201731869

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201731869 A

(43)公開日： 中華民國 106 (2017) 年 09 月 16 日

(21)申請案號：105140136 (22)申請日： 中華民國 105 (2016) 年 12 月 05 日

(51)Int. Cl.： *C07K14/755 (2006.01)* *A61K38/37 (2006.01)*
A61K47/48 (2006.01) *A61P7/04 (2006.01)*

(30)優先權：2015/12/03 美國 62/262,674

(71)申請人：百克莎塔股份有限公司 (美國) BAXALTA INCORPORATED (US)
美國
百克莎塔有限公司 (瑞士) BAXALTA GMBH (CH)
瑞士

(72)發明人：土耳賽克 彼得 TURECEK, PETER (AT)；斯任克 格拉得 SCHRENK, GERALD (AT)；斯柯曼 朱爾根 SIEKMANN, JUERGEN (DE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：18 項 圖式數：9 共 61 頁

(54)名稱

具有延長之半衰期及降低之配位體結合性質的因子ＶＩＩＩ

FACTOR VIII WITH EXTENDED HALF-LIFE AND REDUCED LIGAND-BINDING PROPERTIES

(57)摘要

本發明係關於將水溶性聚合物偶聯至治療蛋白質之經氧化之碳水化合物部分的材料及方法，其包括使經氧化之碳水化合物部分與活化的水溶性聚合物在允許偶聯之條件下接觸。更具體而言，本發明係關於具有延長半衰期及降低的配位體結合性質之經修飾之重組因子 VIII(FVIII)。

The invention relates to materials and methods of conjugating a water soluble polymer to an oxidized carbohydrate moiety of a therapeutic protein comprising contacting the oxidized carbohydrate moiety with an activated water soluble polymer under conditions that allow conjugation. More specifically, the present invention relates to a modified, recombinant Factor VIII (FVIII) with extended half-life and reduced ligand-binding properties.

指定代表圖：

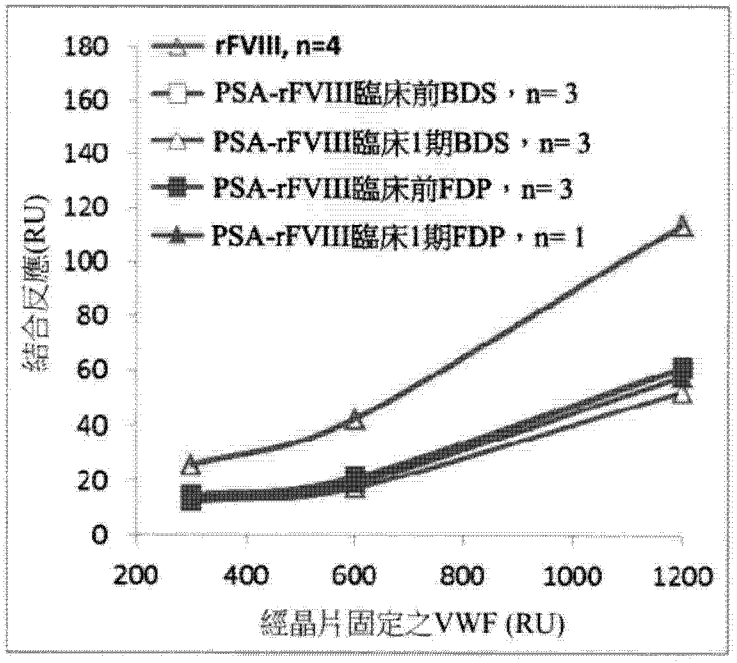

rFVIII, n=4
PSA-rFVIII臨床前BDS，n= 3
PSA-rFVIII臨床1期BDS，n= 3
PSA-rFVIII臨床前FDP，n= 3
PSA-rFVIII臨床1期FDP，n= 1
結合反應(RU)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
200
400
600
800
1000
1200
經晶片固定之VWF (RU)

圖 1

201731869

發明摘要

※ 申請案號：105140136

※ 申請日： 105/12/05

※IPC 分類： C07K 14/755 (2006.01)
A61K 38/37 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

具有延長之半衰期及降低之配位體結合性質的因子 VIII

FACTOR VIII WITH EXTENDED HALF-LIFE AND REDUCED LIGAND-BINDING PROPERTIES

【中文】

本發明係關於將水溶性聚合物偶聯至治療蛋白質之經氧化之碳水化合物部分的材料及方法，其包括使經氧化之碳水化合物部分與活化的水溶性聚合物在允許偶聯之條件下接觸。更具體而言，本發明係關於具有延長半衰期及降低的配位體結合性質之經修飾之重組因子 VIII (FVIII)。

【英文】

The invention relates to materials and methods of conjugating a water soluble polymer to an oxidized carbohydrate moiety of a therapeutic protein comprising contacting the oxidized carbohydrate moiety with an activated water soluble polymer under conditions that allow conjugation. More specifically, the present invention relates to a modified, recombinant Factor VIII (FVIII) with extended half-life and reduced ligand-binding properties.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】（中文/英文）

具有延長之半衰期及降低之配位體結合性質的因子 VIII

FACTOR VIII WITH EXTENDED HALF-LIFE AND REDUCED LIGAND-BINDING PROPERTIES

【技術領域】

【0001】 本發明係關於用於延長因子 VIII (FVIII)之半衰期的材料及方法。

【先前技術】

【0002】 在患有 A 型及 B 型血友病之人群中對於出血之認可的治療及/或預防經常包括因子替代療法。此涉及凝血蛋白諸如因子 VIII (FVIII)及因子 IX (FIX)之輸注(注射至血流中)。此等蛋白質通常來自兩個來源：自人類血漿分離及在遺傳工程化之細胞株中表現。因為缺失的凝結因子之替代物並非永久的，所以接受該種治療之患者必須反復輸注因子

【0003】 治療蛋白質諸如FVIII之藥理學及免疫學性質可藉由化學修飾及與聚合物化合物進行偶聯來改良。聚唾液酸(Polysialic acid；PSA)，亦稱為多聚唾液酸(colominic acid；CA)，為天然產生之多醣。其為具有 α(2→8)酮苷鍵之 N-乙醯神經胺酸之均聚物並且在其非還原末端含有鄰位二醇基團。該聚合物帶有負電荷並且為人體之天然成分。其可容易地自細菌大量地產生並且具有預先確定的物理特性(美國專利第 5,846,951 號)。細菌產生之 PSA 係由與在人體中產生的 PSA 相同之唾液酸單體組成。不同於一些聚合物，PSA 為可生物降解的。

【0004】 多聚唾液酸與過氧化氫酶及天冬醯胺酶之共價偶合已被證明可增加在存在蛋白分解酶或血漿的情況下的酶穩定性。聚唾液酸化與未經修飾天冬醯胺酶之活體內比較研究揭示聚唾液酸化可增加酶之半衰期(Fernandes 及 Gregoriadis, *Int J Pharm.* **2001**, *217*, 215-24)。

【0005】 仍然需要開發用於偶聯水溶性聚合物與蛋白質從而改良蛋白質之藥效學及/或藥代動力學性質，同時將與各種試劑有關之成本降至最

低並將對患者接受者之健康風險降至最小的材料及方法。

【發明內容】

【0006】 本發明提供用於偶聯聚合物與蛋白質以改良蛋白質的活體內半衰期、藥效學及/或藥代動力學性質之材料及方法。

【0007】 在一實施例中，提供一種經修飾之因子 VIII (FVIII)。該經修飾之 FVIII 包含延長 FVIII 半衰期並減少經修飾之 FVIII 與結合 FVIII 之配位體之結合的修飾。示範性配位體選自馮威勒布蘭德(von Willebrand)因子(VWF)及低密度脂蛋白(LDL)受體相關蛋白 1 (LRP1)。示範性修飾係在本文中論述並且包括例如化學修飾，諸如水溶性聚合物之連接。

【0008】 在一示範性實施例中，經修飾之 FVIII 為源自血漿的。在一示範性實施例中，FVIII 係由工程化宿主細胞重組產生。在各種實施例中，經修飾之 FVIII 包括完整的 B 結構域。在各種實施例中，FVIII 為全長 FVIII 且包括完整的 B 結構域。

【0009】 在一示範性實施例中，經修飾之 FVIII 以與未經修飾之 FVIII 相比降低的親和力(KD)結合至 VWF 及 LRP1。

【0010】 在一示範性實施例中，經修飾之 FVIII 包含偶聯至其的聚唾液酸(PSA)。在此實施例中使用的示範性 PSA 部分具有約 20 kDa 之平均分子量。在示範性實施例中，PSA 具有選自以下之平均分子量：約 5、約 10、約 15、約 20、約 25、約 30、約 35、約 40 或約 50 kDa。在一示範性實施例中，PSA 具有低的多分散性。示範性 PSA 偶聯物包括介於 PSA 與 FVIII 分子之間的胺氧基連接物。示範性胺氧基連接物連接至經修飾之 FVIII 的經氧化之碳水化合物。

【0011】 本發明亦提供一種醫藥組合物。示範性醫藥調配物包括上述經修飾之 FVIII 及醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑、鹽、緩衝劑及/或賦形劑。

【0012】 在各種實施例中，上述經修飾之 FVIII 具有比聚乙二醇化 FVIII 更長之活體內半衰期。在各種實施例中，上述經修飾之 FVIII 具有比聚乙二醇化 FVIII 更長之活體內半衰期，所述聚乙二醇化 FVIII 偶聯至具有與具有較長活體內半衰期之偶聯的 FVIII 之 PSA 的平均分子量大致相同之

平均分子量的 PEG 部分。在一示範性實施例中，經 PSA 修飾之 FVIII 偶聯至具有約 20 kDa 之平均分子量的 PSA 部分並且具有比聚乙二醇化 FVIII 更長之活體內半衰期，所述聚乙二醇化 FVIII 偶聯至具有約 20 kDa 之平均分子量的 PEG 部分。在各種實施例中，半衰期長約 1、約 2 或約 3 倍。在另外其他不同實施例中，半衰期長約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9 或約 10 倍。

【0013】 在一示範性實施例中，上述經 PSA 修飾之 FVIII 與聚乙二醇化 FVIII 結合至 VWF 或 LRP1 相比以降低的結合親和力結合至 VWF 或 LRP1，當兩種物質之結合在相當的條件下量測時。在一示範性實施例中，上述經 PSA 修飾之 FVIII 與聚乙二醇化 FVIII 結合至 VWF 或 LRP1 相比以降低的結合親和力結合至 VWF 或 LRP1，當兩種物質之結合在相當的條件下量測時，並且 PEG 與 PSA 具有大致相同之平均分子量。在各種實施例中，與聚乙二醇化 FVIII 結合至 VWF 或 LRP1 相比，與 VWF 或 LRP1 之結合減少了約 0.5 倍。在另外其他實施例中，與聚乙二醇化 FVIII 與 VWF 或 LRP1 之結合相比，與 VWF 或 LRP1 之結合減少了約 0.1、約 0.2、約 0.3、約 0.4、約 0.5、約 0.6、約 0.7、約 0.8、約 0.-9、約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9 或約 10 倍。

【0014】 在一實施例中，提供一種經修飾之重組 FVIII，其包含延長 FVIII 半衰期並減少該經修飾之 FVIII 與選自由 VWF 及 LRP1 組成之群的配位體之結合的修飾，其中該修飾包含經由胺氧基連接物連接至 FVIII 的 PSA。在一示範性實施例中，胺氧基連接物連接至經修飾之 FVIII 的經氧化之碳水化合物，其中經修飾之重組 FVIII 之活體內半衰期比未經修飾之重組 FVIII 及/或聚乙二醇化重組 FVIII 更長且其中經修飾之重組 FVIII 對 VWF 或 LRP1 之結合親和力與未經修飾之重組 FVIII 及/或聚乙二醇化重組 FVIII 與 VWF 或 LRP1 的結合相比較低。在一示範性實施例中，比較物質包括具有大致相同之平均分子量的 PSA 與 PEG 部分。

【0015】 本發明進一步提供一種用本發明之經修飾 FVIII 治療需要該種治療之受試者的方法。在一示範性實施例中，向診斷患有與 FVIII 缺乏或另一種因子(例如 FVII、FIX)缺乏有關之疾病或病症的哺乳動物投與包括所

揭示之經修飾 FVIII 的本發明之醫藥組合物。

【0016】 在一示範性實施例中，本發明提供一種治療哺乳動物受試者之出血性缺陷的方法。示範性方法包括向需要該種治療之受試者投與有效減輕或消除出血性缺陷之一或多種症狀之量的上述經修飾之 FVIII 或其醫藥組合物。在一示範性實施例中，當每 4 天不超過一次、每 5 天不超過一次、每 6 天不超過一次、每 7 天不超過一次、每 8 天不超過一次、每 9 天不超過一次或每 10 天不超過一次向受試者投與時，醫藥調配物之投與達成有效減輕或消除出血性缺陷之一或多種症狀之量。

【圖式簡單說明】

【0017】 **圖 1** 示出了表示為 R_{max} 之結合信號，其為飽和時的最大結合計算值，對於在傳感器-晶片固定化之 VWF 的三個不同密度下的 PSA-rFVIII 組及重新緩衝之 rFVIII 而言。

【0018】 **圖 2** 示出了 PSA-rFVIII 及重新緩衝之 rFVIII 對 LRP1 的 FVIII 蛋白濃度依賴性結合的結果。

【0019】 **圖 3** 顯示 rFVIII 強結合至 LRP1，PEG-rFVIII 呈現與 LRP1 之殘餘締合，且 PEG-rFVIII 實際上不能與 LRP1 締合。

【0020】 **圖 4** 示出了在藉由凝血酶活化 FVIII 之後隨時間的 FXa 產生。

【0021】 **圖 5** 示出了重新緩衝之 rFVIII 及 PSA-rFVIII 的峰值凝血酶產生曲線之評價結果。

【0022】 **圖 6** 示出了重新緩衝之 rFVIII 及 PSA-rFVIII 的總凝血酶產生曲線。

【0023】 **圖 7** 示出了聚乙二醇化及聚唾液酸化 rFVIII 在小鼠中與 rFVIII 相比顯示改良的 PK 參數。

【0024】 **圖 8** 示出了聚乙二醇化及聚唾液酸化 rFVIII 在大鼠中與 rFVIII 相比顯示改良的 PK 參數。

【0025】 **圖 9** 示出了聚乙二醇化及聚唾液酸化 rFVIII 在獼猴中與 rFVIII 相比顯示改良的 PK 參數。

【實施方式】

【0026】 本申請案主張2015年12月3日申請之美國臨時專利申請案第62/262,674號之優先權，該申請案以引用的方式併入本文中。

【0027】 治療蛋白質之藥理學及免疫學性質可藉由化學修飾及與諸如聚唾液酸(PSA)之聚合化合物進行偶聯來改良。所得偶聯物之性質通常在很大程度上視聚合物之結構及大小而定。因此，具有明確且狹窄之尺寸分佈之聚合物通常係此項技術中較佳的。合成聚合物如PEG可容易地製成為具有狹窄尺寸分佈，而PSA可以某種方式純化以便產生具有狹窄尺寸分佈之最終PSA製劑。

【0028】 如本文所述，可溶性聚合物之添加(諸如經由聚唾液酸化作用)為一種改良諸如FVIII之治療蛋白質之性質的手段。

治療蛋白質

凝血蛋白

【0029】 在一態樣中，本發明之起始材料為凝血蛋白，其可來源於人類血漿，或藉由重組工程改造技術產生，如以下專利中所述：美國專利第4,757,006號；美國專利第5,733,873號；美國專利第5,198,349號；美國專利第5,250,421號；美國專利第5,919,766號；及EP 306 968。另外的近期實例包括美國專利第 7,645,860 號；美國專利第 8,637,640 號；美國專利第8,642,737號；及美國專利第8,809,501號。

【0030】 諸如凝血蛋白之治療蛋白質由蛋白水解酶快速降解且由抗體中和，該等凝血蛋白包括因子 IX (FIX)、因子 VIII (FVIII)、因子 VIIa (FVIIa)、馮威勒布蘭德因子(VWF)、因子FV (FV)、因子X (FX)、因子XI (FXI)、因子XII (FXII)、凝血酶(FII)、蛋白質C、蛋白質S、tPA、PAI-1、組織因子(TF)及ADAMTS 13蛋白酶。此現象縮短其半衰期及循環時間，由此限制其治療效果。相對較高的劑量及頻繁投與為達到及維持該等治療凝血蛋白之所要治療或預防作用所必需。因此，難以獲得足夠劑量調節且需要頻繁靜脈內投與對患者之生活方式造成限制。

【0031】 如本文所述，本發明涵蓋凝血蛋白，包括但不限於因子 IX (FIX)、因子 VIII (FVIII)、因子 VIIa (FVIIa)、馮威勒布蘭德因子(VWF)、因

子 FV (FV)、因子 X (FX)、因子 XI、因子 XII (FXII)、凝血酶(FII)、蛋白質 C、蛋白質 S、tPA、PAI-1、組織因子(TF)及 ADAMTS 13 蛋白酶。如本文所用，術語「凝血蛋白」係指展現與特定天然凝血蛋白相關之生物活性的任何因子 IX (FIX)、因子 VIII (FVIII)、因子 VIIa (FVIIa)、馮威勒布蘭德因子(VWF)、因子 FV (FV)、因子 X (FX)、因子 XII (FXII)、凝血酶(FII)、蛋白質 C、蛋白質 S、tPA、PAI-1、組織因子(TF)及 ADAMTS 13 蛋白酶。

【0032】 凝血級聯分為三個不同區段：內源性、外源性及共同途徑(Schenone 等人, *Curr Opin Hematol.* **2004**, *11*, 272-7)。該級聯涉及一系列絲胺酸蛋白酶(酶原)及蛋白質輔因子。需要時，非活性酶原前驅體轉化為活性形式，其隨後轉化級聯中之下一酶。

【0033】 內源性途徑需要凝血因子 VIII、IX、X、XI 及 XII。內源性途徑之起始發生於前激肽釋放素、高分子量激肽原、因子 XI (FXI)及因子 XII (FXII)暴露於帶負電荷之表面時。亦需要自血小板分泌之鈣離子及磷脂。

【0034】 外源性途徑在血管之血管內腔受到損傷時起始。膜糖蛋白組織因子暴露且接著結合於循環因子 VII (FVII)及少量已經存在之其活化形式 FVIIa。此結合促進 FVII 完全轉化為 FVIIa 且隨後在鈣及磷脂存在下促進因子 IX (FIX)轉化為因子 IXa (FIXa)及因子 X (FX)轉化為因子 Xa (FXa)。FVIIa 與組織因子之結合藉由使 FVII 之受質(FIX 及 FX)結合位點更接近且藉由誘導構形變化而增強蛋白水解活性，該構形變化增強 FVIIa 之酶促活性。

【0035】 FX 之活化為該兩條途徑之共同點。因子 Va (FVa)及 Xa 與磷脂及鈣一起將凝血酶原轉化為凝血酶(凝血酶原酶複合物)，凝血酶接著裂解纖維蛋白原形成纖維蛋白單體。該等單體聚合形成纖維蛋白股束。因子 XIIIa (FXIIIa)使此等股束彼此共價鍵結形成剛性網狀物。

【0036】 FVII 轉化為 FVIIa 亦由多種蛋白酶催化，該等蛋白酶包括凝血酶、FIXa、FXa、因子 XIa (FXIa)及因子 XIIa (FXIIa)。對於該級聯之早期之抑制而言，組織因子途徑抑制劑靶向 FVIIa/組織因子/FXa 產物複合物。

因子 VIII

【0037】 凝血因子 VIII (FVIII)在血漿中以非常低濃度循環，並且與馮威勒布蘭德因子(VWF)非共價結合。止血期間，FVIII 自 VWF 分離並且

藉由在存在鈣及磷脂或細胞膜的情況下增強活化速率來充當活化因子 IX (FIXa)介導之 FX 活化的輔因子。

【0038】 由凝血酶活化之 FVIII 與結合至低密度脂蛋白受體蛋白(以下稱為「LRP」)有牽連(Yakhyaev, A.等人, *Blood,* 第 90 卷 (增刊 1), **1997**, 126-I，其以引用的方式併入本文中)。亦顯示未活化的 FVIII 與多功能胞吞受體低密度脂蛋白受體相關蛋白(LRP)相互作用(Lenting, P. J., Neels, J. G., van den Berg, B. M. M., Clijsters, P. P. F. M., Meijerman, D. W. E., Pannekoek, H., van Mourik, J. A., Mertens, K.及 van Zonneveld, A.,-J. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23734-23739；WO 00/28021；Saenko, E. L., Yakhyaev, A. V., Mikhailenko, I., Strickland, D. K.及 Sarafanov, A. G. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37685-37692；以引用的方式併入本文中)。提示此受體在自循環中清除 FVIII 時發揮作用(Saenko, E. L.等人, 同上；Schwarz, H. P., Lenting, P. J., Binder, B., Mihaly, J., Denis, C., Domer, F.及 Turecek, P. L. *Blood* **2000**, *95*, 1703-1708；以引用的方式併入本文中)。

【0039】 LRP 為低密度脂蛋白(LDL)受體家族之成員，該家族亦包括 LDL 受體、極低密度脂蛋白受體、載脂蛋白 E 受體 2 及巨蛋白(關於評論，參見 Neels J. G., Horn, I. R., van den Berg, B. M. M., Pannekoek, H.及 van Zonneveld, A.-J. *Fibrinolysis Proteolysis* **1998**, *12*, 219-240；Herz, J.及 Strickland, D. K. *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 779-784；以引用的方式併入本文中)。其在包括肝、肺、胎盤及腦之多種組織中表現(Moestrup, S. K., Gliemann, J.及 Pallesen, G. *Cell Tissue Res.* **1992**, *269*, 375-382；以引用的方式併入本文中)。該受體由非共價地連接至跨膜 85-kDa .β.鏈的胞外 515-kDa α 鏈組成(Herz, J., Kowal, R. C., Goldstein, J. L.及 Brown, M. S. *EMBO J.* **1990**, *9*, 1769-1776；以引用的方式併入本文中)。α 鏈含有四個具有不同數目之互補型重複序列之團簇，該等重複序列介導許多結構上及功能上不相關之配位體的結合(Moestrup, S. K., Hotlet, T. L., Etzerodt, M., Thogersen, H. C., Nykjaer, A., Andreasen, P. A., Rasmussen, H. H., Sottrup-Jensen, L.及 Gliemann, J. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 13691-13696；Willnow, T. E., Orth, K.及 Herz, J. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 15827-15832；Neels, J. G., van den Berg, B. M. M.,

Lookene, A., Olivecrona, G., Pannekoek, H.及 van Zonneveld, A.-J. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 31305-31311；以引用的方式併入本文中)。

【0040】 β 鏈包含跨膜結構域及對胞吞作用而言必不可少的短胞質尾。α 鏈係用作大的胞外域並包含三種類型之重複序列：表皮生長因子樣結構域、Tyr-Trp-Thr-Asp 序列及 LDL 受體 A 類結構域。牽涉於配位體結合中的此等 A 類結構域存在於四個單獨的團簇中，稱為團簇 I (2 個結構域)、團簇 II (8 個結構域)、團簇 III (10 個結構域)及團簇 IV (11 個結構域)。

【0041】 LRP 亦結合活化的非酶促輔因子因子 VIIIa (Yakhyaev, A.等人, *Blood,* 第 90 卷, (增刊 1), **1997**, 126-I)。已顯示 FVIII 輕鏈與重組 LRP 團簇 II 及 IV 相互作用，而沒有觀察到結合至 LRP 團簇 I 及 III (Neels, J. G.等人 **1999** 同上)。

【0042】 FVIII 合成為具有域結構 A1-A2-B-A3-C1-C2 之約 270-330 kD 之單鏈前驅體。當自血漿純化時(例如，「血漿來源」或「血漿性」)，FVIII 由重鏈(A1-A2-B)及輕鏈(A3-C1-C2)組成。輕鏈之分子質量為 80 kD，而歸因於 B 域內之蛋白分解，重鏈在 90-220 kD 範圍內。

【0043】 FVIII 亦合成為在出血病症中用於治療用途之重組蛋白。已設計各種活體外檢測以確定重組 FVIII (rFVIII)作為治療藥物之潛在功效。此等檢測模擬內源性 FVIII 之活體內效應。FVIII 之活體外凝血酶治療引起其促凝血活性之快速增加及隨後降低，如活體外檢測所量測。此活化及失活均符合重鏈及輕鏈兩者中特定的限制性蛋白水解，其改變 FVIII 中不同結合表位之利用率，例如允許 FVIII 自 VWF 上解離並結合至磷脂表面或改變對某些單克隆抗體之結合能力。

【0044】 FVIII 之缺乏或機能不良與最常見的出血病症，A 型血友病相關。用於控制 A 型血友病之首選治療為以血漿來源或 rFVIII 濃縮物進行之替換療法。FVIII 水準低於 1 %之患有嚴重 A 型血友病之患者通常接受預防療法以便在各劑量之間保持 FVIII 高於 1%。考慮到各種 FVIII 產物在循環中之平均半衰期，此結果可通常藉由每週給予 FVIII 兩至三次來達成。

【0045】 參考多核苷酸及多肽序列包括例如 UniProtKB/Swiss-Prot P00451 (FA8_HUMAN)；Gitschier J 等人, Characterization of the human Factor

VIII gene, *Nature*, **1984**, *312(5992)*, 326-30；Vehar GH 等人, Structure of human Factor VIII, *Nature,* **1984**, *312(5992)*, 337-42；Thompson AR. Structure and Function of the Factor VIII gene and protein, *Semin Thromb Hemost,* **2002**, *2003:29*, 11-29。

多肽

【0046】 在一個態樣中，本發明之起始材料為蛋白質或多肽。如本文所述，術語治療蛋白質係指表現出與治療蛋白質相關之生物活性之任何治療蛋白質分子。在本發明之一實施例中，治療蛋白質分子為全長蛋白質。在一實施例中，治療蛋白質為已經修飾以延長半衰期之 FVIII。

【0047】 所涵蓋之治療蛋白質分子包括全長蛋白質、全長蛋白質之前驅體、全長蛋白質之生物活性次單元或片段，以及此等形式之治療蛋白質中任一者之生物活性衍生物及變體。因此，治療蛋白質包括以下彼等：(1)所具有之胺基酸序列在至少約 25、約 50、約 100、約 200、約 300、約 400 或更多個胺基酸之區域上與本文項之參考核酸或胺基酸序列所編碼之多肽具有大於約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%或約 99%或更大胺基酸序列一致性；及/或(2)特異性結合至針對包含如本文項之參考胺基酸序列的免疫原、其免疫原性片段，及/或其保守修飾變體所產生之抗體，例如多株或單株抗體。

【0048】 根據本發明，術語「重組治療蛋白質」包括經由重組 DNA 技術獲得之任何治療蛋白質。在某些實施例中，該術語包括如本文項之蛋白質。

【0049】 如本文所使用，「內源性治療蛋白質」包括來源於欲接受治療之哺乳動物的治療蛋白質。該術語亦包括自轉殖基因或存在於該哺乳動物中之任何其他外來 DNA 轉錄的治療蛋白質。如本文所使用，「外源性治療蛋白質」包括並非來源於欲接受治療之哺乳動物的凝血蛋白質。

【0050】 如本文所用，「血漿來源之」、「血漿來源之凝血蛋白」或「血漿」包括在獲自哺乳動物之血液中發現的具有參與凝血途徑之性質的蛋白質之所有形式。

【0051】 如本文所用，「生物活性衍生物」或「生物活性變異體」包括分子的具有與該分子實質上相同之功能及/或生物性質(諸如結合性質)及/或相同結構基礎(諸如肽骨架或基本聚合單元)的任何衍生物或變異體。

【0052】 諸如「變異體」或「衍生物」之「類似物」為與天然產生之分子在結構上實質上相似並且具有相同生物活性之化合物，儘管在某些情況下程度不同。舉例而言，多肽變異體係指與參考多肽共享實質上類似之結構且具有相同生物活性之多肽。變異體或類似物與該類似物所來源之天然產生之多肽相比基於涉及以下方面之一或多個突變在其胺基酸序列組成方面有所不同：(i)多肽之一或多個末端及/或天然產生之多肽序列(例如片段)之一或多個內部區域的一或多個胺基酸殘基缺失，(ii)在多肽之一或多個末端(通常為「添加」或「融合」)及/或天然產生之多肽序列之一或多個內部區域(通常為「插入」)插入或添加一或多個胺基酸，或(iii)一或多個胺基酸取代天然產生之多肽序列的其他胺基酸。舉例而言，「衍生物」為一種類型之類似物且係指已經修飾(例如化學修飾)的與參考多肽共享相同或實質上類似之結構的多肽。

【0053】 變異多肽為一種類型之類似物多肽且包括插入變異體，其中一或多個胺基酸殘基添加至本發明之治療蛋白質胺基酸序列中。插入可位於蛋白質之任一末端或兩個末端，且/或可定位於治療蛋白質胺基酸序列之內部區域中。在任一末端或兩個末端具有額外殘基的插入變體包括例如融合蛋白質及包含胺基酸標籤或其他胺基酸標記之蛋白質。在一態樣中，凝血蛋白分子視情況含有 N-端 Met，尤其在分子在諸如大腸桿菌(E. coli)之細菌細胞中重組表現時。

【0054】 在缺失變體中，如本文項之治療蛋白質多肽中之一或多個胺基酸殘基被移除。缺失可在治療蛋白質多肽之一個或兩個末端，且/或藉由移除治療蛋白質胺基酸序列內之一或多個殘基來實現。因此，缺失變體包括治療蛋白質多肽序列之片段。

【0055】 在取代變體中，治療蛋白質多肽之一或多個胺基酸殘基被移除並且以替代殘基進行了替換。在一態樣中，取代在自然界中為保守的且此類型的保守取代為此項技術中熟知的。或者，本發明涵蓋亦為非保守的

取代。示範性保守取代描述於 Lehninger, [*Biochemistry, 第 2 版*; Worth Publishers, Inc., New York (1975), 第 71-77 頁]中並且直接在下文闡明。

保守取代

側鏈特徵	胺基酸
非極性(疏水性)：	
A. 脂族	A L I V P
B. 芳族	F W
C. 含硫	M
D. 臨界	G
不帶電極性的：	
A. 羥基	S T Y
B. 醯胺	N Q
C. 巯基	C
D. 臨界	G
帶正電的(鹼性)	K R H
帶負電的(酸性)	D E

【0056】 或者，示範性保守取代直接在下文闡明。

保守取代 II

原始殘基	示範性取代
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe,
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Phe, Ile
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser

Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

多核苷酸

【0057】 編碼本發明治療蛋白質之核酸包括例如且不限於基因、前mRNA、mRNA、cDNA、多型變異體、對偶基因、合成及天然產生之突變體。

【0058】 編碼本發明治療蛋白質之聚核苷酸亦包括但不限於具有以下特徵者：(1)在嚴格雜交條件下與編碼如本文項之參考胺基酸序列的核酸及其保守性修飾變異體特異性雜交；(2)具有與如本文項之參考核酸序列在至少約 25 個、約 50 個、約 100 個、約 150 個、約 200 個、約 250 個、約 500 個、約 1000 或更多個核苷酸(至多成熟蛋白質之 1218 個核苷酸的全長序列)之區域上的核苷酸序列一致性大於約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%或更高的核酸序列。示範性「嚴格雜交」條件包括在 50%甲醯胺、5X SSC、20 mM Na•PO4，pH 6.8 中在 42℃下雜交；及在 1X SSC 中在 55℃下清洗 30 分鐘。應理解可基於待雜交之序列之長度及 GC 核苷酸含量對此等示範性條件作出改變。此項技術中之公式標準適合於確定合適之雜交條件。參見 Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) §§ 9.47-9.51。

【0059】 「天然產生」之多核苷酸或多肽序列通常來自哺乳動物，包括但不限於靈長類動物，例如人類；齧齒動物，例如大鼠、小鼠、倉鼠；牛、豬、馬、綿羊，或任何哺乳動物。本發明之核酸及蛋白質可為重組分子(例如異源分子及編碼野生型序列或其變異體之分子，或天然產生之分子)。

治療蛋白質之產生

【0060】 治療蛋白質之產生包括在此項技術中已知用於執行以下步驟之任何方法：(i)藉由遺傳工程來產生重組 DNA，(ii)藉由例如但不限於轉染、電穿孔或顯微注射將重組 DNA 引入原核或真核細胞中，(iii)培養該等轉型細胞，(iv)例如原構性或在誘導後表達治療蛋白質，及(v)例如自培養基或藉由收穫經轉型之細胞來分離該凝血蛋白質，以便獲得經純化的治療蛋

白質。

【0061】 在其他態樣中，治療蛋白質藉由在特徵為可產生藥理學上可接受的凝血蛋白質分子之合適原核或真核宿主系統中表達來產生。真核細胞的實例為哺乳動物細胞，諸如 CHO、COS、HEK 293、BHK、SK-Hep 及 HepG2。

【0062】 多種載體用於製備治療蛋白質並且選自真核及原核表達載體。用於原核表達之載體之實例包括質體，諸如但不限於 pRSET、pET 及 pBAD，其中用於原核表達載體中之啟動子包括但不限於以下中之一或多種：lac、trc、trp、recA，或 araBAD。用於真核表達之載體的實例包括：(i)用於在酵母中表達之載體諸如但不限於 pAO、pPIC、pYES，或 pMET，其使用啟動子諸如但不限於 AOX1、GAP、GAL1，或 AUG1；(ii)用於在昆蟲細胞中表達之載體諸如但不限於 pMT、pAc5、pIB、pMIB，或 pBAC，其使用啟動子諸如但不限於 PH、p10、MT、Ac5、OpIE2、gp64，或 polh，及(iii)用於在哺乳動物細胞中表達之載體諸如但不限於 pSVL、pCMV、pRc/RSV、pcDNA3，或 pBPV，及在一態樣中源自病毒系統之載體諸如但不限於牛痘病毒、腺相關病毒、皰疹病毒，或逆轉錄病毒，其使用啟動子諸如但不限於 CMV、SV40、EF-1、UbC、RSV、ADV、BPV，及β-肌動蛋白。

【0063】 另外的近期實例包括美國專利第 7,645,860 號；美國專利第 8,637,640 號；美國專利第 8,642,737 號；及美國專利第 8,809,501 號。

投藥

【0064】 在一實施例中，本發明之偶聯治療蛋白質可藉由注射，諸如靜脈內、肌肉內或腹膜內注射進行投與。

【0065】 為向人類或測試動物投與包含本發明之偶聯治療蛋白質的組合物，在一態樣中，組合物包含一或多種醫醫藥學上可接受之載劑。術語「醫藥學」或「醫藥學上可接受」係指分子實體及組合物為穩定的，可抑制蛋白質降解諸如聚集及裂解產物，並且另外如下所述在使用此項技術中熟知之途徑投與時不產生過敏，或其他不良反應。「醫藥學上可接受之載劑」包括任何及所有臨床上適用之溶劑、分散介質、塗料、抗細菌及抗真

菌劑、等滲及吸收延緩劑及其類似試劑，包括以上揭示之彼等試劑。

【0066】 如本文所使用，「有效量」包括適合於治療疾病或病症或減輕疾病或病症之症狀的劑量。在一實施例中，「有效量」包括適合於治療患有如本文項之出血病症之哺乳動物的劑量。

【0067】 組合物可經口、局部、經皮、非經腸、藉由吸入噴霧、陰道、直腸、或顱內注射投與。如本文所使用之術語非經腸包括皮下注射、靜脈內、肌肉內、腦池內注射，或輸注技術。亦涵蓋藉由靜脈內、真皮內、肌肉內、乳房內、腹膜內、鞘內、眼球後、肺內注射及或手術植入於特定位點來投與。通常，組合物基本上無熱原，以及可能對接受者有害之其他雜質。

【0068】 可以治療醫師選擇之劑量水準及模式來執行組合物之單次或多次投與。為了預防或治療疾病，合適劑量視如上項之待治療之疾病之類型、疾病之嚴重程度及過程、投與藥物是出於預防還是治療目的、先前療法、患者之臨床史及對於藥物之反應，及主治醫師之裁量而定。

【0069】 本發明亦關於包含有效量之如本文所定義之偶聯治療蛋白質的醫藥組合物。醫藥組合物可進一步包含醫藥學上可接受的載劑、稀釋劑、鹽、緩衝劑或賦形劑。醫藥組合物可用於治療以上定義之出血病症。本發明之醫藥組合物可為溶液或凍乾產品。醫藥組合物之溶液可經受任何適合的凍乾過程。

【0070】 作為另一態樣，本發明包括包含本發明之組合物以有利於用於投與至受試者之方式封裝的套組。在一實施例中，此套組包含包裝於容器諸如密封瓶或器皿中的本文項之化合物或組合物(例如，包含偶聯治療蛋白質之組合物)，該容器具有標籤貼附於其上或包含於包裝中以描述化合物或組合物於實施該方法中的用法。在一實施例中，套組含有：具有包含偶聯治療蛋白質之組合物的第一容器及具有用於第一容器中之組合物的生理可接受的重構溶液之第二容器。在一態樣中，化合物或組合物以單位劑型來包裝。套組還可包括適合於根據特定投與途徑來投與組合物之裝置。較佳地，套組含有描述治療蛋白質或肽組合物之用法的標籤。

水溶性聚合物

【0071】 在一態樣中，所提供的治療蛋白質衍生物(亦即，偶聯的治療蛋白質)結合至水溶性聚合物，其包括但不限於聚乙二醇(PEG)、分支PEG、聚唾液酸(PSA)、羥烷基澱粉(HAS)、羥乙基澱粉(HES)、碳水化合物、多醣、聚三葡萄糖、殼聚糖、透明質酸、硫酸軟骨素、硫酸皮膚素、澱粉、右旋糖酐、羧甲基-右旋糖酐、聚伸烷基氧化物(PAO)、聚伸烷基二醇(PAG)、聚丙二醇(PPG)聚噁唑啉、聚丙烯醯基嗎啉、聚乙烯醇(PVA)、聚羧酸酯、聚乙烯吡咯啶酮、聚磷腈、聚噁唑啉、聚乙烯-共-順丁烯二酸酐、聚苯乙烯-共-順丁烯二酸酐、聚(1-羥甲基伸乙基羥甲基甲縮醛)(PHF)、磷酸2-甲基丙烯醯氧基-2'-乙基三甲基銨(MPC)。在本發明之一實施例中，水溶性聚合物係由具有350至120,000 Da、500至100,000 Da、1000至80,000 Da、1500至60,000 Da、2,000至45,000 Da、3,000至35,000 Da、及5,000至25,000 Da之分子量範圍的唾液酸分子組成。水溶性聚合物之偶合可藉由與蛋白質直接偶合或經由連接物分子來執行。化學連接物之一實例為含有碳水化合物選擇性醯肼及巰基反應性馬來醯亞胺基團之 MBPH (4-[4-N-馬來醯亞胺基苯基]丁酸醯肼)(Chamow 等人, *J Biol Chem* **1992**, *267*, 15916-22)。其他示範性及較佳連接物於下文描述。

同雙官能連接物

【0072】 在一示範性實施例中，水溶性聚合物之偶合經由同雙官能連接物進行。在一示範性實施例中，同雙官能連接物在交聯劑間隔臂之兩端處具有相同的反應性基團且具有式 Y-L-Y。在一示範性實施例中，同雙官能連接物為 $NH_2[OCH_2CH_2]_{n'}ONH_2$，其中 n'=1-10。在一示範性實施例中，同雙官能連接物為 $NH_2[OCH_2CH_2]_2ONH_2$。在一示範性實施例中，同雙官能連接物為 $NH_2[OCH_2CH_2]_4ONH_2$。在一示範性實施例中，同雙官能連接物為 $NH_2[OCH_2CH_2]_6ONH_2$。在一示範性實施例中，同雙官能連接物為 $NH_2[OCH_2CH_2]_8ONH_2$。在一示範性實施例中，同雙官能連接物為 $NH_2[OCH_2CH_2]_{10}ONH_2$。

【0073】 在一實施例中，與天然治療蛋白質產物相比，衍生物保留天然治療蛋白質產物之完全功能活性，且提供延長之活體內半衰期。在一示範性實施例中，相對於天然凝血蛋白，衍生物保留至少約20、約21、約22、

約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約34、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約41、約42、約43、約44、約45、約46、約47、約48、約49、約50、約51、約52、約53、約54、約55、約56、約57、約58、約59、約60、約61、約62、約63、約64、約65、約66、約67、約68、約69、約70、約71、約72、約73、約74、約75、約76、約77、約78、約79、約80、約81、約82、約83、約84、約85、約86、約87、約88、約89、約90、約91、約92、約93、約94、約95、約96、約97、約98、約99、約100, 110、約120、約130、約 140 或約 150%生物活性。在一示範性實施例中，相對於天然 rFVIII，PSA-rFVIII 偶聯物獲得約 70%更大的比放射性。在一示範性實施例中，衍生物及天然凝血蛋白之生物活性係藉由發色活性與凝血因子抗原值之比率進行測定(凝血因子:Chr:凝血因子:Ag)。在本發明之一示範性實施例中，構築體之半衰期相對於天然治療蛋白質之活體內半衰期減少或延長約 1.0、約 1.1、約 1.2、約 1.3、約 1.4、約 1.5、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9 或約 10 倍。

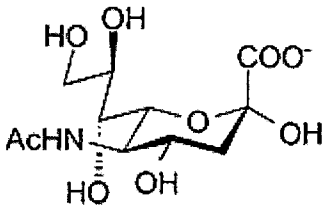
【0074】 在一示範性實施例中，衍生物，例如，包括如本文項之 PSA 的經修飾之 FVIII 之修飾方式使得降低或以其他方式限制經修飾之 FVIII 與諸如 VWF 或 LRP1 之一或多種配位體相互作用(例如結合)的能力。舉例而言，根據本揭示案之經修飾之 FVIII 包括 FVIII，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或更多個 PSA 部分直接連接於其上以分離 FVIII 之胺基酸或連接於例如 FVIII 上之碳水化合物部分。如本文所揭示，涵蓋一種胺氧基連接物，其中連接經由 FVIII 碳水化合物部分發生。

【0075】 在各種實施例中，經修飾之 FVIII 對例如 VWF 及/或 LRP1 之結合親和力直接與經修飾之 FVIII 的半衰期有關。舉例而言，結合至 VWF 愈強，半衰期受到 VWF 而非受到例如水溶性聚合物之控制愈多。以此方式，更嚴重地減少 VWF 結合之修飾將基於與 VWF 相反由水溶性聚合物賦予的阻止清除之性質而控制半衰期延長。

唾液酸及 PSA

【0076】 PSA 由 N-乙醯神經胺酸之聚合物(通常均聚物)組成。二級

胺基通常承載乙醯基，但是其可替代地承載羥乙醯基。羥基上之可能取代基包括乙醯基、乳醯基、乙基、硫酸酯，及磷酸酯基團。



N-乙醯神經胺酸
Neu5Ac

唾液酸(N-乙醯神經胺酸)之結構

【0077】 PSA 及 mPSA 通常包含基本上由藉由 2,8-或 2,9-糖苷鍵或其組合(例如交替 2,8-及 2,9-鍵)連接之 N-乙醯神經胺酸部分組成之線性聚合物。在尤佳之 PSA 及 mPSA 中，糖苷鍵為α-2,8。此類 PSA 及 mPSA 便利地自多聚唾液酸獲得，並且在本文中稱為「CA」及「mCA」。典型 PSA 及 mPSA 包含至少 2 個、較佳至少 5 個、更佳至少 10 個及最佳至少 20 個 N-乙醯神經胺酸部分。因此，其可包含 2 至 300 個 N-乙醯神經胺酸部分、較佳 5 至 200 個 N-乙醯神經胺酸部分，或最佳 10 至 100 個 N-乙醯神經胺酸部分。PSA 及 CA 較佳基本上不含除 N-乙醯神經胺酸以外的糖部分。因此，PSA 及 CA 較佳包含至少 90 %、更佳至少 95 %及最佳至少 98 %N-乙醯神經胺酸部分。

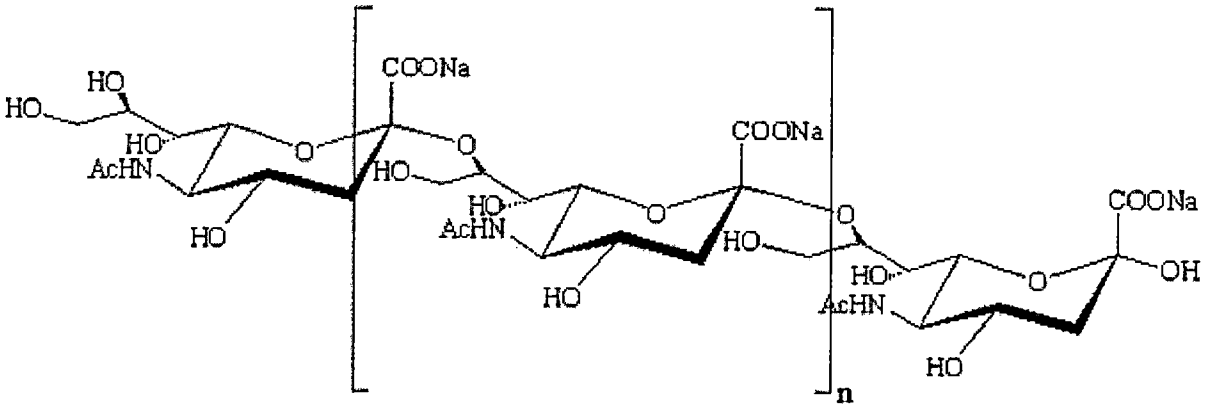
部分之氧化

【0078】 當 PSA 及 CA 包含除 N-乙醯神經胺酸以外的部分(例如在 mPSA 及 mCA 中)時，此等部分較佳位於聚合物鏈之一個或兩個末端處。此類「其他」部分可例如為藉由氧化或還原自末端 N-乙醯神經胺酸部分衍生之部分。

【0079】 例如，WO-A-0187922 描述非還原末端 N-乙醯神經胺酸單元藉由與過碘酸鈉反應而轉化為醛基之此類 mPSA 及 mCA。另外，WO 2005/016974 描述還原末端 N-乙醯神經胺酸單元經受還原以將還原末端 N-乙醯神經胺酸單元處之環還原性打開，由此形成鄰位二醇基團，繼而藉由氧化以將鄰接的二醇基團轉化為醛基的此類 mPSA 及 mCA。

【0080】 富含唾液酸之糖蛋白在人類及其他有機體中結合選擇素。它

們在人類流感感染中起重要作用。例如，唾液酸可掩蔽宿主細胞表面上的甘露糖抗原或掩蔽細菌免於暴露於甘露糖結合凝集素。此防止補體之活化。唾液酸亦掩蔽倒數第二個半乳糖殘基，由此防止糖蛋白藉由肝實質細胞上的半乳糖受體之快速清除。



多聚唾液酸(N-乙醯神經胺酸之均聚物)之結構

【0081】 多聚唾液酸(PSA之亞類)為具有α(2→8)酮苷鍵之N-乙醯神經胺酸(NANA)的均聚物，且尤其是由具有K1抗原之大腸桿菌的特定菌株產生。多聚唾液酸具有許多生理功能。其為藥物及化妝品之重要原料。

【0082】 聚唾液酸化與未經修飾天冬醯胺酶之活體內比較研究揭示聚唾液酸化可增加酶之半衰期(Fernandes 及 Gregoriadis, *Biochimica Biophysica Acta* **1997**, 1341, 26-34)。

【0083】 如本文所使用，「唾液酸部分」包括唾液酸單體或聚合物(「多醣」)，其可溶於水溶液或懸浮液中並且在以藥學有效量投與PSA-凝血蛋白質偶聯物後，對於哺乳動物幾乎沒有負面影響，諸如副作用。在一態樣中，聚合物經表徵為具有約1、約2、約3、約4、約5、約10、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、約100、約200、約300、約400或約500個唾液酸單元。在一示範性實施例中，聚唾液酸包括許多個唾液酸單元以使得聚合物具有約20 kD之分子重量。在某些態樣中，將不同唾液酸單元組合在一個鏈中。

【0084】 在本發明之一實施例中，多醣化合物之唾液酸部分具有高度親水性，並且在一示範性實施例中，整個化合物具有高度親水性。親水性主要由唾液酸單元之懸垂羧基、以及羥基來賦予。醣單元可含有其他官能基，諸如胺、羥基或硫酸酯基團，或其組合。此等基團可存在於天然產生

之醣化合物上，或引入衍生多醣化合物中。

【0085】 天然產生之聚合物 PSA 可獲得其顯示廣泛大小分佈(例如 Sigma C-5762)及高多分散性(PD)之多分散製劑。因為多醣通常在帶有共純化內毒素之固有風險的細菌中產生，所以純化長唾液酸聚合物鏈可提高內毒素含量增加的可能性。具有 1-4 個唾液酸單元之短 PSA 分子亦可合成製備(Kang SH 等人, *Chem Commun*. **2000**;227-8；Ress DK 及 Linhardt RJ, *Current Organic Synthesis*. **2004**;1:31-46)，由此使高內毒素水準之風險降至最低。然而，現在可製造亦不含內毒素之具有狹窄大小分佈及低多分散性的 PSA 製劑。在一態樣中，特定用於本發明之多醣化合物為由細菌產生者。此等天然產生之多醣中之一些被稱為醣脂。在一實施例中，多醣化合物實質上不含末端半乳糖單元。

連接方法

【0086】 治療蛋白質可藉由熟習此項技術者已知之各種技術中之任一者共價地連接至多醣化合物。在本發明之不同態樣中，唾液酸部分結合至治療蛋白質，例如 FIX、FVIII、FVIIa 或 VWF，例如藉由美國專利第 4,356,170 號中項之方法，該專利以引用的方式併入本文中。另外的近期實例包括美國專利第 7,645,860 號；美國專利第 8,637,640 號；美國專利第 8,642,737 號；及美國專利第 8,809,501 號，該等專利以引用的方式併入本文中。

【0087】 使 PSA 與多肽偶合之其他技術亦為已知的並且由本發明涵蓋。例如，美國公開案第 2007/0282096 號描述使例如 PSA 之胺或醯肼衍生物與蛋白質偶聯。另外，美國公開案第 2007/0191597 號描述含有用於與受質(例如，蛋白質)之還原末端反應之醛基的 PSA 衍生物。此等參考文獻全部以引用方式併入。

【0088】 各種方法在美國專利第 5,846,951 號(全部以引用方式併入)之第 7 欄第 15 行至第 8 欄第 5 行予以揭示。示範性技術包括經由凝血蛋白質或多醣任一者上之羧基與凝血蛋白質或多醣之胺基之間之肽鍵的鍵合，或凝血蛋白質或多醣之羧基與治療蛋白質或多醣之羥基之間之酯鍵。治療蛋白質藉此共價地鍵結至多醣化合物之另一種鍵係經由介於凝血蛋白上的

游離胺基之間的希夫鹼，該游離胺基藉由高碘酸鹽氧化作用與多醣之非還原端處形成的醛基反應(Jennings HJ 及 Lugowski C, *J Immunol.* **1981**;127:1011-8 ; Fernandes AI 及 Gregoriadis G, *Biochim Biophys Acta.***1997**;1341;26-34)。在一態樣中，所產生之希夫鹼藉由以 $NaCNBH_3$ 特異性還原以形成二級胺來穩定化。替代方法係藉由在先前氧化之後以 NH_4Cl 還原性胺化來產生 PSA 中之末端游離胺基。雙官能試劑可用於連接兩個胺基或兩個羥基。例如，含有胺基之 PSA 藉由如 BS3 (雙(磺基琥珀醯亞胺基)辛二酸酯/Pierce，Rockford，IL)之試劑來與蛋白質之胺基偶合。另外，如磺基-EMCS (N-ε-馬來醯亞胺己醯氧基)磺基琥珀醯亞胺酯/Pierce)之異雙官能交聯試劑用於例如連接胺及硫醇基團。

【0089】 在一示範性實施例中，製備 PSA 醯肼並且將其在先前氧化及產生醛官能基之後與蛋白質之碳水化合物部分偶合。

【0090】 如上所述，治療蛋白質之游離胺基與唾液酸殘基之 1-羧基反應以形成肽鍵或在 1-羧酸基團與凝血蛋白質上之羥基或其他合適活性基團之間形成酯鍵。或者，羧基與脫乙醯化 5-胺基形成肽鍵，或治療蛋白質分子之醛基與唾液酸殘基之 N-脫乙醯化 5-胺基形成希夫鹼。

【0091】 或者，多醣化合物以非共價方式與治療蛋白質締合。例如，在一態樣中，多醣化合物與藥學活性化合物經由疏水性相互作用相連接。其他非共價締合包括靜電相互作用，其中帶相反電荷的離子彼此吸引。

【0092】 在各種實施例中，治療蛋白質以化學計量之量(例如，1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:7、1:8、1:9 或 1:10 等)與多醣化合物連接或締合。在各種實施例中，1-6、7-12 或 13-20 個多醣連接至凝血蛋白。在其他實施例中，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 個或更多個多醣連接至凝血蛋白。

【0093】 在各種實施例中，對治療蛋白質進行修飾以引入糖基化位點(亦即除天然糖基化位點以外之位點)。可使用此項技術中已知之標準分子生物技術完成該種修飾。此外，治療蛋白質在經由一或多個醣部分偶聯至水溶性聚合物之前可在活體內或活體外糖基化。此等糖基化位點可充當蛋白質與水溶性聚合物偶聯之靶標(美國專利申請案第 20090028822 號、美國專

利申請案第 2009/0093399 號、美國專利申請案第 2009/0081188 號、美國專利申請案第 2007/0254836 號、美國專利申請案第 2006/0111279 號，及 DeFrees S.等人, *Glycobiology*, **2006**, *16*, 9, 833-43)。例如，活體內不天然糖基化之蛋白質(例如，並非糖蛋白之蛋白質)可如上所述進行修飾。

胺氧基鍵

【0094】 在本發明之一實施例中，在製備凝血蛋白之偶聯物中採用使羥胺或羥胺衍生物與醛(例如，在藉由過碘酸鈉進行氧化之後的碳水化合物部分上)反應以形成肟基。舉例而言，首先用諸如過碘酸鈉($NaIO_4$)之氧化劑對糖蛋白(例如本發明之治療蛋白質)進行氧化(Rothfus JA 及 Smith EL., *J Biol Chem* **1963**, *238*, 1402-10；以及 Van Lenten L 及 Ashwell G., *J Biol Chem* **1971**, *246*, 1889-94)。糖蛋白之過碘酸鹽氧化係基於描述於 1928 年之經典馬蘭潑拉德(Malaprade)反應，即以過碘酸鹽來氧化鄰位二醇以形成活性醛基(Malaprade L., Analytical application, *Bull Soc Chim France*, **1928**, *43*, 683-96)。此類氧化劑之其他實例為四乙酸鉛(Pb(OAc)4)、乙酸錳(MnO(Ac)3)、乙酸鈷(Co(OAc)2)、乙酸鉈(TlOAc)、硫酸鈰(Ce(SO4)2)(US 4,367,309)或過釕酸鉀(KRuO4)(Marko 等人, *J Am Chem Soc* **1997**,*119*, 12661-2)。「氧化劑」意謂能夠在生理反應條件下使碳水化合物中之鄰位二醇氧化，從而產生活性醛基的溫和氧化性化合物。

【0095】 第二步驟為使含有胺氧基之聚合物與經氧化碳水化合物部分偶合以形成肟鍵。在本發明之一實施例中，此步驟可在催化量之親核催化劑苯胺或苯胺衍生物存在下進行(Dirksen A et Dawson PE, *Bioconjugate Chem.* **2008**；Zeng Y 等人, *Nature Methods* **2009**,*6*,207-9)。苯胺催化作用極大地加速肟連接反應，使得可使用非常低濃度之該等試劑。在本發明之一示範性實施例中，肟鍵聯藉由用 $NaCNBH_3$ 還原形成烷氧基胺鍵聯而穩定化。其他催化劑於下文描述。

【0096】 關於胺氧基技術之另外資訊可見於以下參考文獻中，其各自全部併入：EP 1681303A1 (HAS 化紅血球生成素)；WO 2005/014024 (聚合物與蛋白質藉由肟連接基團而偶聯)；WO96/40662 (含有胺氧基之連接物化合物及其在偶聯中的應用)；WO 2008/025856 (經修飾之蛋白質)；Peri F 等

人, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 12269-78；Kubler-Kielb J et. Pozsgay V., *J Org Chem* **2005**, *70*, 6887-90；Lees A 等人, Vaccine 2006, 24(6), 716-29；及 Heredia KL 等人, *Macromoecules* **2007**, *40*(14), 4772-9。

【0097】 本揭示案涵蓋將水溶性聚合物與胺氧基連接物偶合之眾多方法。例如，本文描述連接物與諸如 PSA 之水溶性聚合物之還原或非還原端之偶合。偶合位點(例如，還原端對比非還原端)係藉由水溶性聚合物之偶合過程之一或多個條件(例如，時間及溫度)以及狀態(例如，天然對比氧化)來確定。在一實施例中，經氧化之諸如 PSA 之水溶性聚合物藉由在降低的溫度(例如，介於 2-8℃之間)下進行偶合反應在其非還原端偶合至連接物。在一示範性實施例中，天然(例如非氧化)的諸如 PSA 之水溶性聚合物藉由在較高溫度(例如，介於 22-37℃之間)下進行偶合反應在其還原端偶合至胺氧基連接物。上述實施例在下文及實例中更詳細地描述。

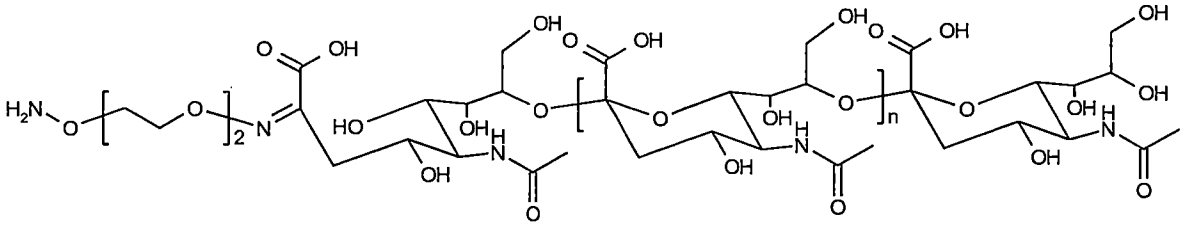
【0098】 如本文所述，經氧化之 PSA 與二胺氧基連接物之反應展示兩個反應：在非還原端處醛基之「快反應」，及在還原端處的「慢反應」。若天然 PSA (其未經氧化且不含活性醛基)在室溫下與還原端反應，則可觀察到衍生化的 PSA。因此，在各種實施例中，為了使諸如 PSA 之水溶性聚合物之還原端處不期望的副反應減至最少，在介於 2-8℃之間的溫度下進行 PSA-胺氧基連接物試劑製備。

【0099】 在本揭示案之一示範性實施例中，提供天然 PSA 在還原端處的衍生化。如本文所述，天然 PSA (其未藉由 $NaIO_4$ 進行氧化且因此在其非還原端不含游離醛基)在室溫下與二胺氧基連接物反應，可在其還原端處觀察到 PSA 之衍生化。此偶合經由在還原端處的開環及後續肟形成而發生(如上項之實際副反應及副產物在胺氧基-PSA 試劑中存在之原因)。在一示範性實施例中，用產生至多以下修飾度之天然 PSA 進行反應：約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29、約 30、約 31、約 32、約 34、約 35、約 36、約 37、約 38、約 39、約 40、約 41、約 42、約 43、約 44、約 45、約 46、約 47、約 48、約 49、約 50、約 51、約 52、約 53、約 54、約 55、約 56、約 57、約 58、約 59、約 60、約 61、約 62、約 63、約 64、約 65、約 66、約 67、約 68、約 69、約 70、約 71、約 72、

約 73、約 74、約 75、約 76、約 77、約 78、約 79、約 80、約 81、約 82、約 83、約 84、約 85、約 86、約 87、約 88、約 89、約 90、約 91、約 92、約 93、約 94、約 95、約 96、約 97、約 98 或約 99%。在一示範性實施例中，用產生至多約 70%之修飾度的天然 PSA 進行反應。

【0100】 在一示範性實施例中，用產生約 20%至約 99%之修飾度的天然 PSA 進行反應並且 PSA-rFVIII 偶聯物相對於天然 rFVIII 獲得高約 20%至約 150%之比活性。在一示範性實施例中，用產生約 30%至約 90%之修飾度的天然 PSA 進行反應並且 PSA-rFVIII 偶聯物相對於天然 rFVIII 獲得高約 30%至約 140%之比活性。在一示範性實施例中，用產生約 30%至約 80%之修飾度的天然 PSA 進行反應並且 PSA-rFVIII 偶聯物相對於天然 rFVIII 獲得高約 40%至約 130%之比活性。在一示範性實施例中，用產生約 30%至約 70%之修飾度的天然 PSA 進行反應並且 PSA-rFVIII 偶聯物相對於天然 rFVIII 獲得高約 50%至約 120%之比活性。在一示範性實施例中，用產生約 30%至約 60%之修飾度的天然 PSA 進行反應並且 PSA-rFVIII 偶聯物相對於天然 rFVIII 獲得高約 40%至約 110%之比活性。在一示範性實施例中，用產生至多約 35%之修飾度的天然 PSA 進行反應並且 PSA-rFVIII 偶聯物相對於天然 rFVIII 獲得高約 50%至約 120%之比活性。在一示範性實施例中，用產生至多約 54%之修飾度的天然 PSA 進行反應並且 PSA-rFVIII 偶聯物相對於天然 rFVIII 獲得高約 50%至約 120%之比活性。在一示範性實施例中，用產生至多約 58%之修飾度的天然 PSA 進行反應並且 PSA-rFVIII 偶聯物相對於天然 rFVIII 獲得高約 50%至約 120%之比活性。在一示範性實施例中，用產生至多約 70%之修飾度的天然 PSA 進行反應並且 PSA-rFVIII 偶聯物相對於天然 rFVIII 獲得高約 70%之比活性。

藉由 13C NMR 光譜學確定以下結構作為主要產物



【0101】 在一示範性實施例中，PSA 及 mPSA 包含至少 2 個，較佳

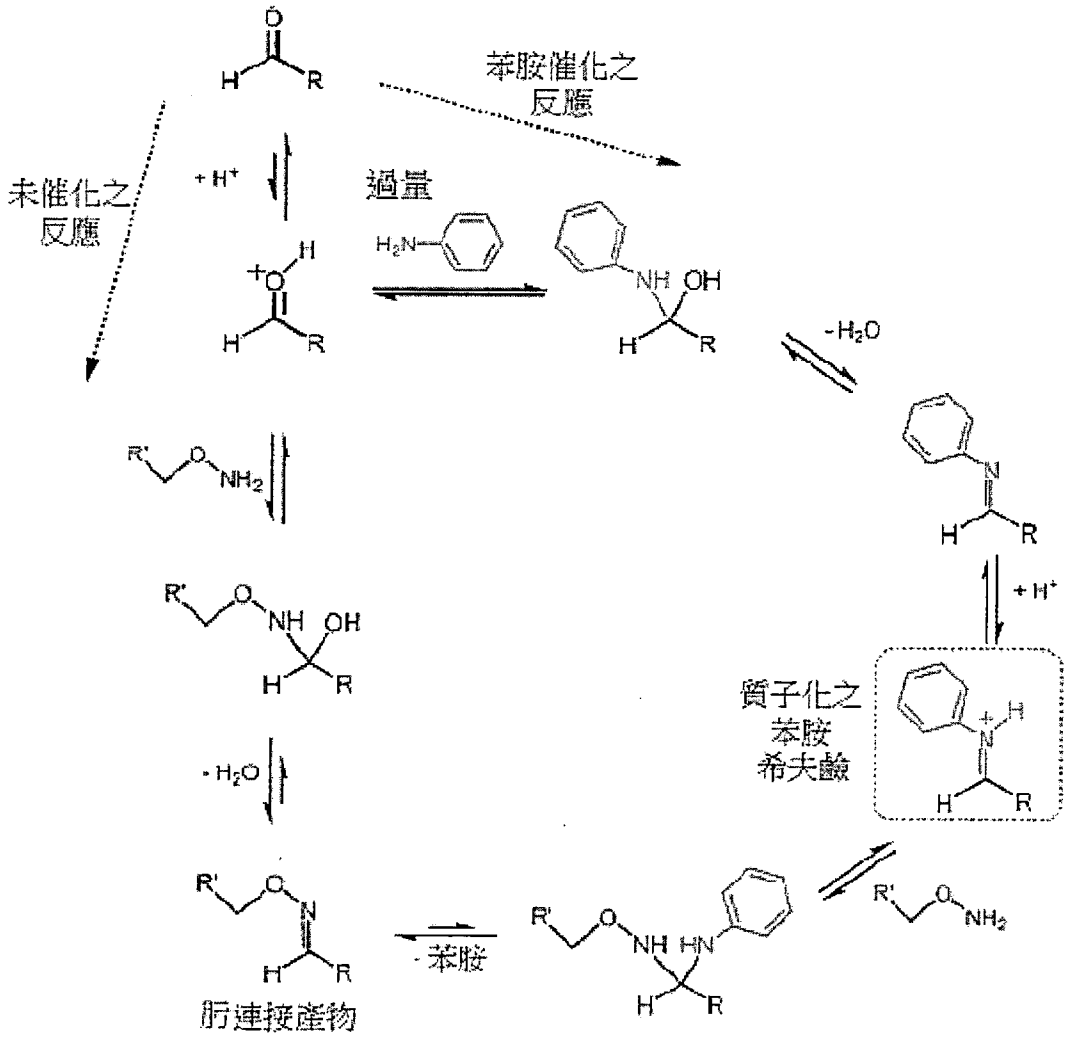
至少 5 個，更佳至少 10 且最佳至少 20 個 N-乙醯神經胺酸部分(n)。在一示範性實施例中，n 可包含 2 至 300 個 N-乙醯神經胺酸部分。在一示範性實施例中，n 可包含 5 至 200 個 N-乙醯神經胺酸部分。在一示範性實施例中，n 可包含 10 至 100 個 N-乙醯神經胺酸部分。在一示範性實施例中，聚唾液酸包括許多個唾液酸單元以使得聚合物具有約 20 kD 之分子重量。反應可轉移至如葡聚糖及澱粉之其他碳水化合物或含有還原性端基之其他多醣。亦涵蓋如間甲苯胺或苯胺之親核催化劑的使用。因此，本文提供使用天然 PSA (亦即無先前氧化)製備胺氧基-PSA 試劑，其隨後可用於治療蛋白質之化學修飾。

【0102】 因此，在本揭示案之各種實施例中，提供以下方法：其中二胺氧基連接物偶合至諸如經氧化之 PSA 的水溶性聚合物的條件(例如，2-8℃培育溫度)有利於偶合至非還原端或者在一替代方案中，其中二胺氧基連接物偶合至諸如天然的非氧化 PSA 之水溶性聚合物的條件(例如，室溫培育)有利於偶合至還原端。

【0103】 在本發明之各種實施例中，根據本文項之胺氧基技術與治療蛋白質(例如，FVIII、FVIIa 或 FIX)之經氧化碳水化合物部分連接之水溶性聚合物包括但不限於聚乙二醇(PEG)、分支 PEG、聚唾液酸(PSA)、碳水化合物、多醣、聚三葡萄糖、殼聚糖、透明質酸、硫酸軟骨素、硫酸皮膚素、澱粉、右旋糖酐、羧甲基-右旋糖酐、聚伸烷基氧化物(PAO)、聚伸烷基二醇(PAG)、聚丙二醇(PPG)聚噁唑啉、聚丙烯醯基嗎啉、聚乙烯醇(PVA)、聚羧酸酯、聚乙烯吡咯啶酮、聚磷腈、聚噁唑啉、聚乙烯-共-順丁烯二酸酐、聚苯乙烯-共-順丁烯二酸酐、聚(1-羥甲基伸乙基羥甲基甲縮醛)(PHF)、磷酸 2-甲基丙烯醯氧基-2'-乙基三甲基銨(MPC)。

親核催化劑

【0104】 如本文所述，水溶性聚合物與治療蛋白質之偶聯可利用苯胺來催化。苯胺有力地催化醛及酮與胺之水性反應以形成穩定亞胺諸如腙及肟。下圖將未經催化之肟連接反應與苯胺催化之肟連接反應進行比較(Kohler JJ, *Chem Bio Chem* **2009**, *10*, 2147-50)：



【0105】 然而，考慮到與苯胺相關之眾多健康風險，需要替代催化劑。本發明提供作為替代肟連接催化劑之苯胺衍生物。此類苯胺衍生物包括但不限於鄰胺基苯甲酸、間胺基苯甲酸、對胺基苯甲酸、磺胺酸、鄰胺基苯甲醯胺、鄰甲苯胺、間甲苯胺、對甲苯胺、鄰茴香胺、間茴香胺，及對茴香胺。

【0106】 在本發明之一實施例中，使用間甲苯胺(亦稱為間甲苯胺、間甲基苯胺、3-甲基苯胺或3-胺基-1-甲基苯)來催化本文項之偶聯反應。間甲苯胺及苯胺具有相似物理性質及基本上相同的 pKa 值(間甲苯胺：pKa 4.73，苯胺：pKa 4.63)。

【0107】 本發明之親核性催化劑適用於肟連接(例如使用胺氧基鍵聯)或腙形成(例如使用醯肼化學)。在本發明之各種實施例中，在偶聯反應中提供以下濃度之親核催化劑：約0.1、約0.2、約0.3、約0.5、約0.6、約0.7、約0.8、約0.9、約1.0、約1.5、約2.0、約2.5、約3.0、約3.5、約4.0、約

4.5、約 5.0、約 5.5、約 6.0、約 6.5、約 7.0、約 7.5、約 8.0、約 8.5、約 9.0、約 9.5、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 25、約 30、約 35、約 40、約 45、或約 50 mM。在一實施例中，提供約 1 mM 至約 10 mM 之量的親核催化劑。在本發明之各種實施例中，偶聯反應混合物之 pH 為約 4.5、約 5.0、約 5.5、約 6.0、約 6.5、約 7.0 及約 7.5。在一實施例中，pH 為約 5.5 至約 6.5。

偶聯蛋白質之純化

【0108】 在各種實施例中，已與氧化劑一起孵育之蛋白質及/或根據本揭示案已與水溶性聚合物進行偶聯之治療蛋白質需要純化。眾多純化技術為本領域中已知的並且包括但不限於層析法，諸如離子交換層析、疏水性相互作用層析、尺寸排阻層析及親和層析或其組合；過濾法(例如，UF/DF)；及沉澱法以及透析程序及上述技術之任何組合(Guide to Protein Purification, Meth. Enzymology 第 463 卷 (由 Burgess RR 及 Deutscher MP 編著), 第 2 版, Academic Press 2009)。

功效

【0109】 在各種實施例中，鼠模型可用於評價半衰期功效。在各種實施例中，鼠模型可用於評價半衰期功效。在一示範性實施例中，鼠模型係用於測定經 PSA 修飾之 FVIII，其具有比聚乙二醇化 FVIII 更長的活體內半衰期。在一示範性實施例中，鼠模型係用於測定偶聯至具有約 20 kDa 之平均分子量之 PSA 部分的經修飾之 FVIII 具有比偶聯至具有約 20 kDa 之平均分子量的 PEG 部分的聚乙二醇化 FVIII 更長的活體內半衰期。在一示範性實施例中，在 FVIII KO 小鼠中的尾夾出血模型係用於測定經 PSA 修飾之 FVIII，其具有比聚乙二醇化 FVIII 更長的活體內半衰期。在一示範性實施例中，在 FVIII KO 小鼠中的頸動脈閉塞模型係用於測定經 PSA 修飾之 FVIII，其具有比聚乙二醇化 FVIII 更長的活體內半衰期。在一示範性實施例中，血友病關節出血(關節內穿刺術)之鼠模型係用於測定經 PSA 修飾之 FVIII，其具有比聚乙二醇化 FVIII 更長的活體內半衰期。

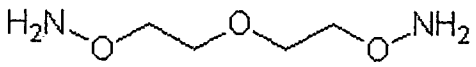
【0110】 以下實例不欲對本發明造成限制，而是僅為本發明之特定實施例之示例。

實例

實例 1

同雙官能連接物 $NH_2[OCH_2CH_2]_2ONH_2$ 之製備

同雙官能連接物 $NH_2[OCH_2CH_2]_2ONH_2$

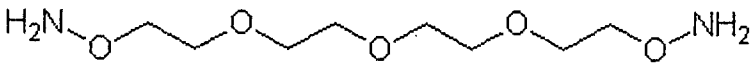


【0111】 根據 Boturyn 等人(*Tetrahedron* **1997**,*53*,5485-92)在採用第一胺之經修改之加百利合成(Gabriel-Synthesis)的兩步有機反應中合成含有兩個活性胺氧基之(3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺)。在第一步驟中，將一個分子之2,2-氯二乙醚與兩個分子之內-N-羥基-5-降冰片烯-2,3-二甲醯亞胺在二甲基甲醯胺(DMF)中反應。所需同雙官能產物藉由乙醇中之肼解作用自所得中間體製備。

實例 2

同雙官能連接物 $NH_2[OCH_2CH_2]_4ONH_2$ 之製備

同雙官能連接物 $NH_2[OCH_2CH_2]_4ONH_2$

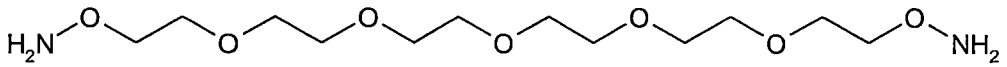


【0112】 根據 Boturyn 等人(*Tetrahedron* **1997**,*53*,5485-92)在採用第一胺之經修改之加百利合成的兩步有機反應中合成含有兩個活性胺氧基之(3,6,9-三氧雜-十一烷-1,11-二氧基胺)。在第一步驟中，將一個分子之雙-(2-(2-氯乙氧基)-乙基)-醚與兩個分子之內-N-羥基-5-降冰片烯-2,3-二甲醯亞胺在DMF 中反應。所需同雙官能產物藉由乙醇中之肼解作用自所得中間體製備。

實例 3

同雙官能連接物 $NH_2[OCH_2CH_2]_6ONH_2$ 之製備

同雙官能連接物 $NH_2[OCH_2CH_2]_6ONH_2$



【0113】 根據 Boturyn 等人(*Tetrahedron* **1997**,*53*,5485-92)在採用第一胺之經修改之加百利合成的兩步有機反應中合成含有兩個活性胺氧基之(3,6,9,12,15-五氧雜-十七烷-1,17-二氧基胺)。在第一步驟中，使一分子六乙

二醇二氯與兩分子內-N-羥基-5-降冰片烯-2,3-二甲醯胺在 DMF 中反應。所需同雙官能產物藉由乙醇中之肼解作用自所得中間體製備。

實例 4

胺氧基-PSA 試劑之詳細合成

【0114】 3-氧雜-戊烷-1,5 二氧基胺根據 Botyryn 等人(Tetrahedron 1997; 53:5485-92)如實例 1 中概述之兩步有機合成中經合成。

步驟 1：

【0115】 向內-N-羥基-5-降冰片烯-2,3-二甲醯亞胺(59.0 g；1.00 當量)於 700 mL 無水 N,N-二甲基甲醯胺中之溶液中添加無水 K_2CO_3(45.51 g；1.00 當量)及 2,2-二氯二乙醚(15.84 mL；0.41 當量)。將反應混合物在 50℃下攪拌 22 h。將混合物在減壓下蒸發至乾。將殘餘物懸浮於 2 L 二氯甲烷中並且以飽和 NaCl 水溶液萃取兩次(分別 1 L)。將二氯甲烷層經 Na_2SO_4 乾燥，接著在減壓下蒸發至乾並且在高真空中乾燥得到 64.5 g 呈白黃色固體形式之 3-氧雜戊烷-1,5-二氧-內-2',3'-二羧基二醯亞胺降冰片烯(中間體 1)。

步驟 2：

【0116】 向中間體 1 (64.25 g；1.00 當量)於 800 mL 無水乙醇中之溶液中添加 31.0 mL 水合肼(4.26 當量)。接著使反應混合物回流 2 小時。藉由在減壓下蒸發溶劑將混合物濃縮至起始體積之一半。將出現之沈澱物過濾掉。將剩餘乙醇層在減壓下蒸發至乾。將含有粗產物 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺之殘餘物在真空中乾燥以獲得 46.3 g。將粗產物藉由管柱層析(矽膠 60；以二氯甲烷/甲醇混合物進行等度溶離，9/1)進一步純化獲得 11.7 g 純最終產物 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺。

實例 5

胺氧基-PSA 之製備

【0117】 將自 Serum Institute of India (Pune, India)獲得之 1000 mg 經氧化 PSA (MW=20 kD)溶解於 16 mL 50 mM 磷酸鹽緩衝液，pH 6.0 中。接著將 170 mg 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺加入反應混合物。在 RT 下振盪 2 小時之後，添加 78.5 mg 氰基硼氫化鈉並且執行反應 18 小時隔夜。接著使用以再生纖維素製成之具有 5 kD 截留量之膜(50 cm^2，Millipore)使反應混合物

經受超濾/滲濾程序(UF/DF)。

實例 6

採用層析純化步驟之胺氧基-PSA 之製備

【0118】 將自 Serum Institute of India (Pune, India)獲得之 1290 mg 經氧化 PSA (MW=20 kD)溶解於 25 mL 50 mM 磷酸鹽緩衝液，pH 6.0 (緩衝液 A)中。接著將 209 mg 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺加入反應混合物。在 RT 下振盪 1 小時之後，添加 101 mg 氰基硼氫化鈉並且執行反應 3 小時。隨後使混合物經受採用 Fractogel EMD DEAE 650-M 層析凝膠(管柱尺寸：XK26/135)之弱陰離子交換層析。反應混合物用 110 mL 緩衝液 A 稀釋並且以 1 cm/min 之流速裝載至用緩衝液 A 預平衡之 DEAE 管柱上。接著用 20 CV 緩衝液 B (20 mM Hepes，pH 6.0)以 2 cm/min 之流速洗滌管柱以移除游離的 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺及氰化物。隨後用由 67%緩衝液 B 及 43%緩衝液 C (20 mM Hepes，1M NaCl，pH 7.5)組成之不連續梯度溶離胺氧基-PSA 試劑。將溶離物使用由聚醚碸製成之 5 kD 膜(50 cm^2，Millipore)藉由 UF/DF 來濃縮。最終滲濾步驟相對於緩衝液 D (20 mM Hepes，90 mM NaCl，pH 7.4)執行。製劑藉由量測總 PSA (間苯二酚檢測)及總胺氧基(TNBS 檢測)以確定修飾度來加以分析表徵。此外，測定多分散性以及游離 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺及氰化物。

實例 7

在無還原步驟下胺氧基-PSA 之製備

【0119】 將自 Serum Institute of India (Pune, India)獲得之 573 mg 經氧化 PSA (MW=20 kD)溶解於 11.3 mL 50 mM 磷酸鹽緩衝液，pH 6.0 (緩衝液 A)中。接著將 94 mg 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺加入反應混合物。接著在 RT 下振盪 5 h 之後，使混合物經受使用 Fractogel EMD DEAE 650-M 層析凝膠(管柱尺寸：XK16/105)之弱陰離子交換層析步驟。反應混合物用 50 mL 緩衝液 A 稀釋並且以 1 cm/min 之流速裝載至用緩衝液 A 預平衡之 DEAE 管柱上。接著用 20 CV 緩衝液 B (20 mM Hepes，pH 6.0)以 2 cm/min 之流速洗滌管柱以移除游離的 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺及氰化物。用由 67%緩衝液 B 及 43%緩衝液 C (20 mM Hepes，1 M NaCl，pH 7.5)組成之不連續梯度溶

離胺氧基-PSA 試劑。將溶離物使用由聚醚碸製成之 5 kD 膜(50 cm^2，Millipore)藉由 UF/DF 來濃縮。最終滲濾步驟相對於緩衝液 D (20 mM Hepes，90 mM NaCl，pH 7.4)執行。製劑藉由量測總 PSA (間苯二酚檢測)及總胺氧基(TNBS 檢測)以確定修飾度來加以分析表徵。此外，測定多分散性以及游離 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺。

實例 8

在親核催化劑間甲苯胺存在下在無還原步驟下胺氧基-PSA 之製備

【0120】 將自 Serum Institute of India (Pune, India)獲得之 573 mg 經氧化 PSA (MW=20 kD)溶解於 9 mL 50 mM 磷酸鹽緩衝液，pH 6.0 (緩衝液 A)中。接著將 94 mg 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺加入此溶液中。隨後將 2.3 mL 50 mM 間甲苯胺儲備溶液添加至此反應混合物中。接著在 RT 下振盪 2 h 之後，使混合物經受使用 Fractogel EMD DEAE 650-M 層析凝膠(管柱尺寸：XK16/105)之弱陰離子交換層析步驟。反應混合物用 50 mL 緩衝液 A 稀釋並且以 1 cm/min 之流速裝載至用緩衝液 A 預平衡之 DEAE 管柱上。接著用 20 CV 緩衝液 B (20 mM Hepes，pH 6.0)以 2 cm/min 之流速洗滌管柱以移除游離 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺及氰化物。用由 67%緩衝液 B 及 43%緩衝液 C (20 mM Hepes，1 M NaCl，pH 7.5)組成之不連續梯度溶離胺氧基-PSA 試劑。將溶離物使用由聚醚碸製成之 5 kD 膜(50 cm^2，Millipore)藉由 UF/DF 來濃縮。最終滲濾步驟相對於緩衝液 D (20 mM Hepes，90 mM NaCl，pH 7.4)執行。製劑藉由量測總 PSA (間苯二酚檢測)及總胺氧基(TNBS 檢測)以測定修飾度來加以分析表徵。此外，測定多分散性以及游離 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺。

實例 9

胺氧基-PSA 試劑之製備

【0121】 根據實例 4-8 製備胺氧基-PSA 試劑。滲濾之後，將產物在-80℃下冷凍並且凍乾。凍乾之後，將試劑溶解於合適體積之水中並且用於經由碳水化合物修飾來製備 PSA-蛋白質偶聯物。

實例 10

使用胺氧基-PSA 及間甲苯胺作為親核催化劑的 rFVIII 之聚唾液酸化

方法 1：

【0122】 將 50 mg rFVIII 轉移至反應緩衝液(50 mM Hepes、350 mM 氯化鈉、5 mM 氯化鈣，pH 6.0)中並稀釋以獲得 1 mg/mL 之蛋白質濃度。向此溶液中添加 $NaIO_4$ 以獲得 200 μM 之最終濃度。在黑暗中，在輕柔振盪下，在室溫下進行氧化 30 min。接著在 RT 下用半胱胺酸(最終濃度：10 mM)淬滅反應持續 60 min。使溶液經受用緩衝液 A (20 mM Hepes、5 mM $CaCl_2$，pH 7.0)平衡的具有 20 mL 體積之 IEX 管柱(Merck EMD TMAE (M))。用 5 CV 緩衝液 A 平衡管柱。接著用緩衝液 B (20 mM Hepes、5 mM $CaCl_2$、1M NaCl，pH 7.0)溶離經氧化之 rFVIII。收集含有 rFVIII 之溶離份。測定(Coomassie, Bradford)蛋白質含量並且用反應緩衝液調節至 1 mg/mL 並藉由逐滴添加 0.5 M HCl 調節至 pH 6.0。接著添加 50 倍莫耳過量之具有 20 kD 之 MW (如上所述)的胺氧基-PSA 試劑，隨後添加間甲苯胺作為親核催化劑(最終濃度：10 mM)。在室溫下，在輕柔振盪下，在黑暗中進行偶合反應 2 小時。藉助於 HIC 移除過量的胺氧基-PSA 試劑。藉由添加含有乙酸銨(50 mM Hepes、350 mM 氯化鈉、5 mM 氯化鈣、8 M 乙酸銨，pH 6.9)之緩衝液使反應混合物之電導率升至 130 mS/cm 並且裝載至用 80 mL 苯基瓊脂糖 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)填充之管柱上，該管柱係用 50 mM Hepes、2.5 M 乙酸銨、350 mM 氯化鈉、5 mM 氯化鈣，pH 6.9 預平衡。隨後，用 50 mM 含有 5 mM $CaCl_2$ 之 Hepes 緩衝液(pH 7.5)溶離偶聯物。最終，收集含有 PSA-rFVIII 之溶離份並且藉由使用由再生纖維素製成之 30 kD 膜(88 cm^2，Millipore)經受 UF/DF。製劑藉由量測總蛋白(Coomassie, Bradford)及 FVIII 發色活性加以分析表徵。與天然 rFVIII 相比，PSA-rFVIII 偶聯物顯示>70% 之比活性。

方法 2：

【0123】 將 58 mg 在 Hepes 緩衝液(50 mM HEPES、～350 mM 氯化鈉、5 mM 氯化鈣、0.1%聚山梨醇酯 80，pH 7.4)中之重組因子 VIII (rFVIII)溶於反應緩衝液(50 mM Hepes、350 mM 氯化鈉、5 mM 氯化鈣，pH 6.0)中以得到 1.0 +/- 0.25 mg/mL 之最終蛋白質濃度。接著藉由逐滴添加 0.5 N HCl 水溶液將溶液之 pH 校正至 6.0。隨後，在 10 分鐘內添加 40 mM 過碘酸鈉

水溶液以得到 200 μM 之濃度。在 T= +22 +/- 2℃之溫度(T)下進行氧化反應 30 +/- 5 min。接著在 T= +22 +/- 2℃下在 15 分鐘內藉由添加 L-半胱胺酸水溶液(1 M)以得到反應混合物中 10 mM 之最終濃度且培育 60+/-5 min 來終止反應。

【0124】 經氧化之 rFVIII 藉由 EMD TMAE (M)(Merck)上之陰離子交換層析進一步純化。用緩衝液 A (20 mM Hepes、5 mM $CaCl_2$，pH 6.5)稀釋混合物以得到 5 ms/cm 之電導率。使用 1.5 cm/min 之流速將此溶液裝載到具有 10 mL 之管柱體積的 IEX 管柱(床高：5.4 cm)上。隨後用 5 CV 的緩衝液 A 與緩衝液 B (20 mM Hepes、5 mM $CaCl_2$、1.0 M NaCl，pH 7.0)之 92:8 混合物(w/w)洗滌(流速：1.5 cm/min)此管柱。接著用緩衝液 A 與緩衝液 B 之 50:50 (w/w)混合物溶離經氧化之 rFVIII，繼之以 5 CV 之緩衝液 B 的溶離後步驟。藉由使用 1.0 cm/min 之流速進行溶離步驟。

【0125】 隨後，在 15 分鐘之最長時間(t)內在輕柔攪拌下將 50 倍莫耳過量之胺氧基-聚唾液酸(PSA-ONH_2)試劑添加至含有經純化之氧化 rFVIII 的溶離物。接著在 15 分鐘內添加間甲苯胺水溶液(50 mM)以得到 10 mM 之最終濃度。在輕柔振盪下，在 T= +22 +/- 2℃之溫度(T)下，在黑暗中培育反應混合物 120 +/- 10 min。

【0126】 所獲得的 PSA-rFVIII 偶聯物使用苯基瓊脂糖 FF 低 sub 樹脂(GE Healthcare)藉由疏水性相互作用層析(HIC)純化，將該樹脂裝填至由 GE Healthcare 製造之管柱中，其中床高(h)為 15 cm 且所得管柱體積(CV)為 81 mL。

【0127】 藉由添加 50 mM 含有 350 mM 氯化鈉、8 M 乙酸銨、5 mM 氯化鈣(pH 6.9)之 Hepes 緩衝液，向反應混合物中摻加乙酸銨。將兩體積之反應混合物與 1 體積的含有乙酸銨之緩衝系統混合並且藉由逐滴添加 0.5 N NaOH 水溶液將 pH 值校正至 pH 6.9。將此混合物以 1 cm/min 之流速裝載至 HIC 管柱上，繼之以使用>3 CV 平衡緩衝液(50 mM Hepes、350 mM 氯化鈉、2.5 M 乙酸銨、5 mM 氯化鈣，pH 6.9)之洗滌步驟。

【0128】 對於反應副產物及抗離液鹽之移除而言，用>5 CV 洗滌緩衝液 1 (50 mM Hepes、3 M 氯化鈉、5 mM 氯化鈣，pH 6.9)以 2 cm/min 之流

速在上向流模式下進行第二洗滌步驟。接著，使用 40%洗滌緩衝液 2 (50 mM Hepes、1.5 M 氯化鈉、5 mM 氯化鈣，pH 6.9)及 60%溶離緩衝液(20 mM Hepes、5 mM 氯化鈣，pH 7.5)之不連續梯度，以 1 cm/min 之流速在下向流模式下進行經純化之 PSA-rFVIII 偶聯物之溶離。在 UV 280 nm 下監測 PSA-rFVIII 偶聯物之溶離並且在< 4 CV 內收集含有偶聯物之溶離物。在相同條件下用>3 CV 溶離緩衝液進行溶離後步驟以將少量及/或未經修飾之 rFVIII 自主要產物中分離。

【0129】 最終，使用由再生纖維素製成的具有分子量截止 30 kD 之膜 (88 cm^2，Millipore)，藉由超濾/滲濾(UF/DF)濃縮經純化之偶聯物。

【0130】 藉由使用此程序製備的偶聯物藉由量測總蛋白、FVIII 發色活性加以分析表徵並且藉由量測 PSA 含量(間苯二酚檢測)測定聚唾液酸程度。對於所獲得的偶聯物，計算比活性>50%且 PSA 程度>5.0。

方法 3：

【0131】 將 50 mg rFVIII 轉移至反應緩衝液(50 mM Hepes、350 mM 氯化鈉、5 mM 氯化鈣，pH 6.0)中並稀釋以獲得 1 mg/mL 之蛋白質濃度。添加 50 倍莫耳過量之具有 20 kD 之 MW (如上所述)的胺氧基-PSA 試劑，隨後添加間甲苯胺作為親核催化劑(最終濃度：10 mM)及 $NaIO_4$(最終濃度：400 μM)。在室溫下，在輕柔振盪下，在黑暗中進行偶合反應 2 小時。隨後，在 RT 下用半胱胺酸(最終濃度：10 mM)淬滅反應持續 60 min。接著藉由添加含有乙酸銨(50 mM Hepes、350 mM 氯化鈉、5 mM 氯化鈣、8 M 乙酸銨，pH 6.9)之緩衝液使反應混合物之電導率升至 130 mS/cm 並且裝載至用 80 mL 苯基瓊脂糖 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT)填充之管柱上，該管柱係用 50 mM Hepes、2.5 M 乙酸銨、350 mM 氯化鈉、5 mM 氯化鈣、0.01 % Tween 80，pH 6.9 預平衡。隨後，用 50 mM Hepes、5 mM 氯化鈣，pH 7.5 溶離偶聯物。最終，收集含有 PSA-rFVIII 之溶離份並且藉由使用由再生纖維素製成之 30 kD 膜(88 cm^2,Millipore)經受 UF/DF。製劑藉由量測總蛋白(Bradford)及 FVIII 發色活性加以分析表徵。與天然 rFVIII 相比，PSA-rFVIII 偶聯物顯示≥70%之比活性。

方法 4：

【0132】 將 50 mg 在 50 mM Hepes 緩衝液(50 mM HEPES、～350 mM 氯化鈉、5 mM 氯化鈣、0.1%聚山梨醇酯 80，pH 7.4)中之重組因子 VIII (rFVIII)溶於反應緩衝液(50 mM Hepes、350 mM 氯化鈉、5 mM 氯化鈣，pH 6.0)中以得到 1.0 +/- 0.25 mg/mL 之最終蛋白質濃度。接著藉由逐滴添加 0.5 N HCl 水溶液將溶液之 pH 校正至 6.0。

【0133】 隨後，在 15 分鐘之最長時間(t)內在輕柔攪拌下將 50 倍莫耳過量之胺氧基-聚唾液酸(PSA-ONH_2)試劑添加至此 rFVIII 溶液中。接著在 15 分鐘內添加間甲苯胺水溶液(50 mM)以得到 10 mM 之最終濃度。最終，添加 40 mM 高碘酸鈉水溶液以得到 400 μM 之濃度。

【0134】 在輕柔振盪下，在 T= +22 +/- 2℃之溫度(T)下，在黑暗中培育反應混合物 120 +/- 10 min。接著藉由添加 L-半胱胺酸水溶液(1 M)以得到反應混合物中 10 mM 之最終濃度且培育 60+/- 5 min 來終止反應。

【0135】 所獲得的 PSA-rFVIII 偶聯物使用苯基瓊脂糖 FF 低 sub 樹脂(GE Healthcare)藉由疏水性相互作用層析(HIC)純化，將該樹脂裝填至由 GE Healthcare 製造之管柱中，其中床高(h)為 15 cm 且所得管柱體積(CV)為 81 mL。

【0136】 藉由添加 50 mM 含有 350 mM 氯化鈉、8 M 乙酸銨、5 mM 氯化鈣(pH 6.9)之 Hepes 緩衝液，向反應混合物中摻加乙酸銨。將兩體積之反應混合物與 1 體積的含有乙酸銨之緩衝系統混合並且藉由逐滴添加 0.5 N NaOH 水溶液將 pH 值校正至 pH 6.9。將此混合物以 1 cm/min 之流速裝載至 HIC 管柱上，繼之以使用>3 CV 平衡緩衝液(50 mM Hepes、350 mM 氯化鈉、2.5 M 乙酸銨、5 mM 氯化鈣，pH 6.9)之洗滌步驟。

【0137】 對於反應副產物及抗離液鹽之移除而言，用>5 CV 洗滌緩衝液 1 (50 mM Hepes、3 M 氯化鈉、5 mM 氯化鈣，pH 6.9)以 2 cm/min 之流速在上向流模式下進行第二洗滌步驟。接著，使用 40%洗滌緩衝液 2 (50 mM Hepes、1.5 M 氯化鈉、5 mM 氯化鈣，pH 6.9)及 60%溶離緩衝液(20 mM Hepes、5 mM 氯化鈣，pH 7.5)之不連續梯度，以 1 cm/min 之流速在下向流模式下進行經純化之 rFVIII 偶聯物之溶離。在 UV 280 nm 下監測 PSA-rFVIII 偶聯物之溶離並且在< 4 CV 內收集含有偶聯物之溶離物。在相同條件下用

>3 CV 溶離緩衝液進行溶離後步驟以將少量及/或未經修飾之 rFVIII 自主要產物中分離。

【0138】 最終，使用由再生纖維素製成的具有分子量截止 30 kD 之膜(88 cm^2，Millipore)，藉由超濾/滲濾(UF/DF)濃縮經純化之偶聯物。

【0139】 藉由使用此程序製備的偶聯物藉由量測總蛋白、FVIII 發色活性加以分析表徵並且藉由量測 PSA 含量(間苯二酚檢測)測定聚唾液酸程度。

分析數據(6 個連續批料之平均值)：

過程產率(Bradford)：58.9%

過程產率(FVIII 發色)：46.4%

比活性：(FVIII 發色/mg 蛋白質)：4148 IU/mg

比活性(起始材料之%)：79.9%

PSA 程度(mol/mol)：8.1

實例 11

二胺氧基連接物與天然 PSA 之偶合

【0140】 此實例描述使用天然 PSA (亦即，無先前氧化)製備胺氧基-PSA 試劑之程序，其可用於治療蛋白質之化學修飾。

a) 在周圍溫度下之偶合

【0141】 將自 Serum Institute of India (Pune, India)獲得之 52.2 mg 天然 PSA (MW=20 kD)溶解於 1.05 mL 50 mM 磷酸鹽緩衝液，pH 6.0 中。接著將 10.3 mg 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺(連接分子)逐滴添加至反應混合物中。在黑暗中，在輕柔攪拌下在室溫下培育反應 2 h。

b) 在升高溫度下之偶合

【0142】 將自 Serum Institute of India (Pune, India)獲得之 52.2 mg 天然 PSA (MW=20 kD)溶解於 1.05 mL 50 mM 磷酸鹽緩衝液，pH 6.0 中。接著將 10.3 mg 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺(連接分子)逐滴添加至反應混合物中。在黑暗中，在輕柔攪拌下在室溫下培育反應 2 h。接著使溫度增至 32-37 ℃並且再培育反應混合物 14 h。

c) 在升高溫度及增加的連接物過量下之偶合

【0143】 將自 Serum Institute of India (Pune, India)獲得之 52.2 mg 天然 PSA (MW=20 kD)溶解於 1.05 mL 50 mM 磷酸鹽緩衝液，pH 6.0 中。接著將 10.3 mg 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺(連接分子)逐滴添加至反應混合物中。在黑暗中，在輕柔攪拌下在室溫下培育反應 2 h。接著將 26.3 mg 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺逐滴添加至反應中，使溫度增至 32-37℃並且再培育反應混合物 14 h。

d) PSA 衍生物之純化

【0144】 培育完成之後，在點 a-c 處產生的反應混合物藉由廣泛透析加以純化。因此，將反應混合物之樣品裝載至 Slide-A-Lyzer 透析盒(0-5-3 mL，MWCO 3.5kD, reg. cellulose, Pierce)中並且根據以下模式針對 10 mM 磷酸鹽緩衝液 pH 8.0 加以透析：

在室溫下 500 mL 緩衝液 2 h

在室溫下 500 mL 緩衝液 2 h

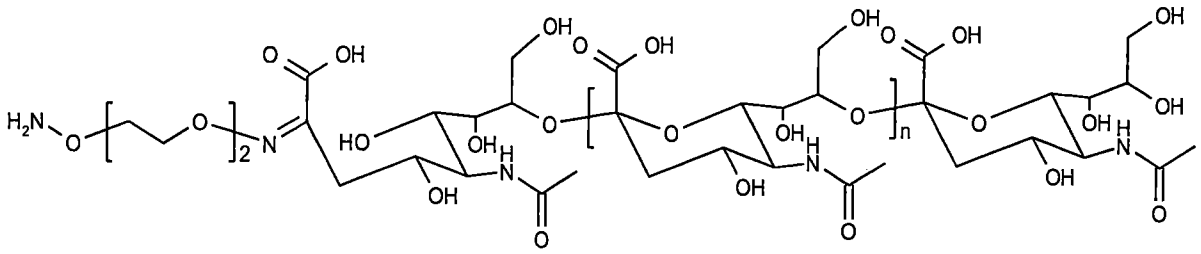
在 4℃下 500 mL 緩衝液 12 h

為了濃縮至初始樣品體積，在室溫下用 50 mL 『Slide-A-Lyzer Concentrating Solution for Dialysis』 1 h。

【0145】 因此，準備將經純化之胺氧基-PSA 用於根據例如以上實例 11、12、14 及 17-31 之蛋白質偶聯反應。同樣，本文項之任何水溶性聚合物均可如此實例中所述偶合至胺氧基連接物，且接著如以上實例中所述偶聯至蛋白質上。

【0146】 製劑藉由量測總 PSA (間苯二酚檢測)及總胺氧基(TNBS 檢測)以確定修飾度來加以分析表徵。對於製劑(a)，經測定修飾度(MD)為 0.35，對於(b)，MD = 0.54 且對於(c)，MD = 0.58。此外，量測多分散性以及游離 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺。對於所有制劑，多分散性均低於 1.15 且游離連接物之含量低於 0.15 莫耳%之 PSA 濃度。

【0147】 對於在還原端處經修飾之 PSA，藉由 ^{13}C NMR 光譜法確定以下結構。



實例 12

採用層析純化步驟在 4℃下胺氧基-PSA 之製備

【0148】 在詳細分析表徵室溫下製備的胺氧基-PSA 試劑期間，NMR 研究(參見，例如美國臨時申請案第 61/647,814 號，其以引用的方式全部併入本文中)揭示用二胺氧基連接物的經氧化之 PSA 之衍生化係由兩個不同反應組成：在 PSA 之非還原端處醛基之快反應及在 PSA 之還原端處醛基(以半縮酮形式)之慢反應。後一反應可被視為對於試劑生產而言有待避免的不期望之副反應。

【0149】 因此，已如本實例中所述優化製備胺氧基-PSA 試劑之過程。若該過程在室溫下進行，則還原端僅發生至顯著程度。因此，過程經調整並且在 2-8℃下進行。藉由在 2-8℃下進行全過程(化學反應及藉由 IEX 的 PSA 試劑之純化)，在 PSA 之還原端處的副反應實質上得以減少。此過程變化由此產生具有較高品質之試劑。

程序

【0150】 將自 Serum Institute of India (Pune, India)獲得之 1290 mg 經氧化 PSA (MW=20 kD)溶解於 25 mL 50 mM 磷酸鹽緩衝液，pH 6.0 (緩衝液 A)中。接著將 209 mg 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺添加至反應混合物中並且在黑暗中，在輕柔攪動下在 2-8℃下培育 1 小時。

【0151】 在培育以後，混合物經受採用 Fractogel EMD DEAE 650-M 層析凝膠(管柱尺寸：XK26/135)之弱陰離子交換層析步驟，在 2-8℃之溫度下在低溫室中進行。反應混合物用預冷卻之緩衝液 A (110 mL)稀釋並且以 1 cm/min 之流速裝載至用緩衝液 A 預平衡之 DEAE 管柱上。接著用 20 CV 緩衝液 B (20 mM Hepes，pH 6.0)以 2 cm/min 之流速洗滌管柱以移除游離的 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺。將胺氧基-PSA 試劑以由 67%緩衝液 B 及 43%緩衝液 C (20 mM Hepes，1 M NaCl，pH 7.5)組成之不連續梯度溶離。將溶離

物使用由聚醚碸製成之 5 kD 膜(50 cm2，Millipore)藉由 UF/DF 來濃縮。製劑藉由量測總 PSA (間苯二酚檢測)及總胺氧基(TNBS 檢測)以確定修飾度來加以分析表徵。最終製劑中之 PSA 濃度為 46.0 mg/mL 且修飾度為 83.5%。此外，經測定多分散性值為 1.131。另外，經量測游離的 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺之濃度為 0.22 μg/mL (0.07 mol %之 PSA)。

【0152】 因此，準備將經純化之胺氧基-PSA 用於根據例如以上實例 11、12、14 及 17-31 之偶聯反應中。

實例 13

聚唾液酸化 rFVIII 之合成(大規模)

【0153】 根據實例 9 中概述之方法(稍微加以修改)以大規模聚唾液酸化 rFVIII。出於此目的，將 1.5 g rFVIII 在如項之 Hepes 緩衝液(50 mM Hepes、350 mM 氯化鈉、5 mM 氯化鈣，pH 6.0)中聚唾液酸化(蛋白質濃度：1.1 mg/mL/藉由螢光檢測所測定)。接著使用苯基瓊脂糖 FF 低 sub 樹脂(GE Healthcare)藉由疏水性相互作用層析純化產物。接著，使用由再生纖維素製成的具有分子量截止 30 kD 之膜，藉由超濾/滲濾(UF/DF)濃縮溶離物。隨後將濃縮物施加於尺寸排阻層析管柱(Superose 6 製備級/GE Healthcare)上。此程序係用作最終精製步驟以將潛在雜質自產物中分離。最終，再次藉由 UF/DF (再生纖維素/分子量截止 30 kD)濃縮經純化之偶聯物(「PSA-rFVIII」)。使用此方法，在 GMP 條件下製備 BDS 以製造用於臨床 I 期研究之材料：批次 D、批次 E 及批次 F。

實例 14

藉由表面電漿共振(SPR)的 VWF-FVIII 結合親和力之測定

【0154】 如下使用 Biacore 儀器(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)分析 VWF-FVIII 結合親和力。

【0155】 在 CM5 生物傳感器晶片之流通槽上以三個密度固定源自血漿之 VWF (pdVWF，Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France)。用電泳緩衝液(10 mM Hepes、150 mM NaCl、0.05%表面活性劑 P20，pH 7.4)將研究性 FVIII 樣品稀釋成一系列五種稀釋液(0.18 至 5 nM FVIII，根據給定之蛋白質值)，接著使用「單循環」模式以 50 μL/min 之恆定流速施加於晶片。

締合時間為 4 min 且解離時間為 10 min。在每次循環之後，自晶片(「再生」)中移除 FVIII 並且用新的 FVIII 樣品重複實驗。使用『Bioevaluation』程序之朗繆爾模型測定締合及解離常數。測定以下動力學參數：締合速率常數 ka、解離速率常數 kd 及平衡解離常數 KD。亦藉由評估 Rmax (飽和時的最大結合計算值)測定結合。由三個不同 VWF 固定水準之平均值計算動力學結果。

【0156】 Biacore 技術用於測定 VWF 與 FVIII 之間的複合體形成之動力學。出於此目的，將源自血漿之 VWF 以三個不同水準固定於傳感器晶片表面上並且將研究性 PSA-rFVIII 及 rFVIII 重新緩衝至以上實例 13 中項之緩衝液中(「重新緩衝之 FVIII」)。在單循環模式下以五個不同濃度注射樣品。使用 Biacore T200 設備之「Bioevaluation」程序的朗繆爾模型測定締合及解離常數，假定固定化之 VWF 與 FVIII 之間有均相 1:1 相互作用。

【0157】 表 1 概括了描述 VWF-FVIII 相互作用之動力學參數，其中 ka 為締合速率常數，kd 為解離速率常數且 KD 為平衡解離常數(=kd/ka)。為了進一步評價及數據比較，計算不同樣品組之平均值及 3 SD 用於 KD。

表 1.

VWF-FVIII 結合之動力學參數

說明		批號	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
PSA-rFVIII BDS	臨床前	批次 A	4.42E+06	8.49E-04	0.26
		批次 B	3.10E+06	8.46E-04	0.33
		批次 C	3.42E+06	6.76E-04	0.24
				平均值	**0.28**
				3 SD	**0.15**
	GMP 臨床 1 期	批次 D	2.11E+06	5.74E-04	0.28
		批次 E	3.06E+06	7.24E-04	0.24
		批次 F	2.91E+06	9.25E-04	0.33
				平均值	**0.28**
				3 SD	**0.15**
PSA-rFVIII FDP	臨床前	批次 G	2.93E+06	9.77E-04	0.39
		批次 H	3.45E+06	7.33E-04	0.27
		批次 I	2.73E+06	6.64E-04	0.26
				平均值	**0.31**

				3 SD	**0.21**
	GMP 臨床 1 期	批次 J	2.97E+06	8.51E-04	0.37
PSA-rFVIII 之重新緩衝之 rFVIII	**臨床前**	批次 K	3.28E+06	7.22E-04	0.26
		批次 L	2.49E+06	6.34E-04	0.29
	GMP 臨床 1 期	批次 M	2.25E+06	8.02E-04	0.37
		批次 N	2.28E+06	7.39E-04	0.34
				平均值	**0.32**
				3 SD	**0.15**

【0158】 相互作用動力學在臨床前 BDS 批次(平均 KD 0.28 nM)與臨床 1 期 BDS 批次(平均 KD 0.28 nM)之間，及臨床前 FDP 批次(平均 KD 0.31 nM)與臨床 1 期 FDP 批次(KD 0.37 nM)之間係相似的。對於重新緩衝之 rFVIII，KD 值在 0.26 與 0.37 nM 範圍內且因此與 PSA-rFVIII 相當。

【0159】 圖 1 展示表示為 Rmax 之結合信號，其為飽和時的最大結合計算值，對於在傳感器晶片固定之 VWF 的三個不同密度下的 PSA-rFVIII 組及重新緩衝之 rFVIII 而言。PSA-rFVIII 及重新緩衝之 rFVIII 均顯示 VWF 濃度依賴性相互作用，在 PSA-rFVIII 臨床前與臨床期 BDS 及 FDP 批次之間無相關差異。與重新緩衝之 rFVIII 相比，PSA-rFVIII 之結合明顯減少了大約 50%。此被視為 rFVIII 之 PSA 修飾之結果，由此產生 rFVIII 偶聯物，其中由 PSA 遮蔽用於 VWF 之特異性結合表位。

【0160】 有趣且不同於與重新緩衝之 rFVIII 相比在 PSA-rFVIII 下觀察到的上述結合性質的是，PEG-rFVIII (聚乙二醇化 rFVIII 蛋白)亦顯示減少的與 VWF 之結合，但不如 PSA-rFVIII 明顯。

實例 15

藉由表面電漿共振(SPR)的 FVIII-LRP1 受體相互作用之測定

【0161】 根據製造商說明書將 LRP1 (α2-巨球蛋白受體/CD91)受體(BioMac, Leipzig, Germany)固定於 Biacore 儀器(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)之 CM4 傳感器晶片的流通槽上。接著使用「kinject」模式將研究性 FVIII 樣品之一系列稀釋液(21 至 357 nM，根據給定之蛋白質值)施加於晶片，允許 FVIII 之締合 10 min 且解離 5 min。在每次循環之後，自晶片(「再

生」)中移除 FVIII 並且用新的 FVIII 樣品重複實驗。使用『Bioevaluation』程序之朗繆爾模型測定締合及解離常數，假定均相 1:1 相互作用。測定以下動力學參數：締合速率常數 ka、解離速率常數 kd 及平衡解離常數 KD。在締合期之後亦藉由測定信號(反應單位)評價結合。由三個不同流通槽之平均值計算動力學結果。

【0162】 使用如上項之 Biacore 技術測定 PSA-rFVIII 對清除受體 LRP1 之結合親和力。在樣品之稀釋系列中測試結合，自 10 稀釋至 100 μg/mL (對應於 21 至 357 nM)。因此對於 PSA-rFVIII BDS 批次及重新緩衝之 rFVIII 而言分析為可能的，但對於 FDP 批次則不可能，此係由於此等樣品之低蛋白質濃度。測定以下參數：ka 為締合速率常數，kd 為解離速率常數且 KD 為平衡解離常數(=kd/ka)。為了進一步評價及數據比較，計算不同樣品組之平均值及 3 SD 用於 KD。

【0163】 表 2 概括了 PSA-rFVIII 臨床前及臨床 1 期 BDS 及重新緩衝之 rFVIII 與 LRP1 受體之間的相互作用之動力學參數。相互作用動力學在臨床前(平均 KD)與臨床 1 期 BDS 批次(平均 KD)之間係相似的。此外，結合動力學在 PSA-rFVIII 與重新緩衝之 rFVIII 之間係相似的。由於一般表面電漿共振檢測及動力學結合參數評價的較高變異性，所以在若干樣品之間 KD 之變化不被視為生物學相關的並且概括證實了 PSA-rFVIII 臨床前與臨床 1 期批次具有相似性質。

表 2.

LRP1-FVIII 結合之動力學參數

說明		批號	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
PSA-rFVIII BDS	臨床前	批次 A	2.45E+04	3.09E-04	12.6
		批次 B	4.70E+03	1.24E-04	26.4
		批次 C	2.08E+04	3.76E-04	18.1
				平均值	**19.0**
				3 SD	**20.7**
	GMP 臨床 1 期	批次 D	4.57E+03	1.32E-04	28.9
		批次 E	1.27E+04	3.32E-04	26.0
		批次 F	4.53E+03	1.86E-04	41.0
				平均值	**32.0**

				3 SD	24.0
說明		批號	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
PSA-rFVIII 之重新緩衝之 rFVIII	臨床前	批次 K	1.70E+04	4.76E-04	28.0
		批次 L	3.73E+04	8.80E-04	23.6
	GMP 臨床 1 期	批次 M	2.09E+04	3.95E-04	18.9
		批次 N	2.92E+04	5.43E-04	18.6
				平均值	22.3
				3 SD	13.5

【0164】 圖 2 示出了 PSA-rFVIII 及重新緩衝之 rFVIII 對 LRP1 的 FVIII 蛋白濃度依賴性結合。將 FVIII 蛋白濃度針對結合信號(表示為反應單位)繪圖。PSA-rFVIII 及重新緩衝之 rFVIII 均顯示 FVIII 濃度依賴性相互作用，在 PSA-rFVIII 之臨床前與臨床 1 期 BDS 批次之間無相關差異。與重新緩衝之 rFVIII 相比，PSA-rFVIII 之結合明顯減少。此被視為 rFVIII 之 PSA 修飾之結果，由此產生 rFVIII 偶聯物，其中由 PSA 遮蔽用於 LRP1 之特異性結合表位。

【0165】 有趣地，比較 rFVIII 之結合活性，PEG-rFVIII 及 PSA-rFVIII 顯示 rFVIII 強結合 LRP1，PEG-rFVIII 呈現與 LRP1 之殘餘締合，且 PEG-rFVIII 實際上不能與 LRP1 締合(圖 3)。

實例 16

FIXa 輔因子活性之測定

【0166】 使用 FIXa 輔因子活性檢測活體外評價 PSA-rFVIII 之 tenase 複合體內的 FVIII 之 FIXa 輔因子活性。此檢測提供對 FXa 產生之動力學性質的詳細理解。根據其給定效力將樣品稀釋至 1.0 IU/mL 之 FVIII 活性並且量測凝血酶活化之後的 FXa 產生時程。

【0167】 圖 4 示出了在藉由凝血酶活化 FVIII 之後 FXa 隨時間之產生。所有 PSA-rFVIII 及重新緩衝之 rFVIII 批次均顯示時間依賴性 FXa 產生，僅在批次之間有較小差異(圖 4，圖 A-D)。組平均值(圖 4，圖 E)之比較證實了 PSA-rFVIII 臨床前及臨床 1 期 BDS 與 FDP 批次具有相似性質。在重新緩衝之 rFVIII 與 PSA-rFVIII 之間觀察到 FXa 產生曲線中之一些差異(圖 4，圖 E)，例如，重新緩衝之 rFVIII 顯示稍微較少的最大 FXa 產生。

【0168】 為了在定量基礎上評價各個樣品組之間的可比性，藉由測定曲線之線性部分的斜率來計算 FX 活化之最大速率。結果展示於表 3 中。對於直接比較而言，評價個別批次之間的相對差異及臨床前 BDS 或 FDP 批次之算術平均值(表 4)。個別臨床 1 期 BDS 批次與臨床前 BDS 批次之平均值之間的相對差異≤11%，證實了兩個樣品組之可比性。臨床 1 期 PSA-rFVIII FDP 與臨床前 FDP 之平均值之間的差異≤11%，再次證明了其相似的特徵。各個 PSA-rFVIII 組與重新緩衝之 rFVIII 之平均值的相對比較展示於表 5 中。差異≤6%，由此證明 PSA-rFVIII 與重新緩衝之 rFVIII 具有相似的 FXa 產生動力學性質。

表 3.

FVIII 之凝血酶預活化之後的 FXa 產生參數

用法		批號	最大速率(nM/min)
PSA-rFVIII BDS	**臨床前**	批次 A	9.58
		批次 B	10.10
		批次 C	10.92
		平均值	**10.20**
		3 SD	**2.04**
	GMP 臨床 1 期	批次 D	9.52
		批次 E	9.14
		批次 F	9.05
		平均值	**9.24**
		3 SD	**0.75**
PSA-rFVIII FDP	**臨床前**	批次 G	8.95
		批次 H	11.15
		批次 I	10.90
		平均值	**10.33**
		3 SD	**3.60**
	GMP 臨床 1 期	批次 J	9.19
PSA-rFVIII 之重新緩衝之 rFVIII	**臨床前**	批次 K	9.01
		批次 L	8.67
	GMP 臨床 1 期	批次 M	9.88
		批次 N	11.35

		平均值	9.73
		3 SD	3.60

表 4.

FXa 產生參數：臨床前 PSA-rFVIII BDS 與 FDP 批次之平均值的相對差異

用法		批號	最大速率(%)
PSA-rFVIII BDS	臨床前	平均值	= 100
	GMP 臨床 1 期	批次 D	93
		批次 E	90
		批次 F	89
PSA-rFVIII FDP	臨床前	平均值	= 100
	GMP 臨床 1 期	批次 J	89

表 5.

FXa 產生參數：在 PSA-rFVIII 組與重新緩衝之 rFVIII 之間的相對差異

用法	最大速率 (%)
重新緩衝之 rFVIII (平均值，n=4)	= 100
PSA-rFVIII BDS 臨床前(平均值，n=3)	105
PSA-rFVIII FDP 臨床前(平均值，n=3)	106
PSA-rFVIII BDS GMP 臨床 1 期 (平均值，n=3)	95
PSA-rFVIII FDP GMP 臨床 1 期(n=1)	94

實例 17

凝血酶產生檢測(TGA)

【0169】 TGA 為一種研究在類似 A 型血友病患者之情況的環境中的凝血酶產生之特定方法。含有<1%之 FVIII 的缺乏 FVIII 之人類血漿補充有增加量之 PSA-rFVIII (0.01 至 1 IU/mL，基於其給定效力)。藉由添加少量與磷脂微胞複合之重組人類組織因子至血漿中以模擬小血管壁損傷來開始反應。

【0170】 藉由比較曲線之峰值凝血酶的濃度依賴性增加來評價凝血酶產生(圖 5)。PSA-rFVIII 及重新緩衝之 rFVIII 均在峰值凝血酶中顯示 FVIII 濃度依賴性增加，僅在個別批次之間有極小變異(圖 5，圖 A 至 D)。組平均值(圖 5，圖 E)之比較證實了 PSA-rFVIII 臨床前及臨床 1 期 BDS 與 FDP 批

次具有相似性質。在重新緩衝之 rFVIII 與 PSA-rFVIII 之間觀察到峰值凝血酶產生之差異(圖 5，圖 E)。

【0171】 為了更全面評價，進行定量比較。表 6 概括了在所測試的不同 FVIII 濃度下量測之凝血酶峰值。藉由計算每個凝血酶峰值之曲線下面積(AUC)比較地分析樣品。此外，計算個別 PSA-rFVIII 臨床 1 期 BDS/FDP 批次之凝血酶峰值之 AUC 與臨床前 BDS/FDP 批次之算術平均值的相對差異。

【0172】 個別臨床 1 期 BDS 批次之值與臨床前 BDS 批次之平均值的相對差異≤9%，證實了兩個樣品組之間的可比性。對於臨床 1 期 FDP，臨床前 FDP 之平均值的差異≤4%，再次展示了高度相似之特徵。

【0173】 峰值凝血酶產生曲線(圖 5)之評價對於重新緩衝之 rFVIII 顯示比 PSA-rFVIII 稍微較高之凝血酶產生。因為在若干 PSA-rFVIII 組之 AUC 計算值與重新緩衝之 rFVIII 之平均值中的相對差異≤14%，所以此結果被視為具有較小相關性並且同實際生理相關差異相比與固有檢測變異更相關。

【0174】 藉由測定總凝血酶產生進一步評價凝血酶產生。所研究之 PSA-rFVIII 及重新緩衝之 rFVIII BDS 之所有樣品在總凝血酶產生中均顯示相似的 FVIII 濃度依賴性增加，其中在組之間有極小差異(圖 6)。與峰值凝血酶產生相比，PSA-rFVIII 與重新緩衝之 rFVIII 之間的差異甚至更低。

表 6.

提高 FVIII 批次之能力的濃度依賴性峰值凝血酶

峰值凝血酶 (nM)								
FVIII (IU/mL)			**0**	**0.01**	**0.05**	**0.1**	**0.25**	**0.5**	**1**
PSA-rFVIII BDS	**臨床前**	批次 A	19.7	105.4	157.5	182.6	215.4	240.0	270.7
		批次 B	18.6	95.4	147.4	170.2	201.0	230.6	260.0
		批次 C	16.7	99.0	155.4	177.1	210.9	241.2	266.4
		平均值	**18.3**	**99.9**	**153.4**	**176.6**	**209.1**	**237.3**	**265.7**
		3 SD	**4.5**	**15.3**	**15.9**	**18.6**	**22.2**	**17.4**	**16.2**
	GMP 臨床 1 期	批次 D	18.3	93.8	152.9	179.8	210.3	238.0	266.4
		批次 E	18.6	91.3	137.1	166.2	196.6	223.3	248.2
		批次 F	18.0	83.8	136.4	160.7	193.3	216.0	243.0
		平均值	**18.3**	**89.6**	**142.1**	**168.9**	**200.1**	**225.8**	**252.5**
		3 SD	**0.9**	**15.6**	**27.9**	**29.4**	**27.0**	**33.6**	**36.9**

PSA-rFVIII FDP	臨床前	批次 G	20.4	102.6	154.0	173.7	201.7	238.6	270.8
		批次 H	17.9	98.9	148.7	167.0	195.8	227.5	259.3
		批次 I	16.6	103.7	158.0	175.6	208.3	239.8	267.0
		平均值	**18.3**	**101.7**	**153.6**	**172.1**	**201.9**	**235.3**	**265.7**
		3 SD	**5.7**	**7.5**	**14.1**	**13.5**	**18.9**	**20.4**	**17.7**
	GMP 臨床 1 期	批次 J	19.3	96.4	149.1	167.6	197.9	223.2	253.8
PSA-rFVIII 之重新緩衝之 rFVIII	臨床前	批次 K	18.0	119.7	169.7	191.6	230.3	250.8	281.6
		批次 L	19.6	119.5	172.0	195.6	232.7	259.6	287.6
	GMP 臨床 1 期	批次 M	19.6	121.4	175.7	202.4	239.5	271.8	299.2
		批次 N	16.3	116.3	167.7	189.3	228.0	256.7	279.0
		平均值	**18.4**	**119.2**	**171.3**	**194.7**	**232.6**	**259.7**	**286.9**
		3 SD	**4.8**	**6.3**	**10.2**	**17.1**	**15.0**	**26.4**	**27.0**

表 7.

峰值凝血酶產生能力-平均臨床前 PSA-rFVIII BDS 與 FDP 批次之相對差異

用法		批號	AUC (nM*IU/mL)	AUC (%)
PSA-rFVIII BDS	臨床前	批次 A	228.8	
		批次 B	217.7	
		批次 C	226.5	
		平均值	**224.3**	**= 100**
		3SD	**17.7**	
	GMP 臨床 1 期	批次 D	225.2	100
		批次 E	210.3	94
		批次 F	204.8	91
		平均值	**213.4**	**95**
		3SD	**31.8**	
PSA-rFVIII FDP	臨床前	批次 G	224.5	
		批次 H	215.2	
		批次 I	225.8	
		平均值	**221.8**	**= 100**
		3SD	**17.4**	
	GMP 臨床 1	批次 J	212.7	**96**

	期			
PSA-rFVIII 之重新緩衝之 rFVIII	臨床前	批次 K	240.5	
		批次 L	246.2	
	GMP 臨床 1 期	批次 M	256.0	
		批次 N	241.1	
		平均值	**246.0**	
		3SD	**21.6**	

表 8.

峰值凝血酶產生能力-在 PSA-rFVIII 組與重新緩衝之 rFVIII 之間的相對差異

用法	AUC (nM*IU/mL)	AUC (%)
重新緩衝之 rFVIII (平均值，n=4)	246.0	**=100**
PSA-rFVIII BDS 臨床前(平均值，n=3)	224.3	91
PSA-rFVIII FDP 臨床前(平均值，n=3)	221.8	90
PSA-rFVIII BDS GMP 臨床 1 期(平均值，n=3)	213.4	87
PSA-rFVIII FDP GMP 臨床 1 期(n=1)	212.7	86

實例 18

在血友病小鼠中 PSA-rFVIII、PEG-rFVIII 及 rFVIII 之藥代動力學的比較

【0175】 在 FVIII 剔除小鼠中量測 PSA-rFVIII、PEG-rFVIII 及 rFVIII 之藥代動力學。經由尾靜脈投與 200 IU FVIII/kg 體重之注射劑。在限定時間點之後處死 6 只小鼠之組並且製備枸櫞酸鈉血漿。用發色活性檢測量測血漿中之 FVIII 活性。如圖 7 及表 9 所示，聚乙二醇化及聚唾液酸化 rFVIII 與 rFVIII 相比顯示改良的 PK 參數(HL 增加～2)。在大鼠(圖 8)及獼猴(圖 9)中觀察到類似結果。(為了允許不同研究之間的比較，將數據針對 1 U/kg 之常用劑量進行歸一化)。

表 9.

批次	AUC 劑量調節的	因數	Term.HL h	因數	MRT h	因數
PSA-rFVIII	0.101	2.5	11.7	2.1	13.1	2.2
PEG-rFVIII	0.085	1.6	6.3	1.0	7.8	1.5
rFVIII	0.041-0.053	=1	5.5-6.0	=1	6.1-5.2	=1

實例 19

PSA-rFVIII 活體內功效

【0176】 在 FVIII KO 小鼠中在尾夾出血模型中量測 PSA-rFVIII 之功效。施用 200 IU FVIII 活性/kg，繼之在注射 PSA-rFVIII 之後 18-54 小時，橫斷尾尖。量測失血量，並且數據證實如由 PK 研究所期望的 PSA-rFVIII 之較長功效。PSA-rFVIII 控制出血持續大約 rFVIII 兩倍之久。

【0177】 亦在 FVIII KO 小鼠中在頸動脈閉塞模型中量測功效。施用 200 IU FVIII 活性/kg，繼之用氯化鐵誘發頸動脈病變。量測至血管閉塞之時間，並且與以上結果一致，數據證實如由 PK 研究所期望的 PSA-rFVIII 之較長功效。在 FVIII KO 小鼠中觀察到 PSA-rFVIII 比 rFVIII 大約 2 倍更長之存活。

【0178】 最終，評價血友病關節出血(關節內穿刺術)之鼠模型中 PEG-rFVIIII 及 PSA-rFVIII 之作用。用經修飾之 rFVIII (亦即 PEG-rFVIII 及 PSA-rFVIII)進行的治療在鼠模型中展示持續至少 rFVIII 的兩倍之久。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

無

申請專利範圍

1. 一種經修飾之因子 VIII (FVIII)，其包含延長 FVIII 半衰期並減少該經修飾之 FVIII 與選自由以下組成之群的配位體之結合的修飾：馮威勒布蘭德因子(VWF)及低密度脂蛋白(LDL)受體相關蛋白 1 (LRP1)。
2. 如請求項 1 之經修飾之 FVIII，其中該經修飾之 FVIII 為源自血漿的。
3. 如請求項 1 之經修飾之 FVIII，其中該經修飾之 FVIII 為重組的。
4. 如請求項 3 之經修飾之 FVIII，其中該經修飾之 FVIII 為全長 FVIII 並且包括完整的 B 結構域。
5. 如請求項 1 之經修飾之 FVIII，其中該 FVIII 以與未經修飾之 FVIII 相比較低的親和力(KD)結合至 VWF 及 LRP1。
6. 如請求項 1 之經修飾之 FVIII，其中該修飾包含聚唾液酸(PSA)。
7. 如請求項 6 之經修飾之 FVIII，其中該 PSA 具有選自由大約 20 kDa 組成之群的平均分子尺寸。
8. 如請求項 6 或 7 之經修飾之 FVIII，其中該 PSA 具有低的多分散性。
9. 如請求項 6 或 7 之經修飾之 FVIII，其中該 PSA 包含胺氧基連接物。
10. 如請求項 9 之經修飾之 FVIII，其中該胺氧基連接物連接至該經修飾之 FVIII 的經氧化之碳水化合物。
11. 一種醫藥組合物，其包含如請求項 1-10 中任一項之經修飾之 FVIII 及醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑、鹽、緩衝劑或賦形劑。
12. 如請求項 6 或 7 之經修飾之 FVIII，其中該半衰期比聚乙二醇化 FVIII 的更長。
13. 如請求項 12 之經修飾之 FVIII，其中該半衰期長約 1、2 或 3 倍。
14. 如請求項 6 或 7 之經修飾之 FVIII，其中該結合至 VWF 或 LRP1 與聚乙二醇化 FVIII 結合至 VWF 或 LRP1 相比係減少的。
15. 如請求項 11 之經修飾之 FVIII，其中該結合至 VWF 或 LRP1 與聚乙二醇化 FVIII 結合至 VWF 或 LRP1 相比減少了 0.5 倍。
16. 一種經修飾之重組 FVIII，其包含延長 FVIII 半衰期並減少該經修飾之 FVIII 與選自由 VWF 及 LRP1 組成之群的配位體之結合的修飾，其中該修飾包含具有胺氧基連接物之 PSA，且其中該胺氧基連接物連接至該經修飾之 FVIII 的經氧化之碳水化合物；

其中該經修飾之重組 FVIII 之半衰期比未經修飾之重組 FVIII 及/或聚乙二醇化重組 FVIII 的更長；並且

其中 VWF 或 LRP1 由該經修飾之重組 FVIII 的結合與 VWF 或 LRP1 由未經修飾之重組 FVIII 及/或聚乙二醇化重組 FVIII 的結合相比係減少的。

17. 如請求項 1-7 中任一項之經修飾之 FVIII，其中該經修飾之 FVIII 係投與至診斷患有與 FVIII 缺乏有關之疾病或病症的哺乳動物。

18. 一種如請求項 1-10 及 12-16 中任一項之經修飾之 FVIII 或如請求項 11 之醫藥組合物之用途，其係用於製備治療哺乳動物之出血性缺陷的藥物，其中該藥物減輕或消除該出血性缺陷之一或多種症狀。

圖式

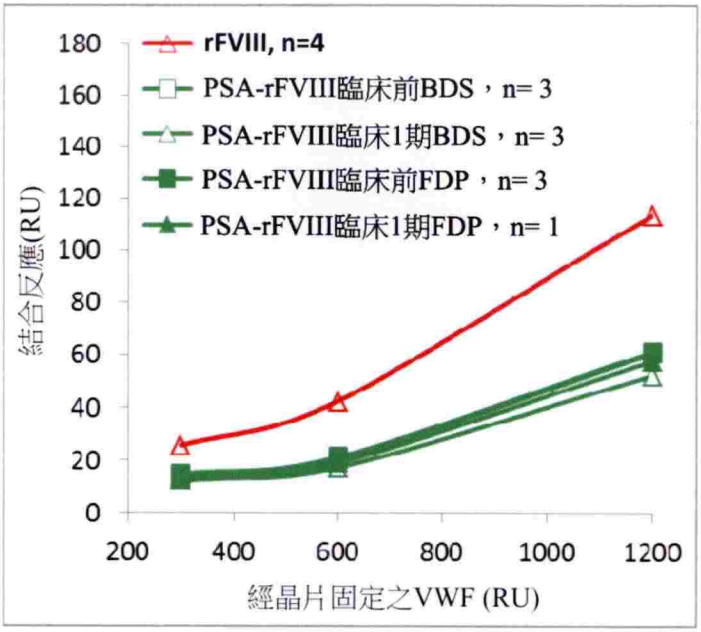

rFVIII, n=4
PSA-rFVIII臨床前BDS，n= 3
PSA-rFVIII臨床1期BDS，n= 3
PSA-rFVIII臨床前FDP，n= 3
PSA-rFVIII臨床1期FDP，n= 1
結合反應(RU)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
200
400
600
800
1000
1200
經晶片固定之VWF (RU)

圖 1

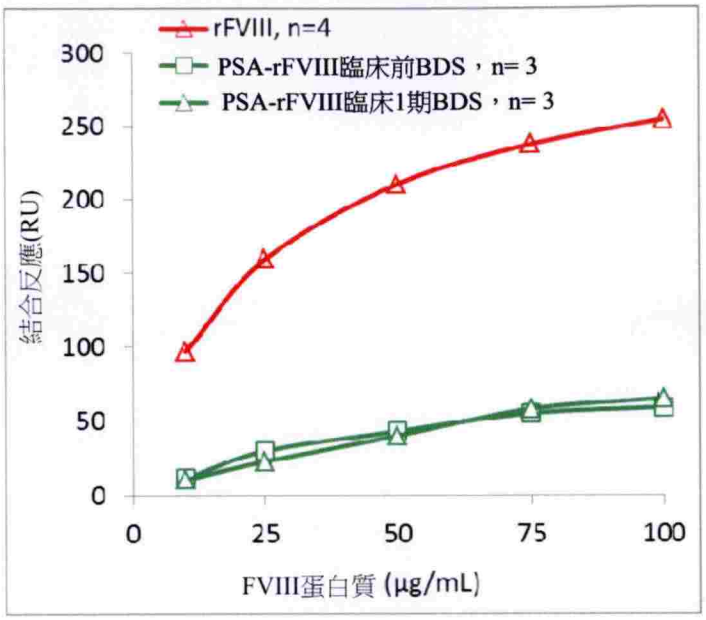
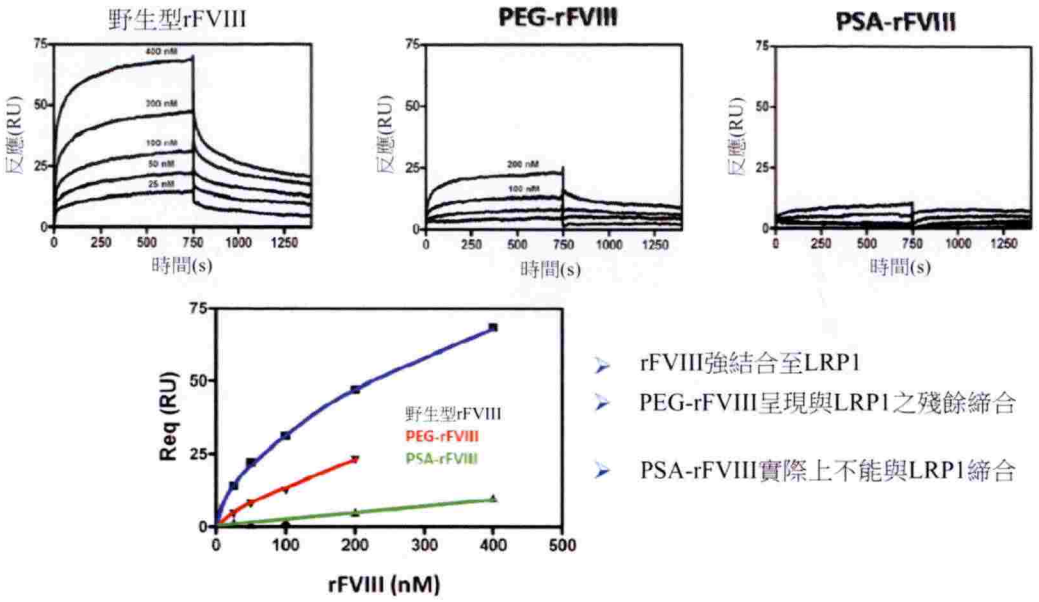
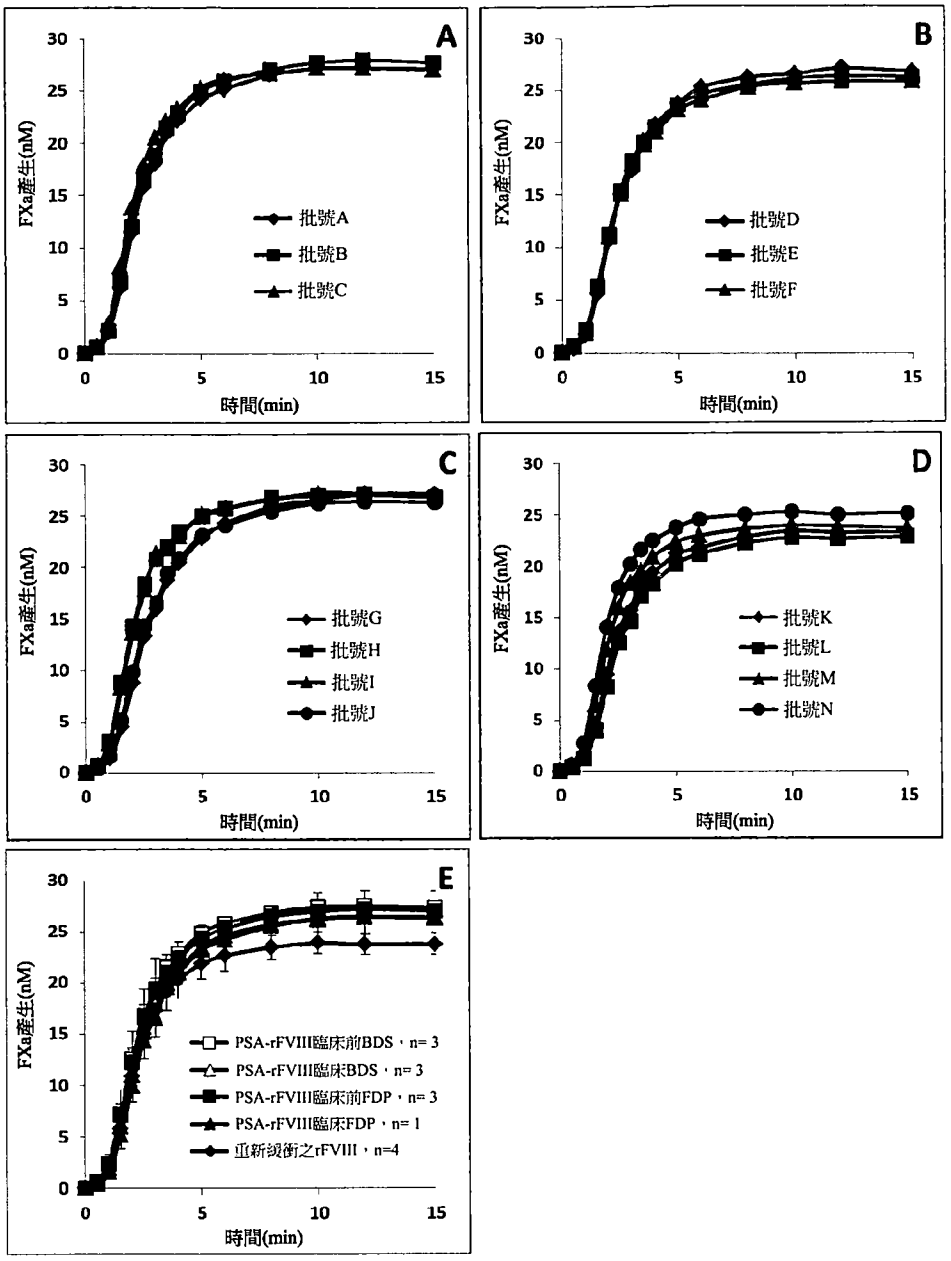

rFVIII, n=4
PSA-rFVIII臨床前BDS，n= 3
PSA-rFVIII臨床1期BDS，n= 3
結合反應(RU)
300
250
200
150
100
50
0
0
25
50
75
100
FVIII蛋白質 (μg/mL)

圖 2



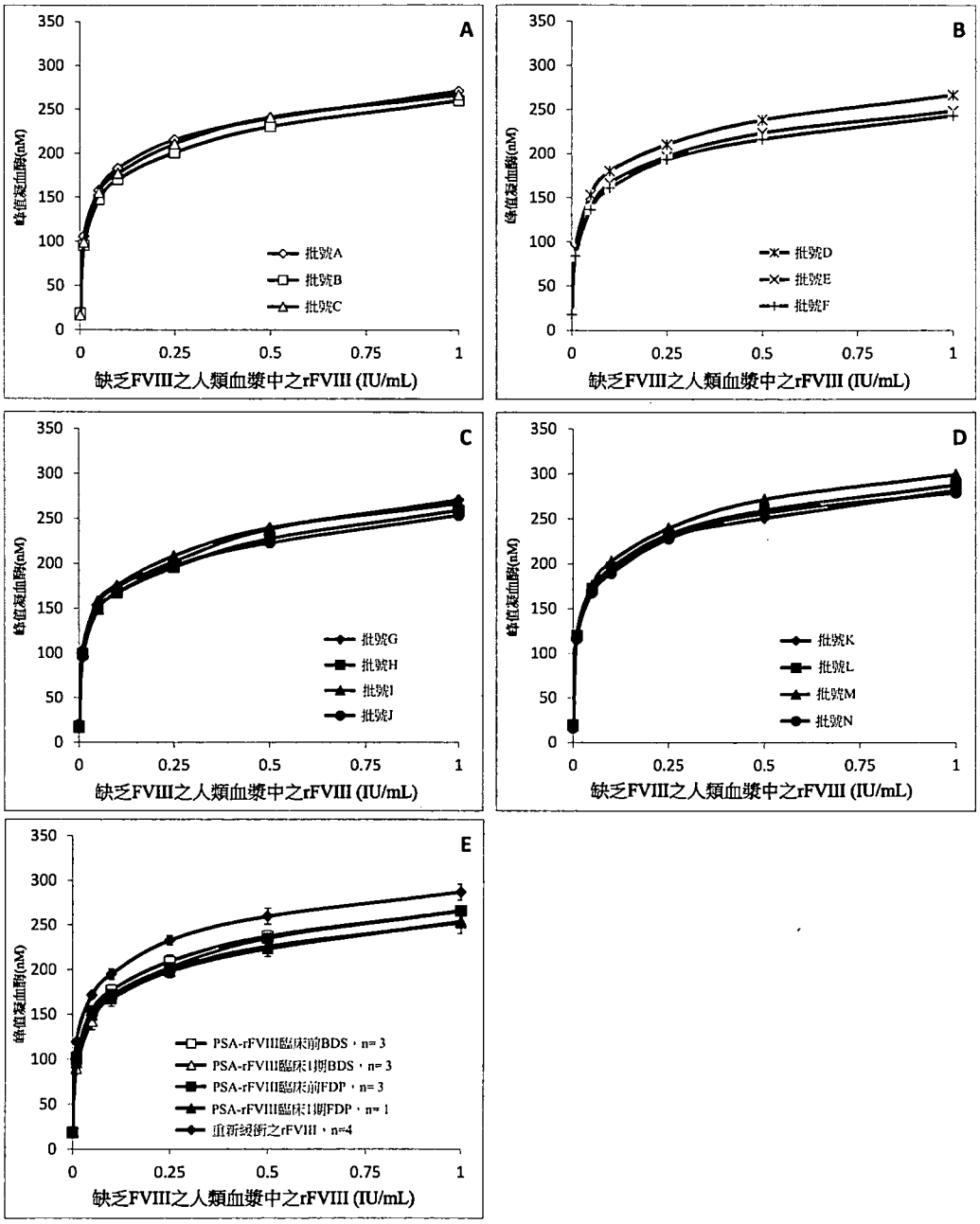
- rFVIII強結合至LRP1
- PEG-rFVIII呈現與LRP1之殘餘締合
- PSA-rFVIII實際上不能與LRP1締合

圖 3



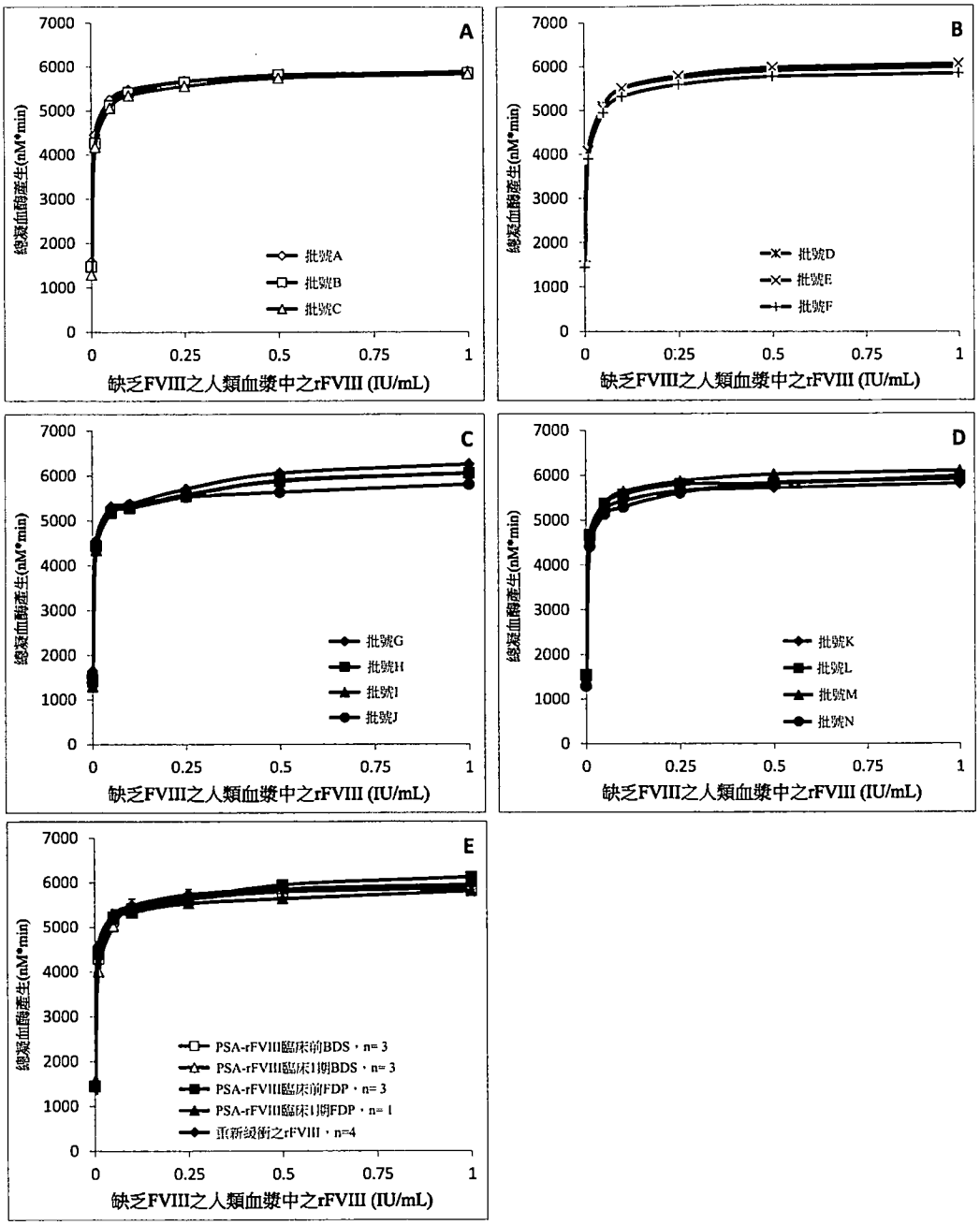
圖A：個別PSA-rFVIII臨床前BDS批次，
圖B：個別PSA-rFVIII臨床1期BDS批次，
圖C：個別PSA-rFVIII FDP批次(臨床前及1期)，
圖D：個別重新緩衝之rFVIII批次，
圖E：平均值± SD之比較

圖 4



圖A：個別PSA-rFVIII臨床前BDS批次，
圖B：個別PSA-rFVIII臨床1期BDS批次，
圖C：個別PSA-rFVIII FDP批次(臨床前及1期)，
圖D：個別重新緩衝之rFVIII批次，
圖E：平均值± SD之比較

圖 5



圖A：個別PSA-rFVIII臨床前BDS批次，
圖B：個別PSA-rFVIII臨床1期BDS批次，
圖C：個別PSA-rFVIII FDP批次(臨床前及1期)，
圖D：個別重新緩衝之rFVIII批次，
圖E：平均值± SD之比較

圖 6

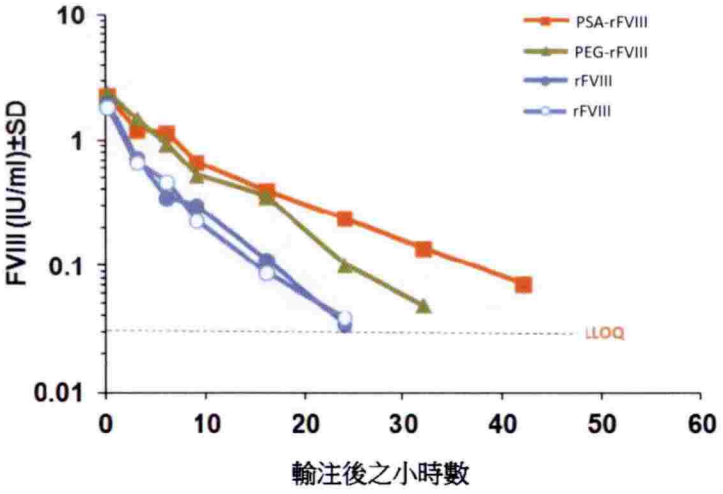

PSA-rFVIII
PEG-rFVIII
rFVIII
rFVIII
FVIII (IU/ml)±SD
10
1
0.1
0.01
LLOQ
0
10
20
30
40
50
60
輸注後之小時數

圖 7

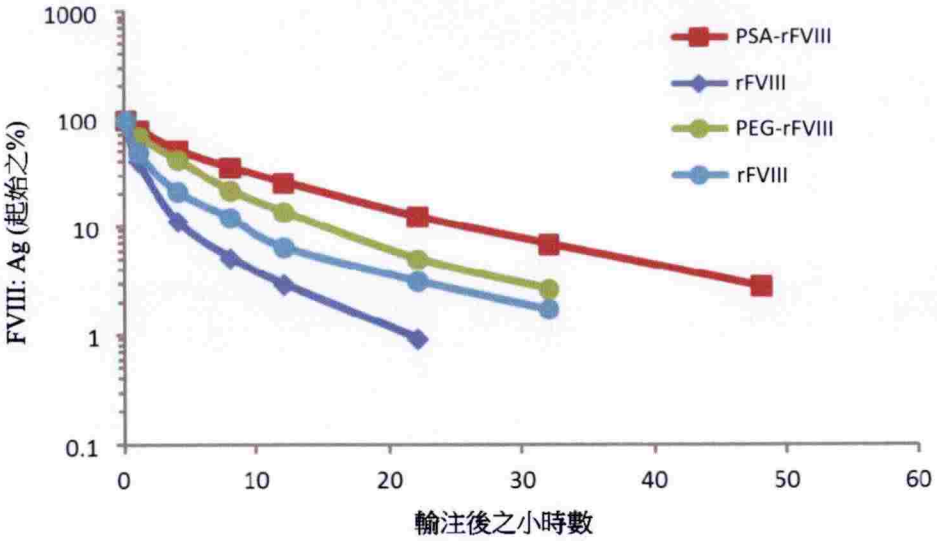

1000
100
10
1
0.1
FVIII: Ag (起始之%)
0
10
20
30
40
50
60
輸注後之小時數
PSA-rFVIII
rFVIII
PEG-rFVIII
rFVIII

圖 8

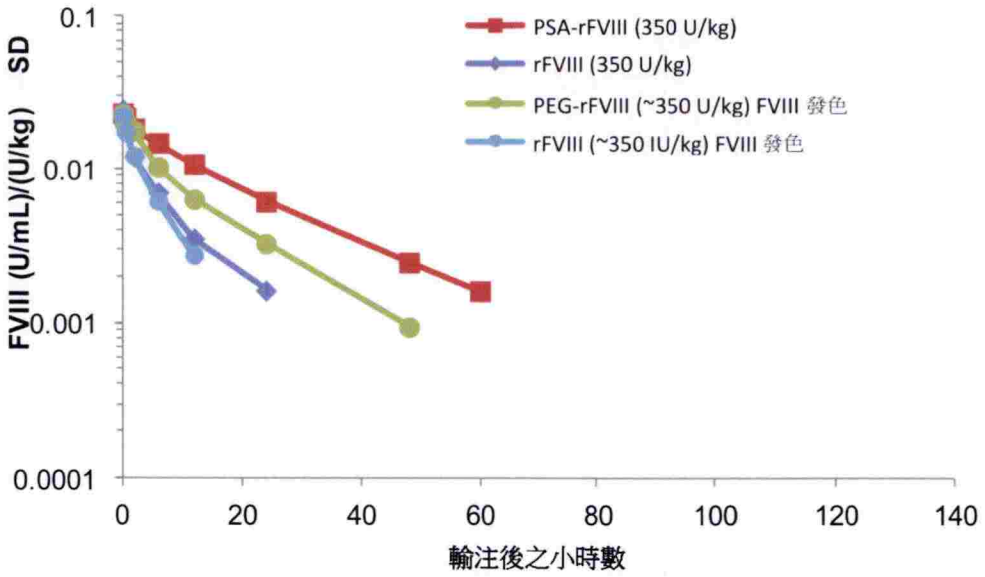

0.1
0.01
0.001
0.0001
FVIII (U/mL)/(U/kg) SD
0
20
40
60
80
100
120
140
輸注後之小時數
PSA-rFVIII (350 U/kg)
rFVIII (350 U/kg)
PEG-rFVIII (~350 U/kg) FVIII 發色
rFVIII (~350 IU/kg) FVIII 發色

圖 9