(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0125789
(43) 공개일자 2013년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) *A61K 38/37* (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7017910
(22) 출원일자(국제) 2011년11월30일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2013년07월09일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2011/071339
(87) 국제공개번호 WO 2012/079979
국제공개일자 2012년06월21일
(30) 우선권주장
10195288.5 2010년12월16일
유럽특허청(EPO)(EP)
61/424,389 2010년12월17일 미국(US)

(71) 출원인
노보 노르디스크 에이/에스
덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레
(72) 발명자
예스페르가르드 크리스티나
덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 코포레이트 페이턴츠 노보 노르디스크 에이/에스
보그스네스 아레
덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 코포레이트 페이턴츠 노보 노르디스크 에이/에스
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
송봉식, 정삼영

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **수성 인자Ⅷ 용액**

(57) 요 약

본 발명은 비교적 고농도의 FⅧ을 포함하는 수용액에서 FⅧ을 안정화시키는 방법에 관한 것이다. 더욱이 본 발명은 이러한 수용액들뿐만 아니라 그것의 사용에 관련된다.

(72) 발명자

크라럽 야누스

덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 코포레이트 페이턴츠 노보 노르디스크 에이/에스

리스첼 크리스티안

덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 코포레이트 페이턴츠 노보 노르디스크 에이/에스

특허청구의 범위

청구항 1

적어도 300 mM의 농도의 염 및 5-30%의 농도의 글리세롤을 포함하는 수용액에서 FVⅢ을 유지시키는 단계를 포함하는, 적어도 1 ㎍/㎖의 FVⅢ 농도 및 5.5-8.5의 pH를 갖는 수용액에서 FVⅢ을 안정화시키는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 수용액은 2-20 mM의 농도의 2가 양이온을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 수용액은 0.05-0.3 g/kg의 농도의 세제를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 염은 NaCl인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 수용액의 염 농도는 300-1000 mM인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, FVⅢ은 B 도메인 절단 변이체이고, FVⅢ 농도는 적어도 1 ㎍/㎖이고, 염 농도는 약 500 mM이고, 글리세롤 농도는 10-20%이고, 2가 양이온의 농도는 약 10 mM이고, 세제 농도는 0.1-0.2 g/kg이고 용액의 pH는 6-8인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

적어도 1 ㎍ FVⅢ/㎖, 5.5-8.5의 pH, 적어도 300 mM의 농도의 염, 및 5-30%의 농도의 글리세롤을 포함하는, 수성 FVⅢ 용액.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 용액은 0.05-0.3 g/kg의 농도의 세제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 용액.

청구항 9

제 7항 또는 제 8항에 있어서, 상기 용액은 2-20 mM의 농도의 2가 양이온을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 용액.

청구항 10

제 7항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 염은 NaCl인 것을 특징으로 하는 FVⅢ 용액.

청구항 11

제 7항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 수용액의 염 농도는 300-1000 mM인 것을 특징으로 하는 FVⅢ 용액.

청구항 12

제 7항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, FVⅢ은 B 도메인 절단 변이체이고, FVⅢ 농도는 적어도 1 ㎍/㎖이고, 염 농도는 약 500 mM이고, 글리세롤 농도는 10-20%이고, 2가 양이온 농도는 약 10 mM이고, 세제 농도는 0.1-0.2 g/kg이고 용액의 pH는 6-8인 것을 특징으로 하는 FVⅢ 용액.

청구항 13

FVⅢ을 분리 또는 정제 동안 제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 따르는 방법 및 제 7항 내지 제 12항 중 어느

한 항에 따르는 용액을 사용하여 안정화시키는, FVⅢ의 크기 배제 크로마토그래피 분리 또는 정제의 방법.

청구항 14

FVⅢ을 변형 처리 동안 제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 따르는 방법 및 제 7항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 따르는 용액을 사용하여 안정화시키는, FVⅢ의 번역후 변형의 방법.

청구항 15

FVⅢ을 안정화시키기 위한 제 7항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 따르는 용액 또는 제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 따르는 방법의 사용.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인자Ⅷ 수율을 개선하기 위한 방법의 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 인자Ⅷ 응집체 형성/침전을 감소시키기에 유용한 방법 및 완충액 조성물/수용액에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] FVⅢ/인자Ⅷ은 예를 들어 화학적 및/또는 효소학적 방법에 의해 선택적으로 번역후 변형될 수 있는 재조합 단백질로부터 유도된 혈장에서 또는 재조합 단백질의 형태로 혈우병 A의 치료/예방에 사용되는 크고 복잡한 당단백질이다.

[0003] 일반적으로 큰 단백질은 응집체를 형성하려는 경향이 있기 때문에 큰 단백질을 용액에서 고농도로 유지하는 것은 어렵다. FVⅢ(B 도메인이 있거나 또는 없음)은 대부분의 다른 단백질과 비교해 용해도가 낮은 것으로 잘 알려져 있다. 보이는 침전은 15 ㎍/㎖만큼 낮은 농도에서 일어날 수 있고, 보이지 않는 침전은 훨씬 더 낮은 농도에서 일어나는데, 이것은 예를 들어 FVⅢ 농도를 1 ㎍/㎖ 훨씬 위로 유지하는 것이 바람직한 단백질의 번역후 변형과 관련하여 특히 바람직하지 않다. FVⅢ을 고농도로 유지하는 것은 예를 들어 FVⅢ의 저장 및/또는 정제와 관련하여 또한 바람직할 수 있다. 마지막으로, B-도메인 삭제/절단 변이체로서 발현될 때조차 포유동물 세포주에서 발현된 고수율의 rFVⅢ을 얻는 것이 어렵고, 따라서 적어도 0.5 ㎍/㎖의 FVⅢ 농도를 갖는 용액에서의 FVⅢ 침전과 관련된 수율 손실을 최소화하기 위해 rFVⅢ의 응집체 형성의 양을 감소시키기 위한 조치를 취하는 것이 매우 바람직하다.

[0004] FVⅢ의 시험관내 응집체 형성이 어떻게 감소될 수 있는 지에 관해서는 이전에 제안되지 않았다. WO09108806에서, 250 mM NaCl의 염 농도가 번역후 변형 후 FVⅢ의 정제와 관련한 용리 단계에서 사용된다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 적어도 1 ㎍/㎖의 FVⅢ 농도 및 5.5-8.5의 pH를 갖는 수용액에서 FVⅢ을 안정화시키는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 적어도 300 mM의 농도의 염 및 5-30%의 농도의 글리세롤을 포함하는 수용액에서 FVⅢ을 유지시키는 단계를 포함한다. 더욱이 본 발명은 이러한 용액들뿐만 아니라 그것의 사용에 관련된다.

[0006] 본 발명자들에 의해, 성분들의 이러한 조합이 FVⅢ이 비교적 높은 FVⅢ-농도의 조건하에서 침전하려는 경향을 감소시킬 수 있다는 것이 본원에 나타나있다. 본 발명의 방법 및 용액은 FVⅢ 농도가 0.5 ㎍/㎖보다 낮은 상황과 관련하여, 예를 들어 농도를 적어도 0.5 ㎍/㎖로 증가시키게 될 FVⅢ의 농축 및/또는 정제와 관련하여 또한 유용하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0007] "FVⅢ/인자Ⅷ"은 주로 간세포에 의해 생산되는 크고 복잡한 당단백질이다. 사람 FVⅢ은 신호 펩티드를 포함하는 2351개의 아미노산으로 구성되고 상동성에 의해 정의된 몇 개의 분명한 도메인을 함유한다. 3개의 A-도메인, 고유한 B-도메인 및 2개의 C-도메인이 있다. 도메인 순서는 NH2-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH로서 열거될 수 있다. FVⅢ은 B-A3 경계에서 분리된 2개의 쇄로서 혈장에서 순환한다. 쇄들은 2가 금속 이온-결합에 의해 연결된다. A1-A2-B 쇄는 중쇄(HC)로 칭하는 한편 A3-C1-C2는 경쇄(LC)로 칭한다. 본원에서 "FVⅢ"은 혈장 유도된 또는 재조합

체 FVⅢ, wt FVⅢ 또는 예를 들어 발색 어세이에서 FVⅢ 활성을 갖는 어떤 FVⅢ 변이체인 것으로 이해된다. 이러한 FVⅢ 변이체의 예는 B-도메인 절단/삭제 변이체, 및/또는 하나 이상의 측기에 접합된 FVⅢ(예를 들어 PEG, 다른 수용성 중합체, 지방산 유도체, Fc:FVⅢ 융합체) 및/또는 하나 이상의 A 및/또는 C 도메인에서 하나 이상의 아미노산 변형을 갖는 FVⅢ 변이체 등을 포함한다. 하나 이상의 이러한 FVⅢ 변형은 wt FVⅢ과 비교해 FVⅢ 변이체의 증가된 순환 반감기를 가져올 수 있다.

[0008] "B 도메인": wt FVⅢ 분자에서 B 도메인의 길이는 약 907개의 아미노산이다. B 도메인 절단 FVⅢ 분자/변이체에서 B 도메인의 길이는 예를 들어 약 10개의 아미노산 내지 약 700개의 아미노산과 같은 약 10 내지 약 800개의 아미노산, 예를 들어 약 12-500개의 아미노산, 12-400개의 아미노산, 12-300개의 아미노산, 12-200개의 아미노산, 15-100개의 아미노산, 15-75개의 아미노산, 15-50개의 아미노산, 15-45개의 아미노산, 20-45개의 아미노산, 20-40개의 아미노산, 또는 20-30개의 아미노산으로 다양할 수 있다. 절단 B-도메인은 중쇄 및/또는 경쇄 및/또는 wt FVⅢ 분자에서 발견되지 않은 인위적으로 도입된 서열의 단편을 포함할 수 있다. 용어 "B-도메인 절단" 및 "B-도메인 삭제"는 본원에서 서로 바꾸어 사용될 수 있다.

[0009] 용액의 "이온 강도/I"는 그 용액에서 이온의 농도의 잘 알려진 척도이다. 용액의 이온 강도, I는 그 용액에 존재하는 모든 이온의 농도의 함수이다. 표 1은 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 여러 가지 염의 몰농도를 이온 강도로 전환한다.

표 1

[0010] 다른 조성의 함수로서의 이온 강도(I)

	NaCl, KCl, NH_4Ac, NaAc, KAc, NH_4Cl	$CaCl_2$, $CaAc_2$, $MgCl_2$, $MgAc_2$,
10 mM	10	30
30 mM	30	90
50 mM	50	150
100 mM	100	300
300 mM	300	900
500 mM	500	1500
1000 mM	1000	3000

[0011] 본원에서 "수용액"/"수성 완충액"은 물이 주 용매인 용액이고 용액은 유기 용매가 없거나 또는 예를 들어 1% 미만의 유기 용매와 같은 미미한 양 및/또는 극미량의 유기 용매를 포함하는 것으로 이해된다.

[0012] 본원에서 "염"은 어떤 염, 예를 들어 표 1에 따르는 하나 이상의 염인 것으로 이해된다.

[0013] 본 발명의 본문에서 "글리세롤"은 글리세롤뿐만 아니라 글리세롤을 대신할 수 있는 다른 화합물 예를 들어 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 에리스리톨, 만니톨, 소르비톨, 자일리톨, 1,3-프로판 디올, 디에탄올아민, 수크로스, 덱스트로스, 트레할로스, 글루코스와 같은 폴리올을 의미한다. 이러한 타입의 화합물은 수용액에서 FVⅢ의 안정화와 관련하여 글리세롤을 대신할 수 있는 것으로 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0014] 본원에서 "세제/계면활성제"는 어떤 세제/계면활성제, 예를 들어 다음 세제: SDS, Triton X-100, X114, CHAPS, DOC, NP-40, Tween 80, 및 Tween 20 중 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.

[0015] 2가 양이온 예를 들어 Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}는 본 발명에 따르는 용액에 첨가된다. "Ca^{2+}"는 $CaOH_2$뿐만 아니라 표 1에 열거된 하나 이상의 염의 형태로 첨가될 수 있다.

[0016] "크기 배제 크로마토그래피/SEC/겔-여과 크로마토그래피"는 용액에서 분자들이 그것들의 크기(더 정확하게는, 그것들의 유체역학 부피)에 기초하여 분리되는 크로마토그래피 방법이다. 전형적으로, 수용액이 컬럼을 통해 샘플을 전달하기 위해 사용될 때, 기술은 겔-여과 크로마토그래피로서 알려져 있고, 그에 비해 유기 용매가 이동상으로서 사용될 때 이름 겔 침투 크로마토그래피가 사용된다. SEC는 중합체를 위한 양호한 Mw 결과를 제공하는 그것의 능력 때문에 널리 사용된 중합체 특성화 방법이다. 겔-여과 크로마토그래피의 주용도는 단백질 및 다른 수용성 중합체의 분별인 한편, 겔 침투 크로마토그래피는 유기-용해성 중합체의 분자량 분포를 분석하기 위해 사용된다.

[0017] 본원에서 "FVⅢ의 번역후 변형"은 예를 들어 친수성 중합체(예를 들어 폴리 에틸렌 글리콜(PEG)), 지방산

유도체, 알부민, Fc 도메인 등과 분자의 접합과 같은 rFVⅢ 또는 혈장 유도 FVⅢ의 어떤 변형을 의미한다. FVⅢ의 변형/변환은 예를 들어 화학적 및/또는 효소학적 접근방법을 사용하여 일어날 수 있다. 펩티드의 효소학적 번역후 변형을 위한 방법의 한 예가 WO03031464에 개시된다.

[0018] 본원에서 "FVⅢ의 안정화"는 활성 FVⅢ의 손실의 감소를 의미한다. 비교적 높은 FVⅢ 농도를 갖는 조건하에서 FVⅢ의 저장, 정제, 및 번역후 변형과 관련하여, FVⅢ 수율의 손실의 주원인은 FVⅢ 분자의 "응집/침전"이다. 따라서 본원에서 "안정화"는 고농도 FVⅢ 용액에서 FVⅢ의 침전의 감소로서 생각될 수 있다. 실시예에서, 본 발명에 따르는 용액 및/또는 방법이 어떻게 FVⅢ 수율의 손실의 감소를 가져오는지를 증명한다.

[0019] **구체예의 목록:**

[0020] **구체예 1:** 제 1양태에서, 본 발명은 따라서 적어도 1 ㎍/㎖의 FVⅢ 농도 및 5.5-8.5의 pH를 갖는 수용액에서 FVⅢ을 안정화시키는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 적어도 300 mM의 농도의 염, 5-35%의 농도의 글리세롤, 2-20 mM의 농도의 2가 양이온(바람직하게는 Ca^{2+}), 및 0.05-0.3 g/kg의 농도의 세제를 포함하는 수용액에서 FVⅢ을 유지하는 단계를 포함한다.

[0021] **구체예 2:** 구체예들 중 어느 구체예에 따르는 방법에 있어서, FVⅢ 농도는 적어도 약 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10,000, 15,000, 20,000, 또는 25,000 ㎍/㎖일 수 있다.

[0022] **구체예 3:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, FVⅢ 농도는 예를 들어 1-20,000 ㎍/㎖, 1-15,000 ㎍/㎖, 1-10,000 ㎍/㎖, 1-5000 ㎍/㎖, 1-4000 ㎍/㎖, 1-3000 ㎍/㎖, 1-2000 ㎍/㎖, 1-1000 ㎍/㎖, 1-900 ㎍/㎖, 1-800 ㎍/㎖, 1-700 ㎍/㎖, 1-600 ㎍/㎖, 1-500 ㎍/㎖, 1-400 ㎍/㎖, 1-300 ㎍/㎖, 1-200 ㎍/㎖, 1-100 ㎍/㎖, 5-5000 ㎍/㎖, 5-4000 ㎍/㎖, 5-3000 ㎍/㎖, 5-2000 ㎍/㎖, 5-1000 ㎍/㎖, 5-900 ㎍/㎖, 5-800 ㎍/㎖, 5-700 ㎍/㎖, 5-600 ㎍/㎖, 5-500 ㎍/㎖, 5-400 ㎍/㎖, 5-300 ㎍/㎖, 5-200 ㎍/㎖, 5-100 ㎍/㎖, 10-25,000 ㎍/㎖, 10-20,000 ㎍/㎖, 10-15,000 ㎍/㎖, 10-10,000 ㎍/㎖, 10-5000 ㎍/㎖, 10-4000 ㎍/㎖, 10-3000 ㎍/㎖, 10-2000 ㎍/㎖, 10-1000 ㎍/㎖, 10-900 ㎍/㎖, 10-800 ㎍/㎖, 10-700 ㎍/㎖, 10-600 ㎍/㎖, 10-500 ㎍/㎖, 10-400 ㎍/㎖, 10-300 ㎍/㎖, 10-200 ㎍/㎖, 10-100 ㎍/㎖, 15-25,000 ㎍/㎖, 15-20,000 ㎍/㎖, 15-10,000 ㎍/㎖, 15-5000 ㎍/㎖, 15-4000 ㎍/㎖, 15-3000 ㎍/㎖, 15-2000 ㎍/㎖, 15-1000 ㎍/㎖, 15-900 ㎍/㎖, 15-800 ㎍/㎖, 15-700 ㎍/㎖, 15-600 ㎍/㎖, 15-500 ㎍/㎖, 15-400 ㎍/㎖, 15-300 ㎍/㎖, 15-200 ㎍/㎖, 15-100 ㎍/㎖, 20-5000 ㎍/㎖, 20-4000 ㎍/㎖, 20-3000 ㎍/㎖, 20-2000 ㎍/㎖ 20-1000 ㎍/㎖, 20-900 ㎍/㎖, 20-800 ㎍/㎖, 20-700 ㎍/㎖, 20-600 ㎍/㎖, 20-500 ㎍/㎖, 20-400 ㎍/㎖, 20-300 ㎍/㎖, 20-200 ㎍/㎖, 또는 20-100 ㎍/㎖와 같은 1-25,000 ㎍/㎖의 범위일 수 있다.

[0023] **구체예 4:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, 염은 하나 이상의 나트륨염 및/또는 하나 이상의 암모늄염으로 구성된 군으로부터 선택된 1가 염인 방법. 이러한 염의 예는 표 1에 열거된다.

[0024] **구체예 5:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, 염은 NaCl인 방법.

[0025] **구체예 6:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, 수용액의 염 농도는 예를 들어 275-1400 mM, 275-1300 mM, 275-1200 mM, 275-1100 mM, 275-100 mM, 275-1000 mM, 275-900 mM, 275-800 mM, 275-700 mM, 275-600 mM, 275-500 mM, 275-400 mM 300-1500 mM, 300-1400 mM, 300-1300 mM, 300-1200 mM, 300-1100 mM, 300-1000 mM, 300-900 mM, 300-800 mM, 300-700 mM, 300-600 mM- 300-500 mM, 300-400 mM, 325-1500 mM, 325-1400 mM, 325-1300 mM, 325-1200 mM, 325-1100 mM, 325-1000 mM, 325-900 mM, 325-800 mM, 325-700 mM, 325-600 mM, 325-500 mM, 325-400 mM, 350-1500 mM, 350-1400 mM, 350-1300 mM, 350-1200 mM, 350-1100 mM, 350-1000 mM, 350-900 mM 350-800 mM, 350-700 mM, 350-600 mM, 350-500 mM, 350-400 mM, 400-1500 mM, 400-1400 mM, 400-1300 mM, 400-1200 mM, 400-1100 mM, 400-1000 mM, 400-900 mM, 400-800 mM, 400-700 mM, 400-600 mM, 400-500 mM, 450-1500 mM, 450-1400 mM, 450-1300 mM, 450-1200 mM, 450-1100 mM, 450-1000 mM, 450-900 mM, 450-800 mM, 450-700 mM, 450-600 mM, 500-1500 mM, 500-1400 mM, 500-1300 mM, 500-1200 mM, 500-1100 mM, 500-1000 mM, 500-900 mM, 500-800 mM, 500-700 mM, 또는 500-600 mM과 같은 275-1500 mM인 방법.

[0026] **구체예 7:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, FVⅢ은 B 도메인 절단 변이체인 방법.

[0027] **구체예 8:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, 글리세롤 농도는 예를 들어 5-30%, 5-25%, 5-20%, 5-

15%, 5-10%, 12.5-35%, 12.5-30%, 12.5-25%, 12.5-20%, 12.5-15%, 15-35%, 15-30%, 또는 15-20%(W/W)와 같은 5-35%인 방법.

[0028] **구체예 9:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, 2가 양이온의 농도는 예를 들어 2-15 mM, 2-10 mM, 2-5 mM, 5-20 mM, 5-15 mM, 5-10 mM, 10-20 mM, 또는 10-15 mM과 같은 2-20 mM인 방법. 2가 양이온은 예를 들어 표 1에 열거한 칼슘염의 형태로 첨가될 수 있다.

[0029] **구체예 10:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, 세제 농도는 예를 들어 0.05-0.4 g/kg, 0.05-0.3 g/kg, 0.05-0.2 g/kg, 0.05-0.1 g/kg, 0.1-0.5 g/kg, 0.1-0.4 g/kg, 0.1-0.3 g/kg, 또는 0.1-0.2 g/kg과 같은 0.05-0.5 g/kg인 방법. 본 발명과 관련하여 사용하기에 적합한 세제의 예는 SDS, Triton X-100, X114, CHAPS, DOC, NP-40, Tween 80, 및 Tween 20을 포함한다.

[0030] **구체예 11:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, 용액의 pH는 예를 들어 5.5-8.0, 5.5-7.5, 5.5-7.0, 5.5-6.5, 5.5-6.0, 6.0-8.5, 6.0-8.0, 6.0-7.5, 6.0-7.0, 6.0-6.5, 6.5-8.5, 6.5-8.0, 6.5-7.5, 6.5-7.0, 7.0-8.5, 7.0-8.0, 7.0-7.5, 7.5-8.5, 7.5-8.0, 또는 8.0-8.5와 같은 5.5-8.5인 방법.

[0031] **구체예 12:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, FVⅢ 분자는 B 도메인 절단 변이체이고, FVⅢ 농도는 적어도 1 ㎍/㎖이고, 염 농도는 약 500 mM이고, 글리세롤 농도는 10-20%이고, 2가 양이온의 농도는 약 10 mM이고, Tween 농도는 0.1-0.2 g/kg이고 용액의 pH는 6-8인 방법.

[0032] **구체예 12:** 적어도 1 ㎍ FVⅢ/㎖, 5.5-8.5의 pH, 적어도 300 mM의 농도의 염, 5-30%의 농도의 글리세롤, 2-20 mM의 농도의 2가 양이온(바람직하게는 Ca^{2+}), 및 0.05-0.3 g/kg의 농도의 세제를 포함하는, 수성 FVⅢ 용액. 세제는 바람직하게는 Tween 20이다.

[0033] **구체예 13:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, 염은 나트륨염 또는 암모늄염으로 구성된 군으로부터 선택된 1가 염인 FVⅢ 용액.

[0034] **구체예 14:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, 염은 NaCl인 FVⅢ 용액.

[0035] **구체예 15:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, 수용액의 염 농도는 300-1000 mM인 FVⅢ 용액. 바람직하게는 염은 NaCl이다.

[0036] **구체예 16:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, FVⅢ 분자는 B 도메인 절단 변이체이고, FVⅢ 농도는 적어도 1 ㎍/㎖이고, 염 농도는 약 500 mM이고, 글리세롤 농도는 10-20%이고, Ca^{2+} 농도는 약 10 mM이고, Tween 농도는 0.1-0.2 g/kg이고 용액의 pH는 6-8인 FVⅢ 용액.

[0037] **구체예 17:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, 구체예 2와 관련하여 제시된 FVⅢ 농도, 구체예 6에 제시된 염 농도, 구체예 8에 제시된 글리세롤 농도, 구체예 9에 제시된 2가 양이온의 농도, 구체예 10에 제시된 세제의 농도, 및 구체예 11에 제시된 pH를 더 포함할 수 있는 FVⅢ 용액. 특정 염은 본원에 제시된 대안들 중 어느 것으로부터 선택될 수 있다. 2가 양이온의 특정 공급원은 마찬가지로 본원에 제시된 대안들 중 어느 것으로부터 선택될 수 있다. 세제의 특정 공급원은 마찬가지로 본원에 제시된 대안들 중 어느 것으로부터 선택될 수 있다.

[0038] **구체예 18:** FVⅢ을 분리 또는 정제 동안 본 발명의 구체예들 중 어느 하나에 따르는 방법 및/또는 본 발명의 구체예들 중 어느 하나에 따르는 용액을 사용하여 안정화시키는, FVⅢ의 크기 배제 크로마토그래피 분리 또는 정제의 방법.

[0039] **구체예 19:** FVⅢ을 변형 처리 동안 본 발명을 따르는 구체예들 중 어느 하나에 따르는 방법 및/또는 본 발명의 구체예들 중 어느 하나에 따르는 용액을 사용하여 안정화시키는, FVⅢ의 번역후 변형의 방법.

[0040] **구체예 20:** FVⅢ을 안정화시키기 위한 본 발명의 구체예들 중 어느 하나에 따르는 용액 및/또는 본 발명의 구체예들 중 어느 하나에 따르는 방법의 사용.

[0041] **구체예 21:** 적어도 1 ㎍/㎖의 FVⅢ 농도 및 5.5-8.5의 pH를 갖는 수용액에서 FVⅢ을 안정화시키는 방법으로서, 상기 방법은 적어도 300 mM의 농도의 염, 및 5-30%의 농도의 글리세롤을 포함하는 수용액에서 FVⅢ을 유지하는 단계를 포함하는 방법.

[0042] **구체예 22:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, 상기 수용액은 2-20 mM의 농도의 2가 양이온을 포함

하는 방법.

[0043] **구체예 23:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, 2가 양이온은 $MgCl_2$인 방법.

[0044] **구체예 24:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, 2가 양이온은 $CaCl_2$인 방법.

[0045] **구체예 25:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, 상기 수용액은 0.05-0.3 g/kg의 농도의 세제를 포함하는 방법. 세제는 바람직하게는 Tween이다.

[0046] **구체예 26:** 적어도 1 ㎍ FVⅢ/㎖, 5.5-8.5의 pH, 적어도 300 mM의 농도의 염, 및 5-30%의 농도의 글리세롤을 포함하는, 수성 FVⅢ 용액.

[0047] **구체예 27:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, 상기 용액은 0.05-0.3 g/kg의 농도의 세제를 더 포함하는 용액. 세제는 바람직하게는 Tween이다.

[0048] **구체예 28:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, 상기 용액은 2-20 mM의 농도의 2가 양이온을 더 포함하는 용액.

[0049] **구체예 29:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, 2가 양이온은 $MgCl_2$인 용액.

[0050] **구체예 30:** 본 발명의 구체예들 중 어느 구체예에 있어서, 2가 양이온은 $CaCl_2$인 용액.

[0051] **실시예**

[0052] **실시예 1:**

[0053] FVⅢ 용액을 10 mM HEPES, 0.5 M NaCl, 20%(v/v) 글리세롤, 2 mM $CaCl_2$, 0.02% tween80, pH 7.5로 완충액 교환하고 약 30 mg/㎖로 농축하였다. 단백질 결정화를 위해 96-웰 마이크로티터 플레이트를 하기 패턴의 완충액으로 준비하였다:

[0054] 열(인자VⅢ과 혼합한 후의 최종 농도):

[0055] A. 50 mM Na 아세테이트, pH 5.0,

[0056] B. 50 mM His, pH 5.5,

[0057] C. 50 mM His, pH 6.0,

[0058] D. 50 mM 이미다졸, pH 6.5,

[0059] E. 50 mM 이미다졸, pH 7.0

[0060] F. 50 mM HEPES, pH 7.5

[0061] G. 50 mM HEPES, pH 8.0

[0062] H. 50 mM Gly-gly, pH 9.0

[0063] 행:

[0064] 1 및 7: 0 M NaCl

[0065] 2 및 8: 0.08 M NaCl

[0066] 3 및 9: 0.2 M NaCl

[0067] 4 및 10: 0.33 M NaCl

[0068] 5 및 11: 0.53 M NaCl

[0069] 6 및 12: 0.8 M NaCl

[0070] 모든 웰은 20% 글리세롤, 0.02% tween80을 함유하였다. 행 1-6은 2 mM $CaCl_2$를 함유하였고, 행 7-12는 16 mM $CaCl_2$를 함유하였다. 200 nl FVⅢ 용액 + 400 nl 완충 용액을 방울방울로 합하고, 플레이트를 투명막으로 밀봉하고, 24시간 동안 배양하고 현미경 아래에서 조사하였다. 방울을 하기 스케일로 침전에 대해 평가하였다: 없음:

맑음, 낮음: 약한 침전물, 높음: 심한 침전물. 결과를 하기 표에 나타낸다:

표 2

[0071] 현미경 아래에서 관찰된, 다른 조건들에서 10 mg/mℓ 인자VIII의 600개의 나노리터 방울의 침전.

	2 mM $CaCl_2$						16 mM $CaCl_2$					
	0 M NaCl	0.08M NaCl	0.2 M NaCl	0.33M NaCl	0.53M NaCl	0.8 M NaCl	0 M NaCl	0.08M NaCl	0.2 M NaCl	0.33M NaCl	0.53M NaCl	0.8 M NaCl
pH 5.0	높음	높음	높음	높음	높음	높음	높음	높음	높음	높음	높음	낮음
pH 5.5	높음	높음	높음	없음	없음	없음	높음	높음	낮음	없음	없음	없음
pH 6.0	높음	높음	없음	없음	없음	없음	높음	높음	없음	없음	없음	없음
pH 6.5	높음	높음	낮음	없음	없음	없음	높음	높음	없음	없음	없음	없음
pH 7.0	높음	낮음	없음	없음	없음	없음	높음	없음	없음	없음	없음	없음
pH 7.5	낮음	없음	없음	없음	없음	없음	높음	없음	없음	없음	없음	없음
pH 8.0	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음	낮음	없음
pH 9.0	높음	높음	높음	낮음	낮음	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음

[0072] 0.33 M 및 그 이상의 NaCl의 농도(열 4-6, 10-12)는 특히 가장 낮은 값의 pH에서 침전을 막는데 가장 유리한 것으로 보인다.

[0073] **실시예 2:**

[0074] 인자VIII의 용액을 10 mM HEPES, 0.5 M NaCl, 20%(v/v) 글리세롤, 10 mm $CaCl_2$, 0.02% tween80, pH 7.5로 완충액 교환하고 Amicon 스핀필터에서 19 mg/mℓ로 농축하였다. 384-웰 마이크로티터 플레이트를 하기 패턴으로 준비하였다:

[0075] 열(인자VIII과 혼합한 후의 최종 농도):

[0076] A. 50 mM His, pH 5.5,

[0077] B. 50 mM His, pH 6.0,

[0078] C. 50 mM 이미다졸, pH 6.5,

[0079] D. 50 mM 이미다졸, pH 7.0

[0080] E. 50 mM HEPES, pH 7.5

[0081] F. 50 mM HEPES, pH 8.0

[0082] 행:

[0083] 1: 0 M NaCl

[0084] 2: 0.17 M NaCl

[0085] 3: 0.23 M NaCl

[0086] 4: 0.3 M NaCl

[0087] 5: 0.4 M NaCl

[0088] 6: 0.5 M NaCl

[0089] 모든 웰은 20% 글리세롤, 0.02% tween80 및 10 mM $CaCl_2$를 함유하였다. 완충 용액 및 인자VIII을 5 mg/mℓ의 최종 인자VIII 농도와 혼합하였다. 각 웰로부터의 빛 산란의 강도를 Wyatt DynaPro 플레이트 판독기에서 측정하였다. 더 높은 강도는 더 높은 자가-회합을 나타낸다. 결과를 하기 표에 나타낸다:

표 3

[0090] 다른 pH 및 NaCl 농도하에서 5 mg/㎖ FVⅢ으로부터의 산란된 빛의 강도(정규화된 계수율).

정규화된 강도						
	pH 5.5	pH 6	pH 6.5	pH 7	pH 7.5	pH 8
0.17 M NaCl	4.98E+08	1.01E+09	5.07E+08	2.91E+09	1.27E+09	1.18E+09
0.23 M NaCl	1.53E+09	9.86E+08	1.67E+09	7.52E+08	6.15E+08	5.02E+08
0.3 M NaCl	1.22E+09	3.27E+09	8.34E+08	4.44E+08	3.67E+08	4.24E+08
0.4 M NaCl	8.27E+08	1.92E+09	3.18E+08	2.12E+08	2.63E+08	3.05E+08
0.5 M NaCl	1.52E+09	4.65E+08	2.16E+08	1.55E+08	1.63E+08	1.92E+08

[0091] 자가-회합의 낮은 정도를 가리키는 가장 낮은 강도는 고농도의 NaCl에서 발견되는 것으로 보인다.

[0092] 본 발명의 어떤 특징이 본원에 예시되고 기술된 한편, 많은 변형, 치환, 변화, 및 등가물은 이제 당업자에게 일어날 것이다. 따라서 첨부된 청구범위는 본 발명의 진정한 개념 내에 있기 때문에 모든 이러한 변형 및 변화를 망라하는 것으로 이해될 것이다.

[0093] **실시예 3:**

[0094] UF/DF

[0095] 2150 g의 N8 포함 용액은 pH 및 $CaCl_2$를 각각 6.13 및 총 10 mmol/kg으로 조정하였다. 이어서 N8 포함 용액을 한외여과(ultra-filtration)에 의해 약 4 mg/㎖로 농축한 다음 투석여과(dia-filtration)에 의해 20 mmol/kg 히스티딘, 9 mmol/kg HCl, 0.5 mol/kg NaCl, 10 mM/kg $CaCl_2$, 20% 글리세롤 pH 6.16을 함유하는 5 부피의 완충액으로 완충액 교환하였다. 그 다음 N8 포함 용액을 9.54 mg/㎖로 더 농축하였다. 수율은 분석의 방법에 따라 97-98%의 범위였다. 농축의 완료 후 측정된 총 HMWP의 수준을 아래 표에 묘사하였다. 결론적으로, 이것은 높은 NaCl 농도의 조건하에서 FVⅢ 농도의 상당한 증가에도 불구하고 HMWP 형성 없음을 증명한다.

표 4

[0096]

샘플 설명	HMWP(%)	이합체(%)	총 HMWP(%)
N8 시작 재료	< 0.3	< 0.3	< 0.3
N8 UF/DF	< 0.3	< 0.3	0.4

[0097] **실시예 4**

[0098] *FVⅢ의 페길화(PEGylation)*

[0099] 시작 재료는 0.5 M 염화나트륨, 10 mM 염화칼슘, 20% 글리세롤, 20 mM 히스티딘 및 9 mM 염산 중에 7.5 mg/㎖ FVⅢ을 함유하는 결과적으로 pH가 6.1인 용액이었다. 210 ㎖의 이 용액에 1.3 mg 시알리다제, 42 mg ST3Gal1 및 1.7 g 40K PEG를 첨가하고, 주위 실온에서 17.7시간 동안 반응하도록 두었다. 반응의 종료에서 탁도 또는 침전의 어떤 신호도 없었다.

[0100] **실시예 5**

[0101] *FVⅢ 분자의 통과액 모드에서의 소수성 상호작용 크로마토그래피*

[0102] 이 단계의 목적은 40K 폴리에틸렌글리콜기와의 공유결합으로 변형된 FVⅢ 분자의 시알화를 위해 사용된, 효소(ST3Gal3) 및 HMWP(고분자량 단백질)를 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의해 제거하는 것이었다. 직경 0.5 cm인 컬럼을 TSK Phenyl 5PW 수지로 10.5 cm의 베드 높이까지 채워, 베드 부피가 2.1 ㎖였다. 컬럼을 450 mM 염화나트륨, 10 mM 염화칼슘, 10% 글리세롤, 0.02% 폴리소르베이트 80, 20 mM 히스티딘 및 9 mM 염산으로 구성된 5 컬럼 부피의 완충액으로 평형화시켜 pH가 6.1이고 전도도가 ~35 mS/cm였다. FVⅢ 분자를 1.05 mg/㎖ 및 0.025 mg/㎖ ST3Gal3의 농도로 포함하는 로드에 염화나트륨을 첨가하여 평형 완충액과 같은 전도도(35 mS/cm)에 도달하도록 하고, 히스티딘 및 염산을 첨가하여 pH를 6.1로 조정하였다. 로드(37.5 ㎖)를 컬럼과 이어서 평형 완충액을 통과시켰다. 컬럼에 결합하지 않은 정제된 FVⅢ 생성물을 통과액에서 수집하여, 41.1 ㎖를 0.85 mg/㎖의 농도로 가져왔다. 수율은 88.7%였다. 고분자량 단백질의 함량은 1.5%에서 1.0%로 감소되었다. ST3Gal3는 ~24000 ppm에서 1328 ppm으로 감소되었고 ~18배 감소에 해당한다.

[0103] **실시예 5**

[0104] **SEC 실시예**

[0105] 크기 배제 크로마토그래피를 40K PEG에 공유결합으로 부착된 rFVⅢa 및 그것의 반응물(rFVⅢ 및 PEG)을 둘 다 함유하는 반응 혼합물에서 GE Healthcare로부터의 AKTA 탐색기 및 Superdex 200 1.8 L로 채워진(10시간 × 23.5 cm·시간) BPG10 컬럼을 사용하여 수행하였다. 유속은 0.8 CV/시간(4.24 ㎖/분)이고, 온도는 22℃이고, 가동 완충액은 하기로 구성되었다:

[0106] L-히스티딘 5.8 g/kg 37.4 mmol/kg

[0107] 37% HCl 0.7 g/kg 7.1 mmol/kg

[0108] $CaCl_2$ $2H_2O$ 0.97 g/kg 6.6 mmol/kg

[0109] L-메티오닌 0.21 g/kg 1.4 mmol/kg

[0110] NaCl 34.9 g/kg 597 mmol/kg

[0111] 수크로스 11.6 g/kg 33.9 mmol/kg

[0112] 폴리소르베이트 80 10 g/kg

[0113] 로딩 전에, 컬럼을 1 CV의 수산화나트륨으로 세척하고, 1.2 CV의 완충액으로 평형화시킨 후 UV를 자동 영점 조정하였다.

[0114] 컬럼을 1.05 mg/㎖(총 97 mg)의 농도를 갖는 92 ㎖(약 5%의 CV)의 반응 혼합물로 로딩하였다.

[0115] 풀을 UV 흡수 신호가 0.15 AU/cm를 초과할 때 수집하여, 0.46 mg/㎖의 농도를 갖는 202 ㎖의 풀 부피가 수득되고, 98%의 수율을 가져왔다.

[0116] 기술된 크기 배제 크로마토그래피 단계는 공정 효소뿐만 아니라 다른 오염물을 감소시키기 위해 사용된다. 공정 효소 ST3Gal3는 SEC 단계에 의해 (약 1328 ppm에서 4 ppm으로) 330배 감소되었다.