



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0055619
 (43) 공개일자 2013년05월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) *A61K 38/37* (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-7031386
 (22) 출원일자(국제) 2011년04월28일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2012년11월29일
 (86) 국제출원번호 PCT/GB2011/000662
 (87) 국제공개번호 WO 2011/135307
 국제공개일자 2011년11월03일
 (30) 우선권주장
 1007357.5 2010년04월30일 영국(GB)

(71) 출원인
캔텀 바이오팔마수티칼 패턴트 리미티드
 몰타, 브이엘티1436, 벨레타, 스트레잇 스트리트
 103, 펠라조 피에트로 스티지스
 (72) 발명자
헨리, 윌리엄
 영국 캠브리지 씨비4 0지엔, 밀턴 로드, 155 캠브
 리지 사이언스 파크, 캔텀 바이오팔마수티칼 리미
 티드
 (74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 **접합된 혈액 응고 인자 VIII**

(57) 요약

본 발명은 하나 이상의 시스테인 잔기, 적합하게는 FVIII 중 환원된 디설피드 결합에 걸친 링커를 통해 FVIII에 접합된 생체적합성 중합체, 및 FVIII의 그러한 접합된 형태를 포함하는 약학조성물을 제공한다.

특허청구의 범위

청구항 1

하나 이상의 시스테인 잔기를 통해 FVIII에 접합된 생체적합성 중합체.

청구항 2

제 1항에 있어서, 생체적합성 중합체가 하나 이상의 환원된 시스테인 디설피드 결합을 통해 FVIII에 접합되는 것인 생체적합성 중합체.

청구항 3

제 2항에 있어서, 생체적합성 중합체가 FVIII에서 디설피드 결합을 형성한 두 개의 시스테인 잔기의 황 잔기를 가교하는 링커기에 의해 FVIII에 접합되는 것인 생체적합성 중합체.

청구항 4

제 3항에 있어서, 링커기가 R¹ 기를 통해 생체적합성 중합체에 접합되며, 여기서 R¹이 직접 결합, C₁₋₁₀ 알킬렌기, 또는 선택적으로-치환된 아릴 또는 헤테로아릴 기인 것인 생체적합성 적합체.

청구항 5

제 4항에 있어서, R¹이 페닐, 벤조일, 나프틸, 피리딘, 피롤, 푸란, 피란, 이미다졸, 피라졸, 옥사졸, 피리다진, 피리미딘 또는 퓨린으로부터 선택되는 것인 생체적합성 중합체.

청구항 6

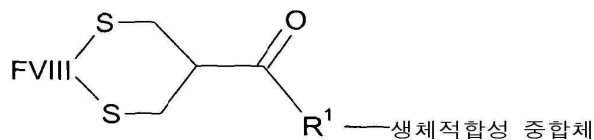
제 3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, FVIII의 시스테인 잔기 사이의 본래의 디설피드 결합의 두 개의 황 원자 사이의 링커기가 3-탄소 가교를 포함하는 것인 생체적합성 중합체.

청구항 7

제 3항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, FVIII의 시스테인 잔기 사이의 본래의 디설피드 결합의 두 개의 황 원자 사이의 링커기가 (CH₂)₂ CH C(O)-인 것인 생체적합성 중합체.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 접합체가 하기 구조를 갖는 것인, FVIII에 접합된 생체적합성 중합체:



상기 식에서, R¹은 직접 결합, 알킬렌기(바람직하게는 C₁₋₁₀ 알킬렌기), 또는 선택적으로-치환된 아릴 또는 헤테로아릴기인 치환기이며; 여기서 아릴기는 페닐, 벤조일 및 나프틸기를 포함하며; 여기서 적합한 헤테로아릴기는 피리딘, 피롤, 푸란, 피란, 이미다졸, 피라졸, 옥사졸, 피리다진, 피리미딘 및 퓨린을 포함하며; 여기서 중합체에 대한 결합이 가수분해적으로 불안정한 결합에 의한 것이거나 안정 결합에 의한 것인 생체적합성 중합체.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 생체적합성 중합체가 약 5-100kDa의 분자량을 갖는 것인 생체적합성 중합체.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 시스테인 잔기를 통해 FVIII에 접합된 생체적합성 중합체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서, 조성물은 약학적으로 허용가능한 희석제, 보조제 또는 담체를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 12

제 10항 또는 제 11항에 있어서, 다른 약학적 활성제를 추가로 포함하는 약학 조성물.

청구항 13

제 10항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서, 비경구 투여에 적합한 약학 조성물.

청구항 14

제 10항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 피내, 피하, 및 근육내 주사, 및 정맥내 또는 골내 주입에 적합한 약학 조성물.

청구항 15

용액, 현탁액 또는 에멀전의 형태인 제 10항 내지 제 14항 중 어느 한 항의 약학 조성물.

청구항 16

제 10항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 있어서, FVIII 접합체가 비변이된 FVIII와 비교할 때 더 긴 반감기를 갖는 것인 약학 조성물.

청구항 17

제 10항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서, FVIII 접합체가 비변이된 FVIII와 비교할 때 더 높은 AUC를 갖는 것인 약학 조성물.

청구항 18

제 10항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, FVIII 접합체가 비변이된 FVIII와 비교할 때 더 높은 생체이용률을 갖는 것인 약학 조성물.

청구항 19

제 10항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, FVIII 접합체가 비변이된 FVIII와 비교할 때 더 낮은 면역원성을 갖는 것인 약학 조성물.

청구항 20

제 10항 내지 제 19항 중 어느 한 항의 약학 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 혈액 응고 질환 또는 외상 치료 방법.

청구항 21

제 20항에 있어서, 혈액 응고 질환이 A형 혈우병인 치료 방법.

청구항 22

제 12항 내지 제 21항 중 어느 한 항의 FVIII 접합체를 포함하는 약학 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 A형 혈우병 또는 외상을 앓는 포유동물에서 혈관질환, 출혈, 위장관 출혈 및 월경과다의 위험을 줄이는 방법.

청구항 23

제 22항에 있어서, 조성물이 피하 투여되는 것인 방법.

청구항 24

제 22항에 있어서, 조성물이 정맥내 투여되는 것인 방법.

청구항 25

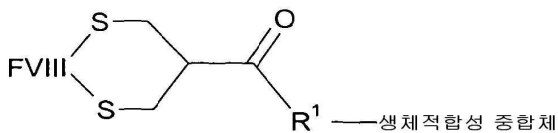
제 22항에 있어서, 조성물이 1일 내지 14일 마다 한번 투여되는 것인 방법.

청구항 26

FVIII의 기능 손실에 의해 특징지어진 혈액 응고 질환의 치료에서 사용 또는 외상의 치료에서 사용을 위해 하나 이상의 시스테인 잔기를 통해 FVIII에 접합된 생체적합성 중합체.

청구항 27

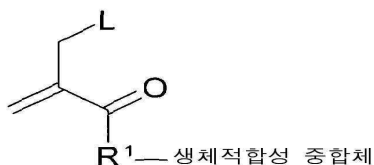
- (a) FVIII 중 두개의 시스테인 잔기 사이의 천연적인 디설피드 결합을 환원시켜 두개의 유리 티올기를 생성하는 단계;
- (b) 공액 이중 결합 및 이탈기를 포함하는 접합-시약 사이에 제 1 티올레이트를 첨가 반응하는 단계;
- (c) 이탈기를 제거하여 공액 이중 결합을 생성하는 단계; 및
- (d) 제 2 티올레이트를 첨가 반응하여 두개의 황 원자 사이에 3-탄소 가교를 형성하는 단계를 포함하는 생체적합성 중합체 및 FVIII의 하기 식의 접합체를 제조하는 방법:



상기 식에서, R1은 직접 결합, 알킬렌기(바람직하게는 C₁₋₁₀ 알킬렌기), 또는 선택적으로-치환된 아릴 또는 헤테로아릴기인 치환기이며; 여기서 아릴기는 페닐, 벤조일 및 나프틸기를 포함하며; 여기서 적합한 헤테로아릴기는 피리딘, 피롤, 푸란, 피란, 이미다졸, 피라졸, 옥사졸, 피리다진, 피리미딘 및 퓨린을 포함하며; 여기서 중합체에 대한 결합이 가수분해적으로 불안정 결합에 의한 것이거나 안정 결합에 의한 것임.

청구항 28

제 27항에 있어서, 접합 시약은 하기 화학식을 갖는 것인 방법:



상기 식에서, R1은 직접 결합, 알킬렌기(바람직하게는 C₁₋₁₀ 알킬렌기), 또는 선택적으로-치환된 아릴 또는 헤테로아릴기인 치환기이며; 여기서 아릴기는 페닐, 벤조일 및 나프틸기를 포함하며; 여기서 적합한 헤테로아릴기는 피리딘, 피롤, 푸란, 피란, 이미다졸, 피라졸, 옥사졸, 피리다진, 피리미딘 및 퓨린을 포함하며; 여기서 중합체에 대한 결합이 가수분해적으로 불안정 결합에 의한 것이거나 안정 결합에 의한 것이며, L은 이탈기임.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 혈액 응고 인자 VIII의 접합된 형태에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인자 VIII(FVIII)는 항-혈우병성 인자(AHF)로도 알려진 필수적인 혈액 응고 인자이다. 인간에서, 인자 VIII는 F8 유전자에 의해 인코딩된다. 이 유전자의 결함은 대략 남성 5000명 중 1명에 영향을 끼치는 열성 X-연관 응고 장애로 공지된, A형 혈우병을 발생시킨다.

[0003] X-연관 F8 유전자는 26개 엑손으로부터의 2351개 아미노산의 폴리펩티드를 인코딩하고, 시그널 펩티드 절단 후 2332 아미노산의 성숙 FVIII 분자를 만든다(Wang *et al. Int. J. Pharmaceutics*, 259: 1-15 (2003)). FVIII는 합성되어 혈관, 사구체, 및 요세관 내피, 및 간의 굴혈관(sinusoidal) 세포에 의해 혈류로 방출되지만 인간에서 방출의 일차성 부위가 어느 곳인지는 여전히 상당히 불확실하다. FVIII 분자는 여섯 개의 단백질 도메인으로 조직된다; NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH. 성숙 분자는 N-연결 및 O-연결 글라이코실화, 술폰화 및 디설피드 결합 형성을 포함하는 다수의 번역-후 변형을 함유한다. FVIII는 총 23개의 시스테인 잔기를 함유하며, 이들 중 16개는 단백질의 A 및 C 도메인에 8개의 디설피드 결합을 형성한다(McMullen *et al. Protein Science*, 4: 740-746 (1995)). 단백질의 번역-후 변형으로 인하여, 단백질의 순환 분자량은 글라이코실화의 수준 및 유형에 따라 330kDa까지 일 수 있다. FVIII는 또한 단백질 가수분해적으로 프로세스되어 순환 종이 중쇄(A1-A2-B) 및 경쇄(A3-C1-C2)로 구성된 이중이량체이다. FVIII가 순환으로 분비되는 경우, 이는 비-공유적 방식으로 폰 빌레브란트(von Willebrand) 인자(vWF)에 결합한다. 두 분자의 결합은 FVIII의 경쇄의 A3 및 C2 도메인과 관련된다(Lacroix-Desmazes *et al. Blood*, 112: 240-249 (2008)). vWF에 결합은 FVIII의 안정성 및 순환 반감기를 증가시킨다. vWF에의 결합이 FVIII의 순환 반감기를 증가시키에도 불구하고, FVIII의 천연 반감기는 15-19시간이다.

[0004] 인자 VIII는 내재성 혈관 응고 경로에 참여하는 필수적인 보조 인자이다. 응고 캐스케이드에서 그의 역할은 "핵 형성 주형(nucleation template)"으로 작용하여 활성화된 혈소판의 표면에 알맞은 공간적인 배향에서 FX아제(FXase) 복합체의 구성성분을 조직한다(Shen *et al. Blood*, 111: 1240-1247 (2008)). FVIII는 처음으로 트롬빈(인자 IIa) 또는 FXa에 의해 활성화되고 그 후 FVIIIa의 형태로 vWF로부터 분리된다. 그 후 FVIIIa는 혈관 손상 부위에서 활성화된 혈소판과 결합하고 A2 및 A3 매개 상호작용을 통해 FIXa와 결합한다. 혈소판 표면 상에 Ca²⁺의 존재하에 FVIII에 FIXa의 결합은 FIXa의 단백질 가수분해적 활성을 대략 200,000-배 증가시킨다. 그 후 이 복합체는 FX를 FXa로 활성화시킨다. 그 후 인자 Xa는, 그의 보조 인자 인자 Va와 함께, 더 많은 트롬빈을 활성화시킨다. 트롬빈은 결국 피브리노겐을 피브린으로 절단하고, 그 후 피브린 혈액 응고체로 중합화되고 교차결합(인자 XIII 사용)한다.

[0005] vWF에 의해 더 이상 보호되지 않으면서, 활성화된 FVIII는 (가장 현저하게 활성화된 단백질 C 및 인자 IXa에 의해) 프로세스 중 단백질 가수분해적으로 불활성화되며 혈류로부터 빠르게 제거된다.

[0006] 단백질의 폐길화에 대한 접근은 폴리테릭스(PolyTherics Ltd)에 의해 개발되었고, PEG 중합체가 단백질에 시스테인 잔기쌍의 환원된 디설피드 결합을 통해 관심 단백질에 부착되는 TheraPEGTM로서 알려져 있다(WO 2005/007197). 기술은 인자 FIXa로부터 오염 없이 인자 IX의 폐길화된 버전을 제조하는데 사용되어 왔다(WO 2009/130602).

[0007] 그러나, FVIII의 폐길화를 위해 이런 동일한 기술을 사용하는 것에 대하여, 진부하거나 통상적인 것으로 고려되지는 않았다.

[0008] FIX에 대하여 FVIII의 활성의 관점에서 보면, 특정한 주요 차이점이 존재하는데, 이는 생체적합성 중합체와 단백질의 접합은 간단한 단계가 아니라는 것을 의미한다.

[0009] 예를 들어, FIXa는 세린 프로테아제인 반면 FVIII는 어떠한 효소적 활성도 가지지 않는다. FIX가 일단 활성화되면, FVIII일 수 있는 그의 보조 인자와 결합을 형성하는 것만을 필요로 하여 응고 캐스케이드에 참여한다.

[0010] 대조적으로, FVIII는 보조 인자이며 다른 응고 인자(FIXa 포함)가 그 위에 조립되는 "주형"을 형성하여 그들의 촉매적 활성을 증가시킨다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 그 기능을 실행하기 위해, FVIII는 FX, FXa, FIXa 및 인지질에 결합할 수 있어야만 한다. 또한, 순환에서 FVIII를 안정화되도록 하기 위해 이는 폰 빌레브란트 인자에 결합해야만 한다. 따라서, 시스템인 잔기 상의 디설피드에서 이 단백질의 폐길화(PEGylation)는, 분자간 상호작용을 수행하는 FVIII의 모든 도메인에 위치한 디설피드가 있기 때문에 이들 상호작용을 입체구조적으로 방해할 수 있다.
- [0012] 그러므로, 인자 FVIII의 폐길화는 FIX의 폐길화와 구별되며 상이한 몇몇의 고유하고 상이한 도전을 제시한다.
- [0013] TheraPEG™ 기술을 활용하는 FIX의 폐길화가 성공적이었다는 사실은 단백질이 구조적 및 기능적으로 상이하기 때문에 같은 접근을 사용하여 제조된 폐길화된 FVIII의 성공 여부를 보여주지 않는다.
- [0014] 인자 VIII(본원에 FVIII로서 지칭됨)의 제작은 하나 이상의 생체적합성 폴리머에 FVIII를 접합함으로써 강화될 수 있음이 밝혀졌다. 강화된 제작 특성은 고순도 FVIII 접합체를 만들어내는 능력을 또한 포함한다.

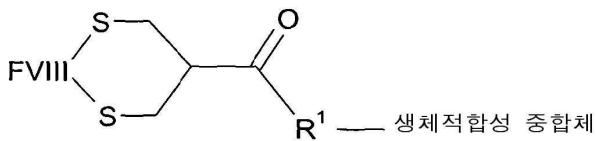
과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명의 제 1 측면에 따르면 하나 이상의 시스템인 잔기를 통해 FVIII에 접합된 생체적합성 중합체가 제공된다.
- [0016] 생체적합성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리-포스파티딜 콜린(PC), 폴리프로필렌 글리콜(PPG), 에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리에틸렌 옥사이드(PEO), 폴리옥시에틸화 폴리올, 폴리올레핀계 알코올, 폴리히드록시알킬메타크릴레이트, 폴리사카라이드, 폴리 α-히드록시산, 폴리비닐 알코올, 폴리포스포스파스파젠, 폴리 N-아크릴로일모르폴린, 폴리알켄 옥사이드 중합체, 폴리말레산, 폴리 DL-알라닌, 카르복시메틸셀룰로오스, 텍스트란, 전분 또는 전분 유도체, 히알루론산 키틴, 폴리메타크릴레이트, 폴리시알산(PSA), 폴리히드록시 알카노에이트, 폴리 아미노산 및 그의 조합으로 구성되는 그룹으로부터 선택될 수 있다. 생체적합성 중합체는 직선형 또는 분지형 구조를 가질 수 있다.
- [0017] 추가의 실시양태에서, 생체적합성 중합체는 FVII, 알부민, 트랜스페린, 모노클론 항체, 항체 단편 예를 들어 단일-도메인 항체, V_L, V_H, Fab, F(ab')₂, Fab', Fab3, scFv, 디-scFv, sdAb, Fc를 포함하는 면역글로불린 및 그의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 단백질이지만, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 하나 이상의 생체적합성 중합체는 바람직한 경우 하나 이상의 시스템인 잔기를 통해 각각의 FVIII 분자에 접합될 수 있다. 유리(free) 시스템인 잔기는 시스템인 디설피드 결합의 환원의 결과이다. 발명의 생체적합성 중합체는 하나 이상의 환원된 시스템인 디설피드 결합을 통해 FVIII에 접합될 수 있다. 접합은 FVIII에 디설피드 결합을 형성한 두 개의 시스템인 잔기의 황 잔기를 가교하는 링커 기를 이용할 수 있다. 따라서 디설피드 결합은 천연 디설피드 결합 또는 재조합으로 도입된 디설피드 결합일 수 있다.
- [0019] PEG 분자는 이는 임의의 적합한 분자량, 예를 들어 5 내지 100kDa, 10 내지 500kDa, 적절하게는 5 내지 30kDa 또는 10 내지 30kDa일 수 있다. 일부 적합한 분자량은 10, 20, 또는 30kDa를 포함한다.
- [0020] 적절하게, FVIII 접합체의 생체적합성 중합체 부분은 FVIII에서 디설피드 결합을 형성하는 두 개의 시스템인 잔기에 결합할 수 있다. 따라서, 링커를 함유하는 PEG는 디설피드 결합을 가교한다. 이러한 접합 절차의 예는 WO 2005/007197, WO 2009/047500 및 WO 2010/010324에 기술되어 있다.
- [0021] 발명의 일 실시양태에서, 생체적합성 중합체는 도 2에 기재된 방식에 따라 FVIII에 접합될 수 있다. 도 2에서, R1기는 FVIII 분자 상의 디설피드 결합의 황 원자에 걸치는 링커기와 생체적합성 중합체 사이에 나타난다.
- [0022] R1은 직접 결합, 알킬렌기(바람직하게는 C₁₋₁₀ 알킬렌기), 또는 선택적으로-치환된 아릴 또는 헤테로아릴기일 수 있는 치환기를 나타내며; 여기서 아릴기는 페닐, 벤조일 및 나프틸기를 포함하며; 여기서 적합한 헤테로아릴기는 피리딘, 피롤, 푸란, 피란, 이미다졸, 피라졸, 옥사졸, 피리다진, 피리미딘 및 퓨린을 포함하며; 여기서 중합체의 결합은 가수분해적으로 불안정 결합에 의한 것이거나 안정 결합에 의한 것일 수 있다.

[0023] 선택적으로 치환된 아릴기 또는 헤테로아릴기 상에 존재할 수 있는 특정 치환기는 예를 들어, -CN, -NO₂, -CO₂R, -COH, -CH₂OH, -COR, -OR, -OCOR, -OCO₂R, -SR, -SOR, -SO₂R, -NHCOR, -NRCOR, -NHCO₂R, -NR'CO₂R, -NO, -NHOH, -NR'OH, -C=N-NHCOR, -C=N-NR'COR, -N⁺R₃, -N⁺H₃, -N⁺HR₂, -N⁺H₂R, 할로젠, 예를 들어 플루오린 또는 클로린, -C≡CR, -C=CR₂ 및 ¹³C=CHR로부터 선택된 하나 이상의 동일하거나 상이한 치환기를 포함하며, 여기서 각각의 R 또는 R'는 독립적으로 수소 원자 또는 알킬(바람직하게는 C₁₋₆) 또는 아릴(바람직하게는 페닐)기를 나타낸다. 전자를 끄는(withdrawing) 치환기의 존재가 특히 바람직하다. 일 실시양태에서, R1에서 선택적으로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴기는 생체적합성 중합체에 R1 단위를 연결하는 아마이드기(NHCO)에 의해 치환된 아릴 또는 헤테로아릴기를 포함한다.

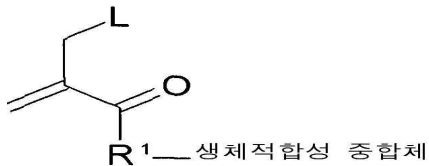
[0024] 따라서 FVIII의 시스테인 잔기 사이의 본래의 디설피드 결합의 두개의 황 원자 사이의 링커기는 3-탄소 가교를 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, FVIII의 시스테인 잔기 사이의 본래의 디설피드 결합의 두개의 황 원자 사이의 링커기는 (CH₂)₂CHC(O)-이다.

[0025] 발명의 일 실시양태에서, 생체적합성 중합체는 상기 기술된 바와 같이 접합될 수 있으며, 여기서 생체적합성 중합체에 접합된 FVIII를 포함하는 조성물은 하기 구조를 갖는다:



[0026]

[0027] 발명의 가장 넓은 범위에서, 시약(reagent)은 하기 식과 같이 나타낼 수 있다:

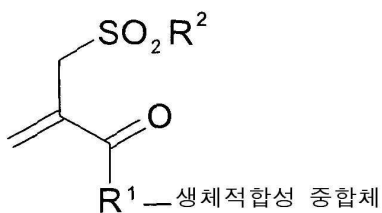


[0028]

[0029] 상기 식에서, R1은 상기에서 상기에서 정의된 바와 같고, L은 이탈기(leaving group)이다.

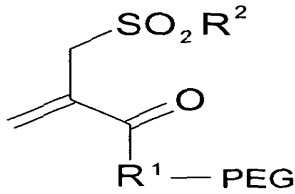
[0030] L은 -SR, -SO₂R, -OSO₂R, -N⁺R₃, -N⁺HR₂, -N⁺H₂R, 할로젠(예를 들어, 플루오린 또는 클로린), 또는 -W를 나타낼 수 있으며, 여기서 각각의 R은 독립적으로 수소 원자 또는 알킬(예를 들어 C₁-C₆ 알킬) 또는 아릴기(예를 들어 페닐)를 나타내고, W는 적어도 하나의 전자를 끄는 치환기를 함유하는 치환된 아릴기(예를 들어 페닐)를 나타낸다.

[0031] 일 실시양태에서, 이탈기 L이 SO₂R²인 경우, 여기서 각각의 R2는 독립적으로 수소 원자 또는 알킬(예를 들어 C₁-C₆ 알킬) 또는 아릴기(예를 들어 페닐)를 나타내며, R1은 상기 정의된 바와 같으며, 접합 시약은 하기 화학식을 가질 수 있다.



[0032]

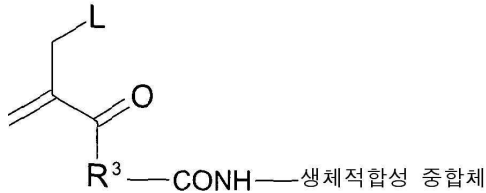
[0033] 일 실시양태에서, 생체적합성 중합체는 PEG일 수 있으며 이탈기는 -SO₂R²일 수 있으며, R2는 상기 정의된 바와 같고, 시약은 하기 식과 같다:



[0034]

[0035]

발명의 다른 실시양태에서, 접합 시약은 생체적합성 중합체가 아미드 부분(CONH)를 통해 연결되는 특정 배열로부터 형성될 수 있으며, 여기서 L은 상기 정의된 바와 같은 이탈기이다. 달리 말하면, R1은 R3-CONH이고 시약은 하기 화학식을 갖는다:



[0036]

[0037]

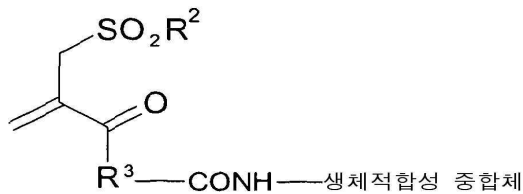
R3는 직접 결합, 알킬렌기(바람직하게는 C₁₋₁₀ 알킬렌기), 또는 선택적으로-치환된 아릴기 또는 헤테로아릴기일 수 있는 치환기를 나타내며, 여기서 아릴기는 페닐, 벤조일 및 나프틸기를 포함하며; 여기서 적합한 헤테로아릴기는 피리딘, 피롤, 푸란, 피란, 이미다졸, 피라졸, 옥사졸, 피리다진, 피리미딘 및 퓨린을 포함하며; 여기서 중합체의 결합은 가수분해적으로 불안정 결합에 의한 것이거나 안정 결합에 의한 것일 수 있다.

[0038]

선택적으로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴기 상에 존재할 수 있는 특정 치환기는 예를 들어, -CN, -NO₂, -CO₂R, -COH, -CH₂OH, -COR, -OR, -OCOR, -OCO₂R, -SR, -SOR, -SO₂R, -NHCOR, -NRCOR, -NHCO₂R, -NR'CO₂R, -NO, -NHOH, -NR'OH, -C=N-NHCOR, -C=N-NR'COR, -N⁺R₃, -N⁺H₃, -N⁺HR₂, -N⁺H₂R, 할로젠, 예를 들어 플루오린 또는 클로린, -C≡CR, -C=CR₂ 및 ¹³C=CHR로부터 선택된 하나 이상의 동일하거나 상이한 치환기를 포함하며, 여기서 각각의 R 또는 R'는 독립적으로 수소 원자 또는 알킬(바람직하게는 C₁₋₆) 또는 아릴(바람직하게는 페닐)기를 나타낸다. 전자를 끄는 치환기의 존재가 특히 바람직하다.

[0039]

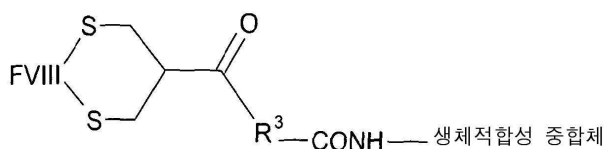
부분 CONH가 존재하는 실시양태에서, 이탈기 L이 -SO₂R²이고, R2 및 R3은 상기 정의된 바와 같은 경우, 시약은 하기 식과 같다:



[0040]

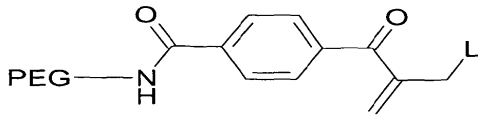
[0041]

접합 시약의 상기 정의된 바와 같이 R1 내의 선택적으로-치환된 아릴 또는 헤테로아릴기가 아미드(NHCO)기에 의해 치환된 아릴 또는 헤테로아릴기를 포함하는 경우 그러한 실시양태에서, R3가 상기 정의된 바와 같은 경우, 접합체 단백질의 구조는 하기 식과 같을 수 있다:

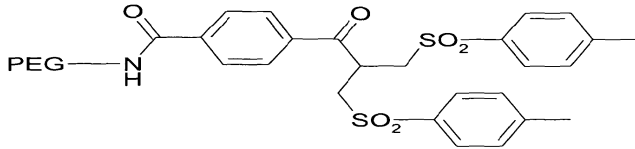


[0042]

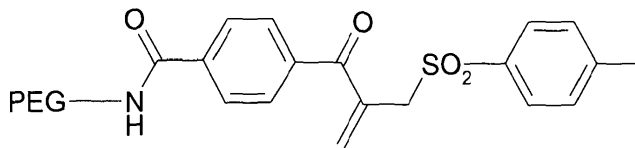
[0043] 생체적합성 중합체가 PEG인 경우, PEG는 폴리에틸렌 부분이며 L은 상기 정의된 바와 같은 이탈기인 발명의 본 실시양태의 접합 시약은 하기 식과 같다:



[0044] 반응 조건이 중성 또는 약 염기성인 경우, 하기 식의 시약이 사용될 수 있다:



[0045] 더 산성인 조건하에서는, 상기 시약은 다음에 나타낸 하기 분자인, 본원에 기술된 바와 같은 접합 반응에서 사용하기에 또한 적합한, PEG 모노-설포늄을 형성할 수 있다.



[0046] 인자 VIII는 임의의 적합한 근원(source)으로부터의 것일 수 있다. 인자 VIIa는 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조되거나, 혈장으로부터 정제될 수 있다. 인자 VIIa는 임의의 활성 단편 또는 그의 뮤테인(mutein)을 포함한다.

[0047] 본원에 사용된 바의 용어 "뮤테인"은 FVIII 단백질의 유사체를 나타내며, 여기서 FVIII의 천연적으로 발생하는 구성요소의 하나 이상의 아미노산 잔기는 본래 FVIII와 비교할 때 수득 생성물의 활성을 크게 변화시키지 않고, 다른 아미노산 잔기에 의해 대체되거나, 결실되거나, 또는 하나 이상의 아미노산 잔기가 FVIII의 본래 서열에 첨가된다. 그러므로 이들 뮤테인은 알려진 합성 및/또는 부위-지시적 돌연변이유발 기술, 또는 임의의 다른 적합한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0048] 본 발명에 따른 뮤테인은, 엄중 조건 하에서, 본 발명에 따라 FVIII를 인코딩하는 DNA 또는 RNA에 혼성화하는, DNA 또는 RNA와 같은 핵산에 의해 인코딩된 단백질을 포함한다. 용어 "엄중 조건"은 당업자가 "엄중"으로서 통상적으로 나타내는 혼성화 및 후속적인 세척 조건을 나타낸다(Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Interscience, N.Y., sections 6.3 and 6.4 (1987, 1992); Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y (1989)).

[0049] 제한됨이 없이, 엄중 조건의 예는 연구 중인 혼성체의 계산된 T_m 보다 12-20°C 낮은 세척 조건, 예를 들어 5분 동안 2xSSC 및 0.5% SDS, 15분 동안 2xSSC 및 0.1% SDS; 30-60분 동안 37°C에서 0.1배.SSC 및 0.5% SDS 및 그 후, 30-60분 동안 68°C에서 0.1xSSC 및 0.5% SDS를 포함한다. 당업자는 엄중 조건이 DNA 서열, 올리고뉴클레오티드 프로브(10-40 염기와 같은) 또는 혼합된 올리고뉴클레오티드 프로브의 길이에 또한 의존한다는 것을 이해한다. 혼합된 프로브가 사용되는 경우, SSC 대신에 테트라메틸 암모늄 클로라이드(TMAC)를 사용하는 것이 바람직하다.

[0050] 임의의 그러한 뮤테인은 FVIII에 본질적으로 유사하거나 심지어 더 나은 활성을 가지는 것과 같은, FVIII의 것과 충분히 복제성인(duplicative) 아미노산 서열을 가진다.

[0051] FVIII의 하나의 특징적인 활성은 혈액 응고 캐스케이드에 참여하는 이의 능력이며, FVIII 활성을 검출하기 위한 분석이 본원 기술된다. 뮤테인이 실질적인 FVIII 활성을 가지는 한, 이는 FVIII에 실질적으로 유사한 활성을 가지는 것으로 고려될 수 있다. 따라서, 임의의 주어진 뮤테인이 FVIII와 적어도 실질적으로 동일한 활성을 가지는 지가 본원 기술된 바와 같은 분석에 뮤테인을 거치도록 것을 포함하는 통상적인 실험을 통해 결정될 수 있다.

- [0055] 바람직한 실시양태에서, 임의의 그런 뮤테인은 FVIII의 아미노산 서열과 적어도 40% 동일성 또는 상동성을 가진다. 더욱 바람직하게는, 뮤테인은 FVIII의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는, 가장 바람직하게는, 적어도 90%, 95%, 또는 99% 동일성 또는 상동성을 가진다.
- [0056] 동일성은 서열을 비교함으로써 결정된, 두개 이상의 폴리펩티드 서열 또는 두개 이상의 폴리뉴클레오티드 서열 사이의 관계를 반영한다. 일반적으로, 동일성은 비교되는 서열의 길이에 걸쳐, 각각 두개의 폴리뉴클레오티드 또는 두개의 폴리펩티드 서열의 정확한 뉴클레오티드 대 뉴클레오티드 또는 아미노산 대 아미노산 대응을 나타낸다.
- [0057] 정확한 대응이 없는 경우의 서열에 대해 "퍼센트 동일성"이 결정될 수 있다. 일반적으로, 비교되는 두개의 서열은 서열 사이의 최대 상관관계를 부여하도록 정렬된다. 이는 정렬의 정도를 향상시키기 위하여 하나 또는 둘 모두의 서열에 "갭"을 삽입하는 것을 포함할 수 있다. 퍼센트 동일성은 비교되는 서열 각각의 전체 길이에 걸쳐 결정될 수 있는데(소위, 전체적인(global) 정렬), 이는 동일하거나 아주 유사한 길이, 또는 정의된 길이 보다 더 짧은 서열(소위, 국소 정렬)에 특히 적절하며, 이는 길이가 다른 서열에 더욱 적절하다.
- [0058] 두개 이상의 서열의 동일성 및 상동성을 비교하기 위한 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 따라서, 예를 들어 [Wisconsin Sequence Analysis Package, version 9.1 (Devereux, et al., *Nucleic acids Research*, 12: 387 (1984))]에서 입수 가능한 프로그램, 예를 들어 프로그램 BESTFIT 및 GAP이 두개의 폴리뉴클레오티드 사이의 퍼센트 동일성 및 두개의 폴리펩티드 서열 사이의 퍼센트 동일성 및 퍼센트 상동성을 결정하기 위해 사용될 수 있다. BESTFIT는 Smith 및 Waterman(*Advances in Applied Mathematics*, 2; 482-489 (1981))의 "국부(local) 상동성" 알고리즘을 사용하고 두개의 서열 사이의 유사성의 최고 단일 부위를 찾는다. 서열 사이의 동일성 및/또는 유사성을 결정하기 위한 다른 프로그램, 예를 들어 BLAST 패밀리의 프로그램(NCBI의 홈페이지 www.ncbi.nlm.nih.gov)를 통해 접근가능한, Atschul et al., *J. Molec. Biol.*, 215: 403 (1990) 및 FASTA(Pearson W R, *Methods in Enzymology*, 183: 63-98 (1990))는 당해 기술분야에 또한 알려져 있다.
- [0059] 본 발명에 따라 사용될 수 있는 FVIII의 뮤테인은 지나친 실험 없이, 본원에 제시된 기술과 가이드라인을 기초로 하여, 당업자에 의해 통상적으로 얻어질 수 있는 치환 펩티드로서 실질적으로 대응하는 서열의 한정된 세트를 포함한다.
- [0060] 본 발명에 따른 뮤테인에 대한 바람직한 변화는 "보존적인" 치환으로서 알려진 것이다. FVIII의 보존적인 아미노산 치환은 그룹의 구성원들 사이의 치환이 분자의 생물학적 기능을 보존할 충분히 유사한 물리화학적 특성을 가지는 그룹 내의 유사(synonymous) 아미노산을 포함할 수 있다. 아미노산의 삽입 및 결실은 그들의 기능을 변형시키지 않으면서, 특히 삽입 또는 결실이 단지 약간의 아미노산, 예를 들어 30 미만, 바람직하게는 10 미만이 관련되고, 기능 형성에 중요한 아미노산 예컨대, 시스테인 잔기를 제거 또는 대체하지 않는 경우, 상기-정의된 서열에서 또한 만들어질 수 있음이 분명하다. 그러한 결실 및/또는 삽입에 의해 제조된 단백질 및 뮤테인은 본 발명의 범주 내이다.
- [0061] 따라서 아미노산 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신은 종종 서로에 대해(지방족 측쇄를 가지는 아미노산) 치환 가능할 수 있다. 이들 가능한 치환 중 글리신 및 알라닌을 서로에 대해 치환하는데 사용하고(이들이 비교적 짧은 측쇄를 가지기 때문), 발린, 류신 및 이소류신을 서로에 대해 치환하는데 사용하는 것이(이들이 소수성인 더 큰 지방족 측쇄를 가지기 때문) 바람직하다. 서로에 대해 종종 치환될 수 있는 다른 아미노산은 다음을 포함한다: 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판(방향족 측쇄를 가지는 아미노산); 리신, 아르기닌 및 히스티딘(염기성 측쇄를 가지는 아미노산); 아스파르테이트 및 글루타메이트(산성 측쇄를 가지는 아미노산); 아스파라긴 및 글루타민(아미드 측쇄를 가지는 아미노산); 및 시스테인 및 메티오닌(측쇄를 함유하는 황을 가지는 아미노산). 치환의 이런 본질은 종종 "보존적인" 또는 "반-보존적인" 아미노산 치환을 지칭한다.
- [0062] 본 발명의 융합 단백질에 대한 서열에 관련된 아미노산 변화는 임의의 적합한 기술 예를 들어, 부위-지시적 돌연변이유발 기술을 사용함으로써 일어날 수 있다.
- [0063] 본 발명의 범주 내에 아미노산 치환 또는 삽입이 천연적으로 발생하거나 비-천연적으로 발생하는 아미노산을 사용해 일어날 수 있다는 점을 주목해야만 한다. 천연 아미노산이 사용되거나 합성 아미노산이 사용되거나 관계없이, L-아미노산만이 존재하는 것이 바람직하다.
- [0064] 또한 FVIII 및 다른 펩티드 또는 단백질 단편을 포함하는 융합 단백질은 융합 단백질이 FVIII의 활성을 유지하는 사용될 수 있다. 이 문맥에서 용어 "융합 단백질"은, 일반적인 용어로, 수소 결합 또는 염교(salt bridge)를 포함하는 화학적 수단에 의해 또는 단백질 합성을 통한 펩티드 결합에 의해 또는 둘 모두에 의해 함께 결합

합된 하나 이상의 단백질을 의미한다.

- [0065] 본원 사용된 바의 "기능적인 유도체"는 FVIII의 유도체 및 그들의 뮤테인을 포함하는데, 이는 당해 기술 분야에 알려진 수단에 의해, N- 또는 C-말단기에 첨가되거나 잔기 상에 측쇄로서 발생하는 작용기로부터 제조될 수 있으며, 그들이 약학적으로 허용가능하다면, 즉 FVIII의 활성에 실질적으로 유사한 단백질의 활성을 파괴하지 않고 그것이 함유되는 조성물에 독성 특성을 부여하지 않는다면 발명에 포함된다.
- [0066] 이들 유도체는 예를 들어, 카르복실기의 지방족 에스테르, 암모니아 또는 일차 또는 이차 아민과의 반응에 의한 카르복실기의 아미드, 아실 부분과 형성된 아미노산 잔기의 유리 아미노기의 N-아실 유도체(예컨대 알카노일 또는 카르복실릭 아로일기) 또는 예를 들어 이용가능한 히드록실 잔기의 글라이코실화를 포함하는, 아실 부분과 형성된 유리 히드록실기(예를 들어 세릴 또는 트레오닐 잔기의 것)의 O-아실 유도체를 포함할 수 있다.
- [0067] 본 발명에 따른 "FVIII의 활성 단편"은 본원에 정의된 바의 FVIII의 단편 또는 뮤테인일 수 있다. 용어 단편은 분자의 임의의 하부세트를 나타내며, 이는 목적인 생물학적 활성을 유지하는 더 짧은 펩티드이다. 단편은 FVIII 분자의 어느 하나의 말단으로부터 아미노산을 제거하고 본원에 기술된 바와 같이 그의 특성에 대해 수득 단편을 시험함으로써 용이하게 제조될 수 있다. 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 중 하나로부터 한번에 하나의 아미노산을 제거하기 위한 프로테아제는 알려져 있으며, 어느 단편이 바람직한 생물학적 활성을 유지하는지를 결정하는 것은 통상적인 시험만이 관련된다.
- [0068] FVIII, 뮤테인 및 그의 활성 단편의 활성 분획으로서, 본 발명은 단백질 분자 단독 또는 그에 연결된 연합 분자 또는 잔기, 예컨대, 당 또는 포스페이트 잔기와 함께인 단백질 분자의 폴리펩티드 쇄의 임의의 단편 또는 전구체, 또는 그들 자신에 의한 단백질 분자 또는 당 잔기의 응고체를 추가로 포함하며, 제공된 상기 분획은 FVIII에 실질적으로 유사한 활성을 가진다.
- [0069] 본원에 용어 "염"은 카르복실기의 염과 FVIII 분자 또는 그의 유사체의 아미노기의 산 부가 염 둘 모두를 나타낸다. 카르복실기의 염은 당해 기술 분야에 알려진 수단에 의해 형성될 수 있으며, 무기염, 예를 들어 나트륨, 칼슘, 암모늄, 철 또는 아연 염 등, 및 그들이 형성된 바와 같이 유기 염기 부가 염, 예를 들어 트리에탄올아민, 아르기닌 또는 리신, 피페리딘, 프로카인 등과 같은 아민 부가 염을 포함할 수 있다. 산 부가염은 예를 들어, 염산 또는 황산과 같은 무기산을 가진 염 및 예를 들어, 아세트산 또는 옥살산과 같은 유기산을 가진 염을 포함한다. 물론, 임의의 그러한 염은 본원 기술된 바와 같은 FVIII의 생물학적 활성을 유지해야만 한다.
- [0070] 본원 사용된 바와 같이, 용어 "인자 VIII 접합체" 또는 "FVIII 접합체"는 생체적합성 중합체 부분을 포함하도록 변이되어 비변이된 인자 VIII와 비교할 때 개선된 약동학 프로파일을 야기하는 인자 VIII를 나타낸다. 약동학 프로파일에서 개선은 하나 이상의 다음 파라미터의 개선으로서 관찰될 수 있다: 효능, 안정성, 곡선 하부 면적, 순환 반감기 및 면역원성 또는 교차-반응성.
- [0071] 비변이 FVIII와 비교할 때, 발명의 FVIII 접합체는 곡선 하부 면적(AUC), Cmax, 클리어런스(CL), 반감기, 혈장 체류 시간 및 비변이 FVIII와 비교시 생물학적 이용 가능성을 포함하는, 약동학 프로파일의 하나 이상의 파라미터의 개선을 보일 수 있다.
- [0072] 환자에게 펩티드 약물을 투여하는 맥락에서 본원에서 사용된 바의 용어, "곡선 하부 면적" 또는 "AUC"는 0부터 무한대까지의 시간의 함수로서 환자에서 전신 순환 중 약물의 농도를 설명하는 곡선 하부 총 면적으로서 정의된다. 본원 사용된 바의 용어 "클리어런스" 또는 "신장 클리어런스"는 분당 배설된 약물의 양을 함유하는 혈장 부피로서 정의된다.
- [0073] 환자에게 펩티드 약물을 투여하는 맥락에서 본원에서 사용된 바의 용어, "반감기" 또는 "t1/2"는 환자에서 약물의 혈장 농도가 절반으로 감소 되는 데 요구되는 시간으로서 정의된다. 다중 클리어런스 메커니즘, 재분배, 및 당해 기술 분야에 공지된 다른 메커니즘에 따라서 펩티드 약물과 관련된 하나 이상의 반감기가 있을 수 있다. 보통, 알파 및 베타 반감기는 알파 상(phase)은 재분배와 관련되고, 베타 상은 클리어런스와 관련되도록 정의된다. 그러나, 대개 혈류에 국한된 단백질 약물에서는, 적어도 두개의 클리어런스 반감기가 있을 수 있다. 알파 상 및 베타 상 반감기에 대한 폐길화의 정확한 영향은 당해 기술 분야에 공지된 바와 같이, 크기 및 다른 파라미터에 따라 다양할 것이다."반감기"의 추가의 설명은 문헌[Pharmaceutical Biotechnology (1997, DFA Crommelin and RD Sindelar, eds., Harwood Publishers, Amsterdam, pp 101-120)]에서 발견할 수 있다.
- [0074] 환자에게 펩티드 약물을 투여하는 맥락에서 본원에서 사용된 바의 용어, "체류 시간"은 투여 이후 환자의 신체에서 약물이 머무르는 평균 시간으로서 정의된다.

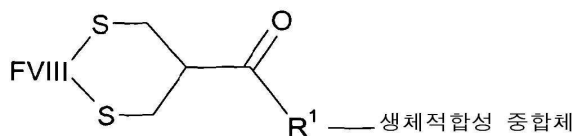
- [0075] 환자에게 펩티드 약물을 투여하는 맥락에서 본원에서 사용된 바의 용어, "면역원성"은 투여 이후, 또는 반복 투여 이후에 그 약물이 환자에서 면역 반응을 유도하는 특성으로서 정의된다.
- [0076] 환자에게 펩티드 약물을 투여하는 맥락에서 본원에서 사용된 바의 용어, "교차-반응성"은 비-접합된 약물의 투여 또는, 반복 투여 후 환자에 의해서 발생된 항체에 약물이 결합하는 경향으로서 정의된다.
- [0077] FVIII 접합체는 비접합된 FVIII와 비교하는 경우, 치료적 혜택을 제공할 수 있다. 그러한 치료적 혜택은 증가된 순환 반감기, 감소된 면역원성, 감소된 교차-반응성, 더 높은 활성, 더 낮은 투여 요구량, 및 대안적인 투여 경로의 허용(예컨대, 피하)을 포함하지만, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0078] 본 발명에 따르면, 생체적합성 접합체와 FVIII의 중합은 약학 조성물에서 FVIII의 유용성을 강화시킨다. 게다가, 생체적합성 부분은 분해 및 항체 반응으로부터 FVIII를 보호할 수 있다. FVIII 접합체는 연장된 순환 반감기를 가질 수 있으며, 이는 투여량-스페이링(sparing) 효과 및 덜 잦은 투여를 유도한다.
- [0079] 인자 VIII는 디설피드 결합에 PEG의 접합을 위하여 폴리테릭스 Ltd의 TheraPEG™ 기술을 사용하여 폐길화될 수 있다. 모노-폐길화된 인자 VIII(FVIII)의 배치는 예를 들어 10, 20 및 30 kDa PEG 시약을 사용해 제조될 수 있다.
- [0080] 폐길화된 FVIII의 응고 활성은 응고 분석을 사용하여 시험관내에서 시험될 수 있다.
- [0081] 인자 VIII는 수십년간 상업적으로 입수가 가능했으며, 혈액 생성물로서 공여자 혈장으로부터 정제될 수 있거나, 재조합 DNA 기술을 통해 제조될 수 있다.
- [0082] FVIII와 접합체를 형성할 몇몇 상이한 유형의 폴리에틸렌 글리콜 중합체가 있다. 단일 폴리에틸렌 글리콜 쇠를 함유하는 직선형 PEG 중합체가 있고 분지형 또는 다중-아암(arm) PEG 중합체가 있다. 분지형 폴리에틸렌 글리콜은 통일 기(unifying group)를 통해 함께 결합된 두개 이상의 분리된 직선형 PEG 쇠를 함유한다. 예를 들어, 2개의 PEG 폴리머는 리신 잔기에 의해 함께 결합될 수 있다. 하나의 직선형 PEG 쇠는 α-아미노기에 결합하는 반면, 다른 PEG 쇠는 ε-아미노기에 결합한다. 리신 코어의 나머지 카르복실기는 단백질에 공유 부착하기 위해 이용가능하도록 남겨진다. 직선형 및 분지형 폴리에틸렌 글리콜 중합체 둘 모두는 분자량 범위에서 상업적으로 입수가 가능하다.
- [0083] 발명의 일 측면에서, FVIII-PEG 접합체는 FVIII에 결합된 하나 이상의 직선형 폴리에틸렌 글리콜 중합체를 함유하는데, 여기서 각각의 PEG는 약 2kDa 내지 약 100kDa 사이의 분자량을 가진다. 발명의 다른 측면에서, FVIII-PEG 접합체는 FVIII에 결합된 하나 이상의 직선형 폴리에틸렌 글리콜 중합체를 함유하는데, 여기서 각각의 직선형 PEG는 약 5kDa 내지 약 40kDa 사이의 분자량을 가진다. 소정의 실시양태에서, 각각의 직선형 PEG는 약 10kDa 내지 약 30 kDa 사이의 분자량을 가진다. 소정의 실시양태에서, 각각의 직선형 PEG는 약 20 kDa의 분자량을 가진다. 소정의 실시양태에서, 각각의 직선형 PEG는 약 10 kDa 미만의 분자량을 가진다. 특정 실시양태에서, FVIII-PEG 접합체는 FVIII에 결합된 하나 초과 직선형 PEG 중합체, 예를 들어 FVIII에 결합된 두개, 세개, 또는 여덟개까지의 직선형 PEG 중합체를 함유한다. 일부 실시양태에서, FVIII-PEG 접합체는 다수의 직선형 PEG 중합체를 함유하는데, 여기서 각각의 직선형 PEG는 약 10-30kD의 분자량을 가진다.
- [0084] 이 발명의 FVIII-PEG 접합체는 FVIII에 결합된 하나 이상의 분지형 PEG 중합체를 함유할 수 있는데, 여기서 각각의 분지형 PEG는 약 2kDa 내지 약 100kDa 사이의 분자량을 가진다. 발명의 다른 측면에서, FVIII-PEG 접합체는 FVIII에 결합된 하나 이상의 분지형 폴리에틸렌 글리콜 중합체를 함유하는데, 여기서 각각의 분지형 PEG는 약 5kDa 내지 약 40kDa 사이의 분자량을 가진다. 소정의 실시양태에서, 각각의 분지형 PEG는 약 5kDa 내지 약 30 kDa 사이의 분자량을 가진다. 소정의 실시양태에서, 각각의 분지형 PEG는 약 20 kDa의 분자량을 가진다. 소정의 실시양태에서, 각각의 분지형 PEG는 약 10 kDa 미만의 분자량을 가진다. 특이적인 실시양태에서, FVIII-PEG 접합체는 FVIII에 결합된 하나 초과 분지형 PEG 중합체, 예를 들어 FVIII에 결합된 두개, 세개, 또는 여덟개까지의 분지형 PEG 중합체를 함유한다. 일부 실시양태에서, FVIII-PEG 접합체는 여덟개까지의 분지형 PEG 중합체를 함유하는데, 여기서 각각의 분지형 PEG는 약 10-30kDa의 분자량을 가진다.
- [0085] FVIII-PEG 접합체는 이온 교환 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 침전 및 막-기반 분리를 포함하지만, 이로 제한되지 않는 당해 기술분야에 알려진 크로마토그래피 방법에 의해 정제될 수 있다.
- [0086] 상기 논의된 바와 같이, 폴리테릭스는 부위-특이적 폐길화를 위해 단백질에서 천연적으로 발생하는 황 원자의

선택적인 화학적 성질을 활용할 수 있는 TheraPEG™ 로 알려진 기술을 개발하였다. 이 기술은 신규한 황-함유성기가 재조합 또는 다른 수단에 의해 도입되는 경우 단백질 및 펩티드에 또한 적용될 수 있다. 폴리테릭스는 디설피드 결합이 PEG-연결된 탄소 가교의 첨가에 의해 더 안정적으로 만들어질 수 있으며 3차 구조를 유지하고 단백질 기능을 지속하면서 단백질에서 디설피드 결합을 위한 변경이 가능하다는 것을 보여주었다. 이는 천연적이거나 선택적으로 가공된 단백질 중 하나에서 부위-특이적으로 관심 있는 단백질에 생체적합성 중합체를 접합시키기 위한 디설피드 결합을 구성하는 두개의 황 원자의 접합성 티올 선택성을 활용하는 것을 최초로 가능하게 한다. 이 접근의 한 예로는, FVIII 단백질에 PEG 부분을 첨가하기 위한(또는 FVIII 단백질을 "폐길화"하기 위한) 기술을 사용하는 것이다.

- [0087] 디설피드-가교성 접합 시약은 상호적인 미카엘(Michael) 및 레트로-미카엘 반응을 겪을 수 있는 잠재적인 교차-접합 시스템이다. 이는 천연적인 디설피드 기의 환원에 의해 생성된 두개의 유리 티올이 본래의 디설피드 결합의 두개의 황 기를 연결하는 3-탄소 가교에 걸쳐 재어닐링(re-anneal)하게 한다(예를 들어, PEG 부분을 첨가하기 위한 접합 반응의 개략적인 도식에 대한 도 2를 참고함). 접합 시약은 FVIII 단백질을 폐길화하기 위해 사용된 생체적합성 중합체로서 PEG를 포함하는 경우 "폐길화" 시약으로서 기술될 수 있다.
- [0088] 기계적으로, 접합 시약 중 공액 이중 결합은 첨가 반응의 순서를 개시하기 위해 요구된다. 일단 티올레이트 첨가가 발생하면, 남아있는 설피산 부분의 제거가 가능해진다. 이는 제 2 티올레이트 음이온의 첨가 및 두개의 황 원자 사이의 3-탄소 가교를 형성을 위한 다른 공액 이중 결합을 생성한다. 한다. 최종 결과는 탄소 가교 어느 한 측에 두개의 아주 안정한 티올-에스테르 결합이다.
- [0089] 발명의 제 2 측면에 따르면, 발명의 제 1 측면과 관련하여 정의된 바의 하나 이상의 시스템인 잔기를 통해 FVIII에 접합된 생체적합성 중합체를 포함하는 약학 조성물이 제공된다.
- [0090] 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 희석제, 보조제 또는 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0091] 경구 투여를 위해 적합한 약학 조성물은 캡슐, 용액, 시럽 또는 현탁액(수용성 또는 비-수용성 액체 중; 또는 식용 폼(foam) 또는 윗(whip)으로서; 또는 에멀전으로서)과 같은 별개의 단위로서 존재할 수 있다. 정제 또는 경질 젤라틴 캡슐에 적합한 부형제는 락토오스, 옥수수 전분 또는 그의 유도체, 스테아르산 또는 그의 염을 포함한다. 경질 젤라틴 캡슐과 함께 사용하기에 적합한 부형제는 예를 들어, 식물성 오일, 왁스, 지방, 반-고체 또는 액체 폴리올 등을 포함한다. 용액 및 시럽의 제조를 위하여 사용될 수 있는 부형제에는, 예를 들어 물, 폴리올 및 당이 포함될 수 있다. 현탁 오일(예컨대 식물성 오일)을 제조하기 위하여 수중유(oil-in-water) 또는 유중수(water in oil) 현탁액이 제공되어 사용될 수 있다.
- [0092] 담체가 고체인 경우 비강(nasal) 투여를 위해 적합한 약학 조성물은 입자 크기, 예를 들어 20 내지 500 마이크로미터를 가지는 조분말을 포함하며, 이는 들이마시는 방식, 즉 코 가까이에 대고 분말의 용기로부터 비강을 통해 빨리 흡입함으로써 투여된다. 담체가 액체인 경우 비내 분무 또는 점비액으로서 투여하기 위하여 적합한 조성물은, 활성 성분의 수용성 또는 오일 용액을 포함한다. 흡입에 의한 투여를 위해 적합한 약학 조성물은 다양한 유형의 정량 가압된 에어로솔, 분무기 또는 취분기를 써서 생성된 미세 입자 더스트(dust) 또는 미스트(mist)를 포함한다.
- [0093] 비경구 투여를 위해 적합한 약학 조성물은 항-산화제, 완충제, 제균제 및 의도되는 부형제의 혈액과 실질적으로 등장액인 제형을 유도하는 용질을 함유할 수 있는 수용성 및 비-수용성 무균 주사 용액; 현탁액 및 증점제를 포함할 수 있는 수용성 및 비-수용성 무균 현탁액을 포함한다. 주사가능한 용액에 사용될 수 있는 부형제는 예를 들어 물, 알코올, 폴리올, 글리신 및 식물성 오일을 포함한다. 조성물은 단위-투여 또는 복합-투여 용기, 예를 들어 봉인된 앰플 및 바이알에 존재할 수 있으며, 운반된 무균 액체, 예를 들어 사용하기 직전에, 주사를 위한 물의 첨가만이 요구되는 냉동-건조된(동결 건조된) 상태 중에 저장될 수 있다. 임시처방 주사 용액 및 현탁액은 무균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다.
- [0094] 일반적으로, 약학 조성물은 보존제, 가용화제, 안정제, 습윤제, 유화제, 감미제, 착색제, 방향제, 염(본 발명의 물질은 그들 자체가 약학적으로 허용가능한 염의 형태로서 제공됨), 완충제, 코팅제 또는 항산화제를 함유할 수 있다. 약학 조성물은 본 발명의 물질 외에 치료적 활성제를 또한 함유할 수 있다. 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 희석제, 보조제, 또는 담체와 조합하여 적용될 수 있다. 그러한 부형제는 염수, 완충된 염수(포스페이트 충전된 염수), 텍스트로스, 리포솜, 물, 글리세롤, 에탄올 및 이의 조합을 포함할 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0095] 약학 조성물은 예를 들어 구강, 정맥내, 피하, 근육내, 골내, 비강내, 또는 다른 경로에 의한 투여를 포함하는

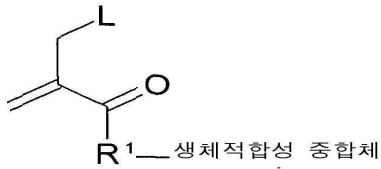
환자의 질환을 치료하기 위해 효과적인, 임의의 효과적이며 편리한 방식으로 투여될 수 있다. 치료요법 또는 예방약으로서, 활성제는 주사가 가능한 조성물, 예를 들어 무균 수용성 분산액, 바람직하게는 등장액으로서 개인에게 투여될 수 있다.

- [0096] 포유동물, 특히 인간에 투여를 위해, 활성제의 일일 투여량은 체중 1kg 당 0.01mg으로부터, 전형적으로 체중 1kg 당 약 1mg일 것으로 고려된다. 어떤 경우든 의사는 나이, 체중, 성별 및 개인의 반응도를 포함하는 인자에 의존적일 개인에 대해 가장 적합한 실제 복용량을 결정할 것이다. 상기 투여량은 평균적인 경우의 예시이다. 물론, 더 높거나 또는 더 낮은 투여량이 뛰어날 경우도 있으며, 그런 경우에는 본 발명의 범주 이내이다.
- [0097] 본 발명의 물질의 투여량은 치료되는 질환 또는 장애, 치료되는 개인의 나이 및 병태, 등에 따라서 넓은 한계 사이에 다양할 수 있으며, 의사는 사용되는 적합한 투여량을 최종적으로 결정할 것이다.
- [0098] 이 투여량은 적절할 때마다 자주 반복 투여될 수 있다. 부작용이 발생하는 경우, 투여량의 용량 및/또는 빈도는 정상적인 임상 실습에 따라서 감소될 수 있다. 일 실시양태에서, 약학 조성물은 1일 내지 14일 마다 한번 투여될 수 있다.
- [0099] 발명의 제 3 측면에 따르면, 제 2 측면의 약학 조성물 및 다른 약학적 활성제가 제공된다. 다른 약학적 활성제는 FVIII의 활성, 예를 들어 다른 혈액 응고 인자의 활성을 촉진 또는 강화시킬 수 있다.
- [0100] 발명의 약학 조성물은 단독 또는 치료적 화합물 또는 분자, 예컨대 항-염증성 약물, 진통제 또는 항생제와 같은 다른 화합물과 함께 적용될 수 있다. 다른 화합물과 함께인 그러한 투여는 동시, 개별 또는 순차적일 수 있다. 구성성분은 적합한 설명서를 포함할 수 있는 키트의 형태로서 준비될 수 있다.
- [0101] 바람직하게는, 발명의 약학 조성물 및 다른 치료적 화합물은 이를 필요로 하는 환자에게 직접적으로 투여된다.
- [0102] 발명은 발명의 약학 조성물, 및 경구 투여를 위한 캡슐, 폐 투여를 위한 흡입제 및 정맥내 투여를 위한 주사가 가능한 용액을 포함하지만, 이로 제한되지 않는 투여 비허가를 포함하는 부분들의 키트를 또한 제공한다.
- [0103] 발명의 제 4 측면에 따르면, 혈액 응고 질환의 치료 방법이 제공되며, 여기서 방법은 이를 필요로 하는 환자에게 본 발명의 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 그러므로, 발명의 이 측면은 상기 방법에서 그러한 조성물의 사용을 또한 포함한다.
- [0104] 혈액 응고 질환은 혈액 응고 인자의 기능의 상실, 또는 자가-항체의 생성에 의해 특징지어질 수 있다. 혈액 응고 질환의 예는 A형 혈우병 및 후천성 A형 혈우병을 포함한다.
- [0105] 본원에 사용된 바의 용어 "치료"는 인간 또는 비-인간 동물에 유용할 수 있는 임의의 레지멘을 포함한다. "비-인간 동물"의 치료는 말 및 반려동물(예컨대 고양이 및 개) 및 양, 염소, 돼지, 소 및 말 패밀리의 구성원을 포함하는 농장/농업 동물을 포함하는 가축의 치료를 포함한다. 치료는 임의의 존재하는 병태 또는 장애에 대한 것일 수 있거나, 예방적일 수 있다(예방적 치료). 치료는 유전적 또는 후천적 질환의 치료일 수 있다. 치료는 급성 또는 만성 병태의 치료일 수 있다.
- [0106] 본 발명의 제 5 측면에 따르면, 상기 기술된 바의 생체적합성 중합체 및 FVIII의 하기 접합체를 제조하기 위한 방법이 제공된다.



- [0107]
- [0108] 상기 방법은 하기를 포함하며, R1은 상기 정의된 바와 같다:
- [0109] (a) FVIII 중 두개의 시스테인 잔기 사이의 천연적인 디설피드 결합을 환원시켜 두개의 유리 티올기를 생성하는 단계;
- [0110] (b) 공액 이중 결합 및 이탈기를 포함하는 접합-시약 사이에 제 1 티올레이트를 첨가 반응하는 단계;
- [0111] (c) 이탈기를 제거하여 공액 이중 결합을 생성하는 단계; 및
- [0112] (d) 제 2 티올레이트를 첨가 반응하여 두개의 황 원자 사이에 3-탄소 가교를 형성하는 단계.

[0113] 그런 방법에서, 접합 시약은 상기 기술된 바와 같은, 하기의 화학식을 가질 수 있다:

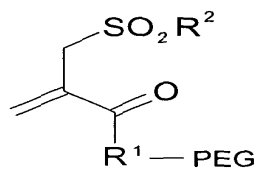


[0114] 상기 식에서 R¹은 상기 정의된 바와 같고, L은 상기 정의된 바의 이탈기이다.
 [0115] 발명의 이 실시양태의 추가의 측면은 접합 시약의 다양한 구조에 관해 상기 기술된 바와 같다.

[0116] 발명의 이 실시양태의 추가의 측면은 접합 시약의 다양한 구조에 관해 상기 기술된 바와 같다.
 [0117] 상기 정의된 바의 치환기를 가진, 사용될 수 있는 접합 시약의 일 예는, 하기 식과 같으며, 여기서 R¹ 및 R²는 상기 정의된 바와 같다 :



[0118] 상기 식에서, 이탈기는 SO₂R²로서 나타낸 설포닐기이다.
 [0119] 생체적합성 중합체가 PEG인 경우, 접합 시약은 하기 식과 같을 수 있으며, 여기서 R² 및 R¹은 상기 정의된 바와 같다:
 [0120] 발명의 제 2 및 후속적인 측면에 대한 바람직한 양상은 필요한 부분만 약간 수정하여 제 1 측면에 대한 바이다.



[0121] 발명의 제 2 및 후속적인 측면에 대한 바람직한 양상은 필요한 부분만 약간 수정하여 제 1 측면에 대한 바이다.
 [0122] 발명의 제 2 및 후속적인 측면에 대한 바람직한 양상은 필요한 부분만 약간 수정하여 제 1 측면에 대한 바이다.

도면의 간단한 설명

[0123] 본 기술내용 및 실시예 참조는 또한 하기의 다수의 도면으로 구성된다:
 도 1은 혈액 인자 응고 캐스케이드를 보여준다. 약어: HMWK - 높은 분자량 키니노겐(Kininogen); PK - 프리칼리크레인(Prekallikrein); PL - 인지질.
 도 2는 디설피드-특이적 페길화 화학과 관련된 단계를 보여준다(Shaunak *et al.* in *Nat Chem Biol.* 2006; 2(6):312-313으로부터).
 도 3은 aPTT 응고 분석과 관련된 단계의 개략도를 보여준다. 약어: HMWK - 높은 분자량 키니노겐(Kininogen); PK - 프리칼리크레인(Prekallikrein); PL - 인지질.
 도 4는 발색(chromogenic) 응고 분석과 관련된 단계의 개략도를 보여준다.
 도 5는 본 발명의 접합체의 두개의 대안적인 개략적인 구조를 보여주며, 여기서 FVIII는 검정 곡선으로 표현되고, (C)는 FVIII의 시스테인 잔기를 나타내며, 여기서 FVIII는 본원 기술된 링커에 의해 생체적합성 중합체에 접합된 것으로 나타난다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0124] 여기서 본 발명은 참고의 목적으로 포함되며 청구된 발명을 제한하는 것으로 이해되지 않는 하기 실시예를 참조

하여 추가로 기술될 것이다.

[0125] 발명은 여기서 단지 예시의 목적을 위해서만 존재하는 하기 실시예를 참조하여 추가로 기술될 것이다.

[0126] **실시예 1: FVIII의 디설피드 폐길화**

[0127] 인간 FVIII의 디설피드 폐길화는 문헌 [Shaunak *et al.* in *Nat Chem Biol.* 2006; 2(6):312-313]에 기술된 절차의 변경된 버전에 따라 실시하였다.

[0128] **실시예 2: 디설피드 결합 환원**

[0129] TheraPEG™ 폐길화 방법은 디설피드 결합의 환원을 필요로 한다. 환원은 세레노시스타민(SeCys)의 존재 또는 부재하에 적합한 환원제, 예를 들어 디티오프레이톨(DTT), 2-메르캅토에탄올 또는 트리스(2-카르복시에틸) 포스핀(TCEP)를 사용해 실시하였다. 사용된 환원제의 농도는 예를 들어 0.5-5mm DTT 또는 약간 물 과량의 TCEP를 사용하였다.

[0130] **실시예 3: FVIII의 폐길화**

[0131] FVIII의 폐길화를 위한 TheraPEG™의 사용의 초기 평가는 소규모 반응(5-20 µg FVIII)에서 실시하였다. 이는 PEG 시약을 사용하여 폐길화된 FVIII를 재현적으로 제조하기 위해 사용할 수 있는 조건을 규명하였다. 벤즈아미딘 또는 다른 부형제를 첨가하여 단백질분해를 방지하거나 단백질 안정성에 도움을 줄 수 있다.

[0132] 반응 규모를 증가시켜(0.2~0.3mg FVIII) 초기 시험관내 평가를 위한 폐길화된 FVIII를 제조하였다. 상이한 PEG 분자량(예컨대 10, 20 및 30 kDa) 및 상이한 수의 접합된 PEG 부분(예컨대 1~8)을 가진 일련의 PEG-FVIII 시료를 시험관내 분석을 위하여 제조하였다.

[0133] 폐길화 반응의 온도의 영향을 평가하여, 폐길화 반응의 온도가 FVIII에서 PEG-FVIII로의 전환에 영향을 미치는지를 결정하였다. 그러나, 초기 시험관내 평가가 더 높은 온도(예컨대 10-30°C)가 폐길화된 생성물의 활성에 부정적인 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다면, 후속적인 반응을 더 낮은 온도(예컨대 2-10°C)에서 실시할 것이다.

[0134] 당해 기술 분야에 알려진 다양한 정제 기술을 사용하여 폐길화된 물질을 단리 및 정제할 수 있다. 그러한 기술은 이온 교환 크로마토그래피, 크기-배제 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 침전 또는 막-기반 분리 기술을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0135] 추가적인 시험관내 평가를 위해 더 큰 양의 물질을 생성하기 위하여, 반응 규모를 예를 들어 1mg FVIII까지 증가시켰다. 더 작은 규모의 반응에서 결정된 조건을 사용하여 FVIII의 폐길화된 변이체를 제조하였다.

[0136] 정제 후, 폐길화된 생성물을 예를 들어 SDS-PAGE 또는 SE-HPLC에 의해 분석하여 순도를 결정하고, 적합한 단백질 분석, 예를 들어 BCA 분석에 의해 정량화하였다. 모든 이들 방법은 당업자에게 알려져 있다.

[0137] **실시예 4: 폐길화된 FVIII의 시험관내 활성 평가**

[0138] FVIII 및 폐길화된 FVIII의 활성은 발색 분석 및 변이된 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간 응고 분석을 사용해 결정하였다.

[0139] **발색 분석**

[0140] 발색 분석(하이펜 바이오메드 카달로그 넘버 더 발색 분석(Hyphen Biomed, catalogue no. 221402)은 염색된 기질의 형성에 의해 FVIII의 활성을 측정하고, 응고체 형성과 관련되지 않는다. 발색 분석과 관련된 단계의 개략도에 대한 도 3을 참고하라.

[0141] 트롬빈에 의해 활성화되는 경우, 인자 VIII:C는 인자 IXa, 인지질 및 칼슘과 효소적 복합체를 형성하며, 인자 X를 인자 Xa로 활성화시킨다. 인자 VIII:C는 인자 VIII:C의 보조 인자 활성을 시험하기 위한 발색 분석이다. 인자 IXa, 인지질(PLPs) 및 칼슘의 일정량의 존재 하에, 트롬빈 활성화된 인자 VIII:C는 효소적 복합체를 형성하

며, 이 복합체는 일정 농도 및 과량으로 분석에 제공된 인자 X를 인자 Xa로 활성화시킨다. 이 활성화는 인자 VIII:C의 양과 직접적으로 연관되는데, 인자 IXa의 일정량 및 과량의 존재하에서 제한 인자이다. 그 후, 생성된 인자 Xa는 특이적인 인자 Xa 발색 기질(SXa-11)에 대한 그의 활성화에 의해서 정확히 측정한다. 인자 Xa는 기질을 절단하고 pNA를 방출한다. 생성된 pNA의 양은 인자 Xa 활성화에 직접적으로 비례한다. 최종적으로, 분석된 시료 중 VIII:C 인자의 양과 405nm에서의 색 발현에 의해 결정된, 방출된 pNA의 양에 의해 측정된, 생성된 인자 Xa 활성화 사이에 직접적인 관계가 있다.

[0142] 5가지 약물학적 인자 VIII 생성물을 사용하여 인자 VIII 활성화-기반 분석을 비교하는 연구를 문헌 [Butenas *et al.* (Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2004 104: Abstract 4012)]에 의해 수행하였다.

[0143] 응고 분석

[0144] FVIII 응고 시험 방법은 활성화된 부분적 트롬보플라스틴 시간(aPTT)을 기초로한 일-단계 분석이다. FVIII는 인자 X에서 인자 Xa로의 효소적 전환 중 인자 IXa, 칼슘, 및 인지질의 존재하에 보조 인자로서 작용한다. 응고체가 형성되는데 걸리는 시간(초)과 FVIII의 농도의 대수 사이에 역관계가 존재한다.

[0145] 조성물

[0146] 1. 인자 VIII 결핍 혈장, 헬레나 바이오사이언스, 카달로그 넘버 5193

[0147] 2. aPTT-ES 시약 헬레나 바이오사이언스 카달로그 넘버 5397

[0148] 3. 칼슘 클로라이드 용액, 0.025 mol/L

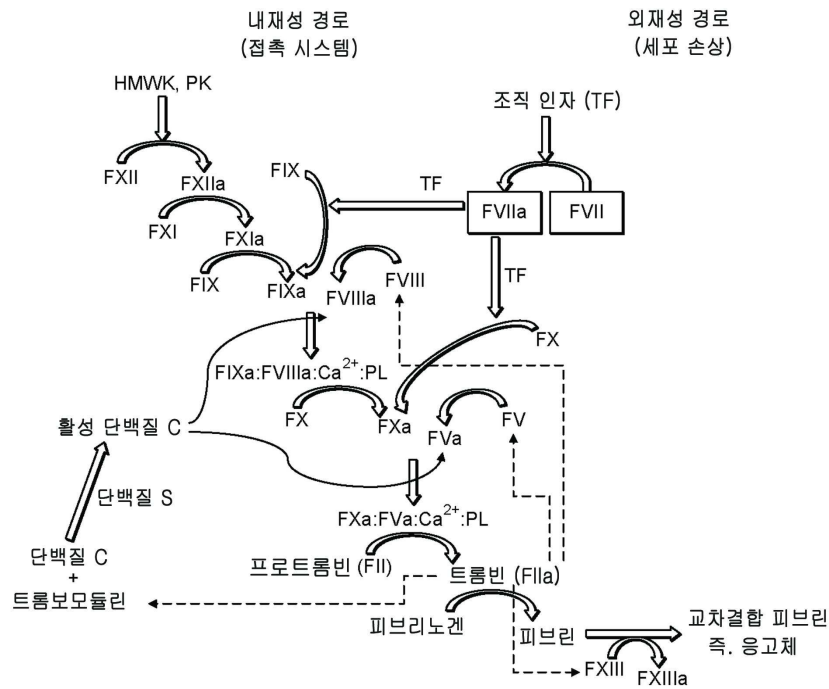
[0149] 25 μ l의 희석된 시험 시료를 인큐베이션시키고 25 μ l의 FVIII 결핍 혈장을 50 μ l의 예열된 aPTT-ES 시약과 함께 인큐베이션시켰다. 활성화는 접촉 시스템을 개시한다. 그 후, 인지질 존재하에 내재성 경로의 남아 있는 단계가 일어난다. 37°C에서 정확히 3분 인큐베이션 후, 50 μ l의 0.025 mol/L 칼슘 클로라이드를 첨가하고 응고가 개시된다. 응고 시간은 시스맥스 CA-50 응고 분석기(Sysmex CA-50 coagulation analyse) 상에서 측정하였다.

[0150] FVIII 및 폐길화된 FVIII 활성을 WHO 국제 FVIII 표준(NIBSC)에 대하여 측정하였다. 미지의 시료의 활성 수준을, 알려진 활성의 FVIII 표준 물질의 일련의 희석액으로부터 만들어진 표준 곡선에 대하여 시험 물질의 다양한 희석물의 응고 시간을 비교함으로써 보간하였고 mL 당 국제 단위(IU/mL)로 기록한다. 폐길화된 FVIII에 대한 유지된 특이적 응고 활성 퍼센트를 또한 계산하였다.

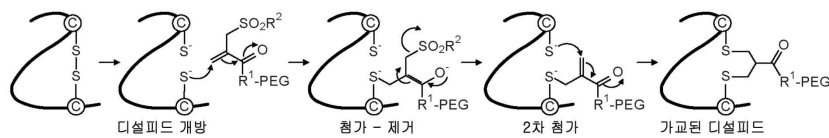
[0151] 폐길화된 FVIII가 비변이된 FVIII와 동일한 속도로 응고하는지를 확인하기 위하여, 산란광 검출에서의 2 내지 80% 변화 사이에 응고 시간을 측정하고 응고 시간을 산란된 빛 중 변화 %에 대해 플로팅하였다. 곡선의 경사도는 응고 반응의 속도로서 취했다. 이는 동일한 네개의 농도의 FVIII 및 폐길화된 FVIII를 사용하여 실시하였다.

도면

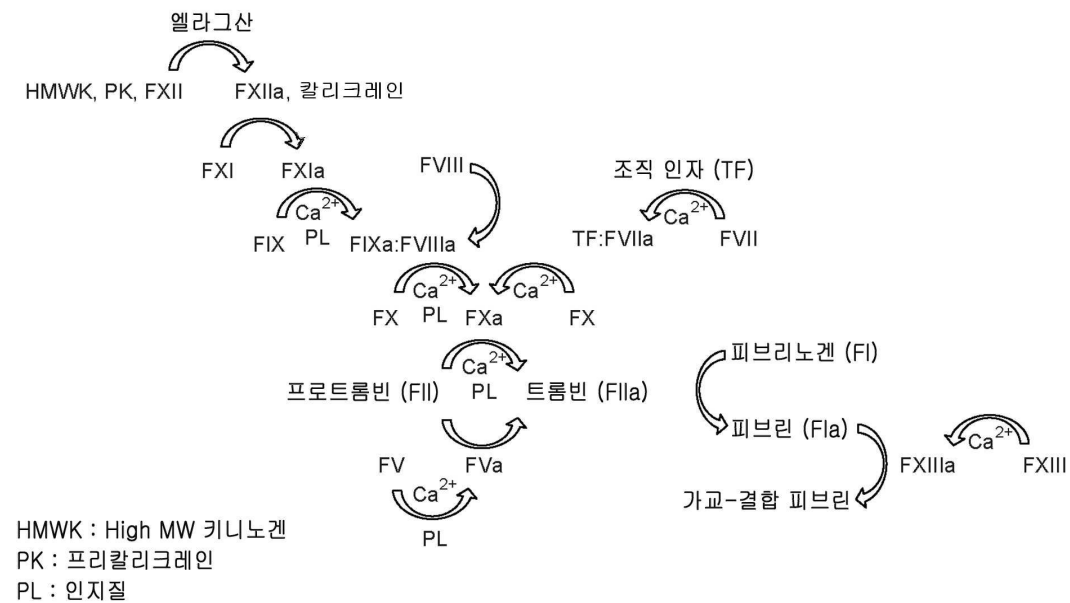
도면1



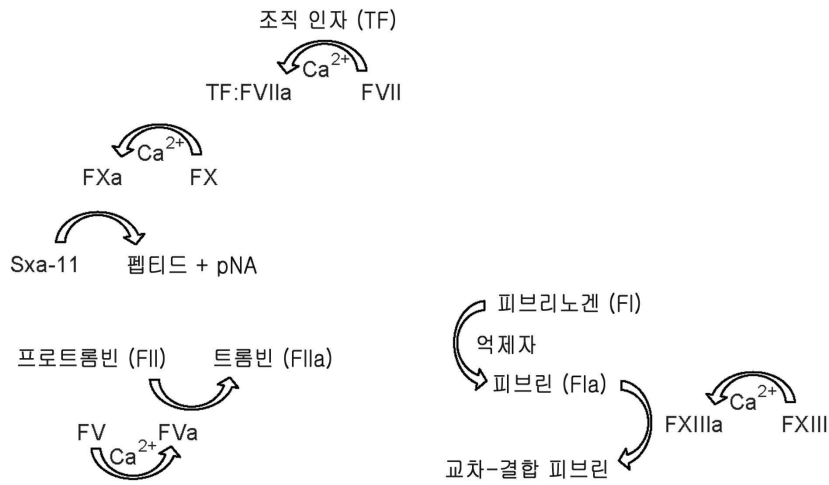
도면2



도면3



도면4



도면5

