



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103804489 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 21

(21) 申请号 201310698649. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2007. 12. 14

*C07K 14/745* (2006. 01)

(30) 优先权数据

*A61K 38/36* (2006. 01)

60/875, 217 2006. 12. 15 US

*A61K 47/48* (2006. 01)

*A61P 7/04* (2006. 01)

(62) 分案原申请数据

200780046301. 6 2007. 12. 14

(71) 申请人 巴克斯特国际公司

地址 美国伊利诺伊州

申请人 巴克斯特保健股份有限公司

(72) 发明人 皮特·图雷切克 于尔根·西克曼

弗里德里·沙伊夫林格尔

米歇尔·卡纳瓦焦

(74) 专利代理机构 上海市华诚律师事务所

31210

代理人 傅强国 贾师英

权利要求书2页 说明书16页 附图8页

(54) 发明名称

具有延长的体内半衰期的因子 VIIa- 聚唾液酸结合物

(57) 摘要

本发明涉及一种蛋白质构建体,其包含源于血浆的或者重组的因子 VIIa (FVIIa) 或其生物活性衍生物,其被结合于包含 1-4 个唾液酸单元的碳水化物部分,其中,与未被结合于碳水化物部分的 FVIIa 分子的体内半衰期相比,蛋白质构建体在哺乳动物血液中的体内半衰期被实质上延长。本发明还提供了一种用于控制哺乳动物体内出血的方法,该哺乳动物由于 FVIIa、FVIII、或 FIX 功能性缺陷或缺乏而具有出血病症。本发明还提供了一种用于在外科手术或者外伤期间控制哺乳动物体内出血的方法。

1. 一种蛋白质构建体,其包含:

(a) 活化的因子 VII(FVIIa) 分子,其选自由血浆 FVIIa、重组 FVIIa(rFVIIa)、以及 FVIIa 的生物活性衍生物所构成的组;以及

(b) 至少一个生理学可接受的碳水化物部分,其包含 1-4 个被结合于所述 FVIIa 分子的唾液酸单元;

其中,与未被结合于所述碳水化物部分的 FVIIa 分子的体内半衰期相比,所述构建体在哺乳动物血液中的体内半衰期被延长。

2. 一种经化学修饰的 FVIIa 分子,其包含:

(a) FVIIa 分子,其选自由血浆 FVIIa 和重组 FVIIa(rFVIIa) 所构成的组;以及

(b) 至少一个生理学可接受的碳水化物部分,其分子量为 2,000 至 100,000 道尔顿,被结合于所述 FVIIa 分子上一个或多个碳水化物部分;其中其中所述生理学可接受的碳水化物部分被直接地共价连接于所述 FVIIa 分子的至少一个氨基酸残基;并且

其中,与未被化学修饰的 FVIIa 分子的体内半衰期相比,所述经化学修饰的 FVIIa 分子在哺乳动物血液中的体内半衰期被延长。

3. 一种经化学修饰的 FVIIa 分子,其包含:

(a) FVIIa 分子,其选自由血浆 FVIIa 和重组 FVIIa(rFVIIa) 所构成的组;以及

(b) 至少一个唾液酸部分,其分子量至少为 20,000 道尔顿,被结合于所述 FVIIa 分子上一个或多个碳水化物部分;并且

其中,与未被化学修饰的 FVIIa 分子的体内半衰期相比,所述经化学修饰的 FVIIa 分子在哺乳动物血液中的体内半衰期被延长。

4. 如权利要求 1 所述的蛋白质构建体、或者如权利要求 2 或 3 所述的经化学修饰的 FVIIa 分子,其特征在于,与未被结合于所述碳水化物部分的 FVIIa 分子的体内半衰期相比,所述构建体、或者经化学修饰的 FVIIa 分子的体内半衰期至少增加至约 2 倍。

5. 如权利要求 1 所述的蛋白质构建体、或者如权利要求 2 或 3 所述的经化学修饰的 FVIIa 分子,其特征在于,与未被结合于所述碳水化物部分的 FVIIa 分子的体内半衰期相比,所述构建体、或者经化学修饰的 FVIIa 分子的体内半衰期至少增加至约 3 倍。

6. 如权利要求 1 所述的蛋白质构建体、或者如权利要求 2 或 3 所述的经化学修饰的 FVIIa 分子,其特征在于,所述生理学可接受的碳水化物部分被直接地共价连接于所述 FVIIa 分子的至少一个氨基酸残基。

7. 如权利要求 1 所述的蛋白质构建体、或者如权利要求 2 或 3 所述的经化学修饰的 FVIIa 分子,其特征在于,所述生理学可接受的碳水化物部分被非共价连接于所述 FVIIa 分子的至少一个氨基酸残基。

8. 如权利要求 1 所述的蛋白质构建体、或者如权利要求 2 或 3 所述的经化学修饰的 FVIIa 分子,其特征在于,所述生理学可接受的碳水化物部分是聚唾液酸或其衍生物。

9. 一种药物组合物,其包含有效量的如权利要求 1 所述的蛋白质构建体或者如权利要求 2 或 3 所述的经化学修饰的 FVIIa 分子、以及一种或多种选自于由药理学可接受的载体、稀释剂、盐、缓冲剂和赋形剂所构成的组的化合物。

10. 一种控制哺乳动物体内出血的方法,所述哺乳动物患有与 FVIIa、因子 VIII(FVIII) 和因子 IX(FIX) 中至少一个的功能性缺陷或缺乏有关的出血病症,所述方法

包括给药如权利要求 1 所述的蛋白质构建体、或者如权利要求 2 或 3 所述的经化学修饰的 FVIIa 分子。

11. 一种在外科手术或外伤期间控制哺乳动物体内出血的方法,所述方法包括给药如权利要求 1 所述的蛋白质构建体、或者如权利要求 2 或 3 所述的经化学修饰的 FVIIa 分子。

12. 一种试剂盒,其包括包装在容器中的有效量的如权利要求 1 所述的蛋白质构建体、或者如权利要求 2 或 3 所述的经化学修饰的 FVIIa 分子,所述试剂盒任选地含有第二治疗剂;并且还包括附贴于所述容器、或者用所述容器包装的标签,所述标签用于描述所述容器内的物质、提供关于所述容器内容物用于控制哺乳动物体内出血的用法的指示和 / 或说明书。

13. 如权利要求 12 所述的试剂盒,其特征在于,所述容器是小瓶或者瓶子或者预先装液的注射器。

## 具有延长的体内半衰期的因子 VIIa- 聚唾液酸结合物

本申请是申请日为 2007 年 12 月 14 日、申请号为 200780046301.6(PCT/US2007/087553) 的发明专利申请的分案申请。

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求在 2006 年 12 月 15 日申请的美国临时专利申请 No. 60/875, 217 的优先权。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及一种蛋白质构建体,其包含结合于含有 1-4 个唾液酸单元的链的碳水化合物部分的凝血因子 VIIa(FVIIa)。本发明还涉及用于延长哺乳动物血液中凝血蛋白、尤其是 FVIIa 的体内半衰期的方法,所述哺乳动物患有与至少 FVIIa、因子 VIII(FVIII) 和因子 IX(FIX) 功能性缺陷或缺乏有关的出血病症。

### 背景技术

[0003] 凝血级联被分成三个不同的部分:内在的、外在的、以及共同的路径(Schenone 等,Curr Opin Hematol. 2004 ;11 :272-7)。该级联涉及一系列丝氨酸蛋白酶(酶原)和蛋白质辅助因子。当需要时,无活性的酶原前体被转化为活性形式,从而转换级联中下一个酶。

[0004] 内在路径需要凝血的因子 VIII、IX、X、XI、以及 XII。当激肽释放酶原、高分子量激肽原、因子 XI(FXI) 和因子 XII(FXII) 暴露于带负电的表面时,内在路径开始启动。还需要钙离子和由血小板分泌的磷脂。

[0005] 当血管的脉管内腔受损伤时,外在路径被启动。细胞膜糖蛋白组织因子被暴露,然后结合于循环性的因子 VII(FVII),并且结合于其较小的在先存在量的活化形式 FVIIa。这种结合可以促进 FVII 全部转化为 FVIIa,并且随后当钙和磷脂存在时、因子 IX(FIX) 转化为因子 IXa(FIXa),而因子 X(FX) 转化为因子 Xa(FXa)。通过使 FVII 的结合位点更接近于底物(FX 和 FIX)、并且通过诱导构型变化,导致 FVIIa 与组织因子的连接增强了蛋白质水解的活性,其增强了 FVIIa 的酶活性。通过外在路径的 FX 活化速率比通过 FIXa、FVIIIa、磷脂、以及钙离子的(内在)路径获得的活化速率大约慢 50 倍。

[0006] FX 的活化是两种路径的共同点。随同磷脂和钙,因子 Va(FVa) 和 Xa 将凝血酶原转化为凝血酶(凝血酶原酶复合物),然后凝血酶裂解纤维蛋白原,从而形成纤维蛋白单体。该单体发生聚合,从而形成纤维蛋白链。因子 XIIIa(FXIIIa) 使这些链彼此共价结合,从而形成刚性网格。

[0007] FVII 向 FVIIa 的转化也是通过由包括凝血酶、FIXa、FXa、因子 XIa(FXIa)、以及因子 XIIa(FXIIa) 在内的许多蛋白酶的催化来进行的。对于级联早期的抑制,组织因子路径抑制剂靶向 FVIIa/ 组织因子 /FXa 产物复合物。

[0008] FVII(亦称稳定因子或者前转化素)是维生素 K- 依赖性的丝氨酸蛋白酶糖蛋白,在止血和凝血中扮演着关键角色(Eigenbrot, Curr Protein Pept Sci. 2002 ;3 :287-99)。

[0009] FVII 是在肝脏中合成的,并且被作为 48kD 的单链糖蛋白被分泌。FVIIa 与所有的维生素 K- 依赖性的丝氨酸蛋白酶糖蛋白共同分享类似的蛋白质结构域结构,该结构域结构包含具有 9-12 个决定着蛋白质与类脂膜的相互作用的残基的氨基端  $\gamma$ - 羧基谷氨酸 (Gla) 结构域、羧基端丝氨酸蛋白酶结构域 (催化结构域)、以及两种含有介导着与组织因子的交互作用的钙离子结合位点的表皮生长因子状结构域。

[0010]  $\gamma$ - 谷氨酰基羧化酶催化在分子的氨基端部分中的 Gla 残基的羧基化。该羧化酶取决于其作用的维生素 K 的还原形式,该还原形式被氧化成环氧化物形式。维生素 K 环氧化物还原酶被要求将维生素 K 的环氧化物形式反向转化回还原形式。

[0011] 大部分的 FVII 在血浆中呈酶原形式循环,并且这种形式的活化导致在精氨酸 152 和异亮氨酸 153 之间的肽键的裂解。得到的活化的 FVIIa 包含  $\text{NH}_2$ - 衍生的轻链 (20kD) 和 COOH 末端衍生的经由单一二硫键 (Cys135 至 Cys262) 连接的重链 (30kD)。轻链含有细胞膜结合性 Gla 结构域,而重链含有催化结构域。

[0012] 被遗传因素和环境因素确定的 FVII 的血浆浓度是约 0.5mg/mL (Pinotti 等, Blood. 2000 ;95 :3423-8)。不同的 FVII 基因型可以导致平均 FVII 水平中的好几倍差异。血浆 FVII 水平在健康孕妇怀孕期间被提高,也随着年龄而增加,并且在孕妇中和具有高甘油三酯血症的人中较高。FVII 具有所有促凝血的因子当中最短的半衰期 (3-6h)。在健康人体中 FVIIa 的平均血浆浓度是 3.6ng/mL,并且 FVIIa 的循环半衰期与其他的凝血因子相比相对较长 (2.5h)。

[0013] 遗传性的 FVII 缺陷是稀有常染色体隐性出血病症,在一般群体中发病率估计是每 500,000 人中 1 例 (Acharya 等, J Thromb Haemost. 2004 ;2248-56)。来自抑制剂的获得性 FVII 缺陷也是非常稀有。也报道了与药物比如头孢菌素、青霉素、以及口服抗凝血剂相关的发生缺陷的病例。另外,已经报告使用白细胞介素 -2 及抗胸腺细胞球蛋白疗法时获得性的 FVII 缺陷会自发性地发生或者与其他的状况比如骨髓瘤、脓毒病、再生障碍性贫血一起发生。

[0014] 代替治疗是用于患有 FVII 缺陷的病人的主要疗法 (Mariani 等, Semin Hematol. 2006 ;43 ( 增补 1 ) :S42-7)。传统上一直使用新鲜冰冻血浆 (FFP)、凝血酶原复合物浓缩物 (PCCs)、或源于血浆的 FVII 浓缩物。然而,重组 FVIIa (rFVIIa) 现在被广泛用于这些病人的疗法。

[0015] 人们已经开发 rFVIIa 与抑制剂一起用于治疗甲型和乙型血友病病人的出血,并且已经发现甚至在大型外科手术比如主要的矫形外科手术期间可以诱导止血 (Hedner, J Biotechnol. 2006 ;124 :747-57)。rFVIIa 是在 BHK 细胞培养物中生产的,并且已经被证明非常类似于源于血浆的 FVIIa。在血友病治疗中使用 rFVIIa 是基于 FVIIa 对于凝血酶活化的血小板表面的低亲和性结合。通过给药药理学剂量的外源性 rFVIIa,在损伤位置处在血小板表面上的凝血酶产生被增强,这与 FVIII/FIX 的存在无关。作为这种提高和凝血酶快速形成的结果,形成了紧密的纤维蛋白止血栓子。

[0016] 虽然最初开发用于治疗 FVII 缺陷和抑制剂综合性的甲型和乙型血友病,但用于 rFVIIa 的新指征 (基于病例报告和较少的临床试验) 包括在具有肝脏疾病、血小板减少、或定性的血小板机能障碍的病人中的使用和在未患凝血紊乱但由于大型外科手术或者较大外伤而出血的病人中的使用。

[0017] 治疗性的多肽药物比如包括 FVIIa 在内的凝血蛋白质会被蛋白水解酶快速降解, 并且被抗体中和。这会降低它们的半衰期和循环时间, 由此限制了它们的疗效。相对高的剂量和频繁给药对于达到并维持期望的 FVIIa 的治疗效果或预防效果来说是必要的。最终难以获得足够剂量的调节, 并且频繁的静脉注射给药的需要形成了对病人生存途径的限制。因此, 具有比较长的循环半衰期的改进的 FVIIa 分子将会减小必要的给药数量。

[0018] 原则上, 对于血液循环中蛋白质的半衰期延长有四个一般选择:

- 直接的化合物或者酶的改进;
- 使用载体分子来保护循环中的蛋白质;
- 构造突变体以延长半衰期;
- 改进降解路径。

[0019] 本发明介绍了一种通过化学修饰进行的凝血蛋白质、尤其是 FVIIa 分子的改进。对于化学修饰治疗性的多肽, 在过去已经使用了数种方法。

[0020] 多肽药物的 PEG 化可以保护它们, 并且改善它们的药效和药物动力学分布型 (Harris 和 Chess, Nat Rev Drug Discov. 2003 ;2 :214-21)。PEG 化工艺将聚乙二醇 (PEG) 的重复单元连接于多肽药物。PEG 分子具有很大的流体动力学体积 (大小为球状蛋白质的 5-10 倍), 是高度水溶性的和水化的、非常易变、无毒、非免疫原性, 并且可从体内快速清除。分子的 PEG 化可以导致提高药物对酶降解的抗性、提高其在体内的半衰期、降低给药频率、减少免疫原性、提高物理学稳定性和热稳定性、提高溶解性、提高液体稳定性、以及降低聚集性。第一个被 FDA (美国食品与药物管理局) 批准的 PEG 化药物在 20 世纪 90 年代初获批。同时, FDA 批准了数种用于口服、注射、以及体表给药的 PEG 化药物。

[0021] ClycoPEGylation™ 技术包括如下方法: 在 PEG 聚合物和肽之间提供肽结合物, 使 PEG 经由完整的糖基连接基团而共价附接于肽。

[0022] 脂质体已被用于包封多种分子比如 DNA、反义 RNA、抗生素、抗癌症药物、以及抗真菌药物、抑制剂 / 激活剂、抗体 (免疫脂质体)、以及抗原 (用于疫苗)。

[0023] 磷脂也可以被结合于 (例如经由酰胺键) PEG (PEG-脂质体)、羧基 PEG 和纯化的大豆磷脂酰乙醇胺 (PE)、酯和氨基甲酸酯衍生物。其中氨基甲酸酯衍生物在当今使用最广泛 (美国专利 No. 6, 593, 294)。最普遍使用的 PEG 的分子量是 2, 000 和 5, 000, 但是也可使用 600 至 12, 000 范围内的 PEG。

[0024] 被酸性单糖取代的蛋白质首先在美国专利 No. 3, 847, 890 中被公开。在该专利中, 酸性的单糖、即, N-乙酰神经氨酸和葡萄糖酸盐被取代到胰岛素、人生长激素或者白蛋白的  $\alpha$ -氨基或  $\epsilon$ -氨基之上, 从而降低多肽的抗原性。

[0025] 聚唾液酸 (PSA)、也称为多聚乙酰神经氨酸 (CA), 是一种天然产生的多糖。其为具有  $\alpha$  (2  $\rightarrow$  8) 酮苷键的 N-乙酰神经氨酸的均聚物, 并且含有位于其非还原性末端的邻接的二醇基团。其带负电, 并且是人体的天然组分。其可以由细菌容易地大量制造出来, 并且具有预定的物理特性 (美国专利 No. 5, 846, 951)。因为在化学和免疫学方面与人体中聚唾液酸相同, 细菌性的聚唾液酸是非免疫原性的, 即使当偶联于蛋白质时。不同于其他的聚合物 (例如 PEG), 聚唾液酸是可生物降解的。多聚乙酰神经氨酸共价偶联于过氧化氢酶和天冬酰胺酶导致了当存在蛋白水解酶或者血浆时酶稳定性的提高。体内聚唾液酸化的 (polysialylated) 和未改性的天冬酰胺酶的对比性研究显示, 聚唾液酸化可以提高酶的半

衰期 (Fermendes 和 Gregoriadis, Int J Pharm. 2001 ;217 :215-24)。

[0026] 然而,迄今为止,尚没有如美国专利 No. 3, 847, 890 所述的包含结合于酸性单糖的多肽的治疗性化合物被商品化。相反,美国专利 No. 5, 846, 951 教导说,在聚合体链中化合物的多糖部分应具有至少 5 个唾液酸残基、并且在其他实施方式中至少 20 或 50 个唾液酸残基。因为多糖通常在带有共纯化内毒素的固有风险的细菌中产生,长链唾液酸聚合体的纯化可能会升高提高的内毒素含量的概率。具有 1-4 个唾液酸单元的较短的 PSA 分子还可以通过合成法制备 (Kang 等, Chem Commun. 2000 ;227-8 ;Ress 和 Linhardt, Current Organic Synthesis. 2004 ;131-46), 因此使高内毒素水平的风险最小化。

[0027] W098/32466A1 建议,在许多其他蛋白质之中的 FVII 可以被 PEG 化,但是其未包含可支持该公开的任何工作实施例。

[0028] W001/58935A3 教导,结合物含有至少一个被共价附接于多肽的非多肽部分,其中多肽的氨基酸序列不同于野生型 FVII 或 FVIIa 的氨基酸序列,在该野生型序列中至少一个含有用于所述非多肽部分的连接基团的氨基酸残基已经被导入或除去。对于非多肽部分,尤其建议为 PEG。

[0029] US20050113565A1 公开了一种 FVII 多肽或者与 FVII 相关的多肽,其中多肽含有一个以上与天门冬酰胺连接的和 / 或与丝氨酸连接的低聚糖链,并且其中所述低聚糖基团中的至少一个被共价附接于至少一个聚合物基团 (PEG, “糖基 PEG 化 (glycoPEGylation)”)。

[0030] 因此,本技术领域仍然需要可以提供凝血性蛋白质制品的组合物和方法,所述制品包含改善的血浆来源制品或与 rFVII、改性 FVII、或与 FVII 相关的多肽。

## 发明内容

[0031] 本发明提供了一种蛋白质构建体,其含有源于血浆的或者重组的因子 VIIa (FVIIa) 或其生物活性衍生物,所述 FVIIa 或者所述其生物活性衍生物被结合于具有 1-4 个唾液酸单元的链,其中,与缺少 1-4 个唾液酸单元链的 FVIIa 或其衍生物相比,该蛋白质构建体在哺乳动物、特别是人类血液中的体内半衰期被实质上延长。另外,本发明提供了含有所述蛋白质构建体的药物组合物、以及通过使用所述蛋白质构建体来用于延长 FVIIa 在哺乳动物血液中的体内半衰期的方法,其中哺乳动物患有与 FVIIa、FVII 和 FIX 中的至少一个的功能性缺陷或缺乏有关的出血病症。还可以给药本发明的蛋白质构建体,来控制在具有正常水平凝血因子的哺乳动物的外伤或者外科手术病例中的出血。

[0032] 在本发明的一个具体实施方式中,提供一种蛋白质构建体,其包含:(a) 活化的 Factor VII (FVIIa) 分子,其选自由血浆 FVIIa、重组 FVIIa (rFVIIa)、以及 FVIIa 的生物活性衍生物所构成的组;以及 (b) 至少一个生理学上可接受的含有 1-4 个被结合于所述 FVIIa 分子的唾液酸单元的碳水化合物部分。其中,与未被结合于所述碳水化合物部分的 FVIIa 分子的体内半衰期相比,所述构建体在哺乳动物血液中的体内半衰期被延长。

[0033] 在本发明的另一个实施方式中,提供上述的蛋白质构建体,其中,与未被结合于所述碳水化合物部分的 FVIIa 分子的体内半衰期相比,所述构建体的体内半衰期至少增加至约两倍。在另一个实施方式中,提供上述的蛋白质构建体,其中,与未被结合于所述碳水化合物部分的 FVIIa 分子的体内半衰期相比,所述构建体的体内半衰期至少增加至约三倍。在再一个实施方式中,提供上述的蛋白质构建体,其中,生理学可接受的碳水化合物部分被直接地

共价连接于所述 FVIIa 分子的至少一个氨基酸残基上。

[0034] 在本发明的又一个实施方式中,提供上述的蛋白质构建体,其中,生理学可接受的碳水化物部分被非共价连接于所述 FVIIa 分子的至少一个氨基酸残基上。在再一个实施方式中,提供上述的蛋白质构建体,其中,所述生理学可接受的碳水化物部分是聚唾液酸或其衍生物。

[0035] 在本发明的一个具体实施方式中,提供一种药物组合物,其包含有效量的上述的蛋白质构建体和一种或多种选自药学上可接受的载体、稀释剂、盐、缓冲剂和赋形剂所组成的组的化合物。

[0036] 在本发明的另一个实施方式中,提供一种控制哺乳动物体内出血的方法,所述哺乳动物具有与 FVIIa、FVIII 和 FIX 中的至少一个的功能性缺陷或缺乏有关的出血病症,其包括给药上述蛋白质构建体。在又一个实施方式中,提供一种在外科手术或外伤期间控制哺乳动物体内出血的方法,包括给药上述蛋白质构建体。

[0037] 在本发明的再一个实施方式中,提供一种试剂盒,其包括包装在容器中的有效量的上述蛋白质构建体。其中,该试剂盒任选地含有第二治疗剂;并且还包括附贴于容器、或者用容器包装的标签,该标签用于描述容器的内容物、并且提供关于容器内容物用于控制哺乳动物体内的出血的用法的指示和/或说明书。在又一个实施方式中,提供上述试剂盒,其中容器是小瓶或者瓶子或者预先装液的注射器。

[0038] 应当理解,本发明不局限于在此描述的 FVII 部分。本发明的一个方面涉及一种蛋白质构建体,其包括凝血级联的一个成员——血浆 FVIIa(即,源于血浆的 FVIIa)和/或重组 FVIIa 或者其生物活性衍生物(在文中也称为“PSA-FVIIa-结合物”),所述 FVII 或者所述其生物活性衍生物被结合于 1-4 个唾液酸部分,其中,所述 FVIIa 或者所述其生物活性衍生物在哺乳动物血液中的体内半衰期被延长。这里使用的术语“蛋白质构建体”指的是活化的因子 VII(FVIIa)分子,选自由血浆 FVIIa、重组 FVIIa(rFVIIa)、以及 FVIIa 的生物活性衍生物所构成的组;以及 (b) 至少一个生理学上可接受的包含 1-4 个被结合于所述 FVIIa 分子的唾液酸单元的碳水化物部分。这里使用的术语“血浆的”指的是“源白血浆的”。

#### FVIIa 多肽和多核苷酸

[0039] 用于本发明的 FVIIa 分子包括全长的蛋白质、蛋白质前体、生物学活性的或功能性的蛋白质亚基或片段,和其功能性衍生物。谈及 FVIIa,意味着包括这种蛋白质的所有潜在形式。

[0040] 根据本发明,术语“重组因子 VIIa”(rFVIIa)并不构成特定的限制,并且可以包括异源的或天然产生的任何 rFVIIa,这是经由 DNA 重组技术而获得的任何 rFVIIa、或可以包括其生物活性衍生物。在特定的实施方式中,该术语包括蛋白质和核酸,例如,基因、前 mRNA、mRNA、以及多肽、多形态的变体、等位基因、突变体、以及种间同系物,其:(1) 具有一氨基酸序列,该氨基酸序列在含有至少约 25、50、100、200、300、400、或更多个氨基酸的区域(直到成熟蛋白质的 406 个氨基酸的全长序列)内,与被在此描述的参照的核酸序列或氨基酸序列进行编码的多肽的一致性约大于 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99%、或者更大;(2) 特异性地结合于抗免疫原升高的抗体例如多克隆抗体,所述免疫原包含在此描述的作为其免疫原性片段的参照氨基酸序列、及其保守性修饰的变体;(3) 在对于编码在此描述的参照氨基酸序列的核酸、及其保守



性地修饰的变体而言严格的杂交条件下进行特异性地杂交；(4) 具有一核酸序列，该核酸序列在至少约 25、50、100、150、200、250、500、1000、或更多个核苷酸的区域（直到成熟蛋白质的 1218 个核苷酸的全长序列）内，与在此描述的参照核酸序列的一致性约大于 95%、96%、97%、98%、99%、或更高。

[0041] 在此使用的术语“内源 FVIIa”包括来源于所述哺乳动物的 FVIIa。也包括由转基因或者任何其它存在于所述哺乳动物的外来 DNA 转录来的 FVIIa。在此使用的术语“外源 FVIIa”包括并非来源于所述哺乳动物的 FVIIa。

[0042] 变体（或类似物）多肽包括嵌合性变体，其中，FVIIa 氨基酸序列上补充有一个以上氨基酸残基。嵌合可以位于蛋白质的任何一个末端或两个末端，或者可以位于 FVIIa 氨基酸序列的内部区域内。在任何一个或两个末端处具有附加残基的嵌合性变体，可以包括，例如，融合蛋白和包含氨基酸标记或标签的蛋白质。例如，FVIIa 分子可以任选地含有 N- 末端 Met，尤其当分子在细菌细胞比如大肠杆菌中被通过重组方式表达时。

[0043] 在缺失性变体中，在 FVIIa 多肽中的一个以上氨基酸残基被除去。在 FVIIa 多肽的一个或两个末端处、或者随着 FVIIa 氨基酸序列内部一个以上残基的去除，可能会因起缺失。因此，缺失性变体包括 FVIIa 多肽序列所有的片段。

[0044] 在取代性变体中，FVIIa 多肽中的一个以上氨基酸残基被除去并且用可选的残基取代。在一个方面，取代在本质上是保守性的，并且这种类型的保守性取代为本领域技术人员所熟知。作为另一种选择，本发明包含同时也是非保守性的取代。示例性的保守性取代如 Lehninger 所述（生物化学第二版。Worth 出版公司出版，纽约（1975），p71-77）并且列于下表。

#### 保守性取代

| 侧链特性        | 氨基酸       |
|-------------|-----------|
| 非极性的（疏水性的）： |           |
| A. 脂肪族的     | A L I V P |
| B. 芳香族的     | F W       |
| C. 含硫的      | M         |
| D. 两可的      | G         |
| 不带电荷的-极性的：  |           |
| A. 羟基       | S T Y     |
| B. 酰胺       | N Q       |
| C. 硫氢基      | C         |
| D. 两可的      | G         |
| 带正电荷的（碱性的）  | K R H     |
| 带负电荷的（酸性的）  | D E       |

可选地，示例性的保守性取代列于下表。

保守性取代 II

| 原始残基    | 示例性的取代基                  |
|---------|--------------------------|
| 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  |

[0045] 多核苷酸或者多肽序列典型地是来自哺乳动物,包括但不限于:灵长类动物,例如,人类;啮齿动物,例如,大鼠、小鼠、仓鼠;母牛;猪;马;绵羊;或者任何哺乳动物。本发明的核酸和蛋白质可能是重组体分子(例如,异源的并编码野生型序列或其变体的分子、或者非天然产生的分子)。参照多核苷酸和多肽序列包括,例如,GenBank 入藏登记号中基因组序列的 J02933、cDNA 的 M13232(Hagen 等,PNAS. 1986 ;83 :2412-6)、多肽序列的 ad P08709(在此将其全部内容并入本文作为参考)。已经描述了 FVII 的许多多形性,例如,参见 Sabater-Lleal 等(Hum Genet. 2006 ;118 :741-51)(在此将其全部内容并入本文作为参考)。

[0046] 在此使用的“生物活性衍生物”或者“生物学活性变体”,包括任何具有与所述分子基本上相同功能的和/或生物学特性(比如结合特性)的分子的衍生物或变体、和/或相同结构基体(比如肽骨架)或基本聚合单元的分子的衍生物或变体。

[0047] 在此使用的术语“源于血浆的 FVIIa”或者“血浆的”包括从哺乳动物获得的在血液中发现的具有激活凝血路径特性的所有形式的蛋白质。

[0048] 在此使用的术语“重组 FVIIa”包括经由 DNA 重组技术而获得的 rFVIIa。其可以通过本技术领域任何已知的方法而产生。在美国专利 No. 4, 784, 950 中公开了一个具体的例子。该 rFVIIa 的实例是 Novo Nordisk 制造并出售的 NovoSeven。

#### FVIIa 产生和表达

[0049] rFVIIa 的生产可以包括本技术领域任何已知的下述方法：(i) 通过基因工程例如经由 RNA 逆转录和 / 或 DNA 扩增来产生重组 DNA，(ii) 通过转染例如经电穿孔法或者微量注射法，将重组 DNA 导入原核或者真核细胞，(iii) 例如以连续的或分批的方式培养所述转化细胞，(iv) 例如组成性或在诱导下表达 FVIIa，和 (v) 例如从培养基或通过收获转化细胞而分离所述 FVIIa，以便 (vi) 例如经过阴离子交换色谱法或者亲和色谱法得到纯化的 rFVIIa。

[0050] 通过在合适的原核或真核寄主系统表达，可以生产出 rFVIIa，其特征在于生产药理学可接受的 rFVIIa 分子。真核细胞的例子是哺乳动物细胞，比如 CHO、COS、HEK293、BHK、SK-Hep 和 HepG2。不具体限制用于生产或分离根据本发明的 rFVIIa 的试剂或者条件，并且可以使用任何本技术领域已知的或者商品化的系统。

[0051] 多种载体可以用于 rFVIIa 的制备，并且可以选自真核和原核的表达载体。用于原核表达的载体的例子包括质粒比如 pRSET、pET、pBAD 等，其中在原核表达载体中使用的启动子包括 lac、trc、tac、pL、araBAD 等。用于真核表达的载体的例子包括：(i) 用于在酵母中表达的载体，比如 pAO、pPIC、pYES、pMET，其使用启动子比如 AOX1、GAP、GAL1、AUG1 等；(ii) 用于在昆虫细胞中表达的载体，比如 pMT、pAc5、pIB、pMIB、pBAC 等，其使用启动子比如 PH、p10、MT、Ac5、OpIE2、gp64、polh 等；以及 (iii) 用于在哺乳动物细胞中表达的载体，比如 pSVL、pCMV、pRc/RSV、pCNA3、pBPV 等；以及来源于病毒系统的载体，所述病毒比如是牛痘病毒、腺病毒相关病毒、疱疹病毒、反录病毒等，使用的启动子比如是 CMV、SV40、EF-1、UbC RSV、ADV、BPV、以及  $\beta$ -肌动蛋白。

#### 唾液酸

[0052] 在此使用的术语“唾液酸部分”，包括可溶于水溶液或者悬浮液的唾液酸单体或者聚合物，并且在以药学有效量给药 PSA-FVIIa- 结合物时，对哺乳动物没有负面影响比如副作用。对于根据本发明使用的唾液酸单元没有具体限制。在一个方面，该聚合物的特点是具有 1 到 4 个单元。不同的唾液酸单元也可以被结合在一条链中。

[0053] 例如，通过美国专利 no4, 356, 170 所述的方法，可以将唾液酸部分结合于 FVIIa，在此将其引入本文以供参考。在本发明的一个具体实施方式中，多糖化合物可以是天然产生的多糖、天然多糖的衍生物、或者多糖的天然衍生物。通常情况下，在化合物中全部糖类残基是唾液酸残基。

[0054] 用于将 PSA 偶联于多肽的其他方法也是已知的。例如，美国专利公开 No. 2007/0282096 描述了将胺类或者酰胺衍生物例如 PSA 结合于蛋白质。另外，美国专利公开 No. 2007/0191597 描述了 PSA 衍生物含有醛基，用于与底物（例如，蛋白质）在还原性的终端处进行反应。

[0055] 在本发明的一个具体实施方式中，多糖化合物的聚唾液酸部分是高度亲水的；并且在另一个实施方式中，整个化合物是高度亲水的。主要通过唾液酸单元的附属羧基以及羟基使化合物具有亲水性。糖单元可以含有其它官能团，比如胺、羟基或者硫酸酯基团，或

者其组合。这些基团可以存在于天然糖类化合物上,或者导入衍生的多糖化合物。

[0056] 特别用于本发明的多糖化合物是细菌产生的多糖化合物。某些天然产生的多糖被称为糖脂。尤其有利的是,多糖化合物基本上不含末端半乳糖单元,易于被肝细胞和库柏法细胞 (Kupffer cells) 的半乳糖受体识别。

### 连接

[0057] FVIIa 可以通过本领域的技术人员所熟知的任何各种技术而被共价连接于多糖化合物。多个实施例引证在美国专利 No. 5, 846, 951 第 7 栏第 15 行至第 8 栏第 5 行中。

[0058] 这些实施例包括:通过在 FVIIa 或多糖的任何一种上的羧基与其它物质的胺基之间肽键的连接,或者在一种物质的羧基与其它物质的羟基之间酯键的连接。通过活性成分进行的另一种连接是经由活性成分上游离氨基之间席夫碱的连接,所述活性成分例如 FVIIa 可以被共价结合于多糖化合物,所述活性成分可与通过高碘酸盐氧化作用而在聚合物的非还原性末端处形成的醛基起反应。(Jennings 和 Lugowski, J Immunol. 1981 ;127 : 1011-8 ;Femandes 和 Gregonradis, Biochim Biophys Acta. 1997 ;1341 ;26-34)。产生的席夫碱可以通过与 NaCNBH<sub>3</sub> 的特异性还原反应以形成仲胺而被稳定化。一种可选的途径是,在预先的氧化反应之后,通过与 NH<sub>4</sub>Cl 的还原性胺化作用而在聚唾液酸 (PSA) 中产生末端游离氨基。双功能试剂可以被用于连接两个氨基或者两个羟基。例如,使用试剂比如 BS<sup>3</sup> (双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯 /Pierce 公司, Rockford, 伊利诺斯州) 可以将含有氨基的 PSA 偶联于蛋白质的氨基。另外,杂双功能交联试剂比如 Sulfo-EMCS (N-ε-马来酰亚胺己酰氧基) 磺基琥珀酰亚胺酯 /Pierce 公司) 可以被用于连接例如胺类和硫醇基团。

[0059] 在另一个途径中,可以制备 PSA 酰肼,并且在预先的氧化反应和产生醛类功能之后将其偶联于蛋白质的碳水化合物部分。

[0060] 治疗性蛋白的游离胺基可以与唾液酸残基的 1-羧基起反应从而形成肽基键,或者可以在 1-羧基和活性成分上的羟基或其他合适的活性基团之间形成酯键。作为另一种选择,羧基可以与脱乙酰基的 5-氨基形成肽键。药物学活性化合物分子的醛基可以与唾液酸残基上的 N-脱乙酰基的 5-氨基形成席夫碱。

[0061] 可选地,多糖化合物可以以非共价方式与药物学活性化合物例如 FVIIa 相连接。例如,多糖化合物和药物学活性化合物可以通过疏水性的相互作用例如通过多糖化合物的脂类组分而与疏水性的药物学活性化合物相连接。其他非共价的连接关系可以通过静电相互作用,这是电荷相反的离子彼此吸引。

[0062] 药物学活性化合物可以以化学计量的含量(例如,1 : 1)而被直接地共价连接于多糖化合物。作为另一种选择,两个以上分子的多糖化合物可以被连接于一个分子的活性成分上。

### 应用

[0063] 本发明的目的在于,与未被连接于至少一个生理学可接受的唾液酸部分上的 FVIIa 的体内半衰期相比,提高了凝血蛋白质、尤其 FVIIa 或其生物活性衍生物的体内半衰期,应用对象患有与 FVIIa 功能性缺陷或缺乏有关的出血病症。本发明的 PSA-FVIIa-结合物可以进一步被用于与 FVIII 和 FIX 中至少一个的功能性缺陷或者先天性或获得性缺乏有关的出血病症治疗。

[0064] 按照目前治疗水平,并且根据国际准则和条例,注入的 FVIIa 的药物动力

学被确认并且被视作有效替代的有效性标准参照物 (Bjorkman 和 Berntrop, Clin Pharmacokinet. 2001 ;40 :185-32)。

[0065] 这基于已证实的假设,即已经通过机能活动的标准化测试所表征的注入的 FVIIa 产物将在血流中被发现,并且将按照预期在那里作为凝血级联的组分起作用。因此动物模型中任何药物动力学分析都将预示对于用 FVIIa 产品治疗的病人的预期功效。

#### 半衰期

[0066] 在本发明的一种实施方式中,蛋白质构建体的体内半衰期被延长。在一个相关的实施方式中,与未被结合于唾液酸的 FVIIa 相比,蛋白质构建体的体内半衰期被延长至少两倍;而在另一个实施方式中,体内半衰期被延长至少三倍。通过在大鼠体内测量药物动力学,可以评估 FVIIa 半衰期的延长情况,如下述实施例所述。

#### 给药

[0067] 给药途径不作具体限制,并且在一种实施方式中,本发明的蛋白质构建体可以注射给药,比如静脉注射、肌肉注射、或者腹膜内注射。

[0068] 为了将本发明包含蛋白质构建体的组合物给药于人类或试验用动物,在一个方面,组合物包含一种以上药物学可接受的载体。术语“药物学”或“药理学可接受的”指的是稳定的分子实体和组合物,其可抑制蛋白质降解比如聚集和分裂产物,另外当通过使用本技术领域众所周知的途径给药时不会产生过敏反应或者其他不良反应,如下所述。术语“药物学可接受的载体”包括任选的临床使用的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗试剂和吸收延迟试剂等,包括上述公开的那些试剂。

[0069] 在此使用的术语“有效量”,包括适合于治疗如上所述患有出血病症的哺乳动物的剂量。

[0070] 组合物可以通过下述途径给药:口服、体表、透皮、肠胃外、吸入喷雾、阴道给药、直肠、或者颅内注射。在此使用的术语“肠胃外”包括皮下注射、静脉注射、肌肉注射、脑池内注射、或者输液技术。通过静脉注射、皮内注射、肌肉注射、乳房内注射、腹膜内注射、鞘内注射、眼球后注射、肺内注射和 / 或特定位点处手术植入的给药也是可行的。一般来讲,组合物基本上不含热原、以及可能对受试者有害的其他杂质。

[0071] 可以进行组合物的单一给药或者多次给药,剂量水平和模式由主治医师选择。为了预防或治疗疾病,如上所述,适当的剂量将取决于被治疗的疾病类型、严重程度和疾病过程,药物给药是用于预防目的还是治疗目的、先前的治疗、病人的病历和对药物的反应、以及主治医师的判断。

#### 药物组合物

[0072] 本发明还涉及一种包含有效量的如上限定的蛋白质构建体的药物组合物。该药物组合物可以进一步包含药物学可接受的载体、稀释剂、盐、缓冲液、或者赋形剂。该药物组合物可以用于治疗如上限定的出血病症。本发明的药物组合物可以是溶液或冻干制品。有许多已知的形成蛋白质特别是 FVIIa 的稳定溶液的方法。在美国专利 No. 5, 874, 408 中公开了一个实施例。可以对药物组合物的溶液进行任何合适的冻干加工。

#### 试剂盒

[0073] 作为附加的方面,本发明包括试剂盒,其包含以可促进向对象给药的方式进行包装的本发明的组合物。在一种实施方式中,这样的试剂盒包括被包装在容器比如密封瓶子

或密封管中的在此描述的化合物或组合物（例如，包含蛋白质构建体的组合物），带有附着于容器、或者包括在包装中的标签，用于描述在实施该方法时化合物或组合物的使用。在一种实施方式中，试剂盒含有具有包含蛋白质构建体的组合物的第一容器、和具有用于第一容器中组合物的生理学可接受的重建溶液的第二容器。在一个方面，化合物或者组合物以单位剂量形式被包装。该试剂盒可以进一步包括适合于根据特定的给药途径而给药组合物的装置。优选地，试剂盒含有描述治疗性蛋白或肽组合物的使用的标签。

#### 附图说明

[0074] 图 1 显示了 rFVIIa 在与 PSA 结合后的 SDS-PAGE。

[0075] 图 2 显示了 rFVIIa-PSA- 结合物和未修饰的 rFVIIa 在大鼠体内的药物动力学。

[0076] 图 3 显示了 rFVIIa-PSA- 结合物和未修饰的 rFVIIa 在大鼠体内的药物动力学（抗原水平）。

[0077] 图 4 显示了 rFVIIa 在 N- 末端与 PSA 结合后的 SDS-PAGE。

[0078] 图 5 显示了单 SA-rFVIIa 和三 SA-rFVIIa 的毛细管电泳。

[0079] 图 6A 和 6B 显示了 rFVIIa-PSA- 结合物和未修饰的 rFVIIa 在大鼠体内的药物动力学，A：单 SA-rFVIIa；B：三 SA-rFVIIa。

[0080] 图 7 显示了 N- 乙酰神经氨酸三聚体的毛细管电泳。

#### 具体实施方式

[0081] 以下用实施例进一步阐明本发明。但并不是对本发明作任何限制。

##### 实施例

##### 实施例 1：

用多聚乙酸神经氨酸修饰 rFVIIa 中的赖氨酸残基

[0082] 按照 Jennings 和 Lugowski 描述的方法 (J Immunol. 1981 ;127 ;1011-8)，用唾液酸（多聚乙酸神经氨酸，CA）对赖氨酸残基进行修饰。该过程使用购自 Sigma 公司（Sigma-Aldrich，圣路易斯市；密苏里州）的 CA。将含有 0.1M NaIO<sub>4</sub> 的 CA 水溶液（浓度：20mg/mL）在室温下避光搅拌 15min 以氧化 CA。每毫升活化的 CA 溶液中加入 2mL 乙二醇，并且在室温下避光进一步搅拌 30min。溶液在 0.05M 磷酸钠缓冲液、pH7.2 中、在 2-8℃ 的温度范围内避光透析过夜。

[0083] 随后将等分的这种溶液加至在 0.05M 磷酸钠缓冲液、pH7.2 中的 rFVIIa 溶液（30 μg/mL）中，使终浓度为 100mg 活化 CA/ 每 mg rFVIIa。该混合物在室温下避光搅拌 180min。添加 NaCNBH<sub>3</sub>（终浓度 10mg/mg rFVIIa），并且在轻轻振荡下将混合物室温下避光保温 18h。然后每毫升该混合物中加入 2.5mL 的 1M TRIS- 水溶液、pH7.2，并且搅拌 60min 以终止反应。

[0084] 使用 QHyperD F50 μm 树脂（Pall BioSeptra 公司，Cergy，法国）和 Pharmacia XK-10 柱（PharmaciaXK10；h = 15cm），通过离子交换色谱法，将游离的试剂与 rFVIIa-CA 酸性结合物相分离。然后用洗脱缓冲液（20mMHEPES/1M NaCl、pH8.0）洗脱结合 CA 的蛋白质。最后，使用 30kD 滤膜（再生纤维素/Millipore 公司），在含有 150mM NaCl 和 0.5% 蔗糖的 20mM HEPES 缓冲液、pH7.4 中，通过超滤 / 渗滤（UF/DF）作用浓缩该洗脱液。

## 实施例 2：

## 聚唾液酸化的 rFVIIa 的生物化学表征

[0085] 通过凝血测试方法测定 rFVIIa-PSA 的酶活性,其中将 FVIIa 加至人的 FVII 缺乏的血浆中,并且通过截短的组织因子与 FVIIa 反应而不是与 FVII(Staclot, Diagnostica Stago 公司, Asnieres, 法国) 反应来引发凝结。

[0086] 通过凝血酶产生测定法 (TGA) 测量 rFVII-PSA 的 FVIII 旁路活性,其中当存在凝血酶特异性的荧光肽-底物时,将 FVIIa 加至含有较高滴度的抗 FVIII 抑制剂的严重的血友病 A 血浆中。用组织因子-磷脂复合物引发凝血,并且通过底物荧光团的裂解速度连续地测量凝血酶产生。由峰值凝血酶,即,在测定期间观察到的最大凝血酶浓度计算出凝血酶产生活性。在两个案例中,使用 NovoSeven 重组 FVIIa 制品 (Novo Nordisk 公司, 哥本哈根, 丹麦) 作为参照。

如表 1 所示,在修饰之后 PSA-rFVIIa 的比活力会降低。

表 1:在与 PSA 结合前后 rFVIIa 的比活力

|             | FVIIa 活性          |                   |
|-------------|-------------------|-------------------|
|             | STF<br>(U/mg 蛋白质) | TGA<br>(U/mg 蛋白质) |
| 未修饰的 rFVIIa | 45942             | 44296             |
| rFVIIa-PSA  | 1003              | 22                |

[0087] 在非还原的条件下进行 SDS-PAGE,目测修饰。用多克隆抗 FVII 抗体 (Affinity Biologicals 公司;Ancaster, 加拿大) 并且用单克隆抗 PSA 抗体 (Chemicon 国际公司, Temecula, 加利福尼亚州, 美国) 进行免疫染色。修饰导致通过与含有蛋白质的 PSA 相关联的斑迹面积所显示的 FVIIa 分子量的增加 (图 1)。

## 实施例 3：

## 在大鼠体内 rFVIIa-PSA- 结合物的药物动力学

[0088] 四个大鼠 (Crl :CD(SD), Charles River 实验室公司, Wilmington, 马萨诸塞州) 被麻醉,并且通过以 20mL/ 每 kg 的体积剂量经尾部静脉注射入在缓冲液 (1.3g/L 甘氨酸替甘氨酸、3g/L 氯化钠、30g/L 甘露醇、1.5g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g/L 吐温 80、pH5.5) 中的 rFVIIa-PSA- 结合物 (16.500U FVIIa/kg)。在 6 个正常大鼠身上将未修饰的 rFVIIa 以 18.000U FVIIa/kg 的剂量用作对照。在注射入所施用物质 5min、30min、1h、2h、4h、6h、8h 和 24h 后,从眼球后静脉取得血液样本。制备柠檬酸血浆并冷冻,用于进一步分析。

[0089] 然后测量血浆中 FVIIa 活性 (Staclot, Diagnostica Stago 公司, Asnieres, 法国)。未修饰的 rFVIIa 的半衰期是 1.1h,并且随着与 rFVIIa 结合增加到 2.3h (图 2)。

[0090] 在附加的实验中测量 FVIIa 抗原水平的药物动力学。六个大鼠被麻醉,并且通过以 10mL/ 每 kg 的体积剂量经尾部静脉注射入在缓冲液 (1.3g/L 甘氨酸替甘氨酸、3g/L 氯化钠、30g/L 甘露醇、1.5g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g/L 吐温 80、pH5.5) 中的 rFVIIa-PSA- 结合物 (450  $\mu\text{g}$ /kg)。在 6 个正常大鼠身上将未修饰的 rFVIIa 以 390  $\mu\text{g}$ /kg 的剂量用作对照。在注射入所施用物质 5min、30min、1h、2h、4h、6h、8h、12h 和 24h 后,从眼球后静脉取得血液样本。制备柠檬酸血浆并冷冻,用于进一步分析。用 ELISA (多克隆抗人 FVII 抗体) 测量血

浆中 FVII 抗原水平。当用在 1.1h (对于天然 rFVIIa) 和 3.1h (对于 rFVIIa- 结合物) 内得到的 MS Excel 确定时,通过线性回归来计算半衰期。FVII 抗原被归一化为在施用 5min 后获得的平均血浆水平 (图 3)。

#### 实施例 4:

##### FVIIa 的 N- 末端聚唾液酸化

[0091] 在 pH6.0 下进行 CA 在 FVIIa 的 N- 末端处的结合。该过程使用购自 Sigma 公司 (Sigma-Aldrich) 的 CA, 其在 Q-Sepharose FF (GE Healthcare 公司, 慕尼黑, 德国) 上通过阴离子交换色谱被进一步纯化。将含有 0.04M  $\text{NaIO}_4$  的纯化 CA 的水溶液 (浓度: 23mg/mL) 在室温下避光搅拌 15min 以氧化 CA。接着, 将等分的这种溶液加至在 0.05M 磷酸钠缓冲液、pH6.0 中的 rFVIIa 溶液 (740  $\mu\text{g/mL}$ ) 中, 使终浓度为 60mg 活化 CA/ 每 mg rFVIIa (过量大约 150 摩尔)。将该混合物在室温下避光搅拌 180min。添加  $\text{NaCNBH}_3$  (25mg/mg rFVIIa), 并且在轻轻振荡下将混合物于 4°C 下避光保温 24h。然后每毫升该混合物中加入 2.5mL 的 1M TRIS- 水溶液、pH7.2, 并且于 4°C 下避光搅拌 60min 以终止反应。

[0092] 使用 QHyperD F50  $\mu\text{m}$  树脂 (Pall BioSeptra 公司, Cergy, 法国) 和 Pharmacia XK-16 柱 (PharmaciaXK16; h = 14cm), 通过离子交换色谱法, 将游离的试剂与 rFVIIa-CA 酸性结合物相分离。然后用洗脱缓冲液 (20mM HEPES/0.5M NaCl、pH8.0) 洗脱结合 CA 的蛋白质。最后, 使用 10kD 滤膜 (再生纤维素 /Millipore 公司) 在含有 150mM NaCl 的 20mM HEPES 缓冲液、pH7.4 中通过 UF/DF 浓缩洗脱液。离子交换色谱和 UF/DF 步骤是在 4°C 下进行。

[0093] 按照在实施例 2 中描述的方法, 通过凝血测试方法、并且通过凝血酶产生测定来确定 N- 末端改性的 rFVIIa-PSA 的酶活性。结果汇总于表 2 中。

表 2: 在与 PSA 进行 N- 末端结合前后 rFVIIa 的比活力

|                    | FVIIa 活性          |                   |
|--------------------|-------------------|-------------------|
|                    | STF<br>(U/mg 蛋白质) | TGA<br>(U/mg 蛋白质) |
| 未修饰的 rFVIIa        | 52749             | 56814             |
| rFVIIa-PSA- (N-末端) | 25030             | 12564             |

[0094] N- 末端结合的 PSA-rFVIIa 的比活力通过 STF 测定法测量约下降到 50%; 并且通过 TGA 测量下降到 25%。

[0095] 按照在实施例 2 中描述的方法, 在用多克隆抗 FVII 抗体、并且用多克隆抗 PSA 抗体进行免疫染色的非还原条件下用 SDS-PAGE 来目测修饰。修饰导致与在抗 PSA 染色的免疫印迹中所显示条带相关联的 FVIIa 分子量轻微的提高 (图 4)。

#### 实施例 5:

##### FVIIa 与 CNBr 活化的合成 N- 乙酰神经氨酸的结合

[0096] 按照美国专利 No. 3, 487, 890. 350 所述的方法, 使 rFVIIa 与 N- 乙酰神经氨酸相结合。将 350mg 合成的 N- 乙酰神经氨酸 (Sigma-Aldrich) 溶于 10mL 的 0.1M HEPES 缓冲液、pH9.0 中, 然后将 430mg 的 CNBr (Fluka 公司, Steinhamm, 德国) 加至这种溶液中, 并且在活化过程期间用 0.5M NaOH 将 pH 调节到 9.5。在 30min 后, pH 值是 9.5。然后通过添加 0.1M



的 HCl, 把 pH 值调节到 8.4。在整个活化过程期间, 通过利用冰浴来控制温度, 并且保持在 20-25°C。对于活化 N-乙酰神经氨酸与 rFVIIa 的结合, 加入在 50mM 磷酸盐缓冲液、pH7.2 中的 rFVIIa 溶液 (50mL/0.44mg rFVIIa/mL), 并且在轻轻搅拌下于室温下保温 30min。然后加入 20mL 的 0.2M Tris 缓冲液, 用于终止反应并阻断游离的氰酸酯, 将混合物在轻轻搅拌下保温 15min。最后, 使用 10kD 滤膜 (再生纤维素 /Millipore 公司) 在 50mM 磷酸盐缓冲液、pH7.2 中通过 UF/DF 浓缩该溶液。

#### 实施例 6:

FVIIa 与 CNBr 活化的合成 N-乙酰神经氨酸三聚体的结合

[0097] 按照美国专利 No. 3, 487, 890 所述用于 N-乙酰神经氨酸的方法, 将 rFVIIa 结合于从 TimTec 有限公司 (Newark, 美国) 购得的合成的 N-乙酰神经氨酸三聚体。将 350mg 的 N-乙酰神经氨酸三聚体溶于 10mL 的 0.1MHEPES 缓冲液、pH9.0 中。然后将 430mg 的 CNBr (Fluka 公司) 加至这种溶液中, 并且在活化过程期间用 0.5M NaOH 将 pH 调节到 9.5。在 30min 后, pH 值是 9.5。然后通过添加 0.1M 的 HCl, 把 pH 值调节到 8.4。在整个活化过程期间, 通过利用冰浴来控制温度, 并且保持在 20-25°C。然后按照在实施例 5 中描述的方法, 进行活化的三聚体与 FVIIa 的结合。

#### 实施例 7:

单 SA-FVIIa 和三 SA-FVIIa 的生物化学表征

[0098] 通过凝血测试方法、并且通过如在实施例 2 中描述的凝血酶产生测定, 来测定实施例 5 中描述的修饰的结合于 N-乙酰神经氨酸的 rFVIIa (单 SA) 或者实施例 6 中描述的结合于 N-乙酰神经氨酸三聚体的修饰的 rFVIIa (三 SA) 的酶活性。结果被汇总于表 3 中。

表 3: 在与 PSA 进行 N-末端结合前后 rFVIIa 的比活力

|             | FVIIa 活性          |                   |
|-------------|-------------------|-------------------|
|             | STF<br>(U/mg 蛋白质) | TGA<br>(U/mg 蛋白质) |
| 未修饰的 rFVIIa | 40579             | 57230             |
| 单 SA-rFVIIa | 6064              | 21784             |
| 三 SA-rFVIIa | 1743              | 4131              |

[0099] 通过 STF 测定法测量的结合少量 PSA 的 rFVIIa 的比活性降低, 但是通过 TGA 测量的单 SA-rFVIIa 约保持 50% 的其 FVIII 旁路活性。

[0100] 另外, 按照 Klausen 和 Komfelt 描述的方法 (J Chromatogr A. 1995 ;718 : 195-202), 通过毛细管电泳 (CE) 研究了单 SA-rFVIIa 和三 SA-rFVIIa。结果显示于图 5 中。图中显示, 与天然 rFVIIa 相比, 由于附加的负电荷, 单 SA-rFVIIa 和三 SA-rFVIIa 发生明显的向更高保留时间的位移。

#### 实施例 8:

rFVIIa-单 SA 和 rFVIIa-三 SA 结合物在大鼠体内的药物动力学

[0101] 十二个大鼠被麻醉, 并且通过以 10mL/ 每 kg 的体积剂量经尾部静脉注射入在缓冲液 (1.3 g/L 甘氨酸替甘氨酸、3g/L 氯化钠、30g/L 甘露醇、1.5g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、0.1g/L 吐温 80、pH5.5) 中的 rFVIIa-单 SA 结合物 (400 μg 蛋白质 /kg)。四个大鼠用 rFVIIa-三

SA 结合物 (400  $\mu$ g 蛋白质/kg) 处理。在 8 个正常大鼠身上将未修饰的 rFVIIa 以 400  $\mu$ g 蛋白质/kg 的剂量用作对照。在注射入所施用物质 5min、30min、1h、2h、4h、7h、10h 和 22h 后, 从眼球后静脉取得血液样本。制备柠檬酸血浆并冷冻, 用于进一步分析。用 ELISA (多克隆抗人 FVII 抗体) 测量血浆中 FVII 抗原水平。在注射 5min 后在血浆中发现的数据被归一化为与浓度相关。在注射 7h 后, rFVIIa- 单 SA 和三 SA-rFVIIa 的血浆水平比天然 rFVIIa 对照物更高。结果被显示于图 6A(rFVIIa- 单 SA) 和图 6B(rFVIIa- 三 SA) 中。

#### 实施例 9:

通过还原性胺化作用将 N- 乙酰神经氨酸三聚体偶联于 rFVIIa

[0102] rFVIIa 通过还原性胺化作用与 N- 乙酰神经氨酸三聚体的结合按照 Biessen 等描述的方法 (Biochem. J. 1994 ;299 :291-6) 进行。将 350mg 的 N- 乙酰神经氨酸三聚体 (TimTec 公司) 溶于 10mL 的 0.1M HEPES 缓冲液、pH7.0 中, 并且将其加至 32mL 的在 20mM HEPES、70mM NaCl、pH7.4 中的重组 FVIIa 溶液中 (0.3mg/mL)。然后加入 NaCNBH<sub>3</sub> 至终浓度为 50mg/mL, 并且通过添加 0.1M 的 HCl 将 pH 校正到 pH7.0。将混合物在轻轻搅拌下于 37°C 保温 48h。使用 10kD 滤膜 (再生纤维素 /Millipore 公司) 在含有 150mMNaCl 的 20mM HEPES 缓冲液、pH7.4 中通过 UF/DF 浓缩该溶液。

[0103] 根据 Klausen 和 Komfelt 所述的方法 (J Chromatogr A. 1995, 718 :195-202), 通过进行 CE 显示了 N- 乙酰神经氨酸三聚体结合于 rFVIIa 的情况。结果显示于图 7 中。图中显示, 与天然 rFVIIa 相比, 衍生物发生明显的向更高保留时间的位移。

#### 实施例 10:

多聚乙酸神经氨酸的纯化和衍生化

[0104] 按照 W00601616A1 所述的方法, 在 Q-Sepharose FF 上通过阴离子交换色谱对 CA 进行纯化。将 5g CA 溶于 50mL 含有 25mM NaCl 的 10mM 三乙醇胺缓冲液、pH7.4 中 (= 起始缓冲液)。该溶液施加到填充有用起始缓冲液平衡的 Q-Sepharose FF (GE Healthcare 公司) 的 Pharmacia XK50 柱上。然后用 8 个柱容积 (CV) 的起始缓冲液洗柱, 并且用 3 个柱容积的在起始缓冲液中的 200mMNaCl、350mM NaCl 和 500mM NaCl 逐级洗脱被结合的 CA。用 350mM NaCl 洗脱的部分通过 SDS 凝胶电泳显示出 20kDa 的分子量。使用由再生纤维素 (Millipore 公司) 制成的 5kD 滤膜通过超滤作用对该部分进行浓缩, 随后在 50mM 磷酸盐缓冲液、pH7.2 中进行渗滤。然后按照在实施例 1 中描述的方法用 NaIO<sub>4</sub> 氧化 CA, 并且按照 W005016973A1 中描述的方法通过还原性胺化作用导入末端伯氨基团。对于还原性胺化作用, 将 11mL 的 2M NH<sub>4</sub>Cl 溶液加至 20mL 在 50mM 磷酸盐缓冲液、pH7.2 中的含有 58mg 氧化 PSA/mL 的溶液中。然后加入在 1M NaOH 中 5M NaCNBH<sub>3</sub> 的溶液, 使终浓度为 75mM。该反应在室温下于 pH8.0 时进行 5 天。然后混合物在含有 10mM NaCl 的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 (50mg/L) 中、随后在含有 5mM EDTA 的 50mM 磷酸盐缓冲液 pH8.0 中进行透析。然后通过末端伯氨基团与 2- 亚氨基四氢噻吩 (iminothiolane) (Traut 试剂 /Pierce 公司) 的反应而导入硫氢基。该反应在含有 5mM EDTA 的 50mM 磷酸盐缓冲液、pH8.0 中、试剂 20 倍摩尔过量的情况下于室温下进行 1h。最后, 使用截流量为 5kD、由再生纤维素 (Millipore 公司) 制成的滤膜, 对含有末端游离 SR 基团的 PSA 溶液进行超滤 / 渗滤。

#### 实施例 11:

通过利用杂双功能交联剂将 PSA 偶联于 rFVIIa

[0105] 将 PSA(Sigma-Aldrich) 在 Q-Sepharose FF(GE 保健公司) 上通过阴离子交换色谱进行纯化, 并且通过化学修饰导入末端硫氢基基团, 从而形成如在实施例 10 中描述的 PSA-SH。对于 PSA-SH 偶联于 rFVIIa, 使用杂双功能的、水溶性的交联剂 Sulfo-EMCS((N-ε-马来酰亚胺己酰氧基) 硫代琥珀酰亚胺酯 /Pierce 公司), 其含有两个反应基团: 用于结合硫氢基的顺丁烯二酰亚胺基, 和用于结合游离氨基的硫代-NHS-酯基。向 2mL 在含有 150mM NaCl 的 20mM HEPES 缓冲液、pH7.4 中的 rFVIIa 溶液 (1.6mg/mL) 中加入 Sulfo-EMCS 至终浓度为 0.07mg 交联剂 /nag 蛋白)。反应在室温下进行 30min。接着, 加入 130mg 根据实施例 10 制备的 PSA-SH(100 倍过量), 并且中间体连接剂 /rFVIIa 复合物偶联于 PSA-SH 的偶联反应在室温下进行额外的 2h。然后将混合物在丁基-琼脂糖凝胶 (GE 保健公司) 上通过 HIC 色谱法进行纯化。将 5MNaCl 溶液加入混合物中至终浓度为 3MNaCl。然后将该混合物施加于填充有丁基-琼脂糖凝胶 (GE 保健公司) 的色谱柱中, 并且用含有 6.7mM CaCl<sub>2</sub> 的 50mM HEPES 缓冲液、pH7.4 进行 rFVIIa-PSA 结合物的洗脱。在洗脱结合物之后, 把 pH 调节到 pH6.9。

#### 实施例 12:

PSA- 酰肼结合于 rFVIIa 的碳水化物部分

[0106] 对于将 PSA 结合于 rFVIIa 的碳水化物部分, 制备 rFVIIa 在 20mM HEPES 缓冲液、pH6.0 中的溶液 (1.6mg/mL)。向 9 个体积的这种溶液中加入 1 体积的 5mM NaIO<sub>4</sub> 溶液, 并且轻轻地混合。该氧化反应于 4℃ 下避光进行 1h, 以产生游离醛基。然后加入亚硫酸氢钠 (终浓度 5mM) 以停止反应。随后加入 PSA- 酰肼 (W00606168A2) (终浓度 10mM), 并且对醛基的偶联反应在室温下进行 1h。然后按照在实施例 1 中描述的方法, 在 QHyperD(Pall BioSeptra 公司) 上通过阴离子交换色谱对 PSA-rFVIIa 结合物进行纯化。

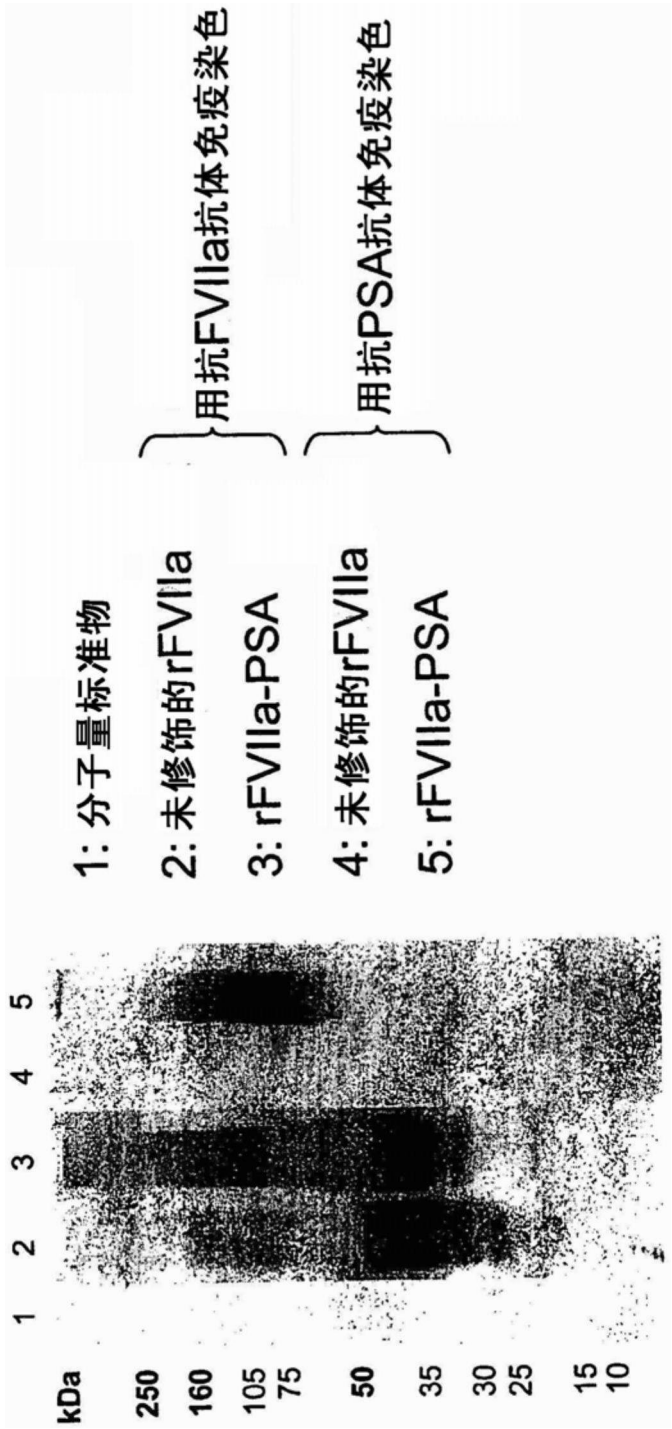


图 1

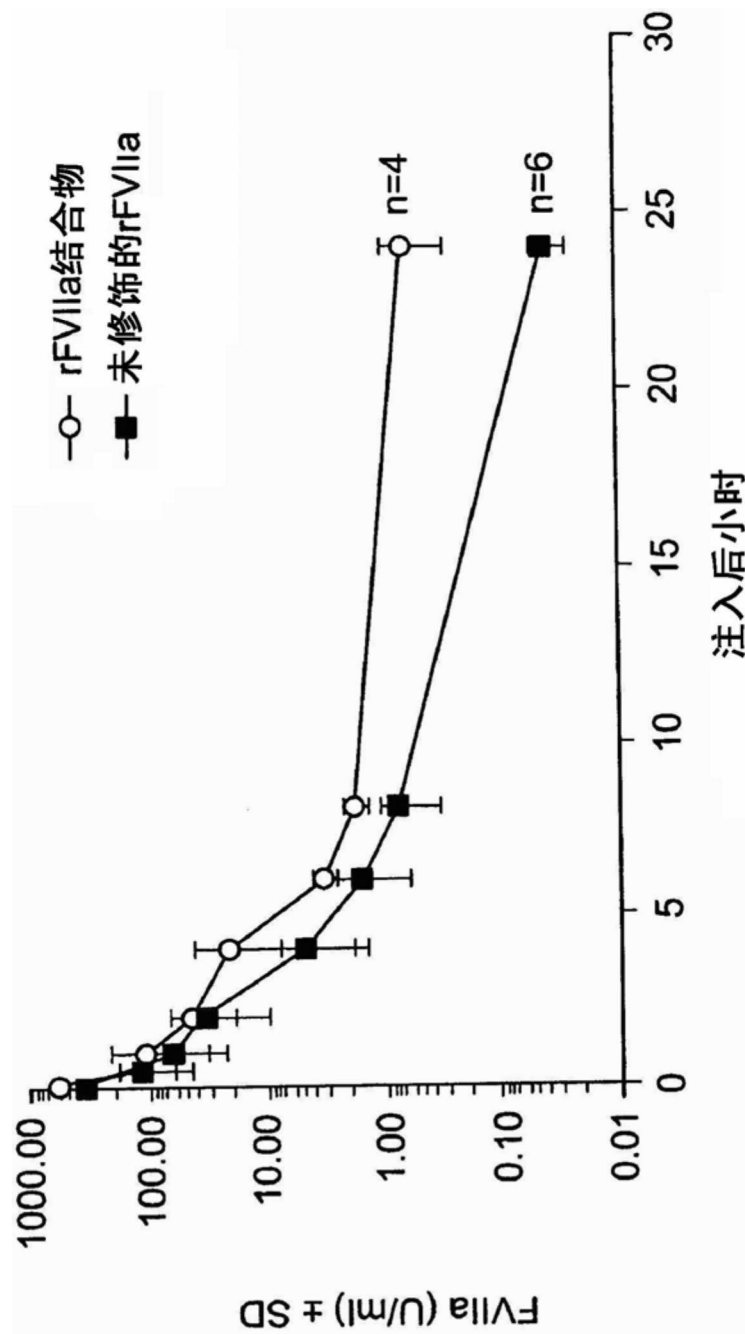


图 2

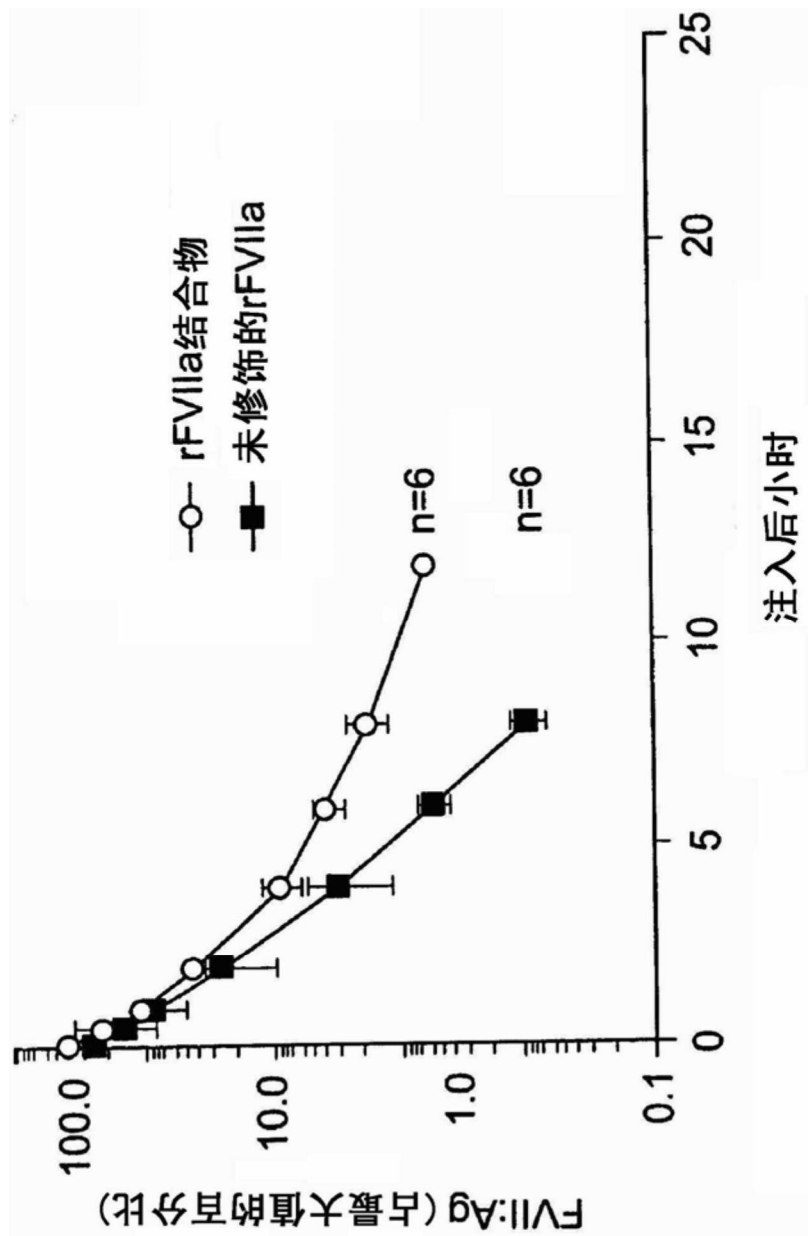


图 3

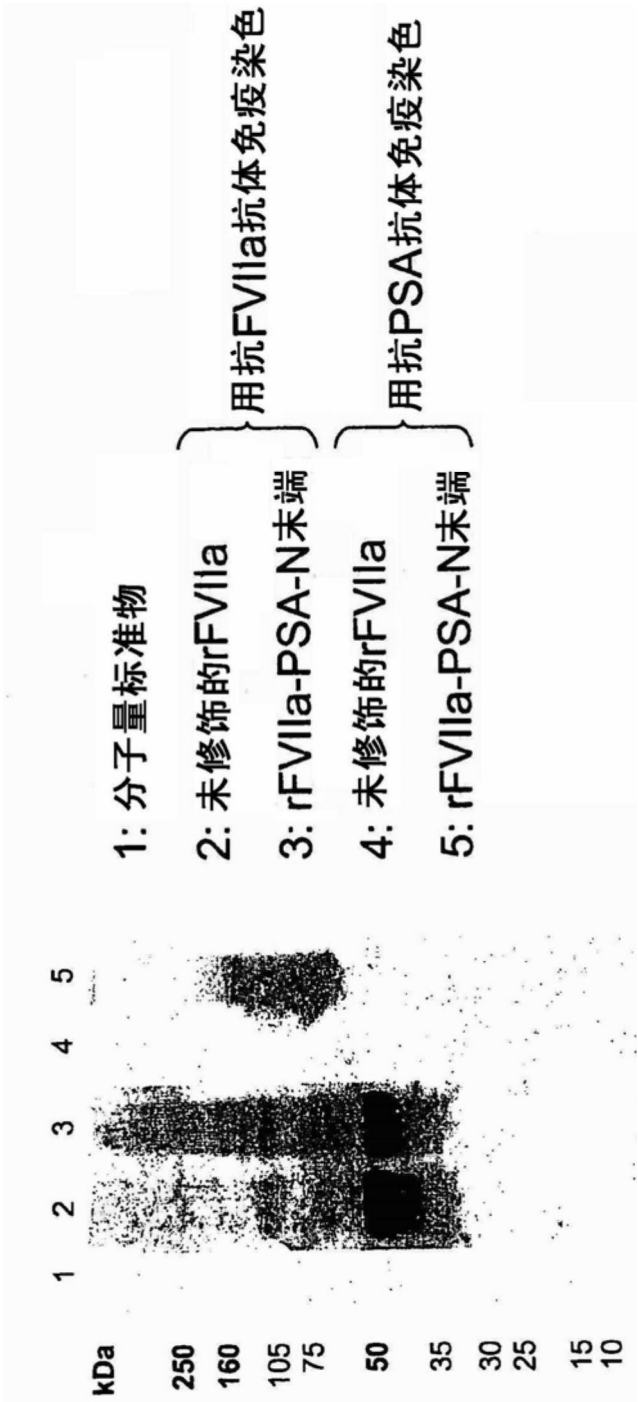


图 4

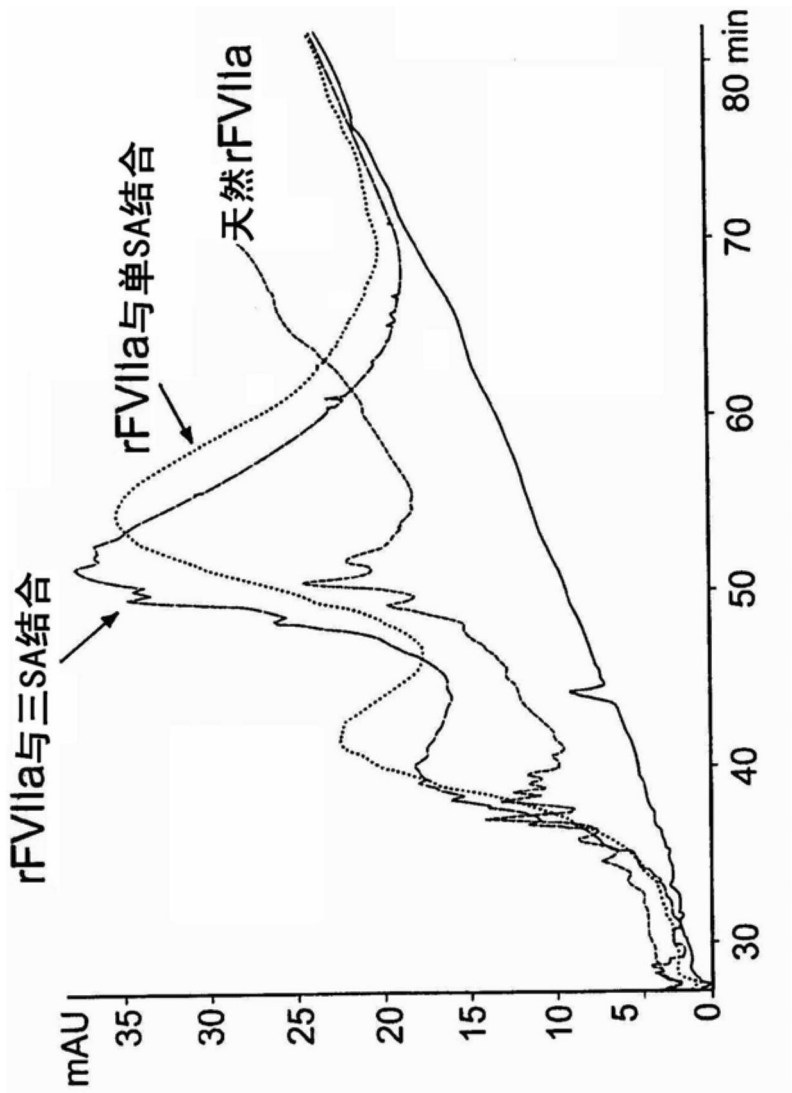


图 5



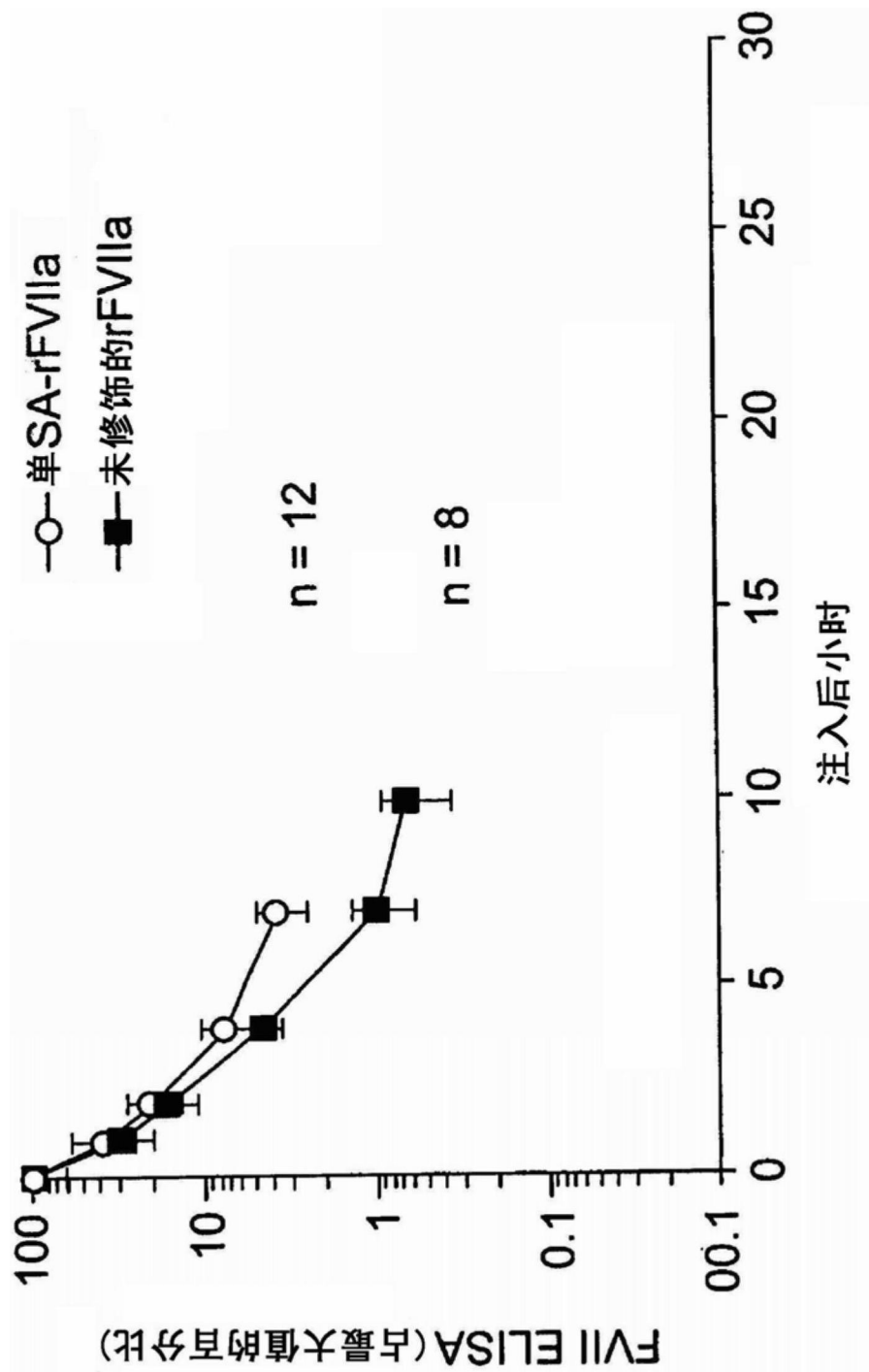


图 6A

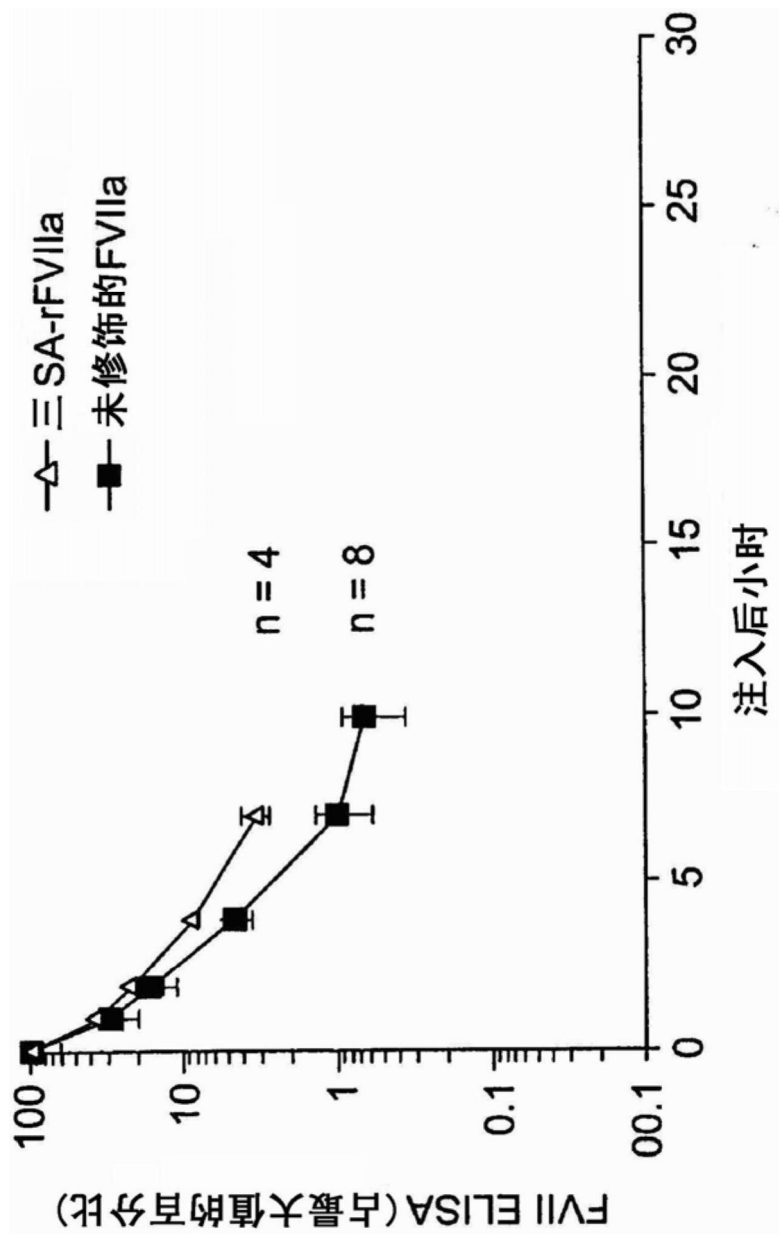


图 6B

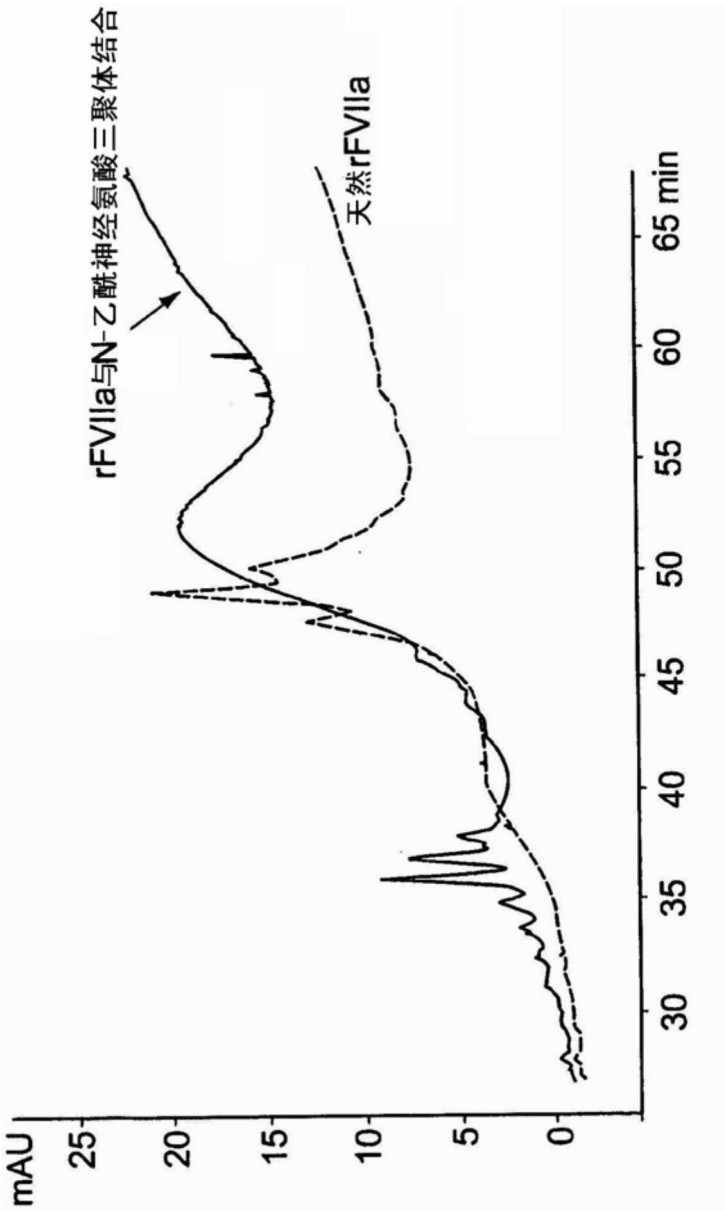


图 7

## Abstract

The present invention relates to a proteinaceous construct comprising plasmatic or recombinant factor VIIa (F VIIa) or biologically active derivatives thereof, which are bound to a carbohydrate moiety comprising 1-4 sialic acid units, wherein the *in vivo* half-life of the proteinaceous construct is substantially prolonged in the blood of a mammal, as compared to the *in vivo* half-life of a FVIIa molecule not bound to a carbohydrate moiety. The invention also provides a method for controlling bleeding in a mammal having a bleeding disorder due to functional defects or deficiencies of FVIIa, FVIII, or FIX. The invention also provides a method for controlling bleeding in a mammal during surgery or trauma.