



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월17일

(11) 등록번호 10-1969601

(24) 등록일자 2019년04월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/48 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01) A61K 47/30 (2017.01)

(21) 출원번호 10-2013-7004971

(22) 출원일자(국제) 2011년07월29일

심사청구일자 2016년07월25일

(85) 번역문제출일자 2013년02월27일

(65) 공개번호 10-2013-0043211

(43) 공개일자 2013년04월29일

(86) 국제출원번호 PCT/US2011/045873

(87) 국제공개번호 WO 2012/016131

국제공개일자 2012년02월02일

(30) 우선권주장

61/369,186 2010년07월30일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

WO2005014024 A2*

WO2008025856 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문현

(73) 특허권자

박스알타 인코퍼레이티드

미국, 일리노이즈 60015, 배독번, 1200 레이크사이드 드라이브

박스엘타 게엠베하

스위스 6300 추크 제흐러벡 4

(72) 발명자

지크만 위르겐

오스트리아 아-1210 비엔나 게라스도르퍼 스트라세 153/209

하이더 스태판

오스트리아 아-3385 프린저스도르프 모짜르트스트라세 2

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

여호섭, 양영준, 류현경

전체 청구항 수 : 총 63 항

심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 옥심 결합용 친핵성 촉매

(57) 요약

본 발명은 물질, 및 수용성 폴리머를 치료 단백질의 산화된 탄수화물 모이어티에 콘주게이트하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 콘주게이션을 허용하는 조건 하에서 상기 산화된 탄수화물 모이어티를 활성화된 수용성 폴리머와 접촉시키는 것을 포함한다. 더 상세하게는, 본 발명은 상기 언급된 물질 및 방법들에 관한 것이고, 여기서 상기 수용성 폴리머는 활성 아미노옥시 그룹을 함유하고 옥심 또는 하이드라존 결합은 상기 산화된 탄수화물 모이어티와, 수용성 폴리머 상의 상기 활성 아미노옥시 그룹 사이에서 형성되고, 상기 콘주게이션은 친핵성 촉매의 존재에서 수행된다.

(72) 발명자

로텐스타이너 한스페터

오스트리아 아-1020 비엔나 하이드가쎄 10/17

이벤스 안드레아스

스위스 채하-8049 취리히 베르겔러스트라쎄 32

투레체 페터

오스트리아 아-3400 클로스터노이부르크 바이들링
하웁트스트라쎄 59계

코홀링 올리버

오스트리아 아-1160 비엔나 파니켄가쎄 12/1/4

명세서

청구범위

청구항 1

수용성 폴리머를 치료 단백질의 산화된 탄수화물 모이어티에 콘주게이션시키는 방법으로서, 이 방법은 콘주게이션을 허용하기 위하여 상기 산화된 탄수화물 모이어티를 활성화된 수용성 폴리머와 접촉시키는 것을 포함하고;

상기 활성화된 수용성 폴리머는 활성 아미노옥시 그룹을 함유하고, 폴리에틸렌 글라이콜 (PEG), 분지형 PEG, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), 폴리시알산 (PSA), 탄수화물, 다당류, 폴루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 살레이트, 더마탄 살레이트, 텍스트란, 카복시메틸-텍스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글라이콜 (PAG), 폴리프로필렌 글라이콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 및 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포름알) (PHF)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

상기 치료 단백질은 당단백질 또는 시험관 내에서 글리코실화된 치료 단백질로서, 인자 VIIa (FVIIa), 인자 VIII (FVIII), 인자 IX (FIX), EPO, Ang-2, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 신경 성장 인자 (NGF), 표피 성장 인자 (EGF), 인간 성장 호르몬 (HGH), TNF-알파, 인슐린, 인터페론-알파 (IFN-알파), 인터페론-감마 (IFN-감마), 콜로니 자극 인자-1 (CSF-1), Humira (아달리무맙), 및 Prolia (테노수맙)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이고;

상기 탄수화물 모이어티는 나트륨 폐리오데이트 ($NaIO_4$), 납 테트라아세테이트 ($Pb(OAc)_4$) 및 칼륨 페루테네이트 ($KRuO_4$)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 산화제를 포함하는 완충액과의 인큐베이션에 의해 산화되고;

옥심 결합은 상기 산화된 탄수화물 모이어티와, 수용성 폴리머 상의 상기 활성 아미노옥시 그룹 사이에서 형성되고;

상기 옥심 결합 형성은 친핵성 촉매인 m -톨루이딘에 의해 촉매되는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서, 0.3 mg/ml 내지 3.0 mg/ml의 치료 단백질 초기 농도를 함유하는 용액은 상기 활성화된 수용성 폴리머와 접촉시키기 전에 pH 5.0 내지 8.0으로 조정되는 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 치료 단백질은 원하는 과잉 농도의 활성화된 수용성 폴리머에 의해 접촉되고, 상기 과잉 농도는 1-배 몰 내지 300-배 몰 과잉이거나, 50-배 몰 과잉인 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 치료 단백질은 0.5 시간 내지 24 시간의 지속시간; 2 °C내지 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건; 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 조건 하에서 활성화된 수용성 폴리머와 인큐베이션되는 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 친핵성 촉매는 0.1 분 내지 30 분의 지속시간; 2 °C내지 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건; 및 교반 또는 교반하지 않는 조건 하에서, 최종 농도 1.0 mM 내지 50 mM의 친핵성 촉매의 양으로 첨가되는 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 산화제는 0.1 분 내지 120 분의 지속시간; 2 °C 내지 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건; 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 조건 하에서, 최종 농도 50 μM 내지 1000 μM 의 산화제의 양으로 첨가되는 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 수용성 폴리머를 상기 치료 단백질의 상기 산화된 탄수화물 모이어티에 콘주케이션하는 것은 L-시스테인, 메티오닌, 글루타티온, 글리세롤, 나트륨 메타 바이설파이트 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 트립토판, 티로신, 히스티딘 또는 그의 유도체, 크레졸, 이미다졸, 및 그의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 켄칭제의 첨가로 면추고;

상기 켄칭제는 5 분 내지 120 분의 지속시간; 2 °C 내지 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건; 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 조건 하에서, 최종 농도 1 mM 내지 100 mM의 켄칭제의 양으로 첨가되는 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 켄칭제는 L-시스테인이고, 10 mM의 최종 농도가 되도록 첨가되고, 상기 조건은 60 분의 지속시간, 22 °C의 온도, 광의 부재 조건 및 교반 조건을 포함하는 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 하기 단계들을 포함하는 방법:

- 치료 단백질을 포함하는 용액의 pH 값을 5.0 내지 8.0의 pH 값으로 조정하는 것을 포함하는 제1 단계로서, 상기 치료 단백질 농도는 0.3 mg/ml 내지 3.0 mg/ml인 제1 단계;
- 상기 치료 단백질 상의 하나 이상의 탄수화물을 산화시키는 것을 포함하는 제2 단계로서, 상기 산화제는 0.1 분 내지 120 분의 지속시간; 2 °C 내지 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건, 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 조건 하에서, 50 μM 내지 1000 μM 의 최종 농도가 되도록 제1 단계에서의 용액에 첨가되는 제2 단계;
- 상기 치료 단백질을 원하는 과잉 농도의 활성화된 수용성 폴리머와 접촉시키는 것을 포함하는 제3 단계로서, 0.5 시간 내지 24 시간의 지속시간, 2 °C 내지 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건; 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 조건 하에서, 상기 과잉 농도는 1-배 몰 과잉 내지 300-배 몰 과잉인 제3 단계;
- 친핵성 촉매를 제3 단계의 용액에 첨가하는 것을 포함하는 제4 단계로서, 상기 친핵성 촉매는, 0.1 분 내지 30 분의 지속시간; 2 °C 내지 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건, 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 조건 하에서, 1 mM 내지 50 mM의 최종 농도가 되도록 첨가되는 제4 단계;
- 치료 단백질이, 치료 단백질 상의 하나 이상의 산화된 탄수화물에 대한 활성화된 수용성 폴리머의 콘주케이션을 허용하기 위하여, 활성화된 수용성 폴리머 및 친핵성 촉매와 함께 인큐베이션되는 제5 단계로서, 상기 조건은 0.5 시간 내지 24 시간의 지속시간, 2 °C 내지 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건, 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 제5 단계; 및
- 상기 제5 단계에서의 치료 단백질의 하나 이상의 산화된 탄수화물에 대한 상기 수용성 폴리머의 콘주케이션이, L-시스테인, 메티오닌, 글루타티온, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (나트륨 메타 바이설파이트), 트립토판, 티로신, 히스티딘 또는 그의 유도체들, 크레졸, 이미다졸, 및 그의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 켄칭제의 첨가로 면추는 제6 단계로서; 상기 켄칭제는 5 분 내지 120 분의 지속시간; 2 °C 내지 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건, 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 조건 하에서, 1 mM 및 100 mM의 최종 농도가 되도록 첨가되는 제6 단계.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 하기 단계들을 포함하는 방법:

- 치료 단백질을 포함하는 용액의 pH 값을 6.0의 pH 값으로 조정하는 것을 포함하는 제1 단계로서, 상기 치료 단백질 농도는 1 mg/ml인 제1 단계;

- b) 상기 치료 단백질 상의 하나 이상의 탄수화물을 산화시키는 것을 포함하는 제2 단계로서, 상기 산화제는 10분의 지속시간; 22 °C의 온도; 광의 부재 조건; 및 교반 조건을 포함하는 조건 하에서, 400 μM의 최종 농도가 되도록 제1 단계에서의 용액에 첨가되는 제2 단계;
- c) 상기 치료 단백질을 원하는 과잉 농도의 활성화된 수용성 폴리머와 접촉시키는 것을 포함하는 제3 단계로서, 15분의 지속시간, 22 °C의 온도; 광의 부재 조건; 및 교반 조건을 포함하는 조건 하에서, 상기 과잉 농도는 50-배 몰 과잉인 제3 단계;
- d) 친핵성 촉매를 제3 단계의 용액에 첨가하는 것을 포함하는 제4 단계로서, 상기 친핵성 촉매는, 15 분의 지속시간; 22 °C의 온도; 광의 부재 조건; 및 교반 조건을 포함하는 조건 하에서, 10 mM의 최종 농도가 되도록 첨가되는 제4 단계;
- e) 치료 단백질이, 치료 단백질 상의 하나 이상의 산화된 탄수화물에 대한 활성화된 수용성 폴리머의 콘주케이션을 허용하기 위하여, 활성화된 수용성 폴리머 및 친핵성 촉매와 함께 인큐베이션되는 제5 단계로서, 상기 조건은 2 시간의 지속시간, 22 °C의 온도; 광의 부재 조건; 및 교반 조건을 포함하는 제5 단계; 및
- f) 상기 제5 단계에서의 치료 단백질의 하나 이상의 산화된 탄수화물에 대한 상기 수용성 폴리머의 콘주케이션 이, L-시스테인 켄칭제의 첨가로 멈추는 제6 단계로서; 상기 켄칭제는 60 분의 지속시간; 22 °C의 온도; 광의 부재 조건; 및 교반 조건을 포함하는 조건 하에서, 10 mM의 최종 농도가 되도록 첨가되는 제6 단계.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 수용성 폴리머는 PSA이고, 10 - 300 시알산 단위로 구성되는 방법.

청구항 13

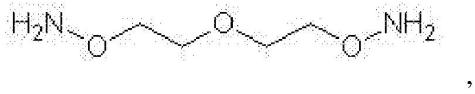
청구항 1에 있어서, 상기 치료 단백질이 혈액응고 단백질이고, 상기 치료 단백질의 산화된 탄수화물 모이어티는 상기 혈액응고 단백질의 활성화 웨პ티드에 위치하는 방법.

청구항 14

청구항 12에 있어서, 상기 PSA는 활성화된 아미노옥시 링커를 산화된 PSA와 반응시켜서 제조되고;

상기 아미노옥시 링커는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되고:

- a) 하기 식의 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 링커:

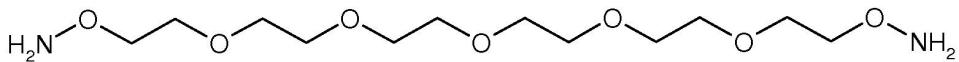


- b) 하기 식의 3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민 링커:



및

- c) 하기 식의 3,6,9,12,15-펜타옥사-헵타데칸-1,17-디옥시아민 링커:



상기 PSA는 산화제와의 인큐베이션에 의해 산화되어 PSA의 비-환원성 말단에서 말단 알데하이드 그룹을 형성하는 방법.

청구항 15

청구항 1 및 3 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 산화제는 NaIO_4 인 방법.

청구항 16

청구항 1 및 3 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 친핵성 촉매는 1 mM 내지 50 mM의 농도 또는 10 mM의 농

도로 제공되는 방법.

청구항 17

청구항 1 및 3 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 나이트륨 시아노보로하이드라이드 (NaCNBH_3), 아스코르브산 (비타민 C) 및 NaBH_3 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 환원성 화합물을 포함하는 완충액에서 콘주게이션된 치료 단백질을 인큐베이션하여 콘주게이션된 치료 단백질에서 옥심 결합을 환원시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 18

청구항 1 및 3 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 콘주게이션된 치료 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 크로마토그래피는 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC), 이온 교환 크로마토그래피 (IEC), 크기 배제 크로마토그래피 (SEC), 친화성 크로마토그래피, 및 역상 크로마토그래피로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 흐름 방향은 상향류로 설정되고 유속은 0.2 cm/min 내지 6.7 cm/min 인 하나 이상의 세정 단계를 포함하는 방법.

청구항 21

청구항 19에 있어서, 흐름 방향은 하향류로 설정되고 유속은 0.1 cm/min 내지 6.7 cm/min 인 하나 이상의 용출 단계를 포함하는 방법.

청구항 22

청구항 18에 있어서, 한외여과/정용여과 (UF/DF)에 의해 콘주게이션된 치료 단백질을 농축하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 23

청구항 18에 있어서, 상기 치료 단백질은 5 내지 11개의 수용성 폴리머 모이어티들을 포함하는 방법.

청구항 24

청구항 1에 있어서, 상기 콘주게이션된 치료 단백질은 크로마토그래피를 사용하여 정제되고; 안티-케이오성 (anti-chaotropic) 염은 로딩 단계 및 세정 단계에 사용되고; 상기 방법은, 흐름 방향은 상향류로 설정되고 유속은 0.2 cm/min 내지 6.7 cm/min 인 하나 이상의 세정 단계 및 흐름 방향은 하향류로 설정되고 상기 유속은 0.2 cm/min 내지 6.7 cm/min 인 하나 이상의 용출 단계를 포함하고; 한외여과/정용여과 (UF/DF)에 의해 콘주게이션된 치료 단백질을 농축하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 25

치료 단백질 상의 산화된 탄수화물 모이어티와, 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 옥심 결합을 형성하는 방법으로서,

상기 방법은,

- 상기 단백질을 나이트륨 페리오데이트 (NaIO_4), 납 테트라아세테이트 (Pb(OAc)_4) 및 칼륨 페루테네이트 (KRuO_4)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 산화제와 함께 인큐베이션하여 치료 단백질 상의 탄수화물 모이어티를 산화시키는 단계; 및
- 상기 옥심 결합의 형성을 허용하기 위하여, 친핵성 촉매의 존재 하에 상기 치료 단백질의 상기 산화된 탄수화물 모이어티와, 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 옥심 결합을 형성하는 단

계를 포함하고;

상기 활성화된 수용성 폴리머는 활성 아미노옥시 그룹을 함유하고, 폴리에틸렌 글라이콜 (PEG), 분지형 PEG, PolyPEG®(Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), 폴리시알산 (PSA), 탄수화물, 다당류, 폴루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 살레이트, 더마탄 살레이트, 텍스트란, 카복시메틸-텍스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글라이콜 (PAG), 폴리프로필렌 글라이콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 및 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포름알) (PHF)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

상기 치료 단백질은 당단백질 또는 시험관 내에서 글리코실화된 치료 단백질로서, 인자 VIIa (FVIIa), 인자 VIII (FVIII), 인자 IX (FIX), EPO, Ang-2, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 신경 성장 인자 (NGF), EGF, 인간 성장 호르몬 (HGH), TNF-알파, 인슐린, 인터페론-알파 (IFN-알파), 인터페론-감마 (IFN-감마), 콜로니 자극 인자-1 (CSF-1), Humira (아달리무맙), 및 Prolia (데노수맙)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이고;

상기 친핵성 촉매는 m-톨루이딘인 방법.

청구항 26

치료 단백질 상의 산화된 탄수화물 모이어티와, 활성 하이드라자이드 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 하이드라존 결합을 형성하는 방법으로서,

상기 방법은,

- 상기 단백질을 나트륨 폐리오레이트 ($NaIO_4$), 납 테트라아세테이트 ($Pb(OAc)_4$) 및 칼륨 퍼루테네이트 ($KRuO_4$)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 산화제와 함께 인큐베이션하여 치료 단백질 상의 탄수화물 모이어티를 산화시키는 단계; 및
- 상기 하이드라존 결합의 형성을 허용하기 위하여, 친핵성 촉매의 존재 하에 상기 치료 단백질의 상기 산화된 탄수화물 모이어티와, 활성 하이드라자이드 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 하이드라존 결합을 형성하는 단계를 포함하고;

상기 활성화된 수용성 폴리머는 활성 하이드라자이드 그룹을 함유하고, 폴리에틸렌 글라이콜 (PEG), 분지형 PEG, PolyPEG®(Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), 폴리시알산 (PSA), 탄수화물, 다당류, 폴루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 살레이트, 더마탄 살레이트, 텍스트란, 카복시메틸-텍스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글라이콜 (PAG), 폴리프로필렌 글라이콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 및 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포름알) (PHF)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

상기 치료 단백질은 당단백질 또는 시험관 내에서 글리코실화된 치료 단백질로서, 인자 VIIa (FVIIa), 인자 VIII (FVIII), 인자 IX (FIX), EPO, Ang-2, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 신경 성장 인자 (NGF), EGF, 인간 성장 호르몬 (HGH), TNF-알파, 인슐린, 인터페론-알파 (IFN-알파), 인터페론-감마 (IFN-감마), 콜로니 자극 인자-1 (CSF-1), Humira (아달리무맙), 및 Prolia (데노수맙)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이고;

상기 친핵성 촉매는 m-톨루이딘인 방법.

청구항 27

삭제

청구항 28

청구항 1 및 3 내지 14 및 24 중 어느 한 항에 있어서, 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 상기 수용성 폴리머는 하기를 포함하는 방법으로 제조되는 방법:

- 상기 산화된 수용성 폴리머 및 활성화된 아미노옥시 링커 사이의 안정한 옥심 결합의 형성을 허용하기 위하여, 산화된 수용성 폴리머를 포함하는 용액을, 활성 아미노옥시 그룹을 포함하는 활성화된 아미노옥시 링커와 함께 인큐베이션하는 단계로서, 상기 조건은 1 분 내지 24 시간의 지속시간; 2 °C내지 37 °C의 온도; 광의 존재

또는 부재 조건, 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하고; 이로써 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 수용성 폴리머를 형성하는 단계; 및

b) 크로마토그래피, 여과 및 침전으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법으로 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 수용성 폴리머를 정제하는 단계.

청구항 29

청구항 28에 있어서,

a') 상기 산화된 수용성 폴리머 및 활성화된 아미노옥시 링커 사이에 안정한 알콕사민 결합의 형성을 허용하기 위하여, 단계 a)의 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 수용성 폴리머를 포함하는 용액을 환원제와 함께 인큐베이션하는 단계를 더 포함하며, 상기 조건은 1 분 내지 24 시간의 지속시간; 2 °C 내지 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건; 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 단계를 추가로 포함하고, 단계 (a')는 단계 (a) 이후에 그리고 단계 (b) 이전에 실행되는 단계.

청구항 30

청구항 28에 있어서,

a') 1 분 내지 24 시간의 지속시간; 2 °C 내지 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건; 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 조건 하에서, 단계 a)의 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 수용성 폴리머를 포함하는 용액을 친핵성 촉매와 함께 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함하고, 단계 (a')는 단계 (a) 이후에 그리고 단계 (b) 이전에 실행되는 방법.

청구항 31

청구항 28에 있어서, 상기 수용성 폴리머는 산화제와의 인큐베이션에 의해 산화되어 수용성 폴리머의 비-환원성 말단에서 말단 알데하이드 그룹을 형성하는 방법.

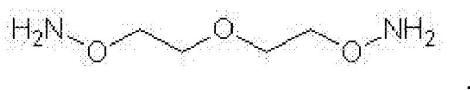
청구항 32

청구항 31에 있어서, 상기 산화제는 NaIO_4 인 방법.

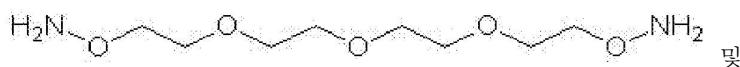
청구항 33

청구항 28에 있어서, 상기 아미노옥시 링커는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법:

a) 하기 식의 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 링커:

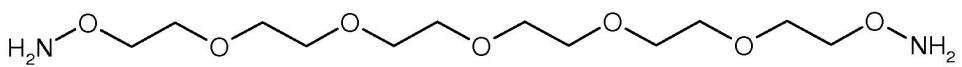


b) 하기 식의 3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민 링커:



및

c) 하기 식의 3,6,9,12,15-펜타옥사-헵타데칸-1,17-디옥시아민 링커:



청구항 34

청구항 29에 있어서, 상기 환원제는 나트륨 시아노보로하이드라이드 (NaCNBH_3), 아스코르브산 (비타민 C) 및 NaBH_3 로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 35

청구항 30에 있어서, 상기 친핵성 촉매는 m -톨루이딘이고, 최종 농도 1.0 mM 내지 50 mM의 친핵성 촉매의 양으로 첨가되는 방법.

청구항 36

청구항 28에 있어서, 한외여과/정용여과 (UF/DF)에 의해 콘주게이션된 치료 단백질을 농축하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 37

수용성 폴리머를 치료 단백질의 산화된 탄수화물 모이어티에 콘주게이션시키는 것을 포함하고, 콘주게이션을 허용하기 위하여 상기 산화된 탄수화물 모이어티를 활성화된 수용성 폴리머와 접촉시키는 것을 포함하는 방법에 의해 생성된 변형 치료 단백질이며,

상기 활성화된 수용성 폴리머는 활성 아미노옥시 그룹을 함유하고, 폴리에틸렌 글라이콜 (PEG), 분지형 PEG, PolyPEG® 폴리시알산 (PSA), 탄수화물, 다당류, 폴루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트, 더마탄 설페이트, 엑스트란, 카복시메틸-엑스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글라이콜 (PAG), 폴리프로필렌 글라이콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 및 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포름알) (PHF)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

상기 치료 단백질은 당단백질 또는 시험관 내에서 글리코실화된 치료 단백질로서, 인자 VIIa (FVIIa), 인자 VIII (FVIII), 인자 IX (FIX), EPO, Ang-2, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 신경 성장 인자 (NGF), EGF, 인간 성장 호르몬 (HGH), TNF-알파, 인슐린, 인터페론-알파 (IFN-알파), 인터페론-감마 (IFN-감마), 콜로니 자극 인자-1 (CSF-1), Humira (아달리무맙), 및 Prolia (테노수맙)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이고;

상기 탄수화물 모이어티는 나트륨 폐리오레이트 ($NaIO_4$), 납 테트라아세테이트 ($Pb(OAc)_4$) 및 칼륨 폐루테네이트 ($KRuO_4$)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 산화제를 포함하는 완충액과의 인큐베이션에 의해 산화되고;

옥심 결합은 상기 산화된 탄수화물 모이어티와, 수용성 폴리머 상의 상기 활성 아미노옥시 그룹 사이에서 형성되고;

상기 옥심 결합 형성은 친핵성 촉매인 m -톨루이딘에 의해 촉매되는, 변형 치료 단백질.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 치료 단백질은 FVIIa, FVIII 및 FIX로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

수용성 폴리머는 PEG 또는 PSA이고,

산화제는 나트륨 폐리오레이트 ($NaIO_4$)이고, 50 μM 내지 1000 μM 의 최종 농도가 되는 양으로 첨가되고,

친핵성 촉매는 m -톨루이딘이고 1 mM 내지 50 mM의 농도로 제공되는, 변형 치료 단백질.

청구항 39

청구항 37에 따른 변형 치료 단백질을 제조하는 방법이며, 상기 방법은 하기 단계들을 포함하는 방법:

- 치료 단백질을 포함하는 용액의 pH 값을 5.0 내지 8.0의 pH 값으로 조정하는 것을 포함하는 제1 단계로서, 상기 치료 단백질 농도는 0.3 mg/ml 내지 3.0 mg/ml인 제1 단계;
- 상기 치료 단백질 상의 하나 이상의 탄수화물을 산화시키는 것을 포함하는 제2 단계로서, 상기 산화제는 0.1 분 내지 120 분의 지속시간; 2 °C 내지 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건, 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 조건 하에서, 50 μM 내지 1000 μM 의 최종 농도가 되도록 제1 단계에서의 용액에 첨가되는 제2 단계;
- 상기 치료 단백질을 원하는 과잉 농도의 활성화된 수용성 폴리머와 접촉시키는 것을 포함하는 제3 단계로서, 0.5 시간 내지 24 시간의 지속시간, 2 °C 내지 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건; 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 조건 하에서, 상기 과잉 농도는 1-배 몰 과잉 내지 300-배 몰 과잉인 제3 단계;

d) 친핵성 촉매를 제3 단계의 용액에 첨가하는 것을 포함하는 제4 단계로서, 상기 친핵성 촉매는, 0.1 분 내지 30 분의 지속시간; 2 °C 내지 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건, 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 조건 하에서, 1 mM 내지 50 mM의 최종 농도가 되도록 첨가되는 제4 단계;

e) 치료 단백질이, 치료 단백질 상의 하나 이상의 산화된 탄수화물에 대한 활성화된 수용성 폴리머의 콘주게이션을 허용하기 위하여, 활성화된 수용성 폴리머 및 친핵성 촉매와 함께 인큐베이션되는 제5 단계로서, 상기 조건은 0.5 시간 내지 24 시간의 지속시간, 2 °C 내지 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건, 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 제5 단계; 및

f) 상기 제5 단계에서의 치료 단백질의 하나 이상의 산화된 탄수화물에 대한 상기 수용성 폴리머의 콘주게이션이, L-시스테인, 메티오닌, 글루타티온, 글리세롤, Na₂S₂O₅ (나트륨 메타 바이설파이트), 트립토판, 티로신, 히스티딘 또는 그의 유도체들, 크레졸, 이미다졸, 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 켄칭제의 첨가로 면추는 제6 단계로서; 상기 켄칭제는 5 분 내지 120 분의 지속시간; 2 °C 내지 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건, 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 조건 하에서, 1 mM 및 100 mM의 최종 농도가 되도록 첨가되는 제6 단계.

청구항 40

청구항 39에 있어서, 단계 a) 내지 단계 e)는 단일 용기에서 일어나는 방법.

청구항 41

청구항 40에 있어서, 콘주게이션된 치료 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 42

청구항 41에 있어서, 콘주게이션된 치료 단백질은 크로마토그래피, 여과 및 침전으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법으로 정제되는 방법.

청구항 43

청구항 42에 있어서, 크로마토그래피는 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC), 이온 교환 크로마토그래피 (IEC), 크기 배제 크로마토그래피 (SEC), 친화성 크로마토그래피, 및 역상 크로마토그래피로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 44

청구항 3에 있어서, 치료 단백질의 초기 농도가 1.0 mg/ml이고 pH가 6.0인 방법.

청구항 45

청구항 5에 있어서, 상기 조건이 120분의 지속시간, 22 °C의 온도, 광의 부재 조건 및 교반 조건을 포함하는 방법.

청구항 46

청구항 6에 있어서, 친핵성 촉매의 최종 농도가 10 mM이고, 상기 조건이 0.1 분 내지 15 분의 지속시간, 22 °C의 온도, 광의 부재 조건, 및 교반 조건을 포함하는 방법.

청구항 47

청구항 7에 있어서, 산화제의 최종 농도가 400 μM이고, 상기 조건이 10분의 지속시간, 22 °C의 온도, 광의 부재 조건, 및 교반 조건을 포함하는 방법.

청구항 48

청구항 1, 3 내지 11 및 13 중 어느 한 항에 있어서, 수용성 폴리머가 PEG인 방법.

청구항 49

청구항 1, 3 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 치료 단백질이 FIX인 방법.

청구항 50

청구항 1, 3 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 치료 단백질이 FVIIa인 방법.

청구항 51

청구항 1, 3 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 치료 단백질이 FVIII인 방법.

청구항 52

청구항 17에 있어서, 환원성 화합물이 NaCNBH₃인 방법.

청구항 53

청구항 18에 있어서, 콘주게이션된 치료 단백질이 크로마토그래피, 여과 및 침전으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법으로 정제되는 방법.

청구항 54

청구항 31에 있어서, 산화된 수용성 폴리머가 PEG인 방법.

청구항 55

청구항 31에 있어서, 산화된 수용성 폴리머가 PSA인 방법.

청구항 56

청구항 34에 있어서, 환원성 화합물이 NaCNBH₃인 방법.

청구항 57

청구항 19에 있어서, 안티-케이오성 염이 크로마토그래피 로딩 단계 및 크로마토그래피 세정 단계에서 사용되는 방법.

청구항 58

청구항 19에 있어서, 크로마토그래피가 칼럼에서 일어나는 방법.

청구항 59

청구항 58에 있어서, 칼럼이 폐닐-세파로오스 FF 및 부틸-세파로오스 FF로 이루어진 그룹으로부터 선택된 크로마토그래피 수지를 포함하는 방법.

청구항 60

청구항 59에 있어서, 수지가 5 cm 내지 20 cm의 총 높이 또는 10 cm의 총 높이에서 칼럼 내에 존재하는 방법.

청구항 61

청구항 20에 있어서, 유속이 2 cm/min인 방법.

청구항 62

청구항 21에 있어서, 유속이 1 cm/min인 방법.

청구항 63

청구항 22에 있어서, 치료 단백질의 최종 농도가 0.5 내지 3 mg/ml인 방법.

청구항 64

청구항 24에 있어서, 크로마토그래피가 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)이고, 하나 이상의 세정 단계 유속이 2 cm/min이며, 하나 이상의 용출 단계 유속이 1 cm/min인 방법.

청구항 65

청구항 30에 있어서,

a") 상기 산화된 수용성 폴리머 및 활성화된 아미노옥시 링커 사이에 안정한 알콕사민 결합의 형성을 허용하기 위하여, 단계 b)의 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 수용성 폴리머를 포함하는 용액을 환원제와 함께 인큐베이션하는 단계를 더 포함하며, 상기 조건은 1 분 내지 24 시간의 지속시간; 2 °C내지 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건; 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 단계를 추가로 포함하고, 단계 (a")는 단계 (a') 이후에 그리고 단계 (b) 이전에 실행되는 방법.

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 수용성 폴리머를 단백질에 콘주케이션 (conjugation)시키는 물질 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 수용성 폴리머 및 치료 단백질 사이의 공유 결합의 형성에 의한 콘주케이트의 제조는 다양한 화학 방법들에 의해 수행될 수 있다. 폴리펩티드 약물의 페길화 (PEGylation)는 순환 중에서 이들을 보호하고, 이들의 약동학적 및 약력학적 특성을 개선시킨다 (Harris 및 Chess, Nat Rev Drug Discov. 2003;2:214-21). 페길화 공정은 폴리펩티드 약물에 에틸렌 글리콜의 반복 단위 (폴리에틸렌 글리콜 (PEG))를 부착시킨다. PEG 분자는 큰 유체역학적 용적 (구형 단백질의 크기의 5 내지 10 배)을 가지며, 물에 매우 잘 용해되고, 수화되며, 비-독성이고, 비-면역 원성이며, 신체로부터 빠르게 제거된다. 분자의 페길화는 효소적 분해에 대한 약물의 저항성 증가, 생체내 반감기 증가, 투약 빈도의 감소, 면역원성의 저하, 물리적 및 열적 안정성의 증가, 용해도 증가, 액체 안정성의 증가, 및 응집의 감소를 유도할 수 있다. 최초의 페길화된 약물은 1990년대 초반에 FDA에 의해서 승인되었다. 그 이후에, FDA는 경구, 주사 및 국소 투여를 위한 여러 페길화된 약물을 승인하였다.

[0003] 콜로민산 (CA)으로도 불리는 폴리시알산 (PSA)은 천연적으로 발생한 폴리사카라이드이다. 이것은 α (2→8) 케토시딕 (ketosidic) 결합을 갖는 N-아세틸뉴라민산의 단일 중합체 (homopolymer)이며, 그의 비-환원성 말단에 인접한 디올기를 함유한다. 이것은 음으로 하전되며, 인체의 천연 구성성분이다. 이것은 박테리아로부터 대량으로, 예정된 물리적 특성을 가지고 쉽게 생산될 수 있다 (미국 특허 제5,846,951호). 박테리아에서 생산된 PSA는 인체에서 생산된 PSA와 화학적으로 및 면역학적으로 동일하기 때문에, 박테리아 PSA는, 심지어 단백질에 커플링

된 경우에도 비-면역원성이다. 일부의 폴리머들과 달리, PSA 산은 생물 분해성이다. 카탈라제 및 아스파라기나제에 대한 콜로민산의 공유적 커플링은 단백분해 효소 또는 혈장의 존재 하에서 효소 안정성을 증가시키는 것으로 나타났다. 폴리시알릴화 및 비변형된 아스파라기나제를 이용한 생체내 비교 시험에서, 폴리시알릴화가 효소의 반감기를 증가시켰다는 것이 밝혀졌다 (Fernandes and Gregoriadis, *Int J Pharm.* 2001;217:215-24).

[0004] 캡티드 또는 단백질에 대한 PEG-유도체의 커플링은 로버츠 (Roberts) 등에 의해서 검토되었다 (*Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:459-76). 수용성 폴리머를 치료학적 단백질에 커플링시키는 한가지 접근 방법은 단백질의 탄수화물 부위를 통한 폴리머의 콘주게이션이다. 단백질 내의 탄수화물의 인접한 히드록실기 (OH)는 과요오드산 나트륨 (NaIO4)에 의해서 쉽게 산화되어 활성 알데히드기를 형성할 수 있다 (Rothfus et Smith, *J Biol Chem* 1963; 238:1402-10; van Lenten et Ashwell, *J Biol Chem* 1971;246:1889-94). 그 다음, 상기 폴리머는, 예를 들어 활성 히드라지드기를 함유하는 시약을 사용함으로써 상기 탄수화물의 알데히드기에 커플링될 수 있다 (Wilchek M 및 Bayer EA, *Methods Enzymol* 1987;138:429-42). 보다 최근의 기술로서 알데히드와 반응하여 옥심 결합을 형성하는 아미노옥시기를 함유하는 시약을 사용하는 것이 있다 (WO 96/40662, WO2008/025856).

[0005] 치료학적 단백질에 대한 수용성 폴리머의 콘주게이션을 설명하는 추가적인 예는, 폰 빌레브란트 인자 내의 탄수화물 부위를 산화시키고, 이어서 히드라지드 화학 반응을 이용하여 PEG에 대해 커플링시키는 것을 교시한 WO 06/071801; rFVIII를 산화시키고, 이어서 히드라지드 화학 반응을 이용하여 PEG 및 그 밖의 다른 수용성 폴리머 (예를 들어, PSA, HES, 텍스트란)에 커플링시키는 것을 교시한 미국 공개 제2009/0076237호; 다른 응고 인자, 예를 들어, rFIX, FVIII 및 FVIIa를 산화시키고, 이어서 옥심 결합의 형성에 의한 아미노 옥시 화학 반응을 이용하여, 예를 들어, PEG에 커플링시키는 것을 교시한 WO 2008/025856; 및 FIX를 산화시키고, 이어서 히드라지드 화학 반응을 이용하여 PEG에 커플링시키는 것을 교시한 미국 특허 제5,621,039호에 기술되어 있다.

[0006] 최근, 시알산의 약한 과요오드산염 산화로 알데히드를 생성시키고, 이어서 촉매량의 아닐린의 존재 하에서 아미노옥시기를 함유하는 시약과 반응시키는 것을 포함하는 개선된 방법이 기술되었다 (Dirksen A 및 Dawson PE, *Bioconjugate Chem.* 2008;19:2543-8; 및 Zeng Y 등, *Nature Methods* 2009;6:207-9). 상기 아닐린 촉매작용은 옥심 라이게이션 (ligation)을 극적으로 촉진시켜, 매우 낮은 농도의 시약의 사용을 가능하게 한다. 친핵성 촉매의 사용은 또한 하기에 기재되어 있다: Dirksen, A, et al, *J Am Chem Soc*, 128:15602-3 (2006); Dirksen, A, et al, *Angew chem. Int Ed*, 45:7581-4 (2006); Kohler, J.J, *ChemBioChem*, 10:2147-50 (2009); Giuseppone, N, et al, *J Am Chem Soc*, 127:5528-39 (2005); 및 Thygesen, M.B, et al, *J Org Chem*, 75:1752-5 (2010).

[0007] 아닐린 촉매작용이 짧은 반응 시간 및 저농도의 아미노옥시 사약의 사용을 허용하는 옥심 결찰을 촉진할 수 있지만, 아닐린은, 예를 들면, 콘주게이트된 치료 단백질이 약품의 기초를 형성할 때 고려되어야 되는 독성 특성을 갖는다. 예를 들면, 아닐린은 메트헤모글로빈혈증을 유발하는 것으로 보여졌다 (Harrison, J.H., 및 Jollow, D.J, *Molecular Pharmacology*, 32(3) 423-431, 1987). 랫트의 장기 식이 치료는 비장에서 종양을 유발하는 것을 보여졌다 (Goodman, DG, et al, *J Natl Cancer Inst*, 73(1):265-73, 1984). 시험관 내에서 연구는 또한, 아닐린이 염색체 돌연변이를 유발하는 잠재성을 가지며 잠재적 유전독성 활성을 갖는다는 것을 보여주었다 (Bombhard E.M. et Herbold B, *Critical Reviews in Toxicology* 35,783-835, 2005).

[0008] 아닐린의 잠재적 위험 특성을 고려하고 상기 방법들로 치료학적 단백질에 수용성 폴리머를 콘주게이션하는 것이 가능하나, 다양한 시약과 관련된 비용을 최소화하고 환자 수령인에 대한 건강 위험을 최소화하면서 단백질의 약동학적 및/또는 약력학적 특성을 개선시키는, 단백질에 수용성 폴리머를 콘주게이션시키는 물질 및 방법을 개발할 필요성은 여전히 남아있다.

발명의 요약

[0010] 본 발명은 콘주게이션 반응이 친핵성 촉매에 의해 촉진될 때 다양한 시약과 관련된 비용 및 환자 수령인에 대한 건강 위험을 최소화하면서 단백질의 약동학적 및/또는 약력학적 특성을 개선시키는, 단백질에 수용성 폴리머를 콘주게이션시키는 물질 및 방법을 제공한다. 본 발명의 다양한 구현예에서, 아닐린을 대신하는 대안적인 촉매가 제공된다.

[0011] 일 구현예에서, 수용성 폴리머를 치료 단백질의 산화된 탄수화물 모이어티에 코주게이션시키는 방법이 제공되고, 이 방법은 콘주게이션을 허용하는 조건 하에서 상기 산화된 탄수화물 모이어티를 활성화된 수용성 폴리머와 접촉시키는 것을 포함하고; 상기 수용성 폴리머는 활성 아미노옥시 그룹을 함유하고 폴리에틸렌 글라이콜 (PEG), 분지형 PEG, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), 폴리시알산 (PSA), 전분, 하이드

록시알킬 전분 (HAS), 하이드록실에틸 전분 (HES), 탄수화물, 다당류, 폴루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트, 더마틴 설페이트, 전분, 텍스트란, 카복시메틸-텍스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글라이콜 (PAG), 폴리프로필렌 글라이콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일옥시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 상기 탄수화물 모이어티는 나트륨 페리오데이트 (NaIO4), 납 테트라아세테이트 (Pb(OAc)4) 및 칼륨 퍼루테네이트 (KRuO4)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 산화제를 포함하는 완충액으로 인큐베이션에 의해 산화되고; 여기서 옥심 결합은 상기 산화된 탄수화물 모이어티와, 수용성 폴리머 상의 상기 활성 아미노옥시 그룹 사이에서 형성되고; 여기서 상기 옥심 결합 형성은 o-아미노 벤조산, m-아미노 벤조산, p-아미노 벤조산, 살파닐산, o-아미노벤즈아마이드, o-톨루이딘, m-톨루이딘, p-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, 및 p-아니시딘으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 친핵성 촉매에 의해 촉진된다.

[0012] 또 하나의 구현예에서, 수용성 폴리머를 치료 단백질의 산화된 탄수화물 모이어티에 코주제이션시키는 방법이 제공되고, 이 방법은 콘주제이션을 허용하는 조건 하에서 상기 산화된 탄수화물 모이어티를 활성화된 수용성 폴리머와 접촉시키는 것을 포함하고; 상기 치료 단백질은 인자 IX (FIX), 인자 VIII (FVIII), 인자 VIIa (FVIIa), 폰빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF), ADAMTS 13 프로테아제, IL-1 알파, IL-1 베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, 콜로니 자극 인자-1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), EPO, 인터페론-알파 (IFN-알파), 공통 인터페론, IFN-베타, IFN-감마, IFN-오메가, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 알파, IL-33, 트롬보포이에틴 (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 1 (ANGPTL1), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 2 (ANGPTL2), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 3 (ANGPTL3), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 4 (ANGPTL4), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 5 (ANGPTL5), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 6 (ANGPTL6), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 7 (ANGPTL7), 바이트로넥틴, 혈관내피 성장 인자 (VEGF), 안지오개닌, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 골형성 단백질-1, 골형성 단백질-2, 골형성 단백질-3, 골형성 단백질-4, 골형성 단백질-5, 골형성 단백질-6, 골형성 단백질-7, 골형성 단백질-8, 골형성 단백질-9, 골형성 단백질-10, 골형성 단백질-11, 골형성 단백질-12, 골형성 단백질-13, 골형성 단백질-14, 골형성 단백질-15, 골형성 단백질 수용체 IA, 골형성 단백질 수용체 IB, 골형성 단백질 수용체 II, 뇌 유래 신경친화성 인자, 카디오토로핀-1, 섬모 신경친화성 인자, 섬모 신경친화성 인자 수용체, 크립토, 크립틱, 시토카인 유래 중성구 화학주성 인자 1, 시토카인 유래 중성구, 화학주성 인자 2 α , 시토카인 유래 중성구 화학주성 인자 2 β , β 내피 세포 성장 인자, 엔도텔린 1, 표피 성장 인자, 에피겐, 에피래굴린, 상피-유래된 중성구 유인체, 섬유아세포 성장 인자 4, 섬유아세포 성장 인자 5, 섬유아세포 성장 인자 6, 섬유아세포 성장 인자 7, 섬유아세포 성장 인자 8, 섬유아세포 성장 인자 8b, 섬유아세포 성장 인자 8c, 섬유아세포 성장 인자 9, 섬유아세포 성장 인자 10, 섬유아세포 성장 인자 11, 섬유아세포 성장 인자 12, 섬유아세포 성장 인자 13, 섬유아세포 성장 인자 16, 섬유아세포 성장 인자 17, 섬유아세포 성장 인자 19, 섬유아세포 성장 인자 20, 섬유아세포 성장 인자 21, 산성 섬유아세포 성장 인자, 염기성 섬유아세포 성장 인자, 신경아교세포계-유래된 신경친화성 인자 수용체 α 1, 신경아교세포계-유래된 신경친화성 인자 수용체 α 2, 성장 관련 단백질, 성장 관련 단백질 α , 성장 관련 단백질 β , 성장 관련 단백질 γ , 헤파린 결합 표피 성장 인자, 간세포 성장 인자, 간세포 성장 인자 수용체, 간종양-유래된 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자 I, 인슐린-유사 성장 인자 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 II, 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질, 케라틴생성세포 성장 인자, 백혈병 억제 인자, 백혈병 억제 인자 수용체 α , 신경 성장 인자 신경 성장 인자 수용체, 뉴로포이에틴, 뉴로트로핀-3, 뉴로트로핀-4, 온코스타틴 M (OSM), 태반 성장 인자, 태반 성장 인자 2, 혈소판-유래된 내피 세포 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자 A 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 AA, 혈소판 유래 성장 인자 AB, 혈소판 유래 성장 인자 B 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 BB, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 α , 혈소판 유래 성장 인자 수용체 β , B형 전구 세포 성장 자극 인자, 줄기세포 인자 (SCF), 줄기세포 인자 수용체, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, 변형 성장 인자 α , 변형 성장 인자 β , 변형 성장 인자 β 1, 변형 성장 인자 β 1.2, 변형 성장 인자 β 2, 변형 성장 인자 β 3, 변형 성장 인자 β 5, 잠재형 변형 성장 인자 β 1, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 I, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 II, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 III, 흉선 기질 림포포이에틴 (TSLP), 종양 괴사 인자 수용체 유형 I, 종양 괴사 인자 수용체 유형 II, 유로키나아제-유형 플라스미노겐 활성제 수용체, 포스포리파아제 활성 단백질 (PUP), 인슐린, 렉틴 리신, 프로락틴, 용모성 생식선, 난포자극 호르몬, 갑성선 자극 호르몬, 조직 플라스미

노겐 활성제, IgG, IgE, IgM, IgA, 및 IgD, α -갈라토시다아제, β -갈라토시다아제, DNase, 폐투인, 황체형성호르몬, 에스트로겐, 인슐린, 알부민, 지단백질, 태아단백, 트랜스페린, 트롬보포이에틴, 유로키나아제, 인테그린, 트롬빈, 렙틴, 휴미라 (아달리무맙), 프롤리아 (데노수맙), Enbrel (에타네르셉트), 표 1의 단백질, 또는 생물학적 활성 단편, 그의 유도체 또는 변형로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 상기 수용성 폴리머는 활성 아미노옥시 그룹을 함유하고 폴리에틸렌 글라이콜 (PEG), 분지형 PEG, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), 폴리시알산 (PSA), 전분, 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록실에틸 전분 (HES), 탄수화물, 다당류, 폴루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 살레이트, 더마탄 살레이트, 전분, 렉스트란, 카복시메틸-렉스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글라이콜 (PAG), 폴리프로필렌 글라이콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파센, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일옥시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 상기 탄수화물 모이어티는 나트륨 폐리오레이트 (NaIO4), 납 테트라아세테이트 (Pb(OAc)4) 및 칼륨 페루테네이트 (KRuO4)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 산화제를 포함하는 완충액으로 인큐베이션에 의해 산화되고; 여기서 옥심 결합은 상기 산화된 탄수화물 모이어티와, 수용성 폴리미 상의 상기 활성 아미노옥시 그룹 사이에서 형성되고; 여기서 상기 옥심 결합 형성은 o-아미노 벤조산, m-아미노 벤조산, p-아미노 벤조산, 살파닐산, o-아미노벤즈아마이드, o-톨루이딘, m-톨루이딘, p-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, 및 p-아니시딘으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 친핵성 촉매에 의해 촉진된다.

[0013] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 여기서 약 0.3 mg/ml 내지 약 3.0 mg/ml의 치료 단백질 초기 농도를 함유하는 용액은 상기 활성 수용성 폴리머와 접촉시키기 전에 pH 값 약 5.0 내지 약 8.0로 조정된다.

[0014] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 언급된 값 초과 또는 미만의 값을 의미한다. 다양한 구현예들에서, 용어 "약"은 언급된 값 플러스 또는 마이너스 언급된 값의 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10%를 포함한다.

[0015] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 치료 단백질의 초기 농도는 약 1.0 mg/ml이고 pH는 약 6.0이다. 관련 구현예에서, 치료 단백질의 초기 농도는 약 0.75 mg/ml이고 pH는 약 6.0이다. 또 하나의 관련 구현예에서, 치료 단백질의 초기 농도는 약 1.25 mg/ml이고 pH는 약 6.0이다.

[0016] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 치료 단백질은 원하는 과잉 농도의 활성 수용성 폴리머에 의해 접촉되고, 여기서 상기 과잉 농도는 약 1-몰 내지 약 300-몰 과잉이다. 또 하나의 구현예에서, 과잉 농도는 약 50-배 몰 과잉이다.

[0017] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 치료 단백질은 약 0.5 시간 내지 약 24 시간의 지속시간; 약 2 °C 내지 약 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재에서; 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하는 조건 하에서 활성화된 수용성 폴리머와 함께 인큐베이트된다. 또 하나의 구현예에서, 상기 조건은 약 120 분의 지속시간, 약 22 °C의 온도, 광의 부재; 및 교반하면서를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "교반하는"은 통상적으로 사용된 실험실 또는 제조 장비 및 생성물에 의해 다양한 속도 및 강도 (예를 들면, 완만한 교반)에서 교반하는 것을 포함하는 것으로 의미된다.

[0018] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 친핵성 촉매는 최종 농도 약 1.0 mM 내지 약 50 mM의 친핵성 촉매로 되는 양으로, 약 0.1 분 내지 약 30 분의 지속시간; 약 2 °C 내지 약 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재에서; 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하는 조건 하에서 첨가된다. 또 하나의 구현예에서, 친핵성 촉매의 최종 농도는 약 10 mM이고, 상기 조건은 최대 약 15 분의 지속시간, 약 22 °C의 온도, 광의 부재; 및 교반하면서를 포함한다.

[0019] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 산화제는 최종 농도 약 50 μ M 내지 약 1000 μ M의 산화제로 되는 양으로, 약 0.1 분 내지 120 분의 지속시간; 약 2 °C 내지 약 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재에서; 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하는 조건 하에서 첨가된다. 또 하나의 구현예에서, 산화제의 최종 농도는 약 400 μ M이고, 상기 조건은 약 10 분의 지속시간, 약 22 °C의 온도, 광의 부재 및 교반하면서를 포함하다.

[0020] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 수용성 폴리머를 상기 치료 단백질의 상기 산화된 탄수화물 모이어티에 콘주게이트하는 것은 L-시스테인, 메티오닌, 글루타티온, 글리세롤, 나트륨 메타 바이설파이트 (Na2S2O5), 트립토판, 티로신, 히스티딘 또는 그의 유도체들, 크레올, 이미다졸, 및 이들의 조합으로 이루어진

그룹으로부터 선택된 켄칭제의 첨가로 면추고; 여기서 상기 켄칭제는 최종 농도 약 1 mM 내지 약 100 mM의 켄칭제로 되는 양으로, 약 5 분 내지 약 120 분의 지속시간; 약 2 °C 내지 약 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재에서; 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하는 조건 하에서, 첨가된다. 또 하나의 구현예에서, 켄칭제는 L-시스테인이다. 또 다른 구현예에서, L-시스테인은 약 10 mM의 최종 농도가 되도록 첨가되고, 상기 조건은 약 60 분의 지속시간, 약 22°C의 온도, 광의 부재 및 교반하면서를 포함하다.

[0021] 또 하나의 구현예에서, 상기 언급된 방법이 제공되고, 이 방법은 하기를 포함한다: a) 치료 단백질을 포함하는 용액의 pH 값을 약 5.0 내지 약 8.0의 pH 값으로 조정하는 것을 포함하는 제1 단계로서, 상기 치료 단백질 농도는 약 0.3 mg/ml 내지 약 3.0 mg/ml인 제1 단계; b) 상기 치료 단백질 상의 하나 이상의 탄수화물을 산화시키는 것을 포함하는 제2 단계로서, 상기 산화제는 약 0.1 분 내지 약 120 분의 지속시간; 약 2 °C 내지 약 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재에서, 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하는 조건 하에서, 약 50 μM 내지 약 1000 μM의 최종 농도로 되도록 제1 단계에서 용액에 첨가되는 제2 단계; c) 상기 치료 단백질을 원하는 과잉 농도의 활성 수용성 폴리머와 접촉시키는 것을 포함하는 제3 단계로서, 약 0.5 시간 내지 약 24 시간의 지속시간, 약 2 °C 내지 약 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재에서; 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하는 조건 하에서, 상기 과잉 농도는 약 1-몰 과잉 내지 약 300-몰 과잉인 제3 단계; d) 친핵성 촉매를 제3 단계의 용액에 첨가하는 것을 포함하는 제4 단계로서, 상기 친핵성 촉매는, 약 0.1 분 내지 약 30 분의 지속시간; 약 2 °C 내지 약 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재에서, 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하는 조건 하에서, 약 1 mM 내지 약 50 mM의 최종 농도가 되도록 첨가되는 제4 단계; e) 치료 단백질이, 활성화된 수용성 폴리머의 치료 단백질 상의 하나 이상의 산화된 탄수화물에의 콘주케이션을 허용하는 조건 하에서, 활성화된 수용성 폴리머 및 친핵성 촉매와 함께 인큐베이트되는 제5 단계로서, 상기 조건은 약 0.5 시간 내지 약 24 시간의 지속시간, 약 2 °C 내지 약 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재에서, 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하는 제5 단계; 및 f) 상기 수용성 폴리머의 제5 단계의 치료 단백질의 하나 이상의 산화된 탄수화물에의 콘주케이트가 L-시스테인, 메티오닌, 글루타티온, 글리세롤, Na2S205 (나트륨 메타 바이설파이트), 트립토판, 티로신, 히스티딘 또는 그의 유도체들, 크레졸, 이미다졸, 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 켄칭제의 첨가로 면추는 제6 단계로서; 상기 켄칭제는 약 5 분 내지 약 120 분의 지속시간; 약 2 °C 내지 약 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재에서, 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하는 조건 하에서, 약 1 mM 및 약 100 mM의 최종 농도가 되도록 첨가되는 제6 단계. 또 하나의 구현예에서, 제1 단계에서의 치료 단백질의 초기 농도는 약 1 mg/ml이고 pH는 약 6.0이고; 여기서 상기 제2 단계에서의 산화제의 최종 농도는 약 400 μM이고, 제5 단계에서의 조건은 약 10 분의 지속시간, 약 22°C의 온도, 광의 부재 및 교반하면서를 포함하고; 여기서 제3 단계에서의 과잉 농도는 약 50 몰 과잉이고; 여기서 제3 단계에서의 조건은 약 15 분의 지속시간, 약 22 °C의 온도, 광의 부재 및 교반하면서를 포함하고; 여기서 제4 단계에서의 친핵성 촉매의 최종 농도는 약 10 mM이고, 제4 단계에서의 조건은 약 15 분의 지속시간, 약 22 °C의 온도, 광의 부재 및 교반하면서를 포함하고; 여기서 제5 단계에서 치료 단백질을 활성화된 수용성 폴리머 및 친핵성 촉매와 함께 인큐베이팅하는 조건은 약 2 시간의 지속시간; 약 22 °C의 온도; 광의 부재; 및 교반하면서를 포함하고; 여기서 제6 단계에서의 상기 켄칭제는 L-시스테인이고; 여기서 상기 L-시스테인은 약 10 mM의 최종 농도가 되도록 첨가되고, 제6 단계에서의 조건은 약 60 분의 지속시간, 약 22 °C의 온도, 광의 부재 및 교반하면서를 포함하다.

[0022] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 수용성 폴리머는 PSA이다. 또 하나의 구현예에서 PSA는 약 10 - 300 시알산 단위로 구성된다. 또 하나의 구현예에서, 수용성 폴리머는 PEG이다. 또 하나의 구현예에서, 수용성 폴리머는 HES이다. 또 다른 구현예에서, 수용성 폴리머는 HAS이다.

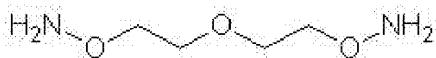
[0023] 또 다른 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 치료 단백질은 FIX이다. 또 하나의 구현예에서, 치료 단백질은 FVIIa이다. 또 하나의 구현예에서, 치료 단백질은 FVIII이다.

[0024] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 산화제는 나트륨 폐리오레이트 (NaIO4)이다.

[0025] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 여기서 상기 치료 단백질의 상기 산화된 탄수화물 모이어티는 혈액응고 단백질의 활성화 웹티드에서 위치한다.

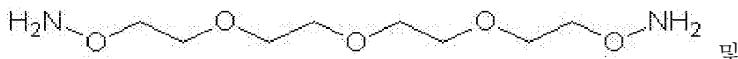
[0026] 일 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 여기서 PSA는 활성화된 아미노옥시 링커를 산화된 PSA와 반응시켜서 제조되고; 여기서 상기 아미노옥시 링커는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된다:

[0027] a) 하기 식의 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 링커:



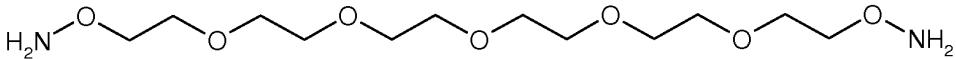
[0028]

[0029] b) 하기 식의 3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민 링커:



및

[0031] d) 하기 식의 3,6,9,12,15-페나톡사-헵타데칸-1,17-디옥시아민 링커:



[0032]

[0033] 여기서 상기 PSA는 산화제로 인큐베이션에 의해 산화되어 PSA의 비-환원 말단에서 말단 알데하이드 그룹을 형성한다. 관련 구현예에서, 아미노옥시 링커는 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민이다.

[0034] 또 다른 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 산화제는 NaIO4이다.

[0035] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 친핵성 촉매는 약 1 mM 내지 약 50 mM의 농도로 제공된다. 일 구현예에서, 친핵성 촉매는 m-톨루이딘이다. 또 다른 구현예에서, m-톨루이딘은 약 10 mM의 농도로 콘주케이션 반응에 존재한다.

[0036] 또 하나의 구현예에서, 상기 언급된 방법이 제공되고, 이 방법은 나트륨 시아노보로하이드라이드 (NaCNBH3), 아스코르브산 (비타민 C) 및 NaBH3로 이루어진 그룹으로부터 선택된 환원 화합물을 포함하는 완충액에서 콘주케이트된 치료 단백질을 인큐베이트하여 콘주케이트된 치료 단백질에서 옥심 결합을 환원시키는 단계를 추가로 포함한다. 일 구현예에서, 환원 화합물은 나트륨 시아노보로하이드라이드 (NaCNBH3)이다.

[0037] 또 다른 구현예에서, 상기 언급된 방법이 제공되고, 이 방법은 콘주케이트된 치료 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 콘주케이트된 치료 단백질은 크로마토그래피, 여과 및 침전으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법으로 정제된다. 또 하나의 구현예에서, 크로마토그래피는 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC), 이온 교환 크로마토그래피 (IEC), 크기 배제 크로마토그래피 (SEC), 친화성 크로마토그래피, 및 역상 크로마토그래피로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, 안티-케이오성 염은 크로마토그래피 로딩 단계 및 크로마토그래피 세정 단계에서 사용된다. 또 하나의 구현예에서, 크로마토그래피는 칼럼에서 일어난다. 또 하나의 구현예에서, 칼럼은 페닐-세파로오스 FF 및 부틸-세파로오스 FF로 이루어진 그룹으로부터 선택된 크로마토그래피 수지를 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 수지는 약 5 cm 내지 약 20 cm의 층 높이에서 칼럼 내에 존재한다. 일 구현예에서, 층 높이는 약 10 cm이다.

[0038] 또 하나의 구현예에서, 상기 언급된 방법이 제공되고, 이 방법은 하나 이상의 세정 단계를 포함하고 여기서 흐름 방향은 상향류로 설정되고 유속은 약 0.2 cm/min 내지 약 6.7 cm/min이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "하향류"는 크로마토그래피 칼럼의 최상부로부터 크로마토그래피 칼럼의 최저부 (통상의 흐름 방향/표준 방식)로의 흐름 방향을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "상향류" 칼럼의 최저부로부터 최상부로의 흐름 방향 (역 흐름 방향)을 의미한다. 일 구현예에서, 유속은 약 2 cm/min이다.

[0039] 또 하나의 구현예에서, 상기 언급된 방법이 제공되고, 이 방법은 하나 이상의 용출 단계를 포함하고 여기서 흐름 방향은 하향류로 설정되고 유속은 약 0.1 cm/min 내지 약 6.7 cm/min이다. 관련 구현예에서, 유속은 약 1 cm/min이다.

[0040] 또 다른 구현예에서, 상기 언급된 방법이 제공되고, 이 방법은 한외-/정용여과 (UF/DF)로 콘주케이트된 치료 단백질을 농축하는 것을 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 치료 단백질의 최종 농도는 약 0.5 내지 약 3 mg/ml이다.

[0041] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 치료 단백질은 약 5 내지 약 11개의 수용성 폴리머 모이어티들을 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 치료 단백질은 약 1 내지 약 3개의 수용성 폴리머를 포함한다.

[0042] 또 다른 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 여기서 콘주케이트된 치료 단백질은 크로마토그래피를 사용하여 정제되고; 여기서 안티-케이오성 염은 로딩 단계 및 세정 단계에 사용되고; 상기 방법은, 흐름 방향이 상향류로

설정되고 유속은 약 0.2 cm/min 내지 약 6.7 cm/min인 하나 이상의 세정 단계 및 흐름 방향이 하향류로 설정되고 상기 유속은 약 0.2 cm/min 내지 약 6.7 cm/min인 하나 이상의 용출 단계를 포함하고; 한외-/정용여과 (UF/DF)에 의해 콘주게이트된 치료 단백질을 농축하는 것을 추가로 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 크로마토그래피는 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)이고; 여기서 하나 이상의 세정 단계 유속은 약 2 cm/min이고; 여기서 하나 이상의 용출 단계 유속은 약 1 cm/min이다.

[0043] 또 하나의 구현예에서, 상기 언급된 방법들 중 어떤 것에 의해 생산된 변형된 치료 단백질이 제공된다.

[0044] 또 다른 구현예에서, 산화된 치료 단백질 상의 탄수화물 모이어티와, 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 옥심 결합을 형성하는 방법이 제공되고, 이 방법은 하기 단계를 포함한다: a) 상기 단백질을 나트륨 폐리오데이트 (NaIO4), 납 테트라아세테이트 (Pb(OAc)4) 및 칼륨 퍼루테네이트 (KRuO4)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 산화제와 함께 인큐베이트하여 치료 단백질 상의 탄수화물 모이어티를 산화시키는 단계; 및 b) 상기 옥심 결합의 형성을 허용하는 친핵성 촉매의 존재에서, 상기 치료 단백질의 상기 산화된 탄수화물 모이어티와, 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 옥심 결합을 형성하는 단계; 여기서 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 상기 수용성 폴리머는 폴리에틸렌 글라이콜 (PEG), 분자형 PEG, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), 폴리시알산 (PSA), 전분, 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록실에틸 전분 (HES), 탄수화물, 다당류, 폴루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트, 더마탄 설페이트, 전분, 텍스트란, 카복시메틸-텍스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글라이콜 (PAG), 폴리프로필렌 글라이콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐파리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일옥시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 여기서 상기 친핵성 촉매는 o-아미노 벤조산, m-아미노 벤조산, p-아미노 벤조산, 설파닐산, o-아미노벤즈아마이드, o-톨루이딘, m-톨루이딘, p-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, 및 p-아니시딘으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0045] 또 하나의 구현예에서, 산화된 치료 단백질 상의 탄수화물 모이어티와, 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 옥심 결합을 형성하는 방법이 제공되고, 이 방법을 하기 단계를 포함한다: a) 상기 단백질을 나트륨 폐리오데이트 (NaIO4), 납 테트라아세테이트 (Pb(OAc)4) 및 칼륨 퍼루테네이트 (KRuO4)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 산화제와 함께 인큐베이트하여 치료 단백질 상의 탄수화물 모이어티를 산화시키는 단계; 및 b) 상기 옥심 결합의 형성을 허용하는 친핵성 촉매의 존재에서, 상기 치료 단백질의 상기 산화된 탄수화물 모이어티와, 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 옥심 결합을 형성하는 단계; 여기서 상기 치료 단백질은 인자 IX (FIX), 인자 VIII (FVIII), 인자 VIIa (VIIa), 폰빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF), ADAMTS 13 프로테아제, IL-1 알파, IL-1 베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, 콜로니 자극 인자-1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), EPO, 인터페론-알파 (IFN-알파), 공통 인터페론, IFN-베타, IFN-감마, IFN-오메가, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 알파, IL-33, 트롬보포이에틴 (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 1 (ANGPTL1), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 2 (ANGPTL2), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 3 (ANGPTL3), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 4 (ANGPTL4), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 5 (ANGPTL5), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 6 (ANGPTL6), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 7 (ANGPTL7), 바이트로넥틴, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 안지오제닌, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 골형성 단백질-1, 골형성 단백질-2, 골형성 단백질-3, 골형성 단백질-4, 골형성 단백질-5, 골형성 단백질-6, 골형성 단백질-7, 골형성 단백질-8, 골형성 단백질-9, 골형성 단백질-10, 골형성 단백질-11, 골형성 단백질-12, 골형성 단백질-13, 골형성 단백질-14, 골형성 단백질-15, 골형성 단백질 수용체 IA, 골형성 단백질 수용체 IB, 골형성 단백질 수용체 II, 뇌 유래 신경친화성 인자, 카디오토로핀-1, 섬모 신경친화성 인자, 섬모 신경친화성 인자 수용체, 크립토, 크립틱, 시토카인 유래 중성구 화학주성 인자 1, 시토카인 유래 중성구, 화학주성 인자 2α, 시토카인 유래 중성구 화학주성 인자 2β, β 내피 세포 성장 인자, 엔도텔린 1, 표피 성장 인자, 에피겐, 에피데굴린, 상피-유래된 중성구 유인체, 섬유아세포 성장 인자 4, 섬유아세포 성장 인자 5, 섬유아세포 성장 인자 6, 섬유아세포 성장 인자 7, 섬유아세포 성장 인자 8, 섬유아세포 성장 인자 8b, 섬유아세포 성장 인자 8c, 섬유아세포 성장 인자 9, 섬유아세포 성장 인자 10, 섬유아세포 성장 인자 11, 섬유아세포 성장 인자 12, 섬유아세포 성장 인자 13, 섬유아세포 성장 인자 16, 섬유아세포 성장 인자 17, 섬유아세포 성장 인자 19, 섬유아세포 성장 인자 20, 섬유아세포 성장 인자 21, 산성 섬유아세포 성장

인자, 염기성 섬유아세포 성장 인자, 신경아교세포계-유래된 신경친화성 인자 수용체 $\alpha 1$, 신경아교세포계-유래된 신경친화성 인자 수용체 $\alpha 2$, 성장 관련 단백질, 성장 관련 단백질 α , 성장 관련 단백질 β , 성장 관련 단백질 γ , 헤파린 결합 표피 성장 인자, 간세포 성장 인자, 간세포 성장 인자 수용체, 간중양-유래된 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자 I, 인슐린-유사 성장 인자 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 II, 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질, 케라틴생성세포 성장 인자, 백혈병 억제 인자, 백혈병 억제 인자 수용체 α , 신경 성장 인자 신경 성장 인자 수용체, 뉴로포이에틴, 뉴로트로핀-3, 뉴로트로핀-4, 온코스타틴 M (OSM), 태반 성장 인자, 태반 성장 인자 2, 혈소판-유래된 내피 세포 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자 A 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 AA, 혈소판 유래 성장 인자 AB, 혈소판 유래 성장 인자 B 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 BB, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 α , 혈소판 유래 성장 인자 수용체 β , B형 전구세포 성장 자극 인자, 줄기세포 인자 (SCF), 줄기세포 인자 수용체, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, 변형 성장 인자 α , 변형 성장 인자 β , 변형 성장 인자 $\beta 1$, 변형 성장 인자 $\beta 1.2$, 변형 성장 인자 $\beta 2$, 변형 성장 인자 $\beta 3$, 변형 성장 인자 $\beta 5$, 잠재형 변형 성장 인자 $\beta 1$, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 I, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 II, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 III, 흉선 기질 림포포이에틴 (TSLP), 종양 피사 인자 수용체 유형 I, 종양 피사 인자 수용체 유형 II, 유로키나아제-유형 플라스미노겐 활성제 수용체, 포스포리파아제 활성 단백질 (PUP), 인슐린, 렉틴 리신, 프로락틴, 융모성 생식선, 난포자극 호르몬, 갑성선 자극 호르몬, 조직 플라스미노겐 활성제, IgG, IgE, IgM, IgA, 및 IgD, α -갈라토시다아제, β -갈라토시다아제, DNase, 폐투인, 황체형성 호르몬, 에스트로겐, 인슐린, 알부민, 지단백질, 태아단백, 트랜스페린, 트롬보포이에틴, 유로키나아제, 인테그린, 트롬빈, 랩틴, Humira (아달리무맙), Prolia (데노수맙), Enbrel (에타네르셉트), 표 1로부터의 단백질, 또는 생물학적 활성 단편, 그의 유도체 또는 변형으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 여기서 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 상기 수용성 폴리머는 폴리에틸렌 글라이콜 (PEG), 분지형 PEG, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), 폴리시알산 (PSA), 전분, 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록실에틸 전분 (HES), 탄수화물, 다당류, 폴루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 살레이트, 더마탄 살레이트, 전분, 엑스트란, 카복시메틸-엑스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글라이콜 (PAG), 폴리프로필렌 글라이콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일옥시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 여기서 상기 친핵성 촉매는 o-아미노 벤조산, m-아미노 벤조산, p-아미노 벤조산, 살파닐산, o-아미노벤즈아마이드, o-톨루이딘, m-톨루이딘, p-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, 및 p-아니시딘으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0046]

또 하나의 구현예에서, 산화된 치료 단백질 상의 탄수화물 모이어티와, 활성 하이드라자이드 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 하이드라존 결합을 형성하는 방법이 제공되고 이 방법은 하기의 단계를 포함한다: a) 상기 단백질을 나트륨 폐리오네이트 (NaIO_4), 납 테트라아세테이트 (Pb(OAc)_4) 및 칼륨 폐루테네이트 (KRuO_4)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 산화제와 함께 인큐베이트하여 치료 단백질 상의 탄수화물 모이어티를 산화시키는 단계; 및 b) 상기 하이드라존 결합의 형성을 허용하는 친핵성 촉매의 존재에서, 상기 치료 단백질의 상기 산화된 탄수화물 모이어티와, 활성 하이드라자이드 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 하이드라존 결합을 형성하는 단계; 여기서 활성 하이드라자이드 그룹을 함유하는 상기 수용성 폴리머는 폴리에틸렌 글라이콜 (PEG), 분지형 PEG, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), 폴리시알산 (PSA), 전분, 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록실에틸 전분 (HES), 탄수화물, 다당류, 폴루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 살레이트, 더마탄 살레이트, 전분, 엑스트란, 카복시메틸-엑스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글라이콜 (PAG), 폴리프로필렌 글라이콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일옥시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 여기서 상기 친핵성 촉매는 o-아미노 벤조산, m-아미노 벤조산, p-아미노 벤조산, 살파닐산, o-아미노벤즈아마이드, o-톨루이딘, m-톨루이딘, p-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, 및 p-아니시딘으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0047]

또 하나의 구현예에서, 하기 단계를 포함하는, 산화된 치료 단백질 상의 탄수화물 모이어티와, 활성 하이드라자이드 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 하이드라존 결합을 형성하는 방법: a) 상기 단백질을 나트륨 폐리오네이트 (NaIO_4), 납 테트라아세테이트 (Pb(OAc)_4) 및 칼륨 폐루테네이트 (KRuO_4)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 산화제와 함께 인큐베이트하여 치료 단백질 상의 탄수화물 모이어티를 산화시키는 단계; 및 b)

상기 하이드라존 결합의 형성을 허용하는 친핵성 촉매의 존재에서, 상기 치료 단백질의 상기 산화된 탄수화물 모이어티와, 활성 하이드라자이드 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 하이드라존 결합을 형성하는 단계; 여기서 상기 치료 단백질은 인자 IX (FIX), 인자 VIII (FVIII), 인자 VIIa (FVIIa), 폰빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF), ADAMTS 13 프로테아제, IL-1 알파, IL-1 베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, 콜로니 자극 인자-1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), EPO, 인터페론-알파 (IFN-알파), 공통 인터페론, IFN-베타, IFN-감마, IFN-오메가, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 알파, IL-33, 트롬보포이에틴 (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 1 (ANGPTL1), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 2 (ANGPTL2), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 3 (ANGPTL3), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 4 (ANGPTL4), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 5 (ANGPTL5), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 6 (ANGPTL6), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 7 (ANGPTL7), 바이트로넥틴, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 안지오게닌, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 골형성 단백질-1, 골형성 단백질-2, 골형성 단백질-3, 골형성 단백질-4, 골형성 단백질-5, 골형성 단백질-6, 골형성 단백질-7, 골형성 단백질-8, 골형성 단백질-9, 골형성 단백질-10, 골형성 단백질-11, 골형성 단백질-12, 골형성 단백질-13, 골형성 단백질-14, 골형성 단백질-15, 골형성 단백질 수용체 IA, 골형성 단백질 수용체 IB, 골형성 단백질 수용체 II, 뇌 유래 신경친화성 인자, 카디오토로핀-1, 섬모 신경친화성 인자, 섬모 신경친화성 인자 수용체, 크립토, 크립틱, 시토카인 유래 중성구 화학주성 인자 1, 시토카인 유래 중성구, 화학주성 인자 2 α , 시토카인 유래 중성구 화학주성 인자 2 β , β 내피 세포 성장 인자, 엔도텔린 1, 표피 성장 인자, 에피겐, 에피레귤린, 상피-유래된 중성구 유인체, 섬유아세포 성장 인자 4, 섬유아세포 성장 인자 5, 섬유아세포 성장 인자 6, 섬유아세포 성장 인자 7, 섬유아세포 성장 인자 8, 섬유아세포 성장 인자 8b, 섬유아세포 성장 인자 8c, 섬유아세포 성장 인자 9, 섬유아세포 성장 인자 10, 섬유아세포 성장 인자 11, 섬유아세포 성장 인자 12, 섬유아세포 성장 인자 13, 섬유아세포 성장 인자 16, 섬유아세포 성장 인자 17, 섬유아세포 성장 인자 19, 섬유아세포 성장 인자 20, 섬유아세포 성장 인자 21, 산성 섬유아세포 성장 인자, 염기성 섬유아세포 성장 인자, 신경아교세포계-유래된 신경친화성 인자 수용체 α 1, 신경아교세포계-유래된 신경친화성 인자 수용체 α 2, 성장 관련 단백질, 성장 관련 단백질 α , 성장 관련 단백질 β , 성장 관련 단백질 γ , 혜파린 결합 표피 성장 인자, 간세포 성장 인자, 간세포 성장 인자 수용체, 간종양-유래된 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자 I, 인슐린-유사 성장 인자 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 II, 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질, 케라틴생성세포 성장 인자, 백혈병 억제 인자, 백혈병 억제 인자 수용체 α , 신경 성장 인자 신경 성장 인자 수용체, 뉴로포이에틴, 뉴로트로핀-3, 뉴로트로핀-4, 온코스타틴 M (OSM), 태반 성장 인자, 태반 성장 인자 2, 혈소판-유래된 내피 세포 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자 A 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 AA, 혈소판 유래 성장 인자 AB, 혈소판 유래 성장 인자 B 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 BB, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 α , 혈소판 유래 성장 인자 수용체 β , B형 전구세포 성장 자극 인자, 줄기세포 인자 (SCF), 줄기세포 인자 수용체, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, 변형 성장 인자 α , 변형 성장 인자 β , 변형 성장 인자 β 1, 변형 성장 인자 β 1.2, 변형 성장 인자 β 2, 변형 성장 인자 β 3, 변형 성장 인자 β 5, 잠재형 변형 성장 인자 β 1, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 I, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 II, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 III, 흉선 기질 림포포이에틴 (TSLP), 종양 피사 인자 수용체 유형 I, 종양 피사 인자 수용체 유형 II, 유로키나아제-유형 플라스미노겐 활성제 수용체, 포스포리파아제 활성 단백질 (PUP), 인슐린, 렙틴 리신, 프로락틴, 융모성 생식선, 난포자극 호르몬, 갑성선 자극 호르몬, 조직 플라스미노겐 활성제, IgG, IgE, IgM, IgA, 및 IgD, α -갈라토시다아제, β -갈라토시다아제, DNase, 페투인, 황체형성 호르몬, 에스트로겐, 인슐린, 알부민, 지단백질, 태아단백, 트랜스페린, 트롬보포이에틴, 유로키나아제, 인테그린, 트롬빈, 렙틴, Humira (아달리무맙), Prolia (데노수맙), Enbrel (에타네르셉트), 표 1로부터의 단백질, 또는 생물학적 활성 단편, 그의 유도체 또는 변형으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 여기서 활성 하이드라자이드 그룹을 함유하는 상기 수용성 폴리머는 폴리에틸렌 글라이콜 (PEG), 분지형 PEG, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), 폴리시알산 (PSA), 전분, 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록실에틸 전분 (HES), 탄수화물, 다당류, 폴루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 살레이트, 더마탄 살레이트, 전분, 엑스트란, 카복시메틸-엑스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글라이콜 (PAG), 폴리프로필렌 글라이콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일 모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일옥시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 여기서 상기 친핵성 촉매는 o-아미노 벤조산, m-아미노 벤조산, p-아미노 벤조산, 살파닐산, o-아미노벤즈아마이드, o-톨루이딘, m-톨루이딘, p-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, 및 p-아니시딘으로 이루어진 그룹으로부터 선택된

다.

[0048] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 상기 수용성 폴리머는 하기를 포함하는 방법으로 제조된다: 상기 산화된 수용성 폴리머 및 활성화된 아미노옥시 링커 사이의 안정한 옥심 결합의 형성을 허용하는 조건 하에서, 산화된 수용성 폴리머를 포함하는 용액을, 활성 아미노옥시 그룹을 포함하는 활성화된 아미노옥시 링커와 함께 인큐베이트하는 단계로서, 상기 조건은 약 1 분 내지 약 24 시간의 지속시간; 약 2 °C 내지 약 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재에서, 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하고; 이로써 활성 아미노옥시 그룹을 형성하는 수용성 폴리머를 형성하는 단계; 및 b) 크로마토그래피, 여과 및 침전으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법으로 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 수용성 폴리머를 정제하는 단계. 용어 "활성화된 수용성 폴리머"는, 일 구현예에서, 알데하이드 그룹을 함유하는 수용성 폴리머를 의미한다.

[0049] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 상기 수용성 폴리머는 하기를 포함하는 방법으로 제조된다: a) 상기 산화된 수용성 폴리머 및 활성화된 아미노옥시 링커 사이의 안정한 옥심 결합의 형성을 허용하는 조건 하에서, 산화된 수용성 폴리머를 포함하는 용액을, 활성 아미노옥시 그룹을 포함하는 활성화된 아미노옥시 링커와 함께 인큐베이트하는 단계로서, 상기 조건은 약 1 분 내지 약 24 시간의 지속시간; 약 2 °C 내지 약 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재에서, 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하고; 이로써 활성 아미노옥시 그룹을 형성하는 수용성 폴리머를 형성하는 단계; b) 상기 산화된 수용성 폴리머 및 활성화된 아미노옥시 링커 사이에 안정한 알콕사민 결합의 형성을 허용하는 조건 하에서, 단계 a)의 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 수용성 폴리머를 포함하는 용액을 환원제와 함께 인큐베이트하는 단계로서, 상기 조건은 약 1 분 내지 약 24 시간의 지속시간; 약 2 °C 내지 약 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재에서; 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하는 단계; 및 c) 크로마토그래피, 여과 및 침전으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법으로 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 수용성 폴리머를 정제하는 단계.

[0050] 또 다른 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 상기 수용성 폴리머는 하기를 포함하는 방법으로 제조된다: a) 상기 산화된 수용성 폴리머 및 활성화된 아미노옥시 링커 사이의 안정한 옥심 결합의 형성을 허용하는 조건 하에서, 산화된 수용성 폴리머를 포함하는 용액을, 활성 아미노옥시 그룹을 포함하는 활성화된 아미노옥시 링커와 함께 인큐베이트하는 단계로서, 상기 조건은 약 1 분 내지 약 24 시간의 지속시간; 약 2 °C 내지 약 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재에서, 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하고; 이로써 활성 아미노옥시 그룹을 형성하는 수용성 폴리머를 형성하는 단계; b) 1 분 내지 24 시간의 지속시간; 2 °C 내지 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재에서; 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하는 조건 하에서, 단계 a)의 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 수용성 폴리머를 포함하는 용액을 친핵성 촉매와 함께 인큐베이트하는 단계; 및 c) 크로마토그래피, 여과 및 침전으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법으로 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 수용성 폴리머를 정제하는 단계.

[0051] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 상기 수용성 폴리머는 하기를 포함하는 방법으로 제조된다: a) 상기 산화된 수용성 폴리머 및 활성화된 아미노옥시 링커 사이의 안정한 옥심 결합의 형성을 허용하는 조건 하에서, 산화된 수용성 폴리머를 포함하는 용액을, 활성 아미노옥시 그룹을 포함하는 활성화된 아미노옥시 링커와 함께 인큐베이트하는 단계로서, 상기 조건은 약 1 분 내지 약 24 시간의 지속시간; 약 2 °C 내지 약 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재에서, 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하고; 이로써 활성 아미노옥시 그룹을 형성하는 수용성 폴리머를 형성하는 단계; b) 단계 a)의 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 수용성 폴리머를 포함하는 용액을 친핵성 촉매와 함께, 1 분 및 24 시간의 지속시간; 2 °C 내지 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재에서; 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하는 조건 하에서 인큐베이트 하는 단계; c) 상기 산화된 수용성 폴리머 및 활성화된 아미노옥시 링커 사이에 안정한 알콕사민 결합의 형성을 허용하는 조건 하에서, 단계 b)의 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 수용성 폴리머를 포함하는 용액을 환원제와 함께 인큐베이트하는 단계로서, 상기 조건은 약 1 분 내지 약 24 시간의 지속시간; 약 2 °C 내지 약 37 °C의 온도; 광의 존재 또는 부재에서; 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하는 단계; 및 d) 크로마토그래피, 여과 및 침전으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법으로 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 수용성 폴리머를 정제하는 단계.

[0052] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 여기서 상기 산화된 수용성 폴리머는 폴리에틸렌 글라이콜(PEG), 분지형 PEG, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), 폴리시알산(PSA), 전분, 하이드록시알킬 전분(HAS), 하이드록실에틸 전분(HES), 탄수화물, 다당류, 폴루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 설플레이트, 더마탄 설플레이트, 전분, 텍스트란, 카복시메틸-텍스트란, 폴리알킬렌 옥사이드(PAO), 폴리알킬렌 글

라이콜 (PAG), 폴리프로필렌 글라이콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일옥시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 상기 수용성 폴리머는 산화제로 인큐베이션에 의해 산화되어 수용성 폴리머의 비-환원 말단에서 말단 알데하이드 그룹을 형성한다. 일 구현예에서, 수용성 폴리머는 PSA이다.

[0053] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 산화제는 NaIO4이다.

[0054] 또 다른 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 아미노옥시 링커는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된다:

[0055] a) 하기 식의 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 링커:



,

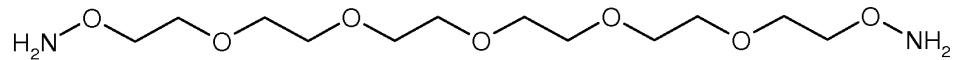
[0056] b) 하기 식의 3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민 링커:



[0057]

[0058] 및

[0059] c) 하기 식의 3,6,9,12,15-페나톡사-헵타데칸-1,17-디옥시아민 링커:



[0060] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 환원제는 나트륨 시아노보로하이드라이드 (NaCNBH3), 아스코르브산 (비타민 C) 및 NaBH3이다. 일 구현예에서, 환원제는 나트륨 시아노보로하이드라이드 (NaCNBH3)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0061] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 친핵성 촉매는 o-아미노 벤조산, m-아미노 벤조산, p-아미노 벤조산, 살파닐산, o-아미노벤즈아마이드, o-톨루이딘, m-톨루이딘, p-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, 및 p-아니시딘으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 친핵성 촉매는 m-톨루이딘이다. 또 하나의 구현예에서, 친핵성 촉매는 최종 농도 약 1.0 mM 내지 약 50 mM의 친핵성 촉매로 되는 양으로 첨가된다.

[0062] 또 하나의 구현예에서, 상기 언급된 방법이 제공되고, 이 방법은 한외-/정용여과 (UF/DF)에 의해 콘주케이트된 치료 단백질을 농축하는 것을 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 응고 인자 IX (서열번호: 1)의 일차구조를 보여준다.

도 2는 산화된 rFIX의 아미노옥시-PSA에의 커플링을 보여준다.

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

도 4는 아미노옥시-PSA의 제조를 보여준다.

도 5는 SDS PAGE에 의해 상이한 촉매의 존재에서 제조된 PSA-FIX 콘주케이트의 가시화를 보여준다. a) 상이한 농도를 사용하는 아닐린과 m-톨루이딘과의 비교; b) 아닐린과 o-아미노벤조산, m-아미노벤조산, p-아미노벤조산, p-아미노벤즈아마이드 및 살파닐산과의 비교; c) 아닐린 및 m-톨루이딘과 o-아니시딘 및 m-아니시딘과의 비교.

도 6은 다양한 친핵성 촉매에 의한 폴리시알릴화의 퍼센트를 보여준다.

발명의 상세한 설명

치료학적 단백질의 약물학적 및 면역학적 특성은, 화학적 변형 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 분지형 PEG, 폴리

시알산 (PSA), 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록실에틸 전분 (HES), 탄수화물, 폴리사카라이드, 폴루란, 키토산, 히알루론산, 황산 콘드로이틴, 황산 더마탄, 녹말, 엑스트란, 카복시메틸-엑스트란, 폴리알킬렌 옥시드 (PAO), 폴리알킬렌 글리콜 (PAG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐파롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-말레이인산 무수물 공중합체, 폴리스테렌-말레이인산 무수물 공중합체, 폴리 (1-하드록시메틸에틸렌 히드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일록시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)와 같은 폴리머 화합물과의 콘주케이션에 의하여 개선될 수 있다. 상기 결과로 생성된 복합체의 특성은 일반적으로, 상기 폴리머의 구조 및 크기에 영향을 받는다. 따라서, 규정된 가느다란 크기 분포를 갖는 폴리머가 당해 기술분야에서 통상적으로 바람직하다. PSA는 가느다란 크기 분포를 갖는 최종 PSA 제제를 제공하는 그러한 방식으로 정제될 수 있는 반면, PEG와 같은 합성 폴리머는 가느다란 크기 분포로 쉽게 제조될 수 있다. 또한, 규정된 폴리머 쇄 및 좁은 크기 분포를 갖는 폐길화 시약은 환매 중에 있으며, 합리적인 가격으로 상업적으로 이용 가능하다.

폴리시알릴화를 통하는 것과 같은 가용성 폴리머의 첨가는, 치료 단백질 예컨대 치료 단백질 FIX뿐만 아니라 그 밖의 다른 응고 단백질들 (예를 들어, VWF, FVIIa (예를 들어, 본 발명에 참고로서 통합된 US 2008/0221032 A1 참조) 및 FVIII)의 특성을 개선시키는 한가지 접근 방법이다.

치료 단백질

본 발명의 어떤 구현예에서, 상기 언급된 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드는 하기 치료 단백질에 의해 예시된다: 효소, 항원, 항체, 수용체, 혈액응고 단백질, 성장 인자, 호르몬, 및 리간드. 어떤 구현예들에서, 치료 단백질은 혈액응고 단백질 예컨대 인자 IX (FIX), 인자 VIII (FVIII), 인자 VIIa (FVIIa), 폰빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF) 또는 ADAMTS 13 프로테아제. 일 구현예에서, 본 발명에 따른 치료 단백질은 당단백질, 또는 다양한 구현예에서, 생체내에서 자연적으로 글리코실화되지 않는 단백질 (즉, 천연 글라이코실화 부위를 함유하지 않는 단백질 또는 정제 전에 호스트 세포에서 글리코실화되지 않는 단백질)이다.

어떤 구현예들에서, 치료 단백질은 하기이다: 면역글로불린, 시토카인 예컨대 IL-1 알파, IL-1 베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, 콜로니 자극 인자-1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), EPO, 인터페론-알파 (IFN-알파), 공통 인터페론, IFN-베타, IFN-감마, IFN-오메가, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 알파, IL-33, 트롬보포이에틴 (TPO), 안지오포이에틴, 예를 들면 Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, 인간 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 ANGPTL1 내지 7, 바이트로넥틴, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 안지오개닌, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 골형성 단백질-1, 골형성 단백질-2, 골형성 단백질-3, 골형성 단백질-4, 골형성 단백질-5, 골형성 단백질-6, 골형성 단백질-7, 골형성 단백질-8, 골형성 단백질-9, 골형성 단백질-10, 골형성 단백질-11, 골형성 단백질-12, 골형성 단백질-13, 골형성 단백질-14, 골형성 단백질-15, 골형성 단백질 수용체 IA, 골형성 단백질 수용체 IB, 골형성 단백질 수용체 II, 뇌 유래 신경친화성 인자, 카디오토로핀-1, 섬모 신경 친화성 인자, 섬모 신경친화성 인자 수용체, 크립토, 크립틱, 시토카인 유래 중성구 화학주성 인자 1, 시토카인 유래 중성구, 화학주성 인자 2a, 시토카인 유래 중성구 화학주성 인자 2b, β 내피 세포 성장 인자, 엔도텔린 1, 표피 성장 인자, 에피겐, 에피레귤린, 상피-유래된 중성구 유인체, 섬유아세포 성장 인자 4, 섬유아세포 성장 인자 5, 섬유아세포 성장 인자 6, 섬유아세포 성장 인자 7, 섬유아세포 성장 인자 8, 섬유아세포 성장 인자 8b, 섬유아세포 성장 인자 8c, 섬유아세포 성장 인자 9, 섬유아세포 성장 인자 10, 섬유아세포 성장 인자 11, 섬유아세포 성장 인자 12, 섬유아세포 성장 인자 13, 섬유아세포 성장 인자 16, 섬유아세포 성장 인자 17, 섬유아세포 성장 인자 19, 섬유아세포 성장 인자 20, 섬유아세포 성장 인자 21, 산성 섬유아세포 성장 인자, 염기성 섬유아세포 성장 인자, 신경아교세포계-유래된 신경친화성 인자 수용체 α1, 신경아교세포계-유래된 신경친화성 인자 수용체 α2, 성장 관련 단백질, 성장 관련 단백질 α, 성장 관련 단백질 β, 성장 관련 단백질 γ, 헤파린 결합 표피 성장 인자, 간세포 성장 인자, 간세포 성장 인자 수용체, 간종양-유래된 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자 I, 인슐린-유사 성장 인자 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 II, 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질, 케라틴생성세포 성장 인자, 백혈병 억제 인자, 백혈병 억제 인자 수용체 α, 신경 성장 인자 신경 성장 인자 수용체, 뉴로포이에틴, 뉴로트로핀-3, 뉴로트로핀-4, 온코스타틴 M (OSM), 태반 성장 인자, 태반 성장 인자 2, 혈소판-유래된 내피 세포 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자 A 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 AA, 혈소판 유래 성장 인자 AB, 혈소판 유래 성장 인자 B 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 BB, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 α, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 β, B형 전구세포 성장 자극 인자, 줄기세포 인자 (SCF), 줄기세포 인자 수용체, TNF (TNF0, TNF1, TNF2 포함), 변형 성장 인자 α, 변형 성장 인자 β, 변형 성장 인자 β

1, 변형 성장 인자 β 1.2, 변형 성장 인자 β 2, 변형 성장 인자 β 3, 변형 성장 인자 β 5, 잠재형 변형 성장 인자 β 1, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 I, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 II, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 III, 흉선 기질 림포포이에틴 (TSLP), 종양 괴사 인자 수용체 유형 I, 종양 괴사 인자 수용체 유형 II, 유로키나아제-유형 플라스미노겐 활성제 수용체, 혈관 내피 성장 인자, 및 키메라 단백질 및 그의 생물학적으로 또는 면역학적으로 활성인 단편.

어떤 구현예들에서, 치료 단백질은 하기이다: 알파-, 베타-, 및 감마-인터페론, 과립구 콜로니 자극 인자 포함 콜로니 자극 인자, 섬유아세포 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 포스포리파아제 활성 단백질 (PUP), 인슐린, 식물성 단백질 예컨대 랙틴 및 리신, 종양 괴사 인자 및 관련 대립유전자, 가용성 형태의 종양 괴사 인자 수용체, 인터루킨 수용체 및 가용성 형태의 인터루킨 수용체, 성장 인자 예컨대 조직 성장 인자, 예컨대 TGF α 또는 TGF β 및 표피 성장 인자, 호르몬, 스마토메틴, 색소 호르몬, 시상하부 방출 인자, 항이뇨 호르몬, 프로락틴, 용모성 생식선, 난포자극 호르몬, 갑성선 자극 호르몬, 조직 플라스미노겐 활성제, 및 면역글로불린 예컨대 IgG, IgE, IgM, IgA, 및 IgD, 갈라토시다아제, α -갈라토시다아제, β -갈라토시다아제, DNase, 페투인, 황체형 성 호르몬, 에스트로겐, 코르티코스테로이드, 인슐린, 알부민, 지단백질, 태아단백, 트랜스페린, 트롬보포이에틴, 유로키나아제, DNase, 인테그린, 트롬빈, 조혈 성장 인자, 렙틴, 글라이코시다제, 휴미라 (아딜리무맙), 프롤리아 (데노수맙), Enbrel (에타네르셉트), 및 그의 단편, 또는 임의의 상기 언급된 단백질 또는 그의 단편을 포함하는 임의의 융합 단백질. 상기 언급된 단백질 외에, 하기 표 1은 본 발명에 의해 고려된 치료 단백질을 제공한다:

11

소포성수지상세포분비펩티드	안지오테신전환효소	인터루킨-1 <alpha> 멜리 엠버 6</alpha>
데오카인	향토콜라겐 I,II	진리신설 및 정소 복현원 단백질 2
분비프리풀드관련단백질 1	아포지방단백질 B-100	그룹 XIIIA 분비 포스포리파이아제 A2
액토다이스풀라신A,	아포지방단백질 D	아교질알파-3(V)사슬
분비프리풀드관련단백질 2	아포지방단백질 E	온파-1,麦크로글로불린-유사단백질 1
리지스틴	터터-1-글릴로실톤리스페라제 1	더마토포린 단백질 1
오스터오플로트	글형성단백질	언-연관단백질
분비프리풀드관련단백질 5	보체C1q 하위성분 서보노트B	데제스 헤이총 단백질
분비프리풀드관련단백질 4	C4b-결합단백질 알파사슬	세포외마트리스 단백질 2
분비프리풀드관련단백질 24	콜라겐트롬리	온나인성인자
글라이피킨-5	코르티코스테로이드결합글로불린	인터루킨-33
분비프리풀드관련단백질 3	카晡시풀타다이아제 A1	글로신단백질 2
분비프리풀드관련단백질 4	카晡시풀타다이아제 A2	글령성단백질 6
에오톡시	에오톡시	무특정단백질 KIAA0564
멜라니세포단백질 Pro117	C-C모티프카모카인 13	세르번타스
분비Lys-6 ^c PAR관련단백질 1	C-C모티프카모카인 18	탄수화물 결포트리스페라제 8
베타마이크로세미노단백질	C-C모티프카모카인 20	콘탁틴-연관단백질 유사 3
글라이피킨-4	글수세포 2상에서발현된유발성수용체	그룹 XIIIB 분비포스포리파이아제 A2-유사단백질
종양인자리간드슈퍼파밀리엠버 15	C-C모티프카모카인 2	코르티코리비라린
리지스틴유사반타	변형성장인자-베타유라단백질light h3	데름포스포인트 19를갖는디신타그린 및
종양인자리간드슈퍼파밀리엠버 12	CD40리간드	데름포스포로티나이제
SPARC	글라이피킨-5	UPF0156 단백질 C19orf10
분비오토스포신	보체인자D	C-X-C모티프케모카인 3
진방구비단백질 2동족체	크로모그라닌-A	시스테인-M
단백질카노피동족체 2	아교질알파-1(I)사슬	데판신-5
글라이피킨-1	온필라브로트인자A도메인인염유단백질 1	데판신-6
WNT1유도가능한신호전달경로	시스테인풀부분비단백질 LCC1 도메인염유 1	트로보스포단모티프 18를갖는디신타그린 및
단백질 1	다신타그린 및 멜탈로프로티나이제	트로보스포단모티프 3를갖는디신타그린 및
SPARC관련모듈찰슬결합단백질 2	아교질알파-4(IV)사슬	다클로판련단백질 4
C-C모티프카모카인 1	케라틴생성제포분획-연관단백질	트로보스포단모티프 5를갖는디신타그린 및
C-유형렉틴도메인파밀리 11 엠버 A	보체C4-B	메탈로프로티나이제
분비Lys-6 ^c PAR관련단백질 2	아교질알파-2(V)사슬	포유소-특이적리포릴린-8
분비C5	보체C5	파브릴린-3
분비유아세포성장인자-6	아교질알파-1(VII)사슬	페루인-B
분비유아세포성장인자-6	아교질알파-2(V)사슬	주정모루진단백질 1

장소-불현도-서열264 단백질	보체 성분 C7	케라틴생성세포 성장 인자	아릴아세트아마이드-탈아세틸화효소-유사 2
클라이피 7-2	보체 성분 C8 바이타사슬	선파-부족인자 8	부정소-특이적 리포칼리-1.2
세리프 토이제 23	보체 성분 C8 감마사슬	위 억제 폴리펩티드	B 콜-액종-항원 2
39S 리보솜 단백질 1L55, 미토콘드리얼 단백질 NipSnap 동족체 3A	아고질 알파-1(XV) 사슬	단백질 호모트로피-5	B 혈액종-항원 3
파리 브로 네트	아고질 알파-1(XVII) 사슬	그란자임 M	소 정자 헬리-단백질 동족체 1
뉴레인	아고질 알파-1(XIX) 사슬	가수트 라-방울 폼티드	보체 C1q-유사 단백질 3
설유아세포 성장 인자 수용체 2	여글 울리고마 마트릭스 단백질	세라프로토이제 HTRAI	UPF0165 단백질 C2orf69
트산물 수수 효소 6	C-반응 단백질	인터페론 알파-4	UPF01669 단백질 C6orf120
억정노증 1 단백질에서 결실됨	파밀구로니-자극 인자	인터페론 알파-5	클리파제-유사 단백질 C6orf127
SPARC 관련 모듈라 칼슘-결합 단백질 1	파밀구로니-자극 인자	인터페론 알파-7	무특정 단백질 C1orf69
아밀로이드 베타 A4 단백질	트롬보스판 단 모티프 7	트롬보스판 단 모티프 7	필소판-유래된 성장 인자 수용체-유사 단백질
종양고사 인자 수용체 슈퍼파밀리 멤버 6	단백질 CTR61	메탈로프로토E-나이아제	
김마-아미노부티르산 유형 B 수용체 서브유닛 1	보체 성분 수용체 1-유사 단백질	여역클로리 슈퍼파밀리 멤버 10	클로드-아데하리-유사 단백질
프로-뉴클리나-마-질환단백질	줄기세포 성장 인자: 텁포구 분비 C-유형 밸린	21 kDa 의 프로토아제-연관 도메인 함유 단백질	주정무특정 단백질 UNQ6190 PRO01339
단백질 험로드 알파-2	CMP-N-아세틸누락미네이트-비타-1	압화아이드로리라제 도메인 함유 단백질 FAM105A1	주정무특정 단백질 UNQ6193 PRO01345
Fc 수용체-유사 A	갈락토스아마이드-알파-2,3-시-알코트란스페라제	트롬보스판 단 모티프 9	주정무특정 단백질 UNQ815 PRO01962
단백질 험로드 알파-1	디펩티드 험타다이아제 4	메탈로프로토 디나이아제	
단백질 험로드 알파-2	아데타-시알로스포포로 테인	인터루킨-9 수용체	시스탄틴 A
C-코모도카인 4 유사	엔도 탈린-1	인터루킨-9	페타다이제 억제 R3HDML
상피 디스코이دين 도메인 함유 수용체 1	아프린-1B1	이하 베타 B-사슬	시스탄틴-9
유신-1	표피-특이적 세린프로테오아제-유사 단백질	세린프로티아제-액티체 키준 유형 2	DAN-도메인 파밀리 멤버 5
콜라겐내피 성장 인자 A	에밀린-1	BMP 결합 내피 조절자 단백질	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질-유사 1
파블린-1	에도풀로스만	케라틴생성세포-연관 단백질 2	부정소 정자-결합 단백질 1
프로란티 수용체	에프린 유형 A-수용체 3	라미닌 서브 유닛 알파-1	엘라피
전구 단백질 전원효소 서브릴리신 핵신 유형 6	에포린 유형 B-수용체 6	백혈구 세포-유래된 콜마토신 2	단백질 FAM55A
CD209 항원	클라이코질린스페라제 1	위 트라이실글리세롤 리파제	성장-분화 인자 6
아고질 알파-2(XIV) 사슬	파체 C1q 풍증 고사 인자-관련 단백질 7	류신 풍부 반복 및 칼포 닌 등족관계 도메인 함유 단백질 3	글루코오스 푸-로스 유-도리-닥타제 도메인
엔라스틴	피브릴린 2	체형 리파제 관련 단백질 2	에트로포이에이트
엔터루킨-15 수용체 서브유닛 알파-1	피브릴린 2	부고인자-1	글루타민-파-시다이아제 6
디드카인	설유아세포 성장 인자 10	파리브로박트 유형 III 도메인 함유 단백질 7	무특정 단백질 UNQ511 PRO01026
인터그린 알파-7	파브리노겐 알파 사슬	마이크로피브릴라-연관 단백질 5	바타-데-파센 128
유신-4	파브리노겐 베타 사슬	클리파제 억제 인자	인터루킨-34
페티딜-글리신 알파-아미드화 모노옥시게나나제	간구개, 페 및 비강-상피암종-연관 단백질 1	마트리스-마발로프로티나이아제-11	클리파제-유사 단백질 4
		마트리스-마발로프로티나이아제-17	부정소-특이적 리포칼리-9
		마트리스-마발로프로티나이아제-20	cDNA FL160937, 분비-프리-콜드 관련 단백질 4 와 아주유사
		N-아세틸글루코사민-1-포소포트렌스파라제	서브유닛-감마

자기소화작용관련단백질 16.1 유방암안티에스토로겐내성단백질 3	간트리아실글리세릴리파제	단백질 Wnt-5b	이슬린성장인자-유사페밀리멤버 3 항공복합체상호작용단백질-유사 1
카드하린-23 다식세포클론나노자극인자 1 열신수용체업파	리포구형원 6복합부아단백질 Gpc 에오시노필라이소포스포리파이어제 루트로파서브유나노백타	UDP-GlcNAc-betaGal비티-1,N-아세틸글루코사미널트란스페라제 4 EM1도메인함유단백질 1 무를장단백질 C6orf15 클라린-10	단백질 Wnt-5b 분비인단백질 1 아교질아파-5(Y)사슬 B홀식중단백질 5
제밀도제타단백질수용체관련단백질 8 E우리하티단백질리가야제 LRSAMI 신경세포정착분자 1 뉴로리긴-4,X-연결 네트린-G1	중뇌별아교세포유래된신경전성인자 메트리스Gfa단백질 72kDa유형IV클라리제나제 스토로렐리신-1 중성구클라리제나제 마소텔린 HHP-유사단백질 2	장쇄지방산CoA리가야제 ACSBG2 중양단백질유래전사체3단백질 펩타이제억제제 15 프로리옹부단백질 1 우로코르틴 트리신-X3(EC 3.4.1.4) HHP-유사단백질 2	WAP-도메인단백질 10A UP0369단백질 C16orf57 주정무특단백질 C10orf31 주정무특단백질 C11orf45 무특징단백질 C12orf18 바타-데파신 130 히스티드트라이드뉴클리오파이드-결합단백질 2
기아트리스아미다이제성분PIG-T 카트리간드 발작-6유사단백질	무신-5AC 무신-6 노트린	프랙탈카인 단백질 Wnt-11	아파리 타박-특이질단백질 9 기세포암종연관단백질 TD26 파트세판 조절단백비특이질단백질 18 보체C1q종양괴사인자관련단백질 8
종양고사인자 우른모들린 종양괴사인자간드슈퍼페밀리멤버 13 단백질CREG1 EGF유사도메인함유단백질 8 아미노아실RNA신타파제-触-풀-상호작용 다기능성단백질 1	옥시토신누로파이신 1 배탄신경성장인자 종양괴사인자리간드슈퍼페밀리멤버 18 뉴로트로핀-3 헬로만유관련성장인자서브유노A 포스포판토테노일염시스테인풀탄산호소	단백질 Wnt-7a FCH및이중SH3도메인단백질 1 가중양유래된서브유노12단백질 2 인터루킨-12서브유노13 UPRO57단백질 KIAA1324 보체C1q종양괴사인자관련단백질 9	아파리 타박-특이질단백질 9 기세포암종연관단백질 2 파트세판 조절단백비특이질단백질 18 보체C1q종양괴사인자관련단백질 8 글형성단백질 SA 단백질 Wfdc13 단백질 Wnt-8a 1g-유사도메인함유단백질 ENSP0000270642
ADAMTS-유사단백질 4 을고인자 XI 이터루킨-22수용체서브유노16p-2 번령된표피자기조절인자1동족체 포로스티글리단D-이소머리제 알파-1형트립신 알파-1형카모트립신 아실-CoA결합단백질 복체인자B 코리오고나노도로민서브유노백타- 바트시칸핵심단백질 표피성장인자수용체 액도-NOX이율회률-티고환기 2 하알루나나제-1 인터루킨-11수용체결합제단백질	풀라스미노엔젤설제억제제 1 풀라스미노엔젤설제억제제 2 프로풀라크C-에노프타다이제인해서 1 막통과무관유관인유단백질 2 단백질이활화물이소머리제 알로상고유래된인자 풀신A 기스트립신 소나히지풀단백질 풀티도글라이칸단백질-1을파 바이글라이칸 표포란타유도가능한단백질 풀소판인자4 풀라스미노엔 겔친파라옥소나제아릴에스테라제 1	유신-17 증화소체단백질 NCU-G1 프릴-4-아이드를슬라제서브유노16p-3 풀타일-프로필리스-트립신이소머리제 SDCCAG10 펩타이제억제제 16 풀리오바이러스수용체관련단백질 4 풀리오바이러스수용체관련단백질 4 옹질단체파밀리22함버 15 GPI이노시톨-아실라제 마틀과단백질 43 안지오조이에탄관련단백질 2 안지오조이에탄관련단백질 6 아릴설파티제K 아우구린 노-특이적세프로토이제 4 DBH-유사모노옥시제나제단백질 1	리보뉴클레아제유사단백질 9 무특징단백질 C12orf66 무특징단백질 C17orf99 단백질 FAM150A 타박-특이질1-유사단백질 무특징단백질 C12orf10 바타-데파신 110 뉴리틴유사단백질 히스티드풍부복신말단백질 1 C-유형렌틴도메인파밀리2함버 A

인터넷 카드 수용체 서비스 유닛 베이	엔클러스인사 보호소, 터번1 유형	모듈 카드 단백질 C10rt56	로신 품부 반복체 할유 단백질 70
인터넷 카드 수용체 유닛 1	플터 딜-프를 월 시스-트랜스 이소미라제 B	세라밸린-3	세트 팬 A13
아슬린	글수 프로토 타이-클라리-칸	세라밸린-4	BTB_P07 도메인 할유 단백질 17
클라이코 헬리	여기 성 단백 프로토 타이-클라리-칸	풀리-파제 유사 단백질 C6orf126	무특징 단백질 C12orf53
부기상 선호트 모관련 단백질	파-도-마-타이-성체-연관 단백질 C	무-풀-진 단백질 C11orf83	C-유형 헌터 도메인 할리 9 험버 A
뉴링	부기상 선호트 모	무-풀-진 단백질 C16orf89	보체 C19유사 단백질 4
프로토 타이-드록스-타이-드 P-설루	헬링 아밀로이드 P-설루	카-볼리-시 태-나-아-체 유사 단백질 X2	CMRF5-유사 단백질 4
CD276 항원	세크라토-그라-나-1	시스-타이-9-유-사	단백질 FAM151B
EGF-유-사 도메인 단백질 1 을 갖는 시스테인 풍부	기저막-특이-체 해고-란-설파이트	될수 소-소-환원 흐소 SDR 파-밀리-할버 13	암하이드-로-라제 도메인 할유 단백질 FAM108A2 A3
CUB 멤스-시 도메인 할유 단백질 1	프로토-오-글라-이-칸-핵-심 단백질	바타-데-파-신 123	오스-타-오-크리
파-리-2	안티-류-코-프-토 타이-나-제	바타-나-판-신 132	막-풀-프-로 타이-제, 세-린 111E
Fe-수-용-체-유-사 단백질 5	스타-밸린-1	시-토-카-인-유-사 단백질 1	막-통-과-단-백-질 14E
단백질 GPR89	세-포-와-수-체-유-사-드 디-스-무-타-체 [Cu-Zn]	대-풀-프-란-유-사 단백질 2	막-통-과-단-백-질 207
첨한 부자 A	세-트-리-트-로-판	대-풀-프-유-사 단백질 1	TOMM20-유-사 단백질 1
류신 품부 반복체 할유 단백질 8A	스폰-디-1	부-정-소-분-비-단-백-질 E3-비-타	무-특-징-단-백-질 C3orf41
다중 이노-시-틀-풀리-포-스-파-이-트 포-스-파-이-제 1	염-체 단-백-질 3 의-구-조-유-지	EGE-유-사-반-복- 및- 디-스-코-이-민-1-유-사 도-메-인-할-유	악-하-선-안-도-로-건-조-절 단-백-질 3A
뉴로-필-린-1	실탈-신-1A	다-백-질 FAM155D	단-백-질 3
풀리-신-4A	타-트-리-박-린	B-풀-식-충-활-원 1	B-풀-식-충-활-원 1
풀리-신-4B	번-령-성-장-인-자-비-타-1	풀-활-성-카-복-실-아-스-테-라-제 4	풀-활-성-카-복-실-아-스-테-라-제 4
페리-오-스-트	티-포-풀-로-풀-리	성-유-아-세-포-성-장-인-자-22	4-이-음-박-수 단-백-질 1
단-백-질 RIC-3	마-탈-로-프-로-타-나-아-체 악-체-제 1	성-장-분-회-인-자-3	단-백-질 HSN2
SLC17 및 NTRK 유-사 단-백-질 2	마-탈-로-프-로-타-나-아-체 악-체-제 2	GL1PR1-유-사 단-백-질 1	카-엘-린-코-트-단-유-사 단-백-질
셀-파-타-체-번-령-인-자 1	마-탈-로-프-로-타-나-아-체 악-체-제 3	세-린-프-로-타-이-체 악-체-제 카-줄-유-형 6	UPF0624 단-백-질 C6orf186
셀-파-타-체-번-령-인-자 2	유-로-카-나-아-체 유-형-풀-러-스 미-노-체-풀-상-체	이-터-루-2-1-B	주-장-유-로-피-트-민-1-유-사 단-백-질 4.6
막-통-과-소-알-파-	리-로-트-란-스-파-린	이-터-루-2-1-C	페-리-시-나-신-유-사 단-백-질
트-란-신-1	종-양-고-사-인-자-수-용-체 슈-파-파-밀-리-한-파-10B	이-터-루-2-1-D	SCO-스-周恩-단
유-로-카-나-아-체 콜-라-스-미-노-肯-활-성-체 표-면-수-용-체	종-양-고-사-인-자-수-용-체 슈-파-파-밀-리-한-파-1A	하-설-로-난- 및-포-로-타-오-글-라-이-칸-린-크	주-정-무-특-징-단-백-질 UNQ9165 PRO28630
V-센-도-메-인-할-유 T-세-포-활-성-화-의-제 1	활-관-내-피-성-장-인-자	난-황-막-의-증-단-백-질 1 동-쪽-체	칼-슘-활-성-화-클-로-라-이-드 차-별-조-절-자-파-밀-리-한-파-3
글루-카-군	수-용-체 1	코-리-오-나-도-트-로-민-서-브-유-Nit-비-타-1	정-평-적-세-리-프-로-티-아-제 UNQ9391 PRO34284
N-아-세-밀-무-리-모-일-1-알-라-나-아-민-1-아-제	비-타-민-D-결-합-단-백-질	변-이-체 1	변-이-체 1
설-프-히-드-릴-유-사-나-아-제 1	바-이-트-로-백-린	리-소-자-민-유-사 단-백-질 1	무-특-징-단-백-질 C4orf26
활-수-소-호-소-환-원-호-소 SDR 매-밀-리-한-파 4	풀-밸-리-브-란-트 인-자	마-트-리-스-마-들-로-프-로-타-나-아-제-28	무-특-징-단-백-질 C4orf40
	림-구-항-원 6-복-합-부-위 단-백-질 G5c	네-프-로-백-린	무-특-징-단-백-질 C5orf55
	단-백-질 12	WAP-4-디-설-파-이-드 코-아-도-메-인	주-정-대-식-세-포-자-금-단-백-질 MST9

인터루 키-18-결합단백질	아연-알파-2-단단단백질	줄파토아디유사 단백질 1	무특질단백질 C15orf61
IRRE 유사 단백질 2 의 기 (Kin)	무특질 단백질 C14orf93	줄파토아디유사 단백질 2A	카모트립시노엔 B2
글수-연관분화마커	라티노수신	세린프로토아제 27	베타-데브신 108A
글루타	알파-1,3-만노실트란스파라제 ALG2	세로카레토글로비파밀리 3A 멤버 2	베타-데브신 111
1-아실-sn-글리세롤-3-포스파이트	C-유형 렌틴도메인 패밀리 11, 헌버 A, 아이소형	트로스포트 멤버 2 를 찾는 디신타그린 및	주정-1-셋 및 면역글로불린 도메인 핵유 단백질 6
아실트란스파라제-감마	CRABP A, b	메틸프로토티나아제	세린프로토아제 악제제 카잔-유령 5,유사 3
발전한 글리코楼层화 최종생성을 특이적 수용체	주요 촉진인자 슈퍼파밀리 도메인 핵유 단백질 7	디스테그린 및 면발로프로티나아제 도메인 핵유	세린프로토아제 악제제 카잔-유령 5,유사 2
NLR 패밀리 CARD 도메인 핵유 단백질 4	류신동부-복합막통과 신경 단백질 1	다-백질 28	주정 세린프로토아제 악제제 카잔-유령 5,유사 2
프로뉴레글린 2,-액-결합된 동령체	NADH 탈수수효소 [유비퀴노] 베타	술균-침투성-증가 단백질 유사 2	주정 세린프로토아제 악제제 카잔-유령 5,유사 2
정자-연류-출원 11A	서브풀레스-서브유보 11, 미토콘드리아	산스필고미엘리나-유사 포스포다이스테라제	틸수수효소 흰원효소 SDR 패밀리 험버 7C
노모세포-분비 단백질 1-동족체	UPF0346 막 단백질 Clorf91	세린프로토아제 악제제 카잔-유령 7	베타-데브신 131
혈청 암부민	단신탈수수효소-관련 단백질 10	노르소필리 4	베타-데브신 134
코글린	클라시스토카니	단백질 Wnt 9b	베타-데브신 136
혈장 프로테아제 C1 악제제	코다니-1	자이모겐 과 단백질 16-동족체 B	베타-데브신 116
인터루 키-7수용체-서브유보-알파	무특질 단백질 Cforf59	세미포린 3D	단백질 FAM132A
인터루 키-7수용체-트립신 악제제 H5	콘도로이틴-설페이트-글루쿠로-글루코-스파라제	아포지방단백질 L4	단백질 FAM132B
인터루 키-7수용체-트립신 악제제 중쇄 A	렌티나제 도메인 핵유 단백질 1	아통과 프로태아제 세린 11D	베타-데브신 115
단백질 S100A7	아통과 단백질 C9orf7	스코파피-반응 성-단백질 1	베타-데브신 114
시밀란-결합 18-유사-사련 10	사이토크롬 P450 2S1	주정 아박신 A2-유사 단백질	세린프로토아제 악제제 카잔-유령 9
세뇨관 2-점성-영 험원-유사	부스리기 단백질 18-동족체 3	글령성 단백질 10	리파제 험버 N
종양 고사-인자 리간드 슈퍼파밀리 험버 13B	탈수수효소-월원효소 SDR 패밀리 험버 7	세로카레토그라닌-3	체장-리파제-글령 단백질 3
충돌-지방산-CoA 리기아제 5	단백질 ENED	보체 C1q 중庸 고사-인자-글령 단백질 4	정소-전립선 및 타-번-불령-토 단백질
크라운 단-14	보체 인자 H-관련 단백질 4	무특질 단백질 Clorf54	뉴로마린 S
포신 풀-부-복체-염유 단백질 20	포신 풀-부-풀 1LG 험버 3	카복시-펩타이드 A6	뉴로펩타이드 S
인터루 키-1-매밀리 험버 7	글리세로포스포다이스테로포스포다이스테라제	C-C 모티프 카모인 19	오톨-1-뉴트린-신-유사-단백질 C16orf38
리프구-향원 6-복합부위 단백질 G3b	도메인 핵유 단백질 5	C-C 모티프 카모인 25	오톨-1-뉴트린-신-유사-단백질 1
아세틸풀린-에스테라제	정형적 G-단백질 연결수용체 113	단백질 CE1	오보스타틴-동족체 1
아밀로-1, X-동령체	정형적 G-단백질 연결수용체 114	무특질 단백질 C6orf1	풀라스미노엔-관련 단백질 A
안지-오-개-난	글리세롤-3-포스파이트-아실트란스파라제 4	무특질 단백질 C7orf34	풀리세라제 3
단자-별-독-수-용-체 2	그릴린-1	카라틴-양성세포-연관 단백질 3	주정 펩타이드 YY-2
아-박신 A2	클론-통로-서브파밀리 K 험버 17	무특질 단백질 C9orf47	주정 펩타이드 YY-3
아포지-방단백질 C-III	KDEL 모티프 험버 1	아교질 알파-1(VIII)-사슬	리보누클리아제-유사 단백질 10
아포지-방단백질 L1	라이밀리	무특질 단백질 C18orf54	리보누클리아제-유사 단백질 12
보체 C1q 하우성분-서브유보 1A	류신-동부-복체-함유 단백질 8B	시스타티-유사 1	리보누클리아제-유사 단백질 13
보체 C1q 하우성분-서브유보 1C	류신-동부-복체-함유 단백질 8D	C2 도메인 핵유 단백질 2	세로판 A11
콜시토-1	시암산 결합-유사-학린 6	DDR5K 도메인 핵유 단백질 1	쿠니조-유령프로토아제-유제 4

세유아세포 성장 인자 23	시스템인 풀부울동 누런1단백질	무를 징다백질 C7orf58	세트파 E3
이터루킨-23-서브유니알파	결합조직 성장 인자	아고질 알파-1(XVIII) 사슬	CRI 수용체
부정소 분비 단백질 E1	단백질 아이소(evereshut) 동족체	렌티-마트릭스 단백질 4	분비 단백질 1
ADAMTS-유사 단백질 1	유-유사 단백질 1	무를 징다백질 C16orf48	스토리스 유발성 분비 단백질 1
케모카인 유사 인자	세유아세포 성장 인자 19	카복실이스 테라제 3	단백질 Wnt
EGF-유사 도메인 유단백질 7	풀리스터틴 관련 단백질 3	다백질 FAM20B	단백질 Wnt(단백질)
트로트노-1	헤지홀-상호작용 단백질	GPR-루프 GTPase 3	주정 세린프로테아제 LOC138632
단통과 단백질 25	이터루킨-17 수용체 B	GRAM 도메인 헤유 단백질 1B	TOM1
UDP-GalNAc 베터-1,3-N-아세틸갈اكت도스아미노일트란스페라제 1	FXYD 도메인 헤유 이온 수송 조절인자 5	포스파티딜이노시톨 클라이언트 U 단백질	주정 무특정 단백질 FLJ46089
이터루킨-15 (IL-15)	내피리고제	인터루킨-27-서브유니오파	주정 무트립 단백질 C1orf34
다풀표피 성장 인자-유사 도메인 11	EDGF 헤유 피콜린-유사 세포외 매트릭스 단백질 2	포로-뉴라클린-4, 막-질-화단백질	UDP-GalNAc 베타Gal 베타E1-3-N-아세틸글루코사마이로스페라제 9
무신 민 카드하린-유사 단백질	오토라풀린	류신동부 반별 신경 단백질 3	무특정 단백질 C11orf44
리보뉴클레아제 4	그룹 3 봄비 포스포리파이아제 A2	NMDA 수용체 조절 단백질 2	무특정 단백질 C12orf73
SH2 도메인 헤유 단백질 3C	그룹 XV 포스포리파이아제 A2	NADH-사이토クロム b5 헐원호소 1	주정 시스테인-9-유사 2
CMPNA-아세틸뉴락미네이트-베타-질락포스아미노도-알파-2,3-시클로발트란스페라제	종양 고사 인자-리간드 슈퍼파밀리 엘파 14	파킨슨병 7 도메인 헤유 단백질 1	주정 알파-드로리제 도메인 헤유 단백질
단통과 단백질 9	파리신-A2	FK506-결합 단백질 11	FAM108A5
WAP-4 디설파이드 코아 도메인 단백질 2	파리린	C-유령 텐도메인 밸리 12 엘파 B	파트-비페니신 133
아데노신 A3 수용체	프로카이너티-1	충질 단백 마텔리 35 엘파 E5	피브-스노우 1
감마-세크레타제 서브유니ット APH-1A	리보뉴클라야제 7	시터산 결합 유사 헨티 12	정율적 염색수용체 웰타
바시간	쿠니즈-유령 프로테이저 엑자제 1	단백질 FAM19A3	RPE-스폰 1
바클로바이러스 IAP 반복 할유 단백질 7	스周恩-2	WD 반복 할유 단백질 32	NPF-유사 단백질 ENSP0000346774
줄루메닌	테스티-간-2	지방세포 인하세-결합 단백질 1	주정 청소 톤이적 프리온 단백질
풀파-S1-카세인	풀필성 세라프로테이저 PAMR1	ADAMTS-유사 단백질 1	포틀리 풀부 단백질 1
사이클린 11	트로신-2A	포인 코일 도메인 헤유 단백질 30	주정 무정 단백질 FP248
보체 인자 H	바소호-비-1	액토-NOX 이형화 터울 고환 7/1	UPF0610-단백질 CSord5
용모 암 소마토암모트로판호르몬	바소린	신경 성장 조절 인자 1	주정 아연-온피-2-당단백질-유-사 2
록사카바이러스 및 아데노바이러스 수용체	자일로-실트란스페라제 1	안티포토리밸트 마트릭스 프로테오글리칸 1	SPARC 단백질
액토뉴클레오파이드	액토뉴클레오파이드	cDNA FLJ3663 fts, 클론 TRARCH2015180, 분비	오토파트린 1
파이로-포스파티아제-조소포디에스터라제 매밀리 엘파 6	파이로-포스파티아제-조소포디에스터라제 매밀리	cdNA FLJ15667, 분비 단백질 산성과 아주	c-유령 랜타 도메인 패밀리 18 엘파 C
ER01-유사 단백질 알파	온코스터틴-M	포리줄드 관련 단백질 2 와 아주 유사	주정 무특정 단백질 UNQ6125/PRO2090
옹고 인자 IX	D 애틀리-1	리파제 엘파 H	리파제 엘파 K
저전화도 면역글로불린감마 Fc 양액 수용체 III-B	HERV-FRD 6p24.1 프로바이러스 선구 Env	유신-19 (MUC-19)	C-유령 랜타 도메인 패밀리 18 엘파 C
풀리린-3	풀리프로토에인	건선감수성 1 후보 유전자 2 단백질	주정 무특정 단백질 UNQ6125/PRO2090
Fc 수용체-유사 단백질 2	프로 스타신	내재성 단백질 2A	보체 C3
	막통과 프로테이제-세린 11E	소포 운반 단백질 SFT2B	이고질 알파-2(IV) 사슬

류신동부반복·자동과 단백질F1RT3 겔슬린	HLA클래스I조직적합성항원, Cw-16 암파사슬	존윌리브란트 인자 A 도메인 함유 단백질 3A	무특징 단백질 UNQ6126/PRO20091
그라놀라신	Wnt 억제 인자 1 C-유형 나트륨 이뇨 펩티드	단백질 시사(shisa)-2동족체 신호 펩티드 제 특异性 서브유닛 3	세르핀 유사 단백질 RMSD 전립선 맥경소 별 혈관 단백질 4
자동과 단백질NNIB	안지오포이터인-2 데옥시리보뉴클리나제-감마	CD164 시그널 유사 2 단백질	아고 젤 암파-1(XXII) 사슬 주정무특징 단백질 C13orf28
그라놀라신	카복시펩타이드아제 A5 C-C 모티프 카모카인-14	카드하린-19 세라밸리-2	시스TEN-S R-스포L-1
제파라나제	인터루킨-1 암파 인터루킨-31 수용체 A	막통과 단백질 C1orf1 정자적도 세 그린트 단백질 1	C3orf1 남세 결합 단백질 2a
제파라나제	인터루킨-10 C-X-C 모티프 케모카인-2	무질 단백질 C6orf72 무질 단백질 C11orf24	오피오르판 신장 암프로 인 조절 단백질
리포클라-1	류신 풍부 반복체 함유 G-단백질 연결 수용체 6 메틸로프로테인아제	아실-CoA 신터타제 파밀리 멤버 2, 미토콘드리알 유로스포민 모티프 6 를 갖는 디신태그린 및 메틸로프로테인아제	주정무특징 단백질 UNQ650/PRO19816 UNQ8330/PRO19650/PRO19816
제파라나제	풀리펩티드 N-아세틸글리코로스아미노일트란스페라제 1 마트 럴린-3	정활적 UDP-당 수용 단백질 SLC35A5 C-유형 럭틴 도메인 파밀리 1 멤버 A C-유형 럭틴 도메인 파밀리 3 멤버 A	주정무특징 단백질 UNQ6975/PRO21958 타카카닌-3 풀비 인디언 단백질 1
다이 엔라-단백질체로 유사 단백질 1 뉴로비아-1-유사 단백질 2	SL 시트로카인 니카스트린	C-유형 럭틴 도메인 파밀리 4 멤버 E C-유형 럭틴 도메인 파밀리 4 멤버 G 정활적 양이온 수송 ATPase 13A4	슬러리로 스티 ADAM 유사 단백질 2 스캐빈저 수용체 시스테인 풍부 도메인 항유 단백질 LO02284/297
ADP-리보오스 파이로포스파타이제, 미토콘드리알	에나멜린 프로토카드하린-15	UPFD480 단백질 C15orf24 조나펠루사다 정자-결합 단백질 4 내령질 양 상주 단백질 ERp17	트립타제 베티-1 트립타제 벌타 트립타제 베티-1
태반 성장 인자 단백질 O-아질-마노-오스 베터-12-N- 아세틸 글루코사미니글루코스페라제 1 정활적 하이드로라제 FNKD	백혈구 면역글로불린 유사 수용체 서브파밀리 A 인터루킨-17F 풀리아오토로핀	막통과 단백질 C16orf54 사이토크롬 P450-4F12 사이토크롬 P450-4X1 사이토크롬 P450-4Z1 단백질 CREG2	풀렉신 도메인 항유 단백질 1 MCS1L-S3L-54II-동족체(단백) COBW 유사 태번 1 단백질 (단백) 시로카인 수용체 유사 인자 2 베타-다페신 103
풀리오바이러스 수용체 리티론-4 수용체	세리포로타이제 억제제 카愍-유형 5 콜리크라인-15 콜링 아밀로이드 A 단백질 성호르몬 결합글로불린 SLAM 매밀리 멤버 6	사이토크로트 B 멤버 9 DnaI 동족체 서브파밀리 B 멤버 9 디펩타이아제 3 막 단백질 FAM174A 노하수체 아데닐레이트 사이클라제, 헬리신 풀리펩티드 풀리카인-1 티록신 결합글로불린 포로카이너D-신-2	베타-다페신 106 히알루론 나디제 3 인터루킨-28 수용체 알파-나 글리아코글로트란스페라제 나도메인 항유 단백질 코르단유사 단백질 1 코르단유사 단백질 UNQ9370/PRO34162
막통과 꼬인코일 도메인 항유 단백질 1	질제-변환 성장 인자 베타-결합 단백질 3 아데노신 모포스페이트-단백질 F1CD	티오리독신 도메인 항유 단백질 15 단백질 FAM119A4 단백질 FAM119A4	주정무특징 단백질 UNQ9370/PRO34162

만통과 프로테아제 세린 3	소마토로비린 증양 고사 인자 수용체 슈퍼파밀리 멤버 10C	프로필시스티인ول 시다아제-유사 트롬보스판 유형-1 도메인 함유 단백질 1	네트란 수용체 UNC5B	
증양 고사 인자 수용체 슈퍼파밀리 멤버 11B	G파취 및 FFA 도메인 1을 갖는 종양절관형성 인자	파이타노일-CoA 하이드록실라제-상호작용 단백질 유사 FXYD 도메인 함유 인온 수용체 조절인자 4	섬유아세포 성장 인자 수용체 FGFR-1 분비 형태 단백질 (단백질)	
세로트란스페린 트립티제 베타-2	TGF-베타수용체 유형 III 단백질 YIFP5	성장 분화 인자 11 타이로트로판서브유보노베타 모를 징 단백질 C19orf56	무특정 단백질 ENSP00000244321 ECE2 EPa6	
소포-연관 단백질-연관 단백질 B/C	보체 C1q 종 양 고사 인자 관련 단백질 2	GPN-루프 GTPase 2 성장호르몬 유도 가능한 막통과 단백질 액로뉴클레오파이드 액로뉴클로스파타아제 액로뉴클로스파타아제 포스포디에스터레이제 풀리페티드 N- 이세 페일로스아미닐트란스페라제-유사 단백질 2	주정 기용성 인터루킨 18 수용체 1 주정 암하이드로라제 도메인 함유 단백질 FAM108A6 주정 Y-세 멤브리온 프로토콜리노메인 함유-유사 단백질 ENSP0000303034	
cDNA FLJ96659(호모사파이엔스 분비 단백질과 온스테오네틴)(SPARC), mRNA	cDNA FLJ77519(호모사파이엔스 분비 프리풀드 관련 단백질 mRNA 와 아주 유사 단백질 2	클리세로포스포다이스테로포스포다이스테라제 도메인 함유 단백질 2 WAP 카잘(Kazal), 멤브리온 프로토콜리노, 쿠니즈 및 NTR. 도메인 함유 단백질 1	B세포 성숙 항원 전사체 베이체 4(증양 고사 인자 수용체 슈퍼파밀리 멤버 17)	
T세포 분화 원천 CD6	슬릿 동족체 1 단백질 피카주리 프로토노센 유사 단백질 1	KDEL 모티프 함유 단백질 1 성장 호르몬 베이체 안지오포이에틴 관련 단백질 3	UPPF0672 단백질 C3orf58 마يل티 오리보-스-포스페이트 이소 미리제 17-베타하이드록시스테로이드 탈수수효소 13 아이노페티다이제 B 멸시딘	
인터루킨 32	안지오포이에틴 관련 단백질 7	락토-모듈린 1 콘드로모듈린 1 아고체 알파-6(Y1) 시슬 단백질 수소 분자 관련 단백질 11 정형적 리보뉴클리아제 11	메테오린 트랜스페라제-유사 단백질 7A NLR3 N-아세틸트란스페라제 15	
마트-렐리 4	마트-ADP-리보실트란스페라제 5 정자-연관 항원 11B 용고 인자 XII	류신동부 번체 함유 단백질 3 MANSC 도메인 함유 단백질 1 리포칼린 15 이질 실파타제 1	메테오린 트랜스페라제-유사 단백질 7A NLR3 N-아세틸트란스페라제 15 에그란 A44 단백질 관련 단백질 1 칼리크로인 11	
필사딘 풀로로	단백질 FAM13D C-X-C 모티프 카복시펩타이제 14 버타-데펜신 127 코르단-유사 단백질 2	증비 염별 생장 보호 2 다百亿 관련 단백질 1 포도당 시스티인 층부 뿐비 단백질 LCC1 도메인 함유 단백질 1	WNT1 유도 분비 단백질 1 스플라이스 베이체 x (단백질)	
토모글로린 2	증양 고사 인자 수용체 슈퍼파밀리 멤버 6B	설유아세포 성장 인자 21 헬장 알파-L-포스포시다아제 기스토로카인-1 기스토로카인-2 클루타티온 페루시다아제 7	뉴로트리민 후각 수용체 10W1 단백질 C14orf159, 미토콘드리알 네트린-G2 메탈로리워터체 STEAP2 스시 도메인 함유 단백질 4 단백질 YIF1B 아포지방 단백질 M C4b 결합 단백질 베타-사슬	인터루킨 11 패밀리 멤버 10 PLA2G1D 프로테오글리칸 3 인솔린 유사 팔린트 DNSL5 줄기세포 단백유사 단백질 3 세포의 등 단백질 라크리틴 라티톨 탈수수효소 13 중성구 대신 3 GLGQ5807
코르단-유사 단백질 2				

T-세포 표면 단백질 CD8 바티 사슬	최우중 결정 인자 1	충질 단체 파밀리 35 펩타이드	TUFT1
C-C 모티프 케이오카인 3-유사 1	류신동부 반별 LG1 파밀리 멤버 4	아연 수송체 2199	DRLV8200
설유아세포 성장 인자 8	BRCAl-A 철물 서보유닛 아브리共识(Babrasis)	노엘린-2	IDLN5808
시알로문 신령심 단백질 24	류신지퍼 단백질 2	발작-6-유사 단백질 2	UBAP2
프로그램된 세포 사멸 1 리간드 2	뉴란소 펠린-3	세마포린-3A	C19TNF 관련 단백질 8
분비 및 막 통과-1	오스토아모들린	세마포린-4C	KIR4DL4-(단백)
보체 C1q 총합 암피사 인자 관련 단백질 6	카탈-유령 세포로테아제 암피제 도메인 힙유	알하이드로제 도메인 힙유 단백질 14A	케모인 유사 인자 슈파파밀리 2 전사체 범이체 2
EGF 유사 모듈 함유 유신-유사 호로몬 수용체-유사 3	정자 아크로솜 암-연관 단백질 3	안기린 반별 도메인 힙유 단백질 36	케라틴 생성 세포 연관 막통과 단백질 1
노엘린-3	세크레토글로빈 파밀리 3A 멤버 1	단백질 시사(shisa)-4	GKGM353
유로 턴신-2	크라우단-2(SP32)	마디 등족체	MATL2963
바이트린	복체 인자 H 관련 단백질 2	시합도 가이린-2	NINP6167
WNT1-유도기능한 신호전달 경로	류신동부 반별 단백질 핵유 면역글로불린	노트이 액신 셀룰관형성 억제체 1-연관 단백질 2-유사 단백질 2	POM121-유사
단백질 3	슈파파밀리	유사 단백질 2	R-TF9268 (SLE)-의존성
cDNA FLJ17579, 흐모사피엔스 폴리스터틴-유사 (분비 단백질) FSTL3와 아주 유사, mRNA	류신동부 반별 및 면역글로불린-유사 도메인	고인 콜일 도메인 힙유 단백질 104	유신 풍부 반별 및 면역글로불린 유사 도메인
안지 오렌신 전환 효소 2	IRRE 유사 단백질 3 의 키(Kin)	막통과 416 파밀리 멤버 20	함유 노고(nogo) 수용체-상호작용 단백질 4
아디포넥틴	조절 세포 신호 변환기	막통과 단백질 107	KCNQ2
안지 오조이에티 관련 단백질 4	풀트로포닌-서보유닛 바티	막통과 단백질 143	ELC15919
아포지방 단백질 A-V	흡수통 억제 활성 단백질 3	막통과 단백질 178	KVVM3106
아스포린	류신동부 반별체 허유 단백질 4	막통과 단백질 205	ISPF6484
슬균침투성 증가 단백질	아연 수송체 5	막통과 단백질 41A	LKH9428
CUB 도메인 항유 단백질 1	류신동부 반별 신경 단백질 1	막통과 단백질 50A	VNF19313
연글 풍간체 출 단백질 1	서단 항도 솔동 단백질	막통과 단백질 51B	ACAH1104
바티-Abs-D-펩타디아제	릴체 아밀로이드 A4 단백질	인터루킨-2-3B	RVAL1944
아교질 알파-1(Y) 사슬	프로버터셀룰린	뉴로닐 펩트리신-2	ZDHHC11
아교질 알파-1(XYY) 사슬	바티-1-4-글리코토 실트란스페라제 7	풀린트리	AGLW2560
아스트로리디올 17-페티-1-풀수소호소 유형 11	3-하이드록시-17-페티-1-풀수소호소 유형 2	막통과 단백질 92	TSSP3023
DnaJ 동족체 서브파밀리(C 멤버 10	C1GALT1 특이적 차폐론 1	막통과 단백질 95	RFY65814
EGF 유사 도메인 험유 단백질 6	베타-카세인	막통과 단백질 93	SHSS33124
응고 인자 XIII A 사슬	카파-카세인	정형적 카복시펩타다이제 PM20D1	MNP19
글루코오스-6-포스파이트 이소미어라제	막통과 단백질 C2orf18	테트라스피닌-12	GSQ96193
식육-조혈 호르몬	카복시펩타다이제 N 촉매 사슬	테트라스피닌-13	VGPW5123
이터루 7-12 서브유닛 바티	CD320 항원	테트라스피닌-15	LMNE6487
이터루 7-12	콘드로이틴설플레이트 식단체 1	UPFD513 막통과 단백질	ALLA2487
안탈렉틴-1	콘드로이틴설플레이트 식단체 2	미토콘드리아 캐풀린 단백질 4	GALL1870
류신동부 신경-아교종-풀성회 단백질 1	CMARF35-유사 분자 7	풀리세라제-2	FRSS1829

립코 구형 원 96	다백질 카보피통족체 3 다세 윤수소수 윤원호소 3	정형적 글루미토 일트랜스퍼라제 ZDHHC24	MRS6218
마트 렐리신	엘타-유사 단백질 4	조나멜루시나 정자-결합 단백질 1 조나멜루시나 정자-결합 단백질 2	GRPR5311
무신-20	전구단백질 전환효소-서브릴리신학신 유형 9	보존적 율리고드 글리지(Golg) 특합체 서브유닛 7	AVTL5809
밸티도글라이콜-인자 단백질	돌리풀 키나아제 엔도 멜린-전환효소-유사 1	아디포박트수용체 단백질 2	CR1C3b C4b 수용체 SCR9(또는 16)C-칼란, 예손 SCR = 예손은 품종-번호 PIKR2786
인터파른 유래 17 kDa 단백질	내재성 암 단백질 2B 동종이식면 염증 성인자-유사	인하번 베타C-사슬 프로리	S100 광출 결합 단백질 A7-유사 3 GTWW5226(LP2085 단백질)
단백질 Wnt-4	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 5 내피 세포 선택적 접합 분자	세마포린-3C 해파란 셀페이트 글루코사민 3-O-설포트 랜스퍼라제 2	KIT8219(HCG20/0043) 하일루로닌 프로토오글리아칸링크 단백질 4
동종이식면 염증 성인자-유사	신호 펩티드, CUB 및 EGF-유사 도메인 유 단백질 1	펩티수용체 풍선 전시체 유사 1 마이크로노벨	
이로마일로로 반복 유X-연결 단백질 3	보체인자 H-관련 단백질 3 프로 헬리신 HI	SPARC-유사 단백질 1 피플리-7	SAMK3000 VFLL3057
크라우디 도메인 유X-연결 1	풀리스타티판련 단백질 1 글리아코실트랜스퍼라제 8 도메인 함유 단백질 1	단백질 HEG-동족체 1 피브리노겐 C-도메인 항유 단백질 1	CYWG5337 VGSAS40
에볼린-2	글루보사이드 알파-1,3-N-아세틸글리코토 소아미노일트랜스퍼라제 1 카드하린-24	포스포리아제 A1 엘파 A 염기성 탄액 프로트리 풍부 단백질 2	GHP53125 GRT3121
글리아코실트랜스퍼라제 8 도메인 함유 단백질 1 글리아코실트랜스퍼라제 8 도메인 함유 단백질 1,3-N-아세틸글리코토 소아미노일트랜스퍼라제 1 카드하린-24	글리세롤-3-포스페이트 이실트랜스퍼라제 3 G-단백질 연결 수용체 156 인터루킨-20 수용체 유파-사슬 글리터-7	정자별상 양관 단백질 SRP2 스시(Sushi) 반복 유연 단백질 비틀리노포 형성 단백질 동족체 1 토르신-1B 단백질 Win-5a	PAMP5101 LTLL9335 VCEW9374 AHPA9419 MDHV1837 HSAL5336 LHLC1946
NKG2D 리간드 4 L-아미노산 육시나아제	히알루로-나-결합 단백질 2 프로히파린 결합 EGF-유사 성장 인자 히스티디풀부 단백질	아크로신 결합 단백질 C-유형 런던 도메인 파밀리 18 엘파 B 총하고 소체-연관 막통과 단백질 4A 파밀리 엘파 3	
프로필 3-하이드록실라제 1	단백질 연결 수용체 14 GPI-에터-올이민 포스페이트 트랜스퍼라제 2 GPI-에탄올이민 포스페이트 트랜스퍼라제 3	아크로신 결합 단백질 C-유형 런던 도메인 파밀리 18 엘파 B 총하고 소체-연관 막통과 단백질 4A 파밀리 엘파 3	
GPI-에터-올이민 포스페이트 트랜스퍼라제 2 GPI-에탄올이민 포스페이트 트랜스퍼라제 3	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 7 풀리스타티 마리브로스아미나이드 엘파 2,6-시알트랜스퍼라제 6	세마포린-3E 아멜로 블리스티 주요 출진인자 슈퍼파밀리 도메인 함유 단백질 5	LPPA601 PINK1 SERH2790
카복스 결합 미토콘드리아 단체 단백질 SCaMC-2 (적은 카복스 결합 미토콘드리아 단체 단백질 2)	마릴 병 유체 인자 수용체 단백질 II-1 관련 수용체	안지오포이에트-1 안지오조이에트-4 다중 표피 성장 인자-유사 도메인 9	FLFFF9364 아파린 GLSH6409
종양 고사 인자 리간드 슈퍼파밀리 엘파 19	Lin-7 동족체 B 다백질 1 디산더그린 및 매들로프로티나아제 도메인 항유	산스파고미 엘리나제 유사 표소스포디에스테리제	SFTP2250

풀모토아트랩스퍼런처 ZDHHC9	단백질 32 Ly6PLA1R, 도마이한우 단백질 3 C-유충 헌틴 도마이파밀리 14 염비 A 단백질 코로나송 등족체 단백질 FAM115A 단백질 14 FK506, 결핵 단백질 14 뉴로 펄린 및 풀리 이드 유사 단백질 2 프로토카드하린 FET-13 프레닐시스테인 썩시다이아제 1 파플린 파티 딜 토릴시스-트립스 이소마리제 유사 1 전립선 풀기 세포 항원 단백질 파지 등족체 2 카트바이오실파스포풀리풀 버타- 만노실트 랜스페라제 단백질 세네-1 등족체 1 ProSAS 시알산 결합 Ig 유사 핵린 9 SLIT 및 TRK-유사 단백질 1 스타터린 테스티신 아틀라스로-유사 단백질 5 아틀라스 토이제, 세 4 전이-액제 KISS-1 소도 아밀로이드 풀리펩타드 트립 (Trem) 유사 전사자 4 단백질 티오 러들 신도망인 험유 단백질 12 출관내피 성장 인자 B 출관내피 성장 인자 C 라디클 블린-3 프리린-1 단백질 FAM3A 단백질 G7c 뉴로 펄린 및 풀리 이드-유사 단백질 1 아교질 알파-1(IV) 사슬 아교질 알파-1(X) 사슬 아교질 알파-1(XVII) 사슬 코아토마서브유노 알파 보체 수용체 유형 1 시스타틴 SN 더우시 리보뉴클레아제-1 세포외 마트릭스 단백질 1	3a ADAMTS-유사 단백질 스텔신 주중트로트신 6 한충 암유전자 단백질 Wnt-1 풀리 단백질 5b 풀리 단백질 5 풀리 단백질 5b 단백질 FAM6D C1q 관통 인자 WAP-나설파이드 코아도망인 단백질 1 세라밸린-1 카복시클라디아제 0 마이엘린 단백질 체로-유사 단백질 2 (상피 V- 유사 항원 1) 세라프로티드 1-유사 단백질 1 포인코일 도망인 학유 단백질 70 C-C 모티프 카모카인 28 무특징 단백질 C1orf29 C1B 도망인 험유 단백질 2 트립 (Trem)-유사 전사자 4 단백질 무특징 단백질 C1orf58 포드로이드 헤린 연풀증기제 총 단백질 2 무특징 단백질 C1orf675 이스트 민-1 시스터틴-8 카디오트로피노린-1 (CT-1) 카모트립시노린 B C-X-C 모티프 카모카인 9 C-X-C 모티프 카모카인 13 세 크레이티고 부전소 블리 단백질 E3-알파 에피아기 단백질 FAM3C 섬유아세포 성장 인자 20 섬유아세포 성장 인자 결합 단백질 3 각풀라 단백질 204 알파-아밀로이제 1b	RRLF920 PTML538 VIGN1945 AVPC1948 AWOG491 PSVL6168 LCU13035 PPPR6495 RLSC6348 CSRPIBP GLLV3061 GWSI6489 GDNAE133955, 블비 프리풀드 관현 단백질 4 와 아주 유사 PRIF VSSW1971 KLIA2939 ALLW1950 GVE166 ESF15812 GNNC2999 AAGC6688 HHSL751 비타-테레신 108B 비타-테레신 118 비타-테레신 124 비타-테레신 125 비타-테레신 126 더우시 리보뉴클레아제-1 유사 2 스핀나오밀린 2 나피세포 티아제 1 카복시에스테나제 7 단백질 NOV 풀체 UPF0258 단백질 FAM1172A 인터루킨-2 서류유노 베타 단백질 FAM3C 기질 세포 유래된 인자 2 유사 단백질 1 부드로풀린-서브풀리 1 엘바 A1
-------------------	---	--	--

자진회도 면역글로불린감마 Fc 영역 수용체 II-A	UDP-GlcNAc-betaGal비E-1,3-N-아세틸글루코사마이도트랜스페라제 3	포스파티딜에탄올아민-결합 단백질 4	케라틴생성세포-연관항문과 단백질 2
아파-네이아단백 하파리-결합 성장 인자 2	칼시토닌유전자관련펩티드 2 카 톨시펩타이드아제 E	옹고 인자 V 옹고 인자 VII	면역글로불린알파 E 수용체 아밀-2
피브리노겐감마-사슬 성장-분화 인자 5	카디오트로피유사 시로카인 인자 1 아교질 알파-2(VIII)사슬	프로-MCH 열산수용체감마-	에프리 유령-A 수용체 10 엑소스토신유사 2
신경아교세포레-유래된 신경진화성인자 인솔리-유사 성장 인자-결합 단백질 3	부스러기-동족체 2 메티-메트-리스-신성 인다-단백질 1	뮤신-7 줄라나-유사-펩티드	콜리스타틴관련단백질 4 풀리스타틴관련단백질 5
인솔린-유사 성장 인자 IA 포-2-마-1-사슬 C 영역	다운증후군 세포-질적 분자 면역글로불린유수파밀린 멤버 1	하미센틴-1 인터루킨-6	막통과-단백질 66 성장분화인자 2
포-2-마-2-사슬 C 영역 포-3-마-3-사슬 C 영역	인터루킨-4 인터루킨-6 수용체-서보유닛파 인터루킨-24	베아-성장-분화 인자 1 인터루킨-8 그램린-2	GDNF 패밀리 수용체 알파-4 유-감마-4-사슬 C 영역 립포구-단백질 86
인솔-트립신-억제제-중쇄 인솔-알파-3-사슬	라다닌-1 리파제 멤버 1	스토로젤라인-2 체장리파제-관련 단백질 1	인하빈 베타 E-사슬 GRAM-D-메인-항유 단백질 1C
UPF0378 단백질 KIAA0100 기나노-건-1	라마닌서브유닛-알파-2 라마닌서브유닛-알파-4	류신-풍부 알파-2-단백질 메트-리스-신모델링-연관 단백질 4 뉴로마이트-DB	인터파른-10 인터파른-16 인터파른-18 뉴로마이트-단백질 5
라마닌 서브유닛-베타-1 단백질-리-신-6-옥시다이아제 엘티마린-1	네트리-4 단세포 성장 인자 수용체 C-C 모티프-케모카인 22 닐랄로-파	디아-크로피-브-연관 단백질 4 뉴로마이트-유-연관 단백질 5 디미-간 메트릭스-메탈로포티나아제-19 인터루킨-11 인터루킨-17A	인터파른-6 면역글로불린-수퍼파밀리 멤버 21 아그린 프로락타틴 헬체(Kelch)-유사 단백질 11
나도-건-1 포스포리파이아제 A2, 파르포린-1	온스테오-신 염기성 탄액프로필린-풍부 단백질 3 인신-특이 적 베타-1-단백질 10 류신-풍부-단백질 3	인터루킨-13 인터루킨-24 인터루킨-26 인터루킨-29 인트론-3 시알론-아드레신 트립신-3	단백질 Wnt-16 프로파리-단 칼리크라인-13 1-아실-sn-글이세롤-3-포스파이트 아실트란스파리제-엘타 칼리크라인-9 비타민 K-의존-성-단백질 S 부티로필린-유사 단백질 8
파이로-시스틴 인자-질-전이 단백질 진립신-소스파타이아제 비타민 K-의존-성 단백질 Z	디플란-아제 2 트립신-12 단백-산성-프로-린-풍부 인단백질 12	아교질 및 칼슘-결합 EGF 도-메이-한-유-단백질 1 생식세포-특이 유전자-1-유사-단백질 프로-콜라린 H2	임신-특이-조-베타-1-단백질 1 정자-아크로솜-막-연관 단백질 4 라미난서브유닛-감마-3 라미난서브유닛-감마-3 뉴트란신-뉴로메이트-N MAM-D-메이-유-단백질 2 다이크로피-브-밀리-연관 단백질 2
포스파티딜이노-시를-콜라이-钳-이-아제 포스포리파이아제 D 파이로-시스틴	디플란-아제 2 트립신-1 단백-산성-프로-린-풍부 인단백질 12	아교질 및 칼슘-결합 EGF 도-메이-한-유-단백질 1 생식세포-특이 유전자-1-유사-단백질 프로-콜라린 H2	라미난서브유닛-감마-3 라미난서브유닛-감마-3 뉴트란신-뉴로메이트-N MAM-D-메이-유-단백질 2 다이크로피-브-밀리-연관 단백질 2 혹색종-억제-활성 단백질 2 릴린
테나스신-X			

트리포일 인자 3 트랜스파린 수용체 단백질 1 전체형 성장인자 알파	감마-세크勒타제-서브유닛 APH1B 아포지방단백질 C-IV	메트로스 메탈로프로테이나이제-24 메트로스 메탈로프로테이나이제-25	레이티-겔-단백질 4 탄산탈수소효소 14
전체형 성장인자 알파	아릴설파타제 G	네트린-1 네트린-3	세뇨관-간질성신장암 항원 뉴로필트 E-W
전체형 성장인자 베타 2 종 10 괴사 인자 리간드 슈퍼파밀리 멤버 6 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼파밀리 멤버 1B	신경고-활성화인자 카스파제 동원도메인 함유 단백질 18 핵마린-설파이트클루로코사민 3-O- 세포트 랜스파라제 3AI	알파-3-아세틸-글락토스-아미나이드 알파-2,6- 알파-N-아세틸-글락토스-아미나이드 알파-2,6- 시알-글락토스-파라제 3	알파-1,3-노실-당단백질 4-베타-1-N- 아세틸글루로사이밀트란스파라제 B 막통과 ampA4-도메인 함유 단백질 5
트론보포이에틴 VTP-페티드	타이로트로판-방출호르몬-분해 세포외효소 구아닐린 풀라수송체-유사 단백질 3	오트코-90 뉴트루린 뉴렉소풀린-1 뉴렉소풀린-2 뉴렉소풀린-3	보체 C1q 종양고사 인자 관련 단백질 3 포도-유-유-베타-1-당단백질 1 액상-글루로-당-유-풀리페티드 1 DnaJ동족체-서브파밀리 B-멤버 14 F-박스 유엔 단백질 8 풀리티드
신형 포유류 키트나이제 시스템이-통부 분비 단백질 2 풀로글루로빈 관련 단백질 C-C 모티프 캐모키인 26 풀리티드-11	1)-베타-아이드-풀리스터로이드-풀수수효소 14 면역글로불리-당-유-풀리페티드 1 DnaJ동족체-서브파밀리 B-멤버 14 F-박스 유엔 단백질 8 풀리티드-11	메타오닌-R-설파사이드-환원효소 B3, 미토콘도리-6P 성유아세포 성장인자 단백질 1 인터루킨-1-파밀리 멤버 5 인터루킨-1-파밀리 멤버 9 콜리크로인-5 메트릴린-2 세포 표면 당단백질 CD200 수용체 1 라이소포스파티드-상-포스파타이제 유형 6 뉴클레오티드-상-포스파타이제 CPV1 트론보스폰단유형-1-도메인 함유 단백질 4 WNT1-유-도-기능한-신호전달 경로 단백질 2 프로모데인 함유 단백질 9 CD99 항원 유사 단백질 2 무특정 단백질 C1orf119 탄수화물을 설포트란스파라제 12 30월직 세린 카복시풀타다이제 CPV1 유신-3A CUB 및 조나렐루시다-유-사 도메인 함유 단백질 1 풀리페티드 N-	메트란스 메탈로프로테이나이제-24 네트린-1 네트린-3 알파-3-아세틸-글락토스-아미나이드 알파-2,6- 시알-글락토스-파라제 1 알파-3-아세틸-글락토스-아미나이드 알파-2,6- 시알-글락토스-파라제 3 FMRF 아마이드-글란페티드 노시설플 V-셋 및 막통과 도메인 함유 단백질 1 포트란-풀부 단백질 4 포로락-방출 펩티드 세린프로테아제 33 인신-특이-액-베타-1-당-단백질 8 레트-반단 FMRF 아마이드-글란페티드 리보뉴클레이제 K6 리보뉴클레이제 T2 레페린 보체 C1r-하위성분-유-사 단백질 라테노산 수용체 반응군 세포-글루타메이-2 슬리-동족체 3 단백질 C3 및 P2P-유-사 알파-2-마크로글로불린-도메인 유리 단백질 8 라테노산 수용체 반응군 단백질 2 여-글-산성-단-백-질 1 스-파-나-오-풀-신-1 베타-백-토-린 단-백-질 3 세-포-란-3G 세-크-라-로-글-로-보-파-밀-리 1C 멤버 1 세-크-라-로-글-로-보-파-밀-리 1D 멤버 1 세-크-라-로-글-로-보-파-밀-리 1D 멤버 2 세-프-1A12 세-프-1D 풀리-브-란트-인-자 C 및 EGF-도-메-인-함-유-단-백-질 4 트론보스-풀-민-모-티-프 15-갖-는-다-신-테-그-린-및 스-카-보-자-수-옹-체-서-스-티-인-총-부-도-메-인-함-유-그-률

아세틸글리코스아미드 블트란스페라제 14 글락 턴-9	1	GPI 트랜스아미다이제 성분 PG-S	메탈로프로티나이제 나트륨 톤로 서브유닛 베타-2	B 단백질 프로타이로브리아린
류신 풍부 반복체 할유 단백질 17		프롤린 풍부 모티프 단백질 3	메탈로프로티나이제 알파체-4	세마포린-4A
류신 충부 반복 천경 단백질 2		설포하이드릴 올시다이제 2	T-세포 면역조절 단백질	
이작-용 청 헤파린-설파이트-N-풀이제 헤파린-호소-N-설플란스페라제 3		트롬보스판단모티프 16 를 갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나이제	트롬보스판단모티프 10 를 갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나이제	종양 고사 인자 수용체 슈퍼파밀리 멤버 27
터프 헤리		SH2 도메인 할유 단백질 3A	홀신 기질 렘프로이아틴	홀유-사수용체 7
노미토글로리아 단체 단백질		SHC-번령 단백질 4	마그과 단백질 130	티오리독신 도메인 할유
신호 헬티드, CUB 및 EGF-유사 도메인 할유 단백질 3		디신테그린 및 매트로프로티나이제 도메인 할유 단백질 23	특수한 앤 플 빠트릭스-연관 단백질	단백질 16 슬파-2-안티풀리스-민
알파-1-산-단백질 1		트라스도신 베타-유사 단백질 2	우로코르 턴-2	단백질 WFDC9
알파-1-산-단백질 2		튜라T(tide) 도메인 할유 단백질 10	우로코르 턴-3 (트롬보스판단모티프 14 를 갖는 디신테그린 및 메들로프로티나이제
周恩 브리브란트 인자 A 도메인 할유 단백질 1		막통과 9-슈파밀리 멤버 3	단백질 AMBP	
다신테그린 및 메탈로프로티나이제 도메인 할유 단백질 9		周恩 브리브란트 인자 D 및 EGF 도메인 할유 단백질	보체 C1q 종양 고사 인자 관련 단백질 9-유사	
인자 오 터시노-건		트롬보스판단모티프 17 를 갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나이제	성장 억제 및 분화 관련 단백질 88	지방세포 혈장 액 연관 단백질
아포지 방단백질 A-II (Apo-A-II) / (Apo-A-II)		마그과 풀로-유사 단백질 2	단백질 Wnt-10a	페리시다신 동족체
아포지 방단백질 A-IV (Apo-A-IV) / (Apo-A-IV)		암신 특이적 베타-1-당단백질 3	단백질 Wnt-3a	진령 강직증 단백질 동족체
아포지 방단백질 C-II (Apo-C-II) / (Apo-C-II)		터노모들린	원종 암유전자 단백질 Wnt-3	킬트나마제 3-유사 단백질 1
베타-2-단백질 1		테트라스파닌-6	단백질 Wnt-6	UPFE672-단백질 CXorf36
세포자멸사 관련 단백질 3		티오리독신 도메인 할유 단백질 5	단백질 Wnt-9a	아릴설파타체 J
베타-세 콕라티제 2		헬관-나파 성장 인자 D	시토카인 SCNF1-1 베타-	코르티스틴
조자 헬액형 ABO 시스템 블트란스페라제		암신 특이적 베타-1-당단백질 9	자이모엔 고립 막 단백질 16	세룰로플라스-민
카탈산 D2		세마포린-3F	조나-나파-다-겔-화 단백질 ...	안지오포이에틴 관련 단백질 5
C-C 모티프 카모카인 3		사포스파티이제 유사 단백질 2	진령 구배 단백질 3 동족체	고인 코일 도메인 할유 단백질 126
C-유형 터도메인 페밀리 1 멤버 B		아포지 방단백질 O-유사	아憾로틴	CD177 할유
칼슘 헬성화 클로라이드 채널 조절자 1		베타-데라신 119	무특징 C5orf46	단백질 카노피 동족체 4
치마체		트롬보스판단모티프 12 를 갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나이제	무특징 aaif 도메인 할유 단백질 카나이제 1	파리-브로 넥 터유-유-단백질 C4orf31
아고-질 알파-1(IV) 사슬		단백질 FAM131A	드락신	단백질 FAM130A
보체 성분 C8 유플-사슬		단백질 FAM13B	설유-아세포 성장 인자 18	질소판-염기 성 단백질
보체 성분 C9 유플-사슬		베타-글리코시다이제-1-유사 단백질	C-X-C 모티프 케 모자인 111	인터페론 앤실론
글루코오스-구루토오스-유-시도리미트제 도메인 할유 단백질 2		리소자임-유사 단백질 1	L-6 PLAUR 도메인 할유 단백질 6	인텔렉틴-2
DnaJ 동족체 서브파밀리 B 멤버 11		인터알파-트립신 억제제 총체 H5-유사 단백질	키모트립신-유사 엘라스 태제 패밀리 멤버 1	알파-1-3-만노-실-유-단백질 4-베타-N-아세릴 터유-시미-네트 헴스페라제 A
액토-누클리오타이드 파이로-조스파티이제 포스포디아스테라제 패밀리		정자 아크로솔-연관 단백질 5	마M 도메인 할유	메트릭스-체포의 포스포글리코프로테인 (SECTM1)과 아주 유사 mRNA
		류신 풍부 반복 및 면역글로불린 유사 도메인 합유 노고(nogo) 수용체 상호작용 단백질 2	글라이코스파티딜이노시톨 엉커 단백질 2	

면적 7 내행질당 아미노펩티다아재 1 수용체 디로신-단백질 키나아재 arbB-3 내행질 양 상주 단백질 ERp-44	표면활성제-역관단백질 2 아디포넥틴수용체 단백질 1 다중 표피 성장 인자-유사 도메인 6	마트릭스 면탈로포로티나아재 27 불필성세린포로티나아재 35 꼬인 코일 도메인 험유 단백질 134	부정소-풀이적 리포질린-6 아파미 정활적 양이온-수송 ATPase 13A5
IgF-6-결합 단백질 보체 인자-유관련 단백질 1 풀리펩티드 N-아세릴-알로스이미닐로란스페라제 2 호모렉신 간세포 성장 인자 활성제 주요 조작 악화 성착물 클러스터 유전자 단백질	신경내분비단백질 [B] 알파-1B-단백질 WAP 카탈аз (Kazal) 면역글로불린, 쿠니즈 및 NTR 도메 인형유 단백질 2 아릴아세트이미도 틀아세틸회호소-유사 1 호스티틴-3 포로-누리글루란-3, 막-질화된 동물체 인슐린 유사 성장 인자-결합 단백질 6 인터-루-1-바타 지밀도-단백질 수용체 관련 단백질 10 접합-부착-분자 C 무트질-단백질 KIAA0319 라미닌 세르보-코일파-5 파리브로박틴유형III-도메인 험유 단백질 4 지단백질 리파제 간질성 풀리게나아재 마트릭스 면탈로포로티나아재-9 무신-16 무신-2 무신-3B 미오신린 산화된 저밀도-단백질 수용체 1 전립선 총유-괴별현단 유전자 1:단백질 수용체-상호작용 세린-트레오닌-단백질 키나아재 2 풀령 누클리오사이드 수송체 3 풀리노-단백질 P 페포-면역성제-역관단백질 D 라티노-신 유전자 6-단백질 동족체에 의해 자극 트레포-밀 유전자 1 조직 인자 경로 억제자 2	세크라토글로브인페리밀 1D-램버 4 세크라토글로브인페리밀 1D-램버 4 V-셋 및 막-통과 도메인 험유 단백질 2A ADM 무특질-단백질 C1orf82 인술 유사 성장 인자-유사 패밀리 암버 1 카드하린-유사 단백질 29 글령성-단백질 15 글령성-단백질 15 웨오-세린-도로티아제 억제제 암버 아형원관련체포-절차 분자 21 알파-락트알부민 카드하린-6 카렐리시-단형-군-펩티드 라미닌 세르보-유사-감마-1 클수수-호소-회원호소-SPR 패밀리-램버 7B C-C 모티프-카모카인 16 C-C 모티프-카모카인 24 HEAT 반복 험유 단백질 C1orf27 아고질-알파-1(X) 사슬 아고질-알파-2(X) 사슬 풀리파제 아고질-알파-1(XVII) 사슬 카arel리시-펩타디아제 N-서브유닛 2 류신-脯부-부록-막-통과 신경 단백질 4 하에-로-노 및 포로티-오글라이-칸-램-크 단백질 2 다신타-그린 및 베탈-로-프로티나아재-도메인 험유 단백질 30 온향-통-족-체의 억제제 염산-수용체 베타 세포의-설파티제 Staff-2 종양-괴사-인자-수용체-슈파파밀리-램버 14 아르-터-밀 신경고-유-라-린-펩티드 아고질-알파-1(XII) 사슬	코라우단-18 잠정-설-세포-면역글로불린-유사-수용체 유사 단백질 KR3DP1 분비-포-리-피아제 A2 수용체 합포-글로-빈 암배-아-황-원-관-련-세-포-접-차-분-자 20 글령성-단-백-질 3 글수-기-절-형-원-2 사이-로-크-률 P450-20A1 설-관-점-부-성-증-가-단-백-질-유-사-3 단-백-질-Phi-19-동-족-체-2 그룹 III-분비-포-리-피아-제 A2 카-렉-시-페-밀-스-페-리-제-8-도-메-인-한-유-도-백-질-2 단-백-질 FAM19A1 GDNF-파-밀-리-수-용-체-알-파-유-사 정-활-적-글-루-타-티-온-파-를-시-다-이-자-8 시-스-타-틴-D 시-스-타-틴-F 필-소-판-풀-성-화-인-자-아-세-틸-하-이-도-로-로-제 필-글-리-신-1 웅-모-각-소-마-토-모-트-로-판-호-트-로-유-사-1 트-릴-페-밀-페-타-다-아-자-1 트-릴-(Trem) 유-사-점-나-자-1-단-백-질

프로트로빈	프로고나톨리비린-1	아고질 알파-1(XIV)사슬	구아밀라이트 사이클라제 활성제 2B
풀유사수용체 9	그란자임 K	베타-데펜신 2	유도 가능 한 T-세포 공동자극 인자
세포간 접합물 4	인터파른 알파-17	인터루킨-1	
인터루킨-19	인터파른 알파-21	인터루킨-3	
이스트 인-2	인터파른 알파-8	인터루킨-7	노치 동족체 2N 말단 유사 단백질
TRIE-유사 단백질 1 의 Km	인터파른 오메가-1	인터루킨-1	라미노닌서브유노비타-2
콜리코리인-10	초기 타반 인슐린 유사펩티드	라미노닌서브유노 알파-3	뉴로필린-2
증재 변환 성장 인자 베타-겔라 단백질 4	EGF 라트로필린 맥 7 개의 막통과 도메인 함유	염색체 X 상의 탈수소효소 혼원효소 SDR 패밀리	EGF 함유 피콜린-유사 세포와 마트리스 단백질 1
상으로 턴 면역글로불린 유사 유령 1 수용체 알파	파리브로넥틴유령 3 및 안카린 반복 도메인 단백질 1	FXYD 도메인 함유 이온 수송 조절 인자 6	수용체 유형 티로신 단백질 포스파티아제 카파
재생 소도 유래된 단백질 3 알파	라이실 육시다이제 동족체 4	세린 인포로레이터 2	재생 소도 유래된 단백질 4
E3 우리부틴-단백질 리가이자제 RNPs	루미칸	스트로렐라인-3	터키나노-4
프로타카 키-나-1	아드로핀	분비 인다반절 1	마트리스 매트로프로티나이제-23
분비 프리풀드 관련 단백질 1, 아이소형 CRA_a	류신 풍부 반복 막통과 단백질 FLRT1	세린 베타-라타마제-유사 단백질 LACTB	보체 C1q 중 양고사 인자 관련 단백질 5
풀라스미노겐 관련 단백질 B	뉴클리오반단-2	미토드리알	풀티신
양화적 미토겔트 랜스파라제 ZDHHC16	포스포리파이아제 A2	웨이지 철구호른 모	전작은 봄비 중단백질
안지 오-포-이에-타-한 단백질 1	프로엔카멜린-B	임신 특이적 베타-1-당단백질 6	판타락신 관련 단백질 PTX3
UPF0510 단백질 C19orf63	풀티도글라이칸 인자 단백질 1-베타	니콜프 관련 단백질 3	카복신에스테 라제 8
스케빈 저수용체 시스테인 풍부 유령 1 단백질 M160	면역글로불린 슈파마일리 험유 루신 풍부 반복 단백질 2	탈수소효소 혼원효소 SDR 패밀리 린버 11	티오라족 관련 막통과 단백질 4
ER 분해-증상 알파-만노시다이제-유사 2	V-세 및 면역글로불린 도메인 함유 단백질 2	재생 소도 유래된 단백질 3-감마	주요 촉진 인자 슈파마일리 도메인 함유 단백질 2
베타-글라토시다이제-1-유사 단백질 2	풀티드 YY	RING 필러 단백질 43	칼리크로린 인-12
인터루킨-17 수용체 E	레티놀 결합 단백질 3	세마노-콜라-2	브라비나 헥사인 단백질
인터루킨-20	아데노	뮤신-15	포리민
인터루킨-25	전위 단백질 SEC63 동족체	뼈-알루프로토이-2	토르신-1A
PDZ 도메인 험유 단백질 11	번령 성장 인자 베타-3	리포타인	C-C 모티프 캐모카인-23
혈액신-3	단백질 Wnt-10b	성장-조절 알파 단백질	테스티컬-3
레티노이드 유도 가능 한 세린 카복시펩타다이제	라늘라제	R-스폰다-2	염기 성 탄-액 프롤린 풍부 단백질 4
단구개-페 및 비강-상-암-암-연관 단백질 2	전구단백질 전환효소 서브릴리신-혁신 유령 4	막통과 및 고인코일 도메인 함유 단백질 3	종양 고사 인자 수용체 슈파파밀리 린버 18
WAP 4-디설피이드 코아 도메인 단백질 5	카복시펩타다이제 A4	VEGF 동반조절된 케모카인-1	CDO 의브라-1
헬소판 유래된 성장 인자 C	율락토에단-4	ADM2	베타-1,4-2-락-토-실트란스페타제 4
디신터그리미 및 멤토프로티나이제 도메인 함유 단백질 33	인슐라-유사 성장 인자-결합 단백질 복합산	하이드로스테로이드-11-베타-율수소효소 1-유사 단백질	율수소효소 유효 소 SDR 패밀리 린버 9
BSD 도메인 험유 단백질 1	불안정한 시술	엘타-유사 단백질 1	엘판
세포 첨해 뿐자 3	아憾로개닌, Y-동령체	에프라-1A1	오토인코린
CDC45 관련 단백질	아밀설파타제 F	설유아세포 성장 인자 수용체-유사 1	테나스신-R
	코리오고나도로 편서브유노비타 범이체 2		

콘트로란틴 다이실클리세를 O-아실트란스페라제 2 3-카로-스테로이드 흰 원효소 오토루킨-17수용체 C 오토루킨-17수용체 D 풀-풀체 서브유닛 1 제한부착 풀자-유사 E3 우리 퍼티-단백질 리가이제 LN3X 류진동부 반복 막통과 신경 단백질 3 메티오닌 아데노신트란스페라제 2 서브 유닛 베타 포도당락신유사단백질 2 풀렌신 도메인 항유 단백질 2 구희 통족체 4 칼로실세라마이드 알파-2,3-시알루트란스페라제 SD11 악통과 매밀리 엔터 2 수시 도메인 항유 단백질 1 세린오-닌-단백질 커니나-아제 TAO2 막통과 프로테아제, 세린 2 UDP-글루코스산 탈산효소 1 모질 친 단백질 C10orf58 디오파 농신 관련 단백질 2 CNP7-아세틸뉴마이네이트-베타- 글리코스아마이드-알파-2,3-시알루트란스페라제 주정무특정단백질 ENSP0000338674 막통과 단백질 119 막통과 단백질 98 Pre-B-림포구 단백질 3 주정무특정 단백질 C14orf144 마-결합 단백질 1 피클리(아교젤 피브리노겐 도메인 항유)3 (아카타 항원) (N13) (마-풀리(아교젤 피브리노겐 도메인 항유) 3 (아카타 항원), 아이소형 CRA, b)	베타-데-페신 104 베타-데-페신 105 베타-데-페신 107 단백질 WFDC11 WAP 4-디-설파이드 코아 도메인 단백질 6 에피엔 단백질 FAM19A5 크라우 단-6 암바이-항원 관련 세포 협착 분자 19 트로보스포단 모티프 1 를 갖는 디신테그린 및 메토로프로토인자 단백질 COQ10A, 미토콘드리알 무통 친 단백질 C19orf41 무통 친 단백질 C21orf63 단백질 레타-동족체 2 코카인- 및 암페타민-조절 전사체 단백질 칼로실세라마이드 알파-2,3-시알루트란스페라제 지방종 HM/GIC-합파트너유사 1 단백질 류신 풀부 반복체 항유 단백질 13 류신 풀부 반복체 항유 단백질 25 류신 풀부 반복체 항유 단백질 33 류신 풀부 반복체 항유 단백질 3 Ly6 PLAUR 도메인 항유 단백질 4 비타민 K 애플-사이드 훈련효소 척물 서브유닛 1 단백질 2 CNP7-아세틸뉴마이네이트-베타- 글리코스아마이드-알파-2,3-시알루트란스페라제 주정무특정단백질 ENSP0000338674 막통과 단백질 119 막통과 단백질 98 Pre-B-림포구 단백질 3 주정무특정 단백질 C14orf144 마-결합 단백질 1 피클리(아교젤 피브리노겐 도메인 항유)3 (아카타 항원) (N13) (마-풀리(아교젤 피브리노겐 도메인 항유) 3 (아카타 항원), 아이소형 CRA, b)	GDNF 패밀리 수용체 알파-3 헬소판 수용체 G24 프로-고나들리-버린-2 콜리코리-알-7 아포지방단백질 F 단백질 CASC4 VIP36 유사 단백질 마그네슘 수송 단백질 1 아밀로리드 감수성 암민 유타시다아제 [구리 헴유] DNA 손상 조절자-식작용 조절자-단백질 2 막통과 단백질 C17orf87 보체 인자 H 관련 단백질 5 EKS06-결합 단백질 7 세린 인포포타이터 1 막통과 및 무리퀴틴-유사 도메인 항유 단백질 1 구아밀리트-결합 단백질 5 액로뉴클레오파트-트리포스파이트 디포스포하이드로라제 6 세르린 B3 단백질 RAD5 동족체 B 스케비저 수용체 클레스 A 엠버 5 세마포린-6B 막통과 단백질 108 소시 베인 항유 단백질 3 제세-변환성 장 인자 베타-결합 단백질 2 주정 무특정 단백질 UNQ6190/PRO20217 분비 및 막통과 1 전구 변종 이고질 알파-1(XXX) 사슬 비트린 수용체 UNCS1D 유신-13 ATP-의 조성 멜탈로프로테아제 YMEL1 전구단백질 전환효소 서브릴리신 핵신 유형 5 12)	성장 인자 단백질 TSPEAR 히파에 스틴 부티로필린 유사 단백질 3 부티로필린 유사 단백질 9 라미닌 서브유닛-감마-2 단백질 LN1 (BR11) 단백질 21 내형질 망-만노-실-올리고사카라이드 1,2-알파- 만노시다아제 해장 뿐비-파릴 막 주요 단백질 GP 단백질 5 세마포린-4B 세마포린-5B 에실-서브-코글리이간 구아밀리트-결합 단백질 5 액로뉴클레오파트-트리포스파이트 디포스포하이드로라제 6 단백질 RAD5 동족체 B 스케비저 수용체 클레스 A 엠버 5 세마포린-6B 막통과 단백질 108 소시 베인 항유 단백질 3 제세-변환성 장 인자 베타-결합 단백질 2 주정 무특정 단백질 UNQ6190/PRO21346 분비 및 막통과 1 전구 변종 이고질 알파-1(XXX) 사슬 비트린 수용체 UNCS1D 유신-13 주정 무특정 단백질 PRO2329 결합-결합 단백질 2 주정 무특정 단백질 PRO2329 결합-결합 단백질 2 종양유발성 1 의 신경아세포종 억제제
---	---	---	---

본원에서 제공된 치료 단백질은 베타적인 것으로 고려되지 않아야 한다. 오히려, 본원에 제공된 명세서로부터 명백한 바와 같이, 본 발명의 방법은 임의의 단백질에 적용 가능하고, 여기서, 수용성 폴리머의 부착은 본 발명에 따라 바람직하다. 예를 들면, 치료 단백질은, 그 전체가 참고로 본원에 통합되어 있는 US 2007/0026485에 기재되어 있다.

혈액 응고 단백질

일 측면에서, 본 발명의 개시 물질은 혈액응고 단백질이고, 이는 인간 혈장으로부터 유래될 수 있고, 하기에 기재된 재조합 조작 기술에 의해 생산될 수 있다: 미국 특허 번호 4,757,006; 미국 특허 번호 5,733,873; 미국 특허 번호 5,198,349; 미국 특허 번호 5,250,421; 미국 특허 번호 5,919,766; 및 EP 306 968.

치료 폴리펩티드 예컨대 인자 IX (FIX), 인자 VIII (FVIII), 인자 VIIa (FVIIa), 폰빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF) 및 ADAMTS 13 프로테아제를 포함하는 혈액응고 단백질은 단백분해 효소에 의해 빠르게 분해되고

항체에 의해 중화된다. 이는 그의 반감기 및 순환 시간을 감소시키고, 이로써 그의 치료 효과를 제한한다. 비교적 높은 용량 및 빈번한 투여가 이를 응고 단백질의 원하는 치료 또는 예방 효과에 도달하고 유지할 필요가 있다. 그 결과, 적절한 용량 조절은 얻기 어렵고 빈번한 정맥내 투여의 필요가 환자의 삶의 방식에 대한 제한이 된다.

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

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

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

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

상기 FX의 활성화는 상기 2 개의 경로의 공통점이 된다. 인지질 및 칼슘과 함께, 인자 Va (FVa) 및 Xa는 프로트롬빈을 트롬빈 (프로트롬비나제 캠플렉스)으로 전환시키며, 이것은 후에 피브리노겐을 분해하여 피브린 모노머를 형성시킨다. 상기 모노머는 중합하여 피브린 가닥을 형성한다. 인자 XIIIa (FXIIIa)는 이를 가닥을 서로 공유적으로 결합시켜 단단한 그물을 형성시킨다.

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

인자 VIIa

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

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

FVII의 대부분은 자이모겐 형태로 혈장 내에서 순환하며, 이 형태의 활성화는 아르기닌 152와 이소류신 153 사이의 케프티드 결합의 분해를 야기한다. 상기 결과로 생성되는 활성화된 FVIIa는 단일 이황화 결합 (Cys 135 대 Cys 262)을 통해서 연결된 NH2-유래된 경쇄 (light chain) (20 kD) 및 COOH 말단-유도된 중쇄 (heavy chain) (30 kD)로 구성된다. 상기 중쇄는 촉매적 영역을 함유하는 반면, 상기 경쇄는 막-결합성 Gla 영역을 함유한다.

유전적 인자 및 환경적 인자에 의해서 결정된 FVII의 혈장 농도는 약 0.5 mg/ml이다 (Pinotti 등, *Blood.*

2000;95:3423-8). 상이한 FVII 유전자형은 평균 FVII 레벨에서 수 배의 차이를 야기할 수 있다. 혈장 FVII 레벨은 건강한 여성에서 임신 중에 상승되며, 또한 연령에 따라 증가하고, 여성 및 고트리글리세라이드혈증 (hypertriglyceridemia)이 있는 사람에게서 더 높다. FVII은 모든 응혈원 인자 중 가장 짧은 반감기를 갖는다 (3 내지 6 시간). FVIIa의 평균 혈장 농도는 건강한 개체내에서 3.6 ng/ml이며, FVIIa의 순환 반감기는 다른 응혈원 인자와 비교하여 비교적 길다 (2.5 h).

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

참조 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는, 예를 들어, 게놈 서열에 대한 유전자 은행 (GenBank) 수탁번호 제 J02933호, cDNA에 대한 M13232 (Hagen 등 *PNAS* 1986; 83: 2412-6), 및 폴리펩티드 서열에 대한 P08709를 포함한다 (본원 명세서에 전체로서 통합된 참고문헌). FVII의 다양한 다형현상은 예를 들어, 문헌 (참조: Sabater-Lleal 등, *Hum Genet.* 2006; 118:741-51; 본 발명에 온전히 참고로 통합됨)에 기술되어 있다.

인자 IX

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

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

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

FIX의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열은 예를 들어, UniProtKB/Swiss-Prot 수탁번호 제P00740호, 미국 특허 제6,531,298호 및 도 1에서 찾아볼 수 있다 (서열번호: 1)

인자 VIII

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

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

FVIII은 또한 출혈성 장애에서 치료학적 사용을 위해 재조합 단백질로 합성된다. 다양한 생체 외 시험이 치료학적 의약으로서의 재조합 FVIII (rFVIII)의 잠재적 효능을 결정하기 위하여 고안되었다. 이들 시험방법은 내인성 FVIII의 생체내 효과를 모사한다. FVIII의 생체 외 트롬빈 처리는 생체 외 시험방법에 의해서 측정된 것으로서, 그의 응혈원 활성의 빠른 증가 및 그에 따른 감소를 야기한다. 상기 활성화 및 불활성화는 중쇄 및 경쇄 양자에서 특이적으로 제한된 단백분해와 일치하며, 이는 FVIII에서 다양한 결합성 항원 결정 부위 (epitopes)의 이용 가능성을 변화시킴으로써, 예를 들어, FVIII가 VWF로부터 해리되어 인지질 표면에 결합하도록 하거나, 특정의 단일 클론성 항체에 대한 결합 능력을 변화시킨다.

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

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

폰 빌레브란트 인자

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

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

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

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

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

본 발명에 따른 그 밖의 다른 치료 단백질은 당해 기술분야에서, 예를 들어, 문헌 (Mann KG, *Thromb Haemost*, 1999;82:165-74)에 기술되어 있다.

A. 폴리펩타이드

일 측면에서, 본 발명의 시작 물질은 단백질 또는 폴리펩타이드이다. 본원 명세서에서 사용된, 용어 치료 단백질은 치료 단백질과 관련된 생물학적 활성을 나타내는 임의의 치료 단백질 분자를 나타낸다. 본 발명의 일 구현 예에서, 상기 치료 단백질 분자는 전체-길이 치료 단백질이다.

고려되는 치료 단백질 분자는, 전체-길이 단백질, 전체 길이 단백질의 전구체, 전체 길이 단백질의 생물학적 활성 서브유니트 또는 단편뿐만 아니라, 치료 단백질의 임의의 형태의 생물학적 활성 유도체 및 변이체를 포함한다. 따라서, 치료 단백질은, (1) 본원 명세서에 기술된 기준 핵산 또는 아미노산 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드에 대해서 적어도 약 25, 약 50, 약 100, 약 200, 약 300, 약 400, 또는 그 이상의 아미노산의 구역에 걸쳐서, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 이상 또는 그 이상의 아미노산 서열 동일성을 가지며; 및/또는 (2) 본원 명세서에 기술된 바와 같은 기준 아미노산 서열, 그의 면역원성 단편 및/또는 그의 보존적으로 변형된 변이체를

포함하는 면역원에 대해서 생성된 항체, 예를 들어, 다중 클론성 (polyclonal) 또는 단일 클론성 (monoclonal) 항체에 특이적으로 결합하는 것을 포함한다.

본 발명에 따르면, 용어 "재조합 치료 단백질"은 재조합 DNA 기술을 통해서 수득된 임의의 치료 단백질을 포함한다. 특정의 구현예에서, 상기 용어는 본원 명세서에 기술된 바와 같은 단백질을 포함한다.

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

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

본원 명세서에서 사용된, "생물학적 활성 유도체" 또는 "생물학적 활성 변이체"는, 결합 특성과 같은 상기 문자와 실질적으로 동일한 기능적 및/또는 생물학적 특성을 가지며, 및/또는 웨티드 골격 또는 기본 폴리머 단위와 같은 동일한 구조적 기반을 갖는 문자의 임의의 유도체 또는 변이체를 포함한다.

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

변이체 폴리펩티드는 유사체 폴리펩타이드의 유형이고, 하나 이상의 아미노산 잔기가 본 발명의 치료 단백질 아미노산 서열에 첨가된 삽입 변이체를 포함한다. 삽입은 단백질의 어느 하나 또는 양자의 말단에 위치할 수 있으며, 및/또는 치료 단백질 아미노산 서열의 내부 구역 내에 위치할 수 있다. 어느 하나 또는 양 말단에 추가적인 잔기를 갖는 삽입 변이체는, 예를 들어, 융합 단백질 및 아미노산 태그 (tag) 또는 다른 아미노산 라벨 (label)을 포함하는 단백질을 포함한다. 일 관점에서, 상기 치료 단백질 문자는 특히 문자가 *E. coli*와 같은 박테리아 세포에서 재조합적으로 발생되는 경우에, N-말단 Met를 임의적으로 함유한다.

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

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

보존적 치환

측쇄 특성	아미노산
무극성(소수성):	
A. 지방족	A L I V P
B. 방향족	F W
C. 황-합유	M
D. 경계선	G
비전하성 극성:	
A. 하이드록실	S T Y
B. 아마이드	N Q
C. 설프히드릴	C
D. 경계선	G
양전하로 하전된(염기성)	K R H
음전하로 하전된(산성)	D E

대안적으로, 예시적인 보존적 치환은 하기에서 바로 나타나 있다.

보존적 치환 II

최초 잔기	예시적인 치환
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe,
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Phe, Ile
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

B. 폴리뉴클레오티드

본 발명의 치료 단백질을 인코딩하는 핵산은, 예를 들면 및 비제한적으로, 유전자, pre-mRNAs, mRNAs, cDNAs, 다형성 변이체, 대립유전자, 합성 및 천연 생성 돌연변이체를 포함한다.

본 발명의 치료 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한, 비제한적으로 하기인 것을 포함한다: (1) 염격한 하이브리드화 조건 하에서 본원에서 기재된 바와 같은 참조 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산, 및 그의 보존적으로 변형된 변이체로 특이적으로 하이브리드화하는 것; (2) 적어도 약 25, 약 50, 약 100, 약 150, 약 200, 약 250, 약 500, 약 1000, 또는 그 초과 뉴클레오타이드의 영역에 걸쳐 (성숙 단백질의 1218 뉴클레오타이드의 전체 길이 서열까지) 본원에서 기재된 참조 핵산 서열에 대해 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 그 초과 뉴클레오타이드 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 갖는 것. 예시적인 "엄격한 하이브리드화" 조건은 하기를 포함한다: 50% 포름아마이드, 5X SSC, 20 mM Na · PO4, pH 6.8에서 42oC에서 하이브리드화; 및 55 °C에서 30분 동안 1X SSC에서 세정. 이들 예시적인 조건에의 변형은 하이브리드화될 서열의 길이 및 GC 뉴클레오타이드 함량을 기준으로 만들어질 수 있다는 것으로 이해된다. 당해분야에서의 식 표준은 적절한 하이브리드화 조건을 결정하는데 적절하다. 참조 Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (제2판, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) §§ 9.47-9.51.

"천연 생성" 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열은 하기를 비제한적으로 포함하는 포유류로부터 전형적으로 유래된다: 영장류, 예들 들면, 인간; 설치료, 예들 들면, 랙트, 마우스, 햄스터; 소, 돼지, 말, 양, 또는 어떤 포유류. 본 발명의 핵산 및 단백질은 재조합 분자일 수 있다 (예들 들면, 이종성 및 야생형 서열 또는 그의 변이체를 인코딩함, 또는 비-천연 생성).

C. 치료 단백질의 생산

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

다른 측면에서, 상기 치료 단백질은 약물학적으로 허용되는 치료 단백질 분자를 생산하는 것을 특징으로 하는 적합한 원핵 또는 진핵 숙주 시스템 내에서의 발현에 의해서 생산된다. 진핵세포의 예로는 CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep, 및 HepG2와 같은 포유동물 세포를 들 수 있다.

상기 치료 단백질의 제조를 위해서 광범위한 종류의 벡터가 사용되며, 진핵성 및 원핵성 발현 벡터로부터 선택된다. 원핵성 발현을 위한 벡터의 예로는 pRSET, pET, 및 pBAD와 같은 플라스미드가 포함되나, 이들로 제한되지 않으며, 여기에서 원핵성 발현 벡터에서 사용된 프로모터는 lac, trc, trp, recA, 또는 araBAD 중의 1 이상을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 진핵성 발현을 위한 벡터의 예로는, (i) AOX1, GAP, GAL1, 또는 AUG1과 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 프로모터를 사용하는, pAO, pPIC, pYES, 또는 pMET와 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 효모내의 발현을 위한 벡터; (ii) PH, p10, MT, Ac5, 0pIE2, gp64, 또는 polh와 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 프로모터를 사용하는 pMT, pAc5, pIB, pMIB, 또는 pBAC와 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 곤충 세포에서의 발현을 위한 벡터, 및 (iii) 포유동물 세포에서의 발현을 위한 pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, 또는 pBPV와 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 벡터, 및 일 관점에서, CMV, SV40, EF-1, Ubc, RSV, ADV, BPV, 및 β -액틴과 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 프로모터를 사용하는, 우두 바이러스 (Vaccinia Virus), 아데노-연관 바이러스, 포진 바이러스 (Herpes Virus), 또는 레트로바이러스와 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 바이러스 시스템으로부터 유도된 벡터가 포함된다.

D. 투여

일 구현예에서, 본 발명의 콘주게이션된 치료 단백질은 정맥내, 근육내 또는 복강내 주사와 같은 주사에 의해서 투여될 수 있다.

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

본원 명세서에서 사용된, "유료량"은 질환 또는 장애를 치료하거나 질환 또는 장애의 증상을 완화시키는데 적당한 용량을 포함한다. 일 구현예에서, "유효량"은 본원 명세서에 기술된 바와 같은 출혈성 장애를 갖는 포유동물을 치료하는데 적합한 용량을 포함한다.

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

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

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

추가적인 측면으로서, 본 발명은 대상체에게 투여하기 위하여, 그 사용을 용이하게 하는 방식으로 포장된 본 발명의 조성물을 포함하는 키트 (kits)를 포함한다. 일 구현예에서, 이러한 키트는 상기 방법을 실시할 때의 화합물 또는 조성물의 사용을 설명하는 것으로 용기에 부착되거나 포장에 포함된 라벨을 갖는 밀봉된 병 또는 용기와 같은 용기 내에 포장된, 본원 명세서에 기술된 화합물 또는 조성물 (예를 들어, 콘주제이션된 치료 단백질을 포함하는 조성물)을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 키트는 콘주제이션된 치료 단백질을 포함하는 조성물을 담은 제1 용기, 및 상기 제1 용기 내의 조성물을 위한 생리학적으로 허용되는 재구성 용액을 담은 제2 용기를 함유한다. 일 관점에서, 상기 화합물 또는 조성물은 단위 투약 형태으로 포장된다. 상기 키트는 특정한 투여 경로에 따라 상기 조성물을 투여하는데 적합한 장치를 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 키트는 치료학적 단백질 또는 웨პ티드 조성물의 사용을 설명하는 라벨을 함유한다.

수용성 폴리머

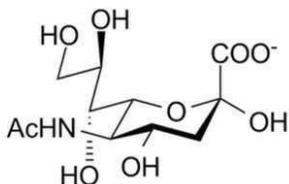
일 측면에서, 제공된 치료 단백질 유도체 (즉, 콘주제이션된 치료 단백질) 분자는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 분지형 PEG, 폴리시알산 (PSA), 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록실에틸 전분 (HES), 탄수화물, 폴리사카라이드, 폴루란, 키토산, 히알루론산, 황산 콘드로이틴, 황산 더마탄, 녹말, 텍스트란, 카복시메틸-텍스트란, 폴리알킬렌 옥시드 (PAO), 폴리알킬렌 글리콜 (PAG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈,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

일 구현예에서, 상기 유도체는 천연 치료학적 치료 단백질 생성물의 전체 기능적 활성을 보유하며, 천연 치료학적 치료 단백질 생성물과 비교할 때, 연장된 생체내 반감기를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 상기 유도체는 천연 치료 단백질에 비해서 적어도 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 또는 150 퍼센트 (%)의 생물학적 활

성을 보유한다. 관련된 관점에서, 상기 유도체 및 천연 치료 단백질의 생물학적 활성은 치료 인자 항원값에 대한 발색 반응 활성 (chromogenic activity)의 비 (치료 인자 : Chr : 치료 인자 : Ag)에 의해서 결정된다. 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 구조물의 반감기는 천연 치료 단백질의 생체내 반감기에 비해 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 배 감소 또는 증가한다.

A. 시알산 및 PSA

PSA는 N-아세틸뉴라민산의 폴리머 (일반적으로 호모폴리머)로 이루어진다. 2차 아미노 그룹은 통상 아세틸 그룹을 갖지만, 대신에 글라이콜릴 그룹을 보유할 수 있다. 하이드록실 그룹 상의 가능한 치환체는 아세틸, 락틸 에틸, 설페이트, 및 포스페이트 그룹을 포함한다.



N-아세틸뉴라민산
Neu5Ac

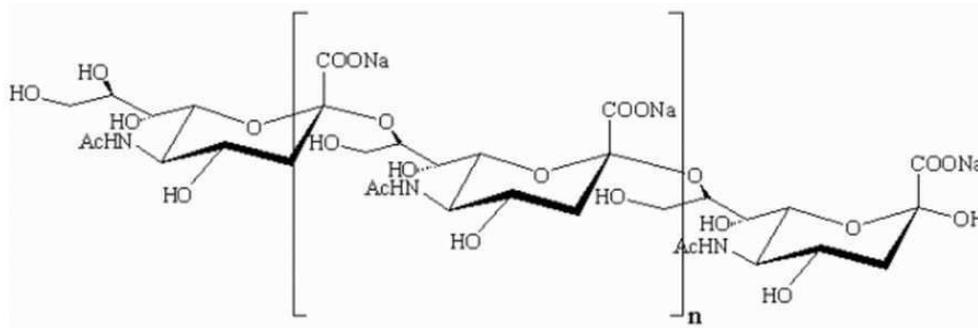
시알산 (N-아세틸뉴라민산)의 구조

PSA 및 mPSA은 일반적으로 2,8- 또는 2,9- 글라이코사이드 결합 또는 이들의 조합 (예를 들면 2,8- 및 2,9- 결합을 대체)에 의해 결합된 N-아세틸뉴라민산 모이어티들로 본질적으로 이루어진 선형 폴리머를 포함한다. 특히 바람직한 PSA 및 mPSA에서, 글라이코사이드 결합은 α -2,8이다. 그와 같은 PSA 및 mPSA는 편리하게 콜로민산으로부터 유래되고, "CA" 및 "mCA"인 것으로 본원에서 정의된다. 전형적인 PSA 및 mPSA는 적어도 2, 바람직하게는 적어도 5, 더 바람직하게는 적어도 10 및 가장 바람직하게는 적어도 20 N-아세틸뉴라민산 모이어티들을 포함한다. 따라서, 2 내지 300 N-아세틸뉴라민산 모이어티들, 바람직하게는 5 내지 200 N-아세틸뉴라민산 모이어티들, 또는 가장 바람직하게는 10 내지 100 N-아세틸뉴라민산 모이어티들을 포함할 수 있다. PSA 및 CA는 바람직하게는 N-아세틸뉴라민산 이외의 당 모이어티들이 본질적으로 없다. 따라서 PSA 및 CA는 바람직하게는 적어도 90 %, 더 바람직하게는 적어도 95 % 및 가장 바람직하게는 적어도 98 % N-아세틸뉴라민산 모이어티들을 포함한다.

(예를 들면 mPSAS 및 mCA에서와 같이)PSA 및 CA가 N-아세틸뉴라민산 이외의 모이어티들을 포함하는 경우 이들은 바람직하게는 폴리머 사슬의 말단의 한쪽 또는 양쪽에서 위치한다. 그와 같은 "다른" 모이어티들은, 예를 들면, 산화 또는 환원에 의해 말단 N-아세틸뉴라민산 모이어티들로부터 유래된 모이어티들일 수 있다.

예를 들면, WO-A-0187922은 그와 같은 mPSA 및 mCA을 기재하고 있고 여기서 비-환원 말단 N-아세틸뉴라민산 단위는 나트륨 폐리오레이트와의 반응에 의해 알데하이드 그룹으로 전환된다. 또한, WO 2005/016974는 그와 같은 mPSA 및 mCA을 기재하고 있고 여기서 환원 말단 N-아세틸뉴라민산 단위에 대해 환원 말단 N-아세틸뉴라민산 단위에서 고리를 환원적으로 개방하기 위해 환원이 수행되고, 이로써 근접 디올 그룹이 형성되고, 그 다음 근접 디올 그룹을 알데하이드 그룹으로 전환시키기 위해 산화가 수행된다.

시알산 풍부 당단백질은 인간 및 다른 유기체에서 셀렉틴에 결합한다. 인간 인플루엔자 감염에서 중요한 역할을 한다. 예를 들면, 시알산은 만노오스 결합 랙틴으로부터 호스트 세포 또는 세균의 표면 상에 만노오스 항원을 숨길 수 있다. 이는 보체의 활성화를 방지한다. 시알산은 또한, 페널티메이트(penultimate) 갈락토오스 잔기를 숨기고 따라서 간 실질 세포 상의 갈락토오스 수용체에 의해 당단백질의 빠른 청소를 방지한다.



콜로민산 (N-아세틸뉴라민산의 호모폴리머)의 구조

콜로민산 (PSA의 하위분류)는 α (2→8) 케토사이드 결합을 갖는 N-아세틸뉴라민산 (NANA)의 호모폴리머이고, 그 중에서도, K1 항원을 갖는 에스캐리치아 콜리의 특정 균주에 의해 생산된다. 콜로민산은 많은 생리 기능을 갖는다. 약물 및 화장품의 원료로서 중요하다.

폴리시알릴화된 및 비변형 아스파라기나제에 의한 생체내 비교 연구는, 폴리시알릴화가 효소의 반감기를 증가시킨다는 것을 보여주었다 (Fernandes 및 Gregoriadis, *Biochimica Biophysica Acta* 1341: 26-34, 1997).

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

본 발명의 일 구현예에서, 폴리사카라이드 화합물의 시알산 부분은 강한 친수성이며, 또 다른 구현예에서는 전체 화합물이 강한 친수성을 띤다. 친수성은 주로 히드록실기뿐만 아니라 시알산 단위의 펜던트 카복실기에 의해 부여된다. 사카라이드 단위는 아민, 히드록실기 또는 셀레이트기, 또는 이들의 조합과 같은 다른 기능적 작용기를 함유할 수 있다. 이들 작용기는 천연적으로 발생한 사카라이드 화합물 상에 존재하거나, 유도된 폴리사카라이드 화합물 내로 도입될 수 있다.

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

B. 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 폐길화

특정의 관점에서, 치료 단백질은 임의의 다양한 화학적 방법에 의해 수용성 폴리머에 콘주케이션된다 (Roberts JM 등, *Advan Drug Delivery Rev* 2002;54:459-76). 예를 들어, 일 구현예에서 치료 단백질은 N-히드록시석신이미드 (NHS) 에스테르를 사용하여 단백질의 유리 아미노기에 PEG를 콘주케이션시킴으로써 변형된다. 또 다른 구현예에서, 수용성 폴리머, 예를 들어, PEG는 말레이이미드 화학 반응, 또는 선행 산화반응 후에 치료 단백질의 탄수화물 부위에 대한 PEG 히드라지드 또는 PEG 아민의 커플링 반응을 이용하여 유리 SH기에 커플링된다.

일 관점에서, 상기 콘주케이션은 안정한 결합의 형성 하에서의 치료 단백질에 대한 수용성 폴리머의 직접 커플링 (또는 링커 시스템을 통한 커플링)에 의해서 수행된다. 또한, 본 발명의 특정한 관점에서, 분해성, 방출 가능성 또는 가수 분해성 링커 시스템이 사용된다 (Tsubery 등 *J Biol Chem* 2004;279:38118-24 / Greenwald 등, *J Med Chem* 1999;42:3657-67 / Zhao 등, *Bioconj Chem* 2006;17:341-51 / WO2006/138572A2 / US7259224B2 / US7060259B2).

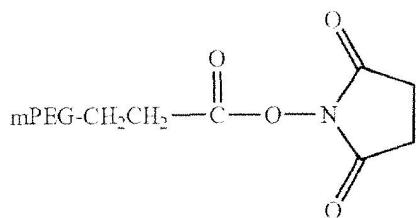
본 발명의 일 구현예에서, 치료 단백질은 석신이미딜 석시네이트, 석신이미딜 글루타레이트 또는 석신이미딜 프로페오네이트와 같은 활성 N-히드록시석신이미드 에스테르 (NHS)를 함유하는 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 사용함으로써 리신 잔기를 통해서 변형된다. 이를 유도체는 안정한 아미드 결합을 형성함으로써 온화한 조건 하에서 치료 단백질의 리신 잔기와 반응한다. 본 발명의 일 구현예에서, 상기 PEG 유도체의 쇄 길이는 5,000 Da이다. 500 내지 2,000 Da, 2,000 내지 5,000 Da, 5,000 초과 10,000 Da 이하, 또는 10,000 초과 20,000 Da 이하, 또는 20,000 초과 150,000 Da 이하의 쇄 길이를 가지며 선형 및 분지형 구조를 포함하는 다른 PEG 유도체가 다양한 구현예에서 사용된다.

아미노기의 폐길화를 위한 대안적의 방법으로는, 우레탄 결합의 형성에 의한 PEG 카보네이트와의 화학적 콘주개 이션, 또는 2급 아미드 결합을 형성하는 환원적 아미노화에 의한 알데히드 또는 케톤과의 반응이 있으나, 이들로 제한되지는 않는다.

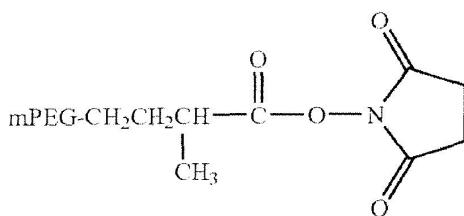
본 발명의 일 구현예에서, 치료 단백질 분자는 상업적으로 이용할 수 있는 PEG 유도체를 사용하여 화학적으로 변형된다. 대안적 관점에서의 이를 PEG 유도체는 선형 또는 분지형 구조를 갖는다. NHS기를 함유하는 PEG-유도체의 예는 이하에 열거한다.

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

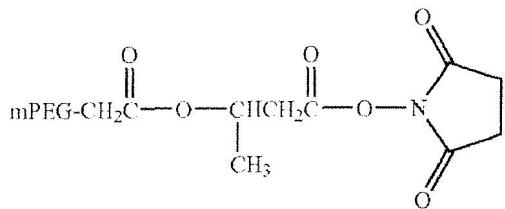
mPEG-석신이미딜 프로페오네이트 (mPEG-SPA)



mPEG-석신이미딜 α -메틸부타노에이트 (mPEG-SMB)

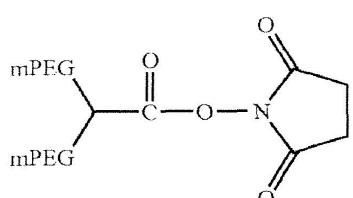


mPEG-CM-HBA-NHS (CM=카복시 메틸; HBA=히드록시 부티르산)



분지형 PEG-유도체의 구조 (Nektar Therapeutics):

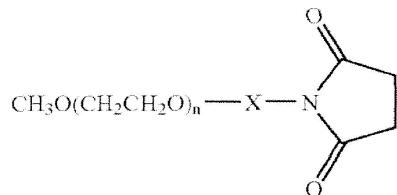
분지형 PEG N-히드록시석신이미드 (mPEG2-NHS)



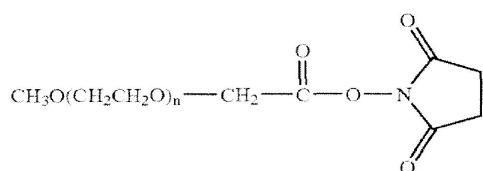
분지된 구조를 갖는 상기 시약은 Kozlowski 등 (BioDrugs 2001;5:419-29)에 의해 보다 상세하게 기술되어 있다.

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

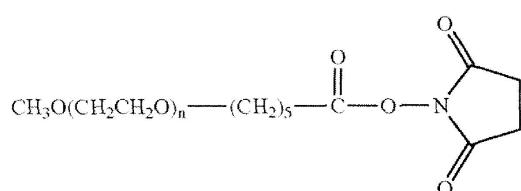
선형 PEG-유도체의 일반적 구조 (NOF Corp.):



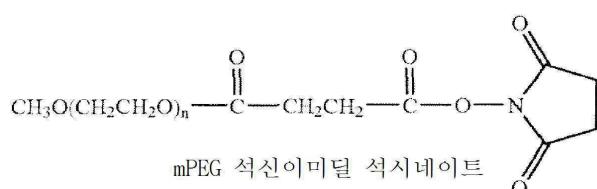
X=카복시메틸



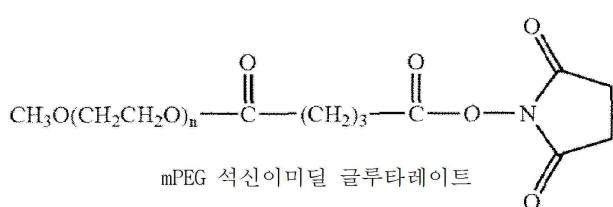
X=카복시펜틸



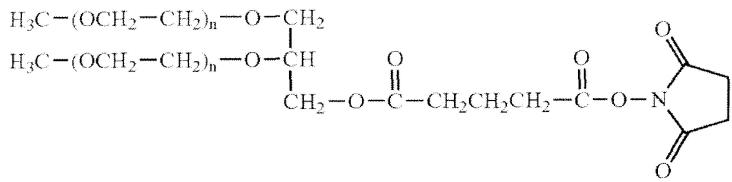
X=석시네이트



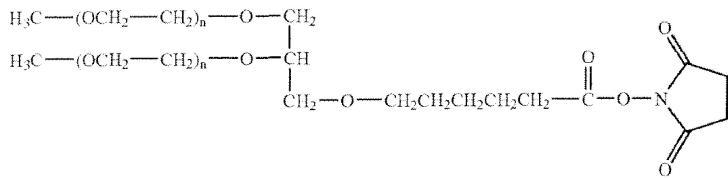
X=글루타레이트



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



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



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

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

놀랍게도, 본 발명의 상기 폐질화된 치료 단백질은 생체내에서의 연장된 반감기와 함께 기능적 활성을 나타낸다. 또한, 상기 폐질화된 rFVIII, FVIIa, FIX, 또는 그 밖의 다른 치료 인자는 트롬빈 불활성화에 대해서 보다 강한 저항성을 나타낸다.

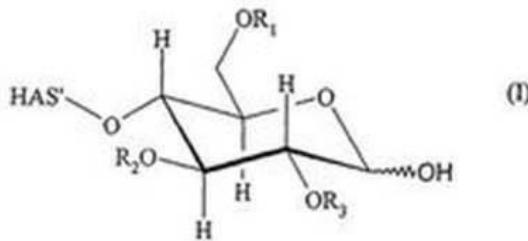
C. 하이드록시알킬 전분 (HAS) 및 하이드록실에틸 전분 (HES)

본 발명의 다양한 구현예에서, 치료 단백질 분자는 하이드록시알킬 전분 (HAS) 또는 하이드록실에틸 전분 (HES) 또는 그의 유도체들을 사용하여 화학적으로 변형된다.

HES는 천연 생성 아밀로펩틴의 유도체이고 몸체에서 알파-아밀라아제에 의해 분해된다. HES는 최대 95 중량 %의 농도에서 옥수수 전분에서 존재하는 탄수화물 폴리머 아밀로펩틴의 치환된 유도체이다. HES는 유익한 생물학적 특성을 나타내고 혈액량 교체 제제로서 임상에서 혈액회석 요법으로 사용된다 (Sommermeyer et al, 1987, Krankenhauspharmazie, 8 (8), 271-278; 및 Weidler et al, 1991, Arzneim.-Forschung/Drug Res. g 419 494-498).

아밀로펩틴은 글루코오스 모이어티들로 이루어지고, 여기서 상기 주요 사슬 알파-1,4- 글리코사이드 결합이 존재하고 분지 부위에서 알파-1, 6-글리코사이드 결합이 발견된다. 이 분자의 물리-화학 특성은 글리코사이드 결합의 유형에 의해 주로 결정된다. 틈이 있는 알파-1,4-글리코사이드 결합으로 인해, 약 6개의 글루코오스-모노머/회전을 갖는 나선형 구조가 생성된다. 폴리머의 물리-화학 뿐만 아니라 생화학 특성은 치환을 통해 변형될 수 있다. 하이드록시에틸 그룹의 도입은 알칼린 하이드록시에틸화에 의해 달성될 수 있다. 반응 조건을 채택하여 하이드록시에틸화에 대해 치환되지 않은 글루코오스 모노머에서 각각의 하이드록시 그룹의 상이한 반응성을 이용할 수 있다. 이러한 사실 때문에, 당업자는 치환 패턴에 제한적으로 영향을 미칠 수 있다.

HAS는 적어도 하나 하이드록시알킬 그룹에 의해 치환된 전분 유도체를 의미한다. 따라서, 용어 하이드록시알킬 전분은 말단 탄수화물 모이어티가 하이드록시알킬 그룹 R1, R2, 및/또는 R3을 포함하는 화합물들로 한정되지 않지만, 말단 탄수화물 모이어티에서 및/또는 전분 분자의 나머지 일부, HAS'에서 어디에도 존재하는 적어도 하나 하이드록시 그룹이, 하이드록시알킬 그룹 R1, R2, 또는 R3에 의해 치환되는 화합물을 의미한다.



알킬 그룹은 적당하게 치환될 수 있는 선형 또는 분지형 알킬 그룹일 수 있다. 바람직하게는, 하이드록시알킬 그룹은 1 내지 10개의 탄소 원자, 더 바람직하게는 1 내지 6개의 탄소 원자, 더 바람직하게는 1 내지 4개의 탄소 원자, 및 더욱 더 바람직하게는 2-4 탄소 원자들을 함유한다. 따라서 "하이드록시알킬 전분"은 바람직하게는 하이드록시에틸 전분, 하이드록시프로필 전분 및 하이드록시부틸 전분을 포함하고, 여기서 하이드록시에틸 전분 및 하이드록시프로필 전분이 특히 바람직하다.

2개 이상 상이한 하이드록시알킬 그룹을 포함하는 하이드록시알킬 전분이 또한 본 발명에서 포함된다. HAS에서 포함된 적어도 하나 하이드록시알킬 그룹은 2개 이상 하이드록시 그룹을 함유할 수 있다. 일 구현예에 따라, 적어도 하나 하이드록시알킬 그룹 포함 HAS는 하나의 하이드록시 그룹을 함유한다.

용어 HAS는 또한, 유도체들을 포함하고 여기서 상기 알킬 그룹은 단일- 또는 다치환된다. 일 구현예에서, 알킬 그룹은 할로겐, 특히 불소, 또는 아릴 그룹으로 치환되고, 단, HAS은 물에서 가용성인 채로 있다. 또한, 하이드록시알킬 그룹의 말단 하이드록시 그룹은 에스테르화 또는 에테르화될 수 있다. HAS 유도체들 WO/2004/024776에 기재되어 있고, 이는 그 전체가 참고로 본원에 통합되어 있다.

D. 부착 방법

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

폴리펩티드에 PSA를 커플링시키는 다른 기술 또한 공지되어 있으며, 본 발명에 의해서 고려된다. 예를 들어, 미국 공개 제2007/0282096호는 예를 들어, PSA의 아민 또는 히드라지드 유도체를 단백질에 콘주케이션시키는 것을 기술하고 있다. 또한, 미국 공개 제2007/0191597호는 환원성 말단에서 기질 (예를 들어, 단백질)과 반응하기 위한 알데히드기를 함유하는 PSA 유도체를 기술하고 있다. 이들 문헌 전체는 참조로서 통합되어 있다.

다양한 방법은 미국 특허 제5,846,951호 (이것은 전체가 참조로서 통합되어 있다)의 7 칼럼, 15 행 내지 8 칼럼, 5 행에 기술되어 있다. 예시적인 기술에는 치료 단백질 또는 폴리사카라이드 중 어느 하나의 카복실기와 치료 단백질 또는 폴리사카라이드의 아민기 사이의 웨პ티드 결합을 통한 결합, 또는 치료 단백질 또는 폴리사카라이드의 카복실기와 치료 단백질 또는 폴리사카라이드의 히드록실기 사이의 에스테르 결합이 포함된다. 상기 치료 단백질을 폴리사카라이드 화합물에 공유적으로 결합시키는 또 다른 결합은 과요오드산염 산화반응에 의해서 상기 폴리사카라이드의 비-환원성 말단에서 형성된 알데히드기와 반응하는 치료 단백질 상의 유리 아미노기 사이에서 시프 염기 (Schiff base)를 통하는 것이다 (Jennings HJ 및 Lugowski C, J Immunol. 1981;127:1011-8; Fernandes AI 및 Gregorius G, Biochim Biophys Acta. 1997;1341:26-34). 일 관점에서, 상기 생성된 시프 염기는 NaCNBH3에 의한 특이적 환원으로 2차 아민을 형성시킴으로써 안정화된다. 대안적인 접근 방법에는, 선행 산화 반응 후에 NH4Cl로 환원적 아미노화시킴으로써 상기 PSA 내의 말단 유리 아미노기를 생성시키는 것이다. 이작용기성 (bifunctional) 시약은 2 개의 아미노기 또는 2 개의 히드록실기를 연결시키기 위해서 사용될 수 있다. 예를 들어, 아미노기를 함유하는 PSA를 BS3 (비스(설포석신이미딜)수베레이트 / Pierce, Rockford, IL)와 같은 시약으로 단백질의 아미노기에 커플링시킨다. 또한, 예를 들어, 아민과 디올기를 연결시키기 위해서 설포-EMCS(N-ε-말레이미도카프로일록시) 설포석신이미드 에스테르/Pierce)와 같은 헤테로-이작용기성성 교차 결합 시약 사용된다.

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

상술한 바와 같이, 상기 치료학적 단백질의 유리 아민기가 상기 시알산 잔기의 1-카복실기와 반응하여 웨პ티드 결합을 형성하거나, 1-카복실산 기와 치료 단백질 상의 히드록실기 또는 다른 적합한 활성 작용기 사이에서 에

스테르 결합이 형성된다. 대안적으로, 카복실기는 탈아세틸화된 5-아미노기와 웨티드 결합을 형성하거나, 치료 단백질의 분자의 알데하이드기는 시알산 잔기의 N-탈아세틸화된 5-아미노 그룹과 시프 염기를 형성한다.

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

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

다양한 구현예에서, 상기 치료 단백질은 글리코실화 부위 (즉, 천연 글리코실화 부위가 아닌 다른 부위)를 도입시키도록 변형된다. 이러한 변형은 당해 기술분야에서 공지된 표준 분자 생물학적 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 더욱이, 치료 단백질은 1개 이상의 탄수화물 부위를 통해서 수용성 폴리머에 콘주게이션되기 전에 생체내 또는 생체 외에서 글리코실화될 수 있다. 상기 글리코실화된 부위는 수용성 폴리머와 단백질의 콘주게이션을 위한 표적으로 작용할 수 있다 (미국 특허출원 제20090028822호, 미국 특허출원 제2009/0093399호, 미국 특허출원 제2009/0081188호, 미국 특허출원 제2007/0254836호, 미국 특허출원 제2006/0111279호, 및 DeFrees S. 등, Glycobiology, 2006, 16, 9, 833-43). 예를 들면, 생체 내에서 자연적으로 글리코실화되지 않는 단백질 (예를 들면, 당단백질이 아닌 단백질)이 본원에서 기재된 바와 같이 변형될 수 있다.

E. 아미노옥시 결합

본 발명의 일 구현예에서, 옥심기를 형성시키기 위한 알데하이드 (예를 들어, 과요오드산 나트륨에 의한 산화 반응에 따른 탄수화물 부위의)와 히드록실아민 또는 히드록실아민 유도체의 반응이 치료 단백질의 복합체의 제조에 적용된다. 예를 들어, 첫째로, 당단백질 (예를 들어, 본 발명에 따르는 치료 단백질)을 과요오드산 나트륨 (NaIO_4)과 같은 산화제로 산화시킨다 (Rothfus JA et Smith EL., J Biol Chem 1963, 238, 1402-10; 및 Van Lenten L 및 Ashwell G., J Biol Chem 1971, 246, 1889-94). 상기 당단백질의 과요오드산염 산화 반응은 활성 알데하이드기를 형성시키기 위한 과요오드산염에 의한 인접한 디올의 산화 반응으로서 1928년에 기술된 고전적인 말라프레이드 (Malaprade) 반응을 기반으로 한다 (Malaprade L., Analytical application, Bull Soc Chim 프랑스, 1928, 43, 683-96). 이러한 산화제에 대한 추가적인 예로는, 테트라 아세트산 납 (Pb(OAc)_4), 아세트산 망간 ($\text{MnO}(\text{Ac})_3$), 아세테이트산 코발트 (Co(OAc)_2), 아세트산 탈륨 (TlOAc), 황산 세륨 ($\text{Ce(SO}_4\text{)}_2$) (US 4,367,309), 또는 과루테늄산 칼륨 (KRuO_4) (Marko 등, J Am Chem Soc 1997, 119, 12661-2)이다. "산화제"는 탄수화물 내의 인접한 디올을 산화시킬 수 있는 약한 산화성 화합물로, 이에 의해 생리학적 반응조건 하에서 활성 알데하이드기를 생성시킬 수 있는 것을 의미한다.

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

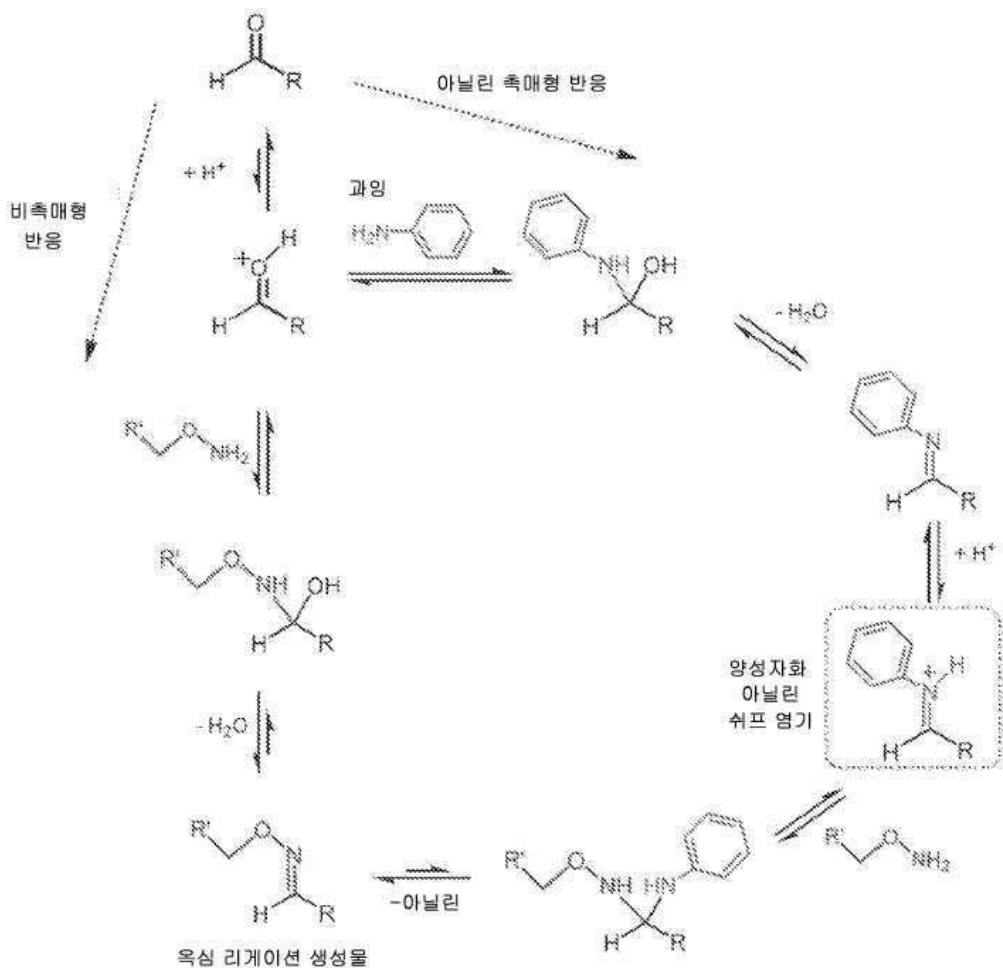
아미노옥시 기술에 대한 추가적인 정보는 각각 전체로서 통합된 하기의 참고문헌에서 찾을 수 있다: EP 1681303A1 (HASylated erythropoietin); WO 2005/014024 (conjugates of a polymer and a protein linked by an oxime linking group); WO96/40662 (aminoxy-containing linker compounds and their application in conjugates); WO 2008/025856 (Modified proteins);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

본 발명의 다양한 구현예에서, 본원 명세서에 기술된 아미노옥시 기술에 따라 치료 단백질 (예를 들어, FVIII, F VIIa, 또는 FIX)의 산화된 탄수화물 부위에 결합되는 수용성 폴리머에는, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 분지형 PEG, 폴리시알산 (PSA), 탄수화물, 폴리사카라이드, 폴루란, 키토산, 히알루론산, 황산 콘드로이틴, 황산 더마탄, 녹말, 텍스트란, 카복시메틸-텍스트란, 폴리알킬렌 옥시드 (PAO), 폴리알킬렌 글리콜 (PAG), 폴리프로필렌 글리콜

(PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐파롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-말레이인산 무수물 공중합체, 폴리스테렌-말레이인산 무수물 공중합체, 폴리(1-히드록시메틸에틸렌 히드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일록시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)가 포함되나, 이들로 제한되지 않는다.

친핵성 촉매

본원에 기재된 바와 같이, 수용성 폴리머의 치료 단백질에의 콘주게이션은 아닐린에 의해 촉진될 수 있다. 아닐린은 안정한 아민 예컨대 하이드라존 및 옥심을 형성하기 위해 알데하이드 및 케톤과 아민과의 수성 반응을 강하게 촉진한다. 하기 도식은 비촉매형 대 아닐린-촉매형 옥심 리게이션 반응을 포함한다 (Kohler JJ, ChemBioChem 2009; 10:2147-50):



그러나, 아닐린과 연관된 수많은 건강 위험을 고려하면, 대안적인 촉매가 바람직하다. 본 발명은 대안적인 옥심 리게이션 촉매로서 아닐린 유도체를 제공한다. 그와 같은 아닐린 유도체들은, 비제한적으로, o-아미노 벤조산, m-아미노 벤조산, p-아미노 벤조산, 살파닐산, o-아미노벤즈아마이드, o-톨루이딘, m-톨루이딘, p-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, 및 p-아니시딘을 포함한다.

본 발명의 일 구현예에서, m-톨루이딘 (아카 메타-톨루이딘, m-메틸아닐린, 3-메틸아닐린, 또는 3-아미노-1-메틸벤젠)은 본원에 기재된 콘주게이션 반응을 촉진하기 위해 사용된다. M-톨루이딘 및 아닐린은 유사한 물리적 특성 및 본질적으로 동일한 pKa 값을 갖는다 (m-톨루이딘: pKa 4.73, 아닐린: pKa 4.63).

본 발명의 친핵성 촉매는 옥심 리게이션 (예를 들면, 아미노옥시 결합 사용) 또는 하이드라존 형성 (예를 들면, 하이드라자이드 화학 사용)에 대해 유용하다. 본 발명의 다양한 구현예에서, 친핵성 촉매는 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50 mM의 농도로 콘주게이션 반응에서 제공된다. 일 구현예에서, 친핵성 촉매는 1 내지 10 mM로 제공된다. 본 발명의 다양한 구현예에서, 콘주게이션 반응의 pH 범위는 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 및 7.5이다. 일 구현예에서, pH는

5.5 내지 6.5이다.

복합 단백질의 정제

다양한 구현예들에서, 산화제 및/또는 본원에 개시된 수용성 폴리머와 콘주게이트된 치료 단백질과 함께 인큐베이트된 단백질의 정제가 바람직하다. 수많은 정제 기술은 당해분야에 공지되어 있고, 비제한적으로, 크로마토그래피 방법들 예컨대 이온교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 친화성 크로마토그래피 또는 이들의 조합, 여과 방법들, 및 침전 방법들을 포함한다 (Guide to Protein Purification, Meth. Enzymology Vol 463 (Burgess RR 및 Deutscher MP에 의해 편집), 2nd edition, Academic Press 2009).

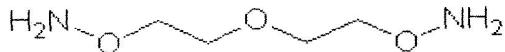
이하의 실시예는 본 발명을 제한하는 것으로 의도된 것이 아니며, 단지 본 발명의 특정한 구현예를 예시하고자 하는 것이다.

실시예

실시예 1

동종이작용기성 링커 $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_2\text{ONH}_2$ 의 제조

하기 화학식의 동종이작용기성 링커 $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_2\text{ONH}_2$

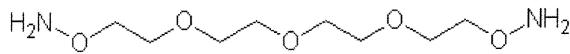


2 개의 활성 아미노옥시기를 함유하는 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을, Boturyn 등 (Tetrahedron 1997;53:5485-92)에 따라 1차 아민의 변형된 가브리엘-합성 (modified Gabriel-Synthesis)을 이용하는 2 단계의 유기 반응을 통해 합성하였다 (도 3). 첫 번째 단계에서, 2,2-클로로디에틸에테르 한 분자를 디메틸포름아미드 (DMF) 중 엔도-N-히드록시-5-노보넨-2,3-디카복시미드 두 분자와 반응시켰다. 상기 목적하는 동종이작용기성 산물은, 상기 반응 결과 생성된 중간체로부터 에탄올에서의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

실시예 2

동종이작용기성 링커 $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_4\text{ONH}_2$ 의 제조

하기 화학식의 동종이작용기성 링커 $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_4\text{ONH}_2$

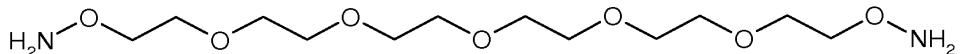


2 개의 활성 아미노옥시기를 함유하는 3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민을, Boturyn 등 (Tetrahedron 1997;53:5485-92)에 따라 1차 아민의 변형된 가브리엘-합성을 이용하는 2 단계 유기 반응을 통해 합성하였다 (도 3). 첫 번째 단계에서, 비스-(2-(2-클로로에톡시)-에틸)-에테르 한 분자를 DMF 중 엔도-N-히드록시-5-노보넨-2,3-디카복시미드 두 분자와 반응시켰다. 상기 목적하는 동종이작용기성 산물은, 상기 반응 결과 생성된 중간체로부터 에탄올에서의 히드라진 분해에 의하여 제조되었다.

실시예 3

동종이작용기성 링커 $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_6\text{ONH}_2$ 의 제조

동종이작용기성 링커 $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_6\text{ONH}_2$



2 개의 활성 아미노옥시기를 함유하는 3,6,9,12,15-펜타옥사-헵타데칸-1,17-디옥시아민은 Boturyn 등 (Tetrahedron 1997;53:5485-92)에 따라 1차 아민의 변형된 가브리엘-합성을 이용하는 2 단계의 유기 반응을 통해 합성하였다. 상기 첫 번째 단계에서, 헥사에틸렌 글리콜 디클로라이드 한 분자를 DMF 중 엔도-N-히드록시-5-

노보넨-2,3-디카복시미드 두 분자와 반응시켰다. 상기 목적하는 동종이작용기성 산물은, 상기 반응 결과 만들어진 중간체로부터 에탄올에서의 히드라진 분해에 의하여 제조되었다.

실시예 4

상기 아미노옥시-PSA 시약의 상세한 합성

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

단계 1:

700 ml 무수 N,N-디메틸포름아미드 중 엔도-N-히드록시-5-노보넨-2,3-디카복시이미드 (59.0 g; 1.00 eq) 용액에, 무수 K_2CO_3 (45.51 g; 1.00 eq) 및 2,2-디클로로디에틸에테르 (15.84 ml; 0.41 eq)를 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 $50^{\circ}C$ 에서 22시간 동안 교반하였다. 상기 혼합물을 감압하에서 건조물이 되도록 증발시켰다. 그 잔여물을 2L의 디클로로메탄에 혼탁하고 NaCl 포화 수용액 (각 1L)으로 2회 추출하였다. 상기 디클로로메탄층을 Na_2SO_4 로 건조시킨 다음, 감압하에서 건조물이 되도록 증발시키고 고진공 상태에서 건조시켜 64.5 g의 3-옥사펜탄-1,5-디옥시-엔도-2',3'-디카복시디이미드노보넨을 담황색 고체로서 얻었다 (중간체 1).

단계 2:

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

실시예 5

아미노옥시-PSA의 제조

Serum Institute of India (Pune, India)로부터 얻은 1000 mg의 산화된 PSA (MW = 20 kD)을 16 ml 50 mM 포스페이트 완충액 pH 6.0에서 용해시켰다. 그 다음 170 mg 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 반응 혼합물에 제공했다. 2시간 동안 실온에서 진탕한 후 78.5 mg 나트륨 시아노보로하이드라이드를 첨가하고 반응을 18시간 동안 밤새 수행했다. 그 다음 반응 혼합물에 대해 재생된 셀룰로오스로 만들어진 5 kD 분획을 갖는 막 ($50 cm^2$, 밀리포어)을 사용하여 한외여과/정용여과 절차 (UF/DF)를 수행했다.

실시예 6

크로마트그래피 정제 단계를 이용하는 아미노옥시-PSA의 제조

Serum Institute of India (Pune, India)로부터 얻은 1290 mg의 산화된 PSA (MW = 20 kD)을 25 ml 50 mM 포스페이트 완충액 pH 6.0 (완충액 A)에서 용해시켰다. 그 다음 209 mg 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 반응 혼합물에 제공했다. 1시간 동안 실온에서 진탕한 후 101 mg 나트륨 시아노보로하이드라이드를 첨가하고 반응을 3시간 동안 수행했다. 그 다음 혼합물에 대해 Fractogel EMD DEAE 650-M 크로마토그래피 젤 (칼럼 치수: XK26/135)을 이용하는 약한 음이온 교환 크로마토그래피 단계를 수행했다. 반응 혼합물을 110 ml 완충액 A로 희석하고 완충액 A로 미리 평형을 이룬 DEAE 칼럼 상 $1 cm/min$ 의 유속으로 로딩했다. 그 다음 칼럼을 20 CV 완충액 B (20 mM Hepes, pH 6.0)으로 세정하여 유리 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 및 시아나이드를 $2 cm/min$ 의 유속으로 제거했다. 그 다음 아미노옥시-PSA 시약을 67% 완충액 B 및 43% 완충액 C (20 mM Hepes, 1M NaCl, pH 7.5)로 이루어진 단계 구배로 용출했다. 용출물을, 폴리에테르 설플론으로 만들어진 5 kD 막, ($50 cm^2$, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 완충액 D (20 mM Hepes, 90 mM NaCl, pH 7.4)에 대향하여 수행했다. 제제를, 총 PSA (레조르시놀 검정) 및 총 아미노옥시 그룹 (TNBS 검정)을 측정하여 분석적으로 특성화하여 변형도를 측정했다. 또한 다분산성 뿐만 아니라 유리 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 및 시아나이드를 측정했다.

실시예 7

환원 단계 없는 아미노옥시-PSA의 제조

Serum Institute of India (Pune, India)로부터 얻은 573 mg의 산화된 PSA (MW = 20 kD)을 11.3 ml 50mM 포스페이트 완충액 pH 6.0 (완충액 A)에서 용해시켰다. 그 다음 94 mg 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 반응 혼합물에 제공했다. 5시간 동안 실온에서 진탕한 후 그 다음 혼합물에 대해 Fractogel EMD DEAE 650-M 크로마토그래피 젤 (칼럼 치수: XK16/105)을 이용하는 약한 음이온 교환 크로마토그래피 단계를 수행했다. 반응 혼합물을 50 ml 완충액 A로 희석하고 완충액 A로 미리 평형을 이룬 DEAE 칼럼 상 1 cm/min의 유속으로 로딩했다. 그 다음 칼럼을 20 CV 완충액 B (20 mM Hepes, pH 6.0)로 세정하여 유리 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 및 시아나이드를 2 cm/min의 유속으로 제거했다. 아미노옥시-PSA 시약을 67 % 완충액 B 및 43 % 완충액 C (20 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 7.5)로 이루어진 단계 구배로 용출했다. 용출물을, 폴리에테르 설품으로 만들어진 5 kD 막, (50 cm², 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 완충액 D (20 mM Hepes, 90 mM NaCl, pH 7.4)에 대항하여 수행했다. 제제를, 총 PSA (레조르시놀 검정) 및 총 아미노옥시 그룹 (TNBS 검정)을 측정하여 분석적으로 특성화하여 변형도를 측정했다. 또한 다분산성 뿐만 아니라 유리 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 측정했다.

실시예 8

친핵성 촉매 m-톨루이딘의 존재에서 환원 단계 없는 아미노옥시-PSA의 제조

Serum Institute of India (Pune, India)로부터 얻은 573 mg의 산화된 PSA (MW = 20 kD)을 9 ml 50 mM 포스페이트 완충액 pH 6.0 (완충액 A)에서 용해시킨다. 그 다음 94 mg 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 이 용액에 제공한다. 순차적으로 2.3 ml의 50 mM m-톨루이딘 모액을 이 반응 혼합물에 첨가한다. 2시간 동안 실온에서 진탕한 후 그 다음 혼합물에 대해 Fractogel EMD DEAE 650-M 크로마토그래피 젤 (칼럼 치수: XK16/105)을 이용하는 약한 음이온 교환 크로마토그래피 단계를 수행했다. 반응 혼합물을 50 ml 완충액 A로 희석하고 완충액 A로 미리 평형을 이룬 DEAE 칼럼 상 1 cm/min의 유속으로 로딩했다. 그 다음 칼럼을 20CV 완충액 B (20 mM Hepes, pH 6.0)로 세정하여 유리 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 및 시아나이드를 2 cm/min의 유속으로 제거했다. 아미노옥시-PSA 시약을 67 % 완충액 B 및 43 % 완충액 C (20 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 7.5)로 이루어진 단계 구배로 용출했다. 용출물을 폴리에테르 설품으로 만들어진 5 kD 막, (50 cm², 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 *against* 완충액 D (20mM Hepes, 90mM NaCl, pH 7.4) 대항하여 수행했다. 제제를, 총 PSA (레조르시놀 검정) 및 총 아미노옥시 그룹 (TNBS 검정)을 측정하여 분석적으로 특성화하여 변형도를 측정했다. 또한 다분산성 뿐만 아니라 유리 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 측정했다.

실시예 9

아미노옥시-PSA 시약의 제조

아미노옥시-PSA 시약을 실시예 4 - 8에 따라 제조했다. 정용여과 후, 생성물을 -80 °C에서 동결하고 동결건조시켰다. 동결건조 후 시약을 적절한 용적의 물에서 용해시키고 탄수화물 변형을 통해 PSA-단백질 콘주케이트의 제조를 위해 사용했다.

실시예 10

상이한 대안적인 친핵성 촉매의 효능의 평가

Rfix를, 상이한 친핵성 촉매 (아닐린, m-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, o-아미노벤조산, m-아미노벤조산, p-아미노벤조산, p-아미노벤즈아마이드, 살파닐산/표준 농도: 10 mM)를 사용하는 표준화된 조건 (20 mM L-히스티딘 중 1 mg/ml rFIX, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 6.0, 5-배 몰 아미노옥시-PSA 시약 과잉, 100 μM NaIO₄) 하에서 나트륨 페리오黛이트, 아미노옥시-PSA 시약과 함께 인큐베이트했다. 반응을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 수행하고 1 mM의 최종 농도를 갖는 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

커플링 효율을, Invitrogen X-세포 미니 시스템을 사용하는 SDS-PAGE로 측정했다. 샘플에 리튬 도데실 살레이트 (LDS) 완충액을 넣고 10분 동안 70 °C에서 변성시켰다. 그 다음 샘플들을 3-8 % TRIS-아세테이트 젤 상에 적용하고 150 V에서 60분 동안 수행했다. 순차적으로 젤을 Coomassie으로 염색했다.

또한 샘플들을, Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 SEC-HPLC 시스템의 사용으

로 앞서 기재된 조건 하에서 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77).

50 μ l의 샘플들을 미희석 상태로 주입하고 등용매적으로 20 mM NaH2PO4, 50 mM Na2SO4(pH 6.1)의 0.22 μ m 여과된 용액으로, 0.5 ml/min의 유속에서 용출했다. 용출 패턴을 280 nm에서 기록했다.

결과는 도 5a-c 및 6 (SDS PAGE) 및 표 2 (SEC- HPLC 결과)에 요약되어 있다. 상이한 제제의 촉매 효과가 설명된다. m-톨루이딘의 사용으로 아닐린으로 얻은 것과 동등한 결과를 얻는다는 것을 보여준다.

표 2

친핵성 촉매	D-PSAylated rFIX	모노-PSAylated rFIX	유리 rFIX
촉매 없음	4.5%	24.9%	70.6%
10mM 아닐린	47.7%	33.6%	18.7%
10mM m-톨루이딘	31.4%	40.8%	27.8%
10mM o-아미노벤조산	30.9%	38.5%	30.6%
10mM m-아미노벤조산	27.6%	38.0%	34.4%
10mM p-아미노벤조산	18.1%	39.3%	42.6%
10mM o-아미노벤즈아마이드	15.9%	38.4%	45.7%
10mM 설파닐산	11.8%	35.8%	52.4%

실시예 11

아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 rFIX의 폴리시알릴화

방법 1:

12.3 mg rFIX를 6.1 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 254 μ l의 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 6.5 μ l의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 순차적으로 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

산화된 rFIX를 함유하는 체류물 (8.8 ml)을 2.46 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

유리 rFIX를 음이온 교환 크로마토그래피 (AEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 15 ml 완충액 A (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 7.5)로 용출했다. 유리 rFIX는 12-25 mS/cm의 전도도에서 용출하고 27-45 mS/cm에서 콘주게이트했다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 6.9)와 함께 190 mS/cm로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 6.9)로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩되었다. 유리 아미노옥시-PSA 시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로 콘주게이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.4)로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획을 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 사용하는 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl 및 5 mM CaCl2를 함유하는 히스티딘 완충액(pH 7.2)에 대항하여 수행했다. 제제를, 총 단백질 (Bradford) 및 FIX 발색 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-rFIX 콘주게이트 천연 rFIX와 비교한 > 50%의 비활성기 측정된다는 것을 보여주었다.

방법 2:

12.3 mg rFIX을 L-히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켜 1 mg rFIX/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 pH 6.0에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액 (또는 다른 켄칭 시약)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 혼합물을 대해 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 순차적으로 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거했다.

산화된 rFIX을 함유하는 얻은 체류물 (8.8 ml)을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하여 10 mM의 최종 농도를 얻고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD의 MW을 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 pH 6.0에서 2.5 시간 동안 실온에서; 0.5 시간 내지 18 시간 +4 °C에서) 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

우리 rFIX를 음이온 교환 크로마토그래피 (AEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 적절한 양의 완충액 A (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)로 희석하여, 용액 전도도 및 pH를 보정한 후 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다 완충액 A로 평형을 이룬. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)로 용출했다. 우리 rFIX를 완충액 B의 25 %를 사용하는 단계 구배로 용출하고, 이로써 얻은 분획에서 12-25 mS/cm의 전도도를 얻고 50 % 완충액 B의 단계 구배를 사용하여 콘주게이트 하고, 이로써 콘주게이트 분획 27-45 mS/cm의 전도도를 얻는다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 6.9 또는 안티-케이오성 염 예를 들면 암모늄 설페이트, 암모늄 아세테이트 등의 사용에 의해)와 함께 190 mS/cm로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 6.9)로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT 또는 비교가능 HIC 배지) 상에 로딩되었다. 우리 아미노옥시-PSA 시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로, 콘주게이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.4)로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 세룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl 및 5 mM CaCl₂를 함유하는 L-히스티딘 완충액 (pH 7.2)에 대항하여 수행했다. 제제를, 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 FIX 발색- 및 응고 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-rFIX 콘주게이트에 대해 천연 rFIX와 비교한 > 50 %의 비활성을 측정했다.

방법 3:

25.4 mg rFIX를 18.7 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 531 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM) 및 5.07 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 then 첨가했다. 순차적으로, 20 kD의 MW을 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 25 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

우리 rFIX를 음이온 교환 크로마토그래피 (AEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)으로 상승되고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)로 용출했다. 우리 rFIX는 12-25 mS/cm의 전도도에서 용출되고 27-45 mS/cm에서 콘주게이트했다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 6.9)와 함께 190 mS/cm로 상승되었고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩되었다. 우리 아미노옥시-PSA 시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로, 콘주게이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.4)로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획을 재생된 세룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl 및 5 mM CaCl₂를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 7.2)에 대항하여 수행했다. 제제를, 총 단백질 (Bradford) 및 FIX 발색 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-rFIX 콘주게이트에 대해 천연 rFIX와 비교한 > 50 %의 비활성을 측정했다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 상기 제제는 우리 FIX를 함유하지 않았다는 것을 보여주었다. 콘주게이트는 57 % 모노-폴리시알릴화된 및 31 % 디-폴리시알릴화된 및 12 % 트리-폴리시알릴화된 생성물로 이루어졌다.

방법 4:

25.4 mg rFIX를 L-히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켜 2 mg rFIX/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 페리오텐레이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속 시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

유리 rFIX를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 적절한 양의 완충액 A (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)로 희석하여 용액 전도도 및 pH 값을 보정한 후 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)로 용출했다. 유리 rFIX를 완충액 B의 25 %를 사용하는 단계 구배로 용출하고, 이로써 얻은 분획에서 12-25 mS/cm의 전도도를 얻고 50 % 완충액 B의 단계 구배를 사용하여 콘주게이트 하고, 이로써 콘주게이트 분획에서 27-45 mS/cm의 전도도를 얻었다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 6.9; 안티-케이오성 염 예를 들면 암모늄 아세테이트의 사용에 의해)과 함께 190 mS/cm로 상승되었고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT; 또는 비교가능 HIC 배지) 상에 로딩되었다. 유리 아미노옥시-PSA 시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로 콘주게이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.4)으로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 L-150 mM NaCl 및 5 mM CaCl₂를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 7.2)에 대향하여 수행했다. 제제를, 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 FIX 발색- 및 응고 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-rFIX 콘주게이트에 대해 천연 rFIX와 비교한 > 50 %의 비활성을 측정했다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 상기 제제는 유리 FIX를 함유하지 않았다는 것을 보여주었다. 콘주게이트는 57 % 모노-폴리시알릴화된 및 31 % 디-폴리시알릴화된 및 12 % 트리-폴리시알릴화된 생성물로 이루어졌다.

실시예 12

아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 rFVIII의 폴리시알릴화

방법 1:

50 mg rFVIII를 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO₄를 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다. 용액에 대해 20 ml의 용적을 갖는 IEX 칼럼 (Merck EMD TMAE (M))을 수행하고, 이를 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.0)으로 평형을 이루었다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 그 다음 상기 산화된 rFVIII을 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, 1M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. rFVIII 함유 분획을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 0.5 M HCl의 적가로 pH 6.0으로 조정했다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨), 그 다음 m-톨루이딘을 친핵성 촉매로서 첨가했다 (최종 농도: 10 mM). 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시-PSA 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도는, 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9으로 미리 평형을 이룬 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 가 충전된 칼럼 상에 로딩된 완충액을 첨가하여 130 mS/cm로 상승되었다. 순차적으로, 콘주게이트를 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로, PSA-rFVIII 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 30 kD 막 (88 cm², 밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 FVIII 발색 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-rFVIII 콘주게이트는 천연 rFVIII와 비교한 > 70%의 비활성이 측정되었다는 것을 보여주었다.

방법 2:

Hepes 완충액 (50 mM HEPES, ~350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.1 % 폴리소르베이트 80, pH 7.4)에서 ADVATE 과정으로부터 유래된 58 mg의 재조합 인자 VIII (rFVIII)을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜 $1.0 \pm 0.25 \text{ mg/ml}$ 의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM 의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 ± 5 분 동안 $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물을 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 ± 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 rFVIII을 EMD TMAE (M) (Merck) 상에서 음이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 혼합물을 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl_2 , pH 6.5)으로 희석하여 5 mM/cm 의 전도도를 얻었다. 이 용액을 1.5 cm/min 의 유속을 사용하여 10 ml의 칼럼 용적을 갖는 IEX 칼럼 (총 높이: 5.4 cm) 상에 로딩했다. 이 칼럼을 순차적으로 완충액 A 및 완충액 B의 92:8 혼합물 (w/w)의 5 CV (20 mM Hepes, 5 mM CaCl_2 , 1.0 M NaCl , pH 7.0)로 세정했다 (유속: 1.5 cm/min). 그 다음 상기 산화된 rFVIII를 완충액 A 및 완충액 B의 50:50 (w/w) 혼합물로 용출하고 그 다음 완충액 B의 5 CV로 후용출 단계를 수행했다. 용출 단계를 1.0 cm/min 의 유속의 사용으로 수행했다.

순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA- ONH_2) 시약을 정제된 산화된 rFVIII를 함유하는 용출물에 대해 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 ± 10 분 동안 암흑에서 $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

얻은 PSA-rFVIII 콘주케이트를, 15 cm의 총 높이 (h) 및 81 ml의 수득한 칼럼 용적 (CV)을 갖는 칼럼 (GE Healthcare 제조)에 충전된 폐닐 세파로오스 FF 낮은 서브 수지 (GE Healthcare)을 사용하여 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)로 정제했다.

반응 혼합물에, 350 mM 나트륨 클로라이드, 8 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9를 함유하는 50 mM Hepes 완충액의 첨가로 암모늄 아세테이트를 고정시켰다. 2 용적의 반응 혼합물을 1 용적의 암모늄 아세테이트 함유 완충계와 혼합하고 pH 값을 pH 6.9으로 0.5 N 수성 NaOH 용액의 적가로 보정했다. 이 혼합물을 HIC 칼럼 상에 1 cm/min 의 유속으로 로딩하고 그 다음 세정 단계 > 3 CV 평형 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)를 사용하여 세정 단계를 수행했다.

반응 부산물 및 안티-케이오성 염의 제거에 대해 제2 세정 단계를 > 5 CV 세정 완충액 1 (50 mM Hepes, 3 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)으로 상향류 방식으로 2 cm/min 의 유속으로 수행했다. 그 다음 정제된 PSA-rFVIII 콘주케이트의 용출을, 40 % 세정 완충액 2 (50 mM Hepes, 1.5 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9) 및 60 % 용출 완충액 (20 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5)의 단계 구배를 사용하여 하향류 방식으로 1 cm/min 의 유속으로 수행했다. PSA-rFVIII 콘주케이트의 용출을 UV 280 nm에서 모니터링하고 콘주케이트 함유 용출물을 < 4 CV 내에서 수집했다. 후 용출 단계를 > 3 CV 용출 완충액으로 주요 생성물로부터 최소 및/또는 비 변형된 rFVIII를 분리하기 위한 조건 하에서 수행했다.

마지막으로 정제된 콘주케이트를 문자량 분획 30kD을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (88cm^2 , 밀리포어)을 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조한 콘주케이트를, PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, FVIII 발색 활성 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다. 얻은 콘주케이트에 대해 비활성 > 50% 및 PSA 도 > 5.0가 계산되었다.

방법 3:

50 mg rFVIII을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨), 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM) 및 NaIO_4 (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (최종 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도는, 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01 % Tween 80, pH 6.9으로 미

리 평형을 이룬 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)가 충전된 칼럼 상에 로딩된 완충액을 첨가하여 130 mS/cm로 상승되었다. 순차적으로, 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5로 용출했다. 마지막으로, PSA-rFVIII 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 30 kD 막 (88cm^2 , 밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 총 단백질 (Bradford) 및 FVIII 발색 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-rFVIII 콘주게이트에 대해 천연 rFVIII와 비교한 $\geq 70\%$ 의 비활성 측정했다.

방법 4:

50 mM Hepes 완충액 (50 mM HEPES, ~350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.1 % 폴리소르베이트 80, pH 7.4) 중 ADVATE 과정으로부터 유래된 50 mg 재조합 인자 VIII (rFVIII)을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 50-배 몰 과잉으로 이 rFVIII 용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM 의 농도를 얻었다.

반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 $T = +22 +/- 2$ °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

얻은 PSA-rFVIII 콘주게이트를, 15 cm의 층 높이 (h) 및 81 ml의 수득한 칼럼 용적 (CV)을 갖는 칼럼 (GE Healthcare 제조)에 충전된 페닐 세파로오스 FF 낮은 서브 수지 (GE Healthcare)을 사용하여 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)로 정제했다.

반응 혼합물에, 350 mM 나트륨 클로라이드, 8 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9을 함유하는 50 mM Hepes 완충액의 첨가에 의해 암모늄 아세테이트를 넣었다. 2 용적의 반응 혼합물을 1 용적의 암모늄 아세테이트 함유 완충계와 혼합하고 pH 값을 pH 6.9으로 0.5 N 수성 NaOH 용액의 적가에 의해 보정했다. 이 혼합물을 1 cm/min의 유속을 사용하여 HIC 칼럼 상에 로딩하고 그 다음 $> 3\text{CV}$ 평형 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)를 사용하여 세정 단계를 수행했다.

반응 부산물 및 안티-케이오성 염의 제거에 대해 제2 세정 단계를 $> 5\text{CV}$ 세정 완충액 1 (50 mM Hepes, 3 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)로 상향류 방식으로 2 cm/min의 유속으로 수행했다. 그 다음 정제된 rFVIII 콘주게이트의 용출을, 40 % 세정 완충액 2 (50 mM Hepes, 1.5 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9) 및 60 % 용출 완충액 (20 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5)의 단계 구배를 사용하여 1 cm/min의 유속으로 하향류 방식으로 수행했다. PSA-rFVIII 콘주게이트의 용출을 UV 280 nm에서 모니터링하고 콘주게이트 함유 용출물을 < 4 CV 내에서 수집했다. 후 용출 단계를 > 3 CV 용출 완충액으로 주요 생성물로부터 최소 및/또는 비변형된 rFVIII를 분리하기 위한 조건 하에서 수행했다.

마지막으로, 정제된 콘주게이트를 분자량 분획 30kD을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (88cm^2 , 밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를, PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, FVIII 발색 활성 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

분석 데이터 (6개의 연속 배치의 평균):

공정 수율 (Bradford): 58.9%

공정 수율 (FVIII 크롬.): 46.4%

비활성: (FVIII 크롬./mg 단백질): 4148 IU/mg

비활성 (개시 물질의 %): 79.9 %

PSA 도 (mol/mol): 8.1

실시예 13

아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 r FVIII의 폐길화

방법 1:

rFVIII을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 14.7 mg rFVIII을 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 296 μl의 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물을 대해 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 순차적으로 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

산화된 rFVIII을 함유하는 체류물 (10.9 ml)을 2.94 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)과 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-rFVIII 콘주게이트를 Q 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 젤을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 30 kD 막 (50cm², 밀리포어)를 사용하여 UF/DF를 수행했다. 제제를, 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 FVIII 빨색 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PEG-rFVIII 콘주게이트는 측정된 천연 rFVIII와 비교한 > 70%의 비활성을 나타낼 것으로 예상된다.

방법 2:

rFVIII을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 개시 중량 또는 농도의 rFVIII을 용해시키거나 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로 40 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 rFVIII을 EMD TMAE (M) (Merck) 상에서 음이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 혼합물을 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 6.5)으로 희석하여 5 ms/cm의 전도도를 얻었다. 이 용액을 1.5 cm/min의 유속을 사용하여 10 ml의 칼럼 용적을 갖는 IEX 칼럼 (총 높이: 5.4 cm) 상에 로딩했다. 이 칼럼을 순차적으로 완충액 A 및 완충액 B의 92:8 혼합물 (w/w)의 5 CV (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, 1.0 M NaCl, pH 7.0)으로 세정했다 (유속: 1.5 cm/min). 그 다음 상기 산화된 rFVIII를 완충액 A 및 완충액 B의 50:50 (w/w) 혼합물로 용출하고 그 다음 완충액 B의 5 CV로 후용출 단계를 수행했다. 용출 단계를 1.0 cm/min의 유속의 사용으로 수행했다.

순차적으로, 20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 rFVIII를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

얻은 PEG-rFVIII 콘주게이트를, 15 cm의 총 높이 (h) 및 81 ml의 수득한 칼럼 용적 (CV)을 갖는 칼럼 (GE Healthcare 제조)에 충전된 폐닐 세파로오스 FF 낮은 서브 수지 (GE Healthcare)을 사용하여 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)로 정제했다.

반응 혼합물에 350 mM 나트륨 클로라이드, 8 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘을 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 6.9)의 첨가로 암모늄 아세테이트를 넣었다. 2 용적의 반응 혼합물을 1 용적의 암모늄 아세테이트 함유 완충계와 혼합하고 pH 값을 pH 6.9으로 0.5 N 수성 NaOH 용액의 적가로 보정했다. 이 혼합물을 1 cm/min의 유속을 사용하여 HIC 칼럼 상에 로딩하고 그 다음 > 3 CV 평형 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드,

2.5 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)를 사용하여 세정 단계를 수행했다.

반응 부산물 및 안티-케이오성 염의 제거에 대해 제2 세정 단계를, > 5CV 세정 완충액 1 (50 mM Hepes, 3 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)로 상향류 방식으로 2 cm/min의 유속으로 수행했다. 그 다음 정제된 rFVIII 콘주게이트의 용출을 하향류 방식으로 40 % 세정 완충액 2 (50 mM Hepes, 1.5 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9) 및 60 % 용출 완충액 (20mM Hepes, 5mM 염화칼슘, pH 7.5)의 단계 구배를 사용하여 1cm/min의 유속에서 수행했다. PEG-rFVIII 콘주게이트의 용출을 UV 280 nm에서 모니터링하고 콘주게이트 함유 용출물을 < 4 CV 내에서 수집했다. 후 용출 단계를 > 3 CV 용출 완충액으로 주요 생성물로부터 최소 및/또는 비변형된 rFVIII를 분리하기 위한 조건 하에서 수행했다.

마지막으로, 정제된 콘주게이트를 분자량 분획 30kD을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)을 사용하는 한와-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

rFVIII을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 6 ml Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해된 7.84 mg rFVIII을 314 μl의 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (10 mM), 및 1.57 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로 PEG-rFVIII 콘주게이트를 Q-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질 /ml 젤을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 30 kD 막 (88cm², 밀리포어)를 사용하여 UF/DF를 수행했다. FVIII 발색 검정 및 총 단백질 (Bradford)의 측정에 의한 콘주게이트의 분석적 특성화는 rFVIII 개시 물질과 비교하여 > 60%의 비활성을 보여준다.

방법 4:

rFVIII을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 rFVIII을 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg rFVIII/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로, 5 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

유리 rFVIII을 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 적절한 양의 완충액 A (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)로 희석하여 용액 전도도 및 pH 값을 보정한 후 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)로 용출했다. 유리 rFVIII을 완충액 B의 25 %를 사용하는 단계 구배로 용출하고, 이로써 얻은 분획에서 12-25 mS/cm의 전도도를 얻고 50 % 완충액 B의 단계 구배를 사용하여 콘주게이트 하고, 이로써 콘주게이트 분획에서 27-45 mS/cm의 전도도를 얻었다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 6.9; 안티-케이오성 염 예를 들면 암모늄 아세테이트의 사용에 의해, 암모늄 설페이트 등)으로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 6.9)로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT; 또는 비교가능 HIC 배지) 상에 로딩되었다. 유리 PEG-시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로, 콘주게이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.4)으로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 14

아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 rFVIIa의 폴리시알릴화

방법 1:

개시 농도 또는 중량의 재조합 인자 VIIa (rFVIIa)을 이동시키거나 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 NaOH 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 50 μ M의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T = +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15 분 내에 T = +22 +/- 2 °C에서 멈추어서 반응 혼합물을 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 rFVIIa를 EMD TMAE (M) (Merck) 상에서 음이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 혼합물을 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 6.5)으로 희석하여 5 ms/cm의 전도도를 얻었다. 이 용액을 1.5 cm/min의 유속을 사용하여 10 ml의 칼럼 용적을 갖는 IEX 칼럼 (총 높이: 5.4 cm) 상에 로딩했다. 이 칼럼을 순차적으로 완충액 A 및 완충액 B의 92:8 혼합물 (w/w)의 5 CV (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, 1.0 M NaCl, pH 7.0)으로 세정했다 (유속: 1.5 cm/min). 그 다음 상기 산화된 rFVIIa를 완충액 A 및 완충액 B의 50:50 (w/w) 혼합물로 용출하고 그 다음 완충액 B의 5 CV로 후용출 단계를 수행했다. 용출 단계를 1.0 cm/min의 유속의 사용으로 수행했다.

순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH₂) 시약을 정제된 산화된 rFVIIa를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 물 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T = +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

얻은 PSA-rFVIIa 콘주게이트를, 15 cm의 총 높이 (h) 및 81 ml의 수득한 칼럼 용적 (CV)을 갖는 칼럼 (GE Healthcare 제조)에 충전된 폐닐 세파로오스 FF 낮은 서브 수지 (GE Healthcare)을 사용하여 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)로 정제했다.

반응 혼합물에 350 mM 나트륨 클로라이드, 8 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘을 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 6.9)의 첨가로 암모늄 아세테이트를 넣었다. 2 용적의 반응 혼합물을 1 용적의 암모늄 아세테이트 함유 완충액과 혼합하고 pH 값을 pH 6.9으로 0.5 N 수성 NaOH 용액의 적가로 보정했다. 이 혼합물을 1 cm/min의 유속을 사용하여 HIC 칼럼 상에 로딩하고 그 다음 > 3 CV 평형 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)을 사용하여 세정 단계를 수행했다.

반응 부산물 및 안티-케이오성 염의 제거에 대해 제2 세정 단계를 > 5CV 세정 완충액 1 (50 mM Hepes, 3 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)로 상향류 방식으로 2 cm/min의 유속으로 수행했다. 그 다음 정제된 rFVIIa 콘주게이트의 용출을 하향류 방식으로 40 % 세정 완충액 2 (50 mM Hepes, 1.5 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9) 및 60 % 용출 완충액 (20 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5)의 단계 구배로 사용하여 1 cm/min의 유속으로 수행했다. PSA-rFVIIa 콘주게이트의 용출을 UV 280 nm에서 모니터링하고 콘주게이트 함유 용출물을 < 4 CV 내에서 수집했다. 후 용출 단계를 주요 생성물로부터 최소 및/또는 비 변형된 rFVIIa를 분리하기 위한 동일한 조건 하에서 > 3 CV 용출 완충액으로 수행했다.

마지막으로, 정제된 콘주게이트를 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (예를 들면 10 kD MWCO, 88cm^2 , 밀리포어)을 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를, PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

개시 중량 또는 농도의 rFVIIa를 용해시키거나 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으

로 0.5 N 수성 NaOH 용액의 적가로 보정했다.

순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH₂) 시약을 이 rFVIIa 용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 150 μM의 농도를 얻었다.

반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

얻은 PSA-rFVIIa 콘주케이트를, 15 cm의 총 높이 (h) 및 81 ml의 수득한 칼럼 용적 (CV)을 갖는 칼럼 (GE Healthcare 제조)에 충전된 페닐 세파로오스 FF 낮은 서브 수지 (GE Healthcare)을 사용하여 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)로 정제했다.

반응 혼합물에, 350 mM 나트륨 클로라이드, 8 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘을 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 6.9)의 첨가로 암모늄 아세테이트를 넣었다. 2 용적의 반응 혼합물을 1 용적의 암모늄 아세테이트 함유 완충계와 혼합하고 pH 값을 pH 6.9으로 0.5 N 수성 NaOH 용액의 적가로 보정했다. 이 혼합물을 1 cm/min의 유속을 사용하여 HIC 칼럼 상에 로딩하고 그 다음 > 3CV 평형 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)을 사용하여 세정 단계를 수행했다.

반응 부산물 및 안티-케이오성 염의 제거에 대해 제2 세정 단계를 > 5CV 세정 완충액 1 (50 mM Hepes, 3 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)로 상향류 방식으로 2 cm/min의 유속으로 수행했다. 그 다음 정제된 rFVIIa 콘주케이트의 용출을 하향류 방식으로 40 % 세정 완충액 2 (50 mM Hepes, 1.5 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9) 및 60 % 용출 완충액 (20 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5)의 단계 구배로 사용하여 1 cm/min의 유속으로 수행했다. PSA-rFVIIa 콘주케이트의 용출을 UV 280 nm에서 모니터링하고 콘주케이트 함유 용출물을 < 4 CV 내에서 수집했다. 후 용출 단계를 > 3 CV 용출 완충액으로 주요 생성물로부터 최소 및/또는 비변형된 rFVIII를 분리하기 위한 조건 하에서 수행했다.

마지막으로, 정제된 콘주케이트를 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)을 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 15

아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 rFIX의 폐길화

방법 1:

rFIX를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 개시 중량 또는 농도의 rFIX을 용해시키거나 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15 분 내에 T = +22 +/- 2 °C에서 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 rFVIII를 EMD TMAE (M) (Merck) 상에서 음이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 혼합물을 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 6.5)로 희석하여 5 mS/cm의 전도도를 얻었다. 이 용액을 1.5 cm/min의 유속을 사용하여 10 ml의 칼럼 용적을 갖는 IEX 칼럼 (총 높이: 5.4 cm) 상에 로딩했다. 이 칼럼을 순차적으로 완충액 A 및 완충액 B의 92:8 혼합물 (w/w)의 5 CV (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, 1.0 M NaCl, pH 7.0)으로 세정했다 (유속: 1.5 cm/min). 그 다음 상기 산화된 rFIX를 완충액 A 및 완충액 B의 50:50 (w/w) 혼합물로 용출하고 그 다음 완충액 B의 5 CV로 후용출 단계를 수행했다. 용출 단계를 1.0 cm/min의 유속의 사용으로 수행했다.

순차적으로, 20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 rFIX를 함유하는 용출물에 15 분의

최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 $T = +22$ +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

얻은 PEG-rFIX 콘주게이트를, 15 cm의 층 높이 (h) 및 81 ml의 수득한 칼럼 용적 (CV)을 갖는 칼럼 (GE Healthcare 제조)에 충전된 폐닐 세파로오스 FF 낮은 서브 수지 (GE Healthcare)을 사용하여 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)로 정제했다.

반응 혼합물에 350 mM 나트륨 클로라이드, 8 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘을 함유하는 50 mM Hepes 완충 액 (pH 6.9)의 첨가로 암모늄 아세테이트를 넣었다. 2 용적의 반응 혼합물을 1 용적의 암모늄 아세테이트 함유 완충계와 혼합하고 pH 값을 pH 6.9으로 0.5 N 수성 NaOH 용액의 적가로 보정했다. 이 혼합물을 1 cm/min의 유속을 사용하여 HIC 칼럼 상에 로딩하고 그 다음 > 3 CV 평형 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)를 사용하여 세정 단계를 수행했다.

반응 부산물 및 안티-케이오성 염의 제거에 대해 제2 세정 단계를 > 5CV 세정 완충액 1 (50 mM Hepes, 3 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)로 상향류 방식으로 2 cm/min의 유속으로 수행했다. 그 다음 정제된 rFIX 콘주게이트의 용출을 하향류 방식으로 40 % 세정 완충액 2 (50 mM Hepes, 1.5 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9) 및 60 % 용출 완충액 (20 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5)의 단계 구배를 사용하여 1 cm/min의 유속으로 수행했다. PEG-rFIX 콘주게이트의 용출을 UV 280 nm에서 모니터링하고 콘주게이트 함유 용출물을 < 4 CV 내에서 수집했다. 후 용출 단계를 주요 생성물로부터 최소 및/또는 비 변형된 rFIX를 분리하기 위한 동일한 조건 하에서 > 3 CV 용출 완충액으로 수행했다.

마지막으로, 정제된 콘주게이트를 분자량 분획10kD를 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (88cm², 밀리포어)을 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

rFIX를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 rFIX를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg rFIX/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로, 5 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

유리 rFIX를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 적절한 양의 완충액 A (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)로 희석하여 용액 전도도 및 pH 값을 보정한 후 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)로 용출했다. 유리 rFIX를 완충액 B의 25 %를 사용하는 단계 구배로 용출하고, 이로써 얻은 분획에서 12- 25 mS/cm의 전도도를 얻고 50 % 완충액 B의 단계 구배를 사용하여 콘주게이트 하고, 이로써 콘주게이트 분획에서 27-45 mS/cm의 전도도를 얻었다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 6.9; 안티-케이오성 염 예를 들면 암모늄 아세테이트의 사용에 의해 등)으로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT; 또는 비교가능 HIC 배지) 상에 로딩되었다. 유리 아미노옥시-PEG 시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로, 콘주게이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.4)으로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 16

아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 rFVIIa의 폐길화

방법 1:

rFVIIa를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 개시 중량 또는 농도의 rFVIIa를 용해시키거나 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 NaOH 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 50 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물을 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 rFVIIa를 EMD TMAE (M) (Merck) 상에서 음이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 혼합물을 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 6.5)로 희석하여 5 mS/cm의 전도도를 얻었다. 이 용액을 1.5 cm/min의 유속을 사용하여 10 ml의 칼럼 용적을 갖는 IEX 칼럼 (총 높이: 5.4 cm) 상에 로딩했다. 이 칼럼을 순차적으로 완충액 A 및 완충액 B의 92:8 혼합물 (w/w)의 5 CV (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, 1.0 M NaCl, pH 7.0)으로 세정했다 (유속: 1.5 cm/min). 그 다음 상기 산화된 rFVIIa를 완충액 A 및 완충액 B의 50:50 (w/w) 혼합물로 용출하고 그 다음 완충액 B의 5 CV로 후용출 단계를 수행했다. 용출 단계를 1.0 cm/min의 유속의 사용으로 수행했다.

순차적으로, 20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 rFVIIa를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

얻은 PEG-rFVIIa 콘주게이트를, 15 cm의 총 높이 (h) 및 81 ml의 수득한 칼럼 용적 (CV)을 갖는 칼럼 (GE Healthcare 제조)에 충전된 폐닐 세파로오스 FF 낮은 서브 수지 (GE Healthcare)을 사용하여 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)로 정제했다.

반응 혼합물에 350 mM 나트륨 클로라이드, 8 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘을 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 6.9)의 첨가로 암모늄 아세테이트를 넣었다. 2 용적의 반응 혼합물을 1 용적의 암모늄 아세테이트 함유 완충액과 혼합하고 pH 값을 pH 6.9으로 0.5 N 수성 NaOH 용액의 적가로 보정했다. 이 혼합물을 1 cm/min의 유속을 사용하여 HIC 칼럼 상에 로딩하고 그 다음 > 3 CV 평형 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)을 사용하여 세정 단계를 수행했다.

반응 부산물 및 안티-케이오성 염의 제거에 대해 제2 세정 단계를 > 5CV 세정 완충액 1 (50 mM Hepes, 3 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)로 상향류 방식으로 2 cm/min의 유속으로 수행했다. 그 다음 정제된 rFVIIa 콘주게이트의 용출을 하향류 방식으로 40 % 세정 완충액 2 (50 mM Hepes, 1.5 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9) 및 60 % 용출 완충액 (20 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5)의 단계 구배를 사용하여 1 cm/min의 유속으로 수행했다. PEG-rFVIIa 콘주게이트의 용출을 UV 280 nm에서 모니터링하고 콘주게이트 함유 용출물을 < 4 CV 내에서 수집했다. 후 용출 단계를 주요 생성물로부터 최소 및/또는 비 변형된 rFVIIa를 분리하기 위한 동일한 조건 하에서 > 3 CV 용출 완충액으로 수행했다.

마지막으로, 정제된 콘주게이트를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다 분자량 분획 10kD를 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어).

이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

rFVIIa를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 rFVIIa를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg rFVIIa/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 15 분 내에 첨

가하여 $100 \mu\text{M}$ 의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m -톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM 의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD 의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM 의 최종 농도를 얻었다.

우리 rFVIIa를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 적절한 양의 완충액 A (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)로 희석하여 용액 전도도 및 pH 값을 보정한 후 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)로 용출했다. 우리 rFVIIa를 완충액 B의 25 %를 사용하는 단계 구배로 용출하고, 이로써 얻은 분획에서 $12\text{--}25 \text{ mS/cm}$ 의 전도도를 얻고 50 % 완충액 B의 단계 구배를 사용하여 콘주게이트 하고, 이로써 콘주게이트 분획에서 $27\text{--}45 \text{ mS/cm}$ 의 전도도를 얻었다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 6.9; 안티-케이오성 염 예를 들면 암모늄 아세테이트의 사용으로)으로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT; 또는 비교가능 HIC 배지) 상에 로딩되었다. 우리 PEG-시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로 콘주게이트를 100% 완충액 E (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.4)로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm^2 , 분획 10 kD , 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)에 대향하여 수행했다.

제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 17

아미노 벤조산의 존재에서 rFIX의 폴리시알릴화

방법 1:

8.2 mg rFIX을 4.0 ml 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 $82 \mu\text{l}$ 의 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 $4 \mu\text{l}$ 의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물을 대해 순차적으로 Vivaspin 6 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

산화된 rFIX를 함유하는 체류물 (6.5 ml)을 1.64 ml 의 수성 o-아미노 벤조산 (50 mM)과 혼합시키고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD 의 MW를 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

콘주게이트의 추가 정제는 본원에서 기재된 바와 같이 수행되었다.

방법 2:

5-배 몰 과잉의 20 kD 의 MW를 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 함유하는 0.65 ml 나트륨 포스페이트 완충액 (pH 6.0) 중 1 mg rFIX의 용액을 제조했다. 그 다음 $333 \mu\text{l}$ 의 수성 o-아미노 벤조산 용액 (30 mM)을 친핵성 촉매로서 첨가하여 10 mM 의 최종 농도를 얻었다. 순차적으로 NaIO₄ (5 mM)의 $20 \mu\text{l}$ 의 수용액을 첨가하여 $100 \mu\text{M}$ 의 최종 농도를 얻었다. 커플링 과정을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행하고 $1 \mu\text{l}$ 의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 콘주게이트의 추가 정제는 본원에서 기재된 바와 같이 수행되었다.

실시예 18

아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 EPO의 폴리시알릴화

방법 1:

개시 농도의 에리트로포이에틴 (EPO)을 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml 의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO₄를 첨가하여 $200 \mu\text{M}$ 의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음

반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 파잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 mL의 용액 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼으로 이동시켰다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 EPO를 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, 1M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. EPO 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/mL로 조정하고 pH 6.0로 0.5M HCl의 적가로 조정했다.

20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 파잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 파잉의 아미노옥시-PSA 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 mL 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주케이트를 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로 PSA-EPO 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (MWCO 10kD, 50cm², 밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다.

10 mg EPO를 5 mL 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 100 μL의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 50 μL의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 순차적으로 수행하여 파잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

산화된 EPO를 함유하는 체류물 (대략 7 mL)을 2 mL의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD의 MW을 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 파잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

유리 EPO를 음이온 교환 크로마토그래피 (AEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 20 mL 완충액 A (50 mM Hepes, pH 7.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 mL HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 7.5)로 용출했다. 유리 EPO를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주케이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주케이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, pH 6.9)으로 ~190 mS/cm로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬 20 mL HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩되었다. 유리 PSA-시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로, 콘주케이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, pH 7.4)로 용출했다. 콘주케이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl을 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 7.2)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-EPO 콘주케이트에 대해 천연 EPO와 비교한 > 50 %의 비활성을 측정했다. 콘주케이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 EPO를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

방법 2:

EPO를 이동시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/mL의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T = +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 면추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종

농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 EPO를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 EPO 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH₂) 시약을 정제된 산화된 EPO를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

얻은 PSA-EPO 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-EPO 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

에리트로포이에틴 (EPO)을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50 배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO₄ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01% Tween 80, pH 6.9으로 미리 평형을 이룬 폐닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로, PSA-EPO 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (MWCO 10 kD, 88cm², 밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 10 mg EPO를 8 ml 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 200 μl의 수성 나트륨 폐리오레이트 용액 (5 mM) 및 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 첨가했다. 순차적으로, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 100 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

유리 EPO를 음이온 교환 크로마토그래피 (AEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 7.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 7.5)로 용출했다. 유리 EPO를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주게이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, pH 6.9)으로 ~190 mS/cm로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩되었다. 유리 PSA-시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로, 콘주게이트를 100% 완충액 E (50 mM Hepes, pH 7.4)로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl을 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 7.2)에 대향하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-EPO 콘주게이트에 대해 천연 EPO와 비교한 > 50 %의 비활성을 측정했다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 EPO를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

방법 4:

EPO를 용해시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)으로

이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH₂) 시약을 이 EPO 용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를 얻었다.

반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

얻은 PSA-EPO 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-EPO 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (MWCO 10 kD, 88cm², 밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 19

아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 Ang-2의 폴리시알릴화

방법 1:

개시 농도의 안지오포이에틴-2 (Ang-2)을 반응 원충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 회석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaI04을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용적 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 Ang-2을 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, 1 M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. Ang-2 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 0.5 M HCl의 적가로 pH 6.0으로 조정했다.

20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주케이트를 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로, PSA - Ang-2 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 안지오포이에틴-2 (Ang-2)을 반응 원충액 (예를 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 회석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaI04을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거했다.

20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 이온 교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA-Ang-2 콘주케이트 함유 분획을

수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

Ang-2을 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HC1 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μ M의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 면추어서 반응 혼합물을 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 Ang-2을 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 Ang-2 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 정제된 산화된 Ang-2을 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

얻은 PSA- Ang-2 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 추가 정제했다

PSA-Ang-2 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

안지오포이에틴-2 (Ang-2)을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50 배 몰 과잉의 PSA 아미노옥시 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μ M)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01% Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 폐닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로, PSA Ang-2 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 안지오포이에틴-2 (Ang-2)을 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50-배 몰 과잉의 PSA 아미노옥시 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μ M)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM) 및 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA Ang-2 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

Ang-2을 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키면서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수

성 HC1 용액의 적가로 보정했다.

순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 Ang-2 용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μ M의 농도를 얻었다.

반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

얻은 PSA-Ang-2 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-Ang-2 분획을 수집하고 재생된 세룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 20

아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 VEGF의 폴리시알릴화

방법 1:

개시 농도의 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μ M의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용적 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 VEGF을 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1 M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. VEGF 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 pH 6.0로 0.5M NaOH의 적가로 조정했다.

20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주케이트를 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로 PSA - VEGF 함유 분획들을 수집하고 재생된 세룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μ M의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 이온 교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA - VEGF 함유 분획을 수집하고 재생된 세룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된

방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

VEGF를 이동시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HC1 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μ M의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물을 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 VEGF를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 VEGF 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 정제된 산화된 VEGF를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이션했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

얻은 PSA-VEGF 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-VEGF 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 문자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

혈관 내피 성장 인자 (VEGF)를 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 PSA 아미노옥시 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μ M)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01% Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 폐닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로, PSA-VEGF 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)를 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μ M)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM) 및 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-VEGF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

VEGF을 용해시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HC1 용액의 적가로 보정했다.

순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 VEGF 용액 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM

의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μ M의 농도를 얻었다.

반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

얻은 VEGF-콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-VEGF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한와-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 21

아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 EGF의 폴리시알릴화

방법 1:

개시 농도의 표피 성장 인자 (EGF)을 반응 완충액 (예를 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μ M의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용적 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 EGF를 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. EGF 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 pH 6.0로 0.5M HCl의 적가로 조정했다.

20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 폐닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주케이트를 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로, PSA-EGF 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 표피 성장 인자 (EGF)을 반응 완충액 (예를 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μ M의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 이온 교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA-EGF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

EGF를 이동시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성

HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μ M의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물을 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 EGF를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 EGF 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 정제된 산화된 EGF를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

얻은 PSA-EGF 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-EGF 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 세룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

표피 성장 인자 (EGF)을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50-배 몰 과잉의 PSA 아미노옥시 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μ M)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물을 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01% Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로 PSA-EGF 함유 분획들을 수집하고 재생된 세룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 표피 성장 인자 (EGF)을 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50-배 몰 과잉의 PSA 아미노옥시 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μ M)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM) 및 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 수집하고 재생된 세룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

EGF를 용해시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

순차적으로 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 EGF-용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μ M의 농도를 얻었다.

반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물을 중 10 mM의 최종 농도를 얻고

60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

얻은 EGF-콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-EGF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 22

아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 NGF의 폴리시알릴화

방법 1:

개시 농도의 신경 성장 인자 (NGF)을 반응 완충액 (예를 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μ M의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용적 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 NGF를 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. NGF 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 pH 6.0로 0.5M HCl의 적가로 조정했다.

20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주케이트를 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로, PSA-NGF 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 신경 성장 인자 (NGF)을 반응 완충액 (예를 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μ M의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 이온 교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA-NGF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

NGF를 이동시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μ M의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 NGF를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 NGF 함유 분획을 수집하고 콘주케이션 반응을 위해 사용한다.

아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH₂) 시약을 정제된 산화된 NGF 함유 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

얻은 PSA-NGF 콘주케이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-NGF 콘주케이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

신경 성장 인자 (NGF)을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO₄ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01 % Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 폐닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주케이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로, PSA NGF 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 신경 성장 인자 (NGF)을 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO₄ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM) 및 콘주케이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 그 다음 용출물의 PSA-NGF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

NGF을 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH₂) 시약을 이 NGF-용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 폐리오레이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를 얻었다.

반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

얻은 NGF-콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-NGF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지

된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 23

아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 HGH의 폴리시알릴화

방법 1:

본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다.

개시 농도의 인간 성장호르몬 (HGH)을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 회석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μ M의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용액 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 HGH를 완충액 B로 용출했다 (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1 M NaCl, pH 7.0). HGH 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 0.5 M HCl의 적가로 pH 6.0으로 조정했다.

20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로 콘주에이트를 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로, PSA-HGH 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다. HGH를 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 회석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μ M의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 이온 교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA-HGH 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다.

HGH를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μ M의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을

수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 $T = +22 \pm 2$ °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 \pm 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 HGH를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 HGH 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 정제된 산화된 HGH 함유 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 \pm 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 $T = +22 \pm 2$ °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

얻은 PSA-HGH 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-HGH 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 세룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다.

인간 성장호르몬 (HGH)을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50 배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μ M)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01% Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로, PSA-HGH 함유 분획들을 수집하고 재생된 세룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다. HGH를 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50 배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μ M)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM) 및 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 그 다음 PSA-HGH 함유 용출물의 분획을 수집하고 재생된 세룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다.

HGH를 용해시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 \pm 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 HGH-용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM

의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μ M의 농도를 얻었다.

반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

얻은 HGH-콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-HGH 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한와-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 24

아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 TNF-알파의 폴리시알릴화

개시 농도의 중양 괴사 인자-알파 (TNF-알파)을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μ M의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용적 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 TNF-알파를 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. TNF-알파 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 pH 6.0로 0.5M HCl의 적가로 조정했다.

20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 폐닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주케이트를 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로 PSA- TNF-알파 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 중양 괴사 인자-알파 (TNF-알파)을 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μ M의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 이온 교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA-TNF-알파 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

TNF-알파를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여

200 μ M의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 면추어서 반응 혼합물을 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 TNF-알파를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 TNF-알파 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 정제된 산화된 TNF-알파 함유 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

얻은 PSA-TNF-알파 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-TNF-알파 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성을, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

종양 괴사 인자-알파 (TNF-알파)을 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μ M)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01 % Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로 PSA-TNF-알파 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 종양 괴사 인자-알파 (TNF-알파)을 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μ M)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). and 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-TNF-알파 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해 분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

TNF-알파을 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

순차적으로 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 TNF-알파-용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μ M의 농도를 얻었다.

반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 면추어서 반응 혼합물을 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

얻은 TNF-알파 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-TNF-알파 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 25

아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 인슐린의 폴리시알릴화

방법 1:

본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다. 개시 농도의 인슐린을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μ M의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 파이프리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용적 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 인슐린을 완충액 B로 용출했다 (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1 M NaCl, pH 7.0). 인슐린 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 0.5 M HCl의 적가로 pH 6.0으로 조정했다.

20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로 콘주케이트를 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로 PSA-인슐린 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다. 인슐린을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μ M의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 파이프리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거했다.

20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 이온 교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA-인슐린 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다.

인슐린을 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)

에서 용해시켜서 $1.0 \pm 0.25 \text{ mg/ml}$ 의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM 의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 ± 5 분 동안 $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물을 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 ± 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 인슐린을 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 인슐린 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH₂) 시약을 정제된 산화된 인슐린 함유 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 진탕 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 ± 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

얻은 PSA-인슐린 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-인슐린 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 문자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다.

인슐린을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO₄ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01 % Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 폐닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로, PSA-인슐린 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다.

인슐린을 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO₄ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM) 및 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-인슐린 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다.

인슐린을 용해시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH

6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH₂) 시약을 이 인슐린-용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를 얻었다.

반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

얻은 인슐린 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA- 인슐린 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한와-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 26

아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 인터페론-알파의 폴리시알릴화

방법 1:

개시 농도의 인터페론-알파를 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 회석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO₄을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용적 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 인터페론-알파를 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, 1M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. 인터페론-알파 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 0.5 M HCl의 적가로 pH 6.0으로 조정했다.

20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주케이트를 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로 PSA-인터페론-알파 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 인터페론-알파를 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 회석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO₄을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 이온교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA-인터페론-알파 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에

공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

인터페론-알파를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μ M의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 인터페론-알파를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 인터페론-알파 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 정제된 산화된 인터페론-감마를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

얻은 PSA-인터페론-알파 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-인터페론-알파 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한와-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

방법 3:

인터페론-알파를 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50-배 몰 과잉의 PSA 아미노옥시 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μ M)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01 % Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로, PSA-인터페론-알파 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 인터페론-알파를 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μ M)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM) 및 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-인터페론-알파 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

인터페론-알파를 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 인터페론-알파 용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μ M의 농도를 얻었다.

반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

얻은 인터페론-알파 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-인터페론-알파 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 27

아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 인터페론-감마의 폴리시알릴화

방법 1:

10 mg 인터페론-감마를 5 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 100 μl의 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 50 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물을 대해 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 순차적으로 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

산화된 인터페론-감마를 함유하는 체류물 (대략 7 ml)을 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

유리 인터페론-감마을 양이온 교환 크로마토그래피 (CEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 6.5)으로 회석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep SPFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B로 용출했다 (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6.5). 유리 인터페론-감마를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주케이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주케이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, pH 6.9)으로 ~190 mS/cm로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩되었다. 유리 PSA-시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로, 콘주케이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, pH 6.9)로 용출했다. 콘주케이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 6.9)에 대향하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-인터페론-감마 콘주케이트에 대해 천연 인터페론-감마와 비교된 > 50 %의 비활성(specific activity)을 측정했다. 콘주케이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 인터페론 감마를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

방법 2:

10 mg 인터페론-감마를 8 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 200 μl의 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM) 및 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 첨가했다. 순차적으로 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 100 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

유리 인터페론 감마를 양이온 교환 크로마토그래피 (CEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 6.5)으로 회석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep SPFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B로 용출했다 (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6.5). 유리 인터페론-감마를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주케이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주케이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, pH 6.9)으로 ~190 mS/cm로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE

Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩되었다. 유리 PSA-시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로, 콘주케이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, pH 6.9)로 용출했다. 콘주케이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 6.9)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA인터페론-감마 콘주케이트에 대해 천연 인터페론-감마와 비교된 > 50 %의 비활성을 측정했다. 콘주케이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 인터페론-감마를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

방법 3:

10 mg 인터페론-감마를 8 ml 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 200 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM) 및 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 첨가했다. 순차적으로 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 100 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

유리 인터페론 감마를 양이온 교환 크로마토그래피 (CEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 6.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep SPFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B로 용출했다 (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6.5). 유리 인터페론-감마를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주케이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주케이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, pH 6.9)으로 ~190 mS/cm로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩되었다. 유리 PSA-시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로 콘주케이트를 100% 완충액 E (50 mM Hepes, pH 6.9)로 용출했다. 콘주케이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 6.9)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. For PSA인터페론-감마 콘주케이트 천연 인터페론-감마와 비교된 > 50 %의 비활성을 측정했다. 콘주케이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 인터페론-감마를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

방법 4:

인터페론-감마을 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH₂) 시약을 이 인터페론-감마 용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를 얻었다.

반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이션했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

얻은 인터페론-감마 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-인터페론-감마 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 28

아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 G-CSF의 폴리시알릴화

방법 1:

개시 농도의 과립구-콜로니 자극 인자 (G-CSF)을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaI04을 첨가하여 200 μ M의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용액 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 G-CSF를 완충액 B로 용출했다 (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, 1 M NaCl, pH 7.0). G-CSF 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 0.5 M HCl의 적가로 pH 6.0으로 조정했다.

20 kD의 MW를 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 폐닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주게이트를 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로 PSA- G-CSF 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 과립구-콜로니 자극 인자 (G-CSF)을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaI04을 첨가하여 200 μ M의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다. 20 kD의 MW를 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 이온 교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA-G-CSF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

G-CSF를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μ M의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 G-CSF를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 용출물의 상기 산화된 G-CSF 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH₂) 시약을 50-배 몰 과잉으로 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 정제된 산화된 G-CSF를 함유하는 용출물에 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

얻은 PSA-G-CSF 콘주케이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-G-CSF 콘주케이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

파립구-콜로니 자극 인자 (G-CSF)을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01 % Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주케이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로, PSA-G-CSF 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 파립구-콜로니 자극 인자 (G-CSF)을 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM) 및 콘주케이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-G-CSF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

G-CSF를 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 G-CSF 용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를 얻었다.

반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

얻은 G-CSF 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-G-CSF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 29

아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 휴미라의 폴리시알릴화

방법 1:

개시 농도의 휴미라를 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH

6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μ M의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용액 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 휴미라를 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. 휴미라 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 pH 6.0로 0.5M HCl의 적가로 조정했다.

20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물을 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로, PSA-휴미라 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 휴미라를 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μ M의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 이온 교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA-휴미라 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

휴미라를 이동시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μ M의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 휴미라를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 산화된 휴미라 함유 용출물의 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 50-배 몰 과잉으로 정제된 산화된 휴미라를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

얻은 PSA-휴미라 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-휴미라 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적

활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

휴미라를 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μ M)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01 % Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주케이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로 PSA-휴미라 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 휴미라를 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μ M)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM) 및 콘주케이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-휴미라 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

휴미라를 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 휴미라 용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오네이트 용액을 첨가하여 400 μ M의 농도를 얻었다.

반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 총 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

얻은 휴미라-콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA- 휴미라 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한와-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 30

아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 프롤리아의 폴리시알릴화

방법 1:

개시 농도의 프롤리아를 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μ M의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오네이트, 켄쳐 및 그의 부

산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용액 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 프롤리아를 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, 1M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. 프롤리아 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 0.5 M HCl의 적가로 pH 6.0으로 조정했다.

20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물을 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로 콘주케이트를 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로, PSA-프롤리아 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 10 mg 프롤리아를 5 ml 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 100 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 50 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 순차적으로 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

산화된 프롤리아 체류물 (대략 7 ml)을 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD의 MW을 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

유리 프롤리아를 양이온 교환 크로마토그래피 (CEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 6.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep SPFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B로 용출했다 (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6.5). 유리 프롤리아를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주케이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주케이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, pH 6.9)으로 ~190 mS/cm로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩되었다. 유리 PSA-시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로, 콘주케이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, pH 6.9)로 용출했다. 콘주케이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 6.9)에 대향하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-프롤리아 콘주케이트에 대해 천연 프롤리아와 비교한 > 50 %의 비활성이 측정된다. 콘주케이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 프롤리아를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

방법 2:

프롤리아를 이동시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 프롤리아를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 프롤리아 함유 분획을 수집하고 콘주케이션 반응을 위해 사용한다.

아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH₂) 시약을 정제된 산화된 프롤리아를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내

에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

얻은 프롤리아 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 프롤리아 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

프롤리아를 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60 분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01 % Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 폐닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로 PSA 프롤리아 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 10 mg 프롤리아를 8 ml 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 200 μl의 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM) 및 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 첨가했다. 순차적으로 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5 배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 100 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

유리 프롤리아를 양이온 교환 크로마토그래피 (CEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 6.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep SPFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B로 용출했다 (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6.5). 유리 프롤리아를 칼럼을 25 % 완충액 B로 및 콘주게이트를 5 % 완충액 B에서 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, pH 6.9)으로 ~190 mS/cm로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩되었다. 유리 PSA-시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로 콘주게이트를 100% 완충액 E (50 mM Hepes, pH 6.9)로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 6.9)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-프롤리아 콘주게이트에 대해 천연 프롤리아와 비교한 > 50 %의 비활성이 측정된다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 프롤리아를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

방법 4:

프롤리아를 용해시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HC1 용액의 적가로 보정했다.

순차적으로 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH₂) 시약을 이 프롤리아 -용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를

얻었다.

반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

얻은 프롤리아 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA- 프롤리아 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 31

다른 치료 단백질의 폴리시알릴화

본원에서 기재된 바와 같은 대안적인 친핵성 촉매 유사 m-톨루이딘 또는 o-아미노벤조산의 존재에서 수행된 폴리시알릴화 반응은 다른 치료 단백질. 예를 들면, 본 발명의 다양한 측면들에서, PSA 아미노옥시 또는 PEG 아미노옥시 시약과의 본원에서 기재된 상기 폴리시알릴화 또는 폐길화 반응은 치료 단백질 예컨대 본원에서 기재된 단백질과 함께 반복된다.

실시예 32

아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 EPO의 폐길화

방법 1:

에리트로포이에틴 (EPO)을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). EPO를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 EPO를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-EPO 콘주케이트를 (예를 들면 Q 세파로오스 FF상) 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 젤을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주케이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. EPO를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 10 mg EPO를 5 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 100 μl의 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 50 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 순차적으로 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

산화된 EPO를 함유하는 체류물 (대략 7 ml)를 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-EPO 콘주케이트를 Q 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 7.5)으로 회색하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 7.5)로 용

출했다. 유리 EPO를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주게이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl을 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 7.2)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PEG-EPO 콘주게이트에 대해 천연 EPO와 비교한 > 50 %의 비활성을 측정했다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 EPO를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

방법 2:

EPO를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본).

EPO를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로 40 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물을 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 EPO를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 EPO 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 EPO를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이션했다.

얻은 PEG-EPO 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-EPO 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한와-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

EPO를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). EPO를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로, 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-EPO 콘주게이트를 Q 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. EPO를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 10 mg EPO를 ~8 ml 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 200 μl의 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM) 및 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 첨가했다. 순차적으로, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 100 μl의 1 M 수성 시

스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-EPO 콘주게이트를 Q 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 7.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 7.5)로 용출했다. 유리 EPO를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주게이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm^2 , 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl을 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 7.2)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PEG-EPO 콘주게이트에 대해 천연 EPO와 비교한 $> 50 \%$ 의 비활성을 측정했다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 EPO를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

방법 4:

EPO를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 EPO를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg EPO/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μ M의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

PEG-EPO 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm^2 , 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 33

아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 Ang-2의 폐길화

방법 1:

Ang-2을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). Ang-2을 7.0 ml 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μ l의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 Ang-2를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-Ang-2 콘주게이트를 (예를 들면 Q 세파로오스 FF상) 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 젤을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. Ang-2을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp,

도쿄, 일본). Ang-2을 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물을 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 Ang-2을 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-Ang-2 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

Ang-2을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본).

Ang-2을 이동시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 Ang-2을 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 Ang-2 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 Ang-2을 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

얻은 PEG-Ang-2 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-Ang-2 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한와-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

Ang-2을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). Ang-2을 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-Ang-2 콘주게이트를 Q 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질 /ml 젤을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼슘 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. Ang-2을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp,

도쿄, 일본). Ang-2을 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μ l의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로 PEG-Ang-2 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주케이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

Ang-2을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 Ang-2을 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg Ang-2/m1의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μ M의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

PEG-Ang-2 콘주케이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주케이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

순차적으로, 유리 Ang-2을 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 제거했다. 용출물의 콘주케이트 함유 분획을 UF/DF로 농축했다.

실시예 34

아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 VEGF의 폐길화

방법 1:

VEGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). VEGF를 7.0 m1 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μ l의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물을 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 VEGF를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-VEGF 콘주케이트를 (예를 들면, Q 세파로오스 FF상) 이온교환 크로마토그래피 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/m1 겔을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주케이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. VEGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). VEGF를 7.0 m1 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μ l의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했

다. 혼합물을 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 VEGF를 함유하는 체류물을 수성 m -톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-VEGF 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주케이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

VEGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). VEGF를 이동시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM 의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 $T = +22 +/- 2$ °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 $T = +22 +/- 2$ °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물을 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 VEGF를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 VEGF 분획을 수집하고 콘주케이션 반응을 위해 사용한다.

20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 VEGF를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m -톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 $T = +22 +/- 2$ °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

얻은 PEG-VEGF 콘주케이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-VEGF 콘주케이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조한 콘주케이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

VEGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). VEGF를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m -톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로, 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl 의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-VEGF 콘주케이트를 Q 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 젤을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼슘 상에 로딩했다. 콘주케이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. VEGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). VEGF를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m -톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로, 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교

반 하에서 인큐베이트하고 8 μ l의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-VEGF 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주케이트 콘주케이트 분획을 수집하고 그 다음 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

VEGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 VEGF를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg VEGF/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로, 5 mM 수성 나트륨 폐리오레이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μ M의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

PEG-VEGF 콘주케이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주케이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)에 대향하여 수행했다.

제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 35

아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 EGF의 폐길화

방법 1:

EGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). EGF를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 폐리오레이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μ l의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오레이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 EGF를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-EGF 콘주케이트를 (예를 들면, Q 세파로오스 FF상) 이온교환 크로마토그래피 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 젤을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주케이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. EGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). EGF를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 폐리오레이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μ l의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오레이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 EGF를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-EGF 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주케이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

EGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). EGF를 이동시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물을 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 EGF를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 EGF 함유 분획을 수집하고 콘주케이션 반응을 위해 사용한다.

20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 NGF 함유 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이션했다.

얻은 PEG-EGF 콘주케이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-EGF 콘주케이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한와-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조한 콘주케이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

EGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). EGF를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-EGF 콘주케이트를 Q-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼슘 상에 로딩했다. 콘주케이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. EGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). EGF를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-EGF 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주케이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

EGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 EGF를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg EGF/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μ M의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

PEG-EGF 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)에 대향하여 수행했다.

제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 36

아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 NGF의 폐길화

방법 1:

NGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). NGF를 7.0 ml 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μ l의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 NGF를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-NGF 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피 (예를 들면, Q-세파로오스 FF 상)로 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. NGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). NGF를 7.0 ml 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μ l의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 NGF를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-NGF 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피 정제했다 (용출물의 콘주게이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

NGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는

NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). NGF를 이동시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물을 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 NGF를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 NGF 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 NGF 함유 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

얻은 PEG-NGF 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-NGF 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

NGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). NGF를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-NGF 콘주게이트를 Q 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼슘 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. NGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). NGF를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-NGF 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 그 다음 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

NGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 NGF를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg NGF/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉

을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

PEG-NGF 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)에 대향하여 수행했다.

제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 37

아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 HGH의 폐길화

방법 1:

본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다.

HGH를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). HGH를 7.0 ml 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 HGH를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-HGH 콘주게이트를 (예를 들면, Q 세파로오스 FF상) 이온교환 크로마토그래피 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 젤을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다.

HGH를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). HGH를 7.0 ml 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 HGH를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-HGH 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피 정제했다 (용출물의 콘주게이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다.

HGH를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). HGH를 이동시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 면추어서 반응 혼합물을 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 HGH를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 HGH 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 HGH 함유 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

얻은 PEG-HGH 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-NGF 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 문자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다.

HGH를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). HGH를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-HGH 콘주게이트를 Q-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 젤을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼슘 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다. HGH를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). HGH를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-HGH 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 그 다음 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코

실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다.

HGH를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 HGH를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg HGH/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μ M의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

PEG - HGH 콘주케이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주케이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)에 대향하여 수행했다.

제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 38

아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 TNF-알파의 폐길화

방법 1:

TNF-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). TNF-알파를 7.0 ml 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μ l의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 TNF-알파를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-TNF-알파 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피 (예를 들면, Q-세파로오스 FF 상)로 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 젤을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주케이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. TNF-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). TNF-알파를 7.0 ml 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μ l의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 TNF-알파를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-TNF-알파 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주케이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

TNF-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). TNF-알파를 이동시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로 40 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μ M의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물을 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션 했다.

상기 산화된 TNF-알파를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 TNF-알파 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 TNF 알파를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

얻은 PEG-TNF-알파 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-TNF-알파 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한와-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

TNF-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). TNF-알파를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μ l의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-TNF-알파 콘주게이트를 Q-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 젤을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼슘 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. TNF-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). TNF-알파를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로, 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μ l의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-TNF-알파 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 그 다음 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

TNF-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 TNF-알파를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg TNF-알파/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로, 5 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 15 분 내에

첨가하여 100 μ M의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

PEG-TNF-알파 콘주케이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주케이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 39

아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 인슐린의 폐길화

방법 1:

본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다. 인슐린을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인슐린을 7.0 ml 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μ l의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 인슐린을 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-인슐린 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피 (예를 들면, Q-세파로오스 FF 상)로 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 젤을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주케이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다. 인슐린을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인슐린을 7.0 ml 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μ l의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 인슐린을 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-인슐린 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주케이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다.

인슐린을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인슐린을 이동시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HC1 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μ M의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물을 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 인슐린을 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 인슐린 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 인슐린 함유 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

얻은 PEG - 인슐린 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG - 인슐린 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다.

인슐린을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인슐린을 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로, 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μ l의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-인슐린 콘주게이트를 Q 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질 /ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼슘 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다. 인슐린을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인슐린을 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μ l의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, 인슐린-콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 그 다음 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다.

인슐린을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인슐린의 초기 농도 또는 중량을 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg 인슐린/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μ M의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

PEG - 인슐린 콘주케이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주케이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 40아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 인터페론-알파의 폐길화**방법 1:**

인터페론-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인터페론-알파를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μ l의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 인터페론-알파를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-인터페론-알파 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피 (예를 들면, Q-세파로오스 FF 상)로 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 젤을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주케이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 인터페론-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인터페론-알파를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μ l의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 인터페론-알파를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-인터페론-알파 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 콘주케이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에

따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

인터페론-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인터페론-알파를 이동시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물을 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 인터페론-알파를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 인터페론-알파 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 인터페론-알파 함유 용출물에 15 분의 최대 지속 시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

얻은 PEG-인터페론-알파 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-인터페론 알파 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

인터페론-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인터페론-알파를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-인터페론-알파 콘주게이트를 Q-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼슘 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 인터페론-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인터페론-알파를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-인터페론-알파 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

인터페론-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의

시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 인터페론-알파를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg 인터페론-알파/m1의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로, 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μ M의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

PEG-인터페론-알파 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 41

아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 인터페론-감마의 폐길화

방법 1:

인터페론-감마를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 10 mg 인터페론-감마를 5 m1 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 100 μ l의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 50 μ l의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 순차적으로 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

산화된 인터페론-감마를 함유하는 체류물 (대략 7 m1)을 2 m1의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-인터페론-감마 콘주게이트를 SP 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 반응 혼합물을 20 m1 완충액 A (50 mM Hepes, pH 6.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 m1 HiPrep SPFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B로 용출했다 (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6.5). 유리 인터페론-감마를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주게이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 6.9)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PEG-인터페론-감마 콘주게이트에 대해 천연 인터페론 감마와 비교된 > 50 %의 비활성을 측정했다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 인터페론-감마를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

방법 2:

인터페론-감마를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인터페론-감마를 이동시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/m1의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μ M의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/-

5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 인터페론-감마를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 인터페론-감마 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 인터페론-감마를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

얻은 PEG-인터페론-감마 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-인터페론-감마 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한와-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 3:

인터페론-감마를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 10 mg 인터페론-감마를 ~8 ml 히스티딘 - 완충액 (pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 200 µl의 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM) 및 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 첨가했다. 순차적으로 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 100 µl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로 PEG-인터페론-감마 콘주게이트를 SP-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 6.5)으로 회석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep SP FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B로 용출했다 (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6.5). 유리 인터페론-감마를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주게이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 6.9)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PEG-인터페론-감마 콘주게이트에 대해 천연 인터페론-감마와 비교된 > 50 %의 비활성을 측정했다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 인터페론-감마를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

방법 4:

인터페론-감마를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 인터페론-감마를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg 인터페론-감마/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 µM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

PEG-인터페론-감마 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 42

아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 G-CSF의 폐길화

방법 1:

G-CSF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). G-CSF를 7.0 mL 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 G-CSF를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-G-CSF 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피 (예를 들면, Q-세파로오스 FF 상)로 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/mL 겔을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주케이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. G-CSF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). G-CSF를 7.0 mL 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 G-CSF를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-G-CSF 콘주케이트를 이온교환 크로마토그래피 정제했다 (용출물의 콘주케이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

G-CSF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). G-CSF를 이동시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/mL의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 G-CSF를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 용출물의 상기 산화된 G-CSF 분획을 수집하고 콘주케이션 반응을 위해 사용한다.

20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 50-배 몰 과잉으로 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 정제된 산화된 G-CSF를 함유하는 용출물에 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

얻은 PEG-G-CSF 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-G-CSF 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

방법 3:

G-CSF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). G-CSF를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로, 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-G-CSF 콘주게이트를 Q-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질 /ml 겔을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼슘 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. G-CSF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). G-CSF를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로, 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-G-CSF 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

G-CSF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 G-CSF를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg G-CSF/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로, 5 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속 시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

G-CSF 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)에 대향하여 수행했다.

제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 43

아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 휴미라의 폐길화

방법 1:

휴미라를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 휴미라를 7.0 ml 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의

1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음, 산화된 휴미라를 함유하는 보전물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-휴미라 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피 (예를 들면, Q-세파로오스 FF 상)로 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 젤을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 휴미라를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 휴미라를 7.0 ml 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음, 산화된 휴미라를 함유하는 보전물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-휴미라 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 2:

휴미라를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 휴미라를 이동시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로 40 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 °C에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 휴미라를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 산화된 휴미라 함유 용출물의 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 50-배 몰 과잉으로 정제된 산화된 휴미라를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

얻은 PEG-휴미라 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-휴미라 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

방법 3:

휴미라를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 휴미라를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로, 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을

얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μ l의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-휴미라 콘주게이트를 Q-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 젤을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 휴미라를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 휴미라를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μ l의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-휴미라 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

방법 4:

휴미라를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 HJumira를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg 휴미라/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μ M의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

The 휴미라 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

실시예 44

아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 프롤리아의 폐길화

방법 1:

프롤리아를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 프롤리아를 7.0 ml 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μ l의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

그 다음 산화된 프롤리아를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로, PEG-프롤리아 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피 (예를 들면, Q-세파로오스 FF 상)로 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 젤을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충

액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 프롤리아를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 10 mg rFIX을 5 ml 히스티딘 - 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 100 μ l의 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 °C에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 50 μ l의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 순차적으로 수행하여 과잉 폐리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

산화된 프롤리아를 함유하는 체류물 (대략 7 mL)을 2 mL의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

마지막으로 PEG-프롤리아 콘주게이트를 SP 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 6.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep SP FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B로 용출했다 (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6.5). 유리 프롤리아를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주게이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl을 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 6.9)에 대향하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PEG-프롤리아 콘주게이트에 대해 천연 프롤리아와 비교한 > 50 %의 비활성이 측정된다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 프롤리아를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

방법 2:

프롤리아를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 프롤리아를 이동시키거나 반응 완충액 (예를 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 $1.0 \pm 0.25 \text{ mg/ml}$ 의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 폐리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 $200 \mu\text{M}$ 의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 ± 5 분 동안 $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 ± 5 분 동안 인큐베이션했다.

상기 산화된 프롤리아를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 산화된 휴미라 함유 용출물의 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 프롤리아를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 파이프로 첨가했다. 그 다음 수성 m -톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 $T = +22 +/- 2$ °C의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 임큐베이트했다.

얻은 PEG-프롤리아 콘주케이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-프롤리아 콘주케이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (IEF/DF)로 높출했다.

방법 3:

프롤리아를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐질화 시약의 사용으로 폐질화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). EPO를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 폐리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 이큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액을

액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로, PEG-프롤리아 콘주케이트를 Q-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 젤을 5 mM CaCl₂를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주케이트를 5 mM CaCl₂ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다.

프롤리아를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 10 mg 프롤리아를 ~8 ml 히스티딘 완충액 (pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 200 μl의 수성 나트륨 폐리오레이트 용액 (5 mM) 및 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 첨가했다. 순차적으로, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 100 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

마지막으로 PEG-프롤리아 콘주케이트를 SP-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 6.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep SPFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B로 용출했다 (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6.5). 유리 프롤리아를 칼럼을 25% 완충액 B로 그리고 콘주케이트를 50% 완충액 B에서 세정하여 용출했다. 콘주케이트 함유 분획들을, 재생된 세룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 6.9)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PEG-프롤리아 콘주케이트에 대해 천연 프롤리아와 비교한 > 50 %의 비활성이 측정된다. 콘주케이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 프롤리아를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

방법 4:

프롤리아를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 폐길화 시약의 사용으로 폐길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 HJumira를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg 프롤리아/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 폐리오레이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

프롤리아 콘주케이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주케이트 함유 분획을 재생된 세룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm², 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl₂, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

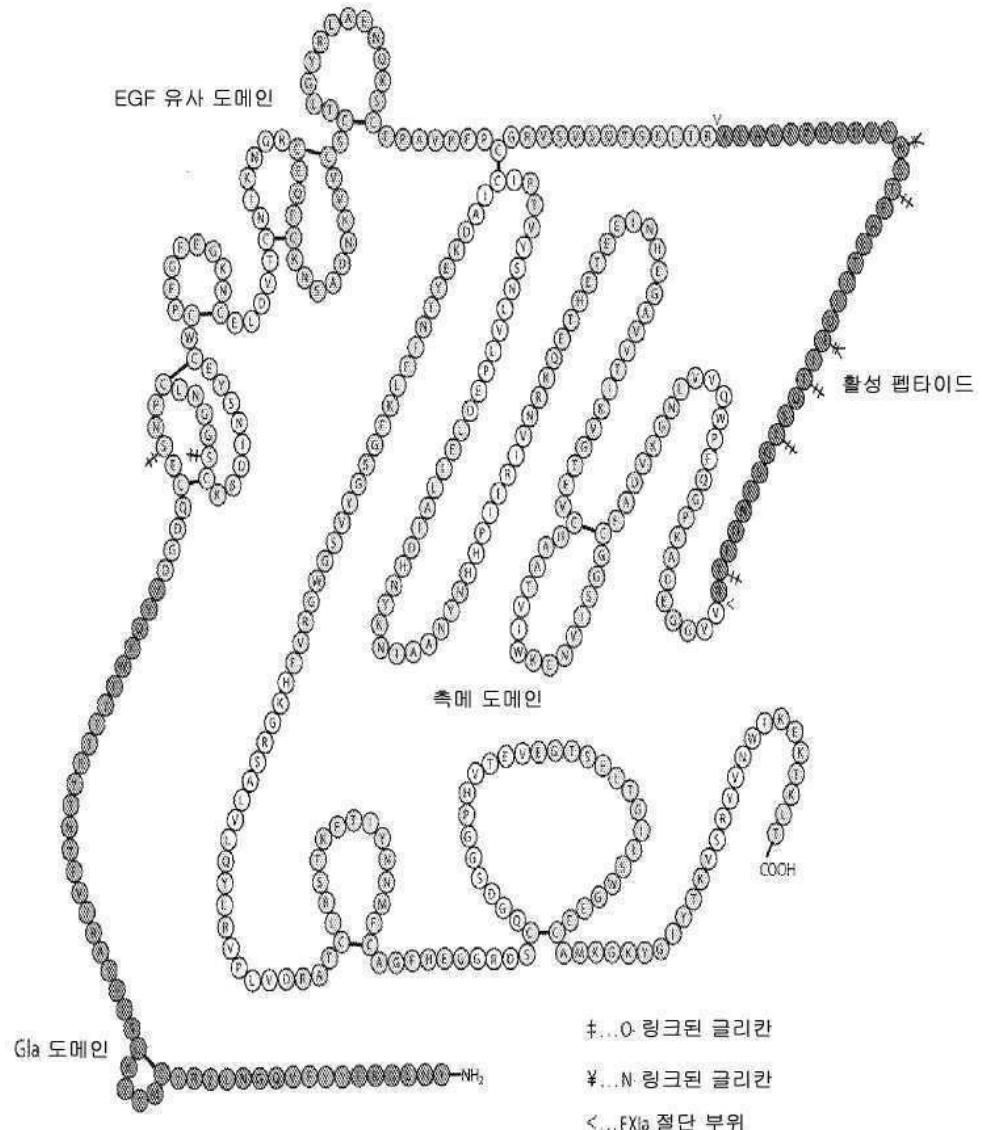
실시예 45

분지형 PEG를 사용하는 치료 단백질의 폐길화

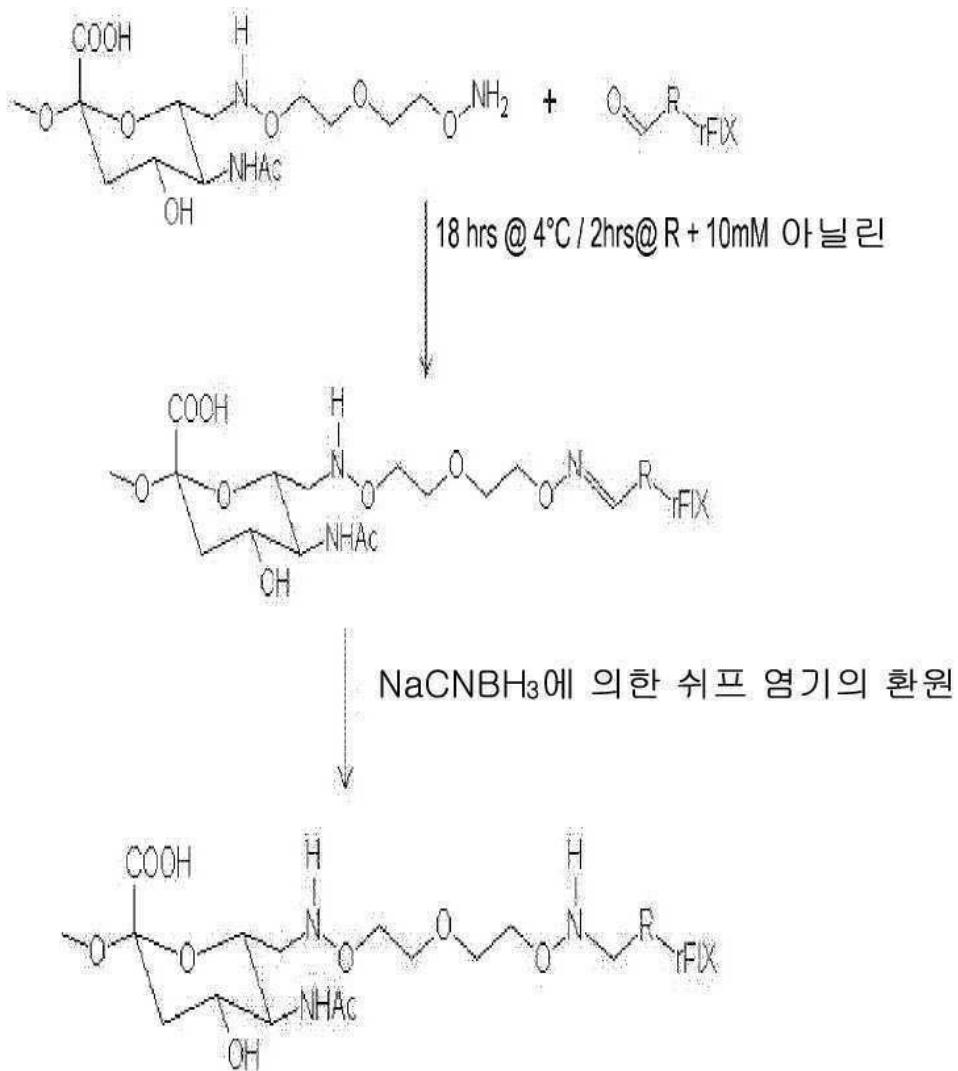
본 발명의 치료 단백질이 폐길화는 분지형 또는 선형 폐길화 시약으로 연장될 수 있고, 이 시약은, 알데하이드 및 활성 아미노옥시 그룹 함유 적당한 링커로 만들어 진다.

도면

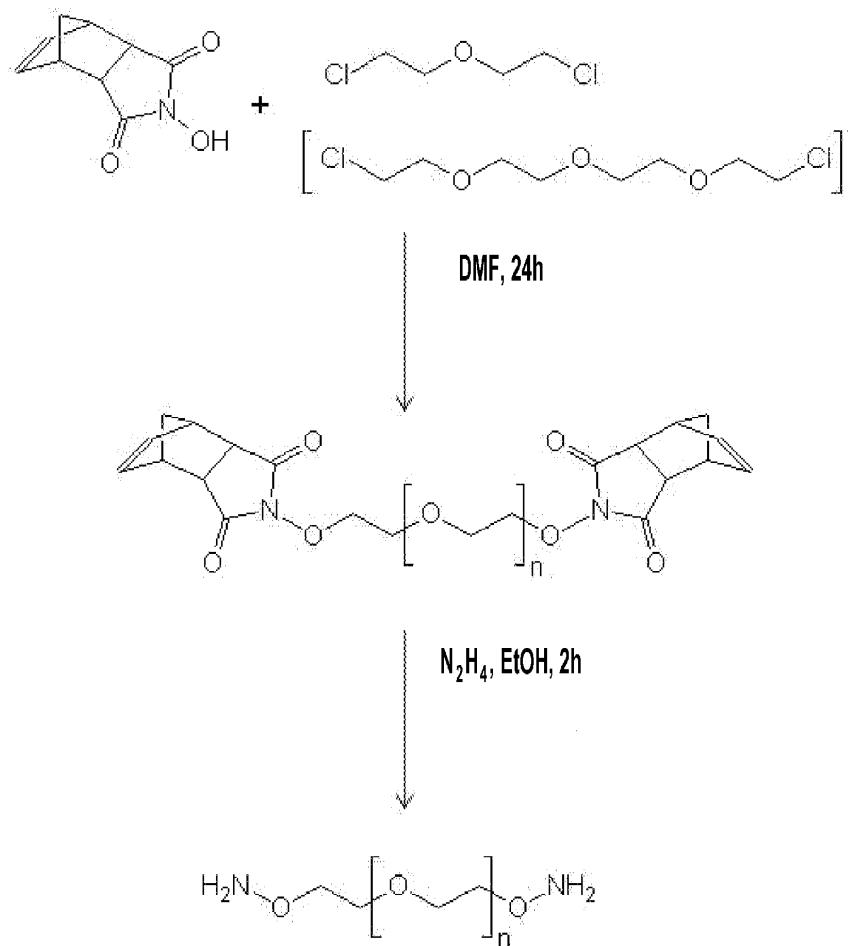
도면1



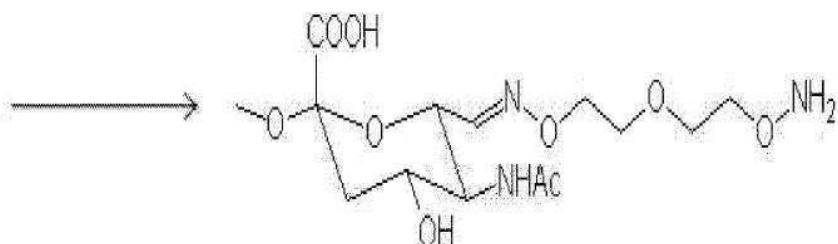
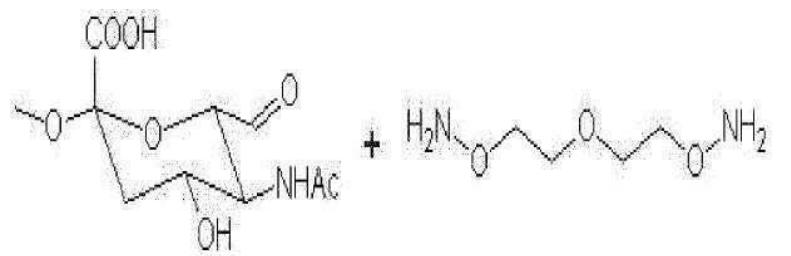
도면2



도면3

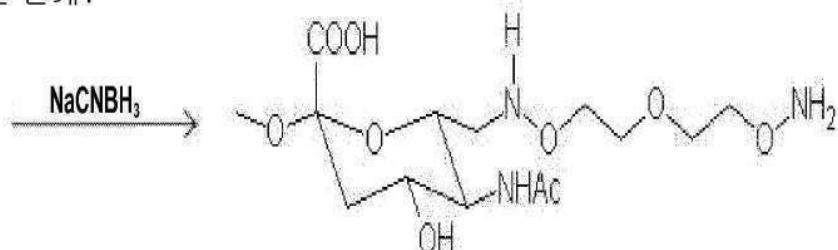


도면4

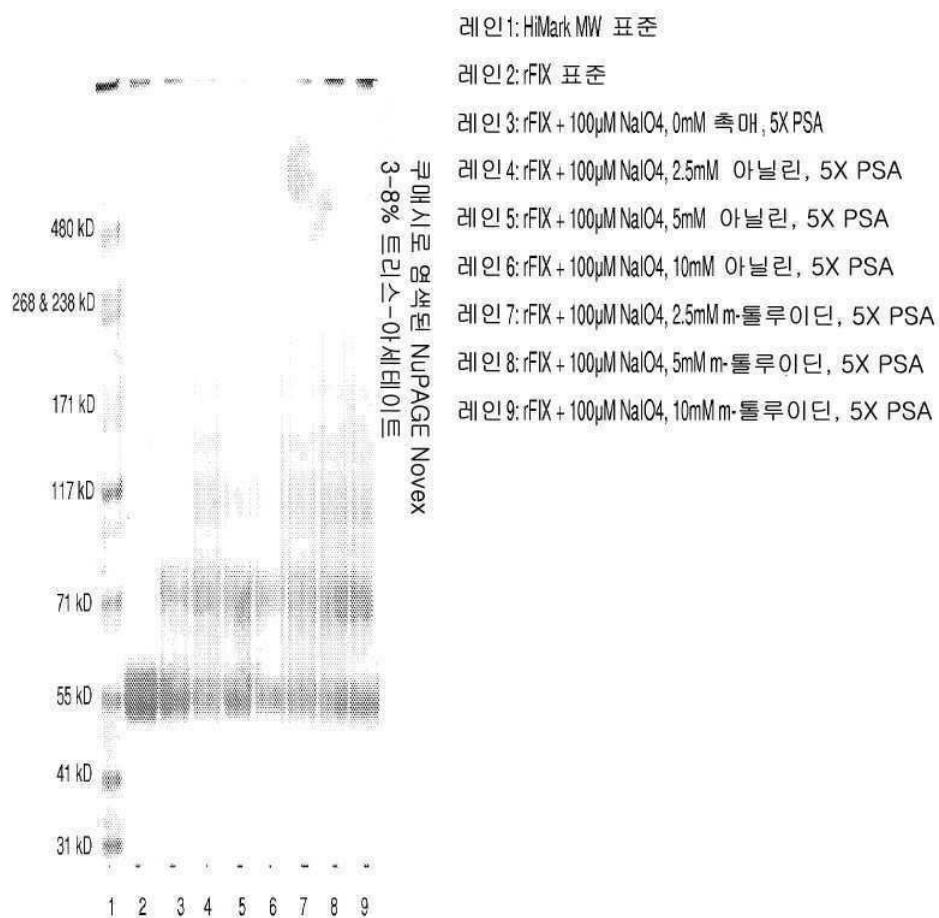


수프 염기를 안정화시키는

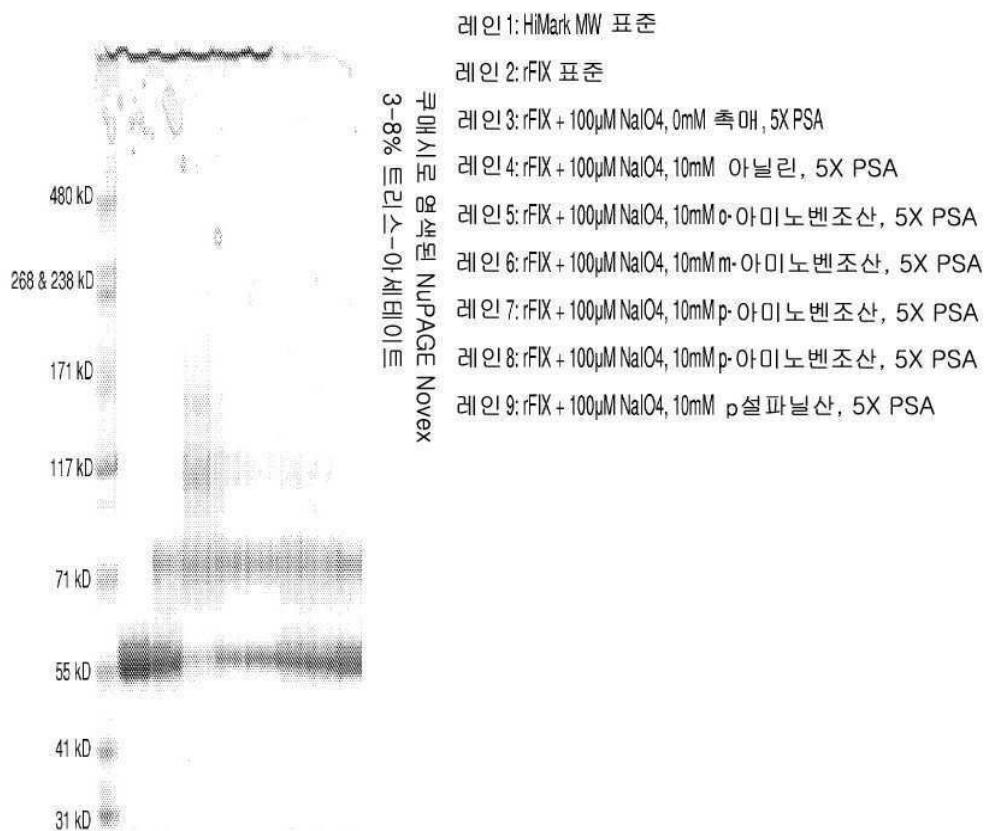
환원 단계 :



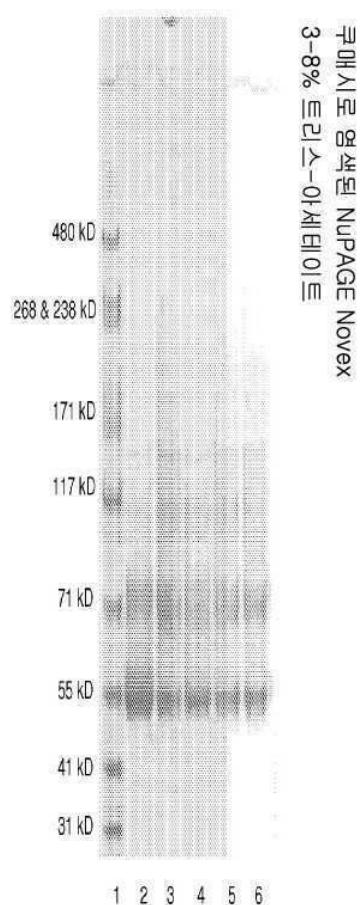
도면5a



도면5b



도면5c



레인 1: HiMark MW 표준

레인 2: rFIX + 100 μ M NaIO4, 0mM 촉매, 5X PSA

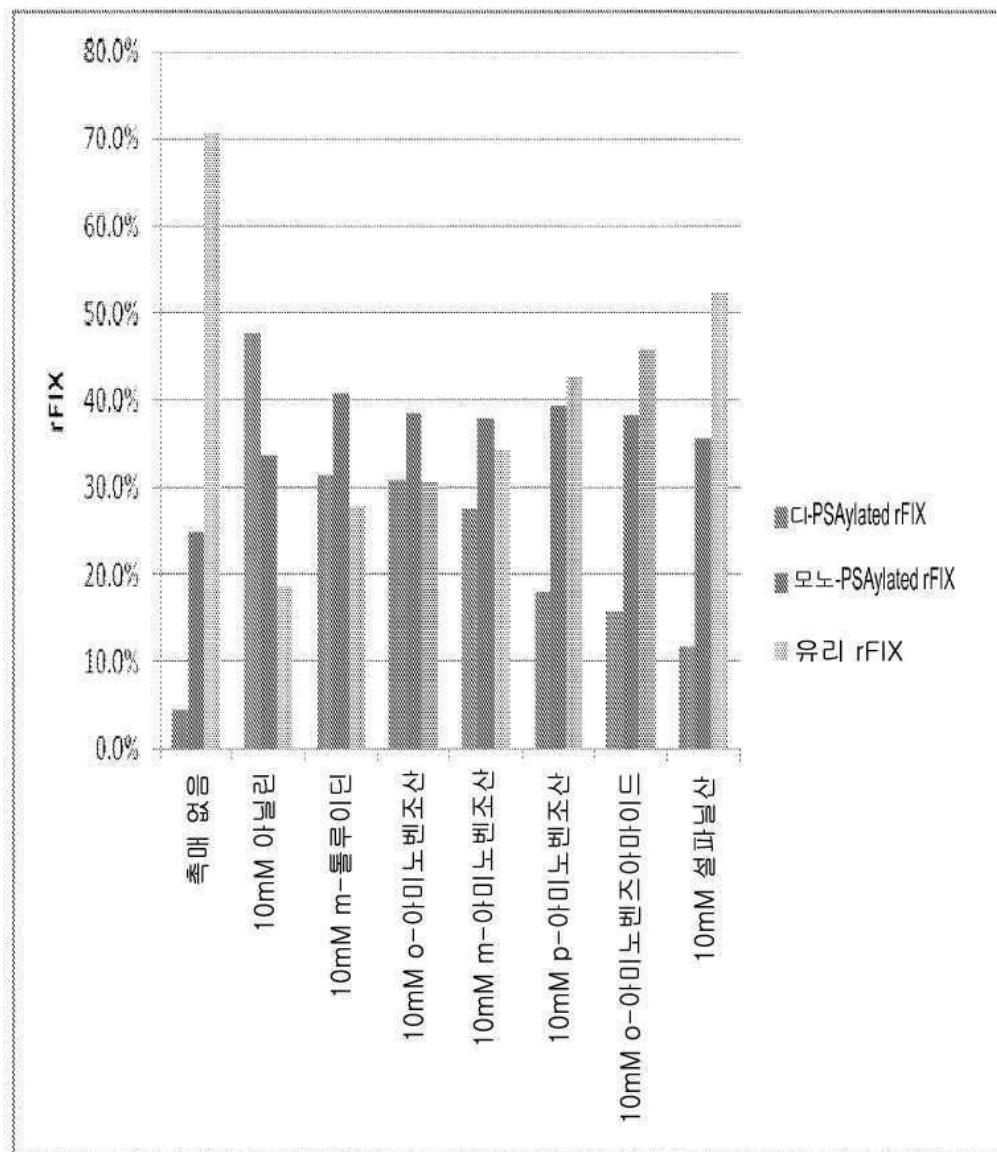
레인 3: rFIX + 100 μ M NaIO4, 10mM 아닐린, 5X PSA

레인 4: rFIX + 100 μ M NaIO4, 10mM o-아니시딘, 5X PSA

레인 5: rFIX + 100 μ M NaIO4, 10mM m-아니시딘, 5X PSA

레인 6: rFIX + 100 μ M NaIO4, 10mM m-톨루이딘, 5X PSA

도면6



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Siekmann, et al.
 <120> Nucleophilic Catalysts for Oxime Linkage
 <130> 31315/46394
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 422
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val
 1 5 10 15
 Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu
 20 25 30

Glu Pro Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu Lys Thr Thr Glu Phe Trp
 35 40 45
 Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn
 50 55 60
 Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro
 65 70 75 80
 Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile
 85 90 95

Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys
 100 105 110
 Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys
 115 120 125
 Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser
 130 135 140
 Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp
 145 150 155 160

Tyr Val Asn Pro Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln
 165 170 175
 Gly Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Glu Asp
 180 185 190
 Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val
 195 200 205
 Asp Ala Phe Cys Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr
 210 215 220

Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly
 225 230 235 240
 Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val

245	250	255
Ile Arg Ala Ile Ile Pro His His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys		
260	265	270
Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu		
275	280	285
Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn		
290	295	300
Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Ala Arg Val		
305	310	315
Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro		
325	330	335
Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr		
340	345	350
Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys		
355	360	365
Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser		
370	375	380
Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly		
385	390	395
Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys		
405	410	415
Glu Lys Thr Lys Leu Thr		
420		