



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0092754

(43) 공개일자 2007년09월13일

(51) Int. Cl.

A61K 47/48(2006.01) *C07K 14/775*(2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7017261

(22) 출원일자 2007년07월26일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2007년07월26일

(86) 국제출원번호 PCT/US2005/046879

국제출원일자 2005년12월23일

(87) 국제공개번호 WO 2006/071801

국제공개일자 2006년07월06일

(30) 우선권주장

60/639,244 2004년12월27일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

백스터 인터내셔널 인코포레이티드

미국 일리노이주 60015 디어필드 원 백스터 파크
웨이

박스터 헬쓰케어 에스.에이.

스위스 칸톤 주리히 발리셀렌 헤르티슈트라쎄 2

(72) 발명자

웨이프링거, 프리드리히

오스트리아 에이-1090 비엔나 미셸보이에른가쎄
4/17

투레첵, 페테르

오스트리아 에이-3400 클로스터노이부르크 하얏트
스트라쎈 59계바이드링

시엑크만, 쥐르겐

오스트리아 에이-1210 비엔나 게라스도르퍼 스트
라쎄 153/209

(74) 대리인

김영, 양영준

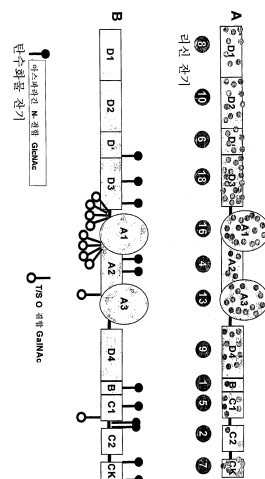
전체 청구항 수 : 총 140 항

(54) 중합체 - 폰 벨레브란트 인자 - 접합체

(57) 요약

본 발명은, 적어도 하나의 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자에 결합되어진 혈장 및/또는 재조합 폰 빌레브란트 인자(VWF)를 포함하는 단백질성 구조물 (또한, 중합체-VWF-접합체라 명명됨), 뿐만 아니라 상기 단백질성 구조물 및 적어도 하나의 인자 VIII (FVIII) 단백질의 복합체에 관한 것이다. 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자는 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 폴리시알산(PSA)일 수 있다. 또한, 본 발명은 적어도 하나의 FVIII 또는 VWF의 기능적 결손 또는 결함과 연관된 출혈성 질병을 가진 포유동물의 혈액에서 VWF 또는 FVIII의 생체내 반감기를 연장시키는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(30) 우선권주장

60/668,378	2005년04월04일	미국(US)
60/671,901	2005년04월15일	미국(US)
60/685,086	2005년05월26일	미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 혈장 폰 빌레브란트 인자(VWF), 재조합 VWF, VWF의 생물학적 활성 유도체, 및 그의 이량체 및 다량체로 구성된 군에서 선택된 VWF 분자; 및

(b) 상기 VWF 분자에 결합된 적어도 하나의 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자를 포함하는 단백질성 구조물로서,

상기 구조물이 적어도 하나의 인자 VIII(FVIII) 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체와 결합하는 능력을 갖고, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 증가된 것인, 단백질성 구조물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비하여 약 1.5배 이상 증가된 것인 단백질성 구조물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비하여 약 2배 이상 증가된 것인 단백질성 구조물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자가 상기 VWF의 탄수화물 잔기 또는 VWF의 생물학적 활성 유도체에 결합된 것인 단백질성 구조물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자가 상기 VWF의 리신 잔기 또는 VWF의 생물학적 활성 유도체에 결합된 것인 단백질성 구조물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자가 폴리(알킬렌 글리콜), 폴리(프로필렌 글리콜), 에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀 알콜), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카라이드), 폴리(α -히드록시산), 폴리(비닐 알콜), 폴리포스파스파젠, 폴리옥사졸린 및 폴리(N-아크릴로일모르폴린)으로 구성된 군에서 선택되는 것인 단백질성 구조물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자가 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 그의 유도체인 단백질성 구조물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자가 폴리시알산 (PSA) 또는 그의 유도체인 단백질성 구조물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 구조물 내에 포함된 상기 VWF는 VWF의 일차 지혈에서 생물학적 활성을 보유하고, 상기 생물학적 활성은 혈소판 및 세포의 매트릭스의 성분 상의 수용체에 대한 결합을 포함하며, 상기 성분이 콜라겐을 포함하는 것인 단백질성 구조물.

청구항 10

(a) 혈장 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 재조합체 VWF, VWF의 생물학적 활성 유도체, 및 그의 이량체 및 다량체로

구성된 군에서 선택되는 VWF 분자; 및

(b) 상기 VWF에 결합된 적어도 하나의 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자를 포함하는 단백질성 구조물로서, 상기 구조물이 적어도 하나의 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체와 결합하는 능력을 가지고, 상기 구조물에 결합된 상기 FVIII 분자의 생체내 반감기가 상기 구조물에 결합되지 않은 FVIII 분자의 생체내 반감기에 비해 증가되는, 단백질성 구조물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 FVIII 분자의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될 때, 상기 구조물에 결합되지 않은 FVIII 분자의 생체내 반감기에 비하여 약 1.5배 이상 증가되는 단백질성 구조물.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 FVIII 분자의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될 때, 상기 구조물에 결합되지 않은 FVIII 분자의 생체내 반감기에 비하여 약 2배 이상 증가되는 단백질성 구조물.

청구항 13

제1항 또는 제10항에 있어서, 상기 VWF 또는 그의 생물학적 활성 유도체가 재조합체 생성물인 단백질성 구조물.

청구항 14

제1항 또는 제10항의 단백질성 구조물, 및 적어도 하나의 FVIII 분자 또는 그의 생물학적 활성 유도체를 포함하는 복합체.

청구항 15

제14항에 있어서, FVIII 분자 또는 그의 생물학적 활성 유도체가 재조합체 생성물인 복합체.

청구항 16

(a) 제1항 또는 제10항의 적어도 하나의 단백질성 구조물의 첫번째 용량을 FVIII의 기능적 결손 또는 결함과 관련된 출혈성 질병을 가진 포유동물에 투여하는 단계; 및

(b) 적어도 하나의 FVIII 분자 또는 그의 생물학적 활성 유도체의 첫번째 용량을 상기 포유동물에 투여하는 단계

를 포함하는, FVIII의 기능적 결손 또는 결함과 관련된 출혈성 질병을 가진 포유동물의 혈액에서 FVIII 또는 그의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기를 연장시키는 방법.

청구항 17

(a) 제1항 또는 제10항의 적어도 하나의 단백질성 구조물의 첫번째 용량을 FVIII 및 VWF 중 하나 이상의 기능적 결손과 관련된 출혈성 질병을 가진 포유동물에 투여하는 단계; 및

(b) 적어도 하나의 FVIII 분자 또는 그의 생물학적 활성 유도체의 첫번째 용량을 상기 포유동물에 투여하는 단계

를 포함하는, FVIII 및 VWF 중 하나 이상의 기능적 결손과 관련된 출혈성 질병을 가진 포유동물의 혈액에서 FVIII 또는 그의 생물학적 활성 유도체 및 VWF 또는 그의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기를 연장시키는 방법.

청구항 18

(a) 제1항 또는 제10항의 적어도 하나의 단백질성 구조물을 제공하는 단계;

(b) 적어도 하나의 FVIII 분자 또는 그의 생물학적 활성 유도체를 제공하는 단계; 및

(c) 상기 단백질성 구조물과 상기 FVIII 분자 또는 그의 생물학적 활성 유도체 간의 복합체를 형성하는 단계

를 포함하는, FVIII 및 VWF 중 하나 이상의 기능적 결손 또는 결함과 관련된 출혈성 질병을 가진 포유동물의 혈

액에서 인자 VIII (FVIII) 또는 그의 생물학적 활성 유도체 및 vWF 또는 그의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기를 연장시키는 방법.

청구항 19

- (a) 제1항 또는 제10항의 적어도 하나의 단백질성 구조물을 제공하는 단계;
- (b) 적어도 하나의 FVIII 분자 또는 그의 생물학적 활성 유도체를 제공하는 단계; 및
- (c) 상기 단백질성 구조물과 상기 FVIII 분자 또는 그의 생물학적 활성 유도체 간의 복합체를 형성하는 단계를 포함하는, 기능적 결함과 관련된 출혈성 질병 또는 FVIII의 기능적 결손 또는 결함과 관련된 질병을 가진 포유동물의 혈액에서 인자 VIII (FVIII) 또는 그의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기를 연장시키는 방법.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 단계(c)의 복합체가 상기 포유동물에 투여되는 것인 방법.

청구항 21

제16항 또는 제17항에 있어서, 적어도 하나의 FVIII 분자 또는 그의 생물학적 활성 유도체가 상기 단백질성 구조물과 동시에 투여되는 것인 방법.

청구항 22

제16항 또는 제17항에 있어서, 적어도 하나의 FVIII 분자 또는 그의 생물학적 활성 유도체가 상기 단백질성 구조물의 투여 전 또는 투여 후에 연속적으로 투여되는 것인 방법.

청구항 23

제1항, 제2항, 제3항 및 제6항 중 어느 한 항의 단백질성 구조물의 유효량, 및 제약학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 염, 완충액 및 부형제로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 포함하는 제약 조성물.

청구항 24

제10항, 제11항 및 제12항 중 어느 한 항의 단백질성 구조물의 유효량, 및 제약학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 염, 완충액 및 부형제로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 포함하는 제약 조성물.

청구항 25

- (a) (i) 혈장 폰 빌레브란트 인자(VWF), 재조합체 VWF, VWF의 생물학적 활성 유도체, 및 그의 이량체 및 다량체로 구성된 군에서 선택되는 VWF 분자; 및

(ii) 상기 VWF 분자에 결합된 적어도 하나의 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자

를 포함하는 단백질성 구조물; 및

- (b) 상기 단백질성 구조물에 결합된 적어도 하나의 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체를 포함하고, 생체내 반감기가 VWF에 결합된 FVIII의 생체내 반감기에 비해 증가된 것인 복합체.

청구항 26

제25항에 있어서, 생체내 반감기가 VWF에 결합된 FVIII의 생체내 반감기에 비해 약 1.5배 이상 증가된 것인 복합체.

청구항 27

제25항에 있어서, 생체내 반감기가 VWF에 결합된 FVIII의 생체내 반감기에 비해 약 2배 이상 증가된 것인 복합체.

청구항 28

- a) 혈장 폰 빌레브란트 인자(VWF), 재조합체 VWF, VWF의 생물학적 활성 유도체, 및 그의 이량체 및 다량체로 구

성된 군에서 선택되는 VWF 분자를 제공하고;

b) 상기 VWF 분자 상의 탄수화물 잔기를 산화시키고;

c) 히드라지드 기를 함유하는 PEG 반응물과 상기 탄수화물 잔기를 접촉시키고;

d) 상기 반응물 PEG 히드라지드가 상기 VWF 상의 적어도 하나의 탄수화물 잔기에 공유 결합하여, 상기 구조물을 형성하는 것을 포함하고,

상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 증가되며, 상기 구조물이 적어도 하나의 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체에 결합할 수 있는 것인, VWF 분자 및 상기 VWF 분자 상의 적어도 하나의 탄수화물 잔기에 공유 결합된 PEG 잔기를 포함하는 단백질성 구조물을 형성하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 화학적 산화제를 사용하여 (b)의 상기 산화 단계를 수행하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 화학적 산화제가 NaIO₄인 방법.

청구항 31

제28항에 있어서, 효소적 산화제를 사용하여 (b)의 상기 산화 단계를 수행하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 효소적 산화제가 갈락토스 산화효소인 방법.

청구항 33

제28항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 선형 알콕시 PEG, 선형 이작용성 PEG, 분지쇄 PEG, 다중-팔 PEG, 갈래진 (forked) 형태의 PEG, 폴리올 코어에 부착된 PEG, 수지상 PEG, 안정한 결합을 가진 PEG, 분해가능한 결합을 가진 PEG, 및 가수분해가능한 결합을 가진 PEG로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 단독중합체, 교대 공중합체, 랜덤 공중합체, 블록 공중합체, 교대 삼원공중합체, 랜덤 삼원공중합체 및 블록 삼원공중합체로 구성된 군에서 선택되는 내부 구조를 가진 것인 방법.

청구항 35

제28항의 방법에 의해 제조된 단백질성 구조물.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 약 1.5배 이상 증가된 것인 단백질성 구조물.

청구항 37

제35항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 약 2배 이상 증가된 것인 단백질성 구조물.

청구항 38

제35항에 있어서, 상기 구조물에 결합될 때, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합되지 않은 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비해 약 1.5배 이상 증가되는 단백질성 구조물.

청구항 39

제35항에 있어서, 상기 구조물에 결합될 때, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합되지 않은 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비해 약 2배 이상 증가되는 단백질성 구조물.

청구항 40

제28항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 약 0.1 내지 약 200mg PEG/mg VWF 단백질의 비율로 제공되는 것인 방법.

청구항 41

제28항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 약 1.0 내지 약 25mg PEG/mg VWF 단백질의 비율로 제공되는 것인 방법.

청구항 42

a) 혈장 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 재조합체 VWF, VWF의 생물학적 활성 유도체, 및 그의 이량체 및 다량체로 구성된 군에서 선택된 VWF 분자를 제공하고;

b) 상기 VWF 분자 상의 일차 아미노기를 PEG 반응물과 접촉시키고;

c) 상기 PEG 반응물이 상기 VWF 상의 상기 일차 아미노기에 공유 결합하여, 상기 구조물을 형성하는 것을 포함하고, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 증가되며, 상기 구조물이 적어도 하나의 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체에 결합할 수 있는 것인, VWF 분자 및 상기 VWF 분자 상의 적어도 하나의 일차 아미노기에 공유 결합된 PEG 잔기를 포함하는 단백질성 구조물의 형성 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 일차 아미노기가 상기 VWF 분자의 리신 잔기 상에 함유된 것인 방법.

청구항 44

제42항에 있어서, 상기 일차 아미노기가 상기 VWF 분자의 N-말단 상에 함유된 것인 방법.

청구항 45

제42항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 N-히드록시숙신이미드-에스테르, PEG 카르보네이트, 카르복실 기를 함유하는 PEG 유도체, 및 알데히드 기를 함유하는 PEG 유도체로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 반응물이 PEG-숙신이미딜 숙시네이트, PEG-숙신이미딜 글루타레이트, PEG 숙신이미딜 부타노에이트, PEG-숙신이미딜 헥사노에이트, 분해가능한 PEG 반응물 및 가수분해가능한 PEG-반응물로 구성된 군에서 선택되는 N-히드록시숙신이미드-에스테르인 방법.

청구항 47

제45항에 있어서, 상기 반응물이 p-니트로페닐 카르보네이트 또는 숙신이미딜 카르보네이트인 PEG 카르보네이트인 방법.

청구항 48

제45항에 있어서, 상기 반응물이 수용성 카르보디이미드의 사용에 의해 일차 아미노기에 결합될 수 있는 카르복실 기를 함유한 PEG 유도체의 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 49

제45항에 있어서, 상기 반응물이 환원 아민화에 의해 일차 아미노기에 결합될 수 있는 PEG 프로피온알데히드인 방법.

청구항 50

a) 혈장 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 재조합체 VWF, VWF의 생물학적 활성 유도체, 및 그의 이량체 및 다량체로

구성된 군에서 선택된 VWF 분자를 제공하고;

b) 상기 VWF 분자 상의 리신 잔기를 알데히드 기를 함유한 PEG 반응물과 접촉시켜 용액 중에 쉬프 (schiff) 염기를 형성하고;

c) 상기 용액을 환원제와 접촉시켜 이차 아미드 결합을 형성하고;

d) 상기 PEG 반응물이 상기 VWF에 공유 결합하여 상기 구조물을 형성하는 것을 포함하고, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 증가되고, 상기 구조물이 적어도 하나의 인자 VIII (FVIII) 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체에 결합할 수 있는 것인, VWF 분자 및 VWF 분자 상에서의 환원성 아민화에 의해 적어도 하나의 일차 아미노기에 공유 결합된 PEG 잔기를 포함하는 단백질성 구조물의 형성 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 환원제가 NaCNBH₃인 방법.

청구항 52

제50항에 있어서, 상기 일차 아미노기가 상기 VWF 분자 상의 N-말단 아미노기이고, 이에 의해 상기 N-말단 아미노기가 선택적으로 PEG화되는 것인 방법.

청구항 53

제50항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 직쇄 알콕시 PEG, 직쇄 이작용성 PEG, 분지쇄 PEG, 다중-팔 PEG, 갈래진 형태의 PEG, 폴리올 코어에 부착된 PEG, 수지상 PEG, 안정한 결합을 가진 PEG, 분해가능한 결합을 가진 PEG, 및 가수분해가능한 결합을 가진 PEG로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, PEG 반응물이 단독중합체, 교대 공중합체, 랜덤 공중합체, 블록 공중합체, 교대 삼원공중합체, 랜덤 삼원공중합체, 및 블록 삼원공중합체로 구성된 군에서 선택되는 내부 구조를 갖는 것인 방법.

청구항 55

제50항의 방법에 의해 제조된 단백질성 구조물.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 1.5배 이상 증가된 것인 단백질성 구조물.

청구항 57

제55항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 2배 이상 증가된 것인 단백질성 구조물.

청구항 58

제55항에 있어서, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될 때, 상기 구조물에 결합되지 않은 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비하여, 1.5배 이상 증가된 단백질성 구조물.

청구항 59

제55항에 있어서, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될 때, 상기 구조물에 결합되지 않은 상기 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비하여, 2배 이상 증가되는 단백질성 구조물.

청구항 60

제50항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 약 0.1 내지 약 200mg PEG/mg VWF 단백질의 비율로 제공되는 방법.

청구항 61

제50항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 약 1.0 내지 약 25mg PEG/mg VWF 단백질의 비율로 제공되는 방법.

청구항 62

- a) 혈장 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 재조합체 VWF, VWF의 생물학적 활성 유도체, 및 그의 이량체 및 다량체로 구성된 군에서 선택된 VWF 분자를 제공하고;
- b) 상기 VWF 분자 상의 리신 잔기를 반응물 PEG 알데히드와 접촉시켜 용액 중에 쉬프 염기를 형성하고;
- c) 상기 용액을 반응성 시약과 접촉시켜 이차 아미드 결합을 형성하고;
- d) 상기 PEG 반응물을 상기 VWF에 공유 결합하여 상기 구조물을 형성하는 것을 포함하고, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 증가되고, 상기 구조물이 적어도 하나의 인자 VIII (FVIII) 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체에 결합할 수 있는 것인, VWF 분자 및 VWF 분자 상의 적어도 하나의 리신 잔기에 공유 결합된 PEG 잔기를 포함하는, 단백질성 구조물의 형성 방법.

청구항 63

- a) 혈장 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 재조합체 VWF, VWF의 생물학적 활성 유도체, 및 그의 이량체 및 다량체로 구성된 군에서 선택된 VWF 분자를 제공하고;
- b) 상기 VWF 분자 상의 술포히드릴 기를 말레이미드 기를 함유한 PEG 반응물과 접촉시키고;
- c) 상기 PEG 반응물이 상기 VWF 상의 적어도 하나의 술포히드릴 기에 공유 결합하여 상기 구조물을 형성하는 것을 포함하고, 여기에서 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 증가되고, 상기 구조물이 적어도 하나의 인자 VIII (FVIII) 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체에 결합할 수 있는 것인, VWF 분자 및 상기 VWF 분자 상의 적어도 하나의 자유 또는 발생된 술포히드릴 기에 공유 결합된 PEG 잔기를 포함하는, 단백질성 구조물의 형성 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 직쇄 알콕시 PEG, 직쇄 이작용성 PEG, 분지쇄 PEG, 다중-팔 PEG, 갈래진 형태의 PEG, 폴리올 코어에 부착된 PEG, 수지상 PEG, 안정한 결합을 가진 PEG, 분해가능한 결합을 가진 PEG, 및 가수분해가능한 결합을 가진 PEG로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 반응물 PEG이 단독중합체, 교대 공중합체, 랜덤 공중합체, 블록 공중합체, 교대 삼원공중합체, 랜덤 삼원공중합체 및 블록 삼원공중합체로 구성된 군에서 선택된 내부 구조를 갖는 것인 방법.

청구항 66

제63항의 방법에 의해 제조된 단백질성 구조물.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비하여 1.5배 이상 증가된 것인 구조물.

청구항 68

제66항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비하여 2배 이상 증가된 것인 구조물.

청구항 69

제66항에 있어서, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될

때, 상기 구조물에 결합되지 않은 상기 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비해 1.5배 이상 증가되는 단백질성 구조물.

청구항 70

제66항에 있어서, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될 때, 상기 구조물에 결합되지 않은 상기 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비해 2배 이상 증가되는 단백질성 구조물.

청구항 71

제63항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 약 0.1 내지 약 200mg PEG/mg VWF 단백질의 비율로 제공되는 것인 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 약 1.0 내지 약 25mg PEG/mg VWF 단백질의 비율로 제공되는 것인 방법.

청구항 73

- a) 혈장 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 재조합체 VWF, VWF의 생물학적 활성 유도체, 및 그의 이량체 및 다량체로 구성된 군에서 선택된 VWF 분자를 제공하고;
- b) 상기 VWF 분자 상의 카르복실기를 아미노기 및 수용성 카르보디이미드를 함유하는 PEG 반응물과 접촉시켜 아미드 결합을 형성하고;
- c) 상기 PEG 잔기가 상기 VWF에 공유 결합하여 상기 구조물을 형성하는 것을 포함하고, 여기에서 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 증가되고, 상기 구조물이 적어도 하나의 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체에 결합할 수 있는 것인, VWF 분자 및 상기 VWF 분자 상의 적어도 하나의 카르복실기에 공유 결합된 PEG 잔기를 포함하는, 단백질성 구조물의 형성 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 직쇄 알콕시 PEG, 직쇄 이작용성 PEG, 분지쇄 PEG, 다중-팔 PEG, 갈래진 형태의 PEG, 폴리올 코어에 부착된 PEG, 수지상 PEG, 안정한 결합을 가진 PEG, 분해가능한 결합을 가진 PEG, 및 가수분해가능한 결합을 가진 PEG로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 75

제74항에 있어서, 상기 반응물 PEG가 단독중합체, 교대 공중합체, 랜덤 공중합체, 블록 공중합체, 교대 삼원공중합체, 랜덤 삼원공중합체 및 블록 삼원공중합체로 구성된 군에서 선택된 내부 구조를 갖는 것인 방법.

청구항 76

제73항의 방법에 의해 제조된 단백질성 구조물.

청구항 77

제76항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 1.5배 이상 증가된 구조물.

청구항 78

제76항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 2배 이상 증가된 구조물.

청구항 79

제76항에 있어서, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될 때, 상기 구조물에 결합되지 않은 FVIII 분자 또는 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비해 1.5배 이상 증가되는 구조물.

청구항 80

제76항에 있어서, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될

때, 상기 구조물에 결합되지 않은 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비해 2배 이상 증가되는 것인 단백질성 구조물.

청구항 81

제73항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 약 0.1 내지 약 200mg PEG/mg VWF 단백질의 비율로 제공되는 것인 방법.

청구항 82

제81항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 약 1.0 내지 약 25mg PEG/mg VWF 단백질의 비율로 제공되는 것인 방법.

청구항 83

- 혈장 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 재조합체 VWF, VWF의 생물학적 활성 유도체, 및 그의 이량체 및 다량체로 구성된 군에서 선택된 VWF 분자를 제공하고;
- 상기 VWF 분자 상의 FVIII 결합 부위를 인자 VIII-결합 부위-보호제와 접촉시켜, 보호된 FVIII 결합 부위를 가진 VWF 분자를 형성하고;
- 단계(b)의 상기 VWF 분자 상의 반응성 부위를 PEG 반응물과 접촉시키고;
- 상기 PEG 반응물이 상기 VWF 분자 상에 공유 결합되도록 하고;
- 상기 FVIII-결합 부위-보호제를 상기 VWF 분자로부터 분리하여 상기 구조물을 형성하는 것을 포함하고, 여기에서 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 증가되고, 여기에서 상기 구조물이 적어도 하나의 인자 VIII (FVIII) 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체에 결합할 수 있는 것인, VWF 분자 및 상기 VWF 분자에 공유 결합된 PEG 잔기를 포함하고, 상기 PEG 잔기가 VWF 분자의 FVIII 결합 부위에 결합되지 않은 것인, 단백질성 구조물의 형성 방법.

청구항 84

제83항에 있어서, 상기 인자 VIII-결합 부위-보호제가 친화성 겔링 상에 함유된 것인 방법.

청구항 85

제83항에 있어서, 상기 인자 VIII-결합 부위-보호제가 인자 VIII, FVIII의 유도체, 헤파린 및 헤파린의 유도체로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 86

제83항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 직쇄 알콕시 PEG, 직쇄 이작용성 PEG, 분지쇄 PEG, 다중-팔 PEG, 갈래진 형태의 PEG, 폴리올 코어에 부착된 PEG, 수지상 PEG, 안정한 결합을 가진 PEG, 분해가능한 결합을 가진 PEG, 및 가수분해가능한 결합을 가진 PEG로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 87

제86항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 단독중합체, 교대 공중합체, 랜덤 공중합체, 블록 공중합체, 교대 삼원공중합체, 랜덤 삼원공중합체 및 블록 삼원공중합체로 구성된 군에서 선택된 내부 구조를 갖는 것인 방법.

청구항 88

제83항의 방법에 의해 제조된 단백질성 구조물.

청구항 89

제88항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 1.5배 이상 증가된 것인 구조물.

청구항 90

제88항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 2배 이상 증가된 것인 구조물.

청구항 91

제88항에 있어서, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될 때, 상기 구조물에 결합되지 않은 상기 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비하여 1.5배 이상 증가되는 구조물.

청구항 92

제88항에 있어서, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될 때, 상기 구조물에 결합되지 않은 상기 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비하여 2배 이상 증가되는 구조물.

청구항 93

제83항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 약 0.1 내지 약 200mg PEG/mg VWF 단백질의 비율로 제공되는 것인 방법.

청구항 94

제93항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 약 1.0 내지 약 25mg PEG/mg VWF 단백질의 비율로 제공되는 것인 방법.

청구항 95

- a) 혈장 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 재조합체 VWF, VWF의 생물학적 활성 유도체, 및 그의 이량체 및 다량체로 구성된 군에서 선택된 VWF 분자를 제공하고;
- b) 폴리시알산 (PSA)를 알데히드를 함유한 PEG 반응물과 접촉시켜 용액 중에 쉬프 염기를 형성하고;
- c) 상기 용액을 환원제와 접촉시켜 2차 아미드 결합을 형성하고;
- d) 상기 VWF 상의 적어도 하나의 리신 잔기에 상기 PSA를 공유 결합시켜 상기 구조물을 형성하는 것을 포함하고, 여기에서 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 증가되고, 상기 구조물이 적어도 하나의 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체에 결합할 수 있는 것인, VWF 분자 및 상기 VWF 분자 상의 적어도 하나의 리신 잔기에 공유 결합된 PSA 잔기를 포함하는, 단백질성 구조물의 형성 방법.

청구항 96

제95항에 있어서, 상기 환원제가 NaCNBH₃인 방법.

청구항 97

제95항의 방법에 따라 제조된 단백질성 구조물.

청구항 98

제97항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 1.5배 이상 증가된 것인 구조물.

청구항 99

제97항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 2배 이상 증가된 것인 구조물.

청구항 100

제97항에 있어서, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될 때, 상기 구조물에 결합되지 않은 상기 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비해 1.5배 이상 증가되는 단백질성 구조물.

청구항 101

제97항에 있어서, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될

때, 상기 구조물에 결합되지 않은 상기 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비해 2배 이상 증가되는 단백질성 구조물.

청구항 102

- a) 혈장 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 재조합체 VWF, VWF의 생물학적 활성 유도체, 및 그의 이량체 및 다량체로 구성된 군에서 선택된 VWF 분자를 제공하고;
- b) 상기 VWF 분자를 폴리시알산 (PSA) 및 글루타르알데히드를 함유한 용액과 접촉시키고;
- c) 상기 VWF에 상기 PSA를 공유적으로 가교결합시켜 상기 구조물을 형성하는 것을 포함하고, 여기에서 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 증가되고, 상기 구조물이 적어도 하나의 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체에 결합할 수 있는 것인, VWF 분자 및 상기 VWF 분자에 공유적으로 가교결합된 PSA 잔기를 포함하는 단백질성 구조물의 형성 방법.

청구항 103

제102항의 방법에 의해 제조된 단백질성 구조물.

청구항 104

제103항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 1.5배 이상 증가된 것인 구조물.

청구항 105

제103항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 2배 이상 증가된 것인 구조물.

청구항 106

제103항에 있어서, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될 때, 상기 구조물에 결합되지 않은 상기 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비해 1.5배 이상 증가되는 단백질성 구조물.

청구항 107

제103항에 있어서, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될 때, 상기 구조물에 결합되지 않은 상기 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비해 2배 이상 증가되는 단백질성 구조물.

청구항 108

- a) 혈장 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 재조합체 VWF, VWF의 생물학적 활성 유도체, 및 그의 이량체 및 다량체로 구성된 군에서 선택된 VWF 분자를 제공하고;
- b) 상기 VWF 분자 상의 탄수화물 잔기를 산화시키고;
- c) 상기 탄수화물 잔기를 히드라지드 기를 함유한 PSA 반응물과 접촉시키고;
- d) 상기 VWF 상의 적어도 하나의 탄수화물 잔기에 상기 PSA 반응물을 공유 결합시켜 상기 구조물을 형성하는 것을 포함하고, 여기에서 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 증가되고, 상기 구조물이 적어도 하나의 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체에 결합할 수 있는 것인, VWF 분자 및 상기 VWF 분자 상의 적어도 하나의 탄수화물 잔기에 공유 결합된 PSA 잔기를 포함하는, 단백질성 구조물의 형성 방법.

청구항 109

제108항에 있어서, 효소적 산화제를 사용하여 (b)의 산화 단계를 수행하는 방법.

청구항 110

제109항에 있어서, 상기 효소적 산화제가 갈락토스 산화효소인 방법.

청구항 111

- a) 혈장 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 재조합체 VWF, VWF의 생물학적 활성 유도체, 및 그의 이량체 및 다량체로 구성된 군에서 선택된 VWF 분자를 제공하고;
- b) 히알루론산(HA)의 용액을 산화제와 접촉시켜 활성화 HA를 형성하고;
- c) 상기 VWF 분자를 상기 활성화 HA와 접촉시켜 상기 구조물을 형성하는 것을 포함하고, 여기에서 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 증가되고, 상기 구조물이 적어도 하나의 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체에 결합할 수 있는 것인, VWF 분자 및 상기 VWF 분자 상의 적어도 하나의 리신 잔기에 공유 결합된 HA 잔기를 포함하는 단백질성 구조물의 형성 방법.

청구항 112

제111항의 방법에 의해 제조된 단백질성 구조물.

청구항 113

제112항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 1.5배 이상 증가된 것인 구조물.

청구항 114

제112항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 2배 이상 증가된 것인 구조물.

청구항 115

제112항에 있어서, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될 때, 상기 구조물에 결합되지 않은 상기 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비해 1.5배 이상 증가되는 단백질성 구조물.

청구항 116

제112항에 있어서, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될 때, 상기 구조물에 결합되지 않은 상기 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비해 2배 이상 증가되는 단백질성 구조물.

청구항 117

- a) 혈장 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 재조합체 VWF, VWF의 생물학적 활성 유도체, 및 그의 이량체 및 다량체로 구성된 군에서 선택된 VWF 분자를 제공하고;
- b) 상기 VWF 분자 상의 탄수화물 기를 산화 효소와 접촉시켜 상기 VWF 상에 산화된 탄수화물 잔기를 형성하고;
- c) 상기 VWF 상의 산화된 탄수화물 잔기를 히드라지드 기를 함유한 PEG 반응물과 접촉시키고;
- d) 상기 PEG 잔기를 상기 VWF에 공유 결합시켜 상기 구조물을 형성하는 것을 포함하고, 여기에서 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 증가되고, 상기 구조물이 적어도 하나의 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체에 결합할 수 있는 것인, VWF 분자 및 상기 VWF 분자 상의 적어도 하나의 탄수화물 기에 공유 결합된 PEG 잔기를 포함하는 단백질성 구조물의 형성 방법.

청구항 118

제117항의 방법에 의해 제조된 단백질성 구조물.

청구항 119

제118항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 1.5배 이상 증가된 것인

구조물.

청구항 120

제118항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 2배 이상 증가된 것인 구조물.

청구항 121

제118항에 있어서, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될 때, 상기 구조물에 결합되지 않은 상기 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비해 1.5배 이상 증가되는 단백질성 구조물.

청구항 122

제118항에 있어서, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될 때, 상기 구조물에 결합되지 않은 상기 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비해 2배 이상 증가되는 단백질성 구조물.

청구항 123

- a) 혈장 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 재조합체 VWF, VWF의 생물학적 활성 유도체, 및 그의 이량체 및 다량체로 구성된 군에서 선택된 VWF 분자를 제공하고;
- b) 상기 VWF 분자를 PEG 반응물과 접촉시켜 용액을 형성하고;
- c) 상기 용액을 관류 챔버에 놓아서, 연동 펌프의 사용에 의해 상기 VWF 분자 상에서 전단 응력을 발생시키고;
- d) 상기 PEG 반응물을 상기 VWF에 공유 결합시켜 상기 구조물을 형성하는 것을 포함하고, 여기에서 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 증가되고, 상기 구조물이 적어도 하나의 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체에 결합할 수 있는 것인, VWF 분자 및 상기 VWF 분자에 공유 결합된 PEG 잔기를 포함하는 단백질성 구조물의 형성 방법.

청구항 124

제123항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 N-히드록시숙신아미드-에스테르, PEG 카르보네이트, 카르복실기를 함유하는 PEG 유도체, 및 아미노기를 함유하는 PEG 유도체로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 125

제123항에 있어서, 상기 PEG 반응물이 PEG-숙신이미딜 숙시네이트, PEG-숙신이미딜 글루타레이트, PEG-숙신이미딜 부타노에이트, PEG-숙신이미딜 헥사노에이트, 가수분해 감수성 에스테르 또는 아미드 결합을 통해 연결된 가수분해가능한 PEG, mPEG-(카르복시메틸)-3-히드록시-부탄산 N-히드록시숙신아미드 에스테르, PEG-p-니트로페닐 카르보네이트, 및 PEG-숙신이미딜 카르보네이트로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 126

제123항의 방법에 의해 제조된 단백질성 구조물.

청구항 127

제126항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 1.5배 이상 증가된 것인 구조물.

청구항 128

제126항에 있어서, 상기 구조물의 생체내 반감기가 VWF 분자의 생체내 반감기에 비해 2배 이상 증가된 것인 구조물.

청구항 129

제126항에 있어서, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될 때, 상기 구조물에 결합되지 않은 상기 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비해 1.5배 이상 증가되는 구조물.

청구항 130

제126항에 있어서, FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기가, 상기 구조물에 결합될 때, 상기 구조물에 결합되지 않은 상기 FVIII 분자 또는 FVIII의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기에 비해 2배 이상 증가되는 구조물.

청구항 131

제10항에 있어서, 상기 적어도 하나의 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자가 상기 VWF 또는 VWF의 생물학적 활성 유도체의 탄수화물 잔기에 결합되는 것인 단백질성 구조물.

청구항 132

제10항에 있어서, 상기 적어도 하나의 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자가 상기 VWF 또는 VWF의 생물학적 활성 유도체의 리신 잔기에 결합되는 것인 단백질성 구조물.

청구항 133

제10항에 있어서, 상기 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자가 폴리(알킬렌 글리콜), 폴리(프로필렌 글리콜), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀 알콜), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카라이드), 폴리(α -히드록시 산), 폴리(비닐 알콜), 폴리포스파스파젠, 폴리옥사졸린 및 폴리(N-아크릴로일모르폴린)으로 구성된 군에서 선택되는 것인 단백질성 구조물.

청구항 134

제10항에 있어서, 상기 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자가 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 그의 유도체인 단백질성 구조물.

청구항 135

제10항에 있어서, 상기 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자가 폴리시알산(PSA) 또는 그의 유도체인 단백질성 구조물.

청구항 136

제10항에 있어서, 상기 구조물에 포함된 상기 VWF가 VWF의 일차 지혈에서 생물학적 활성을 유지하고, 상기 생물학적 활성은 혈소판 상 및 세포외 매트릭스의 성분 상의 수용체에 결합하는 것을 포함하며, 상기 성분이 콜라겐을 포함하는 것인 단백질성 구조물.

청구항 137

제10항에 있어서, 상기 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자가 폴리(알킬렌 글리콜), 폴리(프로필렌 글리콜), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀 알콜), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카라이드), 폴리(α -히드록시산), 폴리(비닐 알콜), 폴리포스파스파젠, 폴리옥사졸린 및 폴리(N-아크릴로일모르폴린)으로 구성된 군에서 선택되는 것인 단백질성 구조물.

청구항 138

제25항에 있어서, 상기 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자가 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 그의 유도체인 복합체.

청구항 139

제26항에 있어서, 상기 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자가 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 그의 유도체인 복합체.

청구항 140

제26항에 있어서, 상기 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자가 폴리시알산(PSA) 또는 그의 유도체인 복합체.

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은, 혈장 및/또는 재조합 폰 빌레브란트 인자(VWF)를 포함하는 단백질성 구조물에 관한 것이고, 상기 VWF는 적어도 하나의 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자뿐만 아니라 상기 단백질성 구조물과 적어도 하나의 인자 VIII (FVIII) 단백질 간의 복합체에 결합된다. 또한, 본 발명은 FVIII 또는 VWF의 적어도 하나의 기능적 결손 또는 결함과 연관된 출혈성 질병을 가진 포유동물의 혈액에서 VWF 또는 FVIII의 생체내 반감기를 연장하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- <2> VWF는 포유동물의 혈장에 존재하는 다량체 부작성 당단백질이며, 여러 생리적 기능을 갖고 있다. 일차 지혈 동안에, VWF는 혈소판 표면 상의 특정한 수용체와 콜라겐과 같은 세포외 매트릭스의 성분 사이에서 매개체로서 작용한다. 또한, VWF는 전구혈액응고제 FVIII를 위한 담체 및 안정화 단백질로서 작용한다. VWF는 내피 세포 및 거대핵세포에서 2813개 아미노산 전구체 분자로서 합성된다. 전구체 폴리펩티드인 프리-프로-VWF는 성숙한 혈장 VWF에서 발견되는 22-잔기 시그널 펩티드, 741-잔기 프로-펩티드 및 2050-잔기 폴리펩티드로 구성된다 [Fischer 등, FEBS Lett. 351: 345-348, 1994]. 혈장으로의 분비 시에, VWF는 상이한 분자 크기를 가진 다양한 종의 형태로 순환된다. 이러한 VWF 분자는 2050 아미노산 잔기의 성숙한 소단위의 올리고- 및 다량체로 구성된다. VWF는 보통 하나의 이량체 내지 50-100개 이량체로 구성된 다량체로서 혈장에서 발견될 수 있다 [Ruggeri 등, Thromb.Haemost. 82: 576-584, 1999]. 인체 순환에서 인간 VWF의 생체내 반감기는 대략 12 내지 20시간이다.
- <3> 인간에서 가장 빈번하게 유전되는 출혈성 질병은 폰 빌레브란트 병(VWD)이고, 이것은 혈장 또는 재조합 기원의 농축물을 함유하는 VWF로의 대체 요법에 의해 치료될 수 있다. 혈액에서 VWF의 짧은 반감기에 기인하여, VWF의 연장된 생체내 반감기를 가진 VWF 농축물을 개발하는 것이 강하게 요구되고 있다. 적어도 하나의 FVIII 및 VWF의 기능적 결손 또는 결함과 연관된 출혈성 질병을 가진 환자의 치료를 위해 빈번한 재-투여를 필요로 하는, 대략 8 내지 12시간의 비교적 짧은 생체내 반감기를 가진 FVIII에도 동일하게 적용된다.
- <4> 선행 기술에서, 진핵 세포 배양액에서 생성된 재조합 VWF (rVWF)는 혈장-유래 VWF에 비하여 더욱 무손상 상태이고, 단백질분해적으로 덜 분해된 것으로 설명되어 있다 [Fisher 등, FEBS Lett. 375: 259-262, 1995]. EP 0 784 632호는 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 재조합 VWF를 정제함으로써 고 순도 VWF를 분리하기 위한 방법을 설명하고 있다. 동종 및 구조적으로 무손상 상태의 VWF를 대규모 생산하기 위한 방법이 당 기술분야에 공지되어 있다 [Schlokot 등, Biotechnol. Appl. Biochem. 24: 257-267, 1996; Fischer 등, CMLS 53: 943-950, 1997]. 재조합 VWF는 폰 빌레브란트 질병(VWD)의 개, 쥐 및 돼지 모델을 사용함으로써 특징화되었다 ([Turecek 등, Blood 90: 3555-3567, 1997]; [Roussi 등, Blood Coag. Fibrinol. 9: 361-372, 1998]; [Schwarz 등, Haemophilia 4: 53-62, 1998; Schwarz 등, Semin. Thromb.Hemost. 28:215-225, 2002]). WO 00/49047호는 프로-VWF를 트롬빈으로 처리함으로써 VWF 제제를 생성하는 방법을 설명한다. 담체 상에 고정화된 rVWF를 사용함으로써 VWF에 결합하는 단백질의 정제 방법이 WO 98/25969호에 개시되어 있다. 혈액 응고 질병을 치료하기 위한, 혈장 유래 및 재조합 VWF 프로-펩티드 (프로-VWF)의 제약학적 용도가 EP 0 977 584에 기재되어 있다. US 6,037,452호는 링커 또는 결합제를 통하여 폴리(알킬렌 옥사이드)에 FVIII 및 인자 IX(FIX)의 결합을 기재하고 있다. EP 0 774 261호에서, 연장된 생물학적 생체내 반감기를 가진 재조합 VWF의 사용은 포유동물의 혈액에서 FVIII를 안정화하고 내인성 FVIII의 생성을 유도하는 것으로 밝혀졌다. 그럼에도 불구하고, VWF- 또는 FVIII-기초 출혈성 질병을 가진 환자를 위해 VWF 및 FVIII의 생체내 반감기를 더욱 증가시키는 것이 요구되고 있다.
- <5> VWF는 생체내에서 FVIII를 안정화시키고, 따라서 FVIII의 혈장 수준을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 그 결과 일차 및 이차 지혈을 조절하기 위한 중심 인자이다. 또한, VWF를 함유하는 치료적 생

성물의 적용 후에, 24 시간에서 ml 당 1 내지 3개 단위까지 내인성 FVIII:C의 증가는 FVIII에 대한 VWF의 생체 내 안정화 효과를 나타내는 것으로 관찰될 수 있음이 알려졌다.

<6> 혈우병 A로서 알려진 응고 FVIII에서의 결함 및/또는 VWD로 알려진 VWF의 정성적 또는 정량적 결함의 치료 스펙트럼을 넓히기 위해 새로운 물질이 강력히 요구되고 있다. 기능적 VWF의 결핍으로 인하여, VWD를 가진 환자는 정상 미만의 FVIII 혈장 수준으로 표시되는 FVIII의 이차 결손을 갖는다. VWD의 유형 및 질병의 심각성에 의존하여, FVIII 수준이 다양할 수 있지만, 일반적으로 건강한 사람에서 발견되는 FVIII 혈장 수준보다 상당히 낮다.

<7> 따라서, 본 발명은 포유동물의 혈액에서 VWF 및/또는 FVIII의 생체 내 반감기를 연장하기 위한 신규 체계를 제공한다. 본 발명의 추가의 목적은, FVIII 및 VWF의 하나 또는 양쪽 모두의 기능적 결손 또는 결함과 관련된 출혈성 질병의 개선된 치료를 위한 방법을 제공하는 데 있다.

발명의 상세한 설명

<8> 발명의 요약

<9> 본 발명은 혈장 및/또는 재조합 폰 빌레브란트 인자(VWF) 또는 그의 생물학적 활성 유도체를 포함하는 단백질성 구조물에 관한 것이며, 상기 VWF 또는 상기 생물학적 활성 유도체는 하나 이상의 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자에 결합되고, 여기에서 단백질성 구조물의 생체 내 반감기는 포유동물, 특히 인간의 혈액에서 연장된다. 또한, 본 발명은 상기 단백질성 구조물과 적어도 하나의 인자 FVIII (FVIII) 단백질 또는 그의 생물학적 활성 유도체 간의 복합체에 관한 것이며, 여기에서 상기 FVIII 단백질 또는 그의 생물학적 활성 유도체의 생체 내 반감기는 포유동물의 혈액에서 연장된다. 추가로, 본 발명에 따르면, 상기 단백질성 구조물 또는 상기 복합체를 함유하는 제약 조성물뿐만 아니라, 상기 단백질성 구조물 또는 상기 복합체를 사용하여 FVIII 및 VWF의 적어도 하나의 기능적 결손 또는 결함과 연관된 출혈성 질병을 가진 포유동물의 혈액에서 VWF 또는 FVIII의 생체 내 반감기를 연장시키기 위한 방법이 제공된다. 단백질 구조물의 제조 방법이 또한 제공된다.

<10> 본 발명의 상세한 설명

<11> 본 발명의 한가지 측면은, 혈장 및/또는 재조합 VWF 또는 그의 생물학적 활성 유도체를 포함하는 단백질성 구조물 (하기에서 "중합체-VWF-접합체"로서 표시됨)에 관한 것이며, 상기 VWF 또는 그의 생물학적 활성 유도체는 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자의 하나 이상의 유형에 결합되고, 여기에서 상기 VWF 또는 상기 생물학적 활성 유도체의 생체 내 반감기는 포유동물의 혈액에서 연장된다.

<12> 본 발명의 추가의 측면은, 2가지 주요 약리학적 메커니즘에 따르는 중합체-VWF-접합체, 및 상기 2가지 형태 사이에서 특징을 가진 중합체-VWF-접합체의 형태를 제공하는 데 있다. 한가지 형태는 VWF에 접합된 중합체를 안정적으로 담지하고, 포유동물에 적용 후에 시간에 걸쳐 완전한 분자로서 제거될 것이다. 다른 형태는 VWF에 접합된 중합체의 가역성을 특징으로 한다. 포유동물에 투여 후에, VWF에 결합된 중합체 분자는 VWF로부터 점차적으로 방출되고, 비-접합 VWF는 약리학적 작용제로서 이용가능해질 것이다. 방출 특징은 접합 화학 및 VWF에 결합된 중합체 분자의 조성물 및 구조에 의존될 것이다.

<13> 중합체-VWF 접합체는 VWD의 치료를 위해 단독으로 유용하거나 또는 증가된 반감기를 위해 FVIII를 안정화하기 위하여 FVIII와 조합되어 사용되거나, 또는 양쪽 모두이다. VWD의 치료를 위해 단독으로 사용될 때, 접합체는 2가지 형태 중의 하나를 취할 수도 있다. 첫번째 형태는 VWF에 방출가능하게 결합된 경우이다. 이러한 방식으로, VWF는 중합체가 방출되거나 분해될 때 활성화된다. 두번째 형태는, VWF에 결합된 중합체 농도가 VWF 활성을 방해하지 않는 정도인 경우이다. 접합체가 FVIII와 결합하고 이를 안정화하기 위해 제조될 때, VWF의 결합 영역을 방해하지 않도록 VWF에 결합된 중합체의 결합 정도 또는 수준이 제공된다. 실시예에 나타난 바와 같이, VWF 및 FVIII 결합 능력을 방해하지 않으면서 VWF로의 만족스런 중합체 접합이 달성될 수 있다. FVIII에 결합하는 VWF의 능력을 유지하면서 VWF 활성을 유지하기 위해 중합체 접합 정도가 조절되거나 변형될 수 있다. 이러한 형태에서, 중합체-VWF 접합체는 증가된 반감기를 위해 FVIII를 안정화하면서 치료적 활성 VWF를 제공한다.

<14> 본 발명을 위해 유용한 VWF 및 FVIII 분자는 전체 길이 단백질, 단백질의 전구체, 단백질의 소단위 또는 단편, 및 그의 기능적 유도체를 포함한다. VWF 및 FVIII 또는 FVIII의 언급은, 이러한 단백질의 모든 가능한 형태를 포함하는 것을 의미한다.

<15> 여기에서 사용된 "생물학적 활성 유도체"는 상기 분자의 실질적으로 동일한 기능적 및/또는 생물학적 성질, 예컨대 결합 성질, 및/또는 펩티드 주쇄 또는 기본 중합체 단위와 같은 동일한 구조적 기초를 가진 분자의 유도체

를 포함한다.

<16> 본 발명을 위해 유용한 VWF는 단량체 및 다량체 형태를 포함하여 모든 가능한 형태를 포함한다. VWF의 한가지 특히 유용한 형태는 적어도 2개의 VWFs의 단독-다량체이다. VWF 단백질은 생물학적 활성 유도체일 수도 있거나, 또는 FVIII를 위한 안정화제로서 단독으로 사용될 때 VWF는 생물학적으로 활성이 아닌 형태일 수도 있다. 본 발명은 조합되어 사용되어지는 VWF의 상이한 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 예를 들어, 본 발명을 위해 유용한 조성물은 상이한 다량체, 상이한 유도체, 및 생물학적 활성 유도체 및 생물학적으로 활성이 아닌 유도체의 양쪽 모두를 포함할 수도 있다. 일차 지혈에서 VWF는 혈소판과 세포외 매트릭스의 특정 성분, 예컨대 콜라겐 간의 다리로서 작용한다. 이러한 과정에서 VWF의 생물학적 활성은 2가지 상이한 시험관내 분석에 의해 측정될 수 있다 [Turecek 등, Semin. Thromb. Hemost. 28: 149-160, 2002]. 리스토세틴 보조인자 분석은, VWF의 존재하에서 항생물질 리스토세틴에 의해 유도되는 신전 혈소판 또는 포르말린-고정 혈소판의 응집을 기초로 한다. 혈소판 응집 정도는 VWF 농도에 의존되고, 비탁 방법에 의해, 예를 들어 응집측정기의 사용에 의해 측정될 수 있다 ([Weiss 등, J.Clin.Invest. 52: 2708-2716, 1973]; [Macfarlane 등, Thromb. Diath. Haemorrh. 34: 306-308, 1975]). 두 번째 방법은 콜라겐 결합 분석이고, 이것은 ELISA 기술을 기초로 한다 ([Brown et Bosak, Thromb. Res. 43: 303-311, 1986]; [Favaloro, Thromb. Haemost. 83: 127-135, 2000]). 마이크로적정 플레이트를 유형 I 또는 III 콜라겐으로 코팅한다. 이어서, VWF를 콜라겐 표면에 결합하고, 이어서 효소-표지화 다클론성 항체로 검출한다. 마지막 단계는 기질 반응이고, 이것은 ELISA 판독기로 광도 측정에 의해 검사할 수 있다.

<17> 여기에서 사용된 바와 같이, "혈장-유래 VWF (pdVWF)"는, 적어도 하나의 FVIII 분자의 생체내-안정화, 예를 들어 결합 성질을 가진 포유동물로부터 수득된 성숙한 VWF를 포함하는, 혈액에서 발견되는 단백질의 모든 형태를 포함한다. 그러나, 본 발명은 성숙한 VWF에 제한되지 않는다. 상기 pVWF의 하나의 생물학적 활성 유도체는 프로-펩티드를 함유하는 프로-VWF이다. 본 발명을 위해 유용한 VWF의 다른 형태는 내피 세포 및 거대핵세포에 의해 합성되는 전구체 VWF 분자 (프리-프로-VWF를 포함하는 비성숙 VWF), 및/또는 각각 전구체 분자의 시그널 펩티드 및 프로-펩티드의 분해 시에 수득되는 VWF 프로펩티드 (프로-VWF) 및/또는 성숙한 pdVWF를 포함한다. pdVWF의 생물학적 활성 유도체의 추가의 예는, 생물학적 활성 형태로 처리되거나 전환되는 전구-약물, 또는 끝이 절단된 형태, 결실을 가진 형태, 치환을 가진 형태, 전구-형태 이외의 첨가를 가진 형태, 성숙한 형태의 단편, 키메라 형태, 및 천연 형태에 비해 후-번역 변형을 가진 형태와 같이 생물학적으로 활성인 전구-약물을 포함한다. 본 발명을 위해 유용한 pdVWF는 생물학적 활성이 아닌 형태를 포함한다. 이것은 성숙한 VWF 또는 혈액에서 발견되는 다른 천연 발생 형태의 변형에 의해 달성될 수 있다. 본 발명을 위해 유용한 VWF의 원천은 돼지 및 인간 변형체를 포함한 포유동물이다.

<18> 여기에서 사용된 바와 같이, "재조합 VWF (rVWF)"는 재조합 DNA 기술을 통해 수득된 VWF를 포함한다. 유용한 rVWF의 하나의 형태는 적어도 하나의 FVIII 분자의 생체내-안정화, 예를 들어 결합 성질을 적어도 갖고, 약리학적으로 허용가능한 당화 패턴을 임의로 갖는다. 그의 특정한 예는 단백질분해에 대해 내성인 A2 도메인을 갖지 않는 VWF를 포함하고 [Lankhof 등, Thromb. Haemost. 77: 1008-1013, 1997], Val449 내지 Asn730의 VWF 단편은 콜라겐 및 헤파린에 대한 당단백질 Ib-결합 도메인 및 결합 부위를 포함한다 [Pietu 등, Biochem.Biophys. Res. Commun. 164: 1339-1347, 1989]. 적어도 하나의 FVIII 분자를 안정화하는 능력의 결정은, 당 기술상태에 알려진 방법에 따라 VWF-결합 포유동물에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 하기 실시예 8에 기재된 바와 같이, VWF-결합 생쥐를 꼬리 정맥을 통해 VWF로 정맥내 처리하고, 그들의 혈장에서 FVIII 활성 수준을 시간에 따라 측정한다. FVIII 활성의 수준은 예를 들어 유럽 약전 (Ph. Eur. 제3판, 1997:2.7.4.)에 공개된 바와 같은 발색 분석법에 의해 측정될 수 있다.

<19> FVIII를 함유하는 샘플 (FVIII:C)을 칼슘을 함유한 완충액 중에서 트롬빈, 활성화 인자 IX (FIXa), 인지질 및 인자 X (FX)와 혼합한다. FVIII가 트롬빈에 의해 활성화되고 이어서 인지질, FIXa 및 칼슘 이온과 복합체를 형성한다. 이러한 복합체는 FX를 FXa로 활성화하고, 이것은 다시 발색 기질 (예, $(\text{AcOH}^+\text{CH}_3\text{OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA})$)을 절단한다. 방출된 파라-니트로아닐린 (pNA)의 시간 경과를 405nm에서 측정한다. 반응의 경사는 샘플 중의 FVIII 농도에 비례한다.

<20> 본 발명의 rVWF는 당 기술분야에 공지된 방법에 의해 생성될 수 있다. 한가지 특별한 예는 재조합 VWF를 생성하는 방법에 관하여 WO 86/06096 (1986년 10월 23일 발행) 및 미국 특허출원 07/559,509호 (Ginsburg 등의 이름으로 1990년 7월 23일 출원) (이들은 여기에서 참고문헌으로 포함된다)에 개시되어 있다. 이것은 (iv) 예를 들어 음이온 교환 크로마토그래피 또는 친화력 크로마토그래피를 통한 정제된 rVWF를 수득하기 위하여, (i) 예

를 들어 RNA의 역 전사 및/또는 DNA의 증폭을 통한 유전공학에 의한 재조합 DNA의 생성, (ii) 예를 들어 일렉트로포레이션 또는 미세주입을 통한 트랜스펙션에 의해 원핵 또는 진핵 세포 내로 재조합 DNA의 도입, (iii) 예를 들어, 연속 또는 회분식 방식으로 상기 형질전환된 세포의 배양, (iv) 예를 들어 구조적으로 또는 유도 시에 VWF의 발현, 및 (v) 예를 들어 배양 배지로부터 또는 형질전환된 세포를 수집함으로써 상기 VWF의 단리를 위해 당 기술분야에 공지된 방법을 포함할 수도 있다.

<21> 약리학적으로 허용가능한 VWF 분자를 생성함을 특징으로 하는 적절한 원핵 또는 진핵 숙주 체계에서의 발현에 의해 rVWF를 생성할 수 있다. 진핵 세포의 예는 포유동물 세포, 예컨대 CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep 및 HepG2이다. 본 발명에 따라 VWF를 생성하거나 단리하기 위해 사용되는 반응물 또는 조건에 특별한 제한이 없고, 당 기술분야에 공지되어 있거나 통상적으로 입수가능한 어떠한 체계라도 사용할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현양태에서, 당 기술분야에 기재된 것과 같은 방법에 의하여 rVWF가 수득된다.

<22> rVWF의 제조를 위하여 다양한 종류의 벡터가 사용될 수 있고, 진핵 및 원핵 발현 벡터로부터 선택될 수 있다. 원핵 발현을 위한 벡터의 예는 pRSET, pET, pBAD 등과 같은 플라스미드를 포함하고, 원핵 발현 벡터에서 사용된 프로모터는 lac, trc, trp, recA, araBAD 등을 포함한다. 진핵 발현을 위한 벡터의 예는 (i) 효모에서의 발현을 위하여, AOX1, GAP, GAL1, AUG1 등과 같은 프로모터를 사용한 pAO, pPIC, pYES, pMET; (ii) 곤충 세포에서의 발현을 위하여, PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh 등과 같은 프로모터를 사용하는 pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC 등과 같은 벡터; 및 (iii) 포유동물 세포에서의 발현을 위하여, CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV 및 β -액틴과 같은 프로모터를 사용하는 pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV 등, 및 백시니아 바이러스, 아데노-결합 바이러스, 헤르페스 바이러스, 레트로바이러스 등으로부터 유래된 벡터를 포함한다.

<23> 본 발명에서 유용한 FVIII는 전체 길이 FVIII를 포함한 생물학적 활성 형태 및 응집 FIX의 활성화에서 보조인자로서 작용하는 능력 및 VWF와의 복합체를 형성하는 능력을 가진 유도체를 포함한다. 본 발명에 따라 사용되는 FVIII는 플라스마-유래 FVIII (pdFVIII) 또는 재조합 FVIII (rFVIII) 또는 생물학적 활성 유도체일 수도 있다. pdFVIII 및 rFVIII는 당 기술분야에 공지된 방법에 의해 생성될 수도 있다. PdFVIII는 임의의 적절한 수단에 의해 정제될 수도 있다. 하나의 유용한 방법은 미국 특허 5,470,954호 (참고문헌에 의해 포함됨)에 기재되어 있다. rFVIII 단백질은 임의의 적절한 수단에 의해 제조될 수도 있다. 이러한 rFVIII의 예는 리콤비네이트 (RECOMBIMATE) 및 애드베이트(ADVATE) (양쪽 모두 백스터 헬스케어 코포레이션에 의해 제조 및 시판됨); 리팩토 (REFACTO) (이에쓰 코포레이션(Wyeth Corporation)에 의해 제조 및 시판되는 FVIII의 B-도메인 결실 형태); 및 코제네이트(KOGENATE) (바이엘 코포레이션에 의해 제조 및 시판됨)을 포함한다. rFVIII의 방법 및 예는 미국 특허 4,757,006호; 4,965,199; 및 5,618,788호 (이들 모두는 참고문헌으로 포함된다)에 기재되어 있다.

<24> 여기에서 사용된 바와 같이, "생리학적으로 허용가능한 중합체"는 수용액 또는 현탁액에 가용성이고 제약학적으로 유효한 양으로 중합체-VWF-접합체의 투여 시에 포유동물에 부정적인 영향, 예컨대 부작용을 갖지 않는 중합체를 포함한다. 본 발명에 따라 사용되는 생리학적으로 허용가능한 중합체에 특별한 제한이 없다. 중합체는 전형적으로 바람직하게는 2 내지 약 300개 반복 단위를 가진 것을 특징으로 한다. 이러한 중합체의 예는, 이에 한정되지 않지만 폴리(알킬렌 글리콜), 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리(프로필렌 글리콜) (PPG), 에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜의 공중합체 등, 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀 알콜), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카라이드), 폴리(α -히드록시산), 폴리(비닐 알콜), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리(N-아크릴로일모르폴린), 및 이들의 조합을 포함한다.

<25> 생리학적으로 허용가능한 중합체는 특정한 구조에 제한되지 않으며, 선형 (예, 알록시 PEG 또는 이작용성 PEG), 분지쇄 또는 다중-팔 (예, 갈래진 형태의 PEG 또는 폴리올 코어에 부착된 PEG), 수지상, 또는 분해가능한 결합일 수 있다. 또한, 중합체의 내부 구조는 다수의 상이한 패턴으로 구성될 수 있고, 단독중합체, 교대 중합체, 랜덤 공중합체, 블록 공중합체, 교대 삼원공중합체, 랜덤 삼원공중합체 및 블록 삼원공중합체로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

<26> 이러한 중합체는 폴리(알킬렌 옥사이드)중합체, 폴리(말레산), 폴리(DL-알라닌), 예컨대 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 히알루론산 및 키틴, 및 폴리(메트)아크릴레이트를 포함한다.

<27> 본 발명의 구현양태에서, 생리학적으로 허용가능한 중합체는 PEG 및 그의 유도체이다. PEG 측쇄는 직쇄, 분지쇄, 갈래진 형태일 수 있거나, 여러 개의 팔로 구성될 수 있다. 본 발명에 따라 사용되는 PEG의 특별한 제한이 없다. 특히 유용한 PEG는 3,000 내지 20,000 범위의 분자량을 갖는다. 공공 소유 상태에 있는, 다시말해서 결코 특허받지 않거나 현재 특허 만료된 몇 가지 유용한 PEG 분자가 존재한다. 다른 유용한 PEG 분자는 예를 들어 WO 03/040211; US 6,566,506; US 6,864,350; 및 US 6,455,639에 개시되어 있다.

- <28> 본 발명의 다른 구현양태에서, 생리학적으로 허용가능한 중합체는 폴리시알산(PSA) 및 그의 유도체이다. PSA는 US 4,356,170 (여기에서 참고문헌으로 포함된다)에 기재된 방법에 의해 VWF에 결합될 수 있다. 본 발명의 하나의 구현양태에서, 다당류 화합물은 천연 발생 다당류, 천연 발생 다당류의 유도체, 또는 천연 발생 다당류 유도체일 수도 있다. 화합물의 다당류 부분은 중합체 사슬에 5개 이상, 전형적으로 10개 이상, 다른 구현양태에서 적어도 20 내지 50개 시알산 잔기를 갖는다. 쉽게 입수가 가능한 다당류 화합물은 전체 500개 이하의 사카라이드 잔기를 가질 수도 있지만, 중합체 사슬에서 300개 잔기보다 더 적게 가질 수도 있다. 일반적으로, 화합물 중의 모든 사카라이드 잔기는 시알산 잔기이다.
- <29> 하나의 구현양태에서, 다당류 화합물의 적어도 폴리시알산 부분은 고 친수성이다. 친수성은 시알산 단위의 매달린 카르복실기뿐만 아니라 히드록실기에 의해 주로 부여된다. 사카라이드 단위는 다른 작용기, 예컨대 아민, 히드록실 또는 설페이트기, 또는 이들의 조합을 함유할 수도 있다. 이러한 기는 천연 발생 사카라이드 화합물 위에 존재할 수도 있거나, 또는 유도체 다당류 화합물 내로 도입될 수 있다.
- <30> 본 발명을 위해 특별히 사용되는 다당류 화합물은 세균에 의해 생산되는 것이다. 천연 발생 다당류의 일부는 당지질로 알려져 있다. 다당류 화합물이 실질적으로 말단 갈락토스 단위를 갖지 않는 것이 특히 유리하며, 이는 간세포 및 쿠프퍼(Kupffer) 세포의 갈락토스 수용체에 의해 인식되는 경향이 있다.
- <31> VWF 다량체는 당 기술분야에 공지된 다양한 기술에 의해 다당류 화합물에 공유 결합될 수도 있다. 그의 예는 VWF 또는 다당류의 하나 위에 있는 카르복실기와 다른 것의 아민기 사이의 펩티드 결합을 통한 연결, 또는 하나의 카르복실기와 다른 것의 히드록실기 사이의 에스테르 결합을 통한 연결을 포함한다. 대안적으로, 하나의 아미노기와 다른 것의 알데히드기 사이에서 슈프(Schiff) 염기가 형성될 수 있다. 다른 연결 메커니즘은 당 기술 분야 범위 내에 있다. 다양한 실시예는 미국 특허 5,846,951호 (이것은 참고문헌으로 포함됨)의 컬럼 7, 15행 내지 컬럼 8, 5행에서 확인된다.
- <32> 여기에서 사용된 바와 같이, 하나 이상의 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자에 결합되는 VWF에 관한 언급은 적절한 화학 결합, 예컨대 공유 결합 또는 비-공유 결합, 예컨대 이온성, 소수성, 친화성, 생체친화성 상호작용을 포함한다. 중합체는 이작용성 반응물의 사용에 의해, 그리고 스페이서 팔을 통해 단백질에 결합될 수 있다. 또한, 중합체 분자는 친화성 상호작용에 의해 VWF에 결합될 수 있다. 예를 들어, VWF는 비오틴화될 수 있고, 아비딘 또는 스트렙아비딘 공액 중합체가 VWF에 결합될 수 있다. 또한, 다클론성 또는 단클론성 항-VWF 항체뿐만 아니라 그의 단편이 중합체에 결합될 수 있고, 이러한 복합체가 VWF에 결합될 수 있다. 중합체는 또한 효소적 방법, 예를 들어 미국 특허 6,379,933호에 교시된 폴리글리코실트랜스퍼라제에 의한 사카라이드의 전달, 또는 US 2004 0132640 A1에 교시된 것과 같은 글리코PEG화 (상기 특허 모두는 여기에서 참고문헌으로 포함됨)에 의하여 VWF에 결합될 수 있다. 다른 접근법은 PEG화 콜라겐 또는 콜라겐 단편을 VWF의 A1 및 A3 도메인에 결합하는 것과 같은 생물학적 기능을 기초로 하여 VWF에 중합체를 결합시키는 것이다. 이러한 목적을 위하여, VWF와의 강력한 상호작용을 나타내는, 예를 들어 인간 태반으로부터 유형 I 및 III으로부터의 콜라겐이 사용될 수 있다. 중합체의 결합은 단백질성 구조물의 생체내 적용 후에 안정하거나 가역적일 수도 있다.
- <33> 여기에서 사용된 바와 같이, "PEG화 VWF"는 하나 이상의 PEGs에 결합된 VWF를 포함하고, 여기에서 사용된 "PEG화"는 하나 이상의 PEG를 VWF에 결합시키는 과정을 포함한다. PEG화의 적절한 방법은 미국 특허 5,122,614호 및 5,539,063호 (PEG화 방법의 모두는 참고문헌으로 포함된다)에 개시되어 있다.
- <34> 본 발명의 구현양태에 따르면, 생리학적으로 허용가능한 중합체는 PEG 또는 PEG 유도체이고, 이것은 당 기술분야에 공지된 전략 및 방법에 의해 VWF에 공유 결합된다. 가장 일반적으로 변형 전략은 리신 잔기의 아미노기를 통한 적어도 하나의 중합체 분자의 결합, 탄수화물 측쇄를 통한 적어도 하나의 중합체 분자의 결합, 술포히드릴기를 통한 적어도 하나의 중합체 분자의 결합, 아스파르트산 및 글루탐산의 카르복실기를 통한 적어도 하나의 중합체 분자의 결합 뿐만 아니라 히드록실기의 적어도 하나의 중합체 분자의 결합 및 N-말단의 적어도 하나의 중합체 분자의 결합이다.
- <35> 본 발명의 하나의 구현양태에서, VWF에 적어도 하나의 중합체 분자의 결합은 VWF의 리신 측쇄의 아미노기에 상기 중합체 분자를 공유 결합시킴으로써 수행될 수 있다. 인간 VWF는 측쇄에 NH₂기를 가진 자유 108개 리신 잔기를 함유하고, 이것은 적어도 하나의 중합체 분자의 결합에 민감하다. 본 발명에 따라 중합체 분자가 공유 결합될 수도 있는 VWF의 리신 잔기의 예는 도 1A에 나타난다. VWF의 리신 잔기에 공유 결합될 수도 있는 적절한 PEG 유도체는 예를 들어 숙신이미딜 숙시네이트, 숙신이미딜 글루타레이트 또는 숙신이미딜 프로피오네이트와 같은 활성 N-히드록시숙신이미드 에스테르(NHS)와의 폴리에틸렌 글리콜이며, 이것은 아마이드 결합을 형성함으로

써 온화한 조건 하에서 리신 잔기와 반응한다. 활성화 PEG의 다른 예는 숙신이미딜 카르보네이트(SC-PEG) 및 벤조트리아졸 카르보네이트 (BTC-PEG)와 같은 활성 카르보네이트를 가진 것이다 (문헌 [Roberts 등, Advanced Drug Delivery Reviews 54: 459-476, 2002의 463면] 참조). SC-PEG 및 BTC-PEG는 리신 잔기와 우선적으로 반응하여 카르바메이트 결합을 형성하지만, 히스티딘 및 티로신 잔기와 반응하는 것으로 알려져 있다. 대안적인 방법은, 예를 들어 시아노 붕소소화나트륨과의 환원 후에, 적어도 하나의 중합체 분자를 우레탄 결합을 형성하는 PEG 카르보네이트와 또는 2차 아민을 형성하는 알데히드 또는 케톤과 결합시키는 것이다. 우레탄 결합 단백질을 생성하는 다른 PEG 아실화 반응물은 p-니트로페닐 카르보네이트, 트리클로로페닐 카르보네이트 및 카르보닐이미다졸을 포함한다. 이러한 반응물은 클로로포르메이트 또는 카르보닐이미다졸을 모노메톡시PEG (mPEG) 위의 말단 히드록실 기와 반응시킴으로써 제조된다 (상기 Roberts 등의 문헌 464면 참조). 다른 예는 이른바 "2차 생성" PEG화 화학에 관한 것이고, 이에 의해 산성 조건 하에서 mPEG-프로피온알데히드가 N-말단 α-아민을 위해 선택된다 (상기 Roberts 등의 문헌 464면 참조). 생리학적 조건 하에서 문헌 (상기 Roberts 등의 문헌 464면 참조)에 기재된 바와 같이 "비 표지 (no tag)"를 가진 치료용 단백질을 방출하는 접합체를 생성하기 위하여, PEG 말레 안히드라이드, mPEG 페닐 에테르 숙신이미딜 카르보네이트 및 mPEG 벤즈아미드 숙신이미딜 카르보네이트와 같은 방출가능한 PEG 반응물이 사용될 수 있다.

<36> 본 발명의 추가의 구현양태에서, 그의 탄수화물 잔기를 통해 적어도 하나의 중합체 분자에 VWF가 결합될 수 있다. 이것은 예를 들어 탄수화물 사슬의 온화한 산화, 예를 들어 NaIO_4 에 의해 수행될 수 있고, 이것은 알데히드 작용기를 형성하여 PEG-히드라이드와 같은 PEG에 결합한다. 이러한 절차의 장점은, 콜라겐 결합 부위를 포함하고 따라서 VWF의 생물학적 활성을 위해 중요한 영역인 VWF의 A1 및 A3 루프가 탄수화물 잔기를 함유하지 않고 도 1B에서 볼 수 있듯이 이러한 절차에 의해 변형되지 않을 수도 있다는 사실을 기초로 한다. 이러한 도면은 아스파라긴 N-결합 GlcNAc 및 트레오닌- 또는 세린 O-결합 GalNAc의 예를 나타내고, 이것은 산화되고 이어서 적어도 하나의 중합체 분자에 의해 결합될 수 있다. VWF의 탄수화물이 특정한 영역에 밀집된다는 사실에 기인하여, VWF는 이러한 변형 절차를 사용하여 적어도 하나의 중합체 분자에 의해 부위 지정 결합될 수 있다. 탄수화물 잔기에 대한 중합체의 결합은, VWF의 치료적 활성 형태가 요망될 때 특히 유리하다. 이것은 공지된 방법을 통해 N-연결 또는 O-연결된 잔기에 중합체를 선택적 반응시킴으로써 증진될 수 있다. 예를 들어, 여러 개의 반응성 알데히드 기를 생성하기 위하여 VWF 위의 탄수화물 잔기를 산화시키기 위해 효소 글루코스 산화효소가 사용될 수 있고, 이것은 PEG-히드라이드와 반응되어 히드라존 결합을 생성하거나 또는 PEG-아민과 반응되어 가역적 쉬프 염기를 생성할 수 있다 (예를 들어, 상기 Roberts 등의 문헌 467면 참조). 특정한 조건 하에서, 과요오드화물 산화에 의해 이것을 글리옥실릴 유도체로 전환시킴으로써 부위-특이적 접합을 위해 VWF의 N-말단 세린 또는 트레오닌이 사용될 수 있다 (예를 들어, 상기 Roberts 등의 문헌 467면 참조).

<37> 본 발명의 다른 구현양태는 술포히드릴 기를 통해 적어도 하나의 중합체 분자를 VWF에 결합시키는 것이다. 인간 VWF는 177개 자유 SH 기를 갖고, 이것은 예를 들어 안정한 설파이드를 형성하는 PEG 말레이미드에 의해 변형될 수 있다. 시스테인 잔기의 PEG화는 예를 들어 PEG-비닐술포, PEG-요오도아세트아미드 또는 PEG-오르소피리딘 디설파이드를 사용하여 수행될 수 있다 (예를 들어, 상기 Roberts 등의 문헌 466면 참조).

<38> 여러 기능에 따르면, VWF 분자는 특정한 수용체 또는 리간드에 대해 몇 개의 결합 부위를 갖는다 [Girma 등, Thromb Haemost. 74: 156-60, 1995]. 한가지 중요한 결합 부위는 FVIII 결합 도메인이고, 이것은 성숙한 소단위 (아미노산 1-272)의 N-말단에 위치한다. 이러한 에피토프는 자유 FVIII와의 항온처리 및 FVIII/VWF 복합체의 형성에 의해 보호될 수 있다. 이어서, 복합체는 화학적으로 변형되고 (예를 들어, PEG화 또는 폴리시알릴화), 자유 FVIII 결합 부위를 가진 중합체-접합 VWF가 FVIII로부터 분리된다 (예를 들어, 0.3M CaCl_2 또는 2M NaCl과의 크기 배제 크로마토그래피에 의하여). 유사하게, VWF는 고정화 FVIII와 함께 친화성 수지에 결합될 수 있다. 이어서, VWF는 중합체 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리시알산 유도체)와 화학적으로 접합되고, 회분 방식으로 또는 크로마토그래피 컬럼의 사용에 의해 이러한 기질 (예를 들어, 0.3M CaCl_2 또는 2M NaCl과 같은 높은 염 조건 하)로부터 용출된다.

<39> VWF의 FVIII 결합 에피토프는 헤파린-결합 부위와 거의 동일하다. 따라서, FVIII 결합 부위가 봉쇄될 수 있고, VWF를 헤파린에 또는 화학적 변형 절차 동안에 고정화된 헤파린과 함께 친화성 수지에 결합시킴으로써 보호될 수 있다.

<40> 여기에서 사용된 바와 같이, 용어 "인자 VIII-결합-부위-보호제"란, VWF 분자 위의 FVIII 결합 도메인 또는 에피토프에 결합하는 반응물을 가리킨다. 인자 VIII-결합 부위-보호제는 인자 VIII, FVIII의 유도체, 헤파린 및 헤파린의 유도체로부터 선택될 수 있다.

- <41> 본 발명은, 적어도 하나의 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자에 결합되지 않은 VWF의 생체내 반감기에 비하여, VWF 또는 그의 생물학적 활성 유도체의 생체내 반감기를 증가시키는 것에 관한 것이다. 본 발명의 하나의 구현양태에서, VWF의 생체내 반감기가 2배 이상 연장되는 반면, 다른 구현양태에서 생체내 반감기는 3배 이상 증가된다. 또 다른 구현양태에서, 적어도 하나의 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자의 결합에 의하여 생체내 반감기가 5배 증가된다. VWF 반감기의 증가 또는 연장은 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이 FVIII 결합 생쥐에서 VWF의 약동학을 측정함으로써 평가될 수 있다. 간략하게, FVIII 결합 생쥐를 꼬리 정맥을 통해 FVIII와 예비혼합된 VWF의 일시 주사로 처리하고, 다양한 시점에서 혈장 샘플에서 VWF 항원 수준을 측정한다. FVIII 항원뿐만 아니라 VWF 항원은 ELISA 분석을 통해 측정될 수 있다.
- <42> 본 발명의 추가의 측면은 적어도 하나의 중합체-VWF-접합체 및 적어도 하나의 FVIII 분자 간에 형성된 복합체에 관한 것이며, 여기에서 FVIII의 생체내 반감기는 중합체-VWF-접합체에 의해 포유동물의 혈액 중에서 연장된다.
- <43> 중합체-VWF-접합체와 FVIII와의 결합은, 적어도 하나의 생리학적으로 허용가능한 중합체 분자에 연결되지 않은 VWF와의 복합체를 형성하는 FVIII의 생체내 반감기에 비하여, 상기 FVIII의 생체내 반감기를 연장시키거나 증가시킨다. 본 발명의 구현양태에서, FVIII의 생체내 반감기를 1.5배 이상 연장시키고, 다른 구현양태에서 2배 이상, 다른 구현양태에서 3배 이상, 추가의 구현양태에서 5배 이상 동안 연장시킨다.
- <44> 혈우병 A 및/또는 VWD 또는 이러한 2가지 질병의 아형의 치료를 위하여 본 발명의 중합체-VWF-접합체가 사용될 수 있다. VWD의 경우에, 중합체-VWF-접합체의 사용은, 각각 예방 프로토콜 또는 요구시 치료라고 일컬어지는, 규칙적 또는 불규칙적 치료에 의해 VWF 함유 농축물을 사용한 현재의 대체 요법과 유사할 것이다. 중합체-VWF-접합체는 혈우병 A 예방의 보조 치료로서 사용될 수 있다. 이러한 치료 상황 하에서, 중합체-VWF-접합체를 혈장-유래 또는 재조합 FVIII 농축물과는 독립적으로 시간 간격으로 투여할 것이며, 혈우병 A의 규칙적 치료를 위해 현재 사용되는 것과 동일한 것이 일상적으로 주어지지만, 중합체-VWF-접합체의 반감기 연장 능력에 기인하여 치료 간격이 늘어나게 된다.
- <45> 혈우병 A 및 VWD의 예방 및 혈우병 A 및 VWD에서의 급성 출혈의 치료를 위한 본 발명의 하나의 구현양태에서, 중합체-VWF-접합체를 FVIII와 함께 투여하거나 또는 FVIII와의 복합체의 형태로 혈우병 A 또는 VWD를 가진 환자에게 투여할 것이다. 이러한 경우에, VWF 및/또는 FVIII의 낮은 혈장 수준을 치료적 유효 수준으로 증가시킴으로써 내부 또는 외부 출혈의 정지가 즉시 달성되는 것이 필요하다. 억제인자 혈우병으로서 알려진 임상적 상황인, FVIII에 대항하여 또는 VWF에 대항하여 발생한 억제 항체를 근절하기 위하여 면역관용 요법을 위해 중합체-VWF-접합체가 사용될 수 있다. 이러한 상황 하에서, FVIII 또는 VWF에 대항하여 발생한 억제인자를 가진 환자에게 초-생리학 및 초-약리학 수준의 FVIII가 투여된다. 이러한 형태의 치료법은, 비-접합 VWF에 비하여 상기 제제를 받은 환자의 순환에서 보통 높은 회복 및 더욱 장 기간의 지속을 가진 중합체-VWF-접합체를 적용함으로써 촉진된다.
- <46> 국제 지침 및 규제에 따르면, 그리고 치료법의 현재 기술상태에 따르면, 주입된 FVIII의 약동학을 효능을 위해 타당한 대용 마커로서 인식하고 허용한다. 이것은, 기능적 활성을 위해 표준화된 시험을 특징으로 하는 주입된 FVIII 생성물이 혈류에서 발견되고 예상대로 FIXa 및 인지질로의 결합에 의한 인자 X의 활성화 복합체인 테나제-복합체의 보조인자로서 작용한다는 확실한 가정을 근거로 한다 [Elodi 등, Thromb. Res. 21: 695-700, 1981]. 따라서, 동물 모델에서의 약동학 분석은, FVIII 생성물로 처리된 환자에서 예상된 효능을 예언할 것이다.
- <47> FIX 보조인자 활성의 결정을 위하여, FVIII 또는 FVIIIa 샘플 (트롬빈으로 완전히 활성화된 FVIII)을 FIXa, FX, 인지질 및 CaCl_2 의 준비된 혼합물에 첨가한다. 이러한 반응 혼합물을 37°C에서 항온처리하여 복합체를 형성하고 이어서 FXa를 생성한다. 20분 이하의 간격으로 작은 샘플을 취하고, 발색 기질에 첨가하고, FXa에 의해 선택적으로 분할한다. 15분의 항온처리 후에, 아세트산의 첨가에 의해 반응을 종료한다. FXa 농도에 비례하는 흡광도(A_{405}) 값을 ELISA 판독기에서 측정하고 반응 혼합물에서 항온처리 시간에 대해 그래프화한다.
- <48> 본 발명의 추가의 측면은
- <49> a) 상기 정의된 것과 같은 적어도 하나의 단백질성 구조물을 제공하고;
- <50> b) 상기 정의된 것과 같은 적어도 하나의 FVIII를 제공하고;
- <51> c) 상기 단백질성 구조물과 상기 FVIII 간의 복합체를 형성하는 단계를 포함하는, FVIII 및 VWF의 적어도 하나의 기능적 결손 또는 결합과 관련된 출혈성 질병을 가진 포유동물의 혈액에서 FVIII의 생체내 반감기를 연장하

기 위한 방법이 제공된다.

- <52> 상기 방법의 하나의 구현양태에서, 단계(c)의 복합체는 예를 들어 단백질성 구조물과 상기 FVIII를 혼합한 다음, 이렇게 형성된 복합체를 상기 출혈성 질병을 가진 포유동물에게 유효량으로 투여함으로써 "체외" (즉, 포유동물의 신체 밖)에서 형성된다.
- <53> 상기 방법의 추가의 구현양태에서, 단계(c)의 복합체는 상기 포유동물에게 유효량으로 단백질성 구조물을 투여할 때 출혈성 질병을 가진 포유동물의 혈액에 존재하는 단백질성 구조물과 내인성 FVIII 사이에서 "체내" (즉, 포유동물의 신체 내)에서 형성된다.
- <54> 상기 방법의 또 다른 구현양태에서, 단계(c)의 복합체는 상기 포유동물에게 유효량으로 단백질성 구조물을 투여할 때 출혈성 질병을 가진 포유동물의 혈액에 존재하는 단백질성 구조물과 외인성 FVIII 사이에서 "체내"에서 형성된다. 외인성 FVIII는 상기 단백질성 구조물과 함께 유효량으로 동시에, 또는 상기 단백질성 구조물의 투여 전 또는 후에 연속적으로 투여될 수도 있다.
- <55> 여기에서 사용된 "내인성 FVIII"은 상기 포유동물로부터 유래된 FVIII를 포함한다. 이것은 또한 트랜스유전자로부터 전사된 FVIII 또는 상기 포유동물에 존재하는 기타 외래 DNA를 포함한다. 여기에서 사용된 바와 같이 "외인성 FVIII"는 상기 제시된 바와 같이 pdFVIII 및 rFVIII를 포함하여 상기 포유동물로부터 유래되지 않은 FVIII 뿐만 아니라 상기 정의된 복합체를 형성한 후에 그것이 단리되어지는 포유동물에 다시 투여되는 pdFVIII, 및 상기 rFVIII의 생성에서 그것의 DNA가 사용되어지는 포유동물에 투여된 rFVIII를 포함한다.
- <56> 여기에서 사용된 "유효량"은 상기 제시된 출혈성 질병을 가진 포유동물을 치료하기 위해 적절한 용량; 예를 들어 인간에게 주입 당 바람직하게는 5 내지 1,000 IU 범위, 더욱 바람직하게는 주입 당 10 내지 250 IU의 범위이다.
- <57> 투여 경로는 특정한 제한을 나타내지 않으며, 하나의 구현양태에서 본 발명의 단백질성 구조물 또는 복합체는 정맥내, 근육내 또는 복강내 주사와 같은 주사에 의해 투여될 수도 있다.
- <58> 본 발명은 또한 출혈성 질병을 포함하여 여기에서 사용된 적어도 하나의 FVIII 및 VWF의 기능적 결손 또는 결함과 관련된 출혈성 질병을 치료하는 것에 관한 것이며, 여기에서 출혈성 질병의 원인은 FVIII 및/또는 VWF의 생체내 반감기 단축, FVIII 및/또는 VWF의 변경된 결합 성질, FVIII 및/또는 VWF의 유전자 결손, 및 FVIII 및/또는 VWF의 발현 감소로 구성된 군에서 선택될 수도 있다. 본 발명의 하나의 구현양태에서, 출혈성 질병은 혈우병 A, VWD 또는 VWF의 손상된 기능 또는 VWF와 기타 분자의 상호작용 손상과 연관된 기타 질병으로 구성된 군에서 선택된다.
- <59> 또한, 본 발명은 상기 정의된 단백질성 구조물의 유효량 또는 복합체의 유효량을 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다. 제약 조성물은 제약학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 염, 완충액 또는 부형제를 더욱 포함할 수도 있다. 상기 정의된 출혈성 질병을 치료하기 위하여 제약 조성물이 사용될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 용액 또는 동결건조된 생성물일 수도 있다. 단백질, 구체적으로 VWF 및 FVIII의 안정한 용액을 형성하기 위한 많은 공지된 방법이 존재한다. 예를 들어, 미국 특허 6,586,573; 5,565,427; 5,763,401; 5,733,873; 4,877,608; 5,605,884; 및 5,328,694 참조. 이러한 용액들을 적절한 동결건조 방법, 예를 들어 미국 특허 6,586,573호 (참고문헌으로 포함됨)에 기재된 방법으로 처리할 수 있다. 본 발명은 단독으로 또는 FVIII와의 조합으로 중합체-VWF-접합체의 다른 적절한 형태를 포함한다.

실시예

<88> 실시예 1: 탄수화물 잔기의 변형에 의한 중합체-VWF-접합체의 제조

- <89> 탄수화물 잔기를 통해 중합체-VWF 접합체를 제조하기 위하여 (도 1B), 20mM 아세트산나트륨 완충액, pH 6.0에서 rVWF의 용액 (최종 농도: 500 μ g/ml)를 제조하고, 탄수화물 잔기의 산화를 위해 NaIO₄를 첨가하였다 (최종 농도 5mM). 4°C에서 20분 동안 산화를 수행한 다음, 반응을 중지시키기 위해 이아황산나트륨 (최종 농도 5mM)를 첨가하였다. 이어서, mPEG-히드라지드 (사슬 길이 3kD)를 첨가하고 (최종 농도 10mM), VWF의 PEG화를 실온에서 1시간 동안 수행하였다. 이어서, PEG화 VWF를 크기-배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 반응 혼합물을 세파크릴 S-300 HR (아머샴)으로 충전된 크로마토그래피 컬럼 (크기: 26mm×840mm)에 적용하고, 5% 트레할로스를 함유하는 20mM HEPES-완충액, 150mM NaCl, pH 7.4를 사용함으로써, PEG화 VWF를 반응물로부터 분리하였다. 변형된 VWF를 VWF-항원 수준 및 OD 280nm의 측정에 의해 나타낸 바와 같이 공극 부피로 용출하였다. 추가의 정제를 위하여, VWF 함유 분획을 EMD TMAE 650M (머어크)로 충전된 음이온-교환 컬럼 (크기: 10mm×108mm)에 직접 적

용하였다. 이어서, 5% 트레할로스 및 1000mM NaCl을 함유하는 20mM HEPES 완충액으로 PEG화 VWF를 용출하였다.

<90> **실시예 2: mPEG 숙신이미딜 숙시네이트로의 VWF 내 리신 잔기의 PEG화**

<91> 리신 잔기를 통한 VWF의 PEG화를 위하여 (도 1A), 20mM HEPES-완충액, 150mM NaCl, pH 7.4 (5% 슈크로스 함유) 중에서 rVWF의 용액 (최종 농도: 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 제조하고, mPEG 숙신이미딜 숙시네이트 (사슬 길이: 5kD)를 첨가하였다 (최종 농도 10mM). VWF를 1시간 동안 실온에서 PEG화 하였다. 이어서, PEG화 VWF를 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 반응 혼합물을 세파크릴 S-300 HR (아머샴)으로 충전된 크로마토그래피 컬럼에 적용하고, PEG화 반응을 위해 사용된 것과 동일한 완충액 시스템에 의하여 PEG화 VWF를 분리하였다. VWF를 VWF-항원 수준 및 OD 280nm의 측정에 의해 나타낸 바와 같이 공극 부피로 용출하였다. 추가의 정제를 위하여, VWF 함유 분획을 EMD TMAE 650M (머어크)로 충전된 음이온-교환 컬럼 (크기: 26mm $\times$ 840mm)에 직접 적용하였다. 이어서, 5% 슈크로스 및 1000mM NaCl을 함유하는 20mM HEPES 완충액으로 PEG화 VWF를 용출하였다.

<92> **실시예 3: mPEG p-니트로페닐 카르보네이트로의 VWF 내 리신 잔기의 PEG화**

<93> mPEG p-니트로페닐 카르보네이트와 함께 VWF의 PEG화를 위하여, 혈장 유래 VWF의 용액 (최종 농도: 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 20mM HEPES-완충액, 150mM NaCl, pH 7.6 (5% 슈크로스 함유)중에서 제조하고, mPEG p-니트로페닐 카르보네이트 (사슬 길이: 2kD)를 첨가하였다 (최종 농도 10mM). VWF를 실온에서 2시간 동안 PEG화하였다. 이어서, PEG화 VWF를 크기-배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 세파크릴 S-300HR (아머샴)으로 충전된 크로마토그래피 컬럼 상에 반응 혼합물을 적용하고, PEG화 반응을 위해 사용된 것과 동일한 완충 체계에 의해 PEG화 VWF를 분리하였다. VWF-항원 수준 및 OD 280nm의 측정에 의해 나타낸 바와 같이 VWF를 공극 부피로 용출하였다.

<94> **실시예 4: mPEG 말레이미드로 VWF 내 술포히드릴 잔기의 PEG화**

<95> mPEG 말레이미드와 함께 자유 SH 잔기를 통해 VWF의 PEG화를 위하여, 20mM HEPES - 완충액, 150mM NaCl, pH 7.6 (4% 만노스 및 1% 트레할로스 함유) 중에서 rVWF의 용액 (최종 농도: 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 제조하고, mPEG 말레이미드 (사슬 길이: 10kD)를 첨가하였다 (최종 농도 10mM). VWF를 실온에서 2시간 동안 PEG화하였다. 이어서, PEG화 VWF를 크기-배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 반응 혼합물을 세파크릴 S-300 HR (아머샴)으로 충전된 크로마토그래피 컬럼 상에 적용하였고, PEG화 반응을 위해 사용된 것과 동일한 완충액 체계에 의해 PEG화 VWF를 분리하였다. VWF-항원 수준 및 OD 280nm의 측정에 의해 나타낸 바와 같이 변형된 VWF를 공극 부피로 용출하였다.

<96> **실시예 5: VWF에 대한 텍스트란의 결합**

<97> 6mg/ml의 텍스트란 (MW 40kD) 용액을 20mM 아세트산나트륨 완충액, pH 6.0에서 제조하고, NaIO₄를 첨가하여 (최종 농도 10mM) 자유 알데히드 기를 생성하였다. 산화를 어두운 곳에서 4℃에서 1시간 동안 수행한 다음, 이아황산나트륨 (최종 농도 5mM)을 첨가하여 반응을 중지하였다. 활성화된 텍스트란을 0.1M 인산나트륨 완충액, pH 7.2 (0.15M NaCl 함유) (PBS - 완충액)에 대해 투석하였다. 이어서, 활성화된 텍스트란의 용액 2.4ml을 rVWF의 용액 10ml에 첨가하였다 (농도: PBS 완충액 중의 0.6mg/ml). 이 혼합물에 5ml의 시아노붕소소화나트륨 용액 (PBS 완충액 중의 64mg/ml)을 첨가하고, 어두운 곳에서 밤새 실온에서 항온처리하였다. 이어서, 3ml의 1.0M 트리스-HCl 용액, pH 7.2를 첨가하여 나머지 알데히드 기를 봉쇄하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하고, 5% 슈크로스를 함유하는 20mM HEPES-완충액, pH 7.4에 대해 투석하였다. 이어서, 혼합물을 세파크릴 S-300 HR (완충액: 20mM HEPES, 5% 슈크로스, pH 7.4)로 충전된 크로마토그래피 컬럼 (크기: 50mm $\times$ 860mm) 상에 적용함으로써 크기-배제 크로마토그래피에 의해 텍스트란 결합된 rVWF 유도체를 더욱 정제하였다. VWF-항원 수준 및 OD 280nm의 측정에 의해 나타낸 바와 같이 rVWF 유도체를 공극 부피로 용출하였다. 이러한 분획을 수집하고, 100kD 재생 셀룰로스 막 (밀리포어)을 사용하여 한외여과에 의해 농축하였다.

<98> **실시예 6: VWD-생쥐에서의 약동학**

<99> 문헌 [Denis 등, PNAS 95: 9524-9529, 1998]에 상세히 기재된 VWF-결합 생쥐를 중증 유형 III VWD를 닮은 인간 VWD 모델로서 사용하였다. 5마리 생쥐의 군은, PEG-rVWF (사슬 길이 3kD, 실시예 1에 따른 rVWF의 PEG화) 또는 대조로서 천연 rVWF와 함께, PEG화 후에 검출가능한 VWF (ELISA)를 기초로 하여 40U VWF:Ag/kg 체중의 용량으로 꼬리 정맥을 통해 일시 주사를 받았다. PEG-rVWF 군을 주사 후 5분, 30분, 1시간, 2시간, 6시간, 10시간 및 24시간 동안 (대조군을 위하여 5분, 15분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 10시간 및 24시간) 마취하고, 심장 천공으로부터 시트레이트 혈장을 제조하였다. VWF 항원 수준은 혈장에 따른다. 실험 결과를 도 2에 요약한다. 문헌 [Lenting 등, J.Biol.Chem. 279:12102-12109, 2004]에 기재된 바와 같이, 전형적인 2상 방식에서의 순환

으로부터 천연 rVWF를 제거하고, 이것은 10 내지 24 시간에 상응하는 600분 내지 1440분 사이에 검출 한계 미만으로 떨어진다. 반대로, 주사 시에 약 0으로부터 주사 후 10시간에 혈장 ml 당 약 0.6U까지 초기 증가 후에 PEG화 rVWF는, 10시간 내지 24시간에 균일한 감소로 주사한 후 24시간에 ml 당 약 0.4U의 실질적으로 높은 수준까지 여전히 존재하였으며, 이것은 PEG화 rVWF의 훨씬 장 기간의 지속을 나타낸다. 시간에 따라 측정가능한 VWF에서의 점차적인 증가는, VWF와 접합된 중합체 PEG의 접합 가역성을 나타내며, 이것은 중합체로부터 방출 후에 측정을 위해 입수가가능하게 된다. 이 모델에서 PEG-VWF의 긴 순환 시간은, VWD의 예방적 치료를 위하여 이러한 제제가 사용될 수 있음을 증명한다.

<100> **실시예 7: FVIII-K.O-생쥐에서의 약동학**

<101> 문헌 [Bi 등, Nat.Genet. 10: 119-121, 1995]에 상세히 기재된 FVIII 결함 생쥐를 중증 인간 혈우병 A의 모델로서 사용하였다. 5마리 생쥐의 군은, 꼬리 정맥을 통해 PEG-rVWF (사슬 길이 3kD, 실시예 1에 따라 rVWF의 PEG화를 수행하였다) 또는 천연 rVWF로 일시 주사 (13 ml/kg)를 받았으며, 각각은 3 U FVIII/ml 및 3 U VWF:Ag/ml을 달성하기 위해 rFVIII와 예비혼합된다. 마취 후에, 생성물 주입 후 5분 및 6시간에 각각의 군으로부터 심장 천공에 의해 시트레이트 혈장을 제조하였다. 대조 군은 완충액을 받고 주사 후 5분에 출혈시켰다. VWF 항원 수준을 혈장 샘플에서 측정하였다. 이 실험 결과를 도 3에 요약한다. 곡선은, VWF의 기준 수준 가까이 까지 떨어지는 rVWF의 전형적인 제거가 FVIII 결함 생쥐에 존재하는 반면, PEG화 rVWF의 적용 후에는 수준이 6 시간의 관찰 기간 내에 증가된다는 것을 나타낸다. 이것은 다시, VWF와 접합된 중합체 PEG의 접합 가역성이, 중합체로부터 방출 후에, 측정을 위해 획득가능하게 되고 적용 후 심지어 360분 (6시간)에 지속적으로 증가됨을 나타낸다.

<102> **실시예 8: VWD-생쥐에서의 FVIII 증가**

<103> 중증 유형 III VWD를 닮은 인간 VWD의 모델로서 문헌 [Denis 등, PNAS 95: 9524-9529, 1998]에 상세히 기재된 폰 빌레브란트 결함 생쥐가 사용되었다. 4 내지 5마리 생쥐의 군을, 20mM HEPES, 150mM NaCl, 5% 사카로스 pH 7.4중에서 PEG-rVWF (사슬 길이 5kD, 실시예 2에 따라 rVWF의 PEG화를 수행하였다)로 또는 천연 rVWF로 꼬리 정맥을 통해 정맥내 처리하였다. 대조 군을 완충액으로 처리하였다 (ELISA를 기준으로 하여 PEG-rVWF-용량 18U VWF:Ag/kg, 2700 µg/kg, rVWF 천연 용량: 2400 µg/kg).

<104> 각각의 생쥐는 10 ml/kg의 부피 용량을 받았다. PEG-rVWF (5분, 1시간, 3시간, 6시간, 10시간, 24시간 및 48시간) 또는 천연 rVWF (5분, 15분, 30분, 1시간, 2시간, 6시간, 24시간 및 32시간)의 주사 후 시점에서, 4 내지 5마리 생쥐의 군을 마취하고, 심장 천공으로부터 시트레이트 혈장을 제조하고, FVIII 활성의 수준 (하우스 분석에서 발색성)을 혈장에서 측정하였다. 주사 후 15분에 대조군을 출혈시켰다. 이 실험의 결과를 도 4에 요약한다.

<105> 생쥐에서 내인성 FVIII의 수준은 rVWF 주입의 결과로서 증가한다. PEG화 rVWF의 적용 후에 곡선 아래의 면적 (AUC)은 rVWF의 적용 후 단지 3.3U*h/ml에 비하여 8.0 U*h/ml이었다. 이것은 PEG화 rVWF에 대해 실질적으로 더욱 긴 순환 시간을 나타낸다. 결과는 VWD에서 2차 FVIII 결함의 예방적 치료를 위하여 PEG화 VWF가 사용될 수 있음을 나타낸다.

<106> **실시예 9: FVIII-K.O-생쥐에서 rFVIII 및 VWF의 회수**

<107> 문헌 [Bi 등, Nat Genet 10: 119-121, 1995]에 상세히 기재된 FVIII 결함 생쥐를 중증 인간 혈우병 A의 모델로서 사용하였다. 5마리 생쥐의 군은 PEG-rVWF (HZ-PEG, 3K, 탄수화물을 통해 결합됨) 또는 천연 rVWF로 꼬리 정맥을 통해 일시 주사 (13ml/kg)를 받고, 각각은 rFVIII와 예비혼합하여 3 U FVIII/ml을 달성한다. 마취 후 심장 천공에 의한 시트레이트 혈장은 주사 후 5분 및 6시간에 각각의 군으로부터 제조되었다. FVIII 활성 및 VWF 항원 회수 수준을 혈장 샘플에서 측정하였다. 이 실험의 결과를 도 5 및 6에 요약하였다.

<108> 양쪽 제제를 위한 PEG화 rVWF는, 처리되지 않은 rVWF에 비하여 공동-주사된 rFVIII의 더욱 높은 회복을 유도하였다. 시간에 걸쳐 PEG화 rVWF에 대해 VWF 수준이 증가된 반면, 정상적인 rVWF는 360분 내에 거의 완전히 제거되었다. 결과는, 증가된 FVIII 순환 시간의 장점과 함께, 혈우병 A의 급성 치료를 위해 FVIII와 복합체화된 PEG화 VWF가 사용될 수 있음을 나타낸다.

<109> **실시예 10: FVIII × VWF-이중 녹아웃 생쥐에서 FVIII 반감기의 증가**

<110> FVIII 결함 및 VWF-결함 생쥐를 잡종 교배함으로써 FVIII×VWF 이중 녹아웃 생쥐를 수득하였다. 이러한 생쥐는 FVIII 결함 뿐만 아니라 VWF 결함을 겪으며, 따라서 동물 모델에서 FVIII - VWF 상호작용을 연구하기 위해 이상

적인 모델을 제공한다.

<111> 5마리 FVIII×VWF 이중 녹아웃 생쥐의 군 (FVIII 결함 생쥐를 VWF-결함 생쥐와 잡종교배하였다)은 꼬리 정맥을 통해 20mM HEPES, 150mM NaCl, 5% 사카로스 pH 7.4 중에서 PEG-rVWF (사슬 길이 5kD, mPEG 숙신이미딜 숙시네이트로 리신 잔기를 변형시킴으로써 실시예 2에 따라 rVWF의 PEG화를 수행하였다)로 또는 천연 rVWF SS-PEG로, 또는 천연 rVWF로 일시 주사 (11ml/kg)를 받았으며, 각각은 rFVIII와 예비혼합되어 9U FVIII/ml 및 9U VWF 항원/ml 및 0.67U VWF:Rco/ml를 달성하였다. 문헌 [Ingerslev, Scand.J.Clin.Invest. 47: 143-149, 1987]에 발행된 바와 같이 ELISA 방법의 사용에 의해 VWF-항원 값을 측정하였다. 일차 지혈 과정에서 VWF의 혈소판 결합 성질을 반영하는 기능적 VWF:Rco 활성을 맥팔레인(Macfarlane) 등에 따라 측정하였다 [Thromb.Diath.Haemorrh. 34: 306-308, 1975]. 주사 후 5분, 3시간, 6시간, 10시간 및 24시간에, 각각의 군으로 부터 마취 후 심장 천공에 의한 시트레이트 혈장을 제조하였다. FVIII 활성 및 VWF 항원 수준을 혈장 샘플에서 측정하였다.

<112> 약동학 라이브러리로부터 하나의 격막 모델을 사용하는 마이크로매쓰 사이언티스트(MicroMath Scientist) 프로그램 (미국 미조리주 세인트루이스 마이크로매쓰 리서치)을 사용하여 FVIII 및 VWF의 반감기를 계산하였다. rVWF 또는 PEG화 rVWF와 공동 주입된 FVIII에 대한 반감기는 1.88 시간 내지 2.58 시간으로 증가되고, 곡선 아래의 면적(AUC)은 4.3으로부터 7.3 U·h/ml로 증가한다. VWF의 반감기는 3.1로부터 10.4로 증가되고, 곡선 아래의 면적은 5.7로부터 22.8로 증가된다. 결과를 도 7 및 8에 요약한다. 데이터는, VWD 및 FVIII의 긴 순환의 장점과 함께, 혈우병 A 및 VWD의 급성 및 예방적 치료를 위해 PEG-VWF가 사용될 수 있음을 나타낸다.

<113> 실시예 11: 생쥐 혈장에서 PEG화의 가역성 증명

<114> VWF 결함 혈장으로서의 시험관내 실험에 의하여 PEG화의 가역성을 증명하였다. 4℃에서 1100 x g 에서 15분 동안 원심분리함으로써 VWF-결함 생쥐 [Denis 등, PNAS 95: 9524-9529, 1998]로부터 시트레이트화 혈장을 수득하였다. 생쥐 혈장의 4개 부피를 실시예 1 (탄수화물을 통한 PEG 결합) 또는 실시예 2 (리신 잔기를 통한 PEG 결합)에 따라 제조되는 1 부피의 PEG화 rVWF와 함께 혼합하고 37℃에서 48시간 동안 유지하였다. 양쪽 실험에서 비-PEG화 rVWF를 대조로서 사용하였다. 1시간, 5.5시간, 24시간 및 48시간 혼합한 후 즉시 작은 샘플을 회수하고, 샌드위치 ELISA 체계를 사용함으로써 동결된 샘플로부터 VWF 항원 함량을 분석하였다. 96웰 ELISA 플레이트를 코팅하기 위해 다클론성 항-VWF 항체 (DAKO)를 사용하고, 결합된 인자 VWF의 검출을 위해 염소-항-토끼-IgG-HRP-접합체 (AXELL)를 분석하였다. 시간에 걸쳐, 증가하는 양의 VWF 항원을 측정하였으며, 이것은 생체의 혈장 샘플에서 VWF에 대한 폴리에틸렌 글리콜의 집합 가역성을 증명한다 (도 9).

<115> 실시예 12: PEG화 VWF 제제의 FVIII 결합 능력의 결정

<116> 상이한 PEG화 rVWF-제제의 FVIII 결합 능력을, 비아코어(BIACORE)^(R) 3000 장치 (비아코어, 스웨덴 업살라)를 사용하여 표면 플라스몬 공명 실험 [Karlsson et Falt, J.Immunol.Methods 200: 121-33, 1997]에 의해 비교하였다. 일반적으로, 리간드를 센서 칩에 고정시키고, 리간드에 대한 다른 성분의 결합은 표면 플라스몬 공명에 의해 결정된다. 이 기술을 사용함으로써, 칩의 표면에 근접한 용액의 굴절을 변화를 측정한다. 칩의 표면에서 결합된 성분의 농도 변화를 시그널로서 검출하고, 이것은 임의의 공명 단위(RU)로 표현된다. 고정화된 리간드에 결합된 단백질 질량과 관찰된 RU 간에 선형 관계가 존재한다. PEG화 VWF 제제를 7000 내지 9000 RU 및 25℃에서 NHS/EDC 화학을 사용하여 비아코어TM 센서 칩의 텍스트란 표면에 25℃에서 고정화하였다. 10mM HEPES 완충액 pH 7.4 (150mM NaCl, 3mM EDTA 및 0.005% 표면활성제 P20 함유) (HBS-완충액, 비아코어)를 15μl/분의 유량으로 사용하였다. 통상적으로 이용가능한 FVIII 생성물 (어드베이트(ADVATE), 오스트리아 비엔나 백스터 AG)의 상이한 양의 결합을 도 10에 나타낸 것과 같이 측정하였다. 이러한 도면은, 실시예 4에 따라 제조된, mPEG 말레이미드 5000으로 변형되어진 PEG화 rVWF 제제의 FVIII 결합 능력을 증명한다. 상이한 PEG화 rVWF 제제를 사용한 비아코어 실험의 결과를 표 1에 요약한다. 이 표에서, PEG화 rVWF 제제의 상이한 FVIII 결합 능력을, 10 내지 20 IU FVIII/ml (발색 검사) 범위의 최대 대조 수준에서 비 PEG화 대조 제제의 RU 값의 퍼센트로 제공한다.

【표 1】

<117>

PEG화 rVWF 제제의 FVIII 결합 능력 (비 PEG화 rVWF= 100%)					
시약	시약 농도				
	0mM	1mM	5mM	10mM	20mM
mPEG SS 5000	100%	30-40%	20-30%	0-20%	0%
mPEG MAL 5000	100%	70-90%	40-60%	30-50%	20-40%
mPEG Hz 3000(a)	100%	60-80%	30-50%	10-20%	0-5%
(a) 5 m NaIO ₄ 로 산화됨					

<118>

실시예 13: 중합체 접합 후 VWF의 질량 증가

<119>

다양한 농도 (1mM, 2.5mM, 5mM, 7.5mM 및 10mM)에서 mPEG 숙신이미딜 숙시네이트 (사슬 길이: 5kD)를 사용하여 실시예 2에 따라 rVWF를 PEG화하였다. PEG화 VWF 종을 2개의 상이한 방법: SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 및 VWF 다량체 분석으로 분석하였다. SDS 겔 전기영동을 3 내지 8% 구배 겔 (트리스 아세타트 겔/바이오-레드)을 사용하여 환원 조건 하에서 수행하였다. 1.6% 아가로스 겔을 사용하여 루게리 에 지머만(Ruggeri et Zimmerman) (Blood 57: 1140-43, 1981)을 사용하여 VWF 다량체 분석을 수행하였다. 아이하라(Aihara) 등에 따라 VWF-다량체의 가시화를 수행하였다 [Thromb.Haemost. 55: 263-67, 1986].

<120>

SDS 겔 전기영동 (도 11)은, 성숙한 VWF (아래쪽 띠) 및 프로-VWF (윗쪽 띠)로 구성된 rVWF 체제를 나타내고, 상이한 반응물 농도를 사용함으로써 PEG화 후에 분자량의 증가를 나타낸다. 또한, PEG 후에 인간 혈청 알부민 (HSA) 체제로부터 분자량의 변이를 대조 체제로서 나타낸다 (PEG화는 실시예 2에 따라 수행되었다). HSA의 분자량은 66,000Da으로부터 190,000Da으로 변하고, 이는 PEG화 절차의 효능을 나타낸다.

<121>

도 12는 상이한 반응물 농도로 PEG 전 및 후에 rVWF의 다량체 패턴을 나타낸다. 증가하는 반응물 농도에서 상이한 다량체의 고 분자량으로의 확대 및 변화가 명백히 증명된다.

<122>

실시예 14: mPEG 숙신이미딜 글루타레이트로의 VWF 내 리신 잔기의 PEG화

<123>

리신 잔기를 통한 VWF의 PEG화를 위하여 (도 1A), rVWF의 용액 (최종 농도: 500µg/ml)을 20mM HEPES-완충액, 150mM NaCl, pH 7.4 (5% 슈크로스)중에서 제조하고, mPEG 숙신이미딜 글루타레이트 (사슬 길이 5kD)를 첨가하였다 (최종 농도: 200mg PEG 숙신이미딜 글루타레이트/mg 단백질). 이어서, 0.1M NaOH로 pH 값을 7.4로 조절하였다. 실온에서 1시간 동안 VWF를 PEG화하고, 실시예 2에 기재된 바와 같이 정제하였다.

<124>

실시예 15: FVIII-K.0-생쥐에서 FVIII 반감기의 증가

<125>

문헌 [Bi 등, Nat. Genet. 10: 119-121, 1995]에 상세히 기재된 FVIII 결합 생쥐를 중증 인간 혈우병 A의 모델로서 사용하였다. 5마리 생쥐의 군은, 실시예 2에 따라 제조된 PEG-rVWF (SS-PEG, 5K) 또는 천연 rVWF로 꼬리 정맥을 통해 일시 주사를 받았으며 (10ml/kg), 각각은 제조된 FVIII와 예비혼합되어 10U FVIII/ml 및 10U VWF/ml를 달성한다. 마취 후에 심장 천공에 의한 시트레이트 혈장을, 주사 후 5분, 3시간, 9시간 및 24시간에 각각의 군으로부터 제조하였다. FVIII 활성 및 VWF 항원 회복 수준을 혈장 샘플에서 측정하였다. 이 실험의 결과를 도 13 및 14에 요약한다.

<126>

FVIII의 반감기가 1.8시간 (천연 rVWF의 존재하)으로부터 3.9시간 (PEG-rVWF와 함께 적용될 때)으로 증가되고, 곡선 아래 면적 (AUC)이 4.1로부터 7.8 U*h로 증가되었다. VWF 반감기는 3.2로부터 13.6h로 증가되고, VWF를 위한 AUC가 대략 7.7로부터 32.1 U*h로 4배로 되었다.

<127>

실시예 16: 상이한 방법에 의한 SS-PEG화 VWF 제제의 FVIII 결합 능력의 결정

<128>

문헌 [Bendetowicz 등, Blood, 92: 529-538, 1998]에 기재된 방법의 변형을 사용하여, 상이한 PEG화 rVWF 제제의 FVIII 결합 능력을 조합된 ELISA 및 발색성 분석 체계(ECA)에 의해 측정하였다. 마이크로적정 플레이트를 50mM Na₂CO₃/NaHCO₃ pH 9.6중에서 200µl의 2.6µg/mL 항-vWF 다클론성 항체로 코팅하였다. 이어서, PBS-트윈 완충액 (100mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 150mM NaCl, pH 7.6 및 0.05% 트윈 20)으로 각각의 단계 후에 플레이트를 세척하였다. 플레이트를 PBS-트윈 중의 0.1% 건조유/2mM 벤즈아미딘 중에서 37°C에서 1시간 동안 봉쇄하였다.

증가하는 양의 VWF를 25분 동안 37℃에서 0.2U/ml rFVIII (어드베이트, 오스트리아 비엔나 벅스터 AG)로 예비 향온처리하고, 100 μ l의 혼합물을 플레이트에 첨가하였다. 향온처리 후에, 포획된 VWF에 결합된 FVIII의 양을 FVIII 발색성 분석 (오스트리아 비엔나 테크노클론)에 의해 측정하였다. FVIII 결합 능력을 1 분에 405nm에서 측정된 흡광도의 변화 (dA 405)로서 표현하였다. 도 15는 2개의 PEG화 VWF 제제의 VWF 용량-의존성 FVIII 결합을 나타내고, 양쪽 모두 mPEG-숙신이미딜 숙시네이트(SS)로 변형된다. 변형된 VWF 제제의 FVIII 결합 능력을 변형되지 않은 출발 VWF 제제의 %로서 계산하였으며, PEG-SS-rVWF-1에 대해 20%, PEG-SS-rVWF-2에 대해 50%인 것으로 밝혀졌다.

<129> 도 16은 실시예 12에 기재된 바와 같이 표면 플라스몬 공명 방법에 의해 측정되는 2개의 PEG-SS-rVWF 제제의 FVIII 결합 능력을 나타낸다. 계산된 결합 능력은 각각 25 및 45%였다.

<130> SDS-PAGE에 의해 측정된 PEG-SS 접합 후에 rVWF 분자의 적절한 분자량 증가를 도 17에서 증명한다.

<131> **실시예 17: 분지쇄 PEG 말레이미드로의 VWF 내 술포히드릴 기의 PEG화**

<132> 분지쇄 PEG 말레이미드로 자유 SH 잔기를 통해 VWF의 PEG화를 위하여, 재조합 VWF (최종 농도: 500 μ g/ml)의 용액을 20mM HEPES-완충액, 150mM NaCl, pH 7.6 (3% 트레할로스 함유)중에서 제조하였다. 이어서, NOF 코포레이션 (NOF 유럽, 벨기에 그로벤덴크)에 의해 공급된 분지쇄 mPEG 말레이미드 (사슬 길이: 20kD)를 첨가하였다 (최종 농도 10mM). VWF를 실온에서 2시간동안 서서히 교반하면서 PEG화하였다. 이어서, 재생 셀룰로스로 구성된 100kD 막 (밀리포어)을 사용하여 PEG화 rVWF를 한외여과/정용여과 (UF/DF)에 의해 반응물로부터 분리하였다.

<133> **실시예 18: mPEG 히드라지드/EDC로의 VWF 내 카르복실 기의 PEG화**

<134> 실시예 23에 따라 푸린 성숙된 rVWF를 제조하고 정제하였다. 50mM 포스페이트 완충액, pH 6.2에 대해 제제를 투석하고 400 μ g/ml의 농도로 희석하였다. 이어서, 5kD의 사슬 길이를 가진 mPEG 히드라지드 (mPEG Hz)를 첨가하였다 (농도: 60mg mPEG Hz/mg VWF). 500mM 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 (EDC)의 새로 제조된 용액 30 μ l를 VWF 함유 혼합물 1ml에 첨가하고, 5시간 동안 서서히 교반하면서 실온에서 향온처리하였다. 100kD 막 (재생 셀룰로스/밀리포어)을 사용하여, 20mM HEPES-완충액 (150mM NaCl, pH 7.4)에 대해 UF/DF에 의하여 PEG화 rVWF로부터 반응물을 분리하였다.

<135> **실시예 19: 폴리시알산으로의 VWF 내 리신 잔기의 변형**

<136> 문헌 ([Fernandes et Gregoriadis, Biochim. Biophys. Acta 1341: 26-34, 1997] 및 [Jennings et Lugowski, J.Immunol. 127: 1011-1018, 1981])에 기재된 바와 같이 폴리시알산 (콜로미닌산, CA)으로 리신 잔기의 변형을 수행하였다. 0.1M NaIO₄를 함유하는 콜로미닌산의 용액 (농도: 20mg/ml)를 어두운 곳에서 실온에서 15분 동안 교반하여 CA를 산화하였다. 활성화된 CA 용액의 ml 당 2ml 에틸렌 글리콜을 첨가하고, 어두운 곳에서 실온에서 추가로 30분 동안 교반하였다. 용액을 0.05M 인산나트륨 완충액, pH 7.2에서 어두운 곳에서 밤새 투석하였다. 이어서, 이 용액의 분취량을 0.05M 인산나트륨 중의 rVWF 용액 (400 μ g/ml)에 첨가하여, mg VWF 당 50mg 활성화 CA의 최종 농도를 수득하였다. 이 혼합물을 30분 동안 실온에서 어두운 곳에서 교반하였다. NaCNBH₃를 첨가하고 (1mg/mg rVWF), 혼합물을 실온에서 18시간 동안 어두운 곳에서 서서히 진탕하면서 향온처리하였다. 수성 1M TRIS-용액, pH 7.2를 첨가하고 (mg NaCNBH₃ 당 50 μ l) 반응을 종료시키기 위해 1 시간 동안 교반하였다. 100kD 막 (재생 셀룰로스/밀리포어)을 사용하여 UF/DF에 의해 rVWF-폴리시알산 접합체로부터 자유 반응물을 분리하였다.

<137> 이 제제의 FVIII 결합 능력을 실시예 16에 기재된 바와 같이 결정하였다.

<138> 환원 조건 하에서 등전압 포커싱 (IEF)에 의해 검출된 등전점(PI)의 변화에 의하여 폴리시알산과 rVWF의 접합을 증명하였다. 도 20은 이 실시예에 따라 폴리시알산과의 접합 전 및 후에 VWF 제제의 비교를 나타낸다. 제조업자 (아마섬 바이오사이언스)의 지시에 따라서 암폴린 PAG 플레이트 시스템(pH 3.5 내지 9.5)을 사용하였다. 폴리시알산과의 접합에 의한 산성 기의 도입은, 변형된 rVWF에 대해 하나의 단일 산성 띠를 유도한다.

<139> ECA 시험의 사용에 의하여 실시예 16에 기재된 것과 같은 54%의 FVIII 결합 능력을 결정하였다. 표면 플라스몬 공명 방법을 사용하여 70%의 FVIII 결합 능력을 결정하였다 (실시예 12).

<140> **실시예 20: 전단 응력 조건 하에서의 PEG화**

<141> 문헌 [Sakariassen 등, J.Lab.Clin.Med. 102: 522-535, 1983]에 기재된 것과 같이 관류 챔버를 제조하고, 전단 응력 조건 하에서 rVWF의 PEG화를 위해 사용하였다. 3% 트레할로스를 함유하는 20mM HEPES, pH 7.4중에서 rVWF

(500 $\mu\text{g/ml}$)의 용액을 제조하였다. 이어서, mPEG 숙신이미딜 숙시네이트 (최종 농도: 5mM)를 첨가하고, 0.1M NaOH로 pH 값을 7.4로 조절하고, 관류 체계에 즉시 충전하였다. 이어서, 사카리아센(Sakariassen) 등 [J.Lab.Clin.Med. 102: 522-535, 1983]에 기재된 관류 조건 하에서 연동 펌프의 사용에 의해 2500^{-1} sec 의 전단 속도로 실온에서 PEG화를 수행하였다.

<142> 실시예 21: pdVWF의 제조

변형을 가진 토렐 엡 블롬백(Thorell et Blomback) [Thromb. Res. 35:431-450, 1984]에 따라서 pdVWF의 제조를 수행하였다. pdVWF의 제조를 위하여, 1.5kg의 한랭침전물을 6 리터의 물에서 20℃ 내지 30℃에서 용해시켰다. 1시간 동안 교반한 후에, 피브로넥틴 침전물을 원심분리에 의해 제거하였다. 상층물 리터 당 8g NaCl를 첨가하고, 용액을 실온으로 가온하고 SD-원액 반응물 (1% 트윈 80 + 0.18% 아세틸트리에틸시트레이트 최종 농도)을 바 이러스 불활성화를 위해 첨가하였다.

0.2M NaCl, 0.02M 아세트산나트륨, pH 6.5 (세척 완충액)으로 사전 평형화된 EMD-TMAE 프락토겔 650M 컬럼 (XK50/180) 위에서 용액을 더욱 정제하였다. 세척 완충액의 20 컬럼 부피로 세척한 후에, VWF를 0.5M NaCl, 0.02M Na-시트레이트, pH 6.9로 용출하였다. VWF의 침전 후에, 글리신 (1M 최종 농도) 및 NaCl (3M 최종 농도)을 첨가하였다. 침전물을 완충액에 용해시키고, 최종 정제를 위하여 0.3M CaCl_2 , 0.15M NaCl, 20mM HEPES, pH 7.4으로 평형화된 세파크릴 S-400 HR (아머샴) 컬럼에 적용하였다.

【표 2】

pdVWF의 정제				
샘플	비활성 [IU VWF:Ag/mg 단백질]	VWF:CB/VWF:Ag [IU/IU]	VWF:RCO/VWF:Ag [IU/IU]	VWF:RCO/FVIII Ag [IU/IU]
출발 물질 (n=2) (재현탁된 한랭침전물)	1.3	0.35	0.17	0.33
위심분리 상층액 (n=2)	2.3	0.34	0.19	0.39
프락토겔 EMD-TMAE 650M (n=2)	191	0.72	0.47	0.77
세파크릴 S-400 HR (n=2)	192	0.91	0.56	40

<146> 실시예 22: PEG SS로의 pdVWF 내 리신 잔기의 PEG화

실시예 21에 따라 pdVWF를 제조하고, 20mM HEPES - 완충액 pH 7.4 (150mM NaCl 및 3% 슈크로스 함유)로 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 최종 농도까지 희석하였다. 이어서, mPEG 숙신이미딜 숙시네이트 (사슬 길이: 5kD)를 첨가하고 (농도: 10 mg PEG SS 5000/mg VWF), pdVWF를 1시간 동안 실온에서 PEG화하였다. 이어서, 재생 셀룰로스로 구성된 100kD (밀리포어)를 사용하여 UF/DF에 의해 PEG화 VWF로부터 반응물을 분리하였다.

<148> 실시예 23: 푸린 성숙화 및 푸린-성숙된 rVWF의 정제

셀로카트(Schlokat) 등 [Biotechnol. Appl. Biochem. 24: 257-267, 1996]에 기재된 바와 같이 프로펩티드의 제거를 위하여, rFVIII 발효 및 정제 공정으로부터 유래된 항-FVIII 항체 컬럼의 유동 분획 143kg을 푸린으로 처리하고, 무균 여과하였다. 공정은 초기 작업을 기초로 하였다 [Fischer 등, FEBS Lett. 375: 259-262, 1995; Fischer 등, PCT/AT98/00034 (WO 98/38219), 1-33, 1998, 18-2-1998 및 Kaersgaard et Barington, J.Chromatogr. B 715: 357-367, 1998].

물로 16 mS/cm까지 4배 희석한 후에, 10mM 트리스, 100mM NaAc, 86mM NaCl, pH 6.5 mS/cm (평형화 완충액)으로 평형화된 XK50/15 EMD-TMAE-프락토겔 650M-컬럼 (300ml 겔; 머어크; #K14540281) 위에 633kg의 묽은 용액을 적용하였다. 컬럼을 평형화 완충액으로 세척하고, 100mM NaAc, 250mM NaCl, 100mM 글리신, 3mM CaCl_2 로 용출하였다.

4506g의 TMAE-용출물을 사르토클린(Sartoclean) GF (0.8 & 0.65 μ) 및 사르토프란 P (0.45 & 0.2 μ) 위에서 여과하고, 29 mS/cm까지 1.5배 희석하고, DNA의 제거를 위해 머스탕 Q 필터 (#1H18770932)를 통해 펌프질하였다.

22±2℃에서 60분 동안 SD 처리하고, 16 mS/cm까지 물로 2배 희석한 후에, TMAE 단계의 평형화 완충액으로 평형화된 아미콘 70/29 우노스피어(UNOsphere) S-컬럼 (600ml 겔; 바이오-래드 #78960C)에 용액을 적용하였다. 컬럼을 평형화 완충액으로 세척하고 TMAE 단계의 용출 완충액으로 용출하였다.

재생 셀룰로스로 구성된 30 kDa 0.1m² 막 (히드로사르트 #01080217, 사르토리우스)을 사용하여 3223g의 우노-S 용출물을 한외여과에 의해 15배 농축하였다. 100mM NaAc, 500mM NaCl, pH 7.0 (1698ml 겔; GE 헬스케어 #17-0489-01)로 평형화된 XK50/86.5 수퍼로스 6 프레프 등급 컬럼 위에서 201g의 농축물을 크기 배제 크로마토그래피에 의해 마지막으로 정제하였다.

【표 3】

푸린-처리된 rVWF의 정제						
샘플	비활성 [IU VWF:Ag/mg 단 백질]	VWF:CB/VWF:A g [IU/IU]	CHO/VAf:Ag [ng/IU]	정제 인자 (CHO)	단계 당 정제 인자 (CHO)	VWF:RCO/FVIII I Ag [IU/IU]
출발 물질 (n=4)	1	0.75	23678	1.0	1	0.69
1.TMAE 용출 액 (n=5)	34	0.84	2766	8.6	8.6	0.62
머스탕 Q (n=4)	44	0.70	2405	10	1.1	0.47
UNO-S 용출액 (n=4)	121	0.71	329	72	7.3	0.40
수퍼로스 6 PG (n=2)	160	0.99	4	6150	85	0.39

실시예 24: 푸린-성숙 rVWF의 PEG화

실시예 23에 따라 푸린-성숙 VWF를 제조하고, 20mM HEPES-완충액 pH 7.4 (150mM NaCl 및 3% 슈크로스 함유)에 대해 투석하였다. 이어서, 용액을 20mM HEPES-완충액 pH 7.4 (150mM NaCl 및 3% 슈크로스 함유)로 300 µg/ml의 최종 농도로 희석하였다. 이어서, mPEG 숙신이미딜 숙시네이트 (사슬 길이: 5kD)를 첨가하고 (농도: 25mg PEG SS 5000/mg VWF), 푸린-성숙 VWF를 실온에서 1시간 동안 PEG화하였다. 이어서, 재생 셀룰로스로 구성된 100kD 막(밀리포어)을 사용하여 UF/DF에 의해 PEG화 VWF로부터 반응물을 분리하였다.

실시예 25: 푸린-성숙 rVWF의 시험관내 특징화

푸린-성숙 rVWF의 FVIII 결합 능력을, 각각 실시예 12 및 도 15에 기재된 바와 같이, 표면 플라스몬 공명 기술 및 ECA에 의해 결정하였다. 결과를 실시예 21에 따라 제조된 알부민-자유 혈장-유래 VWF 제제와 비교하였다.

도 18 및 19에 나타난 바와 같이, 푸린-성숙 rVWF의 FVIII 결합 능력은 혈장-유래 대조 제제에 필적하였다.

실시예 26: 글루타르알데히드와의 가교에 의한 폴리시알산과 VWF의 접합

가교제로서 글루타르알데히드를 사용하여 폴리시알산 (콜로민 산)과 rVWF의 접합을 위하여 [Migneault 등, Biotechniques, 37: 790-796, 2004], 20mM HEPES-완충액 (150mM NaCl, pH 7.4) 중의 4 ml의 콜로민산 용액 (농도: 20 mg/ml)을 제조하고, 0.1M NaCl의 첨가에 의해 pH를 7.4로 조절하였다. 글루타르알데히드를 첨가하여 0.01%의 최종 농도를 수득하였다. 이어서, 20mM HEPES-완충액 (150mM NaCl, pH 7.4) 중의 rVWF 용액 (400 µg/ml) 1ml를 100µl의 분취량으로 첨가하고, 혼합물을 서서히 진탕하면서 1시간 동안 항온처리하였다. 이어서, 혼합물을 투석하고, 트레할로스를 첨가하고 (최종 농도: 3%), rVWF-폴리시알산 접합체를 한외여과에 의해 농축하였다.

실시예 27: VWF-결합 생쥐에서 VWF 반감기의 증가

인간 VWD의 동물 모델로서 문헌 [Denis 등, PNAS 95: 9524-9529, 1998]에 기재된 VWF-결합 생쥐를 사용하였다. 5마리 생쥐의 군은, 실시예 19에 따라 제조된 rVWF-폴리시알산 접합체 또는 천연 rVWF로 꼬리 정맥을 통해 일시 주사를 받고 (10 ml/mg), 100 U VWF:Ag/kg을 달성하였다. 마취 후에 심장 천공에 의한 시트레이트 혈장을, 주사 후 5분, 1시간, 3시간, 6시간, 9시간 및 21시간에 각각의 군으로부터 제조하였다. VWF 항원 회복 및 내인성 생

쥐 FVIII 활성 수준을 혈장 샘플에서 측정하였다. 이 실험의 결과를 도 21 및 22에 요약한다.

<163> 약동학 라이브러리로부터 하나의 구획 모델을 사용하여 마이크로매쓰 사이언티스트(MicroMath Scientist) 프로그램 (미국 미조리주 세인트 루이스 마이크로매쓰 리서치)를 사용하여 VWF의 반감기를 계산하였다. 기준선 공제를 가진 사다리꼴 모델에 의하여 FVIII 활성을 위한 곡선 아래의 면적을 계산하였다.

<164> VWF의 반감기가 1.3시간 (천연 rVWF)로부터 2.4시간 (rVWF-폴리시알산 접합체)로 증가하였으며, FVIII을 위한 AUC는 3.3 U*hr/ml로부터 5.3 U*hr/ml로 증가하였다.

<165> **실시예 28: 환원 아민화에 의해 리신 기에 대한 mPEG 프로피온알데히드의 결합**

<166> 0.05M 인산나트륨 완충액, pH 7.2중에서 rVWF 용액 (400 μ g/ml)을 제조하고, mPEG 프로피온알데히드 (사슬 길이 5kDa)를 첨가하여 mg VWF 당 10mg mPEG 프로피온알데히드의 최종 농도를 수득하였다. 이 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 이어서, NaCNBH₃를 첨가하고 (1 mg/mg rVWF), 혼합물을 서서히 진탕하면서 실온에서 15시간 동안 항온 처리하였다. 수성 1M TRIS-용액, pH 7.2를 첨가하고 (mg NaCNBH₃ 당 50 μ l) 1시간 동안 교반하여 반응을 종료하였다. 이어서, 100kD 막 (재생 셀룰로스/밀리포어)을 사용하여 한외여과/정용여과에 의해 반응물로부터 PEG화 rVWF를 분리하였다.

<167> **실시예 29: VWF의 N-말단 PEG화**

<168> 문헌 [Lee 등, Pharm.Res. 20: 818-825, 2003]에 기재된 바와 같이 rVWF의 N-말단 PEG화를 수행하였다. 50mM 아세트산나트륨 완충액, pH 5.5 중에서 rVWF의 용액 (최종 농도: 500 μ g/ml)을 제조하고, mPEG 프로피온알데히드 (사슬 길이: 5kD)를 첨가하였다 (농도: 10mg mPEG 프로피온알데히드/mg VWF). 환원제로서 2mM NaCNBH₃의 존재 하에서 실온에서 24시간 동안 PEG화를 수행하였다. 이어서, PEG화 rVWF를 100kD 막 (재생 셀룰로스/밀리포어)을 사용한 한외여과/정용여과에 의해 반응물로부터 분리하였다.

<169> **실시예 30: rVWF의 리신-잔기 및 SH-잔기의 연속 PEG화**

<170> 실시예 2에 따라서 mPEG 숙신이미딜 숙시네이트 (사슬 길이: 5kD)로 리신 잔기를 통해 rVWF를 PEG화하였다. 실온에서 1시간 동안 PEG화를 수행하고, 100kD 막 (재생 셀룰로스/밀리포어)을 사용하여 5% 사카로스를 함유하는 20mM HEPES-완충액, pH 7.4에 대하여 UF/DF에 의해 rVWF PEG 접합체로부터 자유 반응물을 분리하였다. 이어서, 0.1M NaOH를 사용하여 용액의 pH 값을 7.6으로 조절하고, 자유 SH-기의 PEG화를 위하여 mPEG 말레이미드 (사슬 길이 5kD/최종 농도 10mM)를 첨가하였다. 서서히 진탕하면서 PEG화를 실온에서 2시간 동안 수행하였다. 이어서, 100kD 막 (재생 셀룰로스/밀리포어)을 사용하여 반응 혼합물로부터 반응물을 다시 분리하였다.

<171> **실시예 31: 탄수화물 잔기의 효소적 산화에 이어서 PEG-Hz와의 PEG화**

<172> 닥티리움 덴드로이데스(Dactylium dendroides) (시그마)로부터의 갈락토스 산화효소를 사용하여, 문헌 [Avigad 등, J.Biol.Chem. 237: 2736-43, 1962]에 기재된 바와 같이, 알데히드 기를 생성하기 위해 rVWF 중에서 탄수화물 잔기의 효소적 산화 [Wilchek et Bayer, Meth. Enzymol. 138: 429-442, 1987]를 수행하였다. 수득된 용액을 50mM 포스페이트 완충액, pH 7.2에 대해 투석하고, 400 μ g/ml의 VWF 농도로 희석하였다. 5kD의 사슬 길이를 가진 mPEG 히드라지드 (mPEG Hz) (최종 농도: 40mg mPEG-Hz/mg VWF)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 3시간 동안 서서히 진탕하면서 항온처리하였다. 100kD 막 (재생 셀룰로스/밀리포어)를 사용하여 5% 사카로스를 함유하는 20mM HEPES-완충액 (150mM NaCl, pH 7.4)에 대하여 UF/DF에 의해 PEG화 rVWF로부터 반응물을 분리하였다.

<173> **실시예 32: rFVIII에 의한 FVIII 결합 부위의 차단과 rVWF의 PEG화**

<174> 비변형 FVIII 결합 부위를 가진 PEG화 rVWF의 제조를 위하여, 50mM HEPES 완충액 (50mM HEPES, 150mM NaCl, 2% 트레할로스, pH 7.4)중에서 rFVIII (200 U/ml) 및 rVWF (40U VWF:Ag/ml)를 함유한 용액 3ml를 제조하고 37°C에서 1시간 동안 항온처리하였다. 혼합물을 실온으로 냉각하고, PEG 숙신이미딜 숙시네이트 (PEG-SS/사슬 길이: 5kD)를 첨가하고 (최종 농도: 1mg PEG-SS/U VWF:Ag), 서서히 진탕하면서 1시간 동안 항온처리하였다. 이어서, 서서히 진탕하면서 CaCl₂를 첨가하여 400mM의 최종 농도를 얻었다. 세파크릴 S-400HR (아머삼)로 충전된 크로마토그래피 컬럼 (2.6×80cm) 위에 용액을 적용하고, 크기-배제 크로마토그래피에 의하여 rFVIII로부터 FVIII에 대한 자유 결합 부위를 가진 PEG화 rVWF를 분리하였다 (용출 완충액: 50mM HEPES-완충액, 400mM CaCl₂, pH 7.4).

실시예 33: 헤파린에 의한 FVIII 결합 부위의 차단과 rVWF의 PEG화

50mM HEPES-완충액 pH7.4중에서 rVWF (300 μ g/ml)의 용액 5ml를 제조하고, 동일한 완충액 중에서 헤파린-세파로스 CL-6B (아머삼 바이오사이언스)의 현탁액 2ml에 첨가하였다. 이 혼합물을 서서히 진탕하면서 2시간 동안 항온처리하고, VWF를 겔에 결합하였다 [de Romeuf et Mazurier, Thromb. Hamost. 69: 436-440, 1993]. 이어서, mPEG 숙신이미딜 숙시네이트 (200mg/kg VWF)를 혼합물에 첨가하고, 1시간 동안 서서히 진탕하면서 실온에서 PEG화를 수행하였다. 혼합물을 2M NaCl을 함유하는 동일한 부피의 HEPES-완충액, pH 7.4로 희석하였다. 여과에 의해 상층액으로부터 겔을 분리하였다. 이어서, 겔을 2ml HEPES-완충액, pH 7.4 (20mM HEPES, 1M NaCl)으로 3회 세척하고, 상층액과 세척 용액을 합하였다. 이어서, PEG화 VWF를 함유한 용액을, 재생 셀룰로스(밀리포어)로 구성된 100kD 막을 사용하여 20mM HEPES-완충액, pH 7.4 (150mM NaCl, 3% 사카로스)에 대하여 한외여과 및 정용여과에 의해 농축하였다. 수득된 유도체는 바이아코어 테크놀로지 또는 ECA 시험을 사용하여 전체 FVIII 결합 능력을 나타낸다 (시험 시스템은 미국 임시 특허 출원 일련번호 60/668,378 (2005년 4월 4일 출원)에 기재된다).

실시예 34: 히알루론산과 VWF의 접합

시그마로부터의 히알루론산 (C 53747)을 사용하여 환원 아민화에 의해 히알루론산(HA)으로 리신 잔기의 변형을 수행하였다. HA를 새로 제조된 0.1M NaIO₄ 용액 중에서 용해하여, 5mg HA/ml의 최종 농도를 수득하였다. 이어서, 서서히 교반하면서 어두운 곳에서 15분 동안 산화를 수행하였다. ml 산화된 HA 용액 당 2ml 에틸렌 글리콜의 첨가하고 실온에서 어두운 곳에서 30분 동안 더욱 교반함으로써 반응을 중지하였다. 용액을 어두운 곳에서 4℃에서 0.05M 인산나트륨 완충액, pH 7.2에 대해 밤새 투석하였다. 이어서, 이 용액의 분취량을 0.05M 인산나트륨 완충액, pH 7.2에서 rVWF 용액 (40 U VWF:Ag/ml)에 첨가하여 mg 단백질 당 50mg 활성화 HA의 최종 농도를 수득하였다. 이 혼합물을 120분 동안 실온에서 어두운 곳에서 교반하였다. NaCNBH₃를 첨가하고 (1 mg/mg 단백질), 혼합물을 실온에서 18시간 동안 어두운 곳에서 서서히 교반하면서 항온처리하였다. 이어서, 이 혼합물의 ml 당 100 μ l의 1M 트리스-완충액, pH 7.2를 첨가하고, 1시간 동안 교반하여 반응을 종료하였다. 100kD 막 (재생 셀룰로스/밀리포어)을 사용하여 UF/DF에 의해 rVWF HA 접합체로부터 자유 반응물을 분리하였다.

실시예 35: PSA 접합된 VWF의 생화학적 시험관내 특징화

실시예 19에 따라 RVWF를 폴리시알릴화하였다. 등전압 포커싱 (도 20), 실시예 16에 따른 ECA-시험 (54%) 및 실시예 12에 따른 표면 플라스몬 공명 (70%)에 의한 FVIII 결합 능력의 결정과 같이 실시예에 기재된 매개변수에 추가로, 비율 VWF:Rco/VWF:Ag을 계산하였다. 통상적으로 입수가능한 분석 체계 (스위스 바젤 로세 아세라크롬 vWF)에 의해 VWF 항원 수준을 결정하였다. 맥팔레인(Macfarlane) 등 (Thromb. Diath. Haemorrh 34: 306-308, 1975)에 의해 기재된 바와 같이 리스토세틴(Ristocetin) 보조인자 분석에 의하여 제제의 기능적 활성을 결정하였다. rVWF 출발 물질에 대해 계산된 0.39의 비율은 폴리시알릴화 후에 0.13으로 감소된다.

실시예 36: 리신 잔기를 통한 분지쇄 PEG와 rVWF의 접합

0.5% 슈크로스를 함유하는 20mM HEPES 완충액, 150mM NaCl, pH 7.4 중에서 성숙한 rVWF (35U VWF:Ag/ml)의 용액을 실시예 23에 따라 제조하였다. 이어서, NOF 코포레이션 (벨기에 그로벤던크 NOF 유럽)에 의해 공급되는 분지쇄 mPEG 숙신이미딜 글루타레이트 (PE-SG/사슬 길이: 20kD)를 서서히 교반하면서 이 용액에 첨가하고 (5mg PEG-SG/mg 단백질), 0.5M NaOH의 적가에 의하여 pH 값을 7.4로 조절하였다. 이어서, 실온에서 1시간 동안 서서히 교반하면서 PEG화를 수행하였다. 이어서, 반응 혼합물을 20mM HEPES 완충액, 150mM NaCl, pH 7.4 (0.5% 슈크로스 함유)에서 평형화된 이온-교환 크로마토그래피 수지 (프락토겔 EMD TMAE 650M) 상에 적용하였다. 이어서, 컬럼을 20CV 평형상태 완충액으로 세척하여 과량의 반응물을 제거하고, PEG화 rVWF를 용출 완충액 (20mM HEPES, 0.5M NaCl, 0.5% 슈크로스, pH 7.4)으로 용출하였다. 재생 셀룰로스로 구성된 막 및 20mM HEPES, 150mM NaCl, 0.5% 슈크로스, pH 7.4로 구성된 완충 체계를 사용하는 100kD의 분자량 컷-오프를 사용하여 용출액을 한외여과/정용여과에 의해 농축하였다. 수득된 PEG화 유도체는 rVWF 출발 물질 (VWF:Rco/VWF:Ag 비율 : 0.89)에 비하여 0.79의 약간 감소된 VWF:Rco/VWF:Ag 비율을 나타내었다. 또한, PEG화 rVWF 출발 물질은 ECA 시험에 의해 측정 시에 83%의 FVIII 결합 능력을 가졌다 (실시예 16).

실시예 37: FVIII-K.O. 생쥐에서 분지쇄 PEG와 접합된 VWF의 약동학

중증 인간 혈우병 A의 모델로서 FVIII 결핍 생쥐 [Bi 등, Nat.Genet. 10: 119-121, 1995]를 사용하였다. 5마리 생쥐의 군은 PEG-rVWF (분지쇄 PEG, SG)와 rFVIII의 혼합물 또는 천연 rVWF와 rFVIII의 혼합물로 꼬리 정

맥을 통해 일시 주사 (10 ml/kg)를 받아서 30U FVIII/ml 및 25U VWF/ml를 달성하였다. 주사 후 5분, 3시간, 9시간, 24시간 및 32시간에 마취 후 심장 천공에 의하여 각각의 군으로부터 시트레이트 혈장을 제조하였다. 혈장 샘플에서 FVIII 활성 및 VWF 항원 회복 수준을 측정하였다. VWF 및 FVIII에 대한 제거 곡선을 도 23 및 도 24에 나타낸다. VWF 반감기는 1.4 시간으로부터 9.7 시간으로 증가하고, VWF에 대한 AUC는 11.8로부터 49.2 U*h/ml로 증가되었다. FVIII에 대한 반감기는 1.2시간 (천연 rVWF의 존재 하)으로부터 4.4시간 (PEG-rVWF와 함께 적용될 때)으로 증가되고, 곡선 아래의 면적 (AUC)은 12.1으로부터 30.5 U*h/ml로 증가되었다.

<185> **실시예 38: FVIII-K.O-생쥐에서 상이한 양의 PEG-VWF와 혼합된 FVIII의 비교 약동학**

<186> 5마리 FVIII 결함 K.O-생쥐의 군은 PEG-rVWF (25mg 분지쇄 PEG-SG 20000/mg 단백질을 가진 리신 잔기의 PEG화) 및 rFVIII (A: 20IU PEG-rVWF/ml + 20IU FVIII/ml; B: 10IU PEG-rVWF/ml + 20IU FVIII/ml; C: 3IU PEG-rVWF/ml + 20 IU FVIII/ml)의 다양한 혼합물로 꼬리 정맥을 통해 일시 주사 (10ml/kg)를 받았다. PEG화 rVWF를 위하여, 3몰 PEG/1 몰 리신의 비율이 계산되었다. 상이한 PEG-rVWF/rFVIII 혼합물 중에서 동일한 양 (단위 기준)의 PEG-rVWF 및 rFVIII를 비교하여, PEG/FVIII의 하기 비율이 계산될 수 있다: 3:1 (A); 1.5:1 (B): 0.45:1 (C). 마취 후에, 주사 후 5분, 1, 3, 9 및 24시간에 각각의 군으로부터 심장 천공에 의해 시트레이트 혈장을 제조하였다. FVIII 반감기 (A: 2.1시간, B: 2.0시간, C: 2.5시간) 및 AUC (A: 18.9, B: 14.5, C: 13.2 U*hr/ml)에서의 관련된 차이가 발견되지 않았다. FVIII에 대한 제거 곡선을 도 25에 나타낸다.

<187> **실시예 39: 상이한 정도의 PEG화와 함께 PEG-VWF 제제를 사용한 비교 약동학**

<188> FVIII 결함 및 VWF-결함 생쥐의 잡종-교배에 의해 FVIII× VWF 이중 녹아웃 생쥐를 수득하였다. 이러한 생쥐는 FVIII 결함 뿐만 아니라 VWF 결함을 갖고 있다. 5마리의 FVIII VWF 이중 녹아웃 생쥐의 군을 천연 rVWF/rFVIII의 혼합물 (100/150 IU/kg) 또는 rFVIII와 혼합된 PEG화 rVWF #A (100/150 IU/kg) 또는 rFVIII와 혼합된 PEG화 rVWF #B (150/150 IU/kg)로 꼬리 정맥을 통해 주입하였다. 실시예 24에 따라 PEG-rVWF #A (5mg PEG-SS 5000/mg 단백질) 및 PEG-rVWF #B (20mg PEG-SS 5000/mg 단백질)을 제조하였다. 제제 #A를 위하여 2.5 몰 PEG/몰 리신의 비율 및 제제 #B를 위하여 10몰 PEG/몰 리신의 비율이 계산되었다. 이를 위하여, 샘플 적용 후 5분, 1시간, 3시간, 9시간 및 24시간에 시트레이트 혈장 샘플을 제조하였다. VWF:Ag 및 FVIII 활성의 혈장 수준을 측정하고, 일반적으로 주사 후 5분에 도달하는 최대 혈장 수준의 퍼센트로서 표현하였다. VWF 및 FVIII을 위한 제거 곡선을 도 26 및 도 27에 나타낸다. 각각 PEG-rVWF #A 및 #B를 위하여 반감기는 6.3 시간 및 8.1 시간이었다. 천연 rVWF를 위하여 2.0시간의 반감기를 계산하였다. 양쪽 PEG화 rVWF를 위한 표준화 AUC (최대 % × h)은 360%*h (천연 rVWF)으로부터 901 %*h (#A) 및 1064%*h (#B)로 증가하였다. 공동-주입된 rFVIII을 위한 순환 시간은 천연 VWF에 비하여 PEG화 rVWF에 의해 개선되었다. FVIII의 반감기는 천연 rVWF의 존재 하에서 0.8시간이고, 각각 PEG화 rVWF #A 및 #B으로 주입할 때 1.5시간 및 1.8시간으로 증가하였다. FVIII을 위한 AUC는 214, 370 및 358 %*h이었다.

<189> **실시예 40: VWF - 이량체의 PEG화**

<190> 재조합 CHO 세포주 (백스터 바이오사이언스)의 조절된 배지로부터 정제된 VWF 이량체 (58IU VWF:Ag/ml)의 용액을 20mM HEPES 완충액, 150mM NaCl, pH 7.4 (0.5% 슈크로스 함유) 중에서 제조하였다. 이어서, NOF 코포레이션에 의해 공급된 분지쇄 mPEG 숙신이미딜 글루타레이트 (PE-SG/사슬 길이: 20kD)를 서서히 교반하면서 이 용액에 첨가하고 (5mg PEG-SG/mg 단백질), 0.5M NaOH의 첨가에 의하여 pH 값을 7.4로 조절하였다. 실온에서 1시간 동안 서서히 교반하면서 PEG화를 수행하였다. 이어서, 0.5% 슈크로스를 함유하는 20mM HEPES 완충액, 150mM NaCl, pH 7.4 중에서 평형화된 이온-교환 크로마토그래피 수지 (프락토겔 EMD TMAE 650M) 상에 반응 혼합물을 적용하였다. 이어서, 컬럼을 20CV 평형화 완충액으로 세척하여 과량의 반응물을 제거하고, PEG화 rVWF 이량체를 용출 완충액 (20mM HEPES, 0.5M NaCl, 0.5% 슈크로스, pH 7.4)으로 용출하였다. 재생 셀룰로스 (밀리포어)로 구성된 막과 20mM HEPES, 150mM NaCl, 0.5% 슈크로스, pH 7.4로 구성된 완충 체계를 사용하여 100kD의 분자량 컷오프를 사용하여 한외여과/정용여과에 의해 용출물을 농축하였다.

<191> **실시예 41: 저 다량체 rVWF의 PEG화 및 시험관내 특징화**

<192> 실시예 23에 따라 성숙한 rVWF를 정제하였다. 정제 절차는 이온-교환 크로마토그래피 단계 뿐만 아니라 20mM HEPES, 150mM NaCl, pH 7.4에서 수행되는 수퍼로즈 6 상에서의 최종 겔여과 단계를 포함하였으며, 여기에서 고 다량체 rVWF (17 다량체)를 공급 부피로 용출하였다. 1.0% 아가로스 겔을 사용하여 루게리 및 지머맨 [Blood 57: 1140-43, 1981]에 따라 VWF 다량체 분석을 수행하였다. 높은 체류 시간으로 용출하면서, 부속 분획으로부터 저 다량체 rVWF 제제 (6 다량체)를 수득하였다. 0.5% 슈크로스, pH 7.4의 첨가에 의해 이 분획을 안정화하

였다. 이어서, mPEG 숙신이미딜 숙시네이트 (PEG-SS)를 사용하여 저 다량체 rVWF를 PEG화하였다. PEG-SS를 서서히 교반하면서 이 용액에 첨가하고 (5mg PEG-SS/mg 단백질), 0.5M NaOH의 적가에 의해 pH 값을 7.4로 조절하였다. 실온에서 1시간 동안 서서히 교반하면서 PEG화를 수행하였다. 이어서, 재생 셀룰로스로 구성된 막과, 20mM HEPES, 150mM NaCl, 0.5% 슈크로스, pH 7.4로 구성된 완충액 체계를 사용하는 100kD의 분자량 컷오프를 사용하여, 한외여과/정용여과에 의해 과량의 반응물을 제거하였다. 실시예 16에 따라 ECA 분석에 의해 결정된 FVIII 결합 능력은 출발 물질에 대해 49%로부터 PEG화 제제에 대해 34%로 약간 감소되었다. 저 다량체 rVWF에 대해 측정된 0.02의 VWF:RCO/VWF:Ag 비율은 PEG화 절차에 의해 영향을 받지 않았다.

<193> 실시예 42: 가역적으로 차단된 FVIII 결합 에피토프로 VWF의 유도체화 (FVIII 및 헤파린으로의 차단)

<194> 크로마토그래피 컬럼 (15mm×148mm)을 헤파린 하이퍼D (바이오-세프라)로 충전하고, 20mM HEPES, 68mM NaCl, 0.5% 슈크로스, pH 7.4으로 구성된 평형상태 완충액으로 평형화하였다. 이어서, 20mM HEPES, 150mM NaCl, 0.5 슈크로스 중에서 성숙한 rVWF (48IU VWF:Ag/ml)의 용액을 H₂O로 희석하여 7 내지 8 mS/cm의 전도성을 수득하고, 1.5cm/분의 선형 유동 속도를 사용하여 이 컬럼에 적용하였다. 이어서, NOF 코포레이션 (NOF 유럽, 벨기에 그로벤딩크)에 의해 공급된 분지쇄 mPEG 숙신이미딜 글루타레이트 (사슬 길이: 20kD)을 15ml 평형상태 완충액에 새로 용해시켜 5mg PEG-SG/mg 결합된 단백질의 최종 농도를 수득하였다. 이어서, 반응물 용액을 컬럼 상으로 펌프질하고, 정적 조건 하에서 PEG화를 2시간 동안 수행하였다. 이어서, 0.05% 리신을 함유하는 10 CV 평형상태 완충액으로 컬럼을 세척하였다. 이어서, 보호된 FVIII 결합 에피토프를 가진 PEG화 rVWF를, 20mM HEPES, 1M NaCl, 0.5% 슈크로스, pH 7.4로 구성된 완충액으로 용출하였다. 마지막으로, 재생 셀룰로스 (밀리포어)로 구성된 100kD 막을 사용하여 20mM HEPES-완충액, pH 7.4 (150mM NaCl, 0.5% 슈크로스)에 대해 이 용액을 한외여과/정용여과에 의해 농축하였다. 수득된 유도체는 0.48의 VWF:RCO/VWF:Ag 비율을 나타내었으며, 이것은 rVWF 출발 물질 (비율 0.47)과 동일하였다. 실시예 36에 기재된 것과 같이 분지쇄 PEG-SG 20000을 사용하는 rVWF의 PEG화 절차와 반대로, FVIII 결합 능력은 ECA 시험 (실시예 16)에 의해 측정 시에 FVIII 에피토프 캡형성을 가진 PEG화 절차에 의해 영향을 받지 않았다.

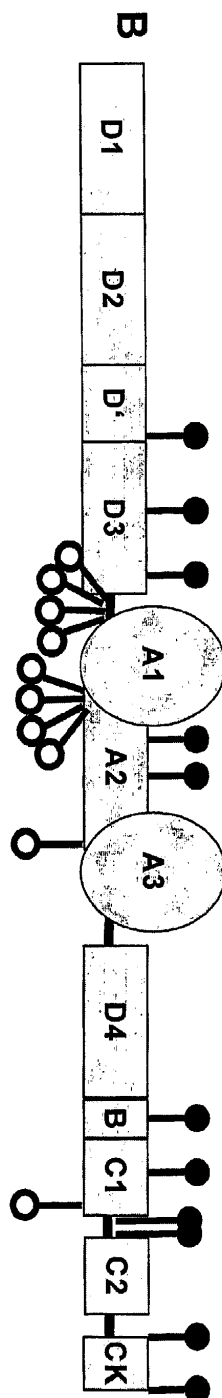
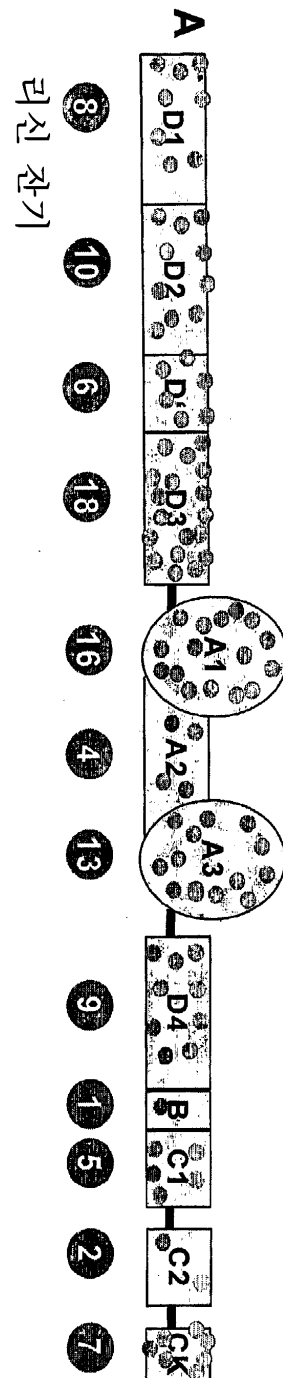
<195> 실시예 43: 리신 잔기를 통한 분해성 PEG와 VWF의 접합

<196> 실시예 23에 따라 성숙한 rVWF를 정제하였다. 이어서, 0.5% 슈크로스를 함유하는 20 mM HEPES 완충액, 150mM NaCl, pH 7.4 중에서 rVWF의 용액을 제조하였다 (40U VWF: Ag/ml). 이어서, 서서히 교반하면서 mPEG-(카르복시메틸)-3-히드록시-부탄산 N-히드록시숙신이미드 에스테르 (사슬 길이: 5KD)를 이 용액에 첨가함으로써 (5mg PEG-시약/mg 단백질) PEG화를 수행하고, 0.5M NaOH의 적가에 의하여 pH 값을 7.4로 조절하였다. 이어서, 실온에서 1 시간 동안 서서히 교반하면서 PEG화 반응을 수행하였다. 이어서, 재생 셀룰로스로 구성된 막과, 20mM HEPES, 150mM NaCl, 0.5% 슈크로스, pH 7.4로 구성된 완충액 체계를 사용하는 100kD의 분자량 컷오프를 사용하여, 한외여과/정용여과에 의해 PEG화 rVWF로부터 과량의 반응물을 분리하였다.

도면의 간단한 설명

- <60>** 도 1A 및 1B는 VWF/접합을 위한 표적 부위에 대한 예의 개략적 구조를 나타낸다. 도 1A에서 회색 점은 적어도 하나의 중합체 분자에 의해 결합될 수 있는 VWF의 리신 잔기를 나타내고, 도 1B는 적어도 하나의 중합체 분자에 의해 결합될 수 있는 VWF에서의 탄수화물 잔기를 나타낸다.
- <61>** 도 2는 VWD를 가진 생쥐에서 비-접합 VWF에 비하여 중합체-VWF-접합체의 약동학을 나타낸다.
- <62>** 도 3은 혈우병 생쥐에서 비-접합 VWF에 비하여 중합체-VWF-접합체의 약동학을 나타낸다.
- <63>** 도 4는 rVWF 또는 PEG-rVWF로 치료된 VWD 생쥐에서 FVIII의 약동학을 나타낸다.
- <64>** 도 5는 중합체-VWF-접합체와 복합체화된 rFVIII 및 VWF와 복합체화된 rFVIII의 적용 후에 혈우병 생쥐에서 rFVIII의 회복을 나타낸다.
- <65>** 도 6은 중합체-VWF-접합체와 복합체화된 rFVIII 및 VWF와 복합체화된 rFVIII의 적용 후에 혈우병 생쥐에서 VWF의 회복을 나타낸다.
- <66>** 도 7은 FVIII x VWF 이중 녹아웃 생쥐에서 rFVIII 및 PEG-rVWF의 약동학을 나타낸다.
- <67>** 도 8은 잡종 교배 생쥐에서 rFVIII 및 PEG-rVWF의 약동학을 나타낸다.
- <68>** 도 9는 생쥐 혈장에서 VWF:Ag 증가를 나타낸다 (리신 및 탄수화물 결합).

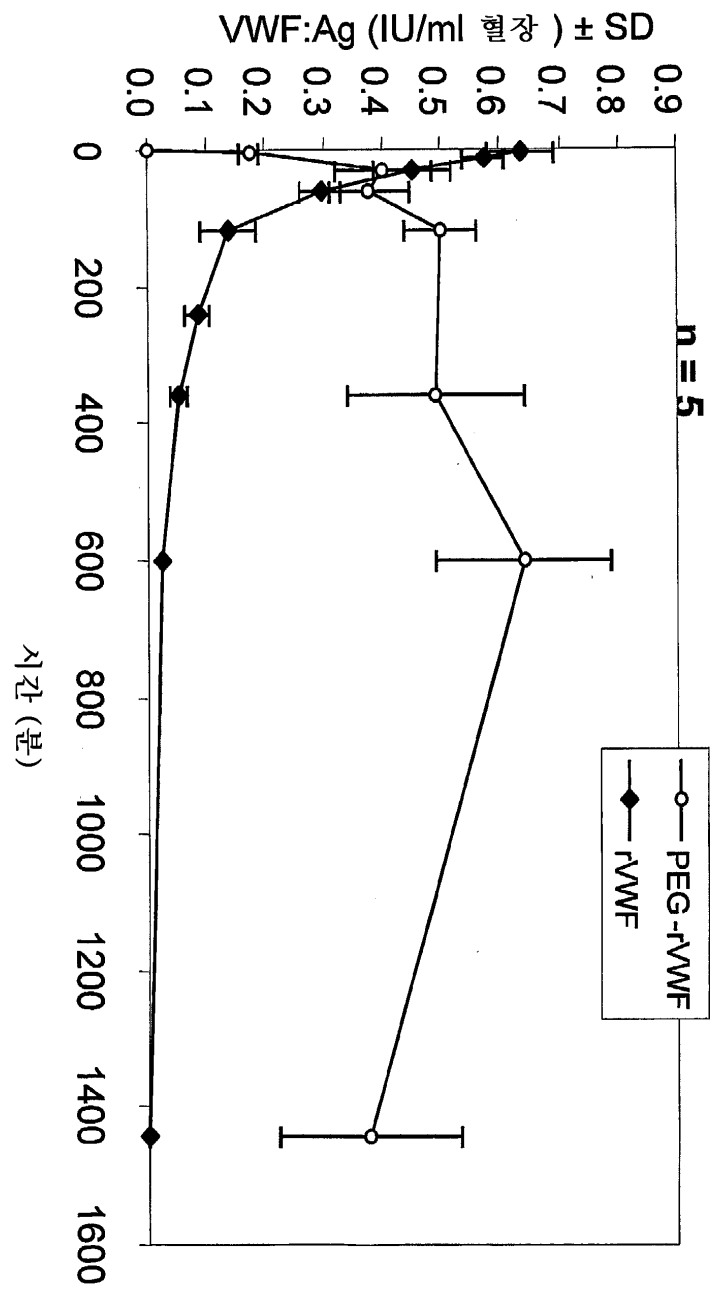
- <69> 도 10은 생체분자 상호작용 연구(왼쪽 도표) 및 비-접합 rVWF에 비하여 PEG-접합 rVWF의 FVIII의 결합 능력의 비교 (오른쪽 도표)를 나타낸다.
- <70> 도 11은 SDS-PAGE에 의해 측정되는 중합체 접합 후에 VWF의 질량 증가를 나타낸다.
- <71> 도 12는 VWF 다량체를 분석하기 위하여 아가로스 전기영동에 의해 측정되는 중합체 접합 후에 VWF의 질량 증가를 나타낸다.
- <72> 도 13은 중합체-VWF-접합체 (PEG화 리신 잔기를 가진 rVWF)와 복합체화된 rFVIII 및 rVWF와 복합체화된 rFVIII의 적용 후에 FVIII-K.O.-생쥐에서 rFVIII의 약동학을 나타낸다.
- <73> 도 14는 중합체-VWF-접합체 (PEG화 리신 잔기를 가진 rVWF)와 복합체화된 rFVIII 및 rVWF와 복합체화된 rFVIII의 적용 후에 FVIII-K.O.-생쥐에서 rVWF의 약동학을 나타낸다.
- <74> 도 15는 조합된 ELISA 및 발색 분석 (ECA)을 사용하여 비-접합 rVWF에 비해 PEG-접합된 rVWF의 FVIII 결합 능력의 결정을 나타낸다.
- <75> 도 16은 표면 플라스몬 공명 기술을 사용하여 PEG-접합 rVWF의 FVIII 결합 능력의 결정을 나타낸다.
- <76> 도 17은 실시예 13에 기재된 바와 같이 SDS-PAGE에 의해 측정되는 중합체 접합 후에 VWF의 질량 증가를 나타낸다.
- <77> 도 18은 조합된 ELISA 및 발색 분석 (ECA)을 사용하여 pdVWF 및 비-처리된 rVWF에 비해 푸린-성숙된 rVWF의 FVIII 결합 능력의 결정을 나타낸다.
- <78> 도 19는 표면 플라스몬 공명 기술을 사용하여 pdVWF 및 비-처리된 rVWF에 비해 푸린-성숙된 rVWF의 FVIII 결합 능력의 결정을 나타낸다.
- <79> 도 20은 환원 조건 하에서 rVWF-폴리시알산 접합체 및 rVWF의 등전압 포커싱 패턴을 나타낸다.
- <80> 도 21은 VWF-결합 생쥐에서 rVWF-폴리시알산 접합체 및 rVWF의 약동학을 나타낸다.
- <81> 도 22는 VWF-결합 생쥐에서 rVWF-폴리시알산 접합체 또는 rVWF의 적용 후에 생쥐 FVIII 활성의 시간 경과를 나타낸다.
- <82> 도 23은 FVIII-결합 생쥐에서 PEG-rVWF (분지쇄 PEG 20K SG) 및 rVWF의 약동학을 나타낸다.
- <83> 도 24는 FVIII 결합 생쥐에서 PEG-rVWF (분지쇄 PEG 20K SG) 또는 rVWF와 공동-주입된 rFVIII의 약동학을 나타낸다.
- <84> 도 25는 FVIII 결합 생쥐에서 다양한 양의 PEG-rVWF (분지쇄 PEG 20K SG)와 공동-주입된 rFVIII의 약동학을 나타낸다.
- <85> 도 26은 FVIII 결합 생쥐에서 PEG-rVWF #A (5mg PEG/mg 단백질), PEG-rVWF #B (20mg PEG/mg 단백질) 및 천연 rVWF의 약동학을 나타낸다.
- <86> 도 27은 PEG-rVWF #A (5mg PEG/mg 단백질), PEG-rVWF #B (20mg PEG/mg 단백질) 및 천연 rVWF와 공동-주입된 rFVIII의 약동학을 나타낸다.
- <87> 본 발명을 이하 실시예에서 더욱 예증할 것이며, 본 발명은 이에 제한되지 않는다.



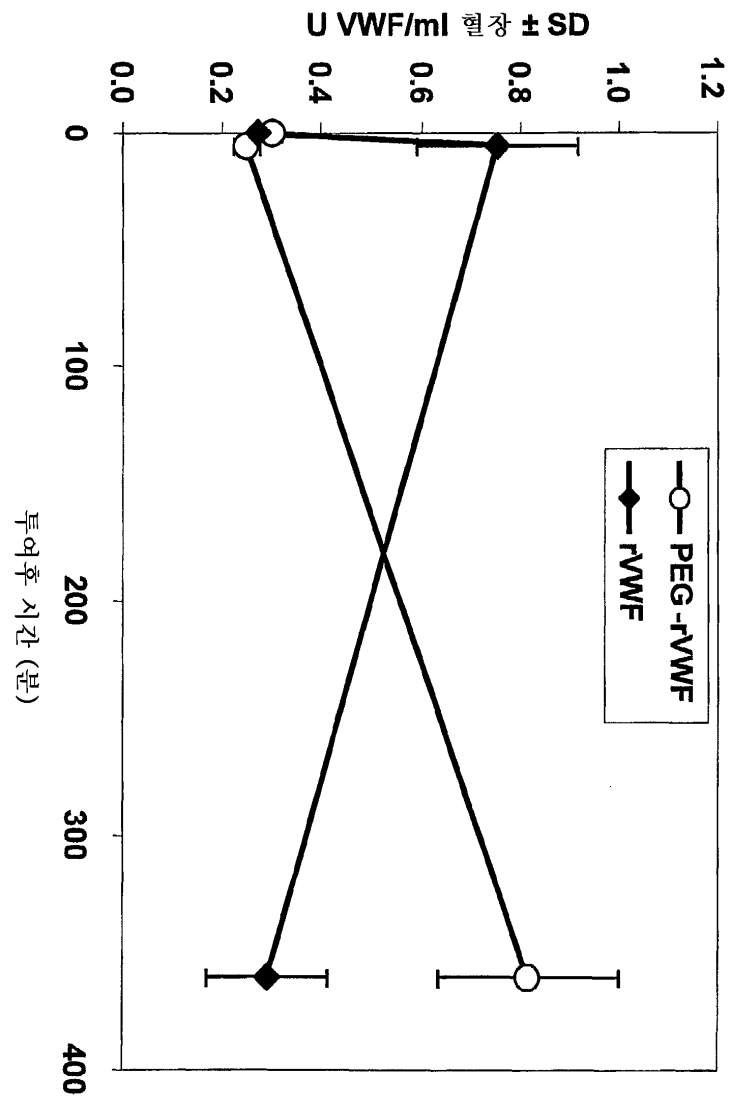
도면

도면1

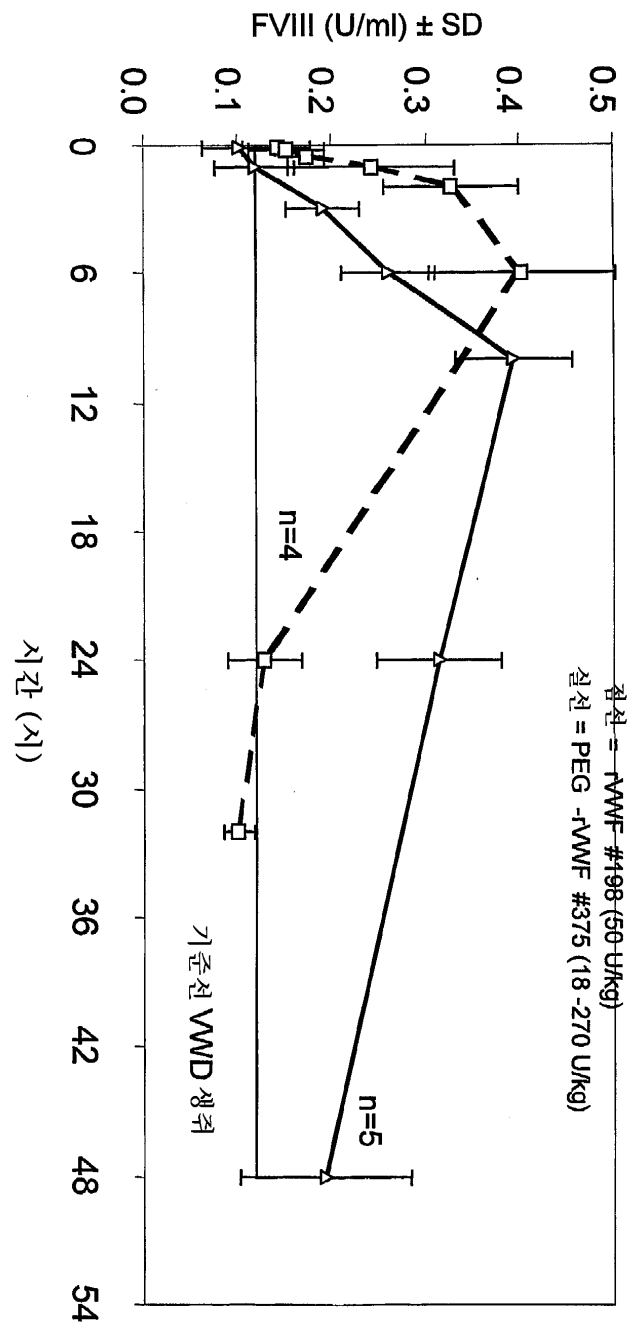
도면2



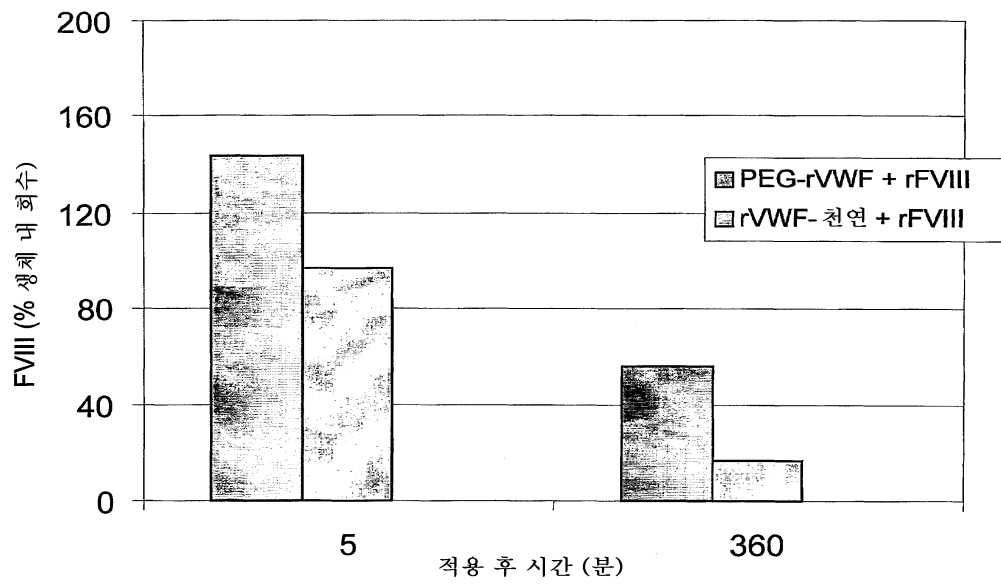
도면3



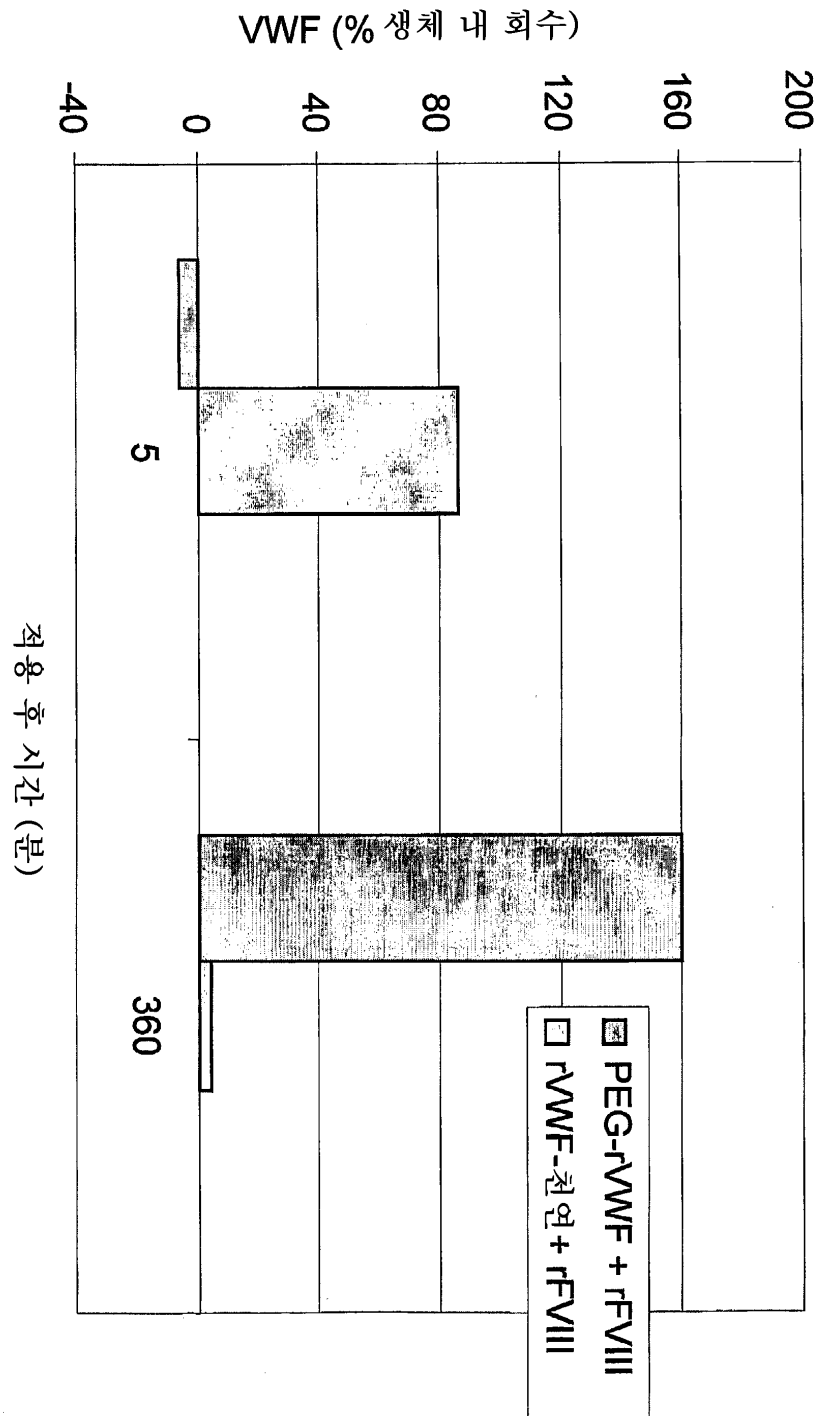
도면4



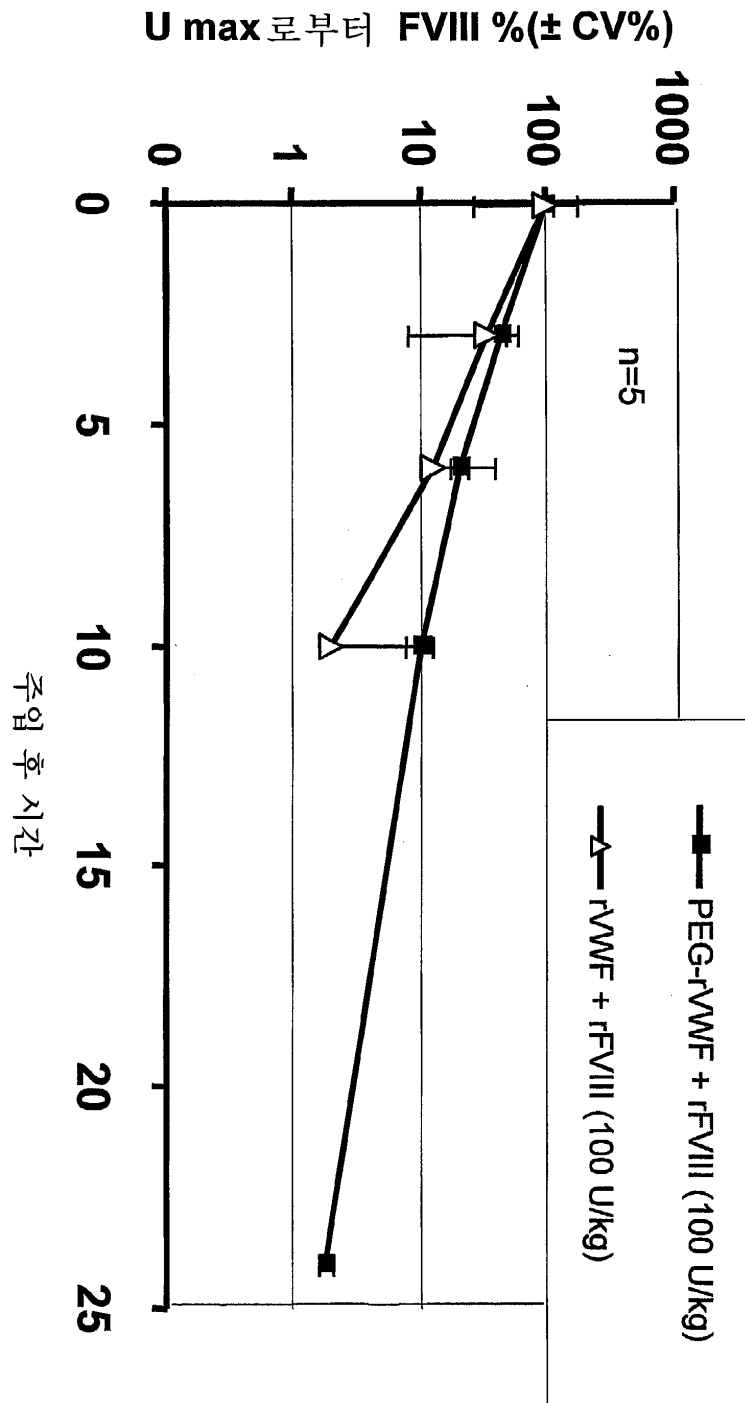
도면5



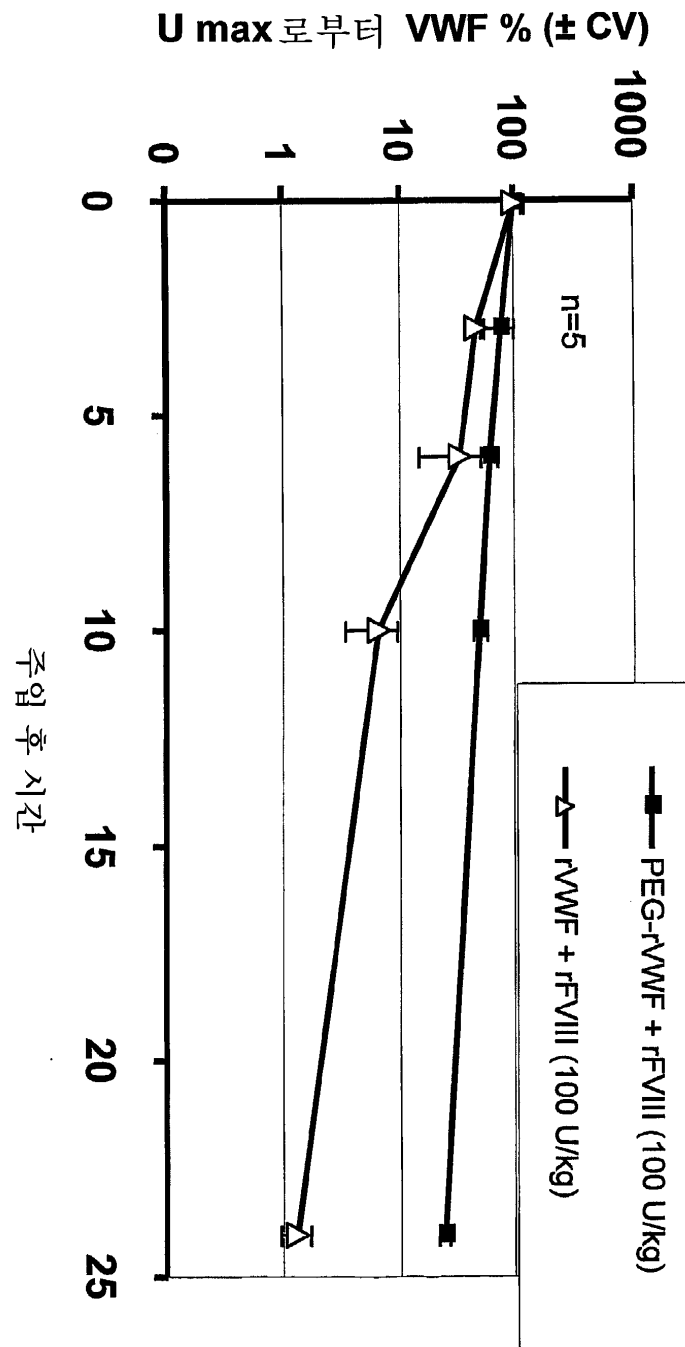
도면6



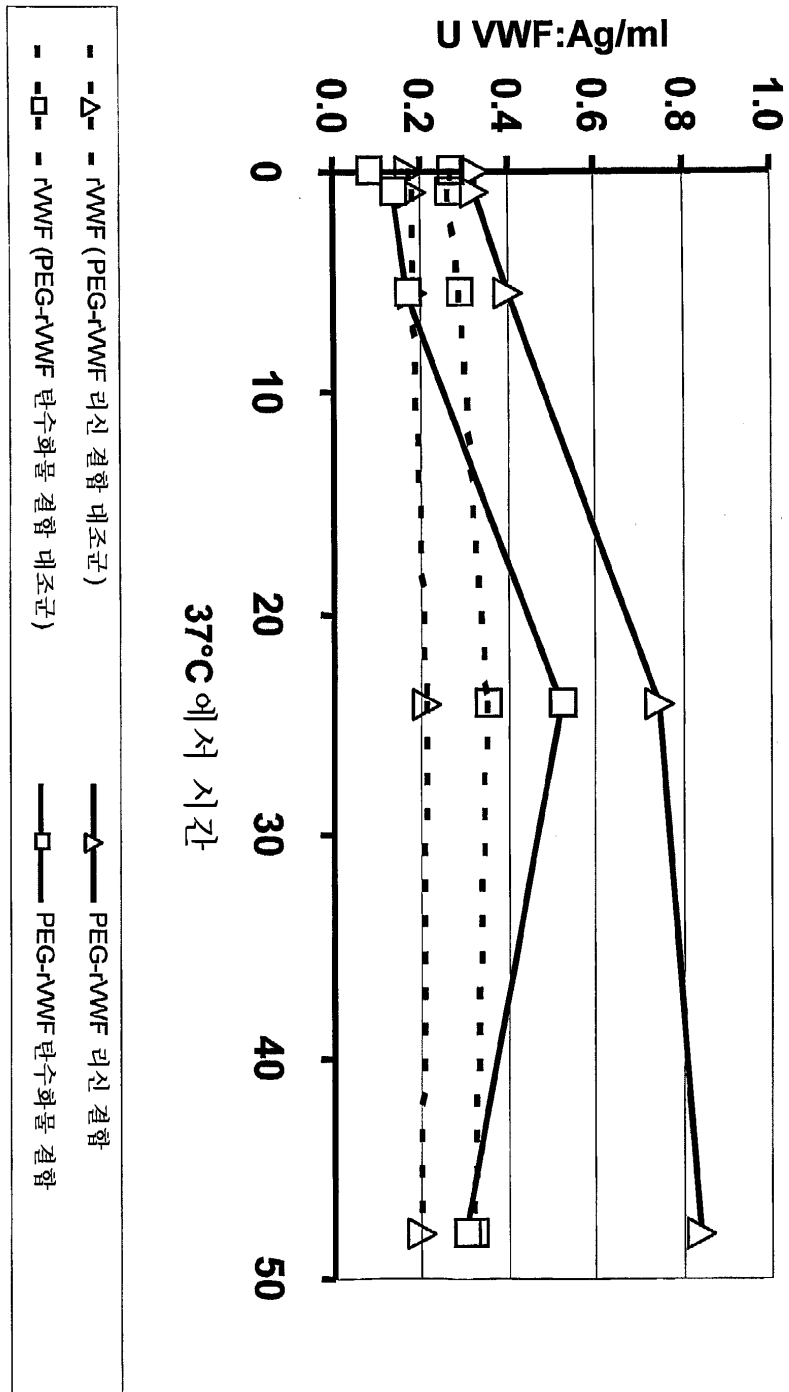
도면7



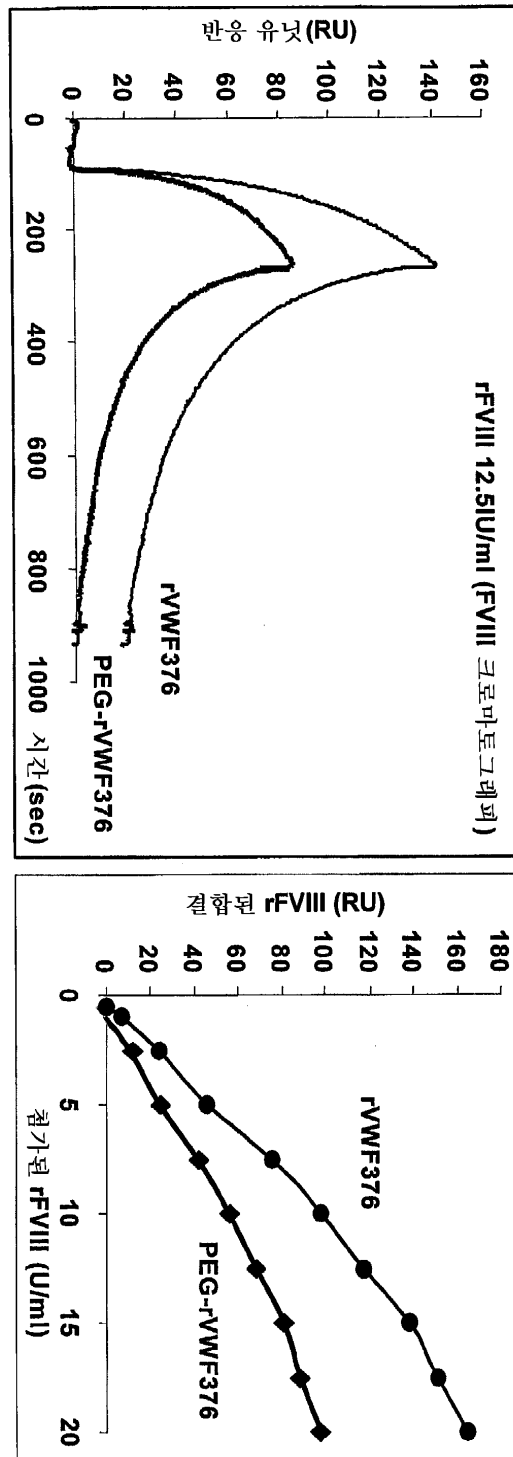
도면8



도면9

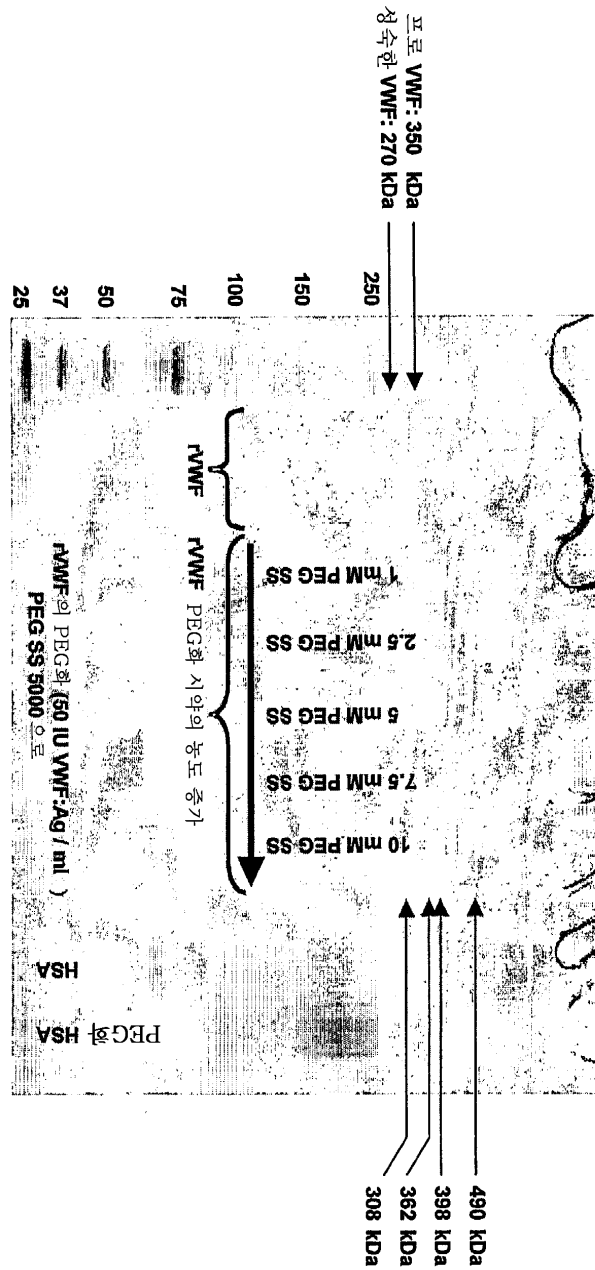
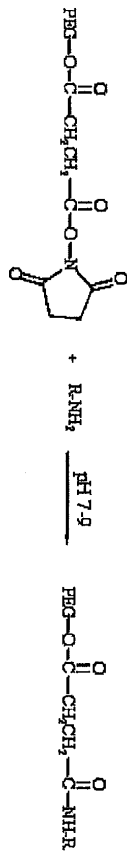


도면10

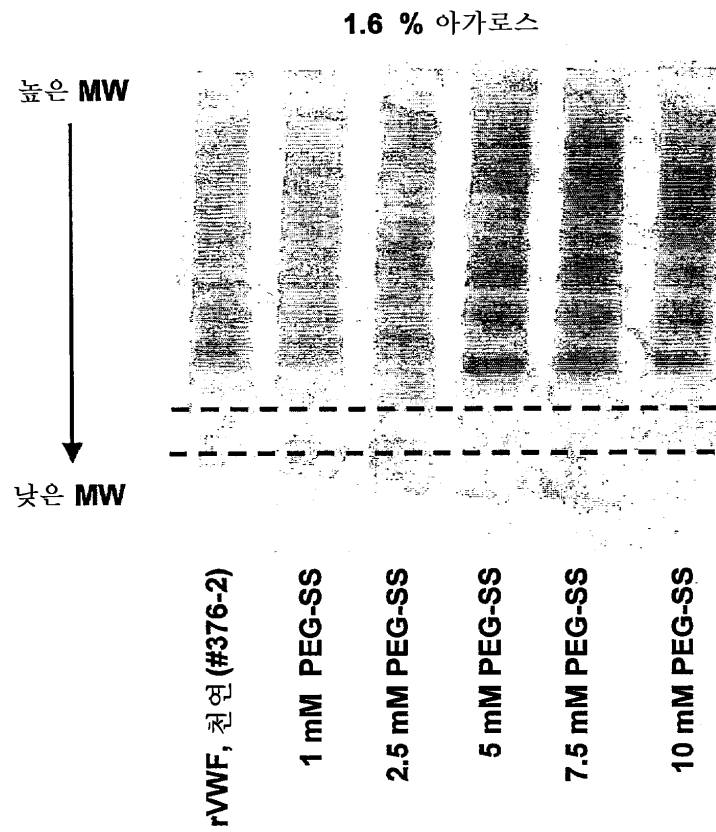


도면11

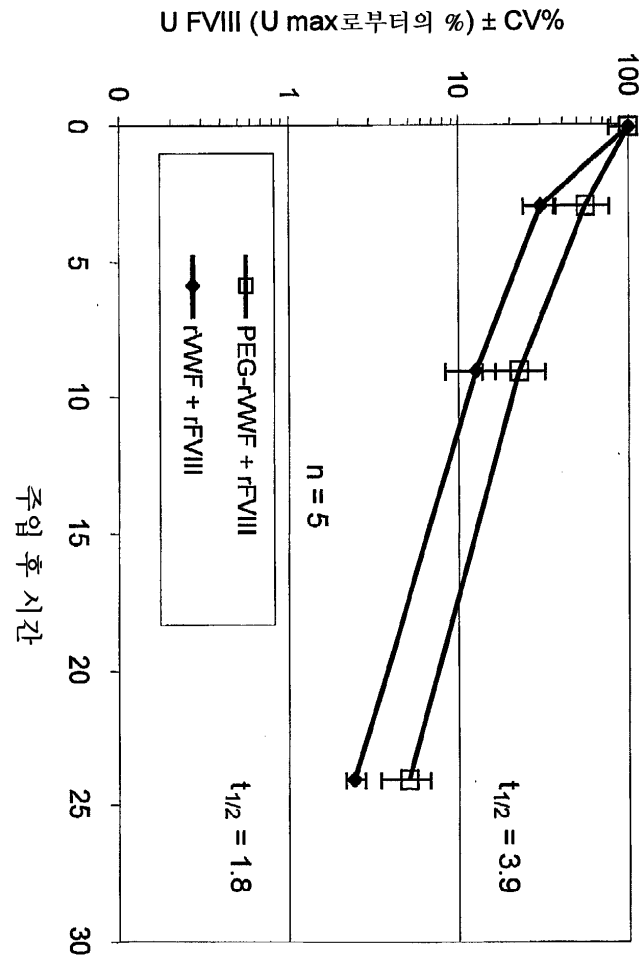
PEG화 메커니즘:



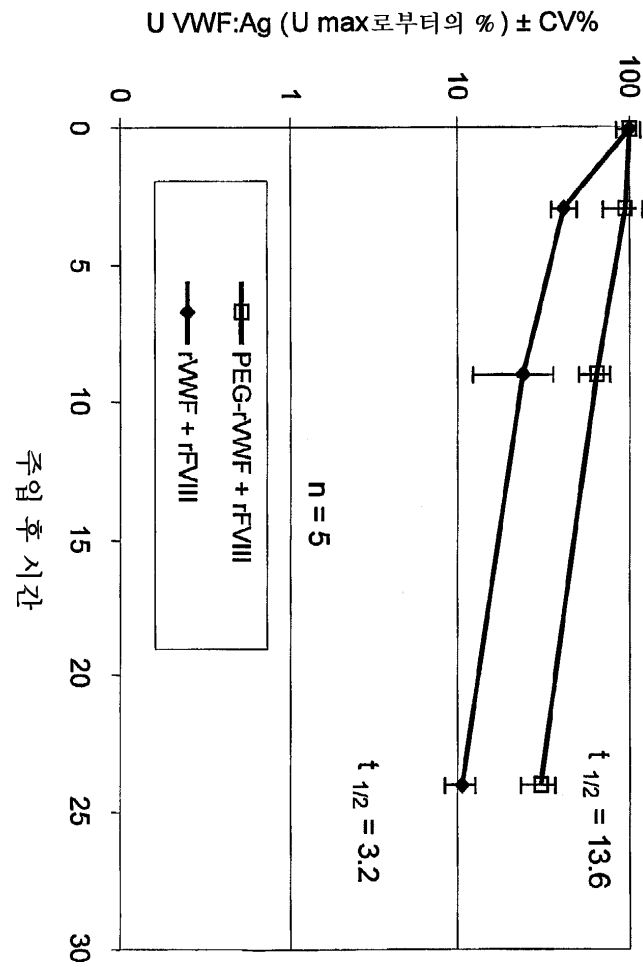
도면12



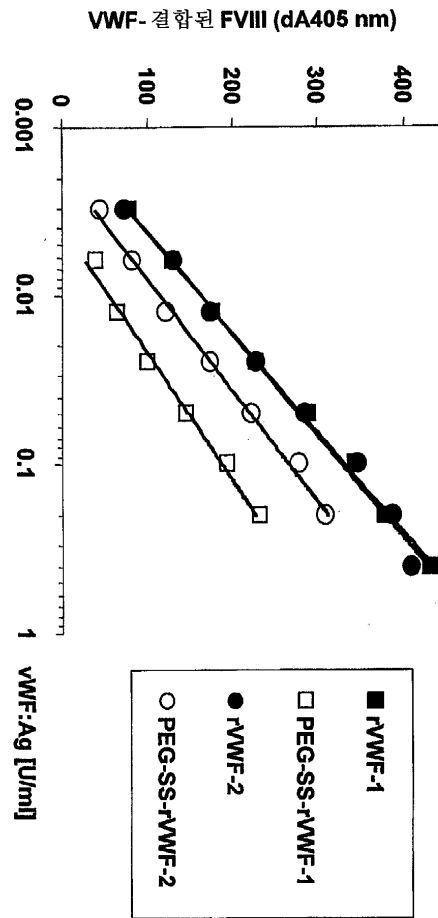
도면13



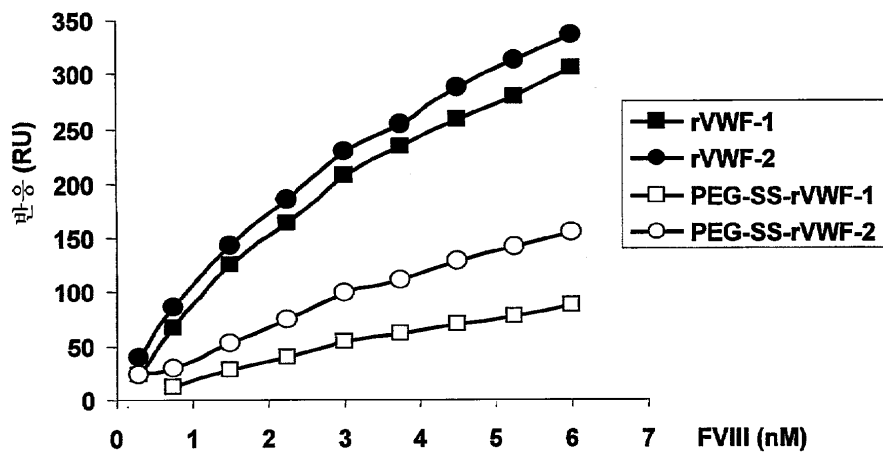
도면14



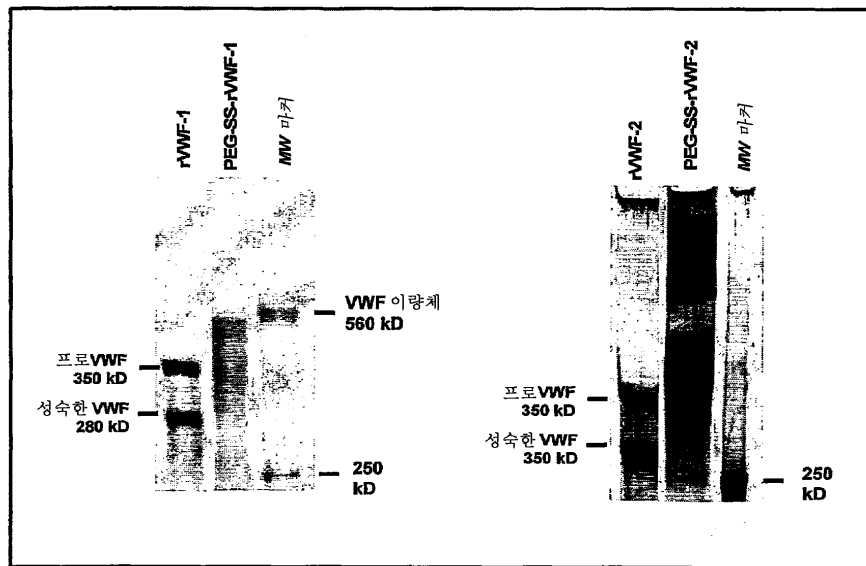
도면15



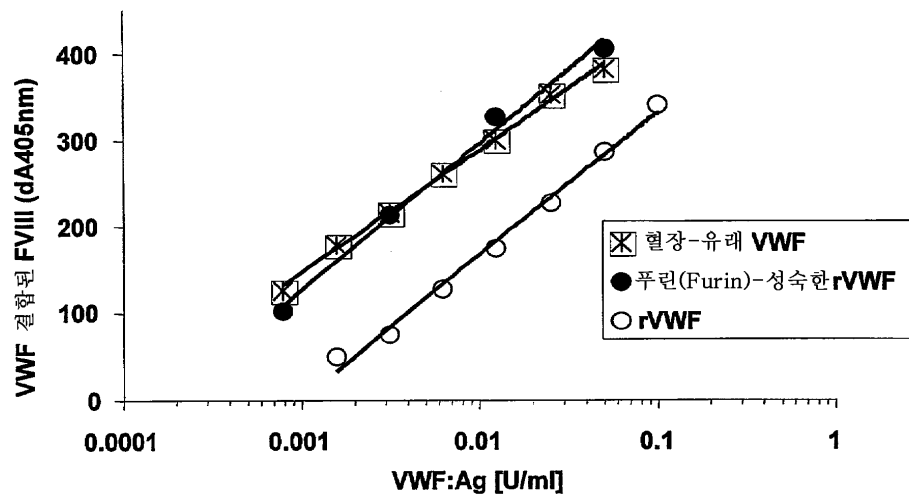
도면16



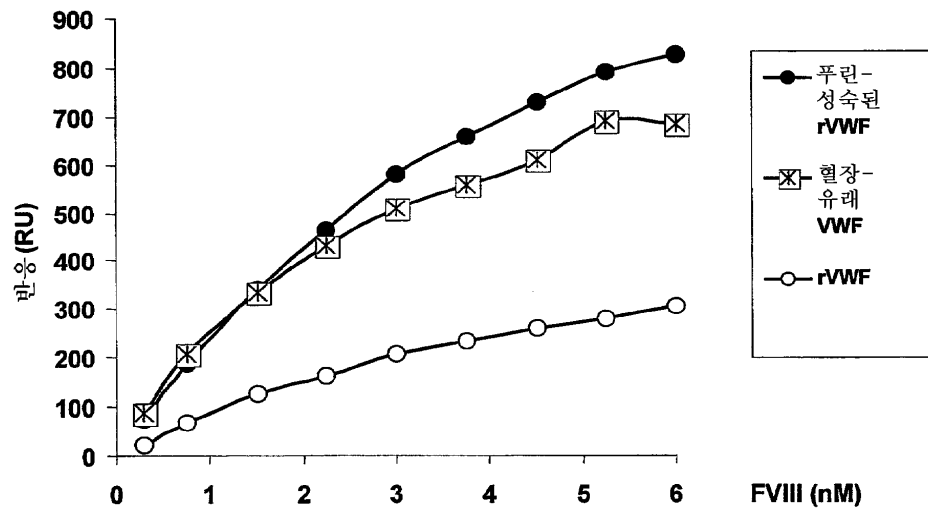
도면17



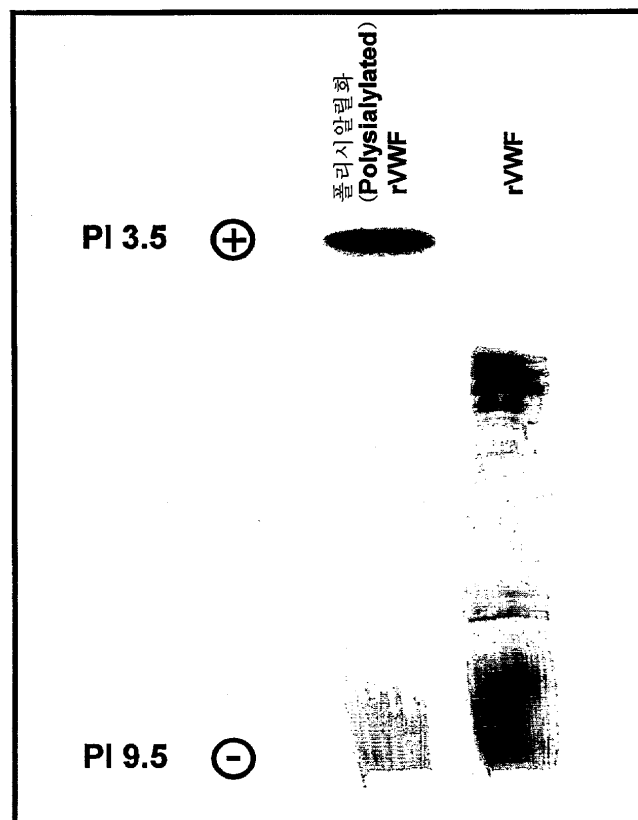
도면18



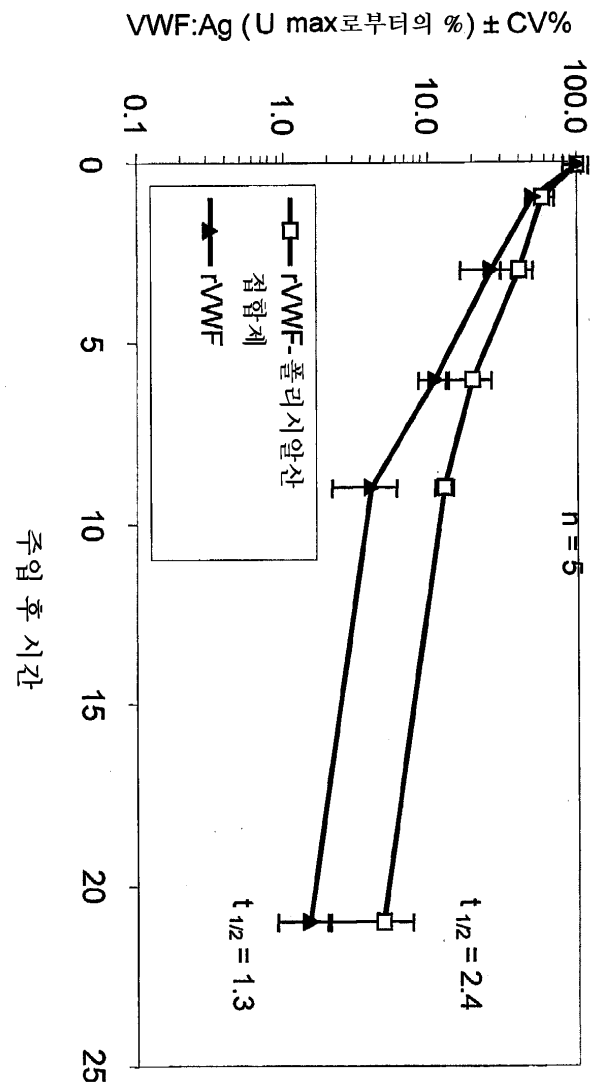
도면19



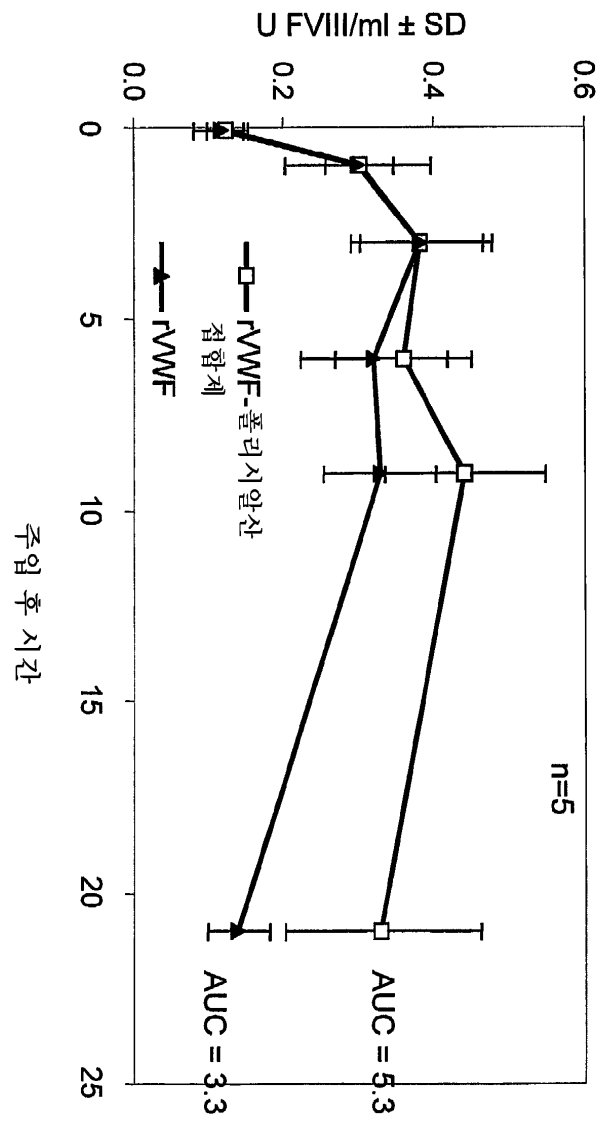
도면20



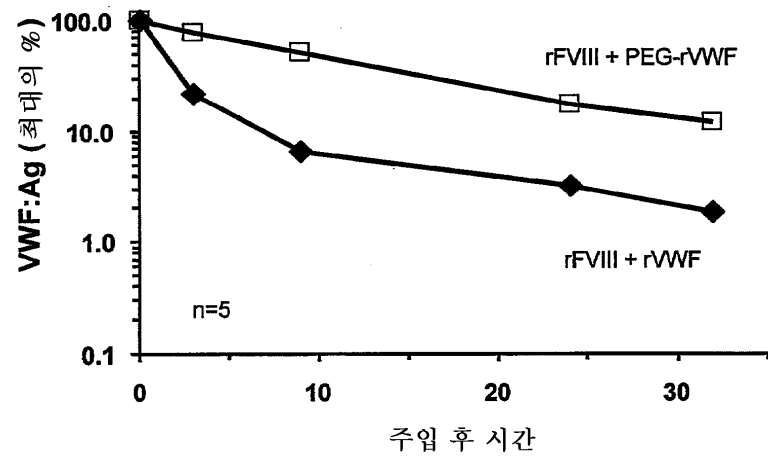
도면21



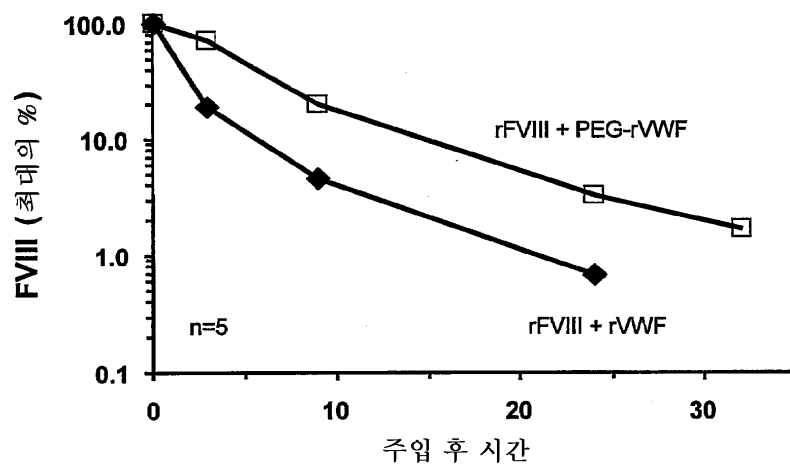
도면22



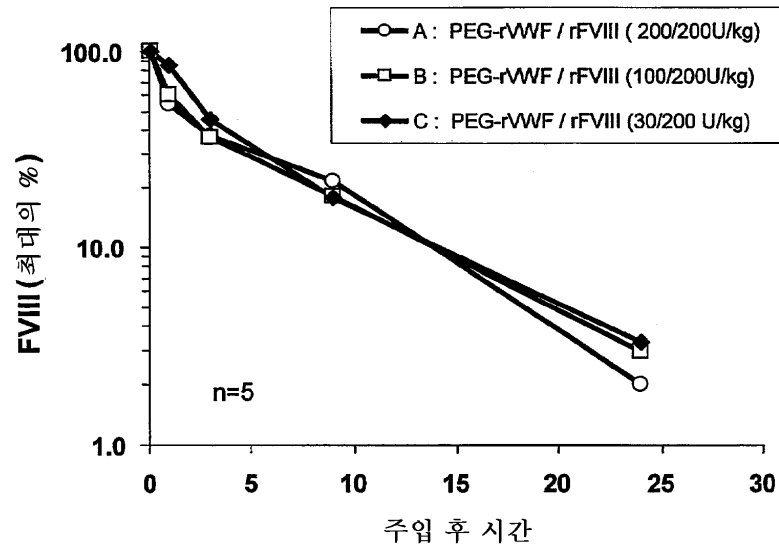
도면23



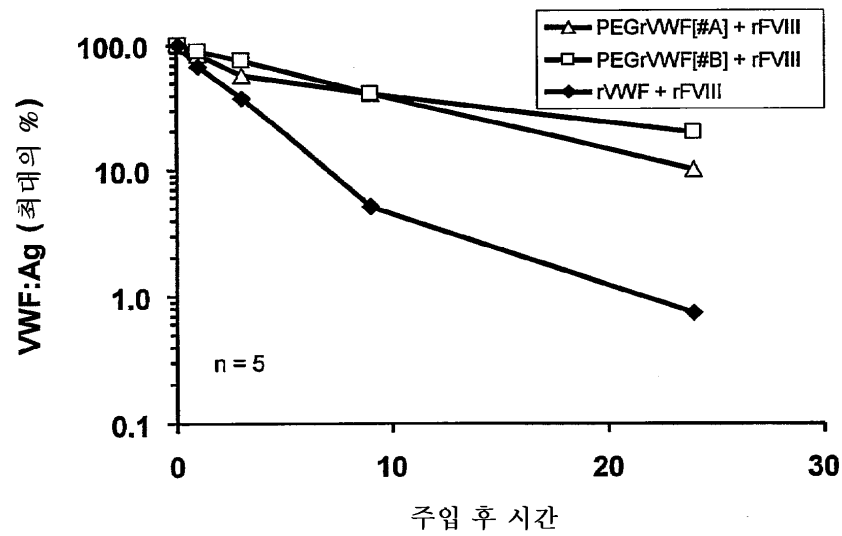
도면24



도면25



도면26



도면27

