(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월25일
(11) 등록번호 10-2269494
(24) 등록일자 2021년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/60 (2017.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01) *A61K 47/61* (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/60 (2017.08)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7007514(분할)
(22) 출원일자(국제) 2011년07월29일
심사청구일자 2021년04월06일
(85) 번역문제출일자 2021년03월12일
(65) 공개번호 10-2021-0032542
(43) 공개일자 2021년03월24일
(62) 원출원 특허 10-2020-7030594
원출원일자(국제) 2011년07월29일
심사청구일자 2020년11월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/045873
(87) 국제공개번호 WO 2012/016131
국제공개일자 2012년02월02일
(30) 우선권주장
61/369,186 2010년07월30일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2005014024 A2
WO2008025856 A2

(73) 특허권자
박스알타 인코퍼레이티드
미국, 일리노이즈 60015, 배녹번, 1200 레이크사이드 드라이브
박스앨타 게엠베하
스위스 8152 글라트파르크 (오프피콘) 투르가우에르슈트라쎄 130
(72) 발명자
지크만 위르겐
오스트리아 아-1210 비엔나 게라스도르퍼 스트라쎄 153/209
하이더 스테판
오스트리아 아-3385 프린저스도르프 모짜르트스트라쎄 2
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 류현경

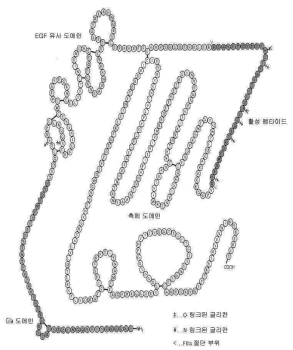
전체 청구항 수 : 총 37 항 심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 **옥심 결합용 친핵성 촉매**

(57) 요 약

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

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/18 (2013.01)
A61K 47/61 (2017.08)
(72) 발명자
로덴스타이너 한스페터
오스트리아 아-1020 비엔나 하이드가쎄 10/17
이벤스 안드레아스
스위스 체하-8049 취리히 베르겔러스트라쎄 32
투레첵 페터
오스트리아 아-3400 클로스터노이부르크 바이들링 하웁트스트라쎄 59게
죄흘링 올리버
오스트리아 아-1160 비엔나 파니켄가쎄 12/1/4

명 세 서

청구범위

청구항 1

수용성 폴리머를 치료 단백질의 산화된 탄수화물 모이어티에 콘주게이션하는 방법으로서,

a) 치료 단백질을 포함하는 용액의 pH 값을 5.0 내지 8.0의 pH 값으로 조정하는 것을 포함하는 제1 단계로서, 상기 치료 단백질 농도는 0.3 mg/ml 내지 3.0 mg/ml인 제1 단계;

b) 50 μM 내지 1000 μM의 최종 농도가 되도록 산화제를 상기 제1 단계의 용액에 첨가하는 것을 포함하는 제2 단계로서, 상기 산화제는, 나트륨 페리오데이트 ($NaIO_4$), 납 테트라아세테이트 ($Pb(OAc)_4$) 및 칼륨 퍼루테네이트 ($KRuO_4$)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제2 단계;

c) m-톨루이딘을 30 분의 지속시간 내에 상기 제2 단계의 용액에 첨가하는 것을 포함하는 제3 단계로서, m-톨루이딘은 2 ℃ 내지 37 ℃의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건, 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 조건 하에서, 1 mM 내지 50 mM의 최종 농도가 되도록 첨가되는 제3 단계;

d) 원하는 과잉 농도의 활성화된 수용성 폴리머를 30 분의 지속시간 내에 상기 제3 단계의 용액에 첨가시키는 것을 포함하는 제4 단계로서, 2 ℃ 내지 37 ℃의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건; 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 조건 하에서, 상기 과잉 농도는 1-배 몰 과잉 내지 300-배 몰 과잉인 제4 단계;

e) 상기 제4 단계의 용액 pH 값을 5.0 내지 8.0의 pH 값으로 조정한 후에, 치료 단백질 상의 하나 이상의 산화된 탄수화물 모이어티에 대한 활성화된 수용성 폴리머의 콘주게이션을 허용하기 위해, 0.5 시간 내지 24 시간의 지속시간, 2 ℃ 내지 37 ℃의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건, 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 조건 하에서, 산화제, m-톨루이딘 및 활성화된 수용성 폴리머와 함께 치료 단백질을 인큐베이션하는 것을 포함하는 제5 단계로서, 치료 단백질 상의 하나 이상의 탄수화물 모이어티는 산화제에 의해서 산화되고; 옥심 결합은 상기 산화된 탄수화물 모이어티와 활성화된 수용성 폴리머 상의 활성 아미노옥시 그룹 사이에서 형성되고 상기 옥심 결합 형성은 m-톨루이딘에 의해 촉매되는 제5 단계; 및

f) 상기 제5 단계에서의 치료 단백질의 하나 이상의 산화된 탄수화물 모이어티에 대한 상기 수용성 폴리머의 콘주게이션이, L-시스테인, 메티오닌, 글루타티온, 글리세롤, $Na_2S_2O_5$ (나트륨 메타 바이설파이트), 트립토판, 티로신, 히스티딘 또는 그의 유도체들, 크레졸, 이미다졸, 및 그의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 켄칭제의 첨가로 멈추는 제6 단계로서; 상기 켄칭제는 5 분 내지 120 분의 지속시간; 2 ℃ 내지 37 ℃의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건, 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하는 조건 하에서, 1 mM 및 100 mM의 최종 농도가 되도록 첨가되는 제6 단계를 포함하며,

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

상기 치료 단백질은 당단백질 또는 시험관 내에서 글리코실화된 치료 단백질로서, 인자 VIIa (FVIIa), 인자 VIII (FVIII), 인자 IX (FIX), EPO, Ang-2, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 신경 성장 인자 (NGF), EGF, 인간 성장 호르몬 (HGH), TNF-알파, 인슐린, 인터페론-알파 (IFN-알파), 인터페론-감마 (IFN-감마), 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), Humira (아달리무맙), 및 Prolia (데노수맙), 또는 그의 생물학적 활성 단편, 유도체 또는 변이체로 이루어진으로 그룹으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

a) 치료 단백질을 포함하는 용액의 pH 값을 6.0의 pH 값으로 조정하는 것을 포함하는 제1 단계로서, 상기 치료 단백질 농도는 2 mg/ml인 제1 단계;

b) 상기 산화제가 나트륨 페리오데이트 ($NaIO_4$)이고, 100 μM의 최종 농도가 되도록 첨가되는 제2 단계;

c) 10 mM의 최종 농도가 되도록 m-톨루이딘이 첨가되는 제3 단계;

d) 상기 과잉 농도의 활성화된 수용성 폴리머가 5-배 몰 과잉 또는 20-배 몰 과잉인 제4 단계;

e) 상기 조건은 2 시간의 지속시간; 22 ℃의 온도; 광의 부재 조건, 및 교반 조건을 포함하는 제5 단계;

f) 상기 켄칭제는 L-시스테인이고, L-시스테인은 15 분의 지속시간, 22 ℃의 온도, 광의 부재 조건, 및 교반 조건을 포함하는 조건 하에서, 10 mM의 최종 농도가 되도록 첨가되는 제6 단계를 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 a) 내지 단계 f)는 단일 용기에서 일어나는, 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 수용성 폴리머는 PSA이고, 10 - 300 시알산 단위로 구성되는, 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 치료 단백질이 혈액응고 단백질인, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 치료 단백질이 FIX 또는 그의 생물학적 활성 단편인, 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 치료 단백질이 FVIIa 또는 그의 생물학적 활성 단편인, 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 치료 단백질이 FVIII 또는 그의 생물학적 활성 단편인, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 m-톨루이딘이 10 mM의 농도의 콘주게이션 반응으로 존재하는, 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 콘주게이트된 치료 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 콘주게이트된 치료 단백질은 크로마토그래피, 여과 및 침전으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법으로 정제되는, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 크로마토그래피는 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 이온 교환 크로마토그래피 (IEC), 크기 배제 크로마토그래피 (SEC), 친화성 크로마토그래피, 및 역상 크로마토그래피로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 안티-케이오성(anti-chaotropic) 염이 크로마토그래피 로딩 단계 및 크로마토그래피 세정 단계에서 사용되는, 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 크로마토그래피가 칼럼에서 일어나는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 칼럼이 페닐-세파로오스 FF 및 부틸-세파로오스 FF로 이루어진 그룹으로부터 선택된 크로마토그래피 수지를 포함하는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 수지가 5 cm 내지 20 cm의 층 높이에서 칼럼 내에 존재하는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 층 높이는 10 cm인, 방법.

청구항 18

제14항에 있어서, 흐름 방향은 상향류로 설정되고 유속은 0.2 cm/min 내지 6.7 cm/min인 하나 이상의 세정 단계를 포함하는, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 유속은 2 cm/min인, 방법.

청구항 20

제14항에 있어서, 흐름 방향은 하향류로 설정되고 유속은 0.1 cm/min 내지 6.7 cm/min인 하나 이상의 용출 단계를 포함하는, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 유속은 1 cm/min인, 방법.

청구항 22

제10항에 있어서, 한외여과/정용여과 (UF/DF)에 의해 콘주게이트된 치료 단백질을 농축하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 치료 단백질의 최종 농도가 0.5 내지 3 mg/ml인, 방법.

청구항 24

제10항에 있어서, 상기 치료 단백질은 5 내지 11개의 수용성 폴리머 모이어티들을 포함하는, 방법

청구항 25

제10항에 있어서, 상기 콘주게이트된 치료 단백질은 크로마토그래피를 사용하여 정제되고; 안티-케이오성 염은 로딩 단계 및 세정 단계에 사용되고; 상기 방법은, 흐름 방향은 상향류로 설정되고 유속은 0.2 cm/min 내지 6.7 cm/min인 하나 이상의 세정 단계 및 흐름 방향은 하향류로 설정되고 유속은 0.2 cm/min 내지 6.7 cm/min인 하나 이상의 용출 단계를 포함하고; 한외여과/정용여과 (UF/DF)에 의해 콘주게이트된 치료 단백질을 농축하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 크로마토그래피가 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)이고, 하나 이상의 세정 단계 유속이 2 cm/min이며; 하나 이상의 용출 단계 유속이 1 cm/min인, 방법.

청구항 27

제1항에 있어서, 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 상기 활성화된 수용성 폴리머는 하기를 포함하는 방법으로 제조되는, 방법:

a) 산화된 수용성 폴리머와 활성화된 아미노옥시 링커 사이의 안정한 옥심 결합의 형성을 허용하기 위하여, 산화된 수용성 폴리머를 포함하는 용액을, 활성 아미노옥시 그룹을 포함하는 활성화된 아미노옥시 링커와 함께 인큐베이션하는 단계로서, 상기 조건은 1 분 내지 24 시간의 지속시간; 2 ℃ 내지 37 ℃의 온도; 광의 존재 또는 부재 조건, 및 교반 또는 교반하지 않는 조건을 포함하고; 상기 인큐베이션 단계에 의해 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 수용성 폴리머를 형성하는 단계; 및

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

청구항 28

제27항에 있어서,

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

청구항 29

제27항에 있어서,

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

청구항 30

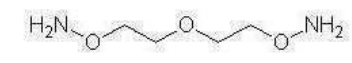
제29항에 있어서,

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

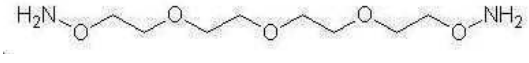
청구항 31

제27항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아미노옥시 링커는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법:

a) 하기 식의 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 링커:

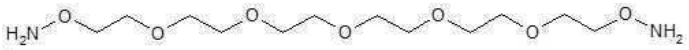


b) 하기 식의 3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민 링커:



및

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



청구항 32

제28항 또는 제30항에 있어서, 상기 환원제는 나트륨 시아노보로하이드라이드($NaCNBH_3$), 아스코르브산 (비타민 C) 및 $NaBH_3$로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 33

제29항 또는 제30항에 있어서, m-톨루이딘은 최종 농도 1.0 mM 내지 50 mM의 m-톨루이딘이 되는 양으로 첨가되는, 방법.

청구항 34

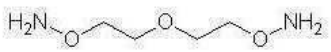
제27항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 한외-/정용여과 (UF/DF)에 의해 콘주게이트된 치료 단백질을 농축하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 35

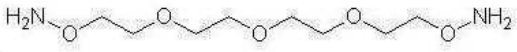
제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 활성화된 수용성 폴리머는 활성화된 PSA이고, 활성화된 아미노옥시 링커를 산화된 PSA와 반응시킴으로써 제조되고;

상기 아미노옥시 링커는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되고:

a) 하기 식의 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 링커:

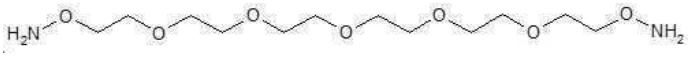


b) 하기 식의 3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민 링커:



및

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



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

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 아미노옥시 링커는 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민인, 방법.

청구항 37

제35항에 있어서, 상기 산화제는 $NaIO_4$인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

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

배 경 기 술

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

[0003] 콜로민산 (CA)으로도 불리는 폴리시알산 (PSA)은 천연적으로 발생한 폴리사카라이드이다. 이것은 α (2→8) 케토시딕 (ketosidic) 결합을 갖는 N-아세틸뉴라민산의 단일 중합체 (homopolymer)이며, 그의 비-환원성 말단에 인접한 디올기를 함유한다. 이것은 음으로 하전되며, 인체의 천연 구성성분이다. 이것은 박테리아로부터 대량으로, 예정된 물리적 특성을 가지고 쉽게 생산될 수 있다 (미국 특허 제5,846,951호). 박테리아에서 생산된 PSA는 인체에서 생산된 PSA와 화학적으로 및 면역학적으로 동일하기 때문에, 박테리아 PSA는, 심지어 단백질에 커플링된 경우에도 비-면역원성이다. 일부의 폴리머들과 달리, PSA 산은 생물 분해성이다. 카탈라제 및 아스파라기나제에 대한 콜로민산의 공유적 커플링은 단백분해 효소 또는 혈장의 존재 하에서 효소 안정성을 증가시키는 것으로 나타났다. 폴리시알릴화 및 비변형된 아스파라기나제를 이용한 생체내 비교 시험에서, 폴리시알릴화가 효소의 반감기를 증가시켰다는 것이 밝혀졌다 (Fernandes and Gregoriadis, Int J Pharm. 2001;217:215-24).

[0004] 펩티드 또는 단백질에 대한 PEG-유도체의 커플링은 로버츠 (Roberts) 등에 의해서 검토되었다 (Adv Drug Deliv Rev 2002;54:459-76). 수용성 폴리머를 치료학적 단백질에 커플링시키는 한가지 접근 방법은 단백질의 탄수화물 부위를 통한 폴리머의 콘주게이션이다. 단백질 내의 탄수화물의 인접한 히드록실기 (OH)는 과요오드산 나트륨 ($NaIO_4$)에 의해서 쉽게 산화되어 활성 알데히드기를 형성할 수 있다 (Rothfus et Smith, J Biol Chem 1963; 238:1402-10; van Lenten et Ashwell, J Biol Chem 1971;246:1889-94). 그 다음, 상기 폴리머는, 예를 들어 활성 히드라지드기를 함유하는 시약을 사용함으로써 상기 탄수화물의 알데히드기에 커플링될 수 있다 (Wilchek M 및 Bayer EA, Methods Enzymol 1987;138:429-42). 보다 최근의 기술로서 알데히드와 반응하여 옥심 결합을 형성하는 아미노옥시기를 함유하는 시약을 사용하는 것이 있다 (WO 96/40662, WO2008/025856).

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

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

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

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

발명의 내용

[0009] **발명의 요약**

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

[0011] 일 구현예에서, 수용성 폴리머를 치료 단백질의 산화된 탄수화물 모이어티에 코주게이션시키는 방법이 제공되고, 이 방법은 콘주게이션을 허용하는 조건 하에서 상기 산화된 탄수화물 모이어티를 활성화된 수용성 폴리머와 접촉시키는 것을 포함하고; 상기 수용성 폴리머는 활성 아미노옥시 그룹을 함유하고 폴리에틸렌 글라이콜 (PEG), 분지형 PEG, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), 폴리시알산 (PSA), 전분, 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록실에틸 전분 (HES), 탄수화물, 다당류, 풀루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트, 더마탄 설페이트, 전분, 덱스트란, 카복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글라이콜 (PAG), 폴리프로필렌 글라이콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일옥시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 상기 탄수화물 모이어티는 나트륨 페리오데이트 ($NaIO_4$), 납 테트라아세테이트 ($Pb(OAc)_4$) 및 칼륨 퍼루테네이트 ($KRuO_4$)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 산화제를 포함하는 완충액으로 인큐베이션에 의해 산화되고; 여기서 옥심 결합은 상기 산화된 탄수화물 모이어티와, 수용성 폴리머 상의 상기 활성 아미노옥시 그룹 사이에서 형성되고; 여기서 상기 옥심 결합 형성은 o-아미노 벤조산, m-아미노 벤조산, p-아미노 벤조산, 설파닐산, o-아미노벤즈아마이드, o-톨루이딘, m-톨루이딘, p-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, 및 p-아니시딘으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 친핵성 촉매에 의해 촉진된다.

[0012] 또 하나의 구현예에서, 수용성 폴리머를 치료 단백질의 산화된 탄수화물 모이어티에 코주게이션시키는 방법이 제공되고, 이 방법은 콘주게이션을 허용하는 조건 하에서 상기 산화된 탄수화물 모이어티를 활성화된 수용성 폴리머와 접촉시키는 것을 포함하고; 상기 치료 단백질은 인자 IX (FIX), 인자 VIII (FVIII), 인자 VIIa (FVIIa), 폰빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF),ADAMTS 13 프로테아제, IL-1 알파, IL-1 베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, 콜로니 자극 인자-1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), EPO, 인터페론-알파 (IFN-알파), 공통 인터페론, IFN-베타, IFN-감마, IFN-오메가, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 알파, IL-33, 트롬보포이에틴 (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 1 (ANGPTL1), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 2 (ANGPTL2), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 3 (ANGPTL3), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 4 (ANGPTL4), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 5 (ANGPTL5), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 6 (ANGPTL6), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 7 (ANGPTL7), 바이트로넥틴, 혈관내피 성장 인자 (VEGF), 안지오게닌, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 골형성 단백질-1, 골형성 단백질-2, 골형성 단백질-3, 골형성 단백질-4, 골형성 단백질-5, 골형성 단백질-6, 골형성 단백질-7, 골형성 단백질-8, 골형성 단백질-9, 골형성 단백질-10, 골형성 단백질-11, 골형성 단백질-12, 골형성 단백질-13, 골형성 단백질-14, 골형성 단백질-15, 골형성 단백질 수용체 IA, 골형성 단백질 수용체 IB, 골형성 단백질 수용체 II, 뇌 유래 신경친화성 인자, 카디오트로핀-1, 섬모 신경친화성 인자, 섬모 신경친화성 인자 수용체, 크립토, 크립틱, 시토카인 유래 중성구 화학주성 인자 1, 시토카인 유래 중성구, 화학주성 인자 2α, 시토카인 유래 중성구 화학주성 인자 2β, β 내피 세포 성장 인자, 엔도텔린 1, 표피 성장 인자, 에피겐, 에피레귤린, 상피-유래된 중성구 유인체, 섬유아세포 성장 인자 4, 섬유아세포 성장 인자 5, 섬유아세포 성장 인자 6, 섬유아세포 성장 인자 7, 섬유아세포 성장 인자 8, 섬유아세포 성장 인자 8b, 섬유아세포 성장 인자 8c, 섬유아세포 성장 인자 9, 섬유아세포 성장 인자 10, 섬유아세포 성장 인자 11, 섬유아세포 성장 인자 12, 섬유아세포 성장 인자 13, 섬유아세포 성장

인자 16, 섬유아세포 성장 인자 17, 섬유아세포 성장 인자 19, 섬유아세포 성장 인자 20, 섬유아세포 성장 인자 21, 산성 섬유아세포 성장 인자, 염기성 섬유아세포 성장 인자, 신경아교세포계-유래된 신경친화성 인자 수용체 α1, 신경아교세포계-유래된 신경친화성 인자 수용체 α2, 성장 관련 단백질, 성장 관련 단백질 α, 성장 관련 단백질 β, 성장 관련 단백질 γ, 헤파린 결합 표피 성장 인자, 간세포 성장 인자, 간세포 성장 인자 수용체, 간종양-유래된 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자 I, 인슐린-유사 성장 인자 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 II, 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질, 케라틴생성세포 성장 인자, 백혈병 억제 인자, 백혈병 억제 인자 수용체 α, 신경 성장 인자 신경 성장 인자 수용체, 뉴로포이에틴,뉴로트로핀-3, 뉴로트로핀-4, 온코스타틴 M (OSM), 태반 성장 인자, 태반 성장 인자 2, 혈소판-유래된 내피 세포 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자 A 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 AA, 혈소판 유래 성장 인자 AB, 혈소판 유래 성장 인자 B 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 BB, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 α, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 β, B형 전구세포 성장 자극 인자, 줄기세포 인자 (SCF), 줄기세포 인자 수용체, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, 변형 성장 인자 α, 변형 성장 인자 β, 변형 성장 인자 β1, 변형 성장 인자 β1.2, 변형 성장 인자 β2, 변형 성장 인자 β3, 변형 성장 인자 β5, 잠재형 변형 성장 인자 β1, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 I, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 II, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 III, 흉선 기질 림포포이에틴 (TSLP), 종양 괴사 인자 수용체 유형 I, 종양 괴사 인자 수용체 유형 II, 유로키나아제-유형 플라스미노겐 활성제 수용체, 포스포리파아제 활성 단백질 (PUP), 인슐린, 렉틴 리신, 프로락틴, 융모성 생식선, 난포자극 호르몬, 갑성선 자극 호르몬, 조직 플라스미노겐 활성제, IgG, IgE, IgM, IgA, 및 IgD, α-갈라토시다아제, β-갈라토시다아제, DNAse, 페투인, 황체형성 호르몬, 에스트로겐, 인슐린, 알부민, 지단백질, 태아단백, 트랜스페린, 트롬보포이에틴, 유로키나아제, 인테그린, 트롬빈, 렙틴, 휴미라 (아달리무맙), 프롤리아 (데노수맙), Enbrel (에타네르셉트), 표 1의 단백질, 또는 생물학적 활성 단편, 그의 유도체 또는 변형로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 상기 수용성 폴리머는 활성 아미노옥시 그룹을 함유하고 폴리에틸렌 글라이콜 (PEG), 분지형 PEG, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), 폴리시알산 (PSA), 전분, 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록실에틸 전분 (HES), 탄수화물, 다당류, 풀루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트, 더마탄 설페이트, 전분, 덱스트란, 카복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글라이콜 (PAG), 폴리프로필렌 글라이콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일옥시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 상기 탄수화물 모이어티는 나트륨 페리오데이트 ($NaIO_4$), 납 테트라아세테이트 ($Pb(OAc)_4$) 및 칼륨 퍼루테네이트 ($KRuO_4$)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 산화제를 포함하는 완충액으로 인큐베이션에 의해 산화되고; 여기서 옥심 결합은 상기 산화된 탄수화물 모이어티와, 수용성 폴리머 상의 상기 활성 아미노옥시 그룹 사이에서 형성되고; 여기서 상기 옥심 결합 형성은 o-아미노 벤조산, m-아미노 벤조산, p-아미노 벤조산, 설파닐산, o-아미노벤즈아마이드, o-톨루이딘, m-톨루이딘, p-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, 및 p-아니시딘으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 친핵성 촉매에 의해 촉진된다.

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

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

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

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

[0017] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 치료 단백질은 약 0.5 시간 내지 약 24 시간의 지속시간; 약 2 ℃ 내지 약 37 ℃의 온도; 광의 존재 또는 부재에서; 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하는 조건 하에서 활성화된 수용성 폴리머와 함께 인큐베이트된다. 또 하나의 구현예에서, 상기 조건은 약 120 분의 지속시간, 약 22 ℃의 온도, 광의 부재; 및 교반하면서를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "교반하는"은

통상적으로 사용된 실험실 또는 제조 장비 및 생성물에 의해 다양한 속도 및 강도 (예들 들면, 완만한 교반)에서 교반하는 것을 포함하는 것으로 의미된다.

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

[0019] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 산화제는 최종 농도 약 50 μM 내지 약 1000 μM의 산화제로 되는 양으로, 약 0.1 분 내지 120 분의 지속시간; 약 2 ℃ 내지 약 37 ℃의 온도; 광의 존재 또는 부재에서; 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하는 조건 하에서 첨가된다. 또 하나의 구현예에서, 산화제의 최종 농도는 약 400 μM이고, 상기 조건은 약 10 분의 지속시간, 약 22oC의 온도, 광의 부재 및 교반하면서를 포함하다.

[0020] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 수용성 폴리머를 상기 치료 단백질의 상기 산화된 탄수화물 모이어티에 콘주게이트하는 것은 L-시스테인, 메티오닌, 글루타티온, 글리세롤, 나트륨 메타 바이설파이트 (Na2S205), 트립토판, 티로신, 히스티딘 또는 그의 유도체들, 크레졸, 이미다졸, 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 켄칭제의 첨가로 멈추고; 여기서 상기 켄칭제는 최종 농도 약 1 mM 내지 약 100 mM의 켄칭제로 되는 양으로, 약 5 분 내지 약 120 분의 지속시간; 약 2 ℃ 내지 약 37 ℃의 온도; 광의 존재 또는 부재에서; 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하는 조건 하에서, 첨가된다. 또 하나의 구현예에서, 켄칭제는 L-시스테인이다. 또 다른 구현예에서, L-시스테인은 약 10 mM의 최종 농도가 되도록 첨가되고, 상기 조건은 약 60 분의 지속시간, 약 22oC의 온도, 광의 부재 및 교반하면서를 포함하다.

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

분의 지속시간, 약 22 ℃의 온도, 광의 부재 및 교반하면서를 포함하다.

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

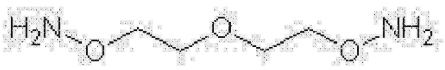
[0023] 또 다른 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 치료 단백질은 FIX이다. 또 하나의 구현예에서, 치료 단백질은 FVIIa이다. 또 하나의 구현예에서, 치료 단백질은 FVIII이다.

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

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

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

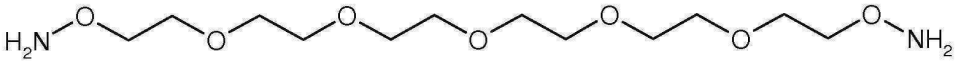
[0028] *a) 하기 식의 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 링커:

[0029] 
,

[0030] b) 하기 식의 3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민 링커:

[0031]
및

[0032] d) 하기 식의 3,6,9,12,15-펜나톡사-헵타데칸-1,17-디옥시아민 링커:

[0033] 

[0034] 여기서 상기 PSA는 산화제로 인큐베이션에 의해 산화되어 PSA의 비-환원 말단에서 말단 알데하이드 그룹을 형성한다. 관련 구현예에서, 아미노옥시 링커는 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민이다.

[0035] 또 다른 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 산화제는 $NaIO_4$이다.

[0036] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 친핵성 촉매는 약 1 mM 내지 약 50 mM의 농도로 제공된다. 일 구현예에서, 친핵성 촉매는 m-톨루이딘이다. 또 다른 구현예에서, m-톨루이딘은 약 10 mM의 농도로 콘주게이션 반응에 존재한다.

[0037] 또 하나의 구현예에서, 상기 언급된 방법이 제공되고, 이 방법은 나트륨 시아노보로하이드라이드 ($NaCNBH_3$), 아스코르브산 (비타민 C) 및 $NaBH_3$로 이루어진 그룹으로부터 선택된 환원 화합물을 포함하는 완충액에서 콘주게이트된 치료 단백질을 인큐베이트하여 콘주게이트된 치료 단백질에서 옥심 결합을 환원시키는 단계를 추가로 포함한다. 일 구현예에서, 환원 화합물은 나트륨 시아노보로하이드라이드 ($NaCNBH_3$)이다.

[0038] 또 다른 구현예에서, 상기 언급된 방법이 제공되고, 이 방법은 콘주게이트된 치료 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 콘주게이트된 치료 단백질은 크로마토그래피, 여과 및 침전으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법으로 정제된다. 또 하나의 구현예에서, 크로마토그래피는 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC), 이온 교환 크로마토그래피 (IEC), 크기 배제 크로마토그래피 (SEC), 친화성 크로마토그래피, 및 역상 크로마토그래피로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, 안티-케이오성 염은 크로마토그래피 로딩 단계 및 크로마토그래피 세정 단계에서 사용된다. 또 하나의 구현예에서, 크로마토그래피는 칼럼에서 일어난다. 또 하나의 구현예에서, 칼럼은 페닐-세파로오스 FF 및 부틸-세파로오스 FF로 이루어진 그룹으로부터 선택된 크로마토그래피 수지를 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 수지는 약 5 cm 내지 약 20 cm의 층 높이에서 칼럼 내에 존재한다. 일 구현예에서, 층 높이는 약 10 cm이다.

[0039] 또 하나의 구현예에서, 상기 언급된 방법이 제공되고, 이 방법은 하나 이상의 세정 단계를 포함하고 여기서 흐름 방향은 상향류로 설정되고 유속은 약 0.2 cm/min 내지 약 6.7 cm/min이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어

"하향류"는 크로마토그래피 칼럼의 최상부로부터 크로마토그래피 칼럼의 최저부 (통상의 흐름 방향/표준 방식)로의 흐름 방향을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "상향류" 칼럼의 최저부로부터 최상부로의 흐름 방향 (역 흐름 방향)을 의미한다. 일 구현예에서, 유속은 약 2 cm/min이다.

[0040] 또 하나의 구현예에서, 상기 언급된 방법이 제공되고, 이 방법은 하나 이상의 용출 단계를 포함하고 여기서 흐름 방향은 하향류로 설정되고 유속은 약 0.1 cm/min 내지 약 6.7 cm/min이다. 관련 구현예에서, 유속은 약 1 cm/min이다.

[0041] 또 다른 구현예에서, 상기 언급된 방법이 제공되고, 이 방법은 한외-/정용여과 (UF/DF)로 콘주게이트된 치료 단백질을 농축하는 것을 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 치료 단백질의 최종 농도는 약 0.5 내지 약 3 mg/ml이다.

[0042] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 치료 단백질은 약 5 내지 약 11개의 수용성 폴리머 모이어티들을 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 치료 단백질은 약 1 내지 약 3개의 수용성 폴리머를 포함한다.

[0043] 또 다른 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 여기서 콘주게이트된 치료 단백질은 크로마토그래피를 사용하여 정제되고; 여기서 안티-케이오성 염은 로딩 단계 및 세정 단계에 사용되고; 상기 방법은, 흐름 방향이 상향류로 설정되고 유속은 약 0.2 cm/min 내지 약 6.7 cm/min인 하나 이상의 세정 단계 및 흐름 방향이 하향류로 설정되고 상기 유속은 약 0.2 cm/min 내지 약 6.7 cm/min인 하나 이상의 용출 단계를 포함하고; 한외-/정용여과 (UF/DF)에 의해 콘주게이트된 치료 단백질을 농축하는 것을 추가로 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 크로마토그래피는 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)이고; 여기서 하나 이상의 세정 단계 유속은 약 2 cm/min이고; 여기서 하나 이상의 용출 단계 유속은 약 1 cm/min이다.

[0044] 또 하나의 구현예에서, 상기 언급된 방법들 중 어떤 것에 의해 생산된 변형된 치료 단백질이 제공된다.

[0045] 또 다른 구현예에서, 산화된 치료 단백질 상의 탄수화물 모이어티와, 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 옥심 결합을 형성하는 방법이 제공되고, 이 방법은 하기 단계를 포함한다: a) 상기 단백질을 나트륨 페리오데이트 ($NaIO_4$), 납 테트라아세테이트 ($Pb(OAc)_4$) 및 칼륨 퍼루테네이트 ($KRuO_4$)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 산화제와 함께 인큐베이트하여 치료 단백질 상의 탄수화물 모이어티를 산화시키는 단계; 및 b) 상기 옥심 결합의 형성을 허용하는 친핵성 촉매의 존재에서, 상기 치료 단백질의 상기 산화된 탄수화물 모이어티와, 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 옥심 결합을 형성하는 단계; 여기서 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 상기 수용성 폴리머는 폴리에틸렌 글라이콜 (PEG), 분지형 PEG, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), 폴리시알산 (PSA), 전분, 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록실에틸 전분 (HES), 탄수화물, 다당류, 풀루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트, 더마탄 설페이트, 전분, 덱스트란, 카복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글라이콜 (PAG), 폴리프로필렌 글라이콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일옥시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 여기서 상기 친핵성 촉매는 o-아미노 벤조산, m-아미노 벤조산, p-아미노 벤조산, 설파닐산, o-아미노벤즈아마이드, o-톨루이딘, m-톨루이딘, p-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, 및 p-아니시딘으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0046] 또 하나의 구현예에서, 산화된 치료 단백질 상의 탄수화물 모이어티와, 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 옥심 결합을 형성하는 방법이 제공되고, 이 방법을 하기 단계를 포함한다: a) 상기 단백질을 나트륨 페리오데이트 ($NaIO_4$), 납 테트라아세테이트 ($Pb(OAc)_4$) 및 칼륨 퍼루테네이트 ($KRuO_4$)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 산화제와 함께 인큐베이트하여 치료 단백질 상의 탄수화물 모이어티를 산화시키는 단계; 및 b) 상기 옥심 결합의 형성을 허용하는 친핵성 촉매의 존재에서, 상기 치료 단백질의 상기 산화된 탄수화물 모이어티와, 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 옥심 결합을 형성하는 단계; 여기서 상기 치료 단백질은 인자 IX (FIX), 인자 VIII (FVIII), 인자 VIIa (FVIIa), 폰빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF),ADAMTS 13 프로테아제, IL-1 알파, IL-1 베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, 콜로니 자극 인자-1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), EPO, 인터페론-알파 (IFN-알파), 공통 인터페론, IFN-베타, IFN-감마, IFN-오메가, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 알파, IL-33,

트롬보포이에틴 (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 1 (ANGPTL1), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 2 (ANGPTL2), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 3 (ANGPTL3), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 4 (ANGPTL4), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 5 (ANGPTL5), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 6 (ANGPTL6), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 7 (ANGPTL7), 바이트로넥틴, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 안지오게닌, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 골형성 단백질-1, 골형성 단백질-2, 골형성 단백질-3, 골형성 단백질-4, 골형성 단백질-5, 골형성 단백질-6, 골형성 단백질-7, 골형성 단백질-8, 골형성 단백질-9, 골형성 단백질-10, 골형성 단백질-11, 골형성 단백질-12, 골형성 단백질-13, 골형성 단백질-14, 골형성 단백질-15, 골형성 단백질 수용체 IA, 골형성 단백질 수용체 IB, 골형성 단백질 수용체 II, 뇌 유래 신경친화성 인자, 카디오트로핀-1, 섬모 신경친화성 인자, 섬모 신경친화성 인자 수용체, 크립토, 크립틱, 시토카인 유래 중성구 화학주성 인자 1, 시토카인 유래 중성구, 화학주성 인자 2α, 시토카인 유래 중성구 화학주성 인자 2β, β 내피 세포 성장 인자, 엔도텔린 1, 표피 성장 인자, 에피겐, 에피레귤린, 상피-유래된 중성구 유인체, 섬유아세포 성장 인자 4, 섬유아세포 성장 인자 5, 섬유아세포 성장 인자 6, 섬유아세포 성장 인자 7, 섬유아세포 성장 인자 8, 섬유아세포 성장 인자 8b, 섬유아세포 성장 인자 8c, 섬유아세포 성장 인자 9, 섬유아세포 성장 인자 10, 섬유아세포 성장 인자 11, 섬유아세포 성장 인자 12, 섬유아세포 성장 인자 13, 섬유아세포 성장 인자 16, 섬유아세포 성장 인자 17, 섬유아세포 성장 인자 19, 섬유아세포 성장 인자 20, 섬유아세포 성장 인자 21, 산성 섬유아세포 성장 인자, 염기성 섬유아세포 성장 인자, 신경아교세포계-유래된 신경친화성 인자 수용체 α1, 신경아교세포계-유래된 신경친화성 인자 수용체 α2, 성장 관련 단백질, 성장 관련 단백질 α, 성장 관련 단백질 β, 성장 관련 단백질 γ, 헤파린 결합 표피 성장 인자, 간세포 성장 인자, 간세포 성장 인자 수용체, 간종양-유래된 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자 I, 인슐린-유사 성장 인자 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 II, 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질, 케라틴생성세포 성장 인자, 백혈병 억제 인자, 백혈병 억제 인자 수용체 α, 신경 성장 인자 신경 성장 인자 수용체, 뉴로포이에틴,뉴로트로핀-3, 뉴로트로핀-4, 온코스타틴 M (OSM), 태반 성장 인자, 태반 성장 인자 2, 혈소판-유래된 내피 세포 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자 A 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 AA, 혈소판 유래 성장 인자 AB, 혈소판 유래 성장 인자 B 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 BB, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 α, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 β, B형 전구세포 성장 자극 인자, 줄기세포 인자 (SCF), 줄기세포 인자 수용체, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, 변형 성장 인자 α, 변형 성장 인자 β, 변형 성장 인자 β1, 변형 성장 인자 β1.2, 변형 성장 인자 β2, 변형 성장 인자 β3, 변형 성장 인자 β5, 잠재형 변형 성장 인자 β1, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 I, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 II, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 III, 흉선 기질 림포포이에틴 (TSLP), 종양 괴사 인자 수용체 유형 I, 종양 괴사 인자 수용체 유형 II, 유로키나아제-유형 플라스미노겐 활성제 수용체, 포스포리파아제 활성 단백질 (PUP), 인슐린, 렉틴 리신, 프로락틴, 융모성 생식선, 난포자극 호르몬, 갑성선 자극 호르몬, 조직 플라스미노겐 활성제, IgG, IgE, IgM, IgA, 및 IgD, α-갈라토시다아제, β-갈라토시다아제, DNAse, 페투인, 황체형성 호르몬, 에스트로겐, 인슐린, 알부민, 지단백질, 태아단백, 트랜스페린, 트롬보포이에틴, 유로키나아제, 인테그린, 트롬빈, 렙틴, Humira (아달리무맙), Prolia (데노수맙), Enbrel (에타네르셉트), 표 1로부터의 단백질, 또는 생물학적 활성 단편, 그의 유도체 또는 변형으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 여기서 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 상기 수용성 폴리머는 폴리에틸렌 글라이콜 (PEG), 분지형 PEG, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), 폴리시알산 (PSA), 전분, 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록실에틸 전분 (HES), 탄수화물, 다당류, 풀루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트, 더마탄 설페이트, 전분, 덱스트란, 카복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글라이콜 (PAG), 폴리프로필렌 글라이콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일옥시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 여기서 상기 친핵성 촉매는 o-아미노 벤조산, m-아미노 벤조산, p-아미노 벤조산, 설파닐산, o-아미노벤즈아마이드, o-톨루이딘, m-톨루이딘, p-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, 및 p-아니시딘으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0047] 또 하나의 구현예에서, 산화된 치료 단백질 상의 탄수화물 모이어티와, 활성 하이드라자이드 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 하이드라존 결합을 형성하는 방법이 제공되고 이 방법은 하기의 단계를 포함한다: a) 상기 단백질을 나트륨 페리오데이트 ($NaIO_4$), 납 테트라아세테이트 ($Pb(OAc)_4$) 및 칼륨 퍼루테네이트 ($KRuO_4$)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 산화제와 함께 인큐베이트하여 치료 단백질 상의 탄수화물 모이어티를 산화시키는 단계; 및 b) 상기 하이드라존 결합의 형성을 허용하는 친핵성 촉매의 존재에서, 상기 치료 단백질의 상기 산화된 탄수화물 모이어티와, 활성 하이드라자이드 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 하

이드라존 결합을 형성하는 단계; 여기서 활성 하이드라자이드 그룹을 함유하는 상기 수용성 폴리머는 폴리에틸렌 글라이콜 (PEG), 분지형 PEG, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), 폴리시알산 (PSA), 전분, 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록실에틸 전분 (HES), 탄수화물, 다당류, 풀루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트, 더마탄 설페이트, 전분, 덱스트란, 카복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글라이콜 (PAG), 폴리프로필렌 글라이콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일옥시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 여기서 상기 친핵성 촉매는 o-아미노 벤조산, m-아미노 벤조산, p-아미노 벤조산, 설파닐산, o-아미노벤즈아마이드, o-톨루이딘, m-톨루이딘, p-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, 및 p-아니시딘으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0048] 또 하나의 구현예에서, 하기 단계를 포함하는, 산화된 치료 단백질 상의 탄수화물 모이어티와, 활성 하이드라자이드 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 하이드라존 결합을 형성하는 방법: a) 상기 단백질을 나트륨 페리오데이트 ($NaIO_4$), 납 테트라아세테이트 ($Pb(OAc)_4$) 및 칼륨 퍼루테네이트 ($KRuO_4$)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 산화제와 함께 인큐베이트하여 치료 단백질 상의 탄수화물 모이어티를 산화시키는 단계; 및 b) 상기 하이드라존 결합의 형성을 허용하는 친핵성 촉매의 존재에서, 상기 치료 단백질의 상기 산화된 탄수화물 모이어티와, 활성 하이드라자이드 그룹을 함유하는 활성화된 수용성 폴리머 사이에서 하이드라존 결합을 형성하는 단계; 여기서 상기 치료 단백질은 인자 IX (FIX), 인자 VIII (FVIII), 인자 VIIa (FVIIa), 폰빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF),ADAMTS 13 프로테아제, IL-1 알파, IL-1 베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, 콜로니 자극 인자-1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), EPO, 인터페론-알파 (IFN-알파), 공통 인터페론, IFN-베타, IFN-감마, IFN-오메가, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 알파, IL-33, 트롬보포이에틴 (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 1 (ANGPTL1), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 2 (ANGPTL2), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 3 (ANGPTL3), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 4 (ANGPTL4), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 5 (ANGPTL5), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 6 (ANGPTL6), 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 7 (ANGPTL7), 바이트로넥틴, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 안지오게닌, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 골형성 단백질-1, 골형성 단백질-2, 골형성 단백질-3, 골형성 단백질-4, 골형성 단백질-5, 골형성 단백질-6, 골형성 단백질-7, 골형성 단백질-8, 골형성 단백질-9, 골형성 단백질-10, 골형성 단백질-11, 골형성 단백질-12, 골형성 단백질-13, 골형성 단백질-14, 골형성 단백질-15, 골형성 단백질 수용체 IA, 골형성 단백질 수용체 IB, 골형성 단백질 수용체 II, 뇌 유래 신경친화성 인자, 카디오트로핀-1, 섬모 신경친화성 인자, 섬모 신경친화성 인자 수용체, 크립토, 크립틱, 시토카인 유래 중성구 화학주성 인자 1, 시토카인 유래 중성구, 화학주성 인자 2α, 시토카인 유래 중성구 화학주성 인자 2β, β 내피 세포 성장 인자, 엔도텔린 1, 표피 성장 인자, 에피겐, 에피레귤린, 상피-유래된 중성구 유인체, 섬유아세포 성장 인자 4, 섬유아세포 성장 인자 5, 섬유아세포 성장 인자 6, 섬유아세포 성장 인자 7, 섬유아세포 성장 인자 8, 섬유아세포 성장 인자 8b, 섬유아세포 성장 인자 8c, 섬유아세포 성장 인자 9, 섬유아세포 성장 인자 10, 섬유아세포 성장 인자 11, 섬유아세포 성장 인자 12, 섬유아세포 성장 인자 13, 섬유아세포 성장 인자 16, 섬유아세포 성장 인자 17, 섬유아세포 성장 인자 19, 섬유아세포 성장 인자 20, 섬유아세포 성장 인자 21, 산성 섬유아세포 성장 인자, 염기성 섬유아세포 성장 인자, 신경아교세포계-유래된 신경친화성 인자 수용체 α1, 신경아교세포계-유래된 신경친화성 인자 수용체 α2, 성장 관련 단백질, 성장 관련 단백질 α, 성장 관련 단백질 β, 성장 관련 단백질 γ, 헤파린 결합 표피 성장 인자, 간세포 성장 인자, 간세포 성장 인자 수용체, 간종양-유래된 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자 I, 인슐린-유사 성장 인자 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 II, 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질, 케라틴생성세포 성장 인자, 백혈병 억제 인자, 백혈병 억제 인자 수용체 α, 신경 성장 인자 신경 성장 인자 수용체, 뉴로포이에틴,뉴로트로핀-3, 뉴로트로핀-4, 온코스타틴 M (OSM), 태반 성장 인자, 태반 성장 인자 2, 혈소판-유래된 내피 세포 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자 A 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 AA, 혈소판 유래 성장 인자 AB, 혈소판 유래 성장 인자 B 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 BB, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 α, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 β, B형 전구세포 성장 자극 인자, 줄기세포 인자 (SCF), 줄기세포 인자 수용체, TNF, TNF0, TNF1, TNF2, 변형 성장 인자 α, 변형 성장 인자 β, 변형 성장 인자 β1, 변형 성장 인자 β1.2, 변형 성장 인자 β2, 변형 성장 인자 β3, 변형 성장 인자 β5, 잠재형 변형 성장 인자 β1, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 I, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 II, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 III, 흉선 기질 림포포이에틴 (TSLP), 종양 괴사 인자 수용체 유형 I, 종양 괴사 인자 수용체 유형 II,

유로키나아제-유형 플라스미노겐 활성제 수용체, 포스포리파아제 활성 단백질 (PUP), 인슐린, 렉틴 리신, 프로락틴, 융모성 생식선, 난포자극 호르몬, 갑성선 자극 호르몬, 조직 플라스미노겐 활성제, IgG, IgE, IgM, IgA, 및 IgD, α-갈라토시다아제, β-갈라토시다아제, DNAse, 페투인, 황체형성 호르몬, 에스트로겐, 인슐린, 알부민, 지단백질, 태아단백, 트랜스페린, 트롬보포이에틴, 유로키나아제, 인테그린, 트롬빈, 렙틴, Humira (아달리무맙), Prolia (데노수맙), Enbrel (에타네르셉트), 표 1로부터의 단백질, 또는 생물학적 활성 단편, 그의 유도체 또는 변형으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 여기서 활성 하이드라자이드 그룹을 함유하는 상기 수용성 폴리머는 폴리에틸렌 글라이콜 (PEG), 분지형 PEG, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), 폴리시알산 (PSA), 전분, 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록실에틸 전분 (HES), 탄수화물, 다당류, 풀루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트, 더마탄 설페이트, 전분, 덱스트란, 카복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글라이콜 (PAG), 폴리프로필렌 글라이콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일옥시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 여기서 상기 친핵성 촉매는 o-아미노 벤조산, m-아미노 벤조산, p-아미노 벤조산, 설파닐산, o-아미노벤즈아마이드, o-톨루이딘, m-톨루이딘, p-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, 및 p-아니시딘으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

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

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

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

[0052] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 상기 수용성 폴리머는 하기를 포함하는 방법으로 제조된다: a) 상기 산화된 수용성 폴리머 및 활성화된 아미노옥시 링커 사이의 안정한 옥심 결합의 형성을 허용하는 조건 하에서, 산화된 수용성 폴리머를 포함하는 용액을, 활성 아미노옥시 그룹을 포함

하는 활성화된 아미노옥시 링커와 함께 인큐베이트하는 단계로서, 상기 조건은 약 1 분 내지 약 24 시간의 지속시간; 약 2 ℃ 내지 약 37 ℃의 온도; 광의 존재 또는 부재에서, 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하고; 이로써 활성 아미노옥시 그룹을 형성하는 수용성 폴리머를 형성하는 단계; b) 단계 a)의 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 수용성 폴리머를 포함하는 용액을 친핵성 촉매와 함께, 1 분 및 24 시간의 지속시간; 2 ℃ 내지 37 ℃의 온도; 광의 존재 또는 부재에서; 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하는 조건 하에서 인큐베이트 하는 단계; c) 상기 산화된 수용성 폴리머 및 활성화된 아미노옥시 링커 사이에 안정한 알콕사민 결합의 형성을 허용하는 조건 하에서, 단계 b)의 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 수용성 폴리머를 포함하는 용액을 환원제와 함께 인큐베이트하는 단계로서, 상기 조건은 약 1 분 내지 약 24 시간의 지속시간; 약 2 ℃ 내지 약 37 ℃의 온도; 광의 존재 또는 부재에서; 및 교반하면서 또는 하지 않으면서를 포함하는 단계; 및 d) 크로마토그래피, 여과 및 침전으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법으로 활성 아미노옥시 그룹을 함유하는 수용성 폴리머를 정제하는 단계.

[0053] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 여기서 상기 산화된 수용성 폴리머는 폴리에틸렌 글라이콜 (PEG), 분지형 PEG, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), 폴리시알산 (PSA), 전분, 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록실에틸 전분 (HES), 탄수화물, 다당류, 풀루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트, 더마탄 설페이트, 전분, 텍스트란, 카복시메틸-텍스트란, 폴리알킬렌 옥사이드 (PAO), 폴리알킬렌 글라이콜 (PAG), 폴리프로필렌 글라이콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일옥시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 상기 수용성 폴리머는 산화제로 인큐베이션에 의해 산화되어 수용성 폴리머의 비-환원 말단에서 말단 알데하이드 그룹을 형성한다. 일 구현예에서, 수용성 폴리머는 PSA이다.

[0054] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 산화제는 $NaIO_4$이다.

[0055] 또 다른 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 아미노옥시 링커는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된다:

[0056] a) 하기 식의 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 링커:

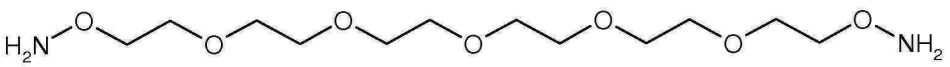
[0057] ,

[0058] b) 하기 식의 3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민 링커:

[0059]

[0060] 및

[0061] c) 하기 식의 3,6,9,12,15-펜나톡사-헵타데칸-1,17-디옥시아민 링커:

[0062]  .

[0063] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 환원제는 나트륨 시아노보로하이드라이드 ($NaCNBH_3$), 아스코르브산 (비타민 C) 및 $NaBH_3$이다. 일 구현예에서, 환원제는 나트륨 시아노보로하이드라이드 ($NaCNBH_3$)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0064] 또 하나의 구현예에서, 상기 방법이 제공되고, 상기 친핵성 촉매는 o-아미노 벤조산, m-아미노 벤조산, p-아미노 벤조산, 설파닐산, o-아미노벤즈아마이드, o-톨루이딘, m-톨루이딘, p-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, 및 p-아니시딘으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 친핵성 촉매는 m-톨루이딘이다. 또 하나의 구현예에서, 친핵성 촉매는 최종 농도 약 1.0 mM 내지 약 50 mM의 친핵성 촉매로 되는 양으로 첨가된다.

[0065] 또 하나의 구현예에서, 상기 언급된 방법이 제공되고, 이 방법은 한외-/정용여과 (UF/DF)에 의해 콘주게이트된 치료 단백질을 농축하는 것을 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0066] 도 1은 응고 인자 IX (서열번호: 1)의 일차구조를 보여준다.

도 2는 산화된 rFIX의 아미노옥시-PSA에의 커플링을 보여준다.

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

도 4는 아미노옥시-PSA의 제조를 보여준다.

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

도 6은 다양한 친핵성 촉매에 의한 폴리시알릴화의 퍼센트를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] **발명의 상세한 설명**

[0068] 치료학적 단백질의 약물학적 및 면역학적 특성은, 화학적 변형 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 분지형 PEG, 폴리시알산 (PSA), 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록실에틸 전분 (HES), 탄수화물, 폴리사카라이드, 풀루란, 키토산, 히알루론산, 황산 콘드로이틴, 황산 더마탄, 녹말, 덱스트란, 카복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 옥시드 (PAO), 폴리알킬렌 글리콜 (PAG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-말레인산 무수물 공중합체, 폴리스테렌-말레인산 무수물 공중합체, 폴리 (1-히드록시메틸에틸렌 히드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일록시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)와 같은 폴리머 화합물과의 콘주게이션에 의하여 개선될 수 있다. 상기 결과로 생성된 복합체의 특성은 일반적으로, 상기 폴리머의 구조 및 크기에 영향을 받는다. 따라서, 규정된 가느다란 크기 분포를 갖는 폴리머가 당해 기술분야에서 통상적으로 바람직하다. PSA는 가느다란 크기 분포를 갖는 최종 PSA 제제를 제공하는 그러한 방식으로 정제될 수 있는 반면, PEG와 같은 합성 폴리머는 가느다란 크기 분포로 쉽게 제조될 수 있다. 또한, 규정된 폴리머 쇄 및 좁은 크기 분포를 갖는 페길화 시약은 판매 중에 있으며, 합리적인 가격으로 상업적으로 이용 가능하다.

[0069] 폴리시알릴화를 통하는 것과 같은 가용성 폴리머의 첨가는, 치료 단백질 예컨대 치료 단백질 FIX뿐만 아니라 그 밖의 다른 응고 단백질들 (예를 들어, VWF, FVIIa (예를 들어, 본 발명에 참고로서 통합된 US 2008/0221032 A1 참조) 및 FVIII)의 특성을 개선시키는 한가지 접근 방법이다.

[0070] **치료 단백질**

[0071] 본 발명의 어떤 구현예에서, 상기 언급된 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드는 하기 치료 단백질에 의해 예시된다: 효소, 항원, 항체, 수용체, 혈액응고 단백질, 성장 인자, 호르몬, 및 리간드. 어떤 구현예들에서, 치료 단백질은 혈액응고 단백질 예컨대 인자 IX (FIX), 인자 VIII (FVIII), 인자 VIIa (FVIIa), 폰빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF) 또는 ADAMTS 13 프로테아제. 일 구현예에서, 본 발명에 따른 치료 단백질은 당단백질, 또는 다양한 구현예에서, 생체내에서 자연적으로 글리코실화되지 않는 단백질 (즉, 천연 글라이코실화 부위를 함유하지 않는 단백질 또는 정제 전에 호스트 세포에서 글리코실화되지 않는 단백질)이다.

[0072] 어떤 구현예들에서, 치료 단백질은 하기이다: 면역글로불린, 시토카인 예컨대 IL-1 알파, IL-1 베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, 콜로니 자극 인자-1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), EPO, 인터페론-알파 (IFN-알파), 공통 인터페론, IFN-베타, IFN-감마, IFN-오메가, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 알파, IL-33, 트롬보포이에틴 (TPO), 안지오포이에틴, 예를 들면 Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, 인간 안지오포이에틴-유사 폴리펩티드 ANGPTL1 내지 7, 바이트로넥틴, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 안지오게닌, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 골형성 단백질-1, 골형성 단백질-2, 골형성 단백질-3, 골형성 단백질-4, 골형성 단백질-5, 골형성 단백질-6, 골형성 단백질-7, 골형성 단백질-8, 골형성 단백질-9, 골형성 단백질-10, 골형성

단백질-11, 골형성 단백질-12, 골형성 단백질-13, 골형성 단백질-14, 골형성 단백질-15, 골형성 단백질 수용체 IA, 골형성 단백질 수용체 IB, 골형성 단백질 수용체 II, 뇌 유래 신경친화성 인자, 카디오트로핀-1, 섬모 신경친화성 인자, 섬모 신경친화성 인자 수용체, 크립토, 크립틱, 시토카인 유래 중성구 화학주성 인자 1, 시토카인 유래 중성구, 화학주성 인자 2α, 시토카인 유래 중성구 화학주성 인자 2β, β 내피 세포 성장 인자, 엔도텔린 1, 표피 성장 인자, 에피겐, 에피레귤린, 상피-유래된 중성구 유인체, 섬유아세포 성장 인자 4, 섬유아세포 성장 인자 5, 섬유아세포 성장 인자 6, 섬유아세포 성장 인자 7, 섬유아세포 성장 인자 8, 섬유아세포 성장 인자 8b, 섬유아세포 성장 인자 8c, 섬유아세포 성장 인자 9, 섬유아세포 성장 인자 10, 섬유아세포 성장 인자 11, 섬유아세포 성장 인자 12, 섬유아세포 성장 인자 13, 섬유아세포 성장 인자 16, 섬유아세포 성장 인자 17, 섬유아세포 성장 인자 19, 섬유아세포 성장 인자 20, 섬유아세포 성장 인자 21, 산성 섬유아세포 성장 인자, 염기성 섬유아세포 성장 인자, 신경아교세포계-유래된 신경친화성 인자 수용체 α1, 신경아교세포계-유래된 신경친화성 인자 수용체 α2, 성장 관련 단백질, 성장 관련 단백질 α, 성장 관련 단백질 β, 성장 관련 단백질 γ, 헤파린 결합 표피 성장 인자, 간세포 성장 인자, 간세포 성장 인자 수용체, 간종양-유래된 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자 I, 인슐린-유사 성장 인자 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 II, 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질, 케라틴생성세포 성장 인자, 백혈병 억제 인자, 백혈병 억제 인자 수용체 α, 신경 성장 인자 신경 성장 인자 수용체, 뉴로포이에틴, 뉴로트로핀-3, 뉴로트로핀-4, 온코스타틴 M (OSM), 태반 성장 인자, 태반 성장 인자 2, 혈소판-유래된 내피 세포 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자 A 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 AA, 혈소판 유래 성장 인자 AB, 혈소판 유래 성장 인자 B 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 BB, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 α, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 β, B형 전구세포 성장 자극 인자, 줄기세포 인자 (SCF), 줄기세포 인자 수용체, TNF (TNF0, TNF1, TNF2 포함), 변형 성장 인자 α, 변형 성장 인자 β, 변형 성장 인자 β1, 변형 성장 인자 β1.2, 변형 성장 인자 β2, 변형 성장 인자 β3, 변형 성장 인자 β5, 잠재형 변형 성장 인자 β1, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 I, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 II, 변형 성장 인자 β 결합 단백질 III, 흉선 기질 림포포이에틴 (TSLP), 종양 괴사 인자 수용체 유형 I, 종양 괴사 인자 수용체 유형 II, 유로키나아제-유형 플라스미노겐 활성제 수용체, 혈관 내피 성장 인자, 및 키메라 단백질 및 그의 생물학적으로 또는 면역학적으로 활성인 단편.

[0073] 어떤 구현예들에서, 치료 단백질은 하기이다: 알파-, 베타-, 및 감마-인터페론, 과립구 콜로니 자극 인자 포함 콜로니 자극 인자, 섬유아세포 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 포스포리파아제 활성 단백질 (PUP), 인슐린, 식물성 단백질 예컨대 렉틴 및 리신, 종양 괴사 인자 및 관련 대립유전자, 가용성 형태의 종양 괴사 인자 수용체, 인터루킨 수용체 및 가용성 형태의 인터루킨 수용체, 성장 인자 예컨대 조직 성장 인자, 예컨대 TGFα 또는 TGFβ 및 표피 성장 인자, 호르몬, 스마토메틴, 색소 호르몬, 시상하부 방출 인자, 항이뇨 호르몬, 프로락틴, 융모성 생식선, 난포자극 호르몬, 갑성선 자극 호르몬, 조직 플라스미노겐 활성제, 및 면역글로불린 예컨대 IgG, IgE, IgM, IgA, 및 IgD, 갈라토시다아제, α-갈라토시다아제, β-갈라토시다아제, DNAse, 페투인, 황체형성 호르몬, 에스트로겐, 코르티코스테로이드, 인슐린, 알부민, 지단백질, 태아단백, 트랜스페린, 트롬보포이에틴, 유로키나아제, DNase, 인테그린, 트롬빈, 조혈 성장 인자, 렙틴, 글라이코시다제, 휴미라 (아달리무맙), 프롤리아 (데노수맙), Enbrel (에타네르셉트), 및 그의 단편, 또는 임의의 상기 언급된 단백질 또는 그의 단편을 포함하는 임의의 융합 단백질. 상기 언급된 단백질 외에, 하기 표 1은 본 발명에 의해 고려된 치료 단백질을 제공한다:

[0074]

표 1

소포성 수지상 세포 분비 펩티드	안지오텐신-전환 효소	인터루킨-1 패밀리 멤버 6	헤르스타틴
데모카인	항트롬빈-III	전립선 및 정소 발현된 단백질 2	류신 풍부 반복체 함유 단백질 28
분비 프리즐드 관련 단백질 1	아포지방단백질 B-100	그룹 XIIA 분비 포스포리파아제 A2	LRRN4 C-말단-유사 단백질
엑토다이스플라신-A	아포지방단백질 D	아교질 알파-3(V) 사슬	Ly6/PLAUR 도메인 함유 단백질 2
분비 프리즐드 관련 단백질 2	아포지방단백질 E	알파-2-매크로글로불린-유사 단백질 1	막통과 단백질 81
레지스틴	베타-1,4-갈락토실트랜스페라제 1	더마토폰틴	마이엘린 단백질 제로-유사 단백질 3
오스테오폰틴	골형성 단백질 7	연골-연관 단백질	단백질 홀배판 동족체
분비 프리즐드 관련 단백질 5	보체 C1q 하위성분 서브유닛 B	데저트 헤지혹 단백질	UDP-글루쿠로노실트랜스페라제 3A2
분비 프리즐드 관련 단백질 4	C4b-결합 단백질 알파 사슬	세포외 매트릭스 단백질 2	프로토카드헤린 알파-1
분비 인단백질 24	칼레틴큘린	위 내인성 인자	포스포리파아제 D4
글라이피칸-6	코르티코스테로이드 결합 글로불린	인터루킨-33	레티놀 탈수소효소 10
분비 프리즐드 관련 단백질 3	카복시펩타다아제 A1	골형성 단백질 2	시알산 결합 Ig-유사 렉틴 14
C-C 모티프 케모카인 4	카복시펩타다아제 A2	골형성 단백질 6	막통과 단백질 161A
멜라닌세포 단백질 Pmel 17	에오탁신	무특징 단백질 KIAA0564	막통과 단백질 161B
분비 Ly-6/uPAR 관련 단백질 1	C-C 모티프 케모카인 13	세르베러스	막통과 단백질 182
베타-마이크로세미노단백질	C-C 모티프 케모카인 18	탄수화물 설포트랜스페라제 8	단백질 FAM24B
글라이피칸-4	C-C 모티프 케모카인 20	콘탁틴-연관 단백질-유사 3	막통과 단백질 52
종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 15	골수 세포 2 상에서 발현된 유발성 수용체	그룹 XIIB 분비 포스포리파아제 A2-유사 단백질	주요 촉진인자 슈퍼패밀리 도메인 함유 단백질 4
레지스틴-유사 베타	C-C 모티프 케모카인 2	코르티콜리베린	UDP-글루쿠로노실트랜스페라제 2A3
종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 12	변형 성장 인자-베타 유래 단백질 ig-h3	트롬보스폰딘 모티프 19 를 갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나아제	치원성 사기질모세포-연관 단백질
SPARC	CD40 리간드	UPF0556 단백질 C19orf10	신경분비 단백질 VGF
글라이피칸-5	코르네오데스모신	C-X-C 모티프 케모카인 3	분비 인단백질 2, 24kDa
전방 구배 단백질 2 동족체	보체 인자 D	시스타틴-M	단백질 FAM150B
단백질 캐노피 동족체 2	크로모그라닌-A	데펜신-5	성장/분화 인자 9
글라이피칸-1	아교질 알파-1(I) 사슬	데펜신-6	클러스테린-유사 단백질 1
폰빌레브란트 인자 A 도메인 함유 단백질 2	디신테그린 및 메탈로프로티나아제 도메인 함유 단백질 18	트롬보스폰딘 모티프 18 를 갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나아제	막통과 및 면역글로불린 도메인 함유 단백질 2
WNT1-유도가능한-신호전달 경로 단백질 1	시스테인 풍부 분비 단백질 LCCL 도메인 함유 1	트롬보스폰딘 모티프 3 를 갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나아제	C-유형 렉틴 도메인 함유 단백질 UNQ5810/PRO19627
C-C 모티프 케모카인 1	아교질 알파-4(IV) 사슬	딕콥프 관련 단백질 4	부정소-특이적 리포칼린-10
SPARC 관련 모듈라 칼슘-결합 단백질 2	케라틴생성세포 분화-연관 단백질	트롬보스폰딘 모티프 5 를 갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나아제	트롬보스폰딘 모티프 8 을 갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나아제
C-유형 렉틴 도메인 패밀리 11 멤버 A	보체 C4-B	포유류 에펜다이민 관련 단백질 1	부정소-특이적 리포칼린-8
분비 Ly-6/uPAR 관련 단백질 2	아교질 알파-2(V) 사슬	피브릴린-3	염기성 프롤린 풍부 펩티드 P-E
글라이피칸-3	보체 C5	페투인-B	추정 무특징 단백질 C10orf99
분비 및 막통과 단백질 1	아교질 알파-1(VII) 사슬	섬유아세포 성장 인자 6	무특징 단백질 C17orf77

정소-발현된서열264단백질	보체 성분 C7	케라틴생성세포성장인자	아릴아세트아마이드 탈아세틸화효소-유사2
글라이피칸-2	보체 성분 C8 베타 사슬	성장 분화 인자8	부정소-특이적 리포칼린-12
세린 프로테아제 23	보체 성분 C8 감마 사슬	위 억제 폴리펩티드	B 흑색종 항원 2
39S 리보솜 단백질 L55, 미토콘드리알	아교질 알파-1(XV) 사슬	당단백질 호르몬 베타-5	B 흑색종 항원 3
단백질 NipSnap 동족체 3A	아교질 알파-1(XVI) 사슬	그란자임 M	소정자 혈장 단백질 동족체 1
파리브로백틴	아교질 알파-1(XVIII) 사슬	가스트린-방출 펩티드	보체 C1q-유사 단백질 3
뉴데신	아교질 알파-1(XIX) 사슬	세린 프로테아제 HTRA1	UPF0365 단백질 C2orf69
섬유아세포 성장 인자 수용체 2	연골 올리고머 매트릭스 단백질	인터페론 알파-4	UPF0669 단백질 C6orf120
탄산탈수소효소 6	C-반응성 단백질	인터페론 알파-5	클리피제-유사 단백질 C6orf127
억성 뇌종양 1 단백질에서 결실됨	과립구 콜로니-자극 인자	인터페론 알파-7	무특징 단백질 C7orf69
SPARC 관련 모듈라 칼슘-결합 단백질 1	과립구-대식세포 콜로니-자극 인자	트롬보스폰딘 모티프 7 를갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나아제	혈소판-유래된 성장 인자 수용체-유사 단백질
아밀로이드 베타 A4 단백질	단백질 CYR61	면역글로불린 슈퍼패밀리 멤버 10	론드로아드헤린-유사 단백질
종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 6	보체 성분 수용체 1-유사 단백질	21kDa 의 프로테아제-연관 도메인 함유 단백질	추정 무특징 단백질 UNQ6490/PRO21339
감마-아미노부티르산 유형 B 수용체 서브유닛 1	쫄기세포 성장 인자; 림프구 분비 C-유형 렉틴	알하이드로라제 도메인 함유 단백질 FAM108A1	추정 무특징 단백질 UNQ6493/PRO21345
프로-뉴레글린-1, 막-결합된 동형체	CMP-N-아세틸뉴라미네이트-베타-갈락토스아마이드-알파-2,3-시알릴트랜스페라제	트롬보스폰딘 모티프 9 를갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나아제	추정 무특징 단백질 UNQ3815/PRO19632
당단백질 호르몬 알파-2	디펩티딜 펩타다아제 4	인터루킨-9 수용체	시스타틴-A
막 메탈로엔도펩타다제-유사 1	덴틴 시알로포스포프로테인	인터루킨-9	펩타다아제 억제제 R3HDML
Fc 수용체-유사 A	엔도델린-1	인히빈 베타 B 사슬	시스타틴-9
C-C 모티프 케모카인 4-유사	에프린-B1	세린 프로테아제 억제제 카텝-유형 2	DAN 도메인 패밀리 멤버 5
상피 디스코이딘 도메인 함유 수용체 1	표피-특이적 세린 프로테아제-유사 단백질	BMP 결합 내피 조절자 단백질	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질-유사 1
뮤신-1	에밀린-1	케라틴생성세포-연관 단백질 2	부정소 정자-결합 단백질 1
혈관 내피 성장 인자 A	엔도플라스민	라미닌 서브유닛 알파-1	엘라핀
피콜린-1	에프린 유형 A 수용체 3	백혈구 세포-유래된 케모탁신-2	단백질 FAM55A
프로락틴 수용체	에프린 유형 B 수용체 6	위 트리아실글리세롤 리파제	성장 분화 인자 6
전구단백질 전환효소 서브틸리신/켁신 유형 6	글라이코실트랜스페라제 1 도메인 함유 단백질 1	류신 풍부 반복 및 칼포닌 동족관계 도메인 함유 단백질 3	글루코오스-푸룩토오스 옥시도리덕타제 도메인 함유 단백질 1
CD209 항원	응고 인자 X	췌장 리파제 관련 단백질 2	에리트로포이에틴
아교질 알파-2(XI) 사슬	응고 인자 VIII	부고환-특이적 알파-만노시다아제	글루타티온 페록시다아제 6
과립구-대식세포 콜로니-자극 인자 수용체 서브유닛 알파	보체 C1q 종양 괴사 인자 관련 단백질 7	파리브로넥틴 유형 III 도메인 함유 단백질 7	무특징 단백질 UNQ511/PRO1026
엘라스틴	피브릴린-2	마이크로피브릴라-연관 단백질 5	베타-데펜신 128
인터루킨-15 수용체 서브유닛 알파	알파-2-HS-당단백질	월라관 억제 인자	인터루킨-31
미드카인	섬유아세포 성장 인자 10	메트릭스 메탈로프로티나아제-21	인터루킨-34
인테그린 알파-7	피브리노겐 알파 사슬	매트릭스 메탈로프로티나아제-17	혈장 칼리크레인-유사 단백질 4
뮤신-4	피브리노겐 베타 사슬	매트릭스 메탈로프로티나아제-20	부정소-특이적 리포칼린-9
펩티딜-글리신 알파-아미드화 모노옥시게나제	긴 구개, 폐 및 비강 상피 암종-연관 단백질 1	N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스페라제 서브유닛 감마	cDNA FLJ60957, 분비 프리폴드 관련 단백질 4 와 아주 유사

[0075]

[0076]

아포지방단백질 A-I	가스트린	멀티메린-2	리파제 멤버 M
프로테오글라이칸 4	당단백질 호르몬 알파 사슬	프로모틸린	CLECSF12
종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 25	N-아세틸글루코사민-1-포소포트랜스페라제 서브유닛 알파/베타	FRAS1 관련 세포외 매트릭스 단백질 3	추정 불활성 그룹 IIC 분비 포스포리파아제 A2
아트락틴	그란자임 A	단백질 키나아제 C-결합 단백질 NELL1	세린 프로테아제 MPN2
전립선-연관 마이크로세미노단백질	간세포 성장 인자-유사 단백질	단백질 키나아제 C-결합 단백질 NELL2	네트린-5
알파-아밀라아제 1	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 1	뉴로트립신	NHL 반복 함유 단백질 3
뇌-유래된 신경친화성 인자	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 2	뉴로세르핀	올팍토메딘-유사 단백질 2B
C-유형 렉틴 도메인 패밀리 4 멤버 M	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 4	니도겐-2	오보치마제-2
과립구 콜로니-자극 인자 수용체	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 10D	압하이드로라제 도메인 함유 단백질 FAM108B1	추정 무특징 단백질 UNQ3029/PRO9830
인슐린-유사 성장 인자 II	인터페론 알파-1/13	뉴로트로핀-4	오보치마제-1
암배아항원 관련 세포 접착 분자 1	인터페론 유래 헬리카제 C 도메인 함유 단백질 1	부정소 분비 글루타티온 페록시다아제	추정 임신-특이적 베타-1-당단백질 7
C-유형 렉틴 도메인 패밀리 7 멤버 A	인터페론 알파-2	그룹 10 분비 포스포리파아제 A2	오보스타틴 동족체 2
CMRF35-유사 분자 1	인터페론 베타	그룹 IID 분비 포스포리파아제 A2	식욕유발 뉴로펩티드 QRFP
콜린 수송체-유사 단백질 4	인터페론 감마	락토페록시다아제	림프구 항원 6K
폐 표면활성제-연관 단백질 A1	인슐린-유사 성장 인자 IB	PMP-22 와 관련된 p53 세포자멸사 효과기	전립선 및 정소 발현된 단백질 1
스페르민 옥시다아제	인디안 헤지혹 단백질	태반-특이적 단백질 1	추정 포스포리파아제 B-유사 1
CMP-N-아세틸뉴라미네이트-베타-1,4-갈락토사이드 알파-2,3-시알릴트랜스페라제	신경 세포 접착 분자 L1-유사 단백질	39 잔기의 결절누두체 펩티드	추정 무특징 단백질 FLJ42147
칼리크레인-8	인터루킨-13	프로라르긴	오토겔린
조직-유형 플라스미노겐 활성제	인터루킨-2	세크레토그라닌-2	리보뉴클레아제 8
페록시좀 N(1)-아세틸-스페르민/스페르미딘 옥시다아제	키모트립신-유사 엘라스타제 패밀리 멤버 2A	엔도뉴클레아제 도메인 함유 1 단백질	핵공 복합체-상호작용 단백질-유사 2
정황적 팔미토일트랜스페라제 ZDHHC4	인히빈 베타 A 사슬	세마포린-3B	전활성제 폴리펩티드-유사 1
콜레스테릴 에스테르 전이 단백질	췌장 분비 트립신 억제제	소마토스타틴	단백질 스프린스터 동족체 2
HLA 클래스 I 조직적합성 항원, A-2 알파 사슬	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 21	탈수소효소/환원효소 SDR 패밀리 멤버 4-유사 2	폰빌레브란트 인자 C 도메인 함유 단백질 2-유사
아교질 알파-1(II) 사슬	인터-알파-트립신 억제제 중쇄 H1	트랜스코발라민-1	유로텐신-2B
프로-인터루킨-16	인터-알파-트립신 억제제 중쇄 H2	트레포일 인자 2	테트라스파닌-18
렙틴 수용체	인터-알파-트립신 억제제 중쇄 H3	테스티칸-1	UPF0514 막 단백질 FAM159A
데코린	전립선-특이적 항원	혈청 파라옥소나제/락토나제 3	라테린
기질 세포-유래된 인자 1	칼리크레인-4	톨로이드-유사 단백질 2	트랜스페라제-유사 단백질 7B
테나스신	혈장 칼리크레인	트립신-2	단백질 TEX261
디신테그린 및 메탈로프로티나아제 도메인 함유 단백질 12	칼슘-활성화 클로라이드 채널 조절자 4	RING 핑거 및 SPRY 도메인 함유 단백질 1	알킬화 DNA 복구 단백질 alkB 동족체 7
트롬보스폰딘 모티프 13 을 갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나아제	살균/침투성-증가 단백질-유사 1	칼슘 결합 및 꼬인 코일 도메인 함유 단백질 1	막통과 emp24 도메인 함유 단백질 6
T-세포 표면 당단백질 CD8 알파 사슬	렙틴	단백질 Wnt-2	XK 관련 단백질 5
EGFR-공동증폭된 및 과발현된 단백질	트롬보스폰딘 모티프 4 를 갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나아제	엑토뉴클레오사이드 트리포스페이트 디포스포하이드로라제 8	추정 V-셋 및 면역글로불린 도메인 함유 단백질 7

[0077]

자가소화작용 관련 단백질 16-1	간 트리아실글리세롤 리파제	단백질 Wnt-8b	인슐린 성장 인자-유사 패밀리 멤버 3
유방암 안티-에스트로겐 내성 단백질 3	림프구 항원 6 복합 부위 단백질 G6c	UDP-GlcNAc:betaGal 베타-1,3-N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제 4	핵공 복합체-상호작용 단백질-유사 1
카드헤린-23	에오시노필 라이소포스포리파아제	EMI 도메인 함유 단백질 1	분비 인단백질 1
대식세포 콜로니-자극 인자 1	루트로핀 서브유닛 베타	무특징 단백질 C6orf15	아교질 알파-5(VI) 사슬
엽산 수용체 알파	마이크로피브릴라-연관 단백질 1	콜렉틴-10	B 흑색종 항원 5
저밀도 지단백질 수용체 관련 단백질 8	중뇌 별아교세포-유래된 신경친화성 인자	장쇄-지방산--CoA 리가아제 ACSBG2	WAP 4-디설파이드 코아 도메인 단백질 10A
E3 우리퀴틴-단백질 리가아제 LRSAM1	매트릭스 Gla 단백질	종양단백질 유래 전사체 3 단백질	UPF0369 단백질 C6orf57
신경 세포 접착 분자 1	72 kDa 유형 IV 콜라게나제	펩타다아제 억제제 15	추정 무특징 단백질 C10orf31
뉴로리긴-4, X-연결	스트로멜라이신-1	프롤린 풍부 산성 단백질 1	추정 무특징 단백질 C11orf45
네트린-G1	중성구 콜라게나제	우로코르틴	무특징 단백질 C12orf28
GPI 트랜스아미다아제 성분 PIG-T	메소텔린	트립신-X3 (EC 3.4.21.4)	무특징 단백질 C17orf67
키트 리간드	뮤신-5AC	HHIP-유사 단백질 2	베타-데펜신 121
발작 6-유사 단백질	뮤신-6	프랙탈카인	베타-데펜신 130
SLAM 패밀리 멤버 7	노르린	단백질 Wnt-11	히스티딘 트리아드 뉴클레오타이드-결합 단백질 2
종양 괴사 인자	옥시토신-뉴로파이신 1	단백질 Wnt-7a	아페린
우로모듈린	베타-신경 성장 인자	FCH 및 이중 SH3 도메인 단백질 1	태반-특이적 단백질 9
종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 13	종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 18	간종양-유래된 성장 인자 관련 단백질 2	간세포 암종-연관 단백질 TD26
단백질 CREG1	뉴로트로핀-3	인터루킨-12 서브유닛 알파	페르세핀
EGF-유사 도메인 함유 단백질 8	혈소판-유래된 성장 인자 서브유닛 A	UPF0577 단백질 KIAA1324	조절된 내분비-특이적 단백질 18
아미노아실 tRNA 신테타제 착물-상호작용 다기능성 단백질 1	포스포판토테노일시스테인 탈탄산효소	보체 C1q 종양 괴사 인자 관련 단백질 9	보체 C1q 종양 괴사 인자 관련 단백질 8
ADAMTS-유사 단백질 4	플라스미노겐 활성제 억제제 1	뮤신-17	골형성 단백질 8A
응고 인자 XI	플라스미노겐 활성제 억제제 2	용해소체 단백질 NCU-G1	단백질 WFDC13
인터루킨-22 수용체 서브유닛 알파-2	프로콜라겐 C-엔도펩타다아제 인핸서 1	프롤릴 4-하이드록실라제 서브유닛 알파-3	단백질 Wnt-8a
변형된 표피 자가조절 인자 1 동족체	막통과 및 우리퀴틴-유사 도메인 함유 단백질 2	펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이소머라제 SDCCAG10	Ig-유사 도메인 함유 단백질 ENSP00000270642
푸로스타글란딘-H2 D-이소머라제	단백질 이황화물-이소머라제	펩타다아제 억제제 16	압하이드로라제 도메인 함유 단백질 15
알파-1-항트립신	안료 상피-유래된 인자	폴리오바이러스 수용체 관련 단백질 4	리보뉴클레아제-유사 단백질 9
알파-1-항키모트립신	펩신 A	용질 담체 패밀리 22 멤버 15	무특징 단백질 C2orf66
아실-CoA-결합 단백질	가스트릭신	GPI 이노시톨-데아실라제	무특징 단백질 C17orf99
보체 인자 B	소닉 헤지혹 단백질	막통과 단백질 43	단백질 FAM150A
코리오고나도트로핀 서브유닛 베타	펩티도글라이칸 인지 단백질 I-알파	안지오포이에틴 관련 단백질 2	태반-특이적 1-유사 단백질
베르시칸 핵심 단백질	바이글라이칸	안지오포이에틴 관련 단백질 6	무특징 단백질 C18orf20
표피 성장 인자 수용체	프로락틴-유도가능한 단백질	아릴설파타제 K	베타-데펜신 110
엑토-NOX 이황화물-티올 교환기 2	혈소판 인자 4	아우구린	뉴리틴-유사 단백질
히알루로니다제-1	플라스미노겐	뇌-특이적 세린 프로테아제 4	히스티딘 풍부 카복실 말단 단백질 1
인터루킨-1 수용체 길항제 단백질	혈청 파라옥소나제/아릴에스테라제 1	DBH-유사 모노옥시게나제 단백질 1	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 2 멤버 A

등록특허 10-2269494

[0078]

인터루킨-6 수용체 서브유닛 베타	알칼리성 인산분해효소, 태반 1 유형	무특징 단백질 C1orf56	류신 풍부 반복체 함유 단백질 70
인터루킨-1 수용체-유사 1	펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이소머라제 B	세레벨린-3	세르핀 A13
인슐린	골수 프로테오글라이칸	세레벨린-4	BTB/POZ 도메인 함유 단백질 17
글라이코델린	염기성 타액 프롤린 풍부 단백질 1	콜리파제-유사 단백질 C6orf126	무특징 단백질 C12orf53
부갑상선 호르몬 관련 단백질	폐 표면활성제-연관 단백질 C	무특징 단백질 C11orf83	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 9 멤버 A
뉴림	부갑상선 호르몬	무특징 단백질 C16orf89	보체 C1q-유사 단백질 4
프롤릴 4-하이드록실라제 서브유닛 알파-2	혈청 아밀로이드 P-성분	카복시펩타다아제-유사 단백질 X2	CMRF35-유사 분자 4
CD276 항원	세크레토그라닌-1	시스타틴-9-유사	단백질 FAM151B
EGF-유사 도메인 단백질 1 을 갖는 시스테인 풍부	기저막-특이적 헤파란 설페이트 프로테오글라이칸 핵심 단백질	탈수소효소/환원효소 SDR 패밀리 멤버 13	알하이드로라제 도메인 함유 단백질 FAM108A2/A3
CUB 및 스시 도메인 함유 단백질 1	안티류코프로테이나제	베타-데펜신 123	오스테오크린
피콜린-2	스타빌린-1	베타-데펜신 132	막통과 프로테아제, 세린 11E2
Fc 수용체-유사 단백질 5	세포외 수퍼록사이드 디스무타제 [Cu-Zn]	시토카인-유사 단백질 1	막통과 단백질 14E
단백질 GPR89	소마토트로핀	딕콥프 관련 단백질 2	막통과 단백질 207
접합 부착 분자 A	세르핀 B5	딕콥프-유사 단백질 1	TOMM20-유사 단백질 1
류신 풍부 반복체 함유 단백질 8A	스폰딘-1	부정소 분비 단백질 E3-베타	무특징 단백질 C3orf41
다중 이노시톨 폴리포스페이트 포스파타아제 1	염색체 단백질 3 의 구조 유지	EGF-유사 반복 및 디스코이딘 I-유사 도메인 함유 단백질 3	악하선 안드로겐-조절 단백질 3A
뉴로필린-1	신탁신-1A	단백질 FAM55D	B 흑색종 항원 1
플렉신-A4	테트라넥틴	섬유아세포 성장 인자 17	불활성 카복실에스테라제 4
플렉신-B1	변형 성장 인자 베타-1	섬유아세포 성장 인자 22	4-이음 박스 단백질 1
페리오스틴	티로글로불린	섬유아세포 성장 인자-결합 단백질 2	단백질 HSN2
단백질 RIC-3	메탈로프로티나아제 억제제 1	성장/분화 인자 3	휴마닌
SLIT 및 NTRK-유사 단백질 2	메탈로프로티나아제 억제제 2	GLIPR1-유사 단백질 1	키엘린/코르딘-유사 단백질
설파타제-변형 인자 1	메탈로프로티나아제 억제제 3	세린 프로테아제 억제제 카잘-유형 6	UPF0624 단백질 C6orf186
설파타제-변형 인자 2	유로키나아제-유형 플라스미노겐 활성제	인터루킨-17B	추정 뉴로피브로민 1-유사 단백질 4/6
막통과 프로테아제, 세린 6	락토트랜스페린	인터루킨-17C	페록시다신-유사 단백질
림프독소-알파	트립신-1	인터루킨-17D	SCO-스폰딘
종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 10B	악하선 안드로겐-조절 단백질 3B	히알루로난 및 프로테오글라이칸 링크 단백질 3	추정 무특징 단백질 UNQ9165/PRO28630
유로키나아제 플라스미노겐 활성제 표면 수용체	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 1A	난황 막 외층 단백질 1 동족체	칼슘-활성화 클로라이드 채널 조절자 패밀리 멤버 3
V-셋 도메인 함유 T-세포 활성화 억제제 1	혈관 내피 성장 인자 수용체 1	코리오고나도트로핀 서브유닛 베타 변이체 1	정황적 세린 프로테아제 UNQ9391/PRO34284
글루카곤	비타민 D-결합 단백질	리소자임-유사 단백질 1	무특징 단백질 C4orf26
N-아세틸뮤라모일-L-알라닌 아미다아제	바이트로넥틴	매트릭스 메탈로프로티나아제-28	무특징 단백질 C4orf40
설프히드릴 옥시다아제 1	폰빌레브란트 인자	네프로넥틴	무특징 단백질 C5orf55
탈수소효소/환원효소 SDR 패밀리 멤버 4	림프구 항원 6 복합 부위 단백질 G5c	WAP 4-디설파이드 코아 도메인 단백질 12	추정 대식세포-자극 단백질 MSTP9

[0079]

인터루킨-18-결합 단백질	아연-알파-2-당단백질	올팍토메딘-유사 단백질 1	무특징 단백질 C15orf61
IRRE-유사 단백질 2 의 킨(Kin)	무특징 단백질 C14orf93	올팍토메딘-유사 단백질 2A	키모트립시노겐 B2
골수-연관 분화 마커	레티노쉬신	세린 프로테아제 27	베타-데펜신 108A
코르딘	알파-1,3-만노실트랜스페라제 ALG2	세크레토글로빈 패밀리 3A 멤버 2	베타-데펜신 111
1-아실-sn-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스페라제 감마	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 11, 멤버 A, 아이소형 CRA_b	트롬보스폰딘 모티프 2 를 갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나아제	추정 V-셋 및 면역글로불린 도메인 함유 단백질 6
발전한 글라이코실화 최종 생성물-특이적 수용체	주요 촉진인자 슈퍼패밀리 도메인 함유 단백질 7	디신테그린 및 메탈로프로티나아제 도메인 함유 단백질 28	세린 프로테아제 억제제 카잘-유형 5-유사 3
NLR 패밀리 CARD 도메인 함유 단백질 4	류신 풍부 반복 막통과 신경 단백질 1	살균/침투성-증가 단백질-유사 2	추정 세린 프로테아제 억제제 카잘-유형 5-유사 2
프로-뉴레귤린-2, 막-결합된 동형체	NADH 탈수소효소 [유비퀴논] 1 베타 서브콤플렉스 서브유닛 11, 미토콘드리알	산 스핑고미엘리나제-유사 포스포디에스테라제 3b	탈수소효소/환원효소 SDR 패밀리 멤버 7C
정자-연관 항원 11A	UPF0546 막 단백질 C1orf91	세린 프로테아제 억제제 카잘-유형 7	베타-데펜신 131
난모세포-분비 단백질 1 동족체	탄산탈수소효소 관련 단백질 10	뉴렉소필린-4	베타-데펜신 134
혈청 알부민	콜레시스토키닌	단백질 Wnt-9b	베타-데펜신 136
코클린	코다닌-1	자이모겐 과립 단백질 16 동족체 B	베타-데펜신 116
혈장 프로테아제 C1 억제제	무특징 단백질 C6orf89	세마포린-3D	단백질 FAM132A
인터루킨-7 수용체 서브유닛 알파	콘드로이틴 설페이트 글루쿠로닐트랜스페라제	아포지방단백질 L4	단백질 FAM132B
인터-알파-트립신 억제제 중쇄 H5	킬티나제 도메인 함유 단백질 1	막통과 프로테아제, 세린 11D	베타-데펜신 115
혈소판-유래된 성장 인자 D	막통과 단백질 C9orf7	스크라피-반응성 단백질 1	베타-데펜신 114
단백질 S100-A7	CMRF35-유사 분자 9	추정 아넥신 A2-유사 단백질	세린 프로테아제 억제제 카잘-유형 9
시알산 결합 Ig-유사 렉틴 10	사이토크롬 P450 2S1	골형성 단백질 10	리파제 멤버 N
세뇨관간질성 신장염 항원-유사	부스러기 단백질 동족체 3	세크레토그라닌-3	췌장 리파제 관련 단백질 3
종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 13B	탈수소효소/환원효소 SDR 패밀리 멤버 7	보체 C1q 종양 괴사 인자 관련 단백질 4	정소, 전립선 및 태반-발현된 단백질
장쇄-지방산--CoA 리가아제 5	단백질 ENED	무특징 단백질 C1orf54	뉴로메딘-S
크라우딘-14	보체 인자 H 관련 단백질 4	카복시펩타다아제 A6	뉴로펩티드 S
류신 풍부 반복체 함유 단백질 20	류신 풍부 반복 LGI 패밀리 멤버 3	C-C 모티프 케모카인 19	뉴로날 펜트락신-유사 단백질 C16orf38
인터루킨-1 패밀리 멤버 7	글리오메딘	C-C 모티프 케모카인 25	오톨린-1
림프구 항원 6 복합 부위 단백질 G5b	글리세로포스포디에스테르 포스포디에스테라제 도메인 함유 단백질 5	키모트립신-유사 엘라스타제 패밀리 멤버 2B	절/아연 퍼플산 포스파타아제-유사 단백질
아세틸콜린에스테라제	정황적 G-단백질 연결 수용체 113	단백질 CEI	오보스타틴 동족체 1
아멜로게닌, X 동형체	정황적 G-단백질 연결 수용체 114	무특징 단백질 C6orf1	플라스미노겐 관련 단백질 A
안지오게닌	글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스페라제 4	무특징 단백질 C7orf34	폴리세라제-3
탄저병 독소 수용체 2	그렘린-1	케라틴생성세포-연관 단백질 3	추정 펩티드 YY-2
아넥신 A2	칼륨 통로 서브패밀리 K 멤버 17	무특징 단백질 C9orf47	추정 펩티드 YY-3
아포지방단백질 C-III	KDEL 모티프 함유 단백질 2	아교질 알파-1(VIII) 사슬	리보뉴클레아제-유사 단백질 10
아포지방단백질 L1	라이일린	무특징 단백질 C18orf54	리보뉴클레아제-유사 단백질 12
보체 C1q 하위성분 서브유닛 A	류신 풍부 반복체 함유 단백질 8B	시스타틴-유사 1	리보뉴클레아제-유사 단백질 13
보체 C1q 하위성분 서브유닛 C	류신 풍부 반복체 함유 단백질 8D	C2 도메인 함유 단백질 2	세르핀 A11
칼시토닌	시알산 결합 Ig-유사 렉틴 6	DDRGK 도메인 함유 단백질 1	쿠니즈-유형 프로테아제 억제제 4

[0080]

가용성 칼슘-활성화 뉴클레오티다제 1	임신-특이적 베타-1-당단백질 2	단백질 FAM55C	메테오린-유사 단백질
C-C 모티프 케모카인 15	Ly6/PLAUR 도메인 함유 단백질 1	아교질 알파-1(XXVI) 사슬	추정 정소 세린 프로테아제 2
CD97 항원 (	Ly6/PLAUR 도메인 함유 단백질 5	단백질 FAM19A2	베타-데펜신 112
콘탁틴-4	MLN64 N-말단 도메인 동족체	단백질 FAM5B	무특징 단백질 FLJ37543
보체 C2	대식세포 이동 억제 인자	섬유아세포 성장 인자 5	단백질 FAM24A
아교질 알파-6(IV) 사슬	2-아실글리세롤 O-아실트랜스페라제 3	정활적 세린 프로테아제 HTRA3	분비 프리즐드 관련 단백질 4
아교질 알파-2(VI) 사슬	미토콘드리아 담체 동족체 1	인터루킨-1 패밀리 멤버 8	보체 C1q-유사 단백질 2
아교질 알파-1(XI) 사슬	아포지방단백질 L6	세린 프로테아제 억제제 카잘-유형 4	추정 무특징 단백질 C17orf69
부스러기 동족체 1	프로토카드헤린 알파-6	오토스파이랄린	추정 시스타틴-13
시스타틴-C	프로토카드헤린 감마-A12	간-발현된 항균 펩티드 2	베타-데펜신 109
중성구 데펜신 1	전압 개폐 수소 통로 1	라이실 옥시다아제 동족체 1	베타-데펜신 113
엔도델린-3	올-트랜스-레티놀 13,14-환원효소	라이실 옥시다아제 동족체 2	베타-데펜신 135
저친화도 면역글로불린 엡실론 Fc 수용체	미세소관 운동 단백질 2 의 조절인자	긴 구개, 폐 및 비강 상피 암종-연관 단백질 4	펩타다아제 S1 도메인 함유 단백질 LOC136242
섬유아세포 성장 인자 수용체 3	R-스폰딘-4	리소자임 g-유사 단백질 2	성장/분화 인자 7
섬유아세포 성장 인자 수용체 4	장쇄 지방산 운반 단백질 3	엔도뮤신	IgA-유도 단백질 동족체
성장 정지-특이적 단백질 6	소포-유통 단백질 SEC22c	뉴로펩티드 B	추정 리포칼린 1-유사 단백질 1
성장 호르몬 수용체	크라우딘-1	키네신-유사 단백질 KIF7	추정 세린 프로테아제 29
이작용성 UDP-N-아세틸글루코사민 2-에피머라제/N-아세틸만노오스아민 키나아제	류신 풍부 반복체 및 면역글로불린-유사 도메인 단백질 3	백혈구-연관 면역글로불린-유사 수용체 2	추정 스캐빈져 수용체 시스테인 풍부 도메인 함유 단백질 LOC619207
면역글로불린 슈퍼패밀리 멤버 8	SLAM 패밀리 멤버 9	칼슘-의존성 포스포리파아제 A2	세크레토글로빈-유사 단백질
인터루킨-4 수용체 알파 사슬	트랜스티레틴	프로아폽토틱 카스파제 어댑터 단백질	추정 스테레오실린-유사 단백질
칼리크레인-14	세린/트레오닌-단백질 키나아제 32B	인테그린 베타-유사 단백질 1	인슐린 성장 인자-유사 패밀리 멤버 2
칼리크레인-6	혈소판-유래된 성장 인자 서브유닛 B	톨로이드-유사 단백질 1	KIR2DL4
라미닌 서브유닛 베타-3	노긴	쿠니츠-유형 프로테아제 억제제 3	추정 아연-알파-2-당단백질-유사 1
류실-시스티닐 아미노펩티다아제	트립타제 알파-1	단백질 TMEM155	인슐린 성장 인자-유사 패밀리 멤버 4
만난 결합 렉틴 세린 프로테아제 1	테트라트리코펩티드 반복 단백질 14	프로살루신	무특징 단백질 C2orf72
만난 결합 렉틴 세린 프로테아제 2	XTP3-활성화전이 유전자 B 단백질	단백질 암니온레스	복제 개시-유사 단백질
중성구 젤라티나제-연관 리포칼린	팔미토일트랜스페라제 ZDHHC15	단백질 WFDC10B	전립선 및 정소 발현된 단백질 3
뉴로펩티드 Y	조나 펠루시다 정자-결합 단백질 3	WAP 4-디설파이드 코아 도메인 단백질 8	B 흑색종 항원 4
아그레칸 핵심 단백질	류신 풍부 반복체 함유 단백질 39	단백질 Wnt-5b	추정 무특징 단백질 C1orf191
폐 표면활성제-연관 단백질 B	췌장 트리아실글리세롤 리파제	단백질 Wnt-7b	베타-데펜신 108B-유사
폴리오바이러스 수용체 관련 단백질 1	막통과 단백질 139	조나 펠루시다-결합 단백질 2	무특징 단백질 FLJ90687
레닌	백혈병 억제 인자	SH3 도메인-결합 단백질 5-유사	분비 프리즐드 관련 단백질 2
리보뉴클레아제 췌장	갈렉틴-1	지방세포 부착 분자	염기성 프롤린 풍부 펩티드 IB-1
세메노겔린-1	C-C 모티프 케모카인 21	무특징 단백질 C12orf59	섬유아세포 성장 인자 16
신호전달 림프구 활성화 분자	CD5 항원-유사	아포지방단백질 A-I-결합 단백질	세린 프로테아제 억제제 카잘-유형 8
조직 인자 경로 억제제	탄수화물 설포트랜스페라제 9	크라우딘-17	무특징 단백질 KIAA0495
우셰린	리포폴리사카라이드-결합 단백질	불활성 카스파제-12	혈소판 염기성 단백질-유사 2

등록특허 10-2269494

[0081]

섬유아세포 성장 인자 23	시스테인풍부 운동 뉴런 1 단백질	무특징 단백질 C7orf58	세르핀 E3
인터루킨-23 서브유닛 알파	결합 조직 성장 인자	아교질 알파-1(XXVIII) 사슬	CR1 수용체
부정소 분비 단백질 E1	단백질 아이셧 (eyes shut) 동족체	덴틴 매트릭스 단백질 4	분비 인단백질 1
ADAMTS-유사 단백질 1	뮤신-유사 단백질 1	무특징 단백질 C16orf48	스트레스 유발성 분비 단백질 1
케모카인-유사 인자	섬유아세포 성장 인자 19	카복실에스테라제 3	단백질 Wnt
EGF-유사 도메인 함유 단백질 7	폴리스타틴 관련 단백질 3	단백질 FAM20B	단백질 Wnt (단편)
텍토닉-1	헤지혹-상호작용 단백질	GPN-루프 GTPase 3	추정 세린 프로테아제 LOC138652
막통과 단백질 25	인터루킨-17 수용체 B	GRAM 도메인 함유 단백질 1B	TOM1
UDP-GalNAc:베타-1,3-N-아세틸갈락토스아미닐트랜스페라제 1	FXYD 도메인 함유 이온 수송 조절인자 5	포스파티딜이노시톨 글라이칸 앵커 생합성 클래스 U 단백질	추정 무특징 단백질 FLJ46089
인터루킨-15 (IL-15)	내피 리파제	인터루킨-27 서브유닛 알파	추정 무특징 단백질 C1orf134
다중 표피 성장 인자-유사 도메인 11	EGF 함유 피불린-유사 세포외 매트릭스 단백질 2	프로-뉴레귤린-4, 막-결합된 동형체	UDP-GlcNAc:betaGal 베타-1,3-N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제 9
뮤신 및 카드헤린-유사 단백질	오로라플린	류신 풍부 반복 신경 단백질 3	무특징 단백질 C11orf44
리보뉴클레아제 4	그룹 3 분비 포스포리파아제 A2	NMDA 수용체-조절 단백질 2	무특징 단백질 C12orf73
SH2 도메인 함유 단백질 3C	그룹 XV 포스포리파아제 A2	NADH-사이토크롬 b5 환원효소 1	추정 시스타틴-9-유사 2
CMP-N-아세틸뉴라미네이트-베타-갈락토스아마이드-알파-2,3-시알릴트랜스페라제	종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 14	파킨슨병 7 도메인 함유 단백질 1	추정 압하이드로라제 도메인 함유 단백질 FAM108A5
막통과 단백질 9	플렉신-A2	FK506-결합 단백질 11	베타-데펜신 133
WAP 4-디설파이드 코아 도메인 단백질 2	파필린	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 12 멤버 B	피브로신-1
아데노신 A3 수용체	프로카이네티신-1	용질 담체 패밀리 35 멤버 F5	정황적 엽산 수용체 델타
감마-세크레타제 서브유닛 APH-1A	리보뉴클레아제 7	시알산 결합 Ig-유사 렉틴 12	RPE-스폰딘
바시긴	쿠니츠-유형 프로테아제 억제제 1	단백질 FAM19A3	NPIP-유사 단백질 ENSP00000346774
바큘로바이러스 IAP 반복 함유 단백질 7	스폰딘-2	WD 반복 함유 단백질 82	추정 정소-특이적 프리온 단백질
칼루메닌	테스티칸-2	지방세포 인핸서-결합 단백질 1	프롤린풍부 단백질 1
알파-S1-카세인	불활성 세린 프로테아제 PAMR1	ADAMTS-유사 단백질 3	추정 무특징 단백질 FP248
사이클린-L1	토르신-2A	꼬인 코일 도메인 함유 단백질 80	UPF0670 단백질 C8orf55
보체 인자 H	바소히빈-1	엑토-NOX 이황화물-티올 교환기 1	추정 아연-알파-2-당단백질-유사 2
융모막 소마토맘모트로핀 호르몬	바소린	신경 성장 조절인자 1	SPARC 단백질
족사키바이러스 및 아데노바이러스 수용체	자일로실트랜스페라제 1	인터포토리센터 매트릭스 프로테오글라이칸 1	오토페트린-1
엑토뉴클레오타이드 파이로포스파타아제/포스포디에스테라제 패밀리 멤버 2	엑토뉴클레오타이드 파이로포스파타아제/포스포디에스테라제 패밀리 멤버 6	cDNA FLJ36603 fis, 클론 TRACH2015180, 분비 프리즐드 관련 단백질 2 와 아주 유사	cDNA FLJ55667, 분비 단백질 산성과 아주 유사하고 시스테인이 풍부
ERO1-유사 단백질 알파	온코스타틴-M	리파제 멤버 H	리파제 멤버 K
응고 인자 IX	D 에틀린-1	뮤신-19 (MUC-19)	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 18 멤버 C
저친화도 면역글로불린 감마 Fc 영역 수용체 III-B	HERV-FRD_6p24.1 프로바이러스 선구 Env 폴리프로테인	건선 감수성 1 후보 유전자 2 단백질	추정 무특징 단백질 UNQ6125/PRO20090
피콜린-3	프로스타신	내재성 막 단백질 2A	보체 C3
Fc 수용체-유사 단백질 2	막통과 프로테아제, 세린 11E	소포 운반 단백질 SFT2B	아교질 알파-2(IV) 사슬

류신 풍부 반복 막통과 단백질 FLRT3	HLA 클래스 I 조직적합성 항원, Cw-16 알파 사슬	폰빌레브란트 인자 A 도메인 함유 단백질 3A	무특징 단백질 UNQ6126/PRO20091
겔솔린	Wnt 억제 인자 1	단백질 시사(shisa)-2 동족체	세르핀-유사 단백질 HMSD
그라놀리신	C-유형 나트륨이노 펩티드	신호 펩티드 제 복합체 서브유닛 3	전립선 및 정소 발현된 단백질 4
막통과 단백질 NMB	안지오포이에틴-2	CD164 시알로뮤신-유사 2 단백질	아교질 알파-1(XXII) 사슬
그라놀린	데옥시리보뉴클레아제 감마	카드헤린-16	추정 무특징 단백질 C13orf28
췌파라나제	카복시펩타다아제 A5	카드헤린-19	시스타틴-S
Ig 뮤 사슬 C 영역	C-C 모티프 케모카인 14	세레벨린-2	R-스폰딘-1
인터루킨-1 알파	인터루킨-5	막통과 단백질 C3orf1	C8orf2
인터루킨-31 수용체 A	인터루킨-10	정자 적도-세그먼트 단백질 1	냄새 결합 단백질 2a
적합 부착 분자 B	C-X-C 모티프 케모카인 2	무특징 단백질 C6orf72	오피오르핀
리포칼린-1	C-X-C 모티프 케모카인 5	무특징 단백질 C11orf24	신장 안드로겐-조절 단백질
류신 풍부 반복체 함유 G-단백질 연결 수용체 6	트롬보스폰딘 모티프 6 를 갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나아제	아실-CoA 신테타제 패밀리 멤버 2, 미토콘드리알	추정 무특징 단백질 UNQ5830/PRO19650/PRO19816
잠재-변환 성장 인자 베타-결합 단백질 1	폴리펩티드 N-아세틸갈락토스아미닐트랜스페라제 1	정활적 UDP-당 수송 단백질 SLC35A5	추정 무특징 단백질 UNQ6975/PRO21938
메트릴린-3	피블린-2	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 1 멤버 A	타키키닌-3
마이엘린 단백질 제로-유사 단백질 1	피콜린-1	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 3 멤버 A	분비 인단백질 1
뉴로비아린-유사 단백질 2	SLAM 패밀리 멤버 8	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 4 멤버 E	스플레로스틴
니카스트린	폴리스타틴	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 4 멤버 G	ADAMTS-유사 단백질 2
ADP-리보오스 파이로포스파타아제, 미토콘드리알	FRAS1 관련 세포외 매트릭스 단백질 1	정활적 양이온-수송 ATPase 13A4	스캐빈져 수용체 시스테인 풍부 도메인 함유 단백질 LOC284297
프로토카드헤린-15	에나멜린	UPF0480 단백질 C15orf24	트립타제 베타-1
태반 성장 인자	히알루로난 및 프로테오글라이칸 링크 단백질 1	조나 펠루시다 정자-결합 단백질 4	트립타제 델타
단백질 O-연결-만노오스 베타-1,2-N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제 1	백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀리 A 멤버 3	내형질 망 상주 단백질 ERp27	추정 모양 중후군 임계 영역 단백질 9
정활적 하이드로라제 PNKD	인터루킨-17F	막통과 단백질 C16orf54	롤렉신 도메인 함유 단백질 1
플레이오트로핀	인터루킨-1 수용체 보조 단백질	사이토크롬 P450 4F12	MCS1L-53L-54L 동족체 (단편)
폴리오바이러스 수용체	세린 프로테아제 억제제 카잘-유형 5	사이토크롬 P450 4X1	COBW-유사 태반-1 단백질 (단편)
리티큘론-4 수용체	칼리크레인-15	사이토크롬 P450 4Z1	시토카인 수용체-유사 인자 2
혈청 아밀로이드 A 단백질	인터페론 알파-14	단백질 CREG2	베타-데펜신 103
성 호르몬 결합 글로불린	임신-특이적 베타-1-당단백질 4	DnaJ 동족체 서브패밀리 B 멤버 9	베타-데펜신 106
SLAM 패밀리 멤버 6	콜라겐나제 3	디펩타다아제 3	히알루로니다제-3
횡문근 형질막-연관 단백질	매트릭스 메탈로프로티나아제-16	막 단백질 FAM174A	인터루킨-28 수용체 알파 사슬
스시(Sushi), 폰빌레브란트 인자 유형 A, EGF 및 펙트린 도메인 함유 단백질 1	뇌하수체 아데닐레이트 사이클라제-활성화 폴리펩티드	티오레독신 도메인 함유 단백질 15	글라이코실트랜스페라제 34 도메인 함유 단백질
티록신 결합 글로불린	프로카이네티신-2	단백질 FAM19A4	코르딘-유사 단백질 1
막통과 및 꼬인 코일 도메인 함유 단백질 1	잠재-변환 성장 인자 베타-결합 단백질 3	아데노신 모노포스페이트-단백질 트랜스페라제 FICD	추정 무특징 단백질 UNQ9370/PRO34162

[0082]

막통과프로테아제,세린 3	소마토리베린	프레닐시스테인 옥시다아제-유사	네트린 수용체 UNC5B	
종양괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 10C	트롬보스폰딘 유형-1 도메인 함유 단백질 1	파이타노일-CoA 하이드록실라제-상호작용 단백질-유사	섬유아세포 성장 인자 수용체 FGFR-1 분비 형태 단백질(단편)	
종양괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 11B	G패쳐 및 FHA 도메인 1 을갖는 종양혈관형성 인자	FXYD 도메인 함유 이온 수송 조절 인자 4	무특징 단백질 ENSP00000244321	
세로트랜스페린	TGF-베타-수용체 유형 III	성장 분화 인자 11	ECE2	
트립타제 베타-2	타이로트로핀서브유닛 베타	뇌도파민 신경친화성 인자	EPA6	
단백질 YIPF5	무특징 단백질 C19orf36	GPN-루프 GTPase 2	추정 가용성 인터루킨 18 수용체 1	
소포-연관막 단백질-연관단백질 B/C	보체 C1q 종양괴사 인자 관련 단백질 2	성장 호르몬-유도가능한 막통과 단백질	추정 알하이드로라제 도메인 함유 단백질 FAM108A6	
cDNA, FLJ96669, 호모사피엔스 분비 단백질과 아주유사, 산성, 시스테인 풍부 (오스테오넥틴)(SPARC), mRNA	엑토뉴클레오타이드 파이로포스파타아제/포스포디에스테라제 패밀리 멤버 5	글리세로포스포디에스테르포스포디에스테라제 도메인 함유 단백질 2	추정 V-셋 및 면역글로불린 도메인 함유-유사 단백질 ENSP00000303034	
cDNA FLJ77519, 호모사피엔스 분비 프리콜드 관련 단백질 mRNA 와 아주 유사	폴리펩티드 N-아세틸갈락토스아미닐트랜스페라제-유사 단백질 2	WAP, 카잘(kazal), 면역글로불린, 쿠니츠 및 NTR 도메인 함유 단백질 1	B 세포 성숙 항원 전사체 변이체 4 (종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 17)	
T-세포 분화 항원 CD6	슬릿 동족체 1 단백질	KDEL 모티프 함유 단백질 1	UPF0672 단백질 C3orf58	
피카쥬린	성장 호르몬 변이체	아디포필린	메틸티오리보오스-1-포스페이트 이소머라제	
피브리노겐-유사 단백질 1	안지오포이에틴 관련 단백질 3	라타제-유사 단백질	17-베타하이드록시스테로이드 탈수소효소 13	
인터루킨-32	안지오포이에틴 관련 단백질 7	콘드로모둘린-1	아미노펩티다아제 B	
메트릴린-4	엑토-ADP-리보실트랜스페라제 5	아교질 알파-6(VI) 사슬	딤시딘	
정자-연관 항원 11B	탄산탈수효소-관련 단백질 11	류신 풍부 반복체 함유 단백질 33	메테오린	
응고 인자 XII	정황적 리보뉴클레아제 11	MANSC 도메인 함유 단백질 1	트랜스페라제-유사 단백질 7A	
헤시딘	정황적 카복시펩타다아제 X1	리포칼린-15	NL3	
클로토	단백질 FAM3D	아릴설파타제 I	N-아세틸트랜스페라제 15	
세르글라이신	C-X-C 모티프 케모카인 14	중배엽발생 후보 2	에프린-A4	
토모레귤린-2	베타-데펜신 127	막횝프 관련 단백질 1	단백질 Plunc	
코르딘-유사 단백질 2	베타-데펜신 129	포도칼	칼리크레인-11	
종양괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 6B	시스테인 풍부 분비 단백질 LCCL 도메인 함유 2	파리브로넥틴유형 III 도메인 함유 단백질 1	WNT1 유도 분비 단백질 1 스플라이스 변이체 x (단편)	
UPF0414 막통과 단백질 C20orf30	섬유아세포 성장 인자 21	뉴로트리민	인터루킨-1 패밀리 멤버 10	
C-유형 렉틴 도메인 패밀리 4 멤버 C	혈장 알파-L-푸코시다제	후각 수용체 10W1	PLA2G12D	
UPF0317 단백질 C14orf159, 미토콘드리아-	가스트로카인-1	단백질 PARM-1	프로테오글라이칸 3	
네트린-G2	가스트로카인 2	PDZ 도메인 함유 단백질 2	인슐린-유사 펩티드 INSL5	
메틸토리딕타제 STEAP2	글루타티온 페록시다아제 7	프로에피레귤린	올팍토메딘-유사 단백질 3	
스시 도메인 함유 단백질 4	HHIP-유사 단백질 1	다당성 신장질환 단백질 1-유사 1	세포외 당단백질 라크리틴	
단백질 YIF1B	인터페론 카파	WLPL514	레티놀탈수소효소 13	
아포지방단백질 M	아포지방단백질 C-I	메트릭스 메탈로프로티나아제-26	중성구 데펜신 3	
C4b-결합 단백질 베타 사슬	프로콜라겐 C-엔도펩티다아제 인핸서 2	RELT-유사 단백질 2	GLGQS807	

[0083]

T-세포 표면 당단백질 CD8 베타 사슬	좌우축 결정 인자 1	용질 담체 패밀리 35 멤버 E3	TUFT1
C-C 모티프 케모카인 3-유사 1	류신 풍부 반복 LGI 패밀리 멤버 4	아연 수송체 ZIP9	DRLV8200
섬유아세포 성장 인자 8	BRCA1-A 작용서브유닛 아브락사스(Abraxas)	노엘린-2	IDLW5808
시알로뮤신 핵심 단백질 24	루신 지퍼 단백질 2	발작 6-유사 단백질 2	UBAP2
프로그랜린-세포 사멸 1 리간드 2	뉴렉소필린-3	세마포린-3A	C1q-TNF 관련 단백질 8
분비 및 막통과 1	오스테오모듈린	세마포린-4C	KIR2DL4 (단편)
보체 C1q 종양괴사 인자 관련 단백질 6	카츠-유형 세린 프로테아제 억제제 도메인 함유 단백질 1	알하이드로라제 도메인 함유 단백질 14A	케모카인-유사 인자 슈퍼 패밀리 2 전사체 변이체 2
EGF-유사 모듈 함유 뮤신-유사 호르몬 수용체-유사 3	정자 아크로솜 막-연관 단백질 3	안키린 반복 도메인 함유 단백질 36	케라틴생성세포 연관 막통과 단백질 1
노엘린-3	제크레토글로빈 패밀리 3A 멤버 1	단백질 시사(shisa)-4	GKGM353
냄새 결합 단백질 2b	츠쿠신	뉴로메딘-U	MATL2963
유로텐신-2	크라우딘-2 (SP82)	마디동족체	NINP6167
바이트린	보체 인자 B 관련 단백질 2	시탑도가이린-2	POM121-유사
WNT1-유도 가능한-신호전달 경로 단백질 3	류신 풍부 반복 단백질 함유 면역글로불린 슈퍼패밀리	뇌-특이적 신생혈관형성 억제제 1-연관 단백질 2-유사 단백질 2	RTFV9368 (SLE-의존성 상향조절 1)
cDNA FLJ75759, 호모사피엔스 폴리스타틴-유사 3 (분비 당단백질) (FSTL3)와 아주 유사; mRNA	류신 풍부 반복 및 면역글로불린-유사 도메인 함유 노고(nogo) 수용체 상호작용 단백질 1	피인 코일 도메인 함유 단백질 104	류신 풍부 반복 및 면역글로불린-유사 도메인 함유 노고(nogo) 수용체 상호작용 단백질 4
안지오텐신-전환 효소 2	IRRE-유사 단백질 3 의 킨(Kin)	막통과 416 패밀리 멤버 20	KCNQ2
아디포넥틴	조혈세포 신호 변환기	막통과 단백질 107	ELCV5929
안지오포이에틴 관련 단백질 4	폴리트로핀-서브유닛 베타	막통과 단백질 143	KVVM3106
아포지방단백질 A-V	혹색종 억제 활성 단백질 3	막통과 단백질 178	ISPF6484
아스포린	류신 풍부 반복체 함유 단백질 4	막통과 단백질 205	LKHP8428
살균 침투 성-증가 단백질	아연 수송체 5	막통과 단백질 41A	VNFT9373
CUB 도메인 함유 단백질 1	류신 풍부 반복 신경 단백질 1	막통과 단백질 50A	ACAH3104
연골중간체 층 단백질 1	선단엔도솜 당단백질	막통과 단백질 50B	RVLA1944
베타-Ala-His 디펩타다아제	혈청 아밀로이드 A-4 단백질	인터루킨-28B	Wpep3002
아교질 알파-1(V) 사슬	프로베타셀룰린	뉴로날 펜트락신-2	ZDHHC11
아교질 알파-1(XXV) 사슬	베타-1,4-갈락토실트랜스페라제 7	롤랜트린	AGLW2560
에스트라디올 17-베타-탈수소효소 11	3-하이드록시부티레이트 탈수소효소 유형 2	막통과 단백질 92	TSSP3028
DnaJ 동족체 서브패밀리 C 멤버 10	C1GALT1-특이적 차ペロ 1	막통과 단백질 95	RFVG5814
EGF-유사 도메인 함유 단백질 6	베타-카세인	막통과 단백질 9B	SHSS3124
응고 인자 XIII A 사슬	카파-카세인	정칠적 카복시펩타다아제 PM20D1	MMP19
글루코오스-6-포스페이트 이소머라제	막통과 단백질 C2orf18	테트라스파닌-12	GSQS6193
식욕-조절 호르몬	카복시펩타다아제 N 촉매 사슬	테트라스파닌-13	VGPW2523
인터루킨-12 서브유닛 베타	CD320 항원	테트라스파닌-15	LMNE6487
인터루킨-22	콘드로이틴 설페이트 신타제 1	UPF0513 막통과 단백질	AILA2487
인텔렉틴-1	콘드로이틴 설페이트 신타제 2	미토콘드리아 짝풀림 단백질 4	GALI1870
류신 풍부 신경아교종-불활성화 단백질 1	CMRF35-유사 분자 7	폴리세라제-2	FRSS1829

[0084]

[0085]

림프구 항원 96	단백질 캐노피 동족체 3	정황적 팔미토일트랜스페라제 ZDHHC24	MRSS6228
마트릴리신	단쇄 탈수소효소/환원효소 3	조나 펠루시다 정자-결합 단백질 1	GRPR5811
뮤신-20	델타-유사 단백질 4	조나 펠루시다 정자-결합 단백질 2	AVLL5809
전구단백질 전환효소 서브틸리신/켁신 유형 9	델타 및 노치-유사 표피 성장 인자 관련 수용체	보존적 올리고머 골지(Golgi) 복합체 서브유닛 7	CR1 C3b/C4b 수용체 SCR9 (또는 16) C-말단. 엑손 SCR = 짧은 공통 반복
펩티도글라이칸 인지 단백질	돌리콜 키나아제	아디포넥틴 수용체 단백질 2	PIKR2786
인터페론 유래 17 kDa 단백질	엔도텔린-전환 효소-유사 1	인히빈 베타 C 사슬	S100 칼슘 결합 단백질 A7-유사 3
단백질 Wnt-4	내재성 막 단백질 2B	브로린	GTWW5826 (LP5085 단백질)
동종이식편 염증성 인자 1-유사	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 5	세마포린-3C	KTIS8219 (HCG2020043)
아르마딜로 반복 함유 X-연결 단백질 3	내피 세포-선택적 접합 분자	헤파란 설페이트 글루코사민 3-O-설포트랜스페라제 2	히알루로난 및 프로테오글라이칸 링크 단백질 4
콘드로이틴 설페이트 N-아세틸갈락토스아미닐트랜스페라제 1	신호 펩티드, CUB 및 EGF-유사 도메인 함유 단백질 1	렙틴 수용체 중첩 전사체-유사 1	마이크로노벨
키토트리오시다제-1	보체 인자 H 관련 단백질 3	SPARC-유사 단백질 1	SAMK3000
크라우딘 도메인 함유 단백질 1	프로렐락신 H1	피불린-7	VFLL3057
에를린-2	폴리스타틴 관련 단백질 1	단백질 HEG 동족체 1	CVWG5837
글라이코실트랜스페라제 8 도메인 함유 단백질 1	글로보사이드 알파-1,3-N-아세틸갈락토스아미닐트랜스페라제 1	피브리노겐 C 도메인 함유 단백질 1	VGSA5840
골지(Golgi) 막 단백질 1	감마-글루타민 하이드로라제	포스포리파아제 A1 멤버 A	GHPS3125
정황적 G-단백질 연결 수용체 125	카드헤린-24	염기성 타액 프롤린 풍부 단백질 2	GRTR3118
인터루킨-20 수용체 알파 사슬	글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스페라제 3	정자발생-연관 단백질 6	PAMP6501
갈렉틴-7	G-단백질 연결 수용체 56	스시(Sushi) 반복 함유 단백질 SRPX2	LTLL9335
NKG2D 리간드 4	히알루로난-결합 단백질 2	비틀린 낭포형성 단백질 동족체 1	VCEW9374
L-아미노산 옥시다아제	프로헤파린 결합 EGF-유사 성장 인자	토르신-1B	AHPA9419
프롤릴 3-하이드록실라제 1	히스티딘 풍부 당단백질	단백질 Wnt-5a	MDHV1887
GPI 에탄올아민 포스페이트 트랜스페라제 2	탄수화물 설포트랜스페라제 14	아크로신-결합 단백질	HSAL5836
GPI 에탄올아민 포스페이트 트랜스페라제 3	인터루킨-20 수용체 베타 사슬	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 18 멤버 B	LHLC1946
칼슘 결합 미토콘드리아 담체 단백질 SCaMC-2 (적은 칼슘 결합 미토콘드리아 담체 단백질 2)	엑토뉴클레오타이드 파이로포스파타아제/포스포디에스테라제 패밀리 멤버 3	용해소체-연관 막통과 단백질 4A	긴 구개, 폐 및 비강 상피 암종-연관 단백질 3 (리간드-결합 단백질 RYA3)
폐 표면활성제-연관 단백질 A2	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 7	세마포린-3E	LPPA601
스플라이싱 인자, 아르기닌/세린 풍부 16	칼리스타틴	아멜로블라스틴	PINK1
알파-N-아세틸갈락토스아미나이드 알파-2,6-시알릴트랜스페라제 6	파리브로넥틴유형 III 도메인 함유 단백질 3B	주요 촉진인자 슈퍼패밀리 도메인 함유 단백질 5	SERH2790
단일 Ig IL-1 관련 수용체	백혈병 억제 인자 수용체	안지오포이에틴-1	FLFF9364
텍토닉-3	Lin-7 동족체 B	안지오포이에틴-4	아페린
종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 11	티오레독신 관련 막통과 단백질 1	다중 표피 성장 인자-유사 도메인 9	GLSH6409
종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 19	디신테그린 및 메탈로프로티나아제 도메인 함유	산 스핑고미엘리나제-유사 포스포디에스테라제	SFVP2550

[0086]

	단백질 32	3a	
팔미토일트랜스페라제 ZDHHC9	Ly6/PLAUR 도메인 함유 단백질 3	ADAMTS-유사 단백질 5	RRLF9220
피볼린-5	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 14 멤버 A	스펙신	PTML5838
단백질 Z-의존성 프로테아제 억제제	단백질 코르니송 동족체	추정 트립신-6	VLGN1945
알파-2-매크로글로불린	단백질 FAM151A	원종양유전자 단백질 Wnt-1	AVPC1948
아구티 관련 단백질	FK506-결합 단백질 14	골형성 단백질 3b	AWQG2491
췌장 알파-아밀라아제	뉴로필린 및 톨로이드-유사 단백질 2	골형성 단백질 5	PSVL6168
나트륨이뇨 펩티드 B	프로토카드헤린 베타-13	골형성 단백질 8B	LCII3035
심방나트륨 이뇨인자	프레닐시스테인 옥시다아제 1	단백질 FAM26D	PPRR6495
중성 세라미다제	페를린	C1q 관련 인자	RLSC6348
베타-2-마이크로글로불린	펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이소머라제-유사 1	WAP 4-디설파이드 코아 도메인 단백질 1	CSRP2BP
골형성 단백질 4	전립선 줄기세포 항원	세레벨린-1	GLLV3061
바이오티니다제	단백질 패치 동족체 2	카복시펩타다아제 O	GWSI6489
스캐빈져 수용체 시스테인 풍부 유형 1 단백질 M130	키토바이오실디포스포폴리콜 베타-만노실트랜스페라제	마이엘린 단백질 제로-유사 단백질 2 (상피 V-유사 항원 1)	cDNA FLJ53955, 분비 프리폴드 관련 단백질 4 와 아주 유사
카복시펩타다아제 B2	단백질 sel-1 동족체 1	세린 프로테아제 1-유사 단백질 1	PPIF
카복시펩타다아제 Z	ProSAAS	꼬인 코일 도메인 함유 단백질 70	VSSW1971
C-C 모티프 케모카인 5	시알산 결합 Ig-유사 렉틴 9	C-C 모티프 케모카인 28	KLIA6249
C-C 모티프 케모카인 7	SLIT 및 NTRK-유사 단백질 1	무특징 단백질 C4orf29	ALLW1950
C-C 모티프 케모카인 8	스타테린	CUB 도메인 함유 단백질 2	GVEI466
CD59 당단백질	테스티신	트렘(Trem)-유사 전사체 4 단백질	ESFI5812
보체 인자 I	막통과 톨로-유사 단백질 5	무특징 단백질 C6orf58	GNNC2999
클러스테린	막통과 프로테아제, 세린 4	콘드로아드헤린	AAGG6488
아교질 알파-2(I) 사슬	전이-억제제 KiSS-1	연골 중간체 층 단백질 2	HHSL751
아교질 알파-1(III) 사슬	소도 아밀로이드 폴리펩티드	무특징 단백질 C10orf25	베타-데펜신 108B
아교질 알파-1(IV) 사슬	트렘(Trem)-유사 전사체 2 단백질	이스르민-1	베타-데펜신 118
아교질 알파-3(IV) 사슬	티오레독신 도메인 함유 단백질 12	시스타틴-8	베타-데펜신 124
아교질 알파-5(IV) 사슬	혈관 내피 성장 인자 B	카디오트로핀-1 (CT-1)	베타-데펜신 125
아교질 알파-3(VI) 사슬	혈관 내피 성장 인자 C	키모트립시노겐 B	베타-데펜신 126
보체 성분 C6	레티클로칼빈-3	C-X-C 모티프 케모카인 9	데옥시 리보뉴클레아제-1-유사 2
아교질 알파-1(IX) 사슬	피브릴린-1	C-X-C 모티프 케모카인 13	스탄니오칼신-2
아교질 알파-1(X) 사슬	단백질 FAM3A	에밀린-3	내피 세포-특이적 분자-1
아교질 알파-1(XVII) 사슬	단백질 G7c	세크레타고긴	카복실에스테라제 7
아교질 알파-1(XXI) 사슬	뉴로필린 및 톨로이드-유사 단백질 1	부정소 분비 단백질 E3-알파	단백질 NOV 동족체
코아토머 서브유닛 알파	임신-특이적 베타-1-당단백질 11	에피파이칸	UPF0528 단백질 FAM172A
보체 수용체 유형 1	세르핀 B4	단백질 FAM5C	인터루킨-27 서브유닛 베타
시스타틴-SN	ADAM DEC1	섬유아세포 성장 인자 20	단백질 FAM3C
데옥시 리보뉴클레아제-1	ADP-의존성 글루코키나아제	섬유아세포 성장 인자-결합 단백질 3	기질 세포-유래된 인자 2-유사 단백질 1
세포외 매트릭스 단백질 1	알파-아밀라아제 2B	막통과 단백질 204	부티로필린 서브패밀리 1 멤버 A1

[0087]

저친화도 면역글로불린 감마 Fc 영역 수용체 III-A	UDP-GlcNAc:betaGal 베타-1,3-N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제 3	포스파티딜에탄올아민-결합 단백질 4	케라틴생성세포-연관 막통과 단백질 2
알파-태아단백	칼시토닌 유전자 관련 펩티드 2	응고 인자 V	면역글로불린 알파 Fc 수용체
헤파린 결합 성장 인자 2	카복시펩타다아제 E	응고 인자 VII	에밀린-2
피브리노겐 감마 사슬	카디오트로핀-유사 시토카인 인자 1	프로-MCH	에프린 유형-A 수용체 10
성장/분화 인자 5	아교질 알파-2(VIII) 사슬	엽산 수용체 감마	엑소스토신-유사 2
신경아교세포계-유래된 신경친화성 인자	부스러기 동족체 2	뮤신-7	폴리스타틴 관련 단백질 4
인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 3	덴틴 매트릭스 산성 인단백질 1	갈라닌-유사 펩티드	폴리스타틴 관련 단백질 5
인슐린-유사 성장 인자 IA	다운증후군 세포 접착 분자	헤미센틴-1	막통과 단백질 66
Ig 감마-1 사슬 C 영역	면역글로불린 슈퍼패밀리 멤버 1	인터루킨-6	성장/분화 인자 2
Ig 감마-2 사슬 C 영역	인터루킨-4	배아 성장/분화 인자 1	GDNF 패밀리 수용체 알파-4
Ig 감마-3 사슬 C 영역	인터루킨-6 수용체 서브유닛 알파	인터루킨-8	Ig 감마-4 사슬 C 영역
인슐린-유사 3	인터루킨-24	그렘린-2	림프구 항원 86
인터-알파-트립신 억제제 중쇄	라디닌-1	스트로멜라이신-2	인히빈 베타 E 사슬
UPF0378 단백질 KIAA0100	리파제 멤버 I	정황적 G-단백질 연결 수용체 171	GRAM 도메인 함유 단백질 1C
키니노겐-1	췌장 리파제 관련 단백질 1	칼폴리신-2	인터페론 알파-10
라미닌 서브유닛 알파-2	류신 풍부 알파-2-당단백질	마이크로피브릴-연관 당단백질 4	인터페론 알파-16
라미닌 서브유닛 알파-4	매트릭스-리모델링-연관 단백질 5	뉴로메딘-B	인터페론 알파-6
라미닌 서브유닛 베타-1	네트린-4	미메칸	면역글로불린 슈퍼패밀리 멤버 21
단백질-리신 6-옥시다아제	간세포 성장 인자 수용체	매트릭스 메탈로프로티나아제-19	아그린
멀티메린-1	C-C 모티프 케모카인 22	인터루킨-11	프로락틴
바소프레신-뉴로파이신 2-코펩틴	닉탈로핀	인터루킨-17A	켈취(Kelch)-유사 단백질 11
니도겐-1	오스테오칼신	인터루킨-18	단백질 Wnt-16
포스포리파아제 A2,	염기성 타액 프롤린 풍부 단백질 3	인터루킨-26	프로페리딘
페르포린-1	임신-특이적 베타-1-당단백질 10	인터루킨-28A	칼리크레인-13
포스파티딜이노시톨-글라이칸-특이적 포스포리파아제 D	류신 풍부 반복 막통과 단백질 FLRT2	막통과 emp24 도메인 함유 단백질 3	1-아실-sn-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스페라제 델타
파이로시스틴	R-스폰딘-3	인터루킨-29	칼리크레인-9
인지질 전이 단백질	시알로아드헤신	인슐린-유사 펩티드 INSL6	비타민 K-의존성 단백질 S
전립선산 포스파타아제	트립신-3	단백질 Wnt-2b	부티로필린-유사 단백질 8
비타민 K-의존성 단백질 Z	디펩타다아제 2	임신-특이적 베타-1-당단백질 1	라미닌 서브유닛 베타-4
타액 산성 프롤린 풍부 인단백질 1/2	아교질 및 칼슘 결합 EGF 도메인 함유 단백질 1	정자 아크로솜 막-연관 단백질 4	림프관 내피 히알루론산 수용체 1
임신 구역 단백질	생식세포-특이 유전자 1-유사 단백질	라미닌 서브유닛 감마-3	시스타틴-SA
프로텔락신 H2	류신 풍부 반복체 함유 단백질 31	라이실 옥시다아제 동족체 3	막통과 단백질 59
세마포린-4D	아포지방단백질 O	뉴로텐신/뉴로메딘 N	아포지방단백(a)-유사 단백질 2
슬릿 동족체 2 단백질	다이스트로글리칸	MAM 도메인 함유 단백질 2	리소자임-유사 단백질 2
알파-텍토린	중성구 데펜신 4	마이크로피브릴라-연관 단백질 2	리소자임-유사 단백질 4
테나스신-X	암포테린 유래 단백질 3	흑색종 억제 활성 단백질 2	릴린

등록특허 10-2269494

[0088]

트레포일 인자 3	감마-세크레타제 서브유닛 APH-1B	매트릭스 메탈로프로티나아제-24	레티놀-결합 단백질 4
트랜스페린 수용체 단백질 1	아포지방단백질 C-IV	매트릭스 메탈로프로티나아제-25	탄산탈수소효소 14
전변형 성장 인자 알파	아릴설파타제 G	네트린-1	세뇨관간질성 신장염 항원
변형 성장 인자 베타-2	신경교-활성화 인자	네트린-3	뉴로펩티드 W
종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 멤버 6	카스파제 동원 도메인 함유 단백질 18	알파-N-아세틸갈락로스아미나이드 알파-2,6-시알릴트랜스페라제 1	알파-1,3-만노실-당단백질 4-베타-N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제 B
종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 1B	헤파란 설페이트 글루코사민 3-O-설포트랜스페라제 3A1	알파-N-아세틸갈락토스아미나이드 알파-2,6-시알릴트랜스페라제 3	막통과 emp24 도메인 함유 단백질 5
종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 5	타이로트로핀-방출 호르몬-분해 세포외효소	흑색종-유래된 성장 조절 단백질	보체 C1q 종양 괴사 인자 관련 단백질 3
트롬보포이에틴	구아닐린	FMRF 아마이드 관련 펩티드	포도칸-유사 단백질 1
VIP 펩티드	콜린 수송체-유사 단백질 3	오토코닌-90	임신-특이적 베타-1-당단백질 5
산성 포유류 키티나제	17-베타-하이드록시스테로이드 탈수소효소 14	뉴르투린	케라토칸
시스테인 풍부 분비 단백질 2	면역글로불린 람다-유사 폴리펩티드 1	뉴렉소필린-1	그룹 IIE 분비 포스포리파아제 A2
합토글로빈 관련 단백질	DnaJ 동족체 서브패밀리 B 멤버 14	뉴렉소필린-2	좌우축 결정 인자 2
C-C 모티프 케모카인 26	F-박스 유일 단백질 8	혈소판 인자 4 변이체	NKG2D 리간드 2
콜렉틴-11	피브로류킨	노시셉틴	대식세포 메탈로엘라스타제
EGF-유사 도메인 단백질 2 를 갖는 시스테인 풍부	메티오닌-R-설폭사이드 환원효소 B3, 미토콘드리알	V-셋 및 막통과 도메인 함유 단백질 1	골수세포 1 상에 발현된 유발성 수용체
C-X-C 모티프 케모카인 16	류신 풍부 반복 LGI 패밀리 멤버 2	프롤린 풍부 단백질 4	시토카인 수용체-유사 인자 1
섬유아세포 성장 인자-결합 단백질 1	소포 운반 단백질 GOT1B	프로락틴-방출 펩티드	세크레틴
인터루킨-1 패밀리 멤버 5	내재성 막 단백질 GPR177	세린 프로테아제 33	기질 세포-유래된 인자 2
인터루킨-1 패밀리 멤버 9	정황적 G-단백질 연결 수용체 78	임신-특이적 베타-1-당단백질 8	리소자임-유사 단백질 6
칼리크레인-5	HEPACAM 패밀리 멤버 2	레트빈딘	세르핀 A9
매트릴린-2	인터루킨-27 수용체 서브유닛 알파	FMRF 아마이드 관련 펩티드	스클레로스틴 도메인 함유 단백질 1
세포 표면 당단백질 CD200 수용체 1	프로엔케팔린-A	리보뉴클레아제 K6	라이소카르디올리핀 아실트랜스페라제 1
라이소포스파티드산 포스파타아제 유형 6	인테그린 알파-10	리보뉴클레아제 T2	혈장 글루타메이트 카복시펩타다아제
뉴클레오타이드 교환 인자 SIL1	KTEL 모티프 함유 단백질 1	레페틴	슬릿 동족체 3 단백질
트롬보스폰딘 유형-1 도메인 함유 단백질 4	백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀리 A 멤버 5	보체 C1r 하위성분-유사 단백질	C3 및 PZP-유사 알파-2-매크로글로불린 도메인 함유 단백질 8
WNT1-유도가능한-신호전달 경로 단백질 2	류신 풍부 반복 및 파이브로넥틴 유형-III 도메인 함유 단백질 3	무특징 글라이코실트랜스페라제 AER61	레티노산 수용체 반응군 단백질 2
브로모도메인 함유 단백질 9	우테로글로빈	세마포린-3G	연골 산성 단백질 1
CD99 항원-유사 단백질 2	네트린-G1 리간드	세크레토글로빈 패밀리 1C 멤버 1	스탄니오칼신-1
무특징 단백질 C1orf159	판넥신-1	세크레토글로빈 패밀리 1D 멤버 1	베타-텍토린
탄수화물 설포트랜스페라제 12	프로토카드헤린-12	세크레토글로빈 패밀리 1D 멤버 2	단백질 인자 3 에 대한 Post-GPI 부착
정황적 세린 카복시펩타다아제 CPVL	프로토카드헤린 알파-10	세르핀 A12	생식세포-특이 유전자 1 단백질
뮤신-3A	프로토카드헤린 베타-10	세르핀 I2	인터루킨-21 수용체
CUB 및 조나 펠루시다-유사 도메인 함유 단백질 1	골석화증-연관 막통과 단백질 1	폰빌레브란트 인자 C 및 EGF 도메인 함유 단백질	V-셋 및 면역글로불린 도메인 함유 단백질 4
폴리펩티드 N-	베타-갈락토사이드 알파-2,6-시알릴트랜스페라제	트롬보스폰딘 모티프 15 를 갖는 디신테그린 및	스캐빈저 수용체 시스테인 풍부 도메인 함유 그룹

[0080]

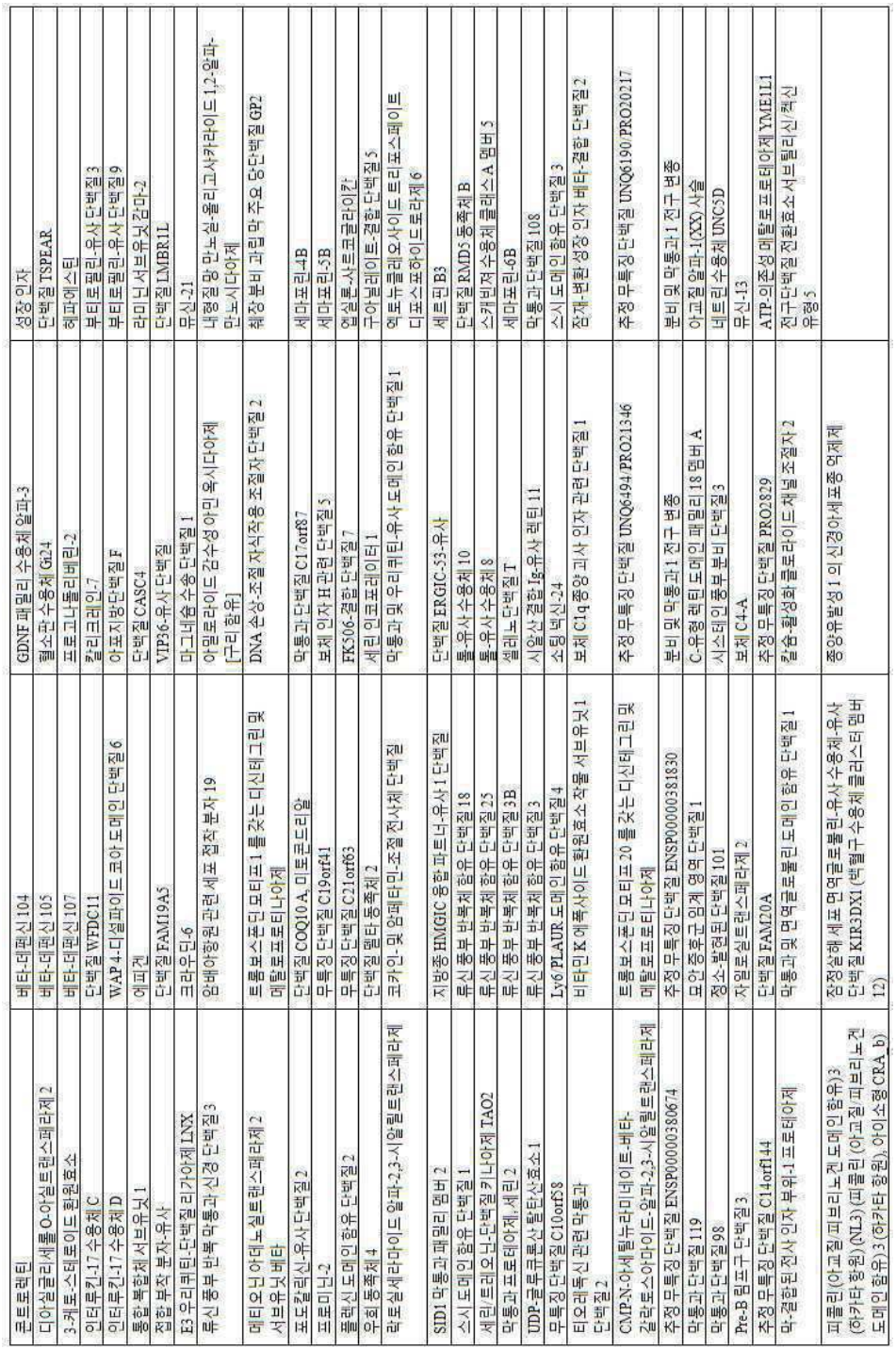
아세틸갈락토스아미닐트랜스페라제 14	1	메탈로프로티나아제	B 단백질
갈렉틴-9	GPI 트랜스아미다아제 성분 PIG-S	나트륨 통로 서브유닛 베타-2	프로티롤리베린
류신 풍부 반복체 함유 단백질 17	프롤린 풍부 막통과 단백질 3	메탈로프로티나아제 억제제 4	세마포린-4A
류신 풍부 반복 신경 단백질 2	설프히드릴 옥시다아제 2	T-세포 면역조절 단백질	
이작용성 헤파란 설페이트 N-탈아세틸화효소/N-설포트랜스페라제 3	트롬보스폰딘 모티프 16 를 갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나아제	트롬보스폰딘 모티프 10 를 갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나아제	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 27
터프텔린	SH2 도메인 함유 단백질 3A	흥선 기질 림포포이에틴	톨-유사 수용체 7
뇌 미토콘드리아 담체 단백질	SHC-변형 단백질 4	막통과 단백질 130	
신호 펩티드, CUB 및 EGF-유사 도메인 함유 단백질 3	디신테그린 및 메탈로프로티나아제 도메인 함유 단백질 23	독특한 연골 매트릭스-연관 단백질	티오레독신 도메인 함유 단백질 16
14-3-3 단백질 시그마	트랜스듀신 베타-유사 단백질 2	우로코르틴-2	알파-2-안티플라스민
알파-1-산 당단백질 1	튜더(Tudor) 도메인 함유 단백질 10	우로코르틴-3 (	WAP 4-디설파이드 코아 도메인 단백질 3
알파-1-산 당단백질 2	막통과 9 슈퍼패밀리 멤버 3	단백질 AMBP	단백질 WFDC9
폰빌레브란트 인자 A 도메인 함유 단백질 1	폰빌레브란트 인자 D 및 EGF 도메인 함유 단백질	보체 C1q 종양 괴사 인자 관련 단백질 9-유사	트롬보스폰딘 모티프 14 를 갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나아제
디신테그린 및 메탈로프로티나아제 도메인 함유 단백질 9	트롬보스폰딘 모티프 17 를 갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나아제	성장 억제 및 분화 관련 단백질 88	지방세포 혈장 막-연관 단백질
안지오텐시노겐	막통과 통로-유사 단백질 2	단백질 Wnt-10a	페록시다신 동족체
아포지방단백질 A-II (Apo-AII) (ApoA-II)	임신-특이적 베타-1-당단백질 3	단백질 Wnt-3a	진행 강직증 단백질 동족체
아포지방단백질 A-IV (Apo-AIV) (ApoA-IV)	테노모듈린	원종양유전자 단백질 Wnt-3	킬티나제-3-유사 단백질 1
아포지방단백질 C-II (Apo-CII) (ApoC-II)	테트라스파닌-6	단백질 Wnt-6	UPF0672 단백질 CXorf36
베타-2-당단백질 1	티오레독신 도메인 함유 단백질 5	단백질 Wnt-9a	아릴설파타제 J
세포자멸사 관련 단백질 3	혈관 내피 성장 인자 D	시토카인 SCM-1 베타	코르티스타틴
베타-세크레타제 2	임신-특이적 베타-1-당단백질 9	자이모겐 과립 막 단백질 16	세룰로플라스민
조직-혈액형 ABO 시스템 트랜스페라제	세마포린-3F	조나펠루시다-결합 단백질 1	안지오포이에틴 관련 단백질 5
카텝신 L2	산 포스파타아제-유사 단백질 2	전방 구배 단백질 3 동족체	꼬인코일 도메인 함유 단백질 126
C-C 모티프 케모카인 3	아포지방단백질 O-유사	아멜로틴	CD177 항원
C-유형 렉틴 도메인 패밀리 1 멤버 B	베타-데펜신 119	무특징 단백질 C5orf46	단백질 캐노피 동족체 4
칼슘-활성화 클로라이드 채널 조절자 1	트롬보스폰딘 모티프 12 를 갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나아제	무특징 aarF 도메인 함유 단백질 키나아제 1	파리브로넥틴유형-III 도메인 함유 단백질 C4orf31
치마제	단백질 FAM131A	드락신	단백질 FAM180A
아교질 알파-1(VI) 사슬	단백질 FAM3B	섬유아세포 성장 인자 18	혈소판 염기성 단백질
보체 성분 C8 알파 사슬	베타-갈라토시다아제-1-유사 단백질	C-X-C 모티프 케모카인 11	인터페론 엡실론
보체 성분 C9	리소자임 g-유사 단백질 1	Ly6/PLAUR 도메인 함유 단백질 6	인텔렉틴-2
글루코오스-푸룩토오스 옥시도리덕타제 도메인 함유 단백질 2	인터-알파-트립신 억제제 중쇄 H5-유사 단백질	키모트립신-유사 엘라스타제 패밀리 멤버 1	알파-1,3-만노실-당단백질 4-베타-N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제 A
DnaJ 동족체 서브패밀리 B 멤버 11	정자 아크로솜-연관 단백질 5	에리트로포이에틴 수용체	매트릭스 세포외 포스포글라이코프로테인
엑토뉴클레오타이드 파이로포스파타아제/포스포디에스테라제 패밀리	류신 풍부 반복 및 면역글로불린-유사 도메인 함유 노고(nogo) 수용체-상호작용 단백질 2	MAM 도메인 함유 글라이코실포스파티딜이노시톨 앵커 단백질 2	cDNA FLJ77863, 호모사피엔스 분비 및 막통과 1 (SECTM1)과 아주 유사, mRNA

[0690]

멤버 7			
내형질 망 아미노펩티다아제 1	표면활성제-연관 단백질 2	매트릭스 메탈로프로티나아제-27	부정소-특이적 리포칼린-6
수용체 티로신-단백질 키나아제 erbB-3	아디포넥틴 수용체 단백질 1	불활성 세린 프로테아제 35	아파민
내형질 망 상주 단백질 ERp44	다중 표피 성장 인자-유사 도메인 6	꼬인 코일 도메인 함유 단백질 134	정황적 양이온-수송 ATPase 13A5
IgGFc-결합 단백질	신경내분비 단백질 7B2	서프라바신	글루타티온 페록시다아제 3
보체 인자 H 관련 단백질 1	알파-1B-당단백질	세크레토글로빈 패밀리 1D 멤버 4	크라우딘-18
폴리펩티드 N- 아세틸갈락토스아미닐트랜스페라제 2	WAP, 카잘(kazal), 면역글로불린, 쿠니즈 및 NTR 도메인 함유 단백질 2	V-셋 및 막통과 도메인 함유 단백질 2A	잠정살해 세포 면역글로불린-유사 수용체 유사 단백질 KIR3DP1
호모펙신	아릴아세트아마이드 탈아세틸화효소-유사 1	ADM	분비 포스포리파아제 A2 수용체
간세포 성장 인자 활성제	히스타틴-3	무특징 단백질 C2orf82	합토글로빈
주요 조직적합성 작물 클래스 I 관련 유전자 단백질	프로-뉴레귤린-3, 막-결합된 동형체	인슐린 성장 인자-유사 패밀리 멤버 1	암배아항원 관련 세포 접착 분자 20
인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 6	아구티-신호전달 단백질	카드헤린-유사 단백질 29	골형성 단백질 3
Ig 델타 사슬 C 영역	크라우딘-8	골형성 단백질 15	골수 기질 항원 2
인터루킨-1 베타	UPF0454 단백질 C12orf49	혈장 세린 프로테아제 억제제	사이토크롬 P450 20A1
저밀도 지단백질 수용체 관련 단백질 10	폰빌레브란트 인자 A 도메인 함유 단백질 5B1	암배아항원 관련 세포 접착 분자 21	살균/침투성-증가 단백질-유사 3
접합 부착 분자 C	카드헤린-6	알파-락트알부민	단백질 dpy-19 동족체 2
무특징 단백질 KIAA0319	카텔리시딘 항균 펩티드	자매 염색분체 합착 단백질 DCC1	그룹 IIF 분비 포스포리파아제 A2
라미닌 서브유닛 알파-5	라미닌 서브유닛 감마-1	갈렉틴-3-결합 단백질	카복시펩타다아제 B
파리브로넥틴유형 III 도메인 함유 단백질 4	탈수소효소/환원효소 SDR 패밀리 멤버 7B	다이네인 중쇄 도메인 함유 단백질 1	글라이코실트랜스페라제 8 도메인 함유 단백질 2
지단백질 리파제	C-C 모티프 케모카인 16	C-C 모티프 케모카인 17	단백질 FAM19A1
간질성 콜라게나제	C-C 모티프 케모카인 24	지방산 아실-CoA 환원효소 1	GDNF 패밀리 수용체 알파-유사
매트릭스 메탈로프로티나아제-9	HEAT 반복 함유 단백질 C7orf27	Fin 싹 개시 인자 동족체	정황적 글루타티온 페록시다아제 8
뮤신-16	아교질 알파-2(IX) 사슬	폴리머면역글로불린 수용체	시스타틴-D
뮤신-2	아교질 알파-3(IX) 사슬	프리온-유사 단백질 돕펠	시스타틴-F
뮤신-5B	콜리파제	C-X-C 모티프 케모카인 6	혈소판-활성화 인자 아세틸하이드로라제
미오실린	아교질 알파-1(XXVII) 사슬	C-X-C 모티프 케모카인 10	팝팔리신-1
산화된 저밀도 지단백질 수용체 1	카복시펩타다아제 N 서브유닛 2	베타-데펜신 1	융질 담체 패밀리 22 멤버 12
전립선 종양 과발현된 유전자 1 단백질	류신 풍부 반복 막통과 신경 단백질 4	히알루로난 및 프로테오글라이칸 링크 단백질 2	융모막 소마토맘모트로핀 호르몬-유사 1
수용체-상호작용 세린/트레오닌-단백질 키나아제 2	콜라겐 삼중 나선 반복 함유 단백질 1	디신테그린 및 메탈로프로티나아제 도메인 함유 단백질 30	조절인자 of 미세소관 운동 단백질 3
평형 뉴클레오사이드 수송체 3	엔도텔린-2	융합 동족체의 억제제	레티놀 탈수소효소 14
셀레노단백질 P	피브로모듈린	엽산 수용체 베타	갈라닌
폐 표면활성제-연관 단백질 D	Fc 수용체-유사 B	세포외 설파타제 Sulf-2	트랜스코발라민-2
레티노산 유전자 6 단백질 동족체에 의해 자극	아연 핑거 RAD18 도메인 함유 단백질 C1orf124	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 14	카테콜-O-트랜스페라제 도메인 함유 단백질 1
트레포일 인자 1	성장/분화 인자 15	아르테민	트리펩티딜-펩타다아제 1
조직 인자 경로 억제제 2	신경교-유래된 넥신	아교질 알파-1(XII) 사슬	트렘(Trem)-유사 전사체 1 단백질

[0091]

프로트롬빈	프로고나돌리베린-1	아교질 알파-1(XIV) 사슬	구아닐레이트 사이클라제 활성제 2B
톨-유사 수용체 9	그란자임 K	베타-데펜신 2	유도가능한 T-세포 공동자극인자
세포간 접합 분자 4	인터페론 알파-17	인터루킨-21	
인터루킨-19	인터페론 알파-21	인터루킨-3	
이스트민-2	인터페론 알파-8	인터루킨-7	노치 동족체 2 N-말단-유사 단백질
IRRE-유사 단백질 1 의 Kin	인터페론 오메가-1	인히빈 알파 사슬	라미닌 서브유닛 베타-2
칼리크레인-10	초기 태반 인슐린-유사 펩티드	라미닌 서브유닛 알파-3	뉴로필린-2
잠재-변환 성장 인자 베타-결합 단백질 4	EGF, 라트로필린 및 7 개의 막통과 도메인 함유 단백질 1	염색체 X 상의 탈수소효소/환원효소 SDR 패밀리 멤버	EGF 함유 피불린-유사 세포외 매트릭스 단백질 1
쌍으로 된 면역글로불린-유사 유형 2 수용체 알파	파리브로넥틴유형 3 및 안키린 반복 도메인 단백질 1	FXYD 도메인 함유 이온 수송 조절인자 6	수용체-유형 티로신-단백질 포스파타아제 카파
재생 소도-유래된 단백질 3 알파	라이실 옥시다아제 동족체 4	세린 인코포레이터 2	재생 소도-유래된 단백질 4
E3 우리퀴틴-단백질 리가아제 RNF5	루미칸	스트로멜라이신-3	타키키닌-4
프로타키키닌-1	아드로핀	분비 인단백질 1	매트릭스 메탈로프로티나아제-23
분비 프리즐드 관련 단백질 1, 아이소형 CRA_a	류신 풍부 반복 막통과 단백질 FLRT1	세린 베타-락타마제-유사 단백질 LACTB, 미토콘드리알	보체 C1q 종양 괴사 인자 관련 단백질 5
플라스미노겐 관련 단백질 B	뉴클레오빈딘-2	갈렉틴-3	옵티신
정황적 팔미토일트랜스페라제 ZDHHC16	포스포리파아제 A2	췌장 전구호르몬	전-작은/분비 당단백질
안지오포이에틴 관련 단백질 1	프로엔케팔린-B	임신-특이적 베타-1-당단백질 6	펜트락신 관련 단백질 PTX3
UPF0510 단백질 C19orf63	펩티도글라이칸 인지 단백질 I-베타	딕콥프 관련 단백질 3	카복실에스테라제 8
스캐빈져 수용체 시스테인 풍부 유형 1 단백질 M160	면역글로불린 슈퍼패밀리 함유 류신 풍부 반복 단백질 2	탈수소효소/환원효소 SDR 패밀리 멤버 11	티오레독신 관련 막통과 단백질 4
ER 분해-향상 알파-만노시다아제-유사 2	V-셋 및 면역글로불린 도메인 함유 단백질 2	재생 소도-유래된 단백질 3 감마	주요 촉진인자 슈퍼패밀리 도메인 함유 단백질 2
베타-갈라토시다아제-1-유사 단백질 2	펩티드 YY	RING 핑거 단백질 43	칼리크레인-12
인터루킨-17 수용체 E	레티놀-결합 단백질 3	세메노겔린-2	브레비칸 핵심 단백질
인터루킨-20	아테린	뮤신-15	포리민
인터루킨-25	전위 단백질 SEC63 동족체	뼈 시알로프로테인 2	토르신-1A
PDZ 도메인 함유 단백질 11	변형성장 인자 베타-3	림포탁틴	C-C 모티프 케모카인 23
렐락신-3	단백질 Wnt-10b	성장-조절 알파 단백질	테스티칸-3
레티노이드-유도가능한 세린 카복시펩타다아제	레날라제	R-스폰딘-2	염기성 타액 프롤린 풍부 단백질 4
단구개, 폐 및 비강 상피 암종-연관 단백질 2	전구단백질 전환효소 서브틸리신/켁신 유형 4	막통과 및 꼬인 코일 도메인 함유 단백질 3	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 18
WAP 4-디설파이드 코아 도메인 단백질 5	카복시펩타다아제 A4	VEGF 동반조절된 케모카인 1	CDO 의 브라더
혈소판-유래된 성장 인자 C	올팍토메딘-4	ADM2	베타-1,4-갈락토실트랜스페라제 4
디신테그린 및 메탈로프로티나아제 도메인 함유 단백질 33	인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 복합 산 불안정한 사슬	하이드록시스테로이드 11-베타-탈수소효소 1-유사 단백질	탈수소효소/환원효소 SDR 패밀리 멤버 9
BSD 도메인 함유 단백질 1	아멜로게닌, Y 동형체	델타-유사 단백질 1	엡핀
세포 접합 분자 3	아릴설파타제 F	에프린-A1	오토얀코린
CDC45 관련 단백질	코리오고나도트로핀 서브유닛 베타 변이체 2	섬유아세포 성장 인자 수용체-유사 1	테나스신-R



코트로핀	베타-데펜신 104	GDNF 패밀리 수용체 알파-3	성장 인자	
디아실글리세롤 O-아실트랜스페라제 2	베타-데펜신 105	혈소판 수용체 GI24	단백질 TSPEAR	
3-케토스테로이드 환원효소	베타-데펜신 107	프로고나돌리베린-2	헤파에스틴	
인터루킨-17 수용체 C	단백질 WFDC11	칼리크레인-7	부티로필린 유사 단백질 3	
인터루킨-17 수용체 D	WAP 4-디설파이드 코아 도메인 단백질 6	아포지방단백질 F	부티로필린 유사 단백질 9	
통합 복합체 서브유닛 1	에피겐	단백질 CASC4	라미닌 서브유닛 감마-2	
정합 부착 분자 유사	단백질 FAM19A5	VIP36 유사 단백질	단백질 LMBR1L	
E3 유리퀴틴-단백질 리가아제 LNX	크라우딘-6	마그네슘 수송 단백질 1	뮤신-21	
류신 풍부 반복 막통과 신경 단백질 3	암배아항원 관련 세포 접착 분자 19	아밀로라이드 감수성 아민 옥시다아제 [구리 함유]	내형질 망 만노실-올리고사카라이드 1,2-알파-만노시다아제	
메티오닌 아데노실트랜스페라제 2 서브유닛 베타	트롬보스폰딘 모티프 1 를갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나아제	DNA 손상-조절 자식작용 조절자 단백질 2	췌장 분비 과립 막 주요 당단백질 GP2	
포도칼릭신-유사 단백질 2	단백질 COQ10 A, 미토콘드리알	막통과 단백질 C17orf87	세마포린-4B	
프로미닌-2	막통장 단백질 C19orf41	보체 인자 H 관련 단백질 5	세마포린-5B	
블랙신 도메인 함유 단백질 2	무통장 단백질 C21orf63	FK506-결합 단백질 7	엔실론-사르코글라이칸	
우회통 족체 4	단백질 멤브타통족체 2	세린 인코프레이터 1	구어널레이트-결합 단백질 5	
락토실세라마이드 알파-2,3-시알릴트랜스페라제	코카인- 및 암페타민-조절 전사체 단백질	막통과 및 우리퀴틴-유사 도메인 함유 단백질 1	엑토뉴클레오사이드 트리포스페이트 디포스포하이드로라제 6	
SID1 막통과 패밀리 멤버 2	지방종 HMGIC 융합 파트너-유사 1 단백질	단백질 ERGIC-53-유사	세트린 B3	
스시 도메인 함유 단백질 1	류신 풍부 반복체 함유 단백질 18	톨-유사 수용체 10	단백질 RMD5 동족체 B	
세린/트레오닌-단백질 키나아제 TAO2	류신 풍부 반복체 함유 단백질 25	톨-유사 수용체 8	스캐빈저 수용체 클래스 A 멤버 5	
막통과 프로테아제, 세린 2	류신 풍부 반복체 함유 단백질 3B	셀레노단백질 T	세마포린-6B	
UDP-글루코로산-탈탄산효소 1	류신 풍부 반복체 함유 단백질 3	시알산 결합 Ig-유사 렉틴 11	막통과 단백질 108	
무통장 단백질 C10orf58	Ly6 PLAUR 도메인 함유 단백질 4	소팀 낵신-24	스시 도메인 함유 단백질 3	
티오레독신 관련 막통과 단백질 2	비타민 K 에폭사이드 환원효소 착물 서브유닛 1	보체 C1q 종양 괴사 인자 관련 단백질 1	잠재-변환 성장 인자 베타-결합 단백질 2	
CMP-N-아세틸뉴라미네이트-베타-갈락토스아미드-2,3-시알릴트랜스페라제	트롬보스폰딘 모티프 20 를갖는 디신테그린 및 메탈로프로티나아제	추정 무통장 단백질 UNQ6494/PRO21346	추정 무통장 단백질 UNQ6190/PRO20217	
추정 무통장 단백질 ENSP00000381830	추정 무통장 단백질 ENSP00000386674	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 18 멤버 A	분비 및 막통과-1 전구 변종	
막통과 단백질 119	모안증후군 임계 영역 단백질 1	정소 불현된 단백질 101	아교질 알파-1(XXV) 사슬	
막통과 단백질 98	정소-불현된 단백질 101	시스테인 풍부 분비 단백질 3	네트린 수용체 UNC5D	
Pre-B 림프구 단백질 3	자일로실트랜스페라제 2	보체 C4-A	뮤신-13	
추정 무통장 단백질 C14orf144	단백질 FAM20A	추정 무통장 단백질 PRO2829	ATP-의존성 메탈로프로테아제 YME1L1	
막-결합된 전사 인자 부위-1 프로테아제	막통과 및 면역글로불린 도메인 함유 단백질 1	칼슘-활성화 클로라이드 채널 조절자 2	전구-단백질 전환효소 서브틸리신/켁신 유형 5	
피콜린(아교질/피브리노겐 도메인 함유) 3 (하카타 항원) (NL3) (피콜린 (아교질/피브리노겐 도메인 함유) 3 (하카타 항원), 아이소형 CRA_b)	잠정실해 세포 면역글로불린-유사 수용체-유사 단백질 KIR3DX1 (백혈구 수용체 클러스터 멤버 12)	종양 유발성 1 의 신경아세포종 억제제		

[0092]

[0093] 본원에서 제공된 치료 단백질은 배타적인 것으로 고려되지 않아야 한다. 오히려, 본원에 제공된 명세서로부터 명백한 바와 같이, 본 발명의 방법은 임의의 단백질에 적용가능하고, 여기서, 수용성 폴리머의 부착은 본 발명에 따라 바람직하다. 예를 들면, 치료 단백질은, 그 전체가 참고로 본원에 통합되어 있는 US 2007/0026485에 기재되어 있다.

[0094] **혈액 응고 단백질**

[0095] 일 측면에서, 본 발명의 개시 물질은 혈액응고 단백질이고, 이는 인간 혈장으로부터 유래될 수 있고, 하기에 기재된 재조합 조작 기술에 의해 생산될 수 있다:미국 특허 번호 4,757,006; 미국 특허 번호 5,733,873; 미국 특허 번호 5,198,349; 미국 특허 번호 5,250,421; 미국 특허 번호 5,919,766; 및 EP 306 968.

[0096] 치료 폴리펩티드 예컨대 인자 IX (FIX), 인자 VIII (FVIII), 인자 VIIa (FVIIa), 폰빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI (FXI), 인자 XII (FXII), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF) 및 ADAMTS 13 프로테아제를 포함하는 혈액응고 단백질은 단백분해 효소에 의해 빠르게 분해되고

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

[0097] 본원 명세서에 기술된 바와 같이, 본 발명의 혈액 응고 단백질은, 인자 IX (FIX), 인자 Ⅷ (FⅧ), 인자 Ⅶa (FⅦa), 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XI, 인자 XⅡ (FXⅡ), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF) 및 ADAMTS 13 프로테아제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본원 명세서에서 사용된 용어, "혈액 응고 단백질"은 특정한 천연 혈액 응고 단백질과 관련된 생물학적 활성을 나타내는 임의의 인자 IX (FIX), 인자 Ⅷ (FⅧ), 인자 Ⅶa (FⅦa), 폰 빌레브란트 인자 (VWF), 인자 FV (FV), 인자 X (FX), 인자 XⅡ (FXⅡ), 트롬빈 (FII), 단백질 C, 단백질 S, tPA, PAI-1, 조직 인자 (TF) 및 ADAMTS 13 프로테아제를 의미한다.

[0098] 혈액 응고 캐스케이드 (cascade)는 3 개의 별개의 부분, 즉 내인성, 외인성 및 공통 경로로 구분된다 (Schenone 등, Curr Opin Hematol. 2004;11:272-7). 상기 캐스케이드는 일련의 세린 프로테아제 효소 (자이모겐) 및 단백질 보조인자를 포함한다. 필요한 경우에, 불활성 자이모겐 전구체를, 상기 캐스케이드에서 결과적으로 다음 효소로 전환되는 활성 형태로 전환시킬 수 있다.

[0099] 상기 내인성 경로는 상기 응고 인자 Ⅷ, IX, X, XI, 및 XⅡ를 필요로 한다. 상기 내인성 경로의 개시는 프리칼리크레인 (prekallikrein), 고분자량 키니노겐 (kininogen), 인자 XI (FXI) 및 인자 XⅡ (FXⅡ)가 음으로 하전된 표면에 노출되는 경우에 일어난다. 또한, 혈소판으로부터 분비된 칼슘 이온 및 인지질이 요구된다.

[0100] 상기 외인성 경로는 혈관의 혈관 내강이 손상되는 경우에 일어난다. 막 당단백질 조직 인자가 노출되고, 그 다음, 순환 인자 Ⅶ (FⅦ) 및 기존에 존재하는 소량의 그의 활성화된 형태 FⅦa에 결합한다. 이러한 결합은 FⅦ의 FⅦa로의 완전한 전환, 및 후속적인 칼슘 및 인지질의 존재 하에서의, 인자 IX (FIX)의 인자 IXa (FIXa)로의 전환 및 인자 X (FX)의 인자 Xa (FXa)로의 전환을 촉진시킨다. FⅦa과 조직 인자의 상기 결합은 기질 (FIX 및 FX)에 대한 FⅦ의 결합 부위를 더 근접하게 하고, 상기 FⅦa의 효소 활성을 증진시키는 형태적 변화 (conformational change)를 유도함으로써 단백분해적 활성을 증진시킨다.

[0101] 상기 FX의 활성화는 상기 2 개의 경로의 공통점이 된다. 인지질 및 칼슘과 함께, 인자 Va (FVa) 및 Xa는 프로트롬빈을 트롬빈 (프로트롬비나제 컴플렉스)으로 전환시키며, 이것은 후에 피브리노겐을 분해하여 피브린 모노머를 형성시킨다. 상기 모노머는 중합하여 피브린 가닥을 형성한다. 인자 XⅢa (FXⅢa)는 이들 가닥을 서로 공유적으로 결합시켜 단단한 그물을 형성시킨다.

[0102] FⅦ의 FⅦa로의 전환은 또한 트롬빈, FIXa, FXa, 인자 XIa (FXIa), 및 인자 XⅡa (FXⅡa)를 포함한 다수의 프로테아제에 의해서 촉진된다. 상기 캐스케이드의 초기 단계의 억제를 위해서, 조직 인자 경로 억제제는 FⅦa/조직 인자/FXa 생성물 컴플렉스를 표적으로 한다.

[0103] 인자 Ⅶa

[0104] FⅦ (또한, 안정한 인자 또는 프로컨버틴 (proconvertin)으로 알려짐)은 지혈 및 응고에 중추적인 역할을 하는 비타민 K-의존성 세린 프로테아제 당단백질이다 (Eigenbrot, Curr Protein Pept Sci. 2002;3:287-99).

[0105] FⅦ은 간에서 합성되며, 48 kD의 단일-쇄 당단백질로서 분비된다. FⅦ은 지질 막과 단백질의 상호 작용을 관장하는 9 내지 12 개의 잔기를 갖는 아미노-말단 감마-카복시글루탐산 (Gla) 영역, 카복시-말단 세린 프로테아제 영역 (촉매적 영역), 및 조직 인자와의 상호작용을 매개하는 칼슘 이온 결합 부위를 함유하는 2 개의 표피 성장 인자-유사 영역으로 구성된 유사한 단백질 영역 구조를, 모든 비타민 K-의존성 세린 프로테아제 당단백질과,공유한다. 감마-글루타밀 카복실라제는 상기 분자의 아미노-말단 부분에서 Gla 잔기의 카복실화를 촉진시킨다. 카복실라제는 그의 작용에 의한, 에폭사이드 형태로 산화되는 비타민 K의 환원된 형태에 의존적이다. 비타민 K 에폭사이드 환원 효소는 비타민 K의 에폭사이드 형태를 환원된 형태로 다시 전환시키는데 필요하다.

[0106] FⅦ의 대부분은 자이모겐 형태로 혈장 내에서 순환하며, 이 형태의 활성화는 아르기닌 152와 이소류신 153 사이의 펩티드 결합의 분해를 야기한다. 상기 결과로 생성되는 활성화된 FⅦa는 단일 이황화 결합 (Cys 135 대 Cys 262)을 통해서 연결된 NH2-유래된 경쇄 (light chain) (20 kD) 및 COOH 말단-유도된 중쇄 (heavy chain) (30 kD)로 구성된다. 상기 중쇄는 촉매적 영역을 함유하는 반면, 상기 경쇄는 막-결합성 Gla 영역을 함유한다.

[0107] 유전적 인자 및 환경적 인자에 의해서 결정된 FⅦ의 혈장 농도는 약 0.5 ㎎/㎖이다 (Pinotti 등, Blood.

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

[0108] 유전적 FVII 결핍은 일반적인 집단에서 500,000 명당 1 증례로 추정되는 출현율을 갖는 희귀한 상염색체 열성 출혈성 장애이다 (Acharya 등, J Thromb Haemost. 2004;2248-56). 억제제로부터 얻어지는 FVII 결핍 또한 매우 희귀하다. 또한 세팔로스포린 (cephalosporins), 페니실린 및 경구용 항응고제와 같은 약물과 관련하여 나타나는 결핍에 대한 증례가 보고되고 있다. 더욱이, 획득된 FVII 결핍은 자발적으로 또는 골수종, 패혈증, 재생불량성 빈혈과 같은 다른 질병과 함께, 인터루킨-2 및 항 흉선 세포성 글로불린 요법과 함께 나타나는 것으로 보고되고 있다.

[0109] 참조 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는, 예를 들어, 게놈 서열에 대한 유전자 은행 (GenBank) 수탁번호 제J02933호, cDNA에 대한 M13232 (Hagen 등 PNAS 1986; 83: 2412-6), 및 폴리펩티드 서열에 대한 P08709를 포함한다 (본원 명세서에 전체로서 통합된 참고문헌). FVII의 다양한 다형현상은 예를 들어, 문헌 (참조: Sabater-Lleal 등, Hum Genet. 2006; 118:741-51; 본 발명에 온전히 참고로 통합됨)에 기술되어 있다.

[0110] 인자 IX

[0111] FIX는 FX를 칼슘 이온, 인지질 및 FVIIIa의 존재 하에서 그의 활성 형태로 전환시킴으로써 치료의 내인성 경로에 참여하는 비타민 K-의존성 혈장 단백질이다. FIX는 FX 내의 특정한 아르기닌-이소류신 결합에 대한 특이성을 갖는 세린 프로테아제로서 현저한 촉매적 능력을 갖는다. FIX의 활성화는 FIX로부터 활성화된 펩티드 절단을 야기하는 FXIa에 의해 발생하며, 하나 이상의 이황화 결합을 갖는 2 개의 쇄를 포함하는 활성화된 FIX 분자를 생산한다. FIX의 결함은 열성 X-연관된 혈우병 B의 원인이 된다.

[0112] 혈우병 A 및 B는 각각 FVIII 및 FIX 폴리펩티드에서의 결핍을 특징으로 하는 유전병이다. 상기 결핍의 근본적 원인은 종종, 양자 모두 X 염색체 상에 위치하는 FVIII 및 FIX 유전자의 돌연변이에 있다. 혈우병에 대한 전통적인 치료법은 흔히 정상 개체로부터 유래하는 혼합된 혈장 (pooled plasma) 또는 반-정제된 응고 단백질의 정맥내 투여를 포함한다. 이들 제제는 감염성 프리온 (prions), HIV, 파보바이러스, 간염 A, 및 간염 C와 같은 병원성 작용제 또는 바이러스에 의해서 오염될 수 있다. 따라서, 인간 혈청의 사용을 필요로 하지 않는 치료학적 약제에 대한 요구가 절실하다.

[0113] FIX 활성의 감소 정도는 혈우병 B의 중증도에 정비례한다. 혈우병 B의 현행 치료는 결여된 단백질을 혈장-유래 또는 재조합 FIX에 의해서 대체시키는 것 (소위 FIX 치환 또는 대체 치료 또는 치료법)을 포함한다.

[0114] FIX의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열은 예를 들어, UniProtKB/Swiss-Prot 수탁번호 제P00740호, 미국 특허 제6,531,298호 및 도 1에서 찾아볼 수 있다 (서열번호: 1)

[0115] 인자 VIII

[0116] 응고 인자 VIII (FVIII)은 혈장 내에서 매우 낮은 농도로 순환하며, 폰 빌레브란트 (VWF)에 비-공유적으로 결합된다. 지혈 중, FVIII은 VWF로부터 분리되고, 칼슘 및 인지질 또는 세포성 막의 존재 하에서 활성화 속도를 증진시킴으로써 활성화된 인자 IX (FIXa)에 매개된 FX 활성화를 위한 보조인자로서 작용한다.

[0117] FVIII은 영역 구조 A1-A2-B-A3-C1-C2를 갖는 약 270 내지 330 kD의 단일-쇄 전구체로 합성된다. 혈장으로부터 정제되는 경우 (예를 들어, "혈장-유래" 또는 "혈장성"), FVIII은 중쇄 (A1-A2-B) 및 경쇄 (A3-C1-C2)로 구성된다. 상기 경쇄의 분자 질량은 80 kD인 반면, 상기 B 영역 내에서의 단백분해로 인하여, 상기 중쇄는 90 내지 220 kD의 범위이다.

[0118] FVIII은 또한 출혈성 장애에서 치료학적 사용을 위해 재조합 단백질로 합성된다. 다양한 생체 외 시험이 치료학적 의약으로서의 재조합 FVIII (rFVIII)의 잠재적 효능을 결정하기 위하여 고안되었다. 이들 시험방법은 내인성 FVIII의 생체내 효과를 모사한다. FVIII의 생체 외 트롬빈 처리는 생체 외 시험방법에 의해서 측정된 것으로서, 그의 응혈원 활성의 빠른 증가 및 그에 따른 감소를 야기한다. 상기 활성화 및 불활성화는 중쇄 및 경쇄 양자에서 특이적으로 제한된 단백분해와 일치하며, 이는 FVIII에서 다양한 결합성 항원 결정 부위 (epitopes)의 이용 가능성을 변화시킴으로써, 예를 들어, FVIII가 VWF로부터 해리되어 인지질 표면에 결합하도록 하거나, 특정의 단일 클론성 항체에 대한 결합 능력을 변화시킨다.

[0119] FVⅢ의 결여 또는 기능부전은 가장 빈번한 출혈성 장애인 혈우병 A와 연관된다. 혈우병 A의 관리를 위해서 선택된 치료는 혈장 유래 또는 rFVⅢ 농축물에 의한 대체요법이다. 1% 이하의 양의 FVⅢ을 갖는 중증 혈우병 A를 앓는 환자는 일반적으로 투약 사이에 1% 이상으로 FVⅢ을 유지시킬 목적으로 예방적 요법을 시행한다. 순환 중인 상기 다양한 FVⅢ 생성물의 평균 반감기를 고려할 때, 상기 결과는 통상적으로 FVⅢ을 1 주일에 2 내지 3 회 제공함으로써 달성될 수 있다.

[0120] 참조 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열은, 예를 들어, UniProtKB/Swiss-Prot P00451 (FA8_HUMAN)을 포함한다 (참조: Gitschier J 등, Characterization of the human Factor Ⅷ gene, Nature, 312 (5992): 326-30 (1984); Vehar GH 등, Structure of human Factor Ⅷ, Nature, 312 (5992):337-42 (1984); Thompson AR. Structure and Function of the Factor Ⅷ gene and protein, Semin Thromb Hemost, 2003:29;11-29 (2002)).

[0121] 폰 빌레브란트 인자

[0122] 폰 빌레브란트 인자 (VWF)는 크기가 약 500 내지 20,000 kD의 범위인 멀티머 (multimers) 계열로서 혈장 중에 순환하는 당단백질이다. VWF의 멀티머 형태는 이황화 결합에 의해서 함께 연결된 250 kD 폴리펩티드 서브유니트로 구성된다. VWF는 손상된 혈관 벽의 내피하층에 대한 초기 혈소판 부착을 매개한다. 오로지 더 큰 멀티머만이 지혈 활성을 나타낸다. 상기 내피세포는 VWF의 큰 폴리머 형태를 분비하고, 작은 분자량을 갖는 VWF (저분자량 VWF)는 단백분해적 분해로부터 생기는 것으로 추측된다. 큰 분자 질량을 갖는 상기 멀티머는 내피세포의 바이벨-팔레이드체 (Weibel-Pallade bodies) 내에 저장되며, 자극에 의해 유리된다.

[0123] VWF는 내피세포 및 거핵세포에 의해서, 대부분 반복된 영역으로 구성되는 프로-VWF 전구체 (prepro-VWF)로서 합성된다. 시그날 펩티드의 분해에 의해서 프로-VWF는 그의 C-말단 구역에서 이황화 결합을 통해서 다이머화한다. 상기 다이머는 유리 말단의 말단부 사이의 이황화 결합에 의해 지배를 받는 멀티머화를 위한 프로모터로서 작용한다. 멀티머로의 집합에 이어서 프로펩티드 서열의 단백분해적 제거가 뒤따른다 (Leyte 등, Biochem. J. 274 (1991), 257-261).

[0124] VWF의 클로닝된 cDNA로부터 예측되는 일차 번역 생성물은 2813-잔기 전구체 폴리펩티드 (프로-VWF 전구체)이다. 상기 프로-VWF 전구체는 22 개의 아미노산 시그날 펩티드 및 741 개의 아미노산 프로펩티드로 구성되며, 성숙 VWF는 2050 개의 아미노산을 포함한다 (Ruggeri Z.A., and Ware, J., FASEB J., 308-316 (1993)).

[0125] VWF에서의 결함은 다소 현저한 출혈성 표현형을 특징으로 하는 폰 빌레브란트병 (VWD)에 대한 원인이 된다. VWD 유형 3은 VWF가 완전히 결여된 가장 중증인 형태이며, VWD 유형 1은 VWF의 양적인 손실과 관련되며, 그의 표현형은 매우 약할 수 있다. VWD 유형 2는 VWF의 성질상의 결함과 관련되며, VWD 유형 3과 같은 정도로 중증일 수 있다. VWD 유형 2는 다수의 서브 형태를 가지며, 이들 중의 일부는 고분자량 멀티머의 손실 또는 감소와 연관된다. 폰 빌레브란트 질환 유형 2a (VWD-2A)는 중간체 및 큰 멀티머 양자의 손실에 의해 특성화된다. VWD-2B는 최고 분자량의 멀티머의 손실에 의해 특성화된다. VWF와 관련된 그 밖의 다른 질환 및 장애는 당해 기술분야에서 공지되어 있다.

[0126] 프로-VWF 전구체의 폴리뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 각각 유전자 은행수탁번호 제NM_000552 및 NP_000543으로 이용 가능하다.

[0127] 본 발명에 따른 그 밖의 다른 치료 단백질은 당해 기술분야에서, 예를 들어, 문헌 (Mann KG, Thromb Haemost, 1999;82:165-74)에 기술되어 있다.

[0128] **A. 폴리펩타이드**

[0129] 일 측면에서, 본 발명의 시작 물질은 단백질 또는 폴리펩타이드이다. 본원 명세서에서 사용된, 용어 치료 단백질은 치료 단백질과 관련된 생물학적 활성을 나타내는 임의의 치료 단백질 분자를 나타낸다. 본 발명의 일 구현예에서, 상기 치료 단백질 분자는 전체-길이 치료 단백질이다.

[0130] 고려되는 치료 단백질 분자는, 전체-길이 단백질, 전체 길이 단백질의 전구체, 전체 길이 단백질의 생물학적 활성 서브유니트 또는 단편뿐만 아니라, 치료 단백질의 임의의 형태의 생물학적 활성 유도체 및 변이체를 포함한다. 따라서, 치료 단백질은, (1) 본원 명세서에 기술된 기준 핵산 또는 아미노산 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드에 대해서 적어도 약 25, 약 50, 약 100, 약 200, 약 300, 약 400, 또는 그 이상의 아미노산의 구역에 걸쳐서, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 이상 또는 그 이상의 아미노산 서열 동일성을 가지며; 및/또는 (2) 본원 명세서에 기술된 바와 같은 기준 아미노산 서열, 그의 면역원성 단편 및/또는 그의 보존적으로 변형된 변이체를

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

[0131] 본 발명에 따르면, 용어 "재조합 치료 단백질"은 재조합 DNA 기술을 통해서 수득된 임의의 치료 단백질을 포함한다. 특정의 구현예에서, 상기 용어는 본원 명세서에 기술된 바와 같은 단백질을 포함한다.

[0132] 본원 명세서에서 사용된, "내인성 치료 단백질"은 치료를 받도록 의도된 포유 동물로부터 유래된 치료 단백질을 포함한다. 상기 용어는 또한, 상기 포유 동물에 존재하는 이식 유전자 (transgene) 또는 임의의 다른 외래 DNA로부터 전사된 치료 단백질을 포함한다. 본원 명세서에서 사용된 용어, "외인성 치료 단백질"은 치료를 받도록 의도된 포유동물로부터 유래하지 않는 치료 단백질을 포함한다.

[0133] 본원 명세서에서 사용된, "혈장-유래 치료 단백질" 또는 "혈장성"은 응고 경로에 참여하는 특성을 갖는 포유동물로부터 수득된 혈액 내에서 발견된 임의의 형태의 단백질을 포함한다.

[0134] 본원 명세서에서 사용된, "생물학적 활성 유도체" 또는 "생물학적 활성 변이체"는, 결합 특성과 같은 상기 분자와 실질적으로 동일한 기능적 및/또는 생물학적 특성을 가지며, 및/또는 펩티드 골격 또는 기본 폴리머 단위와 같은 동일한 구조적 기반을 갖는 분자의 임의의 유도체 또는 변이체를 포함한다.

[0135] "유사체" 예컨대 "변이체" 또는 "유도체"는 천연적으로 발생한 분자와, 비록 특정의 경우에 상이하나, 구조적으로 실질적으로 유사하며 동일한 생물학적 활성을 갖는 화합물이다. 예를 들어, 폴리펩티드 변이체는 참조 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 구조를 공유하며, 동일한 생물학적 활성을 갖는 폴리펩티드를 나타낸다. 변이체 또는 유사체는, (i) 폴리펩티드의 하나 이상의 말단 및/또는 천연적으로 발생한 폴리펩티드 서열의 하나 이상의 내부 구역 (예를 들어, 단편)에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 결실, (ii) 폴리펩티드의 하나 이상의 말단 (전형적으로 "부가" 또는 "융합") 및/또는 천연적으로 발생한 폴리펩티드 서열의 하나 이상의 내부 구역 (전형적으로 "삽입")에서 하나 이상의 아미노산의 삽입 또는 부가, 또는 (iii) 천연적으로 발생한 폴리펩티드 서열에서 하나 이상의 아미노산의 다른 아미노산에 대한 치환을 포함하는 하나 이상의 돌연변이를 근거로 하여, 유사체가 유도된 천연적으로 발생한 폴리펩티드와 비교하여, 그들의 아미노산 서열의 조성이 상이하다. 예를 들어, "유도체"는 예를 들어, 화학적으로 변형된 참조 폴리펩티드와 동일하거나 실질적으로 유사한 구조를 공유하는 폴리펩티드를 나타낸다.

[0136] 변이체 폴리펩티드는 유사체 폴리펩타이드의 유형이고, 하나 이상의 아미노산 잔기가 본 발명의 치료 단백질 아미노산 서열에 첨가된 삽입 변이체를 포함한다. 삽입은 단백질의 어느 하나 또는 양자의 말단에 위치할 수 있으며, 및/또는 치료 단백질 아미노산 서열의 내부 구역 내에 위치할 수 있다. 어느 하나 또는 양 말단에 추가적인 잔기를 갖는 삽입 변이체는, 예를 들어, 융합 단백질 및 아미노산 태그 (tag) 또는 다른 아미노산 라벨 (label)을 포함하는 단백질을 포함한다. 일 관점에서, 상기 치료 단백질 분자는 특히 분자가 E. coli와 같은 박테리아 세포에서 재조합적으로 발현되는 경우에, N-말단 Met를 임의적으로 함유한다.

[0137] 결실 변이체에서, 본원 명세서에 기술된 바와 같은 치료 단백질 폴리펩티드 내의 하나 이상의 아미노산 잔기가 제거된다. 결실은 치료 단백질 폴리펩티드의 어느 하나 또는 양 말단에서 유효할 수 있으며, 및/또는 상기 치료 단백질 아미노산 서열 내의 하나 이상의 잔기의 제거와 함께 일어날 수 있다. 따라서, 결실 변이체는 치료 단백질 폴리펩티드 서열의 단편을 포함한다.

[0138] 치환 변이체에서, 치료 단백질 폴리펩티드의 하나 이상의 아미노산 잔기가 제거되고, 대체 잔기로 치환된다. 일 관점에서, 상기 치환은 사실상 보존적이며, 상기 유형의 보존적 치환은 당해 기술 분야에서 잘 알려져 있다. 대안적으로, 본 발명은 또한 비-보존적인 치환을 포함한다. 보존적 치환의 예는 문헌 (Lehninger, Biochemistry, 2nd Edition; Worth Publishers, Inc., 뉴욕 (1975), pp.71-77)에 기술되어 있으며, 바로 아래에서 설명한다.

보존적 치환

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

[0139]

[0140] 대안적으로, 예시적인 보존적 치환은 하기에서 바로 나타나 있다.

보존적 치환 II

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

[0141]

[0142] B. 폴리뉴클레오티드

[0143] 본 발명의 치료 단백질을 인코딩하는 핵산은, 예를 들면 및 비제한적으로, 유전자, pre-mRNAs, mRNAs, cDNAs, 다형성 변이체, 대립유전자, 합성 및 천연 생성 돌연변이체를 포함한다.

[0144] 본 발명의 치료 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한, 비제한적으로 하기인 것을 포함한다: (1) 엄격한 하이브리드화 조건 하에서 본원에서 기재된 바와 같은 참조 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산, 및 그의 보존적으로 변형된 변이체로 특이적으로 하이브리드화하는 것; (2) 적어도 약 25, 약 50, 약 100, 약 150, 약 200, 약 250, 약 500, 약 1000, 또는 그 초과 뉴클레오타이드의 영역에 걸쳐 (성숙 단백질의 1218 뉴클레오타이드의 전체 길이 서열까지) 본원에서 기재된 참조 핵산 서열에 대해 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 그 초과 뉴클레오타이드 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 갖는 것. 예시적인 "엄격한 하이브리드화" 조건은 하기를 포함한다: 50% 포름아마이드, 5X SSC, 20 mM Na·PO4, pH 6.8에서 42oC에서 하이브리드화; 및 55 ℃에서 30분 동안 1X SSC에서 세정. 이들 예시적인 조건에의 변형은 하이브리드화될 서열의 길이 및 GC 뉴클레오타이드 함량을 기준으로 만들어질 수 있다는 것으로 이해된다. 당해분야에서의 식 표준은 적절한 하이브리드화 조건을 결정하는데 적절하다. 참조 Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (제2판, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)§§ 9.47-9.51.

[0145] "천연 생성" 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열은 하기를 비제한적으로 포함하는 포유류로부터 전형적으로 유래된다: 영장류, 예들 들면, 인간; 설치료, 예들 들면, 랫트, 마우스, 햄스터; 소, 돼지, 말, 양, 또는 어떤 포유류. 본 발명의 핵산 및 단백질은 재조합 분자일 수 있다 (예들 들면, 이종성 및 야생형 서열 또는 그의 변이체를 인코딩함, 또는 비-천연 생성).

[0146] **C. 치료 단백질의 생산**

[0147] 치료 단백질의 생산은 정제된 치료 단백질을 수득하기 위하여 (i) 유전자 가공에 의해서 재조합 DNA를 생산하고, (ii) 예를 들어, 형질 주입, 전기천공 또는 미량주사에 의해서 (단, 이들로 제한되지 않는다) 원핵 또는 진핵 세포 내로 재조합 DNA를 도입시키고, (iii) 상기 형질전환된 세포를 배양하고, (iv) 치료 단백질을, 예를 들어, 구성적으로 또는 유도에 의해서 발현시키고, (v) 예를 들어, 배양 배지로부터, 또는 상기 형질 전환된 세포를 거두어 들임으로써 상기 치료 단백질을 분리시키기 위한 당해 기술분야에서 공지된 모든 방법을 포함한다.

[0148] 다른 측면에서, 상기 치료 단백질은 약물학적으로 허용되는 치료 단백질 분자를 생산하는 것을 특징으로 하는 적합한 원핵 또는 진핵 숙주 시스템 내에서의 발현에 의해서 생산된다. 진핵세포의 예로는 CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep, 및 HepG2와 같은 포유동물 세포를 들 수 있다.

[0149] 상기 치료 단백질의 제조를 위해서 광범위한 종류의 벡터가 사용되며, 진핵성 및 원핵성 발현 벡터로부터 선택된다. 원핵성 발현을 위한 벡터의 예로는 pRSET, pET, 및 pBAD와 같은 플라스미드가 포함되나, 이들로 제한되지 않으며, 여기에서 원핵성 발현 벡터에서 사용된 프로모터는 lac, trc, trp, recA, 또는 araBAD 중의 1 이상을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 진핵성 발현을 위한 벡터의 예로는, (i) AOX1, GAP, GAL1, 또는 AUG1과 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 프로모터를 사용하는, pAO, pPIC, pYES, 또는 pMET와 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 효모내의 발현을 위한 벡터; (ii) PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, 또는 polh와 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 프로모터를 사용하는 pMT, pAc5, pIB, pMIB, 또는 pBAC와 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 곤충 세포에서의 발현을 위한 벡터, 및 (iii) 포유동물 세포에서의 발현을 위한 pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, 또는 pBPV와 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 벡터, 및 일 관점에서, CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV, 및 β-액틴과 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 프로모터를 사용하는, 우두 바이러스 (Vaccinia Virus), 아데노-연관 바이러스, 포진 바이러스 (Herpes Virus), 또는 레트로바이러스와 같은 (단, 이들로 제한되지 않는다) 바이러스 시스템으로부터 유도된 벡터가 포함된다.

[0150] **D. 투여**

[0151] 일 구현예에서, 본 발명의 콘주게이션된 치료 단백질은 정맥내, 근육내 또는 복강내 주사와 같은 주사에 의해서 투여될 수 있다.

[0152] 일 구현예에서, 본 발명의 콘주게이션된 치료 단백질을 포함하는 조성물을 인간 또는 시험 동물에게 투여하기 위하여, 상기 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 상기 용어 "약제학적으로" 또는 "약물학적으로 허용되는"은 이하에 기술되는 바와 같이, 당해 기술분야에서 잘 알려진 경로를 사용하여 투여되는 경우, 안정하며, 응집 및 분해 생성물과 같은 단백질 분해를 억제하고, 이에 더하여 알레르기 또는 그 밖의 다른 유해반응을 야기하지 않는 분자 물질 및 조성물을 나타낸다. "약제학적으로 허용되는 담체"에는 상술한 성분들을 포함한 임의의 모든 임상학적으로 유용한 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등이 포함된다.

[0153] 본원 명세서에서 사용된, "유료량"은 질환 또는 장애를 치료하거나 질환 또는 장애의 증상을 완화시키는데 적당한 용량을 포함한다. 일 구현예에서,"유효량"은 본원 명세서에 기술된 바와 같은 출혈성 장애를 갖는 포유동물을 치료하는데 적합한 용량을 포함한다.

[0154] 상기 조성물은 경구적으로, 국소적으로, 경피적으로, 비경구적으로, 흡입 스프레이에 의해서, 질내로, 직장으로, 또는 두개내 (intracranial) 주사에 의해서 투여될 수 있다. 상기 용어, 비경구는 본원 명세서에서 사용된 바와 같이, 피하 주사, 정맥내, 근육내, 낭내 (intracisternal) 주사, 또는 주입 기술을 포함한다. 정맥내, 피내 (intradermal), 근육내, 유선내, 복강내, 척추강내 (intrathecal), 안구후, 폐내 주사에 의한 투여, 또는 특정 부위에서의 외과적 이식 역시 고려된다. 일반적으로, 조성물은 본질적으로 수용주에게 유해할 수 있는 다른 불순물뿐만 아니라, 발열 인자 (pyrogens)를 함유하지 않는다.

[0155] 상기 조성물의 단일 또는 복수의 투여는 치료하는 의사에 의해서 선택된 용량 및 패턴으로 수행될 수 있다. 질병의 예방 또는 치료를 위해서, 적절한 투여량은 상술한 바와 같이 치료될 질병의 유형, 질병의 중증도 및 과정, 약물이 예방적 또는 치료학적 목적으로 투여되는지 여부, 선행 치료법, 환자의 임상적 병력 및 약물에 대한 반응, 및 주치의의 판단에 따라 좌우될 수 있다.

[0156] 본 발명은 또한, 본원 명세서에 정의된 바와 같은 콘주게이션된 치료 단백질의 유효량을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 상기 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 염, 완충제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 약제학적 조성물은 상기 정의된 출혈성 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 상기 약제학적 조성물은 용액 또는 동결건조된 생성물일 수 있다. 상기 약제학적 조성물의 용액은 임의의 적합한 동결건조 공정에 적용될 수 있다.

[0157] 추가적인 측면으로서, 본 발명은 대상체에게 투여하기 위하여, 그 사용을 용이하게 하는 방식으로 포장된 본 발명의 조성물을 포함하는 키트 (kits)를 포함한다. 일 구현예에서, 이러한 키트는 상기 방법을 실시할 때의 화합물 또는 조성물의 사용을 설명하는 것으로 용기에 부착되거나 포장에 포함된 라벨을 갖는 밀봉된 병 또는 용기와 같은 용기 내에 포장된, 본원 명세서에 기술된 화합물 또는 조성물 (예를 들어, 콘주게이션된 치료 단백질을 포함하는 조성물)을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 키트는 콘주게이션된 치료 단백질을 포함하는 조성물을 담은 제1 용기, 및 상기 제1 용기 내의 조성물을 위한 생리학적으로 허용되는 재구성 용액을 담은 제2 용기를 함유한다. 일 관점에서, 상기 화합물 또는 조성물은 단위 투약 형태으로 포장된다. 상기 키트는 특정한 투여 경로에 따라 상기 조성물을 투여하는데 적합한 장치를 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 키트는 치료학적 단백질 또는 펩티드 조성물의 사용을 설명하는 라벨을 함유한다.

[0158] **수용성 폴리머**

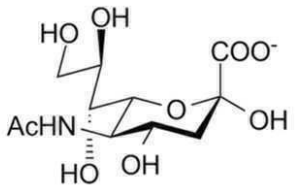
[0160] *일 측면에서, 제공된 치료 단백질 유도체 (즉, 콘주게이션된 치료 단백질) 분자는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 분지형 PEG, 폴리시알산 (PSA), 하이드록시알킬 전분 (HAS), 하이드록실에틸 전분 (HES), 탄수화물, 폴리사카라이드, 풀루란, 키토산, 히알루론산, 황산 콘드로이틴, 황산 더마탄, 녹말, 덱스트란, 카복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 옥시드 (PAO), 폴리알킬렌 글리콜 (PAG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-말레인산 무수물 공중합체, 폴리스테렌-말레인산 무수물 공중합체, 폴리(1-히드록시메틸에틸렌 히드록시메틸 포름알) (PHF), 2-메타크릴로일록시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)를 포함하나, 이들로 제한되지 않는 수용성 폴리머에 결합된다. 본 발명의 일 구현예에서, 상기 수용성 폴리머는 350 내지 120,000, 500 내지 100,000, 1,000 내지 80,000, 1,500 내지 60,000, 2,000 내지 45,000 Da, 3,000 내지 35,000 Da, 및 5,000 내지 25,000 Da의 분자량 범위를 갖는 시알산 분자로 구성된다. 상기 수용성 폴리머의 커플링 반응은 단백질에 대한 직접 커플링에 의해서, 또는 링커 분자를 통해서 수행될 수 있다. 화학적 링커의 한가지 예는 탄수화물-선택적 히드라지드 및 설프히드릴-반응성 말레이미드기를 함유하는 MBPH (4-[4-N-말레이미도페닐]부티르산 히드라지드)이다 (Chamow 등, J Biol Chem 1992;267:15916-22). 그 밖의 다른 예시적이고 바람직한 링커는 하기에서 기술한다.

[0161] 일 구현예에서, 상기 유도체는 천연 치료학적 치료 단백질 생성물의 전체 기능적 활성을 보유하며, 천연 치료학적 치료 단백질 생성물과 비교할 때, 연장된 생체내 반감기를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 상기 유도체는 천연 치료 단백질에 비해서 적어도 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 또는 150 퍼센트 (%)의 생물학적 활

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

[0162] **A. 시알산 및 PSA**

[0163] PSA는 N-아세틸뉴라민산의 폴리머 (일반적으로 호모폴리머)로 이루어진다. 2차 아미노 그룹은 통상 아세틸 그룹을 갖지만, 대신에 글라이콜릴 그룹을 보유할 수 있다. 하이드록실 그룹 상의 가능한 치환체는 아세틸, 락틸 에틸, 설페이트, 및 포스페이트 그룹을 포함한다.



N-아세틸뉴라민산
Neu5Ac

[0164]

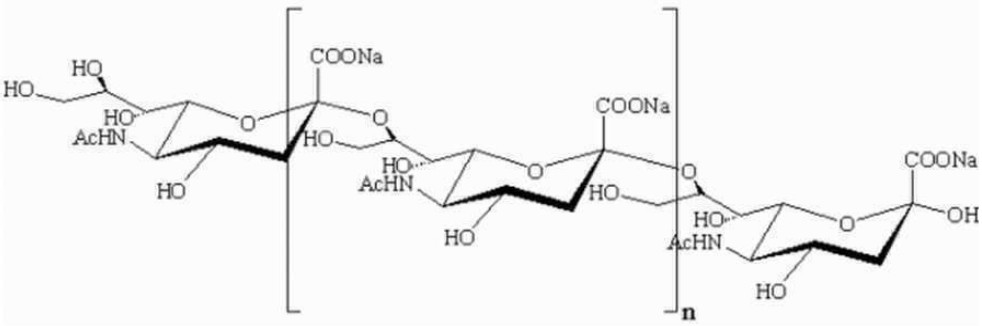
[0165] 시알산 (N-아세틸뉴라민산)의 구조

[0166] PSA 및 mPSA은 일반적으로 2,8- 또는 2,9- 글라이코사이드 결합 또는 이들의 조합 (예들 들면 2,8- 및 2,9- 결합을 대체)에 의해 결합된 N-아세틸뉴라민산 모이어티들로 본질적으로 이루어진 선형 폴리머를 포함한다. 특히 바람직한 PSA 및 mPSA에서, 글라이코사이드 결합은 α-2,8이다. 그와 같은 PSA 및 mPSA는 편리하게 콜로민산으로부터 유래되고, "CA" 및 "mCA"인 것으로 본원에서 정의된다. 전형적인 PSA 및 mPSA는 적어도 2, 바람직하게는 적어도 5, 더 바람직하게는 적어도 10 및 가장 바람직하게는 적어도 20 N-아세틸뉴라민산 모이어티들을 포함한다. 따라서, 2 내지 300 N-아세틸뉴라민산 모이어티들, 바람직하게는 5 내지 200 N-아세틸뉴라민산 모이어티들, 또는 가장 바람직하게는 10 내지 100 N-아세틸뉴라민산 모이어티들을 포함할 수 있다. PSA 및 CA는 바람직하게는 N-아세틸뉴라민산 이외의 당 모이어티들이 본질적으로 없다. 따라서 PSA 및 CA는 바람직하게는 적어도 90 %, 더 바람직하게는 적어도 95 % 및 가장 바람직하게는 적어도 98 % N-아세틸뉴라민산 모이어티들을 포함한다.

[0167] (예를 들면 mPSAS 및 mCA에서와 같이)PSA 및 CA가 N-아세틸뉴라민산 이외의 모이어티들을 포함하는 경우 이들은 바람직하게는 폴리머 사슬의 말단의 한쪽 또는 양쪽에서 위치한다. 그와 같은 "다른" 모이어티들은, 예를 들면, 산화 또는 환원에 의해 말단 N-아세틸뉴라민산 모이어티들로부터 유래된 모이어티들일 수 있다.

[0168] 예를 들면, WO-A-0187922은 그와 같은 mPSA 및 mCA을 기재하고 있고 여기서 비-환원 말단 N-아세틸뉴라민산 단위는 나트륨 페리오데이트와의 반응에 의해 알데하이드 그룹으로 전환된다. 또한, WO 2005/016974는 그와 같은 mPSA 및 mCA을 기재하고 있고 여기서 환원 말단 N-아세틸뉴라민산 단위에 대해 환원 말단 N-아세틸뉴라민산 단위에서 고리를 환원적으로 개방하기 위해 환원이 수행되고, 이로써 근접 디올 그룹이 형성되고, 그 다음 근접 디올 그룹을 알데하이드 그룹으로 전환시키기 위해 산화가 수행된다.

[0169] 시알산 풍부 당단백질은 인간 및 다른 유기체에서 셀렉틴에 결합한다. 인간 인플루엔자 감염에서 중요한 역할을 한다. 예들 들면, 시알산은 만노오스 결합 렉틴으로부터 호스트 세포 또는 세균의 표면 상에 만노오스 항원을 숨길 수 있다. 이는 보체의 활성화를 방지한다. 시알산은 또한, 페뉼티메이트(penultimate) 갈락토오스 잔기를 숨기고 따라서 간 실질 세포 상의 갈락토오스 수용체에 의해 당단백질의 빠른 청소를 방치한다.

[0170] 

[0171] 콜로민산 (N-아세틸뉴라민산의 호모폴리머)의 구조

[0172] 콜로민산 (PSA의 하위분류)는 α (2→8) 케토사이드 결합을 갖는 N-아세틸뉴라민산 (NANA)의 호모폴리머이고, 그 중에서도, K1 항원을 갖는 에스케리치아 콜리의 특정 균주에 의해 생산된다. 콜로민산은 많은 생리 기능을 갖는다. 약물 및 화장품의 원료로서 중요하다.

[0173] 폴리시알릴화된 및 비변형 아스파라기나제에 의한 생체내 비교 연구는, 폴리시알릴화가 효소의 반감기를 증가시킨다는 것을 보여주었다 (Fernandes 및 Gregoriadis, Biochimica Biophysica Acta 1341: 26-34, 1997).

[0174] 본원 명세서에서 사용된, "시알산 부위"는 수성 용액 또는 현탁액에서 가용성이며, PSA-치료 단백질 복합체를 포유동물에 약제학적 유효량으로 투여하면 부작용과 같은 부정적인 영향이 거의 없거나 전혀 없는 시알산 모노머 또는 폴리머 ("폴리사카라이드")를 포함한다. 상기 폴리머는 일 관점에서 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 또는 500 개의 시알산 단위를 갖는 것으로 특정화된다. 특정 관점에서는, 다양한 시알산 단위가 쇄 내에 조합된다.

[0175] 본 발명의 일 구현예에서, 폴리사카라이드 화합물의 시알산 부분은 강한 친수성이며, 또 다른 구현예에서는 전체 화합물이 강한 친수성을 띤다. 친수성은 주로 히드록실기뿐만 아니라 시알산 단위의 펜던트 카복실기에 의해서 부여된다. 사카라이드 단위는 아민, 히드록실기 또는 설페이트기, 또는 이들의 조합과 같은 다른 기능적 작용기를 함유할 수 있다. 이들 작용기는 천연적으로 발생한 사카라이드 화합물 상에 존재하거나, 유도된 폴리사카라이드 화합물 내로 도입될 수 있다.

[0176] 상기 천연적으로 발생한 폴리머 PSA는 넓은 크기 분포 (예를 들어, 시그마 C-5762) 및 높은 다분산성 (PD)을 나타내는 다분산 제제 (polydisperse)로서 이용될 수 있다. 상기 폴리사카라이드는 통상적으로 내독소를 공동 정제하는 유전적 위험을 동반하는 박테리아에서 생산되기 때문에, 긴 시알산 폴리머 쇄의 정제는 내독소 함량을 증가시킬 가능성을 상승시킬 수 있다. 1 내지 4 개의 시알산 단위를 갖는 짧은 PSA 분자는 또한 합성적으로 제조될 수도 있으며 (Kang SH 등, Chem Commun. 2000;227-8; Ress DK 및 Linhardt RJ, Current Organic Synthesis. 2004;1:31-46), 따라서 높은 내독소 함량의 위험을 최소화시킬 수 있다. 그러나, 현재 내독소 또한 함유하지 않으며 가느다란 크기 분포 및 낮은 다분산성을 갖는 PSA 제제를 제조하는 것이 가능하다. 일 관점에서, 본 발명을 위한 특별한 용도의 폴리사카라이드 화합물은 박테리아에 의해서 생산된 것이다. 이러한 천연적으로 발생한 폴리사카라이드 중의 일부는 당지질 (glycolipids)로 알려져 있다. 일 구현예에서, 상기 폴리사카라이드 화합물은 실질적으로 말단 갈락토스 단위를 갖지 않는다.

[0177] **B. 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 페길화**

[0178] 특정의 관점에서, 치료 단백질은 임의의 다양한 화학적 방법에 의해 수용성 폴리머에 콘주게이션된다 (Roberts JM 등, Advan Drug Delivery Rev 2002;54:459-76). 예를 들어, 일 구현예에서 치료 단백질은 N-히드록시석신이미드 (NHS) 에스테르를 사용하여 단백질의 유리 아미노기에 PEG를 콘주게이션시킴으로써 변형된다. 또 다른 구현예에서, 수용성 폴리머, 예를 들어, PEG는 말레이미드 화학 반응, 또는 선행 산화반응 후에 치료 단백질의 탄수화물 부위에 대한 PEG 히드라지드 또는 PEG 아민의 커플링 반응을 이용하여 유리 SH 기에 커플링된다.

[0179] 일 관점에서, 상기 콘주게이션은 안정한 결합의 형성 하에서의 치료 단백질에 대한 수용성 폴리머의 직접 커플링 (또는 링커 시스템을 통한 커플링)에 의해서 수행된다. 또한, 본 발명의 특정한 관점에서, 분해성, 방출 가능성 또는 가수 분해성 링커 시스템이 사용된다 (Tsubery 등 J Biol Chem 2004;279:38118-24 / Greenwald 등, J Med Chem 1999;42:3657-67 / Zhao 등, Bioconj Chem 2006;17:341-51 / WO2006/138572A2 / US7259224B2 / US7060259B2).

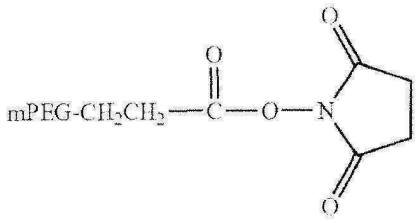
[0180] 본 발명의 일 구현예에서, 치료 단백질는 석신이미딜 석시네이트, 석신이미딜 글루타레이트 또는 석신이미딜 프로피오네이트와 같은 활성 N-히드록시석신이미드 에스테르 (NHS)를 함유하는 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 사용함으로써 리신 잔기를 통해서 변형된다. 이들 유도체는 안정한 아미드 결합을 형성함으로써 온화한 조건 하에서 치료 단백질의 리신 잔기와 반응한다. 본 발명의 일 구현예에서, 상기 PEG 유도체의 쇄 길이는 5,000 Da이다. 500 내지 2,000 Da, 2,000 내지 5,000 Da, 5,000 초과 10,000 Da 이하, 또는 10,000 초과 20,000 Da 이하, 또는 20,000 초과 150,000 Da 이하의 쇄 길이를 가지며 선형 및 분지형 구조를 포함하는 다른 PEG 유도체가 다양한 구현예에서 사용된다.

[0181] 아미노기의 페길화를 위한 대안적의 방법으로는, 우레탄 결합의 형성에 의한 PEG 카보네이트와의 화학적 콘주게이션, 또는 2급 아미드 결합을 형성하는 환원적 아미노화에 의한 알데히드 또는 케톤과의 반응이 있으나, 이들로 제한되지는 않는다.

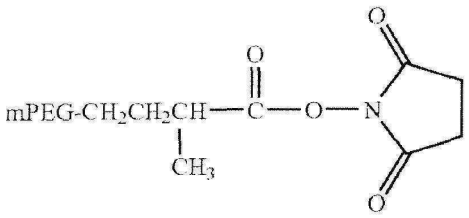
[0182] 본 발명의 일 구현예에서, 치료 단백질 분자는 상업적으로 이용할 수 있는 PEG 유도체를 사용하여 화학적으로 변형된다. 대안적 관점에서의 이들 PEG 유도체는 선형 또는 분지형 구조를 갖는다. NHS기를 함유하는 PEG-유도체의 예는 이하에 열거한다.

[0183] 다음의 PEG 유도체는 Nektar Therapeutics로부터 상업적으로 이용할 수 있는 비-제한적인 예이다 (Huntsville, Ala.; www.nektar.com/PEG reagent catalog 참조; Nektar Advanced PEGylation, price list 2005-2006):

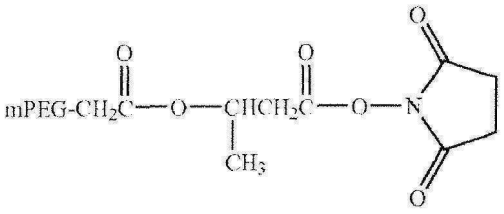
[0184] mPEG-석신이미딜 프로피오네이트 (mPEG-SPA)

[0185] 

[0186] mPEG-석신이미딜 α-메틸부타노에이트 (mPEG-SMB)

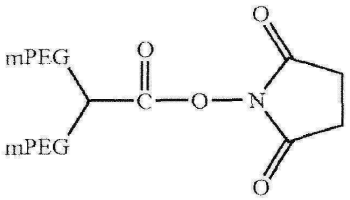
[0187] 

[0188] mPEG-CM-HBA-NHS (CM=카복시메틸; HBA=히드록시 부티르산)

[0189] 

[0190] 분지형 PEG-유도체의 구조 (Nektar Therapeutics):

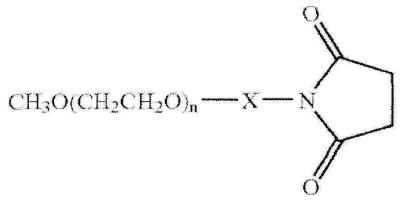
[0191] 분지형 PEG N-히드록시석신이미드 (mPEG2-NHS)

[0192] 

[0193] 분지된 구조를 갖는 상기 시약은 Kozlowski 등 (BioDrugs 2001;5:419-29)에 의해 보다 상세하게 기술되어 있다.

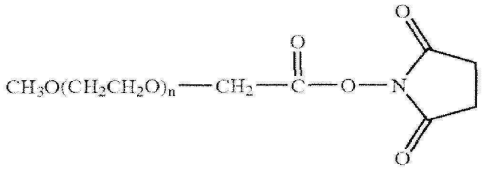
[0194] PEG 유도체의 그 밖의 다른 비-제한적 예는 NOF Corporation으로부터 상업적으로 이용할 수 있다 (도쿄, 일본; www.nof.co.jp/english 참조: Catalogue 2005):

[0195] 선형 PEG-유도체의 일반적 구조 (NOF Corp.):



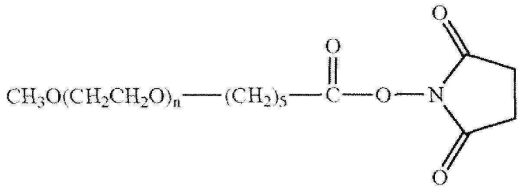
[0196]

[0197] X=카복시메틸



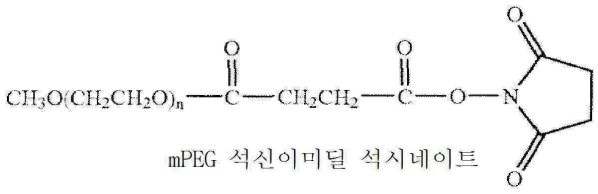
[0198]

[0199] X=카복시펜틸



[0200]

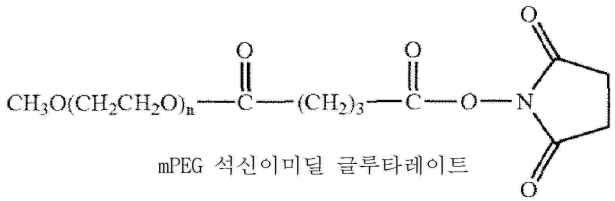
[0201] x=석시네이트



mPEG 석신이미딜 석시네이트

[0202]

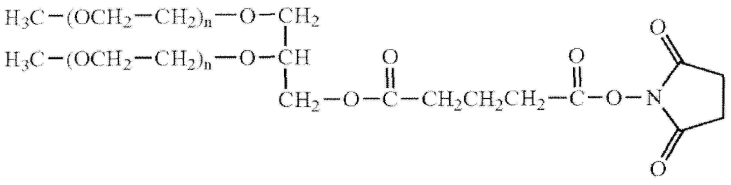
[0203] x=글루타레이트



mPEG 석신이미딜 글루타레이트

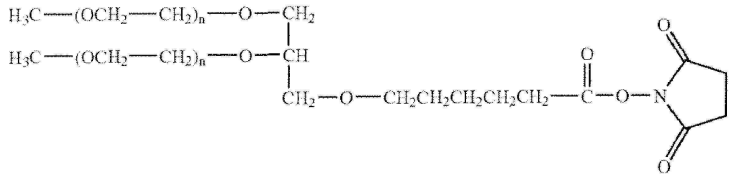
[0204]

[0205] 분지형 PEG-유도체의 구조 (NOF Corp.): 2,3-비스(메틸폴리옥시에틸렌-옥시)-1-(1,5-디옥소-5-석신이미딜옥시, 펜틸옥시)프로판



[0206]

[0207] 2,3-비스 (메틸폴리옥시에틸렌-옥시)-1- (석신이미딜-카복시펜틸옥시)프로판



[0208]

[0209] 이들 프로판 유도체는 1,2 치환 패턴을 갖는 글리세롤 골격을 나타낸다. 본 발명에서는 또한, 1,3-치환된 글리세롤 구조, 또는 US2003/0143596A1에 기술된 그 밖의 다른 분지된 구조를 기반으로 하는 분지형 PEG 유도체가 고려된다.

[0210] 또한, Tsubery 등 (J Biol Chem 2004; 279:38118-24); 및 Shechter 등 (WO04089280A3])에 의해 기술된 바와 같은 분해성 (예를 들어, 가수 분해성) 링커를 갖는 PEG 유도체가 고려된다.

[0211] 놀랍게도, 본 발명의 상기 페길화된 치료 단백질은 생체내에서의 연장된 반감기와 함께 기능적 활성을 나타낸다. 또한, 상기 페길화된 rFVⅢ, FVⅡa, FIX, 또는 그 밖의 다른 치료 인자는 트롬빈 불활성화에 대해서 보다 강한 저항성을 나타낸다.

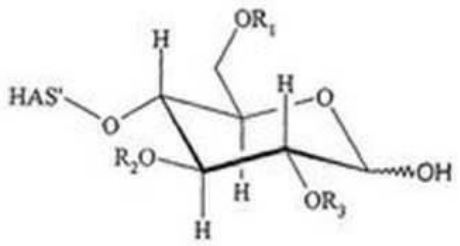
[0212] **C. 하이드록시알킬 전분 (HAS) 및 하이드록실에틸 전분 (HES)**

[0213] 본 발명의 다양한 구현예에서, 치료 단백질 분자는 하이드록시알킬 전분 (HAS) 또는 하이드록실에틸 전분 (HES) 또는 그의 유도체들을 사용하여 화학적으로 변형된다.

[0214] HES는 천연 생성 아밀로펙틴의 유도체이고 몸체에서 알파-아밀라아제에 의해 분해된다. HES는 최대 95 중량 %의 농도에서 옥수수 전분에서 존재하는 탄수화물 폴리머 아밀로펙틴의 치환된 유도체이다. HES는 유익한 생물학적 특성을 나타내고 혈액량 교체 제제로서 임상에서 혈액희석 요법으로 사용된다(Sommermeyer et al, 1987, Krankenhauspharmazie, 8 (8), 271-278; 및 Weidler et al, 1991, Arzneim.-Forschung/Drug Res. g 419 494-498).

[0215] 아밀로펙틴은 글루코오스 모이어티들로 이루어지고, 여기서 상기 주요 사슬 알파-1,4- 글리코사이드 결합이 존재하고 분지 부위에서 알파-1, 6-글리코사이드 결합이 발견된다. 이 분자의 물리-화학 특성은 글리코사이드 결합의 유형에 의해 주로 결정된다. 틈이 있는 알파-1,4-글리코사이드 결합으로 인해, 약 6개의 글루코오스-모노머/회전을 갖는 나선형 구조가 생성된다. 폴리머의 물리-화학 뿐만 아니라 생화학 특성은 치환을 통해 변형될 수 있다. 하이드록시에틸 그룹의 도입은 알칼린 하이드록시에틸화에 의해 달성될 수 있다. 반응 조건을 채택하여 하이드록시에틸화에 대해 치환되지 않은 글루코오스 모노머에서 각각의 하이드록시 그룹의 상이한 반응성을 이용할 수 있다. 이러한 사실 때문에, 당업자는 치환 패턴에 제한적으로 영향을 미칠 수 있다.

[0216] HAS는 적어도 하나 하이드록시알킬 그룹에 의해 치환된 전분 유도체를 의미한다. 따라서, 용어 하이드록시알킬 전분은 말단 탄수화물 모이어티가 하이드록시알킬 그룹 R1, R2, 및/또는 R3을 포함하는 화합물들로 한정되지 않지만, 말단 탄수화물 모이어티에서 및/또는 전분 분자의 나머지 일부, HAS'에서 어디에도 존재하는 적어도 하나 하이드록시 그룹이, 하이드록시알킬 그룹 R1, R2, 또는 R3에 의해 치환되는 화합물을 의미한다.



(I)

[0217]

[0218] 알킬 그룹은 적당하게 치환될 수 있는 선형 또는 분지형 알킬 그룹일 수 있다. 바람직하게는, 하이드록시알킬 그룹은 1 내지 10개의 탄소 원자, 더 바람직하게는 1 내지 6개의 탄소 원자, 더 바람직하게는 1 내지 4개의 탄소 원자, 및 더욱 더 바람직하게는 2-4 탄소 원자들를 함유한다. 따라서 "하이드록시알킬 전분"는 바람직하게는 하이드록시에틸 전분, 하이드록시프로필 전분 및 하이드록시부틸 전분을 포함하고, 여기서 하이드록시에틸 전분 및 하이드록시프로필 전분이 특히 바람직하다.

[0219] 2개 이상 상이한 하이드록시알킬 그룹을 포함하는 하이드록시알킬 전분이 또한 본 발명에서 포함된다. HAS에서 포함된 적어도 하나 하이드록시알킬 그룹은 2개 이상 하이드록시 그룹을 함유할 수 있다. 일 구현예에 따라, 적어도 하나 하이드록시알킬 그룹 포함 HAS는 하나의 하이드록시 그룹을 함유한다.

[0220] 용어 HAS는 또한, 유도체들을 포함하고 여기서 상기 알킬 그룹은 단일- 또는 다치환된다. 일 구현예에서, 알킬 그룹은 할로겐, 특히 불소, 또는 아릴 그룹으로 치환되고, 단, HAS은 물에서 가용성인 채로 있다. 또한, 하이드록시알킬 그룹의 말단 하이드록시 그룹은 에스테르화 또는 에테르화될 수 있다. HAS 유도체들 WO/2004/024776에 기재되어 있고, 이는 그 전체가 참고로 본원에 통합되어 있다.

[0221] **D. 부착 방법**

[0222] 치료 단백질은 당해 기술분야에서 숙련된 기술자에게 공지된 임의의 다양한 기술에 의해 폴리사카라이드 화합물에 공유적으로 연결될 수 있다. 본 발명의 다양한 관점에서, 시알산 부위는 예를 들어, 본 발명에 참조로서 통합된 미국 특허 제4,356,170호에 기술된 방법에 의해서 치료 단백질, 예를 들어, FIX, FVⅢ, FVⅡa 또는 VWF에 결합된다.

[0223] 폴리펩티드에 PSA를 커플링시키는 다른 기술 또한 공지되어 있으며, 본 발명에 의해서 고려된다. 예를 들어, 미국 공개 제2007/0282096호는 예를 들어, PSA의 아민 또는 히드라지드 유도체를 단백질에 콘주게이션시키는 것을 기술하고 있다. 또한, 미국 공개 제2007/0191597호는 환원성 말단에서 기질 (예를 들어, 단백질)과 반응하기 위한 알데히드기를 함유하는 PSA 유도체를 기술하고 있다. 이들 문헌 전체는 참조로서 통합되어 있다.

[0224] 다양한 방법은 미국 특허 제5,846,951호 (이것은 전체가 참조로서 통합되어있다)의 7 칼럼, 15 행 내지 8 칼럼, 5 행에 기술되어 있다. 예시적인 기술에는 치료 단백질 또는 폴리사카라이드 중 어느 하나의 카복실기와 치료 단백질 또는 폴리사카라이드의 아민기 사이의 펩티드 결합을 통한 결합, 또는 치료 단백질 또는 폴리사카라이드의 카복실기와 치료 단백질 또는 폴리사카라이드의 히드록실기 사이의 에스테르 결합이 포함된다. 상기 치료 단백질을 폴리사카라이드 화합물에 공유적으로 결합시키는 또 다른 결합은 과요오드산염 산화반응에 의해서 상기 폴리사카라이드의 비-환원성 말단에서 형성된 알데히드기와 반응하는 치료 단백질 상의 유리 아미노기 사이에서 시프 염기 (Schiff base)를 통하는 것이다 (Jennings HJ 및 Lugowski C, J Immunol. 1981;127:1011-8; Fernandes AI 및 Gregoriadis G, Biochim Biophys Acta. 1997;1341;26-34). 일 관점에서, 상기 생성된 시프 염기는 $NaCNBH_3$에 의한 특이적 환원으로 2차 아민을 형성시킴으로써 안정화된다. 대안적인 접근 방법에는, 선행 산화 반응 후에 NH4Cl로 환원적 아미노화시킴으로써 상기 PSA 내의 말단 유리 아미노기를 생성시키는 것이 있다. 이작용기성 (bifunctional) 시약은 2 개의 아미노기 또는 2 개의 히드록실기를 연결시키기 위해서 사용될 수 있다. 예를 들어, 아미노기를 함유하는 PSA를 BS3 (비스(설포석신이미딜)수베레이트 / Pierce, Rockford, IL)와 같은 시약으로 단백질의 아미노기에 커플링시킨다. 또한, 예를 들어, 아민과 티올기를 연결시키기 위해서 설포-EMCS(N-ε-말레이미도카프로일록시) 설포석신이미드 에스테르/Pierce)와 같은 헤테로-이작용기성성 교차결합 시약 사용된다.

[0225] 또 다른 접근방법에서는, PSA 히드라지드를 제조하고, 선행 산화반응 및 알데히드 기능의 생성 후에 이를 상기 단백질의 탄수화물 부위에 커플링시킨다.

[0226] 상술한 바와 같이, 상기 치료학적 단백질의 유리 아민기가 상기 시알산 잔기의 1-카복실기와 반응하여 펩티드 결합을 형성하거나, 1-카복실산 기와 치료 단백질 상의 히드록실기 또는 다른 적합한 활성 작용기 사이에서 에

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

[0227] 대안적으로, 폴리사카라이드 화합물은 비-공유적 방식으로 치료 단백질과 회합된다. 예를 들어, 일 관점에서 상기 폴리사카라이드 화합물과 약제학적 활성 화합물은 소수성 상호작용을 통해서 결합된다. 그 밖의 다른 비-공유적 회합에는 반대로 하전되어 서로 끌어당기는 이온에 의한 정전기적 상호작용이 포함된다.

[0228] 다양한 구현예에서, 상기 치료 단백질은 상기 폴리사카라이드 화합물에 화학량론적 양 (예를 들어, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:7, 1:8, 1:9, 또는 1:10 등)으로 결합되거나 회합된다. 다양한 구현예에서, 1 내지 6, 7 내지 12 또는 13 내지 20 개의 폴리사카라이드가 상기 치료 단백질에 결합된다. 또 다른 구현예에서는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 개 또는 그 이상의 폴리사카라이드가 상기 치료 단백질에 결합된다.

[0229] 다양한 구현예에서, 상기 치료 단백질은 글리코실화 부위 (즉, 천연 글리코실화 부위가 아닌 다른 부위)를 도입시키도록 변형된다. 이러한 변형은 당해 기술분야에서 공지된 표준 분자 생물학적 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 더욱이, 치료 단백질은 1개 이상의 탄수화물 부위를 통해서 수용성 폴리머에 콘주게이션되기 전에 생체 내 또는 생체 외에서 글리코실화될 수 있다. 상기 글리코실화된 부위는 수용성 폴리머와 단백질의 콘주게이션을 위한 표적으로 작용할 수 있다 (미국 특허출원 제20090028822호, 미국 특허출원 제2009/0093399호, 미국 특허출원 제2009/0081188호, 미국 특허출원 제2007/0254836호, 미국 특허출원 제2006/0111279호, 및 DeFrees S. 등, Glycobiology, 2006, 16, 9, 833-43). 예를 들면, 생체 내에서 자연적으로 글리코실화되지 않는 단백질 (예들 들면, 당단백질이 아닌 단백질)이 본원에서 기재된 바와 같이 변형될 수 있다.

[0230] **E. 아미노옥시 결합**

[0231] 본 발명의 일 구현예에서, 옥심기를 형성시키기 위한 알데히드 (예를 들어, 과요오드산 나트륨에 의한 산화 반응에 따른 탄수화물 부위의)와 히드록실아민 또는 히드록실아민 유도체의 반응이 치료 단백질의 복합체의 제조에 적용된다. 예를 들어, 첫째로, 당단백질 (예를 들어, 본 발명에 따르는 치료 단백질)을 과요오드산 나트륨 ($NaIO_4$)과 같은 산화제로 산화시킨다 (Rothfus JA et Smith EL., J Biol Chem 1963, 238, 1402-10; 및 Van Lenten L 및 Ashwell G., J Biol Chem 1971, 246, 1889-94). 상기 당단백질의 과요오드산염 산화 반응은 활성 알데히드기를 형성시키기 위한 과요오드산염에 의한 인접한 디올의 산화 반응으로서 1928년에 기술된 고전적인 말라프레이드 (Malaprade) 반응을 기반으로 한다 (Malaprade L., Analytical application, Bull Soc Chim 프랑스, 1928, 43, 683-96). 이러한 산화제에 대한 추가적인 예로는, 테트라 아세트산 납 ($Pb(OAc)_4$), 아세트산 망간 (MnO(Ac)3), 아세테이트산 코발트 (Co(OAc)2), 아세트산 탈륨 (TlOAc), 황산 세륨 (Ce(SO4)2) (US 4,367,309), 또는 과루테늄산 칼륨 ($KRuO_4$) (Marko 등, J Am Chem Soc 1997,119, 12661-2)이다. "산화제"는 탄수화물 내의 인접한 디올을 산화시킬 수 있는 약한 산화성 화합물로, 이에 의해 생리학적 반응조건 하에서 활성 알데히드기를 생성시킬 수 있는 것을 의미한다.

[0232] 두 번째 단계는, 아미노옥시기를 함유하는 폴리머를 상기 산화된 탄수화물 부위에 커플링시켜 옥심 결합을 형성시키는 것이다. 본 발명의 일 구현예에서, 상기 단계는 촉매량의 친핵성 촉매인 아닐린 또는 아닐린 유도체의 존재 하에서 수행될 수 있다 (Dirksen A et Dawson PE, Bioconjugate Chem. 2008; Zeng Y 등, Nature Methods 2009;6:207-9). 상기 아닐린 촉매작용은 상기 옥심 라이게이션을 극적으로 촉진시켜 매우 저농도의 시약을 사용하는 것이 가능하게 한다. 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 옥심 결합은 알콕시아민 결합을 형성하도록 $NaCNBH_3$로 환원시시킴으로써 안정화된다 (도 2). 추가의 촉매는 하기에 기재되어 있다.

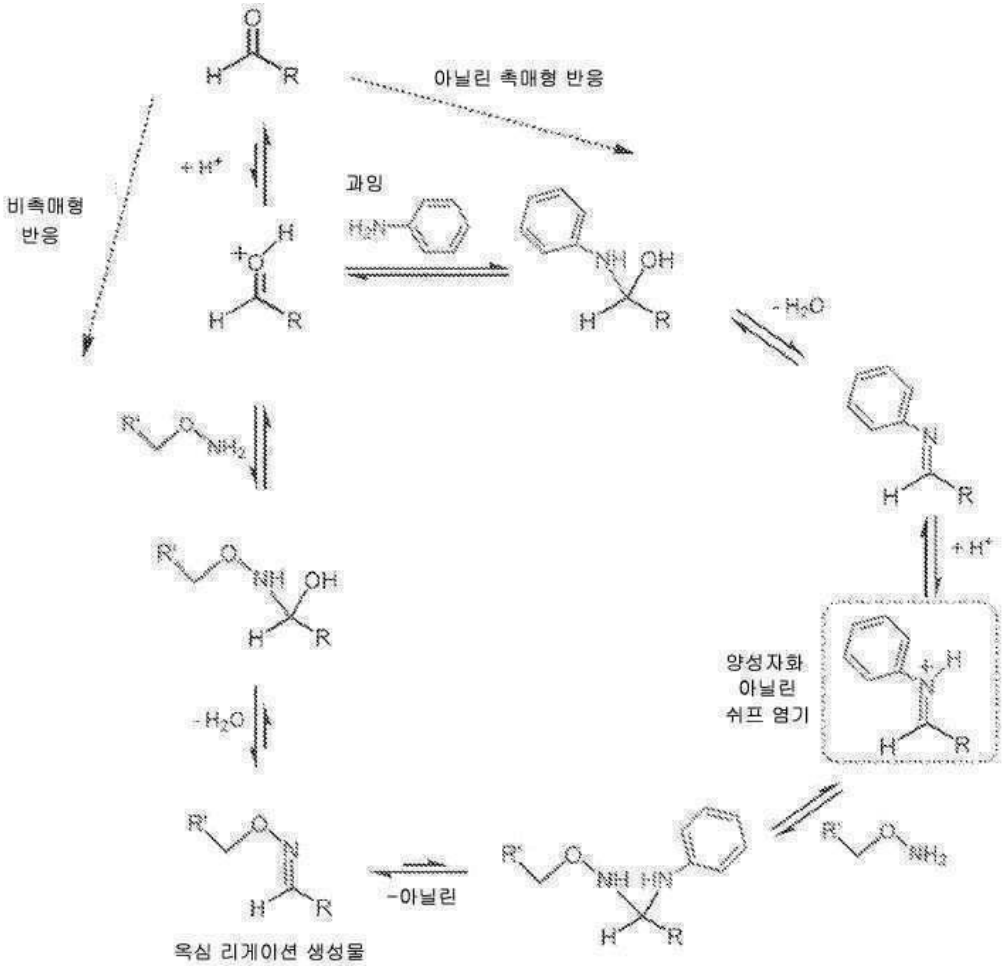
[0233] 아미노옥시 기술에 대한 추가적인 정보는 각각 전체로서 통합된 하기의 참고문헌에서 찾을 수 있다: EP 1681303A1 (HASylated erythropoietin); WO 2005/014024 (conjugates of a polymer and a protein linked by an oxime linking group); WO96/40662 (aminooxy-containing linker compounds and their application in conjugates); WO 2008/025856 (Modified proteins); Peri F 등, Tetrahedron 1998, 54, 12269-78; Kubler-Kielb J et. Pozsgay V., J Org Chem 2005, 70, 6887-90; Lees A 등, Vaccine 2006, 24 (6), 716-29; 및 Heredia KL 등, Macromoecules 2007, 40 (14), 4772-9.

[0234] 본 발명의 다양한 구현예에서, 본원 명세서에 기술된 아미노옥시 기술에 따라 치료 단백질 (예를 들어, FVⅢ, FVⅡa, 또는 FIX)의 산화된 탄수화물 부위에 결합되는 수용성 폴리머에는, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 분지형 PEG, 폴리시알산 (PSA), 탄수화물, 폴리사카라이드, 풀루란, 키토산, 히알루론산, 황산 콘드로이틴, 황산 더마탄, 녹

말, 덱스트란, 카복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 옥시드 (PAO), 폴리알킬렌 글리콜 (PAG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모폴린, 폴리비닐 알코올 (PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-말레인산 무수물 공중합체, 폴리스테렌-말레인산 무수물 공중합체, 폴리(1-히드록시메틸에틸렌 히드록시메틸포름알) (PHF), 2-메타크릴로일록시-2'-에틸트리메틸암모늄포스페이트 (MPC)가 포함되나, 이들로 제한되지 않는다.

[0235] **친핵성 촉매**

[0236] 본원에 기재된 바와 같이, 수용성 폴리머의 치료 단백질에의 콘주게이션은 아닐린에 의해 촉진될 수 있다. 아닐린은 안정한 아민 예컨대 하이드라존 및 옥심을 형성하기 위해 알데하이드 및 케톤과 아민과의 수성 반응을 강하게 촉진한다. 하기 도식은 비촉매형 대 아닐린-촉매형 옥심 리게이션 반응을 포함한다 (Kohler JJ, ChemBioChem 2009;10:2147-50):



[0237]

[0238] 그러나, 아닐린과 연관된 수많은 건강 위험을 고려하면, 대안적인 촉매가 바람직하다. 본 발명은 대안적인 옥심 리게이션 촉매로서 아닐린 유도체를 제공한다. 그와 같은 아닐린 유도체들은, 비제한적으로, o-아미노 벤조산, m-아미노 벤조산, p-아미노 벤조산, 설파닐산, o-아미노벤즈아마이드, o-톨루이딘, m-톨루이딘, p-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, 및 p-아니시딘을 포함한다.

[0239] 본 발명의 일 구현예에서, m-톨루이딘 (아카 메타-톨루이딘, m-메틸아닐린, 3-메틸아닐린, 또는 3-아미노-1-메틸벤젠)은 본원에 기재된 콘주게이션 반응을 촉진하기 위해 사용된다. M-톨루이딘 및 아닐린은 유사한 물리적 특성 및 본질적으로 동일한 pKa 값을 갖는다 (m-톨루이딘: pKa 4.73, 아닐린: pKa 4.63).

[0240] 본 발명의 친핵성 촉매는 옥심 리게이션 (예를 들면, 아미노옥시 결합 사용) 또는 하이드라존 형성 (예들 들면, 하이드라자이드 화학 사용)에 대해 유용하다. 본 발명의 다양한 구현예에서, 친핵성 촉매는 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50 mM의 농도로 콘주게이션 반응에서 제공된다. 일 구현예에서, 친핵성 촉매는 1 내지 10 mM로 제공된다. 본 발명의 다양

한 구현예에서, 콘주게이션 반응의 pH 범위는 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 및 7.5이다. 일 구현예에서, pH는 5.5 내지 6.5이다.

[0241] **복합 단백질의 정제**

[0242] 다양한 구현예들에서, 산화제 및/또는 본원에 개시된 수용성 폴리머와 콘주게이트된 치료 단백질과 함께 인큐베이트된 단백질의 정제가 바람직하다. 수많은 정제 기술은 당해분야에 공지되어 있고, 비제한적으로, 크로마토그래피 방법들 예컨대 이온교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 친화성 크로마토그래피 또는 이들의 조합, 여과 방법들, 및 침전 방법들을 포함한다 (Guide to Protein Purification, Meth. Enzymology Vol 463 (Burgess RR 및 Deutscher MP에 의해 편집), 2nd edition, Academic Press 2009).

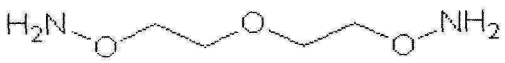
[0243] 이하의 실시예는 본 발명을 제한하는 것으로 의도된 것이 아니며, 단지 본 발명의 특정한 구현예를 예시하고자 하는 것이다.

[0244] **실시예**

[0245] **실시예 1**

[0246] 동종이작용기성 링커 $NH_2[OCH_2CH_2]_2ONH_2$의 제조

[0247] 하기 화학식의 동종이작용기성 링커 $NH_2[OCH_2CH_2]_2ONH_2$

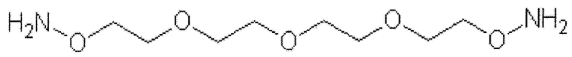
[0248] 

[0249] 2 개의 활성 아미노옥시기를 함유하는 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을, Boturyn 등 (Tetrahedron 1997;53:5485-92)에 따라 1차 아민의 변형된 가브리엘-합성 (modified Gabriel-Synthesis)을 이용하는 2 단계의 유기 반응을 통해 합성하였다 (도 3). 첫 번째 단계에서, 2,2-클로로디에틸에테르 한 분자를 디메틸포름아미드 (DMF) 중 엔도-N-히드록시-5-노보넨-2,3-디카복시미드 두 분자와 반응시켰다. 상기 목적하는 동종이작용기성 산물은, 상기 반응 결과 생성된 중간체로부터 에탄올에서의 히드라진 분해 (hydrazinolysis)에 의하여 제조되었다.

[0250] **실시예 2**

[0251] 동종이작용기성 링커 $NH_2[OCH_2CH_2]_4ONH_2$의 제조

[0252] 하기 화학식의 동종이작용기성 링커 $NH_2[OCH_2CH_2]_4ONH_2$

[0253] 

[0254] 2 개의 활성 아미노옥시기를 함유하는 3,6,9-트리옥사-운데칸-1,11-디옥시아민을, Boturyn 등 (Tetrahedron 1997;53:5485-92)에 따라 1차 아민의 변형된 가브리엘-합성을 이용하는 2 단계 유기 반응을 통해 합성하였다 (도 3). 첫 번째 단계에서, 비스-(2-(2-클로로에톡시)-에틸)-에테르 한 분자를 DMF 중 엔도-N-히드록시-5-노보넨-2,3-디카복시미드 두 분자와 반응시켰다. 상기 목적하는 동종이작용기성 산물은, 상기 반응 결과 생성된 중간체로부터 에탄올에서의 히드라진 분해에 의하여 제조되었다.

[0255] **실시예 3**

[0256] 동종이작용기성 링커 $NH_2[OCH_2CH_2]_6ONH_2$의 제조

[0257] 동종이작용기성 링커 $NH_2[OCH_2CH_2]_6ONH_2$

[0258]

[0259] 2 개의 활성 아미노옥시기를 함유하는 3,6,9,12,15-펜타톡사-헵타데칸-1,17-디옥시아민은 Boturyn 등 (Tetrahedron 1997;53:5485-92)에 따라 1차 아민의 변형된 가브리엘-합성을 이용하는 2 단계의 유기 반응을 통

해 합성하였다. 상기 첫 번째 단계에서, 헥사에틸렌 글리콜 디클로라이드 한 분자를 DMF 중 엔도-N-히드록시-5-노보넨-2,3-디카복시미드 두 분자와 반응시켰다. 상기 목적하는 동종이작용기성 산물은, 상기 반응 결과 만들어진 중간체로부터 에탄올에서의 히드라진 분해에 의하여 제조되었다.

[0260] **실시예 4**

[0261] 상기 아미노옥시-PSA 시약의 상세한 합성

[0262] Botyryn 등 (Tetrahedron 1997; 53:5485-92)에 따라, 실시예 1에서 언급된 두 단계의 유기 합성을 통하여 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 합성하였다.

[0263] 단계 1:

[0264] 700 ml 무수 N,N-디메틸포름아미드 중 엔도-N-히드록시-5-노보넨-2,3-디카복시이미드 (59.0 g; 1.00 eq) 용액에, 무수 K_2CO_3 (45.51 g; 1.00 eq) 및 2,2-디클로로디에틸에테르 (15.84 ml; 0.41 eq)를 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 50℃에서 22시간 동안 교반하였다. 상기 혼합물을 감압하에서 건조물이 되도록 증발시켰다. 그 잔여물을 2L의 디클로로메탄에 현탁하고 NaCl 포화 수용액 (각 1L)으로 2회 추출하였다. 상기 디클로로메탄층을 Na_2SO_4로 건조시킨 다음, 감압하에서 건조물이 되도록 증발시키고 고진공 상태에서 건조시켜 64.5 g의 3-옥사펜탄-1,5-디옥시-엔도-2',3'-디카복시디이미드노보넨을 담황색 고체로서 얻었다 (중간체 1).

[0265] 단계 2:

[0266] 800 ml 무수 에탄올 중 중간체 1 수용액 (64.25 g; 1.00 eq)에, 31.0 ml 히드라진 수화물 (4.26 eq)을 첨가하였다. 그 다음, 상기 반응 혼합물을 2시간 동안 환류시켰다. 감압하에서 상기 용매를 증발시켜, 상기 혼합물을 처음 부피의 절반이 되도록 농축하였다. 상기 발생된 침전물을 여과하였다. 상기 잔여 에탄올층이 건조되도록 감압하에서 증발시켰다. 조 산물인 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 함유하는 잔류물을 진공 상태에서 건조하여 46.3 g을 수득하였다. 상기 조 산물을 칼럼 크로마토그래피 (실리카겔 60; 9/1, 디클로로메탄/메탄올 혼합물을 이용한 등용매 용리)에 의해 추가 정제하여, 11.7 g의 순수한 최종 산물인 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 얻었다.

[0267] **실시예 5**

[0268] 아미노옥시-PSA의 제조

[0269] Serum Institute of India (Pune, India)로부터 얻은 1000 mg의 산화된 PSA (MW = 20 kD)을 16 ml 50 mM 포스페이트 완충액 pH 6.0에서 용해시켰다. 그 다음 170 mg 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 반응 혼합물에 제공했다. 2시간 동안 실온에서 진탕한 후 78.5 mg 나트륨 시아노보로하이드라이드를 첨가하고 반응을 18시간 동안 밤새 수행했다. 그 다음 반응 혼합물에 대해 재생된 셀롤로오스로 만들어진 5 kD 분획을 갖는 막 (50 cm^2, 밀리포어)을 사용하여 한외여과/정용여과 절차 (UF/DF)를 수행했다.

[0270] **실시예 6**

[0271] 크로마트그래피 정제 단계를 이용하는 아미노옥시-PSA의 제조

[0272] Serum Institute of India (Pune, India)로부터 얻은 1290 mg의 산화된 PSA (MW = 20 kD)을 25 ml 50 mM 포스페이트 완충액 pH 6.0 (완충액 A)에서 용해시켰다. 그 다음 209 mg 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 반응 혼합물에 제공했다. 1시간 동안 실온에서 진탕한 후 101 mg 나트륨 시아노보로하이드라이드를 첨가하고 반응을 3시간 동안 수행했다. 그 다음 혼합물에 대해 Fractogel EMD DEAE 650-M 크로마토그래피 겔 (칼럼 치수: XK26/135)을 이용하는 약한 음이온 교환 크로마토그래피 단계를 수행했다. 반응 혼합물을 110 ml 완충액 A로 희석하고 완충액 A로 미리 평형을 이룬 DEAE 칼럼 상 1 cm/min의 유속으로 로딩했다. 그 다음 칼럼을 20 CV 완충액 B (20 mM Hepes, pH 6.0)으로 세정하여 유리 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 및 시아나이드를 2 cm/min의 유속으로 제거했다. 그 다음 아미노옥시-PSA 시약을 67% 완충액 B 및 43% 완충액 C (20 mM Hepes, 1M NaCl, pH 7.5)로 이루어진 단계 구배로 용출했다. 용출물을, 폴리에테르 설폰으로 만들어진 5 kD 막, (50 cm^2, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 완충액 D (20mM Hepes, 90mM NaCl, pH 7.4) 에 대항하여 수행했다. 제제를, 총 PSA (레조르시놀 검정) 및 총 아미노옥시 그룹 (TNBS 검정)을 측정하여 분석적으로 특성화하여 변형도를 측정했다. 또한 다분산성 뿐만 아니라 유리 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 및 시아나이드를 측정했다.

[0273] **실시예 7**

[0274] 환원 단계 없는 아미노옥시-PSA의 제조의 제조

[0275] Serum Institute of India (Pune, India)로부터 얻은 573 mg의 산화된 PSA (MW = 20 kD)을 11,3 ml 50mM 포스페이트 완충액 pH 6.0 (완충액 A)에서 용해시켰다. 그 다음 94 mg 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 반응 혼합물에 제공했다. 5시간 동안 실온에서 진탕한 후 그 다음 혼합물에 대해 Fractogel EMD DEAE 650-M 크로마토그래피 겔 (칼럼 치수: XK16/105)을 이용하는 약한 음이온 교환 크로마토그래피 단계를 수행했다. 반응 혼합물을 50 ml 완충액 A로 희석하고 완충액 A로 미리 평형을 이룬 DEAE 칼럼 상 1 cm/min의 유속으로 로딩했다. 그 다음 칼럼을 20 CV 완충액 B (20 mM Hepes, pH 6.0)로 세정하여 유리 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 및 시아나이드를 2 cm/min의 유속으로 제거했다. 아미노옥시-PSA 시약을 67 % 완충액 B 및 43 % 완충액 C (20 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 7.5)로 이루어진 단계 구배로 용출했다. 용출물을, 폴리에테르 설폰으로 만들어진 5 kD 막, (50 cm^2, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 완충액 D (20 mM Hepes, 90 mM NaCl, pH 7.4)에 대항하여 수행했다. 제제를, 총 PSA (레조르시놀 검정) 및 총 아미노옥시 그룹 (TNBS 검정)을 측정하여 분석적으로 특성화하여 변형도를 측정했다. 또한 다분산성 뿐만 아니라 유리 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민를 측정했다.

[0276] **실시예 8**

[0277] 친핵성 촉매 m-톨루이딘의 존재에서 환원 단계 없는 아미노옥시-PSA의 제조

[0278] Serum Institute of India (Pune, India)로부터 얻은 573 mg의 산화된 PSA (MW = 20 kD)을 9 ml 50 mM 포스페이트 완충액 pH 6.0 (완충액 A)에서 용해시킨다. 그 다음 94 mg 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 이 용액에 제공한다. 순차적으로 2.3 ml의 50 mM m-톨루이딘 모액을 이 반응 혼합물에 첨가한다. 2시간 동안 실온에서 진탕한 후 그 다음 혼합물에 대해 Fractogel EMD DEAE 650-M 크로마토그래피 겔 (칼럼 치수: XK16/105)을 이용하는 약한 음이온 교환 크로마토그래피 단계를 수행했다. 반응 혼합물을 50 ml 완충액 A로 희석하고 완충액 A로 미리 평형을 이룬 DEAE 칼럼 상 1 cm/min의 유속으로 로딩했다. 그 다음 칼럼을 20CV 완충액 B (20 mM Hepes, pH 6.0)로 세정하여 유리 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민 및 시아나이드를 2 cm/min의 유속으로 제거했다. 아미노옥시-PSA 시약을 67 % 완충액 B 및 43 % 완충액 C (20 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 7.5)로 이루어진 단계 구배로 용출했다. 용출물을 폴리에테르 설폰으로 만들어진 5 kD 막, (50 cm^2, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 에 against 완충액 D (20mM Hepes, 90mM NaCl, pH 7.4) 대항하여 수행했다. 제제를, 총 PSA (레조르시놀 검정) 및 총 아미노옥시 그룹 (TNBS 검정)을 측정하여 분석적으로 특성화하여 변형도를 측정했다. 또한 다분산성 뿐만 아니라 유리 3-옥사-펜탄-1,5-디옥시아민을 측정했다.

[0279] **실시예 9**

[0280] 아미노옥시-PSA 시약의 제조

[0281] 아미노옥시 - PSA 시약을 실시예 4 - 8에 따라 제조했다. 정용여과 후, 생성물을 -80 ℃에서 동결하고 동결건조시켰다. 동결건조 후 시약을 적절한 용적의 물에서 용해시키고 탄수화물 변형을 통해 PSA-단백질 콘주케이트의 제조를 위해 사용했다.

[0282] **실시예 10**

[0283] 상이한 대안적인 친핵성 촉매의 효능의 평가

[0284] Rfix를, 상이한 친핵성 촉매 (아닐린, m-톨루이딘, o-아니시딘, m-아니시딘, o-아미노벤조산, m-아미노벤조산, p-아미노벤조산, p-아미노벤즈아마이드, 설파닐산/표준 농도: 10 mM)를 사용하는 표준화된 조건 (20 mM L-히스티딘 중 1 mg/ml rFIX, 150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, pH 6.0, 5-배 몰 아미노옥시-PSA 시약 과잉, 100 μM $NaIO_4$) 하에서 나트륨 페리오데이트, 아미노옥시-PSA 시약과 함께 인큐베이트했다. 반응을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 수행하고 1 mM의 최종 농도를 갖는 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0285] 커플링 효율을, Invitrogen X-세포 미니 시스템을 사용하는 SDS-PAGE로 측정했다. 샘플에 리튬 도데실 설페이트 (LDS) 완충액을 넣고 10분 동안 70 ℃에서 변성시켰다. 그 다음 샘플들을 3-8 % TRIS-아세테이트 겔 상에 적용하고 150 V에서 60분 동안 수행했다. 순차적으로 겔을 Coomassie으로 염색했다.

[0286] 또한 샘플들을, Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 SEC-HPLC 시스템의 사용으로 앞서 기재된 조건 하에서 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77).

[0287] 50 μl의 샘플들을 미희석 상태로 주입하고 등용매적으로 20 mM NaH2PO4, 50 mM Na2SO4(pH 6.1)의 0.22 μm 여과된 용액으로, 0.5 ml/min의 유속에서 용출했다. 용출 패턴을 280 nm에서 기록했다.

[0288] 결과는 도 5a-c 및 6 (SDS PAGE) 및 표 2 (SEC- HPLC 결과)에 요약되어 있다. 상이한 제제의 촉매 효과가 설명된다. m-톨루이딘의 사용으로 아닐린으로 얻은 것과 동등한 결과를 얻는다는 것을 보여준다.

[0289] **표 2**

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

[0290]

[0291] **실시예 11**

[0292] 아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 rFIX의 폴리시알릴화

[0293] **방법 1:**

[0294] 12.3 mg rFIX를 6.1 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 254 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 6.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 순차적으로 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0295] 산화된 rFIX를 함유하는 체류물 (8.8 ml)을 2.46 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD의 MW을 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0296] 유리 rFIX를 음이온 교환 크로마토그래피 (AEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 15 ml 완충액 A (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 7.5)로 용출했다. 유리 rFIX는 12-25 mS/cm의 전도도에서 용출하고 27-45 mS/cm에서 콘주게이트했다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 6.9)와 함께190 mS/cm로 상승되었고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 6.9)로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩되었다. 유리 아미노옥시-PSA 시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로 콘주게이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.4)로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획을 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 사용하는 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl 및 5 mM CaCl2를 함유하는 히스티딘 완충액(pH 7.2)에 대항하여 수행했다. 제제를, 총 단백질 (Bradford) 및 FIX 발색 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-rFIX 콘주게이트 천연 rFIX와 비교한 > 50%의 비활성기 측정된다는 것을 보여주었다.

[0297] **방법 2:**

[0298] 12.3 mg rFIX을 L-히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켜 1 mg rFIX/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 pH 6.0에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액 (또는 다른 켄칭 시약)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 혼합물에 대해 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 순차적으로 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0299] 산화된 rFIX을 함유하는 얻은 체류물 (8.8 ml)을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하여 10 mM의 최종 농도를 얻고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD의 MW을 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 pH 6.0에서 2.5 시간 동안 실온에서; 0.5 시간 내지 18 시간 +4 ℃에서) 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0300] 유리 rFIX를 음이온 교환 크로마토그래피 (AEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 적절한 양의 완충액 A (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)로 희석하여, 용액 전도도 및 pH를 보정한 후 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다 완충액 A로 평형을 이룬. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 7.5)로 용출했다. 유리 rFIX를 완충액 B의 25 %를 사용하는 단계 구배로 용출하고, 이로써 얻은 분획에서 12-25 mS/cm의 전도도로를 얻고 50 % 완충액 B의 단계 구배를 사용하여 콘주게이트 하고, 이로써 콘주게이트 분획 27-45 mS/cm의 전도도를 얻는다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 6.9 또는 안티-케이오성 염 예들 들면 암모늄 설페이트, 암모늄 아세테이트 등의 사용에 의해)와 함께190 mS/cm로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 6.9)로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT 또는 비교가능 HIC 배지) 상에 로딩되었다. 유리 아미노옥시-PSA 시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로, 콘주게이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.4)로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀롤로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl 및 5 mM CaCl2를 함유하는 L-히스티딘 완충액 (pH 7.2) 에 대항하여 수행했다. 제제를, 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 FIX 발색- 및 응고 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-rFIX 콘주게이트에 대해 천연 rFIX와 비교한 > 50 %의 비활성을 측정했다.

[0301] **방법 3:**

[0302] 25.4 mg rFIX를 18.7 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 531 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM) 및 5.07 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 then 첨가했다. 순차적으로, 20 kD의 MW을 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 25 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0303] 유리 rFIX를 음이온 교환 크로마토그래피 (AEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)으로 상승되고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 7.5)로 용출했다. 유리 rFIX는 12-25 mS/cm의 전도도에서 용출되고 27-45 mS/cm에서 콘주게이트했다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 6.9)와 함께 190 mS/cm로 상승되었고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩되었다. 유리 아미노옥시-PSA 시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로, 콘주게이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.4)로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀롤로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl 및 5 mM CaCl2를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 7.2) 에 대항하여 수행했다. 제제를, 총 단백질 (Bradford) 및 FIX 발색 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-rFIX 콘주게이트에 대해 천연 rFIX와 비교한 > 50 %의 비활성을 측정했다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 상기 제제는 유리 FIX를 함유하지 않았다는 것을 보여주었다. 콘주게이트는 57 % 모노-폴리시알릴화된 및 31 % 디-폴리시알릴화된 및 12 % 트리-폴리시알릴화된 생성물로 이루어졌다.

[0304] **방법 4:**

[0305] 25.4 mg rFIX를 L-히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켜 2 mg rFIX/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속 시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW을 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

[0306] 유리 rFIX를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 적절한 양의 완충액 A (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)로 희석하여 용액 전도도 및 pH 값을 보정한 후 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 7.5)로 용출했다. 유리 rFIX를 완충액 B의 25 %를 사용하는 단계 구배로 용출하고, 이로써 얻은 분획에서 12-25 mS/cm의 전도도를 얻고 50 % 완충액 B의 단계 구배를 사용하여 콘주게이트 하고, 이로써 콘주게이트 분획에서 27-45 mS/cm의 전도도를 얻었다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 6.9; 안티-케이오성 염 예들 들면 암모늄 아세테이트의 사용에 의해)과 함께190 mS/cm로 상승되었고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 6.9) 으로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT; 또는 비교가능 HIC 배지) 상에 로딩되었다. 유리 아미노옥시-PSA 시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로 콘주게이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.4)으로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀롤로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 L-150 mM NaCl 및 5 mM CaCl2를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 7.2) 에 대항하여 수행했다. 제제를, 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 FIX 발색- 및 응고 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-rFIX 콘주게이트에 대해 천연 rFIX와 비교한 > 50 %의 비활성을 측정했다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 상기 제제는 유리 FIX를 함유하지 않았다는 것을 보여주었다. 콘주게이트는 57 % 모노-폴리시알릴화된 및 31 % 디-폴리시알릴화된 및 12 % 트리-폴리시알릴화된 생성물로 이루어졌다.

[0307] **실시예 12**

[0308] 아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 rFVIII의 폴리시알릴화

[0309] **방법 1:**

[0310] 50 mg rFVIII를 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, $NaIO_4$를 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다. 용액에 대해 20 ml의 용적을 갖는 IEX 칼럼 (Merck EMD TMAE (M))을 수행하고, 이를 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM $CaCl_2$, pH 7.0)으로 평형을 이루었다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 그 다음 상기 산화된 rFVIII을 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM $CaCl_2$, 1M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. rFVIII 함유 분획을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 0.5 M HCl의 적가로 pH 6.0으로 조정했다. 그 다음 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨), 그 다음 m-톨루이딘을 친핵성 촉매로서 첨가했다 (최종 농도: 10 mM). 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시-PSA 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도는, 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9으로 미리 평형을 이룬 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 가 충전된 칼럼 상에 로딩된 완충액을 첨가하여 130 mS/cm로 상승되었다. 순차적으로, 콘주게이트를 5 mM $CaCl_2$을 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로, PSA-rFVIII 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 30 kD 막 ($88cm^2$, 밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 FVIII 발색 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-rFVIII 콘주게이트는 천연 rFVIII와 비교한 > 70%의 비활성이 측정되었다는 것을 보여주었다.

[0311] **방법 2:**

[0312] Hepes 완충액 (50 mM HEPES, ~350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.1 % 폴리소르베이트 80, pH 7.4)에서 ADVATE 과정으로부터 유래된 58 mg의 재조합 인자 VIII (rFVIII)을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0313] 상기 산화된 rFVIII을 EMD TMAE (M) (Merck) 상에서 음이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 혼합물을 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM $CaCl_2$, pH 6.5)으로 희석하여 5 ms/cm의 전도도를 얻었다. 이 용액을 1.5 cm/min의 유속을 사용하여 10 ml의 칼럼 용적을 갖는 IEX 칼럼 (층 높이: 5.4 cm) 상에 로딩했다. 이 칼럼을 순차적으로 완충액 A 및 완충액 B의 92:8 혼합물 (w/w)의 5 CV (20 mM Hepes, 5 mM $CaCl_2$, 1.0 M NaCl, pH 7.0)로 세정했다 (유속: 1.5 cm/min). 그 다음 상기 산화된 rFVIII를 완충액 A 및 완충액 B의 50:50 (w/w) 혼합물로 용출하고 그 다음 완충액 B의 5 CV로 후용출 단계를 수행했다. 용출 단계를 1.0 cm/min의 유속의 사용으로 수행했다.

[0314] 순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH_2) 시약을 정제된 산화된 rFVIII를 함유하는 용출물에 대해 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

[0315] 얻은 PSA-rFVIII 콘주게이트를, 15 cm의 층 높이 (h) 및 81 ml의 수득한 칼럼 용적 (CV)을 갖는 칼럼 (GE Healthcare 제조)에 충전된 페닐 세파로오스 FF 낮은 서브 수지 (GE Healthcare)을 사용하여 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)로 정제했다.

[0316] 반응 혼합물에, 350 mM 나트륨 클로라이드, 8 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9를 함유하는 50 mM Hepes 완충액의 첨가로 암모늄 아세테이트를 고정시켰다. 2 용적의 반응 혼합물을 1 용적의 암모늄 아세테이트 함유 완충계와 혼합하고 pH 값을 pH 6.9으로 0.5 N 수성 NaOH 용액의 적가로 보정했다. 이 혼합물을 HIC 칼럼 상에 1 cm/min의 유속으로 로딩하고 그 다음 세정 단계 > 3 CV 평형 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)를 사용하여 세정 단계를 수행했다.

[0317] 반응 부산물 및 안티-케이오성 염의 제거에 대해 제2 세정 단계를 > 5CV 세정 완충액 1 (50 mM Hepes, 3 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)으로 상향류 방식으로 2 cm/min의 유속으로 수행했다. 그 다음 정제된 PSA-rFVIII 콘주게이트의 용출을, 40 % 세정 완충액 2 (50 mM Hepes, 1.5 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9) 및 60 % 용출 완충액 (20mM Hepes, 5mM 염화칼슘, pH 7.5)의 단계 구배를 사용하여 하향류 방식으로 1 cm/min의 유속으로 수행했다. PSA-rFVIII 콘주게이트의 용출을 UV 280 nm에서 모니터링하고 콘주게이트 함유 용출물을 < 4 CV 내에서 수집했다. 후 용출 단계를 > 3 CV 용출 완충액으로 주요 생성물로부터 최소 및/또는 비 변형된 rFVIII를 분리하기 위한 조건 하에서 수행했다.

[0318] 마지막으로 정제된 콘주게이트를 분자량 분획 30kD을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 ($88cm^2$, 밀리포어)을 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0319] 이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를, PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, FVIII 발색 활성 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다. 얻은 콘주게이트에 대해 비활성 > 50% 및 PSA 도 > 5.0가 계산되었다.

[0320] **방법 3:**

[0321] 50 mg rFVIII을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨), 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM) 및 $NaIO_4$ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (최종 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도는, 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하고 50 mM

Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01 % Tween 80, pH 6.9으로 미리 평형을 이룬80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)가 충전된 칼럼 상에 로딩된 완충액을 첨가하여 130 mS/cm로 상승되었다. 순차적으로, 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5로 용출했다. 마지막으로, PSA-rFVIII 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 30 kD 막 (88cm^2, 밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 총 단백질 (Bradford) 및 FVIII 발색 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-rFVIII 콘주게이트에 대해 천연 rFVIII와 비교한 ≥ 70%의 비활성 측정했다.

[0322] **방법 4:**

[0323] 50 mM Hepes 완충액 (50 mM HEPES, ~350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.1 % 폴리소르베이트 80, pH 7.4) 중 ADVATE 과정으로부터 유래된 50 mg 재조합 인자 VIII (rFVIII)을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH을 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

[0324] 순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 50-배 몰 과잉으로 이 rFVIII 용액에 15 분의 최대 지속 시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를 얻었다.

[0325] 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0326] 얻은 PSA-rFVIII 콘주게이트를, 15 cm의 층 높이 (h) 및 81 ml의 수득한 칼럼 용적 (CV)을 갖는 칼럼 (GE Healthcare 제조)에 충전된 페닐 세파로오스 FF 낮은 서브 수지 (GE Healthcare)을 사용하여 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)로 정제했다.

[0327] 반응 혼합물에, 350 mM 나트륨 클로라이드, 8 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9을 함유하는 50 mM Hepes 완충액의 첨가에 의해 암모늄 아세테이트를 넣었다. 2 용적의 반응 혼합물을 1 용적의 암모늄 아세테이트 함유 완충계와 혼합하고 pH 값을 pH 6.9으로 0.5 N 수성 NaOH 용액의 적가에 의해 보정했다. 이 혼합물을 1 cm/min의 유속을 사용하여 HIC 칼럼 상에 로딩하고 그 다음 > 3CV 평형 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)를 사용하여 세정 단계를 수행했다.

[0328] 반응 부산물 및 안티-케이오성 염의 제거에 대해 제2 세정 단계를 > 5CV 세정 완충액 1 (50 mM Hepes, 3 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)로 상향류 방식으로 2 cm/min의 유속으로 수행했다. 그 다음 정제된 rFVIII 콘주게이트의 용출을, 40 % 세정 완충액 2 (50 mM Hepes, 1.5 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9) 및 60 % 용출 완충액 (20 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5)의 단계 구배를 사용하여 1 cm/min의 유속으로 하향류 방식으로 수행했다. PSA-rFVIII 콘주게이트의 용출을 UV 280 nm에서 모니터링하고 콘주게이트 함유 용출물을 < 4 CV 내에서 수집했다. 후 용출 단계를 > 3 CV 용출 완충액으로 주요 생성물로부터 최소 및/또는 비변형된 rFVIII를 분리하기 위한 조건 하에서 수행했다.

[0329] 마지막으로, 정제된 콘주게이트를 분자량 분획 30kD을 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (88cm2, 밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0330] 이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주케이트를, PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, FVIII 발색 활성 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0331] 분석 데이타 (6개의 연속 배치의 평균):

[0332] 공정 수율 (Bradford): 58.9%

[0333] 공정 수율 (FVIII 크롬.): 46.4%

[0334] 비활성: (FVIII 크롬./mg 단백질): 4148 IU/mg

[0335] 비활성 (개시 물질의 %): 79.9 %

[0336] PSA 도 (mol/mol): 8.1

[0337] **실시예 13**

[0338] 아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 r FVIII의 페길화

[0339] **방법 1:**

[0340] rFVIII을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 14.7 mg rFVIII을 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 296 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 순차적으로 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0341] 산화된 rFVIII을 함유하는 체류물 (10.9 ml)을 2.94 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)과 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0342] 마지막으로, PEG-rFVIII 콘주게이트를 Q 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM $CaCl_2$를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM $CaCl_2$ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 30 kD 막 (50cm2, 밀리포어)를 사용하여 UF/DF를 수행했다. 제제를, 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 FVIII 발색 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PEG-rFVIII 콘주게이트는 측정된 천연 rFVIII와 비교한 > 70%의 비활성을 나타낼 것으로 예상된다.

[0343] **방법 2:**

[0344] rFVIII을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 개시 중량 또는 농도의 rFVIII을 용해시키거나 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/-5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0345] 상기 산화된 rFVIII을 EMD TMAE (M) (Merck) 상에서 음이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 혼합물을 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 6.5)으로 희석하여 5 ms/cm의 전도도를 얻었다. 이 용액을 1.5 cm/min의 유속을 사용하여 10 ml의 칼럼 용적을 갖는 IEX 칼럼 (층 높이: 5.4 cm) 상에 로딩했다. 이 칼럼을 순차적으로 완충액 A 및 완충액 B의 92:8 혼합물 (w/w)의 5 CV (20 mM Hepes, 5 mM $CaCl_2$, 1.0 M NaCl, pH 7.0)으로 세정했다 (유속: 1.5 cm/min). 그 다음 상기 산화된 rFVIII를 완충액 A 및 완충액 B의 50:50 (w/w) 혼합물로 용출하고 그 다음 완충액 B의 5 CV로 후용출 단계를 수행했다. 용출 단계를 1.0 cm/min의 유속의 사용으로 수행했다.

[0346] 순차적으로, 20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 rFVIII를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

[0347] 얻은 PEG-rFVIII 콘주게이트를, 15 cm의 층 높이 (h) 및 81 ml의 수득한 칼럼 용적 (CV)을 갖는 칼럼 (GE Healthcare 제조)에 충전된 페닐 세파로오스 FF 낮은 서브 수지 (GE Healthcare)을 사용하여 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)로 정제했다.

[0348] 반응 혼합물에 350 mM 나트륨 클로라이드, 8 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘을 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 6.9)의 첨가로 암모늄 아세테이트를 넣었다. 2 용적의 반응 혼합물을 1 용적의 암모늄 아세테이트 함유 완충계와 혼합하고 pH 값을 pH 6.9으로 0.5 N 수성 NaOH 용액의 적가로 보정했다. 이 혼합물을 1 cm/min의 유속

을 사용하여 HIC 칼럼 상에 로딩하고 그 다음 > 3 CV 평형 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)를 사용하여 세정 단계를 수행했다.

[0349] 반응 부산물 및 안티-케이오성 염의 제거에 대해 제2 세정 단계를, > 5CV 세정 완충액 1 (50 mM Hepes, 3 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)로 상향류 방식으로 2 cm/min의 유속으로 수행했다. 그 다음 정제된 rFVIII 콘주게이트의 용출을 하향류 방식으로 40 % 세정 완충액 2 (50 mM Hepes, 1.5 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9) 및 60 % 용출 완충액 (20mM Hepes, 5mM 염화칼슘, pH 7.5)의 단계 구배를 사용하여 1cm/min의 유속에서 수행했다. PEG-rFVIII 콘주게이트의 용출을 UV 280 nm에서 모니터링하고 콘주게이트 함유 용출물을 < 4 CV 내에서 수집했다. 후 용출 단계를 > 3 CV 용출 완충액으로 주요 생성물로부터 최소 및/또는 비변형된 rFVIII를 분리하기 위한 조건 하에서 수행했다.

[0350] 마지막으로, 정제된 콘주게이트를 분자량 분획 30kD을 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)을 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0351] 이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0352] **방법 3:**

[0353] rFVIII을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 6 ml Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해된 7.84 mg rFVIII을 314 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 1.57 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0354] 마지막으로 PEG-rFVIII 콘주게이트를 Q-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼섬 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 30 kD 막 (88cm^2, 밀리포어)를 사용하여 UF/DF를 수행했다. FVIII 발색 검정 및 총 단백질 (Bradford)의 측정에 의한 콘주게이트의 분석적 특성화는 rFVIII 개시 물질과 비교하여 > 60%의 비활성을 보여준다.

[0355] **방법 4:**

[0356] rFVIII을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 rFVIII을 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg rFVIII/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로, 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

[0357] 유리 rFVIII을 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 적절한 양의 완충액 A (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)로 희석하여 용액 전도도 및 pH 값을 보정한 후 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 7.5)로 용출했다. 유리 rFVIII을 완충액 B의 25 %를 사용하는 단계 구배로 용출하고, 이로써 얻은 분획에서 12-25 mS/cm의 전도도를 얻고 50 % 완충액 B의 단계 구배를 사용하여 콘주게이트 하고, 이로써 콘주게이트 분획에서 27-45 mS/cm의 전도도를 얻었다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 6.9; 안티-케이오성 염 예들 들면 암모늄 아세테이트의 사용에 의해, 암모늄 설페이트 등)으로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 6.9)로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT; 또는 비교가능 HIC 배지) 상에 로딩되었다. 유리 PEG-시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로, 콘주게이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.4)으로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀롤로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액

(50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

[0358] 제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0359] **실시예 14**

[0360] 아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 rFVIIa의 폴리시알릴화

[0361] **방법 1:**

[0362] 개시 농도 또는 중량의 재조합 인자 VIIa (rFVIIa)을 이동시키거나 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 NaOH 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 50 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15 분 내에 T = +22 +/- 2 ℃에서 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0363] 상기 산화된 rFVIIa을 EMD TMAE (M) (Merck) 상에서 음이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 혼합물을 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM $CaCl_2$, pH 6.5)으로 희석하여 5 ms/cm의 전도도를 얻었다. 이 용액을 1.5 cm/min의 유속을 사용하여 10 ml의 칼럼 용적을 갖는 IEX 칼럼 (층 높이: 5.4 cm) 상에 로딩했다. 이 칼럼을 순차적으로 완충액 A 및 완충액 B의 92:8 혼합물 (w/w)의 5 CV (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1.0 M NaCl, pH 7.0)으로 세정했다 (유속: 1.5 cm/min). 그 다음 상기 산화된 rFVIIa를 완충액 A 및 완충액 B의 50:50 (w/w) 혼합물로 용출하고 그 다음 완충액 B의 5 CV로 후용출 단계를 수행했다. 용출 단계를 1.0 cm/min의 유속의 사용으로 수행했다.

[0364] 순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH_2) 시약을 정제된 산화된 rFVIIa를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

[0365] 얻은 PSA-rFVIIa 콘주게이트를, 15 cm의 층 높이 (h) 및 81 ml의 수득한 칼럼 용적 (CV)을 갖는 칼럼 (GE Healthcare 제조)에 충전된 페닐 세파로오스 FF 낮은 서브 수지 (GE Healthcare)을 사용하여 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)로 정제했다.

[0366] 반응 혼합물에 350 mM 나트륨 클로라이드, 8 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘을 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 6.9)의 첨가로 암모늄 아세테이트를 넣었다. 2 용적의 반응 혼합물을 1 용적의 암모늄 아세테이트 함유 완충계와 혼합하고 pH 값을 pH 6.9으로 0.5 N 수성 NaOH 용액의 적가로 보정했다. 이 혼합물을 1 cm/min의 유속을 사용하여 HIC 칼럼 상에 로딩하고 그 다음 > 3 CV 평형 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)를 사용하여 세정 단계를 수행했다.

[0367] 반응 부산물 및 안티-케이오성 염의 제거에 대해 제2 세정 단계를 > 5CV 세정 완충액 1 (50 mM Hepes, 3 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)로 상향류 방식으로 2 cm/min의 유속으로 수행했다. 그 다음 정제된 rFVIIa 콘주게이트의 용출을 하향류 방식으로 40 % 세정 완충액 2 (50 mM Hepes, 1.5 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9) 및 60 % 용출 완충액 (20mM Hepes, 5mM 염화칼슘, pH 7.5)의 단계 구배로 사용하여 1 cm/min의 유속으로 수행했다. PSA-rFVIIa 콘주게이트의 용출을 UV 280 nm에서 모니터링하고 콘주게이트 함유 용출물을 < 4 CV 내에서 수집했다. 후 용출 단계를 주요 생성물로부터 최소 및/또는 비 변형된 rFVIIa를 분리하기 위한 동일한 조건 하에서 > 3 CV 용출 완충액으로 수행했다.

[0368] 마지막으로, 정제된 콘주게이트를 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (예를 들면 10 kD MWCO, 88cm^2, 밀리포어)을 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0369] 이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를, PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0370] **방법 2:**

[0371] 개시 중량 또는 농도의 rFVIIa를 용해시키거나 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염

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

[0372] 순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH_2) 시약을 이 rFVIIa 용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 150 μM의 농도를 얻었다.

[0373] 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0374] 얻은 PSA-rFVIIa 콘주게이트를, 15 cm의 층 높이 (h) 및 81 ml의 수득한 칼럼 용적 (CV)을 갖는 칼럼 (GE Healthcare 제조)에 충전된 페닐 세파로오스 FF 낮은 서브 수지 (GE Healthcare)을 사용하여 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)로 정제했다.

[0375] 반응 혼합물에, 350 mM 나트륨 클로라이드, 8 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘을 함유하는 50 mM Hepes 완충액(pH 6.9)의 첨가로 암모늄 아세테이트를 넣었다. 2 용적의 반응 혼합물을 1 용적의 암모늄 아세테이트 함유 완충계와 혼합하고 pH 값을 pH 6.9으로 0.5 N 수성 NaOH 용액의 적가로 보정했다. 이 혼합물을 1 cm/min의 유속을 사용하여 HIC 칼럼 상에 로딩하고 그 다음 > 3CV 평형 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)를 사용하여 세정 단계를 수행했다.

[0376] 반응 부산물 및 안티-케이오성 염의 제거에 대해 제2 세정 단계를 > 5CV 세정 완충액 1 (50 mM Hepes, 3 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)로 상향류 방식으로 2 cm/min의 유속으로 수행했다. 그 다음 정제된 rFVIIa 콘주게이트의 용출을 하향류 방식으로 40 % 세정 완충액 2 (50 mM Hepes, 1.5 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9) 및 60 % 용출 완충액 (20mM Hepes, 5mM 염화칼슘, pH 7.5)의 단계 구배로 사용하여 1 cm/min의 유속으로 수행했다. PSA-rFVIIa 콘주게이트의 용출을 UV 280 nm에서 모니터링하고 콘주게이트 함유 용출물을 < 4 CV 내에서 수집했다. 후 용출 단계를 > 3 CV 용출 완충액으로 주요 생성물로부터 최소 및/또는 비변형된 rFVIII를 분리하기 위한 조건 하에서 수행했다.

[0377] 마지막으로, 정제된 콘주게이트를 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)을 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0378] 이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0379] **실시예 15**

[0380] 아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 rFIX의 페길화

[0381] **방법 1:**

[0382] rFIX를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 개시 중량 또는 농도의 rFIX을 용해시키거나 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15 분 내에 T = +22 +/- 2 ℃에서 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0383] 상기 산화된 rFVIII을 EMD TMAE (M) (Merck) 상에서 음이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 혼합물을 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 6.5)로 희석하여 5 mS/cm의 전도도를 얻었다. 이 용액을 1.5 cm/min의 유속을 사용하여 10 ml의 칼럼 용적을 갖는 IEX 칼럼 (층 높이: 5.4 cm) 상에 로딩했다. 이 칼럼을 순차적으로 완충액 A 및 완충액 B의 92:8 혼합물 (w/w)의 5 CV (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1.0 M NaCl, pH 7.0)으로 세정했다 (유속: 1.5 cm/min). 그 다음 상기 산화된 rFIX를 완충액 A 및 완충액 B의 50:50 (w/w) 혼합물로 용출하고 그 다음 완충액 B의 5 CV로 후용출 단계를 수행했다. 용출 단계를 1.0 cm/min의 유속의 사용으로 수행했다.

[0384] 순차적으로, 20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 rFIX를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

[0385] 얻은 PEG-rFIX 콘주게이트를, 15 cm의 층 높이 (h) 및 81 ml의 수득한 칼럼 용적 (CV)을 갖는 칼럼 (GE Healthcare 제조)에 충전된 페닐 세파로오스 FF 낮은 서브 수지 (GE Healthcare)을 사용하여 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)로 정제했다.

[0386] 반응 혼합물에 350 mM 나트륨 클로라이드, 8 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘을 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 6.9)의 첨가로 암모늄 아세테이트를 넣었다. 2 용적의 반응 혼합물을 1 용적의 암모늄 아세테이트 함유 완충계와 혼합하고 pH 값을 pH 6.9으로 0.5 N 수성 NaOH 용액의 적가로 보정했다. 이 혼합물을 1 cm/min의 유속을 사용하여 HIC 칼럼 상에 로딩하고 그 다음 > 3 CV 평형 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)를 사용하여 세정 단계를 수행했다.

[0387] 반응 부산물 및 안티-케이오성 염의 제거에 대해 제2 세정 단계를 > 5CV 세정 완충액 1 (50 mM Hepes, 3 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)로 상향류 방식으로 2 cm/min의 유속으로 수행했다. 그 다음 정제된 rFIX 콘주게이트의 용출을 하향류 방식으로 40 % 세정 완충액 2 (50 mM Hepes, 1.5 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9) 및 60 % 용출 완충액 (20 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5)의 단계 구배를 사용하여 1 cm/min의 유속으로 수행했다. PEG-rFIX 콘주게이트의 용출을 UV 280 nm에서 모니터링하고 콘주게이트 함유 용출물을 < 4 CV 내에서 수집했다. 후 용출 단계를 주요 생성물로부터 최소 및/또는 비 변형된 rFIX를 분리하기 위한 동일한 조건 하에서 > 3 CV 용출 완충액으로 수행했다.

[0388] 마지막으로, 정제된 콘주게이트를 분자량 분획10kD를 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (88cm2, 밀리포어)을 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0389] 이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0390] **방법 2:**

[0391] rFIX를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 rFIX를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg rFIX/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로, 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

[0392] 유리 rFIX를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 적절한 양의 완충액 A (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)로 희석하여 용액 전도도 및 pH 값을 보정한 후 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 7.5)로 용출했다. 유리 rFIX를 완충액 B의 25 %를 사용하는 단계 구배로 용출하고, 이로써 얻은 분획에서 12- 25 mS/cm의 전도도를 얻고 50 % 완충액 B의 단계 구배를 사용하여 콘주게이트 하고, 이로써 콘주게이트 분획에서 27-45 mS/cm의 전도도를 얻었다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 6.9; 안티-케이오성 염 예들 들면 암모늄 아세테이트의 사용에 의해 등)으로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT; 또는 비교가능 HIC 배지) 상에 로딩되었다. 유리 아미노옥시-PEG 시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로, 콘주게이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.4)으로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀롤로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

[0393] 제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0394] **실시예 16**

[0395] 아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 rFVIIa의 페길화

[0396] **방법 1:**

[0397] rFVIIa를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 개시 중량 또는 농도의 rFVIIa를 용해시키거나 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 NaOH 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 50 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0398] 상기 산화된 rFVIIa을 EMD TMAE (M) (Merck) 상에서 음이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 혼합물을 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 6.5)로 희석하여 5 mS/cm의 전도도를 얻었다. 이 용액을 1.5 cm/min의 유속을 사용하여 10 ml의 칼럼 용적을 갖는 IEX 칼럼 (층 높이: 5.4 cm) 상에 로딩했다. 이 칼럼을 순차적으로 완충액 A 및 완충액 B의 92:8 혼합물 (w/w)의 5 CV (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1.0 M NaCl, pH 7.0)으로 세정했다 (유속: 1.5 cm/min). 그 다음 상기 산화된 rFVIIa를 완충액 A 및 완충액 B의 50:50 (w/w) 혼합물로 용출하고 그 다음 완충액 B의 5 CV로 후용출 단계를 수행했다. 용출 단계를 1.0 cm/min의 유속의 사용으로 수행했다.

[0399] 순차적으로, 20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 rFVIIa를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

[0400] 얻은 PEG-rFVIIa 콘주게이트를, 15 cm의 층 높이 (h) 및 81 ml의 수득한 칼럼 용적 (CV)을 갖는 칼럼 (GE Healthcare 제조)에 충전된 페닐 세파로오스 FF 낮은 서브 수지 (GE Healthcare)을 사용하여 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)로 정제했다.

[0401] 반응 혼합물에 350 mM 나트륨 클로라이드, 8 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘을 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 6.9)의 첨가로 암모늄 아세테이트를 넣었다. 2 용적의 반응 혼합물을 1 용적의 암모늄 아세테이트 함유 완충계와 혼합하고 pH 값을 pH 6.9으로 0.5 N 수성 NaOH 용액의 적가로 보정했다. 이 혼합물을 1 cm/min의 유속을 사용하여 HIC 칼럼 상에 로딩하고 그 다음 > 3 CV 평형 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)를 사용하여 세정 단계를 수행했다.

[0402] 반응 부산물 및 안티-케이오성 염의 제거에 대해 제2 세정 단계를 > 5CV 세정 완충액 1 (50 mM Hepes, 3 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9)로 상향류 방식으로 2 cm/min의 유속으로 수행했다. 그 다음 정제된 rFVIIa 콘주게이트의 용출을 하향류 방식으로 40 % 세정 완충액 2 (50 mM Hepes, 1.5 M 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9) 및 60 % 용출 완충액 (20 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5)의 단계 구배를 사용하여 1 cm/min의 유속으로 수행했다. PEG-rFVIIa 콘주게이트의 용출을 UV 280 nm에서 모니터링하고 콘주게이트 함유 용출물을 < 4 CV 내에서 수집했다. 후 용출 단계를 주요 생성물로부터 최소 및/또는 비 변형된 rFVIIa를 분리하기 위한 동일한 조건 하에서 > 3 CV 용출 완충액으로 수행했다.

[0403] 마지막으로, 정제된 콘주게이트를을 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다 분자량 분획10kD를 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어).

[0404] 이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0405] **방법 2:**

[0406] rFVIIa를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 rFVIIa를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg rFVIIa/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 15 분 내에 첨

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

[0407] 유리 rFVIIa를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 적절한 양의 완충액 A (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)로 희석하여 용액 전도도 및 pH 값을 보정한 후 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 7.5)로 용출했다. 유리 rFVIIa를 완충액 B의 25 %를 사용하는 단계 구배로 용출하고, 이로써 얻은 분획에서 12-25 mS/cm의 전도도를 얻고 50 % 완충액 B의 단계 구배를 사용하여 콘주게이트 하고, 이로써 콘주게이트 분획에서 27-45 mS/cm의 전도도를 얻었다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 6.9; 안티-케이오성 염 예들 들면 암모늄 아세테이트의 사용으로)으로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, 5 mM CaCl2, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT; 또는 비교가능 HIC 배지) 상에 로딩되었다. 유리 PEG-시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로 콘주게이트를 100% 완충액 E (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.4)로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

[0408] 제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0409] **실시예 17**

[0410] 아미노 벤조산의 존재에서 rFIX의 폴리시알릴화

[0411] **방법 1:**

[0412] 8.2 mg rFIX을 4.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$)에서 용해시켰다. 그 다음 82 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 4 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 6 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거했다.

[0413] 산화된 rFIX를 함유하는 체류물 (6.5 ml)을 1.64 ml의 수성 o-아미노 벤조산 (50 mM)와 혼합시키고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD의 MW을 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0414] 콘주게이트의 추가 정제는 본원에서 기재된 바와 같이 수행되었다.

[0415] **방법 2:**

[0416] 5-배 몰 과잉의 20 kD의 MW을 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 함유하는 0.65 ml 나트륨 포스페이트 완충액(pH 6.0) 중 1 mg rFIX의 용액을 제조했다. 그 다음 333 μl의 수성 o-아미노 벤조산 용액 (30 mM)을 친핵성 촉매로서 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 순차적으로 $NaIO_4$ (5 mM)의 20 μl의 수용액을 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻었다. 커플링 과정을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행하고 1 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 콘주게이트의 추가 정제는 본원에서 기재된 바와 같이 수행되었다.

[0417] **실시예 18**

[0418] 아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 EPO의 폴리시알릴화

[0419] **방법 1:**

[0420] 개시 농도의 에리트로포이에틴 (EPO)을 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, $NaIO_4$을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음

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

[0421] 그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM $CaCl_2$, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용적 (Merck EMD TMAE (M))을을 갖는 IEX 칼럼으로 이동시켰다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 EPO를 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM $CaCl_2$, 1M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. EPO 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 pH 6.0로 0.5M HCl의 적가로 조정했다.

[0422] 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시-PSA 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주게이트를 5 mM $CaCl_2$를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로 PSA-EPO 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (MWCO 10kD, 50cm^2, 밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0423] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다.

[0424] 10 mg EPO를 5 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 100 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 50 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 순차적으로 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0425] 산화된 EPO를 함유하는 체류물 (대략 7 ml)을 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD의 MW을 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0426] 유리 EPO를 음이온 교환 크로마토그래피 (AEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 7.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 7.5)로 용출했다. 유리 EPO를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주게이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, pH 6.9)으로 ~190 mS/cm로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩되었다. 유리 PSA-시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로, 콘주게이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, pH 7.4)로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀롤로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl을 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 7.2)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-EPO 콘주게이트에 대해 천연 EPO와 비교한 > 50 %의 비활성을 측정했다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 EPO를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

[0427] **방법 2:**

[0428] EPO를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T = +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종

농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0429] 상기 산화된 EPO를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 EPO 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0430] 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 정제된 산화된 EPO를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

[0431] 얻은 PSA-EPO 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-EPO 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0432] 이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0433] **방법 3:**

[0434] 에리트로포이에틴 (EPO)을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50 배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 $NaIO_4$ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01% Tween 80, pH 6.9으로 미리 평형을 이룬 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로, PSA-EPO 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (MWCO 10 kD, 88cm2, 밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0435] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 10 mg EPO를 8 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 200 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM) 및 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 첨가했다. 순차적으로, 20 kD의 MW을 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 100 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0436] 유리 EPO를 음이온 교환 크로마토그래피 (AEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 7.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 7.5)로 용출했다. 유리 EPO를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주게이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, pH 6.9)으로 ~190 mS/cm로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩되었다. 유리 PSA-시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로, 콘주게이트를 100% 완충액 E (50 mM Hepes, pH 7.4)로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀롤로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm^2, 분획 10 kD, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl을 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 7.2)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-EPO 콘주게이트에 대해 천연 EPO와 비교한 > 50 %의 비활성을 측정했다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 EPO를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

[0437] **방법 4:**

[0438] EPO를 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)으로

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

[0439] 순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 EPO 용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를 얻었다.

[0440] 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0441] 얻은 PSA-EPO 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-EPO 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (MWCO 10 kD, 88cm2, 밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0442] 이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0443] **실시예 19**

[0444] 아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 Ang-2의 폴리시알릴화

[0445] **방법 1:**

[0446] 개시 농도의 안지오포이에틴-2 (Ang-2)을 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, $NaIO_4$을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0447] 그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용적 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 Ang-2을 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1 M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. Ang-2 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 0.5 M HCl의 적가로 pH 6.0으로 조정했다.

[0448] 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주게이트를 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로, PSA - Ang-2 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0449] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 안지오포이에틴-2 (Ang-2)을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, $NaIO_4$을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0450] 그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거했다.

[0451] 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 이온 교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA-Ang-2 콘주게이트 함유 분획을

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

[0452] **방법 2:**

[0453] Ang-2을 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0454] 상기 산화된 Ang-2을 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 Ang-2 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0455] 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 정제된 산화된 Ang-2을 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

[0456] 얻은 PSA- Ang-2 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 추가 정제했다

[0457] PSA-Ang-2 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0458] 이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0459] **방법 3:**

[0460] 안지오포이에틴-2 (Ang-2)을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW를 갖는 50 배 몰 과잉의 PSA 아미노옥시 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 $NaIO_4$ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01% Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로, PSA Ang-2 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0461] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 안지오포이에틴-2 (Ang-2)을 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 PSA 아미노옥시 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 $NaIO_4$ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM) 및 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA Ang-2 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0462] **방법 4:**

[0463] Ang-2을 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수

성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

[0464] 순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 Ang-2 용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를 얻었다.

[0465] 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0466] 얻은 PSA-Ang-2 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-Ang-2 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0467] 이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0468] **실시예 20**

[0469] 아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 VEGF의 폴리시알릴화

[0470] **방법 1:**

[0471] 개시 농도의 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, $NaIO_4$을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0472] 그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용적 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 VEGF을 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1 M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. VEGF 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 pH 6.0로 0.5M NaOH의 적가로 조정했다.

[0473] 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주게이트를 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로 PSA - VEGF 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0474] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, $NaIO_4$을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0475] 그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0476] 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 이온 교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA - VEGF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된

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

[0477] **방법 2:**

[0478] VEGF를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0479] 상기 산화된 VEGF을 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 VEGF 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0480] 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 정제된 산화된 VEGF을 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

[0481] 얻은 PSA-VEGF 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-VEGF 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0482] 이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0483] **방법 3:**

[0484] 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 PSA 아미노옥시 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 $NaIO_4$ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01% Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로, PSA-VEGF 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0485] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)을 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 $NaIO_4$ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM) 및 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-VEGF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0486] **방법 4:**

[0487] VEGF을 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

[0488] 순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 VEGF 용액 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한

교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를 얻었다.

[0489] 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0490] 얻은 VEGF-콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-VEGF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0491] 이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0492] **실시예 21**

[0493] 아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 EGF의 폴리시알릴화

[0494] **방법 1:**

[0495] 개시 농도의 표피 성장 인자 (EGF)을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, $NaIO_4$을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0496] 그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용적 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 EGF를 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. EGF 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 pH 6.0로 0.5M HCl의 적가로 조정했다.

[0497] 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주게이트를 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로, PSA-EGF 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0498] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 표피 성장 인자 (EGF)을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, $NaIO_4$을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0499] 그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0500] 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 이온 교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA-EGF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0501] **방법 2:**

[0502] EGF를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0503] 상기 산화된 EGF를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 EGF 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0504] 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 정제된 산화된 EGF를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

[0505] 얻은 PSA-EGF 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-EGF 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0506] 이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0507] **방법 3:**

[0508] 표피 성장 인자 (EGF)을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 PSA 아미노옥시 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 $NaIO_4$ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01% Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로 PSA-EGF 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0509] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 표피 성장 인자 (EGF)을 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 PSA 아미노옥시 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 $NaIO_4$ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM) 및 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0510] **방법 4:**

[0511] EGF를 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

[0512] 순차적으로 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 EGF-용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를 얻었다.

[0513] 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0514] 얻은 EGF-콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-EGF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0515] 이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0516] **실시예 22**

[0517] 아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 NGF의 폴리시알릴화

[0518] **방법 1:**

[0519] 개시 농도의 신경 성장 인자 (NGF)을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, $NaIO_4$을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0520] 그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용적 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 NGF를 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. NGF 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 pH 6.0로 0.5M HCl의 적가로 조정했다.

[0521] 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주게이트를 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로, PSA-NGF 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0522] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 신경 성장 인자 (NGF)을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, $NaIO_4$을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0523] 그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0524] 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 이온 교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA-NGF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0525] **방법 2:**

[0527] *NGF를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음

반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0528] 상기 산화된 NGF를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 NGF 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0529] 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 정제된 산화된 NGF 함유 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

[0530] 얻은 PSA-NGF 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-NGF 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0531] 이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0532] **방법 3:**

[0533] 신경 성장 인자 (NGF)을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 $NaIO_4$ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01 % Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로, PSA NGF 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0534] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 신경 성장 인자 (NGF)을 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 $NaIO_4$ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM) 및 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 그 다음 용출물의 PSA-NGF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0535] **방법 4:**

[0536] NGF을 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

[0537] 순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 NGF-용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를 얻었다.

[0538] 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0539] 얻은 NGF-콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-NGF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0540] 이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0541] **실시예 23**

[0542] 아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 HGH의 폴리시알릴화

[0543] **방법 1:**

[0544] 본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다.

[0545] 개시 농도의 인간 성장호르몬 (HGH)을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, $NaIO_4$을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0546] 그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용적 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 HGH를 완충액 B로 용출했다 (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1 M NaCl, pH 7.0). HGH 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 0.5 M HCl의 적가로 pH 6.0으로 조정했다.

[0547] 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로, PSA-HGH 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0548] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다. HGH를 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, $NaIO_4$을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0549] 그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0550] 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 이온 교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA-HGH 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0551] **방법 2:**

[0552] 본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다.

[0553] HGH를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0554] 상기 산화된 HGH를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 HGH 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0555] 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 정제된 산화된 HGH 함유 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

[0556] 얻은 PSA-HGH 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-HGH 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0557] 이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0558] **방법 3:**

[0559] 본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다.

[0560] 인간 성장호르몬 (HGH)을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50 배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 $NaIO_4$ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01% Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로, PSA HGH 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0561] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다. HGH를 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50 배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 $NaIO_4$ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM) 및 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 그 다음 PSA -HGH 함유 용출물의 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0562] **방법 4:**

[0563] 본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다.

[0564] HGH을 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

[0565] 순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 HGH-용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를 얻었다.

[0566] 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0567] 얻은 HGH-콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-HGH 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0568] 이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0569] **실시예 24**

[0570] 아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 TNF-알파의 폴리시알릴화

[0571] 개시 농도의 종양 괴사 인자-알파 (TNF-알파)을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, $NaIO_4$을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0572] 그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용적 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 TNF-알파를 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. TNF-알파 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 pH 6.0로 0.5M HCl의 적가로 조정했다.

[0573] 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주게이트를 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로 PSA- TNF-알파 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0574] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 종양 괴사 인자-알파 (TNF-알파)을 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, $NaIO_4$을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0575] 그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 이온 교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA-TNF-알파 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해

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

[0576] **방법 2:**

[0577] TNF-알파를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0578] 상기 산화된 TNF-알파를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 TNF-알파 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0579] 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 정제된 산화된 TNF-알파 함유 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

[0580] 얻은 PSA-TNF-알파 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-TNF-알파 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0581] 이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0582] **방법 3:**

[0583] 종양 괴사 인자-알파 (TNF-알파)을 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 $NaIO_4$ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01 % Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로 PSA-TNF-알파 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0584] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 종양 괴사 인자-알파 (TNF-알파)을 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 $NaIO_4$ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM).and 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-TNF-알파 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0585] **방법 4:**

[0586] TNF-알파을 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

[0587] 순차적으로 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 TNF-알파-용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를 얻었다.

[0588] 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0589] 얻은 TNF-알파 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-TNF-알파 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0590] 이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0591] **실시예 25**

[0592] 아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 인슐린의 폴리시알릴화

[0593] **방법 1:**

[0594] 본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다. 개시 농도의 인슐린을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, $NaIO_4$을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0595] 그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용적 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 인슐린을 완충액 B로 용출했다 (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1 M NaCl, pH 7.0). 인슐린 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 0.5 M HCl의 적가로 pH 6.0으로 조정했다.

[0596] 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로 PSA-인슐린 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0597] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다. 인슐린을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, $NaIO_4$을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0598] 그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0599] 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다.

과잉의 아미노옥시 시약을 이온 교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA-인슐린 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0600] **방법 2:**

[0601] 본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다.

[0602] 인슐린을 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0603] 상기 산화된 인슐린을 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 인슐린 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0604] 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 정제된 산화된 인슐린 함유 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

[0605] 얻은 PSA-인슐린 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-인슐린 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0606] 이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0607] **방법 3:**

[0608] 본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다.

[0609] 인슐린을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 $NaIO_4$ (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01 % Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로, PSA-인슐린 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0610] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다.

[0611] 인슐린을 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시

스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM) 및 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-인슐린 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0612] **방법 4:**

[0613] 본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다.

[0614] 인슐린을 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

[0615] 순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 인슐린-용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를 얻었다.

[0616] 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0617] 얻은 인슐린 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA- 인슐린 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0618] 이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0619] **실시예 26**

[0620] 아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 인터페론-알파의 폴리시알릴화

[0621] **방법 1:**

[0622] 개시 농도의 인터페론-알파를 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0623] 그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용적 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 인터페론-알파를 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. 인터페론-알파 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 0.5 M HCl의 적가로 pH 6.0으로 조정했다.

[0624] 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주게이트를 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로 PSA-인터페론-알파 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0625] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 인터페론-알파를 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다.

이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0626] 그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거했다.

[0627] 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 이온교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA-인터페론-알파 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0628] **방법 2:**

[0629] 인터페론-알파를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0630] 상기 산화된 인터페론-알파를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 인터페론-알파 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0631] 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 정제된 산화된 인터페론-감마를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

[0632] 얻은 PSA-인터페론-알파 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-인터페론-알파 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0633] **방법 3:**

[0634] 인터페론-알파를 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 PSA 아미노옥시 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01 % Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로, PSA-인터페론-알파 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0635] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 인터페론-알파를 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM) 및 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-인터페론-알파 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0636] **방법 4:**

[0637] 인터페론-알파을 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

[0638] 순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 인터페론-알파 용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를 얻었다.

[0639] 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0640] 얻은 인터페론-알파 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-인터페론-알파 함유 분획을 수집하고 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0641] 이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0642] **실시예 27**

[0643] 아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 인터페론-감마의 폴리시알릴화

[0644] **방법 1:**

[0645] 10 mg 인터페론-감마를 5 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 100 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 50 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 순차적으로 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0646] 산화된 인터페론-감마를 함유하는 체류물 (대략 7 ml)을 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD의 MW을 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0647] 유리 인터페론-감마을 양이온 교환 크로마토그래피 (CEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 6.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep SPFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B로 용출했다 (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6.5). 유리 인터페론-감마를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주게이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, pH 6.9)으로 ~190 mS/cm로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩되었다. 유리 PSA-시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로, 콘주게이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, pH 6.9)로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 6.9)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-인터페론-감마 콘주게이트에 대해 천연 인터페론-감마와 비교된 > 50 %의 비활성(specific activity)을 측정했다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 인터페론 감마를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

[0648] **방법 2:**

[0649] 10 mg 인터페론-감마를 8 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 200 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM) 및 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 첨가했다.

순차적으로 20 kD의 MW을 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 100 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0650] 유리 인터페론 감마를 양이온 교환 크로마토그래피 (CEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 6.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep SPFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B로 용출했다 (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6.5). 유리 인터페론-감마를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주게이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, pH 6.9)으로 ~190 mS/cm로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩되었다. 유리 PSA-시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로, 콘주게이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, pH 6.9)로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 6.9)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA인터페론-감마 콘주게이트에 대해 천연 인터페론-감마와 비교된 > 50 %의 비활성을 측정했다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 인터페론-감마를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

[0651] **방법 3:**

[0652] 10 mg 인터페론-감마를 8 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 200 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM) 및 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 첨가했다. 순차적으로 20 kD의 MW을 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 100 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0653] 유리 인터페론 감마를 양이온 교환 크로마토그래피 (CEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 6.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep SPFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B로 용출했다 (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6.5). 유리 인터페론-감마를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주게이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, pH 6.9)으로 ~190 mS/cm로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩되었다. 유리 PSA-시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로 콘주게이트를 100% 완충액 E (50 mM Hepes, pH 6.9)로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 6.9)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. For PSA인터페론-감마 콘주게이트 천연 인터페론-감마와 비교된 > 50 %의 비활성을 측정했다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 인터페론-감마를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

[0654] **방법 4:**

[0655] 인터페론-감마을 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

[0656] 순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 인터페론-감마 용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를 얻었다.

[0657] 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0658] 얻은 인터페론-감마 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-인터페론-감마 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0659] 이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0660] **실시예 28**

[0661] 아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 G-CSF의 폴리시알릴화

[0662] **방법 1:**

[0663] 개시 농도의 과립구-콜로니 자극 인자 (G-CSF)을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0664] 그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용적 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 G-CSF를 완충액 B로 용출했다 (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1 M NaCl, pH 7.0). G-CSF 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 0.5 M HCl의 적가로 pH 6.0으로 조정했다.

[0665] 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로, 콘주게이트를 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로 PSA- G-CSF 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0666] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 과립구-콜로니 자극 인자 (G-CSF)을 반응 완충액 (예들 들면, 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0667] 그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거했다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 이온 교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA-G-CSF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0668] **방법 2:**

[0669] G-CSF를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음

반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0670] 상기 산화된 G-CSF를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 용출물의 상기 산화된 G-CSF 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0671] 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 50-배 몰 과잉으로 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 정제된 산화된 G-CSF을 함유하는 용출물에 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

[0672] 얻은 PSA-G-CSF 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-G-CSF 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0673] 이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0674] **방법 3:**

[0675] 과립구-콜로니 자극 인자 (G-CSF)을 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01 % Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로, PSA-G-CSF 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0676] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 과립구-콜로니 자극 인자 (G-CSF)을 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM) 및 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-G-CSF 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0677] **방법 4:**

[0678] G-CSF를 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

[0679] 순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 G-CSF 용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를 얻었다.

[0680] 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0681] 얻은 G-CSF 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-G-CSF 함유 분획을 수집하고 재생

된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0682] 이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0683] **실시예 29**

[0684] 아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 휴미라의 폴리시알릴화

[0685] **방법 1:**

[0686] 개시 농도의 휴미라를 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0687] 그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용적 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 휴미라를 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. 휴미라 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 pH 6.0로 0.5M HCl의 적가로 조정했다.

[0688] 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로, PSA-휴미라 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0689] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 휴미라를 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0690] 그 다음 용액을 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 이온 교환 크로마토그래피로 제거했다. 용출물의 PSA-휴미라 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0691] **방법 2:**

[0692] 휴미라를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0693] 상기 산화된 휴미라를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 산화된 휴미라 함유 용출물의 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0694] 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 50-배 몰 과잉으로 정제된 산화된 휴미라를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

[0695] 얻은 PSA-휴미라 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PSA-휴미라 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0696] 이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0697] **방법 3:**

[0698] 휴미라를 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01 % Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로 PSA-휴미라 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0699] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 휴미라를 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM) 및 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA-휴미라 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0700] **방법 4:**

[0701] 휴미라를 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

[0702] 순차적으로, 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 이 휴미라 용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를 얻었다.

[0703] 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0704] 얻은 휴미라-콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA- 휴미라 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0705] 이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0706] **실시예 30**

[0707] 아미노옥시-PSA 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 프롤리아의 폴리시알릴화

[0708] **방법 1:**

[0709] 개시 농도의 프롤리아를 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 이 용액에, NaIO4을 첨가하여 200 μM의 최종 농도를 얻었다. 산화를 실온에서 30 분 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 수행했다. 그 다음 반응을 시스테인 (최종 농도: 10 mM)로 60분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0710] 그 다음 용액에 대해 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거하거나, 대안적으로, 완충액 A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.0)으로 평형을 이룬 20 ml의 용적 (Merck EMD TMAE (M))을 갖는 IEX 칼럼을 수행했다. 칼럼을 5 CV 완충액 A로 평형을 이루었다. 상기 산화된 프롤리아를 완충액 B (20 mM Hepes, 5 mM CaCl2, 1M NaCl, pH 7.0)로 용출했다. 프롤리아 함유 분획들을 수집했다. 단백질 함량을 측정하고 (Coomassie, Bradford), 반응 완충액으로 1 mg/ml로 조정하고 0.5 M HCl의 적가로 pH 6.0으로 조정했다.

[0711] 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (최종 농도: 10 mM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 과잉의 아미노옥시 시약을 HIC로 제거했다. 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.9로 미리 충전된 80 ml 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.5)로 용출했다. 마지막으로, PSA-프롤리아 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0712] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 10 mg 프롤리아를 5 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 100 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 50 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 순차적으로 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0713] 산화된 프롤리아 체류물 (대략 7 ml)을 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD의 MW을 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0714] 유리 프롤리아를 양이온 교환 크로마토그래피 (CEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 6.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep SPFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B로 용출했다 (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6.5). 유리 프롤리아를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주게이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, pH 6.9)으로 ~190 mS/cm로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩되었다. 유리 PSA-시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로, 콘주게이트를 100 % 완충액 E (50 mM Hepes, pH 6.9)로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀롤로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD, 밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 6.9)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-프롤리아 콘주게이트에 대해 천연 프롤리아와 비교한 > 50 %의 비활성이 측정된다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 프롤리아를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

[0715] **방법 2:**

[0716] 프롤리아를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH

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

[0717] 상기 산화된 프롤리아를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 프롤리아 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0718] 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH2) 시약을 정제된 산화된 프롤리아를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 pH 6.0에서 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다 (단백질 농도: 1 mg/ml).

[0719] 얻은 프롤리아 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 프롤리아 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0720] 이 절차의 사용에 의해 제조된 콘주게이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0721] **방법 3:**

[0722] 프롤리아를 반응 완충액 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)으로 이동시키고 희석하여 1 mg/ml의 단백질 농도를 얻었다. 20 kD의 MW을 갖는 50-배 몰 과잉의 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨) 그 다음 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘 (10 mM 최종 농도) 및 NaIO4 (최종 농도: 400 μM)을 첨가했다. 커플링 반응을 2시간 동안 암흑에서 완만한 진탕 하에서 실온에서 수행했다. 순차적으로, 반응을 시스테인으로 60 분 동안 실온에서 켄칭했다 (시스테인 농도: 10 mM). 그 다음 반응 혼합물의 전도도를 암모늄 아세테이트 (50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 8 M 암모늄 아세테이트, pH 6.9)을 함유하는 완충액을 첨가하여 조정하고 50 mM Hepes, 2.5 M 암모늄 아세테이트, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, 0.01 % Tween 80, pH 6.9로 미리 평형을 이룬 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)로 충전된 칼럼 상에 충전했다. 순차적으로 콘주게이트를 50 mM Hepes, 5 mM 염화칼슘, pH 7.5으로 용출했다. 마지막으로 PSA 프롤리아 함유 분획들을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)의 사용으로 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0723] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 10 mg 프롤리아를 8 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 200 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM) 및 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 첨가했다. 순차적으로 20 kD의 MW을 갖는 아미노옥시-PSA 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5 배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 100 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0724] 유리 프롤리아를 양이온 교환 크로마토그래피 (CEC)로 제거했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 6.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep SPFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B로 용출했다 (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6.5). 유리 프롤리아를 칼럼을 25 % 완충액 B로 및 콘주게이트를 5 0% 완충액 B에서 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획의 전도도는 순차적으로 완충액 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, pH 6.9)으로 ~190 mS/cm로 상승되고 완충액 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, pH 6.9)으로 미리 평형을 이룬 20 ml HiPrep 부틸 FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩되었다. 유리 PSA-시약을 5 CV 완충액 D로 세정했다. 순차적으로 콘주게이트를 100% 완충액 E (50 mM Hepes, pH 6.9)로 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀롤로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 6.9)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PSA-프롤리아 콘주게이트에 대해 천연 프롤리아와 비교한 > 50 %의 비활성이 측정된다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-

77). 이 제제는 유리 프롤리아를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

[0725] **방법 4:**

[0726] 프롤리아를 용해시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)로 이동시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다.

[0727] 순차적으로 아미노옥시-폴리시알산 (PSA-ONH_2) 시약을 이 프롤리아 -용액에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 마지막으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 첨가하여 400 μM의 농도를 얻었다.

[0728] 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0729] 얻은 프롤리아 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 PSA- 프롤리아 함유 분획을 수집하고 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0730] 이 절차의 사용으로 제조된 콘주케이트를 PSA 함량 (레조르시놀 검정)을 측정하여 총 단백질, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 생물학적 활성, 및 폴리시알화도의 측정을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0731] **실시예 31**

[0732] 다른 치료 단백질의 폴리시알릴화

[0733] 본원에서 기재된 바와 같은 대안적인 친핵성 촉매 유사 m-톨루이딘 또는 o-아미노벤조산의 존재에서 수행된 폴리시알릴화 반응은 다른 치료 단백질. 예를 들면, 본 발명의 다양한 측면들에서, PSA 아미노옥시 또는 PEG 아미노옥시 시약과의 본원에서 기재된 상기 폴리시알릴화 또는 페길화 반응은 치료 단백질 예컨대 본원에서 기재된 단백질과 함께 반복된다.

[0734] **실시예 32**

[0735] 아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 EPO의 페길화

[0736] **방법 1:**

[0737] 에리트로포이에틴 (EPO)을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). EPO를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거했다.

[0738] 그 다음 산화된 EPO를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0739] 마지막으로, PEG-EPO 콘주게이트를 (예들 들면 Q 세파로오스 FF상) 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM $CaCl_2$를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM $CaCl_2$ 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0740] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. EPO를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 10 mg EPO를 5 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 100 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃

에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 50 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 순차적으로 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0741] 산화된 EPO을 함유하는 체류물 (대략 7 ml)를 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0742] 마지막으로, PEG-EPO 콘주게이트를 Q 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 7.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 7.5)로 용출했다. 유리 EPO를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주게이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀롤로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl을 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 7.2)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PEG-EPO 콘주게이트에 대해 천연 EPO와 비교한 > 50 %의 비활성을 측정했다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 EPO를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

[0743] **방법 2:**

[0744] EPO를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본).

[0745] EPO를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0746] 상기 산화된 EPO를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 EPO 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0747] 20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 EPO를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

[0748] 얻은 PEG-EPO 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-EPO 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0749] 이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0750] **방법 3:**

[0751] EPO를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). EPO를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로, 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0752] 마지막으로, PEG-EPO 콘주게이트를 Q 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼섬 상에 로딩했다. 콘주게이트

를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0753] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. EPO를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 10 mg EPO를 ~8 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 200 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM) 및 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 첨가했다. 순차적으로, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 100 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0754] 마지막으로, PEG-EPO 콘주게이트를 Q 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 7.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep QFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 7.5)로 용출했다. 유리 EPO를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주게이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀롤로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl을 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 7.2)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PEG-EPO 콘주게이트에 대해 천연 EPO와 비교한 > 50 %의 비활성을 측정했다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 EPO를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

[0755] **방법 4:**

[0756] EPO를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 EPO를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg EPO/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

[0757] PEG-EPO 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀롤로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm^2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM $CaCl_2$, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

[0758] 제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0759] **실시예 33**

[0760] 아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 Ang-2의 페길화

[0761] **방법 1:**

[0762] Ang-2을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). Ang-2을 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0763] 그 다음 산화된 Ang-2를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이

혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0764] 마지막으로, PEG-Ang-2 콘주게이트를 (예들 들면 Q 세파로오스 FF상) 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0765] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. Ang-2을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). Ang-2을 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0766] 그 다음 산화된 Ang-2을 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0767] 마지막으로, PEG-Ang-2 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0768] **방법 2:**

[0769] Ang-2을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본).

[0770] Ang-2을 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0771] 상기 산화된 Ang-2을 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 Ang-2 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0772] 20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 Ang-2을 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

[0773] 얻은 PEG-Ang-2 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-Ang-2 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0774] 이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0775] **방법 3:**

[0776] Ang-2을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). Ang-2을 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용

액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0777] 마지막으로, PEG-Ang-2 콘주게이트를 Q 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼섬 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0778] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. Ang-2을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). Ang-2을 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0779] 마지막으로 PEG-Ang-2 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주케이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0780] **방법 4:**

[0781] Ang-2을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 Ang-2을 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg Ang-2/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

[0782] PEG-Ang-2 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

[0783] 제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0784] 순차적으로, 유리 Ang-2을 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 제거했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 UF/DF로 농축했다.

[0785] **실시예 34**

[0786] 아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 VEGF의 페길화

[0787] **방법 1:**

[0788] VEGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). VEGF를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0789] 그 다음 산화된 VEGF를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0790] 마지막으로, PEG-VEGF 콘주게이트를 (예들 들면, Q 세파로오스 FF상) 이온교환 크로마토그래피 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에

로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0791] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. VEGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). VEGF를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0792] 그 다음 산화된 VEGF를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0793] 마지막으로, PEG-VEGF 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0794] **방법 2:**

[0795] VEGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본).VEGF를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0796] 상기 산화된 VEGF을 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 VEGF 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0797] 20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 VEGF을 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

[0798] 얻은 PEG-VEGF 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-VEGF 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0799] 이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0800] **방법 3:**

[0801] VEGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). VEGF를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로, 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0802] 마지막으로, PEG-VEGF 콘주게이트를 Q 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼섬 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막

을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0803] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. VEGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). VEGF를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로, 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0804] 마지막으로, PEG-VEGF 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 콘주게이트 분획을 수집하고 그 다음 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0805] **방법 4:**

[0806] VEGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 VEGF를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg VEGF/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로, 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

[0807] PEG-VEGF 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

[0808] 제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0809] **실시예 35**

[0810] <u>아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 EGF의 페길화</u>

[0811] **방법 1:**

[0812] EGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). EGF를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거했다.

[0813] 그 다음 산화된 EGF를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0814] 마지막으로, PEG-EGF 콘주게이트를 (예들 들면, Q 세파로오스 FF상) 이온교환 크로마토그래피 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0815] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. EGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). EGF를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시

켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0816] 그 다음 산화된 EGF를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0817] 마지막으로, PEG-EGF 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0818] **방법 2:**

[0819] EGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). EGF를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0820] 상기 산화된 EGF를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 EGF 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0821] 20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 NGF 함유 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

[0822] 얻은 PEG-EGF 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-EGF 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0823] 이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0824] **방법 3:**

[0825] EGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). EGF를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0826] 마지막으로, PEG-EGF 콘주게이트를 Q-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼섬 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0827] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. EGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). EGF를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아

미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0828] 마지막으로, PEG-EGF 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0829] **방법 4:**

[0830] EGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 EGF를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg EGF/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

[0831] PEG-EGF 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀롤로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

[0832] 제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0833] **실시예 36**

[0834] 아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 NGF의 페길화

[0835] **방법 1:**

[0836] NGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). NGF를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거했다.

[0837] 그 다음 산화된 NGF를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0838] 마지막으로, PEG-NGF 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피 (예들 들면, Q-세파로오스 FF 상)로 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0839] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. NGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). NGF를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거했다.

[0840] 그 다음 산화된 NGF를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼

합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0841] 마지막으로, PEG-NGF 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피 정제했다 (용출물의 콘주게이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0842] **방법 2:**

[0844] *NGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). NGF를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0845] 상기 산화된 NGF를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 NGF 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0846] 20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 NGF 함유 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

[0847] 얻은 PEG-NGF 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-NGF 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0848] 이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0849] **방법 3:**

[0850] NGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). NGF를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0851] 마지막으로, PEG-NGF 콘주게이트를 Q 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼섬 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0852] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. NGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). NGF를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0853] 마지막으로, PEG-NGF 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 그 다음 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0854] **방법 4:**

[0855] NGF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 NGF를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg NGF/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

[0856] PEG-NGF 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

[0857] 제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0858] **실시예 37**

[0859] 아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 HGH의 페길화

[0860] **방법 1:**

[0861] 본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다.

[0862] HGH를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). HGH를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0863] 그 다음 산화된 HGH를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0864] 마지막으로, PEG-HGH 콘주게이트를 (예들 들면, Q 세파로오스 FF상) 이온교환 크로마토그래피 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0865] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다.

[0866] HGH를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). HGH를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0867] 그 다음 산화된 HGH를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0868] 마지막으로, PEG-HGH 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피 정제했다 (용출물의 콘주게이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0869] **방법 2:**

[0870] 본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다.

[0871] HGH를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). HGH를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0872] 상기 산화된 HGH를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 HGH 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0873] 20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 HGH 함유 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

[0874] 얻은 PEG-HGH 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-NGF 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0875] 이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0876] **방법 3:**

[0877] 본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다.

[0878] HGH를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). HGH를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0879] 마지막으로, PEG-HGH 콘주게이트를 Q-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼섬 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0880] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다. HGH를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). HGH를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반

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

[0881] 마지막으로, PEG-HGH 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 그 다음 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0882] **방법 4:**

[0883] 본원에서 기재된 바와 같이, 인간 성장호르몬 (HGH)의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, HGH를 당해분야에 공지된 방법들에 따라 시험관 내에서 글리코실화했다.

[0884] HGH를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 HGH를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg HGH/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

[0885] PEG - HGH 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

[0886] 제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0887] **실시예 38**

[0888] 아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 TNF-알파의 페길화

[0889] **방법 1:**

[0890] TNF-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). TNF-알파를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0891] 그 다음 산화된 TNF-알파를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0892] 마지막으로, PEG-TNF-알파 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피 (예들 들면, Q-세파로오스 FF 상)로 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0893] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. TNF-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). TNF-알파를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0894] 그 다음 산화된 TNF-알파를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서

인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0895] 마지막으로, PEG-TNF-알파 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0896] **방법 2:**

[0897] TNF-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). TNF-알파를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0898] 상기 산화된 TNF-알파를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 TNF-알파 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0899] 20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 TNF 알파를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

[0900] 얻은 PEG-TNF-알파 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-TNF-알파 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0901] 이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0902] **방법 3:**

[0903] TNF-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). TNF-알파를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0904] 마지막으로, PEG-TNF-알파 콘주게이트를 Q-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼섬 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0905] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. TNF-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). TNF-알파를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로, 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0906] 마지막으로, PEG-TNF-알파 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 그 다음 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적

활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0907] **방법 4:**

[0908] TNF-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 TNF-알파를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg TNF-알파/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로, 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

[0909] PEG-TNF-알파 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

[0910] 제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0911] **실시예 39**

[0912] 아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 인슐린의 페길화

[0913] **방법 1:**

[0914] 본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다. 인슐린을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인슐린을 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0915] 그 다음 산화된 인슐린을 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0916] 마지막으로, PEG-인슐린 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피 (예들 들면, Q-세파로오스 FF 상)로 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0917] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다. 인슐린을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인슐린을 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0918] 그 다음 산화된 인슐린을 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이

혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0919] 마지막으로, PEG-인슐린 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0920] **방법 2:**

[0921] 본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다.

[0922] 인슐린을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인슐린을 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0923] 상기 산화된 인슐린을 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 인슐린 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0924] 20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 인슐린 함유 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

[0925] 얻은 PEG - 인슐린 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG - 인슐린 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0926] 이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0927] **방법 3:**

[0928] 본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다.

[0929] 인슐린을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인슐린을 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로, 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0930] 마지막으로, PEG-인슐린 콘주게이트를 Q 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼섬 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0931] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다. 인슐린을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인슐린을 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시

키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0932] 마지막으로, 인슐린-콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 그 다음 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0933] **방법 4:**

[0934] 본원에서 기재된 바와 같이, 인슐린의 아미노산 서열을 먼저 변형시켜 적어도 하나의 글라이코실화 부위에 통합시켰다. 정제 다음에, 인슐린을 시험관 내에서 당해분야에 공지된 방법들에 따라 글리코실화했다.

[0935] 인슐린을 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인슐린의 초기 농도 또는 중량을 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg 인슐린/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

[0936] PEG - 인슐린 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

[0937] 제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0938] **실시예 40**

[0939] 아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 인터페론-알파의 페길화

[0940] **방법 1:**

[0941] 인터페론-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인터페론-알파를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거했다.

[0942] 그 다음 산화된 인터페론-알파를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0943] 마지막으로, PEG-인터페론-알파 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피 (예들 들면, Q-세파로오스 FF 상)로 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0944] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 인터페론-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인터페론-알파를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페

리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거했다.

[0945] 그 다음 산화된 인터페론-알파를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0946] 마지막으로, PEG-인터페론-알파 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 콘주게이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0947] **방법 2:**

[0948] 인터페론-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인터페론-알파를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50 mM Hepes, 350 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0949] 상기 산화된 인터페론-알파를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 인터페론-알파 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0950] 20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 인터페론-알파 함유 용출물에 15 분의 최대 지속 시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

[0951] 얻은 PEG-인터페론-알파 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-인터페론 알파 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0952] 이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0953] **방법 3:**

[0954] 인터페론-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인터페론-알파를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0955] 마지막으로, PEG-인터페론-알파 콘주게이트를 Q-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼섬 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0956] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 인터페론-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인터페론-알파를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서

켄칭했다.

[0957] 마지막으로, PEG-인터페론-알파 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0958] **방법 4:**

[0959] 인터페론-알파를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 인터페론-알파를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg 인터페론 -알파/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로, 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

[0960] PEG-인터페론 -알파 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

[0961] 제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0962] **실시예 41**

[0963] 아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 인터페론-감마의 페길화

[0964] **방법 1:**

[0965] 인터페론-감마를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 10 mg 인터페론-감마를 5 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 100 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 50 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 순차적으로 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[0966] 산화된 인터페론-감마를 함유하는 체류물 (대략 7 ml)을 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0967] 마지막으로, PEG-인터페론-감마 콘주게이트를 SP 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 6.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep SPFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B로 용출했다 (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6.5). 유리 인터페론-감마를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주게이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 6.9)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PEG-인터페론-감마 콘주게이트에 대해 천연 인터페론 감마와 비교된 > 50 %의 비활성을 측정했다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 인터페론-감마를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

[0968] **방법 2:**

[0969] 인터페론-감마를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 인터페론-감마를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5 N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0970] 상기 산화된 인터페론-감마를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 용출물의 산화된 인터페론-감마 함유 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0971] 20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 인터페론-감마를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

[0972] 얻은 PEG-인터페론-감마 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-인터페론-감마 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀룰로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0973] 이 절차의 사용으로 제조한 콘주게이트를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0974] **방법 3:**

[0975] 인터페론-감마를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 10 mg 인터페론-감마를 ~8 ml 히스티딘 - 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 200 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM) 및 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 첨가했다. 순차적으로 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 100 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0976] 마지막으로 PEG-인터페론-감마 콘주게이트를 SP-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 6.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep SP FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B로 용출했다 (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6.5). 유리 인터페론-감마를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주게이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 6.9)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PEG-인터페론-감마 콘주게이트에 대해 천연 인터페론-감마와 비교된 > 50 %의 비활성을 측정했다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 인터페론-감마를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

[0977] **방법 4:**

[0978] 인터페론-감마를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 인터페론-감마를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg 인터페론-감마/ml의 최종 단백질 농도를 얻었더. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최

종 농도를 얻었다.

[0979] PEG-인터페론-감마 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀롤로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

[0980] 제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0981] **실시예 42**

[0982] 아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 G-CSF의 페길화

[0983] **방법 1:**

[0984] G-CSF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). G-CSF를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거했다.

[0985] 그 다음 산화된 G-CSF를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0986] 마지막으로, PEG-G-CSF 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피 (예들 들면, Q-세파로오스 FF 상)로 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0987] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. G-CSF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). G-CSF를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거했다.

[0988] 그 다음 산화된 G-CSF를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[0989] 마지막으로, PEG-G-CSF 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피 정제했다 (용출물의 콘주게이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0990] **방법 2:**

[0991] G-CSF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). G-CSF를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[0992] 상기 산화된 G-CSF를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 용출물의 상기 산화된 G-CSF 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[0993] 20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 50-배 몰 과잉으로 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 정제된 산화된 G-CSF을 함유하는 용출물에 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

[0994] 얻은 PEG-G-CSF 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-G-CSF 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[0995] **방법 3:**

[0996] G-CSF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). G-CSF를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로, 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0997] 마지막으로, PEG-G-CSF 콘주게이트를 Q-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼섬 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[0998] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. G-CSF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). G-CSF를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로, 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[0999] 마지막으로, PEG-G-CSF 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[1000] **방법 4:**

[1001] G-CSF를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 G-CSF를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg G-CSF/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로, 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

[1002] G-CSF 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀롤로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

[1003] 제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[1004] **실시예 43**

[1005] 아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 휴미라의 페길화

[1006] **방법 1:**

[1007] 휴미라를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 휴미라를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거했다.

[1008] 그 다음, 산화된 휴미라를 함유하는 보전물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[1009] 마지막으로, PEG-휴미라 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피 (예들 들면, Q-세파로오스 FF 상)로 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[1010] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 휴미라를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 휴미라를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거했다.

[1011] 그 다음, 산화된 휴미라를 함유하는 보전물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[1012] 마지막으로, PEG-휴미라 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 수집하고 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[1013] **방법 2:**

[1014] 휴미라를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 휴미라를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[1015] 상기 산화된 휴미라를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 산화된 휴미라 함유 용출물의 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[1016] 20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 50-배 몰 과잉으로 정제된 산화된 휴미라를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

[1017] 얻은 PEG-휴미라 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-휴미라 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여

과 (UF/DF)로 농축했다.

[1018] **방법 3:**

[1019] 휴미라를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 휴미라를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로, 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[1020] 마지막으로, PEG-휴미라 콘주게이트를 Q-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼섬 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[1021] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다. 휴미라를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 휴미라를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[1022] 마지막으로, PEG-휴미라 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[1023] **방법 4:**

[1024] 휴미라를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 HJumira를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg 휴미라/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

[1025] The 휴미라 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀롤로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

[1026] 제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[1027] **실시예 44**

[1028] 아미노옥시-PEG 시약 및 친핵성 촉매로서 m-톨루이딘을 사용하는 프롤리아의 페길화

[1029] **방법 1:**

[1030] 프롤리아를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 프롤리아를 7.0 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl2)에서 용해시켰다. 그 다음 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 7.5 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 순차적으로 Vivaspin 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄처 및 그의 부산물을 제거했다.

[1031] 그 다음 산화된 프롤리아를 함유하는 체류물을 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[1032] 마지막으로, PEG-프롤리아 콘주게이트를 이온교환 크로마토그래피 (예들 들면, Q-세파로오스 FF 상)로 정제했다. 예를 들면, 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 평형을 이룬 칼럼 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 적절한 MW 분획 막을 사용하는 UF/DF을 수행했다. 그 다음 제제를 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Coomassie, Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[1033] 대안적인 구현예에서, 방법 1을 하기와 같이 수행했다. 프롤리아를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 10 mg rFIX을 5 ml 히스티딘 - 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 100 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM)을 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 암흑에서 4 ℃에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 50 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다. 혼합물에 대해 Vivaspin 15R 10 kD 원심 여과기를 이용하는 UF/DF를 순차적으로 수행하여 과잉 페리오데이트, 켄쳐 및 그의 부산물을 제거했다.

[1034] 산화된 프롤리아를 함유하는 체류물 (대략 7 ml)을 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이트했다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 이 혼합물을 2.5 시간 동안 실온에서 암흑에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트했다.

[1035] 마지막으로 PEG-프롤리아 콘주게이트를 SP 세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 6.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep SP FF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B로 용출했다 (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6.5). 유리 프롤리아를 칼럼을 25 % 완충액 B로 그리고 콘주게이트를 50 % 완충액 B로 칼럼을 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀롤로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 6.9)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PEG-프롤리아 콘주게이트에 대해 천연 프롤리아와 비교한 > 50 %의 비활성이 측정된다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 프롤리아를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

[1036] **방법 2:**

[1037] 프롤리아를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 프롤리아를 이동시키거나 반응 완충액 (예들 들면 50mM Hepes, 350mM 나트륨 클로라이드, 5mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 1.0 +/- 0.25 mg/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 그 다음 용액의 pH를 6.0으로 0.5N 수성 HCl 용액의 적가로 보정했다. 순차적으로, 40 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 10 분 내에 첨가하여 200 μM의 농도를 얻었다. 산화 반응을 30 +/- 5 분 동안 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 수행했다. 그 다음 반응을 수성 L-시스테인 용액 (1 M)을 15 분 내에 T= +22 +/- 2 ℃에서 첨가하여 멈추어서 반응 혼합물 중 10 mM의 최종 농도를 얻고 60 +/- 5 분 동안 인큐베이션했다.

[1038] 상기 산화된 프롤리아를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. 상기 산화된 휴미라 함유 용출물의 분획을 수집하고 콘주게이션 반응을 위해 사용한다.

[1039] 20 kD의 MW 시약을 갖는 아미노옥시-PEG 시약을 정제된 산화된 프롤리아를 함유하는 용출물에 15 분의 최대 지속시간 (t) 내에 완만한 교반 하에서 50-배 몰 과잉으로 첨가했다. 그 다음 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 15 분 내에 첨가하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다. 반응 혼합물을 120 +/- 10 분 동안 암흑에서 T= +22 +/- 2 ℃의 온도 (T)에서 완만한 진탕 하에서 인큐베이트했다.

[1040] 얻은 PEG-프롤리아 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피로 추가 정제했다. PEG-프롤리아 콘주게이트 함유 분획들을 수집하고 적절한 분획 분자량을 갖는 재생된 셀롤로오스로 만들어진 막 (밀리포어)를 사용하는 한외-/정용여과 (UF/DF)로 농축했다.

[1041] **방법 3:**

[1042] 프롤리아를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). EPO를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시키고 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (10 mM), 및 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)와 혼합했다. 순차적으로 아미노옥시 시약을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 8 μl의 수성 시스테인 용액 (1 M)의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[1043] 마지막으로, PEG-프롤리아 콘주게이트를 Q-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 1.5 mg 단백질/ml 겔을 5 mM CaCl2를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 미리 평형을 이룬 칼섬 상에 로딩했다. 콘주게이트를 5 mM CaCl2 및 500 mM 나트륨 클로라이드를 함유하는 50 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)로 용출하고, 그 다음 막을 사용하는 UF/DF를 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

[1044] 대안적인 구현예에서, 방법 3을 하기와 같이 수행했다.

[1045] 프롤리아를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 10 mg 프롤리아를 ~8 ml 히스티딘 완충액(pH 6.0) (20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl)에서 용해시켰다. 그 다음 200 μl의 수성 나트륨 페리오데이트 용액 (5 mM) 및 2 ml의 수성 m-톨루이딘 용액 (50 mM)을 첨가했다. 순차적으로, 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 5-배 몰 시약 과잉을 얻었다. 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 100 μl의 1 M 수성 시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭했다.

[1046] 마지막으로 PEG-프롤리아 콘주게이트를 SP-세파로오스 FF상 이온교환 크로마토그래피로 정제했다. 반응 혼합물을 20 ml 완충액 A (50 mM Hepes, pH 6.5)으로 희석하고 완충액 A로 평형을 이룬 20 ml HiPrep SPFF 16/10 칼럼 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 상에 로딩했다. 그 다음 칼럼을 완충액 B로 용출했다 (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6.5). 유리 프롤리아를 칼럼을 25% 완충액 B로 그리고 콘주게이트를 50% 완충액 B에서 세정하여 용출했다. 콘주게이트 함유 분획들을, 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 150 mM NaCl를 함유하는 히스티딘 완충액 (pH 6.9)에 대항하여 수행했다. 제제를, 당해분야에 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다. PEG-프롤리아 콘주게이트에 대해 천연 프롤리아와 비교한 > 50 %의 비활성이 측정된다. 콘주게이트를 앞서 기재된 조건 하에서 Shodex KW 803 칼럼이 구비된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하는 크기 배제 HPLC로 추가로 분석적으로 특성화했다 (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). 이 제제는 유리 프롤리아를 함유하지 않는다는 것을 보여준다.

[1047] **방법 4:**

[1048] 프롤리아를 아미노옥시 그룹을 함유하는 선형 20 kD 페길화 시약의 사용으로 페길화했다. 이러한 유형의 시약의 예는 NOF로부터의 Sunbright® CA 시리즈이다 (NOF Corp, 도쿄, 일본). 초기 농도 또는 중량의 HJumira를 이동시키거나 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 150 mM 나트륨 클로라이드, 5 mM 염화칼슘, pH 6.0)에서 용해시켜서 2 mg 프롤리아/ml의 최종 단백질 농도를 얻었다. 순차적으로 5 mM 수성 나트륨 페리오데이트 용액을 15 분 내에 첨가하여 100 μM의 최종 농도를 얻고, 그 다음 50 mM 수성 m-톨루이딘 용액의 첨가로 10 mM의 최종 농도를 30 분의 지속시간 내에 얻었다. 그 다음 20 kD의 MW를 갖는 아미노옥시-PEG 시약 (상기에 기재됨)을 첨가하여 20-배 몰 시약 과잉을 얻었다. pH를 6.0으로 보정한 후 혼합물을 2시간 동안 암흑에서 실온에서 완만한 교반 하에서 인큐베이트하고 1 M 수성 L-시스테인 용액의 첨가로 15분 동안 실온에서 켄칭하여 10 mM의 최종 농도를 얻었다.

[1049] 프롤리아 콘주게이트를 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)로 정제했다. 용출물의 콘주게이트 함유 분획을 재생된 셀룰로오스로 만들어진 10 kD 막 (88 cm2, 분획 10 kD/밀리포어)을 사용하여 UF/DF로 농축했다. 최종 정용여과 단계를 Hepes 완충액 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl2, pH 7.5)에 대항하여 수행했다.

[1050] 제제를, 공지된 방법들에 따른 총 단백질 (Bradford 및 BCA 절차) 및 생물학적 활성을 측정하여 분석적으로 특성화했다.

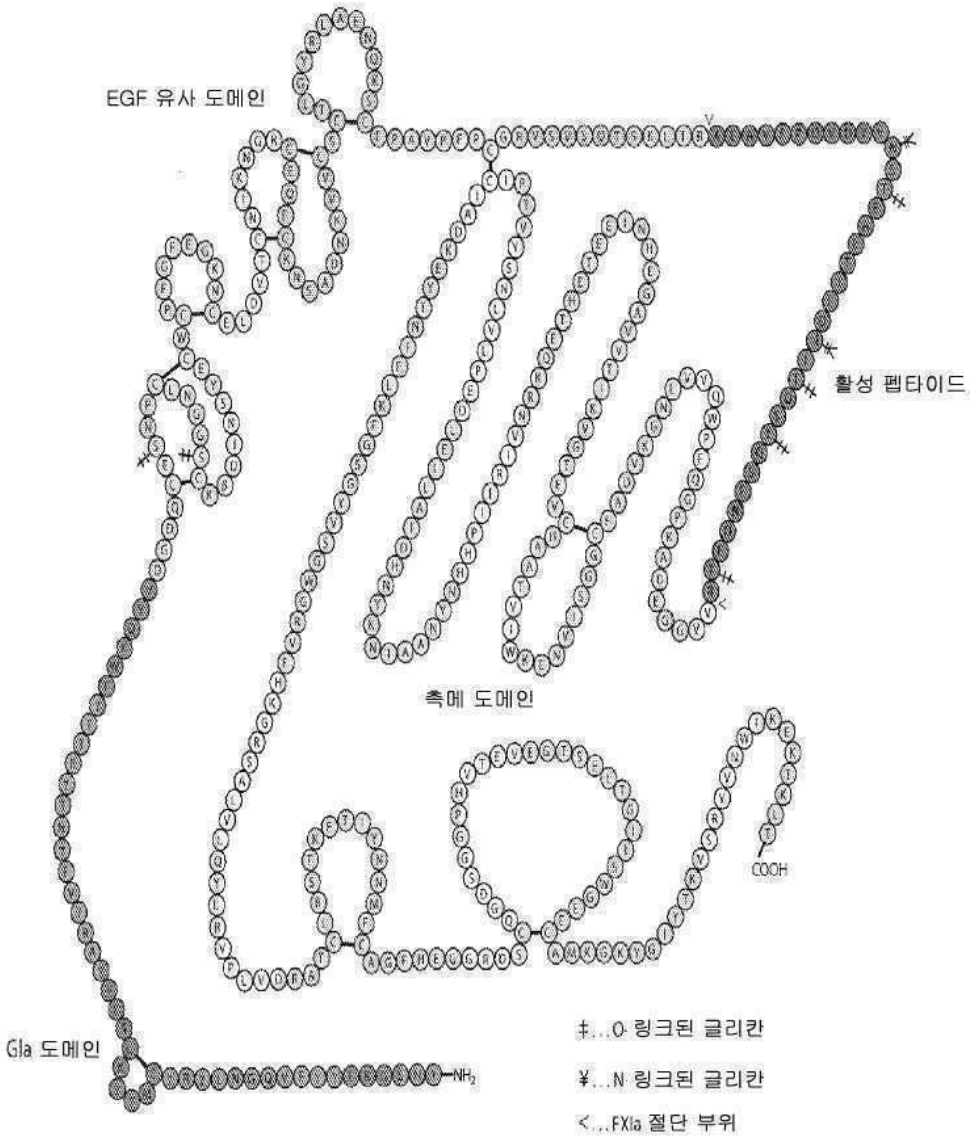
[1051] **실시예 45**

[1052] 분지형 PEG를 사용하는 치료 단백질의 페길화

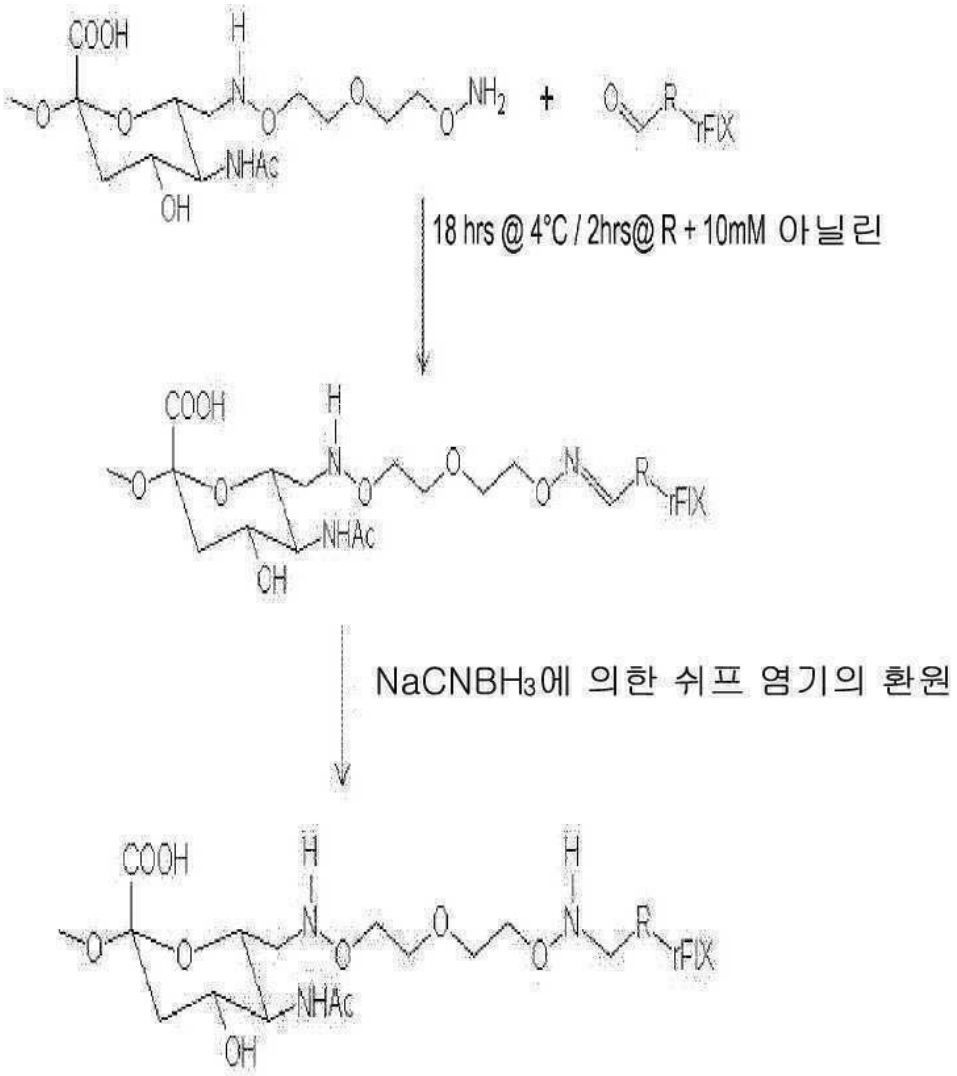
[1053] 본 발명의 치료 단백질이 페길화는 분지형 또는 선형 페길화 시약으로 연장될 수 있고, 이 시약은, 알데하이드 및 활성 아미노옥시 그룹 함유 적당한 링커로 만들어 진다.

도면

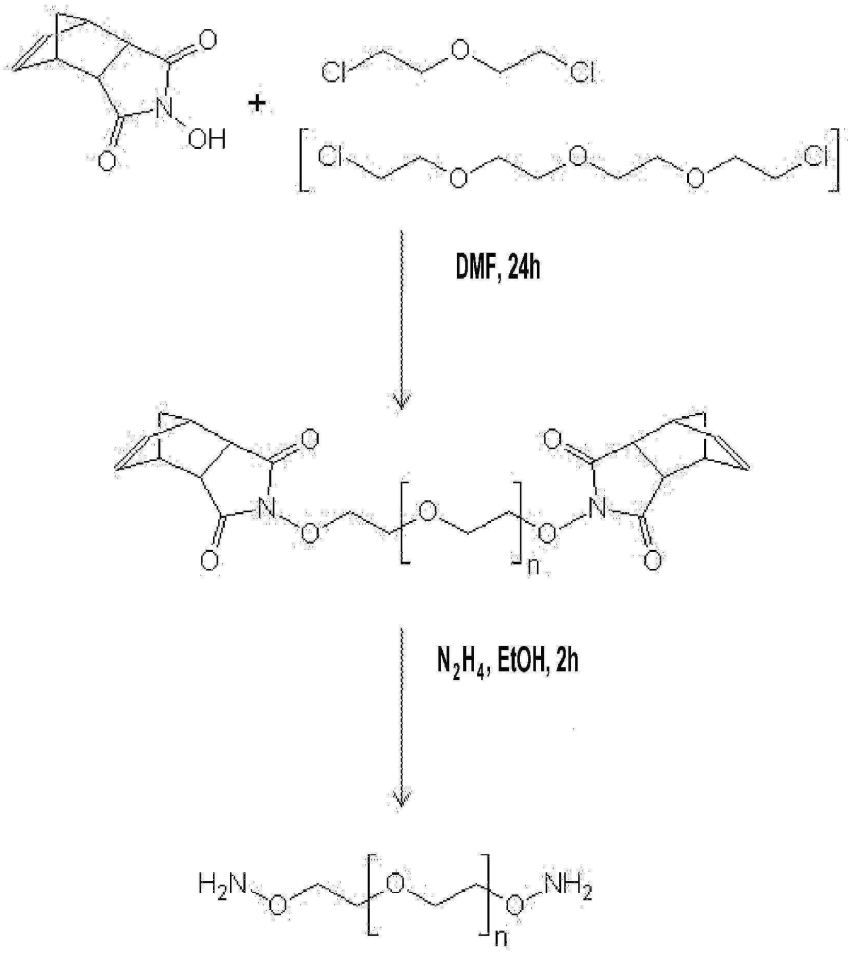
도면1



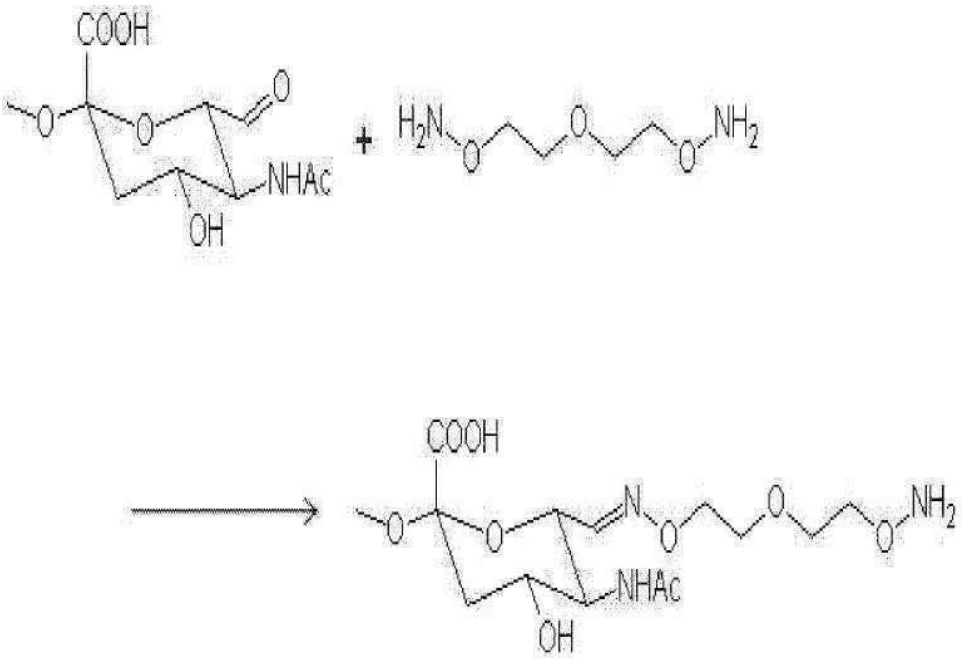
도면2


COOH
H
N
O
NH2
+
O
R
rFIX
NHAc
OH
18 hrs @ 4°C / 2hrs@ R + 10mM 아닐린
COOH
H
N
O
N
R
rFIX
NHAc
CH
NaCNBH3에 의한 쉬프 염기의 환원
COOH
H
N
H
N
R
rFIX
NHAc
OH

도면3

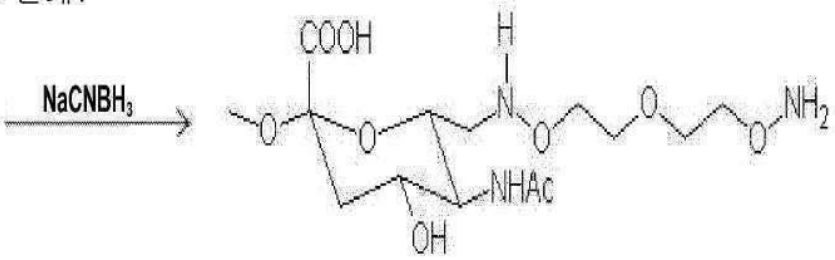


도면4

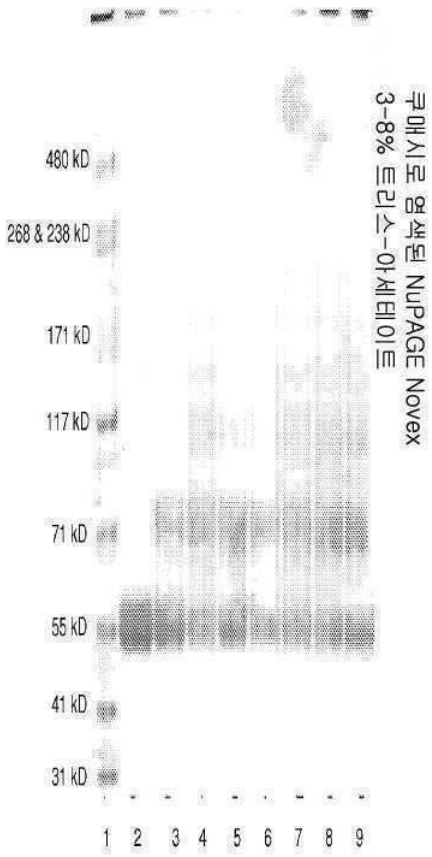


쉬프 염기를 안정화시키는

환원 단계:



도면5a



레인 1: HiMark MW 표준

레인 2: rFIX 표준

레인 3: rFIX + 100μM $NaIO_4$, 0mM 촉매, 5X PSA

레인 4: rFIX + 100μM $NaIO_4$, 2.5mM 아닐린, 5X PSA

레인 5: rFIX + 100μM $NaIO_4$, 5mM 아닐린, 5X PSA

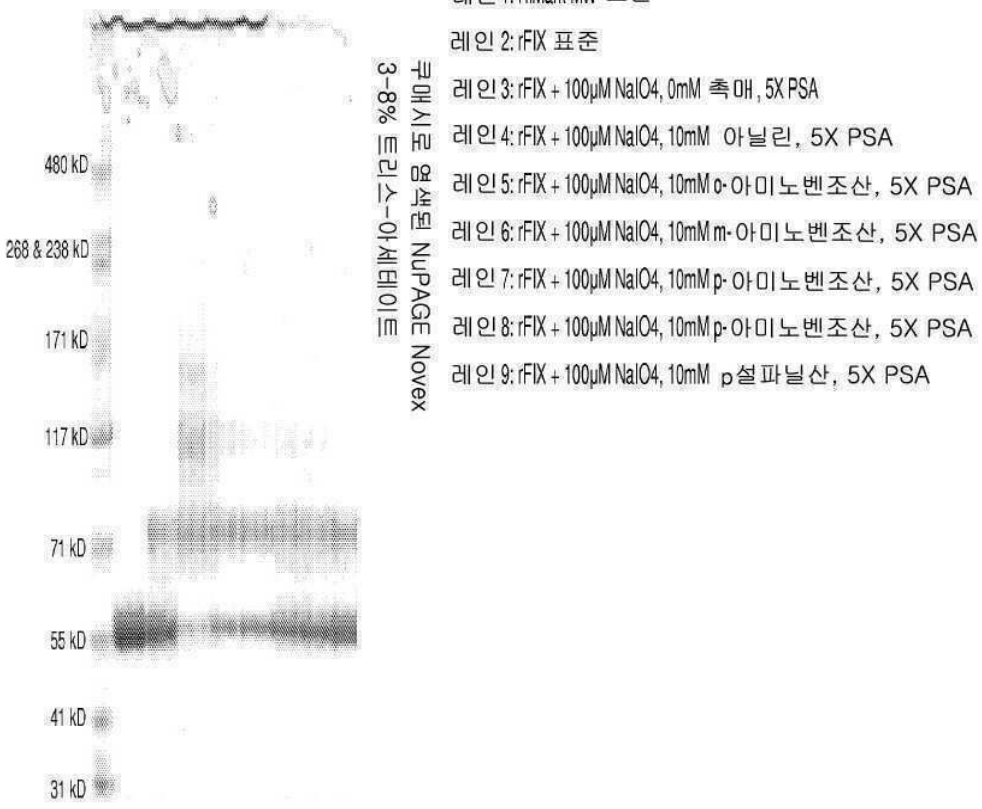
레인 6: rFIX + 100μM $NaIO_4$, 10mM 아닐린, 5X PSA

레인 7: rFIX + 100μM $NaIO_4$, 2.5mM m-톨루이딘, 5X PSA

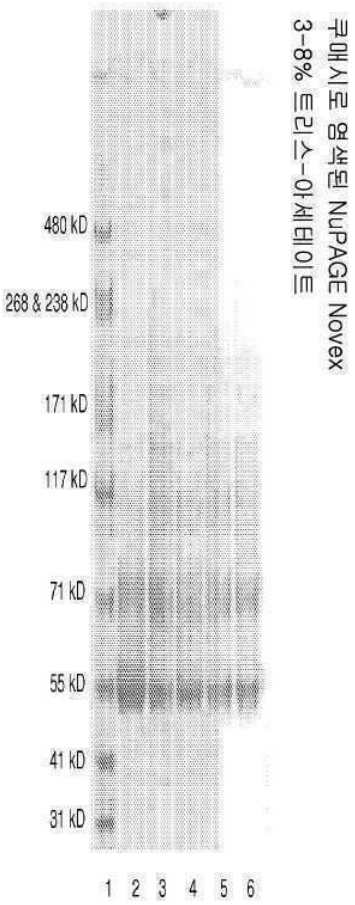
레인 8: rFIX + 100μM $NaIO_4$, 5mM m-톨루이딘, 5X PSA

레인 9: rFIX + 100μM $NaIO_4$, 10mM m-톨루이딘, 5X PSA

도면5b


480 kD
268 & 238 kD
171 kD
117 kD
71 kD
55 kD
41 kD
31 kD
쿠매시로 염색된 NuPAGE Novex 3-8% 트리스-아세테이트
레인 1: HiMark MW 표준
레인 2: rFIX 표준
레인 3: rFIX + 100μM NaIO4, 0mM 촉매, 5X PSA
레인 4: rFIX + 100μM NaIO4, 10mM 아닐린, 5X PSA
레인 5: rFIX + 100μM NaIO4, 10mM o-아미노벤조산, 5X PSA
레인 6: rFIX + 100μM NaIO4, 10mM m-아미노벤조산, 5X PSA
레인 7: rFIX + 100μM NaIO4, 10mM p-아미노벤조산, 5X PSA
레인 8: rFIX + 100μM NaIO4, 10mM p-아미노벤조산, 5X PSA
레인 9: rFIX + 100μM NaIO4, 10mM p설파닐산, 5X PSA

도면5c



레인 1: HiMark MW 표준

레인 2: rFIX + 100μM NaIO4, 0mM 촉매, 5X PSA

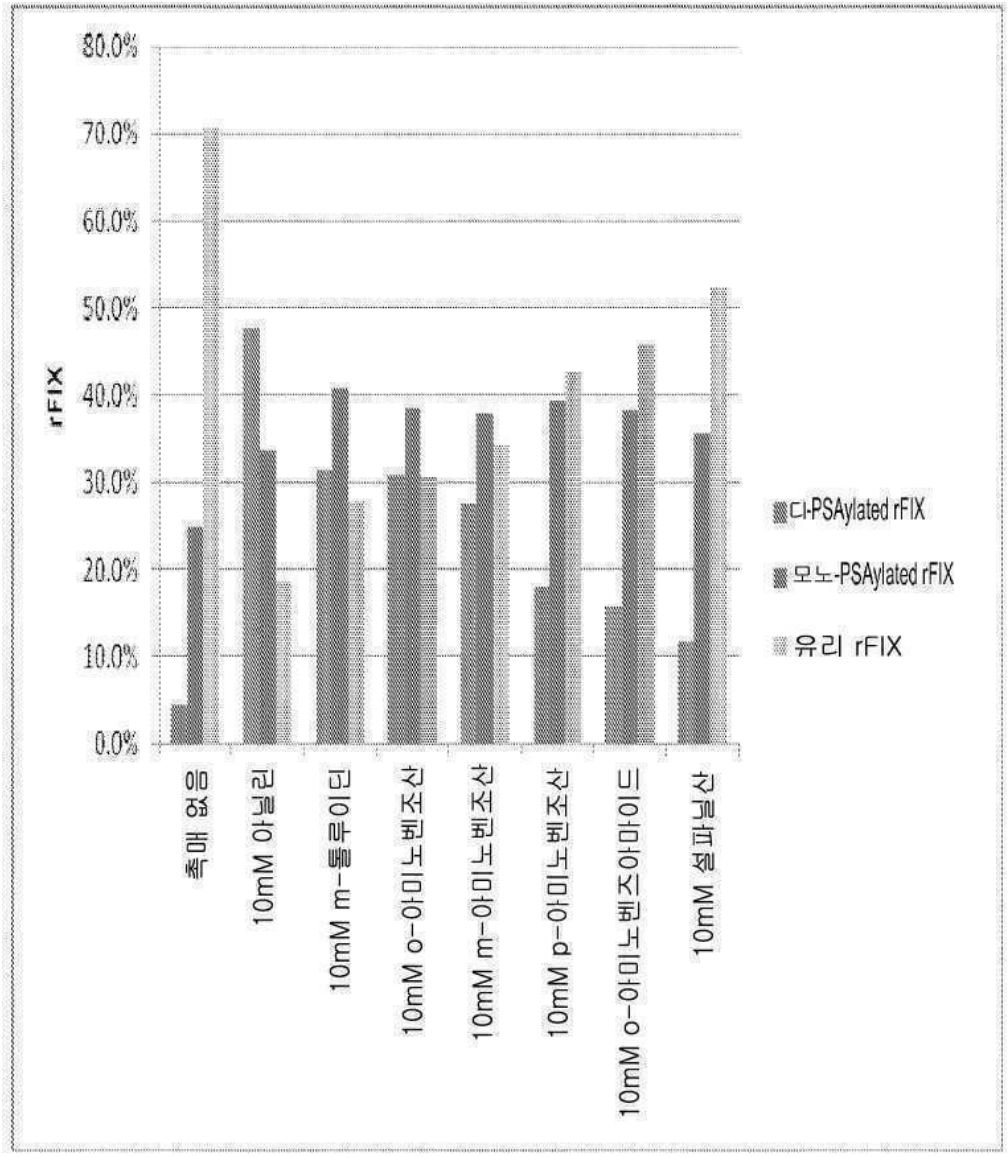
레인 3: rFIX + 100μM NaIO4, 10mM 아닐린, 5X PSA

레인 4: rFIX + 100μM NaIO4, 10mM o-아니시딘, 5X PSA

레인 5: rFIX + 100μM NaIO4, 10mM m-아니시딘, 5X PSA

레인 6: rFIX + 100μM NaIO4, 10mM m-톨루이딘, 5X PSA

도면6



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Siekmann, et al.

<120> Nucleophilic Catalysts for Oxime Linkage

<130> 31315/46394

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 422

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val
1 5 10 15
Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu
20 25 30
Glu Pro Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu Lys Thr Thr Glu Phe Trp

35 40 45
Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn
50 55 60
Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro
65 70 75 80
Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile
85 90 95
Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys

100 105 110
Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys
115 120 125
Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser
130 135 140
Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp
145 150 155 160
Tyr Val Asn Pro Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln

165 170 175
Gly Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp
180 185 190
Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val
195 200 205
Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr
210 215 220
Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly

225 230 235 240
Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val

245 250 255

Ile Arg Ala Ile Ile Pro His His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys

260 265 270

Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu

275 280 285

Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn

290 295 300

Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Ala Arg Val

305 310 315 320

Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro

325 330 335

Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr

340 345 350

Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys

355 360 365

Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser

370 375 380

Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly

385 390 395 400

Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys

405 410 415

Glu Lys Thr Lys Leu Thr

420