



등록특허 10-2385372



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년04월11일

(11) 등록번호 10-2385372

(24) 등록일자 2022년04월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/19 (2006.01) A61K 38/48 (2006.01)
F26B 5/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 9/19 (2013.01)
A61K 38/4846 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7028692

(22) 출원일자(국제) 2015년03월24일

심사청구일자 2020년03월03일

(85) 번역문제출일자 2016년10월14일

(65) 공개번호 10-2016-0137577

(43) 공개일자 2016년11월30일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/022141

(87) 국제공개번호 WO 2015/148444

국제공개일자 2015년10월01일

(30) 우선권주장

61/969,801 2014년03월24일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

JP2002513390 A*

JP2009511495 A*

JP2013534426 A*

JP09511495 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

바이오머라티브 테라퓨틱스 인크.

미국 매사추세츠 (우편번호 02451) 월섬 2엔디 에
비뉴 225

(72) 발명자

톰 브라이언 엠

미국 02127 매사추세츠주 보스턴 드레서 스트리트
81

파크허스트-랭 체리

미국 03053 뉴 햄프셔주 런던데리 캔터베리 레인
138

리베일 브랜드 더블유

미국 03901 메인주 버윅 페리스 웨이 11

(74) 대리인

양영준, 장덕순

전체 청구항 수 : 총 22 항

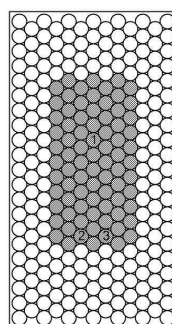
심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 동결건조된 IX 인자 제형

(57) 요약

본 발명은, 특히, 사전-동결건조 제형, 재구성된 제형, 및 동결건조 분말 IX 인자(FIX) 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 FIX 폴리펩타이드를 포함하는 동결건조 분말을 생성하는 동결건조 방법을 제공한다. 본 발명은 (a) FIX 응고 활성을 갖는 IX 인자(FIX) 폴리펩타이드; (b) 완충제; (c) 안정제; (d) 증량제; 및 (e) 계면활성제를 포함하는 사전-동결건조 제형에 관한 것이되, 상기 제형은 충전 용적이 약 5ml 미만이고, 각각의 (a) 내지 (e)는 (1) 동결건조될 때 FIX 폴리펩타이드의 안정성을 개선시키기에 충분한 바이알 당 양(mg/바이알)이다.

대표도 - 도1



○ 비어있는 바이알
● rFIXFc LCM 위약
= 열전대

(52) CPC특허분류

C12Y 304/21022 (2013.01)

F26B 5/06 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

동결건조전 제형으로서,

- (a) IX 인자 (Factor IX: FIX) 및 신생아 Fc 수용체 (FcRn) 결합 상대를 포함하고, FIX 응고 활성을 갖는, 100 IU/바이알 내지 약 10,000 IU/바이알의 농도의 IX 인자 (FIX) 폴리펩타이드;
 - (b) 3 mg/ml 내지 15 mg/ml 의 농도의 L-히스티딘;
 - (c) 10 mg/ml 내지 50 mg/ml 의 농도의 수크로스;
 - (d) 20 mg/ml 내지 100 mg/ml 의 농도의 만니톨; 및
 - (e) 0.01 mg/ml 내지 5 mg/ml 의 농도의 폴리솔베이트 20 을 포함하되,
- 제형은 충전 용적이 2 ml 내지 3 ml 인, 동결건조전 제형.

청구항 2

제 1 항에 있어서, FIX 폴리펩타이드는 220 IU/바이알 내지 1,000 IU/바이알의 농도인, 동결건조전 제형.

청구항 3

제 1 항에 있어서, L-히스티딘은 3.88 mg/ml 내지 9.7 mg/ml 의 농도이고, 수크로스는 17.85 mg/ml 내지 29.95 mg/ml 의 농도이고, 만니톨은 35.7 mg/ml 내지 59.5 mg/ml 의 농도인, 동결건조전 제형.

청구항 4

제 1 항에 있어서, L-히스티딘은 7.76 mg/ml 의 농도이고, 수크로스는 23.8 mg/ml 의 농도이고, 만니톨은 47.6 mg/ml 의 농도이고, 폴리솔베이트 20 은 0.2 mg/ml 의 농도인, 동결건조전 제형.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 충전 용적은 3.0 ml, 2.9 ml, 2.8 ml, 2.7 ml, 2.65 ml, 2.6 ml, 2.5 ml, 2.4 ml, 2.3 ml, 2.2 ml, 2.1 ml 또는 2.0 ml 인, 동결건조전 제형.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 충전 용적은 2.65 ml 인, 동결건조전 제형.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 충전 용적은 2.5 ml 인, 동결건조전 제형.

청구항 8

제 1 항에 있어서, FcRn 결합 상대는 Fc 또는 알부민인, 동결건조전 제형.

청구항 9

제 8 항에 있어서, FcRn 결합 상대는 Fc 인, 동결건조전 제형.

청구항 10

제 1 항에 있어서, FIX 폴리펩타이드는 서열번호 2 에 대해 100% 동일한, 동결건조전 제형.

청구항 11

제 1 항에 있어서, FIX 폴리펩타이드는 서열번호 2 의 FIXFc 단일쇄 (FIXFc-sc) 폴리펩타이드 및 서열번호 4 의 Fc 단일쇄 (Fc-sc) 폴리펩타이드를 포함하는, 동결건조전 제형.

청구항 12

제 1 항에 있어서, FIX 폴리펩타이드는 C-말단 라이신이 없는 서열번호 2 의 FIXFc 단일쇄 (FIXFc-sc) 폴리펩타이드 및 C-말단 라이신이 없는 서열번호 4 의 Fc 단일쇄 (Fc-sc) 폴리펩타이드를 포함하며, FIXFc-sc 폴리펩타이드 및 Fc-sc 폴리펩타이드는 Fc 의 힌지 영역에서 2 개의 이황화 결합을 통해 함께 결합되는, 동결건조전 제형.

청구항 13

동결건조전 제형으로서,

- (a) 서열번호 2 의 FIXFc 단일쇄 (FIXFc-sc) 폴리펩타이드 및 서열번호 4 의 Fc 단일쇄 (Fc-sc) 폴리펩타이드를 포함하는, 100 IU/바이알 내지 10,000 IU/바이알의 농도의 IX 인자 (FIX) 폴리펩타이드;
- (b) 7.76 mg/ml 의 농도의 L-히스티딘;
- (c) 23.8 mg/ml 의 농도의 수크로스;
- (d) 47.6 mg/ml 의 농도의 만니톨; 및
- (e) 0.2 mg/ml 의 농도의 폴리솔베이트 20 을 포함하되,

제형은 충전 용적이 2.65 ml 인, 동결건조전 제형.

청구항 14

제 13 항에 있어서, FIX 폴리펩타이드는 220 IU/바이알 내지 1,000 IU/바이알의 농도인, 동결건조전 제형.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 따른 동결건조전 제형으로부터 동결건조된, 동결건조 분말.

청구항 16

NaCl 용액에 의해 재구성된 제 15 항에 따른 동결건조 분말을 포함하는 재구성된 제형.

청구항 17

제 15 항에 따른 동결건조 분말을 포함하는 바이알.

청구항 18

제 15 항에 따른 동결건조 분말을 포함하는 제 1 용기 및, 제 1 용기의 동결건조 제형과 조합될 때, NaCl 용액에 의해 재구성된 제 15 항에 따른 동결건조 분말을 포함하는 재구성된 제형을 생성하기에 충분한 용적으로 NaCl 용액을 포함하는 제 2 용기를 포함하는 키트.

청구항 19

B형 혈우병의 예방 또는 치료용 약제를 제조하기 위한, 제 16 항에 따른 재구성된 제형을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 20

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 따른 동결건조전 제형으로부터 동결건조된 IX 인자 (FIX) 폴리펩타이드를 생성하는 방법으로서,

- (a) FIX 폴리펩타이드 및 수성 용매를 포함하는 동결건조전 제형을 -65℃ 내지 -40℃ 의 냉동 온도로 냉동시키는 것을 포함하는 "냉동 단계";
- (b) 냉동된 동결건조전 제형으로부터 수성 용매를 제거하는데 효과적인 양에 의해 냉동된 동결건조전 제형

의 압력을 감소시키는 것을 포함하는 "진공 단계"; 및

(c) 냉동된 동결건조전 제형의 온도를 -1.5°C 의 붕괴 온도 초과로 증가시키는 것을 포함하는 단일 "건조 단계" 를 포함함으로써,

동결건조 분말을 생성하는, 동결건조된 FIX 폴리펩타이드를 생성하는 방법.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 하기 (i) 내지 (v) 로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 조건을 특징으로 하는, 동결건조된 FIX 폴리펩타이드를 생성하는 방법:

(i) 동결건조전 제형의 온도는 냉동 단계 동안 5°C 로부터 냉동 온도로 하강되고, 냉동 온도는 냉동 단계 동안 30 분 내지 5 시간 동안 유지됨,

(ii) 단계 (a) 의 냉동된 동결건조전 제형에 "진공 단계" (b) 전에 "어닐링 단계" (a') 가 더 실시되고, 단계 (a) 의 냉동된 동결건조전 제형의 온도는 어닐링 단계 동안 -15°C 내지 -2°C 의 어닐링 온도까지 상승되고, 어닐링 온도는 어닐링 단계 동안 30 분 내지 5 시간 동안 유지됨,

(iii) 냉동된 동결건조전 제형의 온도는 어닐링 단계 동안 어닐링 온도로부터 -65°C 내지 -40°C 의 온도로 하강됨,

(iv) "진공 단계" 는 냉동된 동결건조전 제형에 0.05 내지 1 mbar 의 진공을 2시간 동안 실시하는 것을 포함함, 및

(v) "건조 단계" 는 냉동된 동결건조전 제형의 온도를 -55°C 로부터 40°C 의 건조 온도로 상승시키는 것을 포함하고, 건조 온도는 10 시간 내지 40 시간 동안 유지되고, 건조 단계는 0.05 mbar 내지 1 mbar 의 압력에서 수행됨.

청구항 22

제 20 항에 있어서, 하기 (i) 내지 (iii) 으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 조건을 특징으로 하는, 동결건조된 FIX 폴리펩타이드를 생성하는 방법:

(i) 동결건조전 제형은 멸균 여과되어 단계 (a) 전에 바이알 내로 멸균 충전됨,

(ii) 동결건조 분말은 45 시간 이하에 동결건조전 제형으로부터 생성됨, 및

(iii) 동결건조 분말 중의 잔여 수분은 0.7% 미만임.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 혈액응고 장애에 대한 치료제 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] B형 혈우병(또한 크리스마스병으로 알려짐)은 세계에서 가장 흔한 유전성 출혈 장애이다. 이는 감소된 생체내 및 시험관내 혈액 응고 활성을 야기하며, 병에 걸린 개체의 수명 내내 광대한 의학적 모니터링을 필요로 한다. 처치가 없을 때, 병에 걸린 개체는 중증의 통증 및 쇠약하게 하는 부동상태를 생성하는 관절에서의 자발적 출혈로 고통받을 것이며; 근육 내로의 출혈은 해당 조직에서의 혈액의 축적을 초래하고; 인두 및 목의 자발적 출혈은 즉시 치료되지 않는다면 기절을 야기할 수 있으며, 신출혈; 및 수술후 중증의 출혈, 작은 사고에 의한 손상 또는 발치가 또한 일반적이다.

- [0003] 정상적인 생체내 혈액 응고는 세린 프로테아제 II(프로트롬빈), VII, IX, X 및 XI인자(가용성 혈장 단백질); 막관통 단백질 조직 인자 및 혈장 단백질 V 및 VIII 인자, 피브리노겐, 트랜스글루타미나제 XIII 인자, 인지질(활성 혈소판을 포함함), 및 칼슘을 포함하는 보조인자를 최소로 필요로 한다. 칼리크레인, 고분자량 키니노겐 및 XII 인자를 포함하는 추가적인 단백질은 일부 시험관내 응고 시험에 필요하며, 병리적 병태 하에 생체내에서 어떤 역할을 할 수 있다.
- [0004] 혈우병에서, 혈액 응고는 특정 혈액 응고 인자의 결여에 의해 방해된다. B형 혈우병은 IX 인자 단백질의 감소된 합성 또는 감소된 활성을 지니는 결함 분자 중 하나로부터 초래될 수 있는 IX 인자의 결핍에 의해 야기된다. 혈우병의 치료는 상실 응고 인자의 IX 인자가 고도로 풍부한 외인성 인자 농축물에 의한 대체에 의해 일어난다. 그러나, 혈액으로부터 이러한 농축물의 생성은 이하에 기재하는 바와 같은 기술적 어려움이 많다.
- [0005] 혈장으로부터의 IX 인자(혈장 유래 IX 인자; pdFIX)의 정제는 활성 IX 인자를 거의 배타적으로 수득한다. 그러나, 혈장으로부터의 IX 인자의 이러한 정제는 매우 어려운데, IX 인자는 혈장 중에서 단지 저농도($5\mu\text{g}/\text{ml}$)로 존재하기 때문이다. 문헌[Andersson, Thrombosis Research 7: 451 459 (1975)]. 추가로, 혈액으로부터의 정제는 감염성 제제, 예컨대 HIV 및 HCV의 제거 또는 불활성화를 필요로 한다. 추가로, pdFIX는 짧은 반감기를 가지며, 따라서 빈번한 투약을 필요로 한다. 재조합 IX 인자(rFIX)가 또한 이용가능하지만, 동일한 짧은 반감기로 고통받으며, pdFIX와 같이 빈번한 투약(예를 들어, 예방을 위해 주당 2 내지 3회)을 필요로 한다. rFIX는 또한 pdFIX에 비해 더 낮은 회복 증가분(incremental recovery)(K 값)을 가지는데, 이는 pdFIX보다 더 고용량의 rFIX의 사용을 필요로 한다.
- [0006] 감소된 사망률, 관절 손상의 예방 및 개선된 삶의 질은 혈장-유래 및 재조합 IX 인자의 발생에 기인하여 중요한 성취가 되었다. 출혈로부터의 장기적인 보호는 B형 혈우병 대상체의 치료에서 다른 중요한 진보를 나타낼 것이다. 그러나, 지금까지, 장기적인 보호를 허용하는 생성물은 개발되지 않았다. 따라서, 현재의 요법보다 더 괜찮고 더 효과적인 IX 인자 결핍증에 기인하여 혈우병을 치료하는 개선된 방법에 대한 필요가 남아있다.
- [0007] 특히, 더 높은 약물 생성물 강도, 더 긴 보관수명, 감소된 동결건조 처리 시간 및 더 짧은 재구성 시간을 지니는 개선된 동결건조 FIX 제형에 대한 필요가 남아있다.

발명의 내용

- [0008] 본 발명은 (a) IX 인자(Factor IX: FIX) 응고 활성을 갖는 FIX 폴리펩타이드; (b) 완충제; (c) 안정제; (d) 증량제; 및 (e) 계면활성제를 포함하는 사전-동결건조 제형에 관한 것인데, 제형은 약 5ml 미만, 약 4ml 미만, 또는 약 3ml의 충전 용적을 가지며, 각각의 (a) 내지 (e)는, 기준 사전-동결건조 제형에 비해, (1) 동결건조될 때 FIX 폴리펩타이드의 안정성을 개선시키거나; (2) 동결건조될 때 재구성 시간을 감소시키거나; (3) 상기 제형을 포함하는 스톱퍼 상에서의 스플래싱(splashing)을 감소시키거나; (4) 동결건조 순환 시간을 감소시키거나; (5) 실온에서 사전-동결건조 제형으로부터 제조된 동결건조물의 보관수명을 증가시키거나; 또는 (6) 이들의 임의의 조합을 허용하기에 충분한 바이알 당 양($\text{mg}/\text{바이알}$)이며, 기준 제형은 사전-동결건조 제형에 대해 동일한 바이알 당 양으로 (a) 내지 (e)를 포함하지만, 충전 용적이 적어도 5ml이다. 특정 실시형태에서, 제형의 충전 용적은 약 2.65ml이다.
- [0009] 일부 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 FIX 폴리펩타이드의 적어도 100IU/바이알을 포함한다. 일부 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 FIX 폴리펩타이드의 약 200IU/바이알 내지 약 10,000IU/바이알을 포함한다.
- [0010] 일부 실시형태에서, FIX 폴리펩타이드는 야생형 FIX를 포함한다. 일부 실시형태에서, FIX 폴리펩타이드는 야생형 FIX에 융합된 이중성 모이어티를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 이중성 모이어티는 FIX의 반감기를 연장시키는 모이어티이다. 다른 실시형태에서, 이중성 모이어티는 폴리펩타이드 또는 비-폴리펩타이드 모이어티를 포함한다. 일 실시형태에서, FIX의 반감기를 연장시키는 모이어티는 FcRn 결합 상대 또는 Fc 영역을 포함한다. 일 실시형태에서, FIX 폴리펩타이드는 서열번호 2에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 100% 동일하다.
- [0011] 일부 실시형태에서, 충전 용적은 약 4ml, 약 3.5ml, 약 3.0ml, 약 2.9ml, 약 2.8ml, 약 2.7ml, 약 2.65ml, 약 2.6ml, 약 2.5ml, 약 2.4ml, 약 2.3ml, 약 2.2ml, 약 2.1ml 또는 약 2.0ml이다.
- [0012] 일부 실시형태에서, 감소된 재구성 시간은 1.5분 미만, 1분 미만, 50초 미만, 40초 미만, 30초 미만, 20초 미만 또는 10초 미만이다.
- [0013] 일부 실시형태에서, 완충제는 L-히스티딘이다. 일 실시형태에서, 완충제는 약 3mg/ml 내지 약 15mg/ml의 농도

(mg/ml)이다. 다른 실시형태에서, 완충제는 바이알 당 약 8mg 내지 약 39mg의 농도이다.

- [0014] 일부 실시형태에서, 안정제는 수크로스이다. 일 실시형태에서, 안정제는 10mg/ml 내지 약 50mg/ml의 농도(mg/ml)이다. 다른 실시형태에서, 안정제는 바이알 당 약 27mg 내지 약 132mg의 농도이다.
- [0015] 일부 실시형태에서, 증량제는 만니톨이다. 일 실시형태에서, 증량제는 20mg/ml 내지 약 100mg/ml의 농도(mg/ml)이다. 다른 실시형태에서, 증량제는 바이알 당 약 53mg 내지 바이알 당 약 265mg의 농도이다.
- [0016] 일부 실시형태에서, 계면활성제는 폴리솔베이트 20이다. 일 실시형태에서, 계면활성제는 0.01mg/ml 내지 약 5mg/ml의 농도(mg/ml)이다. 다른 실시형태에서, 계면활성제 바이알 당 약 0.03mg 내지 약 13mg의 농도이다.
- [0017] 일 양상에서, 본 발명은 (a) 약 80 내지 약 2,750IU/ml의 rFIXFc; (b) 약 7.76mg/ml의 L-히스티딘; (c) 약 47.6mg/ml의 만니톨; (d) 약 23.8mg/ml의 수크로스; 및 (e) 약 0.2mg/ml의 폴리솔베이트-20을 포함하는 사전-동결건조 제형에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명은 추가로 FIX 폴리펩타이드, 완충제, 안정제, 증량제, 계면활성제, 또는 이들의 임의의 조합물을 포함하는 동결건조 분말에 관한 것이다.
- [0019] 일부 실시형태에서, 동결건조 분말의 잔여 수분 수준은 1% 미만이다.
- [0020] 일 실시형태에서, 동결건조 분말은 (a) 바이알 당 약 2mg 내지 바이알 당 약 150mg의 양으로 FIX 폴리펩타이드; (b) 바이알 당 10mg 내지 바이알 당 약 30mg의 양으로 완충제; (c) 바이알 당 70mg 내지 바이알 당 약 200mg의 양으로 증량제; (d) 바이알 당 30mg 내지 바이알 당 약 100mg의 양으로 안정제; 및 (e) 바이알 당 0.05mg 내지 바이알 당 약 5mg의 양으로 계면활성제를 포함한다.
- [0021] 다른 실시형태에서, 동결건조 분말은 (a) 바이알 당 약 2.2mg 내지 바이알 당 약 125mg의 양으로 동결건조된 FIX 폴리펩타이드; (b) 바이알 당 약 12.5mg 내지 바이알 당 약 25mg의 양으로 완충제; (c) 바이알 당 약 32.5mg 내지 바이알 당 약 80mg의 양으로 안정제; (d) 바이알 당 약 75mg 내지 바이알 당 약 150mg의 양으로 증량제; 및 (e) 바이알 당 약 0.1mg 내지 바이알 당 약 2mg의 양으로 계면활성제를 포함한다.
- [0022] 다른 실시형태에서, 동결건조 분말은: (a) 약 2.2 내지 약 125mg/바이알의 FIX 폴리펩타이드; (b) 약 20.6mg/바이알의 L-히스티딘; (c) 약 126.1mg/바이알의 만니톨; (d) 약 63.1mg/바이알의 수크로스; 및, (e) 약 0.53mg/바이알의 폴리솔베이트-20을 포함한다;
- [0023] 본 발명은 또한 재구성 완충제에 의해 재구성된 본 명세서에 기재된 동결건조 분말을 포함하는 재구성된 제형에 관한 것이다.
- [0024] 일 실시형태에서, 재구성된 제형은 (a) 약 0.9mg/ml 내지 약 50mg/ml의 농도로 FIX 폴리펩타이드; (b) 1.5mg/ml 내지 약 7.5mg/ml의 농도로 완충제; (c) 10mg/ml 내지 약 50mg/ml의 농도로 증량제; (d) 바이알 당 5mg/ml 내지 25mg/ml의 농도로 안정제; 및 (e) 0.005mg/ml 내지 약 2.5mg/ml의 농도로 계면활성제를 포함한다.
- [0025] 다른 실시형태에서, 재구성된 제형은: (a) 약 0.9mg/ml 내지 약 50mg/ml의 농도로 FIX 폴리펩타이드; (b) 약 3.88mg/ml의 농도로 완충제; (c) 약 23.8mg/ml의 농도로 증량제; (d) 약 11.9mg/ml의 농도로 안정제; (e) 약 0.1mg/ml의 농도로 계면활성제; 및 (f) 재구성 완충제를 포함한다.
- [0026] 다른 실시형태에서, 재구성된 제형은 (a) 약 80IU/ml 내지 약 2,750IU/ml의 농도로 FIX 폴리펩타이드; (b) 약 25mM의 농도로 완충제; (c) 약 131 mM의 농도로 증량제; (d) 약 35mM의 농도로 안정제; (e) 0.01 % (w/v)의 농도로 계면활성제; 및 (f) 재구성 완충제를 포함한다.
- [0027] 본 발명은 추가로 환자에게 본 명세서에 기재된 재구성된 제형을 투여하는 단계를 포함하는, 투여가 필요한 B형 혈우병 환자에게 FIX 폴리펩타이드를 투여하는 방법, 또는 예방, 치료, 개선 또는 관리가 필요한 환자에서 B형 혈우병을 예방, 치료, 개선 또는 관리하는 방법에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 사전-동결건조 제형을 동결건조시키는 단계를 포함하는 FIX 폴리펩타이드를 포함하는 동결건조 분말의 생성 방법에 관한 것이다.
- [0029] 일 양상에서, 본 발명은 (a) FIX 폴리펩타이드 및 수성 용매를 포함하는 사전-동결건조 제형을 냉동시키는 것을 포함하는 "냉동 단계"; (b) 냉동된 사전-동결건조 제형으로부터 수성 용매를 제거하기 위한 효과적인 양에 의해 냉동된 사전-동결건조 제형의 압력을 감소시키는 것을 포함하는 "진공 단계"; 및, (c) 냉동된 사전-동결건조 제형의 온도를 붕괴 온도 초과로 증가시키는 것을 포함하는 단일 "건조 단계"를 포함함으로써, 동결건조 분말을

생성하는 FIX 폴리펩타이드를 동결건조시키는 방법에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 멸균 여과되고, 단계 (a) 전에 바이알 내로 멸균 충전된다.

[0030] 다른 양상에서, 본 발명은 (a) 약 2시간 동안 온도를 약 -55°C 의 냉동 온도로 하강시킴으로써, 그리고 약 2시간 동안 냉동 온도를 유지함으로써 FIX 폴리펩타이드를 포함하는 사전-동결건조 제형을 냉동시키는 것을 포함하는 "냉동 단계"; (a') 약 1.5 시간 동안 단계 (a)의 냉동된 사전-동결건조 제형의 온도를 약 -6°C 의 어닐링 온도로 상승시키고, 약 3시간 동안 어닐링 온도를 유지하고 나서, 약 1.5시간 동안 실온을 약 -55°C 로 하강시키는 것을 포함하는, "어닐링 단계"; (b) 대기압에서 2시간 동안 약 -55°C 에서 단계 (a')의 냉동된 사전-동결건조 제형을 유지하고, 약 2시간 동안 압력을 약 0.33mbar로 하강시키는 것을 포함하는 "진공 단계"; 및, (c) 3시간 동안 단계 (b)의 냉동된 사전-동결건조 제형의 온도를 약 40°C 로 상승시키는 한편, 약 0.33mbar의 압력을 유지하고, 약 40°C 에서 약 25시간 동안 냉동된 사전-동결건조 제형의 온도를 유지하는 한편, 0.33mbar에서 압력을 유지하는 것을 포함하는 단일 "건조 단계"를 포함함으로써, 동결건조 분말을 생성하는, FIX 폴리펩타이드를 포함하는 동결건조 분말의 생성 방법에 관한 것이다.

[0031] 추가 양상에서, 동결건조 분말은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 특징을 가진다: (1) 동결건조될 때 FIX 폴리펩타이드의 개선된 안정성; (2) 동결건조될 때 감소된 재구성 시간; (3) 상기 제형을 포함하는 스톱퍼 상에서의 감소된 스플래싱; (4) 감소된 동결건조 순환 시간; (5) 실온에서 사전-동결건조 제형으로부터 제조된 동결건조물의 증가된 보관수명; 또는 (6) 이들의 임의의 조합.

[0032] 일 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 방법에 따라 사전-동결건조 제형을 동결건조시키는 단계를 포함하는, FIX 폴리펩타이드를 포함하는 동결건조 분말을 안정화시키는 방법을 제공하되, 동결건조 분말은 1회 이상의 건조 단계를 포함하는 동결건조 방법을 이용함으로써 동결건조 분말에 비해 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 측정되는 바와 같이 안정화된다.

[0033] 다른 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 방법에 따라 사전-동결건조 제형을 동결건조시키는 단계를 포함하는, FIX 폴리펩타이드를 포함하는 동결건조 분말의 보관수명을 증가시키는 방법을 제공하되, 동결건조 분말의 보관수명은 1회 이상의 건조 단계를 포함하는 동결건조 방법을 이용함으로써 제조된 동결건조 분말의 보관수명에 비해 SEC 및/또는 FIX 응고 활성 분석에 의해 측정되는 바와 같이 증가된다.

[0034] 본 개시내용은 또한 본 명세서에 기재된 방법에 따른 사전-동결건조 제형을 동결건조시키는 단계를 포함하는 FIX 폴리펩타이드를 포함하는 동결건조 분말의 재구성 시간을 감소시키는 방법을 제공하되, 동결건조 분말의 재구성 시간은 1회 이상의 건조 단계를 포함하는 동결건조 방법을 이용함으로써 제조된 동결건조 분말의 재구성 시간에 비해 감소된다.

[0035] 본 개시내용은 추가로 본 명세서에 기재된 방법에 따라 사전-동결건조 제형을 동결건조시키는 단계를 포함하는, FIX 폴리펩타이드를 포함하는 동결건조 분말을 생성하는 동결건조 처리 시간을 감소시키는 방법을 제공하되, 사전-동결건조 제형의 동결건조 과정은 1회 이상의 건조 단계를 포함하는 동결건조 방법을 이용하여 동결건조 분말을 생성하는 것의 동결건조 과정 시간에 비해 감소된다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 각각의 동결건조 주기에 대한 바이알 장입 패턴을 도시한 도면. 숫자 1, 2 및 3은 열전대 위치를 나타낸다.

도 2는 동결건조 변수(온도, 진공 및 시간)의 함수로서 잔여 수분의 DOE 분석으로부터의 예측 프로파일러를 도시한 도면.

도 3은 동결건조 변수(온도 및 진공)의 함수로서 승화 동안 생성물 온도의 DOE 분석으로부터의 예측 프로파일러를 도시한 도면.

도 4는 동결건조 변수(온도 및 진공)의 함수로서 승화 동안 바이알 질량 흐름의 DOE 분석으로부터의 예측 프로파일러를 도시한 도면.

도 5는 제안된 rFIXFc-2G 동결건조 주기와 유사한 실시예 2에서의 DOE 실행 8로부터의 동결건조 데이터(40°C 의 보관 온도, 250mTorr(0.33mBar)의 챔버 진공 및 25시간의 건조 시간)를 도시한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 본 개시내용은, 특히, 사전-동결건조 제형, 재구성된 제형, 및 동결건조 분말 IX 인자(FIX) 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 개시내용은 또한 FIX 폴리펩타이드를 포함하는 동결건조 분말을 생성하는 동결건조 방법을 제공한다. 또한 FIX 폴리펩타이드를 포함하는 동결건조 분말을 안정화시키는 방법, FIX 폴리펩타이드를 포함하는 동결건조 분말의 보관수명을 증가시키는 방법, FIX 폴리펩타이드를 포함하는 동결건조 분말의 재구성 시간을 감소시키는 방법, 및 FIX 폴리펩타이드를 포함하는 사전-동결건조 제형의 동결건조 과정 시간을 감소시키는 방법이 제공된다. 추가로, 본 개시내용은 FIX 폴리펩타이드를 포함하는 재구성된 제형을 투여함으로써 예방, 치료, 개선 또는 관리가 필요한 환자에서 B형 혈우병을 예방, 치료, 개선 또는 관리하는 방법을 제공한다.
- [0038] **정의**
- [0039] 본 개시내용 전체적으로 단수의 용어 독립체는 하나 이상의 해당 독립체를 지칭하며; 예를 들어, "폴리뉴클레오타이드"는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 나타내는 것으로 이해된다. 이와 같이 단수의 용어, "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본 명세서에서 상호호환적으로 사용될 수 있다.
- [0040] 더 나아가, 본 명세서에서 사용되는 "및/또는"은 다른 것이 있거나 또는 다른 것이 없는 각각 2개의 구체화된 특징 또는 성분의 구체적 개시내용으로서 취해져야 한다. 따라서, 본 명세서 "A 및/또는 B"와 같은 어구에서 사용되는 용어 "및/또는"은 "A 및 B," "A 또는 B," "A"(단독), 및 "B"(단독)를 포함하는 것으로 의도된다. 마찬가지로, "A, B 및/또는 C"와 같은 어구에서 사용되는 용어 "및/또는"은 다음의 양상의 각각을 포함하는 것으로 의도된다: A, B 및 C; A, B 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A(단독); B(단독); 및 C(단독).
- [0041] 어느 양상에서나 언어 "포함하는"과 함께 본 명세서에 기재되어 있으며, "이루어진" 및/또는 "본질적으로 이루어진"에 대해 기재된 다른 유사한 양상이 또한 제공된다는 것이 이해된다.
- [0042] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시내용이 관련된 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 예를 들어, 문헌[Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; 및 the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press]은 본 개시내용에 사용되는 다수 용어의 일반적 사전을 당업자에게 제공한다.
- [0043] 단위, 접두사 및 기호는 그들의 국제 단위체계(SI) 허용 형태로 나타낸다. 수치적 범위는 범위를 정하는 숫자를 포함한다. 달리 표시되지 않는 한, 아미노산 서열은 아미노에서 카복시 배향의 좌에서 우로 기재된다. 본 명세서에 제공되는 표제는 본 명세서에 대해 전체로서 참고가 될 수 있는 개시내용의 다양한 양상의 제한이 아니다. 따라서, 바로 이하에 정의되는 용어는 그의 전문이 본 명세서에 대해 참고로서 더욱 완전하게 정의된다.
- [0044] 용어 "약"은 본 명세서에서 대략, 거의, 주변의, 또는 약을 의미하기 위해 사용되며, 값은 측정 시스템의 제한 방법에 의존할 것이다. 용어 "약"이 수치적 범위와 함께 사용될 때, 이는 제시된 수치적 값 초과 및 미만의 경계로 확장함으로써 해당 범위를 변형시킨다. 일반적으로, 용어 "약"은, 예를 들어, 10% 또는 20%, 위 또는 아래 (더 높거나 또는 더 낮음)의 분산에 의해 언급된 값 초과 및 미만으로 수치적 값을 변형시킬 수 있다. 달리 언급되지 않는 한, "약"의 의미는 제형 또는 조성물에 대한 특정 값에 대해 허용가능한 오차 범위 내인 것으로 추정되어야 한다.
- [0045] 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 상호호환적으로 사용되며, 공유결합된 아미노산 잔기를 포함하는 중합체 화합물을 지칭한다.
- [0046] 용어 "폴리뉴클레오타이드" 및 "핵산"은 상호호환적으로 사용되며, 공유결합되거나 뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 중합체 화합물을 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드는 DNA, cDNA, RNA, 단일 가닥 또는 이중 가닥, 벡터, 플라스미드, 파지 또는 바이러스일 수 있다.
- [0047] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "투여하는"은, 예를 들어, FIX 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에게 처방 또는 제공하는 것을 의미한다. 투여 경로의 예는, 예를 들어, 중심 정맥 접근을 통한 정맥내, 예를 들어, 정맥내 주사 및 정맥내 주입을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 추가적인 투여 경로는 피하, 근육내, 경구, 비강 및 폐 투여를 포함한다. FIX 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물은 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 부형제를 포함할 수 있다. 본 명세서에 제공된 방법, 조성물 및 약제학적 키

트의 이점은 개선된 요법 준수; 출혈을 통한 감소된 파열; 출혈로부터의 관절의 증가된 보호; 관절 손상의 예방; 감소된 이환율; 감소된 사망률; 출혈로부터의 연장된 보호; 감소된 혈전 사건; 및 개선된 삶의 질을 포함한다. 투여하는 단계는 비경구 투여를 포함한다. 일부 실시형태에서, 비경구 투여는 정맥내 또는 피하 투여이다.

[0048] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 B형 혈우병을 포함하지만, 이것으로 제한되지 않는 출혈 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상의 개선 또는 감소를 의미한다. 일 실시형태에서, 출혈 질환 또는 장애"의 치료" 또는 "치료하는"은 출혈 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상의 예방을 포함한다. FIX 결핍증(예를 들어, 낮은 기준 FIX 활성)에 의해 야기되는 출혈 질환 또는 장애에서, 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 FIX 대체 요법을 의미할 수 있다. 대상체에 FIXFc 폴리펩타이드를 투여함으로써, 대상체는 약 1IU/dl 또는 1IU/dl 초과로 FIX 활성의 혈장 트로프 수준을 달성 및/또는 유지할 수 있다. 다른 실시형태에서, "치료" 또는 "치료하는"은 출혈 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상, 예를 들어, 자발적 또는 제어가능하지 않은 출혈 에피소드의 빈도 감소를 의미한다. 그러나, "치료"는 치유가 필요하지 않다.

[0049] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "환자"는 제어가능하지 않은 출혈 에피소드의 적어도 1회 발생률을 갖는 것으로 알려진 개체, 제어가능하지 않은 출혈 에피소드, 예를 들어 출혈 질환 또는 장애, 예를 들어 B형 혈우병과 관련된 질환 또는 장애로 진단된 개체, 제어가능하지 않은 출혈 에피소드, 예를 들어 혈우병의 여지가 있는 개체, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 환자는 또한 특정 활동, 예를 들어, 수술, 수술 활동 또는 임의의 격렬한 활동 전에 하나 이상의 제어가능하지 않은 출혈 에피소드의 위험에 있는 개체를 포함할 수 있다. 환자는 1% 미만, 0.5% 미만, 2% 미만, 2.5% 미만, 3% 미만 또는 4% 미만의 기준 FIX 활성을 가질 수 있다. 환자는 또한 소아 인간을 포함한다. 소아 환자는 출생 내지 20세, 바람직하게는 출생 내지 18세, 출생 내지 16세, 출생 내지 15세, 출생 내지 12세, 출생 내지 11세, 출생 내지 6세, 출생 내지 5세, 출생 내지 2세, 및 2 내지 11세이다.

[0050] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "기준"은 용량을 투여하기 전에 대상체에서 가장 낮게 측정된 혈장 IX 인자 수준이다. IX 인자 혈장 수준은 투약 전 2회 시점에(선별 방문 시 그리고 투약 직전에) 측정될 수 있다. 대안적으로, (a) 전처리 FIX 활성이 1% 미만인 대상체, 검출가능하지 않은 FIX 항원을 가지며, 넌센스 유전자형을 갖는 대상체에서의 기준은 0%로서 나타낼 수 있으며, (b) 1% 미만의 전처리 FIX 활성을 지니고 검출가능한 FIX 항원을 갖는 대상체에 대한 기준은 0.5%로 설정될 수 있고, (c) 전처리 FIX 활성이 1 내지 2%인 대상체에 대한 기준은 Cmin(PK 연구 내내 가장 낮은 활성)이며, (d) 전처리 FIX 활성이 2% 이상인 대상체에 대한 기준은 2%로 설정될 수 있다. 기준 사전 투약 초과의 활성은 사전 치료로부터의 잔여 약물을 고려할 수 있으며, 기준에 대해 붕괴되고, rFIXFBP 투약 후 PK 데이터로부터 차감될 수 있다.

[0051] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "트로프"는 본 발명의 또는 다른 IX 분자의 키메라 폴리펩타이드의 용량을 투여한 후에 그리고 만약에 있다면 다음 용량이 투여되기 전에 도달된 가장 낮은 혈장 IX 인자 활성 수준이다. 트로프는 본 명세서에서 "역치"와 상호호환적으로 사용된다. 기준 IX 인자 수준은 트로프 수준을 계산하기 위해 측정된 IX 인자로부터 차감된다.

[0052] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "반감기"는 생체내 특정 폴리펩타이드의 생물학적 반감기를 지칭한다. 반감기는 대상체에게 투여되는 양의 절반이 동물 내의 순환 및/또는 다른 조직으로부터 클리어런스되는데 필요한 시간으로서 표시될 수 있다.

[0053] 용어 "장시간 작용성" 및 "지속성"은 본 명세서에서 상호호환적으로 사용된다. 일 실시형태에서, 용어 "장시간 작용성" 또는 "지속성"은 rFIXFBP 폴리펩타이드의 투여 결과로서의 FIX 활성이 야생형 FIX(예를 들어, 베네픽스(BENEFIX)(등록상표) 또는 혈장-유래 FIX("pdFIX"))의 FIX 활성보다 더 길다는 것을 나타낸다. "더 긴" FIX 활성은 당업계 임의의 공지된 방법, 예를 들어, aPTT 분석, 색원체(chromogenic) 분석, ROTEM, TGA 등에 의해 측정될 수 있다. 일 실시형태에서, "더 긴" FIX 활성은 $T_{1/2\text{베타}}$ (활성)에 의해 나타날 수 있다. 다른 실시형태에서, "더 긴" FIX 활성은 혈장에 존재하는 FIX 항원 수준에 의해, 예를 들어, $T_{1/2\text{베타}}$ (항원)에 의해 추론될 수 있다.

[0054] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "동결건조물", "동결건조 분말", "동결건조된 생성물" 또는 "생성물 케이크"는 냉동-건조 방법에 의해 제조된 제형을 의미한다. 용어(예를 들어, 물)는 진공 하에서 승화 및 승온에서 잔여 물의 탈착 후 냉동에 의해 제거된다. 약제학적 분야에서, 동결건조물은 분말로서 또는 물리적으로 안정한 케이크로서 제공된다. 동결건조물은 재구성 배지의 첨가 후 빠른 용해를 특징으로 한다.

[0055] 본 명세서에서 사용되는 용어 "사전-동결건조 제형" 또는 "동결건조 공급물"은 용매(예를 들어, 물)가 냉동 건

조 방법에 의해 제거되기 전의 액체 제형을 의미한다. 사전-동결건조 제형의 "충전 용적"은 동결건조 전 액체 제형의 총 용적이다.

[0056] 본 명세서에서 사용되는 " $T_{1/2\beta}$ " 또는 " $T_{1/2}$ 베타" 또는 "베타 HL"은 소실 단계와 관련된 반감기, 즉, 최종 단계와 관련된 $t_{1/2\beta}=(\ln 2)/\text{소실 속도 상수}$ 이다. $T_{1/2}$ 베타는 혈장 내 FIX 활성화에 의해 또는 또는 FIX 항원 수준에 의해 측정될 수 있다. 활성화에 기반한 $T_{1/2}$ 베타는 $T_{1/2}$ 베타 (활성)으로서 나타내며, FIX 항원 수준에 기반한 $T_{1/2}$ 베타는 $T_{1/2}$ 베타(항원)으로서 나타낼 수 있다. $T_{1/2}$ 베타(활성)와 $T_{1/2}$ 베타(항원)은 둘 다 범위 또는 기하평균으로서 나타낼 수 있다.

[0057] 본 명세서에서 사용되는 용어 "재구성된 제형" 또는 "재구성 후 조성물"은 동결건조되고 희석제의 첨가에 의해 재용해되는 제형을 의미한다. 희석제는, 제한 없이, 주사용수(water for injection: WFI), 멸균 주사용수(bacteriostatic water for injection: BWFI), 염화나트륨 용액(예를 들어, 0.9% (w/v) NaCl), 글루코스 용액(예를 들어, 5% 글루코스), 계면활성제 함유 용액(예를 들어, 0.01% 폴리솔베이트 20 또는 폴리솔베이트 80), pH-완충 용액(예를 들어 인산염 완충 용액) 및 이들의 조합물을 함유할 수 있다.

[0058] 일반적 동결건조 과정

[0059] 동결건조, 또는 냉동 건조는 생물 및 약제학적 물질의 보존을 위한 약제학적 산업에서 널리 사용되는 과정이다. 또한 동결건조 주기로서 공지된 동결건조 과정은 전통적으로 3가지의 별도 단계(냉동, 1차 건조 및 2차 건조)로 나뉘어진다. 본 명세서에서 사용되는 "동결건조하는"은 냉동 단계와 건조 단계를 둘 다 포함하는 전체 동결건조 단계를 지칭한다.

[0060] 동결건조에서, 물질 중에 존재하는 물은 냉동 단계 동안 얼음으로 전환되고, 이어서, 1차 건조 단계 동안 저압 조건 하에 직접 승화에 의해 물질로부터 제거된다. 그러나, 냉동 동안 모든 물이 얼음으로 전환되지는 않는다. 물의 일부분은, 예를 들어, 제형 성분 및/또는 활성 성분을 함유하는 고체 기질에 가두어진다. 기질 내의 과량의 결합수는 2차 건조 단계 동안 목적으로 하는 수분 수준으로 감소될 수 있다. 모든 동결건조 단계, 냉동, 1차 건조 및 2차 건조는 최종 생성물 특성을 결정한다. 1차 건조는 전형적으로 동결건조 과정에서 가장 긴 단계이며, 따라서, 과정의 이 부분의 최적화는 상당한 경제적 효과를 가진다.

[0061] 본 발명의 특정 양상에서, 동결건조 과정은 1차 건조 단계만을 포함한다.

[0062] 본 발명의 특정 양상에서, 동결건조 과정은 또한 냉동 단계와 1차 건조 단계 사이에 별도의 "진공 단계"를 포함한다.

[0063] 본 발명의 다른 양상에서, 동결건조 과정은 추가로 냉동 단계와 1차 건조 단계 사이에 "어닐링 단계"를 포함한다.

[0064] 본 명세서에서 사용되는 용어 "어닐링 단계"는 제제의 건조 단계 전에 동결건조를 겪는 폴리캡타이드 제제의 동결건조 과정의 단계를 지칭하며, 이때, 제조 온도는 더 저온으로부터 더 고온으로 상승되고, 이어서, 일정 시간 후에 냉각된다.

[0065] 주기 및 제형 최적화는 1차 건조 동안 생성물 온도가 붕괴 온도를 결코 초과하지 않는다는 것을 보장하기 위해 전통적으로 수행되었다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "붕괴 온도"는 생성물 케이크가 그의 본래의 구조를 상실하기 시작하는 상기 냉동-건조 동안의 생성물 온도를 지칭한다. 붕괴 온도 초과에서, 생성물은 생성물의 외관에 대한 결과를 가질 수 있는 느린 산발적 버블링, 거품형성, 공동현상, 천공, 전체 붕괴, 수축 및 비드화를 겪을 수 있었다. 그 결과, 붕괴는 불량한 생성물 안정성, 긴 건조 시간, 불균일 건조 및 질감 상실을 초래할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제2010/0041870호 참조.

[0066] 본 발명에 따른 동결건조 생성물은 생성물 품질 분석, 재구성 시간, 재구성 품질, 고분자량, 수분, 유리 전이 온도(T_g), 및 생물학적 또는 생화학적 활성화에 기반하여 평가될 수 있다. 전형적으로, 생성물 품질 분석은 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 양이온 교환-HPLC(CEX-HPLC), X-선 회절(XRD), 변조 시차 주사 열량측정법(mDSC), 역상 HPLC(RP-HPLC), 다각 광산란 검출기(MALS), 형광, 자외선 흡수, 비탁법, 모세관 전기이동(CE), SDS-PAGE, 및 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 방법을 이용하는 생성물 분해 속도 분석을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명에 따른 동결건조 생성물의 평가는 케이크 외관을 평가하는 단계를 포함한다. 추가적으로, 동결건조된 생성물은 전형적으로 재구성 후에 생성물의 생물학적 또는 생화학적 활성화에 기반하여 평가될 수 있다.

- [0067] **동결건조된 IX 인자 제형**
- [0068] 본 개시내용은 사전-동결건조, 동결건조 및 재구성 후 제형, 또는 FIX 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0069] 본 발명의 특정 양상에서, 본 명세서에 개시된 제형은 FIX 폴리펩타이드, 완충제, 안정제, 증량제 및 계면활성제, 또는 이들의 임의의 조합물을 포함한다. 제형은 또한 약제학적 제형에 유용한 임의의 다른 제제를 함유할 수 있다.
- [0070] **IX 인자(FIX) 폴리펩타이드**
- [0071] 제형에 유용한 FIX 폴리펩타이드 또는 FIX 단백질은 달리 구체화되지 않는 한 응고에서의 그의 정상적 역할에서 기능성 인자 FIX 단백질이다. 따라서, FIX 폴리펩타이드는 기능성인 변이체 폴리펩타이드 및 이러한 기능성 변이체 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일 실시형태에서, FIX 폴리펩타이드는 인간, 소, 돼지, 개, 고양이 및 무린 FIX 폴리펩타이드이다. 다수의 기능성 변이체, 예를 들어, 단편, 돌연변이체 및 변형된 형태와 같은 FIX의 전장 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드 서열이 공지되어 있다. FIX 폴리펩타이드는 전장 FIX, N-말단에서 전장 FIX - Met, 신호 서열에서 전장 FIX - 신호 서열, 성숙 FIX(- 신호 서열 및 프로펩타이드), 및 N-말단에서 추가적인 Met를 지니는 성숙 FIX를 포함한다. FIX는 제조할 수단("제조할 IX 인자" 또는 "rFIX")에 의해 생성될 수 있으며, 즉, 천연 유래가 아니거나 또는 혈장으로부터 유래되지 않는다.
- [0072] 매우 다수의 기능성 FIX 변이체가 공지되어 있다. 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 국제 특허 출원 공개 번호 WO 02/040544 A3은 4페이지, 9 내지 30번째줄 및 15페이지, 6 내지 31번째 줄에서 헤파린에 의한 저해에 대해 증가된 저항을 나타내는 돌연변이체를 개시한다. 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 국제 특허 출원 공개 번호 WO 03/020764 A2는 표 2 및 3(14 내지 24페이지) 및 12페이지, 1 내지 27번째 줄에서 감소된 T 세포 면역원성을 지니는 FIX 돌연변이체를 개시한다. 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2007/149406 A2는 4페이지, 1번째줄 내지 19페이지, 11번째줄에 대해 증가된 단백질 안정성, 증가된 생체내 및 시험관내 반감기 및 프로테아제에 대한 증가된 내성을 나타내는 기능성 돌연변이체 FIX 분자를 개시한다. WO 2007/149406 A2는 또한 19페이지, 12번째줄 내지 20페이지, 9번째줄에서 키메라 및 다른 변이체 FIX 분자를 개시한다. 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 국제 특허 출원 공개 번호 WO 08/118507 A2는 5페이지, 14번째줄 내지 6페이지 5번째줄에서 증가된 응고 활성을 나타내는 FIX 돌연변이체를 개시한다. 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 국제 특허 출원 공개 번호 WO 09/051717 A2는 9페이지, 11번째줄 내지 20페이지 2번째줄에서 증가된 반감기 및/또는 회복을 야기하는 증가된 수의 N-연결 및/또는 O-연결 글리코실화 부위를 갖는 FIX 돌연변이체를 개시한다. 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 국제 특허 출원 공개 번호 WO 09/137254 A2는 또한 2페이지, 단락 [006] 내지 5페이지, 단락 [011] 및 16페이지, 단락 [044] 내지 24페이지, 단락 [057]에서 증가된 수의 글리코실화 부위를 지니는 IX 인자 돌연변이체를 개시한다. 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 국제 특허 출원 공개 번호 WO 09/130198 A2는 4페이지 26번째줄 내지 12페이지, 6번째줄에서 증가된 반감기를 야기하는 증가된 수의 글리코실화 부위를 갖는 기능성 돌연변이체 FIX 분자를 개시한다. 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 국제 특허 출원 공개 번호 WO 09/140015 A2는 11페이지, 단락 [0043] 내지 13페이지, 단락 [0053]에서 중합체(예를 들어, PEG) 컨쥬게이션을 위해 사용될 수 있는 Cys 잔기의 수가 증가된 기능성 FIX 돌연변이체를 개시한다. FIX 폴리펩타이드는 또한 전문이 본 명세서에 참고로 포함된 2011년 7월 11일자로 출원되고, 2012년 1월 12일자의 WO 2012/006624로서 공개된 국제 특허 출원 PCT/US2011/043569에 기재되어 있다.
- [0073] 특정 실시형태에서, FIX 폴리펩타이드는 야생형 FIX를 포함한다. 일부 실시형태에서, FIX 폴리펩타이드는 야생형 FIX에 융합된 이중성 모이어티를 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 이중성 모이어티는 FIX의 반감기를 연장시키는 모이어티이다. 특정 실시형태에서, 이중성 모이어티는 폴리펩타이드 또는 비-폴리펩타이드 모이어티를 포함한다.
- [0074] 다른 실시형태에서, FIX 폴리펩타이드는 장시간 작용성 FIX 폴리펩타이드이다. 장시간 작용성 FIX 폴리펩타이드는 FIX 부분 및 비 FIX 부분, 예를 들어, FIX 폴리펩타이드의 생체내 또는 시험관내 반감기를 연장시킬 수 있는 이중성 모이어티를 포함할 수 있다. 예시적인 비-FIX 부분은, 예를 들어, Fc, 알부민, PAS 서열, 트랜스페린, CTP(4개의 O-글리칸을 지니는 인간 융모성 고나도트로핀(hCG)의 28개의 아미노산 C-말단 펩타이드(CTP)), 폴리 에틸렌 글리콜(PEG), 하이드록시에틸 전분(HES), 알부민 결합 폴리펩타이드, 알부민-결합 소분자 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 본 발명의 예시적인 장시간 작용성 FIX 폴리펩타이드는, 예를 들어, IX 인자-Fc 폴리펩타이드, IX 인자-알부민 폴리펩타이드, IX 인자-PAS 폴리펩타이드, IX 인자 -트랜스페린 폴리펩타이드, IX 인자 -CTP 폴리펩타이드, IX 인자 -PEG 폴리펩타이드, IX 인자 -HES 폴리펩타이드, IX 인자 -알부민 결합 폴리펩

타이드 폴리펩타이드, 또는 IX 인자 -알부민-결합 소분자 폴리펩타이드를 포함한다.

[0075] 일 실시형태에서, FIX 폴리펩타이드는 인간 항체(IgG1 아이소타입)의 인간 응고 IX 인자(FIX) 및 Fc 도메인을 포함하는 재조합 융합 단백질인 rFIXFc이다. 예를 들어, 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 2011년 7월 11일자 로 출원되고, WO 2012/006624로서 공개된 PCT 출원 번호 PCT/US2011/043569 참조. rFIXFc 폴리펩타이드는 FIXFc 단일쇄(FIXFc-sc) 및 Fc의 힌지 영역에서 2개의 이황화 결합을 통해 함께 결합된 단일쇄(Fc-sc)를 지니는 이형이량체 단백질이다. rFIXFc는 최종 단백질 생성물인 rFIXFc를 형성하기 위해 형질감염 세포주 내에서 조립되는 2개의 단백질 서브유닛, 즉, FIXFc-sc(642개의 아미노산, 서열번호 2) 및 Fc-sc(227개의 아미노산, 서열번호 4)가 필요하다. FIXFc-sc 및 Fc-sc를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 각각 열번호 1 및 서열번호 3으로서 제시된다.

[0076] 특정 실시형태에서, rFIXFc의 IX 인자 부분은 혈장 유래 IX 인자의 Thr148 대립형질 형태와 동일한 1차 아미노산 서열을 가지며, 내인성 IX 인자와 유사한 구조적 및 기능성 특징을 가진다. rFIXFc의 Fc 도메인은 IgG1의 힌지, CH2 및 CH3 영역을 함유한다. rFIXFc의 조립된 이형이량체 성숙 형태는 분자량이 대략 98 킬로달톤인 869개의 아미노산을 함유한다. 일부 실시형태에서, rFIXFc 폴리펩타이드는 서열번호 2의 아미노산 1 내지 642에 대해 적어도 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0077] 일 실시형태에서, FIX에 융합된 제2 부분은 FcRn 결합 상대이다. 다른 실시형태에서, FIX에 융합된 FcRn 결합 상대는 Fc 단편이다. FcRn 결합 상대는 FcRn 결합 상대의 FcRn 수용체에 의해 결과적인 활성 수송을 지니는 FcRn 수용체에 의해 특이적으로 결합될 수 있는 임의의 분자이다. 따라서, 용어 Fc는 기능성인 IgG Fc의 임의의 변이체를 포함한다. FcRn 수용체에 결합하는 IgG의 Fc 부분의 영역은 X선 결정학에 기반하여 기재되었다(본 명세서에 전문이 참고로 포함된 문헌[Burmeister *et al.*, *Nature* 372:379 (1994)]). Fc와 FcRn과의 주요 접촉 면적은 CH2 및 CH3 도메인의 접합 근처이다. Fc-FcRn 접촉은 모두 단일 Ig 중쇄 내에 있다. FcRn 결합 상대는, 예를 들어, 전체 IgG, IgG의 Fc 단편, 및 FcRn의 완전한 결합 영역을 포함하는 IgG의 다른 단편을 포함한다. 주요 접촉 부위는 CH2 도메인의 아미노산 잔기 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311, 및 314 및 CH3 도메인의 아미노산 잔기 385-387, 428 및 433-436을 포함한다. 번역글로불린 또는 번역글로불린 단편 또는 영역의 아미노산 넘버링에 대한 언급은 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 문헌[Kabat *et al.* 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U. S. Department of Public Health, Bethesda; MD]에 모두 기반한다. FcRn 수용체는 인간을 포함하는 몇몇 포유류 종으로부터 단리되었다. 인간 FcRn, 래트 FcRn 및 마우스 FcRn의 서열은 공지되어 있다(본 명세서에 전문이 참고로 포함된 문헌[Story *et al.*, *J. Exp. Med.* 180: 2377 (1994)]) Fc는 번역글로불린의 힌지 영역을 지니는 또는 힌지 영역이 없는 번역글로불린의 CH2 및 CH3 도메인을 포함할 수 있다. 예시적인 Fc 변이체는 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 WO 2004/101740 및 WO 2006/074199에서 제공된다.

[0078] Fc(또는 키메라 폴리펩타이드의 Fc 부분)은 하나 이상의 돌연변이 및 돌연변이의 조합을 함유할 수 있다.

[0079] Fc(또는 키메라 폴리펩타이드의 Fc 부분)은 증가된 반감기를 부여하는 돌연변이, 예컨대 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 문헌[Oganesyan *et al.*, *Mol. Immunol.* 46:1750 (2009)]에 개시된 바와 같은 M252Y, S254T, T256E, 및 이들의 조합; 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 문헌[Vaccaro *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 23:1283 (2005)]에 개시된 바와 같은 H433K, N434F 및 이들의 조합; 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 미국 특허 제 2009/0264627 A1호의 1 내지 2페이지, 단락 [0012] 및 실시예 9 및 10에 개시된 돌연변이체; 및 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 미국 특허 제20090163699 A1의 2페이지 단락 [0014] 내지 [0021]에 개시된 돌연변이체를 함유할 수 있다.

[0080] Fc(또는 키메라 폴리펩타이드의 Fc 부분)는 또한, 예를 들어 다음의 돌연변이를 포함할 수 있다: IgG의 Fc 영역 부위 지정 돌연변이유발 등과 같은 잘 인식된 절차에 따라 변형되어 FcRn에 의해 결합될 변형된 IgG 또는 Fc 단편 또는 이의 부분을 수득할 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어, FcRn 접촉 부위로부터 떨어져 있는 변형뿐만 아니라 FcRn에 대한 결합을 보존 또는 심지어 향상시키는 접촉 부위 내의 변형을 포함한다. 예를 들어, 인간 IgG1 Fc(Fcγ1)에서 다음의 단일 아미노산 잔기는 FcRn에 대한 Fc 결합 친화도의 상당한 상실 없이 치환될 수 있다: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, A330S, P331A, P331S, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A,

Y373A, S375A D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A 및 K447A, 여기서, 예를 들어 P238A는 위치 번호 238에서 알라닌에 의해 치환되는 야생형 프롤린을 나타낸다. 알라닌에 추가로 다른 아미노산이 상기 구체화된 위치에서 야생형 아미노산을 치환할 수 있다. 돌연변이는 Fc 내로 개별적으로 도입되어 천연 Fc와 별개의 100개 초과 FcRn 결합 상대가 생기게 할 수 있다. 추가적으로, 이들 개개 돌연변이의 2, 3개 이상의 조합은 함께 도입되어 수백개 초과 FcRn 결합 상대가 생기게 할 수 있다. 특정 이들 돌연변이는 FcRn 결합 상대에 대해 새로운 기능성을 부여할 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태는 고도로 보존된 N-글리코실화 부위를 제거하는 N297A를 포함한다. 이 돌연변이의 효과는 면역원성을 감소시킴으로써 FcRn 결합 상대의 순환 반감기를 향상시키는 것, 그리고 FcRn에 대한 친화도를 손상시키는 일 없이 FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB 및 FcγRIIIA에 결합할 수 없는 FcRn 결합 상대를 제공하는 것이다(본 명세서에 전문이 참고로 포함된 문헌[Routledge et al. 1995, Transplantation 60:847]; 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 문헌[Friend et al. 1999, Transplantation 68:1632]; 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 문헌[Shields et al. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591]). 추가적으로, 적어도 3개의 인간 Fc 감마 수용체는 하부의 힌지 영역, 일반적으로 아미노산 234 내지 237 내에서 IgG 상의 결합 부위를 인식하는 것으로 나타난다. 따라서, 새로운 기능성 및 잠재적으로 감소된 면역원성의 다른 예는, 예를 들어 인간 IgG1 "ELLG"의 아미노산 233 내지 236을 IgG2 "PVA"로부터의 대응하는 서열(하나의 아미노산 결실을 지냄)로 대체함으로써, 이 영역의 돌연변이로부터 생길 수 있다. 다양한 효과기 기능을 매개하는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII는 이러한 돌연변이가 도입될 때 IgG1에 결합하지 않는 것으로 나타났다(본 명세서에 전문이 참고로 포함되는 문헌[Ward and Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77 (1995)]; 및 본 명세서에 전문이 참고로 포함되는 문헌[Armour et al., *Eur. J. Immunol.* 29:2613 (1999)]. 상기 기재한 돌연변이로부터 생기는 새로운 기능성의 추가적인 예로서, FcRn에 대한 친화도는 일부 예에서 야생형의 친화도 이상으로 증가될 수 있다. 이 증가된 친화도는 증가된 "온(on)" 속도, 감소된 "오프(off)" 속도 또는 증가된 "온" 속도와 감소된 "오프" 속도 둘 다를 반영할 수 있다. FcRn에 대해 증가된 친화도를 부여하는 것으로 믿어지는 돌연변이는, 예를 들어, T256A, T307A, E380A 및 N434A(본 명세서에 전문이 참고로 포함된 문헌[Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276:6591 (2001)])를 포함한다.

[0081] Fc(또는 키메라 폴리펩타이드의 Fc 부분)는 표 14에 나타난 Fc 아미노산 서열(예를 들어, 서열번호 4의 아미노산 21 내지 247)에 대해 적어도 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100% 동일할 수 있다. Fc(또는 키메라 폴리펩타이드의 Fc 부분)는 표 14에 나타난 Fc 아미노산 서열(예를 들어, 서열번호 4의 아미노산 21 내지 247)과 동일할 수 있다.

[0082] 상기 논의한 바와 같이, 예시적인 장시간 작용성 폴리펩타이드는 또한 하나 이상의 알부민 폴리펩타이드, 알부민 결합 폴리펩타이드, 또는 알부민-결합 소분자에 융합된 FIX를 포함한다. 일 실시형태에서, 알부민은 인간 알부민이다. 알부민 또는 알부민 결합 단백질은 FIX의 N-말단 단부에 또는 FIX의 C-말단 단부에 융합되거나 또는 FIX에서 두 아미노산 사이에 삽입될 수 있다. 본 발명에서 사용될 수 있는 알부민, 예를 들어 이의 단편의 예는 공지되어 있다. 예를 들어, 본 명세서에 각각 전문이 참고로 포함되는 미국 특허 제7,592,010호; 미국 특허 제6,686,179호; 및 문헌[Schulte, *Thrombosis Res.* 124 Suppl. 2:S6-S8 (2009)].

[0083] 알부민 결합 폴리펩타이드는, 이하로 제한되지 않고, 박테리아 알부민-결합 도메인, 알부민-결합 펩타이드, 또는 알부민에 결합할 수 있는 알부민-결합 항체 단편을 포함할 수 있다. 문헌[Kraulis et al., *FEBS Lett.* 378:190-194 (1996) 및 Linholt et al., *Protein Sci.* 11:206-213 (2002)]에 개시된 바와 같은 스트렙토코커스 단백질 G로부터의 도메인 3은 박테리아 알부민-결합 도메인의 예이다. 알부민-결합 펩타이드의 예는 코어 서열 DICLPRWGCLW(서열번호 5)를 갖는 일련의 펩타이드를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Dennis et al., *J. Biol. Chem.* 277: 35035-35043 (2002)] 참조. 알부민-결합 항체 단편의 예는 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 문헌[Muller and Kontermann, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 9:319-326 (2007); Roovers et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 56:303-317 (2007), 및 Holt et al., *Prot. Eng. Design Sci.*, 21:283-288 (2008)]에 개시되어 있다.

[0084] 특정 양상에서, 본 발명의 제조물 FIX 폴리펩타이드는 이의 알부민에 결합할 수 있는 비-폴리펩타이드 소분자, 변이체 또는 유도체에 대한 적어도 하나의 부착 부위를 포함한다. 이러한 알부민 결합 모이어티의 예는 문헌[Trusselet et al., *Bioconjugate Chem.* 20:2286-2292 (2009)]에 의해 개시되는 바와 같은 2-(3-말레이미도프로판아미도)-6-(4-(4-요오도페닐)부탄아미도)헥사노에이트("Albu" 태그)이다.

[0085] 상기 논의한 바와 같은 예시적인 장시간 작용성 폴리펩타이드는 또한 인간 융모성 고나도트로핀 또는 이의 단편, 변이체 또는 유도체의 β 서브유닛의 적어도 하나의 C-말단 펩타이드(CTP)에 융합된 FIX를 포함한다. CTP

는 FIX의 N-말단 단부에 또는 FIX의 C-말단 단부에 대해 FIX에 융합될 수 있다. 재조합 단백질에 융합되거나 또는 재조합 단백질 내로 삽입된 하나 이상의 CTP 펩타이드는 해당 단백질의 생체내 반감기를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 미국 특허 제5,712,122호 참조. 예시적인 CTP 펩타이드는 DPRFQDSSSKAPPSLPSPSRLPGSDTPIL(서열번호 6) 또는 SSSSKAPPSLPSPSRLPGSDTPILPQ를 포함한다. (서열번호 7). 예를 들어, 참고로 포함된 미국 특허 출원 공개 제2009/0087411 A1호 참조.

[0086] 상기 논의한 바와 같이, 예시적인 장시간 작용성 폴리펩타이드는 또한 적어도 하나의 PAS 서열 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체에 융합된 FIX를 포함한다. PAS 서열은 FIX의 N-말단 단부에 또는 FIX의 C-말단 단부에 융합될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 PAS 펩타이드 또는 PAS 서열은 주로 알라닌 및 세린 잔기를 포함하거나 또는 주로 알라닌, 세린 및 프롤린 잔기를 포함하는 아미노산 서열, 생리적 조건 하에 무작위 나선 입체구조를 형성하는 아미노산 서열을 의미한다. 따라서, PAS 서열은 빌딩 블록, 아미노산 중합체, 또는 키메라 단백질에서 이중성 모이어티의 부분으로서 사용될 수 있는 알라닌, 세린 및 프롤린을 포함하거나, 본질적으로 이루어지거나, 또는 이루어진 서열 카세트이다. 아미노산 중합체는 또한 알라닌, 세린 및 프롤린 이외의 잔기가 PAS 서열에서 소수의 구성요소로서 첨가될 때, 무작위 나선 입체구조를 형성할 수 있다. "소수의 구성요소"는 알라닌, 세린 및 프롤린 이외의 아미노산이 PAS 서열에서 특정 정도로, 예를 들어, 아미노산의 약 12%까지, 즉, 약 PAS 서열의 100개 아미노산 중 12개, 약 10%까지, 약 9%까지, 약 8%, 약 6%, 약 5%, 약 4%, 약 3%까지, 즉, 약 2%, 또는 약 1%가 첨가될 수 있다는 것이 이해된다. 알라닌, 세린 및 프롤린과 상이한 아미노산은 Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr 및 Val로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 생리적 조건 하에서, PAS 펩타이드는 무작위 나선 입체구조를 형성하고, 이에 의해 본 발명의 재조합 단백질에 대해 증가된 생체내 및/또는 시험관내 안정성을 매개할 수 있으며, 전응고 활성을 가진다.

[0087] PAS 펩타이드의 비제한적 예는 ASPAAPAPASPAAPAPSAPA(서열번호 8), AAPASPAPAAPSAPAPAAPS(서열번호 9), APSSPSPASPSSPASPSS(서열번호 10), APSSPSPASPSSPASPSPS(서열번호 11), SSPSAPSPSSPASPSSSPA(서열번호 12), AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA(서열번호 13), ASAAAPAAASAAASAPASAAA(서열번호 14) 또는 이들의 임의의 변이체, 유도체, 단편 또는 조합을 포함한다. PAS 서열의 추가적인 예는, 예를 들어, 미국 특허 공개 제2010/0292130 A1호, 국제특허출원 공개 WO 2008/155134 A1, 및 유럽 특허 EP2173890호로부터 공지되어 있다.

[0088] 상기 논의한 바와 같이, 예시적인 장시간 작용성 폴리펩타이드는 또한 적어도 하나의 트랜스페린 펩타이드 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체에 융합된 FIX를 포함한다. 적어도 하나의 트랜스페린 펩타이드는 FIX의 N-말단 단부에 또는 FIX의 C-말단 단부에 융합되거나 또는 FIX에서 두 아미노산 사이에 삽입될 수 있다. 임의의 트랜스페린은 본 발명의 재조합 FIX 단백질에 융합되거나 삽입될 수 있다. 예로서, 야생형 인간 Tf(Tf)는 유전자 중복으로부터 유래되는 것으로 나타난 2개의 주요 도메인인 N(약 330개의 아미노산) 및 C(약 340개의 아미노산)을 지니는 대략 75KDa(글리코실화를 설명하지 않음) 679개의 아미노산 단백질이다. 본 명세서에 전체가 참고로 포함된 젠뱅크(GenBank) 수탁 번호NM001063, XM002793, M12530, XM039845, XM 039847 및 S95936(www.ncbi.nlm.nih.gov) 참조.

[0089] 트랜스페린은 트랜스페린 수용체(TfR)-매개 내포 작용을 통해 철을 수송한다. 철이 엔도솜 구획 내로 방출되도록 Tf-TfR 복합체가 세포 표면으로 재순환된 후에, Tf는 철 수송의 다음 주기를 위한 세포외 공간으로 다시 방출된다. Tf는 14 내지 17일 이상의 긴 반감기를 가진다(Li et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 23:206-209 (2002)). 트랜스페린 융합 단백질은 반감기 연장, 암 요법을 위한 표적화된 전달, 경구 전달 및 프로인슐린의 지속적 활성화에 대해 연구되었다(Brandsma et al., *Biotechnol. Adv.*, 29: 230-238 (2011); Bai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:7292-7296 (2005); Kim et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 334:682-692 (2010); Wang et al., *J. Controlled Release* 155:386-392 (2011)).

[0090] 상기 논의한 바와 같이, 예시적인 장시간 작용성 폴리펩타이드는 또한 적어도 하나의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 모이어티에 융합된 FIX를 포함한다.

[0091] 페길화된(PEGylated) FIX는 FIX와 적어도 하나의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 분자 사이에 형성된 컨주게이트를 지칭할 수 있다. PEG는 매우 다양한 분자량 및 평균 분자량 범위에서 상업적으로 입수가능하다. PEG 평균 분자량 범위의 전형적인 예는 약 200, 약 300, 약 400, 약 600, 약 1000, 약 1300 내지 1600, 약 1450, 약 2000, 약 3000, 약 3000 내지 3750, 약 3350, 약 3000 내지 7000, 약 3500 내지 4500, 약 5000 내지 7000, 약 7000 내지 9000, 약 8000, 약 10000, 약 8500 내지 1500, 약 16000 내지 24000, 약 35000, 약 40000, 약 60000, 내지 약 80000 달톤을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 이들 평균 분자량은 단지 예로서 제공되며, 임의의 방법으로 제한하는 것을 의미하지 않는다.

- [0092] 본 발명의 제조합 장시간 작용성 FIX 단백질은 모노- 또는 폴리-(예를 들어, 2-4) PEG 모이어티를 포함하도록 폐길화될 수 있다. 폐길화는 당업계에 공지된 임의의 폐길화 반응에 의해 수행될 수 있다. 폐길화된 단백질 생성물을 제조하는 방법은 일반적으로 (i) 본 발명의 펩타이드가 하나 이상의 PEG 기에 부착되는 조건 하에서 폴리펩타이드를 폴리에틸렌 글리콜(예컨대 PEG의 반응성 에스터 또는 알데하이드)과 반응시키는 단계, 및 (ii) 반응 생성물(들)을 얻는 단계를 포함할 것이다. 일반적으로, 반응을 위한 최적의 반응 조건은 공지된 변수 및 목적으로 하는 결과에 기반하여 경우에 따라 결정될 것이다.
- [0093] 당업자에게 이용가능한 다수의 PEG 부착 방법이 있다, 예를 들어 문헌[Malik F *et al.*, *Exp. Hematol.* 20:1028-35 (1992); Francis, *Focus on Growth Factors* 3(2):4-10 (1992)]; 유럽특허 공개 EP0401384호, EP0154316호 및 EP0401384; 및 국제특허출원 공개 WO92/16221 및 WO95/34326. 비제한적 예로서, FIX 변이체는 FIX 내 하나 이상의 삽입 부위에서 시스테인 치환을 함유할 수 있고, 시스테인은 PEG 중합체에 추가로 컨쥬게이션될 수 있다. 본 명세서에 전문이 참고로 포함되는 문헌[Mei *et al.*, *Blood* 116:270-279 (2010)] 및 미국 특허 제7,632,921호.
- [0094] 상기 논의한 바와 같이, 예시적인 장시간 작용성 폴리펩타이드는 또한 적어도 하나의 하이드록시에틸 전분(HES) 중합체에 융합된 FIX를 포함한다. HES는 천연 유래 아밀로펙틴의 유도체이고, 신체 내 알파-아밀라제에 의해 분해된다. HES는 유리한 생물학적 특성을 나타내며, 혈액 용적 대체제로서 그리고 임상에서 혈액회석 요법에서 사용된다. 예를 들어, 문헌[Sommermeyer *et al.*, *Krankenhauspharmazie* 8:271-278 (1987)]; 및 문헌[Weidler *et al.*, *Arzneim.-Forschung/Drug Res.* 41: 494-498 (1991)] 참조.
- [0095] HES는 주로 분자량 분포 및 치환 정도를 특징으로 한다. HES는 1 내지 300kD, 2 내지 200kD, 3 내지 100kD, 또는 4 내지 70kD의 평균 분자량(중량 평균)을 가진다. 하이드록시에틸 전분은 추가로 0.1 내지 3, 0.1 내지 2, 0.1 내지 0.9, 또는 0.1 내지 0.8의 몰 치환도, 및 하이드록시에틸기에 대해 2 내지 20 범위의 C2:C6 치환비를 나타낼 수 있다. 평균 분자량이 약 130kD인 HES는 프레지니우스사(Fresenius)의 볼루벤(Volugen)(등록상표)이다. 볼루벤(등록상표)은, 예를 들어, 혈액감량증의 치료 및 예방을 위한 치료적 적용증에서 사용되는 용적 대체를 위해 사용되는 인공 콜로이드이다. 당업자에게 이용가능한 다수의 HES 부착 방법, 예를 들어, 상기 기재한 것과 동일한 PEG 부착 방법이 있다.
- [0096] IX 인자 응고 활성은 국제 단위(들)(IU)로서 표현한다. IX 인자 활성의 하나의 IU는 정상 인간 혈장의 1밀리리터에서 IX 인자의 양에 가깝게 대응한다. 1 단계 응고 분석(활성화된 부분적 트롬보플라스틴 시간; aPTT), 트롬빈 생성 시간(TGA) 및 회전 트롬보탄성측정(rotational thromboelastometry)(ROTEM(등록상표))을 포함하는 몇몇 분석이 IX 인자 활성을 측정하는데 이용가능하다.
- [0097] **완충제**
- [0098] 본 발명에 유용한 완충제는 다른 산 또는 염기의 첨가 후 선택된 값 근처의 용액의 산도(pH)를 유지하기 위해 사용되는 약산 또는 염기일 수 있다. 적합한 완충제는 제형의 pH 제어를 유지함으로써 약제학적 제형의 안정성을 최대화할 수 있다. 적합한 완충제는 또한 생리적 적합성을 보장하거나 용해도를 최적화할 수 있다. 유동성, 점성 및 다른 특성은 또한 제형의 pH에 의존할 수 있다. 통상적인 완충제는 히스티딘, 시트르산염, 숙신산염, 아세트산염 및 인산염을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 완충제는 L-히스티딘 또는 L-히스티딘과 L-히스티딘 하이드로클로라이드의 혼합물을 등장제와 함께 포함하고, 잠재적으로 당업계에 공지된 산 또는 염기에 의한 pH 조절을 포함한다. 특정 실시형태에서, 완충제는 L-히스티딘이다. 특정 실시형태에서, 제형의 pH는 약 6 내지 약 8, 또는 약 6.5 내지 약 7.5에서 유지된다.
- [0099] **안정제**
- [0100] 안정제는 해당 생성물을 안정화하기 위해 약제학적 생성물에 첨가된다. 이러한 제제는 다수의 상이한 방법으로 단백질을 안정화시킬 수 있다. 통상적인 안정화제는 아미노산 예컨대 글리신, 알라닌, 라이신, 알기닌 또는 트레오닌, 탄수화물, 예컨대 글루코스, 수크로스, 트레할로스, 라피노스 또는 말토스, 임의의 종류 및 분자량의 폴리올, 예컨대 글리세롤, 만니톨, 솔비톨, 사이클로덱스트린 또는 데스트란, 또는 PEG를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 본 발명의 일 양상에서, 안정제는 동결건조 제제에서 FIX 폴리펩타이드의 안정성을 최대화하기 위해 선택된다. 특정 실시형태에서, 안정제는 수크로스이다.
- [0101] **증량제**
- [0102] 증량제는 생성물에 용적 및 질량을 첨가하기 위해 약제학적 생성물에 첨가될 수 있고, 이에 의해 이의 정확한

측정 및 조절을 용이하게 한다. 통상적인 증량제는 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨, 솔비톨, 탄산칼슘 또는 스테아르산마그네슘을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 특정 실시형태에서, 증량제는 만니톨이다.

[0103] 계면활성제

[0104] 계면활성제는 친액성 및 소액성기를 지니는 양친매성 물질이다. 계면활성제는 음이온성, 양이온성, 쌍성이온 또는 비이온성일 수 있다. 비이온성 계면활성제의 예는 알킬 에톡실레이트, 노닐페놀 에톡실레이트, 아민 에톡실레이트, 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리프로필렌 옥사이드, 지방 알코올, 에킨대 세틸 알코올 또는 올레일 알코올, 코카마이드 MEA, 코카마이드 DEA, 폴리솔베이트 또는 도데실 다이메틸아민 옥사이드를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 특정 실시형태에서, 계면활성제는 폴리솔베이트 20 또는 폴리솔베이트 80이다.

[0105] 사전동결건조 제형

[0106] 일 양상에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 사전-동결건조 제형을 제공한다:

[0107] (a) FIX 응고 활성을 갖는 IX 인자 (FIX) 폴리펩타이드;

[0108] (b) 완충제;

[0109] (c) 안정제;

[0110] (d) 증량제; 및

[0111] (e) 계면활성제,

[0112] 여기서, 제형은 약 5ml 미만, 약 4ml 미만, 또는 약 3ml 미만의 충전 용적을 가지며, 각각의 (a) 내지 (e)는, 기준 사전-동결건조 제형에 비해,

[0113] (1) 동결건조될 때 FIX 폴리펩타이드의 안정성을 개선시키거나;

[0114] (2) 동결건조될 때 재구성 시간을 감소시키거나;

[0115] (3) 상기 제형을 포함하는 스톱퍼 상에서의 스플래싱을 감소시키거나;

[0116] (4) 동결건조 순환 시간을 감소시키거나;

[0117] (5) 실온에서 사전-동결건조 제형으로부터 제조된 동결건조물의 보관수명을 증가시키거나; 또는

[0118] (6) 이들의 임의의 조합

[0119] 을 허용하는데 충분한 바이알 당 양(mg/바이알)이며,

[0120] 기준 제형은 사전-동결건조 제형과 동일하지만, 적어도 5ml 충전 용적을 갖는 바이알 당 양으로 (a) 내지 (e)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 기준 제형은 5.3ml 충전 용적 또는 5ml 충전 용적을 가진다.

[0121] 다른 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 (1) 동결건조될 때 FIX 폴리펩타이드의 개선된 안정성; (2) 동결건조될 때 감소된 재구성 시간; (3) 상기 제형을 포함하는 스톱퍼 상에서의 감소된 스플래싱; (4) 감소된 동결건조 순환 시간; 및 (5) 실온에서 사전-동결건조 제형으로부터 제조된 동결건조물의 증가된 보관수명으로부터 선택된 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4 또는 적어도 5가지 특성을 허용한다. 특정 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 (1) 동결건조될 때 FIX 폴리펩타이드의 안정성을 개선시킨다. 특정 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 (2) 동결건조될 때 재구성 시간을 감소시킨다. 특정 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 (3) 상기 제형을 포함하는 스톱퍼 상에서의 스플래싱을 감소시킨다. 특정 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 (4) 동결건조 순환 시간을 감소시킨다. 특정 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 (5) 실온에서 사전-동결건조 제형으로부터 제조된 동결건조물의 보관수명을 증가시킨다. 특정 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 (6) 본 명세서에 기재된 특성의 임의의 조합을 허용한다.

[0122] 특정 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 FIX 폴리펩타이드의 적어도 약 100IU/바이알을 포함한다. 특정 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 FIX 폴리펩타이드의 적어도 약 200IU/바이알 내지 약 10,000IU/바이알, 약 200IU/바이알 내지 약 6,000IU/바이알, 또는 약 500IU/바이알 내지 약 5,000IU/바이알을 포함한다. 특정 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 FIX 폴리펩타이드의 약 220IU/바이알, 약 250IU/바이알, 약 300IU/바이알, 약 400IU/바이알, 약 500IU/바이알, 약 600IU/바이알, 약 700IU/바이알, 약 800IU/바이알, 약 900IU/바이알, 약 1,000IU/바이알, 약 1,100IU/바이알, 약 1,200IU/바이알, 약 1,300IU/바이알, 약 1,400IU/바이알, 약 1,500IU/

바이알, 약 2,000IU/바이알, 약 2,500IU/바이알, 약 3,000IU/바이알, 약 4,000IU/바이알, 약 5,000IU/바이알, 약 5,500IU/바이알, 약 6,000IU/바이알, 약 6,500IU/바이알, 약 7,000IU/바이알, 약 7,500IU/바이알, 약 8,000IU/바이알, 약 8,500IU/바이알, 약 9,000IU/바이알, 약 9,500IU/바이알 또는 약 10,000IU/바이알을 포함한다.

- [0123] 일부 실시형태에서, 더 고농도의 사전-동결건조 제형은 충전 용적을 감소시킴으로써 달성된다. 특정 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 약 4.0ml, 약 3.5ml, 약 3.0ml, 약 2.9ml, 약 2.8ml, 약 2.7ml, 약 2.65ml, 약 2.6ml, 약 2.5ml, 약 2.4ml, 약 2.3ml, 약 2.2ml, 약 2.1ml, 또는 약 2.0ml의 충전 용적을 가진다. 일부 실시형태에서, 사전-동결건조 제형의 충전 용적은 약 2.65ml이다. 일부 실시형태에서, 사전-동결건조 제형의 충전 용적은 약 5ml 미만이다.
- [0124] 일부 실시형태에서, FIX 폴리펩타이드는 추가적인 정제 단계, 예를 들어, 제2 초미세여과 단계에 의해 추가로 농축될 수 있다.
- [0125] 특정 실시형태에서, 감소된 재구성 시간은 1.5분 미만, 1분 미만, 50초 미만, 40초 미만, 30초 미만, 20초 미만 또는 10초 미만이다. 구체적 실시형태에서, 감소된 재구성 시간은 30초 미만이다.
- [0126] 특정 실시형태에서, 사전-동결건조 제형의 감소된 동결건조 순환 시간은 약 4일 이하, 약 3일 이하, 약 2일 이하, 또는 약 1일 이하이다.
- [0127] 특정 실시형태에서, 사전-동결건조 제형 중의 완충제의 농도는 약 3mg/ml 내지 약 15mg/ml, 4mg/ml 내지 약 12mg/ml, 약 5mg/ml 내지 약 10mg/ml, 또는 약 5.82mg/ml 내지 약 9.7mg/ml이다. 일 실시형태에서, 완충제는 약 3.88mg/ml 내지 약 9.7mg/ml의 농도이다. 일 실시형태에서, 완충제는 약 7.76mg/ml의 농도이다. 일부 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 약 7.76mg/ml의 농도로 L-히스티딘을 함유한다.
- [0128] 특정 실시형태에서, 사전-동결건조 제형 중의 안정제의 농도는 10mg/ml 내지 약 50mg/ml, 약 13mg/ml 내지 약 40mg/ml, 약 15mg/ml 내지 약 35mg/ml, 또는 약 17.85mg/ml 내지 약 29.95mg/ml이다. 일 실시형태에서, 완충제는 약 23.8mg/ml의 농도이다. 일부 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 23.8mg/ml의 농도로 수크로스를 함유한다.
- [0129] 특정 실시형태에서, 사전-동결건조 제형 중의 증량제의 농도는 약 20mg/ml 내지 약 100mg/ml, 약 30mg/ml 내지 약 70mg/ml, 약 30mg/ml 내지 약 60mg/ml, 또는 약 35.7mg/ml 내지 약 59.5mg/ml이다. 일 실시형태에서, 증량제는 약 47.6mg/ml의 농도이다. 일부 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 약 47.6mg/ml의 농도로 만니톨을 함유한다.
- [0130] 특정 실시형태에서, 사전-동결건조 제형 중의 계면활성제의 농도는 약 0.01mg/ml 내지 약 5mg/ml, 약 0.1mg/ml 내지 약 4mg/ml, 약 0.1mg/ml 내지 약 3mg/ml, 약 0.01mg/ml 내지 약 2mg/ml, 또는 약 0.05mg/ml 내지 약 1mg/ml이다. 일 실시형태에서, 계면활성제는 약 0.2mg/ml의 농도이다. 일부 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 약 0.2mg/ml의 농도로 폴리솔베이트 20 또는 폴리솔베이트 80을 함유한다.
- [0131] 특정 실시형태에서, 사전-동결건조 제형 중의 FIX 폴리펩타이드 농도는 약 80IU/ml 내지 약 2,750IU/ml이다. 일부 실시형태에서, 사전-동결건조 제형 중의 FIX 폴리펩타이드의 농도는 적어도 약 100IU/ml, 적어도 약 200IU/ml, 적어도 약 300IU/ml, 적어도 약 400IU/ml, 적어도 약 500IU/ml, 적어도 약 600IU/ml, 적어도 약 700IU/ml, 적어도 약 800IU/ml, 적어도 약 900IU/ml, 적어도 약 1000IU/ml, 적어도 약 1500IU/ml, 적어도 약 2000IU/ml, 또는 적어도 약 2500IU/ml이다.
- [0132] 일 양상에서, 본 개시내용은 추가로 하기를 포함하는 사전-동결건조 제형을 제공한다:
- [0133] (a) 약 80 내지 약 2,750IU/ml의 rFIXFc;
- [0134] (b) 약 7.76mg/ml의 L-히스티딘.
- [0135] (c) 약 47.6mg/ml의 만니톨;
- [0136] (d) 약 23.8mg/ml의 수크로스; 및
- [0137] (e) 약 0.2mg/ml의 폴리솔베이트-20.
- [0138] 특정 실시형태에서, 이러한 사전-동결건조 제형의 충전 용적은 약 3ml, 약 2.9ml, 약 2.8ml, 약 2.7ml, 약 2.65ml, 약 2.6ml, 약 2.5ml, 약 2.4ml, 약 2.3ml, 약 2.2ml, 약 2.1ml, 또는 약 2.0ml이다. 일 실시형태에서, 이

러한 사전-동결건조 제형의 충전 용적은 약 2.65ml이다.

[0139] 추가로, 본 개시내용은 임의의 상기 사전-동결건조 제형으로부터 동결건조된 동결건조 분말을 제공한다. 일부 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 본 명세서에 기재된 임의의 제형이다.

[0140] **동결건조 분말**

[0141] 본 개시내용은 또한 FIX 폴리펩타이드, 완충제, 안정제, 증량제, 계면활성제, 또는 이들의 임의의 조합물을 포함하는 동결건조 분말을 제공한다.

[0142] 특정 실시형태에서, 동결건조 분말은 완충제(예를 들어, L-히스티딘)의 바이알 당 약 8mg 내지 약 39mg, 바이알 당 약 9mg 내지 약 35mg, 바이알 당 약 10mg 내지 약 30mg, 바이알 당 약 12mg 내지 약 25mg, 바이알 당 약 15mg 내지 약 23mg을 포함한다. 일 실시형태에서, 동결건조 분말은 완충제의 바이알 당 약 25mg, 바이알 당 약 24mg, 바이알 당 약 23mg, 바이알 당 약 22mg, 바이알 당 약 21mg, 바이알 당 약 20mg, 바이알 당 약 19mg, 바이알 당 약 18mg, 바이알 당 약 17mg, 바이알 당 약 16mg, 바이알 당 약 15mg을 포함한다. 다른 실시형태에서, 동결건조 분말은 완충제의 바이알 당 약 20.6mg을 포함한다. 일부 실시형태에서, 완충제는 L-히스티딘이다.

[0143] 특정 실시형태에서, 동결건조 분말은 안정제의 바이알 당 약 27mg 내지 약 132mg, 바이알 당 약 30mg 내지 약 120mg, 바이알 당 약 40mg 내지 약 110mg, 바이알 당 약 50mg 내지 약 100mg, 바이알 당 약 60mg 내지 약 90mg을 포함한다. 일 실시형태에서, 동결건조 분말은 안정제의 바이알 당 약 68mg, 바이알 당 약 67mg, 바이알 당 약 66mg, 바이알 당 약 65mg, 바이알 당 약 64mg, 바이알 당 약 63mg, 바이알 당 약 62mg, 바이알 당 약 61mg, 바이알 당 약 60mg, 바이알 당 약 59mg을 포함한다. 다른 실시형태에서, 동결건조 분말은 안정제의 바이알 당 약 63.1mg을 포함한다. 일부 실시형태에서, 안정제는 수크로스이다.

[0144] 특정 실시형태에서, 동결건조 분말은 증량제의 바이알 당 약 50mg 내지 약 265mg, 바이알 당 약 53mg 내지 약 265mg, 바이알 당 약 50mg 내지 약 250mg, 바이알 당 약 53mg 내지 약 265mg, 바이알 당 약 80mg 내지 약 200mg, 바이알 당 약 100mg 내지 약 150 또는 바이알 당 약 110mg 내지 약 140mg을 포함한다. 일 실시형태에서, 동결건조 분말은 증량제의 약 131mg, 바이알 당 약 130mg, 바이알 당 약 129mg, 바이알 당 약 128mg, 바이알 당 약 127mg, 바이알 당 약 126mg, 바이알 당 약 125mg, 바이알 당 약 124mg, 바이알 당 약 123mg, 또는 바이알 당 약 122mg을 포함한다. 다른 실시형태에서, 동결건조 분말은 증량제의 바이알 당 약 126.1mg을 포함한다. 일부 실시형태에서, 증량제는 만니톨이다.

[0145] 특정 실시형태에서, 동결건조 분말은 계면활성제의 바이알 당 약 0.03mg 내지 약 13mg, 바이알 당 약 0.05mg 내지 약 10mg, 바이알 당 약 0.07mg 내지 약 8mg, 바이알 당 약 0.1mg 내지 약 2mg을 포함한다. 일 실시형태에서, 동결건조 분말은 계면활성제의 바이알 당 약 1mg, 바이알 당 약 0.9mg, 바이알 당 약 0.8mg, 바이알 당 약 0.7mg, 바이알 당 약 0.6mg, 바이알 당 약 0.5mg, 바이알 당 약 0.4mg, 바이알 당 약 0.3mg, 바이알 당 약 0.2mg, 또는 바이알 당 약 0.1mg을 포함한다. 다른 실시형태에서, 동결건조 분말은 계면활성제의 바이알 당 약 0.5mg을 포함한다. 일 실시형태에서, 동결건조 분말은 계면활성제의 바이알 당 약 0.53mg을 포함한다. 일부 실시형태에서, 계면활성제는 폴리솔베이트 20 또는 폴리솔베이트 80이다.

[0146] 특정 실시형태에서, 동결건조 분말은 하기를 포함한다:

[0147] (a) 바이알 당 약 2mg 내지 바이알 당 약 150mg의 양으로 FIX 폴리펩타이드;

[0148] (b) 바이알 당 약 10mg 내지 바이알 당 약 30mg의 양으로 완충제;

[0149] (c) 바이알 당 약 70mg 내지 바이알 당 약 200mg의 양으로 증량제.

[0150] (d) 바이알 당 약 30mg 내지 바이알 당 약 100mg의 양으로 안정제; 및

[0151] (e) 바이알 당 약 0.05mg 내지 바이알 당 약 5mg의 양으로 계면활성제.

[0152] 일부 실시형태에서, 동결건조 분말은 하기를 포함한다:

[0153] (a) 바이알 당 약 2.2mg 내지 바이알 당 약 125mg의 양으로 FIX 폴리펩타이드;

[0154] (b) 바이알 당 약 8mg 내지 바이알 당 약 39mg의 양으로 완충제;

[0155] (c) 바이알 당 약 53mg 내지 바이알 당 약 265mg의 양으로 증량제.

[0156] (d) 바이알 당 약 27mg 내지 바이알 당 약 132mg의 양으로 안정제; 및

- [0157] (e) 바이알 당 약 0.03mg 내지 바이알 당 약 13mg의 양으로 계면활성제.
- [0158] 특정 실시형태에서, 동결건조 분말은 하기를 포함한다:
- [0159] (a) 바이알 당 약 2.2mg 내지 바이알 당 약 125mg의 양으로 동결건조된 FIX 폴리펩타이드;
- [0160] (b) 바이알 당 약 12.5mg 내지 바이알 당 약 25mg의 양으로 완충제;
- [0161] (c) 바이알 당 약 32.5mg 내지 바이알 당 약 80mg의 양으로 안정제;
- [0162] (d) 바이알 당 약 75mg 내지 바이알 당 약 150mg의 양으로 증량제; 및
- [0163] (e) 바이알 당 약 0.1mg/ml 내지 바이알 당 약 2mg/ml의 양으로 계면활성제.
- [0164] 일 실시형태에서, 동결건조 분말은 하기를 포함한다:
- [0165] (a) 약 2.2 내지 약 125mg/바이알의 FIX 폴리펩타이드;
- [0166] (b) 약 20.6mg/바이알의 L-히스티딘;
- [0167] (c) 약 126.1mg/바이알의 만니톨;
- [0168] (d) 약 63.1mg/바이알의 수크로스; 및
- [0169] (e) 약 0.53mg/바이알의 폴리솔베이트 20.
- [0170] 재구성된 제형
- [0171] 더 나아가, 본 개시내용은 재구성 완충제에 의해 재구성된 임의의 상기 동결건조 분말을 포함하는 재구성된 제형을 제공한다.
- [0172] 특정 실시형태에서, 재구성 완충제는 NaCl 용액이다. 일부 실시형태에서, 재구성 완충제는 5ml이다.
- [0173] 특정 실시형태에서, 재구성된 제형은 하기를 포함한다:
- [0174] (a) 약 0.9mg/ml 내지 약 50mg/ml의 농도로 FIX 폴리펩타이드;
- [0175] (b) 2mg/ml 내지 약 5mg/ml의 농도로 완충제;
- [0176] (c) 20mg/ml 내지 약 30mg/ml의 농도로 증량제;
- [0177] (d) 바이알 당 8mg/ml 내지 15mg/ml의 농도로 안정제; 및
- [0178] (e) 0.05mg/ml 내지 약 0.4mg/ml의 농도로 계면활성제.
- [0179] 특정 실시형태에서, 재구성된 제형은 하기를 포함한다:
- [0180] (a) 약 0.9mg/ml 내지 약 50mg/ml의 농도로 FIX 폴리펩타이드;
- [0181] (b) 약 3.88mg/ml의 농도로 완충제;
- [0182] (c) 약 23.8mg/ml의 농도로 증량제;
- [0183] (c) 약 11.9mg/ml의 농도로 안정제;
- [0184] (e) 약 0.1mg/ml의 농도로 계면활성제; 및
- [0185] (f) 약 3.25mg/ml NaCl을 포함하는 재구성 완충제.
- [0186] 특정 실시형태에서, 재구성된 제형은 하기를 포함한다:
- [0187] (a) 약 80IU/ml 내지 약 2,750IU/ml의 농도로 FIX 폴리펩타이드;
- [0188] (b) 약 25 mM의 농도로 완충제;
- [0189] (c) 약 131 mM의 농도로 증량제;
- [0190] (d) 약 35 mM의 농도로 안정제;
- [0191] (e) 약 0.01%(w/v)의 농도로 계면활성제; 및

- [0192] (f) 재구성 완충제.
- [0193] 제형 조성물의 예는 표 2 내지 4에서 추가로 제공된다.
- [0194] 일 양상에서, 본 개시내용은 추가로 본 명세서에 기재된 사전-동결건조 제형, 동결건조 분말, 또는 재구성된 제형을 포함하는 바이알을 제공한다.
- [0195] 다른 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 동결건조 분말을 포함하는 제1 용기 및 제1 용기의 동결건조 분말과 조합될 때 재구성된 제형을 생성하기에 충분한 용적으로 재구성 완충제를 포함하는 제2 용기를 포함하는 키트를 제공한다. 특정 실시형태에서, 키트의 재구성 완충제의 용적은 약 5ml이다. 일부 실시형태에서, 용적은 약 5.3ml이다. 특정 실시형태에서, 키트의 재구성 완충제는 NaCl을 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 B형 혈우병을 치료하기 위해 사용된다.
- [0196] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 환자에게 본 명세서에 기재된 재구성된 제형을 투여하는 단계를 포함하는, 투여가 필요한 B형 혈우병 환자에게 FIX 폴리펩타이드를 포함하는 방법을 제공하되, 투여는 환자에서 출혈 에피소드의 빈도 또는 중증도를 예방 또는 감소시킨다.
- [0197] 본 개시내용은 추가로 본 명세서에 기재된 재구성된 제형을 투여함으로써 예방, 치료, 개선 또는 관리가 필요한 환자에서 B형 혈우병을 예방, 치료, 개선 또는 관리하는 방법을 제공한다.
- [0198] FIX 폴리펩타이드를 포함하는 동결건조 분말을 생성하는 방법
- [0199] 본 개시내용은 FIX 폴리펩타이드를 포함하는 동결건조 분말을 생성하는 방법을 제공한다. 일 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 사전-동결건조 제형을 동결건조시키는 단계를 포함하는 동결건조 방법을 제공한다. 다른 양상에서, 본 개시내용은 단일 건조 단계를 포함하는 동결건조 방법을 제공한다.
- [0200] 일 양상에서, 본 개시내용은 하기 단계들:
- [0201] (a) FIX 폴리펩타이드 및 수성 용매를 포함하는 사전 동결건조제형을 냉동시키는 것을 포함하는 "냉동 단계";
- [0202] (b) 냉동된 사전-동결건조 제형으로부터 수성 용매를 제거하는데 효과적인 양에 의해 상기 냉동된 사전-동결건조 제형의 압력을 감소시키는 것을 포함하는 "진공 단계"; 및
- [0203] (c) 냉동된 사전-동결건조 제형의 온도를 붕괴 온도 초과로 증가시키는 것을 포함하는 단일 "건조 단계"를 포함함으로써
- [0204] 동결건조 분말을 생성하는, FIX 폴리펩타이드의 동결건조 방법을 제공한다. 다른 양상에서, 동결건조 처리 시간은 기준 방법, 예를 들어, 2회 이상의 건조 단계를 갖는 동결건조 과정에 비해 감소된다.
- [0205] 다른 양상에서, 본 발명에 의해 생성된 동결건조 분말은 다음 중 하나 이상의 특징을 가진다: (1) FIX 폴리펩타이드의 개선된 안정성; (2) 감소된 재구성 시간; (3) 상기 제형을 포함하는 스톱퍼 상에서의 감소된 스플래시; 또는 (4) 실온에서 동결건조 분말의 증가된 보관수명.
- [0206] 특정 실시형태에서, 붕괴 온도는 -1.5°C 이다.
- [0207] 특정 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 냉동 단계 동안 약 -65°C 내지 약 -40°C , 약 -65°C 내지 약 -45°C , 약 -65°C 내지 약 -55°C , 약 -60°C 내지 약 -40°C , 약 -60°C 내지 약 -50°C 또는 약 -60°C 내지 약 -55°C 의 냉동 온도로 냉동된다. 특정 실시형태에서, 사전-동결건조 제형은 냉동 단계 동안 약 -55°C 의 냉동 온도로 냉동된다. 특정 실시형태에서, 냉동 온도는 냉동 단계 동안 약 5°C 로부터 약 -55°C 로 하강된다.
- [0208] 특정 실시형태에서, 냉동 온도는 냉동 단계 동안 약 30분 내지 약 5시간, 약 1시간 내지 약 5시간, 약 1.5시간 내지 약 5시간, 약 1.5시간 내지 약 4시간, 약 1.5시간 내지 약 3시간, 또는 약 1.5시간 내지 약 2.5시간에 유지된다. 특정 실시형태에서, 냉동 온도는 냉동 단계 동안 약 2시간 동안 유지된다.
- [0209] 특정 실시형태에서, 단계 (a)의 냉동된 사전-동결건조 제형은 추가로 "진공 단계" (b) 전에 "어닐링 단계" (a')가 실시된다. 특정 실시형태에서, 단계 (a)의 냉동된 사전-동결건조 제형의 온도는 어닐링 단계 동안 약 -15°C 내지 약 -2°C 의 어닐링 온도까지 상승된다. 특정 실시형태에서, 단계 (a)의 냉동된 사전-동결건조 제형의 온도는 어닐링 단계 동안 약 -6°C 의 어닐링 온도로 상승된다.
- [0210] 특정 실시형태에서, 어닐링 온도는 어닐링 단계 동안 약 2시간 내지 약 4 시간 동안 유지된다. 특정 실시형태에

서, 어닐링 온도는 어닐링 단계 동안 약 30분 내지 약 5시간, 약 1시간 내지 약 5시간, 약 2시간 내지 약 5시간, 약 2시간 내지 약 4시간 또는 약 2.5시간 내지 약 3.5시간 동안 유지된다. 특정 실시형태에서, 어닐링 온도는 어닐링 단계 동안 약 3시간 동안 유지된다.

- [0211] 특정 실시형태에서, 냉동된 사전-동결건조 제형의 온도는 어닐링 단계 동안 어닐링 온도로부터 약 -65°C 내지 약 -40°C 의 온도로 하강된다. 특정 실시형태에서, 냉동된 사전-동결건조 제형의 온도는 어닐링 단계 동안 어닐링 온도로부터 -55°C 의 온도로 하강된다.
- [0212] 특정 실시형태에서, "진공 단계"는 냉동된 사전-동결건조 제형에 약 0.05 내지 약 1mbar, 약 0.05 내지 약 0.50mbar, 약 0.10 내지 약 0.50mbar, 약 0.15 내지 약 0.50mbar, 약 0.20 내지 약 0.50mbar, 또는 약 0.25 내지 약 0.50mbar의 진공을 실시하는 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, "진공 단계"에서 진공은 약 0.33mbar이다.
- [0213] 특정 실시형태에서, 진공은 약 5시간, 약 4시간, 약 3시간, 약 2시간, 또는 약 1시간 동안 "진공 단계"에서 유지된다. 일부 실시형태에서, 진공은 약 2시간 동안 "진공 단계"에서 유지된다.
- [0214] 특정 실시형태에서, "건조 단계"는 약 -55°C 에서부터 약 40°C 의 건조 온도로 냉동된 사전-동결건조 제형의 온도를 상승시키는 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 건조 단계는 적어도 약 30°C , 적어도 약 32°C , 적어도 약 34°C , 적어도 약 35°C , 적어도 약 36°C , 적어도 약 38°C , 적어도 약 39°C , 적어도 약 40°C 이다. 다른 실시형태에서, 건조 단계는 약 35°C , 약 40°C , 약 32°C 또는 약 45°C 이다.
- [0215] 특정 실시형태에서, 건조 단계는 추가로 약 10시간 내지 약 40시간, 약 10시간 내지 약 30시간, 또는 약 20시간 내지 약 30시간 동안 건조 단계를 유지하는 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 건조 단계는 약 25시간 동안 유지된다.
- [0216] 특정 실시형태에서, 건조 단계는 약 0.05mbar 내지 약 1mbar, 약 0.05 내지 약 0.50mbar, 약 0.10 내지 약 0.50mbar, 약 0.15 내지 약 0.50mbar, 약 0.20 내지 약 0.50mbar, 또는 약 0.20mbar 내지 약 0.45mbar의 압력에서 수행된다. 특정 실시형태에서, 압력은 건조 단계 동안 약 0.33mbar에서 유지된다. mbar 단위는 Torr 또는 임의의 다른 단위로 전환될 수 있다. 예를 들어, 1mbar는 0.75006375541921 Torr로 전환될 수 있다.
- [0217] 일 양상에서, 본 개시내용은 하기 단계들:
- [0218] (a) 약 2시간 동안 온도를 약 -55°C 의 냉동 온도로 하강시킴으로써, 그리고 상기 냉동 온도를 약 2시간 동안 유지함으로써 FIX 폴리펩타이드를 포함하는 사전-동결건조 제형을 냉동시키는 것을 포함하는 "냉동 단계";
- [0219] (a') 단계 (a)의 냉동된 사전-동결건조 제형의 온도를 약 -6°C 의 어닐링 온도로 약 1.5시간 동안 상승시키고, 약 3시간 동안 어닐링 온도를 유지하고 나서, 약 1.5시간 동안 온도를 약 -55°C 로 하강시키는 것을 포함하는 "어닐링 단계";
- [0220] (b) 대기압에서 2시간 동안 약 -55°C 에서 단계 (a')의 냉동된 사전-동결건조 제형을 유지하고, 약 2시간 동안 압력을 약 0.33mbar로 하강시키는 것을 포함하는 "진공 단계"; 및
- [0221] (c) 단계 (b)의 냉동된 사전-동결건조 제형의 온도를 약 40°C 로 3시간 동안까지 상승시키는 한편, 약 0.33mbar의 압력을 유지하고, 또는 약 25시간 동안 약 40°C 에서 냉동된 사전-동결건조 제형의 온도를 유지하는 한편, 약 0.33mbar의 압력을 유지하는 것을 포함하는 단일 "건조 단계"를 포함함으로써,
- [0222] 동결건조 분말을 생성하는, FIX 폴리펩타이드를 포함하는 동결건조 분말을 생성하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 동결건조 방법은 더 적은 순환 시간을 취한다.
- [0223] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법에 의해 생성된 동결건조 분말은 다음의 특징을 가진다:
- [0224] (1) FIX 폴리펩타이드의 개선된 안정성;
- [0225] (2) 감소된 재구성 시간;
- [0226] (3) 상기 제형을 포함하는 스톱퍼 상에서의 감소된 스프래싱;
- [0227] (4) 실온에서 동결건조 분말의 증가된 보관 수명; 또는
- [0228] (5) 이들의 임의의 조합
- [0229] 일부 실시형태에서, 동결건조 주기 기간은 약 4.5일, 약 4일, 약 3.5일, 약 3일, 약 2.5일, 또는 약 2일 미만일

수 있다. 다른 실시형태에서, 동결건조 주기 기간은 약 3일 이하이다. 특정 실시형태에서, 동결건조 방법에서 사용되는 사전-동결건조 제형의 충전 용적은 약 5ml 미만이다. 특정 실시형태에서, 충전 용적은 약 4ml, 약 3.5 ml, 약 3.0ml, 약 2.9ml, 약 2.8ml, 약 2.7ml, 약 2.65ml, 약 2.6ml, 약 2.5ml, 약 2.4ml, 약 2.3ml, 약 2.2ml, 약 2.1ml, 또는 약 2.0ml이다. 일 실시형태에서, 충전 용적은 약 2.65ml이다.

[0230] 특정 실시형태에서, 동결건조 방법에 의해 생성되는 동결건조 분말의 감소된 재구성 시간은 약 1.5분 미만, 약 1분 미만, 약 50초 미만, 약 40초 미만, 약 30초 미만, 약 20초 미만 또는 약 10초 미만이다. 특정 실시형태에서, 동결건조 방법에 의해 생성된 동결건조 분말의 감소된 재구성 시간은 약 30초 미만이다.

[0231] 특정 실시형태에서, 동결건조 방법에서 사용되는 사전-동결건조 제형의 감소된 동결건조 순환 시간은 약 4일 이하, 약 3일 이하, 약 2일 이하, 또는 약 1일 이하이다.

[0232] 일부 실시형태에서, 동결건조 분말은 약 90시간 이하, 약 80시간 이하, 약 70시간 이하, 약 60시간 이하, 약 50시간 이하, 약 45시간 이하, 약 40시간 이하, 또는 약 30시간 이하로 사전-동결건조 제형으로부터 생성된다. 특정 실시형태에서, 동결건조 분말은 약 45시간 이하에 사전-동결건조 제형으로부터 생성된다.

[0233] 특정 실시형태에서, 동결건조 분말에서 잔여 수분은 약 1.0%, 약 0.7%, 약 0.6%, 약 0.5%, 약 0.4% 또는 약 0.3% 미만이다. 일부 실시형태에서, 동결건조 분말 중의 잔여 수분은 약 0.5% 미만이다.

[0234] 일 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 방법에 따라 사전-동결건조 제형을 동결건조시키는 단계를 포함하는, FIX 폴리펩타이드를 포함하는 동결건조 분말을 안정화시키는 방법을 제공하되, 동결건조 분말은 1회 이상의 건조 단계를 포함하는 동결건조 방법을 이용함으로써 동결건조 분말에 비해 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 측정되는 바와 같이 안정화된다.

[0235] 다른 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 방법에 따라 사전-동결건조 제형을 동결건조시키는 단계를 포함하는, FIX 폴리펩타이드를 포함하는 동결건조 분말의 보관수명을 증가시키는 방법을 제공하되, 동결건조 분말의 보관수명은 1회 이상의 건조 단계를 포함하는 동결건조 방법을 이용함으로써 제조된 동결건조 분말의 보관수명에 비해 SEC 및/또는 FIX 응고 활성 분석에 의해 측정되는 바와 같이 증가된다.

[0236] 본 개시내용은 또한 본 명세서에 기재된 방법에 따른 사전-동결건조 제형을 동결건조시키는 단계를 포함하는 FIX 폴리펩타이드를 포함하는 동결건조 분말의 재구성 시간을 감소시키는 방법을 제공하되, 동결건조 분말의 재구성 시간은 1회 이상의 건조 단계를 포함하는 동결건조 방법을 이용함으로써 제조된 동결건조 분말의 재구성 시간에 비해 감소된다.

[0237] 본 개시내용은 추가로 본 명세서에 기재된 방법에 따라 사전-동결건조 제형을 동결건조시키는 단계를 포함하는, FIX 폴리펩타이드를 포함하는 동결건조 분말을 생성하는 동결건조 처리 시간을 감소시키는 방법을 제공하되, 사전-동결건조 제형의 동결건조 과정은 1회 이상의 건조 단계를 포함하는 동결건조 방법을 이용하여 동결건조 분말을 생성하는 것의 동결건조 과정 시간에 비해 감소된다.

[0238] 이제 본 발명을 상세하게 기재하면, 단지 예시의 목적을 위해 본 명세서에 포함되고 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는 다음의 실시예를 참고로 하여 더 명확하게 이해될 것이다. 본 명세서에서 언급되는 모든 특허 및 간행물은 명확하게 참고로 포함된다.

[0239] 실시예

[0240] 실시예 1: IX 인자-Fc 약물 물질 및 약물 생성물 조성물

[0241] rFIXFc 설명

[0242] rFIXFc는 인간 면역글로불린 G1(IgG1)의 Fc 도메인에 공유결합된 인간 응고 IX 인자(FIX)로 이루어진 장시간 작용성, 완전 재조합 융합 단백질이다. rFIXFc의 IX 인자 부분은 혈장 유래 IX 인자의 Thr¹⁴⁸ 대립형질 형태와 동일한 1차 아미노산 서열을 가지며, 내인성 IX 인자와 유사한 구조적 및 기능성 특징을 가진다. rFIXFc의 Fc 도메인은 IgG1의 힌지, CH2 및 CH3 영역을 함유한다. rFIXFc는 대략 98 킬로달톤의 분자량을 지니는 869개의 아미노산을 함유한다.

[0243] rFIXFc를 인간 배아 신장(HEK) 세포주에서 재조합 DNA 기법에 의해 생성하고, 이어서 정제한다.

[0244] rFIXFc를 포함하는 본 발명의 rFIXFc 약물 생성물 제형은 고농도 약물 생성물, 예를 들어, 4000+IU/바이알 약물 생성물 강도를 개발하게 한다. 이는 이하의 표 1과 비교하여 나타내는 바와 같이 약물 물질 중의 더 고농도의

rFIXFc 단백질을 필요로 한다. 본 발명의 rFIXFc 약물 생성물 제형은 실온 안정성을 증가시키도록 250 및 500IU/바이알 약물 생성물 강도의 보관 수명을 증가시킬 수 있다. 연구 데이터는 250 및 500IU/바이알 약물 생성물 강도가 기준 약물 생성물보다 가속되된 조건 하에서 상당히 더 안정하다는 것을 시사한다.

[0245] 본 발명의 rFIXFc 약물 생성물 제형은 또한 동결건조될 때 체류 시간을 감소시킬 수 있다. 기준 약물 생성물 재구성 시간은 1 내지 2분으로 변한다. 연구 데이터는 LCM 약물 생성물이 재구성 시간을 30초 미만으로 감소시킨다는 것을 시사한다.

[0246] 본 발명의 rFIXFc 약물 생성물 제형은 또한 동결건조 처리 시간을 감소시킬 수 있다. 현재 동결건조 주기는 대략 4.5일이다. 더 낮은 바이알 용적에 의해, 이는 더 경제적인 제조를 위해 대략 3일 이하로 감소될 가능성이 있을 수 있다.

[0247] 약물 물질(Drug Substance: DS)

[0248] 본 발명의 rFIXFc 제형에 대한 약물 물질은 기준 약물 물질과 동일한 제형 부형제를 사용할 것이다. 더 고농도는 약물 물질 제조 동안 제2 초미세여과 단계를 이용하여 달성될 것이다. 표 1 참조.

표 1

약물 물질 조성		
약물 물질 조성		
성분	기준 약물 생성물	약물 생성물
rIX인자-Fc	10-13 mg/mL	65-75 mg/mL
L-히스티딘	3.88 mg/mL (25 mM)	3.88 mg/mL (25 mM)
폴리솔베이트 20	0.1 mg/mL (0.01 %)	0.1 mg/mL (0.1 %)

[0249]

[0250] 약물 생성물(DP)

[0251] 상기 언급한 목적을 달성하기 위해, 기준 약물 생성물(단백질 및 부형제)의 농도가 2배가 되는 한편, 동결건조 전에 바이알의 충전 용적을 감소시키는 약물 생성물을 설계하였다. 이는 환자에 대한 모든 성분의 용량이 일정하게 남아있는 한편, 상기 언급한 약물 생성물 성능 변수가 개선된다는 것을 보장한다.

[0252] 이하의 표 2 내지 4는 동결건조 공급원료의 조성, 동결건조 후 바이알 내 고체 생성물의 함량 및 재구성 후 조성을 상술한다. rFIXFc 단백질 농도의 넓은 변화를 주목하는 것이 중요하다. IX 인자의 각각의 배치는 그의 활성(IU/mg)이 약간 상이하다는 사실에 기인하여, 공급원료는 분석 활성을 이용하여 조제된다. 이는 다양한 단백질 농도를 초래하고, 상이한 강도의 약물 생성물에 첨가된 이 변화는 이하에 언급되는 범위를 제공한다.

표 2

약물 생성물- 사전 동결건조 제형 조성

약물 생성물 동결건조 공급원료 조성

성분	기준 약물 생성물	기준 약물 생성물	약물 생성물 250-5500 IU/바이알
rIX인자-Fc	250-2000 IU/바이알 0.45-9.5 mg/mL 40-500 IU/mL	3000 IU/바이알 5.5-13.7 mg/mL 480-750 IU/mL	0.9-50 mg/mL 80-2750 IU/mL
L-히스티딘	3.88 mg/mL (25 mM)	3.88 mg/mL (25 mM)	7.76 mg/mL (50 mM)
만니톨	23.8 mg/mL (131 mM)	23.8 mg/mL (131 mM)	47.6 mg/mL (261 mM)
수크로스	11.9 mg/mL (35 mM)	11.9 mg/mL (35 mM)	23.8 mg/mL (70 mM)
폴리솔베이트 20	0.1 mg/mL (0.01 %)	0.1 mg/mL (0.01 %)	0.2 mg/mL (0.2 %)
공급원료 충전 용적	5.3 mL	7.4 mL	2.65 mL

[0253]

표 3

약물 생성물- 동결건조물 조성

약물 생성물 동결건조된 바이알 고체 조성

성분	기준 약물 생성물	기준 약물 생성물	약물 생성물 250-5500 IU/바이알*
	250-2000 IU/바이알	3000 IU/바이알	
rIX인자-Fc	2.2-46 mg/바이알	28-69 mg/바이알	2.2-125 mg/바이알
L-히스티딘	19.4 mg/바이알	27.2 mg/바이알	19.4 mg/바이알
만니톨	119 mg/바이알	167 mg/바이알	119 mg/바이알
수크로스	59.5 mg/바이알	83.3 mg/바이알	59.5 mg/바이알
폴리솔베이트 20	0.5 mg/바이알	0.7 mg/바이알	0.5 mg/바이알

*값은 오버필(overflow)을 포함하지 않는 공칭값이다. 오버필을 포함하는 값은 20.6 mg/바이알 (L-히스티딘), 126.01 mg/바이알 (만니톨), 63.1 mg/바이알 (수크로스) 및 0.53 mg/바이알 (폴리솔베이트) 이다.

[0254]

표 4

약물 생성물- 재구성된 제형 조성			
재구성 후 약물 생성물 바이알 조성			
성분	기준 약물 생성물 250-2000 IU/바이알	기준 약물 생성물 3000 IU/바이알	약물 생성물 250-5500 IU/바이알
희석제	주사용수 중의 NaCl 5.2mL		
rIX인자-Fc	0.45-9.5 mg/mL 40-500 IU/mL	5.5-13.7 mg/mL 480-750 IU/mL	0.9-50.0 mg/mL 80-2750 IU/mL
L-히스티딘	3.88 mg/mL (25 mM)	5.43 mg/mL (35 mM)	3.88 mg/mL (25 mM)
만니톨	23.8 mg/mL (131 mM)	33.3 mg/mL (183 mM)	23.8 mg/mL (131 mM)
수크로스	11.9 mg/mL (35 mM)	16.7 mg/mL (48 mM)	11.9 mg/mL (35 mM)
폴리솔베이트 20	0.1 mg/mL (0.01 %)	0.14 mg/mL (0.014 %)	0.1 mg/mL (0.01 %)
재구성 완충제	3.25 mg/mL	3.25 mg/mL	3.25 mg/mL
재구성된 용적	5.3 mL	5.3 mL	5.3 mL

[0255]

[0256] 실시예 2: 제2 세대 rFIXFc 약물 생성물에 대한 동결건조 주기 변수의 연구

[0257]

요약

[0258]

본 연구의 목적은 본 발명의 rFIXFc 약물 생성물에 대한 동결건조 주기의 건조 단계 과정 변수 주위의 범위를 평가하는 것이다.

[0259]

이 보고는 동결건조 과정 변수(건조 보관 온도, 챔버 진공 수준 및 건조 시간)를 평가하는 실험의 통계학적 설계(DOE) 및 건조 동안 생성물 온도에 대한 그들의 효과, 얻어진 잔여 수분 및 약물 생성물의 건조 속도를 요약한다.

[0260]

제2 세대 rFIXFc 약물 생성물에 대한 예비 동결건조 주기 설계 실험은 별도의 1차 및 2차 건조 단계가 대략 -1.5℃의 제형의 높은 붕괴 온도에 기인하여 필수적이지 않다는 것을 입증하였다. 보관 온도의 효과, 진공 수준 및 잔여 수분 수준에 대한 건조 시간 및 위약에 대한 동결건조 과정 동안 생성물 온도를 평가하기 위해 실험 설계(DOE)의 12가지의 실험을 개발하였다. 데이터의 분석은 1% 미만의 잔여 수분을 달성하기 위해, 건조 단계 동안 30℃의 최소 보관 온도가 필요하다는 것을 나타낸다. 분석은 또한 25시간 이상의 건조 시간이 바이알 내 잔여 수분을 추가로 감소시키지 않고, 챔버 진공 수준이 잔여 수분에 대해 적은 효과만을 가진다는 것을 입증하였다. 건조 동안 생성물 온도는 보관 온도 및 챔버 진공 수준에 의해 상당히 영향받지만, 연구에서 대부분의 응집 건조 조건(1000mTorr 챔버 진공에서 40℃ 보관 온도)은 붕괴 온도보다 10℃ 더 낮은 생성물 온도를 초래하였다. 바이알 질량 흐름은 대부분 보관 온도의 함수이며, 진공 제어를 유지하기 위해, 상업적 동결건조기는 0.7g/시간/바이알의 수분 유동 속도를 조절할 필요가 있을 것이다. 동결건조 주기는 보관 온도 40℃, 250mTorr(0.33mBar)의 챔버 진공 및 25시간의 건조 시간을 이용하여 0.5% 미만의 잔여 수준을 지니는 생성물을 달성하도록 제안되었다.

[0261]

도입

[0262]

가속화된 저장 동안 개선된 단백질 안정성, 개선된 재구성 시간 및 스톱퍼 상의 스플래싱을 감소시키기 위한 감소된 충전 용적을 가능하게 하도록 제2 세대 IX인자-Fc(rFIXFc-2G) 약물 생성물 조성은 설계하였다. 이는 재구성 생성물이 제1 세대 조성물과 동일하게 되도록 5.3mL로부터 2.65mL로 충전 용적을 감소시킴으로써, 그리고 제형 내 단백질 및 부형제 농도를 배가시킴으로써 달성하였다. 충전 용적을 감소시키기 위한 다른 이점은 동결건조 동안 제거될 필요가 있는 물의 양의 감소였다.

[0263]

새로운 약물 생성물 설계는 약물 생성물 과정의 재입증을 필요로 하기 때문에, 동결건조 주기를 재연구하였다. 위약 형성의 붕괴 온도는 대략 -1.5℃로서 측정되었는데, 이는 기준 rFIXFc 동결건조 과정에 대해 설계된 것보

다 동결건조 주기가 더 짧아지게 할 것이다. 생성물은 40℃를 초과하는 보관 온도에서조차 붕괴를 겪지 않기 때문에 초기 실험을 통해 별도의 1차 건조 단계를 분리할 필요가 없다는 것을 결정하였다. 진공이 적용된 후에 1차 건조 온도에 대해 직접 단계와 조합한 기준 약물 생성물로부터의 냉동 프로파일을 이용하여 주기를 설계하였다. 만니톨은 활성 바이알과 동일한 외관을 만드는 케이크에 대한 결정질 구조를 제공하기 때문에, 위약은 활성 rFIXFc-2G 바이알에 대한 양호한 대용물이다. 무정형당은 또한 단백질을 건조시키기가 더 어려우며, 따라서, 얻어진 수분은 약간 더 많고, 과정에 대한 최악의 경우값을 제공한다. 바이알로부터 단백질의 제거는 또한 수증기에 대한 내성을 감소시켜서, 바이알 질량흐름에 대한 최악 경우의 추정을 제공한다.

[0264] 통계학적 실험 설계(DOE) 연구를 수행하여 동결건조 과정 변수(건조 보관 온도, 챔버 진공 수준 및 건조 시간) 및 건조 과정 동안 생성물 온도에 대한 그들의 효과, 얻어진 잔여 수분 및 약물 생성물의 건조 속도를 평가하였다.

[0265] 물질 및 방법

[0266] 본 연구의 목적은 제2 세대 rFIXFc 약물 생성물에 대한 동결건조 주기의 건조 단계 과정 변수 주위의 범위를 평가하는 것이다. JMP 9에서 DOE 연구를 설계하기 위해 사용한 건조 단계 변수 및 범위를 표 5에 나타낸다. 개개 실험 변수 설정값을 나타내는 얻어진 12가지 실험 DOE 계획을 표 6에 나타낸다.

표 5

DOE 연구 설계에서 사용한 건조 변수 범위

건조 DOE 변수	최소값	최대값
보관 온도 (°C)	0	40
챔버 진공 (mTorr)	100	1000
건조 시간 (h)	15	35

[0267]

표 6

JMP9로부터의 실험 주형 산출물의 연구 설계

실험	온도 (C)	진공 (mT)	시간(hr)
1	40	100	35
2	0	100	15
3	40	1000	25
4	20	100	28.2
5	20	500	25
6	0	100	25
7	20	550	25
8	40	250	15
9	20	1000	15
10	0	1000	35
11	10	500	25
12	40	500	25

[0268]

[0269] 연구에서 각각의 동결건조 주기에 대해, 80개의 10ml 스캇(Schott) 바이알(P/N: 68000320)을 표 7에 나타낸 바와 같은 제2 세대 rFIXFc 위약 2.75ml로 충전하여, 잔여 수분 평가에 대한 최악 충전 용적을 제공한다. 이 충전 바이알을 도 1에 나타낸 각각의 실험에 대해 3개의 열전대를 지니는 단일 선반 상에 배열하였다.

표 7

제2 세대 rFIXFc 약물 생성물 위약 방안

성분	FW	g/L	mM	% (w/v)
히스티딘	155.15	7.76	50.00	0.776
PS-20	1227.54	0.2	0.1629	0.020
만니톨	182.172	47.6	261.29	4.760
수크로스	342.30	23.8	69.53	2.380
	$\rho =$	1.029	g/mL	

[0270]

[0271]

사용한 동결건조 주기는 표 8에 나타난 주기의 변화였다. 동결건조기 선반 건조 온도, 건조 단계 시간 및 건조 진공 수준은 표 6에 나타난 실험표의 설계에 기반하였다. SP 인더스트리즈 리오스타 II(SP Industries Lyostar II)를 각각의 동결건조 주기에 대해 사용하고 나서, 바이알을 중간 선반에 두었다.

표 8

온도, 시간 및 진공의 DOE 입력을 나타내는 동결건조 주기 변수

상	단계	온도 (°C)	램프 (°C/분)	담금 (분)	진공 (mTorr)
장입	장입	25	-	필요시	-
냉동	평형	0	0.5	60	-
	냉동	-55	0.5	120	-
	어닐링	-6	0.5	180	-
	냉동	-55	0.5	120	-
풀다운	초기 진공	-55	-	-	DOE 진공
건조	1 ¹ / ₂ ° 건조	DOE 온도	직접 단계	DOE 시간	DOE 진공
최종	최종	5	5.0	필요시	DOE 진공

[0272]

[0273]

각각의 동결건조 주기 후에, 5개의 바이알을 코너 및 중간 위치로부터 선택하고, 절차 TDMP-74를 이용하여 잔여 수분을 측정하고 나서, 선반에 걸쳐 평균화하였다. 건조 동안 생성물 온도 및 바이알 질량흐름 속도를 열전대를 이용하고, 리오스타 II 소프트웨어 내의 압력측정 온도 측정(Manometric Temperature Measurement)에 의해 측정하였다. 이들 산출을 JMP 9 소프트웨어를 이용하여 분석하여 제2 세대 rFIXFc 동결건조 과정에 대한 건조 변수의 효과를 측정하였다. JMP 단계 분석을 수행하여 유의한 변수를 결정하였고, 이어서, 이들 변수를 과정 산출(잔여 수분, 생성물 온도 및 건조 동안의 질량 유동)이 입력 변수에 반응하는 방법을 나타내는 표준 최소 제곱 효과 선별 알고리즘을 이용하여 분석하였다.

[0274]

결과 및 논의

[0275]

12가지의 동결건조 실험 결과를 표 9에 나타낸다.

표 9

잔여 수분, 바이알 질량 흐름 및
생성물 온도의 DOE 결과

실행	온도 (C)	진공 (mT)	시간 (hr)	NB 기준	수분%	dm/dt (g/hr/바이알)	Tp (MTM, °C)
1	40	100	35	16322-117	0.33	0.53	-26.5
2	0	100	15	16322-110	2.82	0.28	-32.2
3	40	1000	25	16322-090	0.57	0.45	-15.2
4	20	100	28.2	16322-139	1.28	0.41	-29.5
5	20	500	25	16322-098	1.58	0.57	-20.3
6	0	100	25	16322-151	2.18	0.27	-32.5
7	20	550	25	16322-146	1.49	0.56	-19.7
8	40	250	15	18266-004	0.59	0.70	-21.9
9	20	1000	15	16322-131	1.95	0.38	-15.6
10	0	1000	35	16322-124	2.56	0.17	-15.8
11	10	500	25	16322-104	2.01	0.35	-21.8
12	40	500	25	16322-083	0.49	0.56	-19.8

1. 잔여 수분에 대한 동결건조 주기 변수의 분석

rFIXFc-2G 위약을 약물 생성물에 대한 최악 대응물로서 사용하였는데, 일반적으로 단백질보다 2차 건조 동안 당 으로부터 잔여 수분을 제거하는 것이 더 어렵기 때문이다. DOE 분석 결과를 나타내는 얻어진 예측 프로파일러를 도 2에 나타낸다. 몇몇 관찰은 명확하다: 보관 온도는 약물 생성물에서 잔여 수분에 대한 가장 유의한 효과를 가진다. 이는 밀착 결합된 물을 제거하는 2차 건조가 확산 및 탈착 제어 과정이라는 사실에 기반하여 예측된다. 상기 모델은 30°C보다 더 높은 보관 온도가 1%보다 낮은 잔여 수분 수준을 달성하는데 필요하다는 것을 고신되 도로 예측한다. 진공 수준은 얻어진 잔여 수분에 대해 작지만 측정가능한 효과를 갖는 것을 나타낸다. 건조 시간은 추가적인 건조 시간의 추가가 잔여 수분 수준을 계속해서 감소시키지 않는 경우 25시간에 시작하는 감소된 복귀 지점을 나타내는 것으로 나타난다. 이 유형의 거동은 보관 온도에 의해 결정되는 평형경계에 대한 역학 접근과 일치하고, 잔여 수분은 추가 건조가 가능하지 않은 점근선에 접근한다. 이런 잔여 수분 DOE 분석에 기반하여, 건조 보관 온도는 30°C 이상이어야 하고, 건조 시간은 25시간 이하에서 고정되어야 한다.

2. 승화 동안 생성물 온도에 대한 동결건조 주기 변수의 분석

rFIXFc-2G 약물 생성물 위약의 냉동 건조 붕괴 온도를 대략 -1.5°C로서 측정하였다. 실행적으로, 이는 증량수 (bulk water)가 동결건조 동안 바이알로부터 제거됨에 따라 생성물 온도가 이 붕괴 온도 미만에서 유지되는 한, 약물 생성물이 훌륭한 케이크 구조를 유지할 것이라는 것을 의미한다. DOE 분석은 보관 온도 및 챔버 진공 수준 이 둘 다 도 3에서 나타내는 바와 같이 생성물에 대해 상당한 효과를 가진다는 것을 결정하였다. 챔버 진공은 가장 큰 효과를 가지며, 더 높은 압력은 승화 동안 더 높은 생성물 온도로 바뀐다. 1000mTorr(1.33mBar)에서조차, 가장 높게 측정된 생성물 온도는 생성물 붕괴 온도 미만의 -15.2°C, 대략 13°C였다. 보관 온도는 또한 생성물 온도에 대한 보통의 효과를 갖지만, 결과는 진공 효과보다 덜 확연하다. 이 분석은 보관 온도 40°C 및 챔버 진공 수준 1000mTorr에서조차 붕괴 위험이 거의 없으며, 임의의 실행적 동결건조 주기 설계 공간의 가능성을 본질적으로 제거한다는 것을 나타낸다.

3. 승화 동안 바이알 질량 흐름 속도에 대한 동결건조 주기 변수의 분석

바이알 질량 흐름 속도(dm/dt)는 승화 과정 동안 물이 바이알로부터 제거되는 속도의 측정이다. 동결건조 주기에 필요한 시간을 감소시키기 위해 더 빠른 건조가 바람직하지만, 너무 많은 수분은 스케일 냉동 건조기를 제조함에 있어서 응축기에 충격을 줄 수 있고, 생성물 챔버 내 진공 제어의 상실을 야기한다. 위약은 최악 바이알 질량 흐름 조건을 나타낸다. 제형에 존재하는 단백질이 없기 때문에, 케이크 내 고체 백분율은 최소화되며, 이는 냉동 건조 케이크로부터 질량 흐름에 대한 더 낮은 저항성을 야기한다. 보관 온도는 도 4에 나타내는 바와 같이 바이알에 대해 유의한 효과를 가지며, 증가된 온도는 더 빠른 승화를 야기한다. 챔버 진공 수준은 DOE 분석 모델에 포함되지만, p값은 0.136인데, 이는 95% 신뢰도로 유의하지 않다. 본 연구에서 가장 높게 측정된

dm/dt는 0.7 g/hr/바이알이었다.

4. 위약 DOE 연구에 기반하여 제안된 제2 세대 rFIXFc 동결건조 주기

위약 DOE 연구로부터의 데이터는 0.5% 미만의 잔여 수분 표적을 달성하는 한편, 단일 건조 주기를 이용하여 생성물을 그의 붕괴 온도 미만으로 유지하기 위한 동결건조 주기를 설계하는 것이 실현가능하다는 것을 시사한다. 제안된 동결건조 주기를 표 10에 나타내고, rFIXFc-2G 동결건조 주기와 유사한 조건 하에 있는 DOE 실행 8로부터의 데이터를 도 5에 나타낸다. 0.5%의 잔여 수분 표적을 선택하였는데, 이는 제1 세대 rFIXFc 약물 생성물 강도 시리즈의 평균값이기 때문이다. 이 수분 수준은 쿠션을 제공하며, 따라서 생성물이 가속화된 안정성 동안 수분을 흡수함에 따라, 생성물 품질 속성은 영향받지 않을 것이다.

동결건조 주기의 냉동 및 어닐링 부분을 기준 rFIXFc 약물 생성물 동결건조 주기에 대해 연구한 바와 같이 사용하였고, 별도의 1차 및 2차 건조 단계를 40℃ 보관 온도 및 250mTorr 진공에서 25시간 동안 단일 건조 단계로 대체하였다.

표 10

rFIXFc-2G 에 대해 제안된 동결건조 주기

상	단계	온도 (°C)	램프 (°C/분)	담금 (분)	진공 (mTorr)
장입	장입	25	-	필요시	-
냉동	평형	0	0.5	60	-
	냉동	-55	0.5	120	-
	어닐링	-6	0.5	180	-
	냉동	-55	0.5	120	-
풀다운	초기 진공	-55	-	-	250
건조	1½° 건조	40	0.5	1500	250
최종	최종	5	5.0	필요시	250

결론

잔여 수분에 대한 제2 세대 rFIXFc 약물 생성물 동결건조 과정 변수, 생성물 온도 및 위약의 바이알 질량 흐름 속도를 평가하는 12가지 실험 DOE 연구를 완료하였다. 데이터의 분석은 1% 미만의 잔여 수분을 달성하기 위해, 건조 단계 동안 30℃의 최소 보관 온도가 필요하다는 것을 나타낸다. 상기 분석은 또한 25시간보다 더 긴 건조 시간이 바이알 내 잔여 수분을 감소시키지 않고, 진공 수준이 잔여 수분에 대해 적은 효과만을 가진다는 것을 입증하였다. 건조 동안 생성물 온도는 보관 온도 및 챔버 진공 수준에 의해 유의하게 영향받는다. 본 연구에서 대부분의 응집 조건(1000mTorr 챔버 진공에서 40℃ 보관 온도)은 붕괴 온도보다 10℃ 더 높은 생성물 온도를 야기하였다.

동결건조 주기는 보관 온도 40℃, 250mTorr(0.33mBar)의 챔버 진공 및 25시간의 건조 시간을 이용하여 0.5% 미만의 잔여 수준을 지니는 생성물을 달성하도록 제안되었다.

구체적 실시형태의 앞서 언급한 설명은 본 발명의 일반적 특성을 매우 완전하게 나타낼 것이며, 당업계의 기술 내의 지식을 적용함으로써, 과도한 실험 없이 본 발명의 일반적 개념으로부터 벗어나지 않고 이러한 구체적 실시형태를 다양한 적용을 위해 용이하게 변형시키고/시키거나 적합하게 할 수 있을 것이다. 따라서, 이러한 적합화 및 변형은 본 명세서에 제시된 교시 및 가이드에 기반하여 개시된 실시형태의 동등물의 의미 및 범위 내인 것으로 의도된다. 본 명세서의 용어 또는 어구가 교시 및 가이드에 비추어 당업자에 의해 이해되도록, 본 명세서의 어구 또는 용어는 설명의 목적을 위해, 제한 없이 이해되어야 한다.

본 발명의 범위 및 범주는 상기 기재한 예시적 실시형태에 의해 제한되어서는 안되지만, 다음의 청구범위 및 그들의 동등물에 따라서는 한정되어야 한다. 본 발명의 다른 실시형태는 본 명세서에 개시된 본 발명의 명시 및 실행을 고려하여 당업자에게 명확할 것이다.

본 명세서에 언급된 모든 문헌, 논문, 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개개 간행물 또는 특허 출원이 참고로 포함되는 것으로 개개로 표시되는 것과 동일한 정도로 본 명세서에 참고로 포함된다.

본 출원은 본 명세서에 전문이 참고로 포함되는 2014년 3월 24일자로 출원된 미국 가출원 특허61/969,801호에 대한 우선권을 주장한다.

[0294]

서열 표

표 11

FIX의 폴리뉴클레오타이드 서열

FIX-Fc쇄 DNA 서열 (밀줄친 FIX 신호 펩타이드, 이중 밀줄친 FIX 서열
볼드체의 Fc 영역) (서열번호 2를 암호화하는 서열번호 1)

pSYN-FIX-030 뉴클레오타이드 서열 (nt 1 내지 7583):

FIX 엑손 1 (신호 펩타이드, 제1 아미노산 프로펩타이드): nt 690-
777

FIX 미니 인트론 : nt 778-1076

FIX 서열 : nt 1077-2371

Fc : nt 2372-3052

```

1 gcgcgcgttg acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg
51 gggtcattag ttcataagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac
101 ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccac cgacccccgc ccattgacgt
151 caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac tttccattga
201 cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gccacttgg cagtacatca
251 agtgtatcat atgccaagta cgcctccctat tgacgtcaat gacggtaa
301 ggcccgcttg gcattatgcc cagtacatga ctttatggga ctttcctact
351 tggcagtaca tctacgtatt agtcacgct attaccatgg tgatgcgggt
401 ttggcagtac atcaatgggc gtggatagcg gtttgactca cggggatttc
451 caagtctcca cccattgac gtcaatggga gtttgttttg gcacccaaat
501 caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaa
551 gggcggtagg cgtgtacggt gggaggtcta tataagcaga gctctctggc
601 taactagaga acccactgct tactggctta tcgaaattaa tacgactcac
651 tatagggaga cccaagcttc gcgacgtacg gccgccacca tgacgcgcgt
701 gaacatgac atggcagaat caccaggcct catcaccatc tgccttttag
751 gatatctact cagtgcctgaa tgtacagggt tgtttccttt tttaaaatac
801 attgagtatg cttgcctttt agatatagaa atatctgatg ctgtcttctt
851 cactaaatgt tgattacatg atttgacagc aatattgaag agtctaacag
901 ccagcacgca ggttggtgaa tactgtggga acatcacaga ttttggtctc

```

[0295]

951 atgccctaaa gagaaattgg ctttcagatt atttggatta aaaacaaaga
 1001 ctttcttaag agatgtaaaa ttttcatgat gttttctttt ttgctaaaaac
 1051 taaagaatta ttcttttaca tttcagtttt tcttgatcat gaaaacgccca
 1101 acaaaattct gaatcggcca aaqaggtata attcaggtaa attggaagag
 1151 ttgtttcaag ggaatctaga gagaagaatgt atggaagaaa agtqtaqt
 1201 tgaagaagca cgaqaagt
 1251 ggaagcagta ttttgatgga gatcagttgt agtccaatcc atgtttaaat
 1301 ggcggcagtt gcaaggatga cattaattcc tatgaatgtt ggtgtccctt
 1351 tggatttgaa ggaagaact gtgaattaga tgaacatgt aacattaaga
 1401 atggcagatg cgaqcagttt tgaataata gtctgataa caagtggtt
 1451 tctcctgta ctgagggata tcgacttgca gaaaaccaga agtctctgta
 1501 accagcagtg ccatttccat gtggaagagt ttctgtttca caaacttcta
 1551 agctcaccg tgctgagact gtttttctgt atgtggacta tgaatttct
 1601 actgaagctg aaaccatttt ggataacatc actcaaaqca cccaatcatt
 1651 taatgacttc actcgggttg ttggtggaga agatgccaaa ccaggtcaat
 1701 tcccttgcca ggttgttttg aatggtaaag ttgatgcatt ctgtggaggg
 1751 tctatcgtta atgaaaaatg gattgttaact gctgccact gtgttgaaac
 1801 tgggtttaa attacagttg tcgcaggtga acataatatt gagggagacg
 1851 aacatacaga gcaaaagcga aatgtgattc gaattattcc tcaccacaac
 1901 tacaatgcag ctattaataa gtacaacat gacattgcc tctggaact
 1951 ggacgaacc ttagtgctaa acagctacgt tacacctatt tgcattgctg
 2001 acaaggaata cacgaacatc ttctcaaat ttggtctggt ctatgtaagt
 2051 ggttgaggaa ggtcttcca caaaggaga tcagctttag ttcttcagta
 2101 ccttagagtt ccactgttg accgagccac atgtcttga tctacaaagt
 2151 tcaccatcta taacaacatg ttctgtgctg gcttccatga aggaagtga
 2201 gattcatgtc aaggaatag tgggggaccc catgttactg aagtggaaag
 2251 gaccagtttc ttaactgga ttattagctg ggtgaagag tgtgcaatga
 2301 aagqcaata tggaatatat accaaggtgt cccggtatgt caactggatt
 2351 aaggaaaaa caaagctcac tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc
 2401 agtccggaa ctctgggag gaccgtcagt cttctcttc ccccaaac

[0296]

2451 ccaaggacac cctcatgac tcccggaacc ctgaggtcac atgcgtggtg
 2501 gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga
 2551 cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca
 2601 acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg
 2651 ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc
 2701 ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac
 2751 aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc
 2801 agcctgacct gcctgggtcaa aggtttctat cccagcgaca tcgccgtgga
 2851 gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg
 2901 tgttggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac
 2951 aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgtccg tgatgcatga
 3001 ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta
 3051 aatgagaatt cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac
 3101 aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta
 3151 ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt tggggtgggc
 3201 gaagaactcc agcatgagat ccccgcgctg gaggatcatc cagccggcgt
 3251 cccgaaaaac gattccgaag cccaacctt catagaaggc gccggtggaa
 3301 tcgaaatctc gtagcacgtg tcagtctgct tcctcgcca cgaagtgcac
 3351 gcagttgccg gccgggtcgc gcagggcgaa ccccccccc caccgtgct
 3401 cgccgatctc ggtcatggcc ggcccgagg cgtcccgaa gttcgtggac
 3451 acgacctccg accactcggc gtacagctcg tccaggccgc gcaccacac
 3501 ccaggccagg gtgtgtccg gcaccacctg gtcttgacc gcgtgatga
 3551 acagggtcac gtcgtcccg accacaccgg cgaagtcgtc ctccacgaag
 3601 tcccgggaga acccgagccg gtcggtccag aactcgaccg ctccggcgac
 3651 gtcgcgcgcg gtgagcaccg gaacggcact ggtcaacttg gccatggtt
 3701 agttcctcac cttgtcgtat tatactatgc cgatatacta tgccgatgat
 3751 taattgtcaa cacgtgctga tcagatccga aatggatat acaagctccc
 3801 gggagctttt tgcaaaagcc taggcctcca aaaaagcctc ctactactt
 3851 ctggaatagc tcagaggcag aggcggcctc ggcctctgca taaataaaaa

[0297]

3901 aaattagtca gccatggggc ggagaatggg cggaactggg cggagttagg
 3951 ggcggggatgg gcggagttag gggcgggact atggttgctg actaattgag
 4001 atgcatgctt tgcatacttc tgcttgctgg ggagcctggg gactttccac
 4051 acctggttgc tgactaattg agatgcatgc tttgcatact tctgcctgct
 4101 ggggagcctg gggactttcc acaccctcgt cgagctagct tcgtgaggct
 4151 ccggtgcccg tcagtgggca gagcgacat cggccacagt ccccgagaag
 4201 ttggggggag gggtcggcaa ttgaaccggt gcctagagaa ggtggcgcg
 4251 ggtaaaactgg gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt tttccgag
 4301 gtgggggaga accgtatata agtgcagtag tcgccgtgaa cgttctttt
 4351 cgcaacgggt ttgccgccag aacacaggta agtgccgtgt gtggttccg
 4401 cgggcctggc ctctttacgg gttatggccc ttgcgtgcct tgaattactt
 4451 ccacctggct ccagtacgtg attcttgatc ccgagctgga gccaggggag
 4501 ggccttgccg tttaggagcc cttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg
 4551 cctgggcgct gggggccgag cgtgcgaatc tgggtggacc ttcgccgctg
 4601 tctcgtgctt ttcgataagt ctctagccat ttaaaatttt tgatgacctg
 4651 ctgcgacgct tttttcttgg caagatagtc ttgtaaatgc gggccaggat
 4701 ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc gggggcgagg acggggcccg
 4751 tgcgctccag cgcacatggt cggcgaggcg gggcctgcga gcgcggccac
 4801 cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgcct
 4851 ggcctgcgag cgccgtgtat cggcccgccc tgggaggcaa ggtggtccg
 4901 gtcggcacca gttgcgtgag cggaaagatg gccgcttccc ggccctgctc
 4951 caggggggctc aaaatggagg acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag
 5001 tcaccacacac aaaggaaagg ggcctttccg tctcagccg tcgcttcag
 5051 tgactccacg gagtaccggg cggcgtccag gcacctcgat tagttctgga
 5101 gcttttgtag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcgatg
 5151 gagtttcccc aactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttgaca
 5201 cttgatgtaa ttctccttgg aatttgccct ttttgagttt ggatcttgg
 5251 tcattctcaa gcctcagaca gtggttcaaa gtttttttct tccatttcag
 5301 gtgtcgtgaa cacgtggtcg cggccgagcc gccaccatgg agacagacac
 5351 actcctgcta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc actggtgaca

[0298]

5401 aaactcacac atgccaccg tggccagcac ctgaactcct gggaggaccg
 5451 tcagtcttcc tcttccccc aaaaccaag gacacctca tgatctccc
 5501 gaccctgag gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg
 5551 aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag
 5601 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt
 5651 cctcacgctc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtga
 5701 aggtctccaa caaagccctc ccagccccc togagaaac catctccaa
 5751 gccaaaggcg agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatccc
 5801 cgatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct
 5851 tctatcccag cgacatgcgc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag
 5901 aacaactaca agaccacgcc tcccgtgttg gactccgacg gctccttctt
 5951 cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag cagggaacg
 6001 tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag
 6051 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaata ctcgagagat ctggccggct
 6101 gggcccgctt cgaaggtaag cctatcccta accctctcct cggctctgat
 6151 tctacgcgta ccggtcatca tcaccatcac cattgagttt aaaccgcgtg
 6201 atcagcctcg actgtgcctt ctagttgcca gccatctgtt gtttgccct
 6251 ccccgctgcc ttccttgacc ctggaaggcg ccaactccac tgcctttcc
 6301 taataaaatg aggaaattgc atcgattgt ctgagtaggt gtcattctat
 6351 tctggggggt ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca
 6401 atagcaggca tgctggggat gcggtgggct ctatggcttc tgaggcggaa
 6451 agaaccagtg gcggtataac ggttatccac agaatacagg gataacgcag
 6501 gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag
 6551 gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca
 6601 caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgaca ggactataaa
 6651 gataccaggc gtttccccct agaagctccc tcgtgcgctc tcctgttcg
 6701 accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt
 6751 ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggctg
 6801 ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccgttca gcccgaccgc

[0299]

6851 tgcgccttat ccggttaacta tcgtcttgag tccaaccccg taagacacga
 6901 cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt
 6951 atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac
 7001 actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt
 7051 cggaanaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta
 7101 gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga
 7151 tctcaagaag atcctttgat cttttctacg ggtctgacg ctacgtggaa
 7201 cgaaaactca cgttaaggga ttttggcat gacattaacc tataaaaata
 7251 ggcgtatcac gaggcccttt cgtctcgccg gtttcgggtga tgacggtgaa
 7301 aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc
 7351 ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg
 7401 ggtgtcgggg ctggcctaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga
 7451 gtgcaccata tatgcggtgt gaaataccgc acagatgctg aaggagaaaa
 7501 taccgcatca ggcgccattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg
 7551 gcgatcgggtg cgggcctctt cgctattacg cca

[0300]

표 12

FIX의 폴리펩타이드 서열

FIX-Fc 단량체 혼성체: *FIX-Fc* 및 *Fc*쇄를 공동발현시킴으로써 생성됨.

A. FIX-Fc쇄 (서열번호 2)

c-말단의 라이신은 서브유닛 중 하나로 제시되지 않으며; 이 가공은 종종 포유류 세포 배양물에서 뿐만 아니라 혈장 유래 단백질에 의해 생성된 재조합 단백질에서 관찰된다.

FIX-Fc-SC 서브유닛 (FIX-Fc의 Fc 부분은 볼드체임):

1 YNSGKLEEFV QGNLERECME EKCSFEEARE VFENTERTE FWKQYVDGQ
 51 CESNPCLNGG SCKDDINSYE CWCDFGFEGK NCELDVTCNI KNGRCEQFCK
 101 NSADNKVCS CTEGYRLAEN QKSCEPAVVF PCGRVSVSQT SKLTRAETVF
 151 PDVDYVNSTE AETILDNITQ STQSFNDFTR VVGGEDAKPG QFPWQVVLNG
 201 KVDAFCGSGI VNEKWIIVTAA HCVETGVKIT VVAGEHNIEE TEHTEQKRN
 251 IRIIPHHNYN AAINKYNHDI ALLELDEPLV LNSYVTPICI ADKEYTNIFL
 301 KFGSGYVSGW GRVFHKGRSA LVLQYLRVPL VDRATCLRST KFTIYNNMFC

[0301]

351 AGFHEGGRDS CQGDSGGPHV TEVEGTSFLT GIISWGEECA MKGKYGIYTK
 401 VSRVNVWIK KTKLTDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
 451 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
 501 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR
 551 DELTKNQVSL TCVLKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP FVLDSGGSFF
 601 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK

[0302]

표 13

Fc의 폴리뉴클레오타이드 서열

Fc DNA 서열 (밀줄친 마우스 Igκ 신호 펩타이드) (서열번호 4를 암호화하는 서열번호 3)

```

1 atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg
51 ttccactggt gacaaaactc acacatgccc accgtgcca gcacctgaac
101 tcttgaggag accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc
151 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag
201 ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg
251 tgcataatgc caagacaaag ccgctggagg agcagtacaa cagcacgtac
301 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa
351 ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga
401 aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc
451 ctgcccccat cccgcgatga gctgaccaag aaccagggtca gcctgacctg
501 cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca
551 atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc
601 gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg
651 gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca
701 accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a

```

[0303]

표 14

Fc의 폴리펩타이드 서열

Fc쇄 (서열번호 4)

```

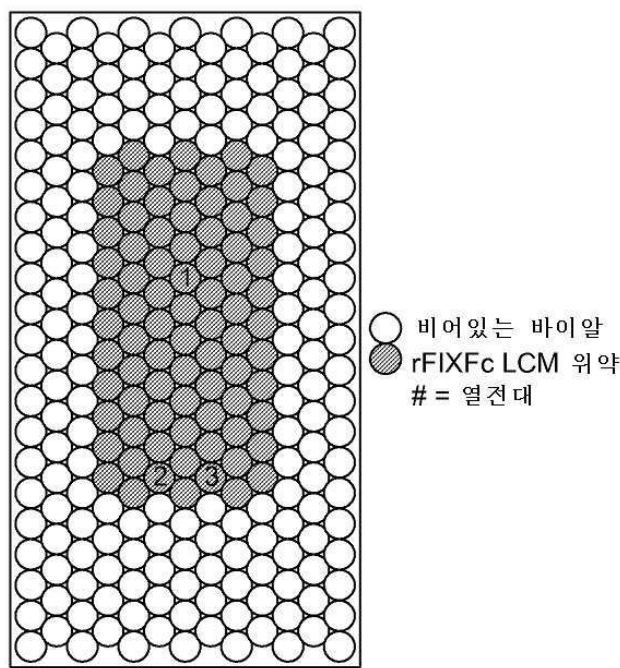
1 DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
51 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
101 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK
151 GFYPSTIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
201 NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK

```

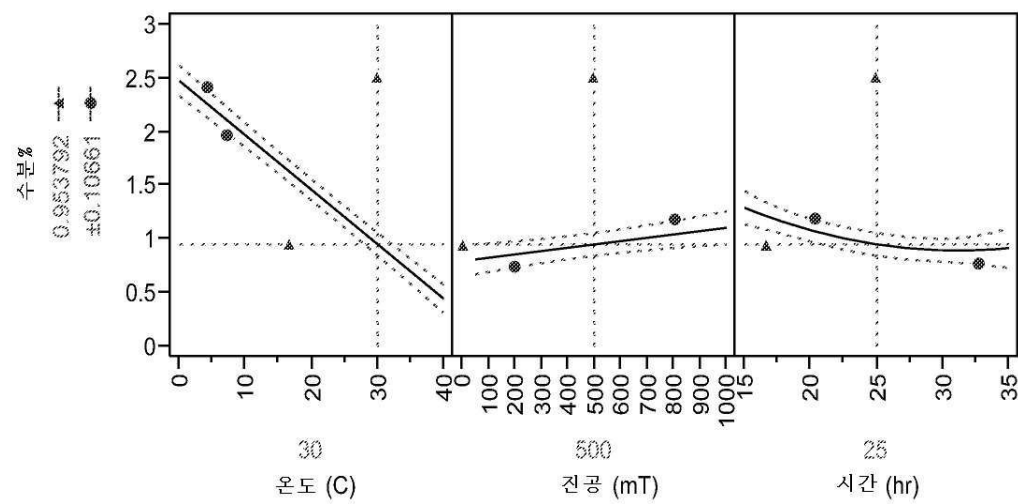
[0304]

도면

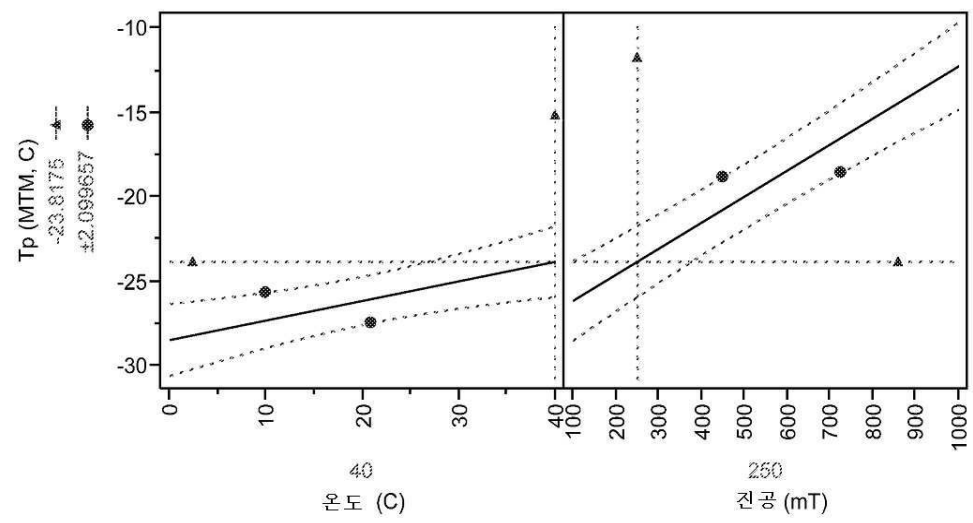
도면1



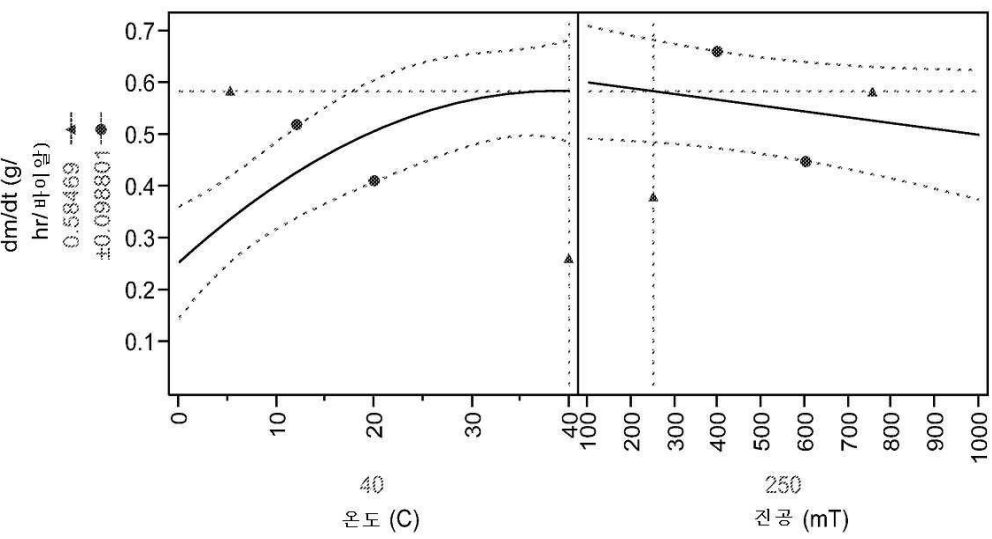
도면2



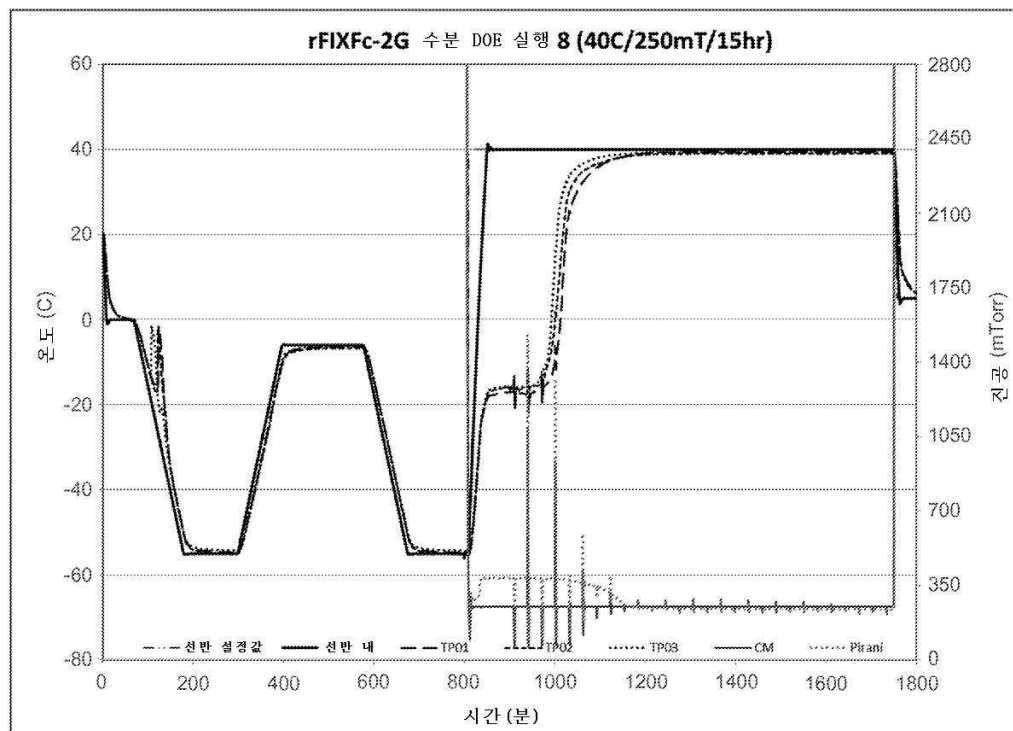
도면3



도면4



도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> BIOGEN IDEC MA INC.

<120> LYOPHILIZED FACTOR IX FORMULATIONS

<130> WO/2015/148444

<140> PCT/US2015/022141

<141> 2015-03-24

<150> US 61/969,801

<151> 2014-03-24

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7583

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FIX-Fc Chain

<400> 1

gcgcgcgttg acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag

60

ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc cgccttggct 120

gaccgccc aa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc 180

caatagggac tticcattga cgtcaatggg tggagtatit acggtaaaact gccacttgg 240

cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgcctccctat tgacgtcaat gacggtaaat 300

ggcccgctg gcattatgcc cagtacatga ctttatggga ctttctact tggcagtaca 360

tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcgggt ttggcagtac atcaatgggc 420

gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga 480

gtttgttttg gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat 540

tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggagggtcta tataagcaga gctctctggc 600

taactagaga acccactgct tactggctta tcgaaattaa tacgactcac tatagggaga 660

cccaagcttc gcgacgtacg gccgccacca tgcagcgcgt gaacatgac atggcagaat 720

caccaggcct catcaccatc tgccttttag gatcttact cagtgtgaa tgtacaggtt 780

gttttcttt tttaaaatc attgagtatg ctgtccttt agatatagaa atatctgatg 840

ctgtcttctt cactaaattt tgattacatg atttgacagc aatattgaag agtctaacag 900

ccagcacgca ggttggttaag tactgtggga acatcacaga ttttggctcc atgcctaaa 960

gagaaattgg ctttcagatt atttggatta aaaacaaaga ctttcttaag agatgtaaaa 1020

ttttcatgat gttttcttt ttgctaaaac taaagaatta ttcttttaca tticagtttt 1080

tcttgatcat gaaaacgcca acaaaattct gaatcgcca aagaggata attcaggtaa 1140

attggaagag ttgtttcaag ggaatctaga gagagaatgt atggaagaaa agttagtttt 1200

tgaagaagca cgagaagttt ttgaaaacac tgaagaaca actgaatttt ggaagcagta 1260

tgttgatgga gatcagtggt agtccaatcc atgttttaaat ggccggcagtt gcaaggatga 1320

cattaattcc tatgaatgtt ggtgtccctt tggatttgaa ggaaagaact gtgaattaga 1380

tgtaacatgt aacattaaga atggcagatg cgagcagttt tgtaaaaata gtgctgataa 1440

caagggtggt tgcctctgta ctgagggata tcgacttgca gaaaaccaga agtcctgtga 1500

accagcagtg ccatttccat gtggaagagt ttctgtttca caaacttcta agtcacccg 1560

tgctgagact gtttttctg atgtggacta tgtaaatct actgaagctg aaaccatttt 1620

ggataacatc actcaaagca cccaatcatt taatgacttc actcgggttg ttggtggaga 1680

agatgcaaaa ccagggtcaat tcccttggca ggttggtttg aatggtaaa ttgatgcatt 1740

ctgtggaggc tctatcgta atgaaaaatg gattgttaact gctgcccact gtgttgaaac 1800

tggtgttaaa attacagttg tcgcaggtga acataatatt gaggagacag aacatacaga 1860

gcaaaagcga aatgtgattc gaattattcc tcaccacaac tacaatgcag ctattaataa 1920
 glacaacat gatattgcc ttctggaact ggacgaaccc ttagtgctaa acagctacgt 1980
 tacacctatt tgcattgctg acaaggaata cacgaacatc ttctctcaat ttggatctgg 2040
 ctatgtlaagt ggctggggaa gagtcttcca caaagggaga tcagctttag ttcttcagta 2100
 ccttagagtt ccacttgttg accgagccac atgtcttcga tctacaaagt tcaccatcta 2160
 taacaacatg ttctgtgctg gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag 2220

tgggggaccc catgttactg aagtggaagg gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg 2280
 ggggtgaagag tgtgcaatga aaggcaaata tggaatatat accaaggtgt cccggtatgt 2340
 caactggatt aaggaaaaaa caaagctcac tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc 2400
 agctccggaa ctctggggcg gaccgtcagt ctctctcttc ccccaaaaac ccaaggacac 2460
 cctcatgac tcccgaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga 2520
 ccctgaggtc aagtccaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa 2580
 gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca 2640

ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctccacgc 2700
 ccccatcgag aaaacatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac 2760
 cctgccccca tcccggtatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa 2820
 aggttctat ccagcgcaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa 2880
 ctacaagacc acgcctcccc tgttggaact cgacggctcc ttcttctct acagcaagct 2940
 caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga 3000
 ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatgagaatt 3060

cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa 3120
 aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca 3180
 ataaacaagt tgggggtggc gaagaactcc agcatgagat ccccgcgctg gaggatcatc 3240
 cagccggcgt cccggaaaac gattccgaag cccaaccttt catagaaggc ggcgggtggaa 3300
 tcgaaatctc gtagcacgtg tcagtcctgc tctcggcca cgaagtgcac gcagttgccc 3360
 gccgggtcgc gcagggcgaa ctccgcccc cacggctgct cgccgatctc ggtcatggcc 3420
 ggcccggagg cgtcccggaa gttcgtggac acgacctccg accactcggc gtacagctcg 3480

tccaggccgc gcacccacac ccaggccagg gtgttgtccg gcaccacctg gtcctggacc 3540
 gcgctgatga acagggtcac gtcgtcccgg accacaccgg cgaagtcgtc ctccacgaag 3600
 tcccgggaga acccgagccg gtcggtccag aactcgaccg ctccggcgac gtcgcgcgcg 3660
 gtgagcaccg gaacggcact ggtcaacttg gccatggttt agttcctcac cttgtcgtat 3720

tatactatgc cgatatacta tgccgatgat taattgtcaa cacgtgctga tcagatccga	3780
aaatggatat acaagctccc gggagctttt tgcaaaagcc taggcctcca aaaaagcctc	3840
ctcactactt ctggaatagc tcagaggcag aggcggcctc ggccctctgca taaataaaaa	3900
aaattagtca gccatggggc ggagaatggg cggaactggg cggagttagg ggcgggatgg	3960
gcggagttag gggcgggact atggttgtct actaattgag atgcatgctt tgcatacttc	4020
tgccctgtgg ggagcctggg gactttccac acctggttgc tgactaattg agatgcatgc	4080
tttgcatact tctgcctgtc ggggagcctg gggactttcc acaccctcgt cgagctagct	4140
tcgtgaggct ccggtgcccc tcagtgggca gagcgacat cggccacagt ccccagaaag	4200
ttggggggag gggtcggcaa ttgaaccggt gcctagagaa ggtggcgagg ggtaaactgg	4260
gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt tttcccagg gtgggggaga accgtatata	4320
agtgcagtag tcgccgtgaa cgttcttttt cgcaacgggt ttgccgccag aacacaggta	4380
agtgccgtgt gtggttcccc ggggcctggc ctctttacgg gttatggccc ttgcgtgcct	4440
tgaattactt ccacctggct ccagtacgtg attcttgatc ccgagctgga gccaggggag	4500
ggccttgccg tttaggagcc ctttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg cctgggcgct	4560
ggggccgccc cgtgcgaatc tgggtggcacc ttcgcgcctg tctcgtgctt ttcgataagt	4620
ctctagccat ttaaaatfff tgatgacctg ctgcgacgt ttttttctgg caagatagtc	4680
ttgtaaatgc gggccaggat ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc gcgggcggcg	4740
acggggcccc tgctgccag cgcacatgtt cggcgaggcg gggcctgcga gcgcggccac	4800
cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgcct ggcctcgcc	4860
cgccgtgtat cgccccccc tgggcggcaa ggctggcccg gtcggcacca gttgcgtgag	4920
cggaaagatg gccgcttccc ggccctgctc cagggggctc aaaatggagg acgcggcgct	4980
cgggagagcg ggcgggtgag taccacacac aaaggaaagg ggcccttccg tctcagccg	5040
tcgcttcatg tgactccacg gagtaccggg cgccgtccag gcacctgat tagttctgga	5100
gcttttggag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcgatg gagtttcccc	5160
acactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttggca cttgatgtaa ttctccttgg	5220
aatttgccct ttttgagttt ggatcttggg tcattctcaa gcctcagaca gtggttcaaa	5280
gtttttttct tccatttcag gtgtcgtgaa cacgtggtcg cggccgcgcc gccaccatgg	5340
agacagacac actcctgcta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc actggtgaca	5400
aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggaggaccg tcagtcttcc	5460
tcttcccccc aaaaccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag gtcacatgcg	5520

tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg	5580
tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg	5640
tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca	5700
aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tgcagaaaac catctccaaa gccaaagggc	5760
agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg cgatgagctg accaagaacc	5820
aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggt tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg	5880
agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccggtgtg gactccgacg	5940
gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg	6000
tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct	6060
ccctgtctcc gggtaaatga ctgagagat ctggccggct gggcccgttt cgaagtaag	6120
cctatcccta accctctcct cggtctcgat tctacgcgta ccggtcatca tcaccatcac	6180
cattgagttt aaaccgcgtg atcagcctcg actgtgcctt ctagttgcca gccatctgtt	6240
gtttgcccc ccccggtgcc ttccttgacc ctggaagggt ccactccac tgtcctttcc	6300
taataaaatg aggaaattgc atcgattgt ctgagtaggt gtcattctat tctggggggt	6360
ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca tgctggggat	6420
gcggtgggct ctatggcttc tgaggcgga agaaccagtg gcggtaatat ggttatccac	6480
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa	6540
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccatagctc cggccccctg acgagcatca	6600
caaaaatcga cgtcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc	6660
gtttccccc agaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg accctgccgc ttaccggata	6720
cctgtccgc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta	6780
tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgtccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgtca	6840
gcccgaccgc tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga	6900
cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg	6960
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg	7020
tatctgcgt ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg	7080
caaacaaacc accgctggta gcggtggttt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag	7140
aaaaaaagga tcicaagaag atcctttgat cttttctacg gggctgacg ctacgtggaa	7200
cgaaaactca cgtaaggga ttttggtcat gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac	7260

gaggcccttt cgctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct 7320
cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg 7380
cgcgtcagcg ggtgttgccg ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat 7440
tgtactgaga gtgcaccata tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa 7500
taccgcatca ggcgccattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg gcgatcgggtg 7560
cgggcctctt cgtattacg cca 7583

<210> 2

<211> 642

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FIX-Fc Chain

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr

100 105 110

Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val

115 120 125

Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr

130 135 140

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu

145 150 155 160

Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
165 170 175

Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
180 185 190

Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
195 200 205

Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
210 215 220

Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225 230 235 240

Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
245 250 255

His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
260 265 270

Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
275 280 285

Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
290 295 300

Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305 310 315 320

Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
325 330 335

Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
340 345 350

Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
355 360 365

His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
370 375 380

Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385 390 395 400

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

405 410 415
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 420 425 430
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 435 440 445

 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 450 455 460
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 465 470 475 480
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 485 490 495
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 500 505 510

 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 515 520 525
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 530 535 540
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 545 550 555 560
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 565 570 575

 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 580 585 590
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 595 600 605
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 610 615 620
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 625 630 635 640

Gly Lys

<210> 3

<211> 741

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc Portion

<400> 3

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tccitgggagg accgtcagtc      120
ttctcttccc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca      180
tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac      240
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac      300
cgtgtgggtc gctcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag      360

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa      420
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgcgatga gctgaccaag      480
aaccaggtca gctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag      540
tggaagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctccccgt gttggactcc      600
gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg      660
aacgtcttct catgtccgt gatgatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc      720
ctctccctgt ctccgggtaa a                                              741

```

<210> 4

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc Portion

<400> 4

```

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1           5           10           15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
           20           25           30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
           35           40           45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

```

50

55

60

His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
65					70					75					80
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				85				90						95	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
			100					105					110		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val

115					120					125					
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
130					135					140					
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
145					150					155					160
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
165					170					175					
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val

180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Gly Lys

225

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Core sequence of albumin-binding peptides

<400> 5

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

<210> 6

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTP peptide

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 7

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTP peptide

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS peptide

<400> 8

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro

1 5 10 15

Ser Ala Pro Ala

20

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS peptide

<400> 9

Ala Ala Pro Ala Ser Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro

1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser

20

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS peptide

<400> 10

Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala

1 5 10 15

Ser Pro Ser Ser

20

<210> 11

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS peptide

<400> 11

Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala

1 5 10 15

Ser Pro Ser

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS peptide

<400> 12

Ser Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Ser Ser Pro Ala Ser Pro Ser Pro

1 5 10 15

Ser Ser Pro Ala

20

<210> 13

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS peptide

<400> 13

Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro

1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala

20

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAS peptide

<400> 14

Ala Ser Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Pro

1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala

20