



등록특허 10-2310704



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년10월08일
 (11) 등록번호 10-2310704
 (24) 등록일자 2021년10월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/59 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) *A61P 17/02* (2006.01)
A61P 41/00 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01) *C07K 14/745* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/59 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7015367(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2013년02월05일
 심사청구일자 2020년06월29일
- (85) 번역문제출일자 2020년05월28일
- (65) 공개번호 10-2020-0063274
- (43) 공개일자 2020년06월04일
- (62) 원출원 특허 10-2014-7025500
 원출원일자(국제) 2013년02월05일
 심사청구일자 2018년02월05일
- (86) 국제출원번호 PCT/IL2013/050107
- (87) 국제공개번호 WO 2013/121416
 국제공개일자 2013년08월22일
- (30) 우선권주장
 13/372,540 2012년02월14일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 KR1020080093148 A*
 WO2011004361 A2*
 KR1020110008084 A
 KR102118729 B1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 13 항

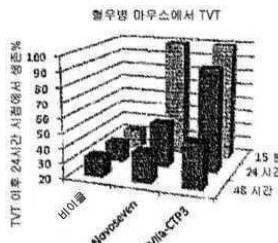
심사관 : 정지혜

(54) 발명의 명칭 장기 작용 응고 인자들 및 이를 생산하는 방법들

(57) 요약

응고 인자의 카르복시 말단에 부착되어 있지만, 응고 인자의 아미노 말단에는 부착되지 않은 용모막 고나도트로핀의 적어도 하나의 카르복시-말단 웨პ티드(CTP)를 포함하는 폴리웨პ티드와, 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 공개한다. 본 발명의 상기 폴리웨პ티드 및 폴리뉴클레오티드가 포함된 약제학적 조성물, 이를 이용하고 생산하는

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도30d

방법들이 또한 공개된다.

(52) CPC특허분류

A61P 1/16 (2018.01)
A61P 17/02 (2018.01)
A61P 41/00 (2018.01)
A61P 43/00 (2018.01)
A61P 7/00 (2018.01)
C07K 14/745 (2013.01)
C07K 2319/31 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

활성화된 응고 인자 FVII(FVIIa), 및

상기 FVIIa의 카르복시 말단에 부착된 3개의 CTP

로 이루어진 융모막 고나도트로핀 카르복시 말단 펩티드(CTP)-변형된 활성화 응고 인자 FVII(FVIIa) 폴리펩티드로서,

상기 CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리펩티드는 서열번호 25의 아미노산 39-528의 아미노산 서열을 갖고,

상기 CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리펩티드는 이황화-결합된 2개의 쇄를 갖는 이종이량체의 형태이며,

상기 폴리펩티드는 서열번호 25의 아르기닌 152에서 절단된 것인,

CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리펩티드.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 하나 이상의 CTP가 당화된, CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리펩티드.

청구항 4

제1항에 있어서, 하나 이상의 CTP가 링커를 통해 상기 응고 인자에 부착되는, CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리펩티드.

청구항 5

제4항에 있어서, 링커가 펩티드 결합인, CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리펩티드.

청구항 6

제1항 및 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 피험체에서 혈액 응고 또는 응고 장애의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약제 제조용으로 사용되는, CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리펩티드.

청구항 7

제6항에 있어서, 혈액 응고 또는 응고 장애가 혈우병인, CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리펩티드.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 혈우병이 혈우병 A인, CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리펩티드.

청구항 9

제6항에 있어서, 피하 투여용으로 사용되는, CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리펩티드.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 피험체는 어린이인, CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리펩티드.

청구항 11

제1항 및 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리펩티드, 및 약학적으로 허용되는 담체

를 포함하는, 혈액 응고 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

제1항 및 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리펩티드를 포함하는, 혈액 응고 장애의 예방 또는 치료용 약제.

청구항 13

응고 인자의 생물학적 반감기를 연장하거나, 응고 인자의 곡선하 면적(AUC)을 개선하거나, 응고 인자의 투여 빈도를 감소시키거나, 또는 응고 인자의 제거 속도를 감소시키는 방법으로서,

상기 방법은 3개의 융모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드들(CTPs)을 FIX 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착하여, 제1항 및 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리펩티드를 생산하는 단계를 포함하고,

이로써 응고 인자의 생물학적 반감기가 연장되거나, 곡선하 면적(AUC)이 개선되거나, 투여 빈도가 감소되거나, 또는 제거 속도가 감소되는,

방법.

청구항 14

3개의 융모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프타이드(CTP)를 FVIIa 폴리펩타이드의 카르복시 말단에 부착시켜 CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리펩티드를 생산하는 단계

를 포함하는, 제1항 및 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리펩티드의 생산 방법.

청구항 15

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 융모막 고나도트로핀의 적어도 하나의 카르복시-말단 웨프티드(CTP)가 포함된 폴리펩티드 그리고 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 공개된다. 본 발명의 상기 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드가 포함된 약제학적 조성물과, 이를 생산 및 이용하는 방법도 또한 공개된다.

배경 기술

[0002] 응고 인자 대체 요법의 개발로 혈우병을 가진 많은 개인들의 삶이 변화되었다. 혈우병은 혈액 응고 또는 응고를 제어하는 신체의 능력을 손상시키는 일단의 유전 장애이다. 혈우병이 있는 환자들은 효과적인 혈액 응고에 필수적인 인자 VIII (FVIII) 또는 인자 IX (FIX) 단백질들을 충분하게 생산할 수 없다. 종종 혈우병 환자들에게는 비록 작은 손상일지라도 며칠 또는 몇 주간 지속되는 혈액 손실을 초래할 수 있으며, 그리고 완전한 치유는 되지 않고, 관절 및 기타 장기들을 쇠약하게 하는 영구적인 손상 가능성과, 조기 사망으로 이어질 수 있다.

[0003] 혈우병의 한 가지 유형인 B형 혈우병은 상기 FIX 유전자에서 돌연변이에 의해 유발되는 X-연계된(linked) 출혈 장애로서, FIX의 응혈촉진 활성 결핍이 초래된다. B형 혈우병 환자들은 자발적 연조직 출혈과 재발성 혈관절증(hemarthroses)을 앓는데, 대개 심각한 관절증으로 진행된다. 이를 환자들을 위한 현재 치료는 재조합 FIX의 정맥 투여가 포함된다. 그러나 비용 문제와 순환계로부터 FIX의 상대적으로 신속한 제거 문제는 장기-작용 FIX의 개발을 힘들게 한다.

[0004] FVIII 및 FIX의 상업적 이용가능성은 생명을 위협하는 출혈 사건들의 통제를 개선시켰다. 많은 환자들은 출혈 및 이와 연합된 여병 위험을 감소시키는 예방 요법을 제공받는다. 그러나, 상당 비율(10-30%)의 환자들은 외부

생성 투여된 FVIII 및 FIX에 대항하여 억제성 항체들을 만든다. 우회 산물(bypassing product)인 FVIIa의 투여는 생체항상성을 유도할 수 있고, 억제성 Abs를 보유하는 환자들에게 효과적인 치료를 제공할 수 있다.

[0005] 재조합 FVIIa(NovoSeven®)는 시판되며, 억제제들을 보유하는 혈우병 환자들의 출혈 치료를 위하여 1996년에 승인되었다. 그러나, rFVIIa는 2.5 시간의 말기 반감기(terminal half-life)에 의해 신속하게 제거된다. 그 결과, 환자들은 작은 출혈 내지 중간 농도의 출혈 이후 충분한 생체항성성을 얻기 위하여, 일반적으로 다중의, 빈번한 주입(2-3 시간 간격으로 2-3회 투여량)이 필요하다. 결과적으로, 단일 투여 이후 지혈 활성 기간을 연장시키고, 투여 빈도를 상당히 줄일 수 있는 장기-작용(long-acting) 형태의 FVIIa를 개발하는 데 상당한 관심이 집중된다. 장기-작용 FVIIa는 장기적 예방 요법의 실현 가능성도 또한 증가시킬 것이다.

[0006] 상기 FVIIa의 반감기 연장을 위한 다양한 기술들이 개발되고 있다. 그러나, 상기 단백질의 생물학적 활성을 보전되면서, 상기 단백질의 연장된 반감기를 얻고, 그리고 상기 변형에 의해 심각한 면역원성(immunogenicity)이 유도되지 않도록 하는 것은 힘들다.

발명의 내용

발명의 요약

[0008] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드와 상기 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드를 제공한다.

[0009] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드와 상기 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드가 포함된 약제학적 조성물을 제공한다.

[0010] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드와 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0011] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드와 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현 벡터를 제공한다.

[0012] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드와 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

[0013] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드와 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현 벡터를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0014] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 생물학적 반감기를 연장시키는 방법을 제공하는 데, 상기 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)를 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 생물학적 반감기가 연장된다.

[0015] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 곡선하 면적(AUC)를 개선시키는 방법을 제공하는 데, 이 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)를 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 AUC는 개선된다.

[0016] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 투여 빈도를 감소시키는 방법을 제공하는 데, 이 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)를 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 투여 빈도를 감소시킨다.

[0017] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 제거 속도(clearance rate)를 감소시키는 방법을 제공하는 데, 이 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)를 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 제거 속도(clearance rate)를 감소시키는 방법을 제공하는 데, 이 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)를 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 제거 속도(clearance rate)를 감소시킨다.

리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 제거 속도는 감소된다.

[0018] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드를 생산하는 방법을 제공하는 데, 이 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프트드(CTP)를 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드가 생성된다.

[0019] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 피험체에게서 혈우병을 치료하는 방법을 제공하는 데, 이 방법은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드와 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프트드(CTP)를 포함하는 CTP-변형된 FIX(FIX) 폴리펩티드를 상기 피험체에게 투여하는 것을 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 피험체의 혈우병은 치료된다.

[0020] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 피험체에서 혈액 응고 또는 응고 장애를 예방하는 방법을 제공하는 데, 이 방법은 상기 피험체에게 상기 인자 VII (FVII) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3 내지 5개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프트드(CTP)를 포함하는 CTP-변형된 응고 인자를 투여하는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 피험체에서 혈우병이 예방된다.

[0021] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 피험체에서 혈액 응고 또는 응고 장애를 치료하는 방법에 관계되며, 상기 방법은 상기 피험체에게 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 3 내지 5개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프트드(CTP)를 포함하는 CTP-변형된 응고 인자를 투여하는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 피험체에서 혈우병이 예방된다.

[0022] 본 발명의 다른 특징들 및 장점들은 다음의 상세한 설명 및 도면으로부터 자명해질 것이다. 그러나, 본 발명의 바람직한 구현예들로 명시된 상세한 설명 및 특정 실시예들은 오로지 설명을 위하여 제공된 것이며, 본 상세한 설명으로부터 본 발명의 범위 및 사상 안에서 다양한 변화 및 변형이 될 수 있음을 당업자들에게 자명할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0023] **도 1a.** $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 비타민 K3 존재하에 FIX-CTP 및 FIX-CTP-CTP 변이체들로 제한된, 희석된, 형질감염된, 그리고 선별된 세포들을 보여주는 막대 그래프. FIX의 농도는 Human FIX ELISA 키트(Affinity Biologicals; Cat. No. FIX-AG RUO)를 이용하여 정량화되었으며, 그리고 산출된 단백질 농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)는 두 개의 독립적인 실시의 평균이다. 도 1b는 FIX Ab 인지의 SDS-PAGE 겔 현미경 사진으로, 현미경 사진 a는 웨스턴-블롯에서 항-FIX 항체의 인지를 도시하고; 현미경 사진 b는 웨스턴-블롯에서 항- γ 카르복실화 항체의 인지를 도시한다. a-b에서 레인 1에는 재조합 FIX가 함유된 시료가 적재되었으며, A-B에서 레인 2에는 FIX-CTP 수확물(harvest)이 함유된 시료가 적재되었다. A-B에서 레인 3에는 FIX-(CTP)₂ 수확물이 포함된 시료가 적재되었다.

도 2. rhFIX(American Diagnostics)와 비교하였을 때, FIX-CTP 및 FIX-(CTP)₂ 수확물들의 비교 색원성 활성 (EC_{50} 농도로 측정되었을 때)을 보여주는 그래프.

도 3. rhFIX, FIX-CTP-CTP의 수확물, 및 FIX-CTP의 수확물의 PK 프로파일을 보여주는 그래프.

도 4. 인간 FIX ELISA 키트(Affinity Biologicals; 카탈로그 번호 FIX-AG RUO)를 이용하여 측정될 때, FIX-CTP의 수확물들 및 FIX-CTP-CTP 수확물들 그리고 FIX-CTP-CTP 정제된 단백질 FIX 항원 농도를 보여주는 막대 그래프. 상기 산출된 단백질 농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)는 2회의 독립적인 실시의 평균이다.

도 5. FIX Ab 인지의 SDS-PAGE 겔 현미경 사진들을 나타낸다. 현미경 사진 A는 코마시 블루(coomassie blue)착색을 나타내며; 현미경 사진 B는 웨스턴-블롯에서 항-FIX 항체의 인지를 나타내며; 현미경 사진 C는 웨스턴-블롯에서 항- γ 카르복실화 항체의 인지를 나타낸다. A-C에서 레인 1에는 FIX-(CTP)₂가 포함된 시료가 적재되었다. A-C에서 레인 2에는 결합안된 FIX-(CTP)₂가 포함된 시료가 적재되었다. A-C에서 레인 3에는 FIX-(CTP)₂의 농축된 용리액이 포함된 시료가 적재되었다.

도 6. 인간 정상적인 혼주 혈장 및 rhFIX(American Diagnostics)와 비교하였을 때, FIX-(CTP)₂ 색원성 활성(시료 농도/O.D.)을 보여주는 그래프.

도 7. 정제된 FIX-CTP-CTP, rhFIX, FIX-CTP-CTP의 수확물, 그리고 FIX-CTP의 수확물의 PK 프로파일을 보여주는

그래프.

도 8. 항-CTP 및 항-감마 카르복실화 항체들을 보여준다. 3개, 4개 또는 5개 CTPs에 융합된 FIX, FIX-CTP₃, FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅ 수확물들의 웨스턴 블로트는 Precision Plus Dual Color Protein Marker(Bio-Rad)를 이용하여 12% Tris-글리신 겔 상에 적재되었다. 상기 SDS-PAGE 분석은 항-CTP 다클론 Ab(Adar Biotech Production) 또는 항-G1a Ab(American Diagnostica)를 이용하여 웨스턴 면역-블로트에 의해 시행되었다.

도 9. FIX-CTP₃, FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅의 코마시 블루 탐지를 나타낸다. Jacalin 컬럼(당화된 단백질들의 면역 친화성 정제)을 이용한 정제 공정 후, FIX-CTP₃, FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅는 Precision Plus Dual Color Protein Marker(Bio-Rad)를 이용하여 12% Tris-글리신 겔 상에 적재되었다. 상기 SDS-PAGE는 시료 탐지용 코마시 블루 염료에 의해 착색되었다.

도 10. FIX 색원성 활성을 나타냄. 완전하게 정제된 (HA 컬럼) FIX-CTP₃, FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅ 대(versus) 정상적인 혼주 인간 혈장의 시험관내 효능(potency)의 비교 평가는 시판되는 색원성 활성 테스트 키트, BIOPHEN(Hyphen BioMed 221802)를 이용하여 시행되었다. 모든 시료는 연속적으로 희석되었고, 정상적인 인간 혈장으로 구성된 기준 제제에 대한 투여분량 반응 곡선(dose response curve)의 비교에 의해 상기 효능이 평가되었다.

도 11. FIX-CTP₃, FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅의 비교 약동학 (PK) 프로파일을 나타냄. 혈장 시료 안에 FIX 농도는 인간 FIX Elisa 키트(Affinity Biologicals)를 이용하여 정량화되었다. 약동학 프로파일이 산출되었으며, 이는 각 시점에서 3마리 동물의 평균이다. PK Solutions 2.0 소프트웨어를 이용하여 말기 반감기가 산출되었다.

도 12. FIX-(CTP)₃ SDS-PAGE 분석 - Coomassie SDS-PAGE를 나타낸다. FIX-(CTP)₃ γ-카르복실화된 농축(enriched) 단백질, rhFIX 및 rFIXa(활성화된 FIX)는 Precision Plus Dual Color Protein Marker(Bio-Rad)를 이용하여 12% Tris-글리신 겔 상에 적재되었다. 상기 SDS-PAGE Coomassie 분석은 Commasie 블루 시약(800 ng의 단백질)으로 겔을 착색시켜 시행되었다(도 12a). 웨스턴 면역블로트는 항-인간 FIX 다클론 Ab(도 12b), 항-인간 감마 카르복실화 단클론 항체(American Diagnostics Cat #499, 3570) (도 12c), 항-FIX 프로-펩티드 다클론 Ab(도 12d), 그리고 항-CTP 다클론 Ab(도 12e)와 함께 100 ng의 단백질을 이용하여 시행되었다.

도 13: 상기 FIX-(CTP)₃ 색원성 활성을 나타냄. FIX-(CTP)₃ 수확물과 FIX-(CTP)₃ γ-카르복실화된 농축 단백질 대(vs.) 정상적인 혼주 인간 혈장의 시험관내 효능의 비교 평가는 시판되는 색원성 활성 테스트 키트, BIOPHEN(Hyphen BioMed 221802)를 이용하여 시행되었다. FIX-(CTP)₃ 수확물과 단백질은 연속적으로 희석되었고, 정상적인 인간 혈장으로 구성된 기준 제제에 대한 투여분량 반응 곡선(dose-response curve)의 비교에 의해 상기 효능이 평가되었다.

도 14: 비교 응고 시간을 나타냄. 시험관내 aPTT (활성화된 부분적 트롬빈 시간 분석)은 BeneFIX에 대한 FIX-(CTP)₃의 응고 활성을 비교하여 시행되었다. 상기 단백질들 연속적으로 희석되었고, 그리고 인간 FIX-감소된(depleted) 혈장에 섞였고(spiked), 그리고 상기 응고 시간이 측정되었다.

도 15. FIX-(CTP)₃ 비교 PK 프로파일을 나타낸다. FIX 농도는 인간 FIX ELISA 키트(Affinity Biologicals; Cat. # FIX-AG RUO)를 이용하여 정량화되었다. 각 단백질에 대한 상기 약동학 프로파일이 산출되었고, 이것은 각 시점에서 3마리 동물의 평균이다.

도 16. 활성 프로파일 매개변수를 나타낸다. PK 표본추출과 평행하게, BeneFIX® 또는 FIX-(CTP)₃, 구연산염 혈장 시료가 투여된 FIX-결핍 동물에서 aPTT 분석에 의해 이들의 응고 활성이 평가되었으며, 활성 %로 해석되었다. 각 수집 시점에서 상기 활성 %는 현재 응고 시간/정상적인 마우스 혼주 혈장의 응고시간*100으로 산출되었다.

도 17. 제 1 유발(challenge) 출혈 매개변수를 나타낸다. FIX-결핍 마우스에게 100 IU/Kg의 BeneFIX® 또는 rFIX-(CTP)₃가 단일 정맥 주사로 투여되었다. 투약 후 48시간 시점에 꼬리 정맥이 약간 절단되었고, 그리고 꼬리 정맥 출혈 시간(TVBT) 및 출혈 강도 (헤모글로빈 OD)가 평가되었다. 제 2 출혈 유발은 생체항상성에 도달된 후 15분에 시행되었고, 동일한 매개변수가 측정되었다.

도 18. 제 2 유발 출혈 매개변수를 나타낸다. 도 17에 대한 범례에서 설명된 제 1 출혈이 자발적으로 또는 수작

업에 의해 중단되면, 제 2 출혈 유발은 제 1 유발 이후 15분에 시행되었고, 상기 시간 및 출혈 강도가 재측정되었다.

도 19. rFVII-CTP 구조체(A), rFVII-CTP-CTP 구조체(B), rFIX-CTP 구조체(C), 그리고 rFIX-CTP-CTP 구조체(D)을 설명하는 도표다.

도 20a. 5 μ g/ml의 비타민 K3 존재하에 FVII-CTP 변이체들로 형질감염된 제한된 희석된 클론 및 선별된 세포 수확물을 나타내는 막대 그래프를 보여준다. FVII의 농도는 FVII ELISA(AssayPro)를 이용하여 정량화되었다.

도 20b. 5 μ g의 비타민 K3 존재하에 FVII-CTP 변이체들로 형질감염된 제한된 희석된 선별된 세포 수확물을 나타내는 막대 그래프를 보여준다. FVII 활성은 FVII 색원성 활성 분석 (AssayPro)을 이용하여 정량화되었다..

도 20c. 5 μ g의 비타민 K3 존재하에 FVII-CTP 변이체들로 형질감염된 제한된 희석된 선별된 세포 수확물을 나타내는 막대 그래프를 보여준다. 상기 활성 값을 수확물 FVII 농도로 나눔으로써 각 형태에 있어서 FVII의 특이 활성이 산출되었다.

도 20d. FVII, FVII-CTP-CTP, 및 FVII-CTP 수확물들의 PK 프로파일을 보여주는 그래프.

도 21. 항-FVII, 항-CTP, 그리고 항-γ 카르복실화 항체들을 이용하여 3, 4, 5개 CTPs에 융합된 FVII의 웨스턴 블롯을 나타냄. FIX-CTP₃, FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅ 수확물들은 Precision Plus Dual Color Protein Marker (Bio-Rad)을 이용한 12% Tris-글리신 겔 (expedeon) 상에 적재되었다. 상기 SDS-PAGE 분석은 항-FVII Ab, 항-CTP 다 클론 Ab(Adar Biotech Production) 또는 항-Gla Ab(American Diagnostica)를 이용한 웨스턴 면역블롯에 의해 시행되었다.

도 22. FVII 활성-색원성 활성을 나타낸다. HA 정제된 (상당하게 감마 카르복실화된 분획물(fraction)) FVII-CTP₃, FVII-CTP₄, 및 FVII-CTP₅ 대(versus) 정상적인 혼주 인간 혈장의 시험관내 효능의 비교 평가는 시판되는 색원성 활성 테스트 키트, BIOPHEN(Hyphen BioMed 221304)을 이용하여 실시되었다. 모든 시료는 연속적으로 희석되었고, 정상적인 인간 혈장으로 구성된 기준 제제에 대한 투여분량 반응 곡선의 비교에 의해 상기 효능이 평가되었다.

도 23. 제 1 비교 약동학 (PK) 프로파일-FVII 3, 4 및 5 CTPs. FVII-CTP₃, FVII-CTP₄, 및 FVII-CTP₅(군 A, B 및 C, 차례로)는 Sprague Dawley 쥐들(한 치료당 6마리 쥐)에게 체중 kg당 250 μ g 투여분량으로 단일 정맥 주사에 의해 투여되었다. 투여 후 0.083, 0.5, 2, 5, 8, 24, 48, 72 및 96 시간 시점에서 3마리의 쥐로부터 교대로 후면-안와로부터 혈액 시료를 빼내었다. 표본추출 후 즉시 구연산염 혈장 (0.38%)이 준비되었고, 분석까지 -20°C에 보관되었다. FVII-(CTP)₅는 다른 두 가지 형태와 비교하였을 때 우수한 프로파일을 나타내었다.

도 24. 제 2 비교 PK 프로파일-FVII 3, 4 및 5 CTPs를 나타낸다. FVII 선별 및 상기 HA 정제 공정 (군 A, B 및 C, 차례로)이후 FVII-CTP₃, FVII-CTP₄, 및 FVII-CTP₅는 체중 kg 당 29.45 μ g의 투여 분량에서 Sprague Dawley 쥐들(률질당 3마리 쥐)에게 단일 정맥 주사로 투여되었다. 투여 후 0.083, 0.5, 2, 8, 24, 48 및 72 시간 시점에서 후면-안와로부터 혈액 시료를 빼내었다. 표본추출 후 즉시 구연산염 혈장 (0.38%)이 준비되었고, 분석까지 -20°C에 보관되었다.

도 25. FVII-CTP3 정제 공정의 개요 도식을 나타낸다. 배치(Batch) 31은 상기 PK/PD 연구용으로 생산되었다. 배치 38는 생존 연구용으로 생산되었다.

도 26. 최종 FVII 및 FVIIa의 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯을 나타낸다. 10 μ g (배치 31) 또는 5 μ g(배치 38)은 Coomassie 착색된 SDS-PAGE의 각 레인에 적재되었다. 1 μ g 단백질은 웨스턴 블롯의 각 레인에 적재되었다. 1. FVII-CTP₃ 폴리펩티드; 2. 중쇄, 3x CTP가 포함됨; 3. 경쇄. 3개의 모든 항체가 FVII를 탐지한다. FVIIa 중쇄는 α-CTP에 의해 탐지되었고, 경쇄는 α-FVII 및 α-Gla 두 가지 모두에 의해 탐지되었다.

도 27. FVII-CTP₃ 색원성 활성을 세라믹 히드록시아파타이트(HA) 컬럼 상에서 정제에 의해 강화되었다는 것을 나타낸다. FVII-CTP₃ 수확물, 공정중인(in-process) 분획물, 그리고 정제된 FVII-CTP₃ 대(versus) 정상적인 혼주 인간 혈장의 시험관내 효능의 비교 평가는 시판되는 색원성 활성 테스트 키트, BIOPHEN(Hyphen BioMed 221304)을 이용하여 시행되었다. FVII-CTP3 수확물과 단백질은 연속적으로 희석되었고, 그리고 정상적인 인간 혈장으로 구성된 기준 제제에 대한 투여분량 반응 곡선의 비교에 의해 상기 효능이 평가되었다.

도 28. FVIII-결핍 마우스에서 FVIIa-CTP₃ vs. NovoSeven®의 상기 PK 프로파일을 나타낸다. FVIIa-CTP₃은 FVII 선별, HA 정제 공정 그리고 활성화이후에 생산되었다. FVIIa-CTP₃ 또는 NovoSeven®는 FVIII-/− 혈우병 마우스에게 단일 정맥 주사에 의해 투여되었다. 투여 후 0.083, 0.5, 2, 8, 24, 48 및 72 시간 시점에서 후면-안와로부터 혈액 시료를 빼내었다. 표본추출 후 즉시 구연산염 혈장(0.38%)이 준비되었고, 분석까지 -20°C에 보관되었고, 그리고 PK 프로파일은 STACLOT 시판 키트를 이용하여 FVIIa 응고 활성에 근거하여 확증되었다.

도 29. FVIIa-CTP₃은 FVII 선별, HA 정제 공정 그리고 활성화이후에 생산되었다는 것을 보여준다. FVIIa-CTP₃ 또는 NovoSeven®는 FVIII-/− 혈우병 마우스에게 단일 정맥 주사에 의해 투여되었다. 투여 후 0.083, 0.5, 2, 8, 24, 48 및 72 시간 시점에서 후면-안와로부터 혈액 시료를 빼내었다. 표본추출 후 즉시 구연산염 혈장(0.38%)이 준비되었고, 분석까지 -20°C에 보관되었다. 트롬빈 생성 배개변수는 상기 PK 실험 동안 평가되었으며, 그리고 정점까지의 최대량, 시점까지 트롬빈 양 그리고 트롬빈 생성 속도가 포함된 배개변수가 평가되었다.

도 30. 꼬리 정맥 횡절단(TVT) 후 혈우병 마우스 생존 곡선을 나타낸다. 투여후 TVT는 (a) 15 분, (b) 24 시간 또는 (c) 48 시간에 시행되었다. TVT 이후 마우스 생존은 24 시간 동안 관찰되었고, 첫 12시간 동안 1시간마다, 그리고 24시간 이후에 기록되었다. 도 30d는 TVT 이후 24시간에 기록된 마우스의 생존을 요약한다. 대조군 데이터(담체)는 실험당 5 마리 마우스로 3회 실험의 요약이다.

도 31. FVII-3-CTP 및 FVII-5 CTP 면역-블롯을 나타낸다. A) GLA에 대해 블롯됨. B) FVIIa에 대해 블롯됨. C) CTP에 대해 블롯됨.

도 32. 선별 HA 컬럼 정제(FVIIS 대 FVII HA)로부터 비교 PK 프로파일-FVII 3 & 5 CTP를 나타낸다.

도 33. 비교 PK 프로파일-FVII 3 & 5 CTP-2회차 연구(IV 대 SC)를 나타낸다.

도 34. 꼬리 정맥 횡절단(TVT) 이후 혈우병 마우스 생존 곡선을 나타낸다. TVT는 SC 투여 후 12시간 시점에 시행되었다. TVT 이후 24시간 동안 마우스 생존이 관찰되었고, 처음 12시간 동안 매 한 시간마다 그리고 24시간 이후에 기록되었다.

도 35. IV 또는 SC 투여 후 MOD-5014 대 NovoSeven®의 PK 프로파일을 나타낸다. A) IV 투여; B) SC 투여.

도 36. 단일 SC 투여 후 MOD-5014 (클론 61 #75, #81) 대 NovoSeven®의 PK 프로파일을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024]

발명의 상세한 설명

[0025]

한 구현예에 있어서, 본 발명은 장기-작용 응고 인자들과 이를 생산하고 이용하는 방법들을 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 장기-작용 응고 인자들은 카르복시 말단 웨პ티드(CTP, 또한 CTP 유닛으로도 칭함)를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자가 포함된 장기-작용 폴리웨პ티드는 인간 음모막 고나도트로핀(hCG)의 카르복시 말단 웨პ티드(CTP)를 더 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, CTP는 응고 인자의 분해에 대항하는 보호제로 작용하다. 또 다른 구현예에 있어서, CTP는 상기 응고 인자의 C_{max}를 연장시킨다. 또 다른 구현예에 있어서, CTP는 상기 응고 인자의 T_{max}를 연장시킨다. 또 다른 구현예에 있어서, CTP는 상기 응고 인자의 순환 반감기를 연장시킨다. 일부 구현예들에 있어서, CTP는 상기 응고 인자의 효능을 강화시킨다.

[0026]

또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자의 생물학적 반감기를 연장시키는 방법이 제시되는 데, 상기 방법은 1 내지 10개의 CTPs를 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 응고 인자의 생물학적 반감기는 연장된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자의 생물학적 반감기를 연장시키는 방법이 제시되며, 상기 방법은 1 내지 5개의 CTPs를 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 응고 인자의 생물학적 반감기는 연장된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 상기 응고 인자의 순환 반감기를 연장시키는 방법을 제시한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 상기 응고 인자의 반감기를 증가시키는 방법을 제시한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 상기 응고 인자의 반감기를 연장시키는 방법을 제시한다.

[0027]

제7 응고인자는 간세포에 의해 혈류로 비활성 전-효소(pro-enzyme)로 분비되는 444개 아미노산의 당단백질(50kDa)이다. 조직 손상시 그리고 순환하는 혈액에 노출될 때, FVII는 FVII에 대한 진정한 수용체 단백질이며,

관 벽의 심층에 국지화된 다양한 세포들에 의해 발현되는 조직인자와 복합체를 형성한다. 상기 FVII-조직인자 복합체의 형성으로 FVII는 활성화된다. 활성화된 FVII(FVIIa)는 FIX 및 FX의 활성화에 의해 비고유 응고 경로를 개시한다.

[0028] FVII는 상기 응결 시스템과 연합된 비타민 K-의존적 당단백질 군에 속한다. FVII 이외에, 상기 군은 FIX, FX, 단백질 C 그리고 프로트롬빈으로 구성된다. 이들 단백질은 유사한 도메인 조직들을 보유하며, 성숙 아미노산 서열에 이어서 N-말단 프로펩티드가 있는 전구체(precursors)로 합성된다. 상기 프로펩티드는 감마 카르복실라제의 도킹 부위를 포함하여, 이 효소는 글루타민산(Glu)을 감마 카르복시 글루타민산(Gla)으로 전환시킨다. 상기 도메인 다음에 2개의 상피 성장 인자-유사(EGF) 도메인, 즉, 연결 영역(CR)과 C-말단 세린 프로테아제 도메인 이 이어진다. 분비에 앞서, FVII 프로펩티드는 절단되어, 406개 아미노산의 단일 쇄 지모겐(zymogen) FVII 당단백질이 형성된다. 분비 후, 상기 단백질은 CR 안에서 절단에 의해 이황화물-연계된 2개의 쇄 이종이량체, FVIIa로 활성화될 수 있다. 상기 FVII의 혈장 농도는 10 nM이며, 그리고 건강한 개체에서 대략 1%는 활성형으로 순환된다.

[0029] FIX는 415개의 아미노산(55kDa) 당단백질이며; 이것은 상기 응결 시스템과 연합된 비타민 K-의존적 당단백질 군에 속한다. FIX는 성숙 아미노산 서열에 이어서 N-말단 프로펩티드가 있는 전구체로 합성되는 FVII, FX, 단백질 C, 그리고 프로트롬빈과 같은 유사한 도메인 조직을 보유한다.

[0030] FIX는 이의 생화학 성질 및 약동학 성질에 결정적인 복잡한 전사-후 변형을 겪는 단일 쇄 분자로 분비된다. 모든 전사-후 변형중에, 상기 비타민 K-의존적 감마 카르복실라제에 의해 감마 카르복실화되는 FIX의 아미노 말단부근의 12개 글루타민산 잔기가 가장 결정적인 것들이다. FIX와 인지질 표면과의 상호작용 및 최적의 FIX 활성을 위하여 카르복실화가 요구된다. 상기 아미노 말단 프로펩티드는 상기 감마 카르복실라제를 위한 인지 부위로 작용되며, 따라서 감마 카르복실화 이후, 쌍을 이룬 염기성 아미노산 절단 효소(PACE/Furin)로 공지된 골지체(Golgi apparatus) 세린 프로테아제에 의해 쪼개진다. 상기 골지체에서 티로신 155의 황산염화, 세린 158의 인산화, Ser 63 및 61에서 O-당화 그리고 마지막으로, Asn 157 및 16에서 N-당화의 추가적인 4가지 전사-후 변형이 발생될 것이만, FIX의 적절한 활성화에 필수적인 것으로 보이지는 않았다.

[0031] FIX는 혈장에서 단일 쇄 비활성 지모겐으로 순환된다(평균 농도 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). 2개 웨프티드 결합: Arg 145 및 Arg 180에서 하나 또는 두 개의 생리학적 활성물질들, FVIIa-TF 복합체 또는 FIXa에 의해 단백질분해성 절단시에, 상기 활성화 웨프티드는 제거되고, FIX는 단일 이황화 결합에 의해 서로 연계된 중쇄 및 경쇄로 구성된 온전한 활성 효소로 전환된다. 상기 N-말단 경쇄는 상기 비-촉매성 감마 카르복시글루타민산(Gla)과 2개의 상피 성장 인자-유사 도메인을 포함하고, 상기 C-말단 중쇄는 상기 분자의 트립신-유사 촉매성 도메인을 포함한다. FIXa는 단독으로는 촉매성 활성이 부족한 것을 특징으로 한다. 그러나 FVIII와 복합될 때, 이의 단백질분해성 활성은 이의 고유 기질 FX에 대해 4-5배 크기로 증가된다.

[0032] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자의 생물학적 반감기를 연장시키는 방법 또는 상기 응고 인자의 곡선하 면적(AUC)을 개선시키는 방법이 제시되는 데, 상기 방법은 1 내지 10개의 CTPs를 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 응고 인자의 생물학적 반감기가 연장되거나, 또는 상기 응고 인자의 AUC가 개선된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자의 생물학적 반감기를 연장시키는 방법 또는 상기 응고 인자의 곡선하 면적(AUC)을 개선시키는 방법이 제시되는 데, 상기 방법은 1 내지 5개의 CTPs를 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 응고 인자의 생물학적 반감기가 연장되거나 또는 상기 응고 인자의 AUC가 개선된다. 또 다른 구현예에 있어서, FIX의 생물학적 반감기를 연장시키는 방법 또는 FIX의 곡선하 면적(AUC)을 개선시키는 방법이 제시되는 데, 상기 방법은 1 내지 5개의 CTPs를 FIX의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 FIX의 생물학적 반감기가 연장되거나 또는 FIX의 AUC가 개선된다. 또 다른 구현예에 있어서, FVII 또는 FVIIa의 생물학적 반감기를 연장시키는 방법 또는 FVII 또는 FVIIa의 곡선하 면적(AUC)을 개선시키는 방법이 제시되는 데, 상기 방법은 1 내지 5개의 CTPs를 FVII 또는 FVIIa의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 FVII 또는 FVIIa의 생물학적 반감기가 연장되거나 또는 FVII 또는 FVIIa의 AUC가 개선된다.

[0033] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 생물학적 반감기를 연장시키는 방법을 제시하는 데, 상기 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)를 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 생물학적 반감기가 연장된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 FVIIa 폴리펩티드의 생물학적 반감기를 연장시키는 방법이 제시되는 데, 이 방법은 최대 5개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)를 상기 FVIIa 폴리펩티드에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 FVIIa 폴리펩티드의 생물학적 반감기가 연장된다.

드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 FVIIa 폴리펩티드의 생물학적 반감기가 연장된다. 한 구현예에 있어서, 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)이 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된다. 또 다른 구현예에 있어서, 4개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프트드(CTP)이 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된다. 또 다른 구현예에 있어서, 5개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)이 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된다.

[0034] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 곡선하 면적(AUC)을 개선시키는 방법을 제시하는 데, 상기 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)를 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 AUC가 개선된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 FVIIa 폴리펩티드의 곡선하 면적(AUC)을 개선시키는 방법을 제시하는 데, 상기 방법은 최대 5개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)를 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 FVIIa 폴리펩티드의 AUC는 개선된다. 한 구현예에 있어서, 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)이 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된다. 또 다른 구현예에 있어서, 4개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프트드(CTP)이 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된다. 또 다른 구현예에 있어서, 5개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)이 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된다.

[0035] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 응고 인자는 단백질이다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 응고 인자는 웨프티드다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 응고 인자는 폴리펩티드다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 효소다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 세린 프로테아제다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 당단백질이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 트란스글루타미나제다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 비활성 지모겐이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 당업계 숙련자들에게 공지된 임의의 응고 인자다.

[0036] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 FVIII이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 FV이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 제13인자이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 FX이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 피브린이다.

[0037] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 FVIIa이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 FVII이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 FIX이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 FX이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 제11a인자이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 FXII이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 제10a인자이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 제5a인자이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 프로트롬빈. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 트롬빈이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 FXI이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 폰 빌레브란트 인자이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 FVIIIa이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 B-도메인 결손된 FVIII (FVIIIBDD)이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 B 도메인-결손된 FVIII (FVIIIBDD)이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 베타 도메인-결손된 FVIII (FVIIIBDD)이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 FIXa이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 프레칼리크레인(prekallikrein)이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 칼리크레인(kallikrein)이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 FXIIa이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 피브리노겐이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 트롬보모듈린이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 인자 II (FII)이다.

[0038] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 당단백질이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 비타민 K-의존적 당단백질이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 비타민 K-독립적 당단백질이다.

[0039] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 단백질이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 당단백질이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 당단백질 FV이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 FVI이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 FVII이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 FVIII이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 FIX이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 FX이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 FXII이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 폰 빌레브란트 인자이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 FIXa이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 FII이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 FIXa이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자

는 재조합 FXIa이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 피브린이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 FVIIa이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 FXa이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 프로트롬빈. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 트롬빈이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 FVIIia다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 프레칼리크레인이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 칼리크레인이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 재조합 FXIIa이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 임의의 공지된 재조합 응고 인자다. 또 다른 구현예에 있어서, 신호 웨პ티드가 포함된 상기 응고 인자는 임의의 공지된 재조합 응고 인자다.

[0040] 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자는 상기 C-말단에 부착된 1-10개의 CTP 반복부(repeat)를 포함하며, 상기 N-말단에는 부착된 CTPs가 없다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자는 상기 C-말단에 부착된 적어도 하나의 CTP를 포함하며, 그리고 상기 N-말단에는 부착된 CTPs가 없다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 C-말단에 부착된 1-10개의 CTP 반복부를 포함하며 상기 N-말단에는 부착된 CTPs가 없는 응고 인자는 조작된(engineered) 응고 인자다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 C-말단에 부착된 적어도 하나의 CTP를 포함하며 상기 N-말단에는 부착된 CTPs가 없는 응고 인자는 응고 인자다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 C-말단에 부착된 적어도 하나의 CTP를 포함하며 상기 N-말단에는 부착된 CTPs가 없는 응고 인자는 접합된 응고 인자다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 C-말단에 부착된 적어도 하나의 CTP를 포함하며 상기 N-말단에는 부착된 CTPs가 없는 응고 인자는 접합된 응고 인자다.

[0041] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드 그리고 상기 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨პ티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 FIX(FIX) 폴리펩티드를 제시한다.

[0042] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 FVIIa 폴리펩티드와 상기 FVIIa의 카르복시 말단에 부착된 5개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨პ티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 FVIIa 폴리펩티드를 더 제시한다.

[0043] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 FIX, FVII, Factor X, 단백질 C, 또는 프로트롬빈의 도메인 조직에 유사한 또는 동일한 도메인 조직을 포함하는 응고인자다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 N-말단 프로펩티드를 가진 전구체로 합성된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 이용된 상기 응고 인자는 비활성 프로-엔자임 형태다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 간세포에서 생산된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 글루타민산(Glu)을 감마 카르복시 글루타민산(Gla)으로 전환시키는 감마 카르복실라제의 도킹 부위를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 이용된 상기 응고 인자는 시판되는 응고 인자다.

[0044] 한 구현예에 있어서, 상기 FVII를 인코딩하는 핵산 서열은 다음의 핵산 서열을 포함한다:

[0045] ctgcaggacatggctccaggccctcaggcccttcgtgccttgcgttggtttcaggcgtgcctggctgc

[0046] agtcttcgttaaccaggaggaagccccacggcgccctgcacccggcgccggcgccaaacgcgttcctggagg

[0047] agctgcggccgggtccctggagagggagtgcaggaggcagtgccttcgaggaggcccggagatc

[0048] ttcaaggacgcggagggacgaagctgttctggattttacagtgtatggggaccagtgtgcctcaagtcc

[0049] atgccagaatggggctctgcaaggaccagtcctatatctgccttcgcctccctgccttcgagg

[0050] gccggaactgtgagacgcacaaggatgaccagctgtgtgtgaacgagaacggcggtgtgagcagtac

[0051] tgcagtgaccacacggcaccaaggcgcttcgtcggtgccacgaggggtactctgtgtggcagacgggt

[0052] gtcctgcacacccacagttaaatccatgtggaaaaatacctatctagaaaaaaagaaatgccagcaaac

[0053] cccaaggccgaatttgtggggcaaggtgtccccaaaggggagtgtccatggcaggtcctgttgtgg

[0054] aatggagctcagtgtgtggggaccctgatcaacaccatctgggtggctccggccactgttcg

[0055] caaaaatcaagaactggaggaacctgatcgccgtgtggcgagcacgaccctcagcgagcacgacggatg

[0056] agcagagccggcggtggcgaggtcatcatccccagcacgtacgtccggcaccaccaaccacgacatc

[0057] gcgctgtccgcctgcaccagccgtggctctactgaccatgtggtgcccttcgcctgcccgaacggac

[0058] gttctctgagaggacgtggcctcggtgcgttcattggtagccggctggggccagctgtggaccgtg
 [0059] ggcgcacggccctggagctatggtcctcaacgtgccccggctgtgaccaggactgcctgcagcagtca
 [0060] cggaagggtggagactccccaaatacacggagtacatgttctgtgccggactcggatggcagcaagga
 [0061] ctccgtcaagggggacagtggaggcccacatgccacccactaccggggcacgtggtaacctgacggcatcg
 [0062] tcagctggggccaggctgcgaaccgtggccactttgggtgtacaccagggtctccagtagatcgag
 [0063] tggctgcaaaagctatgcgtcagagccacgcccaggagtcctcgcagccccattccctgaggatg
 [0064] cggcgc (서열 번호: 11).

[0065] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 FVII의 아미노산 서열은 다음의 아미노산 서열을 포함한다:

[0066] MVSQALRLCLLGLQGCLA AVFVTQEEAHGV LRRR RANA FLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKD
 [0067] AERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCEHKDDQLICVNENGGEQYCS
 [0068] HTGTKRSCRCHEGYSLLADGV SPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVPKGEC PWQVLLVNGA
 [0069] QLCGGTLINTI WVVAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLS EH DGDEQSRRVAQVI IPSTYVPGTTNHDI ALL
 [0070] RLHQPVV LTDHVVPLCLP ERTFSERTLA FVRFL VSGWGQ LDRGATA LEMLVNVPR LMTQDCLQQSRKV
 [0071] GDSPNITEYMFCAGYSDGS KDSCKGD SGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQ
 [0072] KLMRSEPRPGVLLRAPFP (서열 번호: 9).

[0073] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 FVII의 아미노산 서열은 다음의 아미노산 서열을 포함한다:

[0074] MVSQALRLCLLGLQGCLA AVFVTQEEAHGV LRRR RANA FLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKD
 [0075] AERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCEHKDDQLICVNENGGEQYCS
 [0076] HTGTKRSCRCHEGYSLLADGV SPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVPKGEC PWQVLLVNGA
 [0077] QLCGGTLINTI WVVAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLS EH DGDEQSRRVAQVI IPSTYVPGTTNHDI ALL
 [0078] RLHQPVV LTDHVVPLCLP ERTFSERTLA FVRFL VSGWGQ LDRGATA LEMLVNVPR LMTQDCLQQSRKV
 [0079] GDSPNITEYMFCAGYSDGS KDSCKGD SGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQ
 [0080] KLMRSEPRPGVLLRAPFP*GCGR (서열 번호: 10).

[0081] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 FVII-CTP (상기 카르복시 말단에 부착된)를 인코딩하는 핵산 서열은 다음의 핵산 서열을 포함한다:

[0082] ctcgaggacatggctccaggccctcaggcccttcgttggcttcaggctgcctggc
 [0083] agtcttcgttaaccaggaggaagccacggcgtccgcacccggcgccaaacgcgttcctggagg
 [0084] agctgcggccggctccctggagaggagtgcaggaggcagtgccttcgaggaggccggagatc
 [0085] ttcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggattttacagtgtatggggaccagtgtgcctcaagtcc
 [0086] atgccagaatggggctctgcaggaccgcgtccatctgcattctgcctccctgccttcgagg
 [0087] gccgaaactgtgagacgcacaaggatgaccagctgtgtgaacgagaacggcggcgtgagcagta
 [0088] tgca gtcgtgaccacacggcaccaaggcgtccgtcggtgccacgaggactctctgtggcagacgggt
 [0089] gtcctgcacacccacagttaaatccatgtggaaaatacctttagaaaaaagaaatgcacaaac
 [0090] cccaaggccgaattgtggggcaagggtgtccccaaaggagggtgtccatggcaggctctgttgttg
 [0091] aatggagctcagttgtgtggggaccctgtatcaacaccatctggtggtctccggccactgttcga
 [0092] caaaaatcaagaactggaggaacctgtcgccgtgtggcgagcacgacccatcagcagcacgacggatg

[0093] agcagagccggcggtggcgaggcatcatccccagcacgtacgtccgggaccaccaaccacgacatc
 [0094] gcgctgtccgcctgcaccagccgtggtcctcaactgaccatgtggtgcctctgcctgcggaaacggac
 [0095] gttctctgagaggacgtggcctcgtgcgttctcatggtcagggctggggccagctgctggaccgtg
 [0096] gcgccacggccctggagctaaggcctcaacgtgcccggctgatgaccaggactgcctgcaggactca
 [0097] cggaagggtggagactccccaaatacacggagtacatgttctgtgcggctactcgatggcagcaagga
 [0098] ctccgtcaaggggacagtggaggcccacatgccacccactaccgggacgtggtaacctgaccggcatcg
 [0099] tgagctggggccaggcgtgcgcaccgtggccacttcggcgtgtacaccagggtgtcccagtacatcgag
 [0100] tggctgcagaaactgatgagaagcgagccagaccggcgtgctgagagccccctccccagcagcag
 [0101] ctccaaggcccctccccctagcctgcccagccctagcagactgcctggccagcgcacacccatcctgc
 [0102] cccagtgaggatccggccgc (서열 번호: 12).

[0103] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 FVII-CTP(상기 카르복시 말단에 부착된)의 아미노산 서열은 다음의 아미노산 서열을 포함한다:

[0104] MVSQALRLCLLGLQGLAAVFVTQEEAHGVLRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKD
 [0105] AERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGCEQYCSD
 [0106] HTGTKRSCRCHEGYSLADGVSCTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCVKGECPWQVLLVNGA
 [0107] QLCGGTLINTIWVVAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTNTNDIALL
 [0108] RLHQPVVLTDHVPLCLPERTFSERTLAFVRFLVSGWGQLLDRGATAELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKV
 [0109] GDSPNITEYMFCAAGSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQ
 [0110] KLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ* (서열 번호: 13).

[0111] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 FVII-CTP-CTP(상기 카르복시 말단에 부착된)를 인코딩하는 핵산 서열은 다음의 핵산 서열을 포함한다:

[0112] ctcgaggacatggctccaggccctcaggccctgcctctgccttggttcaggcgtgcggctgc
 [0113] agtcttcgtaacccaggaggaagccacggcgtccgcacccggcgcggcgcgcacgcgttcggagg
 [0114] agctgcggccggctccggagggatgcaggcgtgcaggcgttcgttcggaggccggagatc
 [0115] ttcaaggacgcggagggacgaagctgttcggattttacagtgtggggaccagtgtgcctcaagtcc
 [0116] atgccagaatggggctcgcaggaccgcgtccatatctgccttcgcctccgccttcgagg
 [0117] gccggaactgtgagacgcacaaggatgaccgcgtatgtgtgaacgagaacggcggcgtgagcgtac
 [0118] tgcagtgaccacacggcaccaaggcgtccgtcggtgccacggggactctctgctggcagacgggt
 [0119] gtcctgcacacccacagttgaatatccatgtggaaaatacctatctagaaaaagaaatgccagcaa
 [0120] cccaggccgaattgtggggcaagggtgtccccaaagggaggtgtccatggcaggctctgttgttgg
 [0121] aatggagctcagtgtgtggggaccctgatcaacaccatctgggttgtccgcggccactgttcga
 [0122] caaaatcaagaactggaggaacctgatcgcggtgtggcgagcacgcacgcacgcacggatg
 [0123] agcagagccggcggtggcgaggcatcatccccagcacgtacgtccgggaccaccaaccacgacatc
 [0124] gcgctgtccgcctgcaccagccgtggtcctcaactgaccatgtggtgcctgcctgcggaaacggac
 [0125] gttctctgagaggacgtggcctcgtgcgttctcatggtcagggctggggccagctgctggaccgtg
 [0126] gcgcacggccctggagctcatggcctcaacgtgccccggctgatgaccaggactgcctgcaggatca

[0127] cggaagggtggagactccccaaatcacggagtacatgttctgtgccggactcggatggcagcaagga
 [0128] ctccctgcaagggggacagtggaggcccacatgccaccactaccggggacgtggtaacctgaccggcatcg
 [0129] tgagctggggccaggcgtgcgccaccgtggccacttcggcgtgtacaccagggtgtccagtagatcgag
 [0130] tggctgcagaaacigatgagaagcgagccagaccggcgtctgtagagagcccttccccagcagcag
 [0131] ctccaaggcccctccccctagctgccagccctagcagactgcctggccctccgacacaccaatcctgc
 [0132] cacagagcagctccctaaggccctccatccctgcctccatccccctccggctgccaggcccctgac
 [0133] acccctatcctgcctcagtgtgaaggctggatccgcggcgc (서열 번호: 14).

[0134] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 FVII-CTP-CTP(상기 카르복시 말단에 부착된)의 아미노산 서열은 다음의 아미노산 서열을 포함한다:

[0135] MVSQALRLCLLGLQGCLA AVFTQEEAHVLHRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKD
 [0136] AERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCEHKDDQLICVNENGCEQYCS
 [0137] HTGTKRSCRCHEGYSLADGVSCPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLVNGA
 [0138] QLCGGTLINTIWVVAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLS EHGDQE SRRVAQVIIPSTYVP GTTNHDIA
 [0139] RLHQPVVLT DHVVPLCLP ERTFSERTLA FVRFSLVSGWGQ LDRGATALELMV LNVPR LMTQDCLQQSRKV
 [0140] GDSPNITEYMFCAGYSDGS KDSCKG DS GGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRV SQYIEWLQ
 [0141] KLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPI
 [0142] LPQ** (서열 번호: 15).

[0143] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 FVII-CTP-CTP-CTP(상기 카르복시 말단에 부착된)를 인코딩하는 핵산 서열은 다음의 핵산 서열을 포함한다:

[0144] ctcgaggacatggttcccaggccctcaggctcttcgccttcgttggcttcaggctgcctggctgc
 [0145] agtcttcgttaaccaggaggaagcccacggcgtccgcacccggccggccgcgcacgcgttcctggagg
 [0146] agctgcggccggctccctggagagggagtgcaggaggaggcgtgtcccttcgaggaggccggagatc
 [0147] ttcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggatttttacagtgtatggggaccagtgtgcctca
 [0148] atgccagaatggggctctgcaggaccagtcctatatctgcatttcgcctccctgcattcgagg
 [0149] gcccgaactgtgagacgcacaaggatgaccagtcgtgtgtgaacgagaacggcggctgtgac
 [0150] tgcagtgaccacacggcaccaaggcgtccgtcggtgccacgagggtactctctgctggcagacgg
 [0151] gtccatgcacacccacagttaaatccatgtggaaaatacctttagaaaaaagaaatgc
 [0152] cccaggccgaatttgtggggcaagggtgtccccaaaggagggtgtccatggcaggcttcgttgt
 [0153] aatggagctcagtgtgtgggggaccctgtatcaacaccatctgggttgtccgcggccactgttc
 [0154] caaaaatcaagaactggaggaacctgatcgccgtgtggcgagcacgacccatcagc
 [0155] agcagagccggcgggtggcgcaggatcatcatccccagcacgtacgtccggcaccaccaacc
 [0156] ggcgtgtccgcgtcaccagccgtggcttcactgaccatgtggtgcccttcgcctgc
 [0157] gttctctgagaggacgctggcctcgtgcgttcattggatcagcggctggggcagctgtgg
 [0158] ggcgcacggccctggagctcatggctcaacgtgccccggctgtgacccaggactgc
 [0159] cggaagggtggagactccccaaatcacggagtacatgttctgtgccggactcggatgg
 [0160] ctccctgcaagggggacagtggaggcccacatgccaccactaccggggacgtggtaacctgaccggcatcg

[0161] tgagctgggccaggcgtgcgcaccgtggccacttggcgtgtacaccagggtgtcccagtacatcgag
 [0162] tggctgcagaaactgatgagaagcgagccagaccggcgtgtcgtgagagcccccttcccagcagcag
 [0163] ctccaaggcccctccccctagctgcccagccctagcagactgcctggcccagtgcacccctatcctgc
 [0164] ctcagtcagctccagcaaggccccacccctagccctgccttccttcggcgcctggcccagcgt
 [0165] actccaattctgccccagtcctccagcagaaggctcccccctccatctgtccatccccagcagactgcc
 [0166] aggccttctgatacacccatctcccacagtgtgaggatccgcggccgctaattaa (서열 번호: 24).

[0167] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 FVII-CTP-CTP-CTP (상기 카르복시 말단에 부착된)의 아미노산 서열은 다음의 아미노산 서열을 포함한다:

[0168] MVSQALRLCLLGLQGCLAATFVTQEEAHVLHRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKD
 [0169] AERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCEHKDDQLICVNENGGEQYCSD
 [0170] HTGTRKSCRCHEGYSLLADGVSCPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVPKGECPWQVLLVNGA
 [0171] QLCGTLINTIWVVAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSHDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALL
 [0172] RLHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKV
 [0173] GDSPNITEYMFACAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTIIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQ
 [0174] KLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPI
 [0175] LPQSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ** (서열 번호: 25).

[0176] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 FVII-(CTP)₄(상기 카르복시 말단에 부착된)를 인코딩하는 핵산 서열은 다음의 핵산 서열을 포함한다:

[0177] ctcgaggacatggttcccaggccctcaggcccttcgttggcgtcaggcgtgcgttcgt
 [0178] agtcttcgttaaccaggaggaagccacggcgttcgtcaccggcgccggcgccaaacgcgttcgtggagg
 [0179] agctggccgggtccctggagagggagtgcaggaggaggcgttcgttcgtggaggccggagatc
 [0180] ttcaaggacgcggagaggacgaagctgttcgttcttacagtgttcgtggaccagtgtgcctcaagtcc
 [0181] atgcagaatggggctctgcaggaccagtcgttcgttcgtatatctgttcgttcgttcgttcgttcgt
 [0182] gccggaactgtgagacgcacaaggatgaccagtcgttcgttcgttcgttcgttcgttcgttcgttcgt
 [0183] tgcaatggggccatggggccatggggccatggggccatggggccatggggccatggggccatggggccat
 [0184] gtcctgcacacccacagttgaatatccatgtggaaaataccttcttagaaaaaagaaatgccagcaac
 [0185] cccaaaggccgaattgtggggcaaggtgtccccaaaggggagtgtccatggcaggccatggggccatgg
 [0186] aatggagctcagtgtgtggggaccctgtcaacaccatctggtggttcggccaccactgttcgt
 [0187] caaaatcaagaactggaggaacctgtcgccgtgtggcgagcacgacccatcgcaatggggatg
 [0188] agcagagccggcggtggcgaggcatcatccccagcacgtacgtccggcaccaccaaccacgacatc
 [0189] gcgctgtccgcgtgcaccagccgtgttcactgaccatgtggtgcccttcgttcgttcgttcgt
 [0190] gttctctgagaggacgctggccttcgtgcgttcattggcgtcaggcgtggccagctgtggaccgt
 [0191] gcgccacggccctggagctcatggcctcaacgtccccggctgtgaccaggactgcctgcagcagtca
 [0192] cggaagggtggagactccccaaatcacggagtacatgttcgtccggctactcgatggcagcaagga
 [0193] ctccatgcaggggacagtggaggccacatgccaccactaccgggacgtggtacctgaccggcatcg
 [0194] tgagctgggccaggcgtgcgcaccgtggccacttcggcgtgtacaccagggtgtcccagtacatcgag

[0195] tggctgcagaaactgatgagaagcgagcccagaccggcgtgtgctgagagcccccttcccaagcagcag
 [0196] ctccaaggcccctcccccstagctgcccagccctagcagactgcctggcccagtgcacccctatcctgc
 [0197] ctcaaggctccagcaaggcccccccccstagcctgccttccttcggctgcctggccccagcgat
 [0198] actccaattctgccccagtcctccagcagtaaggctccccccatctgcctccccccagcagactgcc
 [0199] aggccttctgatacacccatctcccacagtgtgaggatccgc (서열 번호: 26).

[0200] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 FVII-(CTP)₄ (상기 카르복시 말단에 부착된)의 아미노산 서열은 다음의 아미노산 서열을 포함한다:

[0201] LEDMVSQALRLCLLGLQGCLAFFVFTQEEAHGVLRHRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREI
 [0202] FKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGEQY
 [0203] CSDHTGTRKSRCRCHEGYSLLADGVSCPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLV
 [0204] NGAQLCGGTLINTIWVSAAHCFDIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHD
 [0205] ALLRLHQPVLTDHVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWQLLRGATALELMVNVPRLMTQDCLQQS
 [0206] RKVGDSPITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIE
 [0207] WLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSKAPPPSLPSRLPGPSDTPILPQSSSKAPPPSLPSRLPGPSD
 [0208] TPILPQSSSKAPPPSLPSRLPGPSDTPILPQ**G (서열 번호: 27).

[0209] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 FVII-(CTP)₅ (상기 카르복시 말단에 부착된)를 인코딩하는 핵산 서열은 다음의 핵산 서열을 포함한다:

[0210] ctcgaggacatggctcccaggcccctcaggccctcgcttcgtggcttcaggctgcggcgtgc
 [0211] agtcttcgttaaccaggaggaagccacggcgtcctgcacccggcgccggcgccaaacgcgttcctggagg
 [0212] agctgcggccgggctccctggagagggagtgcaggaggcagtgcccttcgaggaggccccgggagatc
 [0213] ttcaaggacgcggagggacgaaactgttt
 [0214] atgccagaatggggctctgcaggaccagtcctatatctgttttttttttttttttttttttttttttttt
 [0215] gccgaaactgtgagacgcacaaggatgaccagtcgttgtgtgaacgagaacggcgctgtgagcgtac
 [0216] tgcagtgaccacacggcaccaaggcgtcctgtcggtgccacgagggtactctgtggcagacgggt
 [0217] gtcctgcacacccacagttgaatatccatgtggaaaaatacctatcttagaaaaaagaaaatgc
 [0218] cccaaaggccgaattgtggggcaagggtgtccccaaaggggagtgtccatggcaggctctgtttgg
 [0219] aatggagctcagtgtgtgggggaccctgtatcaacaccatctgggtggctccggccactgtttcga
 [0220] caaaatcaagaactggaggaacctgtcgccgtgtggcgagcacgaccctagcgagcacgacgggatg
 [0221] agcagagccggcggtggcgaggcatcatccccagcacgtacgtccccggcaccaccaaccacgacatc
 [0222] gcgctgtccgcctgcaccagccgtggctctactgaccatgtggccctctgcctgcccgaacggac
 [0223] gttctctgagaggacgctggccttcgtgcgttcattggtcagccgtggccagctgtggaccgt
 [0224] ggcacggccctggagctatggcctcaacgtccccggctgtgaccaggactgcctgcaggatca
 [0225] cggaagggtggagactccccaaatcacggagtacatgttctgtccggctactcgatggcagcaagga
 [0226] ctccgtcaagggggacagtggaggcccacatgccaccactaccggggcacgtggtaacctgaccgg
 [0227] tgagctggggcaggctgcccaccgtggccacttcggcgtgtacaccagggtgtcccaatcgag
 [0228] tggctgcagaaactgatgagaagcgagcccagaccggcgtgtgctgagagcccccttcccaagcagcag

[0229] ctccaaggcccctccccctagectgccagccctagcagactgcctggccctgtacaccctatcctgc
 [0230] ctcagtccagctcctctaaggctccaccacccctccctgcctagccctcaagactgccaggccctagcgat
 [0231] acaccaattctgccccagtcctccagcagcaaggctccccacccctgccttccatcaaggctgcc
 [0232] tggcccatccgatacccaatttgccctcagagcagcttagcaaggcacccctccctccagtcigcccttc
 [0233] caagcagactccctggccctcagacactccaatctccacagtcctctagcttaaagctccacccctcc
 [0234] agcctgcccagccctagtagactccccggacctctgataccccatcttgccccagtgatgaggatccgc
 [0235] (서열 번호: 28).

[0236] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 FVII-(CTP)₅(상기 카르복시 말단에 부착된)의 아미노산 서열은 다음의 아미노산 서열을 포함한다:

[0237] LEDMVSQALRLLCLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLRHRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREI
 [0238] FKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFGRNCETHKDDQLICVNENGGEQY
 [0239] CSDHTGTRKSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLV
 [0240] NGAQLCGGTLINTIWVVAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHD
 [0241] ALLRLHQPVVLTDHVPLCLPERTFSERTLAFVRFLVSGWGQLDRGATALELMVNVPRLMQTQDCLQQS
 [0242] RKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIE
 [0243] WLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSKAPPPSLPSRSLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSRSLPGPSD
 [0244] TPILPQSSSSKAPPPSLPSRSLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSRSLPGPSDTPILPQSSSSKAPPP
 [0245] SLPSPSRSLPGPSDTPILPQ**GS (서열 번호: 29).

[0246] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 FIX를 인코딩하는 핵산 서열은 다음의 핵산 서열을 포함한다:

[0247] gcgatcgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatgccttttagga
 [0248] tatctactcagtgtaatgtacagttttctgtatcatgaaaacgcacaattctgaatcgccaaa
 [0249] gaggtataattcaggtaaatttggaaagatgttgtcaaggaaacctttagagagaatgtatgaaagaaaat
 [0250] gtagtttgaagaagcagcagaatgttttggaaacactgaaagaacaactgaatttggaaagcagtatgtt
 [0251] gatggagatcagtgtgatccatgttaaatggcggcagtgtcaaggatgacattaaatcctatga
 [0252] atgttgggtcccttggatttgaaggaaagaactgtgaattagatgtaaatgtaaatggca
 [0253] gatgcgagcagttttaaaaatagtgtataacaagggtggttgtccctgtactgagggatatcgactt
 [0254] gcagaaaaaccagaagtccgtgaaccaggcagtgcattccatgtggaaagatgttctgttcaaaacttc
 [0255] taagctcacccgtgtgagactgtttccctgtatgtggactatgtaaattctactgaagctgaaaccatt
 [0256] tggataacatcaactaaaggccaaatcatataatgacttactcgagtttgttggtggaaagatgcca
 [0257] ccaggtcaattcccttggcaggttgttgaatggtaaagtgtatgcattctgtggaggcttatcgtaa
 [0258] tgaaaaatggattgttaactgtccccactgtgttggaaactgggttaaaattacagttgtcgaggtaac
 [0259] ataatattgaggagacagaacatacagagaaaaagcgaatgtattcgaaatttcctcaccacaactac
 [0260] aatgcagcttataaagtacaaccatgacattgccttctggaaactggacgaaacccttagtgtaaac
 [0261] ctacgttacacctatgtcattgtgacaaggaaatcacgaacatcttcctcaaatttggatctggctatg
 [0262] taagtggctggggaaagagtcttccacaaaggagatcagcttagttctccagtagcttaggttccact
 [0263] gttgaccgagccacatgtttcgatctacaaagtccacatctataacaacatgttctgtggcttcca

산 서열을 포함한다:

[0333] MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSF
 [0334] EEAREVFENTERTTEFWKQYVGDQCESNPCLNGSCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCE
 [0335] QFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSQTSKLTRAETVFPDVYVNSTEATIILDN
 [0336] ITQSTQSFDTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNI
 [0337] EETEHTEQKRNVIIRIIPHNNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSG
 [0338] WGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTEVEGTSFLT
 [0339] GIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRVNVIKEKTLTSSSKAPPPSLPSRLPGPSDTPILPQSSSKAPP
 [0340] PSLPSPSRPLPGPSDTPILPQ** (서열 번호: 21).

[0341] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 FIX-(CTP)₃(상기 카르복시 말단에 부착된)를 인코딩하는 핵산 서열은 다음의 핵산 서열을 포함한다:

[0342] tctagagtgcacccggccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatctg
 [0343] ccttttaggatatctactcagtgtcatgtacagttttcttgcataaaaaacgccaacaaattctga
 [0344] atcggccaaagaggataattcaggtaaatttgaagagttttgttcaaggaaaccttgagagagaatgtatg
 [0345] gaagaaaagtgttagtttgaagaagcacgagaagttttgaaaacactgaaagaacaactgaattttggaa
 [0346] gcagtagttgtatggagatcagtgtgagtccatccatgttaatggcggcagttgcaaggatgacatt
 [0347] attcctatgaatgttgggtcccttggatttgaaggaaagaactgtgaatttagatgtAACATgtAACATT
 [0348] aagaatggcagatgcgagcagtttgcataaaatagtgcgtataacaagggtggttgcctgtactgaggg
 [0349] atatcgacttcgcagaaaccagaagtccctgtgaaccagcagtgccatccatgtggaaagttttcttt
 [0350] cacaaacttctaagtcacccgtgtgaggcagtttccatgttgactatgtaaattctactgaagct
 [0351] gaaaccatttggataacatcactcaaagcaccaatcattaatgacttcactcgagtgttggtggaga
 [0352] agatgccaaccaggtaattccctggcaggttttgaatggtaaagtgtatgcattctgtggaggct
 [0353] ctatcgtaatgaaaatggatgttaactgtccccactgttgtgaaactgggttaaaattacagtgtc
 [0354] gcaggtgaacataatattgaggagacagaacatacagagcaaaagcgaatgtgattcaatttccca
 [0355] ccacaactacaatgcagcttaataagtacaaccatgacattgccttggacttggacgaacccttag
 [0356] tgcttaaacagctacgttacacctattgcattgtgtacaaggaaatcacgaacatcttcccaaatttgg
 [0357] tctggctatgtaaagtggctgggaagagtctccacaaaggagatcagcttttagttctcgtaccttag
 [0358] agttccacttgtgaccgagccacatgttccatgtacaaagttccatctataacaacatgttctgtg
 [0359] ctggcttccatgaaggaggtagagattcatgtcaaggagatagtggggacccatgttactgaagtggaa
 [0360] gggaccagttcttaactggaaatttagtgggtgaagagtgtgcaatgaaaggcaaatatggaaata
 [0361] taccaaggatcccgatgtcaactggattaaggaaaaacaaagctactgtccagcagcaaggccc
 [0362] ctccccggccgtgcctcccaagcaggctgcctggcccagtgcacccctatcctgcctcagtcagc
 [0363] tccagcaaggccccccccctagcctgccttccttcggctgcctggcccagcgatactccaaattct
 [0364] gccccagtcctccagcgtaaaggctccccctcatctgcctccccagcagactgccaggcccttctg
 [0365] atacacccatcctccacagtgtgaggatccgcggccgc (서열 번호: 30).

[0366] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 FIX-(CTP)₃(상기 카르복시 말단에 부착된)의 아미노산 서열은 다음의 아미노산

서열을 포함한다:

[0401] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 FIX-(CTP)₄(상기 카르복시 말단에 부착된)의 아미노산 서열은 다음의 아미노산 서열을 포함한다:

[0402] SRVDPMQRVNIMIAESPLGITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECM
 [0403] EEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYECWCPFGFEKGNCLEDTVCI
 [0404] KNGRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCAPEAVPFPCGRVSQSQTSLTRAEVFPDVYVNTEA
 [0405] ETILDNITQSTQSFNDTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDACCGGSIVNEKWIVTAAHCETGVKITVV
 [0406] AGEHNIEETEHTEQKRNVIIRIIPHHNNAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKG
 [0407] SGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTEVE
 [0408] GTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTAKVSRVNWIKEKTKLTSSSKAPPPSLPSPSLPGPSDTPILPQSS
 [0409] SSKAPPPSLPSPSLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSL
 [0410] PGPSDTPILPQ**GSAa(서열 번호: 33).

[0411] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 FIX-(CTP)₅(상기 카르복시 말단에 부착된)를 인코딩하는 핵산 서열은 다음의 핵산 서열을 포함한다:

[0412] ctagagtgcacccggccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatctgc
 [0413] cttaggatatctactcagtgcgtaatgtacagttttcttgcataaaaacgccaacaaattctgaa
 [0414] tcggccaaagaggtaattcaggtaaatttggaaagagtttttcaaggAACCTTgagagagaatgtatgg
 [0415] aagaaaaagtgtatTTTGAAGAACGACGAGAAGTTTGAAGAAACTGAAAGAACACTGAATTGGAAAG
 [0416] cagtatgttgcgtatggagatcagtgtgagtccatccatgttaatggcgccatgtcaaggatgacattaa
 [0417] ttccatgtatgttggtgtcccttggatt
 [0418] agaatggcagatgcgagcagttt
 [0419] tatcgacttcgagaaaccagaagtccgtgtgaaccagcagtgccatccatgtggaaagtttttttttttt
 [0420] acaaacttctaagtcacccgtgtgaggcagttt
 [0421] aaaccatTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCAATCATTAAATGACTTCACTCGAGTTGTTGGAGAA
 [0422] gatgccaaaccaggtaattcccttggcagggttt
 [0423] tatcgtaatgaaaaatggatt
 [0424] caggtgaacataatatt
 [0425] cacaactacaatgcagctattaaatggatt
 [0426] gctaaacagctacgttacacctatt
 [0427] ctggctatgtatggctggggagagttt
 [0428] gtt
 [0429] tggcttt
 [0430] ggaccagtt
 [0431] accaaggatccccgtatgtcaactggatt
 [0432] tccccggccctccctcccccaaggcaggctggccctgttttttttttttttttttttttttttttttt
 [0433] ccttt
 [0434] ccccaaggctccaccacccctccctgccttagcccttcaagactgccaggccctagcgatcaccaatttg

[0435] taccccaat tgcctagagcagcttagcaaggcacccccccagtcgtcccttccaagcagactcc
[0436] ctggccctcagacactccaat cctccacagtccttagctctaaagctccacccctccagcgtcccgac
[0437] ccttagtagactccccggaccttctgatacccccatttgccccagtgatgaggatccgccccgc
[0438] (서열 번호: 34).

[0439] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 FIX-(CTP)₅(상기 카르복시 말단에 부착된)의 아미노산 서열은 다음의 아미노산 서열을 포함한다:

[0440] RVDPAMQRVN MIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECME
[0441] EKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGSCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCKIK
[0442] NGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSQS KLTRAEVFPDVYVNSTEAE
[0443] TILDNITQSTQSFNDTRVVGGEDAKPGQFWQVVLNGKVDAFCGGSVNEKIVTAAHCVETGVKITVVA
[0444] GEHNIETEHTEQKRNVIRIIPHYNNAIAINKYHDIALLELDEPLVLSYVTPICIADKEYTNIFLKFGS
[0445] GYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTEVEG
[0446] TSFLTGII SWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLTSSSSKAPPPSLPSPSR LPGPSDTPILPQSSS
[0447] SKAPPPSLPSPSR LPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSR LPGPSDTPILPQSSSKAPPPSLPSPSR LP
[0448] GPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSR LPGPSDTPILPQ**GSAa(서열 번호: 35).

[0449] 또 다른 구현예에 있어서, 퓨린은 본 발명의 상기 응고 인자-CTP를 발현시키는 세포에 추가된다. 또 다른 구현 예에 있어서, 퓨린은 세포 안에서 본 발명의 상기 응고 인자-CTP의 생산 효율을 증가시킨다. 또 다른 구현예에 있어서, 퓨린은 상기 본 발명의 상기 응고 인자-CTP의 코딩 서열이 포함된 벡터로 공동-형질감염된다. 또 다른 구현예에 있어서, 퓨린은 별도 벡터에 의해 인코딩된다. 또 다른 구현예에 있어서, 퓨린과 응고 인자-CTP는 하나의 벡터에 의해 인코딩된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 퓨린의 코딩 서열은 pCI-DHFR 안으로 삽입된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 퓨린의 코딩 서열은 pCI-dhfr/smaI+NotI, Furin/AsisI F.I.+NotI에서 조작된다.

[0450] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 퓨린을 인코딩하는 핵산 서열은 다음의 핵산 서열을 포함한다:

[0451] tctagagtgcacccggccatggagctgaggccctggttgtctatgggttgtacgcagcaacaggAACCTTGGT
[0452] cctgttagcagctgtgtcaggccagaaggcttccaccaacacgtggctgtgcgcattccctggaggcc
[0453] cagcggtgccaaacagtgtggcacggcatggttcccaacctggccagatcttcggggactattac
[0454] cactctggcatcgaggagtgacgaagcggtccctgtcgccctaccggccggcacagccggctgcagag
[0455] ggagcctaagtacagtggctggaaacagcagggtggcaaagcgcacggactaaacggacgtgtaccaggagc
[0456] ccacagacccaaagtccctcagcagtggtaacctgttgcactcagcggacactaatgtgaaggcg
[0457] gcctggcgcaggctacacaggcacggcatgtggctccattctggacgtggcatcgagaagaacca
[0458] cccggacttggcaggcaattatgtatccctggggcagtttgatgtcaatgaccaggaccctgaccccaac
[0459] ctcggtagacacacagatgaatgacaacaggcacggcacacgggtgtggggggaaagtggctgggtggcaac
[0460] aacgggtctgtggtaggtgtggctacaacgcccgcattggaggggtgcgcattgtggatggcgaggt
[0461] gacagatgcagtggaggcacgcctggccatggccctgaacccaaaccacatccacatctacagtgccagctgg
[0462] gccccgaggatgacggcaagacagtggatggccagccgcctcgccgaggaggccttccctgggt
[0463] agccaggccgaggggggctggctccatcttgtctggcctcgggaaacggggccggaaacatgacag
[0464] ctgcaactgcaactgacggctacaccaacagtatctacacgcgttccatcagcagcgcacgcagtggcaac
[0465] tgccgtggtagacagcggcgtcgccatggccacgcactacagcagtggcaaccagaatgagaag

[0466] cagatcgtgacgactgacttgccgcagaagtgcacggagtctcacacggcacctcagcctctgccccct
[0467] agcagccggcatattgtctcacctggaggccaataagaacctcacatggcggaatgcacacacctgg
[0468] tggtacagacctaagccagccacctaattccaaacgactggccaccaatggtgtggccggaaagtg
[0469] agccactcatatggtaacggctttggacgcaggcgccatggtgccctggccagaatigaccacagt
[0470] ggccccccagcggaaagtgcatacgacatccaccgagccaaagacatcggaaacggctcgagggtgc
[0471] ggaagaccgtgaccgcgtgcctggcgagccaaaccacatcactcggtggagcacgctcaggcgccgc
[0472] accctgtccataatcgccgtggcgcacctggccatccacctggtcagcccatggcacccgcctccaccct
[0473] gctggcagccaggccacatgactactccgagatgggttaatgactggccctcatgacaactcattcct
[0474] gggatgaggatcccttgcgagtggtcctagagattgaaaacaccagcgaagccaacaactatggacg
[0475] ctgaccaagttaccctcgtaactatggcaccgccttggggctgcccgtacccatggccaaagcagtgg
[0476] ctgcaagaccctcacgtccagtcggcgtgtgggtgcgaggaaggcttcctgcaccagaagagct
[0477] gtgtccagcaactgcctccaggcttgcggcccaagtctcgatacgactatagcaccgagaatgacgtg
[0478] gagaccatccggccagcgttgcggcccttgcacgcctatgtgccatgcaggggccggccctgac
[0479] agactgcctcagctccccagccacgcgccttggaccctgtggagcagacttgcctccggcaaagccaga
[0480] gcagccgagagtccccccacagcagcagccacctcggtggccggaggtggaggcgggcaacggctg
[0481] cggcgaggctgtccctcacacctgcctgaggtggtgccggctcagctgcgccttcatcgtgt
[0482] cttcgtaactgttctggctctgcagctgcgtctggcttagtttgggggtgaagggtgtacacca
[0483] tggaccgtggctcatcttacaagggctggccctgaagcctggcaggaggatgcccgtctgactca
[0484] gaagaggacgagggccggggcagaggaccgccttatcaaagaccagagcgccttgaacgcggccgc
[0485] (서열 번호: 22).

[0486] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 퓨린의 아미노산 서열은 다음의 아미노산 서열을 포함한다:

[0487] MELRPWLLVVAAATGTLVLLAADAQGQKVFTNTWAVRIPGGPAVANSVARKHGFLNLGQIFGDYYHFWHRG
[0488] VTKRSLSPHPRPRHSRLQREPQVQWLREQVAKRTKRDVYQEPTDPKFPQQWYLSVTQRDLNVKAAWAQGY
[0489] TGHGIVVSILDDGIEKNHPDLAGNYDPGASFDVNDQDPDPQPRYTQMNDNRHGRCAVEAAVANNGVCVG
[0490] GVAYNARIGGVRMLGEVTDAVEARSLGLNPNIHIYSASWGPEDDGKTVDPGRALAEAFFRGVSQGRGG
[0491] LGSIFVWASGNNGGREHDSCNCGYTNSIYTLSISSATQFGNVPWYSEACSSTLATTYSSGNQNEKQIVTTD
[0492] LRQKCTESHTGTSASAPLAAGIIALTLEANKNLTWMDMQHLVVQTSKPAHNLNANDWATNGVGRKVSHSYGY
[0493] GLLDAGAMVALAQNWTTVAPQRKCIIDILTEPKDIGRKLEVRKTVTACLGEPNHITRLEHAQARLTLSYNR
[0494] RGDLAIHLVSPMGRSTLLAARPHDYSADGFNDWAFMTTHSWDEDPSGEWVLEIENTSEANNYGTLLKFTL
[0495] VLYGTAPEGLPVPPESSGCKTLTSSQACVVCEEGFSLHQKSCVQHCPPGFAPQVLDTHYSTENDVETIRAS
[0496] VCAPCHASCATCQGPALTDCLSCPASHASLDPVEQTCSRQSQSSRESPQQPPLPPEVEAGQLRAGLLP
[0497] SHLPEVVAGLSCAFIVLVFVTFLVLQLRSGFSFRGVKVYTMDRGLISYKGLPPEAWQECPSDSEEDEGR
[0498] GERTAFIKDQSAL* (서열 번호: 23).

[0499] 한 구현예에 있어서, 상기 용어 응고 인자는 공자의 응고 인자의 상동체를 더 포함한다. 한 구현예에 있어서, 상기 상동체는 응고 활성을 갖는다. 일부 구현예들에 있어서, 본 발명에 따른 상동성(homology)은 결손, 삽입, 또는 아미노산 치환이 포함된 치환 변이체, 그리고 생물학적으로 이의 활성 폴리펩티드 단편들을 포함한다. 한 구현예에 있어서, 상기 변이체는 보존적 치환, 또는 결손, 삽입, 또는 상기 응고 인자의 3차원 구조를 유의미적

으로 변경시키지 않는 치환을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 결손, 삽입, 또는 치환은 한 구현예에 있어서 특정 결합 짹에 결합하는 관심피험체의 상기 응고 인자의 기능을 변경시키지 않는다.

[0500] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 응고 인자의 상동체를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 응결 활성을 갖는 응고 인자의 상동체를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 기능성 결합을 갖는 응고 인자의 상동체를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응결 활성을 갖는 응고 인자의 상동체들을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 본 명세서에서 설명된 것과 같은 기능성 결합을 갖는 응고 인자의 상동체들을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상동체들은 이를 테면, 디풀트 매개변수를 이용하여 National Center of Biotechnology Information(NCBI)의 BlastP 소프트웨어를 이용하여 측정하였을 때, 응고 인자에 대하여 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 87%, 적어도 89%, 적어도 91%, 적어도 93%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성인 폴리펩티드다.

[0501] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 퓨린의 상동체들을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 구현예에 있어서 전구체 단백질을 절단하는 관심 기능이 유지된 퓨린의 상동체들을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상동체들은 이를 테면, 퓨린 디풀트 매개변수를 이용하여 National Center of Biotechnology Information(NCBI: 미국 국립 생명공학 정보센터)의 BlastP 소프트웨어를 이용하여 측정하였을 때, 퓨린에 대하여 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 87%, 적어도 89%, 적어도 91%, 적어도 93%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성인 폴리펩티드다.

[0502] 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 1 내지 10개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨პ티드(CTP)이 포함된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제시된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 1 내지 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨პ티드(CTP)를 포함하는 폴리펩티드가 본 명세서에서 제시된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와의 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 1-5개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨პ티드(CTP)를 포함하는 폴리펩티드가 본 명세서에서 제시된다. 또 다른 구현예에 있어서, 카르복시 말단에 적어도 하나의 CTP를 갖는 응고 인자가 포함된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제시된다.

[0503] 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 1-5개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨პ티드(CTP)로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제시된다.

[0504] 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 1-5개의 CTPs로 기본적으로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제시된다.

[0505] 본 발명의 상기 조성물들과 방법들은 요소들 또는 단계들을 포함하고, 또 다른 구현예에 있어서, 이들 요소들 또는 단계들로 구성되며, 또는 또 다른 구현예에 있어서, 이들 요소들 또는 단계들로 기본적으로 구성되는 것으로 이해된다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 용어 "포함하는(comprise)"은 표시된 활성 물질, 예를 든다면 상기 CTP-변형된 응고 인자의 함유, 뿐만 아니라 다른 활성 물질들, 그리고 약학 산업 분야에 공지된 약제학적으로 허용가능한 담체들, 부형제들, 완화제들, 안정화제들, 등등의 함유를 지칭한다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 용어 "~로 기본적으로 구성된(consisting essentially of)"이란 조성물의 유일한 활성 성분은 표시된 활성 성분만을 포함하는 조성물을 지칭이지만, 그러나, 조제물(formulation)의 안정화, 보존, 등등을 위한 다른 화합물들이 포함될 수 있으나, 표시된 활성 성분의 치료요법적 효과에 직접적으로 관련되지 않는다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 용어 "~로 기본적으로 구성된(~consisting essentially of)"이란 상기 활성 성분의 방출을 촉진시키는 성분들을 지칭할 수 있다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 용어 "구성된(consisting)"이란 상기 활성 성분과 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제가 함유된 조성물을 지칭한다.

[0506] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 2개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨პ티드(CTP)를 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 2-3개의 CTPs를 포함하는 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 2-4개의 CTPs를 포함하는 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 2-5개의 CTPs를 포함하는 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 2-6개의 CTPs를 포함하는 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 2-7개의 CTPs를 포함하는 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 2-8개의 CTPs를 포함하는 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 2-9개의 CTPs를 포함하는 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 2-10개의 CTPs를 포함하는 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다.

부착된 3-8개의 CTPs로 기본적으로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 3-9개의 CTPs로 기본적으로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 3-10개의 CTPs로 기본적으로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다.

[0516] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 4개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨პ티드(CTP)로 기본적으로 구성된 폴리펩티드를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 4-5개의 CTPs로 기본적으로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 4-6개의 CTPs로 기본적으로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 4-7개의 CTPs로 기본적으로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 4-8개의 CTPs로 기본적으로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 4-9개의 CTPs로 기본적으로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 4-10개의 CTPs로 기본적으로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다.

[0517] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 5개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨პ티드(CTP)로 기본적으로 구성된 폴리펩티드를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 5-6개의 CTPs로 기본적으로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 5-7개의 CTPs로 기본적으로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 5-8개의 CTPs로 기본적으로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 5-9개의 CTPs로 기본적으로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 5-10개의 CTPs로 기본적으로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다.

[0518] 또 다른 구현예에 있어서, 명세서에서 기술된 바와 같이, 아미노 말단에 CTPs가 없는 응고 인자를 포함하는 폴리펩티드, 기본적으로 아미노 말단에 CTP없는 응고인자로 구성된 폴리펩티드, 또는 아미노 말단에 CTP없는 응고 인자로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 아미노 말단에 CTP가 부족한 응고인자를 포함하는 폴리펩티드, 아미노 말단에 CTP가 부족한 응고인자로 구성된 폴리펩티드, 또는 아미노 말단에 CTP가 부족한 응고인자로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 명세서에서 기술된 바와 같이, 카르복시 말단에 적어도 하나의 CTP를 갖고 아미노 말단에는 CTP가 없는 응고 인자를 포함하는 폴리펩티드, 카르복시 말단에 적어도 하나의 CTP를 갖고 아미노 말단에는 CTP가 없는 응고 인자로 기본적으로 구성된 폴리펩티드, 또는 카르복시 말단에 적어도 하나의 CTP를 갖고 아미노 말단에는 CTP가 없는 응고 인자로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 또 다른 구현예에 있어서, 명세서에서 기술된 바와 같이, 카르복시 말단에 일정 수의 CTP를 갖고 아미노 말단에는 CTP가 없는 응고 인자를 포함하는 폴리펩티드, 카르복시 말단에 일정 수의 CTP를 갖고 아미노 말단에는 CTP가 없는 응고 인자로 기본적으로 구성된 폴리펩티드, 또는 카르복시 말단에 일정 수의 CTP를 갖고 아미노 말단에는 CTP가 없는 응고 인자로 구성된 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다.

[0519] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 상기 명세서에서 기술된 바와 같이 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0520] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드와 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨პ티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현 벡터를 포함하는 조성물을 더 제공한다.

[0521] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 FVIIa 폴리펩티드와 이 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨პ티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 더 제공한다.

[0522] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 상기 본 명세서에서 설명된 것과 같은 재조합 응고 인자를 제공한다. 한 구현예에 있어서, 본 발명은 상기 본 명세서에서 설명된 것과 같은 조작된(engineered) 응고 인자를 제공한다. 한 구현예에 있어서, 상기 본 명세서에서 설명된 것과 같은 상기 조작된 응고 인자는 CTP-변형된 응고 인자로 지칭된다.

다.

[0523] 한 구현예에 있어서, 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 CTPs는 상기 카르복시 말단에 일렬(tandem)로 부착된다.

[0524] 한 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 조작된 응고 인자는 CTP-변형되지 않은 응고 인자와 비교하였을 때 등가의 또는 개선된 생물학적 활성을 갖는다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 조작된 응고 인자는 CTP-변형되지 않은 응고 인자와 비교하였을 때 등가의 또는 개선된 약리학적 측정치(Measurements)를 갖는다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 조작된 응고 인자는 CTP-변형되지 않은 응고 인자와 비교하였을 때 등가의 또는 개선된 약동학(pharmacokinetics)을 갖는다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 조작된 응고 인자는 CTP-변형되지 않은 응고 인자와 비교하였을 때 등가의 또는 개선된 약력학(pharmacodynamics)을 갖는다.

[0525] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 응고 또는 응고 장애를 예방 또는 치료하는 방법을 제시한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 피험체에게서 혈우병을 예방 또는 치료하는 방법을 제시하는데, 이 방법은 본 발명의 CTP-변형된 응고 인자의 투여를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 피험체에게서 혈우병을 예방 및 치료 방법을 제시하는데, 이 방법은 본 발명의 CTP-변형된 응고 인자의 투여를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 피험체에게서 혈우병을 치료하는 방법을 제시하는데, 이 방법은 본 발명의 CTP-변형된 FVII의 투여를 포함한다.

[0526] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 피험체에게서 혈우병을 치료하는 방법이 제시되는 데 이 방법은 본 발명의 CTP-변형된 FIX의 투여를 포함한다. 한 구현예에 있어서, 혈우병은 B형 혈우병이다. 한 구현예에 있어서, B형 혈우병은 FIX 결핍 또는 크리스마스 병으로 공지되어 있다. 한 구현예에 있어서 상기 혈우병은 중증 혈우병이며, 한 구현예에 있어서 상기 응고 인자 농도가 0~1%인 혈우병이 설명된다. 또 다른 구현예에 있어서 상기 혈우병은 중간농도의 혈우병이며, 한 구현예에 있어서, 상기 응고 인자 농도가 1~5%인 혈우병이 설명된다. 또 다른 구현예에 있어서 상기 혈우병은 경증 혈우병이며, 한 구현예에 있어서 상기 응고 인자 농도가 5~50%인 혈우병이 설명된다.

[0527] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 응고 또는 응고 장애를 예방 또는 치료하는 방법을 제시하며, 이 방법은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드와 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)이 부착된 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드를 상기 피험체에게 투여하는 것을 포함하고, 그렇게 함으로써 이 피험체에서 응고 또는 응고 장애가 예방 또는 치료된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 피험체에서 응고 또는 응고 장애를 방 또는 치료하는 방법을 제시하는데, 이 방법은 인자 VII (FVII) 폴리펩티드와 상기 인자 VII (FVII) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프트드(CTP)가 포함된 CTP-변형된 인자 VII (FVII) 폴리펩티드를 상기 피험체에게 투여하는 것을 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 피험체에서 응고 또는 응고 장애가 예방 또는 치료된다.

[0528] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 피험체에게서 혈우병을 예방 또는 치료하는 방법을 제시하는데, 이 방법은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드와 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)이 부착된 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드를 상기 피험체에게 투여하는 것을 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 피험체의 혈우병을 예방 또는 치료한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 피험체에게서 혈우병을 예방 또는 치료하는 방법을 제시하는데, 이 방법은 FVIIa 폴리펩티드와 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)가 포함된 CTP-변형된 FVIIa 폴리펩티드를 상기 피험체에게 투여하는 것을 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 피험체의 혈우병을 예방 또는 치료한다.

[0529] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 피험체에게서 혈우병을 치료하는 방법을 제시하는데, 이 방법은 본 명세서에서 설명된 것과 같은 하나 또는 그 이상의 CTP-변형된 응고 인자들을 상기 피험체에게 투여하는 것을 포함한다. 따라서, 한 구현예에 있어서, 본 발명은 피험체에게서 혈우병을 치료하는 방법을 제시하는데, 이 방법은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드와 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)이 포함된 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드 그리고 FVIIa 폴리펩티드와 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)이 포함된 CTP-변형된 FVIIa 폴리펩티드를 상기 피험체에게 투여하는 것을 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 피험체의 혈우병은 치료된다. 한 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 FIX와 상기 CTP-변형된 FVIIa는 동일한 시간에 동일한 조성물로 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 FIX와 상기 CTP-변형된 FVIIa는 동일한 시간

있어서, 본 발명은 피험체에게서 혈우병을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 데, 이 방법은 FIX와 인자 VII (FVII) 폴리펩티드와 상기 FIX와 상기 인자 VII (FVII) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3-5개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프트드(CTP)이 포함된 CTP-변형된 FIX와 CTP-변형된 인자 VII (FVII) 폴리펩티드를 상기 피험체에게 피하 또는 정맥으로 투여하는 것을 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 피험체의 혈우병을 예방 또는 치료한다.

[0532] 일부 구현예들에 있어서, 피험체에서 혈우병을 예방 또는 치료하는 방법이 본 명세서에서 제시되는 데, 상기 방법은 상기 피험체에게 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 3 내지 5개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프트드(CTP)를 포함하는 CTP-변형된 응고 인자 폴리펩티드를 투여하는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 피험체에서 혈우병을 예방하고, 이때 상기 CTP-변형된 응고 인자의 서열은 서열 번호: 25, 27, 또는 29로 구성된 군에서 선택된다.

[0533] 일부 구현예들에 있어서, 피험체에서 혈우병을 예방 또는 치료하는 방법이 본 명세서에서 제시되는 데, 상기 방법은 상기 피험체에게 상기 인자 VII (FVII) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3-5개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프트드(CTP)이 포함된 CTP-변형된 FVII를 피하 투여하는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 피험체에서 혈우병을 예방하고, 이때 상기 CTP-변형된 FVII의 서열은 서열 번호: 25, 27, 또는 29로 구성된 군에서 선택된다.

[0534] 다른 구현예들에 있어서, 상기 조작된 응고 인자는 B형 혈우병 환자들의 치료용이다. 한 구현예에 있어서, 카르복시 말단에 일렬로 3개의 CTPs가 포함된 응고 인자 IX는 B형 혈우병 환자의 치료용이다. 한 구현예에 있어서, 카르복시 말단에 일렬로 4개의 CTPs가 포함된 응고 인자 IX는 B형 혈우병 환자의 치료용이다. 한 구현예에 있어서, 카르복시 말단에 일렬로 5개의 CTPs가 포함된 응고 인자 IX는 B형 혈우병 환자의 치료용이다. 또 다른 구현예에 있어서, 카르복시 말단에 일렬로 2개의 CTPs가 포함된 응고 인자 IX는 B형 혈우병 환자의 치료용이다. 또 다른 구현예에 있어서, 카르복시 말단에 일렬로 1개의 CTPs 반복부가 포함된 응고 인자 IX는 B형 혈우병 환자의 치료용이다. 다른 구현예들에 있어서, 상기 조작된 응고 인자는 환자에게 필요한 주입 수를 감소시킬 수 있으며, 환자에게 요구되는 투여분량(dose)을 감소시킬 수 있으며, 또는 이의 조합도 가능하다.

[0535] 한 구현예에 있어서, 카르복시 말단에 일렬로 된 3개의 CTPs가 포함된 응고 인자 IX는 FIX-CTP-CTP 수확물, FIX-CTP 수확물 또는 rhFIX와 비교하여 이의 응결 활성은 유지되면서 개선된 PK 프로파일을 나타낸다. 한 구현예에 있어서, rFIX-CTP3의 제거 반감기는 쥐과 FIX-결핍 마우스에서 rFIX보다 2.5 내지 4-배 더 길다. 한 구현예에 있어서, FIX-결핍 마우스에서 rFIX-CTP3의 투여로 투여후 적어도 76 시간 동안 전응집 효과(procoagulatory effect)는 상당히 연장되었다. 한 구현예에 있어서, rFIX-CTP3의 투여는 FIX-결핍 마우스에서 rFIX보다 더 높은 활성 피크를 만들었다. 또 다른 구현예에 있어서, 카르복시 말단에 일렬로 2개의 CTPs가 포함된 응고 인자 IX는 FIX-CTP 수확물 또는 rhFIX와 비교하여 이의 응고 활성은 유지되면서 개선된 PK 프로파일을 나타낸다. 또 다른 구현예에 있어서, 카르복시 말단에 일렬로 2개의 CTPs가 포함된 응고 인자 IX는 rhFIX와 비교하였을 때, 반감기는 3-배 증가된 반감기와 4.5-배 더 높은 AUC를 나타낸다.

[0536] 또 다른 구현예에 있어서, SC 투여는 재조합 FVII와 비교하였을 때, 더 높은 CTP-변형된 FVII의 생체이용율을 초래한다. 또 다른 구현예에 있어서, NovoSeven®의 SC 투여와 비교하였을 때 FVIIa-CTP3과 FVIIa-CTP5의 SC 투여 후 반감기는 더 길고, 생체이용율(AUC SC/AUC IV)은 더 높다. 또 다른 구현예에 있어서, MOD-5014와 MOD-5019의 피하 주사는 재조합 FVII(NovoSeven®)과 비교하여 개선된 마우스 생존을 나타낸다(아래 실시예 8 참조).

[0537] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 용어 "CTP 웨프트드", "카르복시 말단 웨프트드" 그리고 "CTP 서열"은 본 명세서에서 호환된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 카르복시 말단 웨프트드는 전장(full-length)의 CTP다. 각 가능성은 본 발명의 별도 구현예를 나타낸다.

[0538] 또 다른 구현예에 있어서, 신호 웨프트드는 US 7,553,940(이의 전문이 참조함으로써 본 명세서에 포함된다)에서 설명된 것과 같이, 상기 CTP의 아미노 말단에 부착된다.

[0539] 다른 구현예들에 있어서, 상기 용어 조작된 응고 인자는 성숙된(matured) 응고 인자의 아미노산 서열을 지칭한다. 다른 구현예들에 있어서, 상기 용어 조작된 응고 인자는 응고인자의 신호 서열 또는 신호 웨프트드가 포함된 상기 응고 인자의 아미노산 서열을 지칭한다.

[0540] 또 다른 구현예에 있어서, "신호 서열" 및 "신호 웨프트드"는 본 명세서에서 호환된다. 또 다른 구현예에 있어서, 폴리뉴클레오티드 문자를 언급할 때 "서열"은 코딩 부분을 지칭할 수 있다. 각 가능성은 본 발명의 별도 구현예

를 나타낸다.

[0541] 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 적어도 하나의 CTP가 포함된 조작된 응고 인자는 적어도 하나의 CTP가 없는 동일한 응고 인자와 비교하였을 때, 강화된 생체내 생체내 생물학적 활성을 보유한다. 한 구현예에 있어서, 상기 강화된 생물학적 활성은 상기 조작된 응고 인자의 더 연장된 반감기로부터 생성되며, 반면 적어도 일부 생물학적 활성은 유지된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 강화된 생물학적 활성은 상기 CTP 변형으로 인한 강화된 생물학적 활성으로부터 생성된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 강화된 생물학적 활성은 상기 CTP-변형된 응고 인자의 연장된 반감기와 강화된 기능성 모두로부터 생성된다.

[0542] 일부 구현예들에 있어서, 상기 응고 인자의 카르복시 말단 끝에 있는 적어도 하나의 CTP 서열은 응고 인자의 분해에 대항하여 강화된 보호를 제공한다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 응고 인자의 카르복시 말단 끝에 있는 적어도 하나의 CTP 서열은 제거(clearance)에 대항하여 강화된 보호를 제공한다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 응고 인자의 카르복시 말단 끝에 있는 적어도 하나의 CTP 서열은 연장된 제거 시간을 제공한다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 응고 인자의 카르복시 말단 끝에 있는 적어도 하나의 CTP 서열은 이의 Cmax를 강화시킨다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 응고 인자의 카르복시 말단 끝에 있는 적어도 하나의 CTP 서열은 이의 Tmax를 강화시킨다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 응고 인자의 카르복시 말단 끝에 있는 적어도 하나의 CTP 서열은 이의 T½를 연장시킨다.

[0543] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 접합된(conjugated) 응고 인자는 변형되지 않은 접합된 응고 인자와 동일한 방식으로 이용된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 접합된 응고 인자는 증가된 순환하는 반감기와 혈장 잔류 시간, 감소된 제거, 그리고 증가된 임상적 활성(생체내)을 갖는다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같이, 상기 접합된 응고 인자의 개선된 성질들로 인하여, 이러한 접합체(conjugate)는 동일한 응고 인자의 변형되지 않은 형태보다 덜 빈번하게 투여된다.

[0544] 또 다른 구현예에 있어서 감소된 투여 빈도로 개선된 치료 전략을 초래할 것이며, 한 구현예에 있어서, 감소된 투여 빈도는 개선된 환자 순응성으로 이어지고, 이는 개선된 치료 성과, 뿐만 아니라 개선된 환자 삶의 질로 이어질 수 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자들의 통상적인 접합체들과 비교하였을 때, 본 발명의 분자량과 링커(linker) 구조를 갖는 접합체들은 개선된 효능, 개선된 안정성, 상승된 AUC 농도, 그리고 강화된 순환 반감기를 갖는다는 것을 알았다.

[0545] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드와 상기 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)이 포함된 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드가 포함된 약제학적 조성물을 더 제공한다.

[0546] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 FVIIa 폴리펩티드와 상기 FVIIa의 카르복시 말단에 부착된 5개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 FVIIa 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물을 더 제공한다.

[0547] 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 접합된 응고 인자가 포함된 조성물이 본 명세서에서 제시된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 상기 접합된 응고 인자가 포함된 약제학적 조성물이 본 명세서에서 제시된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 치료요법적으로 효과량의 상기 접합된 응고 인자가 포함된 약제학적 조성물이 본 명세서에서 제시된다. 한 구현예에 있어서, 치료요법적으로 효과량의 접합된 응고 인자는 예를 든다면 치료될 특정 병, 치료되는 환자의 상태, 뿐만 아니라 조성물내 다른 성분들과 같은 인자들에 따라 결정된다.

[0548] 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 접합된 응고 인자는 혈우병을 앓는 피험체의 치료에 유용하다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 접합된 응고 인자는 혈우병의 예방 요법에 유용하며, 따라서 출혈 및 연합된 여명 위험이 감소된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 접합된 응고 인자는 투여된 외부생성된 응고 인자들에 대한 억제성 항체 발달 위험은 감소시키면서, 혈우병을 앓는 피험체의 치료에 유용하다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 접합된 응고 인자는 혈우병을 앓는 피험체의 치료에 유용하며, 따라서 생체항상성이 유도된다.

[0549] 한 구현예에 있어서, 본 발명의 CTP-변형된 응고 인자는 치료요법적 용도들을 갖는다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 CTP-변형된 응고 인자는 예방 용도들을 갖는다.

[0550] 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 접합된 응고 인자는 과도한 출혈 또는 타박상을 경험한 또는 연장된 프로트롬빈 시간(PT) 또는 부분적 트롬보플라스틴 시간(PTT)을 갖는 피험체의 치료에 유용하

다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 접합된 응고 인자는 출혈을 야기하는 후천적으로 얻은(acquired) 상태, 예를 든다면 비타민 K 결핍 또는 간 질환을 가진 피험체의 치료에 유용하다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 접합된 응고 인자는 후천적으로 얻은 (다른 질환들로 인하여) 또는 유전된, 경미한 또는 심각한, 영구적인 또는 일과적인 응고 인자들이 결핍된 피험체의 치료에 유용하다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 접합된 응고 인자는 혈우병 A를 앓는 피험체의 치료에 유용하다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 접합된 응고 인자는 B형 혈우병을 앓는 피험체의 치료에 유용하다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 접합된 응고 인자는 만성 질환, 예를 든다면 간 질환 또는 암으로 인하여 후천적으로 얻은 결핍을 갖는 피험체의 치료에 유용하고; 급성 상태 예를 든다면, 빠른 속도로 응고 인자들을 소모하는 과종성(disseminated) 혈관내 응결(DIC)로 인한 후천적으로 얻은 결핍을 갖는 피험체의 치료에 유용하고; 비타민 K의 결핍으로 인하여 후천적으로 얻은 결핍을 갖는 피험체의 치료에 유용하고, 또는 비타민 K 결핍제 유사 와파린 (제2, 7, 9, 및 10인자 생산은 비타민 K를 필요로 함) 치료에 유용하다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 접합된 응고 인자는 응고 불균형(imbalances)을 야기하는 질환, 예를 든다면, 간 질환, 요독증, 암, 골수 장애, 뱀독에 노출, 비타민 K 결핍, 항응결 요법, 항응혈제 와파린의 우발적 섭취, 다중의 혈액 수혈(보관된 혈액 유닛은 이들의 일부 응고 인자를 상실한다), 또는 이의 조합을 포함하나 이에 국한되지 않은 질환에 걸린 피험체의 치료에 유용하다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 피험체에게 본 발명의 CTP-변형된 응고 인자를 투여하는 것이 포함된, 상기 피험체에서 심정맥 혈전증을 치료하는 방법을 제시한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 혈우병이 있는 피험체에게 본 발명의 CTP-변형된 응고 인자를 투여하는 것이 포함된, 상기 피험체에서 통제불능 출혈을 예방하는 방법을 제시한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 혈우병이 있는 피험체에게 본 발명의 CTP-변형된 응고 인자를 투여하는 것이 포함된, 상기 피험체에서 출혈 사건을 예방하는 방법을 제시한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 B형 혈우병이 있는 피험체(선천적 FIX 결핍)에게서 출혈 사건을 제어하는 방법을 제시한다.

[0551]

또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조성물들과 방법들은 FVIII 또는 FIX에 대한 억제제들이 있는 혈우병 A 또는 B 환자들 그리고 후천적으로 얻은 혈우병이 있는 환자들에게서 출혈 사건을 치료하기 위한 것이며; FVIII 또는 FIX에 대한 억제제들이 있는 혈우병 A 또는 B 환자들 그리고 후천적으로 얻은 혈우병이 있는 환자들에 있어서 외과적 중재(surgical interventions) 또는 침투성 처리의 경우 출혈을 예방하기 위한 것이며; 선천적 FVII 결핍된 환자들에게서 출혈 사건의 치료 및 선천적 FVII 결핍이 있는 환자들에게서 외과적 중재 또는 침투성 처리의 경우 출혈을 예방하기 위한 것이다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조성물들과 방법들은 근육 출혈의 치료 및 예방용이다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조성물들과 방법들은 관절 출혈의 치료 및 예방용이다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조성물들과 방법들은 코피 및 잇몸(gum) 출혈, 점막 출혈, 중추신경계로의 출혈의 치료요법적 또는 예방 치료를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조성물들과 방법들은 위장 또는 뇌 출혈의 치료요법적 또는 예방 치료를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조성물들과 방법들은 낮은 빈도 약한 출혈의 치료요법적 또는 예방 치료를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조성물들과 방법들은 낮은 빈도 중간 출혈의 치료요법적 또는 예방 치료를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조성물들과 방법들은 높은 빈도 약한 출혈의 치료요법적 또는 예방 치료를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조성물들과 방법들은 높은 빈도 중간 출혈의 치료요법적 또는 예방 치료를 제공한다.

[0552]

한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조성물들과 방법들은 무증상 혈우병의 치료요법적 또는 예방 치료를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조성물들과 방법들은 약한 내지 중간 농도의 혈우병의 치료요법적 또는 예방 치료를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조성물들과 방법들은 중증 혈우병의 치료요법적 또는 예방 치료를 제공한다.

[0553]

한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조성물들과 방법들은 출혈의 치료요법적 또는 예방 치료를 제공하는 데, 한 구현예는 통제불능의 출혈이며, 그리고 또 다른 구현예는 뇌안의 출혈이다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조성물들과 방법들은 신생아 응혈장애; 심각한 간 질환; 고-위험 외과수술; 외상성 혈액 손실; 골수 이식; 혈소판감소증 및 혈소판 기능 장애들; 구강 항응결의 긴급 역전; 제5, 7, 10, 및 11인자의 선천적 결핍; 또는 폰 빌레브란트 병의 치료요법적 또는 예방 치료를 제공하고, 한 구현예에 있어서, 폰 빌레브란트 인자에 대한 억제제를 갖는 폰 빌레브란트 병의 치료요법적 또는 예방 치료를 제공한다.

[0554]

한 구현예에 있어서, 본 발명의 CTP-변형된 응고 인자는 본 명세서에서 설명된 것과 같이 피험체의 혈우병 또는 관련 질환의 치료용이다. 한 구현예에 있어서, 상기 피험체는 인간이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 피험체

는 가축이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 피험체는 포유류다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 피험체는 농장 동물이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 피험체는 원숭이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 피험체는 말이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 피험체는 소다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 피험체는 마우스다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 피험체는 쥐(rat)이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 피험체는 갯과 동물이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 피험체는 고양잇과 동물이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 피험체는 소, 양, 돼지, 말, 뮤린(murine), 또는 사슴이다. 한 구현예에 있어서, 상기 피험체는 남성이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 피험체는 여성이다. 한 구현예에 있어서, 상기 피험체는 어린이고, 또 다른 구현예에 있어서, 청소년이며, 또 다른 구현예에 있어서, 성인이거나 또는, 또 다른 구현예에 있어서, 노인이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 피험체는 어린 피험체이며, 또 다른 구현예에 있어서, 늙은 피험체이다.

[0555] 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같이 [(CTP)n>1-응고 인자]는 카르복시 말단에서 펩티드 결합을 통하여 적어도 하나의 CTP 유닛에 연계된 전장의 응고 인자 또는 이의 활성 단편을 포함하며, 이의 아미노 말단에는 CTPs가 없다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같이 [(CTP)n>1-응고 인자]는 본 명세서에서 설명된 것과 같은 적어도 하나의 CTP 유닛에 펩티드 결합을 통하여 연계된 응고 인자 또는 이의 활성 단편을 포함하며, 이때 상기 CTP 유닛은 펩티드 결합을 통하여 추가 CTP 유닛에 연계되며, 이의 아미노 말단에는 CTPs가 없다. 또 다른 구현예에 있어서, 하나의 핵산 분자는 이의 C-말단에 부착된 적어도 하나의 CTP가 포함된 조작된 응고 인자를 인코딩하고, 그리고 이의 아미노 말단에는 CTPs가 없다.

[0556] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP는 링커를 경유하여 상기 응고 인자에 부착된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP 서열을 상기 응고 인자에 연결시키는 상기 링커는 공유 결합이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP 서열을 상기 응고 인자에 연결시키는 상기 링커는 펩티드 결합이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP 서열을 상기 응고 인자에 연결시키는 상기 링커는 치환된 펩티드 결합이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP 서열은 다음을 포함한다: DPRFQDSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL (서열 번호: 1). 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP 서열은 다음을 포함한다: SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (서열 번호: 2). 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP 서열은 서열 번호: 1과 서열 번호: 2에서 제시되는 서열로부터 선별된 아미노산 서열을 포함한다.

[0557] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 카르복시 말단 펩티드(CTP)는 서열 번호: 1에서 제시된 바와 같이 인간 융모막 고나도트로핀의 아미노산 112 내지 위치 145의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 CTP 서열은 서열 번호: 2에서 제시된 바와 같이 인간 융모막 고나도트로핀의 아미노산 118 내지 위치 145의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP 서열은 인간 융모막 고나도트로핀의 위치 112-118 사이의 임의의 위치에서 시작되며, 그리고 인간 융모막 고나도트로핀의 위치 145에서 종료된다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 CTP 서열 펩티드의 길이는 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개 또는 34개의 아미노산이며, 그리고 상기 CTP 아미노산 서열의 위치 112, 113, 114, 115, 116, 117 또는 118에서 시작된다.

[0558] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP 펩티드는 융모막 고나도트로핀 CTP의 변이체이며, 상기 변이체는 미국 특허 5,712,122(이의 전문이 참조함으로써 명세서에 포함된다)에서 설명된 것과 같이 1-5개 보존적 아미노산 치환에 의해 고유(native) CTP와는 상이하다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP 펩티드는 융모막 고나도트로핀 CTP의 변이체이며, 상기 변이체는 1개의 보존적 치환에 의해 고유 CTP와 상이하다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP 펩티드는 융모막 고나도트로핀 CTP의 변이체이며, 상기 변이체는 2개의 보존적 치환에 의해 고유 CTP와 상이하다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP 펩티드는 융모막 고나도트로핀 CTP의 변이체이며, 상기 변이체는 3개의 보존적 치환에 의해 고유 CTP와 상이하다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP 펩티드는 융모막 고나도트로핀 CTP의 변이체이며, 상기 변이체는 4개의 보존적 치환에 의해 고유 CTP와 상이하다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP 펩티드는 융모막 고나도트로핀 CTP의 변이체이며, 상기 변이체는 5개의 보존적 치환에 의해 고유 CTP와 상이하다.

[0559] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 CTP 펩티드 아미노산 서열은 상기 고유 CTP 아미노산 서열 또는 이의 펩티드에 적어도 70% 상동성이다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 CTP 펩티드 아미노산 서열은 상기 고유 CTP 아미노산 서열 또는 이의 펩티드에 적어도 80% 상동성이다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 CTP 펩티드 아미노산 서열은 상기 고유 CTP 아미노산 서열 또는 이의 펩티드에 적어도 90% 상동성이다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 CTP 펩티드 아미노산 서열은 상기 고유 CTP 아미노산 서열 또는 이의 펩티드에 적어도 95% 상동성이다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 CTP 펩티드 아미노산 서열은 상기 고유 CTP 아미노산 서열 또는 이의 펩티드에 적어도 98% 상동성이다.

[0560] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 CTP 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기 고유 인간 CTP

DNA 서열 또는 이의 펩티드에 적어도 70% 상동성이다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 CTP 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기 고유 인간 CTP DNA 서열 또는 이의 펩티드에 적어도 80% 상동성이다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 CTP 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기 고유 인간 CTP DNA 서열 또는 이의 펩티드에 적어도 90% 상동성이다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 CTP 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기 고유 인간 CTP DNA 서열 또는 이의 펩티드에 적어도 95% 상동성이다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 CTP 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기 고유 인간 CTP DNA 서열 또는 이의 펩티드에 적어도 98% 상동성이다.

[0561] 한 구현예에 있어서, 적어도 하나의 상기 용모막 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열은 절두된다(truncated). 또 다른 구현예에 있어서, 상기 용모막 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열은 모두 절두된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 용모막 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열중 2개는 절두된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 용모막 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열중 3개는 절두된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 용모막 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열중 4개는 절두된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 용모막 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열중 5개는 절두된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 용모막 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열중 2개 또는 그 이상은 절두된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 용모막 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열은 모두 절두된다. 한 구현예에 있어서, 상기 절두된 CTP는 서열 번호: 3의 처음 10개 아미노산을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 서열 번호: 3은 다음의 아미노산(AA) 서열을 포함한다: SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ.

[0562] 한 구현예에 있어서, 상기 절두된 CTP는 서열 번호: 4의 처음 10개 아미노산을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 서열 번호: 4는 다음의 아미노산(AA) 서열을 포함한다: SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ.

[0563] 한 구현예에 있어서, 상기 절두된 CTP는 서열 번호: 4의 처음 11개 아미노산을 포함한다. 한 구현예에 있어서, 상기 절두된 CTP는 서열 번호: 4의 처음 12개 아미노산을 포함한다. 한 구현예에 있어서, 상기 절두된 CTP는 서열 번호: 4 또는 서열 번호: 3의 처음 8개 아미노산을 포함한다. 한 구현예에 있어서, 상기 절두된 CTP는 서열 번호: 4의 처음 13개 아미노산을 포함한다. 한 구현예에 있어서, 상기 절두된 CTP는 서열 번호: 4의 처음 14개 아미노산을 포함한다. 한 구현예에 있어서, 상기 절두된 CTP는 서열 번호: 4 또는 서열 번호: 3의 처음 6개 아미노산을 포함한다. 한 구현예에 있어서, 상기 절두된 CTP는 서열 번호: 4 또는 서열 번호: 3의 처음 5개 아미노산을 포함한다.

[0564] 한 구현예에 있어서, 상기 용모막 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열중 적어도 하나는 당화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 용모막 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열 양쪽은 당화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 용모막 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열중 2개는 당화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 용모막 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열중 3개는 당화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 용모막 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열중 4개는 당화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 용모막 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열중 5개는 당화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 용모막 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열중 2개 또는 그 이상은 당화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 모든 용모막 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열은 당화된다.

[0565] 한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 CTP 서열은 적어도 하나의 당화 부위를 포함한다. 한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 CTP 서열은 2개의 당화 부위를 포함한다. 한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 CTP 서열은 3개의 당화 부위를 포함한다. 한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 CTP 서열은 4개의 당화 부위를 포함한다. 한 구현예에 있어서, 하나 또는 그 이상의 상기 용모막 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열은 완전하게 당화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 하나 또는 그 이상의 상기 용모막 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열은 부분적으로 당화된다. 한 구현예에 있어서, 부분적 당화는 상기 CTP 당화 부위중 하나가 당화된 것을 나타낸다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP 당화 부위들중 2개가 당화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP 당화 부위들중 3개가 당화된다.

[0566] 일부 구현예들에 있어서, 상기 CTP 서열 변형은 더 낮은 투약량(dosages)의 사용을 허용하는 데 유익하다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 CTP 서열 변형은 더 적은 투약량을 허용하는 데 유익하다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 CTP 서열 변형은 안전한, 장기-작용 효과를 허용하는 데 유익하다.

[0567] 일부 구현예들에 있어서, 본 명세서에서 이용된 바와 같이 "폴리펩티드", "조작된 응고 인자", 또는 "단백질"은 고유 폴리펩티드(분해 산물들, 합성에 의해 합성된 폴리펩티드 또는 재조합 폴리펩티드)와 펩티드모방체(peptidomimetics) (전형적으로, 합성에 의해 합성된 폴리펩티드), 뿐만 아니라 폴리펩티드 유사체인 웨토이드와 세미웨토이드를 포괄하는 데, 일부 구현예들에 있어서, 응고인자가 포함된 상기 폴리펩티드에게 신체 안에서 응고 인자를 좀더 안정적으로 하는 또는 세포 안으로 더 잘 침투할 수 있도록 하는 변형을 제공한다.

- [0568] 일부 구현예들에 있어서, 변형은 C 말단 변형, 다음이 포함된 폴리펩티드 결합 변형이 포함되나 이에 국한되지 않는다: CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH 또는 CF=CH, 골격(backbone) 변형, 및 잔기 변형. 웹티드모방체 화합물들을 제조하는 방법들은 당 분야에 공지되어 있으며, 예를 들면, Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992)에서 설명되어 있고, 이는 전문이 제시된 것과 같이 명세서의 참고자료에 편입된다. 이에 대한 상세한 설명은 하기에 제시된다.
- [0569] 일부 구현예들에 있어서, 상기 폴리펩티드 안에 폴리펩티드 결합 (-CO-NH-)은 치환된다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 폴리펩티드 결합은 N-메틸화된 결합 (-N(CH₃)-CO-)에 의해 치환된다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 폴리펩티드 결합은 에스테르 결합 (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-)에 의해 치환된다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 폴리펩티드 결합은 케토메틸렌 결합 (-CO-CH₂-)에 의해 치환된다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 폴리펩티드 결합은 α-아자 결합 (-NH-N(R)-CO-)에 의해 치환되며, 이때 R은 임의의 알킬, 이를 테면, 메틸, 카르바(carba) 결합 (-CH₂-NH-)이다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 폴리펩티드 결합은 히드록시메틸렌 결합 (-CH(OH)-CH₂-)에 의해 치환된다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 폴리펩티드 결합은 티오아미드 결합 (-CS-NH-)에 의해 치환된다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 폴리펩티드 결합은 올레핀 이중 결합 (-CH=CH-)에 의해 치환된다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 폴리펩티드 결합은 레트로 아미드 결합 (-NH-CO-)에 의해 치환된다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 폴리펩티드 결합은 폴리펩티드 유도체들(-N(R)-CH₂-CO-)에 의해 치환되며, 이때 R은 탄소 원자 상에 자연적으로 제시되는 "정상적인" 측쇄다. 일부 구현예들에 있어서, 이들 변형은 상기 폴리펩티드 쇄를 따라 임의의 결합에서 일어나며, 한 구현예는 동시에 몇 군데(2-3개 결합)에서 일어난다.
- [0570] 일부 구현예들에 있어서, 상기 폴리펩티드의 천연 방향족 아미노산들, 예를 든다면 Trp, Tyr 및 Phe는 합성된 비-천연 산으로 치환되는 데, 예를 든다면 페닐글리신, TIC, 나프틸엘알라닌 (No1), Phe의 고리(ring)-메틸화된 유도체들, Phe의 할로겐화된 유도체들 또는 o-메틸-Tyr이다 일부 구현예들에 있어서, 본 발명의 상기 폴리펩티드는 하나 또는 그 이상의 변형된 아미노산 또는 하나 또는 그 이상의 비-아미노산 단량체(이를 테면 지방산, 복합 탄수화물 등등)를 포함한다.
- [0571] 한 구현예에 있어서, "아미노산" 또는 "아미노산 서열"은 자연적으로 생성되는 20개의 아미노산을 포함하는 것으로 이해된다; 이들 아미노산은 대개 생체내에서 해독후 변형되는 데, 예를 들면, 히드록시프롤린, 포스포세린 그리고 포스포트레오닌; 그리고 2-아미노아디프산, 히드록시세린, 이소데스모신(isodesmosine), 노르-발린, 노르-류신 및 오르니틴이 포함되나 이에 국한되지 않은 기타 독특한 아미노산. 한 구현예에 있어서, "아미노산"은 D-아미노산과 L-아미노산을 모두 포함한다.
- [0572] 일부 구현예들에 있어서, 본 발명의 상기 폴리펩티드는 응고 인자가 포함된 가용성 형태(soluble form)의 상기 폴리펩티드를 요구하는 치료제에 이용된다. 일부 구현예들에 있어서, 본 발명의 상기 폴리펩티드는 히드록실이 함유된 측쇄로 인하여 폴리펩티드 용해도를 증가시킬 수 있는 세린 및 트레오닌이 포함되나 이에 국한되지 않는 하나 또는 그 이상의 비-천연 또는 천연 극성 아미노산을 포함한다.
- [0573] 일부 구현예들에 있어서, 본 발명의 상기 조작된 응고 인자는 직선형(linear form)으로 이용되지만, 고리화(cyclization)에 의해 조작된 응고 인자들 특징을 심각하게 방해하지 않는 경우, 고리형의 상기 조작된 응고 인자들 또한 이용될 수 있다는 것을 당업자는 인지할 수 있을 것이다.
- [0574] 일부 구현예들에 있어서, 본 발명의 상기 조작된 응고 인자들은 생화학적으로 합성되는 데, 예를 든다면 표준 고형 상 기술(standard solid phase techniques)에 의해 합성된다. 일부 구현예들에 있어서, 이들 생화학 방법들은 배타적 고형 상 합성, 부분적 고형 상 합성, 단편 응축(condensation), 또는 고전적 용액 합성을 포함한다.
- [0575] 일부 구현예들에 있어서, 재조합 단백질 기술은 본 발명의 상기 조작된 응고 인자들을 만드는데 이용된다. 일부 구현예들에 있어서, 재조합 단백질 기술은 상대적으로 긴 폴리펩티드(이를 테면, 18-25개보다 더 긴 아미노산)의 생산에 이용된다. 일부 구현예들에 있어서, 재조합 단백질 기술은 본 발명의 상기 조작된 응고 인자들을 다량 생산할 때 이용된다. 일부 구현예들에 있어서, 재조합 기술은 Bitter 및 다른 사람들, (1987) Methods in Enzymol. 153:516-544, Studier 및 다른 사람들(1990) Methods in Enzymol. 185:60-89, Brisson 및 다른 사람들(1984) Nature 310:511-514, Takamatsu 및 다른 사람들(1987) EMBO J. 6:307-311, Coruzzi 및 다른 사람들(1984) EMBO J. 3:1671-1680 그리고 Brogli 및 다른 사람들, (1984) Science 224:838-843, Gurley 및 다른 사람들(1986) Mol. Cell. Biol. 6:559-565 그리고 Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463에서 설명되어 있으며, 이들 각 전문은 참조함으로써

본 명세서에 포함된다.

[0576] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 상기 본 명세서에서 설명된 것과 같이, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드들이 포함된 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자의 코딩 부분을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 상기 본 명세서에서 설명된 것과 같이, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드들이 포함된 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자의 코딩 부분으로 구성된 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 상기 본 명세서에서 설명된 것과 같이, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드들이 포함된 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자의 코딩 부분으로 기본적으로 구성된 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다.

[0577] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 상기 본 명세서에서 설명된 것과 같이, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드들이 포함된 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자의 코딩 부분을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 상기 본 명세서에서 설명된 것과 같이, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드들로 구성된 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자의 코딩 부분으로 구성된 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 상기 본 명세서에서 설명된 것과 같이, 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드들로 구성된 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자의 코딩 부분으로 기본적으로 구성된 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 한 구현예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드 서열이다. 한 구현예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드 분자다.

[0578] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 본 명세서에서 설명된 것과 같은 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드와 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현 벡터를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 FVIIa 폴리펩티드와 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현 벡터를 제공한다.

[0579] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 본 명세서에서 설명된 것과 같은 발현 벡터를 포함하는 세포를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드와 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현 벡터를 포함하는 세포를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, FVIIa 폴리펩티드와 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

[0580] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 본 명세서에서 설명된 것과 같이 상기 발현 벡터가 포함된 조성물을 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드와 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현 벡터를 포함하는 조성물을 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 FVIIa 폴리펩티드와 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현 벡터를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0581] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 본 명세서에서 설명된 것과 같은 상기 세포가 포함된 조성물을 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 세포는 진핵 세포다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 세포는 원핵 세포다.

[0582] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 CTP-변형된 응고 인자를 만드는 방법을 제시하는 데, 이 방법은 1 내지 10개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드(CTP)를 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 CTP-변형된 응고 인자가 만들어진다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 CTP-변형된 응고 인자를 만드는 방법을 제공하는 데, 이 방법은 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드(CTP)를 인코딩하는 1 내지 10개의 폴리뉴클레오티드 서열을 상기 응고 인자를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하고, 그렇게 함으로써 CTP-변형된 응고 인자가 만들어진다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드를 생산하는 방법을 제공하는 데, 이 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드(CTP)를 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키

는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드를 생산한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 CTP-변형된 FVIIa 폴리펩티드를 만드는 방법을 제공하는 데, 이 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)를 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 CTP-변형된 FVIIa 폴리펩티드를 생산한다.

[0583] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조작된 응고 인자들은 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 분자를 이용하여 합성된다. 일부 구현예들에 있어서, 본 발명의 상기 조작된 응고 인자들을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 분자는 cis-조절 서열(이를 테면, 촉진제 서열)의 전사 조절이 포함된 발현 벡터 안에 결합된다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 cis-조절 서열은 본 발명의 조작된 응고 인자의 구성적(constitutive) 발현을 지시하는 데 적합하다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 cis-조절 서열은 본 발명의 상기 조작된 응고 인자들의 조직-특이적 발현을 지시하는 데 적합하다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 cis-조절 서열은 본 발명의 상기 조작된 응고 인자들의 유도성(inducible) 발현을 지시하는 데 적합하다.

[0584] 일부 구현예에 있어서, 본 발명의 용도에 적합한 조직-특이적 촉진제는 하나 또는 그 이상의 특이적 세포 군에서 기능을 하는 서열들을 포함한다. 예를 들면, 촉진제 예를 든다면 간-특이적인 일부민 촉진제[Pinkert 및 다른 사람들, (1987) *Genes Dev.* 1:268-277], 임파-특이적 촉진제[Calame 및 다른 사람들, (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275]; T-세포 수용체들의 특정 촉진제내[Winoto 및 다른 사람들, (1989) *EMBO J.* 8:729-733] 그리고 면역글로불린; [Banerji 및 다른 사람들(1983) *Cell* 33:729-740], 뉴런-특이적 촉진제, 예를 든다면 신경섬유 촉진제[Byrne 및 다른 사람들(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477], 판크레아제-특이적 촉진제[Edlunch 및 다른 사람들(1985) *Science* 230:912-916] 또는 유선-특이적 촉진제 예를 든다면 유장 촉진제(미국 특허 4,873,316 및 유럽 출원 공개 번호 264,166)를 포함하나 이에 국한되지 않는다. 본 발명의 용도에 적합한 유도성 촉진제들은 예를 들면, 테트라사이클린-유도성 촉진제를 포함한다(Srour, M.A., 및 다른 사람들, 2003. *Thromb. Haemost.* 90: 398-405).

[0585] 한 구현예에 있어서, 구절 "폴리뉴클레오티드 분자"는 RNA 서열 형태로 단리되고 제공되는 단일 또는 이중 가닥의 핵산 서열, 상보성 폴리뉴클레오티드 서열(cDNA), 게놈 폴리뉴클레오티드 서열 및/또는 복합 폴리뉴클레오티드 서열들(이를 테면, 전술한 것들의 조합)을 지칭한다.

[0586] 한 구현예에 있어서, "상보성 폴리뉴클레오티드 서열"은 역 전사효소 또는 임의의 다른 RNA-의존적 DNA 중합효소를 이용하여 메신저 RNA의 역 전사로부터 생성된 서열을 지칭한다. 한 구현예에 있어서, 상기 서열은 DNA 중합효소를 이용하여 후속적으로 생체내 또는 시험관내에서 증폭될 수 있다.

[0587] 한 구현예에 있어서, "게놈 폴리뉴클레오티드 서열"은 염색체로부터 유도된(단리된) 서열을 지칭하고, 따라서 염색체의 연속(contiguous) 부분을 나타낸다.

[0588] 한 구현예에 있어서, "복합(composite) 폴리뉴클레오티드 서열"은 적어도 부분적으로 상보성이며 그리고 적어도 부분적으로 게놈인 서열을 지칭한다. 한 구현예에 있어서, 복합 서열은 본 발명의 상기 폴리펩티드를 인코딩하는 데 요구되는 일부 엑손 서열 뿐만 아니라 이들 사이에 끼어있는 일부 인트론 서열을 포함할 수 있다. 한 구현예에 있어서, 상기 인트론 서열은 다른 유전자의 인트론이 포함된 임의의 원천이 될 수 있으며, 전형적으로 보존된 스플라이싱(splicing) 신호 서열들을 포함할 것이다. 한 구현예에 있어서, 인트론 서열들은 cis-작용 발현 조절 요소들을 포함한다.

[0589] 한 구현예에 있어서, 발현과 분비에 이어서, 상기 전구체 조작된 응고 인자들로부터 상기 신호 웨프티드들이 잘려 나오고, 상기 성숙 조작된 응고 인자들이 생성된다.

[0590] 일부 구현예들에 있어서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 PCR 기술, 또는 당 분야의 숙련자들에게 공지된 임의의 다른 방법 또는 절차를 이용하여 제조된다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 절차는 2개의 상이한 DNA 서열의 결합(ligation)이 관련된다(예를 들면, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel 및 다른 사람들, John Wiley & Sons, 1992 참고).

[0591] 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 응고 인자들이 인코딩된 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 상기 재조합 폴리펩티드를 발현시킬 수 있는 발현 벡터(가령, 핵산 구조체) 안에 삽입된다. 한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 발현 벡터는 원핵세포에서 이 벡터가 복제 및 통합에 적합하도록 만드는 추가 서열들을 포함한다. 한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 발현 벡터는 진핵세포에서 이 벡터가 복제 및 통합에 적합하도록 만드는 추가 서열들을 포함한다. 한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 발현 벡터는 원핵세포 및 진핵세포 모두에서 이 벡터가 복제 및 통합에 적합하도록 만드는 셔틀 벡터를 포함한다. 일부 구현예들에 있어서, 클로닝 벡터들은 전사 및 해독 개시

서열(이를 테면, 촉진제, 증강인자) 그리고 전사 및 해독 종료물질들(이를 테면, 폴리아데닐화 신호)을 포함한다.

[0592]

한 구현예에 있어서, 다양한 원핵 또는 진핵 세포들은 본 발명의 상기 응고 인자들을 발현시키는 숙주-발현 시스템으로 이용될 수 있다. 일부 구현예들에 있어서, 이를 세포는 미생물, 예를 든다면 상기 폴리펩티드 코딩 서열이 포함된 재조합 박테리오파아지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질변환된 박테리아; 상기 폴리펩티드 코딩 서열이 포함된 재조합 효모 발현 벡터로 형질변환된 효모; 재조합 바이러스 발현 벡터(이를 테면, 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)에 감염된 식물 세포계 또는 재조합 플라스미드 발현 벡터, 예를 든다면 상기 폴리펩티드 코딩 서열이 포함된 Ti 플라스미드로 형질변환된 식물 세포를 포함하나 이에 국한되지 않는다.

[0593]

일부 구현예들에 있어서, 본 발명의 상기 응고 인자들을 발현시키기 위하여 비-박테리아 발현 시스템(이를 테면 CHO 세포와 같은 포유류 발현 시스템)이 이용된다. 한 구현예에 있어서, 포유류 세포 안에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 데 이용된 상기 발현 벡터는 CMV 촉진제와 네오마이신 저항 유전자가 포함된 pCI-DHFR 벡터다. 상기 pCI-dhfr의 구조는 실시예 1에서 한 구현예에 따라 설명된다.

[0594]

일부 구현예들에 있어서, 본 발명의 박테리아 시스템에서 다수의 발현 벡터들은 발현되는 상기 폴리펩티드의 의도된 용도에 따라 유익하게 선별될 수 있다. 한 구현예에 있어서, 다량의 폴리펩티드가 바람직하다. 한 구현예에 있어서, 소수성 신호 서열과 융합된 형태로 높은 농도의 상기 단백질 산물을 발현을 지시하는 벡터는 상기 박테리아의 원형질 또는 배양 배지로 발현된 산물을 지향시키고, 이때 상기 단백질 산물은 필요에 따라 정제된다. 한 구현예에 있어서, 특정 융합 단백질들은 상기 폴리펩티드의 회수에 도움을 주는 특이적 절단 부위를 가지고 록 조작된다. 한 구현예에 있어서, 이러한 조작을 위하여 개작될 수 있는 벡터들은 대장균(*E. coli*) 발현 벡터 pET 시리즈를 포함하나 이에 국한되지 않는다[Studier 및 다른 사람들, Methods in Enzymol. 185:60-89 (1990)].

[0595]

한 구현예에 있어서, 효모 발현 시스템들이 이용된다. 한 구현예에 있어서, 구성적 또는 유도성 촉진제가 포함된 다수의 벡터들은 미국 특허 출원 번호: 5,932,447(이의 전문이 참조함으로써 본 명세서에 포함된다)에서 공개된 것과 같이 효모에서 이용될 수 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 효모 염색체 안으로 외부 DNA 서열의 통합을 촉진시키는 벡터가 이용된다.

[0596]

한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 발현 벡터는 예를 들면, 단일 mRNA로부터 몇 가지 단백질의 해독을 허용하는 추가 폴리뉴클레오티드 서열 예를 든다면, 내부 리보좀 진입 부위 (IRES)와 촉진제-키메라 폴리펩티드의 계놈 통합용 서열을 더 포함할 수 있다.

[0597]

일부 구현예들에 있어서, 포유류 발현 벡터들은 pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81(Invitrogen에서 이용가능), pCI(Promega에서 이용가능), pMbac, pPbac, pBK-RSV 및 pBK-CMV(Strategene에서 이용가능), pTRES(Clontech에서 이용가능), 그리고 이들의 유도체들을 포함하나 이에 국한되지 않는다.

[0598]

일부 구현예들에 있어서, 진핵 바이러스들 예를 든다면 레트로바이러스들로부터 조절 요소들이 포함된 발현 벡터들이 본 발명에 이용된다. SV40 벡터들은 pSVT7과 pMT2를 포함한다. 일부 구현예들에 있어서, 소의 유두종 바이러스로부터 유도된 벡터는 pBV-1MTHA를 포함하고, Epstein Bar 바이러스로부터 유도된 벡터는 pHEBO, 그리고 p205를 포함한다. 다른 예시적인 벡터들은 pMSG, pAVO09/A+, pMT010/A+, pMAMneo-5, 베큘로바이러스 pDSVE, 그리고 SV-40 초기(early) 촉진제, SV-40 후기(later) 촉진제, 메탈로로티오넨 촉진제, 뮤린 유선 종양 바이러스 촉진제, Rous 육종 바이러스 촉진제, 폴리헤드린 촉진제, 또는 진핵 세포에서 발현에 효과적으로 알려진 다른 촉진제들의 지시하에 단백질 발현을 허용하는 임의의 다른 벡터들을 포함한다.

[0599]

일부 구현예들에 있어서, 재조합 바이러스 벡터들은 예를 든다면 측면 감염(lateral infection) 및 표적 특이성과 같은 장점을 제공하기 때문에 본 발명의 상기 응고 인자들의 생체내 발현에 유용하다. 한 구현예에 있어서, 측면 감염은 예를 들면, 레트로바이러스의 생명 주기에서 고유한 것이며, 단일 감염된 세포는 뺨어져 나오는 (bud off) 많은 후손 비리온을 만들어내고 인접 세포들을 감염시키는 공정이다. 한 구현예에 있어서, 상기 결과로 큰 지역이 신속하게 감염되며, 이들중 대부분은 원래 바이러스 입자들에 의해 처음 감염되지 않았던 지역들이다. 한 구현예에 있어서, 측면적으로 퍼질 수 없는 바이러스 벡터들이 생성된다. 한 구현예에 있어서, 이러한 특징은 오직 국지적인 숫자의 표적화된 세포로만 특정 유전자를 도입시키는 것이 원하는 목적인 경우에 유용할 것이다.

- [0600] 한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 발현 벡터를 세포 안으로 도입시키기 위하여 다양한 방법들이 이용될 수 있다. 이러한 방법들은 일반적으로 Sambrook 및 다른 사람들, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), Ausubel 및 다른 사람들, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang 및 다른 사람들, Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega 및 다른 사람들, Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) 그리고 Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986]에서 설명되며, 예를 들면, 재조합 바이러스 벡터로 안정적인 또는 일시적인 형질감염, 리포렉션, 전기천공 그리고 감염을 포함한다. 추가적으로, 양성-음성 선별 방법들의 경우 미국 특허 5,464,764 및 5,487,992을 참고로 한다(이들의 전문이 참조함으로써 본 명세서에 포함된다).
- [0601] 일부 구현예들에 있어서, 바이러스 감염에 의한 핵산 도입은 바이러스들의 감염 성질로 인하여 더 높은 형질감염 효율을 획득할 수 있기 때문에 다른 방법들 예를 든다면 리포렉션과 전기천공보다 몇 가지 장점들을 제공한다.
- [0602] 한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조작된 응고 인자들은 상기 본 명세서에서 설명된 것과 같은 (가령, 생체내 유전자 요법) 임의의 적합한 투여 방식으로 개인에게 투여된 핵산 구조체로부터 발현될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 한 구현예에 있어서, 상기 핵산 구조체는 적절한 유전자 전달 담체/방법(형질감염, 형질도입(transduction), 상동성 재조합, 등등)을 통하여 적합한 세포 안으로 도입되고, 그리고 필요에 따라 발현 시스템과 그 다음 상기 변형된 세포들은 배양으로 확장되고, 개체에게 다시 넣는다(가령, 체외 유전자 요법).
- [0603] 한 구현예에 있어서, 식물 발현 벡터들이 이용된다. 한 구현예에 있어서, 상기 폴리펩티드 코딩 서열의 발현은 다수의 촉진제에 의해 구동된다. 일부 구현예들에 있어서, 바이러스 촉진제들 예를 든다면, CaMV의 35S RNA 및 19S RNA 촉진제 [Brisson 및 다른 사람들, Nature 310:511-514 (1984)], 또는 TMV에 대한 피복 단백질 촉진제 [Takamatsu 및 다른 사람들, EMBO J. 6:307-311 (1987)]가 이용된다. 또 다른 구현예에 있어서, 식물 촉진제들이 이용되는 데, 예를 들면, RUBISCO의 작은 서브유닛[Coruzzi 및 다른 사람들, EMBO J. 3:1671-1680 (1984); 그리고 Brogli 및 다른 사람들, Science 224:838-843 (1984)] 또는 열 쇼크 촉진제들, 이를 테면, 대두 hsp17.5-E 또는 hsp17.3-B가 이용된다[Gurley 및 다른 사람들, Mol. Cell. Biol. 6:559-565 (1986)]. 한 구현예에 있어서, 구조체들은 Ti 플라스미드, Ri 플라스미드, 식물 바이러스 벡터들, 직접 DNA 형질전환, 혼미주사, 전기천공 및 기타 당 분야에 공지된 기술을 이용하여 식물 세포 안으로 도입된다. 예를 들면, Weissbach & Weissbach [Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463 (1988)] 참고. 기타 발현 시스템, 예를 든다면 당 분야에 공지된 곤충 및 포유류 숙주 세포 시스템들 또한 본 발명에 의해 이용될 수 있다.
- [0604] 상기 삽입된 코딩 서열(상기 폴리펩티드를 인코딩하는)의 전사 및 해독에 필요한 효소이외에, 본 발명의 상기 발현 구조체는 상기 발현된 폴리펩티드의 안정성, 생산, 정제, 수율 또는 활성을 최적화시키도록 조작된 서열들을 또한 포함할 수 있음을 인지할 것이다.
- [0605] 일부 구현예들에 있어서, 형질전환된 세포들은 다량의 재조합 조작된 응고 인자들의 발현을 허용하는 효과적인 조건들 하에서 배양된다. 일부 구현예들에 있어서, 효과적인 배양 조건들은 단백질 생산을 허용하는 효과적인 배지, 생물배양기, 온도, pH 그리고 산소 조건을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 한 구현예에 있어서, 효과적인 배지는 본 발명의 상기 재조합 폴리펩티드를 생산하기 위하여 세포가 배양되는 임의의 배지를 지칭한다. 일부 구현예들에 있어서, 배지는 전형적으로 동화가능한 탄소, 질소 그리고 인산염 원료, 그리고 적절한 염, 미네랄, 금속 및 다른 영양분들, 예를 든다면 비타민들이 함유된 수성 용액을 포함한다. 일부 구현예들에 있어서, 본 발명의 세포들은 통상적인 발효 생물배양기, 쉐이크 플라스크, 테스트 튜브, 미량적정 접시 그리고 배양판 (petri plates)에서 배양될 수 있다. 일부 구현예들에 있어서, 배양은 재조합 세포에 적합한 온도, pH 및 산소 함량에서 실시된다. 일부 구현예들에 있어서, 배양 조건은 당 분야 숙련자들의 경험 범위내에서 결정된다.
- [0606] 일부 구현예들에 있어서, 생산에 이용되는 벡터 및 숙주계에 따라, 재조합 세포 안에 남아있는 생성된 본 발명의 조작된 응고 인자들은 상기 발효 배지로 분비되고, 2개의 세포 막 사이의 공간, 예를 든다면 대장균 안에 원형질 공간으로 배출되거나; 또는 세포의 외측 표면 또는 바이러스 막에 유지된다.
- [0607] 한 구현예에 있어서, 배양에서 예정된 시간 이후, 상기 재조합 조작된 응고 인자는 회수된다.
- [0608] 한 구현예에 있어서, 본 명세서에서 이용된 구절 "상기 재조합 조작된 응고 인자의 회수"는 상기 폴리펩티드가

포함된 전체 발효 배지의 수거를 지칭하고, 분리 또는 정제의 추가 단계를 반드시 포함하는 것은 아니다.

[0609] 한 구현예에 있어서, 본 발명의 조작된 응고 인자들은 단백질 정제 기술, 예를 든다면, 친화력 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 여과, 전기영동, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 젤 여과 크로마토그래피, 역 상크로마토그래피, 콘카나발린 A 크로마토그래피, 크로마토포커싱 및 차등 가용화(differential solubilization)을 포함하나 이에 국한되지 않는 다양한 표준 단백질 정제 기술을 이용하여 정제된다.

[0610] 한 구현예에 있어서, 회수를 촉진하기 위하여, 상기 발현된 코딩 서열은 본 발명의 상기 조작된 응고 인자와 융합된 절단가능한 모이어티가 인코딩되도록 공작될 수 있다. 한 구현예에 있어서, 융합 단백질은 상기 폴리펩티드가 친화력 크로마토그래피에 의해 용이하게 단리될 수 있도록; 이를 테면, 절단가능한 모이어티에 특이적인 컬럼 상에 고정시킴으로써 용이하게 단리될 수 있도록 융합 단백질이 기획될 수 있다. 한 구현예에 있어서, 절단 부위는 상기 조작된 응고 인자와 상기 절단가능한 모이어티 사이에 있도록 공작되며, 그리고 상기 폴리펩티드는 이 부위에서 상기 융합 단백질을 특이적으로 절단하는 적절한 효소 또는 물질로 처리하여 크로마토그래피 컬럼으로부터 방출될 수 있다. [이를 테면, Booth 및 다른 사람들, Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); 그리고 Gardella 및 다른 사람들, J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990)참고].

[0611] 한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조작된 응고 인자는 "실질적으로 순수한" 형태로 회수된다.

[0612] 한 구현예에 있어서, 상기 구절 "실질적으로 순수한"이란 본 명세서에서 설명된 것과 같은 적용에 상기 단백질의 효과적인 사용이 허용되는 순도를 지칭한다.

[0613] 한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조작된 응고 인자는 시험관내 발현 시스템을 이용하여 또한 합성될 수 있다. 한 구현예에 있어서, 시험관내 합성 방법들은 당 분야에 공지되어 있으며, 시스템의 성분들은 시판된다.

[0614] 일부 구현예들에 있어서, 상기 재조합 조작된 응고 인자들은 합성되고 그리고 정제된다; 이들의 치료요법적 효과는 생체내 또는 시험관내에서 분석될 수 있다. 한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 재조합 조작된 응고 인자들의 결합 활성은 당 분야에 공지된 바와 같이 다양한 분석을 이용하여 확인될 수 있다.

[0615] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조작된 응고 인자는 그 자체로(*per se*) 개인에게 제공될 수 있다. 한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 조작된 응고 인자는 약제학적으로 허용가능한 담체와 혼합되어, 약제학적 조성물의 일부분으로 개인에게 제공될 수 있다.

[0616] 또 다른 구현예에 있어서, "약제학적 조성물"은 본 명세서에서 설명된 것과 같은 하나 또는 그 이상의 상기 활성 성분과 다른 화학 성분들, 예를 든다면 생리학적으로 적합한 담체들과 부형제들의 제제(preparation)를 지칭한다. 약제학적 조성물의 목적은 유기체에게 화합물을 투여를 촉진시키는 것이다.

[0617] 또 다른 구현예에 있어서, "활성 성분"은 생물학적 효과를 담당하는 관심 피험체의 상기 폴리펩티드 서열을 지칭한다.

[0618] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 임의의 조성물은 임의의 형태로 관심피험체의 조작된 응고 인자의 상기 카르복시 말단에만 결합된 적어도 하나의 CTP 서열을 포함할 수 있다. 한 구현예에 있어서, 본 발명은 복합된 제제물들을 제공한다. 한 구현예에 있어서, "복합된 제제"는 상기에서 특정된 복합 짹들이 개별적으로 투여될 수 있거나 상이하게 고정된 복합을 이용하여 투여될 수 있고, 상이한 양의 복합 짹들은 가령, 일제히, 동시에, 별도로 또는 순차적으로 투여될 수 있다는 의미에서 구체적으로 "부품이 있는 키트(kit of part)"로 특정된다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 부품이 있는 키트의 해당 부품은 이를 테면, 일제히 투여되거나 또는 시간적으로 빗겨나가도록 즉, 상이한 시점과 동일한 또는 상이한 시간에 투여될 수 있다. 상기 조합 짹의 총량 비율은 일부 구현예들에 있어서, 상기 복합된 제제로 투여될 수 있다. 한 구현예에 있어서, 상기 복합된 제제는 이를 테면 치료되는 환자의 하위군의 필요에 맞게 또는 단일 환자의 요구에 맞도록 다양하게 변화될 수 있는데, 이때 상이한 요구는 특정 질환, 질환의 심각성, 나이, 성별 또는 체중으로 인하여 다양할 수 있으며 당업자는 용이하게 결정할 수 있다.

[0619] 또 다른 구현예에 있어서, 구절 "생리학적으로 허용가능한 담체"와 "약제학적으로 허용가능한 담체"는 서로 호환되며, 유기체에게 심각한 자극을 야기하지 않고, 투여된 화합물의 생물학적 활성 및 성질을 무효화시키지 않는 담체 또는 희석제를 지칭한다. 보강제(adjuvant)도 상기 구절에 포함된다. 한 구현예에 있어서, 상기 약제학적으로 허용가능한 담체에 포함된 성분들중 하나는 예를 들면, 유기 및 수성 매질 모두에서 광범위한 용해도를 갖는 생체적합성 고분자인 폴리에틸렌 글리콜(PEG)일 수 있다(Mutter 및 다른 사람들(1979)).

[0620] 또 다른 구현예에 있어서, "부형제"는 약제학적 조성물에 추가되어 활성 성분의 투여를 더 촉진시키는 비활성

물질을 지칭한다. 한 구현예에 있어서, 부형제들은 탄산 칼슘염, 인산 칼슘염, 다양한 당과 전분 유형, 셀룰로오스 유도체들, 젤라틴, 식물성 오일 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.

[0621] 약물의 조제물 및 투여 기술은 "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition에서 찾아볼 수 있으며, 이의 전문이 참조함으로써 본 명세서에 포함된다.

[0622] 투약량(dosage) 범위의 다양한 구현예들이 본 발명에 의해 고려된다. 본 발명의 상기 조작된 응고 인자의 투약량은 한 구현예에 있어서 일일 0.005-100 mg의 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 0.005-5 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 0.01-50 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 0.1-20 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 0.1-10 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 0.01-5 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 0.001-0.01 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 0.001-0.1 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 0.1-5 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 0.5-50 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 0.2-15 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 0.8-65 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 1-50 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 5-10 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 8-15 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 10-20 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 20-40 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 60-120 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 12-40 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 40-60 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 50-100 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 1-60 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 15-25 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 5-10 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 55-65 mg 범위 내에 있다.

[0623] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 50-500 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 50-150 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 100-200 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 150-250 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 200-300 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 250-400 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 300-500 mg 범위 내에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 350-500 mg 범위 내에 있다.

[0624] 한 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 20 mg이다. 한 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 30 mg이다. 한 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 40 mg이다. 한 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 50 mg이다. 한 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 0.01 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 0.1 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 1 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 0.530 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 0.05 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 50 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 10 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 20-70 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 5 mg이다.

[0625] 한 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 응고 인자의 투약량은 일일 1-5 mg이다. 한 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 응고 인자의 투약량은 일일 1-3 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 응고 인자의 투약량은 일일 2 mg이다.

[0626] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일일 1-90 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 2일에 1-90 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 3일에 1-90 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 4일에 1-90 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 5일에 1-90 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 6일에 1-90 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일주일에 1-90 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 9일에 1-90 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 11일에 1-90 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 14일에 1-90 mg이다.

[0627] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자 투약량은 일일 10-50 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 2일에 10-50 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 3일에 10-50 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 4일에 10-50 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 5일에 10-50 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 6일에 10-50 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 일주일에 10-50

mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 9일에 10-50 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 11일에 10-50 mg이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 투약량은 14일에 10-50 mg이다.

[0628] 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 비강내 투약형(dosage form)으로 제형화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 주사가능한 투약형으로 제형화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 0.0001 mg 내지 0.6 mg 범위의 투여분량(dose)으로 피험체에게 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 0.001 mg 내지 0.005 mg 범위의 투여분량으로 피험체에게 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 0.005 mg 내지 0.01 mg 범위의 투여분량으로 피험체에게 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 0.01 mg 내지 0.3 mg 범위의 투여분량으로 피험체에게 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 0.2 mg 내지 0.6 mg 범위의 투여분량으로 피험체에게 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자는 이의 아미노 말단에는 CTPs가 없다.

[0629] 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 1-100 μ g 범위의 투여분량으로 피험체에게 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 10-80 μ g 범위의 투여 분량으로 피험체에게 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 20-60 μ g 범위의 투여 분량으로 피험체에게 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 10-50 μ g 범위의 투여 분량으로 피험체에게 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 40-80 μ g 범위의 투여 분량으로 피험체에게 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 10-30 μ g 범위의 투여 분량으로 피험체에게 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 30-60 μ g 범위의 투여 분량으로 피험체에게 투여된다.

[0630] 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 0.2 mg 내지 2 mg 범위의 투여 분량으로 피험체에게 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 2 mg 내지 6 mg 범위의 투여 분량으로 피험체에게 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 4 mg 내지 10 mg 범위의 투여 분량으로 피험체에게 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 5 mg 내지 15 mg 범위의 투여 분량으로 피험체에게 투여된다.

[0631] 한 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 FIX의 투약량은 동일한 기간에 걸쳐 환자들에게 재조합 FIX(이를 테면, BeneFIX®, Wyeth 또는 Mononine®, CSL Behring)의 권장 투약량으로 투여된 FIX 양의 50%를 포함한다. 한 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 FVIIa의 투약량은 동일한 기간에 걸쳐 환자들에게 재조합 FVIIa(이를 테면, NovoSeven®)의 권장 투약량으로 투여된 FVIIa 양의 50%를 포함한다. 한 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 FVII의 투약량은 동일한 기간에 걸쳐 환자들에게 재조합 FVII의 권장 투약량으로 투여된 FVII 양의 50%를 포함한다. 예를 들면, NovoSeven®가 수술전 또는 수술 후 환자에게 2시간마다 90 mcg/kg 투여분량으로 투여되면 (가령, 85kg 환자의 경우 12시간에 걸쳐 2시간마다 7.65 mg씩 또는 6회 투여 분량으로 45.9 mg), 본 발명의 CTP-변형된 응고 인자는 환자에게 재조합 FVIIa의 12시간 투여량의 50%인 투여량으로 투여될 수 있다(가령, 12시간에 걸쳐 1회 투여되는 23 mg의 투여량).

[0632] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 응고 인자의 투약량은 CTP-변형되지 않은 응고 인자를 이용하여 투여되는 경우 보다 상기 응고 인자 양의 45%를 함유하게 된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 응고 인자의 투약량은 CTP-변형되지 않은 응고 인자를 이용하여 투여되는 경우 보다 상기 응고 인자 양의 10%를 함유하게 된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 응고 인자의 투약량은 CTP-변형되지 않은 응고 인자를 이용하여 투여되는 경우 보다 상기 응고 인자 양의 25%를 함유하게 된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 응고 인자의 투약량은 CTP-변형되지 않은 응고 인자를 이용하여 투여되는 경우 보다 상기 응고 인자 양의 35%를 함유하게 된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 응고 인자의 투약량은 CTP-변형되지 않은 응고 인자를 이용하여 투여되는 경우 보다 상기 응고 인자 양의 75%를 함유하게 된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 응고 인자의 투약량은 CTP-변형되지 않은 응고 인자를 이용하여 투여되는 경우 보다 상기 응고 인자 양의 100%를 함유하게 된다. 그러나, 상기 투약량이 CTP-변형되지 않은 응고 인자 형태의 응고 인자(이를 테면 FIX)와 동일한 양을 함유한다 할지라도, 재조합 응고 인자들과 비교하였을 때 이들의 증가된 반

감기로 인하여 덜 빈번하게 투여될 것이기 때문에 이것은 피험체에게 여전히 유익하다.

[0633] 또 다른 구현예에 있어서, 접합된 응고 인자의 치료요법적으로 효과량은 FIX의 경우 일일에 1회 내지 일주일에 1회 체중 kg 당 50-500 IU이며 또는 FVIIa의 경우 $10\text{ }\mu\text{g/Kg} - 500\text{ }\mu\text{g/Kg}$ 이다. 또 다른 구현예에 있어서, 접합된 응고 인자의 치료요법적으로 효과량은 일일 1회, 체중 kg 당 150-250 IU 이다. 또 다른 구현예에 있어서, 접합된 응고 인자가 포함된 약제학적 조성물은 인간 환자에게 다양한 수단에 의해 투여되는 데 효과적인 강도로 제형화된다.

[0634] 한 구현예에 있어서, FIX는 피험체 안에서 FIX 순환 활성이 20-30 IU/dL이 되는 데 효과적인 양으로 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, FIX는 피험체 안에서 FIX 순환 활성이 25-50 IU/dL이 되는 데 효과적인 양으로 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, FIX는 피험체 안에서 FIX 순환 활성이 50-100 IU/dL이 되는 데 효과적인 양으로 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, FIX는 피험체 안에서 FIX 순환 활성이 100-200 IU/dL이 되는 데 효과적인 양으로 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, FIX는 피험체 안에서 FIX 순환 활성이 10-50 IU/dL이 되는 데 효과적인 양으로 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, FIX는 피험체 안에서 FIX 순환 활성이 20-100 IU/dL이 되는 데 효과적인 양으로 투여된다.

[0635] 한 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 응고 인자는 주 단위로 피험체에게 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 응고 인자는 주당 2회 피험체에게 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 응고 인자는 피험체에게 격주간격(2주에 1회)으로 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 응고 인자는 피험체에게 한 달에 2회 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 응고 인자는 피험체에게 한 달에 1회 투여된다.. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 응고 인자는 피험체에게 매일 투여된다.. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CTP-변형된 응고 인자는 피험체에게 2일 마다 1회 투여된다.

[0636] 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 피험체에게 3일 마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 4일 마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 5일 마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 6일 마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 7-14일 마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 10-20일 마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 5-15일 마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 15-30일 마다 1회 투여된다.

[0637] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 방법들은 응고 인자 요법에 사용시 순응성을 증가시키는 것을 포함하는 데, 이 방법들은 이를 필요로 하는 피험체에게 응고 인자와 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 적어도 하나의 융모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)가 포함된 폴리펩티드를 제공하고, 그렇게 함으로써 응고 인자 요법의 사용에서 순응성이 증가되는 것을 포함한다.

[0638] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 방법들은 응고 인자 요법이 필요한 만성 질환자들의 순응성을 증가시키는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 방법들은 상기 본 명세서에서 설명된 것과 같이 상기 응고 인자를 CTPs로 변형시킴으로써 응고 인자의 투여 빈도를 감소시킬 수 있다.

[0639] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 투여 빈도를 감소시키는 방법을 제시하는 데, 이 방법은 3개의 융모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)를 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 투여 빈도를 감소시킨다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 FVIIa 폴리펩티드의 투여 빈도를 감소시키는 방법을 제시하는 데, 이 방법은 3개의 융모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프트드(CTP)를 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 FVIIa 폴리펩티드의 투여 빈도를 감소시킨다.

[0640] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 용어 순응성은 점착(adherence)을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 방법들은 응고 인자의 투여 빈도를 감소시킴으로써, 응고 인자 요법을 요하는 환자들의 순응성 증가를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자의 투여 빈도 감소는 상기 CTP-변형된 응고 인자를 더 안정적으로 만드는 상기 CTP 변형에 의해 획득된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자의 투여 빈도 감소는 상기 응고 인자의 T_½ 증가에 의해 획득된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자의 투여 빈도 감소는 상기 응고 인자의 제거 시간의 증가 또는 상기 응고 인자의 제거 속도 감소로 인하여 획득된다.

- [0641] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 제거 속도를 감소시키는 방법을 제시하는 데, 이 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드(CTP)를 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 제거 속도가 감소된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 FVIIa 폴리펩티드의 제거 속도를 감소시키는 방법을 제시하는 데, 이 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프트드(CTP)를 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 FVIIa 폴리펩티드의 제거 속도가 감소된다.
- [0642] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 응고 인자의 투여 빈도 감소는 상기 응고 인자의 AUC 측량의 증가에 의해 획득된다.
- [0643] 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자의 투여 빈도를 감소시키는 방법이 명세서에서 제시되는 데, 이 방법은 1 내지 10개의 CTPs를 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 응고 인자의 투여 빈도를 감소시킨다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자의 투여 빈도를 감소시키는 방법이 명세서에서 제시되는 데, 이 방법은 1 내지 5개의 CTPs를 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 응고 인자의 투여 빈도를 감소시킨다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자의 투여 빈도를 감소시키는 방법이 명세서에서 제시되는 데, 이 방법은 3개의 CTPs를 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 응고 인자의 투여 빈도를 감소시킨다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자의 투여 빈도를 감소시키는 방법이 명세서에서 제시되는 데, 이 방법은 3 내지 5개의 CTPs를 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 응고 인자의 투여 빈도를 감소시킨다.
- [0644] 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자 요법의 사용에서 순응성을 증가시키는 방법이 명세서에서 제시되는 데, 이 방법은 이를 필요로 하는 피험체에게 응고 인자와 상기 응고인자의 상기 카르복시 말단에 부착된 1 내지 10개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드들이 포함된 폴리펩티드를 제공하고, 그렇게 함으로써 응고 인자 요법의 사용에서 순응성이 증가되는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자 요법의 사용에서 순응성을 증가시키는 방법이 명세서에서 제시되는 데, 이 방법은 이를 필요로 하는 피험체에게 응고 인자와 상기 응고 인자의 상기 카르복시 말단에 부착된 1 내지 5개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드들이 포함된 폴리펩티드를 제공하고, 그렇게 함으로써 응고 인자 요법의 사용에서 순응성이 증가되는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자 요법의 사용에서 순응성을 증가시키는 방법이 명세서에서 제시되는 데, 이 방법은 이를 필요로 하는 피험체에게 응고 인자와 상기 응고인자의 상기 카르복시 말단에 부착된 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드들이 포함된 폴리펩티드를 제공하고, 그렇게 함으로써 응고 인자 요법의 사용에서 순응성이 증가되는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자 요법의 사용에서 순응성을 증가시키는 방법이 명세서에서 제시되는 데, 이 방법은 이를 필요로 하는 피험체에게 응고 인자와 상기 응고인자의 상기 카르복시 말단에 부착된 3 내지 5개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드들이 포함된 폴리펩티드를 제공하고, 그렇게 함으로써 응고 인자 요법의 사용에서 순응성을 증가시키는 것을 포함한다.
- [0645] 또 다른 구현예에 있어서, 피험체에서 혈액 응고 또는 응고 장애를 예방 또는 치료하는 방법이 명세서에서 제시되는 데, 이 방법은 상기 피험체에게 응고 인자와 상기 응고인자의 상기 카르복시 말단에 부착된 1 내지 10개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드들이 포함된 폴리펩티드를 제공하고, 그렇게 함으로써 피험체에서 혈액 응고 또는 응고 장애를 치료하는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 피험체에서 혈액 응고 또는 응고 장애를 예방 또는 치료하는 방법이 명세서에서 제시되는 데, 이 방법은 상기 피험체에게 응고 인자와 상기 응고 인자의 상기 카르복시 말단에 부착된 1 내지 5개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드들이 포함된 폴리펩티드를 제공하고, 그렇게 함으로써 피험체에서 혈액 응고 또는 응고 장애를 예방 또는 치료하는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 피험체에서 혈액 응고 또는 응고 장애를 예방 또는 치료하는 방법이 명세서에서 제시되는 데, 이 방법은 상기 피험체에게 응고 인자와 상기 응고인자의 상기 카르복시 말단에 부착된 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드들이 포함된 폴리펩티드를 제공하고, 그렇게 함으로써 피험체에서 혈액 응고 또는 응고 장애를 예방 또는 치료하는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 피험체에서 혈액 응고 또는 응고 장애를 예방 또는 치료하는 방법이 명세서에서 제시되는 데, 이 방법은 상기 피험체에게 응고 인자와 상기 응고인자의 상기 카르복시 말단에 부착된 3 내지 5개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프티드들이 포함된 폴리펩티드를 제공하고, 그렇게 함으로써 피험체에서 혈액 응고 또는 응고 장애를 예방 또는 치료하는 것을 포함한다.
- [0646] 또 다른 구현예에 있어서, 피험체에서 혈우병을 예방하는 방법이 명세서에서 제시되는 데, 이 방법은 상기 피험체에게 응고 인자와 상기 응고인자의 상기 카르복시 말단에 부착된 1 내지 10개의 용모막 고나도트로핀 카르복

시 말단 웨티드들이 포함된 폴리웨티드를 제공하고, 그렇게 함으로써 상기 피험체에서 혈우병을 예방하는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 피험체에게 응고 인자와 상기 응고인자의 상기 카르복시 말단에 부착된 1 내지 5개의 융모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드들이 포함된 폴리웨티드를 제공하고, 그렇게 함으로써 상기 피험체에서 혈우병을 예방하는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 피험체에게 응고 인자와 상기 응고인자의 상기 카르복시 말단에 부착된 3개의 융모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드들이 포함된 폴리웨티드를 제공하고, 그렇게 함으로써 상기 피험체에서 혈우병을 예방하는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 피험체에게 응고 인자와 상기 응고인자의 상기 카르복시 말단에 부착된 3 내지 5개의 융모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드들이 포함된 폴리웨티드를 제공하고, 그렇게 함으로써 상기 피험체에서 혈우병을 예방하는 것을 포함한다.

[0647] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 본 명세서에서 제시된 상기 조성물들이 SC 투여 후 혈류 안으로 뜻밖에도 더 효과적으로 흡수된다는 것을 보여준다(실시예 7-9 참고). FVIIa 피하 투여 가능성은 예방 용도로 이용될 때 장점과 같이 작용한다. 피하 주사는 환자들이 자가 주사에 더 용이하며, 환자들이 너무 어리고, 정맥이 너무 작아서 찾기 힘들 때 유익하다.

[0648] 또 다른 구현예에 있어서, 피험체에게 혈우병을 치료하는 방법이 본 명세서에서 제시되는 데, 이 방법은 상기 피험체에게 응고 인자와 상기 응고인자의 상기 카르복시 말단에 부착된 1 내지 10개의 융모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드들이 포함된 폴리웨티드를 제공하고, 그렇게 함으로써 상기 피험체의 혈우병을 치료하는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 피험체에게 혈우병을 치료하는 방법이 본 명세서에서 제시되는 데, 이 방법은 상기 피험체에게 응고 인자와 상기 응고인자의 상기 카르복시 말단에 부착된 1 내지 5개의 융모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드들이 포함된 폴리웨티드를 제공하고, 그렇게 함으로써 상기 피험체의 혈우병을 치료하는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 피험체에게 혈우병을 치료하는 방법이 본 명세서에서 제시되는 데, 이 방법은 상기 피험체에게 응고 인자와 상기 응고인자의 상기 카르복시 말단에 부착된 3개의 융모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드들이 포함된 폴리웨티드를 제공하고, 그렇게 함으로써 상기 피험체의 혈우병을 치료하는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 피험체에게 혈우병을 치료하는 방법이 본 명세서에서 제시되는 데, 이 방법은 상기 피험체에게 응고 인자와 상기 응고인자의 상기 카르복시 말단에 부착된 3 내지 5개의 융모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드들이 포함된 폴리웨티드를 제공하고, 그렇게 함으로써 상기 피험체의 혈우병을 치료하는 것을 포함한다.

[0649] 한 구현예에 있어서, 경구 투여는 테블릿, 캡슐, 로젠지(lozenges), 씹을 수 있는 테블릿, 혼탁액, 유액 그리고 이와 유사한 것들이 포함된 단위 투약형을 포함한다. 이러한 단위 투약형들은 본 발명의 소요(desired)의 응고 인자의 안전하고 효과적인 양을 포함하고, 한 구현예에 있어서, 이들 각각은 약 0.7 또는 3.5 mg 내지 약 280 mg/70 kg이며, 또는 또 다른 구현예에 있어서, 약 0.5 또는 10 mg 내지 약 210 mg/70 kg이다. 경구 투여를 위한 단위 투약형 조제물에 적합한 약제학적으로-허용가능한 담체들은 당 분야에 공지되어 있다. 일부 구현예들에 있어서, 테블릿은 전형적으로 비활성 희석제, 예를 든다면 탄산 칼슘염, 탄산 나트륨염, 만니톨, 락토즈 그리고 셀룰로오스; 결합제 예를 든다면 전분, 젤라틴 그리고 슈크로즈; 붕해제 예를 든다면 전분, 알긴산 그리고 크로스카르멜로즈; 윤활제 예를 든다면 스테아레이트 마그네슘, 스테아르산 그리고 활석과 같은, 통상적인 약제학적으로-양립가능한 보강제들을 포함한다. 한 구현예에 있어서, 활택제(glidants) 예를 든다면 이산화규소는 분말-혼합물의 유동 특징을 개선시키는 데 이용될 수 있다. 한 구현예에 있어서, 발색제, 예를 든다면 FD&C 염료는 외양을 위하여 추가될 수 있다. 감미제 및 풍미제(flavoring agents), 예를 든다면 아스파르탐, 사카린, 멘톨, 페퍼민트 및 과일향들은 씹을 수 있는 테블릿에 유용한 보강제들이다. 캡슐은 전형적으로 앞서 공개된 하나 또는 그 이상의 고형 희석제를 포함한다. 일부 구현예들에 있어서, 맛, 비용, 그리고 자체 안정성과 같은 본 발명의 목적에 결정적이지 않는 부차적인 사항에 의존적으로 담체 성분들이 선별되며, 이는 당업자에 의해 용이하게 이루어질 수 있다.

[0650] 한 구현예에 있어서, 상기 경구 투약형은 예정된 방출 프로파일을 포함한다. 한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 경구 투약형은 연장된 방출형의 테블릿, 캡슐, 로젠지 또는 씹을 수 있는 테블릿을 포함한다. 한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 경구 투약형은 서방(slow release)형의 테블릿, 캡슐, 로젠지 또는 씹을 수 있는 테블릿을 포함한다. 한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 경구 투약형은 즉각 방출형 테블릿, 캡슐, 로젠지 또는 씹을 수 있는 테블릿을 포함한다. 한 구현예에 있어서, 상기 경구 투약형은 당 분야에 공지된 것과 같이 상기 약학 활성 성분의 원하는 방출 프로파일에 따라 제형화된다.

[0651] 일부 구현예들에 있어서, 경구 조성물들은 액상 용액, 유액, 혼탁액, 그리고 이와 유사한 것들을 포함한다. 일부 구현예들에 있어서, 이러한 조성물의 제조에 적합한 약제학적으로-허용가능한 담체들은 당 분야에 공지되어

있다. 일부 구현예들에 있어서, 액상 경구 조성물들은 약 0.001% 내지 약 0.933%의 상기 소요의 화합물 또는 화합물들을 포함하고, 또는 또 다른 구현예에 있어서, 약 0.01% 내지 약 10%를 포함한다.

[0652] 일부 구현예들에 있어서, 본 발명의 상기 방법에 사용을 위한 조성물들은 용액 또는 유액을 포함하는 데, 일부 구현예들에 있어서 본 발명의 상기 화합물들의 안전하고 효과량이 포함된 그리고 국소 비강내 투여를 위한 임의 선택적인 다른 화합물들이 포함된 수성 용액 또는 유액이다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 조성물은 약 0.001% 내지 약 10.0% w/v의 피험체 화합물, 더욱 바람직하게는 약 0.001% 내지 약 2.0%를 포함하고, 이는 비강 경로를 통하여 상기 화합물들의 전신 운반에 이용된다.

[0653] 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 근육으로 주사된다(근육내 주사). 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 피부 아래로 주사된다(피하 주사). 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 근육으로 주사된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자와 적어도 하나의 CTP 유닛이 포함된 폴리펩티드는 피부로 주사된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자는 전신 투여를 통하여 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자는 정맥 주사에 의해 투여된다. 또 다른 구현예에 있어서, 투여는 장관외(parenteral), 폐, 경구, 국소, 피내(intradermal), 근육내, 복막내, 정맥, 피하, 비강내, 경비(transnasal), 안구내, 눈에(ophthalmic), 경막외, 불, 직장, 경점막, 내장 또는 척수강(intramedullary) 주사 뿐만 아니라 두개내(intrathecal) 주사가 포함된 장관외 운반 또는 직접적인 심실내 투여가 될 수 있다.

[0654] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 제제는 전신적인 방법이 아닌 국소적 방법, 예를 들면, 환자 신체의 특정 영역에 제제를 직접 주사한다.

[0655] 한 구현예에 있어서, 상기 투여 경로는 장(enteral)을 통하는 것일 수 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 경로는 결막, 경피, 피내, 동맥내, 질, 직장, 종양내, 파르캔세랄(paracanceral), 경점막, 근육내, 혈관내, 심실내, 머리속(intracranial), 비강내, 설하, 또는 이의 조합이 될 수 있다.

[0656] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물들은 액상 제제의 정맥, 동맥내 주사, 또는 근육내 주사에 의해 투여된다. 일부 구현예들에 있어서, 액상 조제물은 용액, 혼탁액, 분산액, 유액, 오일 그리고 이와 유사한 것들을 포함한다. 한 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물들은 정맥으로 투여되고, 따라서 정맥 투여용으로 적합한 형태로 제형화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물들은 동맥내 주사로 투여되며 따라서 동맥내 주사 투여용으로 적합한 형태로 제형화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물들은 근육내 주사로 투여되며 따라서 근육내주사 투여용으로 적합한 형태로 제형화된다.

[0657] 추가로, 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물들은 신체 표면에 국소적으로 투여되고, 따라서 국소 투여용으로 적합한 형태로 제형화된다. 적합한 국소 조제물은 젤, 연고, 크림, 로션, 드롭, 및 이와 유사한 것들을 포함한다. 국소 투여를 위하여, 본 발명의 상기 화합물들은 추가적인 적절한 치료요법적 물질 또는 물질들과 복합되고, 약학 담체와 함께 또는 약학 담체 없이 생리학적으로 허용가능한 희석제 안에서 용액 혼탁액 또는 유액으로 제조되고, 적용된다.

[0658] 한 구현예에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물들은 당 분야에 공지된 공정들, 이를 테면, 통상적인 혼합, 용해, 과립화, 당파-제조, 분화(levigating), 유화(emulsifying), 캡슐화(encapsulating), 엔트랩핑(entraping) 또는 동결건조화(lyophilizing) 공정 수단에 의해 제조된다.

[0659] 한 구현예에 있어서, 본 발명에 따른 용도의 약제학적 조성물들은 부형제들 및 상기 활성 성분을 약제학적으로 이용될 수 있는 조제물로 만드는 것을 용이하게 하는 보조제들이 포함된 하나 또는 그 이상의 생리학적으로 허용 가능한 담체들을 이용하여 통상적인 방법으로 제형화된다. 한 구현예에 있어서, 조제물은 선택된 투여 경로에 따라 달라진다.

[0660] 한 구현예에 있어서, 본 발명의 주사가능한 물질들은 수성 용액으로 제형화된다. 한 구현예에 있어서, 본 발명의 주사가능한 물질들은 생리학적으로 양립가능한 완충액들, 예를 든다면 Hank 용액, Ringer 용액, 또는 생리학적 염 완충액 안에서 제형화된다. 일부 구현예들에 있어서, 경점막 투여 용으로, 조제물 안에는 방벽을 투과하는 데 적합한 침투물질이 이용된다. 이러한 침투제들은 일반적으로 당 분야에 공지되어 있다.

[0661] 한 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 상기 조제물들은 장관외 투여, 이를 테면, 볼루스(bolus) 주사 또는 연속 주입에 의한 장관외 투여용으로 제형화된다. 일부 구현예들에 있어서, 주사용 조제물은 단위 투약형, 이를 테면, 보존제가 임의선택적으로 추가된 앰플 또는 다중투여분량 용기에 제공된다. 일부 구현예들에

있어서, 조성물은 혼탁액, 용액 또는 유성 또는 수성 담체내 유액이며, 그리고 예를 든다면 혼탁, 안정화 및/또는 분산 물질과 같은 제형화 물질들(formulatory agents)을 포함한다.

[0662] 일부 구현예들에 있어서, 상기 조성물들은 보존제들, 예를 든다면 염화 벤잘코니움과 티메로살 그리고 이와 유사한 것들; 키클레이팅제, 예를 든다면 에테테이트 나트륨 및 기타물질들; 완충액들 예를 든다면 인산염, 구연산염 및 아세트산염; 강장제 예를 든다면 염화나트륨, 염화칼륨, 글리세린, 만니톨 및 기타물질들; 항산화제 예를 든다면 아스코르브산, 아세틸시스틴, 메타비스풀포트 나트륨(sodium metabisulfite) 및 기타물질들; 방향족 물질; 점도 조정제, 예를 든다면 셀룰로오스 및 이의 유도체들이 포함된 중합체들; 그리고 폴리비닐 알코올 및 이들 수성 조성물의 pH를 조정하는 데 필요한 산과 염기를 또한 포함한다. 일부 구현예들에 있어서, 상기 조성물들은 국소 마취제 또는 기타 활성물질을 또한 포함한다. 상기 조성물들은 스프레이, 미스트, 드롭 및 이와 유사한 것으로 이용될 수 있다.

[0663] 일부 구현예들에 있어서, 장관외 투여용 약제학적 조성물들은 물-용해가능한 형태의 상기 활성 제제의 수성 용액을 포함한다. 추가적으로, 일부 구현예들에 있어서, 상기 활성 성분들의 혼탁액은 적절한 오일 또는 물 기반의 주사 혼탁액으로 제조된다. 일부 구현예들에 있어서, 적합한 친지성(lipophilic) 용매 또는 담체들은 지방 오일 예를 든다면 참기름, 또는 합성된 지방산 에스테르 예를 든다면 에틸 올레이트, 트리글리세리드 또는 리포좀을 포함한다. 일부 구현예들에 있어서, 수성 주사 혼탁액은 혼탁액의 점성을 증가시키는 물질, 예를 든다면 카르복시메틸 셀룰로오스 나트륨, 솔비톨 또는 벡스트란을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 혼탁액은 적합한 안정화제들 또는 상당히 농축된 용액의 제조를 허용하기 위하여 상기 활성 성분들의 용해도를 증가시키는 물질들을 또한 포함한다

[0664] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 활성 화합물은 담체, 특히 리포좀으로 운반될 수 있다(Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat 및 다른 사람들, Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 317-327; J. E. Diederichs and al., Pharm./nd. 56 (1994) 267-275 참고).

[0665] 또 다른 구현예에 있어서, 제어 방출 시스템에서 운반되는 상기 약제학적 조성물은 정맥 주입, 이식가능한 삼투암 펌프, 경피 패취, 리포좀, 또는 다른 투여 방식용으로 제형화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 펌프가 이용된다(Langer, 상기 참고; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald 및 다른 사람들, Surgery 88:507 (1980); Saudek 및 다른 사람들, N. Engl. J. Med. 321:574 (1989). 또 다른 구현예에 있어서, 중합체 물질들이 이용될 수 있다. 여전히 또 다른 구현예에 있어서, 제어 방출 시스템은 상기 치료요법적 표적, 가령, 뇌에 근접하게 위치될 수 있고, 따라서 상기 전신 투여분량의 분획만을 요구한다(이를 테면, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, 상기 참고, vol. 2, pp. 115-138 (1984) 참고). Langer에 의한 검토에서 다른 제어 방출 시스템도 논의된다(Science 249:1527-1533 (1990)).

[0666] 일부 구현예들에 있어서, 상기 활성 성분은 적합한 담체, 이를 테면, 살균, 발열원-없는 물 기반의 용액으로 사용하기 전 재구성되는 분말 형태다. 일부 구현예들에 있어서, 조성물들은 연무(atomization) 및 흡입 투여용으로 제형화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 조성물들은 부착된 연무형화(atomizing) 수단이 있는 용기 안에 포함된다.

[0667] 한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 제제는 직장용 조성물 예를 든다면, 이를 테면, 통상적인 좌약 베이스 예를 든다면 코코아 수지 또는 기타 글리세리드를 이용한 좌약 또는 정체 관장제(retention enemas)로 제형화된다.

[0668] 일부 구현예들에 있어서, 본 발명의 내용에 사용되는 데 적합한 약제학적 조성물은 문맥은 의도된 목적을 획득하는 데 유효한 활성 성분의 양이 함유된 조성물을 포함한다. 일부 구현예들에 있어서, 치료요법적으로 효과량이란 질환의 증상을 예방, 경감 또는 개선시키는 데 효과적인, 또는 치료 피험체의 생존을 연장시키는 데 효과적인 활성 성분의 양을 말한다.

[0669] 한 구현예에 있어서, 치료요법적으로 효과량의 결정은 당업자의 능력 범위 안에 있다.

[0670] 약제학적으로-허용가능한 담체들 또는 이의 성분들로 작용할 수 있는 일부 예시적인 물질들은 당(sugars), 예를 든다면 락토즈, 포도당 및 슈크로즈; 전분, 예를 든다면 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로오스 및 이의 유도체들, 예를 든다면 카르복시메틸 셀룰로오스 나트륨, 에틸 셀룰로오스, 그리고 메틸 셀룰로오스; 분말화된 트라가탄; 맥아; 젤라틴; 활성; 고형 윤활제, 예를 든다면 스테아르산 및 스테아레이트 마그네슘; 황산칼슘; 식물성 오일, 예를 든다면 땅콩유, 목화씨유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 그리고 테오브로마유; 폴리올 예를 든다면

프로필렌 글리콜, 글리세린, 솔비톨, 만니톨, 및 폴리에틸렌 글리콜; 알긴산; 유화제, 예를 든다면 Tween™ 상표의 유화제; 가습제, 이를 테면, 라우릴 숤페이트 나트륨; 발색제; 풍미제; 테블릿화(tableting) 물질, 안정화제들; 항산화제; 보존제들; 발열원-없는 물; 등장성 염수; 그리고 인산염 완충액 용액이다. 상기 화합물과 병용되는 약제학적으로-허용가능한 담체의 선택은 기본적으로 상기 화합물이 투여되는 방식에 의해 결정된다. 한 구현예에 있어서, 상기 괴형체 화합물이 주사되는 경우 상기 약제학적으로-허용가능한 담체는 살균된 생리학적 염수와 혈액-양립가능한 혼탁물질이며, 이의 pH는 약 7.4로 조정되었다.

[0671] 추가로, 상기 조성물들은 결합제 (이를 테면 아카시아, 옥수수 전분, 젤라틴, 카르보머, 에틸 셀룰로오스, 구아르검, 히드록시프로필 셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸 셀룰로오스, 포비돈), 봉해 물질들(이를 테면 옥수수전분, 감자 전분, 알긴산, 이산화규소, 크로스카르멜로즈 나트륨, 크로스포비돈, 구아르검, 전분 글리콜레이트 나트륨), 다양한 pH 및 이온 강도의 완충액들(이를 테면, Tris-HCl), 아세트산염, 인산염), 첨가제들 예를 든다면, 표면 흡수를 방지하기 위한 일부민 또는 젤라틴, 세제들(이를 테면, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, 담즙산 염), 프로테아제 억제제들, 계면활성제(이를 테면 라우릴 숤페이트 나트륨), 침투 강화제, 가용화물질들(이를 테면, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리세롤), 항-산화제 (이를 테면, 아스코르브산, 메타비스ulfite 나트륨, 부틸화된 히드록시아니솔), 안정화제들(이를 테면 히드록시프로필 셀룰로오스, 히드록시프로필메틸 셀룰로오스), 점성 증가 물질(이를 테면 카르보머, 콜로이드성 이산화규소, 에틸 셀룰로오스, 구아르검), 감미제 (이를 테면 아스파르탐, 구연산), 보존제들(이를 테면, 티메로살, 벤질 알코올, 파라벤), 유행제 (이를 테면 스테아르산, 스테아레이트 마그네슘, 폴리에틸렌 글리콜, 라우릴 숤페이트 나트륨), 유동-보조제(flow-aids) (이를 테면 콜로이드성 이산화규소), 가소제들(이를 테면 디에틸 프탈레이트, 트리에틸 구연산염), 유화제 (이를 테면 카르보머, 히드록시프로필 셀룰로오스, 라우릴 숤페이트 나트륨), 중합체 코팅 (이를 테면, 폴옥사머 또는 폴옥사민), 코팅 및 막 형성 물질들(이를 테면 에틸 셀룰로오스, 아클릴레이트, 폴리메타아크릴레이트) 및/또는 보강제를 더 포함한다.

[0672] 시럽, 엘류시르, 유액 및 혼탁액 용으로 전형적인 담체 성분들은 에탄올, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 액상 슈크로즈, 솔비톨 및 물을 포함한다. 혼탁액의 경우, 전형적인 혼탁 물질들은 메틸 셀룰로오스, 카르복시메틸 셀룰로오스 나트륨, 셀룰로오스 (이를 테면 Avicel™, RC-591), 트라가탄 및 알긴산 나트륨염을 포함하고; 전형적인 가습 물질들은 레시틴 및 폴리에틸렌 옥시드 소르비탄 (이를 테면 폴리소르베이트 80)을 포함한다. 전형적인 보존제들은 메틸 파라벤 및 벤조산 나트륨을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 경구 액상 조성물들은 하나 또는 그 이상의 성분들 예를 든다면 앞서 공개된 감미제, 풍미 물질들 및 발색제들을 또한 포함한다.

[0673] 상기 조성물들은 중합성 화합물들의 미립 제제 예를 든다면 폴리락트산, 폴리글리콜산, 히드로겔, 등등 또는 리포좀, 마이크로유액, 미셀, 단층라멜라 또는 다층라멜라 소포, 적혈구 고스트(erythrocyte ghosts), 또는 스페로블라스트(spheroplasts) 상에 상기 활성 재료의 혼입을 포함한다. 이러한 조성물들은 물리적 상태, 용해도, 안정성, 생체내 방출속도, 그리고 생체내 제거 속도에 영향을 줄 것이다.

[0674] 중합체(이를 테면 폴옥사머 또는 폴옥사민)으로 피복된 과립 조성물 및 조직-특이적 수용체, 리간드 또는 항원에 대항하는 항체들에 결합된 화합물 또는 조직-특이적 수용체의 리간드에 결합된 화합물들이 본 발명에 의해 또한 고려된다.

[0675] 일부 구현예들에 있어서, 화합물들은 물-가용성 중합체 예를 든다면 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸 셀룰로오스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐파리돈 또는 폴리프롤린의 공유적 부착에 의해 변형된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 변형된 화합물들은 대응하는 변형되지 않은 화합물들과 비교하여 정맥 주사 후 혈액내에서 실질적으로 더 긴 반감기를 나타낸다. 한 구현예에 있어서, 변형은 수성 용액에서의 상기 화합물의 용해도를 또한 증가시키고, 응집을 제거하고, 상기 화합물의 물리적 그리고 화학적 안정성을 강화시키고, 그리고 상기 화합물의 면역원성 및 반응성을 상당히 감소시킨다. 또 다른 구현예에 있어서, 생체내 상기 소요의 생물학적 활성을 이러한 중합체-화합물의 투여에 의해 변형되지 않은 화합물과 비교하여 덜 빈번하게 그리고 더 적은 투여분량을 얻음으로써 획득된다.

[0676] 일부 구현예들에 있어서, 제제의 효과량 또는 투여분량은 시험관내 분석으로 우선 평가될 수 있다. 한 구현예에 있어서, 투여분량은 동물 모델에서 공식화될 수 있고, 이러한 정도를 이용하여 인간에게서 유용한 더욱 정확한 투여분량이 결정될 수 있다.

[0677] 한 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 상기 활성 성분의 독성 및 치료 효과는 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준 약학 과정에 의해 결정될 수 있다. 한 구현예에 있어서, 이들 시험관내 그리고 세포 배양

분석 및 동물 연구로부터 획득된 데이터는 인간에 적용하기 위한 투약량 범위를 공식화하는 데 이용될 수 있다. 한 구현예에 있어서, 상기 투약량은 이용되는 상기 투약형과 투여 경로에 따라 가변적이다. 한 구현예에 있어서, 환자의 상태에 따라 개별 의사들에 의해 정확한 조제물, 투여 경로 및 투약량이 선택될 수 있다. [이를 테면, Fingl, 및 다른 사람들, (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1 참고].

[0678] 한 구현예에 있어서, 치료될 상태의 심각성 및 반응성에 따라 투여는 수일 내지 수주 동안, 치유가 효과적일 때 까지, 또는 질환 상태의 감축이 이루어질 때까지 지속되는 치료 과정과 함께 단일 또는 다중 투여가 될 수 있다.

[0679] 한 구현예에 있어서, 투여되는 조성물의 양은 치료 피험체, 질환의 심각성, 투여 방식, 처방 의사의 판단 등등에 따라 물론 달라질 것이다.

[0680] 한 구현예에 있어서, 양립가능한 약학 담체 안에서 제형화된 본 발명의 상기 제제가 포함된 조성물이 제조되고, 적절한 용기에 넣고, 명시된 상태의 치료용이라는 라벨이 용기에 부착된다.

[0681] 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자는 복합체 유기 부형제들 및 안정화제들, 예를 든다면 비이온성 표면 활성 물질들(가령, 계면활성제), 다양한 당, 유기 폴리올 및/또는 인간 혈청 알부민과 복합된 동결건조된 (가령, 냉동-건조된) 제제가다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 조성물은 주사용 멸균 수 안에 설명된 동결건조된 응고 인자를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 조성물은 주사용 살균 PBS 안에 동결건조된 응고 인자를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 약제학적 조성물은 주사용 살균 0.9% NaCl 안에 동결건조된 응고 인자를 포함한다.

[0682] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자와 복합체 담체들, 예를 든다면 인간 혈청 알부민, 폴리올, 당, 그리고 음이온성 표면 활성 안정화 물질들을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자와 락토비온산 그리고 아세트산염/글리신 완충액을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자와 아미노산들, 예를 든다면 물에 인터페론 조성물의 용해도를 증가시키는 아르기닌 또는 글루탐산염을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 본 명세서에서 설명된 것과 같은 동결건조된 응고 인자와 글리신 또는 인간 혈청 알부민(HSA), 완충액(가령, 아세트산염) 그리고 등장성 물질(가령, NaCl)을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 본 명세서에서 설명된 것과 같은 동결건조된 응고 인자와 인산염 완충액, 글리신 및 HSA를 포함한다.

[0683] 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자가 포함된 상기 약제학적 조성물은 약 4 내지 7.2의 pH를 갖는 완충된 용액에 두었을 때 안정화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자가 포함된 상기 약제학적 조성물은 약 4 내지 8.5의 pH를 갖는 완충된 용액에 있다.. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자가 포함된 상기 약제학적 조성물은 약 6 내지 7의 pH를 갖는 완충된 용액에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 응고 인자가 포함된 상기 약제학적 조성물은 약 6.5의 pH를 갖는 완충된 용액에 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자가 포함된 상기 약제학적 조성물은 안정화 물질로써 아미노산으로, 그리고 일부 경우에는 염(상기 아미노산이 전하를 띤 측쇄를 보유하지 않는 경우)에 의해 안정화된다.

[0684] 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자가 포함된 상기 약제학적 조성물은 안정화 물질로써 약 0.3wt% 내지 5wt% 사이의 아미노산이 포함된 액상 조성물이다.

[0685] 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자가 포함된 상기 약제학적 조성물은 투여 정확성 및 제품 안전성을 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자가 포함된 상기 약제학적 조성물은 주사가능한 용도에 사용하기 위한 생물학적으로 활성을 가진, 안정적인 액상 조제물을 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 본 명세서에서 설명된 것과 같은 동결건조된 응고 인자를 포함한다.

[0686] 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자가 포함된 상기 약제학적 조성물은 보관 및 투여하기 전 운반에 용이한 액상 상태로 장시간 보관이 허용되는 액상 조제물을 제공한다.

[0687] 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자가 포함된 상기 약제학적 조성물은 매트릭스 재료로써 고형 지질을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자가 포함된 상기 주사가능한 약제학적 조성물은 매트릭스 재료로써 고형 지질을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 스프레이 응결(congealing)에 의한 지질 극미립자 생산에 대해서는 Speiser (Speiser and al., Pharm. Res. 8 (1991) 47-54)에서 설명되고, 경구 투여용 지질 나노펠취는 (Speiser EP 0167825 (1990))에서 설명된다. 또 다

른 구현예에 있어서, 이용되는 지질(가령, 장관외 영영공급용 유액 안에 존재하는 지방산으로 구성된 글리세리드)은 신체에 의해 잘 용인된다.

[0688] 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자가 포함된 상기 약제학적 조성물은 중합성 극미립자를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자가 포함된 상기 약제학적 조성물은 나노입자들을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자가 포함된 상기 약제학적 조성물은 리포좀을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자가 포함된 상기 약제학적 조성물은 지질 유액을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자가 포함된 상기 약제학적 조성물은 미소구체(microspheres)를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자가 포함된 상기 약제학적 조성물은 지질 나노입자들을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자가 포함된 상기 약제학적 조성물은 양쪽성 지질이 포함된 지질 나노입자들을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 응고 인자가 포함된 상기 약제학적 조성물은 약물, 지질 매트릭스 그리고 계면활성제가 포함된 지질 나노입자를 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 지질 매트릭스는 적어도 50% w/w의 모노글리세리드 함량을 갖는다.

[0689] 한 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 팩(pack) 또는 분배 기구, 예를 든다면 FDA 승인된 키트, 상기 활성 성분이 포함된 하나 또는 그 이상의 단위 투약형이 함유된 FDA 승인된 키트 안에 존재한다. 한 구현예에 있어서, 상기 팩은 예를 들면, 금속 또는 플라스틱 포일을 포함하는 데 예를 든다면 블리스터(blister) 팩이 된다. 한 구현예에 있어서, 상기 팩 또는 분배 기구에는 투여 지침이 수반된다. 한 구현예에 있어서, 상기 팩 또는 분배 기구에는 약물의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부기관이 지정한 형태로 상기 용기에 연계된 경고문이 있으며, 이 경고문은 상기 조성물 또는 인간 또는 동물 투여 형태의 기관에 의한 승인이 반영된다. 한 구현예에 있어서, 이러한 경고문은 승인된 제품 삽입용으로 또는 약물 처방용으로 U.S. Food and Drug Administration에서 승인된 라벨이다.

[0690] 한 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 응고 인자들은 각 물질 자체만으로 치료된 경우의 효과와 비교하여 개선된 치료요법적 효과를 획득하기 위하여 추가 활성 물질들과 함께 개인에게 제공될 수 있음을 이해할 것이다. 또 다른 구현예에 있어서, 복합 요법과 연합된 부작용을 회피하기 위한 측정이 있을 수 있다(이를 테면, 상기 상보성 물질의 투여 및 선택).

[0691] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 FVIIa 폴리펩티드와 상기 FVIIa의 카르복시 말단에 부착된 5개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨პ티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 FVIIa 폴리펩티드를 제공한다.

[0692] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 FVIIa 폴리펩티드와 상기 FVIIa의 카르복시 말단에 부착된 5개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨პ티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 FVIIa 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0693] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 FVIIa 폴리펩티드와 상기 FVIIa의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨პ티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0694] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 FVIIa 폴리펩티드와 상기 FVIIa의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨პ티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현 벡터를 제공한다.

[0695] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 FVIIa 폴리펩티드와 상기 FVIIa의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨პ티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

[0696] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 FVIIa 폴리펩티드와 상기 FVIIa의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 웨პ티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현 벡터를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0698] *또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 FVIIa 폴리펩티드의 생물학적 반감기를 연장시키는 방법을 제시하는 데, 이 방법은 3개의 융모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨პ티드(CTP)를 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하고, 그렇게 함으로써 상기 FVIIa 폴리펩티드의 생물학적 반감기가 연장된다.

[0699] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 FVIIa 폴리펩티드의 곡선하 면적(AUC)을 개선시키는 방법을 제시하는 데,

이 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 펩티드(CTP)를 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하고, 그렇게 함으로써 상기 FVIIa 폴리펩티드의 AUC가 개선된다.

[0700] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 FVIIa 폴리펩티드의 투여 빈도를 감소시키는 방법을 제시하고, 이 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 펩티드(CTP)를 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하고, 그렇게 함으로써 상기 FVIIa 폴리펩티드의 투여 빈도를 감소시킨다.

[0701] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 FVIIa 폴리펩티드의 제거 속도를 감소시키는 방법을 제시하고, 이 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 펩티드(CTP)를 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하고, 그렇게 함으로써 상기 FVIIa 폴리펩티드의 제거 속도는 감소된다.

[0702] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 CTP-변형된 FVIIa 폴리펩티드를 만드는 방법을 제시하는 데, 이 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 펩트드(CTP)를 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하고, 그렇게 함으로써 CTP-변형된 FVIIa 폴리펩티드가 생성된다.

[0703] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 피험체에게서 혈우병을 치료하는 방법을 제시하는 데, 이 방법은 FVIIa 폴리펩티드와 상기 FVIIa 폴리펩티드의 카르복시 말단에 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 펩티드(CTP)가 포함된 CTP-변형된 FVIIa 폴리펩티드를 상기 피험체에게 투여하는 것을 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 피험체의 혈우병은 치료된다.

[0704] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드와 상기 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 펩티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드를 제공하며, 이때 상기 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 서열은 서열 번호: 31에서 제시된 서열이다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드를 제공하고, 이때 적어도 하나의 CTP는 서열 번호: 1 및 서열 번호: 2로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 의해 인코딩된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드를 제공하고, 이때 적어도 하나의 CTP 당화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드를 제공하고, 이때 적어도 하나의 CTP는 절두된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드를 제공하고, 이때 적어도 하나의 CTP는 링커를 통하여 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드에 부착된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드를 제공하고, 이때 상기 링커는 펩티드 결합이다.

[0705] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 상기 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드가 포함된 약제학적 조성물을 제공한다.

[0706] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드와 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 고나도트로핀 카르복시 말단 펩티드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 이때 상기 폴리뉴클레오티드의 서열은 서열 번호: 30에서 제시된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 이때 적어도 하나의 CTP는 서열 번호: 1 및 서열 번호: 2로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 의해 인코딩된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 이때 적어도 하나의 CTP 당화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 이때 적어도 하나의 CTP는 절두된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 이때 적어도 하나의 CTP는 링커를 통하여 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드에 부착된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 이때 상기 링커는 펩티드 결합이다. 발현 벡터는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0707] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 상기 발현 벡터가 포함된 세포를 제공한다.

[0708] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 상기 발현 벡터가 포함된 조성물을 제공한다.

[0709] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 생물학적 반감기를 연장시키는 방법을 제시하는 데, 이 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 펩티드(CTP)를 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 생물학적 반감기가 연장된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP 서열 번호: 1 및 서열 번호: 2로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 의해 인코딩된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP 당화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP는 절두된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP는 링커를 통하여 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드에 부착된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 상기 링커는 펩티드 결합이다.

하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP는 링커를 통하여 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드에 부착된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 상기 링커는 웨პ티드 결합이다.

[0710] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 곡선화 면적(AUC)을 개선시키는 방법을 제시하는데, 이 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨пт드(CTP)를 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 AUC가 개선된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP 서열 번호: 1 및 서열 번호: 2로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 의해 인코딩된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP 당화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP는 절두된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP는 링커를 통하여 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드에 부착된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 상기 링커는 웨პ티드 결합이다.

[0711] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 투여 빈도를 감소시키는 방법을 제시하는 데, 이 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨пт드(CTP)를 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 투여 빈도를 감소시킨다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP 서열 번호: 1 및 서열 번호: 2로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 의해 인코딩된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP 당화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP는 절두된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP는 링커를 통하여 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드에 부착된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 상기 링커는 웨პ티드 결합이다.

[0712] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 제거 속도를 감소시키는 방법을 제시하는 데, 이 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨пт드(CTP)를 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 제거 속도가 감소된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP 서열 번호: 1 및 서열 번호: 2로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 의해 인코딩된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP 당화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP는 절두된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP는 링커를 통하여 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드에 부착된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 상기 링커는 웨პ티드 결합이다.

[0713] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드를 생산하는 방법을 제시하는 데, 이 방법은 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨пт드(CTP)를 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그렇게 함으로써 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드를 생산한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 상기 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 서열은 서열 번호: 31에서 제시된 서열이다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP 서열 번호: 1 및 서열 번호: 2로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 의해 인코딩된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP 당화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP는 절두된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP는 링커를 통하여 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드에 부착된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 상기 링커는 웨პ티드 결합이다.

[0714] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 피험체에게서 혈우병을 치료하는 방법을 제시하는 데, 이 방법은 인자 IX (FIX) 폴리펩티드와 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착된 3개의 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨пт드(CTP)이 포함된 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드를 상기 피험체에게 투여하는 것을 포함하며, 그렇게 함으로써 상기 피험체의 혈우병은 치료된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 상기 CTP-변형된 인자 IX (FIX) 폴리펩티드의 서열은 서열 번호: 31에서 제시된 서열이다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP 서열 번호: 1 및 서열 번호: 2로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 의해 인코딩된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP 당화된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP는 절두된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은 한 방법을 제시하는 데, 이때 적어도 하나의 CTP는 링커를 통하여 상기 인자 IX (FIX) 폴리펩티드에 부착된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명은

한 방법을 제시하는 데, 이때 상기 링커는 웨티드 결합이다.

[0715] 당 분야에 일반적으로 공지된 바와 같이, 본 발명의 상기 변형된 웨티드들과 단백질들은 소요의 용도에 따라 라벨, 약물, 표적화 물질들, 담체들, 고형 지지대, 그리고 이와 유사한 것들에 연결될 수 있다. 상기 변형된 생물학물질의 라벨된 형태는 이들의 대사적 운명을 추적하는 데 이용될 수 있으며; 이러한 목적에 적합한 라벨은 특히 방사능동위원소 라벨, 예를 든다면 요오드 131, 테크네튬 99, 인디움 111, 그리고 이와 유사한 것들을 포함한다. 상기 라벨은 분석 시스템에서 상기 변형된 단백질들 또는 웨티드들을 탐지하는 데 또한 이용될 수 있다: 이 경우, 방사능동위원소가 또한 이용될 수 있으며, 뿐만 아니라 효소 라벨, 형광 라벨, 색원성 라벨, 그리고 이와 유사한 것들도 또한 이용될 수 있다. 이러한 라벨의 용도는 상기 웨티드 또는 단백질 자체가 표적화 물질 예를 든다면 항체 또는 수용체 리간드인 경우 특히 유용하다.

[0716] 다른 것들과 같이, 유사한 연계 기술을 이용하여 본 발명의 상기 변형된 웨티드들과 단백질들을 고형 지지대에 결합시킬 수 있다. 결합되었을 때, 이들 변형된 웨티드들과 단백질들은 소요의 성분 분리용으로 특이적 반응을 나타내는 친화력 시약으로 이용될 수 있다.

[0717] 끝으로, 본 발명의 상기 변형된 웨티드들과 단백질들은 이를 새로운 화합물들과 특이적인 면역활성을 가진 항체를 만드는데 이용될 수 있다. 이들 항체는 상기 변형되지 않은 웨티드 또는 단백질의 생물학적 활성 성질에 따라 다양한 진단 및 치료 용도에 유용하다. 본 발명은 본 명세서에서 설명된 것과 같은 CTP-변형된 FIX, FVII, 또는 FVIIa와 면역활성을 가진 항체들을 제공하는 것으로 이해되어야 한다. 한 구현예에 있어서, 이러한 항체들은 내생 응고 인자들로부터 투여된 CTP-변형된 응고 인자들과 구별 또는 식별하는 데 이용된다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 항체들은 투여된 CTP-변형된 응고 인자들을 국소화시키는 데 이용될 수 있다.

[0718] 다음의 실시예들을 검토하면 본 발명의 추가 목적, 장점들 및 새로운 성질들은 당업자들에게 자명해질 것이지만, 이들 실시예에 국한되지 않는다. 추가적으로, 상기에서 나타낸 다양한 각 구현예들과 그리고 하기 청구범위에서 청구된 본 발명의 측면들은 다음의 실시예에서 실험적으로 뒷받침된다.

[0719] 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예들

[0721] 일반적으로, 본 명세서에서 이용된 명명법 및 본 발명에서 이용된 실험 절차는 문자, 생화학, 미생물학 그리고 재조합 DNA 기술을 포함한다. 이러한 기술들은 문헌에서 상세하게 설명된다. 예를 들면, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook 및 다른 사람들, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel 및 다른 사람들, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson 및 다른 사람들, "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren 및 다른 사람들(eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 미국 특허 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 및 5,272,057에서 제시된 방법론들; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites 및 다른 사람들(eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); 이용가능한 면역분석들은 특히 및 과학 문헌에서 광범위하게 설명된다. 예를 들면, 미국 특허 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 및 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) 그리고 "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, Ca(1990); Marshak 및 다른 사람들, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); 이들 모두 전문이 참조함으로써 본 명세서에 포함된다. 기타 일반적인 참고자료는 본 서류에서 제시된다.

[0722] **실시예 1**

[0723] **응고 인자 IX의 생성 및 이용**

[0724] **재조합 FIX 분자의 클로닝 및 발현:**

[0725] FIX 클론은 우리의 진핵 발현 벡터 pCI-neo (Promega, catalog no. E1841)에서 제작되었다. 호모 사피엔스 (*Homo sapiens*) 응고 인자 IX의 ORF 클론은 "Origen" (RC219065)에서 주문하였다. 프라이머들은 Sigma-Genosys에서 주문하였다.

[0726] **301-1-pCI-neo-p200-11 (FIX-ctp x2)의 제작:**

[0727] 프라이머 101: 5' GTTTAGTGAACCGTCAGAAT 3' (서열 번호: 36)

[0728] 프라이머 103^R: 5' TTGAGGAAGATGTTCTGTGA 3' (인자 IX의 SspI 부위를 포함) (서열 번호: 37)

[0729] PCR 반응은 프라이머 101 및 프라이머 103^R 그리고 플라스미드 DNA, 주형으로 FIX의 cDNA 클론("Origen" RC219065)을 이용하여 시행되었다; PCR 증폭 결과, ~ 1085 bp (pcr 10) 산물이 형성되었으며, 젤로부터 정제되었다(상기 단편은 FIX 서열의 아미노 말단을 포함한다).

[0730] 프라이머 98: 5' ATTACAGTTGTCGCAGGTGA 3' (서열 번호: 38)

[0731] 프라이머 99^R : 5' GCTGGAGCTAGTGAGCTTGTTCCTT 3' (서열 번호: 39)

[0732] 프라이머 100: 5' GCTCACTAGCTCCAGCAGCAAGGCC 3' (서열 번호: 40)

[0733] 프라이머 27^R: 5' TTTTCACTGCATTCTAGTTGTGG 3' (서열 번호: 41)

[0734] 3번의 PCR 반응이 시행되었다. 처음 반응은 프라이머 98 및 프라이머 99^R 그리고 플라스미드 DNA, 주형으로 FIX의 cDNA 클론 ("Origen", RC219065)으로 시행되었다; 상기 PCR 증폭 결과, ~ 540 bp 산물이 형성되었다.

[0735] 두 번째 반응은 프라이머 100 및 프라이머 27^R 그리고 주형으로 402-2-p72-3의 플라스미드 DNA(hGH-CTP-CTP)를 이용하여 시행되었다; 상기 PCR 증폭 결과, ~ 258 bp 산물이 형성되었다.

[0736] 최종 반응 (pcr 3)은 프라이머 98 및 27^R 그리고 주형으로 기존 두 반응의 산물 혼합물을 이용하여 시행되었다; 상기 PCR 증폭 결과, ~ 790 bp 산물이 형성되었고, TA 클로닝 벡터 (Invitrogen, catalog K2000-01)에 결찰되었다. SspI-EcoRI 단편이 단리된다(TA 3-3).

[0737] 또 다른 PCR 반응(pcr 12)은 프라이머 101과 프라이머 27^R 그리고 주형으로 pcr 10 및 pcr3의 SspI-EcoRI 단편 산물 혼합물을 이용하여 시행되었다; 상기 PCR 증폭 결과, ~ 1700 bp 산물이 형성되었고(FIX-ctp-ctp) 그리고 TA 클로닝 벡터 (Invitrogen, catalog K2000-01)에 결찰되었다(lig 180).

[0738] FIX 서열에서 오류가 발견되었고, 따라서 단편들은 FIX-ctp-ctp의 삽입물(insert)을 만들기 위하여 정확한 DNA 서열로 대체되었다.

[0739] TA-pcr3-3은 SspI와 XbaI으로 절단되었고, 큰 단편이 단리되었다(벡터). TA 180-4는 SspI와 XbaI으로 절단되었고, 작은 단편 (삽입물)이 단리되었고, 그리고 SspI와 XbaI으로 절단된 TA-pcr3-3의 단리된 큰 단편에 결찰되었다. 새로운 플라스미드 TA-183-2는 Sal I 및 Not I으로 절단되었고, 그리고 FIX-CTP-CTP 삽입물은 단리되었다 (~1575 bp). 이 단편은 진핵 발현 벡터 pCI-neo (Sal I 및 Not I으로 절단된) 안에 결찰되어 상기 301-1-p200-11 클론을 얻었다.

[0740] **pCI-dhfr-Factor 9-ctpx2 (p223-4) 제작:** 벡터 pCI-dhfr (p6-1)는 SmaI 및 Not I으로 절단되었다. FIX-CTP-CTP (p200-11)는 ASsI F.I. 및 Not I으로 절단되었다. 상기 두 단편들이 결찰되었다.

[0741] **pCI-dhfr Factor 9-ctp x3 (p225-7) 제작:** 벡터 pCI-dhfr OXM-CTPx3 (p216-4)는 XbaI 및 ApaI으로 절단되었다. FIX-CTP-CTP (p223-4)는 XbaI 및 ApaI으로 절단되었다. 상기 두 단편들이 결찰되었다.

[0742] **pCI-dhfr Factor 9-ctp x3 T148a(p243-2) 제작:** 플라스미드 p225-7은 위치 148에 트레오닌을 포함하고 있으며, FIX의 좀 더 흔한 형태는 이 위치에 알라닌을 포함하고 있기 때문에, 부위 직접적인 돌연변이 생성법을 이용하여

Thr는 Ala으로 대체되었다.

[0743] 프라이머 75: ctcccagtcaattacagct (서열 번호: 42)

[0744] 프라이머 122r: ggaaaaactgcctcagcacgggtgagc (서열 번호: 43)

[0745] 프라이머 123: gtgctgaggcagtttcctgtgtggactat (서열 번호: 44)

[0746] 프라이머 124r: caacacagtggcagcag (서열 번호: 45)

[0747] 3번의 PCR 반응이 시행되었다. 첫 반응은 프라이머 75와 프라이머 122r 그리고 주형으로 플라스미드 DNA p225-7을 이용하여 시행되었다; 상기 PCR 증폭 결과, ~ 692 bp 산물이 형성되었고, 그리고 젤로부터 정제되었다. 제 2 PCR 반응은 프라이머 123 및 프라이머 124r 그리고 주형으로 플라스미드 DNA p225-7을 이용하여 시행되었고; 상기 PCR 증폭 결과, ~237 bp 산물이 형성되었고 젤로부터 정제되었다. 세번째 - 중첩 PCR 반응- 반응은 프라이머 75 및 124r, 그리고 주형으로 앞선 두 반응 산물 혼합물을 이용하여 시행되었다; 상기 PCR 증폭 결과, ~ 910 bp 산물이 형성되었다. 이 중첩 PCR 산물은 XbaI과 NsiI으로 절단되었고 p225-7 플라스미드 (XbaI과 NsiI으로 절단된) 안에 재-결찰되어 p243-2로 지정된 FIX-ctpx3 T148A를 얻었다.

[0748] **FIX-4개 CTP (p259-4) 작제:** 3.5개 CTP 단편은 제한 효소 Apa1 및 Xba1에 의해 oxym-4개 CTP (p254-3)으로부터 단리되었다. FIX+0.5개 CTP 단편은 제한 효소 Apa1 및 Xba1을 이용하여 FIX-3개 CTP (p243-2)로부터 단리되었다. 상기 두 단편들이 결찰되었다.

[0750] ***FIX-5개 CTP (p260-18) 작제:** 4.5개 CTP 단편은 제한 효소 Apa1과 Xba1에 의해 oxym-5개 CTP (255-1)으로부터 단리되었다. FIX+0.5개 CTP 단편은 효소 Apa1과 Xba1을 이용하여 FIX-3개 CTP (p243-2)로부터 단리되었다. 상기 두 단편들이 결찰되었다.

[0751] Dg44 세포들은 100mm 조직 배양 접시 상에 도말되었고, 50-60% 합류가 될 때까지 성장하였다. 총 2 μ g (microgram)의 FIX cDNA가 단백질-없는 배지 (Invitrogen CD Dg44)에서 FuGene 시약(Roche)을 이용하여 1개의 100mm 플레이트의 형질감염에 이용되었다. 형질감염 후 48시간 후 상기 배지는 제거되었고, 뉴클레오시드없이, 그리고 800 μ g/ml의 G418 (네오마이신) 존재하에 단백질-없는 배지 (Invitrogen CD Dg44)로 대체되었다. 14일 후, 상기 형질감염된 세포 군은 T25 조직 배양 플라스크로 이동되었고, 상기 세포가 안정적인 클론으로 성장하기 시작될때까지 추가 10-14일 동안 선별은 지속되었다. 발현이 높은 클론이 선별되었다. 대략 2×10^7 세포를 이용하여 1700 cm² 롤러 바틀 (Corning, Corning NY)에서 5 ng/ml의 비타민 K3 (메나디온 중황산나트륨; Sigma)이 보충된 성장 배지 300 ml을 접종하였다. 상기 생산 배지 (수확물)는 세포 생존능이 약 70%로 급격히 감소된 후 수거되었다. 상기 생산 배지는 우선 정화되었고, 그 다음 대략 20-배로 농축되었고, 그리고 유동 여과 카세트 (10KDa MWCO; Millipore Corp.)를 이용하여 투석되었다.

[0752] **FIX 항원 농도의 측정:** FIX-CTP 수확물 항원 농도은 AssayMax Human FIX ELISA 키트(AssayPro-EF1009-1)를 이용하여 측정되었다. 상기 산출된 단백질 농도는 2회의 별도 실험에서 3개의 상이한 희석물의 평균이다(도 1a, 표 1).

표 1: 산출된 단백질 농도

	FIX-CTP	FIX-CTP-CTP
FIX Ag 수준 (μ g/ml)	41.9	19.2
SD	8.76	3.67
%CV	20.92	19.15

[0754]

[0755] **FIX SDS-PAGE - 면역 블롯:** FIX-CTP 수확물을 또는 정제된 rhFIX(American Diagnostics), 100 ng의 단백질은 Precision Plus Dual Color Protein Marker (Bio-Rad)를 이용하여 12% Tris-글리신 겔 상에 적재되었다. 상기 SDS-PAGE 분석은 웨스턴 면역블롯에서 항-인간 FIX 다클론 항체와 항-인간 감마 카르복실화 단클론 항체 (American Diagnostics)를 이용하여 시행되었다. 이미 보고된 바와 같이, rhFIX는 55KDa으로 이동되며, 한편 2 개의 CTPs에 융합된 FIX는 75KDa으로 이동된다. FIX-CTP 단백질들의 이들 두 변이체들 모두 FIX 활성 및 기능에 필수적인 해독 후 변형인 감마 카르복실화된 것으로 나타났다(도 1b).

[0756] **FIX 색원성 활성의 측정:** FIX-CTP 수확물을 대(versus) rhFIX 단백질 (American Diagnostics)의 시험관내 효능

의 비교 평가는 시판되는 색원성 활성 테스트 키트, BIOPHEN(Hyphen BioMed 221802)를 이용하여 실시되었다. 트롬빈, 인지질, 칼슘 존재하에 과량의 FXIa는 시료채취된 FIX를 FIXa로 활성화시킨다. FIXa는 트롬빈, 활성화된 FVIII:C (과량으로 공급됨), 인지질, 그리고 칼슘과 함께 효소 복합체를 형성하고, 그리고 분석 시스템 안에 존재하는 Factor X를 FXa로 활성화시킨다. 상기 활성은 FIX의 양과 직접적인 상관관계가 있으며, 이것은 제한 인자다. 그 다음 생성된 FXa는 FXa 색원성 기질(pNA) 상에서 이의 특이 활성에 의해 측정된다. 생성된 pNA의 양은 FIXa 활성에 직접적으로 비례한다. rhFIX와 FIX-CTP 수확물들은 연속적으로 희석되었고, 그리고 상기 효능은 rhFIX 또는 인간 혈장으로 구성된 기준 제제에 상기 FIX 수확물들의 투여분량-반응 곡선을 비교하여 평가되었다. FIX의 평균 EC50은 21 ng/ml이었고, FIX-(CTP)₂ 수확물의 산출된 EC50는 382 ng/ml이었고, 그리고 상기 FIX-CTP 수확물의 산출된 EC50는 1644 ng/ml이었다. 상기 FIX-(CTP)₂ 수확물의 효소 활성이 대략 15-배 감소됨이 관찰되었다(표 2).

[0757] FIX 응고 활성(aPTT): 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT)은 응결 캐스캐이드의 고유한 그리고 공통적인 경로의 온전성의 척도다. 상기 aPTT는 고유 경로 활성 물질, 인지질 및 칼슘 추가 후 혈장이 응고되는 데 허용되는 시간(초)이다. 상기 aPTT 시약은 부분적 트롬보플라스틴으로 불리는데, 그 이유는 조직 인자는 인지질과 함께 포함되지 않고, 프로타임(PT) 시약에 포함되기 때문이다. 상기 활성물질은 상기 시스템을 시작하고, 그 다음 고유 경로의 나머지 단계들은 인지질 존재하에 일어난다. 기준 aPTT 범위는 실험실마다 다변하지만, 그러나 일반적으로 27-34 초 범위 안에 있다.

[0758] 상기 분석의 원리는 rhFIX의 추가에 의해 FIX-CTP 수확물들이 FIX-감손된 인간 혈장의 응고 활성을 복원시키는 능력을 정량화하는 것이다. 300 μl의 FIX-결핍 인간 혈장은 100μl의 rhFIX 또는 FIX-CTP 수확물들과 혼합되고, 연속적으로 희석되었다. 37°C에서 60초간 항온처리된 후, 트롬보플라스틴, CaCl₂, 및 인지질이 상기 혼합물에 추가되었고, 응고 시간(초)이 측정되었다(American Medical Laboratories에 의해 실시됨). 상기 효능은 rhFIX 또는 인간 혈장으로 구성된 기준 제제에 상기 FIX 수확물들의 투여분량-반응 곡선을 비교하여 평가되었다. 1 유닛의 FIX 활성은 1 ml 정상적인 인간 혈장의 상기 활성과 대등한 FIX 농도에 대응한다. 제시된 aPTT 결과에서는 FIX-(CTP)₂는 rhFIX와 비교하였을 때 이의 특이적 응결 활성이 5-7배 감소된 것으로 나타난다(표 2). 더욱이, 상기 aPTT 결과와 함께 색원성 활성 시험관내 분석은 FIX-(CTP)₂ 수확물이 FIX-CTP 수확물과 비교하여 개선된 효소 활성을 가진다는 것이 암시한다(표 2). FIX-CTP 단백질들의 개선된 활성은 상기 발현 시스템의 최적화 (가령 Furin과의 공동-형질감염 및 비타민 K3 배지 농도의 최적화) 이후에 획득가능하며, Furin과의 초-형질감염 후 강화되었다(데이터는 제시되지 않음).

표 2: FIX 응고 활성

rhFIX(A D) (μg/ml)	PTT(Sec)	FIX-CTP (μg/ml)	PTT (Sec)	FIX-CTP-CTP (μg/ml)	PTT (Sec)
5	31.3	9	45.2	4	47.5
1.25	35.7	2.25	53.3	1	55.9
0.3125	43	0.5625	64.1	0.25	67
0.07812	52.1	0.140625	76.3	0.0625	77.4
5					

[0760] **[0761] 약동학 연구:** rhFIX(American Diagnostic)와 FIX-CTP 수확물들은 Sprague-Dawley 쥐 (물질당 6마리 쥐)에게 75 μg/kg 체중의 투여분량으로 단일 정맥 주사로 투여되었다(표 3).

[0762]

표 3: PK 연구 수술 계획

치료된 집단	테스트 물질	한 집단당 동물 수	투여 경로	성별	투여분량 수준 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	투여 분량수준 (동물당 μg)	주사된 용적(μl)	농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	*시점 (투여 후 시간)
1	rFIX	6	IV	M	75	15	500	30	0 (투여전) 0.083, 0.5, 1.5, 4, 8, 24, 48, 72.
2	rFIX-CTP	6	IV	M	75	15	500	30	0 (투여전) 0.083, 0.5, 1.5, 4, 8, 24, 48, 72.
3	rFIX-CTP-CTP	6	IV	M	75	15	1000	15	0 (투여전) 0.083, 0.5, 1.5, 4, 8, 24, 48, 72.

[0763]

3 마리 쥐으로부터 교대로 투여 후 0.083, 0.5 1.5, 4, 8, 24, 48, 및 72 시점에 후면-안와로부터 혈액 시료를 취하였다. 혈장은 표본 추출 직후 준비되었고, 분석때까지 -20°C에서 보관되었다. FIX 농도는 FIX ELISA-특이적 분석 (AssayPro)에 의해 정량화되었다. 약동학 프로파일은 각 단백질에서 산출되었으며, 이는 각 시점에서 3마리 평균을 나타낸다(도 3). 말기 반감기는 PK Solutions 2.0 소프트웨어를 이용하여 산출되었다. 표 4는 상이한 표본추출 시간 대에서 관찰된 FIX 농도를 요약한 것이다.

[0765]

표 4: 관찰된 FIX 농도

시간 (Hr.)	FIX-AD (ng/ml)	FIX-CTP (ng/ml)	FIX-CTP-CTP (ng/ml)
0.083	1506.7	1477.5	1914.8
0.5	1949.8	1150.1	1830.1
1.5	2189.4	1009.0	1264.3
4	733.90	709.33	1000.00
8	319.80	167.20	1234.67
24	BLQ	54.625	230
48	BLQ	BLQ	120.9

[0766]

[0767]

상기 PK 프로파일과 상기 말단 반감기의 요약은 표 5에서 요약된다. FIX-CTP 수확물들은 rhFIX와 비교하였을 때 개선된 $T_{1/2\beta}$ 값을 나타낸다(각각 차례로 2-배와 5-배 증가). FIX 투여 수집에서, 24시간 시점에서 FIX의 동물 혈청 농도는 정량 하한점(BLQ) 미만이기 때문에, 추가적인 PK 매개변수는 산출되지 않았다.

[0768]

표 5: PK 매개변수의 요약

산물	말기 반감기- (hr)	비율 ($\text{FIX}-(\text{CTP})_X/\text{rhFIX}$)
rhFIX (American Diagnostics)	2.62	-
FIX-CTP	5.55	2.11
FIX-CTP (FIX-CTP-CTP)	12.9	4.92

[0769]

[0770] 이 연구에서, 상기 치료요법적 효능은 유지되면서 FIX 반감기를 연장시키는 새로운 방법이 설명되었다. 활성 단백질에 CTP 웨티드 추가는 상기 단백질의 활성 간섭에 유해한 가능성이 있다. 따라서, 상기 FIX의 N-말단에서 CTP 서열의 추가에 의해 활성 재조합 FIX-CTP가 생성되는 것은 예상밖이다.

[0771] 면역친화성 정제된 FIX-CTP-CTP의 특징화

[0772] FIX-CTP-CTP 정제

[0773] 단백질의 PK 프로파일이 임상 환경을 모방하여, 임상 환경으로 추정될 수 있는, 증가된 활성을 보유한 높은 등급의 함량을 가진 단백질을 평가하기 위하여, FIX-CTP-CTP는 FIX의 카르복시 말단에 2개의 일렬 CTP 유닛을 가지도록 변형된 FIX다. FIX-CTP-CTP는 FIX의 N-말단 영역에 존재하는 γ 카르복시글루타밀 (G1a) 잔기에 대항하는 매트릭스-결합된 단클론 항체를 이용하여 정제되었다(American Diagnostics Cat. # 3570MX). 상기 단클론 항체는 세파로즈 CL-4B에 결합되었다. 88 µg/ml 농도의 상기 FIX-CTP-CTP 수확물은 20mM Tris, 150mM NaCl 및 10mM EDTA, pH = 7.4에 대하여 투석되었다. 적재율(loading rate)은 분당 0.5 ml이었고, 용리는 20mM Tris-HCl, 350 mM NaCl 및 50 mM CaCl₂를 이용하여 시행되었으며, 그리고 상기 결합안된 분획물은 5회 재순환되었다. 최종적으로, 상기 용리액 분획물은 PBS로 투석되었고, 뽑아내어 놓축된다.

[0774] FIX 항원 농도의 측정: FIX-CTP 수확물들, FIX-(CTP)₂ 수확물들, 그리고 FIX-(CTP)₂ 정제된 단백질 농도는 Human FIX ELISA 키트(Affinity Biologicals; Cat. #FIX-AG RUO)를 이용하여 측정되었다. 상기 산출된 단백질 농도(µg/ml)는 2회의 독립적인 시행의 평균이다(도 4, 표 6).

표 6: 산출된 단백질 농도

	FIX-CTP	FIX-CTP-CTP	FIX-CTP-CTP (정제된)
FIX Ag 수준 (µg/ml)	125.78	88.53	172.9
SD	17.28	21.31	2.63
%CV	13.74	24.08	1.52

[0775]

[0776] 추가적으로, FIX-CTP-CTP는 Bradford 분석에 의해 정량화되었다. 상기 산출된 농도는 202 µg/ml이었고, 이 농도는 인간 FIX ELISA에 의해 획득된 농도와 유사하다.

[0777]

[0778] SDS-PAGE 블롯: FIX-CTP-CTP 수확물, 결합안된 분획물 그리고 정제된 단백질은 Precision Plus Dual Color Protein Marker (Bio-Rad)를 이용하여 12% Tris-글리신 겔 상에 적재되었다. 상기 SDS-PAGE Coomassie 분석은 Coomassie 블루 시약(800ng의 단백질)로 상기 겔을 착색시킴으로써 시행되었다. 웨스턴 면역블롯은 100 ng의 단백질, 항-인간 FIX 다클론 항체(Ab), 그리고 항-인간 감마 카르복실화 단클론 Ab(American Diagnostics Cat #499 and #3570)를 이용하여 시행되었다. 상기 면역친화성 정제 과정은 불순물은 감소시키면서 놓축 상기 FIX-CTP-CTP 부분을 상당히 놓축시켰다(도 5).

[0779]

[0779] N-말단 시퀀싱(sequencing): FIX-CTP-CTP 정제된 단백질은 12% Tris-글리신 SDS-PAGE에 의해 분리되었고, PVDF 막에 후속적으로 전기-블롯되었다. 관심 밴드를 잘라내고, 정제된 Biobrene 처리된 유리 섬유 필터 상에 두었다. 상기 N-말단 서열 분석은 140 C HPLC 마이크로-그라디언트(micro-gradient) 시스템이 구비된 펠스된 액상 단백질 서열화기를 이용한 Edmann 분해에 의해 시행되었다. N-말단 시퀀싱에 의해 FIX-CTP-CTP가 불완전한 그리고 완전한 프로-웨티드 절단된 단백질들의 혼합물이라는 것이 밝혀졌다. 불충분한 프로-웨티드 절단은 FIX 응결 활성을 감소시키는 것을 보여주었다. Furin과의 공동-형질감염에 의해, 상기 프로-웨티드 절단 공정은 개선될 수 있을 것이다.

[0780]

[0780] FIX 색원성 활성의 측정: FIX-CTP-CTP 정제된 단백질 대(versus) rhFIX(American Diagnostics) 그리고 인간 정상적인 혼주 혈장의 시험판내 효능의 비교 평가는 시판되는 색원성 활성 테스트 키트, BIOPHEN(Hyphen BioMed 221802)를 이용하여 시행되었다. 트롬빈, 인지질 그리고 칼슘 존재하에서, 과량의 FXIa는 FIX를 FXa로 활성화시킨다. FXIa는 트롬빈 (과량으로 공급됨), 인지질 및 칼슘과 효소 복합체를 형성하고, 분석 시스템 안에 존재하는 Factor X를 FXa로 활성화시킨다. 상기 활성은 FIX의 양에 직접적으로 관련되며, 이는 제한 인자가 된다. 생성된 FXa는 FXa 색원성 기질 (pNA) 상에 이의 특이 활성에 의해 측정되었다. 생성된 pNA의 양은 FXa 활성에 직접적으로 비례하였다. rhFIX, 인간 혈장 및 FIX-CTP-CTP는 연속적으로 희석되었고, 그리고 효능은 투여분량-반응 곡선 (도 6)을 비교함으로써 평가되었다. rhFIX의 평균 EC₅₀은 68.74 ng/ml이며, 반면 FIX-CTP-CTP 산출된

EC_{50} 은 505 ng/ml이었다. FIX-CTP-CTP의 상기 효소 활성은 재조합 FIX과 비교하여 대략 7배 감소됨이 관찰되었고, 그리고 정상적인 혼주 인간 혈장(pulled)과 비교하여 16.5-배 감소되었다. 이러한 감소된 활성은 N-말단 분석으로 확인된 N-말단 프로-펩티드의 불충분한 절단에 의해 설명될 수 있다.

[0781] **FIX 응고 활성(aPTT):** 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT)은 응결 캐스캐이드의 고유한 그리고 공통적인 경로의 온전성의 척도다. 상기 aPTT는 고유 경로 활성 물질, 인지질 및 칼슘 추가 후 혈장이 응고되는 데 허용되는 시간(초)이다.

[0782] 상기 분석은 rhFIX의 추가에 의해 FIX-CTP-CTP 단백질이 FIX-감소된 인간 혈장의 응고 활성을 복원시키는 능력을 정량화하는 것이다. 300 μl 의 FIX-결핍 인간 혈장은 100 μl 의 rhFIX 또는 FIX-CTP-CTP(FIX-CTP-CTP(CTP는 C-말단에 일렬로 되어 있다) 또는 추가적으로 희석된 정상적인 혼주 인간 혈장과 혼합되었다. 37°C에서 60초간 항온처리된 후, 조직 인자(TF), CaCl_2 , 및 인지질이 상기 혼합물에 추가되었고, 응고 시간(초)이 측정되었다.

상기 효능은 rhFIX 또는 인간 혈장으로 구성된 기준 제제에 상기 FIX-CTP-CTP의 투여분량-반응 곡선을 비교하여 평가되었다. 1 유닛의 FIX 활성은 1 ml 정상적인 인간 혈장의 상기 활성과 대등한 FIX 농도에 대응한다.

[0783] 상기 aPTT 결과는 FIX-CTP-CTP 응결 활성이 정상적인 혼주 인간 혈장의 단지 1.4 낮았으며, rhFIX의 것과 유사함을 나타낸다. 상기 aPTT 결과는 색원성 활성 시험관내 분석과 함께 FIX-CTP-CTP 정제는 이의 활성을 순상시키지 않았음을 암시한다.

[0784] **FIX-CTP-CTP의 약동학 활성:** 정제된 FIX-CTP-CTP, rhFIX(American Diagnostic) 그리고 FIX-CTP-CTP 및 FIX-CTP 이 함유된 수확물들은 Sprague-Dawley 쥐(물질당 8마리 쥐)에게 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중의 투여분량으로 투여되었다(표 7).

표 7: PK 연구 개요

치료된 집단	테스트 물질	시점 당 동물의 수	투여분량 수준 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	투여분량수준 ($\mu\text{g}/\text{동물}$)	주사된 용적(μl)	농도 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	시점 (투여 후 시간)
A	rFIX	8	100	20	500	40	0 (투여전) 0.083, 0.5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 48, 72.
B	rFIX-CTP (수확물)	8	100	20	500	40	0 (투여전) 0.083, 0.5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 48, 72.
C	rFIX-CTP-CTP(수확물)	6	100	20	500	40	0 (투여전) 0.083, 0.5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 48, 72.
D	rFIX-CTP-CTP (정제된)	4	100	20	500	40	0.083, 0.5 1, 2, 4, 7, 10, 24, 4, 8, 72.

[0786]

[0787] 4 마리 쥐으로부터 교대로 투여 후 0.083, 0.5, 2, 4, 7 10, 24, 48, 및 72 시점에 후면-안와로부터 혈액 시료를 취하였다. 구연산염화된 혈장(0.32%)은 표본 추출 직후 준비되었고, 분석때까지 -20°C에서 보관되었다. FIX 농도는 인간 FIX ELISA 키트(Affinity Biologicals)에 의해 정량화되었다. 약동학 프로파일은 각 단백질에서 산출되었으며, 이는 각 시점에서 4마리 평균을 나타낸다(도 7). 말기 반감기는 PK Solutions 2.0 소프트웨어를 이용하여 산출되었다. 표 8은 상이한 표본추출 시간 대에서 관찰된 FIX 농도를 요약한 것이다.

[0788]

표 8: 관찰된 FIX 농도

시간 (hr)	FIX-CTP	FIX-(CTP) ₂	rhFIX ng/ml	정제된 FIX-
	수학물 ng/ml	수학물 ng/ml		CTP-CTP ng/ml
0.085	1038.97	1123.62	325.05	886.48
0.5	939.12	956.80	274.58	670.92
1	791.97	843.85	222.90	674.17
2	304.98	673.31	186.00	503.91
4	315.37	525.50	109.69	357.36
7	171.45	384.36	67.62	257.02
10	50.34	250.73	40.20	158.66
24	10.07	78.50	BLQ	52.13
48	BLQ	23.40	BLQ	18.07

[0789]

[0790]

PK 매개변수의 요약은 표 9에서 제공된다.

[0791]

표 9: PK 매개변수의 요약

	T _½ (hr)	AUC hr/ml	ng- MRT (hr)	Vd ml/Kg	CL ml/hr/Kg
FIX-CTP	4.17	3622	4.5	155.1	27.6
수학물					
FIX-(CTP)₂	10.44	9105.7	12	165.4	10.9
수학물					
rhFIX	3.72	1416.8	5.1	373.8	70.183
정제된 FIX-	11.14	6314.2	12.3	254.5	15.83
CTP-CTP					

[0792]

[0793]

상기 FIX-CTP-CTP 수학물은 FIX-CTP 수학물과 비교하였을 때 개선된 PK 프로파일을 나타내었다. 더욱이, 정제된 FIX-CTP-CTP는 T_½β 값에서 3-배 증가를 나타내었고, rhFIX와 비교하였을 때 AUC에서 4.5-배 증가되었다.

[0794]

단일 CTP에 융합된 경우와 비교하여, 일렬 CTP 분자들에 융합된 분비된 FIX의 감소된 양은 여분의 CTP 추가로 인한 것으로 보이며, ELISA에 의해 감소가 탐지되지는 않았는데, 그 이유는 Bradford-정제된 FIX-CTP-CTP 산출된 농도는 상기 ELISA-산출된 농도와 유사하였기 때문이다.

[0795]

FIX-CTP-CTP 응고 활성은 혼주 인간 혈장과 유사하였지만; 그러나, 이의 시험관내 색원성 활성은 rhFIX 또는 혼주 인간 혈장과 비교하였을 때 훨씬 더 낮았다. 상기 색원성 활성 분석은 상기 응결 분석과 비교하였을 때 매우 민감한 분석으로 보고되었다. FIX-CTP-CTP의 활성 감소 이유는 다양할 수 있다. CTP의 추가로 FXIa에 대한 FIX 친화력이 감소될 수 있으며 또는 전사-후 변형 (이를 테면 12-10개 GLA 잔기 및 프로-펩티드 절단)이 감소될 수 있다. N-말단 분석에서 상기 FIX-CTP-CTP 프로-펩티드의 상기 단백질분해성 절단은 분비전에 완전하게 종료되지 않았던 것으로 나타났다. 이러한 전사-후 변형은 상기 단백질의 정상적인 효소 활성에 결정적이기 때문에, Furine-PACE 플라스미드와의 공동-형질감염이 유리하며, 그리고 FIX-CTP-CTP 활성을 개선시킬 수 있다.

[0796]

끝으로, 쥐에서 FIX-CTP-CTP 비교 PK 연구는 상기 FIX의 C-말단에 2개의 일렬 CTPs의 융합으로 인하여 연장된 반감기를 가진 FIX가 생성됨을 나타내었다.

[0797]

FIX 감손된 마우스 모델: 생체내 활성을 평가하기 위하여, FIX 녹아웃(knockout) 마우스를 얻고, 그리고 교배

후손이 확립되었다. 10 µg의 시판 재조합 hFIX(BeneFIX®) 또는 rFIX-(CTP)₂ (FIX-CTP-CTP)는 마취된 FIX 농아우 마우스 (22~28g)의 꼬리 정맥으로 주사된다. 주사된 단백질의 양은 정상적인 혈장에서 필요한 FIX 농도(5µg/ml)와 대등하다. 특정 시점에서 짧게 자른 꼬리로부터 혈액 시료를 취하여 특정 혼화된 모세관에 보관한다. ELISA에 의해 FIX 농도에 대하여 혈장 시료가 평가되며, aPTT 응결 분석에 의해 효과가 측정된다.

[0798] 증가되는 FIX 프로펩티드 절단 효과: CTP 웨이트드 cDNA는 인간 FIX cDNA의 3' 단부에 융합되었다. 대응하는 rFIX 및 Furin 발현 구조체들은 Dg44 세포 안에 공동-형질감염되었고; 인간 rFIX cDNA는 대조군으로 Furin 플라스미드와 함께 공동-형질감염되었다. 높은 농도의 FIX 분비는 상기 세포에서 Furin 프로테아제의 제한된 양으로 인하여 Pro-Factor 및 성숙 인자 FIX의 혼합물 분비로 이어진다, Furin 발현 벡터와 Pro-Factor 발현 벡터의 공동-형질감염으로 회수가 증가되고, 그리고 상기 배지로 완전하게 가공된 FIX가 분비된다.

[0799] FIX-(CTP)₂ 및 Furin 공동-형질감염 이후, 안정적인 클론이 생성되며, 프로-펩티드 절단 평가를 위하여 수화물은 수거된다. 100 ng의 단백질은 Precision Plus Dual Color Protein Marker (Bio-Rad)를 이용하여 12% Tris-글리신 겔 상에 적재된다. 상기 SDS-PAGE 분석은 웨스턴 면역블롯에서 항-인간 FIX 다클론 Ab(American Diagnostics) 및 항-프로-펩티드 다클론 항체를 이용하여 시행된다. 이미 보고된 바와 같이, rhFIX는 55kDa로 이동되었으며, 한편, 2개의 CTPs에 융합된 FIX는 75 kDa로 이동되었다. FIX 단백질들의 두 변이체들은 모두 적절하고, 완전한 프로-펩티드 절단을 겪었음을 보여준다.

[0800] 적절한 프로-펩티드 절단이 FIX-(CTP)₂ 효소 활성을 개선시키는지를 판단하기 위하여, Furin으로 공동-형질감염된 FIX-(CTP)₂ 수화물의 색원성 및 응결 활성의 비교 평가가 시행된다. FIX-(CTP)₂ 특이 활성의 상당한 개선이 관찰되며, 이는 rhFIX의 활성과 유사하다.

[0801] 결론적으로, 본 명세서에서 설명된 것과 같은 상기 결과는 FIX-CTP-CTP가 B형 혈우병 환자들을 치료하는 데 효과적으로 이용될 수 있음을 암시한다. CTP 구조체들에 융합된 FIX는 특정한 시험관내 측정에서 단점을 극복하는 개선된 생체내 약리학적 효능으로부터 이익을 얻는다. 이러한 제안된 치료는 주입 속도의 감소 및 필요한 투여 분량의 감소로 인하여 기존 치료보다 유익하다.

[0802] 일부만-융합된 분자 전략이 상기 반감기를 개선시키는 데 이용되었을 때, 상기 재조합 FIX는 비활성화되었다는 사실은 중요하다. 현재 새로운 방법은 개선된 장기-작용 활성을 제시하는 신규한 재조합 FIX-융합 단백질의 기획 및 정제로 어어진다. 단순한 크기 변형은 주사된 FIX의 약동학을 개선시키지 않았기 때문에, FIX에 융합된 CTP가 약동학 매개변수를 촉진시킨다는 발견은 예상치못한 것이었다. 많이 당화된 웨이트드-시알산 잔기의 존재로 상기 단백질은 안정화되었고, 그리고 FIX 기능의 주요 결정 인자들을 폐기하지 않고 맥관 수용체들과의 상호작용으로부터 이 단백질은 보호되었다.

[0803] FIX-CTP는 B형 혈우병 환자들에게서 rFIX와 유사한 치료요법적 효과를 가지며, 덜 빈번한 투여가 요구되었다. B형 혈우병 환자들의 외과적 중재 동안 출혈 사건을 제어하고, 필요한 주사 횟수를 감소시키는 데 있어서 단일 FIX-CTP 주사로도 충분하였다.

[0804] 상기 CTP 기술은 장기-작용 FIX의 개발에 이용되었다. 구체적으로, 적어도 하나의 인간 CTP를 FIX에 융합시킴으로써 재조합 rFIX 분자의 반감기 연장이 시행되었다. 상기 재조합 FIX-CTP는 포유류 세포에서 발현되었으며, 시험관내 및 생체내에서 특징화되었다. rFIX-CTP의 상기 시험관내 활성은 rFIX와 필적함이 설명되었다. 쥐에서 약동학 및 효과 연구에서 상기 rFIX-CTP의 개선된 성질들이 설명되었다. 이 연구 결과들은 야생형 효소와 유사한 지혈 성질을 갖는 반감기 연장된 rFIX 분자의 개발이 실현가능함을 설명한다.

실시예 2

정제된 FIX-CTP₃ 대(vs.) FIX-CTP₄ 및 FIX-CTP₅의 비교 평가

2.1 연구 목적

부분적 정제 공정 후 FIX-CTP₄ 및 FIX-CTP₅와 비교하여 FIX-CTP₃의 약동학 매개변수의 비교 분석 .

2.2 FIX-CTP₄ 및 FIX-CTP₅ 수화물들의 생산

FIX의 C-말단에 4개 또는 5개의 일렬 CTP 서열에 융합된 FIX cDNA(Origen RC219065)는 Excellgene 발현 시스템을 이용하여 10 ng/L의 비타민 K3 (Sigma, Mennadiion) 존재하에서 Dg44 세포에서 발현되었다. 상기 수화물들

은 수거되고 (300ml), 여과되고, 그리고 냉동되었다.

[0811] 2.3 FIX-CTP₃ 수확물의 생산

[0812] FIX-CTP₃는 자체적으로(in-house) pCI-DHFR 벡터, 클론 196, BR-9를 이용하여 25 ng/L의 비타민 K3 (Sigma) 존재하에서 CHO 세포에서 발현시켰다. 상기 수확물들은 수거되고, 그리고 여과되었다.

[0813] 모든 FIX-CTP 시료 (3개, 4개 및 5개의 CTP)는 재료의 부족으로 인하여 Jacalin 컬럼으로만 정제되었다.

[0814] 2.4 FIX 항원 농도의 측정

[0815] FIX 항원 농도은 Human FIX ELISA 키트(Affinity Biologicals; Cat. # FIX-AG RUO)를 이용하여 측정되었다. 상기 산출된 단백질 농도는 4회 독립적인 실시의 평균이다. FIX-CTP₃ 농도는 2가지의 추가 형태보다 약간 더 높았다(표 10).

[0816] 표 10: FIX 항원 농도

	3 개 CTP	4 개 CTP	5 개 CTP
최종	최종	최종	
Jacalin40	Jacalin40	Jacalin40	
평균(ng/ml)	1016.69	4644.11	1686.82
SD	225.41	925.63	160.07
%CV	22.17	19.93	9.49

[0817]

[0818] 2.5 FIX-CTP Coomassie 착색 및 면역-블롯

[0819] FIX-CTP₃, FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅ 수확물들은 Precision Plus Dual Color Protein Marker (Bio-Rad)을 이용하여 12% Tris-글리신 겔 상에 적재되었다. 상기 SDS-PAGE 분석은 웨스턴 면역-블롯에서 항-CTP 다클론 Ab(Adar Biotech Production) 또는 항-G1a Ab(American Diagnostica)를 이용하여 시행되었다.

[0820] 이미 보고된 바와 같이, 3개의 CTPs에 융합된 FIX는 80 kDa으로 이동된 반면, 4개 또는 5개의 CTPs에 융합된 FIX는 차례로 각각 85 kDa 또는 90 kDa으로 이동되었다. 예상된 바와 같이, Excellgene의 FIX-CTP₄ 및 FIX-CTP₅ 수확물들은 ProLor에서 생산되는 FIX-CTP₃ 수확물과 비교하였을 때 매우 낮은 감마 카르복실화 농도를 보여주었다(도 8).

[0821] Jacalin 컬럼 (당화된 단백질들의 면역친화성 정제)을 이용한 정제 공정 이후, FIX-CTP₃, FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅는 Precision Plus Dual Color Protein Marker (Bio-Rad)을 이용하여 12% Tris-글리신 겔 상에 적재되었다. 상기 SDS-PAGE는 시료 탐지용 Coomassie 블루 염료에 의해 착색되었다. 모든 변이체들은 훨씬 더 선명한 밴드 프로파일을 보여주었고(도 9), 이것은 순도가 개선되었음을 암시한다.

[0822] 2.6 FIX 색원성 활성의 측정

[0823] 인간의 정상적인 혼주 혈장과 비교하여 완전하게 정제된 (HA 컬럼) FIX-CTP₃, FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅의 시험관내 효능의 비교 평가는 시판되는 색원성 활성 테스트 키트, BIOPHEN(Hyphen BioMed 221802)를 이용하여 시행되었다. 모든 시료들은 연속적으로 희석되었고, 그리고 정상적인 인간 혈장으로 구성된 기준 제제에 대한 투여분량 반응 곡선의 비교에 의해 상기 효능이 평가되었다. 혈장과 비교하여 FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅의 감소된 색원성 활성(도 10)은 FIX 단백질들의 전사-후 부적절한 변형 결과, 이를 테면 부적절한 감마 카르복실화 및 프로-펩티드 결단 또는, 대안으로, CTP 카세트의 추가로 인한 결과일 수 있다. 상기 FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅ 활성의 변동 (표 11)은 항원 부위의 CTP 차폐로 인하여 상기 FIX ELISA 능력의 부적절한 정량화에 의해 야기될 수 있다.

[0824]

표 11: 시료/혈장 EC50 비율

시료	시료/혈장 EC50 비율
혈장	1
3 개 CTP 최종 HA	2
4 개 CTP 최종 HA	5.35
5 개 CTP 최종 HA	2.73

[0825]

[0826]

2.7 약동학 연구

[0827]

Jacalin-정제된 FIX-CTP₃, FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅(군 A, B 및 C, 차례로)는 Sprague-Dawley 쥐(치료 군당 6마리 쥐)에게 250 μg/kg 체중의 투여 분량으로 단일 정맥 주사로 투여되었다. 3 마리 쥐으로부터 교대로 투여 후 0.083, 0.5, 2, 5, 8, 24, 48, 72 및 96 시점에 후면-안와로부터 혈액 시료를 취하였다(표 12). 구연산염화된 혈장(0.38%)은 표본 추출 직후 준비되었고, 분석때까지 -20°C에서 보관되었다.

[0828]

표 12: PK 연구 작업 계획

치료 집단	치료	한 집단당 동물 수	투여분량			시점 (투여 후 시간 hr)
			투여 경로	수준 (동물당 μg)	주사된 용적(μl)	
A	FIX- CTP*3 Jacalin	6	IV	50	200	0.083, 0.5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96
	FIX- CTP*4 Jacalin					0.083, 0.5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96
	FIX- CTP*5 Jacalin					0.083, 0.5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96

[0829]

[0830]

혈장 시료 내 FIX 농도는 인간 FIX ELISA 키트(Affinity Biologicals)를 이용하여 정량화되었다. 상기 약동학 프로파일이 산출되었고, 각 시간 대에서 3마리 동물의 평균이다. 말기 반감기는 PK Solutions 2.0 소프트웨어를 이용하여 산출되었다. 아래 표 13에서 상이한 표본추출 시점에서 상기 산출된 FIX 농도가 요약되어 있다.

[0831]

표 13: 산출된 FIX 농도

시간 (hr)	평균 3 개		SD		평균 4 개		SD		평균 5 개		SD	
	CTP ng/ml	3 개 CTP	CTP ng/ml	4 개 CTP	CTP ng/ml	5 개 CTP						
0.083	1087.82	72.39	904.54	21.06	1097.23	82.24						
0.5	774.18	86.31	736.82	66.93	998.79	70.43						
2	562.23	3.70	627.09	32.47	747.85	14.02						
5	357.44	8.63	431.23	29.41	576.49	27.36						
8	239.20	7.82	327.46	30.26	394.96	36.48						
24	77.08	4.26	107.38	5.18	142.42	16.13						
48	27.73	2.02	39.83	1.85	53.66	3.33						
72	12.55	1.48	21.53	1.55	23.54	3.32						
96	6.66	1.23	10.63	0.13	18.54	3.39						

[0832]

[0833] 상기 PK 프로파일 및 상기 PK 매개변수의 요약은 아래 표 14와 도 11에 제공된다. 모든 시점에서 완전한 PK 분석 프로파일은 4개 또는 5개 CTP 카세트를 FIX에 추가시켜도 FIX-CTP₃과 비교하였을 때 이의 반감기가 증가되지 않음을 암시하였다. FIX-CTP₅ 투여 이후 상기 AUC는 FIX-CTP₃와 비교하였을 때 1.4- 내지 1.6-배 증가되었고, 이는 통계학적으로 유의적이지 않았다.

[0834]

표 14: PK 프로파일 및 상기 PK 매개변수의 요약

24- 96hr	3 개 CTP	4 개 CTP	5 개 CTP
반감기(hr)	20.43	22.02	23.96
AUC (ng·hr/ml)	8218.38	10504.49	13329.41
Vd (ml/kg)	700.76	586.02	494.89
CL (ml/hr/kg)	23.77	18.45	14.32

[0835]

[0836] 투약 후 96 시간 시점에서 시료들은 상기 분석의 정량화의 하한에 있는 매우 낮은 FIX 농도를 갖는 것으로 나타났기 때문에, 상기 말기 반감기는 좀더 정확하게 과학적으로 절절한 계산이 제공되도록 재-산출되었다(표 15). 이러한 산출에 따라, FIX-CTP₃, FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅의 반감기들 간에 차이는 훨씬 더 적었다.

[0837]

표 15: 재산출된 말기 반감기

8-72 hr	3 개 CTP	4 개 CTP	5 개 CTP
반감기(hr)	15.38	16.63	16.04

[0838]

2.8 결론:

[0840]

본 연구에서 FIX-CTP₃, FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅의 상기 약동학 매개변수 및 잠재적 응고 활성이 평가되었다. 4개와 5개의 CTPs를 FIX에 융합시키도 FIX-CTP₃와 비교하였을 때, 우수한 또는 개선된 반감기 연장을 제공하지 못하였고, 그리고 감소된 색원성 활성이 관찰되었다. 아래 표 16에서는 상기 상이한 FIX-CTP 융합된 변이체들(1내지 5개의 CTPs)에 대한 반감기 개선 비율이 요약되어 있다. CTP를 FIX에 융합시키면 이들의 약동학 거동은 개선되지만, 그러나 예상과는 달리, 이러한 개선은 제한적이었다. 놀랍게도, FIX에 일렬로 3개, 4개 또는 5개의 CTPs를 융합한 후, 유사한 반감기 값이 산출되었다.

표 16: 반감기 개선 비율의 요약

4CTP vs. 5CTP	0 %
rhFIX vs. 1CTP	112
1CTP vs. 2CTP	141
2CTP vs. 3CTP	37
3CTP vs. 4CTP	6

[0842]

[0843] 이들 데이터에서 3개의 CTP가 FIX에 융합되면 단백질 반감기가 최대로 개선되며, 이는 추가 임상 개발에 있어서 FIX-CTP₃가 반감기, 구조 및 잠재적 응고 활성 측면에서 최적의 변이체임을 확인시켜주는 것이다.

[0844]

실시예 3

[0845]

FIX-/- 혈우병 마우스 모델의 FIX-CTP₃ 치료

[0846]

상기에서 설명된 바와 같이, rhFIX와 비교하여 FIX-CTP, FIX-CTP₂ 및 FIX-CTP₃ 수화물 PK 프로파일 및 응결 활성을 테스트하는 연구가 시행되었다. FIX-CTP₃은 FIX-CTP₁ 및 FIX-CTP₂ 수화물들 또는 rhFIX와 비교하여 이의 응결 활성을 유지되면서 개선된 PK 프로파일을 나타내었다. 이 결과를 더 평가하기 위하여, FIX-CTP₃ γ-카르복시글루탐산염 단백질이 정제되었다. FIX-CTP₃은 정상적인 쥐에게 단일 IV 투여 후 rhFIX와 비교하였을 때, 반감기는 3-배, 그리고 AUC는 4.5-배 더 높은 것으로 나타난다. FIX-CTP₃은 감소된 시험관내 색원성과 응고 활성을 나타내고, 대부분은 아마도 N-말단 프로-펩티드의 불충분한 결단과 전사-후 적절한 변형 (PTMs), 예를 든다면 적절한 감마 카르복실화로 인한 것일 것이다.

[0847]

[0847] 현행 연구에서, 3개의 일렬 CTPs에 융합된 인간 재조합 FIX의 약동학 및 약력학적 성질은 FIX-결핍 마우스에서 테스트되었다.

[0848]

연구 목적:

[0849]

FIX-결핍 마우스에게 유사한 특이 활성 및 투여분량(PD에 대한 유사한 특이 활성 그리고 PK에 대한 유사한 FIX 상수)에서 FIX-(CTP)₃의 단일 IV 투여 후 시판 rhFIX(BeneFIX®)과 비교하여 rFIX-(CTP)₃의 상기 약동학 및 약력학적 매개변수를 측정하는 것을 목적으로 한다.

[0850]

FIX-CTP₃ 수화물의 생산:

[0851]

FIX C-말단에서 3개의 일렬 CTP 서열이 융합된 FIX cDNA(Or iGene RC219065-Thr 148)는 Excellgene 발현 시스템을 이용하여 25 ng/ml의 비타민 K3 (Sigma, Mennadion) 존재하에서 Dg44 세포에서 발현되었다. 5 리터의 세포 혼탁액이 포함된 5개의 별개 배치(배치)가 배양되었고(총 25 리터) 그리고 생존능력이 60-70%로 감소된 후에 수확되었다. 상기 수화물은 여과되었고, -70°C에서 냉동되었다.

[0852]

수화물 FIX 항원 농도의 측정:

[0853]

수화물 FIX 항원 농도은 인간 FIX ELISA 키트(Affinity Biologicals; Cat. # FIX-AG RUO)를 이용하여 측정되었다. 상기 항원 농도은 각 배치마다 산출되었다. 상이한 배치를 통하여 상기 FIX 농도가 유지되었다(표 17).

[0854]

표 17: FIX 항원 농도

FIX 항원 수준			
배치	#1	Bat #2	Bat #3
Av (μg/ml)	28.81	32.74	42.9
STD	2.5	2.69	4.0
%CV	8.84	8.38.2	9.4

[0855]

FIX-CTP₃ 정제 공정:

[0857] 간단한 정제 연구에 이어서, 다음의 3개 컬럼을 이용한 정제 공정이 시행되었다: DEAE 세파로즈, 헤파린 세파로즈 및 HA Bio Rad 세라믹 헤드록시아파타이트 유형 1 ($40 \mu\text{m}$), FIX-CTP₃, γ -카르복실화된 농축 단백질이 정제되었다. 간략하게 설명하자면: 5 리터의 정화된 수화물은 4일 기간 동안 4°C에서 해동되었다. 각 배치 동안, 상기 정화된 수화물 (2 리터)은 4-배 농축되었으며, 10 KDa의 명목적 분자량 차단 크기를 가진 1회용 중공 파이버 카트리지를 이용하여 20 mM Tris-HCl pH 8.2에 대해 투석되었다. 이 공정 (UFDF1)은 2회 시행되었고, 1 리터의 UFDF1가 DEAE 세파로즈 컬럼 상에 적재되었으며, FIX는 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ pH 8.2로 용리되었다. 상기 산물은 20 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ pH 7.5로 1:1 희석되었고, 상기 pH는 헤파린 세파로즈 컬럼 상에 적재되기 전에 7.5로 조정되었다. 상기 용리는 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 및 10 mM CaCl₂ pH 7.5로 시행되었다. 용리된 산물은 농축되었고, Pellicon XL 카세트 10 KDa 차단(cutoff) 막 (UFDF2)을 이용하여 10 mM 인산염 pH 6.8에 대하여 투석되었다. 상기 산물은 HA 컬럼 상에 적재되었고, FIX의 상기 활성화된 분획물은 150 mM 인산염 pH 6.8로 용리되었다. 상기 정제 산물은 표적 농도인 2 mg/ml로 농축되었으며 그리고 TBS pH 7.45에 대해 투석되었으며, 분획량(aliquots)으로 나눠서 -70°C에 보관되었다.

[0858] 상기 정제 공정은 전체 용적(25 리터)을 정제하기 위하여 주 단위로 5회 반복되었다. 상기 정제 공정은 HA# 6-10으로 명명되었다. 각 정제 산물은 별도로 평가되었다(App # 1-5). 상기 정제 공정 종료시, 상기 상이한 배치들이 취합되고, 표적 농도인 4 mg/ml로 더 농축되었다.

[0859] FIX-CTP₃ 분석학적 성질:

[0860] FIX 항원 농도 측정

[0861] FIX-CTP₃ γ -카르복실화된 농축 단백질 항원 농도은 인간 FIX ELISA 키트(Affinity Biologicals; Cat. # FIX-AG RUO)를 이용하여 측정되었다. 상기 산출된 단백질 농도는 2회의 독립적 실시 평균이다(표 18).

표 18: FIX-CTP3 항원 농도

FIX-CTP ₃ HA 정제된 풀 - ELISA #1				FIX-CTP ₃ HA 정제된 풀 - ELISA #2				최종 Av.
Dil.	1	2	Av.	Dil.	1	2	Av.	
130000	3412240	3781830	3597035	130000	3692260	3568240	3630250	3613643
260000	3915600	4158440	4037020	260000	3706820	3595540	3651180	3844100
520000	4158544	4334096	4246320	520000	3831464	3530748	3681106	3963713
1040000	4096352	4004104	4050228	1040000	3863392	3684304	3773848	3912038
Av. (ng/ml)	3895684	4069618	3982651	Av. (ng/ml)	3773484	3594708	3684096	3833373
STD	338367.5	234486.7	274313.5	STD	86576.66	65369.65	63369.86	154459.6
%CV	8.685703	5.761884	6.887712	%CV	2.294343	1.818497	1.720092	4.029338
Av. (mg/ml)	3.895684	4.069618	3.982651	Av. (mg/ml)	3.773484	3.594708	3.684096	3.833373

FIX-CTP ₃ HA 정제된 풀 - ELISA #1				FIX-CTP ₃ HA 정제된 풀 - ELISA #2				최종 Av.
Dil.	1	2	Av.	Dil.	1	2	Av.	
130000	3412240	3781830	3597035	130000	3692260	3568240	3630250	3613643
260000	3915600	4158440	4037020	260000	3706820	3595540	3651180	3844100
520000	4158544	4334096	4246320	520000	3831464	3530748	3681106	3963713
1040000	4096352	4004104	4050228	1040000	3863392	3684304	3773848	3912038
Av. (ng/ml)	3895684	4069618	3982651	Av. (ng/ml)	3773484	3594708	3684096	3833373
STD	338367.5	234486.7	274313.5	STD	86576.66	65369.65	63369.86	154459.6
%CV	8.685703	5.761884	6.887712	%CV	2.294343	1.818497	1.720092	4.029338
Av. (mg/ml)	3.895684	4.069618	3.982651	Av. (mg/ml)	3.773484	3.594708	3.684096	3.833373

[0863]

[0864] SDS-PAGE 블롯:

[0865] FIX-CTP₃ γ -카르복실화된 농축 단백질, rhFIX 및 rFIXa(활성화된 FIX)는 Precision Plus Dual Color Protein Marker (Bio-Rad)을 이용하여 12% Tris-글리신 겔 상에 적재되었다. 상기 SDS-PAGE Coomassie 분석은 Coomassie 블루 시약(800 ng의 단백질)로 상기 겔의 착색에 의해 시행되었다(도 12). 웨스턴 면역블롯은 항-인간 FIX 다클론 Ab(도 12b), 항-인간 감마 카르복실화 단클론 항체(American Diagnostics Cat #499, 3570) (도 12c), 항-FIX 프로-펩티드 다클론 Ab(도 12d), 그리고 항-CTP 다클론 Ab(도 12e)과 함께 100 ng의 단백질을 이용하여 시행되었다. 이미 보고된 바와 같이, FIX-CTP₃은 75KDa으로 이동되었다.

[0866] 상기 정제 과정에 의해 불순물은 감소시키면서 FIX-CTP₃ 부분은 상당히 농축되었다. 상기 정제 공정 수율은 항-Gla 면역블롯에서 설명된 바와 같이(도 12b) 오직 상기 감마 카르복실화된 FIX-CTP₃ 분획물만을 수집하기 위한 필요조건으로 인하여 대략 2-3% 범위로 상당히 낮다(데이터 제공되지 않음). Coomassie 및 FIX 면역블롯에 근거하여, 상기 FIX-CTP₃ 부분은 단지 대략 60-70%이며, 아마도 더 낮은 당화 형태를 가진 추가적인 더 낮은 분자량 밴드들이 또한 탐지되었다.

[0867] FIX-CTP₃ 응고 활성:

[0868] FIX-CTP₃ 색원성 활성:

[0869] 인간 정상적인 혼주 혈장과 비교하여 FIX-CTP₃ 수확물 및 FIX-CTP₃ γ-카르복실화된 농축 단백질의 시험관내 효능의 비교 평가는 시판되는 색원성 활성 테스트 키트, BIOPHEN(Hyphen BioMed 221802)를 이용하여 시행되었다. FIX-CTP₃ 수확물 및 단백질은 연속적으로 희석되었고, 상기 효능은 정상적인 인간 혈장으로 구성된 기준 제제에 대한 투여분량 반응 곡선의 비교에 의해 평가되었다. 앞서 설명된 바와 같이, FIX-CTP₃ 수확물은 혼주 인간 혈장보다 50배 더 활성이 적었다(표 19, 도 13). FIX-CTP₃ 정제 이후, 상기 색원성 활성은 상당히 개선되었고, 혼주 인간 혈장보다 단지 4.72배 활성이 적었다(표 19, 도 13). 수확물 감소된 색원성 활성은 FIX 단백질 변이체들의 부적절한 전사-후 변형, 이를 테면 부적절한 감마 카르복실화 및 프로-펩티드 절단으로 인한 결과일 수 있다. 상기 FIX-CTP₃ γ-카르복실화된 분획물의 정제와 농축(enrichment) 이후, 상기 활성이 개선되었고, 이는 γ-카르복실화가 FIX 활성에 중요한 기여를 한다는 것을 나타낸다.

[0870] 표 19: FIX-CTP3 색원성 활성

시료	EC ₅₀ (ng/ml)	시료 /혈장 EC ₅₀ 비율
FIX-CTP ₃	741.3	54.4
수확물		
순수한 FIX- CTP ₃	64.6	4.72
혈장	13.63	1

[0871]

[0872] 1단계 응고 분석 (aPTT):

[0873] 활성화된 부분적 트롬보플라스틴 시간(aPTT)은 응결 캐스캐이드의 고유한 그리고 공통적인 경로의 온전성의 척도다. 상기 aPTT는 고유 경로 활성 물질, 인지질 및 칼슘 추가 후 혈장이 응고되는 데 허용되는 시간(초)이다. 상기 분석의 원리는 rhFIX의 추가에 의해 FIX-CTP₃이 FIX-감소된 인간 혈장의 응고 활성을 복원시키는 능력을 정량화하는 것이다. 200 μl의 FIX-결핍 인간 혈장은 25 μg/ml의 FIX-CTP₃와 혼합되고, 그리고 TBS에서 더 희석된다. 37°C에서 60초간 항온처리된 후, 50 μl의 PTT 활성물질 (Actin FS)과 50 μl의 칼슘 25 mM이 상기 혼합물에 추가되었고, 상기 응고 시간(초)은 Sysmex® CA 1500 Coagulator (Sheba hospital, National Coagulation Center에 의해 인가된 aPTT 분석을 이용하여 시행됨)을 이용하여 측정되었다. 상기 효능은 정상적인 혼주 인간 혈장의 기준 제제의 투여분량-반응 곡선에 대해 FIX-CTP₃를 비교하여 평가되었다. 상기 결과는 <1-110%의 FIX 농도를 포함하는 표준 곡선으로부터 추정되어 활성 비율로 나타낸다. FIX-CTP₃는 신체내 FIX의 정상값이 5 μg/ml에서 상기 활성이 6.5%로 나타났기 때문에, 정상적인 혼주 인간 혈장과 비교하였을 때 이의 응결 활성은 15-20 배 감소된 것으로 나타났다(표 20).

[0874]

표 20: FIX-CTP₃ 응고 활성

FIX-CTP ₃	공급자가 제공하는 FIX 농도(mg/ml)	테스트된 시료내 농도(μg/ml)	FIX 활성 % (인간 정상적인 인간 모듬에 대하여 표준화됨)
	3.83	25 5	34.7 6.5

[0875]

FIX-CTP₃는 또한 BeneFIX®와 비교하였을 때 증가된 응고 시간을 나타낸다(표 21 및 도 14).

[0877]

표 21: 비교 응고 시간(aPTT)

응고시간		
	FIX-CTP ₃	BeneFIX®
38ug/ml	77.6	
19ug/ml	83.4	
7.6ug/ml	93.2	50.6
3.8ug/ml	104.8	57.6
1.9ug/ml	112.2	63.7
0.95ug/ml	122.6	71.5
0.475ug/ml		83.7
0.238ug/ml	94.3	

[0878]

추가적인 응고 분석은 상기 PK-PD 연구를 개시하기에 앞서, University of North Carolina의 Dr. Paul Monahan에 의해 FIX-결핍 마우스에서 독립적으로 시행되었다. 상기 aPTT 결과는 적절한 응고 활성을 위하여 요구되는 더 긴 기간(초로 측정됨)과 더 높은 농도에 의해 설명되는 것과 같이, FIX-CTP₃ 응결 활성이 정상적인 혼주 인간 혈장보다 40배 더 적다는 것을 암시한다(표 22).

[0880]

표 22: 비교 응고 활성

FIX 활성 (유닛)		
	FIX-CTP ₃	BeneFIX®
38ug/ml	13.9	
19ug/ml	8.8	
7.6ug/ml	4	116.8
3.8ug/ml	1.6	67.4
1.9ug/ml	0.9	41.7
0.95ug/ml	0.4	22.4
0.475ug/ml		8.5
0.238ug/ml	3.7	

[0881]

FIX-CTP₃ 및 BeneFIX®의 경우 ELISA에 의해 산출된 FIX 항체 농도에 근거된 특이 활성(u/ml)은 각각 차례로 4.46과 198.9이었다.

[0883]

색원성 대(vs.) aPTT 분석에서 설명된 것과 같이, 상기 산출된 FIX-CTP₃ 활성의 불일치는 상기 aPTT 분석 및 생체내 관련성의 우위의 민감성에 의해 설명될 수 있을 것이다. 색원성 활성 분석에 있어서, FIX 형태들을 더 약하게 활성화시킬 수 있는 과량의 시약들과 효소이 존재한다. 상기 FIX-CTP 특이 활성 값들에 있어서 차이는 상이한 시약들과 자동화된 기계의 사용으로 설명될 수 있다. University of North Carolina에서 산출된 상기 활성 값은 상기 PK-PD 연구 기획에 이용되었다.

[0884]

FIXa 단백질 텁지:

[0885]

상기 정제 공정 이후, FIX 활성화 (FIXa)가 일어나지 않았음을 확인하기 위하여, FIXa Biophen 색원성 분석

(Cat. # Ref. 221812)을 이용하여 FIXa 탐지 분석이 시행되었다. 상기 분석은 앞서 설명된 바와 같이 상기 색원성 활성 캐스캐이드를 이용하여 특정 시료 안에 존재하는 FIXa의 양을 측정한다. FIX-CTP₃ 및 rhFIX는 희석되었고, FIXa 농도가 측정되었다. FIX-CTP₃은 정제 또는 보관 동안 활성화되지 않았다(표 23).

[0886]

표 23: FIXa 탐지

시료	FIX- CTP ₃	rhFIX
초기농도(mg/ml)	1000	5.7
rFIXa (mg/ml)	BLQ	0.00487
시료내 FIXa%	BLQ	0.085

[0887]

[0888]

FIX-CTP₃ PK-PD 연구: FIX-CTP₃ 및 rhFIX(BeneFIX®)는 100 IU FIX/kg 체중이 포함된 625 μg/kg 체중의 투여분량에서 C57BI FIX-결핍 마우스에게 단일 정맥 주사로 투여되었다. 3 마리 마우스로부터 교대로 투여 후 0.25, 4, 24, 48, 72 및 96 시점에 후면-안와로부터 혈액 시료를 취하였다. 구연산염화된 혈장(0.32%)은 표본 추출 직후 준비되었고, 분석때까지 -20°C에서 보관되었다. hFIX 항원 농도이 평가되었고, 상세한 PK 분석이 시행되었다. BeneFIX®와 비교하였을 때, FIX-결핍 동물에서 상기 응고 활성을 연장시키는 FIX-CTP₃의 능력을 평가하기 위하여, 상기 FIX-/− 치료된 마우스로부터 수거된 구연산염 혈장 시료 안의 FIX 활성은 자동화된 FIX 활성 분석을 이용하여 산출되었다(표 24).

[0889]

표 24: 연구 개요

	산물	투여	투여	# 마우스	수집 시점(투약 후 hr)	요구되 는 양
**코호 트 1	FIX-CTP ₃	단일 투여분량: IV	100IU/Kg 2.5IU/마우스(553μg/마우스)	12 마리 마우스	0.25, 1, 4, 8, 16, 24, 48	6636μg
코호트 2	FIX-CTP ₃	단일 투여분량: IV	**472μg/Kg 12.57μg/마우 스	18 마리 마우스	*0.25, 1*, 4*, 8 *, 16*, 24*, 48*, 72*, 96*	200μg 12.57μg/ 마우스
**코호 트 3	BeneFIX®	단일 투여분량: IV	100IU/Kg 2.5IU/마우스	18 마리마 우스,	0.25, 1, 4, 8, 16, 24, 48, *72, *96	226.3 μg 12.57μg/ 마우스

[0890]

* 오직 PK 수집 시점

** 투약 후 T=48에서 꼬리 정맥 출혈; 코호트 1 & 3

FIX-/− 마우스에서 FIX-CTP₃ 약동학 프로파일

[0894]

FIX 농도는 인간 FIX ELISA 키트(Affinity Biologicals; Cat. # FIX-AG RUO)를 이용하여 정량화되었다. 상기 약동학 프로파일은 각 단백질에 대해 산출되었고, 각 시점에서 3마리 동물의 평균이다. 아래 표 25와 도 15에는 코호트 1 & 3의 경우 상이한 표본추출 시간에서 상기 산출된 FIX 농도가 요약되어있다. 상기 PK 프로파일 및 상기 PK 매개변수의 요약은 아래에서 제시된다(표 26 & 27). PK 분석은 드러난 사실을 증명하기 위하여 코호트 #2에 대해서 또한 실시되었다(데이터 제시되지 않음).

[0895]

표 25: FIX 농도

시점(hr)	FIX-CTP ₃ ng/ml	BeneFIX® ng/ml
0.25	3645.397	2823.023
1	2411.09	2416.248
4	1703.205	1506.228
8	1139.736	864.764
16	415.32	347.465
24	238.37	158.7973
36	141.0105	94.40067
48	95.461	42.28833
72	76.90953	11.87567
96	24.955	BLQ

[0896]

[0897] AUC_{0-inf}, T_{1/2} 및 제거 (CL)를 결정하기 위하여 2-구획 모듈(two-compartment module)(WinLin 소프트웨어)이 이용되었다. 상기 PK 매개변수는 아래 표 26에서 설명된다.

[0898]

표 26: PK 성질

FIX 형태	T _{1/2α} (1/hr)	T _{1/2 β} (1/hr)	AUC ng/ml*hr	CL ml/Kg/hr	MRT (hr)	V _{ss} (ml/Kg)
BeneFIX®	3.4	12.7	22428	29	11.5	320.8
FIX-CTP₃	4	28.7	31770	19	22	425.2

[0899]

[0900] 상기 3개의 CTP "카세트"를 rhFIX에 추가하면 생체내 FIX 반감기는 적어도 2.5-배 연장되었다. 생체내 FIX-CTP₃ 투여 후 AUC는 rhFIX와 비교하여 2-배 증가되었다. FIX-CTP₃-주사된 마우스는 BeneFIX®-주사된 마우스와 비교하였을 때 개선된 PK 프로파일을 나타내었다.

[0901]

FIX-결핍 마우스에서 FIX-CTP₃ 약력학적 프로파일:

[0902]

PK 표본추출과 나란하게, BeneFIX® 또는 FIX-CTP₃, 구연산염 혈장 시료가 투여된 FIX-결핍 동물은 aPTT 분석에 의해 이들의 응고 활성에 대해 평가되었으며, 이는 활성 %로 해독되었다. 각 수거 시점에서 상기 활성 %은 상기 현재 응고 시간/정상적인 마우스 혼주 혈장의 응고시간*100으로 산출되었다. 표 27은 BeneFIX® 또는 FIX-CTP₃의 투여 후 상기 활성 값을 요약한다.

[0903]

FIX-CTP₃ 투여후, 투여 후 1시간 시점에서 상당한 응고 활성이 탐지되었고, 투여 후 4시간 시점에서는 96% 활성에 도달되며, 반면 BeneFIX®의 최대 활성 값은 40%이었다(표 27, 도 16). FIX-CTP₃ 응고 활성은 더 오래 지속되었는데, 이는 활성의 연장을 설명한다. BeneFIX®-치료된 마우스의 응고 활성은 36시간 이후의 시점에서는 탐지불가능하였고, FIX-CTP₃-치료된 마우스에서는 투약 후 72시간 시점에서도 측정가능한 활성의 유지가 지속되었다(표 27, 도 16). 상기 응고 % 약동학 프로파일 분석에서 FIX-CTP₃ 응고 활성은 상당히 더 오랜 기간 동안 유지되었고, 이의 반감기는 BeneFIX®보다 거의 2-배 더 높다는 것이 제시된다(표 28).

[0904]

표 27: FIX 활성 %

투약후 시간 Hr	BeneFIX® 활성 %	FIX-CTP ₃ 활성 %
0.25	39.9	1.0
1	33.4	15.5
4	24.9	93.6
8	18.8	65.2
16	10.3	39.9
24	1.7	11.9
36	1.4	11.0
48	<1	4.6
72	<1	1.4

[0905]

[0906]

표 28: 응고 활성

FIX 형태	T½α (1/hr)	T½ β (1/hr)
BeneFIX®	5.7	-----
FIX-CTP ₃	7.3	16

[0907]

[0908]

9.3 FIX-결핍 마우스 출혈 시도

[0909]

FIX-결핍 마우스에게 100 IU/kg의 BeneFIX® 또는 rFIX-CTP₃이 단일 정맥 주사로 투여되었다. 상기 꼬리 정맥은 투약 후 48시간 시점에서 약간 절단되었으며, 그리고 꼬리 정맥 출혈 시간(TVBT) 및 출혈 강도(해모글로빈 OD)가 평가되었다. 제 2 출혈 시도는 생체항상성에 도달된 후 15분 시점에서 시행되었고, 상기와 동일한 매개변수가 측정되었다. 첫 번째 출혈 시도 이후, FIX-CTP₃-투여된 동물들의 출혈은 해모글로빈 OD 값으로 설명되는 바와 같이, BeneFIX® 출혈보다 유의적으로 그 강도가 덜하였다(도 17).

[0910]

이미 보고된 바와 같이 혈우병 마우스에서 첫 번째 출혈 시도 동안, 상기 출혈 시간이 반드시 치료 효과와 관련되지 않기 때문에, 추가 출혈 이후 상기 생체항상성의 평가가 권장된다. 상기 첫 번째 출혈이 일단 자발적으로 또는 수작업에 의해 중단되면, 제 2 출혈 시도는 제 1 시도 이후 15분 시점에서 시행되었고, 그리고 상기 시간 및 출혈 강도가 재측정되었다. 제 2 출혈 사건 동안 FIX-CTP₃-투여된 동물들은 감소된 출혈 시간 및 강도를 보여주었으며, 이것은 FIX-CTP₃은 시간이 지난 시점에도 강력함을 나타낸다(도 18).

[0911]

끌므로, 제 2 출혈 시도 후 12시간 동안 상기 동물들은 더 관찰되었으며, 모든 재발 출혈 사건들이 기록되었다. FIX-CTP₃-투여된 동물들은 재발성 출혈 사건 없이 그 다음 12시간 동안 혈액 생체항상성을 유지할 수 있었다. 대조적으로, BeneFIX®-치료된 마우스의 50%는 꼬리에서 자발적 출혈이 있었다(표 29).

[0912]

표 29: 꼬리 횡절단 이후 12시간 시점에서 결과

마우스집단	지연된 재출혈	사망 또는 안락사를 요하는 고통
FIX-CTP ₃ (100IU/kg)	0/5 (0%)	0/5
BeneFIX® (100IU/kg)	3/6 (50%)	0/6
FIX-- (치료안됨)	5/6 (100%)	1/6

[0913]

[0914]

3개의 일렬 CTP "카세트"에 융합된 FIX의 단일 분자로 구성된 융합 단백질인 재조합 FIX-CTP₃은 B형 혈우병 환자들을 치료하는 데 이용되는 현재 이용가능한 FIX 산물의 깊은 반감기 문제를 해결하기 위하여 개발되었다.

rFIX-CTP₃의 제거 반감기는 쥐(이미 보고된 바와 같이)과 FIX-결핍 마우스에서 rFIX보다 일관되게 2.5 내지 4배 더 길다는 것이 설명되었다.

[0915] 이론에 결부되는 것을 원하진 않지만, 상기 융합 단백질은 FIX의 제거를 감소시키고, 간 수용체들에 대한 FIX 친화력을 차폐 및 감소시킴으로써 프로테아제 활성, 분해로부터 FIX를 보호한다. 이와 함께, 상기 CTP 도메인의 특징으로 FIX의 반감기는 연장된다.

[0916] rFIX-CTP₃의 약동학 분석에 추가하여, 우리는 FIX-결핍 마우스에서 FIX-CTP₃의 상기 약력학적 성질을 검사하였다. rFIX-CTP₃과 rFIX는 FIX-결핍 마우스에서 상기 응고 결핍 농도를 보상하기 위한 필적되는 투여분량 (유닛)으로 투여되었다. 그러나, FIX-결핍 마우스에서 FIX-CTP₃의 효과는 투약 후 적어도 76시간 까지 상당히 연장되고, 더 높은 활성 정점에 도달한다. FIX-CTP₃ 응고 활성은 BeneFIX®와 비교하였을 때 1시간 지연된 후 시작되었다. 3개의 일렬 CTPs의 추가로 인하여 이론적으로 상기 활성화 부위를 차폐하고, 캐스케이드 개시를 지연시키기 때문에 FIX 활성화가 요구될 수 있다. FIX-CTP₃ 투여 후, 100% 정점 활성이 관찰되었지만, 반면 BeneFIX® 활성은 단지 40%이었다. 상기 우수한 초기 활성은 매우 중요한 매개변수이며, 3개의 CTP 추가는 회복을 개선시키는 능력을 보유한 것으로 설명된다.

[0917] B형 혈우병을 가진 환자들을 위한 예방적 FIX 대체 요법은 1 - 2% 정상적인 응고 활성의 혈장 농도를 유지하는 것을 목표로 한다. 상기 꼬리 정맥 출혈 분석은 인간 출혈 생체항상성 모델을 모방하는 낮은 활성 값에서 출혈 항상성을 유지하는 능력을 측정하는 생체내 민감성 테스트다. 투약 후 48시간 시점에서 꼬리 정맥 출혈 시도에 반응하여, rFIX-CTP₃-투여된 동물들은 지속된 응고 활성으로 설명되는 더 짧고 덜 심각한 출혈로 혈액 생체항상성을 유지하였다.

[0918] FIX는 해독 후 광범위한 변형을 겪는 다수의 기능성 도메인이 포함된 복합 단백질이다. FIX 활성을 위하여 필수적인 해독 후 변형중의 하나가 비타민 K-의존적 γ-글루타밀 카르복실라제에 의해 Gla 도메인 안에 처음 12개 글루타민산의 감마-카르복실화다. 상기 변형은 FIX가 인지질 막에 결합되는 것을 촉진시키고, 따라서, 이것은 FIX 기능에 결정적이다. 감마-카르복실화안된 FIX는 기능성을 하지 못하고, 따라서 감마-카르복실화는 속도-제한 단계가 된다.

[0919] 상기 PK-PD 연구는 일시적으로 형질감염된 세포들을 이용하여 시행되었다. 해독 후 변형의 광범위한 분석학적 평가는 안정적인 최적화된 클론으로부터 생산 분비된 안정적인 FIX-CTP₃ 단백질에서 시행된다.

[0920] 제공되는 데이터에 근거하여, FIX-CTP₃ 응고 인자는 일상적인 예방 투여분량의 FIX 대체 요법을 제공받은 환자들에서 주사 빈도를 감소시키는 능력을 갖는다. rFIX-CTP₃은 인자의 각 투여 이후 출혈로부터 연장된 보호를 부여할 수 있고, 출혈 사건을 치료하는 데 필요한 인자의 전체 유닛을 감소시킬 수 있고, 및/또는 주사를 줄인 외과수술을 하는 동안 충분한 항성상을 유지시킬 수 있는 것으로 예상된다.

0921] 실시예 4

0922] 응고 인자 FVII의 생성 및 이용

[0923] 활성화된 FVII (FVIIa) 응고 인자의 장기-작용 형태는 혈우병 A와 B를 가진 환자들의 치료에 유용할 것이다. FVIIa-CTP₃ 재조합 단백질은 주입 빈도를 감소시키고, 심지어 상기 약물 적재를 감소시킴으로써 환자의 삶의 질을 상당히 개선시고, 자발적 출혈 사건을 회피하며, 관절 및 다른 장기로의 누적된 손상을 회피할 수 있는 예방 치료에 의해, 혈우병 환자들의 치료를 개선시키는 임상적 가능성을 갖는다.

[0924] 인간 CTP에 FVII의 융합에 기초된 연장된 반감기를 갖는 재조합 FVIIa-CTP 분자의 생산은 본 명세서에서 설명된다. 상기 재조합 FVIIa-CTP는 포유류 세포들에서 발현되었으며, 시험관 및 생체내에서 특징화되었다. rFVII-CTP 활성은 rFVII에 필적되는 것으로 나타났다. 쥐에서 약동학 및 효과 연구로부터 rFVII-CTP의 개선된 성질이 설명되었다. 상기 연구 결과들로부터 상기 야생형 효소에 매우 유사한 지혈 성질을 가진 반감기연장된 rFVIIa 분자의 개발이 가능하다는 것이 설명되었다.

[0925] 재조합 FVII 분자의 클로닝 및 발현: 우리의 진핵 발현 벡터(pCI-dhfrr)에서 몇 가지 FVII 클론이 작제되었다 (도 19). 호모 사피엔스(*homo sapiens*) 응고 인자 VII의 상기 서열이 포함된 Human MGC 실증된 FL cDNA 클론 (IRCM)은 "Open Biosystems"에서 주문하였다(OB-MHS4426). Sigma-Genosys에서 다음 서열을 갖는 프라이머들이

합성되었다: 프라이머 67: 5'CTCGAGGACATGGTCTCCAGGCC3' (FVII DNA의 5' 말단과 XhoI 제한효소절단 부위가 포함됨) (서열 번호: 5); 프라이머 68^R: 5' TCTAGAATAAGGTATTTCCACATG3' XbaI 제한효소절단 부위가 포함됨) (서열 번호: 6); 프라이머 69: 5' TCTAGAAAAAGAAATGCCAGC3' (XbaI 제한효소절단 부위가 포함됨) (서열 번호: 7); 그리고 프라이머 70^R: 5'GCAGGCCGATCCTCAGGGAAATGGGCTCGCA3' (FVII DNA의 3' 말단과 NotI 제한효소절단 부위가 포함됨) (서열 번호: 8).

[0926] 2 세트의 PCR 반응에서 클로닝이 시행되었다. 첫 번째 반응은 프라이머 67 및 프라이머 68^R와 주형으로 상기 FVII 서열(OB-MHS4426)을 가진 cDNA 플라스미드를 이용하여 시행되었다; 상기 PCR 증폭 결과, ~534 bp 산물이 형성되었고, 단리되어 TA 클로닝 벡터에 결찰되었다(Invitrogen, Catalog No: K2000-01). 상기 FVII 서열의 상기 아미노 말단이 포함된 XhoI-XbaI 단편이 단리되었다. 두 번째 반응은 프라이머 69 및 프라이머 70^R로 시행되었으며, 주형으로 상기 FVII 서열(OB-MHS4426)을 가진 cDNA 플라스미드가 다시 이용되었다. 상기 PCR 증폭 결과로써, ~813 bp 산물이 형성되었고, TA 클로닝 벡터 안에 결찰되었다(Invitrogen, Catalog No: K2000-01). FVII 서열의 상기 카르복시말단이 함유된 XbaI-NotI 단편이 단리되었다. 상기 두개 단편은 우리의 진핵 발현 벡터 pCI-dhfr 안에 삽입되어(삼중 결찰), 상기 501-0-p136-1 클론을 얻었다.

[0927] 플라스미드 501-p136-1 (pCI-dhfr 벡터 안에 FVII)은 제한 효소 XhoI 및 KpnI으로 절단되었다. ~1186 bp의 단편이 단리되었다. CTP 서열, 종료 서열 그리고 GeneArt (0721543)에 의해 합성된 NotI 서열이 이어진 부분적 FVII 클론 (1180 bp-1322 bp)은 제한 효소 KpnI 및 NotI으로 절단되었다. ~253 bp 단편이 단리되었다. 상기 두 개 단편은 우리의 진핵 발현 벡터pCI-dhfr (삼중 결찰) 안으로 삽입되어(삼중 결찰), 상기 501-1-p137-2 클론을 얻었다. pCI-dhfr-701-2-p24-2는 제한 효소 XhoI 및 ApaI으로 절단되었고, 큰 단편 (벡터)이 단리되었다.

[0928] pCI-dhfr-501-2-p137-2 (FVII-ctp x1)는 제한 효소 XhoI 및 ApaI으로 절단되었고, ~1200 bp 삽입물이 단리되었다. 상기 벡터와 삽입물이 결찰되어 501-2-p139-2를 얻었다. Dg44 세포들은 100 mm 조직 배양 접시 상에 도말되었으며, 50-60% 핵유되도록 성장되었다. 총 2 μg 의 DNA는 단백질-없는 배지 (Invitrogen CD Dg44)에서 FuGene 시약(Roche)을 이용하여 1개의 100mm 플레이트의 형질감염에 이용되었다. 상기 배지는 형질감염 후 48시간 시점에서 제거되었고, 뉴클레오시드가 없는 단백질-없는 배지 (Invitrogen CD Dg44)로 대체되었다. 14일 후, 상기 형질감염된 세포 군은 T25 조직 배양 플라스크로 이동되었으며, 상기 세포들이 안정적인 클론으로 성장될 때까지 10-14일 동안 선별이 지속되었다. 높은-발현 클론이 선별되었으며, 대략 2x10⁷ 세포는 1700cm² 롤러 바틀(Corning, Corning NY)에서 5 ng/ml의 비타민 K3 (menadione sodium bisulfate; Sigma)가 보충된 300 ml의 성장 배지에 접종되었다. 상기 생산 배지 (수확물)는 상기 세포 생존능이 대략 70%로 급격히 감소된 후 수거되었다. 상기 생산 배지는 우선 정화되었고, 그 다음 대략 20-배로 농축된 후, 유동 여과 카세트(10KDaMWCO; Millipore Corp, Billerica, MA)를 이용하여 PBS에 대하여 투석되었다.

FVII 항원 농도의 측정

[0929] 상기 CTP 웨티드를 인코딩하는 cDNA는 상기 인간 FVII를 인코딩하는 cDNA의 3' 말단에 융합되었다. 상기 대응하는 rFVII 구조체는 Dg44 세포로 형질감염되었다. 대조군으로써, 인간 rFVII cDNA가 이용되었다. 상기 생산 배지 (수확물)가 수거되었고, 농축되었으며, 그리고 분비된 상기 재조합 FVII는 더 평가되었다. rFVII, rFVII-CTP 및 rFVII-CTP 항원 농도은 AssayMax Human FVII ELISA 키트(AssayPro)에 의해 측정되었다(도 20a). 고유 rFVII와 비교하였을 때 rFVII-CTP와 rFIX-(CTP)₂의 분비 농도에서 유의적인 차이는 없었다.

SDS-PAGE 블롯

[0930] SDS-PAGE 분석은 50 ng의 수확물, 정제된 또는 활성화된 rFVII 단백질의 적재에 의해 시행되었다. 시료들은 Precision Plus Dual Color Protein Marker (Bio-Rad)을 이용하여 12% Tris-글리신 겔 상에 적재되었다. 상기 SDS-PAGE 분석은 웨스턴 면역블롯에서 토끼로부터 생성된 항-인간 FVII 단클론 항체(Ab) (R&D systems) 또는 항-CTP 다클론 항체를 이용하여 시행되었다.

[0931] 상기 rFVII 항원의 농도는 항-FVII Ab로 SDS-PAGE 면역블롯에서 탐지된 단백질 농도과 관련된다. rFVII-CTP는 단일 벤드로 이용된 반면, 상기 FVII 대조군의 대응하는 분자량은 대략 52 KDa이었다(데이터 제시되지 않음). 이들 두 단백질들은 면역블롯 상에서 FVII에 특이적인 항체들과 반응하였다. 상기 rFVII-CTP는 또한 CTP에 특이적인 항체들과 반응하였다. rFVII는 미량의 활성화된 단백질도 없이 이의 지모겐 형으로 분비되었다.

FVII 색원성 활성:

[0935] rFVII, rFVII-CTP 및 rFIX-(CTP)₂ 수화물 활성은 시판되는 색원성 테스트 키트(AssaySense) 인간 FVII 색원성 활성 분석 키트(AssayPro)를 이용하여 측정되었다. 상기 rFVII-CTP의 기능적 특징과 더 활성화되는(FVIIa) 지의 능력에 대하여, 농축된 rFVII-CTP(수화물들)는 Factor X를 Factor Xa로 활성화시키는 TF/FVIIa의 능력을 측정하는 시판되는 색원성 테스트 키트에 두었는데, 이 키트는 FXa 특이적 기질 존재하에서 정량화된 신호를 방출한다(AssayPro). 상기 rFVII 단백질의 C-말단에 상기 CTP 펩티드 추가에 의해 상기 FVII 세린 프로테아제 활성이 손상되지 않았다(도 20b, 20c).

FVII 응고 활성:

[0937] 프로트롬빈 시간(PT)은 응결의 비고유 경로(extrinsic pathway)를 측정한다. 상기 PT는 비고유 경로 활성물질, 인지질 및 칼슘 추가 후 혈장이 응결되는 데 소요되는 시간(초 단위로 측정됨)이다. 혈액의 응고 경향, 특히 와파린 투약량 측정, 간 손상 및 비타민 K 상태를 결정하는 데 이용된다. 프로트롬빈 시간의 기준 범위는 보통 대략 12~15 초다. 구체적으로, 상기 분석은 rhFVII의 추가에 의해 FVII-감소된 인간 혈장의 응고 활성을 복원시키는 FVII-CTP 및 FVII-(CTP)₂ 수화물의 능력을 정량화하였다. 300 μl의 FVII-결핍 인간 혈장은 100 μl의 특정 농도의 FVII, FVII-CTP 및 FVII-(CTP)₂ 수화물들, 또는 정상적인 혼주 인간 혈장과 혼합되었고, 그리고 더 희석되었다. 37°C에서 60초간 항온처리 후, Tissue Factor (TF), CaCl₂, 및 인지질이 혼합물에 추가되었다. 상기 응고 시간(초)이 측정되었다. 효능은 rhFVII 또는 혼주 인간 혈장으로 구성된 기준 체제에 대해 FVII-CTP 및 FVII-(CTP)₂ 수화물들의 투여분량-반응 곡선을 비교함으로써 평가되었다. 활성 FVII의 1 유닛은 인간 정상적인 혈장 1 ml의 활성에 대등한 FVII의 양으로 정의되었다. 상기 rFVII 및 rFVII-CTP의 PT 응고 활성은 혈액응고측정기 (Instrumentation Laboratory)에서 측정되었다.

[0938] 앞서 나타낸 바와 같이, CTP 펩티드가 rFVII 단백질의 C-말단에 추가되어도 이의 세린 프로테아제 활성이 손상되지 않았으며, 인간 혈장에서 고유 Factor X와 FIX의 개시 및 활성화로 이어진다. 상기 C 말단에 추가 CTP의 삽입 후, 세린 프로테아제 활성은 3배 감소되었다(데이터 제공되지 않음).

약동학 연구:

[0940] rFVII, rFVII-CTP, 및 rFVII-(CTP)₂ 수화물들은 Sprague-Dawley 쥐(물질당 6마리 쥐)에게 100μg/kg 체중의 투여분량으로 정맥 투여되었다. 모든 생체내 실험들의 경우, 각 단백질의 양은 FVII ELISA 키트에 기초하여 결정되었다. 각 FVII 테스트 물질의 경우, 상기 주사된 양은 rFVII 대(versus) rFVII-CTP의 분자량 차이를 고려하여 산출되었으며, 이로써 상이한 몰 농도가 야기된다.

[0941] 정량화되는 상기 표본추출 과정 농도의 간섭을 최소화하기 위하여 교대로 표본추출 과정을 이용하여 후면 안와로부터 혈액 시료를 추출하였다: 번갈아서 3마리 쥐으로부터 30분과 90 분 그리고 2, 6, 및 48 시간, 그리고 나머지 3마리 쥐으로부터 15분과 60분, 그리고 1.5, 4, 및 24 시간. 혈장은 표본추출 직후 준비되고, 분석때까지 -20°C에 보관된다. FVII 농도는 FVII ELISA 특이적 분석에 의해 정량화되었다. 반감기 및 곡선 아래 면적(AUC)은 선형 사다리꼴 공식을 이용하여 산출되었다. 제거 매개변수의 비교로부터 상기 생체내 반감기 및 rFVII-(CTP)₂ AUC는 rFVII의 것보다 유의적으로 더 높다는 것이 드러났다(표 30).

표 30: PK 연구 매개변수

집단	경로	투여 μg/kg	T _{1/2} 분	AUC _{0-t} ng/min/mL	CL/F mL/min/kg	MRT 분
FVII	IV	60	4.07	3314.7	6.195	6.2
FVII- CTP	IV	60	β=51.06	31353.9	0.287	73.7
FVII- CTP- CTP	IV	60	β=13.66	7626.8	1.18	15.4

[0943]

재조합 FVIIa-CTP의 특징화:

[0944] 활성화 동안, FVII는 R152에서 절단되어 한 개의 이황화 다리에 의해 서로 연계된 중쇄 및 경쇄 도메인이 된다. rFVIIa-(CTP)₂는 이온 교환 컬럼 정제에 의해 정제되고 활성화된다. rFVIIa-(CTP)₂를 충분히 평가하기 위

하여, 상기 단백질은 시판 FVIIa(NovoSeven®)에 대한 환원 조건하에 SDS-PAGE 상에 적재된다. 상기 중쇄 및 경쇄 도메인은 분리되고, 분자량 55 및 25 kDa의 별도 밴드로 이동된다. 이들 두 단백질들은 FVII에 특이적인 항체들과 반응하지만, 상기 rFVIIa-CTP의 중쇄는 항-CTP-특이적 항체들과 특이적으로 반응하며, 이것은 이 밴드가 CTP에 융합된 FVII 중쇄임을 나타낸다. 상기 경쇄는 항-감마 카르복실라제 Ab와 특이적으로 반응한다. 상기 FVIIa 단백질 농도는 FVIIa-특이적 ELISA 키트에 의해 측정된다.

[0946] FVIIa N-말단 시퀀싱:

활성화된 또는 지모겐 정제된 단백질들 안에 rFVII-CTP-CTP는 SDS-PAGE (12% Tris-글리신)에 의해 분리되며, 후속적으로 PVDF 막에 전기별도된다. 관심 밴드들을 잘라내고, 정제된 Biobrene-치료된 유리 섬유 필터 상에 둔다. 상기 N-말단 서열 분석은 140 C HPLC 마이크로-그라디언트(micro-gradient) 시스템이 구비된 펠스된 액상 단백질 서열화기를 이용한 Edmann 분해에 의해 시행되었다. 상기 재조합 단백질과 적절한 프로-펩티드 절단의 실체는 N-말단 시퀀싱에 의해 더 실증된다.

[0948] FVIIa 응고 활성:

FVII-(CTP)₂ 응결 활성을 평가하기 위하여, 활성화된 부분적 트롬보플라스틴 시간 분석 (aPTT)이 시행되었다. FVII-결핍 혈장 시료는 rFVIIa(NovoSeven®) 또는 rFVIIa-(CTP)₂로 대체된다. 300 μl의 FVII 결핍 인간 혈장은 100 μl의 특정 농도의 FVIIa 또는 rFVIIa-(CTP)₂, 또는 정상적인 혼주 인간 혈장과 혼합되며, 더 희석된다. 37 °C에서 60초간 항온처리 후 Tissue Factor (TF), CaCl₂, 및 인지질이 상기 혼합물에 추가된다. 응고 시간(초)가 측정된다. 효능은 rhFVIIa 또는 인간 정상적인 혼주 혈장으로 구성된 기준 제제에 대해 rFVIIa-(CTP)₂의 투여분량-반응 곡선을 비교함으로써 평가되었다. 활성 FVIIa의 1 유닛은 인간 정상적인 혈장 1 ml의 활성에 대등한 FVIIa의 양으로 정의되었다. 상기 rFVII 및 rFVIIa-(CTP)₂의 aPTTa 응고 활성은 혈액응고측정기 (Instrumentation Laboratory)에서 측정되었다. rFVIIa 및 rFVIIa-(CTP)₂의 aPTT 응고 활성은 유사하다.

[0950] 쥐에서 약동학 연구:

rFVIIa의 장수 능력에 있어서 rFVIIa에 상기 CTP의 추가로 인한 영향을 규정하기 위하여, 쥐에서 비교 약동학 연구가 시행된다. TBS 안에 NovoSeven® (rFVIIa) 및 rFVIIa-(CTP)₂는 6마리 SD 쥐에게 IV 주사된다. 시간 경과에 따른 FVIIa의 농도는 FVIIa ELISA 키트를 이용하여 탐지된다. 각 단백질에서 상기 반감기 및 AUC가 산출된다. 이를 제거 매개변수의 비교에 의해 rFVIIa-(CTP)₂의 생체내 반감기 측정, 회복, AUC는 NovoSeven®보다 우수한 것으로 드러났다.

[0952] FVIIa-CTP 생체내 효과 모델 (혈우병의 FVIII-결핍 마우스 모델):

생체내 활성 모델을 평가하기 위하여, FVIII 녹아웃 마우스를 구하였고, 교배 후손이 확립되었다. 10 μg의 시판 재조합 hFVIIa(NovoSeven®) 또는 rFVIIa-(CTP)₂는 마취된 상기 FVIII 녹아웃 마우스 (22-28g)의 꼬리 정맥으로 주사된다. 주사된 단백질의 양은 정상적인 혈장 안에서 FVIII의 요구량에 대등하다(5μg/ml). 절단된 꼬리로부터 특정 시점에 혈액 시료를 빼내어 혜파린처리된 모세관 투브로 넣었다. ELISA를 통하여 FVIIa 농도에 대하여 혈장 시료를 평가하고, 그리고 aPTT 응결 분석에 의해 그 효과가 측정된다.

[0954] 상기 연구에서, CTP를 가진 FVII 융합 구조체가 생성된다. 상기 재조합 단백질은 연장된 반감기를 제공하며 치료요법적 효능을 유지하는 치료의 기초가 된다.

[0955] 이를 결과로부터 rFVIIa-(CTP)₂는 혈우병 환자들에게 있어서 rFVIIa에 유사한 치료요법적 효과를 가진다는 것이 암시된다. 더욱이, 이 기술은 덜 빈번한 투여를 요구한다. rFVIIa-(CTP)₂의 단일 주사로 출혈 사건을 제어하고, 외과적 중재 동안 요구되는 주사 횟수를 충분히 감소시킬 수 있는 것으로 보인다. 상기 재조합 단백질은 장기적 예방 치료로 이용될 수 있다.

[0956] 실시예 5

[0957] 정제된 FIX-CTP₃, FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅의 비교 평가

[0958] 5.1 연구 목적

- [0959] FVII-CTP₃에 대한 FIX-CTP₄ 및 FIX-CTP₅의 약동학 매개변수 및 응고 활성 비교 평가.
- [0960] **5.2 FIX-CTP₄ 및 FIX-CTP₅ 수화물들의 생산**
- [0961] FVII의 C-말단에 4개 또는 5개의 일렬 CTP 서열이 융합된 FVII cDNA는 20 µg/L의 비타민 K3 (Sigma, Mennadion) 존재하에서 Excellgene 발현 시스템을 이용하여 Dg44 세포에서 발현되었다. 상기 수화물이 수거되었고(300 ml), 여과 및 냉동되었다.
- [0962] **5.3 FVII-CTP₃ 수화물의 생산**
- [0963] FVII-CTP₃는 자체적으로(in-house) pCI-DHFR 백터를 이용하여 포유류 발현 시스템, CHO 세포에서 발현시켰다. 안정적인 형질감염된 모둠 #71은 쉐이크 플라스크 안에서 25 ng/L의 비타민 K3 (Sigma) 존재하에서 성장되었다. 상기 수화물들은 수거되고, 여과되었다.
- [0964] 모든 FVII-CTP 수화물들(3개, 4개 그리고 5개 CTPs)은 농축되었고, Pellicon XL MWCO 10kDa를 이용하여 TBS (50 mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.4)에 대해 투석되었다.
- [0965] **5.4 FVII 항원 농도의 측정**
- [0966] FVII 항원 농도는 Human FVII ELISA 키트(Zymotest HyPhen)를 이용하여 측정되었다(표 31). 상기 산출된 단백질 농도는 2회의 독립적인 운용 평균이다.
- [0967] **표 31: FVII 항원 농도**
- | | FVII-
CTP ₃ | FVII-
CTP ₄ | FVII-
CTP ₅ |
|------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 평균(ng/ml) | 224357.3 | 87884.1 | 589423 |
| SD | 44789.5 | 3248.7 | 5309 |
| %CV | 20.0 | 3.7 | 9 |
- [0968]
- [0969] **5.5 FVII-CTP 면역-블롯**
- [0970] FIX-CTP₃, FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅ 수화물들은 Precision Plus Dual Color Protein Marker(Bio-Rad)를 이용하여 2% Tris-글리신 겔 (expedeon) 상에 적재되었다. 상기 SDS-PAGE 분석은 웨스턴 면역-블롯에서 항-CTP 다클론 Ab(Adar Biotech Production) 또는 항-Gla Ab(American Diagnostica)를 이용하여 시행되었다.
- [0971] 3개, 4개 그리고 5개 CTP에 융합된 FVII는 차례로 80, 90 그리고 100kDa로 이동되었다. 예상한 대로, Excellgene의 FIX-CTP₄ 및 FIX-CTP₅ 수화물들은 Proktor에서 생산된 FVII-CTP₃ 수화물과 비교하였을 때 상기 생산 공정이 최적화되지 않았기 때문에 낮은 감마 카르복실화 함량을 보유한다(도 21).
- [0972] **5.6 시험관내 효능의 FVII의 비교 평가**
- [0973] 정상적인 혼주 인간 혈장과 비교하여 HA 정제된 (상당하게 감마 카르복실화된 분획물) FIX-CTP₃, FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅의 시험관내 효능의 비교 평가는 시판되는 색원성 활성 테스트 키트, BIOPHEN(Hyphen BioMed 221304)를 이용하여 시행되었다. 모든 시료는 연속적으로 희석되었고, 그리고 상기 효능은 정상적인 인간 혈장으로 구성된 기준 제제에 대한 투여분량 반응 곡선의 비교에 의해 평가되었다. FVII-CTP₃ 및 FVII-CTP₅는 정상적인 혼주 혈장 보다 더 낮은 색원성 활성을 나타내었다(도 22). FVII-CTP₄는 EC50 비율에 의해 반영되는 것과 같이 FVII-CTP₃ 및 FVII-CTP₅와 비교하였을 때, 더 높은 활성을 나타내었다(표 32).

[0974]

표 32: FVII 시험관내 응고 활성

시료	EC50 (ng/ml)	시료 /혈장 EC50 비율
혈장	0.05	
FVII 3 개 CTP	0.12	2.72
FVII 4 개 CTP	0.03	0.71
FVII 5 개 CTP	0.06	1.35

[0975]

5.7 FVII 시험관내 응고 활성:

[0977]

Sheba Medical Center, the Israel National Coagulation Center에서 시행된 FVII 활성 분석은 FVII (Siemens)이 결핍된 면역-흡착된 혈장을 이용한 프로트롬빈 (PT)-기반 분석이다. 상기 PT 시약은 이노빈 (innovin)이며, 상기 분석은 Sysmex® CA 1500 기구에서 시행된다. FVII 정상 범위는 55-145% 이내에 있다.

[0978]

표 33: FVII 시험관내 색원성 활성

시료	FVII 활성 %	테스트된 시료 농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
		안에 농도($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
FVII 3 개 CTP	36	0.5	224.2
	18	0.25	
	6	0.125	
FVII 4 개 CTP	334	0.5	87.9
	176	0.25	
	93	0.125	
FVII 5 개 CTP	38	0.5	58.9
	19	0.25	
	10	0.125	

[0979]

신체내 순환하는 FVII의 정상 농도는 대략 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이기 때문에, FVII-CTP₃ 및 FVII-CTP₅ 수화물들은 정상적인 혼주 인간 혈장과 비교하여 이들의 응결 활성이 3배 감소되었고; 이 결과는 획득된 상기 색원성 활성과 관련된다(표 33).

[0981]

상기 FVII-CTP₄ 수화물은 색원성 활성 분석에서 관찰된 것과 같이 정상적인 혼주 인간 혈장과 비교하여 잠재적 응결 활성이 3배 증가를 나타낸다(표 33). FVII-CTP₄의 상기 활성 비율은 FVII-CTP₃ 및 FVII-CTP₅의 활성 비율과 비교하여 훨씬 높았다. 상기 ELISA 방법의 방법적 한계는 FVII-CTP₄의 Ag 농도의 정확한 계산을 제한할 수 있다.

[0982]

5.8 약동학 연구

[0983]

상기 FIX-CTP₃, FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅ 약동학 (PK) 매개변수를 측정하기 위하여 2가지 약동학 연구가 시행되었다. 첫 번째 연구동안, FIX-CTP₃, FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅ (군 A, B 및 C, 차례로)는 Sprague Dawley 쥐(치료 당 6마리 쥐)에게 $250 \mu\text{g}/\text{kg}$ 체중의 투여 분량으로 단일 정맥주사로 투여되었다. 3 마리 쥐으로부터 교대로 투여 후 0.083, 0.5, 2, 5, 8, 24, 48, 72 및 96 시점에 후면-안와로부터 혈액 시료를 취하였다(표 34). 구연산염화된 혈장(0.38%)은 표본 추출 직후 준비되었고, 분석때까지 -20°C 에서 보관되었다.

[0984]

표 34: 약동학 연구 기획안- 농축된 수확물

치료 집단	테스트 물질	한 집단당 동물 수/ 시점	투여 경로	투여분량 수준 (μg / 동물)	주사된 용적 (μl)	농도 ($\mu\text{g/ml}$)	시점 (투여 후 시간)
A	FVII-CTP ^{*3}	6	IV	50	200	250	0 (투여전) 0.083, 0.5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96
B	FVII-CTP ^{*4}	6	IV	50	200	250	0 (투여전) 0.083, 0.5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96
C	FVII-CTP ^{*5}	6	IV	50	200	250	0 (투여전) 0.083, 0.5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96

[0985]

[0986] 혈장 시료 안에서 FVII 농도는 인간 FVII Elisa 키트(Zymutest FVII-Biophen)를 이용하여 정량화되었다. 상기 약동학 프로파일이 산출되었고, 각 시점에서 3마리 동물의 평균이다. 말기 반감기 값들은 PK Solutions 2.0 소프트웨어를 이용하여 산출되었다. 아래 표 35는 상이한 표본추출 시점에서 산출된 FVII 농도를 요약한다. 상기 PK 프로파일 (도 23-24)과 상기 PK 매개변수 (표 36)의 요약 또한 아래에 제공된다. FVII-CTP₅는 FVII-CTP₃ 및 FVII-CTP₄와 비교하였을 때 우수한 프로파일을 나타낸다(표 36).

[0987]

표 35: 첫 번째 약동학 연구 - FVII 농도

시간 (hr)	AVE-FVII- 3-CTP (ng/ml)	AVE-FVII- 4-CTP (ng/ml)	AVE-FVII- 5-CTP (ng/ml)	SD
0.083	4214	583	3600	427
0.5	3386	892	5213	1682
2	1138	219	3603	1338
5	1390	374	2726	1127
8	333	167	1349	44
24	133	12	476	98
48	38	3	165	24
72	12	2	91	62
96	26	1	42	8

[0988]

표 36: 약동학 분석

	FVII 3-CTP	FVII 4-CTP	FVII-5 CTP
반감기(0.083-8 hr) (hr)	2.5	4.9	6.6
반감기(8-72hr) (hr)	13.3	16.6	17.7
AUC (ng·hr/ml)(8-72hr)	18374.6	51224.4	72954.2
Vd (ml/kg)(8-72hr)	203.7	91.9	67.7
CL(ml/hr/kg) (8-72hr)	10.6	3.8	2.7

[0990]

[0991]

4개 또는 5개 CTPs 추가하면 3개 CTP 추가와 비교하였을 때, 각각 차례로 2-배 및 3-배로 FVII 반감기가 상당히 연장되었다(표 36). 이와 같은 우위는 상기 연구 초기에 더욱 상당하며(0.083-8 hr), 이는 잠재적인 개선된 단백질 회수 및 감소된 여분의 혈관 제거를 암시한다. FVII-CTP₄ 및 FVII-CTP₅ 투여후 AUC는 FVII-CTP₃와 비교하였을 때 각각 차례로 3- 및 4-배 증가되었다. 4개 및 5개의 CTPs를 FVII에 추가하는 동안 제거 또한 감소되었다

(표 36).

[0992] 상기 연구에서 관찰된 바와 같이, 4개 또는 5개 CTPs 추가하면 3개 CTP 추가와 비교하였을 때, 초기 및 말단 반감기 모두에서 FVII 반감기가 상당히 연장되었다. 제 1 연구 및 제 2 연구에서 반감기값은 서로 상이한데, 그 이유는 전반적인 경향은 유지되지만, 투여분량 및 연구 기간에 의해 영향을 받는 상이한 분석 방법때문이다. FVII-CTP₄ 및 FVII-CTP₅ 투여후 AUC는 FVII-CTP₃와 비교하였을 때 각각 차례로 2.5- 및 7배 증가되었다.

5.9 결론:

[0994] 본 연구에서, FIX-CTP₃, FIX-CTP₄, 및 FIX-CTP₅의 상기 PK 매개변수 및 잠재적인 응고 활성이 평가되었다. 4개 또는 5개 CTPs가 FVII에 융합되면 FVII-CTP₃과 비교하였을 때, 유사한 색원성과 시험판내 응고 활성을 유지되면서 우수한 그리고 개선된 반감기 개선과, 노출 및 감소된 제거가 제공된다. 이런 결과들은 상이한 농도의 단백질에서 관찰되며, 수화물 및 정제된 단백질 모두에 대해 일관되었다. FVII의 C-말단에 CTP의 융합과 관련된 전반적인 효과를 평가하면서, 1-5개의 CTPs 융합은 CTP 비례 방식으로 FVII의 반감기 및 AUC를 상당히 증가시키고, 이는 상기 분자에서 CTP 부분이 증가될수록, 초기 시험판내 응고 활성을 유지되면서 FVII 수명 및 안정성은 아래 표 37에서 요약된 바와 같이 상당히 개선됨을 암시한다.

표 37:

비교 평가	T _{1/2} 증가율	AUC 증가율
FVII 대(vs.) FVII-CTP ₂	268	200
FVII-CTP ₂ 대(vs.) FVII-CTP ₃	67	57.8
FVII-CTP ₃ 대(vs.) FVII-CTP ₄	24	178
FVII-CTP ₄ 대(vs.) FVII-CTP ₅	6	42

[0996]

[0997] 이미 보고된 바와 같이, FVII 반감기는 인간 및 동물 모두에서 FVII의 활성화된 형태 (FVIIa)의 반감기와 관련된다. 따라서, CTP 융합 후 상기 활성화된 형태에서 반감기의 유사한 개선이 획득될 수 있을 것으로 예측된다.

실시예 6

FVIII-결핍 혈우병 마우스에서 FVII-CTP₃ 실현가능성 연구

[1000] 상기 본 명세서에서 설명된 것과 같은 시판 FVII과 비교하여 FVII-CTP, FVII-CTP₂ 및 FVII-CTP₃ 수화물 PK 프로파일 및 응결 활성을 테스트하는 연구가 시행되었다. FVII-CTP₃은 FVII-CTP 및 FVII-CTP₂ 또는 rhFVII와 비교하여 이의 응결 활성을 유지되면서 개선된 PK 프로파일을 나타내었다. FVII-CTP₃ 시험판내 그리고 생체내 성질을 더 특징화하기 위하여, 상기 단백질을 발현시키고 분비하는 안정적인 미니 모둠을 만들고, 정제 및 활성화 공정들이 개발되었다.

[1001] 현재 연구에 있어서, FVIIa-CTP₃의 상기 약동학 및 악력학적 성질은 FVIII-결핍 마우스에서 테스트되었다. 상기 단백질의 PK 프로파일이 평가되었다. FVIIa 특이 활성-기반 PK 프로파일이 확립되었으며, 시판 산물 NovoSeven®과 비교되었다. 추가로, FVIII-결핍 마우스의 꼬리 정맥 횡절단(생존 연구) 이후 이 마우스에서 응결을 유도하는 FVIIa-CTP₃의 장기-작용 생체내 항상성 능력이 테스트되었다.

연구 목적:

[1003] FVIII-결핍 마우스에서 유사한 활성 투여분량의 FVIIa-CTP₃ 대(vs.) 시판 rhFVIIa(NovoSeven®)의 단일 IV 투여에 대한 약동학 및 악력학적 매개변수 분석.

[1004] FVIII-결핍 마우스에서 유사한 활성 투여분량의 FVIIa-CTP₃ 대(vs.) NovoSeven®의 단일 IV 투여 후, 꼬리 정맥 횡절단 유발(생존 연구) 이후 FVIIa-CTP₃ 의 생체내 능력을 측정.

FVII-CTP₃ 수화물 생산:

[1006] FVII-CTP₃는 자체적으로(in-house) pCI-DHFR 벡터를 이용하여 Dg44 세포에서 발현시켰다. 안정적인 형질감염된 모둠 #71은 쉐이크 플라스크 안에서 25 ng/L의 비타민 K3 (Sigma) 존재하에서 성장되었다. 상기 수확물들은 수거되고, 여과되었다. 세포 혼탁액이 배양되었고, 생존성이 60-80%로 감소된 후 수확되었다. 상기 수확물들은 여과되었고, -70°C에서 냉동되었다.

[1007] 수확물 FVII 항원 농도의 측정:

[1008] FVII 항원 농도은 인간 FVII ELISA 키트(Zymotest HyPhen)를 이용하여 측정되었다(표 38). 모아진 수확물 배치당 상기 항원 농도이 산출되었다.

[1009] 표 38: FVII-CTP₃ 항원 농도

FVII 항원 수준			
	PK-PD 연구		생존 연구
	수확물 31A	수확물 31B	수확물 38
Av (μg/ml)	16.0	15.9	16.6
STD	1.5	0.0	0.8
%CV	9.1	0.1	4.9

[1010]

[1011] FVII-CTP₃ 정제 공정 (도 25)

[1012] 공정 개요

[1013] 간단한 정제 연구에 이어서, 2개 컬럼을 이용하는 다음의 정제 공정이 시행되었다. VII-선별 친화력 컬럼 (GE) 및 세라믹 히드록시아파타이트 유형 1 (HA), 40 μm (Bio Rad), FVII-CTP₃ γ-카르복실화된 농축 단백질이 정제되었다. 자가-활성화는 2-8°C에서 CaCl₂ 존재 하에 정제된 FVII-CTP₃의 항온처리에 의해 유도되었다. 상기 정제 공정은 최종 발달 단계이며, 최적화되어, 따라서 상기 정제 단계의 일부는 2개 배치에서 동일하지 않다.

[1014] 10kDa 중공(hollow) 섬유 또는 Pellicon 카세트를 이용한 한외-여과/희석여과 (UFDF)

[1015] 정화된 수확물은 주말동안(2-3일) 4°C에서 해동되었다.

[1016] 배치(배치) 31에서, 정화된 수확물 (12 리터)은 10 kDa 분자량 차단시키는 중공 섬유 카트리지(GE Healthcare Catalog # UFP-10-C-4X2MA)를 이용하여 4배 농축된다(2회 연속 실시). 농축된 수확물은 TBS (50mM Tris 150mM NaCl pH 7.4)의 1-2배 용적에 대하여 희석-여과되었다.

[1017] 배치(배치) 38에서, 정화된 수확물 (8.5 리터)은 10 kDa 분자량 차단시키는 Pellicon 2 (Millipore) 카세트를 이용하여 4배 농축된다. 농축된 수확물은 VII-선별 컬럼에 바로 적재되었다.

[1018] 열음 냉각된 완충액과 함께 열음위에서 양쪽 한외-여과는 모두 시행되었다. UFDF 시료들은 적재 전에 0.22 μm에서 여과되었다.

[1019] FVII-선별>Select 컬럼 상에서 포획

[1020] 상기 UFDF 또는 농축된 수확물은 TBS pH 7.4로 사전-평형화된 VII-선별 컬럼 (XK16/20, CV 18m1)에 적재되었다. 상기 컬럼은 50 mM Tris-HCl, 0.5M NaCl pH 7.5로 세척되었으며, FVII-CTP₃은 50 mM Tris-HCl, 1M NaCl 50% (v/v), 프로필렌 글리콜 pH 7.5로 용리되었다. 상기 공정은 상기 동일한 컬럼을 이용하여 2회 연속 주기로 실시되었다.

[1021] 세라믹 히드록시아파타이트 컬럼 상에서 감마 카르복실화-기초된 분리

[1022] 상기 용리된 산물은 10 mM 인산나트륨염 pH 6.8과 1:10으로 희석되고, 세라믹 히드록시아파타이트 컬럼 (XK16/20, CV 24m1) 상에 적재되었다. 상기 컬럼은 59 mM 인산나트륨염 pH 6.8로 세척되며, 그리고 상기 FVII의 γ-카르복실화된 농축 분획물은 500mM 인산나트륨염 pH 6.8로 용리되었다. 이 공정은 상기 동일한 컬럼을 이용하여 2회 연속 주기로 실시되었다. 각 배치에서, 2회 주기 용리물은 취합되어, 1.7-2 mg/ml로 농축되고, 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 8.2로 희석-여과되어, 용적은 감소되고, 상기 활성화 단계를 위한 재료로 준비되었다.

[1023] **FVII 활성화**

[1024] 정제된 FVII-CTP₃은 1 mg/ml로 희석되었고, 24시간 동안 2-8°C에서 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl 및 1mM CaCl₂에서 항온처리되었다. 준비된 조제물 완충액 (20 mM 구연산염, 240 mM NaCl, 13.3 mM 글리신, pH 6.9)로 완충액 교환(UFDF)에 의해 활성화는 종료되었다.

[1025] **FVII-CTP₃ 및 FVIIa-CTP₃ 분석학적 성질:**

[1027] ***SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯**

[1028] 정제된 FVII-CTP₃ 및 FVIIa-CTP₃은 Precision Plus Dual Color Protein Marker (Bio-Rad)을 이용하여 12% Tris-글리신 겔 상에 적재되었다. 상기 SDS-PAGE Coomassie 분석은 Coomassie 브릴리언트(brilliant) 블루 시약(레인당 5 또는 10 µg의 단백질)로 상기 겔을 착색시킴으로써 시행되었다. 웨스턴 블롯 분석은 항-인간 FVII 다클론 Ab(R&D Systems; AF2338), 항-인간 감마 카르복실화 단클론 항체(American Diagnostics Catalog #499, 3570), 그리고 항-CTP 다클론 Ab를 이용하여 시행되었다(레인당 1 µg의 단백질). 환원 조건하에 FVII-CTP₃은 75kDa으로 이동되었고, FVIIa-CTP₃은 2개의 주요 밴드로 이동되었다: 차례로 밴드 2와 3으로 도 26에 나타난 바와 같이, 50 kDa에는 중쇄, 그리고 25 kDa에는 경쇄.

[1029] 상기 정제 과정에 의해 불순물은 감소되면서 상기 FVII-CTP₃ 부분은 상당히 농축되었다. 상기 정제 공정 수율은 25-30% FVII가었다(ELISA에 따르면). 정제동안 상실된 상기 단백질의 대부분은 FVII 색원성 활성이 낮거나 또는 없다. Coomassie-착색된 SDS-PAGE에 근거하여, 상기 감소된 FVIIa-CTP₃은 예측된 것보다 더 많은 밴드를 보유한다. 대략 ~75 kDa로 이동된 밴드는 비-활성화된 FVII를 나타낸다(도 26, 밴드 1). 이 밴드는 약간의 MW 차이를 가진 2개의 밴드로 구성되는 데, 이러한 차이는 상이한 γ-카르복실화 함량이 반영된 것일 수 있다. 20 kDa 보다 적은 MW을 가진 추가 밴드들이 관찰되었다. 이것은 중쇄의 분해 산물들일 것으로 이미 보고된 바 있다.

[1030] **FVII-CTP₃ 색원성 활성:**

[1031] 인간 정상적인 혼주 혈장과 비교하여 공정내 분획물 FVII-CTP₃ 수획물과 정제된 FVII-CTP₃의 시험관내 효능의 비교 평가는 시판되는 색원성 활성 테스트 키트, BIOPHEN(Hyphen BioMed 221304)를 이용하여 실시되었다. FVII-CTP₃ 수획물과 단백질 연속적으로 희석되었고, 정상적인 인간 혈장으로 구성된 기준 제제에 대한 투여분량 반응곡선의 비교에 의해 상기 효능이 평가되었다. FVII-CTP₃ 정제 후, 상기 색원성 활성은 상당히 개선되었고, 그리고 비-활성 분획물들은 HA 컬럼에 의해 주로 분리되었다(도 27). FVII 색원성 활성과 웨스턴 블롯에서 단클론 항-G1a 항체들을 이용한 FVII 텁지 간에 강력한 상관관계가 관찰되었다. 수획물에서 EC50 값으로 반영되는 FVII 색원성 활성의 효능은 카르복실화된 분획물과 비-카르복실화된 FVII 분획물 모두에 의해 영향을 받는다. FVII-CTP₃ γ-카르복실화된 분획물의 정제 및 농축 후, 상기 활성이 개선되었고, 이것은 된, FVII 활성에 있어서 γ-카르복실화의 중요한 기여도를 설명한다(도 27). 이 매개변수는 FVII 생체내 적절한 활성에 결정적이며, 클론 발달 프로그램에서 더 이야기될 것이다.

[1032] **A280에 의한 단백질 측정**

[1033] FVIIa-CTP₃ 및 NovoSeven®의 이론상 소멸 계수(extinction coefficient)는 ProtParam 알고리즘 (<http://web.expasy.org/protaparam>)을 이용하여 산출되었다. 이러한 계산은 아미노산 서열에 기초한다. FVII-CTP₃ 및 NovoSeven®에 대한 상기 산출된 소멸 계수는 각각 차례로 1.186과 1.406이었다. 이를 값은 280nm에서 L당 1g의 흡수를 나타낸다.

[1034] 두 단백질 사이에 상기 소멸 계수 차이는 CTP는 방향족 및 시스테인 잔기가 없고, 따라서 흡수도에 기여하지 못하기 때문에 NovoSeven®와 비교하여 전적으로 FVIIa-CTP₃의 분자량 증가로 기인된다.

[1035] A280에 의한 단백질 측정은 VII-선별 컬럼의 용리로부터 시작하여 최종 FVII 및 정제된 공정내 시료에 이용된다.

[1036] **FVIIa 항원 농도의 측정**

[1037] FVIIa 항원 농도는 Human FVIIa ELISA 키트(IMUBIND, American Diagnostica)를 이용하여 측정된다. 상기 항원

농도은 각 배치에서 산출되었다. 그러나, 이 수단은 주사용 투여분량 측정에는 유용하지 못한데, 그 이유는 이 수단은 활성 산물의 양을 나타내지 않기 때문이다.

[1038] FVIIa- Staclot® VIIa-rTF의 응고 분석

FVIIa는 상기 단일-쇄 FVII의 쇄 안(intra-chain)의 절단으로부터 유도된다. 고유 조직 인자(TF)는 FVIIa의 공 인자다. TF에 결합 시, FVII는 Factor X가 Factor Xa로의 활성화를 중재하고, 한편 이 자체는 FVIIa로 형질전환 된다. 상기 가용성 조직 인자는 고유 조직 인자의 세포외 부분이다. 자가-활성화에 의해 더 이상 FVII를 활성화 시킬 수는 없지만, 조식 인자에 결합된 FVIIa는 FX를 FXa로 활성화시킬 수 있다.

[1040] 본 분석에 이용된 재조합 가용성 조직 인자(rsTF)는 FVIIa 응고 테스트를 구성하기 위하여 FVIIa 특이성을 이용 한다. FVIIa 존재하에서 rsTF, 칼슘 및 인지질은 FVII가 FVIIa로 활성화 없이 혈장의 응결로 유도한다.

[1041] 이 시스템에서 관찰된 응고 시간은 시료 안에 FVII 존재의 간접없이 상기 테스트된 시료 안에 FVIIa 함량과 역 비례 관계에 있다.

[1042] 상기 분석은 Omri Laboratories (Nes-Ziona, Israel)에 의해 시행되었다. 각 연구에 앞서 재구성 후 NovoSeven® 와 FVIIa-CTP₃ 모두에 대해 FVIIa 활성이 평가되었다. NovoSeven® 활성은 바이알에서 보고된 바와 같이 예측된 활성과 상관관계가 없었지만, 이러한 불일치는 활성 평가를 위한 상이한 방식때문일 것이다. 표 39에서는 상기 단백질 농도를 고려하지 않고 용적당 FVIIa 응고 활성이 요약되어 있다.

표 39: 배치 산물의 FVIIa 응고 활성

	PK 연구		생존 연구	
	FVIIa-3*CTP (FVIIa 31)	NovoSeven®	FVIIa-3*CTP (FVIIa 38)	NovoSeven®
	활성 (U/ml)	1.3E+06	2.5E+05	1.3E+06
				7.4E+05

[1043] FVIIa-CTP₃ 특이 활성:

[1044] [1045] FVIIa 특이 활성(단백질 농도를 ml 당 활성으로 나누어 계산됨)은 A280에 기초하여 산출되었고, 표 40에 제시된다. MW이 상이한 두 분자의 특이 활성을 비교하였을 때, 상기 활성을 표준화시키기 위하여 (가령, 분자량 차그렇게 함으로써 1 mg의 NovoSeven®에서 활성 부위 수는 FVIIa-CTP₃에 있는 수의 1.185배 더 높다) 보정이 있어야만 한다. 상기 전환 인자의 계산은 다음 식으로 나타낸다:

$$\begin{aligned} \text{표준화된 SA} &= \frac{\text{SA(FVIIa-CTP}_3)}{\text{MW.(FVII CTP}_3)} \times \text{MW(고유의 FVII)} = \\ &= \frac{\text{SA(FVIIa CTP}_3)}{53419.5\text{Da}} \times 45079.1\text{Da} = \text{SA(FVIIa-CTP}_3) * 1.185 \end{aligned}$$

표 40: NovoSeven®와 비교하였을 때 FVIIa-CTP₃ 특이 활성

시료	평균 A280	STDV (n=9)	%CV	소멸 계수	Prot 농도 (mg/ml)	U/ml	특이 활성		NovoSeven®로부터 배수 감소
							U/mg 단백질	U/mg FVIIa	
NovoSeven®	1.274	0.031	2.398	1.406	0.906	8.36E+05	9.23E+05	9.23E+05	1.0
FVIIa-CTP ₃	4.396	0.092	2.094	1.186	3.706	7.23E+05	1.95E+05	2.31E+05	4.0

[1046] FVIIa-CTP₃ PK-PD 연구:

[1047] 연구 개요

[1048] FVIIa-CTP₃ 및 rhFVIIa(NovoSeven®, NS)는 C57B FVIII-결핍 마우스에게 6.4E6 U/kg 체중 (160,000 U/동물)의 투여분량으로 단일 정맥 주사에 의해 투여되었다. 투여 후 0.166, 0.5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58 및 72 시

간 시점에서 4마리 마우스에서 교대로 후면-안와로부터 혈액 시료를 빼내었다(표 41). 표본추출 후 즉시 구연산 염 혈장 (0.32%)이 준비되었고, 분석까지 -20°C에 보관되었다. FVIIa 응고 활성 농도가 평가되었고, 상세한 PK 분석이 시행되었다. 상기 연구는 Omri Laboratories (Nes-Ziona, Israel)에서 시행되었다.

[1053] **표 41: 연구 개요**

치료된 집단	테스트 물질	한 집단당 동물 수/ 시점	투여 경로	유닛의 양/동물	주사된 용적(μ l)	시점 (투여 후 시간)
A	rhFVIIa	4	IV	1.6e5	200	0 (투여전) 0.166, 0.5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58, 72
B	FVIIa- CTP ₃	4	IV	1.6e5	200	0 (투여전) 0.166, 0.5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58, 72

[1054] **FVIII-결핍 마우스에서 FVIIa-CTP₃ PK 프로파일**

[1055] 혈액 시료내 FVIIa 활성은 Staclot® VIIa-rTF 키트(Stago, Parsippany, NJ)를 이용하여 정량화되었다. 각 단 백질에 대하여 상기 약동학 프로파일이 산출되었고, 이는 각 시점 4마리 동물의 평균을 나타낸다. 도 28은 상기 실험을 통하여 FVIIa의 상기 PK 프로파일을 나타낸다. FVIIa 회수는 표 42에 제시된다. 표 43에서는 상기 PK 매개변수가 요약되어 있다.

[1056] 표 41에서는 NovoSeven® 또는 FVIIa-CTP₃을 투여한 후 상기 응고 활성 값이 요약되어 있다. FVIIa-CTP₃ 및 NovoSeven®은 투약 후 30분에 최대 활성에 도달되었다. NovoSeven®의 최고 활성 값은 FVIIa-CTP₃의 최고 활성 값의 겨우 43%에 도달되었다. FVIIa-CTP₃ 응고 활성은 더 오랜 시간 동안 유지되었으며, 이는 연장된 활성을 나타낸다. NovoSeven®-치료된 마우스에 대한 응고 활성은 12시간 이후 시점에서는 감지불가능하였지만 FVII-CTP₃ 치료된 마우스는 투여후 48시간 대에서도 측정가능한 활성의 유지가 지속되었다(표 41 및 도 28).

[1057] 3개의 일렬 CTP 복사체가 FVIIa에 추가되면 투약후 최대 활성에 의해 측정된 바, 그리고 시험관내 분석에 근거하여 예상 활성과 비교하였을 때 100% 회수가 상승되었고(표 42), 상기 반감기 및 평균 잔류 시간(MRT)은 5-배 증가되었다. 상기 노출 시간(AUC)은 증가된 3-배 증가되었다(표 43).

[1058] **표 41: 단일 IV 주사이후 FVIIa 응고 활성**

투여 후 시간 (hr)	평균 FVIIa 응고 활성 (U/ml)	
	FVIIa-CTP ₃	NovoSeven®
0.16	6.8E+07	3.2E+07
0.5	9.7E+07	4.3E+07
2	2.1E+07	3.9E+06
4	7.7E+06	7.3E+05
8	2.7E+06	4.2E+04
12	3.7E+05	6.2E+03
24	2.4E+04	BLQ
34	4.6E+03	BLQ
48	1.5E+03	BLQ

[1059]

[1061]

표 42: FVIIa-CTP₃ 회수

치료된 집단	테스트 물질	유닛의 양/동물	실제 투여된 투여 분량(U/ml)	*예상 Cmax (U/ml 혈액)	Cmax (U/ml)	회수%
A	rFVIIa	1.60E+05	1.20E+06	1.40E+05	4.25E+04	30
B	FVIIa-CTP ₃	1.60E+05	1.29E+06	1.50E+05	9.74E+04	64.6

[1062]

*예상된 Cmax는 투여된 투여분량을 혈액 용적으로 나누어 유도된다.

[1063]

표 43: FVIIa-CTP3 대(vs.) NovoSeven®의 PK 매개변수

PK 매개변수	NovoSeven®	FVIIa-CTP ₃
반감기 _{-α} (0.5-12hr)	0.94	1.57
반감기 _{-β} (12-48hr)	NA	4.62
AUC (mU*hr/ml)	5.80E+07	1.80E+08
Vd/Kg (ml/Kg)	1408	2375
CL/Kg (ml/hr/Kg)	1034	356
MRT (hr)	1.3	6.7

[1064]

트롬빈 생성 분석 (TGA)

[1065]

트롬빈 생성은 상기 응고 캐스케이트의 중요한 부분이며, 그렇기 때문에 특정 개인이 트롬빈을 잘 생성할 수 있는지의 여부가 출혈 또는 혈전증의 위험과 관련될 수 있다. 트롬빈 생성을 분석할 때 흔히 측정되는 변수들은 지연(lag) 시간, 트롬빈 생성이 절정에 이를 때 까지의 시간, 내생성 트롬빈 가능성 [ETP] (가령, 곡선하 면적 및 꼬리), 트롬보그람(thrombogram) ("TG")의 시간적 경과를 포함한다. 지연 시간 이후, 트롬빈 분출(burst)이 관찰된다. 그러나, 응고는 모든 트롬빈의 95% 이상은 아직 형성되지 않는 지체 시간 끝에 발생된다. 상기 트롬빈 생성 분석은 인간 혈우병 혈장이 보충된 Thrombinoscope 시약들을 이용하여 시행되었다. TGA는 마우스 혈장에서 NovoSeven® 및 FVIIa-CTP₃ 주사에 의해 유도된 상기 응고 능력을 반영한다. 도 29는 FVIIa-CTP₃ 또는 NovoSeven®의 투여 후 마우스 혈장에서 TGA 매개변수 값을 나타낸다. FVIIa-CTP₃ 투여 후, 3개의 매개변수 모두(트롬빈 생성 속도 생성된 트롬빈 및 FVIIa의 최대량)는 NovoSeven® 치료와 비교하여 FVII-CTP₃의 장점을 나타낸다. 이것은 NovoSeven®과 비교하였을 때 FVII-CTP₃의 잠재적인 장기-작용 우수성에 대한 생각을 더 강화시킨다.

[1066]

FVIIa-CTP₃ 꼬리 정맥 횡절단(TVT) 연구:

[1067]

연구 개요

[1068]

FVIIa-CTP₃의 상기 PK/PD 테스트로부터 획득된 데이터는 FVIIa-CTP₃의 기능에 대한 이해를 제공하였으며, FVIIa-CTP₃은 NovoSeven®와 비교하였을 때 약동학적 장점을 가진다는 것이 설명되었다. 그러나, 외상성 사건 이후 생체내에서 응고를 유도하는 상기 단백질의 능력은 여전히 설명되지 않고 있다. 출혈을 몇게 하는 FVIIa-CTP₃의 능력을 평가하기 위하여, 출혈 유발에 상기 동일한 FVIII-결핍 마우스 모델이 이용되었다.

[1069]

FVIII-결핍 마우스에게 FVIIa-CTP₃ 또는 NovoSeven®가 단일 정맥 주사에 의해 투여된다. 상기 마우스에게 상기 FVIIa 응고 활성 분석에서 평가된 각 약물의 효능에 따라 산출된 등가의 FVIIa 활성(1.6E05 유닛, 200 μl)을 제공하는 양의 약물이 투여되었다(표 44). 상기 투여된 투여분량은 9 mg/kg의 NovoSeven®, 그리고 FVIIa-CTP₃의 감소된 활성으로 인하여 40 mg/kg의 FVII-CTP₃이었다. 대조군에게는 200 μl 담체가 주사되었다.

[1070]

상기 꼬리 정맥은 투여 후 15 분 (주사 1), 24 시간(주사 2) 또는 48 시간(주사 3) 시점에 꼬리 끝에서부터 2.7cm 절단되었고, 24시간 동안 마우스 생존이 기록되었다.

[1073]

표 44: 주사된 시료의 평가

주사횟수.	NovoSeven®			FVIIa-CTP ₃			
	단백질 농도 (mg/ml)	활성 (U/ml)	특이 활성 (U/mg)	단백질 농도 (mg/ml)	활성 (U/ml)	특이 활성 (U/mg)	특이 활성 (표준화된)
1	0.91	8.0E+05	8.8E+05	3.63	6.6E+05	1.8E+05	2.2E+05
2	0.92	8.3E+05	9.0E+05	3.81	7.8E+05	2.0E+05	2.4E+05
3	0.89	8.8E+05	9.9E+05	3.68	7.3E+05	2.0E+05	2.3E+05

[1074]

단백질 농도는 A280에 의해 측정되었다.

[1075]

결과

[1076]

3번의 주사 (5 동물들 x 3회 주사)에 대하여 담체-주사된 대조군의 데이터들이 요약되었고, 도 30에 제시된다. 꼬리 정맥 절단 후 24시간 동안 30% 생존이 관찰되었다.

[1077]

NovoSeven® 및 FVIIa-CTP₃-치료된 마우스는 FVIIa 투여 후 15분에 행해진 꼬리 정맥 횡절단이후 적절한 지혈 활성을 나타내었다. FVIIa-CTP₃ 및 NovoSeven® 치료된 동물들에게서 100% 생존율이 관찰되었다(도 30).

[1078]

상기 PK/PD 연구에서 설명된 FVII-CTP₃의 감소된 제거 속도는 투여 후 24시간 시점에서 실시된 꼬리 정맥 횡절 단 이후 대부분 명백하게 평가된다. NovoSeven®의 생존율의 감소가 관찰된다. 대조군과 유사하게, 10 시간 이내에 50% 사망이 관찰된다. 반면, FVIIa-CTP₃ 치료된 마우스의 90%는 생존하였다(도 30). 이 결과는 상기 FVIIa-CTP₃ 치료의 장기-작용 효과를 나타낸다.

[1079]

투여 후 48시간 시점에서, FVIIa-CTP₃ 또는 NovoSeven®로 치료된 군에서 생존율 감소 경향이 나타난다(도 30c). FVIIa-CTP 마우스에서 약간의 개선이 관찰되었지만, 그 차이는 통계학적 유의성에는 미치지 못하였다.

[1080]

고찰:

[1081]

제조합 단백질들에 CTP의 융합에 의해 필적되는 활성은 유지되면서 단백질들의 순환 반감기는 연장된다. 70kDa의 임계 크기 이상에서 단백질의 감소된 제거 이면의 기전은 신장 제거에 있어서 잘 이해되며, CTP 융합 이후 추가 보호가 획득된다. CTP 융합은 상기 단백질 차폐를 지나가고, 단백질분해성 절단으로부터 이를 보호하고, 높은 음전하로 인하여 이의 방사성 분자량을 증가시키고, 간 제거 수용체에 대한 이의 친화력을 감소시키는 것으로 보인다.

[1082]

본 연구는 단백질 반감기 및 제거에 있어서 FVII에 CTP의 융합 효과에 대한 특별한 이해를 제공하고, 그리고 이러한 변형 이후 이의 특이 활성 패러다임을 설명하는 것을 목적으로 한다. FVIII-결핍 마우스에게 FVIIa-CTP₃ 또는 재조합 시판 FVIIa(NovoSeven®)는 유사한 투여분량(유닛 기준)으로 단일 IV 주사에 의해 투여되었고, PK 활성-기반 분석이 실시되었다. FVIIa-CTP₃은 이의 반감기 및 AUC가 차례로 5-배 및 3.5-배 증가로 반영된 것과 같이 우수한 수명을 나타낸다. Staclot® 활성 키트에 의해 산출된 FVIIa-CTP의 특이 활성(U/mg)을 A280에 의해 측정된 단백질 농도로 나누면 NovoSeven®의 특이 활성보다 4-5 배 더 낮은 것으로 나타났다.

[1083]

CTP가 생체내에서 FVIIa의 지혈 효과에 어떻게 영향을 주는지에 대한 이해를 구축하기 위하여, 출혈을 감소시키는 FVIIa-CTP₃ 능력에 대해 조사하였다. 혈우병 마우스 모델의 꼬리 정맥 횡절단출혈 모델에서, rFVIIa 투여로 인하여 유발을 받은 동물들의 생존율을 개선시킬 수 있고 출혈로 인한 사망을 회피할 수 있었다. 본 명세서에서 설명된 것과 같은 연구에서, 동물들에게 FVIIa-CTP₃ 또는 NovoSeven®가 투여되었다. 이들 분자 모두는 투약 후 0.25 시간에 시행된 횡절단에서 생체항상성을 유지시킬 수 있었다. 투여 후 24시간에 꼬리 횡절단이 실시될 때 FVIIa-CTP₃-치료된 군에서 상당히 연장된 활성 기간이 나타났다. 담체-치료된 군의 생존율은 예상보다 더 높았고, 기준 연구에서 얻은 값보다 더 높았다(50% 대(vs.) 20%(기준 연구), 데이터 제공되지 않음). 투약 후 36시간 시점이 포함된 좀더 이른 시점에서 치료된 동물들의 생존율이 더 평가된다.

[1085] 결론에서, FVIIa-CTP₃은 혈우병 마우스에서 활성 기간의 증가를 가지며, 이는 NovoSeven®와 비교하였을 때 더 오랜 지혈 효과로 해석될 수 있다. 취합된 데이터는 FVII에 CTP의 융합은 혈우병을 가진 환자들에게서 예방 치료를 상당히 개선시킬 수 있는 가능성이라는 것을 시사한다.

[1086] 실시예 7: SD 쥐에게 단일 IV 또는 SC 주사 후 정제된 FVII-CTP₃ 대(vs.) FVII-CTP₅ 프로파일의 비교 평가

연구 목적

[1088] 두 가지 연구가 시행되었다:

[1089] 첫 번째 연구 목적은 Sprague Dawley 수컷 쥐에게 동물당 50 μg 단일 정맥 투여 후 FVII 선별- 및 HA-콜럼 정제 후 rFVII-CTP₃ 대(versus) rFVII-CTP₅의 약동학 매개변수를 측정하는 것이었다.

[1090] 두 번째 연구에서, 동물 당 100 μg의 단일 정맥 또는 피하 투여 후 Sprague Dawley 수컷 쥐에게서 rFVII-CTP3-HA 대(versus) rFVII-CTP5-HA 약동학 매개변수가 검사되었다.

결과

FVII-CTP3 및 FVII-CTP5 항원 농도 측정

[1093] FVII 항원 농도은 Human FVII ELISA 키트(ZymotestHyPhen)(아래 표 45 참고)를 이용하여 측정되었다. T

[1094] 표 45: 3회 독립적 실시의 평균인 상기 산출된 단백질 농도를 요약한다.

	FVII 3 개 CTP		FVII 5 개 CTP	
	<u>FVIIS 46 el.</u> <u>Conc. Dial</u>	<u>FVII HA 46 el.</u> <u>Conc. Dial</u>	<u>FVIIS el.</u> <u>Conc. Dial</u>	<u>FVII HA 5 100% B</u> <u>Conc. Dial</u>
AVE (ng\ml)	3.78E+06	1.59E+06	1.88E+06	7.92E+05
SD	1.30E+06	6.03E+05	7.15E+05	3.57E+05
CV (%)	3.43E+01	3.80E+01	3.80E+01	4.51E+01

[1095]

검사된 시료들의 웨스턴 블로트 분석

[1097] FVII-CTP_{3,5} 시료는 Precision Plus Dual Color Protein Marker(Bio-Rad)를 이용하여 4-12% bisTrisgel (NuPage, invitrogen)에 적재되었다. 웨스턴 면역-블로트에서 다클론 항 FVII Ab(R&D systems), 항 CTP 다클론 Ab(Adar Biotech Production) 또는 항 Gla Ab(American diagnostica)를 이용하여 상기 SDS-PAGE 분석이 실시되었다. 요약하면, 3개 및 5개의 CTP에 융합된 FVII는 차례로 80 및 100kDa로 이동되었다(도 31 참고).

[1098]

시험관내 효능의 FVII의 비교 평가

[1099] Sheba medical center, the national coagulation center에서 실시한 FVII 활성 분석은 FVII (Siemens)가 결핍된 면역흡착을 이용한 PT 기반 분석이다. PT 시약은 이노빈이며, 상기 분석은 Sysmex CA 1500 기구에서 시행된다. FVII 정상적인 범위는 55-145%이다. 시료 활성은 표 46에 요약된다.

[1100]

표 46: 시료 활성

시료	농도 (mg/ml) (NANODROP에 따른)	테스트된 시료 안에 농도(μg/ml)	결과 (%)	평균- 혈장%
FVII-5 개 CTP FVIIIS el. Conc. Dial	2.19	2	87	16%
		1	30	
		0.5	10	
FVII-5 개 CTP HA 5 100% B Conc. Dial	1	2	97	21%
		1	36	
		0.5	13	
FVIIIS 46 el. Conc. Dial	3.17	2	100	18%
		1	35	
		0.5	12	
FVII HA 46 el. Conc. Dial (1)	1.5	2	92	20%
		1	33	
		0.5	10	

[1101]

[1102] 신체에서 순환 FVII의 정상 농도는 대략 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 이다. FVII-CTP₃ 및 FVII-CTP₅는 모두 정상적인 혼주 인간 혈장과 비교하여 이들의 응결 활성이 약 5-배 감소를 나타낸다.

[1103]

약동학 연구

[1104]

상기 FVII-CTP₃ 및 FVII-CTP₅ (FVII 선별 및 FVII HA 컬럼 이후) 약동학 (PK) 프로파일 및 매개변수를 결정하기 위하여 2가지 약동학 연구가 시행되었다. 첫 번째 연구에서, FVII 선별/HA 정제 후 FVII-CTP₃ 및 FVII-CTP₅는 쥐당 50 μg 의 투여 분량으로 Sprague Dawley 쥐(물질당 6마리 쥐)에게 단일 정맥 주사를 통하여 투여되었다.

[1105]

투여 후 0.083, 0.5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96 및 120 시간 시점에서 3마리 마우스에서 교대로 후면-안와로부터 혈액 시료를 빼내었다. 표본추출 후 즉시 구연산염 혈장 (0.38%)이 준비되었고, 분석까지 -20°C 에 보관되었다.

[1106]

제 2 연구에서, HA 컬럼이후의 시료만 테스트되었다. 이들 시료는 쥐당 100 μg 의 투여 분량으로 Sprague Dawley 쥐(물질당 6마리 쥐)에게 단일 정맥 또는 피하 주사를 통하여 투여되었다. 상기 제 1 연구와 동일한 시점 그리고 조건에서 혈액 시료가 취합되었다.

[1107]

표 47. 첫 번째 연구안 (FVII 선별 대 FVII HA).

치료된 집단	테스트 물질	한 집단당 동물 수/	투여 경로	투여 수준 (동물당 μg)	주사된 용적(μl)	농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	시점 (투여 후 시간)
A	FVII-CTP*3 배치 46 HA	6	IV	50	200	250	0 (투여전) 0.083 0.5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
B	FVII-CTP*3 배치 46 FVIIIS	6	IV	50	200	250	0 (투여전) 0.083 0.5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
C	FVII-CTP*5 배치 5 HA	6	IV	50	200	250	0 (투여전) 0.083 0.5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
D	FVII-CTP*5 배치 5 FVIIIS	6	IV	50	200	250	0 (투여전) 0.083 0.5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120

*

[1109]

표 48. 두 번째 연구안 (IV 대 SC)

치료된 집단	테스트 물질	한 집단당 동물 수/	투여 경로	투여 수준 (동물당 μg)	주사된 용적(μl)	농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	시점 (투여 후 시간)
A	FVII-CTP*3 배치 46 HA	6	IV	100	200	500	0 (투여전) 0.083 0.5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
B	FVII-CTP*3 배치 46 HA	6	SC	100	200	500	0 (투여전) 0.083 0.5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
C	FVII-CTP*5 배치 5 HA	6	IV	100	200	500	0 (투여전) 0.083 0.5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120
D	FVII-CTP*5 배치 5 HA	6	SC	100	200	500	0 (투여전) 0.083 0.5, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 96, 120

[1111]

[1112]

이들 두 연구에서 주요 차이는 상기 투약량 및 투여 경로다. 첫 번째 연구에서, 쥐에게 쥐당 $50 \mu\text{g}$ 의 IV 주사되었고, 반면 두 번째 연구에서 쥐에게 쥐당 $100 \mu\text{g}$ 의 IV 또는 SC 주사되었다(총 $500 \mu\text{g}/\text{kg}$; 쥐 체중은 200 g). 상기 투약량의 증가는 투여 유형의 변경으로 인한 것이며; SC 투여는 IV 투여와 유사한 효과를 얻기 위하여 더

많은 양을 요구한다.

[1113] PK 연구의 분석

[1114] 혈장 시료에서 FVII 농도는 인간 FVII Elisa 키트(zymutest FVII-Biophen)를 이용하여 정량화되었다. 약동학 프로파일이 산출되었고, 각 시점에서 3마리 동물의 평균이 반영된다. 말기 반감기 값은 PK Solutions 2.0 소프트웨어를 이용하여 산출되었다. 아래 표에는 각 상이한 표본추출 시점에서 상기 산출된 FVII 농도가 요약되어 있다. PK 프로파일 및 상기 PK 매개변수의 요약이 아래 표에서 제시된다.

표 49. 첫 번째 약동학 연구 (FVII 선별 대 FVII HA) -FVII 농도(ng/ml)

시간 (hr)	FVII CTP*3 배치 46 HA	FVII CTP*3 배치 46 FVII S	FVII CTP*5 배치 5 HA	FVII CTP*5 배치 5 FVII S
0.083	1816.3	1633.9	2064.3	1853.5
0.5	1523.7	1409.9	1351.4	1418.0
2	1284.9	1041.7	1389.7	834.4
5	607.9	531.6	722.7	737.2
8	524.2	430.0	712.2	614.6
24	115.5	132.9	272.5	201.8
48	21.1	31.6	62.3	90.4
72	9.5	15.8	29.1	31.8
96	BLQ	5.8	7.0	16.9
120	BLQ	BLQ	8.5	13.4

표 50. 두 번째 약동학 연구 (IV 대 SC) -FVII 농도(ng/ml).

시간 (hr)	FVII CTP*3 배치 46 HA- IV	FVII CTP*5 배치 5 HA- IV	FVII CTP*3 배치 46 HA- SC	FVII CTP*5 배치 5 HA- SC
0.083	6452.6	6153.3	5.0	BLQ
0.5	3930.7	3660.6	14.5	14.6
2	1992.3	2176.2	113.6	96.2
5	1598.9	2087.3	106.6	70.5
8	781.6	1075.6	188.9	129.7
24	268.5	627.2	155.0	239.2
48	51.9	143.3	43.0	88.6
72	8.8	39.0	7.0	36.7
96	BLQ	10.8	BLQ	10.4
120	BLQ	8.2	BLQ	8.7

[1116]

[1117]

[1119]

표 51. PK 분석-제 1 약동학 연구 (FVII S 대 HA).

	FVII CTP*3 배치 46 HA	FVII CTP*3 배치 46 FVII S	FVII CTP*5 배치 5 HA	FVII CTP*5 배치 5 FVII S
반감기(0.083-8 hr) (hr)	4.3	4.0	5.51	5.59
반감기(8-72\96\120hr) (hr)	11.1	12.1	16.46	20.29
반감기(8-72) (hr)	11.1	13.4	13.62	15.64
AUC(O-t)(관찰영역)(8- 72/96/120hr)	14566.9	13686.4	21812.7	19307.9
AUC (∞) 영역(8- 72/96/120hr)	14718.2	13788.1	22013.9	19701
Vd(영역)/kg (ml/kg)(8- 2/96/120hr)	271.1	316.1	269.7	371.5
CL(영역)/kg(ml/hr/kg) (8- 72/96/120hr)	17.0	18.1	11.356	12.69

[1120]

[1121]

5개의 CTP 추가는 3개의 CTP와 비교하였을 때 FVII 반감기를 연장시켰다. 두 가지 형태의 5 CTP (가령, FVII S 및 FVII HA)는 긴 시간(96시간 및 120시간)에서 탐지된 반면, FVII-3 CTP HA 및 FVII-3 CTP는 각각 차례로 72시간과 96시간에 탐지되었다. 첫 번째 사실에 근거하여 상기 FVII-5 CTPs의 반감기는 3개의 CTPs 변이체들보다 더 길다(도 32 참고). 동일한 시점(8-72시간)에서 모든 검사된 재료 (3개 및 5개 CTPs)를 비교하였을 때, 비록 5개 CTP가 상당히 더 길었지만, 상기 반감기는 유사하였다(도 32).

[1122]

표 52: PK 분석 - 두 번째 약동학 연구-(IV 대 SC).

	FVII CTP*3 배치 46 HA-IV	FVII CTP*5 배치 5 HA-IV	FVII CTP*3 배치 46 HA-SC	FVII CTP*5 배치 5 HA-SC	생체이용성 CTP*3	생체이용 성 CTP*5
반감기(0.083 -8 hr) (hr)	3.0	3.9	-1.8	-3.18		
반감기(8- 72\96\120hr) (hr)	9.9	14.6	13.14	22.94		
반감기(8-72) (hr)	9.9	13.0	13.14	29.47		
AUC(O- t)(관찰영역)(8- 72/96/120hr)	28866.8	43761.0	6600	9822.7	22.9	22.4
AUC (∞) 영역(8- 72/96/120hr)	28993.0	43934.4	6733	10110.8	23.22	23.01
Vd(영역)/kg (ml/kg)(8- 72/96/120hr)	246.4	240.5	1407.6	1636.8		
CL(영역)/kg(ml/hr/kg) (8- 72/96/120hr)	17.2	11.4	74.261	49.452		

[1123]

- [1124] 다시, 첫 번째 연구에서 관찰된 바와 같이, 5개 CTPs의 추가는 초기 및 말기 반감기 모두에서 그리고 두 가지 투여 방식(IV 및 SC, 도 33 참고)에서 3개 CTP와 비교하였을 때 FVII 반감기를 연장시켰다. 예상한 바와 같이, IV로 투여된 것과 비교하였을 때 SC 투여 후, 나중 시점에서 혈액에 FVII가 처음으로 탐지되었다.
- [1125] 상기에서와 같이, 두 가지 PK 연구가 요약되었다. 첫 번째 연구의 주요 목적은 2가지 상이한 커럼: FVII 선별 및 FVII HA 이후 FVII-3 CTP와 FVII-5 CTP 간에 차이를 점검하는 것이었다. 우리의 기존 연구에서, 수확물 대 정제된 단백질들이 점검되었고, 쥐에게 수확물이 주사된 경우에 FVII의 3 CTP 및 5 CTP 형태 간의 차이가 더 크다는 것을 알았다.
- [1126] 두 커럼 이후 FVII 3\5 CTP 사이의 결과에서는 유의적인 차이가 없었고, 따라서 두 번째 연구에서 FVII HA 3\5 CTP를 주사하는 것으로 결정되었다.
- [1127] **실시예 8: 피하 주사 후 FVIII 결핍 마우스에서 FVIIa-CTP₃ (MOD-5014) 생존 연구**
- [1128] **연구 목적**
- [1129] 피하 투여 후 꼬리 정맥 횡절단 연구에서 NovoSeven®, MOD-5014 (FVIIa-CTP₃) 및 MOD-5019 (FVIIa-CTP₅)의 효과 평가.
- [1130] FVIIa-CTP₃ (MOD-5014) 및 FVIIa-CTP₅ (MOD 5019) 분석학적 성질:
- [1131] A280에 의한 단백질 측정
- [1132] NovoSeven®의 이론상 소멸 계수는 ProtParam 알고리즘(<http://web.expasy.org/protaram>)을 이용하여 산출되었다. 이러한 계산은 아미노산 서열에 기초한다. NovoSeven®에 대한 상기 산출된 소멸 계수는 1.406이었고, MOD-5019의 경우는 1.075이었다(값은 280nm에서 L당 1g의 흡수도를 나타낸다). MOD-5014의 소멸 계수는 Mscn에서 아미노산 분석에 의해 측정되었다. MOD-5014의 상기 소멸 계수는 1.27이었다.
- [1133] **FVIIa - STACLOT VIIa-rTF의 응고 분석**
- [1134] FVIIa는 상기 단일-쇄 FVII의 쇄 안(intra-chain)의 절단으로부터 유도된다. 고유 조직 인자(TF)는 FVIIa의 공인자이며, TF에 결합 시, FVII는 Factor Xa로의 활성화를 중재하고, 한편 이 자체는 FVIIa로 형질전환된다. 상기 가용성 조직 인자는 고유 조직 인자의 세포외 부분이다. 자가-활성화에 의해 더 이상 FVII를 활성화시킬 수는 없지만, 조직 인자에 결합된 FVIIa는 FX를 FXa로 활성화시킬 수 있다.
- [1135] 본 분석에 이용된 재조합 가용성 조직 인자(rsTF)는 FVIIa 응고 테스트를 구성하기 위하여 FVIIa 특이성을 이용한다. FVIIa 존재하에서 재조합 가용성 조직 인자(rsTF), 칼슘 및 인지질은 FVII가 FVIIa로 활성화 없이 혈장의 응결로 유도한다.
- [1136] 이 시스템에서 관찰된 응고 시간은 시료 안에 FVII 존재의 간섭없이 상기 테스트된 시료 안에 FVIIa 함량과 역비례 관계에 있다.
- [1137] 각 연구에 앞서 재구성된 NovoSeven®, 및 MOD-5014 그리고 MOD-5019에서 FVIIa 활성이 평가되었다.
- [1138] FVIIa 특이 활성(단백질 농도를 ml 당 활성으로 나누어 계산됨)은 A280에 기초하여 산출되었고, 표 53에 제시된다. MW이 상이한 두 분자의 특이 활성을 비교하였을 때, 상기 활성을 표준화시키기 위하여 (가령, 분자량 차그렇게 함으로써 1 mg의 NovoSeven®에서 활성 부위 수는 MOD-5014에 있는 수의 1.185배 더 높고, MOD-5019보다 1.307배 더 높다) 보정이 있어야만 한다. 상기 전환 인자의 계산은 다음 식으로 나타낸다:
- $$\text{표준화된 } SA = \frac{SA(FVIIa - CTP_3)}{MW(\text{고유의 } FVII)} \times MW(FVII - CTP_3) = \\ = \frac{SA(FVIIa - CTP_3)}{45079.1Da} \times 53419.5Da = SA(FVIIa - CTP_3) * 1.185$$
- [1139]

[1140] 표 53 - NovoSeven®와 비교하여 MOD-5014 특이적 활성

시료	A280에 의한 단백질 농도 (mg/ml)	특이 활성 (U/mg FVIIa)	NovoSeven®
NovoSeven®	0.93	52,487	1.0
MOD-5014 배치 73	1.4	25,490	2.05
MOD-5019 배치 9	3.0	11,698	4.48

[1141] 연구 개요

[1143] 가장 중요한 측정은 외상성 사건 이후 생체내 응고를 유도하는 상기 단백질의 능력을 측정하는 것이다. 출혈을 멎게 하는 MOD-5014의 능력을 평가하기 위하여, 출혈 유발에 상기 동일한 FVIII-결핍 마우스 모델이 이용되었다.

[1144] FVIII-결핍 마우스에게 MOD-5014, MOD-5019 또는 NovoSeven®가 단일 피하 주사에 의해 투여되었다. 군 A 및 B에는 FVIIa 활성과 등가의 양으로 NovoSeven® 및 MOD-5014가 차례로 투여되었다. 결정적인 인자(단백질의 활성 또는 단백질의 양)을 평가하기 위하여 군 C에는 MOD-5014과 등가의 양의 FVIIa 단백질 양으로 MOD-5019가 투여되었다. 상기 투여된 투여분량은 4.2 mg/kg의 NovoSeven®, 그리고 8.6mg/kg의 MOD-5014 및 MOD-5019이었다. 상기 꼬리 정맥은 투여 후 12시간 시점에 꼬리 끝에서부터 2.7cm 절단되었고, 24시간 동안 마우스 생존이 기록되었다.

[1145] 표 54- 군 지정

집단	주사날짜	테스트 물질	투여된 투여분량		주사된 용적(μl)	집단당 마우스의 수	투여 후 출혈 시간
			mg FVII /Kg	mU/Kg			
A	13.1.13	NovoSeven®	4.23	221,876	100	10	12
B	15.1.13	MOD-5014, 배치 73	8.59	218,750	160	10	12
C	27.1.13	MOD-5019, 배치 9	8.59	100,496	160	10	12

[1146]

[1147] 결과

[1148] 상기 실험 데이터는 표 55와 도 34에서 요약되어 있다.

[1149] 표 55. TVT 연구 결과

TVT 후 시간 (h)	생존 마우스의 수			생존%		
	NovoSeven®	MOD-5014	MOD-5019	NovoSeven®	MOD-5014	MOD-5019
0	9	10	10	100	100	100
1	9	10	10	100	100	100
2	9	10	10	100	100	100
3	8	10	8	89	100	80
4	6	9	8	67	90	80
5	5	9	7	56	90	70
6	4	8	5	44	80	50
7	3	8	5	33	80	50
8	2	7	5	22	70	50
9	1	6	5	11	60	50
10	1	5	5	11	50	50
11	1	3	5	11	30	50
12	1	3	5	11	30	50
24	1	3	4	11	30	40

[1150]

[1151] TTV 이후 24시간 시점에서, NovoSeven® 주사된 마우스의 단지 11%만 생존하였다. 이 시점까지 MOD-5014의 30%와 MOD-5019의 40%가 생존하였다. 피하 주사된 MOD-5014 및 MOD-5019는 NovoSeven®와 비교하였을 때 마우스 생존을 개선시켰다. 그럼에도 불구하고, 상기 결과는 실험 동안 동물의 50% 이상이 죽었기 때문에 최적의 것은 아니다.

[1152] 다른 응고 인자들과 마찬가지로 FVIIa는 혈류에서 바로 이용가능하도록 하기 위하여 보통 정맥으로 주사된다. 그러나, 본 발명에서는 명세서에서 제시된 상기 조성물은 SC 투여 이후 혈류로 놀라울 정도로 효과적으로 흡수 된다는 것을 보여준다. FVIIa 피하 투여가 가능한 점은 예방 용도로 이용될 수 있는 장점으로 작용한다. 피하 주사는 환자들이 자가-주사를 하는 데 또한 훨씬 더 용이하고, 환자들이 어린 경우 그리고 이들의 정맥이 작고, 찾기 힘든 경우 유리하다.

[1153] 따라서, 상기 피하 적용은 예방 치료에 이용될 수 있다.

[1154] **실시예 9: SD 쥐에게 재조합 MOD-5014 대(VS.) NOVOSEVEN®의 피하 투여 후 재조합 MOD-5014 대(VS.) NOVOSEVEN® 비교 PK-PD 연구**

[1155] 연구 목적

[1156] SD 쥐에게 MOD-5014 대(versus) 시판 rFVIIa를 단일 SC 투여한 후 이들의 약동학 및 약력학적 매개변수의 측정.

[1157] 상이한 2개의 클론 (클론 번호 28; 클론 번호 61)로부터 기인된 MOD-5014 산물이 함유된 2개의 독립적인 실험 (05010 & 05034)에서 약동학 매개변수의 비교.

[1158] 실험 방법

[1159] 동물들

[1160] 24마리 수컷 SD 쥐는 주사하기 전 적어도 4일전에 Harlan Laboratories Israel, Ltd로부터 받았다. 상기 동물들은 연구 시작 시점에 ~200gr 체중을 가진 건강한 젊은 쥐들이다. 치료 개시 시점에서 동물들의 체중 변화는 각 성별의 평균 체중의 ±20%를 초과하지 않아야 한다. 본 연구에 이용된 동물들의 건강 상태는 동물의 도착시점에 검사된다. 양호한 건강상태의 동물들만 실험 조건에 순응시키고, 본 연구에 이용된다.

[1161] FVIIa - STACLOT VIIa-Rtf의 응고 분석

[1162] 본 분석에 이용된 상기 재조합 가용성 조직 인자(rsTF)는 FVIIa 응고 테스트를 구축하기 위하여 상기 FVIIa 특이성을 이용한다. FVIIa, 칼슘 및 인지질 존재하에 rsTF는 FVII가 FVIIa로 활성화없이, 혈장을 응결시킨다.

[1163] 본 시스템에서 관찰된 응고 시간은 시료 안에 FVII 존재로 인한 간섭없이 테스트된 시료 안에 FVIIa 함량과 역 상관관계를 갖는다.

[1164] 각 연구에 앞서 재구성된 후 NovoSeven®와 MOD-5014 모두에 대한 FVIIa 활성이 평가되었다. FVIIa 특이 활성은 A280에 근거하여 산출되었다. MW가 상이한 두 분자의 특이 활성을 비교할 때, 상기 활성을 표준화시키기 위하여 (가령, 분자량 차그렇게 함으로써 1 mg의 NovoSeven®에서 활성 부위 수는 MOD-5014에 있는 수의 1.185배 더 높다) 보정이 있어야만 한다.

[1165] PK 솔버 소프트웨어

[1166] 상기 약동학 매개변수는 PK 솔버(solver) 소프트웨어를 이용하여 산출되었다. 상기 IV 투여 곡선은 2개의 구별 CA 볼루스로 분석되고, 그리고 상기 SC 투여는 NCA 맥관외-로그 직선 사다리꼴 분석에 의해 분석되었다. 반감기, AUC, 제거 및 용적 분포 상세가 산출되었고, 산출 매개변수는 실험 군간에 비교에서 연구되었다.

[1167] 실험 재료들

[1168] 실험 번호 05010:

[1169] A. NovoSeven® RT: (Lot # AU61553, 12년 7월 31일*제조) A280에 따른 FVIIa 농도 : 0.86 mg/ml. FVIIa Staclot 활성 분석: 56,867 U/mg. 주사된 투여분량: 946 μ g/kg. NovoSeven® 분획량의 모듈*, 모두 동일한 로트 (Lot) 번호에서 취함.

[1170] B. 클론 28: MOD-5014 RS12-001: A280에 따른 0.77 mg/ml**. FVIIa Staclot 활성 분석: 34,162 U/mg. 주사된 투여분량: 850 μ g FVIIa/kg.

[1171] 실험 번호 05034:

[1172] A. NovoSeven® RT: (Lot #AU61347, 13년 1월 1일 제조) A280에 따른 FVIIa 농도: 0.82mg/ml, 살균 NS 완충액에 의해 0.4 mg/ml로 희석. FVIIa Staclot 활성 분석: 55,688 U/mg. 주사된 투여분량: 360 μ g/kg 및 20,047.7 U/kg.

[1173] B. 클론 61: MOD-5014 배치 75: A280에 따른 1.9 mg/ml**, 조제물 완충액에 의해 0.89 mg/ml로 희석. 주사된 투여분량: 20,047.7 U/kg. FVIIa 응고 활성: FVIIa Staclot 활성 분석에 따르면 25,002* U/mg.

[1174] C. 클론 61: MOD-5014 배치 81A: A280에 따르면 2.36 mg/ml(연구 당일 아침 여과 그리고 280nm에서 채측정), 조제물 완충액에 의해 0.4 mg/ml로 희석. 주사된 투여분량: 360 μ g FVIIa/kg. FVIIa 응고 활성: FVIIa Staclot 활성 분석에 따르면 24943U/mg.

[1175] D. 클론 61: MOD-5014 배치 81A: A280에 따르면 2.36 mg/ml, 조제물 완충액에 의해 0.89 mg/ml로 희석. 주사된 투여분량: 20,047.7 U/kg. FVIIa 응고 활성: FVIIa Staclot 활성 분석에 따르면 24,943U/mg.

연구 개요

[1176] 실험 번호 05010

[1178] MOD-5014 및 NovoSeven®는 SD 쥐에게 0.9mg/kg 체중의 투여분량으로 단일 경맥 또는 피하 주사에 의해 투여되었다. 투여 후 0.5, 4, 8, 12, 24, 34, 48 및 58시간 시점에서 3마리 마우스에서 교대로 동(sinus)-안와 눈으로부터 혈액 시료를 빼내었다. 표본추출 후 즉시 구연산염 혈장 (0.32%)이 준비되었고, 분석까지 -20°C에 보관되었다. 상기 연구는 "Science in Action", Nes-Ziona에서 시행되었다. FVIIa 응고 활성 농도가 평가되었고, 상세한 PK 분석이 시행되었다. 상기 연구는 Proktor-Biotech에서 시행되었다.

[1179] 표 55: 연구 기획안 05010

치료된 집단	테스트 물질	집단당 동물의 수	한 집단당 동물 수/ 시점	투여 경로	성별	투여 분량 수준 (μ g/kg)	주사된 용적(μ l)	시점 (투여 후 시간)
A	rFVIIa (Novo Seven ®)	6	3	IV	M	946	220	0, 0.5, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58
B	rFVIIa RS12-001 (클론 28)	6	3	IV	M	850	220	0, 0.5, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58
C	rFVIIa (Novo Seven ®)	6	3	SC	M	946	220	0, 0.5, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58
D	rFVIIa RS12-001 (클론 28)	6	3	SC	M	850	220	0, 0.5, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58

[1180]

실험 번호 05034

[1182] MOD-5014 및 NovoSeven®는 SD 쥐에게 0.9mg/kg 체중의 투여분량으로 단일 피하 주사에 의해 투여되었다. 투여 후 0.5, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48 및 72시간 시점에서 3마리 마우스에서 교대로 동-안와 눈으로부터 혈액 시료를 빼내었다. 표본추출 후 즉시 구연산염 혈장 (0.32%)이 준비되었고, 분석까지 -20°C에 보관되었다. 상기 연구는 "Science in Action", Nes-Ziona에서 시행되었다.

[1183] FVIIa 응고 활성 농도가 평가되었고, 상세한 PK 분석이 시행되었다. 상기 연구는 Proktor-Biotech에서 시행되었다.

[1184] 표 56. 연구 기획안 05034

테스트 ·집단	테스트 물질	한 집단당 동물 수/ 시점 ***	투여 경로	성별	동물당 투여 분량수 준 ($\mu\text{g/kg}$)	동물당 투여분 량 수준 (U/kg)	주사된 용적(μl)	시점 (투여 후 시간)
A	FVIIa (NovoSeven®)	3	SC	M	360	20047. 7	207	0, 0.5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48, 72
B	FVIIa 75 (클론 61)	3	SC	M	801.8 4	20047. 7	207	0, 0.5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48, 72
C	FVIIa 81A (클론 61)	3	SC	M	360	8979.4 8	207	0, 0.5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48, 72
D	FVIIa 81A (클론 61)	3	SC	M	803.7 4	20047. 7	207	0, 0.5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 34, 48, 72

[1185]

결과

[1186] 혈액 시료 안에 FVIIa 활성은 STACLOT VIIa-rTF 키트(Stago)를 이용하여 정량화되었다. 각 단백질에 대한 약동학 프로파일이 산출되었고, 각 시점에서 3마리 동물의 평균이다.

[1187]

실험 번호 05010

[1188]

배경 감소 후: 15 mU/ml.

[1189]

도 35는 NovoSeven® 또는 MOD-5014의 IV 및 SC 투여 후 FVIIa의 상기 PK 프로파일을 제시한다. 표 57에서는 각 시점에 대한 FVIIa 활성 값이 요약되어 있다. IV 및 SC 투여는 상이한 PK 패턴을 갖는다(도 35 참고; 배경 감소 후: 15 mU/ml). IV 주사 후 Cmax는 SC 주사 이후 획득된 것보다 더 높은데, 그 이유는 혈액에 투여 직후 상기 약물이 존재하기 때문이다(표 57 및 표 58에서 0.5hr에 측정됨). 그러나, SC 투여 후 약물 분자들은 세포 내 매트릭스 및 조직으로 전달되고, 따라서 Cmax는 주사 후 24시간 후에만 측정될 수 있다. SC 투여 후 약물의 총 회수는 IV 주사 후 Cmax 값보다 더 낮다.

[1190]

주사 후 8시간 시점에서, IV 또는 SC 주사되었을 때, NovoSeven®는 대등한 PK 패턴을 나타내었다(배경 감소 후: 15mU/ml, 도 35). 더욱이, NovoSeven® 치료된 마우스의 경우 응고 활성은 12 시간 이후 시점에서는 탐지불 가능하였고, 반면 MOD-5014 치료된 마우스는 투약 후 58시간 대에서 여전히 측정가능한 활성이 지속되었다(표 57; 배경 감소 후: 15 mU/ml; 도 35).

[1192]

표 57. IV 또는 SC 투여 후 MOD-5014 대(vs.) NovoSeven®의 FVIIa 응고 활성

시간 (hr)	NovoSeven® IV (A)		MOD-5014 IV (B)		NovoSeven® SC (C)		MOD-5014 SC (D)	
	mU/ml	%CV	mU/ml	%C V	mU/ml	%C V	mU/ml	%C V
0.5	304651.7	18.7	232818.3	5.0	11491.7	2.4	3691.7	19.0
4	40068.3	7.8	62085.0	9.5	21385.0	22.6	12018. 3	15.8
8	5276.7	2.5	25931.7	6.1	5525.0	32.5	6445.0	2.2
12	255.0	13.8	5633.3	9.3	297.7	41.4	924.7	24.1
24	1.3	7.1	251.3	11.8	1.3	89.2	249.3	60.3
34	0.0		78.3	4.5	0.0		63.7	85.5
48			29.0	9.9	0.0		35.0	47.2
58			10.3	4.6	0.0		13.7	33.5

[1193]

배경 감소 후: 15 mU/ml

[1195]

표 58. IV 또는 SC 투여 후 MOD-5014 대(vs.) NovoSeven®의 PK 매개변수**A. IV**

PK 매개변수	NovoSeven® RT (A)	MOD-5014 (RS 12-001) (B)
반감기- α (0.5-4hr)	0.24	1.04
반감기- β (4-58hr)	1.31	3.17
AUC 0-inf mU/ml*h	702467.95	820778.67
Vss [U/Kg/(mU/ml)]	0.13	0.13
CL [(U/Kg)/(mU/ml)/h]	0.08	0.04
MRT (hr)	1.74	3.62

B. SC

PK 매개변수	NovoSeven® RT (B)	MOD-5014 (RS 12-001) (C)
반감기(hr)	1.40	7.78
Cmax (mU/ml)	21385.00	12018.33
AUC 0-inf (mU/ml*h)	115099.72	84158.87
MRT 0-inf (hr)	4.32	7.04
Vz/F (U/Kg)/(mU/ml)	0.95	3.88
Cl/F (U/Kg)/(mU/ml)/h	0.47	0.35

[1196]

실험 번호 05034

[1198]

도 36은 NovoSeven® 또는 MOD-5017의 SC 투여 후 FVIIa의 상기 PK 프로파일을 나타낸다. 클론 번호 61의 2가지 상이한 배치 (#75 및 #81)가 동일한 농도 또는 동일한 활성 유닛에서 NovoSeven®와 비교 검사되었다. 각 시점에서 FVIIa 활성 값의 요약은 표 59에 제시된다.

[1199]

상기 결과는 기존 실험에 대응하는 SC 투여 후 유사한 PK 패턴을 나타낸다. 더욱이 상기 NovoSeven® 치료된 마우스의 응고 활성은 12시간 이후 시점에서 탐지불가하였고, 반면 MOD-5014 치료된 마우스는 투약후 24시간 시점에서 측정가능한 활성이 지속되었다(표 59 및 도 36; 그리고 배경 감소: 56 mU/ml (8, 12 hr) 또는 32 mU/ml (0.5, 2, 6, 14 hr)).

[1200]

비록 모두 동일한 유익 활성으로 주사되었지만, 클론 번호 61 배치 #81 (D) Cmax (1,301mU/ml)는 클론 번호 61 배치 #75 (B)와 NovoSeven® (A) (차례로 3,521mU/ml와 5,908mU/ml)의 Cmax 값보다 더 낮았다(표 60). 그러나, 배치 #75 (B) 와 #81 (D)는 주사후 8시간 시점에서 측정되었을 때 동일한 활성 유닛을 보유한다(차례로 559 mU/ml 및 478 mU/ml)(도 36과 표 59; 배경 감소 후: 56 mU/ml (8, 12 hr) 또는 32 mU/ml (0.5, 2, 6, 14 hr)).

[1201]

표 59: 단일 SC 투여 후 MOD-5014(클론 61 #75, #81) 대(vs.) NovoSeven®의 FVIIa 응고 활성

시간 (hr)	NovoSeven® (A)		MOD-5014 클론61 배치 75 (B) - 동일한 U/kg		MOD-5014 클론61 배치 81A (C) - 동일한 농도 FVIIa μg/kg		MOD-5014 클론61 배치 81A (D) - 동일한 U/kg	
	mU/ml	%CV	mU/ml	%CV	mU/ml	%CV	mU/ml	%C V
0.5	3271.3	46.5	350.3	26.6	101.3	24.1	208.7	51.2
2	5908.0	18.1	3521.3	70.9	1294.7	7.0	1301.3	31.6
6	1411.7	23.6	1349.7	45.6	425.3	27.6	663.0	13.4
8	1029.0	12.4	559.3	52.7	152.7	19.5	478.0	25.4
12	121.3	9.9	563.0	17.4	148.7	36.3	712.7	16.2
24	1.0	25.0	117.0	41.9	21.3	36.4	99.0	36.7

[1202]

배경 감소 후: 56mU/ml (8, 12hr) 또는 32mU/ml (0.5, 2, 6, 14hr).

[1203]

표 60. 단일 SC 투여 후 MOD-5014(클론 61 #75, #81) 대(vs.) NovoSeven®의 PK 매개변수

PK 매개변수	NovoSeven® RT (A)	MOD-5014 클론61 배치 75 (B)- 동일한 U/kg	MOD-5014 클론61 배치 81A (C)- 동일한 농도 FVIIa μg/kg	MOD-5014 클론61 배치 81A (D)- 동일한 U/kg
반감기(hr)	1.67	5.70	4.62	6.41
Cmax (mU/ml)	5908.00	3521.33	1294.67	1301.33
AUC 0-inf (mU/ml*h)	24688.18	20456.96	6260.23	13098.16
MRT 0-inf (hr)	3.73	7.86	6.40	10.59
Vz/F (U/Kg)/(mU/m l)	1.96	8.06	9.55	14.15
C1/F (U/Kg)/(mU/m l)/h	0.81	0.98	1.43	1.53

[1204]

본 보고서는 두 가지 PK 연구를 요약한다; 05010 & 05034. 단백질 반감기와 피하 투여시 제거에 있어서 FVII에 CTP 융합의 영향에 관한 특이적 의견을 제공하고, 상기 변형 후 이의 특이 활성의 폐러다임을 해결하는 것이 우리의 목표다. 이들 연구에 있어서, SD 쥐에게 2가지 클론, 그리고 2가지 상이한 배치에서 유래된 MOD-5014를 단일 SC 주사에 의해 투여하고, 재조합 시판 FVIIa(NovoSeven®)와 비교한다. 상기 성분들은 유사한 FVIIa 농도 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) 또는 동일한 활성 농도 (U/Kg)에서 주사되었으며, 상기 PK 활성 기반 분석이 시행되었다.

[1205]

첫 번째 연구의 주요 목적은 IV 및 SC 투여 후 상이한 PK 매개변수를 실증하는 것이었다. 상기 연구에 기초하여, 우리는 IV 또는 SC 투여 이후 측정된 PK 패턴에 차이가 있다는 결론을 내릴 수 있었다. MOD-5014 SC 주사 후 $t^{\frac{1}{2}}$ 은 7.78hr로 측정되었지만, IV 주사 후에는 겨우 4.2hr이었다. AUC 값은 동일하였다(표 58).

[1206]

그러나, 두 번째 연구는 MOD-5014 클론 번호 61의 두 배치간에 차이에 중점을 두었는데, 이들은 동일한 FVIIa 농도 또는 대등한 활성 유닛으로 주사되고, NovoSeven®와 비교되었다. 본 연구에서 클론 61 배치 #75는 배치 #81보다 더 나은 PK 매개변수를 나타낸다는 것을 보여주었다. 동일한 유닛 활성 농도으로 주사된 배치 #81은 알 수 없는 이유로 더 낮은 Cmax를 갖는다. 더욱이, 클론 61 배치 #81이 상이한 2가지 투여분량(FVIIa 농도 또는 유닛 활성)으로 주사될 경우 두 활성 값 사이에 2.5배 차이가 나는 대신 동일한 Cmax가 측정되었다. 이 두 연구를 함께 분석한 후, 클론 28은 SC 주사 이후 클론 61 #75(더 나은 배치)보다 더 연장된 $t^{\frac{1}{2}}$ 매개변수를 나타낸다는 결론을 내릴 수 있다(차례로 7.78hr 및 5.7hr, 표 60). 상이한 시점 시료는 상이한 PK 패턴을 만들고, 이는 상기 PK 곡선에서 변화로 이어진다는 결론을 또한 내릴 수 있다. 상기 곡선의 패턴은 우리에게 혈액내 약물의 거동에 대해 더 많은 것을 교시할 수 있다. 따라서, 우리는 Baxter에 의해 탐지된 것과 유사한 시점(0, 0.5, 2,

6, 8, 12, 24, 34, 48, 72hr)를 결정하기로 하였다. 더욱이, 05010 실험에서 FVIIa 농도는 너무 높았고, 다음의 SC 실험(05034)에서 수정되었다. 앞으로의 PK 연구를 위하여, 투여분량으로 360 μ g FVIIa/kg에서 상기 성분들을 주사하기로 결정하였다.

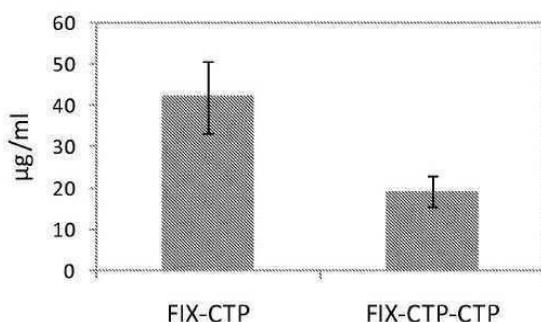
[1209] 이들 모두를 고려하였을 때, 우리는 최고 품질의 클론 및 배치를 결정하고, FVIIa 농도 또는 활성 유닛에 의해 MOD-5014 주사량에 대한 최고의 방법을 결정하기 위하여 SC 투여 후 MOD-5014에 대해 더 많이 배워갈 수 있다.

[1210] 본 발명의 일부 특징들이 설명되었지만, 본 명세서에서 설명된 것과 같이, 많은 변형, 치환, 변화 및 이에 대등한 것들은 당업계 숙련자들에게 일어날 수 있다. 따라서, 첨부된 청구항은 본 발명의 진정한 사상 안에 속하는 이러한 모든 변형 및 변화를 포용하는 것으로 의도됨을 인지해야 한다.

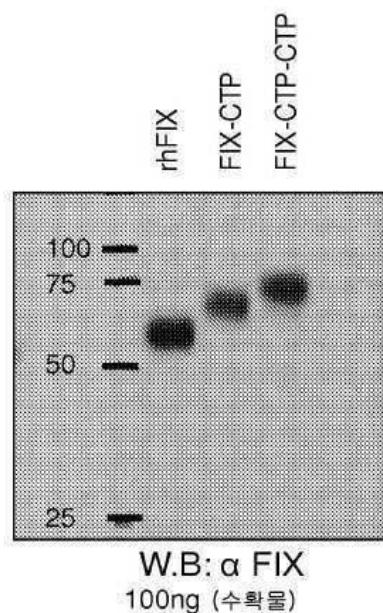
도면

도면1

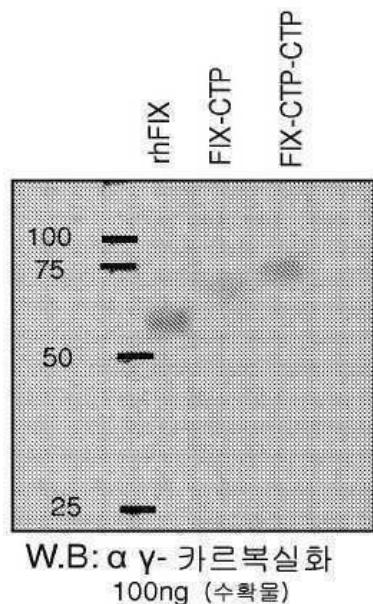
인자 IX Ag 수준-ELISA (수확물)



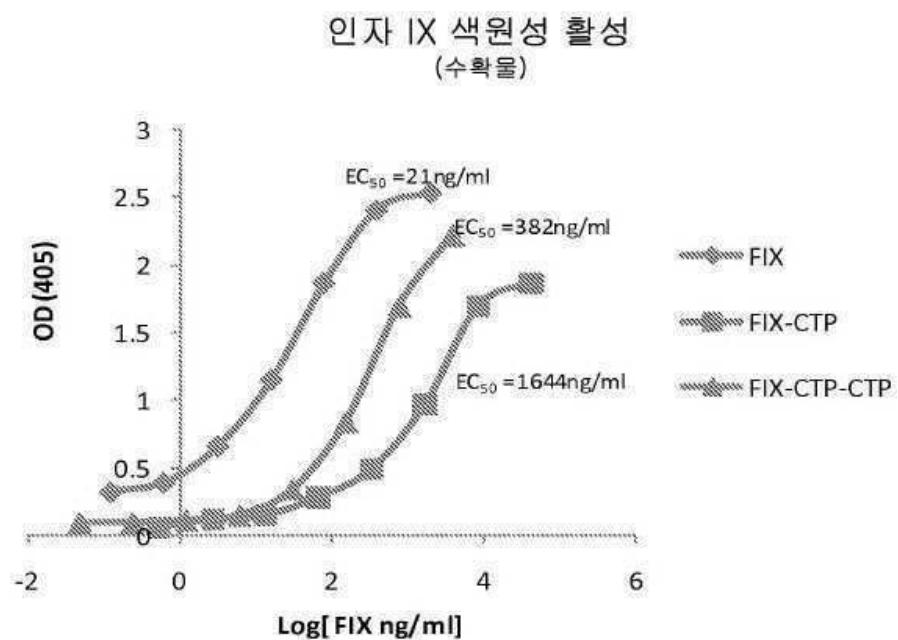
도면1b



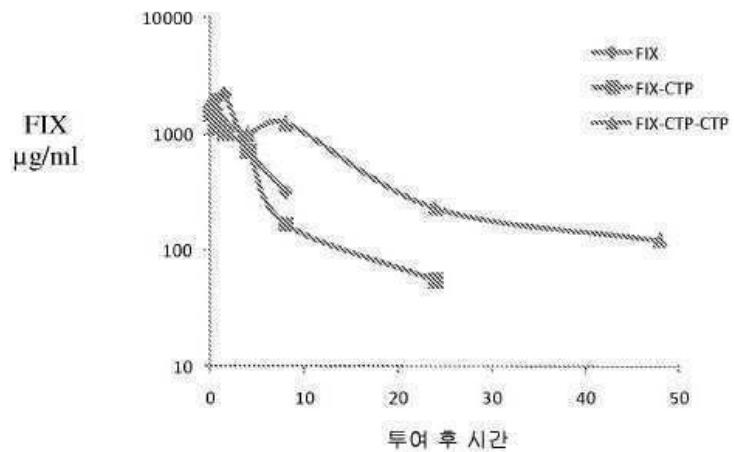
도면1c



도면2

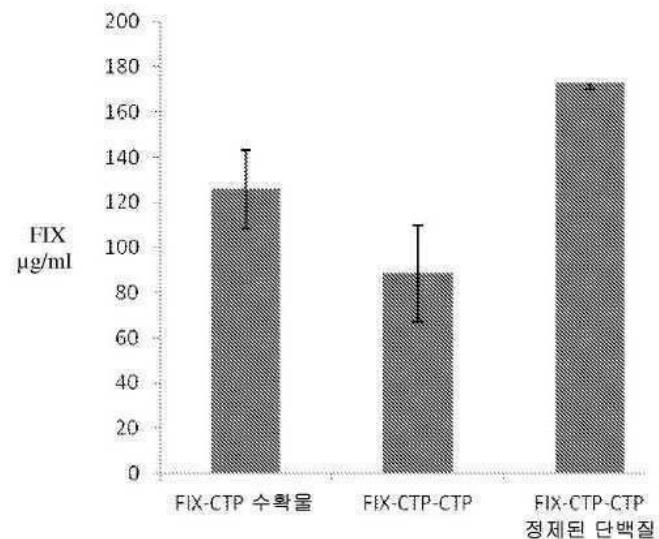


도면3

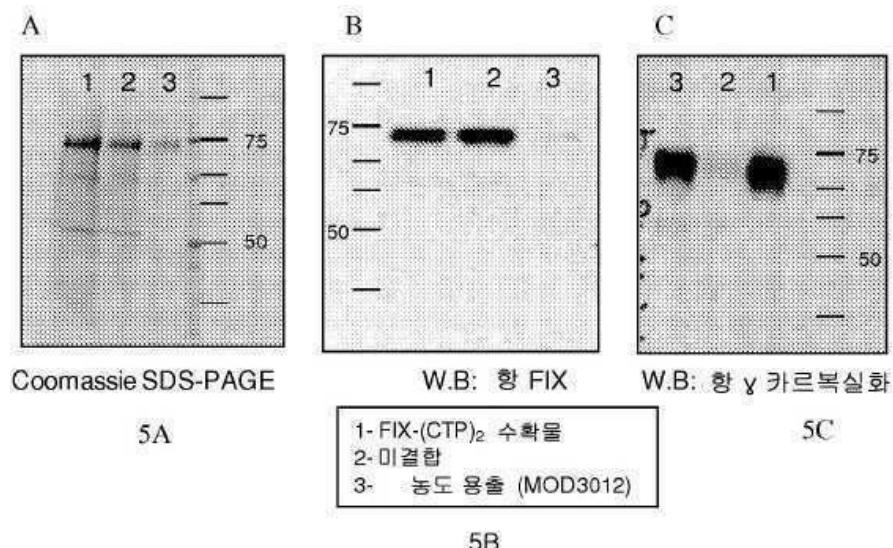
재조합 FIX-PK 프로파일

도면4

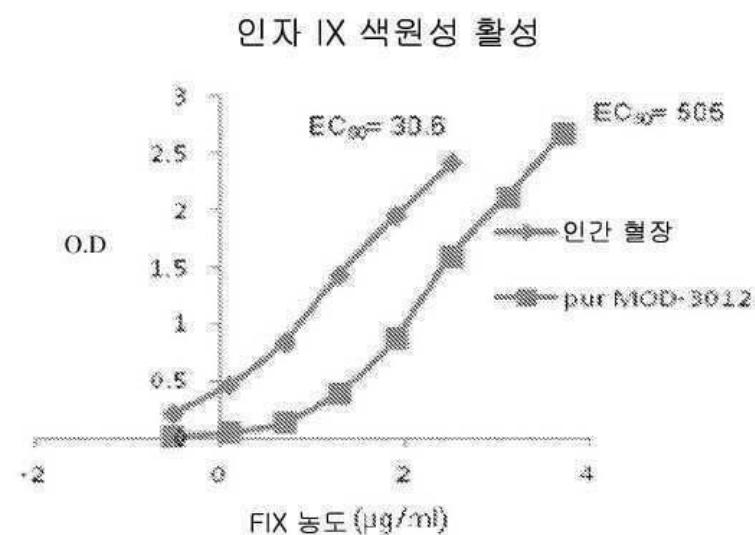
FIX 항원 수준



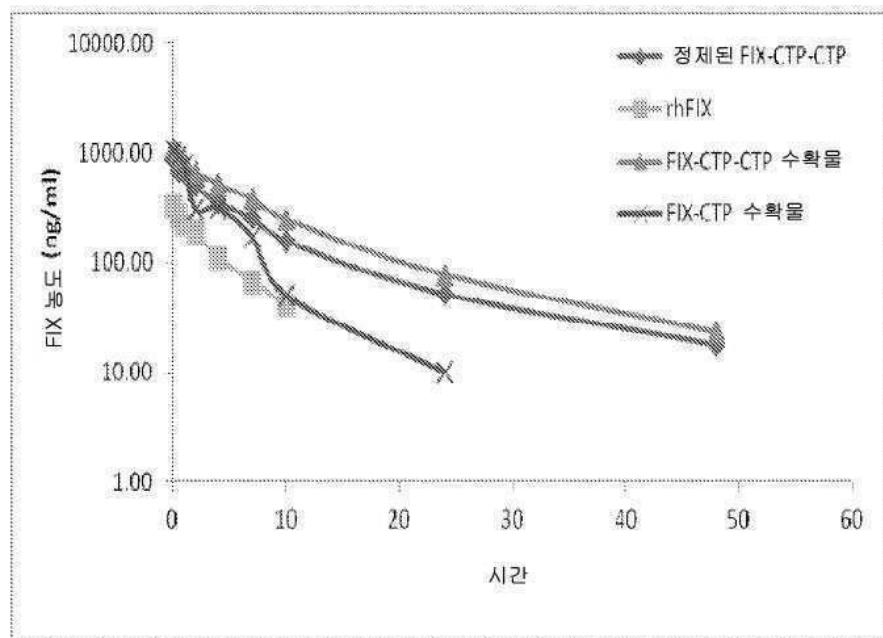
도면5a



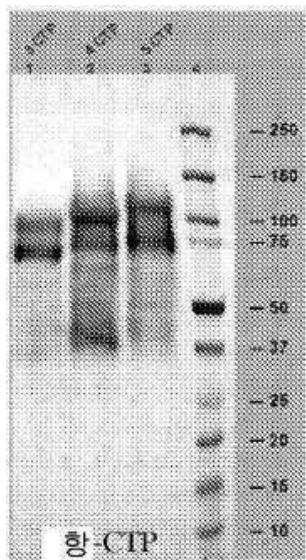
도면6



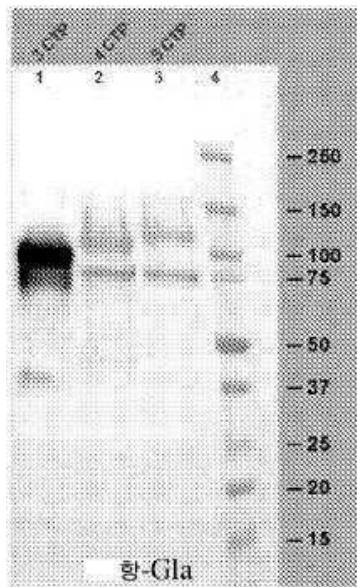
도면7



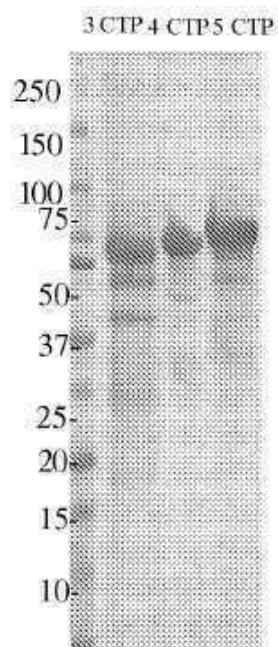
도면8a



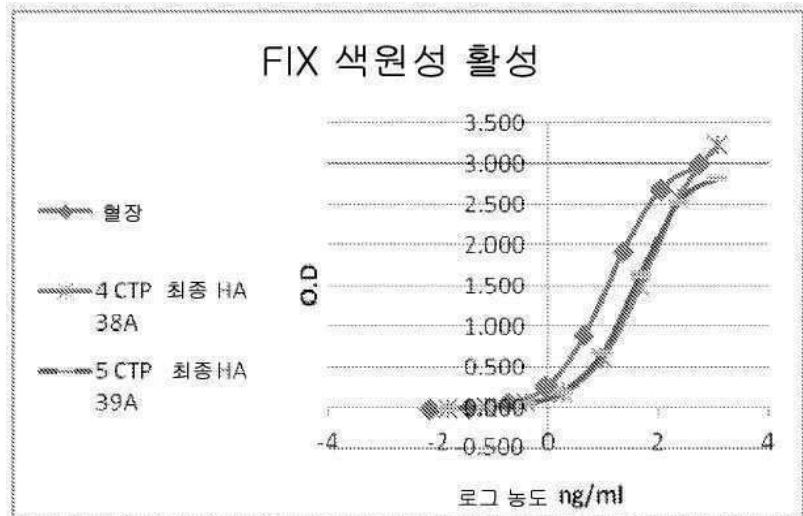
도면8b



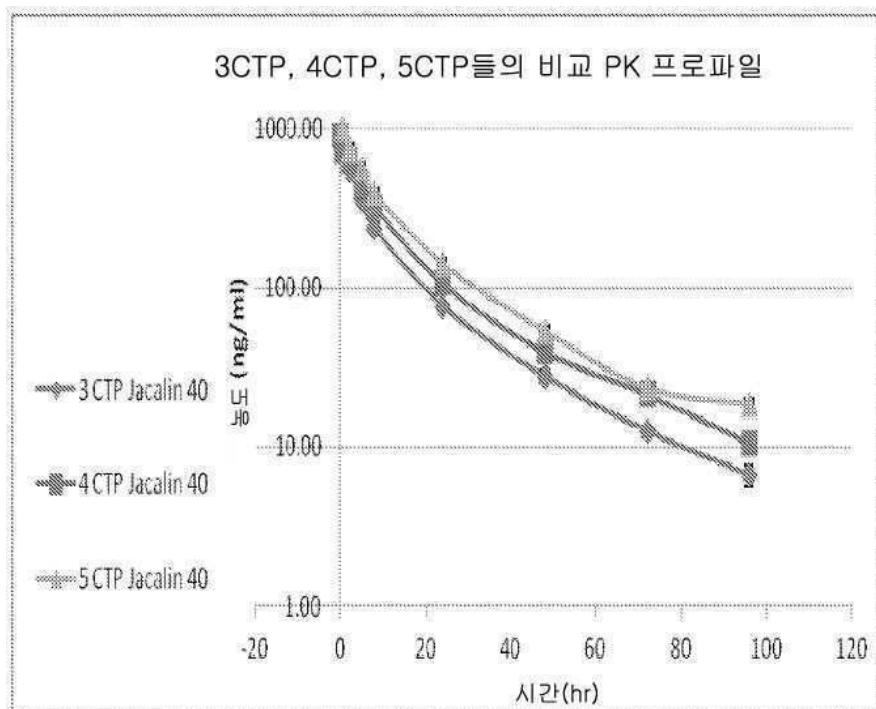
도면9



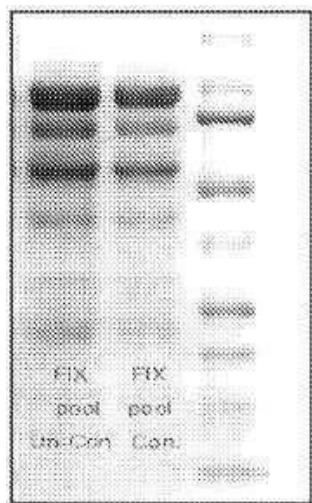
도면10



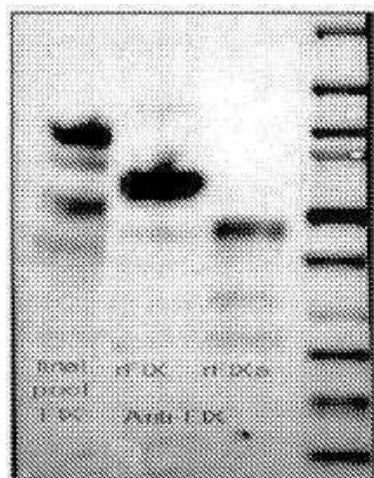
도면11



도면 12a



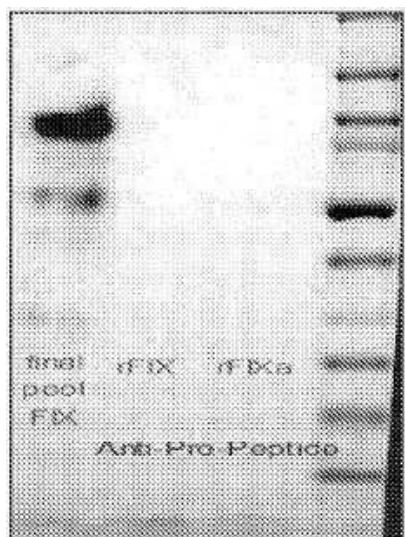
도면 12b



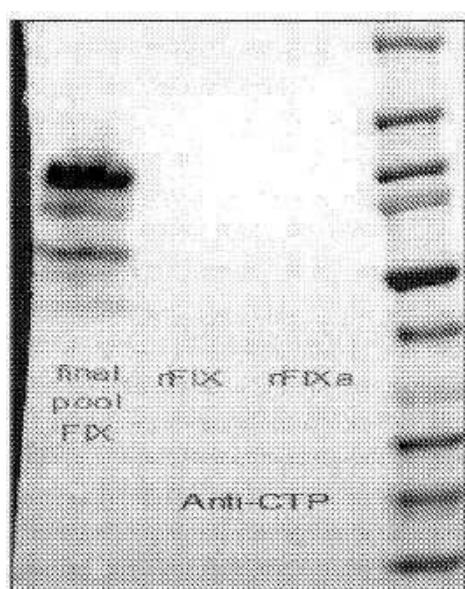
도면 12c



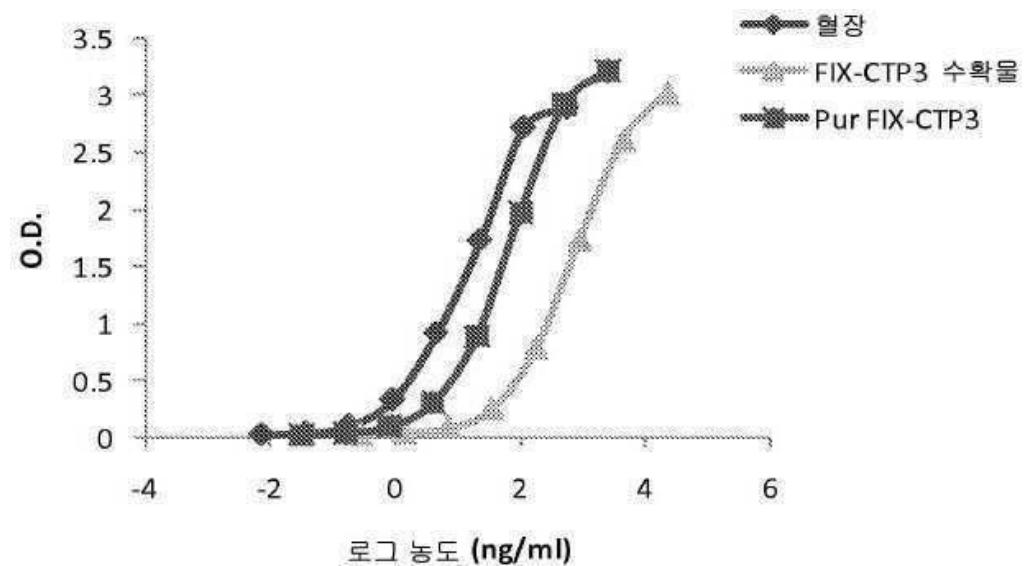
도면 12d



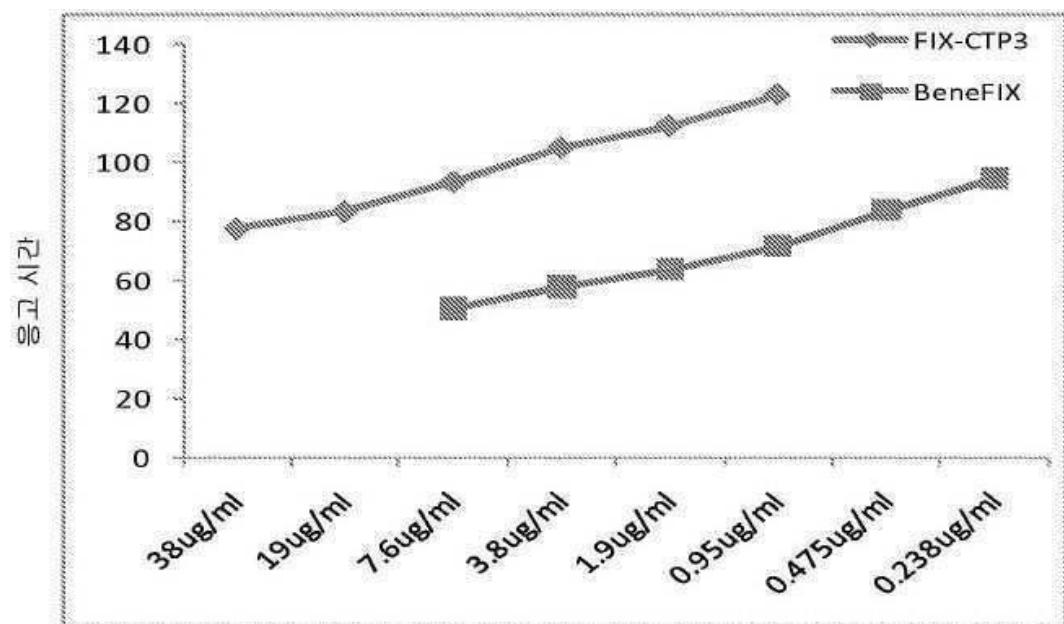
도면 12e



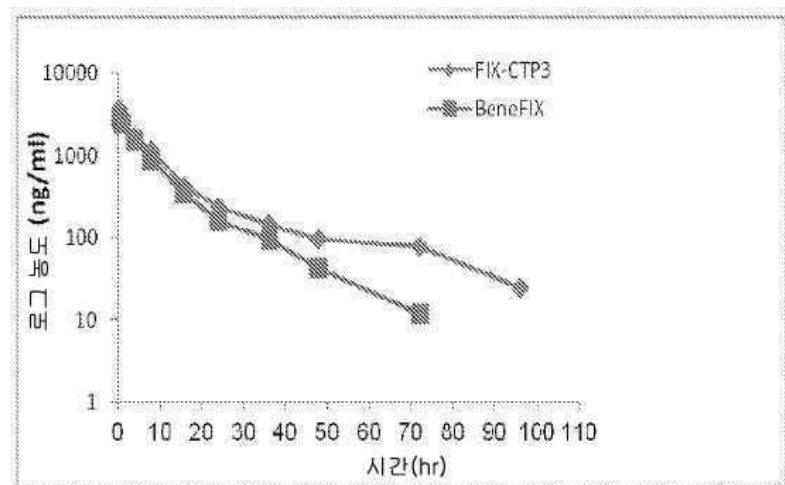
도면13



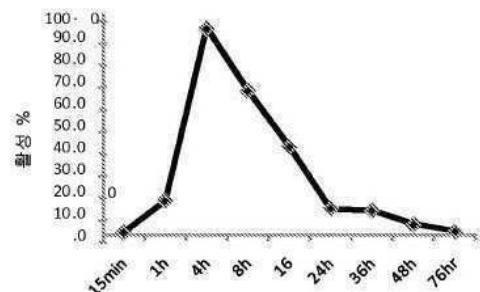
도면14



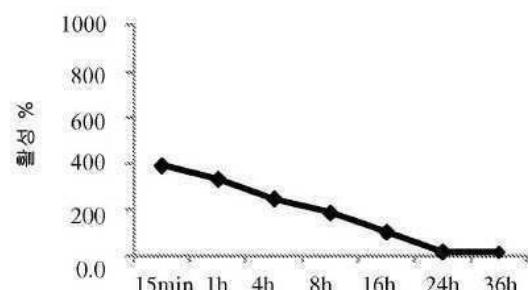
도면15



도면16a



도면16b

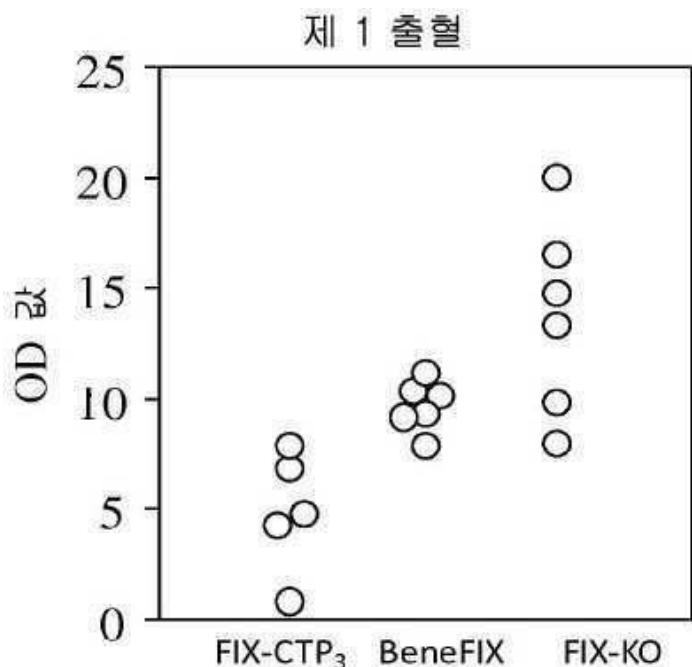


도면17a

제 1 출혈 도전:
헤모글로빈 OD 값

	FIX-CTP ₃	BeneFIX	FIXKO
#1	6.84	10.26	19.92
#2	0.72	10.14	13.32
#3	4.68	11.16	16.38
#4	NA	9.18	7.92
#5	7.86	7.77	9.72
#6	4.14	9.15	14.7

도면17b

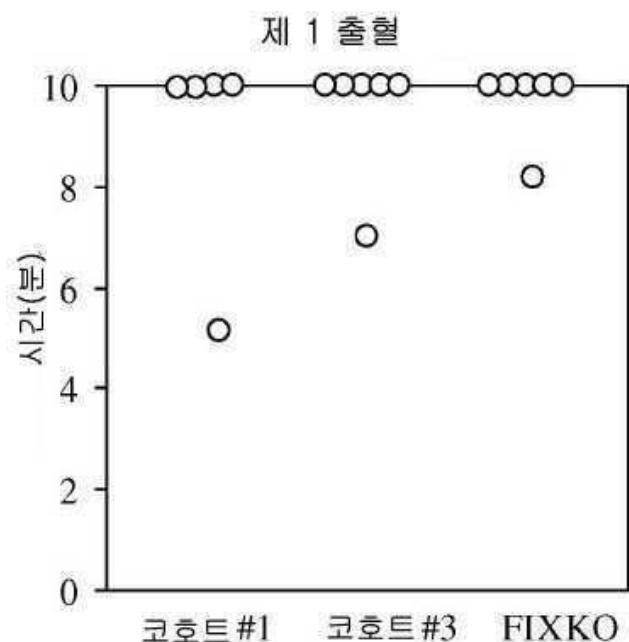


도면17c

제 1 출혈 시간(분)

	코호트 #1	코호트 #3	FIXKO
#1	10	10	10
#2	5.12	10	8.17
#3	10	10	10
#4		10	10
#5	10	7	10
#6	10	10	10

도면17d

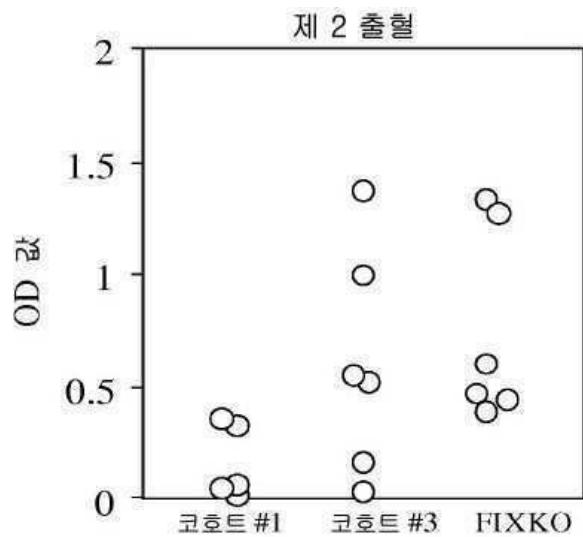


도면18a

제 2 출혈: OD 값

	FIX-CTP ₃	BeneFIX	FIXKO
#1	0.324	1.368	1.32
#2	0.358	0.516	0.43
#3	0.006	0.548	0.6
#4		0.027	1.26
#5	0.064	0.158	0.46
#6	0.045	0.992	0.384

도면 18b

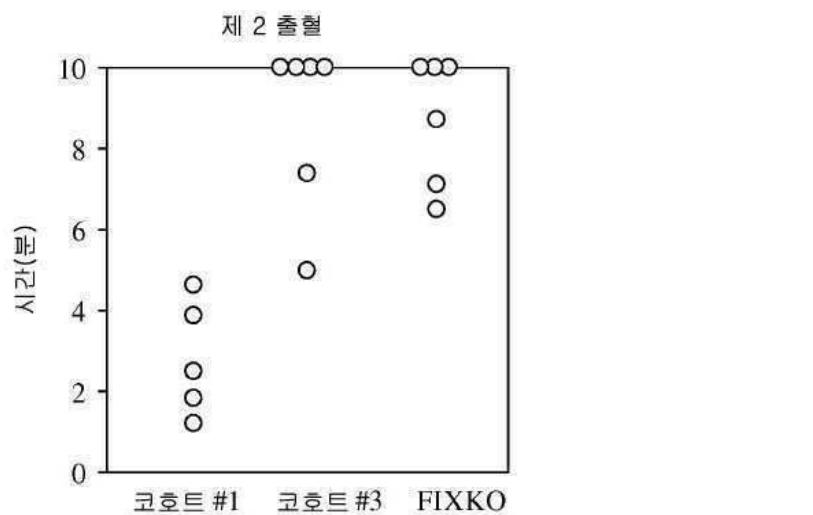


도면 18c

제 2 출혈 시간(분)

	코호트 #1	코호트 #3	FIXKO
#1	4.63	10	10
#2	2.5	10	8.7
#3	1.2	10	7.13
#4		5	10
#5	3.87	7.4	10
#6	1.83	10	6.5

도면 18d



도면19a

FVII-CTP

도면19b

FVII-CTP-CTP



도면19c

FIX-CTP



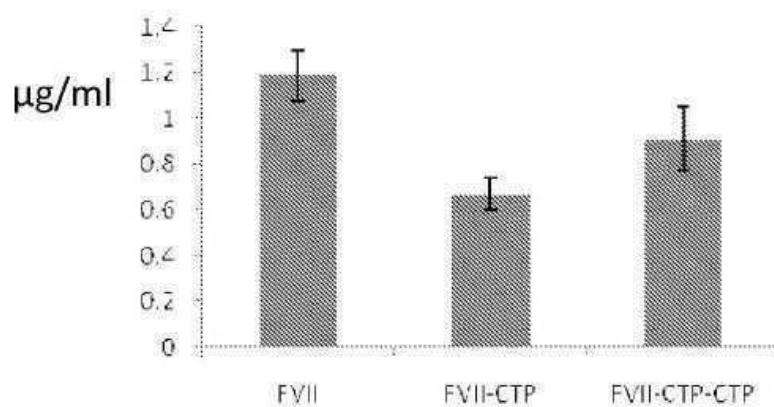
도면19d

FIX-CTP-CTP



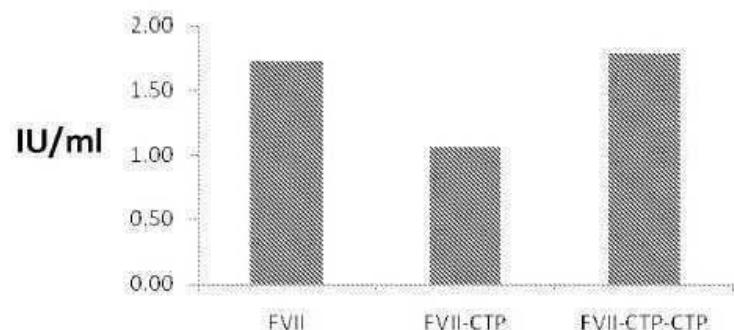
도면20a

r FVII 항원 수준

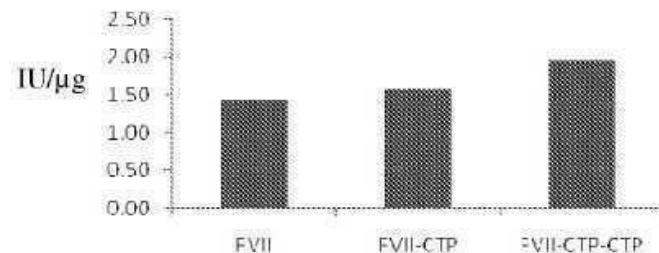


도면20b

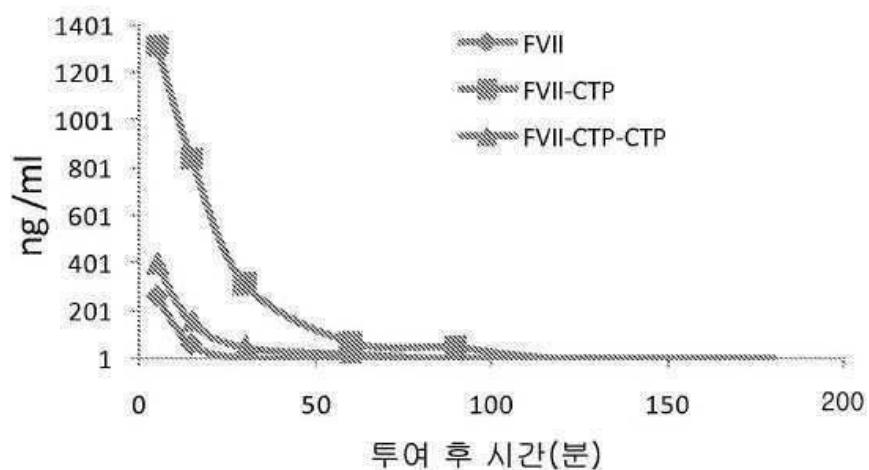
r FVII 색원성 활성



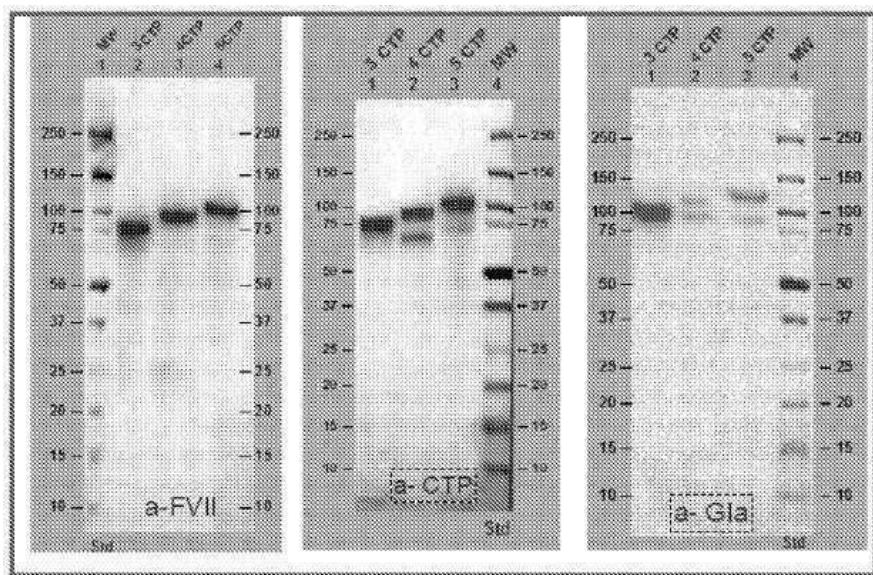
도면20c

FVII 특이 활성

도면20d

FVII PK 프로파일

도면21a

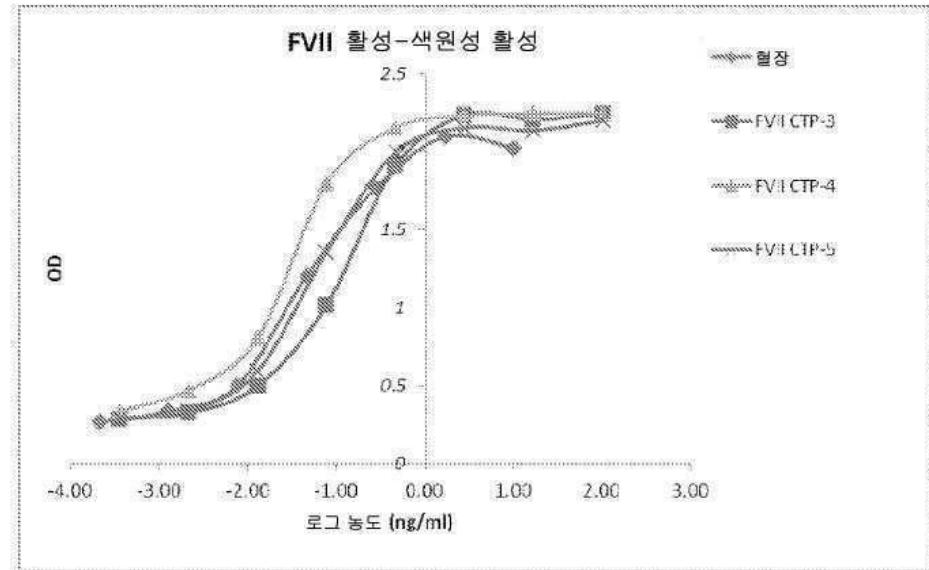


21A

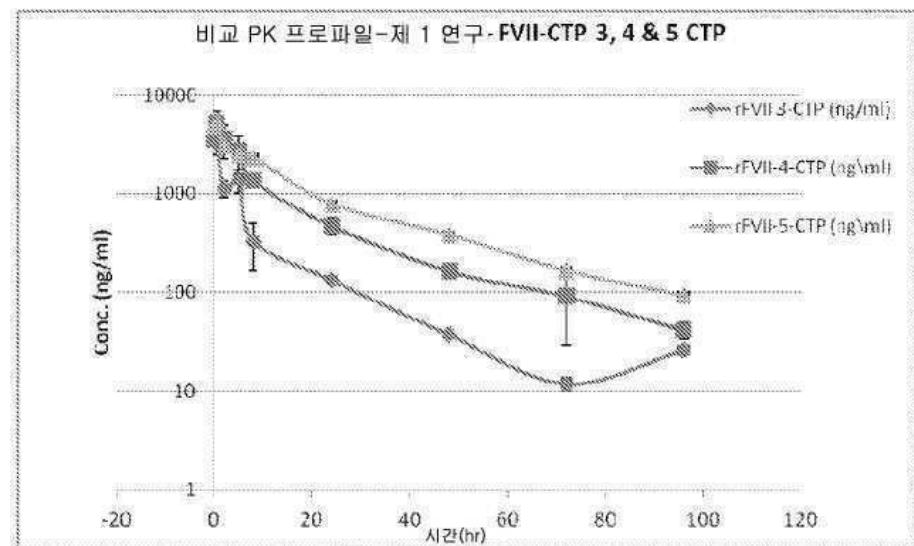
FIGURE 21B

21C

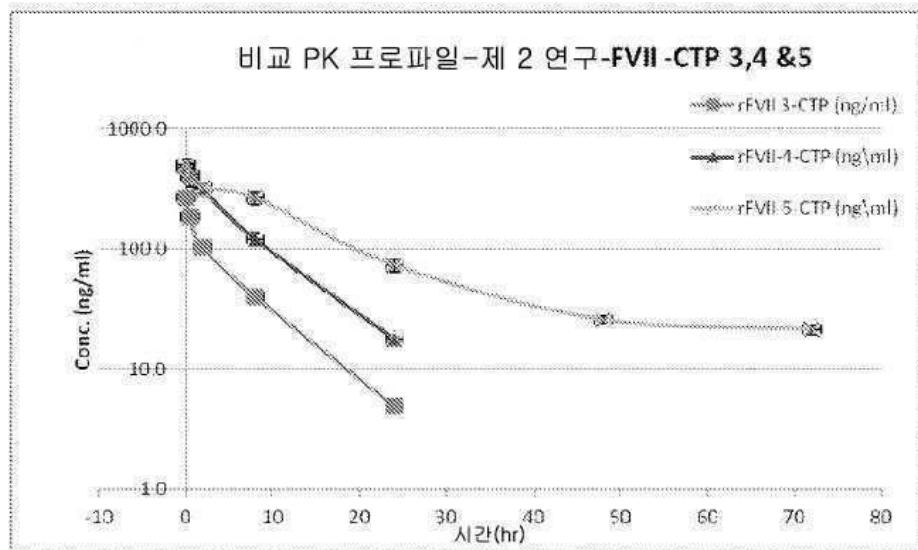
도면22



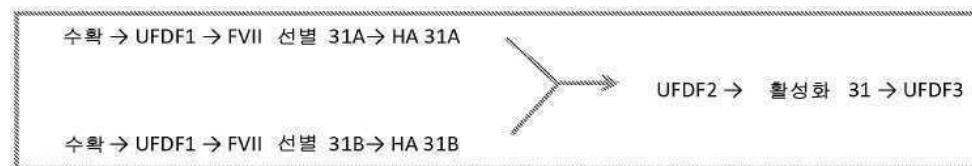
도면23



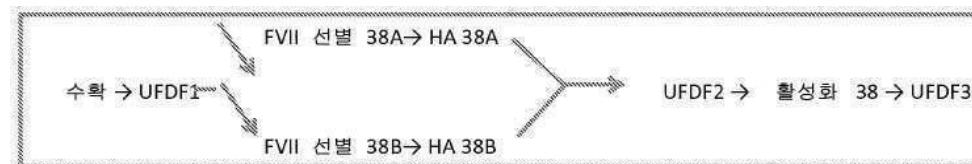
도면24



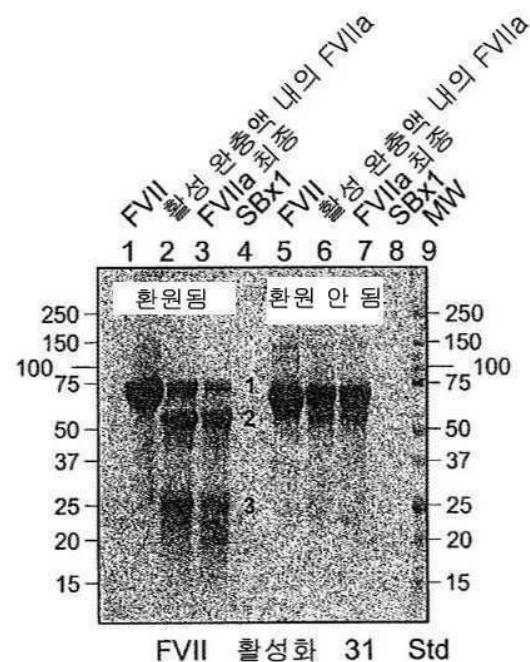
도면25a



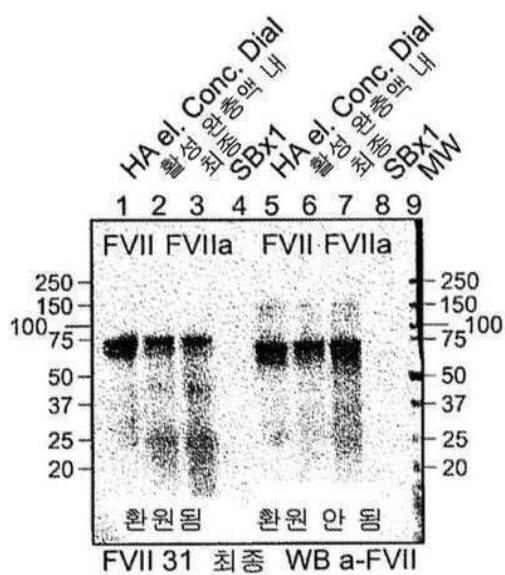
도면25b



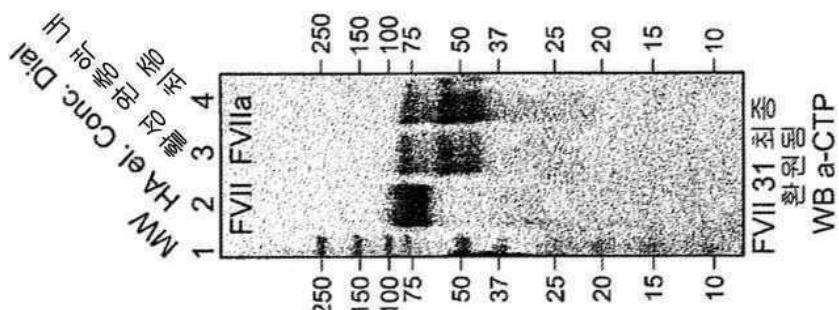
도면26a



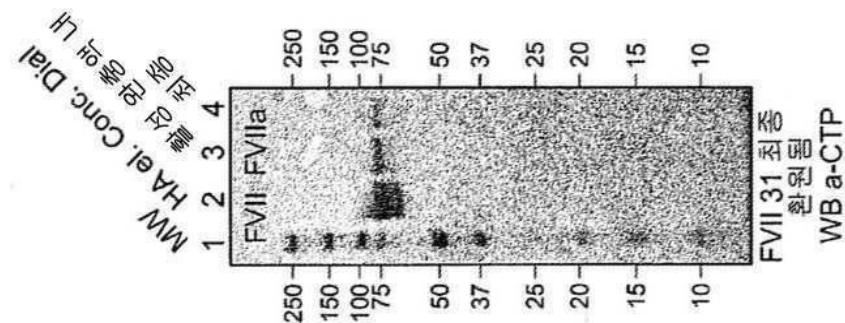
도면26b



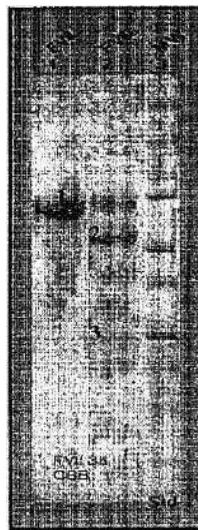
도면26c



도면26d



도면26e



도면26f



도면26g

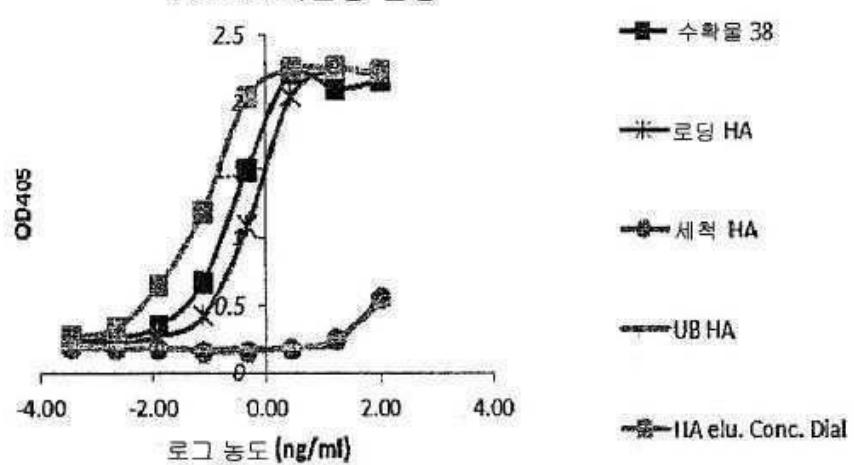


도면26h

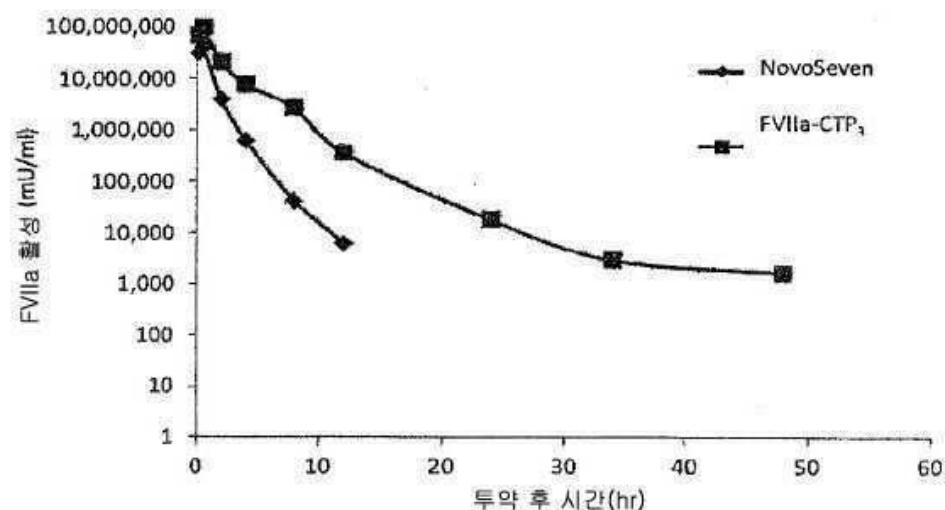


도면27

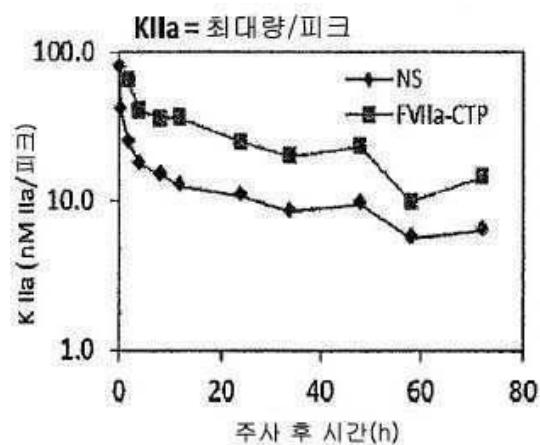
FVII 38 색원성 활성



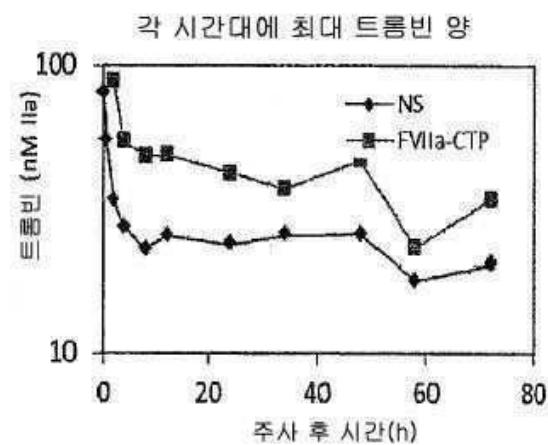
도면28



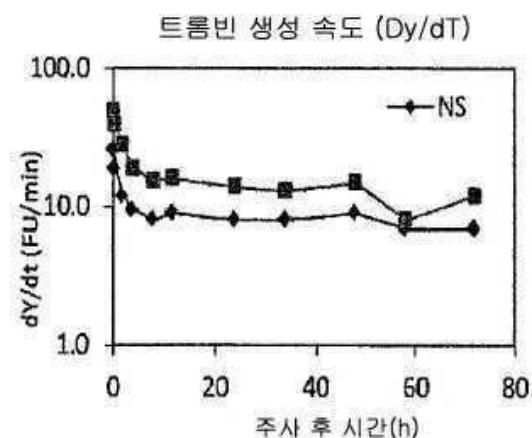
도면29a



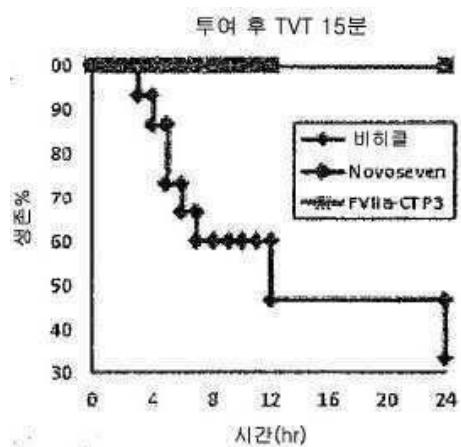
도면29b



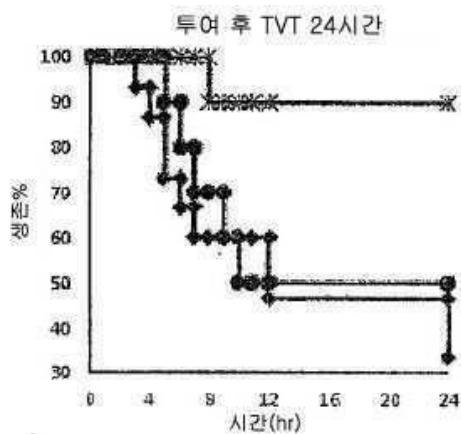
도면29c



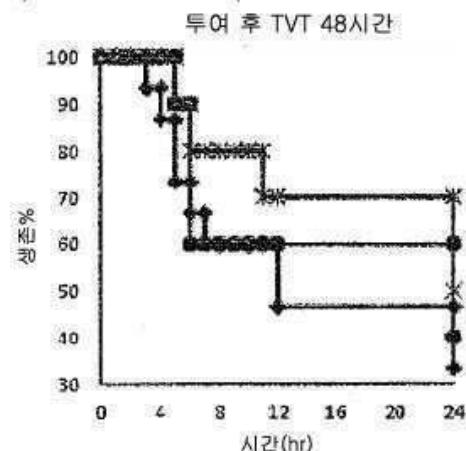
도면30a



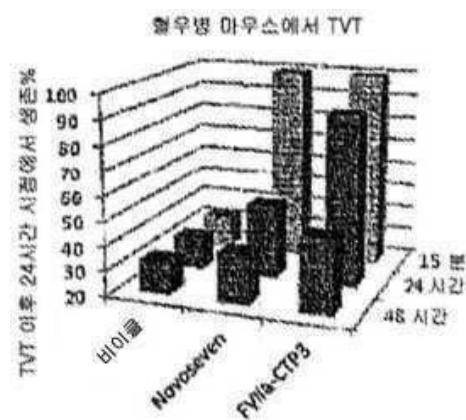
도면30b



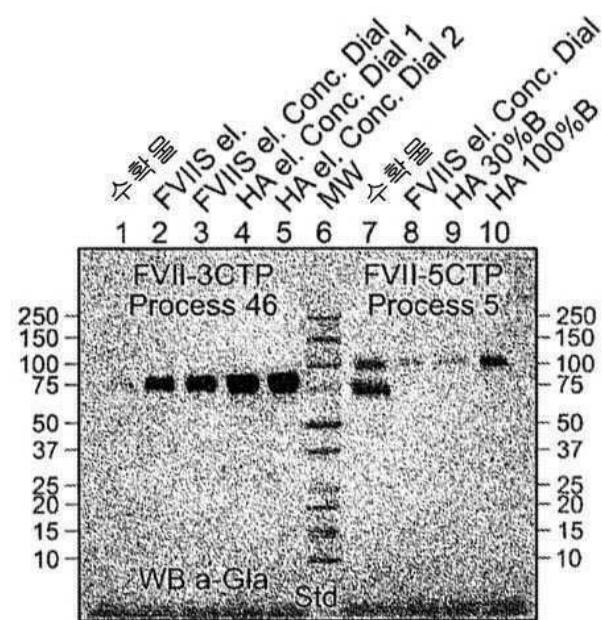
도면30c



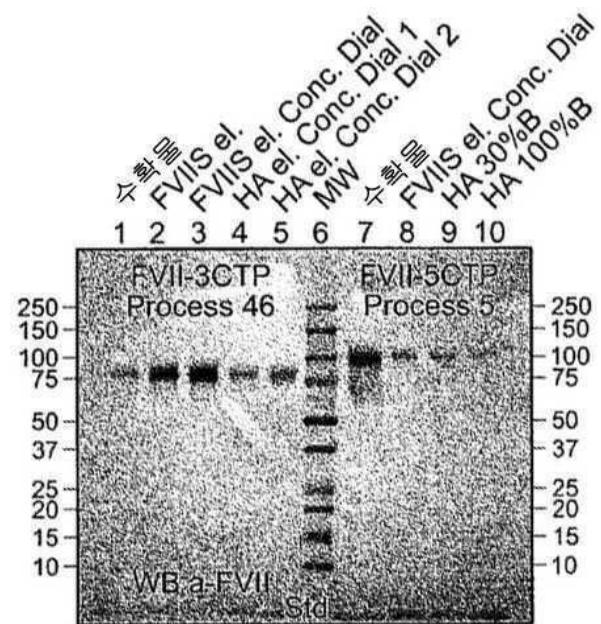
도면30d



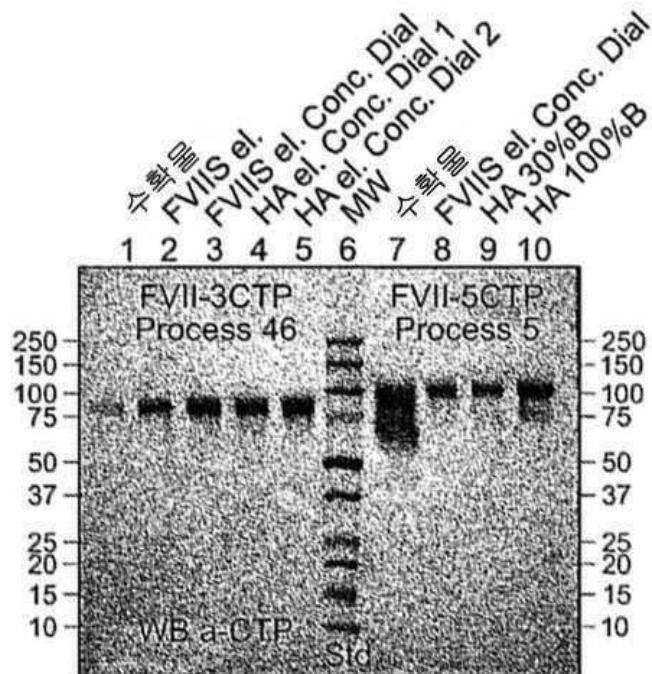
도면31a



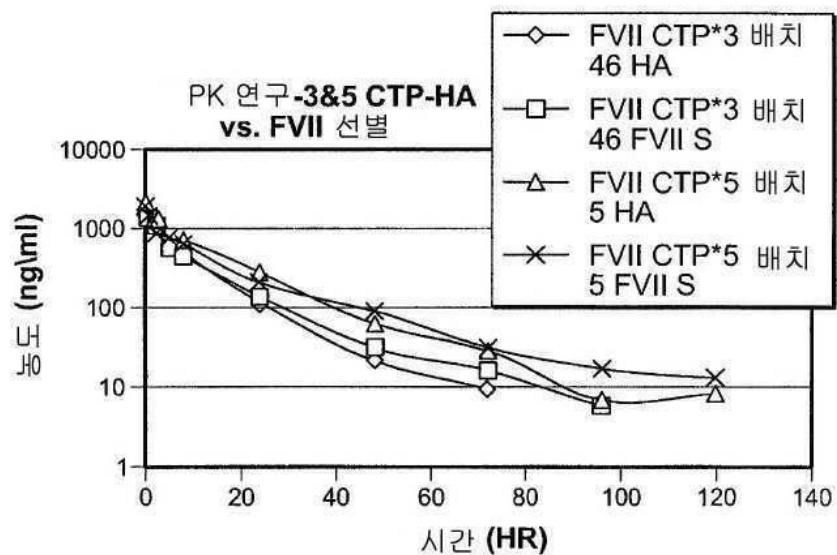
도면31b



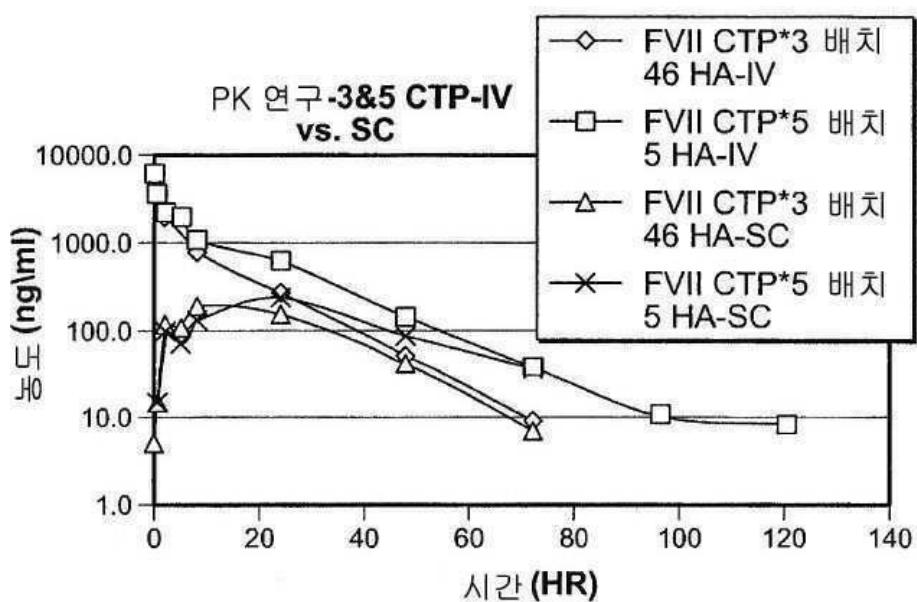
도면31c



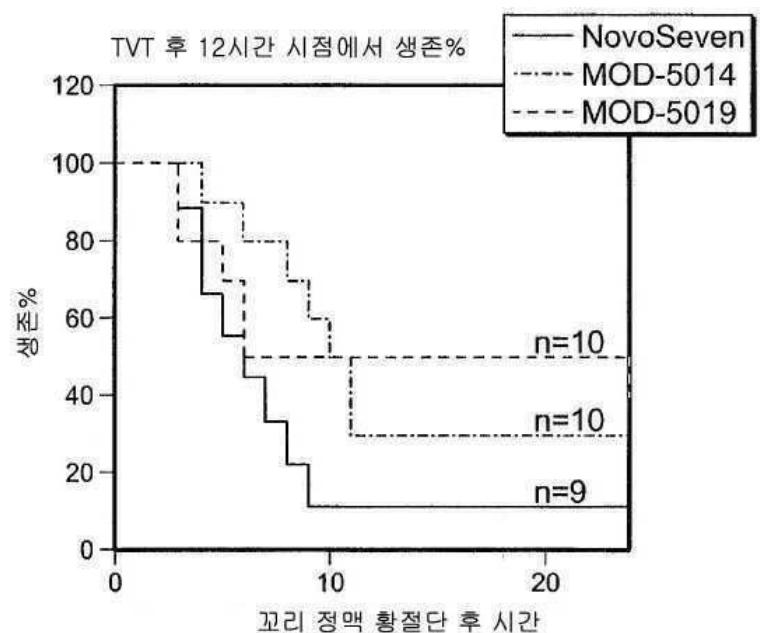
도면32



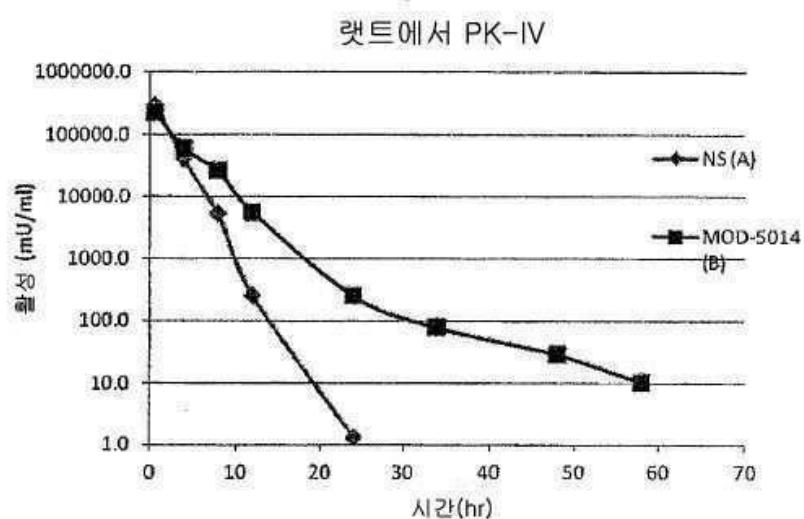
도면33



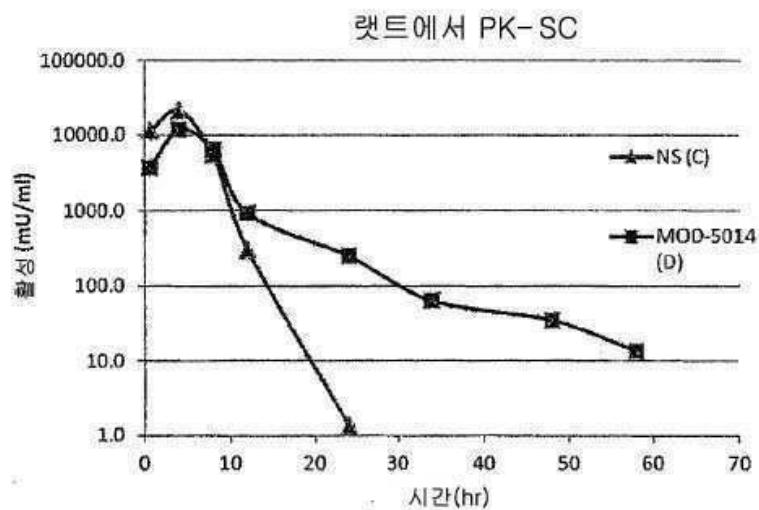
도면34



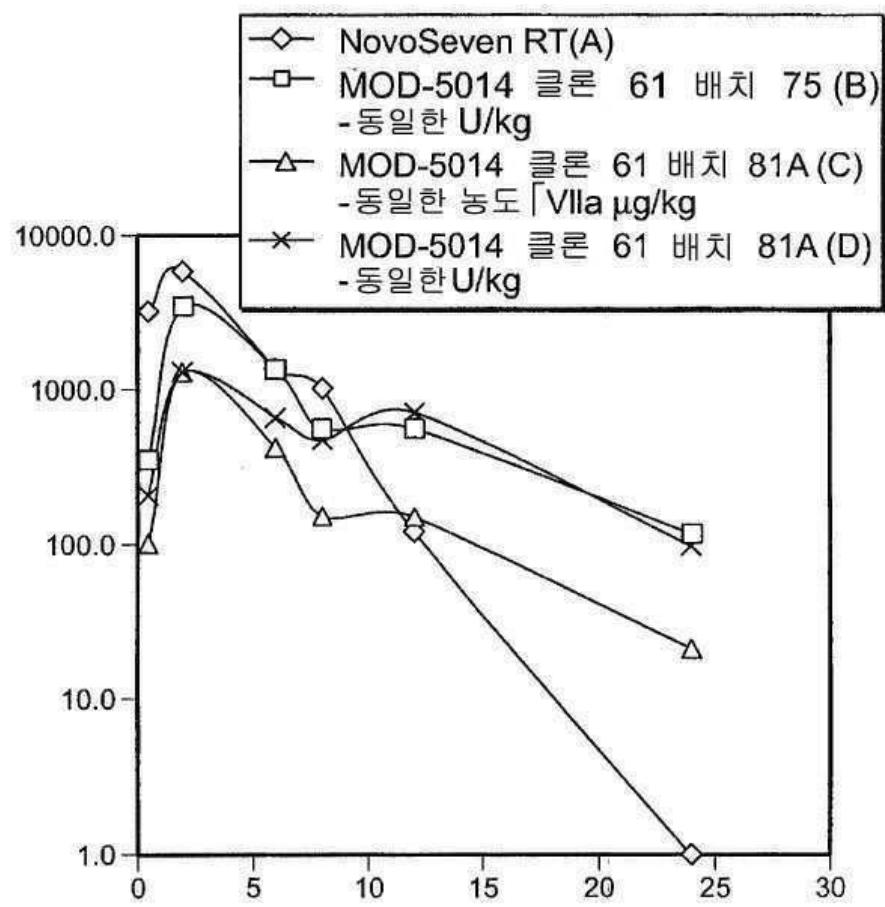
도면35a



도면35b



도면36



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> PROLOR BIOTECH INC.

FIMA, UDI EYAL

HART, GILI

<120> LONG-ACTING COAGULATION FACTORS AND METHODS OF PRODUCING SAME

<130> P-9520-PC5

<150> 13/372,540

<151> 2012-02-14

<160> 45

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser

1 5 10 15

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu

20 25 30

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg

1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

20 25

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro

1 5 10

<210> 4

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg

1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

20 25

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer for Factor VII

<400> 5

ctcgaggaca tggctccca ggccc 25

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer for Factor VII

<400> 6

tctagaatag gtatttcc acat 24

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer for Factor VII

<400> 7

tctagaaaaa agaaatgcc a 22

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer for Factor VII

<400> 8

gcggccgcat cctcaggaa atggggctcg ca 32

<210> 9

<211> 444

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Gly Leu Gln

1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val

20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro

35 40 45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu

50 55 60

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile

65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly

85 90 95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro

100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile

115 120 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr

130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala

145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile

165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val

180	185	190
Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu		
195	200	205
Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile		
210	215	220
Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg		
225	230	235
Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly		
245	250	255
Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr		
260	265	270
Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln		
275	280	285
Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg		
290	295	300
Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser		
305	310	315
Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met		
325	330	335
Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser		
340	345	350
Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala		
355	360	365
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly		
370	375	380
Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val		
385	390	395
Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr		
405	410	415
Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu		
420	425	430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro

435 440

<210> 10

<211> 448

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Gly Leu Gln

1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val

20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro

35 40 45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu

50 55 60

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile

65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly

85 90 95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro

100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile

115 120 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr

130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala

145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile

165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val

180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
 195 200 205
 Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
 210 215 220
 Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
 225 230 235 240

 Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly
 245 250 255
 Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
 260 265 270
 Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
 275 280 285
 Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
 290 295 300

 Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
 305 310 315 320
 Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
 325 330 335
 Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
 340 345 350
 Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
 355 360 365

 Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
 370 375 380
 Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
 385 390 395 400
 Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
 405 410 415
 Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
 420 425 430

 Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Gly Cys Gly Arg

435	440	445	
<210> 11			
<211> 1356			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 11			
ctcgaggaca tggctccca ggcctcagg ctccctgcc ttctgcttgg gcttcaggc			60
tgcctggctg cagtcttgcgt aaccaggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg			120
cgcgccaacg cttccctgga ggagctgcgg ccggctccc tggagaggga gtgcaaggag			180
gaggcgtgtc cttcgagga gccccggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg			240
ttctggattt ctacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgccaa gaatggggc			300
tcctgcaagg accagctcca gtcctataatc tgcttctgcc tccctgcctt cgaggcgccgg			360
aactgtgaga cgacacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag			420
cagtagtgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct			480
ctgctggcag acgggggtgtc ctgcacaccc acagttaat atccatgtgg aaaaatacct			540
attctagaaa aaagaaatgc cagcaaaccc caaggccaa ttgtgggggg caaggtgtgc			600
cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttgtga atggagctca gtttgtgtggg			660
gggaccctga tcaacaccat ctgggtggc tccgcccccc actgttgcgaa caaaatcaag			720
aactggagga acctgtatgcg ggtgctggc gagcacgacc tcagcgagca cgacgggat			780
gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatac atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc			840
aaccacgaca tcgcgtgtc ccgcctgcac cagccgtgg tcctactga ccatgtggtg			900
ccccctgtcc tggccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt ggccttcata			960
ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggccca cggccctggaa gctcatggc			1020
ctcaacgtgc cccggctgtat gaccaggac tgcctgcagc agtacggaa ggtggagac			1080
tccccaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc			1140
tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccaactacc gggcacgtg gtacctgacg			1200
ggcatgtca gctggggcca gggctgcga accgtggcc actttgggt gtacaccagg			1260
gtctccctgtt acatcgatgt gctgcaaaag ctcatgcgt cagagccacg cccaggatc			1320
ctcctgcgag cccatttcc ctgaggatgc ggccgc			1356
<210> 12			
<211> 1442			
<212> DNA			

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTP-modified Factor VII

<400> 12

ctcgaggaca tggtctccca ggccctcagg ctcccttgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60

tgcctggctg cagtctcgt aaccaggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg 120
cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag 180
gagcagtgtc cttcgagga ggcccgaggatcttcaagg acgcggagag gacgaagctg 240
ttctggattt cttagtgc tgccccaccatgtgcctcaa gtccatgcca gaatggggc 300
tcctgcagg accagctcca gtcctataatc tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg 360
aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag 420
cagtaactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480

ctgctggcag acgggtgtc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaataacct	540
atcttagaaa aaagaaatgc cagcaaaccc caaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc	600
cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggta atggagctca gttgtgtgg	660
gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcggccc actgttcga caaaaatcaag	720
aactggagga acctgtatcg cgtgtggc gagcacgacc tcagcgagca cgacgggat	780
gagcagagcc ggccgggtggc gcaggatcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc	840
aaccacgaca tcgcgtgtc ccgcgtgcac cagccgtgg tcctcactga ccatgtggtg	900

ccccctctgcc	tgcccgaaacg	gacgttctct	gagaggacgc	tggccttcgt	gcgcttctca	960
tttgtcagcg	gctggggcca	gctgtggac	cgtggcgcca	cggccctgga	gctcatggtc	1020
ctcaacgtgc	cccggtgtat	gaccaggac	tgcctgcagc	agtacggaa	ggtgggagac	1080
tccccaata	tcacggagta	catgttctgt	gccggctact	cgatggcag	caaggactcc	1140
tgcaaggggg	acagtggagg	cccacatgcc	acccactacc	ggggcacgtg	gtacctgacc	1200
ggcatcgtga	gctggggcca	gggctgcgcc	accgtgggcc	acttcggcgt	gtacaccagg	1260
gtgtcccaagt	acatcgagt	gctgcagaaa	ctgatgagaa	gcgagccag	acccggcgtg	1320

ctgctgagag ccccttccc cagcagcgc tccaaggccc ctccccctag cctgcccgac	1380
cctagcagac tgccctggcc cagcgacacc cccatctgc cccagtgagg atccgcggcc	1440
gc	1442

<210> 13

<211> 472

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTP-modified Factor VII

<400> 13

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Gly Leu Gln

1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val

20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro

35 40 45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu

50 55 60

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile

65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly

85 90 95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro

100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile

115 120 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr

130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala

145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile

165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val

180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu

195 200 205

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile

210 215 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
 225 230 235 240
 Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly
 245 250 255
 Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
 260 265 270
 Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
 275 280 285
 Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
 290 295 300
 Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
 305 310 315 320
 Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
 325 330 335
 Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
 340 345 350
 Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
 355 360 365
 Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
 370 375 380
 Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
 385 390 395 400
 Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
 405 410 415
 Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
 420 425 430
 Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser
 435 440 445
 Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro
 450 455 460
 Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

465

470

<210> 14

<211> 1535

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTP-modified Factor VII

<400> 14

ctcgaggaca tggctccca ggcctcagg ctccctgcc ttctgcttg gcttcaggc	60
tgccctggctg cagtttcgt aaccaggag gaagcccacg gcgtccgtca ccggcgccgg	120
cgcgcacaacg cgttccgtga ggagctgcgg ccgggtccc tggagaggaa gtgcaaggag	180
gagcagtgtc cttcgagga ggcggggag atcttaagg acgcggagag gacgaagctg	240
ttctggattt cttagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgccaa gaatggggc	300
tcctgcaagg accagctcca gtcctataatc tgcttcgtcc tccctgcctt cgaggcgccg	360
aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag	420
cagtagtgcgtcgtacacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct	480
ctgctggcag acgggggtgtc ctgcacaccc acagttaat atccatgtgg aaaaataacct	540
attcttagaaa aaagaaatgc cagcaaacc caaggccaa ttgtgggggg caaggtgtgc	600
cccaaaggaa agtgtccatg gcaggtccctg ttgtggta atggagctca gttgtgtggg	660
gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcggccc actgttcga caaaatcaag	720
aactggagga acctgtatcgc ggtgctggc gggcacgacc tcagcgagca cgacggggat	780
gagcagagcc ggccgggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc	840
aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagccgtgg tcctactga ccatgtggtg	900
ccccctcgcc tggccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggcctgtcgt ggccttcata	960
ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggccca cggccctgga gctcatggtc	1020
ctcaacgtgc cccggctgat gaccaggac tgcctgcagc agtcacggaa ggtggggagac	1080
tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc	1140
tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccaactacc gggcacgtg gtacctgacc	1200
ggcatcgta gctggggcca gggctgcgcc accgtggcc acttcggcgt gtacaccagg	1260
gtgtcccaagt acatcgagtgc gctgcagaaa ctgtatggaa gcgagccag accccggcgt	1320
ctgctgagag ccccttccc cagcagcgc tccaaaggccc ctcggccat cctggccagc	1380
ccttagcagac tgcctggcc ctccgacaca ccaatcctgc cacagagcag ctcctctaag	1440

gcccctc ctc catccctgcc atccccctcc cggctgccag gcccctctga caccctatc 1500
 ctgcctcagt gatgaaggc tggatccgcg gccgc 1535
 <210> 15
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> CTP-modified Factor VII

<400> 15
 Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Gly Leu Gln
 1 5 10 15
 Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
 20 25 30
 Leu His Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
 35 40 45
 Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
 50 55 60
 Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
 65 70 75 80
 Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
 85 90 95
 Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
 100 105 110
 Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile
 115 120 125
 Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr
 130 135 140
 Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
 145 150 155 160
 Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
 165 170 175
 Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val

180	185	190
Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu		
195	200	205
Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile		
210	215	220
Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg		
225	230	235
Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly		
245	250	255
Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr		
260	265	270
Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln		
275	280	285
Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg		
290	295	300
Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser		
305	310	315
320		
Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met		
325	330	335
Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser		
340	345	350
Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala		
355	360	365
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly		
370	375	380
Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val		
385	390	395
Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr		
405	410	415
Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu		
420	425	430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser Ser

435

440

445

Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro

450

455

460

Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro

465 470 475 480

Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro

485

490

495

Ile Leu Pro Gln

500

<210> 16

<211> 1404

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

gcgatcgcca tgcagcgcgt	gaacatgatc atggcagaat	caccaggcct catcaccatt	60
gccttttagg atatctactc	agtgctgaat gtacagttt	tcttgatcat gaaaacgcca	120
acaaaattct gaatcgccca	aagaggtaaa attcaggtaa	attggaagag ttttgtcaag	180
ggaaccttga gagagaatgt	atggaagaaa agttagtta	tgaagaagca cgagaagtt	240
ttgaaaacac taaaaca	actgaatttt ggaaggcgt	tgttgatgga gatcgtgt	300
agtccaatcc atgttaat	ggcggcagt	tttttatcc tatgaatgtt	360

ggtgtccctt tggatttcaa	ggaaagaact gtgaattaga	tgttaacatgt aacattaaga	420
atggcagatg cgagcagttt	tgtaaaaataa gtgcgtataa	caagggtgt tgctccgt	480
ctgagggata tcgacttgca	gaaaaccaga agtcctgtga	accagcagt ccattccat	540
gtggaagagt ttctgtttca	caaacttcta agtcacccg	tgctgagact gttttcctg	600
atgtggacta taaaattct	actgaagctg aaaccatttt	ggataacatc actcaaagca	660
cccaatcatt taatgacttc	actcgagttt	ttggggaga agatgccaaa ccaggtcaat	720
tccctggca gttgttttg	aatggtaaag ttgatgcatt	ctgtggaggc tctatcgta	780

atgaaaaatg gattgttaact	gctgcccact gtgttgaac	tgggttaaa attacagtt	840
tgcagggtga acataatatt	gaggagacag aacatacaga	gcaaaagcga aatgtgattc	900
gaattattcc tcaccacaac	tacaatgcag ctattaataa	gtacaaccat gacattgccc	960

ttctggaact ggacgaaccc ttagtgctaa acagctacgt tacacctatt tgcattgctg	1020
acaaggaata cacgaacatc ttctcaat ttggatctgg ctatgttaat ggctggggaa	1080
gagtttcca caaaggaga tcagcttag ttctccagta ctttagagtt ccacttgttgc	1140
accgagccac atgtttcgta tctacaaagt tcaccatcta taacaacatg ttctgtgtcg	1200

gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc catttactg	1260
aagtggagg gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg gggtaagag tgtcaatga	1320
aaggcaata tgaaatatat accaaggtat cccgtatgt caactggatt aaggaaaaaa	1380
caaagctcac ttgaacgcgg ccgc	1404

<210> 17

<211> 461

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr

1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu

20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn

35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys

50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn

65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln

85 90 95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile

100 105 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys

115 120 125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe

130 135 140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
 145 150 155 160
 Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
 165 170 175
 Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
 180 185 190
 Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
 195 200 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
 210 215 220
 Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
 225 230 235 240
 Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Ser Ile
 245 250 255
 Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
 260 265 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
 275 280 285
 His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
 290 295 300
 Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
 305 310 315 320
 Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
 325 330 335

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
 340 345 350
 Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
 355 360 365
 Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
 370 375 380
 Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val

405	410	415
-----	-----	-----

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly

420	425	430
-----	-----	-----

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser

435	440	445
-----	-----	-----

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr

450	455	460
-----	-----	-----

<210>

18

<211> 1502

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTP-modified Factor IX

<400> 18

gcgatcgcca tgcagcgcgt gaacatgatc atggcagaat caccaggcct catcaccatc	60
tgccttttag gatatctact cagtgcgtaa tgtacagttt ttcttgatca tgaaaacgcc	120
aacaaaattc tgaatcggcc aaagaggtat aattcaggta aattggaaga gtttgttcaa	180
ggAACCTTG agagagaatg tatgaaagaa aagtgtagtt ttgaagaagc acgagaagtt	240
tttggaaaaca ctgaaagaac aactgaattt tggaaggcgt atgttgatgg agatcagtgt	300
gagtccaaatc catgtttaaa tggcggcagt tgcaaggatg acattaattc ctatgaatgt	360

tgggtgcctt ttggatttga aggaaagaac tgtgaattag atgtaacatg taacattaag	420
aatggcagat gcgagcagtt ttgtaaaaat agtgcgtata acaagggtgtt tgcctcgt	480
actgaggat atcgacttgc agaaaaccag aagtctgtg aaccagcgt gccatttcca	540
tgtgaaagat ttctgtttc acaaacttct aagctcaccc gtgcgtgagac tggggcgtt	600
gatgtggact atgtaaattc tactgaagct gaaaccatggataacat cactcaaagc	660
acccaaatcat ttaatgactt cactcgagtt gttggggag aagatgcca accaggtcaa	720
ttcccttggc agttgtttt gaatggtaaa gttgtatgc tctgtggagg ctctatcg	780

aataaaaat ggattgtaac tgctgcccac tgggtttaa aattacagtt	840
gtcgcagggtg aacataatat tgaggagaca gaacatacag agaaaaagcg aatgtgatt	900
cgaatttttc ctaccacaa ctacaatgca gctattaata agtacaacca tgacattgcc	960

cttctggaac tggacgaacc cttagtgcta aacagctacg ttacacctat ttgcattgt	1020
gacaaggaaat acacgaacat ctcctcaaa ttggatctg gctatgttaag tggctgggaa	1080
agagtcttcc acaaaggag atcagctta gttctcagt accttagt tccacttgtt	1140
gaccgagcca caigtctcg atctacaaag ttcaccatct ataacaacat gttctgtgt	1200

gc	1260
ggcttccatg aaggaggtt agattcatgt caaggagata gtggggacc ccatgttact	1320
gaagtggaa ggaccagtt ctaactgga attattagct ggggtgaaga gtgtgcaatg	1380
aaaggcaaat atgaaatata taccaaggta tcccggtatg tcaactggat taaggaaaaa	1440
acaaagctca cttagtccag cagcaaggcc cctccccga gcctgccctc cccaagcagg	1500
ctgcctggc ctcgcacac accaatctg ccacagtgtt gaaggtctgg atccgcggcc	1502

<210> 19

<211> 489

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTP-modified Factor IX

<400> 19

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr

1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu

20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn

35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys

50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn

65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln

85 90 95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile

100 105 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Asn Cys

115	120	125
Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe		
130	135	140
Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly		
145	150	155
Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe		
165	170	175
Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala		
180	185	190
Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu		
195	200	205
Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe		
210	215	220
Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp		
225	230	235
Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile		
245	250	255
Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly		
260	265	270
Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu		
275	280	285
His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn		
290	295	300
Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu		
305	310	315
Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile		
325	330	335
Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr		
340	345	350
Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val		
355	360	365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg

370	375	380
Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His		
385	390	395
Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val		
405	410	415
Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly		
420	425	430
Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser		
435	440	445
Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Ser Ser Ser		
450	455	460
Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly		
465	470	475
Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln		
485		

<210> 20

<211> 1585

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTP-modified Factor IX

<400> 20

gcgatcgcca tgcagcgcgt gaacatgatc atggcagaat caccaggct catcaccatc	60
tgccttttag gatatctact cagtgctgaa tgtacagttt ttcttgatca tgaaaacgcc	120
aacaaaattc tgaatcgccc aaagaggtat aattcaggta aatttggaga gtttgttcaa	180
gggaaccttg agagagaatg tatggaaagaa aagtgttagt ttgaagaagc acgagaagtt	240
tttggaaaaca ctgaaagaac aactgaattt tggaaggcgt atgttgatgg agatcagtgt	300
gagtccaaatc catgtttaaa tggcggcagt tgcaaggatg acattaattc ctatgaatgt	360
tgggtgcctt ttggatttga aggaaagaac tgtgaattag atgtAACATG taacattaag	420

aatggcagat gcgagcagtt ttgtaaaaat agtgctgata acaaggtggt ttgctcctgt	480
actgagggat atcgacttgc agaaaaccag aagtccctgt aaccagcagt gccatttcca	540

tgtggaagag tttctgttcc acaaacttct aagctcaccc gtgctgagac tgttttcct	600
gatgtggact atgtaaatttc tactgaagct gaaaccattt tggtataacat cactcaaagg	660
acccaatcat ttaatgactt cactcgagtt gttggggag aagatgccaa accaggtcaa	720
ttcccttggc agttgtttt gaatggtaaa gttgtatgc tctgtggagg ctctatcgaa	780
aatgaaaaat ggattgtaac tgctgccac tgtgttggaa ctgggtttaa aattacagt	840

gtcgccaggta aacataatat tgaggagaca gaacatacag agcaaaagcg aaatgtgatt	900
cgaatttttc ctcaccacaa ctacaatgca gctattaata agtacaacca tgacattgcc	960
cttcggAAC tggacgaacc ctttagtgcta aacagctacg ttacacctat ttgcattgct	1020
acaaggaaata cacgaacatc ttccctaaat ttggatctgg ctatgtaaat ggctggggaa	1080
gagtttcca caaaggaga tcagcttag ttcttcagta ctttagagtt ccacttgg	1140
accgagccac atgtttcgta tctacaaatg tcaccatcta taacaacatg ttctgtgt	1200
gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc catgttactg	1260

aagtggagg gaccaggttc ttaactggaa ttattagctg gggtgaagag tgtgcaatga	1320
aaggcaata tggaaatat accaaggat cccggatgt caactggatt aaggaaaaaa	1380
caaagctcac tagetccagc agcaaggccc ctccccggag cctgcctcc ccaagcaggc	1440
tgcctggcc ctccgacaca ccaatcctgc cacagagcag ctcccttaag gcccctctc	1500
catccctgcc atccccctcc cggctgcctg gcccctctga caccctatac ctgcctcagt	1560
gatgaaggc tggatccgccc gcccgc	1585

<210> 21

<211> 517

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTP-modified Factor IX

<400> 21

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr

1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu

20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn

35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys

50	55	60
Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn		
65	70	75
Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln		
85	90	95
Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile		
100	105	110
Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys		
115	120	125
Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe		
130	135	140
Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly		
145	150	155
Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe		
165	170	175
Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala		
180	185	190
Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu		
195	200	205
Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe		
210	215	220
Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp		
225	230	235
Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Ser Ile		
245	250	255
Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly		
260	265	270
Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu		
275	280	285
His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn		
290	295	300

Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu

305 310 315 320

Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile

325 330 335

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr

340 345 350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val

355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg

370 375 380

Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His

385 390 395 400

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val

405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly

420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser

435 440 445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Ser Ser Ser

450 455 460

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly

465 470 475 480

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro

485 490 495

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr

500 505 510

Pro Ile Leu Pro Gln

515

<210> 22

<211> 2413

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

tctagagtgc accccgccat ggagctgagg ccctgggtgc tatgggtggt agcagcaaca	60
ggaaccttgg tcctgttagc agctgatgtc cagggcaga aggtctcac caacacgtgg	120
gctgtgcgca tccctggagg cccagcggtg gccaacagtg tggcacggaa gcatgggttc	180
ctcaacctgg gccagatctt cggggactat taccacttct ggcacatcgagg agtgacgaag	240
cggtccctgt cgccctcaccg cccgcggcac agccggctgc agagggagcc tcaagtacag	300
tggctggaac agcaggtggc aaagcgacgg actaaacggg acgtgtacca ggagcccaca	360
gaccctaagt ttccctcagca gtggcacccgt tctgggtgtca ctacacaggg cacggcatttgc	420
aaggcggcct gggcgccagg ctacacaggg cacggcatttgc tggtctccat tctggacgat	480
ggcatcgaga agaaccaccc ggacttggca ggcaattatg atcctggggc cagtttgc	540
gtcaatgacc aggaccctga cccccagccct cggtaacacac agatgaatga caacaggcac	600
ggcacacgggt gtgcggggga agtggctgca gtggccaaaca acggtgtctg tggtaggt	660
gtggccctaca acgccccat tggagggggtg cgcatgctgg atggcgaggt gacagatgca	720
gtggaggcac gctcgctggg cctgaacccc aaccacatcc acatctacag tgccagctgg	780
ggccccgagg atgacggcaa gacagtggat gggccagccc gcctcgccga ggaggccttc	840
ttccgtgggg ttagccaggc ccgagggggg ctgggctcca tctttgtctg ggcctcgaaa	900
aacggggcc gggaaacatga cagctgcaac tgcgacggct acaccaacag tatctacacg	960
ctgtccatca gcagcgccac gcagttggc aacgtgccgt ggtacagcga ggcctgtcg	1020
tccacactgg ccacgaccta cagcgtggc aaccagaatg agaagcagat cgtgacgact	1080
gacttgccgc agaagtgcac ggagtctcac acggcacct cagcctctgc ccccttagca	1140
gccggcatca ttgtctcac cctggaggcc aataagaacc tcacatggcg ggacatgcaa	1200
cacctgggtt tacagacccctt gaagccagcc cacctcaatg ccaacgactg ggccaccaat	1260
ggtgtggcc gggaaagttag ccactcatat ggctacggc tttggacgc aggccatgt	1320
gtggccctgg cccagaattt gaccacagtg gccccccagc ggaagtgcacat catgcacatc	1380
ctcaccgagc ccaaagacat cggaaacgg ctcgaggtgc ggaagaccgt gaccgcgtgc	1440
ctggcgagc ccaaccacat cactcggtc gagcacgc cggccggctt caccctgtcc	1500
tataatcgcc gtggcgacct ggccatccac ctggtcagcc ccatgggcac ccgcgtccacc	1560
ctgctggcag ccaggccaca tgactactcc gcagatgggt ttaatgactg ggccttcatg	1620
acaactcatt cctggatga ggatccctt ggcgagtggg tcctagatg tgaaaacacc	1680
agcgaagcca acaactatgg gacgctgacc aagttcaccc tcgtactcta tggcaccggcc	1740

cctgagggc tgccgtacc tccagaaaggc agtggtgc acgcctcac gtccagttag	1800
gcctgtgtgg tgtgcgagga aggcttctcc ctgcaccaga agagctgtgt ccagcactgc	1860
cctccaggct tcgccccca agtcctcgat acgcactata gcaccgagaa tgacgtggag	1920
accatccggg ccagcgtctg cgccccctgc cacgcctcat gtgccacatg ccagggccg	1980

gcctgacag actgcctcag ctgccccaggc caccgcctt tggaccctgt ggagcagact	2040
tgctccggc aaagccagag cagccgagag tccccggcac acgcgcggcc acctcggtcg	2100
ccccccggagg tggaggcggg gcaacggctg cgggcaggc tgctgcctc acaccgtcc	2160
gaggtgggtgg ccggcctcag ctgcgccttc atcgtgttgg ttttgtcac tgtttctg	2220
gtccctgcaggc tgcgtctgg cttagttt cgggggtga aggtgtacac catggaccgt	2280
ggcctcatct cctacaaggg gtcggccct gaagcctggc aggaggagtg cccgtctgac	2340
tcaagaaggagg acgaggggccg gggcgagagg accgcctta tcaaagacca gaggcgcctc	2400

tgaacgcggc cgc	2413
----------------	------

<210> 23

<211> 794

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Val Leu Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn

20	25	30
----	----	----

Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val

35	40	45
----	----	----

Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe Gly Asp Tyr

50	55	60
----	----	----

Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His

65	70	75	80
----	----	----	----

Arg Pro Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu

85	90	95
----	----	----

Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu

100	105	110
-----	-----	-----

Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr
 115 120 125
 Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly
 130 135 140
 His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His
 145 150 155 160
 Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn
 165 170 175

 Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn
 180 185 190
 Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn
 195 200 205
 Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Gly Val
 210 215 220
 Arg Met Leu Asp Gly Glu Val Thr Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu
 225 230 235 240

 Gly Leu Asn Pro Asn His Ile His Ile Tyr Ser Ala Ser Trp Gly Pro
 245 250 255
 Glu Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Gly Pro Ala Arg Leu Ala Glu Glu
 260 265 270
 Ala Phe Phe Arg Gly Val Ser Gln Gly Arg Gly Leu Gly Ser Ile
 275 280 285
 Phe Val Trp Ala Ser Gly Asn Gly Arg Glu His Asp Ser Cys Asn
 290 295 300

 Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala
 305 310 315 320
 Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr
 325 330 335
 Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val
 340 345 350
 Thr Thr Asp Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser

355	360	365
-----	-----	-----

Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala
 370 375 380
 Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr
 385 390 395 400
 Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val
 405 410 415
 Gly Arg Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly
 420 425 430

Ala Met Val Ala Leu Ala Gln Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg
 435 440 445
 Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg
 450 455 460
 Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His
 465 470 475 480
 Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn
 485 490 495

Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg
 500 505 510
 Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe
 515 520 525
 Asn Asp Trp Ala Phe Met Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser
 530 535 540
 Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr
 545 550 555 560

Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu
 565 570 575
 Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser Gly Cys Lys Thr Leu Thr Ser
 580 585 590
 Ser Gln Ala Cys Val Val Cys Glu Glu Gly Phe Ser Leu His Gln Lys
 595 600 605

Ser Cys Val Gln His Cys Pro Pro Gly Phe Ala Pro Gln Val Leu Asp

610 615 620

Thr His Tyr Ser Thr Glu Asn Asp Val Glu Thr Ile Arg Ala Ser Val

625 630 635 640

Cys Ala Pro Cys His Ala Ser Cys Ala Thr Cys Gln Gly Pro Ala Leu

645 650 655

Thr Asp Cys Leu Ser Cys Pro Ser His Ala Ser Leu Asp Pro Val Glu

660 665 670

Gln Thr Cys Ser Arg Gln Ser Ser Arg Glu Ser Pro Pro Gln

675 680 685

Gln Gln Pro Pro Arg Leu Pro Pro Glu Val Glu Ala Gly Gln Arg Leu

690 695 700

Arg Ala Gly Leu Leu Pro Ser His Leu Pro Glu Val Val Ala Gly Leu

705 710 715 720

Ser Cys Ala Phe Ile Val Leu Val Phe Val Thr Val Phe Leu Val Leu

725 730 735

Gln Leu Arg Ser Gly Phe Ser Phe Arg Gly Val Lys Val Tyr Thr Met

740 745 750

Asp Arg Gly Leu Ile Ser Tyr Lys Gly Leu Pro Pro Glu Ala Trp Gln

755 760 765

Glu Glu Cys Pro Ser Asp Ser Glu Glu Asp Glu Gly Arg Gly Glu Arg

770 775 780

Thr Ala Phe Ile Lys Asp Gln Ser Ala Leu

785 790

<210> 24

<211> 1621

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTP-modified Factor VII

<400> 24

ctcgaggaca tggctccca ggcctcagg ctcctctgcc ttctgcttgg gcttcaggc 60

tgccctggctg cagtcttcgt aaccaggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg	120
cgcgccaacg ctttcctgga ggagctgcgg cgggctccc tggagaggga gtgcaaggag	180
gagcagtgtc cttcgagga gccccggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg	240
ttctggattt ctacagtga tggggaccag tggctcaa gtcatgccaa gaatggggc	300
tcctgcaagg accagctcca gtcctatac tgcttcgtcc tccctgcctt cgagggccgg	360
aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag	420
cagtaactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgca ggtgccacga ggggtactct	480
ctgctggcag acgggggtgtc ctgcacaccc acagttaat atccatgtgg aaaaataacct	540
attcttagaaa aaagaaatgc cagcaaaccc caaggccaa ttgtgggggg caagggtgtc	600
cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg	660
gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccggggccc actgtttcga caaaatcaag	720
aactggagga acctgatcgc ggtgctggc gagcacgacc tcagcgagca cgacgggat	780
gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc	840
aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagccgtgg tcctactga ccatgtggtg	900
ccctctgcc tgcccgaaacg gacgttctct gagaggacgc tggcctcgt gcgcttctca	960
ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggccca cggccctggaa gctcatggtc	1020
ctcaacgtgc cccggctgtat gacccaggac tgcctgcagc agtcacggaa ggtggagac	1080
tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc	1140
tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccaactacc gggcacgtg gtacctgacc	1200
ggcatcgtga gctggggcca gggctggcc accgtggcc acttcggcgt gtacaccagg	1260
gtgtcccaagt acatcgagtg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccacg accccggcgtg	1320
ctgctgagag cccccttccc cagcagcagc tccaaaggccc ctccccctag cctgcccacg	1380
ccttagcagac tgcctggcc cagtgcacacc cctatccgtc ctcaatcccgat ctccagcaag	1440
gccccccccc ctgcctgcc ttctccttct cggctgcgt gccccagcga tactccaatt	1500
ctgccccagt cttccagcag taaggctccc cctccatctc tgccatcccc cagcagactg	1560
ccagggccctt ctgatacacc catcctccca cagtgatgag gatccgcggc cgcttaatta	1620
a	1621
<210> 25	
<211> 528	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> CTP-modified Factor VII

<400> 25

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Gly Leu Gln

1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val

20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro

35 40 45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu

50 55 60

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile

65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly

85 90 95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro

100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile

115 120 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr

130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala

145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile

165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val

180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu

195 200 205

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile

210 215 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg

225 230 235 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly

245 250 255

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr

260 265 270

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln

275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg

290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser

305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met

325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser

340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala

355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly

370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val

385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr

405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu

420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser

435 440 445

Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro

450 455 460

Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro

465 470 475 480

Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro

485 490 495
Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro

500 505 510
Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

515 520 525

<210> 26

<211> 1607

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTP-modified Factor VII

<400> 26

ctcgaggaca tggctccca ggcctcagg ctccctgcc ttctgcttgg gcttcaggc	60
tgcctggctg cagtcttctgt aaccaggag gaagcccacg gcttcctgca ccggcgccgg	120
cgcgccaacg cttccctgga ggagctgcgg ccggctccc tggagaggga gtgcaaggag	180

gaggcagtgt cttcgagga ggccgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg	240
ttctggattt cttagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgccaa gaatggggc	300
tcctgcaagg accagctcca gtcctataatc tgcttctgcc tccctgcctt cgaggcgccgg	360
aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag	420
cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct	480
ctgctggcag acggggtgtc ctgcacaccc acagttaat atccatgtgg aaaaataacct	540
attctagaaa aaagaatgc cagcaaacc c aaggccgaa ttgtggggg caaggtgtgc	600

ccccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggta atggagctca gttgtgtgg	660
gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcggccc actgttcga caaaatcaag	720
aactggagga acctgtatcgc ggtgtggc gagcacgacc tcagcgagca cgacgggat	780
gaggcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatac atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc	840
aaccacgaca tcgcgtgtc ccgcctgeac cagccgtgg tcctactga ccatgtgg	900
cccccctgcc tggccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttgc ggccttctca	960
ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggccca cggccctgga gtcatggc	1020

ctcaacgtgc cccggctgat gacccaggac tgcctgcagc agtcacggaa ggtggagac	1080
tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc	1140
tgcagggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc gggcacgtg gtacctgacc	1200

ggcatcgta gctggggcca gggctgcgcc accgtggcc acttcggcgt gtacaccagg	1260
gtgtccccagt acatcgagt gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag accccggcgt	1320
ctgctgagag cccccttccc cagcagcgc tccaggccc ctccccctag cctgcccagc	1380
cctagcagac tgccctggcc cagtgacacc cctatactgc cttagtccag ctccagcaag	1440

gccccacccc ctagcctgcc ttctccttct cggtgcctg gccccagcga tactccaatt	1500
ctgccccagt cctccagcag taaggctccc cctccatctc tgccatcccc cagcagactg	1560
ccagggccctt ctgatacacc catcctccca cagtgatgag gatccgc	1607

<210> 27

<211> 532

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTP-modified Factor VII

<400> 27

Leu Glu Asp Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu

1 5 10 15

Gly Leu Gln Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala

20 25 30

His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu

35 40 45

Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Gln Cys Ser

50 55 60

Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu

65 70 75 80

Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys

85 90 95

Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe

100 105 110

Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp

115 120 125

Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser

130 135 140

Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser

145 150 155 160

Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys

165 170 175

Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly

180 185 190

Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln

195 200 205

Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile

210 215 220

Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys

225 230 235 240

Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu

245 250 255

His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro

260 265 270

Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg

275 280 285

Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu

290 295 300

Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser

305 310 315 320

Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu

325 330 335

Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu

340 345 350

Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met

355 360 365

Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp

370 375 380

Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr

385 390 395 400

Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly

405 410 415

Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met

420 425 430

Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser

435 440 445

Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu

450 455 460

Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys

465 470 475 480

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser

485 490 495

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro

500 505 510

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile

515 520 525

Leu Pro Gln Gly

530

<210> 28

<211> 1775

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTP-modified Factor VII

<400> 28

ctcgaggaca tggtctccca ggccctcagg ctcctctgcc ttctgcttgg gcttcaggc	60
tgcctggctg cagtcttcgt aaccaggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg	120
cgcgccaacg cttcctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag	180
gagcagtgtc cttcgagga gccccggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg	240
ttctggattt ctacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatggggc	300
tcctgcaagg accagctcca gtcctataatc tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg	360

aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggtgtgag	420
cagtaactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgca ggtgccacga ggggtactct	480
ctgctggcag acggggtgc ctgcacaccc acagttaat atccatgtgg aaaaataacct	540
attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc accaaggcgaa ttgtggggg caagggtgc	600
cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtgg	660
gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcccccc actgttcga caaaatcaag	720
aactggagga acctgatcgc ggtgctggc gagcacgacc tcagcgagca cgacgggat	780

gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc	840
aaccacgaca tcgcgtgct ccgcctgac cagccgtgg tcctcactga ccatgtggtg	900
ccctctgcc tgcccgAACg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt ggccttcata	960
ttggtcggcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc	1020
ctcaacgtgc cccggctgat gaccaggac tgcctgcagc agtcacggaa ggtggagac	1080
tccccaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc	1140
tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc gggcacgtg gtacctgacc	1200

ggcatcgtga gctggggcca gggctgcgcc accgtggcc acttcggcgt gtacaccagg	1260
gtgtcccaagt acatcgagt gctgcagaaa ctgtatggaa gcgagcccag accccggcgtg	1320
ctgctgagag ccccttccc cagcagcagc tccaaaggccc ctccctcttag cctgcccagc	1380
ccttagcagac tgcctggcc ctctgacacc cctatccgc cttagtccag ctccctctaag	1440
gctccaccac ctccctgcc tagccctca agactgccag gccctagcga tacaccaatt	1500
ctgccccagt ctccagcag caaggctccc ccacctagcc tgccttcctcc atcaaggctg	1560
cctggcccat ccgatacccc aatttgcct cagagcagct ctagcaaggc acctcccccc	1620

agtctgcct ctccaaaggcag actccctggc cttcagaca ctccaaatctt cccacagtcc	1680
tcttagctcta aagctccacc tcccagcctg cccagcccta gtagactccc cggaccttct	1740
gataccccca tcttgccca gtatgggaa tccgc	1775

<210> 29

<211> 589

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTP-modified Factor VII

<400> 29

Leu Glu Asp Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu

Gly Leu Gln Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala

20 25 30

His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu

35 40 45

Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser

50 55 60

Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu

65 70 75 80

Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys

85 90 95

Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe

100 105 110

Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp

115 120 125

Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser

130 135 140

Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser

145 150 155 160

Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys

165 170 175

Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly

180 185 190

Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln

195 200 205

Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile

210 215 220

Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys

225 230 235 240

Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu

245 250 255

His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro

260	265	270
Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg		
275	280	285
Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu		
290	295	300
Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser		
305	310	315
Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu		
325	330	335
Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu		
340	345	350
Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met		
355	360	365
Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp		
370	375	380
Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr		
385	390	395
Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly		
405	410	415
Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met		
420	425	430
Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser		
435	440	445
Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu		
450	455	460
Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys		
465	470	475
Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser		
485	490	495
Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro		
500	505	510

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile

515 520 525

Leu Pro Gln Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser

530 535 540

Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser

545 550 555 560

Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu

565 570 575

Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Gly Ser

580 585

<210> 30

<211> 1673

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> CTP-modified Factor IX

<400> 30

tctagagtgc accccgccat gcagcgcgtg aacatgtatca tggcagaatc accaggcctc	60
atcaccatct gccttttagg atatctactc agtgctgaat gtacagttt tcttgatcat	120
gaaaacgcca acaaattctt gaatcgccca aagaggata attcaggtaa attgaaagag	180
tttgttcaag ggaaccttga gagagaatgt atgaaagaaa agtgtatgtt tgaagaagca	240
cgagaagttt ttgaaaacac tgaaagaaca actgaattttt ggaagcagta tggtatgga	300
gatcagtgtg agtccaatcc atgtttaat ggcggcagtt gcaaggatga cattaattcc	360
tatgaatgtt ggttccctt tggatttcaa ggaaagaact gtgaatttga tgtaacatgt	420

aacattaaga atggcagatg cgagcagttt tgtaaaaata gtgctgataa caaggtggtt	480
tgctcctgta ctgagggata tcgacttgca gaaaaccaga agtcctgtga accagcagtg	540
ccatttccat gtgaaagagt ttctgttca caaacttcta agtcacccg tgctgaggca	600
gttttcctg atgtggacta tgtaaattct actgaagctg aaaccatttt ggataacatc	660
actcaaagca cccaaatcatt taatgacttc actcgagttt tggtggaga agatgccaaa	720
ccaggtcaat tcccttggca ggttggggaaatggtaaag ttgtatgcatt ctgtggggc	780
tctatcgta atgaaaaatg gattgttaact gctgccact gtgttgaac tggtttaaa	840

attacagttg tcgcaggta acataatatt gaggagacag aacatacaga gcaaaagcga	900
--	-----

aatgtgatttc gaatttattcc tcaccacaac tacaatgcag ctattaataa gtacaaccat	960
gacattgccct ttctggaaact ggacgaaccc ttagtgctaa acagctacgt tacacctatt	1020
tgcattgctg acaaggaata cacgaacatc ttcccaaatttggatctgg ctatgtaaat	1080
ggctggggaa gagtcttcca caaaggaga tcaagtttag ttcttcagta ccttagagg	1140
ccacttgttgc accgagccac atgtcttcga tctacaaagt tcaccatcta taacaacatg	1200
ttctgtgctg gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc	1260
catgttactg aagtggaaagg gaccagttc ttaactggaa ttattagctg gggtaagag	1320
tgtcaatga aaggcaata tgaaatataat accaaggtat cccgtatgt caactggatt	1380
aaggaaaaaaa caaagctcac tagctccagc agcaaggccc ctcccccgag cctgccctcc	1440
ccaagcaggc tgcctggcc cagtgcaccc cctatcctgc ctcagtcag ctccagcaag	1500
gccccacccc ctggccatgc ttctccatct cggctgcctg gccccagcga tactccaatt	1560
ctggccatgt cctccagcag taaggctccc cctccatctc tgccatcccc cagcagactg	1620
ccaggccctt ctgatacacc catcccccac cagtgtatgg gatccggcgc cgc	1673

<210> 31

<211> 545

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTP-modified Factor IX

<400> 31

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr

1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu

20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn

35

40

45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys

50

55

60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn

65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln

85

90

95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile

100	105	110
Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys		
115	120	125
Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe		
130	135	140
Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly		
145	150	155
Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe		
165	170	175
Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala		
180	185	190
Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu		
195	200	205
Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe		
210	215	220
Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp		
225	230	235
Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Ser Ile		
245	250	255
Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly		
260	265	270
Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu		
275	280	285
His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn		
290	295	300
Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu		
305	310	315
Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile		
325	330	335
Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr		
340	345	350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val

355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg

370 375 380
 Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
 385 390 395 400
 Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
 405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
 420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser

435 440 445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Ser Ser Ser
 450 455 460

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly
 465 470 475 480
 Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
 485 490 495

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr

500 505 510

Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
 515 520 525

Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
 530 535 540

Gln

545

<210> 32

<211> 1757

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTP-modified Factor IX

<400> 32

tctagagtgc accccgccat gcagcgcgtg aacatgatca tggcagaatc accaggcctc	60
atcaccatct gccttttagg atatctactc agtgctgaat gtacagttt tcttgatcat	120
gaaaacgcc aaaaaattct gaatcgcca aagaggata attcaggtaa attgaaagag	180
tttgtcaag ggaaccttga gagagaatgt atggaagaaa agttagtta tgaagaagca	240
cgagaagttt ttgaaaacac taaaagaaca actgaattt ggaagcagta tggtgatgga	300
gatcagtgtg agtccaatcc atgttaat ggcggcagtt gcaaggatga cattaattcc	360
tatgaatgtt ggtgtccctt tggatttcaa ggaaagaact gtgaatttga tgtaacatgt	420
aacattaaga atggcagatg cgagcagttt tgtaaaaata gtgtgtataa caagggttt	480
tgctcgtta ctgagggata tcgacttgca gaaaaccaga agtcctgtga accagcagt	540
ccatttccat gtggaaaggt ttctgttca caaacttcta agtcacccg tgctgaggca	600
gttttcctg atgtggacta tgtaaattct actgaagctg aaaccattt ggataacatc	660
actcaaagca cccaatcatt taatgacttc actcgagttt ttgggtggaga agatgccaaa	720
ccaggtcaat tcccttggca ggttggggaa aatggtaaag ttgtatgcatt ctgtggaggc	780
tctatcgta ataaaaatg gattgttaact gctccccact gtgtgaaac ttgggttaaa	840
attacagttg tcgcagggtga acataatatt gaggagacag aacatacaga gcaaaagcga	900
aatgtgattc gaattattcc tcaccacaac tacaatgcag ctattaataa gtacaaccat	960
gacatttgcctt tctggaaact ggacgaaccc tttagtgcata acagctacgt tacacctatt	1020
tgcatttgcgtt acaaggaata cacgaacatc ttccctcaat ttggatctgg ctatgttaat	1080
ggctggggaa ggttccca caaaggaga tcaagtttag ttcttcagta ccttagagtt	1140
ccacttgcgtt accgagccac atgtttcgta tctacaatg tcaccatcta taacaacatg	1200
ttctgtgctg gttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc	1260
catgttactg aagtggagg gaccagttt ttaactggaa ttattagctg gggtaagag	1320
tgtgcaatga aaggcaata tggatatat accaaggtat cccgttatgt caactggatt	1380
aaggaaaaaa caaagctcac tagtccagc agcaaggccc ctccccgag cctgccctcc	1440
ccaagcagggc tgcctgggcc ctctgacacc cctatctgc cttagtccag ctccctcaag	1500
gccccaccac ctccctgcc tagcccttca agactgccag gccctagcga tacaccaatt	1560
ctgccccagt cttccagcag caaggctccc ccacctagcc tgccttctcc atcaaggctg	1620
cctggcccat ccgatacccc aatttgcct cagagcagct ctagcaaggc acctcccccc	1680
agtctgcctt ctccaaggcag actccctggc cttcagaca ctccatttct gccacagtga	1740
tgaggatccg cggccgc	1757

<210> 33

<211> 583

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTP-modified Factor IX

<400> 33

Ser Arg Val Asp Pro Ala Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu

1 5 10 15

Ser Pro Gly Leu Ile Thr Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala

20 25 30

Glu Cys Thr Val Phe Leu Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn

35 40 45

Arg Pro Lys Arg Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly

50 55 60

Asn Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala

65 70 75 80

Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln

85 90 95

Tyr Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly

100 105 110

Ser Cys Lys Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly

115 120 125

Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn

130 135 140

Gly Arg Cys Glu Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val

145 150 155 160

Cys Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys

165 170 175

Glu Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr

180 185 190

Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val

195 200 205

Asn Ser Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr

210 215 220

Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys

225 230 235 240

Pro Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala

245 250 255

Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala

260 265 270

His Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His

275 280 285

Asn Ile Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg

290 295 300

Ile Ile Pro His His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His

305 310 315 320

Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr

325 330 335

Val Thr Pro Ile Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu

340 345 350

Lys Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys

355 360 365

Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp

370 375 380

Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met

385 390 395 400

Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp

405 410 415

Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr

420 425 430

Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly

435 440 445

Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr

450	455	460
Lys Leu Thr Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser		
465	470	475
Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser		
485	490	495
Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu		
500	505	510
Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Lys		
515	520	525
Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser		
530	535	540
Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro		
545	550	555
Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile		
565	570	575
Leu Pro Gln Gly Ser Ala Ala		
580		
<210> 34		
<211> 1840		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> CTP-modified Factor IX		
<400> 34		
ctagagt cga cccgc catg cagcgcgtga acatgatcat ggcagaatca ccaggcctca		60
tcaccatctg ccttttagga tatctactca gtgctgaatg tacagtttt ctgtatcatg		
aaaacgcca acaaattctg aatcgccaa agaggtataa ttccaggtaaa ttggaaagagt		
ttgttcaagg gaacctttag agagaatgt a tggaaagaaaa gtgtatgtt gaagaagcac		
gagaagttt tgaaaacact gaaagaacaa ctgaatttg gaagcagtat gttgtatggag		
atcagtgtga gtccaatcca tggtaatgg cgccgcgttg caaggatgac attaattcct		
atgaatgtt ggtcccttt ggatttgaag gaaagaactg tgaatttagat gtaacatgt		
acattaagaa tggcagatgc gagcagttt gtaaaaatag tgctgataac aagggtggtt		

gctcctgtac tgaggatat cgacttgcag aaaaccagaa gtcctgtcaa ccagcagtgc	540
cattccatg tggaaagat tctgttcaaaacttctaa gtcacccgt gctgaggcag	600
ttttcctga tgtggactat gtaaattcta ctgaagctga aaccatggataacatca	660
ctcaaaagcac ccaatcattt aatgactica ctcgagttgttggagaa gatccaaac	720
caggtcaatt ccctggcag gttgtttga atggtaagt tgcatttc tgtggaggct	780
ctatcgtaa taaaaatgg attgtactg ctgccactg tggtaaact ggtttaaaa	840
ttacagttgt cgccaggtgaa cataatattt aggagacaga acatacagag caaaagcgaa	900

atgtgattcg aattattcct caccacaact acaatgcagc tattaataag tacaaccatg	960
acatgcct tcggaaactg gacgaacct tagtgtaaa cagctacgtt acaccattt	1020
gcattgctga caaggaatac acgaacatct tcctcaaatt tggatctggc tatgttaagt	1080
gctggggaaag agtcttccac aaaggagat cagcttagt tcttcgtac ctttagttc	1140
cacttgttga ccgagccaca tgtttcgat ctacaaagt caccatctt aacaacatgt	1200
tctgtgctgg ctccatgaa ggaggttagag attcatgtca aggagatagt gggggacccc	1260
atgttactga agtggaaagg accagttct taactggaat tattagctgg ggtgaagagt	1320

gtgcaatgaa aggcaaataat ggaatata ccaaggatc ccggatgtc aactggatta	1380
aggaaaaaac aaagctcaact agtccagca gcaaggcccc tccccggagc ctgcctccc	1440
caagcaggct gcctggccc tctgacaccc ctatctgcc tcagtccagc tcctctaagg	1500
ctccaccacc ttccctgcct agccctcaa gactgccagg ccctagcgat acaccaattc	1560
tgccccagtc ctccagcagc aaggctcccc cacctagcct gccttccca tcaaggctgc	1620
ctggcccatc cgataccca atttgcctc agagcagctc tagcaaggca cctccccca	1680
gtctgccttc tccaaggcaga ctccctggcc ctccagacac tccaatcctc ccacagtcct	1740

ctagctctaa agtccaccc cccagcctgc ccagccctag tagactcccc ggacctctg	1800
ataccccat ctggccctc tgatgaggat ccggggccgc	1840

<210> 35

<211> 610

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTP-modified Factor IX

<400> 35

Arg Val Asp Pro Ala Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser

1 5 10 15

Pro Gly Leu Ile Thr Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu

20	25	30
----	----	----

Cys Thr Val Phe Leu Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg

35	40	45
----	----	----

Pro Lys Arg Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn

50	55	60
----	----	----

Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg

65	70	75	80
----	----	----	----

Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr

85	90	95
----	----	----

Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser

100	105	110
-----	-----	-----

Cys Lys Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe

115	120	125
-----	-----	-----

Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly

130	135	140
-----	-----	-----

Arg Cys Glu Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu

165	170	175
-----	-----	-----

Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser

180	185	190
-----	-----	-----

Lys Leu Thr Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn

195	200	205
-----	-----	-----

Ser Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln

210	215	220
-----	-----	-----

Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe

245	250	255
-----	-----	-----

Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His

260	265	270
-----	-----	-----

Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn

275 280 285

Ile Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile

290 295 300

Ile Pro His His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp

305 310 315 320

Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val

325 330 335

Thr Pro Ile Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys

340 345 350

Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly

355 360 365

Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg

370 375 380

Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe

385 390 395 400

Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser

405 410 415

Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly

420 425 430

Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile

435 440 445

Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys

450 455 460

Leu Thr Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro

465 470 475 480

Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser

485 490 495

Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro

500 505 510

Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Lys Ala

515	520	525
Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp		
530	535	540
Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser		
545	550	555
Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu		
565	570	575
Pro Gln Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro		
580	585	590
Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Gly Ser		
595	600	605

Ala Ala

610	
<210> 36	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer 101 for FIX-(CTP)2	
<400> 36	
gtttagtgaa ccgtcagaat 20	
<210> 37	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer 103-R for FIX-(CTP)2	
<400> 37	
ttgaggaaga tttcggtgt 20	
<210> 38	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer 98 for FIX-(CTP)2	

<400> 38

attacagttg tcgcaggta 20

<210> 39

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer 99-R for FIX-(CTP)2

<400> 39

gctggagcta gtgagcttg ttttcctt 30

<210> 40

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer 100 for FIX-(CTP)2

<400> 40

gctcactagc tccagcagca aggcc 25

<210> 41

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer 27-R for FIX-(CTP)2

<400> 41

tttcactgc attctagttg tgg 23

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer 75

<400> 42

ctcccagttc aattacagct 20

<210> 43

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer 122r	
<400> 43	
ggaaaaactg cctcagcacg ggtgagc	27
<210> 44	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer 123	
<400> 44	
gtgcgtgaggc agttttcct gatgtggact at	32
<210> 45	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer 124r	
<400> 45	
caacacagtg ggcagcag	18

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

활성화된 응고 인자 FVII(FVIIa), 및

상기 FVIIa의 카르복시 말단에 부착된 3개의 CTP

로 이루어진 융모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드(CTP)-변형된 활성화 응고 인자 FVII(FVIIa) 폴리웨티드로서,

상기 CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리웨티드는 서열번호 25의 아미노산 39-528의 아미노산 서열을 갖고,

상기 CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리웨티드는 이황화-결합된 2개의 쇄를 갖는 이종이량체의 형태이며,

상기 폴리웨티드는 서열번호 25의 아르기닌 152에서 절단된 것인,

CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리웨티드.

【변경후】

활성화된 응고 인자 FVII(FVIIa), 및

상기 FVIIa의 카르복시 말단에 부착된 3개의 CTP

로 이루어진 용모막 고나도트로핀 카르복시 말단 웨티드(CTP)-변형된 활성화 응고 인자 FVII(FVIIa) 폴리웨티드로서,

상기 CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리웨티드는 서열번호 25의 아미노산 39-528의 아미노산 서열을 갖고,

상기 CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리웨티드는 이황화-결합된 2개의 쇄를 갖는 이종이량체의 형태이며,

상기 폴리웨티드는 서열번호 25의 아르기닌 152에서 절단된 것인,

CTP-변형된 활성화 응고 인자 FVIIa 폴리웨티드.