(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 101965409 A
(43)申请公布日 2011.02.02

(21)申请号 200880123751.5

(22)申请日 2008.07.25

(30)优先权数据
60/984,518 2007.11.01 US
60/991,304 2007.11.30 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2010.07.01

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2008/071170 2008.07.25

(87)PCT申请的公布数据
WO2009/058446 EN 2009.05.07

(71)申请人 罗切斯特大学
地址 美国纽约州

(72)发明人 P·J·费伊 H·瓦卡巴亚施

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 权陆军 郭文洁

(51)Int.Cl.
C12Q 1/68(2006.01)
C12P 21/06(2006.01)
C07K 14/755(2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 41 页 序列表 12 页
附图 21 页

(54)发明名称

具有增加的稳定性的重组因子VIII

(57)摘要

本发明涉及重组因子VIII,所述重组因子VIII包括导致因子VIII和因子VIIIa两者的稳定性增强的一种或多种突变。还公开了制备和使用所述重组因子VIII的方法和含有所述重组因子的药物组合物。本发明还涉及编码所述重组因子VIII的分离的核酸分子以及含有所述分离的核酸分子的DNA表达系统和宿主细胞。

CN 101965409 A

1. 一种重组因子 VIII，包含导致因子 VIII 和因子 VIIIa 二者的稳定性增强的一种或多种突变，其中所述一种或多种突变包括在 A1A2 或 A2A3 结构域界面的任一界面或者两个界面用疏水性氨基酸残基取代一个或多个带电荷的氨基酸残基。

2. 根据权利要求 1 所述的重组因子 VIII，其中所述带电荷的氨基酸残基为 Glu 或 Asp，并且所述疏水性氨基酸残基取代为 Ala、Val、Ile、Leu、Met、Phe 或 Trp 之一。

3. 根据权利要求 1 所述的重组因子 VIII，其中所述一种或多种突变包括野生型因子 VIII 的 Glu287 残基的取代、野生型因子 VIII 的 Asp302 残基的取代、野生型因子 VIII 的 Asp519 残基的取代、野生型因子 VIII 的 Glu665 残基的取代、野生型因子 VIII 的 Glu1984 残基的取代或它们的组合。

4. 根据权利要求 3 所述的重组因子 VIII，其中所述 Asp302 残基的取代为 D302A。

5. 根据权利要求 3 所述的重组因子 VIII，其中所述 Glu287 残基的取代为 E287A。

6. 根据权利要求 3 所述的重组因子 VIII，其中所述 Glu665 残基的取代为 E665A 或 E665V。

7. 根据权利要求 3 所述的重组因子 VIII，其中所述 Asp519 残基的取代为 D519A 或 D519V。

8. 根据权利要求 3 所述的重组因子 VIII，其中所述 Glu1984 残基的取代为 E1984A 或 E1984V。

9. 根据权利要求 3 所述的重组因子 VIII，其中所述一种或多种突变包括选自下列的两种或更多种取代：Glu665 残基、Asp519 残基和 Glu1984 残基。

10. 根据权利要求 9 所述的重组因子 VIII，其中所述两种或更多种取代包括：D519VE665V、D519AE665V、D519VE1984A、E665VE1984A、E665AE1984V、D519AE665VE1984A、D519VE665VE1984A 或 D519VE665VE1984V。

11. 根据权利要求 1 所述的重组因子 VIII，其中所述重组因子 VIII 由结构域 A1、A2、A3、C1 和 C2、或它们的部分组成。

12. 根据权利要求 11 所述的重组因子 VIII，其中结构域 A1 和 A2 存在于重链上并且结构域 A3、C1 和 C2 存在于轻链上。

13. 根据权利要求 1 所述的重组因子 VIII，其中所述重组因子 VIII 包含来自人因子 VIII 的一个或多个结构域或其部分，和来自非人哺乳动物的因子 VIII 的一个或多个结构域或其部分。

14. 根据权利要求 1 所述的重组因子 VIII，其中所述重组因子 VIII 为基本上纯的。

15. 根据权利要求 1 所述的重组因子 VIII，其中所述重组因子 VIII 还包含下列的一种或多种：(i) 经修饰以增强重组因子 VIII 对因子 IXa 和因子 X 中的一种或两种的亲和力的因子 IXa 和 / 或因子 X 结合结构域；(ii) 增强在培养物中的分泌的修饰的位点；(iii) 增强其循环半衰期的修饰的血清蛋白结合位点；(iv) 有效降低其抗原性和 / 或免疫原性的至少一个糖基化识别序列；和 (v) 改善重组因子 VIIIa 的比活的修饰的钙结合位点。

16. 根据权利要求 1 所述的重组因子 VIII，还包含野生型因子 VIII 的 Glu113 残基的取代，所述 Glu113 残基的取代增强激活的因子 VIIIa 的活性。

17. 根据权利要求 16 所述的重组因子 VIII，其中所述一种或多种突变包括野生型因子 VIII 的 Glu287 残基的取代、野生型因子 VIII 的 Asp302 残基的取代、野生型因子 VIII 的

Asp519 残基的取代、野生型因子 VIII 的 Glu665 残基的取代、野生型因子 VIII 的 Glu1984 残基的取代或它们的组合。

18. 根据权利要求 17 所述的重组因子 VIII，其中所述取代包括 E113AD519A、E113AD519V、E113AE665A、E113AE665V 或 E113AE1984V。

19. 一种药物组合物，包含根据权利要求 1 所述的重组因子 VIII。

20. 根据权利要求 19 所述的药物组合物，还包含稳定剂。

21. 根据权利要求 19 所述的药物组合物，还包含递送溶媒。

22. 根据权利要求 19 所述的药物组合物，还包含药物上可接受的载体。

23. 一种分离的核酸分子，编码根据权利要求 1 所述的重组因子 VIII。

24. 根据权利要求 23 所述的分离的核酸分子，其中所述一种或多种突变包括野生型因子 VIII 的 Glu287 残基的取代、野生型因子 VIII 的 Asp302 残基的取代、野生型因子 VIII 的 Asp519 残基的取代、野生型因子 VIII 的 Glu665 残基的取代、野生型因子 VIII 的 Glu1984 残基的取代或它们的组合。

25. 根据权利要求 24 所述的分离的核酸分子，其中所述 Asp302 残基的取代为 D302A。

26. 根据权利要求 24 所述的分离的核酸分子，其中所述 Glu287 残基的取代为 E287A。

27. 根据权利要求 24 所述的分离的核酸分子，其中所述 Glu665 残基的取代为 E665A 或 E665V。

28. 根据权利要求 24 所述的分离的核酸分子，其中所述 Asp519 残基的取代为 D519A 或 D519V。

29. 根据权利要求 24 所述的分离的核酸分子，其中所述 Glu1984 残基的取代为 E1984A 或 E1984V。

30. 根据权利要求 24 所述的分离的核酸分子，其中所述一种或多种突变包含选自下列的两种或更多种取代：Glu665 残基、Asp519 残基和 Glu1984 残基。

31. 根据权利要求 30 所述的分离的核酸分子，其中所述两种或更多种取代包括 D519VE665V、D519AE665V、D519VE1984A、E665VE1984A、E665AE1984V、D519AE665VE1984A、D519VE665VE1984A 或 D519VE665VE1984V。

32. 根据权利要求 23 所述的分离的核酸分子，其中所述重组因子 VIII 还包含下列的一种或多种：(i) 经修饰以增强重组因子 VIII 对因子 IXa 和因子 X 中的一种或两种的亲和力的因子 IXa 和 / 或因子 X 结合结构域；(ii) 增强在培养物中的分泌的修饰的位点；(iii) 增强其循环半衰期的修饰的血清蛋白结合位点；(iv) 有效降低其抗原性和 / 或免疫原性的至少一个糖基化识别序列；和 (v) 改善重组因子 VIIIa 的活性的修饰的钙结合位点。

33. 根据权利要求 23 所述的分离的核酸分子，其中所述核酸为 RNA。

34. 根据权利要求 23 所述的分离的核酸分子，其中所述核酸为 DNA。

35. 一种重组 DNA 表达系统，包含根据权利要求 34 所述的 DNA 分子。

36. 根据权利要求 35 所述的重组 DNA 表达系统，其中所述 DNA 分子相对于启动子在有义方向上。

37. 一种宿主细胞，包含根据权利要求 23 所述的核酸分子。

38. 一种宿主细胞，包含根据权利要求 34 所述的 DNA 分子。

39. 根据权利要求 38 所述的宿主细胞，其中所述 DNA 分子在表达系统中。

40. 根据权利要求 38 所述的宿主细胞，其中所述宿主细胞为动物细胞、细菌细胞、昆虫细胞、真菌细胞、酵母细胞、植物细胞或藻类细胞。

41. 一种制备重组因子 VIII 的方法，包括：

将根据权利要求 38 的宿主细胞在使该宿主细胞表达所述重组因子 VIII 的条件下培养；和

分离所述重组因子 VIII。

42. 根据权利要求 41 所述的方法，其中所述培养在生长培养基中体外进行。

43. 根据权利要求 42 所述的方法，其中所述生长培养基包含冯维勒布兰德因子。

44. 根据权利要求 43 所述的方法，其中所述宿主细胞包含编码冯维勒布兰德因子的转基因。

45. 根据权利要求 44 所述的方法，其中所述重组因子 VIII 被分泌到生长培养基中，所述分离包括将重组因子 VIII 从生长培养基中分离。

46. 根据权利要求 41 所述的方法，还包括：

在所述分离之前破坏所述宿主细胞，其中所述分离包括从细胞碎片中分离所述重组因子 VIII。

47. 一种治疗动物血友病 A 的方法，所述方法包括：

给表现血友病 A 的动物施用有效量的根据权利要求 1 所述的重组因子 VIII，从而使动物在血管损伤后表现出有效的血液凝集。

48. 根据权利要求 47 所述的方法，其中所述有效量包括约 10 至约 50 单位 /kg 动物体重之间。

49. 根据权利要求 47 所述的方法，其中所述动物为哺乳动物。

50. 根据权利要求 47 所述的方法，其中所述动物选自由下列组成的组：人、大鼠、小鼠、豚鼠、狗、猫、猴、黑猩猩、猩猩、牛、马、绵羊、猪、山羊、兔和鸡。

51. 根据权利要求 47 所述的方法，还包括周期性地重复所述施用。

具有增加的稳定性的重组因子 VIII

[0001] 本申请要求 2007 年 11 月 1 日提交的美国临时专利申请序列第 60/984,518 号和 2007 年 11 月 30 日提交的美国临时专利申请系列第 60/991,304 号的优先权权益，通过引用将他们每一个整体并入本文。

[0002] 本发明是根据美国国家卫生研究院授予的 HL 76213 和 HL 38199 号基金在政府的支持下进行的。政府具有本发明的某些权利。

[0003] 发明背景

[0004] 最常见的重度遗传性出血疾患血友病 A 是由血浆蛋白因子 VIII 的缺乏或缺陷引起的。还没有血友病 A 的治愈方法并且治疗由使用（纯化的）血浆制剂或重组蛋白制剂的替代治疗组成。

[0005] 因子 VIII 以非共价的金属离子依赖性的异源二聚体参与循环。这种前体辅因子 (procofactor) 形式的蛋白含有包括 A1(a1)A2(a2)B 结构域的重链 (HC) 和包括 (a3)A3C1C2 结构域的轻链 (LC)，小写的 a 表示富含酸性残基的短的（约 30 至 40 个残基）区段（参见 Fay，“Activation of Factor VIII andMechanisms of Cofactor Action（因子 VIII 的激活和辅因子的作用机制），”Blood Rev. 18 :1-15(2004)）。因子 VIII 在 A1A2、A2B 和 A3A3 接合处被凝血酶或因子 Xa 催化的蛋白裂解激活。该反应的产物因子 VIIIa 是包括称为 A1、A2 和 A3C1C2 的亚基的异源三聚体，它在酶原因子 X 向丝氨酸蛋白酶因子 Xa 的膜依赖性的转化中作为丝氨酸蛋白酶因子 IXa 的辅因子起作用（参见 Fay，“Activation of Factor VIII and Mechanisms of Cofactor Action（因子 VIII 的激活和辅因子的作用机制），”Blood Rev. 18 :1-15(2004)).

[0006] 重构研究已显示因子 VIII 异源二聚体结构是由静电相互作用和疏水相互作用二者支撑的 (Fay，“Reconstitution of Human Factor VIII from IsolatedSubunits（由分离的亚基重构人因子 VIII），”Arch Biochem Biophys. 262 :525-531(1988) ;Ansong 等人，“Factor VIII A1 Domain Residues 97-105Represent a Light Chain-interactive Site（因子 VIII A1 结构域残基 97-105 代表轻链相互作用位点），”Biochemistry. 45 :13140-13149(2006))，并且链间亲和力被因子 VIII 与冯维勒布兰德 (von Willebrand) 因子的结合进一步加强 (Fay，“Reconstitution of Human Factor VIII from Isolated Subunits（由分离的亚基重构人因子 VIII），”Arch Biochem Biophys. 262 :525-531(1988) ;Kaufman 等人，“Regulation of Factor VIII Expression and Activity by vonWillebrand Factor（冯维勒布兰德因子对因子 VIII 表达和活性的调节，”Thromb Haemost. 82 :201-208(1999))。金属离子也促进链间亲和力和活性参数 (Wakabayashi 等人，“Metal Ion-independent Association of Factor VIIISubunits and the Roles of Calcium and Copper Ions for Cofactor Activity andInter-subunit Affinity（金属离子非依赖性的因子 VIII 亚基缔合和钙离子和铜离子对辅因子活性和亚基间亲和力的作用），”Biochemistry40 :10293-10300(2001))。需要钙来产生活性的因子 VIII 构象。诱变研究将钙结合位点定位在 A1 结构域内富含酸性残基的区段（残基 110-126）并且鉴定了此区域中离子配位的主要的特定残基 (Wakabayashi 等人，“Residues110-126in the A1 Domain

of Factor VIII Contain a Ca^{2+} Binding Site Requiredfor Cofactor Activity(因子 VIII 的 A1 结构域中的残基 110-126 含有辅因子活性所需的 Ca^{2+} 结合位点),"J Biol Chem.279:12677-12684(2004))。近期的中间分辨率的 X 射线结构 (Shen 等人,"The Tertiary Structure and DomainOrganization of Coagulation Factor VIII(凝血因子 VIII 的三级结构和结构域组织),"Blood 111:1240-1247(2008)) 证实了这种钙结合位点并提出了在 A2 结构域中的第二个可能位点。这个结构还显示 A1 和 A3 结构域中占有两个 1 型铜离子位点。较早的功能研究已显示铜离子促进重链和轻链缔合形成异源二聚体,这在生理 pH 值下将链间亲和力增加几倍 (Fay 等人,"HumanFactor VIIIa Subunit Structure;Reconstruction of Factor VIIIa from theIsolated A1/A3-C1-C2Dimer and A2Subunit(人因子 VIIIa 亚基结构:由分离的 A1/A3-C1-C2 二聚体和 A2 亚基重构因子 VIIIa),"J Biol Chem.266:8957-8962(1991);Wakabayashi 等人,"pH-dependent Association ofFactor VIII Chains:Enhancement of Affinity at Physiological pH by Cu^{2+}(pH 依赖性的因子 VIII 链的缔合:Cu^{2+} 在生理 pH 下增强亲和力),"BiochimBiophys Acta.1764:1094-1101(2006);Ansong 等人,"Factor VIII A3 DomainResidues 1954-1961 Represent an A1 Domain-Interactive Site(因子 VIII A3 结构域残基 1954-1961 代表 A1 结构域相互作用位点),"Biochemistry44:8850-8857(2005))。

[0007] 因子 VIIIa 的不稳定性是由 A2 亚基和 A1/A3C1C2 二聚体之间的弱静电相互作用引起的 (Fay 等人,"Human Factor VIIIa Subunit Structure:Reconstruction of Factor VIIIa from the Isolated A1/A3-C1-C2 Dimer and A2Subunit(人因子 VIIIa 亚基结构:由分离的 A1/A3-C1-C2 二聚体和 A2 亚基重构因子 VIIIa),"J Biol Chem.266:8957-8962(1991);Lollar 等人,"pH-dependent Denaturation of Thrombin-activated Poreine Factor VIII(凝血酶激活的猪因子 VIII 的 pH 依赖性的变性,"J Biol Chem.265:1688-1692(1990)) 并且会导致因子 Xase 的活性减弱 (Lollar 等人,"Coagulant PropertiesofHybrid Human/Porcine Factor VIII Molecules(杂合的人 / 猪因子 VIII 分子的促凝血特性),"J Biol Chem.267:23652-23657(1992);Fay 等人,"Modelfor the Factor VIIIa-dependent Decay of the Intrinsic Factor Xase:Role ofSubunit Dissociation and Factor IXa-catalyzed Proteolysis(因子 VIIIa 依赖性的内在因子 Xase 衰退 (decay) 的模型:亚基解离和因子 IXa 催化的蛋白水解的作用),"J Biol Chem.271:6027-6032(1996))。关于因子 VIIIa 中的 A2 亚基的缔合的可用信息是有限的,A1 和 A3 结构域中的残基似乎都促进这种亚基的保留。已经显示几种因子 VIII 点突变相对于野生型有利于 A2 的解离,并且这些残基定位在 A1-A2 结构域界面 (Pipe 等人,"Mild HemophiliaA Caused by Increased Rate of Factor VIII A2 Subunit Dissociation:Evidencefor Nonproteolytic Inactivation of Factor VIIIa in vivo(因子 VIII A2 亚基解离的速率增加引起的轻度血友病 A:体内因子 VIII 非蛋白水解灭活的证据),"Blood 93:176-183(1999);Pipe 等人,"Hemophilia A Mutations Associatedwith 1-stage/2-stage Activity Discrepancy Disrupt Protein-protein Interactionswithin the Triplicated A Domains of Thrombin-activated Factor VIIIa(1 期 /2 期活性差异相关的血友病 A 突变破坏凝血酶激活的因子 VIIIa 的三个 A 结构域中的蛋白 - 蛋白相互作用),"Blood 97:685-691(2001)) 或 A2-A3 结构域界面 (Hakeos

等人,“Hemophilia A Mutations within the Factor VIII A2-A3Subunit Interface Destabilize Factor VIIIa and Cause One-stage/Two-stageActivity Discrepancy(因子 VIII A2-A3 亚基界面内的血友病 A 突变使因子 VIIIa 不稳定并且引起 1 期 /2 期活性差异),”Thromb Haemost.88 :781-787(2002))。这些因子 VIII 变体表现出特征性的 1 期 /2 期测定差异 (Duncan 等人,“Familial Discrepancy Between the One-stage and Two-stage Factor VIIIMethods in a Subgroup of Patients with Haemophilia A(患血友病 A 的患者亚群中 1 期和 2 期因子 VIII 方法之间的家族差异),”Br J Haematol.87 :846-848(1994) ;Rudzki 等人,“Mutations in a Subgroup of Patients with MildHaemophilia A and a Familial Discrepancy Between the One-stage andTwo-stage Factor VIII :C Methods(患轻度血友病 A 的患者亚群中的突变和 1 期与 2 期因子 VIII :C 方法之间的家族差异),”Br J Haematol.94 :400-406(1996)),其中由于 A2 亚基解离的速率增加致使后一种测定所测得的活性值显著降低。

[0008] 因子 VIII 的 A 结构域的基于血浆铜蓝蛋白的同源性模型的检测 (Pemberton 等人,“A Molecular Model for the Triplicated A Domains ofHuman Factor VIII Based on the Crystal Structure of Human Ceruloplasmin(基于人血浆铜蓝蛋白的晶体结构的人因子 VIII 的三个 A 结构域的分子模型),”Blood89 :2413-2421(1997)) 表明 A2 结构域与 A1 和 A3 结构域的每一个之间的的延伸界面,其中多个可能的接触点有利于结合相互作用。

[0009] 在稳定因子 VIIIa 方面存在着明显的兴趣,因为更稳定形式的蛋白代表了血友病 A 的优良治疗剂,可能需要较少的材料来治疗患者 (Fay 等人,“Mutating Factor VIII :Lessons from Structure to Function(对因子 VIII 进行突变 :由结构到功能的教导),”BloodReviews 19 :15-27(2005))。为了这个目的,描述了因子 VIII 的制备,其中通过在 A2 和其他的因子 VIII 结构域之间引入新共价键在重组蛋白中制备了突变以防止 A2 亚基解离 (Pipe 等人,“Characterization of a Genetically Engineered Inactivation-resistantCoagulation Factor VIIIa(遗传工程化的抗失活的凝血因子 VIIIa 的表征),”Proc NatlAcad Sci USA 94 :11851-11856(1997) ;Gale 等人,“An EngineeredInterdomain Disulfide Bond Stabilizes Human Blood Coagulation Factor VIIIa(工程化的结构域间二硫键稳定人血凝血因子 VIIIa),”J.Thromb.Haemostasis 1 :1966-1971(2003))。然而,从此有建议认为这些类型的突变可能在治疗性因子 VIII 中是不希望的,因为他们基本上排除了下调的方法。这种情况会产生可能引起损伤的血栓前病症。因此,可能希望增强因子 VIII 和因子 VIIIa 两者的稳定性,但是以促进前血栓病症的可能性最小的方式进行。

[0010] 本发明针对于克服本领域内的这些和其他缺陷。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明的第一方面涉及重组因子 VIII,所述重组因子 VIII 包括导致因子 VIII 和因子 VIIIa 两者的稳定性增强的一种或多种突变。

[0013] 优选地,所述一种或多种突变构成了疏水性氨基酸残基对 A1A2 或 A2A3 结构域界面的任一界面或两个界面的一个或多个带电荷氨基酸残基的取代。本发明的特别优选的重组因子 VIII 包括野生型因子 VIII 的 Glu287 残基的取代、野生型因子 VIII 的 Asp302 残基

的取代、野生型因子 VIII 的 Asp519 残基的取代、野生型因子 VIII 的 Glu665 残基的取代、野生型因子 VIII 的 Glu1984 残基的取代或它们的组合。

[0014] 本发明的第二方面涉及包含根据本发明的第一方面的重组因子 VIII 的药物组合物。

[0015] 本发明的第三方面涉及编码根据本发明的第一方面的重组因子 VIII 的分离的核酸分子。本发明的这个方面还包括含有编码本发明的重组因子 VIII 的 DNA 分子的重组 DNA 表达系统、和含有所述 DNA 分子和 / 或重组表达系统的重组宿主细胞。

[0016] 本发明的第四方面涉及制备重组因子 VIII 的方法，该方法包括 :将根据本发明的第三方面的宿主细胞在使得所述宿主细胞表达重组因子 VIII 的条件下培养 ;和分离所述重组因子 VIII。

[0017] 本发明的第五方面涉及治疗动物血友病 A 的方法。该治疗方法包括 :给表现血友病 A 的动物施用有效量的根据本发明的第一方面的重组因子 VIII，从而使动物在血管损伤后表现出有效的血液凝集。

[0018] 本发明证明在 A1A2 和 A2A3 结构域界面的大量带电荷的残基不参与氢键键合，但是可能使因子 VIII 结构不稳定和 / 或在因子 VIII 前体辅因子激活后促进 A2 亚基解离。在所附的实施例中显示用疏水性残基取代这些带电荷的残基 - 目的是增加隐藏的疏水区域并诱导隐藏的亲水区域 - 增强结构域间的结合亲和力。在评估了因子 VIII 变体在较高的温度下的活性和 A2 亚基解离所导致的因子 VIII 活性衰退的时程之后评估了稳定性参数。这些研究的结果证明大量突变产生增加的稳定性参数，这与可能由于 A2 结构域界面处隐藏的电荷所导致的去稳定力的消除是一致的。因子 VIII 和激活的辅因子 VIIIa 的这些稳定化的变体应该提供治疗血友病 A 的改良治疗剂。

[0019] 附图简述

[0020] 图 1 为图解如通过一期凝集测定（黑色柱）和二期发色因子 Xa 生成测定（灰色柱）所测量的因子 VIII 突变体相对于野生型因子 VIII 的活性的图。野生型和突变体因子 VIII 形式的活性如实施例中所描述地测量。误差线显示由三次独立的测定进行平均的标准偏差的值。

[0021] 图 2A-B 分别图解野生型和突变体因子 VIII 和因子 VIIIa 的活性衰退。在图 2A 中，在 55℃下孵育因子 VIII(4nM) 并在所指示的时间取出等分试样并通过如实施例中所描述的因子 Xa 生成测定来测定活性。显示了野生型（虚线，空心圆）、R282A（空心三角形）、S524A（空心正方形）、N684A（空心菱形）、R531A（实心圆）、S650A（实心三角形）、E287A（实心正方形）和 D302A（实心菱形）的结果。在图 2B 中，在 40nM 因子 IXa 存在的条件下在 23℃下孵育凝血酶激活的因子 VIIIa(4nM) 并在所指示的时间点取出等分试样并通过如实施例中所描述的因子 Xa 生成测定来测量活性。显示了野生型（虚线，空心圆）、R282A（空心三角形）、S524A（空心正方形）、Y1792F（空心菱形）、N684A（实心圆）、Y1786F（实心三角形）、R531A（实心正方形）、E287A（实心菱形）和 D302A（灰色圆）的结果。所选的快速衰退的变体的结果在图 2B 的插图中以放大的比例显示。

[0022] 图 3A-B 图解因子 VIII 突变体和野生型因子 VIII 的 SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析。图 3A 显示在 8％的聚丙烯酰胺凝胶上的 SDS-PAGE 后通过 GelCode 显现的纯化的野生型和突变体因子 VIII 蛋白 (0.77μg)。图 3B 显示在 8％的聚丙烯酰胺

凝胶上电泳，转移到 PVDF 膜上并通过生物素化的 R8B12 抗体探测的纯化的野生型和突变体因子 VIII 蛋白 (0.34μg)。条带通过如所附的实施例中所描述的化学荧光显现。野生型（泳道 1)、Glu272Ala（泳道 2)、Glu272Val（泳道 3)、Asp519Ala（泳道 4)、Asp519Val（泳道 5)、Glu665Ala（泳道 6)、Glu665Val（泳道 7)、Glu1984Ala（泳道 8) 和 Glu1984Val（泳道 9)。MW，分子量标志物 ;sFVIII，单链形式的因子 VIII ;HC，重链 ;LC，轻链。单链形式与野生型和突变体因子 VIII 的异源二聚体形式的表观化学计量比为 0.96（野生型）、0.64(Glu272Ala)、0.92(Glu272Val)、0.74(Asp519Ala)、0.8(Asp519Val)、0.64(Glu665Ala)、0.63(Glu665Val)、0.91(Glu1984Ala) 和 0.5(Glu1984Val)。

[0023] 图 4A-D 图解因子 VIII 突变体相对于野生型因子 VIII 的比活和凝血酶生成测定。图 4A 显示使用如所附的实施例中所描述的一期凝集测定（灰色柱）和二期发色因子 Xa 生成测定（实心柱）所测定的活性值。图 4B-C 图解因子 VIII 蛋白的凝血酶生成图 (thrombogram)。野生型（虚线）、Glu272Ala（空心正方形）、Glu272Val（实心正方形）、Asp519Ala（空心圆）、Asp519Val（实心圆）、Glu665Ala（空心三角形）、Glu665Val（实心三角形）、Glu1984Ala（空心菱形）和 Glu1984Val（实心菱形）。图 4D 图解由凝血酶生成测定所获得的参数值。凝血酶生成测定如所附的实施例中所描述地进行。凝血酶生成图显示三次重复样品的平均值。参数值表达为相对于野生型的值 (%)。野生型的实际值为 7.5±0.5 分钟（滞后时间）、13.7±0.3 分钟（峰时间）、157.3±14.7nM（峰值）、979.8±37.9nM/分钟 (ETP)。显示了滞后时间（空心柱）、峰时间（灰色柱）、峰值（实心柱）和 ETP（线纹柱）。误差线显示由三次独立的测定进行平均的标准偏差的值。

[0024] 图 5A-B 图解野生型和突变体因子 VIII 的活性衰退。在不同的温度 (52-60℃）下孵育因子 VIII(4nM) 并在所指示的时间取出等分试样并通过如所附的实施例中所描述的因子 Xa 生成测定来测定活性。通过非线性最小二乘回归拟合数据，获得衰退速率。每个点代表由三次独立的测定平均的值。显示了野生型（虚线，交叉符号）、Glu272Ala（空心正方形）、Glu272Val（实心正方形）、Asp519Ala（空心圆）、Asp519Val（实心圆）、Glu665Ala（空心三角形）、Glu665Val（实心三角形）、Glu1984Ala（空心菱形）、Glu1984Val（实心菱形）和全长的 Kogenate 因子 VIII（灰色圆）的结果。图 5A 图解在 55℃孵育后代表性的因子 VIII 衰退曲线。图 5B 图解在不同温度下的因子 VIII 衰退速率的曲线。图 5B 中的插图为在 52-55℃的温度范围内的衰退结果的放大。

[0025] 图 6 为图解在 37℃下血浆中的因子 VIII 的活性衰退的图。在缺乏因子 VIII 的血浆中在 37℃下孵育因子 VIII(1nM) 并在所指示的时间取出等分试样并进行如所附的实施例中所描述的一期凝集测定。显示了野生型（虚线，交叉符号）、Asp519Ala（空心圆）、Asp519Val（实心圆）、Glu665Ala（空心三角形）、Glu665Val（实心三角形）、Glu1984Ala（空心菱形）和 Glu1984Val（实心菱形）的结果。通过非线性最小二乘回归拟合数据，并且每个点代表由三次独立的测定平均的值。

[0026] 图 7A-B 为图解在不存在或存在因子 IXa 的条件下野生型和突变体因子 VIIIa 的活性衰退的图。图 7A 显示在 23℃下孵育的凝血酶激活的因子 VIIIa(4nM)。在所指示的时间点取出等分试样并通过如所附的实施例中所描述的因子 Xa 生成测定来测量活性。图 7B 显示在存在 IXa 的条件下野生型和突变体因子 VIIIa 的活性衰退。在存在 40nM 因子 IXa 的条件下用凝血酶激活因子 VIII(4nM)。在所指示的时间点取出等分试样并通过如所

附的实施例中所描述的因子 Xa 生成测定来测量活性。显示了野生型（虚线，交叉符号）、Glu272Ala（空心正方形）、Glu272Val（实心正方形）、Asp519Ala（空心圆）、Asp519Val（实心圆）、Glu665Ala（空心三角形）、Glu665Val（实心三角形）、Glu1984Ala（空心菱形）和 Glu1984Val（实心菱形）的结果。通过非线性最小二乘回归拟合数据，并且每个点代表由三次独立的测定平均的值。

[0027] 图 8 为图解将 Asp519、Glu665 和 / 或 Glu1984 残基变为 Ala 或 Val 的因子 VIII 双组合突变体或三组合突变体的比活的图。使用如实施例中所描述的一期凝集测定（灰色柱）和二期发色因子 Xa 生成测定（黑色柱）测定活性值。误差线显示由三次独立的测定进行平均的标准偏差值。

[0028] 图 9 为图解野生型因子 VIII 和将 Asp519、Glu665 和 / 或 Glu1984 残基变为 Ala 或 Val 的因子 VIII 双组合突变体或三组合突变体的因子 VIII 活性衰退速率的图。如实施例中所描述的，进行因子 VIII 活性衰退实验并通过非线性最小二乘回归评估衰退速率。灰色柱显示相对于最佳单突变体的速率（参见实施例 5，图 5A）并其通过除以最佳（最低）的速率值计算。例如，最佳单突变体 D519AE665A 对的速率相对值等于 D519AE665A 的衰退速率除以 D519A 的衰退速率。黑色柱显示表示为 10 倍的实际衰退速率参数值。

[0029] 图 10 为图解野生型因子 VIII 和将 Asp519、Glu665 和 / 或 Glu1984 残基变为 Ala 或 Val 的因子 VIII 双组合突变体或三组合突变体的因子 VIIIa 活性衰退速率的图。如实施例中所描述的，在不存在因子 IXa 的条件下孵育 1.5nM 因子 VIIIa 后进行因子 VIIIa 活性衰退测量并且通过非线性最小二乘回归评估了衰退速率。灰色柱显示相对于最佳单突变体的速率（参见实施例 7，图 7A），并且其如图 9 的说明中所描述的计算。黑色柱显示表示为 10 倍的实际衰退速率参数值。

[0030] 图 11A-B 图解使用组合突变体的凝血酶生成测定的结果。图 11A 显示因子 VIII 蛋白的凝血酶生成图。凝血酶生成测定如实施例中所描述的进行。试剂的终浓度为 0.2nM（因子 VIII）、0.5pM(rTF)、4μM(PSPCPE 囊泡)、433μM（荧光底物）、13.3mM $CaCl_2$ 和 105nM（凝血酶校准物）。显示了野生型（虚线）、D519AE665V（空心圆）、D519VE665V（实心圆）、D519VE1984A（空心三角形）和 D519VE665VE1984A（实心三角形）的结果。图 11B 显示由凝血酶生成测定所获得的参数值。凝血酶生成图显示三次重复样品的平均值。参数值表达为相对于野生型的值（%）。野生型的实际值为 8.5±0.4 分钟（滞后时间）、21.3±0.6 分钟（峰时间）、58.5±15.6nM（峰值）、883.6±199.8nM/ 分钟 (ETP)。滞后时间（空心柱）、峰时间（灰色柱）、峰值（实心柱）和 ETP（线纹柱）。误差线显示由三次独立的测定进行平均的标准偏差值。

[0031] 图 12A-C 图解与 Glu113Ala 突变的组合的在残基 Asp519、Glu665 和 / 或 Glu1984 处的 Ala 或 Val 突变体的因子 VIII 和因子 VIIIa 的相对于野生型的比活和活性衰退速率。图 12A 显示使用如实施例中所描述的一期凝集测定（灰色柱）和二期发色因子 Xa 生成测定（黑色柱）所测定的组合突变体相对于野生型的比活。误差线显示由三次独立的测定进行平均的标准偏差值。图 12B 显示在 55℃下的因子 VIII 活性衰退测定的结果，衰退速率通过如实施例中所描述的非线性最小二乘回归评估。图 12C 显示在不存在因子 IXa 的条件下孵育 1.5nM 因子 VIIIa 后进行的因子 VIIIa 活性衰退测量的结果，并且衰退速率通过如实施例中所描述的非线性最小二乘回归评估。

[0032] 发明详述

[0033] 本发明涉及重组因子 VIII，所述重组因子 VIII 具有导致因子 VIII 和因子 VIIIa 两者的稳定性增强的一种或多种突变。

[0034] 本发明的重组因子 VIII 可以通过修饰野生型因子 VIII 或突变体因子 VIII 的氨基酸序列来制备，所述突变体因子 VIII 已被另外修饰以影响因子 VIII 的其他特性，如抗原性、循环半衰期、蛋白分泌、对因子 IXa 和 / 或因子 X 的亲和力、改变的因子 VIII 灭活裂解位点、免疫原性、架存期等。

[0035] 可以根据本发明被修饰的合适的野生型因子 VIII 可以来自多种动物，包括但不限于：哺乳动物，如人（参见，例如 GenBank 登录号 AAA52484（氨基酸）和 K01740（核苷酸）；和 GenBank 登录号 CAD97566（氨基酸）和 AX746360（核苷酸），通过引用将它们整体并入本文）、大鼠（参见，例如，GenBank 登录号 AAQ21580（氨基酸）和 AY362193（核苷酸），通过引用将它们整体并入本文）、小鼠（参见，例如，GenBank 登录号 AAA37385（氨基酸）和 L05573（核苷酸），通过引用将它们整体并入本文）、豚鼠、狗（参见，例如，GenBank 登录号 AAB87412（氨基酸）和 AF016234（核苷酸）；以及 GenBank 登录号 AAC05384（氨基酸）和 AF049489（核苷酸），通过引用将它们整体并入本文）、猫、猴、黑猩猩（参见，例如 GenBank 登录号 XP 529212（氨基酸和 XM 529212（核苷酸），通过引用将它们整体并入本文）、猩猩、牛、马、绵羊、猪（参见，例如 GenBank 登录号 NP_999332（氨基酸）和 NM_214167（核苷酸），通过引用将它们整体并入本文）、山羊、兔和鸡。这些和其他序列还可以经由血友病 A 突变、结构、测试和资源网站（或 HAMSTeRS）以电子方式获得，该网站还提供人、猪、鼠和犬的因子 VIII 蛋白的比对。因此，哺乳动物因子 VIII 蛋白的保守性和同源性是熟知的。

[0036] 举例来说，人因子 VIII cDNA 核苷酸和预测的氨基酸序列分别以 SEQID NO：1 和 2 显示在下面。人因子 VIII 是作为约 300kDa 的单链蛋白合成的，它具有定义“结构域”序列 NH_2-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH 的内在序列同源性。在因子 VIII 分子中，如本文所用的“结构域”为通过内在氨基酸序列同一性和凝血酶的蛋白裂解位点定义的连续的氨基酸序列。除非另外指明，否则在与人氨基酸序列（SEQ ID NO：2）比对时，因子 VIII 结构域包含下列氨基酸残基：

[0037] A1，残基 Ala_1-Arg_{372}；

[0038] A2，残基 Ser_{373}-Arg_{740}；

[0039] B，残基 Ser_{741}-Arg_{1648}；

[0040] A3，残基 Ser_{1690}-Ile_{2032}；

[0041] C1，残基 Arg_{2033}-Asn_{2172}；以及

[0042] C2，残基 Ser_{2173}-Tyr_{2332}。

[0043] A3-C1-C2 序列包含残基 Ser_{1690}-Tyr_{2332}。剩余的序列残基 Glu_{1649}-Arg_{1689} 通常被称为因子 VIII 轻链激活肽。因子 VIII 被凝血酶或因子 Xa 激活，凝血酶或因子 Xa 将它从冯维勒布兰德因子解离形成因子 VIIIa，因子 VIIIa 具有促凝血功能。因子 VIIIa 的生物学功能是通过几级放大来增加因子 IXa 对因子 X 激活的催化效力。凝血酶激活的因子 VIIIa 为 160kDa 的 A1/A2/A3-C1-C2 异源三聚体，它与因子 IXa 和因子 X 在血小板或单核细胞的表面上形成复合体。如本文所用的“部分结构域”是形成结构域的部分的连续氨基酸序列。

[0044] 编码野生型人因子 VIII 的基因具有如下的 SEQ ID NO：1 的核苷酸序列：

[0045] gccaccagaagatactacctgggtgcagtggaactgtcatgggactatatgcaaagt

[0046] gatctcggtgagctgcctgtggacgcaagatttcctcctagagtgccaaaatctttt

[0047] ccattcaacacctcagtcgtgtacaaaaagactctgtttgtagaattcacggatcac

[0048] cttttcaacatcgctaagccaaggccaccctggatgggtctgctaggtcctaccatc

[0049] caggctgaggtttatgatacagtggtcattacacttaagaacatggcttcccatcct

[0050] gtcagtcttcatgctgttggtgtatcctactggaaagcttctgagggagctgaatat

[0051] gatgatcagaccagtcaaagggagaaagaagatgataaagtcttccctggtggaagc

[0052] catacatatgtctggcaggtcctgaaagagaatggtccaatggcctctgacccactg

[0053] tgccttacctactcatatctttctcatgtggacctggtaaaagacttgaattcaggc

[0054] ctcattggagccctactagtatgtagagaagggagtctggccaaggaaaagacacag

[0055] accttgcacaaatttatactacttttgctgtatttgatgaagggaaaagttggcac

[0056] tcagaaacaaagaactccttgatgcaggatagggatgctgcatctgctcgggcctgg

[0057] cctaaaatgcacacagtcaatggttatgtaaacaggtctctgccaggtctgattgga

[0058] tgccacaggaaatcagtctattggcatgtgattggaatgggcaccactcctgaagtg

[0059] cactcaatattcctcgaaggtcacacatttcttgtgaggaaccatcgccaggcgtcc

[0060] ttggaaatctcgccaataactttccttactgctcaaacactcttgatggaccttgga

[0061] cagtttctactgttttgtcatatctcttcccaccaacatgatggcatggaagcttat

[0062] gtcaaagtagacagctgtccagaggaaccccaactacgaatgaaaaataatgaagaa

[0063] gcggaagactatgatgatgatcttactgattctgaaatggatgtggtcaggtttgat

[0064] gatgacaactctccttcctttatccaaattcgctcagttgccaagaagcatcctaaa

[0065] acttgggtacattacattgctgctgaagaggaggactgggactatgctcccttagtc

[0066] ctcgcccccgatgacagaagttataaaagtcaatatttgaacaatggccctcagcgg

[0067] attggtaggaagtacaaaaaagtccgatttatggcatacacagatgaaacctttaag

[0068] actcgtgaagctattcagcatgaatcaggaatcttgggacctttactttatggggaa

[0069] gttggagacacactgttgattatatttaagaatcaagcaagcagaccatataacatc

[0070] taccctcacggaatcactgatgtccgtcctttgtattcaaggagattaccaaaaggt

[0071] gtaaaacatttgaaggattttccaattctgccaggagaaatattcaaatataaatgg

[0072] acagtgactgtagaagatgggccaactaaatcagatcctcggtgcctgacccgctat

[0073] tactctagtttcgttaatatggagagagatctagcttcaggactcattggccctctc

[0074] ctcatctgctacaaagaatctgtagatcaaagaggaaaccagataatgtcagacaag

[0075] aggaatgtcatcctgttttctgtatttgatgagaaccgaagctggtacctcacagag

[0076] aatatacaacgctttctccccaatccagctggagtgcagcttgaggatccagagttc

[0077] caagcctccaacatcatgcacagcatcaatggctatgtttttgatagtttgcagttg

[0078] tcagtttgtttgcatgaggtggcatactggtacattctaagcattggagcacagact

[0079] gacttcctttctgtcttcttctctggatataccttcaaacacaaaatggtctatgaa

[0080] gacacactcaccctattcccattctcaggagaaactgtcttcatgtcgatggaaaac

[0081] ccaggtctatggattctggggtgccacaactcagactttcggaacagaggcatgacc

[0082] gccttactgaaggtttctagttgtgacaagaacactggtgattattacgaggacagt

[0083] tatgaagatatttcagcatacttgctgagtaaaaacaatgccattgaaccaagaagc

[0084] ttctcccagaattcaagacaccctagcactaggcaaaagcaatttaatgccaccaca

[0085] attccagaaaatgacatagagaagactgacccttggtttgcacacagaacacctatg

[0086] cctaaaatacaaaatgtctcctctagtgatttgttgatgctcttgcgacagagtcct

[0087] actccacatgggctatccttatctgatctccaagaagccaaatatgagacttttct

[0088] gatgatccatcacctggagcaatagacagtaataacagcctgtctgaaatgacacac

[0089] ttcaggccacagctccatcacagtggggacatggtatttacccctgagtcaggcctc

[0090] caattaagattaaatgagaaactggggacaactgcagcaacagagttgaagaaactt

[0091] gatttcaaagtttctagtacatcaaataatctgatttcaacaattccatcagacaat

[0092] ttggcagcaggtactgataatacaagttccttaggacccccaagtatgccagttcat

[0093] tatgatagtcaattagataccactctatttggcaaaaagtcatctccccttactgag

[0094] tctggtggacctctgagcttgagtgaagaaaataatgattcaaagttgttagaatca

[0095] ggtttaatgaatagccaagaaagttcatggggaaaaaatgtatcgtcaacagagagt

[0096] ggtaggttatttaaagggaaaagagctcatggacctgctttgttgactaaagataat

[0097] gccttattcaaagttagcatctctttgttaaagacaaacaaaacttccaataattca

[0098] gcaactaatagaaagactcacattgatggcccatcattattaattgagaatagtcca

[0099] tcagtctggcaaaatatattagaaagtgacactgagtttaaaaaagtgacacctttg

[0100] attcatgacagaatgcttatggacaaaaatgctacagctttgaggctaaatcatatg

[0101] tcaaataaaactacttcatcaaaaaacatggaaatggtccaacagaaaaaagagggc

[0102] cccattccaccagatgcacaaaatccagatatgtcgttctttaagatgctattcttg

[0103] ccagaatcagcaaggtggatacaaaggactcatggaaagaactctctgaactctggg

[0104] caaggccccagtccaaagcaattagtatccttaggaccagaaaaatctgtggaaggt

[0105] cagaatttcttgtctgagaaaaacaaagtggtagtaggaaagggtgaatttacaaag

[0106] gacgtaggactcaaagagatggtttttccaagcagcagaaacctatttcttactaac

[0107] ttggataatttacatgaaaataatacacacaatcaagaaaaaaaaaattcaggaagaa

[0108] atagaaaagaaggaaacattaatccaagagaatgtagttttgcctcagatacataca

[0109] gtgactggcactaagaatttcatgaagaacctttcttactgagcactaggcaaaat

[0110] gtagaaggttcatatgacggggcatatgctccagtacttcaagattttaggtcatta

[0111] aatgattcaacaaatagaacaaagaaacacacagctcatttctcaaaaaaaggggag

[0112] gaagaaaacttggaaggcttgggaaatcaaaccaagcaaattgtagagaaatatgca

[0113] tgcaccacaaggatatctcctaatacaagccagcagaattttgtcacgcaacgtagt

[0114] aagagagctttgaaacaattcagactcccactagaagaaacagaacttgaaaaaagg

[0115] ataattgtggatgacacctcaacccagtggtccaaaaacatgaaacatttgaccccg

[0116] agcaccctcacacagatagactacaatgagaaggagaaaggggccattactcagtct

[0117] cccttatcagattgccttacgaggagtcatagcatccctcaagcaaatagatctcca

[0118] ttacccattgcaaaggtatcatcatttccatctattagacctatatatctgaccagg

[0119] gtcctattccaagacaactcttctcatcttccagcagcatcttatagaaagaaagat

[0120] tctggggtccaagaaagcagtcatttcttacaaggagccaaaaaaaataacctttct

[0121] ttagccattctaaccttggagatgactggtgatcaaagagaggttggctccctgggg

[0122] acaagtgccacaaattcagtcacatacaagaaagttgagaacactgttctcccgaaa

[0123] ccagacttgcccaaaacatctggcaaagttgaattgcttccaaaagttcacatttat

[0124] cagaaggacctattccctacggaaactagcaatgggtctcctggccatctggatctc

[0125] gtggaagggagccttcttcagggaacagagggagcgattaagtggaatgaagcaaac

[0126] agacctggaaaagttccctttctgagagtagcaacagaaagctctgcaaagactccc

[0127] tccaagctattggatcctcttgcttgggataaccactatggtactcagataccaaaa

[0128] gaagagtggaaatcccaagagaagtcaccagaaaaaacagcttttaagaaaaaggat

[0129] accattttgtccctgaacgcttgtgaaagcaatcatgcaatagcagcaataaatgag

[0130] ggacaaaataagcccgaaatagaagtcacctgggcaaagcaaggtaggactgaaagg

[0131] ctgtgctctcaaaacccaccagtcttgaaacgccatcaacgggaaataactcgtact

[0132] actcttcagtcagatcaagaggaaattgactatgatgataccatatcagttgaaatg

[0133] aagaaggaagattttgacatttatgatgaggatgaaaatcagagcccccgcagcttt

[0134] caaaagaaaacacgacactattttattgctgcagtggagaggctctgggattatggg

[0135] atgagtagctccccacatgttctaagaaacagggctcagagtggcagtgtccctcag

[0136] ttcaagaaagttgttttccaggaatttactgatggctcctttactcagcccttatac

[0137] cgtggagaactaaatgaacatttgggactcctggggccatatataagagcagaagtt

[0138] gaagataatatcatggtaactttcagaaatcaggcctctcgtccctattccttctat

[0139] tctagccttatttcttatgaggaagatcagaggcaaggagcagaacctagaaaaaac

[0140] tttgtcaagcctaatgaaaccaaaacttacttttggaaagtgcaacatcatatggca

[0141] cccactaaagatgagtttgactgcaaagcctgggcttatttctctgatgttgacctg

[0142] gaaaaagatgtgcactcaggcctgattggacccccttctggtctgccacactaacaca

[0143] ctgaaccctgctcatgggagacaagtgacagtacaggaatttgctctgtttttcacc

[0144] atctttgatgagaccaaaagctggtacttcactgaaaatatggaaagaaactgcagg

[0145] gctccctgcaatatccagatggaagatcccacttttaaagagaattatcgcttccat

[0146] gcaatcaatggctacataatggatacactacctggcttagtaatggctcaggatcaa

[0147] aggattcgatggtatctgctcagcatgggcagcaatgaaaacatccattctattcat

[0148] ttcagtggacatgtgttcactgtacgaaaaaaagaggagtataaaatggcactgtac

[0149] aatctctatccaggtgtttttgagacagtggaaatgttaccatccaaagctggaatt

[0150] tggcgggtggaatgccttattggcgagcatctacatgctgggatgagcacacttttt

[0151] ctggtgtacagcaataagtgtcagactcccctgggaatggcttctggacacattaga

[0152] gattttcagattacagcttcaggacaatatggacagtgggccccaaagctggccaga

[0153] cttcattattccggatcaatcaatgcctggagcaccaaggagccctttcttggatc

[0154] aaggtggatctgttggcaccaatgattattcacggcatcaagacccagggtgcccgt

[0155] cagaagttctccagcctctacatctctcagtttatcatcatgtatagtcttgatggg

[0156] aagaagtggcagacttatcgaggaaattccactggaaccttaatggtcttctttggc

[0157] aatgtggattcatctgggataaaacacaatatttttaaccctccaattattgctcga

[0158] tacatccgtttgcacccaactcattatagcattcgcagcactcttcgcatggagttg

[0159] atgggctgtgatttaaatagttgcagcatgccattgggaatggagagtaaagcaata

[0160] tcagatgcacagattactgcttcatcctactttaccaatatgtttgccacctggtct

[0161] ccttcaaaagctcgacttcacctccaagggaggagtaatgcctggagacctcaggtg

[0162] aataatccaaaagagtggctgcaagtggacttccagaagacaatgaaagtcacagga

[0163] gtaactactcagggagtaaaatctctgcttaccagcatgtatgtgaaggagttcctc

[0164] atctccagcagtcaagatggccatcagtggactctctttttcagaatggcaaagta

[0165] aaggtttttcagggaaatcaagactccttcacacctgtggtgaactctctagaccca

[0166] ccgttactgactcgctaccttcgaattcacccccagagttgggtgcaccagattgcc

[0167] ctgaggatggaggttctgggctgcgaggcacaggacctctactga

[0168] 由 SEQ ID NO:1 编码的野生型人因子 VIII 具有如下的 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列：

[0169] ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVH

[0170] LFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEY

[0171] DDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSG

[0172] LIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAW

[0173] PKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQAS

[0174] L**E**ISPITFLTAQTLLM**D**LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEE

[0175] AEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV

[0176] LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGE

[0177] VGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKW

[0178] TVTVE**D**GPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDK

[0179] RNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQL

[0180] SVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVY**E**DTLTLFPFSGETVFMSMEN

[0181] PGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRS

[0182] FSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSP

[0183] TPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGL

[0184] QLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVH

[0185] YDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTES

[0186] GRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSP

[0187] SVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEG

[0188] PIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEG

[0189] QNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEE

[0190] IEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYEGAYAPVLQDFRSL

[0191] NDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRS

[0192] KRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQS

[0193] PLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKD

[0194] SGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPK

[0195] PDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEAN

[0196] RPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKD

[0197] TILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRT

[0198] TLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYG

[0199] MSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEV

[0200] EDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMA

[0201] PTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFT

[0202] IFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQ

[0203] RIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVF**E**TVEMLPSKAGI

[0204] WRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLAR

[0205] LHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDG

[0206] KKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMEL

[0207] MGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQV

[0208] NNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKV

[0209] KVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

[0210] 在上面的序列中，通过粗体和下划线标记了几个带电荷的残基，包括 Glu287、Asp302、Asp519、Glu665 和 Glu1984。

[0211] 本发明的重组因子 VIII 由在 A1A2 或 A2A3 结构域界面的任一个或两个的一个或多个带电荷氨基酸残基被疏水性氨基酸残基取代来表征。优选地，被取代的带电荷的残基为不参与 A1A2 结构域之间或 A2A3 结构域之间的氢键键合的 Glu 或 Asp 残基。取代带电荷的残基的疏水性氨基酸残基可以为 Ala、Val、Ile、Leu、Met、Phe 或 Trp 的任一种。本发明的特别优选的重组因子 VIII 包括野生型因子 VIII 的 Glu287 残基的取代、野生型因子 VIII 的 Asp302 残基的取代、野生型因子 VIII 的 Asp519 残基的取代、野生型因子 VIII 的 Glu665 残基的取代、野生型因子 VIII 的 Glu1984 残基的取代或它们的组合。D302A、E287A、E665A、E665V、D519A、D519V、E1984A 和 E1984V 取代对于实现因子 VIII 和因子 VIIIa 二者的稳定性增强的重组因子 VIII 是优选的。这些取代的优选组合包括但不限于：D519AE665V、D519VE665V 和 D519VE1984A 双突变体、以及 D519AE665VE1984A 和 D519VE665VE1984A 三突变体。认为这些突变体的增强的稳定性是通过与野生型因子 VIIIa 相比稳定因子 VIII 中的结构域间界面以及降低 A2 亚基从 A1/A3C1C2 解离来达成的。

[0212] 可以根据本发明被修饰的合适的突变体因子 VIII 序列还可以包括任何先前已知的或随后被鉴定的突变体因子 VIII 序列，所述突变体因子 VIII 序列具有关于多种属性的被修饰的特性，包括但不限于：抗原性、循环半衰期、蛋白分泌、对因子 IXa 和 / 或因子 X 的亲和力、改变的因子 VIII 灭活裂解位点、因子 VIIIa 的增强的比活、免疫原性和架存期。

[0213] 可以根据本发明被修饰的合适的突变体因子 VIII 的一个实例为具有修饰的钙结合位点，优选在 SEQ ID NO：2 的残基 113 处的因子 VIII。这提供具有增强的比活的因子 VIIIa。这种类型的示例性突变体描述在授予 Fay 等人的美国专利申请公布第 10/581,471 号中，通过引用将其整体并入本文。优选地，还根据一种或多种上文所描述的突变（例如，在位置 287、302、519、665 和 / 或 1984）修饰残基 113 突变体以提供高稳定性 / 高比活的因子 VIII 蛋白。示例性的高稳定性 / 高比活的因子 VIII 蛋白包括但不限于：具有组合的 E113AD519A、E113AD519V、E113AE665A、E113AE665V 或 E113AE1984V 取代的那些。

[0214] 可以根据本发明被修饰的合适的突变体因子 VIII 的第二个实例为含有 SEQ ID NO：2 的氨基酸残基 1-740 和 1690-2332 的无 B 结构域的因子 VIII（参见，例如授予 Lollar 的美国专利第 6,458,563 号，通过引用将其整体并入本文）。

[0215] 在本发明的无 B 结构域的重组因子 VIII 的一个实施方式中，B- 结构域被 DNA 接

头区段取代，并且至少一个密码子被编码与猪的因子 VIII 的相应残基具有相同电荷的氨基酸残基的密码子取代（参见，例如授予 Hauser 等人的美国专利申请公布第 2004/0197875 号，通过引用将其整体并入本文）。

[0216] 在本发明的无 B 结构域重组因子 VIII 的另一实施方式中，修饰的突变体因子 VIII 被具有插入一个或多个位点的截短的因子 IX 内含子 1 的核苷酸序列编码（参见，例如授予 Negrier 的美国专利第 6,800,461 号和授予 Negrier 的美国专利第 6,780,614 号，通过引用将他们每一个整体并入本文）。这种重组因子 VIII 可用于体外产生较高产率的重组因子 VIII 和用于基因治疗的转移载体中（参见，例如授予 Negrier 的美国专利第 6,800,461 号，通过引用将其整体并入）。在此实施方式的具体实例中，重组因子 VIII 可以被具有插入两个位点的截断的因子 IX 内含子 1 并且具有适于在造血细胞系、并且尤其是在血小板中驱动表达的启动子的核苷酸序列编码（参见，例如授予 Negrier 的美国专利第 6,780,614 号，通过引用将其整体并入本文）。

[0217] 无论实施方式如何，无 B 结构域的因子 VIII 优选含有一种或多种上文所述的突变（例如，在位置 287、302、519、665 和 / 或 1984）。根据本文的实施例所制备的重组因子 VIII 蛋白为无 B 结构域的。

[0218] 可以根据本发明被修饰的合适的突变体因子 VIII 的第三个实例为含有一个或多个动物氨基酸残基作为负责人因子 VIII 的抗原性的人氨基酸残基的取代的嵌合的人 / 动物因子 VIII。具体地，动物（例如，猪）残基取代可以包括但不限于下列的一种或多种：R484A、R488G、P485A、L486S、Y487L、Y487A、S488A、S488L、R489A、R489S、R490G、L491S、P492L、P492A、K493A、G494S、V495A、K496M、H497L、L498S、K499M、D500A、F501A、P502L、I503M、L504M、P505A、G506A、E507G、I508M、I508A、M2199I、F2200L、L2252F、V2223A、K2227E 和 / 或 L2251（授予 Lollar 的美国专利第 5,859,204 号、授予 Lollar 的美国专利第 6,770,744 号和授予 Lollar 的美国专利申请公布第 2003/0166536 号，通过引用将它们每一个整体并入本文）。优选地，重组嵌合因子 VIII 含有一种或多种上文所述的突变（例如，在位置 287、302、519、665 和 / 或 1984）。

[0219] 可以根据本发明被修饰的合适的突变体因子 VIII 的第四个实例为以下的增强的亲和力的因子 VIII：因子 IXa（参见，例如 Fay 等人，“Factor VIIIaA2 Subunit Residues 558-565Represent a Factor IXa Interactive Site（因子 VIIIa A2 亚基残基 558-565 代表因子 IXa 的相互作用位点），”J. Biol.Chem.269(32):20522-7(1994);Bajaj 等人，“Factor IXa:Factor VIIIa Interaction.Helix 330-338of Factor IXa Interacts with Residues 558-565and SpatiallyAdjacent Regions of the A2 Subunit of Factor VIIIa（因子 IXa：因子 VIIIa 相互作用。因子 IXa 的螺旋 330-338 与因子 VIIIa 的 A2 亚基的残基 558-565 和空间邻近区相互作用），”J. Biol.Chem.276(19):16302-9(2001)；和 Lenting 等人“The Sequence Glu 1811-Lys 1818 of Human Blood Coagulation FactorVIII Comprises a Binding Site for Activated Factor IX（人血凝血因子 VIII 的序列 Glu1811-Lys1818 包含激活的因子 IX 的结合位点），”J. Biol.Chem.271(4):1935-40(1996)，通过引用将它们每一个整体并入本文）和 / 或因子 X（参见，例如 Lapan 等人，“Localization of a Factor X Interactive Site in theA1 Subunit of Factor VIIIa（因子 VIIIa 的 A1 亚基中的因子 X 相互作用位点的定位），”J. Biol.Chem.272：

2082-88(1997),通过引用将其整体并入本文)。优选地,亲和力增强的因子 VIII 含有一种或多种上文所述的突变(例如,在位置 287、302、519、665 和/或 1984)。

[0220] 可以根据本发明被修饰的合适的突变体因子 VIII 的第五个实例为被修饰以增强因子 VIII 的分泌的因子 VIII(参见,例如 Swaroop 等人,"Mutagenesis of a Potential Immunoglobulin-Binding Protein-Binding SiteEnhances Secretion of Coagulation Factor VIII(可能的免疫球蛋白-结合蛋白-结合位点的诱变增强凝血因子 VIII 的分泌),"J. Biol.Chem.272(39):24121-4(1997),通过引用将其整体并入本文)。优选地,分泌增强的突变体因子VIII 含有一种或多种上文所鉴定的突变(例如,在位置287、302、519、665 和/或 1984)。

[0221] 可以根据本发明被修饰的合适的突变体因子 VIII 的第六个实例为具有增加的循环半衰期的因子 VIII。这种修饰可以使用多种方法制备,包括但不限于:通过降低与下列物质的相互作用:硫酸乙酰肝素 (Sarafanov 等人,"Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans Participate in Factor VIIICatabolism Mediated by Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein(细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖参与低密度脂蛋白受体相关蛋白介导的因子 VIII 的分解代谢),"J. Biol.Chem.276(15):11970-9(2001),通过引用将其整体并入本文)和/或低密度脂蛋白受体相关的蛋白("LRP")(Saenko 等人,"Role of the Low Density Lipoprotein-Related Protein Receptor inMediation of Factor VIII Catabolism(低密度脂蛋白相关蛋白的受体在介导因子VIII 分解代谢中的作用),"J. Biol.Chem.274(53):37685-92(1999);以及Lenting 等人,"The Light Chain of Factor VIII Comprises a Binding Site forLow Density Lipoprotein Receptor-Related Protein(因子 VIII 的轻链包含低密度脂蛋白受体相关蛋白的结合位点),"J. Biol.Chem.274(34):23734-9(1999),通过引用将他们每一个整体并入本文)。优选地,半衰期增强的突变体因子 VIII 含有一种或多种上文所述的突变(例如,在位置 287、302、519、665 和/或 1984)。

[0222] 可以根据本发明被修饰的合适的突变体因子 VIII 的第七个实例为由以下核苷酸序列编码的修饰的因子 VIII,该核苷酸序列经过修饰编码在已知的现有的表位中的氨基酸以在天冬酰胺残基处产生糖基化的识别序列(参见,例如授予 Lollar 的美国专利第6,759,216 号,通过引用将其整体并入本文)。此实例的突变体因子 VIII 可用于提供逃离存在的抑制抗体检测(低抗原性因子 VIII)和降低发展抑制抗体的可能(低免疫原性因子 VIII)的修饰的因子 VIII。在这个实例的一个具体的实施方式中,修饰的因子 VIII 被突变为具有 N-连接的糖基化的共有氨基酸序列。这种共有序列的实例为 N-X-S/T,其中 N 为天冬酰胺,X 为任一氨基酸,并且 S/T 代表丝氨酸或苏氨酸(参见授予 Lollar 的美国专利第6,759,216 号,通过引用将其整体并入本文)。优选地,糖基化位点被修饰的因子 VIII 含有一种或多种上文所鉴定的突变(例如,在位置 287、302、519、665 和/或 1984)。

[0223] 可以根据本发明被修饰的合适的突变体因子 VIII 的第八个实例为修饰的因子 VIII,该修饰的因子 VIII 为具有多种突变的促凝血活性的因子 VIII(参见,例如授予 Kaufman 等人的美国专利申请公布第 2004/0092442 号,通过引用将其整体并入本文)。这种实施方式的一个实例涉及被进行如下修饰的修饰的因子 VIII:(i) 缺失冯维勒布兰德因子结合位点;(ii) 在 Arg 740 处添加突变;和 (iii) 在 A2 和 A3 结构域之间添加氨基酸序

列间隔区，其中所述氨基酸间隔区具有足以在激活后使促凝血活性因子 VIII 蛋白变为异源二聚体的长度（参见授予 Kaufman 等人的美国专利申请公部第 2004/0092442 号，通过引用将其整体并入本文）。优选地，促凝血活性的因子 VIII 还被修饰以含有一种或多种上文所述的突变（例如，在位置 287、302、519、665 和 / 或 1984）。

[0224] 此外，突变体因子 VIII 可以被修饰以具有通常关于重组凝血因子的多种优势（参见，例如 Saenko 等人，“The Future of Recombinant CoagulationFactors（重组凝血因子的前景），”J. Thrombosis and Haemostasis 1 :922-930(2003)，通过引用将其整体并入本文）。

[0225] 本发明的重组因子 VIII 可以在使 A1A2 或 A2A3 结构域界面不稳定的任何带电荷的残基（包括位置 87、302、519、665 或 1984）处被修饰；以及被修饰为无 B 结构域、嵌合的、具有增强因子 VIIIa 活性的修饰的钙结合位点（例如，在位置 113 处）、具有改变的灭活裂解位点、具有增强的因子 IXa 和 / 或因子 X 亲和力、具有增强的分泌、具有增加的循环半衰期、或具有突变体糖基化位点；或除对带电荷的残基的一个或多个修饰外再进行任何一种或多种此类修饰，包括改善重组因子 VIII 的活性的修饰的钙结合位点。实施例中描述了许多示例性的无 B 结构域、比活增强、高稳定性的重组因子 VIII 蛋白。

[0226] 重组因子 VIII 优选以基本上纯的形式制备。在具体的实施方式中，基本上纯的重组因子 VIII 为至少约 80％纯的，更优选至少 90％纯的，最优选至少 95％纯的。基本上纯的重组因子 VIII 可以通过本领域内熟知的常规技术获得。通常，基本上纯的重组因子 VIII 是被分泌到重组宿主细胞的生长培养基中的。可选择地，制备了基本上纯的重组因子 VIII，但是其并不分泌到生长培养基中。在这种情况下，为了分离基本上纯的重组因子 VIII，繁殖携带重组质粒的宿主细胞，通过超声、加热或化学处理将其裂解，并将匀浆物离心以去除细胞碎片。然后对上清液进行硫酸铵分级沉淀。将含有基本上纯的重组因子 VIII 的级分在合适尺寸的葡聚糖或聚丙烯酰胺柱中进行凝胶过滤以分离重组因子 VIII。如果需要，蛋白级分（含有基本上纯的重组因子 VIII）可以进一步通过高效液相色谱（“HPLC”）来纯化。

[0227] 本发明的另一方面涉及编码本发明的重组因子 VIII 的分离的核酸分子。编码重组因子 VIII 的分离的核酸分子可以为 RNA 或 DNA。

[0228] 在一个实施方式中，分离的核酸分子可以具有编码增强因子 VIII 的比活的位置 113 处的突变，同时还被带电荷的残基的取代中的一种或多种（例如，在 SEQ ID NO :2 的位置 287、302、519、665、1984 和 / 或 332-340）修饰的核苷酸序列。

[0229] 在另一实施方式中，分离的核酸分子可以具有编码上文所述类型的无 B 结构域因子 VIII，同时还被带电荷的残基的取代中的一种或多种（例如，在 SEQ ID NO :2 的位置 287、302、519、665 和 / 或 1984）修饰的核苷酸序列。

[0230] 在另一实施方式中，分离的核酸分子可以具有编码上文所述类型的嵌合的人 / 猪因子 VIII，同时还被带电荷的残基的取代中的一种或多种（例如，在 SEQ ID NO :2 的位置 287、302、519、665 和 / 或 1984）修饰的核苷酸序列。

[0231] 在另一实施方式中，分离的核酸分子可以具有编码灭活位点被如上文所述修饰的因子 VIII，同时还被带电荷的残基的取代中的一种或多种（例如，在 SEQ ID NO :2 的位置 287、302、519、665 和 / 或 1984）修饰的核苷酸序列。

[0232] 在又一实施方式中，分离的核酸分子可以具有编码对因子 IXa 和 / 或因子 X 的亲

和力增强了的因子 VIII，同时还被带电荷的残基的取代中的一种或多种（例如，在 SEQ ID NO :2 的位置 287、302、519、665 和 / 或 1984）修饰的核苷酸序列。

[0233] 在再一实施方式中，分离的核酸分子可以具有编码对多种血清结合蛋白的亲和力被改变以增加其循环半衰期的因子 VIII，同时还被带电荷的残基的取代中的一种或多种（例如，在 SEQ ID NO :2 的位置 287、302、519、665 和 / 或 1984）修饰的核苷酸序列。

[0234] 在另一实施方式中，分离的核酸分子可以具有编码在培养物中分泌增加的因子 VIII，同时还被带电荷的残基的取代中的一种或多种（例如，在 SEQ ID NO :2 的位置 287、302、519、665 和 / 或 1984）修饰的核苷酸序列。

[0235] 在另一实施方式中，分离的核酸分子可以具有编码具有一个或多个非天然存在的糖基化位点的因子 VIII，同时还被带电荷的残基的取代中的一种或多种（例如在 SEQ ID NO :2 的位置 287、302、519、665 和 / 或 1984）修饰的核苷酸序列。

[0236] 在又一实施方式中，分离的核酸分子编码在任何一个或多个如上文所描述的带电荷的残基处被修饰并且还被修饰以具有下列的任何两个或更多个的分离的核酸分子 :被修饰为无 B 结构域、被修饰为嵌合的、被修饰为具有改变的灭活裂解位点、被修饰为具有增强的因子 IXa 和 / 或因子 X 亲和力、被修饰为具有增强的分泌、被修饰为具有增加的循环半衰期、被修饰为具有一个或多个非天然存在的糖基化位点、以及在钙结合位点内（例如，在位置 113）被修饰以便改善重组因子 VIII 的比活。

[0237] 本发明的另一方面涉及包含本发明的分离的 DNA 分子的重组 DNA 表达系统，该表达系统编码重组因子 VIII。在一个实施方式中，DNA 分子相对于启动子在有义方向上。

[0238] 本发明的另一方面涉及包含编码本发明的重组因子 VIII 的分离的核酸分子的宿主细胞。在具体的实施方式中，宿主细胞可以含有 DNA 分子形式的分离的核酸分子，所述 DNA 分子形式为稳定的质粒或在宿主细胞基因组中的稳定的插入序列或整合序列。在另一实施方式中，宿主细胞可以含有在表达系统中的 DNA 分子。合适的宿主细胞可以为但不限于 :动物细胞（例如，幼仓鼠肾（“BHK”）细胞）、细菌细胞（例如，大肠杆菌 (E.coli)）、昆虫细胞（例如，Sf9 细胞）、真菌细胞、酵母细胞（例如，酵母菌 (Saccharomyces) 或裂殖酵母属 (Schizosaccharomyces)）、植物细胞（例如，拟南芥 (Arabidopsis) 细胞或烟草细胞）、或藻类细胞。

[0239] 重组 DNA 表达系统和宿主细胞可以使用本领域内熟知的多种重组技术来制备，如下文所进一步讨论的。

[0240] 可以使用常规的重组 DNA 技术将编码本发明的重组因子 VIII 的 DNA 分子整合到细胞中。一般地，这包括将 DNA 分子插入到该 DNA 分子为异源（即，不是正常存在的）的表达系统中。异源 DNA 分子以有义方向和正确的阅读框插入表达系统或载体中。载体含有用于插入的编码蛋白的序列的转录和翻译的必需元件。因此，本发明的一个实施方式提供含有本发明的分离的核酸的 DNA 构建体，所述分离的核酸与 5’启动子和 3’调节区（即，转录终止子）两者可操作连接，所述 5’启动子和 3’调节区能够使本发明的编码的重组因子 VIII 在宿主细胞或宿主生物体中转录和表达。

[0241] 关于本发明的重组表达系统，含有编码本发明的重组因子 VIII 的 DNA 分子的表达载体可以使用本领域内的常见技术制备。可以使用本领域内所熟知的试剂将本发明的核酸分子插入到许多可用的表达载体的任一种中。在制备用于表达的 DNA 载体中，可以将 DNA 序

列正常地插入到或取代到细菌质粒中。可以采用任何方便的质粒，它们的特征为具有细菌复制系统、容许在细菌中进行选择的标志物和方便定位的一个或多个独特的限制位点。载体的选择取决于优选的转化技术和用于转化的靶宿主。

[0242] 可以采用多种宿主－载体系统来表达编码重组因子 VIII 的序列。主要地，载体系统必须与所用的宿主细胞相容。宿主－载体系统包括但不限于下列：用噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 转化的细菌；微生物，如含酵母载体的酵母；用病毒（例如，痘苗病毒、腺病毒、腺伴随病毒等）感染的哺乳动物细胞系统；用病毒（例如，杆状病毒）感染的昆虫细胞系统；和用细菌（例如，土壤杆菌属 (Agrobacterium)）感染的植物细胞。这些载体的表达元件在它们的强度和特异性方面不同。依据所采用的宿主－载体系统，可以使用大量合适的转录和翻译元件的任一种。

[0243] 当以重组方式制备时，在重组的宿主细胞中表达因子 VIII 蛋白或多肽（或它们的片段或变体），所述重组的宿主细胞通常但不排他地为真核细胞。

[0244] 用于实施本发明的合适的载体包括但不限于：下列病毒载体，如 λ 载体系统 gt11、gtWES.tB、Charon 4；和质粒载体，如 pCMV、pBR322、pBR325、pACYC177、pACYC184、pUC8、pUC9、pUC18、pUC19、pLG339、pR290、pKC37、pKC101、SV 40、pBluescript II SK+/- 或 pBluescript II KS+/-（参见“Stratagene Cloning Systems(Stratagene 克隆系统）”目录 (1993))、pQE、pIH821、pGEX、pET 系列 (Studier 等人，“Use of T7RNA Polymerase to DirectExpression of Cloned Genes（使用 T7RNA 聚合酶来指导克隆的基因的表达），”Methods in Enzymology 185：60-89(1990)，通过引用将其整体并入本文）；以及它们的任何衍生物。现在已知的或今后描述的用于遗传转化的任何合适的载体适用于本发明。

[0245] 可以经由转化，尤其是转导、接合、动员或电穿孔将重组分子引入细胞。使用本领域内标准的克隆方法将 DNA 序列克隆到载体中，如 Maniatis 等人在下面文献中所描述的，Molecular Cloning：A Laboratory Manual（分子克隆：实验室手册），Cold Springs Harbor，N.Y.：Cold Springs Laboratory，(1982)，通过引用将其整体并入本文。

[0246] 通过引用整体并入本文的授予 Cohen 和 Boyer 的美国专利第 4,237,224 号描述了使用限制酶裂解和用 DNA 连接酶连接制备重组质粒形式的表达载体。然后通过转化方法引入这些重组质粒并在单细胞培养物中复制，所述单细胞培养物包括原核生物体和以组织培养物生长的真核细胞。

[0247] 不同的遗传信号和加工事件控制着许多水平的基因表达（例如，DNA 转录和信使 RNA(mRNA) 翻译）。

[0248] DNA 转录依赖于启动子的存在，所述启动子为指导 RNA 聚合酶结合并从而促进 mRNA 合成的 DNA 序列。真核启动子的 DNA 序列与原核启动子的 DNA 序列不同。此外，真核启动子和伴随的遗传信号在原核系统中可能不被识别或可能不起作用；并且，另外，原核启动子在真核细胞中不被识别并且不起作用。

[0249] 类似地，原核细胞中的 mRNA 翻译依赖于适当的原核信号的存在，该原核信号与真核细胞的信号不同。mRNA 在原核细胞中的有效翻译需要在 mRNA 上的称为 Shine-Dalgarno（“SD”）序列的核糖体结合位点。这个序列为位于起始密码子前的短的 mRNA 核苷酸序列，所述起始密码子通常为 AUG，它编码蛋白氨基末端的蛋氨酸。SD 序列与

16S rRNA(核糖体 RNA)的 3’末端互补并且可能通过与 rRNA 形成双链体来促进 mRNA 与核糖体的结合从而容许核糖体正确定位。对于使基因表达最大化的综述,参见 Roberts 和 Lauer,Methods in Enzymology 68:473(1979),通过引用将其整体并入本文。

[0250] 启动子在它们的“强度”(即,它们促进转录的能力)方面不同。为了表达克隆的基因的目的,通常希望使用强启动子以获得高水平的转录和因此的高水平基因表达。依据所采用的宿主细胞系统,可以使用大量合适的启动子的任一种。例如,当在大肠杆菌(Escherichia coli)中克隆时,它的噬菌体或质粒启动子,如 T7 噬菌体启动子、lac 启动子、trp 启动子、recA 启动子、核糖体 RNA 启动子、大肠杆菌噬菌体 λ 的 P_R 启动子和 P_L 启动子以及包括但不限于 lacUV5、ompF、bla、lpp 等的其他启动子可用于指导邻近的 DNA 区段的高水平转录。此外,杂合的 trp-lacUV5(tac)启动子或由重组 DNA 或其他合成 DNA 技术所制备的其他大肠杆菌启动子可用于提供插入的基因的转录。

[0251] 可以选择在不特异性诱导的时候抑制启动子作用的细菌宿主细胞株系和表达载体。在某些操作中,特异性诱导物的添加是插入的 DNA 有效转录所必需的。例如,lac 操纵子通过添加乳糖或 IPTG(异丙基硫代 -β-D- 半乳糖苷)诱导。诸如 trp、pro 等的许多其他操纵子处于不同的控制下。

[0252] 特异性起始信号也是原核细胞中有效的基因转录和翻译所需的。如分别由合成的基因特异性信使 RNA 和蛋白的量所测量的,这些转录和翻译起始信号强度可以不同。含有启动子的 DNA 表达载体还可以含有多种“强”转录和 / 或翻译起始信号的任何组合。例如,大肠杆菌中的有效翻译需要距起始密码子(“ATG”)的 5’端约 7-9 个碱基的 SD 序列以提供核糖体结合位点。因此,可以采用宿主细胞核糖体可以利用的任何 SD-ATG 组合。这种组合包括但不限于:来自大肠杆菌噬菌体 λ 的 cro 基因或 N 基因或来自大肠杆菌色氨酸 E、D、C、B 或 A 基因的 SD-ATG 组合。此外,可以使用通过重组 DNA 或包括整合合成的核苷酸的其他技术制备的任何 SD-ATG 组合。

[0253] 在一个实施方式中,本发明的核酸分子以有义方向整合到合适的载体中以便使开放阅读框正确地确定方向以便编码的蛋白在所选择的启动子的控制下表达。这包括将合适的调节元件引入 DNA- 载体构建体。这些包括载体的非翻译区、有用的启动子和 5’和 3’的非翻译区,它们与宿主细胞蛋白相互作用以实现转录和翻译。这些元件在它们的强度和特异性方面可以不同。依据所利用的载体系统和宿主,可以使用任何数目的合适的转录和翻译元件,包括组成型的和诱导型的启动子。

[0254] 组成型的启动子为在生物体的整个发育和生命中指导基因表达的启动子。

[0255] 诱导型启动子为能够响应于诱导物直接或间接激活一种或多种 DNA 序列或基因的转录的启动子。在不存在诱导物的条件下,DNA 序列或基因将不被转录。

[0256] 本发明的 DNA 构建体还可以包括可操作地连接至编码所选择的蛋白的 DNA 分子的 3’调节区,该 3’调节区选自能够提供在所选的宿主细胞中表达的正确的转录终止和 mRNA 多聚腺苷酸化的那些。

[0257] 可以使用如下列文献中所描述的熟知的分子克隆技术将所选择的载体、启动子和合适的 3’调节区连接在一起以制备本发明的 DNA 构建体:Sambrook 等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(分子克隆:实验室手册),第二版,Cold Spring Harbor Press,NY(1989);和 Ausubel,F. M. 等人 Current Protocols in Molecular Biology(现

代分子生物学实验技术),New York,N.Y:John Wiley&Sons(1989),通过引用将它们每一个整体并入本文。

[0258] 如所注意到的,使用原核宿主细胞的一个替代方案为使用真核宿主细胞,如哺乳动物细胞,真核宿主细胞也可用于重组制备本发明的重组因子 VIII。适于实施本发明的哺乳动物细胞包括,但不限于:COS(例如,ATCCNo.CRL 1650 或 1651)、BHK(例如,ATCC No.CRL 6281)、CHO(例如,ATCC No.CCL 61)、HeLa(例如,ATCC No.CCL 2)、293(ATCC No.1573)、CHOP、和 NS-1 细胞。

[0259] 用于在哺乳动物细胞中指导表达的合适的表达载体通常包括启动子以及本领域内已知的其他转录和翻译控制序列。常见的启动子包括 SV40、MMTV、金属硫蛋白 -1、腺病毒 Ela、CMV、极早期 (immediate early)、免疫球蛋白重链启动子和增强子和 RSV-LTR。

[0260] 一旦制备了本发明的 DNA 构建体,其便可容易地被整合到宿主细胞中。因此,本发明的另一方面涉及制备重组细胞的方法。基本地,此方法通过在有效地在宿主细胞中产生 DNA 分子转录的条件下用本发明的 DNA 构建体转化宿主细胞来进行。可以经由转化,尤其是转导、接合、动员或电穿孔将重组分子引入细胞。

[0261] 根据本文所讨论的重组技术,本发明的另一方面涉及制备本发明的重组因子 VIII 的方法。此方法包括将本发明的宿主细胞在使宿主细胞表达重组因子 VIII 的条件下培养。然后分离重组因子 VIII。在一个实施方式中,宿主细胞在生长培养基中体外生长。在具体的实施方式中,合适的生长培养基可以包括但不限于含有冯维勒布兰德因子(在本文中称为“VWF”)的生长培养基。在这个实施方式中,宿主细胞可以含有编码 VWF 的转基因或 VWF 可以作为补充物被引入生长培养基。生长培养基中的 VWF 将容许重组因子 VIII 的较高表达水平。一旦重组因子 VIII 被分泌到生长培养基中,随后便可以使用相关的重组 DNA 和蛋白领域内的那些普通技术人员所熟知的技术(包括本文所描述的那些技术)将其从生长培养基中分离。在另一实施方式中,制备本发明的重组因子 VIII 的方法还包括在分离重组因子 VIII 之前破坏宿主细胞。在这个实施方式中,重组因子 VIII 是从细胞碎片中分离的。

[0262] 位置 287、302、519、665 和 / 或 1984 处的修饰是尤其优选的,因为他们导致因子 VIII 和因子 VIIIa 两者的稳定性增强。这种增加的稳定性对于因子 VIII 的循环半衰期和血液凝集期间因子 VIIIa 的活性是很重要的。此外,这种特性在用于治疗用途的蛋白的纯化和制备期间增强可用因子 VIII 的回收方面很重要。

[0263] 当表达载体用于体内转化以诱导靶细胞中的因子 VIII 表达的目的时,可以依据所需的增强程度采用不同强度的启动子。本领域的技术人员可以根据哺乳动物启动子作为启动子的强度而容易地选择合适的哺乳动物启动子。可选择地,可以为了在需要表达或抑制因子 VIII 时进行控制的目的而采用诱导型启动子。本领域的技术人员可以从本领域内已知的那些诱导型哺乳动物启动子中选择合适的启动子。最后,可以选择组织特异性哺乳动物启动子以将任何基因转化系统的效力限制在特定的组织中。组织特异性启动子是本领域内已知的并且可以根据要治疗的组织或细胞类型选择。

[0264] 本发明的另一方面涉及治疗动物的诸如血友病尤其是血友病 A 的血液疾患的方法。这种方法包括给表现血友病 A 的动物施用有效量的本发明的重组因子 VIII,从而使动物在血管损伤后表现出有效的血液凝集。合适的有效量的重组因子 VIII 可以包括但不限于约 10 至约 50 单位 / 千克动物体重之间。所述动物可以为任何动物,但是优选为人、大鼠、

小鼠、豚鼠、狗、猫、猴、黑猩猩、猩猩、牛、马、绵羊、猪、山羊或兔。

[0265] 本发明的重组因子 VIII 可用于在具有和不具有抑制抗体的血友病患者中和由于抑制抗体的显现所引起的获得性因子 VIII 缺乏的患者中治疗由因子 VIII 缺乏所致的不受控的出血（例如，关节内、颅内或胃肠出血）。在具体的实施方式中，根据与用于人或动物因子 VIII 相同的方法将单独的重组因子 VIII 或药物组合物形式（即，与稳定剂、递送溶媒 (delivery vehicles) 和 / 或载体组合）的重组因子 VIII 静脉内输注给患者。

[0266] 可选择地，或除此之外，可以如下来施用重组因子 VIII：通过施用如腺伴随病毒的病毒载体 (Gnatenko 等人，“Human Factor VIII Can BePackaged and Functionally Expressed in an Adeno-associated VirusBackground：Applicability to Hemophilia A Gene Therapy（人因子 VIII 可以在腺伴随病毒背景中被包装并功能性表达：血友病 A 基因治疗的适用性）.”Br. J. Haematol. 104 :27-36(1999)，通过引用将其整体并入本文）；或通过移植遗传工程化以制备重组因子 VIII 的细胞，通常经由含这种细胞的装置进行移植。这种移植通常包括使用重组皮肤成纤维细胞，一种非病毒方法 (Roth 等人，“Nonviral Transfer of the Gene Encoding Coagulation FactorVIII in Patients with Sever Hemophilia（在患重度血友病的患者中编码凝血因子 VIII 的基因的非病毒转移）.”New Engl. J. Med. 344 :1735-1742(2001)，通过引用将其整体并入本文）。

[0267] 应施用给需要这种治疗的患者的重组因子 VIII 的治疗剂量依据因子 VIII 缺乏的严重程度而不同。一般地，在频率、持续时间和单位方面调节剂量水平以与各患者的出血发作的严重程度和持续时间一致。因此，如标准的凝集测定所测量的，重组因子 VIII 以足以递送给患者治疗有效量的蛋白以停止出血的量包含在药物上可接受的载体、递送溶媒或稳定剂内。

[0268] 因子 VIII 经典地被定义为存在于正常血浆中纠正由患血友病 A 的个体所获得的血浆中的凝集缺陷的物质。纯化的和部分纯化的形式的因子 VIII 的体外促凝血活性被用于计算输注到人患者中的重组因子 VIII 的剂量并且是从患者血浆中恢复活性和体内出血缺陷纠正的可靠指示物。根据 Lusher 等人，″ Recombinant Factor VIII for the Treatment of Previously UntreatedPatients with Hemophilia A-Safety, Efficacy, and Development of Inhibitors（用于治疗之前未被治疗的患血友病 A 的患者的重组因子 VIII- 抑制剂的安全性、效力和开发）”New Engl. J. Med. 328 :453-459(1993)；Pittman 等人，“A2Domain of Human Recombinant-derived Factor VIII is Required forProcoagulant Activity but not for Thrombin Cleavage（人重组衍生的因子 VIII 的 A2 结构域是促凝血活性所需的但不是凝血酶裂解所需的）.”Blood79 :389-397(1992)；和 Brinkhous 等人，“Purified Human Factor VIIIProcoagulant Protein :Comparative Hemostatic Response After Infusions intoHemophilic and von Willebrand Disease Dogs（纯化的人因子 VIII 促凝血蛋白：输注到患血友病的狗和患冯维勒布兰德疾病的狗中之后的比较性止血反应），”Proc. Natl. Acad. Sci. 82 :8752-8755(1985)，通过引用将它们整体并入本文，在新的因子 VIII 分子的体外标准测定和他们在狗输注模型或人患者中的行为之间没有报道差异。

[0269] 通常，通过施用重组因子 VIII 在患者中实现的期望的血浆因子 VIII 活性水平在正常的 30-100％的范围内。在一个实施方式中，治疗性重组因子 VIII 的施用以静脉内给

予，优选的剂量在约 5 至 50 单位 /kg 体重的范围内，具体在 10-50 单位 /kg 体重的范围内，更具体为 20-40 单位 /kg 体重的剂量；频率间隔为约 8 至 24 小时（重度感染的血友病患者）的范围内；治疗持续时间天数在 1 至 10 天的范围内或直至出血发作消退。参见，例如，Roberts 和 Jones，“Hemophilia and Related Conditions--CongenitalDeficiencies of Prothrombin(Factor II，Factor V, and Factors VII to XII)（血友病和相关病症 - 凝血酶原（因子 II、因子 V 和因子 VII 至 XII）先天性的缺乏），”Ch. 153，1453-1474，1460，in Hematology（血液学），Williams，W. J. 等人，编辑 (1990)，通过引用将其整体并入本文。具有抑制剂的患者可能需要与它们先前的因子 VIII 形式不同的重组因子量。例如，患者可能需要较少的重组因子 VIII，因为该重组因子 VIII 比野生型 VIII 具有更高的比活和降低的抗体反应性。对于使用人或血浆来源的因子 VIII 的治疗，输注的治疗性重组因子 VIII 的量通过一期因子 VIII 凝血测定来界定，并且在选择的情况下，通过测量在输注后患者血浆中的因子 VIII 来测定体内恢复。应了解对于任何具体的受试者，应根据个体的需要和施用或监督组合物施用的人员的专业判断随时间调整特定的剂量方案，并且本文所列出的浓度仅为示例性的，不旨在限制所要求保护的重组因子 VIII 的范围或实施。

[0270] 根据需要，治疗形式可以为重组因子 VIII 的单次静脉内施用或在长期的时间阶段内的定期施用或连续施用。可选择地，治疗性重组因子 VIII 可以与脂质体一起以不同时间间隔内的一个或几个剂量皮下或口服施用。

[0271] 重组因子 VIII 还可以用于治疗在显示出人因子 VIII 抗体的血友病患者中由于因子 VIII 缺乏所致的不受控的出血。

[0272] 本文证明了本发明的重组因子 VIII 的比活可以与野生型因子 VIII 不同。具有比野生型因子 VIII 高的促凝血活性的因子 VIII 可用于治疗血友病，因为将需要较低的剂量来纠正患者的因子 VIII 缺乏。这不仅降低了患者和保险公司的医疗费用，还降低了发展针对因子 VIII 的免疫反应的可能（因为施用了较少的抗原）。

实施例

[0273] 提供了下列实施例来说明本发明的实施方式，但是它们不意欲限制本发明的范围。

[0274] 材料与方法

[0275] 试剂

[0276] 重组因子 VIII(Kogenate™) 是 Bayer Corporation(Berkeley，CA) 的 LisaRegan 博士慷慨赠送的。含有 20％磷脂酰胆碱 (PC)、40％磷脂酰乙醇胺 (PE) 和 40％磷脂酰丝氨酸 (PS) 的磷脂囊泡如先前所述使用辛基葡糖苷制备 (Mimms 等人，“Phospholipid Vesicle Formation and TransmembraneProtein Incorporation Using Octyl Glucoside（使用辛基葡糖苷的磷脂囊泡形成和跨膜蛋白整合），”Biochemistry20 :833-840(1981)，通过引用将其整体并入本文）。试剂 α - 凝血酶、因子 VIIa、因子 IXa β、因子 X 和因子 Xa(Enzyme Research Laboratories，South Bend，IN)、蛭素和磷脂 (DiaPharma，West Chester，OH)、发色的 Xa 底物 Pefachrome Xa(Pefa-5523，CH_3OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA • AcOH ；Centerchem Inc. Norwalk CT)、重组人组织因子 (rTF)、Innovin(Dade Behring，Newark，DE)、荧光底物 Z-Gly-Gly-Arg-AMC(Calbiochem，San Diego，CA) 和凝血酶校准物 (Diagnostica Stago，

Parsippany,NJ) 购自所指示的卖主。

[0277] 野生型和变体因子 VIII 的构建、表达和纯化 :

[0278] 将 Ala 突变体 (在 D27、H281、R282、E287、D302、S313、H317、T522、S524、R531、N538、E540、S650、S654、D666、E683、N684、S695、D696、S1791、D1795、Q1820、E1829、S1949、N1950 和 R1966 处) ;Phe 突变体 (在 Y476、Y664、Y1786 和 Y1792 处) ;Ala 和 Val 突变体 (在带电荷的残基 E272、D519、E665 和 E1984 处) ;和野生型因子 VIII 形式分别构建为在 B 结构域中缺乏残基 Gln744-Ser1637 的无 B 结构域的因子 VIII(Doering 等人,“Expression and Characterization of Recombinant MurineFactor VIII(重组鼠因子 VIII 的表达和表征),”Thromb Haemost.88 :450-458(2002),通过引用将其整体并入本文)。克隆和表达构建体是 Pete Lollar 博士和 John Healey 博士慷慨赠送的。如先前所描述的在 BHK 细胞中稳定地表达重组野生型和变体因子 VIII 形式并将其纯化 (Wakabayashi 等人,“Residues 110-126in the A 1Domain of Factor VIII Contain a Ca^{2+}BindingSite Required for Cofactor Activity(因子 VIII 的 A1 结构域中的残基 110-126 含有辅因子活性所需的 Ca^{2+} 结合位点),”J Biol Chem.279 :12677-12684(2004),通过引用将其整体并入本文)。转染后,变体之间因子 VIII 分泌的量没有显著差异。如通过 SDS-PAGE 判断的,来自两个 750cm^2 培养瓶的变体蛋白产量范围在大于 10μg 至约 100μg,纯度为约 85% 至大于 95%。因子 VIII 制剂中的主要污染物为白蛋白并且其在因子 VIII 中存在的浓度显示对活性参数的稳定性没有影响。因子 VIII 的浓度使用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 测量,并且因子 VIII 的活性通过一期凝集测定和二期发色的因子 Xa 生成测定来确定,如下文所述。

[0279] SDS-PAGE 和蛋白质印迹

[0280] 将因子 VIII 蛋白 (0.77μg 用于凝胶染色并且 0.34 μg 用于蛋白质印迹) 在 8% 聚丙烯酰胺凝胶上以恒定电压 (100V) 电泳。将凝胶用 Gelcode Blue(Thermo Scientific, Rockford,IL) 染色 ;或将凝胶转移到聚偏氟乙烯膜上并用生物素化的抗 A2 抗体 (R8B 12, Green Mountain Antibodies,Burlington,VT) 探测,然后用过氧化物酶轭合的链霉亲和素 (Calbiochem,San Diego,CA) 孵育。使化学发光底物 (ECF 底物,GE Healthcare, Piscataway,NJ) 反应,并且使用磷光影象分析仪 (Storm 860,GE Healthcare) 扫描荧光信号。单链因子 VIII 形式 (170kDa) 和重链 (HC,90kDa) 的密度使用 ImageQuant 软件 (GE Healthcare) 定量并且计算了量的比率。

[0281] ELISA

[0282] 如先前所描述的进行夹心 ELISA 以测量因子 VIII 蛋白的浓度 (Wakabayashi 等人,“A Glu 113Ala Mutation within a Factor VIIICa^{2+}-Binding Site Enhances Cofactor Interactions in Factor Xase(因子 VIIICa^{2+} 结合位点内的 Glu113Ala 突变增强因子 Xase 中的辅因子相互作用),”Biochemistry 44 :10298-10304(2005),通过引用将其整体并入本文),使用纯化的商业重组因子 VIII(Kogenate,Bayer Corporation) 作为标准物。因子 VIII 的捕获使用抗 C2 抗体 (ESH-8,American Diagnostica Inc.,Stamford, CT),并采用生物素化的 R8B12 抗体来进行因子 VIII 检测。

[0283] 一期凝集测定 (One-stage Clotting Assay)

[0284] 使用化学消除了因子 VIII 的基质血浆进行一期凝集测定 (参见,“Methodology of the One-stage Assay of Factor VIII(VIII :C)(因子 VIII(VIII :C) 一期测定的方

法),”Scand J Haematol Suppl.41:13-24(1984),通过引用将其整体并入本文)并使用Diagnostica Stago凝集仪器进行测定。在37℃下用APTT试剂(General Diagnostics)孵育血浆6分钟,然后添加稀释的因子VIII至杯皿中。1分钟后对混合物进行复钙,测定凝集时间并将其与混合的正常血浆标准物比较。

[0285] 二期发色因子Xa生成测定

[0286] 根据先前所描述的方法(Wakabayashi等人,“Metal Ion-independentAssociation of Factor VIII Subunits and the Roles of Calcium and Copper Ionsfor Cofactor Activity and Inter-subunit Affinity(金属离子非依赖性的因子VIII亚基缔合以及钙离子和铜离子对辅因子活性和亚基间亲和力的作用),”Biochemistry 40:10293-10300(2001);Wakabayashi等人,“Ca^{2+}Bindingto Both the Heavy and Light Chains of Factor VIII Is Required for CofactorActivity(Ca^{2+}与因子VIII的重链和轻链二者的结合是辅因子活性所需的),”Biochemistry 41:8485-8492(2002),通过引用将它们每一个整体并入本文),在纯化的系统(Lollar等人,“Factor VIII and Factor VIIIa(因子VIII和因子VIIIa),”Methods Enzymol.222:128-143(1993),通过引用将其整体并入本文)中监测因子X向因子Xa转化的速率。用20nM α-凝血酶激活在含有20mM N-[2-羟乙基]哌嗪-N'-[2-乙烷磺酸](HEPES),pH 7.2、0.1M NaCl、0.01%吐温20、0.01% BSA、5mM $CaCl_2$和10μM PSPCPE囊泡的缓冲液(缓冲液A)中的因子VIII(1nM)1分钟。通过添加蛭素(10U/ml)来终止反应并使所得的因子VIIIa与因子IXa(40nM)反应1分钟。添加因子X(300nM)以开始反应,1分钟后通过添加50mM EDTA来淬灭反应。与发色底物Pefachrome Xa(0.46mM的终浓度)反应后测定生成的因子Xa。所有反应都在23℃下进行。

[0287] 凝血酶生成测定

[0288] 血浆中生成的凝血酶的量通过自动校准的凝血酶生成图象法测量(Hemker等人,“Calibrated Automated Thrombin Generation Measurement inClotting Plasma(凝集的血浆中自动校准的凝血酶生成测量),”PathophysiolHaemost Thromb.33:4-15(2003);Hemker等人,“Thrombin Generation inPlasma:Its Assessment via the Endogenous Thrombin Potential(血浆中的凝血酶生成:经由内源凝血酶潜能的凝血酶生成评估),”Thromb Haemost.74:134-138(1995),通过引用将他们每一个整体并入本文)。在96孔板中,将来自缺乏因子VIII抑制剂的重度血友病A患者的80μl缺乏因子VIII(小于1%的残余活性,血小板贫乏)的血浆(George King Bio-Medical,OverlandPark,KS)与在含有下列物质的HEPES-BSA缓冲液(20mM HEPES,pH7.35、0.15M NaCl、6% BSA)中的因子VIII样品(20μl;6nM)混合:3pMrTF(rTF储液的浓度通过因子Xa生成测定使用已知浓度的因子VIIa测定)、PSPCPE囊泡(24μM),或与20μl凝血酶校准物(630nM)混合,并且立即通过与在含有0.1M $CaCl_2$的HEPES-BSA缓冲液中的20μl荧光底物(2.5mM,Z-Gly-Gly-Arg-AMC)混合来开始反应。在37℃下将所有试剂预热。试剂的终浓度为1nM因子VIII(除非另外指明)、0.5pM rTF、4μMPSPCPE囊泡、433μM荧光底物、13.3mM $CalCl_2$和105nM凝血酶校准物。使用微板荧光分光光度计(Spetramax Gemini,Molecular Devices,Sunnyvale,CA)用355nm(激发)/460nm(发射)的滤光设置以8秒钟的间隔监测37℃下的荧光信号的显现。荧光信号通过来自荧光酶校准物样品的参考信号来校正

(Hemker 等人,“Calibrated Automated ThrombinGeneration Measurement in Clotting Plasma(凝集的血浆中自动校准的凝血酶生成测量),”Pathophysiol Haemost Thromb.33 :4-15(2003),通过引用将他们每一个整体并入本文)并且如先前所述计算以 nM 表示的实际凝血酶生成 (Hemker 等人,“Thrombin Generation in Plasma :Its Assessment via theEndogenous Thrombin Potential(血浆中的凝血酶生成 :经由内源凝血酶潜能的凝血酶生成评估),”Thromb Haemost.74 :134-138(1995),通过引用将其整体并入本文。

[0289] 在较高的温度下的因子 VIII 活性

[0290] 在 52-60℃下孵育在缓冲液 A 中的野生型因子 VIII 或因子 VIII 变体 (4nM)。在所指示的时间取出等分试样并使用二期发色因子 Xa 生成测定来测定残余的因子 VIII 活性。

[0291] 因子 VIIIa 活性的时程

[0292] 在 23℃下用 20nM 凝血酶激活在含有 10μM PSPCPE 囊泡的缓冲液 A 中的野生型和突变体因子 VIII(4nM)1 分钟。立即用蛭素 (10U/ml) 淬灭反应,在所指示的时间取出等分试样并在添加因子 IXa(40nM) 和因子 X(300nM) 后使用因子 Xa 生成测定来测定活性。对于在存在因子 IXa 的条件下进行的衰退测量,在添加凝血酶之前将因子 IXa(40nM) 添加至反应物中。

[0293] 血浆中的因子 VIII 稳定性

[0294] 将野生型或变体因子 VIII(1nM) 添加到来自缺乏因子 VIII 抑制剂的重度血友病 A 患者的缺乏因子 VIII(小于 1%的残余活性)的血浆 (GeorgeKing Bio-Medical) 中。对血浆补充 0.02% NaN_3 以防止微生物的生长,并在 37℃下孵育样品。在所指示的时间取出等分试样并使用一期凝集测定来测定残余的活性。

[0295] 数据分析

[0296] 通过非线性最小二乘回归使用如下的等式将因子 VIIIa 的活性值作为时间的函数与单指数衰退曲线拟合 :

[0297] $A = A_0 \times e^{-k \cdot t}$

[0298] 其中 A 为残余的因子 VIIIa 活性 (nM/ 分钟 /nM 因子 VIII),A_0 为初始活性,k 为表观速率常数,并且 t 为在较高的温度下因子 VIII 的反应时间(分钟)(对于因子 VIII 衰退实验)或在淬灭凝血酶激活后的反应时间(分钟)(对于因子 VIIIa 衰退测量)。通过 Kaleidagraph(Synergy, Reading, PA) 进行非线性最小二乘回归分析。通过 Student t 检验进行平均值的比较。使用 Swiss PDB Viewer 分析了因子 VIII A 结构域的模制结构 (Pemberton 等人,“A Molecular Model for the Triplicated A Domains of Human Factor VIIIBased on the Crystal Structure of Human Ceruloplasmin(基于人血浆铜蓝蛋白的晶体结构的人因子 VIII 的三个 A 结构域的分子模型),”Blood89 :2413-2421(1997),通过引用将其整体并入本文)以鉴定定位在 A2 结构域界面的带电荷的残基和根据分离互补结构域的极性原子的大于2.8 Å的阈值显示出极小的氢键相互作用可能的带电荷的残基 (Weiner 等人,“ANew Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic AcidsProteins(核酸蛋白的分子机械模拟的新力场),”J Am Chem Soc.106 :765-784(1984),通过引用将其整体并入本文)。

[0299] 实施例 1 :靶向氢键相互作用的因子 VIII 突变体的活性值

[0300] 目前仍然不够了解的涉及因子 VIII 中的 A2 结构域的键合相互作用代表了调节辅

因子活性的主要机制。因子 VIII 同源性模型 (Pemberton 等人,“A Molecular Model for the Triplicated A Domains of Human Factor VIIIBased on the Crystal Structure of Human Ceruloplasmin(基于人血浆铜蓝蛋白的晶体结构的人因子 VIII 的三个 A 结构域的分子模型),”Blood89 :2413-2421(1997),通过引用将其整体并入本文)鉴定了许多氢键连接 A2 结构域中的残基与 A1 或 A3 结构域中的那些残基的可能。使用氢供体和受体原子之间的空间间隔小于2.8 Å这一标准 (Weiner 等人,“A NewForce Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids Proteins(核酸蛋白的分子机械模拟的新力场),”J Am Chem Soc.106 :765-784(1984),通过引用将其整体并入本文),鉴定出 30 个残基具有可能参与与来自互补的 A 结构域的原子氢键键合的侧链原子(参见下表 1)。在所鉴定的残基的约一半中,侧链原子与骨架的羰基氧或酰胺氢原子并置,而剩余的则表现相邻侧链之间可能有相互作用。除了用 Phe 取代 Tyr 之外,将因子 VIII A 结构域中的靶残基分别突变为 Ala,点突变以无 B 结构域的因子 VIII 稳定地表达。

[0301] 使用一期凝集测定和(二期)因子 Xa 生成测定测量纯化的蛋白的因子 VIII 活性。来自一期测定(图 1)的结果表明 30 个点突变体中 9 个显示出相对于野生型因子 VIII 小于 50％的活性。这些变体中的 5 个表现出一期 / 二期测定差异(大于 1.5 倍的差异),其中 3 个突变体 (S524A、H281A 和 E287A) 仅在二期测定中显示出降低。在几个被靶向的残基中突变的活性值降低与那些侧链对因子 VIII 和 / 或因子 VIIIa 的结构稳定性的作用一致。

[0302] 表 1 :能够氢键键合的氨基酸残基

[0303]

残基（原子）	结构域	配对残基（原子）	结构域	距离(Å)
D27 (O_δ)	A1	N538 (H_δ)	A2	2.16
H281 (N_δ)	A1	S524 (H_γ)	A2	2.12
R282 (H_η)	A1	G520 (CO^a)	A2	2.02
E287 (H_ε)	A1	P672 (CO)	A2	1.79
D302 (H_δ)	A1	D482 (CO)	A2	1.98
S313 (H_γ)	A1	G643 (CO)	A2	1.87
H317 (N_δ)	A1	E540 (H_ε)	A2	2.78
Y476 (H_η)	A2	E272 (CO)	A1	1.62
T522 (O_γ)	A2	R282 (NH^b)	A1	2.39
S524 (H_γ)	A2	H281 (N_δ)	A1	2.12
R531 (H_η)	A2	R282 (CO)	A1	2.33
N538 (H_δ)	A2	D27 (O_δ)	A1	2.16
E540 (H_ε)	A2	H317 (N_δ)	A1	2.78
S650 (H_γ)	A2	P1980 (CO)	A3	1.54
S654 (H_γ)	A2	Y1786 (O_η)	A3	1.65
Y664 (H_η)	A2	H1822 (CO)	A3	1.94
D666 (O_δ)	A2	L1789 (NH)	A3	1.93
E683 (O_ε, H_ε)	A2	Q1820 (H_ε, O_ε)	A3	2.58, 1.72
N684 (O_ε)	A2	S1791 (H_γ)	A3	1.76
S695 (H_γ)	A2	L1843 (CO)	A3	2.03
D696 (H_δ)	A2	S1949 (O_γ), N1950 (NH)	A3	1.99, 2.21
Y1786 (O_η)	A3	S654 (H_γ)	A2	1.65

[0304]

S1791 (H_γ)	A3	N684 (O_ε)	A2	1.76
Y1792 (H_η)	A3	S654 (CO)	A2	2.27
D1795 (O_δ)	A3	L687 (NH)	A2	1.99
Q1820 (O_ε, H_ε)	A3	E683 (H_ε, O_ε)	A2	1.72, 2.58
E1829 (O_ε, H_ε)	A3	Y664 (NH, CO)	A2	2.15, 1.95
S1949 (O_γ)	A3	D696 (H_δ)	A2	1.99
N1950 (H_δ)	A3	T646 (CO)	A2	2.39
R1966 ($H_{\eta1}$,$H_{\eta2}$)	A3	K661 (CO)	A2	2.79, 2.01

[0305] [a] 骨架羰基氧原子。

[0306] [b] 骨架酰胺氢原子。

[0307] 实施例 2 :因子 VIII 变体的热稳定性

[0308] 为了评估野生型前体辅因子和变体的热稳定性，基于早期研究中所描述的因子 VIII 灭活结果采用 55℃的温度 (Ansong 等人，“Factor VIII A3Domain Residues 1954-1961Represent an A1 Domain-Interactive Site(因子 VIII A3 结构域残基 1954-1961 代表 A1 结构域相互作用的位点)，”Biochemistry 44 :8850-8857(2005)，通过引用将其整体并入本文)。对于这些反应，在较高的温度下将因子 VIII 孵育指示的时间，然后立即将反应混合物冷却至室温，并使因子 VIII 与凝血酶反应，使用因子 Xa 生成测定来测定辅因子的活性。如“方法”中所描述测定热处理下因子 VIII 活性的损失速率，如残余辅因子功能所判定的。图 2A 显示与野生型相比对热处理显示出最大敏感性和最小敏感性的变体。

[0309] 表 2(下面) 总结了获自 30 个变体的因子 VIII 热稳定性测定的结果。总体上，这些活性数据与单指数衰退函数很好地拟合，在大多数条件下相关系数大于 0.98。尽管关于氨基酸取代的许多突变是良性的 (21 种显示出小于 2 倍的衰退速率差异)，但是包括 Arg282(A1 结构域)，和 A2 结构域残基 Ser524、Asn684 和 Ser650 的几种残基显示出约 5 倍至约 20 倍的因子 VIII 衰退速率增加，这表明了这些残基在维持因子 VIII 稳定性中的重要作用。此外，R282A 和 N684A 变体显示出显著降低的比活值，这表明这两种单点突变影响了活性和稳定性参数两者。另一方面，用 Ala 取代 E287 和 D302 使得在较高的温度下因子 VIII 衰退速率降低。在突变后蛋白稳定性的这一明显增加与这些酸性侧链使野生型辅因子中的结构域间相互作用不稳定是一致的。

[0310] 表 2 :因子 VIII 和 VIIIa 的衰退速率和活性值

[0311]

	衰退速率（分钟$^{-1}$）			比活	
	因子 VIII	因子 VIIIa		一期测定	二期测定
		FIXa (+)[a]	FIXa (-)[b]		
野生型	0.0473 (1.00[c])	0.0113 (1.00)	0.0631 (1.00)	4.77[d] (1.00)	44.5[e] (1.00)
R282A	0.9646 (20.4)	0.4708 (41.7)	0.6738 (10.7)	0.95 (0.20)	1.77 (0.04)
S524A	0.4332 (9.16)	0.4554 (40.4)	0.4416 (7.00)	4.20 (0.88)	1.02 (0.02)
N684A	0.4002 (8.46)	0.4096 (36.3)	1.1837 (18.8)	0.41 (0.09)	2.15 (0.05)
R531A	0.2448 (5.18)	0.0758 (6.72)		2.62 (0.55)	24.0 (0.54)
S650A	0.1395 (2.95)	0.0317 (2.81)		4.41 (0.93)	45.5 (1.02)
Y664F	0.1173 (2.48)	0.0148 (1.31)		5.25 (1.10)	47.4 (1.07)
H281A	0.1170 (2.47)	0.0450 (3.99)		3.70 (0.78)	21.1 (0.47)
Y1786F	0.1138 (2.41)	0.2361 (20.9)	1.0740 (17.0)	1.43 (0.30)	6.21 (0.14)
D696A	0.0889 (1.88)	0.0118 (1.05)		4.82 (1.01)	45.0 (1.01)
S313A	0.0770 (1.63)	0.0210 (1.86)		4.34 (0.91)	36.5 (0.82)
E683A	0.0743 (1.57)	0.0263 (2.33)		1.00 (0.21)	15.8 (0.36)
D1795A	0.0697 (1.47)	0.0238 (2.11)		3.82 (0.80)	32.5 (0.73)
E540A	0.0691 (1.46)	0.0091 (0.81)		4.40 (0.92)	37.9 (0.85)
R1966A	0.0682 (1.44)	0.0163 (1.44)		3.74 (0.78)	36.6 (0.82)
D666A	0.0646 (1.37)	0.0545 (4.83)		2.47 (0.52)	17.5 (0.39)
N538A	0.0630 (1.33)	0.0144 (1.28)		4.00 (0.84)	35.7 (0.80)
H317A	0.0629 (1.33)	0.0145 (1.28)		3.83 (0.80)	30.8 (0.69)

[0312]

N1950A	0.0618 (1.31)	0.0195 (1.73)		3.46 (0.72)	25.7 (0.58)
S654A	0.0599 (1.27)	0.0145 (1.28)		5.02 (1.05)	45.2 (1.02)
T522A	0.0596 (1.26)	0.0270 (2.39)		0.83 (0.18)	24.5 (0.55)
S1791A	0.0595 (1.26)	0.0208 (1.85)		3.73 (0.78)	28.9 (0.65)
Y1792F	0.0577 (1.22)	0.4335 (38.4)	0.7237 (11.5)	1.41 (0.30)	3.42 (0.08)
Y476F	0.0579 (1.22)	0.0139 (1.23)		4.57 (0.96)	41.8 (0.94)
S1949A	0.0573 (1.21)	0.0129 (1.14)		3.17 (0.66)	28.6 (0.64)
S695A	0.0524 (1.11)	0.0085 (0.75)		5.15 (1.08)	45.4 (1.02)
D27A	0.0489 (1.03)	0.0089 (0.79)		4.53 (0.95)	40.1 (0.90)
Q1820A	0.0480 (1.01)	0.0114 (1.01)		4.91 (1.03)	44.0 (0.99)
E287A	0.0367 (0.78)	0.0088 (0.78)		2.86 (0.60)	16.4 (0.37)
D302A	0.0369 (0.78)	0.0049 (0.43)		5.38 (1.03)	49.0 (1.10)

[0313] 突变体因子 VIII 形式是根据因子 VIII 衰退的速率递减排序的。根据最小二乘曲线拟合评估速率衰退值的标准偏差，并且标准偏差在平均值的约 10％内。

[0314] [a] 在存在因子 IXa 的条件下进行的衰退实验。

[0315] [a] 在不存在因子 IXa 的条件下进行的衰退实验。

[0316] [c] 括号内的值为相对于野生型的值

[0317] [d] 单位 / μ g

[0318] [e]nM 生成的因子 Xa/ 分钟 /nM 因子 VIII

[0319] 实施例 3 :因子 VIIIa 衰退速率

[0320] 由于 A2 亚基的解离，因子 VIIIa 活性是不稳定的 (Fay 等人，“HumanFactor VIIIa Subunit Structure :Reconstr uction of Factor VIIIa from theIsolated A1/A3-C1-C2Dimer and A2Subunit(人因子 VIIIa 亚基结构 :由分离的 A1/A3-C1-C2 二聚体和 A2 亚基重构因子 VIIIa)，”J biol Chem.266 :8957-8962(1991) ;Lollar 等人，“pH-dependent Denaturation ofThrombin-activated Porcine Factor VIII(凝血酶激活的猪因子 VIII 的 pH 依赖性的变性，”J Biol Chem.265 :1688-1692(1990)，通过引用将他们每一个整体并入本文)。早期研究的结果显示添加因子 IXa 和磷脂囊泡与因子 VIIIa 形成 Xase 复合体通过部分稳定因子 Xase 内的 A2 亚基 (Fay 等人，“Modelfor the Factor VIIIa-dependent Decay of the Intrinsic Factor Xase :Role ofSubunit Dissociation and Factor IXa-catalyzed Proteolysis(因子 VIIIa 依赖性的内在因子 Xase 衰退的模型 :亚基解离和因子 IXa 催化的蛋白水解的作用)，”J Biol Chem.271 :6027-6032(1996)，通过引用将其整体并入本文) 降低该辅因子的不稳定性 (Lollar 等人，“Stabilization of Thrombin-activatedPorcine Factor VIII :C by Factor IXa Phospholipid(通过因子 IXa 磷脂稳定凝血酶激活的猪因子 VIII :C)，”Blood 63 :1303-1308(1984) ;Lamphear 等 人，“Factor IXa Enhances Reconstitution of Factor VIIIa from Isolated

A2Subunitand A1/A3-C1-C2Dimer(因子 IXa 增强由分离的 A2 亚基和 A1/A3-C1-C2 二聚体重构因子 VIIIa),"J. Biol.Chem.267 :3725-3730(1992),通过引用将它们每一个整体并入本文)。这种方法最近被用来检测 E1829A 因子 VIIIa 突变体的衰退速率 (Wakabayashi 等 人,"A3Domain Residue Glu1829Contributes to A2Subunit Retention in Factor VIIIa(A3 结构域残基 Glu1829 促进因子 VIIIa 中的 A2 亚基保留),"J.Thromb.Haemost.5 :996-1001(2007),通过引用将其整体并入本文),因为这种变体因子 VIIIa 的活性衰退在不存在因子 IXa 和膜的情况下太快而不能准确测量。类似地采用这种方法来评估此实施例中所描述的变体组的因子 VIIIa 衰退速率。将因子 VIII(4nM) 与摩尔过量的因子 IXa(40nM) 和磷脂囊泡一起孵育,用凝血酶快速激活,随后在 23℃下在一段时间过程内测量因子 Xase 的活性。因子 Xase 活性的衰退速率由 A2 亚基解离引起,并且使用单指数衰退拟合数据。由于因子 VIIIa(144nM) 内 A2 亚基亲和力的高 K_d 值和反应中所用的低因子 VIIIa 浓度 (4nM),可以忽视解离的 A2 亚基再缔合的影响,这支持应用简单的单指数进行这种回归分析。

[0321] 结果显示在图 2B 中,该图显示了受影响最严重的变体以及显示对突变反应阳性的那些变体的数据。7 种变体与野生型相比具有显著 (大于 5 倍) 增加的因子 VIIIa 衰退速率 (表 2)。这些突变包括 :R282A、S524A、N684A、E1829A、Y1786F、D666A 和 Y1792F。如通过二期测定所测量的这些变体的因子 VIII 活性值显著低于通过一期测定所测得的那些活性值 (图 1),这与所述突变导致了可测量速率的 A2 亚基解离是一致的。此外,这些突变中的几种 (包括 R282A、N684A 和 Y1792F) 在一期测定中显示出整体的低比活。如在因子 VIII 突变体具有这种测定差异的情况下一样,一期测定所测得的活性也降低 (Pipe 等人,"Mild Hemophilia A Caused byIncreased Rate of Factor VIII A2 Subunit Dissociation :Evidence forNonproteolytic Inactivation of Factor VIIIa in vivo(因子 VIII A2 亚基解离的速率增加引起的轻度血友病 A :体内因子 VIII 非蛋白水解灭活的证据),"Blood 93 :176-183(1999) ;Pipe 等人,"Hemophilia A Mutations Associatedwith 1-stage/2-stage Activity Discrepancy Disrupt Protein-protein Interactionswithin the Triplicated A Domains of Thrombin-activated Factor VIIIa(1 期 /2 期活性差异相关的血友病 A 突变破坏凝血酶激活的因子 VIIIa 的三个 A 结构域中的蛋白 - 蛋白相互作用),"Blood97 :685-691(2001) ;Hakeos 等人,"Hemophilia A Mutations within the Factor VIII A2-A3Subunit InterfaceDestabilize Factor VIIIa and Cause One-stage/Two-stage ActiVity Discrepancy(因子 VIII A2-A3 亚基界面内的血友病 A 突变使因子 VIIIa 不稳定并且引起 1 期 /2 期活性差异),"Thromb Haemost.88 :781-787(2002),通过引用将它们每一个整体并入本文),这可能反应了 A2 解离速率对测定因子 VIII 活性的直接影响。

[0322] 相反地,如通过凝血酶激活后辅因子衰退速率的降低所判定的,具有比野生型因子 VIII 高的热稳定性的变体 E287A 和 D302A 也产生增强的因子 VIIIa 稳定性。D302A 变体的结果更明显,它显示出与野生型因子 VIIIa 相比降低约 2 倍的辅因子衰退速率,在 40 分钟后保持其初始活性的约 90%。这种观察现象与突变主要改变前体辅因子内结构域间界面的构象一致。

[0323] 总之,实施例 1-3 中的这些结果鉴定了在因子 VIII 的前体辅因子和辅因子形式中多种残基对 A2(结构域) 亚基间的相互作用的贡献,其中所选择的残基对蛋白稳定性的作

用完全不同。尽管所观察到的在靶残基处的突变的作用大部分为良性的或有害的，在两个A1结构域酸性残基D302和E287处的突变产生了在前体辅因子形式和活性辅因子形式中适度的稳定性增强。E287相对于野生型的相对活性略微降低，而D302变体的活性值与野生型蛋白不可区别，这表明后一种代表了功能获得性突变。这些结果表明，一些去稳定化可能是由于界面处的（负）电荷的隐藏引起和/或这些残基侧链为疏水性时，导致稳定性增加。

[0324] 实施例4：另外的靶残基的鉴定和Glu272、Asp519、Glu665和Glu1984处的点突变体的产生

[0325] 根据前面的实施例的结果，探究了其他带电荷的残基的取代。使用因子VIII的A结构域的基于血浆铜蓝蛋白的同源性模型(Pemberton等人，“AMolecular Model for the Triplicated A Domains of Human Factor VIII Basedon the Crystal Structure of Human Ceruloplasmin(基于人血浆铜蓝蛋白的晶体结构的人因子VIII的三个A结构域的分子模型)，”Blood 89:2413-2421(1997)，通过引用将其整体并入本文）鉴定出了4个带电荷的残基(Glu272、Asp519、Glu665和Glu1984)。这四种残基似乎在A2结构域与A1结构域(Glu272和Asp519)或与A3结构域(Glu665和Glu1984)的界面处被隐藏，但是根据可能键合的邻近原子的空间间隔大于2.8 Å，它们似乎不参与氢键键合相互作用。将这些残基突变为Ala或Val以消除电荷，并提供与来自其他被隐藏的残基的类似侧链的可能的疏水相互作用。在稳定表达的BHK细胞系中将因子VIII变体制备成无B结构域的因子VIII。

[0326] 因子VIII表达为单链和异源二聚体形式的混合物。如通过SDS-PAGE所判定，纯化的蛋白在约85％至大于95％的范围内（图3A)。使用采用抗A2结构域抗体的蛋白质印迹来定量单链和异源二聚体形式的化学计量（图3B)。野生型的这个值接近于一，因子VIII变体的这个值则略低并且是不定的。

[0327] 使用一期和二期测定两者（图4A)和凝血酶生成参数（图4B-D)来评估纯化的蛋白的比活。除了Glu272Ala变体外所有变体都产生为野生型比活值的至少80％的比活值，这表明剩余的突变对因子VIII辅因子功能如果有影响的话也具有很小的影响。在低rTF浓度(0.5pM)和生理浓度(1nM)的因子VIII的条件下进行的凝血酶生成产生了与比活值平行的结果。图4D中所显示的参数值表明Glu272Ala的峰值和ETP与野生型相比降低了，而剩余变体的所有其他参数值的范围在野生型值的大于80％至110％的范围内。

[0328] 实施例5：Glu272、Asp519、Glu665和Glu1984因子VIII变体的热稳定性

[0329] 如通过活性损失速率所判定的，在较高的温度下评估了纯化的因子VIII突变体蛋白的稳定性。在52-60℃下孵育因子VIII(4nM)，并且在所指示的时间点取出等分试样，冷却至室温，使其与凝血酶反应，使用如“材料与方法”中所描述的因子Xa生成测定测量残余辅因子活性。图5A中所显示的结果图解在55℃下因子VIII野生型和变体的活性衰退的时程。这个温度是基于早期的研究选择的(Ansong等人，“Factor VIII A1 DomainResidues 97-105Represent a Light Chain-interactive Site(因子VIII A3A1结构域残基97-105代表轻链相互作用位点))，”Biochemistry 45:13140-13149(2006)，通过引用将其整体并入本文)，野生型因子VIII在该温度显示在1h内几乎完全的活性损失。在约15分钟内，野生型蛋白损失了50％的活性。如通过略快的活性衰退所判定的，观察到Glu272Ala和Glu272Val变体显示出降低的稳定性，并且这种特性可能与观察到的此位点突变的比活降低有关。另一方面，Ala和Val对Asp519、Glu665和Glu1984的取代全部都显示出在较高的

温度下改善的稳定性，其中具有前两个位点处的突变的变体经过约 20 至 25 分钟保持 50％的活性，而后一位点的突变则产生经过大于 30 分钟保持该活性水平的变体。来自拟合曲线的衰退速率值的比较（表 1，下面）表明 Glu1984 变体的因子 VIII 热稳定性相对于野生型改善了约 2 倍，其中 Val 突变似乎比 Ala 略微优选。

[0330] 评估温度范围的结果（图 5B）表明 Asp519、Glu665 和 Glu1984 的 Ala 和 Val 变体都一致地显示出在所测试的所有温度下与野生型相比多达 2 倍的衰退速率降低。然而，如果一种形式显示较高的稳定性，单链和异源二聚体形式以略微不同的比率存在可能影响这些衰退速率结果。使用基本上全部为异源二聚体形式的 Kogenate 因子 VIII 的对照实验 (Wakabayashi 等人，“Metal Ion-independent Association of Factor VIII Subunits and theRoles of Calcium and Copper Ions for Cofactor Activity and Inter-subunitAffinity（金属离子非依赖性的因子 VIII 亚基缔合和钙离子和铜离子对辅因子活性和亚基间亲和力的作用），”Biochemistry 40 :10293-10300(2001)，通过引用将其整体并入本文）产生了野生型的约 2 倍的衰退速率（图 5B)，这与异源二聚体形式在较高的温度下显示低于单链因子 VIII 的稳定性是一致的。因此，所测量的衰退速率显然是由于各种因子 VIII 形式中单链和双链含量的不均一性所引起的。然而，由于所有的变体与野生型相比都具有较少的相对的单链因子 VIII（参见图 5B)，这些数据表明这些变体的衰退速率值低估了突变体和野生型之间的稳定性增加。

[0331]

表 3：因子 VIII 和 VIIIa 衰退速率

	因子 VIII 衰退		因子 VIIIa 衰退	
	在 55℃下的热稳定性（分钟$^{-1}$）	血浆稳定性（小时$^{-1}$）	不存在因子 IXa（分钟$^{-1}$）	存在因子 IXa（分钟$^{-1}$）
野生型	0.0471* (1.00)	0.0178 (1.00)	0.0836 (1.00)	0.0154 (1.00)
E272A	0.0542 (1.15)	n.d.†	0.1638 (1.95)	0.0163 (1.06)
E272V	0.0602 (1.28)	n.d.	0.2271 (2.72)	0.0159 (1.03)
D519A	0.0336 (0.71)‡	0.0066 (0.37)‡	0.0556 (0.66)‡	0.0063 (0.41)‡
D519V	0.0262 (0.56)‡	0.0184 (1.03)	0.0642 (0.77)‡	0.0068 (0.44)‡
E665A	0.0359 (0.76)‡	0.0149 (0.84)§	0.0520 (0.62)‡	0.0078 (0.51)‡
E665V	0.0309 (0.66)‡	0.0047 (0.26)‡	0.0160 (0.19)‡	0.0052 (0.34)‡
E1984A	0.0240 (0.51)‡	0.0080 (0.45)‡	0.0241 (0.29)‡	0.0027 (0.18)‡
E1984V	0.0211 (0.45)‡	0.0078 (0.44)‡	0.0217 (0.26)‡	0.0019 (0.13)‡

根据最小二乘曲线拟合评估速率衰退值的标准偏差，并且热稳定性和因子 VIIIa 衰退测量的标准偏差在平均值的约 10%内，血浆稳定性测量的标准偏差在平均值的约 15%内。括号内的值为相对于野生型值的值。单字母代码用于表示氨基酸残基，E (Glu)、D (Asp)、A (Ala)和 V (Val)。

†未测定。

‡与野生型的速率相比，$p<0.001$（Student *t*-检验）。

§与野生型的速率相比，$p<0.05$（Student *t*-检验）。

[0332] 实施例 6：在 37℃下血浆中的因子 VIII 的稳定性

[0333] 为了测试在更天然的条件下突变对因子 VIII 稳定性的影响，将接近生理浓度的蛋白（1nM）在 37℃下在（抗凝的）缺乏因子 VIII 的血浆中孵育最多 4 天，所述血浆来自不含因子 VIII 抑制剂活性的血友病 A 患者。使用一期凝集测定每天一次测定残余的因

子 VIII。2 天后，野生型因子 VIII 的活性降至约 50％，Asp519Val 变体的活性也一样，而 Glu665Ala 变体显示出适度的（约 15％）活性衰退速率降低（图 6 和表 3)。然而，在第 4 天，Asp519Ala、Glu665Val 和两种 Glu1984 变体的活性值都大于或等于初始值的 50％。自血浆孵育所获得的结果与在较高温度下进行的孵育的结果很大部分上平行，其中 Glu665Val 变体和两种 Glu1984 变体都表现出在两种反应条件下稳定性的显著增加，如通过功能的保留所判断的。尽管两种 Asp519 变体在较高的温度下都显示出改善的稳定性，但是只有 Ala 变体在血浆测定中显示出改善。

[0334] 实施例 7 :Glu272、Asp519、Glu665 和 Glu1984 变体的因子 VIIIa 衰退速率

[0335] 上述结果表明与用疏水性残基取代隐藏的带电荷残基一致的突变一般产生显示增强的稳定性的因子 VIII 蛋白。因为这些突变在 A2 结构域与 A1 或 A3 的界面处或接近该界面，所以预测他们可能通过降低 A2 亚基的解离速率来积极地影响因子 VIIIa 的不稳定性。在两种条件下评估了这种机制所引起的因子 VIIIa 活性损失速率。在第一种中，用凝血酶激活野生型和因子 VIII 变体，并在添加因子 IXa 和因子 X 后，在所指示的时间测定剩余的辅因子活性并监测因子 Xa 生成的速率。在第二种方法中，将上述测定修改为包括在因子 VIII 激活之前添加因子 IXa 以容许立即形成因子 Xase。已经显示因子 VIIIa 整合到因子 Xase 复合体中通过将其衰退速率降低达 10 倍之多而部分地稳定辅因子的活性，这是通过与因子 IXa 用 Xase 拴系 A2 和 A3C1C2 亚基相一致的机制达成的 (Fay 等人，“Model for theFactor VIIIa-dependent Decay of the Intrinsic Factor Xase :Role of SubunitDissociation and Factor IXa-catalyzed Proteolysis（因子 VIIIa 依赖性的内在因子 Xase 衰退的模型 :亚基解离和因子 IXa 催化的蛋白水解的作用），”JBiol Chem. 271 : 6027-6032(1996)，通过引用将其整体并入本文）。

[0336] 在不存在或存在添加的因子 IXa 的条件下获得的结果分别显示在图 7A 和 7B 中。在不存在因子 IXa 的条件下，野生型因子 VIIIa 在约 8 分钟内损失了其活性的 50％（图 7A)，而当在因子 VIII 激活期间添加了因子 IXa 时，这个活性水平持续了约 40 分钟 (图 7B)。衰退速率值显示在表 3 中，并且表明辅因子活性通过形成因子 Xase 而稳定了大于 5 倍。变体的评定揭示在不存在因子 IXa 的条件下，Glu272Ala 和 Glu272Val 两种形式与野生型对照相比都具有分别为 2 倍和 3 倍的衰退速率增加。这些结果表明任一突变的弱化的亚基间亲和力可能是涉及酸性侧链的相对较弱的亲和力键合相互作用损失的结果。在存在因子 IXa 的条件下，两种变体的衰退速率基本上不能与野生型区别开，这表明因子 IXa 的添加消除了这种残基处的突变所产生的任何不良相互作用。

[0337] 在另外三个位点 (Asp519、Glu665 和 Glu1984) 的突变均导致了因子 VIIIa 衰退速率的降低，降低程度依据改变的具体残基并且在一种情况下依据取代的残基而变化。不存在因子 IXa 的条件下 Asp519 的突变产生约 30％的衰退速率降低，这在 Ala 和 Val 两种变体是类似的。在存在因子 IXa 的条件下，这些变体的活性衰退速率都降低了大于 2 倍，这表明了突变和与酶结合的稳定作用的协同作用。尽管 Glu665Ala 变体显示了与两种 Asp519 变体类似的值，但是 Glu665Val 变体在不存在和存在因子 IXa 的条件下分别显示出 5 倍和 3 倍的衰退速率降低，这表明用较大的疏水残基进行的取代会产生更有利于 A2 亚基保留的与邻近残基的相互作用。最后，两种 Glu1984 变体在不存在因子 IXa 的条件下与野生型相比都显示出约 4 倍的因子 VIIIa 衰退降低，并且在存在 IXa 时显示出 5-8 倍的降低。在图 7B

中观察到了这种增强的稳定性的显著性，图 7B 显示在包括任一 Glu1984 变体的因子 Xase 中 40 分钟后保持着大于 90％的因子 VIIIa 活性。对于在 Glu1984 处的 Ala 或 Val 的反应的类似性表明两种残基都得到很好的耐受，其中在存在 Val 的条件下可能会达成略强的亚基间亲和力。总之，这些结果证明了用疏水性残基选择性地取代带电荷的残基后改善的 A2 亚基保留所引起的因子 VIIIa 稳定性的显著增强。

[0338] 实施例 1 至 7 的讨论

[0339] 上述实施例证明在预测连接 A2 结构域的位点用疏水性残基取代所选择的带电荷的残基导致了虽然可变但是一般性的因子 VIII 稳定性增加。这种稳定性根据在较高的温度下活性保留和辅因子中 A2 亚基解离速率的降低来评估。

[0340] 在实施例 1 至 3 的初步分析中，基于小于2.8 Å的空间间隔选择了定位在因子 VIII A2 结构域界面的 30 个残基来进行突变分析，这些残基可能形成氢键键合配对物。将 30 个带电荷 / 极性残基突变为 Ala（或对于 Tyr 残基，突变为 Phe），稳定地表达重组蛋白，并测量活性损失速率。所检测的 30 个残基中的 14 个显示出与野生型相比在 55℃下大于 2 倍的因子 VIII 衰退速率增加和因子 VIIIa 衰退速率增加，这表明 A1A2 和 A2A3 结构域界面处的多个残基促进因子 VIII 的稳定性。有趣地，所检测的两个酸性残基 Asp302 和 Glu287 在突变为 Ala 时在前体辅因子和活性辅因子两种形式中都产生了适度（小于 2 倍）的稳定性增强。这两个酸性残基在人、犬、猪、小鼠、兔、大鼠和蝙蝠的因子 VIII 中都是保守的。这些初步结果表明这些酸性侧链不促进对氢键相互作用的稳定，反而对因子 VIII 结构有一些不良影响，如通过功能稳定性所评估的。

[0341] 根据这些初步研究，评估了所制备的另外的疏水相互作用的功能获得。实施例 4 至 7 中所检测的 4 种酸性残基在人、犬、猪、小鼠、兔和蝙蝠的因子 VIII 中是保守的，而在大鼠因子中 Glu665 为 Ala 并且 Glu1984 为 Thr（参见 Swiss Institute of Bioinformatics, online analysis UniProtKB（瑞士生物信息研究所，在线分析 UniProtKB)/Swiss-Prot Release 55.5 和 UniProtKB/TrEMBL Release 38.5(2008)，通过引用将其整体并入本文）。实施例 4 至 7 的结果证明用 Ala 和 / 或 Val 取代这些残基中的三个 Asp519、Glu665 和 Glu1984 导致了蛋白稳定性增强。实施例 4 至 7 中只有一个所评定的酸性残基在突变时产生了对活性不利的结果。Glu272 突变为 Ala 产生了具有降低的凝血酶生成参数值的低比活的因子 VIII 形式；并且 Ala 和 Val 取代两者与野生型相比都具有中等程度的热稳定性降低，和辅因子形式中高 2 至 3 倍的 A2 亚基解离速率。根据这些观察，认为 Glu272 可能确实参与与邻近残基的键合相互作用，并且随后在此位点的突变破坏这些相互作用。此结论与血友病 A 数据库的检测一致 (Kemball-Cook 等人，“TheFactor VIII Structure and Mutation Resource Site：HAMSTeRS version 4（因子 VIII 结构和突变资源位点：HAMSTeRS 第 4 版），”Nucleic Acids Res. 26：216-219(1998)；Kemball-Cook(MRC Clinical Sciences Centre(MRC 临床科学中心)，Haemophilia A Mutation Database（血友病 A 突变数据库）(2008 年 7 月 2 日登录)，通过引用将它们每一个整体并入本文)，该数据库将位置 272 处的 Lys（电荷相反）或 Gly（小侧链）列为具有降低的因子 VIII 抗原的中度 / 轻度表型。后一种观察现象与突变致使血浆不稳定性增加一致。然而，在这个位点突变为 Ala 或 Val 后这些突变对细胞培养物中的表达水平没有显著影响。相反地，数据库中没有列出 Asp519、Glu665 和 Glu1984 处的突变。

[0342] 蛋白质倾向于折叠而使带电荷的或极性部分保持溶剂暴露而疏水基团被隐藏(Pace 等人,“Forces Contributing to the Conformational Stability ofProteins(促进蛋白质构象稳定性的力),”FASEB J.10:75-83(1996),通过引用将其整体并入本文)。因此,根据在用疏水性残基取代 Glu287、Asp302、Asp519、Glu665 和 Glu1984 时在这些位置观察到的功能获得性突变,认为这些带电荷残基被隐藏在 A2 结构域界面处。此外,这些结果表明,这些酸性残基不促进静电键合相互作用,并且可能使野生型蛋白结构和 / 或亚基相互作用不稳定。

[0343] 由于使用 Ala 或 Val 的诱变产生了疏水残基(以取代带电荷的酸性残基),Ala 或 Aal 取代将趋于稳定界面的其他疏水性接触。此外,Val 侧链比 Ala 大,因此在给定位点的取代后对活性的影响的比较可能提供对在该位点的残基包装和体积的一些深入了解。例如,用任一残基取代 Glu1984 产生了类似的结果,这表明在该位点两种残基都得到很好的耐受;而 Glu665Val 与 Glu665Ala 相比显示出因子 VIIIa 衰退速率的 3 倍降低,这表明较大体积的 Val 侧链在推定的疏水性结合袋中更好地耐受。

[0344] 总之,实施例 1 至 7 的结果显著促进了因子 VIII A 结构域结构的理解,因子 VIII A 结构域结构先前仅限于源自与高分辨率的血浆铜蓝蛋白结构的同源性的模型 (Pemberton 等人,“A Molecular Model for the Triplicated ADomains of Human Factor VIII Based on the Crystal Structure of HumanCeruloplasmin,”Blood 89:2413-2421(1997)(基于人血浆铜蓝蛋白的晶体结构的人因子 VIII 的三个 A 结构域的分子模型),通过引用将其整体并入本文)和最近的人因子 VIII 的中间分辨率的结构(3.75 Å) (Shen 等人,“TheTertiary Structure and Domain Organization of Coagulation Factor VIII(凝血因子 VIII 的三级结构和结构域组织),”Blood 111:1240-1247(2008),通过引用将其整体并入本文). 尽管后一种结构不容许分配氢键相互作用(<2.8Å),但是该研究的作者指出因子 VIII 的 A 结构可以高度准确地与血浆铜蓝蛋白的结构域叠加。

[0345] 尽管血浆铜蓝蛋白模型表明 Asp302 和 Glu287 可能促进氢键相互作用,但是实施例 1 至 3 的稳定性研究证明这是不可能的。相反,相信这些酸性侧链是被隐藏在疏水性环境中的。相反地,实施例 4 至 7 的结果支持 Glu272 可能促进 A2 结构域界面处的氢键相互作用这一观点,因为这种电荷的损失降低了因子 VIII(VIIIa) 稳定性。如由模型所预测的,实施例 4 至 7 中评定的剩余的三个酸性残基似乎隐藏在界面处,因为似乎没有来自互补结构域上的邻近残基的极性原子定位在这些残基的羧基附近。更确切地,注意到这些部分似乎邻近疏水基团。例如,模型预测 Asp519 的羧基氧和 Thr275 的甲基碳间隔为约4.2 Å,Glu665 的羧基氧和 Val1982 的甲基碳间隔为约8.1 Å,并且 Glu1984 的羧基氧和 Val663 的甲基碳间隔为约6.2Å。

[0346] 表现出增强的稳定性和降低的辅因子活性衰退速率的因子 VIII 变体代表对于治疗制剂的积极属性。前一种特性应容许蛋白纯化和配制期间活性蛋白的产量增加,从而导致较高的比活值。这些试剂与野生型相比还可以具有较长的循环半衰期(参见图 6),未包括各种细胞清除机制。先前两个小组已报道了通过降低 / 消除 A2 亚基解离速率而稳定辅因子活性的因子 VIII 变体。在两种情况下,都采用将 A2 结构域共价连接到分子的其他区域的突变。在一种情况下,通过连接 A2 结构域和与 A3C1C2 结构域邻接的 B 结构

域的区段来制备抗失活的因子 VIII，并且该区段缺乏在前体辅因子激活后释放 A2 结构域或 B 结构域片段的凝血酶裂解位点 (Pipe 等人，“Characterization of a Genetically Engineered Inactivation-resistantCoagulation Factor VIIIa（遗传工程化的抗失活的凝血因子 VIIIa 的表征），”Proc Natl Acad Sci U S A 94：11851-11856(1997)，通过引用将其整体并入本文）。在第二种情况下，用 Cys 残基取代在 A3 和 A2 结构域中邻近的所选择残基以在两个结构域之间形成二硫桥接，以便在凝血酶激活后使 A2 保持与 A3 共价 (Gale 等人，“An Engineered Interdomain Disulfide BondStabilizes Human Blood Coagulation Factor VIIIa（工程化的结构域间二硫键稳定人血凝血因子 VIIIa），”J Thromb Haemost.1：1966-1971(2003)；Radtke 等人，“Disulfide Bond-stabilized Factor VIII has Prolonged Factor VIIIaActivity and Improved Potency in Whole Blood Clotting Assays（二硫键稳定的因子 VIII 具有延长的因子 VIIIa 活性并且在全血凝集测定中具有改善的效价），”J ThrombHaemost.5：102-108(2007)，通过引用将它们每一个整体并入本文）。后一种突变体还显示出在凝血酶生成测定中增加的活性，尽管这些研究中的反应条件使用亚生理（＜ 0.5nM) 浓度的因子 VIII。

[0347] 使用生理的因子 VIII 水平 (1nM) 的实施例 1 至 7 的结果显示出在野生型和表现较高的稳定性的变体之间的极低的差异，尽管 Glu272Ala 产生了与其较低的比活一致的凝血酶生成参数。没有观察到与高稳定性变体的显著差异可能反映了反应条件的不同和 / 或这些突变不与 A2 结构域共价桥接并且因子 VIIIa 的衰退速率未显著降低。

[0348] 实施例 1 至 7 中所列的结果证明在将保守的酸性残基转化为疏水性残基的单点突变后可以达成辅因子失活速率若干倍的降低。在这些情况的每一种中，这些突变发生在界面处，其中所改变的残基可能被隐藏并且不在表面暴露，并且不改变蛋白内的共价相互作用。根据初步的结果，辅因子形式的 Glu1984Val 和 Glu1984Ala 变体和野生型辅因子显示出类似的失活速率，如通过激活的蛋白 C 催化的在 Arg336 和 Arg562 处的裂解所测量的 (Varfaj 等人，“Residues Surrounding Arg336and Arg562 Contribute to theDisparate Rates of Proteolysis of Factor VIIIa Catalyzed by Activated ProteinC(Arg336 和 Arg562 周围的残基促进激活的蛋白 C 催化的因子 VIIIa 蛋白水解的全异速率），”J.Biol.Chrm.282(28)：20264-72(2007)，通过引用将其整体并入本文）。这支持了这些较高稳定性变体的下调也应通过与野生型辅因子几乎相同的蛋白 C 途径进行这一观点。因此，本发明的稳定化变体应没有关于上述的失活抗性突变体的问题。

[0349] 实施例 8：二取代的和三取代的因子 VIII 变体的稳定性分析

[0350] 为了确定是加性作用还是协同作用造成因子 VIII(VIIIa) 稳定性进一步增强，使用“材料与方法”中所描述的相同方法制备上述实施例中所描述的点突变的组合。具体地，使用残基 Asp519、Glu665 和 Glu1984 处的 Ala 或 Val 取代制备双组合或三组合突变体。这些组合突变体（氨基酸使用单字母代码标示）包括：D519AE665A、D519AE665V、D519AE1984A、D519AE1984V、D519VE665V、D519VE1984A、D519VE1984V、E665AE1984A、E665AE1984V、E665VE1984A、E665VE1984V、D519AE665VE1984A、D519VE665VE1984A、D519VE665VE1984V。此分析中排除了 D519VE665A 因子 VIII，因为该突变体在 ELISA 和蛋白质印迹结果中显示不典型的特征。

[0351] 为了制备三突变体，将 D519A 或 D519V 与 E665VE1984A 或 E665VE1984V 组合。取

消了其他组合，因为 E665AE1984A 和 E665AE1984V 双突变体与各单突变体相比不增强因子 VIII 和因子 VIIIa 的稳定性。由于与 D519VE665A 所观察到的相同的原因，排除了使用 D519AE665VE1984V 的结果。

[0352] 组合了 Asp519 处的突变 (Ala 或 Val) 与 Glu665 或 Glu1984 处的突变的第一组新突变体 (组 A) 保持着正常的比活值 (大于野生型 (WT) 值的 80％，图 8)。有趣地，如通过一期凝集测定所测量的，D519AE665A、D519VE665V、D519VE1984A 和 D519VE1984V 与野生型因子 VIII 相比显示出多达约 1.8 倍的比活值显著增加 (图 8)。为 Glu665 和 Glu1984 处的突变组合的第二组突变体 (组 B) 的比活出乎意料地显示出与野生型因子 VIII 相比多达约 2 倍的比活降低，例外的是 E665VE1984A 略高于野生型值 (图 8)。第三组 (组 C) 代表三突变，并且通过一期测定显示出正常至适度增加的活性 (D519VE665VE1984V)。然而，如通过二期测定所测量的 D519VE665VE1984V 活性显著降低。由于 Asp519 定位在 A1 和 A2 界面处，而 Glu665 和 Glu1984 定位在 A2 和 A3 界面处，认为与组 B 相比，组 A 突变的比活增加趋势可能是由于在 A1-A2 接合处影响构象并且保持活性辅因子形式的更有利的相互作用引起的。

[0353] 图 9 显示在 55℃下进行的因子 VIII 的热稳定性实验的结果的概要。使用实施例 5 所获得的单突变的数据 (图 5A)，将组合突变体所获得的速率值与在该具体组合中最佳单突变体的速率值进行比较。图 9 还显示了因子 VIII 衰退速率的实际值 (还参见表 4)。相对衰退速率的降低程度似乎与所观察到的突变组合的增强相关。在组 A 中，突变体 D519AE665A、D519AD665V 和 D519VE665V 显示出稳定性的显著增强 (衰退速率降低) 并且大部分的突变体还维持着野生型值的约 50％的绝对衰退速率。在另一方面，与最佳单突变相比，组 B 突变体中的两个突变体的相对速率略微增加 (E665AE1984A 和 E665AE1984V)。在组 C 中，突变体 D519AE665VE1984A 和 D519VE665VE1984A 未显示速率的显著改变，而 D519VE665VE1984V 的速率值则略微增加。

[0354] 有趣地，所观察到的突变组合的稳定性增强更容易以因子 VIIIa 的形式观察到 (图 10)。为了增加因子 VIIIa 衰退测定对高稳定性突变体的灵敏性，采用比在上述实施例中更低浓度的因子 VIIIa(1.5nM) 进行孵育。所有组 A 突变体都观察到了与单突变体相比多达 4 倍的高稳定性增强。D519VE665V 和 D519VE1984 的因子 VIIIa 衰退速率的实际值分别为野生型因子 VIII 的衰退速率的 14％和 12％ (图 10 和表 4)。组 B 突变体在与成对突变中的较好的单突变相比时一般产生较弱的结果，其中 E665AE1984A 和 E665AE1984V 分别显示约 2.2 和约 2.7 倍的相对衰退速率值增加。三突变 (组 C) 显示了最大的因子 VIIIa 稳定性增强，其中 D519VE665VE1984A 观察到了最大的稳定性，D519VE665VE1984A 显示出野生型的约 10％的衰退速率 (图 10 和表 4)。

[0355] 表 4 :组合突变体的因子 VIII 和 VIIIa 的衰退速率和活性值

[0356]

	衰退速率（分钟$^{-1}$）		比活	
	因子 VIII	因子 VIIIa	一期测定	二期测定
野生型	0.0473 (1.00[a])	0.1400 (1.00)	4.77[b] (1.00)	44.5[c] (1.00)
D519AE665A	0.0255 (0.54)	0.0352 (0.25)	0.95 (0.20)	1.77 (0.04)
D519AE665V	0.0213 (0.45)	0.0222 (0.16)	4.20 (0.88)	1.02 (0.02)
D519AE1984A	0.0250 (0.53)	0.0266 (0.19)	0.41 (0.09)	2.15 (0.05)
D519AE1984V	0.0247 (0.53)	0.0319 (0.23)	2.62 (0.55)	24.0 (0.54)
D519VE665V	0.0238 (0.51)	0.0198 (0.14)	4.41 (0.93)	45.5 (1.02)
D519VE1984A	0.0256 (0.54)	0.0168 (0.12)	5.25 (1.10)	47.4 (1.07)
D519VE1984V	0.0259 (0.55)	0.0262 (0.19)	3.70 (0.78)	21.1 (0.47)
E665AE1984A	0.0324 (0.69)	0.1302 (0.93)	1.43 (0.30)	6.21 (0.14)
E665AE1984V	0.0348 (0.74)	0.1267 (0.90)	4.82 (1.01)	45.0 (1.01)
E665VE1984A	0.0232 (0.49)	0.0360 (0.26)	4.34 (0.91)	36.5 (0.82)
E665VE1984V	0.0220 (0.47)	0.0671 (0.48)	1.00 (0.21)	15.8 (0.36)
D519AE665VE1984A	0.0246 (0.52)	0.0235 (0.17)	3.82 (0.80)	32.5 (0.73)
D519VE665VE1984A	0.0254 (0.54)	0.0142 (0.10)	4.40 (0.92)	37.9 (0.85)
D519VE665VE1984V	0.0307 (0.65)	0.0227 (0.16)	3.74 (0.78)	36.6 (0.82)
D519A	0.0336[d] (0.71)	0.0898 (0.64)		
D519V	0.0262[d] (0.56)	0.0836 (0.60)		
E665A	0.0359[d] (0.76)	0.0834 (0.60)		
E665V	0.0309[d] (0.66)	0.0395 (0.28)		
E1984A	0.0240[d] (0.51)	0.0574 (0.41)		
E1984V	0.0211[d] (0.45)	0.0471 (0.34)		

[0357] 根据最小二乘曲线拟合估计速率衰退值的标准偏差，并且标准偏差在平均值的约10％内。

[0358] [a] 括号内的值为相对于野生型的值

[0359] [b] 单位 / μ g

[0360] [c]nM 生成的因子 Xa/ 分钟 /nM 因子 VIII

[0361] [d] 从上面的表 3 复制的数据。

[0362] 对所选择的突变体进行了凝血酶生成测定，结果显示在图 11A-B 中。当使用 1nM 因子 VIII 的终浓度测试单突变体（参见“材料与方法”，和上文的实施例 4）时，凝血酶生成特征没有显著改善。为了更好地比较更稳定的因子 VIII 突变体，使用较低的因子

VIII 浓度 (0.2nM)。这个分析的结果显示 D519VE665V 具有与野生型因子 VIII 相比约 20％的滞后时间和峰时间降低，以及约 2.3 倍的峰高增加和约 1.5 倍的内源凝血酶潜能 (endogenous thrombin potential，ETP) 增加（图 11A-B)。尽管 D519AE665V、D519VE1984A 和 D519VE665VE1984A 的滞后时间和峰时间值与野生型相比没有显著改变，但是峰高和 ETP 值显著高于野生型（约 20％至 70％）。总之，这些结果表明全都具有增强的因子 VIIIa 稳定性的四个组合突变体显示出改善的凝血酶生成特征。这个观察现象表明这些突变体在生理条件下可能具有增加每单位因子 VIII 浓度的凝血酶生成的较高能力。

[0363] 实施例 9：与高比活 Glu113Ala(E113A) 突变组合的 Asp519、Glu665 和 Glu1984 处的 Ala 或 Val 突变体

[0364] 已知如通过一期凝集测定所判定的，E113A 突变增强因子 VIII 的比活（授予 Fay 等人的美国专利申请公布第 10/581,471 号；Wakabayashi 等人，“A Glu113Ala Mutation within a Factor VIII Ca(2+)-Binding Site EnhancesCofactor Interactions in Factor Xase（因子 VIII Ca(2+)- 结合位点内的 Glu113Ala 突变增强因子 Xase 内的辅因子相互作用），”Biochemistry44：10298-10304(2005)，通过引用将他们每一个整体并入本文)。由于具有高稳定性和高比活二者的因子 VIII 的产生代表了血友病治疗中用于潜在的治疗应用的一种独特种类的试剂，分析了 E113A 与上述实施例中所描述的具有高稳定性突变体的组合突变的作用。

[0365] 使用“材料与方法”中所描述的相同方法制备 Asp519、Glu665 和 Glu1984 处的 Ala 或 Val 突变体与 E113A 突变的组合。这些双突变体（氨基酸使用单字母代码标示）包括：E113AD519A、E113AD519V、E113AE665A、E113AE665V 和 E113AE1984V。

[0366] 使用一期测定所测得的组合突变体的比活值比野生型因子 VIII 高约 2 至约 3.3 倍，而二期测定则保持正常活性水平。这些结果表明 Asp519、Glu665 或 Glu1984 处的突变没有不利地影响 E113A 突变所观察到的活性增强（图 12A)。此外，E113A 与高稳定性突变体的组合的因子 VIII 和因子 VIIIa 衰退速率与各原始的高稳定性单突变体的值没有显著差异（参见，图 5B-C；表 5)，这表明 E113A 突变不影响这些突变体的增强的稳定性参数。

[0367] 表 5：因子 VIII 和 VIIIa 的衰退速率和活性值

[0368]

	衰退速率（分钟$^{-1}$）		比活	
	因子 VIII	因子 VIIIa	一期测定	二期测定
野生型	0.0473 (1.00[a])	0.1400 (1.00)	4.77[b] (1.00)	44.5[c] (1.00)
E113AD519A	0.0471 (0.63)	0.0748 (0.53)	14.3 (2.99)	37.3 (0.84)
E113AD519V	0.0297 (0.57)	0.0495 (0.35)	10.3 (2.16)	40.9 (0.92)
E113AE665A	0.0270 (0.61)	0.0754 (0.54)	15.7 (3.29)	45.4 (1.02)
E113AE665V	0.0286 (0.59)	0.0333 (0.24)	9.6 (2.02)	44.5 (1.00)
E113AE1984V	0.0278 (0.53)	0.0567 (0.40)	13.4 (2.81)	48.5 (0.52)
D519A	0.0336[d] (0.71)	0.0898 (0.64)		
D519V	0.0262[d] (0.56)	0.0836 (0.60)		
E665A	0.0359[d] (0.76)	0.0834 (0.60)		
E665V	0.0309[d] (0.66)	0.0395 (0.28)		
E1984A	0.0240[d] (0.51)	0.0574 (0.41)		
E1984V	0.0211[d] (0.45)	0.0471 (0.34)		

[0369] 根据最小二乘曲线拟合估计速率衰退值的标准偏差，并且标准偏差在平均值的约10％内。

[0370] [a] 括号内的值为相对于野生型的值

[0371] [b] 单位 / μ g

[0372] [c] nM 生成的因子 Xa/ 分钟 /nM 因子 VIII

[0373] [d] 从上面的表 3 复制的数据。

[0374] 从上述结果可知，为了产生特征为比活增加和因子 VIII/ 因子 VIIIa 稳定性增强的重组因子 VIII 的目的，E113A 突变可以与任何目前所描述的稳定性增加的突变组合。这包括 E113A（或如授予 Fay 等人的美国专利申请序列第 10/581,471 号中所描述的其他合适的 E113 取代，通过引用将其整体并入本文）与本文所描述的类型的稳定性增强的单突变体或多突变体组合。

[0375] 尽管本文详细描绘和说明了优选的实施方式，但是对于相关领域的那些技术人员来说明显的是可以在不背离本发明的精神的条件下进行各种修改、添加、替代等，因此这些也被认为是在如下的权利要求所界定的本发明的范围内。

序列表

<110> 罗彻斯特大学
菲利普·J·法伊
海洛纳奥·维卡巴耶世

<120> 具有增加的稳定性的重组因子 VIII

<130>176/62591

<150>60/984,518
<151>2007-11-01

<150>60/991,304
<151>2007-11-30

<160>2

<170>PatentIn 版本 3.5

<210>1
<211>6999
<212>DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>1
gccaccagaa gatactacct gggtgcagtg gaactgtcat gggactatat gcaaagtgat 60
ctcggtgagc tgcctgtgga cgcaagattt cctcctagag tgccaaaatc ttttccattc 120
aacacctcag tcgtgtacaa aaagactctg tttgtagaat tcacggatca ccttttcaac 180
atcgctaagc caaggccacc ctggatgggt ctgctaggtc ctaccatcca ggctgaggtt 240
tatgatacag tggtcattac acttaagaac atggcttccc atcctgtcag tcttcatgct 300
gttggtgtat cctactggaa agcttctgag ggagctgaat atgatgatca gaccagtcaa 360
agggagaaag aagatgataa agtcttccct ggtggaagcc atacatatgt ctggcaggtc 420
ctgaaagaga atggtccaat ggcctctgac ccactgtgcc ttacctactc atatctttct 480
catgtggacc tggtaaaaga cttgaattca ggcctcattg gagccctact agtatgtaga 540
gaagggagtc tggccaagga aaagacacag accttgcaca aatttatact acttttgct 600
gtatttgatg aagggaaaag ttggcactca gaaacaaaga actccttgat gcaggatagg 660
gatgctgcat ctgctcgggc ctggcctaaa atgcacacag tcaatggtta tgtaaacagg 720
tctctgccag gtctgattgg atgccacagg aaatcagtct attggcatgt gattggaatg 780

ggcaccactc ctgaagtgca ctcaatattc ctcgaaggtc acacatttct tgtgaggaac 840
catcgccagg cgtccttgga aatctcgcca ataactttcc ttactgctca aacactcttg 900
atggaccttg gacagtttct actgttttgt catatctctt cccaccaaca tgatggcatg 960
gaagcttatg tcaaagtaga cagctgtcca gaggaacccc aactacgaat gaaaaataat 1020
gaagaagcgg aagactatga tgatgatctt actgattctg aaatggatgt ggtcaggttt 1080
gatgatgaca actctccttc ctttatccaa attcgctcag ttgccaagaa gcatcctaaa 1140
acttgggtac attacattgc tgctgaagag gaggactggg actatgctcc cttagtcctc 1200
gcccccgatg acagaagtta taaaagtcaa tatttgaaca atggccctca gcggattggt 1260
aggaagtaca aaaaagtccg atttatggca tacacagatg aaacctttaa gactcgtgaa 1320
gctattcagc atgaatcagg aatcttggga cctttacttt atggggaagt tggagacaca 1380
ctgttgatta tatttaagaa tcaagcaagc agaccatata acatctaccc tcacggaatc 1440
actgatgtcc gtcctttgta ttcaaggaga ttaccaaaag gtgtaaaaca tttgaaggat 1500
tttccaattc tgccaggaga aatattcaaa tataaatgga cagtgactgt agaagatggg 1560
ccaactaaat cagatcctcg gtgcctgacc cgctattact ctagtttcgt taatatggag 1620
agagatctag cttcaggact cattggccct ctcctcatct gctacaaaga atctgtagat 1680
caaagaggaa accagataat gtcagacaag aggaatgtca tcctgttttc tgtatttgat 1740
gagaaccgaa gctggtacct cacagagaat atacaacgct ttctccccaa tccagctgga 1800
gtgcagcttg aggatccaga gttccaagcc tccaacatca tgcacagcat caatggctat 1860
gtttttgata gtttgcagtt gtcagtttgt ttgcatgagg tggcatactg gtacattcta 1920
agcattggag cacagactga cttcctttct gtcttcttct ctggatatac cttcaaacac 1980
aaaatggtct atgaagacac actcacccta ttcccattct caggagaaac tgtcttcatg 2040
tcgatggaaa acccaggtct atggattctg gggtgccaca actcagactt tcggaacaga 2100
ggcatgaccg ccttactgaa ggtttctagt tgtgacaaga acactggtga ttattacgag 2160
gacagttatg aagatatttc agcatacttg ctgagtaaaa acaatgccat tgaaccaaga 2220
agcttctccc agaattcaag acacccctagc actaggcaaa agcaatttaa tgccaccaca 2280
attccagaaa atgacataga gaagactgac ccttggtttg cacacagaac acctatgcct 2340
aaaatacaaa atgtctcctc tagtgatttg ttgatgctct tgcgacagag tcctactcca 2400
catgggctat ccttatctga tctccaagaa gccaaatatg agacttttc tgatgatcca 2460
tcacctggag caatagacag taataacagc ctgtctgaaa tgacacactt caggccacag 2520
ctccatcaca gtggggacat ggtatttacc cctgagtcag gcctccaatt aagattaaat 2580
gagaaactgg ggacaactgc agcaacagag ttgaagaaac ttgatttcaa agtttctagt 2640
acatcaaata atctgatttc aacaattcca tcagacaatt tggcagcagg tactgataat 2700
acaagttcct taggaccccc aagtatgcca gttcattatg atagtcaatt agataccact 2760
ctatttggca aaaagtcatc tccccttact gagtctggtg gacctctgag cttgagtgaa 2820
gaaaataatg attcaaagtt gttagaatca ggtttaatga atagccaaga aagttcatgg 2880
ggaaaaaatg tatcgtcaac agagagtggt aggttattta aagggaaaag agctcatgga 2940
cctgctttgt tgactaaaga taatgcctta ttcaaagtta gcatctcttt gttaaagaca 3000
aacaaaactt ccaataattc agcaactaat agaaagactc acattgatgg cccatcatta 3060
ttaattgaga atagtccatc agtctggcaa aatatattag aaagtgacac tgagtttaaa 3120

aaagtgacac ctttgattca tgacagaatg cttatggaca aaaatgctac agctttgagg 3180
ctaaatcata tgtcaaataa aactacttca tcaaaaaaca tggaaatggt ccaacagaaa 3240
aaagagggcc ccattccacc agatgcacaa aatccagata tgtcgttctt taagatgcta 3300
ttcttgccag aatcagcaag gtggatacaa aggactcatg gaaagaactc tctgaactct 3360
gggcaaggcc ccagtccaaa gcaattagta tccttaggac cagaaaaatc tgtggaaggt 3420
cagaatttct tgtctgagaa aaacaaagtg gtagtaggaa agggtgaatt tacaaaggac 3480
gtaggactca aagagatggt ttttccaagc agcagaaacc tatttcttac taacttggat 3540
aatttacatg aaaataatac acacaatcaa gaaaaaaaaa ttcaggaaga aatagaaaag 3600
aaggaaacat taatccaaga gaatgtagtt ttgcctcaga tacatacagt gactggcact 3660
aagaatttca tgaagaacct tttcttactg agcactaggc aaaatgtaga aggttcatat 3720
gacggggcat atgctccagt acttcaagat tttaggtcat taaatgattc aacaaataga 3780
acaaagaaac acacagctca tttctcaaaa aaaggggagg aagaaaactt ggaaggcttg 3840
ggaaatcaaa ccaagcaaat tgtagagaaa tatgcatgca ccacaaggat atctcctaat 3900
acaagccagc agaattttgt cacgcaacgt agtaagagag ctttgaaaca attcagactc 3960
ccactagaag aaacagaact tgaaaaaagg ataattgtgg atgacacctc aacccagtgg 4020
tccaaaaaca tgaaacattt gaccccgagc accctcacac agatagacta caatgagaag 4080
gagaaagggg ccattactca gtctccctta tcagattgcc ttacgaggag tcatagcatc 4140
cctcaagcaa atagatctcc attacccatt gcaaaggtat catcatttcc atctattaga 4200
cctatatatc tgaccagggt cctattccaa gacaactctt ctcatcttcc agcagcatct 4260
tatagaaaga aagattctgg ggtccaagaa agcagtcatt tcttacaagg agccaaaaaa 4320
aataaccttt ctttagccat tctaaccttg gagatgactg gtgatcaaag agaggttggc 4380
tccctgggga caagtgccac aaattcagtc acatacaaga aagttgagaa cactgttctc 4440
ccgaaaccag acttgcccaa aacatctggc aaagttgaat tgcttccaaa agttcacatt 4500
tatcagaagg acctattccc tacggaaact agcaatgggt ctcctggcca tctggatctc 4560
gtggaaggga gccttcttca gggaacagag ggagcgatta agtggaatga agcaaacaga 4620
cctggaaaag ttcccctttct gagagtagca acagaaagct ctgcaaagac tccctccaag 4680
ctattggatc ctcttgcttg ggataaccac tatggtactc agataccaaa agaagagtgg 4740
aaatcccaag agaagtcacc agaaaaaaca gcttttaaga aaaaggatac cattttgtcc 4800
ctgaacgctt gtgaaagcaa tcatgcaata gcagcaataa atgagggaca aaataagccc 4860
gaaatagaag tcacctgggc aaagcaaggt aggactgaaa ggctgtgctc tcaaaaccca 4920
ccagtcttga aacgccatca acgggaaata actcgtacta ctcttcagtc agatcaagag 4980
gaaattgact atgatgatac catatcagtt gaaatgaaga aggaagattt tgacatttat 5040
gatgaggatg aaaatcagag cccccgcagc tttcaaaaga aaacacgaca ctattttatt 5100
gctgcagtgg agaggctctg ggattatggg atgagtagct ccccacatgt tctaagaaac 5160
agggctcaga gtggcagtgt ccctcagttc aagaaagttg ttttccagga atttactgat 5220
ggctccttta ctcagccctt ataccgtgga gaactaaatg aacatttggg actcctgggg 5280
ccatatataa gagcagaagt tgaagataat atcatggtaa ctttcagaaa tcaggcctct 5340
cgtccctatt ccttctattc tagccttatt tcttatgagg aagatcagag gcaaggagca 5400
gaacctagaa aaaactttgt caagcctaat gaaaccaaaa cttacttttg gaaagtgcaa 5460

catcatatgg cacccactaa agatgagttt gactgcaaag cctgggctta tttctctgat 5520
gttgacctgg aaaaagatgt gcactcaggc ctgattggac cccttctggt ctgccacact 5580
aacacactga accctgctca tgggagacaa gtgacagtac aggaatttgc tctgtttttc 5640
accatctttg atgagaccaa aagctggtac ttcactgaaa atatggaaag aaactgcagg 5700
gctccctgca atatccagat ggaagatccc acttttaaag agaattatcg cttccatgca 5760
atcaatggct acataatgga tacactacct ggcttagtaa tggctcagga tcaaaggatt 5820
cgatggtatc tgctcagcat gggcagcaat gaaaacatcc attctattca tttcagtgga 5880
catgtgttca ctgtacgaaa aaaagaggag tataaaatgg cactgtacaa tctctatcca 5940
ggtgtttttg agacagtgga aatgttacca tccaaagctg gaatttggcg ggtggaatgc 6000
cttattggcg agcatctaca tgctgggatg agcacacttt ttctggtgta cagcaataag 6060
tgtcagactc ccctgggaat ggcttctgga cacattagag attttcagat tacagcttca 6120
ggacaatatg gacagtgggc cccaaagctg gccagacttc attattccgg atcaatcaat 6180
gcctggagca ccaaggagcc cttttcttgg atcaaggtgg atctgttggc accaatgatt 6240
attcacggca tcaagaccca gggtgcccgt cagaagttct ccagcctcta catctctcag 6300
tttatcatca tgtatagtct tgatgggaag aagtggcaga cttatcgagg aaattccact 6360
ggaaccttaa tggtcttctt tggcaatgtg gattcatctg ggataaaaca caatattttt 6420
aaccctccaa ttattgctcg atacatccgt ttgcacccaa ctcattatag cattcgcagc 6480
actcttcgca tggagttgat gggctgtgat ttaaatagtt gcagcatgcc attgggaatg 6540
gagagtaaag caatatcaga tgcacagatt actgcttcat cctactttac caatatgttt 6600
gccacctggt ctccttcaaa agctcgactt cacctccaag ggaggagtaa tgcctggaga 6660
cctcaggtga ataatccaaa agagtggctg caagtggact tccagaagac aatgaaagtc 6720
acaggagtaa ctactcaggg agtaaaatct ctgcttacca gcatgtatgt gaaggagttc 6780
ctcatctcca gcagtcaaga tggccatcag tggactctct tttttcagaa tggcaaagta 6840
aaggtttttc agggaaatca agactccttc acacctgtgg tgaactctct agacccaccg 6900
ttactgactc gctaccttcg aattcacccc cagagttggg tgcaccagat tgccctgagg 6960
atggaggttc tgggctgcga ggcacaggac ctctactga 6999

<210>2
<211>2332
<212>PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<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 Val 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

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
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
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
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

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

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

945 950 955 960

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

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
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 Glu 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

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

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
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
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

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

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

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
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

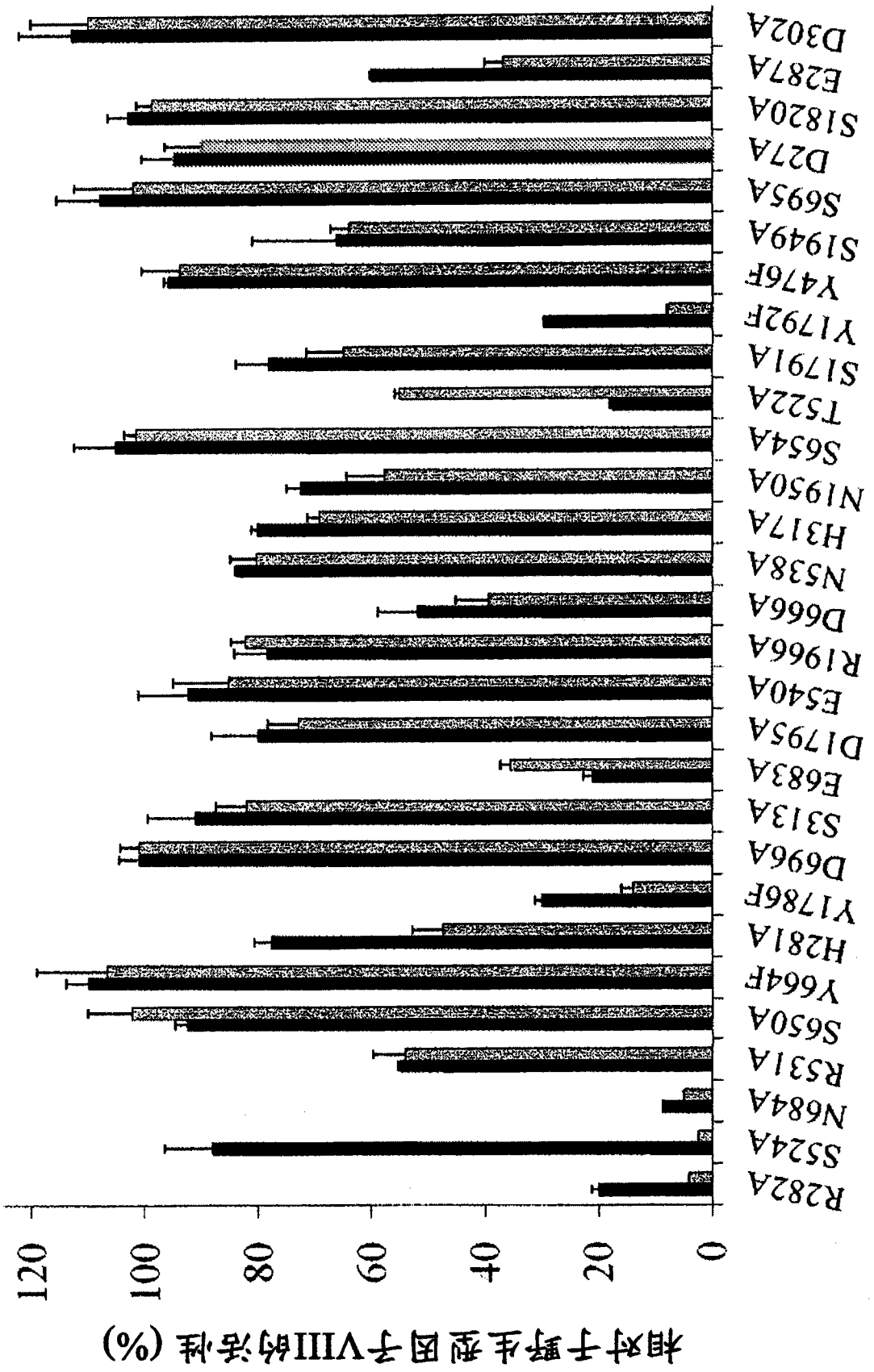
相对于野生型因子VIII的活性 (%)
0
20
40
60
80
100
120
R282A
S524A
N684A
R531A
S650A
Y664F
H281A
Y786F
D696A
S313A
E683A
D1795A
E540A
R1966A
D666A
N538A
H317A
N1950A
S654A
T522A
S1791A
Y1792F
Y476F
S1949A
S695A
D27A
S1820A
E287A
D302A

图 1

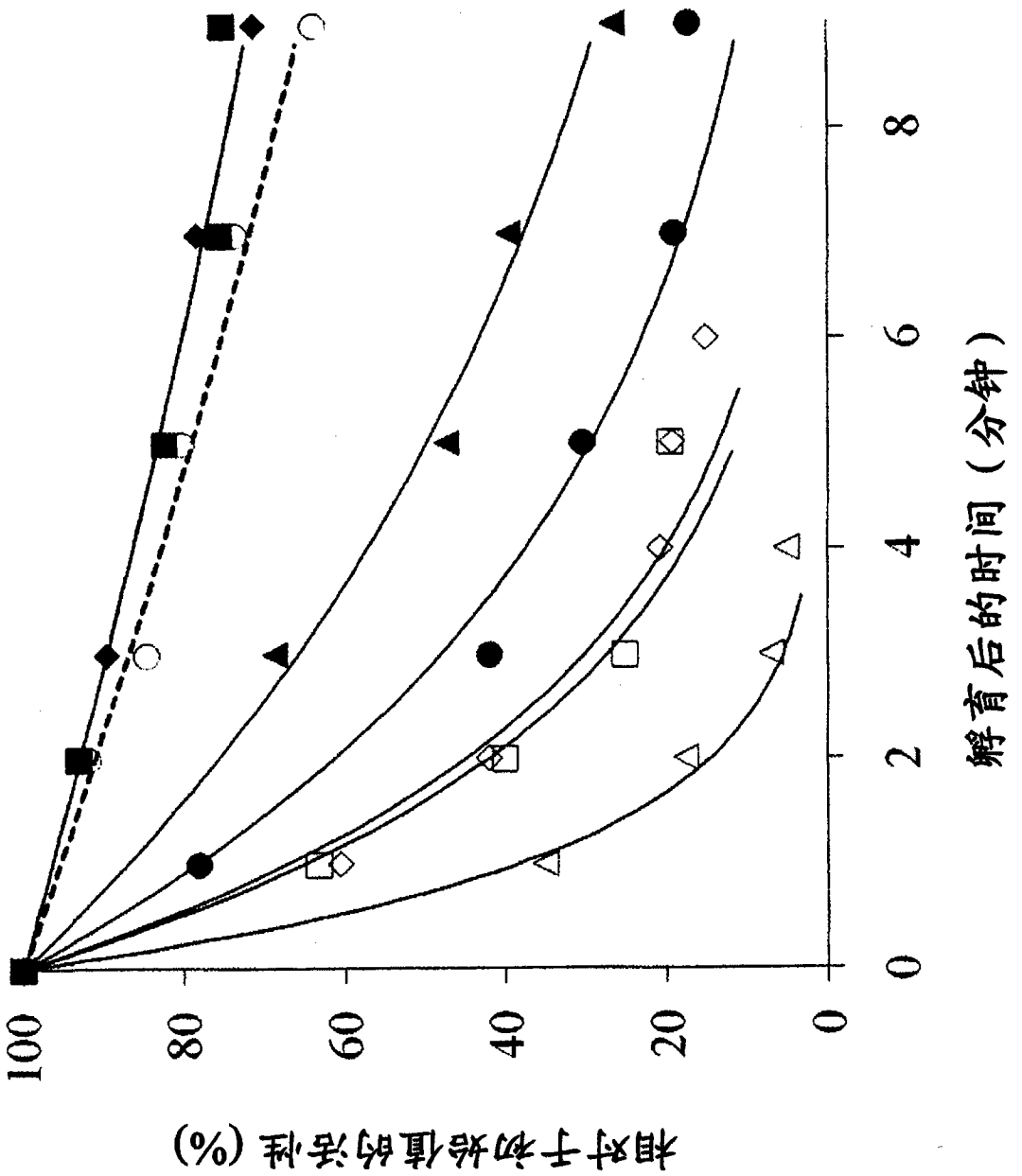

图 2A

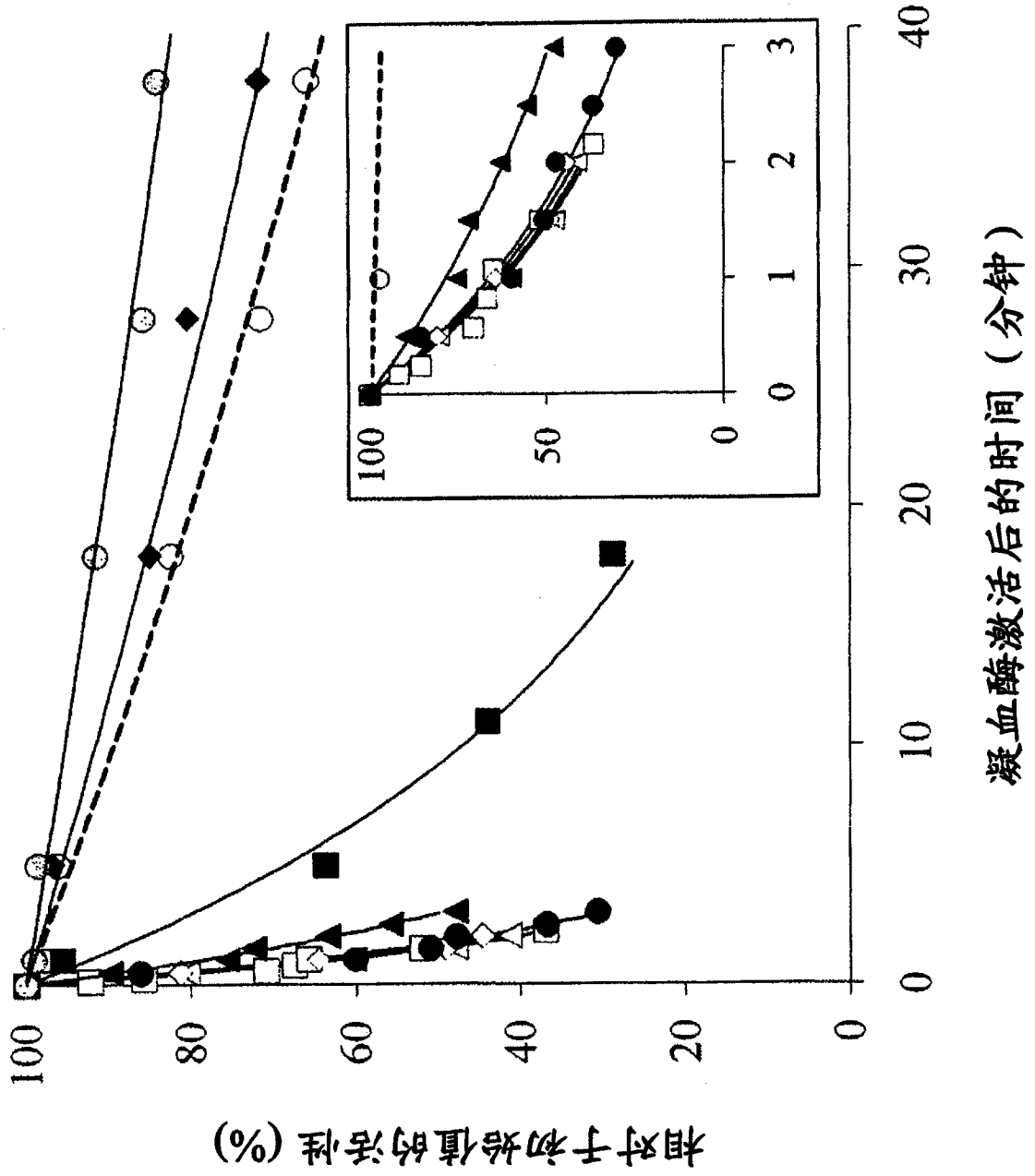
凝血酶激活后的时间（分钟）
0
10
20
30
40
相对于初始值的活性（%）
100
80
60
40
20
0
100
50
0
0
1
2
3

图 2B

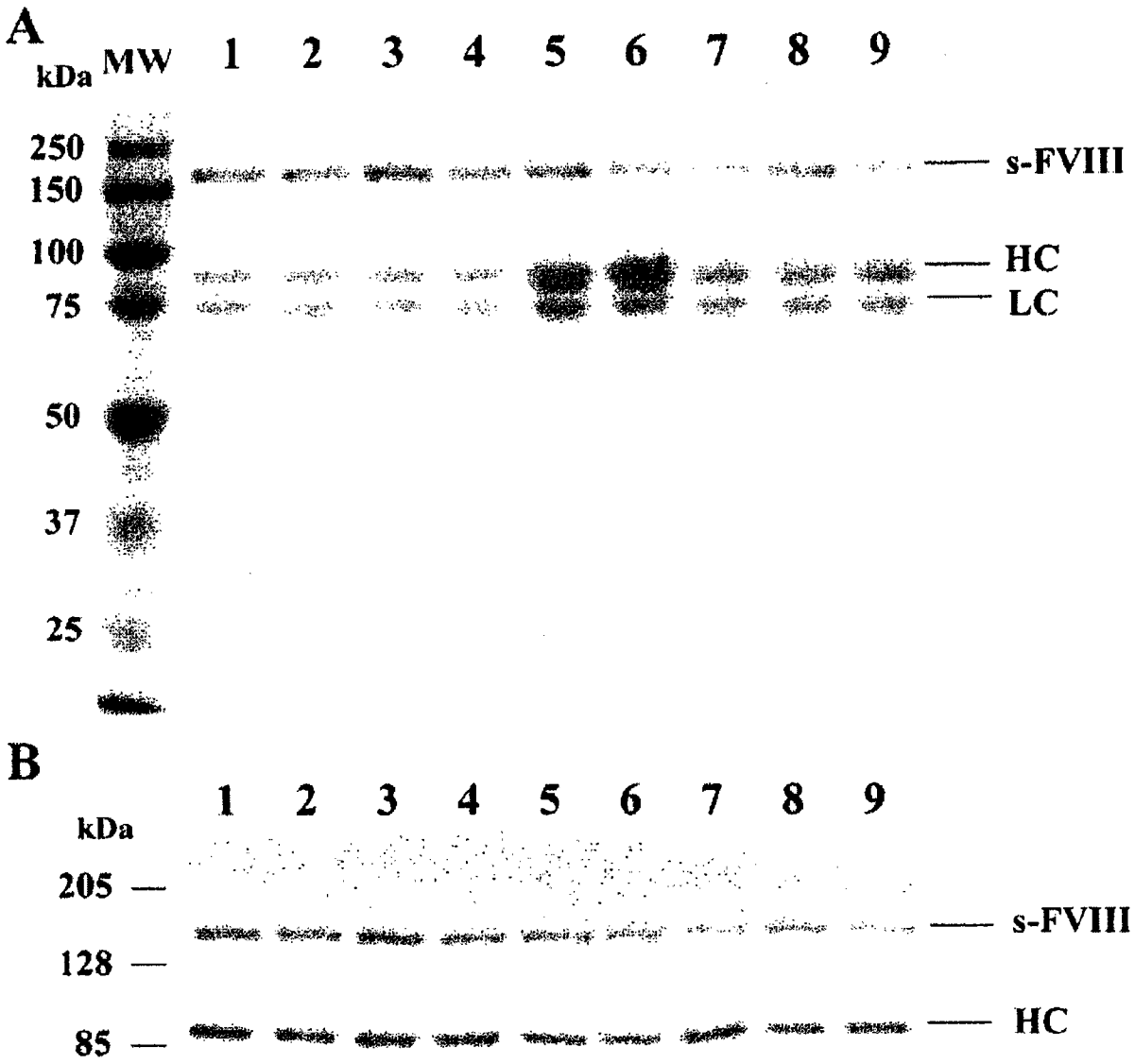
A
kDa
MW
1 2 3 4 5 6 7 8 9
250
150
100
75
50
37
25
s-FVIII
HC
LC
B
kDa
1 2 3 4 5 6 7 8 9
205
128
85
s-FVIII
HC

图 3A-B

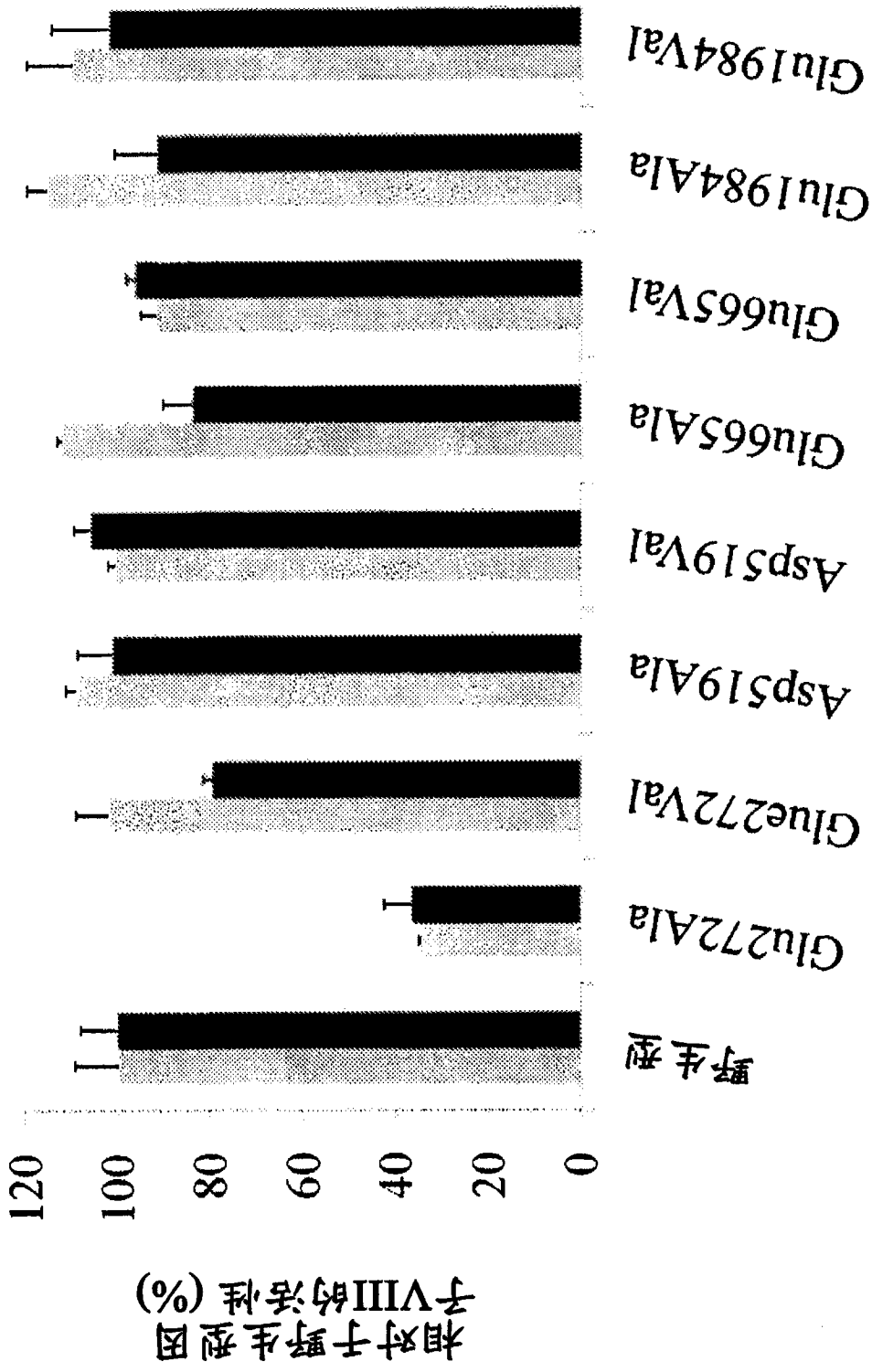
野生型
Glu272Ala
Glue272Val
Asp519Ala
Asp519Val
Glu665Ala
Glu665Val
Glu1984Ala
Glu1984Val
0
20
40
60
80
100
120
相对于野生型因子VIII的活性 (%)

图 4A

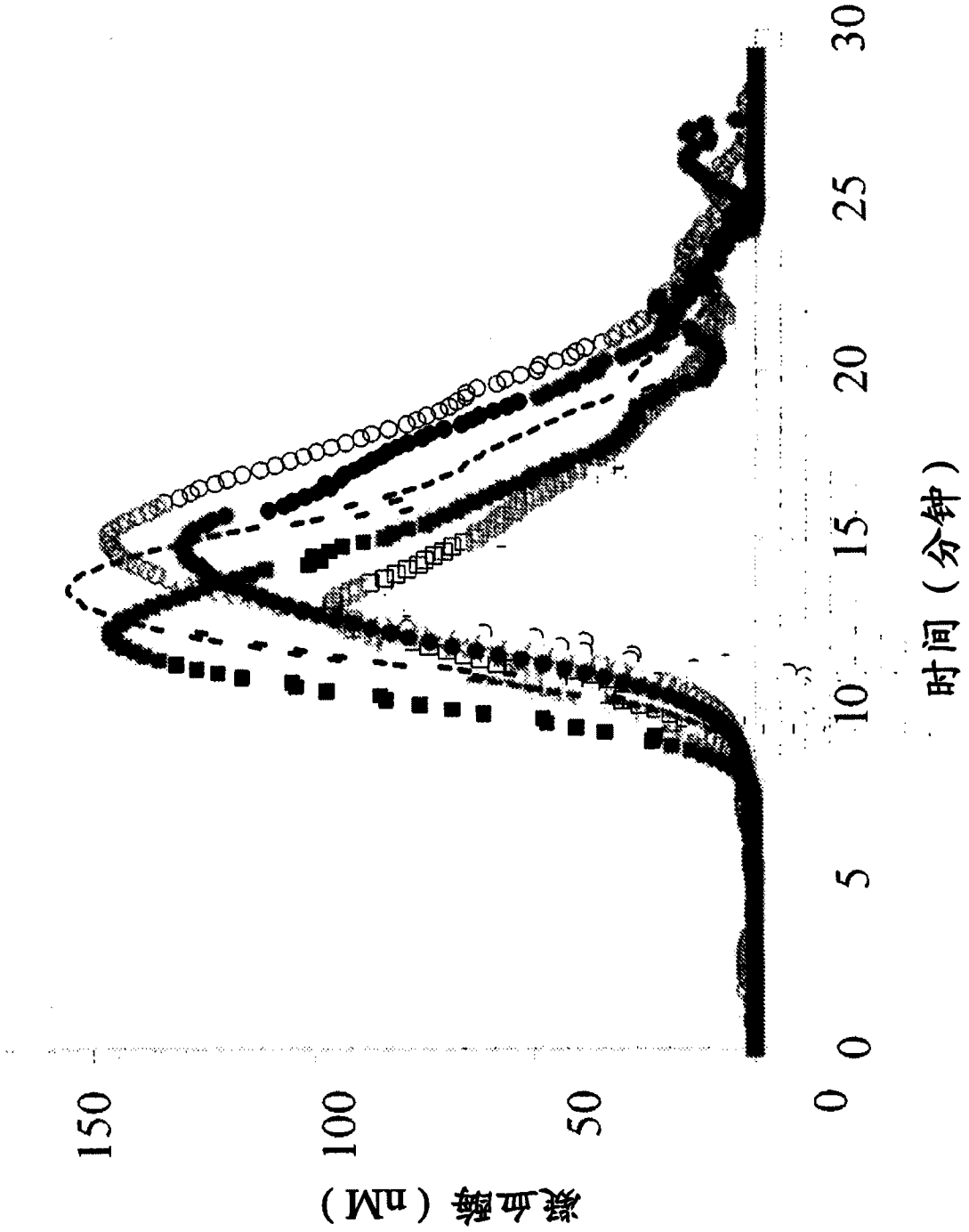

图 4B

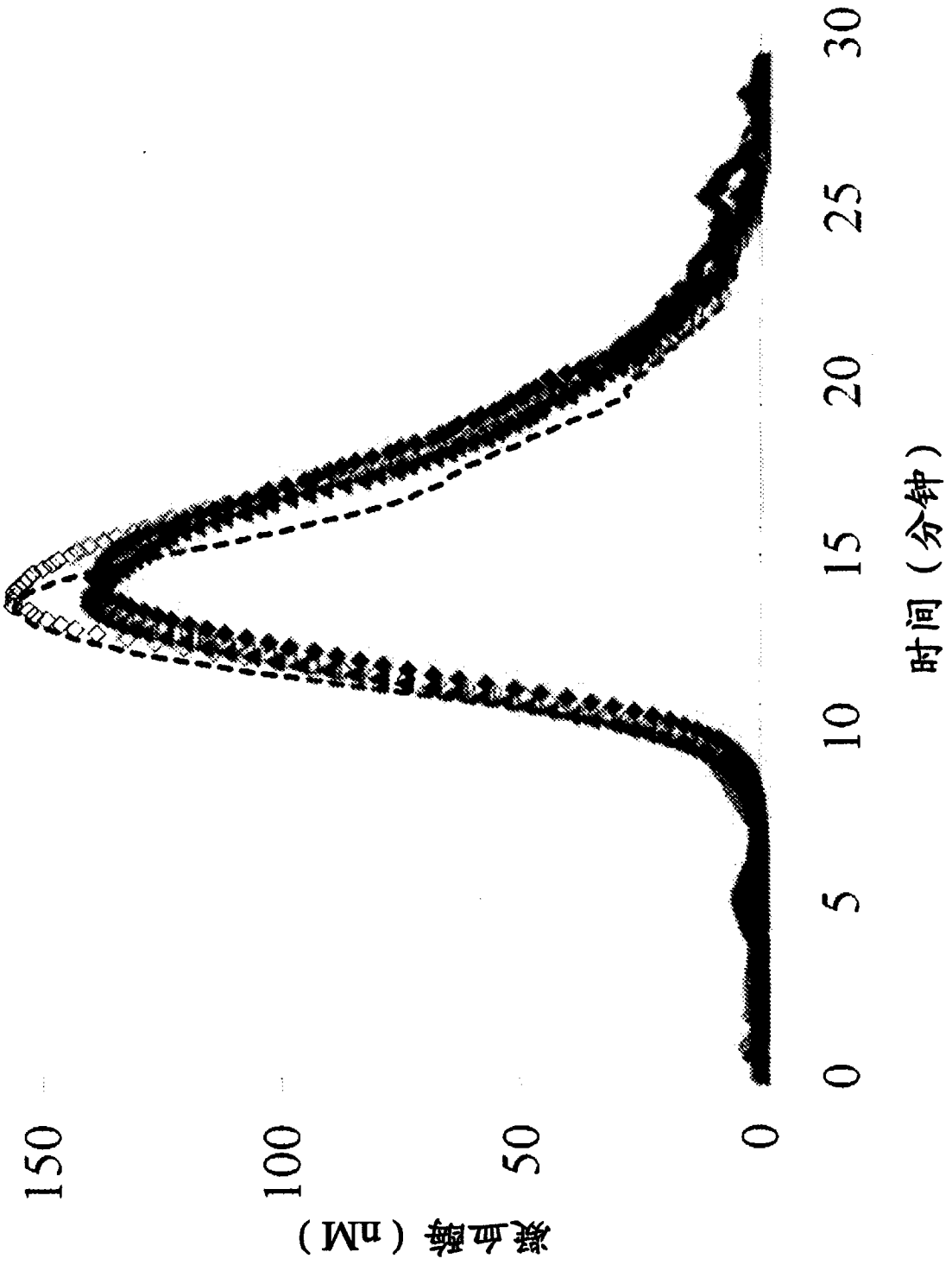

图 4C

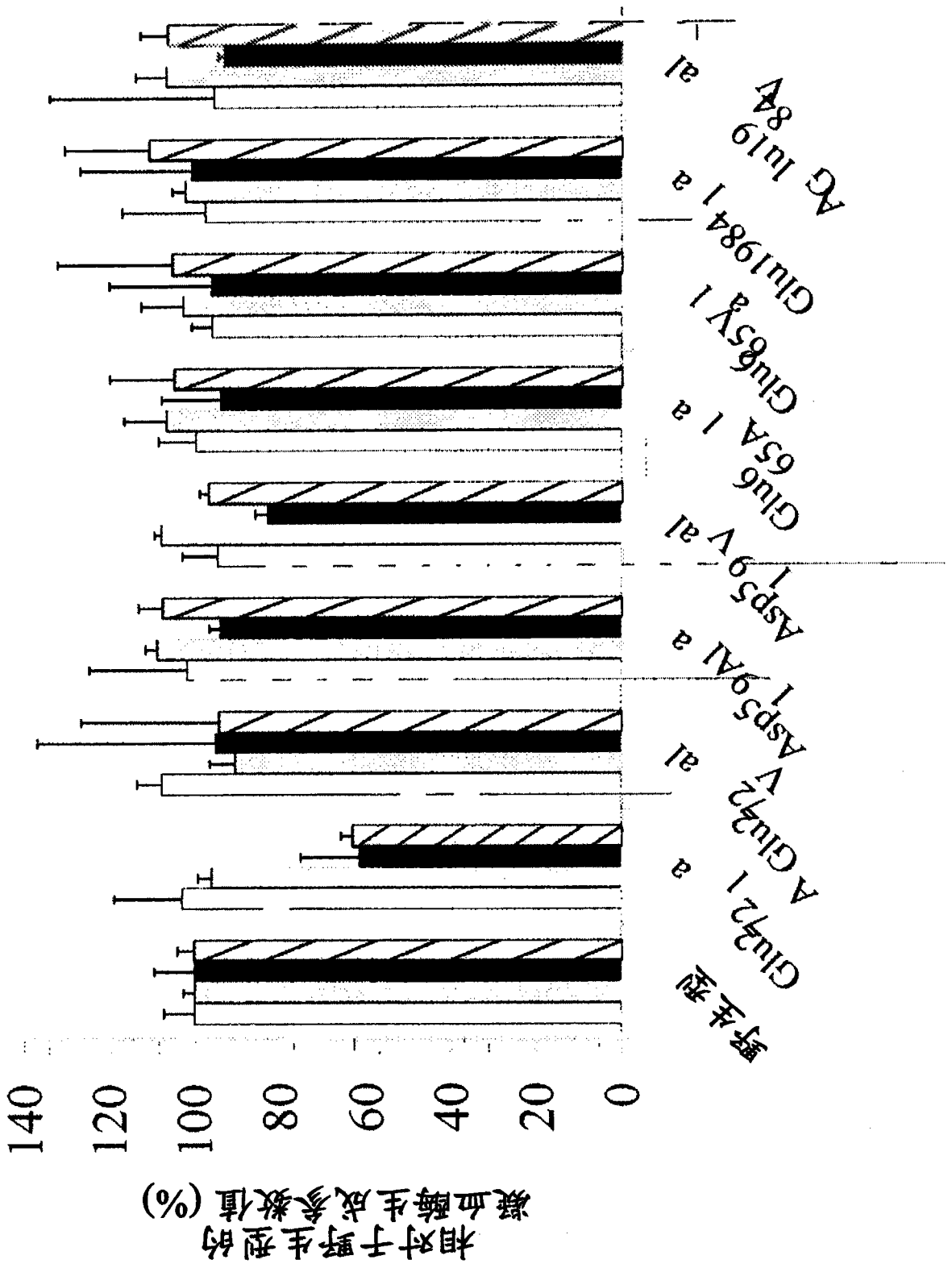
相对于野生型的
凝血酶生成参数值 (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
野生型
Glu42 1 a
A Glu42 V al
Asp59 1 a
Asp59 1 V al
Glu65A 1 a
Glu65γ 1
Glu198A 1 a
AG Ile19 8V al

图 4D

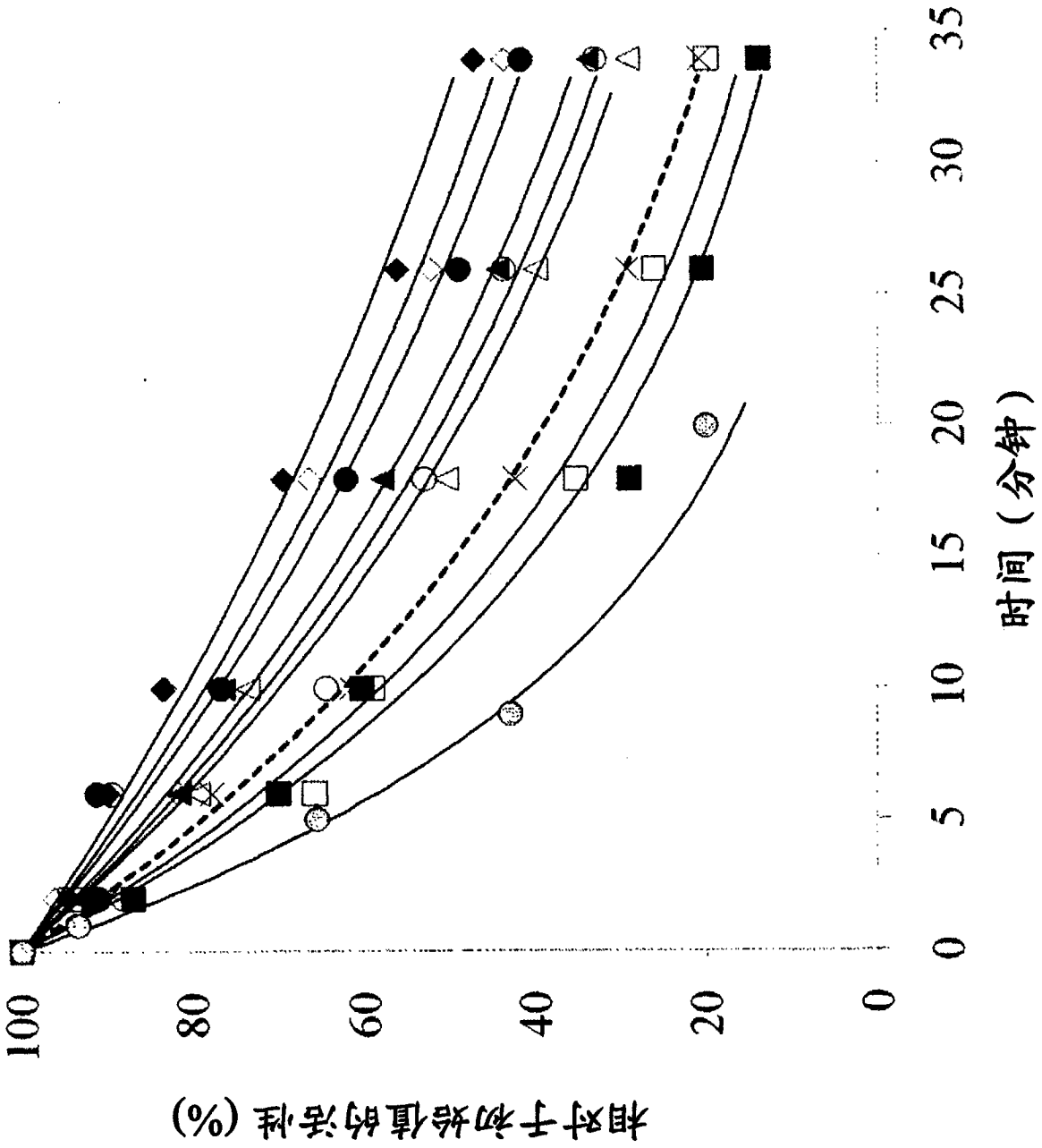

图 5A

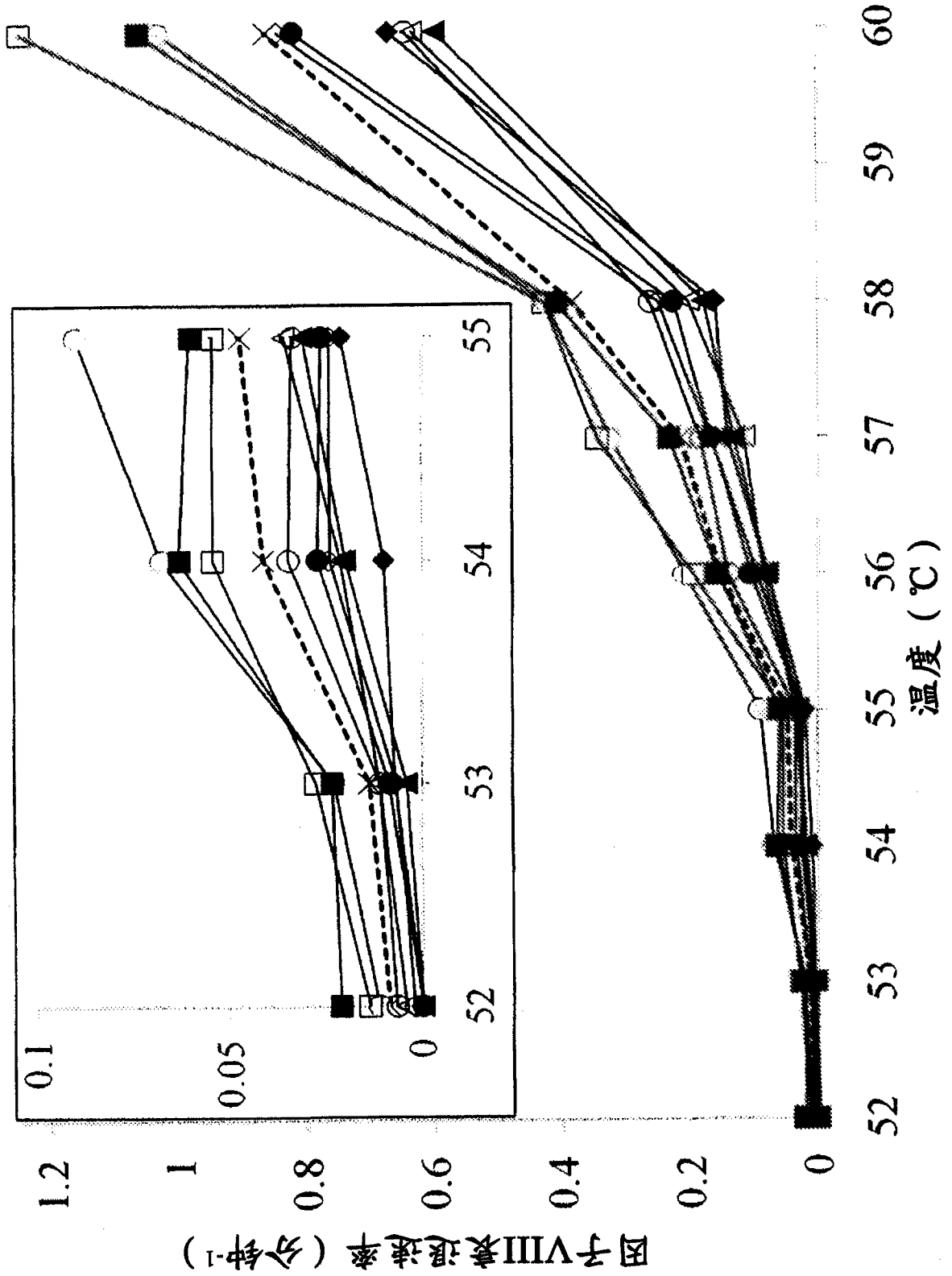
因子VIII表观速率（分钟-1）
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.1
0.05
0
52
53
54
55
温度（℃）
52
53
54
55
56
57
58
59
60

图 5B

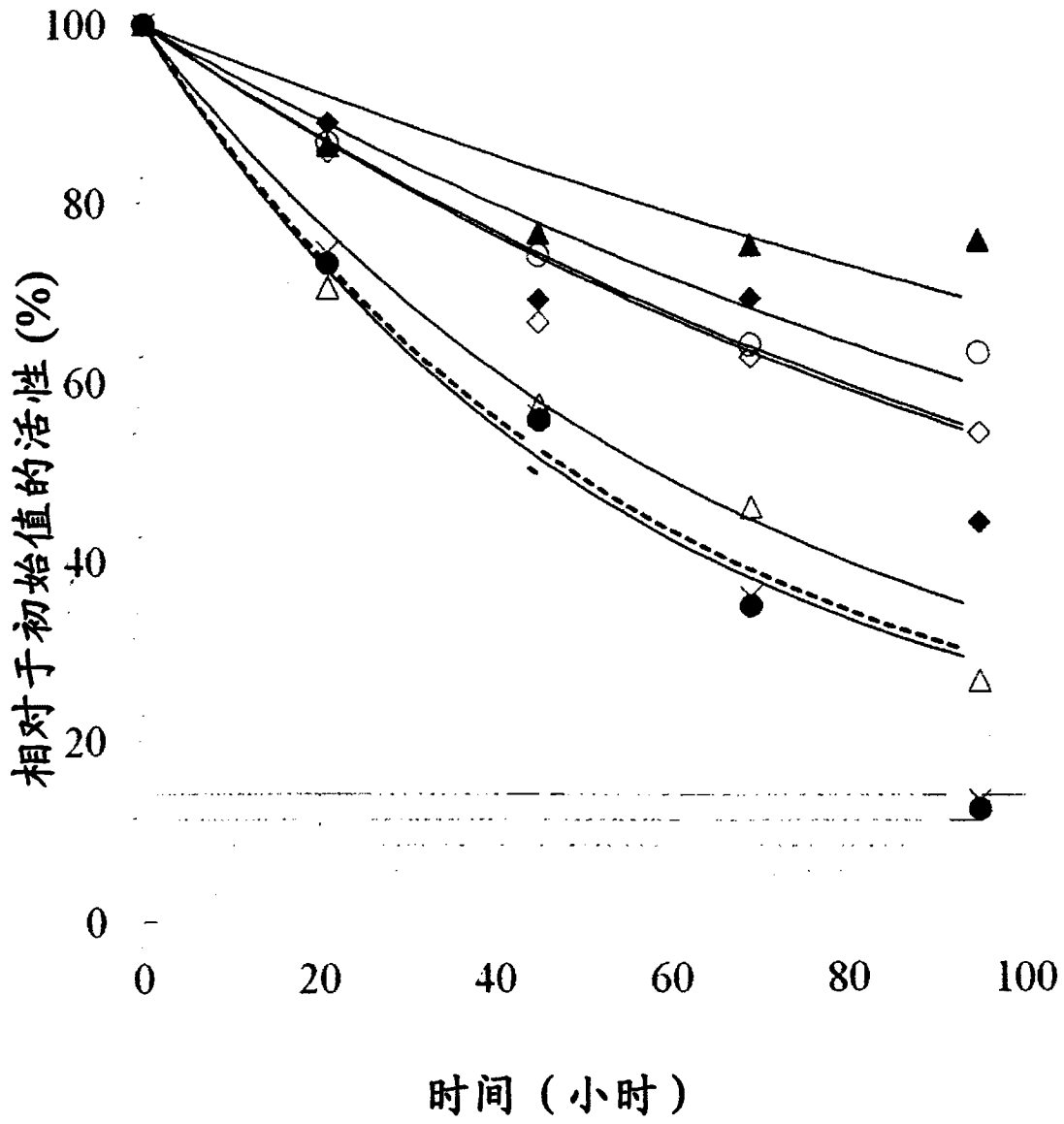

图 6

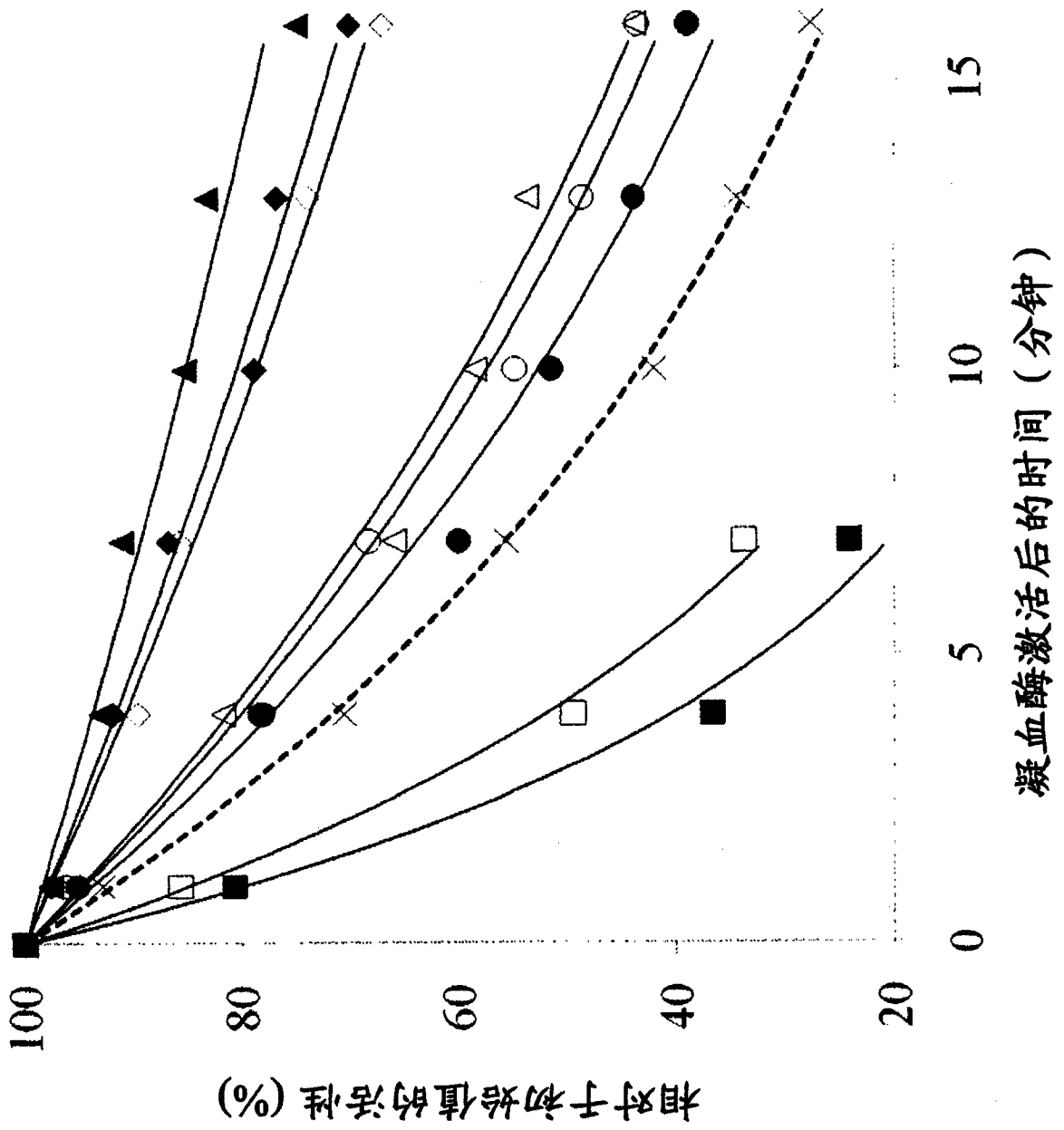

图 7A

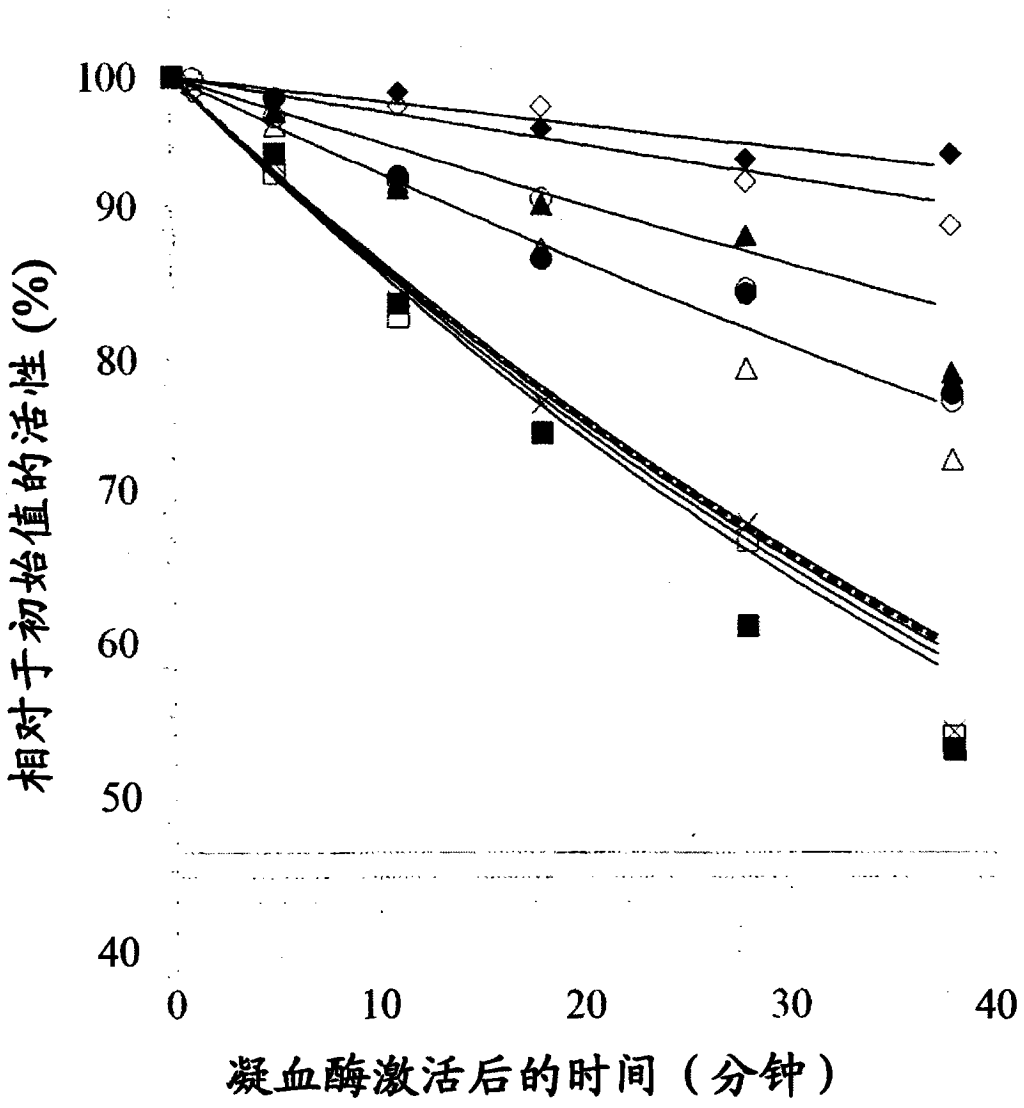

图 7B

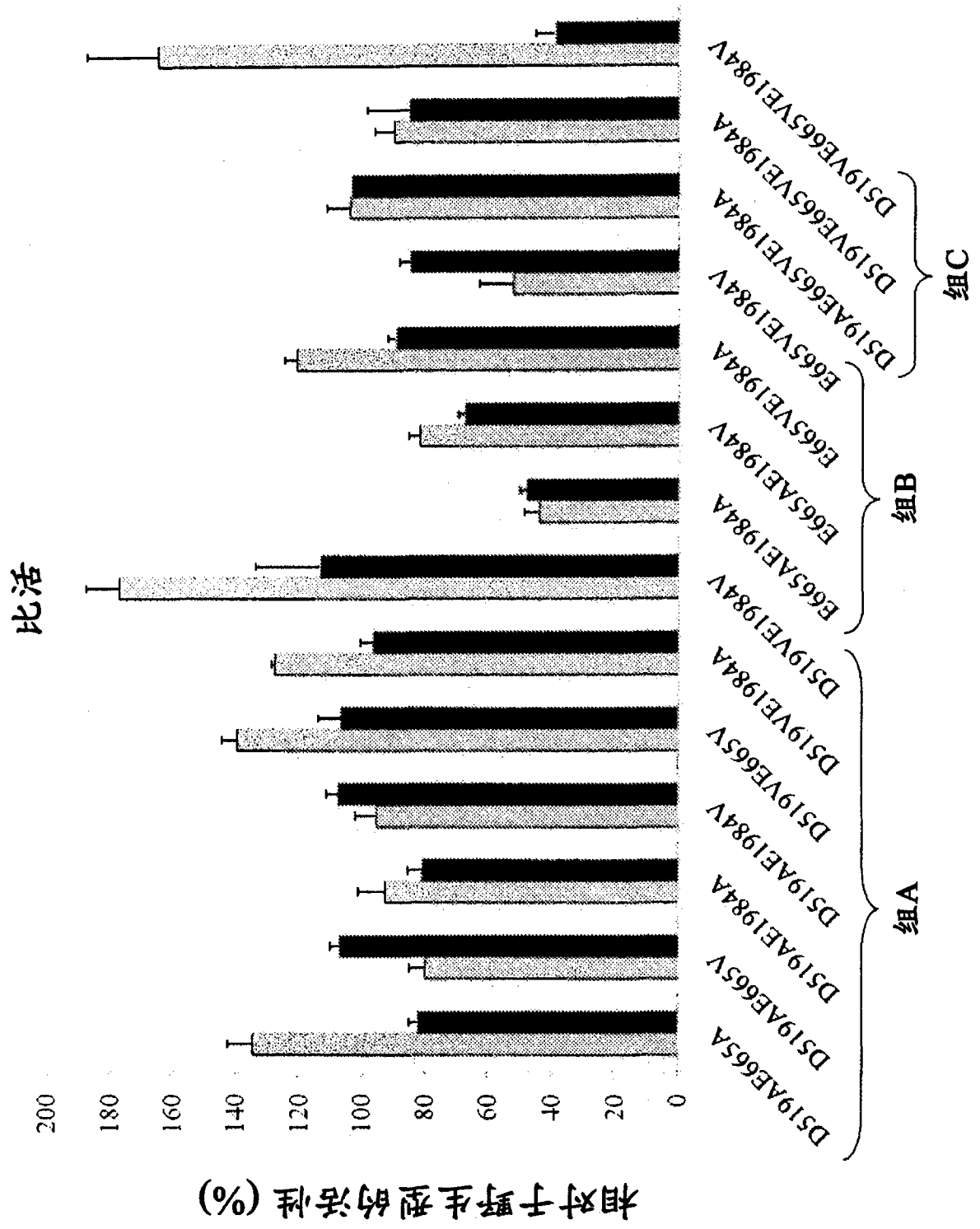
相对于野生型的活性 (%)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
比活
D519AE665A
D519AE665V
D519AE984A
D519AE984V
D519VE665V
D519VE984A
E665AE984A
E665AE984V
E665VE984A
E665VE984V
D519AE665VE984A
D519AE665VE984V
D519VE665VE984A
D519VE665VE984V
组A
组B
组C

图 8

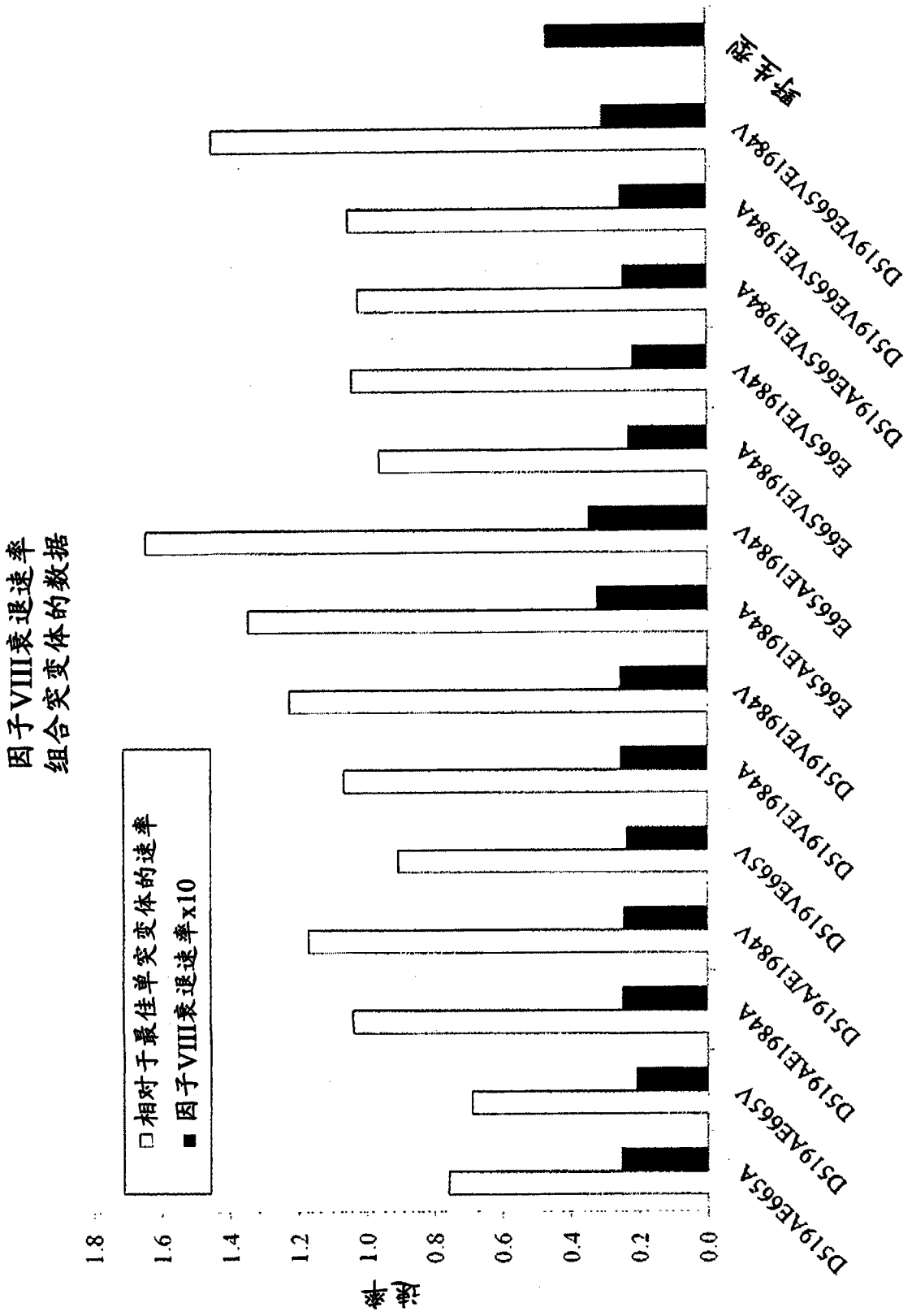
因子VIII衰退速率
组合突变体的数据
□相对于最佳单突变体的速率
■因子VIII衰退速率x10
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
野生型
D519VE665VE1984V
D519VE665VE1984A
D519AE665VE1984A
E665VE1984V
E665VE1984A
E665AE1984V
E665AE1984A
D519VE1984V
D519VE1984A
D519VE665V
D519AE1984V
D519AE1984A
D519AE665V
D519AE665A

图 9

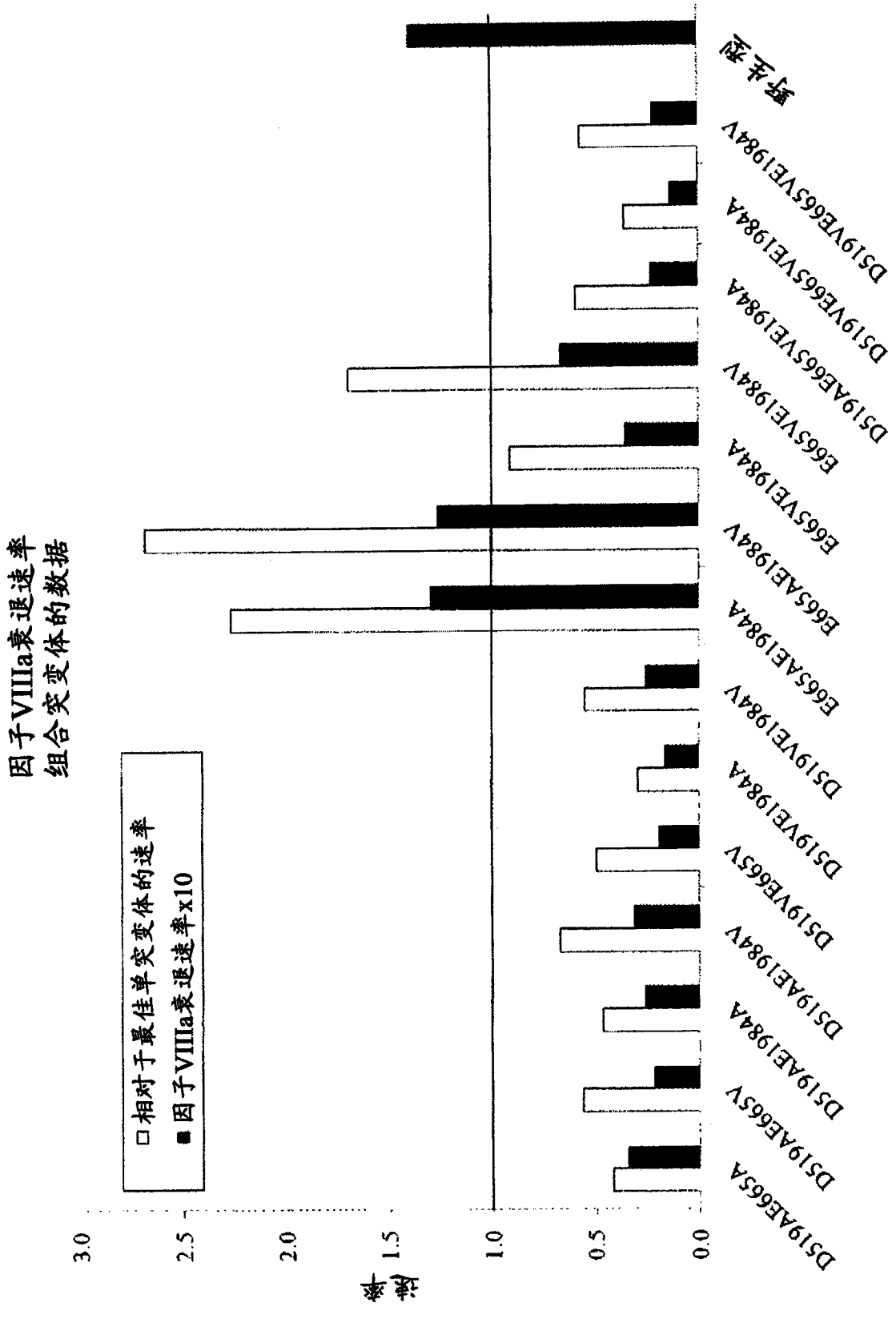
因子VIIIa衰退速率
组合突变体的数据
□相对于最佳单突变体的速率
■因子VIIIa衰退速率x10
速率
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
野生型
D519VE665VE1984V
D519VE665VE1984A
D519AE665VE1984A
E665VE1984V
E665VE1984A
E665AE1984V
E665AE1984A
D519VE1984V
D519VE1984A
D519VE665V
D519AE1984V
D519AE1984A
D519AE665V
D519AE665A

图 10

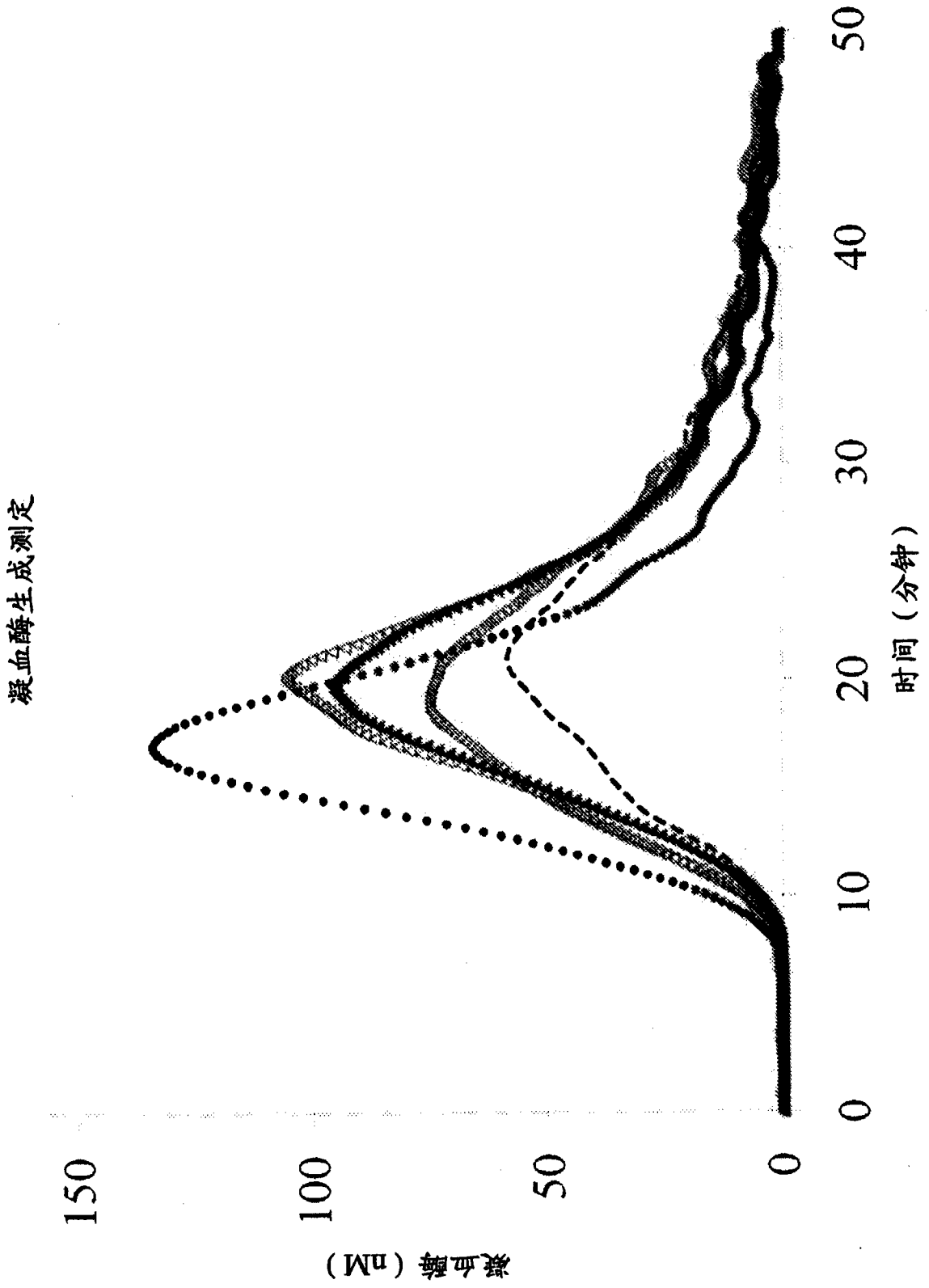

图 11A

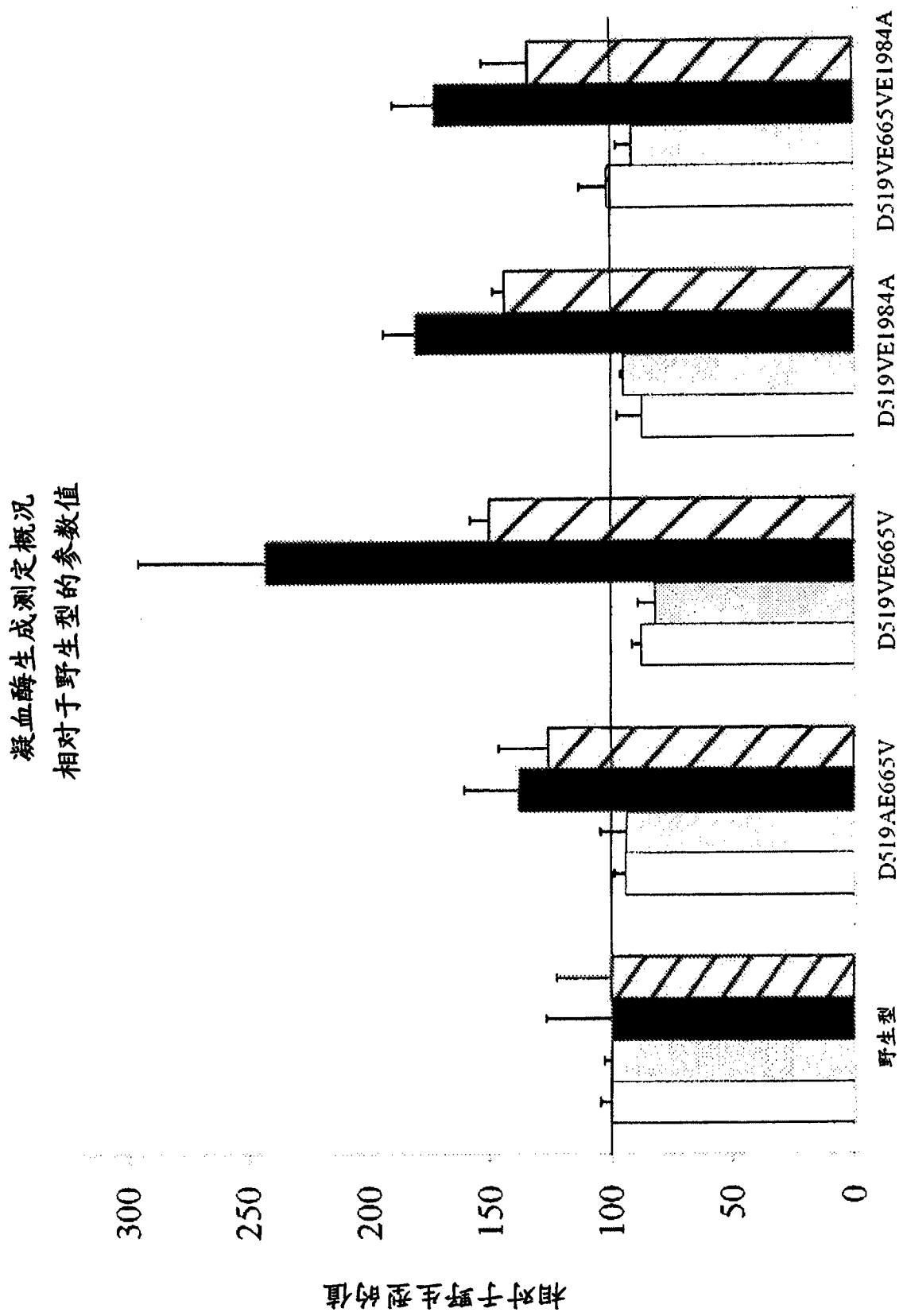
凝血酶生成测定概况
相对于野生型的参数值
300
250
200
150
100
50
0
相对于野生型的值
野生型
D519AE665V
D519VE665V
D519VE1984A
D519VE665VE1984A

图 11B

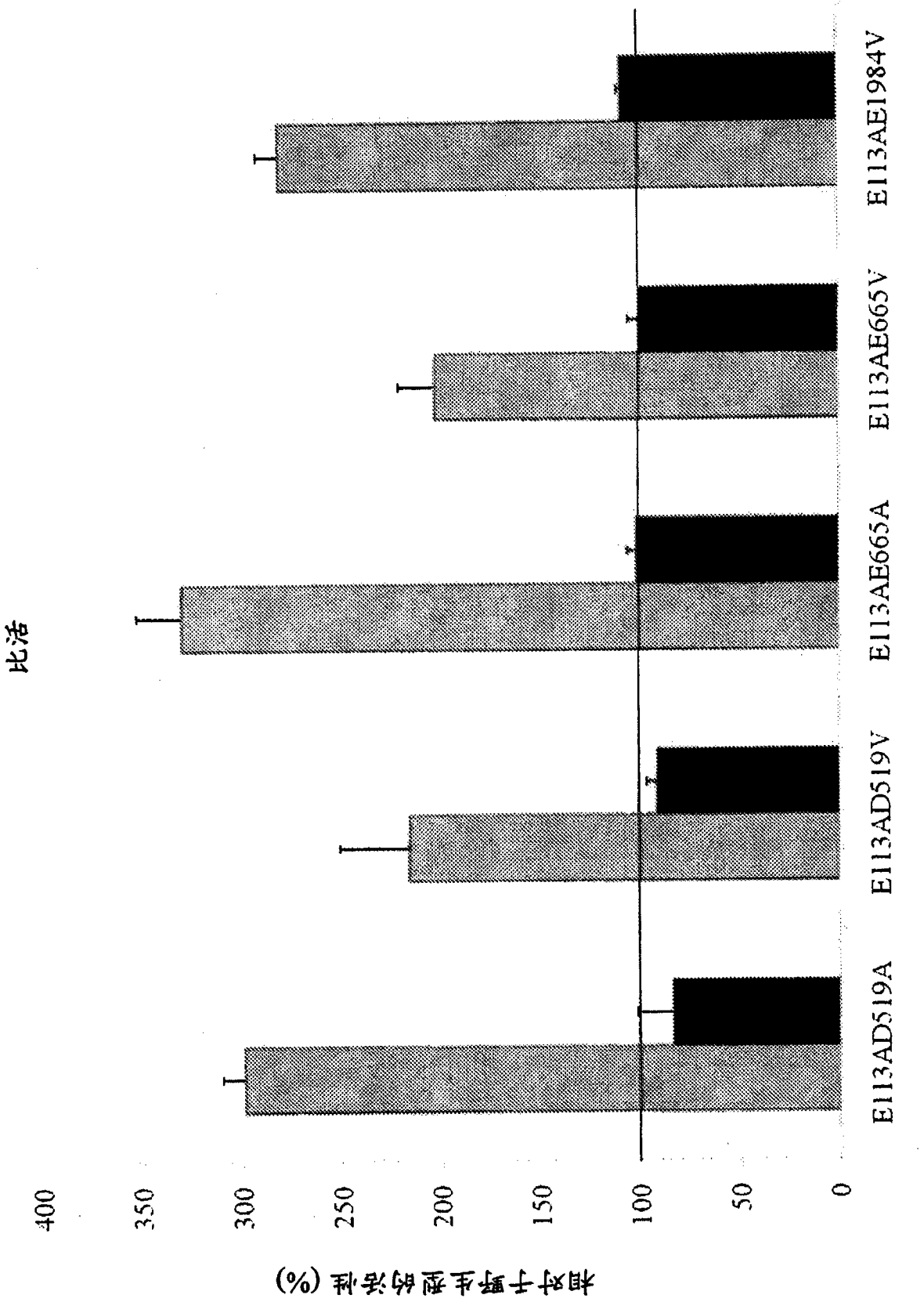
比活
相对于野生型的活性 (%)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
E113AD519A
E113AD519V
E113AE665A
E113AE665V
E113AE1984V

图 12A

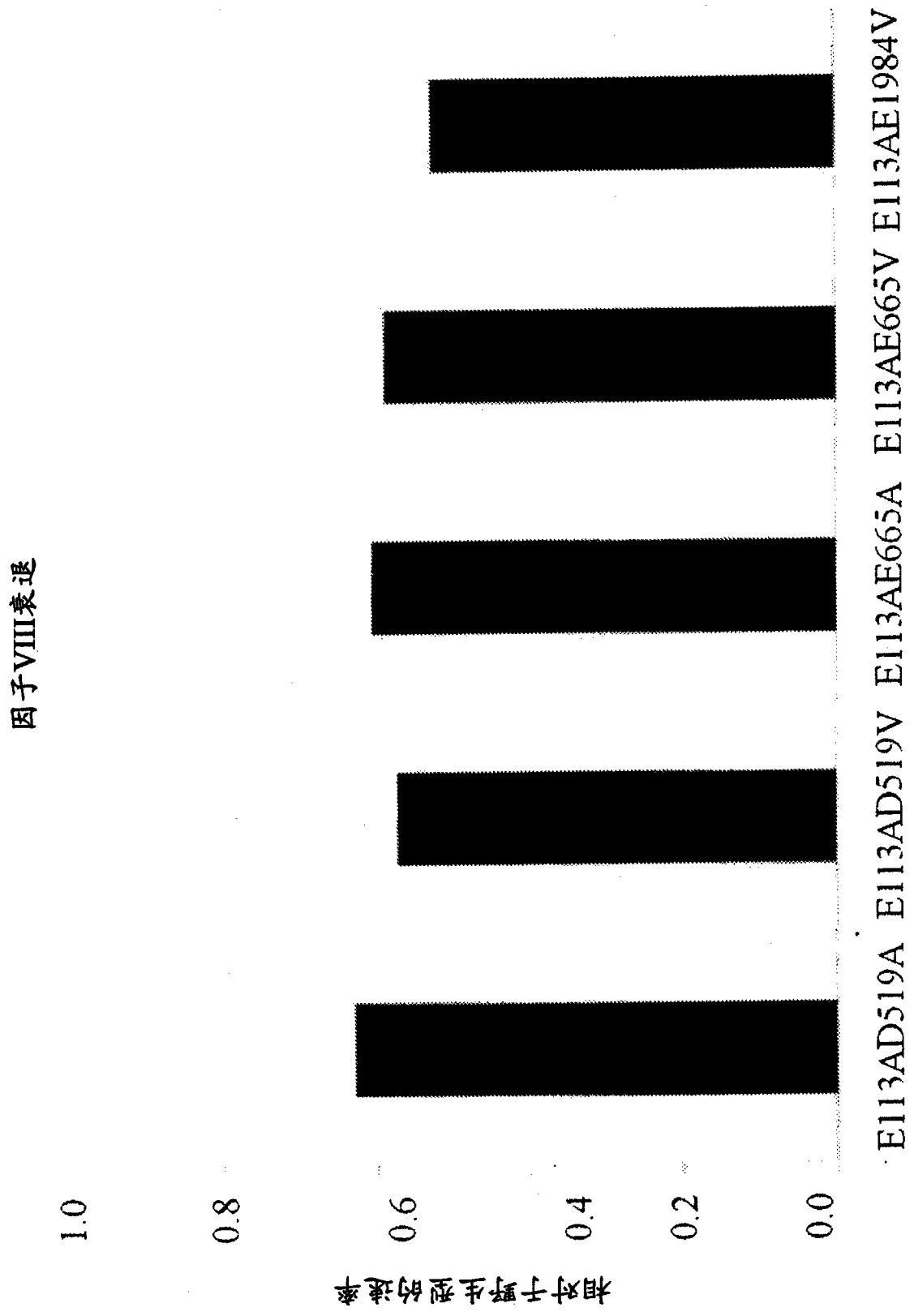
因子VIII衰退
相对于野生型的速率
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
E113AD519A
E113AD519V
E113AE665A
E113AE665V
E113AE1984V

图 12B

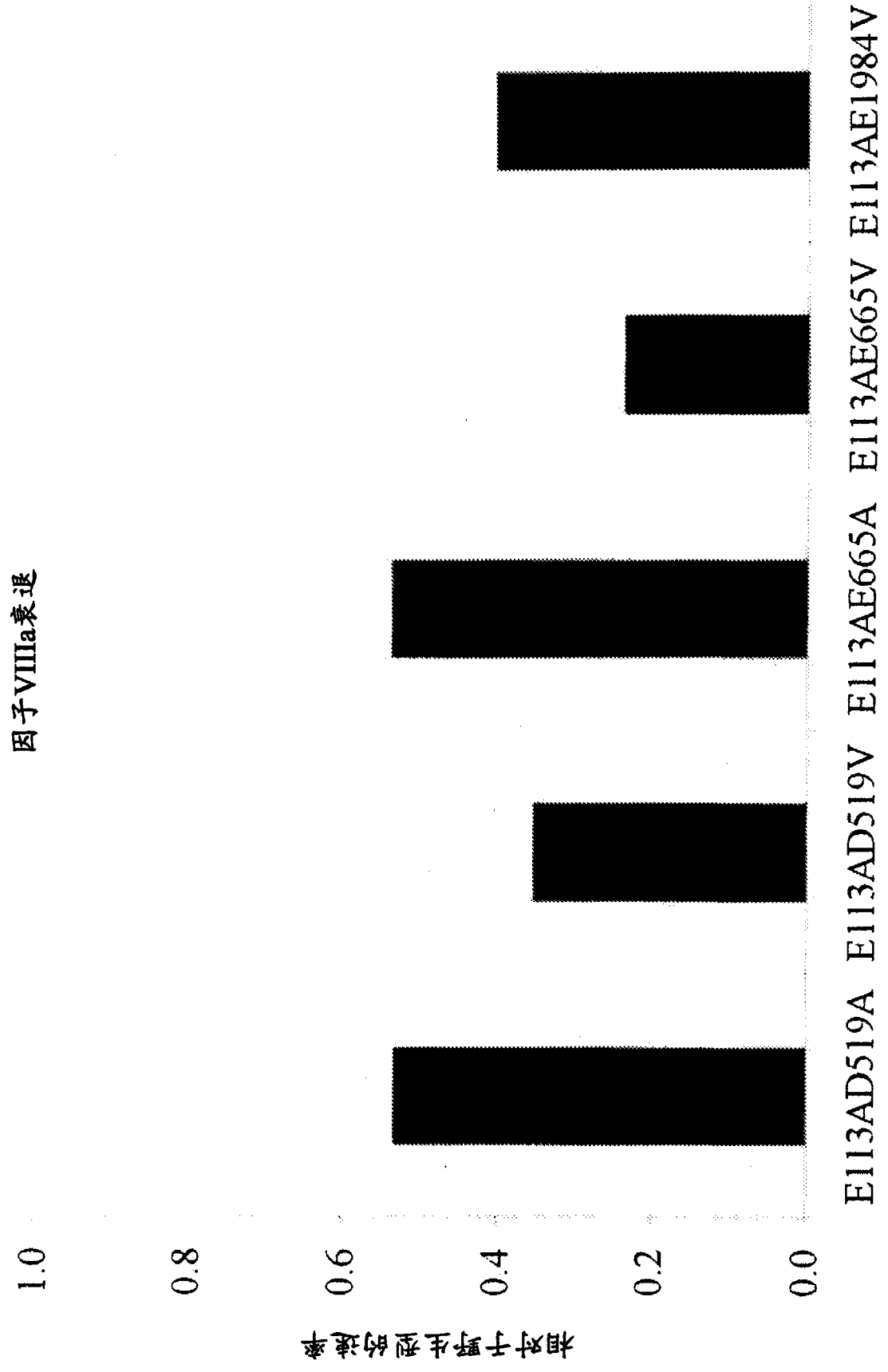
因子VIIIa衰退
相对于野生型的速率
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
E113AD519A
E113AD519V
E113AE665A
E113AE665V
E113AE1984V

图 12C