



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0002129
(43) 공개일자 2012년01월05일

(51) Int. Cl.

A61K 47/48 (2006.01) A61K 47/30 (2006.01)
C07K 14/745 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0062860

(22) 출원일자 2010년06월30일
심사청구일자 없음

(71) 출원인

한미홀딩스 주식회사

서울특별시 송파구 위례성대로 14 (방이동, 한미타워)

(72) 발명자

송대해

경기도 화성시 능동 자연엔 데시앙아파트 875동
1401호

임성인

경기도 화성시 동탄원천로 157, 1011호 (반송동,
오피스타워)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

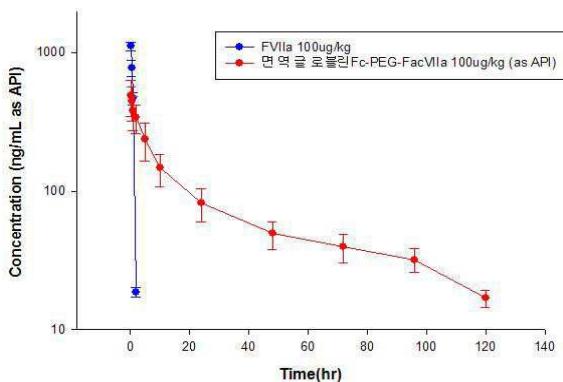
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 면역글로불린 단편을 이용한 제7인자 (Factor VIIa) 약물 결합체

(57) 요약

본 발명은 Factor VIIa, 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc 영역이 상호 공유결합에 의해 연결되어 있어 생체 내 지속성 및 안정성이 향상된 혈액 응고 결합체 및 그 이용에 관한 것이다. 본 발명의 혈액 응고 결합체는 Factor VIIa의 생체 내 활성이 비교적 높게 유지되고, 혈중 반감기가 현저히 증가되어 혈액 응고 치료 시 복약순응도를 월등히 개선할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김창환

경기도 수원시 권선구 권선로694번길 26, 106동
101호 (권선동, 권선 SK VIEW)

홍성갑

경기도 용인시 기흥구 동백죽전대로 283, 111동
702호 (중동, 참솔마을월드메르디앙)

임대성

경기도 용인시 기흥구 관곡로85번길 7-9, 302호 (구갈동)

권세창

서울특별시 광진구 아차산로 552, 10동 1204호 (광장동, 극동아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

FacVIIa 및 면역글로불린 Fc 영역이 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비펩타이드성 중합체를 통해 연결된 FacVIIa 결합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 비펩타이드성 중합체의 각 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역과 FacVIIa의 N-말단에 결합된 FacVIIa 결합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역이 비당쇄화됨을 특징으로 하는 FacVIIa 결합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역이 CH1, CH2, CH3 및 CH4 도메인으로 이루어진 군으로부터 1개 내지 4개 선택되는 도메인으로 이루어진 FacVIIa 결합체.

청구항 5

제4항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역이 헌지영역을 추가로 포함하는 FacVIIa 결합체.

청구항 6

제1항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역이 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM에서 유래된 Fc 영역인 FacVIIa 결합체.

청구항 7

제6항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역의 각각의 도메인이 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM로 이루어진 군에서 선택되는 면역글로불린에서 유래된 상이한 기원을 가진 도메인의 하이브리드인 FacVIIa 결합체.

청구항 8

제6항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역이 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단체 면역글로불린으로 구성된 이량체 또는 다량체인 FacVIIa 결합체.

청구항 9

제6항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역이 IgG4 Fc 영역인 FacVIIa 결합체.

청구항 10

제9항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역이 인간 비당쇄화 IgG4 Fc 영역인 FacVIIa 결합체.

청구항 11

제1항에 있어서, 비펩타이드성 중합체의 반응기가 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 부틸 알데히드 그룹, 말레이미드 그룹 및 석시니미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 FacVIIa 결합체.

청구항 12

제11항에 있어서, 석시니미드 유도체가 석시니미딜 프로피오네이트, 석시니미딜 카르복시메틸, 하이드록시 석시니미딜 또는 석시니미딜 카보네이트인 FacVIIa 결합체.

청구항 13

제11항에 있어서, 비펩타이드성 중합체가 양 말단 또는 세말단에 반응 알데히드 그룹의 반응기를 갖는 FacVIIa 결합체.

청구항 14

제11항에 있어서, 비펩타이드성 중합체가 각 말단에 반응 알데히드 그룹의 반응기를 갖는 FacVIIa 결합체.

청구항 15

제14항에 있어서, 비펩타이드성 중합체가 폴리에틸렌 글리콜인 FacVIIa 결합체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중의 어느 한 항의 FacVIIa 결합체를 포함하는 혈액 응고용 약제학적 조성물.

청구항 17

(1) 각 말단에 알데히드, 말레이미드, 또는 석시니미드 유도체 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체를 사용하여 면역글로불린 Fc 영역의 아민 그룹 또는 티올 그룹에 공유결합으로 연결하는 단계;

(2) 상기 (1)의 반응 혼합물로부터 비펩타이드성 중합체가 공유결합된 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 연결체를 분리하는 단계; 및

(3) 분리된 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 FacVII를 공유결합으로 연결하여 비펩타이드성 중합체의 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 FacVII와 결합된 FacVII 결합체를 생성하는 단계;

(4) 상기(3)에서 생성된 FacVII 결합체를 활성화하여 FacVIIa 및 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체를 통해 연결되는 FacVIIa 결합체를 생성하는 단계를 포함하는 FacVIIa 결합체 제조방법.

청구항 18

(1) 각 말단에 알데히드 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체를 사용하여 면역글로불린 Fc의 N-말단에 pH5.0 내지 pH7.0에서 공유결합으로 연결하는 단계;

(2) 상기 (1)의 반응 혼합물로부터 N-말단에 비펩타이드성 중합체가 공유결합된 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 연결체를 분리하는 단계; 및

(3) 분리된 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 FacVII를 공유결합으로 연결하여 비펩타이드성 중합체의 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 FacVII와 결합된 FacVII 결합체를 생성하는 단계;

(4) 상기(3)에서 생성된 FacVII 결합체를 활성화하여 FacVIIa 및 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체를 통해 연결되는 FacVIIa 결합체를 생성하는 단계를 포함하는 FacVIIa 결합체 제조방법.

청구항 19

(1) 각 말단에 알데히드 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체를 사용하여 FacVII의 경쇄의 N-말단에 공유결합으로 연결하는 단계;

(2) 상기 (1)의 반응 혼합물로부터 비펩타이드성 중합체가 공유결합된 FacVII를 포함하는 연결체를 분리하는 단계; 및

(3) 분리된 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역을 공유결합으로 연결하여 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 FacVII으로 결합된 FacVII 결합체를 생성하는 단계;

(4) 상기(3)에서 생성된 FacVII 결합체를 활성화하여 FacVIIa 및 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체를 통해 연결되는 FacVIIa 결합체를 생성하는 단계를 포함하는 FacVIIa 결합체 제조방법.

청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FacVII는 FacVII의 N-말단이 비펩타이드성 중합체와 결합하는 결합체의 제조방법.

청구항 21

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 활성화가 온-컬럼(On-column) 활성화 또는 인-솔루션(In solution) 활성화에 의한 FacVIIa 결합체 제조방법.

청구항 22

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FacVII 및 FacVIIa가 천연형 FacVII 및 천연형 FacVIIa인 FacVIIa 결합체의 제조방법.

청구항 23

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비펩타이드성 중합체가 폴리에틸렌글리콜인 FacVIIa 결합체의 제조방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 제7인자(Factor VIIa, FacVIIa)의 지속형 제형을 위한 혈액 응고 결합체에 관한 발명으로서, 구체적으로 본 발명은 FacVIIa, 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc 영역이 공유 결합에 의해 상호 연결되어 혈중 반감기가 현저히 증가하고 혈액 응고 기능을 유지하며 복약순응도를 월등히 증가시킨 혈액 응고 결합체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

현재 세계 혈우병 환자는 14만 명으로 추정하고 있으며 매년 20%의 증가 추세를 보이고 있다. 유전적으로 만 명당 한명의 비율로 혈우병이 발생되고 있지만 전체 환자의 25% 내외만이 진단 또는 치료를 받고 있다. 혈액인자 치료의 가장 큰 문제점은 기존 치료제에 대한 항체가 생성되는 부분에 있다. 혈액 인자 VIII이 결핍되어 발병하는 혈우병을 A형, 혈액인자 XI가 결핍되어 발병하는 혈우병을 B형으로 나누어 구분 지으며, 전체 혈우병 환자 중 A형 혈우병이 80%, B형 혈우병 환자가 20%를 차지하는데, A형 혈우병 환자의 10~15%에서 혈액인자 치료 시 항체가 생성되며, B형 혈우병 환자의 1~3%에서 혈액인자 치료 시 항체가 생성된다.

[0003]

FacVIIa은 FacVII의 활성형이다. 간에서 생성되는 FacVII은 406의 아미노산으로 구성된 효소로서 10번 아미노산인 글루탐산이 감마-카르복실화 되어있으며, 145번 및 322번 아미노산인 아스파라진이 엔-글라이코시레이션 되어있고, 52번 및 60번 아미노산인 세린이 오-글라이코시레이션 되어있다. 두 개의 EGF-유사 도메인과 하나의 세린 프로테아제 도메인을 가지며, FacVII의 152번째 아르기닌과 153번째 이소류신 사이가 절단되면서 중쇄의 활성부위가 노출되어 활성을 가지게 된다. 이 과정에서 경쇄와 중쇄가 붙어있는 단쇄이던 FacVII이 경쇄와 중쇄가 떨어진 두 개의 사슬 구조인 FacVIIa로 변형된다.

[0004]

FacVIIa은 기존의 여러 혈액 인자들과는 달리 혈액 응고 과정에서 보조 혈액 응고 경로로 작용하여 항체가 생성되지 않으며 그에 따른 고용량 투여가 가능한 혈액 인자이다. 따라서 혈우병 치료 방법에 있어, A형 및 B형 혈우병에 모두 적용가능하며 항체 생성 및 고용량 투여에 높은 안정성을 가지는 FacVIIa로의 대체 치료가 진행되고 있다. 또한 혈액 인자의 치료과정에서 생성된 항체로 인하여 더 이상 기존 혈액 인자로의 혈우병 치료는 불가능하며 FacVIIa만의 치료가 가능한 현실이다.

[0005]

반면 FacVIIa는 항체는 생성되지 않지만 여러 혈액 인자 중 가장 짧은 혈중 반감기를 가지기 때문에 빈번한 약물 투여로 인해 환자에게 고통을 야기하고 과량의 약물 투여로 인해 환자에게 경제적 부담을 배가시켰다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 FacVIIa는 반드시 지속형 제제의 개발이 이루어져야 하며 그로 인해 출혈이 있을 때

마다 혈액 인자를 보충하는 보충요법이 아닌 예방목적의 치료가 가능해 질 것이라고 기대하고 있다.

- [0006] FacVIIa의 C 말단에 Albumin 퓨전한 rVIIa-FP(CSL Behring)은 전임상 단계에 있으며 렉트에서 혈중 반감기가 천연형 FacVIIa 대비 6.7배 증가하였으나 여전히 4.38h으로 매우 짧아 효과적인 혈우병 치료 및 예방에 사용하기엔 부적합하다.
- [0007] 페길화 리포좀 제형(Pegylated liposome formulation)을 이용한 PEGLip-FVIIa(0mri)의 경우 역시 전임상 단계 이지만 혈중 반감기가 천연형 FacVIIa 대비 2배 증가로 미비한 수준이다.
- [0008] FacVIIa의 Gla 도메인 변이(domain mutation) 및 과당쇄화(hyperglycosylation)를 통해 혈중 반감기를 연장시킨 MAXY-VII(Bayer/Maxygen), 40K PEG 당쇄화를 이용하여 혈중 반감기를 연장시킨 NN7128(Novo/Neose) 두 제품 각각 임상 1상 및 임상 2상 진행중이며 천연형 FacVIIa 대비 5배의 혈중 반감기 증가로 여전히 효과적인 혈우병 치료 및 예방에 부적합하다.
- [0009] 이에, 본 발명자들은 FacVIIa의 혈중반감기 증가 및 생체 내 활성유지를 동시에 극대화할 수 있는 방법으로 면역글로불린 Fc 영역, 비펩타이드성 중합체 및 FacVIIa를 공유 결합에 의해 부위 선택적으로 상호 연결시키는 제조방법을 사용하였고, 그 결과 혈액 응고 기능 결합체의 혈중 반감기를 60hrs으로 획기적으로 증가시키고 공지의 페길화 방법이나 인프레임 퓨전(inframe fusion) 방법보다 월등히 개선된 혈중반감기 증가효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 FacVIIa의 생체 내 활성을 유지하면서 혈중 반감기를 연장시켜 월등히 우수한 혈액 응고 기능을 가진 FacVIIa 결합체, 이를 포함하는 지속형 제제 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 FacVIIa 및 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체를 통해 연결된 FacVIIa 결합체를 제공한다.
- [0012] 본 발명의 FacVIIa는 FacVII이 활성화되어 얻어진 활성을 가지는 FacVII를 의미한다.
- [0013] 바람직하게 본 발명의 FacVIIa 결합체는 FacVII 결합체를 활성화하여 생성된다. FacVII, 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc 영역으로 구성되는 지속형 결합체를 제조 후, 별도의 활성화 과정을 거쳐 최종적으로 FacVIIa, 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc 영역으로 이루어진 FacVIIa 결합체를 제조함으로써, FacVIIa 지속형 결합체를 제조하는 과정에서 결합체의 체내 활성을 높이고 구조의 단일화 비율(homogeneous)을 높일 수 있다.
- [0014] 본 발명에서 FacVII 결합체를 FacVIIa 결합체로 활성화시키는 방법은 온-컬럼(On-column) 활성화 방법 및 인-솔루션(In solution) 활성화 방법을 포함하나 이에 한정하는 것은 아니다. 바람직하게 본 발명의 FacVII 결합체는 온-컬럼 활성화 방법을 사용하여 활성화된다.
- [0015] 고체-상(Solid-Phase) 활성화 방법으로도 불리는 온-컬럼(On-column) 활성화 방법은 별도의 첨가물을 넣어주지 않고 음이온 교환 컬럼에 FacVII 결합체를 결합시킨 후 "자가활성(autoactivation)"시키는 방법이다.
- [0016] 인-솔루션(In solution) 활성화 방법은 온-컬럼 활성화 방법과 달리 FacVII의 활성화에 필요한 여러 요소, 예를 들면 칼슘 이온의 농도, pH, 온도 및 FacVII의 농도 등을 모두 고려하여 FacVII의 활성화를 유도하는 방법이다.
- [0017] 본 발명의 FacVIIa는 보조 혈액 응고 경로를 통하여 혈액 응고 과정에 작용하는 웹타이드이다. 이러한 웹타이드는 천연형 FacVII, FacVII 아고니스트(agonist), 전구물질(precursors), 유도체(derivatives), 단편(fragment), 변이체(variants) 등을 포함한다.

- [0018] FacVIIa 아고니스트는 FacVIIa의 구조와 상관없이 FacVIIa와 동일한 생물학적 활성을 나타내는 물질을 의미한다.
- [0019] FacVIIa 유도체는 천연형 FacVIIa과 비교시 최소한 80% 이상 아미노산 서열에서 상동성을 보이며, 아미노산 잔기의 일부 그룹이 화학적으로 치환(예; alpha-methylation, alpha-hydroxylation), 제거(예; deamination) 또는 수식(예; N-methylation)된 형태일수 있고, 체내에서 혈액 응고를 조절하는 기능을 보유한 펩타이드를 의미한다.
- [0020] FacVIIa 유도체는 FacVIIa 서열에 하나 또는 그 이상 아미노산이 추가 또는 삭제된 형태를 의미하며 추가된 아미노산은 천연에 존재하지 않는 아미노산(예; D형 아미노산) 도 가능할 수 있고, 이러한 FacVIIa 단편은 체내에서 혈액 응고를 조절 기능을 보유한다.
- [0021] FacVIIa 변이체는, FacVIIa와 아미노산서열이 하나 이상 다른 펩타이드로서, 체내에서 혈액 응고를 조절 기능을 보유한 펩타이드를 의미한다.
- [0022] FacVIIa 아고니스트, 유도체, 단편 및 변이체에서 각각 사용된 제조방법은 독립적으로 사용될 수 있고 조합도 가능하다. 예를 들어 아미노산 서열이 하나 이상 다르고 N-말단 아미노산 잔기에 탈아미노화(deamination) 된 체내에서 혈액 응고를 조절 기능을 보유한 펩타이드도 포함된다.
- [0023] 바람직하게 본 발명의 FacVIIa 결합체는 비펩타이드성 중합체의 각 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역과 FacVIIa의 N-말단에 결합한 FacVIIa 결합체이다.
- [0024] 더욱 바람직하게 본 발명의 FacVIIa 결합체는 비펩타이드성 중합체의 각 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역과 FacVIIa의 경쇄의 N-말단에 결합한 FacVIIa 결합체이다.
- [0025] 활성화 전의 FacVII은 경쇄와 중쇄가 연결된 단쇄 구조이므로 경쇄의 N-말단만이 노출되어 있으나, FacVIIa의 형태가 되면 FacVII의 152번째 아르기닌과 153번째 이소류신 사이가 절단되면서 중쇄의 활성부위가 노출되며, 이때 노출되는 153번째 이소류신이 중쇄의 N-말단이 된다. 중쇄의 N-말단은 FacVIIa의 활성에 중요한 역할을 하는 부분이므로, 경쇄의 N-말단에 결합체를 형성하는 경우에 역가가 높게 된다.
- [0026] 구체적인 일 실시예로서, 본 발명자는 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단에 PEG를 결합시키고 여기에 FacVII의 경쇄의 N-말단에 선택적으로 커플링하여 FacVII-PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 제조하였다. 그 후 별도의 활성화 과정을 거쳐 FacVIIa-PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 완성하였다. 본 발명에서 제조한 FacVIIa-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 혈중반감기는 약 60시간으로 획기적으로 증가하였고, 모델 동물에서 혈액 응고 효과를 보여 생체 내 활성이 유지된 새로운 지속형 FacVIIa 제형을 제조할 수 있었다.
- [0027] 면역글로불린 Fc 영역은 생체 내에서 대사되는 생분해성의 폴리펩타이드이기 때문에, 약물의 캐리어로 사용하기에 안전하다. 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 면역글로불린 전체 분자에 비해 상대적으로 분자량이 적기 때문에 결합체의 제조, 정제 및 수율 면에서 유리할 뿐만 아니라 아미노산 서열이 항체마다 다르기 때문에 높은 비균질성을 나타내는 Fab 부분을 제거함으로써 물질의 동질성이 크게 증가되고 혈중 항원성의 유발 가능성도 낮아지게 되는 효과도 기대할 수 있다.
- [0028] 본 발명에서, "면역글로불린 Fc 영역"은, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역, 중쇄 불변영역 1(CH1)과 경쇄 불변영역(CL1)을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및 중쇄 불변영역 3(CH3)부분을 의미하며, 중쇄 불변영역에 힌지(hinge)부분을 포함하기도 한다. 또한 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역 글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄불변영역 1(CL1)을 포함하는 확장된 Fc영역일 수 있다. 또한, CH2및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다. 즉, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 1)CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인, 2)CH1 도메인 및 CH2 도메인, 3)CH1 도메인 및 CH3 도메인, 4)CH2

도메인 및 CH3 도메인, 5)1개 또는 2개의 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)와의 조합, 6)중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체일 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열유도체(mutant)를 포함한다. 아미노산 서열 유도체란 천연 아미노산 서열중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 것을 의미한다. 예를 들면, IgG Fc의 경우 결합에 중요하다고 알려진 214 내지 238, 297 내지 299, 318 내지 322 또는 327 내지 331번 아미노산 잔기들이 변형을 위해 적당한 부위로서 이용될 수 있다. 또한, 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 몇몇 아미노산이 제거되거나 또는 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가될 수도 있는 등 다양한 종류의 유도체가 가능하다. 또한, 이팩터 기능을 없애기 위해 보체결합부위, 예로 C1q 결합부위가 제거될 수도 있고, ADCC 부위가 제거될 수도 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 영역의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제WO 97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다.

[0030] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 웨티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.

[0031] 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation), 아밀화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.

[0032] 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동일한 생물학적 활성을 나타내나 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 유도체다.

[0033] 또한, 이러한 Fc 영역은 인간 및 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랙트, 기니아 퍽 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체 일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간 또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질 분해효소를 처리하여 얻을 수 있다. 파파인을 처리할 경우에는 Fab 및 Fc로 절단되고, 웨신을 처리할 경우에는 pF'c 및 F(ab')2로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pF'c를 분리할 수 있다.

[0034] 바람직하게는 인간 유래의 Fc 영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 Fc 영역이다.

[0035] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 당쇄의 증감 또는 제거에는 화학적 방법, 효소학적 방법 및 미생물을 이용한 유전 공학적 방법과 같은 통상적인 방법이 이용될 수 있다. 여기서, Fc에서 당쇄가 제거된 면역글로불린 Fc 영역은 보체(c1q)의 결합력이 현저히 저하되고, 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포독성이 감소 또는 제거되므로, 생체 내에서 불필요한 면역반응을 유발하지 않는다. 이런 점에서 약물의 캐리어로서의 본래의 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나 비당쇄화된 면역글로불린 Fc 영역이라 할 것이다.

[0036] 본 발명에서 "당쇄의 제거(Deglycosylation)"는 효소로 당을 제거한 Fc 영역을 말하며, "비당쇄화(Aglycosylation)"는 원핵동물, 바람직하게는 대장균에서 생산하여 당쇄화되지 않은 Fc 영역을 의미한다.

[0037] 한편, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랙트, 기니아 퍽 등의 동물기원일 수 있으며, 바람직하게는 인간기원이다. 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또

는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 영역일 수 있다. 바람직하게는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM유래이며 가장 바람직하게는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래이다.

[0038] 한편, 본 발명에서 "조합(combination)" 이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단체 면역글로불린 Fc 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단체 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 즉, IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc 및 IgE의 Fc 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 단편으로부터 이량체 또는 다량체의 제조가 가능하다.

[0039] 본 발명에서 "하이브리드(hybrid)"란 단체의 면역글로불린 Fc 영역 내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 Fc 단편에 해당하는 서열이 존재함을 의미하는 용어이다. 본 발명의 경우 여러 형태의 하이브리드가 가능하다. 즉, IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc 및 IgD Fc의 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 이루어진 그룹으로부터 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하며, 헌지를 포함할 수 있다.

[0040] 한편, IgG 역시 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 서브클래스로 나눌 수 있고 본 발명에서는 이들의 조합 또는 이들의 혼성화도 가능하다. 바람직하게는 IgG2 및 IgG4 서브클래스이며, 가장 바람직하게는 보체 의존적 독성(CDC, Complement-dependent cytotoxicity)과 같은 이펙터 기능(effector function)이 거의 없는 IgG4의 Fc 영역이다.

[0041] 즉, 가장 바람직한 본 발명의 약물의 캐리어용 면역글로불린 Fc 영역은, 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역이다. 인간 유래의 Fc 영역은 인간 생체에서 항원으로 작용하여 이에 대한 새로운 항체를 생성하는 등의 바람직하지 않은 면역 반응을 일으킬 수 있는 비-인간 유래의 Fc 영역에 비하여 바람직하다.

[0042] 본 발명에서 "비펩타이드성 중합체"는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 중합체를 의미하며, 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다.

[0043] 본 발명에 사용가능한 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA(폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜이다. 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.

[0044] 기존 인프레임 퓨전(inframe fusion) 방법으로 제조된 융합단백질에서 사용된 펩타이드성 중합체의 단점은 생체 내에서 단백질분해효소에 의해 쉽게 절단되어 캐리어에 의한 활성약물의 혈중반감기 증가 효과를 기대만큼 얻을 수 없다는 것이다. 그러나, 본 발명에서는 단백질분해효소에 저항성 있는 중합체를 사용하여 캐리어와 유사하게 펩타이드의 혈중반감기를 유지할 수 있다. 그러므로, 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 중합체는 상기와 같은 역할, 즉 생체 내 단백질분해효소에 저항성 있는 중합체이면 제한없이 사용될 수 있다. 비펩타이드성 중합체는 분자량이 1 내지 100 kDa 범위, 바람직하게는 1 내지 20 kDa 범위인 것이 바람직하다. 또한, 상기 면역글로불린 Fc 영역과 결합되는 본 발명의 비펩타이드성 중합체는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.

[0045] 본 발명에 사용되는 비펩타이드성 중합체는 면역글로불린 Fc 영역 및 단백질 약물과 결합될 수 있는 반응기를 가진다.

- [0046] 상기 비펩타이드성 중합체의 양말단 또는 세말단을 가지며 반응기는 반응 알테히드 그룹, 프로피온 알테히드 그룹, 부틸 알테히드 그룹, 말레이미드(maleimide) 그룹 및 석시니미드(succinimide) 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 상기에서, 석시니미드 유도체로는 석시니미딜 프로피오네이트, 하이드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있다. 특히, 상기 비펩타이드성 중합체가 양말단에 반응 알테히드 그룹의 반응기를 갖는 경우, 비특이적 반응을 최소화하고, 비펩타이드성 중합체의 양 말단에서 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린과 각각 결합하는데 효과적이다. 알테히드 결합에 의한 환원성 알킬화로 생성된 최종 산물은 아미드 결합으로 연결된 것보다 훨씬 안정적이다. 알테히드 반응기는 낮은 pH에서 아미노 말단에 선택적으로 반응하며, 높은 pH, 예를 들어 pH9.0 조건에서는 라이신 잔기와 공유결합을 형성할 수 있다.
- [0047] 상기 비펩타이드성 중합체의 양말단 또는 세말단 반응기는 서로 같거나 다를 수 있다. 예를 들어, 한쪽 말단에는 말레이미드 그룹을, 다른 쪽 말단에는 알테히드 그룹, 프로피온 알테히드 그룹, 또는 부틸 알테히드 그룹을 가질 수 있다. 양쪽 말단에 하이드록시 반응기를 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)을 비펩타이드성 중합체로 이용하는 경우에는 공자의 화학반응에 의해 상기 하이드록시기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수 가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)을 이용하여 본 발명의 단백질 결합체를 제조할 수 있다.
- [0048] 또한 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 FacVIIa 결합체를 포함하는 혈액 응고용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0049] 바람직하게 본 발명은 혈우병, 출혈, 급성 내뇌출혈, 외상 및 FacVII 결핍을 포함하는 혈액 응고 관련 질병의 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0050] 본 발명에서 "투여"는, 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 결합체의 투여 경로는 약물이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비강내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등이 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여시, 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직하다. 바람직하게는 주사제 형태로 투여될 수 있다. 또한, 약제학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 결합체를 포함한 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구투여시에는 결합제, 활택제, 봉해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 혼탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘리서, 스스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 혼탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.
- [0052] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐파리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 약제학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중등도 등의 여러

관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다. 본 발명의 약제학적 조성물은 생체 내 지속성 및 역가가 우수하므로, 본 발명의 약제학적 제제의 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있다.

- [0054] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 (1) 말단에 알데히드, 말레이미드, 또는 석시니미드 유도체 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체를 사용하여 면역글로불린 Fc 영역의 아민 그룹에 공유결합으로 연결하는 단계;
- [0055] (2) 상기 (1)의 반응 혼합물로부터 비펩타이드성 중합체가 공유결합된 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 연결체를 분리하는 단계; 및
- [0056] (3) 분리된 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 FacVII을 공유결합으로 연결하여 비펩타이드성 중합체의 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 FacVII와 결합된 FacVII 결합체를 생성하는 단계;
- [0057] (4) 상기(3)에서 생성된 FacVII 결합체를 활성화하여 FacVIIa 및 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체를 통해 연결되는 FacVIIa 결합체를 생성하는 단계를 포함하는 FacVIIa 결합체 제조방법을 제공한다.

- [0058] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 (1) 각 말단에 알데히드 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체를 사용하여 면역글로불린 Fc의 N-말단에 pH5.0 내지 pH7.0에서 공유결합으로 연결하는 단계;
- [0059] (2) 상기 (1)의 반응 혼합물로부터 N-말단에 비펩타이드성 중합체가 공유결합된 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 연결체를 분리하는 단계; 및
- [0060] (3) 분리된 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 FacVII을 공유결합으로 연결하여 비펩타이드성 중합체의 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 FacVII와 결합된 FacVII 결합체를 생성하는 단계;
- [0061] (4) 상기(3)에서 생성된 FacVII 결합체를 활성화하여 FacVIIa 및 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체를 통해 연결되는 FacVIIa 결합체를 생성하는 단계를 포함하는 FacVIIa 결합체 제조방법을 제공한다.

- [0062] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 (1) 각 말단에 알데히드 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체를 사용하여 FacVII에 공유결합으로 연결하는 단계;
- [0063] (2) 상기 (1)의 반응 혼합물로부터 비펩타이드성 중합체가 공유결합된 FacVII를 포함하는 연결체를 분리하는 단계; 및
- [0064] (3) 분리된 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역을 공유결합으로 연결하여 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 FacVII으로 결합된 FacVII 결합체를 제조하는 단계;
- [0065] (4) 상기(3)에서 제조된 FacVII 결합체를 활성화하여 FacVIIa 및 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체를 통해 연결되는 FacVIIa 결합체를 생성하는 단계를 포함하는 FacVIIa 결합체 제조방법을 제공한다.
- [0066] 바람직하게 본 발명의 FacVIIa 결합체 제조방법에서 FacVII 결합체는 음이온 교환컬럼에 부착시킨 온-컬럼 활성화방법(autoactivation)을 통하여 FacVIIa 결합체로 활성화된다.
- [0067]
- [0068] 바람직하게 본 발명의 FacVIIa 결합체 제조방법의 FacVII는 FacVII의 N-말단이 비펩타이드성 중합체와 결합한다.
- [0069] 더욱 바람직하게 본 발명의 FacVIIa 결합체 제조방법의 FacVII는 FacVII의 경쇄의 N-말단이 비펩타이드성 중합체와 결합한다.

- [0070] 바람직하게 본 발명의 FacVIIa 결합체 제조방법의 FacVII는 천연형 FacVII, FacVII 아고니스트(agonist), 전구물질(precursors), 유도체(derivatives), 단편(fragment) 또는 변이체(variants)이고, 가장 바람직하게는 천연형 FacVII이다.
- [0071] 바람직하게 본 발명의 FacVIIa 결합체 제조방법의 FacVIIa는 천연형 FacVIIa, FacVIIa 아고니스트(agonist),

전구물질(precursors), 유도체(derivatives), 단편(fragment) 또는 변이체(variants)이고, 가장 바람직하게는 천연형 FacVIIa이다.

[0072] 바람직하게 본 발명의 FacVIIa 결합체 제조방법의 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA(폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 가장 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜이다.

[0073] 바람직하게 본 발명의 FacVIIa 결합체 제조방법의 비펩타이드성 중합체는 말단에 알데히드 유도체 반응기를 가지고 있으며, 더욱 바람직하게는 세 말단의 알데히드 반응기를 가지는 비펩타이드성 중합체이다.

발명의 효과

[0074] 본 발명의 FacVIIa 결합체는 FacVIIa의 생체 내 활성이 비교적 높게 유지되고, 혈중 반감기가 현저히 증가되어 혈액 응고 기능을 필요로하는 환자들의 복약순응도를 높일 수 있는 FacVIIa 지속형 제형 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0075] 도 1은 FacVIIa와 면역글로불린 Fc-PEG-FacVIIa의 SD 랫드에서의 시간별 혈중 농도 변화를 나타낸 그래프이다.

도 2는 Novoseven, FacVIIa, 면역글로불린 Fc-PEG-FacVIIa의 *in vitro* 효력 비교시험 결과이다.

도 3은 Novoseven, FacVIIa, 면역글로불린 Fc-PEG-FacVIIa의 *in vivo* 효력 비교시험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0076] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 면역글로불린 Fc-PEG-FacVIIa 결합체 제조

[0078]

[0079] 5K PropionALD(3) PEG (프로피온알데히드기를 3개 가지고 있는 PEG, NOF, 일본)를 면역글로불린 Fc의 N-말단에 폐길화시키기 위하여 면역글로불린 Fc 와 PEG의 몰비를 1 : 2, 면역글로불린 Fc 농도를 6 mg/ml로 하여 4°C에서 4.5 hrs 반응하였다. 이 때 반응은 pH 6.0 인 100mM 농도의 인산칼륨 완충액 내에서 이루어졌으며, 환원제인 20mM SCB (NaCNBH3)를 첨가하여 반응시켰다. 반응액은 SOURCE Q (LRC25 85ml, Pall Corporation)를 통하여 모노-폐길화 면역글로불린 Fc를 정제하였다. 그 후 FVII과 면역글로불린 Fc-5K PEG 몰비를 1 : 10, 전체 단백질 농도 20mg/ml로 하여 4°C에서 18시간 반응하였다. 반응액은 100mM 인산칼륨 pH6.0이며 환원제인 20mM SCB를 첨가하였다. 커플링 반응액은 두 개의 정제 컬럼을 거쳐 정제된다. 먼저 커플링 반응에 참여하지 않은 다량의 면역글로불린 Fc-5K PEG를 제거하기 위하여 SOURCE Q (LRC25 85ml, Pall Corporation)를 이용하였다. 20mM Tris(pH7.5)에서 1M NaCl을 사용하여 염 구배를 주면 상대적으로 결합력이 약한 면역글로불린 Fc-5K가 먼저 용출되고 뒤쪽으로 면역글로불린 Fc-3 arm PEG-FVII이 용출된다. 이후 FVII 및 FVII 다량체 불순물로부터 면역글로불린 Fc-3 arm PEG-FVII를 분리하기 위해 SOURCE ISO (GE Healthcare) column으로 이차 정제를 하였다. FVII, 면역글로불린 Fc-3 arm PEG-FVII, FVII 다량체 불순물이 차례대로 용출되었다.

[0080] 면역글로불린 Fc-3 arm PEG-FVII의 활성화를 위해 정제된 면역글로불린 Fc-3 arm PEG-FVII를 SOURCE Q에 채결합시킨 후 1.75 mM의 칼슘이온이 함유된 이동상을 6시간 동안 흘려주었다. 35mM의 칼슘이온으로 용출시켜 면역글로불린 Fc-3 arm PEG-FVIIa를 얻었다.

[0081] 컬럼 : Source Q (LRC25 85ml, Pall Corporation)

[0082] 유속 : 4 ml/분

[0083] 구배 : A 0 → 7% 1분 B, 7%→40% 80분 B (A: 20mM Tris pH7.5, B: A + 1M NaCl)

[0084] 컬럼 : SOURCE ISO (23ml, 16/10 HR column, GE Healthcare)

[0085] 유속 : 2 ml/분

[0086] 구배 : B 100 → 40% 60분 A (A: 20mM Tris pH7.5, B: A + 1.6M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

[0087] 컬럼 : Source Q (15ml, 16/10 HR column, GE Healthcare)

[0088] 유속 : 1ml/분

[0089] 이동상: 20mM Tris pH7.5 + 1.75mM CaCl₂ + 1.25mM NaCl

실시예 2. 20k PEG-FacVIIa(N) 결합체 제조

[0091] 20k mPEG 부틸알데히드 (Nektar, 미국)를 FVII의 N 말단에 페길화시키기 위하여 FVII와 20k PEG의 몰비를 1 : 5, FVII의 농도를 5mg/ml로 하여 4°C에서 10시간 반응하였다. 이 때 반응은 pH 5.0인 100mM 농도의 아세트산 나트륨 완충액 내에서 이루어졌으며, 환원제인 20mM SCB (NaCNBH_3)가 첨가되었다. 모노-페길화 FVII는 RESOURCE Q (1ml, prepacked, GE Healthcare)를 통해 정제되었다. 20mM Tris (pH7.5)에서 1M NaCl을 사용하여 염 구배를 주면 멀티-페길화 FVII, 모노-페길화 FVII, FVII 순으로 용출된다. 이후 FVII 및 FVII 다량체 불순물로부터 모노-페길화 FVII를 분리하기 위해 Superdex_200 (Hiroad 16/60, GE Healthcare) 컬럼으로 이차 정제를 하였다. 정제된 모노-페길화 FVII의 활성화를 위해 해당 물질을 SOURCE Q에 결합시킨 후 1.75mM의 칼슘이온이 함유된 이동상을 1시간 동안 흘려주었다. 35mM의 칼슘이온으로 용출시켜 모노-페길화 FVIIa를 얻었다.

[0092] 컬럼 : RESOURCE Q (1ml, prepacked, GE Healthcare)

[0093] 유속 : 0.5 ml/분

[0094] 구배 : A 0 → 50% 50분 B (A: 20mM Tris pH7.5, B: A + 1M NaCl)

[0095] 컬럼 : Superdex_200 (Hiroad 16/60 HR column, GE Healthcare)

[0096] 유속 : 1 ml/분

[0097] 이동상 : PBS

[0098] 컬럼 : RESOURCE Q (1ml, prepacked, GE Healthcare)

[0099] 유속 : 0.5ml/분

[0100] 이동상: 20mM Tris pH7.5 + 1.75mM CaCl₂ + 1.25mM NaCl

실시예 3. 20k PEG-FacVIIa(Lys) 결합체 제조

[0102]

[0103]

20k mPEG SPA (Nektar, 미국)를 FVII의 라이신(lysine)에 폐길화시키기 위하여 FVII와 20k PEG의 몰비를 1 : 5, FVII의 농도를 3mg/ml로 하여 상온에서 3시간 반응하였다. 이 때 반응은 pH 8.0인 100mM 농도의 인산나트륨 완충액 내에서 이루어졌다. 모노-폐길화 FVII는 RESOURCE Q (1ml, prepacked, GE Healthcare)를 통해 정제되었다. 20mM Tris (pH7.5)에서 1M NaCl을 사용하여 염 구배를 주면 멀티-폐길화 FVII, 모노-폐길화 FVII, FVII 순으로 용출된다. 이후 FVII 및 FVII 다량체 불순물로부터 모노-폐길화 FVII를 분리하기 위해 Superdex_200 (Hiroad 16/60, GE Healthcare) 컬럼으로 이차 정제를 하였다. 정제된 모노-폐길화 FVII의 활성화를 위해 해당 물질을 SOURCE Q에 결합시킨 후 1.75mM의 칼슘이온이 함유된 이동상을 1시간 동안 흘려주었다. 35mM의 칼슘이온으로 용출시켜 모노-폐길화 FVIIa를 얻었다.

[0104]

컬럼 : SOURCE Q (23ml, HR Column, GE Healthcare)

[0105]

유속 : 2 ml/분

[0106]

구배 : A 0 → 50% 50분 B (A: 20mM Tris pH7.5, B: A + 1M NaCl)

[0107]

컬럼 : Superdex_200 (Hiroad 16/60 HR column, GE Healthcare)

[0108]

유속 : 1 ml/분

[0109]

이동상 : PBS

[0110]

컬럼 : RESOURCE Q (1ml, prepacked, GE Healthcare)

[0111]

유속 : 0.5ml/분

[0112]

이동상: 20mM Tris pH7.5 + 1.75mM CaCl₂ + 1.25mM NaCl

[0113]

실시예4 . FVIIa와 면역글로불린Fc-PEG-FVIIa의 혈중 반감기 측정

[0114]

정상 SD 랫드에 100 mcg/kg의 FVIIa와 면역글로불린Fc-PEG-FVIIa를 정맥 투여한 후 ELISA 방법을 이용하여 혈중농도를 구하여 두 시험 물질의 약물동력학 계수를 비교하였다.

[0116]

FVIIa를 투여한 랫드는 약물 투여 후 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 24, 48시간 후, 면역글로불린Fc-PEG-FVIIa를 투여한 랫드는 투여 후 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 24, 48, 72, 96, 120시간 후에 경경맥을 이용하여 0.5mL의 혈액을 채혈하였다. sodium citrate를 함유하는 튜브에 혈액시료를 모아 응고를 방지하였고, 에펜도르프 고속 마이크로원심분리기에서 5분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 혈장 내 단백질 양은 FVIIa에 대한 항체를 이용하여 ELISA방법(IMUBIND, Factor VIIa ELISA Kit, american diagnostica inc.)으로 측정하였다.

[0117]

FVIIa와 면역글로불린Fc-PEG-FVIIa의 혈중농도 그래프와 약물동력학 분석 결과를 그래프 1과 표 3에 나타내었다. 표에서 Tmax는 최고 약물농도에 도달하는 시간을, T1/2는 약물의 혈중반감기를, MRT(mean residence time)는 약물 분자의 평균적인 체내 체류시간을 의미한다.

[0118]

표 1 및 [도1]에서 알 수 있듯이, 면역글로불린Fc-PEG-FVIIa의 혈중반감기는 약 60 시간으로 우수한 혈중반감기를 나타냄을 확인하였다.

표 1

	FVIIa	면역글로불린Fc-PEG-FVIIa
Tmax(hr)	0.25	0.25

T1/2(hr)	0.284	60.4
MRT(hr)	0.63	32.71

[0120] SD 랫드에서 FVIIa와 면역글로불린Fc-PEG-FVIIa의 약물동력학 시험 결과

[0121] 실시예5 . FVIIa와 면역글로불린Fc-PEG-FVIIa의 in vitro 활성 측정

[0122]

[0123] 천연형 FVIIa와 실시예 1에서 제조한 면역글로불린Fc-PEG-FVIIa의 in vitro 활성을 측정하기 위하여 상용 kit (Chromogenix, COASET)를 이용하여 chromogenic assay를 진행하였다. 상용 대조품으로 사용 된 Novoseven은 Novo nordisk 사에서 판매중인 유전자 재조합 FVIIa로, 혈우병 환자의 출혈과 수술시 지혈 작용을 적응증으로 하고 있는 의약품이다.

[0124] 활성 측정 시험은 유럽약전 "2.7.10. ASSAY OF HUMAN COAGULATION FACTOR VII"에서 기술 된 내용을 바탕으로 진행하였다. 농도 별 희석 된 Novoseven, FVIIa와 면역글로불린Fc-PEG-FVIIa가 FX을 FXa로 활성화 시키고, 활성화 된 FXa에 의해 기질로 사용 된 S-2765가 가수분해 되어 peptide와 chromophoric group인 pNA로 분해된다. 분해 된 pNA는 노란 색을 띠므로 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값과 처리 된 약물의 농도 값을 이용하여 dose response curve와 EC50값을 확인하였다. 시험 결과, 면역글로불린Fc-PEG-FacVIIa의 EC50값은 50.72 ng/mL로 Novoseven에 비해 27배 높은 EC50값을 가졌다 [도2].

표 2

	Lot. No.	EC50 (as FVIIa)
Novoseven	PU60399	1.87 ng/mL
FVIIa	B13160-PJE271	1.77 ng/mL
면역글로불린Fc-PEG-FacVIIa	B13160-LJE131	50.72 ng/mL

[0126] 상용 대조품 Novoseven, FVIIa, 면역글로불린Fc-PEG-FVIIa 의 EC50과 specific activity 수치

[0127] 실시예 6 . FVIIa와 면역글로불린Fc-PEG-FVIIa의 in vivo 효력 측정

[0128] FVIIa와 면역글로불린Fc-PEG-FVIIa의 in vivo 활성을 측정하기 위하여 warfarin 전 투여한 SD 랫드에서 시험 물질 투여에 따른 in vivo FVII(a) 활성을 측정하였다. 상용 대조품으로 사용 된 Novoseven은 Novo nordisk 사에서 판매중인 유전자 재조합 FVIIa로, 혈우병 환자의 출혈과 수술시 지혈 작용을 적응증으로 하고 있는 의약품이다.

[0129] Factor II, IX, X, VII과 같은 비타민 K-의존성 응고 인자들의 감마-카르복실화를 저해하는 물질인 Warfarin을 24시간 전에 전투여 한 SD 랫드에 Novoseven과 FVIIa, 면역글로불린Fc-PEG-FVIIa 250 µg을 정맥 투여 한 후, 04. 4, 24, 48 시간 후에 경정맥을 이용하여 1 mL의 혈액을 구연산 나트륨을 함유하는 튜브를 이용해 채혈 하였고, 원심분리를 통해 혈청을 분리하였다. 분리 된 혈청에서 FVII (%)의 활성은 ACL9000 (Werfen group)을 이용하여 측정하였다.

[0130] 시험 결과, FVIIa의 in vivo 활성은 Novoseven과 유사한 활성을 가졌으며, 면역글로불린Fc-PEG-FVIIa의 활성은 투여 후 25분과 4시간에서 Novoseven에 비해 낮은 활성을 보였지만 투여 후 24시간 후에는 Novoseven 대비 6.5배 높은 활성을 유지하였다[표3, 도3].

표 3

[0131]

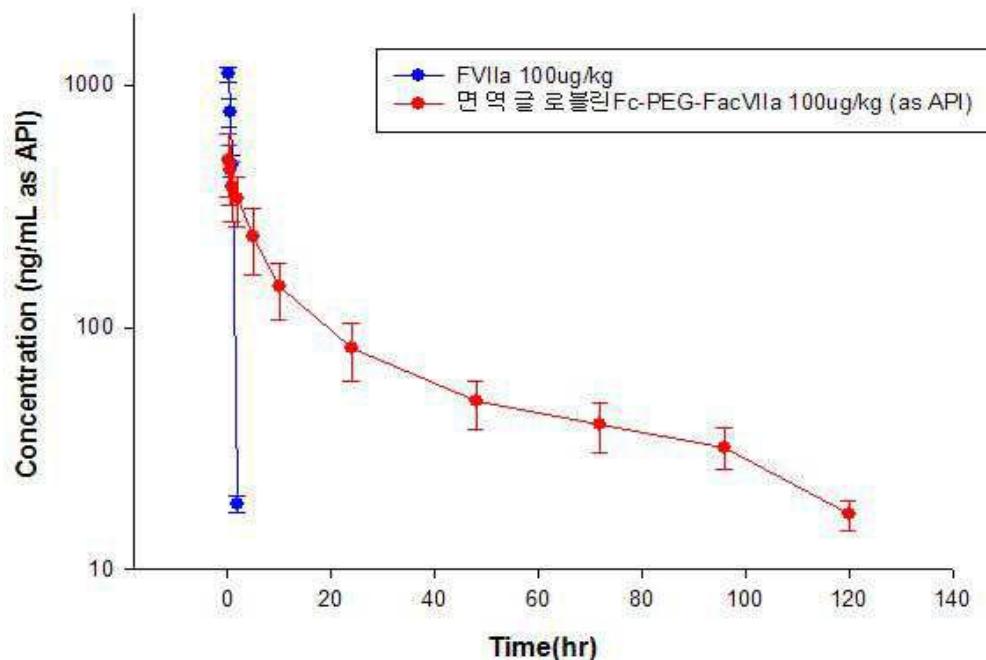
Group		FVII(%)			
		25 min	4 hr	24 hr	48 hr
Non-treat	Vehicle	218.8±39.1	183.6±9.4	240.8±40.1	239.4±24.6
Wafarin Pre-treatment 10 mg/kg	Vehicle	3.5 ±1.5	2.6±0.7	3.0±0.8	16.9±11.5
	Novoseven	762.6±138.1	298.2±169.1	3.2±0.8	28.7±26.0
	FVIIa	838.8±147.9	303.8±59.2	4.7±3.6	39.5±44.2
	면역글로불린Fc-P EG-FacVIIa	295.8±51.3	217.6±34.1	20.8±5.3	27.9±24.0

[0132]

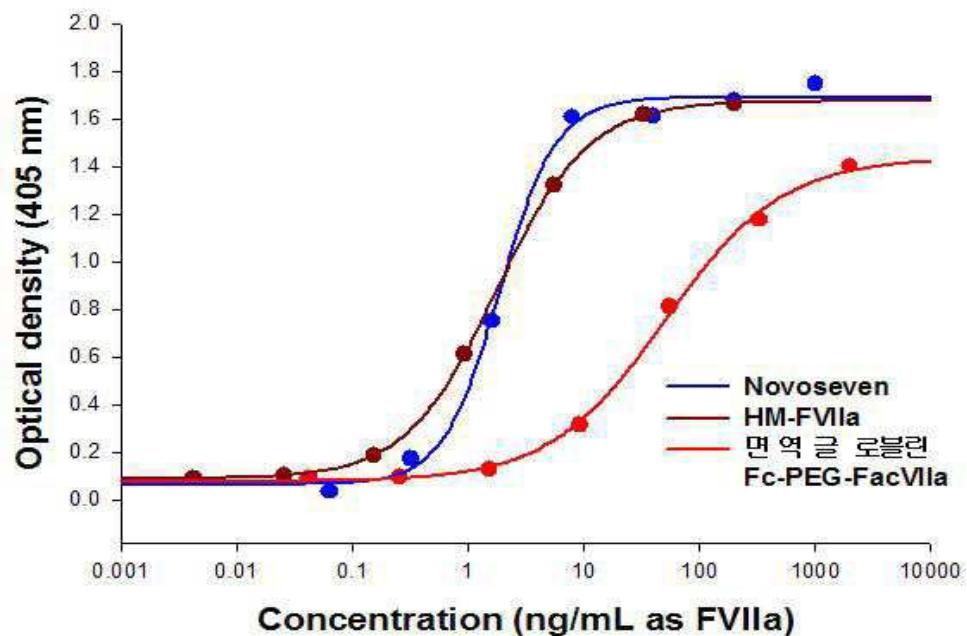
상용 대조품 Novoseven, FVIIa, 면역글로불린Fc-PEG-FVIIa의 시간에 따른 In vivo 활성 결과

도면

도면1



도면2



도면3

