



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년10월02일
 (11) 등록번호 10-0861470
 (24) 등록일자 2008년09월26일

(51) Int. Cl.
A61K 38/16 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2003-7004723
 (22) 출원일자 2003년04월02일
 심사청구일자 2006년09월28일
 번역문제출일자 2003년04월02일
 (65) 공개번호 10-2003-0034245
 (43) 공개일자 2003년05월01일
 (86) 국제출원번호 PCT/DK2001/000633
 국제출원일자 2001년10월02일
 (87) 국제공개번호 WO 2002/29025
 국제공개일자 2002년04월11일
 (30) 우선권주장
 PA200001456 2000년10월02일 덴마크(DK)
 (뒷면에 계속)
 (56) 선행기술조사문헌
 WO 0028065
 US 6100061

(73) 특허권자
노보 노르디스크 헬스 케어 악티엔게젤샤프트
 스위스 체하-8050 취리히 안드레아슈트라체 15
 (72) 발명자
펑겔한스쿠르트
 덴마크디케이-3520파룸문케회이바엔취35
클라우센닐스크리스찬
 덴마크디케이-2820겐토프테사스베이14
 (74) 대리인
김정욱, 박종혁, 정삼영

전체 청구항 수 : 총 38 항

심사관 : 김윤경

(54) 인자 VII 글리코형

(57) 요약

본 발명은 인자 VII 및 아스파라긴-연결 글리코실화의 변경된 패턴을 갖는 다른 혈액 응고 인자를 포함하는 조성물에 관련된다.

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리즈, 모잠비크, 에쿠아도르, 필리핀, 콜롬비아, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스, 터키

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우, 적도 기니

(30) 우선권주장

PA200100262 2001년02월16일 덴마크(DK)
 PA200100430 2001년03월14일 덴마크(DK)
 PA200100751 2001년05월14일 덴마크(DK)

특허청구의 범위

청구항 1

다수의 인자 VII 폴리펩티드를 포함하는 제제로서, 폴리펩티드는 아스파라긴-연결 올리고당 사슬을 포함하고 올리고당 사슬의 94~99%는 하나 이상의 시알산 부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 2

다수의 인자 VII 폴리펩티드를 포함하는 제제로서, 폴리펩티드는 아스파라긴-연결 올리고당 사슬을 포함하고 올리고당 사슬의 1~7%는 중성 전하를 갖는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 3

다수의 인자 VII 폴리펩티드를 포함하는 제제로서, 폴리펩티드는 아스파라긴-연결 올리고당 사슬을 포함하고 올리고당 사슬의 6~16%는 하나 이상의 말단 갈락토오스 잔기를 함유하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 4

다수의 인자 VII 폴리펩티드를 포함하는 제제로서, 폴리펩티드는 아스파라긴-연결 올리고당 사슬을 포함하고 올리고당 사슬의 6~9%는 하나 이상의 말단 N-아세틸갈락토사민 잔기를 함유하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 5

다수의 인자 VII 폴리펩티드를 포함하는 제제로서, 폴리펩티드는 아스파라긴-연결 올리고당 사슬을 포함하고 올리고당 사슬의 11~23%는 하나 이상의 말단 갈락토오스 또는 N-아세틸갈락토사민 잔기를 함유하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 6

다수의 인자 VII 폴리펩티드를 포함하는 제제로서, 폴리펩티드는 아스파라긴-연결 올리고당 사슬을 포함하고 올리고당 사슬의 2% 이상은 안테나형 N-아세틸글루코사민에 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 연결된 하나 이상의 푸코오스 부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고당 사슬에 있는 시알 잔기가 $\alpha 2 \rightarrow 3$ 결합을 통해 갈락토오스에 연결되는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 8

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 시알산 잔기가 N-아세틸뉴라민산 (NeugAc) 및 N-글리콜릴뉴라민산 (Neu5Gc)을 포함하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 9

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고당이 코어 N-아세틸글루코사민에 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 연결된 푸코오스를 포함하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 10

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고당 사슬의 95~98%는 하나 이상의 시알산 잔기를 함유하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 11

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고당 사슬의 96~97%는 하나 이상의 시알산 잔기를 함유하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 12

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고당 사슬의 2~4%는 중성 전하를 갖는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 13

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고당 사슬의 8~12%는 하나 이상의 말단 갈락토오스 잔기를 함유하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 14

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고당 사슬의 7~8%는 하나 이상의 말단 N-아세틸갈락토사민 잔기를 함유하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 15

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고당 사슬의 12~18%는 하나 이상의 말단 갈락토오스 또는 N-아세틸갈락토사민 잔기를 함유하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 16

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고당 사슬의 5% 이상은 안테나형 N-아세틸글루코사민에 α 1->3 연결된 하나 이상의 푸코오스 부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 17

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고당 사슬의 10% 이상은 안테나형 N-아세틸글루코사민에 α 1->3 연결된 하나 이상의 푸코오스 부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 18

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고당 사슬의 20% 이상은 안테나형 N-아세틸글루코사민에 α 1->3 연결된 하나 이상의 푸코오스 부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 19

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고당 사슬의 40% 이상은 안테나형 N-아세틸글루코사민에 α 1->3 연결된 하나 이상의 푸코오스 부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 20

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 야생형 인자 VII의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 21

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 야생형 인자 VIIa인 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 22

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 인자 VII이 S56A-인자 VII, S60A-인자 VII, 잔기 290 및 291 사이에서 단백질 가수분해적으로 절단된 인자 VII; 잔기 315 및 316 사이에서 단백질 가수분해적으로 절단된 인자 VII; 및 산화된 인자 VII로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 23

삭제

청구항 24

인자 VII 폴리펩티드의 다수를 포함하는 제제로서, 여기에서 폴리펩티드는 아스파라긴-연결 올리고당 사슬을 포함하고 여기에서 (i) 올리고당 사슬의 94~100%는 하나 이상의 시알산 부분을 포함하고 (ii) 올리고당 사슬의 6

~9%는 하나 이상의 말단 N-아세틸갈락토사민 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 25

제 24 항에 있어서, 인자 VII 폴리펩티드가 야생형 인자 VII의 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 26

야생형 인자 VII의 서열을 갖는 인자 VIIa 폴리펩티드의 다수를 포함하는 제제로서, 폴리펩티드는 아스파라긴-연결 올리고당 사슬을 포함하고 올리고당 사슬의 94~99%는 하나 이상의 시알산 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 27

야생형 인자 VII의 서열을 갖는 인자 VIIa 폴리펩티드의 다수를 포함하는 제제로서, 폴리펩티드는 아스파라긴-연결 올리고당 사슬을 포함하고 올리고당 사슬의 2% 이상은 안테나형 N-아세틸글루코사민에 $\alpha 1\text{-}3$ 연결된 하나 이상의 푸코오스 부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 28

제 1 항 내지 제 6 항 또는 제 24 항 내지 제 27 항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 진균, 곤충 및 척추동물 세포로 구성된 균으로부터 선택되는 숙주세포에서 생산되는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 29

제 28 항에 있어서, 숙주세포가 포유동물 세포인 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 30

제 29 항에 있어서, 포유동물 세포가 햄스터로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 31

제 30 항에 있어서, 햄스터 세포가 CHO 세포 및 BHK 세포로 구성된 균으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 32

제 29 항에 있어서, 포유동물 세포가 인간으로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 33

제 32 항에 있어서, 인간 세포가 HEK 세포인 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 34

제 1 항 내지 제 6 항 또는 제 24 항 내지 제 27 항 중 어느 한 항에 있어서, 제제는 기준 제제의 생물활성의 110% 이상인 생물활성을 나타내고, 기준 제제 내에서 올리고당 사슬의 93% 이하는 하나 이상의 시알산 부분을 포함하며, 상기 기준 제제는, 상이한 패턴의 아스파라긴-연결 글리코실화를 나타내는 것 외에는 제제에 함유된 것과 동일한 폴리펩티드를 포함하는 것임을 특징으로 하는 제제.

청구항 35

제 34 항에 있어서, 제제는 상기 기준 제제의 생물활성의 120% 이상인 생물활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 36

제 35 항에 있어서, 제제는 상기 기준 제제의 생물활성의 130% 이상인 생물활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 37

제 36 항에 있어서, 제제는 상기 기준 제제의 생물활성의 140% 이상인 생물활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

N-연결 글리코실화의 사전결정된 패턴을 갖는 인자 VII 폴리펩티드를 포함하는 제제를 생산하기 위한 방법으로서, 상기 방법은 폴리펩티드 상에 존재하는 94% 이상의 아스파라긴-연결 올리고당이 하나 이상의 시알산 잔기를 포함하는 조건 하에서 폴리펩티드를 발현하는 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

제 1 항 내지 제 6 항 또는 제 24 항 내지 제 27 항 중 어느 한 항의 제제 및 억제학적으로 허용되는 담체 또는 보조제를 포함하는 것을 특징으로 하는, 혈우병 A, 혈우병 B, 인자 XI 결핍, 인자 VII 결핍, 저혈소판증, von Willebrand 병, 수술, 외상 및 항응고 요법으로 구성된 군으로부터 선택되는 인자 VII-반응 증후군의 치료; 혈관 성형술, 깊은 정맥 혈전증, 폐 색전증, 발작, 파종혈관내 응고 (DIC), 그람-음성 내독혈증과 연관된 폐 및 신장에서의 피브린 침전 및 심근경색증으로 구성된 군으로부터 선택되는 혈액 응고의 예방; 및 전신적 염증 반응 증후군(SIRS), 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 다중성 기관 부전(MOF), 용혈 요독 증후군(HUS) 및 혈소판감소 자색 반(TTP)로 구성된 군으로부터 선택되는 조직 인자 중재 반응의 예방용 억제학적 조제물.

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 인자 VII 및 아스파라긴-연결 글리코실화의 변경된 패턴을 갖는 다른 혈액 응고 인자를 포함하는 조성물에 관련된다.

배경기술

<2> 응고 카스케이드에 관련된 단백질, 예를 들어 인자 VII, 인자 VIII, 인자 IX, 인자 X 및 단백질 C를 포함하는 단백질은 다양한 병적 상태를 치료하기 위한 유용한 치료제가 되도록 제공되고 있다. 따라서, 약제학적으로 허용되고 불변 및 사전결정된 임상적 효능을 나타내는 이들 단백질을 포함하는 조제물에 대한 필요가 증가한다.

<3> 약제학적 생성물의 공급원으로서 인간 플라즈마를 이용하는 것의 많은 단점들 때문에, 재조합 시스템에서 이들 단백질을 생산하는 것이 바람직하다. 그러나, 응고 단백질은 다양한 공- 및 후-번역 변형, 예를 들어 아스파라긴-연결 (N-연결) 글리코실화; O-연결 글리코실화; 및 glu 잔기의 γ -카르복실화를 포함하는 변형이 일어난다. 이 변형은 이종 세포를 숙주로서 단백질의 대규모 생산에 사용될 때 양적 또는 질적으로 상이할 수 있다. 특히, 이종 세포에서의 생산은 종종 글리코형의 상이한 정렬을 일으키는데, 이는 상이한 공유 결합 올리고당 구조를 갖는 동일한 폴리펩티드이다.

<4> 상이한 시스템에서, 치료 단백질의 올리고당 구조에서의 변화는 특히 면역원성 및 생체내 클리어런스 (clearance)의 변화에 연결되어 있다. 그러므로, 응고 단백질 제제, 특히 사전 결정된 글리코형 패턴을 함유한 재조합 인간 인자 VII, 변형된 인자 VII, 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드를 포함하는 제제를 제공하는 조성물 및 방법이 당업계에 필요하다.

<5> 발명의 개요

<6> 본 발명은 사전결정된 글리코형 패턴을 나타내는 인자 VII 폴리펩티드 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드를 포함하는 제제에 관련된다. 여기에서 사용될 때, 인자 VII 또는 인자 VII-관련 제제는, 변체 및 화학적으로 변환된 형태를 포함하는, 다수의 인자 VII 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드는 물론이고, 단백질 가수분해적으로 활성화되어 (예를 들어, 인자 VIIa), 합성된 세포로부터 분리된 형태를 지칭한다. 글리코형 패턴은 인자 VII 폴리펩티드 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드에 공유적으로 결합된 변화하는 구조를 갖는 올리고당 사슬의 제제 내에서의 분포를 지칭한

다.

- <7> 한 양태에서, 본 발명은 다수의 인자 VII 폴리펩티드 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드를 포함하는 제제를 제공하는데, 여기에서 폴리펩티드는 아스파라긴-연결 올리고당 사슬을 포함하고 여기에서 다음 중 하나 이상이 적용된다: (i) 올리고당 사슬의 약 94 내지 100%는 적어도 하나의 시알산 부분을 포함하거나; (ii) 올리고당 사슬의 약 0 내지 7%는 중성 전하를 갖거나; (iii) 올리고당 사슬의 약 16% 미만, 예를 들어 약 6 내지 16%는 적어도 하나의 말단 갈락토오스 잔기를 포함하거나; (iv) 올리고당 사슬의 약 25% 미만, 예를 들어 올리고당 사슬의 약 6 내지 9%는 적어도 하나의 말단 N-아세틸갈락토사민 잔기를 포함하거나; 또는 (v) 올리고당 사슬의 약 30% 미만, 예를 들어 올리고당 사슬의 약 11 내지 23%는 적어도 하나의 말단 갈락토오스 또는 N-아세틸갈락토사민 잔기를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 하나 이상의 (i) 내지 (v) 외에: 올리고당 사슬 내의 모든 시알산 잔기는 $\alpha 2 \rightarrow 3$ 결합을 통해 갈락토오스와 연결되거나; 적어도 몇몇의 시알산 잔기는 N-아세틸뉴라민산 (Neu5Ac) 외에 N-글리콜릴뉴라민산 (Neu5Gc)를 포함하거나; 또는 올리고당 사슬은 코어 N-아세틸글루코사민에 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 연결된 푸코오스 잔기를 함유한다. 한 구체예에서, 본 발명은 올리고당 사슬의 약 94 내지 100%가 적어도 하나의 시알산 잔기를 함유하고 모든 시알산 잔기가 $\alpha 2 \rightarrow 3$ 결합을 통해 갈락토오스와 연결된 야생형 인자 VIIa를 포함하는 제제를 포함한다. 또다른 구체예에서, 본 발명은 올리고당 사슬의 약 94 내지 100%가 적어도 하나의 시알산 잔기를 갖고 적어도 몇몇의 시알산 잔기는 N-글리콜릴뉴라민산인 야생형 인자 VIIa를 포함하는 제제를 포함한다. 또다른 구체예에서, 본 발명은 올리고당 사슬의 약 94 내지 100%가 적어도 하나의 시알산 잔기를 갖고 적어도 몇몇의 사슬은 N-아세틸갈락토사민을 함유하는 야생형 인자 VIIa를 포함하는 제제를 포함한다. 그러므로 본 발명의 제제는 인간 플라즈마로부터 분리되고 글리코시다제 처리에 의해 생체외에서 변환되지 않은 야생형 인자 VII 또는 인자 VIIa를 포함하지 않는다.
- <8> 또다른 양태에서, 본 발명은 다수의 인자 VII 폴리펩티드 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드를 포함하는 제제를 제공하는데, 여기에서 폴리펩티드는 아스파라긴-연결 올리고당 사슬을 포함하고 여기에서 적어도 약 2%는 안테나 N-아세틸글루코사민 잔기에 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 연결된 적어도 하나의 푸코오스 (즉, Man 잔기에 $\beta 1 \rightarrow 2$, 4 또는 6 연결된 N-아세틸글루코사민 잔기)를 함유한다. 바람직하게는, 올리고당 사슬의 적어도 약 5%가 적어도 하나의 이러한 안테나 푸코오스를 함유하고; 더욱 바람직하게는 적어도 약 10% 또는 20%이고; 가장 바람직하게는, 적어도 약 40%이다.
- <9> 본 발명에 따른 제제는 화학적 및/또는 효소적 변환이 일어난 하나 이상의 변환되지 않은 야생형 인자 VII; 및 야생형 인자 VII에 비하여 아미노산 서열에 하나 이상의 변경을 갖는 인자 VII 변이체를 포함할 수 있다. 본 발명의 제제는 내재성 인자 VII 유전자로부터 인자 VII를 발현하는 인간 세포 또는 재조합 유전자로부터 인자 VII 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드를 발현하도록 프로그램된 세포로부터 유래될 수 있다.
- <10> 또다른 양태에서, 본 발명은 증가된 저장 안정성, 생체이용률, 및/또는 반감기를 포함하되 이에 제한되지 않는, 하나 이상의 개선된 기능을 나타내는 인자 VII 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드를 포함하는 제제를 제공한다.
- <11> 또다른 양태에서, 본 발명은 인자 VII 및 인자 VII-관련 폴리펩티드의 글리코형 패턴을 측정 및/또는 최적화하는 방법을 포함하는데, 이는:
- <12> (a) 제 1 세트의 사전결정된 배양 조건하에서 인자 VII 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드를 발현하는 세포를 배양하는 단계;
- <13> (b) 배양물로부터 인자 VII 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드를 회수하여 폴리펩티드를 포함하는 제제를 얻는 단계; 및
- <14> (c) 폴리펩티드에 연결된 올리고당 사슬의 구조를 분석하여 제제의 글리코형 패턴을 측정하는 단계에 의해서 수행된다.
- <15> 방법은 제 2 세트의 사전결정된 배양 조건을 성취하기 위해 단계 (a)의 배양 조건을 변경하는 단계; 및 원하는 글리코형 패턴이 성취될 때까지 단계를 반복하는 단계를 더욱 포함할 수 있다. 대안으로, 방법은 화학적 또는 효소적으로 처리하여 올리고당 구조를 변경하는 단계; 및 원하는 글리코형 패턴이 성취될 때까지 단계를 반복하는 단계를 포함할 수 있다. 게다가, 방법은 사전결정된 글리코형 패턴을 갖는 제제가 생물활성 또는 다른 기능성 (예를 들어, 약물동력 프로파일 또는 안정성)의 적어도 하나의 시험을 하는 추가적 단계, 및 특정 글리코형 패턴과 특정 생물활성 또는 기능성 프로파일의 상호관계를 나타내는 단계를 포함할 수 있다.
- <16> 또다른 양태에서, 본 발명은 N-연결 글리코실화의 사전결정된 패턴을 갖는 인자 VII 폴리펩티드 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드를 포함하는 제제를 생산하기 위한 방법을 제공한다. 몇몇 구체예에서, 방법은 인자 VII 폴리펩티

드 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드에 연결된 아스파라긴-연결 올리고당 사슬의 적어도 약 94%가 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 시알산 잔기와 같이 적어도 하나의 시알산 잔기를 포함하는 조건 하에서 폴리펩티드를 발현하는 세포를 배양함으로써 수행된다. 몇몇 구체예에서, 방법은 적어도 약 5%가 안테나 N-아세틸글루코사민 잔기에 α 1-3 연결된 적어도 하나의 푸코오스를 함유하는 조건 하에서 폴리펩티드를 발현하는 세포를 배양함으로써 수행된다. 인자 VII 폴리펩티드 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드는, 그들의 공급원에 관계없이, 효소적으로 처리되어 원하는 글리코형 패턴을 성취한다.

<17> 또다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제제를 포함하는 약제학적 조제물 및 인자 VII 폴리펩티드 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드에 민감한 증후군의 예방 및/또는 치료의 방법을 제공한다. 방법은 혈액 응고에서의 향상 또는 저해가 일어나는 조건 하에서, 치료를 필요로 하는 환자에 약제학적 조제물을 투여하는 단계를 포함한다. 한 시리즈의 구체예에서, 인자 VII 제제는 혈액 응고를 향상시키는 것이 요구될 때, 예를 들어 혈우병 A, 혈우병 B, 인자 IX 결핍, 인자 VII 결핍, 저혈소판증, 또는 von Willebrand 병; 응고 인자 저해제의 존재에 수반되는 증후군; 외과수술 또는 항응고제 요법의 전, 중 또는 후; 외상 후와 같은 때에 투여된다. 또다른 시리즈의 구체예에서, 인자 VII-관련 폴리펩티드의 제제 (즉, 야생형 인자 VII에 비하여 감소 또는 변형된 생물활성을 갖는 제제)는 혈액 응고를 감소시키기 위해, 예를 들어 혈관성형술이 시술된 환자 또는 깊은 정맥 혈전증, 폐 색전증, 발작, 파종혈관내 응고 (DIC), 그람-음성 내독혈증과 연관된 폐 및 신장에서의 피브린 침전, 또는 심근경색증을 겪는 환자에 투여된다. 본 발명에 있어서, 인자 VII-관련 폴리펩티드의 제제는 또한 조직 인자 (TF)-중재 경로를 통하여 세포내 신호전달을 변형(예를 들어 감소)시켜, 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 전신적 염증 반응 증후군 (SIRS), 용혈 요독 증후군 (HUS), 다중성 기관 부전 (MOF), 및 혈소판감소 자색반 (TTP)와 같은 상태를 치료하도록 요구될 때 투여될 수 있다.

발명의 상세한 설명

<18> 본 발명자들은 사전결정된 글리코형 패턴을 갖는 응고 단백질의 제제가 개선된 기능성을 나타낸다는 것을 발견하였다. 따라서, 본 발명은 이들 단백질 제제를 제공하는 방법 및 조성물에 관련된다. 특히, 본 발명은 아스파라긴-연결 (N-연결) 올리고당 사슬의 특정 사전결정된 패턴을 갖는 인자 VII 폴리펩티드 및 인자 VII-관련 폴리펩티드를 포함하는 제제에 관련된다. 본 발명의 제제는 변경된 성질을 나타내는데, 이는 개선된 약물동력 특징 및 개선된 임상 효능을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 발명은 또한 이들 제제를 포함하는 약제학적 조제물은 물론이고, 조제물을 사용하는 치료적 방법도 포함한다.

<19> 인자 VII 폴리펩티드 및 인자 VII-관련 폴리펩티드

<20> 본 발명은, 예를 들어 미국 특허 제 4,784,950 호에 개시된 아미노산 서열을 갖는 것 (야생형 인자 VII)과 같은, 인간 인자 VII 폴리펩티드를 포함한다. 여기에서 사용될 때, "인자 VII" 또는 "인자 VII 폴리펩티드"는 야생형 인자 VII는 물론이고, 야생형 인자 VII에 비하여 동일 또는 개선된 생물학적 활성을 실질적으로 나타내는 인자 VII의 변체를 포함한다. 용어 "인자 VII"는 비절단된 (효소원) 형태에서의 인자 VII 폴리펩티드는 물론이고, 단백질 가수분해적으로 프로세싱되어 각각의 생물학적 형태를 생성하는 인자 VII를 포함하도록 의도되는데, 이는 인자 VIIa로 표시될 수 있다. 전형적으로 인자 VII는 잔기 152 및 153 사이로 절단되어 인자 VIIa를 생성한다.

<21> 여기에서 사용될 때, "인자 VII-관련 폴리펩티드"는 변체를 포함하는, 폴리펩티드를 포함하는데, 여기에서 인자 VIIa 생물학적 활성은 실질적으로 야생형 인자 VIIa의 활성에 비하여 변형 또는 감소된다. 이들 폴리펩티드는 화학적으로 변형된 인자 VII 또는 인자 VIIa 및, 폴리펩티드의 생물활성을 변형 또는 방해하도록 특정 아미노산 서열 변경이 도입된 인자 VII 변체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

<22> 혈액 응고에서 인자 VIIa의 생물학적 활성은 (i) 조직 인자 (TF)에 결합하고 및 (ii) 인자 IX 또는 인자 X의 단백질 가수분해 절단에 촉매작용하여 활성화된 인자 IX 또는 X (각각, 인자 IXa 또는 Xa)를 생산하는 능력으로부터 유래한다. 본 발명을 위하여, 인자 VIIa 생물학적 활성은 미국 특허 제 5,997,864 호에 개시된 것과 같이, 인자 VII-결핍 플라즈마 및 트롬보플라스틴을 사용하여 혈액 응고를 촉진하는 제제의 능력을 측정함으로써 정량할 수 있다. 이 검정에서, 생물학적 활성은 대조군 샘플에 대한 응고 시간에서의 감소로서 표현되고 1 유닛/ml 인자 VII 활성을 함유한 모아진 인간 혈청 표준에 비교하여 "인자 VII 유닛"으로 전환된다. 대안으로, 인자 VIIa 생물학적 활성은 (i) 지질막에 매몰된 TF를 포함하는 시스템에서 인자 Xa를 생산하는 인자 VIIa의 능력을 측정 (Persson et al., *J. Biol. Chem.* 272: 19919-19924, 1997); (ii) 수성 시스템에서의 인자 X 가수분해를 측정 (아래 실시예 5 참조); (iii) 표면 플라스몬 (plasmon) 공명에 기초한 기구를 이용하여 TF에 대한 그 물리적 결합력을 측정 (Persson, *FEBS Letts.* 413:359-363, 1997); (iv) 합성 기질의 가수분해를 측정 (아래 실시예 4

참조); 및 (v) TF-독립 시험관내 시스템에서 트롬빈의 생성을 측정함으로써 정량될 수 있다.

<23> 야생형 인자 VIIa에 비하여 실질적으로 동일하거나 개선된 생물학적 활성을 갖는 인자 VII 변체는, 위에 설명된 것과 같은 하나 이상의 응고 검정, 단백질 가수분해 검정, 또는 TF 결합검정에서 시험될 때, 동일한 세포 타입에서 생산된 적어도 약 25%, 바람직하게는 적어도 약 50%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 75%, 및 가장 바람직하게는 적어도 약 90%의 야생형 인자 VII의 특정 활성을 나타내는 것을 포함한다. 야생형 인자 VIIa에 비하여 실질적으로 감소된 생물학적 활성을 갖는 인자 VII 변체는 위에 설명된 것과 같은 하나 이상의 응고 검정, 단백질 가수분해 검정, 또는 TF 검정에서 시험될 때, 약 25% 미만, 바람직하게는 약 10% 미만, 더욱 바람직하게는 약 5% 미만 및 가장 바람직하게는 약 1% 미만의 야생형 인자 VIIa의 특정 활성을 나타내는 것들이다. 야생형 인자 VII에 비하여 실질적으로 변형된 생물학적 활성을 갖는 인자 VII 변체는 TF-독립 인자 X 단백질 분해 활성을 나타내는 인자 VII 변체 및 TF에 결합하되 인자 X를 절단하지 않는 변체들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

<24> 인자 VII의 변체는, 야생형 인자 VII에 비하여 실질적으로 동일하거나 또는 더 나은 생물활성을 나타내든지, 또는 대안으로, 야생형 인자 VII에 비하여 실질적으로 변경되거나 또는 감소된 생물활성을 나타내든지, 하나 이상의 아미노산의 삽입, 결손, 또는 치환에 의해 야생형 인자 VII의 서열과는 다른 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 야생형 인자 VII와 실질적으로 동일한 생물학적 활성을 갖는 인자 VII 변체의 제한되지 않는 예는 S52A-FVIIa, S60A-FVIIa (Iino et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 352:182-192, 1998); 미국 특허 제 5,580,560 호에 설명된 것과 같이 증가된 단백질 가수분해 안정성을 나타내는 FVIIa 변체; 잔기 290 및 291 사이 또는 잔기 315 및 316 사이에 단백질 가수분해적으로 절단된 인자 VIIa (Mollerup et al., *Biotechnol. Bioeng.* 48: 501-505, 1995); 및 인자 VIIa의 산화된 형태 (Kornfelt et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 363: 43-54, 1999)를 포함한다. 야생형 인자 VII에 비하여 실질적으로 감소 또는 변형된 생물학적 활성을 갖는 인자 VII 변체의 제한되지 않는 예는 R152E-FVIIa (Wildgoose et al., *Biochem.* 29: 3413-3420, 1990), S344A-FVIIa (Kazama et al., *J. Biol. Chem.* 270: 66-72, 1995), FFR-FVIIa (Holst et al., *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 15: 515-520, 1998), 및 Gla 도메인이 없는 인자 VIIa (Nicolaisen et al., *FEBS Letts.* 317: 245-249, 1993)을 포함한다. 화학적으로 변형된 인자 VII 폴리펩티드 및 서열 변체의 제한되지 않는 예는 예를 들어 미국 특허 제 5,997,864 호에 설명된다.

<25> **아스파라긴-연결 글리코실화**

<26> 본 발명은 인자 VII 글리코형의 특정 스펙트럼, 즉 아스파라긴-연결 (N-연결) 올리고당 사슬의 사전결정된 패턴을 갖는 인자 VII 폴리펩티드 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드를 포함하는 인자 VII 폴리펩티드 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드의 제제를 제공한다.

<27> 여기에서 사용될 때, N-연결 글리코실화의 "패턴" 또는 글리코형 "패턴", "분포", 또는 "스펙트럼"은 인자 VII 폴리펩티드 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드의 주어진 집단내에서 특정 올리고당 구조의 표시를 지칭한다. 이러한 패턴의 제한되지 않는 예는 (i) 적어도 하나의 시알산 잔기를 갖거나; (ii) 어떤 시알산 잔기가 없거나 (즉 전기적으로 중성이거나); (iii) 적어도 하나의 말단 갈락토오스 잔기를 갖거나; (iv) 적어도 하나의 말단 N-아세틸갈락토사민 잔기를 갖거나; (v) 적어도 하나의 "캡핑되지 않은" 안테나를 갖거나 (즉, 적어도 하나의 말단 갈락토오스 또는 N-아세틸갈락토사민 잔기를 갖거나); 또는 (vi) 안테나형 N-아세틸글루코사민 잔기에 α1-→3 연결된 적어도 하나의 푸코오스를 갖는, 올리고당 사슬의 상대 비율을 포함한다.

<28> 여기에서 사용될 때, 올리고당 사슬은 단일 아스파라긴 잔기에 공유적으로 연결된 전체 올리고당 구조를 지칭한다. 인자 VII는 통상적으로 Asn 145 및 Asn 322에서 글리코실화된다. 인간의 체자리에서 생산되는 인자 VII 상에 존재하는 N-연결 올리고당 사슬은 바이-, 트리- 또는 테트라안테나가 될 수 있는데, 각 안테나는 Man (β1-→4)GlcNAc (β1-→4)GlcNAc-Asn에 (α1-→3 또는 6으로) 연결된 Man 잔기로 (β1-2, 4, 또는 6으로) 연결된 구조 Neu5Ac (α2-→3 또는 α2-→6) Gal (β1-→4) GlcNAc를 갖는다 (Neu5Ac는 N-아세틸뉴라민산 (시알산)을 의미하고, Gal은 갈락토오스를 의미하고, GlcNAc는 N-아세틸글루코사민을 의미하고, Man은 마노오스를 의미한다). 올리고당 사슬은 또한 푸코오스 잔기를 포함할 수 있는데, 이는 GlcNAc에 α1-→6으로 연결될 수 있다. 인자 VII가 인간 체자리에서 생산될 때, 몇몇은 중심 푸코오스 잔기가 없고; 모든 사슬은 안테나형 푸코오스 잔기가 없고; 모든 사슬은 거의 완전히 시알화되는데, 다시 말해, 각 안테나의 말단 당은 α2-→3 또는 α2-→6 결합을 통해 갈락토오스에 연결된 N-아세틸뉴라민산이다.

<29> 그러나 다른 환경에서 생산될 때, 인자 VII는 하나 이상의 그들 안테나 상에 상이한 말단 구조를 갖는 올리고당 사슬을 함유할 수 있는데, 이는 예를 들어, 시알산 잔기가 없는 것; N-글리콜릴뉴라민산 (Neu5Gc) 잔기를 함유한 것; 갈락토오스 대신에 말단 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc) 잔기를 함유한 것등이다. 예를 들어, 소 혈청의

존재에서 배양된 BHK 세포에서 생산될 때, 인자 VII 제제는 다음의 올리고당 패턴을 나타낸다:

- <30> --올리고당 사슬의 87 내지 93%는 적어도 단일 시알산 잔기를 함유하고;
- <31> --7 내지 13%는 중성이고 (어떤 시알산도 없고);
- <32> --9 내지 16%는 적어도 하나의 말단 갈락토오스 잔기를 함유하고;
- <33> --19 내지 29%는 적어도 하나의 말단 N-아세틸갈락토사민 잔기를 함유하고;
- <34> --30 내지 39%는 적어도 하나의 캡핑되지 않은 안테나를 함유하는데, 다시 말해, 적어도 하나의 말단 갈락토오스 또는 N-아세틸갈락토사민 잔기를 함유한다.
- <35> 본 발명자들은 종래 설명된 것들과는 상이한 특정 사전결정된 올리고당 패턴을 함유한 인자 VII 제제를 생산하였다. 본 발명은 다음의 글리코형 패턴 중 하나 이상을 나타내는 인자 VII 폴리펩티드 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드를 포함하는 제제를 포함한다:
- <36> (i) 올리고당 사슬의 약 94 내지 100%, 예를 들어 94 내지 99%, 95 내지 98%, 또는 96 내지 97%가 적어도 하나의 시알산 잔기를 함유한다. 상이한 구체예에서, 올리고당 사슬의 적어도 약 94%, 95%, 96%, 또는 97%가 적어도 하나의 시알산 잔기를 함유한다.
- <37> (ii) 올리고당 사슬의 6% 이하, 예를 들어 약 1.5 내지 6% 또는 약 2 내지 4%가 중성이다.
- <38> (iii) 올리고당 사슬의 약 16% 미만, 바람직하게는, 약 10% 미만, 예를 들어 약 6 내지 10% 또는 약 8 내지 9%는 적어도 하나의 말단 갈락토오스를 함유하고;
- <39> (iv) 올리고당 사슬의 약 25% 미만, 바람직하게는 약 10% 미만, 예를 들어 약 6 내지 9% 또는 약 7 내지 8%는 적어도 하나의 말단 GaINAc 잔기를 함유하고;
- <40> (v) 올리고당 사슬의 약 30% 미만, 바람직하게는, 약 25% 미만, 예를 들어 약 11 내지 23% 또는 약 12 내지 18%는 적어도 하나의 캡핑되지 않은 안테나를 함유하고;
- <41> (vi) 올리고당 사슬의 적어도 약 2%, 바람직하게는, 적어도 약 5%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 10% 또는 20%; 및 가장 바람직하게는, 적어도 약 40%는 안테나형 N-아세틸글루코사민 잔기에 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 연결된 적어도 하나의 푸코오스 (즉, Man 잔기에 $\beta 1 \rightarrow 2, 4$, 또는 6 연결된 N-아세틸글루코사민 잔기)를 함유한다.
- <42> (i) 내지 (vi)의 각각이 본 발명에 의해 포함되는 개별적인 글리코형 패턴을 대표할 수 있다는 것, 즉, 본 발명에 따르는 제제가 (i) 내지 (vi) 중 오직 하나에 의해 설명될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 대안으로, 특정 글리코 패턴에 의존하여, 본 발명에 포함되는 제제는 (i) 내지 (vi) 중 하나 이상에 의해 설명될 수 있다.
- <43> 더욱이, 본 발명에 포함되는 제제는 하나 이상의 다른 구조적 특징과 조합으로 하나 이상의 (i) 내지 (vi)에 의해 설명될 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 시알산 잔기 (Neu5Ac 또는 Neu5Gc)가 오직 $\alpha 2 \rightarrow 3$ 배열로만 갈락토오스에 연결된 인자 VII 폴리펩티드 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드를 포함하는 제제를 포함한다. 본 발명은 또한 중심 N-아세틸글루코사민에 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 연결된 푸코오스 및/또는 안테나형 N-아세틸글루코사민에 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 연결된 푸코오스를 함유하는 인자 VII 폴리펩티드 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드를 포함하는 제제를 포함한다. 한 시리즈의 구체예에서, 본 발명의 제제는 인자 VII 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드를 포함하는데 여기에서 99% 이상은 적어도 하나의 시알산 잔기를 함유하고 (a) 시알산 잔기는 오직 $\alpha 2 \rightarrow 3$ 배열로만 연결되고/또는 (b) 중심 N-아세틸글루코사민에 연결된 푸코오스 잔기가 있고/또는 (c) 검출가능한 수의 안테나가 N-아세틸갈락토사민에서 종결한다. 한 구체예에서, 본 발명은 올리고당 사슬의 99% 이상이 적어도 하나의 시알산 잔기를 함유하고 시알산 잔기는 오직 $\alpha 2 \rightarrow 3$ 배열로만 갈락토오스에 연결되는 야생형 인자 VIIa를 포함하는 제제를 포함한다. 또다른 구체예에서, 본 발명은 올리고당의 99% 이상이 적어도 하나의 시알산 잔기를 함유하고 적어도 몇몇은 N-아세틸갈락토사민을 포함하는 야생형 인자 VIIa를 포함하는 제제를 포함한다. 본 발명은 인간 플라즈마로부터 분리되고 글리코시다제로의 처리에 의해 생체외에서 변형되지 않은 야생형 인자 VII 또는 야생형 인자 VIIa를 포함하지 않는다.
- <44> 한 구체예에서, 인자 VIIa 제제는 하나의 안테나형 N-아세틸글루코사민에 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 연결된 단일 푸코오스를 갖는 올리고당 사슬을 포함한다. 또다른 구체예에서, 인자 VIIa 제제는 바이안테나형 올리고당의 각 안테나형 N-아세틸글루코사민에 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 연결된 단일 푸코오스를 갖는 올리고당 사슬을 포함한다 (Sialyl Lewis X 구조). 또다른 구체예에서, 인자 VIIa 제제는 (i) 중심 N-아세틸글루코사민에 연결된 푸코오스 및 (ii) 하나의 안테나형 N-아세

틸글루코사민에 α1->3 연결된 단일 푸코오스를 갖는 올리고당 사슬을 포함한다. 또다른 구체예에서, 인자 VIIa 제제는 (i) 중심 N-아세틸글루코사미네 연결된 푸코오스 및 (ii) 바이안테나형 올리고당의 각 안테나형 N-아세틸글루코사민에 α1->3 연결된 푸코오스 잔기를 갖는 올리고당 사슬을 포함한다.

- <45> 본 발명의 실행에서, N-연결 올리고당의 패턴은 업계에 공지된 어떤 방법을 이용하여 결정될 수 있는데, 이는 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC); 모세관 전기영동법 (CE); 핵자기공명 (NMR); 고속-원자 충격, 전자스프레이 또는 매트릭스-지원 레이저 이탈과 같은 이온화 기술을 이용한 질량 분석법 (MS); 가스 크로마토그래피 (GC); 및 음이온-교환 (AIE)-HPLC, 크기배제 크로마토그래피 (SEC) 또는 MS와 결합한 엑소글리코시다제 처리를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, Weber et al., *Anal. Biochem.* 225:135 (1995); Klausen et al., *J. Chromatog.* 718:195 (1995); Morris et al., in *Mass Spectrometry of Biological Materials*, McEwen et al., eds., Marcel Dekker, (1990), pp 137-167; Conboy et al., *Biol. Mass Spectrom.* 21:397, 1992; Hellerqvist, *Meth. Enzymol* 193:554 (1990); Sutton et al., *Anal. Biochem.* 318:34 (1994); Harvey et al., *Organic Mass Spectrometry* 29:752 (1994)를 참조한다.
- <46> 상기 방법 (또는 상이한 구조를 갖는 올리고당을 분석하는 어떤 다른 방법)중 어떤 것을 이용한 인자 VII-유래 올리고당 사슬의 분별 후, 분별된 종은, 예를 들어 군 (i)-(v) 중 하나로 할당된다. (i)-(ii) 각각의 상대 함량은 샘플에서 올리고당 사슬의 전체 함유량에 대한 그 군에 할당된 올리고당의 함으로서 계산된다.
- <47> 예를 들어, AIE-HPLC를 이용하여, 13개 이상의 N-연결 올리고당 피크는 BHK 세포에서 생산된 재조합 인자 VII 제제로부터 분별될 수 있다. 예를 들어, Klausen et al., *Mol. Biotechnol.* 9: 195,1998을 참조한다. 다섯개의 피크 (Klausen et al.에서 1-5로 표시)는 시알산을 함유하지 않는 반면, 여덟개의 피크 (6, 7, 및 10-15로 표시)는 시알산을 포함한다.
- <48> 주어진 분별에서, 시알산-함유 및 시알산-미함유 사슬의 수 및 분포가 (a) 발견되는 폴리펩티드; (b) 세포 타입 및 배양 조건; 및 (c) 분별의 방법에 의존한다는 것과, 결과 패턴이 그에 따라 다양할 수 있다는 것이 이해될 것이다.
- <49> 어떤 경우에서, 일단 시알산-함유 올리고당이 비-시알산-함유 올리고당으로부터 분별되면, 전통적인 데이터 분석 프로그램은 각 피크 아래의 면적; 전체 피크 면적; 및 특정 피크로 나타나는 전체 피크 면적의 백분율을 계산한다. 이 수단에서, 주어진 제제에 대하여, 시알산-함유 피크 면적의 총합/전체 피크 면적 X 100은 본 발명에 따른 제제에 대한 % 시알화 수치 (즉, 적어도 하나의 시알산 잔기를 갖는 올리고당 사슬의 부분)를 산출한다. 유사한 수단으로, 시알산을 갖지 않거나 또는 적어도 하나의 갈락토오스 또는 N-아세틸글루코사민을 갖는 사슬의 %가 계산될 수 있다.
- <50> **N-연결 올리고당의 사전결정된 패턴을 갖는 인자 VII의 생산 방법**
- <51> N-연결 올리고당의 사전결정된 패턴을 각각 갖는 인자 VII, 인자 VII 변체 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드의 제제는 인자 VII 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드를 발현하는 어떤 적당한 숙주 세포를 이용하여 생산될 수 있다.
- <52> 숙주 세포: 몇몇 구체예에서, 숙주 세포는 내재성 인자 VII 유전자를 발현하는 인간 세포이다. 이들 세포에서, 내재성 유전자는 원상태인 것이나 또는 제자리에서 변형된 것일 수 있고, 또는 인자 VII 유전자 외부의 서열이 제자리에서 변형되어 내재성 인자 VII 유전자의 발현을 변경할 수 있다. 내재성 인자 VII 유전자를 발현할 수 있는 어떤 인간 세포가 사용될 수 있다.
- <53> 다른 구체예에서, 이종의 숙주 세포가 재조합 유전자로부터 인간 인자 VII를 발현하도록 프로그래밍된다. 숙주 세포는 척추동물, 곤충, 또는 진균 세포가 될 수 있다. 바람직하게, 세포는 포유동물 N-연결 글리코실화; O-연결 글리코실화; 및 γ-카르복실화의 전 스펙트럼이 가능한 포유동물 세포이다. 미국 특허 제 4,784,950 호를 참조한다. 바람직한 포유동물 세포주는 CHO (ATCC CCL 61), COS1 (ATCC CRL 1650), 새끼 햄스터 신장 (BHK) 및 HEK293 (ATCC CRL 1573; Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36: 59-72,1977) 세포주를 포함한다. 바람직한 BHK 세포주는 tk⁻ts13 BHK 세포주인데 (Waechter and Baserga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 1106-1110,1982), 이하 BHK 570 세포로 지칭한다. BHK 570 세포주는 ATCC 수납번호 CRL 10314 하의 American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852로부터 구입가능하다. tk⁻ts13 BHK 세포주는 또한 수납번호 CRL 1632하의 ATCC로부터 구입가능하다. 게다가, Rat Hep I (Rat hepatoma; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (Rat hepatoma; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), 인간 폐 (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9. 1) 및 DUKX 세포 (CHO 세포주) (Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220,1980)(DUKX 세포는 CXB11 세포로도 지칭됨), 및 DG44 (CHO 세포주) (*Cell*, 33: 405,1983, and *Somatic Cell and Molecular*

Genetics 12: 555,1986)를 포함하는 수많은 다른 세포주가 이용될 수 있다. 3T3 세포, Namalwa 세포, 골수종 및 골수종과 다른 세포와의 융합 세포 또한 이용될 수 있다. 특히 바람직한 구체예에서, 숙주세포는 혈청의 부재에서 성장하여 인자 VII를 발현하도록 프로그래밍된 BHK 21 세포이다. 몇몇 구체예에서, 세포는 그들이 유래된 세포보다 질적 또는 양적으로 상이한 스펙트럼의 글리코실화 효소 (예를 들어, 글리코실 트랜스퍼라제 및/또는 글리코시다제)를 발현하는 돌연변이 또는 재조합 세포가 될 수 있다. 세포는, 예를 들어, 인자 VII의 일부절단된 형태와 같은, 다른 이종의 펩티드 또는 단백질을 발현하도록 프로그래밍될 수 있다. 한 구체예에서, 숙주 세포는 흥미있는 인자 VII 폴리펩티드 (즉, 인자 VII 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드) 및 변경된 효소 또는 인자 VII 절편과 같은 또다른 이종의 펩티드 모두를 공동-발현하도록 프로그래밍된 CHO 세포이다.

<54> 방법: 본 발명은 (i)-(vi)로서 위에 설명된 글리코형 패턴의 어떤 것을 포함하는 제제의 생산 방법 및, 나아가 구체예에서, 인자 VII 및 인자 VII-관련 폴리펩티드의 글리코형 분배를 최적화하기 위한 방법을 포함한다. 이러한 방법은 하기의 단계:

<55> (a) 제 1 세트의 사전결정된 배양 조건 하에서 인자 VII 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드를 발현하는 세포를 배양하는 단계;

<56> (b) 배양물로부터 인자 VII 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드를 회수하여 폴리펩티드를 포함하는 제제를 얻는 단계; 및

<57> (c) 폴리펩티드에 연결된 올리고당의 구조를 분석하여 글리코형 패턴을 결정하는 단계에 의해 수행된다.

<58> 방법은:

<59> (d1) 단계 (a)의 배양 조건을 변경하여 제 2 세트의 사전결정된 배양 조건을 성취하는 단계;

<60> (e1) 원하는 글리코형 패턴이 성취될 때까지 단계 (b)-(d1)을 반복하는 단계를 더욱 포함한다.

<61> 대안으로, 방법은:

<62> (d2) 제제를 화학적 및/또는 효소적으로 처리하여 올리고당 구조를 변경시키는 단계; 및

<63> (e2) 원하는 글리코형 패턴이 성취될 때까지 단계 (b)-(d2)를 반복하는 단계를 더욱 포함한다.

<64> 이들 방법은 사전결정된 글리코형 패턴을 갖는 제제를 생물활성 (예를 들어, 응고, 인자 X 단백질 가수분해, 또는 TF 결합을 포함) 또는 다른 기능성 (예를 들어, 약물동력 프로파일 또는 안정성)에 대한 적어도 하나의 시험을 하는 단계, 및 원하는 글리코형 패턴을 식별하기 위하여 특정 생물활성 또는 기능성 프로파일에 특정 글리코형 패턴을 상호 연관시키는 단계를 더욱 포함할 수 있다.

<65> 단계 (d1)에서 변경될 수 있는 배양 조건에서의 변수는: 기원의 세포 (예를 들어, 원래 사용된 것과는 상이한 종으로부터 유래한 세포); 또는 하나 이상의 글리코실트랜스퍼라제 또는 글리코시다제에서의 변경 또는 글리코실화 기구의 다른 성분을 갖는 돌연변이 또는 재조합 세포 (Grabenhorst et al., *Glycoconjugate J.* 16: 81,1999; Bragonzi et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1474: 273,2000; Weikert, *Nature Biotechnol.* 17: 1116,1999 참조); 폴리펩티드의 발현 수준; 대사 조건 (예를 들어, 글루코오스 또는 글루타민 농도); 혈청의 유무; 비타민 k의 농도; 단백질 가수분해물, 호르몬, 미량 금속, 염은 물론이고 온도, 용존산소량 및 pH와 같은 공정 파라미터를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

<66> 제제의 올리고당 패턴을 변형하기 위해 단계 (d2)에서 이용될 수 있는 효소 처리는 특정 말단 구조를 갖는 올리고당 사슬의 분포에서 원하는 변형을 성취하는 조건 하에서 서열 내에, 하나 이상의 시알리다제 (뉴라미니다제), 갈락토시다제, 푸코시다제; 갈락토실 트랜스퍼라제, 푸코실 트랜스퍼라제, 및/또는 시알릴트랜스퍼라제의 처리를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 글리코실 트랜스퍼라제는 Calbiochem (La Jolla, CA)으로부터 시중구입 가능하고 글리코시다제는 Glyko, Inc., (Novato, CA)로부터 시중구입 가능하다.

<67> 한 시리즈의 구체예에서, 인자 VII 또는 관련된 폴리펩티드를 발현하는 숙주 세포는 (i)-(ii) 중 어떤 것으로서 위에 설명된 올리고당 구조의 원하는 패턴을 갖는 글리코실화된 인자 VII 폴리펩티드를 분비하는 특정 배양 조건에서 배양된다. 이러한 배양 조건은 혈청의 감소, 또는 완전한 부재를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 바람직하게, 숙주 세포는 혈청의 부재에서 성장하도록 적응되고, 성장 단계 및 생산 단계 모두에서 혈청의 부재에서 배양된다. 이러한 적응 방법은, 예를 들어, Scharfenberg, et al., *Animal Cell Technology Developments towards the 21st Century*, E. C. Beuvery et al. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, pp. 619-623,1995 (BHK 및 CHO 세포); Cruz, *Biotechnol Tech.* 11: 117-120,1997 (곤충 세포); Keen, *Cytotechnol.* 17: 203-

211,1995 (골수종 세포) ; Berg et al., *Biotechniques* 14: 972-978,1993 (인간 신장 293 세포)에 설명된다. 바람직한 구체예에서, 세포에 첨가된 성장 배지는 동물 조직 또는 동물 세포 배양물로부터 분리된 어떠한 단백질 또는 다른 성분도 함유하지 않는다. 예를 들어, 아래의 실시예 1을 참조한다. 전형적으로, 전통적인 성분 외에, 인자 VII을 생산하는데에 적당한 배지는 0.1 내지 50 mg/l 사이의 농도로 비타민 K를 함유하는데, 이는 인자 VII 내 글루타민 잔기의 γ -카르복실화에 필요하다.

<68> 또다른 시리즈의 구체예에서, 본 발명의 글리코형은 인자 VII 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드가 거기에 함유된 N-연결 올리고당의 효소적 및/또는 화학적으로 변형됨으로써 생산된다.

<69> **인자 VII 제제**

<70> 여기에서 사용될 때, "인자 VII 제제"는 합성된 장소인 세포로부터 분리된 변체 및 화학적으로 변형된 형태를 포함하는, 인자 VII 폴리펩티드, 인자 VIIa 폴리펩티드, 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드의 다수를 지칭한다.

<71> 그들 기원의 세포로부터 폴리펩티드의 분리는 업계에 공지된 어떤 방법에 의해 성취될 수 있는데, 이는 부착성 세포 배양물로부터 원하는 생성물을 함유한 세포 배양 배지의 제거; 비-부착성 세포를 제거하기 위한 원심분리 또는 여과; 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

<72> 게다가, 인자 VII 폴리펩티드는 더욱 정제될 수 있다. 정제는 업계에 공지된 어떤 방법을 이용하여 성취될 수 있는데, 이는 항-인자 VII 항체 컬럼 상에서와 같은 친화도 크로마토그래피 (예를 들어, Wakabayashi et al., *J. Biol. Chem.* 261: 11097, 1986; 및 Thim et al., *Biochem.* 27: 7785,1988 참조); 소수성 상호작용 크로마토그래피; 이온-교환 크로마토그래피; 크기 배제 크로마토그래피; 전기영동 방법 (예를 들어, 예비 등전점 전기영동 (IEF)), 차별 용해도 (예를 들어, 황산암모늄 침전), 또는 추출 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

<73> 일반적으로, Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, New York, 1982; 및 *Protein Purification*, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989을 참조한다. 정제 후, 제제는 바람직하게 약 10% 미만, 더욱 바람직하게는 약 5% 미만 및 가장 바람직하게는 약 1% 미만의, 숙주 세포로부터 유래된 비-인자 VII 단백질을 함유한다.

<74> 인자 VII 및 인자 VII-관련 폴리펩티드는, 인자 IXa, 칼리크레인, 인자 Xa, 및 트롬빈과 같이 트립신-유사 특이성을 갖는 인자 XII 또는 다른 단백질분해효소를 이용하여, 단백질 가수분해 절단에 의해 활성화될 수 있다. 예를 들어, Osterud et al., *Biochem.* 11: 2853 (1972); Thomas, 미국 특허 제 4,456, 591 호; 및 Hedner et al., *J. Clin. Invest.* 71: 1836 (1983)을 참조한다. 대안으로, 인자 VII는 Mono Q? (Pharmacia) 등과 같은 이온-교환 크로마토그래피 컬럼을 통해 통과시킴으로써 활성화 될 수 있다. 그 다음 결과 활성화 인자 VII는 아래 설명된 것과 같이 조제 및 투여될 수 있다.

<75> **인자 VII 제제의 기능적 성질**

<76> 본 발명에 따른 사전결정된 올리고당을 갖는 인자 VII 폴리펩티드 및 인자 VII-관련 폴리펩티드의 제제는 기준 제제에 비하여 개선된 기능적 특징을 나타낸다. 개선된 기능적 특징은 a) 저장 안정성과 같은 물리적 특징; b) 생체이용률 및 반감기와 같은 약물동력 특징; 및 c) 인간에서의 면역원성을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

<77> 기준 제제는 아스파라긴-연결 글리코실화의 상이한 패턴을 나타내는 것 외에 비교되고 있는 본 발명의 제제에 함유된 것 (예를 들어, 야생형 인자 VII 또는 특정 변체 또는 화학적으로 변형된 형태)과 동일한 폴리펩티드를 포함하는 제제를 지칭한다. 예를 들어, 기준 제제는 전형적으로 다음 글리코형 패턴 중 하나 이상을 포함한다: (i) 올리고당 사슬의 약 93% 미만 (예를 들어, 약 92% 미만 또는 약 90% 미만)이 적어도 하나의 시알산 잔기를 함유하고; (ii) 올리고당 사슬의 적어도 약 6% (예를 들어, 적어도 약 7.5% 또는 적어도 약 10%)는 어떠한 시알산도 없고 (즉 중성) ; (iii) 올리고당 사슬의 적어도 약 10% (예를 들어, 적어도 약 12.5% 또는 적어도 약 15%)는 적어도 하나의 말단 갈락토오스 잔기를 함유하고; (iv) 올리고당 사슬의 적어도 약 15% (예를 들어, 적어도 약 20% 또는 적어도 약 25%)는 적어도 하나의 N-아세틸갈락토사민 잔기를 함유하고; (v) 올리고당 사슬의 적어도 약 25% (예를 들어, 적어도 약 30% 또는 적어도 약 35%)는 적어도 하나의 캡핑되지 않은 안테나를 함유하고 (즉, 적어도 하나의 말단 갈락토오스 또는 N-아세틸갈락토사민 잔기를 함유하고); 또는 (vi) 본질적으로 검출이 가능하지 않은 수준 (예를 들어, 약 0.2% 미만)의 안테나형 푸코오스 잔기를 함유한다.

<78> 인자 VII 제제의 저장 안정성은 (a) 25°C에서 건조 분말로서 저장될 때 제제의 생물활성의 20%가 감퇴하는데 필요한 시간 및/또는 (b) 제제 내에 인자 VIIa 응집의 부분이 두배가 되는데 필요한 시간을 측정함으로써 평가될 수 있다.

- <79> 몇몇 구체예에서, 본 발명의 제제는 (본 발명의 제제와 기준 제제 모두를 25℃에서 건조 분말로서 저장할 때) 20%의 생물활성이 감퇴하는데 필요한 시간에 있어서 기준 제제에서의 동일한 현상에 필요한 시간에 비하여 적어도 약 30%, 바람직하게는 적어도 약 60% 및 더욱 바람직하게는 약 100%의 증가를 나타낸다. 생물활성 측정은 어떤 응고 검정, 단백질 가수분해 검정, TF-결합 검정, 또는 TF-독립 트롬빈 생성 검정을 이용하여 수행될 수 있다.
- <80> 몇몇 구체예에서, 본 발명의 제제는 (본 발명의 제제와 기준 제제 모두를 25℃에서 건조 분말로서 저장할 때) 응집이 두배가 되는데 필요한 시간에 있어서 기준 제제에 비하여 적어도 약 30%, 바람직하게는 적어도 약 60%, 및 더욱 바람직하게는 적어도 약 100%의 증가를 나타낸다. 응집의 성분은 단백질 Pak 300 SW 컬럼 (7.5 x 300 mm) (Waters, 80013)상에서 겔 침투 HPLC에 의해 다음과 같이 측정된다. 컬럼을 Eluent A (0.2 M 황산 암모늄, 5 % 이소프로판올, 인산으로 pH를 2.5로 조절한 후, 트리에틸아민으로 pH를 7.0로 조절)로 평형시키고, 25 µg의 샘플을 컬럼에 가한다. 30분동안 0.5 ml/min의 유속에서 Eluent A로 용리하고, 215 nm에서의 흡광도를 측정하여 검출을 성취한다. 응집의 함유량은 인자 VII 응집의 피크 면적/인자 VII 피크의 전체 면적 (모노머 및 응집)으로서 계산한다.
- <81> "생체이용률"은 투여 후 사전결정된 시간에 플라즈마에서 검출될 수 있는 인자 VII 또는 인자 VII-관련 제제의 투여된 용량의 부분을 지칭한다. 전형적으로, 생체이용률은 약 25 내지 250 µg/kg의 제제의 용량을 투여하고; 투여 후 사전결정된 시간에 플라즈마 샘플을 얻고; 응고 검정 (또는 어떤 생물검정), 면역검정, 또는 이에 상응하는 것 중 하나 이상을 이용하여 샘플에서 인자 VII 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드의 함유량을 측정함으로써 시험 동물에서 측정된다. 데이터는 전형적으로 [인자 VII] 대 시간으로서 그래프적으로 나타나고 생체이용률은 곡선 아래 면적 (AUC)으로서 표현된다. 시험 제제의 상대적 생체이용률은 시험 제제의 AUC와 기준 제제의 AUC 간의 비율로 지칭한다.
- <82> 몇몇 구체예에서, 본 발명의 제제는 기준 제제의 생체이용률에 비하여 적어도 약 110%, 바람직하게는 적어도 약 120%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 130% 및 가장 바람직하게는 적어도 약 140%의 상대 생체이용률을 나타낸다. 생체이용률은 어떤 포유류 (바람직하게는 개)에서 측정될 수 있고, AUC를 계산하는데에 사용된 사전결정된 시간은 10분에서 8시간까지 상이한 증분을 포함할 수 있다.
- <83> "반감기"는 인자 VII 폴리펩티드 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드의 플라즈마 농도가 특정 수치로부터 그 수치의 반으로 감소하는데에 필요한 시간을 지칭한다. 반감기는 생체이용률에 대한 것과 동일한 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 제제는 기준 제제의 반감기에 비하여 적어도 약 0.25시간, 바람직하게는 적어도 약 0.5시간, 더욱 바람직하게는 적어도 약 1시간, 및 가장 바람직하게는 적어도 약 2시간의 반감기 증가를 나타낸다.
- <84> 제제의 "면역원성"은, 사람에게 투여되었을 때, 체액성, 세포성, 또는 양쪽 모두에서 해로운 면역반응을 유도하는 능력을 지칭한다. 인자 VIIa 폴리펩티드 및 인자 VIIa-관련 폴리펩티드는 인간에서 검출가능한 면역반응을 유도하지 않는 것으로 공지된다. 그럼에도 불구하고, 어떤 인간 부차-집단에서, 특정 투여된 단백질에 대한 감수성을 나타내는 개인이 존재한다. 면역원성은 민감한 개인에서, 업계에 공지된 전통적인 방법을 이용하여, 항-인자 VII 항체 및/또는 인자 VII-반응성 T-세포의 존재를 정량함으로써 측정할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 제제는 기준 제제의 개인에 대한 면역원성에 비하여 적어도 약 10%, 바람직하게는 적어도 약 25%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 40% 및 가장 바람직하게는 적어도 약 50%의 민감한 개인에서의 면역원성 감소를 나타낸다.
- <85> **약제학적 조성물 및 사용 방법**
- <86> 본 발명의 제제는 응고 인자 결핍 (예를 들어, 혈우병 A 및 B 또는 응고 인자 XI 또는 VII의 결핍); 저혈소판증 또는 von Willebrand 병; 또는 응고 인자 저해제에 의해 야기되는 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는 출혈 이상과 같은 어떤 인자 VII-반응성 증후군, 또는 어떤 원인으로부터의 과다 출혈을 치료하는데에 사용될 수 있다. 제제는 또한 수술 또는 다른 외상에 연관된 환자 또는 항응고제 요법을 받는 환자에게 투여될 수 있다.
- <87> 야생형 인자 VII에 비하여 실질적으로 생물활성을 감소시킨, 본 발명에 따르는 인자 VII-관련 폴리펩티드를 포함한 제제는, 예를 들어 (재협착에서와 같이) 발생시 혈전증 또는 혈관의 폐쇄의 위험을 증가시킬 수 있는 혈관성 형질 또는 다른 외과적 방법이 시술되고 있는 환자에, 항응고제로서 사용될 수 있다. 항응고제가 처방되는 다른 의료적 지표는 깊은 정맥 혈전증, 폐 색전증, 발작, 과중혈관내 응고 (DIC), 그람-음성 내독혈증과 연관된 폐 및 신장에서의 피브린 침전, 심근경색증, 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 전신적 염증 반응 증후군 (SIRS), 용혈 요독 증후군 (HUS), MOF, 및 TTP를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

- <88> 본 발명에 따르는 인자 VII 및 인자 VII-관련 제제를 포함하는 약제학적 조성물은 예방적 및/또는 치료적 처리를 위한 비경구 투여에 대하여 일차적으로 의도된다. 바람직하게, 약제학적 조성물은 혈관내, 피하, 또는 근육내와 같이 비경구적으로 투여된다. 그들은 연속성 또는 박동성 주입에 의해 투여될 수 있다.
- <89> 약제학적 조성물 또는 조제물은 약제학적으로 허용되는 담체, 바람직하게는 수성 담체 또는 희석제와 조합된, 바람직하게는 여기에 용해된, 본 발명에 따르는 제제를 포함한다. 물, 완충액, 0.4% 식염수, 0.3% 글리신 등과 같은 다양한 수성 담체가 사용될 수 있다. 본 발명의 제제는 또한 손상 부위로의 송달 또는 표적화를 위하여 리포솜 제제 내로 조제될 수 있다. 리포솜 제제는 일반적으로 예를 들어 미국 특허 제 4,837,028, 4,501,728, 및 4,975,282 호에 설명된다. 조성물은 전통적인, 주지된 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있다. 결과 수용액은 사용을 위해 무균 상태 하에서 포장되거나 여과되어 동결건조될 수 있는데, 동결건조 제제는 투여에 앞서 멸균 수용액과 결합된다.
- <90> 조성물은 약제학적으로 허용되는 부가적 물질 또는 보조제를 함유할 수 있는데, 이는 예를 들어, 아세트산 나트륨, 유산 나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘 등과 같은, pH 조절제 및 완충제 및/또는 탄력성 조절제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- <91> 이들 조제물 내에 인자 VII 또는 인자 VII-관련 폴리펩티드의 농도는 광범위하게 변화할 수 있는데, 즉 무게로 약 0.5% 미만, 통상적으로 또는 적어도 무게로 약 1 % 미만부터 무게로 15 또는 20%까지이고 선택된 투여의 특정 방식에 따라 액체의 부피, 점도 등에 의해 일차적으로 선택될 것이다.
- <92> 그러므로, 혈관내 주입을 위한 전형적인 약제학적 조성물은 250 ml의 멸균 Ringer 용액 및 10 mg의 제제를 함유하도록 만들어질 수 있다. 비경구적으로 투여가능한 조성물을 제조하기 위한 실제 방법은 당업자에게 공지되거나 명확할 것이고 예를 들어, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1990)에 좀더 상세하게 설명된다.
- <93> 본 발명의 제제를 함유한 조성물은 예방적 및/또는 치료적 처리를 위하여 투여될 수 있다. 치료적 적용에서, 조성물은 질병 및 그것의 합병증을 치유, 완화 또는 부분적으로 저지하기에 충분한 양으로, 상기 설명된 것과 같은 질병으로 이미 고통받는 대상에게 투여된다. 이것을 성취하기에 충분한 양은 "치료적 유효량"으로서 정의된다. 각 목적을 위한 유효량은 질병 또는 손상의 격한 정도는 물론이고 대상의 체중 및 일반상태에 의존한다. 그러나 일반적으로, 유효량은 70 kg인 대상에 있어서 하루에 약 0.05 mg부터 약 500 mg의 제제 범위이고, 하루에 약 1.0 mg부터 약 200 mg의 제제의 용량이 더욱 통상적으로 사용된다. 적당한 용량을 결정하는 것은, 매트릭스 수치를 구성하고 매트릭스에서 상이한 점을 시험함으로써 평범한 실험을 이용하여 성취될 수 있다는 것이 이해될 것이다.
- <94> 본 발명의 제제의 국소 송달, 예를 들어 국소 적용과 같은 것은, 분무, 살포, 이중 풍선 카테터, 혈관 이식편 또는 스텐트 (stent)에 결합된 스텐트, 풍선 카테터를 코팅하는데 사용되는 히드로겔, 또는 다른 확립된 방법과 같은 것에 의하여 수행될 수 있다. 어떤 사건에서, 약제학적 조성물은 대상을 효과적으로 치료하기에 충분한 제제의 양을 제공해야 한다.
- <95> 본 발명의 조성물은, 비-인자 VII-관련 응고제 또는 항응고제와 같은, 다른 생물활성제를 더욱 포함할 수 있다.
- <96> 하기 실시예는 본 발명의 예시를 제한하지 않는 것으로서 의도된다.

실시예

- <97> **실시예 1: 변경된 글리코형 패턴을 나타내는 인자 VII 제제의 생산 및 분석**
- <98> 하기의 실험은 변경된 글리코형 패턴을 갖는 인자 VII 제제를 생산하도록 수행된다.
- <99> I. 생산 : 인자 VII-암호화 플라즈미드로 형질전환된 BHK 세포주를 혈청이 없는 현탁 배양액에서 성장하도록 적응시켰다. 세포를 순차적으로 스피너 (spinner) 배양액에서 증식시키고 세포 수가 증가하면, 새로운 배지를 첨가하여 부피를 점차 증가시켰다.
- <100> 최종적으로, 6 ℓ의 종자 배양물을 마크로포러스 (macroporus) Cytopore 1 캐리어 (Pharmacia)를 갖는 100-리터 생산 생물반응기에 접종하고, 그 후 현탁 세포는 캐리어에 부착되었다. 배양물을 36°C에서 6.7 내지 6.9의 pH 및 50%의 DO에서 유지하였다. 세포수가 증가함에 따라 새로운 배지를 첨가하여 생산 생물반응기내의 부피를 점차 증가시켰다. 세포밀집도가 대략 2×10^6 세포/ml에 도달하면, 생산 단계를 시작하고 매 24시간마다 배지

교환을 수행하였다: 세포-함유 캐리어의 침강을 허용하도록 교반을 중지하고, 80%의 배양 상청액을 수확하고 새로운 배지로 대체하였다.

<101> 수확한 배양 상청액을 여과하여 부착되지 않는 세포 및 세포 데브리를 제거한 후 다음 프로세싱을 위해 옮겼다.

<102> 생산 단계 도중에 세포는 3 내지 6 x 10⁶ 세포/ml 및 2 내지 7 mg 인자 VII/리터의 적정농도에 도달하였다.

<103> II. 제조합 인자 VII의 글리코형 패턴의 분석

<104> 하기 제제의 올리고당 패턴은: (a) Part I에서 설명된 것과 같이 생산되는 제조합 인자 VII (n=7) ; 및 두 개의 기준 제제: (b) 소 혈청의 존재에서 BHK 세포에서 생산되는 제조합 인자 VII (n=10) ; 및 (c) 인간 플라즈마로부터 정제된 인자 VII와 비교하였다.

<105> N-연결 올리고당은 화학적 절단 (Oxford GlycoSciences의 GlycoPrep1000 유닛 상에서, 히드라진분해) 또는 효소적 절단 (Boehringer Mannheim등에서 구입한 N-글리코시다제 F)에 의해서 폴리펩티드로부터 분비되었다. 분비된 올리고당을 2-아미노벤즈아미드로 표지하였다 (신호 표지 키트, K-404 사용, Oxford Glyco-Sciences 또는 Glyko). 표지한 올리고당은 Guard 컬럼 (4 x 50 mm, Dionex, P/N 43054)을 가진 CarboPac PA100 컬럼 (4 x 250 mm, Dionex, P/N 43055) 상에서 음이온-교환 HPLC를 이용하여 분석하였다. 컬럼을 150 mM 수산화나트륨으로 평형시키고 0 내지 150 mM 아세트산나트륨, 150 mM 수산화나트륨의 구배로 용리하였다. 올리고당을 330 nm로 여기하고 420 nm로 발산한 형광을 사용하여 검출하였다.

<106> 다양한 인자 VII 올리고당 구조 (Klausen et al., 1998)의 상대 함유량은 음이온-교환 HPLC에서의 카르보히드레이트 피크에 대한 상대 피크 면적으로서 계산하였다. 각 올리고당의 구조적 요소에 기초하여, 하기: (i) 적어도 하나의 시알산을 함유한 사슬; (ii) 어떠한 시알산도 없는 사슬 (즉, 중성) ; (iii) 적어도 하나의 말단 갈락토오스 잔기를 함유한 사슬; (iv) 적어도 하나의 말단 N-아세틸갈락토사민 잔기를 함유한 사슬; 및 (v) 적어도 하나의 캡핑되지 않은 안테나 (즉, 적어도 하나의 말단 갈락토오스 또는 N-아세틸갈락토사민 잔기)를 함유한 사슬 중 하나로 할당하였다. 최종적으로, 각 군에 할당된 올리고당 사슬의 상대 함유량의 총합을 전체 올리고당 사슬의 백분율로서 계산하였다. 이 측정의 표준 편차는 0.08% (당일 편차); 0.7% (일간 편차); 및 0.5% (1-100 μg 간격)이 되도록 계산하였다.

<107> 결과 글리코형 패턴은 하기 표에서 예시한다:

| | (i) | (ii) | (iii) | (iv) | (v) |
|---|-----------|----------|----------|-----------|-----------|
| a | 93.1-98.7 | 1.3-6.9 | 5.9-16.4 | 5.9-8.7 | 11.7-23.9 |
| b | 88.3-92.5 | 7.5-12.9 | 9.4-16.8 | 19.0-28.6 | 30.1-39.0 |
| c | 99.5% | <0.5% | 2-3% | 0% | 2-3% |

<108>

<109> 이 실시예에 따라 (즉, 혈청의 부재에서) 생산된 제조합 인자 VII 제제는 혈청의 존재에서 생산된 제조합 인자 VII 및 인간 플라즈마로부터 분리된 천연 인자 VII 모두의 글리코형 패턴과는 상이한 글리코형 패턴을 나타낸다. 혈청의 부재에서 생산된 제조합 인자 VII의 올리고당은 혈청의 존재에서 생산된 것보다 더 높은 정도로 시알화되고 더 적은 중성 사슬 및 갈락토오스 또는 N-아세틸갈락토사민에서 종결되는 더 적은 사슬을 함유한다.

<110> III. 생체이용률 :

<111> 하기 실험은 상기 (I 및 II)와 같이 생산된 두 개의 인자 VII 제제의 생체이용률과 두 개의 기준 인자 VII 제제 (즉, 혈청의 존재에서 생산된 것) (A 및 B)의 생체이용률을 비교하기 위해 수행하였다.

<112> 염화 나트륨 (7.87 mg/ml), 칼슘 클로라이드 디히드레이트 (1.48 mg/ml), 마니톨 (2.5 mg/ml) 및 폴리소르베이트 80을 함유한 글리실글리신 완충용액 (pH 7.4) 중 25 μg/kg (≈ 100μg/랫트)의 용량으로 시험 제제 또는 기준 제제 중 하나를 8마리 래트의 군에 투여하였다. 초기 투여 후 10분 및 30분에 혈액 샘플을 회수하였다. 샘플로부터 플라즈마를 얻고 ELISA로 인자 VII을 정량하였다. 각 샘플의 생체이용률은 10분 및 30분 샘플에 기초를 둔 인자 VII에 대한 플라즈마 농도 곡선 하의 용량-조절 면적으로서 표현한다 (AUC₁₀₋₃₀/용량). 상대 생체이용률은 시험 및 기준 샘플의 평균 AUC₁₀₋₃₀/용량 간의 비율 X 100으로서 표현한다. 상대 생체이용률에 대한 90% 신뢰성 한계는 제제 간의 차이점에 대한 90% 신뢰성 한계로부터 계산하였다.

<113> 결과는 아래의 표에 요약된다 (위에 설명된 것과 같이 측정된, 각 제제의 % 시알화는 괄호에 나타난다).

| 시험 | 기준 | 상대 생체이용률 | 90% 신뢰성 한계 하부 | 90% 신뢰성 한계 상부 |
|---------------|------------|----------|---------------|---------------|
| I (97.5%) | A (93%) | 128.6 | 116.1 | 141.1 |
| I (97.5%) | B (86%) | 154.9 | 141.2 | 168.5 |
| II (96.7%) | A 93% | 117.3 | 104.8 | 129.8 |
| II (96.7%) | B (86%) | 141.2 | 127.5 | 154.8 |

<114>

<115> 결과는, 예를 들어 93% 및 96 또는 97% 사이에서와 같이, 적어도 하나의 시알산 잔기를 갖는 올리고당 사슬의 부분에서 상대적으로 작은 차이점 조차도 생체이용률 상에 현저한 영향력 (20 내지 30%의 증가)을 가질 수 있다는 것을 가리킨다. 더욱이 % 시알화에서의 10% 증가는 생체이용률에서의 40 내지 50%의 증가를 야기한다.

<116> **실시예 2: 변경된 글리코형 패턴을 나타내는 인자 VII 제제의 분석**

<117> 인자 VII는 실시예 1에서 설명된 것과 같이 생산하되, 인자 VII를 500 l 배양물로부터 수확하는 것을 예외로 하였다. 글리코형 분석은 실시예 1에서 설명된 것과 같이 수행하였다. 세 개의 독립된 제제 (A, B, 및 C)를 분석하고 기준 제제 (D)와 비교하였다.

<118> 생체이용률은 개 모델에서 하기와 같이 측정하였다: 네 군으로 나눈 12 마리의 비글 (Beagle) 개에서 사지 교차 연구로서 실험을 수행하였다. 염화나트륨 (2.92 mg/ml), 칼슘 클로라이드 디히드레이트 (1.47 mg/ml), 마니톨 (30 mg/ml) 및 폴리스orb에이트 80을 함유한 글리실글리신 완충용액 (pH 5.5) 중 $\approx 90 \mu\text{g/kg}$ 의 용량으로 세 개의 시험 제제 A, B 및 C 및 기준 제제 D를 동물에 투여한다. 초기 투여 후 10, 30, 및 60분 및 2, 3, 4, 6 및 8시간에 혈액 샘플을 회수하였다. 샘플로부터 플라즈마를 얻고 ELISA로 인자 VII를 정량하였다.

<119> 각 샘플의 생체이용률은 인자 VII에 대한 플라즈마 농도 곡선 하의 용량-조절 면적으로서 표현한다. 상대 생체이용률은 시험 및 기준 제제의 평균 AUC/용량 간의 비율 X 100으로서 표현하고 상대 생체이용률에 대한 90% 신뢰성 한계를 계산하였다.

<120> 결과는 아래 표에 요약된다. 상기 실시예 1에서 설명된 것과 같이, 각 제제의 % 시알화는 괄호안에 나타난다.

| 시험 | 기준 | 상대 생체이용률 | 90% 신뢰성 한계 하부 | 90% 신뢰성 한계 상부 |
|--------------|--------------|----------|---------------|---------------|
| A (98.7%) | D (88.2%) | 144 | 135 | 153 |
| B (95.9%) | D (88.2%) | 127 | 119 | 136 |
| C (93.1%) | D (88.2%) | 112 | 105 | 120 |

<121>

<122> 결과는 적어도 하나의 시알산 잔기를 갖는 올리고당 사슬의 부분에서의 작은 차이점이 인자 VII의 생체이용률 상에 현저한 영향력을 갖는다는 것을 가리킨다. % 시알화에서의 10% 증가는 세 개의 시험 제제 및 기준 제제에 대하여 선형 관계에 가깝게 생체이용률에서의 30 내지 50%의 증가를 야기한다.

<123> **실시예 3: 변경된 글리코형 패턴을 나타내는 인자 VII 제제**

<124> 하기 실험은 변경된 글리코형 패턴을 갖는 인자 VII 제제를 생산하도록 수행하였다.

<125> I. 세포주의 구성 및 인자 VII 생산 :

<126> 인간 FVII의 발현을 위한 플라스미드 벡터 pLN174를 설명하였다 (Persson and Nielsen, 1996. FEBS Lett. 385: 241-243). 간략하게 말해서, 이것은 삽입된 cDNA의 전사를 위한 마우스 메탈로티오닌 프로모터의 제어 하의 프로펩티드, 및 선별가능한 마커로서의 사용을 위한 SV40 초기 프로모터의 제어 하의 마우스 디히드포폴레이트 환원효소 cDNA를 포함한 인간 FVII를 암호화하는 cDNA 뉴클레오티드 서열을 지닌다.

<127> 감마-카르복시화 인식 서열을 암호화하는 플라스미드 벡터의 구성에 있어서, FVII의 프로펩티드를 포함한 FVII를 암호화하는 cDNA를 함유한 클로닝 벡터 (pBluescript 11 KS+, Stratagene)를 사용하였다 (pLN171). (Persson

et al. 1997. *J. Biol. Chem.* 272: 1991919924). 이 클로닝 벡터를 이용한 역 PCR-중재 돌연변이 유발로써 FVII를 암호화하는 cDNA 내로 정지 코돈을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 FVII의 프로펩티드 뒤에 삽입하였다. 주형 플라스미드는 NaOH의 처리로써 변형시킨 후 Pwo (Boehringer-Mannheim) 및 Taq (Perkin-Elmer) 중합효소로 하기 프라이머로써 PCR 하였다:

- <128> a) 5'-AGC GTT TTA GCG CCG GCG CCG GTG CAG GAC-3'
- <129> b) 5'-CGC CGG CGC TAA AAC GCT TTC CTG GAG GAG CTG CGG CC-3'

<130> 잔여 주형 DNA를 효소절단하기 위하여 결과 혼합물을 DpnI으로 효소절단하고 PCR 생성물로 *Escherichia coli*를 형질전환하였다. 서열분석으로써 돌연변이의 존재에 대하여 클론을 스크리닝하였다. 올바른 클론 유래의 cDNA를 BamHI-EcoRI 절편으로서 발현 플라스미드 pcDNA3 (Invitrogen)로 옮겼다. 결과 플라스미드를 pLN329로 명명하였다. CHO K1 세포 (ATCC CCI61)는 Fugene6 방법 (Boehringer-Mannheim)으로 동량의 pLN174 및 pLN329로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션체는 1 μM의 메토티렉세이트 및 0.45 mg/ml의 G-418를 첨가하여 선택하였다. 트랜스펙션체의 풀 (pool)은 제한 희석으로 클로닝하고 클론 유래의 FVII 발현을 측정하였다.

<131> 고생산 클론을 더욱 서브클로닝하고 10% 소태아 혈청을 갖는 Dulbecco-modified Eagle's medium에서 2.4 pg/세포/일의 특정 FVII 발현을 갖는 클론 E11을 선택하였다. 동물 유래 성분이 없는 시중구입 가능한 CHO 배지 (JRH Bioscience)에서 클론을 무혈청 현탁 배양에 적응시켰다.

<132> 적응시킨 세포는 스피너 배양물에서 순차적으로 증식시키고 세포 수가 증가함에 따라, 새로운 배지를 첨가하여 부피를 점차 증가시켰다. 25일 후, 50 리터 생반응기 내로 6 ℓ의 스피너 배양물을 접종하였다. 생반응기 내에서 세포를 증식시키고, 세포 수가 증가함에 따라, 새로운 배지를 첨가하여 부피를 점차 증가시켰다.

<133> 최종적으로, 50 ℓ의 중자 배양물을 마크로포러스 (macroporus) Cytopore 1 캐리어 (Pharmacia)를 갖는 500-리터 생산 생물반응기에 접종하고, 그 후 현탁 세포는 캐리어에 부착되었다. 배양물을 36°C에서 7.0 내지 7.1의 pH 및 포화의 50%의 DOT에서 유지하였다. 세포수가 증가함에 따라 새로운 배지를 첨가하여 생산 생물반응기내의 부피를 점차 증가시켰다. 세포밀집도가 대략 10-12 x 10⁵ 세포/ml에 도달하면, 생산 단계를 시작하고 매 24시간마다 배지 교환을 수행하였다: 세포-함유 캐리어의 침강을 허용하도록 교반을 중지하고, 80%의 배양 상청액을 수확하고 새로운 배지로 대체하였다. 수확한 배양 상청액을 여과하여 부착되지 않는 세포 (즉, 캐리어에 고정되지 않은 세포)를 제거한 후 다음 프로세싱을 위해 옮겼다.

<134> 생산 단계 도중에 세포는 2 내지 3 x 10⁷ 세포/ml 및 8 mg 인자 VII/리터의 적정농도에 도달하였다.

<135> II. 글리코형 분석 :

<136> A. 상기 설명된 것과 같이 생산된 인자 VII 제제의 올리고당 패턴 (a)은 (b) 소혈청의 존재에서 BHK 세포에서 생산된 재조합 인자 VII 제제 및 (c) 인간 플라즈마로부터 정제된 인자 VII 제제의 그것과 비교하였다. 사용된 방법은 본질적으로 실시예 1에서 설명된 것과 같다.

<137> 결과는 아래 표에 나타난다. 올리고당 할당은 다음과 같다 : (i) 적어도 하나의 시알산을 함유한 사슬; (ii) 시알산이 없는 (즉, 중성인) 사슬; (iii) 적어도 하나의 말단 갈락토오스 잔기를 함유한 사슬; (iv) 적어도 하나의 N-아세틸갈락토사민 잔기를 함유한 사슬; 및 (v) 적어도 하나의 캡핑되지 않은 안테나 (즉, 적어도 하나의 말단 갈락토오스 또는 N-아세틸갈락토사민 잔기)를 함유한 사슬.

| | (i) | (ii) | (iii) | (iv) | (v) |
|---|-----------|----------|----------|-----------|-----------|
| a | 95.2 | 4.8 | 22.9 | 0.1 | 23.0 |
| b | 88.3-92.5 | 7.5-12.9 | 9.4-16.8 | 19.0-28.6 | 30.1-39.0 |
| c | 99.5% | <0.5% | 2-3% | 0% | 2-3% |

<139> B. 본 실시예에서 설명된 것과 같이 생산된 다섯 개의 독립적인 인자 VII 제제의 올리고당 패턴 (a)은 실시예 1에서 설명된 분석 방법을 이용하여, (b) 소 혈청의 존재에서 BHK 세포에서 생산된 재조합 인자 VII 제제 및 (c) 인간 플라즈마로부터 정제된 인자 VII 제제와 비교하였다.

<140> 각 올리고당의 구조적 요소에 기초하여, 다음: (i) 적어도 하나의 시알산을 함유하는 사슬; (ii) 시알산이 없는 (즉, 중성인) 사슬; (iii) 안테나에 연결된 적어도 하나의 푸코오스를 함유하는 사슬 중 하나로 할당하였다. 최종적으로, 각 군에 할당된 올리고당 사슬의 상대 함유량의 합은 전체 올리고당 사슬의 백분율로서 계산하였다.

이 측정의 표준 편차는 0.08% (당일 편차); 0.7% (일간 편차); 및 0.5% (1-100 µg 간격)으로 계산하였다.

<141> 결과 글리코형 패턴은 하기 표에 예시된다:

| | (i) | (ii) | (iii) |
|---|------------|-----------|-----------|
| a | 89.0-97.9% | 2.1-11.0% | 6.3-21.3% |
| b | 88.3-92.5% | 7.5-12.9% | 0% |
| c | 99.5% | <0.5% | 0% |

<142>

<143> 실시예 1에 따라 생산된 (즉, CHO 세포주에 의해 혈청의 부재에서 생산된) 재조합 인자 VII 제제는 혈청의 존재에서 생산된 재조합 인자 VII의 글리코형 및 인간 플라즈마로부터 분리된 천연 인자 VII 둘 모두와 상이한 글리코형 패턴을 나타낸다. CHO 282.4 세포주에 의하여 혈청의 부재에서 생산된 재조합 인자 VII의 올리고당은 안테나에 연결된 푸코오스를 갖는 구조를 포함하는데, 이는 기준 제제 양쪽에는 없다. 두 개의 구조를 정제하고, 위에 설명된 것과 같이 매트릭스 지원 레이저 이탈 이온화 질량 분석법, 결합 특이적 푸코시다제 효소로의 처리 및 음이온-교환 HPLC로써 특성결정하였다. 두 구조는 시알 Lewis x 구조, 즉, 시알화된 올리고당에서 안테나형 N-아세틸글루코사민에 α1->3 연결된 푸코오스를 함유하는 것으로 나타났다.

<144> III. 생물활성 :

<145> 본 실시예에서 설명된 것과 같이 생산된 다섯 개의 인자 VII은 (a) 트롬빈 생성 및 (b) 조직 인자 (TF)로의 결합에 대하여 분석하고 혈청의 존재에서 BHK 세포로부터 생산된 재조합 인자 VII (기준)와 비교하였다. 하기 표는 글리코형 패턴 (시알산을 함유한 올리고당 사슬의 % 및 푸코실화 안테나를 함유한 %) 및 두 생물활성을 상호연관시킨다.

| 인자 VII 제제 | 올리고당 패턴 | | 트롬빈 생성 (기준의%) | TF 결합 Kd (nM) |
|-----------|---------|-------|---------------|---------------|
| | %시알화 | %푸코스화 | | |
| 1 | 98 | 6 | 125 | 2.8 |
| 2 | 94 | 13 | 123 | 2.0 |
| 3 | 93 | 14 | 126 | 1.8 |
| 4 | 88 | 16 | 145 | 3.3 |
| 5 | 86 | 21 | 158 | 2.8 |
| 기준 | 86-93 | 0 | 100 | 2.2-6.6 |

<146>

<147> 결과는 푸코실화된 안테나를 가진 인자 VII 제제가 푸코실화된 안테나가 없는 인자 VII 보다 (트롬빈 생성 등에 의하여 나타날 때) 더 높은 TF-독립성 인자 VII 활성을 나타낸다는 것을 가리킨다.

<148> **실시예 4: 시험관 내 가수분해 검정**

<149> 하기 방법은 인자 VIIa 생물활성을 검정하는데에 이용할 수 있다. 검정은 마이크로티터 플레이트 (MaxiSorp, Nunc, Denmark)에서 수행한다. 최종 농도 1mM의 발색성 기질 D-Ile-Pro-Arg-p-니트로아닐리드 (S-2288, Chromogenix, Sweden)를 0.1 M NaCl, 5 mM CaCl₂ 및 1 mg/ml 소혈청 알부민을 함유한 50 mM Hepes, pH 7.4 중 인자 VIIa (최종 농도 100 nM)에 첨가한다. SpectraMax™ 340 플레이트 판독기 (Molecular Devices, USA)에서 405 nm에서의 흡광도를 연속적으로 측정한다. 20 분 인큐베이션 동안 발생된 흡광도는, 효소를 함유하지 않은 블랭크 웰에서의 흡광도의 공제 후, 시험 및 기준 인자 VIIa 간의 비율을 계산하는데에 사용한다.

<150> 실시예 5 : 시험관 내 단백질 가수분해 검정

<151> 하기 방법은 인자 VIIa 생물활성을 검정하는데에 이용할 수 있다. 검정은 마이크로티터 플레이트 (MaxiSorp, Nunc, Denmark)에서 수행한다. 0.1 M NaCl, 5 mM CaCl₂ 및 1 mg/ml 소혈청 알부민을 함유한 100 µl의 50 mM Hepes, pH 7.4 중 인자 VIIa (10 nM) 및 인자 X (0.8 µM)을 15분동안 인큐베이션한다. 그 다음, 0.1 M NaCl, 20 mM EDTA 및 1 mg/ml 소혈청 알부민을 함유한 50µl의 50 mM Hepes, pH 7.4를 첨가하여 인자 X 절단을 정지한다. 생성된 인자 Xa의 양은 발색성 기질 Z-D-Arg-Gly-Arg-p-니트로아닐리드 (S-2765, Chromogenix, Sweden)를, 최종 농도 0.5 mM로 첨가하여 측정한다. 405 nm에서의 흡광도는 SpectraMax™ 340 플레이트 판독기 (Molecular Devices, USA)에서 연속적으로 측정한다. 10분 동안 발생된 흡광도는, FVIIa를 함유하지 않은 블랭크 웰에서의 흡광도의 공제 후, 시험 및 기준 인자 VIIa의 단백질 가수분해 활성 간의 비율을 계산하는데에 이용한다.

- <152> 여기에서 지칭된 모든 특허, 특허 출원, 및 참고문헌은 그 전문이 참고문헌으로서 여기에 수록된다.
- <153> 본 발명의 많은 변화는 위에 상술된 설명의 견지에서 당업자들에게 스스로 제시될 것이다. 이러한 명확한 변화는 부가된 청구범위의 전체 의도된 범위 내에 있다.