



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102812039 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201180009866. 3

C07K 14/755(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 02. 09

审查员 李翠莹

(30) 优先权数据

10153716. 5 2010. 02. 16 EP

61/305723 2010. 02. 18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 08. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/051889 2011. 02. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/101277 EN 2011. 08. 25

(73) 专利权人 诺沃—诺迪斯克有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 J. 布查特 C. 贝伦斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 孔青 林森

(51) Int. Cl.

C07K 14/745(2006. 01)

权利要求书1页 说明书35页
序列表25页

(54) 发明名称

缀合蛋白质

(57) 摘要

本发明涉及经修饰的治疗性蛋白质,例如凝血因子。特别地,本发明涉及包含疏水侧基的缀合因子 VIII 分子,例如 FVII、FVIII 或 FIX。

1. 一种FVIII分子,其中所述FVIII分子与至少一个疏水侧基共价缀合,其中所述疏水侧基通过唾液酸与所述FVIII分子连接;以及其中所述疏水侧基与O-聚糖通过唾液酸共价缀合,其中所述O-聚糖位于截短的B结构域中,且其中因子VIII活化导致所述疏水侧基脱去,其中所述疏水侧基选自以下一种或多种:脂肪酸和脂肪二酸,脂肪酸是指具有4-28个碳原子的脂族一元羧酸,脂肪二酸是指如前脂肪酸的定义的但在 ω 位置具有额外羧酸基团的脂肪酸。

2. 权利要求1的FVIII分子,其中所述FVIII分子的vWF结合能力降低。

3. 权利要求1-2中任一项的FVIII分子,其中所述FVIII分子还与至少一种亲水聚合物缀合。

4. 一种制备权利要求1-3中任一项的FVIII分子的方法,其中所述方法包括通过唾液酸转移酶催化的反应使疏水侧基与FVIII分子连接。

5. 权利要求1-3中任一项的FVIII分子在制备用于治疗A型血友病的药物中的用途。

6. 权利要求1-3中任一项的FVIII分子在制备用于治疗血友病的药物中的用途。

7. 一种药物组合物,其包含权利要求1-3中任一项的FVIII分子。

缀合蛋白质

发明领域

[0001] 本发明涉及修饰的蛋白质。特别地,本发明涉及与疏水侧基缀合的蛋白质例如凝血因子。此外,本发明涉及这类分子的用途以及用于产生这类分子的方法。

[0002] 发明背景

[0003] A 型血友病是一种遗传性出血病症,由凝血因子 VIII (FVIII) 活性缺乏或功能障碍引起。临床表现不在于初期止血—血凝块形成正常发生—而在于因缺乏相继的凝血酶形成导致血块不稳定。通过静脉内注射从血液分离或重组产生的凝血因子 FVIII 来治疗该疾病。具有抑制物的 A 型血友病患者可通过按需给予因子 VIIa (FVIIa) 来治疗。B 型血友病由凝血因子 IX (FIX) 活性缺乏或功能障碍引起,可通过按需给予因子 IX (FIX) 治疗患者。

[0004] 现行治疗建议从传统的按需治疗转向预防。与冯维勒布兰德因子 (von Willebrandt factor) 结合的内源性 FVIII 的循环半衰期为 12-14 小时,因此一周进行几次预防性治疗,从而使患者获得实际上无症状的生活。内源性因子 VII 的循环半衰期小于 2 小时。内源性因子 IX 的循环半衰期为 19-24 小时。对于许多人,尤其儿童和未成年人,静脉内给药与明显的不方便和 / 或疼痛有关。因此本领域需要延长重组凝血因子的循环半衰期。同样地,本领域需要以部位定向方式延长多种其它治疗性蛋白质和肽的半衰期,优选产生相对均质和定义明确的产物。

[0005] 已将多种方法应用于开发总体上循环半衰期显著延长的凝血因子和药用蛋白质。许多这类方法涉及与亲水聚合物例如 PEG (聚乙二醇) 缀合。一方面,由于这类基团可在体内完全降解的事实,与疏水侧链缀合的确是有吸引力的方法。另一方面,蛋白质与一个或多个定义明确的疏水部分缀合至今都未成为用于延长相对大的蛋白质 (包括凝血因子例如 FVIII) 的半衰期的有吸引力方法。实际上,这种疏水部分与蛋白质缀合不应视为实际可行的方法,这是因为:1) 大的蛋白质例如 FVIII 只在缺乏有机溶剂的水性缓冲液中稳定;2) 亲脂性部分 (例如脂肪酸) 在这种水性缓冲液中不溶解;3) 难以确定相对小的亲脂性部分的连接可引起大得多的蛋白质 (例如 FVIII) 半衰期的任何显著延长;4) 亲脂性部分当与通常是蛋白质亲水表面连接时,由于聚集或在能量上是有利的但是破坏性的解折叠所致,可能干扰其稳定性;和 5) 可以以导致生物活性降低的类似方式,干扰蛋白质与其天然结合配偶体的相互作用。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明涉及重组蛋白质分子,例如抗体的抗原结合片段、FVII、FVIII 和 FIX,其中所述蛋白质分子通过唾液酸与至少一个疏水侧基共价缀合。本发明此外还涉及用于制备这类缀合物的方法以及这类缀合物的用途。

[0008] 这类缀合物具有改进的循环半衰期并且的确优选具有相对均质的结构。此外,缀合物保持生物活性,并优选在不使用任何有机溶剂的情况下产生。然而,可采用这样的制备这类分子的方法:其中所述方法包括使用痕量有机溶剂。

[0009] 发明描述

[0010] 定义:

[0011] 蛋白质

[0012] 本发明范围内的蛋白质和肽优选为适于治疗性治疗的蛋白质 / 肽。这类蛋白质包括但不限于血清蛋白质例如血液凝固凝血因子、血红蛋白、免疫球蛋白、抗体、抗体的抗原结合片段（例如 Fab 片段）、细胞因子（例如白介素、 α 干扰素、 β 干扰素和 γ 干扰素）、TNF 受体家族的成员（例如 DR3、TNF1R、TNF2R、CD27 和 CD30）、集落刺激因子（包括粒细胞集落刺激因子）、血小板衍生生长因子和磷脂酶活化蛋白（PUP）。其它蛋白质包括胰岛素、GLP-1、GLP-2、植物蛋白质（例如凝集素和蓖麻毒蛋白）、肿瘤坏死因子和相关等位基因、肿瘤坏死因子受体的可溶形式、白介素受体和白介素受体的可溶形式、人生长激素、生长因子（例如组织生长因子，例如 TGF α 或 TGF β 和表皮生长因子）、激素、生长调节素、红细胞生成素、色素激素、下丘脑释放因子、抗利尿激素、催乳素、绒毛膜促性腺激素、促卵泡激素、促甲状腺激素、组织纤溶酶原激活物等。目标免疫球蛋白包括 IgG、IgE、IgM、IgA、IgD 及其片段。

[0013] 本发明的蛋白质可在结构上类似于天然蛋白质，可通过以下方式衍生自天然蛋白质：将一个或多个氨基酸加入天然蛋白质的 C 端和 N 端任一端或两端、在天然氨基酸序列的一个或多个不同位点处取代一个或多个氨基酸、在天然蛋白质的任一端或两端或者在氨基酸序列中的一个或几个位点处缺失一个或多个氨基酸、或者在天然氨基酸序列的一个或多个位点处插入一个或多个氨基酸。

[0014] 本文所用术语“抗体”、“单克隆抗体”和“mAb”，意欲指具有与抗原特异性结合的能力的免疫球蛋白分子及其片段。全长抗体包含 4 条多肽链，2 条重（H）链和 2 条轻（L）链通过二硫键互相连接。每条重链由重链可变区（本文简写为 HCVR 或 VH）和重链恒定区组成。重链恒定区由 3 个结构域 CH1、CH2 和 CH3 组成。每条轻链由轻链可变区（本文简写为 LCVR 或 VL）和轻链恒定区组成。轻链恒定区由 1 个结构域 CL 组成。还可将 VH 和 VL 区进一步细分为超变区，称为互补决定区（CDR），其散布有更保守的称为构架区（FR）的区域。每条 VH 和 VL 由 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成，按下列顺序从氨基端至羧基端排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。全长抗体通常是双价或二价的，即它具有用两个“臂”与抗原结合的能力。相比之下，本发明的单价抗体只包含一个对抗原有特异性的结合部位。

[0015] “Fab 区”/“Fab 结构域”/“Fab 片段”含有限定抗体可结合的具体靶标的可变区段（variable section）。Fab 片段是本发明的单特异性 / 单价抗体的实例。与未经翻译后修饰的 Fab 片段相比，本发明的缀合 Fab 片段的循环半衰期通常显著延长。因此，抗体的 Fab 片段和其它抗原结合片段特别可用于调节免疫系统，从而治疗例如癌症和免疫相关病症，例如自身炎症性疾病（包括银屑病、I 型糖尿病、格雷夫斯病（Grave's disease）、炎性肠病（IBD）、克罗恩病（Crohn's disease）、溃疡性结肠炎、肠易激综合征、多发性硬化、类风湿性关节炎（RA）、自身免疫性心肌炎、川崎病（Kawasaki disease）、冠状动脉疾病、慢性阻塞性肺病、间质性肺病、自身免疫性甲状腺炎、系统性红斑狼疮（SLE）、硬皮病、全身性硬皮病、银屑病关节炎、骨关节炎、特应性皮炎、白斑、移植物抗宿主病、斯耶格伦综合征（Sjögren's syndrome）、自身免疫性肾炎、肺出血 - 肾炎综合征（Goodpasture's syndrome）、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、变态反应、哮喘和其它自身免疫病）。

[0016] 本发明的单价抗体的实例包括：Fab 片段；由 VL、VH、CL 和 CH I 结构域组成的单价片段；包含在铰链区例如通过二硫键连接的 2 个 Fab 片段的二价片段，其中这些 Fab 片段中只有一个对其抗原有特异性；(iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；(iv) 由抗体单臂

的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段, (v) dAb 片段 (Ward 等 (1989) Nature 341:544-546), 其由 VH 结构域组成; (vi) 分离的互补决定区 (CDR); 和 (v) 对其抗原是单价的双特异性抗体。

[0017] 凝血因子: 凝血因子参与继发性血块 (secondary clot) 的形成。凝血因子包括下列因子: vWF、因子 I、因子 II (凝血酶原)、因子 V、因子 VII、因子 VIII、因子 IX、因子 X、因子 XI、因子 XII 和因子 XIII。本发明的凝血因子变体具有凝血因子活性, 即分子活性为天然凝血因子活性的至少 25%, 优选为天然凝血因子活性的至少 50%、更优选至少 75%、最优选至少 90%。

[0018] 因子 VII (FVII) 是主要在肝脏中产生的糖蛋白。成熟蛋白质包括 406 个氨基酸残基, 并且由通过同源性限定的 4 个结构域组成。有一个 N 端 Gla 结构域, 接着是 2 个表皮生长因子 (EGF) 样结构域和 C 端丝氨酸蛋白酶结构域。FVII 作为单链分子在血浆中循环。在活化 FVII (FVIIa) 激活时, 该分子在残基 Arg152 和 Ile153 之间被切割, 产生通过二硫键结合在一起的二链蛋白质。轻链含有 Gla 和 EGF 样结构域, 而重链是蛋白酶结构域。FVIIa 需要与其细胞表面辅因子组织因子结合才具有生物活性。

[0019] 因子 VII(a) 可以是血浆来源的或采用众所周知的生产和纯化方法重组产生的。糖基化、 γ -羧化和其它翻译后修饰的程度和位置可随所选择的宿主细胞及其生长条件而变化。术语“因子 VII 多肽”可指酶原以及因子 VII 的活化形式。术语“因子 VII(a) 多肽”在本文是指野生型因子 VIIa 分子以及 FVII(a) 变体、FVII(a) 衍生物和 FVII(a) 缀合物。与野生型人因子 VIIa 相比, 这类变体、衍生物和缀合物可具有基本相同的或改进的生物活性。

[0020] 本发明的“FVII/FVII 变体”包含具有 SEQ ID NO:1 序列的因子 FVII, 其中母蛋白质 (parent protein) 的一个或多个氨基酸被另一个氨基酸取代和 / 或其中母蛋白质的一个或多个氨基酸缺失和 / 或其中一个或多个氨基酸插入蛋白质中和 / 或其中一个或多个氨基酸添加到母蛋白质中。此外, FVII 变体包含具有与野生型因子 VIIa 相比基本相同或改进生物活性的 FVII 多肽, 其中母肽的一个或多个氨基酸经遗传修饰和 / 或化学修饰和 / 或酶修饰, 例如通过烷基化、糖基化、聚乙二醇化、酰化、酯形成、二硫键形成或酰胺形成。

[0021] SEQ ID NO. 1: 野生型人凝血因子 VII

[0022]

```
ANAFlyyLRPGSLyRyCKyyQCSFyyARyIFKDAyRTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKD  
QLQSYICFCLPAFEGRNCEETHKDDQLICVNENGGCEQYCSOHTGTRSCRCHEGYSLAD  
GVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRVGGKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGGTINT  
IWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRL  
HQPVVLT DHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLD RGATALELMVLNVPRLMTQD  
CLQQSRKVGDSPNITEYMFCA GYS DGS KDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGC  
ATVGHF G VYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP
```

[0023] γ : 表示 γ -羧化 Glu (‘E’) 残基。

[0024] 可如下测定 FVIIa 缀合物活性:

[0025] 凝血酶原和 FX 用抑制剂的混合物处理, 以中和痕量的活性酶。将 FX (135 nM 终浓度)、凝血酶原 (1.2 μ M)、TF 途径抑制剂 (0.1 μ g/ml) 和抗凝血酶 (AT, 2.5 μ M) 与 CaCl_2

(3 mM) 一起混合,并在 4℃下保存过夜。将健康志愿者的外周血抽到柠檬酸盐中。按照 M. Kjalke *Thromb. Haemostasis* 78,1202-1208,1997 中所述,通过密度梯度离心和凝胶过滤分离血小板,并通过与 50 μ g/ml 凝血酶受体激动剂肽 (SFLLRN) 一起在 37℃下温育 15 分钟将其激活。将等分试样的血小板悬液转移到 TruCount 管 (Becton Dickinson) 中,按照生产商所述,通过使用荧光珠作为标准品,在 FACScan 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 上测定血小板密度。使用约 100,000 个/ μ l 的最终血小板密度。将因子 V (终浓度 7 μ g/ml) 加入蛋白质/Ca²⁺混合物中。然后加入 FVIIa 缀合物 (50 nM),接着加入血小板,得到 200 μ l 的最终体积。在定时的间隔,将等分试样的 10 μ l 转移到 90 μ l 0.5mM Chromozym TH (Roche Molecular Biochemicals)/20 mM Hepes (pH 7.4) (含有 150 mM NaCl、1 mg/ml BSA、1 mM EDTA 和 50 μ M Pefabloc Xa (Pentapharm, Basel)) 中。20 分钟后,通过加入 100 μ l 50% 乙酸,终止底物水解,测量 405 nm 下的吸光度。根据凝血酶标准曲线计算凝血酶浓度。用于表征 FVIIa 活性的其它测定可参见 WO 07031559 或 Person, *PNAS* 98(24) 13583-13588, 2001 和文中引述的参考文献。

[0026] 因子 VIII 分子: FVIII/ 因子 VIII 是一种大的复合糖蛋白,主要通过肝细胞产生。FVIII 由 2351 个氨基酸组成,包括信号肽,并含有由同源性限定的几个不同的结构域。有 3 个 A 结构域、一个独特的 B 结构域和 2 个 C 结构域。结构域顺序可列为 NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH。FVIII 作为在 B-A3 边界被分隔开的 2 条链在血浆中循环。该链通过二价金属离子束缚连接。A1-A2-B 链称为重链 (HC),而 A3-C1-C2 称为轻链 (LC)。

[0027] 内源性因子 VIII 分子在体内作为具有各种大小的 B 结构域的分子库 (pool) 循环。体内可能发生的是逐渐地酶促去除 B 结构域,产生具有各种大小的 B 结构域的分子库。一般认为,在第 740 位的切割 (由其去除 B 结构域的最后部分) 连同凝血酶活化一起发生。然而,不能排除这种可能性,其中例如第 740 位的切割位点已受损的因子 VIII 变体可能有活性。

[0028] 本文所用的“因子 VIII”或“FVIII”是指这样的人血浆糖蛋白:其是固有凝血途径的成员且是血液凝固所必需的。“天然 FVIII”是如 SEQ ID NO. 2 所示的全长人 FVIII 分子 (氨基酸 1-2332)。B 结构域跨越 SEQ ID NO 2 中的氨基酸 741-1648。

[0029] SEQ ID NO 2:

[0030]

ATRRYYLGAVELSWDYMOSDLGELPVDARFPFRVPKSF PFNTSVVYKKT LFVEFT
 DHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGA EYDD
 QTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKOLNSGLIGALL
 VCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGY
 VNRSPLGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPREVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLL
 MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRF
 ODDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGR
 KYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRP
 LYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSSFVNMERDLASGLI
 GPLLIC YKESVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFOA
 SNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKVMVYEDTLTLPF
 SGETVFM SMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDY YEDSYEDISAYLLSKN
 NAI EPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD PWF AHRT PMPKIONVSSSDLLMLLRQ
 SPTPHGLSLSDLOEAKYETFSDDSPGAIDSNNSLSEMT HFRPQLHHS GDMVFTPE SGLQL
 RLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSPMPVHYDSQLDTT
 LFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNSKLLSGLMNSQESSWGKNVSSTESGR LFKGKRAHG
 PALLTKONALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTP
 LIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTSSKNMEMVQOKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPES
 ARWIQORTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGONFLSEKNKVVGKGEFTKDVGLKE
 MVFPSSRNLF LTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVL PQIHTVTGTKNFMKNLF
 LLSTRQNVESYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVE
 KYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTL
 TQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFODNSSHL
 PAASYRKKDSGVQESSHFLOGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGS LGTSATNSVTYKKVEN
 TVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSN GSPGHLDLVEGSLLOGTEGAIKWNEAN
 RPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEK SPEKTA FK KKD TILSL
 NACESNHAAIAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLC SQNPPVLKRHQREITRTTLOSDQEEID
 YDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQS
 GSVPOQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFY
 SSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKVQH HMAPTKDEFDCKAWAYFSQVDLEKD
 VHSGLIGPLL VCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIOME
 DPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEE
 YKMALYNLYPGVFETVEMLP SKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHI
 RDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFS
 SLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKH NIFNPPIIARYIRLHPHYSIR
 STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAW
 RPQVNNPKEWLQVDFOKTMKVTVGTTQGVKSLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGK
 VKVFGGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAODLY

[0031] 本发明的因子 VIII 分子可以是 B 结构域截短的因子 FVIII 分子, 其中其余结构域与 SEQ ID NO. 2 中的氨基酸第 1-740 和 1649-2332 号所示序列高度对应, 但在残基 1670 和 1684 之间的 vWF 结合区内还可能有一个或多个改变。优选的本发明 B 结构域接头 (21 个氨基酸) 如 SEQ ID NO 4 (SFSQNSRHPSQNPPVLKRHQ) 所示。本发明的 FVIII 分子可略不

同于 SEQ ID NO 2 所示序列,这就意味着其余结构域(即 3 个 A 结构域和 2 个 C 结构域)可略微(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸或更多个)不同于 SEQ ID NO 2 所示氨基酸序列(氨基酸 1-740 和 1649-2332)的例如约 1%、2% 或 3%,这是由于可引入突变以例如降低 vWF 结合能力的事实。此外,将氨基酸修饰(取代、缺失等)引入分子的其它位置以改进因子 VIII 与各种其它组分(例如 LRP、各种受体、其它凝血因子、细胞表面)的结合能力、糖基化位点的引入和/或破坏等,似乎是可取的。

[0032] 本发明的因子 VIII 分子具有因子 VIII 活性,这就意味着以下能力:以功能上类似于或等同于 FVIII 的方式在凝血级联中起作用,通过与活化血小板上的 FIXa 相互作用诱导 FXa 形成,支持血凝块形成。可通过本领域众所周知的技术例如血块分析、内源性凝血酶潜力分析等,体外评价所述活性。本发明的因子 VIII 分子具有的 FVIII 活性为天然人 FVIII 的至少约 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90% 和 100% 或甚至超过 100%。

[0033] 作为单链前体分子合成内源性全长 FVIII。在分泌前,前体被切割成重链和轻链。可由两种不同的策略产生重组 B 结构域缺失的 FVIII。没有 B 结构域的重链和轻链的任一个作为 2 条不同的多肽链分别合成(二链策略),或者 B 结构域缺失的 FVIII 作为单条前体多肽链合成(单链策略),其以与全长 FVIII 前体相同的方式切割成重链和轻链。

[0034] 在 B 结构域缺失的 FVIII 前体多肽中,重链和轻链部分通常被接头分隔开。为了使在 B 结构域缺失的 FVIII 中引入免疫原性表位的风险降到最低,接头的序列优选来源于 FVIII B 结构域。作为最低限度,接头必须包含用于将 B 结构域缺失的 FVIII 前体多肽切割成重链和轻链的蛋白酶的识别位点。全长 FVIII 的 B 结构域中,氨基酸 1644-1648 构成该识别位点。导致 B 结构域缺失的 FVIII 活化时脱去接头的凝血酶位点位于重链。因此,接头的大小和氨基酸序列不太可能影响其被凝血酶活化而从剩余 FVIII 分子脱去。B 结构域的缺失对于 FVIII 的产生是有利的。然而,在不降低生产率的情况下,B 结构域的各部分可包括在接头中。B 结构域对生产率的负作用并不归因于 B 结构域的任何特定大小或序列。

[0035] 截短的 B 结构域可含有几个 O-糖基化位点。然而,按照一个优选的实施方案,该分子在截短的 B 结构域中只包含 1 个、或者 2、3 或 4 个 O-联寡糖。按照一个优选的实施方案,截短的 B 结构域只包含 1 个潜在的 O-糖基化位点,且一个或多个疏水部分优选通过接头与该 O-糖基化位点共价缀合。因子 VIII 分子还含有许多 N-联寡糖,这些中的每一个可潜在地用作连接疏水侧基的锚。

[0036] wt FVIII 分子中 B 结构域的长度约为 907 个氨基酸。本发明分子中截短的 B 结构域的长度可在以下范围内变化:约 10-约 800 个氨基酸、例如约 10 个氨基酸-约 700 个氨基酸、例如约 12-500 个氨基酸、12-400 个氨基酸、12-300 个氨基酸、12-200 个氨基酸、15-100 个氨基酸、15-75 个氨基酸、15-50 个氨基酸、15-45 个氨基酸、20-45 个氨基酸、20-40 个氨基酸或 20-30 个氨基酸。截短的 B 结构域可包含重链和/或轻链的片段和/或人工引入的不存在于 wt FVIII 分子中的序列。术语“B 结构域截短的”和“B 结构域缺失的”在本文中可互换使用。

[0037] 冯维勒布兰德因子(vWF): vWF 是一种大的单聚体/多聚体糖蛋白,其存在于血浆中并且在内皮(在怀布尔-帕拉德体中)、巨核细胞(血小板的 α 颗粒)和内皮下结缔组织中组成型产生。其主要功能是与其它蛋白质特别是因子 VIII 结合,它在血小板粘附在伤

口部位方面很重要。因子 VIII 与 vWF 结合的同时在循环中无活性；因子 VIII 当不与 vWF 结合时快速降解或被清除。因此由此得出结论，迄今已认为在获得循环半衰期延长的因子 FVIII 变体中，FVIII 中 vWF 结合能力的降低或消除是非常不希望的方法。

[0038] 术语“与 vWF 结合的能力降低”在本文意指包括因子 VIII 变体，其中结合 vWF 的能力降低至少 50%、优选至少 60%、更优选至少 70%、更优选至少 80%、更优选至少 90%、最优选约 100%。FVIII 与 vWF 的结合可通过 ELISA 样测定来测量或用表面等离子共振测量为与固定化 vWF 的直接结合。因子 VIII 中负责与 vWF 结合的区域是跨越的残基 1670-1684 的区域，如 EP0319315 中公开的。预期涉及该区域的因子 VIII 点突变体和 / 或缺失突变体可改进与 vWF 结合的能力。本发明特别优选的点突变实例包括包含一个或多个下列点突变的变体：Y1680F、Y1680R、Y1680N、E1682T 和 Y1680C。不受理论束缚，预期将疏水侧基与 vWF 结合能力降低的因子 VIII 分子连接而非将这类侧基与 vWF 结合能力正常的因子 VIII 分子连接可能是有利的原因是，侧基的大小在大的因子 VIII/vWF 复合物中相对较小。据推测，相对较大的侧基在保护游离因子 VIII 不被清除中更有效地起作用。

[0039] 因子 IX：因子 IXa (FIXa) 是一种胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶，其通过产生在凝血期间支持适当凝血酶形成所需要的大多数因子 Xa (作为 X 酶复合物 (tenase complex) 的一部分)，而在止血中起关键作用 (有关综述参见 (Hoffman 和 Monroe, III 2001))。因子 IX (FIX) 是维生素 K 依赖性凝血因子，具有类似于因子 VII、凝血酶原、因子 X 和蛋白 C 的结构。循环的酶原形式由 415 个氨基酸组成，其分为 4 个截然不同的结构域，包含 1 个 N 端富含 γ -羧基谷氨酸 (Gla) 的结构域、2 个 EGF 结构域和 1 个 C 端胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶结构域。FIX 的活化通过在 Arg145-Ala146 和 Arg180-Val181 处的有限蛋白酶解而产生，释放出 35-aa 片段，即所谓的活化肽 (Schmidt 和 Bajaj 2003)。活化肽被极度糖基化，含有 2 个 N- 联聚糖和多达 4 个 O- 联聚糖。

[0040] 本文所用“因子 IX”或“FIX”是指人因子 IX 糖蛋白，其是固有的凝血途径的成员，并且是血液凝固所必需的。“因子 IX(a)”包括 FIX(a) 的天然等位基因变体，其可彼此存在和产生。因子 IX(a) 可以是血浆来源的或采用众所周知的生产和纯化方法重组产生的。糖基化、 γ -羧化和其它翻译后修饰的程度和位置可随所选择的宿主细胞及其生长条件而变化。除非另有规定或说明，否则因子 IX 意指在凝血中起正常作用的任何功能性人因子 IX 蛋白分子，包括其任何片段、类似物和衍生物。“野生型 FIX”的一个实例是全长人 FIX 分子，如 SEQ ID NO:3 所示。

[0041] 本文所用术语“类似物”或“多种类似物”或“变体”，意指具有 SEQ ID NO:3 序列的因子 FIX，其中母蛋白质的一个或多个氨基酸被另一个氨基酸取代和 / 或其中母蛋白质的一个或多个氨基酸缺失和 / 或其中一个或多个氨基酸被插入蛋白质中和 / 或其中一个或多个氨基酸被添加到母蛋白质中。这类添加可发生在母蛋白质的 N 端或 C 端的任一端或两端上。该定义中的“类似物”或“多种类似物”仍具有呈其活性形式的 FIX 活性。在一个实施方案中，变体与 SEQ ID NO: 3 的序列有至少 90% 同一性。在又一个实施方案中，变体与 SEQ ID NO: 3 的序列有至少 95% 同一性。如本文所用，对具体位置的任何提及，是指在 SEQ ID NO: 3 中的相应位置。

[0042] 除非另有说明，否则因子 IX 结构域包括下列氨基酸残基：Gla 结构域，为自残基 Tyr1 到残基 Lys43 的区域；EGF1，为自残基 Gln44 到残基 Leu84 的区域；EGF2，为自残基

Asp85 到残基 Arg145 的区域 ;活化肽,为自残基 Ala146 到残基 Arg180 的区域 ;和蛋白酶结构域,为自残基 Val181 到 Thr414 的区域。轻链是指包括 Gla 结构域、EGF1 和 EGF2 的区域,而重链是指蛋白酶结构域。

[0043] SEQ ID NO. 3:野生型人凝血因子 IX

[0044]

```
YNSGKLYyFVQGNLyRyCMyyKCSFyyARyVFyNTyRTTyFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSC  
KDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQK  
SCEPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRAEAVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVG  
EDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHT  
QKRNVIIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGW  
GRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHV  
TEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYKVSRYVNWIKEKTKLT
```

[0045] γ :表示 γ -羧化 Glu (‘E’) 残余物 (remains)。在完全 γ -羧化 FIX 中,起始 12 个 Glu 残基是 γ -羧化的,但有其中观察到较少 γ -羧化的变体 (尤其在重组 FIX 产物的情况下)。

[0046] 注意,二态性存在于 FIX 的 148 位处,其可以是 Ala 或 Thr (参见 McGraw 等 (1985) *PNAS*, 82:2847)。Ala 存在于 N9-GP (rFIX 糖聚乙二醇化的) 和 BeneFIX 上,而由 Biogen Idec 产生的 FIX:Fc 携带 Thr。因此,本发明的 FIX 分子可在 148 位处具有 Ala 或 Thr 残基。

[0047] FIX 缀合物的活性测定可采用本领域所述方法进行,例如以下文献中描述的一步法活化的部分促凝血酶原激酶时间测定 (one stage activated partial thromboplastin time assay):Biggs (1972, Human Blood Coagulation Haemostasis and Thrombosis (第 1 版), Oxford, Blackwell, Scientific, 第 614 页))。简单来说,为了按本文所述测定因子 IX 分子的生物活性,用相等体积的活化的部分促凝血酶原激酶试剂、采用本领域众所周知的无菌静脉切开术从 B 型血友病患者中分离的因子 IX 缺陷的血浆或因因子 IX 免疫耗竭血浆 (可市购自例如 Helena Laboratories 或 ILS)、正常混合血浆 (作为标准品) 或样品和 25 mM 钙,进行测定。在该测定中,1 单位活性定义为存在于 1 毫升正常混合血浆中的量。或者,活性可相对已相对 WHO 人 FIX 标准品 (NIBSC) 进行校准的正常人血浆混合物 (pool) 来测量。此外,生物活性的测定可按照例如 Proctor 和 Rapaport (Amer. J. Clin. Path. 36:212 (1961)) 所述来进行,所述生物活性基于因子 IX 将因子 IX 缺陷型患者血浆的凝固时间降至正常的能力。

[0048] 融合蛋白:融合蛋白 / 嵌合蛋白是通过连接原来编码单独蛋白质的两个或更多个基因来产生的蛋白质。该融合基因的翻译产生具有得自原有蛋白质每一个的功能性质的单一多肽。治疗性蛋白质例如本发明的凝血因子分子可与另一种多肽融合,例如抗体结合多肽例如 Fc 受体。本发明的蛋白质还可与 Fc 结构域、优选包含导致效应子功能降低的突变和 / 或对新生儿 Fc 受体的亲和力增加的突变的 Fc 结构域融合。与凝血因子 (例如因子 VIII) 相比,抗体具有非常长的半衰期。因此,很可能通过在凝血因子 Fc 受体融合蛋白和循环的抗体之间形成非共价复合物,而显著延长凝血因子 (例如因子 VII、因子 VIII 和因子 IX) 的半衰期。

[0049] 改进的循环半衰期:与野生型蛋白质分子相比,本发明的蛋白质具有改进的循环

半衰期,优选延长循环半衰期。循环半衰期优选延长至少 10%、优选至少 15%、优选至少 20%、优选至少 25%、优选至少 30%、优选至少 35%、优选至少 40%、优选至少 45%、优选至少 50%、优选至少 55%、优选至少 60%、优选至少 65%、优选至少 70%、优选至少 75%、优选至少 80%、优选至少 85%、优选至少 90%、优选至少 95%、优选至少 100%、更优选至少 125%、更优选至少 150%、更优选至少 175%、更优选至少 200%、最优选至少 250% 或 300%。甚至更优选这类分子具有延长至少 400%、500%、600% 或甚至 700% 的循环半衰期。

[0050] 疏水侧链/疏水侧基: 本发明的蛋白质与侧基缀合。关于这一点,“侧基”要理解为在性质上主要为疏水的侧基,且其中所述侧基不是蛋白质分子的天然部分。

[0051] 与未缀合蛋白质相比,当与蛋白质缀合时,所述疏水侧基可延长蛋白质的体内循环半衰期。这些疏水侧基在本文中可指“白蛋白结合剂 (albumin binder)”,并且包括脂肪酸的衍生物。这些基团在体外或体内对白蛋白可具有或可不具有亲和力。已表明白蛋白结合剂与蛋白质或肽连接可能延长所述蛋白质或肽的血浆半衰期。一类典型的白蛋白结合剂来源于脂肪酸,因为白蛋白能够与极疏水分子结合。因此,在本发明的情况下,具有 $-(\text{CH}_2)_{12}-$ 部分的化合物是可能的白蛋白结合剂。如果这类化合物与蛋白质或肽连接,并导致所述蛋白质或肽的血浆半衰期延长,则要理解的是该白蛋白结合剂可通过与白蛋白结合和/或通过其它机制,而有助于血浆半衰期的整体延长。在一个实施方案中,白蛋白结合剂-蛋白质缀合物是其中单一白蛋白结合剂已与蛋白质连接的分子。在其它的实施方案中,多于一种白蛋白结合剂已与蛋白质连接,例如 2 种、3 种、4 种、5 种或更多种。

[0052] 白蛋白结合部分可包含对白蛋白结合特别相关的部分,因此延长在血流中的循环,该部分因此可称为半衰期延长部分。半衰期延长部分优选位于用作与肽的连接点的部分的相对端或在其附近。白蛋白结合部分的剩余部分,即在半衰期延长部分和用作与肽的连接点的部分之间的部分,可称为接头部分、接头、间隔物等。然而,接头的存在是任选的,因此,白蛋白结合部分可与半衰期延长部分相同。

[0053] 在具体的实施方案中,白蛋白结合部分和/或半衰期延长部分在生理 pH (7.4) 下是亲脂性的和/或带有负电荷。在一个优选的实施方案中,白蛋白结合部分和/或半衰期延长部分任选通过接头与唾液酸残基或唾液酸衍生物的氨基经由酰胺键共价连接。根据本发明一个极优选的实施方案,采用酶促方法例如涉及使用唾液酸转移酶的方法,将白蛋白结合部分与乙二醇-蛋白质连接。

[0054] 为此目的,术语“白蛋白结合部分”、“半衰期延长部分”和“接头”包括这些分子的未反应形式以及反应形式。指一种形式还是指另一种形式,根据使用术语的上下文将是明显的。术语“脂肪酸”是指具有 4-28 个碳原子的脂族一元羧酸,优选是无支链的,和/或偶数的,且它可以是饱和的或不饱和的。术语“脂肪二酸”是指如上定义的但在 ω 位置具有额外羧酸基团的脂肪酸。因此,脂肪二酸是二羧酸。该命名与通常用于本领域的一样,例如 $-\text{COOH}$ 以及 $\text{HOOC}-$ 是指羧基; $-\text{C}_6\text{H}_4-$ 是指亚苯基 (phenylen); $-\text{CO}-$ 以及 $-\text{OC}-$ 是指羰基 ($\text{O}=\text{C} <$); $\text{C}_6\text{H}_5\text{-O}-$ 是指苯氧基。

[0055] 在一个优选的实施方案中,本发明的白蛋白结合部分包含通过接头和唾液酸残基或唾液酸衍生物与肽或蛋白质连接的脂肪酰基 ($-(\text{CH}_2)_n\text{-CO}-$, 其中 $n=1,2,3,\dots,40$) 或 ω -羧基脂肪酰基 ($\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_n\text{-CO}-$, 其中 $n=1,2,3,\dots,40$)。

[0056] 在一个优选的实施方案中,接头部分如果存在,则具有 2-80 个 C 原子,优选 5-70

个 C 原子。在其它优选的实施方案中,接头部分如果存在,则具有 4-60 个杂原子,优选 2-40 个杂原子,更优选 3-30 个杂原子。杂原子特别优选的实例为 N 原子、O 原子和 S 原子。H 原子和 C 原子不是杂原子。

[0057] 在另一个实施方案中,接头包含至少一个 OEG 分子和 / 或至少一个谷氨酸残基,或更确切地说是相应基团 (OEG 命名为 8-氨基-3,6-二氧杂辛酸,即该基团: $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$)。

[0058] 在一个优选的实施方案中,接头部分包含通过酰胺键与唾液酸残基连接的二羧酰胺部分。在优选实例中,二羧酰胺残基具有 2-30 个 C 原子,优选 4-20 个 C 原子,更优选 4-10 个 C 原子。在其它优选的实例中,二羧酰胺残基具有 0-10 个杂原子,优选 0-5 个杂原子。

[0059] 在另一优选的实例中,接头部分包含含有氨基和远端羧基两者的基团,其通过其远端羧基经由酰胺键与唾液酸残基连接。在一个优选的实施方案中,该基团是 OEG 基团。

[0060] 氨基酸谷氨酸 (Glu) 包含 2 个羧酸基团。其 γ -羧基优选用于与唾液酸残基或唾液酸衍生物的氨基、或与 OEG 分子 (如存在的话) 的氨基、或与另一个 Glu 残基 (如存在的话) 的氨基形成酰胺键。Glu 的氨基进而与半衰期延长部分的羧基、或与 OEG 分子 (如存在的话) 的羧基、或与另一个 Glu 残基 (如存在的话) 的 γ -羧基形成酰胺键。这种包含 Glu 的方式有时简称为“ γ -Glu”。

[0061] 因此,本发明的个别蛋白质可包含有亲水和疏水性质两者的侧基。此外得出,可将本发明的蛋白质与疏水侧基以及性质上不必是疏水的一个或多个侧基 (例如亲水物 (hydrophilier)、多肽等) 缀合。

[0062] 在宽的方面,本发明涉及蛋白质的稳定缀合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药,所述缀合物包含 a) 一个或多个 N- 联聚糖,和 / 或 b) 一个或多个 O- 联聚糖,其中疏水侧基 (白蛋白结合残基) 任选通过亲水间隔物与所述蛋白质中的所述一个或多个聚糖连接。聚糖可以是天然存在的或其可被遗传改造成本发明的蛋白质。

[0063] 在一个实施方案中,侧链与蛋白质通过一个或多个其 N- 联聚糖连接。在另一个实施方案中,侧链与蛋白质通过一个或多个其 O- 联聚糖连接。在又一个实施方案中,侧链与蛋白质通过其 N- 联聚糖及其 O- 联聚糖两者连接。在一个优选的实施方案中,所述蛋白质是凝血因子。

[0064] 在本发明的一个实施方案中,亲水间隔物的 $\text{LogP} < 0$ 。

[0065] 可通过其 logP 值来描述亲水间隔物的溶解度。 LogP , 亦称分配系数,是在平衡时两种不混溶溶剂的混合物的两相中化合物浓度比的对数。通常一种溶剂是水,而第二种选自辛-1-醇、氯仿、环己烷和丙二醇二壬酸酯 (PGDP)。在这些不同溶剂中测量的 LogP 值显示的差异主要由氢键键合作用所致。辛醇可给予和接受氢键,而环己烷是惰性的。氯仿可给予氢键,而 PGDP 只可接受氢键。

[0066] 在本发明的另一个实施方案中,在辛-1-醇、氯仿、环己烷和丙二醇二壬酸酯 (PGDP) 的任一种中,亲水间隔物的 LogP 低于 -0.5。在又一个实施方案中,在辛-1-醇、氯仿、环己烷和丙二醇二壬酸酯 (PGDP) 的任一种中,亲水间隔物的 logP 低于 -1。

[0067] 或者,可运用以下已发表的算法,将白蛋白结合剂部分或亲水间隔物部分的 LogP 值计算为 mLogP 和 / 或 cLogP (T. Fujita, J. Iwasa 和 C. Hansch, *J. Am. Chem. Soc.* 86, 5175-5180, (1964) "A New Substituent Constant, Pi , Derived

from Partition Coefficients (从分配系统推导的一种新的取代基常数 P_i)” ;C. A. Lipinski 等. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3-25, (1997) “Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings (药物研发与发展背景下估算溶解度和渗透性的实验与计算方法)”及 I. Moriguchi, S. Hirono, I. Nakagome, H. Hirano, *Chem. Pharm. Bull.* 42, 976-978, (1994) “Comparison of Reliability of logP Values for Drugs Calculated by Several Methods (比较通过几种方法计算的药物 logP 值的可靠度)”。在又一个实施方案中,蛋白质通过接头与一个白蛋白结合残基连接。

[0068] 在另一个实施方案中,该蛋白质的聚糖的各个类型通过一个或两个或更多个接头与一个或两个或更多个白蛋白结合残基连接。这些白蛋白结合残基可以是相同的或不同的。同样,这些接头可以是相同的或不同的。因此,在一个实例中,一个或两个或更多个白蛋白结合残基通过一个接头与蛋白质的一种聚糖类型连接,另外,一个或两个或更多个白蛋白结合残基通过接头与蛋白质的另一种聚糖类型连接。或者除此之外,白蛋白结合残基通过一种或多种类型的聚糖与蛋白质上的其它位点连接,例如天然或重组引入的半胱氨酸残基、一个或两个 N 端、一个或两个 C 端、谷氨酰胺残基或赖氨酸残基。这类聚糖的优选实例是分叉复合物 N-聚糖和核心 -1 型 O-聚糖。

[0069] 在另一个实施方案中,该蛋白质经重组改造以含有比天然蛋白质多的聚糖。这些聚糖适宜用本发明的白蛋白结合残基修饰。

[0070] 在又一个实施方案中,除疏水侧链以外,该蛋白质具有一个或多个修饰。因此,该蛋白质可与一种或多种亲水聚合物例如但不限于例如 PEG、多聚唾液酸、羟烷基淀粉、葡聚糖、树枝状高分子 (dendrimer) 等连接。在一个实施方案中,亲水聚合物与蛋白质的聚糖之一连接,而疏水侧链与蛋白质的另一个聚糖连接。在一个具体的实施方案中,亲水聚合物是与 FVIII 分子的 O-聚糖连接的 PEG,而疏水侧链连接所述 FVIII 分子的 N-聚糖。在另一个具体实施方案中,亲水聚合物是与 FVIII 分子的 N-聚糖连接的 PEG,而疏水侧链连接 FVIII 分子的 O-聚糖。

[0071] 又一方面,本发明涉及蛋白质缀合物及其药学上可接受的盐、溶剂化物和前药,其中缀合物具有式 (I) :

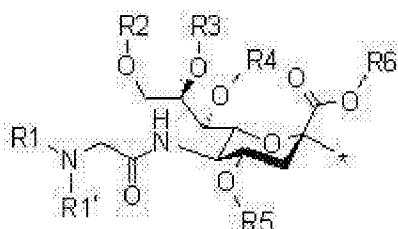
[0072] $(A-W-B1-B2)_z$ -脱唾液酸蛋白质 (asialoProtein) (I)

[0073] 其中

[0074] 脱唾液酸蛋白质表示其中末端唾液酸已从聚糖脱去的蛋白质, z 是整数值 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

[0075] B2 表示具有以下结构的甘氨酸基-唾液酸:

[0076]



[0077] 其中 R_1 、 R_1' 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 和 R_6 是连接 B2 与 B1 的键或是氢,其中 * 表示与脱唾

液酸凝血因子 (asialoCoagulationFactor) 连接。因此以 * 结尾的键仅表示键, 即开放键。

[0078] B1 表示接头,

[0079] W 是连接 A 和 B1 的化学基团, 和

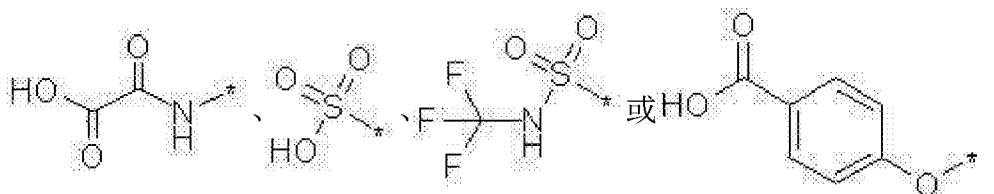
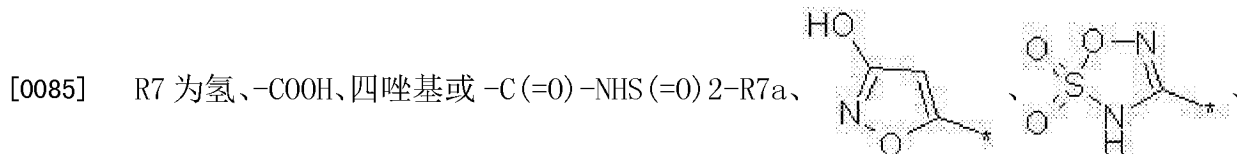
[0080] A 表示疏水白蛋白结合侧基。

[0081] 在一个优选的实施方案中, A 包含疏水基例如亚烷基链 $-(CH_2)_n-$, 其中 $n=8-26$, 任选与芳基取代基和以下带有负电荷的基团连接: 例如羧基、磺基、次磺基、亚磺基、膦酸或次膦酸、酰基磺酰胺、羧酸等排物例如四唑、羟基嘞唑等。

[0082] 在又一个实施方案中, A 具有以下结构

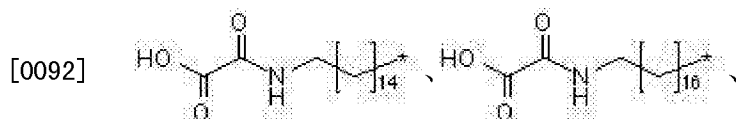
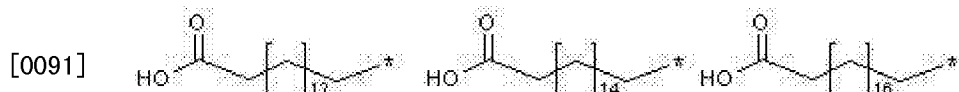
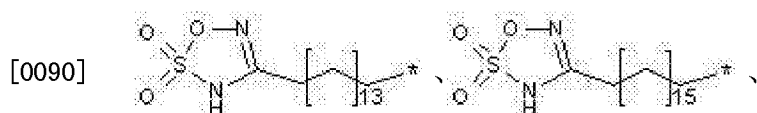
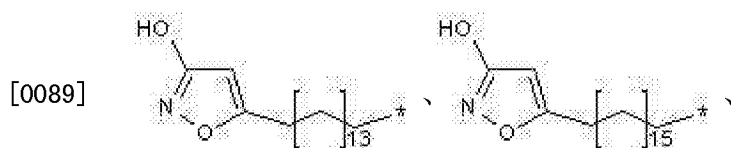
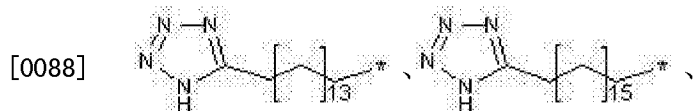


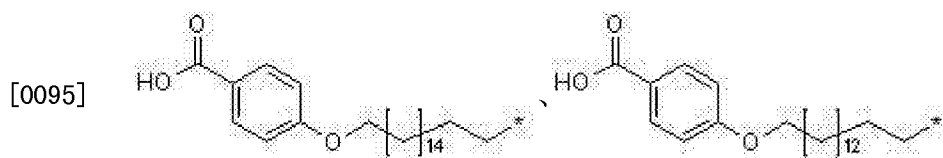
[0084] 其中 * 表示通过 W 与 B1 连接, 因此以 * 结束的键仅表示键, 即开放键。



[0086] n 选自 7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 和 25, R7a 选自 C_{1-6} 烷基、苯基或 C_{1-6} 烷基苯基, 其中 * 表示与基团 A 的其余部分连接。在又一个实施方案中, R7 为 $-COOH$ 。在另一个实施方案中, n 选自 14、16 和 18。在又一个实施方案中, R7 为 $-COOH$, n 选自 14、16 和 18。

[0087] 在又一个实施方案中, A 选自以下清单

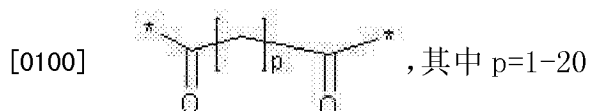
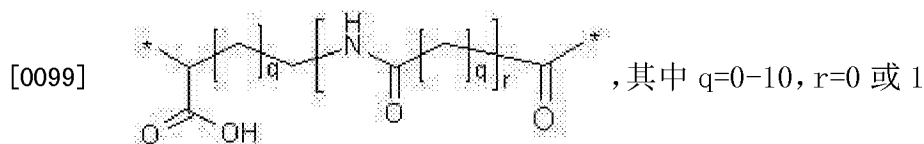




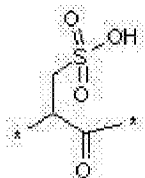
[0096] 以及 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-$ 基团, 其中 $n=8-26$

[0097] 其中 * 表示通过 W 与 B1 连接, 因此以 * 结束的键仅表示键, 即开放键。

[0098] 在又一个实施方案中, W 为 $-\text{CONH}-$



[0101]



[0102] C3-C10 环烷基

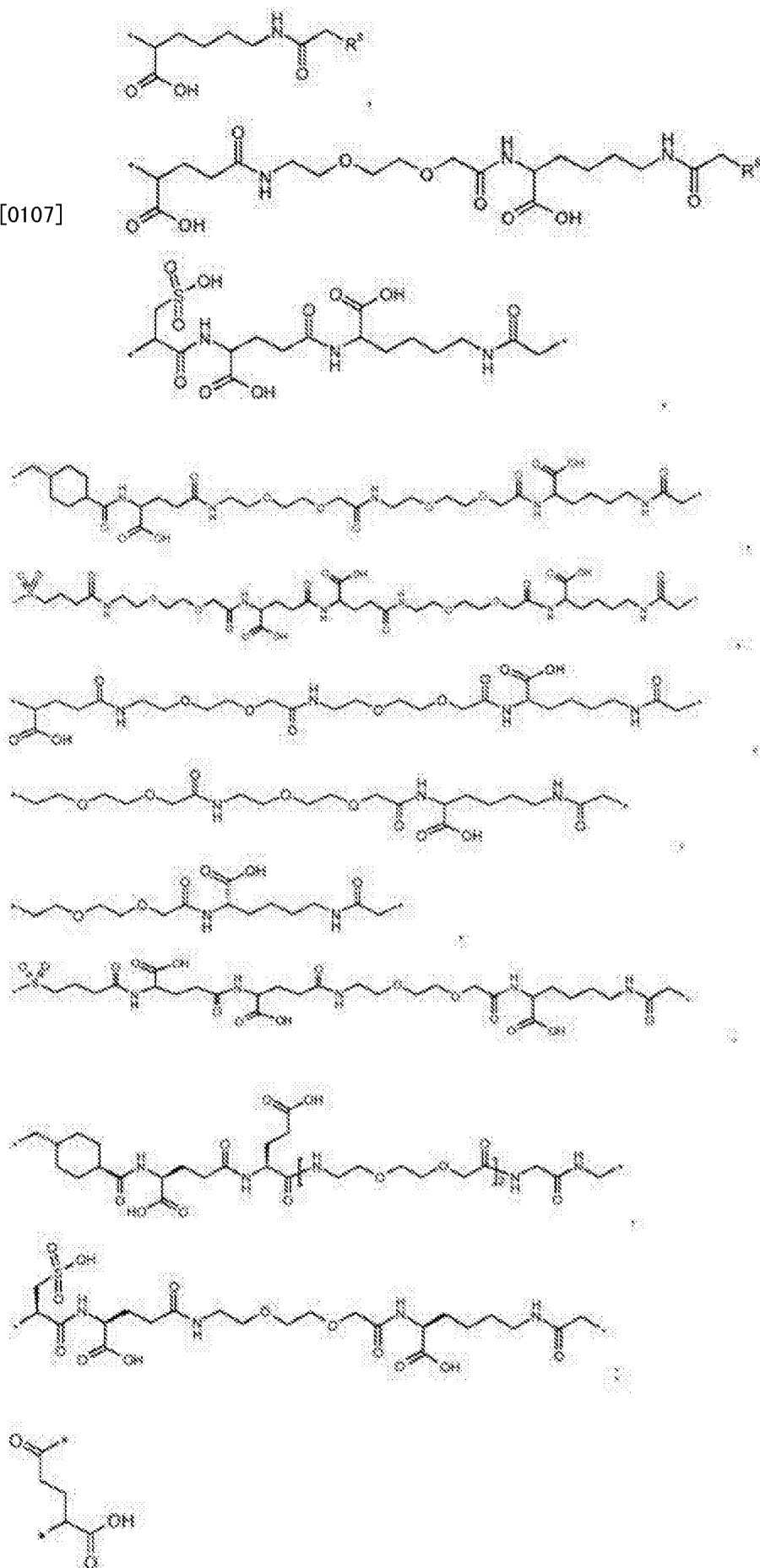


[0104] $-\text{SO}_2-(\text{CH}_2)_n-$

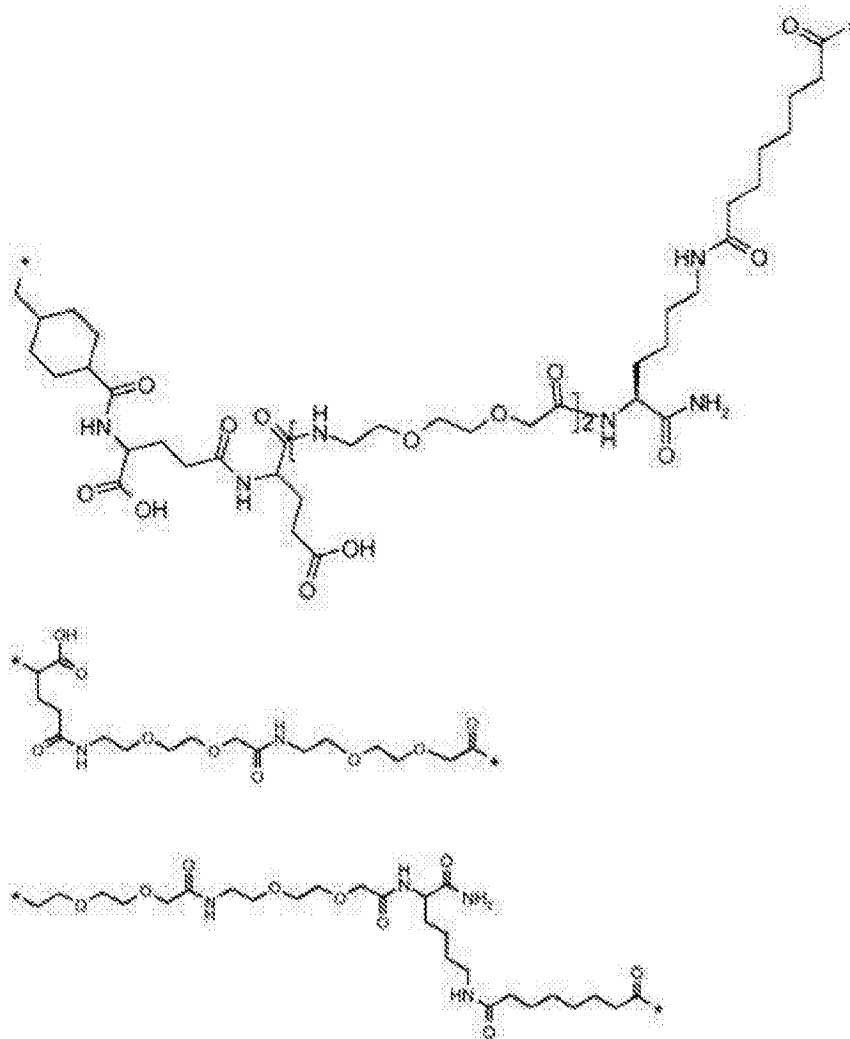
[0105] B1 的互连结构单元 (structural element) 任选通过氮原子或连接到 B2 的胺。

[0106] 在又一个实施方案中, B1 选自以下清单

[0107]



[0108]

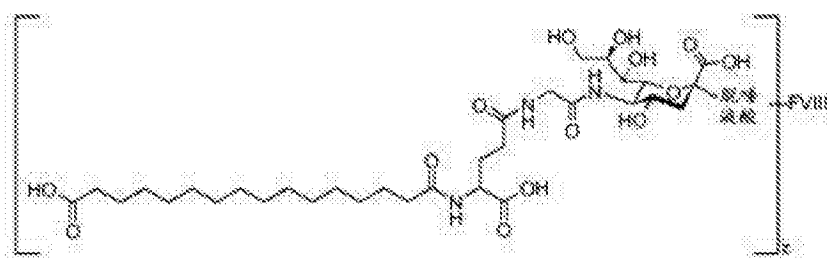
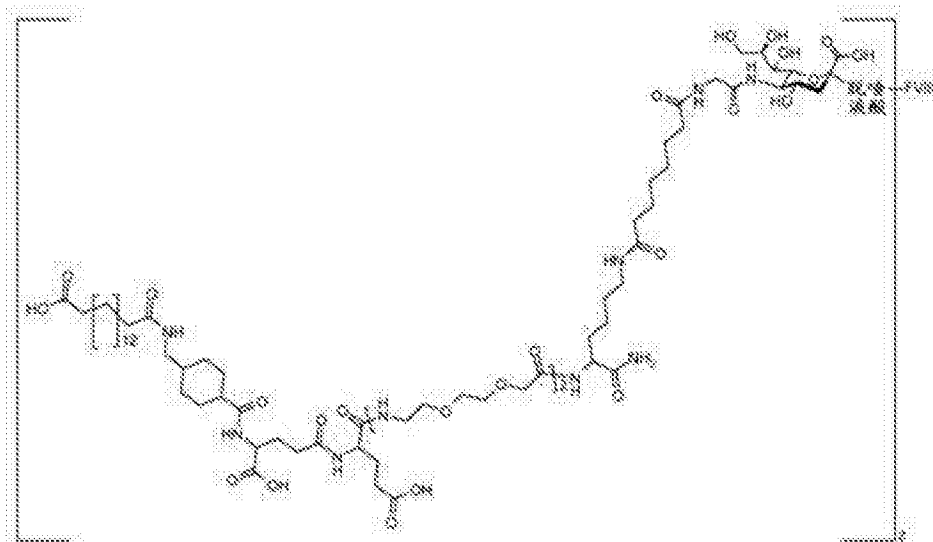


[0109] 其中 * 表示与 B2 和 W 连接。

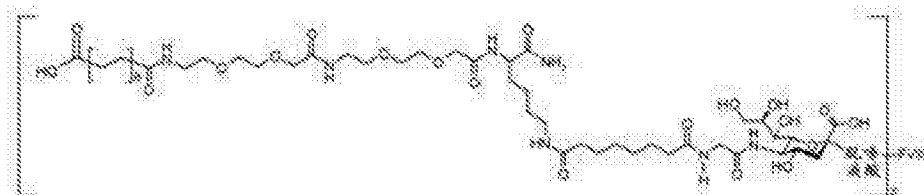
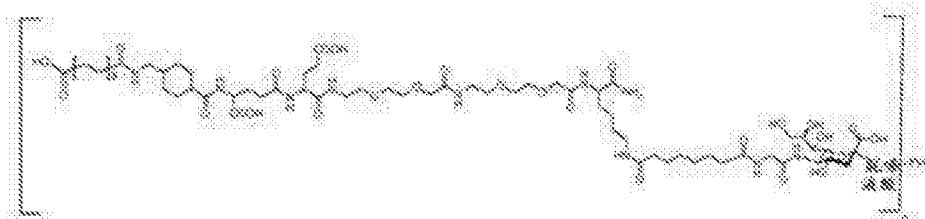
[0110] 在一个具体的实施方案中, R1、R1'、R3、R4、R5 和 R6 为氢, R2 与 B1 连接。在又一个具体实施方案中, R1'、R2、R3、R4、R5 和 R6 为氢, R1 与 B1 连接。

[0111] 在又一个实施方案中, 蛋白质缀合物选自以下清单

[0112]



[0113]



[0114] 其中每个蛋白质分子连接 1、2、3、4 或 5 个侧链 ($z=1, 2, 3, 4$ 或 5)。在一个具体的实施方案中, 1、2、3 或 4 个侧链与蛋白质的 N- 聚糖连接。在另一个具体实施方案中, 侧链与 O- 聚糖连接。在另一个具体实施方案中, 除与 FVIII O- 聚糖连接的侧链以外, 1、2、3 或 4 个侧链与 FVIII N- 聚糖连接。在又一个具体实施方案中, 除与 FVIII O- 聚糖连接的 40 kDa PEG 以外, 1、2、3 或 4 个侧链与 FVIII N- 聚糖连接。在又一个实施方案中, 1、2、3 或 4 个侧链与一个或两个 FVIIa N- 聚糖连接, 而另一个聚糖用 PEG 修饰。在另一个实施方案中, 1、2、3 或 4 个侧链与一个或两个 FIX N- 聚糖连接, 而另一个聚糖或相同 (支链) 聚糖用 PEG 修饰。

[0115] **糖蛋白**: 术语“糖蛋白”意欲包括含有与“骨架”氨基酸序列的一个或多个氨基酸残基连接的一个或多个寡糖 (聚糖) 的肽、寡肽和多肽。聚糖可以是 N- 联或 O- 联的。聚糖可以是天然存在的和 / 或通过遗传工程改造插入蛋白质中。

[0116] **N-联寡糖和 O-联寡糖**: 本文所用术语“聚糖”或可互换使用的“寡糖链”是指与单个氨基酸残基共价连接的整个寡糖结构。聚糖通常是 N- 联或 O- 联的, 例如, 聚糖与天冬酰胺残基 (N- 联糖基化) 或丝氨酸或苏氨酸残基 (O- 联糖基化) 连接。N- 联寡糖链可以是多分支的 (multi-antennary), 例如二分支的、三分支的或四分支的, 最常见含有 $\text{Man}_3\text{-GlcNAc-GlcNAc-}$ 的核心结构。

[0117] N- 聚糖和 O- 聚糖两者通过产生蛋白质的细胞与蛋白质连接。当初生蛋白质从核糖体易位到内质网时, 细胞 N- 糖基化机器识别氨基酸链中的 N- 糖基化共有序列基序 (N-X-S/T 基序) 并使其糖基化 (Kiely 等, 1976 ; Glabe 等, 1980)。

[0118] 一些糖蛋白在人中原位产生时, 具有带末端或“帽化”唾液酸残基的聚糖结构, 即各分支 (antenna) 的末端糖是通过 $\alpha 2\rightarrow3$ 或 $\alpha 2\rightarrow6$ 键与半乳糖连接的 N- 乙酰基神经氨酸。其它糖蛋白具有被其它糖残基封端的聚糖。然而, 当在其它情况下产生时, 糖蛋白可含有在一个或多个其分支上具有不同末端结构的寡糖链, 例如缺乏唾液酸残基 ; 含有 N- 乙醇酰基神经氨酸 (Neu5Gc) 残基 ; 含有末端 N- 乙酰基半乳糖胺 (GalNAc) 残基替代半乳糖等。N- 联寡糖和 / 或 O- 联寡糖的模式可采用本领域已知的任何方法确定, 包括但不限于 : 高效液相色谱法 (HPLC) ; 毛细管电泳 (CE) ; 核磁共振 (NMR) ; 采用电离技术例如快速原子轰击、电喷雾或基质辅助激光解吸 (MALDI) 的质谱法 (MS) ; 气相色谱法 (GC) ; 及用外切糖苷酶处理结合阴离子交换 (AIE)-HPLC、尺寸排阻色谱法 (SEC)、质谱分析 (MS)、凝胶电泳 (SDS-PAGE、CE-PAGE)、等电聚焦凝胶或等电聚焦毛细管电泳 (CE-IEF), 参见例如 Weber 等, *Anal. Biochem.* 225:135 (1995) ; Klausen 等, *J. Chromatog.* 718:195 (1995) ; Morris 等, 载于 *Mass Spectrometry of Biological Materials*, McEwen 等, 主编, Marcel Dekker, (1990), 第 137-167 页 ; Conboy 等, *Biol. Mass Spectrom.* 21:397, 1992 ; Hellerqvist, *Meth. Enzymol.* 193:554 (1990) ; Sutton 等, *Anal. Biochem.* 318:34 (1994) ; Harvey 等, *Organic Mass Spectrometry* 29:752 (1994)。

[0119] 因此, 术语“末端唾液酸”或可互换的“末端神经氨酸”意欲包括在聚糖或寡糖链中作为末端糖残基连接的唾液酸残基, 即各分支的末端糖是通过 $\alpha 2\rightarrow3$ 或 $\alpha 2\rightarrow6$ 键与半乳糖连接的 N- 乙酰基神经氨酸。

[0120] 术语“半乳糖或其衍生物”意指半乳糖残基, 例如天然 D- 半乳糖或其衍生物, 例如 N- 乙酰基半乳糖胺残基。

[0121] 术语“末端半乳糖或其衍生物”意指在聚糖或寡糖链中作为末端糖残基连接的半乳糖或其衍生物,例如,各分支的末端糖是半乳糖或 N-乙酰基半乳糖胺。

[0122] 术语“脱唾液酸糖蛋白”意欲包括其中已脱去一个或多个末端唾液酸残基的糖蛋白,例如,通过用唾液酸酶处理或通过化学处理,使至少一个半乳糖或 N-乙酰基半乳糖胺残基从半乳糖或 N-乙酰基半乳糖胺的下面的“层”中暴露出来(“暴露的半乳糖残基”)。

[0123] 通常,可通过引入氨基酸突变来引入 N-联聚糖,以获得 N-X-S/T 基序。本发明的蛋白质分子含有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个或更多个 N-联聚糖。N-联聚糖的结构是高甘露糖的形式或复杂形式。高甘露糖聚糖在聚糖的非还原端含有末端甘露糖残基。复杂 N-聚糖在非还原端含有末端唾液酸、半乳糖或 N-乙酰基葡萄糖胺。

[0124] 同样地, O-聚糖与氨基酸链中特定的 O-糖基化位点连接,但引发 O-糖基化的基序比 N-糖基化信号的异源性大的多,且预测氨基酸序列中的 O-糖基化位点的能力仍不足够(Julenius 等, 2004)。因此,人工 O-糖基化位点的构建伴随有某些不确定性。

[0125] 在本发明的缀合物中,侧链与 N-联聚糖或 O-联聚糖中的唾液酸连接。

[0126] 疏水侧基的连接:

[0127] 用于将基团与蛋白质偶联的化学方法往往是非选择性的,但一些是位点选择性的。然而,常见于大多数方法的是以下事实:含有疏水基团的试剂不能用于水性缓冲液中,除非加入有害的添加剂例如洗涤剂或有机溶剂。疏水基团由于其在水性环境中的不溶性而固有地难与蛋白质偶联,而蛋白质只溶于水性环境中。

[0128] 许多优势与酶促方法的采用有关。按照本发明优选的酶促方法,可通过化学法制备[疏水侧基]-唾液酰-CMP 底物。可使用唾液酸转移酶,将该底物酶促地转移到脱唾液酸蛋白质中存在的聚糖。本发明的发明人意想不到地证实,可在不加入有机溶剂的情况下进行这种酶促方法。许多缺点与使用有机溶剂有关,例如生物活性丧失、环境问题、确保有机溶剂完全除去所要采取的其它步骤等。在处理 FVIII 蛋白时,将甘油加入缓冲液中可能是有利的,例如 5-30% 甘油,优选 10-20% 甘油。甘油的存在似乎在例如冷冻/融化过程中稳定因子 VIII 分子,而且还可防止因子 VIII 聚集的形成。甘油是高度亲水性的,因此不视为有机溶剂。此外,由于其高度亲水的性质,甘油没有在其它有机溶剂中所观察到的对蛋白质稳定性的负面作用,其它有机溶剂例如乙醇、丙醇、乙腈、二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷、二甲亚砜等。因此,酶促缀合期间存在的甘油在缀合过程结束后不必除去。

[0129] 唾液酸转移酶:唾液酸转移酶是将唾液酸转移至初生寡糖的酶。各种唾液酸转移酶对特定的糖核苷酸供体底物有特异性。唾液酸转移酶将唾液酸加到糖脂(神经节苷脂)的末端半乳糖或者糖蛋白的 N-联聚糖或 O-联聚糖上。有大约 20 种不同的唾液酸转移酶,可根据其所作用的受体底物和其形成的糖键类型来区分。通常在唾液酸的 2 位和半乳糖的 3 位或 6 位形成键。优选的本发明唾液酸转移酶属于 EC 2.4.99 酶类。非限制性实例为 ST3Gal-I (对 O-聚糖有特异性)和 ST3Gal-III (对 N-聚糖有特异性)及 ST6GalNAc-I。因此,可通过例如选择特异性唾液酸转移酶和/或工程改造具有特定糖基化模式的蛋白质,来工程改造本发明缀合蛋白质的结构。

[0130] 受体底物:术语受体或受体底物是指在唾液酸转移酶介导的反应中通过糖苷键与供体底物连接的亲核底物(参见例如 Boons 和 Hale, *Organic Synthesis with Carbohydrates*, Sheffield Academic Press, 2000, Sheffield, England)。受体是单糖或

寡糖或其衍生物。受体的反应部分是包含在这类单糖或寡糖或衍生物中的羟基。在唾液酸转移酶介导的反应中反应性羟基通常是末端或非末端半乳糖上的羟基。反应性羟基通常是末端半乳糖的 3- 羟基或 6- 羟基。反应性羟基的另一种类型是末端唾液酸的 8- 羟基。

[0131] **供体底物**: 术语供体或供体底物是指在唾液酸转移酶介导的反应中通过糖苷键与受体底物连接的亲电子底物 (参见例如 Boons 和 Hale, *Organic Synthesis with Carbohydrates*, Sheffield Academic Press, 2000, Sheffield, England)。供体底物是 Leloir 或非 Leloir 型的糖核苷酸。优选的本发明糖核苷酸是具有与唾液酸的 *N*- 乙酰基连接的取代基的唾液酸胞苷一磷酸。

[0132] 用于产生重组蛋白质的宿主细胞优选为哺乳动物源的, 以确保分子在折叠和翻译后修饰 (例如糖基化和硫酸盐化) 期间被适当加工。在实施本发明时, 细胞为哺乳动物细胞, 更优选是已确立的哺乳动物细胞系, 包括而不限于 CHO、幼仓鼠肾 (BHK) 和 HEK293 细胞系。

[0133] 目前优选的细胞是 HEK293、COS、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、幼仓鼠肾 (BHK) 和骨髓瘤细胞, 特别是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

[0134] **药物组合物**: 药物组合物在本文优选意指包括适于胃肠外给药的包含本发明蛋白质分子的组合物, 例如即用型无菌水性组合物或可在例如水或水性缓冲液中重构的干燥的无菌组合物。本发明的组合物可包含各种药学上可接受的赋形剂、稳定剂等。

[0135] 这类组合物中的其它成分可包括润湿剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、张度调节剂、螯合剂、金属离子、油性溶媒、蛋白质 (例如人血清白蛋白、明胶或蛋白质) 和两性离子 (例如氨基酸例如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸)。当然, 这类其它成分不应不良地影响本发明药物制剂的整体稳定性。胃肠外给药可借助注射器 (任选笔式注射器) 经皮下、肌内、腹膜内或静脉内注射进行。或者, 胃肠外给药可通过输注泵进行。另一种选择是可为溶液剂或混悬剂的组合物, 用于以经鼻或经肺喷雾形式给予蛋白质。作为又一个选择, 药物组合物还可适于透皮 (例如通过无针注射或由贴剂、任选离子导入贴剂) 或跨黏膜 (例如含服) 给予。

[0136] 本文所用术语“治疗”是指有此需要的任何人或其它动物受试者的医学治疗。预期所述受试者已由医学从业者进行身体检查, 所述医学从业者给出临时诊断或明确诊断, 表明所述特定治疗有益于所述人或其它动物受试者的健康。所述治疗的时机和目的视受试者的健康现状而在个体中彼此不同。因此, 所述治疗可以是预防性的、治标性的、针对症状的和 / 或治疗性的。

[0137] 因此按照第一方面, 本发明涉及重组蛋白质, 其中所述蛋白质与至少一个疏水侧基共价缀合, 其中所述疏水侧基通过唾液酸与所述蛋白质连接。疏水侧基任选通过接头与蛋白质缀合。

[0138] 在一个实施方案中, 蛋白质是凝血因子, 例如 FVII (FVII(a))、FVIII 或 FIX。在另一个实施方案中, 蛋白质是抗体的抗原结合片段。

[0139] 在本发明一个优选的实施方案中, 疏水侧基 (“白蛋白结合剂”) 选自以下一种或多种: 脂肪酸和脂肪二酸。在另一个优选的实施方案中, 疏水侧基通过唾液酸与因子 VIII 连接。在另外又一个优选的实施方案中, 因子 VIII 分子包含至少一个聚糖, 其中所述至少一个聚糖与唾液酸连接, 且其中所述唾液酸与疏水侧基连接。

[0140] 在本发明特别引人关注的实施方案中,因子 VIII 分子具有调节的、优选降低的 vWF 结合能力。在又一个引人关注的实施方案中,因子 VIII 分子是 B 结构域截短的变体,优选包含具有 SEQ ID NO 4 所示序列的 B 结构域接头。按照一个特别优选的实施方案,疏水侧基与位于因子 VIII 分子的截短 B 结构域中的 O- 聚糖共价缀合,其中因子 VIII 活化导致脱去疏水侧基。在另一个实施方案中,B 结构域中的 O- 聚糖与亲水聚合物(例如 PEG、HES 或 PSA)或肽(例如白蛋白)共价缀合。如果类似于 SEQ ID NO 4 所示 B 结构域的 B 结构域中的 O- 联聚糖与亲水聚合物缀合,则一个或多个疏水侧链优选与 N- 联聚糖缀合,反之亦然。还可采用化学或酶促方法,使亲水聚合物通过 N- 联聚糖和 / 或 O- 联聚糖上的唾液酸与 FVIII 缀合。还可采用本领域已知的其它方法,使亲水聚合物与所述分子缀合。

[0141] 在本发明又一个引人关注的实施方案中,因子 VIII 多肽与另一种多肽例如 Fc 结构域(优选效应子功能降低和 / 或对新生儿 Fc 受体的亲和力提高的突变 Fc 结构域)或抗体结合蛋白融合。

[0142] 另一方面涉及制备本发明分子的方法,其中所述方法包括使疏水侧基与重组因子 VIII 分子连接。在一个优选的实施方案中,疏水侧基通过唾液酸转移酶催化的反应连接。在一个特别优选的实施方案中,唾液酸转移酶选自:ST3Gal-I 和 ST3Gal-III。在又一个实施方案中,唾液酸转移酶是 ST6GalNAc-I。此外,本发明尤其涉及通过这类方法获得的或可获得的分子。优选酶促方法不采用有机溶剂的任何添加,但在不显著降低这类反应的效率的情况下可能加入痕量(即小于 1%)。

[0143] 第三方面涉及治疗血友病、炎性疾病或癌症的方法,所述方法包括给予有此需要的患者治疗有效量的本发明分子。

[0144] 本发明第六方面涉及通过本发明的方法可获得的或获得的蛋白质。

[0145] 第七方面涉及本发明的分子用于治疗血友病、炎性疾病和癌症的用途。

[0146] 最后一方面涉及包含本发明分子的药物组合物。

[0147] 缩略语:

[0148] CV = 柱体积

[0149] FLD = 荧光检测

[0150] MQ = MilliQ 水(高纯水)

[0151] m/z = 质荷比

[0152] MS = 质谱法

[0153] HPLC = 高压液相色谱法

[0154] RP = 反相

[0155] LC-MS = 液相色谱 - 质谱法

[0156] NMR = 核磁共振光谱法

[0157] rt 或 RT = 室温

[0158] Boc = 叔丁氧基羰基

[0159] O-*t*-Bu = 叔丁酯

[0160] *t*-Bu = 叔丁基

[0161] CMP = 胞苷一磷酸

[0162] DCM = 二氯甲烷, CH₂Cl₂, 亚甲基氯

- [0163] DIC = 二异丙基碳二亚胺
- [0164] DIPEA = N,N-二异丙基乙胺
- [0165] DMF = N,N-二甲基甲酰胺
- [0166] DMSO = 二甲亚砜
- [0167] Fmoc = 9H-芴-9-基甲氧基羰基
- [0168] Lys(Mtt)-OH = (S)-6-[(二苯基-对甲苯基-甲基)氨基]-2-氨基-己酸
- [0169] Thx = 反式-4-氨基甲基环己烷甲酸
- [0170] GSC:甘氨酸基唾液酸 CMP 酯
- [0171] MBP:甘露糖结合蛋白
- [0172] NAN = N-乙酰基神经氨酸
- [0173] NMP = N-甲基吡咯烷-2-酮
- [0174] OEG = (2[2-(氨基)乙氧基]乙氧基)乙酸
- [0175] TFA = 三氟乙酸
- [0176] THF = 四氢呋喃
- [0177] TIPS = 三异丙基硅烷
- [0178] UM = 4-甲基伞形基 (Methylumbelliferyl)
- [0179] Lac = 乳糖酰基或乳糖
- [0180] HC:重链
- [0181] LC:轻链
- [0182] SC:单链 (HC 和 LC 共价连接)
- [0183] PSC:聚乙二醇唾液酸 CMP 酯
- [0184] wt:野生型
- [0185] 氨基酸缩写按照 IUPAC 惯例。
- [0186] 缓冲液缩写按照 Stoll, V. S. 和 Blanchard, J. S., *Methods of Enzymology*, 182, 1990, Academic Press, 24-38。

实施例

[0187] 通用方法

[0188] HPLC

[0189] 在使用 Agilent Zorbax 或 Vydac C18 二氧化硅柱 (通常 4.6mm x 50mm, 5 μ m, 300 Å) 的 Agilent 1100 系统中进行 RP-HPLC 分析。通过 214 nm 和 280 nm 下的 UV 进行检测。使用合适梯度的标准水 /0.1% TFA (A) 和乙腈 /TFA (B) 缓冲液进行洗脱。

[0190] 采用类似于分析型系统的梯度和 2 或 5 cm C18 柱,在 Waters 系统 (2545 梯度泵和 2489 检测器) 或 Gilson 系统 (321 梯度泵, 155 UV/VIS 检测器和 GX-271 液体处理器) 中进行制备型 RP-HPLC。在一些情况下,利用分别使用 10 mM NH_4HCO_3 (aq) 和 90% 乙腈与 10% 10 mM NH_4HCO_3 (aq) 作为 A 缓冲液和 B 缓冲液的中性系统。

[0191] LC-MS

[0192] 在配备两个 Perkin Elmer Series 200 微型泵、Perkin Elmer Series 200 自动进样器、Applied Biosystems 785A UV 检测器的 PE-Sciex API 150 质谱仪上进行 LC-MS 分

析。使用与用于 HPLC 系统一样的缓冲液,在室温以 1.5 ml/ 分钟洗脱 Waters Xterra 3.0 mm x 50 mm 5 μ C-18 二氧化硅柱。其用 5% B 缓冲液平衡,用 5% B 缓冲液洗脱 1.0 分钟,然后用 5-90% B 缓冲液的线性梯度在 7 分钟内洗脱。通过 214 nm 的 UV 检测和总离子流进行检测。将柱洗出液流分引入 PE-Sciex API 100 质谱仪的离子喷雾界面。在运行期间每 2 秒钟对质量范围 100-800 amu 进行扫描。

[0193] 蛋白质纯化

[0194] 在 Äkta Explorer 色谱系统和来自 GE Health Care 的柱中进行蛋白质色谱。

[0195] 按照 GE Healthcare 说明书 71-7006-00 AT,使用通过将 6- 一脱氧 -6- 一氨基 - β - 环糊精 (Sigma 产品 M2314) 固定在 NHS Hitrap 柱 (GE Healthcare, CV 1 ml, 产品 17-0716-01) 上制备的柱,来进行环糊精亲和色谱。使用 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、150 mM NaCl (pH 7.3)、10% 甘油作为起始缓冲液,和 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、150 mM NaCl (pH 7.3)、10% 甘油、20 mM 羟丙基环糊精作为洗脱缓冲液,进行色谱。

[0196] SDS-PAGE

[0197] 使用 NuPAGE 7% Tris- 乙酸酯凝胶 (Invitrogen) 进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。按照 M. M. Kurfurst, *Anal. Biochem.* 200 (2):244-248, 1992 中所述,对凝胶进行考马斯染色 (Invitrogen LC6065) 或银染 (SilverQuest 染色试剂盒, Invitrogen)), 并且适当时还用碘化钡对 PEG 进行染色。

[0198] 在 LDS 处理前, FVIII 和 FVIII- 缀合物的样品任选用凝血酶 (2 μ l, 20 U/ml, 每个样品 1 μ l) 处理。与凝血酶的温育在 37°C 下进行 10 分钟。然后,按照标准 SDS PAGE 方法处理样品。在这些分析中,对应于凝血酶的条带出现在凝胶的低分子量范围内。

[0199] 蛋白质浓度测定

[0200] 通过消光系数为 14.6 (1%) 的 UV 测量 (A280), 测定 FVIII 和 FVIII- 缀合物的浓度。或者,适当时,采用 HPLC 方法。使用 Grace Vydac (Mikrolab, Aarhus, Denmark) 214TP5215 C4 柱 (2.1 x 150 mm), 粒径 5mm, 200 mL/ 分钟的流速,在 Agilent 1100 系统中于 40°C 进行分析。溶剂为 0.07% 三氟乙酸 (TFA)/Milli-Q 水 (溶剂 A) 和 0.1% TFA/ 乙腈 (溶剂 B)。因子 VIII 蛋白用 40%-55% 溶剂 B 的线性梯度在 60 分钟内洗脱。通过对 HPLC 色谱图中的面积积分,并与因子 VIII 标准品进行比较,来确定各个样品的蛋白质浓度。在 6N HCl 中于 110°C 水解 24 小时后,通过氨基酸分析,测定标准品中的因子 VIII 浓度。基本上按照生产商所述,使用荧光标记,在 HP1100 HPLC 中对样品进行分析 (Agilent Technologies, 注释 5968-5658E)。

[0201] 用于实验的 GSC 原材料。GSC (甘氨酰基唾液酸胞嘧啶 5'-一磷酸酯) 获自 Albany Molecular Research Inc., 按照分析型 HPLC 为 74% 纯度 (Zorbax C18 4.6x50mm; A:10 mM 碳酸氢铵水溶液; B:90% 乙腈 + 10% A; 流速:1 ml/ 分钟, 梯度:0-100%B, 16 分钟内, 40°C 烘箱温度, UV (214 nm, 280 nm) 检测; GSC:Rt = 0.5 分钟)。

[0202] 实施例 1

[0203] 重组 B 结构域截短的 O-糖基化因子 VIII 的产生

[0204] 细胞系和培养方法

[0205] 使用因子 VIII cDNA, 构建哺乳动物表达质粒。质粒编码 B 结构域缺失的因子 VIII、包含全长人因子 VIII 的氨基酸 1-740 的因子 VIII 重链、包含全长人因子 VIII 的氨基

酸 1649-2332 的因子 VIII 轻链（该分子在本文可称为“N8”，参见 Thim 等，Haemophilia (2010) 16, 349）。重链和轻链序列通过 21 个氨基酸接头（SFSQNSRHPSQNPPVLKRHR-SEQ ID NO 4）连接，所述接头包含全长人因子 VIII 的氨基酸 741-750 和 1638-1648 的序列。中国仓鼠卵巢（CHO）细胞用质粒转染，用二氢叶酸还原酶系统选择，最终产生在无动物组分的培养基中培养的克隆悬液生产细胞（producer cell）。

[0206] 该方法第一步是细胞小瓶的接种，从工作细胞库小瓶接种到化学上确定且无动物组分的生长培养基中。最初在融化后，将细胞在 T 培养瓶中孵育。融化后 1 天或 2 天，将细胞转移至摇瓶中，通过连续稀释扩大培养物体积，以保持细胞密度在 $0.2-3.0 \times 10^6$ 个细胞/ml 之间。下一步将摇瓶培养物转移到种子生物反应器中。在此进一步扩大培养物体积后，最终转移到生产生物反应器中。所有接种物扩大步骤都使用相同的化学上确定且无动物组分的培养基。在转移到生产生物反应器后，向培养基中补充增加产物浓度的组分。在生产生物反应器中，以 3 天的循环时间，用重复的批量生产来培养细胞。收获时，将 80-90% 的培养物体积转移到收获槽中。其余培养液然后用新鲜培养基稀释，以获得初始细胞密度，然后开始新的生长期。收获批次通过离心澄清，过滤并转移到存储槽，然后开始纯化过程。将缓冲液加入存储槽中的无细胞收获物中以稳定 pH。

[0207] 在生产运行结束时，收集细胞，冷冻，以结束生产细胞库。测定该细胞库的支原体、无菌度和病毒污染。

[0208] 纯化

[0209] 为了从细胞培养基中分离出 B 结构域缺失的因子 VIII（Y1680F），采用 4 步纯化法，包括 Capto MMC 柱上的浓缩步骤、免疫吸附色谱步骤、阴离子交换色谱步骤和最后的凝胶过滤步骤。通常采用以下方法：将 11 升除菌过滤的培养基以 15 ml/ 分钟的流速泵入在以下缓冲液 A 中平衡的 Capto MMC（GE Healthcare, Sweden）的柱（1.6 x 12 cm）中：20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、50 mM NaCl、0.02% 吐温 80，pH = 7.5。柱用 75 ml 缓冲液 A 洗涤，接着用 75 ml 含有 1.5 M NaCl 的缓冲液 A 洗涤。将蛋白质用 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% 吐温 80、2.5 M NaCl、8 M 乙二醇（pH = 7.5）以 1 ml/ 分钟的流速洗脱。收集 8 ml 的流分，测定因子 VIII 活性（显色测定法）。合并含有因子 VIII 的流分，通常获得约 50 ml 的合并体积。

[0210] 已开发出抗因子 VIII 的单克隆抗体（Kjalke Eur J Biochem 234 773）。通过表位作图（结果未显示），发现该抗体 F25 识别重链从氨基酸残基 725 到 740 的远 C 端序列。基本上按照生产商所述，以 2.4 mg/ml 凝胶的密度将 F25 抗体与 NHS 活化的琼脂糖凝胶 4 FF（GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden）偶联。将之前步骤的合并物用 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% 吐温 80（pH = 7.3）稀释 10 倍，并以 0.5 ml/ 分钟的流速，加到用 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、150 mM NaCl、0.02% 吐温 80、1 M 甘油（pH = 7.3）平衡的 F25 琼脂糖凝胶柱（1.6 x 9.5 cm）上。柱用平衡缓冲液洗涤直到 UV 信号恒定，然后用 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.65 M NaCl（pH = 7.3）洗涤，直到 UV 信号再次恒定。因子 VIII 用 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% 吐温 80、2.5 M NaCl、50% 乙二醇（pH = 7.3）以 1 ml/ 分钟的流速洗脱。收集 1 ml 的流分，测定因子 VIII 活性（显色测定法）。合并含有因子 VIII 的流分，通常获得约 25 ml 的合并体积。

[0211] 制备缓冲液 A：20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% 吐温 80、1 M 甘油（pH = 7.3）和缓

冲液 B:20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% 吐温 80、1 M 甘油、1 M NaCl (pH = 7.3) 用于离子交换步骤。Macro-Prep 25Q Support (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 的柱 (1 x 10 cm) 用 85% 缓冲液 A/15% 缓冲液 B 以 2 ml/ 分钟的流速平衡。之前步骤的合并物用缓冲液 A 稀释 10 倍, 并以 2 ml/ 分钟的流速泵入柱中。柱用 85% 缓冲液 A/15% 缓冲液 B 以 2 ml/ 分钟的流速洗涤, 并且在 120 ml 内以 2 ml/ 分钟的流速, 用从 15% 缓冲液 B 至 70% 缓冲液 B 的线性梯度洗脱因子 VIII。收集 2 ml 的流分, 测定因子 VIII 活性 (显色测定法)。合并含有因子 VIII 的流分, 通常获得约 36 ml 的合并体积。

[0212] 将之前步骤的合并物加到已平衡的 Superdex 200, 制备级 (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) 柱 (2.6 x 60 cm) 中, 并以 1ml/ 分钟用 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% 吐温 80、1 M 甘油、150 mM NaCl (pH = 7.3) 洗脱。收集 3 ml 的流分, 测定因子 VIII 活性 (显色测定法)。合并含有因子 VIII 的流分, 通常获得约 57 ml 的合并体积。将含有因子 VIII 的合并物保存在 -80°C 。

[0213] 利用上述 4 步纯化法, 经显色活性和 ELISA 测量判断, 得到约 15% 的总收率。

[0214] 在实施例 1 中得到的重组 N8 因子 VIII 分子在 B 结构域中具有一个 O- 联聚糖 (参见 Thim 等, Haemophilia (2010) 16, 349)。疏水侧基与该 O- 聚糖特异性连接, 因此能够产生具有均一结构的分子。此外, 在分子活化时, 脱去 B 结构域和疏水侧链, 活化分子因此具有类似于活化内源性因子 VIII 的结构。

[0215] 实施例 2

[0216] C-16 脂肪二酸 γ -Glu NHS 酯与 GSC 偶联得到唾液酸转移酶底物 1

[0217]



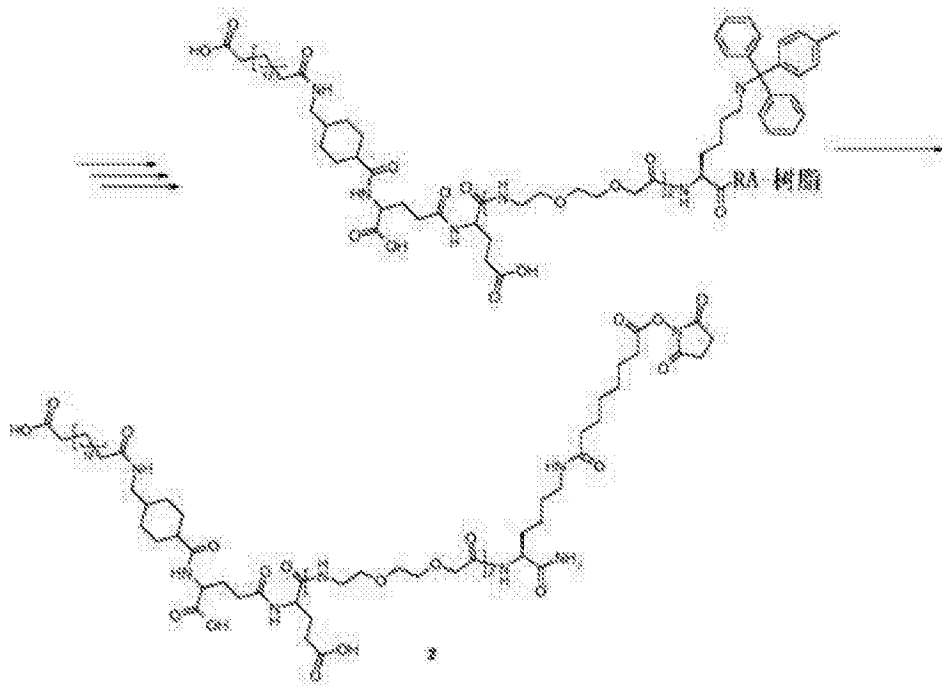
[0218] 将 GSC (甘氨酸基唾液酸 CMP 酯) (7.5 mg, 11 μmol) 溶于 TRIS 缓冲液 (100 mM, pH 8.4, 50 μl) 和乙腈 50 μl 的混合物中。得到两相系统。将 C-16 脂肪二酸 γ -Glu NHS 酯 (7 mg; 有关类似物 C-18 化合物的制备参见 WO 2005/012347 A2 实施例 5) 溶于 THF (50 μl) 中, 然后加入 TRIS- 缓冲液 (50 μl), 得到澄清溶液。将该溶液加到 GSC 的溶液中。得到澄清溶液。在约 4 小时反应时间后, 真空浓缩样品以除去大部分有机溶剂, 然后在 -20°C 下冷冻。产物 (1) 通过 HPLC 和 LC-MS 鉴定。

[0219] 采用中性缓冲液系统和 C4 Jupiter 10x250 cm 柱, 通过 RP-HPLC 纯化。流速 5 ml/ 分钟, 梯度 2% B 缓冲液 / 分钟。收集含有产物 1 的后期洗脱流分。将流分浓缩至干燥。尽管相对良好地保留在 C4 柱上, 但产物显示完全的水溶性, 并再次溶于 10 mM NH_4HCO_3 。使用 GSC 作为标准品, 通过在 272 nm 下的 UV 测量 (CMP 基团), 确定溶液中的产物浓度为 4.1 μM 。产量 4.2 mg (50%)。通过 LCMS 证实产物身份。将产物溶液保存在 -20°C 。

[0220] 采用上述方案, 制备携带疏水侧链的唾液酸转移酶底物。底物 1 被证实在水性缓冲液中完全溶解。

[0221] 实施例 3. 白蛋白结合剂 NHS 酯 2 的制备

[0222]



[0223] 在 CEM Liberty 微波肽合成仪上,将 Rink- 酰胺树脂 (Novabiochem, 0.4 g, 0.25 mmol) 用于合成。采用标准 Fmoc 化学方案,且按该顺序使用下列所用氨基酸 (所有溶液具有在含有 0.3 M HOAt 的 NMP 中的 7 当量氨基酸):

[0224] 1. Fmoc-Lys(Mtt)-OH: 1.12 g/6 ml

[0225] 2. Fmoc-OEG-OH: 1.39 g/12 ml (2 次偶联)

[0226] 3. Fmoc-Glu-OtBu: 0.77 g/6 ml

[0227] 4. Fmoc-Thx-OH: 0.68 g/6 ml

[0228] 5. C-16 二酸单叔丁酯 (参见 WO 2005/012347 A2 实施例 4): 0.62 g/6 ml

[0229] 所有偶联通过加入 DIC 7 eq 进行。

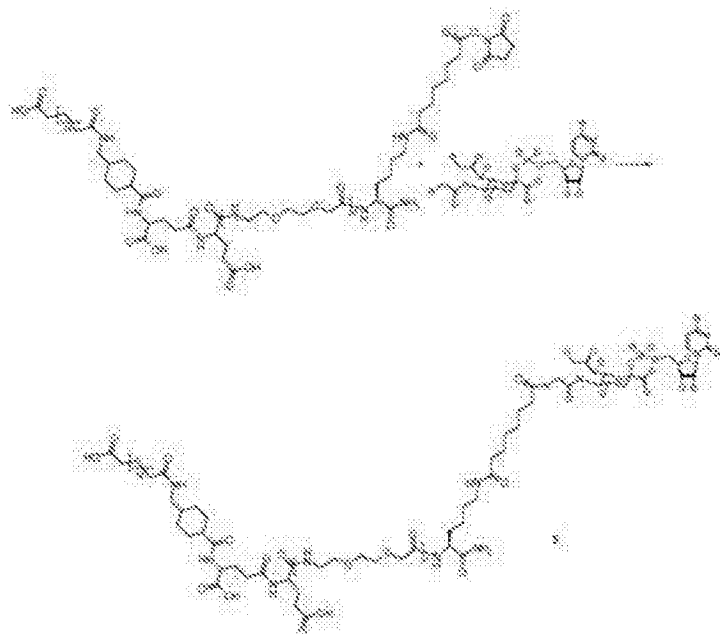
[0230] 在这些偶联后,将树脂从 Liberty 合成仪上除去并洗涤,排干,并用 5 ml 六氟异丙醇处理 10 分钟。树脂然后用 DCM 洗涤,排干。然后,重复六氟异丙醇处理和 DCM 洗涤。

[0231] 将辛二酸双-NHS 酯 (368 mg) 溶于 NMP (10 ml, 含有 0.5 mM 溴酚蓝) 中,加入 DIPEA (170 μ l)。将该溶液加到排干的树脂中,使之反应过夜。偶联后,树脂用 NMP 洗涤并且然后用 DCM 洗涤,并排干。向排干的树脂中加入 TFA:TIPS: 巯基乙醇:H₂O 94:1:2.5:2.5 的混合物,将树脂在环境温度下振荡 2 小时。将树脂慢慢排干到 75 ml 冰冷的乙醚中,得到产物沉淀。在室温下再搅拌 0.5 小时并离心,得到固体产物,将其用乙醚洗涤两次并真空干燥。将粗产物溶于 HPLC A 缓冲液和 B 缓冲液的混合物中,通过制备型 RP-HPLC 纯化。通过 HPLC 和 LCMS 证实产物身份和纯度。

[0232] 采用上述方案,制备极复杂的白蛋白结合侧链作为 NHS 酯。将该化合物准备与实施例 4 中的 GSC 反应。

[0233] 实施例 4. NHS 酯与 GSC 偶联得到底物 3

[0234]

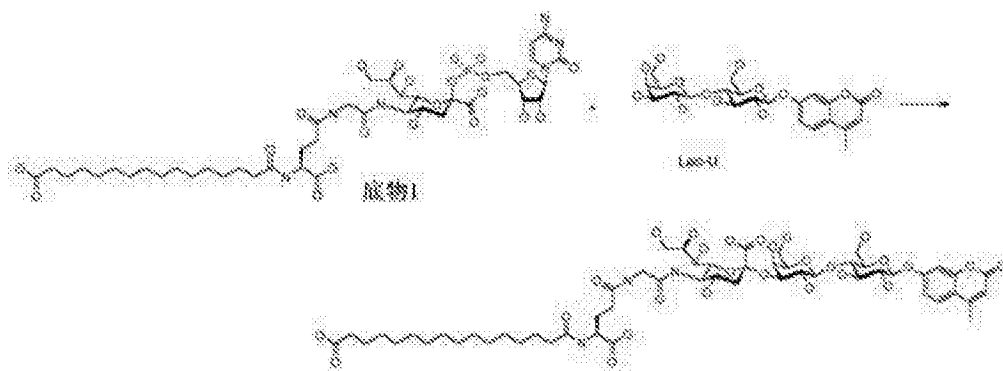


[0235] 将实施例 3 的 NHS 酯 2 (20 mg) 溶于 THF (500 μ l) 中,加入 TRIS 缓冲液 (100 mM, pH 8.4, 1500 μ l)。称取 GSC (20 mg), 加入 NHS 酯的溶液中,并使之在室温下反应 30 分钟的时间。反应混合物用 MQ- 水稀释至 4 ml, 并通过 RP HPLC 纯化,如实施例 2 所述。梯度 10 $\rightarrow$ 50% B 缓冲液。相关流分通过 LCMS 鉴定并冻干。产物再次显示极好的水溶性。产量:7.7 mg。产物通过 LCMS 鉴定。

[0236] 采用上述方案,制备携带复杂白蛋白结合疏水侧链的唾液酸转移酶底物。证明底物 3 完全溶于水性缓冲液中。

[0237] 实施例 5. 底物 1 与荧光标记的乳糖偶联

[0238]



[0239] 用于反应的试剂:

[0240] 缓冲液:HEPES 100 mM, pH 7.5

[0241] 酶: α 2, 3-(N)-唾液酸转移酶 (大鼠), 获自 CalBiochem, 目录号 566218。将酶在缓冲液中稀释, 在 10 kDa Millipore Biomax 超滤装置中浓缩约 10 倍: 将 100 μ l 分装在每个装置中, 在室温下以 12,000 G 离心 2 + 6 分钟。最终体积约 8-10 μ l (每个), 浓度 1700 mU/ml。12.5 mU, 7.5 μ l 用于反应

[0242] 受体:Lac-MM。溶液 0.5 mg/ml (1 mM)/TRIS 50 mM (pH 7.4) + 1 mM CaCl_2 。将 2.5 μ l (2.5 nmol) 的体积用于各反应

[0243] 供体,底物 1:12.5 nmol,3 μ l 用于各反应

[0244] 对照供体,CMP-NAN,1.4 mg,即 2.2 μ mol/540 μ l HEPES pH 7.5 :4.1 mM。12.5 nmol 用于各反应,即 3 μ l

[0245] 2 个反应在 Eppendorf 管中进行,接着进行 RP HPLC。采用下列 HPLC 方法:柱 C18 2.1x50 mm,缓冲液:A:纯净水,B:无水 MeCN,流速:0.2 ml/分钟,柱温:40℃。检测 UV:214 和 254 nm,FLD:激发:315 nm,发射:375 nm。根据 FLD 迹线(trace)对反应物进行量化。

[0246] 反应 1:受体 + 供体 + 酶。在 20 小时时间后,该反应生成产物的转化率达到 81%。产物通过 LCMS 证实。

[0247] 反应 2:受体 + 对照供体 + 酶。在 20 小时时间后,该反应生成产物的转化率达到 97%。

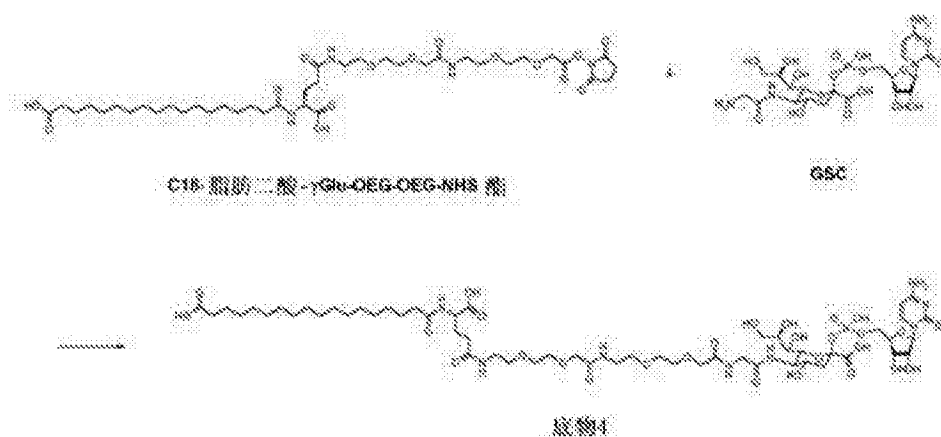
[0248] 在 20 小时后,不含酶的对照反应无产物形成。

[0249] 该反应用来验证底物 1 作为供体在唾液酸转移酶催化的偶联反应中与作为受体的荧光标记的乳糖(Gal-Glc,其是脱唾液酸-蛋白质聚糖上末端 GalNAc-Glc 二糖的模拟物)反应的能力。所有反应在水性缓冲液中进行。

[0250] 实施例 6

[0251] C18-脂肪二酸 γ Glu-OEG-OEG NHS 酯与 GSC 偶联得到唾液酸转移酶底物 4

[0252]

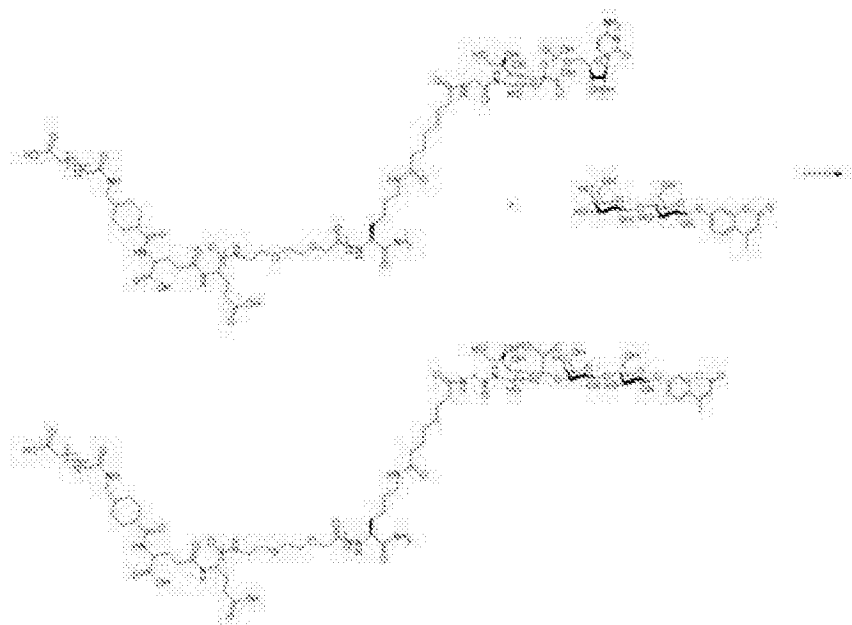


[0253] 将 17-((S)-1-羧基-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-二氧代-吡咯烷-1-基氧基羰基甲氧基)-乙氧基]乙基氨甲酰基}甲氧基)乙氧基]乙基氨甲酰基}丙基氨甲酰基)十七酸(300 mg;0.36 mmol,有关该化合物的制备参见 WO 2009/115469 A1)溶于 THF (6ml)和 100 mM HEPES 缓冲液 pH 7.5 (4.5 ml)的混合物中。加入在 THF (4.5 ml)和 100 mM HEPES 缓冲液 pH 7.5 (6 ml)的混合物中的 GSC (甘氨酸基唾液酸胞嘧啶 5'-一磷酸酯,252 mg;0.397 mmol)溶液。将反应混合物温育 1 小时。HPLC 表明 GSC 原材料完全转化。通过在制备型 HPLC 中运行数次对反应混合物进行纯化(C18 50x200 mm;A:水;B:乙腈;C:100 mM 碳酸氢铵水溶液;流速:50 ml/分钟;梯度:90(A):0(B):10(C)等度洗脱 8 分钟,然后在 40 分钟内线性变成(change linearly to) 60(A):30(B):10(C);底物 4: R_t = 36 分钟)。通过分析型 HPLC 对流分进行分析。合并纯流分,冻干以除去碳酸氢铵。通过将冻干粉溶于水,使之通过 Dowex 50W X2 短柱,使铵反离子与钠阳离子交换,呈其钠形式。将水性洗出液再次冻干,得到总共 278 mg 的底物 4。LC-MS (电喷雾) API3000 (300-2000): R_t = 3.98 分

钟, $m/z = 1345$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO; 400MHz; 选定峰): δ 1.22 ppm (bs; 28H); 1.40 (bs, 4H); 1.72 (m, 1H); 1.86 (m, 1H); 2.07 (m, 4H); 5.75 (m, 2H); 6.77 (bs, 1H); 7.02 (bs, 1H); 7.23 (bs, 1H); 7.55 (m, 1H); 7.68 (m, 1H); 7.95 (s, 1H); 8.48 (s, 1H)。

[0254] 实施例 7. 底物 3 与荧光标记的乳糖偶联

[0255]



[0256] 受体: Lac-MM, 溶液 0.5 mg/ml (1 mM)/TRIS-缓冲液 (50 mM, pH 7.4 + 1 mM CaCl_2)。2.5 μl (2.5 nmol) 用于各反应

[0257] 酶: 大鼠 MBP-ST3Gal-III, 1.06 U/mg; 0.9 mg/ml, (0.954 mU/ μl), 2.6 μl (2.5 mU) 用于各反应 (有关酶的参考文献, 参见例如 US 7220555 B2)

[0258] 供体, 底物 3: 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的咪唑缓冲液, 10 μl (13.4 nmol) 用于各反应

[0259] 对照供体: CMP-NAN, 1.4 mg, 4.1 mM HEPES 缓冲液

[0260] 反应 1: 受体 (2.5 μl) + 供体 (10 μl) + 酶 (2.6 μl)

[0261] 反应 2: 受体 (2.5 μl) + 对照供体 (4 μl) + 酶 (2.6 μl)

[0262] 反应 3: 受体 (2.5 μl) + 供体 (10 μl) (无酶)

[0263] 3 个反应在微量 eppendorf 管中进行, 将受体 + 供体 + 酶混合, 并在 37°C 下温育。

[0264] 使用以下 HPLC 方法, 通过 HPLC 监测反应: 柱: C18 2.1x50 mm, 缓冲液: A: 0.1%TFA/水, 1:0.1%TFA/MeCN, 流速: 0.2 ml/分钟, 柱温: 40°C, DAD: 214 和 254 nm, FLD: 激发: 315 nm, 发射: 375 nm

[0265] 结果:

[0266] 反应 1: 2 小时后几乎完全转化成产物。

[0267] 反应 2: 1 小时后完全转化成产物。

[0268] 反应 3: 无反应

[0269] 通过 LCMS 鉴定产物

[0270] 该反应用来验证底物 3 作为供体在唾液酸转移酶催化的偶联反应与作为受体的荧光标记的乳糖 (Gal-Glc, 其是脱唾液酸-蛋白质聚糖上末端 GalNAc-Glc 二糖的模拟

物)反应的能力。所有反应在水性缓冲液中进行。

[0271] 实施例 8. 使用 ST3Gal-III 使底物 1 与 wt B 结构域缺失的 FVIII (“N8”) 的 N-聚糖偶联

[0272] wt B 结构域缺失的 FVIII: 0.3 mg, 在 150 μ l 缓冲液 (20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% 吐温 80、500 mM NaCl、1 M 甘油, pH 7.3) 中

[0273] 唾液酸酶/神经氨酸酶: 60 μ l (大约 72 mU) (产气荚膜梭状芽胞杆菌 (*C. perfringens*), VI-A 型, N-5254, 得自 Sigma, 0.6-1.8 U/ml 凝胶) 在琼脂糖 (悬液) 中

[0274] 底物 1: 4 μ l, 4.1 mM, 16 nmol, 在 10 mM NH_4HCO_3 中

[0275] ST3Gal-III: 300 μ l (0.9 mg/ml)。与实施例 7 中所用相同的批次

[0276]

	MW/活性	量
FVIII	178.400 Da	0.15 mg, 0.84 nMol
唾液酸酶	0.6-1.8 U/ml 凝胶	60 ml, 大约 72 mU
底物 1	4.1 mM	20 nmol
ST3Gal-III	0.9 mg/ml; 1.06 U/mg	300 mU, 大约 95mU

[0277] 将唾液酸酶在微型过滤装置中洗涤用于离心 (Pierce): 两次用水 2 X 200 μ l, 然后三次用缓冲液 (HEPES, 100 mM pH 7.5)。最后, 使之排干。加入 FVIII (0.3 mg, 在约 150 μ l 缓冲液中) 并混合。每 15 分钟, 反应物用吸管混合。3 小时反应后, 将混合物过滤, 取样品用于 SDS PAGE 分析。滤液的一半用于进一步反应 (70 μ l)。使用 10 kDa Millipore Biomax 超滤装置使 ST3Gal-III (300 μ l) 浓缩至大约 30 μ l: 12.000 g 达大约 6 分钟)。将底物 1 (4 μ l) 和 ST3Gal-III (10 μ l 的浓缩材料) 加到滤液中。将混合物在 32°C 下温育。1 小时后和 23 小时后, 取出样品用于 SDS PAGE。

[0278] 样品 (未还原) 的 SDS PAGE 分析

[0279] 1 μ l 样品用 100 μ l FVIII 缓冲液稀释。在用或不用凝血酶的在先处理的情况下, 从各样品中取出 2 x 25 μ l 用于分析。

[0280] 凝胶通过 SilverQuest 染色

[0281] 泳道 (2-5 和 7-12 分别用或不用凝血酶处理):

[0282] 2: wt B 结构域缺失的 FVIII: 2 条强的条带对应于 HC 和 LC, 一条较不强的条带对应于 SC

[0283] 3: 3 小时后与唾液酸酶的反应混合物: 与泳道 1 相同。

[0284] 4 和 5: 1 小时和 23 小时后与底物 1 和 ST3Gal-III 的反应混合物: 与泳道 2 相同, 但额外的条带对应于 ST3-Gal-III。

[0285] 7: wt B 结构域缺失的 FVIII: 系列条带对应于 LC' (A3C1C2 结构域)、A1 和 A2。

[0286] 8: 3 小时后与唾液酸酶的反应混合物: 与泳道 7 相同

[0287] 9 和 10: 1 小时和 23 小时后与底物 1 和 ST3Gal-III 的反应混合物。与泳道 7 和 8 非常相似, 但注意 A1 和 A3C1C2 条带稍微偏向较高分子量移动, 对应于用底物 1 的脂肪酸部分的修饰。

[0288] SDS-PAGE 凝胶分析为以下提供证据: 1-4 个基团 C16- γ Glu-唾液酸与 wt B 结构域缺失的 FVIII 的脱唾液酸-N-聚糖连接。

[0289] 该实施例表明, 底物 1 可与 FVIII 偶联。意想不到的是, 含有极疏水性脂肪酸的底

物是任意水溶性的,并且易于在缓冲液中处理。

[0290] 实施例 9. 通过与底物 1 和 ST3Gal-III 反应制备 N-聚糖修饰的 wt B 结构域缺失的 FVIII (“N8”): 化合物 5

[0291] 脱唾液酸 wt B 结构域缺失的 FVIII (1 mg, 5.6 nmol, 在 800 μ l 缓冲液组氨酸 (1.5 mg/ml)、CaCl₂ (0.25 mg/ml)、吐温 80 (0.1 mg/ml)、NaCl (500 mM)、蔗糖 (3 mg/ml) 中) 用 ST3Gal-III (500 μ l, 浓缩至 50 μ l, 500 mU) 和底物 1 (20 μ l, 80 nmol) 处理。将反应物在 32°C 下温育 22 小时。从 SDS PAGE 分析中取出样品。然后, 加入 CMP-NAN (2 mg, 3.1 μ mol 在 20 μ l 缓冲液 (20 mM 咪唑、10 mM CaCl₂、0.02% 吐温 80、500 mM NaCl、1 M 甘油, pH 7.3) 中的溶液), 在 32°C 下温育 1 小时。

[0292] 用约 18 ml 20 mM 咪唑、10 mM CaCl₂、0.02% 吐温 80、1 M 甘油 (pH 7.3) 将反应混合物稀释至 19 ml。盐浓度因此约为 28 mM。将溶液加样到自旋 AIEC 柱 (Vivapure Q Mini M, 强阴离子交换) 中, 该柱已用 10 ml 20 mM 咪唑、10 mM CaCl₂、0.02% 吐温 80、1 M 甘油 (pH 7.3) 平衡。然后, 柱用以下溶液洗涤:

[0293] 1. 2x10 ml 的 20 mM 咪唑、10 mM CaCl₂、0.02% 吐温 80、1 M 甘油 (pH 7.3),

[0294] 2. 2x10 ml 的 20 mM 咪唑、10 mM CaCl₂、0.02% 吐温 80、1 M 甘油 (pH 7.3)、50mM NaCl

[0295] 3. 2x10 ml 的 20 mM 咪唑、10 mM CaCl₂、0.02% 吐温 80、1 M 甘油 (pH 7.3)、200 mM NaCl。

[0296] 最后, FVIII 缀合物用 20 mM 咪唑、10 mM CaCl₂、0.02% 吐温 80、1 M 甘油 (pH 7.3)、1 M NaCl 洗脱。回收 1 ml 的缀合物 (700 μ g)。把它加到 Superdex 200 10/300 GL 凝胶过滤柱上, 用组氨酸 (1.5 mg/ml)、CaCl₂ (0.25 mg/ml)、吐温 80 (0.1 mg/ml)、NaCl (18 mg/ml)、蔗糖 (3 mg/ml) 洗脱。洗出液在约 0.4 柱体积处有一个峰, 另一个峰在约 0.60 柱体积处。第一峰通过 SDS PAGE 鉴定为 ST3Gal-III 酶 (可能呈聚集形式)。第二峰含有缀合物 (5), 分离为 226 μ g/3.5 ml。通过具有在先凝血酶切割的非还原 SDS PAGE 来表征产物, 据此, 对应于含有修饰聚糖的 A1 和 A3C1C2 的条带略偏向较高分子量移动。

[0297] 在该实施例中, 底物 1 与 FVIII 的 N-聚糖偶联, 并且缀合物通过色谱步骤分离。该偶联容易进行。

[0298] 实施例 10. 通过与底物 3 和 ST3Gal-III 反应制备 N-聚糖修饰的 wt B 结构域缺失的 FVIII: 化合物 6

[0299] 将脱唾液酸 wt B 结构域缺失的 FVIII (1 mg, 5.6 nmol, 在 800 μ l 缓冲液组氨酸 (1.5 mg/ml)、CaCl₂ (0.25 mg/ml)、吐温 80 (0.1 mg/ml)、NaCl (500 mM)、蔗糖 (3 mg/ml) 中) 用 ST3Gal-III (500 μ l, 浓缩至 50 μ l, 500 mU) 和底物 3 (45 μ l, 60 nmol) 处理。将反应物在 32°C 下温育 21.5 小时。从 SDS PAGE 分析中取出样品。然后, 加入 CMP-NAN (2 mg, 3.1 μ mol 在 20 μ l 缓冲液 (20 mM 咪唑、10 mM CaCl₂、0.02% 吐温 80、500 mM NaCl、1 M 甘油 (pH 7.3) 中) 的溶液, 在 32°C 下温育 1 小时。

[0300] 将反应混合物用大约 18 ml 20 mM 咪唑、10 mM CaCl₂、0.02% 吐温 80、1 M 甘油 (pH 7.3) 稀释至 19 ml。盐浓度因此大约为 28 mM。然后如实施例 9 所述通过自旋柱 AIEC 纯化产物。回收 1 ml 的缀合物 (820 μ g)。将其加到 Superdex 200 10/300 GL 凝胶过滤柱上, 用组氨酸 (1.5 mg/ml)、CaCl₂ (0.25 mg/ml)、吐温 80 (0.1 mg/ml)、NaCl (18 mg/ml)、蔗

糖 (3 mg/ml) 洗脱。洗出液在约 0.43 柱体积处有一个峰, 另一个峰位于约 0.58 柱体积处。第一峰通过 SDS PAGE 鉴定为 ST3Gal-III 酶 (可能呈聚集形式)。第二峰含有缀合物 (6), 分离为 273 μ g/2.5 ml。通过具有在先凝血酶切割的非还原 SDS PAGE 来表征产物, 据此, 对应于含有修饰的聚糖的 A1 和 A3C1C2 的条带明显偏向较高分子量移动。

[0301] 在该实施例中, 底物 3 与 FVIII 的 N-聚糖偶联, 并且缀合物通过色谱步骤分离。

[0302] 实施例 11. 通过与底物 3 和 ST3Gal-I 反应制备 O-聚糖修饰的 wt B 结构域缺失的 FVIII: 化合物 7

[0303] 将缓冲液 (20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% 吐温 80、1 M 甘油 (pH 7.3)、500 mM NaCl) 中的 wt B 结构域缺失的 FVIII (5.7 mg/ml, 352 μ l, 10.2 nmol) 与唾液酸酶 (产脉节杆菌 (*A. ureafaciens*), 12 μ l, 0.43 mg/ml, 130 U/ml, 参见 Christensen 和 Egebjerg, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 41, 225-231)、HIS-ST3Gal-I (21.6 U/mg, 100 μ l) 和底物 3 (150 μ l, 200 nmol) 混合。将混合物在 32°C 下温育 2.5 小时, 之后通过环糊精亲和色谱法分离缀合的 FVIII。将材料加载到固定化环糊精柱上, 用 18 ml 起始缓冲液洗涤。以步进至 100% 洗脱缓冲液进行洗脱, 由此洗脱的产物为 730 μ g/2.5 ml。产物然后用 CMP-NAN (40 μ l, 34 mg/ml) 和 MBP-SBD-ST3Gal-III (200 μ l, 0.33 mg/ml, 约 0.5 U/ml) 在 32°C 下处理 1 小时, 并冷冻。融化后, 按实施例 9 中所述, 通过自旋柱 AIEC 纯化产物, 用 5 x 350 μ l 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% 吐温 80、1 M 甘油 (pH 7.3)、1 M NaCl 进行最后的洗脱, 得到缀合物 586 μ g/700 μ l。将其加到 Superdex 200 10/300 GL 凝胶过滤柱中, 用组氨酸 (1.5 mg/ml)、 CaCl_2 (0.25 mg/ml)、吐温 80 (0.1 mg/ml)、NaCl (18 mg/ml)、蔗糖 (3 mg/ml) 洗脱。洗出液在 0.58 柱体积处含有一个主峰, 收集该峰, 其含有 348 μ g 的缀合物 (7)/2.5 ml。产物通过非还原 SDS PAGE 表征, 表明对应于含有修饰聚糖的 HC 的条带略偏向较高分子量移动。同样地, 在加入和没有加入 wt B 结构域缺失 FVIII 的分析型环糊精亲和色谱法证实缀合物与环糊精结合, 而 wt B 结构域缺失的 FVIII 不结合。

[0304] 实施例 12. 制备 O-聚糖聚乙二醇化 /N-聚糖疏水侧链修饰的 wt B 结构域缺失的 FVIII: 化合物 8

[0305] 如 W02009/108806 A1 中所述, 使用唾液酸酶 (产脉节杆菌)、ST3Gal-I 和 40 kDa PSC (有关该化合物的描述参见 W0 2007/056191 A2), 对 wt B 结构域缺失的 FVIII (1 mg, 5.6 nmol) 进行聚乙二醇化反应。在反应完成后, 将产物加到 Superdex 200 10/300 GL 凝胶过滤柱上, 用 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% 吐温 80、1 M 甘油 (pH 7.3)、25 mM NaCl 洗脱。含有聚乙二醇化 FVIII 的产物被洗脱成两个部分分离的介于 0.38 和 0.54 柱体积间的峰。如实施例 9 所述, 该合并物通过自旋柱 AIEC (省略步骤 3) 纯化, 最后的洗脱用 3 x 300 μ l 的缓冲液 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% 吐温 80、1 M 甘油 (pH 7.3)、1 M NaCl 进行, 得到聚乙二醇化 FVIII 240 μ g/600 μ l。接着, 产物用 MBP-SBD-ST3Gal-III (125 μ l, 0.33 mg/ml, 约 0.5 U/ml) 和底物 3 (15 μ l, 20 nmol) 处理。将反应混合物在 32°C 下温育 20 小时, 之后加入 CMP-NAN (34 mg/ml, 14 μ l), 使之在 32°C 下反应 1 小时。然后将反应混合物在 -80°C 下冷冻。融化的样品用缓冲液 (25 ml 的 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% 吐温 80、1 M 甘油 (pH 7.3)) 稀释, 并按照实施例 9 中所述在自旋柱 AIEC 上纯化。最后的洗脱用 3 x 250 μ l 的 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% 吐温 80、1 M 甘油 (pH 7.3)、1 M NaCl 进行。将合并物加到 Superdex 200 10/300 GL 凝胶过滤柱上, 用组氨酸 (1.5 mg/

ml)、CaCl₂ (0.25 mg/ml)、吐温 80 (0.1 mg/ml)、NaCl (18 mg/ml)、蔗糖 (3 mg/ml) 洗脱。洗出液在 0.58 柱体积处含有一个峰 (其含有非聚乙二醇化 FVIII) 并且在约 0.43 柱体积处含有两个未分开的峰。早期洗脱出的这两个峰可能为 ST3Gal-III (呈聚集形式), 而后期洗脱出的峰含有所需化合物。收集含有所需化合物 (8) 的具有少量 ST3Gal-III 的流分 (50 μg/2.5 ml), 并且非还原 SDS PAGE 显示 HC 移向较高分子量, 这与 PEG 与 O-聚糖连接一致。具有在先凝血酶切割的非还原 SDS PAGE 显示, 对应于含有修饰聚糖的 A1 和 A3C1C2 的条带移向较高分子量, 这与底物 3 与 N-聚糖连接一致。

[0306] 实施例 13. 脱唾液酸 wt B 结构域缺失的 FVIII

[0307] 经由两个途径, 通过用唾液酸酶处理 wt B 结构域缺失的 FVIII, 获得脱唾液酸 wt B 结构域缺失的 FVIII。第一途径包括用唾液酸酶处理 wt B 结构域缺失的 FVIII, 随即或同时 (一锅法 (one-pot)) 进行唾液酸转移酶介导的偶联 (将 FVIII 的基团修饰为 O-聚糖或 N-聚糖)。这描述于实施例 8、11 和 12。

[0308] 或者, 用下列方法 (实施例 9 和 10), 获得脱唾液酸 wt B 结构域缺失的 FVIII。按照 W02009/108806 A1 中所述, 使用唾液酸酶 (产脉节杆菌)、ST3Gal-I 和 40 kDa PSC, 对 wt B 结构域缺失的 FVIII 进行聚乙二醇化反应。在反应完成后, 通过 AIEC 将 (未聚乙二醇化) 脱唾液酸-FVIII 与聚乙二醇化 FVIII 分离。最后, 使用 MonoQ AIEC 柱, 对脱唾液酸-FVIII 进行缓冲液交换。从 AIEC/82 ml 缓冲液中分离的 37.4 mg 量的脱唾液酸-FVIII 用 MQ 水 (150 ml) 稀释, 得到 12 mS/cm 的电导率, 并加样至已用缓冲液组氨酸 (1.5 mg/ml)、CaCl₂ (0.25 mg/ml)、吐温 80 (0.1 mg/ml)、NaCl (50 mM)、蔗糖 (3 mg/ml) 平衡的柱上。使用缓冲液组氨酸 (1.5 mg/ml)、CaCl₂ (0.25 mg/ml)、吐温 80 (0.1 mg/ml)、NaCl (1 M)、蔗糖 (3 mg/ml) 的梯度洗脱产物。产物以约 500 mM NaCl 洗脱。

[0309] 实施例 14. 底物 4 与脱唾液酸运铁蛋白的酶促偶联。N-聚糖修饰的运铁蛋白的制备。

[0310] 将底物 4 (2.7 mg ; 2.0 μmol) 溶于 100 μl 含有 20% (w/v) HPCD 的咪唑缓冲液 (20 mM 咪唑、10 mM CaCl₂、0.02% 吐温 80、150 mM NaCl、1M 甘油 (pH 7.3)) 中。加入脱唾液酸运铁蛋白 (0.4 mg) 在 200 μl 咪唑缓冲液中的溶液, 接着加入 MBP-SBD-ST3Gal-III 酶 (0.33 mg/ml)/20 μl Hepes 缓冲液 (14 mM Hepes ; 140 mM NaCl、50% (v/v) 甘油, pH 7.0)。向混合物中再加入咪唑缓冲液 (80 μl) 至总的反应体积为 400 μl, 然后在室温下温育 2 小时。通过 LC/MSD TOF (Agilent technology™) 分析反应混合物, 对在 300-2000 Da 中测量的光谱实施去卷积算法。根据峰强度, 计算以下的产物分布 (收率 ; m/z) : 未反应的脱唾液酸运铁蛋白 (28% ; 78386.3869Da) ; 单衍生化的脱唾液酸运铁蛋白 (48% ; 79409.8768Da) ; 双衍生化的脱唾液酸运铁蛋白 (24% ; 80440.8368Da)。该实施例表明可能随后获得分析数据, 其显示所形成产物的质量以验证底物 4 的疏水侧基已转移到多肽 (运铁蛋白) 的脱唾液酸聚糖上。

[0311] 实施例 15. 与疏水侧链缀合的 FVIII 的白蛋白结合

[0312] 按照 GE Healthcare 说明书 71-7006-00 AT, 使用 HiTrap NHS 柱 (GE Healthcare, CV 1 ml, 产品 17-0716-01) 来制备琼脂糖凝胶-HSA (人血清白蛋白) 柱。取代 (substitution) 为 10 μmol/ml。使用得自 Sigma 的 HSA (A1653)。1 mg/1 ml 缓冲液的量用于偶联。通过上述说明书所描述的方案测定偶联效率为 71%。

[0313] 使用具有下列条件的柱：

[0314] 流速：0.5 ml/分钟

[0315] 平衡缓冲液：A 缓冲液：20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、150 mM NaCl (pH 7.3)、10% 甘油

[0316] 洗脱缓冲液：B 缓冲液：20 mM 羟丙基环糊精 /A 缓冲液

[0317] 温度：22℃

[0318] 检测：荧光检测，激发 315 nm，发射：375 nm

[0319] 采用步进梯度，从 0%-20%（保留时间 3 分钟）步进到 60%（5.25 分钟）到 100%（7.5 分钟）的 B 缓冲液。

[0320] 3 个样品以如下方式运行：

[0321] 1) 空白样品，无峰，但有对应于羟丙基环糊精步进梯度的低强度宽信号

[0322] 2) wt BDD FVIII（“N8”）的样品，在 2.5 分钟保留时间处显示对应于柱空体积的峰，因此该蛋白质对柱无亲和力

[0323] 3) 类似于实施例 10 的化合物 6 制备的白蛋白结合剂 FVIII 缀合物的粗制反应混合物的样品显示，除了 7.5 分钟保留时间对应于在 20% B 缓冲液中洗脱的峰以外，在 2.5 分钟保留时间的峰对应于柱空体积。因此，该蛋白质的流分与柱结合。分离该流分，发现是对应于化合物 6 的用疏水侧链修饰的 FVIII。这通过在 SDS PAGE 分析中观察对应于 LC 和 HC 的条带移动来确定。

[0324] 在相似的实验中发现，样品 2 或 3 的蛋白质无一与不含固定化蛋白质的柱结合。

[0325] 该实施例表明，在该实验条件下，wt BDD FVIII 不与 HAS 结合，而对应于化合物 6 的用疏水侧链修饰的 FVIII 衍生物与 HAS 结合。

[0326] 实施例 16. 与疏水侧链缀合的 FVIII 的体外活性 (FVIII:C) 表征

[0327] 在显色 FVIII 测定中，使用 Coatest SP 试剂 (Chromogenix)，如下对 FVIII 衍生物 5-8 的 FVIII 活性 (FVIII:C) 进行评价：将 FVIII 样品和 FVIII 标准品（例如根据 NIBSC 的第 7 个国际 FVIII 标准品进行校准的纯化野生型 rFVIII）稀释于 Coatest 测定缓冲液（50 mM Tris、150 mM NaCl、1% BSA (pH 7.3)，含防腐剂）中。将 50 μl 样品、标准品和缓冲液阴性对照一式两份加到 96 孔微量滴定板 (Nunc) 中。将得自 Coatest SP 试剂盒的因子 IXa/因子 X 试剂、磷脂试剂和 CaCl_2 以 5:1:3 (vol:vol:vol) 混合，将 75 μl 该混合物加至各孔中。在室温下温育 15 分钟后，加入 50 μl 因子 Xa 底物 S-2765/凝血酶抑制剂 I-2581 混合物，并且将反应物在室温下温育 10 分钟，然后加入 25 μl 1 M 柠檬酸 (pH 3)。在 Spectramax 微量滴定板读板仪 (Molecular Devices) 中测量 415 nm 的吸光度与用作参考波长的 620 nm 下的吸光度。从所有样品中减去阴性对照的值，并通过吸光度值相对 FVIII 浓度作图的线性回归，绘制校准曲线。通过将样品活性除以通过 HPLC 测定的蛋白质浓度，来计算比活。

[0328] 表 1

[0329]

缀合物	修饰	FVIII:C 比活 (IU/mg)
5 (实施例 9)	底物 1 与 N- 聚糖连接	6378
6 (实施例 10)	底物 3 与 N- 聚糖连接	5522
7 (实施例 11)	底物 3 与 O- 聚糖连接	6628
8 (实施例 12)	底物 3 与 N- 聚糖连接，且 40 kDa PEG 与 O- 聚糖连接	4530
wt BDD FVIII (“N8”)	—	9300-10000

[0330] 实施例 17:在一步法凝血测定中测量的 FVIII:C

[0331] 在一步法 FVIII 凝血测定中,如下对 FVIII 衍生物 5-8 的 FVIII:C 作进一步评价:将 FVIII 衍生物样品和 FVIII 标准品(例如根据 NIBSC 的第 7 个国际 FVIII 标准品进行校准的纯化野生型 rFVIII)在 HBS/BSA 缓冲液(20 mM hepes、150 mM NaCl (pH 7.4) 与 1% BSA)中稀释至约 10 U/ml,接着在含有 VWF (Dade Behring) 的 FVIII 缺陷型血浆中稀释 10 倍。随后将样品在 HBS/BSA 缓冲液中稀释。在 ACL300R 或 ACL5000 仪器 (Instrumentation Laboratory) 上,应用单因素程序,测量 APTT 凝血时间。具有 VWF (Dade Behring) 的 FVIII 缺陷型血浆用作测定血浆, SynthASil (HemosIL™, Instrumentation Laboratory) 用作 aPTT 试剂。在凝血仪器中,将稀释的样品或标准品与 FVIII 缺陷型血浆和 aPTT 试剂在 37℃ 下混合。加入氯化钙,通过浊度测定直到血块形成的时间。根据 FVIII 标准品稀释液的血块形成时间的标准曲线,计算样品中的 FVIII:C。表 2 中的数据表明,通过 FVIII 衍生物 5-8 的凝血测定所测量的 FVIII:C 比活为良好至极好。

[0332] 表 2

[0333]

缀合物	修饰	FVIII:C 一步法凝血比活 (IU/mg)
5(实施例 9)	底物 1 与 N- 聚糖连接	3522
6(实施例 10)	底物 3 与 N- 聚糖连接	4165
7(实施例 11)	底物 3 与 O- 聚糖连接	5766
8(实施例 12)	底物 3 与 N- 聚糖连接且 40 kDa PEG 与 O- 聚糖连接	1750
wt BDD FVIII (“N8”)	-	9300-10000

[0334] 实施例 18. 与疏水侧链缀合的 FVIII 的药代动力学表征

[0335] 在 FVIII 缺陷型小鼠(具有 C57Bl/6 背景的 FVIII 外显子 16 敲出 (KO) 小鼠,在 Taconic M&B 繁育)或在 vWF 缺陷型小鼠(具有 C57Bl/6 背景的 vWF 外显子 4 + 5 KO 小鼠,在 Charles River, Germany 繁育)中,对 rFVIII 变体的药代动力学特征进行了评价。vWF-KO 小鼠具有 13% 的正常 FVIII:C,而 FVIII-KO 小鼠无可检测的 FVIII:C。使用体重约 25 克和年龄范围为 16-28 周龄的雄性和雌性(约 1:1)混合小鼠。小鼠在尾静脉接受单次静脉内注射的 FVIII (280 IU/kg)。在给药后直到 64 小时的时间点,使用未包覆的毛细玻璃管,从眼窝丛采血。从每只小鼠取 3 个样品,在各时间点上收集 2-4 个样品。血液立即用柠檬酸钠稳定,稀释于 4 体积 FVIII Coatest SP 缓冲液(参见实施例 16)中,然后在 4000 × g 下离心 5 分钟。将从稀释血液获得的血浆在干冰上冷冻,并保存在 -80℃。按照实施例 16 中所述,在显色测定法中测定 FVIII:C。应用 WinNonlin Pro 4.1 版软件,通过无房室法 (NCA),进行药代动力学分析。表 2 表示药代动力学参数的估计值:半衰期 ($t_{1/2}$)、清除率 (CL) 和平均停留时间 (MRT)。数据显示,在 FVIII 与疏水侧链缀合时,清除率降低,半衰期和平均停留时间延长。

[0336] 表 3

[0337]

缀合物	wt BDD FVIII 的修饰	种类	$t_{1/2}$ (小时)	MRT (小时)	CL (ml/h/kg)
5(实施例 9)	底物 1 与 N 聚糖连接	FVIII KO 小鼠	12	15	4.5
6(实施例 10)	底物 3 与 N 聚糖连接	FVIII KO 小鼠	11	14	6.6
7(实施例 11)	底物 3 与 O 聚糖连接	FVIII KO 小鼠	9.4	14	4.6
8(实施例 12)	底物 3 与 N 聚糖连接且 40 kDa PEG 与 O 聚糖连接	vWF KO 小鼠	11	15	6.6
wt BDD FVIII (“N8”)		FVIII KO 小鼠	6.7 9.3	9.9 11	8.1 10
wt BDD FVIII (“N8”)		vWF KO 小鼠	0.5	0.64	151

[0338] 实施例 19. N-聚糖疏水侧链修饰的 FVIIa 的制备

[0339] 使用下列试剂：

[0340] 使用脱唾液酸 FVIIa（内部批次）：Gly-Gly 缓冲液中，pH 6（1.39 mg/ml），500 μ l，13 nmol。

[0341] 使用底物 1（白蛋白结合剂-GSC）：(MW 1869)：2 mg/ml，30 μ l 或 32 nmol。

[0342] 使用 MBP-SBP-ST3Gal-III：1.2 U/ml，100 μ l。

[0343] 脱唾液酸-FVIIa 是指用唾液酸酶预处理并纯化的重组 FVIIa。将脱唾液酸-FVIIa 融化，加入底物 1 和 ST3Gal-III。将混合物在 32°C 下温育。110 分钟后，通过环糊精亲和色谱法分离样品。色谱图含有 2 个峰。第一洗脱峰对应于未修饰的脱唾液酸-FVIIa，最后的洗脱峰对应于用白蛋白结合剂修饰的脱唾液酸-FVIIa，如使用 SDS-PAGE 的 FVIIa 重链和轻链分子量增加所示一样。

[0344] 该实施例表明，FVIIa 在其 N-聚糖处用底物 3 的疏水侧链修饰是可能的。

[0345] 实施例 15. N-聚糖疏水侧链修饰的 FIX 的制备

[0346] 使用下列试剂：

[0347] FIX（内部批次）：在 10 mM 组氨酸、3 mM CaCl_2 、50 mM NaCl 缓冲液 pH 6（11 mg/ml）中。将 100 μ l（20 nmol）用缓冲液 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、150 mM NaCl（pH 7.3）、10% 甘油（pH 7.3）稀释至 1 ml。使用 100 μ l（2 nmol）

[0348] 使用底物 1（白蛋白结合剂 GSC，MW 1869）：2 mg/ml，7.5 μ l（8 nmol）

[0349] 使用 MBP-SBP-ST3Gal-III：1.2 U/ml，25 μ l

[0350] 唾液酸酶 / 神经氨酸酶：琼脂糖（悬液），0.6–1.8 U/ml 凝胶上的 50 μ l（6.7 mU）（产气荚膜梭状芽胞杆菌，VI-A 型，N-5254，得自 Sigma）

[0351] 使用 Pierce 自旋柱将唾液酸酶离心，用水 500 μ l 洗涤两次，然后用缓冲液 50 mM HEPES、100 mM NaCl、10 mM CaCl_2 （pH 7）洗涤 3 次。将其离心，将酶加入融化的 FIX 中。将反应物在室温下轻轻振荡过夜，然后使用 Pierce 自旋柱过滤。将含有脱唾液酸 FIX 的所得滤液加入底物 1 和 ST3Gal-III 中，在 32°C 下温育 46 小时。通过环糊精亲和色谱法分离反应混合物的样品。色谱图含有 2 个峰。第一洗脱峰对应于未修饰的脱唾液酸-FIX，最后的洗脱峰对应于用白蛋白结合剂修饰的脱唾液酸-FIX，如使用 SDS-PAGE 的 FVIIa 重链和轻链分子量增加所示一样。凝胶还显示存在通过 FIX 自活化产生的少量 FIXa。

[0352] 该实施例表明，FIX 在其 N-聚糖处用底物 3 的疏水侧链修饰是可能的。

[0001]

CPCH1261852P

序 列 表

<110> 诺沃—诺迪斯克有限公司

<120> 缀合蛋白质

<130> 7929

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 406

<212> PRT

<213> 人(homo sapiens)

<220>

<221> X

<222> (6).. (7)

<223> X: 表示 γ -羧化 Glu ("E")残基

<220>

<221> X

<222> (14).. (14)

<223> X: 表示 γ -羧化 Glu ("E")残基

<220>

<221> X

<222> (16).. (16)

<223> X: 表示 γ -羧化 Glu ("E")残基

<220>

<221> X

<222> (19).. (20)

<223> X: 表示 γ -羧化 Glu ("E")残基

[0002]

<220>

<221> X

<222> (25).. (26)

<223> X: 表示 γ -羧化 Glu ("E")残基

<220>

<221> X

<222> (29).. (29)

<223> X: 表示 γ -羧化 Glu ("E")残基

<220>

<221> X

<222> (35).. (35)

<223> X: 表示 γ -羧化 Glu ("E")残基

<400> 1

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Xaa	Xaa	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Xaa	Arg	Xaa
1				5					10					15	

Cys	Lys	Xaa	Xaa	Gln	Cys	Ser	Phe	Xaa	Xaa	Ala	Arg	Xaa	Ile	Phe	Lys
				20				25					30		

Asp	Ala	Xaa	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
			35				40					45			

Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
		50					55				60				

Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
65						70				75					80

[0003]

Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly			
85	90	95	
Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys			
100	105	110	
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr			
115	120	125	
Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg			
130	135	140	
Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro			
145	150	155	160
Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln			
165	170	175	
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala			
180	185	190	
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu			
195	200	205	
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg			
210	215	220	
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn			
225	230	235	240

[0004]

His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255

His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270

Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285

Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335

Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350

Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365

Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380

[0005]

Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400

Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 2
<211> 2332
<212> PRT
<213> 人

<400> 2

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
35 40 45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
50 55 60

Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
65 70 75 80

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val
85 90 95

[0006]

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala
100 105 110

Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val
115 120 125

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn
130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
145 150 155 160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
165 170 175

Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
180 185 190

His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp
195 200 205

His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
210 215 220

Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg
225 230 235 240

Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His

[0007]

245	250	255
Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu		
260	265	270
Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile		
275	280	285
Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly		
290	295	300
Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met		
305	310	315
		320
Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg		
325	330	335
Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp		
340	345	350
Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe		
355	360	365
Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His		
370	375	380
Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu		
385	390	395
		400

[0008]

Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
405 410 415

Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
420 425 430

Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
435 440 445

Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
450 455 460

Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
465 470 475 480

Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
485 490 495

His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
500 505 510

Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
515 520 525

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
530 535 540

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp

[0009]

545	550	555	560
Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe			
565	570	575	
Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln			
580	585	590	
Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe			
595	600	605	
Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser			
610	615	620	
Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu			
625	630	635	640
Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr			
645	650	655	
Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro			
660	665	670	
Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp			
675	680	685	
Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala			
690	695	700	

[0010]

Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
705 710 715 720

Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
725 730 735

Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Arg
740 745 750

Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys
755 760 765

Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn
770 775 780

Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro
785 790 795 800

His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe
805 810 815

Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser
820 825 830

Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val
835 840 845

Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly

[0011]

850	855	860	
Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser			
865	870	875	880
Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala			
	885	890	895
Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His			
	900	905	910
Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro			
	915	920	925
Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp			
	930	935	940
Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp			
	945	950	955
Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys			
	965	970	975
Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys			
	980	985	990
Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala			
	995	1000	1005

[0012]

Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu
1010 1015 1020

Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu
1025 1030 1035

Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp
1040 1045 1050

Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr
1055 1060 1065

Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly
1070 1075 1080

Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys
1085 1090 1095

Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His
1100 1105 1110

Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln
1115 1120 1125

Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe
1130 1135 1140

Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr

[0013]

1145	1150	1155
Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn		
1160	1165	1170
Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His		
1175	1180	1185
Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys Lys Glu Thr		
1190	1195	1200
Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr Val Thr		
1205	1210	1215
Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg		
1220	1225	1230
Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu		
1235	1240	1245
Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys		
1250	1255	1260
His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu		
1265	1270	1275
Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys		
1280	1285	1290

[0014]

Thr Thr	Arg Ile Ser Pro Asn	Thr Ser Gln Gln Asn	Phe Val Thr
1295	1300	1305	

Gln Arg	Ser Lys Arg Ala Leu	Lys Gln Phe Arg Leu	Pro Leu Glu
1310	1315	1320	

Glu Thr	Glu Leu Glu Lys Arg	Ile Ile Val Asp Asp	Thr Ser Thr
1325	1330	1335	

Gln Trp	Ser Lys Asn Met Lys	His Leu Thr Pro Ser	Thr Leu Thr
1340	1345	1350	

Gln Ile	Asp Tyr Asn Glu Lys	Glu Lys Gly Ala Ile	Thr Gln Ser
1355	1360	1365	

Pro Leu	Ser Asp Cys Leu Thr	Arg Ser His Ser Ile	Pro Gln Ala
1370	1375	1380	

Asn Arg	Ser Pro Leu Pro Ile	Ala Lys Val Ser Ser	Phe Pro Ser
1385	1390	1395	

Ile Arg	Pro Ile Tyr Leu Thr	Arg Val Leu Phe Gln	Asp Asn Ser
1400	1405	1410	

Ser His	Leu Pro Ala Ala Ser	Tyr Arg Lys Lys Asp	Ser Gly Val
1415	1420	1425	

Gln Glu	Ser Ser His Phe Leu	Gln Gly Ala Lys Lys	Asn Asn Leu
---------	---------------------	---------------------	-------------

[0015]

1430	1435	1440
Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln Arg Glu		
1445	1450	1455
Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys		
1460	1465	1470
Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr		
1475	1480	1485
Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys		
1490	1495	1500
Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu		
1505	1510	1515
Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile		
1520	1525	1530
Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg		
1535	1540	1545
Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp		
1550	1555	1560
Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu		
1565	1570	1575

[0016]

Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys
1580 1585 1590

Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His
1595 1600 1605

Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu
1610 1615 1620

Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg Leu Cys Ser Gln
1625 1630 1635

Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr
1640 1645 1650

Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile
1655 1660 1665

Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp
1670 1675 1680

Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr
1685 1690 1695

Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser
1700 1705 1710

Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro

[0017]

1715	1720	1725
Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe		
1730	1735	1740
Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu		
1745	1750	1755
Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val		
1760	1765	1770
Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser		
1775	1780	1785
Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg		
1790	1795	1800
Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys		
1805	1810	1815
Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys		
1820	1825	1830
Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His		
1835	1840	1845
Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu		
1850	1855	1860

[0018]

Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu
1865 1870 1875

Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu
1880 1885 1890

Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu
1895 1900 1905

Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly
1910 1915 1920

Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln
1925 1930 1935

Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile
1940 1945 1950

His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys
1955 1960 1965

Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe
1970 1975 1980

Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val
1985 1990 1995

Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu

[0019]

2000	2005	2010
Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys	Cys Gln Thr Pro Leu	Gly Met Ala
2015	2020	2025
Ser Gly His Ile Arg Asp Phe	Gln Ile Thr Ala Ser	Gly Gln Tyr
2030	2035	2040
Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu	Ala Arg Leu His Tyr	Ser Gly Ser
2045	2050	2055
Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys	Glu Pro Phe Ser Trp	Ile Lys Val
2060	2065	2070
Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile	Ile His Gly Ile Lys	Thr Gln Gly
2075	2080	2085
Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser	Leu Tyr Ile Ser Gln	Phe Ile Ile
2090	2095	2100
Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys	Lys Trp Gln Thr Tyr	Arg Gly Asn
2105	2110	2115
Ser Thr Gly Thr Leu Met Val	Phe Phe Gly Asn Val	Asp Ser Ser
2120	2125	2130
Gly Ile Lys His Asn Ile Phe	Asn Pro Pro Ile Ile	Ala Arg Tyr
2135	2140	2145

[0020]

Ile Arg	Leu His Pro Thr His	Tyr Ser Ile Arg Ser	Thr Leu Arg
2150	2155	2160	

Met Glu	Leu Met Gly Cys Asp	Leu Asn Ser Cys Ser	Met Pro Leu
2165	2170	2175	

Gly Met	Glu Ser Lys Ala Ile	Ser Asp Ala Gln Ile	Thr Ala Ser
2180	2185	2190	

Ser Tyr	Phe Thr Asn Met Phe	Ala Thr Trp Ser Pro	Ser Lys Ala
2195	2200	2205	

Arg Leu	His Leu Gln Gly Arg	Ser Asn Ala Trp Arg	Pro Gln Val
2210	2215	2220	

Asn Asn	Pro Lys Glu Trp Leu	Gln Val Asp Phe Gln	Lys Thr Met
2225	2230	2235	

Lys Val	Thr Gly Val Thr Thr	Gln Gly Val Lys Ser	Leu Leu Thr
2240	2245	2250	

Ser Met	Tyr Val Lys Glu Phe	Leu Ile Ser Ser Ser	Gln Asp Gly
2255	2260	2265	

His Gln	Trp Thr Leu Phe Phe	Gln Asn Gly Lys Val	Lys Val Phe
2270	2275	2280	

Gln Gly	Asn Gln Asp Ser Phe	Thr Pro Val Val Asn	Ser Leu Asp
---------	---------------------	---------------------	-------------

[0021]

2285	2290	2295
Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr	Leu Arg Ile His Pro	Gln Ser Trp
2300	2305	2310
Val His Gln Ile Ala Leu Arg	Met Glu Val Leu Gly	Cys Glu Ala
2315	2320	2325
Gln Asp Leu Tyr		
2330		

<210> 3
<211> 415
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> X
<222> (7)..(8)
<223> X: 表示 γ -羧化 Glu ("E") 残基。

<220>
<221> X
<222> (15)..(15)
<223> X: 表示 γ -羧化 Glu ("E") 残基。

<220>
<221> X
<222> (17)..(17)
<223> X: 表示 γ -羧化 Glu ("E") 残基。

<220>
<221> X

[0022]

<222> (20).. (21)

<223> X: 表示 γ -羧化 Glu ("E")残基。

<220>

<221> X

<222> (26).. (27)

<223> X: 表示 γ -羧化 Glu ("E")残基。

<220>

<221> X

<222> (30).. (30)

<223> X: 表示 γ -羧化 Glu ("E")残基。

<220>

<221> X

<222> (33).. (33)

<223> X: 表示 γ -羧化 Glu ("E")残基。

<220>

<221> X

<222> (36).. (36)

<223> X: 表示 γ -羧化 Glu ("E")残基。

<220>

<221> 其它特征

<222> (40).. (40)

<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 3

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

1

5

10

15

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

20

25

30

[0023]

Xaa Asn Thr Xaa Arg Thr Thr Xaa Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
35 40 45

Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60

Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65 70 75 80

Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
85 90 95

Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
100 105 110

Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
115 120 125

Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
130 135 140

Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145 150 155 160

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

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

[0024]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0025]

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

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

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

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

Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
405 410 415

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 21 个氨基酸的 FVIII B 结合域接头

<400> 4

Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu
1 5 10 15

Lys Arg His Gln Arg
20