가 글리코실화함을 일반적으로 의미한다.
- <295> 치환기가 좌측에서 우측으로 기재한 이들의 치환기의 통상의 화학식에 의해 특정될 경우, 이들의 치환기는 화학적으로 동일한 치환기를 동일하게 포함하며, 이들의 동일한 치환기들은 우측에서 좌측으로 그 구조를 기재한 것으로 한다. 즉, $-\text{CH}_2\text{O}-$ 는 또 $-\text{OCH}_2-$ 로 인용하여 기재하도록 한다.
- <296> 용어 "알킬"은 그 자체 또는 또 다른 치환기의 일부로서 특별한 설명이 없는 경우, 하나의 직쇄 또는 분기사슬, 또는 사이클릭 탄화수소래디컬, 또는 그 조합을 의미하며, 완전 포화할 수 있고, 모노 또는 다불포화할 수 있으며, 지정한 탄소원자 수(즉, $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 은 1~10개의 탄소원자를 의미함)를 가진 디- 및 다가래디컬을 포함할 수 있다.
- <297> 포화 탄화수소래디컬의 예로는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, t-부틸, 이소부틸, sec-부틸, 시클로헥실, (시클로헥실)메틸, 시클로프로필메틸, 예로서 n-펜틸, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸 등의 동족체(homologs) 및 이성체 등의 그룹(groups)을 포함하나 한정된 것은 아니다.
- <298> 하나의 불포화 알킬기는 하나 이상의 2중 결합 또는 3중 결합을 가진 것이다. 불포화 알킬기의 예에는 비닐, 2-프로펜일, 크로틸, 2-이소펜테닐, 2-(부탈디에닐), 2,4-펜타디에닐, 3-(1,4-펜타디에닐), 에티닐, 1- 및 3-프로피닐, 3-부티닐, 그 고급 동족체 및 이성체를 포함하나, 한정된 것은 아니다.
- <299> 용어 "알킬"은 특별한 설명이 없는 경우, 또 "헤테로알킬" 등, 아래에서 구체적으로 정의한 알킬의 유도체를 포함하는 것을 의미한다. 탄화수소기로 한정되어 있는 알킬기를 "호모알킬"이라 한다.
- <300> 용어 알킬렌은 그 자체 또는 또 다른 치환체의 일부로서 하나의 알칸에서 유도된 2가 래디컬을 의미하며, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 를 예시하나, 한정되어 있는 것은 아니며, 또 "헤테로알킬렌"과 같이 아래에서 설명한 기(groups)를 포함한다.
- <301> 일반적으로, 알킬(또는 알킬렌)기는 탄소원자 1-24개를 가지며, 이들의 기는 10개 또는 그 이하의 탄소원자 수를 가지며 본 발명에서 바람직하다.
- <302> "저급알킬"(lower alkyl) 또는 "저급알킬렌"(lower alkylene)은 길이가 더 짧은 사슬의 알킬 또는 알킬렌기이며, 일반적으로 8개 또는 그 이하의 탄소원자를 가진다.
- <303> 용어 "알콕시", "알킬아미노" 및 "알킬티오"(또는 티오알콕시)는 통상의 의미로 사용되며, 각각 산소원자, 아미노기, 또는 황 원자에 의해 그 분자의 잔부에 결합된 알킬기를 말한다.
- <304> 용어 "헤테로알킬"은 그 자체 또는 다른 용어와 조합하여, 특별한 설명이 없는 경우, 안정성 있는 직쇄 또는 분기사슬, 또는 시클릭 탄화수소래디컬 또는 그 결합을 의미하며, 위에서 설명한 탄소원자 수와 O, N, Si 및 S로 이루어진 그룹에서 선택한 최소 하나의 헤테로원자로 이루어진 것이다.
- <305> 여기서, 질소원자와 황원자는 선택적으로 산화시킬 수 있고, 질소 헤테로원자는 선택적으로 4차원화할 수 있다.
- <306> 그 헤테로원자 O, N 및 S와 Si는 헤테로알킬기의 어느 내부위치에, 또는 그 분자의 잔부에 알킬기가 결합되어 있는 위치에 설정할 수 있다.

- <307> 이들의 예에는 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$, 및 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 를 포함하나 한정되어 있는 것은 아니다.
- <308> 2개까지의 헤테로원자는 예로서 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ 및 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 등 연속적으로 할 수 있다.
- <309> 동일하게, 용어 "헤테로알킬렌"은 그 자체 또는 또 다른 치환체의 일부로서 헤테로알킬에서 유도된 2가 래디컬을 의미하며, 예로서 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-$ 와 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 를 들 수 있으나, 한정된 것은 아니다.
- <310> 헤테로알킬렌기에 있어서, 헤테로원자는 또 사슬말단 모두 또는 어느 하나를 점유할 수 있다(즉, 알킬렌옥시, 알킬렌디옥시, 알킬렌아미노, 알킬렌디아미노 등).
- <311> 더 나아가서, 알킬렌과 헤테로알킬렌 결합기에 있어서, 그 결합기의 식을 기재한 방향에 따라 그 결합기의 배향(orientation)을 의미하는 것은 아니다. 예로서, 식 $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'-$ 는 $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'-$ 와 $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2-$ 모두를 나타낸다.
- <312> 용어 "시클로알킬" 및 "헤테로시클로알킬"은 이들 자체 또는 다른 용어와 조합하여, 특별한 설명이 없는 경우, "알킬"과 "헤테로알킬" 각각에서의 시클릭(cyclic)의 버전(versions)을 나타낸다.
- <313> 또, 헤테로시클로알킬에 있어서, 하나의 헤테로원자는 그 헤테로시클이 그 분자의 잔부에 결합되어 있는 위치를 점유할 수 있다.
- <314> 시클로알킬의 예에는 시클로펜틸, 시클로헥실, 1-시클로헥세닐, 3-시클로헥세닐, 시클로헵틸 등을 포함하나 한정된 것은 아니다. 헤테로시클로알킬의 예에는 1-(1,2,5,6-테트라히드로피리딜), 1-피페리디닐, 2-피페리디닐, 3-피페리디닐, 4-모르폴리닐, 3-모르폴리닐, 테트라히드로푸란-2-일, 테트라히드로푸란-3-일, 테트라히드로티엔-2-일, 테트라히드로티엔-3-일, 1-피페라지닐, 2-피페라지닐 등을 포함하나 한정된 것은 아니다.
- <315> 용어 "할로" 또는 "할로젠"은 이들 자체에 따라 또는 또 다른 치환체의 일부로, 특별한 설명이 없는 경우 플루오린, 클로린, 브로민 또는 요오드원자를 의미한다.
- <316> 또, "할로알킬" 등의 용어는 모노할로알킬 및 폴리할로알킬을 포함하는 것을 의미한다. 예로서, 용어 "할로(C_1-C_4)알킬"은 트리플루오로메틸, 2,2,2-트리플루오로에틸, 4-클로로부틸, 3-브로모프로필 등을 포함하는 것을 의미하나 한정되어 있는 것은 아니다.
- <317> 용어 "아릴"(aryl)은 특별한 설명이 없는 경우, 하나의 폴리불포화 방향족치환기를 의미하며, 그 치환기는 하나의 단일링 또는 다중링(multiple ring)(바람직하게는 1~3개의 링)으로, 함께 축합되거나 또는 공유결합된다.
- <318> 용어 "헤테로아릴"은 N, O 및 S에서 선택하는 1~4개의 헤테로원자를 포함하는 아릴기(또는 링)을 말하며, 여기서, 질소와 황원자는 선택적으로 산화되며, 질소원자는 선택적으로 4차원화 한다.
- <319> 헤테로아릴기는 헤테로원자에 의해 그 분자의 잔부에 결합할 수 있다.
- <320> 아릴 및 헤테로아릴기의 비한정예에는 페닐, 1-나프틸, 2-나프틸, 4-비페닐, 1-피롤릴, 2-피롤릴, 3-피롤릴, 3-피라졸릴, 2-이미다졸릴, 4-이미다졸릴, 피라지닐, 2-옥사졸릴, 4-옥사졸릴, 2-페닐-4-옥사졸릴, 5-옥사졸릴, 3-이소옥사졸릴, 4-이소옥사졸릴, 5-이소옥소졸릴, 2-티아졸릴, 4-티아졸릴, 5-티아졸릴, 2-푸릴, 3-푸릴, 2-티에닐, 3-티에닐, 2-피리디닐, 3-피리디닐, 4-피리디닐, 2-피리미디닐, 4-피리미디닐, 5-벤조티아졸릴, 푸리닐, 2-벤즈이미다졸릴, 5-인돌릴, 1-이소퀴놀릴, 5-이소퀴놀릴, 2-퀴녹살리닐, 5-퀴녹살닐, 3-퀴놀릴, 테트라졸릴, 벤조[b]푸라닐, 벤조[b]티에닐, 2,3-디히드로벤조[1,4]디옥신-6-일, 벤조[1,3]디옥솔-5-일 및 6-퀴놀릴을 포함한다.
- <321> 상기 기재한 아릴 및 헤테로아릴링계 각각의 치환기들은 아래에서 설명한 허용할 수 있는 치환기의 그룹에서 선택한다.
- <322> 다른 용어(즉, 아릴옥시, 아릴티오옥시, 아릴알킬)와 조합하여 사용할 때 용어 "아릴"(aryl)에는 위에서 정의한 바와 같이 아릴 및 헤테로아릴링 모두를 포함한다.
- <323> 이와 같이, 용어 "아릴알킬"은 하나의 탄소원자(즉, 하나의 메틸렌기)가 예로서 하나의 산소원자(즉, 페녹시메틸, 2-피리디닐옥시메틸, 3-(1-나프틸옥시)프로필 등)에 의해 치환되는 알킬기를 포함하여 하나의 알킬기에 하나의 아릴기가 결합되는 래디컬(즉, 벤질, 펜에틸, 피리디메틸 등)을 포함하는 것을 의미한다.
- <324> 각각의 상기 용어(즉, "알킬", "헤테로알킬", "아릴" 및 "헤테로아릴")는 그 표시한 래디컬의 치환 및 비치환

형태 모두를 포함하는 것을 의미한다. 각각의 종류의 래디컬에 있어서 바람직한 치환기를 아래에서 설명한다.

- <325> 알킬 및 헤테로알킬래디컬에 대한 치환체(알킬렌, 알케닐, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐, 알키닐, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 시클로알케닐 및 헤테로시클로알케닐)는 일반적으로 "알킬기치환체"라고 말할 수 있고, 이들은 다음에 나타낸 기들로부터 선택한 여러 가지의 기들 중 하나 이상으로 할 수 있고, 이들 기의 예시는 한정된 것이 아니다.
- OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -할로젠, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR''C(O)R', -NR'-C(O)NR''R''', -NR''C(O)₂R', -NR-C(NR'R'')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR''', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN 및 -NO₂. 여기서, 0~(2m'+1)의 범위의 수를 가지며, m' 는 상기 래디컬에서 탄소원자의 총수이다.
- <326>
- <327> R', R'', R''' 및 R''''는 각각 독립하여 수소, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴(즉, 1~3개의 할로젠원자로 치환시킨 아릴), 치환 또는 비치환 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시기 또는 아릴알킬기이다.
- <328> 본 발명의 하나의 화합물이 하나 이상의 R기를 포함할 경우, 예로서 그 R기들의 각각은 각각의 R', R'', R''' 및 R''''와 같이 독립하여 선택한다(이들의 기들 중 하나 이상이 존재할 때).
- <329> R'과 R''가 동일한 질소원자에 결합할 경우, 이들은 그 질소원자와 결합하여 하나의 5-, 6- 또는 7-멤버링을 형성할 수 있다.
- <330> 예로서, 상기 치환체의 설명으로부터, 상기 용어"알킬"이 할로알킬(즉, -CF₃ 및 -CH₂CF₃) 및 아실(즉, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃ 등) 등 수소기 이외의 기에 결합된 탄소원자를 포함하는 기(groups)를 포함한다는 것을 의미함은 이 분야의 기술자에 의해 이해할 수 있다.
- <331> 알킬래디컬에 대하여 설명한 치환체와 동일하게, 아릴 및 헤테로아릴기의 치환체는 "아릴기치환체"이다.
- <332> 그 치환체는 예로서 다음에 열거한 기에서 선택한다:
- <333> 할로젠, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -NR''C(O)R', -NR'-C(O)NR''R''', -NR''C(O)R', -NR-C(NR'R'')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR''', -S(O)R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN 및 -NO₂, -R', -N₃, -CH(ph)₂, 플루오로(C₁-C₄)알콕시, 및 플루오로 (C₁-C₄)알킬.
- <334> 여기서, 방향족링계 상에서 0~개방가의 총수까지의 범위내에 있는 수임.
- <335> R', R'', R''' 및 R''''는 수소, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴 및 치환 또는 비치환 헤테로아릴에서 독립하여 선택하는 것이 바람직하다.
- <336> 본 발명의 하나의 화합물이 1개 이상의 R기를 포함할 경우, 예로서 그 R기 각각은 이들 기 중 1개 이상이 존재할 때 각각의 R', R'', R''' 및 R''''와 같이 독립하여 선택한다. 다음의 제조공정(schemes)에서 부호 X는 위에서와 같이 "R"을 나타낸다.
- <337> 그 아릴 또는 헤테로아릴링의 인접원자 상에 치환기 중 2개는 식 -T-C(O)-(CRR')_u-U-중 하나의 치환기로 선택치환시킬 수 있다. 여기서, T와 U는 독립하여 -NR-, -O-, -CRR'- 또는 하나의 단일결합이고, U는 0~3의 정수이다.
- <338> 또, 그 아릴 또는 헤테로아릴링의 인접원자 상에서 치환기 중 2개는 식 -A-(CH₂)_r-B-의 하나의 치환기로 선택치환시킬 수 있다. 여기서, A와 B는 독립하여 -CRR'-, -O-, -NR-, -S-, -S(O)-, S(O)₂-, -S(O)₂NR'- 또는 하나의 단일결합이고, r은 1~4의 정수이다.
- <339> 이와 같이 형성된 새로운 링의 단일결합 중 하나는 하나의 2중 결합으로 선택치환시킬 수 있다.
- <340> 또, 그 아릴 또는 헤테로아릴링의 인접원자 상에서 치환기 중 2개가 식 -(CRR')_z-X-(CR''R''')_d-의 하나의 치환기로 선택치환시킬 수 있다. 여기서, z와 d는 독립하여 0~3의 정수이고, X는 -O-, -NR'-, -S-, -S(O), -S(O)₂-, 또는 -S(O)₂NR'-이다.
- <341> 치환기 R, R', R'' 및 R''''는 독립하여 수소 또는 치환 또는 비치환(C₁-C₆)알킬에서 선택하는 것이 바람직하다.

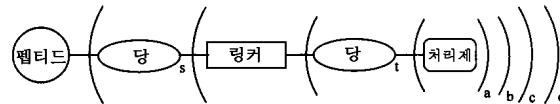
- <342> 여기서 사용되는 용어 "헤테로원자"는 산소(O), 질소(N), 황(S) 및 실리콘(Si)을 포함하는 것을 의미한다.
- <343> 여기서 사용된 인자(factor) VII펩티드는 인자(factor) VII 및 인자(factor) VIIa펩티드(peptides) 모두를 말한다.
- <344> 이들의 용어는 부가(addition), 결실(deletion), 치환 및 융합 단백질 돌연변이체(protein mutants)를 포함하는 이들 펩티드의 변이체(variants) 및 돌연변이체(mutants)를 일반적으로 말한다.
- <345> 인자 VII 및 인자 VIIa 모두가 사용될 경우 그 사용에서는 그 속(renus) "인자 VII 펩티드"의 2종(species)을 설명한 것이다.
- <346> 본 발명에서는 여기서 설명한 화합물에서 확인된 특정치환기에 따라 비교적 비독성인 산과염기로 제조하는 본 발명의 화합물의 염을 포함한다.
- <347> 본 발명의 화합물이 비교적 산성인 작용성을 포함할 경우, 염기부가염은 적합한 불활성 용매 중에서 또는 청정한 상태(neat)에서, 중성 형태의 본 발명 화합물을 충분한 양의 바람직한 염기와 접촉시켜 얻을 수 있다.
- <348> 염기부가염의 예에는 소듐, 포타슘, 리튬, 칼슘, 암모늄, 유기아미노 또는 마그네슘염, 또는 하나의 유사염을 포함한다.
- <349> 본 발명의 화합물이 비교적 염기성인 작용성을 포함할 경우, 산부가염은 적합한 불활성 용매 중에서 또는 청정한 상태에서 중성 형태의 본 발명 화합물을 충분한 양의 바람직한 산과 접촉시켜 얻을 수 있다.
- <350> 산부가염의 예에는 염산, 보름산, 질산, 카르본산, 모노히드로젠카르본산, 인산, 모노히드로젠인산, 디히드로젠인산, 황산, 모노히드로젠황산, 히드로요오드산 또는 아인산 등 무기산에서 유도된 염과, 아세트산, 프로피온산, 이소부티르산, 말레산, 말로산, 벤조산, 숙신산, 수베르산, 푸마르산, 락트산, 만델산, 프탈산, 벤젠술폰산, p-톨릴술폰산, 시트르산, 타르타르산, 메탄술폰산 등 비교적 비독성인 유기산에서 유도된 염을 포함한다.
- <351> 또, 아르기네이트 등 아미노산의 염과, 글루쿠론산 또는 갈락투노르산 등 유기산의 염을 포함한다[예로서, Berge 등, "Pharmaceutical Salts" Journal of Pharmaceutical Science 66:1-19(1977) 참조].
- <352> 본 발명의 어느 특정 화합물에는 이들의 화합물이 염기부가염 또는 산부가염 중에 포함하도록 하는 염기성과 산성의 작용성 모두를 포함한다.
- <353> 상기 중성형태의 화합물은 상기 염을 염기 또는 산과 접촉시켜, 모(parent) 화합물을 통상의 방법으로 분리하여 재생성하는 것이 바람직하다.
- <354> 그 모형태(parent form)의 화합물은 극성용매 중에서의 용해도 등 어느 물성에서의 여러 가지의 염 형태와 다르다.
- <355> 여기서 사용되는 "염반대이온"(salt counterion)은 구성성분 중 하나가 음전하를 가질 때(즉, COO⁻), 본 발명의 하나의 화합물과 회합하는 양전하 이온을 말한다.
- <356> 염 반대이온의 예에는 H⁺, H₃O⁺, 암모늄, 포타슘, 칼슘, 리튬, 마그네슘 및 소듐을 포함한다.
- <357> 여기서, 사용되는 용어"CMP-SA-PEG"는 하나의 폴리에틸렌글리콜 성분으로 이루어진 하나의 시알산에 콘주게이팅(conjugating)되어 있는 하나의 시티딘 모노포스페이트 분자이다.
- <358> 그 폴리에틸렌글리콜 사슬의 길이가 특정되어 있지 않을 경우, 어느 PEG사슬 길이라도 가능하다(즉, 1KDa, 2KDa, 5KDa, 10KDa, 20KDa, 30KDa, 40KDa). 하나의 예로서 CMP-SA-PEG는 스킴(scheme) 1에서 화합물 5이다.
- <359> I. 발명의 개요(Introduction)
- <360> 본 발명은 인자(Factor)VII의 재모델링(remodeling) 및 변형(modification)하는 하나의 방법을 포함한다.
- <361> 혈액응고 경로(blood coagulation pathway)는 여러 가지 사건(events)으로 이루어진 하나의 복합 반응이다.
- <362> 이 경로에서 하나의 중개사건(intermediate event)에는 조직인자(tissue factor)와 칼슘이온의 존재하에서 인자(Factor)X를 인자 Xa로 전환시켜(인자 VIIa로 활성화할 때) 혈액응고의 외인성 경로에 참가하는 하나의 프로엔자임(proenzyme)으로서 인자 VII이 있다.

- <363> 그 다음으로, 인자 Xa는 인자 Va, 칼슘이온 및 인지질(phospholipid)의 존재하에서 프로트롬빈(prothrombin)을 트롬빈(thrombin)으로 전환한다.
- <364> 인자 X의 인자 Xa로서의 활성화는 혈액응고의 내인성 및 외인성 경로 모두가 공유하는 하나의 사건이다.
- <365> 따라서, 인자 VIIa는 인자 VIII이 결핍되거나 억제되는 환자의 치료에 사용될 수 있다.
- <366> 또, 인자 VIIa가 내인성 경로에 참가할 수 있다는 것을 나타낸 확인자료도 있어, 혈액응고에 인자 VII/인자 VIIa의 역할에 대한 중요성이 현저하게 증대하였다.
- <367> 인자 VII은 불활성(inactive) 지모젠(zymogen)으로서 혈액 중에서 순환하는 하나의 단일 사슬의 당단백질이다.
- <368> 인자 VIIa의 대표적인 뉴클레오티드와 아미노 서열은 도 5에서 기재되어 있다.
- <369> 인자 VII의 인자 VIIa로의 활성화는 인자 XIIa 등 수종의 다른 플라즈마 프로테아제(plasma proteases)에 의해 촉진시킬 수 있다.
- <370> 인자 VII의 활성화는 인자 VII 펩티드 골격이 아스파라긴 152에서 절단(cleaved)될 경우 발생한다.
- <371> 그 활성화 생성물, 인자 VIIa는 최소 하나의 디설피드 결합에 의해 함께 가진 하나의 H사슬(heavy chain)과 하나의 L사슬(light chain)로 이루어진 하나의 당단백질(glycoprotein)이다.
- <372> 또, 인자 VIIa로 전환시킬 수 없는 변형 인자 VII 분자는 이미 설명한 바 있으며, 혈병(blood clots), 혈전증(thrombosis) 등의 경우 항응고 치료 구제(remedy)로 유용하다.
- <373> 그 혈액응고 경로에서 인자 VII의 중요성과, 혈액응고의 증감 레벨 치료로서의 그 사용에 대하여 설명한 바와 같이, 생물학적 반감기가 더 긴 하나의 분자가 포텐시(potency)를 증가시키며, 일반적으로 건강한 사람의 인체 내에서 합성 및 분비될 때 야생형 인자 VII와 더 유사한 치료 프로파일(profile)에 혈액응고 장애(질병)치료에 유효하고 유용하다.
- <374> 인자 VII가 치료 적용에 있어서 하나의 중요하고 유용한 화합물이나 재조합 세포에서 인자 VII를 생성하는 현행 방법에서는 하나의 생성물(product)을 얻었으나, 그 생성물은 생물학적 반감기가 오히려 짧고, 잠재적으로 면역원성(immunogenicity)을 유도하는 글리코실화 패턴이 비최적화(non-optimal)되었으며, 기능이 상실되었고, 동일한 효과를 얻기 위하여 용량(dose)을 더 자주 더 많이 사용할 필요성이 증대되는 등 여러 가지의 결점을 가진다.
- <375> 치료용으로 사용되는 재조합 인자 VII/인자 VIIa의 효과를 향상(개선)하기 위하여, 본 발명에는 하나의 변형기를 가진 글리코실화 및 언글리코실화(unglycosylated) 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 콘주게이트(conjugates)를 제공한다.
- <376> 그 변형기는 PEG(m-PEG), PPG(m-PPG) 등의 폴리머 변형기, 치료성분, 진단성분, 표적성분(targeting moieties) 등에서 선택할 수 있다.
- <377> 수용성 폴리머 변형기로 상기 인자 VII/인자 VIIa를 변형(modification)하여, 환자의 혈액순환 중에 재조합 인자 VII/인자 VIIa의 안정성과 보유시간을 향상(개선)시킬 수 있고, 또 재조합 인자 VII/인자 VIIa의 항원성(antigenicity)을 감소할 수 있다.
- <378> 본 발명의 펩티드 콘주게이트는 글리코실화 또는 언글리코실화 펩티드에 하나의 당을 효소에 의해 결합시켜 형성할 수 있다.
- <379> 하나의 글리코실화 분위(site) 및/또는 하나의 변형 글리코실기는 하나의 변형기를 가진 하나의 변형당을 글리코 콘주게이션(glyco conjugation)에 의해 콘주게이팅 하는 하나의 부위(locus)를 제공한다.
- <380> 또, 본 발명의 방법은 하나의 거의 균질성 있는 유도화 패턴을 가진 펩티드 콘주게이트와 글리코 펩티드 콘주게이트를 집합(assembling)할 수 있도록 한다.
- <381> 본 발명에서 사용되는 효소는 그 펩티드의 하나의 특정 아미노산잔기, 아미노산잔기의 조합, 특정 글리코실잔기, 또는 글리코실잔기의 조합에 대하여 일반적으로 선택적이다.
- <382> 또, 그 방법은 펩티드 콘주게이트의 대규모 생산에 실용적이다.
- <383> 이와 같이, 본 발명의 방법은 균일한 유도체화 패턴을 사전에 선택한 펩티드 콘주게이트를 대규모로 제조하는

실용적 수단을 제공한다.

- <384> 본 발명의 방법들은 세포배양 세포(즉, 포유동물세포, 곤충세포, 식물세포, 균세포, 효모세포 또는 원핵생물 세포) 또는 형질 전환식물 또는 동물 중에서 생산할 때 불충분하게 글리코실화 한 글리코 펩티드를 포함하나, 한정되지 않는 치료용 펩티드의 변형에 특히 적합하다.
- <385> 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트는 하나의 펩티드 콘주게이트와 하나의 의약적으로 허용할 수 있는 캐리어로 이루어진 의약제제로 제조할 수 있다.
- <386> 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트는 출혈사건이 있는 혈우병 환자, 혈우병 A환자, 혈우병 B환자, 인자 VII에 항체를 가진 혈우병 A환자, 인자 IX에 항체를 가진 혈우병 B환자, 간경변증 환자, 간이식 조직을 가진 간경변증 환자, 상부 위장관 출혈을 가진 간경변증 환자, 뼈 골수이식 환자, 간 절제 환자, 부분간 절제(partial hepatectomy) 환자, 골반-관절구 골절 재구성 실시중인 환자, 급성 뇌내출혈의 출혈 환자, 동종 줄기세포이식 환자, 외상성 뇌손상 출혈 환자, 응급시 출혈 환자, 외상(trauma) 출혈 환자, 바리실(variceal) 출혈 환자, 선택적 수술 출혈 환자, 심장수술 환자, 척수수술 출혈 환자, 간절제(liver resection) 환자의 군(group)에서 선택한 한명의 환자에 투여할 수 있다.
- <387> 하나의 예에서 그 환자는 사람이다.
- <388> 본 발명은 또 면역 또는 망상 내피계(reticuloendothelial system)(RES)에 의해 예로서 흡수율 감소 또는 클리어런스율(clearance rate) 감소 때문에 치료 반감기를 증가시킨 글리코실화 및 언글리코실화 펩티드의 콘주게이트를 제공한다.
- <389> 더욱이, 본 발명의 방법에는 펩티드 상에서 항원성 결정 인자를 차폐(masking)하여 그 펩티드에 대한 숙주 면역 응답을 감소 또는 제거하는 수단을 제공한다.
- <390> 또, 표적제의 선택적 결합을 사용하여 특정 표적제에 특이성이 있는 특정조직 또는 세포 수용체에 펩티드를 표적으로 정한다.
- <391> 수용성 폴리머를 가진 인자 VII/인자 VIIa 콘주게이트의 제조에 대한 최적 조건 결정에는 여러 가지의 파라미터의 최적화가 포함한다.
- <392> 이들의 파라미터는 그 펩티드와 수용성 폴리머의 동정(identity)에 따라 좌우한다.
- <393> 예로서, 그 폴리머가 폴리(에틸렌 글리콜), 즉 하나의 분기 폴리(에틸렌 글리콜)인 경우, 반응에 사용되는 폴리머의 양과, 그 폴리머의 존재에 의한 반응 혼합액의 점도 사이에는 밸런스(balance)를 설정하는 것이 바람직하다. 그 폴리머가 너무 높게 농축될 경우 그 반응 혼합액은 점조성이 있어 반응 및 물질 전달속도를 느리게 한다.
- <394> 더 나아가서, 과잉의 효소 첨가를 고려할 수 있으나, 효소가 너무 많이 존재할 경우 과잉의 효소는 하나의 오염 물질이 되어, 그 제거에는 별도의 정제공정을 필요로 하여 최종 제품의 코스트를 불필요하게 증가시킨다.
- <395> 또, 일반적으로 변형(modification)을 조정하여 펩티드를 생성하는 것이 바람직하다.
- <396> 어느 예에서는 하나의 변형당을 우선적으로 첨가하는 것이 바람직하다.
- <397> 또 다른 예에서는 2종의 변형당을 우선적으로 첨가하는 것이 바람직하다. 따라서, 그 반응조건은 펩티드에 변형기의 콘주게이션을 하는 정도에 영향을 주도록 조정하는 것이 바람직하다.
- <398> 본 발명은 바람직한 레벨의 콘주게이션을 가진 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 수율을 극대화하는 조건을 제공한다.
- <399> 또, 본 발명의 예에서의 조건들은 그 생성물을 정제하는데 필요한 시간과 재료, 여러 가지의 시약의 코스트를 고려할 필요가 있다.
- <400> 여기서 설명한 반응조건을 최적화하여 고가시약의 소비를 최소화하면서 바람직한 생성물의 우수한 수율을 제공한다.
- <401> II. 물질(matter)/펩티드 콘주게이트(peptide conjugates)의 조성물
- <402> 제 1국면(aspect)에서, 본 발명은 하나의 변형당과 하나의 인자 VII/인자 VII a 펩티드 사이에 하나의 콘주게이트를 제공한다.

- <403> 또, 본 발명은 하나의 변형기와 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 사이에 하나의 콘주게이트를 제공한다.
- <404> 하나의 펩티드 콘주게이트는 수종 형태 중 하나를 가질 수 있다.
- <405> 하나의 예에서, 하나의 펩티드 콘주게이트는 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드와 하나의 글리코실 결합기에 의해 그 펩티드의 아미노산에 결합된 하나의 변형기로 구성할 수 있다.
- <406> 또 다른 예에서, 하나의 펩티드 콘주게이트는 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드와, 하나의 글리코실 결합기에 의해 그 펩티드의 글리코실잔기에 결합된 하나의 변형기로 구성할 수 있다.
- <407> 또 하나의 다른 예에서, 그 펩티드 콘주게이트는 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드와, 하나의 글리코 펩티드 카르보히드레이트와 그 펩티드 골격의 아미노산 잔기에 모두 직접 결합되어 있는 하나의 글리코실 결합기로 구성할 수 있다.
- <408> 또 하나의 예에서, 하나의 펩티드 콘주게이트는 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드와, 그 펩티드의 아미노산잔기에 직접 결합되어 있는 하나의 변형기로 구성할 수 있다.
- <409> 이 예에서, 펩티드 콘주게이트는 하나의 글리코실기로 구성할 수 없다. 이들 예 중 어느 예에서도, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드는 글리코실화 할 수 없다.
- <410> 본 발명의 콘주게이트는 일반적으로 아래에 나타낸 일반 구조에 대응한다:



- <411>
- <412> 위 구조에서,
- <413> 부호 a, b, c, d 및 s는 영(zero)이 아닌 양(+)의 정수이고,
- <414> 부호 t는 0 또는 양(+)의 정수이다.
- <415> "처리제"(agent) 또는 변형기는 하나의 치료제, 하나의 바이오 활성제(bioactive agent), 하나의 검출할 수 있는 라벨, 하나의 폴리머 변형기[수용성 폴리머(즉, PEG, m-PEG, PPG 및 m-PPG) 등] 등으로 할 수 있다.
- <416> 그 "처리제" 또는 변형기는 하나의 펩티드, 즉 효소, 항체, 항원 등으로 할 수 있다.
- <417> 그 링커(linker)는 범위가 넓은 링커 그룹(linker groups) 중 어느 하나로 할 수 있다(상기 참고문헌 참조).
- <418> 또, 그 링커는 하나의 단일 결합 또는 하나의 "제로 오더 링커"(zero order linker)로 할 수 있다.
- <419> II. A. 펩티드(peptide)
- <420> 인자 VII는 길이가 약 406의 아미노산이고, 분자량이 약 50KDa인 하나의 단 사슬 폴리펩티드(single-chain polypeptide)이다.
- <421> 인자 VII 펩티드 골격이 아스파라긴 152에서 절단(cleaving)될 때 인자 VIIa로 인자 VII의 전환이 발생한다. 인자 VII 및/또는 인자 VIIa 펩티드에는 2개의 N-글리칸 부위(sites)를 포함한다. 하나의 부위는 아스파라긴 145에서 위치가 설정되고, 다른 하나는 아스파라긴 322에서 위치가 설정된다.
- <422> 아스파라긴 145에서의 N-글리칸 부위는 인자 VIIa의 L사슬(light chain) 상에 위치되고, 아스파라긴 322에서의 N-글리칸 부위는 인자 VIIa의 H사슬(heavy chain) 상에 위치된다.
- <423> 인자 VII 및/또는 인자 VIIa 펩티드에는 2개의 O-글리칸 부위를 포함한다.
- <424> 인자 VII 또는 인자 VIIa는 클로닝(cloning) 하고, 시퀀싱(sequencing)(서열결정)을 한다.
- <425> 하나의 예에서, 그 인자 VIIa 펩티드는 SEQ ID NO: 1의 서열을 가진다.
- <426> 본 발명은 여기서 설명한 인자 VII 핵산 및 아미노산 서열로 한정하는 것은 아니다.
- <427> 변이시켜 특성을 증감하거나 펩티드의 구조 특성을 변형하는 다른 서열의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 사용은 본 발명의 범위내에 속한다.

- <428> 예로서, 본 발명에서 유용한 변이체 인자 VII/인자 VIIa 펩티드에는 다른 위치에서 부가 O-글리코실화 부위 또는 상기 부위를 제공하는 펩티드를 포함한다.
- <429> 더욱이, 하나 이상의 N-글리코실화 부위를 포함하는 변이체 펩티드는 본 발명에서 유용하다.
- <430> 인자 VII의 변이체(variants)는 예로서 특허문헌 USP 4,784,950 및 USP 5,580,560 명세서에서 기재되어 있으며, 여기서 라이신-38, 라이신-32, 아르기닌-290, 아르기닌-341, 이소류신-42, 타이로신-278 및 타이로신-322가 다수의 아미노산에 의해 치환되어 있다.
- <431> 또, 특허문헌 USP 5,861,374; USP 6,039,944; USP 5,833,982; USP 5,788,965; USP 6,183,743; USP 5,997,864 및 USP 5,817,788 명세서에서는 인자 VIIa를 형성하기 위하여 절단(cleaving)되지 않은 인자 VII 변이체에 대하여 기재되어 있다.
- <432> 그 혈액응고 경로와 여기서의 인자 VII의 역할은 공지되어 있다는 것을 이 기술분야의 기술자들은 이해할 수 있다. 따라서, 위에서 설명한 바와 같이 다수의 변이체로서 천연 변이체와 처리 변이체 모두가 본 발명에 포함된다.
- <433> 하나의 예에서, 인자 VII/인자 VIIa 활성을 가진 하나의 펩티드는 여기서 설명한 아미노산 서열에 대하여 최소 약 95%가 상동성인 하나의 아미노산 서열을 가진다.
- <434> 그 아미노산 서열은 여기서 설명한 아미노산 서열에 대하여 최소 약 96%, 97% 및 98% 또는 99%가 상동성인 것이 바람직하다.
- <435> 하나의 예에서, 그 글리코실 결합기 결합되어 있는 아미노산 잔기는 세린, 트레오닌 및 아스파라긴에서 선택한 하나의 멤버이다.
- <436> 또 다른 예에서, 그 펩티드는 SEQ. ID. NO 2의 서열을 가진다.
- <437> 또 다른 예에서, 그 아미노산 잔기는 Asn 145, Asn 322 및 그 조합에서 선택한 하나의 멤버이다.
- <438> 또 다른 예에서, 그 펩티드는 하나의 바이오 활성(bioactive) 인자 VII/인자 VIIa 펩티드이다.
- <439> 또 하나의 예에서, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트 상에서 그 변형당 및/또는 PEG 성분은 L사슬(light chain) 상에 위치한다.
- <440> 또 다른 예에서, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트 상에서 그 변형당 및/또는 PEG 성분은 H사슬(heavy chain) 상에 주로 위치한다.
- <441> 또 다른 예에서, 인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 하나의 개체군에서 그 L 사슬에는 하나의 변형당 및/또는 PEG 성분을 주로 포함한다.
- <442> 또 다른 예에서, 인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 하나의 개체군에서 그 H사슬(heavy chain)에는 하나의 변형당 및/또는 PEG 성분을 주로 포함한다.
- <443> 또 다른 예에서, 그 개체군(population)에서 L사슬의 기능화(functionalization) 비는 약 33:66이다.
- <444> 또 다른 예에서, 그 개체군에서 L사슬:H사슬의 기능화 비는 약 35:65이다.
- <445> 또 다른 예에서, 그 개체군에서 L사슬:H사슬의 기능화 비는 약 40:60이다.
- <446> 또 다른 예에서, 그 개체군에서 L사슬:H사슬의 기능화 비는 약 45:55이다.
- <447> 또 다른 예에서, 그 기능화 비는 약 50:50이다.
- <448> 또 다른 예에서, 그 기능화 비는 약 55:45이다.
- <449> 또 다른 예에서, 그 기능화 비는 약 60:40이다.
- <450> 또 다른 예에서, 그 기능화 비는 약 65:35이다.
- <451> 또 다른 예에서, 그 기능화 비는 약 66:33이다.
- <452> 또 다른 예에서, 그 기능화 비는 약 70:30이다.
- <453> 또 다른 예에서, 그 기능화 비는 약 75:25이다.

<454> 또 다른 예에서, 그 기능화 비는 약 80:20이다.

<455> 또 다른 예에서, 그 기능화 비는 약 85:15이다.

<456> 또 다른 예에서, 그 기능화 비는 약 90:10이다.

<457> 또 다른 예에서, 그 개체군에서 L사슬:H사슬의 기능화 비는 약 90:10 이상이다.

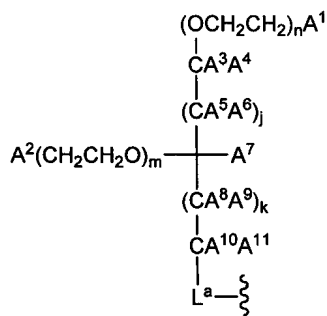
<458> 인자 VII/VIIa의 활성 측정방법과, 발현방법은 이 기술분야에서 공지되었으며, 예로서 특허문헌 USP 4,784,950 명세서에 기재되어 있다.

<459> 간단히 말하면, 인자 VII 또는 그 변이체의 발현은 바쿨로바이러스(baculovirus) 발현 시스템을 사용하는 예.콜리(E. coli), CHO 세포, BHK 세포, 곤충세포를 포함하여 원핵 시스템과 진핵 시스템 모두에서 얻을 수 있으며, 모두 이 기술분야에서 공지되었다.

<460> 본 발명의 방법에 의해 제조된 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 활성에 대한 아세이(assay)는 이 분야에서 공지된 방법을 사용하여 얻을 수 있다.

<461> 하나의 비한정 예로서, 참고문헌[Quick 등, Hemorrhagic Disease and Thrombosis, 2nd ed. Leat Febiger, Philadelphia, 1996]에서는 본 발명의 방법에 의해 제조된 하나의 인자 VII 분자의 생물학적 활성 측정에 유용한 일단 응고 아세이(one-stage clotting assay)에 대하여 기재되었다.

<462> 본 발명에서 사용되는 펩티드는 그 다음 변형기가 아래에 나타난 구조식인 경우 인자 VII/인자 VIIa를 포함하나, 한정된 것은 아니다:



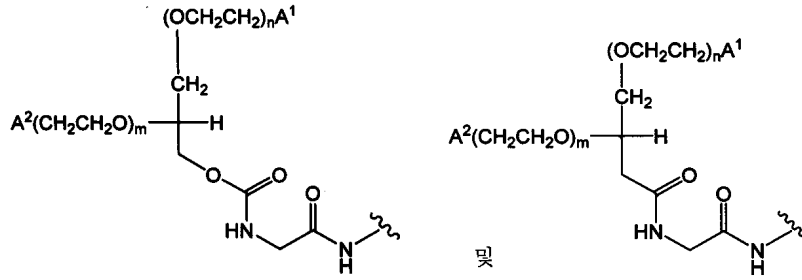
<463>

<464> 이들의 경우, 그 펩티드 콘주게이트에서 펩티드는 도 13의 펩티드에서 선택한 하나의 멤버이다.

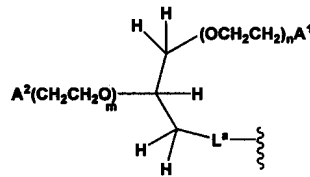
<465> 이들의 경우, 그 펩티드 콘주게이트에서 그 펩티드는 인자 VII, 인자 VIIa, 인자 VIII, 인자 IX, 인자 X, 인자 XI, 하나의 펩티드(a peptide)에서 선택한 하나의 멤버이다.

<466> 여기서, 그 하나의 펩티드는 에리트로포이에틴(erythropoietin), 그라눌로사이트 콜로니(granulocyte colony) 자극 인자(G-CSF), 그라눌로사이트-마크로파아지 콜로니 자극 인자(GM-CSF), 인터페론 알파, 인터페론 베타, 인터페론 감마, α_1 -엔티트립신(ATT, 또는 α_1 -프로테아제 억제제), 글루코세레브로시다아제, 티슈(tissue)-타입 플라스미노겐 액티베이터(TPA), 인터류킨-2(IL-2), 우로키나아제, 사람 DN 효소, 인슐린, 간염(Hepatitis) B 표면 단백질(HbsAg), 사람 성장 호르몬, TNF 리셉터-IgG Fc 부위 융합 단백질(Enbrel: 상품명), 엔티-HER2 모노클로날항체(Herceptin: 상품명), 레스피레이토리 신시티얼 바이러스(Respiratory Syncytial Virus)(Synagis: 상품명)의 단백질 F에 대한 모노클로날 항체, TNF- α (Remicade: 상품명)에 대한 모노클로날 항체, 글리코 프로테인 IIb/IIIa(상품명: Reopro)에 대한 모노클로날 항체, CD20(Rituxan: 상품명)에 대한 모노클로날 항체, 엔티-트롬빈III(AT III), 사람 코리온 고나도트로핀(human Chorionic Gonadotropin)(hCG), 알파-갈락토시다아제(Fabrazyme: 상품명), 알파-이두로니다아제(iduronidase) (Aldurazyme: 상품명), 여포자극 호르몬(follicle stimulating hormone), 베타-글루코시다아제, 엔티-TNF-알파 모노클로날 항체(MLB 5075), 글루카곤(gluagon)형상 펩티드-1(GLP-1), 베타-글루코시다아제(MLB 5064), 알파-갈락토시다아제 A(MLB 5082) 및 섬유 아세포 증식 인자(fibroblast growth factor)에서 선택한 하나의 멤버이다.

하나의 예에서, 그 폴리머 변형기는 아래에 나타낸 구조식에 의한 하나의 구조를 가진다.

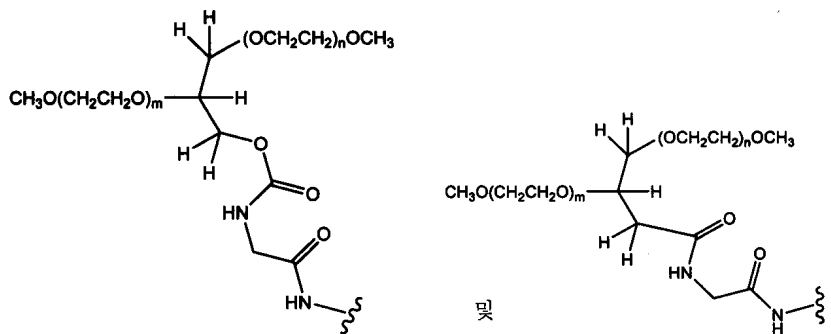


본 발명에서 사용된 펩티드는 그 변형기가 다음에 나타낸 구조식인 경우 인자 VII 또는 인자 VIIa를 포함하나, 한정되는 것은 아니다.



하나의 예로서, 상기 구조식에서 A¹ 및 A²는 각각 -OH와 -OCH₃에서 선택한 멤버이다.

이 예에 의한 폴리머 변형기의 예는 다음 구조식을 포함한다.



그 변형기가 위에서 나타낸 것 등 하나의 분기 수용성 폴리머인 하나의 예에서, 시알리다아제의 농도가 반응 혼합 중에서 약 1.5 ~ 약 2.5 U/L인 것이 일반적으로 바람직하다.

시알리다아제의 양은 약 2U/L인 것이 더 바람직하다.

또 다른 예에서, 펩티드 기체 약 5 ~ 약 9gr을 위에서 설명한 시알리다아제의 양과 접촉한다.

그 변형당은 그 반응 혼합액 중에서 약 1gr ~ 약 6gr, 바람직하게는 약 3gr ~ 약 4gr이 존재한다.

하나의 분기 수용성 폴리머 변형기, 즉 위에서 나타낸 성분을 가진 하나의 변형당의 농도를 약 0.5mM 미만에서 유지하는 것이 일반적으로 바람직하다.

하나의 바람직한 예에서, 그 변형기는 분자량 약 20KDa ~ 약 60KDa, 더 바람직하게는 약 30KDa ~ 약 50KDa, 좀 더 바람직하게는 약 40KDa를 가진 분기 폴리(에틸렌 글리콜)이다.

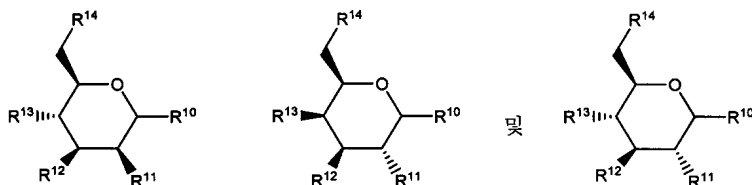
분자량 약 40KDa를 가진 하나의 예의 변형기는 약 35KDa ~ 약 45KDa의 분자량을 가진 변형기이다.

위에서 설명한 변형기를 사용하는 하나의 바람직한 예에서, 그 글리코실전이효소의 농도에 있어서는 글리코실전이효소와 펩티드의 비가 전이효소 약 40μg/mL 대 펩티드 약 200 μM이다.

II. B. 변형당(modified sugar)

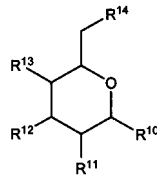
하나의 예에서, 본 발명의 펩티드는 하나의 변형당과 반응함으로써 하나의 펩티드 콘주게이트를 형성한다.

- <484> 하나의 변형당은 하나의 "당 도너성분"(sugar donor moiety)과 하나의 "당 트랜스퍼성분"(sugar transfer moiety)으로 이루어진다.
- <485> 그 당 도너성분은 본 발명의 하나의 콘주게이트로서, 하나의 글리코실성분 또는 아미노성분에 의해 그 펩티드에 결합되어 있는 변형당의 어느 부분이다.
- <486> 그 당 도너성분에는 그 펩티드 콘주게이트의 변형당에서 글리코실 결합기로 전환(conversion)할 때 화학적으로 변화하는 원자들(atoms)을 포함한다.
- <487> 상기 당 트랜스퍼(transfer)성분은 본 발명의 하나의 콘주게이트로서 그 펩티드에 결합되지 않은 변형당의 어느 부분이다.
- <488> 예로서, 본 발명의 하나의 변형당은 페질화당 뉴클레오타이드(PEGylated sugar nucleotide), PEG-시알산 CMP이다.
- <489> PEG-시알산 CMP에 있어서, 그 당 도너성분 또는 PEG-시알릴 도너성분은 PEG-시알산으로 이루어진 것이며, 반면에 당 트랜스퍼성분 또는 시알릴 트랜스퍼성분은 CMP로 이루어진 것이다.
- <490> 본 발명에서 유용한 변형당에서, 그 사카릴성분은 하나의 사카리드, 하나의 데옥시-사카리드, 하나의 아미노-사카리드 또는 하나의 N-아실 사카리드가 바람직하다.
- <491> 그 용어 "사카리드"(saccharide) 및 그 등가 화합물, "사카릴", "당"(sugar) 및 "글리코실"은 모노머, 디머(dimers), 올리고머 및 폴리머이다.
- <492> 또, 그 당 성분은 하나의 변형기로 기능화한다.
- <493> 그 변형기는 사카릴성분에 일반적으로 그 당(sugar) 상에서 하나의 아민, 술폰히드릴 또는 히드록실, 즉 1급 히드록실성분과의 콘주게이션(conjugation)을 통해, 콘주게이팅(conjugating)된다.
- <494> 하나의 예에서, 그 변형기는 그 당(sugar) 상에서 하나의 아민성분을 통해, 즉 그 변형기의 하나의 반응성 유도체와 그 아민의 반응으로 형성되는 하나의 아마이드, 하나의 우레탄 또는 하나의 우레아를 통해 결합된다.
- <495> 어느 사카릴 성분이라도 그 변형당의 당 도너성분으로 사용할 수 있다.
- <496> 그 사카릴 성분은 만노오스, 갈락토오스 또는 글루코오스 또는 하나의 공지된 당의 입체 화학적 특성을 가진 종(species) 등 하나의 공지된 당(known sugar)으로 할 수 있다.
- <497> 이들의 변형당의 일반 구조식은 다음의 구조식에서 나타낸다:



- <498>
- <499> 본 발명의 조성물의 형성에 유용한 다른 사카릴 성분에는 푸코오스 및 시알산과, 글루코사민, 갈락토사민, 만노사민, 시알산의 5-아민 아날로그 등의 아미노당을 포함하나, 한정된 것은 아니다.
- <500> 그 사카릴 성분은 자연에서 발견되는 하나의 구조체로 할 수 있고, 또 변형시켜 변형기를 콘주게이팅하는 하나의 부위(site)를 제공할 수 있다.
- <501> 예로서, 그 변형당은 9-히드록시 성분을 하나의 아민으로 치환하는 하나의 시알산 유도체를 제공한다.
- <502> 그 아민은 하나의 선택된 변형기의 활성화 아날로그로 용이하게 유도시킨다.
- <503> 본 발명에서 유용한 변형당의 예는 여기서 참고로 인용하는 특허문헌 PCT 특허출원 PCT/US05/002522의 명세서에 기재되어 있다.
- <504> 또 하나의 예에서, 본 발명은 위에서 설명한 바와 같이 하나의 링커-변형기 카세트(cassette)를 가진 그 대응하는 아민성분으로 그 6-히드록실 위치를 전환시키는 변형당을 사용한다.
- <505> 이들의 변형당의 코어(core)로서 사용할 수 있는 대표적인 글리코실기에는 Gal, GalNAc, Glc, GlcNAc, Fuc, Xyl, Man 등을 포함한다.

<506> 이 예에 의한 하나의 대표적인 변형당은 아래에 나타낸 구조식을 가진다.:



<507>

<508> 위 구조식에서,

<509> $R^{11}-R^{14}$ 는 H, OH, $C(O)CH_3$, NH 및 $NHC(O)CH_3$ 에서 독립하여 선택한 멤버이며,

<510> R^{10} 은 또 다른 글리코실 잔기(-O-글리코실) 또는 인자 VII/인자 VIIa 펩티드(-NH-(인자 VII/인자 VIIa)의 하나의 아미노산에의 하나의 결합이고,

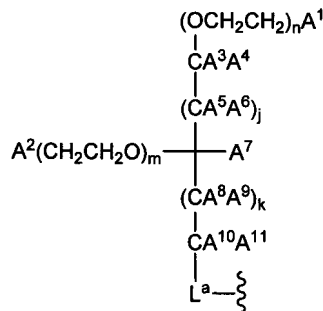
<511> R^{14} 는 OR^1 , NHR^1 또는 $NH-L-R^1$ 이다.

<512> R^1 및 $NH-L-R^1$ 은 위에서 설명한 것과 같다.

<513> II. C. 글리코실 결합기(glycosyl linking groups)

<514> 하나의 예에서, 본 발명은 본 발명의 하나의 변형당과 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 사이에 합성된 하나의 펩티드 콘주게이트를 제공한다.

<515> 또 다른 예에서, 그 변형당에서의 변형기가 다음에 나타낸 구조식을 가질 경우,

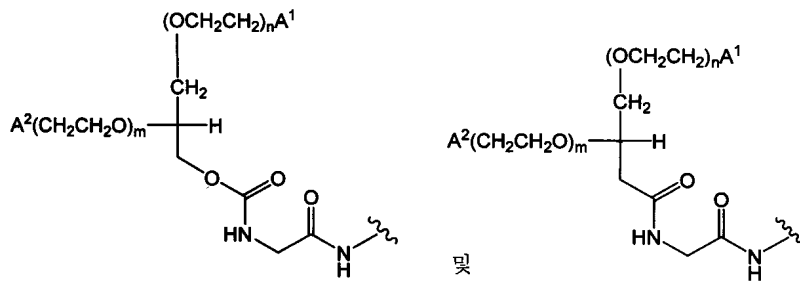


<516>

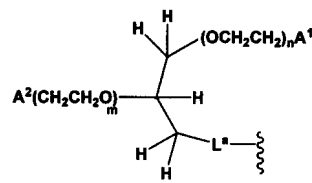
<517> 그 펩티드 콘주게이트에서의 펩티드는 도 13의 펩티드에서 선택한 하나의 멤버이다.

<518> 또 다른 하나의 예에서, 그 펩티드 콘주게이트에서의 펩티드가 인자(Factor)VII, 인자(Factor)VIIa, 인자 VIII, 인자 IX, 인자 X, 인자 XI, 에리트로포이에틴(erythropoietin), 그라눌로사이트 콜로니 자극 인자(granulocyte colony stimulating factor)(G-CSF), 그라눌로사이트-마크로파아지(Granulocyte-Macrophage) 자극인자(Stimulating Factor)(GM-CSF), 글루코세레브로시다아제(glucocerebrosidase), 조직-타입 플라스미노겐 액티베이터(Tissue-Type Plasminogen Activator)(TPA), 인터류킨(Interleukin)-2(IL-2), 우로키나아제(urokinase), 사람 DN효소(human DNase), 인슐린, 간염 B 표면 단백질(Hepatitis B surface protein)(HbsAg), 사람 성장호르몬, TNF 리셉터(Receptor)-IgGfc 부위 융합 단백질(fusion protein)(상품명: Enbrel), 앤티(anti)-HER2 모노클로날항체(monoclonal antibody)(Hercepting 상품명), 레스피레이토리 신시티얼 바이러스(Respiratory Syncytial Virus)(상품명: Synagis)의 단백질 F에 대한 모노클로날항체, TNF- α (상품명: Remicade)에 대한 모노클로날항체, 글리코프로테인(glycoprotein)IIb/IIIa(상품명: Reopro)에 대한 모노클로날항체, CD20(Rituxan: 상품명)에 대한 모노클로날항체, 앤티-트롬빈(anti-thrombin)III(AT III), 사람 코리온고나도트로핀(human Chorionic Gonadotropin)(hCG), 알파-갈락토시다아제(Fabrazyme: 상품명), 알파-이두로니다아제(iduronidase)(Aldurazyme: 상품명), 여포 자극 호르몬(follicle stimulating hormone), 베타-글루코시다아제, 앤티-TNF-알파 모노클로날항체(HLB 5075), 글루카곤(glucagon)형상 펩티드-1-(GLP-1), 베타-글루코시다아제(MLB 5064), 알파-갈락토시다아제 A(MLB 5082) 및 섬유 아세포 증식 인자(fibroblast growth factor)에서 선택한 하나의 멤버이다.

<519> 이 예에서, 그 변형당의 당 도너성분(사카릴 성분 및 변형기 등)은 하나의 "글리코실 결합기"이다.
 <520> 그 "글리코실 결합기"는 그 펩티드와 그 변형기 사이에 설정되어 있는 글리코실 성분으로 할 수 있다.
 <521> 하나의 예에서, 그 폴리머 변형기는 다음에 나타낸 구조식에 의한 하나의 구조를 가진다:

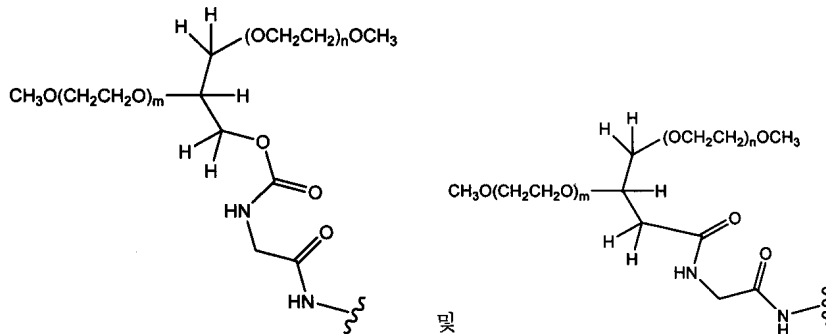


<522>
 <523> 하나의 예에서, 그 변형당 상의 변형기는 아래에 나타낸 구조를 가진다:



<524>
 <525> 하나의 예에서, A¹ 및 A²는 각각 -OH 및 -OCH₃에서 선택한 멤버이다.

<526> 이 예에 의한 폴리머 변형기는 아래에 나타낸 구조들을 포함한다:



<527>
 <528> 하나의 펩티드 상에서 글리코실을 부가 및/또는 변형하는데 유용한 방법의 적용이 광범위하기 때문에 그 글리코실 결합기는 실질상 어느 구조라도 가질 수 있다.

<529> 다음에 이어지는 설명에서, 본 발명은 푸라노오스 및 피라노오스의 선택된 유도체의 사용에 대하여 참고로 설명한다.

<530> 그 설명의 요지를 명백하게 하여, 설명한 구조와 조성물이 글리코실 결합기와 변형당의 종류에 따라 일반적으로 적용할 수 있다는 것을 이 분야의 기술자들은 이해할 수 있다.

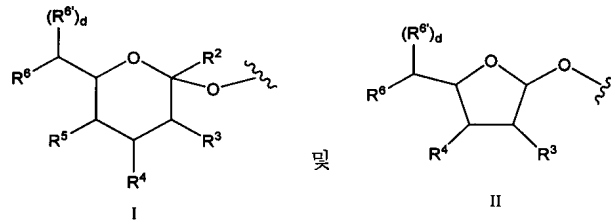
<531> 그 글리코실 결합기는 실질상 어느 모노-또는 올리고-사카리드라도 구성할 수 있다.

<532> 그 글리코실 결합기는 그 측쇄 또는 그 펩티드 골격을 통해 하나의 아미노산에 결합할 수 있다.

<533> 또, 그 글리코실 결합기는 하나의 사카릴 성분을 통하여 그 펩티드에 결합할 수 있다.

<534> 이 사카릴 성분은 그 펩티드 상에서 O-결합 또는 N-결합 글리칸 구조의 일부분으로 할 수 있다.

<535> 하나의 예에서, 본 발명은 다음에 나타낸 구조식(I 및 II)에서 선택한 하나의 구조식을 가진 하나의 무손상(intact) 글리코실 결합기로 이루어진 하나의 펩티드 콘주게이트를 제공한다.



<536>

<537> 위 구조식 I 에서, R^2 는 H, CH_2OR^7 , $COOR^7$ 또는 OR^7 이고, 여기서 R^7 은 H, 치환 또는 비치환 알킬 또는 치환 또는 비치환 헤테로알킬이다.

<538> $COOR^7$ 이 하나의 카르복실산 또는 카르복실레이트인 경우 두 가지 형태가 단일 구조 COO^- 또는 $COOH$ 의 설정에 의해 나타낸다.

<539> 위 구조식 I 및 II에서, 부호 R^3 , R^4 , R^5 , R^6 및 $R^{6'}$ 는 독립하여 H, 치환 또는 비치환 알킬, OR^8 , $NHC(O)R^9$ 를 나타낸다.

<540> 지수 d는 0 또는 1이다.

<541> R^8 및 R^9 는 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 시알산 또는 폴리시알산에서 독립하여 선택한다.

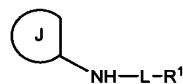
<542> R^3 , R^4 , R^5 , R^6 또는 $R^{6'}$ 중 최소 하나에는 하나의 변형기를 포함한다.

<543> 이 변형기는 하나의 결합(bond) 또는 하나의 결합기를 통해 결합된 하나의 폴리머 변형 성분, 즉 PEG로 할 수 있다.

<544> 하나의 예에서, 결합되어 있는 탄소를 함께 가진 R^6 및 $R^{6'}$ 는 시알산의 피루빌 측쇄의 성분이다.

<545> 또 다른 예에서, 결합되어 있는 탄소를 함께 가진 R^6 및 $R^{6'}$ 는 시알산의 측쇄 성분이며, 그 폴리머 변형기가 R^5 의 하나의 성분이다.

<546> 하나의 예에서, 본 발명은 아래에 나타낸 구조식을 가진 하나의 글리코실 결합기를 사용한다.



<547>

<548> 위 구조식에서,

<549> J는 하나의 글리코실 성분이고,

<550> L은 하나의 결합 또는 하나의 링커(linker)이고,

<551> R^1 은 하나의 변형기, 즉 폴리머 변형기이다.

<552> 대표적인 결합(bonds)은 글리코실 성분 상에서 하나의 NH_2 성분과 그 변형기 상에서 상보 반응성의 하나의 기 사이에 형성되어 있는 결합이다.

<553> 예로서, R^1 은 하나의 카르복실산 성분을 포함할 경우, 그 구조 $NHC(O)R^1$ 를 가진 하나의 결합을 제공하는 글리코실 잔기 상에서 NH_2 성분과 활성화하여 결합할 수 있다.

<554> J는 그 피라노오스 또는 푸라노오스 구조를 절단하는 상태, 즉 산화상태, 즉 소듐 퍼아यो테이트의 노출에 의해 분해되지 않거나 "무손상"(intact)인 하나의 글리코실 성분이 바람직하다.

<555> 대표적인 링커(linkers)에는 알킬 및 헤테로알킬 성분이 있다. 그 링커에는 결합기, 예로서 아실계 결합기, 즉 $-C(O)NH-$, $-OC(O)NH-$ 등을 포함한다.

<556> 그 결합기는 본 발명의 종들(species)의 성분들 사이, 즉 글리코실 성분과 그 링커(L)의 사이 또는 그 링커와

그 변형기(R¹) 사이에서 형성된 결합이다.

<557> 다른 대표적인 결합기는 에테르, 티오에테르 및 아민이다.

<558> 예로서, 하나의 예에서는 그 링커가 하나의 글리신잔기 등 하나의 아미노산잔기이다.

<559> 그 글리신의 카르복실산 성분은 그 글리코실잔기 상에서 하나의 아민과의 반응에 의해 그 대응하는 아미드로 전환되고, 그 글리신의 아민은 그 변형기의 하나의 활성화 카르복산 또는 카르보네이트와의 반응에 의해 그 대응한 아미드 또는 우레탄으로 전환된다.

<560> NH-L-R¹의 하나의 대표적인 종(species)은 다음 식을 가진다:

<561>
$$-NH\{C(O)(CH_2)_aNH\}_s\{C(O)(CH_2)_b(OCH_2CH_2)cO(CH_2)_dNH\}_tR^1$$

<562> 위 식에서,

<563> 지수 s 및 t는 각각 독립하여 0 또는 1이다.

<564> 지수 a, b 및 d는 각각 독립하여 0 ~ 20의 정수이다.

<565> 지수 c는 1 ~ 2500의 정수이다.

<566> 다른 유사한 링커는 하나의 -NH 성분이 또 다른 기, 예로서 -S, -O 또는 CH₂에 의해 치환되는 종들(species)을 기재로 한다.

<567> 지수 s 및 t에 상응하는 하나 이상의 괄호내 성분은 하나의 치환 또는 비치환 알킬 또는 헤테로알킬 성분과 치환된다는 것을 이 기술분야의 기술자들은 이해할 수 있다.

<568> 더 구체적으로 말하면, 본 발명은 NH-L-R¹이 아래에 열거한 식인 화합물을 이용한다:

**NHC(O)(CH₂)_aNHC(O)(CH₂)_b(OCH₂CH₂)_cO(CH₂)_dNHR¹,
NHC(O)(CH₂)_b(OCH₂CH₂)_cO(CH₂)_dNHR¹, NHC(O)O(CH₂)_b(OCH₂CH₂)_cO(CH₂)_dNHR¹,
NH(CH₂)_aNHC(O)(CH₂)_b(OCH₂CH₂)_cO(CH₂)_dNHR¹, NHC(O)(CH₂)_aNHR¹, NH(CH₂)_aNHR¹, 및 NHR¹**

<569> 이들의 식에서, 지수 a, b 및 d는 정수 0 ~ 20, 바람직하게는 1 ~ 5에서 선택한다.

<571> 그 지수 c는 1 ~ 약 2500의 정수이다.

<572> 하나의 대표적인 예에서, 지수 c는 PEG 성분이 약 1KD, 5KD, 10KDM 15KD, 20KD, 25KDM 30KDM 35KDM 40KD 또는 45KD가 되도록 선택한다.

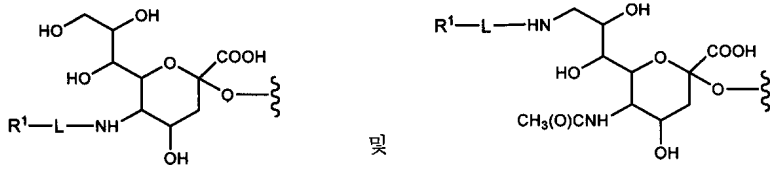
<573> 간편하게 하기 위하여, 이 섹션(section)의 나머지 부분에서 글리코실 결합기는 하나의 시알릴 성분을 기재로 한다.

<574> 그러나, 만노실, 갈락토실, 글루코실 또는 푸코실 등 또 다른 글리코실 성분은 시알릴 성분 대신 사용할 수 있다는 것을 이 분야의 기술자들은 이해할 수 있다.

<575> 하나의 대표적인 예에서, 그 글루코실 결합기는 하나의 무손상(intact) 글리코실 결합기이며, 그 무손상 글리코실 결합기에서는 그 글리코실 성분 또는 그 결합기의 형성성분이 화학적 프로세스(즉, 소듐 메타퍼아이오데이트) 또는 효소 프로세스(즉, 산화효소)에 의해 분해되지 않는다.

<576> 본 발명의 선택된 콘주게이트에는 하나의 아미노-시카리드의 아민 성분, 즉 만노사민, 글루코사민, 갈락토사민, 시알산 등에 결합되어 있는 하나의 변형기를 포함한다.

<577> 이 발명의 주 구성에 의한 대표적인 변형기-무손상 글리코실 결합기 카세트(cassettes)는 아래에 나타낸 구조식을 가진 구조체 등 하나의 시알산 구성체를 기재로 한다:

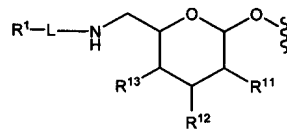


위 구조식에서, R^1 및 L은 위에서 설명한 내용과 같다.

대표적인 R^1 기의 구조에 대한 더 구체적인 설명은 아래에서 기술한다.

또 다른 예에서, 그 콘주게이트는 하나의 펩티드와, 변형당의 6-탄소 위치에서 하나의 링커를 통해 그 변형기가 결합되어 있는 하나의 변형당 사이에 형성된다.

이와 같이, 이 예에 의한 글리코실 결합기는 아래에 나타낸 구조식을 가진다:

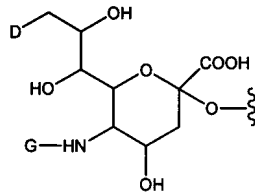


위 식에서,

래디컬은 위에서 설명한 내용과 같다.

글리코실 결합기에는 한정함이 없이 글루코오스, 글루코사민, N-아세틸-글루코사민, 갈락토오스, 갈락토사민, N-아세틸-갈락토사민, 만노오스, 만노사민, N-아세틸-만노사민 등이 있다.

하나의 예에서, 본 발명은 아래의 구조식으로 나타낸 글리코실 결합기로 이루어진 하나의 펩티드 콘주게이트를 제공한다.



위 구조식에서,

D는 $-OH$ 와 $R^1-L-NH-$ 에서 선택된 하나의 멤버이고,

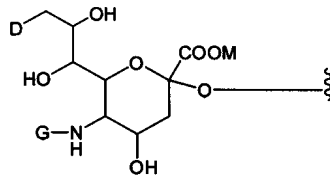
G는 H와 R^1-L- 및 $-C(O)(C_1-C_6)$ 알킬에서 선택된 하나의 멤버이며,

R^1 은 하나의 직쇄 또는 분기 폴리(에틸렌 글리콜)잔기로 이루어진 하나의 성분이고,

L은 하나의 링커, 즉 하나의 결합("제로오더":zero order), 치환 또는 비치환 알킬 및 치환 또는 비치환 헤테로 알킬이다.

대표적 예에서, D가 OH일 때, G는 R^1-L- 이고, G가 $-C(O)(C_1-C_6)$ 알킬일 때 D는 R^1-L-NH 이다.

하나의 예에서, 본 발명은 아래에 나타낸 구조식을 가진 글리코실 결합기로 이루어진 하나의 펩티드 콘주게이트를 제공한다.



<596>

<597>

위 구조식에서,

<598>

D는 -OH와 $R^1-L-HN-$ 에서 선택된 하나의 멤버이고,

<599>

G는 R^1-L 및 $-C(O)(C_1-C_6)$ 알킬- R^1 에서 선택된 하나의 멤버이며,

<600>

R^1 은 하나의 직쇄 폴리(에틸렌 글리콜)잔기와 분기 폴리(에틸렌 글리콜)잔기에서 선택된 하나의 멤버이고,

<601>

M은 H, 하나의 염 반대이온 및 하나의 단일 음전하에서 선택된 멤버이며,

<602>

L은 하나의 결합, 치환 또는 비치환 알킬 및 치환 또는 비치환 헤테로알킬에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 링 커이다.

<603>

하나의 대표적 예에서, D가 OH일 때, G는 R^1-L 이다.

<604>

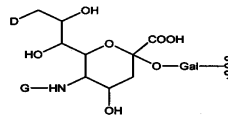
또 다른 대표적 예에서, G가 $-C(O)(C_1-C_6)$ 알킬일 때 D는 $R^1-L-NH-$ 이다.

<605>

본 발명의 어느 화합물에서, 하나의 COOH 기는 변형하여 COOM으로 할 수 있다. 여기서 M은 H, 하나의 음전하와 하나의 염 반대이온에서 선택된 하나의 멤버이다.

<606>

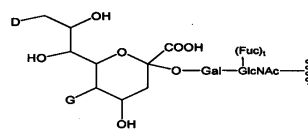
본 발명은 아래에 나타낸 구조식을 가진 하나의 글리코실 결합기를 포함하는 하나의 펩티드 콘주게이트를 제공한다.



<607>

<608>

다른 예에서, 그 글리코실 결합기는 아래에 나타낸 구조식을 가진다:



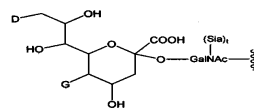
<609>

<610>

위 구조식에서, 지수 t는 0 또는 1이다.

<611>

또 다른 대표적 예에서, 그 글리코실 결합기는 아래에 나타낸 구조식을 가진다:



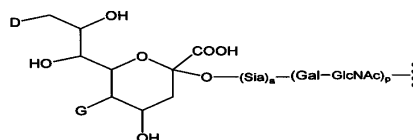
<612>

<613>

위 구조식에서, 지수 t는 0 또는 1이다.

<614>

하나의 또 다른 예에서, 그 글리코실 결합기는 아래에 나타낸 구조식을 가진다:



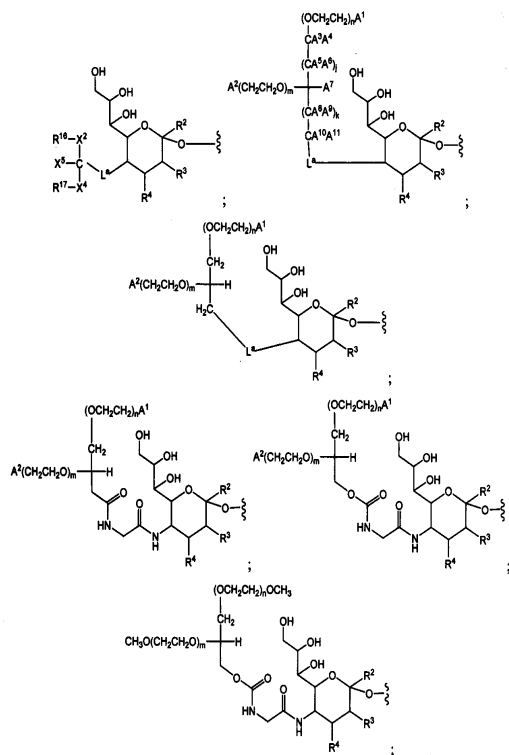
<615>

<616> 위 구조식에서,

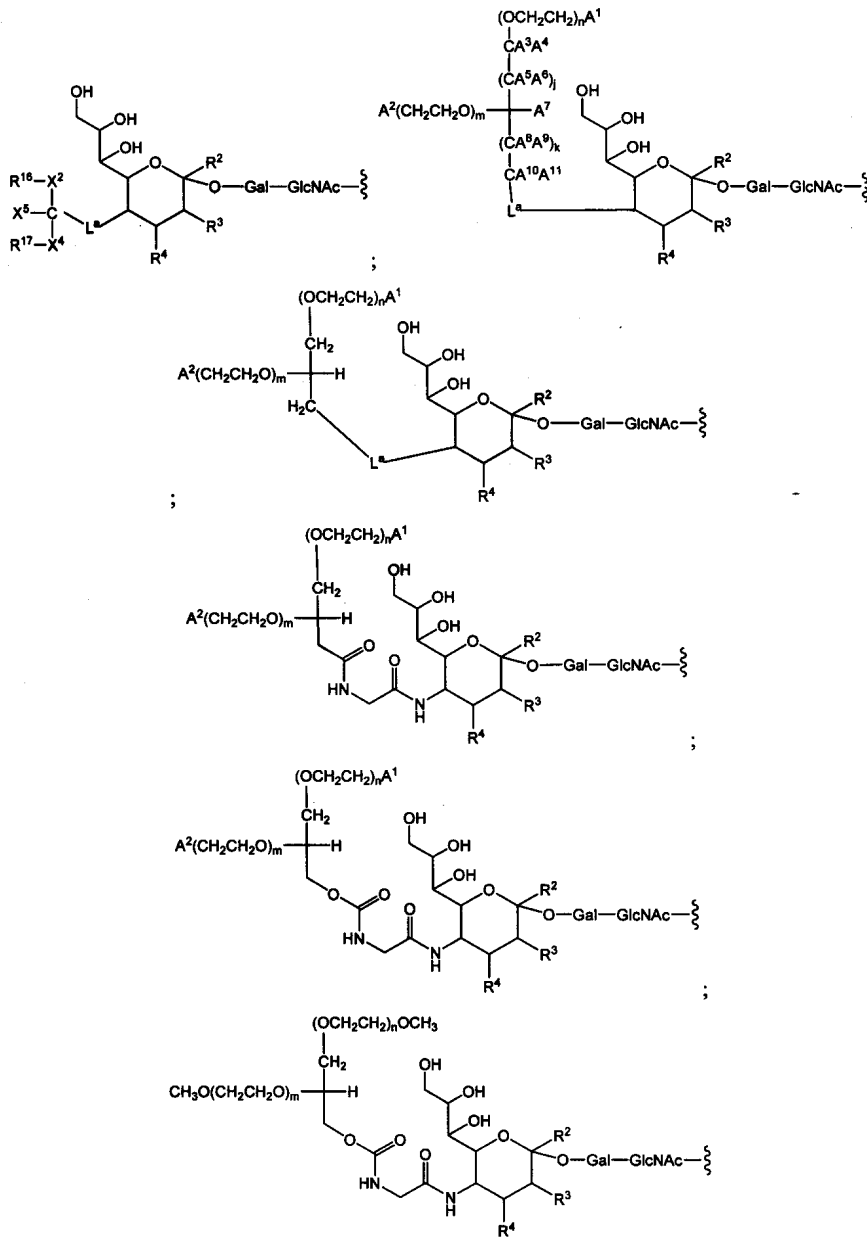
<617> 지수 p는 1 ~ 10의 정수를 나타내며,

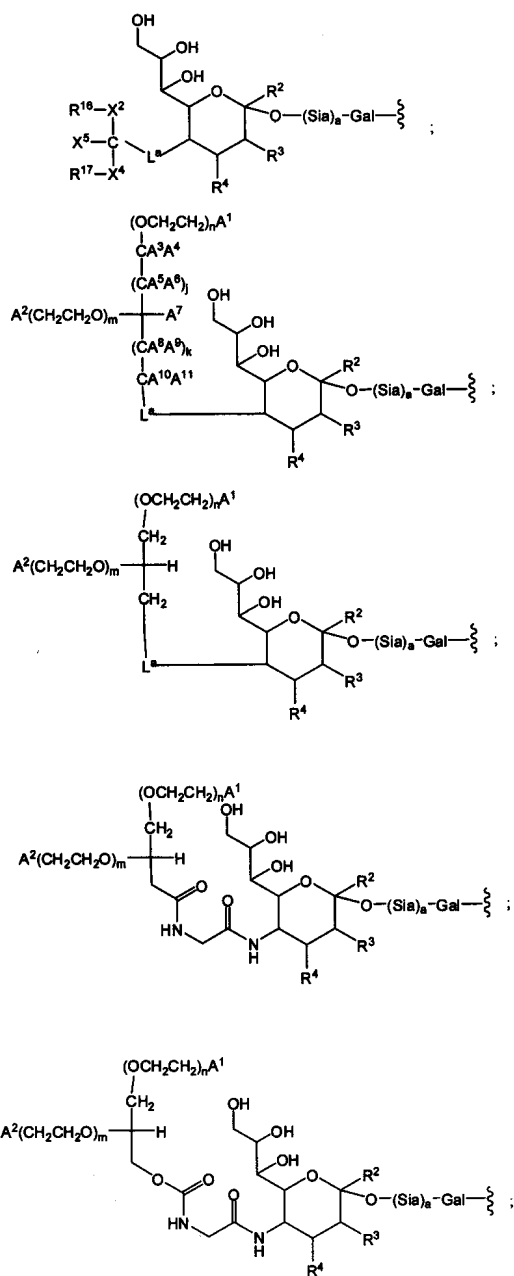
<618> 지수 a 는 0 또는 1이다.

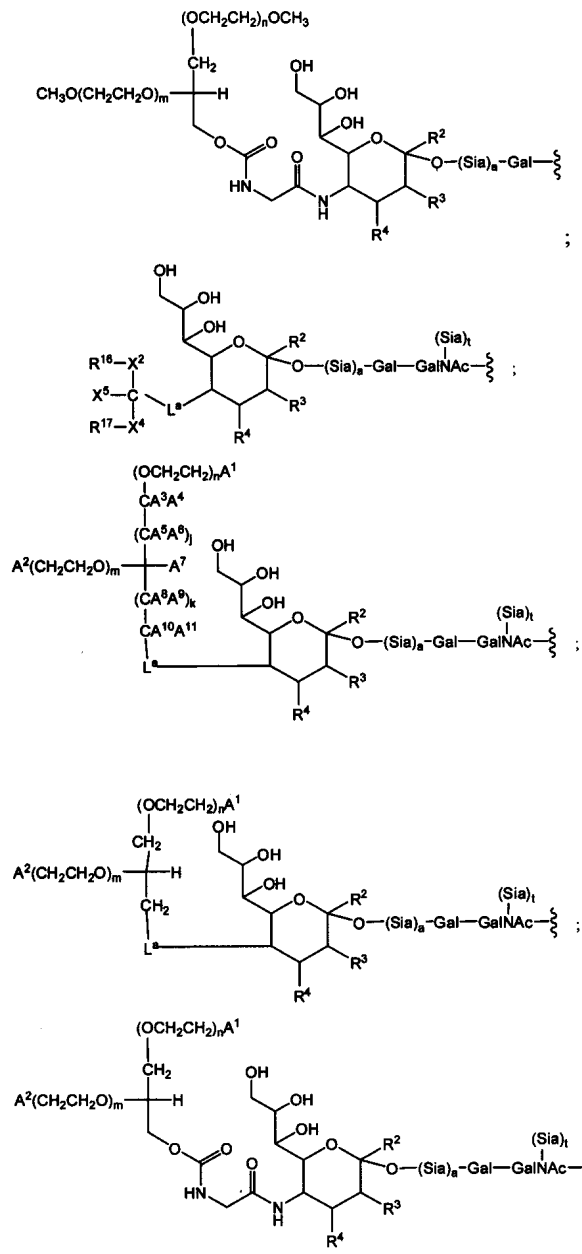
<619> 또 다른 대표적 예에서, 그 펩티드 콘주게이트는 아래에 나타난 구조식에서 선택한 하나의 글리코실 성분으로 이루어진다:

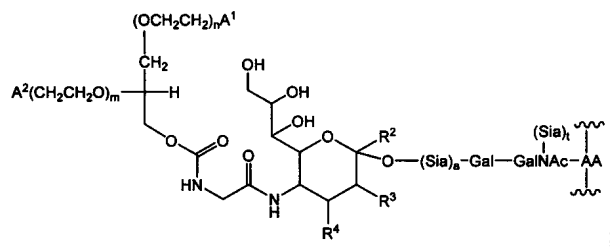
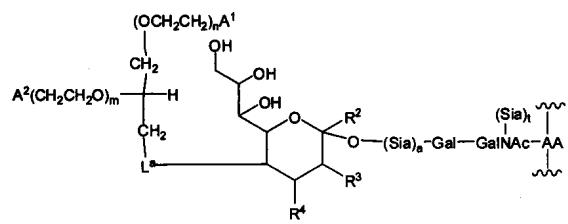
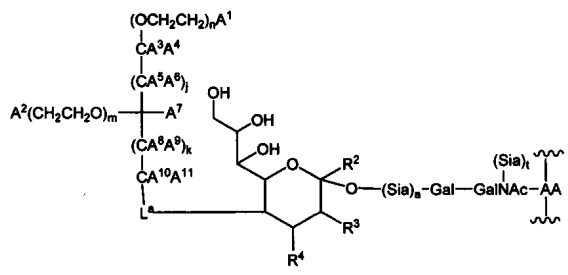
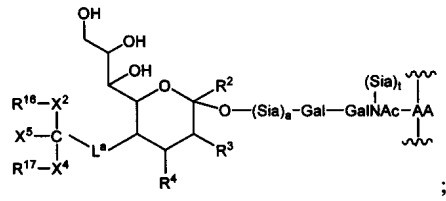
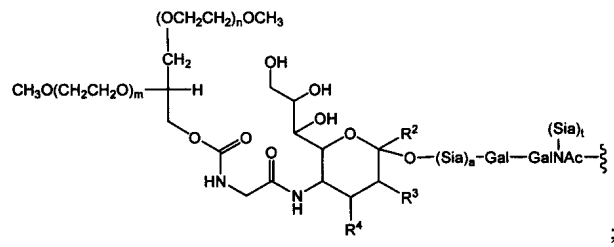


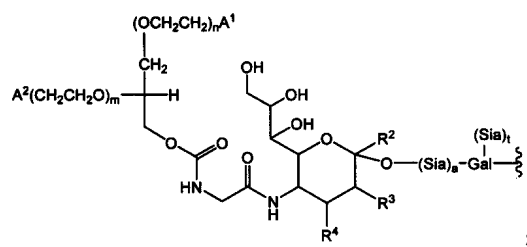
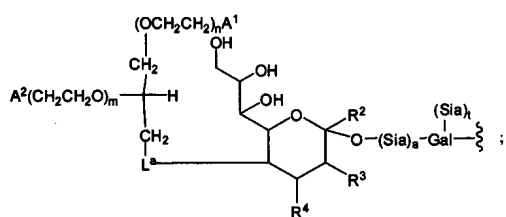
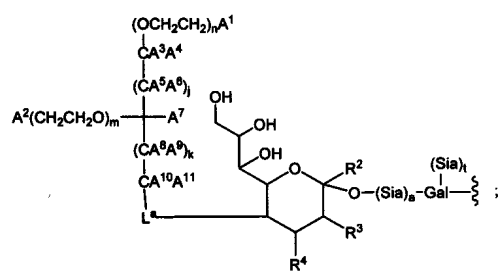
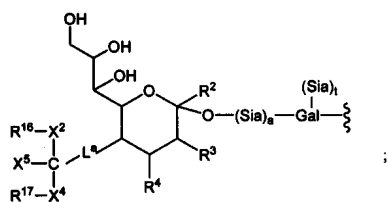
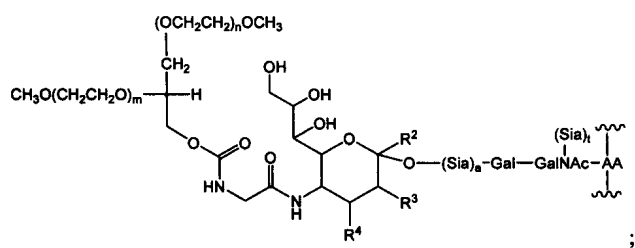
$\langle 620 \rangle$

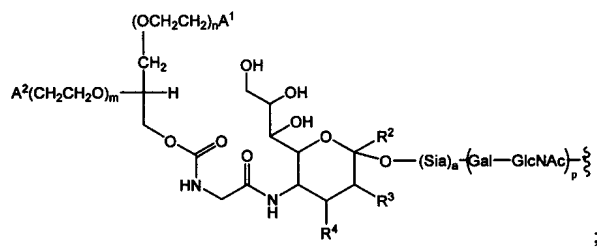
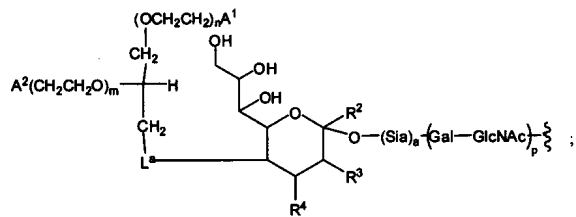
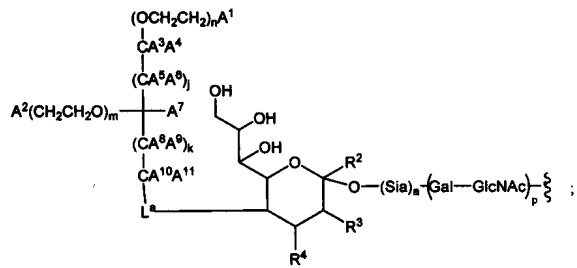
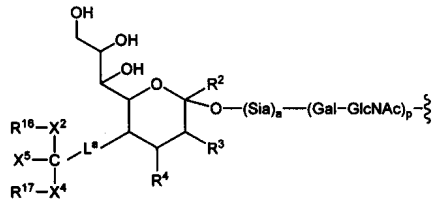
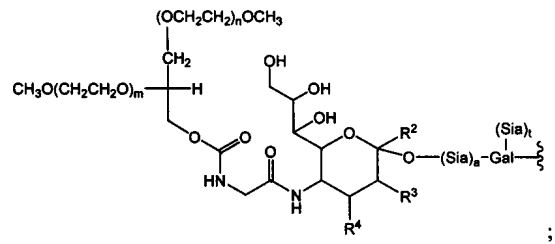




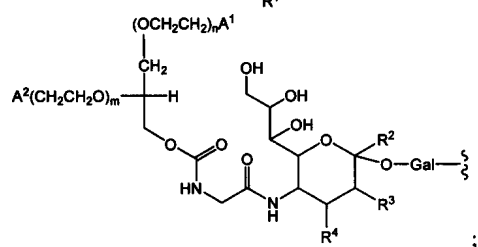
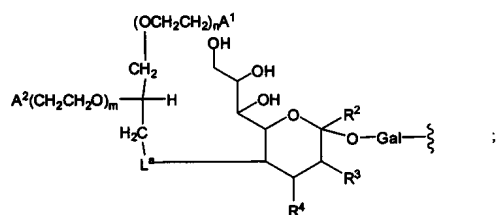
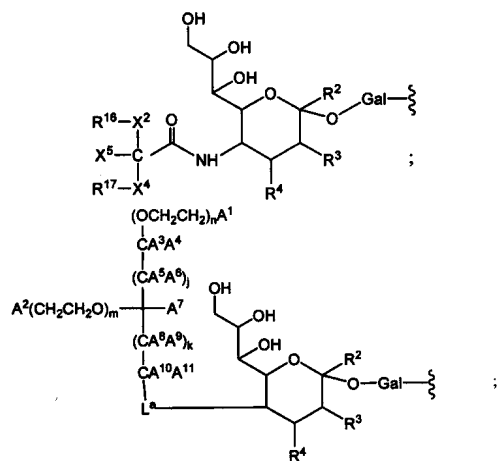
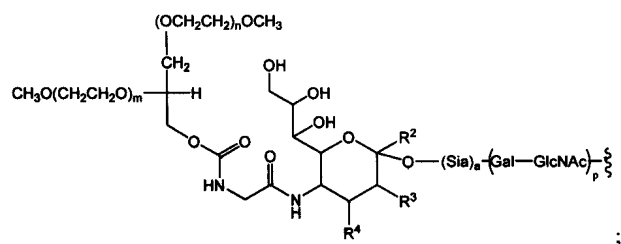


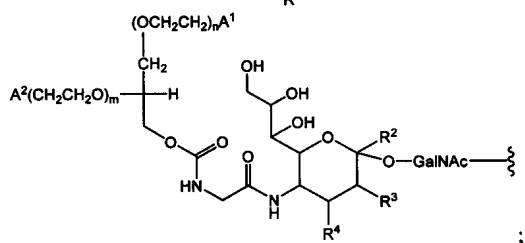
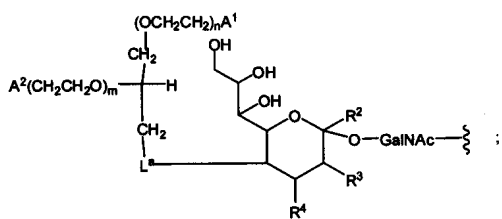
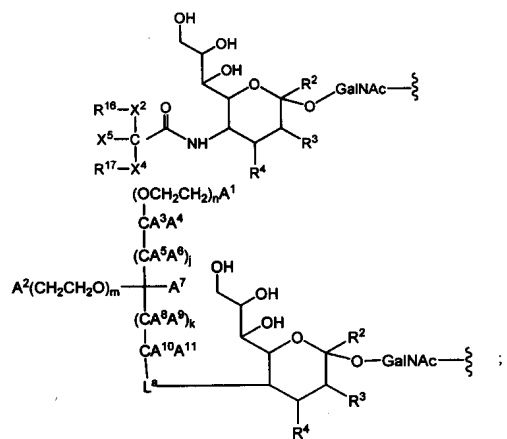
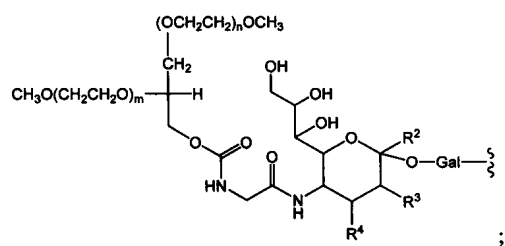


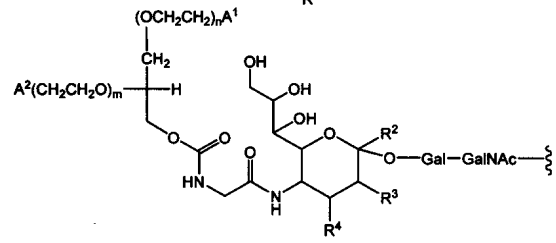
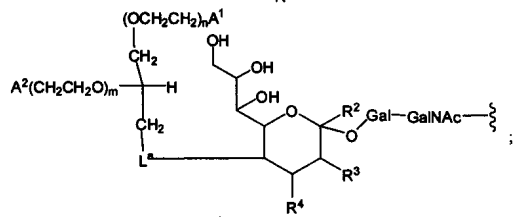
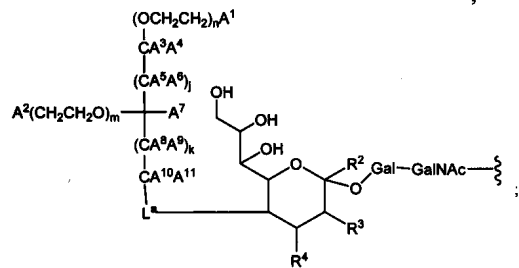
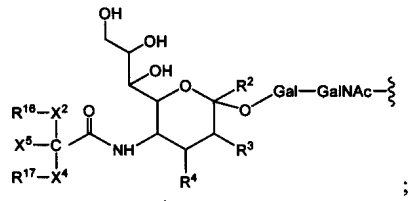
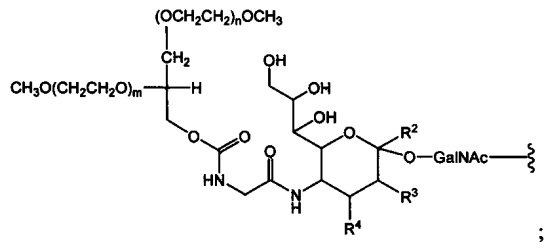


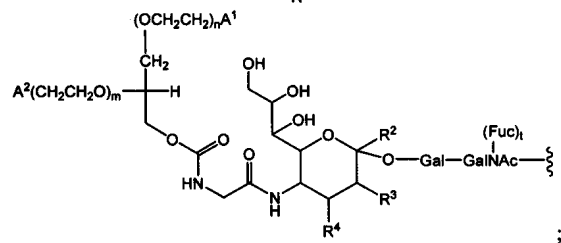
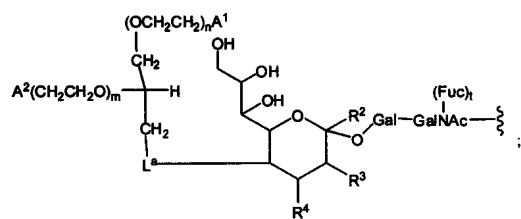
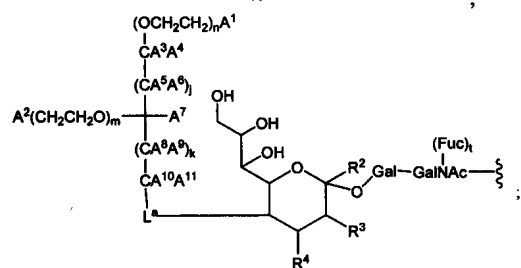
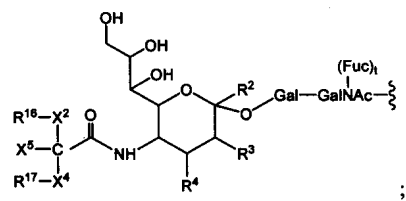
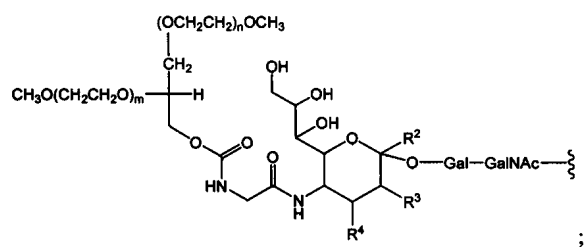


<626>

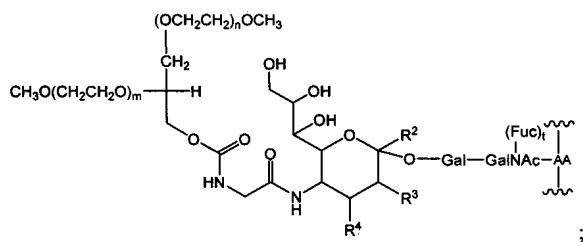
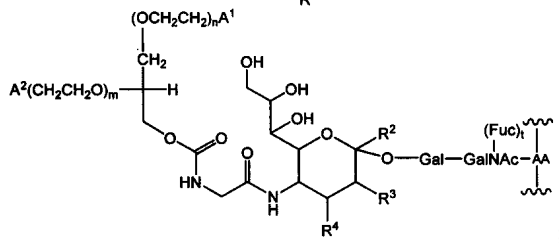
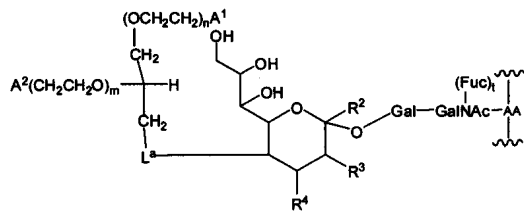
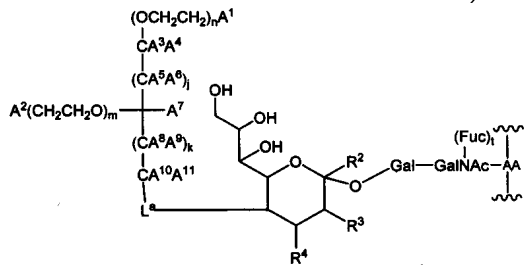
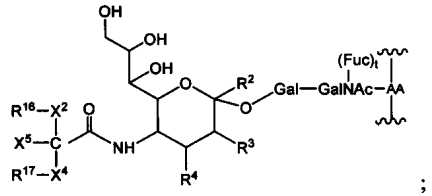
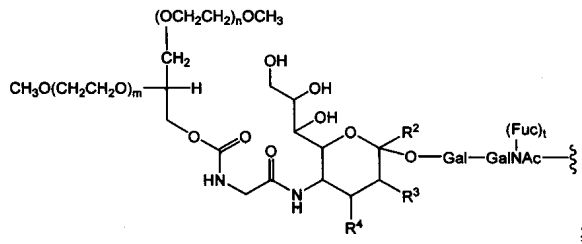








<630>



<631>

<632>

<633>

위 구조식에서,

<634>

지수 a와 링커 L^a는 위에서 설명한 내용과 같다.

<635>

지수 p는 1 ~ 10의 정수이다.

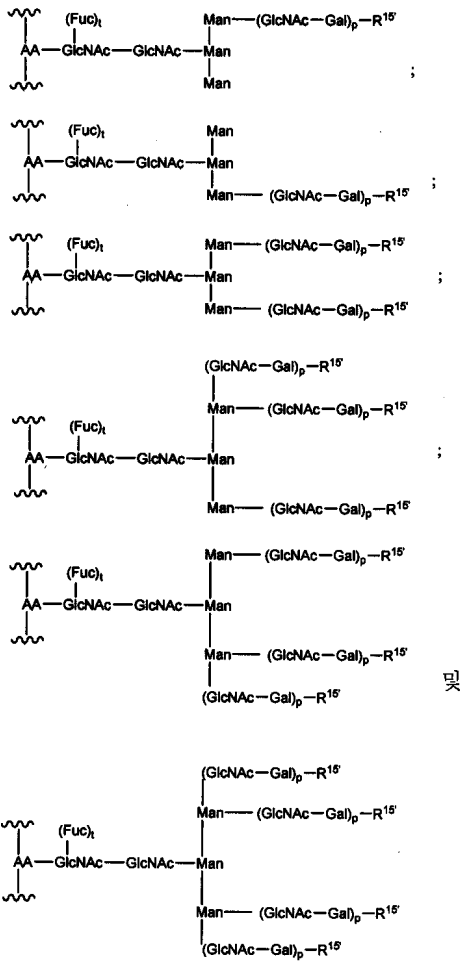
<636>

지수 t와 a는 독립하여 0 또는 1에서 선택한다.

<637>

이들 기의 각각은 위에서 설명한 모노, 비, 트리 및 테트라-안테나형상 사카리드 구조체의 성분으로 포함할 수 있다.

- <638> AA는 그 펩티드의 하나의 아미노산 잔기이다.
- <639> 하나의 대표적인 예에서, 그 PEG 성분은 분자량 약 20KDa를 가진다.
- <640> 다른 하나의 대표적인 예에서, 그 PEG 성분은 분자량 약 5KDa를 가진다.
- <641> 또 다른 대표적인 예에서, 그 PEG 성분은 분자량 약 10KDa를 가진다.
- <642> 또 다른 하나의 대표적인 예에서, 그 PEG 성분은 분자량 약 40KDa를 가진다.
- <643> 하나의 예에서, 그 글리코실 결합기는 하나의 시스테인 잔기를 기재로 한 하나의 분기 SA-PEG-10KDa 성분이며, 1개 또는 2개의 이들 글리코실 결합기는 그 펩티드에 공유 결합되어 있다.
- <644> 또 다른 예에서, 그 글리코실 결합기는 하나의 라이신 잔기를 기재로 한 하나의 분기 SA-PEG-10KDa 성분이고, 1개 또는 2개의 이들 글리코실 결합기가 그 펩티드에 공유 결합되어 있다.
- <645> 하나의 예에서, 그 글리코실 결합기는 하나의 시스테인 잔기를 기재로 한 하나의 분기 SA-PEG-10KDa 성분이고, 1개 또는 2개의 이들 글리코실 결합기가 그 펩티드에 공유 결합되어 있다.
- <646> 하나의 예에서, 그 글리코실 결합기는 하나의 라이신 잔기를 기재로 한 하나의 분기 SA-PEG-10KDa 성분이고, 1개 또는 2개의 이들 글리코실 결합기가 그 펩티드에 공유 결합되어 있다.
- <647> 하나의 예에서, 그 글리코실 결합기는 하나의 시스테인 잔기를 기재로 한 하나의 분기 SA-PEG-5KDa 성분이고, 1, 2 또는 3개의 이들 글리코실 결합기가 그 펩티드에 공유 결합되어 있다.
- <648> 하나의 예에서, 그 글리코실 결합기는 하나의 라이신 잔기를 기재로 한 하나의 분기 SA-PEG-5KDa 성분이고, 1, 2 또는 3개의 이들 글리코실 결합기가 그 펩티드에 공유 결합되어 있다.
- <649> 하나의 예에서, 그 글리코실 결합기는 하나의 시스테인 잔기를 기재로 한 하나의 분기 SA-PEG-40KDa 성분이고, 1개 또는 2개의 이들 글리코실 결합기가 그 펩티드에 공유 결합되어 있다.
- <650> 하나의 예에서, 그 글리코실 결합기는 하나의 라이신 잔기를 기재로 한 하나의 분기 SA-PEG-40KDa 성분이고, 1개 또는 2개의 이들 글리코실 결합기가 그 펩티드에 공유 결합되어 있다.
- <651> 하나의 예에서, 본 발명의 하나의 글리코페질화 펩티드(glycoPEGylated peptide) 콘주게이트는 아래에 나타난 구조식에서 선택한다:



<652>

<653>

위 구조식에서, 지수 t는 0 ~ 1의 정수이고,

<654>

지수 p는 1 ~ 10의 정수이다.

<655>

부호 R¹⁵는 H, OH(즉, Gal-OH), 하나의 시알릴 성분, 하나의 시알릴 결합기[즉, 시알릴 결합기-폴리머 변형기 (Sia-L-R¹), 또는 하나의 폴리머 변형 시알릴 성분(즉, Sia-Sia-L-R¹)("Sia-Sia^p")를 결합하는 하나의 시알릴 성분]을 나타낸다.

<656>

대표적인 폴리머 변형 사카릴 성분은 식 I 및 II에 의한 하나의 구조를 가진다.

<657>

본 발명의 하나의 대표적인 펩티드 콘주게이트에는 식 I 또는 II에 의한 하나의 구조를 포함하는 하나의 R¹⁵를 가진 최소 하나의 글리칸을 포함한다.

<658>

개방가(open valence)를 가진 식 I 및 II의 산소는 하나의 Gal 또는 GalNAc 성분의 하나의 탄소에 하나의 글리코 시드 결합을 통해 결합하는 것이 바람직하다.

<659>

하나의 또 다른 예에서, 그 산소는 하나의 갈락토오스 잔기의 위치 3에서 탄소에 결합되어 있다.

<660>

하나의 대표적인 예에서, 그 변형 시알산은 그 갈락토오스 잔기에 α 2, 3-결합되어 있다.

<661>

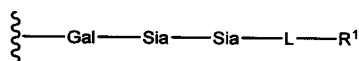
또 다른 예에서, 그 시알산은 그 갈락토오스 잔기에 α 2, 6-결합되어 있다.

<662>

하나의 대표적인 예에서, 그 시알릴 결합기는 하나의 폴리머 변형 시알릴 성분(즉, Sia-Sia-L-R¹)("Sia-Sia^p")을 결합하는 하나의 시알릴 성분이다.

<663>

여기서, 그 글리코실 결합기는 아래에 나타낸 바와 같이 하나의 시알릴 성분을 통하여 하나의 갈락토실 성분에 결합되어 있다:



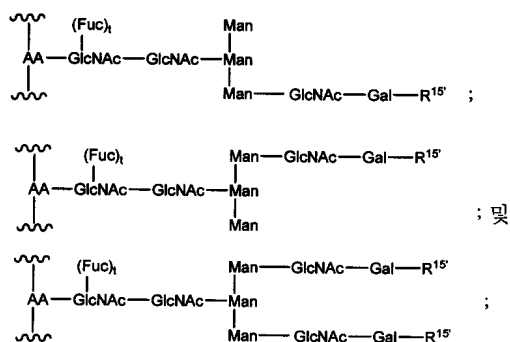
<664>

<665>

본 발명의 상기 주요구성에 의한 하나의 대표적인 종(species)은 Sia-Sia 결합, 즉 CST-II, ST8Sia-II 및 ST8Sia-IV을 형성하는 하나의 효소를 사용하여 하나의 글리칸의 말단 시알산에 Sia-L-R¹을 콘주게이팅 함으로 제조한다.

<666>

또 다른 대표적인 예에서, 그 켈티드 콘주게이트 상에서의 글리칸은 아래에 나타난 그룹(group)에서 선택한 하나의 구조식 및 그 조합을 가진다.



<667>

<668>

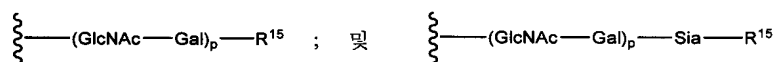
상기 구조식 각각에서, $R^{15'}$ 는 위에서 설명한 것과 같다.

<669>

더욱이, 하나의 대표적인 본 발명의 펩티드 콘주게이트에는 구조식 I 또는 II에 의한 하나의 구조를 R¹⁵ 성분이 최소 하나의 글리칸을 포함한다.

<670>

또 다른 대표적인 예에서, 그 글리코실 결합기는 아래에 나타낸 구조식을 가진 최소 하나의 글리콜 결합기를 구성한다:



<671>

<672>

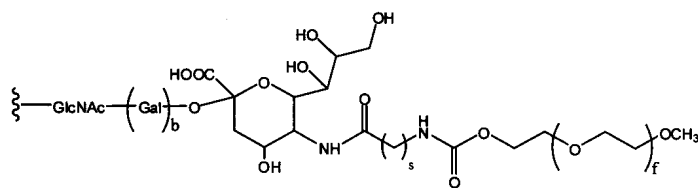
위 식에서,

<673>

R^{15} 은 상기 시알릴 결합기이고, 그 지수 p는 1 ~ 10에서 선택한 정수이다.

<674>

하나의 예에서, 그 글리코실 결합 성분은 아래에 나타낸 구조식을 가진다:



<675>

<676>

위 식에서,

<677>

지수 b 는 0과 1의 정수이다.

<678>

지수 s 는 1 ~ 10의 정수이다. 지수 f 는 1 ~ 2500의 정수이다.

<679>

하나의 예에서, 그 폴리머 변형기는 PEG이다.

<680>

또 다른 예에서, 그 PEG 성분은 분자량 약 20KDa를 가진다.

<681>

또 다른 예에서, 그 PEG 성분은 분자량 약 5KDa를 가진다.

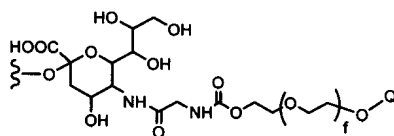
<682>

또 다른 예에서, 그 PEG 성분은 분자량 약 10KDa를 가진다.

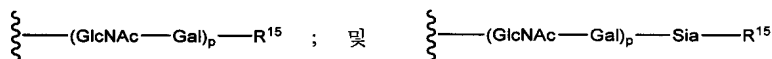
<683>

또 다른 예에서, 그 PEG 성분은 분자량 약 40KDa를 가진다.

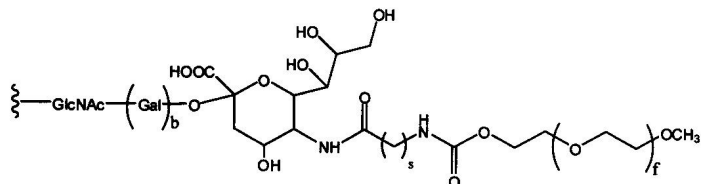
- <684> 또 다른 예에서, 그 글리코실 결합기는 Asn145, Asn322, Ser52, Ser60 또는 그 조합에 결합되어 있다.
- <685> 하나의 예에서, 그 글리코실 결합기는 하나의 선상 SA-PEG-10KDa 성분이며, 1개 또는 2개의 이들 글리코실 결합기가 그 펩티드에 공유 결합되어 있다.
- <686> 또 다른 예에서, 그 글리코실 결합기는 하나의 선상 SA-PEG-20KDa 성분이고, 1개 또는 2개의 이들 글리코실 결합기가 그 펩티드에 공유 결합되어 있다.
- <687> 하나의 예에서, 그 글리코실 결합기는 하나의 선상 SA-PEG-5KDa 성분이고, 1개, 2개 또는 3개의 이들 글리코실 결합기가 그 펩티드에 공유 결합되어 있다.
- <688> 하나의 예에서, 그 글리코실 결합기는 하나의 선상 SA-PEG-40KDa 성분이고, 1개 또는 2개의 이들 글리코실 결합기가 그 펩티드에 공유 결합되어 있다.
- <689> 또 다른 예에서, 그 글리코실 결합기는 다음 구조식을 가진 하나의 시알릴 결합기이다:



- <690>
- <691> 또 다른 예에서, Q는 H와 CH₃에서 선택된 하나의 멤버이다.
- <692> 또 다른 예에서, 상기 글리코실 결합기는 아래에 나타낸 구조식을 가진다:

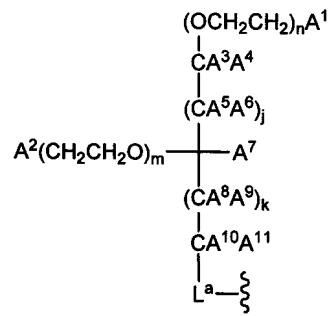


- <693>
- <694> 위 식에서,
- <695> R¹⁵는 상기 시알릴 결합기이고, 지수 p는 1 ~ 20에서 선택된 정수이다.
- <696> 하나의 예에서, 그 글리코실 결합기는 아래에 나타내 구조식으로 이루어진다.



- <697>
- <698> 위 식에서, 지수 b는 0 및 1에서 선택한 정수이다.
- <699> 하나의 예에서, 그 지수 s는 1이고, 그 지수 f는 약 200 ~ 약 300에서 선택한 정수이다.
- <700> 또 다른 예에서, 그 글리코실 결합기는 SA-PEG-10KDa와 SA-PEG-20KDa에서 선택한 하나의 멤버이고, 인자 VII/인자 VIIa 펩티드에 공유 결합되어 있는 상기 글리코실 결합기의 수는 1 ~ 2에서 선택된 정수이다.
- <701> 또 다른 예에서, 그 글리코실 결합기는 SA-PEG-5KDa와 SA-PEG-40KDa에서 선택한 하나의 멤버이고, 인자 VII/인자 VIIa 펩티드에 공유 결합되어 있는 상기 글리코실 결합기의 수는 1 ~ 3에서 선택한 정수이다.
- <702> II. D. 변형기(modifying groups)
- <703> 본 발명의 펩티드 콘주게이트는 하나의 변형기로 이루어진다.
- <704> 이 변형기는 하나의 아미노산 또는 하나의 글리코실 결합기에 의해 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드에 공유 결합할 수 있다.

<705> 또 다른 예에서, 그 변형기가 아래에 나타낸 구조식일 때,



<706>

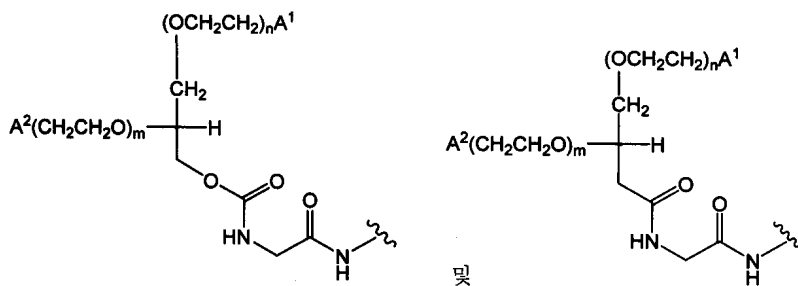
<707> 그 펩티드 콘주게이트에서의 펩티드가 도 13에서의 펩티드로부터 선택된 하나의 멤버이다.

<708> 또 다른 예에서, 그 펩티드 콘주게이트에서의 펩티드는 인자 VII, 인자 VIIa, 인자 VIII, 인자 IX, 인자 X, 인자 XI, 에리트로포이에틴, 그라눌로사이트콜로니 자극 인자(G-CSF), 그라눌러사이트-마크로파아지콜로니 자극 인자(GM-CSF), 인터페론 알파, 인터페론 베타, 인터페론 감마, α 1-엔티트립신(ATT, 또는 α -1 프로테아제 억제제), 글루세레브로사다아제, 리슈(tissue)-타입 플라스미노겐 액티베이터(plasminogen Activator)(TPA), 인터류킨-2-(IL-2), 우로키나아제(urokinase), 사람 DN효소, 인슐린, 감염 B 표면 단백질(HbsAg), 사람 성장호르몬, TNF 리셉터-IgFc 부위 융합 단백질(Enbrel: 상품명), 엔티-HER2 모노클로날항체(Herceptin: 상품명), 레스피레이토리 신스티얼바이러스(synagis: 상품명)의 단백질 F에 대한 모노클로날항체, TNF- α (Remicade: 상품명)에 대한 모노클로날항체, 글리코 프로테인 IIb/IIIb(Reopro: 상품명)에 대한 모노클로날항체, CD20(Rituxan: 상품명)에 대한 모노클로날항체, 엔티-트롬빈(anti-thrombin)III(AT III), 사람 코리온 고나도트로핀(human Chorionic Gonadotropin)(hCG), 알파-갈락토시다아제(Fabrazyme: 상품명), 알파-이두로니다아제(iduronidase)(Aldurazyme: 상품명), 여포(follicle)자극 호르몬, 베타-글루코시다아제, 엔티-TNF-알파 모노클로날항체(MLB 5075), 글루카곤(glucagon)형상 펩티드-1(GLP-1), 베타-글루코시다아제(MLB 5064), 알파-갈락토시다아제 A(MLB 5082) 및 섬유 아세포 증식 인자에서 선택한 하나의 멤버이다.

<709> "변형기"(modifying groups)에는 표적성분, 치료성분, 바이오분자(biomolecules)를 포함하는 여러 가지의 구조를 포함할 수 있다.

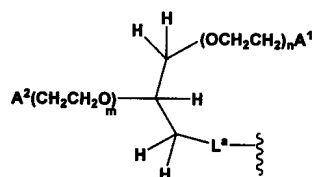
<710> 또, "변형기"에는 폴리머 변형기를 포함하며, 이들의 폴리머 변형기는 바이오(bio) 이용율(vioavailability) 또는 생체의 반감기 등 펩티드의 특성을 변경할 수 있는 폴리머이다.

<711> 하나의 예에서, 그 폴리머 변형기는 다음에 나타낸 구조식에 의한 하나의 구조를 가진다:



<712>

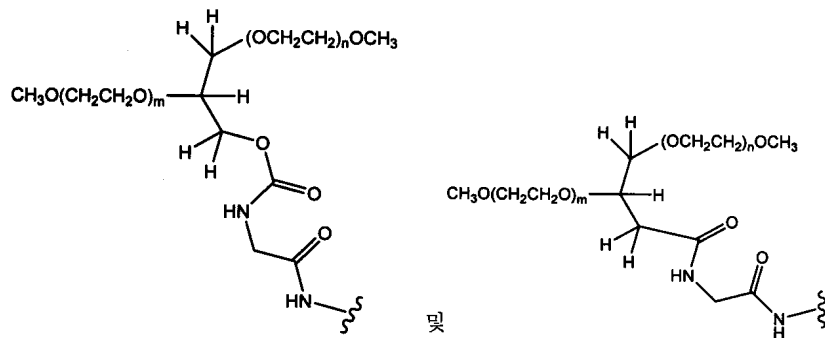
<713> 상기 구조식에 의한 또 다른 예에서, 그 폴리머 변형기는 아래에 나타낸 구조식에 의한 하나의 구조를 가진다:



<714>

<715> 하나의 예에서, A^1 및 A^2 는 각각 -OH 및 -OCH₃에서 선택한 멤버이다.

<716> 이 예에 의한 대표적인 폴리머 변형기는 아래에 나타낸 구조식을 포함한다:



<717>

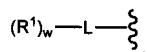
<718> 간단하게 하기 위하여, 이 섹션의 잔부(remainder)에서 변형기는 수용성 및 수불용성 폴리머 등 폴리머 변형기를 주로 기재로 한다.

<719> 그러나, 표적성분, 치료성분 및 바이오분자 등 다른 변형기를 그 폴리머 변형기 대신 사용할 수 있다는 것을 이 분야의 기술자에 의해 알 수 있다.

<720> II. D. i. 변형기(modifying groups)의 링커(linkers)

<721> 그 변형기의 링커는 그 변형기(즉, 폴리머 변형기, 표적성분, 치료성분, 바이오분자)를 그 펩티드에 결합하는데 사용한다.

<722> 하나의 예에서, 그 폴리머 변형기는 일반적으로 하나의 헤테로 원자, 즉 질소를 통하여 아래에 나타낸 바와 같이 하나의 링커 L를 통한 코어(core) 상에서 하나의 글리코실 결합기에 결합되어 있다.



<723>

<724> 위 링커에서,

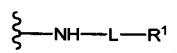
<725> R^1 은 폴리머 성분이고, L은 하나의 결합과 하나의 결합기(linking group)에서 선택한다.

<726> 지수 w는 1-6, 바람직하게는 1-3, 더 바람직하게는 1-2에서 선택한 정수를 나타낸다.

<727> 대표적인 결합기(linking group)에는 치환 또는 비치환 알킬 성분, 치환 또는 비치환 헤테로 알킬 성분 및 시알산을 포함한다.

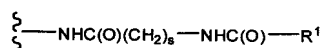
<728> 그 링커의 하나의 대표적인 성분은 하나의 아실 성분이다.

<729> 본 발명에 의한 하나의 대표적인 화합물은 식 I 및 II에 의한 하나의 구조를 가진다. 여기서, R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 및 $R^{6'}$ 중 최소 하나는 아래에 나타낸 구조식을 가진다:



<730>

<731> 이 예에 의한 또 다른 예에서, R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 및 $R^{6'}$ 중 최소 하나는 아래에 나타낸 구조식을 가진다:

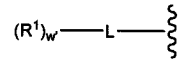


<732>

<733> 위 식에서, 지수 s는 0 ~ 20의 정수이고, R^1 은 하나의 선상 폴리머 변형 성분이다.

<734> 하나의 대표적인 예에서, 그 폴리머 변형기-링커 구조는 하나의 분기구조이며, 그 분기구조에는 중심성분(central moiety)에 결합된 2개 이상의 폴리머 사슬을 포함한다.

<735> 이 예에서, 그 구성을 아래에 나타낸 구조식을 가진다:



<736>

<737> 이 구조식에서, R^1 및 L은 위에서 설명한 것과 같으며, w'는 2 ~ 6, 바람직하게는 2 ~ 4, 더 바람직하게는 2 ~ 3의 정수이다.

<738> L이 하나의 결합인 경우, 그 L은 R^1 의 하나의 전구물질 상에서의 하나의 반응성 작용기와 그 사카릴 코어 상에서 상보 반응성을 가진 하나의 반응성 작용기 사이에서 형성된다.

<739> L이 하나의 비제로 오더 링커(non-zero order linker)인 경우, L의 하나의 전구물질은 R^1 전구물질(precursor)과의 작용 전에 글리코실 성분 상에서 적합하게 할 수 있다.

<740> 또, R^1 과 L의 전구물질은 글리코실 성분에서 후 결합되어 있는 하나의 사전형성된 카세트(cassette)에 결합시킬 수 있다.

<741> 여기서 설명한 바와 같이, 적합한 반응성 작용기를 가진 전구물질의 선택과 제조는 이 기술분야의 기술자의 인식능력 범위 내에서 가능한 것이다.

<742> 더욱이, 그 전구물질의 결합(coupling)은 이 기술분야에서 이해할 수 있는 화학적 처리기술에 의해 진행할 수 있다.

<743> 하나의 대표적인 예에서, L은 하나의 결합기(linking group)로, 그 결합기는 폴리머 변형기가 하나의 치환 알킬 링커에 의해 결합되어 있는 하나의 변형당을 형성하는 소형 펩티드(즉, 1 ~ 4 아미노산잔기) 또는 하나의 아미노산에서 형성된다.

<744> 대표적인 링커에는 글리신, 라이신, 세린 및 시스테인을 포함한다.

<745> 그 PEG 성분은 하나의 아미드 또는 우레탄 결합을 통해 그 링커의 아민성분에 결합시킬 수 있다.

<746> 그 PEG 성분은 각각 티오 에테르 또는 에테르 결합을 통해 시스테인과 세린의 황 또는 산소에 결합되어 있다.

<747> 하나의 대표적인 예에서, R^5 는 폴리머 변형기를 포함한다.

<748> 또 다른 대표적인 예에서, R^5 에는 그 폴리머 변형기와 하나의 링커 L 모두를 포함하며, 그 링커는 그 변형기를 그 분자의 잔부에 결합한다.

<749> 위에서 설명한 바와 같이, L은 하나의 선상 또는 분기구조로 할 수 있다. 동일하게, 그 폴리머 변형기는 분기 또는 선상으로 할 수 있다.

<750> II. D. ii. 수용성 폴리머(water-soluble polymers)

<751> 다수의 수용성 폴리머는 이 분야의 기술자에 의해 공지되었으며, 본 발명을 실시하는데 유용하다.

<752> 용어 수용성 폴리머는 사카리드(즉, 텍스트란, 아밀로오스, 히알로루론산, 폴리(시알산), 헤파란, 헤파린 등);

<753> 폴리(아미노산), 즉 폴리(아스파르트산) 및 폴리(글루탐산);

<754> 핵산; 합성 폴리머(즉, 폴리(아크릴산), 폴리(에테르), 즉 폴리(에틸렌 글리콜); 펩티드, 단백질 등 종(species)을 포함한다.

<755> 본 발명은 그 콘주게이트이 잔부(remainder)를 결합시킬 수 있는 하나의 지점을 반드시 포함할 필요가 있는 유일한 제한을 가진 어느 수용성 폴리머라도 실시할 수 있다.

<756> 또, 폴리머의 활성화 방법은 특허문헌 WO 94/17039; USP 5,324,844; WO 94/18247; WO 94/04193; USP 5,219,564; USP 5,122,614; WO 90/13540; USP 5,281,698 및 WO 93/15189 명세서에서 확인할 수 있으며, 활성화 폴리머와 펩티드, 즉 옹고인자 VIII(WO 94/15625), 헤모글로빈(WO 94/09027), 산소를 가진 분자(USP 4,412,989), 리보뉴클레아제 및 슈퍼옥사이드(superoxide) 디스뮤타아제(dismutase)(Veronses 등, App. Biochem, Biotech. 11: 141-45 (1985) 사이의 콘주게이션(conjugation)에 대하여 확인할 수 있다.

- <757> 대표적인 수용성 폴리머는 그 폴리머의 샘플 중에서 실질상의 비의 그 폴리머 분자가 거의 동일한 분자량을 가진 것들이다.
- <758> 이와 같은 폴리머는 "호모 분산성"(homodisperse)이 있다.
- <759> 또, 본 발명은 하나의 폴리(에틸렌 글리콜) 콘주게이트를 참고로 하여 설명한다.
- <760> PEG의 기능화와 콘주게이션에 대한 수종의 참고문헌과 단행본(monographs)을 참고로 예시할 수 있다:
- <761> 예로서, Harris, Macromol. Chem. Phys. C25: 325-373 (1985);
- <762> Scouten, Methods in Enzymology 135: 30-65 (1987);
- <763> Wong 등, Enzyme Microb. Technol. 14: 866-874 (1992);
- <764> Delgado 등, Critical Reviews in Therapeutic Drug
- <765> Carrier Systems 9: 249-304 (1992);
- <766> Zalipsky, Bioconjugate Chem. 6: 150-165 (1995); 및
- <767> Bhadra 등, Pharmazie, 57: 5-29 (2002).
- <768> 그 반응성 분자들을 사용하여 반응성 PEG 분자를 제조하여 콘주게이트를 형성하는 루트(routes)는 이 기술분야에서 공지되었다.
- <769> 예로서, 특허문헌 USP 5,672,662 명세서에서는 선상 또는 분기 폴리(알킬렌 옥사이드), 폴리(옥사에틸화 폴리올), 폴리(올레핀 알코올) 및 폴리(아크릴로모르폴린)에서 선택한 하나의 폴리머 산의 활성 에스테르의 수용성이며 분리할 수 있는 콘주게이트에 대하여 개시되어 있다.
- <770> 특허문헌 USP 6,376,604 명세서에서는 수용성 비-펩티드 폴리머의 말단 히드록실과 디(1-벤조트리아졸릴) 카르보네이트를 유기 용매 중에서 반응시켜 그 수용성 비 펩티드 폴리머의 수용성 1-벤조트리아졸릴 카르보네이트 에스테르를 제조하는 방법에 대하여 기술하였다.
- <771> 그 활성 에스테르를 사용하여 단백질 또는 펩티드 등 생물학적 활성제를 가진 콘주게이트를 형성하였다.
- <772> 특허문헌 W0 99/45964 명세서에서는 하나의 생물학적 활성제와, 하나의 안정성 결합을 통해 폴리머 골격에 결합된 최소 하나의 말단을 가진 하나의 폴리머 골격으로 이루어진 하나의 활성화 수용성 폴리머로 구성된 하나의 콘주게이트에 있어서, 최소 하나의 말단이 분기형성 성분에 결합된 근접 반응성 기를 가진 하나의 분기형성 성분으로 구성되고, 그 생물학적 활성제가 그 근접 반응성기 중 최소 하나에 결합되는 것을 특징으로 하는 콘주게이트에 대하여 기재되어 있다.
- <773> 다른 분기 폴리(에틸렌 글리콜)은 특허문헌 W0 96/21469 명세서에 기재되어 있고, 특허문헌 USP 5,932,462 명세서에서는 반응성 작용기를 포함하는 하나의 분기 말단을 포함한 하나의 분기 PEG 분자로 형성된 하나의 콘주게이트에 대하여 기재되어 있다.
- <774> 그 유리 반응성기는 하나의 단백질 또는 펩티드 등 하나의 생물학적 활성종과 반응하여, 그 폴리(에틸렌 글리콜)과 그 생물학적 활성종 사이에 콘주게이트를 형성하는데 이용할 수 있다.
- <775> 특허문헌 USP 5,446,090 명세서에서는 하나의 2 작용성 PEG 링커와 그 PEG 링커 말단 각각에서 하나의 펩티드를 가진 콘주게이트를 형성할 때 그 사용에 대하여 기재되어 있다.
- <776> 분해할 수 있는 PEG 결합을 함유한 콘주게이트는 특허문헌 W0 99/34833; W0 99/14259 및 USP 6,348,558 명세서에 기재되어 있다.
- <777> 이와 같은 분해 가능한 결합은 본 발명에서 적용할 수 있다.
- <778> 위에서 설명한 폴리머 활성화에 대한 공지된 방법은 여기서 설명한 분기 폴리머의 형성과, 또 다른 중, 즉 당, 당 뉴클레오타이드 등에 이들의 분기 폴리머의 콘주게이션에 대하여도 본 발명의 구성에 유용하다.
- <779> 하나의 대표적인 수용성 폴리머는 폴리(에틸렌 글리콜), 즉 메톡시-폴리(에틸렌 글리콜)이다.
- <780> 본 발명에서 사용된 그 폴리(에틸렌 글리콜)은 어느 특정형태 또는 분자량 범위에 한정되어 있는 것이 아니다.

<781> 무분기(unbranched) 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 있어서, 그 분자량은 500 ~ 100,000이 바람직하다.

<782> 분자량 2000 ~ 60,000의 사용이 바람직하며, 분자량 약 5,000 ~ 약 40,000이 바람직하다.

<783> II. D. iii. 분기 수용성 폴리머(branched water soluble polymers)

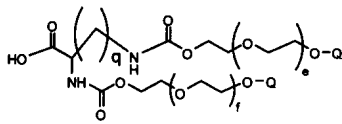
<784> 또 다른 예에서, 그 폴리(에틸렌 글리콜)은 하나 이상의 PEG 성분을 결합시킨 하나의 분기 PEG이다.

<785> 분기 PEG의 예는 다음 특허문헌과 참고문헌에 기재되어 있다: 특허문헌 USP 5,932,462; USP 5,919,455; USP 6,113,906; USP 5,183,660; WO 02/09766; 참고문헌(Kodera Y. Bioconjugate Chemistry 5: 283-288 (1994); 참고문헌(Yamasaki 등, Agric. Biol. Chem, 52: 2125-2127, 1998).

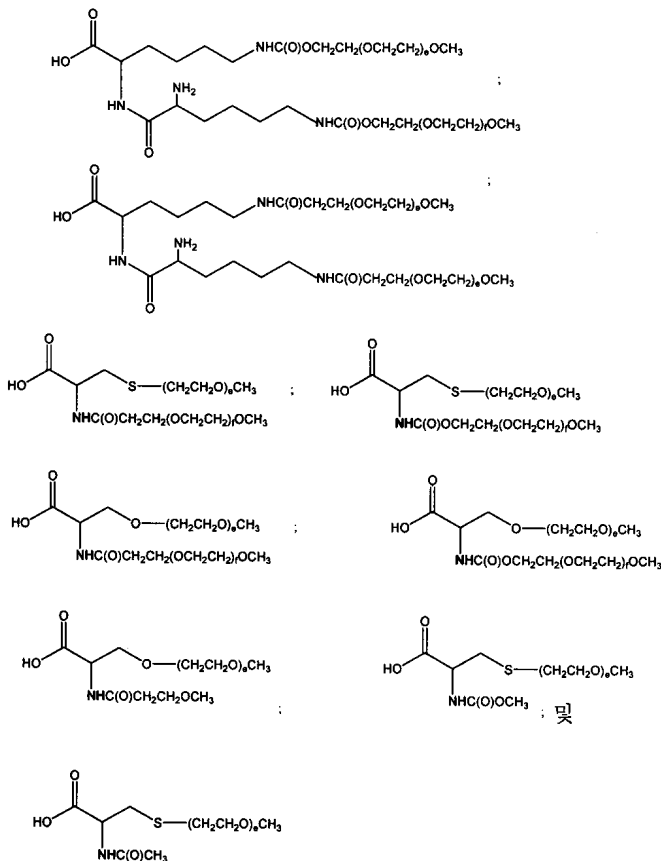
<786> 하나의 바람직한 예에서, 그 분기 PEG의 각 폴리(에틸렌 글리콜)의 분자량은 40,000 달톤(daltons) 또는 그 이하이다.

<787> 대표적인 폴리머 변형기에는 측쇄 함유 아미노산, 즉 세린, 시스테인, 라이산과, 소형 펩티드, 즉 lys-lys를 기재로 하는 구조를 포함한다.

<788> 대표적인 구조에는 다음 식을 포함한다:



<789>



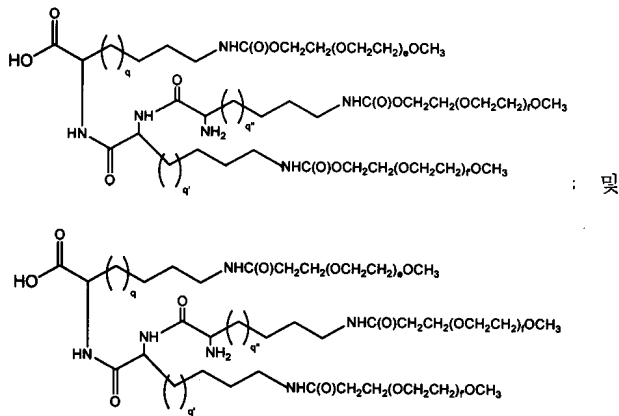
<790>

<791> 그 디-라이신 구조에서 유리아민은 하나의 아미드 또는 우레탄 결합을 통하여 하나의 PEG 성분으로 페질화(pegylation) 할 수도 있다는 것을 이 분야의 기술자들은 이해할 수 있다.

<792> 또 하나의 예에서, 그 폴리머 변형 성분은 하나의 트리-라이신 펩티드를 기재로 하는 하나의 분기 PEG 성분이다.

<793> 그 트리-라이신 펩티드는 모노-, 다-, 토리-, 또는 테트라페질화 할 수 있다.

<794> 이 예에 의한 대표적인 종은 아래에 나타낸 구조식을 가진다:



<795>

<796> 위 식에서,

<797> 지수 e, f 및 f'는 독립하여 1 ~ 2500의 정수를 선택한다.

<798> 지수, q, q' 및 q''는 독립하여 1 ~ 20의 정수를 선택한다.

<799> 본 발명에서 유용한 그 분기 폴리머는 이 분야의 기술자가 이해하고 있는 바와 같이, 위에서 설명한 구성 상에서의 변형(variations)을 포함한다.

<800> 예로서, 위에서 나타낸 디-라이신-PEG 콘주게이트는 3개의 폴리머 서브유닛(subunits)을 포함하며, 그 3번째 서브유닛은 위 구조에서 변경되지 않는 것과 같이 나타낸 α-아민에 결합되어 있다.

<801> 동일하게, 그 폴리머 변형 성분으로 바람직하게 라벨링(labeling) 한 3 또는 4개의 폴리머 서브유닛에 의해 기능화시킨 하나의 트리-라이신의 사용은 본 발명의 범위에 포함한다.

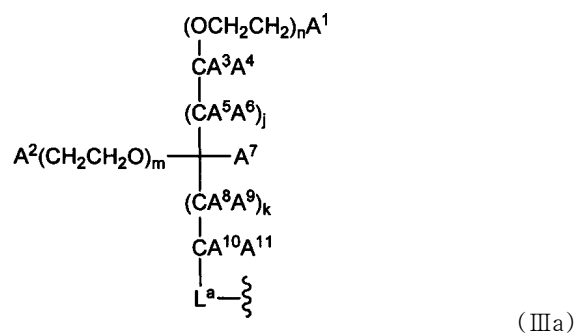
<802> 여기서 설명한 바와 같이, 본 발명의 콘주게이트에서 유용한 PEG는 선상 또는 분기상으로 할 수 있다.

<803> 본 발명의 이 예에 의한 그 분기 PEG 함유 펩티드 콘주게이트를 형성하는데 유용한 하나의 대표적인 전구물질(precursor)은 아래에 나타낸 구조식을 가진다:



<804>

<805> 본 발명의 이 예에 의한 상기 분기 PEG 함유 펩티드 콘주게이트를 형성하는데 유용한 또 다른 대표적인 전구물질은 아래에 나타낸 구조식을 가진다.

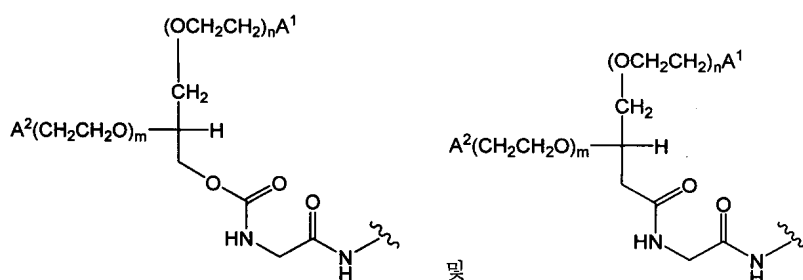


<806>

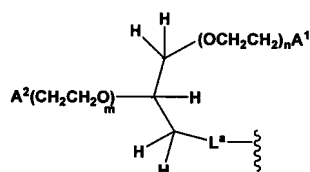
<807> 이 구조식에 의한 분기 폴리머 종은 주로 순수 수용성 폴리머이다.

<808> 여기서, X^{3'}는 하나의 이온화할 수 있는 기(즉, OH, COOH, H₂PO₄, HSO₃, HPO₃ 및 그 염 등) 또는 다른 반응성 작용기(즉, 위 참고문헌에서와 같음)를 포함하는 하나의 성분이다.

- <809> C는 탄소이다. X^5 , R^{16} 및 R^{17} 은 독립하여, 미 반응성(non-reactive) 기(즉, H, 비치환 알킬, 비치환 헤테로알킬)와 폴리머 암(arms)(즉, PEG)에서 선택한다.
- <810> X^2 및 X^4 는 생리적 상태하에서 주로 미반응성인 것이 바람직한 결합 프라그멘트이며, 같거나 다르다.
- <811> 하나의 대표적인 링커에는 방향족 성분 또는 에스테르 상분도 포함하지 않는다.
- <812> 또, 이들의 결합에는 생리적으로 관련된 상태하에서 분해하도록 형성된 하나 이상의 성분, 즉 에스테르, 디설파이드 등을 포함할 수 있다.
- <813> X^2 및 X^4 는 폴리머 암(arms) R^{16} 및 R^{17} 을 C에 결합한다.
- <814> $X^{3'}$ 가 하나의 링커, 당 및 링커-당 카세트 상에서 상보성의 반응성을 가진 하나의 반응성 작용기와 반응할 경우, $X^{3'}$ 는 결합 프라그멘트 X^3 의 하나의 성분으로 전환한다.
- <815> X^2 , X^3 및 X^4 에 대한 대표적인 결합 프라그멘트(fragments)는 S, SC(O)NH, HNC(O)S, SC(O)O, O, NH, NHC(O), (O)CNH 및 NHC(O)O, OC(O)NH, CH₂S, CH₂O, CH₂CH₂O, CH₂CH₂S, (CH₂)_oO, (CH₂)_oS 또는 (CH₂)_oY'-PEG를 독립하여 선택적으로 포함한다.
- <816> 여기서, Y'는 S, NH, NHC(O), C(O)NH, NHC(O)O, OC(O)NH 또는 O이며, 지수 o는 1 ~ 50의 정수이다.
- <817> 하나의 대표적인 예에서, 그 결합 프라그멘트 X^2 및 X^4 는 같거나 다른 프라그멘트이다.
- <818> 하나의 대표적인 예에서, 그 전구물질(식 III) 또는 하나의 그 활성화 유도체는 당성분, 즉 하나의 아민 상에서 $X^{3'}$ 와 상보성인 반응성이 있는 하나의 기 사이의 반응을 통해 하나의 당, 하나의 활성화당 또는 하나의 당뉴클레오타이드와 반응함으로써 결합되어 있다.
- <819> 또, $X^{3'}$ 는 하나의 전구물질 상에서 하나의 반응성 작용기와 함께 링커 L에 반응한다.
- <820> 구조식 I 및 II의 R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 또는 $R^{6'}$ 중 1개 이상에는 분기 폴리머 변형 성분을 포함할 수 있으며, 또는 이 변형 성분이 링커 L를 통해 결합된다.
- <821> 하나의 대표적인 예에서, 그 폴리머 변형기는 다음에 나타난 구조식에 의한 하나의 구조를 가진다:

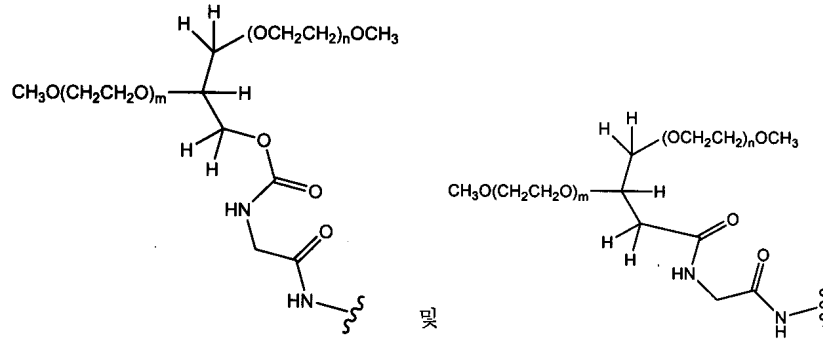


- <822>
- <823> 상기 구조식에 의한 또 다른 대표적인 예에서, 그 분기 폴리머는 다음에 나타난 구조식에 의한 하나의 구조를 가진다:

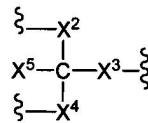


- <824>
- <825> 하나의 대표적인 예에서, A^1 및 A^2 는 각각 -OH 및 -OCH₃에서 선택한다.

이 예에 의한 대표적인 폴리머 변형기에는 다음 구조를 포함한다:

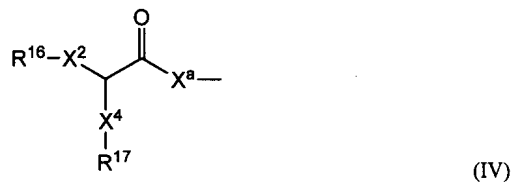


하나의 대표적인 예에서, 아래에 나타낸 성분은 링커 암(linker arm) L이다.



이 예에서, 하나의 대표적인 링커는 하나의 천연산 또는 비천연산의 아미노산, 아미노산 아날로그 또는 아미노산 유사체 또는 하나 이상의 상기 종(species)에서 형성된 하나의 소형 펩티드(small peptide)에서 유도된다.

예로서, 본 발명의 화합물에서 확인되는 어느 분기 폴리머는 아래에 나타낸 구조식을 가진다:



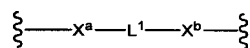
위 구조식에서, X^a는 분기 폴리머 변형성분의 전구물질 상에서 하나의 반응성 작용기, 즉 X³와 당 성분 또는 하나의 전구물질 상에서 하나의 반응성 작용기를 하나의 링커에 반응시켜 형성되는 하나의 결합 프라그먼트이다.

예로서, X³가 하나의 카르복실산인 경우 이것은 활성화시켜, 하나의 아미노-사카리드(즉, Sia, GalNH₂, GlcNH₂, ManNH₂ 등)에서 현수된 하나의 아민기에 직접 결합함으로써, 하나의 아미드인 X^a를 형성한다.

대표적인 추가 반응성 작용기와 활성화 전구물질을 아래에서 설명한다.

지수 c는 1 ~ 10의 정수를 나타내고, 기타 부호는 위에서 설명한 것과 같이 동일한 동정(identity)을 가진다.

또 다른 대표적인 예에서, X^a는 아래에 나타낸 또 다른 링커로 형성된 하나의 결합 성분이다:



위에서 나타낸 링커에서, X^b는 하나의 제 2 결합 프라그먼트이며, X^a에 대하여 설명한 그룹(groups)에서 독립적으로 선택하고, L와 유사한다.

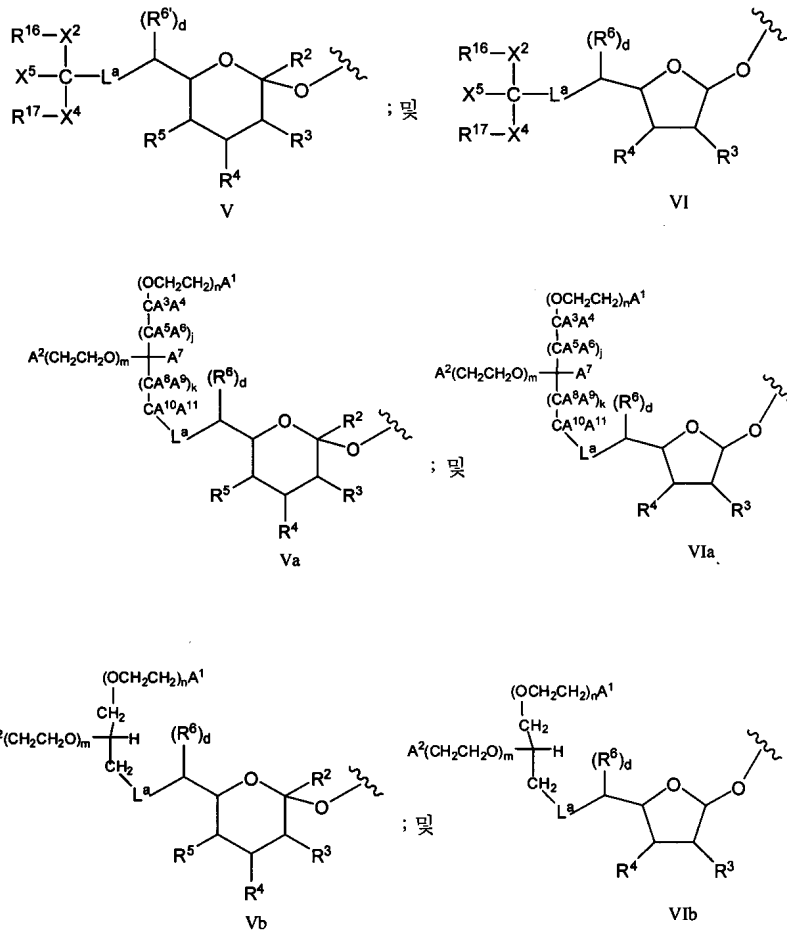
L¹은 하나의 결합, 치환 또는 비치환 알킬 또는 치환 또는 비치환 헤테로알킬이다.

X^a 및 X^b에 대한 대표적인 종(species)에는 S, SC(O)NH, HNC(O)S, SC(O)O, O, NH, NHC(O), C(O)NH 및 NHC(O)O 및 OC(O)NH를 포함한다.

또 다른 대표적인 예에서, X⁴는 R¹⁷에 결합하는 하나의 펩티드 결합이며, 그 R¹⁷은 하나의 아미노산, 다-펩티드(즉, Lys-Lys) 또는 트리-펩티드(즉, Lys-Lys-Lys)이며, 이 펩티드에서는 그 알파-아민 성분 및/또는 측쇄 헤테

로 원자가 하나의 폴리머 변형성분으로 변형시킨다.

<843> 또 하나의 대표적인 예에서, 본 발명의 펩티드 콘주게이트는 하나의 성분, 즉 R^{15} 성분을 포함하며, 그 R^{15} 는 아래에 나타난 구조식에서 선택한 하나의 구조식을 가진다:



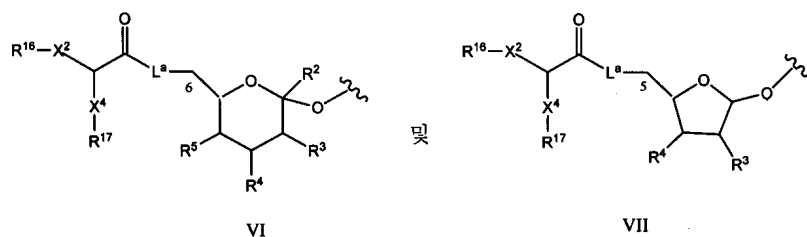
<844> 위 구조식에서, 여러 가지 부호에 의해 나타난 래디컬의 동정(identity)은 위에서 설명한 것과 동일하다.

<845> L^a 는 L 및 L^1 에 대하여 위에서 설명한 하나의 링커 또는 하나의 결합이다. 즉 치환 또는 비치환 알킬 또는 비치환 또는 비치환 헤테로알킬 성분이다.

<846> 하나의 대표적인 예에서, L^a 는 구조식에서 나타난 바와 같이 폴리머 변형성분으로 기능화하는 시알산 측쇄의 하나의 성분이다.

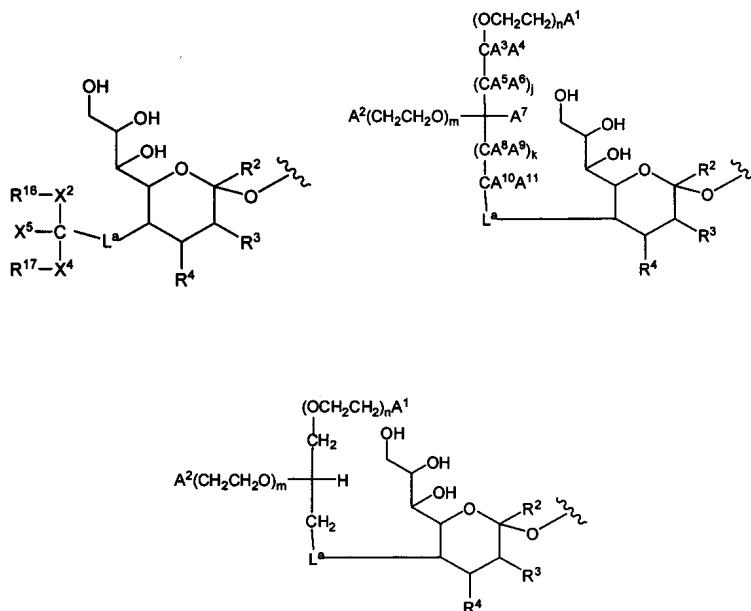
<847> 대표적인 L^a 성분에는 하나 이상의 OH 또는 NH2를 포함하는 치환 또는 비치환 알킬 사슬이 있다.

<848> 또 다른 대표적인 예에서, 본 발명은 하나의 성분, 즉 구조식(VI) 및 (VII)을 가진 R^{15} 성분을 가진 펩티드 콘주게이트를 제공한다.



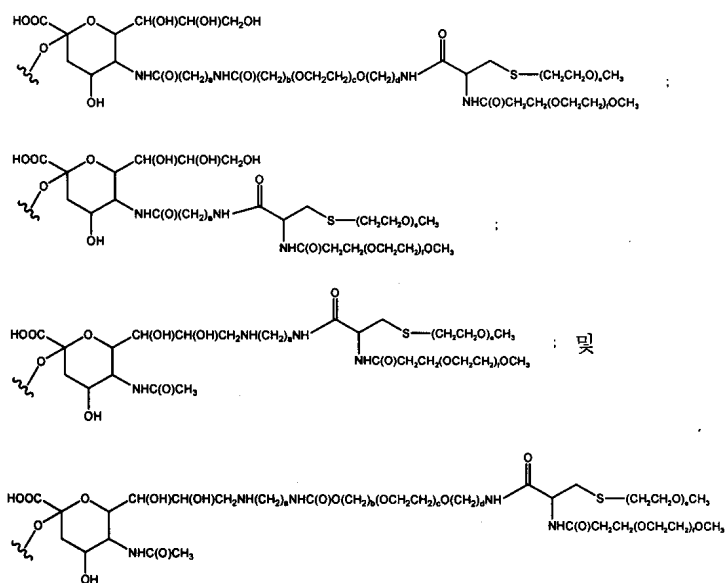
<850> 위 식에서, 여러 가지의 부호를 나타낸 래디컬의 동정(identity)은 위에서 설명한 것과 동일하다.

- <852> 이 분야의 기술자들에 의해 알 수 있는 바와 같이,
- <853> 구조식 VI 및 VII에서의 링커 암(linker arm)은 위에서 설명한 다른 변형당에 동일하게 적용할 수 있다.
- <854> 대표적인 예에서, 위 구조식 VI 및 VII의 종(species)은 위에서 설명한 글리칸 구조에 결합한 R¹⁵이다.
- <855> 또 하나의 다른 대표적인 예에서, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트에는 아래에 나타난 구조식에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 구조식을 가진 R¹⁵ 성분을 포함한다.



- <856> 위 구조식에서,
- <857> 래디컬의 동정(identity)은 위에서 설명한 것과 같다.
- <859> L^a에 대한 하나의 대표적인 종(species)은 -(CH₂)_jC(O)NH(CH₂)_hC(O)NH-이며, 여기서 지수 h와 j는 독립하여 0 ~ 10의 정수에서 선택한다.
- <860> 하나의 다른 대표적인 종은 -C(O)NH-이다.
- <861> 그 지수 m 및 n은 0 ~ 5,000에서 독립하여 선택한 정수이다.
- <862> A¹, A², A³, A⁴, A⁵, A⁶, A⁷, A⁸, A⁹, A¹⁰ 및 A¹¹은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헥테로알킬, 치환 또는 비치환 시클로알킬, 치환 또는 비치환 헥테로시클로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헥테로아릴, -NA¹²A¹³, -OA¹² 및 SiA¹²A¹³에서 독립하여 선택한 멤버이다.
- <863> A¹² 및 A¹³은 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헥테로알킬, 치환 또는 비치환 시클로알킬, 치환 또는 비치환 헥테로시클로 헥테로아릴, 치환 또는 비치환 아릴 및 치환 또는 비치환 헥테로아릴에서 독립하여 선택한 멤버이다.
- <864> 위에서 설명한 본 발명의 예는 그 폴리머가 하나의 수용성 폴리머, 특히 폴리(에틸렌 글리콜)("PEG"), 즉 메톡시-폴리(에틸렌 글리콜)인 종(species)을 참고로 예시한다.
- <865> 하나의 대표적인 폴리머로서 PEG를 사용하여 구체적으로 기재하는 설명과 여러 가지의 구성을 명백하게 하기 위한 다음에 이어지는 설명 섹션의 주 구성은 PEG 이외의 하나의 폴리머를 사용하는 종에 동일하게 적용할 수 있다는 것을 이 분야의 기술자에 의해 이해할 수 있다.
- <866> 어느 분자량, 즉 1KDa, 2KDa, 5KDa, 10KDa, 15KDa, 20KDa, 25KDa, 30KDa, 35KDa, 40KDa 및 45KDa의 PEG는 본 발명에서 유용하다.

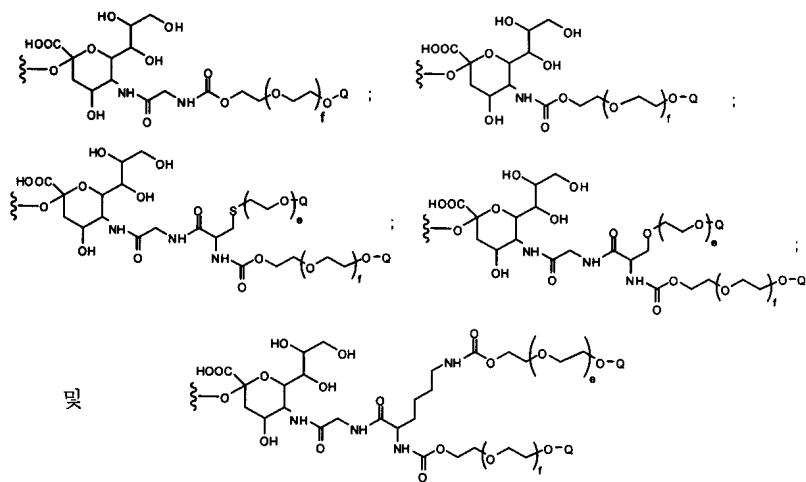
<867> 하나의 대표적인 예에서, 그 R¹⁵ 성분은 아래에 나타낸 구조 그룹에서 선택한 하나의 멤버이다:



<868>

<869> 상기 구조의 각각에서 링커 프라그먼트-NH(CH₂)_a-는 존재할 수도 있고, 또는 없을 수도 있다.

<870> 다른 대표적인 예에서, 그 펩티드 콘주게이트에는 아래에 나타낸 구조식의 그룹에서 선택한 하나의 R¹⁵ 성분을 포함한다.



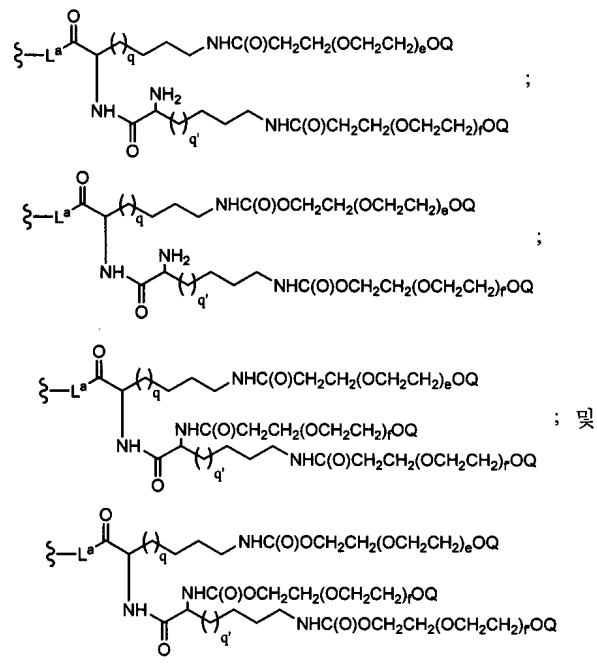
<871>

<872> 위에서 나타낸 각각의 구조식에서, 지수 e 및 f는 독립하여 1 ~ 2500의 정수에서 선택한다.

<873> 또 다른 대표적인 예에서, e 및 f는 약 1KDa, 2KDa, 5KDa, 10KDa, 15KDa, 20KDa, 25KDa, 30KDa, 35KDa, 40KDa 및 45KDa인 하나의 PEG 성분을 구성하도록 선택한다.

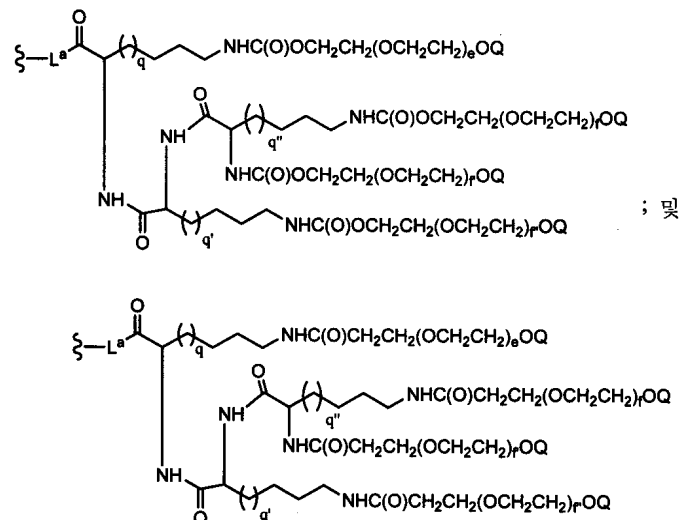
<874> 부호 Q는 치환 또는 비치환 알킬(즉, C₁-C₆ 알킬, 즉 메틸), 치환 또는 비치환 헤테로알킬 또는 H를 나타낸다.

<875> 다른 분기 폴리머는 디-라이신(Lys-Lys) 펩티드를 기재로한 구조, 즉 아래에 나타낸 구조식과,



<876>

<877> 트리-라이신 펩티드(Lys-Lys-Lys)를 기재로 한 구조, 즉 아래에 나타낸 구조식을 가진다:

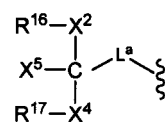


<878>

<879> 위에서 나타낸 구조식 각각에서, 지수 e, f, f' 및 f''은 독립하여 1 ~ 2500에서 선택한 정수를 나타낸다.

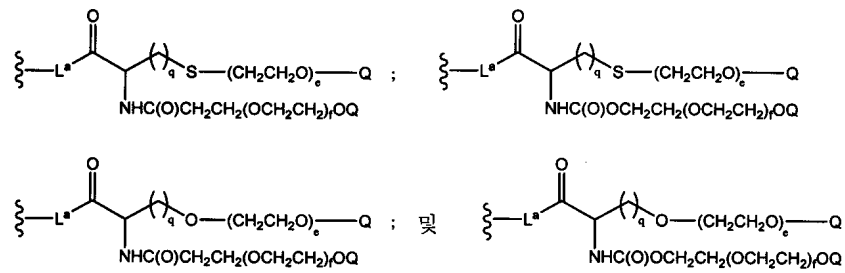
<880> 지수 q, q' 및 q''는 독립하여 1 ~ 20에서 선택한 정수를 나타낸다.

<881> 또 다른 대표적인 예에서, 다음 구조식을 나타낸 변형기는



<882>

<883> 다음에 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 구조식이다:

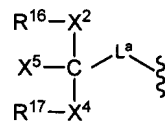


<884>

<885> 위 구조식에서, Q는 H 및 치환 또는 비치환 C₁-C₆ 알킬에서 선택한 하나의 멤버이다.

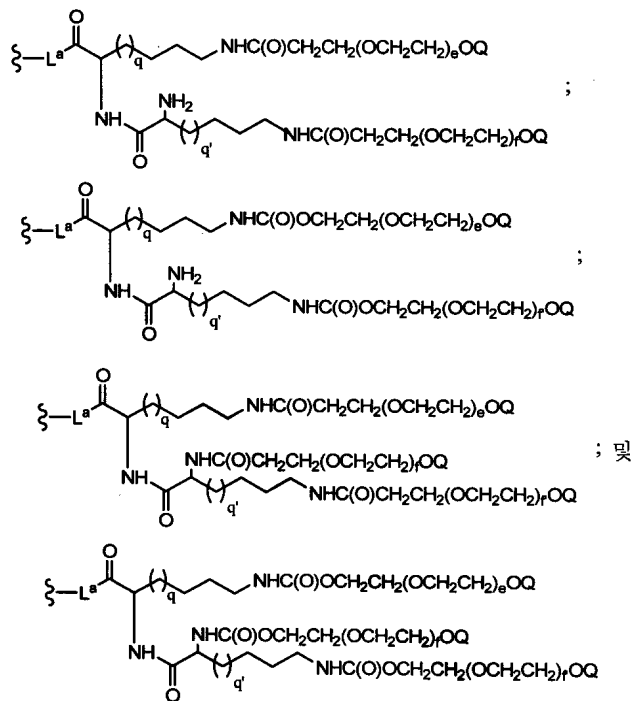
<886> 지수 e 및 f는 1 ~ 2500에서 독립하여 선택한 정수이고, 지수 q는 0 ~ 20에서 선택한 정수이다.

<887> 또 다른 대표적인 예에서, 다음에 나타낸 구조식의 변형기는



<888>

<889> 다음에 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 구조식을 가진다:

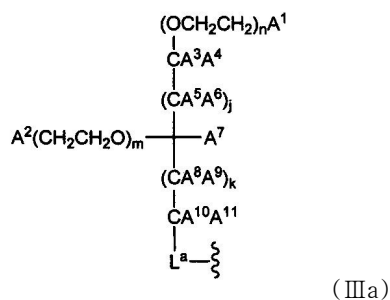


<890>

<891> 위 구조식에서, Q는 H 및 치환 또는 비치환 C₁-C₆ 알킬에서 선택한 하나의 멤버이다.

<892> 지수 e, f 및 f'는 1 ~ 2500에서 독립하여 선택한 정수이고, 지수 q 및 q'는 1 ~ 20에서 선택한 정수이다.

<893> 또 다른 대표적인 예에서, 그 분기폴리머는 아래에 나타낸 구조식에 의한 하나의 구조를 가진다:



<894>

<895> 위 구조식에서,

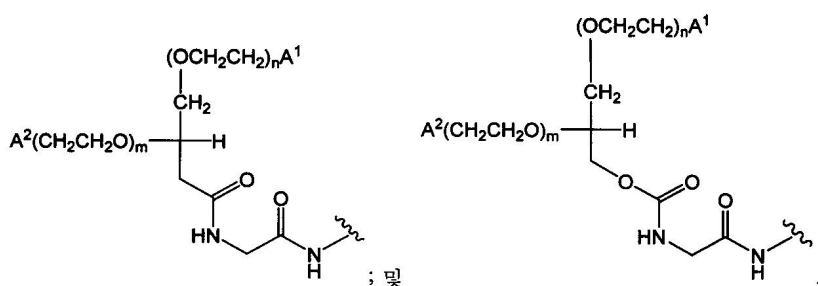
<896> 지수 m 및 n은 0~5000에서 독립하여 선택한 정수이다.

<897> A¹, A², A³, A⁴, A⁵, A⁶, A⁷, A⁸, A⁹, A¹⁰ 및 A¹¹은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 시클로알킬, 치환 또는 비치환 헤테로시클로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, -NA¹²A¹³, -OA¹² 및 -SiA¹²A¹³에서 독립하여 선택한 멤버이다.

<898> A¹² 및 A¹³은 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 시클로알킬, 치환 또는 비치환 헤테로시클로알킬, 치환 또는 비치환 아릴 및 치환 또는 비치환 헤테로아릴에서 독립하여 선택한 멤버(members)이다.

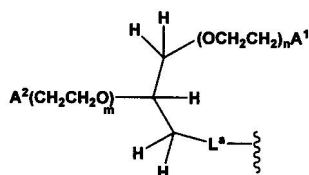
<899> 구조식 IIIa는 구조식 III의 하나의 서브셋(subset)이다. 구조식 IIIa에 의해 설명한 구조는 또 구조식 III에 의해 포함한다.

<900> 하나의 대표적인 예에서, 그 폴리머 변형기는 아래에 나타난 구조식에 의한 하나의 구조를 가진다:



$\langle 901 \rangle$

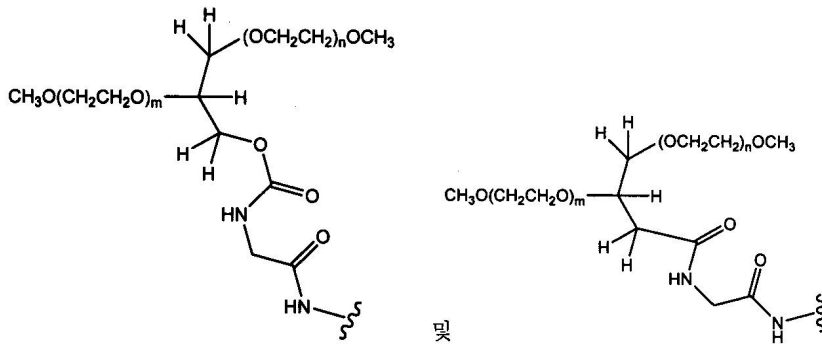
<902> 상기 구조식에 의한 또 다른 대표적인 예에서, 그 분기폴리머는 아래에 나타낸 구조식에 의한 하나의 구조를 가진다:



<903>

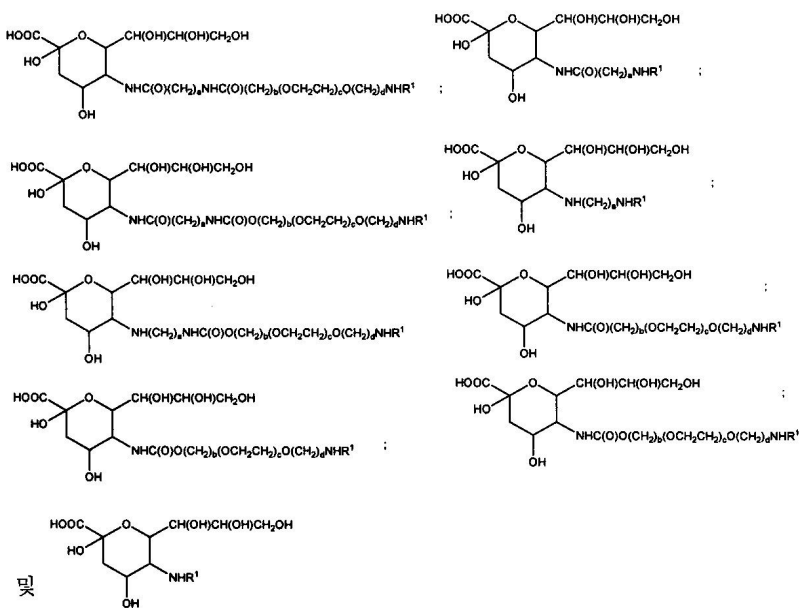
<904> 하나의 대표적인 예에서, A^1 및 A^2 는 -OH 및 -OCH₃에서 독립하여 선택한 멤버이다.

<905> 이 예에 의한 대표적인 폴리머변형기는 아래에 나타낸 구조식을 가진다:



<906>

<907> 하나의 예에서, 그 변형당은 시알산이며, 본 발명에서 유용한 선택된 변형당 화합물은 아래에 나타낸 구조식을 가진다:



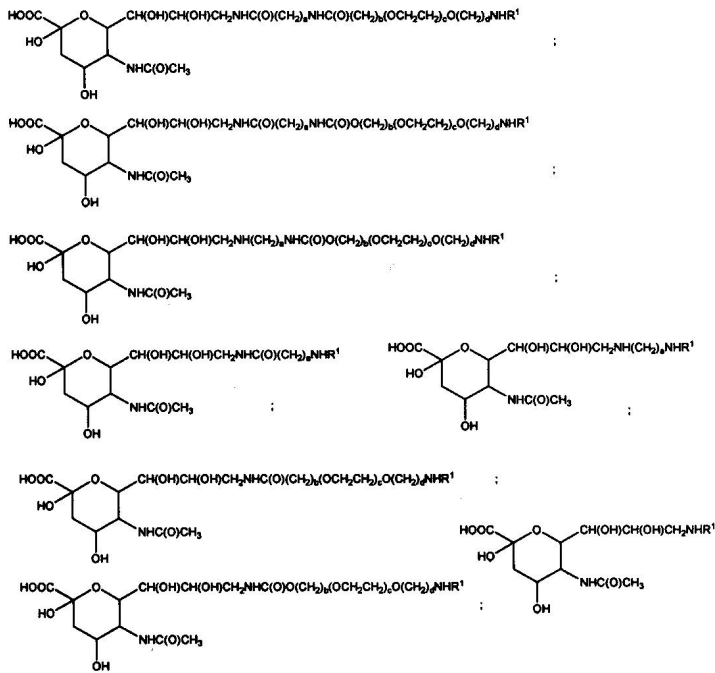
<908>

<909> 위 구조식에서,

<910> 지수 a, b 및 d는 0~20에서의 정수이다. 지수 e는 1~2500에서의 정수이다.

<911> 위에서 설명한 구조들은 R¹⁵의 화합물로 할 수 있다.

<912> 또 다른 예에서, 그 당의 1급 히드록실 성분은 그 변형기로 기능화시킨다. 예로서, 시알산의 그 9-히드록실은 그 대응하는 아민으로 전환시킬 수 있고, 기능화시킬 수 있어 본 발명에 의한 하나의 화합물을 구성한다. 이 예에 의한 구조식은 아래에 나타낸 구조식을 포함한다:



<913>

<914>

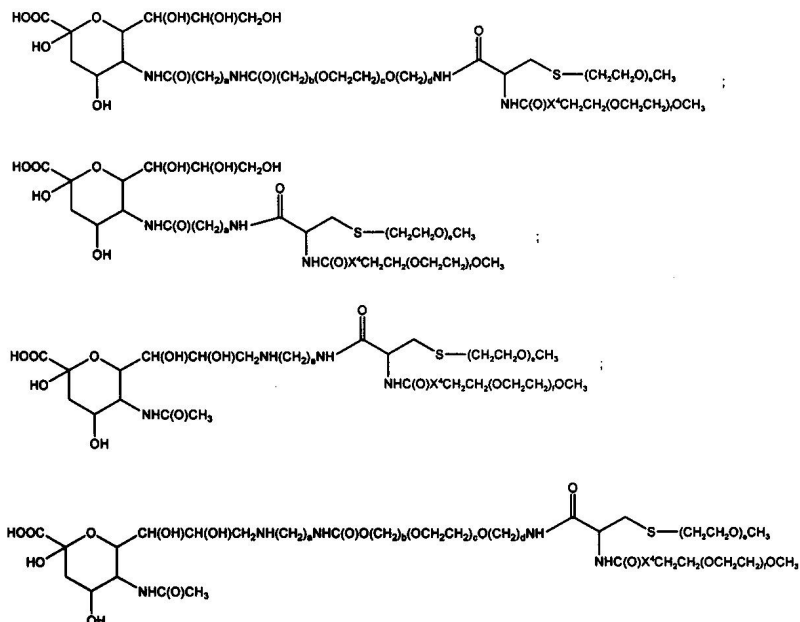
위에서 설명한 구조체들은 R¹⁵의 성분으로 할 수 있다.

<915>

이 분야의 기술자들이 이해하고 있는 바와 같이 본 발명을 PEG를 기준으로 하여 앞 섹션에서 예시한 바 있으나, 폴리머 변형성분은 여기서 설명한 화합물과 방법에서 유용하다.

<916>

선택한 예에서, R¹ 또는 C-R¹은 하나의 분기 PEG이며, 예로서 위에서 설명한 종들(species) 중 하나이다. 하나의 대표적인 예에서, 그 분기 PEG 구조체는 하나의 시스테인펩티드를 기재로 한다. 이 예에 의해 구체적으로 설명한 변형당은 아래에 나타난 구조식을 포함한다:



<917>

<918>

위 구조식에서,

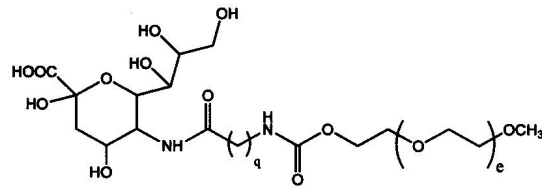
<919>

X⁴는 하나의 결합 또는 0이다. 상기 구조의 각각에서, 알킬아민링크 -(CH₂)_nNH-는 존재할 수 있거나, 없을 수도 있다. 위에서 설명한 구조들은 R¹⁵/R^{15'}의 성분으로 할 수 있다.

<920>

여기서 설명한 바와 같이, 본 발명에서 유용한 폴리머-변형시알산은 또 선상구조로 할 수도 있다. 이와 같이,

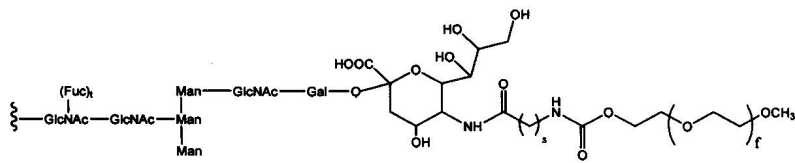
본 발명은 아래에 나타낸 구조식의 하나의 구조에서 유도된 하나의 시알산 성분을 포함하는 콘주게이트를 제공한다.



위 구조식에서, 지수 q 및 e 는 위에서 설명한 것과 같다.

대표적인 변형당은 수용성 또는 수불용성폴리머로 변형시킨다. 유용한 폴리머의 예는 아래에서 더 예시한다.

또 다른 대표적인 예에서, 그 펩티드는 곤충세포에서 유도하며, GlcNAc 및 Gal을 그 만노오스코어(core)에 부가하여 리모델링(remodeling)하고, 하나의 선상PEG 성분을 가진 하나의 시알산을 사용하여 글리코페질화시켜, 아래에 나타낸 구조식을 가진 최소 하나의 성분으로 이루어진 하나의 인자 VII/인자VIIa 펩티드를 제공한다.



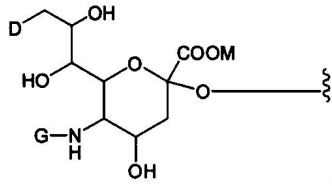
위 구조식에서,

지수 t 는 0~1의 정수이다.

지수 s 는 1~10의 정수이다.

지수 f 는 1~2500의 정수이다.

하나의 예에서, 본 발명은 아래에 나타낸 구조식을 가진 글리코실결합기로 이루어진 하나의 펩티드 콘주게이트를 제공한다:



위 구조식에서,

D 는 $-OH$ 및 $R^1-L-NH-$ 에서 선택한 하나의 멤버이고,

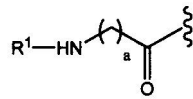
R^1 은 하나의 직쇄 폴리(에틸렌글리콜)잔기와 분기 폴리(에틸렌글리콜)잔기에서 선택한 하나의 멤버이며,

M 은 H , 하나의 염 반대이온 및 하나의 단일음전하에서 선택한 하나의 멤버이고,

L 은 하나의 결합, 치환 또는 비치환 알킬 및 치환 또는 비치환 헤테로알킬에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 링 커이다.

하나의 대표적인 예에서, D 가 OH 인 경우 G 는 R^1-L 이다. 또 다른 대표적인 예에서, G 가 $-C(=O)(C_1-C_6)$ 알킬인 경우, D 는 $R^1-L-NH-$ 이다.

<938> 하나의 대표적인 예에서, $L-R^1$ 은 아래에 나타낸 구조식을 가진다:

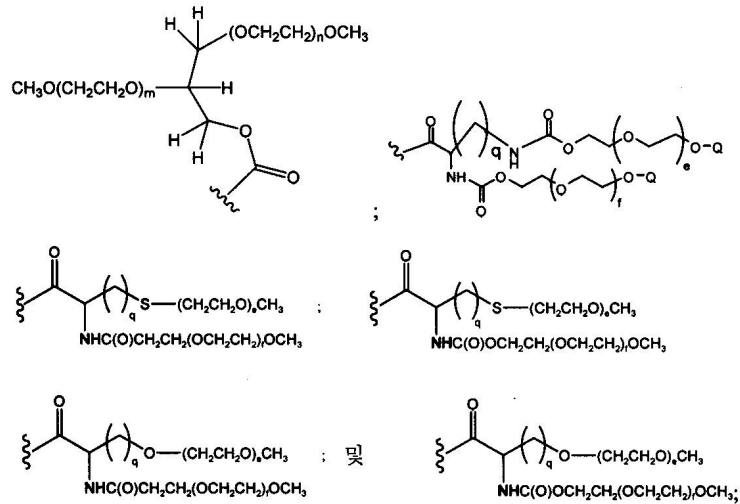


<939>

<940> 위 구조식에서,

<941> a는 0~20에서 선택한 정수이다.

<942> 하나의 대표적인 예에서, R^1 은 아래에 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 구조체를 가진다:



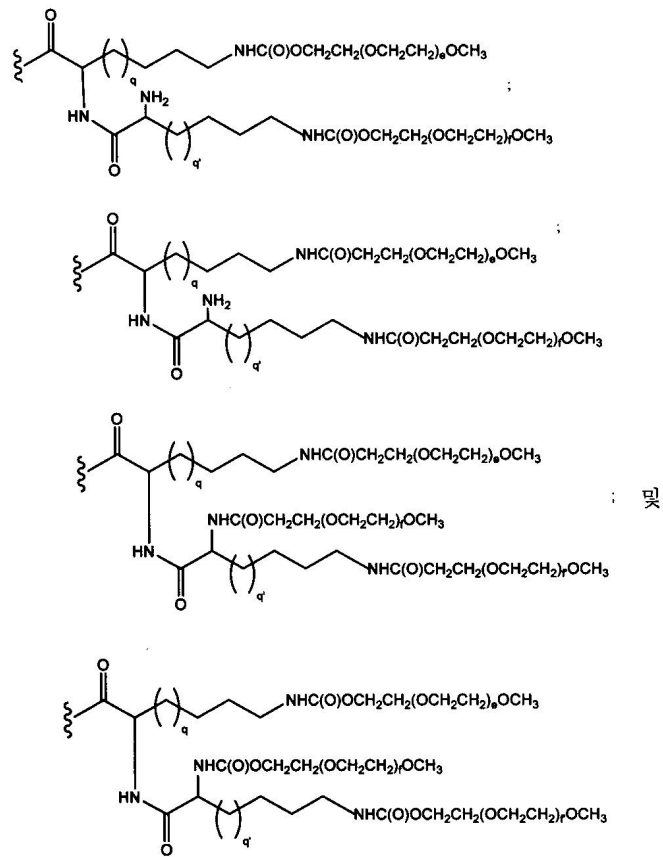
<943>

<944> 위 구조식에서,

<945> 지수 e, f, m 및 n은 1~2500에서 독립하여 선택한 정수이다.

<946> 지수 q는 0~20에서 선택한 정수이다.

<947> 하나의 대표적인 예에서, R^1 은 아래에 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 구조체이다.



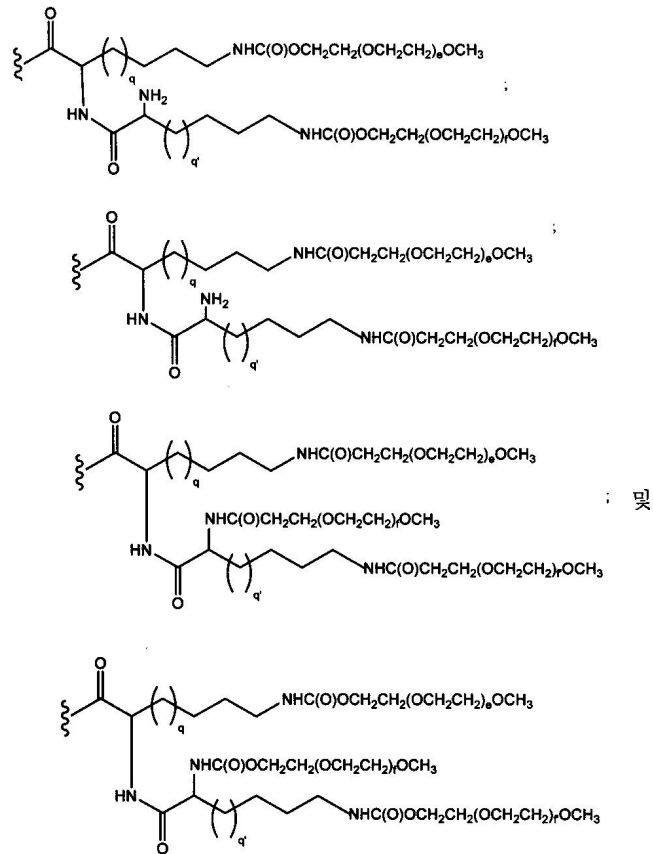
<948>

<949> 위 구조식에서,

<950> 지수 e , f 및 f' 는 1~2500에서 독립하여 선택한 정수이다.

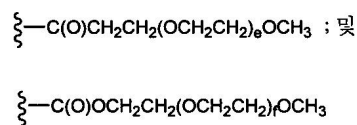
<951> 지수 q 및 q' 는 1~20에서 독립하여 선택한 정수이다.

<952> 또 다른 대표적인 예에서, R¹은 아래에 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 구조체이다.

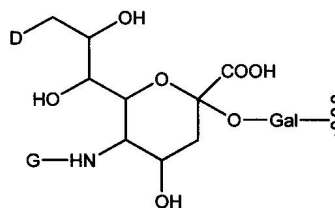


<953> 위 구조식에서,
 <954> 지수 e, f 및 f'는 1~2500에서 독립하여 선택한 정수이다.
 <955> 지수 q 및 q'는 1~20에서 독립하여 선택한 정수이다.

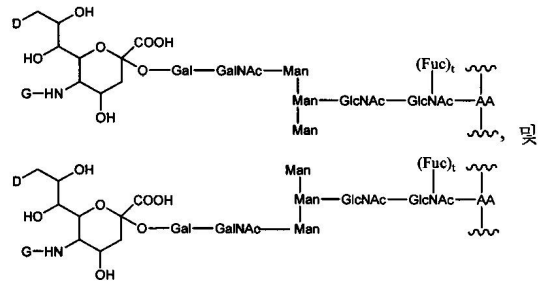
<957> 또 다른 대표적인 예에서, R¹은 아래에 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 구조체이다:



<958> 위 구조식에서,
 <959> 지수 e 및 f는 1~2500에서 독립하여 선택한 정수이다.
 <961> 또 다른 대표적인 예에서, 그 글리코실링커는 아래에 나타낸 구조식을 가진다.



<962> 또 다른 대표적인 예에서, 그 펩티드 콘주게이트는 아래에 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 구조식에 의한 상
 <963> 기 글리코실링커 중 최소 하나를 구성한다:



<964>

<965>

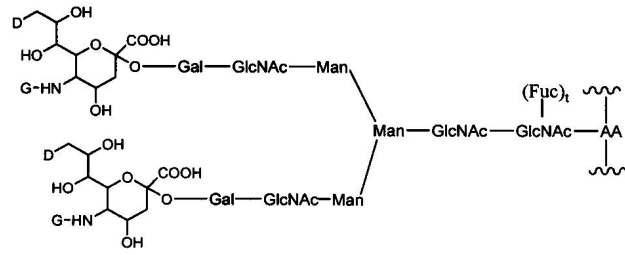
위 구조식에서,

<966>

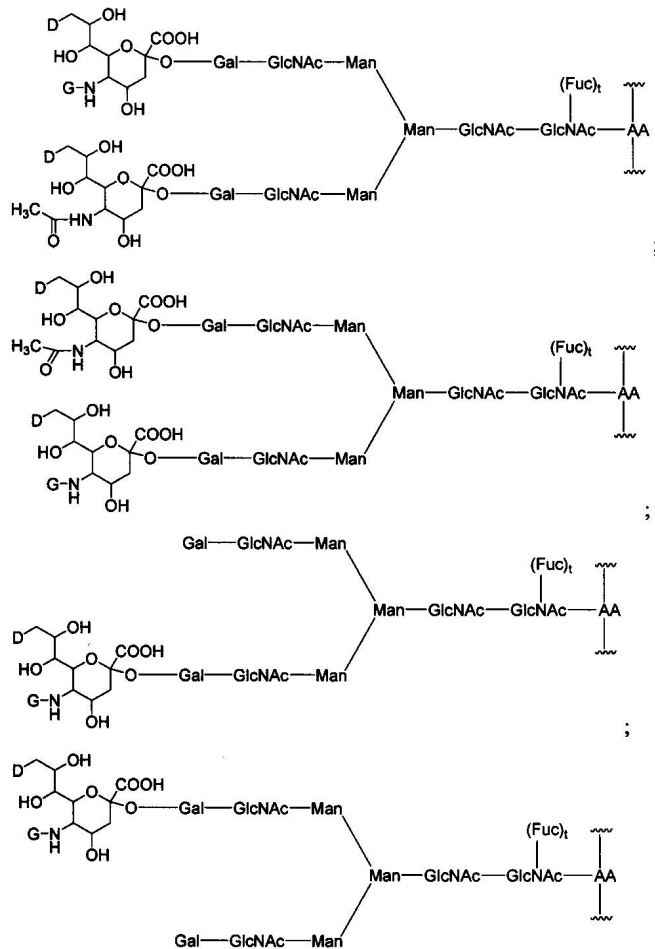
AA는 상기 펩티드 콘주게이트의 하나의 아미노산 잔기이고, 지수 t는 0 및 1에서 선택한 정수이다.

<967>

또 다른 대표적인 예에서, 그 펩티드 콘주게이트는 아래에 나타난 구조식에서 독립적으로 선택한 하나의 멤버인 하나의 구조체를 가진다:



<968>



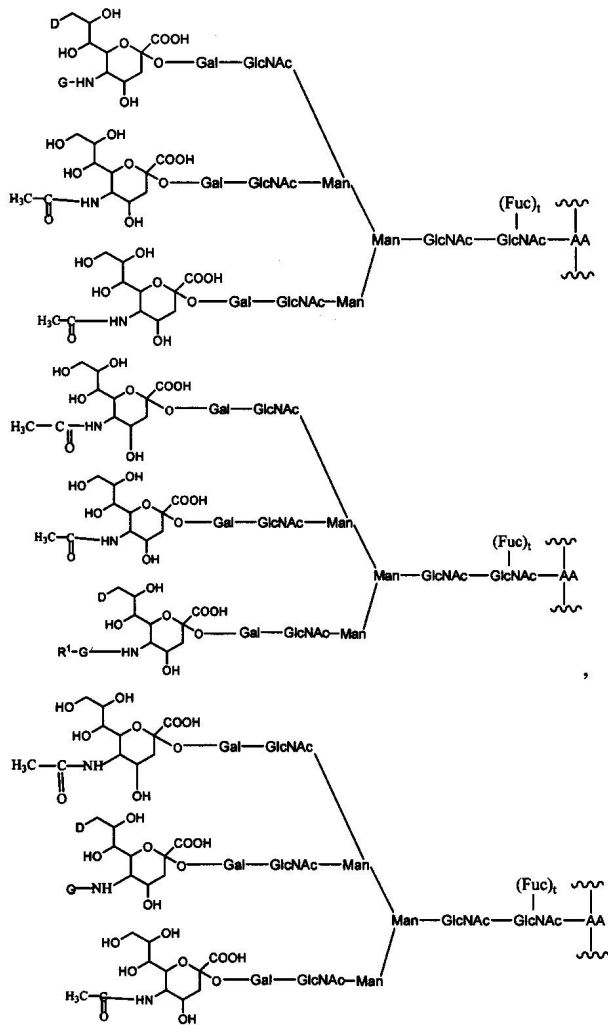
<969>

<970>

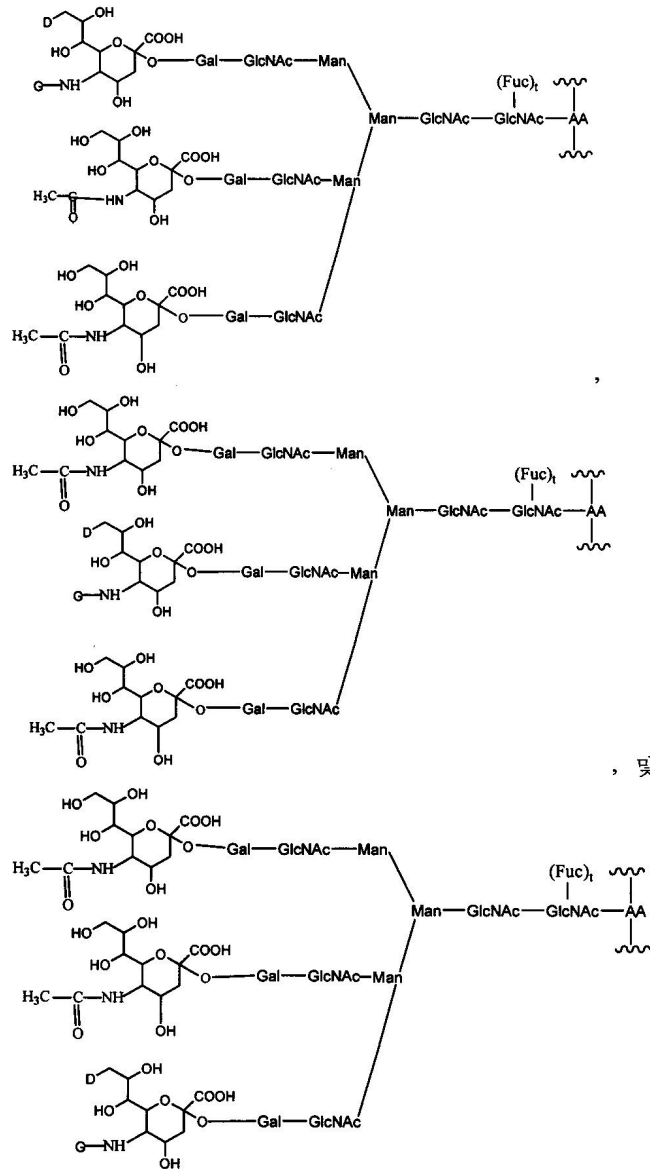
위 구조식에서,

<971> AA는 상기 펩티드 콘주게이트의 하나의 아미노산 잔기이고, 지수 t는 0 및 1에서 선택한 정수이다.

<972> 또 다른 대표적인 예에서, 그 펩티드 콘주게이트는 아래에 나타난 구조식에서 선택한 하나의 구조식에 의한 상기 글리코실링커 중 최소 하나를 구성한다:



<973>



<974>

<975>

위 구조식에서,

<976>

AA는 상기 펩티드 콘주게이트의 하나의 아미노산 잔기이고, 지수 t는 0 및 1에서 선택한 정수이다.

<977>

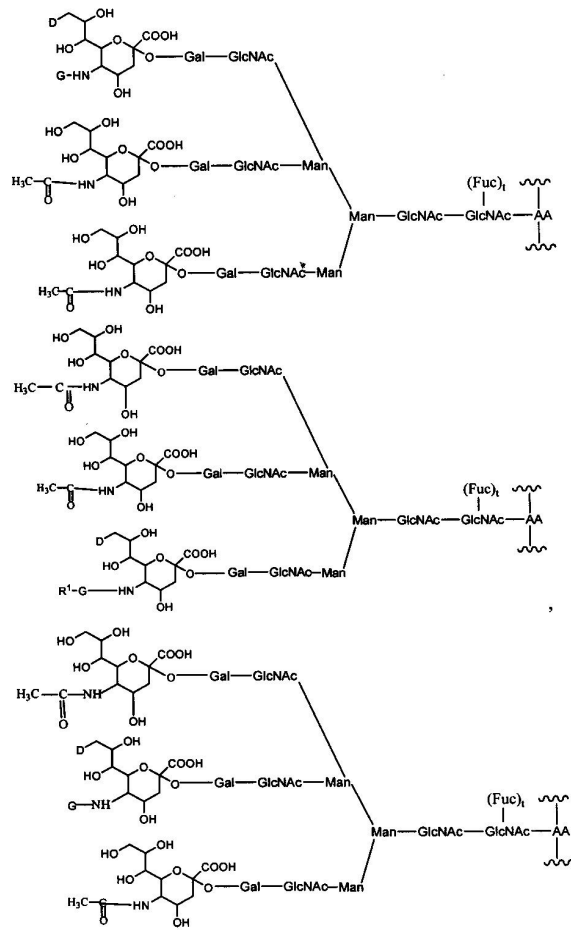
하나의 대표적인 예에서, G를 함유하지 않은 시알릴 성분의 0과 2개에서 선택한 하나의 멤버는 존재하지 않는다.

<978>

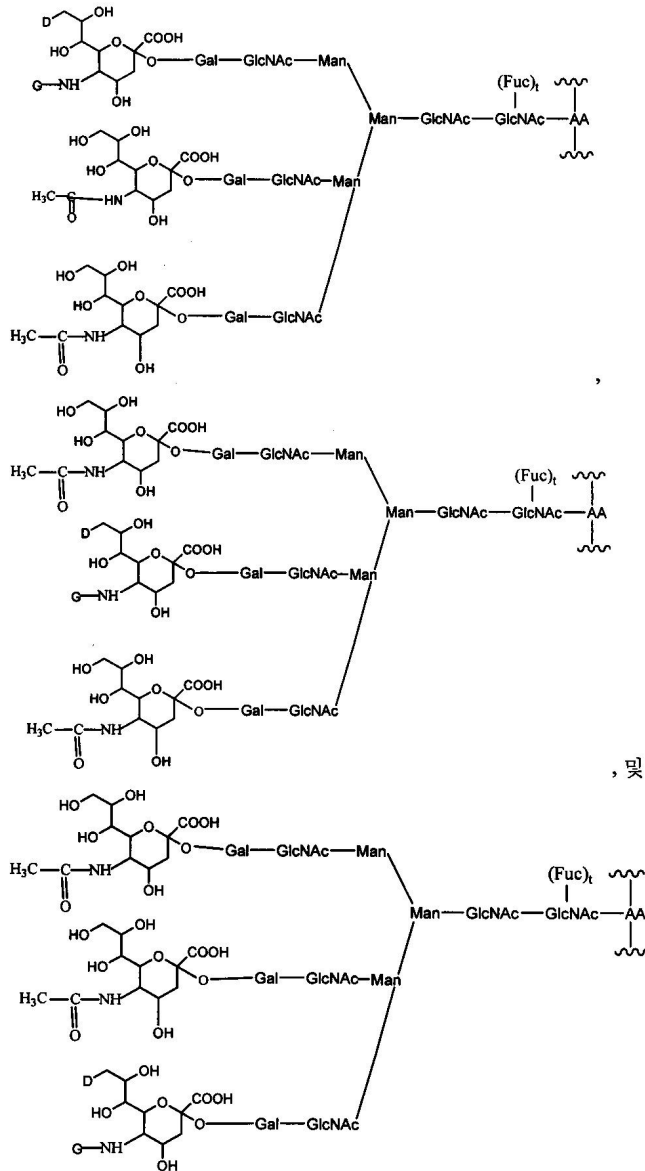
하나의 대표적인 예에서, G를 함유하지 않은 시알릴 성분의 1과 2개에서 선택한 하나의 멤버는 존재하지 않는다.

<979>

또 다른 대표적인 예에서, 그 펩티드 콘주게이트는 아래에 나타난 구조식에서 선택한 하나의 구조식에 의한 상기 글리코실 링커 중 최소 하나를 구성한다:



<980>



<981>

<982>

위 구조식에서,

<983>

AA는 상기 펩티드 콘주게이트의 하나의 아미노산 잔기이고, 지수 t는 0과 1에서 선택한 정수이다.

<984>

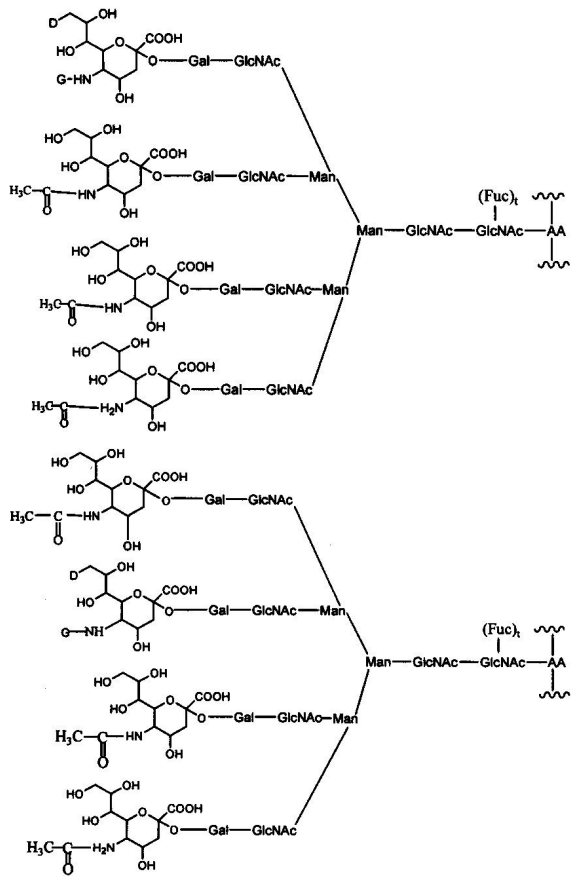
하나의 대표적인 예에서, G를 함유하지 않은 시알릴성분의 0과 2개에서 선택한 하나의 멤버는 존재하지 않는다.

<985>

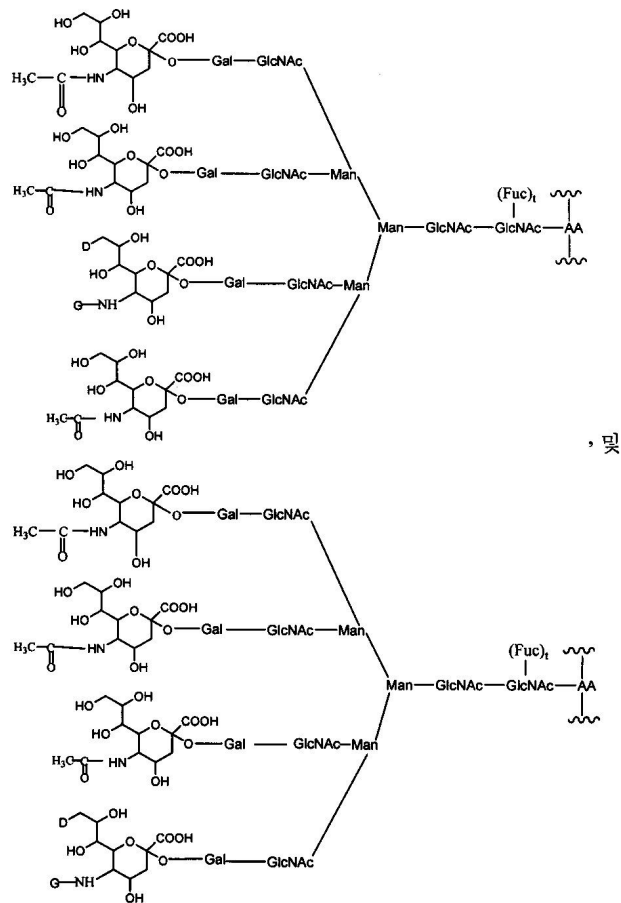
하나의 대표적인 예에서, G를 함유하지 않은 시알릴성분의 1과 2개에서 선택한 하나의 멤버가 존재하지 않는다.

<986>

또 다른 대표적인 예에서, 그 펩티드 콘주게이트는 아래에 나타난 구조식에서 선택한 하나의 구조식에 의한 상기 글리코실 링커 중 최소 하나를 구성한다:

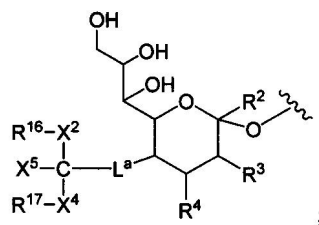


<987>



<988>

- <989> 위 구조식에서,
- <990> AA는 상기 펩티드 콘주게이트의 하나의 아미노산 잔기이고, 지수 t는 0과 1에서 선택한 정수이다.
- <991> 하나의 대표적인 예에서, G를 함유하지 않은 시알릴 성분의 0과 2개에서 선택한 하나의 멤버는 존재하지 않는다. 하나의 대표적인 예에서, G를 함유하지 않은 시알릴 성분의 1과 2개에서 선택한 하나의 멤버는 존재하지 않는다.
- <992> 또 다른 대표적인 예에서, 인자 VII/인자VIIa 펩티드는 아미노산 서열 SEQ.ID.NO:1을 가진다. 또 다른 대표적인 예에서, 글리코실링커는 세린과 트레오닌에서 선택한 하나의 아미노산 잔기에 의해 상기 인자 VII/인자 VIIa 펩티드에 결합된다.
- <993> 또 다른 대표적인 예에서, 그 아스파라긴 잔기는 N152, N322 및 그 조합에서 선택한 하나의 멤버이다.
- <994> 또 다른 대표적인 예에서, 그 인자 VIIa 펩티드는 하나의 바이오활성(bioactive) VIIa 펩티드이다.
- <995> 또 다른 대표적인 예에서, 그 글리코실링커는 하나의 아스파라긴 잔기인 하나의 아미노산을 통해 상기 인자 VII/인자VIIa 펩티드에 결합되어 있다.
- <996> 또 다른 대표적인 예에서, 본 발명은 하나의 적합한 숙주(host)에서 생산되는 하나의 인자VII/인자VIIa 펩티드를 제공한다. 또, 본 발명은 이 펩티드를 발현하는 방법을 제공한다. 또 다른 대표적인 예에서, 그 숙주는 하나의 포유동물 발현 시스템(mammalian expression system)이다.
- <997> 또 다른 대표적인 예에서, 본 발명은 필요시에 피검자의 응고잠재력 절충력(compromised clotting potency)에 특징이 있는 상태치료를 하는 방법에 있어서, 피검자의 상기 상태를 회복(개선)하는데 효과적인 본 발명의 인자 VII/인자VIIa 펩티드 콘주게이트의 양을 피검자에 투여하는 스텝으로 이루어짐을 특징으로 하는 치료 방법을 제공한다. 또 다른 대표적인 예에서, 그 방법은 여기서 설명한 방법에 의해 생성된 인자 VII/인자VIIa 펩티드 콘주게이트의 양을 상기 포유동물에 투여하는 것을 구성한다.
- <998> 또 다른 국면(aspect)에서, 본 발명은 아래에 나타난 구조식을 가진 하나의 변형 시알릴 잔기를 구성하는 하나의 글리코실 링커로 이루어진 하나의 인자VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트를 제조하는 방법을 제공한다:



<999> 위 구조식에서,

<1000> 위 구조식에서,

<1001> R^2 는 H, CH_2OR^7 , $COOR^7$ 또는 OR^7 이고,

<1002> R^7 은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 또는 치환 또는 비치환 헤테로알킬을 나타낸다. R^3 및 R^4 는 H, 치환 또는 비치환 알킬, OR^8 , $NHC(O)R^9$ 에서 독립하여 선택한 멤버이고, R^8 및 R^9 는 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬 또는 시알산에서 독립하여 선택한다.

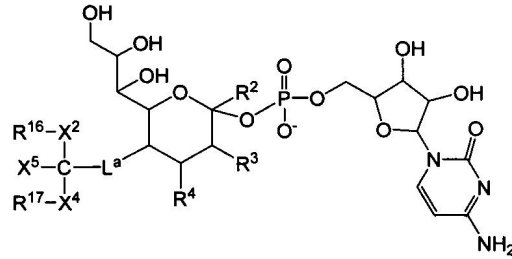
<1003> R^{16} 및 R^{17} 은 폴리머암(arms)을 독립하여 선택한다. X^2 및 X^4 는 폴리머 성분 R^{16} 및 R^{17} 을 탄소(C)에 결합하는 결합 프라그먼트를 독립하여 선택한다.

<1004> X^5 는 하나의 미 반응성 기이고, L^a 는 하나의 링커기이다. 그 방법은 (a)아래에 나타난 글리코실 성분으로 이루어진 하나의 인자VII/인자VIIa 펩티드와,



<1005>

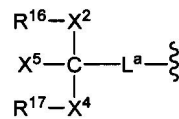
<1006> 아래에 나타낸 구조식을 가진 하나의 PEG-시알산도너 성분과



<1007>

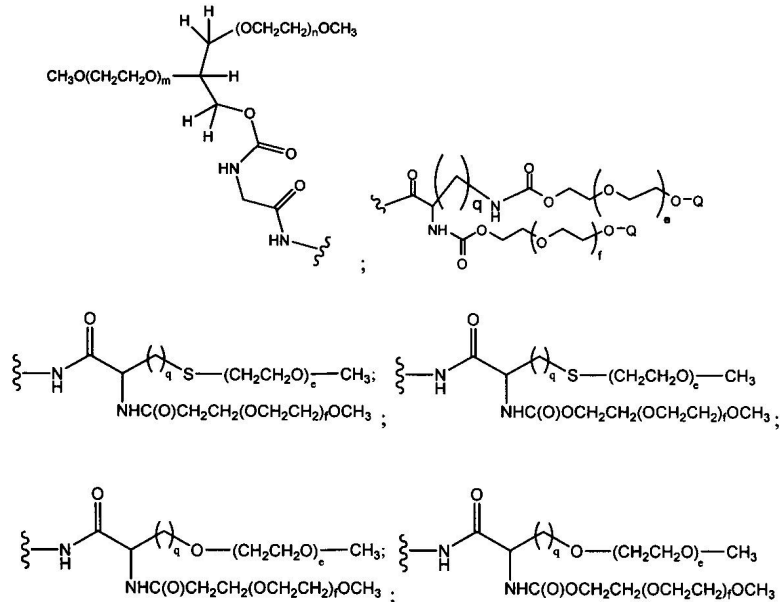
<1008> 상기 글리코실 성분의 Gal 상에서 PEG-시알산을 전이하는 효소를 그 전이에 적합한 조건 하에서 접촉하는 것으로 이루어진다.

<1009> 또 다른 대표적인 예에서, 아래에 나타낸 성분은



<1010>

<1011> 아래에 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 구조식을 가진다.



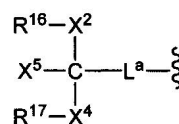
<1012>

<1013>

<1014> 위 구조식에서,

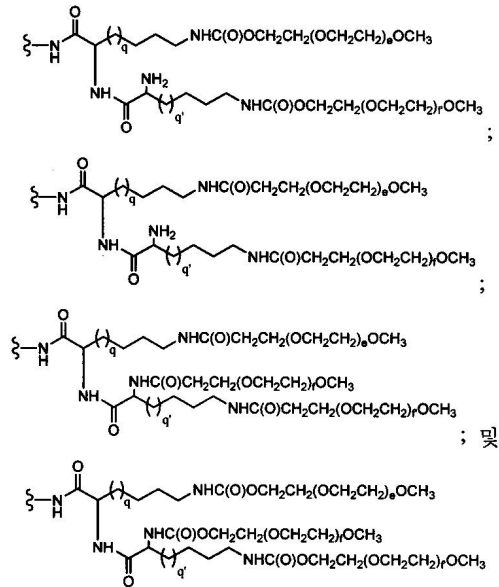
<1015> 지수 e, f, m 및 n은 1~2500에서 독립하여 선택한 정수이고, 지수 q는 0~20에서 선택한 정수이다.

<1016> 또 다른 대표적인 예에서, 아래에 나타낸 성분은



<1017>

<1018> 아래에서 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 구조식을 가진다:

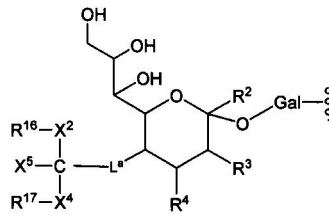


<1019>

<1020> 위 구조식에서,

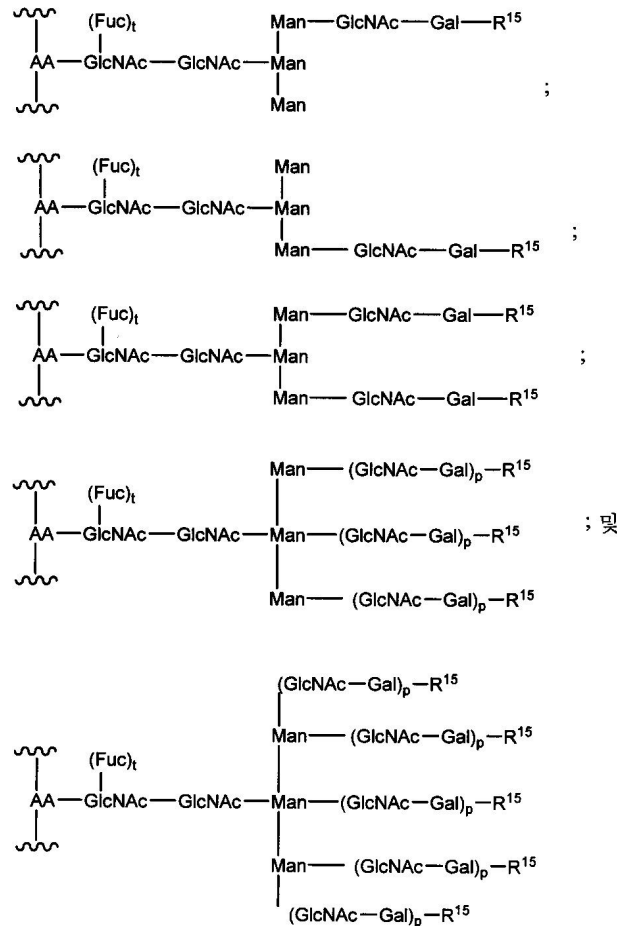
<1021> 지수 e , f 및 f' 는 1~2500에서 독립하여 선택한 정수이고, 지수 q 및 q' 는 1~20에서 독립하여 선택한 정수이다.

<1022> 또 다른 대표적인 예에서, 그 글리코실 링커는 아래에 나타낸 구조식으로 구성된다:



<1023>

<1024> 또 다른 대표적인 예에서, 그 인자 VII/인자VIIa 펩티드 콘주게이트는 아래에 나타낸 구조식을 가진 최소 하나의 글리코실링커로 구성한다:



<1025>

<1026> 위 구조식에서,

<1027> AA는 상기 펩티드의 하나의 아미노산 잔기이며, 지수 t는 0과 1에서 선택한 정수이다. R¹⁵는 변형시알릴 성분이다.

<1028> 또 다른 대표적인 예에서, 그 인자 VII/인자VIIa 펩티드는 아미노산 서열 SEQ.ID.NO:1을 가진다.

<1029> 또 다른 대표적인 예에서, 그 글리코실링커는 하나의 아스파리긴 잔기인 하나의 아미노산 잔기를 통해 상기 인자 VII/인자VIIa 펩티드에 결합된다.

<1030> 또 다른 대표적인 예에서, 그 아스파리긴 잔기는 N152, N322 및 그 조합에서 선택된 하나의 멤버이다.

<1031> 또 다른 대표적인 예에서, 그 인자 VIIa 펩티드는 하나의 바이오 활성 인자VIIa 펩티드이다.

<1032> 또 다른 대표적인 예에서, 그 방법은 스텝(a) 전에 (b) 하나의 적합한 숙제 내에서 인자 VII/인자VIIa 펩티드를 발현하는 것을 구성한다.

<1033> 또 다른 국면에서, 본 발명은 피검자의 응고 잠재력 절충에 특징이 있는 상태를 치료하는 방법에 있어서 상기 피검자의 상태를 개선(회복)하는데 효과적이며, 여기서 설명한 방법에 의해 생성된 인자VII/인자VIIa 펩티드 콘주게이트의 양을 피검자에 투여하는 스텝으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다. 또 다른 대표적인 예에서, 그 방법은 여기서 설명한 방법에 의해 제조된 인자VII/인자VIIa 펩티드 콘주게이트의 양을 상기 포유동물에 투여하는 것을 포함한다.

<1034> 또 다른 국면에서, 본 발명은 하나의 인자VII 또는 인자VIIa 펩티드 콘주게이트를 합성하는 방법에 있어서,

<1035> (a) 시알리다아제와, (b) 글리코실 전이효소, 엑소글리코시다아제 및 엔도글리코시다아제에서 선택한 하나의 멤버인 효소와, (c) 변형당/변형 시알릴 잔기와 (d) 상기 인자VII 또는 인자 VIIa 펩티드를 배합하여 이와 같이 인자 VII/인자VIIa 펩티드 콘주게이트를 합성하는 것으로 이루어지는 방법을 제공한다.

<1036> 하나의 대표적인 예에서, 그 배합은 10시간 이하의 시간이다. 또 다른 대표적인 예에서, 본 발명은 하나의 캐핑

스텝(capping step)을 더 포함한다.

II.D.iv. 수-불용성 폴리머

위에서 설명한 것과 동일한 또 다른 예에서, 그 변형당에는 수용성 폴리머보다 오히려 물에 불용성인 폴리머를 포함한다. 본 발명의 콘주게이트에는 또 하나 이상의 수-불용성 폴리머를 포함한다. 본 발명의 이 예에서는 치료 펩티드를 조절 방식으로 투여하는 하나의 비히클(vehicle)로서 그 콘주게이트를 사용하여 설명한다. 폴리머 약제 투여 시스템은 종래 기술에서 공지되어 있다. 예에서, 다음 참고문헌을 참조할 수 있다(Dunn 등, Eds. Polymeric Drugs and drug Delivery systems, ACS Symposium. Series. Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D. C. 1991.)

실제로 어느 공지된 약제투여 시스템은 본 발명의 콘주게이트에 적용할 수 있다는 것을 이 분야의 기술자들은 이해할 수 있다.

위에서 설명한 R^1 , $L-R^1$, R^{15} , $R^{15'}$ 에 대한 구성과 다른 래디컬은 이 기술 분야의 기술자에 의해 용이하게 접근할 수 있는 화학적 특성을 이용하여 제한 없이 선상 및 분기 구조에 결합시킬 수 있는 수-불용성 폴리머에 동일하게 적용할 수 있다.

대표적인 수-불용성 폴리머에는 폴리포스파진, 폴리(비닐알코올), 폴리아미드, 폴리카르보네이트, 폴리알킬렌, 폴리아크릴아미드, 폴리알킬렌글리콜, 폴리알킬렌옥사이드, 폴리알킬렌 테레프탈레이트, 폴리비닐에테르, 폴리비닐에스테르, 폴리비닐할라이드, 폴리비닐피롤리돈, 폴리글리콜리드, 폴리실록산, 폴리우레탄, 폴리(메틸 메타아크릴레이트), 폴리(에틸 메타아크릴레이트), 폴리(부틸 메타아크릴레이트), 폴리(이소부틸 메타아크릴레이트), 폴리(헥실 메타아크릴레이트), 폴리(이소데실 메타아크릴레이트), 폴리(라우릴 메타아크릴레이트), 폴리(페닐 메타아크릴레이트), 폴리(메틸아크릴레이트), 폴리(이소프로필 아크릴레이트), 폴리(이소부틸 아크릴레이트), 폴리(옥타데실 아크릴레이트), 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리(에틸렌글리콜), 폴리(에틸렌옥사이드), 폴리(에틸렌 테레프탈레이트), 폴리(비닐 아세테이트), 폴리비닐클로리드, 폴리스티렌, 폴리비닐피롤리돈, 플루로닉스 및 폴리비닐페놀과 그 코폴리머가 있으며, 한정되어 있는 것은 아니다.

본 발명의 콘주게이트에서 유용한 합성변형 천연(natural)폴리머에는 알킬셀룰로오스, 히드록시알킬셀룰로오스, 셀룰로오스 에테르, 셀룰로오스 에스테르 및 니트로 셀룰로오스가 있으나, 한정되어 있는 것은 아니다.

광범위한 분류의 합성변형 천연폴리머 중 특히 바람직한 멤버에는 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 히드록시프로필 셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스, 히드록시 부틸메틸 셀룰로오스, 셀룰로오스 아세테이트, 셀룰로오스 프로피오네이트, 셀룰로오스 아세테이트 부티레이트, 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트, 카르복시메틸 셀룰로오스, 셀룰로오스 트리아세테이트, 셀룰로오스 술페이트염과, 아크릴 및 메타아크릴 에스테르와 알긴산의 폴리머가 있으며, 한정되어 있는 것은 아니다.

여기서 설명은 폴리머 및 다른 폴리머는 상품 공급원으로 용이하게 얻을 수 있으며[상품공급원:Sigma Chemical Co.(St.Louis,MO,USA), Fluka(Ronkonkoma, NY, USA), BioRad(Richmond,CA,USA)], 또는 표준기술을 사용하여 이들의 상품 공급업자로부터 얻은 모너머에서 합성할 수 있다.

본 발명의 콘주게이트에 유용한 대표적인 생분해성 폴리머에는 폴리락티드, 폴리글리코리드 및 그 코폴리머, 폴리(에틸렌테레프탈레이트), 폴리(부티르산), 폴리(발레르산), 폴리(락티드-코-카포락톤), 폴리(락티드-코-글리코리드), 폴리안하이드리드(poly anhydrides), 폴리ortho에스테르, 그 블렌드(blends) 및 코폴리머가 있으며, 한정되어 있는 것은 아니다. 콜라겐, 플루노닉 등을 포함하는 조성물 등 겔 형성 조성물이 특히 유용하다.

본 발명에서 유용한 폴리머에는 "하이브리드"(hybrid) 폴리머(혼성 폴리머)가 있으며, 이들의 혼성 폴리머는 이들의 구조 중 최소 일부분 중에 하나의 바이오재흡수성(bioresorbable) 분자를 가진 수-불용성재를 포함한다. 이와 같은 폴리머의 하나의 예는 하나의 수-불용성 코폴리머를 포함하는 것으로, 그 코폴리머는 하나의 바이오재 흡수성 영역, 하나의 친수성 영역 및 폴리머 사슬에 대하여 다수의 가교결합 작용기를 가진다.

본 발명에서, "수-불용성재"(water-insoluble materials)에는 수(water) 또는 수 함유환경 하에 실질상 불용성인 재료가 있다. 이와 같이, 그 코폴리머의 어느 영역 또는 세그먼트가 친수성이거나, 또는 수용성으로 할 수 있어도, 전체로서 그 폴리머 분자는 수중에서 실질상 용해하지 않는다.

본 발명에서, 용어 "바이오재흡수성 분자"에는 생체(body)에 의한 정상적인 배설경로에 의해 대사작용을

하거나, 절단(broken down)하며 재흡수 및/또는 제거할 수 있는 하나의 영역을 포함한다. 이와 같은 대사물 또는 절단 생성물은 실질상 그 생체에 대하여 비 독성인 것이 바람직하다.

<1049> 그 바이오재흡수성 영역은 그 코폴리머 조성물이 전체로서 수용성으로 되지않는 한 소수성 또는 친수성으로 할 수 있다. 이와 같이, 그 바이오재흡수성 영역은 전체로서 그 폴리머가 수-불용성으로 남아있는 구성특징을 기준으로 하여 선택한다. 따라서, 상대적 특성, 즉 함유된 작용기의 종류와 바이오재흡수성 조성물이 수-불용성으로 남아있도록 확보한다.

<1050> 대표적인 재흡수성 폴리머에는 예로서, 합성에 의해 제조된 폴리(α -히드록시-카르복실산)/폴리(옥시알킬렌)의 재흡수성 블록 코폴리머를 포함한다(참조:Cohn 등, USP 4,826,945). 이들의 코폴리머는 가교결합되지 않으며. 수용성이므로 그 생체는 그 분해블록 코폴리머 조성물을 배설할 수 있다[참조:Younes 등, J.Biomed.Mater.Res.21:1301-1316(1987);Cohn 등, J.Biomed.Master.Res.22:993-1009(1988)].

<1051> 바람직한 바이오재흡수성 폴리머에는 폴리(에스테르), 폴리(히드록시산), 폴리(락톤), 폴리(아미드), 폴리(에스테르-아미드), 폴리(아미노산), 폴리(안히드ريد), 폴리(오르토에스테르), 폴리(카르보네이트), 폴리(포스파진), 폴리(포스포에스테르), 폴리(티오에스테르), 폴리사카리드 및 그 혼합물에서 선택한 하나 이상의 성분이 있다. 그 바이오재흡수성 폴리머에는 하나의 폴리(히드록시)산 성분이 포함되는 것이 더 바람직하다. 그 폴리(히드록시)산 중에서 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리카프로산, 폴리부티르산, 폴리발레르산과 그 코폴리머 및 혼합물이 바람직하다.

<1052> 생체 내 흡수하는 ("바이오재흡수":bioresorbed) 프라그멘트의 형성외에, 본 발명의 방법에 사용하는 바람직한 폴리머코팅도 배설할 수 있고 대사 작용할 수 있는 하나의 프라그멘트(fragment)를 형성할 수 있다.

<1053> 또 본 발명에서는 고차(higher order) 코폴리머를 사용할 수 있다. 예로서, 특허문헌(casey 등, USP 4,438,253)(1984.3.20자 특허취득)에서는 폴리(글리콜산)과 히드록실말단(ended)폴리(알킬렌글리콜)의 에스테르 전이반응으로부터 생성된 트리-블록코폴리머가 개시되어 있다. 이와 같은 조성물은 재흡수성 모노필라멘트 구조체로서 사용에 대하여 개시되어 있다. 이와 같은 조성물의 가요성(flexibility)은 그 폴리머 구조 중에서 테트라-p-톨릴 오르토카르보네이트 등 방향족 오르토카르보네이트의 결합에 의해 조절한다.

<1054> 또, 락트산 및/또는 글리콜산을 기재로 한 다른 폴리머를 사용할 수 있다. 예로서, 특허문헌(Spinu, USP 5,202,413;1993.4.13.특허취득)에서는 올리고머디올 또는 디아민 잔기 상에서 락티드 및/또는 글리코리드의 개환(ring-opeing)중합한 다음, 이어서 디이소시아네이트, 디아실클로리드 또는 디클로로실란 등 하나의 2기능성 화합물에 의한 사슬연장(chain extension)에 의해 생성된 폴리락티드 및/또는 폴리글리코리드의 순차블록(sequentially ordered blocks)을 가진 생분해성 멀티-블록(multi-block) 코폴리머에 대하여 개시되어 있다.

<1055> 본 발명에서 유용한 코팅의 바이오재흡수성 영역은 가수분해 및/또는 효소에 의해 절단할 수 있도록 구성할 수 있다. 본 발명에서, "가수분해에 의해 절단가능성"(hydrolytically cleavable)은 수중에서 또는 물 함유 환경하에서 가수분해에 대한 그 코폴리머, 특히 바이오재흡수성 영역의 감수성(suseptibility)을 말한다. 동일하게, 여기서 사용되고 있는 바와 같이 "효소에 의한 절단가능성"(enzymatically cleavable)은 내인성(endogenous) 또는 외인성 효소에 의한 절단(cleavage)에 있어서 그 코폴리머, 특히 바이오재흡수성 영역의 감수성을 말한다.

<1056> 그 친수성 영역이 그 생체 내에서 설정될 경우 그 친수성 영역은 배설 가능성 있는 프라그멘트 및/또는 대사 가능성 있는 프라그멘트 중에서 처리를 진행시킬 수 있다. 이와 같이, 그 친수성 영역에는 예로서 폴리에테르, 폴리알킬렌옥사이드, 폴리올, 폴리(비닐피롤리딘), 폴리(비닐알코올), 폴리(알킬옥사졸린), 폴리사카리드, 카르보히드레이트, 펩티드, 단백질과 그 코폴리머 및 혼합물을 함유할 수 있다. 더 나아가서, 그 친수성 영역은 또 예로서 하나의 폴리(알킬렌)옥사이드로 할 수 있다. 이와 같은 폴리(알킬렌)옥사이드에는 예로서 폴리(에틸렌)옥사이드, 폴리(프로필렌)옥사이드와 그 혼합물 및 코폴리머를 포함할 수 있다.

<1057> 하이드로겔의 성분인 폴리머는 본 발명에서 유용하다.하이드로겔(hydrogels)은 폴리머재이며, 이들의 폴리머재는 비교적 다량의 물을 흡수할 수 있다. 하이드로겔 형성 화합물의 예에는 폴리아크릴산, 소듐카르복시메틸 셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리딘, 젤라틴, 카라기난 및 다른 폴리사카리드, 히드록시에틸렌 메타아크릴산(HEMA)과 그 유도체 등이 있으나, 한정되어 있는 것은 아니다. 안정성이 있고, 생분해성이 있으며 바이오재흡수성이 있는 히드로겔을 제조할 수 있다. 더욱이, 하이드로겔 조성물에는 하나 이상의 이들 특성을 나타내는 서브유닛(subunits)을 함유할 수 있다.

<1058> 가교결합에 의해 보존성(integrity)을 조정할 수 있는 생(bio)-상용성 하이드로겔 조성물은 공지되었으며, 본 발명의 방법에서 사용하는데 바람직하다. 예로서, 특허문헌(Hubbell 등, USP 5,410,016;1995.4.25.특허취득;

USP 5,529,914;1996.06.25.특허취득)에서는 수용성계(water-soluble systems)에 대하여 개시되어 있다. 이들의 수용성계는 가수분해에 의해 불안정한 두개의 연장부(extensions) 사이에 삽입된 하나의 수용성 중심블록 세그먼트를 가진 가교결합된 블록코폴리머를 가진다. 이와 같은 코폴리머는 광 중합할 수 있는 아크릴레이트 기능성으로 더 엔드-캐핑(end-capping)이된다. 가교결합될 때, 이들의 계는 하이드로겔이 된다. 이와 같은 코폴리머의 수용성 중심블록은 폴리(에틸렌글리콜)을 포함할 수 있다. 이와 같이, 그 가수분해에 의해 불안정하게 되는 연장부는 폴리글리콜산 또는 폴리락트산 등 하나의 폴리(α -히드록시산)으로 할 수 있다 (참조:Sawhney 등, Macromolecules 26:581-587(1993)).

<1059> 또 다른 바람직한 예에서, 그 겔은 하나의 열가역겔(thermoreversible gel)이다. 플루로닉(pluronics), 콜라겐, 젤라틴, 히알루론산, 폴리사카리드, 폴리우레탄 하이드로겔, 폴리우레탄-우레아하이드로젠 및 그 조합 등의 성분을 포함하는 열가역겔이 바람직하다.

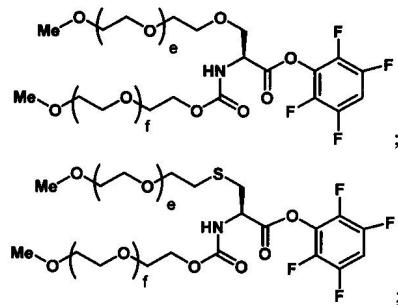
<1060> 또 다른 대표적인 예에서, 본 발명의 콘주게이트에는 하나의 리포솜(liposome)의 성분을 포함한다. 리포솜은 예로서 특허문헌(Eppstein 등, USP 4,522,811)에서 기재되어 있는 바와 같이 이 분야의 기술자에 의해 공지된 방법에 의해 제조할 수 있다. 예로서, 리포솜제제는 무기용매 중에서 적합한 지질(lipids) (스테아로일 포스파티딜 에타놀아민, 스테아로일 포스파티딜콜린, 아라카도일 포스파티딜콜린 및 콜레스테롤)을 용해시킨 다음, 증발시켜 그 용기의 표면에 건조지질의 박막을 잔존시켜 제조할 수 있다.그 다음, 그 활성 화합물의 수용액 또는 의약적으로 허용할 수 있는 그 염을 그 용기 내에 도입한다. 도입 후에, 그 용기를 수동으로 회전시켜 그 용기의 측면에서 지질제를 유리하고 지질응집을 분산시킴으로써 리포솜 현탁액을 형성한다.

<1061> 위에서 설명한 마이크로파티클과 그 마이크로파티클의 제조방법은 실시예에 의해 제공되며, 본 발명에서 유용한 마이크로파티클의 범위를 한정하는 것은 아니다. 서로 다른 방법에 의해 제조된 마이크로파티클(microparticle)이본 발명에서 유용하다는 것은 이 분야의 기술자에 의해 알 수 있다.

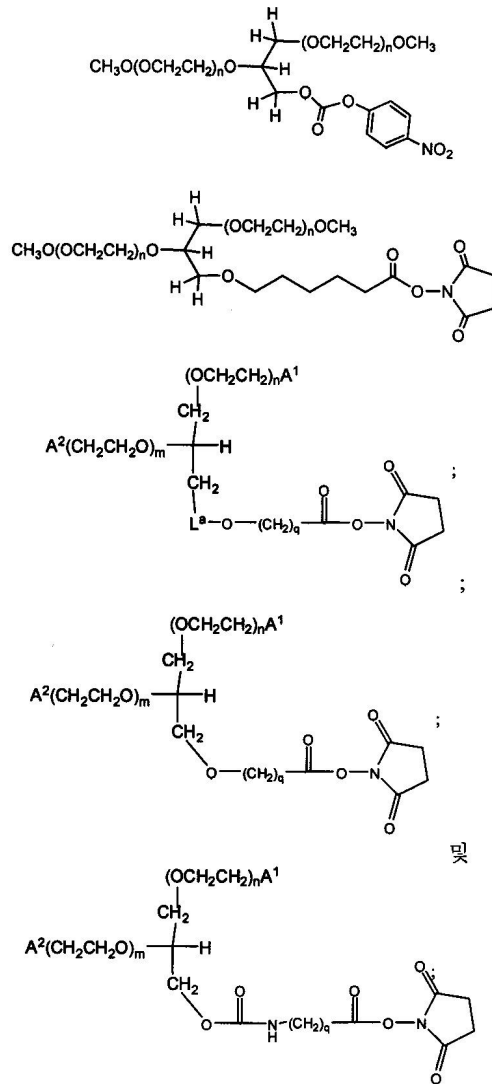
<1062> 직쇄 및 분기 모두를 가진 수용성 폴리머에 있어서 위에서 설명한 구조형식은 일반적으로 수-불용성 폴리머에 대해서도 적용할 수 있다. 이와 같이, 예로서 시스테인, 세린, 디라이신 및 트리라이신 분기형성 코어(branching cores)는 2종의 수-불용성 폴리머 성분으로 기능화할 수 있다. 이들의 종(species)을 제조하는데 사용되는 방법은 일반적으로 상기 수용성 폴리머를 제조하는데 사용되는 방법과 유사하다.

<1063> II.D.V. 폴리머 변형기(polymeric modizying groups)의 제조방법

<1064> 폴리머 변형기는 하나의 글리코실 또는 사카릴성분 또는 하나의 아미노성분 과의 반응에서 활성화할 수 있다. 활성화 종의 대표적인 구조체(즉, 카르보네이트 및 활성에스테르)는 아래에 나타낸 구조식을 포함한다:



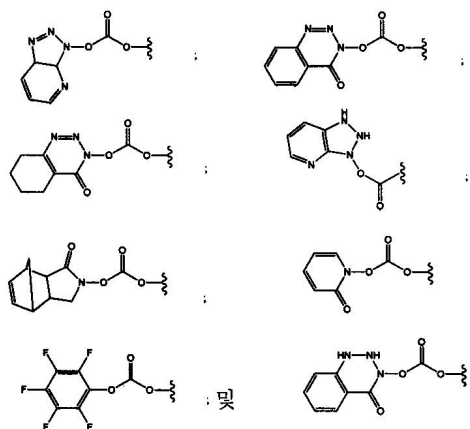
<1065>



<1066>

<1067>

상기 구조식에서, 지수 q는 1~40에서 선택한 정수이다. 여기서 설명한 화합물의 제조에 유용한 선상 및 분기PEG를 활성화하는데 적합한 다른 활성 또는 분리기(leaving groups)는 아래에 나타난 구조식을 가진 종(species)을 포함하나, 한정되어 있는 것은 아니다:



<1068>

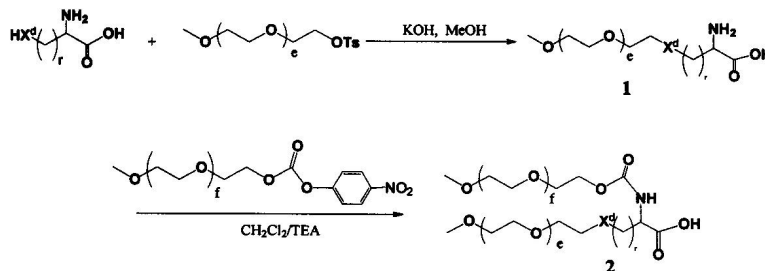
<1069>

상기 구조식을 가진 종 및 다른 종으로 활성화하는 PEG분자와 그 활성화 PEG의 제조방법은 특허문헌 W004/083259 명세서에서 기재되어 있다.

<1070> 위에서 나타낸 분기폴리머의 하나 이상의 m-PEG암(arms)이 하나의 다른 말단 (즉, OH, COOH, NH₂, C₂-C₁₀-알킬 등)을 PEG성분에 의해 치환시킬 수 있다는 것은 이 분야의 기술자에 의해 알 수 있다. 더욱이, 위 구조들은 그 α-탄소원자와 아미노산 측쇄의 작용기 사이에 알킬링커를 삽입(또는 탄소원자를 제거)함으로써 용이하게 변형시킨다.

<1071> 이와 같이, "효모"(homo) 유도체 및 고급(higher)호모로그(homologues)와, 저급(lower)호모로그는 본 발명에서 유용한 분기PEG의 코어(cores)범위 내에 있다.

<1072> 여기서 설명한 분기PEG종은 아래에 나타낸 스킴(scheme)에서 설명한 방법에 의해 용이하게 제조한다:



<1073>

<1074> 위 스킴에서,

<1075> X^d는 0 또는 S이고, r은 1~5의 정수이다.

<1076> 지수 e 및 f는 독립하여 1~2500의 정수를 선택한다.

<1077> 하나의 대표적인 예에서, 이들 지수의 하나 또는 둘은 그 폴리머가 분자량 약 5KDa, 약 10KDa, 15KDa, 20KDa, 25KDa, 30KDa, 35KDa 또는 40KDa로 되도록 선택한다.

<1078> 이와 같이, 위 스킴에 의해, 하나의 천연 또는 비천연아미노산은 하나의 활성화 m-PEG 유도체, 이 경우 토실레이트와 접촉시켜, 측쇄테로원자 X^d를 알킬화시켜 구조식 1을 형성한다. 그 모노-기능화 m-PEG 아미노산은 하나의 반응성 m-PEG 유도체와 함께 N-아실화 조건에 따르도록 처리하여, 분기 m-PEG 2를 집합한다.

<1079> 이 분야의 기술자들이 이해하고 있는 바와 같이, 그 토실레이트 이탈기는 어느 적합한 이탈기, 즉 할로젠, 메실레이트, 트리플레이트 등으로 대체할 수 있다. 동일하게, 그 아민을 아실화(acylation) 하는데 사용되는 반응성 카르보네이트는 하나의 활성에스테르, 즉 N-히드록시 숙시이미드 등으로 대체할 수 있거나, 또는 그 산을 디시클로헥실 카르보디이미드, 카르보닐 디이미다졸 등 하나의 탈수제를 사용하여 반응 현장에서 활성화시킬 수 있다.

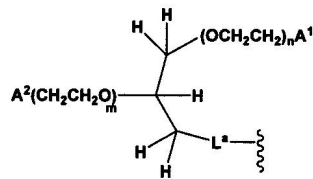
<1080> 다른 대표적인 예에서, 그 우레아성분은 하나의 아미드 등 하나의 기(group)로 대체한다.

<1081> II.E. 물질(matter)의 호모분산성 펩티드 콘주게이트 조성물(homodisperse peptide conjugate compositions)

<1082> 화학적으로 또한 효소에 의해 부가하는 글리코실 결합기에 의해 형성되는 펩티드 콘주게이트의 구성 이외에, 본 발명은 치환펩티드에서 균질성이 높은 펩티드 콘주게이트를 함유하는 물질의 조성물을 제공한다. 본 발명의 방법을 사용하여, 인자VII/인자VIIa 콘주게이트의 하나의 개체군에서 글리코실 결합기의 실질상 부분과 글리코실 성분이 구조가 동일한 하나의 아미노산 또는 글리코실 잔기에 결합되어 있는 펩티드 콘주게이트를 형성할 수 있다. 이와 같이, 하나의 제 2 국면에서 본 발명은 하나의 글리코실 결합기, 즉, 하나의 무손상(intact) 글리코실 결합기를 통하여 펩티드 콘주게이트에 공유결합되어 있는 수용성폴리머 성분의 개체군(population)을 가진 하나의 펩티드 콘주게이트를 제공한다. 본 발명의 하나의 대표적인 펩티드 콘주게이트에서, 그 수용성 폴리머 개체군의 각 멤버는 글리코실 결합기에 의해 그 펩티드 콘주게이트의 하나의 글리코실 잔기에 결합되어 있고, 그 글리코실 결합기가 결합되어 있는 그 펩티드 콘주게이트의 각각의 글리코실 잔기가 동일한 구조를 가진다.

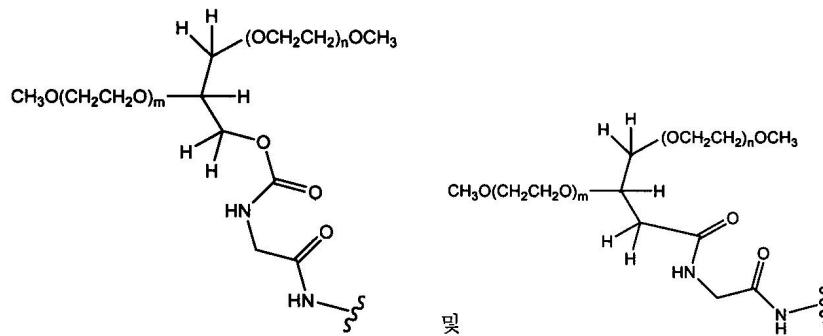
<1083> 또, 본 발명은 하나의 글리코실 결합기에 의해 하나의 변형기, 즉 치료성분, 진단성분, 표적성분, 독성성분(toxin moiety) 등에 그 펩티드가 콘주게이트링 하는 위에서 설명한 콘주게이트와 유사한 콘주게이트를 제공한다. 위에서 인용한 변형기 각각은 하나의 소형분자, 천연폴리머(즉, 폴리펩티드) 또는 합성폴리머로 할 수 있다. 그 변형기가 하나의 시알산에 결합되어 있는 경우, 그 변형기가 실질상 비형광(non-fluorescent)인 것이 일반적으 로 바람직하다.

<1097> 하나의 대표적인 예에서, $L-(R^1)_w$ 는 아래에 나타낸 구조식에 의한 하나의 구조를 가진다:

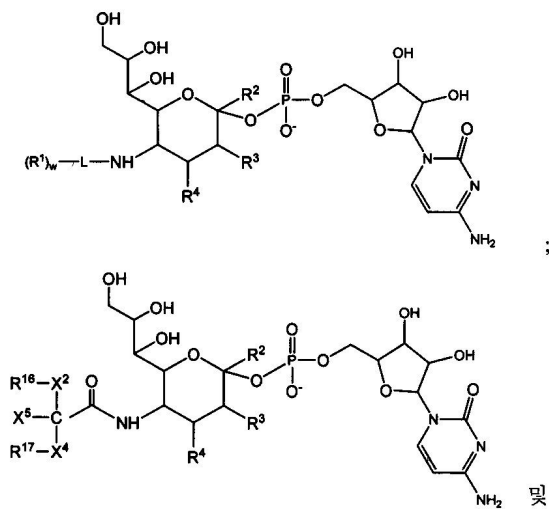


<1098>
<1099> 하나의 대표적인 예에서, A^1 및 A^2 는 각각 -OH와 -OCH3에서 선택한다.

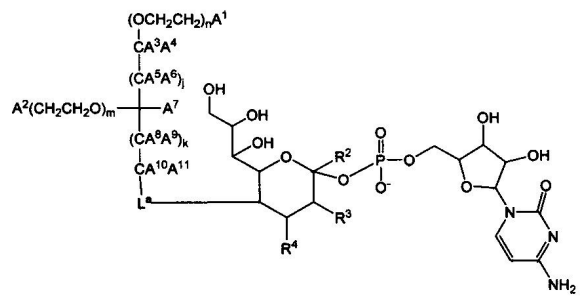
<1100> 이 예에 의한 대표적인 폴리머 변형기들은 아래에 나타낸 구조식을 가진다:



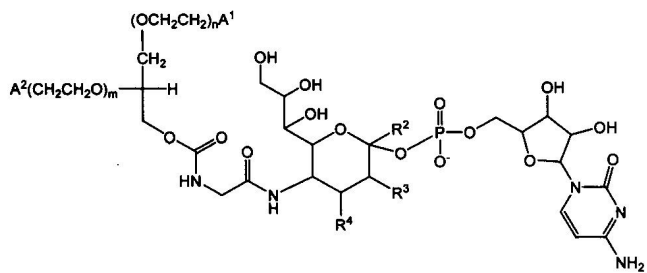
<1101>
<1102> 또 다른 대표적인 예에서, 그 뉴클레오타이드는 아래에 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 구조식을 가진다:



<1103>
<1104>

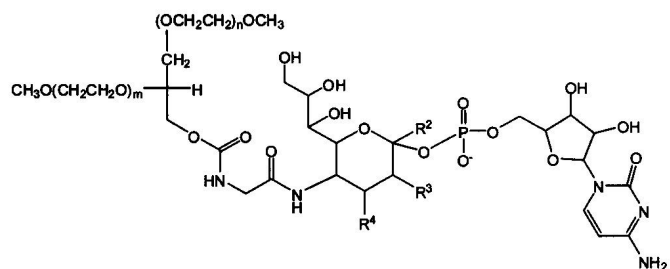


<1105> 이 예에 의한 하나의 대표적인 뉴클레오타이드당은 아래에 나타낸 구조를 가진다:



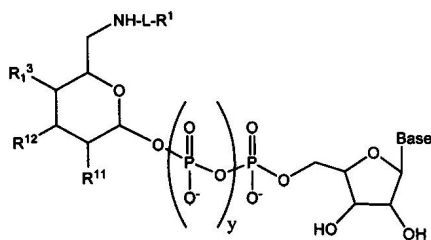
<1106>

<1107> 이 예에 의한 하나의 대표적인 뉴클레오타이드당은 아래에 나타낸 구조를 가진다:



<1108>

<1109> 또 다른 대표적인 예에서, 그 뉴클레오타이드당은 아래에 나타낸 구조식을 기재로 한다:



<1110>

<1111> 위 구조식에서,

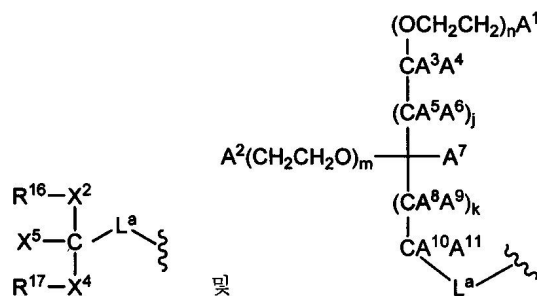
<1112> R기 및 L은 위에서 설명한 성분을 나타낸다.

<1113> 지수 y는 0, 1 또는 2이다.

<1114> 하나의 대표적인 예에서, L은 NH와 R¹ 사이의 하나의 결합이다.

<1115> 그 염기(base)는 하나의 핵산염기이다.

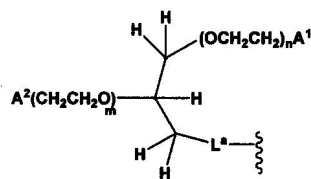
<1116> 하나의 대표적 예에서, L-R¹은 아래에 나타내 구조식에서 선택한 하나의 멤버이다:



<1117>

<1118> 위 구조식에서, 부호를 위에서 설명한 것과 같다.

<1119> 하나의 대표적인 예에서, $L-R^1$ 은 아래에 나타낸 구조식에 의한 하나의 구조이다.:



<1120>

<1121> 하나의 대표적인 예에서, A^1 및 A^2 는 각각 -OH와 -OCH₃에서 선택한다.

<1122> III. 방법(the methods)

<1123> 위에서 설명한 콘주게이트(conjugates) 이외에, 본 발명은 이들의 콘주게이트와 다른 콘주게이트의 제조방법을 제공한다.

<1124> 더욱이 본 발명은 질병 보유 피검자 또는 질병발생 위험이 있는 피검자에 본 발명의 하나의 콘주게이트를 투여하여 질병상태를 예방, 치료 또는 개선(회복)하는 방법을 제공한다.

<1125> 대표적인 예에서, 그 콘주게이트는 하나의 폴리머 변형 성분과 하나의 글리코실화 또는 비글리코실화 펩티드 사이에 형성된다.

<1126> 그 폴리머는 하나의 글리코실 결합기에 의해 그 펩티드에 콘주게이팅 되어 있으며, 그 글리코실 결합기는 그 펩티드(또는 글리코실잔기)와 그 변형기(즉, 수용성 폴리머) 사이에 삽입되어 공유 결합한다.

<1127> 그 방법에는 하나의 변형당과, 하나의 효소, 즉 그 변형당을 그 기질(substrate)에 콘주게이팅하는 하나의 글리코실 전이효소를 함유한 하나의 혼합물과 그 펩티드를 접촉하는 것을 포함한다.

<1128> 그 변형당의 당 성분은 뉴클레오타이드 당에서 선택하는 것이 바람직하다.

<1129> 하나의 인자 VII/ 인자 VIIa 펩티드 콘주게이트를 합성하는 방법은

<1130> a) 시알리다아제와;

<1131> b) 하나의 글리코실 전이효소, 엑소(exo) 글리코시다아제 또는 엔도(endo) 글리코시다아제 등 하나의 글리코실 결합기의 전이를 촉진할 수 있는 하나의 효소와,

<1132> c) 변형당과,

<1133> d) 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를 배합하여

<1134> 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트를 합성하는 것을 구성한다.

<1135> 그 반응은 그 변형당과 그 펩티드 사이에 하나의 공유 결합을 형성하는 적합한 조건하에서 실시한다.

<1136> 그 변형당의 당 성분은 뉴클레오타이드 당에서 선택하는 것이 바람직하다.

<1137> 하나의 대표적인 예에서, 위에서 설명한 변형당 등 그 변형당은 그 대응하는 뉴클레오타이드 당과 같이 활성화한다.

<1138> 본 발명에서 사용되는 대표적인 변형 형태의 당 뉴클레오타이드에는 뉴클레오타이드 모노-, 디- 또는 트리포스페이트 또는 그 아날로그(analogs)를 포함한다.

<1139> 하나의 바람직한 예에서, 그 변형당 뉴클레오타이드는 하나의 UDP-글리코시드, CMP-글리코시드 또는 하나의 GDP-글리코시드에서 선택한다.

<1140> 그 변형당 뉴클레오타이드의 당 뉴클레오타이드 부분은

<1141> UDP-갈락토오스, UDP-갈락토사민, UDP-글루코오스,

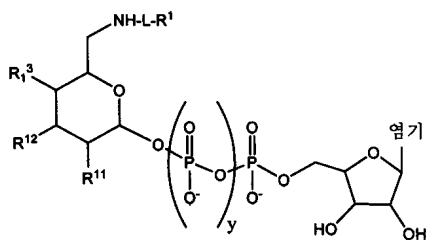
<1142> UDP-글루코사민, GDP-만노오스, GDP-푸코오스,

<1143> CMP-시알산 또는 CMP-NeuAc에서 선택하는 것이 더 바람직하다.

<1144> 하나의 대표적인 예에서, 그 뉴클레오타이드 포스페이트는 C-1에서 결합되어 있다.

<1145> 또, 발명은 6-탄소 위치에서 L-R¹으로 변형시킨 당 뉴클레오타이드의 사용을 제공한다.

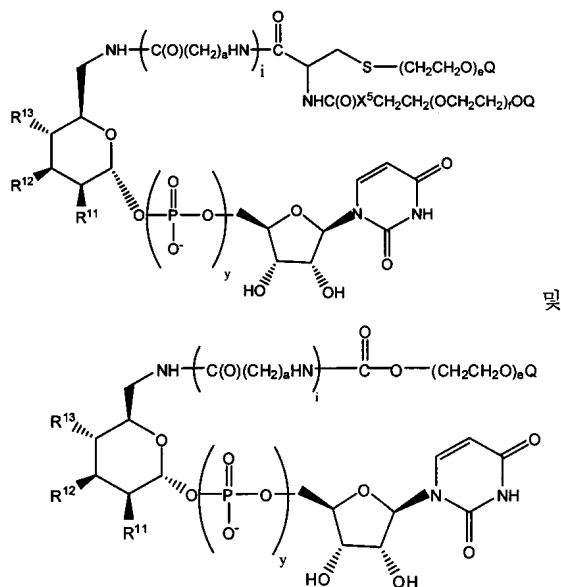
<1146> 이 예에 의한 대표적인 종(species)에는 다음에 나타난 구조식을 포함한다:



<1147>

<1148> 위 구조식에서, 모든 R기는 및 L은 위에서 설명한 것과 같은 성분을 나타낸다. 지수 y는 0, 1 또는 2이다. 하나의 대표적인 예에서, L은 NH와 R¹ 사이의 하나의 결합이다. 그 염기는 하나의 핵산 염기이다.

<1149> 본 발명에서 유용한 6-위치에서 탄소가 변형되는 대표적인 뉴클레오타이드 당은 GDP 만노오스의 입체 화학적 특성을 가진 종으로 아래에 나타난 구조식을 포함한다:



<1150>

<1151> 위 구조식에서, X⁵는 하나의 결합 또는 0이다.

<1152> 지수 i는 0(zero) 또는 1을 나타낸다.

<1153> 지수 a는 1 ~ 20의 정수를 나타낸다.

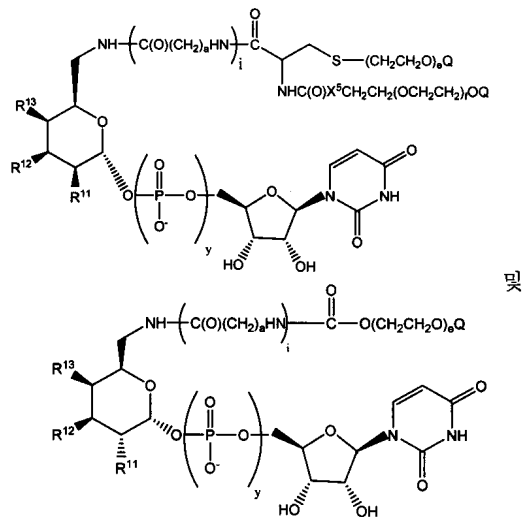
<1154> 지수 e 및 f는 독립하여 1 ~ 2500의 정수를 나타낸다.

<1155> Q는 위에서 설명한 것과 같이, H 또는 치환 또는 비치환 C₁~C₆ 알킬이다.

<1156> 또, S가 0로 치환되는 세린 유도체가 이 일반 구조식내에 포함된다는 것은 이 분야 기술자가 알 수 있다.

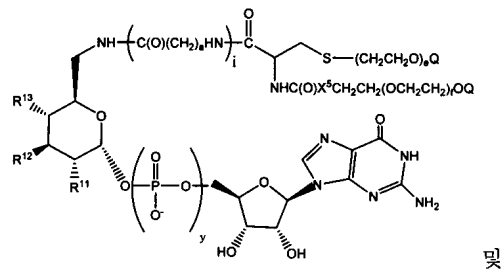
<1157> 또 다른 하나의 대표적인 예에서, 본 발명은 그 변형당이 UDP 갈락토오스의 입체 화학적 작용을 기준으로 하는 하나의 콘주게이트를 제공한다.

<1158> 이 발명에서 유용한 하나의 대표적인 뉴클레오타이드당은 아래에 나타낸 구조식의 구조를 가진다.

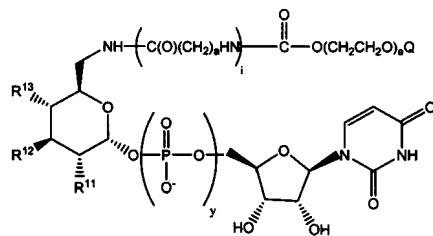


<1159>

<1160> 또 다른 대표적인 예에서, 그 뉴클레오타이드당은 글루코오스의 입체화학적 작용을 기준으로 한다. 이 예에 의한 대표적인 종(species)은 아래에 나타낸 구조식을 가진다:

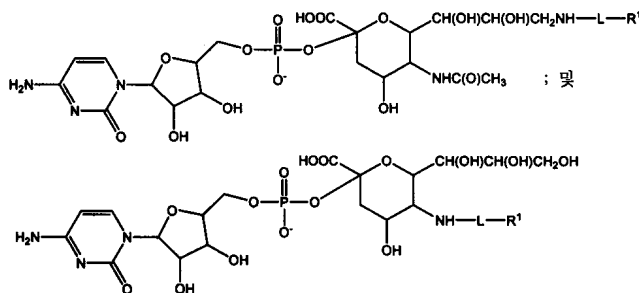


<1161>



<1162>

<1163> 이와 같이, 글리코실 성분이 시알산인 하나의 대표적인 예에서 본 발명의 방법은 아래에 나타낸 구조식을 가진 화합물을 사용한다:

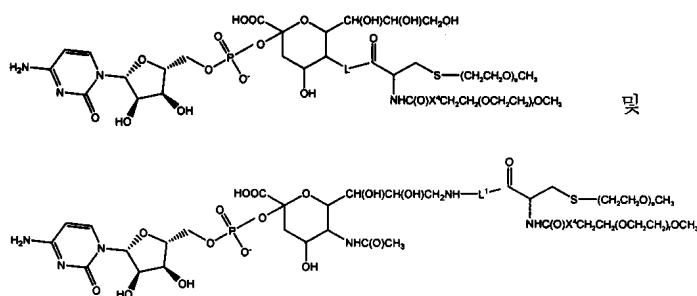


<1164>

<1165> 위 구조식에서, L-R¹은 위에서 설명한 것과 같으며, L¹-R¹은 변형기에 결합된 하나의 링커를 나타낸다. L에서와 같이, L¹에 의한 대표적인 링커종(linker species)에는 하나의 결합, 알킬 또는 헤테로 알킬 성분을 포함한다.

<1166> 더욱이, 위에서 설명한 바와 같이, 본 발명은 직쇄 또는 분기 수용성 폴리머로 변형시킨 뉴클레오타이드당의 사용

을 제공한다. 예로서, 아래에 나타난 구조식을 가진 화합물을 본 발명의 범위 내에서 콘주게이트의 제조에 유용하다:



<1167>

<1168>

위 구조식에서,

<1169>

X^4 는 O(산소) 또는 하나의 결합이다.

<1170>

일반적으로, 그 당성분 또는 당성분-링커 카세트(cassette) 또는 PEG 또는 PEG-링커 카세트 그룹(groups)은 반응성기를 사용하여 함께 결합되며, 그 반응성기들은 결합프로세스에 의해 하나의 유기 작용기 또는 미반응성종으로 일반적으로 변형시킨다. 그 당반응성 작용기는 그 당성분상의 어느 위치에서도 위치된다. 본 발명의 실시예에 유용한 반응성기와 여러가지 유형의 반응은 바이오콘주게이트의 화학적 작용기술에서 일반적으로 공지된 것이다.

<1171>

반응성 당 성분으로 이용할 수 있는 바람직한 현행반응유별(classes)은 비교적 온화한 조건 하에서 처리되는 반응이다.

<1172>

이들의 반응에는 구핵(nucleophilic) 치환(즉, 아민 및 알코올과 아실할라이드, 할성에스테르의 반응), 구전자(electrophilic)치환(즉, 에나민반응) 및 탄소-탄소와 탄소-헤테로원자 다중결합의 부가(즉, 미카엘반응, 딜스-알더 부가)를 포함하나 한정된 것은 아니다.

<1173>

이들의 반응과 다른 유용한 반응은 예로서 아래의 참고문헌에서 기재되어 있다. :

<1174>

March, Advanced Organic Chemistry, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, 1996; Feeney 등, Modification of proteins; Advances in Chemistry Series, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982

<1175>

하나의 당핵 또는 변형기에서 부속(또는 현수)(pendent)되어 있는 유용한 반응성 작용기들은

<1176>

(a) N-히드록시 숙신이미드에스테르, N-히드록시 벤조트리아졸 에스테르, 산할라이드, 아실 이미다졸, 티오에스테르, P-니트로페닐에스테르, 알킬, 알케닐, 알머닐 및 방향족에스테르를 포함하나 한정되지 않은 카르복실기 및 여러가지의 그 유도체;

<1177>

(b) 에스테르, 에테르, 알데히드 등으로 전환시킬 수 있는 히드록실기;

<1178>

(c) 할로알킬기(여기서 할라이드가 하나의 구핵기(예로서 하나의 아민, 하나의 카르복실레이트 아니온, 티올 아니온, 카르바니온, 또는 하나의 알콕시드 이온등)로 후치환됨으로써 할로겐 원자의 작용기에서 하나의 새로운 기의 공유결합을 얻음);

<1179>

(d) 디에노필(dienophile)기 (예로서, 말레이미도기등 딜스-알더(Diels-Alder) 반응에 참가할 수 있는 기(groups)임);

<1180>

(e) 카르보닐 유도체(예로서, 이민, 히드라존, 세미카르바존, 또는 옥심)의 형성에 의해, 또는 그리냐르(Grignard) 부가 또는 알킬리튬 부가 등의 메카니즘에 의해 후속 유도체가 가능하도록 하는 알데히드 또는 케톤기;

<1181>

(f) 아민과의 후속반응으로, 예로서 술폰아미드를 형성하는 술폰일 할라이드기;

<1182>

(g) 예로서, 디술피드로 전환시킬수 있거나 또는 아실할라이드와 반응시킬 수 있는 티올기;

<1183>

(h) 예로서, 아실화, 알킬화 또는 산화시킬 수 있는 아민 또는 술폰히드릴기;

- <1184> (i) 예로서, 시클로부가, 아실화, 미카엘 부가 등을 실시할 수 있는 알켄 및
- <1185> (j) 예로서, 아민 및 히드록실 화합물과 반응할 수 있는 에폭사이드를 포함하나, 한정되어 있는 것은 아니다.
- <1186> 그 반응성 작용기를 선택하여 그 반응성 당핵 또는 변형기를 집합하는데 필요한 반응에 참가하지 않게 하거나, 또는 그 반응을 방해하지 않게 한다. 또, 하나의 반응성 작용기는 하나의 보호기의 존재에 의해 그 반응의 참가로부터 보호받을 수 있다. 이 분야의 기술자들은 반응조건의 선택설정을 방해하지 않도록 하나의 특정 작용기를 보호하는 방법을 이해하고 있다. 유용한 보호기의 예는 아래의 참고문헌을 참조할 수 있다(Greene 등, *Protective Groups in organic synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1991.).
- <1187> 다음에 이어지는 설명에서, 본 발명의 실시에서 유용한 변형당의 다수의 특정예를 설명한다.
- <1188> 하나의 대표적인 예에서, 하나의 시알산 유도체는 그 변형기가 결합되어 있는 당행으로 이용된다.
- <1189> 시알산 유도체에 대한 설명 요지는 설명만을 명백하게 하기 위한 것이며, 본 발명의 범위를 한정된 것으로 해석할 필요는 없다.
- <1190> 다수의 다른 당성분은 하나의 예로서 시알산을 사용하여 설명한 것과 동일한 방식으로 활성화시켜 유도화시킬 수 있다는 것을 이 분야의 기술자들은 이해할 수 있다. 예로서, 다수의 방법은 공지된 방법에 의해 용이하게 변형시키는 수종의 당기질을 지칭하는 갈락토오스, 글루코오스, N-아세틸갈락토사민을 변형하는데 이용할 수 있다. 예로서, 다음 참고문을 참조할 수 있다(Elhalabi 등, *Curr. Med. Chem.* 6: 93(1999); Schafer 등, *J. Org. Chem.* 65: 24(2000).).
- <1191> 하나의 대표적인 예에서, 그 변형당은 6-아미노-N-아세틸-글리코실 성분을 기준으로 한다.
- <1192> 상기 스킴(scheme)에서, 지수 n은 정수 1-2500을 나타낸다. 하나의 대표적인 예에서, 이 지수는 그 폴리머의 분자량이 약 10KDa, 15Kda 또는 20KD가 되도록 선택한다.
- <1193> 부호 "A"는 하나의 활성화기, 즉 하나의 할로, 하나의 활성화 에스테르의 하나의 성분(즉, 하나의 N-히드록시 숙신 이미드 에스테르), 하나의 카르보네이트의 하나의 성분(즉, P-니트로페닐 카르보네이트) 등을 나타낸다. 이 분야의 기술자들은 다른 PEG-아미드 뉴클레오타이드당이 이 방법 및 동일한 방법에 의해 용이하게 제조할 수 있다는 것을 알 수 있다.
- <1194> 그 펩티드는 원핵세포(즉, 예. 콜리등 세균세포) 또는 진핵세포(포유동물, 효모, 곤충, 진균 및 식물세포 등)에서 일반적으로 다시(de novo) 새로 합성하거나, 또는 재조합에 의해 발현시킨다.
- <1195> 그 펩티드는 하나의 장편 단백질(full-length protein) 또는 하나의 프라그먼트(fragment) 단백질로 할 수 있다.
- <1196> 더욱이, 그 펩티드는 하나의 야생형 펩티드 또는 변이 펩티드로 할 수 있다.
- <1197> 하나의 대표적인 예에서, 그 펩티드에는 1개 이상의 N-또는 O-결합 글리코실화 부위를 그 펩티드 서열에 추가하는 하나의 변이(mutation)를 포함한다.
- <1198> 또, 발명의 방법은 재조합에 의해 생성되는 불완전 글리코실화 펩티드의 변형(modification)하는 것을 제공한다.
- <1199> 재조합에 의해 생성된 다수의 글리코프로테인은 글리코실화가 불충분하게 되어, 바람직하지 않은 성질, 즉 면역원성, RES에 의한 인식을 가질 수 있는 카르보 히드레이트 잔기를 나타낸다.
- <1200> 본 발명의 하나의 방법에서 하나의 변형당을 사용하여 그 펩티드가 하나의 수용성 폴리머, 치료제 등과 함께 동시에 더 글리코실화시켜 유도체화할 수 있다.
- <1201> 그 변형당의 당성분은 하나의 완전 글리코실화 펩티드 중에서 그 수용체에 적합하게 콘주게이팅하는 잔기 또는 바람직한 성질을 가진 또 다른 당성분으로 할 수 있다.
- <1202> 이 분야의 기술자들은 실질상 어느 펩티드 또는 글리코 펩티드라도 어느 소오스(source)에서 사용하여 본 발명을 실시할 수 있다는 것을 알 수 있다.
- <1203> 본 발명을 실시할 수 있는 대표적인 펩티드는 특허문헌 WO 03/031464 및 여기서 설명한 다수의 참고문헌에서 기재되어있다.

- <1204> 본 발명의 방법에 의해 변형한 펩티드는 합성 또는 야생형 펩티드로 할 수 있고, 또 이들의 펩티드는 부위특이적 변이유발(site-directed mutagenesis) 등 종래기술에서 공지된 방법에 의해 생성된 변이 펩티드로 할 수 있다.
- <1205> 펩티드의 글리코실화는 일반적으로 N-결합 또는 O-결합이다. 하나의 대표적인 N-결합은 하나의 아스파라긴잔기의 측쇄에서의 그 변형당의 결합이다.
- <1206> 그 트리펩티드 서열, 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌(여기서, X는 프롤린을 제외한 어느 아미노산이다.)은 그 아스파라긴 측쇄에서 하나의 카르보히드레이트 성분의 효소에 의한 결합 인식서열(recognition sequences)이다.
- <1207> 이와 같이, 하나의 폴리펩티드에서 이들의 트리펩티드 서열 존재로, 하나의 잠재적인 글리코실화 부위를 형성한다.
- <1208> O-결합 글리코실화는 비천연(non-natural) 아미노산, 즉 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시라이신을 또 사용할 수 있어도, 하나의 히드록시 아미노산(바람직하게는 세린 또는 트레오닌)의 히드록시 측쇄에 하나의 당(즉, N-아세틸갈락토사민, 갈락토오스, 만노오스, GlcNAc, 글루코오스, 푸코오스 또는 커실로오스)의 결합(attachment)을 말한다.
- <1209> 더욱이, 펩티드 이외에, 본 발명의 방법은 다른 생체구조(즉, 하나의 글리코실화 부위를 포함하는 글리코리피드, 리피드(lipids), 스핑고이드(sphingoids), 세라미드, 전세포(whole cells)등)로 실시할 수 있다.
- <1210> 하나의 펩티드 또는 다른 구조에 글리코실화부위의 부가는 1개 이상의 글리코실화 부위를 포함하도록 그 아미노산 서열을 변경(altering)함으로써 간편하게 얻어진다.
- <1211> 또 그 부가는 그 펩티드(O-결합글리코실화 부위용)의 서열내에서 하나의 -OH기를 제공하는 1개 이상의 종(species), 바람직하게는 세린 또는 트레오닌 잔기의 결합에 의해 얻어질 수 있다.
- <1212> 그 부가는 변이에 의해, 또는 그 펩티드의 전체적인 화학적 합성에 의해 얻어진다.
- <1213> 그 펩티드 아미노산 서열은 DNA레벨에서 변경에 의해, 특히 바람직한 아미노산으로 번역하는 코돈(codon)을 발생하도록한 사전선택염기에서 그 펩티드를 엔코딩하는 DNA를 변이함으로써, 변경되는 것이 바람직하다.
- <1214> 그 DNA변이는 종래기술에서 공지된 방법을 사용하여 실행하는 것이 바람직하다.
- <1215> 하나의 대표적인 예에서, 그 글리코실화 부위는 폴리 뉴클레오티드를 셔플링(shuffling)함으로써 추가된다.
- <1216> 하나의 후보 펩티드(candidate peptide)를 엔코딩하는 폴리 뉴클레오티드는 DNA 셔플링 프로토콜(protocols)로 변조(modulation)할 수 있다.
- <1217> DNA 셔플링은 재조합 및 변이의 반복 프로세스로, 관련 유전자의 하나의 풀(pool)의 임의 세편화(random fragmentation)에 의해 실시하고, 이어서 하나의 폴리머 효소 사슬반응 프로세스에 의해 그 세편(fragments)을 집합한다.
- <1218> 참고문헌을 아래에 예시한다: Stemmer, Proc. NAH. Acad. SCi USA 91: 10747-10751(1994); Stemmer, Nature 370; 389-391(1994); USP 5,605,793; USP 5,837,458; USP 5,830,721 및 USP 5,811,238.
- <1219> 본 발명을 실시할 수 있는 대표적인 펩티드, 글리코실화 부위를 부가 또는 제거하는 방법 및 글리코실 구조체 또는 서브구조체를 부가 또는 제거하는 방법은 특허문헌 W003/031464와 그 관련 US 특허출원 및 PCT출원에서 구체적으로 기재되어 있다.
- <1220> 또, 본 발명은 하나의 펩티드에서 하나 이상의 선택 글리코실잔기를 부가 또는 제거한 다음, 하나의 변형당을 그 펩티드의 최소 1개의 선택 글리코실잔기에 콘주게이팅하는 이점(효과)을 가진다.
- <1221> 본 발명의 이예는 예로서 하나의 펩티드 상에 존재하지 않거나 소정량으로 존재하지 않는 하나의 선택 글리코실잔기에 그 변형당을 콘주게이팅하고자 할 경우 유용하다.
- <1222> 이와 같이, 하나의 펩티드에 하나의 변형당을 결합(coupling)하기 전에, 그 선택 글리코실 잔기가 효소에 의한 결합 또는 화학적 결합에 의해 그 펩티드에 콘주게이팅된다.
- <1223> 또 다른 예에서, 하나의 글리코펩티드의 글리코실화 패턴은 그 글리코펩티드에서 하나의 카르보히드레이트 잔기

의 제거에 의해, 그 변형당의 콘주게이션 전에 변경된다. 예로서, 특허문헌 W098/31826을 참조할 수 있다.

<1224> 그 글리코펩티드 상에 존재한 어느 카르보히드레이트 성분의 부가 또는 제거는 화학적으로 또는 효소에 의해 이루어진다. 하나의 대표적인 화학적 탈글리코실화(deglycosylation)는 화합물 트리플루오로메탄술포산 또는 하나의 등가화합물에 그 폴리펩티드 변종(variants)의 노출에 의해 발생한다.

<1225> 이 처리결과, 그 결합당(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민) 이외에 거의 모든당을 절단하여, 동시에 그 펩티드를 무손상 상태로 잔류하도록 한다.

<1226> 화학적 탈글리코실은 다음 참고문헌에 기재되어있다(Hakimuddin 등, Arch, Biochem, Biophys. 259; 52(1987); Edge 등, Ana. Biochem. 118; 131(1981)).

<1227> 폴리펩티드 변종상에서 카르보히드레이트 성분의 효소에 의한 절단은 다음참고문헌에 의해 기재된 바와 같이 다수의 엔도-및 엑소-글리코시다아제를 사용하여 얻을 수 있다(참고문헌: Thotakura 등, Meth, Enzymol. 138: 350(1987)).

<1228> 하나의 대표적인 예에서, 그 펩티드는 그 펩티드 상에서 글리코콘주게이션 또는 리모델링(remodeling)을 실시하기 전에 뉴라미니다아제(neuraminidase)로 주로 완전히 탈시알릴화한다. 그 다음에 이어서 글리코콘주게이션 또는 리모델링하며, 그 펩티드는 하나의 시알릴 전이효소를 사용하여 선택적으로 재시알릴화한다. 하나의 대표적인 예에서, 그 재시알릴화(re-sialylation)는 시알릴 수용체의 하나의 개체군에서 주로 각각의 말단사카릴수용체에서 발생한다(즉, >80%, 바람직하게는 85%이상, 90%이상, 바람직하게는 95%이상, 더 바람직하게는 96%, 97%, 98% 또는 99%이상).

<1229> 하나의 바람직한 예에서, 그 사카리드는 실제로 하나의 균일한 시알릴화 패턴(즉, 실질상 균일한 글리코실화 패턴)을 가진다.

<1230> 글리코실 성분의 화학적인 부가는 어느 공지된 방법에 의해 실시한다.

<1231> 당성분의 효소에 의한 부가는 본 발명에서 사용되는 변형당의 무변성(native) 글리코실단위를 치환시키는 여기서 설명한 방법 중 하나의 변형방법을 사용하여 얻는 것이 바람직하다.

<1232> 당 성분을 부가하는 다른 방법은 다음 특허문헌에서 개시되어 있다(USP 5,876,980; USP6,030,815; USP 5,728,554 및 USP 5,922,577).

<1233> 선택글리코실 잔기의 대표적인 결합지점(attachment points)에는

<1234> (a) N-결합글리코실화의 공통부위와 O-결합글리코실화부위;

<1235> (b) 하나의 글리코실전이효소의 수용체인 말단 글리코실 성분;

<1236> (c) 아르기닌, 아스파라긴 및 히스티딘;

<1237> (d) 유리 카르복실기;

<1238> (e) 유리술포히드릴기(시스테인의 상기기등);

<1239> (f) 유리히드록실기(세린, 트레오닌 또는 히드록시프롤린의 상기기등);

<1240> (g) 방향족잔기(페닐알라닌, 타이로신 또는 트립토판의 상기기등); 또는

<1241> (h) 글루타민의 아미드기를 포함하나, 한정되어있는 것은 아니다.

<1242> 본 발명에서 유용한 대표적인 방법은 다음 참고문헌에서 기재되어있다(특허문헌 W087/05330; 1987. 09.11 공개; Aplin 및 Wriston, CRC CRIT. REV. Biochem. pp 259-306)1981)).

<1243> 하나의 예에서, 본 발명은 하나의 결합기에 의해 2개 이상의 펩티드를 결합하는 하나의 방법을 제공한다.

<1244> 그 결합기는 어느 유용한 구조이며, 직쇄 및 분기구조에서 선택할 수 있다. 하나의 펩티드에 결합되어 있는 그 링커의 각각의 말단에는 하나의 변형당(즉, 하나의 초기의 무손상 글리코실 결합기)을 포함한다.

<1245> 하나의 대표적인 본 발명의 방법에서, 2개의 펩티드는 하나의 폴리머(즉, PEG링커)를 포함하는 하나의 링커에 의해 함께 결합된다.

<1246> 그 구성은 위에서 설명한 일반 구조체와 일치한다. 여기서 설명한 바와 같이 본 발명의 구성에서는 2개의 무손

상 글리코실 결합기(즉, $s + t = 1$)를 포함한다.

<1247>

2개의 글리코실기를 포함하는 하나의 PEG링커 상의 포커스(focus)는 구성을 명백하게 하기 위한 것이며, 본 발명의 이 예에서 유용한 링커암(arms)의 동정(identity)을 한정하는 것으로 볼 필요는 없다.

<1248>

이와 같이, 하나의 PEG 성분은 하나의 제 1 글리코실 단위를 가진 하나의 제 1 말단과 하나의 제 2 글리코실 단위를 가진 하나의 제 2 말단에서 기능화한다.

<1249>

상기 제 1 및 제 2 글리코실 단위는 다른 전이효소의 기질인 것이 바람직하며, 각각 제 1 및 제 2 글리코실 단위에 제 1 및 제 2 펩티드의 직립결합(orthogonal Attachment)을 하도록 한다.

<1250>

실제로, 그 (글리코실)¹-PEG-(글리코실)² 링커는 제 1 글리코실 단위가 하나의 기질인 제 1 펩티드와 하나의 제 1 전이효소와 접촉하여, (펩티드)¹-(글리코실)¹-(글리코실)²를 형성한다.

<1251>

그 다음, 전이효소 및/ 또는 미반응 펩티드는 선택적으로 그 반응혼합물에서 제거한다.

<1252>

제 2 글리코실 단위가 하나의 기질인 제 2 펩티드와 하나의 제 2 전이효소는 상기 (펩티드)¹-(글리코실)¹-PEG-(글리코실)² 콘주게이트에 추가되어 (펩티드)¹-(글리코실)¹-PEG-(글리코실)²-(펩티드)²를 형성한다;

<1253>

그 글리코실 잔기들 중 최소 하나는 직접 또는 간접적으로 O-결합된다.

<1254>

위에서 개략적으로 설명한 방법이 예로서 하나의 분기 PEG, 덴드라이머(dendrimer), 폴리(아미노산), 폴리사카리드등을 사용하여 2개 이상의 펩티드 사이에 콘주게이트를 형성하는데 적용할 수 있다는 것은 이 분야의 기술자에 의해 이해할 수 있다.

<1255>

하나의 대표적인 예에서, 본 발명의 하나의 방법에 의해 변형시킨 펩티드는 포유동물세포(즉, CHO세포) 또는 형질전환동물에서 생성된 하나의 글리코펩티드이며, 따라서 불완전하게 시알틸화한 N-및/또는 O-결합 올리고사카리드 사슬을 포함한다.

<1256>

하나의 시알산이 결합되고 하나의 말단 갈락토오스 잔기가 함유되어있는 글리코펩티드의 올리고사카리드 사슬은 폐질화(PEGylation), PPG화(PPGylation)할 수 있거나, 또는 하나의 변형시알산으로 변형시킬 수 있다.

<1257>

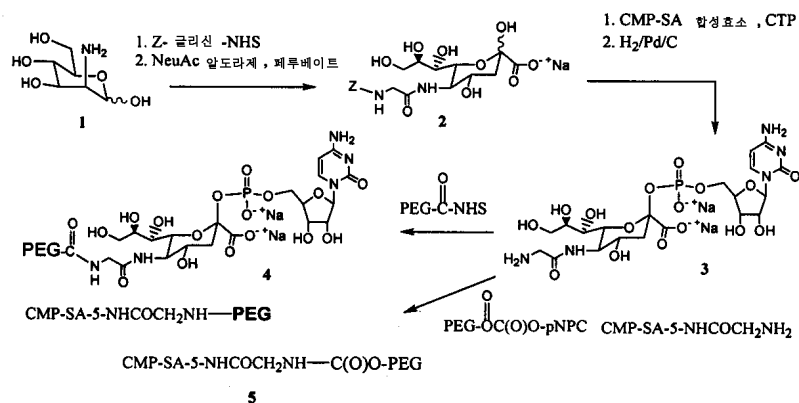
아래에 나타난 스킴(scheme)(제조공정도) 1에서, 아미노 글리코시드 1을 하나의 보호아미노산(즉, 글리신) 유도체의 활성에스테르로 처리하여, 그 당아민잔기를 그 대응하는 보호아미노산 아마이드 부가물(adduct)로 전환한다.

<1258>

그 부가물을 하나의 알돌라아제로 처리하여 α -히드록시 카르복실레이트 2를 생성한다. 그 화합물 2를 CMP-SA 합성효소의 작용과 그 다음 CMP 유도체의 촉매 수소첨가반응에 의해 그 대응하는 CMP 유도체로 전환시켜 화합물 3을 생성한다. 그 글리신 부가물의 생성에 의해 도입된 아민을 PEG결합의 하나의 부위로 사용하여, 그 화합물 3을 하나의 활성화 PEG 또는 PPG 유도체(즉, PEG-C(O)NHS, PEG-OC(O)O-P-니트로페닐)와 반응시킴으로써 각각 4 또는 5등의 종(species)을 생성한다.

<1259>

스킴(scheme) 1



<1260>

<1261>

하나의 대표적인 예에서, 하나의 변형당은 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 상에서의 하나의 O-글리칸 결합부위에 결합시킬 수 있다.

- <1262> 사용하여 이 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트를 생성할 수 있는 글리코실 전이효소에는 아래의 것이 포함되어 있다:
- <1263> Ser56-Glc-(Xyl)n-Gal-SA-PEG-갈락토실전이효소 및 시알릴전이효소; Ser56-Glc-(Xyl)n-Xyl-PEG-키실로실전이효소; Ser60-Fuc-GlcNAc-(Gal)n-(SA)m-GlcNAc 전이효소.
- <1264> III. A. 펩티드에 변형당의 콘주게이션(conjugation of modified sugars to peptides)
- <1265> PEG 변형당은 그 콘주게이션을 매개(mediate)하는 하나의 적합한 효소를 사용하여 하나의 글리코실화 또는 비(non)글리코실화 펩티드에 콘주게이팅 한다.
- <1266> 그 변형 도너당, 효소 및 수용체 펩티드의 농도를 선택하여 그 수용체가 소비될 때까지 글리코실화를 진행하도록 하는 것이 바람직하다.
- <1267> 시알릴전이효소에 대하여 설명한 아래의 구체적인 고찰은 일반적으로 다른 글리코실 전이효소 반응에 적용할 수 있다.
- <1268> 본 발명에서 사용하는 바람직한 시알릴전이효소의 리스트는 도 3에 제공하여 설명한다.
- <1269> 글리코실전이효소를 사용하여 바람직한 올리고사카리드 구조를 합성하는 여러 가지의 방법은 공지되어 있어, 일반적으로 본 발명에 적용할 수 있다.
- <1270> 대표적인 방법은 예로서 특허문헌 WO 96/32491; Ito 등, Pure Appl. Chem. 65:753 (1993); 특허문헌 USP 5,352,670; USP 5,374,541; USP 5,545,553; USP 6,399,336 및 USP 6,440,703(소유권 공유); PCT 출원(소유권 공유), WO 03/031464, WO 04/033651 및 WO 04/099231에서 기재되어 있다.
- <1271> 본 발명은 하나의 단일 글리코실전이효소 또는 글리코실전이효소의 조합물을 사용하여 실시한다.
- <1272> 예로서, 그 하나는 하나의 시알릴전이효소와 하나의 갈락토실전이효소의 하나의 조합물을 사용할 수 있다.
- <1273> 1종 이상의 효소를 사용하는 이들의 예에서, 그 효소와 기질은 초기반응 혼합물 중에서 조합하는 것이 바람직하며, 또는 제 1 효소반응이 완료되거나 거의 완료된 경우 제 2 효소반응의 효소와 시약을 그 반응 배지에 첨가한다.
- <1274> 하나의 단일 용기 내에서 2종의 효소만을 차례로 실시함으로써, 전체적인 수율은 하나의 중간 종을 분리시키는 처리공정에 비하여 향상된다. 더욱이, 추가용매와 부산물의 청소 및 폐기하는 것을 감소시킨다.
- <1275> 하나의 바람직한 예에서, 각각의 제 1 효소와 제 2 효소는 하나의 글리코실전이효소이다.
- <1276> 또 다른 바람직한 예에서, 하나의 효소는 하나의 엔도(endo) 글리코시다아제이다. 하나의 추가하는 바람직한 예에서, 2종 이상의 효소는 사용하여 본 발명의 변형 글리코프로테인을 집합한다.
- <1277> 그 효소들을 사용하여 그 펩티드에 변형당의 부가 전후 어느 시점에서 그 펩티드 상에서의 하나의 사카리드 구조를 변경시킨다.
- <1278> 또 다른 예에서, 그 방법에 의해 하나 이상의 엑소 또는 엔도 글리코시다아제를 사용하도록 한다.
- <1279> 그 글리코시다아제는 일반적으로 하나의 변이체로, 그 변이체가 작용하여 글리코실 결합을 파괴(rupture)하기 보다 그 결합을 형성한다.
- <1280> 그 변이체 글리카나아제에는 일반적으로 하나의 활성 부위의 산성 아미노산잔기에 대한 아미노산 잔기의 치환을 포함한다.
- <1281> 예로서, 엔도글리카나아제가 엔도-H인 경우, 그 치환 활성부위 잔기를 일반적으로 위치 130에서 Asp, 위치 132에서 Glu 또는 그 조합으로 할 수 있다. 그 아미노산은 일반적으로 세린, 알라닌, 아스파라긴 또는 글루타민으로 치환시킨다.
- <1282> 그 변이체 효소는 통상적으로 엔도 글리카나아제 가수분해 스텝의 역반응과 동일한 하나의 합성 스텝에 의해, 그 반응을 촉진한다.
- <1283> 이들의 예에서, 그 글리코실 도너분자(즉, 하나의 바람직한 올리고 또는 모노 사카리드 구조)에는 하나의 이탈기를 포함하고 있어, 그 반응은 그 단백질 상에서 하나의 GlcNAc 잔기에 그 도너분자를 부가하면서 진행한다.

- <1284> 예로서, 그 이탈기는 플루오리드 등 하나의 할로겐으로 할 수 있다. 다른 예에서, 그 이탈기는 하나의 Asn 또는 하나의 Asn-펩티드 성분이다. 또 다른 예에서, 그 글리코실 도너분자 상에서의 GlcNAc 잔기는 변경된다. 예로서, 그 GlcNAc 잔기는 하나의 1, 2 옥사졸린 성분으로 구성할 수 있다.
- <1285> 하나의 바람직한 예에서, 본 발명의 하나의 콘주게이트를 생성하는데 사용되는 각각 효소는 촉매량으로 존재한다.
- <1286> 하나의 특정 효소의 촉매량은 그 효소의 기질의 농도와 반응조건(온도, 시간 및 pH 값 등)에 따라 변화한다.
- <1287> 사전에 선택된 기질농도와 반응조건 하에서 주어진 효소의 촉매량을 측정하는 수단은 이 분야의 기술자에 의해 공지되었다.
- <1288> 위 처리공정을 실시하는 온도는 바로 위 동결(freezing) 온도에서 가장 감온성인 효소가 변성되는 온도까지의 범위로 할 수 있다.
- <1289> 바람직한 온도는 약 0℃ ~ 약 55℃의 범위, 더 바람직하게는 약 20℃ ~ 약 37℃의 범위이다.
- <1290> 또 다른 대표적인 예에서, 본 발명의 방법의 하나 이상의 성분은 하나의 고온성 효소(thermophilic enzyme)를 사용하여 고온에서 실시한다.
- <1291> 그 반응 혼합물은 그 수용체가 글리코실화 하는데 충분한 시간 동안 유지함으로써, 소정의 바람직한 콘주게이트를 형성한다.
- <1292> 그 콘주게이트의 일부는 24시간 이내에서 통상적으로 얻어지는 회수 가능한 양으로 하여 수시간 후에 자주 검출할 수 있다.
- <1293> 그 반응속도는 하나의 선택계(selected system)에 최적화하는 다수의 변동 팩터(variable factors)(즉, 효소농도, 도너농도, 수용체농도, 온도, 용매용량)에 따라 좌우된다는 것은 이 분야의 기술자에 의해 알 수 있다.
- <1294> 또, 본 발명은 변형 펩티드의 산업적 규모의 생산을 제공한다.
- <1295> 여기서, 사용하고 있는 바와 같이, 산업적 규모(industrial scale)에서는 일반적으로 최소 1g의 완성된 순수 콘주게이트를 생산한다.
- <1296> 다음에 이어지는 설명에서, 본 발명은 하나의 글리코실화 펩티드에 변형 시알산 성분의 콘주게이션(conjugation)을 예시한다.
- <1297> 대표적인 변형 시알산은 PEG로 라벨링(labeling)한다.
- <1298> PEG-변형 시알산과 글리코실화 펩티드의 사용에 대한 다음 설명의 구성요지(focus)는 설명을 명백하게 하기 위한 것으로, 이들의 2개 패턴의 콘주게이션으로 본 발명을 한정시키는 것을 의미하지 않는다.
- <1299> 그 설명은 일반적으로 시알산 이외 변형 글리코실 성분의 부가에 적용할 수 있다는 것은 이 분야의 기술자에 의해 알 수 있다.
- <1300> 더욱이, 그 설명에서는 다른 PEG 성분, 치료성분, 바이오 분자(biomolecules)를 포함하는 PEG 이외 처리제(agents)로 하나의 글리코실 단위의 변형(modification)에 동일하게 적용할 수 있다.
- <1301> 하나의 효소에 의한 접근방법에서는 하나의 펩티드 또는 글리코 펩티드 상에서 폐질화(PEGylated) 또는 PPG화(PPGylated) 카르보히드레이트의 선택적 도입을 사용할 수 있다.
- <1302> 그 방법은, PEG, PPG, 또는 하나의 차폐(masked)된 반응성 작용기를 함유한 변형당을 이용하여 적합한 글리코실전이효소 또는 글리코 합성효소와 배합한다.
- <1303> 바람직한 그 카르보히드레이트 결합을 형성하는 글리코실전이효소를 선택하고, 그 도너기질로서 그 변형당을 이용함으로써, 그 PEG 또는 PPG는 그 펩티드 골격상에, 하나의 글리코 펩티드의 기존의 당 잔기 상에 또는 하나의 펩티드에 부가되는 당 잔기 상에 직접 도입할 수 있다.
- <1304> 하나의 대표적인 예에서, 하나의 시알릴전이효소의 하나의 수용체(acceptor)는 하나의 천연구조로서 변형되는 펩티드 상에 존재하거나, 또는 제조함에 의해, 효소처리에 의해 또는 화학적 처리에 의해 그 펩티드 상에 위치된다.
- <1305> 적합한 수용체에는 예로서 Gal β 1,4GlcNAc, Gal β 1,4GalNAc, Gal β 1,3GalNAc, 락토-N-테트라오오스, Gal β

1,3GlcNAc, Gal β 1,3Ara, Gal β 1,6GlcNAc, Gal β 1,4Glc(락토오스) 및 이 분야의 기술자에 의해 공지된 기타 수용체 등 갈락토실 수용체를 포함한다(참고문헌: Paulson 등, J. Biol. Chem. 253: 5617-5624(1978)). 대표적인 시알릴전이효소는 여기서 설명한다.

<1306> 하나의 예에서, 그 시알릴전이효소의 하나의 수용체는 그 글리코 펩티드의 생체내 합성을 할 때 변형되는 글리코 펩티드 상에 존재한다.

<1307> 이와 같은 글리코 펩티드는 그 글리코 펩티드의 글리코실화 패턴의 사전변형 없이 청구항의 청구방법을 사용하여 시알릴화 할 수 있다.

<1308> 또, 본 발명의 방법(methods)을 사용하여 하나의 적합한 수용체를 포함하지 않은 하나의 펩티드를 시알릴화 할 수 있고; 이 처리기술에서는 이 분야의 기술자에 의해 공지된 방법에 의해 하나의 수용체를 포함하는 펩티드를 1차적으로 변형한다.

<1309> 하나의 대표적인 예에서, 하나의 GalNAc 잔기는 하나의 GalNAc 전이효소의 작용에 의해 부가된다.

<1310> 하나의 대표적인 예에서, 갈락토실 수용체는 그 펩티드, 즉 하나의 GlcNAc에 결합된 하나의 적합한 수용체에 하나의 갈락토오스 잔기를 결합하여 집합시킨다.

<1311> 상기 방법에서는 하나의 적합한 양의 갈락토실 전이효소(즉, Gal β 1, 3 또는 Gal β 1, 4)와 하나의 적합한 갈락토실 도너(즉, UDP-갈락토오스)를 함유하는 하나의 반응 혼합물로 변형시키는 펩티드를 배양하는 것을 포함한다.

<1312> 그 반응은 실질상 완료할 때까지 처리를 진행하도록 하거나, 또는 사전에 선택한 양의 갈락토오스 잔기를 부가할 때 그 반응을 완료시킨다.

<1313> 하나의 선택 사카리드 수용체를 집합하는 다른 방법은 이 분야의 기술자에 의해 알 수 있다.

<1314> 또 다른 예에서, 글리코 펩티드-결합 올리고 사카리드는 전체 또는 부분적으로 1차 "트리밍(trimmed)되어 시알릴 전이효소의 하나의 수용체 또는 하나 이상의 적합한 잔기가 부가되어 하나의 적합한 수용체를 얻을 수 있는 하나의 성분으로 나타낸다(exposing).

<1315> 글리코실 전이효소와 엔도 글리코시다아제 등 효소(예로서, 특허문헌 USP 5,716,812 참조)는 결합 및 트리밍 반응에 유용하다.

<1316> 이 방법의 또 다른 예에서, 그 펩티드의 시알산 성분은 주로 완전 제거되어(즉, 최소 90%, 최소 95% 또는 최소 99%) 하나의 변형 시알산의 하나의 수용체를 나타낸다(exposing).

<1317> 다음에 이어지는 설명에서, 본 발명의 방법은 결합되어 있는 하나의 PEG 성분을 가진 변형당의 사용을 예시한다.

<1318> 이 설명의 구성요지는 구체적 설명을 명확하게 하기 위한 것이다.

<1319> 이 설명에서는 그 변형당이 하나의 치료성분, 바이오분자 등을 가진 이들의 예에 동일하게 적용할 수 있다는 것을 이 기술분야의 기술자들에 의해 알 수 있다.

<1320> 변형당의 부가 전에 하나의 카르보히드레이트 잔기를 "트리밍"(trimming)하는 본 발명의 하나의 대표적 예에서, 제 1세대 2(bi) 안테나형상 구조에 고급 만노오스를 트리밍 백(trimming back)한다.

<1321> 하나의 PEG 성분을 가진 하나의 변형당은 그 "트리밍 백"에 의해 나타낸 하나 이상의 당 잔기에 콘주게이팅 된다.

<1322> 하나의 예에서, 하나의 PEG 성분은 그 PEG 성분에 콘주게이팅 된 하나의 GlcNAc 성분에 의해 부가된다.

<1323> 그 변형된 GlcNAc는 2 안테나형상 구조의 1개 또는 2개의 말단 만노오스 잔기에 부가된다.

<1324> 또, 하나의 비변형 GlcNAc가 그 분기 중의 말단 중 하나 또는 2개에 부가할 수 있다.

<1325> 또 다른 대표적 예에서, 하나의 PEG 성분은 그 말단 만노오스 잔기 상에 부가된 하나의 GlcNAc 잔기에 콘주게이팅 되어 있는 하나의 갈락토오스 잔기를 가진 하나의 변형당을 통해 그 2 안테나형 구조의 말단 만노오스 잔기의 하나 또는 2개에 부가되어 있다.

<1326> 또, 하나의 비변형 Gal은 하나 또는 2개의 말단 GlcNAc 잔기에 부가할 수 있다.

- <1327> 또 다른 예에서, 하나의 PEG 성분은 위에서 설명한 바와 같이 하나의 변형 시알산을 사용하여 하나의 Gal 잔기에 부가한다.
- <1328> 또 다른 대표적인 예에서, 하나의 고급 만노오스 구조는 그 2 안테나형상 구조가 분기된 만노오스에 "트리밍 백" 되어 있다.
- <1329> 하나의 예에서, 하나의 PEG 성분은 그 폴리머로 변형된 하나의 GlcNAc를 통해 부가되어 있다.
- <1330> 또, 하나의 비변형 GlcNAc는 그 만노오스에 부가된 후, 이어서 하나의 결합된 PEG 성분으로 하나의 Gal에 부가된다.
- <1331> 또 다른 예에서, 비변형 GlcNAc와 Gal 잔기는 그 만노오스에 차례로 부가되고, 이어서 하나의 PEG 성분으로 변형된 하나의 시알산 성분에 부가된다.
- <1332> 또 하나의 고급 만노오스 구조는 그 기본(elementary)적인 트리-만노실 코어에 트리밍 백(trimming back)된다.
- <1333> 또 다른 하나의 대표적인 예에서, 고급 만노오스는 제 1 만노오스가 결합되어 있는 GlcNAc에 "트리밍 백"된다.
- <1334> 그 GlcNAc는 하나의 PEG 성분을 가진 하나의 Gal 잔기에 콘주게이팅된다.
- <1335> 또, 하나의 비변형(unmodified) Gal은 그 GlcNAc에 부가된 다음, 이어서 하나의 수용성 당으로 변형시킨 하나의 시알산을 부가한다.
- <1336> 또 하나의 예에서, 그 말단 GlcNAc는 Gal과 콘주게이팅하고, 다음으로 그 GlcNAc는 하나의 PEG 성분을 가진 하나의 변형 푸코오스로 푸코실화 한다.
- <1337> 또, 고급 만노오스는 그 펩티드의 Asn에 결합된 제 1 GlcNAc로 트리밍 백 할 수 있다.
- <1338> 하나의 예에서, 그 GlcNAc-(Fuc)_a 잔기의 GlcNAc가 하나의 수용성 폴리머를 가진 하나의 GlcNAc와 콘주게이팅된다.
- <1339> 또 다른 예에서, 그 GlcNAc-(Fuc)_a 잔기의 GlcNAc는 Gal로 변형되어 하나의 수용성 폴리머를 가진다.
- <1340> 하나의 또 다른 예에서, 그 GlcNAc는 Gal로 변형된 다음에, 이어서 하나의 PEG 성분으로 변형시킨 하나의 시알산의 그 Gal과 콘주게이션에 의해 변형된다.
- <1341> 다른 대표적인 예는 특허문헌[미국 특허출원 공개 공보: 20040132640; 20040063911; 20040137557; 미국 특허출원 10/369,979; 10/410,913; 10/360,770; 10/410,945 및 PCT/US02/32263]에 기재되어 있다. 이들의 특허문헌을 여기서 참고로 예시한다.
- <1342> 위에서 기재한 예들은 여기서 설명한 방법의 구체적 설명을 제공한 것이다. 여기서 설명한 방법을 사용하여 어느 바람직한 구조의 하나의 카르보히드레이트 잔기를 "트리밍 백"하여 구성할 수 있다.
- <1343> 그 변형당은 여기서 설명한 바와 같이 카르보히드레이트 성분의 말단에 부가할 수 있거나, 또는 그 카르보히드레이트의 말단과 펩티드 코어 사이에서 중간체로 할 수 있다.
- <1344> 하나의 대표적인 예에서, 하나의 기존의 시알산은 하나의 시알리다아제를 사용하여 하나의 글리코 펩티드에서 제거함으로써 그 기초가 되는 갈락토실 잔기의 모두 또는 대부분을 나타낸다(unmasking).
- <1345> 또, 하나의 펩티드 또는 글리코 펩티드는 갈락토오스 잔기 또는 하나의 갈락토오스 단위에서 종료되는 하나의 올리고 사카리드로 라벨링(labeling)된다.
- <1346> 그 갈락토오스 잔기의 노출 또는 부가한 다음에, 하나의 적합한 시알릴 전이효소를 사용하여 하나의 변형 시알산을 부가한다.
- <1347> 또 다른 대표적인 예에서, 시알산 상에서 시알산을 전이하는 하나의 효소를 사용한다.
- <1348> 하나의 시알릴화 글리칸을 하나의 시알리다아제로 처리하지 않고 이 방법을 실시하여 그 시알산 바로 아래에 있는 글리칸 잔기를 노출시킬 수 있다.
- <1349> 하나의 대표적인 폴리머-변형 시알산은 폴리(에틸렌 글리콜)로 변형시킨 하나의 시알산이다.
- <1350> 시알산과 변형 시알산 성분을, 하나의 시알산 잔기를 함유한 글리칸 상에 부가하거나, 또는 하나의 기존의 시알

산 잔기를, 이들의 중의 하나의 글리칸 상에서 치환하는 다른 대표적인 효소에는 ST3Gal3, CST-II, ST8Sia-II, ST8Sia-III 및 ST8Sia-IV가 있다.

<1351> 또 다른 접근방법에서, 하나의 차폐(masked) 반응성이 있는 기능성(reactive functionality)은 그 시알산에 존재한다.

<1352> 그 차폐 반응성이 있는 작용기는 그 변형 시알산을 인자 VII/인자 VIIa 펩티드에 결합하는데 사용되는 조건에 의해 영향을 받지 않는 것이 바람직하다.

<1353> 그 펩티드에 그 변형 시알산을 공유 결합한 다음에, 그 차폐(mask)를 제거하고, 그 펩티드를 PEG 등 하나의 처리제로 콘주게이팅 한다.

<1354> 그 처리제(agent)는 그 변형당 잔기 상에서 노출된 반응성기와의 반응에 의해 특정지게 그 펩티드에 콘주게이팅 되어 있다.

<1355> 어느 변형당이라도 그 글리코 펩티드의 올리고 사카리드 측쇄 말단 당에 따라, 적합한 글리코실 전이효소로 사용할 수 있다.

<1356> 위에서 설명한 바와 같이, 그 PEG화 구조 도입에 필요로 하는 글리코 펩티드의 말단 당은 발현할 때 자연적으로 도입할 수 있거나, 또는 적합한 글리코시다아제, 글리코실 전이효소 또는 글리코다아제와 글리코실 전이효소의 혼합물(mix)을 사용하여 후 발현(post expression)을 얻을 수 있다.

<1357> 또 하나의 대표적인 예에서, UDP-갈락토오스-PEG를 β 1,4-갈락토실 전이효소와 처리함으로써, 그 변형 갈락토오스를 적합한 말단 N-아세틸 글로코사민 구조로 전이한다.

<1358> 그 글리코 펩티드 상의 말단 GlcNAc 잔기는 포유동물, 곤충, 식물체 또는 진균 등에서와 같은 발현 시스템에서 발생할 수 있는 바와 같이 발현할 때 얻을 수 있으나, 또 그 글리코 펩티드를 하나의 시알리다아제 및/또는 글리코시다아제 및/또는 글리코실 전이효소와 필요에 따라 처리하여 얻을 수 있다.

<1359> 또 다른 대표적인 예에서, GNT1-5 등 하나의 GlcNAc 전이효소는 하나의 글리코 펩티드 상에서 폐질화(PEG화)-GlcNAc를 하나의 말단 만노오스 잔기로 전이하는데 사용된다.

<1360> 하나의 또 다른 대표적인 예에서, 하나의 N-및/또는 O-결합 글리칸 구조는 하나의 글리코 펩티드에서 효소에 의해 제거시켜 그 변형당으로 콘주게이팅하는 하나의 아미노산 또는 하나의 말단 글리코실 잔기를 노출시킨다.

<1361> 예로서, 하나의 엔도 글리카나아제를 사용하여 하나의 글리코 펩티드의 N-결합 구조를 제거시켜 그 글리코 펩티드 상에서 하나의 GlcNAc-결합-Asn과 같이 하나의 말단 GlcNAc를 노출시킨다.

<1362> UDP-Gal-PEG와 적합한 갈락토실 전이효소를 사용하여 그 노출된 GlcNAc 상에 PEG-갈락토오스 기능성을 도입한다.

<1363> 하나의 또 다른 예에서, 그 변형당은 그 펩티드 골격으로 당 잔기를 전이하는데 공지되어 있는 하나의 글리코실 전이효소를 사용하여 그 펩티드 골격에 직접 부가한다.

<1364> 본 발명의 실시에서 유용한 대표적인 글리코실 전이효소에는 GalNAc 전이효소(GalNAc T1-14), GlcNAc 전이효소, 푸코실 전이효소, 글루코실 전이효소, 키실로스 전이효소, 만노실 전이효소 등을 포함하나, 한정되어 있는 것은 아니다.

<1365> 이와 같은 접근방법을 사용함으로써, 어느 카르보히드레이트라도 결합되어 있는 펩티드 상에서, 또는 기존의 글리코 펩티드 상에서 변형당의 직접 부가를 하도록 한다.

<1366> 상기 두 경우에서, 그 변형당의 부가는 그 글리코실 전이효소의 기질 특이성(substrate specificity)에 의해 규정되어 있는 바와 같이 그 펩티드 골격 상의 특정위치에서 발생하며, 화학적 방법을 사용하여 하나의 단백질의 펩티드 골격을 변형할 때 발생하는 것과 같이 임의로 발생하지 않는다.

<1367> 처리제(agents)는 그 폴리 펩티드 사슬에 적합한 아미노산 서열을 작용하여 글리코실 전이효소 기질의 펩티드가 결합되어 있는 단백질 또는 글리코 펩티드에 도입할 수 있다.

<1368> 위에서 설명한 각각의 대표적인 예에서, 하나 이상의 추가한 화학적 또는 효소에 의한 변형 스텝(modification steps)을 이용하여 그 펩티드에 변형당을 콘주게이션 한다.

<1369> 하나의 대표적인 예에서, 하나의 효소(즉, 푸코실 전이효소)를 사용하여 하나의 글리코실 단위(즉, 푸코오스)를

그 펩티드에 결합된 말단 변형당에 현수(부속)(appending)한다.

<1370> 또 다른 예에서, 하나의 효소에 의해 반응을 사용하여 그 변형당이 콘주게이팅 되지 않은 부위(site)를 "캐핑"(capping) 한다.

<1371> 예로서, 그 콘주게이팅된 변형당은 처리제(agents)와 반응하여, 그 처리제는 그 변형당이 결합되어 있는 펩티드 성분과의 결합을 안정화 또는 탈안정화(destabilization)한다.

<1372> 또 다른 예에서, 그 변형당의 하나의 성분은 탈보호 되어 그 펩티드에 콘주게이션 된다.

<1373> 그 변형당이 그 펩티드에 콘주게이팅된 후 하나의 단계(a stage)에서 본 발명의 방법에서 유용한 효소 및 화학적 처리공정이 있다는 것은 이 분야의 기술자에 의해 이해할 수 있다.

<1374> 그 변형당-펩티드 콘주게이트의 또 다른 제조는 본 발명의 범위내에 존재한다.

<1375> 본 발명의 콘주게이트의 제조를 위한 효소 및 반응조건은 본 발명 출원과 특허문헌 WO 03/031464, WO 04/033651 및 WO 04/099231(본 특허출원의 출원인의 공동소유 임)에서 구체적으로 기재되어 있다.

<1376> 하나의 선택한 예에서, 곤충 세포에서 발현된 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드는 리모델링(remodeling)하여, 그 리모델링된 글리코 펩티드 상의 글리칸에는 하나의 GlcNAc-Gal 글리코실 잔기를 포함하도록 한다.

<1377> GlcNAc와 Gal의 부가는 하나의 단일 용기 중에서 하나의 단일반응으로 또는 분리반응으로 하여 발생할 수 있다.

<1378> 이 예에서는 GlcNAc-전이효소 I 및 Gal-전이효소 I 이 사용된다.

<1379> 그 변형 시알릴 성분은 ST3Gal-III를 사용하여 부가한다.

<1380> 또 다른 예에서, GlcNAc, Gal 및 변형 Sia의 부가는 또 위에서 설명한 효소를 사용하여 하나의 단일반응 용기내에서 발생할 수 있다.

<1381> 각각의 효소에 의한 리모델링과 글리코 페질화(glycoPEGylation) 스텝은 개별적으로 실시한다.

<1382> 그 펩티드가 포유동물 세포에서 발현될 경우, 다른 방법들이 유용하다.

<1383> 하나의 예에서, 그 펩티드는 Sia-Sia-L-R¹을 형성하는 그 펩티드 상에서 하나의 시알산에 직접 그 변형 시알산을 전이하거나, 또는 Sia-L-R¹을 형성하는, 그 변형 시알산의 펩티드 상에서 하나의 시알산을 치환하는 하나의 시알릴전이효소와 그 펩티드를 접촉시켜 콘주게이션 하기 전에 리모델링할 필요 없이 콘주게이팅 한다.

<1384> 이 방법에서 유용한 하나의 대표적인 효소는 CSR-II이다.

<1385> 시알산을 시알산에 부가하는 다른 효소는 이 기술분야의 기술자에 의해 공지되었으며, 이와 같은 효소의 예는 여기서 첨부된 도면에서 기재되었다.

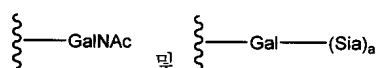
<1386> 본 발명의 콘주게이트를 제조하는 다른 방법에서, 하나의 포유동물 시스템에서 발현된 상기 펩티드는 하나의 시알리다아제를 사용하여 탈시알릴화(desialylation)한다.

<1387> 그 노출된 Gal 잔기는 O-결합 글리칸에 특이성이 있는 하나의 시알릴 전이효소를 사용하여 하나의 변형 시알산으로 시알릴화하여, 하나의 O-결합 변형 글리칸을 가진 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를 제공한다.

<1388> 그 탈시알릴화한 변형 인자 VII/인자 VIIa 펩티드는 ST3GalIII 등 하나의 시알릴 전이효소를 사용하여 선택적으로, 부분 또는 완전 리시알릴화(re-sialylation)시킨다.

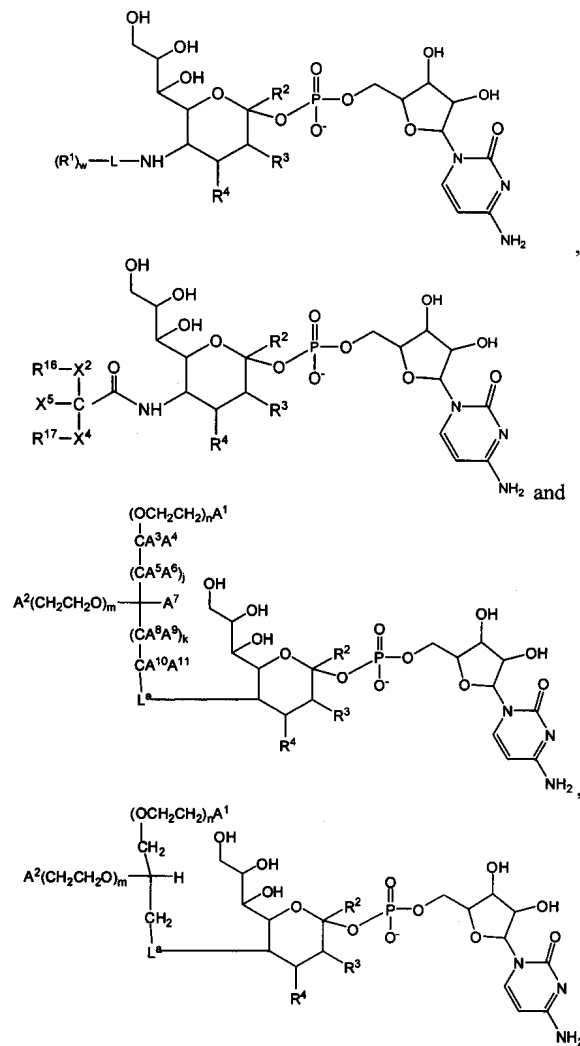
<1389> 또 다른 국면(aspect)에서, 본 발명은 본 발명의 하나의 페질화(PEGylated) 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 제조방법을 제공한다.

<1390> 그 방법은 (a) 아래에 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 글리코실기를 함유하는 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를



<1391>

<1392> 아래에 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 맴버인 구조식을 가진 하나의 PEG-시알산 도너



<1393>

<1394> 및 상기 글리코실기의 GalNAc, Gal 및 Sia에서 선택한 하나의 맴버 상에서 상기 도너로부터 PEG-시알산을 전이 하는 하나의 효소와 함께, 상기 전이에 적합한 조건하에서 접촉하는 것을 포함한다.

<1395> 하나의 대표적인 변형 시알산 도너는 하나의 링커 성분을 통해, 하나의 폴리머, 즉 하나의 직쇄 또는 분기 폴리 (에틸렌 글리콜) 성분으로 변형시킨 CMP-시알산이다.

<1396> 위에서 설명한 바와 같이, 그 펩티드는 그 변형당을 결합하기 전에 GalNAc 및/또는 Gal 및/또는 Sia("리모델 링": remodeling)로 선택적으로 글리코실화 한다.

<1397> 그 리모델링 스텝(remodeling steps)은 차례로 동일 용기 내에서 스텝 사이에서 글리코실화 펩티드를 정제하지 않고 실시할 수 있다.

<1398> 또, 하나 이상의 리모델링 스텝을 밟은 후에, 이어지는 다음의 글리코실화 스텝 또는 글리코 페질화 (glycoPEGylation) 스텝으로 진행하기 전 그 글리코실화 펩티드를 정제할 수 있다.

<1399> 하나의 대표적인 예에서, 그 방법은 하나의 숙주 내에서 그 펩티드를 발현하는 것을 더 포함한다.

<1400> 하나의 대표적인 예에서, 그 숙주는 하나의 포유동물 세포 또는 하나의 곤충 세포이다.

<1401> 또 다른 대표적인 예에서, 그 포유동물 세포는 하나의 BHK 세포와 하나의 CHO 세포에서 선택된 하나의 맴버이며,

<1402> 그 곤충세포는 하나의 스포도프테라 프루기페르다 세포(spodoptera frugiperda cell)이다.

<1403> 상기 예에서, 구체적으로 설명되고, 아래에서 더 설명한 바와 같이, 그 PEG-당의 하나의 수용체 성분의 위치 설

정은 어느 소정의 스텝에서 얻어진다.

<1404>

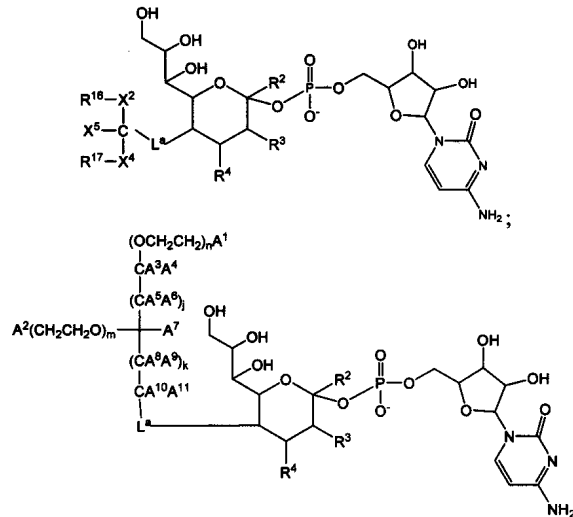
예로서, 하나의 예에서, 그 펩티드에 GalNAc의 부가 후에 제 2 스텝에 의해 그 PEG-당은 동일한 반응용기 내에서 그 GalNAc에 콘주게이팅 한다.

<1405>

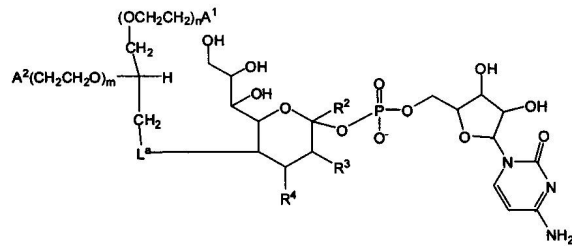
또, 이들의 2개의 스텝은 거의 동시에 하나의 단일 용기 내에서 실시할 수 있다.

<1406>

하나의 대표적인 예에서, 그 PEG-시알산 도너는 아래에 나타낸 구조식을 갖는다:



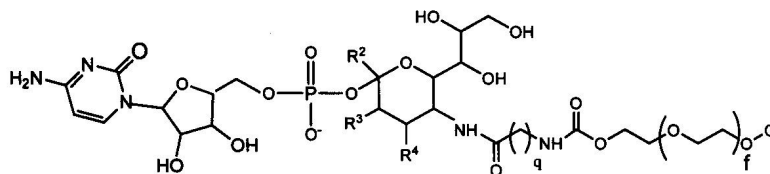
<1407>



<1408>

<1409>

또 다른 대표적인 예에서, 그 PEG-시알산 도너는 다음 구조식을 가진다:



<1410>

<1411>

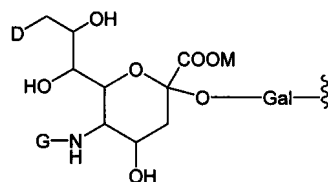
하나의 다른 대표적 예에서, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드는 글리코 페질화 또는 리모델링하기 전에 하나의 적합한 발현 시스템에서 발현된다.

<1412>

대표적인 발현 시스템에는 Sf-9/바쿠로바이러스(baculovirus) 및 차이니즈 햄스터 난소(또는 CHO 세포)[Chinese Hamster Ovary(CHO) cells]를 포함한다.

<1413>

하나의 대표적인 예에서, 본 발명은 아래에 나타낸 구조식을 가진 하나의 변형 시알릴 잔기를 함유하는 하나의 글리코실 링커로 이루어진 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 제조방법을 제공한다.

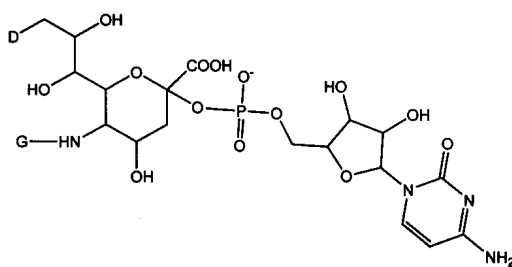


<1414>

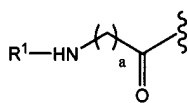
- <1415> 위 구조식에서,
- <1416> D는 -OH 및 R^1-L-NH 에서 선택한 하나의 멤버이다.
- <1417> G는 R^1-L- 및 $-C(O)(C_1-C_6)$ 알킬- R^1 에서 선택한 하나의 멤버이고,
- <1418> R^1 은 하나의 직쇄 폴리(에틸렌 글리콜) 잔기와 분기 폴리(에틸렌 글리콜) 잔기에서 선택한 하나의 멤버를 함유하는 하나의 성분(moiety)이며,
- <1419> M은 H, 하나의 금속 및 하나의 단일 음전하에서 선택한 하나의 멤버이고,
- <1420> L은 하나의 결합, 치환 또는 비치환 알킬 및 치환 또는 비치환 헤테로알킬에서 선택한 하나의 멤버인 링커이다.
- <1421> 여기서, D가 OH일 경우, G는 R^1-L 이고,
- <1422> G가 $-C(O)(C_1-C_6)$ 알킬일 경우, D가 $R^1-L-NH-$ 로 되도록 한다.
- <1423> 본 발명의 상기 방법은 (a) 아래에 나타낸 글리코실 성분을 함유하는 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를



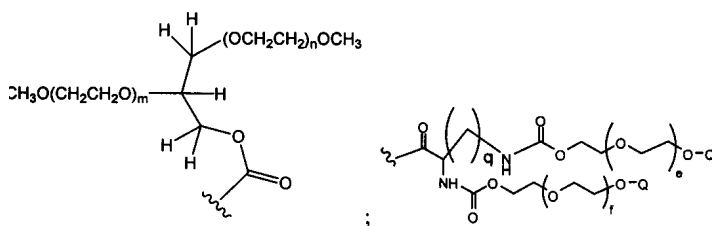
- <1424> 아래에 나타낸 구조식을 가진 하나의 PEG-시알산 도너 성분 및
- <1425>



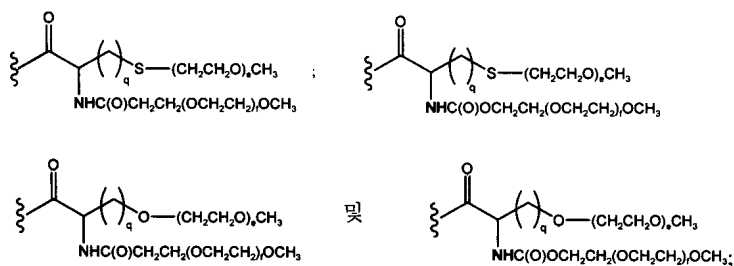
- <1426>
- <1427> 상기 PEG-시알산을 상기 글리코실 성분의 Gal 상에 전이하는 하나의 효소와 함께 상기 전이에 적합한 조건하에서 접촉하는 것으로 이루어진다.
- <1428> 하나의 대표적인 예에서, $L-R^1$ 은 아래에 나타낸 구조식을 가진다:



- <1429>
- <1430> 위 구조식에서,
- <1431> 지수 a는 0 ~ 20에서 선택한 하나의 정수이다.
- <1432> 또 다른 대표적인 예에서, R^1 은 아래에 나타낸 구조식에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 구조를 가진다:



- <1433>



<1434>

<1435> 위 구조식에서,

<1436> 지수 e, f, m 및 n은 1 ~ 2500에서 독립하여 선택한 정수이고, 지수 q는 1 ~ 20에서 선택한 하나의 정수이다.

<1437> 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 대규모량(large scale amounts) 또는 소규모량(small scale amounts)은 여기서 설명한 본 발명의 방법(methods)에 의해 생산할 수 있다.

<1438> 하나의 대표적인 예에서, 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 양은 약 0.5mg ~ 약 100kg에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1439> 하나의 대표적인 예에서, 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 양은 약 0.1kg ~ 약 1kg에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1440> 하나의 대표적인 예에서, 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 양은 약 0.5kg ~ 약 10kg에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1441> 하나의 대표적인 예에서, 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 양은 약 0.5kg ~ 약 3kg에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1442> 하나의 대표적인 예에서, 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 양은 약 0.1kg ~ 약 5kg에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1443> 하나의 대표적인 예에서, 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 양은 약 0.08kg ~ 약 0.2kg에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1444> 하나의 대표적인 예에서, 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 양은 약 0.05kg ~ 약 0.4kg에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1445> 하나의 대표적인 예에서, 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 양은 약 0.1kg ~ 약 0.7kg에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1446> 하나의 대표적인 예에서, 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 양은 약 0.3kg ~ 약 1.75kg에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1447> 하나의 대표적인 예에서, 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 양은 약 25kg ~ 약 65kg에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1448> 여기서 설명한 반응에서 사용되는 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 농도는 약 0.5 ~ 약 10mg의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드/mL 반응 혼합액에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1449> 하나의 대표적인 예에서, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 농도는 약 0.5mg ~ 약 1mg의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드/mL 반응 혼합액에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1450> 하나의 대표적인 예에서, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 농도는 약 0.8mg ~ 약 3mg의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드/mL 반응 혼합액에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1451> 하나의 대표적인 예에서, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 농도는 약 2mg ~ 약 6mg의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드/mL 반응 혼합액에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1452> 하나의 대표적인 예에서, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 농도는 약 4mg ~ 약 9mg의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드/mL 반응 혼합액에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1453> 하나의 대표적인 예에서, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 농도는 약 1.2mg ~ 약 7.8mg의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드/mL 반응 혼합액에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1454> 하나의 대표적인 예에서, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드/mL 반응 혼합액에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1455> 여기서 설명한 반응에서 사용할 수 있는 CMP-SA-PEG의 농도는 약 0.1 ~ 약 1.0mM에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1456> 그 농도를 증감할 수 있는 팩터(factors)에는 PEG의 크기, 배양시간, 온도, 버퍼성분과, 사용되는 글리코실 전 이효소의 종류(type)와 농도가 포함한다.

<1457> 하나의 대표적인 예에서, CMP-SA-PEG 농도는 약 0.1 ~ 약 1.0mM에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1458> 하나의 대표적인 예에서, CMP-SA-PEG 농도는 약 0.1 ~ 약 0.5mM에서 선택한 하나의 멤버이다.

- <1459> 하나의 대표적인 예에서, CMP-SA-PEG 농도는 약 0.1 ~ 약 0.3mM에서 선택한 하나의 멤버이다.
- <1460> 하나의 대표적인 예에서, CMP-SA-PEG 농도는 약 0.2 ~ 약 0.7mM에서 선택한 하나의 멤버이다.
- <1461> 하나의 대표적인 예에서, CMP-SA-PEG 농도는 약 0.3 ~ 약 0.5mM에서 선택한 하나의 멤버이다.
- <1462> 하나의 대표적인 예에서, CMP-SA-PEG 농도는 약 0.4 ~ 약 1.0mM에서 선택한 하나의 멤버이다.
- <1463> 하나의 대표적인 예에서, CMP-SA-PEG 농도는 약 0.5 ~ 약 0.7mM에서 선택한 하나의 멤버이다.
- <1464> 하나의 대표적인 예에서, CMP-SA-PEG 농도는 약 0.8 ~ 약 0.95mM에서 선택한 하나의 멤버이다.
- <1465> 하나의 대표적인 예에서, CMP-SA-PEG 농도는 약 0.55 ~ 약 1.0mM에서 선택한 하나의 멤버이다.
- <1466> 여기서 설명한 반응에서 사용할 수 있는 CMP-SA-PEG의 몰 당량의 그 인자 VII/인자 VIIa 단백질에 첨가할 수 있는 SA-PEG의 이론적인 수를 기준으로 한다.
- <1467> 그 SA-PEG의 이론적인 수는 CMP-SA-PEG의 분자량(MW) 및 몰(moles)과 대비할 때, 그 인자 VII/인자 VIIa 단백질 상에서의 시알레이션(sialation) 부위의 이론적 수와 인자 VII/인자 VIIa 단백질의 분자량을 기준으로 한다.
- <1468> 인자 VII/인자 VIIa에 있어서, 이것은 N-글리칸을 기준으로 하여 약 4개 또는 5개의 PEG이며, 그 글리칸은 2개의 글리칸 부위만으로 초기에 비(bi) 및 트리(tri) 안테나형상으로 형성되어 있다.
- <1469> 하나의 대표적인 예에서, CMP-SA-PEG의 몰 당량은 1 ~ 20에서 선택한 정수이다.
- <1470> 하나의 대표적인 예에서, CMP-SA-PEG의 몰 당량은 2 ~ 6에서 선택한 정수이다.
- <1471> 하나의 대표적인 예에서, CMP-SA-PEG의 몰 당량은 3 ~ 17에서 선택한 정수이다.
- <1472> 하나의 대표적인 예에서, CMP-SA-PEG의 몰 당량은 4 ~ 11에서 선택한 정수이다.
- <1473> 하나의 대표적인 예에서, CMP-SA-PEG의 몰 당량은 5 ~ 20에서 선택한 정수이다.
- <1474> 하나의 대표적인 예에서, CMP-SA-PEG의 몰 당량은 1 ~ 10에서 선택한 정수이다.
- <1475> 하나의 대표적인 예에서, CMP-SA-PEG의 몰 당량은 12 ~ 20에서 선택한 정수이다.
- <1476> 하나의 대표적인 예에서, CMP-SA-PEG의 몰 당량은 14 ~ 17에서 선택한 정수이다.
- <1477> 하나의 대표적인 예에서, CMP-SA-PEG의 몰 당량은 7 ~ 15에서 선택한 정수이다.
- <1478> 하나의 대표적인 예에서, CMP-SA-PEG의 몰 당량은 8 ~ 16에서 선택한 정수이다.
- <1479> III. B. 인자 VII/인자 VIIa의 동시 탈시알릴화 및 글리코페질화(simultaneous Desialylation and GlycoPEGylation of Factor VII/Factor VIIa)
- <1480> 본 발명은 인자 VII/인자 VIIa를 글리코페질화하는(glycopegylating) 하나의 "원-팟"(one-pot)방법을 제공한다.
- <1481> 상기 원-팟방법은 하나의 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트를 제조하는 다른 대표적인 방법과 현저한 차이가 있다. 그 다른 제조방법에서는 시알리다아제로 순차적으로 탈-시알릴화하고, 그 다음 아니온치환 컬럼상에서 아시알로(asialo)인자 VII/인자 VIIa를 순차적으로 정제하며, 그 다음 CMP-시알산-PEG와 글리코실 전이효소(ST3Gal3 등), 엑소글리코시다아제 또는 엔도글리코시다아제를 사용하여 글리코페질화하는 것을 사용하여 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트를 제조한다.
- <1482> 그 다음 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트는 아니온치환에 의해 정제하고, 이어서 사이즈 배제 크로마토그래피에 의해 그 정제된 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트를 생성한다.
- <1483> 그 원-팟방법은 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트를 제조하는 하나의 개량방법을 제공한다.
- <1484> 이 방법에서, 앞에서 설명한 프로세스에서 사용한 제 1 아니온치환 크로마토그래피를 제거한 하나의 원-팟반응에서 그 탈시알릴화반응과 글리코페질화 반응을 조합시켜 그 아시알로 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를 정제한다.
- <1485> 이 프로세스 스텝에서의 스텝감축은 수종의 잇점을 얻는다. 첫째로, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 제조에 필요로 하는 프로세스 스텝의 수를 감소시켜, 그 프로세스 스텝의 조작복잡성을 감축한다.
- <1486> 둘째로, 그 펩티드 콘주게이트의 제조 프로세스시간을 감축한다. 즉 4일에서 2일로 감축한다. 이것은 프로세스

스텝(in-process) 중에서의 조절과 관련된 품질제어비용과 원료의 필요요건을 감축한다.

<1487> 셋째로, 본 발명이 더 적은양의 시알리다아제를 사용한다. 즉, 20배의 더 적은양의 시알리다아제를 사용한다. 즉, 이 프로세스에 관련된 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 제조에 500mU/L가 필요하다. 시알리다아제를 사용할 때 이와같은 감소로 인하여, 이 반응 혼합물 중에서 시알리다아제 등 오염물질의 양을 현저하게 감소한다.

<1488> 하나의 대표적인 예에서, 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트는 다음에 설명한 방법에 의해 제조한다.

<1489> 제 1 스텝에서, 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를 본 발명의 하나의 시알리다아제, 하나의 변형당과, 그 변형당에서 그 펩티드로 글리코실 결합기의 전이를 촉진할 수 있는 하나의 효소를 배합하여, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트를 제조한다. 어느 시알리다아제라도 이 방법에서 사용할 수 있다. 본 발명에서 유용한 대표적인 시알리다아제는 CAZY 데이터베이스에서 확인할 수 있다(http://afmb.cnrs-mrs.fr/_/CAZY/index.html 및 WWW.cazy.org/CAZY 참조).

<1490> 대표적인 시알리다아제는 입수원(sources)의 어느 멤버에서도 구입할 수 있다(QA-Bio, Calbiochem, Marukin, prozyme 등).

<1491> 하나의 대표적인 예에서, 그 시알리다아제는 사이토플라즘(cytoplasmic) 시알리다아제, 라이소소말(lysosomal) 시알리다아제, 엑소(exo)- α 시알리다아제 및 엔도시알리다아제에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1492> 또 다른 대표적인 예에서, 그 사용되는 시알리다아제는 클로스트리듐 퍼프링겐스(*Clostridium perfringens*)등 세균, 또는 아데노바이러스(adenovirus) 등 바이러스에서 생성된다.

<1493> 하나의 대표적인 예에서, 그 변형당에서 그 펩티드로 글리코실 결합기의 전이를 촉진할 수 있는 그 효소는 시알릴전이효소 및 무코실전이효소 등 하나의 글리코실 전이효소와, 엑소글리코시다아제 및 엔도글리코시다아제에서 선택한 하나의 멤버이다.

<1494> 하나의 대표적인 예에서, 그 효소는 하나의 글리코실 전이효소로 ST3 Gal3이다.

<1495> 또 다른 대표적인 예에서, 그 사용되는 효소는 에셰리키아 콜리(*Escherichia Coli*)등 세균 또는 아스페로길러스 니거(*Aspergillus niger*)등 진균에서 생성한다.

<1496> 또 다른 대표적인 예에서, 그 시알리다아제는 소정시간 동안 그 글리코실전이효소의 부가전에 인자 VII/인자 VIIa 펩티드에 부가시켜, PEG-시알산 반응물질과 글리코실전이효소를 부가하면서 글리코페질화반응을 개시하기 전에, 그 시알리다아제 반응을 처리하도록 한다.

<1497> 여러 가지의 이들의 예를 설명하였으나, 최종적으로, 여기서 설명한 어느 변형당이라도 이 반응에서 사용할 수 있다.

<1498> 또 다른 대표적인 예에서, 그 방법은 하나의 "캐핑"(capping)스텝을 더 포함한다.

<1499> 이 스텝에서, 추가하는 비페질화(non-PEGylated) 시알산은 이 반응 혼합물에 첨가할 수 있다.

<1500> 하나의 대표적인 예에서, 이 시알산은 상기 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 또는 펩티드 콘주게이트에 부가시켜, PEG-시알산의 부가를 더 방지한다.

<1501> 또 다른 대표적인 예에서, 이 시알산은 이 반응 혼합물 중에서 그 글리코실전이효소의 작용(기능)을 방해하여, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 또는 펩티드 콘주게이트에 글리코실 결합기의 부가를 효과적으로 정지시킨다.

<1502> 가장 중요한 것으로, 그 반응혼합물에 첨가한 그 시알산은 비글리코페질화 글리칸을 캐핑(capping)함으로써, 약물동태(pharmacokinetics)를 개선(향상)하는 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트를 제공한다. 또, 이 시알리다아제는 사전 정제없이 소정량까지 페질화 범위가 바람할 때 그 글리코페질화 반응혼합물에 직접 첨가할 수 있다.

<1503> 하나의 대표적인 예에서, 그 캐핑스텝(capping step) 후에 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 또는 펩티드 콘주게이트 상에서 시알릴화부위 중 약 50% 이하가 하나의 시알릴성분을 함유하지 않는다.

<1504> 하나의 대표적인 예에서, 그 캐핑스텝 후에 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 또는 펩티드 콘주게이트 상에서 시알릴화부위 중 약 40% 이하가 하나의 시알릴 성분을 함유하지 않는다.

- <1505> 하나의 대표적인 예에서, 그 캐핑스텝 후에 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 또는 펩티드 콘주게이트 상에서 그 시알릴화 부위 중 약 30%이하가 하나의 시알릴성분을 함유하지 않는다.
- <1506> 하나의 대표적인 예에서, 그 캐핑스텝 후에 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 또는 펩티드 콘주게이트 상에서 그 시알릴화 부위 중 약 20%이하가 하나의 시알릴 성분을 함유하지 않는다.
- <1507> 하나의 대표적인 예에서, 그 캐핑스텝 후에 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 또는 펩티드 콘주게이트 상에서 그 시알릴화 부위 중 약 10%이하가 하나의 시알릴 성분을 함유하지 않는다.
- <1508> 하나의 대표적인 예에서, 그 캐핑스텝 후에 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 또는 펩티드 콘주게이트 상에서 그 시알릴화 부위 중 약 20%-약 5%가 하나의 시알릴 성분을 함유하지 않는다.
- <1509> 하나의 대표적인 예에서, 그 캐핑스텝 후에 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 또는 펩티드 콘주게이트 상에서 그 시알릴화 부위 중 약 25%-약 10%가 하나의 시알릴 성분을 함유하지 않는다.
- <1510> 하나의 대표적인 예에서, 그 캐핑스텝 후에 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 또는 펩티드 콘주게이트 상에서 그 시알릴화 부위 모두가 하나의 시알릴 성분을 함유하지 않는다.
- <1511> III. C. 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 탈시알릴화 및 선택변형 (Desialylation and selective modification of Factor VII Factor VIIa peptides)
- <1512> 또 다른 대표적인 예에서, 본 발명은 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를 탈 시알릴화하는 방법을 제공한다.
- <1513> 그 방법은 최소 약 40%, 바람직하게는 45%, 바람직하게는 50%, 바람직하게는 약 55%, 바람직하게는 약 60%, 바람직하게는 약 65%, 바람직하게는 약 70%, 바람직하게는 약 75%, 바람직하게는 약 80%, 바람직하게는 최소 85%, 더 바람직하게는 최소 90%, 좀 더 바람직하게는 최소 92%, 바람직하게는 최소 94%, 더 바람직하게는 최소 96%, 더욱더 바람직하게는 최소 98%, 가장 더 바람직하게는 100% 탈시알릴화하는 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를 제공하는 것이 바람직하다.
- <1514> 그 방법에는 상기 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를 하나의 시알릴다아제와 바람직하게는 소정의 시간동안 접촉하는 것을 포함한다.
- <1515> 그 사전에 선택한 시간은 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를 바람직한 정도까지 탈시알릴화하는데 충분하다.
- <1516> 하나의 바람직한 예에서, 그 탈시알릴화한 인자 VII/인자 VIIa 펩티드는 소정정도의 탈시알릴화가 얻어질 때 그 시알리다아제에서 분리한다. 하나의 대표적인 탈시알릴화반응과 정제 사이클을 여기서 설명한다.
- <1517> 이 분야의 기술자들은 그 탈시알릴화 반응을 실시하는 시간에 대하여 적합한 소정의 시간을 측정할 수 있다. 하나의 대표적인 예에서, 그 소정의 바람직한 시간은 24시간 이하, 바람직하게는 8시간 이하, 더 바람직하게는 6시간 이하, 더 바람직하게는 4시간 이하, 더 바람직하게는 2시간이다. 더욱더 바람직하게는 1시간 이하이다.
- <1518> 또 다른 대표적인 예에서, 그 탈시알릴화 반응종료시에 그 인자 VII/인자 VIIa 제조에서 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 개체군의 멤버 중 최소 10%가 결합된 하나의 단일 시알산만을 가지며, 바람직하게는 최소 20%, 더 바람직하게는 최소 30%, 더 바람직하게는 최소 40%, 더 바람직하게는 최소 50%, 더 바람직하게는 최소 60%가 그 단일 시알산만을 가지고, 완전 탈시알릴화한 것이 더 바람직하다.
- <1519> 하나의 또 다른 예에서, 그 탈 시알릴화 반응이 종료할 때 그 인자 VII/인자 VIIa 제조에서, 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 개체군 멤버 중 최소 10%가 완전 탈시알릴화하며, 바람직하게는 최소 20%, 더 바람직하게는 최소 30%, 더 바람직하게는 최소 40%, 더 바람직하게는 최소 50%, 가장 더 바람직하게는 최소 60%가 완전 탈시알릴화한다.
- <1520> 또 다른 대표적인 예에서, 그 탈시알릴화 반응이 종료할 때, 그 인자 VII/인자 VIIa 제조에서, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 개체군 멤버의 최소 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 또는 60%가 하나의 단일 시알산만을 가지며, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 최소 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 또는 60%가 완전 탈시알릴화한다.
- <1521> 하나의 바람직한 예에서, 그 탈시알릴화 반응이 종료할 때 그 인자 VII/인자 VIIa 제조에서, 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 개체군의 최소 50%가 완전 탈시알릴화되며, 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 개체군의 멤버 최소 40%가 하나의 단일시알산 성분만을 가진다.
- <1522> 탈시알릴화의 다음에 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드는 하나의 변형당으로 선택적으로 콘주게이팅을 한다. 하나의 대표적인 변형당에는 하나의 분기 또는 선상 폴리(에틸렌글리콜) 성분에 결합된 하나의 사카릴 성분을

포함한다. 그 콘주게이션은 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 하나의 아미노산 또는 글리코실 잔기 상에 하나의 변형당 도너에서 그 변형당을 전이하는 하나의 효소에 의해 촉진한다.

<1523> 하나의 대표적인 변형당 도너는 하나의 분기 또는 선상 폴리(에틸렌글리콜)성분을 가진 하나의 CMP-시알산이다. 하나의 대표적인 폴리(에틸렌글리콜)성분은 분자량 최소 약 2KDa, 더 바람직하게는 최소 약 5KDa, 더 바람직하게는 최소 약 10KDa, 바람직하게는 최소 약 20KDa, 더바람직하게는 최소 약 30KDa, 더 바람직하게는 최소 약 40KDa를 가진다.

<1524> 하나의 대표적인 예에서, 그 변형당 도너에서 그 변형당 성분을 전이하는데 사용되는 효소는 하나의 글리코실 전이효소, 즉 시알릴 전이효소이다. 본 발명의 방법에서 유용한 하나의 대표적인 시알릴 전이효소는 ST3 Gal3이다.

<1525> 본 발명의 하나의 대표적인 방법은 최소 1개, 바람직하게는 최소 2개, 바람직하게는 최소 3개의 변형기(modifying groups)를 가진 하나의 변형 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를 얻는데 있다.

<1526> 하나의 예에서, 생성된 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드가 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 L사슬(light chain) 상에서 하나의 단일 변형기를 가진다.

<1527> 또 다른 예에서, 그 방법에서는 그 H 사슬(heavy chain) 상에서 하나의 단일 변형기를 가진 하나의 변형 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를 제공한다.

<1528> 또 하나의 다른 예에서, 그 방법에서는 그 L 사슬상에서 하나의 단일 변형기와 그 H 사슬 상에서 하나의 변형기를 가진 하나의 변형 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를 제공한다.

<1529> 또 다른 주변(aspect)에서 본 발명은 하나의 변형 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 제조방법을 제공한다. 그 방법에서는 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를 하나의 변형기를 가진 하나의 변형당 도너 및 그 펩티드의 하나의 아미노산 또는 글리코실 잔기 상에 그 변형당 도너로부터 하나의 변형당 성분을 전이할 수 있는 하나의 효소와 함께 접촉하는 것을 포함한다.

<1530> 하나의 대표적인 예에서, 그 방법에서는 개체군 멤버의 최소 40%, 바람직하게는 최소 50%, 바람직하게는 최소 60%, 더 바람직하게는 최소 70% 및 가장 바람직하게는 최소 80%가 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 L 사슬상에서 모노(mono) 콘주게이팅을 하는 변형 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 하나의 개체군을 제공한다.

<1531> 하나의 대표적인 예에서, 그 방법에서는 개체군 멤버의 최소 40%, 바람직하게는 최소 50%, 바람직하게는 최소 60%, 더 바람직하게는 최소 70% 및 더 바람직하게는 최소 80%가 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 L 사슬 상에서 디(di)-콘주게이팅을 하는 변형 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 하나의 개체군을 제공한다.

<1532> 이 국면의 하나의 대표적인 예에서, 그 방법에서는 개체군 멤버의 50%이하, 바람직하게는 30% 이하, 바람직하게는 20%이하, 더 바람직하게는 10% 이하가 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 H 사슬 상에서 모노(mono) 콘주게이팅을 하는 변형 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 하나의 개체군을 제공한다.

<1533> 이 국면의 하나의 대표적인 예에서, 그 방법에서는 개체군 멤버의 50%이하, 바람직하게는 30%이하, 바람직하게는 20%이하, 더 바람직하게는 10%이하가 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 H 사슬 상에서 디(di)콘주게이팅을 한 변형 인자 VII/인자 VIIa 펩티드의 하나의 개체군을 제공한다.

<1534> 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드는 그 접촉스텝을 실시하기 전에 하나의 시알리다아제의 작용으로 처리할 수 있고, 또는 사전 탈시알릴화 처리없이 사용할 수 있다. 상기 펩티드가 시알리다아제와 접촉할 경우, 주로 완전 탈시알릴화 할 수 있거나, 부분적으로만 탈시알릴화할 수 있다.

<1535> 하나의 바람직한 예에서, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드는 그 접촉 스텝을 실시하기 전에 최소 부분적으로 탈시알릴화한다. 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드는 주로 완전 탈시알릴화(주로, 아시알로) 하거나 또는 부분적으로 탈시알리화한다.

<1536> 하나의 바람직한 예에서, 그 탈시알릴화 인자 VII/인자 VIIa 펩티드는 위에서 설명한 탈시알리화 예 중 하나의 예이다.

<1537> III. D. 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 합성에서 첨가 시약의 추가 알리쿼트(additional aliquots of reagents added in the synthesis of Factor VII/Factor VIIa peptide conjugate)

<1538> 여기서 설명한 펩티드 콘주게이트의 합성에 대한 하나의 대표적인 예에서, 하나의 반응성분/시약의 하나 이상

의 추가 알리쿼트(additional aliquots)를 선택시간 후에 그 반응 혼합물에 첨가한다.

<1539> 하나의 대표적인 예에서, 그 펩티드 콘주게이트는 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트이다.

<1540> 또 다른 대표적인 예에서, 그 반응성분/시약에는 하나의 변형당 뉴클레오티드를 첨가한다.

<1541> 그 반응성분/시약에 하나의 변형당 뉴클레오티드의 도입으로 글리코 페질화 반응(GlycoPEGylation reaction)의 완료를 유도할 수 있는 가능성을 높인다.

<1542> 하나의 대표적인 예에서, 그 뉴클레오티드 당은 여기서 설명한 하나의 CMP-SA-PEG이다.

<1543> 하나의 대표적인 예에서, 그 반응성분/시약에는 하나의 시알리다아제를 첨가한다.

<1544> 하나의 대표적인 예에서, 그 반응성분/시약에는 하나의 글리코실 전이효소를 첨가한다.

<1545> 하나의 대표적인 예에서, 그 반응성분/시약에는 마그네슘을 첨가한다.

<1546> 하나의 대표적인 예에서, 첨가한 그 추가 알리쿼트는 그 반응을 개시할 때 첨가되는 원 량(original amount)의 약 10%, 또는 20%, 또는 30%, 또는 40%, 또는 50%, 또는 60%, 또는 70%, 또는 80%, 또는 90%를 나타낸다.

<1547> 하나의 대표적인 예에서, 그 반응성분/시약은 그 반응개시 약 3시간, 또는 6시간, 또는 8시간, 또는 10시간, 또는 12시간, 또는 18시간, 또는 24시간, 또는 30시간, 또는 36시간 후에 그 반응에 첨가한다.

<1548> III. E. L사슬 페질화 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 선택적 생성(selective production of light chain PEGylated Factor VII/Factor VIIa peptide conjugates)

<1549> 하나의 대표적인 예에서, 본 발명은 그 H사슬에 비하여, L사슬 상에서 변형시킨 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 생성을 증가시키는 방법을 제공한다.

<1550> 이 방법에서는 그 H사슬의 불활성화 또는 격리를 포함하고 있어, 그 L사슬 상에서 글리코 페질화가 우선적으로 발생하도록 한다.

<1551> 그 인자 VIIa의 H사슬의 세린 프로테아제 활성은 이 격리(sequestration)를 기초로 하여 사용할 수 있다.

<1552> 세린 프로테아제에 대한 위친화성(pseudoaffinity) 수치 및/또는 벤즈아민딘 매트릭스를 글리코 페질화 반응 혼합물에 첨가하여 그 H사슬을 격리하는 한편, 그 L사슬 상에서는 글리코 페질화가 진행된다.

<1553> 그 다음, 그 L사슬은 이 분야 기술에서 공지된 표준기술에 의해 그 H사슬에서 격리된 상태에서 정제할 수 있다.

<1554> 그 H사슬은 벤즈아미딘을 첨가시켜 그 매트릭스에서 제거시킬 수 있고, 또 그 용액의 pH를 저하시켜 그 수치에서 제거시킬 수 있다.

<1555> 이 스텝에서 도입된 벤즈아미딘 불순물은 다이어 필트레이션(diafiltration)에 의해 제거시킬 수 있다.

<1556> III. F. 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 정제(purification of Factor VII/Factor VIIa peptide conjugates)

<1557> 위 프로세스에 의해 생성된 생성물은 정제 없이 사용할 수 있다.

<1558> 그러나, 그 생성물과 하나 이상의 중간체 생성물, 즉 뉴클레오티드당, 분기 및 선상 PEG 중, 변형당 및 변형 뉴클레오티드당을 회수하는 것이 통상적으로 바람직하다.

<1559> 두께가 얇거나 두꺼운 층 크로마토그래피, 컬럼 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피 또는 막 여과 등 글리코실화 펩티드의 회수를 위한 공지된 표준기술을 사용할 수 있다.

<1560> 그 회수에 있어, 막 여과를 사용하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 역삼투막, 또는 여기서 설명한 바와 같이, 또 여기서 인용한 참고문헌에서 설명한 바와 같이 그 회수를 위한 1종 이상의 컬럼 크로마토그래피 기술을 사용한다.

<1561> 예로서, 분자량을 약 3000 ~ 약 10,000으로 컷 오프(cutoff)하는 막 여과를 사용하여 글리코실 전이효소 등 단백질 제거할 수 있다.

<1562> 어느 예에서는 생성물의 정제를 확보하기 위하여 불순물과 생성물 사이에 분자량의 컷 오프차(cutoff differences)를 이용한다.

- <1563> 예로서, 미반응(unreacted) CMP-SA0-PEG-40KDa에서 생성물 인자 VIIa-SA-PEG-40KDa를 정제하기 위하여 인자 VIIa-SA-PEG-40KDa를 그 보유액(retentate) 중에 잔유하도록 함과 동시에 CMP-SA-PEG-40KDa를 그 여액(filtrate) 중에 유동하도록 하나의 여과기(filter)를 선택할 필요가 있다.
- <1564> 그 다음, 나노여과 또는 역삼투를 사용하여 염(salts)을 제거하며 생성물 사카리드(즉, 특허문헌 WO 98/15581 참조)를 정제할 수 있다.
- <1565> 나노여과막은 역삼투막의 하나의 종류로, 이들의 역삼투막은 1가염(monovalent salts)을 통과시키거나, 그 사용되는 막에 따라 분자량이 약 100Da 보다 크고 약 2,000Da 까지의 무전하 용질(solutes) 및 다가염을 잔류시킨다.
- <1566> 이와 같이, 일반적인 적용에 있어서, 본 발명의 방법에 의해 제조된 사카리드는 그 막에서 잔류되며, 혼입되는 염은 통과한다.
- <1567> 제 1 스텝에서와 같이, 그 펩티드가 세포 내에서 생성될 경우, 그 입자단편(particulate debris)으로 숙주세포(host cells) 또는 용해단편(lysed fragments)이 제거된다.
- <1568> 그 다음으로, 글리코 폐질화시킨 후, 그 글리코 폐질화 된 펩티드는 공지의 방법, 예로서, 원심분리 또는 한외 여과에 의해 정제시킨다. 선택적으로, 그 단백질은 시판되는 단백질 농축 필터로 농축시킨 다음, 아래에 나타낸 처리스텝에서 선택한 하나 이상의 스텝에 의해 다른 불순물에서 폴리 펩티드 변이체를 분리할 수 있다.
- <1569> 아래에 나타난 그 처리스텝은 다음과 같다.
- <1570> 면역 친화성 크로마토그래피(immunoaffinity chromatography); 이온교환 컬럼 분획법(column fractionation) (즉, 디에틸아미노에틸(DEAE) 또는 카르복시메틸 또는 술포프로필기 함유 매트릭스 상에서); 블루-세파로오스(Blue-Sepharose), CM블루-세파로오스, MONO-Q, MONO-S, 렌틸 렉틴(lentil lectin)-세파로오스, WGA-세파로오스, Con A-세파로오스, 에테르 토요펄(Ether Toyopearl), 부틸 토요펄, 페닐 토요펄, 또는 단백질 A 세파로오스 상에서의 크로마토그래피; SDS-PAGE 크로마토그래피; 실리카 크로마토그래피; 크로마토포커싱(chromatofocussing); 역상(reverse phase) HPLC(즉, 현수 지방족기를 가진 실리카겔); 세파덱스(Sephadex) 분자시브(molecular sieve)를 사용하는 겔 여과 또는 사이즈배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography); 폴리 펩티드를 선택 결합하는 컬럼 상에서의 크로마토그래프 및 에타놀 또는 암모늄 술페이트 침전법.
- <1571> 이 섹션 다음에 더 구체적으로 설명한 바와 같이, 정제를 사용하여 다른 사슬에서 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘 주게이트의 하나의 사슬을 분리할 수 있다.
- <1572> 배양에서 생성된 변형 글리코 펩티드는 세포, 효소 등으로부터 초기 추출에 의해 통상적으로 분리시킨 후, 이어서 하나 이상의 농축, 염석(salting-out), 수성 이온교환 또는 사이즈배제 크로마토그래피 스텝에 의해 분리한다.
- <1573> 또, 그 변형 글리코 프로테인은 친화성 크로마토그래프에 의해 정제할 수 있다. 최종적으로, 최종 정제 스텝에서는 HPLC를 사용할 수 있다.
- <1574> 상기 스텝 중 어느 스텝에서 하나의 프로테아제 억제제(inhibitor)를 함유시켜 단백질 분해를 억제할 수 있고, 항생물질 또는 보존제를 함유시켜 외래 오염균(adventitious contaminants)의 증식을 방지할 수 있다.
- <1575> 위 스텝에서 사용한 프로테아제 억제제는 앤티파인(antipain), 알파-1-앤티트립신, 앤티-트롬빈, 류펩틴, 아마스타틴(amastatin), 키모스타틴(chymostatin), 반즈아미딘(banzamidin)과 다른 세린 프로테아제 억제제(즉, 세르핀: serpins)을 포함하여 저분자량의 억제제로 할 수 있다.
- <1576> 일반적으로, 세포 배양액 중에서 키모스타틴이 농도 200 μ M 이상으로 사용할 수 있으나 세린 프로테아제 억제제는 농도 범위 0.5~100 μ M에서 사용할 필요가 있다.
- <1577> 다른 세린 프로테아제 억제제는 세린 프로테아제의 키모트립신 형상 족, 서브틸리신 형상 족, 알파/베타 히드로라아제 족, 또는 시그날 펩티다아제 족(clans)에 특이성이 있는 억제제를 포함한다.
- <1578> 세린 프로테아제 이외에, 또 다른 타입의 프로테아제 억제제는 시스테인 프로테아제 억제제(1~10 μ M) 및 아스파라긴 프로테아제 억제제(1~5 μ M)와, 펩스타틴(1~5 μ M) 등의 비특이성 프로테아제 억제제를 포함하여, 사용할 수 있다.

- <1579> 본 발명에서 사용되는 프로테아제 억제제에는 또 거머리(leech)에서 분리된 히루스타신(hirustasin) 억제제 등 자연 프로테아제 억제제를 포함할 수 있다.
- <1580> 어느 예에서, 프로테아제 억제제는 합성 펩티드 또는 항체를 함유하며, 그 프로테아제 촉매부위에 특이성 있게 결합하여 글리코 페질화 반응을 방해함이 없이 인자 VII/인자 VIIa를 안정화할 수 있다.
- <1581> 또 다른 예에서, 본 발명의 변형 글리코 펩티드를 생성하는 시스템에서 얻은 상청액(supernatants)은 시판되는 단백질 농축 여과기(filter)(예로서, Amicon 또는 Millipore Pellicon 한외여과 유닛)를 사용하여 1차 농축시킨다.
- <1582> 농축 스텝 처리 다음에, 그 농축액을 하나의 적합한 정제 매트릭스에 사용할 수 있다.
- <1583> 예로서, 하나의 적합한 친화성 매트릭스는 그 펩티드의 하나의 리간드(ligand), 하나의 적합한 지지체에 결합되어 있는 하나의 렉틴(lectin) 또는 항체 분자를 함유할 수 있다.
- <1584> 또, 하나의 아미노 교환수지는 예로서 현수(부속) DEAE 기를 가진 하나의 매트릭스 또는 기질(substrate)를 사용할 수 있다.
- <1585> 적합한 매트릭스에는 아크릴 아마이드, 아가로오스(agarose), 텍스트란, 셀룰로오스 또는 단백질 정제에서 통상 사용되는 다른 타입을 포함한다.
- <1586> 또, 하나의 카티온 교환 스텝을 사용할 수 있다.
- <1587> 적합한 카티온 교환제에는 술포프로필 또는 카르복시메틸기를 함유하는 여러 가지의 불용성 매트릭스를 포함한다.
- <1588> 술포프로필기가 특히 바람직하다.
- <1589> 정제에 유용한 다른 방법에는 사이즈배제 크로마토그래피(SEC), 히드록시아파타이트(hydroxyapatite) 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 및 블루세파로오스(Blue Sepharose) 상에서의 크로마토그래피를 포함한다.
- <1590> 상기 이들의 방법과 다른 유용한 방법은 특허문헌으로서 본 특허출원의 출원인이 공유한 미국 가특허출원(대리인 문서번호: 40853-01-5168-P1, 2005.05.06 출원) 명세서에서 구체적으로 기재되어 있다.
- <1591> 소수성 RP-HPLC 배지, 즉 현수(부속) 메틸 또는 다른 지방족 기를 가진 실리카 겔을 사용하는 1개 이상의 RP-HPLC 스텝을 사용하여 하나의 폴리 펩티드 콘주게이트 조성물을 더 정제할 수 있다.
- <1592> 여러 가지의 조합에 있어서, 상기 정제 스텝 일부 또는 전부를 또 사용하여 하나의 균질 또는 주로 균질인 변형 글리코 단백질을 제공할 수 있다.
- <1593> 대규모(large-scale)의 발효에서 얻은 본 발명의 변형 글리코 펩티드는 참고문헌(Urdal 등, J. Chromatog. 296: 171 (1984))에서 개시되어 있는 방법과 유사한 방법에 의해 정제할 수 있다.
- <1594> 이 참고문헌에서는 하나의 분리용(preparative) HPLC 컬럼 상에서 재조합 사람 IL-2의 정제에 대한 2개의 연속적인 RP-HPLC 스텝이 기재되어 있다.
- <1595> 또, 친화성 크로마토그래피 등의 기술을 사용하여 그 변형 글리코 단백질을 정제할 수 있다.
- <1596> 하나의 대표적인 예에서, 그 정제는 특허문헌으로 미국 가특허출원 60/665,588(2005.3.24 출원) 명세서에서 설명한 방법에 의해 얻어진다.
- <1597> 본 발명에 의해, 페질화 펩티드(pegylated peptides), 즉 연속적인 탈시알릴화 또는 동시 시알릴화에 의해 생성된 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 또는 펩티드 콘주게이트는 마그네슘 클로리드의 증감액(gradient)을 사용하여 정제 또는 용해시킬 수 있다.
- <1598> 하나의 대표적인 예에서, 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트는 하나의 L사슬과 하나의 H사슬로 분리할 수 있고, 하나의 사슬은 다른 사슬에서 분리하여 정제시킬 수 있다.
- <1599> 또 다른 대표적인 예에서, 하나의 생성물은 그 생성물 중 최소 80%의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트가 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 L사슬부분인 생성물에서 얻어진다.
- <1600> 또 다른 대표적인 예에서, 하나의 생성물은 그 생성물 중 최소 90%의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트가 그

인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 L사슬부분인 생성물에서 얻어진다.

- <1601> 또 다른 대표적인 예에서, 하나의 생성물이 그 생성물 중 최소 95%의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트가 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 L사슬 부분인 생성물에서 얻어진다.
- <1602> 또 다른 대표적인 예에서, 하나의 생성물은 그 생성물 중 주로 전체의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트가 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 L사슬부분인 생성물에서 얻어진다.
- <1603> 이 생성물은 본 발명의 어느 화합물에 대하여서도 가능하다.
- <1604> 또 다른 대표적인 예에서, 하나의 생성물은 그 생성물 중 최소 80%의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트가 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 H사슬부분인 생성물에서 얻어진다.
- <1605> 또 다른 대표적인 예에서, 하나의 생성물은 그 생성물 중 최소 90%의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트가 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 H사슬부분인 생성물에서 얻어진다.
- <1606> 또 다른 대표적인 예에서, 하나의 생성물은 그 생성물 중 최소 95%의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트가 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 H사슬부분인 생성물에서 얻어진다.
- <1607> 또 다른 대표적인 예에서, 하나의 생성물은 그 생성물 중 주로 전체의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트가 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트의 H사슬부분인 생성물에서 얻어진다.
- <1608> 이 생성물은 본 발명의 어느 화합물이라도 가능하다.
- <1609> III. G. 인자 VII/인자 VIIa 콘주게이트의 특성(propeties Factor VII/Factor VIIa Conjugates)
- <1610> 하나의 대표적인 예에서, 본 발명의 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트는 하나의 미변성(native) 인자 VII/인자 VIIa 펩티드로서 동일한 생화학적 특성(즉, 응고: clotting)을 주로 가진다.
- <1611> 하나의 대표적인 예에서, 본 발명의 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트는 페질화(PEGylation)부위, 부가 PEG의 사이즈 및 부가 PEG의 수에 따라, 하나의 미변성(native) 인자 VII/인자 VIIa 펩티드에 비하여 생화학적 증감특성(reduced, or enhanced properties)(즉, 응고: clotting)을 가진다.
- <1612> 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트는 혈액응고 프로세스(blood clotting process) 중에 포함되어 있다.
- <1613> 하나의 대표적인 예에서, 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트는 미변성(native) 인자 VII/인자 VIIa의 응고활성(clotting activity) 약 20%, 또는 약 25%, 또는 약 30%, 또는 약 35%, 또는 약 40%, 또는 약 45%, 또는 약 50%, 또는 약 55%, 또는 약 60%, 또는 약 65%, 또는 약 70%, 또는 약 75%, 또는 약 80%, 또는 약 85%, 또는 약 90%, 또는 약 95%를 보유한다.
- <1614> 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트는 아미도 용해 활성(amidolytic activity)을 가진다.
- <1615> 하나의 대표적인 예에서, 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트는 미변성(native) 인자 VII/인자 VIIa의 아미도 용해 활성 약 20%, 또는 약 25%, 또는 약 30%, 또는 약 35%, 또는 약 40%, 또는 약 45%, 또는 약 50%, 또는 약 55%, 또는 약 60%, 또는 약 65%, 또는 약 70%, 또는 약 75%, 또는 약 80%, 또는 약 85%, 또는 약 90%, 또는 약 95%를 보유한다.
- <1616> 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트는 인자 X를 인자 Xa로 전환시킬 수 있다.
- <1617> 하나의 대표적인 예에서, 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트는 미변성(native) 인자 VII/인자 VIIa의 X 전환 활성(conversion activity) 약 20%, 또는 약 25%, 또는 약 30%, 또는 약 35%, 또는 약 40%, 또는 약 45%, 또는 약 50%, 또는 약 55%, 또는 약 60%, 또는 약 65%, 또는 약 70%, 또는 약 75%, 또는 약 80%, 또는 약 85%, 또는 약 90%, 또는 약 95%를 보유한다.
- <1618> IV. 의약조성물(pharmaceutical compositions)
- <1619> 또 다른 국면에서, 본 발명은 의약조성물을 제공한다.
- <1620> 그 의약조성물은 하나의 의약적으로 허용할 수 있는 희석제와, 하나의 비천연 PEG 성분, 치료성분 또는 바이오분자와 하나의 글리코실화 또는 비글리코실화 펩티드 사이에 있는 하나의 공유 결합 콘주게이트(covalent conjugate)를 포함한다.
- <1621> 그 폴리머 치료성분 또는 바이오분자는 그 펩티드와 그 폴리머 치료성분 또는 바이오분자 사이에 삽입되어 공유

결합되는 하나의 무손상(intact) 글리코실 결합기에 의해 그 펩티드에 콘주게이팅 되어 있다.

<1622> 본 발명의 의약조성물은 여러 가지의 약제 투여 시스템(drug delivery systems)의 사용에 적합하다.

<1623> 본 발명에서 사용하는 적합한 제제는 다음 참고문헌에서 확인된다(Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)).

<1624> 약제 투여방법의 간단한 설명에 대해서는 다음 참고문을 참조할 수 있다(Langer, Science 249:1527-1533 (1990)).

<1625> 하나의 대표적인 예에서, 그 의약제제는 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트와, 소듐 클로리드, 칼슘 클로리드 디히드레이트, 글리실 글리신, 폴리소르베이트 80 및 만니톨에서 선택한 하나의 멤버인 하나의 의약적으로 허용할 수 있는 희석제를 함유한다.

<1626> 또 다른 대표적인 예에서, 그 의약적으로 허용할 수 있는 희석제는 소듐 클로리드와 글리실 글리신이다.

<1627> 또 다른 대표적인 예에서, 그 의약적으로 허용할 수 있는 희석제는 칼슘 클로리드 디히드레이트와 폴리 소르베이트 80이다.

<1628> 또 다른 대표적인 예에서, 그 의약적으로 허용할 수 있는 희석제는 만니톨이다.

<1629> 그 의약조성물은 예로서, 국소투여, 경구투여, 비강(nasal)투여, 정맥내투여, 두개내(intracranial)투여, 복강내투여, 피하투여 또는 근육내투여를 포함하여 어느 적합한 투여방식으로 제제할 수 있다.

<1630> 피하주사 등 비경구 투여에 있어서, 그 캐리어는 물, 식염수, 알코올, 지방(fat), 왁스 또는 버퍼(buffer)를 함유하는 것이 바람직하다.

<1631> 경구투여에 있어서, 상기 캐리어 또는 만니톨, 락토오스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 사카린, 탈컴(talcum), 셀룰로오스, 글루코오스, 수크로오스 및 마그네슘 카보네이트 등 하나의 고형 캐리어 중 어느 것이라도 사용할 수 있다.

<1632> 생분해성 마이크로 스피어(microspheres)(즉, 폴리락테이트 폴리글리콜레이트)도 이 발명의 의약조성물용 캐리어로 사용할 수 있다.

<1633> 적합한 생분해성 마이크로스피어는 예로서 특허문헌 USP 4,897,268 및 USP 5,075,109의 명세서에 개시되어 있다.

<1634> 일반적으로, 그 의약조성물은 비경구투여, 즉 정맥내투여 한다.

<1635> 따라서, 본 발명은 하나의 허용할 수 있는 캐리어, 바람직하게는 수용성 캐리어, 즉 물, 버퍼수, 식염수, PBS 등에서 용해 또는 현탁시킨 화합물을 함유하는 비경구투여용 조성물을 제공한다.

<1636> 그 조성물에는 pH 조정제 및 버퍼링제, 긴장성(tonicity) 조정제, 습윤제, 청정제(detergents) 등 근접 생리적 조건에 필요로 하며 의약적으로 허용할 수 있는 보조물질을 함유할 수 있다.

<1637> 이들의 조성물은 통상의 살균기술에 의해 살균할 수 있고, 또는 살균여과 할 수 있다.

<1638> 그 결과 얻어진 수용액은 그대로 용도에 따라 패키징할 수 있고, 또 동결건조할 수 있다. 동결건조제제는 투여 전에 살균 캐리어 수용액과 배합한다.

<1639> 그 제제의 pH는 일반적으로, 3~11, 더 바람직하게는 5~9, 가장 바람직하게는 7~8이다.

<1640> 어느 일부 예에서, 본 발명의 글리코 펩티드는 표준 소포(vesicle)형성 리피드(lipids)에서 형성된 리포솜 내에서 결합시킬 수 있다.

<1641> 여러 가지의 방법은 아래의 참고문헌에서 기재한 바와 같이 리포솜의 제조에 이용할 수 있다(Szoka 등, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980); USP 4,235,871; USP 4,501,728 및 4,837,028).

<1642> 여러 가지의 표적제(즉, 본 발명의 시알릴 갈락토시드)를 사용하는 리포솜의 표적(targeting)은 이 기술에서 공지되었다(특허문헌 USP 4,957,773 및 USP 4,603,044 참조).

<1643> 리포솜에 표적제를 커플링하는 표준방법을 사용할 수 있다.

<1644> 이들의 방법은 일반적으로, 표적제의 결합을 위하여 활성화할 수 있는 포스파티딜에타놀아민 또는 본 발명의 리

피드-유도체화 글리코 펩티드 등 유도체화 친지성 화합물 등 리피드 성분의 리포솜 내에 결합하는 것을 포함한다.

<1645> 표적 메카니즘(targeting mechanisms)에서는 표적, 예로서 하나의 세포 표면 수용체와의 상호작용에 그 표적성분을 이용할 수 있게 그 리포솜의 표면에 표적제의 위치설정을 필요로 한다.

<1646> 본 발명의 카르보히드레이트는 이 분야의 기술자에 의해 공지된 방법을 사용하여 그 리포솜을 형성하기 전에 하나의 리피드 분자에 결합시킬 수 있다(즉, 각각의 사슬이 긴 하나의 알킬 할라이드 또는 하나의 지방산과 그 카르보히드레이트 상에 존재한 하나의 히도록실기의 알킬화 또는 아실화).

<1647> 또, 그 리포솜은 그 막 형성할 때 그 막에 1차적으로 하나의 연결부분이 결합할 수 있게 형성할 수 있다.

<1648> 그 연결부분(connector portion)은 하나의 친지성 부분을 가질 필요가 있으며, 그 친지성 부분은 그 막(membrane) 내에 견고하게 매입(embeded)하며 고정한다.

<1649> 그 연결부분은 하나의 반응성 부분을 가질 필요가 있으며, 그 반응성 부분은 그 리포솜의 수용성 표면상에서 화학적으로 이용할 수 있다.

<1650> 그 반응성 부분은 후에 부가되는 표적제 또는 카르보히드레이트와 안정성 있는 화학적 결합 형성에 화학적으로 적합하도록 선택한다.

<1651> 일부 어느 경우에, 그 표적제를 그 연결분자(connector molecule)에 직접 결합할 수 있으나, 대부분의 예에서는 하나의 화학적 브리지(chemical bridge)로 작용하는 하나의 제 3 분자의 사용이 더 적합하여, 그 소포표면(vesicle surface) 상에서 3차원적으로 형성하는 표적제 또는 카르보히드레이트를 가진 그 막 내에 있는 연결분자(connector molecule)를 결합한다.

<1652> 또, 본 발명의 방법에 의해 제조한 화합물은 진단 시약으로 사용할 수 있다.

<1653> 예로서, 표지(labeled) 화합물을 사용하여 염증을 가진 것으로 의심되는 환자의 염증 또는 재양전이(metastasis) 부위를 설정할 수 있다.

<1654> 이 사용에서, 상기 화합물은 ^{125}I , ^{14}C 또는 트리튬으로 표시할 수 있다.

<1655> 본 발명의 의약조성물에서 사용되는 활성성분은 혈병생성(blood clot production)을 자극(촉진)하는 생물학적 특성을 가진 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트이다.

<1656> 그 인자 VII/인자 VIIa 펩티드 콘주게이트는 비경구 투여하는 것이 바람직하다(즉, IV, IM, SC 또는 IP).

<1657> 유효용량은 치료조건과 투여 루트에 따라 상당히 변동되나, 그 활성제 약 0.1(~7U) ~ 100(~7000U) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중량의 범위에 있는 것으로 예측된다.

<1658> 빈혈상태(anemic condition) 치료용으로 바람직한 용량은 1주일에 3회로 하여 약 50 ~ 약 300Units/kg 이다.

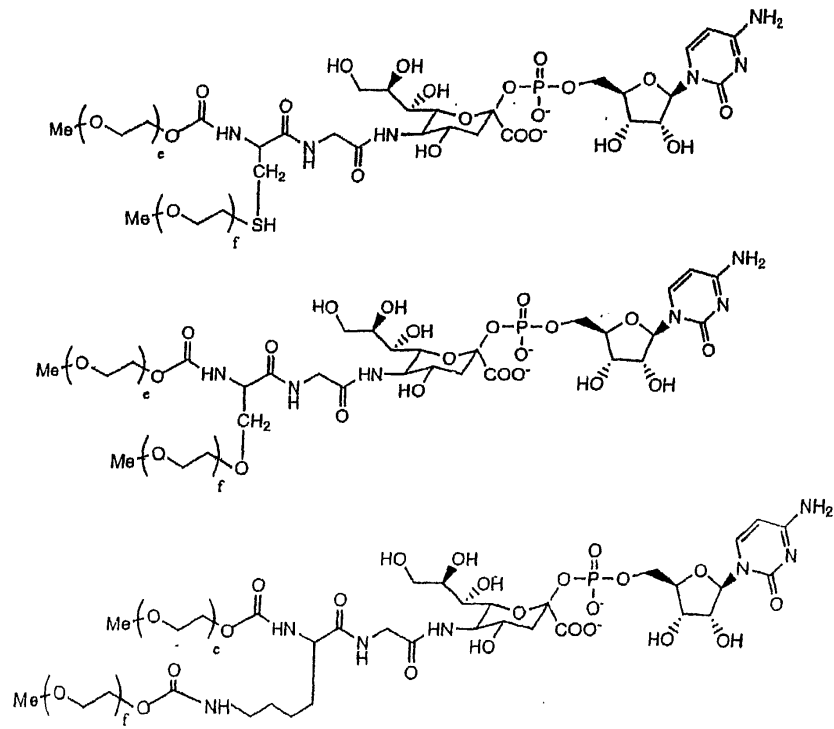
<1659> 본 발명은 생체내 정주시간(residence time)을 높인 하나의 인자 VII/인자 VIIa 펩티드를 함유한 물질의 조성물을 구성하고 있어, 상기 용량(dosages)은 본 발명의 조성물을 투여할 때 선택적으로 감소시킨다.

<1660> 본 발명의 조성물을 제조할 때 유용한 종(species)의 제조방법은 다수의 특허문헌, 즉 특허출원 공개 US 20040137557; WO 04/083258; 및 WO 04/033651의 명세서에서 일반적으로 기재되어 있다.

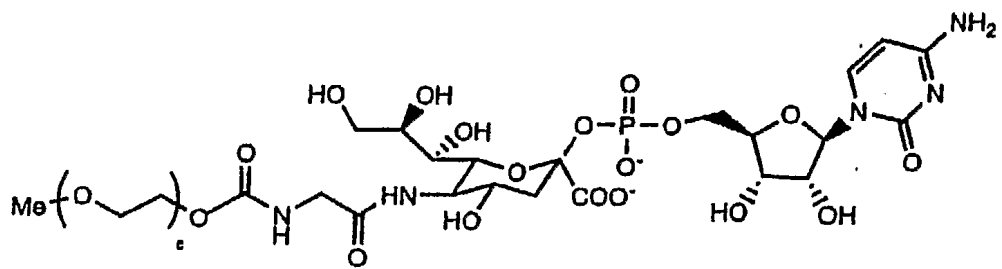
<1661> 다음 실시예를 들어 본 발명의 콘주게이트와 방법을 설명하며, 본 발명을 한정하는 것은 아니다.

도면

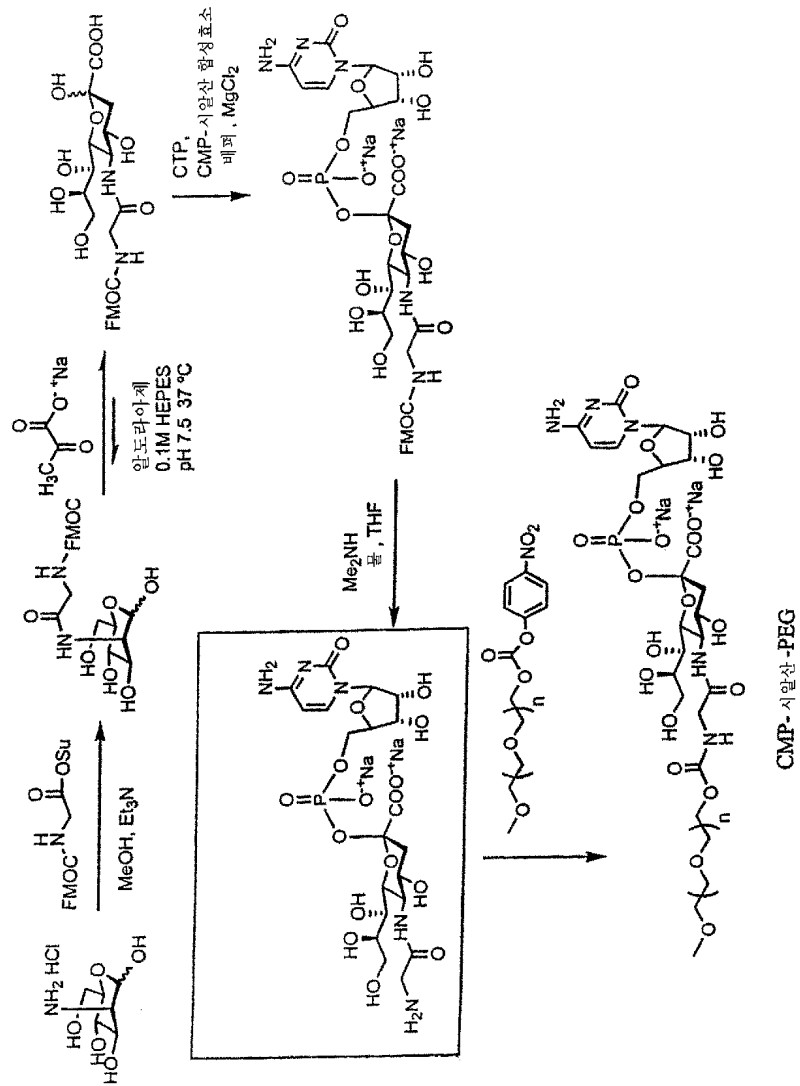
도면1A



도면1B



도면2



도면3A

단백질	세균	EC#	GenBank / GenPept		SwissProt	PDB / 3D
At1g08280	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AC011438 BT004583 NC_003070	AAF18241.1 AAO42829.1 NP_172305.1	Q84W00 Q8SGD2	
At1g08680/F22013.14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AC003981 AY084135 AY124607 NC_003070 NM_180609	AAF99778.1 AAL36042.1 AAM70516.1 NP_172342.1 NP_850940.1	Q8VZJ0 Q9FRR9	
At3g48820/T21J18_90	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AY080589 AY133816 AL132963 NM_114741	AAL85966.1 AAM91750.1 CAB87910.1 NP_190451.1	Q8RY00 Q9M301	
α -2,3-시알릴전이효소 (ST3Gal-IV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ584673	CAE48298.1		
α -2,3-시알릴전이효소 (ST3Gal-V)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ585768	CAE51392.1		
α -2,6-시알릴전이효소 (Siat7b)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ620651	CAF05850.1		
α -2,8-시알릴전이효소 (Siat8A)	<i>Bos taurus</i>	2.4.99.8	AJ899418	CAG27880.1		
α -2,8-시알릴전이효소 (Siat8D)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ899421	CAG27883.1		
α -2,8-시알릴전이효소 (Siat8C)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ704553	CAG28696.1		
CMP α -2,6-시알릴전이효소 (ST5Gal I)	<i>Bos taurus</i>	2.4.99.1	Y15111 NM_177517	CAA76385.1 NP_803483.1	Q18974	
시알릴전이효소 8 (fragment)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AF450088	AAL47018.1	Q8WN13	
시알릴전이효소 ST3Gal-II (Siat4B)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748341	CAG44450.1		
시알릴전이효소 ST3Gal-III (Siat6)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748342	CAG44451.1		
시알릴전이효소 ST3Gal-VI (Siat10)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748843	CAG44452.1		
ST3Gal I	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ305086	CAC24698.1	Q9BEG4	
ST6GalNAc-VI	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ620949	CAF06585.1		
CDS4	<i>Branchiostoma floridae</i>	n.d.	AF391289	AAM16873.1	Q8T771	
폴리시알릴전이효소 (PST) (fragment) ST8Sia IV	<i>Cercopithecus aethiops</i>	2.4.99.-	AF210729	AAF17105.1	Q8TT09	
폴리시알릴전이효소 (STX) (fragment) ST8Sia II	<i>Cercopithecus aethiops</i>	2.4.99.-	AF210318	AAF17104.1	Q8TT10	
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal I (Siat4)	<i>Ciona intestinalis</i>	n.d.	AJ626815	CAF25173.1		
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal I (Siat4)	<i>Ciona savignyi</i>	n.d.	AJ626814	CAF25172.1		
α -2,8-폴리시알릴전이효소 ST8Sia IV	<i>Cricetulus griseus</i>	2.4.99.-	Z46801	AAE28634 CAA86822.1	Q64690	
Gal β -1,3/4-GlcNAc α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal I	<i>Cricetulus griseus</i>	n.d.	AY286875	AAP22942.1	Q80WL0	
Gal β -1,3/4-GlcNAc α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal II (fragment)	<i>Cricetulus griseus</i>	n.d.	AY286876	AAP22943.1	Q80WK9	
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal I (Siat4)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783740	CAH04017.1		
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal II (Siat5)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783741	CAH04018.1		

도면3B

단백질	세균	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal III (Siat6)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ626821	CAF25179.1	
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ744809	CAG32845.1	
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal V-r (Siat5-related)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783742	CAH04019.1	
α -2,6-시알릴전이효소 ST6Gal I (Siat1)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ744801	CAG32837.1	
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc II (Siat7B)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ634459	CAG25680.1	
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc V (Siat7E) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ646874	CAG26703.1	
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ646883	CAG26712.1	
α -2,8-시알릴전이효소 ST8Sia I (Siat 8A) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715535	CAG29374.1	
α -2,8-시알릴전이효소 ST8Sia III (Siat 8C) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715543	CAG29382.1	
α -2,8-시알릴전이효소 ST8Sia IV (Siat 8D) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715545	CAG29384.1	
α -2,8-시알릴전이효소 ST8Sia V (Siat 8E) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715546	CAG29385.1	
α -2,8-시알릴전이효소 ST8Sia VI (Siat 8F) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715551	CAG29390.1	
α -2,6-시알릴전이효소 II (ST6Gal II)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ627627	CAF29495.1	
N-glycan α -2,8-시알릴전이효소	<i>Danio rerio</i>	n.d.	BC050483 AY055462 NM_153662	AAH50483.1 AAL17875.1 NP_705948.1	Q7ZU51 Q8QH83
ST3Gal III-related (sial6r)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	BC053179 AJ626820 NM_200355	AAH53179.1 CAF25178.1 NP_956649.1	Q7T3B9
ST3Gal-V	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ619930	CAF04061.1	
st6GalNAc-VI	<i>Danio rerio</i>	n.d.	BC060532 AJ620947	AAH60932.1 CAF06584.1	
α -2,6-시알릴전이효소 (CG4971) ST6Gal I	<i>Drosophila melanogaster</i>	2.4.99.1	AE003465 AF218237 AF397532 AE003465 NM_079129 NM_166684	AAF47256.1 AAG13185.1 AAK92126.1 AAM70791.1 NP_523853.1 NP_728474.1	Q9GU23 Q9V121
α -2,3-시알릴전이효소 (ST3Gal-VI)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ585787 AJ627204	CAE51381.1 CAF26503.1	
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal I	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.4	X80503 NM_205217	CAA56666.1 NP_990548.1	Q11200
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal IV (fragment)	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	AF035250	AAC14163.1	Q73724
α -2,3-시알릴전이효소 (ST3GAL-II)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ585761	CAE51385.2	
α -2,6-시알릴전이효소 (Siat7b)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ620653	CAF05852.1	
α -2,6-시알릴전이효소 ST6Gal I	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.1	X75558 NM_205241	CAA63235.1 NP_990572.1	Q92182
α -2,6-시알릴전이효소	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.3	-	AAE69026.1	Q92183

도면3C

단백질	세균	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
ST6GalNAc I			X74946 AAE68029.1 NM_205240 CAA52902.1 NP_990571.1	
α -2,6- 시알릴전이효소 ST6GalNAc II	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	X77775 AAE68030.1 NM_205233 CAA54813.1 NP_990584.1	Q92184
α -2,6- 시알릴전이효소 ST6GalNAc III (SIAT7C) (fragment)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ634455 CAG25677.1	
α -2,6- 시알릴전이효소 ST6GalNAc V (SIAT7E) (fragment)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ646877 CAG26706.1	
α -2,8- 시알릴전이효소 (GD3 Synthase) ST8Sia I	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	U73176 AAC28888.1	P79783
α -2,8- 시알릴전이효소 (SIAT8B)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ699419 CAG27881.1	
α -2,8- 시알릴전이효소 (SIAT8C)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ699420 CAG27882.1	
α -2,8- 시알릴전이효소 (SIAT8F)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ699424 CAG27886.1	
α -2,8- 시알릴전이효소 ST8Sia-V (SIAT8C)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ704584 CAG28697.1	
1. 갈락토사미드 α -2,6- 시알릴전이효소 II (ST6Gal II)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ627629 CAF29497.1	
GM3 synthase (SIAT9)	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.9	AY515255 AAS83519.1	
폴리시알릴전이효소 ST8Sia IV	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	AF006194 AAB95120.1	O42399
α -2,3- 시알릴전이효소 ST3Gal I	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	L29555 AAA36612.1 AF059321 AAC17874.1 L13972 AAC37574.1 AF155238 AAD39238.1 AF186191 AAG29876.1 BC018357 AAH18357.1 NM_003033 NP_003024.1 NM_173344 NP_775479.1	Q11201 O60677 Q9UN51
α -2,3- 시알릴전이효소 ST3Gal II	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	U63090 AAB40389.1 BC038777 AAH36777.1 X96667 CAA65447.1 NM_006927 NP_008858.1	Q16842 O00654
α -2,3- 시알릴전이효소 ST3Gal III (SiaT6)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.6	L23768 AAA35778.1 BC050380 AAH50380.1 AF425851 AAO13869.1 AF425852 AAO13960.1 AF425853 AAO13861.1 AF425854 AAO13862.1 AF425855 AAO13863.1 AF425856 AAO13864.1 AF425857 AAO13865.1 AF425858 AAO13866.1 AF425859 AAO13867.1 AF425860 AAO13868.1 AF425861 AAO13869.1 AF425862 AAO13870.1 AF425863 AAO13871.1 AF425864 AAO13872.1 AF425865 AAO13873.1 AF425866 AAO13874.1 AF425867 AAO13875.1 AY167992 AAO38806.1 AY167993 AAO38807.1 AY167994 AAO38808.1	Q11203 Q85UR6 Q85UR7 Q85UR8 Q85UR9 Q85US0 Q85US1 Q85US2 Q8IX43 Q8IX44 Q8IX45 Q8IX46 Q8IX47 Q8IX48 Q8IX49 Q8IX50 Q8IX51 Q8IX52 Q8IX53 Q8IX54 Q8IX55

도면3D

단백질	세균	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
			AY167995 AAO38809.1 AY167996 AAO38810.1 AY167997 AAO38811.1 AY167998 AAO38812.1 NM_005279 NP_006270.1 NM_174964 NP_777624.1 NM_174965 NP_777625.1 NM_174966 NP_777626.1 NM_174967 NP_777627.1 NM_174968 NP_777629.1 NM_174970 NP_777630.1 NM_174972 NP_777632.1	Q8IX57 Q8IX58	
α -2,3- 시알릴전이효소 ST3Gal IV	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L23767 AAA16460.1 AF035249 AAC14162.1 BC010645 AAH10645.1 AY040826 AAK93790.1 AF516602 AAM86431.1 AF516603 AAM86432.1 AF516604 AAM86433.1 AF525084 AAM81378.1 X74570 CAA52662.1 CR456858 CAG33139.1 NM_005278 NP_006269.1	Q11206 O60497 Q96Q99 Q8N6A6 Q8N6A7 Q8NFD3 Q8NFG7	
α -2,3- 시알릴전이효소 ST3Gal VI	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	AF119391 AAD39131.1 BC023312 AAH23312.1 AB022918 BAA77609.1 AX877828 CAE89695.1 AX880023 CAF00161.1 NM_005100 NP_006091.1	Q9Y274	
α -2,6- 시알릴전이효소 (ST6Gal II ; KIAA1877)	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	BC008680 AAH08680.1 AB058780 BAB47606.1 AB059555 BAC24793.1 AJ512141 CAD54408.1 AX795193 CAE48260.1 AX795193 CAE48261.1 NM_032528 NP_115917.1	Q86Y44 Q8IJG7 Q96HE4 Q96JF0	
α -2,6- 시알릴전이효소 (ST6GALNAC III)	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	BC059363 AAH60363.1 AY358540 AAQ88904.1 AK091215 BAC03611.1 AJ507291 CAD45371.1 NM_152996 NP_694541.1	Q8N259 Q8NDV1	
α -2,6- 시알릴전이효소 (ST6GalNac V)	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	BC001201 AAH01201.1 AK056241 BAB71127.1 AL035409 CAB72344.1 AJ507292 CAD45372.1 NM_030965 NP_112227.1	Q9BVH7	
α -2,6- 시알릴전이효소 (SThM) ST6GalNac II	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	U14560 AAH52228.1 BC040455 AAH40455.1 AJ251053 CAB81434.1 NM_006456 NP_006447.1	Q9UJ37 Q12971	
α -2,6- 시알릴전이효소 ST6Gal I	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.1	BC031476 AAH31476.1 BC040009 AAH40009.1 A17362 CAA01327.1 A23699 CAA01586.1 X17247 CAA35111.1 X54363 CAA38246.1 X62822 CAA44634.1 NM_003032 NP_003023.1 NM_173216 NP_775323.1	P15907	
α -2,6- 시알릴전이효소 ST6GalNac I	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.3	BC022452 AAH22452.1 AY095001 AAM22800.1 AY358918 AAQ89277.1 AK000113 BAA90953.1 Y11339 CAA72179.2	Q8TBJ6 Q9NSC7 Q9NXQ7	

도면3E

단백질	세균	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
α -2,6- 시알릴전이효소 ST8Sia IV	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	NM_018414 NP_060884.1 L41680 AAC41775.1 BC027866 AAH27866.1 BC053657 AAH53657.1 NM_005668 NP_005659.1	Q8N1F4 Q92187 Q92693	
α -2,6- 시알릴전이효소 (GD3 synthase) ST8Sia I	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.8	L32867 AAAG2366.1 L43494 AAC37586.1 BC046158 AAH46158.1 - AAQ53140.1 AY569975 AAS75783.1 Q26360 BAA05391.1 X77922 CAA54891.1 NM_003034 NP_003025.1	Q86X71 Q92185 Q93064	
α -2,6- 시알릴전이효소 ST8Sia II	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L29556 AAAG2366.1 U82762 AAB51242.1 U33551 AAC24458.1 BC069584 AAH69584.1 NM_006011 NP_006002.1	Q92186 Q92470 Q92746	
α -2,6- 시알릴전이효소 ST8Sia III	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	AF004668 AAB87642.1 AF003092 AAC15901.2 NM_015879 NP_056963.1	O43173 Q9NS41	
α -2,6- 시알릴전이효소 ST8Sia V	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	U91641 AAC51727.1 CR457037 CAG33318.1 NM_013305 NP_037437.1	O15466	
ENSP0000020221 (fragment)		n.d.	AC023295		
락토실세라미드 α -2,3- 시알릴전이효소 (ST3Gal V)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.9	AF105026 AAD14634.1 AF119415 AAF66146.1 BC065936 AAH65936.1 AY152815 AAO16866.1 AAP65066 AAP65066.1 AY359105 AAQ89463.1 AB018356 BAA33950.1 AX876536 CAE89320.1 NM_003896 NP_003887.2	Q9UNP4 O94902	
N- 아세틸갈락토미네르 α -2,6- 시알릴전이효소 (ST6GalNAc VI)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	BC008594 AAH06564.1 BC007802 AAH07802.1 BC016299 AAH16299.1 AY358672 AAQ89035.1 AB035173 BAA87035.1 AK023900 BAB14715.1 AJ507293 CAD45373.1 AX880950 CAE91145.1 CR457318 CAG33599.1 NM_013443 NP_038471.2	Q969X2 Q9H8A2 Q9ULB8	
N- 아세틸갈락토미네르 α -2,6- 시알릴전이효소 IV (ST6GalNAc IV)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	AF127142 AAF00102.1 BC036705 AAH36705.1 - AAP63349.1 AB035172 BAA87034.1 AK000600 BAA91281.1 Y17461 CAB44354.1 AJ271734 CAC07404.1 AX061620 CAC24981.1 AX068265 CAC27250.1 AX969252 CAF14360.1 NM_014403 NP_055218.3 NM_175039 NP_778204.1	Q9H4F1 Q9NWU6 Q9UKU1 Q9ULB9 Q9Y3G3 Q9Y3G4	
ST8SIA-VI (fragment)	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	AJ621583 CAF21722.1 XM_291725 XP_291725.2		
무명칭 단백질 생성물	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	AK021929 BAB13940.1 AJ881996 CAE91353.1	Q9HAA9	
Gal β -1,3/4-GlcNAc α -	<i>Mesocricetus</i>	2.4.99.6	AJ245699 CAB53394.1	Q9QXF6	

도면3F

단백질	세균	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
2,3-시알릴전이효소 (ST3Gal III)	<i>auratus</i>				
Gal β -1,3/4-GlcNAc α -2,3-시알릴전이효소 (ST3Gal IV)	<i>Mesocricetus auratus</i>	2.4.99.6	AJ245700	CAB53395.1	Q9QXF5
GD3 synthase (fragment) ST8Sia I	<i>Mesocricetus auratus</i>	n.d.	AF141657	AAD33879.1	Q9WUL1
폴리시알릴전이효소 (ST8Sia IV)	<i>Mesocricetus auratus</i>	2.4.99.-	AJ245701	CAB53396.1	Q9QXF4
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal I	St3gal1 <i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	AF214C28 AK031344 AK078469 X73523 NM_009177	AAF60973.1 BAC27358.1 BAC37290.1 CAA51919.1 NP_033203.1	P54751 Q11262 Q6JL30
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal II	St3gal2 <i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	BC016264 BC066064 AK034554 AK034863 AK053827 X78989 NM_009179	AAH15264.1 AAH66064.1 BAC28752.1 BAC28859.1 BAC35543.1 CAA54294.1 NP_033205.1	Q11204 Q8BPL0 Q8BSA0 Q8BSE0 Q61WH6
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal III	St3gal3 <i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC006710 AK005053 AK013016 X94234 NM_009176	AAH06710.1 BAB23779.1 BAB28698.1 CAA59013.1 NP_033202.2	P97325 Q922X5 Q9CZ48 Q9DB59
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal IV	St3gal4 <i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	BC011121 BC050773 D28941 AK009543 AB061305 X95809 NM_005178	AAH11121.1 AAH50773.1 BAA06068.1 BAB29732.1 BAB47508.1 CAA65076.1 NP_033204.2	P97354 Q91325 Q91Y74 Q921R6 Q9CVE8
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal VI	St3gal6 <i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	AF119390 BC052338 AB063326 AK033562 AK041173 NM_018794	AAD39130.1 AAH52338.1 BAB79494.1 BAC28360.1 BAC30851.1 NP_081254	Q80JR7 Q8BLV1 Q8VIB3 Q9WVG2
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc II	St6galnac2 <i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	NM_009180 BC010208 AB027198 AK004613 X93999 X94000 NM_009180	6677963 AAH10208.1 BAB00637.1 BAB23410.1 CAA63821.1 CAA63822.1 NP_033208.2	P70277 Q9DC24 Q9JNM5
α -2,6-시알릴전이효소 ST6Gal I	St6gal1 <i>Mus musculus</i>	2.4.99.1	BC027833 D16106 AK034768 AK084124 NM_145933	AAE68031.1 AAH27833.1 BAA03680.1 BAC28828.1 BAC39120.1 NP_066045.1	Q64665 Q6BM52 Q8K1L1
α -2,6-시알릴전이효소 ST6Gal II	St6gal2 <i>Mus musculus</i>	n.d.	AK082566 AB095083 AK129462 NM_172829	BAC38534.1 BAC87752.1 BAC98272.1 NP_768417.1	Q8BUU4
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc I	St6galnac1 <i>Mus musculus</i>	2.4.99.3	Y11274 NM_011371	CAA72137.1 NP_035501.1	Q9QZ39 Q9JJP6
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc III	St6galnac3 <i>Mus musculus</i>	n.d.	BC058387 AK034904 Y11342 Y11343	AAH58387.1 BAC28836.1 CAA72181.2 CAB95031.1	Q9WUV2 Q9JHP6

도면3G

단백질	세균	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
α -2,6-시알릴전이 효소 ST6GalNAc IV	<i>St6galnac4</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.7	NM_011372 NP_035502 BC056451 AAH56451.1 AK065730 BAC39523.1 AJ007310 CAA07446.1 Y15779 CAB43507.1 Y15780 CAB43514.1 Y19055 CAB93946.1 Y19057 CAB93948.1 NM_011373 NP_035503.1	Q8C3J2 Q9JHP2 Q9R2B6 Q88725 Q9JHP0 Q9QUP9 Q9R2B5
α -2,8-시알릴전이 효소 (GD3 synthase) ST8Sia I	<i>St8sia1</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	L38677 AAA91869.1 BC024621 AAH24821.1 AK046188 BAC32625.1 AK052444 BAC34994.1 X84235 CAA59014.1 AJ401102 CAC20706.1 NM_011374 NP_035504.1	Q64468 Q64667 Q8BL76 Q8BWI0 Q8K1C1 Q9EPK0
α -2,8-시알릴전이 효소 (ST8Sia VI)	<i>St8sia6</i> <i>Mus musculus</i>	n.d.	AB060664 BAC01265.1 AK086105 BAC39367.1 NM_145838 NP_665837.1	Q6BI43 Q8K4T1
α -2,8-시알릴전이 효소 ST8Sia II	<i>St8sia2</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	X83562 CAA68548.1 X99646 CAA67965.1 X99647 CAA67966.1 X99648 CAA67965.1 X99649 CAA67965.1 X99650 CAA67965.1 X99651 CAA67965.1 NM_009181 NP_033207.1	Q35696
α -2,8-시알릴전이 효소 ST8Sia IV	<i>St8sia4</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	BC060112 AAH60112.1 AK003690 BAB22941.1 AK041723 BAC31044.1 AJ223956 CAA11685.1 X86000 CAA59992.1 Y09484 CAA70692.1 NM_005183 NP_033209.1	Q64692 Q8EY70
α -2,8-시알릴전이 효소 ST8Sia V	<i>St8sia5</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC034855 AAH34855.1 AK078670 BAC37354.1 X98014 CAA66642.1 X98014 CAA66643.1 X98014 CAA66644.1 NM_013886 NP_038694.1 NM_153124 NP_694764.1 NM_177416 NP_803135.1	P70126 P70127 P70128 Q8BJW0 Q8JZQ3
α -2,8-시알릴전이 효소 ST8Sia III	<i>St8sia3</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC075645 AAH75645.1 AK015874 BAB30012.1 X80502 CAA56665.1 NM_003182 NP_033208.1	Q64689 Q9CJU8
GD1 합성 효소 (ST6GalNAc V)	<i>St6galnac5</i> <i>Mus musculus</i>	n.d.	BC055737 AAH66737.1 AB030836 BAA85747.1 AB028840 BAA89292.1 AK034387 BAC28693.1 AK038434 BAC29997.1 AK042663 BAC31331.1 NM_012028 NP_036158.2	Q8CAM7 Q8CBX1 Q9QYJ1 Q9R0K9
GM3 합성 효소 (α -2,3- 시알릴전이 효소) ST3Gal V	<i>St3gal5</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.9	AF119416 AAF66147.1 AB018048 AAP66063.1 AB013302 BAA33491.1 AK012661 BAA76467.1 Y15003 BAB28571.1 NM_011375 NP_035505.1	Q88829 Q9CZ65 Q9QWV9
N-시알릴전이 효소 아세틸 갈락토사미나이드 α -2,8-시알릴전이 효소 (ST6GalNAc VI)	<i>St6galnac6</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC036685 AAH36985.1 AB035174 BAA87036.1 AB035123 BAA95940.1 AK030648 BAC27064.1	Q8CDC3 Q8JZV3 Q9JMS5 Q9RCG9

도면3H

단백질	세균	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
M138L	<i>Myxoma virus</i>	n.d.	NM_019973 U46578 AF170726 NC_001132	NP_058669.1 AAD00069.1 AAE61323.1 AAE61326.1 AAF15026.1 NP_051852.1	
α -2,3-시알릴전이효소 (St3Gal-I)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AJ585760	CAE51384.1	
α -2,6-시알릴전이효소 (Siat1)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AJ620649	CAF05848.1	
α -2,8-폴리시알릴전이효소 IV (ST6Sia IV)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AB094402	BAC77411.1	Q7T2X5
GalNAc α -2,6-시알릴전이효소 (RtST6GalNAc)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AB097943	BAC77520.1	Q7T2X4
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal IV	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	2.4.99.-	AF121867	AAF28871.1	Q9N257
OJ1217_F02.7	<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>	n.d.	AP004084	BAD07616.1	
OSJNBa0043L24.2 or OSJNBb0002J11.9	<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>	n.d.	AL731626 AL662889	CAD41185.1 CAE04714.1	
P0683f02.18 or P0489B03.1	<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>	n.d.	AP003289 AP003794	BAB63715.1 BAB90552.1	
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc V (Siat7E) (fragment)	<i>Oryzias latipes</i>	n.d.	AJ646876	CAG26705.1	
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal I (Siat4)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744803	CAG32839.1	
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal II (Siat5)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744804	CAG32840.1	
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal III (Siat6)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ628319	CAF25177.1	
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ628324	CAF25182.1	
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal VI (Siat10)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744808	CAG32844.1	
α -2,6-시알릴전이효소 (Siat7A)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ748740	CAG38615.1	
α -2,6-시알릴전이효소 (Siat7B)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ748741	CAG38616.1	
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc III (Siat7C)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ634454	CAG25676.1	
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc IV (Siat7D) (fragment)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646870	CAG26699.1	
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc V (Siat7E)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646875	CAG26704.1	
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragment)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646882	CAG26711.1	
α -2,8-시알릴전이효소 8A (Siat8A)	<i>Pan troglodytes</i>	2.4.99.8	AJ697656	CAG26896.1	
α -2,8-시알릴전이효소 8B (Siat8B)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697659	CAG26897.1	
α -2,8-시알릴전이효소 8C (Siat8C)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697660	CAG26898.1	
α -2,8-시알릴전이효소 8D (Siat8D)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697661	CAG26899.1	
α -2,8-시알릴전이효소	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697662	CAG26900.1	

도면31

단백질	세균	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
8E (Siat8E)				
α -2,6-시알릴전이 효소 8F (Siat8F)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697653 CAG26901.1	
1. 갈락토사미드 α -2,6-시알릴전이 효소 I (ST6Gal I; Siat1)	<i>Pan troglodytes</i>	2.4.99.1	AJ627524 CAF29492.1	
1. 갈락토사미드 α -2,6-시알릴전이 효소 II (ST6Gal II)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ627625 CAF29493.1	
GM3 합성 효소 ST3Gal V (Siat9)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744907 CAG32843.1	
S138L	<i>Rabbit fibroma virus</i>	n.d.	NC_001266 NP_052025	
α -2,3-시알릴전이 효소 ST3Gal III	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.6	M97754 AAA42146.1 Q02734 NM_031697 NP_113885.1	
α -2,3-시알릴전이 효소 ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ626825 CAF25183.1	
α -2,3-시알릴전이 효소 ST3Gal VI	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ626743 CAF25053.1	
α -2,6-시알릴전이 효소 ST3Gal II	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	X78988 CAA54293.1 Q11205 NM_031685 NP_113883.1	
α -2,6-시알릴전이 효소 ST6Gal I	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.1	M18789 AAA41196.1 P13721 M83143 AAB07233.1	
α -2,6-시알릴전이 효소 ST6GalNAc I (Siat7A)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ634458 CAG25684.1	
α -2,6-시알릴전이 효소 ST6GalNAc II (Siat7B)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ634457 CAG25679.1	
α -2,6-시알릴전이 효소 ST6GalNAc III	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	L28554 AAC42086.1 Q64686 BC072501 AAH72501.1 NM_019123 NP_061996.1	
α -2,6-시알릴전이 효소 ST6GalNAc IV (Siat7D) (fragment)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646871 CAG26700.1	
α -2,6-시알릴전이 효소 ST6GalNAc V (Siat7E)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646872 CAG26701.1	
α -2,6-시알릴전이 효소 ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragment)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646881 CAG26710.1	
α -2,8-시알릴전이 효소 (GD3 합성 효소) ST8Sia I	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U53883 AAC27541.1 P70554 D45255 BAA08213.1 P97713	
α -2,6-시알릴전이 효소 (SIAT8E)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ690422 CAG27884.1	
α -2,6-시알릴전이 효소 (SIAT8F)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ690423 CAG27885.1	
α -2,8-시알릴전이 효소 ST8Sia II	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	L13445 AAA42147.1 Q07977 NM_067156 NP_476497.1 Q64688	
α -2,8-시알릴전이 효소 ST8Sia III	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U55938 AAB50061.1 P97377 NM_013029 NP_037161.1	
α -2,8-시알릴전이 효소 ST8Sia IV	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U90215 AAB49989.1 Q08563	
1. 갈락토사미드 α -2,6-시알릴전이 효소 II (ST6Gal II)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ627626 CAF29494.1	
GM3 합성 효소 ST3Gal V	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AB018049 BAA33492.1 Q88330 NM_031337 NP_112627.1	

도면3J

단백질	세균	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
ST3Gal-I (Sial4A)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ746840	CAG44449.1
α -2,3-시알릴전이효소 (ST3Gal-II)	<i>Silurana tropicalis</i>	n.d.	AJ586763	CAE51387.1
α -2,6-시알릴전이효소 (Sial7b)	<i>Silurana tropicalis</i>	n.d.	AJ620650	CAF05849.1
α -2,6-시알릴전이효소 (ST3Galnac)	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	n.d.	AJ699425	CAG27887.1
α -2,3-시알릴전이효소 (ST3Gal-III)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ586765	CAE51389.1
α -2,3-시알릴전이효소 (ST3Gal-IV)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ584674	CAE48299.1
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal I	<i>Sus scrofa</i>	2.4.99.4	M97753	AAA31125.1 Q02745
α -2,6-시알릴전이효소 (fragment) ST6Gal I	<i>Sus scrofa</i>	2.4.99.1	AF136746	AAD33059.1 Q9XSG8
α -2,6-시알릴전이효소 (ST6GalNAc-V)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ620948	CAF06585.2
시알릴전이효소 (fragment) ST6Gal I	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AF041031	AAC16633.1 Q62717
ST6GalNAc-V	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ620949	CAF06686.1
α -2,3-시알릴전이효소 (Sial5-r)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ744805	CAG32841.1
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal I (Sial4)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626816	CAF25174.1
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal II (Sial5) (fragment)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626817	CAF25175.1
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal III (Sial6)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626818	CAF25176.1
α -2,6-시알릴전이효소 ST6Gal I (Sial1)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ744300	CAG32836.1
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc II (Sial7B)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634460	CAG25681.1
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc II B (Sial7B-related)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634461	CAG25682.1
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc III (Sial7C) (fragment)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634466	CAG25678.1
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc IV (Sial7D) (fragment)	<i>Takifugu rubripes</i>	2.4.99.3	Y17466 AJ646869	CAB44338.1 Q9W6U6 CAG26698.1
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc V (Sial7E) (fragment)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ646873	CAG26702.1
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc VI (Sial7F) (fragment)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ646880	CAG26709.1
α -2,8-시알릴전이효소 ST8Sia I (Sial 8A) (fragment)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715534	CAG29373.1
α -2,8-시알릴전이효소 ST8Sia II (Sial 8B) (fragment)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715538	CAG29377.1
α -2,8-시알릴전이효소 ST8Sia III (Sial 8C) (fragment)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715541	CAG29380.1
α -2,8-시알릴전이효소 ST8Sia IIIr (Sial 8Cr)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715542	CAG29381.1
α -2,8-시알릴전이효소 ST8Sia V (Sial 8E)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715547	CAG29386.1

도면3K

단백질	세균	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
(fragment)					
α -2,8-시알릴전이효소 ST8Sia VI (Siat 8F) (fragment)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715549	CAG29388.1	
α -2,9-시알릴전이효소 ST8Sia Vlr (Siat 8Fr) (fragment)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715550	CAG29389.1	
α -2,3-시알릴전이효소 (Siat5-r)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ744806	CAG32842.1	
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal I (Siat4)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ744802	CAG32838.1	
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal III (Siat6)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ626822	CAF25180.1	
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc II (Siat7B)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ634462	CAG25683.1	
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc V (Siat7E) (fragment)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ646879	CAG26708.1	
α -2,8-시알릴전이효소 ST8Sia I (Siat 8A) (fragment)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715536	CAG29375.1	
α -2,8-시알릴전이효소 ST8Sia II (Siat 8B) (fragment)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715537	CAG29376.1	
α -2,8-시알릴전이효소 ST8Sia III (Siat 8C) (fragment)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715539	CAG29378.1	
α -2,8-시알릴전이효소 ST8Sia Illr (Siat 8Cr) (fragment)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715540	CAG29379.1	
α -2,8-시알릴전이효소 ST8Sia V (Siat 8E) (fragment)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715548	CAG29387.1	
α -2,3-시알릴전이효소 (ST3Gal-II)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ686762	CAE51388.1	
α -2,3-시알릴전이효소 (ST3Gal-VI)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ686766	CAE51390.1	
α -2,3-시알릴전이효소 ST3Gal-III (Siat6)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ686764	CAE51388.1	
α -2,8-시알릴전이효소 폴리시알릴전이효소	<i>Xenopus laevis</i>	2.4.98.-	AB007468	BAA32617.1	O93234
α -2,8-시알릴전이효소 ST8Sia-I (Siat8A;GD3 synthase)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AY272056 AY272057 AJ704662	AAQ16162.1 AAQ16163.1 CAG28695.1	
Unknown (protein for MGC:81265)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	BC068760	AAH68760.1	
α -2,3-시알릴전이효소 (3Gal-VI)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ626744	CAF25054.1	
α -2,3-시알릴전이효소 (Siat4c)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ622908	CAF22058.1	
α -2,6-시알릴전이효소 ST6GalNAc V (Siat7E) (fragment)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ646879	CAG26707.1	
α -2,6-시알릴전이효소 ST8Sia III (Siat 8C) (fragment)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ715544	CAG29383.1	
3. 감작토사미드 α -2,6- 시알릴전이효소 II (ST6Gal II)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ627628	CAF29496.1	
시알릴전이효소 ST8SiaI	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AY652775	AAT67042	
폴리- α -2,8-시알토실 시알릴전이효소 (NeuS) polysialyltransferase	<i>Escherichia coli K1</i>	2.4.-.-	M76370 X60598	AAA24213.1 CAA43053.1	Q67269
	<i>Escherichia coli K92</i>	2.4.-.-	M88479	AAA24215.1	Q47404

도면3L

단백질	세균	EC#	GenBank / GenPept		SwissProt	PDB / 3D
α -2,8 폴리시알릴전이효소 SiaD	<i>Neisseria meningitidis E1940</i>	2.4.-.-	M95053 X78068	AAA20478.1 CAA64985.1	Q51281 Q51145	
SynE	<i>Neisseria meningitidis FAM18</i>	n.d.	U75650	AAB53842.1	O06435	
폴리시알릴전이효소 (SiaD)(fragment)	<i>Neisseria meningitidis M1019</i>	n.d.	AY234192	AAO85290.1		
SiaD (fragment)	<i>Neisseria meningitidis M209</i>	n.d.	AY281045	AAP34769.1		
SiaD (fragment)	<i>Neisseria meningitidis M3045</i>	n.d.	AY281044	AAP34767.1		
폴리시알릴전이효소 (SiaD)(fragment)	<i>Neisseria meningitidis M3315</i>	n.d.	AY234191	AAO85289.1		
SiaD (fragment)	<i>Neisseria meningitidis M3515</i>	n.d.	AY281047	AAP34770.1		
폴리시알릴전이효소 (SiaD)(fragment)	<i>Neisseria meningitidis M4211</i>	n.d.	AY234190	AAO85288.1		
SiaD (fragment)	<i>Neisseria meningitidis M4642</i>	n.d.	AY281048	AAP34771.1		
폴리시알릴전이효소 (SiaD)(fragment)	<i>Neisseria meningitidis M5177</i>	n.d.	AY234193	AAO85291.1		
SiaD	<i>Neisseria meningitidis M5178</i>	n.d.	AY281043	AAP34766.1		
SiaD (fragment)	<i>Neisseria meningitidis M980</i>	n.d.	AY281045	AAP34768.1		
NMB0067	<i>Neisseria meningitidis MC58</i>	n.d.	NC_003112	NP_273131		
Lst	<i>Aeromonas punctata Sch3</i>	n.d.	AF126256	AAS66624.1		
ORF2	<i>Haemophilus influenzae A2</i>	n.d.	M94855	AAA24979.1		
HI1699	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	n.d.	U32842 NC_000907	AAC23345.1 NP_439841.1	Q48211	
α -2,3-시알릴전이효소	<i>Neisseria gonorrhoeae F52</i>	2.4.99.4	U60664	AAC44539.1 AAE67205.1	P72074	
α -2,3-시알릴전이효소	<i>Neisseria meningitidis 126E, NRCC 4010</i>	2.4.99.4	U60662	AAC44544.2		
α -2,3-시알릴전이효소	<i>Neisseria meningitidis 405Y, NRCC 4030</i>	2.4.99.4	U60661	AAC44543.1		
α -2,3-시알릴전이효소 (NMB0922)	<i>Neisseria meningitidis MC58</i>	2.4.99.4	U60660 AE002443 NC_003112	AAC44541.1 AAF41330.1 NP_273982.1	P72097	
NMA1118	<i>Neisseria meningitidis Z2491</i>	n.d.	AL162755 NC_003118	CAB84380.1 NP_283887.1	Q8JUV5	
PM0508	<i>Pasteurella multocida PM70</i>	n.d.	AE006086 NC_002563	AAK02592.1 NP_245445.1	Q8CNC4	
WaaH	<i>Salmonella enterica SARB25</i>	n.d.	AF519787	AAM82550.1	Q8KS93	
WaaH	<i>Salmonella enterica SARB3</i>	n.d.	AF519788	AAM82551.1	Q8KS92	
WaaH	<i>Salmonella enterica SARB39</i>	n.d.	AF519789	AAM82552.1		
WaaH	<i>Salmonella enterica SARB53</i>	n.d.	AF519790	AAM82553.1		
WaaH	<i>Salmonella enterica SARB57</i>	n.d.	AF519791	AAM82554.1	Q8KS91	
WaaH	<i>Salmonella enterica SARB71</i>	n.d.	AF519793	AAM82556.1	Q8KS89	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i>	n.d.	AF519792	AAM82555.1	Q8KS90	

도면3M

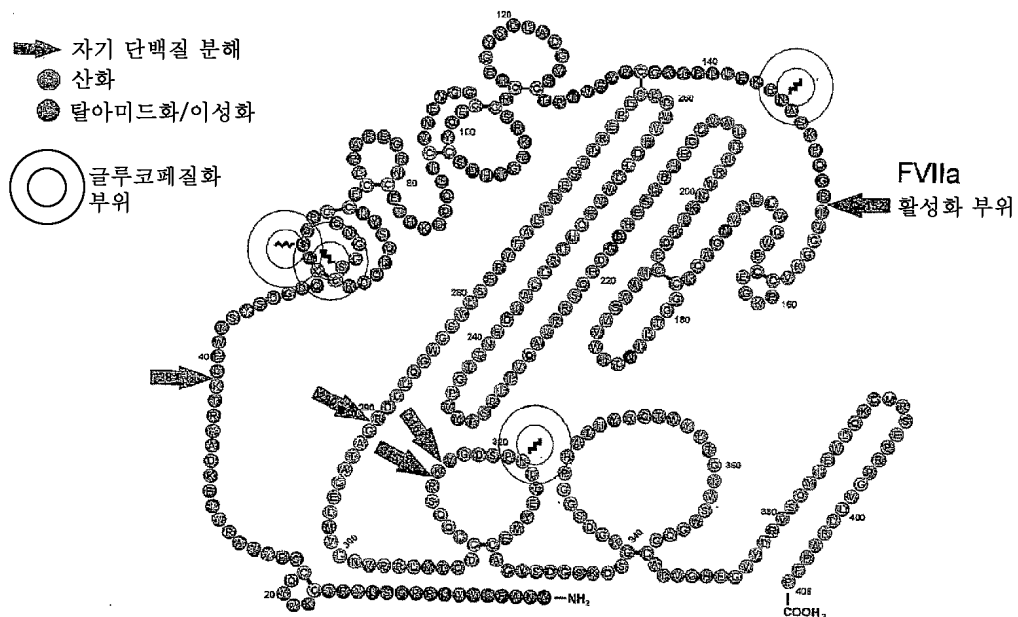
단백질	세균	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
	SARB8				
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC10V	n.d.	AF519779	AAM88840.1	Q8KS89
WaaH (fragment)	<i>Salmonella enterica</i> SARC12	n.d.	AF519781	AAM88842.1	
WaaH (fragment)	<i>Salmonella enterica</i> SARC13I	n.d.	AF519782	AAM88843.1	Q8KS88
WaaH (fragment)	<i>Salmonella enterica</i> SARC14I	n.d.	AF519783	AAM88844.1	Q8KS87
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC15II	n.d.	AF519784	AAM88845.1	Q8KS86
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC16II	n.d.	AF519785	AAM88846.1	Q8KS85
WaaH (fragment)	<i>Salmonella enterica</i> SARC3I	n.d.	AF519772	AAM88834.1	Q8KSA4
WaaH (fragment)	<i>Salmonella enterica</i> SARC4I	n.d.	AF519773	AAM88835.1	Q8KSA3
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC5IIa	n.d.	AF519774	AAM88836.1	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC6IIa	n.d.	AF519775	AAM88837.1	Q8KSA2
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC8	n.d.	AF519777	AAM88838.1	Q8KSA1
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC9V	n.d.	AF519778	AAM88839.1	Q8KSA0
UDP-glucose : α -1,2-글루코실전이효소 (WaaH)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>anzonae</i> SARC 5	2.4.1.-	AF511116	AAM48166.1	
bifunctional α -2,3/-2,8-시알릴전이효소 (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43449	n.d.	AF401529	AAL06004.1	Q83CZ5
Cst	<i>Campylobacter jejuni</i> 81-176	n.d.	AF305571	AAL09368.1	
α -2,3-시알릴전이효소 (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43429	2.4.99.-	AY044156	AAK73183.1	
α -2,3-시알릴전이효소 (Cst-III)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43430	2.4.99.-	AF400047	AAK85419.1	
α -2,3-시알릴전이효소 (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43432	2.4.99.-	AF215659	AAG43979.1	Q8FCM9
α -2,3/8-시알릴전이효소 (CstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43438	n.d.	AF400048	AAK91725.1	Q83MQ0
α -2,3-시알릴전이효소 cst-II	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43446	2.4.99.-	AF167344	AAF34137.1	
α -2,3-시알릴전이효소 (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43456	2.4.99.-	AF401528	AAL05890.1	Q93D05
α -2,3- α -2,8-시알릴전이효소 (CstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43460	2.4.99.-	AY044888	AAK96001.1	Q938X6
α -2,3/8-시알릴전이효소 (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 700297	n.d.	AF215647	AAL36482.1	
ORF	<i>Campylobacter jejuni</i> GB11	n.d.	AY422197	AAR62875.1	
α -2,3-시알릴전이효소 cstIII	<i>Campylobacter jejuni</i> MSC67360	2.4.99.-	AF195055	AAG29922.1	
α -2,3-시알릴전이효소 cstIII Cj1140	<i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 11168	2.4.99.-	AL139077 NC_002163	CAB73395.1 NP_282288.1	Q9PNF4
α -2,3 α -2,8-시알릴전이효소 II (cstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> O:10	n.d.	AX934427	AAO96559.1 CAF04167.1	
α -2,3 α -2,8-시알릴전이효소 II (CstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> O:19	n.d.	AX934431	CAF04169.1	
α -2,3 α -2,8-시알릴전이효소 II (CstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> O:36	n.d.	AX934436	CAF04171.1	
α -2,3 α -2,8-	<i>Campylobacter</i>	n.d.	AX934434	CAF04170.1	

도면3N

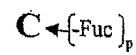
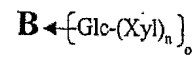
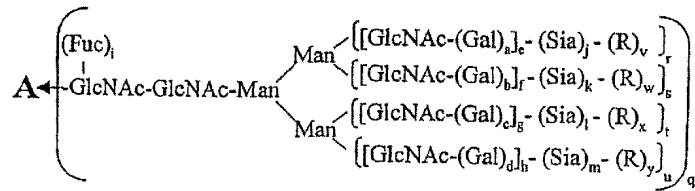
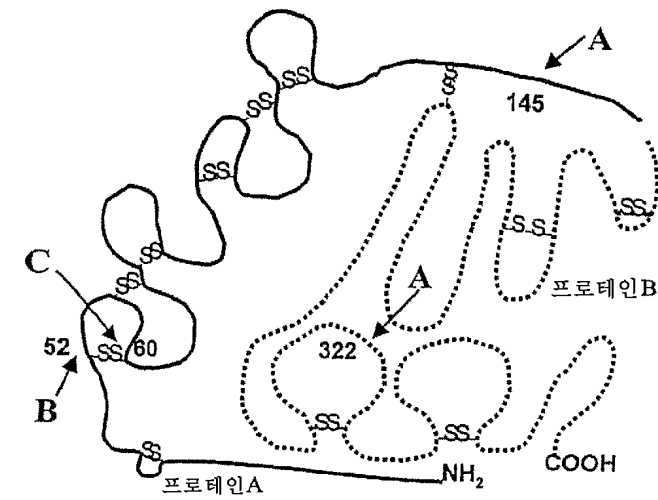
단백질	세균	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
시알릭전이효소 II (CstII)	<i>Jejuni</i> O:4				
α -2,3/ α -2,8-시알릭전이효소 II (CstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> O:41	n.d.	-	AAO96670.1 AAT17967.1 CAF04168.1	
α -2,3-시알릭전이효소 cst-I	<i>Campylobacter jejuni</i> OH4384	2.4.99.-	AF130466 -	AAF13495.1 AAS36261.1	Q9RGF1
bifunctional α -2,3/-2,8-시알릭전이효소 (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> OH4384	2.4.99.-	AF130984 AX934425	AAF31771.1 CAF04166.1	1RO7 1RO8 C A
HI0352 (fragment)	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	n.d.	U32720 X57315 NC_000907	AAC22013.1 CAA40567.1 NP_438516.1	P24324
PM1174	<i>Pasteurella multocida</i> PM70	n.d.	AE006157 NC_002663	AAK03258.1 NP_246111.1	Q9CLP3
Sequence 10 from patent US 6503744	미확인	n.d.	-	AAO96672.1	
Sequence 10 from patent US 6699705	미확인	n.d.	-	AAT17969.1	
Sequence 12 from patent US 6699705	미확인	n.d.	-	AAT17970.1	
Sequence 2 from patent US 6709834	미확인	n.d.	-	AAT23232.1	
Sequence 3 from patent US 6503744	미확인	n.d.	-	AAO96668.1	
Sequence 3 from patent US 6699705	미확인	n.d.	-	AAT17965.1	
Sequence 34 from patent US 6503744	미확인	n.d.	-	AAO96684.1	
Sequence 35 from patent US 6503744 (fragment)	미확인	n.d.	-	AAO96685.1 AAS36262.1	
Sequence 48 from patent US 6699705	미확인	n.d.	-	AAT17988.1	
Sequence 5 from patent US 6699705	미확인	n.d.	-	AAT17966.1	
Sequence 9 from patent US 6503744	미확인	n.d.	-	AAO96671.1	

도면4A

인자(Factor) VII



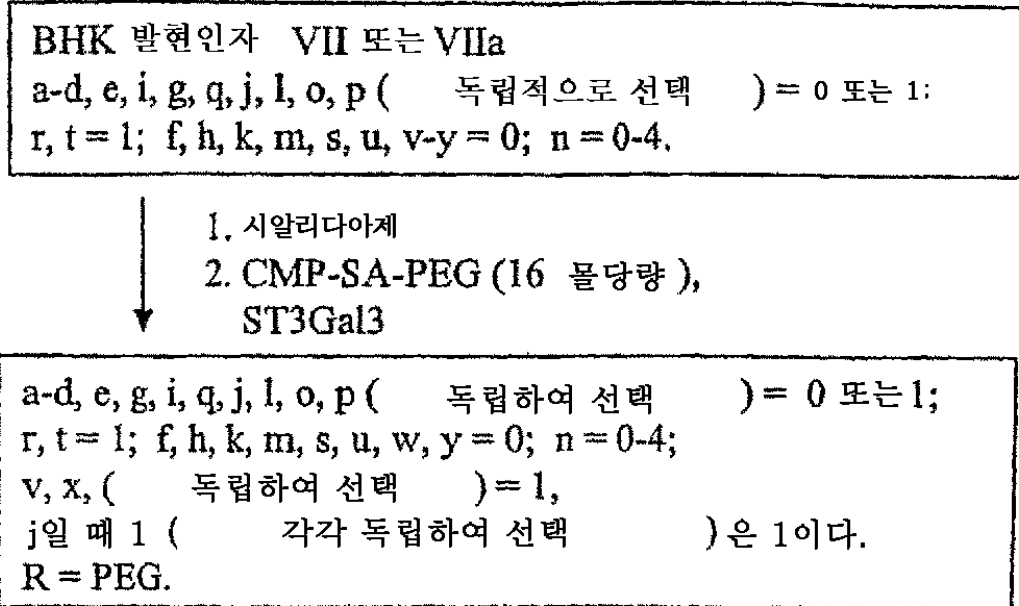
도면4B



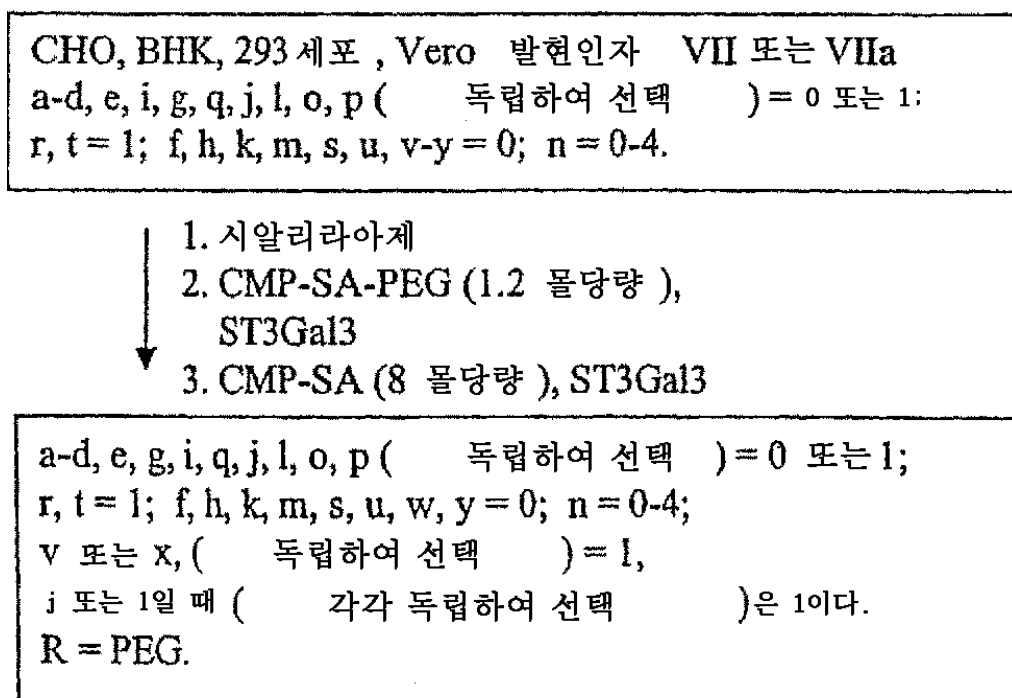
a-d, i, q-u (독립하여 선택) = 0 또는 1
 o, p (독립하여 선택) = 0 또는 1
 e-h, n (독립하여 선택) = 0 내지 6
 j-m (독립하여 선택) = 0 내지 20
 v-y = 0;
 R = 변형기, 만노오스, oligo-

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

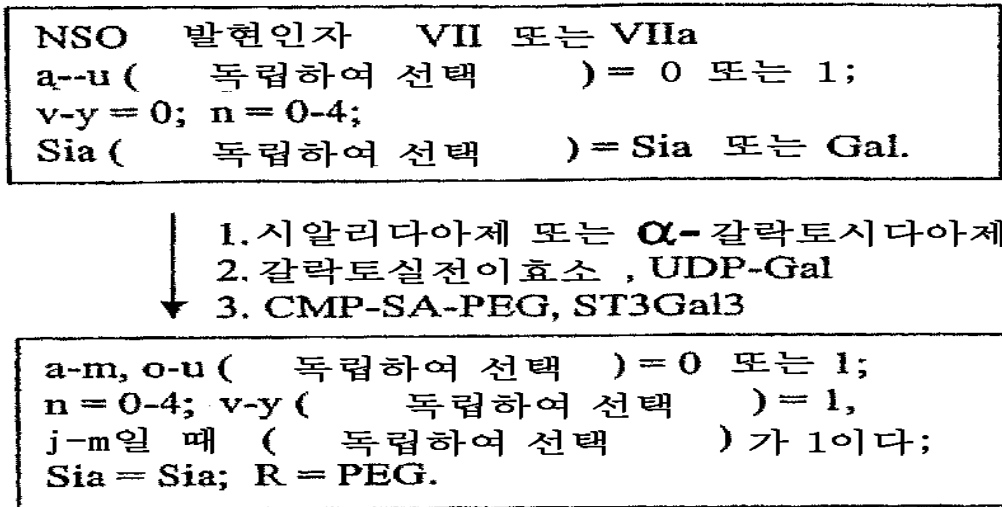
도면4C



도면4D



도면4E



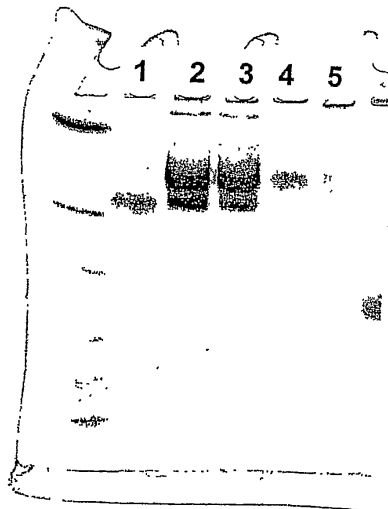
도면5A

ATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTGGGCTTCAG
 GGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCCACGGCGT
 CCTGCACCGGCGCCGGCGCGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGC
 CGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGA
 GGAGGCCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTT
 TGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCA
 GAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCCTATATCTGCTTCT
 GCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAAGTGTGAGACGCACAAGGATGAC
 CAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAG
 TGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTGCGTGCCACGAGGGGTACT
 CTCTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGTCACACCCACAGTTGAATATCCA
 TGTGGAATAATACCTATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCA
 AGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTGCCCCAAAGGGGAGTGTCCA
 TGGCAGGTCTGTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGGGGGGAC
 CCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAA
 AATCAAGAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGAC
 CTCAGCGAGCACGACGGGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGG
 TCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACCACCAACCACGACATC
 GCGCTGCTCCGCTGCACCAGCCCGTGGTCCTCACTGACCATGTGGTG
 CCCCTCTGCCTGCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTC
 GTGCGCTTCTCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGG
 CGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTGCTCAACGTGCCCCGGCTGATGA
 CCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAAT
 ATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
 CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGGCCACATGCCACCCACTACCGGG
 GCACGTGGTACCTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCA
 ACCGTGGGGCACTTTGGGGTGTACACCAGGGTCTCCAGTACATCGA
 GTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCAGGAGTCTCC
 TGCGAGCCCCATTTCCC

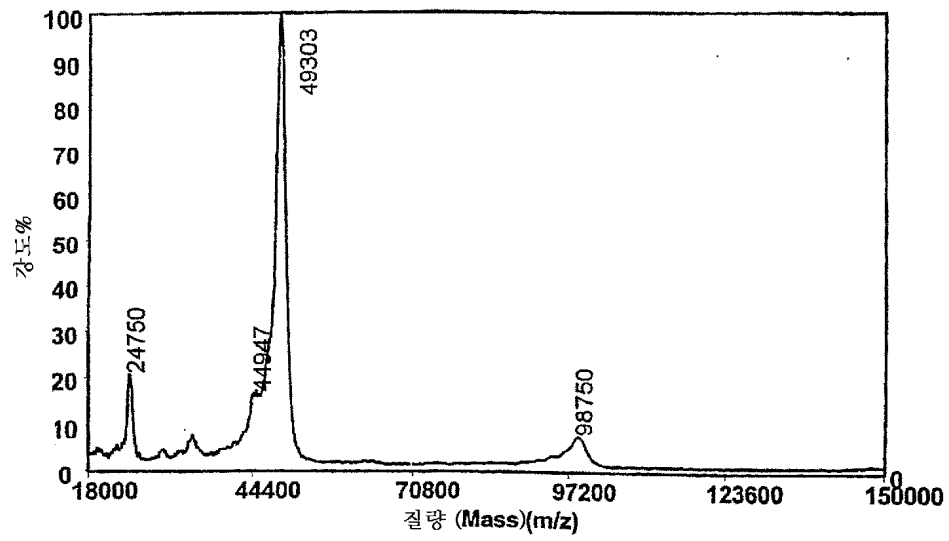
도면5B

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln Gly Cys
 Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg
 Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys
 Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys
 Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
 Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val
 Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg
 Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro
 Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln
 Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
 Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile
 Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
 Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp
 Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu
 Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser
 Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu
 Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg
 Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp
 Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg
 Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met
 Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro

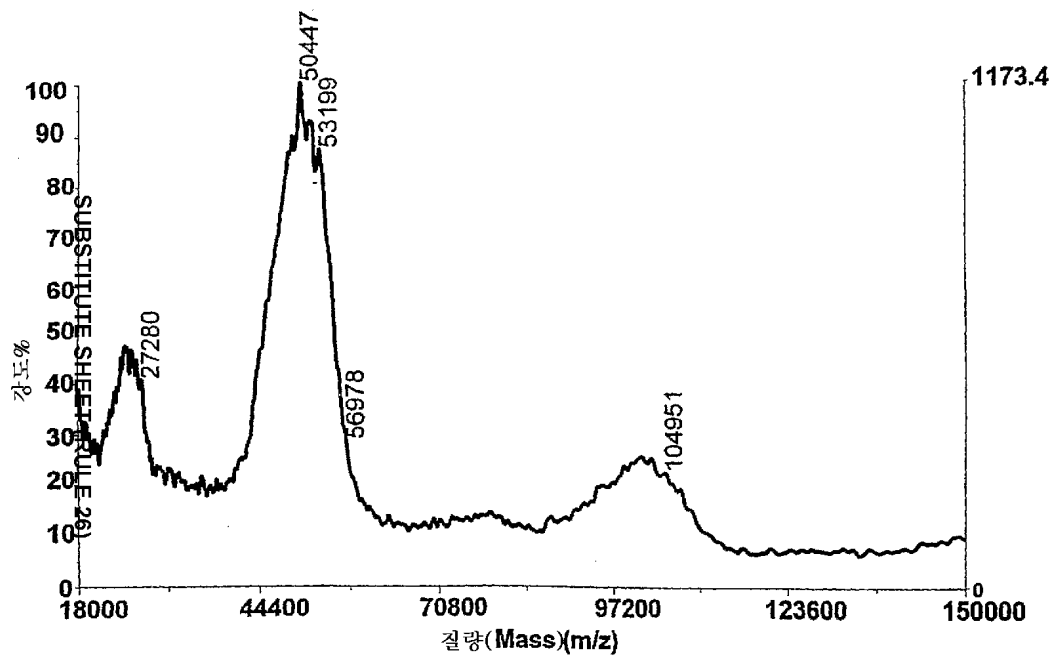
도면6



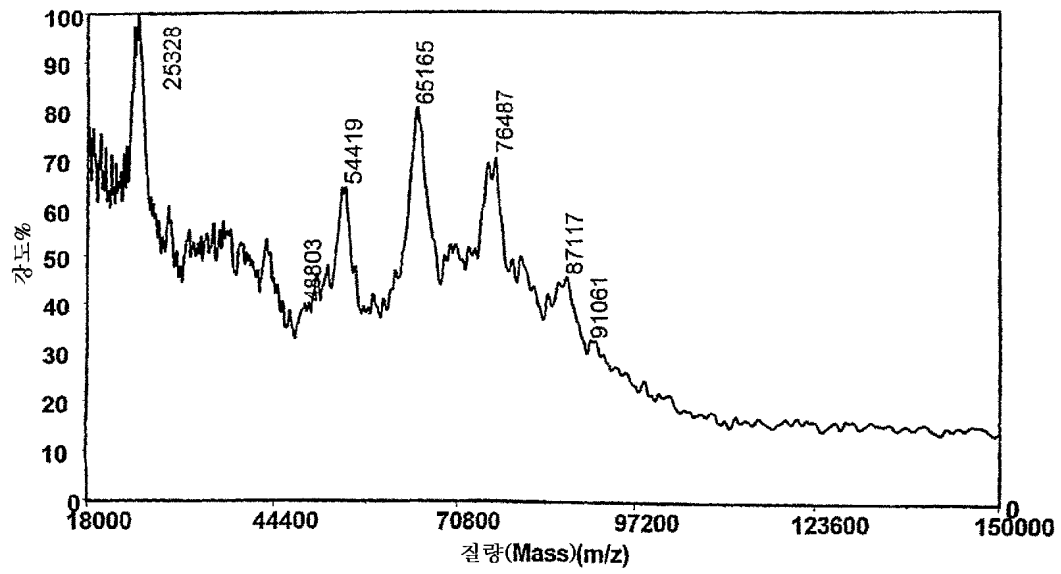
도면7



도면8



도면9

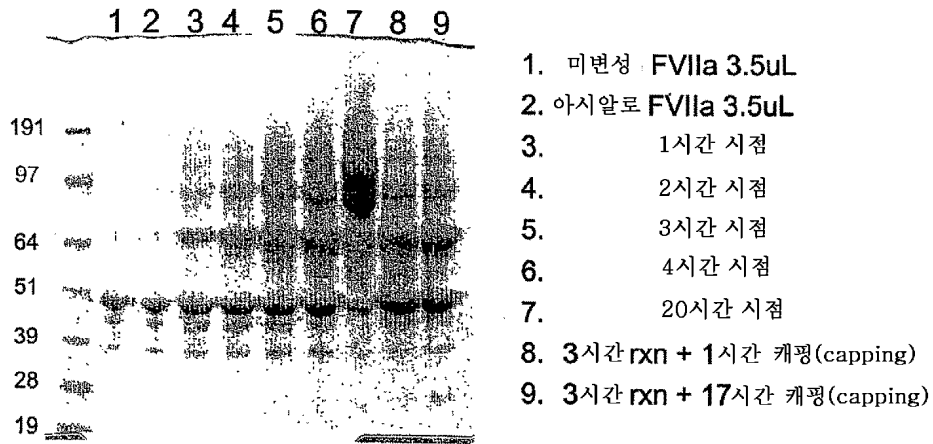


도면10



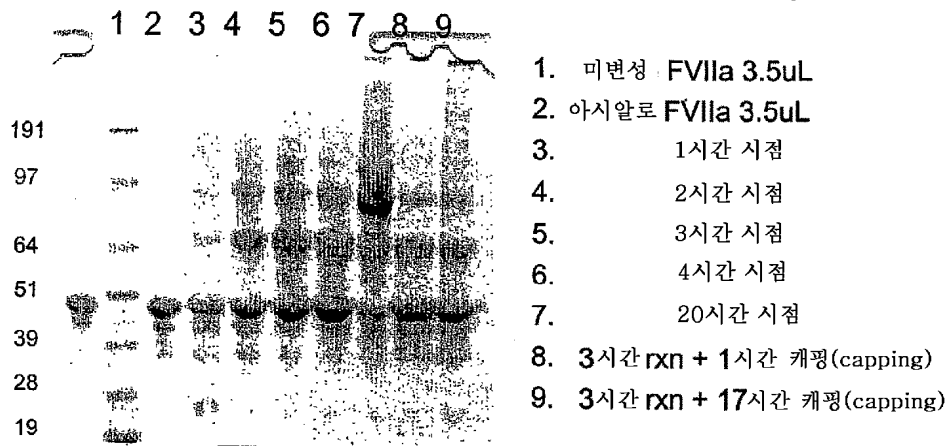
도면11A

동시 탈시알화(simultaneousdesialation)(0.5U/L) 및 폐질화(PEGylation)



도면11B

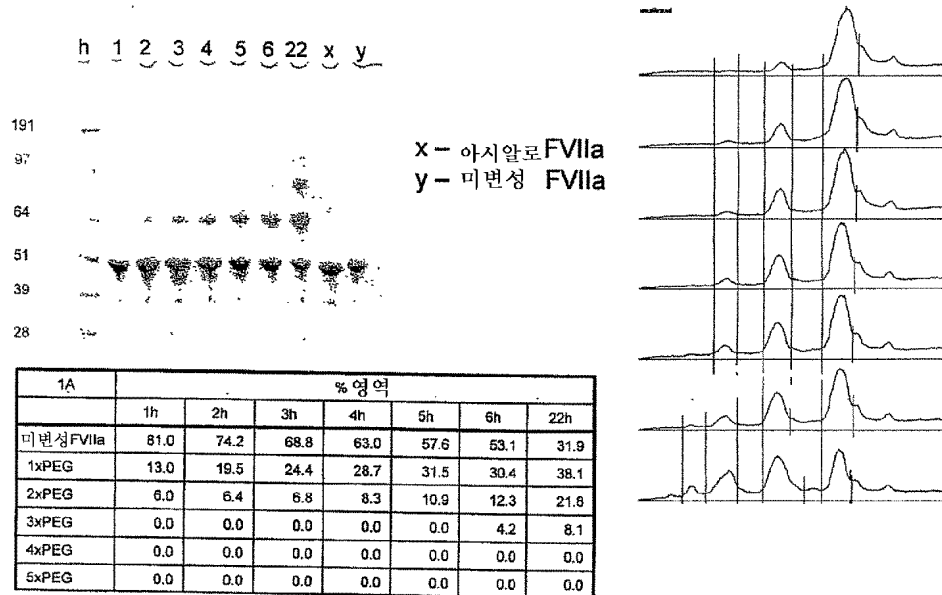
동시 탈시알화(simultaneousdesialation) (0.1U/L에서) 및 폐질화(PEGylation)



도면12A

샘플 1A

33U/L ST3Gal3 A. niger / 0.2mM 10K CMP-SA-PEG

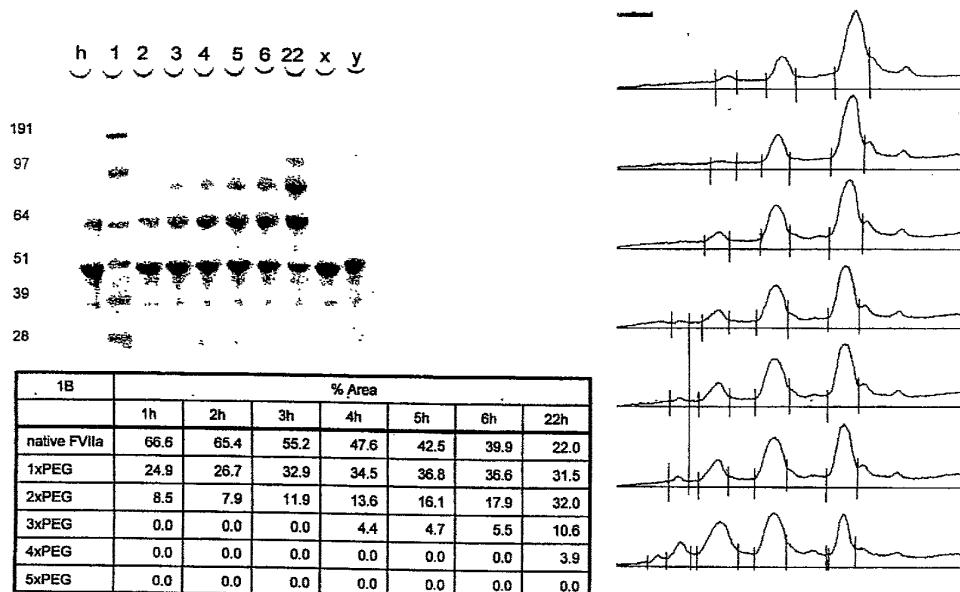


도면12B

샘플 1B

33U/L ST3Gal3 A. niger / 0.2mM 10K CMP-SA-PEG

30분 지연형 폐질화(30min delayed PEGylation)



도면13A

12AP1/E5 -- Viventia Biotech	AI-301 -- AutoImmune
1964 -- Aventis	AIDS vaccine -- ANRS, CIBG, Hersed
20K growth hormone -- AMUR	Biomed, Hollis-Eden, Rome, United
28P6/E6 -- Viventia Biotech	Biomedical, American Home Products,
3-Hydroxyphthaloyl-beta-lactoglobulin --	Maxygen
4-IBB ligand gene therapy --	airway receptor ligand -- IC Innovations
64-Cu MAb conjugate TETA-1A3 --	AJvW 2 -- Ajinomoto
Mallinckrodt Institute of Radiology	AK 30 NGF -- Alkermes
64-Cu MAb conjugate TETA-cT84.66	Albuferon -- Human Genome Sciences
64-Cu Trastuzumab TETA conjugate --	albumin -- Biogen, DSM Anti-Infectives,
Genentech	Genzyme Transgenics, PPL
A 200 -- Amgen	Therapeutics, TranXenoGen, Welfide
A10255 -- Eli Lilly	Corp.
A1PDX -- Hedral Therapeutics	aldesleukin -- Chiron
A6 -- Angstrom	alefacept -- Biogen
aaAT-III -- Genzyme	Alemtuzumab
Abciximab -- Centocor	Allergy therapy -- ALK-Abello/Maxygen,
ABI.001 -- Atlantic BioPharmaceuticals	ALK-Abello/RP Scherer
ABT-828 -- Abbott	allergy vaccines -- Allergy Therapeutics
Accutin	Alnidofibatide -- Aventis Pasteur
Actinohivin	Alnorine -- SRC VB VECTOR
activin -- Biotech Australia, Human	ALP 242 -- Gruenenthal
Therapeutics, Curis	Alpha antitrypsin -- Arriva/Hyland
AD 439 -- Tanox	Immuno/ProMetic/Protease Sciences
AD 519 -- Tanox	Alpha-1 antitrypsin -- Cutter, Bayer, PPL
Adalimumab -- Cambridge Antibody Tech.	Therapeutics, Profile, ZymoGenetics,
Adenocarcinoma vaccine -- Biomira -- NIS	Arriva
Adenosine deaminase -- Enzond	Alpha-1 protease inhibitor -- Genzyme
Adenosine A2B receptor antagonists --	Transgenics, Welfide Corp.
Adenosine Therapeutics	Alpha-galactose fusion protein --
ADP-001 -- Axis Genetics	Immunomedics
AF 13948 -- Affymax	Alpha-galactosidase A -- Research
Afelimomab -- Knoll	Corporation Technologies, Genzyme
AFP-SCAN -- Immunomedics	Alpha-glucosidase -- Genzyme,
AG 2195 -- Corixa	Novazyme
agalsidase alfa -- Transkaryotic Therapies	Alpha-lactalbumin
agalsidase beta -- Genzyme	Alpha-L-iduronidase -- Transkaryotic
AGENT-- Antisoma	Therapies, BioMarin
AI 300 -- AutoImmune	alteplase -- Genentech
AI-101 -- Teva	alvircept sudotox -- NIH
AI-102 -- Teva	ALX-0600, a GLP-2 agonist -- NPS Allelix
AI-201 -- AutoImmune	Corp.

도면13B

ALX1-11 --sNPS Pharmaceuticals	Anti-alphavβ3 integrin MAb -- Applied
Alzheimer's disease gene therapy	Molecular Evolution
AM-133 -- AMRAD	Anti-angiogenesis monoclonal antibodies -
Amb a 1 immunostim conj. -- Dynavax	- KS Biomedix/Schering AG
AMD 3100 -- AnorMED -- NIS	Anti-B4 MAb-DC1 conjugate --
AMD 3465 -- AnorMED -- NIS	ImmunoGen
AMD 3465 -- AnorMED -- NIS	Anti-B7 antibody PRIMATIZED -- IDEC
AMD Fab -- Genentech	Anti-B7-1 MAb 16-10A1
Amediplase -- Menarini, Novartis	Anti-B7-1 MAb 1G10
AM-F9	Anti-B7-2 MAb GL-1
Amoebiasis vaccine	Anti-B7-2-gelonin immunotoxin --
Amphiregulin -- Octagene	Antibacterials/antifungals --
anakinra -- Amgen	Diversa/IntraBiotics
analgesic -- Nobex	Anti-beta-amyloid monoclonal antibodies -
ancestim -- Amgen	- Cambridge Antibody Tech., Wyeth-
AnergiX.RA -- Corixa, Organon	Ayerst
Angiocidin -- InKine	Anti-BLyS antibodies -- Cambridge
angiogenesis inhibitors -- ILEX	Antibody Tech. /Human Genome
AngioMab -- Antisoma	Sciences
Angiopoietins -- Regeneron/Procter &	Antibody-drug conjugates -- Seattle
Gamble	Genetics/Eos
angiostatin -- EntreMed	Anti-C5 MAb BB5-1 -- Alexion
Angiostatin/endostatin gene therapy --	Anti-C5 MAb N19-8 -- Alexion
Genetix Pharmaceuticals	Anti-C8 MAb
angiotensin-II, topical -- Maret	anticancer cytokines -- BioPulse
Anthrax -- EluSys Therapeutics/US Army	anticancer matrix -- Telios Integra
Medical Research Institute	Anticancer monoclonal antibodies --
Anthrax vaccine	ARIUS, Immunex
Anti platelet-derived growth factor D	anticancer peptides -- Maxygen,
human monoclonal antibodies --	Micrologix
CuraGen	Anticancer prodrug Tech. -- Alexion
Anti-17-1A MAb 3622W94 --	Antibody Technologies
GlaxoSmithKline	anticancer Troy-Bodies -- Affite -- Affitech
Anti-2C4 MAb -- Genentech	anticancer vaccine -- NIH
anti-4-1BB monoclonal antibodies --	anticancers -- Epimmune
Bristol-Myers Squibb	Anti-CCR5/CXCR4 sheep MAb -- KS
Anti-Adhesion Platform Tech. -- Cytovax	Biomedix Holdings
Anti-adipocyte MAb -- Cambridge	Anti-CD11a MAb KBA --
Antibody Tech./ObeSys	Anti-CD11a MAb M17
antiallergics -- Maxygen	Anti-CD11a MAb TA-3 --
antiallergy vaccine -- Acambis	Anti-CD11a MAb WT.1 --
Anti-alpha4-integrin MAb	Anti-CD11a MAb WT.1 --

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

도면13C

Anti-CD11b MAb LM2	Anti-CD4 idiotype vaccine
Anti-CD154 MAb -- Biogen	Anti-CD4 MAb -- Centocor, IDEC
Anti-CD16-anti-CD30 MAb -- Biotest	Pharmaceuticals, Xenova Group
Anti-CD18 MAb -- Pharmacia	Anti-CD4 MAb 16H5
Anti-CD19 MAb B43 --	Anti-CD4 MAb 4162W94 --
Anti-CD19 MAb -liposomal sodium	GlaxoSmithKline
butyrate conjugate --	Anti-CD4 MAb B-F5 -- Diaclone
Anti-CD147	Anti-CD4 MAb GK1-5
Anti-CD19 MAb-saporin conjugate --	Anti-CD4 MAb KT6
Anti-CD19-dsFv-PE38-immunotoxin --	Anti-CD4 MAb OX38
Anti-CD2 MAb 12-15 --	Anti-CD4 MAb PAP conjugate -- Bristol-
Anti-CD2 MAb B-E2 -- Diaclone	Myers Squibb
Anti-CD2 MAb OX34 --	Anti-CD4 MAb R1B 5-2
Anti-CD2 MAb OX54 --	Anti-CD4 MAb W3/25
Anti-CD2 MAb OX55 --	Anti-CD4 MAb YTA 3.1.2
Anti-CD2 MAb RM2-1	Anti-CD4 MAb YTS 177-9
Anti-CD2 MAb RM2-2	Anti-CD40 ligand MAb 5c8 -- Biogen
Anti-CD2 MAb RM2-4	Anti-CD40 MAb
Anti-CD20 MAb BCA B20	Anti-CD40 MAb 5D12 -- Tanox
Anti-CD20-anti-Fc alpha RI bispecific MAb	Anti-CD44 MAb A3D8
-- Medarex, Tenovus	Anti-CD44 MAb GKWA3
Anti-CD22 MAb-saporin-6 complex --	Anti-CD44 MAb IM7
Anti-CD3 immunotoxin --	Anti-CD44 MAb KM81
Anti-CD3 MAb 145-2C11 -- Pharming	Anti-CD44 variant monoclonal antibodies -
Anti-CD3 MAb CD4IgG conjugate --	- Corixa/Hebrew University
Genentech	Anti-CD45 MAb BC8-I-131
Anti-CD3 MAb humanised -- Protein	Anti-CD45RB MAb
Design, RW Johnson	Anti-CD48 MAb HuLy-m3
Anti-CD3 MAb WT32	Anti-CD48 MAb WM-63
Anti-CD3 MAb-ricin-chain-A conjugate --	Anti-CD5 MAb -- Becton Dickinson
Anti-CD3 MAb-xanthine-oxidase	Anti-CD5 MAb OX19
conjugate --	Anti-CD6 MAb
Anti-CD30 MAb BerH2 -- Medac	Anti-CD7 MAb-PAP conjugate
Anti-CD30 MAb-saporin conjugate	Anti-CD7 MAb-ricin-chain-A conjugate
Anti-CD30-scFv-ETA'-immunotoxin	Anti-CD8 MAb -- Amerimmune, Cytodyn,
Anti-CD38 MAb AT13/5	Becton Dickinson
Anti-CD38 MAb-saporin conjugate	Anti-CD8 MAb 2-43
Anti-CD3-anti-CD19 bispecific MAb	Anti-CD8 MAb OX8
Anti-CD3-anti-EGFR MAb	Anti-CD80 MAb P16C10 -- IDEC
Anti-CD3-anti-interleukin-2-receptor MAb	Anti-CD80 MAb P7C10 -- ID Vaccine
Anti-CD3-anti-MOV18 MAb -- GIBCO	Anti-CD80 MAb P7C10 conjugate
Anti-CD3-anti-SCLC bispecific MAb	Anti-CEA MAb CE-25

도면13D

Anti-CEA MAb MN 14 -- Immunomedics	Anti-hCG antibodies -- Abgenix/AVI BioPharma
Anti-CEA MAb MN14-PE40 conjugate -- Immunomedics	Anti-heparanase human monoclonal antibodies -- Oxford Glycosciences/Medarex
Anti-CEA MAb T84.66-interleukin-2 conjugate	Anti-hepatitis C virus human monoclonal antibodies -- XTL Biopharmaceuticals
Anti-CEA sheep MAb -- KS Biomedix Holdings	Anti-HER-2 antibody gene therapy
Anti-cell surface monoclonal antibodies -- Cambridge Antibody Tech. /Pharmacia	Anti-herpes antibody -- Epicyte
Anti-c-erbB2-anti-CD3 bifunctional MAb -- Otsuka	Anti-HIV antibody -- Epicyte
Anti-CMV MAb -- Scotgen	anti-HIV catalytic antibody -- Hesed Biomed
Anti-complement	anti-HIV fusion protein -- Idun
Anti-CTLA-4 MAb	anti-HIV proteins -- Cangene
Anti-EGFR catalytic antibody -- Hesed Biomed	Anti-HM1-24 MAb -- Chugai
anti-EGFR immunotoxin -- IVAX	Anti-hR3 MAb
Anti-EGFR MAb -- Abgenix	Anti-Human-Carcinoma-Antigen MAb -- Epicyte
Anti-EGFR MAb 528	Anti-ICAM-1 MAb -- Boehringer Ingelheim
Anti-EGFR MAb KSB 107 -- KS Biomedix	Anti-ICAM-1 MAb 1A-29 -- Pharmacia
Anti-EGFR MAb-DM1 conjugate -- ImmunoGen	Anti-ICAM-1 MAb HA58
Anti-EGFR MAb-LA1 --	Anti-ICAM-1 MAb YN1/1.7.4
Anti-EGFR sheep MAb -- KS Biomedix	Anti-ICAM-3 MAb ICM3 -- ICOS
Anti-FAP MAb F19-I-131	Anti-idiotypic breast cancer vaccine 11D10
Anti-Fas IgM MAb CH11	Anti-idiotypic breast cancer vaccine ACA14C5 --
Anti-Fas MAb Jo2	Anti-idiotypic cancer vaccine -- ImClone Systems/Merck KGaA ImClone, Viventia Biotech
Anti-Fas MAb RK-8	Anti-idiotypic cancer vaccine 1A7 -- Titan
Anti-Flt-1 monoclonal antibodies -- ImClone	Anti-idiotypic cancer vaccine 3H1 -- Titan
Anti-fungal peptides -- State University of New York	Anti-idiotypic cancer vaccine TriAb -- Titan
antifungal tripeptides -- BTG	Anti-idiotypic Chlamydia trachomatis vaccine
Anti-ganglioside GD2 antibody-interleukin-2 fusion protein -- Lexigen	Anti-idiotypic colorectal cancer vaccine -- Novartis
Anti-GM2 MAb -- Kyowa	Anti-idiotypic colorectal cancer vaccine -- Onyvax
Anti-GM-CSF receptor monoclonal antibodies -- AMRAD	Anti-idiotypic melanoma vaccine -- IDEC Pharmaceuticals
Anti-gp130 MAb -- Tosoh	Anti-idiotypic ovarian cancer vaccine ACA 125
Anti-HCA monoclonal antibodies -- AltaRex/Epigen	

도면13E

Anti-idiotypic ovarian cancer vaccine AR54 -- AltaRex	Anti-L-selectin monoclonal antibodies -- Protein Design Labs, Abgenix, Stanford University
Anti-idiotypic ovarian cancer vaccine CA-125 -- AltaRex, Biomira	Anti-MBL monoclonal antibodies -- Alexion/Brigham and Women's Hospital
Anti-IgE catalytic antibody -- Hesel Biomed	Anti-MHC monoclonal antibodies
Anti-IgE MAb E26 -- Genentech	Anti-MIF antibody humanised -- IDEC, Cytokine PharmaSciences
Anti-IGF-1 MAb	Anti-MRSA/VRSA sheep MAb -- KS Biomedix Holdings
anti-inflammatory -- GeneMax	Anti-mu MAb -- Novartis
anti-inflammatory peptide -- BTG	Anti-MUC-1 MAb
anti-integrin peptides -- Burnha	Anti-MUC 18
Anti-interferon-alpha-receptor MAb 64G12 -- Pharma Pacific Management	Anti-Nogo-A MAb IN1
Anti-interferon-gamma MAb -- Protein Design Labs	Anti-nuclear autoantibodies -- Procyon
Anti-interferon-gamma polyclonal antibody -- Advanced Biotherapy	Anti-ovarian cancer monoclonal antibodies -- Dompe
Anti-interleukin-10 MAb --	Anti-p185 monoclonal antibodies
Anti-interleukin-12 MAb --	Anti-p43 MAb
Anti-interleukin-1-beta polyclonal antibody -- R&D Systems	Antiparasitic vaccines
Anti-interleukin-2 receptor MAb 2A3	Anti-PDGF/bFGF sheep MAb -- KS Biomedix
Anti-interleukin-2 receptor MAb 33B3-1 -- Immunotech	Anti-properdin monoclonal antibodies -- Abgenix/Gliatech
Anti-interleukin-2 receptor MAb ART-18	Anti-PSMA (prostate specific membrane antigen)
Anti-interleukin-2 receptor MAb LO-Tact-1	Anti-PSMA MAb J591 -- BZL Biologics
Anti-interleukin-2 receptor MAb Mikbeta1	Anti-Rev MAb gene therapy --
Anti-interleukin-2 receptor MAb NDS61	Anti-RSV antibodies -- Epicyte, Intracell
Anti-interleukin-4 MAb 11B11	Anti-RSV monoclonal antibodies -- Medarex/MedImmune, Applied Molecular Evolution/MedImmune
Anti-interleukin-5 MAb -- Wallace Laboratories	Anti-RSV MAb, inhalation -- Alkermes/MedImmune
Anti-interleukin-6 MAb -- Centocor, Diacclone, Pharmadigm	Anti-RT gene therapy
Anti-interleukin-8 MAb -- Abgenix	Antisense K-ras RNA gene therapy
Anti-interleukin-8 MAb -- Xenotech	Anti-SF-25 MAb
Anti-JL1 MAb	Anti-sperm antibody -- Epicyte
Anti-Klebsiella sheep MAb -- KS Biomedix Holdings	Anti-Tac(Fv)-PE38 conjugate
Anti-Laminin receptor MAb-liposomal doxorubicin conjugate	Anti-TAPA/CD81 MAb AMP1
Anti-LCG MAb -- Cytoclonal	Anti-tat gene therapy
Anti-lipopolysaccharide MAb -- SUBSTITUTED SHEEP (rule 20)	Anti-tat gene therapy

도면13F

Anti-TCR- α beta MAb R73	APC-8024 -- Demegen
Anti-tenascin MAb BC-4-I-131	ApoA-1 -- Milano, Pharmacia
Anti-TGF- β human monoclonal antibodies -- Cambridge Antibody Tech., Genzyme	Apogen -- Alexion
Anti-TGF- β MAb 2G7 -- Genentech	apolipoprotein A1 -- Avanir
Antithrombin III -- Genzyme Transgenics, Aventis, Bayer, Behringwerke, CSL, Myriad	Apolipoprotein E -- Bio-Tech. General
Anti-Thy1 MAb	Applaggin -- Biogen
Anti-Thy1.1 MAb	aprotinin -- ProdiGene
Anti-tissue factor/factor VIIA sheep MAb -- KS Biomedix	APT-070C -- AdProTech
Anti-TNF monoclonal antibodies -- Centocor, Chiron, Peptech, Pharacia, Serono	AR 177 -- Aronex Pharmaceuticals
Anti-TNF sheep MAb -- KS Biomedix Holdings	AR 209 -- Aronex Pharmaceuticals, Antigenics
Anti-TNF α MAb -- Genzyme	AR545C
Anti-TNF α MAb B-C7 -- Diaclone	ARGENT gene delivery systems -- ARIAD
Anti-tooth decay MAb -- Planet BioTech.	Arresten
Anti-TRAIL receptor-1 MAb -- Takeda	ART-123 -- Asahi Kasei
Antitumour RNases -- NIH	arylsulfatase B -- BioMarin
Anti-VCAM MAb 2A2 -- Alexion	Arylsulfatase B, Recombinant human -- BioMarin
Anti-VCAM MAb 3F4 -- Alexion	AS 1051 -- Ajinomoto
Anti-VCAM-1 MAb	ASI-BCL -- Intracell
Anti-VEC MAb -- ImClone	Asparaginase - Merck
Anti-VEGF MAb -- Genentech	ATL-101 -- Allzyme
Anti-VEGF MAb 2C3	Atrial natriuretic peptide -- Pharis
Anti-VEGF sheep MAb -- KS Biomedix Holdings	Aurintricarboxylic acid-high molecular weight
Anti-VLA-4 MAb HP1/2 -- Biogen	Autoimmune disorders -- GPC
Anti-VLA-4 MAb PS/2	Biotech/MorphoSys
Anti-VLA-4 MAb R1-2	Autoimmune disorders and transplant rejection -- Bristol-Myers Squibb/Genzyme Tra
Anti-VLA-4 MAb TA-2	Autoimmune disorders/cancer -- Abgenix/Chiron, CuraGen
Anti-VAP-1 human MAb	Autotaxin
Anti-VRE sheep MAb -- KS Biomedix Holdings	Avicidin -- NeoRx
ANUP -- TranXenoGen	axogenesis factor-1 -- Boston Life Sciences
ANUP-1 -- Pharis	Axokine -- Regeneron
AOP-RANTES -- Senetek	B cell lymphoma vaccine -- Biomira
Apan-CH -- Praecis Pharmaceuticals	B7-1 gene therapy --
	BABS proteins -- Chiron
	BAM-002 -- Novelos Therapeutics
	BB-951 (BB-951 MAb) -- Novartis

도면13G

Bay-16-9996 -- Bayer	BMP 2 -- Genetics Institute/Medtronic-
Bay-39-9437 -- Bayer	Sofamor Danek, Genetics Institute/
Bay-50-4798 -- Bayer	Collagenesis, Genetics
BB-10153 -- British Biotech	Institute/Yamanouch
BBT-001 -- Bolder BioTech.	BMP 2 gene therapy
BBT-002 -- Bolder BioTech.	BMP 52 -- Aventis Pasteur, Biopharm
BBT-003 -- Bolder BioTech.	BMP-2 -- Genetics Institute
BBT-004 -- Bolder BioTech.	BMS 182248 -- Bristol-Myers Squibb
BBT-005 -- Bolder BioTech.	BMS 202448 -- Bristol-Myers Squibb
BBT-006 -- Bolder BioTech.	bone growth factors -- IsoTis
BBT-007 -- Bolder BioTech.	BPC-15 -- Pfizer
BCH-2763 -- Shire	brain natriuretic peptide --
BCSF -- Millenium Biologix	Breast cancer -- Oxford
BDNF -- Regeneron -- Amgen	GlycoSciences/Medarex
Becaplermin -- Johnson & Johnson,	Breast cancer vaccine -- Therion
Chiron	Biologics, Oregon
Bectumomab -- Immunomedics	BSSL -- PPL Therapeutics
Beriplast -- Aventis	BST-2001 -- BioStratum
Beta-adrenergic receptor gene therapy --	BST-3002 -- BioStratum
University of Arkansas	BTI 322 --
bFGF -- Scios	butyrylcholinesterase -- Shire
BI 51013 -- Behringwerke AG	C 6822 -- COR Therapeutics
BIBH 1 -- Boehringer Ingelheim	C1 esterase inhibitor -- Pharming
BIM-23190 -- Beaufour-lpsen	C3d adjuvant -- AdProTech
birch pollen immunotherapy -- Pharmacia	CAB-2.1 -- Millennium
bispecific fusion proteins -- NIH	calcitonin -- Inhale Therapeutics Systems,
Bispecific MAb 2B1 -- Chiron	Aventis, Genetronics, TranXenoGen,
Bitistatin	Unigene, Rhone Poulenc Rohrer
BIWA 4 -- Boehringer Ingelheim	calcitonin -- oral -- Nobex, Emisphere,
blood substitute -- Northfield, Baxter Intl.	Pharmaceutical Discovery
BLP-25 -- Biomira	Calcitonin gene-related peptide -- Asahi
BLS-0597 -- Boston Life Sciences	Kasei -- Unigene
BLyS -- Human Genome Sciences	calcitonin, human -- Suntory
BLyS radiolabelled -- Human Genome	calcitonin, nasal -- Novartis, Unigene
Sciences	calcitonin, Panoderm -- Elan
BM 06021 -- Boehringer Mannheim	calcitonin, Peptitol -- Shire
BM-202 -- BioMarin	calcitonin, salmon -- Therapicon
BM-301 -- BioMarin	calin -- Biopharm
BM-301 -- BioMarin	Calphobindin I
BM-302 -- BioMarin	calphobindin I -- Kowa
	calreticulin -- NYU

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

도면13H

Campath-1M	CD4 receptor antagonists --
cancer therapy -- Cangene	Pharmacoepia/Progenics
cancer vaccine -- Aixlie, Aventis Pasteur,	CD4 soluble -- Progenics
Center of Molecular Immunology, YM	CD4, soluble -- Genzyme Transgenics
BioSciences, Cytos, Genzyme,	CD40 ligand -- Immunex
Transgenics, GlobelImmune, Igeneon,	CD4-ricin chain A -- Genentech
ImClone, Virogenetics, InterCell, Iomai,	CD59 gene therapy -- Alexion
Jenner Biotherapies, Memorial Sloan-	CD8 TIL cell therapy -- Aventis Pasteur
Kettering Cancer Center, Sydney	CD8, soluble -- Avidex
Kimmel Cancer Center, Novavax,	CD95 ligand -- Roche
Protein Sciences, Argonex, SIGA	CDP 571 -- Celltech
Cancer vaccine ALVAC-CEA B7.1 --	CDP 850 -- Celltech
Aventis Pasteur/Therion Biologics	CDP-860 (PEG-PDGF MAb) -- Celltech
Cancer vaccine CEA-TRICOM -- Aventis	CDP 870 -- Celltech
Pasteur/Therion Biologics	CDS-1 -- Ernest Orlando
Cancer vaccine gene therapy -- Cantab	Cedelizumab -- Ortho-McNeil
Pharmaceuticals	Cetermin -- Insmad
Cancer vaccine HER-2/neu -- Corixa	CETP vaccine -- Avant
Cancer vaccine THERATOPE -- Biomira	Cetorelix
cancer vaccine, PolyMASC -- Valentis	Cetuximab
Candida vaccine -- Corixa, Inhibitex	CGH 400 -- Novartis
Canstatin -- ILEX	CGP 42934 -- Novartis
CAP-18 -- Panorama	CGP 51901 -- Tanox
Cardiovascular gene therapy -- Collateral	CGRP -- Unigene
Therapeutics	CGS 27913 -- Novartis
carperitide -- Suntory	CGS 32359 -- Novartis
Casocidin-1 -- Pharis	Chagas disease vaccine -- Corixa
CAT 152 -- Cambridge Antibody Tech.	chemokines -- Immune Response
CAT 192 -- Cambridge Antibody Tech.	CHH 380 -- Novartis
CAT 213 -- Cambridge Antibody Tech.	chitinase -- Genzyme, ICOS
Catalase -- Enzon	Chlamydia pneumoniae vaccine -- Antex
Cat-PAD -- Circassia	Biologics
CB 0006 -- Celltech	Chlamydia trachomatis vaccine -- Antex
CCK(27-32) -- Akzo Nobel	Biologics
CCR2-64I -- NIH	Chlamydia vaccine -- GlaxoSmithKline
CD, Procept -- Paligent	Cholera vaccine CVD 103-HgR -- Swiss
CD154 gene therapy	Serum and Vaccine Institute Berne
CD39 -- Immunex	Cholera vaccine CVD 112 -- Swiss Serum
CD39-L2 -- Hyseq	and Vaccine Institute Berne
CD39-L4 -- Hyseq	Cholera vaccine inactivated oral -- SBL
CD4 fusion toxin -- Senetek	Vaccin
CD4 IgG -- Genentech	CD4 soluble -- Progenics
	CD4, soluble -- Genzyme Transgenics
	CD40 ligand -- Immunex
	CD4-ricin chain A -- Genentech
	CD59 gene therapy -- Alexion
	CD8 TIL cell therapy -- Aventis Pasteur
	CD8, soluble -- Avidex
	CD95 ligand -- Roche
	CDP 571 -- Celltech
	CDP 850 -- Celltech
	CDP-860 (PEG-PDGF MAb) -- Celltech
	CDP 870 -- Celltech
	CDS-1 -- Ernest Orlando
	Cedelizumab -- Ortho-McNeil
	Cetermin -- Insmad
	CETP vaccine -- Avant
	Cetorelix
	Cetuximab
	CGH 400 -- Novartis
	CGP 42934 -- Novartis
	CGP 51901 -- Tanox
	CGRP -- Unigene
	CGS 27913 -- Novartis
	CGS 32359 -- Novartis
	Chagas disease vaccine -- Corixa
	chemokines -- Immune Response
	CHH 380 -- Novartis
	chitinase -- Genzyme, ICOS
	Chlamydia pneumoniae vaccine -- Antex
	Biologics
	Chlamydia trachomatis vaccine -- Antex
	Biologics
	Chlamydia vaccine -- GlaxoSmithKline
	Cholera vaccine CVD 103-HgR -- Swiss
	Serum and Vaccine Institute Berne
	Cholera vaccine CVD 112 -- Swiss Serum
	and Vaccine Institute Berne
	Cholera vaccine inactivated oral -- SBL
	Vaccin
	CD4 soluble -- Progenics
	CD4, soluble -- Genzyme Transgenics
	CD40 ligand -- Immunex
	CD4-ricin chain A -- Genentech
	CD59 gene therapy -- Alexion
	CD8 TIL cell therapy -- Aventis Pasteur
	CD8, soluble -- Avidex
	CD95 ligand -- Roche
	CDP 571 -- Celltech
	CDP 850 -- Celltech
	CDP-860 (PEG-PDGF MAb) -- Celltech
	CDP 870 -- Celltech
	CDS-1 -- Ernest Orlando
	Cedelizumab -- Ortho-McNeil
	Cetermin -- Insmad
	CETP vaccine -- Avant
	Cetorelix
	Cetuximab
	CGH 400 -- Novartis
	CGP 42934 -- Novartis
	CGP 51901 -- Tanox
	CGRP -- Unigene
	CGS 27913 -- Novartis
	CGS 32359 -- Novartis
	Chagas disease vaccine -- Corixa
	chemokines -- Immune Response
	CHH 380 -- Novartis
	chitinase -- Genzyme, ICOS
	Chlamydia pneumoniae vaccine -- Antex
	Biologics
	Chlamydia trachomatis vaccine -- Antex
	Biologics
	Chlamydia vaccine -- GlaxoSmithKline
	Cholera vaccine CVD 103-HgR -- Swiss
	Serum and Vaccine Institute Berne
	Cholera vaccine CVD 112 -- Swiss Serum
	and Vaccine Institute Berne
	Cholera vaccine inactivated oral -- SBL
	Vaccin

SUBSTITUTE SHEET (RULE 56)

도면13I

CI-782 -- Hitachi Kase	CSF -- ZymoGenetics
Ciliary neurotrophic factor -- Fidia, Roche	CSF-G -- Hangzhou, Dong-A, Hanmi
CIM project -- Active Biotech	CSF-GM -- Cangene, Hunan, LG Chem
CL 329753 -- Wyeth-Ayerst	CSF-M -- Zarix
CL22, Cobra -- ML Laboratories	CT 1579 -- Merck Frosst
Clenoliximab -- IDEC	CT 1786 -- Merck Frosst
Clostridium difficile antibodies -- Epicyte	CT-112 ^A -- BTG
clotting factors -- Octagene	CTB-134L -- Xenova
CMB 401 -- Celltech	CTC-111 -- Kaketsuken
CNTF -- Sigma-Tau	CTGF -- FibroGen
Cocaine abuse vaccine -- Cantab,	CTLA4-Ig -- Bristol-Myers Squibb
ImmuLogic, Scripps	CTLA4-Ig gene therapy --
coccidiomycosis vaccine -- Arizo	CTP-37 -- AVI BioPharma
collagen -- Type I -- Pharming	C-type natriuretic peptide -- Suntory
Collagen formation inhibitors -- FibroGen	CVS 995 -- Corvas Intl.
Collagen/hydroxyapatite/bone growth	CX 397 -- Nikko Kyodo
factor -- Aventis Pasteur, Biopharm,	CY 1747 -- Epimmune
Orquest	CY 1748 -- Epimmune
collagenase -- BioSpecifics	Cyanovirin-N
Colorectal cancer vaccine -- Wistar	Cystic fibrosis therapy -- CBR/IVAX
Institute	CYT 351
Component B, Recombinant -- Serono	cytokine Traps -- Regeneron
Connective tissue growth factor inhibitors	cytokines -- Enzon, Cytoclonal
-- FibroGen/Taisho	Cytomegalovirus glycoprotein vaccine --
Contortrostatin	Chiron, Aquila Biopharmaceuticals,
contraceptive vaccine -- Zonagen	Aventis Pasteur, Virogenetics
Contraceptive vaccine hCG	Cytomegalovirus vaccine live -- Aventis
Contraceptive vaccine male reversible --	Pasteur
IMMUCON	Cytosine deaminase gene therapy --
Contraceptive vaccine zona pellucida --	GlaxoSmithKline
Zonagen	DA-3003 -- Dong-A
Copper-64 labelled MAb TETA-1A3 -- NCI	DAB389interleukin-6 -- Senetek
Coralayne	DAB389interleukin-7
Corsevin M	DAC:GLP-2 -- ConjuChem, Inc.
C-peptide analogues -- Schwarz	Daclizumab (anti-IL2R MAb) -- Protein
CPI-1500 -- Consensus	Design Labs
CRF -- Neurobiological Tech.	DAMP ^A -- Incyte Genomics
cRGDfV pentapeptide --	Daniplestim -- Pharmacia
CRL 1095 -- CytRx	darbepoetin alfa -- Amgen
CRL 1336 -- CytRx	DBI-3019 -- Diabetogen
CRL 1605 -- CytRx	DCC -- Genzyme
CS-560 -- Sankyo	

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

도면13J

decorin -- Integra, Telios	DWP-404 -- Daewoong
defensins -- Large Scale Biology	DWP-408 -- Daewoong
DEGR-VIIa	Dx 88 (Epi-KAL2) -- Dyax
DeImmunised antibody 3B6/22 AGEN	Dx 890 (elastin inhibitors) -- Dyax
Deimmunised anti-cancer antibodies --	E coli O157 vaccine -- NIH
Biovation/Viragen	E21-R -- BresaGen
Dendroamide A	Eastern equine encephalitis virus vaccine
Dengue vaccine -- Bavarian Nordic, Merck	--
denileukin diftiox -- Ligand	Echicetin --
DES-1101 -- Desmos	Echinhibin 1 --
desirudin -- Novartis	Echistatin -- Merck
desmopressin -- Unigene	Echitamine --
Desmoteplase -- Merck, Schering AG	Ecromeximab -- Kyowa Hakko
Destabilase	EC-SOD -- PPL Therapeutics
Diabetes gene therapy -- DeveloGen,	Ecuzumab (5G1.1) -- Alexion
Pfizer	EDF -- Ajinomoto
Diabetes therapy -- Crucell	EDN derivative -- NIH
Diabetes type 1 vaccine -- Diamyd	EDNA -- NIH
Therapeutics	Edobacomab -- XOMA
DiaCIM -- YM BioSciences	Edrecolomab -- Centocor
dialytic oligopeptides -- Research Corp	EF 5077
Diamyd -- Diamyd Therapeutics	Efalizumab -- Genentech
DiaPep227 -- Pepgen	EGF fusion toxin -- Seragen, Ligand
DiavaX -- Corixa	EGF-P64k vaccine -- Center of Molecular
Digoxin MAb -- Glaxo	Immunology
Diphtheria tetanus pertussis-hepatitis B	EL 246 -- LigoCyte
vaccine -- GlaxoSmithKline	elastase inhibitor -- Synergen
DIR therapy -- Solis Therapeutics --	elcatonin -- Therapicon
DNase -- Genentech	EMD 72000 -- Merck KGaA
Dornase alfa -- Genentech	Emdogain -- BIORA
Dornase alfa, inhalation -- Genentech	emfilermin -- AMRAD
Doxorubicin-anti-CEA MAb conjugate --	Emoctakin -- Novartis
Immunomedics	enamel matrix protein -- BIORA
DP-107 -- Trimeris	Endo III -- NYU
drotrecogin alfa -- Eli Lilly	endostatin -- EntreMed, Pharis
DTctGMCSF	Enhancins -- Micrologix
DTP-polio vaccine -- Aventis Pasteur	Enlimomab -- Isis Pharm.
DU 257-KM231 antibody conjugate --	Enoxaparin sodium -- Pharmuka
Kyowa	enzyme linked antibody nutrient depletion
dural graft matrix -- Integra	therapy -- KS Biomedix Holdings
Dutepase -- Baxter Intl.	Eosinophil-derived neutralizing agent --
DWP-401 -- Daewoong	SPHERULE (PAT. 5,601,601)

SUBSTITUTE SHEET (PAT. 5,601,601)

도면13K

EP-51389 -- Asta Medica
 EPH family ligands -- Regeneron
 Epidermal growth factor -- Hitachi Kasei, Johnson & Johnson
 Epidermal growth factor fusion toxin -- Senetek
 Epidermal growth factor-genistein -- EPI-HNE-4 -- Dyax
 EPI-KAL2 -- Dyax
 Epoetin-alfa -- Amgen, Dragon Pharmaceuticals, Nanjing Huaxin
 Epratuzumab -- Immunomedics
 Epstein-Barr virus vaccine -- Aviron/SmithKline Beecham, Bioresearch
 Eptacog alfa -- Novo Nordisk
 Eptifibatide -- COR Therapeutics
 erb-38 --
 Erlizumab -- Genentech
 erythropoietin -- Alkermes, ProLease, Dong-A, Elanex, Genetics Institute, LG Chem, Protein Sciences, Serono, Snow Brand, SRC VB VECTOR, Transkaryotic Therapies
 Erythropoietin Beta -- Hoffman La Roche
 Erythropoietin/Epoetin alfa -- Chugai
 Escherichia coli vaccine -- North American Vaccine, SBL Vaccin, Swiss Serum and Vaccine Institute Berne
 etanercept -- Immunex
 examorelin -- Mediolanum
 Exendin 4 -- Amylin
 exonuclease VII
 F 105 -- Centocor
 F-992 -- Fornix
 Factor IX -- Alpha Therapeutics, Welfide Corp., CSL, enetics Institute/AHP, Pharmacia, PPL Therapeutics
 Factor IX gene therapy -- Cell Genesys
 Factor VII -- Novo Nordisk, Bayer, Baxter Intl.
 Factor VIIa -- PPL Therapeutics, ZymoGenetics
 Factor VIII -- Bayer Genentech, Beaufour-Ipsen, CLB, Inex, Octagen, Pharmacia, Pharming
 Factor VIII -- PEGylated -- Bayer
 Factor VIII fragments -- Pharmacia
 Factor VIII gene therapy -- Targeted Genetics
 Factor VIII sucrose formulation -- Bayer, Genentech
 Factor VIII-2 -- Bayer
 Factor VIII-3 -- Bayer
 Factor Xa inhibitors -- Merck, Novo Nordisk, Mochida
 Factor XIII -- ZymoGenetics
 Factors VIII and IX gene therapy -- Genetics Institute/Targeted Genetics
 Famoxin -- Genset
 Fas (delta) TM protein -- LXR BioTech.
 Fas TR -- Human Genome Sciences
 Felvizumab -- Scotgen
 FFR-VIIa -- Novo Nordisk
 FG-001 -- F-Gene
 FG-002 -- F-Gene
 FG-004 -- F-Gene
 FG-005 -- F-Gene
 FGF + fibrin -- Repair
 Fibrimage -- Bio-Tech. General
 fibrin-binding peptides -- ISIS Innovation
 fibrinogen -- PPL Therapeutics, Pharming
 fibroblast growth factor -- Chiron, NYU, Ramot, ZymoGenetics
 fibrolase conjugate -- Schering AG
 Filgrastim -- Amgen
 filgrastim -- PDA modified -- Xencor
 FLT-3 ligand -- Immunex
 FN18 CRM9 --
 follistatin -- Biotech Australia, Human Therapeutics
 follitropin alfa -- Alkermes, ProLease, Serono, Akzo Nobel

SUBSTITUTE SHEET (Prior Art)

도면13L

Follitropin Beta -- Bayer, Organon	GM-CSF -- Immunex
FP 59	GM-CSF tumour vaccine -- PowderJect
FSH -- Ferring	GnRH immunotherapeutic -- Protherics
FSH + LH -- Ferring	Goserelin (LhRH antagonist) --
F-spondin -- CeNeS	AstraZeneca
fusion protein delivery system -- UAB	gp75 antigen -- ImClone
Research Foundation	gp96 -- Antigenics
fusion toxins -- Boston Life Sciences	GPI 0100 -- Galenica
G 5598 -- Genentech	GR 4991W93 -- GlaxoSmithKline
GA-II -- Transkaryotic Therapies	Granulocyte colony-stimulating factor --
Gamma-interferon analogues -- SRC VB	Dong-A
VECTOR	Granulocyte colony-stimulating factor
Ganirelix -- Roche	conjugate
gastric lipase -- Meristem	grass allergy therapy -- Dynavax
Gavilimomab --	GRF1-44 -- ICN
G-CSF -- Amgen, SRC VB VECTOR	Growth Factor -- Chiron, Atrigel, Atrix,
GDF-1 -- CeNeS	Innogenetics, ZymoGenetics, Novo
GDF-5 -- Biopharm	growth factor peptides -- Biotherapeutics
GDNF (glial derived neurotrophic factor) -	growth hormone -- LG Chem
- Amgen	growth hormone, Recombinant human --
gelsolin -- Biogen	Serono
Gemtuzumab ozogamicin -- Celltech	GT 4086 -- Gliatech
Gene-activated epoetin-alfa -- Aventis	GW 353430 -- GlaxoSmithKline
Pharma -- Transkaryotic Therapies	GW-278884 -- GlaxoSmithKline
Glanzmann thrombasthenia gene therapy	H 11 -- Viventia Biotech
-	H5N1 influenza A virus vaccine -- Protein
Glatiramer acetate -- Yeda	Sciences
glial growth factor 2 -- CeNeS	haemoglobin -- Biopure
GLP-1 -- Amylin, Suntory, TheraTech,	haemoglobin 3011, Recombinant -- Baxter
Watson	Healthcare
GLP-1 peptide analogues -- Zealand	haemoglobin crosfumaril -- Baxter Intl.
Pharaceuticals	haemoglobin stabilized -- Ajinomoto
GLP-2 -- Novo Nordisk, Ontario, Inc.,	haemoglobin, recombinant -- Apex
Suntory Limited	HAF -- Immune Response
glucagon -- Eli Lilly, ZymoGenetics	Hantavirus vaccine
Glucagon-like peptide-1 7-36 amide --	HB 19
Suntory	HBNF -- Regeneron
Glucogen-like peptide -- Amylin	HCC-1 -- Pharis
Glucocerebrosidase -- Genzyme	hCG -- Milkhaus
glutamate decarboxylase -- Genzyme	hCG vaccine -- Zonagen
Transgenics	HE-317 -- Hollis-Eden Pharmaceuticals
Glycoprotein S3 -- Kureha	

도면13M

Heat shock protein cancer and influenza vaccines -- StressGen	Herpes simplex vaccine -- Cantab Pharmaceuticals, CEL-SCI, Henderson Morley
Helicobacter pylori vaccine -- Acambis, AstraZeneca/CSL, Chiron, Provalis	Herpes simplex vaccine live -- ImClone Systems/Wyeth-Lederle, Aventis Pasteur
Helistat-G -- GalaGen	HGF derivatives -- Dompe
Hemolink -- Hemosol	hIAPP vaccine -- CruceCell
hepapoietin -- Snow Brand	Hib-hepatitis B vaccine -- Aventis Pasteur
heparanase -- InSight	HIC 1
heparinase I -- Ibex	HIP -- Altachem
heparinase III -- Ibex	Hirudins -- Biopharma, Cangene, Dongkook, Japan Energy Corporation, Pharmacia Corporation, SIR International, Sanofi-Synthelabo, Sotragene, Rhein Biotech
Hepatitis A vaccine -- American Biogenetic Sciences	HIV edible vaccine -- ProdiGene
Hepatitis A vaccine inactivated	HIV gp120 vaccine -- Chiron, Ajinomoto, GlaxoSmithKline, ID Vaccine, Progenics, VaxGen
Hepatitis A vaccine Nothav -- Chiron	HIV gp120 vaccine gene therapy --
Hepatitis A-hepatitis B vaccine -- GlaxoSmithKline	HIV gp160 DNA vaccine -- PowderJect, Aventis Pasteur, Oncogen, Hyland Immuno, Protein Sciences
hepatitis B therapy -- Tripep	HIV gp41 vaccine -- Panacos
Hepatitis B vaccine -- Amgen, Chiron SpA, Meiji Milk, NIS, Prodeva, PowderJect, Rhein Biotech	HIV HGP-30W vaccine -- CEL-SCI
Hepatitis B vaccine recombinant -- Evans Vaccines, Epitac Combiotech, Genentech, MedImmune, Merck Sharp & Dohme, Rhein Biotech, Shantha Biotechnics, Vector, Yeda	HIV immune globulin -- Abbott, Chiron
Hepatitis B vaccine recombinant TGP 943 -- Takeda	HIV peptides -- American Home Products
Hepatitis C vaccine -- Bavarian Nordic, Chiron, Innogenetics Acambis,	HIV vaccine -- Applied bioTech., Axis Genetics, Biogen, Bristol-Myers Squibb, Genentech, Korea Green Cross, NIS, Oncogen, Protein Sciences Corporation, Terumo, Tonen Corporation, Wyeth-Ayerst, Wyeth-Lederle Vaccines-Malvern, Advanced BioScience Laboratories, Bavarian Nordic, Bavarian Nordic/Statens Serum Institute, GeneCure, Immune Response, Progenics, Therion Biologics, United Biomedical, Chiron
Hepatitis D vaccine -- Chiron Vaccines	HIV vaccine vCP1433 -- Aventis Pasteur
Hepatitis E vaccine recombinant -- Genelabs/GlaxoSmithKline, Novavax	HIV vaccine vCP1452 -- Aventis Pasteur
hepatocyte growth factor -- Panorama, Sosei	
hepatocyte growth factor kringle fragments -- EntreMed	
Her-2/Neu peptides -- Corixa	
Herpes simplex glycoprotein DNA vaccine -- Merck, Wyeth-Lederle Vaccines-Malvern, Genentech, GlaxoSmithKline, Chiron, Takeda	

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

도면13N

HIV vaccine vCP205 -- Aventis Pasteur	Human monoclonal antibodies --
HL-9 -- American BioScience	Medarex/Northwest Biotherapeutics,
HM-9239 -- Cytran	Medarex/Seattle Genetics
HML-103 -- Hemosol	human netrin-1 -- Exelixis
HML-104 -- Hemosol	human papillomavirus antibodies --
HML-105 -- Hemosol	Epicyte
HML-109 -- Hemosol	Human papillomavirus vaccine -- Biotech
HML-110 -- Hemosol	Australia, IDEC, StressGen
HML-121 -- Hemosol	Human papillomavirus vaccine MEDI 501
hNLP -- Pharis	-- MedImmune/GlaxoSmithKline
Hookworm vaccine	Human papillomavirus vaccine MEDI
host-vector vaccines -- Henogen	503/MEDI 504 --
HPM 1 -- Chugai	MedImmune/GlaxoSmithKline
HPV vaccine -- MediGene	Human papillomavirus vaccine TA-CIN --
HSA -- Meristem	Cantab Pharmaceuticals
HSF -- StressGen	Human papillomavirus vaccine TA-HPV --
HSP carriers --Weizmann, Yeda, Peptor	Cantab Pharmaceuticals
HSPPC-70 -- Antigenics	Human papillomavirus vaccine TH-GW --
HSPPC-96, pathogen-derived --	Cantab/GlaxoSmithKline
Antigenics	human polyclonal antibodies --
HSV 863 -- Novartis	Biosite/Eos BioTech./ Medarex
HTLV-I DNA vaccine	human type II anti factor VIII monoclonal
HTLV-I vaccine	antibodies -- ThromboGenics
HTLV-II vaccine -- Access	humanised anti glycoprotein Ib murine
HU 901 -- Tanox	monoclonal antibodies --
Hu23F2G -- ICOS	ThromboGenics
HuHMF1	HumaRAD -- Intracell
HumaLYM -- Intracell	HuMax EGFR -- Genmab
Human krebs statika -- Yamanouchi	HuMax-CD4 -- Medarex
human monoclonal antibodies --	HuMax-IL15 -- Genmab
Abgenix/Biogen, Abgenix/ Corixa,	HYB 190 -- Hybridon
Abgenix/Immunex, Abgenix/Lexicon,	HYB 676 -- Hybridon
Abgenix/ Pfizer, Athersys/Medarex,	I-125 MAb A33 -- Celltech
Biogen/MorphoSys, CAT/Searle,	Ibritumomab tiuxetan -- IDEC
Centocor/Medarex, Corixa/Kirin	IBT-9401 -- Ibex
Brewery, Corixa/Medarex, Eos	IBT-9402 -- Ibex
BioTech./Medarex, Eos/Xenex,	IC 14 -- ICOS
Exelixis/Protein Design Labs,	Idarubicin anti-Ly-2.1 --
ImmunoGen/ Raven, Medarex/	IDEC 114 -- IDEC
B.Twelve, MorphoSys/ImmunoGen, XTL	IDEC 131 -- IDEC
Biopharmaceuticals/Dyax,	IDEC 152 -- IDEC
	IDM 1 -- IDM

도면130

IDPS -- Hollis-Eden Pharmaceuticals
 iduronate-2-sulfatase -- Transkaryotic
 Therapies
 IGF/IBP-2-13 -- Pharis
 IGN-101 -- Igeneon
 IK HIR02 -- Iketon
 IL-11 -- Genetics Institute/AHP
 IL-13-PE38 -- NeoPharm
 IL-17 receptor -- Immunex
 IL-18BP -- Yeda
 IL-1Hy1 -- Hyseq
 IL-1β -- Celltech
 IL-1β adjuvant -- Celltech
 IL-2 -- Chiron
 IL-2 + IL-12 -- Hoffman La-Roche
 IL-6/sIL-6R fusion -- Hadasit
 IL-6R derivative -- Tosoh
 IL-7-Dap 389 fusion toxin -- Ligand
 IL-21 -- Novo Nordisk, ZymoGenetics
 IM-862 -- Cytran
 IMC-1C11 -- ImClone
 imiglucerase -- Genzyme
 Immune globulin intravenous (human) --
 Hoffman La Roche
 immune privilege factor -- Proneuron
 Immunocal -- Immunotec
 Immunogene therapy -- Briana Bio-Tech
 Immunoliposomal 5-fluorodeoxyuridine-
 dipalmitate --
 immunosuppressant vaccine -- Aixlie
 immunotoxin -- Antisoma, NIH
 ImmuRAIT-Re-188 -- Immunomedics
 imreg-1 -- Imreg
 infertility -- Johnson & Johnson, E-
 TRANS
 Infliximab -- Centocor
 Influenza virus vaccine -- Aventis Pasteur,
 Protein Sciences
 inhibin -- Biotech Australia, Human
 Therapeutics
 Inhibitory G protein gene therapy
 INKP-2001 -- InKine
 Inolimomab -- Diaclone
 insulin -- AutoImmune, Altea, Biobras,
 BioSante, Bio-Tech. General, Chong
 Kun Dang, Emisphere, Flamel, Provalis,
 Rhein Biotech, TranXenoGen
 insulin (bovine) -- Novartis
 insulin analogue -- Eli Lilly
 Insulin Aspart -- Novo Nordisk
 insulin detemir -- Novo Nordisk
 insulin glargine -- Aventis
 insulin inhaled -- Inhale Therapeutics
 Systems, Alkermes
 insulin oral -- Inovax
 insulin, AeroDose -- AeroGen
 insulin, AERx -- Aradigm
 insulin, BEODAS -- Elan
 insulin, Biphasix -- Helix
 insulin, buccal -- Generex
 insulin, I2R -- Flemington
 insulin, intranasal -- Bentley
 insulin, oral -- Nobex, Unigene
 insulin, Orasome -- Endorex
 insulin, ProMaxx -- Epic
 insulin, Quadrant -- Elan
 insulin, recombinant -- Aventis
 insulin, Spiros -- Elan
 insulin, Transfersome -- IDEA
 insulin, Zymo, recombinant -- Novo
 Nordisk
 insulinotropin -- Scios
 Insulysin gene therapy --
 integrin antagonists -- Merck
 interferon (Alpha2) -- SRC VB VECTOR,
 Viragen, Dong-A, Hoffman La-Roche,
 Genentech
 interferon -- BioMedicines, Human
 Genome Sciences
 interferon (Alfa-n3)—Interferon Sciences
 Intl.
 interferon (Alpha), Biphasix -- Helix

도면13P

interferon (Alpha)—Amgen, BioNative, Novartis, Genzyme Transgenics, Hayashibara, Inhale Therapeutics Systems, Medusa, Flamel, Dong-A, GeneTrol, Nاستech, Shantha, Wassermann, LG Chem, Sumitomo, Aventis, Behring EGIS, Pepgen, Servier, Rhein Biotech,	IL-2/ diphtheria toxin -- Ligand
interferon (Alpha2A)	Interleukin-3 -- Cangene
interferon (Alpha2B) -- Enzon, Schering-Plough, Biogen, IDEA	Interleukin-4 -- Immunology Ventures, Sanofi Winthrop, Schering-Plough, Immunex/ Sanofi Winthrop, Bayer, Ono
interferon (Alpha-N1) -- GlaxoSmithKline	interleukin-4 + TNF-Alpha -- NIH
interferon (beta) -- Rentschler, GeneTrol, Meristem, Rhein Biotech, Toray, Yeda, Daiichi, Mochida	interleukin-4 agonist -- Bayer
interferon (Beta1A) -- Seroно, Biogen	interleukin-4 fusion toxin -- Ligand
interferon (beta1A),inhale -- Biogen	Interleukin-4 receptor -- Immunex, Immun
interferon (β1b)-- Chiron	Interleukin-6 -- Ajinomoto, Cangene, Yeda, Genetics Institute, Novartis
interferon (tau)-- Pepgen	interleukin-6 fusion protein
Interferon alfacon-1 -- Amgen	interleukin-6 fusion toxin -- Ligand, Seroно
Interferon alpha-2a vaccine	interleukin-7 -- IC Innovations
Interferon Beta 1b -- Schering/Chiron, InterMune	interleukin-7 receptor -- Immunex
Interferon Gamma -- Boehringer Ingelheim, Sheffield, Rentschler, Hayashibara	interleukin-8 antagonists -- Kyowa Hakko/Millennium/Pfizer
interferon receptor , Type I -- Seroно	interleukin-9 antagonists -- Genaera
interferon(Gamma1B) -- Genentech	Interleukin-10 -- DNAX, Schering-Plough
Interferon-alpha-2b + ribavirin -- Biogen, ICN	Interleukin-10 gene therapy --
Interferon-alpha-2b gene therapy -- Schering-Plough	interleukin-12 -- Genetics Institute, Hoffman La-Roche
Interferon-con1 gene therapy --	interleukin-13 -- Sanofi
interleukin-1 antagonists -- Dompe	interleukin-13 antagonists -- AMRAD
Interleukin-1 receptor antagonist -- Abbott Bioresearch, Pharmacia	Interleukin-13-PE38QQR
Interleukin-1 receptor type I -- Immunex	interleukin-15 -- Immunex
interleukin-1 receptor Type II -- Immunex	interleukin-16 -- Research Corp
Interleukin-1 trap -- Regeneron	interleukin-18 -- GlaxoSmithKline
Interleukin-1-alpha -- Immunex/Roche	Interleukin-18 binding protein -- Seroно
interleukin-2 -- SRC VB VECTOR, Ajinomoto, Biomira, Chiron	lor-P3 -- Center of Molecular Immunology
	IP-10 -- NIH
	IPF -- Metabolex
	IR-501 -- Immune Response
	ISIS 9125 -- Isis Pharmaceuticals
	ISURF No. 1554 -- Millennium
	ISURF No. 1866 -- Iowa State Univer.
	ITF-1697 -- Italfarmaco
	IxC 162 -- Ixion
	J 695 -- Cambridge Antibody Tech., Genetics Inst., Knoll
	Jagged + FGF -- Repair
	JKC 362 -- Phoenix Pharmaceuticals

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

도면13Q

JTP-2942 -- Japan Tobacco	leuprolide, ProMaxx -- Epic
Juman monoclonal antibodies -- Medarex/Raven	leuprorelin, oral -- Unigene
K02 -- Axy's Pharmaceuticals	LeuTech -- Papatin
Keliximab -- IDEC	LEX 032 -- SuperGen
Keyhole limpet haemocyanin	LiDEPT -- Novartis
KGF -- Amgen	Lintuzumab (anti-CD33 MAb) -- Protein Design Labs
KM 871 -- Kyowa	lipase -- Altus Biologics
KPI 135 -- Scios	lipid A vaccine -- EntreMed
KPI-022 -- Scios	lipid-linked anchor Tech. -- ICRT, ID Biomedical
Kringle 5	liposome-CD4 Tech. -- Sheffield
KSB 304	Listeria monocytogenes vaccine
KSB-201 -- KS Biomedix	LMB 1
L 696418 -- Merck	LMB 7
L 703801 -- Merck	LMB 9 -- Battelle Memorial Institute, NIH
L1 -- Acorda	LM-CD45 -- Cantab Pharmaceuticals
L-761191 -- Merck	lovastatin -- Merck
lactoferrin -- Meristem, Pharming, Agennix	LSA-3
lactoferrin cardio -- Pharming	LT- β receptor -- Biogen
LAG-3 -- Serono	lung cancer vaccine -- Corixa
LAIT -- GEMMA	lusupultide -- Scios
LAK cell cytotoxin -- Arizona	L-Vax -- AVAX
lamellarins -- PharmaMar/University of Malaga	LY 355455 -- Eli Lilly
laminin A peptides -- NIH	LY 366405 -- Eli Lilly
lanoteplase -- Genetics Institute	LY-355101 -- Eli Lilly
laronidase -- BioMarin	Lyme disease DNA vaccine -- Vical/Aventis Pasteur
Lassa fever vaccine	Lyme disease vaccine -- Aquila
LCAT -- NIH	Biopharmaceuticals, Aventis, Pasteur, Symbicom, GlaxoSmithKline, Hyland
LDP 01 -- Millennium	Immuno, MedImmune
LDP 02 -- Millennium	Lymphocytic choriomeningitis virus vaccine
Lecithinized superoxide dismutase -- Seikagaku	lymphoma vaccine -- Biomira, Genitope
LeIF adjuvant -- Corixa	LYP18
leishmaniasis vaccine -- Corixa	lys plasminogen, recombinant
lenercept -- Hoffman La-Roche	Lysosomal storage disease gene therapy -- Avigen
Lenograstim -- Aventis, Chugai	lysostaphin -- Nutrition 21
lepirudin -- Aventis	M 23 -- Gruenenthal
leptin -- Amgen, IC Innovations	
Leptin gene therapy -- Chiron Corporation	
leptin, 2nd-generation -- Amgen	
leridistim -- Pharmacia	

도면13R

M1 monoclonal antibodies -- Acorda Therapeutics	melanin concentrating hormone -- Neurocrine Biosciences
MA 16N7C2 -- Corvas Intl.	melanocortins -- OMRF
malaria vaccine -- GlaxoSmithKline, AdProTech, Antigenics, Apovia, Aventis Pasteur, Axis Genetics, Behringwerke, CDCP, Chiron Vaccines, Genzyme Transgenics, Hawaii, MedImmune, NIH, NYU, Oxxon, Roche/Saramane, Biotech Australia, Rx Tech	Melanoma monoclonal antibodies -- Viragen
Malaria vaccine CDC/NIIMALVAC-1	melanoma vaccine -- GlaxoSmithKline, Akzo Nobel, Avant, Aventis Pasteur, Bavarian Nordic, Biovector, CancerVax, Genzyme Molecular Oncology, Humbolt, ImClone Systems, Memorial, NYU, Oxxon
malaria vaccine, multicomponent	Melanoma vaccine Magevac -- Therion
mammaglobin -- Corixa	memory enhancers -- Scios
mammastatin -- Biotherapeutics	meningococcal B vaccine -- Chiron
mannan-binding lectin -- NatImmu	meningococcal vaccine -- CAMR
mannan-MUC1 -- Psiron	Meningococcal vaccine group B conjugate -- North American Vaccine
MAP 30	Meningococcal vaccine group B recombinant -- BioChem Vaccines, Microscience
Marinovir -- Phytera	Meningococcal vaccine group Y conjugate -- North American Vaccine
MARstem -- Maret	Meningococcal vaccine groups A B and C conjugate -- North American Vaccine
MB-015 -- Mochida	Mepolizumab -- GlaxoSmithKline
MBP -- ImmuLogic	Metastatin -- EntreMed, Takeda
MCI-028 -- Mitsubishi-Tokyo	Met-CkB7 -- Human Genome Sciences
MCIF -- Human Genome Sciences	met-enkephalin -- TNI
MDC -- Advanced BioScience -- Akzo Nobel, ICOS	METH-1 -- Human Genome Sciences
MDX 11 -- Medarex	methioninase -- AntiCancer
MDX 210 -- Medarex	Methionine lyase gene therapy -- AntiCancer
MDX 22 -- Medarex	Met-RANTES -- Genexa Biomedical, Serono
MDX 22	Metreleptin
MDX 240 -- Medarex	Microtubule inhibitor MAb
MDX 33	Immunogen/Abgenix
MDX 44 -- Medarex	MGDF -- Kirin
MDX 447 -- Medarex	MGV -- Progenics
MDX H210 -- Medarex	micrin -- Endocrine
MDX RA -- Houston BioTech., Medarex	microplasmin -- ThromboGenics
ME-104 -- Pharmexa	MIF -- Genetics Institute
Measles vaccine	
Mecasernin -- Cephalon/Chiron, Chiron	
MEDI 488 -- MedImmune	
MEDI 500	
MEDI 507 -- BioTransplant	

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

도면13S

migration inhibitory factor -- NIH	MAB 45-2D9- -- haematoporphyrin conjugate
Mim CD4.1 -- Xycte Therapies	MAB 4B4
mirostipen -- Human Genome Sciences	MAB 4E3-CPA conjugate -- BCM Oncologia
Mitumomab (BEC-2) -- ImClone Systems, Merck KGaA	MAB 4E3-daunorubicin conjugate
MK 852 -- Merck	MAB 50-6
MLN 1202 (Anti-CCR2 monoclonal antibody) -- Millenium Pharmaceuticals	MAB 50-61A -- Institut Pasteur
Mobenakin -- NIS	MAB 5A8 -- Biogen
molgramostim -- Genetics Institute, Novartis	MAB 791T/36-methotrexate conjugate
monoclonal antibodies --	MAB 7c11.e8
Abgenix/Celltech, Immusol/ Medarex, Viragen/ Roslin Institute, Cambridge Antibody Tech./Elan	MAB 7E11 C5-selenocystamine conjugate
MAB 108 --	MAB 93KA9 -- Novartis
MAB 10D5 --	MAB A5B7-cisplatin conjugate -- Biodynamics Research, Pharmacia
MAB 14.18-interleukin-2 immunocytokine - Lexigen	MAB A5B7-I-131
MAB 14G2a --	MAB A7
MAB 15A10 --	MAB A717 -- Exocell
MAB 170 -- Biomira	MAB A7-zinostatin conjugate
MAB 177Lu CC49 --	MAB ABX-RB2 -- Abgenix
MAB 17F9	MAB ACA 11
MAB 1D7	MAB AFP-I-131 -- Immunomedics
MAB 1F7 -- Immune Network	MAB AP1
MAB 1H10-doxorubicin conjugate	MAB AZ1
MAB 26-2F	MAB B3-LysPE40 conjugate
MAB 2A11	MAB B4 -- United Biomedical
MAB 2E1 -- RW Johnson	MAB B43 Genistein-conjugate
MAB 2F5	MAB B43.13-Tc-99m -- Biomira
MAB 31.1 -- International BioImmune Systems	MAB B43-PAP conjugate
MAB 32 -- Cambridge Antibody Tech., Peptech	MAB B4G7-gelonin conjugate
MAB 323A3 -- Centocor	MAB BCM 43-daunorubicin conjugate -- BCM Oncologia
MAB 3C5	MAB BIS-1
MAB 3F12	MAB BMS 181170 -- Bristol-Myers Squibb
MAB 3F8	MAB BR55-2
MAB 42/6	MAB BW494
MAB 425 -- Merck KGaA	MAB C 242-DM1 conjugate -- ImmunoGen
MAB 447-52D -- Merck Sharp & Dohme	MAB C242-PE conjugate
	MAB c30-6
	MAB CA208-cytorhodin-S conjugate -- Hoechst Japan
	MAB CC49 -- Enzon

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

도면13T

MAb ch14.18 --	MAb LL2-Y-90
MAb CH14.18-GM-CSF fusion protein --	MAb LS2D617 -- Hybritech
Lexigen	MAb LYM-1-gelonin conjugate
MAb chCE7	MAb LYM-1-I-131
MAb CI-137 -- AMRAD	MAb LYM-1-Y-90
MAb cisplatin conjugate	MAb LYM-2 -- Peregrine
MAb CLB-CD19	MAb M195
MAb CLB-CD19v	MAb M195-bismuth 213 conjugate --
MAb CLL-1 -- Peregrine	Protein Design Labs
MAb CLL-1-GM-CSF conjugate	MAb M195-gelonin conjugate
MAb CLL-1-IL-2 conjugate -- Peregrine	MAb M195-I-131
MAb CLN IgG -- doxorubicin conjugates	MAb M195-Y-90
MAb conjugates -- Tanox	MAb MA 33H1 -- Sanofi
MAb D612	MAb MAD11
MAb Dal B02	MAb MGb2
MAb DC101 -- ImClone	MAb MINT5
MAb EA 1 --	MAb MK2-23
MAb EC708 -- Biovation	MAb MOC31 ETA(252-613) conjugate
MAb EP-5C7 -- Protein Design Labs	MAb MOC-31-In-111
MAb ERIC-1 -- ICRT	MAb MOC-31-PE conjugate
MAb F105 gene therapy	MAb MR6 --
MAb FC 2.15	MAb MRK-16 -- Aventis Pasteur
MAb G250 -- Centocor	MAb MS11G6
MAb GA6	MAb MX-DTPA BrE-3
MAb GA733	MAb MY9
MAb Gliomab-H -- Viventia Biotech	MAb Nd2 -- Tosoh
MAb HB2-saporin conjugate	MAb NG-1 -- Hygeia
MAb HD 37 --	MAb NM01 -- Nissin Food
MAb HD37-ricin chain-A conjugate	MAb OC 125
MAb HNK20 -- Acambis	MAb OC 125-CMA conjugate
MAb huN901-DM1 conjugate --	MAb OKI-1 -- Ortho-McNeil
ImmunoGen	MAb OX52 -- Bioproducts for Science
MAb I-131 CC49 -- Corixa	MAb PMA5
MAb ICO25	MAb PR1
MAb ICR12-CPG2 conjugate	MAb prost 30
MAb ICR-62	MAb R-24
MAb IRac-ricin A conjugate	MAb R-24 α Human GD3 -- Celltech
MAb K1	MAb RFB4-ricin chain A conjugate
MAb KS1-4-methotrexate conjugate	MAb RFT5-ricin chain A conjugate
MAb L6 -- Bristol-Myers Squibb, Oncogen	MAb SC 1
MAb LiCO 16-88	MAb SM-3 -- ICRT
MAb LL2-I-131 -- Immunomedics	MAB SMART-IL10 Protein Design Labs

도면13U

MAb SMART ABL 364 -- Novartis	muplestim -- Genetics Institute, Novartis,
MAb SN6f	DSM Anti-Infectives
MAb SN6f-deglycosylated ricin A chain conjugate --	murine MAb -- KS Biomedix
MAb SN6j	Mutant somatropin -- JCR Pharmaceutical
MAb SN7-ricin chain A conjugate	MV 833 -- Toagosei
MAb T101-Y-90 conjugate -- Hybritech	Mycoplasma pulmonis vaccine
MAb T-88 -- Chiron	Mycoprex -- XOMA
MAb TB94 -- Cancer ImmunoBiology	myeloperoxidase -- Henogen
MAb TEC 11	myostatin -- Genetics Institute
MAb TES-23 -- Chugai	Nacolomab tafenatox -- Pharmacia
MAb TM31 -- Avant	Nagrecor -- Scios
MAb TNT-1 -- Cambridge Antibody Tech.,	nagrestipen -- British Biotech
Peregrine	NAP-5 -- Corvas Intl.
MAb TNT-3	NAPc2 -- Corvas Intl.
MAb TNT-3 -- IL2 fusion protein --	nartograstim -- Kyowa
MAb TP3-At-211	Natalizumab -- Protein Design Labs
MAb TP3-PAP conjugate --	Nateplase -- NIH, Nihon Schering
MAb UJ13A -- ICRT	nateplase -- Schering AG
MAb UN3	NBI-3001 -- Neurocrine Biosci.
MAb ZME-018-gelonin conjugate	NBI-5788 -- Neurocrine Biosci.
MAb-BC2 -- GlaxoSmithKline	NBI-6024 -- Neurocrine Biosci.
MAb-DM1 conjugate -- ImmunoGen	Nef inhibitors -- BRI
MAB-ricin-chain-A conjugate -- XOMA	Neisseria gonorrhoea vaccine -- Antex
MAB-temoporfin conjugates	Biologics
Monopharm C -- Viventia Biotech	Neomycin B-arginine conjugate
monteplase -- Eisai	Nerelimomab -- Chiron
montirelin hydrate -- Gruenenthal	Nerve growth factor -- Amgen -- Chiron,
moroctocog alfa -- Genetics Institute	Genentech
Moroctocog-alfa -- Pharmacia	Nerve growth factor gene therapy
MP 4	nesiritide citrate -- Scios
MP-121 -- Biopharm	neuregulin-2 -- CeNeS
MP-52 -- Biopharm	neurocan -- NYU
MRA -- Chugai	neuronal delivery system -- CAMR
MS 28168 -- Mitsui Chemicals, Nihon	Neurophil inhibitory Factor -- Corvas
Schering	Neuroprotective vaccine -- University of
MSH fusion toxin -- Ligand	Auckland
MSI-99 -- Genaera	neurotrophic chimaeras -- Regeneron
MT 201 -- Micromet	neurotrophic factor -- NsGene, CereMedix
Muc-1 vaccine -- Corixa	NeuroVax -- Immune Response
mucosal tolerance -- Aberdeen	neurturin -- Genentech
mullerian inhibiting subst	neutral endopeptidase -- Genentech
	NGF enhancers -- NeuroSearch

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

도면13V

NHL vaccine -- Large Scale Biology	onychomycosis vaccine -- Boehringer
NIP45 -- Boston Life Sciences	Ingelheim
NKI-B20	opebecan -- XOMA
NM 01 -- Nissin Food	opioids -- Arizona
NMI-139 -- NitroMed	Oprelvekin -- Genetics Institute
NMMP -- Genetics Institute	Oregovomab -- AltaRex
NN-2211 -- Novo Nordisk	Org-33408 b-- Akzo Nobel
Noggin -- Regeneron	Orolip DP -- EpiCept
Nonacog alfa	oryzacystatin
Norelin -- Biostar	OSA peptides -- GenSci Regeneration
Norwalk virus vaccine	osteoblast-cadherin GF -- Pharis
NRLU 10 -- NeoRx	Osteocalcin-thymidine kinase gene
NRLU 10 PE -- NeoRx	therapy
NT-3 -- Regeneron	osteogenic protein -- Curis
NT-4/5 -- Genentech	osteopontin -- OraPharma
NU 3056	osteoporosis peptides -- Integra, Telios
NU 3076	osteoprotegerin -- Amgen, SnowBrand
NX 1838 -- Gilead Sciences	otitis media vaccines -- Antex Biologics
NY ESO-1/CAG-3 antigen -- NIH	ovarian cancer -- University of Alabama
NYVAC-7 -- Aventis Pasteur	OX40-IgG fusion protein -- Cantab,
NZ-1002 -- Novazyme	Xenova
obesity therapy -- Nobex	P 246 -- Diatide
OC 10426 -- Ontogen	P 30 -- Alfacell
OC 144093 -- Ontogen	p1025 -- Active Biotech
OCIF -- Sankyo	P-113 ^A -- Demegen
Oct-43 -- Otsuka	P-16 peptide -- Transition Therapeutics
Odulimomab -- Immunotech	p43 -- Ramot
OK PSA - liposomal	P-50 peptide -- Transition Therapeutics
OKT3-gamma-1-ala-ala	p53 + RAS vaccine -- NIH, NCI
OM 991	PACAP(1-27) analogue
OM 992	paediatric vaccines -- Chiron
Omalizumab -- Genentech	Pafase -- ICOS
oncoimmunin-L -- NIH	PAGE-4 plasmid DNA -- IDEC
Oncolysin B -- ImmunoGen	PAI-2 -- Biotech Australia, Human
Oncolysin CD6 -- ImmunoGen	Therapeutics
Oncolysin M -- ImmunoGen	Palifermin (keratinocyte growth factor) --
Oncolysin S -- ImmunoGen	Amgen
Oncophage -- Antigenics	Palivizumab -- MedImmune
Oncostatin M -- Bristol-Myers Squibb	PAM 4 -- Merck
OncoVax-CL -- Jenner Biotherapies	pamiteplase -- Yamanouchi
OncoVax-P -- Jenner Biotherapies	pancreatin, Minitabs -- Eurand
onercept -- Yeda	Pargen -- Fournier

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

도면13W

Pantarin -- Selective Genetics	Pemtumomab
Parainfluenza virus vaccine -- Pharmacia, Pierre Fabre	Penetratin -- Cyclacel
paraoxanase -- Esperion	Pepscan -- Antisoma
parathyroid hormone -- Abiogen, Korea Green Cross	peptide G -- Peptech, ICRT
Parathyroid hormone (1-34) -- Chugai/Suntory	peptide vaccine -- NIH ,NCI
Parkinson's disease gene therapy -- Cell Genesys/ Ceregene	Pexelizumab
Parvovirus vaccine -- MedImmune	pexiganan acetate -- Genaera
PCP-Scan -- Immunomedics	Pharmaprojects No. 3179 -- NYU
PDGF -- Chiron	Pharmaprojects No. 3390 -- Ernest Orlando
PDGF cocktail -- Theratechnologies	Pharmaprojects No. 3417 -- Sumitomo
peanut allergy therapy -- Dynavax	Pharmaprojects No. 3777 -- Acambis
PEG anti-ICAM MAb -- Boehringer Ingelheim	Pharmaprojects No. 4209 -- XOMA
PEG asparaginase -- Enzon	Pharmaprojects No. 4349 -- Baxter Intl.
PEG glucocerebrosidase	Pharmaprojects No. 4651
PEG hirudin -- Knoll	Pharmaprojects No. 4915 -- Avanir
PEG interferon-alpha-2a -- Roche	Pharmaprojects No. 5156 -- Rhizogenics
PEG interferon-alpha-2b + ribavirin -- Biogen, Enzon, ICN Pharmaceuticals, Schering-Plough	Pharmaprojects No. 5200 -- Pfizer
PEG MAb A5B7 --	Pharmaprojects No. 5215 -- Origene
Pegacaristim -- Amgen -- Kirin Brewery -- ZymoGenetics	Pharmaprojects No. 5216 -- Origene
Pegaldesleukin -- Research Corp	Pharmaprojects No. 5218 -- Origene
pegaspargase -- Enzon	Pharmaprojects No. 5267 -- ML Laboratories
pegfilgrastim -- Amgen	Pharmaprojects No. 5373 -- MorphoSys
PEG-interferon Alpha -- Viragen	Pharmaprojects No. 5493 -- Metabolex
PEG-interferon Alpha 2A -- Hoffman La-Roche	Pharmaprojects No. 5707 -- Genentech
PEG-interferon Alpha 2B -- Schering-Plough	Pharmaprojects No. 5728 -- Autogen
PEG-r-hirudin -- Abbott	Pharmaprojects No. 5733 -- BioMarin
PEG-rHuMGDF -- Amgen	Pharmaprojects No. 5757 -- NIH
PEG-uricase -- Mountain View	Pharmaprojects No. 5765 -- Gryphon
Pegvisomant -- Genentech	Pharmaprojects No. 5830 -- AntiCancer
PEGylated proteins, PolyMASC -- Valentis	Pharmaprojects No. 5839 -- Dyax
PEGylated recombinant native human leptin -- Roche	Pharmaprojects No. 5849 -- Johnson & Johnson
	Pharmaprojects No. 5860 -- Mitsubishi-Tokyo
	Pharmaprojects No. 5869 -- Oxford GlycoSciences
	Pharmaprojects No. 5883 -- Asahi Brewery
	Pharmaprojects No. 5947 -- StressGen

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

도면13X

Pharmaprojects No. 5961 -- Theratechnologies	Plasminogen activators -- Abbott Laboratories, American Home Products, Boehringer Mannheim, Chiron Corporation, DuPont Pharmaceuticals, Eli Lilly, Shionogi, Genentech, Genetics Institute, GlaxoSmithKline, Hemispherx Biopharma, Merck & Co, Novartis, Pharmacia Corporation, Wakamoto, Yeda
Pharmaprojects No. 5962 -- NIH	plasminogen-related peptides -- Bio-Tech. General/MGH
Pharmaprojects No. 5966 -- NIH	platelet factor 4 -- RepliGen
Pharmaprojects No. 5994 -- Pharming	Platelet-derived growth factor -- Amgen -- ZymoGenetics
Pharmaprojects No. 5995 -- Pharming	plusonemin-- Hayashibara
Pharmaprojects No. 6023 -- IMMUCON	PMD-2850 -- Protherics
Pharmaprojects No. 6063 -- Cytoclonal	Pneumococcal vaccine -- Antex Biologics, Aventis Pasteur
Pharmaprojects No. 6073 -- SIDDCO	Pneumococcal vaccine intranasal -- BioChem Vaccines/Biovector
Pharmaprojects No. 6115 -- Genzyme	PR1A3
Pharmaprojects No. 6227 -- NIH	PR-39
Pharmaprojects No. 6230 -- NIH	pralmorelin -- Kaken
Pharmaprojects No. 6236 -- NIH	Pretarget-Lymphoma -- NeoRx
Pharmaprojects No. 6243 -- NIH	Priliximab -- Centocor
Pharmaprojects No. 6244 -- NIH	PRO 140 -- Progenics
Pharmaprojects No. 6281 -- Senetek	PRO 2000 -- Procept
Pharmaprojects No. 6365 -- NIH	PRO 367 -- Progenics
Pharmaprojects No. 6368 -- NIH	PRO 542 -- Progenics
Pharmaprojects No. 6373 -- NIH	pro-Apo A-I -- Esperion
Pharmaprojects No. 6408 -- Pan Pacific	prolactin -- Genzyme
Pharmaprojects No. 6410 -- Athersys	Prosaptide TX14(A) -- Bio-Tech. General
Pharmaprojects No. 6421 -- Oxford GlycoSciences	prostate cancer antibodies -- Immunex, UroCor
Pharmaprojects No. 6522 -- Maxygen	prostate cancer antibody therapy -- Genentech/UroGenesys, Genotherapeutics
Pharmaprojects No. 6523 -- Pharis	prostate cancer immunotherapeutics -- The PSMA Development Company
Pharmaprojects No. 6538 -- Maxygen	prostate cancer vaccine -- Aventis Pasteur, Zonagen, Corixa, Dendreon, Jenner Biotherapies, Therion Biologics
Pharmaprojects No. 6554 -- APALEXO	
Pharmaprojects No. 6560 -- Ardana	
Pharmaprojects No. 6562 -- Bayer	
Pharmaprojects No. 6569 -- Eos	
Phenoxazine	
Phenylase -- Ibex	
Pigment epithelium derived factor -- plasminogen activator inhibitor-1, recombinant -- DuPont Pharmaceuticals	

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

도면13Y

prostate-specific antigen -- EntreMed	rDnase -- Genentech
protein A -- RepliGen	RDP-58 -- SangStat
protein adhesives -- Enzon	RecepTox-Fce -- Keryx
protein C -- Baxter Intl., PPL Therapeutics, ZymoGenetics	RecepTox-GnRH -- Keryx, MTR Technologies
protein C activator -- Gilead Sciences	RecepTox-MBP -- Keryx, MTR Technologies
protein kinase R antags -- NIH	recFSH -- Akzo Nobel, Organon
protirelin -- Takeda	REGA 3G12
protocadherin 2 -- Caprion	Regavirumab -- Teijin
Pro-urokinase -- Abbott, Bristol-Myers Squibb, Dainippon, Tosoh -- Welfide	relaxin -- Connetics Corp
P-selectin glycoprotein ligand-1 -- Genetics Institute	Renal cancer vaccine -- Macropharm
pseudomonal infections -- InterMune	repifermin -- Human Genome Sciences
Pseudomonas vaccine -- Cytovax	Respiratory syncytial virus PFP-2 vaccine -- Wyeth-Lederle
PSGL-Ig -- American Home Products	Respiratory syncytial virus vaccine -- GlaxoSmithKline, Pharmacia, Pierre Fabre
PSP-94 -- Procyon	Respiratory syncytial virus vaccine inactivated
PTH 1-34 -- Nobex	Respiratory syncytial virus-parainfluenza virus vaccine -- Aventis Pasteur, Pharmacia
Quilimmune-M -- Antigenics	Reteplase -- Boehringer Mannheim, Hoffman La-Roche
R 744 -- Roche	Retroprep -- RetroScreen
R 101933	RFB4 (dsFv) PE38
R 125224 -- Sankyo	RFI 641 -- American Home Products
RA therapy -- Cardion	RFTS -- UAB Research Foundation
Rabies vaccine recombinant -- Aventis Pasteur, BioChem Vaccines, Kaketsuken Pharmaceuticals	RG 12986 -- Aventis Pasteur
RadioTheraCIM -- YM BioSciences	RG 83852 -- Aventis Pasteur
Ramot project No. 1315 -- Ramot	RG-1059 -- RepliGen
Ramot project No. K-734A -- Ramot	rGCR -- NIH
Ramot project No. K-734B -- Ramot	rGLP-1 -- Restoragen
Ranibizumab (Anti-VEGF fragment) -- Genentech	rGRF -- Restoragen
RANK -- Immunex	rh Insulin -- Eli Lilly
ranpirnase -- Alfacell	RHAMM targeting peptides -- Cangene
ranpirnase-anti-CD22 MAb -- Alfacell	rHb1.1 -- Baxter Intl.
RANTES inhibitor -- Milan	rhCC10 -- Claragen
RAPID drug delivery systems -- ARIAD	rhCG -- Serono
rasburicase -- Sanofi	Rheumatoid arthritis gene therapy
rBPI-21, topical -- XOMA	
RC 529 -- Corixa	
rCFTR -- Genzyme Transgenics	
RD 62198	

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

도면132

Rheumatoid arthritis vaccine -- Veterans Affairs Medical Center	SC 56929 -- Pharmacia
rhLH -- Serono	SCA binding proteins -- Curis, Enzon
Ribozyme gene therapy -- Genset	scFv(14E1)-ETA Berlex Laboratories, Schering AG
Rickettsial vaccine recombinant	ScFv(FRP5)-ETA --
RIGScan CR -- Neoprobe	ScFv6C6-PE40 --
RIP-3 -- Rigel	SCH 55700 -- Celltech
Rituximab -- Genentech	Schistosomiasis vaccine -- Glaxo Wellcome/Medeva, Brazil
RK-0202 -- RxKinetix	SCPF -- Advanced Tissue Sciences
RLT peptide -- Esperion	scuPA-suPAR complex -- Hadasit
rM/NEI -- IVAX	SD-9427 -- Pharmacia
rmCRP -- Immtech	SDF-1 -- Ono
RN-1001 -- Renovo	SDZ 215918 -- Novartis
RN-3 -- Renovo	SDZ 280125 -- Novartis
RNAse conjugate -- Immunomedics	SDZ 89104 -- Novartis
RO 631908 -- Roche	SDZ ABL 364 -- Novartis
Rotavirus vaccine -- Merck	SDZ MMA 383 -- Novartis
RP 431 -- DuPont Pharmaceuticals	Secretin -- Ferring, Repligen
RP-128 -- Resolution	serine protease inhbs -- Pharis
RPE65 gene therapy --	sermorelin acetate -- Serono
RPR 110173 -- Aventis Pasteur	SERP-1 -- Viron
RPR 115135 -- Aventis Pasteur	sertenef -- Dainippon
RPR 116258A -- Aventis Pasteur	serum albumin, Recombinant human -- Aventis Behring
rPSGL-Ig -- American Home Products	serum-derived factor -- Hadasit
r-SPC surfactant -- Byk Gulden	Sevirumab -- Novartis
RSV antibody -- Medimmune	SGN 14 -- Seattle Genetics
Ruplizumab -- Biogen	SGN 15 -- Seattle Genetics
rV-HER-2/neu -- Therion Biologics	SGN 17/19 -- Seattle Genetics
SA 1042 -- Sankyo	SGN 30 -- Seattle Genetics
sacrosidase -- Orphan Medical	SGN-10 -- Seattle Genetics
Sant 7	SGN-11 -- Seattle Genetics
Sargramostim -- Immunex	SH 306 -- DuPont Pharmaceuticals
saruplase -- Gruenenthal	Shanvac-B -- Shantha
Satumomab -- Cytogen	Shigella flexneri vaccine -- Avant, Acambis, Novavax
SB 1 -- COR Therapeutics	Shigella sonnei vaccine --
SB 207448 -- GlaxoSmithKline	sICAM-1 -- Boehringer Ingelheim
SB 208651 -- GlaxoSmithKline	Silteplase -- Genzyme
SB 240683 -- GlaxoSmithKline	SIV vaccine -- Endocon, Institut Pasteur
SB 249415 -- GlaxoSmithKline	SK 856 -- Sanwa Kagaku Kenkyusho
SB 249417 -- GlaxoSmithKline	
SB 6 -- COR Therapeutics	
SB RA 31012 --	

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

도면13AA

SK-827 -- Sanwa Kagaku Kenkyusho	Staphylokinase -- Biovation, Prothera,
Skeletex -- CellFactors	Thrombogenetics
SKF 106160 -- GlaxoSmithKline	Streptococcal A vaccine -- M6
S-nitroso-AR545C --	Pharmaceuticals, North American
SNTP -- Active Biotech	Vaccine
somatomedin-1 -- GroPep, Mitsubishi-	Streptococcal B vaccine -- Microscience
Tokyo, NIH	Streptococcal B vaccine recombinant --
somatomedin-1 carrier protein -- Insmmed	Biochem Vaccines
somatostatin -- Ferring	Streptococcus pyogenes vaccine
Somatotropin/	STRL-33 -- NIH
Human Growth Hormone -- Bio-Tech.	Subalin -- SRC VB VECTOR
General, Eli Lilly	SUIS -- United Biomedical
somatropin -- Bio-Tech. General,	SUIS-LHRH -- United Biomedical
Alkermes, ProLease, Aventis Behring,	SUN-E3001 -- Suntory
Biovector, Cangene, Dong-A, Eli Lilly,	super high affinity monoclonal antibodies -
Emisphere, Enact, Genentech,	- YM BioSciences
Genzyme Transgenics, Grandis/InfiMed,	Superoxide dismutase -- Chiron, Enzon,
CSL, InfiMed, MacroMed, Novartis,	Ube Industries, Bio-Tech, Yeda
Novo Nordisk, Pharmacia Serono,	superoxide dismutase-2 -- OXIS
TranXenoGen	suppressin -- UAB Research Foundation
somatropin derivative -- Schering AG	SY-161-P5 -- ThromboGenics
somatropin, AIR -- Eli Lilly	SY-162 -- ThromboGenics
Somatropin, inhaled -- Eli Lilly/Alkermes	Systemic lupus erythematosus vaccine --
somatropin, Kabi -- Pharmacia	MedClone/VivoRx
somatropin, Orasome -- Novo Nordisk	T cell receptor peptides -- Xoma
Sonermin -- Dainippon Pharmaceutical	T cell receptor peptide vaccine
SP(V5.2)C -- Supertek	T4N5 liposomes -- AGI Dermatics
SPf66	TACI, soluble -- ZymoGenetics
sphingomyelinase -- Genzyme	targeted apoptosis -- Antisoma
SR 29001 -- Sanofi	tasonermin -- Boehringer Ingelheim
SR 41476 -- Sanofi	TASP
SR-29001 -- Sanofi	TASP-V
SS1(dsFV)-PE38 -- NeoPharm	Tat peptide analogues -- NIH
β2 microglobulin -- Avidex	TBP I -- Yeda
β2-microglobulin fusion proteins -- NIH	TBP II
β-amyloid peptides -- CeNeS	TBV25H -- NIH
β-defensin -- Pharis	Tc 99m ior cea1 -- Center of Molecular
Staphylococcus aureus infections --	Immunology
Inhibitex/ZLB	Tc 99m P 748 -- Diatide
Staphylococcus aureus vaccine conjugate	Tc 99m votumumab -- Intracell
-- Nabi	Tc 99m rh-Annexin V -- Theseus Imaging
Staphylococcus therapy -- Tripep	teceleukin -- Biogen

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

도면13BB

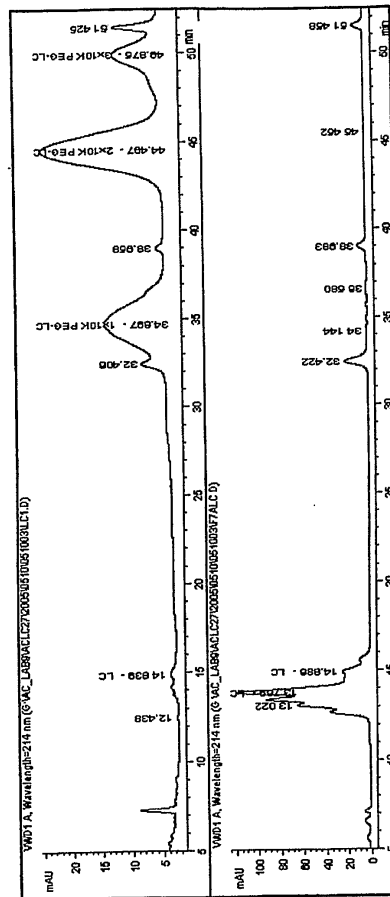
tenecteplase -- Genentech	TM 29 -- Avant
Teriparatide -- Armour Pharmaceuticals, Asahi Kasei, Eli Lilly	TMC-151 -- Tanabe Seiyaku
terlipressin -- Ferring	TNF tumour necrosis factor -- Asahi Kasei
testisin -- AMRAD	TNF Alpha -- CytImmune
Tetrafibrin -- Roche	TNF antibody -- Johnson & Johnson
TFPI -- EntreMed	TNF binding protein -- Amgen
tgD-IL-2 -- Takeda	TNF degradation product -- Oncotech
TGF-Alpha -- ZymoGenetics	TNF receptor -- Immunex
TGF-β -- Kolon	TNF receptor 1, soluble -- Amgen
TGF-β2 -- Insmed	TNF Tumour necrosis factor-alpha -- Asahi Kasei, Genetech, Mochida
TGF-β3 -- OSI	TNF-Alpha inhibitor -- Tripep
Thalassaemia gene therapy -- Crucell	TNFR:Fc gene therapy -- Targeted Genetics
TheraCIM-h-R3 -- Center of Molecular Immunology, YM BioSciences	TNF-SAM2
Theradigm-HBV -- Epimmune	Tolerimab -- Innogenetics
Theradigm-HPV -- Epimmune	Toxoplasma gondii vaccine -- GlaxoSmithKline
Theradigm-malaria -- Epimmune	TP 9201 -- Telios
Theradigm-melanoma -- Epimmune	TP10 -- Avant
TheraFab -- Antisoma	TP20 -- Avant
ThGRF 1-29 -- Theratechnologies	tPA -- Centocor
ThGRF 1-44 -- Theratechnologies	trafermin -- Scios
Thrombin receptor activating peptide -- Abbott	TRAIL/Apo2L -- Immunex
thrombomodulin -- Iowa, Novocastra	TRAIL-R1 MAb -- Cambridge Antibody Technologies
Thrombopoietin -- Dragon Pharmaceuticals, Genentech	transferrin-binding proteins -- CAMR
thrombopoietin, Pliva -- Recepton	Transforming growth factor-beta-1 -- Genentech
Thrombospondin 2 --	transport protein -- Genesis
thrombostatin -- Thromgen	Trastuzumab -- Genetech
thymalfasin -- SciClone	TRH -- Ferring
thymocartin -- Gedeon Richter	Triabin -- Schering AG
thymosin Alpha1 -- NIH	Triconal
thyroid stimulating hormone -- Genzyme	Triflavin
tlCAM-1 -- Bayer	troponin I -- Boston Life Sciences
Tick anticoagulant peptide -- Merck	TRP-2 ^Δ -- NIH
TIF -- Xoma	trypsin inhibitor -- Mochida
Tifacogin -- Chiron, NIS, Pharmacia	TSP-1 gene therapy --
Tissue factor -- Genentech	TT-232
Tissue factor pathway inhibitor	TTS-CD2 -- Active Biotech
TJN-135 -- Tsumura	
TM 27 -- Avant	

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

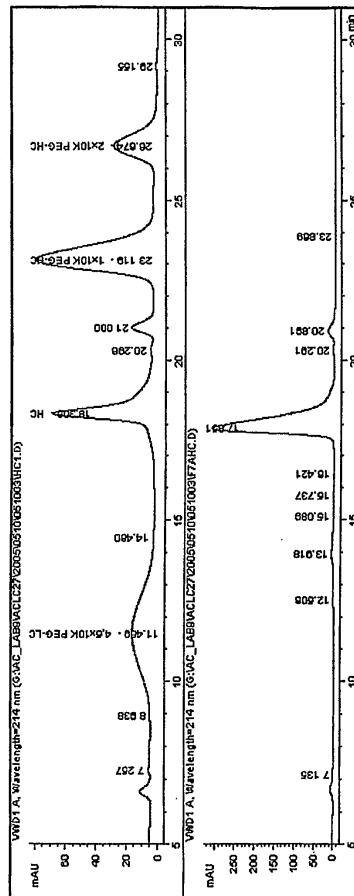
도면13CC

Tuberculosis vaccine -- Aventis Pasteur, Genesis	vascular targeting agents -- Peregrine
Tumor Targeted Superantigens -- Active Biotech -- Pharmacia	vasopermeation enhancement agents -- Peregrine
tumour vaccines -- PhotoCure	vasostatin -- NIH
tumour-activated prodrug antibody conjugates -- Millennium/ImmunoGen	VCL -- Bio-Tech. General
tumstatin -- ILEX	VEGF -- Genentech, Scios
Tuvirumab -- Novartis	VEGF inhibitor -- Chugai
TV-4710 -- Teva	VEGF-2 -- Human Genome Sciences
TWEAK receptor -- Immunex	VEGF-Trap -- Regeneron
TXU-PAP	viscumin, recombinant -- Madaus
TY-10721 -- TOA Eiyo	Vitaxin
Type I diabetes vaccine -- Research Corp	Vitrax -- ISTA Pharmaceuticals
Typhoid vaccine CVD 908	West Nile virus vaccine -- Bavarian Nordic
U 143677 -- Pharmacia	WP 652
U 81749 -- Pharmacia	WT1 vaccine -- Corixa
UA 1248 -- Arizona	WX-293 -- Willex BioTech.
UGIF -- Sheffield	WX-360 -- Willex BioTech.
UIC 2	WX-UK1 -- Willex BioTech.
UK 101	XMP-500 -- XOMA
UK-279276 -- Corvas Intl.	XomaZyme-791 -- XOMA
urodilatin -- Pharis	XTL 001 -- XTL Biopharmaceuticals
urofolitrophin -- Serono	XTL 002 -- XTL Biopharmaceuticals
Urokinase -- Abbott	yeast delivery system -- GlobelImmune
uteroferrin -- Pepgen	Yersinia pestis vaccine
V 20 -- GLYCODesign	YIGSR-Stealth -- Johnson & Johnson
V2 vasopressin receptor gene therapy vaccines -- Active Biotech	Yisum Project No. D-0460 -- Yisum
Varicella zoster glycoprotein vaccine -- Research Corporation Technologies	YM 207 -- Yamanouchi
Varicella zoster virus vaccine live -- Cantab Pharmaceuticals	YM 337 -- Protein Design Labs
Vascular endothelial growth factor -- Genentech, University of California	Yttrium-90 labelled biotin
Vascular endothelial growth factors -- R&D Systems	Yttrium-90-labeled anti-CEA MAb T84.66
	--
	ZD 0490 -- AstraZeneca
	ziconotide -- Elan
	ZK 157138 -- Berlex Laboratories
	Zolimomab aritox
	Zorcell -- Immune Response
	ZRXL peptides -- Novartis

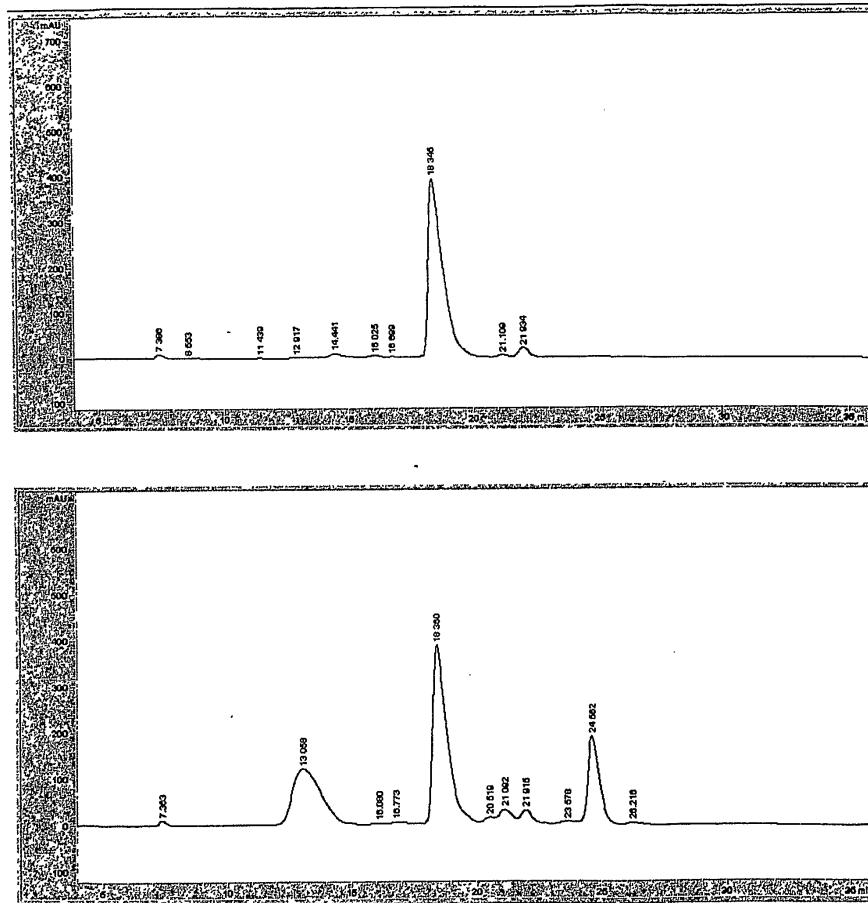
도면14A



도면14B



도면15B



서열목록

- <110> NEOSE TECHNOLOGIES, INC.
- <120> GLYCOPEGYLATED FACTOR VII AND FACTOR VIIA

- <130> 040853-5175-WO

- <150> US 60/746,868
- <151> 2006-05-09

- <150> US 60/756,443
- <151> 2006-01-05

- <150> US 60/733,649
- <151> 2005-11-04

- <150> US 60/730,607
- <151> 2005-10-26

<150> US 60/725,894
<151> 2005-10-11

<150> US 60/709,983
<151> 2005-08-19

<160> 2

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
<211> 1332
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taaccacagga ggaagccac gccgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctcgc gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccgga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacatag atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctccctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccggcgcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctgagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cgcggggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgtttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt gctcaacgtg 1020

ccccgctga tgaccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gccacatgc caccactac aggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gcatcatgcg ctgagagcca cgccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc cc 1332

<210> 2
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
 20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
 35 40 45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Glu Cys Ser Phe Glu Glu

50 55 60
 Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
 65 70 75 80
 Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
 85 90 95
 Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
 100 105 110
 Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile
 115 120 125
 Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Gly Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr
 130 135 140
 Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
 145 150 155 160
 Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
 165 170 175
 Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
 180 185 190
 Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
 195 200 205
 Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
 210 215 220
 Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
 225 230 235 240
 Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly
 245 250 255
 Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
 260 265 270
 Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
 275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
435 440