



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0124950
(43) 공개일자 2024년08월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/19 (2006.01) A61K 38/48 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01) A61K 47/10 (2017.01)
A61K 47/18 (2017.01) A61K 47/26 (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/19 (2013.01)
A61K 38/482 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7022975
(22) 출원일자(국제) 2022년12월21일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년07월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/082179
(87) 국제공개번호 WO 2023/122691
국제공개일자 2023년06월29일
(30) 우선권주장
63/293,013 2021년12월22일 미국(US)

(71) 출원인
버텍스 파마슈티칼스 인코포레이티드
미국 매사추세츠주 02210 보스턴 15쓰 플로어 노
던 애비뉴 50
(72) 발명자
산 빙
미국 캘리포니아 95129 산 호세 도일 로드 5139
코넬리 브라이언 데이비드
미국 캘리포니아 94705 버클리 웨스트무어랜드 드
라이브 7100
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태평양

전체 청구항 수 : 총 69 항

(54) 발명의 명칭 보체 인자-I 제제

(57) 요약

본원에는 야생형 보체 인자 I(CFI) 및 이의 변이체를 포함하는 약학적으로 허용가능한 제제가 제공되며; 일부 실시형태에서, 야생형 CFI 및 이의 변이체는 융합 작제물, 예를 들어 인간 혈청 알부민을 포함하는 융합 작제물의 일부이다. 제제는 액체 또는 동결건조 상태 중 어느 하나에서의 저장 중 급격한 스트레스에 대해 CFI를 안정화한다. 또한 본원에는 제제의 제조 방법, 및 질환의 치료에서의 제제의 사용 방법이 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/02 (2013.01)

A61K 47/10 (2013.01)

A61K 47/183 (2013.01)

A61K 47/26 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

A61P 27/02 (2018.01)

C12Y 304/21045 (2013.01)

(72) 발명자

발란 시부

미국 캘리포니아 94065 레드우드 시티 비콘 쇼어
드라이브 310

채터지 안주

미국 캘리포니아 94553 마르티네즈 도니골 웨이 22

명세서

청구범위

청구항 1

야생형 보체 인자 I(CFI) 또는 이의 변이체(CFI 변이체)를 포함하는 제제로서,
제제는 완충제, 계면활성제, 및 장성 개질제를 포함하는 제제.

청구항 2

청구항 1에 있어서,
제제는 하나 이상의 벌크화제, 동결보존제, 및 동결건조보존제를 포함하는 제제.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,
CFI 또는 이의 변이체의 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 300 mg/ml로 존재하는 제제.

청구항 4

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,
CFI 또는 이의 변이체의 농도는 약 150 mg/ml로 존재하는 제제.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,
완충제는 아세테이트, 히스티딘, 또는 석시네이트를 포함하는 제제.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서,
완충제는 소듐 아세테이트, 히스티딘 히드로클로라이드, 또는 소듐 석시네이트인 제제.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서,
완충제는 약 1 mM 내지 약 50 mM로 존재하는 제제.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,
계면활성제는 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80/20, 또는 폴록사머 F68인 제제.

청구항 9

청구항 8에 있어서,
계면활성제는 약 0.001% 내지 약 0.1% v/v로 존재하는 제제.

청구항 10

청구항 9에 있어서,
계면활성제는 약 0.01% 내지 약 0.03% v/v로 존재하는 제제.

청구항 11

청구항 10에 있어서,

계면활성제는 약 0.02% v/v로 존재하는 제제.

청구항 12

청구항 1 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서,

장성 개질제는 소르비톨, 트레할로오스, 소듐 클로라이드, 또는 아르기닌 히드로클로라이드인 제제.

청구항 13

청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서,

벌크화제는 트레할로오스 또는 글리신인 제제.

청구항 14

청구항 12에 있어서,

소르비톨은 약 1% 내지 약 10% v/v로 존재하는 제제.

청구항 15

청구항 14에 있어서,

소르비톨은 약 5% v/v로 존재하는 제제.

청구항 16

청구항 12에 있어서,

트레할로오스는 약 1% 내지 약 15% v/v로 존재하는 제제.

청구항 17

청구항 16에 있어서,

트레할로오스는 약 10% v/v로 존재하는 제제.

청구항 18

청구항 12에 있어서,

소듐 클로라이드는 약 1 mM 내지 약 500 mM로 존재하는 제제.

청구항 19

청구항 18에 있어서,

소듐 클로라이드는 약 150 mM로 존재하는 제제.

청구항 20

청구항 12에 있어서,

아르기닌 히드로클로라이드는 약 10 mM 내지 약 200 mM로 존재하는 제제.

청구항 21

청구항 20에 있어서,

아르기닌 히드로클로라이드는 약 70 mM로 존재하는 제제.

청구항 22

청구항 20에 있어서,
아르기닌 히드로클로라이드는 약 135 mM로 존재하는 제제.

청구항 23

청구항 13에 있어서,
글리신은 약 1% 내지 약 5% v/v로 존재하는 제제.

청구항 24

청구항 23에 있어서,
글리신은 약 2%로 존재하는 제제.

청구항 25

청구항 13에 있어서,
글리신은 약 1 mM 내지 약 100 mM로 존재하는 제제.

청구항 26

청구항 25에 있어서,
글리신은 60 mM로 존재하는 제제.

청구항 27

청구항 2 내지 청구항 26 중 어느 한 항에 있어서,
동결보존제 또는 동결건조보존제는 글루코오스, 수크로오스, 글리신, 소르비톨, 트레할로오스, 수크로오스, 또는 만니톨로부터 선택되는 제제.

청구항 28

청구항 27에 있어서,
글루코오스는 약 1% 내지 약 10% v/v로 존재하는 제제.

청구항 29

청구항 28에 있어서,
글루코오스는 약 4% v/v로 존재하는 제제.

청구항 30

청구항 27에 있어서,
수크로오스는 약 1% 내지 약 10% v/v로 존재하는 제제.

청구항 31

청구항 28에 있어서,
수크로오스는 약 4% v/v로 존재하는 제제.

청구항 32

청구항 28에 있어서,
수크로오스는 약 5% v/v로 존재하는 제제.

청구항 33

청구항 28에 있어서,
수크로오스는 약 8% v/v로 존재하는 제제.

청구항 34

청구항 27에 있어서,
글리신은 약 50 mM 내지 약 150 mM로 존재하는 제제.

청구항 35

청구항 34에 있어서,
글리신은 약 120 mM로 존재하는 제제.

청구항 36

청구항 27에 있어서,
트레할로오스는 약 1% 내지 약 10% v/v로 존재하는 제제.

청구항 37

청구항 36에 있어서,
트레할로오스는 약 4% v/v로 존재하는 제제.

청구항 38

청구항 27에 있어서,
만니톨은 약 1 mM 내지 약 100 mM로 존재하는 제제.

청구항 39

청구항 38에 있어서,
만니톨은 약 60 mM로 존재하는 제제.

청구항 40

청구항 27에 있어서,
소르비톨은 약 1% 내지 약 5% v/v로 존재하는 제제.

청구항 41

청구항 40에 있어서,
소르비톨은 약 2.5% v/v로 존재하는 제제.

청구항 42

청구항 1 내지 청구항 41 중 어느 한 항에 있어서,
표 2.2 또는 표 3.3에 제시된 제제로부터 선택되는 제제.

청구항 43

청구항 1 내지 청구항 42 중 어느 한 항에 있어서,
제제는 고체 형태인 제제.

청구항 44

청구항 1 내지 청구항 42 중 어느 한 항에 있어서,
제제는 동결건조 형태인 제제.

청구항 45

청구항 1 내지 청구항 42 중 어느 한 항에 있어서,
제제는 액체 형태인 제제.

청구항 46

청구항 1 내지 청구항 45 중 어느 한 항에 있어서,
제제는 $-80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $0^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 또는 $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 중 임의의 하나 이상에서 안정한 제제.

청구항 47

청구항 1 내지 청구항 46 중 어느 한 항에 있어서,
제제는 적어도 1주, 적어도 1개월, 또는 적어도 1년 동안 안정한 제제.

청구항 48

청구항 1 내지 청구항 47 중 어느 한 항에 있어서,
제제는 야생형 CFI를 포함하는 제제.

청구항 49

청구항 1 내지 청구항 47 중 어느 한 항에 있어서,
제제는 야생형 CFI에 대한 적어도 하나의 변형을 포함하는 CFI 변이체를 포함하고, CFI 변이체는 보체 시스템을 조절할 수 있고, CFI 변이체는 야생형 CFI에 비해 적어도 하나의 개선된 특징을 갖는 제제.

청구항 50

청구항 49에 있어서,
개선된 특징은 반감기 또는 생체이용률의 증가, 또는 활성, 기질 특이성, 효능, 기질 친화성, 보조인자 친화성 및 촉매 능력 중 임의의 하나 이상의 증가 또는 감소로부터 선택되는 제제.

청구항 51

청구항 50에 있어서,
개선된 특징은 활성의 증가인 제제.

청구항 52

청구항 51에 있어서,
활성의 증가는 야생형 CFI에 비해, C3b 및/또는 C4b의 절단을 증가시키는 것을 포함하는 제제.

청구항 53

청구항 49에 있어서,
CFI 변이체는 서열 번호 1 또는 서열 번호 5에 제시된 아미노산 서열을 갖는 야생형 CFI에 상응하는 적어도 하나의 변형을 포함하는 제제.

청구항 54

청구항 49에 있어서,

CFI 변이체는 표 2에 제시된 것으로부터 선택되는 제제.

청구항 55

청구항 1 내지 청구항 54 중 어느 한 항에 있어서,

야생형 CFI 또는 CFI 변이체는 제1 성분과 적어도 하나의 제2 성분을 포함하는 융합 작제물의 제1 성분이고, 야생형 CFI 또는 CFI 변이체는 제2 성분에 융합되는 제제.

청구항 56

청구항 55에 있어서,

융합 작제물의 제2 성분은 단백질인 제제.

청구항 57

청구항 55 또는 청구항 56에 있어서,

융합 작제물의 제2 성분은 반감기 연장제인 제제.

청구항 58

청구항 57에 있어서,

반감기 연장제는 개질된 알부민 또는 알부민 유도체인 제제.

청구항 59

청구항 57에 있어서,

반감기 연장제는 야생형 알부민인 제제.

청구항 60

청구항 57에 있어서,

반감기 연장제는 인간 혈청 알부민, 또는 이의 변이체인 제제.

청구항 61

청구항 60에 있어서,

융합 작제물은 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 제제.

청구항 62

야생형 CFI 또는 이의 변이체(CFI 변이체)를 포함하는 융합 작제물을 포함하는 제제로서,

야생형 CFI 또는 CFI 변이체는 인간 혈청 알부민에 융합되고, 제제는 표 2.2 또는 표 3.3에 제시된 것으로부터 선택되는 제제.

청구항 63

청구항 62에 있어서,

융합 작제물은 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 제제.

청구항 64

청구항 1 내지 청구항 63 중 어느 한 항의 제제를 치료적 유효량으로 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 치료를 필요로 하는 대상체에서 병태를 치료하는 방법.

청구항 65

청구항 64에 있어서,
병태는 안구 병태인 방법.

청구항 66

청구항 64에 있어서,
병태는 비-안구 병태인 방법.

청구항 67

청구항 64 내지 청구항 66 중 어느 한 항에 있어서,
대상체는 인간인 방법.

청구항 68

청구항 64 내지 청구항 67 중 어느 한 항에 있어서,
투여 경로는 피하인 방법.

청구항 69

청구항 64 내지 청구항 67 중 어느 한 항에 있어서,
투여 경로는 정맥내인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 본 출원은 2021년 12월 22일자에 출원된 미국 임시 출원 제63/293,013호의 우선권을 주장하며, 이의 내용은 이의 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 전자 서열목록에 대한 참조

[0004] 전자 서열목록(VTEX_707_01WO_SeqList_ST26.xml; 크기: 31,757 바이트; 및 생성일자: 2022년 12월 17일)의 내용은 이의 전체가 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0005] 보체 인자 I(CFI)는 세포 결합된 또는 유체 상 C3b 및 C4b를 절단함으로써 보체 활성화를 조절하는, 보체 시스템의 가용성 단백질이다. 이는 인간 혈액에서 순환하고 보체 시스템의 고전 경로, 력틴 경로, 및 대체 경로 사이의 균형을 유지하는 역할을 하는 가용성 당단백질이다. 조절 장애가 있는 CFI, 돌연변이되고 조절 장애가 있는 CFI, 및 CFI 결핍은 보체 시스템이 수반된 질환에서 관련이 있다. 보체 시스템을 조절하는 데 유용한 약학적으로 허용가능한 CFI 제제가 요구된다. 본원에는 이러한 요구를 해결하는 제제를 제공한다.

발명의 내용

[0006] 본 개시내용은 야생형 보체 인자 I(CFI) 또는 CFI 변이체, 및 이의 융합 단백질을 포함하는 제제를 제공한다. 제공된 제제는 급격한 스트레스에 대해 활성 성분을 안정화시키고, 액체 및 동결건조 상태 둘 모두에서 저장을 허용한다. 또한 본원에는 제제의 제조 방법, 및 질환의 치료에서의 제제의 사용 방법이 제공된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0007] 본 개시내용은 야생형 CFI 또는 CFI 변이체, 및 이의 융합 단백질을 포함하는 제제를 제공한다. 제공된 제제는 급격한 스트레스에 대해 활성 성분을 안정화시키고, 액체와 동결건조 상태 둘 모두에서 저장을 허용한다. 또한 본원에는 제제의 제조 방법, 및 질환의 치료에서의 제제의 사용 방법이 제공된다.

[0008] I. 약학적으로 허용가능한 제제

[0009] 본원에 기재된 약학적으로 허용가능한 제제는 약학적으로 허용가능한 저장 조건을 허용하는 농도 범위에서 본 개시내용의 야생형 CFI 또는 CFI 변이체, 및 이의 융합 작제물(본원에서 "활성 성분" 또는 "활성 약학 성분"으로 상호교환적으로 지칭됨)에 안정화 특성을 제공한다. 안정화 특성은 예를 들어 분해 방지, 농도 유지, 응집 방지, 및/또는 생활성 유지일 수 있다.

[0010] 본 개시내용의 제제는 야생형 CFI, CFI 변이체, 야생형 CFI를 포함하는 융합 작제물(예를 들어, CFI-HSA), 또는 CFI 변이체를 포함하는 융합 작제물(예를 들어, 표 2의 임의의 CFI 변이체-HSA 융합), 완충제, 장성 개질제, 계면활성제, 및 추가로 선택적으로 벌크화제, 동결보존제, 동결건조보존제, 및/또는 안정화제를 포함한다.

[0011] 제제는 고체(건조) 형태(예를 들어, 동결건조 케이크 또는 동결보존됨)로서 활성 성분의 저장을 지지하기 위해 고안될 수 있다. 일부 실시형태에서, 제제는 동결건조물이다. 일부 실시형태에서, 제제는 액체 제제이다.

[0012] 제제는 다양한 농도에서 액체로서 용액 중 활성 성분의 저장을 지지(예를 들어, 안정성, 활성을 유지하면서)하기 위해 고안될 수 있다. 농도는 상이한 유형의 투여(예를 들어, 피하 또는 정맥내)에서 사용하기 위해 제제에서 조정될 수 있다. 예를 들어, 약 10 mg/mL 내지 약 300 mg/mL, 예를 들어 약 10 mg/mL, 약 15 mg/mL, 20 mg/mL, 약 25 mg/mL, 30 mg/mL, 약 35 mg/mL, 40 mg/mL, 약 45 mg/mL, 약 50 mg/mL, 약 55 mg/mL, 약 60 mg/mL, 약 65 mg/mL, 약 70 mg/mL, 약 75 mg/mL, 약 80 mg/mL, 약 85 mg/mL, 약 90 mg/mL, 약 95 mg/mL, 약 100 mg/mL, 약 105 mg/mL, 약 110 mg/mL, 약 115 mg/mL, 약 120 mg/mL, 약 125 mg/mL, 약 130 mg/mL, 약 135 mg/mL, 약 140 mg/mL, 약 145 mg/mL, 약 150 mg/mL, 약 155 mg/mL, 약 160 mg/mL, 약 165 mg/mL, 약 175 mg/mL, 약 180 mg/mL, 약 185 mg/mL, 약 190 mg/mL, 약 195 mg/mL, 약 200 mg/mL, 약 205 mg/mL, 약 210 mg/mL, 약 215 mg/mL, 약 220 mg/mL, 약 225 mg/mL, 약 230 mg/mL, 약 235 mg/mL, 약 245 mg/mL, 약 250 mg/mL, 약 255 mg/mL, 약 260 mg/mL, 약 260 mg/mL, 약 265 mg/mL, 약 270 mg/mL, 약 275 mg/mL, 약 280 mg/mL, 약 285 mg/mL, 약 290 mg/mL, 약 295 mg/mL, 또는 약 300 mg/mL의 활성 성분은 액체 용액으로서 제제에 저장될 수 있다. 일부 실시형태에서, 제제는 약 50 mg/mL의 농도의 활성 성분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제제는 약 100 mg/mL의 농도의 활성 성분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제제는 150 mg/mL 초과 농도의 활성 성분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제제는 약 170 mg/mL의 농도의 활성 성분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제제는 약 190 mg/mL의 농도의 활성 성분을 포함한다.

[0013] 본 개시내용의 제제는 활성 성분이 하기 온도: $-80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $0^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 또는 $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 중 임의의 하나 이상에서 안정성(예를 들어, 활성)을 유지하도록 한다.

[0014] 본 개시내용의 제제는 활성 성분이 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월, 적어도 7개월, 적어도 8개월, 적어도 9개월, 적어도 10개월, 적어도 11개월, 적어도 1년, 적어도 2년 이상 동안 안정성(예를 들어, 활성)을 유지하도록 한다.

[0015] 본원에 기재된 제제의 pH는 본원에 기재된 CFI 변이체 및 융합 작제물에 안정화 특성을 제공하는 임의의 pH이다. 일부 실시형태에서, 제제는 약 5 내지 약 7.5의 pH를 포함한다. pH는 예를 들어 약 pH 5.0, 약 pH 5.1, 약 pH 5.2, 약 pH 5.3, 약 pH 5.4, 약 pH 5.5, 약 pH 5.6, 약 pH 5.7, 약 pH 5.8, 약 pH 5.9, 약 pH 6.0, 약 pH 6.1, 약 pH 6.2, 약 pH 6.2, 약 pH 6.3, 약 pH 6.4, 약 pH 6.5, 약 pH 6.6, 약 pH 6.7, 약 pH 6.8, 약 pH 6.9, 약 pH 7, 약 pH 7.1, 약 pH 7.2, 약 pH 7.3, 약 pH 7.4, 또는 약 pH 7.5일 수 있다.

[0016] 제제는 약학적으로 허용가능한 완충제를 포함한다. 완충제는 제제의 pH를 목적하는 범위로 유지하기 위해 사용될 수 있다. 임의의 적합한 완충제가 본 개시내용의 제제에서 사용될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 완충제의 예는 히스티딘, 아세테이트, 시트레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 글루타메이트, 글리신, 바이카르보네이트, 설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 및 히드록시메틸아미노메탄(tris) 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 완충제는 약 1 mM 내지 약 50 mM로 존재한다. 일부 실시형태에서, 완충제는 약 20 mM로 존재한다. 일부 실시형태에서, 완충제는 히스티딘, 예를 들어 히스티딘 히드로클로라이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 완충제는 아세테이트, 예를 들어 소듐 아세테이트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 완충제는 석시네이트, 예를 들어 소듐 석시네이트를 포함한다.

[0017] 제제는 때때로 습윤제 및/또는 가용화제로 지칭된 계면활성제를 포함한다. 비제한적으로, 계면활성제 부형제는 생물학적 분자의 용해도와 생체이용률을 조절하고, 투여 형태에서 생물학적 분자의 안정성을 증가시키며, 바람직한 다형성 형태를 유지하기 위해 사용될 수 있다. 계면활성제의 예는 폴리소르베이트 20(PS20, Tween 20), 폴리소르베이트 80(PS80, Tween 80), PS80/20, 플록사머(Pluronic F68 및 F127), Triton X-100, Brij 30, 및

Brij 35를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 제제는 계면활성제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 계면활성제는 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80이다. 일부 실시형태에서, 제제는 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리소르베이트 20은 약 0.01% 내지 약 0.05%이다. 일부 실시형태에서, 폴리소르베이트는 약 0.02%이다. 일부 실시형태에서, 제제는 폴리소르베이트 80을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리소르베이트 80은 약 0.01% 내지 약 0.05%이다. 일부 실시형태에서, 폴리소르베이트 80은 약 0.02%이다.

[0018] 제제는 때때로 또한 양성 강화제, 등장화제 또는 등장화 작용제로 지칭될 수 있는 양성 개질제를 포함한다. 양성 개질제는 대상체에게 투여된 경우 제제의 삼투압이 목적하지 않는 세포 용해와 같은 임의의 유해 효과를 유발하지 않도록 제제의 삼투압을 조정하는 데 사용된다. 본 개시내용의 활성 성분과 상용성인 임의의 약학적으로 허용가능한 양성 개질제는 본원에 기재된 제제에서 사용하기에 적합할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 양성 개질제는 예를 들어 만니톨, 소르비톨, 락토오스, 텍스트로오스, 트레할로오스, 소듐 클로라이드, 포타슘 클로라이드, 글리세롤, 글리세린, 또는 아르기닌 히드로클로라이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제제는 양성 개질제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 양성 개질제는 아르기닌 히드로클로라이드이다. 일부 실시형태에서, 제제는 아르기닌 히드로클로라이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 아르기닌 히드로클로라이드는 약 10 mM 내지 약 200 mM이다. 일부 실시형태에서, 아르기닌 히드로클로라이드는 약 70 mM이다. 일부 실시형태에서, 아르기닌 히드로클로라이드는 약 135 mM이다. 일부 실시형태에서, 소르비톨은 양성 개질제이고, 소르비톨은 약 1% 내지 약 10% v/v, 예를 들어 약 5% v/v로 존재한다. 일부 실시형태에서, 양성 개질제는 트레할로오스이고, 트레할로오스는 약 1% 내지 약 15% v/v, 예를 들어 약 10% v/v로 존재한다. 일부 실시형태에서, 양성 개질제는 소듐 클로라이드이고, 이는 약 1 mM 내지 약 500 mM, 예를 들어 약 150 mM로 존재한다. 일부 실시형태에서, 양성 개질제는 비-이온성 완충제의 경우 소르비톨 또는 트레할로오스이고, 이온성 완충제의 경우 소듐 클로라이드이다.

[0019] 제제는 벌크화제, 예를 들어 트레할로오스 또는 글리신을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 벌크화제는 글리신이고, 이는 약 1% 내지 약 5% v/v, 예를 들어 약 2%로 제제에 존재한다. 일부 실시형태에서, 벌크화제는 글리신이고, 이는 약 1 mM 내지 약 100 mM, 예를 들어 약 60 mM로 제제에 존재한다.

[0020] 제제는 동결보존제 및/또는 동결건조보존제를 포함할 수 있다. 동결보존제 및 동결건조보존제는 냉동 및 해동 사이클 중 변성으로부터 생물학적 분자를 보호하도록 제제에 포함된다. 이는 또한 생물학적 완전성을 보존하는 것, 예를 들어 동결건조(즉, 냉동 건조) 및 재구성 중 생활성을 유지하는 것을 보조할 수 있다. 일부 경우에, 동결보존제 및 동결건조보존제는 상호교환적으로 지칭될 수 있다. 본 개시내용의 CFI 변이체 및 융합 작제물을 포함하는 제제에 안정화 특성을 제공할 수 있는 임의의 약학적으로 허용가능한 동결보존제 및/또는 동결건조보존제가 사용될 수 있다. 동결보존제 및 동결건조보존제의 비제한적인 예는 폴리올, 이당류, 다당류, 글루코오스, 글리신, 만니톨, 소르비톨, 수크로오스, 트레할로오스, 및 텍스트란 40을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제제는 동결보존제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 동결보존제는 적어도 하나의 수크로오스, 글리신, 소르비톨, 트레할로오스, 및 만니톨이다. 일부 실시형태에서, 동결보존제는 수크로오스이다. 일부 실시형태에서, 수크로오스는 약 2% 내지 약 10%이다. 일부 실시형태에서, 수크로오스는 약 4% 내지 약 5%이다. 일부 실시형태에서, 수크로오스는 약 8.5%이다. 일부 실시형태에서, 동결보존제는 글리신이다. 일부 실시형태에서, 글리신은 약 50 mM 내지 약 150 mM, 예를 들어 약 120 mM이다. 일부 실시형태에서, 글리신은 약 120 mM이다. 일부 실시형태에서, 동결보존제는 소르비톨이다. 일부 실시형태에서, 글루코오스는 약 1% 내지 약 10% v/v, 예를 들어 약 4% v/v로 제제에 존재한다. 일부 실시형태에서, 소르비톨은 약 1% 내지 약 5%로 존재한다. 일부 실시형태에서, 소르비톨은 약 2.5% v/v이다. 일부 실시형태에서, 트레할로오스는 약 1% 내지 약 10% v/v, 예를 들어 약 4% v/v로 존재한다. 일부 실시형태에서, 소르비톨은 약 2.5%이다. 일부 실시형태에서, 동결보존제는 만니톨이다. 일부 실시형태에서, 만니톨은 약 1 mM 내지 약 100 mM이다. 일부 실시형태에서, 만니톨은 약 60 mM이다.

[0021] 제제는 때때로 안정화제로 지칭된 안정화 작용제를 포함할 수 있다. 안정화 작용제는 본원에 기재된 CFI 변이체 및 융합 작제물을 포함하는 제제에 안정화 특성을 제공하는 임의의 부형제이다. 예를 들어, 안정화 작용제는 칼슘 클로라이드(CaCl_2), 히스타민, 메티오닌, 아스코르브산, 글루타티온, 비타민 E, 폴리(에틸렌이민), 킬레이트제, 항미생물 보존제, 항산화 보존제, 또는 임의의 다른 약학적으로 허용가능한 안정화 작용제일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제제는 안정화제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 안정화제는 칼슘 클로라이드이다. 일부 실시형태에서, 제제는 칼슘 클로라이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 칼슘 클로라이드는 약 20 mM 내지 약 50 mM이다. 일부 실시형태에서, 칼슘 클로라이드는 약 35 mM이다.

- [0022] 예시적인 제제는 표 2.2 및 표 3.3에 제공된다.
- [0023] 일부 실시형태에서, 제제는 20 mM 소듐 아세테이트, 5% 소르비톨, 0.02% PS80을 포함하고, 약 5의 pH이다.
- [0024] 일부 실시형태에서, 제제는 20 mM 소듐 아세테이트, 5% 소르비톨, 0.02% PS80을 포함하고, 약 5.5의 pH이다.
- [0025] 일부 실시형태에서, 제제는 20 mM 소듐 아세테이트, 150 mM 소듐 클로라이드, 0.02% PS80을 포함하고, 약 5.5의 pH이다.
- [0026] 일부 실시형태에서, 제제는 20 mM 소듐 아세테이트, 70 mM 아르기닌 히드로클로라이드, 2% 수크로오스, 60 mM 글리신, 0.02% PS80을 포함하고, 약 5.5의 pH이다.
- [0027] 일부 실시형태에서, 제제는 20 mM 히스티딘 히드로클로라이드, 70 mM 아르기닌 히드로클로라이드, 2% 수크로오스, 60 mM 글리신, 0.02% PS80을 포함하고, 약 6의 pH이다.
- [0028] 일부 실시형태에서, 제제는 20 mM 히스티딘 히드로클로라이드, 150 mM 소듐 클로라이드, 0.02% PS80을 포함하고, 약 6의 pH이다.
- [0029] 일부 실시형태에서, 제제는 20 mM 소듐 석시네이트, 10% 트레할로오스, 0.02% PS80을 포함하고, 약 5의 pH이다.
- [0030] 일부 실시형태에서, 제제는 20 mM 소듐 석시네이트, 5% 트레할로오스, 2% 글리신, 0.02% PS80을 포함하고, 약 5의 pH이다.
- [0031] 일부 실시형태에서, 제제는 20 mM 히스티딘 히드로클로라이드, 10% 트레할로오스, 0.02% PS80을 포함하고, 약 6의 pH이다.
- [0032] 일부 실시형태에서, 제제는 20 mM 히스티딘 히드로클로라이드, 5% 트레할로오스, 2% 글리신, 0.02% PS80을 포함하고, 약 6의 pH이다.
- [0033] 일부 실시형태에서, 제제는 20 mM 히스티딘 히드로클로라이드, 10% 트레할로오스, 0.02% PS80을 포함하고, 약 7의 pH이다.
- [0034] 일부 실시형태에서, 제제는 20 mM 히스티딘 히드로클로라이드, 5% 트레할로오스, 2% 글리신, 0.02% PS80을 포함하고, 약 7의 pH이다.
- [0035] 일부 실시형태에서, 제제는 20 mM 히스티딘, 135 mM 아르기닌 히드로클로라이드, 0.02% 폴리소르베이트 20을 포함하고, 약 5.8의 pH이다.
- [0036] 일부 실시형태에서, 제제는 20 mM 히스티딘, 70 mM 아르기닌 히드로클로라이드, 4% 수크로오스, 0.02% 폴리소르베이트 20을 포함하고, 약 5.8의 pH이다.
- [0037] 일부 실시형태에서, 제제는 20 mM 히스티딘, 8.5% 수크로오스, 0.02% 폴리소르베이트 20을 포함하고, 약 5.8의 pH이다.
- [0038] 일부 실시형태에서, 제제는 20 mM 히스티딘, 70 mM 아르기닌 히드로클로라이드, 120 mM 글리신, 0.02% 폴리소르베이트 20을 포함하고, 약 5.8의 pH이다.
- [0039] 일부 실시형태에서, 제제는 20 mM 히스티딘, 70 mM 아르기닌 히드로클로라이드, 2.5% 소르비톨, 0.02% 폴리소르베이트 20을 포함하고, 약 5.8의 pH이다.
- [0040] 일부 실시형태에서, 제제는 20 mM 히스티딘, 70 mM 아르기닌 히드로클로라이드, 4% 트레할로오스, 0.02% 폴리소르베이트 20을 포함하고, 약 5.8의 pH이다.
- [0041] 일부 실시형태에서, 제제는 20 mM 히스티딘, 5% 수크로오스, 35 mM 칼슘 클로라이드, 0.02% 폴리소르베이트 20을 포함하고, 약 5.8의 pH이다.
- [0042] **II. 제제용 보체 인자 I 변이체 및 융합 작제물**
- [0043] **A. 보체 인자 I 변이체**
- [0044] 본원에는 본원에서 "CFI 변이체"로 지칭된 야생형 CFI에 대한 하나 이상의 변형을 포함하는 변이체를 포함하는 제제가 제공된다. 본원에서 사용된, 야생형 CFI에 대한 "변형"은 하기를 포함한다: 하나 이상의 아미노산 잔기의 결실, 하나 이상의 도메인의 결실, 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환, 하나 이상의 아미노산 잔기의 삽입

(즉, 부가), 하나 이상의 도메인의 삽입(즉, 부가), 하나 이상의 도메인의 역전, 및 하나 이상의 도메인의 치환.

- [0045] 본 개시내용의 CFI 변이체는 C3에 직접적으로 작용하지 않고, 예를 들어 본 개시내용의 변이체는 직접적으로 C3를 절단하지 않고, 직접적으로 C3를 억제하지 않고, 직접적으로 C3의 활성화를 억제하지 않으며, 직접적으로 C3의 활성화를 감소시키지 않는다.
- [0046] 본원에서 사용된, "야생형 CFI"는 신호 서열을 갖거나 갖지 않으면서, 질환-유발 CFI가 아닌 임의의 자연 발생 전장 CFI를 지칭하고, 이는 임의의 종의 것일 수 있다.
- [0047] 일부 실시형태에서, 야생형 CFI는 혈장-유래이다. 일부 실시형태에서, 야생형 CFI는 인간 야생형 CFI이다. 일부 실시형태에서, 신호 서열을 갖는 야생형, 인간 CFI는 서열 번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함한다(하기 표 1에 도시된 것과 같음). 일부 실시형태에서, 야생형 CFI는 인간 CFI이다. 일부 실시형태에서, 야생형, 인간 CFI는 신호 서열을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, 신호 서열이 없는 야생형 CFI는 서열 번호 5에 제시된 아미노산 서열을 포함한다(하기 표 1에 도시된 것과 같음).
- [0048] 야생형 CFI는 각각 A-사슬 및 B-사슬로도 지칭되는 중쇄 및 경쇄를 포함한다. 중쇄(A-사슬)는 4개의 도메인을 갖는다: FI 막 공격 복합체(FIMAC) 도메인(서열 번호 5의 잔기 36 내지 90), 복수의 스캐빈저 수용체 시스테인-풍부(SRCR) 도메인으로 추가로 구성되는 SRCR 도메인, 저밀도 지질단백질 1 도메인(LDLr1), 및 저밀도 지질단백질 2 도메인(LDLr2). 경쇄(B-사슬)는 세린 프로테아제 도메인(SPD)으로 이루어진다. 이들 사슬 간의 계면은 A:B 사슬 계면으로 지칭된다.
- [0049] 본 개시내용의 CFI 변이체는 야생형 CFI의 하나 이상의 아미노산 잔기의 하나 이상의 결실, 야생형 CFI의 하나 이상의 CFI 도메인의 결실, 야생형 CFI의 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환, 야생형 CFI에 대한 하나 이상의 아미노산 잔기의 삽입, 야생형 CFI의 하나 이상의 CFI 도메인의 역전, 및 야생형 CFI에 대한 하나 이상의 도메인의 삽입을 포함한다.
- [0050] 본 개시내용의 CFI 변이체는 CFI 베이스 분자에 대한 하나 이상의 변형의 도입에 의해 생성될 수 있고, 여기서 CFI 베이스 분자의 도메인은 야생형 CFI에서 확인된 도메인에 상응한다. 따라서, CFI 베이스 분자는 임의의 종의 야생형 CFI일 수 있거나, CFI 베이스 분자는 임의의 종의 야생형 CFI의 단지 일부 도메인을 갖는(예를 들어, 이미 CFI 변이체) 야생형 CFI의 단지 일부를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CFI 베이스 분자는 야생형, 마우스 CFI이다. 일부 실시형태에서, CFI 베이스 분자는 야생형, 인간 CFI이다. 일부 실시형태에서, CFI 베이스 분자는 야생형, 비-인간 영장류 CFI이다. 일부 실시형태에서, CFI 베이스 분자는 야생형, 인간 CFI의 단지 일부 도메인을 포함한다.
- [0051] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 CFI 변이체는 보체 시스템의 활성을 조절하고, 야생형 CFI에 비해 적어도 하나의 개선된 특징을 갖는다. 상기 개선된 특징은 생체이용률, 반감기, 활성, 효능, 촉매 능력, 보조인자 친화성(예를 들어, 인자 H 및/또는 CR1에 대한 친화성), 기질 특이성 및 기질 친화성(예를 들어, C3b 및/또는 C4b에 대한 친화성) 중 임의의 하나 이상의 증가 또는 감소를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 개선된 특징은 증가된 반감기이다. 일부 실시형태에서, 개선된 특징은 하기 후속 섹션에서 추가로 상세히 논의된 활성의 증가이다. 다른 실시형태에서, 개선된 특징은 C3b 및/또는 C4b에 대한 기질 특이성의 변화이고, 이는 CFI 변이체의 조정가능성을 허용한다.
- [0052] 표 1에 제공된 것은 CFI 변이체의 생성을 위해 사용될 수 있는 예시적인 베이스 분자이다. 본원에 제공된 베이스 분자는 추가의 변형 없이 보체 시스템의 조절에 유용할 수 있거나, 추가의 변형으로 보체 시스템의 조절에 유용할 수 있다. 예를 들어, 표 1에 제공된 베이스 분자 중 어느 하나는 하나 이상의 변형, 예컨대 하나 이상의 아미노산 잔기의 결실, 하나 이상의 CFI 도메인의 결실, 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환, 또는 하나 이상의 아미노산 잔기 또는 CFI 도메인의 부가를 포함하도록 추가로 변형될 수 있다. 표 1의 베이스 분자는 하기 추가로 설명된 융합 작제물의 추가 부분일 수 있다.

[0053]

[표 1]

CFI 변이체의 생성을 위한 베이스 분자

CFI 베이스 분자의 설명	베이스 분자의 명명	아미노산 서열
혈장 유래, 야생형 인간 CFI(wt hCFI)(신호 서열은 밑줄 표시됨)	CFI-PD	MKLLHVFLFLCFHLRFCKVITYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLS CDKVFCQPWQRCIEGTCVCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPT YCQKSLKLECLHPGTFKFLNNGTCTAEGKFSVSLKHGNTDSEGI VEVKLVLDQDKTMFICKSSWSMREANVACLDLGFQGGADTQR RFKLSDLINSTECLHVVHCRGLETSLAECTFTKRRTMGYQDFA DVVCYTQKADSPMDDFQCVNGKYISQMKACDGINDCGDS DELCCACQKGKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEVDCTGEDEVGC AGFASVTQEETEILTADMDAERRRIKSLPKLSCGVKNRMHIR RKRVGGKRAQLGDLWPQVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTA AHCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIEYVDRIIFHENY NAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPSPACVPWSPYLFQPN DTCIVSGWGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFYGNRFYE KEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCMDANNVTYVWGVVSW GENCGKPEFPGVYTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNNV(서열 번호 1)
wt hCFI, 신호 서열 없음	hCFI	KVITYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCKDVFCQPWQRCIEGTC VCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQKSLKLECLHPGTFKFL NNGTCTAEGKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVLDQDKTMFICKS SWSMREANVACLDLGFQGGADTQRRFKLSDLINSTECLHVVH CRGLETSLAECTFTKRRTMGYQDFAVDVCYTQKADSPMDDF FQCVNGKYISQMKACDGINDCGDSDELCCACQKGKGFHCK SGVCIPSQYQCNGEVDCTGEDEVGCAGFASVTQEETEILTAD MDAERRRIKSLPKLSCGVKNRMHIRRKRVGGKRAQLGDL WPQVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTAHCLRASKTHRYQIWT TVVDWIHPDLKRIVIEYVDRIIFHENYNAGTYQNDIALIEMKK DGNKKDCELPSPACVPWSPYLFQPNPNDTCIVSGWGREKDNE RVFSLQWGEVKLISNCSKFYGNRFYEKEMECAGTYDGSIDAC KGDSGGPLVCMDANNVTYVWGVVSWGENCGKPEFPGVYTK VANYFDWISYHVGRPFISQYNNV(서열 번호 5)
Δ(K1-P305), wt hCFI의 A-사슬 결실	ΔA-사슬(CFI-SPD)	KLSCGVKNRMHIRRKRVGGKRAQLGDLWPQVAIKDASGITC GGIYIGGCWILTAHCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIV IEYVDRIIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPSP ACVPWSPYLFQPNPNDTCIVSGWGREKDNERVFSLQWGEVKLI SNCSKFYGNRFYEKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCMD ANNVTYVWGVVSWGENCGKPEFPGVYTKVANYFDWISYHV GRPFISQYNNV(서열 번호 12)
야생형 마우스 CFI(https://www.uniprot.org/uniprot/Q61129)	마우스 CFI(mCFI)	MKLAHLSLFLALHLSSSRSPASDLPQEELVDQKCLLQKYTH RSCNKVFCQPWQRCIEGTCICKLPYQCPRAGTPVCAMNGRSY PTYCHQKSFELHPEIKFSHNGTCAAEGKFNVSIIYGRTKTEG LVQVKLVLDQDERMFICKNSWSMAEANVACVDLGFPLGV RDIIQGSFNIISGNLHINDTECLHVVHCRGVETSLAECAFTKRRT ELSNGLAGVVYKQDADFPTSLSFQCVNGKHIPQEKACNGVND CGDQSDDELCCGCRGNASLCKSGVCIPDQYKCNGEVDCTGE DESRCEEDRQQNIPKGLARSAQGEAEIETEEMLTGMDNERK RIKSLPKLSCGVKRNTHTRRKRVIGGKPANVGDYPWQVAIK DQQRITCGGIYIGGCWILTAHCVRPSPRAHSYQVWWTALLDW LKPNSQLGIQTVKRVIVHEKYNGATFQNDIALIEMKMHTGKKE CELPNSVPACVPWSPYLFQPNDRCIISGWGRGKDNQKVYSLR WGEVDLIGNCSQFYPDRIYKEMQACAGTRDGSIDACKGDSG GPLVCEDINNVTYVWGVVSWGENCGKPEFPGVYTRVANYFD

[0054]

CFI 베이스 분자의 설명	베이스 분자의 명명	아미노산 서열
		WISYHVGRSLVSQHN(서열 번호 23)
wt hCFI + GSSGG(링커) + wt hCFI	hCFI-hCFI 융합물	KVTYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQRCIEGTCVCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQKSLECLHPGKFLNNGTCTAEGKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVQDQKTMFICKSSWSMREANVACLDLGFQGGADTQRRFKLSDLINSTECLHVCRLGLETSLAECTFTKRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFQFCVNGKYISQMKACDGINDCGDSDELCKACQKGKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEVDCTITGEDEVGCAGFASVTQEETEILTADMDAERRRIKSLPKLSCGVKNRMHRRKRIVGGKRAQLGDLWPQVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTAHCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLKRIVIEYVDRIIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPSPACVPWSPYLFQPNDCIVSGWGREGDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFYGNRFYEKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCMDDANNVTYVWGVVSWGENCGKPEFPGVYTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNV(서열 번호 16)

[0055]

[0056]

일부 실시형태에서, 베이스 분자 그 자체가 CFI 변이체일 수 있고, 예를 들어 일부 실시형태에서, 단지 세린 프로테아제 도메인 그 자체만을 포함하는 CFI 변이체(CFI-SPD)가 CFI 변이체이다. 일부 실시형태에서, CFI 변이체는 표 1의 임의의 베이스 분자로부터 유래되고, 변형되지 않은 CFI의 루프에 상응하는 루프에 대한 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, CFI 변이체는 표 1의 임의의 베이스 분자로부터 유래되고, 치환 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, CFI 변이체는 표 1의 임의의 베이스 분자로부터 유래되고, CFI의 하나 이상의 도메인의 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, CFI 변이체는 표 1의 임의의 베이스 분자로부터 유래되고, CFI의 A-사슬과 B-사슬의 역전을 포함한다.

[0057]

일부 실시형태에서, 본원에는 적어도 하나의 CFI 도메인을 포함하는 CFI 변이체가 제공되고, 적어도 하나의 CFI 도메인은 임의의 종의 야생형 CFI의 도메인에 상응한다. 예를 들어, 적어도 하나의 CFI 도메인의 아미노산 서열은 서열 번호 5에 제시된 야생형 인간 CFI로부터 유래된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 서열 번호 5로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 본원에 제공된 CFI 변이체는 서열 번호 5에 제시된 서열에 대한 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 변형은 하나 이상의 아미노산 잔기의 결실, 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환 돌연변이, 하나 이상의 아미노산 잔기의 부가, CFI의 하나 이상의 도메인의 결실, CFI의 하나 이상의 도메인의 치환, 또는 CFI의 하나 이상의 도메인의 부가를 포함할 수 있다.

[0058]

일부 실시형태에서, 본원에는 임의의 종의 적어도 하나의 CFI 도메인을 포함하는 CFI 변이체가 제공되고, 여기서 적어도 하나의 CFI 도메인은 세린 프로테아제 도메인(SPD), 인자 I 막 공격 복합체(FIMAC) 도메인, 스캐빈저 수용체 시스테인-풍부 도메인(SRCR), 저밀도 지질단백질 수용체 1(LDLr1), 및 저밀도 지질단백질 수용체 2(LDLr2) 도메인으로부터 선택된 임의의 하나 이상의 CFI 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 임의의 하나 이상의 CFI 도메인은 인간 CFI의 도메인이다. 일부 실시형태에서, 임의의 하나 이상의 CFI 도메인은 서열 번호 5에 제시된 서열로부터 유래된 아미노산 서열을 포함한다.

[0059]

일부 실시형태에서, CFI 변이체는 야생형 CFI의 모든 도메인, 즉 각각의 하나의 SPD, FIMAC 도메인, SRCR 도메인, LDLr1 도메인, 및 LDLr2 도메인을 포함하고, 야생형 CFI에 대한 이들 도메인 중 임의의 하나 이상의 변형을 포함한다.

[0060]

일부 실시형태에서, CFI 변이체는 야생형 CFI의 도메인에 상응하는 모든 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, CFI 변이체는 SPD를 포함한다. 일부 실시형태에서, CFI 변이체는 단지 SPD만을 포함하고, 여기서 CFI의 A-사슬은 결실되었으며, 이는 본원에서 "CFI-SPD"로 지칭된다. 일부 실시형태에서, CFI-SPD는 인간 CFI의 SPD인, 서열 번호 12(표 1에 도시된 것과 같음)에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, CFI-SPD는 야생형 CFI SPD에 대한 추가 변형을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, CFI-SPD는 야생형 CFI

SPD에 대한 하나 이상의 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, CFI-SPD는 서열 번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대한 적어도 하나의 변형을 포함한다.

[0061] CFI의 예시적인 변이체는 하기에 추가로 상세히 기재되어 있다. 예시적인 CFI 변이체는 서열 번호 5에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CFI에 대한 아미노산 잔기의 하나 이상의 치환을 포함한다. 예를 들어, 위치 S499 및 I500에서의 치환을 포함하는 CFI 변이체는 서열 번호 5에 제시된 아미노산 서열의 위치 S499 및 I500에서 치환을 가질 것이다.

[0062] *활성 및 특이성 조정*

[0063] 본원에 제공된 CFI 변이체의 활성과 특이성은 특정 적용과 치료 적응증에 대해 조정(조절)될 수 있다. 예를 들어, 활성과 특이성은 C3b 분해제, 또는 C4b 분해제, 또는 C3b와 C4b 둘 모두의 분해제의 선택에 의해 조정될 수 있다. 본원에 언급된 바, 기질에 대한 프로테아제 활성은 이의 기질, C4b 및 C3b를 절단하는 본 개시내용의 CFI 변이체의 능력을 지칭한다. 이는 다양한 방식으로, 예를 들어 C4b 분해제 활성, C4b에 대한 프로테아제 활성, C3b 분해제 활성, C3b에 대한 프로테아제 활성, 절단 생성물의 수율의 증가 등으로서 표현될 수 있다.

[0064] 본원에서 사용된, C3b 분해제는 C3b를 절단할 수 있는 CFI 변이체이고; 마찬가지로, C4b 분해제는 C4b를 절단할 수 있는 CFI 변이체이다. C3b 분해제의 사용이, C4b를 분해하지 않음을 의미하는 것은 아니다. CFI 변이체는 C3b 분해제와 C4b 분해제 둘 모두일 수 있고, 서로에 대해 특이성을 보일 수 있으나, 반드시 그런 것은 아니다.

[0065] 본원에 제공된 CFI 변이체는 기질에 대한 프로테아제 활성의 증가 또는 감소뿐만 아니라 기질 특이성의 증가 또는 감소를 포함하는 변형된 특징을 갖는다.

[0066] 일부 실시형태에서, 특정 C3b 분해제인 본 개시내용의 CFI 변이체는 질환의 치료에 유용하다.

[0067] 일부 실시형태에서, 특정 C4b 분해제인 본 개시내용의 CFI 변이체는 질환의 치료에 유용하다.

[0068] 일부 실시형태에서, C4b와 C3b 분해제 둘 모두이고, 야생형 CFI에 비해 개선된 특징(예를 들어, C4b와 C3b 둘 모두에 대한 증가된 활성)을 보이는 본 개시내용의 CFI 변이체는 질환의 치료에 유용하다.

[0069] *예시적인 CFI 변이체*

[0070] 본원에는 야생형 CFI에 대한 적어도 하나의 변형을 포함하거나 이로 이루어진 CFI 변이체가 제공된다.

[0071] 비제한적으로, 본 개시내용은 표 2에 기재된 예시적인 CFI 변이체를 고려한다. 표 2의 변이체는 본원에 기재된 변형된 CFI를 포함한다. 의심의 여지를 피하기 위해, 달리 제시되지 않는 한, 잔기 번호가 표시되는 경우, 이는 서열 번호 5(야생형 인간 CFI), 또는 이에 상응하는 서열을 지칭한다. 의심의 여지를 피하기 위해, 예를 들어 설명이 P433A인 변이체는 P433A 치환을 포함하는 CFI 변이체이고, 예를 들어 서열 번호 5(또는 이에 상응하는 서열)에서의 P433A 치환을 포함하는 CFI 변이체이고; 본 개시내용은 또한 P433A 치환으로 이루어진 CFI 변이체, 예를 들어 서열 번호 5가 P433A 치환을 갖는 CFI 변이체를 제공한다.

[0072] 본 개시내용의 CFI 변이체는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개 이상의 변형, 예를 들어 치환, 결실, 삽입 및 융합을 가질 수 있다. 제시된 변이체에 대한 변형, 예를 들어 치환은 당업자가 인식한 많은 방식 중 하나로 나타내어질 수 있다. 예를 들어, D395A 및 E416A에서 치환을 갖는 hCFI 변이체는 치환 "D395A 및 E416A", "D395A-E416A", "D395A + E416A", "D395A /E416A", 또는 "D395A; E416A"를 갖는 것으로 지칭될 수 있고, 이는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 일부 경우에, D395A 및 E416A에서 치환을 갖는 CFI 변이체는 "hCFI; D395A; E416A" 또는 CFI 변이체(D395A; E416A)"로 지칭될 수 있다. 본원에 기재된, 결실과 같은 다른 변형, 또는 결실, 융합 및 치환과 같은 변형의 조합을 갖는 변이체는 유사한 명명 방식을 따를 수 있다.

[0073] 표 2는 본 개시내용의 예시적인 CFI 변이체를 제공한다. 변이체를 개시하는 이 표와 다른 표는 하기 기호 및 약어 및 관련 의미를 포함할 수 있다: HSA= 인간 혈청 알부민; CFI= 보체 인자 I; Δ= 언급된 아미노산 범위의 결실; Δ 또는 > = 언급된 서열의 결실과 언급된 아미노산으로 대체됨

[0074] [표 2]

예시적인 CFI 변이체 및 CFI 변이체 조합

변이체 설명	변이체 설명	변이체 설명
K14A	E461Q; R462K; F464Y	A502S
Y20A	E530D	K504Q
Y20F	E457G	K504E
D26A	E461Q	K504R
F29A	R462K	K504A
R35A	F464Y	K504G
E38A	I317D;R318D;R319D;K320D;R321K	K504L
M220A;K221Q	Δ(K1-P305); N531G	K504P
S507A	Δ(K1-P305); Y408L; N531G	K504H
S250A	Δ(K1-P305); N531G; P535A	A361G
S250L	P535G	T495F; Y496L; D497E; S499G; I500K
Δ(K1-P305)	Y408L; N531G; E457G	T495F; Y496L; D497E; S499G; I500K; G533A; K534Q; P535K; E536N; F537K
D425A	Y408L; N531G; E457G; E461Q	F537K
D425K	Δ(K1-P305); Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y	F537R
D425R	Y408L; N531G; P535A	Q467K
514-MDANNVT-520(서열 번호 24) → NG	Δ(K1-P305); I317D;R318D;R319D;K320D;R321K	Q467R
ΔC-말단(Δ558-PFISQYNV-565(서열 번호 25))	K14A; D425R	Q467K; F537K
R557A	Y408G	E530G
K326A;R327A	Y408P	E530G; N531G
Y408L;N531G	Y408D	E530F
L307G	Y408A	E530Y
N531G; P535A	Y408N	E530D; F537K
Y408L	Y408T	R557K
456-REKDNERVFS-465(서열 번호 26) → NTASSGADYPDE(서열 번호 27)	Y408K	P558L
E457G; E461Q;R462K; F464Y	Y408R	E457G; E461Q
E38A; D425R	Y408H	R462A
Y20F; D425R	Y408I	R462D
S250A; D425R	P535K	E457G; E461G
N531G	K534Q	N531G; E457G; E461Q
N531A	E530D;N531G;G533A;K534Q;P535K;E536N	W381K
P535A	R321A	N404G
Y408F	N402E	D506A
Y408F; N531G	N422K	D506V
Y408L; N531G; E457G;	A502S; K504Q; F537K	D506E
		D506G
		I322V

[0075]

변이체 설명
I322V; V323I
R327P
I322V; V323I; R327P
V323A
A328C; W468C
A328C; W468C; K326Y; R327N
Y408L; N531G; E461Q
D425R; Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y
Y20F; E38A; S250A; D425A
Y20F; E38A; S250A; D425A; Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y
V311-V565
K1-G310
V311-V565 - G(13) (서열번호 29) - K1-G310
C309S
C435S
Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K
Y408L; N531G; E457G; E461Q; F464Y
Y408L; N531G; E457G; R462K; F464Y
Y408L; N531G; E461Q; R462K; F464Y
Y408L; E457G; E461Q; R462K; F464Y
E457G; N531G; E461Q; R462K; F464Y
Y408L; E457G; E461Q; R462K
N531G; E457G; E461Q; F464Y
E416A
Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y; S507A
H370A
P384A
P384G
420-DGNK-424(서열 번호 30) → GG
E536A
N85Q
N159Q
N476Q
N518Q
N52Q; N85Q; N159Q

변이체 설명
N446Q; N476Q; N518Q
E457A
E457D
E457F
E457H
E457I
E457K
E457L
E457M
E457N
E457P
E457Q
E457R
E457S
E457T
E457W
E457Y
E457V
Y408E
K14A; Y20F; D26A; R35A; E38A
K14A; Y20F; D26A; R35A; E38A; L304G; P305G; K306G; L307G; S308G
Y408M
Y408Q
Y408S
Y408W
D341A
Y408V
E461A
E461D
E461F
E461G
E461H
E461I
E461L
E461M
E461N
E461P
E461S
E461T
E461W

변이체 설명
E461Y
E461V
R456A
I317D-R318D-R319D-K320D-R321K; Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y
K312A
R314A
K312A; R314A
P558S
F559L
I560V
Y563H
P558S; F559L; I560V; Y563H
P558G
L304G; P305G; K306G; L307G; S308G
N531D
N531E
N531F
N531H
N531I
N531K
N531L
N531M
I322T
N531P
N531Q
N531R
N531S
N531T
N531V
N531W
N531Y
Y403F
A405S
G406R
Q409D
A405S; G406R; Y408L; Q409D
A405S; G406A; Y408L; Q409D
Q409Y
Q409H
G406A

[0076]

변이체 설명
G406A; Y408L
T377G
W381A
W381A; P384A
W381A; ΔP384
G469L
R456N
K458A
G469L; R456N; E457T; K458A
G469L; R456N; K458A
G469L; R456N; K458A; E461G
G469L; R456N; K458A; E461G; F537K
K504D
K504F
K504I
K504M
K504N
K504S
K504T
K504V
K504W
K504Y
G406D
G406E
G406F
G406H
G406I
G406K
G406L
G406M
G406N
G406P
G406Q
G406S
G406T
G406V
G406W
G406Y
G406D; Y408L
G406D; N531G
G406D; P535A

변이체 설명
G406D; Y408L; N531G
G406D; Y408L; P535A
G406D; N531G; P535A
G406D; Y408L; N531G; P535A
K340G
I345G
K340G; I345G
Y372G
P384A
P384G
W381G
V390G
W381G; V390G
W381G; P384A; V390G
W381G; P384G; V390G
N404G
Q409G
K418G
D425G
K418G; D425G
S465G
G344R
G344K
G344Y
T346R
T346K
T346H
K504E
K504D
E530R
E530K
T346R; K504E; E530R
T346K; K504D; E530K
G344R; Y408L; N531G
G344K; Y408L; N531G
T346R ; Y408L; N531G
T346K ; Y408L; N531G
K504D; Y408L; N531G
K504E; Y408L; N531G
Y408L; E530R; N531G
Y408L; E530K; N531G
T346R; Y408L; K504E; E530R;

변이체 설명
N531G
T346K; Y408L; K504D; E530K; N531G
Y408L; S507A; N531G
Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y; S507A E457G; S507A
N531G; P535A; S507A
F208Y
F246Y
F480Y
F537Y
F208Y; F246Y; F480Y; F537Y
H362T; V463S; R456I; D459W; S343R
H362T; V463S; R456I; D459W; S343K
H362T; V463S; R456F; D459W; S343R
H362T; V463S; R456I ; S343R
H362T; R456I; D459W; S343R
H362T; R456I; S343R
H362T; R456I; S343K
K14A; D425R; Y408L-N531G
Y408L; E457G; S507A; N531G
E457G; N531G
E457G; Y408L
Y408L; N531G; E457G; R462K
Y408L; N531G; E457G; F464Y
Y408L; N531G; E461Q; R462K
Y408L; N531G; E461Q; F464Y
Y408L; N531G; R462K; F464Y
Y408L; E457G; E461Q; F464Y
Y408L; E457G; R462K; F464Y
Y408L; E461Q; R462K; F464Y
N531G; E457G; E461Q; R462K
N531G; E457G; R462K; F464Y
N531G; E461Q; R462K; F464Y
Y408L; N531G; R462K
Y408L; N531G; F464Y
Y408L; E457G; E461Q
Y408L; E457G; R462K
Y408L; E457G; F464Y
Y408L; E461Q; R462K

[0077]

변이체 설명
Y408L; E461Q; F464Y
Y408L; R462K; F464Y
N531G; E457G; R462K
N531G; E457G; F464Y
N531G; E461Q; R462K
N531G; E461Q; F464Y
N531G; R462K; F464Y
E457G; E461Q; R462K
E457G; E461Q; F464Y
E457G; R462K; F464Y
E461Q; R462K; F464Y
Y408L; N531G
Y408L; E461Q
Y408L; R462K
Y408L; F464Y
N531G; E461Q
N531G; R462K
N531G; F464Y
E457G; R462K
E457G; F464Y
E461Q; R462K
E461Q; F464Y
R462K; F464Y
Y408L; N422K
E457G; N422K
N531G; N422K
P535G; N422K
Y408L; P535G; N422K
E457G; P535G; N422K
N531G; P535G; N422K
Y408L; E457G; N422K
Y408L; N531G; N422K
E457G; N531G; N422K
Y408L; E457G; N531G; N422K
Y408L; E457G; P535G; N422K
E457G; N531G; P535G; N422K
Y408L; E457G; N531G; P535G; N422K
Y408L; E416A
E457G; E416A
N531G; E416A
P535G; E416A

변이체 설명
Y408L; D425R; E416A
E457G; D425R; E416A
N531G; D425R; E416A
Y408L; E457G; E416A
Y408L; N531G; E416A
E457G; N531G; E416A
Y408L; E457G; N531G; E416A
Y408L; E457G; D425R; E416A
Y408L; N531G; D425R; E416A
E457G; N531G; D425R; E416A
D425R; Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y; E416A
E457G; N531G; E461Q; R462K; F464Y; E416A
Y408L; E530Y
E457G; E530Y
N531G; E530Y
P535G; E530Y
Y408L; D425R; E530Y
E457G; D425R; E530Y
N531G; D425R; E530Y
Y408L; E457G; E530Y
Y408L; N531G; E530Y
E457G; N531G; E530Y
Y408L; E457G; N531G; E530Y
Y408L; E457G; D425R; E530Y
Y408L; N531G; D425R; E530Y
E457G; N531G; D425R; E530Y
Y408L; E457G; N531G; D425R; E530Y
D425R; Y408L; N531G; E457G; E461Q; R462K; F464Y; E530Y
E457G; N531G; E461Q; R462K; F464Y; E530Y
R365A
R365V
R365I
R365L
R365M
R365F
R365Y
R365W
R365G

변이체 설명
R365P
R365S
R365T
R365N
R365Q
R365H
R365K
R365D
R365E
A366G
K368G
K368E
K424A
K424V
K424I
K424L
K424M
K424F
K424Y
K424W
K424G
K424P
K424S
K424T
K424N
K424Q
K424R
K424H
K424D
K424E
K423G
K423A
K423E
K423D
D549A
D549V
D549L
D549M
D549F
D549Y
D549W
D549T

[0078]

변이체 설명
D549N
D549Q
D549G
D549P
D549R
D549H
D549K
Y553A
Y553V
Y553I
Y553L
Y553S
Y553N
Y553Q
Y553R
Y553H
Y553K
Y553E
R557V
R557I
R557L
R557M
R557F
R557Y
R557W
R557S
R557T
R557N
R557Q
R557G
R557P
R557H
R557D
R557E
T377G; N531G
T377G; E457G
T377G; E461Q
T377G; E457G; E461Q
T377G; E457G; E461Q; N531G
Y408L; N531G; R557A
N531G; P535A; R557A
E457G; E461Q; R557A

변이체 설명
N531G; E457G; E461Q; R557A
Y408L; E457G; E461Q; R462K; N531G; R557A
N531G; P535A; R557K
E457G; E461Q; R557K
N531G; E457G; E461Q; R557K
Y408L; E457G; E461Q; R462K; N531G; R557K
Y408L; N531G; ΔC- 말단(Δ558-PFISQYNNV- 565(서열 번호 25))
N531G; P535A; ΔC- 말단(Δ558-PFISQYNNV- 565(서열 번호 25))
N531G; E457G; E461Q; ΔC- 말단(Δ558-PFISQYNNV- 565(서열 번호 25))
Y408L; E457G; E461Q; R462K; N531G; ΔC- 말단(Δ558-PFISQYNNV- 565(서열 번호 25))
ΔC-말단(Δ557-RPFISQYNNV- 565(서열 번호 28))
Q69G
L73G
L76G
H362G
H370G
F399G
E401G
A405G
R456G
D459G
R484G
D501G
A502G
V526G
S527G
W528G
F537G
P538G
V540G
Y553G
A342G
R371G

변이체 설명
R327G
S343G
Q373G
W375G
I382G
H383G
L386G
K387G
R388G
I389G
I391G
E392G
Y393G
K419G
D420G
N422G
N460G
R462G
V463G
Y408F; E457G; E461Q; N531G
Y408F; E457G; E461Q; R462K; F464Y; N531G
Y408F; E457G; E461Q; R462K; N531G
Y408F; E457G; E461Q; F464Y; N531G
E457G; E461Q; R462K; F464Y; N531G; R557K
E457G; E461Q; F464Y; N531G; R557K
E530F; P558S
E530Y; P558S
E457G; E461Q; E530F; N531G; P558S
E457G; E461Q; R462K; F464Y; E530F; N531G; P558S
Y408L; E457G; E461Q; R462K; E530F; N531G; P558S
E457G; E461Q; F464Y; E530F; N531G; P558S
E457G; E461Q; E530Y; N531G; P558S
E457G; E461Q; R462K; F464Y; E530Y; N531G; P558S
Y408L; E457G; E461Q; R462K; E530Y; N531G; P558S
Y408F; E457G; E461Q; R462K; E530Y; N531G; P558S

변이체 설명
E457G; E461Q; F464Y; E530Y; N531G; P558S
E457G; E461Q; K504H; N531G
E457G; E461Q; R462K; F464Y; K504H; N531G
Y408L; E457G; E461Q; R462K; K504H; N531G
E457G; E461Q; F464Y; K504H; N531G
E416A; E457G; E461Q; N531G
Y408L; E416A; E457G; E461Q; R462K; N531G
Y408F; E416A; E457G; E461Q; R462K; N531G
E416A; E457G; E461Q; F464Y; N531G
T377G; E457G; E461Q; R462K; F464Y; N531G
T377G; Y408L; E457G; E461Q; R462K; N531G
T377G; E457G; E461Q; F464Y; N531G
T377G; E416A; K504H
E416A; K504H
T377G; K504H
N422K; E457G; E461Q; N531G
N422K; E457G; E461Q; Q467K; N531G
E416A; N422K; E457G; E461Q; Q467K; N531G
K504R; E530F; D425K; P558S
K504R; E530F; D425R; P558S
K504R; E530F; D425R; P558G
K504R; E530F; D425K; P558G
K504R; E530F; D425K; P558S; E457G; E461Q; N531G
K504R; E457G; E461Q; N531G
E530F; E457G; E461Q; N531G
D425R; E457G; E461Q; N531G
D425K; E457G; E461Q; N531G
P558S; E457G; E461Q; N531G
P558G; E457G; E461Q; N531G
K504R; E530F; E457G; E461Q; N531G
K504R; D425R; E457G; E461Q; N531G
K504R; P558S; E457G; E461Q; N531G
E530F; P558S; E457G; E461Q; N531G

변이체 설명
D425R; P558S; E457G; E461Q; N531G
D425R; E530F; E457G; E461Q; N531G
D425K; E530F; E457G; E461Q; N531G
D425R; E530F; P558G; E457G; E461Q; N531G
K504R; E530F; P558G; E457G; E461Q; N531G
K504R; D425R; P558G; E457G; E461Q; N531G
R557A; N531M
R557K; N531M
R557A; N531M; Y403F; K504Y
R557A; N531D; Y403F; K504Y
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457G; E461Q
R557A; N531G; Y403F; K504Y; E457G; E461Q
R557A; N531D; Y403F; K504Y; E457G; E461Q
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457G; E461T
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457G; E461V
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457N; E461Q
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457N; E461L
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457N; E461T
R557A; N531M; Y403F; K504Y; E457N; E461V
N531M; Y403F; K504Y; E457G; E461Q
N422K; E461Q
T377G; N422K
N531G; E457G; T377G
N531G; E461Q; N422K
N531G; E461Q; T377G
N531G; N422K; T377G
E457G; E461Q; N422K
E457G; N422K; T377G
E461Q; N422K; T377G
N531G; E457G; N422K; T377G

변이체 설명
N531G; E461Q; N422K; T377G
E457G; E461Q; N422K; T377G
T377G; N422K; E457G; E461Q; N531G
D425K; Y408M
D425K; E530F
D425K; F537K
D425K; K504R
D425K; P558S
Y408M; E530F
Y408M; K504R
Y408M; P558S
E530F; F537K
E530F; K504R
E530F; P558S
F537K; K504R
F537K; P558S
K504R; P558S
D425K; Y408M; F537K
D425K; Y408M; K504R
D425K; Y408M; E530F; F537K
D425K; Y408M; E530F; P558S
D425K; E530F; F537K; K504R
Y408M; E530F; F537K; K504R
Y408M; F537K; K504R; P558S
D425K; Y408M; E530F; F537K; K504R
D425K; Y408M; E530F; K504R; P558S
D425K; Y408M; E530F; K504R; P558S
D425K; Y408M; E530F; K504R; P558S
D425K; E530F; F537K; K504R; P558S
D425K; Y408M; E530F; F537K; K504R; P558S
D425K; E457G; E461Q; K504R; N531G
D425K; E457G; E461Q; N531G; P558S
T377G; Y408M; N422K; E457G; E461Q; E530F; N531G
T377G; N422K; D425K; E457G; E461Q; E530F; N531G
E457G; E461Q; N531G; S507A
N531G; S507A

[0080]

변이체 설명	변이체 설명	변이체 설명
E457G; S507A	P433F	$\Delta(V565) > VG$
E461Q; S507A	$\Delta(Y496)$	$\Delta(V565) > VY$
N422K; S507A	$\Delta(D497)$	E416K
T377G; S507A	$\Delta(Y496; D497)$	E416R
D425K; S507A	S499G	D395A
Y408M; S507A	S499A	D395G
P558S; S507A	S499K	D395K
E530F; S507A	S499V	D395R
F537K; S507A	Y496L	D395A; D425A
K504R; S507A	S499G; I500K	D395A; E416A
Y408F; S507A	S499A; I500K	D395A; E416A; D425A
R557A; S507A	T495F; Y496L; S499G; I500K	N402D
E416A; E457G; E461Q; R462K; F464Y; N531G	K423R	K368D
N52Q; N159Q	R62A	K1103A
N476Q; N518Q	R62E	E1106A
Y408F; N531M	R62L	I1134G
Y408F; K504Y	R62H	I208G
G406A; Y403F	E401K	H383K; D385N; K387S; R388Q; E392Q; Y393T; D395K; K419M; D420H; G421T; N422G; D425E
D425K	E401R	H383K; R388Q; E392Q; Y393T; K419M
Y403F; D425K; E457G; N531G	E401A	K51D; T59E; R61D
G406A; D425K; E457G; E461Q; N531G	E401F	Q69H; L73F; G79E; T80I; L83S; N84H
Y403F; G406A; D425K; E457G; E461Q; N531G	N402G	$\Delta(1-KVTYTS-6(\text{서열 번호 33}))$ > RSPSASDLP(서열 번호 34)
Y403F; D425K; E457G; E461Q; K504Y; N531G	N402K	M186E; G187L; Y188S; Q189N; D190G; F191L; D193G
Y403F; G406A; D425K; E457G; E461Q; K504Y; N531G	N402R	H948N
D425K; E457G; E461Q; N531G	H554F	L950S
D425K; E457G; E461Q; N531G; R557A	H554K	D988N
R557A	R371E	L990S
$\Delta(V565)$	A342R	V1108N
F559Y	K51R; N52A; A55P; T59M; R61G; F64Y	E1110S
$\Delta(S308)$	N52A	Q1131N
F559W	A55P	I1133S
F559H	T59E	N422A
L307F	L73F	T377A
L307H	L73D	
L307W	$\Delta(275-CAGFASVAQE-284(\text{서열 번호 31})) >$ CEEDRQQNIPKGLARSAQGE AEIETE(서열 번호 32)	
L307Y	R484A	
P433A	R484K	
P433G	R484E	

[0081]

[0082]

B. 보체 인자 I를 포함하는 융합 작제물

[0083]

본원에는 보체 인자 I의 적어도 하나의 도메인을 포함하는 제1 성분(CFI 부분), 및 적어도 하나의 제2 성분을 포함하는 융합 작제물용 제제가 제공되며, 제1 성분과 제2 성분 및 후속 성분은 융합된다(예를 들어, 선택적 링커에 의해 인접하거나 분리됨). 이러한 융합 작제물은 본원에서 "CFI 융합 작제물" 또는 간단히 "융합 작제물"로 지칭된다. 일부 실시형태에서, 융합 작제물은 추가 성분, 예를 들어 제3 성분, 제4 성분 등을 포함한다.

[0084]

일부 실시형태에서, 융합 작제물의 제2 성분 및 후속 성분은 단백질이다. 일부 실시형태에서, 제2 성분 및/또는 후속 성분은 단백질이 아니다.

[0085]

본 개시내용의 융합 작제물의 성분은 선택적 링커에 의해 함께 유지될 수 있다. 이는 임의의 적합한 길이의 적어도 하나의 아미노산일 수 있다. 링커는 가요성 링커일 수 있고, 길이가 약 1 내지 약 20개의 아미노산 잔기의 펩티드일 수 있으며, 여기서 아미노산 잔기는 글리신 잔기를 포함할 수 있다. 링커는 또한 선택적으로 세린 잔기를 포함할 수 있다. 예시적인 가요성 링커는 당업계에 알려진 글리신 중합체, 글리신-세린 중합체, 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체, 또는 임의의 다른 적합한 가요성 링커를 포함할 수 있지만 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 링커는 (GGSS)ⁿ이고, 여기서 n은 약 1 내지 약 20의 임의의 수이다(서열 번호 35). 예시적인 링커는 (GGSS)ⁿGG(서열 번호 36)이고, 여기서 n은 약 1 내지 약 20의 임의의 수이다. 예시적인 링커는 (GGSSGG)ⁿ이고, 여기서 n은 약 1 내지 약 20의 임의의 수이다(서열 번호 37). 일부 실시형태에서, 링커는 프로

테아제-감응성 절단성 링커이다. 융합 작제물을 연결하는 예시적인 링커는 길이가 1 내지 50개, 5 내지 50개, 10 내지 50개, 15 내지 50개, 20 내지 50개, 25 내지 50개, 1 내지 20개, 2 내지 20개, 3 내지 20개, 4 내지 20개, 5 내지 20개, 6 내지 20개, 7 내지 20개, 8 내지 20개, 9 내지 20개, 10 내지 20개, 3 내지 15개, 3 내지 10개, 3 내지 9개, 3 내지 8개, 3 내지 7개, 3 내지 6개, 3 내지 5개, 4 내지 15개, 4 내지 10개, 4 내지 9개, 4 내지 8개, 4 내지 7개, 4 내지 6개, 4 내지 5개, 5 내지 15개, 5 내지 10개, 5 내지 9개, 5 내지 8개, 5 내지 7개, 5 내지 6개, 6 내지 15개, 6 내지 10개, 6 내지 9개, 6 내지 8개, 또는 6 내지 7개의 아미노산일 수 있다.

[0086] CFI + 반감기 연장제 융합 작제물

[0087] 일부 실시형태에서, 융합 작제물은 야생형 CFI 또는 CFI 변이체(제1 성분), 및 적어도 하나의 제2 성분을 포함하고, 여기서 제2 성분은 반감기 연장제이다. 자연 발생 CFI가 상대적으로 짧은 반감기를 갖기 때문에, 일부 실시형태에서, 이는 CFI 또는 이의 변이체의 반감기를 증가시키는 데 유리할 수 있다. 반감기 연장제인 제2 성분을 사용함으로써, 활성이 증가할 수 있거나, 야생형 CFI에 비해 다른 특징을 개선할 수 있다. 예를 들어, 야생형 CFI 또는 CFI 변이체는 CFI를 반감기 연장제에 융합시킴으로써 이들의 반감기를 연장시킬 수 있다.

[0088] 예시적인 반감기 연장제는 알부민, 예컨대 인간 혈청 알부민, PEG, 비-생분해성 중합체, 생분해성 중합체, 및 Fc를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 제2 성분은 단백질이고, 반감기 연장제, 예컨대 알부민 또는 Fc이다. 일부 실시형태에서, 제2 성분은 단백질이 아니고, 반감기 연장제, 예컨대 PEG이다. 일부 실시형태에서, 반감기 연장제는 펩티드 반복부를 포함한다.

[0089] 일부 실시형태에서, 제2 성분은 반감기 연장제이고, 알부민이다. 본원에서 사용된, 알부민은 임의의 알부민, 예컨대 임의의 혈청 알부민, 또는 알부민 변이체, 또는 알부민 유도체를 지칭한다는 것을 유의해야 한다. 예를 들어, 알부민의 변이체는 서열 번호 7(야생형 인간 혈청 알부민(HSA))에 제시된 아미노산 서열에 상응하는 적어도 하나의 변형, 또는 임의의 비-인간 종의 알부민의 아미노산 서열에 상응하는 적어도 하나의 변형을 포함하는 임의의 알부민을 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 알부민은 인간 혈청 알부민(HSA)이고, 서열 번호 7에 제공된다.

[0090] 야생형 CFI 및 HSA를 포함하는 예시적인 융합 작제물은 본원에서 "CFI-HSA"로 지칭되고, 하기에 추가로 상세히 논의된다. 본 개시내용의 예시적인 융합 작제물은 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함한다.

[0091] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 융합 작제물은 본 개시내용의 알부민 및 CFI 변이체를 포함한다. 예시적인 CFI 변이체는 표 2에 제공되어 있다.

[0092] 융합 작제물의 구조적 배열

[0093] 일부 실시형태에서, 본원에는 적어도 하나의 제1 성분 및 제2 성분을 포함하는 융합 작제물이 제공되고, 여기서 제1 성분은 임의의 본원에 제공된 야생형 CFI 또는 CFI 변이체(CFI 부분)이고, 여기서 제1 성분과 제2 성분은 융합되며, 제2 성분은 CFI 부분의 N-말단 단부에 융합된다. 일부 실시형태에서, 제2 성분은 CFI 부분의 C-말단 단부에 융합된다. 일부 실시형태에서, 제2 성분은 CFI 부분의 C-말단 단부에 융합되고, 제3 성분은 CFI 부분의 N-말단 단부에 추가로 융합된다. 일부 실시형태에서, 제2 성분은 CFI 부분의 N-말단 단부에 융합되고, 제3 성분은 CFI 부분의 C-말단 단부에 추가로 융합된다.

[0094] 표 3을 참조하면, 서열 번호 1은 "CFI-PD"로 지칭된 야생형 혈장-유래 인간 CFI의 아미노산 서열이고, 리더 서열을 갖는다. 제2 성분과의 융합에 사용된 야생형 CFI는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 이는 서열 번호 1에 제시된 리더 서열을 포함하지 않는다. 마우스 Ig 카파 사슬 V-III 영역 MOPC 63 리더 서열(서열 번호 2)이 대신 본원에 제공된 임의의 CFI 융합 작제물의 제조를 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에는 적어도 하나의 CFI 도메인을 포함하는 CFI 융합 작제물이고, 여기서 적어도 하나의 CFI 도메인은 서열 번호 5에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0095] 본 개시내용의 예시적인 융합 작제물은 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함한다.

[0096] [표 3]

예시적인 CFI 융합 작제물의 성분

설명	서열
야생형 혈장-유래 인간 CFI(CFI-PD)	MKLLHVLLFLCFHLRFCKVITYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQRCIEGTCVCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQKSLECLHPGTFKFLNNGTCTAEGKF SVSLKHGNTDSEGIVEVKLVLDQDKTMFICKSSWSMREANVACLDLGFQGGADTQR RFLKSDLINSTECLHVHCRGLETSLAECTFTKRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPM DDFQCVNGKYISQMKACDGINDCGDSDELCKACQKGFGHCKSGVCIPSQYQC NGEVDCITGEDEVGCAGFASVTQEETEILTADMDAERRRIKSLLPKLSCGVKNRMHI RRKRIVGGKRAQLGDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTAACHLRASKTHRYQI WTTVVVDWIHPDLKRIVIEYVDRIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPRS IPACVPWSPYLFQPNDCIVSGWGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFYGNRFYE KEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCMDANNVTYVWGVVSWGENCCKPEFPGV YTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNV(서열 번호 1)
리더 서열(CFI-HSA 에 대한 마우스 리더)	METDTLLLWVLLLWVPGSTG(서열 번호 2)
인간 CFI 리더 서열	MKLLHVLLFLCFHLRFC(서열 번호 3)
신호 서열이 없는 서열 번호 1의 야생형 CFI	KVITYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQRCIEGTCVCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQKSLECLHPGTFKFLNNGTCTAEGKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVLDQDKTMFICKSSWSMREANVACLDLGFQGGADTQRRFLKSDLINSTECLHVHCRGLETSLAECTFTKRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFQCVNGKYISQMKACDGINDCGDSDELCKACQKGFGHCKSGVCIPSQYQCNGEVDCITGEDEVGCAGFASVTQEETEILTADMDAERRRIKSLLPKLSCGVKNRMHIRKRIVGGKRAQLGDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTAACHLRASKTHRYQIWTTVVVDWIHPDLKRIVIEYVDRIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPRSIPACVPWSPYLFQPNDCIVSGWGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFYGNRFYEKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCMDANNVTYVWGVVSWGENCCKPEFPGVYTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNV(서열 번호 5)
링커	GGSSGG(서열 번호 6)
인간 혈청 알부민(HSA)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQCCPFEDHVKLVEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFT ECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQ RFPKAEFAEVSKLVTDLTKEVHTECCHGDLLECADRADLAKYICENQDSISSKLKE CCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCCKNYAEAKDVFLGMFLYE YARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIK QNCELFEQLGEYKFQNALVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAK RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKKADDKETCFEAEGKKLVAAASQAALGL(서열 번호 7)
CFI 연결된 HSA(CFI-HSA)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQCCPFEDHVKLVEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFT ECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQ RFPKAEFAEVSKLVTDLTKEVHTECCHGDLLECADRADLAKYICENQDSISSKLKE CCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCCKNYAEAKDVFLGMFLYE YARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIK QNCELFEQLGEYKFQNALVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAK RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE KCKKADDKETCFEAEGKKLVAAASQAALGLGSSGGKVTYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQRCIEGTCVCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQKSLECLHPGTFKFLNNGTCTAEGKFSVSLKHGNTDSEGIVEVKLVLDQDKTMFICKSSWSMREANVACLDLGFQGGADTQRRFLKSDLINSTECLHVHCRGLETSLAECTFTKRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFQCVNGKYISQMKACDGINDCGDSDELCKACQKGFGHCKSGVCIPSQYQCNGEVDCITGEDEVGCAGFASVTQEETEILTADMDAERRRIKSLLPKLSCGVKNRMHIRKRIVGGKRAQLGDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTAACHLRASKTHRYQIWTTVVVDWIHPDLKRIVIEYVDRIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPRSIPACVPWSPYLFQPNDCIVSGWGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFYGNRFYEKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCMDANNVTYVWGVVSWGENCCKPEFPGVYTKVANYFDWISYHVGRPFISQYNV(서열 번호 21)

[0097]

[0098] III. CFI-함유 제제의 용도

[0099] 본 개시내용의 제제는 대상체에서 치료제에 사용될 수 있다. 본원에서 사용된, 대상체는 임의의 포유류 대상체를 포함하고, 영장류, 설치류, 가축 동물, 동물원 동물, 및 애완동물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 포유류 대상체는 인간 대상체이다. 일부 실시형태에서, 포유류 대상체는 비-인간 영장류이다.

[0100] A. 비-안구 병태의 치료

[0101] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 제제는 대상체에서 비-안구 병태를 치료하는 데 유용하다. 일부 실시형태에서, 본원에는 치료를 필요로 하는 대상체에서 안구 병태의 치료 방법이 제공되고, 방법은 치료적 유효량의 임의의 하나의 본원에 제공된 제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0102] 일부 실시형태에서, 비-안구 병태는 CFI 결핍을 특징으로 한다. 일부 실시형태에서, 비-안구 병태는 보체 시스

템의 조절 장애를 특징으로 한다.

- [0103] 일부 실시형태에서, 비-안구 병태는 전신성 급성 적응증이다. 일부 실시형태에서, 비-안구 병태는 급성 사구체 신염, 급성 신장 손상, 급성 호흡곤란 증후군, 세균성 수막염, 뇌출혈, 화상, 코로나바이러스 감염, 엡스타인-바 바이러스 감염, 조혈모세포 이식, 허혈 재관류 손상, 라임병, 심근경색, 장기 이식, 치주염, 폐렴, 전자간증, 주혈흡충증, 폐혈증, 뇌졸중, 혈전색전증, 및 외상성 뇌 손상으로 이루어진 군으로부터 선택된 전신성 급성 적응증이다.
- [0104] 일부 실시형태에서, 비-안구 병태는 전신성 만성 적응증이다. 일부 실시형태에서, 비-안구 병태는 알츠하이머병, 항호중구 세포질 항체(ANCA)-관련 혈관염, 항인지질 증후군, 천식, 죽상동맥경화증, 비정형 용혈성 요독 증후군(aHUS), 자가면역 용혈성 빈혈, 수포성 유천포창(BP), C3 사구체병증, 만성 신부전, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 한랭 응집소 질환(CAD), 크론병, 당뇨병성 신경병증, 전신성 중증 근무력증(gMG), 다발혈관염을 동반한 육아종증(GPA), 길랭-바레 증후군(GBS), 유전성 혈관부종(HAE), 화농성 한선염(HS), IgA 신장병(IgAN), 루푸스 신장염(LN), 막 사구체신염(MN), 현미경적 다발혈관염(MPA), 운동 신경 질환, 다초점 운동 신경병증(MMN), 다발성 경화증(MS), 비-인슐린 의존성 당뇨병, 골관절염, 췌장염, 파킨슨병, 발작성 야간 혈색소뇨증(PNH), 이식 후 림프증식성 질환, 단백질 소실 장질환, 건선, 괴저성 농피증, 류마티스 관절염, 정신분열증(SZ), 전신성 홍반 루푸스(SLE), 면역 혈소판감소증(ITP), 및 케양성 대장염, 램퍼트-이튼 근무력증 증후군(LEMS), CHAPLE 증후군(CD55 결핍증), 혈전성 미세혈관조영술(TMA) 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(CIDP), 헌팅턴병 및 허혈 재관류 손상으로 이루어진 군으로부터 선택된 전신성 만성 적응증이다.
- [0105] 일부 실시형태에서, C4b 분해제인 CFI 변이체 또는 융합 작제물을 포함하는 본원에 제공된 제제의 사용에 의해 치료될 수 있는 질환은 비-안구 병태를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 비-안구 병태는 전신성 만성 적응증이다. 일부 실시형태에서, 비-안구 병태는 알츠하이머병, 근위축성 측삭경화증(ALS), 항호중구 세포질 항체(ANCA)-관련 혈관염, 항인지질 증후군, 천식, 죽상동맥경화증, 비정형 용혈성 요독 증후군(aHUS), 자가면역 용혈성 빈혈, 수포성 유천포창(BP), C3 사구체병증, 만성 신부전, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 한랭 응집소 질환(CAD), 크론병, 당뇨병성 신경병증, 전신성 중증 근무력증(gMG), 다발혈관염을 동반한 육아종증(GPA), 길랭-바레 증후군(GBS), 유전성 혈관부종(HAE), 화농성 한선염(HS), IgA 신장병, 루푸스 신장염(LN), 막 사구체신염(MN), 현미경적 다발혈관염(MPA), 운동 신경 질환, 다초점 운동 신경병증(MMN), 다발성 경화증(MS), 비-인슐린 의존성 당뇨병, 골관절염, 췌장염, 파킨슨병, 발작성 야간 혈색소뇨증(PNH), 이식 후 림프증식성 질환, 단백질 소실 장질환, 건선, 괴저성 농피증, 류마티스 관절염, 정신분열증(SZ), 전신성 홍반 루푸스(SLE), 면역 혈소판감소증(ITP), 온혈구 자가면역 용혈성 빈혈(wAIHA), 면역-복합체 막증식성 사구체신염(IC-MPGN), 및 케양성 대장염, 램퍼트-이튼 근무력증 증후군(LEMS), CHAPLE 증후군(CD55 결핍증), 혈전성 미세혈관조영술(TMA) 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(CIDP), 헌팅턴병 및 허혈 재관류 손상으로 이루어진 군으로부터 선택된 전신성 만성 적응증이다.
- [0106] 일부 실시형태에서, 비-안구 병태는 비-종양학적이다.
- [0107] 일부 실시형태에서, 비-안구 병태는 종양학적이다. 일부 실시형태에서, 비-안구 병태는 종양학적이고, 고형 종양 또는 액상 종양을 특징으로 한다. 일부 실시형태에서, 비-안구 병태는 고형 종양을 특징으로 하고, 대장 종양, 호르몬-불응성 전립선암, 흑색종, 전이성 유방암, 전이성 대장암, 전이성 식도암, 전이성 췌장암, 전이성 위암, 비인두암종, 비-소세포 폐암, 췌장 종양, 편평 세포 암종, 및 위 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 비-안구 병태는 액상 종양을 특징으로 하고, 급성 골수성 백혈병, B-세포 림프종 및 호지킨병으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0108] **B. 안구 병태의 치료**
- [0109] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 제제는 대상체에서 안구 병태를 치료하는 데 유용하다. 일부 실시형태에서, 본원에는 치료를 필요로 하는 대상체에서 안구 병태의 치료 방법이 제공되고, 방법은 치료적 유효량의 임의의 본원에 제공된 제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0110] 일부 실시형태에서, 안구 병태는 CFI 결핍을 특징으로 한다. 일부 실시형태에서, 안구 병태는 보체 시스템의 조절 장애를 특징으로 한다.
- [0111] 일부 실시형태에서, 안구 병태는 조절 장애 CFI 유전자의 존재를 특징으로 한다. 일부 실시형태에서, 안구 병태는 보체 시스템의 조절 장애 및 낮은 CFI 수준을 특징으로 한다.
- [0112] 일부 실시형태에서, 안구 병태는 당뇨병성 황반 부종(DME), 당뇨병성 망막병증, 건성 연령-관련 황반 변성

(AMD), 녹내장, 각결막염, 시신경 척수염 스펙트럼 장애(NMOSD), 개방각 녹내장, 결절성 맥락막 혈관병증, 스타 가르트병, 포도막염, 및 유리체망막병증으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0113] 일부 실시형태에서, 안구 병태는 비-종양학적이다.

[0114] C. 투여

[0115] 본원에 기재된 제제의 인비보 투여는 정맥내 또는 피하로 수행될 수 있다.

[0116] 예시적인 실시형태에서, 본원에 기재된 제제의 투여는 피하 투여이다. 일부 실시형태에서, 피하 투여는 매일, 격일, 매주 2회, 또는 매주 투여이다.

[0117] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 제제의 투여는 정맥내 투여이다.

[0118] 본원에 일반적으로 고려된 바, 본원에 기재된 CFI 변이체 또는 융합 작제물은 활성화된 2개의 사슬 형태로 전달된다. 그러나, 일부 경우에, 불활성 CFI 변이체 또는 융합 작제물은 불활성 단일 사슬 형태로 전달될 수 있다. 일부 실시형태에서, 전달되는 것은 단일 사슬 불활성과 두 사슬 활성 형태 둘 모두를 포함한다.

[0119] D. 투여량

[0120] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 임의의 제제는 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 투여량으로 이를 필요로 하는 대상체에 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 투여량은 약 1 mg/kg이다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 제제의 치료용 CFI, 변이체 또는 융합 작제물의 투여는 약 0.05 mg/kg, 약 0.1 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 1.5 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 2.5 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 3.5 mg/kg, 약 4 mg/kg, 약 4.5 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 5.5 mg/kg, 약 6 mg/kg, 약 6.5 mg/kg, 약 7 mg/kg, 약 7.5 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 8.5 mg/kg, 약 9 mg/kg, 약 9.5 mg/kg, 또는 약 10 mg/kg의 투여량으로의 피하 투여이다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 제제의 치료용 CFI, 변이체 또는 융합 작제물의 투여는 약 0.1 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 1.5 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 2.5 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 3.5 mg/kg, 약 4 mg/kg, 약 4.5 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 5.5 mg/kg, 약 6 mg/kg, 약 6.5 mg/kg, 약 7 mg/kg, 약 7.5 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 8.5 mg/kg, 약 9 mg/kg, 약 9.5 mg/kg, 또는 약 10 mg/kg의 투여량으로의 정맥내 투여이다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 치료용 CFI 변이체 또는 융합 작제물의 투여는 매일 투여, 격일 투여, 매주 투여, 또는 매주 2회 투여이다.

[0121] 일부 실시형태에서, 혈장 중 본원에 제공된 제제의 치료용 CFI, 변이체 또는 융합 작제물의 표적 수준은 약 0.1 µg/ml, 약 0.5 µg/ml, 약 1 µg/ml, 약 1.5 µg/ml, 약 2 µg/ml, 약 2.5 µg/ml, 약 3 µg/ml, 약 3.5 µg/ml, 약 4 µg/ml, 약 4.5 µg/ml, 5 µg/ml, 약 5.5 µg/ml, 약 6 µg/ml, 약 6.5 µg/ml, 약 7 µg/ml, 약 7.5 µg/ml, 약 8 µg/ml, 약 8.5 µg/ml, 약 9 µg/ml, 약 9.5 µg/ml, 약 10 µg/ml, 약 10.5 µg/ml, 약 11 µg/ml, 약 11.5 µg/ml, 약 12 µg/ml, 약 12.5 µg/ml, 약 13 µg/ml, 약 13.5 µg/ml, 약 14 µg/ml, 약 14.5 µg/ml, 15 µg/ml, 약 15.5 µg/ml, 약 16 µg/ml, 약 16.5 µg/ml, 약 17 µg/ml, 약 17.5 µg/ml, 약 18 µg/ml, 약 18.5 µg/ml, 약 19 µg/ml, 약 19.5 µg/ml, 약 20 µg/ml, 약 20.5 µg/ml, 약 21 µg/ml, 약 21.5 µg/ml, 약 22 µg/ml, 약 22.5 µg/ml, 약 23 µg/ml, 약 23.5 µg/ml, 약 24 µg/ml, 약 24.5 µg/ml, 25 µg/ml, 약 25.5 µg/ml, 약 26 µg/ml, 약 26.5 µg/ml, 약 27 µg/ml, 약 27.5 µg/ml, 약 28 µg/ml, 약 28.5 µg/ml, 약 29 µg/ml, 약 29.5 µg/ml, 약 30 µg/ml일 수 있다. 표적 수준은 약 10 µg/ml, 약 25 µg/ml, 약 50 µg/ml, 약 100 µg/ml, 약 150 µg/ml, 약 200 µg/ml, 약 250 µg/ml, 또는 심지어 약 300 µg/ml일 수 있다.

[0122] 실시예

[0123] 실시예 1: CFI, CFI 변이체 및 융합 단백질의 제조

[0124] 개요

[0125] 하기 제공된 방법은 야생형 CFI, CFI 변이체, 및 야생형 CFI 및 CFI 변이체를 포함하는 융합 작제물의 발현, 정제, 활성화, 및 인비트로 시알릴화에 적용가능하다.

[0126] 실시예 1의 경우, CFI-HSA에 대한 언급은 인간 야생형 CFI(서열 번호 21)의 N-말단 단부에 융합된 인간 혈청 알부민을 지칭한다.

[0127] 야생형 CFI-HSA 단백질을 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포에서 발현시키고, 항-알부민 친화성 정제에 의해 정제하고, 푸린으로 활성화하고, 컬럼 사이징에 의해 정제한다. 활성화된 CFI-HSA 단백질을 인비트로 시알릴화에

적용하여 CFI-HSA의 총 시알릴화를 증가시켰다. 마지막으로, 시알릴화된 단백질을 항-알부민 친화성 정제를 사용하여 정제하였고, 크기-배제 컬럼 크로마토그래피로 폴리스하였다.

[0128] 발현

[0129] CFI 단백질의 아미노 말단에 인간 혈청 알부민을 갖는 CFI-HSA 유전자(서열 번호 21)(ThermoFisher Scientific, Geneart, 독일 레겐스부르크 소재)를 합성하였다. 단백질을 발현 중 제거된 서열 번호 2의 신호 서열로 제조하였다. 아미노 말단 알부민 태그를 링커(서열 번호 6)를 통해 CFI 유전자에 연결하였다. 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 CFI-HSA 유전자를 발현 벡터(Lake Pharma, 캘리포니아주 헤이워드 소재)에 삽입하였다. 생성된 플라스미드 DNA를 E. 콜라이로 형질전환하였다. 형질감염된 E. 콜라이를 플라스미드 DNA 발현을 위해 200 ml의 LB 배지에서 성장시켰고, 표준 기술을 이용하여 수집하였다. 품질 평가를 위해 아가로오스 겔에서 플라스미드 DNA를 실행시키고, 서열을 확인한 후 형질감염을 진행하였다.

[0130] 1.0 리터의 현탁액 TunaCHO™ 세포를 셰이크 플라스크에 시딩하였고, 무-혈청 화학적 정의 배지를 사용하여 확장하였다. 형질감염 당일, 확장된 세포를 신선한 배지를 갖는 새로운 플라스크에 시딩하였다. Lipofectamine 2000(ThermoFisher Scientific)을 사용하여 플라스미드 DNA를 CHO 세포에 일시적으로 형질감염시켰다. 제조 실행이 종료될 때까지 세포를 회분식 배양물로 유지하였다. 단백질을 8% CO₂ 농도로 125 RMP에서 37°C에서 14 일 동안 발현시켰다. 세포를 원심분리하였고, 14일 발현 종료 시 분비된 CFI-HSA의 정제를 위해 상청액을 수집하였다.

[0131] 정제

[0132] 발현된 CFI-HSA 단백질을 갖는 상청액을 CaptureSelect™ 인간 알부민 친화성 매트릭스(ThermoFisher Scientific)의 10 ml 중력 유동 컬럼을 통과시켰다. 컬럼-결합된 단백질을 10 컬럼 부피의 20 mM 소듐 포스페이트 완충액으로 세척하였다. 결합된 CFI-HSA 단백질을 두 단계로 용출하였다: 단계 1에서, 3 컬럼 부피의 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 완충액 및 2 M MgCl₂로, 그리고 단계 2에서, 3 컬럼 부피의 20 mM 시트르산, pH 3.0으로. 단계 1과 단계 2 둘 모두로부터의 용출물을 5 ml 분획으로 수집하였다. 단계 2 용출의 각 분획을 10%의 중화 완충액(1.5 M tris-HCl pH 7.4)으로 중화시켰다. 모든 분획을 환원 및 비-환원 SDS-PAGE 전기영동으로 분석하였고, 밴드를 SimplyBlue™ SafeStain(ThermoFisher Scientific)으로 시각화하였다. CFI-HSA를 비-환원 겔에서 130 kDa 밴드로서 그리고 환원 겔에서는 102 kDa 및 28 kDa 밴드로서 실행한다. 최대 CFI-HSA 농도 및 순도를 갖는 분획을 추가 가공을 위해 풀링하였다.

[0133] 푸린 활성화

[0134] CFI-HSA는 불활성, 단일 사슬 전구체 단백질로 발현되고, 다른 세린 프로테아제인 푸린에 의해 활성화된다. 푸린은 보존된 RRKR 서열(푸린 인식 서열로도 지칭됨)에서 CFI를 절단시켜, 디설파이드 결합에 의해 연결된 중쇄와 경쇄를 생성하는 엔도프로테아제이다. 푸린-가공된, 성숙한, 2-사슬 단백질은 CFI 단백질의 활성화된 형태이다.

[0135] 활성화된 형태의 단백질 제조를 위한 CFI-HSA 절단은 18시간 동안 30°C에서 Tris-NaCl(tris 완충 식염수), 2.5 mM CaCl₂ 및 0.5% CHAPS에서 정제된 CFI-HSA mg당 4 µg의 제조용 푸린을 인큐베이션함으로써 수행되었다. CFI-HSA 단백질 농도는 1.4 mg/ml에서 유지되었다. 이는 90% 초과 단백질의 활성화를 유도한다. 활성화된 단백질을 크기-배제 크로마토그래피에 의해 불활성화된 CFI-HSA, 및 다른 단백질로부터 분리하였다. 크기 배제 크로마토그래피(SEC)는 HiLoad 16/600 Superdex 200 컬럼(GE Healthcare Life Sciences)과 이동상으로서 포스페이트 완충 식염수(PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4)를 사용하여 수행되었다. 수집된 분획은 CE-SDS(LabChip GXII, Perkin Elmer)에 의해 분석되었다. 표적 단백질을 함유하는 분획을 풀링하였고 SE-UPLC에 의해 분석하였다.

[0136] 인비트로 시알릴화

[0137] 활성화된 CFI-HSA 단백질은 인비트로 시알릴화되었다. 간략하게, 시알릴화는 두단계 효소 반응으로 수행되었다. 먼저, 10 mM UDP-갈락토오스, 5 mM MnCl₂, 및 100 mM MES, pH 6.5 완충액 중 1:200 물 비의 갈락토실트랜스퍼라아제(GalT1) 효소 및 CFI-HSA를 이용하여 200 µl 부피에서 CFI-HSA의 갈락토실화 반응을 수행하였다. 갈락토실화된 CFI-HSA는 이전에 기재된 바와 같이 CaptureSelect™ 인간 알부민 친화성 크로마토그래피에 의해 반응 혼합물로부터 정제되었다. 다음으로, 1시간 동안 37°C에서 80 µM 알칼린 포스파타아제, 6.1 mM

CMP-NANA, 10 mM ZnCl₂ 및 200 mM MES 완충액, pH 6.5 중 1:50 몰 비의 효소 알파 2,6-시알릴 트랜스퍼라아제 및 정제된 CFI-HSA를 이용하여 250 µl 부피에서 시알릴화 반응을 수행하였다. 시알릴화된 CFI-HSA 단백질을 CaptureSelect™ 인간 알부민 친화성 크로마토그래피에 의해 반응 혼합물로부터 정제하였다. CFI-HSA 상의 시알릴산 사슬의 범위와 특징은 하기 추가로 상세히 설명된, 총 시알릴산 정량화를 위한 Agilent/Prozyme 분석 서비스, GS-SAP 방법(Agilent GS48), 및 질량 분광광도계(MS) 분석(Lake Pharma 분석 서비스)을 이용하여 결정되었다.

[0138] 간략하게, 총 시알산 정량화는 96 웰 플레이트에서 10 µl의 방출 시약과 20 µl의 각 샘플을 혼합함으로써 수행되었다. 반응 혼합물을 80℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 실온으로 냉각시켰고, 10 µl의 라벨링 시약을 50℃에서 3시간의 추가 인큐베이션 동안 각 샘플에 첨가하였다. 샘플을 실온으로 다시 냉각시켰고, 160 µl의 탈이온수(dI)를 첨가하여 총 부피를 200 µl로 만들었다. 4% 메탄올, 물 중 8% 아세트 니트릴(라인 A1) 및 100% ACN(라인 B1) 중에서 30℃에서 0.4 ml/분의 유속으로 실행하도록 10 µl의 샘플을 Agilent UHPLC Poroshell C18 컬럼에 주입하였다. 피크를 373/448 nm 파장에서 기록하였다. 시알산의 피코몰(pmol)에 대한 총 피크 면적의 표준 곡선은 동일한 컬럼에서 키트와 공급된 1 내지 2000 pmol의 NANA(N-아세틸 뉴라민산, Neu5Ac)를 실행함으로써 생성되었다. 각 샘플의 총 시알산을 표준 곡선에 대해 샘플 피크 영역을 비교함으로써 정량화하였다.

[0139] 질량 분광광도 분석은 표준 트립신 Q-TOF 질량 분석기에 의해 수행되었다. 간략하게, 모든 샘플을 DTT 및 요오도아세트아미드로 처리, 환원 및 알킬화한 후 트립신 소화를 수행하였다. 소화된 샘플은 단백질 BEH C18 컬럼을 사용하여 Xevo G2-XS-QTOF 질량 분석기와 결합된 Waters ACQUITY UPLC에 의해 분석되었다.

[0140] 폴리싱

[0141] 정제된 CFI-HSA 단백질을 HiLoad 16/600 Superdex 200 컬럼(GE Healthcare Life Sciences) 및 이동상으로서 포스페이트 완충 식염수를 사용하여 크기-배제 크로마토그래피(SEC)에 적용하였다. 수집된 분획은 CE-SDS(LabChip GXII, Perkin Elmer)에 의해 분석되었다. 표적 단백질을 함유하는 분획을 풀링하였고, 농도를 5 mg/ml로 만들었고, 샘플을 급속 냉동하여 -80℃에서 저장하였다.

[0142] CFI-HSA 변이체의 발현 및 정제

[0143] CFI-HSA 변이체의 DNA를 표준 기술을 이용하여 합성 또는 부위-지정 돌연변이유발에 의해 생성하였다. 14일 대신 7일 동안 발현을 수행한 것을 제외하고, 야생형 CFI-HSA 단백질과 관련하여 본원에 기재된 바와 같이 TunaCHO™ 세포 중 250 ml의 현탁액에서 단백질을 발현시켰다. 7일 후, 세포를 원심분리하였고, 컨디셔닝된 배지를 CaptureSelect™ 인간 알부민 친화성 매트릭스(ThermoFisher Scientific)의 중력 유동 컬럼을 통과시켰다. 컬럼-결합된 단백질을 10 컬럼 부피의 20 mM 소듐 포스페이트 완충액으로 세척하였다. 결합된 CFI-HSA 단백질은 5 ml 분획으로 3 컬럼 부피의 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 완충액 및 2 M MgCl₂로 용출되었다. CFI-HSA 또는 이의 변이체를 30 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4로 완충액 교환하였다(투스락 또는 스핀 농축기에 의해). 1:25의 몰 비(푸린:CFI-HSA)로 제조한 인간 푸린을 CFI-HSA에 첨가하였고, 반응 혼합물을 16시간 동안 30℃에서 인큐베이션하였다. 활성화 효율을 평가하기 위해 9% SDS-PAGE 겔에서 2 마이크로그램의 활성화 혼합물을 실행하였다. 일반적으로, 80% 초과 활성화율을 달성하였다.

[0144] 실시예 2: 제제 개발 연구 I

[0145] 실시예 2의 경우, CFI-HSA에 대한 언급은 야생형 CFI(서열 번호 21)의 N-말단 단부에 융합된 인간 혈청 알부민을 지칭한다. CFI-HSA는 약 150 mg/mL의 농도에서 제제화되었다.

[0146] 연구는 안정성을 위한 최적의 옵션을 제공하는 조건을 평가하기 위해 다양한 액체 및 동결건조 제제에서, CFI-HSA의 물리적 및 화학적 특성을 조사하도록 고안되었다. 예를 들어, 피하 투여를 가능하게 하기 위해서는, CFI 함유 조성물의 고농도 및 안정성이 바람직할 것이다.

[0147] 본 연구에서 시험된 활성 약학 성분(API)은 CFI-HSA(서열 번호 21)였다. 본 연구에 사용된 물질은 하기를 포함하였다:

[0148] (1) 약물 물질: CFI-HSA, 153.4 mg/mL, F1 제제

[0149] (2) CFI-HSA를 제제화하고 분석하는 데 사용된 화학물질과 물질은 표 2.1에 나타난 것과 같고, 하기와 같다:

[0150] [표 2.1]

물질

화학물질	공급사	카탈로그 번호	CAS #	등급
아세트산	EMD	AX0073-9	64-19-7	
소르비톨	EMD	111597	50-70-4	EP, BP, NF, JP
NaCl	EMD	106404	7647-14-5	EP
석신산	Sigma Aldrich	1623411	110-15-6	USP
아르기닌.HCl	Sigma Aldrich	A4599	1119-34-2	EP, JP, USP
수크로오스	Pfanstiehl	S-124-2-MC	57-50-1	NF, EP, JP, ChP
트레할로오스	Pfanstiehl	T-104-4	6138-23-4	NF, EP, JP, ChP
글리신	JT Baker	0581-05	56-40-6	USP
폴리소르베이트 80	Croda	Super Refined™	9005-65-6	USP, JP, EP

[0151]

[0152] 본 안정성 연구에서, CFI-HSA의 안정성은 최적 범위의 pH에 걸쳐 다양한 양성 개질제/별크화제를 함유하는 12개의 제제에서 모니터링되었다. 표 2.2는 시험된 12개에 대한 제제 매트릭스를 제공한다.

[0153] (1) pH 5 내지 7

[0154] (2) 완충제(본원에서 또한 완충화 작용제로 상호교환적으로 지칭됨)

[0155] (3) 양성 개질제(비-이온성 완충제의 경우 소르비톨 또는 트레할로오스, 및 이온성 완충제의 경우 소듐 클로라이드)

[0156] (4) 별크화제(트레할로오스 또는 글리신)

[0157] (5) 계면활성제

[0158] [표 2.2]

제제 매트릭스

Form 번호	Form. 유형	완충제(20 mM)	pH	장성 개질제/벌크화제	API (mg/mL)	계면활성제
1	액체	소듐 아세테이트	5	5% 소르비톨	150	0.02% PS 80
2	액체	소듐 아세테이트	5.5	5% 소르비톨	150	0.02% PS 80
3	액체	소듐 아세테이트	5.5	150 mM NaCl	150	0.02% PS 80
4	액체	소듐 아세테이트	5.5	70 mM 아르기닌.HCl, 2% 수크로오스, 60 mM 클리신	150	0.02% PS 80
5	액체	히스티딘 HCl	6	70 mM 아르기닌.HCl, 2% 수크로오스, 60 mM 클리신	150	0.02% PS 80
6	액체	히스티딘 HCl	6	150 mM NaCl	150	0.02% PS 80
7	Lyo	소듐 석시네이트	5	10% 트레할로오스	150	0.02% PS 80
8	Lyo	소듐 석시네이트	5	5% 트레할로오스 2.0% 글리신	150	0.02% PS 80
9	Lyo	히스티딘 HCl	6	10% 트레할로오스	150	0.02% PS 80
10	Lyo	히스티딘 HCl	6	5% 트레할로오스, 2% 글리신	150	0.02% PS 80
11	Lyo	히스티딘 HCl	7	10% 트레할로오스	150	0.02% PS 80
12	Lyo	히스티딘 HCl	7	5% 트레할로오스, 2% 글리신	150	0.02% PS 80

*Form. = 제제; API = 활성 약학 성분; CFI-HSA; Lyo=동결건조됨

[0159]

[0160] 동결건조된 제제 제조

[0161] 각 제제에 대해, CFI-HSA DS 용액을 투석 카세트(Slide-A-Lyzer® 투석 카세트, 10,000 MWCO)에 로딩하였다. 제제를 각각의 제제 완충액으로 투석하였다.

[0162] 제제를 무균 BSC에서 0.2 μm PES 막을 통해 멸균-여과하였고, 0.2 mL까지 2 cc 멸균 유리 바이알에 채웠다. 이후, 바이알을 lyo 벤트 마개로 부분적으로 마개로 막았고, 표 2에 설명된 파라미터를 사용하여 동결건조하였다. 동결건조 후, 챔버를 질소로 다시 채웠고, 바이알을 마개로 막았다. 이후, 바이알을 꺼내고, 마개로 막고, 압착하고, 라벨링하였다. 추가의 바이알을, 사전 동결건조 분석을 제로 시점(time zero)에 함께 수행하기 위해, 동결건조 전에 곁에 두고 동결시켰다.

[0163] 액체 제제 제조

[0164] 각 제제에 대해, CFI-HSA DS 용액을 투석 카세트(Slide-A-Lyzer® 투석 카세트, 10,000 MWCO)에 로딩하였다. 제제를 각각의 제제 완충액으로 투석하였다. 제제를 무균 BSC에서 0.2 μm PES 막을 통해 멸균-여과하였고, 2 cc 멸균 유리 바이알에 0.2 mL까지 채웠다. 이후, 바이알을 마개로 막고, 압착하고, 라벨링하였다.

[0165] 분석 방법

[0166] 하기 분석 방법을 이용하였다.

[0167] (1) 육안 검사: 흑색 또는 백색 백그라운드에 대해 백색 광원(13W 형광등) 하에서 육안 검사를 수행하였다. 모든 시점에서 모든 제제의 디지털 사진을 획득하였다.

[0168] (2) 농도 측정: CFI-HSA의 농도를 1.041 mg/mL⁻¹ x cm⁻¹의 E.C.를 사용하여 SoloVPE를 통해 A280에 의해 분석하였다.

[0169] (3) SE-HPLC: 크기-배제 HPLC 크로마토그래피를 하기 파라미터를 이용하여 실행하였다.

- HPLC: Agilent 1260 시스템
- 컬럼: Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 4.6 x 300 mm, 2.7 μm, LC 컬럼 P/N: PL1580-5301
- 이동상: 150 mM 소듐 포스페이트, pH 6.9 ± 0.1
- 희석제: DI 수
- 샘플 농도: 0.5 mg/mL
- 유속: 0.35 mL/분
- 실행 시간: 15 분
- 오토샘플러 온도: 5°C
- 컬럼 온도: 30°C
- 흡광도 검출: 280 nm, 215 nm
- 주입 부피: 20 μL
- 주입 로드: 15 분

[0170]

[0171] (4) FlowCAM: FlowCAM 입자 이미징 시스템은 입자의 자동화된 분석을 위해 광학, 전자공학, 및 유체공학을 조합한다. 광학 시스템은 유동 셀을 통과함에 따른 유체 중 입자의 실시간 이미지를 캡처하는 데 사용된다. 이미징 소프트웨어는 입자 크기와 형태를 평가하는 능력을 제공한다. 모든 샘플을 분석하였고, 75 torr에서 30 분 동안 탈기한 후 분석하였다.

[0172] (5) 대기 이하(Sub-Ambient) DSC: Intercooler II를 갖는 Pyris Diamond DSC를 사용하여, 대략 10 μL의 각각의 샘플을 -60°C에서 동결시켰다. 10°C.분의 램프 속도로, 샘플을 해동될 때까지 가온시키고, 가온 과정 중 열 흐름을 기록하였다.

[0173] (6) 푸리에 변환 적외선 분광법(FTIR): FTIR은 기체, 액체, 또는 고체의 적외선 흡수 스펙트럼을 획득하기 위해 사용된 기술이다. IBI는 파수 [cm⁻¹]에 대해 샘플 물질의 적외선 복사 흡수를 수집하는 FTIR-660 Plus 분광계를 사용한다. 이러한 데이터는 폴리펩티드의 2차 구조에 대한 정보를 제공한다.

[0174] 계면활성제 스크리닝

[0175] CFI-HSA 약물 물질을 물을 이용하여 15 mg/mL로 희석하였다. 이후, 용액을 0.2 μm 시린지 필터를 통해 멸균 여과하였고, 1.0 mL의 충전량으로 3 cc 바이알에 채웠다. 이후, 각각 4개의 바이알에 1% PS20, 1% PS80, 또는 10% F-68의 스톱 용액을 직접 스파이킹하여, 0.015% PS20, 0.015% PS80, 또는 0.15% F-68의 최종 농도에 도달하였다. 4개의 채워진 바이알을 무-계면활성제 대조군으로 사용하였다. 조건별로 총 4개의 바이알을 제조하였다. 조건별 바이알을 셰이커에 두었고, 주변 온도에서 4시간 동안 1000 rpm에서 진탕하였다. 조건별 하나(1)의 바이알을 4시간 동안 주변 온도에서 동시 인큐베이션하였다.

[0176] [표 2.3]

계면활성제 스크린 매트릭스

계면활성제	CFI-HSA(mg/mL)
없음(계면활성제 없음)	15.3
0.015% PS20	
0.015% PS80	
0.15% F-68	

[0177]

[0178] 계면활성제를 갖는 CFI-HSA 및 계면활성제를 갖지 않는 CFI-HSA의 안정성을 4시간 동안 진탕(오비탈 셰이커에서 1000 RPM, 실온); 및 실온에서 4시간 동안 정적 조건 후 연구하였다.

[0179] 진탕 및 정적 조건 후, 모든 샘플은 계면활성제에 관계 없이 투명, 무색이며, 가시적인 미립자가 없는 것으로 나타났다.

[0180] 4시간의 진탕 또는 정적 인큐베이션 후, PS80, PS20, 및 F68이 있거나 없는 모든 샘플에 대해 유사한 크로마토

그래피 프로파일이 관찰되었다. 모든 샘플은 또한 유사한 순도와 총 피크 면적을 보였다(표 2.4).

[표 2.4]

계면활성제 스크리닝 SE-HPLC 결과

샘플	정적 샘플		진탕 샘플 1		진탕 샘플 2	
	전체 면적 비율(%)		전체 면적 비율(%)		전체 면적 비율(%)	
	HMW 1	주요 피크	HMW 1	주요 피크	HMW 1	주요 피크
계면활성제 없음	0.2	99.8	0.6	99.4	0.5	99.5
폴리소르베이트 80	0.2	99.8	0.5	99.5	0.5	99.5
폴리소르베이트 20	0.2	99.8	0.6	99.4	0.4	99.6
폴록사머 F68	0.2	99.8	0.3	99.7	0.2	99.8

FlowCam 분석은 표 2.5에 나타나 있다. 계면활성제가 없는 샘플은 입자 수의 유의한 증가를 보여준다. 그러나, 모든 계면활성제-함유 샘플은 계면활성제와 관계없이 상대적으로 낮은 입자 농도를 보였다.

[표 2.5]

계면활성제 스크리닝 FlowCam 결과

입자/mL	계면활성제															
	계면활성제 없음				PS80(0.02%)				PS20(0.01%)				Pluronic F68(0.1%)			
	정적	진탕			정적	진탕			정적	진탕			정적	진탕		
		1	2	3		1	2	3		1	2	3		1	2	3
>2 μm	498	5111	6896	1516	648	409	1904	818	259	1504	3442	1335	80	2143	988	2232
>5 μm	90	1365	2173	608	279	109	509	120	110	578	978	309	30	668	265	578
>10 μm	50	259	239	150	10	35	70	20	20	90	190	70	10	90	49	60
>25 μm	0	10	0	0	0	7	0	0	0	10	50	0	0	20	25	0

이러한 결과를 기반으로, 0.02% 폴리소르베이트 80이 제제 최적화 연구의 다음 라운드를 위한 최적의 선택 중 하나로 결정되었다.

제제 최적화

가속 안정성 연구의 목적은 150 mg/mL의 CFI-HSA를 함유하는 액체 및 동결건조된 제제 둘 모두의 안정화를 평가하기 위한 것이었다. 모든 제제를 0.2 mL 충전량으로 채웠고, F7 내지 F12를 동결건조하였다. 사전-동결건조된 샘플은 동결건조 사이클 기간 동안 -70℃에서 동결되었고, 분석을 위해 제로 시점에 해동되었다.

본 연구는 냉장(5℃), 스트레스(25℃), 및 가속(40℃) 저장 온도에서의 모든 제제 후보의 인큐베이션을 포함하였다. 연구의 온도 저장 부분은 4주 기간에 걸쳐 수행되었다. 표 2.6은 제제 안정성 평가에 사용된 저장 조건을 요약한다.

[표 2.6]

안정성 연구 스트레스 조건의 요약

스트레스	조건	시점(들)
온도(액체)	5°C; 25°C; 40°C	0, 1, 2, 4주
온도(동결건조됨)	5°C; 25°C; 40°C	
진탕	Vortex	1000 RPM에서 4시간

제로 시점에, 바이알을 표 2.6에 따라 적절한 온도에 두었다. 각 시점에 바이알을 꺼내 분석하였다.

[0193] 제로 시점에, 모든 사전-동결건조된 제제는 투명, 무색이며, 가시적인 미립자가 없는 것으로 나타났다. 동결건조된 제제는 양호한 케이크를 나타냈다. 모든 액체 및 재구성된 동결건조된 제제는 투명하고, 약간 황색빛을 띠는 색조이고, 가시적인 미립자가 없는 것으로 나타났다. 최대 4주 시점의 연구 전반에 걸쳐, 저장 온도에 관계없이, 동결건조된 케이크에는 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 유사하게, 대부분의 액체 및 재구성된 동결건조된 제제는 모든 온도에서 투명하고, 황색빛을 띠는 색조이고, 가시적인 미립자가 없는 것으로 나타났다.

[0194] 제로 시점에, 130 mg/mL 내지 160 mg/mL 범위에서, 모든 제제는 표적 근처 농도를 나타냈다. 최대 4주 시점의 연구 전반에 걸쳐, 5°C, 25°C, 및 40°C에서의 대부분의 제제는 실험적 변동 범위 내의 농도를 나타냈다. 표 2.7은 안정성 농도 결과를 보여준다.

[0195] [표 2.7]

안정성 농도 결과

Form 번호		농도(mg/mL)								
		T = 0	T = 1주		T = 2주			T = 4주		
			25°C	40°C	5°C	25°C	40°C	5°C	25°C	40°C
1	액체	150.49	150.25	148.81	144.89	145.86	147.50	148.1	143.0	142.8
2		144.67	157.14	156.21	153.71	151.85	154.11	155.5	155.4	158.8
3		143.57	149.07	145.49	117.26	116.40	109.87	117.7	118.0	110.3
4		141.64	147.39	139.79	136.98	136.45	130.40	138.3	139.5	133.0
5		147.23	151.12	147.23	130.47	133.93	125.85	130.3	132.3	118.1
6		128.91	135.09	127.99	118.92	120.16	107.19	119.3	119.4	94.7
7	LYOPH	156.46	180.31	175.71	170.60	174.47	174.83	168.9	174.2	185.4
8		158.47	160.32	150.62	142.27	151.29	152.59	153.6	153.1	151.9
9		178.19	170.42	174.25	171.15	155.01	171.56	151.3	174.2	169.4
10		143.10	141.45	146.56	147.61	146.88	147.56	145.5	146.9	149.4
11		147.09	154.29	139.70	146.20	143.73	143.09	146.8	143.6	151.6
12		128.43	127.70	126.12	128.12	127.46	127.72	127.6	127.9	128.5
13		137.87	N/A	136.39	N/A	N/A	199.96	N/A	148.8	143.9

[0196]

[0197] CFI-HSA의 FTIR 스펙트럼은 1650 내지 1660 cm^{-1} 에서 강한 α -나선형 신호로 알부민에서 보고된 것과 유사한 것으로 나타났다. CFI-HSA가 후보 제제에서 동결건조된 경우 FTIR 스펙트럼의 주요 변화는 관찰되지 않았다.

[0198] 제로 시점에, 재구성된 동결건조된 제제를 포함하는 모든 제제는 경미한 HMW(고분자량) 및 LMW(저분자량) 피크의 유사한 크로마토그래피 프로파일을 나타냈다. (SE-HPLC 결과)

[0199] 25 내지 40°C에서 1주 저장 후, 모든 액체 제제는 LMW뿐만 아니라 HMW도 증가한 것으로 나타났다. LMW의 증가는 낮은 pH에서 훨씬 더 빨랐다. 그러나, 모든 동결건조된 제제는 특히 LMW의 증가 징후 없이 훨씬 더 안정하게 유지되었다. (SE-HPLC 결과)

[0200] 5, 25 및 40°C에서 2주 저장 후, 모든 액체 제제는 LMW뿐만 아니라 HMW도 증가한 것으로 나타났다. LMW의 증가는 낮은 pH에서 훨씬 더 빨랐다. 그러나, 모든 동결건조된 제제는 특히 LMW의 증가 징후 없이 훨씬 더 안정하게 유지되었다. (SE-HPLC 결과)

[0201] 일반적인 분해 과정은 5, 25 및 40°C에서 4주 시점에서 일정하게 유지되었다: 모든 액체 제제는 LMW뿐만 아니라 HMW도 증가한 것으로 나타났다. LMW의 증가는 낮은 pH에서 훨씬 더 빨랐다. 그러나, 모든 동결건조된 제제는 특히 LMW의 증가 징후 없이 더 안정하게 유지되었다. (SE-HPLC 결과)

[0202] 40°C에서 4주 저장에 걸쳐 각각 시험된 제제의 분해 속도를 비교하였다. 모든 시험된 제제 중에서, 본 연구에서, 트레할로오스와 글리신 둘 모두를 벌크화제로서 함유하는 동결건조된 제제는 6 내지 7의 pH 범위에서 수행성이 최상이었다.

- [0203] **결과**
- [0204] 다양한 제제 조건에서 150 mg/mL에서의 CFI-HSA의 안정성을 본 실시예에서 시험하였다. 조사된 조건은 5.0 내지 7.0 범위의 pH 값에 걸쳐 다양한 완충액(20 mM 소듐 아세테이트, 소듐 석시네이트, 또는 히스티딘.HCl.), 장성 개질제(소듐 클로라이드, 소르비톨, 또는 트레할로오스), 벌크화제(트레할로오스 또는 글리신)를 함유하는 액체 제제 및 동결건조된 제제를 포함하였다. 최대 4주 동안 냉장(5℃), 주변(25℃), 및 가속(40℃) 온도에서의 정적 저장 조건 하에서 제제를 시험하였다. 연구 과정에 걸쳐, 육안 검사, 농도, SE-HPLC, 및 FlowCAM에 의한 분석을 수행하였다. 추가적으로, 동결건조된 제제를 또한 DSC 및 FTIR로 분석하였다.
- [0205] 초기에, 일반적으로 사용된 계면활성제 안정화제를 사용하여 작은 계면활성제 스크린을 수행하였다. 연구는 진탕 유도된 전단 응력에 대한 노출 후 분해에 대한 CFI-HSA의 안정화에 있어서 계면활성제의 이점을 평가하였다. 15 mg/mL의 CFI-HSA 약물 물질에 계면활성제 0.015% PS20, 0.015% PS80, 및 0.15% F68을 스파이킹하였다. SE-HPLC에 의한 진탕 응력 후 계면활성제-함유 바이알의 비교는 진탕과 관계 없이 모든 샘플에 대해 유사한 프로파일을 보였다. 그러나, MFI 분석은 무-계면활성제 샘플이 실질적으로 계면활성제를 함유하는 샘플에 비해 비-가시적인 미립자 농도를 증가시켰음을 입증하였다. 이는 CFI-HSA가 전단 응력에 감응성이었고, 추가 연구에서 계면활성제를 첨가하면 개선된 안정성이 달성될 수 있다는 증거를 제공하였다. 가속 안정성 연구를 위해 약물 물질의 현재 계면활성제인 0.02% PS80을 선택하였다.
- [0206] 12개의 후보 제제의 제조 후, 모든 샘플은 제로 시점에 투명하며, 가시적인 미립자가 없는 것으로 나타났다.
- [0207] 전체 연구 전반에 걸쳐, 저장 온도와 관계 없이 동결건조된 케이크에서 시각적 외관의 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 유사하게, 대부분의 액체 및 재구성된 동결건조된 제제는 모든 온도에서 대표적인 황색빛을 띤 색조이며 투명하게 보였다. 4주 후, 대부분의 제제는 모든 저장 조건에서 목표 농도에 근접하였다.
- [0208] FTIR 결과에서, 사전-동결건조된 샘플과 동결건조된 샘플 사이의 스펙트럼 프로파일에서 유의한 차이가 없음을 확인하였다.
- [0209] FlowCAM 분석은 모든 샘플에 대해 상대적으로 낮은 차감된 비가시적 입자 농도를 보였는데, 이는 침전 또는 입자가 적절히 제제화된 CFI-HSA에 대한 중요한 요소가 아님을 시사한다.
- [0210] 가속 연구는 극압 조건 하에서 수행되었고, 예측이 불가능할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 모든 온도에서의 4주 후 SE-HPLC에 의한 분석은 액체 제제, 특히 F1, F2, F3, 및 F4와 같이 낮은 pH 제제에서 유의하게 더 높은 LMW를 보였다. 심지어 pH 6에서도, F5 및 F6은 5℃에서 4주 동안 저장 중 LMW가 대략 1% 증가하였다. CFI-HSA의 자가분해를 억제하는 데 효과적인 첨가제를 포함시키는 것이 유용할 수 있다. CFI-HSA가 동결건조되는 경우, 자가분해가 중단된다. 동결건조된 제제가 40℃에서 4주 동안 저장된 경우 LMW의 유의한 증가는 관찰되지 않았다. 시험된 것 중에서, 비-이온성 트레할로오스에 비해 벌크화제로서 이온성 벌크화제인 글리신을 함유하는 제제 F8, F10, 및 F12는 응집에 대해 개선된 안정성을 보였다. 또한, pH가 5에서 7로 증가함에 따라 응집은 보다 느려졌다.
- [0211] 주요 분해 생성물과 안정성을 나타내는 검정은 SE-HPLC에 의한 HMW 및 LMW의 증가로 확인되었다. 본 연구에서 생성된 모든 결과를 기반으로, 150 mg/mL에서의 CFI-HSA에 대한 주요 제제 중 하나는 pH 6.0 내지 7.0에서 20 mM 히스티딘, 5.0% 트레할로오스, 2.0% 글리신, 및 0.02% 폴리소르베이트 80의 동결건조된 조건일 수 있다.
- [0212] **실시예 3: 제제 개발 연구 II**
- [0213] 본원에 기재된 활성 성분에 대한 추가 제제를 독립 연구로 개발하였다. 피하 투여를 가능하게 하기 위해서는, CFI 함유 조성물의 고농도 및 안정성을 달성하는 것이 바람직하다.
- [0214] 실시예 3의 경우, CFI-HSA에 대한 언급은 야생형 CFI(서열 번호 21)의 N-말단 단부에 융합된 인간 혈청 알부민을 지칭한다. CFI-HSA는 30 내지 189 mg/mL의 농도에서 제제화되었다.
- [0215] **생물물리학 특징 및 pH 안정성 프로파일**
- [0216] pH 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 또는 7.5에서, 135 mM 소듐 클로라이드를 함유하는 시트레이트 포스페이트 완충액으로 5 mg/mL의 CFI-HSA의 스톱 용액을 투석하였다. 임의의 잠재적 침전을 평가하기 위한 시각적 관찰 후, 샘플을 0.2 마이크론으로 여과하였고, 상응하는 완충액에서 2 mg/mL로 조정하였고, 무균 상태로 마이크로튜브로 옮겼다. 샘플 세트를 -70℃, 25℃, 또는 40℃에서 저장하였다. 7일 후, 세트를 외관(유백광 및 입자), 단백질 농도(OD280), SEC, DSF, DLS, icIEF, CE-SDS, 및 S2288 발색 활성 검정에 의해 분석하였다.

[0217] 25℃ 또는 40℃에서 7일 저장 후, 모든 샘플은 시험된 온도 및 모든 pH 수준 둘 모두에서 육안으로 검출가능한 입자 없이 시각적으로 투명한 것으로 확인되었다. 단백질 농도는 모든 샘플에서 안정하였다(표 3.1).

[0218] [표 3.1]

25℃ 및 40℃에서 1 주 저장 후 CFI-HSA 농도

샘플 코드	pH	온도	투석 직후 5에서 2 mg/ml로 조정된 농도(mg/mL)	투석 후 1 주차 농도(mg/mL)
샘플 A	5.0	25℃	2.0	1.95
샘플 A	5.0	40℃	2.0	1.94
샘플 B	5.5	25℃	2.0	2.0
샘플 B	5.5	40℃	2.0	2.02
샘플 C	6.0	25℃	2.0	1.99
샘플 C	6.0	40℃	2.0	2.02
샘플 D	6.5	25℃	2.0	1.98
샘플 D	6.5	40℃	2.0	1.99
샘플 E	7.0	25℃	2.0	1.97
샘플 E	7.0	40℃	2.0	1.99
샘플 F	7.5	25℃	2.0	2.02
샘플 F	7.5	40℃	2.0	2.04

[0219]

[0220] SEC-HPLC는 저장 조건 하에서 응집을 평가하기 위해 사용되었다. 25℃ 저장 시, 주요 피크 순도는 pH가 7.5에서 5.0로 감소함에 따라 지속적으로 증가하는 것으로 나타났다. 대조적으로, pH 5.0 및 40℃ 저장 조건에서, 주요 피크 순도는 급격히 감소하였고, 보다 낮은 분자량 종이 스파이크를 가졌는데, 이는 잠재적인 단백질 분해가 발생하였음을 나타낸다. 요약하면, 이러한 조건 하에서, 5.5 내지 6.0의 pH가 CFI-HSA 안정성을 위한 최적의 범위인 것으로 나타났다.

[0221] 저장 조건 하에서 응집을 추가로 평가하기 위해 동적 광 산란(DLS)으로 입자 집합체(ensemble collection)의 유체역학적 크기를 측정하였다. 결과는 강도 가중 평균(Zave)과 다분산도 둘 모두가 pH 5에서 급격히 증가하였지만, pH 6 내지 7.5에서는 유사했다는 것을 보였다. 한편, 주요 종(99.8% 초과)의 크기는 pH가 증가함에 따라 약간 증가하였다. 종합하면, DLS로 측정된 다분산도와 입자 크기 데이터는 최적 저장 pH가 약 6인 것을 나타냈고, 이는 SEC-HPLC 결과를 확증한다.

[0222] CE-SDS를 수행하여 사전-제제를 사용하여 순도 변화를 평가하였다. 결과는 환원 및 비-환원 CE-SDS 둘 모두에 의해 pH 5 및 7.5에서 순도가 약간 감소하고, pH 5.5 내지 6.5에서 순도가 유사했음을 보였다. 유사하게, 시차 주사 형광측정(DSF)에 의해 5.5 내지 7.0의 최적 pH 수준이 제안된 반면, 이미징 모세관 등전점 포커싱(icIEF)에 의해 pH 5가 가장 안정하지 않은 것으로 확인되었다.

[0223] 고농도 액체 제제

[0224] 고농도 제제의 타당성을 평가하였다. 정제된 CFI-HSA를 20 mM 히스티딘, 150 mM ArgHCl, 5.8의 pH로 투석하였고, 스핀 필터 장치에서 189 mg/mL로 농축시켰다. 고농도의 아르기닌을 사용하여 용해도를 증가시켰고, 농축된 CFI-HSA에 의해 유발된 과도한 점도를 방지하였다. 단백질 농도와 아르기닌 농도가 점도에 미치는 영향을 평가하기 위해, 189 mg/mL에서의 농축된 샘플을 또한 20 mM His, 5.8의 pH에서 169 mg/mL로 희석시켜 135 mM ArgHCl에 도달시켰다. 표 3.2에 제시된 데이터는 점도가 심지어 189 mg/mL CFI-HSA에서도 단지 10.6 센티푸아즈(CP)인 것을 나타냈고, 이는 시험된 제제를 사용하여 과도한 점도의 위험이 최소화되었음을 나타낸다.

[0225] [표 3.2]

고농도 CFI-HSA의 점도

CFI-HSA	완충액	점도
189 mg/mL	20 mM His, 150 mM Arg.HCl, 5.8의 pH	10.6 CP
169 mg/mL	20 mM His, 135 mM Arg.HCl, 5.8의 pH	8.1 CP

[0226]

[0227] 농축된 샘플을 0.2 마이크로ном으로 여과하였고, SEC를 사용하여 응집물에 대해 시험하였다. 5 mg/mL로 희석되고, 5℃ 오토샘플러에 저장된 150 mM 아르기닌 중 188.7 mg/mL 샘플에서는 응집물 수준에서의 변화(1.5%)가 관찰되

지 않았다. 5 mg/ml로 희석되고 1주 동안 5℃ 오토샘플러에 저장된 169.7 mg/mL 샘플은 단지 1.72% 응집물만을 보였다. 이후, 5 mg/ml로 희석된 5℃ 에서 1주 후 169.7 mg/mL 샘플은 2.5% HMW 종을 보였다.

[0228] 169.7 mg/mL로 농축된 CFI-HSA 샘플의 생활성은 S2288 발색 검정을 사용하여 평가되었다. 도 20에 도시된 바와 같이, 169.7 mg/mL 샘플의 활성은 대조군(Ct1) 샘플의 활성과 유사하다. 곡선 기울기의 경미한 차이는 점성 용액의 상당한 희석 후 검정에서 최종 농도가 부정확한 것에 기인할 수 있거나, 5℃에서 약 1개월 저장 후 생활성의 일부 손실에 기인할 수 있다.

[0229] 종합하면, 이러한 결과는 아르기닌 히드로클로라이드와 히스티딘 완충제를 함유하는 액체 제제가 고농도(예를 들어, 150 mg/mL 초과)에서 CFI-HSA를 안정화할 수 있음을 시사한다.

[0230] 제제 스크리닝

[0231] 제제(F1 내지 F7)의 패널을 스크리닝하여 CFI-HSA의 안정성에 대한 이온 강도, 완충제 유형, 동결보존제 및 칼슘 클로라이드(CaCl_2)의 효과를 결정하였다. 제제는 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하였고, 이는 다양한 농도의 장성 개질제(본원에서 상호교환적으로 등장화제로도 지칭됨), 동결보존제, 동결건조보존제, 안정화제 및 계면활성제를 포함하고, 이전에 시험된 히스티딘 및 아르기닌 완충액에 첨가되었다. 표 3.3은 본 실시예, F1 내지 F7에서 시험된 제제를 보여주며, 이는 실시예 2의 F1 내지 F12와 혼동되어서는 안된다.

[0232] [표 3.3]

CFI-HSA 에 대해 시험된 제제

제제	pH	히스티딘 완충액(mM)	등장화제 아르기닌 히드로클로라이드(mM)	동결보존제/동결건조보존제	안정화제	계면활성제(PS20)	삼투압
F1	5.8	20	135	-	-	0.02%	279
F2	5.8	20	70	4% 글루코오스	-	0.02%	279
F3	5.8	20	-	8.5% 수크로오스	-	0.02%	285
F4	5.8	20	70	120 mM 글리신	-	0.02%	282
F5	5.8	20	70	2.5% 소르비톨	-	0.02%	299
F6	5.8	20	70	4% 트레할로오스	-	0.02%	279
F7	5.8	20	-	5% 수크로오스	35 mM CaCl_2	0.02%	279

[0233]

[0234] 스톱 CFI-HSA 샘플을 약 40 mg/mL로 농축한 후, 표 3.3에 나열된 7개의 제제에 대해 투석하였다. 농축된 샘플을 0.2 마이크론으로 여과하였고, 무균 상태로 유리 바이알에 채웠고, 캡핑하였다. 각 조성물의 한 바이알을 동결과 해동의 3회 사이클에 적용하였고, 외관, OD280 및 SEC로 평가하였다. 단기간 열 안정성 연구를 위해, 각 조성물의 4개의 바이알을 5주 안정성 연구에 포함시켰고, 각각 -70℃, 5℃, 25℃ 및 40℃에서 수행하였다. 5주 안정성 샘플을 OD280, SEC 및 CE-SDS로 분석하였다. 또한, 탈아미드화 및 산화를 평가하기 위해, 선택된 샘플에 대해 펩티드 맵 MS/MS 및 생활성 분석을 실시하였다.

[0235] 5주 후, 육안 검사에서, 침전 징후를 보인 40℃ 샘플에서 저장된 경우 F3를 제외하고, 모든 제제가 콜로이드적으로 안정한 것으로 나타났다. OD280에서의 단백질 농도 측정은 CFI-HSA 농도가 모든 시험된 온도에서 3회 동결/해동 사이클 1주, 또는 5주 저장 후 변화하지 않고 유지됨을 보였다.

[0236] SEC 및 CD-SDS에 의한 순도 평가는, 모든 7개의 제제의 경우, -70℃ 샘플은 순도가 변하지 않았고, 5℃ 샘플은 주요 종의 약 97% 순도를 가졌고, 25℃ 샘플은 약 96%를 가졌고, 모든 40℃ 샘플은 90 내지 92% 순도임을 보였다. 모든 7개의 제제에서 5주 저장에 걸쳐 40℃에서 순도의 유의한 감소와 25℃에서 순도의 경미한 감소는 실온에서 액체 고농도 제제가 실현가능하지 않다는 것을 나타낸다.

[0237] CFI-HSA가 시험된 제제 및 저장 조건에서 저장 후 활성을 유지하는지를 확인하기 위해 생활성 검정을 수행하였다(표 3.4). 제제는 전반적으로 비교적 유사하다. 제제 F1은 40℃에서 다른 6개의 제제보다 약간 더 안정하다. 제제 F3은 25℃와 40℃ 둘 모두에서 가장 안정성이 낮으며, 이는 -70℃ 대조군에 비해 20 내지 30% 낮은 활성을 보였고, F2, F4, 또는 F1 샘플에 비해 더 큰 활성 손실을 보였다.

[0238] [표 3.4]

시험된 저장 조건에 따른 CFI-HSA 의 생활성

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
5°C	113%	94%	92%	99%	107%	112%	107%
25°C	116%	83%	72%	89%	85%	90%	-
40°C	62%	35%	26%	32%	35%	38%	-

[0239]

[0240]

시험된 저장 조건에 따른 탈아미드화 및 산화 수준을 결정하기 위해 CFI-HSA 제제에 대해 펩티드 맵핑 MS/MS를 수행하였다. 5°C 샘플에서 5주 동안 저장 후 제제 F1, F2, F4, F5, 및 F6을 시험하였다. F4(F/T) 동결이 대조군으로서 실행되었다. 결과는 모든 부위에 대한 탈아미드화 및 산화 수준이 상이한 제제 간에 유사함을 나타냈다.

[0241]

임상 평가 및 약물 제조를 위해 개발된 추가의 시험 및 제제는 표 3.5의 제제를 포함한다. CFI-HSA를 표 3.5의 3개의 신규 제제로 완충액 교환하였고, 100 mg/mL 또는 150 mg/mL로 농축시키면서, 임의의 침전, 심각한 유백광, 또는 높은 점도를 관찰하였다. 동결건조 생성물에 보다 적합한 제제를 제조하기 위해, 60 mM 글리신 또는 60 mM 만니톨을 F2 및 F3에 첨가하여 각각 동결건조된 케이크의 구조를 보호하였다. 이후, 샘플을 멸균 여과하고, 충전하였고, 점도, SEC 및 활성에 대해 시험하였다.

[0242]

[표 3.5]

임상 제조 및 시험용 제제

	Prot. Conc. (mg/mL)	pH	완충액	등장화제/Cyro/동결건조보존제			PS-80		
F1	100	5.8	20 mM 히스티딘	135 mM Arg HCL			0.02%		
F2				70 mM Arg HCL	2% 수크로오스	60 mM 글리신	0.02%		
F3				70 mM Arg HCL	2% 수크로오스	60 mM 만니톨	0.02%		
F1	150			135 mM Arg HCL			0.02%		
F2	70 mM Arg HCL			2% 수크로오스	60 mM 글리신	0.02%			
F3	70 mM Arg HCL			2% 수크로오스	60 mM 만니톨	0.02%			

[0243]

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.