(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년02월28일
(11) 등록번호 10-1832937
(24) 등록일자 2018년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/36 (2006.01) *A61K 38/37* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7003964
(22) 출원일자(국제) 2010년07월26일
심사청구일자 2015년07월10일
(85) 번역문제출일자 2012년02월15일
(65) 공개번호 10-2012-0100884
(43) 공개일자 2012년09월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/043242
(87) 국제공개번호 WO 2011/017055
국제공개일자 2011년02월10일
(30) 우선권주장
61/228,828 2009년07월27일 미국(US)
61/347,136 2010년05월21일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2008025856 A2*
WO2005014026 A2*
WO2005014024 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
박스알타 인코퍼레이티드
미국, 일리노이즈 60015, 배녹번, 1200 레이크사이드 드라이브
박스앨타 게엠베하
스위스 6300 추크 제흐러벡 4
(72) 발명자
시크만, 위르겐
오스트리아, 에이-1210 비엔나, 게라스도르퍼 스트라쎄 153/209
하이더, 스테판
오스트리아, 에이-3385 프린저스도르프, 모짜르트스트라쎄 2
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 14 항 심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 **혈액 응고 단백질 복합체**

(57) 요 약

본원 발명은 콘주게이션이 가능한 조건하에서, 산화된 탄수화물 부위와 활성화된 수용성 폴리머를 접촉시키는 것을 포함하는, 혈액 응고 단백질의 산화된 탄수화물 부위에 수용성 폴리머를 콘주게이션시키는 물질 및 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본원 발명은 전술한 물질 및 방법에 있어서, 상기 수용성 폴리머가 활성 아미노옥시기를 함유하며, 여기서 상기 산화된 탄수화물 부위 및 상기 수용성 폴리머상의 활성 아미노옥시기 사이에 옥심 결합이 형성되는 물질 및 방법에 관한 것이다. 본원 발명의 일 구체예에서, 상기 콘주게이션은 친핵성 촉매인 아닐린의 존재하에 수행된다. 또한, 상기 생성된 옥심 결합은 $NaCNBH_3$과의 환원 작용에 의하여 알콕시아민 결합을 형성함으로써 안정화될 수 있다.

(72) 발명자

로텐스테이너, 한스피터

오스트리아, 에이-1020 비엔나, 하이드가쎄10/17

투레씩, 피터

오스트리아, 에이-3400 클로스터노이부르크, 하우프트스트라쎄 59, 웨이들링

명 세 서

청구범위

청구항 1

콘주게이션 (conjugation)이 가능한 조건하에서, 산화된 탄수화물 부위와 활성화된 수용성 폴리머를 접촉시키는 단계를 포함하는, 수용성 폴리머를 혈액 응고 단백질의 산화된 탄수화물 부위에 콘주게이션시키고, 이를 통해 콘주게이션된 혈액 응고 단백질을 얻는 방법으로서,

상기 혈액 응고 단백질은, 인자 IX (FIX) 및 인자 Ⅷ (FⅧ) 로 이루어진 군에서 선택되고;

상기 활성화된 수용성 폴리머는 활성 아미노옥시기를 함유하는 폴리시알산 (PSA)이며 ; 및

상기 탄수화물 부위는, 과요오드산 나트륨 (sodium periodate, $NaIO_4$), 테트라 아세트산 납 (lead tetraacetate, $(Pb(OAc)_4)$, 및 과루테늄산 칼륨 (potassium perruthenate, $KRuO_4$)으로 이루어진 군에서 선택되는 산화제를 포함하는 버퍼와의 인큐베이션 (incubation)에 의해 산화되고; 여기서 상기 산화된 탄수화물 부위 및 상기 수용성 폴리머상의 활성 아미노옥시기 사이에는 옥심 결합 (oxime linkage)이 형성되는, 수용성 폴리머를 혈액 응고 단백질의 산화된 탄수화물 부위에 콘주게이션시키고,

여기에서 콘주게이트된 혈액응고 단백질은 천연 혈액 응고 단백질의 50% 이상의 생물학적 활성을 보유하는 것인, 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 PSA는 10 내지 300 시알산 단위 (sialic acid units)로 구성된 것인, 방법.

청구항 4

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 혈액 응고 단백질은 인자 IX(FIX) 인, 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 혈액 응고 단백질은 인자Ⅷ (FⅧ)인, 방법.

청구항 7

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 산화제는 과요오드산 나트륨 ($NaIO_4$)인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 혈액 응고 단백질의 산화된 탄수화물 부위는 상기 혈액 응고 단백질의 활성 펩티드에 위치한 것인, 방법.

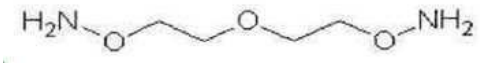
청구항 9

제1항에 있어서, 상기 PSA는 산화된 PSA와 활성화된 아미노옥시 링커의 반응에 의해 제조되며;

상기 아미노옥시 링커는,

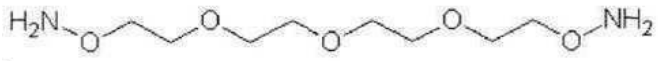
a) 하기 화학식 1의 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 링커;

[화학식 1]


; 및

b) 하기 화학식 2의 3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민 링커;

[화학식 2]



로 이루어진 군에서 선택되고;

상기 PSA는 산화제와의 인큐베이션에 의한 산화로, 상기 PSA의 비환원성 말단에 알데히드 말단기를 형성하는 것인, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 아미노옥시 링커는 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민인, 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 산화제는 $NaIO_4$인, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 활성화된 수용성 폴리머와 상기 산화된 탄수화물 부위의 접촉은, 아닐린 및 아닐린 유도체로 이루어진 군에서 선택되 는 친핵성 촉매를 포함하는 버퍼에서 일어나는, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 수소화 시아노 붕소 나트륨 (sodium cyanoborohydride, $NaCNBH_3$) 및 아스코르 브산 (비타민 C)으로 이루어진 군에서 선택되는 환원성 화합물을 포함하는 버퍼에서, 상기 콘주게이션된 혈 액 응고 단백질을 인큐베이션함으로써 상기 콘주게이션된 혈액 응고 단백질내의 옥심 결합을 환원시키는 단 계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 환원성 화합물은 수소화 시아노 붕소 나트륨 ($NaCNBH_3$)인, 방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

(a) FIX 분자; 및

(b) 상기 (a)의 FIX 분자에 결합된 1 개 이상의 아미노옥시 폴리시알산(PSA);

를 포함하는 변형된 FIX로서,

상기 아미노옥시 폴리시알산(PSA)는 1개 이상의 탄수화물 부위를 통하여 상기 FIX에 부착된 것이며,

상기 변형된 FIX 는 (a) 의 FIX 분자에 대하여 적어도 50% 이상의 생물학적 활성을 보유하는 것인, 변형된 FIX.

청구항 17

삭제

청구항 18

(a) FVⅢ 분자; 및

(b) 상기 (a)의 FVⅢ 분자에 결합된 적어도 1 개의 아미노옥시 폴리시알산(PSA);

를 포함하는 변형된 FVⅢ로서,

상기 아미노옥시 폴리시알산(PSA);는 1개 이상의 탄수화물 부위를 통하여 상기 FVⅢ에 부착된 것이며,

상기 변형된 FVⅢ 는 (a) 의 FVⅢ 분자에 대하여 50% 이상의 생물학적 활성을 보유하는 것인, 변형된 FVⅢ.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본원은 2010년 5월 21일에 출원된 미국 가출원 제61/347,136호 및 2009년 7월 27일에 출원된 미국 가출원 제61/228,828호를 우선권으로 주장하며, 이들은 모두 온전히 본원 발명에 참조로서 통합되었다.

[0002] 본원 발명은 수용성 폴리머를 혈액 응고 단백질에 콘주게이션 (conjugation)시키는 물질 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 인자 IX (FIX), 인자 Ⅷ (FVⅢ), 인자 Ⅶa (FⅦa), 폰 빌레브란트 (Von Willebrand) 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI (FXI), 인자 XⅡ (FXⅡ), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF) 및 ADAMTS 13 프로테아제를 포함하는 혈액 응고 단백질과 같은 치료학적 폴리펩티드는 단백분해 효소에 의해서 신속하게 분해되고, 항체에 의해서 중화된다. 이는 그들의 반감기 및 순환시간을 감소시킴으로써 이들의 치료학적 유효성을 제한한다. 이들 응고 단백질의 바람직한 치료학적 또는 예방적 효과를 달성하고 지속시키기 위해서는 비교적 고용량 및 빈번한 투여가 요구된다. 결과적으로, 적절한 용량 조절이 이루어지기 어려우며, 빈번한 정맥내 투여의 필요는 환자의 생활 방식에 제한을 가하게 된다.

[0004] 폴리펩티드 약물의 페길화 (PEGylation)는 순환 중에서 이들을 보호하고, 이들의 약동학적 및 약력학적 특성을 개선시킨다 (Harris 및 Chess, Nat Rev Drug Discov. 2003;2:214-21). 페길화 공정은 폴리펩티드 약물에 에틸렌 글리콜의 반복 단위 (폴리에틸렌 글리콜 (PEG))를 부착시킨다. PEG 분자는 큰 유체역학적 용적 (구형 단백질의 크기의 5 내지 10 배)을 가지며, 물에 매우 잘 용해되고, 수화되며, 비-독성이고, 비-면역원성이며, 신체로부터 빠르게 제거된다. 분자의 페길화는 효소적 분해에 대한 약물의 저항성 증가, 생체내 반감기 증가, 투약 빈도의 감소, 면역원성의 저하, 물리적 및 열적 안정성의 증가, 용해도 증가, 액체 안정성의 증가, 및 응집의 감소를 유도할 수 있다. 최초의 페길화된 약물은 1990년대 초반에 FDA에 의해서 승인되었다. 그 이후에, FDA는 경구, 주사 및 국소 투여를 위한 여러 페길화된 약물을 승인하였다.

[0005] 콜로민산 (CA)으로도 불리는 폴리시알산 (PSA)은 천연적으로 발생한 폴리사카라이드이다. 이것은 α (2→8) 케토시딕 (ketosidic) 결합을 갖는 N-아세틸뉴라민산의 단일 중합체 (homopolymer)이며, 그의 비-환원성 말단에

인접한 디올기를 함유한다. 이것은 음으로 하전되며, 인체의 천연 구성성분이다. 이것은 박테리아로부터 대량으로, 예정된 물리적 특성을 가지고 쉽게 생산될 수 있다 (미국 특허 제5,846,951호). 박테리아에서 생산된 PSA는 인체에서 생산된 PSA와 화학적으로 및 면역학적으로 동일하기 때문에, 박테리아 PSA는, 심지어 단백질에 커플링된 경우에도 비-면역원성이다. 일부의 폴리머들과 달리, PSA 산은 생물 분해성이다. 카탈라제 및 아스파라기나제에 대한 콜로민산의 공유적 커플링은 단백분해 효소 또는 혈장의 존재 하에서 효소 안정성을 증가시키는 것으로 나타났다. 폴리시알릴화 및 비변형된 아스파라기나제를 이용한 생체내 비교 시험에서, 폴리시알릴화가 효소의 반감기를 증가시켰다는 것이 밝혀졌다 (Fernandes and Gregoriadis, Int Biochimica Biophysica Acta 1341:26-34, 1997).

[0006] 수용성 폴리머와 치료학적 단백질 사이에 공유 결합을 형성함으로써 복합체를 제조하는 방법은, 다양한 화학적 방법에 의해서 수행될 수 있다. 예를 들어, 펩티드 또는 단백질에 대한 PEG-유도체의 커플링은 로버츠 (Roberts) 등에 의해서 검토되었다 (Adv Drug Deliv Rev 2002;54:459-76). 수용성 폴리머를 치료학적 단백질에 커플링시키는 한가지 접근 방법은 단백질의 탄수화물 부위를 통한 폴리머의 콘주게이션이다. 단백질 내의 탄수화물의 인접한 히드록실기 (OH)는 과요오드산 나트륨 (NaIO4)에 의해서 쉽게 산화되어 활성 알데히드기를 형성할 수 있다 (Rothfus et Smith, J Biol Chem 1963; 238:1402-10; van Lenten et Ashwell, J Biol Chem 1971;246:1889-94). 그 다음, 상기 폴리머는, 예를 들어 활성 히드라지드기를 함유하는 시약을 사용함으로써 상기 탄수화물의 알데히드기에 커플링될 수 있다 (Wilchek M 및 Bayer EA, Methods Enzymol 1987;138:429-42). 보다 최근의 기술로서 알데히드와 반응하여 옥심 결합을 형성하는 아미노옥시기를 함유하는 시약을 사용하는 것이 있다 (WO 96/40662, WO2008/025856).

[0007] 치료학적 단백질에 대한 수용성 폴리머의 콘주게이션을 설명하는 추가적인 예는, 폰 빌레브란트 인자 내의 탄수화물 부위를 산화시키고, 이어서 히드라지드 화학 반응을 이용하여 PEG에 대해 커플링시키는 것을 교시한 WO 06/071801; rFVⅢ를 산화시키고, 이어서 히드라지드 화학 반응을 이용하여 PEG 및 그 밖의 다른 수용성 폴리머 (예를 들어, PSA, HES, 덱스트란)에 커플링시키는 것을 교시한 미국 공개 제2009/0076237호; 다른 응고 인자, 예를 들어, rFIX, FVⅢ 및 FVⅡa를 산화시키고, 이어서 옥심 결합의 형성에 의한 아미노 옥시 화학 반응을 이용하여, 예를 들어, PEG에 커플링시키는 것을 교시한 WO 2008/025856; 및 FIX를 산화시키고, 이어서 히드라지드 화학 반응을 이용하여 PEG에 커플링시키는 것을 교시한 미국 특허 제5,621,039호에 기술되어 있다.

[0008] 최근, 시알산의 약한 과요오드산염 산화로 알데히드를 생성시키고, 이어서 촉매량의 아닐린의 존재 하에서 아미노옥시기를 함유하는 시약과 반응시키는 것을 포함하는 개선된 방법이 기술되었다 (Dirksen A et Dawson PE, Bioconjugate Chem. 2008;19,2543-8; 및 Zeng Y 등, Nature Methods 2009;6:207-9). 상기 아닐린 촉매작용은 옥심 라이게이션 (ligation)을 극적으로 촉진시켜, 매우 낮은 농도의 시약의 사용을 가능하게 한다.

[0009] 상기 방법들로 치료학적 단백질에 수용성 폴리머를 콘주게이션하는 것이 가능하나, 다양한 시약과 관련된 비용을 최소화하면서 단백질의 약동학적 및/또는 약력학적 특성을 개선시키는, 단백질에 수용성 폴리머를 콘주게이션시키는 물질 및 방법을 개발할 필요성은 여전히 남아있다.

발명의 내용

[0010] **발명의 요약**

[0011] 본원 발명은 다양한 시약과 관련된 비용을 최소화하면서 단백질의 약동학적 및/또는 약력학적 특성을 개선시키는, 단백질에 수용성 폴리머를 콘주게이션시키는 물질 및 방법을 제공한다.

[0012] 본원 발명의 일 구체예에서, 콘주게이션이 가능한 조건하에서, 산화된 탄수화물 부위와 활성화된 수용성 폴리머를 접촉시키는 것을 포함하는, 혈액 응고 단백질의 산화된 탄수화물 부위에 수용성 폴리머를 콘주게이션시키는 방법으로서; 상기 혈액 응고 단백질은 인자 IX (FIX), 인자 Ⅷ (FVⅢ), 인자 Ⅶa (FVⅡa), 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI (FXI), 인자 XⅡ (FXⅡ), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF) 및 ADAMTS 13 프로테아제 또는 이들의 생물학적 활성 단편, 유도체 또는 변이체로 이루어진 군에서 선택되고; 상기 수용성 폴리머는 활성 아미노옥시기를 함유하며, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 분지형 PEG, 폴리시알산 (PSA), 탄수화물, 폴리사카라이드, 풀루란 (pullulane), 키토산 (chitosan), 히알루론산 (hyaluronic acid), 황산 콘드로이틴 (chondroitin sulfate), 황산 더마탄 (dermatan sulfate), 녹말, 덱스트란 (dextran), 카복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 옥시드 (PAO), 폴리알킬렌 글리콜 (PAG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG), 폴리옥사졸린 (polyoxazoline), 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리

비닐피롤리돈 (polyvinylpyrrolidone), 폴리포스파젠 (polyphosphazene), 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-말레인산 무수물 공중합체 (polyethylene-co-maleic acid anhydride), 폴리스테렌-말레인산 무수물 공중합체 (polystyrene-co-maleic acid anhydride), 폴리(1-히드록시메틸에틸렌 히드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일록시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)로 이루어진 군에서 선택되며; 상기 탄수화물 부위는 과요오드산 나트륨 (NaIO4), 테트라 아세트산 납 (lead tetraacetate, (Pb(OAc)4) 및 과루테늄산 칼륨 (potassium perruthenate, KRuO4)로 이루어진 군에서 선택된 산화제를 포함하는 버퍼와 함께 인큐베이션 (incubation)함으로써 산화되고; 여기서 상기 산화된 탄수화물 부위 및 상기 수용성 폴리머 상의 활성 아미노옥시기 사이에 옥심 결합 (oxime linkage)이 형성되는, 방법을 제공한다.

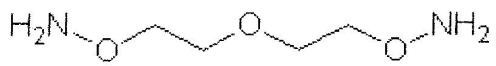
[0013] 본원 발명의 또 다른 구체예에서, 전술한 방법에 따른 상기 수용성 폴리머는 PSA이다. 관련된 구체예에서, 상기 PSA는 약 5 내지 500 또는 10 내지 300 시알산 단위로 이루어진다. 또 다른 구체예에서, 전술한 방법에 따른 상기 혈액 응고 단백질은 FIX이다. 또 다른 구체예에서, 전술한 방법에 따른 상기 혈액 응고 단백질은 FVIIa이다. 또 다른 구체예에서, 전술한 방법에 따른 상기 혈액 응고 단백질은 FVIII이다. 또 다른 구체예에서는, 전술한 방법에 있어서, 상기 산화제가 과요오드산 나트륨 (NaIO4)인 방법을 제공한다. 또 다른 구체예에서, 전술한 방법에 따른 상기 혈액 응고 단백질의 산화된 탄수화물 부위는 상기 혈액 응고 단백질의 활성화 펩티드에 위치한다.

[0014] 본원 발명의 또 다른 구체예에서는, 전술한 방법에 있어서, 상기 PSA는 산화된 PSA와 활성화된 아미노옥시 링커의 반응에 의해 제조된 것인, 방법을 제공한다.

[0015] 여기서 상기 아미노옥시 링커는 하기의 링커로 이루어진 군에서 선택된다:

[0016] 하기 화학식 1의 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 링커:

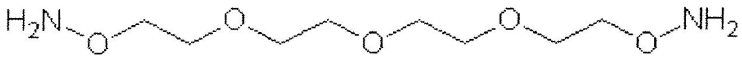
[0017] [화학식 1]



[0018] 및

[0019] 하기 화학식 2의 3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민 링커:

[0020] [화학식 2]



[0021]

[0022] 여기서 상기 PSA는 산화제와의 인큐베이션에 의한 산화로, 상기 PSA의 니환원성 말단에 알데히드 말단기를 형성한 것이다. 또 다른 구체예에서, 전술한 방법에 있어서, 상기 활성화된 아미노옥시 링커는 1 내지 50 에틸렌 글리콜 단위를 포함하는 방법을 제공한다. 또 다른 구체예에서, 전술한 방법에 있어서, 상기 아미노옥시 링커는 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민인 방법을 제공한다. 관련된 구체예에서, 상기 산화제는 $NaIO_4$이다.

[0023] 본원 발명의 또 다른 구체예에서, 전술된 방법에 있어서, 상기 활성화된 수용성 폴리머와 상기 산화된 탄수화물 부위의 접촉은, 아닐린 및 아닐린 유도체로 이루어진 군에서 선택되는 친핵성 촉매를 포함하는 버퍼에서 일어나는 방법을 제공한다.

[0024] 본원 발명의 또 다른 구체예에서, 전술한 방법에 있어서, 상기 콘주게이션된 혈액 응고 단백질을 수소화 시아노 붕소 나트륨 (sodium cyanoborohydride, NaCNBH3) 및 아스코르브산 (비타민 C)으로 이루어진 군에서 선택되는 환원성 화합물을 포함하는 버퍼에서 인큐베이션함으로써, 상기 콘주게이션된 혈액 응고 단백질 내의 옥심 결합을 환원시키는 단계를 추가로 포함하는 방법을 제공한다. 관련된 구체예에서, 상기 환원성 화합물은 수소화 시아노 붕소 나트륨 (NaCNBH3)이다.

[0025] 본원 발명의 또 다른 구체예에서, 전술한 방법에 의해서 생산된 변형된 혈액 응고 단백질을 제공한다.

[0026] 본원 발명의 또 다른 구체예에서, FIX 분자 또는 그의 생물학적 활성 단편, 유도체 또는 변이체; 및 상기 FIX 분자에 결합된 적어도 1 개의 아미노옥시 PSA를 포함하는, 변형된 FIX를 제공하며, 여기서 상기 아미노옥시 PSA는 1개 이상의 탄수화물 부위를 통하여 상기 FIX에 부착된다.

[0027] 본원 발명의 또 다른 구체예에서, FVIIa 분자 또는 그의 생물학적 활성 단편, 유도체 또는 변이체; 및 상기 FVIIa 분자에 결합된 적어도 1 개의 아미노옥시 PSA를 포함하는 변형된 FVIIa를 제공하며, 여기서 상기 아미노옥시 PSA는 1개 이상의 탄수화물 부위를 통하여 상기 FVIIa에 부착된다.

[0028] 본원 발명의 또 다른 구체예에서, FVIII 분자 또는 그의 생물학적 활성 단편, 유도체 또는 변이체; 및 상기 FVIII 분자에 결합된 적어도 1 개의 아미노옥시 PSA를 포함하는 변형된 FVIII을 제공하며, 여기서 상기 아미노옥시 PSA는 1개 이상의 탄수화물 부위를 통하여 상기 FVIII에 부착된다.

[0029] 본원 발명의 또 다른 구체예에서, FIX 분자 또는 그의 생물학적 활성 단편, 유도체 또는 변이체; 및 상기 FIX 분자에 결합된 적어도 1 개의 아미노옥시 PEG를 포함하는 변형된 FIX를 제공하며, 여기서 상기 아미노옥시 PEG는 1개 이상의 탄수화물 부위를 통하여 상기 FIX에 부착된다.

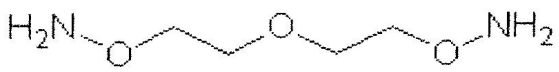
[0030] 본원 발명의 또 다른 구체예에서, FVIIa 분자 또는 그의 생물학적 활성 단편, 유도체 또는 변이체; 및 상기 FVIIa 분자에 결합된 적어도 1 개의 아미노옥시 PEG를 포함하는 변형된 FVIIa를 제공하며, 여기서 상기 아미노옥시 PEG는 1개 이상의 탄수화물 부위를 통하여 상기 FVIIa에 부착된다.

[0031] 본원 발명의 또 다른 구체예에서, FVIII 분자 또는 그의 생물학적 활성 단편, 유도체 또는 변이체; 및 상기 FVIII 분자에 결합된 적어도 1 개의 아미노옥시 PEG를 포함하는 변형된 FVIII를 제공하며, 여기서 상기 아미노옥시 PEG는 1개 이상의 탄수화물 부위를 통하여 상기 FVIII에 부착된다.

[0032] 또 다른 구체예에서, 활성 아미노옥시 링커를 포함하는 수용성 폴리머로서; 상기 수용성 폴리머는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 분지형 PEG, 폴리시알산 (PSA), 탄수화물, 폴리사카라이드, 풀루란, 키토산, 히알루론산, 황산 콘드로이틴, 황산 더마탄, 녹말, 덱스트란, 카복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 옥시드 (PAO), 폴리알킬렌 글리콜 (PAG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-말레인산 무수물 공중합체, 폴리스테렌-말레인산 무수물 공중합체, 폴리(1-히드록시메틸에틸렌 히드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일록시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)로 이루어진 군에서 선택되며; 상기 활성 아미노옥시 링커는 하기의 링커로 이루어진 군에서 선택되는, 활성 아미노옥시 링커를 포함하는 수용성 폴리머를 제공한다:

[0033] 하기 화학식 1의 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 링커:

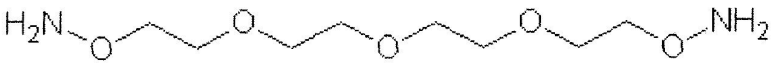
[0034] [화학식 1]



[0035] 및

[0036] 하기 화학식 2의 3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민 링커:

[0037] [화학식 2]

[0038] 

[0039] 또한 또 다른 구체예에서, 전술한 방법에 있어서, 상기 활성화된 아미노옥시 링커는 1 내지 50의 에틸렌 글리콜 단위를 포함하는 방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 응고 인자 IX의 일차 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 산화된 rFIX와 아미노옥시-PSA의 커플링 반응을 나타낸 것이다.

도 3은 수용성 디-아미노옥시 링커인 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 및 3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민의 합성을 나타낸 것이다.

도 4는 아미노옥시-PSA의 제조를 나타낸 것이다.

도 5는 SDS-PAGE 및 쿠마시 염색 (Coomassie stain)을 이용한 PSA-rFIX 복합체의 분석적 특성화를 나타낸 것이다.

도 6은 안티-FIX 및 안티-PSA 항체에 의한 검출을 이용한 PSA-rFIX의 분석적 특성화를 나타낸 것이다.

도 7은 주입 후 시간에 대한 천연 rFIX 및 PSA-rFIX 복합체의 활성을 나타낸 것이다.

도 8은 주입 후 시간에 대한 PSA-rFVIII 및 애드베이트 (Advate) 레벨을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 치료학적 단백질의 약물학적 및 면역학적 특성은, 화학적 변형 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 분지형 PEG, 폴리시알산 (PSA), 탄수화물, 폴리사카라이드, 풀루란, 키토산, 히알루론산, 황산 콘드로이틴, 황산 더마탄, 녹말, 덱스트란, 카복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 옥시드 (PAO), 폴리알킬렌 글리콜 (PAG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-말레인산 무수물 공중합체, 폴리스테렌-말레인산 무수물 공중합체, 폴리(1-히드록시메틸에틸렌 히드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일록시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)와 같은 폴리머 화합물과의 콘주게이션에 의하여 개선될 수 있다. 상기 결과로 생성된 복합체의 특성은 일반적으로, 상기 폴리머의 구조 및 크기에 영향을 받는다. 따라서, 규정된 가느다란 크기 분포를 갖는 폴리머가 당해 기술분야에서 통상적으로 바람직하다. PSA는 가느다란 크기 분포를 갖는 최종 PSA 제제를 제공하는 그러한 방식으로 정제될 수 있는 반면, PEG와 같은 합성 폴리머는 가느다란 크기 분포로 쉽게 제조될 수 있다. 또한, 규정된 폴리머 쇄 및 좁은 크기 분포를 갖는 폐길화 시약은 판매 중에 있으며, 합리적인 가격으로 상업적으로 이용 가능하다.

[0042] 폴리시알릴화를 통하는 것과 같은 가용성 폴리머의 첨가는, FIX뿐만 아니라 그 밖의 다른 응고 단백질들 (예를 들어, VWF, FVIIa (예를 들어, 본원 발명에 참고로서 통합된 US 2008/0221032 A1 참조) 및 FVIII)과 같은 혈액 응고 단백질의 특성을 개선시키는 한가지 접근 방법이다.

[0043] **혈액 응고 단백질**

[0044] 본원 명세서에 기술된 바와 같이, 본원 발명의 혈액 응고 단백질은, 인자 IX (FIX), 인자 VIII (FVIII), 인자 VIIa (FVIIa), 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI, 인자 XII (FXII), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF) 및 ADAMTS 13 프로테아제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본원 명세서에서 사용된 용어, "혈액 응고 단백질"은 특정한 천연 혈액 응고 단백질과 관련된 생물학적 활성을 나타내는 임의의 인자 IX (FIX), 인자 VIII (FVIII), 인자 VIIa (FVIIa), 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XII (FXII), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF) 및 ADAMTS 13 프로테아제를 의미한다.

[0045] 혈액 응고 캐스케이드 (cascade)는 3 개의 별개의 부분, 즉 내인성, 외인성 및 공통 경로로 구분된다 (Schenone 등, Curr Opin Hematol. 2004;11:272-7). 상기 캐스케이드는 일련의 세린 프로테아제 효소 (자이모겐) 및 단백질 보조인자를 포함한다. 필요한 경우에, 불활성 자이모겐 전구체를, 상기 캐스케이드에서 결과적으로 다음 효소로 전환되는 활성 형태로 전환시킬 수 있다.

[0046] 상기 내인성 경로는 상기 응고 인자 VIII, IX, X, XI, 및 XII를 필요로 한다. 상기 내인성 경로의 개시는 프리칼리크레인 (prekallikrein), 고분자량 키니노겐 (kininogen), 인자 XI (FXI) 및 인자 XII (FXII)가 음으로 하전된 표면에 노출되는 경우에 일어난다. 또한, 혈소판으로부터 분비된 칼슘 이온 및 인지질이 요구된다.

[0047] 상기 외인성 경로는 혈관의 혈관 내강이 손상되는 경우에 일어난다. 막 당단백질 조직 인자가 노출되고, 그 다음, 순환 인자 VII (FVII) 및 기존에 존재하는 소량의 그의 활성화된 형태 FVIIa에 결합한다. 이러한 결합은 FVII의 FVIIa로의 완전한 전환, 및 후속적인 칼슘 및 인지질의 존재 하에서의, 인자 IX (FIX)의 인자 IXa (FIXa)로의 전환 및 인자 X (FX)의 인자 Xa (FXa)로의 전환을 촉진시킨다. FVIIa과 조직 인자의 상기 결합은 기질 (FIX 및 FX)에 대한 FVII의 결합 부위를 더 근접하게 하고, 상기 FVIIa의 효소 활성을 증진시키는 형태적 변화 (conformational change)를 유도함으로써 단백분해적 활성을 증진시킨다.

[0048] 상기 FX의 활성화는 상기 2 개의 경로의 공통점이 된다. 인지질 및 칼슘과 함께, 인자 Va (FVa) 및 Xa는 프로트롬빈을 트롬빈 (프로트롬비나제 컴플렉스)으로 전환시키며, 이것은 후에 피브리노겐을 분해하여 피브린 모노머

를 형성시킨다. 상기 모노머는 중합하여 피브린 가닥을 형성한다. 인자 XIIIa (FXIIIa)는 이들 가닥을 서로 공유적으로 결합시켜 단단한 그물을 형성시킨다.

[0049] FVII의 FVIIa로의 전환은 또한 트롬빈, FIXa, FXa, 인자 XIa (FXIa), 및 인자 XIIa (FXIIa)를 포함한 다수의 프로테아제에 의해서 촉진된다. 상기 캐스케이드의 초기 단계의 억제를 위해서, 조직 인자 경로 억제제는 FVIIa/조직 인자/FXa 생성물 컴플렉스를 표적으로 한다.

[0050] **A. 폴리펩티드**

[0051] 일 양상에서, 본원 발명의 시작 물질은 인간 혈장으로부터 유래할 수 있거나, 특허인 미국 특허 제4,757,006호; 미국 특허 제5,733,873호; 미국 특허 제5,198,349호; 미국 특허 제5,250,421호; 미국 특허 제5,919,766호; 및 EP 306 968에 기술된 바와 같은 재조합 가공 기술에 의해서 생산될 수 있는, 혈액 응고 단백질이다. 본원 명세서에서 사용된, 용어 혈액 응고 단백질은 천연 혈액 응고 단백질과 관련된 생물학적 활성을 나타내는 임의의 혈액 응고 단백질 분자를 나타낸다. 본원 발명의 일 구체예에서, 상기 혈액 응고 단백질 분자는 전체-길이 혈액 응고 단백질이다.

[0052] 고려되는 혈액 응고 단백질 분자는, 전체-길이 단백질, 전체 길이 단백질의 전구체, 전체 길이 단백질의 생물학적 활성 서브유니트 또는 단편뿐만 아니라, 혈액 응고 단백질의 임의의 형태의 생물학적 활성 유도체 및 변이체를 포함한다. 따라서, 혈액 응고 단백질은, (1) 본원 명세서에 기술된 기준 핵산 또는 아미노산 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드에 대해서 적어도 약 25, 약 50, 약 100, 약 200, 약 300, 약 400, 또는 그 이상의 아미노산의 구역에 걸쳐서, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 이상 또는 그 이상의 아미노산 서열 동일성을 가지며; 및/또는 (2) 본원 명세서에 기술된 바와 같은 기준 아미노산 서열, 그의 면역원성 단편 및/또는 그의 보존적으로 변형된 변이체를 포함하는 면역원에 대해서 생성된 항체, 예를 들어, 다중 클론성 (polyclonal) 또는 단일 클론성 (monoclonal) 항체에 특이적으로 결합하는 것을 포함한다.

[0053] 본원 발명에 따르면, 용어 "재조합 혈액 응고 단백질"은 재조합 DNA 기술을 통해서 수득된 임의의 혈액 응고 단백질을 포함한다. 특정의 구체예에서, 상기 용어는 본원 명세서에 기술된 바와 같은 단백질을 포함한다.

[0054] 본원 명세서에서 사용된, "내인성 혈액 응고 단백질"은 치료를 받도록 의도된 포유 동물로부터 유래된 혈액 응고 단백질을 포함한다. 상기 용어는 또한, 상기 포유 동물에 존재하는 이식 유전자 (transgene) 또는 임의의 다른 외래 DNA로부터 전사된 혈액 응고 단백질을 포함한다. 본원 명세서에서 사용된 용어, "외인성 혈액 응고 단백질"은 치료를 받도록 의도된 포유동물로부터 유래하지 않는 혈액 응고 단백질을 포함한다.

[0055] 본원 명세서에서 사용된, "혈장-유래 혈액 응고 단백질" 또는 "혈장성"은 응고 경로에 참여하는 특성을 갖는 포유동물로부터 수득된 혈액 내에서 발견된 임의의 형태의 단백질을 포함한다.

[0056] 본원 명세서에서 사용된, "생물학적 활성 유도체" 또는 "생물학적 활성 변이체"는, 결합 특성과 같은 상기 분자와 실질적으로 동일한 기능적 및/또는 생물학적 특성을 가지며, 및/또는 펩티드 골격 또는 기본 폴리머 단위와 같은 동일한 구조적 기반을 갖는 분자의 임의의 유도체 또는 변이체를 포함한다.

[0057] "유사체", "변이체" 또는 "유도체"는 천연적으로 발생한 분자와, 비록 특정의 경우에 상이하나, 구조적으로 실질적으로 유사하며 동일한 생물학적 활성을 갖는 화합물이다. 예를 들어, 폴리펩티드 변이체는 기준 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 구조를 공유하며, 동일한 생물학적 활성을 갖는 폴리펩티드를 나타낸다. 변이체 또는 유사체는, (i) 폴리펩티드의 1 이상의 말단 및/또는 천연적으로 발생한 폴리펩티드 서열의 1 이상의 내부 구역 (예를 들어, 단편)에서 1 이상의 아미노산 잔기의 결실, (ii) 폴리펩티드의 1 이상의 말단 (전형적으로 "부가" 또는 "융합") 및/또는 천연적으로 발생한 폴리펩티드 서열의 1 이상의 내부 구역 (전형적으로 "삽입")에서 1 이상의 아미노산의 삽입 또는 부가, 또는 (iii) 천연적으로 발생한 폴리펩티드 서열에서 1 이상의 아미노산의 다른 아미노산에 대한 치환을 포함하는 1 이상의 돌연변이를 근거로 하여, 유사체가 유도된 천연적으로 발생한 폴리펩티드와 비교하여, 그들의 아미노산 서열의 조성이 상이하다. 예를 들어, "유도체"는 예를 들어, 화학적으로 변형된 기준 폴리펩티드와 동일하거나 실질적으로 유사한 구조를 공유하는 폴리펩티드를 나타낸다.

[0058] 변이체 또는 유사체 폴리펩티드는 1 이상의 아미노산 잔기가 본원 발명의 혈액 응고 단백질 아미노산 서열에 첨가된 삽입 변이체를 포함한다. 삽입은 단백질의 어느 하나 또는 양자의 말단에 위치할 수 있으며, 및/또는 혈액 응고 단백질 아미노산 서열의 내부 구역 내에 위치할 수 있다. 어느 하나 또는 양 말단에 추가적인 잔기를 갖는 삽입 변이체는, 예를 들어, 융합 단백질 및 아미노산 태그 (tag) 또는 다른 아미노산 라벨 (label)을 포함하는 단백질을 포함한다. 일 관점에서, 상기 혈액 응고 단백질 분자는 특히 분자가 E. coli와 같은 박테리아 세포에

서 재조합적으로 발현되는 경우에, N-말단 Met를 임의적으로 함유한다.

[0059] 결실 변이체에서, 본원 명세서에 기술된 바와 같은 혈액 응고 단백질 폴리펩티드 내의 1 이상의 아미노산 잔기가 제거된다. 결실은 혈액 응고 단백질 폴리펩티드의 어느 하나 또는 양 말단에서 유효할 수 있으며, 및/또는 상기 혈액 응고 단백질 아미노산 서열 내의 1 이상의 잔기의 제거와 함께 일어날 수 있다. 따라서, 결실 변이체는 혈액 응고 단백질 폴리펩티드 서열의 단편을 포함한다.

[0060] 치환 변이체에서, 혈액 응고 단백질 폴리펩티드의 1 이상의 아미노산 잔기가 제거되고, 대체 잔기로 치환된다. 일 관점에서, 상기 치환은 사실상 보존적이며, 상기 유형의 보존적 치환은 당해 기술 분야에서 잘 알려져 있다. 대안적으로, 본원 발명은 또한 비-보존적인 치환을 포함한다. 보존적 치환의 예는 문헌 (Lehninger, Biochemistry, 2nd Edition; Worth Publishers, Inc., 뉴욕 (1975), pp.71-77)에 기술되어 있으며, 바로 아래에서 설명한다.

[0061] 보존적 치환

[0062] **측쇄 특징**	**아미노산**
[0063] 비-극성 (소수성):	
[0064] A. 지방족	A L I V P
[0065] B. 방향족	F W
[0066] C. 황-함유	M
[0067] D. 경계선	G
[0068] 비하전-극성:	
[0069] A. 히드록실	S T Y
[0070] B. 아미드	N Q
[0071] C. 설프히드릴	C
[0072] D. 경계선	G
[0073] 양으로 하전됨 (염기성)	K R H
[0074] 음으로 하전됨 (산성)	D E

[0075] 대안적으로, 보존적 치환의 예를 바로 아래에서 설명한다.

[0076] 보존적 치환 II

[0077] **본래의 잔기**	**치환의 예**
[0078] Ala (A)	Val, Leu, Ile
[0079] Arg (R)	Lys, Gln, Asn
[0080] Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
[0081] Asp (D)	Glu
[0082] Cys (C)	Ser
[0083] Gln (Q)	Asn
[0084] Glu (E)	Asp
[0085] His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
[0086] Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe,
[0087] Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
[0088] Lys (K)	Arg, Gln, Asn

[0089]	Met (M)	Leu, Phe, Ile
[0090]	Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
[0091]	Pro (P)	Gly
[0092]	Ser (S)	Thr
[0093]	Thr (T)	Ser
[0094]	Trp (W)	Tyr
[0095]	Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
[0096]	Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

[0097] **B. 폴리뉴클레오티드**

[0098] 본원 발명의 혈액 응고 단백질을 코딩하는 핵산은, 예를 들어 유전자, mRNAs 전구체 (pre-mRNAs), mRNAs, cDNAs, 다형성 변이체, 대립유전자, 합성 및 천연적으로 발생한 돌연변이체를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0099] 본원 발명의 혈액 응고 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한, (1) 엄격한 하이브리드화 조건 하에서, 본원 명세서에 기술된 바와 같은 기준 아미노산 서열 및 그의 보존적으로 변형된 변이체를 코딩하는 핵산에 대해 특이적으로 하이브리드화하는 것; (2) 본원 명세서에 기술된 바와 같은 기준 아미노산 서열에 대해서 적어도 약 25, 약 50, 약 100, 약 150, 약 200, 약 250, 약 500, 약 1000 개, 또는 그 이상의 뉴클레오티드 (성숙된 단백질의 1218 뉴클레오티드의 전체 길이 서열까지)의 구역에 걸쳐서 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 이상 또는 그보다 높은 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는 것을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 예시적인 "엄격한 하이브리드화" 조건은 50% 포름아미드, 5X SSC, 20 mM $Na \cdot PO_4$, pH 6.8 중에서, 42℃에서의 하이브리드화; 및 55℃에서 1X SSC에서의 30 분 동안의 세정을 포함한다. 상기 예시적 조건에서의 변화는 하이브리드화될 서열의 길이 및 GC 뉴클레오티드 함량을 기반으로 하여 만들어질 수 있는 것으로 해석된다. 당해 기술분야에서의 표준 방식이 적절한 하이브리드화 조건을 결정하는데 적절하다 (참조: Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) § § 9.47-9.51).

[0100] "천연적으로 발생한" 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열은 전형적으로 영장류, 예를 들어, 인간; 설치류, 예를 들어, 랫트, 마우스, 햄스터; 소, 돼지, 말, 양 또는 임의의 포유동물을 포함하는 포유동물로부터 유래되나, 이에 제한되지 않는다. 본원 발명의 핵산 및 단백질은 재조합체 분자 (예를 들어, 이종성 (heterologous)이며, 야생형 서열 또는 그의 변이체를 코딩하거나, 비-천연적으로 발생함)일 수 있다.

[0101] 본원 발명의 특정의 구체예에서, 전술한 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드는 하기의 혈액 응고 단백질로 예시된다.

[0102] 인자 VIIa

[0103] FVII (또한, 안정한 인자 또는 프로컨버틴 (proconvertin)으로 알려짐)은 지혈 및 응고에 중추적인 역할을 하는 비타민 K-의존성 세린 프로테아제 당단백질이다 (Eigenbrot, Curr Protein Pept Sci. 2002;3:287-99).

[0104] FVII은 간에서 합성되며, 48 kD의 단일-쇄 당단백질로서 분비된다. FVII은 지질 막과 단백질의 상호 작용을 관장하는 9 내지 12 개의 잔기를 갖는 아미노-말단 감마-카복시글루탐산 (Gla) 영역, 카복시-말단 세린 프로테아제 영역 (촉매적 영역), 및 조직 인자와의 상호작용을 매개하는 칼슘 이온 결합 부위를 함유하는 2 개의 표피 성장 인자-유사 영역으로 구성된 유사한 단백질 영역 구조를, 모든 비타민 K-의존성 세린 프로테아제 당단백질과,공유한다. 감마-글루타밀 카복실라제는 상기 분자의 아미노-말단 부분에서 Gla 잔기의 카복실화를 촉진시킨다. 카복실라제는 그의 작용에 의한, 에폭사이드 형태로 산화되는 비타민 K의 환원된 형태에 의존적이다. 비타민 K 에폭사이드 환원 효소는 비타민 K의 에폭사이드 형태를 환원된 형태로 다시 전환시키는데 필요하다.

[0105] FVII의 대부분은 자이모겐 형태로 혈장 내에서 순환하며, 이 형태의 활성화는 아르기닌 152와 이소류신 153 사이의 펩티드 결합의 분해를 야기한다. 상기 결과로 생성되는 활성화된 FVIIa는 단일 이황화 결합 (Cys 135 대 Cys 262)을 통해서 연결된 NH_2-유래된 경쇄 (light chain) (20 kD) 및 COOH 말단-유도된 중쇄 (heavy chain) (30

kD)로 구성된다. 상기 중쇄는 촉매적 영역을 함유하는 반면, 상기 경쇄는 막-결합성 Gla 영역을 함유한다.

[0106] 유전적 인자 및 환경적 인자에 의해서 결정된 FVII의 혈장 농도는 약 0.5 ㎎/㎖이다 (Pinotti 등, Blood. 2000;95:3423-8). 상이한 FVII 유전자형은 평균 FVII 레벨에서 수 배의 차이를 야기할 수 있다. 혈장 FVII 레벨은 건강한 여성에서 임신 중에 상승되며, 또한 연령에 따라 증가하고, 여성 및 고트리글리세라이드혈증(hypertriglyceridemia)이 있는 사람에게서 더 높다. FVII은 모든 응혈원 인자 중 가장 짧은 반감기를 갖는다 (3 내지 6 시간). FVIIa의 평균 혈장 농도는 건강한 개체내에서 3.6 ng/㎖이며, FVIIa의 순환 반감기는 다른 응혈원 인자와 비교하여 비교적 길다 (2.5 h).

[0107] 유전적 FVII 결핍은 일반적인 집단에서 500,000 명당 1 증례로 추정되는 출현율을 갖는 희귀한 상염색체 열성 출혈성 장애이다 (Acharya 등, J Thromb Haemost. 2004;2248-56). 억제제로부터 얻어지는 FVII 결핍 또한 매우 희귀하다. 또한 세팔로스포린 (cephalosporins), 페니실린 및 경구용 항응고제와 같은 약물과 관련하여 나타나는 결핍에 대한 증례가 보고되고 있다. 더욱이, 획득된 FVII 결핍은 자발적으로 또는 골수종, 패혈증, 재생불량성 빈혈과 같은 다른 질병과 함께, 인터루킨-2 및 항 흉선 세포성 글로불린 요법과 함께 나타나는 것으로 보고되고 있다.

[0108] 기준 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는, 예를 들어, 게놈 서열에 대한 유전자 은행 (GenBank) 수탁번호 제J02933호, cDNA에 대한 M13232 (Hagen 등 PNAS 1986; 83: 2412-6), 및 폴리펩티드 서열에 대한 P08709를 포함한다 (본원 명세서에 전체로서 통합된 참고문헌). FVII의 다양한 다형현상은 예를 들어, 문헌 (참조: Sabater-Lleal 등, Hum Genet. 2006; 118:741-51; 본원 발명에 온전히 참고로 통합됨)에 기술되어 있다.

[0109] 인자 IX

[0110] FIX는 FX를 칼슘 이온, 인지질 및 FVIIIa의 존재 하에서 그의 활성 형태로 전환시킴으로써 혈액 응고의 내인성 경로에 참여하는 비타민 K-의존성 혈장 단백질이다. FIX는 FX 내의 특정한 아르기닌-이소류신 결합에 대한 특이성을 갖는 세린 프로테아제로서 현저한 촉매적 능력을 갖는다. FIX의 활성화는 FIX로부터 활성화된 펩티드 절단을 야기하는 FXIa에 의해 발생하며, 1 이상의 이황화 결합을 갖는 2 개의 쇄를 포함하는 활성화된 FIX 분자를 생산한다. FIX의 결함은 열성 X-연관된 혈우병 B의 원인이 된다.

[0111] 혈우병 A 및 B는 각각 FVIII 및 FIX 폴리펩티드에서의 결핍을 특징으로 하는 유전병이다. 상기 결핍의 근본적 원인은 종종, 양자 모두 X 염색체 상에 위치하는 FVIII 및 FIX 유전자의 돌연변이에 있다. 혈우병에 대한 전통적인 치료법은 흔히 정상 개체로부터 유래하는 혼합된 혈장 (pooled plasma) 또는 반-정제된 응고 단백질의 정맥내 투여를 포함한다. 이들 제제는 감염성 프리온 (prions), HIV, 파보바이러스, 간염 A, 및 간염 C와 같은 병원성 작용제 또는 바이러스에 의해서 오염될 수 있다. 따라서, 인간 혈청의 사용을 필요로 하지 않는 치료학적 약제에 대한 요구가 절실하다.

[0112] FIX 활성의 감소 정도는 혈우병 B의 중증도에 정비례한다. 혈우병 B의 현행 치료는 결여된 단백질을 혈장-유래 또는 재조합 FIX에 의해서 대체시키는 것 (소위 FIX 치환 또는 대체 치료 또는 치료법)을 포함한다.

[0113] FIX의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열은 예를 들어, UniProtKB/Swiss-Prot 수탁번호 제P00740호, 미국 특허 제6,531,298호 및 도 1에서 찾아볼 수 있다.

[0114] 인자 VIII

[0115] 응고 인자 VIII (FVIII)은 혈장 내에서 매우 낮은 농도로 순환하며, 폰 빌레브란트 (VWF)에 비-공유적으로 결합된다. 지혈 중, FVIII은 VWF로부터 분리되고, 칼슘 및 인지질 또는 세포성 막의 존재 하에서 활성화 속도를 증진시킴으로써 활성화된 인자 IX (FIXa)에 매개된 FX 활성화를 위한 보조인자로서 작용한다.

[0116] FVIII은 영역 구조 A1-A2-B-A3-C1-C2를 갖는 약 270 내지 330 kD의 단일-쇄 전구체로 합성된다. 혈장으로부터 정제되는 경우 (예를 들어, "혈장-유래" 또는 "혈장성"), FVIII은 중쇄 (A1-A2-B) 및 경쇄 (A3-C1-C2)로 구성된다. 상기 경쇄의 분자 질량은 80 kD인 반면, 상기 B 영역 내에서의 단백분해로 인하여, 상기 중쇄는 90 내지 220 kD의 범위이다.

[0117] FVIII은 또한 출혈성 장애에서 치료학적 사용을 위해 재조합 단백질로 합성된다. 다양한 생체 외 시험이 치료학적 의약으로서의 재조합 FVIII (rFVIII)의 잠재적 효능을 결정하기 위하여 고안되었다. 이들 시험방법은 내인성 FVIII의 생체내 효과를 모사한다. FVIII의 생체 외 트롬빈 처리는 생체 외 시험방법에 의해서 측정된 것으로서, 그의 응혈원 활성의 빠른 증가 및 그에 따른 감소를 야기한다. 상기 활성화 및 불활성화는 중쇄 및 경쇄 양자에서 특이적으로 제한된 단백분해와 일치하며, 이는 FVIII에서 다양한 결합성 항원 결정 부위 (epitopes)의 이용 가능성을 변

화시킴으로써, 예를 들어, FVⅢ가 VWF로부터 해리되어 인지질 표면에 결합하도록 하거나, 특정의 단일 클론성 항체에 대한 결합 능력을 변화시킨다.

[0118] FVⅢ의 결여 또는 기능부전은 가장 빈번한 출혈성 장애인 혈우병 A와 연관된다. 혈우병 A의 관리를 위해서 선택된 치료는 혈장 유래 또는 rFVⅢ 농축물에 의한 대체요법이다. 1% 이하의 양의 FVⅢ을 갖는 중증 혈우병 A를 앓는 환자는 일반적으로 투약 사이에 1% 이상으로 FVⅢ을 유지시킬 목적으로 예방적 요법을 시행한다. 순환 중인 상기 다양한 FVⅢ 생성물의 평균 반감기를 고려할 때, 상기 결과는 통상적으로 FVⅢ을 1 주일에 2 내지 3 회 제공함으로써 달성될 수 있다.

[0119] 기준 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열은, 예를 들어, UniProtKB/Swiss-Prot P00451 (FA8_HUMAN)을 포함한다 (참조: Gitschier J 등, Characterization of the human Factor Ⅷ gene, Nature, 312 (5992): 326-30 (1984); Vehar GH 등, Structure of human Factor Ⅷ, Nature, 312 (5992):337-42 (1984); Thompson AR. Structure and Function of the Factor Ⅷ gene and protein, Semin Thromb Hemost, 2003:29;11-29 (2002)).

[0120] 폰 빌레브란트 인자

[0121] 폰 빌레브란트 인자 (VWF)는 크기가 약 500 내지 20,000 kD의 범위인 멀티머 (multimers) 계열로서 혈장 중에 순환하는 당단백질이다. VWF의 멀티머 형태는 이황화 결합에 의해서 함께 연결된 250 kD 폴리펩티드 서브유니트로 구성된다. VWF는 손상된 혈관 벽의 내피하층에 대한 초기 혈소판 부착을 매개한다. 오로지 더 큰 멀티머만이 지혈 활성을 나타낸다. 상기 내피세포는 VWF의 큰 폴리머 형태를 분비하고, 작은 분자량을 갖는 VWF (저분자량 VWF)는 단백분해적 분해로부터 생기는 것으로 추측된다. 큰 분자 질량을 갖는 상기 멀티머는 내피세포의 바이벨-팔레이드체 (Weibel-Pallade bodies) 내에 저장되며, 자극에 의해 유리된다.

[0122] VWF는 내피세포 및 거핵세포에 의해서, 대부분 반복된 영역으로 구성되는 프로-VWF 전구체 (prepro-VWF)로서 합성된다. 시그날 펩티드의 분해에 의해서 프로-VWF는 그의 C-말단 구역에서 이황화 결합을 통해서 다이머화한다. 상기 다이머는 유리 말단의 말단부 사이의 이황화 결합에 의해 지배를 받는 멀티머화를 위한 프로모터로서 작용한다. 멀티머로의 집합에 이어서 프로펩티드 서열의 단백분해적 제거가 뒤따른다 (Leyte 등, Biochem. J. 274 (1991), 257-261).

[0123] VWF의 클로닝된 cDNA로부터 예측되는 일차 번역 생성물은 2813-잔기 전구체 폴리펩티드 (프로-VWF 전구체)이다. 상기 프로-VWF 전구체는 22 개의 아미노산 시그날 펩티드 및 741 개의 아미노산 프로펩티드로 구성되며, 성숙 VWF는 2050 개의 아미노산을 포함한다 (Ruggeri Z.A., and Ware, J., FASEB J., 308-316 (1993)).

[0124] VWF에서의 결함은 다소 현저한 출혈성 표현형을 특징으로 하는 폰 빌레브란트병 (VWD)에 대한 원인이 된다. VWD 유형 3은 VWF가 완전히 결여된 가장 중증인 형태이며, VWD 유형 1은 VWF의 양적인 손실과 관련되며, 그의 표현형은 매우 약할 수 있다. VWD 유형 2는 VWF의 성질상의 결함과 관련되며, VWD 유형 3과 같은 정도로 중증일 수 있다. VWD 유형 2는 다수의 서브 형태를 가지며, 이들 중의 일부는 고분자량 멀티머의 손실 또는 감소와 연관된다. 폰 빌레브란트 질환 유형 2a (VWD-2A)는 중간체 및 큰 멀티머 양자의 손실에 의해 특성화된다. VWD-2B는 최고 분자량의 멀티머의 손실에 의해 특성화된다. VWF와 관련된 그 밖의 다른 질환 및 장애는 당해 기술분야에서 공지되어 있다.

[0125] 프로-VWF 전구체의 폴리뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 각각 유전자 은행수탁번호 제NM_000552 및 NP_000543으로 이용 가능하다.

[0126] 본원 발명에 따른 그 밖의 다른 혈액 응고 단백질은 당해 기술분야에서, 예를 들어, 문헌 (Mann KG, Thromb Haemost, 1999;82:165-74)에 기술되어 있다.

[0127] **C. 혈액 응고 단백질의 생산**

[0128] 혈액 응고 단백질의 생산은 정제된 혈액 응고 단백질을 수득하기 위하여 (i) 유전자 가공에 의해서 재조합 DNA를 생산하고, (ii) 예를 들어, 형질 주입, 전기천공 또는 미량주사에 의해서 (단, 이들로 제한되지 않는다) 원핵 또는 진핵 세포 내로 재조합 DNA를 도입시키고, (Ⅲ) 상기 형질전환된 세포를 배양하고, (iv) 혈액 응고 단백질을, 예를 들어, 구성적으로 또는 유도에 의해서 발현시키고, (v) 예를 들어, 배양 배지로부터, 또는 상기 형질 전환된 세포를 거두어 들임으로써 상기 혈액 응고 단백질을 분리시키기 위한 당해 기술분야에서 공지된 모든 방법을 포함한다.

[0129] 다른 양상에서, 상기 혈액 응고 단백질은 약물학적으로 허용되는 혈액 응고 단백질 분자를 생산하는 것을 특징으로 하는 적합한 원핵 또는 진핵 숙주 시스템 내에서의 발현에 의해서 생산된다. 진핵세포의 예로는 CHO, COS,

HEK 293, BHK, SK-Hep, 및 HepG2와 같은 포유동물 세포를 들 수 있다.

[0130] 상기 혈액 응고 단백질의 제조를 위해서 광범위한 종류의 벡터가 사용되며, 진핵성 및 원핵성 발현 벡터로부터 선택된다. 원핵성 발현을 위한 벡터의 예로는 pRSET, pET, 및 pBAD와 같은 플라스미드가 포함되나, 이들로 제한되지 않으며, 여기에서 원핵성 발현 벡터에서 사용된 프로모터는 lac, trc, trp, recA, 또는 araBAD 중의 1 이상을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 진핵성 발현을 위한 벡터의 예로는, (i) AOX1, GAP, GAL1, 또는 AUG1과 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 프로모터를 사용하는, pAO, pPIC, pYES, 또는 pMET와 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 효모내의 발현을 위한 벡터; (ii) PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, 또는 polh와 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 프로모터를 사용하는 pMT, pAc5, pIB, pMIB, 또는 pBAC와 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 곤충 세포에서의 발현을 위한 벡터, 및 (iii) 포유동물 세포에서의 발현을 위한 pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, 또는 pBPV와 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 벡터, 및 일 관점에서, CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV, 및 β-액틴과 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 프로모터를 사용하는, 우두 바이러스 (Vaccinia Virus), 아데노-연관 바이러스, 포진 바이러스 (Herpes Virus), 또는 레트로바이러스와 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 바이러스 시스템으로부터 유도된 벡터가 포함된다.

[0131] **D. 투여**

[0132] 일 구체예에서, 본원 발명의 콘주게이션된 혈액 응고 단백질은 정맥내, 근육내 또는 복강내 주사와 같은 주사에 의해서 투여될 수 있다.

[0133] 일 구체예에서, 본원 발명의 콘주게이션된 혈액 응고 단백질을 포함하는 조성물을 인간 또는 시험 동물에게 투여하기 위하여, 상기 조성물은 1 이상의 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 상기 용어 "약제학적으로" 또는 "약물학적으로 허용되는"은 이하에 기술되는 바와 같이, 당해 기술분야에서 잘 알려진 경로를 사용하여 투여되는 경우, 안정하며, 응집 및 분해 생성물과 같은 단백질 분해를 억제하고, 이에 더하여 알레르기 또는 그 밖의 다른 유해반응을 야기하지 않는 분자 물질 및 조성물을 나타낸다. "약제학적으로 허용되는 담체"에는 상술한 성분들을 포함한 임의의 모든 임상학적으로 유용한 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균 및 항진균제, 등장성 및 흡수지연제 등이 포함된다.

[0134] 본원 명세서에서 사용된, "유효량"은 본원 명세서에 기술된 바와 같은 출혈성 장애를 갖는 포유동물을 치료하는데 적합한 용량을 포함한다.

[0135] 상기 조성물은 경구적으로, 국소적으로, 경피적으로, 비경구적으로, 흡입 스프레이에 의해서, 질내로, 직장으로, 또는 두개내 (intracranial) 주사에 의해서 투여될 수 있다. 상기 용어, 비경구는 본원 명세서에서 사용된 바와 같이, 피하 주사, 정맥내, 근육내, 낭내 (intracisternal) 주사, 또는 주입 기술을 포함한다. 정맥내, 피내 (intradermal), 근육내, 유선내, 복강내, 척추강내 (intrathecal), 안구후, 폐내 주사에 의한 투여, 또는 특정 부위에서의 외과적 이식 역시 고려된다. 일반적으로, 조성물은 본질적으로 수용주에게 유해할 수 있는 다른 불순물뿐만 아니라, 발열 인자 (pyrogens)를 함유하지 않는다.

[0136] 상기 조성물의 단일 또는 복수의 투여는 치료하는 의사에 의해서 선택된 용량 및 패턴으로 수행될 수 있다. 질병의 예방 또는 치료를 위해서, 적절한 투여량은 상술한 바와 같이 치료될 질병의 유형, 질병의 중증도 및 과정, 약물이 예방적 또는 치료학적 목적으로 투여되는지 여부, 선행 치료법, 환자의 임상적 병력 및 약물에 대한 반응, 및 주치의의 판단에 따라 좌우될 수 있다.

[0137] 본원 발명은 또한, 본원 명세서에 정의된 바와 같은 콘주게이션된 혈액 응고 단백질의 유효량을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 상기 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 염, 완충제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 약제학적 조성물은 상기 정의된 출혈성 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 본원 발명의 상기 약제학적 조성물은 용액 또는 동결건조된 생성물일 수 있다. 상기 약제학적 조성물의 용액은 임의의 적합한 동결건조 공정에 적용될 수 있다.

[0138] 추가적인 양상으로서, 본원 발명은 대상체에게 투여하기 위하여, 그 사용을 용이하게 하는 방식으로 포장된 본원 발명의 조성물을 포함하는 키트 (kits)를 포함한다. 일 구체예에서, 이러한 키트는 상기 방법을 실시할 때의 화합물 또는 조성물의 사용을 설명하는 것으로 용기에 부착되거나 포장에 포함된 라벨을 갖는 밀봉된 병 또는 용기와 같은 용기 내에 포장된, 본원 명세서에 기술된 화합물 또는 조성물 (예를 들어, 콘주게이션된 혈액 응고 단백질을 포함하는 조성물)을 포함한다. 일 구체예에서, 상기 키트는 콘주게이션된 혈액 응고 단백질을 포함하는 조성물을 담은 제1 용기, 및 상기 제1 용기 내의 조성물을 위한 생리학적으로 허용되는 재구성 용액을 담은 제2 용기를 함유한다. 일 관점에서, 상기 화합물 또는 조성물은 단위 투약 형태으로 포장된다. 상기 키트는 특

정한 투여 경로에 따라 상기 조성물을 투여하는데 적합한 장치를 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 키트는 치료학적 단백질 또는 펩티드 조성물의 사용을 설명하는 라벨을 함유한다.

[0139] **수용성 폴리머**

[0140] 일 양상에서, 제공된 혈액 응고 단백질 유도체 (즉, 콘주게이션된 혈액 응고 단백질) 분자는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 분지형 PEG, 폴리시알산 (PSA), 탄수화물, 폴리사카라이드, 폴루란, 키토산, 히알루론산, 황산 콘드로이틴, 황산 더마탄, 녹말, 덱스트란, 카복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 옥시드 (PAO), 폴리알킬렌 글리콜 (PAG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-말레인산 무수물 공중합체, 폴리스테렌-말레인산 무수물 공중합체, 폴리(1-히드록시메틸에틸렌 히드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일록시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)를 포함하나, 이들로 제한되지 않는 수용성 폴리머에 결합된다. 본원 발명의 일 구체예에서, 상기 수용성 폴리머는 350 내지 120,000, 500 내지 100,000, 1,000 내지 80,000, 1,500 내지 60,000, 2,000 내지 45,000 Da, 3,000 내지 35,000 Da, 및 5,000 내지 25,000 Da의 분자량 범위를 갖는 시알산 분자로 구성된다. 상기 수용성 폴리머의 커플링 반응은 단백질에 대한 직접 커플링에 의해서, 또는 링커 분자를 통해서 수행될 수 있다. 화학적 링커의 한가지 예는 탄수화물-선택적 히드라지드 및 설프히드릴-반응성 말레이미드기를 함유하는 MBPH (4-[4-N-말레이미도페닐]부티르산 히드라지드)이다 (Chamow 등, J Biol Chem 1992;267:15916-22). 그 밖의 다른 예시적이고 바람직한 링커는 하기에서 기술한다.

[0141] 일 구체예에서, 상기 유도체는 천연 치료학적 혈액 응고 단백질 생성물의 전체 기능적 활성을 보유하며, 천연 치료학적 혈액 응고 단백질 생성물과 비교할 때, 연장된 생체내 반감기를 제공한다. 또 다른 구체예에서, 상기 유도체는 천연 혈액 응고 단백질에 비해서 적어도 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 또는 150 퍼센트 (%)의 생물학적 활성을 보유한다. 관련된 관점에서, 상기 유도체 및 천연 혈액 응고 단백질의 생물학적 활성은 혈액 응고 인자 항원값에 대한 발색 반응 활성 (chromogenic activity)의 비 (혈액 응고 인자 : Chr : 혈액 응고 인자 : Ag)에 의해서 결정된다. 본원 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 구조물의 반감기는 천연 혈액 응고 단백질의 생체내 반감기에 비해 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 배 감소 또는 증가한다.

[0142] **A. 시알산 및 PSA**

[0143] 본원 명세서에서 사용된, "시알산 부위"는 수성 용액 또는 현탁액에서 가용성이며, PSA-혈액 응고 단백질 복합체를 포유동물에 약제학적 유효량으로 투여하면 부작용과 같은 부정적인 영향이 거의 없거나 전혀 없는 시알산 모노머 또는 폴리머 ("폴리사카라이드")를 포함한다. 상기 폴리머는 일 관점에서 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 또는 500 개의 시알산 단위를 갖는 것으로 특정화된다. 특정 관점에서는, 다양한 시알산 단위가 쇄 내에 조합된다.

[0144] 본원 발명의 일 구체예에서, 폴리사카라이드 화합물의 시알산 부분은 강한 친수성이며, 또 다른 구체예에서는 전체 화합물이 강한 친수성을 띤다. 친수성은 주로 히드록실기뿐만 아니라 시알산 단위의 펜던트 카복실기에 의해서 부여된다. 사카라이드 단위는 아민, 히드록실기 또는 설페이트기, 또는 이들의 조합과 같은 다른 기능적 작용기를 함유할 수 있다. 이들 작용기는 천연적으로 발생한 사카라이드 화합물 상에 존재하거나, 유도된 폴리사카라이드 화합물 내로 도입될 수 있다.

[0145] 상기 천연적으로 발생한 폴리머 PSA는 넓은 크기 분포 (예를 들어, 시그마 C-5762) 및 높은 다분산성 (PD)을 나타내는 다분산 제제 (polydisperse)로서 이용될 수 있다. 상기 폴리사카라이드는 통상적으로 내독소를 공동 정제하는 유전적 위험을 동반하는 박테리아에서 생산되기 때문에, 긴 시알산 폴리머 쇄의 정제는 내독소 함량을 증가시킬 가능성을 상승시킬 수 있다. 1 내지 4 개의 시알산 단위를 갖는 짧은 PSA 분자는 또한 합성적으로 제조될 수도 있으며 (Kang SH 등, Chem Commun. 2000;227-8; Ress DK 및 Linhardt RJ, Current Organic Synthesis. 2004;1:31-46), 따라서 높은 내독소 함량의 위험을 최소화시킬 수 있다. 그러나, 현재 내독소 또한 함유하지 않으며 가느다란 크기 분포 및 낮은 다분산성을 갖는 PSA 제제를 제조하는 것이 가능하다. 일 관점에서, 본원 발명을 위한 특별한 용도의 폴리사카라이드 화합물은 박테리아에 의해서 생산된 것이다. 이러한 천연적으로 발생한 폴리사카라이드 중의 일부는 당지질 (glycolipids)로 알려져 있다. 일 구체예에서, 상기 폴리사카라이드 화합물은 실질적으로 말단 갈락토스 단위를 갖지 않는다.

[0146] **B. 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 페길화**

[0147] 특정의 관점에서, 혈액 응고 인자, 예를 들어, FVⅢ, FVⅡa, FIX, 또는 그 밖의 다른 혈액 응고 인자 분자는 임의의 다양한 화학적 방법에 의해 수용성 폴리머에 콘주게이션된다 (Roberts JM 등, Advan Drug Delivery Rev 2002;54:459-76). 예를 들어, 일 구체예에서 FVⅢ, FVⅡa, 또는 FIX는 N-히드록시석신이미드 (NHS) 에스테르를 사용하여 단백질의 유리 아미노기에 PEG를 콘주게이션시킴으로써 변형된다. 또 다른 구체예에서, 수용성 폴리머, 예를 들어, PEG는 말레이미드 화학 반응, 또는 선행 산화반응 후에 FVⅢ, FVⅡa, 또는 FIX의 탄수화물 부위에 대한 PEG 히드라지드 또는 PEG 아민의 커플링 반응을 이용하여 유리 SH 기에 커플링된다.

[0148] 일 관점에서, 상기 콘주게이션은 안정한 결합의 형성 하에서의 혈액 응고 인자, 예를 들어, FVⅢ, FVⅡa, 또는 FIX에 대한 수용성 폴리머의 직접 커플링 (또는 링커 시스템을 통한 커플링)에 의해서 수행된다. 또한, 본원 발명의 특정한 관점에서, 분해성, 방출 가능성 또는 가수 분해성 링커 시스템이 사용된다 (Tsubery 등 J Biol Chem 2004;279:38118-24 / Greenwald 등, J Med Chem 1999;42:3657-67 / Zhao 등, Bioconj Chem 2006;17:341-51 / WO2006/138572A2 / US7259224B2 / US7060259B2).

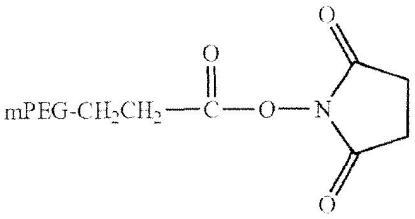
[0149] 본원 발명의 일 구체예에서, 혈액 응고 인자, 예를 들어, FVⅢ, FVⅡa, 또는 FIX는 석신이미딜 석시네이트, 석신이미딜 글루타레이트 또는 석신이미딜 프로피오네이트와 같은 활성 N-히드록시석신이미드 에스테르 (NHS)를 함유하는 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 사용함으로써 리신 잔기를 통해서 변형된다. 이들 유도체는 안정한 아미드 결합을 형성함으로써 온화한 조건 하에서 FVⅢ, FVⅡa, 또는 FIX의 리신 잔기와 반응한다. 본원 발명의 일 구체예에서, 상기 PEG 유도체의 쇄 길이는 5,000 Da이다. 500 내지 2,000 Da, 2,000 내지 5,000 Da, 5,000 초과 10,000 Da 이하, 또는 10,000 초과 20,000 Da 이하, 또는 20,000 초과 150,000 Da 이하의 쇄 길이를 가지며 선형 및 분지형 구조를 포함하는 다른 PEG 유도체가 다양한 구체예에서 사용된다.

[0150] 아미노기의 페길화를 위한 대안적의 방법으로는, 우레탄 결합의 형성에 의한 PEG 카보네이트와의 화학적 콘주게이션, 또는 2급 아미드 결합을 형성하는 환원적 아미노화에 의한 알데히드 또는 케톤과의 반응이 있으나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0151] 본원 발명의 일 구체예에서, 혈액 응고 인자, 예를 들어, FVⅢ, FVⅡa, FIX, 또는 그 밖의 다른 혈액 응고 인자, 분자는 상업적으로 이용할 수 있는 PEG 유도체를 사용하여 화학적으로 변형된다. 대안적 관점에서의 이들 PEG 유도체는 선형 또는 분지형 구조를 갖는다. NHS기를 함유하는 PEG-유도체의 예는 이하에 열거한다.

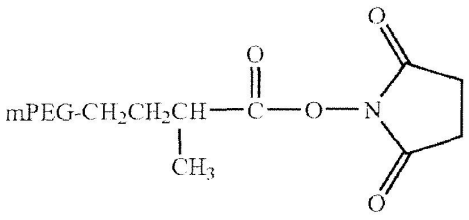
[0152] 다음의 PEG 유도체는 Nektar Therapeutics로부터 상업적으로 이용할 수 있는 비-제한적인 예이다 (Huntsville, Ala.; www.nektar.com/PEG reagent catalog 참조; Nektar Advanced PEGylation, price list 2005-2006):

[0153] mPEG-석신이미딜 프로피오네이트 (mPEG-SPA)



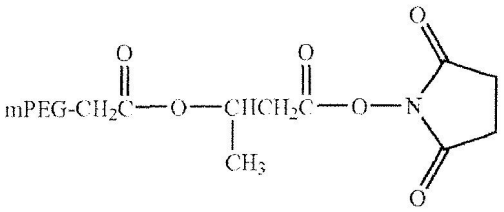
[0154]

[0155] mPEG-석신이미딜 α-메틸부타노에이트 (mPEG-SMB)



[0156]

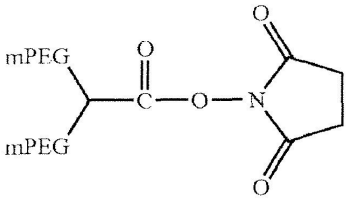
[0157] mPEG-CM-HBA-NHS (CM=카복시메틸; HBA=히드록시 부티르산)



[0158]

[0159] 분지형 PEG-유도체의 구조 (Nektar Therapeutics):

[0160] 분지형 PEG N-히드록시석신이미드 (mPEG2-NHS)

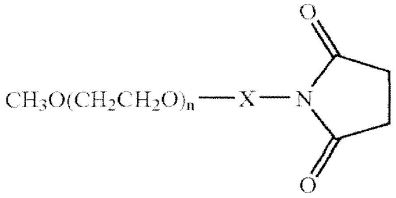


[0161]

[0162] 분지된 구조를 갖는 상기 시약은 Kozlowski 등 (BioDrugs 2001;5:419-29)에 의해 보다 상세하게 기술되어 있다.

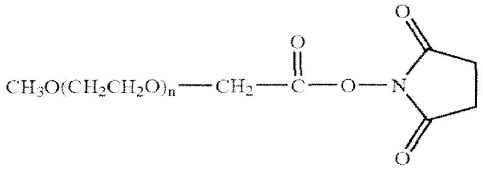
[0163] PEG 유도체의 그 밖의 다른 비-제한적 예는 NOF Corporation으로부터 상업적으로 이용할 수 있다 (도쿄, 일본; www.nof.co.jp/english 참조: Catalogue 2005):

[0164] 선형 PEG-유도체의 일반적 구조 (NOF Corp.):



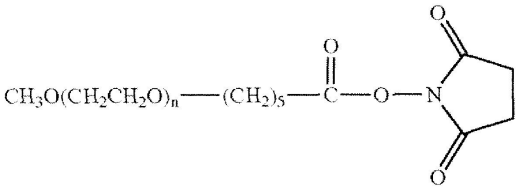
[0165]

[0166] X=카복시메틸



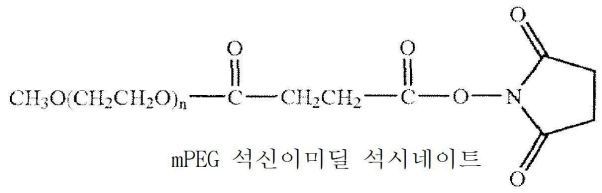
[0167]

[0168] X=카복시펜틸



[0169]

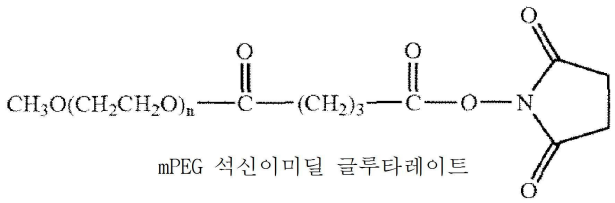
[0170] x=석시네이트



mPEG 석신이미딜 석시네이트

[0171]

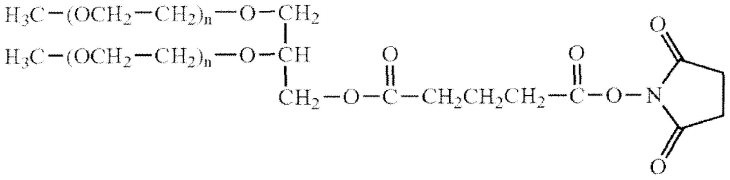
[0172] x=글루타레이트



mPEG 석신이미딜 글루타레이트

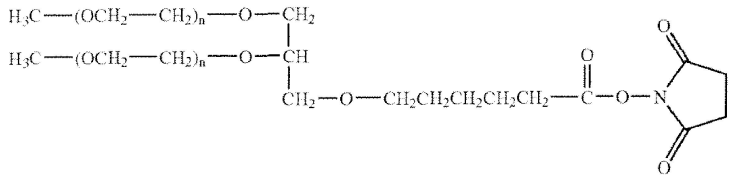
[0173]

[0174] 분지형 PEG-유도체의 구조 (NOF Corp.): 2,3-비스(메틸폴리옥시에틸렌-옥시)-1-(1,5-디옥소-5-석신이미딜옥시, 펜틸옥시)프로판



[0175]

[0176] 2,3-비스 (메틸폴리옥시에틸렌-옥시)-1- (석신이미딜-카복시펜틸옥시)프로판



[0177]

[0178] 이들 프로판 유도체는 1,2 치환 패턴을 갖는 글리세롤 골격을 나타낸다. 본원 발명에서는 또한, 1,3-치환된 글리세롤 구조, 또는 US2003/0143596A1에 기술된 그 밖의 다른 분지된 구조를 기반으로 하는 분지형 PEG 유도체가 고려된다.

[0179] 또한, Tsubery 등 (J Biol Chem 2004; 279:38118-24); 및 Shechter 등 (WO04089280A3])에 의해 기술된 바와 같은 분해성 (예를 들어, 가수 분해성) 링커를 갖는 PEG 유도체가 고려된다.

[0180] 놀랍게도, 본원 발명의 상기 페길화된 FVⅢ, FVⅡa, FIX, 또는 그 밖의 다른 혈액 응고 인자는 생체내에서의 연장된 반감기와 함께 기능적 활성을 나타낸다. 또한, 상기 페길화된 rFVⅢ, FVⅡa, FIX, 또는 그 밖의 다른 혈액 응고 인자는 트롬빈 불활성화에 대해서 보다 강한 저항성을 나타낸다.

[0181] **C. 부착 방법**

[0182] 혈액 응고 단백질은 당해 기술분야에서 숙련된 기술자에게 공지된 임의의 다양한 기술에 의해 폴리사카라이드 화합물에 공유적으로 연결될 수 있다. 본원 발명의 다양한 관점에서, 시알산 부위는 예를 들어, 본원 발명에 참조로서 통합된 미국 특허 제4,356,170호에 기술된 방법에 의해서 혈액 응고 단백질, 예를 들어, FIX, FVⅢ, FVⅡa 또는 VWF에 결합된다.

[0183] 폴리펩티드에 PSA를 커플링시키는 다른 기술 또한 공지되어 있으며, 본원 발명에 의해서 고려된다. 예를 들어, 미국 공개 제2007/0282096호는 예를 들어, PSA의 아민 또는 히드라지드 유도체를 단백질에 콘주게이션시키는 것을 기술하고 있다. 또한, 미국 공개 제2007/0191597호는 환원성 말단에서 기질 (예를 들어, 단백질)과 반응하기

위한 알데히드기를 함유하는 PSA 유도체를 기술하고 있다. 이들 문헌 전체는 참조로서 통합되어 있다.

[0184] 다양한 방법은 미국 특허 제5,846,951호 (이것은 전체가 참조로서 통합되어있다)의 7 칼럼, 15 행 내지 8 칼럼, 5 행에 기술되어 있다. 예시적인 기술에는 혈액 응고 단백질 또는 폴리사카라이드 중 어느 하나의 카복실기와 혈액 응고 단백질 또는 폴리사카라이드의 아민기 사이의 펩티드 결합을 통한 결합, 또는 혈액 응고 단백질 또는 폴리사카라이드의 카복실기와 혈액 응고 단백질 또는 폴리사카라이드의 히드록실기 사이의 에스테르 결합이 포함된다. 상기 혈액 응고 단백질을 폴리사카라이드 화합물에 공유적으로 결합시키는 또 다른 결합은 과요오드산염 산화반응에 의해서 상기 폴리사카라이드의 비-환원성 말단에서 형성된 알데히드기와 반응하는 혈액 응고 단백질 상의 유리 아미노기 사이에서 시프 염기 (Schiff base)를 통하는 것이다 (Jennings HJ 및 Lugowski C, J Immunol. 1981;127:1011-8; Fernandes AI 및 Gregoriadis G, Biochim Biophys Acta. 1997;1341;26-34). 일 관점에서, 상기 생성된 시프 염기는 $NaCNBH_3$에 의한 특이적 환원으로 2차 아민을 형성시킴으로써 안정화된다. 대안적인 접근 방법에는, 선행 산화 반응 후에 NH_4Cl로 환원적 아미노화시킴으로써 상기 PSA 내의 말단 유리 아미노기를 생성시키는 것이 있다. 이작용기성 (bifunctional) 시약은 2 개의 아미노기 또는 2 개의 히드록실기를 연결시키기 위해서 사용될 수 있다. 예를 들어, 아미노기를 함유하는 PSA를 BS3 (비스(설포석신이미딜)수베레이트 / Pierce, Rockford, IL)와 같은 시약으로 단백질의 아미노기에 커플링시킨다. 또한, 예를 들어, 아민과 티올기를 연결시키기 위해서 설포-EMCS(N-ε-말레이미도카프로일록시) 설포석신이미드 에스테르/Pierce)와 같은 헤테로-이작용기성성 교차 결합 시약 사용된다.

[0185] 또 다른 접근방법에서는, PSA 히드라지드를 제조하고, 선행 산화반응 및 알데히드 기능의 생성 후에 이를 상기 단백질의 탄수화물 부위에 커플링시킨다.

[0186] 상술한 바와 같이, 상기 치료학적 단백질의 유리 아민기가 상기 시알산 잔기의 1-카복실기와 반응하여 펩티드 결합을 형성하거나, 1-카복실산 기와 혈액 응고 단백질 상의 히드록실기 또는 다른 적합한 활성 작용기 사이에서 에스테르 결합이 형성된다. 대안적으로, 카복실기는 탈아세틸화된 5-아미노기와 펩티드 결합을 형성하거나, 혈액 응고 단백질의 분자의 알데히드기는 시알산 잔기의 N-탈아세틸화된 5-아미노 그룹과 시프 염기를 형성한다.

[0187] 대안적으로, 폴리사카라이드 화합물은 비-공유적 방식으로 혈액 응고 단백질과 회합된다. 예를 들어, 일 관점에서 상기 폴리사카라이드 화합물과 약제학적 활성 화합물은 소수성 상호작용을 통해서 결합된다. 그 밖의 다른 비-공유적 회합에는 반대로 하전되어 서로 끌어당기는 이온에 의한 정전기적 상호작용이 포함된다.

[0188] 다양한 구체예에서, 상기 혈액 응고 단백질은 상기 폴리사카라이드 화합물에 화학량론적 양 (예를 들어, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:7, 1:8, 1:9, 또는 1:10 등)으로 결합되거나 회합된다. 다양한 구체예에서, 1 내지 6, 7 내지 12 또는 13 내지 20 개의 폴리사카라이드가 상기 혈액 응고 단백질에 결합된다. 또 다른 구체예에서는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 개 또는 그 이상의 폴리사카라이드가 상기 혈액 응고 단백질에 결합된다.

[0189] 다양한 구체예에서, 상기 혈액 응고 단백질은 글리코실화 부위 (즉, 천연 글리코실화 부위가 아닌 다른 부위)를 도입시키도록 변형된다. 이러한 변형은 당해 기술분야에서 공지된 표준 분자 생물학적 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 더욱이, 혈액 응고 단백질은 1개 이상의 탄수화물 부위를 통해서 수용성 폴리머에 콘주게이션되기 전에 생체 내 또는 생체 외에서 글리코실화될 수 있다. 상기 글리코실화된 부위는 수용성 폴리머와 단백질의 콘주게이션을 위한 표적으로 작용할 수 있다 (미국 특허출원 제20090028822호, 미국 특허출원 제2009/0093399호, 미국 특허출원 제2009/0081188호, 미국 특허출원 제2007/0254836호, 미국 특허출원 제2006/0111279호, 및 DeFrees S. 등, Glycobiology, 2006, 16, 9, 833-43).

[0190] **D. 아미노옥시 결합**

[0191] 본원 발명의 일 구체예에서, 옥심기를 형성시키기 위한 알데히드 (예를 들어, 과요오드산 나트륨에 의한 산화반응에 따른 탄수화물 부위의)와 히드록실아민 또는 히드록실아민 유도체의 반응이 혈액 응고 단백질의 복합체의 제조에 적용된다. 예를 들어, 첫째로, 당단백질 (예를 들어, 본원 발명에 따르는 혈액 응고 단백질)을 과요오드산 나트륨 ($NaIO_4$)과 같은 산화제로 산화시킨다 (Rothfus JA et Smith EL., J Biol Chem 1963, 238, 1402-10; 및 Van Lenten L 및 Ashwell G., J Biol Chem 1971, 246, 1889-94). 상기 당단백질의 과요오드산염 산화반응은 활성 알데히드기를 형성시키기 위한 과요오드산염에 의한 인접한 디올의 산화 반응으로서 1928년에 기술된 고전적인 말라프레이드 (Malaprade) 반응을 기반으로 한다 (Malaprade L., Analytical application, Bull

Soc Chim 프랑스, 1928, 43, 683-96). 이러한 산화제에 대한 추가적인 예로는, 테트라 아세트산 납 ($Pb(OAc)_4$), 아세트산 망간 ($MnO(Ac)_3$), 아세테이트산 코발트 ($Co(OAc)_2$), 아세트산 탈륨 (TlOAc), 황산 세륨 ($Ce(SO_4)_2$) (US 4,367,309), 또는 과루테늄산 칼륨 ($KRuO_4$) (Marko 등, J Am Chem Soc 1997,119, 12661-2)이다. "산화제"는 탄수화물 내의 인접한 디올을 산화시킬 수 있는 약한 산화성 화합물로, 이에 의해 생리학적 반응조건 하에서 활성 알데히드기를 생성시킬 수 있는 것을 의미한다.

[0192] 두 번째 단계는, 아미노옥시기를 함유하는 폴리머를 상기 산화된 탄수화물 부위에 커플링시켜 옥심 결합을 형성시키는 것이다. 본원 발명의 일 구체예에서, 상기 단계는 촉매량의 친핵성 촉매인 아닐린 또는 아닐린 유도체의 존재 하에서 수행될 수 있다 (Dirksen A et Dawson PE, Bioconjugate Chem. 2008; Zeng Y 등, Nature Methods 2009;6:207-9). 상기 아닐린 촉매작용은 상기 옥심 라이게이션을 극적으로 촉진시켜 매우 저농도의 시약을 사용하는 것이 가능하게 한다. 본원 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 옥심 결합은 알콕시아민 결합을 형성하도록 $NaCNBH_3$로 환원시시킴으로써 안정화된다 (도 2).

[0193] 본원 발명의 일 구체예에서, 혈액 응고 단백질에 수용성 폴리머를 콘주게이션시키는 반응 단계는 각각 및 연속적으로 수행된다 (즉, 출발물질 (예를 들어, 혈액 응고 단백질, 수용성 폴리머 등), 시약 (예를 들어, 산화제, 아닐린 등) 및 반응 생성물 (예를 들어, 혈액 응고 단백질 상의 산화된 탄수화물, 활성화된 아미노옥시 수용성 폴리머 등)은 개개 반응 단계 사이에서 분리된다).

[0194] 아미노옥시 기술에 대한 추가적인 정보는 각각 전체로서 통합된 하기의 참고문헌에서 찾을 수 있다: EP 1681303A1 (HASylated erythropoietin); WO 2005/014024 (conjugates of a polymer and a protein linked by an oxime linking group); WO96/40662 (aminooxy-containing linker compounds and their application in conjugates); WO 2008/025856 (Modified proteins); Peri F 등, Tetrahedron 1998, 54, 12269-78; Kubler-Kielb J et. Pozsgay V., J Org Chem 2005, 70, 6887-90; Lees A 등, Vaccine 2006, 24 (6), 716-29; 및 Heredia KL 등, Macromoecules 2007, 40 (14), 4772-9.

[0195] 본원 발명의 다양한 구체예에서, 본원 명세서에 기술된 아미노옥시 기술에 따라 혈액 응고 단백질 (예를 들어, FVIII, FVIIa, 또는 FIX)의 산화된 탄수화물 부위에 결합되는 수용성 폴리머에는, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 분지형 PEG, 폴리시알산 (PSA), 탄수화물, 폴리사카라이드, 풀루란, 키토산, 히알루론산, 황산 콘드로이틴, 황산 더마탄, 녹말, 덱스트란, 카복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 옥시드 (PAO), 폴리알킬렌 글리콜 (PAG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-말레인산 무수물 공중합체, 폴리스테렌-말레인산 무수물 공중합체, 폴리 (1-히드록시메틸에틸렌 히드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일록시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)가 포함되나, 이들로 제한되지 않는다.

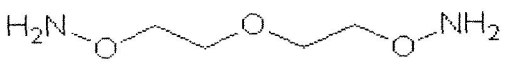
[0196] 이하의 실시예는 본원 발명을 제한하는 것으로 의도된 것이 아니며, 단지 본원 발명의 특정한 구체예를 예시하고자 하는 것이다.

[0197] **실시예**

[0198] **실시예 1**

[0199] 동일 이작용기성 링커 $NH_2[OCH_2CH_2]_2ONH_2$의 제조

[0200] 하기 화학식의 동일 이작용기성 링커 $NH_2[OCH_2CH_2]_2ONH_2$



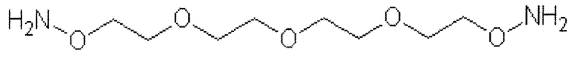
[0201]

[0202] 2 개의 활성 아미노옥시기를 함유하는 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을, Boturyn 등 (Tetrahedron 1997;53:5485-92)에 따라 1차 아민의 변형된 가브리엘-합성 (modified Gabriel-Synthesis)을 이용하는 2 단계의 유기 반응을 통해 합성하였다 (도 3). 첫 번째 단계에서, 2,2-클로로디에틸에테르 한 분자를 디메틸포름아미드 (DMF) 중 엔도-N-히드록시-5-노보넨-2,3-디카복시미드 두 분자와 반응시켰다. 상기 목적하는 동일 이작용기성 산물은, 상기 반응 결과 생성된 중간체로부터 에탄올에서의 히드라진 분해 (hydrazinolysis)에 의하여 제조되었다.

[0203] **실시예 2**

[0204] 동일 이작용기성 링커 $NH_2[OCH_2CH_2]_4ONH_2$의 제조

[0205] 하기 화학식의 동일 이작용기성 링커 $NH_2[OCH_2CH_2]_4ONH_2$



[0206]

[0207] 2 개의 활성 아미노옥시기를 함유하는 3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민을, Boturyn 등 (Tetrahedron 1997;53:5485-92)에 따라 1차 아민의 변형된 가브리엘-합성을 이용하는 2 단계 유기 반응을 통해 합성하였다 (도 3). 첫 번째 단계에서, 비스-(2-(2-클로로에톡시)-에틸)-에테르 한 분자를 DMF 중 엔도-N-히드록시-5-노보넨-2,3-디카복시미드 두 분자와 반응시켰다. 상기 목적하는 동일 이작용기성 산물은, 상기 반응 결과 생성된 중간체로부터 에탄올에서의 히드라진 분해에 의하여 제조되었다.

[0208] **실시예 3**

[0209] 아미노옥시-PSA의 제조

[0210] 세럼 인스티튜트 오브 인디아 (Serum Institute of India; Pune, 인도)로부터 입수한 500 ㎎의 산화된 PSA (MW=18.8 kD)를 pH 5.5인 8 ㎖의 50 mM 아세트산 나트륨 버퍼에 용해시켰다. 그 다음에, 100 ㎎의 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 첨가하였다. 실온에서 2 시간 동안 교반한 후, 44 ㎎의 수소화 시아노 붕소 나트륨를 첨가하였다. 4℃에서 추가적으로 4 시간 동안 교반한 후, 상기 반응 혼합물을 슬라이드-A-레이저 (Slide-A-Lyzer; Pierce, Rockford, IL) 투석 카세트 (3.5 kD 멤브레인, 재생 셀룰로즈)에 로딩하고, 4일 동안 PBS pH 7.2에 대하여 투석하였다. 상기 생성물을 -80℃에서 냉동시켰다. 상기 공정에 따른 상기 아미노옥시-PSA의 제조는 도 4에 설명된다.

[0211] 아미노옥시 PSA의 제조를 위한 대체 공정

[0212] 세럼 인스티튜트 오브 인디아 (Pune, 인도)로부터 입수한 1000 ㎎의 산화된 PSA (MW = 20 kD)를 pH 6.0인 16 ㎖의 50 mM 포스페이트 버퍼에 용해시켰다. 그 다음, 170 ㎎의 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 상기 반응 혼합물에 첨가하였다. RT에서 2 시간 동안 교반한 후, 78.5 ㎎의 수소화 시아노 붕소 나트륨를 첨가하고, 상기 반응을 밤새 18 시간 동안 수행하였다. 그 다음, 상기 반응 혼합물에, 재생 셀룰로즈로 만들어진 5 kD 컷-오프 (cut-off) 멤브레인 (밀리포어(Millipore))을 이용한 한외 여과 (ultrafiltration)/정용 여과 (diafiltration) 공정 (UF/DF)을 적용하였다.

[0213] **실시예 4**

[0214] 아미노옥시-PSA와 rFIX의 커플링 반응 및 그 복합체의 정제

[0215] pH 6.0인 50 mM 아세트산 나트륨 버퍼 6.3 ㎖에 용해된 12.6 ㎎의 rFIX에, 289 ㎕의 과요오드산 나트륨 수용액 (10 mM)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 4℃의 암실에서 1 시간 동안 교반하고, 6.5 ㎕의 1 M 글리세롤을 첨가하여 실온에서 15 분 동안 켄칭 (quenching)하였다. 저분자량의 오염 물질을 비바스핀 (Vivaspin) (Sartorius, Goettingen, 독일) 농축기 (30 kD 멤브레인, 재생 셀룰로즈)를 이용한 한외 여과/정용 여과 (UF/DF)에 의해서 제거하였다. 그 다음, 43 ㎎의 아미노옥시-PSA를 UF/DF 투석 잔류물 (retentate)에 첨가하고, 상기 혼합물을 4℃에서 18 시간 동안 교반하였다. 상기 여분의 PSA 시약을 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)에 의해 제거하였다. 상기 냉각된 반응 혼합물의 전도율은 180 mS/㎝ 까지 상승하였으며, pH 6.9인 50 mM 헤페스 (HEPES), 3 M 염화나트륨, 6.7 mM 염화칼슘, 0.01% 트윈 80으로 미리 평형화된 5 ㎖ 하이트랩 부틸 (HiTrap Butyl) FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) HIC 칼럼 (1.6×2.5 ㎝) 상에 로딩하였다. 상기 복합체를 pH 7.4인 50 mM 헤페스, 6.7 mM 염화칼슘, 0.005% 트윈 80으로, 5 ㎖/분의 유속으로 2.4 칼럼 용적 (CV) 내에서 용리시켰다. 상기 제제는 총 단백질 (BCA) 및 FIX 색소생산 활성을 측정함으로써 분석적으로 특성화되었다. 상기 PSA-rFIX 복합체에

대한 고유 활성도 (specific activity)는 80.2 IU/mg 단백질로 측정되었다 (천연 rFIX와 비교하여 56.4%). 상기 결과는 표 1에 정리하였다.

표 1

[0216]

항목	BCA [mg/mℓ]	FIX:Chrom [IU/mℓ]	고유 활성도 [IU FIX:Chrom/mg BCA]	고유 활성도 [%]
rFIX	8.58	1221	142.3	100
PSA-rFIX	1.15	92.2	80.2	56.4

[0217] 쿠마시 (Coomassie) 염색을 사용한 SDS-PAGE에 의한 상기 PSA-rFIX 복합체의 분석적 특성화는 도 5에 나타낸다. SDS-PAGE를 수행한 후, 안티-FIX 및 안티-PSA 항체를 사용한 웨스턴 블랏 (Western blot)은 도 6에 나타낸다.

[0218] **실시예 5**

[0219] 친핵성 촉매로서 아닐린의 존재 하에 수행된, 아미노옥시-PSA와 rFIX의 커플링 반응

[0220] pH 6.0인 50 mM 아세트산 나트륨 버퍼 1.4 mℓ에 용해된 3.0 mg의 rFIX에, 14.1 μℓ의 과요오드산 나트륨 수용액 (10 mM)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 4℃의 암실에서 1 시간 동안 교반하고, 1.5 μℓ의 1 M 글리세롤을 첨가하여 실온에서 15 분 동안 켄칭하였다. 저분자량 오염 물질을 PD-10 탈염 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT)을 이용한 크기 배제 크로마토그래피 (Size exclusion chromatography, SEC)에 의해서 제거하였다. pH 6.0인 1.33 mℓ의 50 mM 아세트산 나트륨 버퍼에 용해된 1.2 mg의 산화된 rFIX를 70 μℓ의 아닐린 (200 mM 수용성 저장 용액)과 혼합하고, 실온에서 45 분 동안 교반하였다. 그 다음에, 4.0 mg의 아미노옥시-PSA를 첨가하고, 상기 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 및 4℃에서 추가로 16 시간 동안 교반하였다. 시료를 1 시간 후, 2 시간 후, 및 18 시간 후에 반응의 종료 시에 배출시켰다. 그 다음, 상기 여분의 PSA 시약 및 유리 rFIX를 HIC에 의해서 제거하였다. 상기 냉각된 반응 혼합물의 전도율은 180 mS/cm 까지 상승하였으며, 이를 pH 6.9인 50 mM 헤페스, 3 M 염화나트륨, 6.7 mM 염화칼슘, 0.01% 트윈 80, 으로 미리 평형화된 5 mℓ 하이트랩 부틸 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) HIC 칼럼 (1.6×2.5 cm) 상에 로딩하였다. 상기 복합체를 20 CV에서 pH 7.4인 50 mM 헤페스, 6.7 mM 염화칼슘, 0.005% 트윈 80의 선형 구배로 5 mℓ/분의 유속으로 용리시켰다.

[0221] **실시예 6**

[0222] 아미노옥시-PSA와 rFIX의 커플링 반응 및 $NaCNBH_3$에 의한 환원

[0223] pH 6.0인 50 mM 아세트산 나트륨 버퍼 5.25 mℓ에 용해된 10.5 mg의 rFIX에, 53 μℓ의 과요오드산 나트륨 수용액 (10 mM)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 4℃의 암실에서 1 시간 동안 교반하고, 5.3 μℓ의 1 M 글리세롤을 첨가하여 실온에서 15 분 동안 켄칭하였다. 저분자량 오염 물질을 비바스틴 (Sartorius, Goettingen, Germany) 농축기 (30 kD 멤브레인, 재생 셀룰로즈)를 이용한 UF/DF에 의해서 제거하였다. 그 다음, 35.9 mg의 아미노옥시-PSA를 UF/DF 투석 잔류물에 첨가하고, 상기 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 교반하였다. 그 후, 53 μℓ의 수소화 시아노 붕소 나트륨 수용액 (5 M)을 첨가하고, 상기 반응을 추가로 16 시간 동안 진행시켰다. 그 후, 상기 여분의 PSA 시약을 HIC에 의해서 제거하였다. 상기 냉각된 반응 혼합물의 전도율은 180 mS/cm 까지 상승하였으며, 이를 pH 6.9인 50 mM 헤페스, 3 M 염화나트륨, 6.7 mM 염화칼슘, 0.01% 트윈 80으로 미리 평형화된 5 mℓ 하이트랩 부틸 FF HIC (GE Healthcare, Fairfield, CT) 칼럼 (1.6×2.5 cm) 상에 로딩하였다. 상기 복합체를 2.4 CV에서 pH 7.4인 50 mM 헤페스, 6.7 mM 염화칼슘, 0.005% 트윈 80로, 5 mℓ/분의 유속으로 용리하였다.

[0224] **실시예 7**

[0225] 아미노옥시-PSA (링커: $NH_2[OCH_2CH_2]_4ONH_2$)와 rFIX의 커플링 반응 및 그 복합체의 정제

[0226] pH 6.0인 50 mM 아세트산 나트륨 버퍼 2.8 ml에 용해된 rFIX 5.6 mg에, 102 μℓ의 과요오드산 나트륨 수용액 (10 mM)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 4℃ 암실에서 1시간 동안 교반하고 1M 글리세롤 2.9 μℓ를 첨가하여 실온에서 15분 동안 켄칭하였다. 저분자량의 오염 물질을, 비바스핀 (Sartorius, Goettingen, 독일) 농축기 (30 kD

멤브레인, 재생 셀룰로스)를 이용하는 UF/DF 방법에 의해 제거하였다. 그 다음, 19 mg의 아미노옥시-PSA를 상기 UF/DF 투석 잔류물에 첨가하고 상기 혼합물을 4℃에서 18시간 동안 교반하였다. 상기 여분의 PSA 시약을 HIC를 이용하여 제거하였다. 상기 냉각된 반응 혼합물의 전도율은 180 mS/cm 까지 상승하였으며, pH 6.9인 50 mM 헤페스, 3M 염화 나트륨, 6.7 mM 염화 칼슘, 0.01% 트윈 80으로 미리 평형화된 5 ml 하이트랩 부틸 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) HIC 칼럼 (1.6 × 2.5 cm)에 로딩하였다. 상기 복합체를 2.4 CV 내에서 pH 7.4인 50 mM 헤페스, 6.7 mM 염화 칼슘, 0.005% 트윈 80으로, 유속 5 ㎖/분으로 용리시켰다.

[0227]

[0228] **실시예 8**

[0229] 아미노옥시-PSA와 rFVⅢ의 커플링 반응

[0230] pH 6인 11 ml 헤페스 버퍼 (50 mM 헤페스, 5 mM $CaCl_2$, 150 mM NaCl, 0.01% 트윈)에 용해된 rFVⅢ 11 mg에, 10 mM 과요오드산 나트륨 57 ㎕를 첨가하였다. 상기 혼합물을 4℃ 암실에서 30분 동안 교반하고 1M 글리세롤 수용액 107 ㎕를 첨가하여 4℃에서 30분 동안 켄칭하였다. 그 다음, 19.8 mg의 아미노옥시-PSA (18.8 kD)를 첨가하고 상기 혼합물을 4℃에서 밤새 교반하였다. 이온 강도 (ionic strength)는 8M 아세트산 암모늄을 함유하는 버퍼 (8M 아세트산 암모늄, 50 mM 헤페스, 5 mM $CaCl_2$, 350 mM NaCl, 0.01% 트윈 80, pH 6.9)의 첨가에 의해 최종 농도가 2.5M 아세트산 암모늄에 이를 때까지 증가하였다. 그 다음, 상기 반응 혼합물을 평형 버퍼 (2.5M 아세트산 암모늄, 50 mM 헤페스, 5 mM $CaCl_2$, 350 mM NaCl, 0.01% 트윈 80, pH 6.9)로 평형을 이룬 하이트랩 부틸 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 칼럼에 로딩하였다. 그 산물을 용리 버퍼 (50 mM 헤페스, 5 mM $CaCl_2$, 0.01% 트윈 80, pH 7.4)로 용리시키고, 상기 용리액을 30,000 MWCO인 비바스핀 (Sartorius, Goettingen, 독일) 장치를 사용한 원심 분리에 의하여 농축하였다.

[0231]

[0232] **실시예 9**

[0233] 혈우병에 걸린 마우스에서의 PK 연구

[0234] FIX-결핍 마우스에, 제형 버퍼 (formulation buffer) (10 mM 히스티딘, 260 mM 글리신, 29 mM 수크로스, 0.005% 트윈 80, pH 6.8) 중 rFIX 또는 PSA-rFIX (실시예 4에 따라 제조된)를 체중 1 kg 당 10 ml의 용적량으로 주입하였다. 마우스 6 마리 그룹에 물질 주입 후 5분, 3시간, 9, 16, 24 및 48 시간이 지난 다음 희생시켜, 심장 천자에 의해 혈액을 채취하였다. 구연산 혈장 (Citrated plasma)을 제조하여 FIX 활성을 분석할 때까지 냉동 보관하였다.

[0235] FIX 활성은 FIX 발색 반응 분석 (Biophen FIX 검정, Hyphen Biomed, Neuville-sur-Oise, 프랑스)으로 측정하였으며, 도 7과 같은 방출 곡선 (elimination curves)을 얻었다. 실제 FIX 활성량은 PSA-rFIX에 대하여 123 IU FIX/kg이었으며, rFIX에 대하여 143 IU FIX/kg이었다. 약동학적 파라미터는 프로그램 R (통계학적 계산을 위한 R 기초 (The R Foundation for Statistical Computing), 2008)으로 계산하였다. 생체 내에서 rFIX에 대하여 13% 회복되었고 PSA-rFIX에 대하여 29% 회복되었다. PSA-rFIX에 대하여 조정된 AUC 양은 rFIX와 비교할 때 6.4배로 증가하였고, 최종 반감기는 1.2의 지수로 증가하였으며 MRT는 rFIX와 비교할 때 PSA-rFIX에 대하여 1.7배 더 길었다 (표 2).

표 2

[0236]

항목	생체 내 회복[%]	AUC [(IU/㎖)/ (IU/kg)]	증가 지수	최종 반감기[h]	증가 지수	MRT [h]	증가 지수
rFIX	13	0.0100	=1	8.0	=1	7.3	=1
PSA-rFIX	29	0.0650	6.4X	9.6	1.2X	12.3	1.7X

[0237]

[0238] **실시예 10**

[0239] 혈액 응고 단백질의 폴리시알릴화 (Polysialylation)

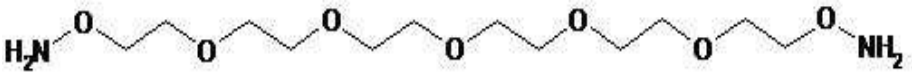
[0240] 본원 명세서에 언급된 폴리시알릴화는 다른 응고 단백질에 까지 확대하여 해석될 수 있다. 예를 들어, 본원 발명의 다양한 양상에서, 아미노옥시-PSA와 함께 실시예 5, 6 및 9에서 언급된 상기 폴리시알릴화는 FVIII, FVIIa 및 VWF와 같은 응고 단백질에서 반복될 수 있다.

[0241]

[0242] **실시예 11**

[0243] 동일 이작용기성 링커 $NH_2[OCH_2CH_2]_6ONH_2$의 제조

[0244] 동일 이작용기성 링커 $NH_2[OCH_2CH_2]_6ONH_2$



[0245]

[0246] 2 개의 활성 아미노옥시기를 함유하는 3,6,9,12,15-펜타톡사-헵타데칸-1,17-디옥시아민은 Boturyn 등(Tetrahedron 1997;53:5485-92)에 따라 1차 아민의 변형된 가브리엘-합성을 이용하는 2 단계의 유기 반응을 통해 합성하였다. 상기 첫 번째 단계에서, 헥사에틸렌 글리콜 디클로라이드 한 분자를 DMF 중 엔도-N-히드록시-5-노보넨-2,3-디카복시미드 두 분자와 반응시켰다. 상기 목적하는 동일 이작용기성 산물은, 상기 반응 결과 만들어진 중간체로부터 에탄올에서의 히드라진 분해에 의하여 제조되었다.

[0247]

[0248] **실시예 12**

[0249] 말레이미도/아미노옥시 링커 시스템을 이용한 rFIX의 폴리시알릴화

[0250] A. 변형 시약의 제조

[0251] 말레이미도/아미노옥시 링커 시스템 (Toyokuni 등, Bioconjugate Chem 2003; 14, 1253-9)을 이용하여 아미노옥시-PSA 시약을 제조하였다. 두 단계 공정을 이용하여 자유 말단 SH기를 함유하는 PSA-SH (20 kD)를 제조하였다: a) WO05016973 A1에 따른 산화된 PSA와 NH_4Cl의 환원적 아민화 반응에 의한 PSA-NH_2의 제조, 및 b) US7645860에 설명된 바에 따른 말단 1차 아미노기와 2-이미노티올란 (Traut's reagent/Pierce, Rockford, IL)의 반응에 의한 설프히드릴기의 도입. PSA-SH는 pH 7.5에서 상기 링커의 10배 분자 초과량이고 PSA-SH 농도가 50 mg/ml인 PBS-버퍼에서 상기 링커의 말레이미도기에 커플링되었다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 부드럽게 교반하면서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 상기 여분의 링커 시약을 제거하고 정용 여과에 의하여 상기 아미노옥시-PSA의 버퍼를 산화 버퍼 (50 mM 인산 나트륨, pH 6.0)로 교환하였다. 상기 버퍼는 펠리컨 XL5kD 재생 셀룰로스 멤브레인 (밀리포어, Billerica, MA)을 이용하여 25회 교환하였다.

[0252] B. $NaIO_4$와의 산화 반응 후 rFIX의 변현

[0253] rFIX를 버퍼 중 100 μM 과요오드산 나트륨을 이용한, pH 6.0의 50 mM 인산 나트륨 버퍼에서 산화시켰다. 상기 혼합물을 4℃ 암실에서 1시간 동안 교반하고 최종 농도가 5 mM이 되도록 글리세롤을 첨가하여 실온에서 15분 동안 켄칭하였다. 저분자량 오염물질을 PD-10 탈염 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT)을 이용한 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)를 이용하여 제거하였다. 그 다음, 10 mM의 최종 농도를 얻을 수 있도록 산화된 rFIX에 아닐린을 가하였고 PSA의 5배 분자 초과량이 되도록 상기 아미노옥시-PSA 시약과 혼합하였다. 상기 반응 혼합물을 실온의 암실에서 부드럽게 교반하면서 2시간 동안 인큐베이션하였다.

[0254] C. 상기 복합체의 정제

[0255] 상기 여분의 PSA 시약 및 유리 rFIX를 HIC에 의해 제거하였다. 상기 반응 혼합물의 전도율은 180 mS/cm 까지 상승하였으며, 이를 pH 6.9인 50 mM 헤페스, 3M 염화 나트륨, 6.7 mM 염화 칼슘, 0.01% 트윈 80으로 미리 평형화된, 48 ml 부틸-세파로스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 채워진 칼럼에 로딩하였다. 그 다음, 상기 복합체를 40 CV에서 60% 용리 버퍼 (50 mM 헤페스, 6.7 mM 염화 칼슘, pH 7.4)의 선형 구배로 용리시켰다. 마지막으로 분획을 함유하는 상기 PSA-rFIX를 채취하고 재생 셀룰로스로 만든 30 kD 멤브레인 (밀리포어)을 사용하여 UF/DF를 수행하였다. 상기 제제는 총 단백질 측정 및 FIX 발색 활성도에 의하여 분석적으로 특성화되었다. 천연 rFIX와 비교할 때, 두 변이체로 제조된 상기 PSA-rFIX 복합체에 대한 고유 활성도는 > 50 %인 것으로 측정되었

다.

[0256]

[0257] **실시예 13**

[0258] 아미노옥시-PSA 시약의 제조

[0259] 실시예 3에 따라 아미노옥시-PSA 시약을 제조하였다. 그 최종 산물을 5 kD 멤브레인 (재생 셀룰로스, 밀리포어)을 이용하여, pH 7.2인 버퍼 (50 mM 헤페스)에 대해 정용 여과하고, -80℃에서 냉동시키고 동결 건조하였다. 동결 건조 후, 상기 시약을 적절한 부피의 물에 용해시켜 탄수화물 변형을 통한 PSA-단백질 복합체의 제조에 사용하였다.

[0260]

[0261] **실시예 14**

[0262] FVⅢ 결핍 녹-아웃 마우스 모델에서의, 폴리시알릴화된 rFVⅢ의 약동학

[0263] 실시예 8에 따라 PSA-FVⅢ 복합체를 제조하였다. 상기 복합체는 6237 IU/mg의 고유 활성도를 보였고 (FVⅢ 활성도는 발색 반응 분석에 의해 측정되었고; 총 단백질은 브래드포드 분석 (Bradford assay)에 의해 측정되었다), 레조시놀 분석 (Resorcinol assay) (Svennerholm L, Biochim Biophys Acta 1957; 24: 604-11)에 의해 측정된 폴리시알릴화 정도는 6.7 (FVⅢ 1몰당 PSA 1몰)이었다.

[0264] Bi 등 (Nat Genet 1995;10:119-21)에 의해 상세히 설명된 FVⅢ 결핍 마우스를 중증 인간 혈우병 A의 모델로서 사용하였다. 6마리 마우스 그룹에, 실시예 8에 따라 제조된 PSA-rFVⅢ 또는 천연 rFVⅢ (ADVATE, Baxter Healthcare Corporation)을 체중 1 kg당 200 IU FVⅢ의 양으로 꼬리 정맥을 통하여 정맥 주사를 놓았다. 주사 후 5분, 3, 6, 9, 16, 24, 32 및 42 시간 후에 마취한 다음 심장 천자를 통해 각 그룹으로부터 구연산 혈장을 채취하였다. FVⅢ 활성도 레벨을 발색 반응 분석을 이용하여 혈장 시료 내에서 측정하였다. 상기 실험 결과는 표 3에 정리하였으며 도 8에 도시하였다. 모든 계산은 R 버전 2.10.1 (통계학적 계산을 위한 언어 및 환경 (A language and environment for statistical computing), 통계학적 계산을 위한 R 기초, 비엔나, 오스트리아, http://www.R-project.org.)로 수행하였다. 결과적으로 상기 PSA-rFVⅢ 복합체에 대한 평균 체류 시간 (MRT)은 5.4 h (Advate 대조군)로부터 11.1 h까지 증가하였다.

표 3

[0265]

항목	생체 내 회복 IVR %	AUC 0-24 (IU/㎖.h)/IU/kg	최종 반감기 (h)	평균 체류 시간 (h)	클리어런스 CL (㎖/h/kg)
PSA-rFVⅢ	71	0.161	7.2	11.111.1	6.0
rFVⅢ 대조군 (Advate)	58	0.054	4.4	5.4	17.1

[0266] **실시예 15**

[0267] 상기 아미노옥시-PSA 시약 합성의 상세한 내용

[0268] Botyryn 등 (Tetrahedron 1997; 53:5485-92)에 따라, 실시예 1에서 언급된 두 단계의 유기 합성을 통하여 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 합성하였다.

[0269] 단계 1:

[0270] 700 ml 무수 N,N-디메틸포름아미드 중 엔도-N-히드록시-5-노보넨-2,3-디카복시이미드 (59.0 g; 1.00 eq) 용액에, 무수 K_2CO_3 (45.51 g; 1.00 eq) 및 2,2-디클로로디에틸에테르 (15.84 ml; 0.41 eq)를 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 50℃에서 22시간 동안 교반하였다. 상기 혼합물을 감압하에서 건조물이 되도록 증발시켰다. 그 잔여물을 2L의 디클로로메탄에 현탁하고 NaCl 포화 수용액 (각 1L)으로 2회 추출하였다. 상기 디클로로메탄층을 Na_2SO_4로 건조시킨 다음, 감압하에서 건조물이 되도록 증발시키고 고진공 상태에서 건조시켜 64.5 g의 3-옥사펜탄-1,5-디옥시-엔도-2',3'-디카복시디이미드노보넨을 담황색 고체로서 얻었다 (중간체 1).

[0271] 단계 2:

[0272] 800 ml 무수 에탄올 중 중간체 1 수용액 (64.25 g; 1.00 eq)에, 31.0 ml 히드라진 수화물 (4.26 eq)을 첨가하였다. 그 다음, 상기 반응 혼합물을 2시간 동안 환류시켰다. 감압하에서 상기 용매를 증발시켜, 상기 혼합물을 처음 부피의 절반이 되도록 농축하였다. 상기 발생된 침전물을 여과하였다. 상기 잔여 에탄올층이 건조되도록 감압하에서 증발시켰다. 조 산물인 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 함유하는 잔류물을 진공 상태에서 건조하여 46.3 g을 수득하였다. 상기 조 산물을 칼럼 크로마토그래피 (실리카겔 60; 9+1, 디클로로메탄/메탄올 혼합물을 이용한 등용매 용리)에 의해 추가 정제하여, 11.7 g의 순수한 최종 산물인 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 얻었다.

[0273]

[0274] **실시예 16**

[0275] PSA 히드라지드를 이용한 rFIX의 폴리시알릴화

[0276] 아디프산 디히드라지드 (ADH)와 산화 PSA의 반응에 의해 제조된 PSA 히드라지드 시약을 사용하여 rFIX를 폴리시알릴화하였다.

[0277] **단계 1:** PSA 히드라지드의 제조

[0278] Serum Institute of India (Pune, 인도)로부터 입수한 산화 PSA (MW = 20 kD) 500 mg을, pH 5.5인 50 mM 아세트산 나트륨 버퍼 8 ㎖에 용해시켰다. 그 다음, 아디프산 디히드라지드 (ADH) 100 mg을 첨가하였다. 상기 용액을 2시간 동안 부드럽게 교반하였다. 그 다음, 수소화 시아노 붕소 나트륨 44 mg을 첨가하였다. 상기 반응물을 4℃에서 4시간 동안 추가적으로 인큐베이션한 후, 상기 반응 혼합물을 슬라이드-A-레이저 (Pierce, Rockford, IL) 투석 카세트 (3.5 kD 멤브레인, 재생 셀룰로스)에 로딩하고 pH 7.2의 PBS에 대하여 4일 동안 투석하였다. 그 산물을 -80℃에서 냉동시켰다.

[0279] **단계 2:** rFIX와 PSA 히드라지드의 반응 및 상기 복합체의 정제

[0280] 단계 1에서 언급된 바에 따라 PSA 히드라지드 시약을 사용하여 rFIX를 폴리시알릴화하였다. rFIX (농도: 1 mg/ml)를 $NaIO_4$ (농도: 80)와 4℃ 암실에서 부드럽게 교반하면서 1시간 동안 산화시켰다. 글리세롤을 첨가하여 상기 반응 정지시키고, 상기 산화된 FIX에 재생 셀룰로스로 만든 30 kD 멤브레인 (Vivaspin)을 사용하여 UF/DF을 수행하였다. 그 다음, 상기 산화된 rFIX을 200 배 분자 초과량의 시약 및 1 mg/ml의 단백질 농도를 이용하여 pH 6.5에서 폴리시알릴화하였다. rFIX 및 상기 폴리시알릴화 시약을 실온의 암실에서 부드럽게 교반하면서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 마지막으로, 상기 PSA-rFIX 복합체를 HIC에 의해 정제하였다. 상기 반응 혼합물의 전도율은 아세트산 암모늄을 함유하는 버퍼 (50 mM 헤페스, 350 mM NaCl, 5 mM 염화 칼슘, 8M 아세트산 암모늄, 0.01% 트윈 80, pH 6.9)의 첨가에 의해 130 mS/cm 까지 상승하였으며, 이를 pH 6.9의 50 mM 헤페스, 2.5M 아세트산 암모늄, 350 mM 염화 나트륨, 5 mM 염화 칼슘, 0.01% 트윈 80로 미리 평형을 이룬 하이트랩 부틸 FF 칼럼 (5 ml, GE Healthcare, Fairfield, CT)에 로딩하였다. 그 다음, 상기 복합체를 pH 7.4인 50 mM 헤페스, 5 mM 염화 칼슘, 0.01% 트윈 80으로 용리하였다. 마지막으로 분획을 함유하는 상기 PSA-rFIX를 채취하고 재생 셀룰로스로 만든 30 kD 멤브레인 (Vivaspin)을 사용하여 UF/DF를 수행하였다. 천연 rFIX와 비교할 때, 상기 PEG-rFIX 복합체에 대한 고유 활성도는 > 50%로 측정되었다 (발색 반응 분석).

[0281]

[0282] **실시예 17**

[0283] 친핵성 촉매로서 아닐린의 존재하에 수행된, PSA 히드라지드를 이용한 rFIX의 폴리시알릴화

[0284] rFIX 123 mg을 60 ml 인산 버퍼 (50 mM $NaPO_4$, pH 6.5)에 용해시켰다. 그 다음, 과요오드산 나트륨 수용액 1.2 ㎖ (10 mM)를 첨가하고, 상기 혼합물을 4℃의 암실에서 부드럽게 교반하면서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 600 ㎕의 1M 글리세롤 수용액의 첨가에 의해 상기 반응물을 RT에서 15분 동안 켄칭하였다. 그 다음, 상기 혼합물에 펠리컨 XL 울트라셀 30 kD 멤브레인을 이용한 UF/DF를 수행하였다.

[0285] 산화된 rFIX을 함유하는 상기 UF/DF 투석 잔류물 (63.4ml)을 59.6 ml의 인산 버퍼 (50 mM $NaPO_4$, pH 6.0)로 추가적으로 희석하고 6.5 ml의 아닐린 수용액 (200 mM)과 혼합하고 RT에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. 그 다음, 12.3 ml의 상기 PSA-히드라지드 시약 (실시예 16에 따라 제조된)을 첨가하여 5배 분자 초과량의 시약을 제조하였다. 상기 혼합물을 RT의 암실에서 부드럽게 교반하면서 2시간 동안 인큐베이션하였다.

[0286] 상기 여분의 PSA-히드라지드 시약 및 유리 rFIX를 HIC를 이용해 제거하였다. 상기 반응 혼합물의 전도율은 180 mS/cm 까지 상승하였으며, 이를 pH 6.9인 50 mM 헤페스, 3M 염화 나트륨, 6.7 mM 염화 칼슘, 0.01% 트윈 80로 미리 평형화된 부틸-세팔로스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 48 mℓ로 채워진 칼럼에 로딩하였다. 그 다음, 상기 복합체를 pH 7.4인 50 mM 헤페스, 5 mM 염화 칼슘, 0.01% 트윈 80으로 용리하였다. 마지막으로 분획을 함유하는 상기 PSA-rFIX를 채취하고 재생 셀룰로스로 만든 30 kD 멤브레인 (밀리포어)을 이용하여 UF/DF를 수행하였다. 상기 제제는 총 단백질 측정 (BCA) 및 FIX 발색 활성도에 의하여 분석적으로 특성화되었다. 천연 rFIX와 비교할 때, 상기 PSA-rFIX 복합체에 대한 고유 활성도는 > 50%로 측정되었다.

[0287]

[0288] **실시예 18**

[0289] 2 단계 공정을 이용한 rFIX의 폴리시알릴화 및 정제

[0290] 140 mg의 rFIX를 62 ml의 인산 버퍼 (50 mM $NaPO_4$, pH 6.0)에 용해시켰다. 그 다음, 1.92 ml의 과요오드산 나트륨 수용액 (10 mM)을 첨가하고, 상기 혼합물을 4℃의 암실에서 부드럽게 교반하면서 1시간 동안 인큐베이션하고, 1M 글리세롤 수용액 64 ㎕를 첨가하여 RT에서 15분 동안 켄칭하였다. 그 다음, 상기 혼합물에 펠리컨 XL 울트라셀 30 kD 멤브레인을 이용하여 UF/DF를 수행하였다.

[0291] 산화된 rFIX를 함유하는 상기 UF/DF 투석 잔류물을, 73.8 ml의 인산 버퍼 (50 mM $NaPO_4$, pH 6.0)로 추가적으로 희석시키고, 8.2 ml의 아닐린 수용액 (200 mM)과 혼합하여 RT에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 상기 아미노옥시 시약 (실시예 3에 따라 제조된) 12.3 mℓ를 첨가하여 2.5 배 분자 초과량 시약을 제조하였다. 상기 혼합물을 RT의 암실에서 부드럽게 교반하면서 2.5 시간 동안 인큐베이션하였다.

[0292] 상기 유리 rFIX를 음이온 교환 크로마토그래피 (AIEC) 를 사용하여 제거하였다. 상기 반응 혼합물을 20 ml의 버퍼 A (50 mM 헤페스, 5 mM $CaCl_2$, pH 7.5)로 희석하고, 이를 버퍼 A로 미리 평형을 이룬 Q-세파로스 FF 26/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT)에 로딩하였다. 그 다음, 상기 칼럼을 버퍼 B (50 mM 헤페스, 1M NaCl, 5 mM $CaCl_2$, pH 7.5)로 용리하였다. 유리 rFIX 용리액의 전도율은 12 내지 25 mS/cm 사이였으며, 상기 복합체는 27 내지 45 mS/cm였다. 그 다음, 분획을 함유하는 상기 복합체의 전도율은 버퍼 C (50 mM 헤페스, 5M NaCl, 5 mM $CaCl_2$, pH 6.9)의 첨가에 의해 190 mS/cm 까지 상승하였으며, 이를 버퍼 D (50 mM 헤페스, 3M NaCl, 5 mM $CaCl_2$, pH 6.9)로 미리 평형을 이룬 부틸 세파로스 FF 26/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT)에 로딩하였다. 자유 PSA-시약을 5 CV 버퍼 D 내에서 세정하였다. 그 다음, 상기 복합체를 100% 버퍼 E (50 mM 헤페스, 5 mM $CaCl_2$, pH 7.4)로 용리하였다. 분획을 함유하는 상기 복합체를 재생 셀룰로스로 만든 10 kD 멤브레인 (88 cm^2, 10 kD 절단/밀리포어)을 이용한 UF/DF에 의해 농축하였다. 150 mM NaCl 및 5 mM $CaCl_2$를 함유하는 pH 7.2의 히스티딘 버퍼에 대하여 최종 정용 여과 단계를 수행하였다. 상기 제제를 총 단백질 (BCA) 및 FIX 발색 활성 측정에 의하여 분석적으로 특성화하였다. 천연 rFIX와 비교할 때, 상기 PSA-rFIX 복합체에 대한 고유 활성도는 > 50%로 측정되었다.

[0293]

[0294] **실시예 19**

[0295] 아미노옥시-PSA와 rFVIIa의 커플링 반응 및 상기 복합체의 정제

[0296] 5 ml의 반응 버퍼 (50 mM 헤페스, 150 mM 염화 나트륨, 5 mM 염화 칼슘, pH 6.0) 중 10 mg의 rFVIIa 용액을, $NaIO_4$ 수용액 (최종 농도: 100 μM)과 혼합하고 4℃의 암실에서 부드럽게 교반하면서 1시간 동안 인큐베이션하고, 시스테인 수용액 (최종 농도: 1 mM)을 첨가하여 15분 동안 켄칭하였다. 그 다음, 상기 반응 혼합물에 UF/DF를 수행하였다. 상기 투석 잔류물 (10 ml)에, 30배 분자 초과량의 아미노옥시 시약 (실시예 1에 따라 제조된)을 첨가하였다, 상기 커플링 반응은 실온의 암실에서 부드럽게 교반하면서 2시간 동안 수행되었다. 상기 여분의 아미노옥시 시약을 HIC를 통하여 제거하였다. 상기 반응 혼합물의 전도율은 아세트산 암모늄 (50 mM 헤페스, 350 mM NaCl, 5 mM 염화 칼슘, 8 M 아세트산 암모늄, 0.01% 트윈 80, pH 6.9)을 함유하는 버퍼의 첨가에 의해 130 mS/cm 까지 상승하였으며, 이를 pH 6.9의 50 mM 헤페스, 2.5 M 아세트산 암모늄, 350 mM 염화 나트륨, 5 mM 염화 칼슘, 0.01% 트윈 80으로 미리 평형을 이룬 하이트랩 부틸 FF 칼럼 (5 ml, GE Healthcare, Fairfield, CT)에 로딩하였다. 그 다음, 상기 복합체를 20 CV에서 100% 용리 버퍼의 선형 구배에 의해 pH 7.4인 50 mM 헤페스,

5 mM 염화 칼슘, 0.01% 트윈 80으로 용리하였다. 마지막으로 분획을 함유하는 상기 PSA-rFVIIa을 채취하고, 재생 셀룰로스로 만든 30 kD 멤브레인 (Vivaspin)을 이용하여 UF/DF를 수행하였다. 상기 제제는 총 단백질 (BCA) 및 FVIIa 발색 활성 (Staclot assay, Diagnostica Stago, Asni, 프랑스) 측정에 의해 분석적으로 특성화되었고, 상기 rFVIIa 출발 물질과 비교할 때, 고유 활성도가 > 20%인 것으로 확인되었다.

[0297]

[0298] **실시예 20**

[0299] 친핵성 촉매로서 아닐린의 존재하에 수행된, 아미노옥시-PSA와 rFVIIa의 커플링 반응

[0300] pH 6.0인 50 mM 아세트산 나트륨 버퍼 1.4 ㎖에 용해된 rFVIIa 3.0 mg에, 과요오드산 나트륨 수용액 (10mM) 14.1 ㎕를 첨가하였다. 상기 혼합물을 4℃ 암실에서 1시간 동안 교반하고, 1M 글리세롤 1.5 ㎕를 첨가하여 실온에서 15분 동안 켄칭하였다. PD-10 탈염 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT)을 이용한 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)를 통하여 저분자량 오염 물질을 제거하였다. pH 6.0인 50 mM 아세트산 나트륨 버퍼 3 ml에 용해된 산화 rFVIIa 3 mg을, 아닐린 (친핵성 촉매, 최종 농도: 10 mM)과 혼합하여 실온에서 30분 동안 교반하였다. 그 다음, 아미노옥시-PSA를 첨가하여 5 배 분자 초과량이 되도록 제조하고 상기 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 그 다음, 상기 여분의 PSA 시약 및 유리 rFIX를 HIC를 통해 제거하였다. 상기 냉각된 반응 혼합물의 전도율은 180 mS/cm까지 상승하였으며, 이를 pH 6.9인 50 mM 헤페스, 3M 염화 나트륨, 6.7 mM 염화 칼슘, 0.01% 트윈 80으로 미리 평형을 이룬 5 ml 하이트랩 부틸 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) HIC 칼럼 (1.6× 2.5 cm)에 로딩하였다. 상기 복합체를 20 CV에서 유속 5 ml/분으로, pH 7.4인 50 mM 헤페스, 6.7 mM 염화 칼슘, 0.005% 트윈 80 선형 구배로 용리하였다.

[0301]

[0302] **실시예 21**

[0303] 아미노옥시-PEG 시약의 제조

[0304] 분지형 PEG-알데히드 (MW 40 kD)를, 실시예 1에 설명된 바에 따라 제조된 디아미노옥시 링커의 커플링 반응에 사용하였다. 상기 PEG-알데히드 시약은 NOF (NOF Corp., 도쿄, 일본)으로부터 입수하였다. 500 mg의 PEG-알데히드를 pH 5.5인 50 mM 아세트산 나트륨 버퍼 8 ml에 용해시켰다. 그 다음, 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 100 mg을 첨가하였다. 실온에서 2시간 동안 교반한 다음, 44 mg의 수소화 시아노 붕소 나트륨을 첨가하였다. 4℃에서 4시간 동안 추가적으로 교반한 후, 상기 반응 혼합물을 슬라이드-A-레이저 (Pierce, Rockford, IL) 투석 카세트 (3.5 kD 멤브레인, 재생 셀룰로스)에 로딩하고, pH 7.2인 PBS에 대해 4일 동안 투석하였다. 그 산물을 -80℃에서 냉동시켰다..

[0305]

[0306] **실시예 22**

[0307] rFIX와 아미노옥시 PEG-시약의 페길화

[0308] 아미노옥시기를 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약을 사용하여 rFIX를 페길화하였다. 상기 유형의 시약의 예로는 NOF (NOF Corp., 도쿄, 일본)의 선브라이트 (Sunbright®) CA 시리즈를 들 수 있다. rFIX를 2 mg/ml의 단백질 농도에서 $NaIO_4$ (최종 농도: 100 μM)와 반응 버퍼 (50 mM 헤페스, 150 mM 염화 나트륨, 5 mM 염화 칼슘, pH 6.0)에서 4℃의 암실에서 부드럽게 교반하면서 1시간 동안 산화시키고, 글리세롤 수용액 (최종 농도: 1 mM)을 첨가하여 15분 동안 켄칭하였다. 그 다음, 상기 반응 혼합물에 UF/DF를 수행하였다. 상기 투석 잔류물에 3배 분자 초과량의 아미노옥시 시약 및 아닐린 (친핵성 촉매, 최종 농도: 10 mM)을 첨가하였다. 상기 커플링 반응은 실온의 암실에서 부드럽게 교반하면서 2시간 동안 수행되었다. 마지막으로 상기 PEG-rFIX 복합체를 Q-세파로스 FF 상에서 이온-교환 크로마토그래피에 의해 정제하였다. pH 8.0인 50 mM 트리스로 미리 평형을 이룬 상기 칼럼 상에 1.5 mg 단백질/ml 겔을 로딩하였다. 상기 복합체를 20 CV에서 pH 8.0인 50 mM 트리스 및 1 M 염화 나트륨으로 용리한 다음, 30 kD 멤브레인을 이용한 UF/DF를 수행하였다. 상기 제제를 총 단백질 (BCA) 및 FIX 발색 활성 측정에 의하여 분석적으로 특성화하였다. 천연 rFIX와 비교할 때, 상기 PEG-rFIX 복합체에 대한 고유 활성도는 > 75%로 측정되었다.

[0309]

[0310] **실시예 23**

[0311] 아미노옥시 PEG-시약과 rFVⅢ의 페길화

[0312] 아미노옥시기를 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약을 사용하여 rFVⅢ를 페길화하였다. 상기 유형의 시약의 예로는 NOF (NOF Corp., 도쿄, 일본)의 선브라이트 (Sunbright®) CA 시리즈를 들 수 있다. rFVⅢ를 단백질 농도 1 mg/ml에서 $NaIO_4$ (최종 농도: 100 μM)와 반응 버퍼 (50 mM 헤페스, 150 mM 염화 나트륨, 5 mM 염화 칼슘, pH 6.0)에서 4℃의 암실에서 부드럽게 교반하면서 1시간 동안 산화시키고, 시스테인 수용액 (최종 농도: 1 mM)을 첨가하여 15분 동안 켄칭하였다. 그 다음, 상기 반응 혼합물에 UF/DF를 수행하였다. 상기 투석 잔류물에 20배 분자 초과량의 아미노옥시 시약 및 아닐린 (친핵성 촉매, 최종 농도: 10 mM)을 첨가하였다. 상기 커플링 반응은 실온의 암실에서 부드럽게 교반하면서 2시간 동안 수행되었다. 마지막으로 상기 PEG-rFVⅢ 복합체를 Q-세파로스 FF 상에서 이온-교환 크로마토그래피를 통해 정제하였다. 5 mM $CaCl_2$을 함유하는 pH 7.4의 50 mM 헤페스 버퍼로 미리 평형화된 상기 칼럼상에 1.5 mg 단백질/ml 겔을 로딩하였다. 상기 복합체를 5 mM $CaCl_2$ 및 500 mM 염화 나트륨을 함유하는 pH 7.4의 50 mM 헤페스 버퍼로 용리하였고, 30 kD 멤브레인을 이용한 UF/DF를 수행하였다. FVⅢ 발색 반응 분석 및 총 단백질 (BCA 분석)의 측정에 의한 상기 복합체의 분석적 특성화는 상기 rFVⅢ 출발 물질과 비교할 때, > 60%의 고유 활성도를 나타내었다.

[0313]

[0314] **실시예 24**

[0315] 아미노옥시 PEG-시약과 rFⅦa의 페길화

[0316] 아미노옥시기를 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약을 사용하여 rFⅦa를 페길화하였다. 상기 유형의 시약의 예로는 NOF (NOF Corp., 도쿄, 일본)의 선브라이트 (Sunbright®) CA 시리즈를 들 수 있다. rFⅦa를 2 mg/ml의 단백질 농도에서 $NaIO_4$ (최종 농도: 100 μM)와 반응 버퍼 (50 mM 헤페스, 150 mM 염화 나트륨, 5 mM 염화 칼슘, pH 6.0)에서 4℃의 암실에서 부드럽게 교반하면서 1시간 동안 산화시키고, 글리세롤 수용액 (최종 농도: 1 mM)을 첨가하여 15분 동안 켄칭하였다. 그 다음, 상기 반응 혼합물에 UF/DF를 수행하였다. 상기 투석 잔류물에 5배 분자 초과량의 아미노옥시 시약 및 아닐린 (친핵성 촉매, 최종 농도: 10 mM)을 첨가하였다. 상기 커플링 반응은 실온의 암실에서 부드럽게 교반하면서 2시간 동안 수행되었다. 마지막으로 상기 PEG-rFⅦa 복합체를 Q-세파로스 FF 상에서 이온-교환 크로마토그래피를 통하여 정제하였다. 1 mM $CaCl_2$를 함유하는 pH 7.4인 20 mM 헤페스 버퍼로 미리 평형을 이룬 상기 칼럼상에 1.5 mg 단백질/ml 겔을 로딩하였다. 상기 복합체를 1 mM $CaCl_2$ 및 500 mM 염화 나트륨을 함유하는 pH 7.4인 20 mM 헤페스 버퍼로 용리한 다음, 30 kD 멤브레인을 이용한 UF/DF를 수행하였다. FⅦa 활성 (Staclot 분석, Diagnostica Stago, Asni, 프랑스) 및 총 단백질 측정 (BCA 분석)에 의한 상기 복합체의 분석적 특성화는, 상기 rFⅦa 출발 물질과 비교할 때, > 25%의 고유 활성도를 나타내었다.

[0317]

[0318] **실시예 25**

[0319] PEG-히드라지드 시약과 rFIX의 페길화

[0320] 히드라지드기를 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약을 사용하여 rFIX를 페길화하였다. 상기 유형의 시약의 예로는 NOF (NOF Corp., 도쿄, 일본)의 선브라이트 (Sunbright®) HZ 시리즈를 들 수 있다. rFIX를 2 mg/ml의 단백질 농도에서 $NaIO_4$ (최종 농도: 100 μM)와 반응 버퍼 (50 mM 헤페스, 150 mM 염화 나트륨, 5 mM 염화 칼슘, pH 6.0)에서 4℃의 암실에서 부드럽게 교반하면서 1시간 동안 산화시키고, 글리세롤 수용액 (최종 농도: 1 mM)을 첨가하여 15분 동안 켄칭하였다. 그 다음, 상기 반응 혼합물에 UF/DF를 수행하였다. 상기 투석 잔류물에 50배 분자 초과량의 히드라지드 시약 및 아닐린 (친핵성 촉매, 최종 농도: 10 mM)을 첨가하였다. 상기 커플링 반응은 실온의 암실에서 부드럽게 교반하면서 2시간 동안 수행되었다. 마지막으로 상기 PEG-rFIX 복합체를 Q-세파로스 FF 상의 이온-교환 크로마토그래피를 통하여 정제하였다. 상기 반응 혼합물을 pH 8.0인 50 mM 트리스-버퍼로 미리 평형을 이룬 상기 칼럼 (1.5 mg 단백질/ml 겔)에 로딩하였다. 상기 복합체를 pH 8.0인 20 CV 트리스 버퍼 (50 mM 트리스, 1 M NaCl)로 용리시키고, 그 다음, 30 kD 멤브레인을 이용한 UF/DF를 수행하였다. 상기 제제는 총 단백질 측정 (BCA) 및 FIX 발색 활성에 의하여 분석적으로 특성화되었다. 천연 rFIX와 비교할 때, 상기 PEG-

rFIX에 대한 고유 활성도는 > 50%로 측정되었다 (발색 반응 분석).

[0321]

[0322] **실시예 26**

[0323] 2 mM 아닐린의 존재하에 수행된, rFVⅢ의 폴리시알릴화

[0324] rFVⅢ를 반응 버퍼 (50 mM 헤페스, 350 mM 염화 나트륨, 5 mM 염화 칼슘, 0.01% 트윈 80, pH 6)로 옮겨 담고, 1 mg/ml의 단백질 농도가 되도록 희석하고, $NaIO_4$ (최종 농도: 100 μM)와 반응 버퍼 (50 mM 헤페스, 150 mM 염화 나트륨, 5 mM 염화 칼슘, pH 6.0)에서 4℃의 암실에서 부드럽게 교반하면서 1시간 동안 산화시키고, 시스테인 수용액 (최종 농도: 1 mM)을 첨가하여 15분 동안 켄칭하였다. 그 다음, 상기 반응 혼합물에 UF/DF를 수행하였다. 상기 투석 잔류물에 20배 분자 초과량의 아미노옥시 시약 및 아닐린 (친핵성 촉매, 최종 농도: 2 mM)을 첨가하였다. 상기 커플링 반응은 실온의 암실에서 부드럽게 교반하면서 2시간 동안 수행되었다. 상기 여분의 아미노옥시 시약을 HIC를 통해 제거하였다. 상기 반응 혼합물의 전도율은 아세트산 암모늄 (50 mM 헤페스, 350 mM 염화 나트륨, 5 mM 염화 칼슘, 8 M 아세트산 암모늄, 0.01% 트윈 80, pH 6.9)을 함유하는 버퍼의 첨가에 의해 130 mS/cm까지 상승하였으며, 이를 pH 6.9인 50 mM 헤페스, 2.5 M 아세트산 암모늄, 350 mM 염화 나트륨, 5 mM 염화 칼슘, 0.01% 트윈 80으로 미리 평형을 이룬 부틸-세파로스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 53 ml로 채워진 칼럼에 로딩하였다. 그 다음, 상기 복합체를 pH 7.4인 50 mM 헤페스, 5 mM 염화 칼슘, 0.01% 트윈 80으로 용리하였다. 마지막으로 분획을 함유하는 상기 PSA-rFIX를 채취하고, 재생 셀룰로스로 만들어진 30 kD 멤브레인 (밀리포어, Billerica, MA)을 이용한 UF/DF를 수행하였다. 상기 제제는 총 단백질 측정 (BCA) 및 FVⅢ 발색 활성에 의해 분석적으로 특성화되었다. 천연 rFVⅢ와 비교할 때, 상기 PSA-rFVⅢ 복합체에 대한 고유 활성도는 80%로 측정되었다.

[0325]

[0326] **실시예 27**

[0327] 10 mM 아닐린의 존재하에 수행된, rFVⅢ의 폴리시알릴화

[0328] rFVⅢ을 반응 버퍼 (50 mM 헤페스, 350 mM 염화 나트륨, 5 mM 염화 칼슘, 0.01% 트윈 80, pH 6)에 옮겨 담고, 1 mg/ml의 단백질 농도로 희석하고, $NaIO_4$ (최종 농도: 100 μM)와 반응 버퍼 (50 mM 헤페스, 150 mM 염화 나트륨, 5 mM 염화 칼슘, pH 6.0)에서 4℃의 암실에서 부드럽게 교반하면서 1시간 동안 산화시키고, 시스테인 수용액 (최종 농도 : 1 mM)을 첨가하여 15분 동안 켄칭하였다. 그 다음, 상기 반응 혼합물에 UF/DF를 수행하였다. 상기 투석 잔류물에 20배 분자 초과량의 아미노옥시 시약 및 아닐린 (친핵성 촉매, 최종 농도: 10 mM)을 첨가하였다. 상기 커플링 반응은 실온의 암실에서 부드럽게 교반하면서 2시간 동안 수행되었다. 상기 여분의 아미노옥시 시약을 HIC를 통하여 제거하였다. 상기 반응 혼합물의 전도율은 아세트산 암모늄을 함유하는 버퍼 (50 mM 헤페스, 350 mM 염화 나트륨, 5 mM 염화 칼슘, 8 M 아세트산 암모늄, 0.01% 트윈 80, pH 6.9)의 첨가에 의해 130 mS/cm 까지 상승하였으며, 이를 pH 6.9인 50 mM 헤페스, 2.5 M 아세트산 암모늄, 350 mM 염화 나트륨, 5 mM 염화 칼슘, 0.01% 트윈 80으로 미리 평형화된 부틸-세팔로스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 53 ml가 채워진 칼럼에 로딩하였다. 그 다음, 상기 복합체를 pH 7.4인 50 mM 헤페스, 5 mM 염화 칼슘, 0.01% 트윈 80으로 용리하였다. 마지막으로 분획을 함유하는 상기 PSA-rFIX를 채취하고 재생 셀룰로스로 만들어진 30 kD 멤브레인 (밀리포어, Billerica, MA)을 이용한 UF/DF를 수행하였다. 상기 제제는 총 단백질 측정 (BCA) 및 FVⅢ 발색 활성에 의해 분석적으로 특성화되었다. 천연 rFVⅢ과 비교할 때, 상기 PSA-rFVⅢ 복합체에 대한 고유 활성도는 80%로 측정되었다.

[0329]

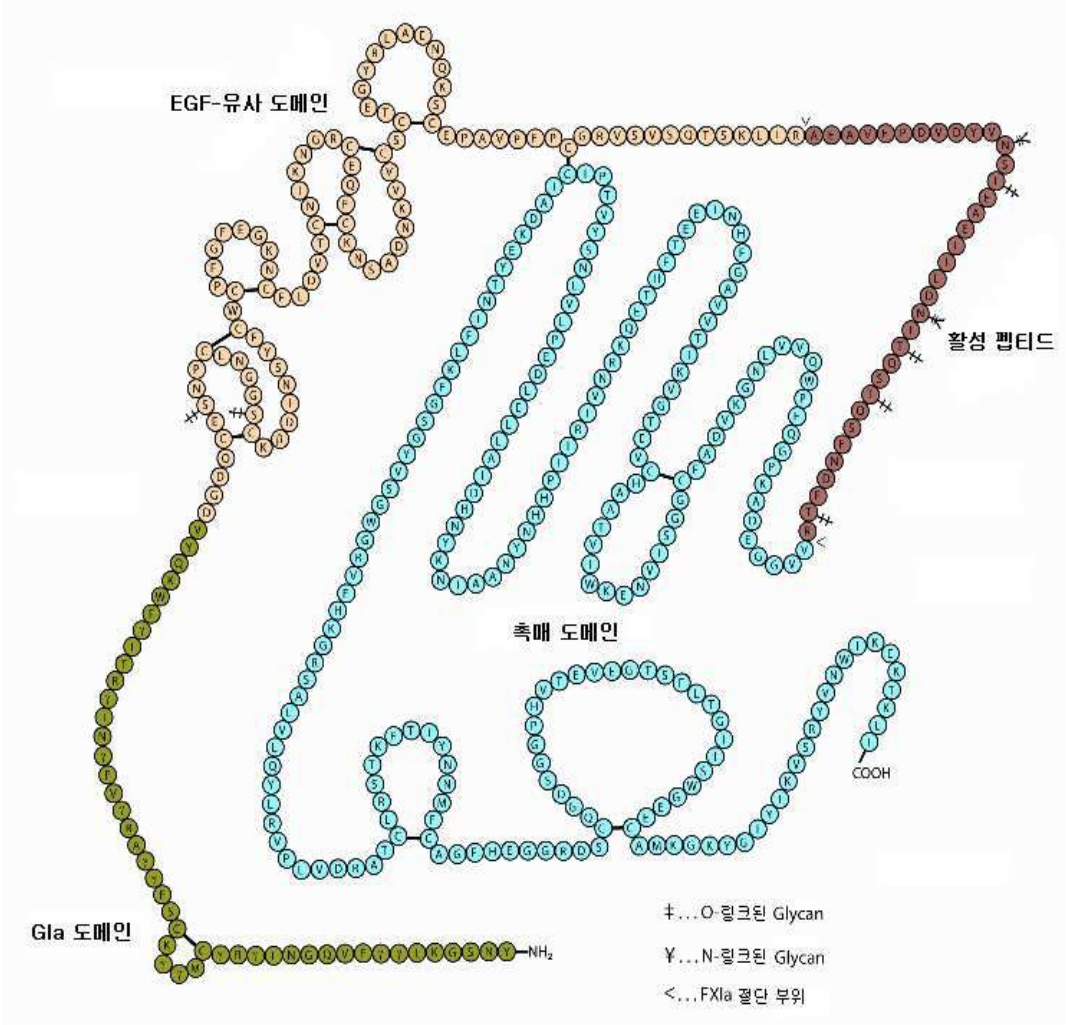
[0330] **실시예 28**

[0331] 분지형 PEG를 이용한 혈액 응고 단백질의 페길화

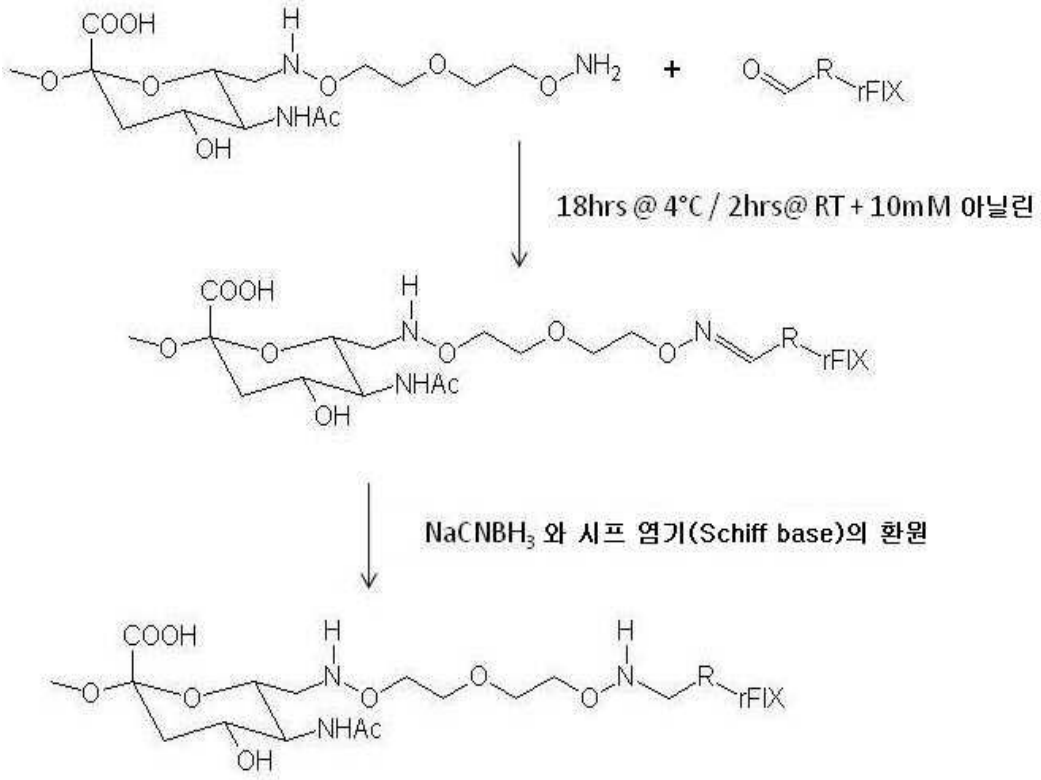
[0332] 혈액 응고 단백질 (예를 들어 실시예 22 내지 25에서 설명된 바와 같은 FIX, FVⅢ 및 FVⅡa)의 페길화는, 실시예 21에서 언급한 바와 같이 알데히드, 및 활성 아미노옥시기를 함유하는 적합한 링커로 만들어진 분지형 또는 선형 페길화 시약으로 확대 해석될 수 있다.

도면

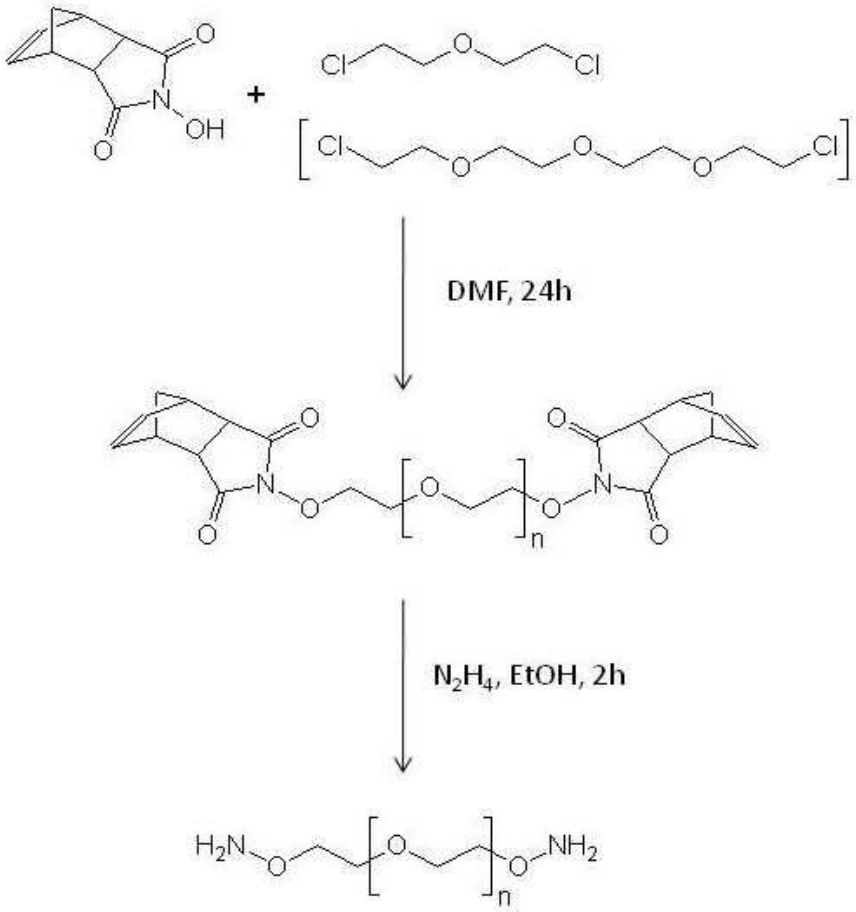
도면1


EGF-유사 도메인
활성 펩티드
촉매 도메인
COOH
Gla 도메인
NH2
‡...O-링크된 Glycan
¥...N-링크된 Glycan
<...FXIa 절단 부위

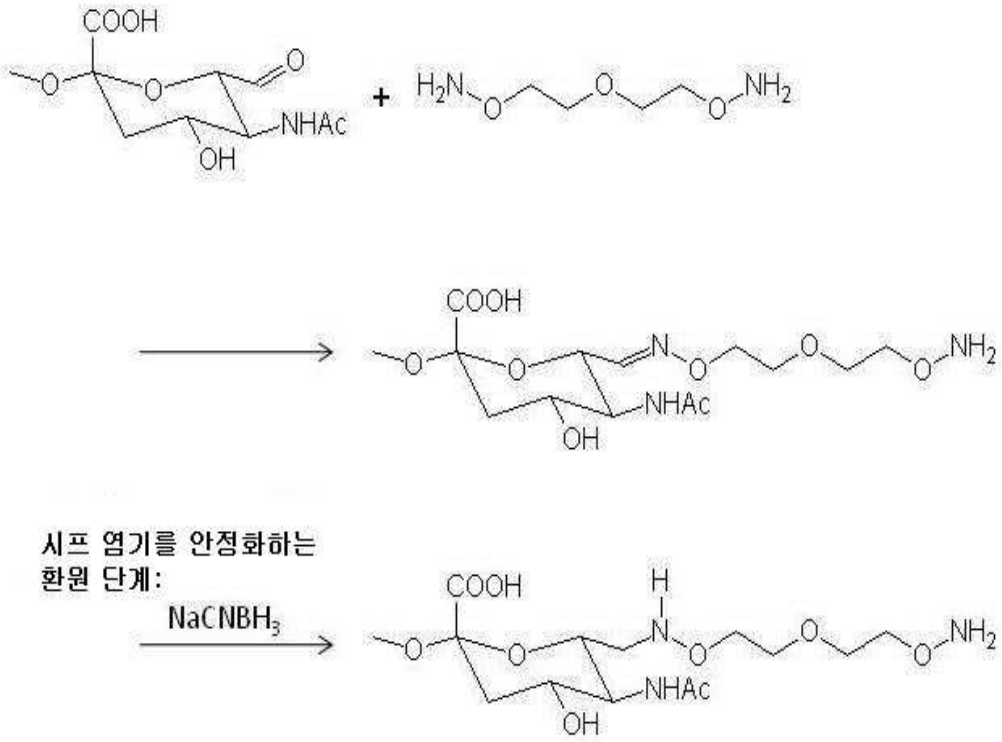
도면2


COOH
H
N
O
NH2
NHAc
OH
+
O
R
rFIX
18hrs @ 4°C / 2hrs@ RT + 10mM 아닐린
N
NaCNBH3 와 시프 염기(Schiff base)의 환원

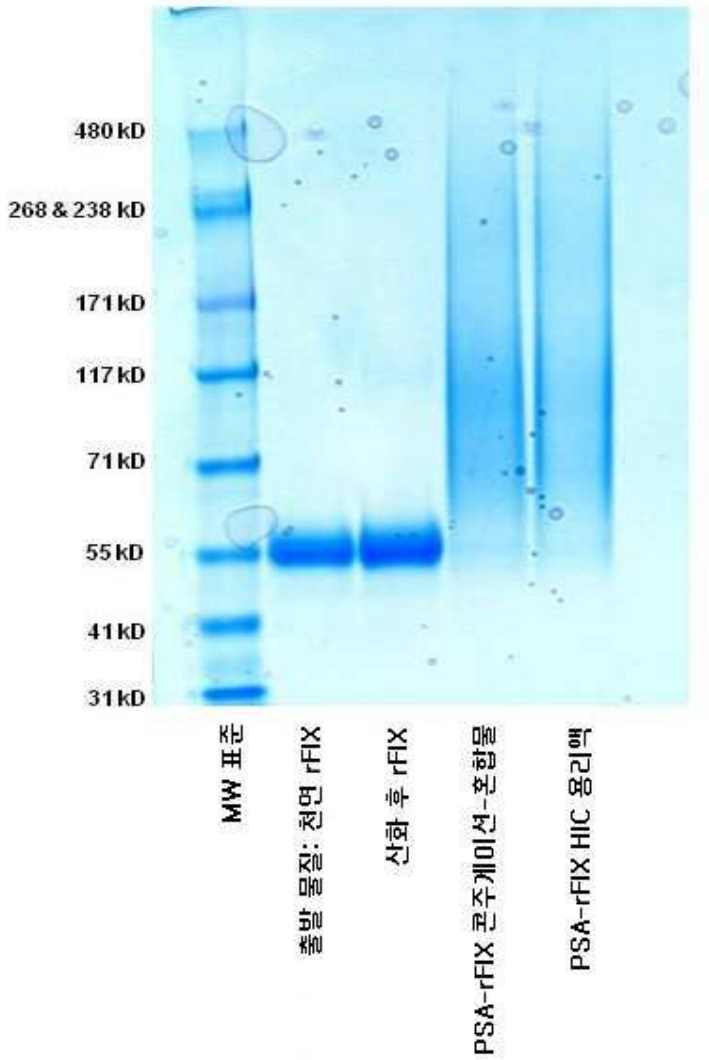
도면3


O
N
OH
O
+
Cl
O
Cl
Cl
O
O
O
Cl
DMF, 24h
O
N
O
O
O
n
O
N
O
N_2H_4, EtOH, 2h
H_2N
O
O
n
NH_2

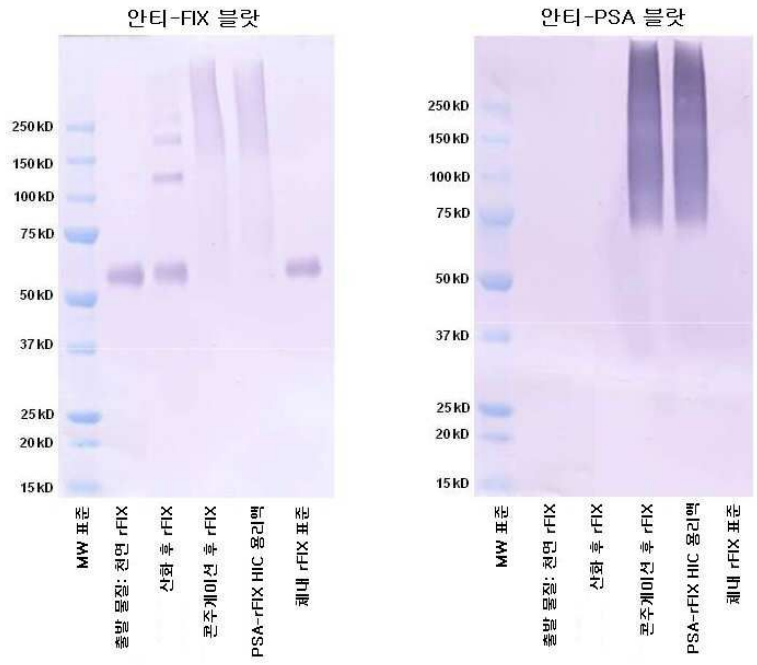
도면4


COOH
O
O
NHAc
OH
+
H_2N
O
O
O
NH_2
COOH
O
O
N
O
O
O
NH_2
NHAc
OH
시프 염기를 안정화하는
환원 단계:
$NaCNBH_3$
COOH
H
N
O
O
O
O
NH_2
NHAc
OH

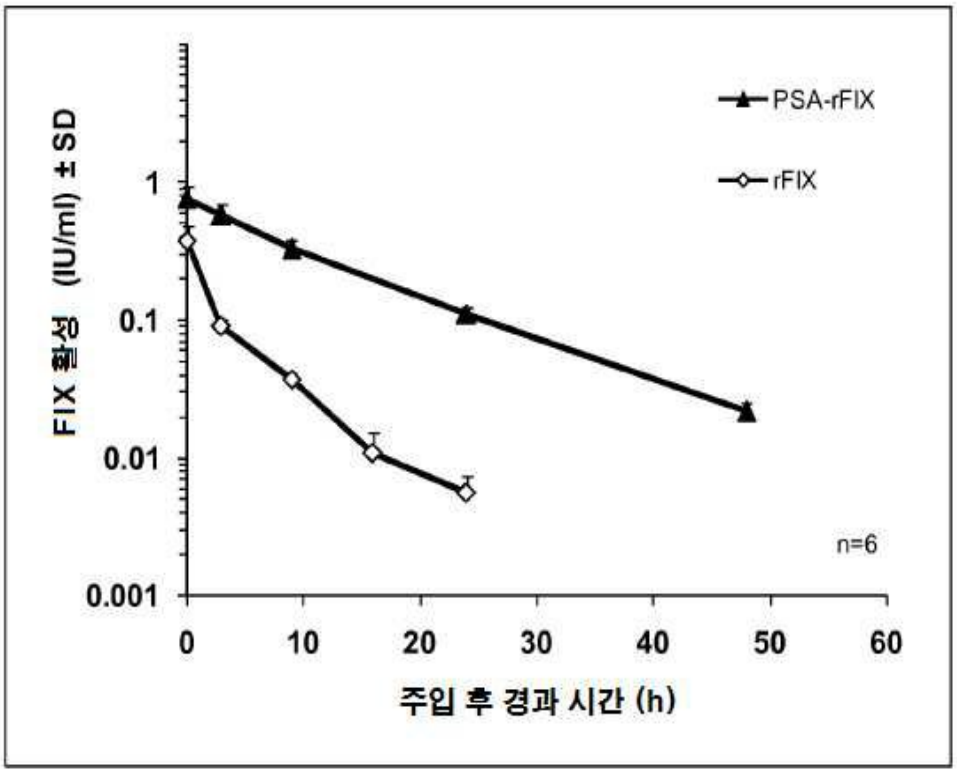
도면5


480 kD
268 & 238 kD
171 kD
117 kD
71 kD
55 kD
41 kD
31 kD
MW 표준
출발 물질: 천연 rFIX
산화 후 rFIX
PSA-rFIX 콘주게이션-혼합물
PSA-rFIX HIC 용리액

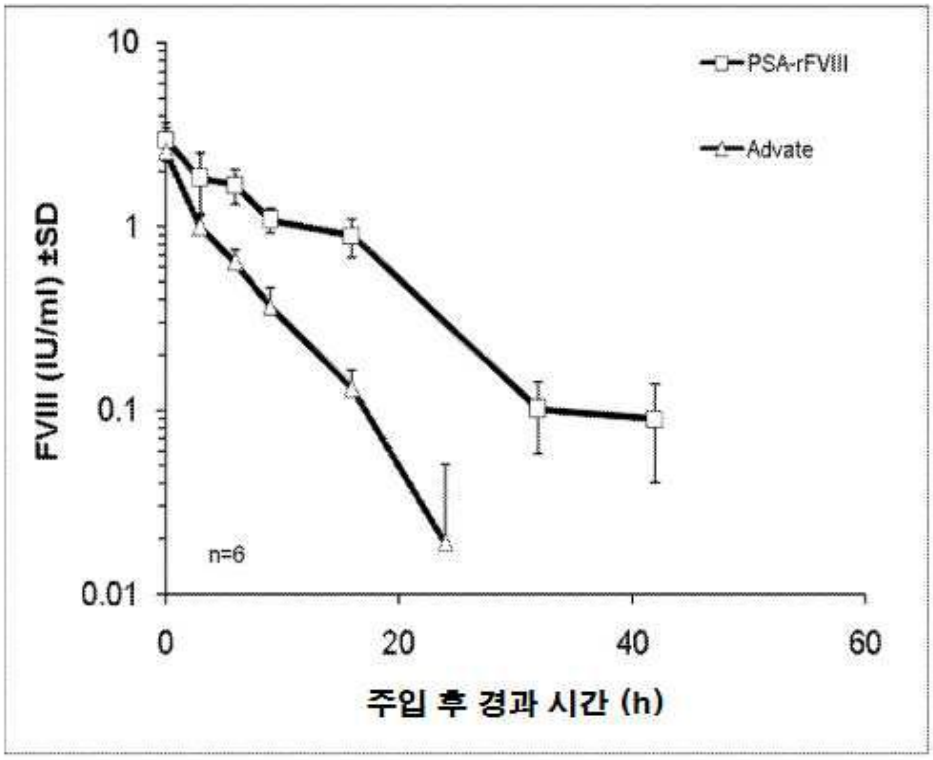
도면6


안티-FIX 블랏
250 kD
150 kD
100 kD
75 kD
50 kD
37 kD
25 kD
20 kD
15 kD
MW 표준
출발 물질: 천연 rFIX
산화 후 rFIX
콘주게이션 후 rFIX
PSA-rFIX HIC 용리액
폐내 rFIX 표준
안티-PSA 블랏
250 kD
150 kD
100 kD
75 kD
50 kD
37 kD
25 kD
20 kD
15 kD
MW 표준
출발 물질: 천연 rFIX
산화 후 rFIX
콘주게이션 후 rFIX
PSA-rFIX HIC 용리액
폐내 rFIX 표준

도면7


PSA-rFIX
rFIX
FIX 활성 (IU/ml) ± SD
1
0.1
0.01
0.001
n=6
0
10
20
30
40
50
60
주입 후 경과 시간 (h)

도면8


10
1
0.1
0.01
FVIII (IU/ml) ±SD
n=6
0
20
40
60
주입 후 경과 시간 (h)
PSA-rFVIII
Advate