



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104704118 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 10

(21) 申请号 201380053832. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 10. 15

C12N 9/64(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 38/48(2006. 01)

12188473. 8 2012. 10. 15 EP

A61K 47/48(2006. 01)

61/715920 2012. 10. 19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 04. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/071510 2013. 10. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/060401 EN 2014. 04. 24

(71) 申请人 诺和诺德保健 AG (股份有限公司)

地址 瑞士苏黎世

(72) 发明人 H. R. 斯坦尼克 O. H. 奥森

H. 奥斯特加亚尔德

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李波 彭昶

权利要求书1页 说明书41页

序列列表3页 附图11页

(54) 发明名称

凝血因子 VII 多肽

(57) 摘要

本发明涉及具有凝剂活性的经修饰的凝血因子 VII (因子 VII) 多肽, 以及编码表达此类多肽的多核苷酸构建体、包含且表达此类多核苷酸的载体和宿主细胞、药物组合物、用途和治疗方法。

1. 相对于人因子 VII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1), 包含两个或更多个取代的因子 VII (a) 多肽,

其中所述取代中的至少一个是其中 T293 已替换为 Lys (K)、Tyr (Y)、Arg (R) 或 Phe (F); 其中 Q176 已替换为 Lys (K)、Arg (R)、Asn (N); 和 / 或 Q286 已替换为 Asn (N), 和

其中所述取代中的至少一个是其中 M298 已替换为 Gln (Q)、Lys (K)、Arg (R)、Asn (N)、Gly (G)、Pro (P)、Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Phe (F)、Trp (W)、Tyr (Y)、Asp (D)、Glu (E)、His (H)、Cys (C)、Ser (S) 或 Thr (T)。

2. 根据权利要求 1 的因子 VII (a) 多肽, 其中 T293 已替换为 Lys (K)、Tyr (Y)、Arg (R) 或 Phe (F)。

3. 根据权利要求 1 的因子 VII (a) 多肽, 其中 Q176 已替换为 Lys (K)、Arg (R) 或 Asn (N)。

4. 根据权利要求 1 的因子 VII (a) 多肽, 其中 Q286 已替换为 Asn (N)。

5. 根据前述权利要求中任一项的因子 VII (a) 多肽, 其中 M298 已替换为 Q。

6. 根据权利要求 1 的因子 VII (a) 多肽, 其中所述多肽具有下述取代的组之一: T293K/M298Q、T293Y/M298Q、T293R/M298Q、T293F/M298Q、Q176K/M298Q、Q176R/M298Q、Q176N/M298Q、Q286N/M298Q、T293Y/V158D/E296V/M298Q、T293R/V158D/E296V/M298Q、T293K/V158D/E296V/M298Q、Q176K/V158D/E296V/M298Q 或 Q176R/V158D/E296V/M298Q。

7. 根据前述权利要求中任一项的因子 VII (a) 多肽, 其中所述因子 VII (a) 多肽与至少一种延长半衰期的部分偶联。

8. 根据权利要求 7 的因子 VII (a) 多肽, 其中所述延长半衰期的部分选自生物相容性脂肪酸及其衍生物、羟基烷基淀粉 (HAS), 例如羟乙基淀粉 (HES)、聚乙二醇 (PEG)、聚 (Glyx-Sery)_n (HAP)、透明质酸 (HA)、肝素前体聚合物 (HEP)、基于磷酸胆碱的聚合物 (PC 聚合物)、Fleximers、葡聚糖、聚唾液酸 (PSA)、Fc 结构域、转铁蛋白、白蛋白、弹性蛋白样肽 (ELP)、XTEN 聚合物、PAS 聚合物、PA 聚合物、白蛋白结合肽、CTP 肽和 FcRn 结合肽。

9. 根据权利要求 8 的因子 VII (a) 多肽, 其中所述延长半衰期的部分是肝素前体聚合物。

10. 根据权利要求 7-8 中任一项的因子 VII (a) 多肽, 其中所述因子 VII (a) 多肽具有另外的突变 R396C、Q250C 或 407C。

11. 用于产生权利要求 1-10 中任一项中限定的因子 VII (a) 多肽的方法。

12. 药物组合物, 其包含如权利要求 1-10 中任一项中限定的因子 VII (a) 多肽。

13. 用于治疗受试者中的出血障碍或出血发作或者用于增强正常止血系统的方法, 所述方法包括给有此需要的受试者施用治疗或预防有效量的如权利要求 1-10 中任一项中限定的因子 VII (a) 多肽。

14. 如权利要求 1-10 中任一项中限定的因子 VII (a) 多肽, 其作为药物使用。

15. 根据权利要求 14 的因子 VII (a) 多肽, 其在 A 或 B 型血友病治疗中作为药物使用。

凝血因子 VII 多肽

技术领域

[0001] 本发明涉及具有促凝活性的经修饰的凝血因子 VII (因子 VII) 多肽。它还涉及编码此类多肽的多核苷酸构建体、包含且表达此类多核苷酸的载体和宿主细胞、包含此类多肽的药物组合物、以及此类多肽的用途和治疗方法。

[0002] 通过引用并入本文的序列表

SEQ ID NO: 1:野生型人凝血因子 VII。

[0003] 发明背景

对血管的损伤活化止血系统,其涉及细胞和分子组分之间的复杂相互作用。最终引起出血停止的过程称为止血。止血的重要部分是在损伤部位处的血液凝固和凝块形成。凝血过程高度依赖几种蛋白质分子的功能。这些称为凝血因子。凝血因子中的一些是可以以失活酶原或酶促活性形式存在的蛋白酶。通过由另一种蛋白酶解活性凝血因子催化的多肽链的特异性切割,酶原形式可以转换为其酶促活性形式。因子 VII 是在肝中合成且作为单链糖蛋白分泌到血液内的维生素 K 依赖性血浆蛋白质。通过在单个位点处即在 SEQ ID NO: 1 的 R152 和 I153 之间的特异性蛋白酶解切割,因子 VII 酶原转换为活性形式(因子 VIIa),产生由单个二硫键连接的双链分子。因子 VIIa 中的两条多肽链被称为轻和重链,分别对应于 SEQ ID NO: 1(野生型人凝血因子 VII)的残基 1-152 和 153-406。因子 VII 占优势地作为酶原循环,但较少部分采取活化形式(因子 VIIa)。

[0004] 血液凝固过程可以分成三个时期:初始、扩大和传播。初始和传播期促使凝血酶形成,所述凝血酶是在止血中具有许多重要功能的凝血因子。如果排列在血管内表面的内皮细胞的单层屏障发生受损,则凝血级联起始。这暴露出血液中的血小板将与之粘附的内皮下细胞和血管外基质蛋白质。如果这发生,则存在于内皮下细胞表面上的组织因子(TF)变得暴露于在血液中循环的因子 VIIa。TF 是膜结合蛋白质,并且充当因子 VIIa 的受体。因子 VIIa 是具有固有的低活性的酶,即丝氨酸蛋白酶。然而,当因子 VIIa 与 TF 结合时,它的活性极大增加。因子 VIIa 与 TF 相互作用也将因子 VIIa 定位于具有 TF 的细胞的磷脂表面上,并且将其最佳放置用于将因子 X 活化为 Xa。当这发生时,因子 Xa 可以与因子 Va 组合,以在具有 TF 的细胞的表面上形成所谓的“凝血酶原酶”复合物。凝血酶原酶复合物随后通过切割凝血酶原而生成凝血酶。通过使 TF 暴露于循环因子 VIIa 而活化且导致凝血酶的初始生成的途径称为 TF 途径。TF: 因子 VIIa 复合物也催化因子 IX 至因子 IXa 的活化。随后活化因子 IXa 可以扩散至血小板表面,所述血小板粘附至损伤部位且已活化。这允许因子 IXa 与 FVIIIa 组合,以在活化血小板的表面上形成“tenase”复合物。由于其在将因子 X 活化为 Xa 中的显著效率,该复合物在传播期中起关键作用。有效的 tenase 催化的因子 Xa 活性的产生,进而又导致由凝血酶原酶复合物催化的凝血酶原至凝血酶的有效切割。

[0005] 如果在因子 IX 或因子 VIII 中存在任何缺陷,则它损害重要的 tenase 活性,并且降低凝血所需的凝血酶产生。最初由 TF 途径形成的凝血酶充当促凝信号,其鼓励血小板在损伤部位处的招募、活化和聚集。这导致松散的原始血小板塞的形成。然而,该原始血小板塞是不稳定的且需要强化以支持止血。塞的稳定涉及将血小板锚定且纠缠在纤维蛋白纤维

网中。

[0006] 坚固且稳定的凝块的形成依赖于产生局部凝血酶活性的强爆发。因此,在血管损伤后导致凝血酶生成的过程中的缺陷可以导致出血障碍,例如 A 和 B 型血友病。具有 A 和 B 型血友病的人分别缺乏功能因子 VIIIa 或因子 IXa。在传播期中的凝血酶生成严重依赖 tenase 活性,即需要因子 VIIIa 和 FIXa 两者。因此,在具有 A 或 B 型血友病的人中,无法进行原始血小板塞的适当固结,且持续出血。

[0007] 替补疗法是用于 A 和 B 型血友病的传统治疗,并且涉及因子 VIII 或因子 IX 的静脉内施用。然而,在许多情况下,患者产生针对输注蛋白质的抗体(也称为抑制剂),这降低或取消治疗的功效。重组因子 VIIa (Novoseven®) 已被批准用于治疗具有抑制剂的 A 或 B 型血友病患者,并且还用于终止出血发作或预防与创伤和/或手术相关的出血。重组因子 VIIa 也被批准用于治疗具有先天性因子 VII 缺陷的患者。已提出重组 FVIIa 通过不依赖 TF 的机制运转。根据该模型,重组 FVIIa 由于其 Gla 结构域导向活化血液血小板的表面,在此处,它随后将因子 X 蛋白酶解活化为 Xa,因此绕过功能性 tenase 复合物的需要。在不存在 TF 的情况下,FVIIa 的低酶促活性以及 Gla 结构域对于膜的低亲和力可以解释实现具有血友病的人中的止血所需的超生理学水平的循环 FVIIa 的需要。

[0008] 重组因子 VIIa 具有 2-3 小时的体内功能半衰期,其可能需要频繁施用以解决患者中的出血。进一步地,患者通常仅在出血已开始后接受因子 VIIa 疗法,而不是作为预防措施,这通常影响其一般生活质量。具有更长的体内功能半衰期的重组因子 VIIa 变体将降低所需施用数目,支持更不频繁的给药且因此保留出于患者和护理持有者 (care-holder) 的利益显著改善因子 VIIa 疗法的希望。

[0009] W02007031559 (7012) 公开了对通过抗凝血酶的抑制敏感性降低的因子 VII 变体。

[0010] W02009126307 (催化剂) 公开了促凝活性改变的经修饰的因子 VII 多肽。

[0011] 一般而言,在具有凝血病的人中存在许多未满足的医疗需要。重组因子 VIIa 促进凝块形成的用途突出了其作为治疗剂的增长的重要性。然而,重组因子 VIIa 疗法仍留下显著未满足的医疗需要,并且存在具有改善的药理学特性,例如增加的体内功能半衰期和改善的活性的重组因子 VIIa 多肽的需要。

[0012] 发明概述

本发明提供了经修饰的因子 VII 多肽,其经涉及而具有改善的药理学特性。在广泛方面,本发明涉及与人野生型因子 VIIa 相比较,显示出增加的体内功能半衰期的因子 VII 多肽。在另一个广泛方面,本发明涉及因子 VII 多肽,其显示出对通过内源血浆抑制剂特别是抗凝血酶的失活的抗性增加。在进一步广泛方面,本发明涉及具有增强或基本上保持的活性的因子 VII 多肽。

[0013] 本文提供的是具有增加的体内功能半衰期的因子 VII 多肽,其包含赋予增强的对抗凝血酶失活的抗性和很少或无蛋白酶解活性丧失的突变组合。在本发明的特别有利的方面,因子 VII 多肽与一种或多种“延长半衰期的基团”偶联,以增加体内功能半衰期。

[0014] 在一个方面,本发明涉及相对于人因子 VII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1),包含两个或更多个取代的因子 VII (a) 多肽,

其中所述取代中的至少一个是其中 T293 已替换为 Lys (K)、Tyr (Y)、Arg (R) 或 Phe (F) ;

其中 Q176 已替换为 Lys(K)、Arg(R)、Asn(N) ;和 / 或 Q286 已替换为 Asn(N), 并且其中所述取代中的至少一个是其中 M298 已替换为 Gln(Q)、Lys(K)、Arg(R)、Asn(N)、Gly(G)、Pro(P)、Ala (A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Phe(F)、Trp(W)、Tyr(Y)、Asp(D)、Glu(E)、His(H)、Cys(C)、Ser(S) 或 Thr(T)。

[0015] 在有利实施方案中, 本发明涉及与至少一种延长半衰期的部分偶联的因子 VII (a) 多肽。

[0016] 在另一个方面, 本发明涉及用于产生本发明的因子 VII (a) 多肽的方法。

[0017] 在进一步方面, 本发明涉及包含本发明的因子 VII (a) 多肽的药物组合物。

[0018] 本发明的一般目的是改善目前在具有凝血病的人中可用的治疗选择, 且获得具有改善的治疗效用的因子 VII 多肽。本发明具有的一个目的是获得因子 VII 多肽, 其具有延长的体内功能半衰期, 同时维持药学可接受的蛋白酶解活性。为了实现这点, 本发明的因子 VII 多肽包含突变组合, 所述突变赋予对通过血浆抑制剂抗凝血酶的失活的降低的敏感性, 同时基本上保存蛋白酶解活性; 在本发明特别有利的实施方案中, 因子 VII 多肽还与一种或多种“延长半衰期的基团”偶联。

[0019] 用本发明的经修饰的因子 VII 多肽的医学治疗提供了超过目前可用的治疗方案的许多优点, 例如在注射间更长的持续时间、更低的剂量、更方便的施用和在注射间潜在改善的止血保护。

[0020] 附图简述

图 1 显示了因子 VIIa/ 抗凝血酶 (AT) 复合物的模型。通过经由 CA 原子的最小二乘法拟合程序重叠 FVIIa (根据 FVIIa 和 TF 的复合物的 x 射线结构, pdb 条目: 1dan; Banner 等人 1996) 和 FXa (根据 FXa 和 AT 的复合物的 x 射线结构, pdb 条目: 2gd4; Johnson 等人 2006) 的蛋白酶结构域, 且仅保留 FVIIa 和抗凝血酶来生成该模型。在左取向中, 将抗凝血酶 (白色, 以草图表示) 置于 FVIIa (以固体表面表示) 之上, 且在右取向中, 显示了进入 FVIIa 的活性位点 (以黑色表示) 和底物结合裂缝内的视图。FVIIa 表面的深灰色区域表示已就通过点诱变降低的抗凝血酶结合而探究的区域。特别地, 氨基酸残基 Q176、Q286 和 T293 (以黑色表示) 已通过饱和诱变得到探究。

[0021] 图 2 显示了来自多个物种的 FVIIa 重链的序列比对 (Higgins 等人 1992): 人、黑猩猩、犬、猪、牛、小鼠、大鼠和兔。上部和下部的序列编号分别对应于胰凝乳蛋白酶和 FVII 序列编号系统。对带有下划线的残基实施突变。

[0022] 图 3 显示了在静脉内施用于 Sprague Dawley 大鼠后, 作为凝结活性 (凝结) 和 FVIIa- 抗凝血酶复合物 EIA (AT) 水平的半对数曲线的 FVIIa 变体的药物代谢动力学概况。对于几种化合物, FVIIa- 抗凝血酶复合物的浓度在所有或几个时间点低于测定的检测极限, 如通过曲线上的数据点缺失所示。数据显示为平均值 $\pm$ SD (n=3), 其中凝结活性和 FVIIa- 抗凝血酶水平转换为 nM。图的标题描述了所施用化合物的特性。估计的药物代谢动力学参数在表 3 中给出。

[0023] 图 4 显示了测量的 FVIIa- 抗凝血酶复合物的体外抗凝血酶反应性和体内峰水平之间的关系。如实施例 12 中详述的, 对于许多未经修饰的 FVIIa 变体, 测定了在静脉内施用于 Sprague Dawley 大鼠后的 FVIIa- 抗凝血酶复合物的峰水平 (指示为 C_{max} FVIIa-AT)。线性关系证实体外 FVIIa 变体筛选操作的预测性。

[0024] 图 5 显示了在 FVIII 缺陷小鼠 ($n = 6/\text{剂量}$) 的尾部尖端 4 nm 横切前 5 分钟静脉内给药的 FVIIa Q176K 和野生型 FVIIa 的急性剂量应答。结果作为平均值 $\pm$ SEM 给出。分别计算了失血 ED50, 对于野生型 FVIIa 为 1.8 mg/kg, 并且对于 FVIIa Q176K 为 2.6 mg/kg, $p=0.50$ 。

[0025] 图 6 显示了从 1) FVIIa 突变体 Q176K 和 2) 1DAN 结构的催化结构域、重链的 LSQKAB 叠加计算获得的各个 $C\alpha-C\alpha$ 距离 (Banner, D'Arcy, Chène, Winkler, Guha, Konigsberg, Nemerson, & Kirchhofer, 1996)。关于残基 176 的 $C\alpha-C\alpha$ 距离由黑点指示。

[0026] 图 7 显示了抗凝血酶和 FVIIa Q176K 之间的复合物的理论模型。在充填空间中的是两个残基: FVIIa 突变体 Q176K 的 Lys 176 和抗凝血酶的 Arg 399 的相对位置。该模型由抗凝血酶 / FXa 复合物的结构构建 (Johnson, Li, Adams, & Huntington, 2006), 其中 FXa 分子已被 FVIIa 突变体 Q176K 分子的重链重迭。FVIIa、FXa 和抗凝血酶的主链以丝带表示法显示。FVIIa 的残基 Lys 176 和 Arg 399 分别标记为 FVIIa-176K 和 ATIII-399R。

[0027] 发明详述

本发明涉及因子 VII 多肽的设计和用途, 所述因子 VII 多肽显示出增加的体内功能半衰期、对通过血浆抑制剂抗凝血酶的失活的降低的敏感性和保持的蛋白酶解活性。本发明的发明人已发现人因子 VII 中的突变的特异性组合和与延长半衰期的部分的缀合的组合赋予上述特性。本发明的因子 VII 多肽具有在血液中延长的功能半衰期, 这在需要更持久的促凝活性的情况下是治疗上有用的。

[0028] 本发明涉及相对于人因子 VII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1), 包含两个或更多个取代的因子 VII (a) 多肽,

其中所述取代中的至少一个是其中 T293 已替换为 Lys (K)、Tyr (Y)、Arg (R) 或 Phe (F); 其中 Q176 已替换为 Lys (K)、Arg (R)、Asn (N); 和 / 或 Q286 已替换为 Asn (N), 并且其中所述取代中的至少一个是其中 M298 已替换为 Gln (Q)、Lys (K)、Arg (R)、Asn (N)、Gly (G)、Pro (P)、Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Phe (F)、Trp (W)、Tyr (Y)、Asp (D)、Glu (E)、His (H)、Cys (C)、Ser (S) 或 Thr (T)。

[0029] 因子 VII

凝血因子 VII (因子 VII) 是主要在肝中产生的糖蛋白。成熟蛋白质由通过 SEQ ID NO: 1 限定的 406 个氨基酸残基组成, 并且由四个结构域组成。存在 N 末端富含 γ -羧基谷氨酸 (Gla) 的结构域, 随后为两个表皮生长因子 (EGF) 样结构域和 C 末端胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶结构域。因子 VII 在血浆中主要作为单链分子循环。因子 VII 通过在残基 Arg152 和 Ile153 之间的切割活化为因子 VIIa, 产生由二硫键保持在一起的双链蛋白质。轻链含有 Gla 和 EGF 样结构域, 而重链是蛋白酶结构域。根据 SEQ ID NO: 1 在因子 VII 中的特异性 Glu (E) 残基, 即 E6、E7、E14、E16、E19、E20、E25、E26、E29 和 E35, 可以进行翻译后 γ 羧化。Gla 结构域中的 γ 羧基谷氨酸残基是许多钙离子配位所需的, 其使 Gla 结构域维持在介导与磷脂膜的相互作用的构象中。

[0030] 术语“因子 VII (a)”包含未切割的单链酶原, 因子 VII, 以及切割的双链和因此活化的蛋白酶, 因子 VIIa。“因子 VII (a)”包括因子 VII (a) 的天然等位基因变体, 其可以存在于个体中且在每个个体中彼此不同。野生型人因子 VII 序列在 SEQ ID NO: 1 中提供。

[0031] 因子 VII (a) 可以使用众所周知的生产和纯化方法, 从血浆衍生或重组产生。糖

基化、 γ 羧化及其他翻译后修饰的程度和位置可以取决于所选宿主细胞及其生长条件而改变。

[0032] 因子 VII 多肽

术语“因子 VII (a) 多肽”在本文中指野生型因子 VII (a) 分子以及因子 VII (a) 变体和因子 VII (a) 缀合物。相对于野生型人因子 VIIa, 此类变体和缀合物可以显示出基本上相同或改善的活性。

[0033] 如本文使用的, 术语因子 VII 多肽的“活性”指由野生型人因子 VII (a) 显示出的任何活性, 并且包括但不限于凝结或凝结剂活性、促凝活性、蛋白酶解或催化活性例如实现因子 X 活化或因子 IX 活化; 结合 TF、因子 X 或因子 IX 的能力; 和 / 或与磷脂结合的能力。这些活性可以使用公认的测定在体外或体内进行评价, 例如通过测量体外或体内凝血。此类测定的结果指示多肽显示出可以与多肽体内活性关联的活性, 其中体内活性可以被称为生物活性。测定因子 VII 多肽的活性的测定是本领域技术人员已知的。评价 FVII 多肽活性的示例性测定包括体外蛋白酶解测定, 例如在下文实施例中所述。

[0034] 如本文使用的, 术语“增加或保持的活性”指与野生型人因子 VIIa 相比较, 显示出基本上相同或增加的活性的因子 VIIa 多肽, 例如 i) 在 TF 的存在和 / 或不存在下, 与重组野生型人因子 VIIa 相比较, 基本上相同或增加的蛋白酶解活性; ii) 与重组野生型人因子 VIIa 相比较, 具有基本上相同或增加的 TF 亲和力的因子 VII (a) 多肽; iii) 对于活化血小板具有基本上相同或增加的亲和力的因子 VII (a) 多肽; 或 iv) 与重组野生型人因子 VIIa 相比较, 具有基本上相同或增加的结合因子 X 或因子 IX 的亲和力 / 能力的因子 VII (a) 多肽。例如, 保持的活性意指与野生型人因子 VIIa 相比较, 保留的活性的量是或是约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500% 或更多活性。

[0035] 如本文使用的, 术语“因子 VII (a) 变体”意指具有 SEQ ID NO: 1 的序列的因子 VII, 其中亲本蛋白质的一个或多个氨基酸已由另一种天然存在的氨基酸取代, 和 / 或其中亲本蛋白质的一个或多个氨基酸已缺失, 和 / 或其中一个或多个氨基酸已插入到蛋白质中, 和 / 或其中一个或多个氨基酸已加入到亲本蛋白质中。此类添加可在亲本蛋白质的 N- 或 C- 末端或两者处发生。在一个实施方案中, 变体与 SEQ ID NO: 1 的序列至少 95% 相同。在另一个实施方案中, 变体与 SEQ ID NO: 1 的序列至少 99% 相同。如本文使用的, 对特定位置的任何提及指 SEQ ID NO: 1 中的相应位置。

[0036] 在本说明书中使用的氨基酸取代的术语如下。第一个字母表示在 SEQ ID NO: 1 的位置处天然存在的氨基酸。随后数目表示在 SEQ ID NO: 1 中的位置。第二个字母表示取代天然氨基酸的不同氨基酸。实例是 K197A- 因子 VII, 其中在 SEQ ID NO: 1 的位置 197 处的赖氨酸替换为丙氨酸。

[0037] 在本文背景下, 如表 1 中所示, 氨基酸的三字母或单字母缩写已以其常规含义使用。除非另有明确说明, 本文提及的氨基酸是 L- 氨基酸。

[0038] 表 1: 氨基酸缩写

氨基酸	三字母代码	单字母代码
甘氨酸	Gly	G
脯氨酸	Pro	P
丙氨酸	Ala	A
缬氨酸	Val	V
亮氨酸	Leu	L
异亮氨酸	Ile	I
甲硫氨酸	Met	M
半胱氨酸	Cys	C
苯丙氨酸	Phe	F
酪氨酸	Tyr	Y
色氨酸	Trp	W
组氨酸	His	H
赖氨酸	Lys	K
精氨酸	Arg	R
谷氨酰胺	Gln	Q
天冬酰胺	Asn	N
谷氨酸	Glu	E
天冬氨酸	Asp	D
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T

[0039] 如本文使用的,术语“因子 VII (a) 缀合物”意指相对于野生型因子 VII (a),显示出基本上相同或改善的生物活性的因子 VII 多肽,其中氨基酸中的一个或多个或所连接的聚糖链中的一条或多条已进行化学和 / 或酶促修饰,例如通过烷基化、糖基化、酰化、酯形成、二硫键形成或酰胺形成。

[0040] 相对于人因子 VII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1),本发明的因子 VII 多肽包含两个或更多个取代,

其中所述取代中的至少一个是其中 T293 已替换为 Lys(K)、Tyr(Y)、Arg(R) 或 Phe(F); 其中 Q176 已替换为 Lys(K)、Arg(R)、Asn(N); 和 / 或 Q286 已替换为 Asn(N), 并且其中所述取代中的至少一个是其中 M298 已替换为 Gln(Q)、Lys(K)、Arg(R)、Asn(N)、Gly(G)、Pro(P)、Ala (A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Phe(F)、Trp(W)、Tyr(Y)、Asp(D)、Glu(E)、His(H)、Cys(C)、Ser(S) 或 Thr(T)。

[0041] 在一系列有利实施方案中,本发明涉及因子 VII 多肽,其中所述多肽具有下述取代的组之一: T293K/M298Q、T293Y/M298Q、T293R/M298Q、T293F/M298Q、Q176K/M298Q、Q176R/M298Q、Q176N/M298Q、Q286N/M298Q、T293Y/V158D/E296V/M298Q、T293R/V158D/E296V/M298Q、T293K/V158D/E296V/M298Q、Q176K/V158D/E296V/M298Q 和 Q176R/V158D/E296V/M298Q。

[0042] 半衰期 - 对通过血浆抑制剂的失活的抗性

除体内清除之外,体内功能半衰期也对化合物在体内是“治疗上可用的”的时间段具有重要性。重组人野生型因子 VIIa 的循环的半衰期是约 2.3 小时 (“Summary Basis for Approval for NovoSeven[®]”, FDA 参考号 96 0597)。

[0043] 术语“体内功能半衰期”以其通常含义使用,即,使体内 / 靶器官内剩余的因子 VII 多肽生物活性在末期中降低 50% 所需的时间,或因子 VII 多肽的活性是其初始值 50% 的时

间。体内半衰期的替代术语包括终末半衰期、血浆半衰期、循环的半衰期、循环半衰期和清除半衰期。体内功能半衰期可以通过本领域已知的任何合适方法进行测定,如下文进一步讨论的(实施例 12)。

[0044] 如关于体内功能半衰期或血浆半衰期使用的,术语“增加的”用于指示如在可比较条件下测定的,多肽的有关半衰期相对于参考分子,例如野生型人因子 VIIa 的半衰期增加。

[0045] 在一个方面,相对于野生型人因子 VIIa,本发明的因子 VIIa 多肽显示出增加的体内功能半衰期。例如,有关半衰期可以增加至少约 25%,例如至少约 50%,例如至少约 100%、150%、200%、250% 或 500%。

[0046] 尽管对凝血级联的生物化学和病理生理学有详细的理解,但个别凝血因子从循环中清除的机制基础在很大程度上仍是未知的。与其他维生素 K 依赖性蛋白质的酶原和酶形式相比较,因子 VII 及其活化形式因子 VIIa 的循环半衰期中的显著差异提示存在因子 VIIa 的特异性和不同清除机制。两类途径看起来在因子 VIIa 的清除中是可操作的 - 一种导致完整蛋白质的消除,另一种由血浆抑制剂介导且导致蛋白酶解失活。

[0047] 抗凝血酶 III(抗凝血酶, AT) 是丰富的血浆抑制剂,且靶向凝血系统的大多数蛋白酶,包括因子 VIIa。它以微摩尔浓度存在于血浆中,并且属于丝氨酸蛋白酶抑制剂的 serpin 家族,其通过自杀底物机制不可逆地结合靶蛋白酶且使靶蛋白酶失活。通过抗凝血酶的抑制看起来促成在静脉内施用后的体内重组因子 VIIa 占优势清除途径。在血友病患者中的重组因子 VIIa 的药物代谢动力学的近期研究中,约 60% 的总清除率可以归因于该途径 (Agerso 等人, (2011) J Thromb Haemost, 9, 333-338)。

[0048] 在一些实施方案中,相对于野生型人因子 VIIa,本发明的因子 VII (a) 多肽显示出对通过内源血浆抑制剂特别是抗凝血酶的失活的增加的抗性。

[0049] 在本发明的一个实施方案中,由于对通过抑制剂(例如内源血浆抑制剂,如抗凝血酶)的失活的抗性,因子 VIIa 多肽显示出增加的半衰期。由于与天然因子 VIIa 相比较,本发明的因子 VII (a) 多肽对抑制的更高抗性,较低剂量可能足以在作用部位处获得功能上足够的浓度,并且因此其可以以更低剂量和/或以更低频率施用于具有出血发作的受试者和/或需要增强正常止血系统的受试者。

[0050] 本发明的发明人已发现具有下述突变 T293Y、T293R、T293K、Q176K、Q176R、Q286N 的因子 VII 多肽赋予增加的对抗凝血酶失活的抗性。不受理论束缚,这些因子 VIIa 多肽变体对抑制剂失活的该抗性可能是以不依赖 TF 的活性减小为代价而实现,这可以代表这些因子 VIIa 多肽变体就活性而言的缺点。

[0051] 已知具有下述突变 M298Q 和 V158D/E296V/M298Q 的因子 VIIa 多肽赋予增加的蛋白酶解活性。然而,这些因子 VIIa 多肽变体还显示对抑制剂失活的敏感性增加,这可以代表这些因子 VIIa 多肽变体就体内功能半衰期而言的缺点。

[0052] 本发明的发明人已发现通过组合上文提及的这两组突变,实现增加或保持的活性,同时维持对抑制剂失活的高抗性。也即,包含突变组合的本发明的因子 VII 多肽显示出对抗凝血酶失活的增加的抗性,以及基本上保持的蛋白酶解活性。当本发明的因子 VII 多肽与一种或多种延长半衰期的部分缀合时,实现惊人的对半衰期延长的改善作用。考虑到这些特性,本发明的此类缀合的因子 VII 多肽显示出改善的循环半衰期,同时维持药学可

接受的蛋白酶解活性。

[0053] 另外的修饰

本发明的因子 VII 多肽可以包含进一步修饰,特别是对因子 VII 多肽赋予另外的有利特性的进一步修饰。因此,除上文提及的至少两个取代之外,本发明的因子 VII 多肽可以例如包含进一步的氨基酸修饰,例如一个进一步的氨基酸取代。在一个此类实施方案中,本发明的因子 VII 多肽具有选自 R396C、Q250C 和 407C 的另外突变或添加,如例如 W02002077218 中所述。

[0054] 本发明的因子 VII 多肽可以包含另外的修饰,其在或不在因子 VII 多肽的一级序列中。另外的修饰包括但不限于碳水化合物部分的添加、延长半衰期的部分的添加例如 PEG 部分、Fc 结构域的添加等。例如,可以进行此类另外的修饰,以增加因子 VII 多肽的稳定性或半衰期。

[0055] 延长半衰期的部分或基团

术语“延长半衰期的部分”和“延长半衰期的基团”在本文中可互换使用,并且应理解为指连接至一种或多种氨基酸位点链官能的一种或多种化学基团,例如 -SH、-OH、-COOH、-CONH₂、-NH₂,或者一种或多种 N 和 / 或 O 聚糖结构,并且当缀合至这些蛋白质 / 肽时,可以增加蛋白质 / 肽的体内循环半衰期。延长半衰期的部分的实例包括:生物相容性脂肪酸及其衍生物、羟基烷基淀粉 (HAS) 例如羟乙基淀粉 (HES)、聚乙二醇 (PEG)、聚 (Glyx-Sery)_n (HAP)、透明质酸 (HA)、肝素前体聚合物 (Heparosan polymers; HEP)、基于磷酸胆碱的聚合物 (PC 聚合物)、Fleximers、葡聚糖、聚唾液酸 (PSA)、Fc 结构域、转铁蛋白、白蛋白、弹性蛋白样肽 (ELP)、XTEN 聚合物、PAS 聚合物、PA 聚合物、白蛋白结合肽、CTP 肽、FcRn 结合肽,及其任何组合。

[0056] 在特别有利的实施方案中,本发明的因子 VII 多肽与一种或多种持久基团 / 延长半衰期的部分偶联。

[0057] 在一个实施方案中,本发明的半胱氨酸缀合的因子 VII 多肽具有缀合至引入因子 VII 多肽中的半胱氨酸的硫氢基的一种或多种疏水延长半衰期的部分。此外能够将持久的延长半衰期的部分连接至其他氨基酸残基。

[0058] 在一个实施方案中,本发明的因子 VII 多肽与组织因子二硫键连接,如例如 W02007115953 中所述。

[0059] 在另一个实施方案中,本发明的因子 VII 多肽是具有增加的血小板亲和力的因子 VIIa 变体。

[0060] PEG化衍生物

根据本发明的“PEG 化因子 VII 多肽变体 / 衍生物”可以具有连接至 FVII 多肽的任何部分,包括因子 VII 多肽的任何氨基酸残基或碳水化合物部分的一种或多种聚乙二醇 (PEG) 分子。化学和 / 或酶促方法可以用于使 PEG 或其他持久基团缀合至因子 VII 多肽上的聚糖。酶促缀合过程的实例例如在 W003031464 中描述。聚糖可以是天然存在的,或它可以使用本领域众所周知的方法,例如通过在因子 VII 的氨基酸序列中引入 N 糖基化基序 (NXT/S, 其中 X 是任何天然存在的氨基酸) 中而改造。根据本发明的“半胱氨酸-PEG 化因子 VII 多肽变体”具有缀合至存在于或引入到 FVII 多肽中的半胱氨酸残基的硫氢基的一种或多种 PEG 分子。

[0061] 肝素前体缀合物

根据本发明的因子 VII 多肽肝素前体缀合物可以具有连接至 FVII 多肽的任何部分,包括因子 VII 多肽的任何氨基酸残基或碳水化合物部分的一种或多种肝素前体聚合物 (HEP) 分子。化学和 / 或酶促方法可以用于使 HEP 缀合至因子 VII 多肽上的聚糖。酶促缀合过程的实例例如在 W003031464 中描述。聚糖可以是天然存在的,或它可以使用本领域众所周知的方法,例如通过在因子 VII 的氨基酸序列中引入 N 糖基化基序 (NXT/S, 其中 X 是任何天然存在的氨基酸) 中而改造。

[0062] 根据本发明的“半胱氨酸-HEP 因子 VII 多肽缀合物”具有缀合至存在于或引入到 FVII 多肽中的半胱氨酸残基的硫氢基的一种或多种 HEP 分子。

[0063] 在本发明的一个有利实施方案中,因子 VII 多肽偶联至 HEP 聚合物。

[0064] 融合蛋白

融合蛋白是通过两种或更多种 DNA 序列的框内连接制备的蛋白质,所述 DNA 序列最初编码分开的蛋白质或肽或其片段。融合蛋白 DNA 序列的翻译将导致单一蛋白质序列,其可以具有衍生自原始蛋白质或肽的每一个的功能特性。编码融合蛋白的 DNA 序列可以通过标准分子生物学方法,例如重叠 PCR 或 DNA 连接人工制备,并且执行装配,排除在第一个 5' 末端 DNA 序列中的终止密码子,同时保留在 3' 末端 DNA 序列中的终止密码子。所得到的融合蛋白 DNA 序列可以插入适当的表达载体内,所述表达载体支持在标准宿主生物例如细菌、酵母、真菌、昆虫细胞或哺乳动物细胞中的异源融合蛋白表达。

[0065] 融合蛋白可以含有接头或间隔肽序列,其使限定融合蛋白的蛋白质或肽部分分开。接头或间隔肽序列可以促进单个的蛋白质或肽部分的正确折叠,并且可以使得单个的蛋白质或肽部分更可能保留其个体的功能特性。接头或间隔肽序列可以在完全融合蛋白 DNA 序列的单个 DNA 片段的框内装配期间,即在重叠 PCR 或 DNA 连接期间,插入融合蛋白 DNA 序列内。

[0066] Fc 融合蛋白

术语“Fc 融合蛋白”在本文中意欲包含融合至 Fc 结构域的本发明的因子 VII 多肽,所述 Fc 结构域可以衍生自任何抗体同种型。由于 IgG 抗体的相对长的循环半衰期,IgG Fc 结构域通常是优选的。Fc 结构域可以另外进行修饰,以便调节某些效应子功能例如补体结合和 / 或与某些 Fc 受体结合。与 wt FVII 多肽的半衰期相比较,FVII 多肽与 Fc 结构域的融合一般导致融合蛋白的循环半衰期延长,所述 Fc 结构域具有与 FcRn 受体结合的能力。IgG Fc 结构域中的位置 234、235 和 237 中的突变一般导致与 Fc γ RI 受体的结合降低,并且可能还导致与 Fc γ RIIa 和 Fc γ RIII 受体的结合降低。这些突变不改变与 FcRn 受体的结合,这通过胞吞再循环途径促进长循环半衰期。优选地,根据本发明的融合蛋白的经修饰的 IgG Fc 结构域包含下述突变中的一种或多种,其分别导致与某些 Fc 受体的亲和力减少 (L234A、L235E 和 G237A),且导致 C1q 介导的补体固定降低 (A330S 和 P331S)。可替代地,Fc 结构域可以是 IgG4 Fc 结构域,优选包含 S241P/S228P 突变。

[0067] 因子 VII 多肽的产生

在一个方面,本发明涉及用于产生因子 VII 多肽的方法。本文描述的因子 VII 多肽可以借助于重组核酸技术产生。一般地,克隆的人野生型因子 VII 核酸序列进行修饰,以编码所需蛋白质。该修饰序列随后插入表达载体内,所述表达载体进而转化或转染到宿主细胞

内。高等真核细胞特别是培养的哺乳动物细胞作为宿主细胞是优选的。

[0068] 在进一步的方面,本发明涉及包含且表达所述多核苷酸构建体的转基因动物。

[0069] 在进一步的方面,本发明涉及包含且表达所述多核苷酸构建体的转基因植物。

[0070] 人野生型因子 VII 的完全核苷酸和氨基酸序列是已知的(参见 U. S. 4,784,950,其中描述了重组人因子 VII 的克隆和表达)。

[0071] 氨基酸序列改变可以通过多种技术来完成。核酸序列的修饰可以通过位点特异性诱变。用于位点特异性诱变的技术是本领域众所周知的,并且在例如 Zoller 和 Smith (DNA 3:479-488,1984) 或 "Splicing by extension overlap", Horton 等人, Gene 77, 1989, 第 61-68 页中描述。因此,使用因子 VII 的核苷酸和氨基酸序列,可以引入所选择的一种或多种改变。同样地,使用特异性引物,使用聚合酶链反应制备 DNA 构建体的操作是本领域技术人员众所周知的(参照 PCR Protocols, 1990, Academic Press, San Diego, California, USA)。

[0072] 编码本发明的因子 VII 多肽的核酸构建体可以适当地为基因组或 DNA 起源,例如通过制备基因组或 cDNA 文库,且依照标准技术,使用合成寡核苷酸探针,通过杂交筛选编码全部或部分的多肽的 DNA 序列而获得(参照 Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989)。

[0073] 编码因子 VII 多肽的核酸构建体还可以通过确定的标准方法合成制备,所述方法例如由 Beaucage 和 Caruthers, Tetrahedron Letters 22(1981), 1859 - 1869 描述的亚磷酸酰胺方法,或由 Matthes 等人, EMBO Journal 3(1984), 801 - 805 描述的方法。根据亚磷酸酰胺方法,例如在自动化 DNA 合成仪中合成寡核苷酸,纯化,退火,连接且克隆到合适载体中。编码人因子 VII 多肽的 DNA 序列还可以通过聚合酶链反应使用特异性引物进行制备,例如如 US 4,683,202, Saiki 等人, Science 239(1988), 487 - 491, 或 Sambrook 等人, 同上中所述。

[0074] 此外,核酸构建体可以具有混合的合成和基因组、混合的合成和 cDNA 或混合的基因组和 cDNA 起源,依照标准技术,通过连接合成、基因组或 cDNA 起源(适当时)的片段制备,所述片段对应于整个核酸构建体的多个部分。

[0075] 核酸构建体优选是 DNA 构建体。用于产生根据本发明的因子 VII 多肽的 DNA 序列通常编码在因子 VII 的氨基末端处的前原多肽,以获得适当的翻译后加工(例如谷氨酸残基的 γ 羧化),且从宿主细胞中分泌。前原多肽可以是因子 VII 或另一种维生素 K 依赖性血浆蛋白质例如因子 IX、因子 X、凝血酶原、蛋白 C 或蛋白 S 的那种。如本领域技术人员应当理解的,可以在因子 VII 多肽的氨基酸序列中进行另外的修饰,其中这些修饰不显著损害该蛋白质充当凝结剂的能力。

[0076] 编码人因子 VII 多肽的 DNA 序列通常插入重组载体内,所述重组载体可以是任何载体,其可以方便地进行重组 DNA 操作,并且载体的选择通常依赖于它待引入其内的宿主细胞。因此,载体可以是自主复制载体,即作为染色体外实体存在的载体,其复制不依赖于染色体复制,例如质粒。可替代地,载体可以是这样的载体,当引入宿主细胞内时,其整合到宿主细胞基因组内且连同它已整合到其内的一条或多条染色体一起复制。

[0077] 载体优选是其中编码人因子 VII 多肽的 DNA 序列可操作地连接至 DNA 转录所需的

另外区段的表达载体。一般地,表达载体衍生自质粒或病毒 DNA,或可以含有两者的元件。术语“可操作地连接”指示区段如此排列,从而使得它们对于其预期目的协同地发挥作用,例如转录在启动子中起始且进行通过编码多肽的 DNA 序列。

[0078] 用于表达因子 VIIa 多肽变体的表达载体可包含能够指导克隆的基因或 cDNA 转录的启动子。启动子可以是任何 DNA 序列,其显示在选择的主细胞中的转录活性,并且可以衍生自编码与主细胞同源或异源的蛋白质的基因。

[0079] 指导编码人因子 VII 多肽的 DNA 在哺乳动物细胞中转录的合适启动子的实例是 SV40 启动子 (Subramani 等人, Mol. Cell Biol. 1(1981),854 -864)、MT-1 (金属硫蛋白基因) 启动子 (Palmiter 等人, Science 222(1983), 809 - 814)、CMV 启动子 (Boshart 等人, Cell 41:521-530, 1985) 或腺病毒 2 主要晚期启动子 (Kaufman 和 Sharp, Mol. Cell. Biol, 2:1304-1319, 1982)。

[0080] 用于在昆虫细胞中使用的合适启动子的实例是多角体蛋白启动子 (US 4,745,051; Vasuvedan 等人, FEBS Lett. 311, (1992) 7 - 11)、P10 启动子 (J.M. Vlak 等人, J. Gen. Virology 69,1988, 第 765-776 页)、苜蓿丫纹夜蛾 (*Autographa californica*) 多角体病毒碱性蛋白质启动子 (EP 397 485)、杆状病毒立即早期基因 1 启动子 (US 5,155,037; US 5,162,222)、或杆状病毒 39K 迟早期基因启动子 (US 5,155,037; US 5,162,222)。

[0081] 用于在酵母主细胞中使用的合适启动子的实例包括来自酵母糖酵解基因 (Hitzeman 等人, J. Biol. Chem. 255 (1980),12073 - 12080; Alber 和 Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1(1982),419 - 434) 或醇脱氢酶基因 (Young 等人, in Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Hollaender 等人, 编辑), Plenum Press, New York, 1982) 的启动子、或者 TPI1 (US 4,599,311) 或 ADH2-4c (Russell 等人, Nature 304(1983),652 - 654) 启动子。

[0082] 用于在丝状真菌主细胞中使用的合适启动子的实例是例如 ADH3 启动子 (McKnight 等人, The EMBO J. 4(1985),2093 - 2099) 或 tpiA 启动子。其他有用的启动子的实例是衍生自编码米曲霉 (*A. oryzae*) TAKA 淀粉酶、米赫根毛霉 (*Rhizomucor miehei*) 天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉 (*A. niger*) 中性 α 淀粉酶、黑曲霉酸稳定 α 淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉 (*A. awamori*) 葡糖淀粉酶 (gluA)、米赫根毛霉脂肪酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉磷酸丙糖异构酶或构巢曲霉 (*A. nidulans*) 乙酰胺酶的基因的那些启动子。优选的是 TAKA 淀粉酶和 gluA 启动子。合适启动子在例如 EP 238 023 和 EP 383 779 中提及。

[0083] 如果需要,编码因子 VII 多肽的 DNA 序列也可操作地连接至合适终止子,例如人生长激素终止子 (Palmiter 等人, Science 222,1983,第 809-814 页)、或者 TPI1 (Alber 和 Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1,1982,第 419-434 页) 或 ADH3 (McKnight 等人, The EMBO J. 4,1985,第 2093-2099 页) 终止子。表达载体还可以含有位于启动子下游和因子 VII 序列自身的插入位点上游的一组 RNA 剪接位点。优选的 RNA 剪接位点可以得自腺病毒和 / 或免疫球蛋白基因。在表达载体中还包含的是位于插入位点下游的多腺苷酸化信号。特别优选的多腺苷酸化信号包括来自 SV40 的早期或晚期多腺苷酸化信号 (Kaufman 和 Sharp, 同前)、来自腺病毒 5' E1b 区的多腺苷酸化信号、人生长激素基因终止子 (DeNoto 等人 Nucl. Acids Res. 9:3719-3730,1981)、或者来自人因子 VII 基因或牛因子 VII 基因的多腺苷酸

化信号。表达载体还可以包括位于启动子和 RNA 剪接位点之间的非编码病毒前导序列,例如腺病毒 2 三联前导序列;和增强子序列例如 SV40 增强子。

[0084] 为了将本发明的因子 VII 多肽导向宿主细胞的分泌途径内,可以在重组载体中提供分泌信号序列(也称为前导序列、前原序列或前序列)。分泌信号序列在正确读码框中连接至编码人因子 VII 多肽的 DNA 序列。分泌信号序列通常位于编码肽的 DNA 序列 5'。分泌信号序列可以是通常与蛋白质结合的那种,或可以来自编码另一种分泌蛋白质的基因。

[0085] 对于从酵母细胞的分泌,分泌信号序列可以编码任何信号肽,其确保将表达的人因子 VII 多肽有效导向细胞的分泌途径内。信号肽可以是天然存在的信号肽或其功能部分,或它可以是合成肽。已发现的合适的信号肽是 α 因子信号肽(参照 US 4,870,008)、小鼠唾液淀粉酶的信号肽(参照 O. Hagenbuchle 等人, Nature 289, 1981, 第 643-646 页)、经修饰的羧肽酶信号肽(参照 L. A. Valls 等人, Cell 48, 1987, 第 887-897 页)、酵母 BAR1 信号肽(参照 WO 87/02670)、或酵母天冬氨酸蛋白酶 3(YAP3) 信号肽(参照 M. Egel-Mitani 等人, Yeast 6, 1990, 第 127-137 页)。

[0086] 对于酵母中的有效分泌,编码前导肽的序列还可以插入信号序列下游和编码人因子 VII 多肽的 DNA 序列上游。前导肽的功能是允许将所表达的肽从内质网导向高尔基体,且进一步导向分泌囊泡用于分泌到培养基内(即人因子 VII 多肽跨越细胞壁或至少穿过细胞膜输出到酵母细胞的周质空间内)。前导肽可以是酵母 α 因子前导肽(其用途在例如 US 4,546,082、US 4,870,008、EP 16 201、EP 123 294、EP 123 544 和 EP 163 529 中描述)。可替代地,前导肽可以是合成前导肽,也就是在自然界中未发现的前导肽。合成前导肽可以例如如 WO 89/02463 或 WO 92/11378 中所述构建。

[0087] 对于在丝状真菌中的使用,信号肽可以方便地衍生自编码曲霉菌属物种(*Aspergillus* sp.) 淀粉酶或葡糖淀粉酶的基因,编码米赫根毛霉脂肪酶或蛋白酶或者柔毛腐质霉(*Humicola lanuginosa*) 脂肪酶的基因。信号肽优选衍生自编码米曲霉 TAKA 淀粉酶、黑曲霉中性 α 淀粉酶、黑曲霉酸稳定淀粉酶或黑曲霉葡糖淀粉酶的基因。合适的信号肽公开于例如 EP 238 023 和 EP 215 594 中。

[0088] 对于在昆虫细胞中的使用,信号肽可以方便地衍生自昆虫基因(参照 WO 90/05783),例如鳞翅类烟草天蛾(*Manduca sexta*) 脂肪动员激素前体信号肽(参照 US 5,023,328)。

[0089] 用于分别连接编码因子 VII 多肽的 DNA 序列、启动子和任选的终止子和/或分泌信号序列,且将其插入含有复制所必需的信息的合适载体内的操作,是本领域技术人员熟知的(参照例如 Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989)。

[0090] 转染哺乳动物细胞且在细胞中表达所引入的 DNA 序列的方法在例如下述中描述: Kaufman 和 Sharp, J. Mol. Biol. 159(1982), 601 - 621; Southern 和 Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1(1982), 327 - 341; Loyter 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79(1982), 422 - 426; Wigler 等人, Cell 14(1978), 725; Corsaro 和 Pearson, Somatic Cell Genetics 7(1981), 603, Graham 和 van der Eb, Virology 52(1973), 456; 和 Neumann 等人, EMBO J. 1(1982), 841 - 845。

[0091] 通过例如磷酸钙介导的转染(Wigler 等人, Cell 14:725-732, 1978; Corsaro 和

Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603-616, 1981;Graham 和 Van der Eb, Virology 52d:456-467, 1973) 或电穿孔 (Neumann 等人, EMBO J. 1:841-845, 1982), 将克隆的 DNA 序列引入培养的哺乳动物细胞内。为了鉴定且选择表达外源 DNA 的细胞, 一般将赋予可选表型 (可选标记) 的基因连同目的基因或 cDNA 一起引入细胞内。优选的可选标记包括赋予对药物例如新霉素、潮霉素和氨甲蝶呤的抗性的基因。可选标记可以是可扩增的可选标记。优选的可扩增的可选标记是二氢叶酸还原酶 (DHFR) 序列。可选标记由 Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA, 引入本文作为参考) 综述。本领域技术人员容易地能够选择合适的可选标记。

[0092] 可选标记可以与目的基因同时在分开的质粒上引入细胞内, 或它们可以在相同质粒上引入。如果在相同质粒上, 则可选标记和目的基因可以处于不同启动子或相同启动子的控制下, 后面一种安排产生双顺反子信息。这类构建体是本领域已知的 (例如 Levinson 和 Simonsen, U. S. 4, 713, 339)。将另外的 DNA (称为“载体 DNA”) 加入引入细胞内的混合物中也可以是有利的。

[0093] 在细胞已吸收 DNA 后, 它们在适当生长培养基中生长, 通常为 1-2 天, 以开始表达目的基因。如本文使用的, 术语“适当的生长培养基”意指含有细胞生长和目的因子 VII 多肽表达所需的营养素及其他组分的培养基。培养基一般包括碳源、氮源、必需氨基酸、必需糖、维生素、盐、磷脂、蛋白质和生长因子。对于 γ 羧化蛋白质的产生, 培养基将含有维生素 K, 优选以约 0.1 $\mu\text{g/ml}$ - 约 5 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度。随后应用药物选择, 以选择以稳定方式表达可选标记的细胞的生长。对于已用可扩增的可选标记转染的细胞, 药物浓度可以增加, 以选择拷贝数增加的克隆序列, 从而增加表达水平。随后在稳定转染的细胞的克隆中筛选目的人因子 VII 多肽的表达。

[0094] 编码因子 VII 多肽的 DNA 序列引入其内的宿主细胞可以是任何细胞, 其能够产生翻译后修饰的人因子 VII 多肽, 并且包括酵母、真菌和高等真核细胞。

[0095] 用于本发明中的哺乳动物细胞系的实例是 COS-1 (ATCC CRL 1650)、幼仓鼠肾 (BHK) 和 293 (ATCC CRL 1573; Graham 等人, J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977) 细胞系。优选 BHK 细胞系是 tk- ts13 BHK 细胞系 (Waechter 和 Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1106-1110, 1982, 引入本文作为参考), 下文被称为 BHK 570 细胞。BHK 570 细胞系已在 ATCC 登录号 CRL 10314 下, 保藏于美国典型培养物中心, 12301 Parklawn Dr., Rockville, Md. 20852。tk- ts13 BHK 细胞系也可在登录号 CRL 1632 下得自 ATCC。另外, 许多其他细胞系可以在本发明内使用, 包括大鼠 Hep I (大鼠肝癌; ATCC CRL 1600)、大鼠 Hep II (大鼠肝癌; ATCC CRL 1548)、TCMK (ATCC CCL 139)、人肺 (ATCC HB 8065)、NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1)、CHO (ATCC CCL 61) 和 DUKX 细胞 (Urlaub 和 Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980)。

[0096] 合适酵母细胞的实例包括酵母属物种 (*Saccharomyces* spp.) 或裂殖酵母属物种 (*Schizosaccharomyces* spp.) 的细胞, 特别是酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或克氏酵母 (*Saccharomyces kluyveri*) 的菌株。用异源 DNA 转化酵母细胞且由其产生异源多肽的方法例如在 US 4, 599, 311、US 4, 931, 373、US 4, 870, 008、5, 037, 743 和 US 4, 845, 075 中描述, 所述专利全部在此引入作为参考。经转化的细胞通过由可选标记决定的表型选择, 所述表型通常为药物抗性或在不存在特定营养素例如亮氨酸的情况下生

长的能力。用于酵母中的优选载体是公开于 US 4,931,373 中的 POT1 载体。编码人因子 VII 多肽的 DNA 序列之前可以是信号序列和任选的前导序列,例如如上所述。合适的酵母细胞的进一步实例是克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*),例如乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*),汉逊酵母属例如多形汉逊酵母 (*H. polymorpha*),或毕赤酵母属 (*Pichia*) 例如巴斯德毕赤酵母 (*P. pastoris*) 的菌株(参照 Gleeson 等人, J. Gen. Microbiol. 132,1986,第 3459-3465 页;US 4,882,279)。

[0097] 其他真菌细胞的实例是丝状真菌的细胞,例如曲霉菌属物种、链孢霉属物种 (*Neurospora spp.*)、镰刀菌属物种 (*Fusarium spp.*) 或木霉属物种 (*Trichoderma spp.*),特别是米曲霉、构巢曲霉或黑曲霉的菌株。曲霉菌属物种用于表达蛋白质的用途在例如 EP 272 277, EP 238 023, EP 184 438 中描述。尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*) 的转化可以例如如由 Malardier 等人, 1989, Gene 78: 147-156 描述的进行。木霉属物种的转化可以例如如 EP 244 234 中所述执行。

[0098] 当丝状真菌用作宿主细胞时,它可以用本发明的 DNA 构建体转化,方便地通过将 DNA 构建体整合到宿主染色体内,以获得重组宿主细胞。该整合一般视为有利的,因为 DNA 序列更可能在细胞中稳定维持。DNA 构建体整合到宿主染色体内可以根据常规方法,例如通过同源或异源重组执行。

[0099] 昆虫细胞的转化和在其中异源多肽的产生可以如 US 4,745,051;US 4,879,236;US 5,155,037;5,162,222;EP 397,485 中所述执行,所述专利全部引入本文作为参考。用作宿主的昆虫细胞系可以适当地是鳞翅目 (Lepidoptera) 细胞系,例如草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞或粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 细胞(参照 US 5,077,214)。培养条件可以适当地如例如 WO 89/01029 或 WO 89/01028 或上述参考文献中的任一个中所述。

[0100] 上文描述的经转化的或经转染的宿主细胞随后在允许因子 VII 多肽表达的条件下,在合适的营养培养基中培养,这之后所得到的肽的全部或部分可以从培养物中回收。用于培养细胞的培养基可以是适合于生长宿主细胞的任何常规培养基,例如含有适当补充物的最小或复杂培养基。合适的培养基可得自商业供应商,或可以根据公开的配方(例如在美国典型培养物中心的目录中)制备。由细胞产生的因子 VII 多肽随后可以通过常规操作从培养基中回收,所述常规操作包括通过离心或过滤使宿主细胞与培养基分离,借助于盐例如硫酸铵沉淀上清液或滤液的蛋白质性质组分,通过多种层析操作例如离子交换层析、凝胶过滤层析、亲和层析等等纯化,取决于所讨论的多肽类型。

[0101] 转基因动物技术可以用于产生本发明的因子 VII 多肽。优选在宿主雌性哺乳动物的乳腺内产生蛋白质。在乳腺内的表达和目的蛋白质随后分泌到乳内克服在从其他来源中分离蛋白质中遇到的许多困难。乳容易收集,可以大数量获得,且是生物化学充分表征的。此外,主要乳蛋白质以高浓度(通常为约 1 - 15 g/l)存在于乳中。

[0102] 从商业观点看来,明确优选使用具有大产乳量的物种作为宿主。虽然可以使用更小的动物例如小鼠和大鼠(且在原理阶段证明时是优选的),但优选使用家畜哺乳动物,包括但不限于猪、山羊、绵羊和牛。由于诸如在该物种中的先前转基因历史、产乳量、成本和用于收集绵羊乳的设备的容易获得性(关于影响宿主物种选择的因素的比较,参见例如 WO 88/00239)的此类因素,绵羊是特别优选的。一般希望选择宿主动物的品种,其已育种用于

乳制品用途,例如East Friesland绵羊,或在以后通过转基因系的育种引入乳制品原种。在任何情况下,应使用已知的良好健康状态的动物。

[0103] 为了获得在乳腺中的表达,使用来自乳蛋白质基因的转录启动子。乳蛋白质基因包括编码酪蛋白(参见 U. S. 5,304,489)、 β 乳球蛋白、 α -乳清蛋白和乳清酸性蛋白的那些基因。 β 乳球蛋白(BLG)启动子是优选的。在牛 β 乳球蛋白基因的情况下,一般使用基因的 5' 侧翼序列的至少近侧 406 bp 的区域,尽管高达约 5 kbp 的 5' 侧翼序列的更大部分是优选的,例如包含 β 乳球蛋白基因的 5' 侧翼启动子和非编码部分的 ~4.25 kbp DNA 区段(参见 Whitelaw 等人, Biochem. J. 286: 31-39(1992))。来自其他物种的启动子 DNA 的相似片段也是合适的。

[0104] β 乳球蛋白基因的其他区域也可以掺入构建体内,如可以表达基因的基因组区域一样。本领域一般公认例如与含有此类 DNA 序列的那些相比较,缺乏内含子的构建体弱表达(参见 Brinster 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 836-840(1988); Palmiter 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 478-482(1991); Whitelaw 等人, Transgenic Res. 1: 3-13(1991); WO 89/01343; 和 WO 91/02318, 所述参考文献各自引入本文作为参考)。在这点上,可能时,一般优选使用含有编码目的蛋白质或多肽的基因的天然内含子的全部或一些的基因组序列,因此进一步包括来自例如 β 乳球蛋白基因的至少一些内含子是优选的。一个此类区域是提供来自牛 β 乳球蛋白基因的 3' 非编码区的内含子剪接和 RNA 多腺苷酸化的 DNA 区段。当取代基因的天然 3' 非编码序列时,该牛 β 乳球蛋白区段可以增强且稳定目的蛋白质或多肽的表达水平。在其他实施方案内,在变体因子 VII 序列的初始 ATG 周围的区域替换为来自乳特异性蛋白质基因的相应序列。此类替换提供了假定的组织特异性初始环境,以增强表达。将整个变体因子 VII 前原和 5' 非编码序列替换为例如 BLG 基因的那些是方便的,尽管可以替换更小的区域。

[0105] 对于因子 VII 多肽在转基因动物中的表达,编码变体因子 VII 的 DNA 区段可操作地连接至其表达所需的另外 DNA 区段,以产生表达单元。此类另外的区段包括上述启动子,以及提供 mRNA 的转录终止和多腺苷酸化的序列。表达单元进一步包括编码与编码经修饰的因子 VII 的区段可操作地连接的分泌信号序列的 DNA 区段。分泌信号序列可以是天然因子 VII 分泌信号序列,或可以是另一种蛋白质例如乳蛋白质的那种(参见例如 von Heijne, Nucl. Acids Res. 14: 4683-4690(1986); 和 Meade 等人, U. S. 4,873,316, 其引入本文作为参考)。

[0106] 通过将变体因子 VII 序列插入含有另外 DNA 区段的质粒或噬菌体载体内,方便地进行用于转基因动物中的表达单元的构建,尽管表达单元可以通过基本上任何序列的连接进行构建。特别方便的是提供含有编码乳蛋白质的 DNA 区段的载体,且将乳蛋白质的编码序列替换为因子 VII 变体的那种;从而制备包括乳蛋白质基因的表达控制序列的基因融合物。在任何情况下,表达单元在质粒或其他载体中的克隆促进变体因子 VII 序列的扩增。扩增方便地在细菌(例如大肠杆菌(*E. coli*))宿主细胞中进行,因此载体通常包括在细菌宿主细胞中起作用的复制起点和可选标记。表达单元随后引入所选择的宿主物种的受精卵(包括早期胚胎)内。异源 DNA 的引入可以通过几种途径之一完成,包括显微注射(例如美国专利号 4,873,191)、逆转录病毒感染(Jaenisch, Science 240: 1468-1474(1988))或使用胚胎干(ES)细胞的定点整合(由 Bradley 等人, Bio/Technology 10:

534-539(1992) 综述)。随后将卵植入假孕雌性的输卵管或子宫内,并且允许发育足月。在其种系中携带所引入的 DNA 的子代以正常孟德尔方式将 DNA 传递给其后代,允许转基因兽群的发展。用于产生转基因动物的一般操作是本领域已知的(参见例如 Hogan 等人, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986; Simons 等人, Bio/Technology 6: 179-183(1988); Wall 等人, Biol. Reprod. 32: 645-651(1985); Buhler 等人, Bio/Technology 8: 140-143(1990); Ebert 等人, Bio/Technology 9: 835-838(1991); Krimpenfort 等人, Bio/Technology 9: 844-847(1991); Wall 等人, J. Cell. Biochem. 49: 113-120(1992); U. S. 4,873,191; U. S. 4,873,316; WO 88/00239, WO 90/05188, WO 92/11757; 和 GB 87/00458)。用于将外源 DNA 序列引入哺乳动物及其生殖细胞内的技术最初在小鼠中发展(参见例如 Gordon 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7380-7384(1980); Gordon 和 Ruddle, Science 214: 1244-1246(1981); Palmiter 和 Brinster, Cell 41: 343-345(1985); Brinster 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4438-4442(1985); 和 Hogan 等人(同前)。这些技术随后适用于大型动物,包括家畜物种(参见例如 WO 88/00239, WO 90/05188 和 WO 92/11757; 和 Simons 等人, Bio/Technology 6: 179-183(1988))。概括起来,在迄今为止用于生成转基因小鼠或家畜的最有效途径中,根据建立的技术,将目的 DNA 的几百个线性分子注射到受精卵的原核之一内。可以采用将 DNA 注射到接合子的细胞质内。

[0107] 还可以采用在转基因植物中的产生。表达可以是一般化的或针对特定器官例如块茎(参见 Hiatt, Nature 344:469-479(1990); Edelbaum 等人, J. Interferon Res. 12:449-453(1992); Sijmons 等人, Bio/Technology 8:217-221(1990); 和 EP 0 255 378)。

[0108] 纯化

本发明的因子 VII 多肽从细胞培养基中回收。本发明的因子 VII 多肽可以通过本领域已知的多种操作进行纯化,包括但不限于层析(例如离子交换、亲和、疏水、层析聚焦和尺寸排阻)、电泳操作(例如制备型等电聚焦(IEF)、差示溶解度(例如硫酸铵沉淀)、或提取(参见例如 Protein Purification, J.-C. Janson 和 Lars Ryden, 编辑, VCH Publishers, New York, 1989)。优选地,它们可以通过在抗因子 VII 抗体柱上的亲和层析进行纯化。如由 Wakabayashi 等人, J. Biol. Chem. 261:11097-11108, (1986) 和 Thim 等人, Biochemistry 27: 7785-7793, (1988) 描述的,钙依赖性单克隆抗体的使用是特别优选的。另外的纯化可以通过常规化学纯化方法例如高效液相层析来实现。其他纯化方法包括柠檬酸钡沉淀是本领域已知的,并且可以应用于本文描述的新型因子 VII 多肽的纯化(参见例如 Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y., 1982)。

[0109] 对于治疗目的,优选本发明的因子 VII 多肽是基本上纯的。因此,在本发明的优选实施方案中,本发明的因子 VII 多肽纯化到至少约 90 - 95% 同质性,优选至少约 98% 同质性。纯度可以通过例如凝胶电泳和氨基末端氨基酸测序进行评价。

[0110] 因子 VII 多肽在其活化位点处进行切割,以便将其转换为其二链形式。活化可以根据本领域已知的操作进行,例如由 Osterud 等人, Biochemistry 11:2853-2857(1972); Thomas, 美国专利号 4,456,591; Hedner 和 Kisiel, J. Clin. Invest. 71:1836-1841(1983); 或 Kisiel 和 Fujikawa, Behring Inst. Mitt. 73:29-42(1983) 描述的那些。可替代地,如由 Bjoern 等人 (Research Disclosure, 269 September 1986, 第

564-565 页) 描述的, 因子 VII 可以通过使其经过离子交换层析柱例如 Mono Q[®] (Pharmacia fine Chemicals) 等等进行活化。所得到的活化因子 VII 变体随后可以如下所述配制且施用。

[0111] 测定

本发明还提供了用于选择根据本发明的优选因子 VII 多肽的合适测定。这些测定随后可以作为简单的初步体外测试执行。

[0112] 因子 VIIa 多肽的活性还可以使用生理学底物例如因子 X (“体外蛋白酶解测定”) (参见实施例 5) 进行测量, 适当地以 5-1000 nM (例如 30-40 nM) nM 的浓度, 其中在添加合适的生色底物 (例如 S-2765) 后测量生成的因子 Xa。另外, 活性测定可以在生理温度下运行。

[0113] 因子 VIIa 多肽生成凝血酶的能力还可以在包含以生理学浓度的所有相关凝血因子和抑制剂 (当模拟 A 型血友病状况时, 减去因子 VIII) 和活化血小板的测定中进行测量 (如 Monroe 等人 (1997) Brit. J. Haematol. 99, 542-547 中的第 543 页上所述, 其在此引入作为参考)。参见实施例 8。

[0114] 药物组合物

在一个方面, 本发明涉及包含本发明的因子 VII 多肽的组合物和制剂。例如, 本发明提供了包含连同药学可接受的载体一起配制的本发明的因子 VII 多肽的药物组合物。

[0115] 相应地, 本发明的一个目的是提供包含因子 VII 多肽的药物制剂, 所述因子 VII 多肽以 0.25 mg/ml - 100 mg/ml 的浓度存在, 并且其中所述制剂具有 2.0 - 10.0 的 pH。制剂可以进一步包含缓冲系统、防腐剂、张度剂、螯合剂、稳定剂、抗氧化剂或表面活性剂, 以及其多种组合中的一种或多种。防腐剂、等渗剂、螯合剂、稳定剂、抗氧化剂和表面活性剂在药物组合物中的使用是技术人员众所周知的。可以参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 19 版, 1995。

[0116] 在一个实施方案中, 药物制剂是水性制剂。此类制剂通常是溶液或悬浮液、但还可以包括胶体、分散体、乳剂和多相材料。术语“水性制剂”定义为包含至少 50% w/w 水的制剂。同样地, 术语“水溶液”定义为包含至少 50% w/w 水的溶液, 并且术语“水性悬浮液”定义为包含至少 50% w/w 水的悬浮液。

[0117] 在另一个实施方案中, 药物制剂是冷冻干燥制剂, 医生或患者在使用前向其中加入溶剂和 / 或稀释剂。

[0118] 在进一步方面, 药物制剂包含因子 VII 多肽的水溶液和缓冲剂, 其中所述多肽以 1 mg/ml 或以上的浓度存在, 并且其中所述制剂具有约 2.0 - 约 10.0 的 pH。

[0119] 本发明的因子 VII 多肽可以肠胃外, 例如静脉内、例如肌内、例如皮下施用。可替代地, 本发明的 FVII 多肽可以经由非肠胃外途径例如口服或局部施用。本发明的多肽可以预防施用。本发明的多肽可以治疗施用 (根据需要)。

[0120] 治疗用途

在广泛方面, 本发明的因子 VII 多肽或包含所述多肽的药物制剂可以用作药剂。

[0121] 在一个方面, 本发明的因子 VII 多肽或包含所述多肽的药物制剂可以用于治疗具有凝血病的受试者。

[0122] 在另一个方面, 本发明的因子 VII 多肽或包含所述多肽的药物制剂可以用于制备

药剂用于治疗出血障碍或出血发作或者用于增强正常止血系统。

[0123] 在进一步方面,本发明的因子 VII 多肽或包含所述多肽的药物制剂可以用于治疗 A 型血友病、B 型血友病或者具有获得性抑制剂的 A 或 B 型血友病。

[0124] 在另一个方面,本发明的因子 VII 多肽或包含所述多肽的药物制剂可以用于治疗受试者中的出血障碍或出血发作或者用于增强正常止血系统的方法中,该方法包括给有此需要的受试者施用治疗或预防有效量的本发明的因子 VII 多肽。

[0125] 如本文使用的,术语“受试者”包括任何人患者或非人脊椎动物。

[0126] 如本文使用的,术语“治疗”指有此需要的任何人或其他脊椎动物受试者的医学治疗。所述受试者预期已经历通过医学从业者或兽医学从业者的体格检查,所述从业者给出指示所述特异性治疗的使用对所述人或其他脊椎动物的健康有益的初步或明确诊断。根据受试者健康的现状,所述治疗的时机和目的可以从一个个体到另一个不同。因此,所述治疗可以是预防、姑息、针对症状和 / 或治愈的。就本发明而言,预防、姑息、针对症状和 / 或治愈治疗可以代表本发明的分开方面。

[0127] 如本文使用的,术语“凝血病”指增加的出血趋势,其可以通过正常凝血级联的任何凝固组分的任何性质或数量缺陷,或者纤维蛋白溶解的任何上调引起。此类凝血病可以是先天性和 / 或获得性和 / 或医源性的,并且由本领域技术人员鉴定。先天性低凝血病(hypocoagulopathies)的非限制性实例是 A 型血友病、B 型血友病、因子 VII 缺乏、因子 X 缺乏、因子 XI 缺乏、血管性血友病和血小板减少症,例如血小板无力症和巨大血小板综合征。A 或 B 型血友病的临床严重性通过血液中的 FIX/ 因子 VIII 的功能单位浓度确定,并且分类为轻度、中度或重度。重度血友病通过对应于 <1% 正常水平的 <0.01 U/ml 的凝血因子水平限定,而具有中度和轻度血友病的人分别具有 1-5% 和 >5% 的水平。具有“抑制剂”(即,针对因子 VIII 的同种抗体)的 A 型血友病和具有“抑制剂”(即,针对因子 IX 的同种抗体)的 B 型血友病是部分先天性和部分获得性的凝血病的非限制性实例。

[0128] 获得性凝血病的非限制性实例是由维生素 K 缺乏引起的丝氨酸蛋白酶缺乏;此类维生素 K- 缺乏可以通过施用维生素 K 拮抗剂例如华法林引起。获得性凝血病也可以在广泛创伤后发生。在另外称为“血液的恶性循环”的这种情况下,它的特征在于血稀释(稀释性血小板减少症和凝固因子的稀释)、体温过低、凝固因子的消耗和代谢紊乱(酸中毒)。输液疗法和增加的纤维蛋白溶解可能恶化该情形。所述出血可以来自身体的任何部分。

[0129] 医源性凝血病的非限制性实例是可能开处方用于治疗血栓栓塞性疾病的抗凝血药(例如肝素、阿司匹林、华法林及其他血小板聚集抑制剂)的超剂量。医源性凝血病的第二个非限制性实例是由过度和 / 或不适当的输液疗法诱发的凝血病,例如可以由输血诱发的凝血病。

[0130] 在本发明的一个实施方案中,出血与 A 或 B 型血友病相关。在另一个实施方案中,出血与具有获得性抑制剂的 A 或 B 型血友病相关。在另一个实施方案中,出血与血小板减少症相关。在另一个实施方案中,出血与血管性血友病相关。在另一个实施方案中,出血与严重组织损伤相关。在另一个实施方案中,出血与严重创伤相关。在另一个实施方案中,出血与手术相关。在另一个实施方案中,出血与出血性胃炎和 / 或肠炎相关。在另一个实施方案中,出血是例如在胎盘早剥中的血崩。在另一个实施方案中,出血在机械性止血可能性有限的器官中,例如颅内、耳内或眼内发生。在另一个实施方案中,出血与抗凝治疗相关。

[0131] 本发明进一步通过下述实施例举例说明,然而,所述实施例不应解释为限制保护范围。前述说明书和下述实施例中公开的特点可以分开地或以其任何组合是用于以其不同形式实现本发明的材料。

实施例

[0132] 蛋白质

人血浆衍生的因子X (FX) 和因子Xa (FXa) 得自Enzyme Research Laboratories Inc. (South Bend, IN)。可溶性组织因子1-219 (sTF) 或1-209 根据公开的操作 (Freskgard 等人, 1996) 进行制备。重组野生型 FVIIa 的表达和纯化如前所述 (Thim 等人, 1988 ;Persson 和 Nielsen, 1996) 执行。根据公开的操作 (Olson 等人, 1993), 通过肝素琼脂糖凝胶 (GE Healthcare) 再纯化人血浆衍生的抗凝血酶 (Baxter)。

[0133] 实施例 1

为了对 FVIIa- 抗凝血酶相互作用作图, 基于 FVIIa- 抗凝血酶复合物的复合物结构模型, 在计算机芯片上设计 FVIIa 变体文库。使用公开的 FXa- 抗凝血酶 Michaelis 复合物的 X 射线结构 (Johnson 等人 2006) 作为模板, 构建图 1 中所示的模型。对模型中与抗凝血酶紧密接近的 FVIIa 残基 (在 FVIIa 和抗凝血酶侧链之间的最大距离是 12 Å) 实施诱变。第一个文库设计为探究保守变化对人 FVIIa 结合抗凝血酶的影响。来自多个物种 (黑猩猩、犬、猪、牛、小鼠、大鼠和兔) 的 FVII 序列比对显示于图 2 中。将在其他物种中具有不同侧链, 与抗凝血酶紧密接近的人 FVIIa 中的侧链突变为相应物种的那种。一个实例是在位置 286 中的残基在人 FVII 中是 Gln, 并且在猪 FVII 中是 Arg。在筛选第一个文库后, 随后设计第二个聚焦文库, 在其中测试所选位置中的可能氨基酸取代的全部或一些 (除 Cys 和 Pro 之外)。实例包括根据 SEQ ID NO: 1 的位置 176、286 和 293。

[0134] 实施例 2

使用来自 Novagen 的 KOD Xtreme™ Hot Start DNA 聚合酶或来自 Stratagene 的 QuickChange® 定点诱变试剂盒, 使用基于定点诱变 PCR 的方法, 将突变引入编码 FVII cDNA 的哺乳动物表达载体内。使用下述表达载体: pTT5 (Durocher 等人 (2002) Nucleic Acid Res. 30(2):e9) 用于转染 HEK293F 和 HKB11 细胞; 来自 Icosagen (Estonia) 的 pQMCF 用于转染 CHOEBNALT85; pZEM219b (Busby 等人 (1991) J. Biol. Chem., 266:15286-15292) 和 pMPSVHE (Artelt 等人 (1988) Gene 62:213-219) 用于转染 CHO-K1; pLN174 (Persson 等人 (1996) FEBS Lett., 385:241-243) 用于转染 BHK 细胞。根据制造商的建议设计引物。所需突变的引入通过 DNA 测序 (MWG Biotech, 德国) 加以验证。

[0135] 实施例 3

FVII 变体在幼仓鼠肾 (BHK) 细胞、Freestyle™ 293-F 人胚肾细胞 (HEK293F; Gibco by Life Technologies, Naerum, DK)、HKB11 (HEK293 和人 B 细胞系的杂交细胞系) 细胞 (ATCC, LGC Standards AB, Borås, 瑞典)、中国仓鼠卵巢 (CHO K1) 细胞或来自 Icosagen Cell Factory, Estonia 的 CHO-EBNALT85 细胞中表达。

[0136] 根据用于产生稳定细胞系的制造商的说明书, 使用来自 Merck Millipore (Hellerup, 丹麦) 的 GeneJuice®, 用 FVII 变体构建体转染 BHK 贴壁细胞。使用氨甲蝶呤 (Sigma-Aldrich) 作为选择试剂。将稳定细胞系在培养基中培养至大规模, 给出总共

5 - 10 升细胞上清液。细胞在温箱中在 37℃、5 或 8% CO₂ 下在 DMEM (Gibco by Life Technologies, Naerum, DK) 中进行培养, 所述 DMEM 补充有 2%(V/V) 胎牛血清 (Gibco by Life Technologies, Naerum, DK)、1%(v/v) 青霉素 / 链霉素 (Gibco by Life Technologies, Naerum, DK) 和 5 mg/l 维生素 K₁ (Sigma-Aldrich)。

[0137] 根据制造商的说明书, 使用 293Fectin™ (Invitrogen by Life Technologies, Naerum, DK) 瞬时转染 HEK293F 和 HKB11 悬浮细胞。细胞在振荡温箱中在 37℃、5 或 8% CO₂ 和 85 - 125 rpm 下进行培养。经转染的细胞在培养基中扩增至大量表达, 给出总共 250 ml - 1 升细胞上清液。上清液通过离心收获, 随后通过 0.22 μm PES 滤器 (Corning ; Fischer Scientific Biotech, Slangerup, DK) 进行过滤。HEK293F 和 HKB11 细胞在补充有 1%(v/v) 青霉素 / 链霉素 (Gibco by Life Technologies, Naerum, DK) 和维生素 K₁ (Sigma-Aldrich) 的 Freestyle 293 Expression Medium (Gibco by Life Technologies, Naerum, DK) 中进行培养。

[0138] 通过电穿孔 (Gene Pulse Xcell, Biorad, Copenhagen, DK), 瞬时转染 CHOEBNALT85 悬浮细胞。经转染的细胞用 700 μg/l Geneticin® (Gibco by Life Technologies) 选择, 并且扩增至中等 / 大量, 给出总共 500 ml - 10 升上清液。根据制造商的说明书, 将细胞在补充有 5 mg/l 维生素 K₁ (Sigma-Aldrich) 的培养基中进行培养。细胞在振荡温箱中在 37℃、5 或 8% CO₂ 和 85 或 125 rpm 下进行培养。上清液通过离心收获, 随后通过 0.22 μm PES 滤器 (Corning ; Fischer Scientific Biotech, Slangerup, DK) 进行过滤。

[0139] 根据制造商的建议, 通过电穿孔 (Gene Pulse Xcell, Biorad, Copenhagen, DK), 转染适应于悬浮细胞的 CHOK1 细胞。使用 700 μg/l Geneticin® (Gibco by Life Technologies) 作为选择试剂。稳定细胞系用于大规模表达。细胞在温箱中在 37℃、5 或 8% CO₂ 和 85 或 125 rpm 下进行培养。补充有 1%(v/v) 青霉素 / 链霉素 (Gibco by Life Technologies, Naerum, DK) 和 5 mg/l 维生素 K₁ (Sigma-Aldrich) 的 Thermo Scientific HyClone CDM4CHO™ 培养基用于表达。将上清液通过 0.22 μm PES 滤器 (Corning, Fischer Scientific, Slangerup, DK) 过滤。

[0140] 大规模表达 (BHK)- 贴壁 BHK 细胞系在 DMEM/F12 培养基 (Invitrogen by Life Technologies, Naerum, DK) 中进行培养, 所述 DMEM/F12 培养基补充有 5 mg/l 维生素 K1 和 2% 胎牛血清 (Invitrogen by Life Technologies, Naerum, DK)。在用于生物反应器的种子培养繁殖物的期间, 使用 10% 胎牛血清且培养基补充有 1 μm 氨甲蝶呤 (Sigma-Aldrich, Copenhagen, DK)。简言之, 细胞在通风 T-175 烧瓶、2 层和 10 层细胞工厂中繁殖, 在 37℃ 和 5% CO₂ 下温育。在汇合时, 使用 TrypLE™ Express (Gibco by Life Technologies, Naerum, DK) 解离细胞, 之后传递至下一步骤。生产期作为在具有微载体 (5 g/L, Cytodex 3, GE Life Sciences, Uppsala, SE) 的生物反应器中的重复分批培养执行。通过添加 CO₂ 和 Na₂CO₃, 将 pH 控制在 7 附近。通过用氧吹扫, 将溶解氧浓度保持高于 50% 的空气中的饱和。温度维持在 36.5℃。在纯化前, 抽取的收获物通过过滤 (3 μm Clarigard, Opticap XL10 ; 0.22 μm Durapore, Opticap XL10, Merck Millipore, Hellerup, DK) 澄清。

[0141] 大规模表达 (CHOK1)- 悬浮适应的 CHOK1 细胞系在补充有 5 mg/L 维生素 K1 的化学成分确定的培养基 (CDM4CHO, Thermo Scientific HyClone, Fisher Scientific,

Slangerup, DK) 中进行培养。在用于生物反应器的种子培养物的繁殖期间,培养基补充有 600 µg/ml Geneticin® (Invitrogen by Life Technologies, Naerum, DK),简言之,细胞在通风的摇瓶中扩增,在定轨振荡器中在 37°C 和 5% CO₂ 下温育。生产期作为在生物反应器中的重复分批培养执行。通过添加 CO₂ 和 Na₂CO₃,将 pH 控制于在 7 附近。通过用氧吹扫,溶解氧浓度保持高于 50% 的在空气中的饱和。温度维持在 36.5°C。在纯化前,抽取的收获物通过过滤(3 µm Clarigard, Opticap XL10 ;0.22 µm Durapore, Opticap XL10, Merck Millipore, Hellerup, DK) 澄清。

[0142] 实施例 4

基本上如其他地方(Thim 等人 1988) 描述的,FVII 变体通过针对 Gla 结构域的抗体亲和层析进行纯化。简言之,方案包括 1 - 3 个步骤。在步骤 1 中,将 5 mM CaCl₂ 加入条件培养基中,并且将样品装载到亲和柱上。在用 20 mM HEPES、2 M NaCl、10 mM CaCl₂、0.005% Tween 80, pH 8.0 充分洗涤后,在(步骤 2) 阴离子交换柱(Source 15Q, GE Healthcare) 上,用 20 mM HEPES、20 mM NaCl、20 mM EDTA、0.005% Tween80, pH 8.0 洗脱结合的蛋白质。在用 20 mM HEPES、20 mM NaCl、0.005% Tween80, pH 8.0 洗涤后,在(步骤 3) CNBr-Sepharose Fast Flow 柱(GE Healthcare) 上,用 20 mM HEPES、135 mM NaCl、10 mM CaCl₂、0.005% Tween80, pH 8.0 洗脱结合的蛋白质,根据制造商的说明书,人血浆衍生的 FXa 已以 1 mg/ml 的密度与所述柱偶联。将流速优化以确保纯化的酶原变体基本上完全活化为活性形式。对于能够在条件培养基中或在阴离子交换柱上自活化的活性增强的 FVIIa 变体,省略步骤 2 和 / 或步骤 3,以阻止蛋白酶解降解。将纯化的蛋白质贮存于 -80°C 下。蛋白质质量通过 SDS-PAGE 分析进行评价,并且功能分子的浓度如下所述通过活性位点滴定或经由 rpHPLC 的轻链含量定量进行测量。

[0143] 通过活性位点滴定测量 FVIIa 变体浓度 - 在用亚化学计量水平的 d-Phe-Phe-Arg- 氯甲基酮 (FFR-cmk ;Bachem) 滴定后,通过来自不可逆的酰胺裂解活性丧失的活性位点滴定来测定在纯化制剂中的功能分子浓度,基本上如其他地方 (Bock, 1992) 描述的。简言之,所有蛋白质均在测定缓冲液 (50 mM HEPES (pH 7.4)、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂、1 mg/mL BSA 和 0.1% (w/v) PEG8000) 中稀释。使最终浓度 150 nM 的 FVIIa 变体与 500 nM 可溶性组织因子 (sTF) 预温育 10 分钟,随后在 96 孔板中的 100 µL 总反应体积中添加以 0-300 nM (n=2) 最终浓度的 FFR-cmk。反应在室温下温育过夜。在另一块 96 孔板中,20 µL 每种反应在含有 1 mM S-2288 (Chromogenix, Milano, 意大利) 的测定缓冲液中稀释 10 倍。在配备 SOFTmax PRO 软件的 Spectramax 190 微板分光光度计中,在 405 nm 处连续测量吸光度增加 10 分钟。酰胺裂解活性报告为在空白扣除后线性进展曲线的斜率。活性位点浓度通过外推测定,作为完全取消酰胺裂解活性所需的 FFR-cmk 的最小浓度。

[0144] 使用反相 HPLC 由轻链含量测量 FVIIa 变体浓度 - 在可替代方法中,纯化制剂中的功能 FVIIa 分子浓度通过经由反相 HPLC (rpHPLC) 定量 FVIIa 轻链 (LC) 含量进行测定。使用范围为 0 - 3 µM 的 FVIIa 浓度制备使用野生型 FVIIa 的校准曲线,而浓度未知的样品以 1.5 µM (n=2) 的估计浓度进行制备。所有样品均使用以 20% (v/v) 浓度加入样品中的 0.5 M 三 (2- 羧乙基) 膦 (TCEP ;Calbiochem/Merck KGaA, Darmstadt, 德国) 和甲酸的 1:1 混合物进行还原,随后将样品在 70°C 下加热 10 分钟。将还原的 FVIIa 变体装载到维持在 30°C 下的 C4 柱 (Vydac, 300 Å, 粒子大小 5 µm, 4.6 mm, 250 mm) 上。移动相由在水中的 0.09% TFA

(溶剂 A)和在乙腈中的 0.085% TFA (溶剂 B) 组成。在注射 80 μ L 样品后,系统在 25% 溶剂 B 下等度运行 4 分钟,随后为经过 10 分钟来自 25–46% B 的线性梯度。使用分别为 280 和 348 nm 的激发和发射波长,通过荧光检测峰。通过峰整合执行轻链定量,并且基于野生型 FVIIa 标准曲线计算 FVIIa 变体的相对量。

[0145] 实施例 5

为了鉴定具有基本上保持的活性但与血浆抑制剂抗凝血酶降低的反应性的 FVIIa 变体,对生成的变体文库实施下文详述的筛选测定,其以手动和自动化形式两者建立。简言之,活性测量为在磷脂囊泡的存在下,每种变体蛋白酶解活化大分子底物因子 X 的能力(体外蛋白酶解测定)。每种反应在辅因子组织因子 (sTF) 的存在或不存在下执行,以模拟可能的 TF 依赖性和不依赖性重组 FVIIa 作用机制。每种变体对通过抗凝血酶抑制的敏感性在假一阶条件下,在低分子量肝素的存在下进行定量,以模拟内源肝素样葡糖氨基聚糖 (GAG) 在体内加速反应的能力。如图 4 中所示,发现测量的体外抗凝血酶反应性与 FVIIa–抗凝血酶复合物的体内累积关联,因此验证体外筛选操作的预测性。

[0146] 来自变体筛选的结果在表 2 中给出。在变体中,用 Lys (K)、Arg (R)、Tyr (Y) 或 Phe (F) 替换 T293 使抗凝血酶反应性降低至或低于 10% 的野生型 FVIIa 的水平,而在不存在 sTF 的情况下的蛋白酶解活性维持轻微高于野生型水平。对于 T293Y 变体,观察到 >200% 的野生型 FVIIa 的活性水平。类似地,在 Q176 处的 Lys (K)、Arg (R) 和 Asn (N) 取代极大降低抗凝血酶反应性,同时使蛋白酶解活性基本上保存在野生型水平。值得注意的是,对于 Q176R 变体观察到小于 1% 的抗凝血酶反应性。

[0147] 表 2:相对于野生型 FVIIa (以 % 表示), FVIIa 变体的蛋白酶解活性和抗凝血酶反应性。如所示的,在磷脂囊泡的存在下以及在可溶性组织因子 (sTF) 的存在和不存在下,用人血浆衍生的 FX 作为底物测量蛋白酶解活性。在低分子量肝素的存在下,测量通过人血浆衍生的抗凝血酶的抑制。指示了用于产生每种变体的表达系统。

蛋白质名称	序列修饰	蛋白酶解活性 +PS:PC (%)	蛋白酶解活性 +sTF/PS:P C (%)	抗凝血酶抑制 (%)	表达系统
FVIIa A175K	175A>K	123	113.5	125.6	BHK

FVIIa V172N	172V>N	76.5	94.4	28.4	BHK
FVIIa N173D	173N>D	35.1	51.5	80.9	BHK
FVIIa G174E	174G>E	49	62.9	118.4	BHK
FVIIa G174S	174G>S	62.2	68.8	131.2	BHK
FVIIa A175L	175A>L	67.9	64.5	169.6	BHK
FVIIa Q176K	176Q>K	80.4	116.9	7.2	BHK
FVIIa Q286N	286Q>N	29.7	83.3	5.8	BHK
FVIIa Q176L	176Q>L	66.2	63.4	144.1	BHK
FVIIa K197N	197K>N	45.8	66.4	99	BHK
FVIIa K199G	199K>G	60	76.3	81.1	BHK
FVIIa K199S	199K>S	67.4	88.4	91.1	BHK
FVIIa N200Y	200N>Y	93.2	101.9	134.1	BHK
FVIIa R202A	202R>A	27.4	51.6	86.3	BHK
FVIIa R202V	202R>V	25.4	54.1	98.2	BHK
FVIIa N203K	203N>K	122.4	103.2	179.9	BHK
FVIIa I205T	205I>T	41.6	62.8	67.5	BHK
FVIIa V235T	235V>T	72.1	86.1	112.4	BHK
FVIIa P236A	236P>A	52.9	73.1	91.2	BHK
FVIIa T238Q	238T>Q	24.5	32.1	40.4	BHK
FVIIa t239A	239T>A	100.8	102.7	160.7	BHK
FVIIa T239I	239T>I	22.8	53.5	10.9	BHK
FVIIa Q286V	286Q>V	10.9	31.6	18.7	BHK
FVIIa Q286T	286Q>T	3.6	13.2	17.7	BHK
FVIIa Q286L	286Q>L	13.8	31.3	27.1	BHK
FVIIa A292V	292A>V	56.4	71.3	165.5	BHK
FVIIa T293K	293T>K	112	140.6	2.7	BHK
FVIIa T293L	293T>L	175.5	117.3	108.1	BHK
FVIIa L295R	295L>R	4	13.8	10.4	BHK
FVIIa D319A	319D>A	176.9	86.1	163.6	BHK
FVIIa D319G	319D>G	77.3	109.8	74.8	BHK
FVIIa A175T	175A>T	12.9	29.3	57	BHK
FVIIa A292R	292A>R	45.8	62.4	194.3	BHK
FVIIa Q176A	176Q>A	34.6	67.2	9.6	BHK
FVIIa Q176N	176Q>N	104.5	132.8	15.9	BHK
FVIIa Q176S	176Q>S	43.9	87.3	19.2	BHK
FVIIa I198A	198I>A	71.2	66.4	44.9	BHK
FVIIa K199A	199K>A	40.6	57.3	130.6	BHK
FVIIa T293A	293T>A	25	54.4	13.5	BHK
FVIIa T293S	293T>S	68.3	111.6	25.4	BHK
FVIIa Q286R	286Q>R	150.6	235.5	31.2	BHK
FVIIa A292E	292A>E	5.6	8.6	29.7	BHK
FVIIa M298Q	298M>Q	625.5	252.2	200.1	BHK
FVIIa Q366E	366Q>E	82.9	55.8	60.8	HEK293
FVIIa Q366D	366Q>D	20.5	10.1	10.5	HEK293
FVIIa T370A	370T>A	67.3	121.9	158.9	HEK293
FVIIa V371E	371V>E	20	68.4	4	HEK293
FVIIa V371T	371V>T	10.4	79	7.6	HEK293
FVIIa V371I	371V>I	87.5	71.4	117.3	HEK293

FVIIa A175T	175A>T	21.6	21	35.2	HEK293
FVIIa I205T	205I>T	41.2	77.8	61.6	HKB11
FVIIa P236N	236P>N	-0.1	4.5	70.3	HKB11
FVIIa G237N	237G>N	4.8	7	29.2	HKB11
FVIIa G291N	291G>N	-1.1	0.1	0	HKB11
FVIIa Q286A	286Q>A	44.3	63.2	88.2	BHK
FVIIa Q286Y	286Q>Y	4.6	24.3	7.4	BHK
FVIIa I198Q	198I>Q	32.8	43.8	35.5	BHK
FVIIa I198E	198I>E	76.4	69.6	82.6	BHK
FVIIa Q286I	286Q>I	-0.2	3.5	4.4	CHO
FVIIa Q286K	286Q>K	22.6	63.8	54.8	BHK
FVIIa Q286W	286Q>W	13.9	42.1	9.6	BHK
FVIIa Q286R	286Q>R	97.7	111.9	27.9	BHK
FVIIa Q176H	176Q>H	18.7	46	7.9	BHK
FVIIa K199H	199K>H	34.3	45.6	16.3	BHK
FVIIa Q286F	286Q>F	17.7	39.2	6.4	HKB11
FVIIa Q286M	286Q>M	163.8	196.7	30.6	HKB11
FVIIa Q286D	286Q>D	0.6	5.6	0	HKB11
FVIIa Q286E	286Q>E	9.6	3.8	12.6	HKB11
FVIIa Q176R	176Q>R	68.1	111.3	0.8	HKB11
FVIIa A175Q	175A>Q	73.6	65.2	117.4	HKB11
FVIIa Q176I	176Q>I	24.1	41.6	41.6	HKB11
FVIIa A175F	175A>F	111.2	73.1	89.8	HKB11
FVIIa A175H	175A>H	143.3	113	100.7	HKB11
FVIIa A175V	175A>V	88.4	94.8	87.3	HKB11
FVIIa Q176E	176Q>E	10.5	32.3	9	CHO
FVIIa Q176F	176Q>F	24.3	63.6	2.5	HKB11
FVIIa Q176T	176Q>T	43.7	65.3	21.2	CHO
FVIIa Q176V	176Q>V	19.7	32.1	0	HKB11
FVIIa Q176Y	176Q>Y	11.9	22.9	0	CHO
FVIIa T293M	293T>M	118	75.6	36.6	HKB11
FVIIa T293F	293T>F	132.4	76	7.7	CHO
FVIIa Q176M	176Q>M	103.4	87.9	49	HKB11
FVIIa I198S	198I>S	76	88.7	47.4	HKB11
FVIIa I198T	198I>T	7.4	83.4	19.9	HKB11
FVIIa A175D	175A>D	84.9	86.1	65.3	HKB11
FVIIa Q176W	176Q>W	3.3	40.5	1.1	CHO
FVIIa Q286H	286Q>H	3.3	6.8	5	CHO
FVIIa Q286S	286Q>S	20.7	38.2	32.8	CHO
FVIIa T293D	293T>D	3.4	13	0.5	CHO
FVIIa T293I	293T>I	19.6	43.1	12.1	CHO
FVIIa T293N	293T>N	49.1	54	20.1	CHO
FVIIa T293H	293T>H	51	65.4	6.5	HKB11
FVIIa A175Y	175A>Y	127.9	106.6	84.5	CHO
FVIIa A175N	175A>N	82.2	89.5	139.3	CHO
FVIIa V172D	172V>D	52.8	65	24.5	CHO
FVIIa A175R	175A>R	110.6	83.1	125.1	CHO
FVIIa A175W	175A>W	124.7	111.7	76.9	CHO

FVIIa I198V	198I>V	45.2	54.4	80.7	CHO
FVIIa T293Y	293T>Y	237.2	92.1	10.3	CHO
FVIIa T293W	293T>W	8.4	5.5	6.4	CHO
FVIIa A175S	175A>S	20.6	28.6	46.7	CHO
FVIIa V172K	172V>K	95.1	83	87.9	CHO
FVIIa V172E	172V>E	32.3	43.1	27.5	CHO
FVIIa V172M	172V>M	61.9	68.9	60.8	CHO
FVIIa V172Q	172V>Q	16.1	24.7	13.2	CHO
FVIIa V172T	172V>T	65.5	55.1	72.8	CHO
FVIIa V172W	172V>W	39.1	49.3	72.3	CHO
FVIIa T293R	293T>R	133.2	128.9	3.8	CHO
FVIIa T293V	293T>V	25.3	57.7	17.6	CHO
FVIIa V172L	172V>L	65.7	64.4	72.7	CHO
FVIIa V172G	172V>G	28.8	57	26.3	CHO
FVIIa I198L	198I>L	50.5	66.3	80.1	CHO
FVIIa V172Y	172V>Y	72.4	67.5	86.4	CHO
FVIIa V172I	172V>I	63	64.5	83.4	CHO
FVIIa V172A	172V>A	54.6	61.9	93.2	CHO
FVIIa V172S	172V>S	57.9	56.9	56.6	CHO
FVIIa A175M	175A>M	84.3	96	111.3	CHO
FVIIa V172R	172V>R	122.1	111.1	47.8	CHO
FVIIa M298Q	298M>Q	625.5	252.2	200.1	BHK
FVIIa K337A	337K>A	214.5	122	107.3	CHO
FVIIa Q176A M298Q	176Q>A, 298M>Q				CHO
FVIIa Q176L M298Q	176Q>L, 298M>Q				CHO
FVIIa V158D Q176L E296V M298Q	158V>D, 176Q>L, 296E>V, 298M>Q				CHO
FVIIa Q286A M298Q	286Q>A, 298M>Q				CHO
FVIIa V158D Q286A E296V M298Q	158V>D, 286Q>A, 296E>V, 298M>Q				CHO
FVIIa V158D Q286R E296V M298Q	158V>D, 286Q>R, 296E>V, 298M>Q	201.9	131.5	50.1	CHO
FVIIa T293A M298Q	293T>A, 298M>Q	8964.3	340.2	205.6	CHO
FVIIa T293L M298Q	293T>L, 298M>Q	1542.5	218.5	189.5	CHO
FVIIa V158D T293L E296V M298Q	158V>D, 293T>L, 296E>V, 298M>Q				CHO
FVIIa V158D Q286N E296V M298Q	158V>D, 286Q>N, 296E>V, 298M>Q	2771.2	594.5	84.7	CHO
FVIIa Q286N M298Q	286Q>N, 298M>Q	137.6	128.2	20.9	CHO
FVIIa V158D Q176K E296V M298Q	158V>D, 176Q>K, 296E>V, 298M>Q	7562.8	447.3	49.1	CHO
FVII Q176K M298Q	176Q>K, 298M>Q	584.9	214.4	9.6	CHO
FVIIa V158D T293K E296V M298Q	158V>D, 293T>K, 296E>V, 298M>Q	5406.9	232.8	19.5	CHO
FVIIa T293K M298Q	293T>K, 298M>Q	1025.5	512.9	7.5	CHO
FVIIa V158D E296V M298Q	158V>D, 296E>V, 298M>Q	8916.7	517	311.7	CHO
FVIIa L305V S314E K337A F374Y	305L>V, 314S>E, 337K>A, 374F>Y	426.3	92.2	315.8	CHO
FVIIa Q176K L305V S314E K337A F374Y	176Q>K, 305L>V, 314S>E, 337K>A, 374F>Y	1279.8	127.6	83.5	CHO
FVIIa Q286N L305V S314E K337A F374Y	286Q>N, 305L>V, 314S>E, 337K>A,	883.2	96.9	141.1	CHO

	374F>Y				
FVIIa T293K L305V S314E K337A F374Y	293T>K, 305L>V, 314S>E, 337K>A, 374F>Y	1519.7	198.3	69.4	CHO

[0148] 使用因子 X 作为底物测量蛋白酶解活性 (手动体外蛋白酶解测定) - FVIIa 变体的蛋白酶解活性使用血浆衍生的因子 X (FX) 作为底物进行估计。所有蛋白质均在测定缓冲液 (50 mM HEPES (pH 7.4)、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂、1 mg/mL BSA 和 0.1% (w/v) PEG8000) 中稀释。通过在 25 μM 75:25 磷脂酰胆碱: 磷脂酰丝氨酸磷脂囊泡 (PS:PC; Haematologic Technologies, Vermont, USA) 的存在下, 在 96 孔板中的 100 μl 总反应体积中 (n = 2), 使 10 nM 每种 FVIIa 缀合物与 40 nM FX 一起在室温下温育 30 分钟, 测定 FX 活化的动力学参数。通过在 25 μM PC:PS 磷脂的存在下, 在 100 μl 总反应体积中 (n = 2), 使 5 pM 每种 FVIIa 缀合物与 30 nM FX 一起在室温下温育 20 分钟, 测定在 sTF 的存在下的 FX 活化。在温育后, 通过添加 50 μl 停止缓冲液 [50 mM HEPES (pH 7.4)、100 mM NaCl、80 mM EDTA], 随后添加 50 μl 2 mM S-2765 生色底物 (Chromogenix, Milano, 意大利), 来猝灭反应。最后, 在 Spectramax 190 微板阅读器中, 在 405 nm 处连续测量吸光度增加。通过使用线性回归, 将数据拟合至 Michaelis Menten 方程的简化形式 ($v = k_{cat} * [S] * [E] / K_m$), 估计表观催化速率值 (k_{cat}/K_m), 因为 FX 底物浓度 ([S]) 低于活化反应的 K_m 。由在相同条件下用人血浆衍生的 FXa 制备的标准曲线估计生成的 FXa 量。估计的 k_{cat}/k_m 值相对于野生型 FVIIa 的那种进行报告。结果在表 2 和表 3 中给出。

[0149] 表 3: FVIIa 变体和 PEG 化缀合物的体外功能 (上面部分) 和药物代谢动力学 (下面部分) 特性

化合物		FVIIa凝块效力 (%)	蛋白酶解活性 (%)	TEG R-时间EC50 (nM)	TGA效力 (%)	AT抑制 (%)
FVIIa		100 ± 7	100	0.43 ± 0	100	100
	+40k PEG	15 ± 1	25 ± 4	1.80 ± 1	40 ± 6	63 ± 10
	Q286N	65 ± 7	30 ± 1	0.54	27 ± 4	6 ± 1
	+40k PEG	7.1 ± 1	32 ± 1			2 ± 1
	Q176K	115 ± 22	80 ± 4	0.84 ± 0	135 ± 49	7 ± 3
M298Q	T293K	140 ± 15	112 ± 6	0.46 ± 0	135 ± 49	3 ± 3
		182 ± 23	626 ± 39			200 ± 74
	Q286N	135 ± 5	138 ± 7			21 ± 4
	+40k PEG	26 ± 2	47 ± 1			12 ± 3
	Q176K	274 ± 7	585 ± 6			10 ± 5
DVQ	+40k PEG	43 ± 4	191 ± 9			6 ± 8
	T293K	242 ± 66	1026 ± 13			8 ± 2
	+40k PEG	45 ± 8	222 ± 9	0.52 ± 0		5.6 ± 2
		480 ± 43	8917 ± 239	0.07 ± 0	4000 ± 600	312 ± 104
	+40k PEG	68 ± 11	917 ± 47			210 ± 62
Q286N		310 ± 51	2771 ± 35	0.06 ± 0	3900 ± 570	85 ± 20
	+40k PEG	110 ± 14	1042 ± 37			65 ± 14
	Q176K	403 ± 25	7563 ± 48	0.17 ± 0	3900 ± 570	49 ± 21
	+40k PEG	89 ± 17	1488 ± 24			31 ± 19
	T293K	185 ± 8	5407 ± 151			20 ± 11

化合物	大鼠中的T½ (小时)	大鼠中的MRT (小时)	大鼠AT复合物Cmax/剂量 (Kg/L)	犬中的T½ (小时)	犬中的MRT (小时)	犬AT复合物Cmax/剂量 (Kg/L)
FVIIa		0.8 ± 0.01	1.1 ± 0.03	0.6 ± 0.08	1.7 ± 0.0	2.2 ± 0.1
	+40k PEG	7.4 ± 0.20	8.3 ± 0.30	0.7 ± 0.05	8 ± 0.2	11 ± 0.4
	Q286N	1.0 ± 0.02	1.2 ± 0.04	<LLOQ	2.3 ± 0.1	2.7 ± 0.2
	+40k PEG	16 ± 0.20	22 ± 0.80	<LLOQ	20 ± 2.1	28 ± 3.5
	Q176K	1.0 ± 0.03	1.0 ± 0.06	<LLOQ		
M298Q	T293K	1.1 ± 0.00	1.2 ± 0.02	<LLOQ		
		0.9 ± 0.02	1.0 ± 0.01	1.12 ± 0.17		
	Q286N	0.9 ± 0.02	1.1 ± 0.10	0.06 ± 0.01		
	+40k PEG	12 ± 1.10	15 ± 1.00	0.08 ± 0.02		
	Q176K	0.9 ± 0.02	1.1 ± 0.03	<LLOQ	1.6 ± 0.2	2.1 ± 0.31
DVQ	+40k PEG	7.8 ± 0.20	8.2 ± 0.10	<LLOQ	17 ± 0.6	18 ± 0.89
	T293K	1.0 ± 0.02	1.1 ± 0.03	<LLOQ		
	+40k PEG	13 ± 0.30	15 ± 0.60	0.07 ± 0.03		
		1.2 ± 0.10	0.7 ± 0.10	1.9 ± 0.30		
	+40k PEG	7.2 ± 1.30	2.1 ± 0.30	2.6 ± 0.30	8.6 ± 1.2	2.6 ± 0.4
Q286N		0.8 ± 0.02	0.8 ± 0.04	0.40 ± 0.06		
	+40k PEG	5.6 ± 0.10	5.5 ± 0.20	0.30 ± 0.02	6.3 ± 0.3	6.4 ± 0.4
	Q176K	0.6 ± 0.01	0.7 ± 0.04	0.10 ± 0.02	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.08
	+40k PEG	3.9 ± 0.04	3.1 ± 0.06	0.20 ± 0.10	2.0 ± 0.1	2.4 ± 0.08
	T293K	0.7 ± 0.04	0.8 ± 0.06	0.05 ± 0.01		

化合物	FVIIa凝块效力 (%)	蛋白酶解活性 (%)	TEG R-时间EC50 (nM)	TGA效力 (%)	AT抑制 (%)
40-HEP-[C]-FVIIa T293K 407C	27 ± 2	72 ± 5			2 ± 1

化合物	大鼠中的T½ (小时)	大鼠中的MRT (小时)	大鼠AT复合物Cmax/剂量 (Kg/L)
40-HEP-[C]-FVIIa T293K 407C	17.3 ± 0.5	21.9 ± 1	<LLOQ

DVQ :FVIIa V158D/E296V/M298Q

AT :抗凝血酶

+ 40k PEG :使用 40-kDa PEG 糖基 PEG 化。

FVIIa 凝块效力 :以野生型 FVIIa 比活性百分比表示的,FVII 缺乏血浆中的 sTF 依赖性凝块比活性。

蛋白酶解活性 : 以野生型 FVIIa 百分比表示的,在 PS:PC 囊泡存在下的 FXa 活性
TEG R- 时间 :高岭土诱导的血友病样人全血的血栓弹力图凝血时间。

TGA 效力 :以野生型 rFVIIa 百分比表示的,富含血小板的血友病样血浆中的凝血酶生成速率

AT 抑制 :以野生型 rFVIIa 百分比表示的,在低分子量凝血酶的存在下通过 AT 的抑制。

T½ :在 IV 施用后的活性分子的终末半衰期

MRT :在 IV 施用后的活性分子的平均停留时间。

AT 复合物 C_{max} / 剂量 :化合物 - 抗凝血酶复合物的最大测量水平除以剂量。

[0150] 使用因子 X 作为底物测量蛋白酶解活性 (自动化体外蛋白酶解测定) - FVIIa 变体的蛋白酶解活性使用血浆衍生的因子 X (FX) 作为底物进行估计。所有蛋白质均在 50 mM HEPES (pH 7.4)、100 mM NaCl、10 mM $CaCl_2$ 、1 mg/mL BSA 和 0.1% (w/v) PEG8000 中稀释。通过在 25 μ M 75:25 磷脂酰胆碱:磷脂酰丝氨酸 (PS:PC) 磷脂 (Haematologic technologies, Vermont, USA) 的存在下,在 96 孔板中的 100 μ L 总反应体积中 ($n = 2$),使 10 nM 每种 FVIIa 缀合物与 40 nM FX 一起在室温下温育 30 分钟,测定相对蛋白酶解活性。通过在 25 μ M PC:PS 磷脂的存在下,在 100 μ L 总反应体积中 ($n = 2$),使 5 pM 每种 FVIIa 缀合物与 30 nM FX 一起在室温下温育 20 分钟,测定在 sTF 的存在下的 FX 活化。在温育后,通过添加在停止缓冲液 [50 mM HEPES (pH 7.4)、100 mM NaCl、80 mM EDTA] 中的 100 μ L 1 mM S-2765,来猝灭反应。紧在猝灭后,在 Envision 微板阅读器 (PerkinElmer, Waltham, MA) 中,在 405 nm 处连续测量吸光度增加。所有添加、温育和板移动均通过与 Envision 微板阅读器联机偶联的 Hamilton Microlab Star 自动机 (Hamilton, Bonaduz, 瑞士) 执行。蛋白酶解活性相对于野生型 FVIIa 进行计算。结果在表 2 和表 3 中给出。

[0151] 通过抗凝血酶的 FVIIa 抑制的测量 (手动测定) - 不连续方法用于测量在假一阶条件下,在低分子量 (LMW) 肝素 (Calbiochem/Merck KGaA, Darmstadt, 德国) 的存在下,通过人血浆衍生的抗凝血酶 (AT) 的体外抑制速率。测定在 96 孔板中在 200 μ L 总反应体积中执行,使用含有 50 mM HEPES (pH 7.4)、100 mM NaCl、10 mM $CaCl_2$ 、1 mg/mL BSA 和 0.1% (w/v) PEG8000 的测定缓冲液。向 200 nM FVIIa 和 12 μ M LMW 肝素的混合物中,加入在 100 μ L 最终反应体积中的 5 μ M 抗凝血酶。在不同时间,通过将 20 μ L 反应混合物转移至另一块含有 180 μ L sTF (200 nM)、猝灭反应的聚凝胺 (0.5 mg/mL; 海美溴铵, Sigma-Aldrich) 和 S-2288 (1 mM) 的微量滴定板,来猝灭反应。紧在转移后的不同时间,在 Spectramax 190 微板阅读器中,在 405 nm 处监控底物切割 10 分钟。通过数据与指数衰变函数的非线性最小二乘法拟合获得假一阶速率常数 (k_{ob}),并且由下述关系 $k = k_{obs}/[AT]$ 获得二阶速率常数 (k)。抑制速率相对于野生型 FVIIa 的那种进行报告。结果在表 2 和表 3 中给出。

[0152] 通过抗凝血酶的 FVIIa 抑制的测量 (自动化测定) - 不连续方法用于测量在假一阶条件下,在低分子量 (LMW) 肝素 (Calbiochem/Merck KGaA, Darmstadt, 德国) 的存在下,通过人血浆衍生的抗凝血酶 (AT) 的体外抑制速率。测定在 96 孔板中在 200 μ L 总反应体积中执行,使用含有 50 mM HEPES (pH 7.4)、100 mM NaCl、10 mM $CaCl_2$ 、1 mg/mL BSA 和 0.1% (w/v) PEG8000 的缓冲液。向 200 nM FVIIa 和 12 μ M LMW 肝素的混合物中,加入在 100 μ L 最终反应体积中的 5 μ M 抗凝血酶。在不同时间,通过将 20 μ L 反应混合物转移至另一块含有 180 μ L sTF (200 nM)、聚凝胺 (0.5 mg/mL; 海美溴铵, Sigma-Aldrich) 和 S-2288 (1 mM) 的微量滴定板,来猝灭反应。紧在转移后的不同时间,在 Envision 微板阅读器中,在 405 nm 处监控底物切割 10 分钟。通过数据与指数衰变函数的非线性最小二乘法拟合获得假一阶速率常数 (k_{ob}),并且由下述关系 $k = k_{obs}/[AT]$ 获得二阶速率常数 (k)。所有添加、温育和板移动均通过与 Envision 微板阅读器 (PerkinElmer, Waltham, MA) 联机偶联的 Hamilton Microlab Star 自动机 (Hamilton, Bonaduz, 瑞士) 执行。抑制速率相对于野生型 FVIIa 的那种进行报告。结果在表 2 和表 3 中给出。

[0153] 实施例 6

鉴定的抗凝血酶抗性 FVIIa 变体的选择进一步与活性增强取代 M298Q、V158D/E296V/M298Q 或 L305V/S314E/K337A/F374Y 组合进行评估。

[0154] 使用实施例 5 中所述的蛋白酶解测定表征纯化的蛋白质制剂证实变体保留超活性。这使用实施例 7 中所述的基于 STACLOT®VIIa-rTF 血浆的测定通过效力评估加以证实，并且对于一些变体，还通过如实施例 8 中所述的在 FVIII 缺乏血浆中的凝血酶生成和血栓弹力图加以证实（参见表 2。另外，T293K 和 Q176K 突变使 M298Q 的抗凝血酶反应性有效降低至低于野生型 FVIIa 的 10%，而较不显著的降低与更活性（和抗凝血酶反应性）变体 V158D/E296V/M298Q 或 L305V/S314E/K337A/F374Y 组合观察到（参见表 4）。在 V158D/E296V/M298Q 背景下，T293K 突变使抗凝血酶反应性降低至野生型水平的约 20%。相反，在 M298Q 背景下，T293A 和 T293L 均不能使抗凝血酶反应性维持低于 100%。这些数据显示 Q176K 和 T293K 突变就维持活性同时基本上降低抗凝血酶反应性而言是优良的。

[0155] 表 4: 与活性增强取代 M298Q、V158D/E296V/M298Q 或 L305V/S314E/K337A/F374Y 组合的 FVIIa 变体的蛋白酶解活性和抗凝血酶反应性（以野生型的 % 表示）。如所示的，在磷脂囊泡的存在下以及在可溶性组织因子（sTF）的存在和不存在下，用人血浆衍生的 FX 作为底物测量蛋白酶解活性。在低分子量肝素的存在下，测量通过人血浆衍生的抗凝血酶的抑制。指示了用于产生每种变体的表达系统。

蛋白质名称	序列修饰	蛋白酶解活性 +PS:PC (%)	蛋白酶解活性 +sTF/PS:PC (%)	抗凝血酶抑制 (%)	表达系统
FVIIa Q176A M298Q	176Q>A, 298M>Q				CHO
FVIIa Q176L M298Q	176Q>L, 298M>Q				CHO
FVIIa V158D Q176L E296V M298Q	158V>D, 176Q>L, 296E>V, 298M>Q				CHO
FVIIa Q286A M298Q	286Q>A, 298M>Q				CHO
FVIIa V158D Q286A E296V M298Q	158V>D, 286Q>A, 296E>V, 298M>Q				CHO
FVIIa T293A M298Q	293T>A, 298M>Q	8964.3	340.2	205.6	CHO
FVIIa T293L M298Q	293T>L, 298M>Q	1542.5	218.5	189.5	CHO
FVIIa V158D T293L E296V M298Q	158V>D, 293T>L, 296E>V, 298M>Q				CHO
FVIIa V158D Q286N E296V M298Q	158V>D, 286Q>N, 296E>V, 298M>Q	2771.2	594.5	84.7	CHO
FVIIa Q286N M298Q	286Q>N, 298M>Q	137.6	128.2	20.9	CHO
FVIIa V158D Q176K E296V M298Q	158V>D, 176Q>K, 296E>V, 298M>Q	7562.8	447.3	49.1	CHO
FVII Q176K M298Q	176Q>K, 298M>Q	584.9	214.4	9.6	CHO
FVIIa V158D T293K E296V M298Q	158V>D, 293T>K, 296E>V, 298M>Q	5406.9	232.8	19.5	CHO
FVIIa T293K M298Q	293T>K, 298M>Q	1025.5	512.9	7.5	CHO
FVIIa V158D E296V M298Q	158V>D, 296E>V, 298M>Q	8916.7	517	311.7	CHO
FVIIa L305V S314E K337A F374Y	305L>V, 314S>E, 337K>A, 374F>Y	426.3	92.2	315.8	CHO
FVIIa Q176K L305V S314E K337A F374Y	176Q>K, 305L>V, 314S>E, 337K>A, 374F>Y	1279.8	127.6	83.5	CHO
FVIIa Q286N L305V S314E K337A F374Y	286Q>N, 305L>V, 314S>E, 337K>A, 374F>Y	883.2	96.9	141.1	CHO
FVIIa T293K L305V S314E K337A F374Y	293T>K, 305L>V, 314S>E, 337K>A, 374F>Y	1519.7	198.3	69.4	CHO

[0156] 实施例 7

使用商业 FVIIa 特异性凝血测定；来自 Diagnostica Stago 的 STACLOT[®]VIIa-rTF 估计效力。测定基于由 J. H. Morrissey 等人, Blood. 81:734-744(1993) 公开的方法。它测量在磷脂的存在下,在 FVII 缺乏血浆中 sTF 起始的 FVIIa 活性依赖性纤维蛋白凝块形成时间。凝血时间在 ACL9000 (ILS) 凝固仪器上进行测量,并且基于 FVIIa 校准曲线使用在双对数尺度 (bilogarithmic scale) 上的线性回归计算结果。相同测定用于测量在来自动物 PK 研究中的血浆样品中的 FVIIa 凝结活性。血浆中的定量下限 (LLOQ) 估计为 0.25 U/ml。使用比活性将血浆活性水平转换为 nM。结果在表 2 和图 3 中给出。

[0157] 实施例 8

如下所述,未经修饰的和 40k- 糖基 PEG 化形式中的抗凝血酶抗性变体的选择就其对 FVIII 缺乏血浆中的凝血酶生成和凝块形成的作用进行测试。结果在表 2 中给出。

[0158] 人供体血液的凝血酶生成测定 (TGA) - 在来自健康供体的富含血小板的血浆 (PRP) (最终血小板浓度为 $150 \times 10^9/l$) 中测量凝血酶生成。PRP 用抑制性抗人因子 VIII IgG 进行处理,以诱导 A 型血友病样状况。在起始测定前大约 5 分钟,通过添加 100 μ M 最终浓度的 PAR-1 激动剂 SFFLRN (Bachem, Bubendorf, 瑞士) 和 100 ng/ml 最终浓度的胶原受体 (GPVI) 激动剂惊厥蛋白 (convulxin) (Pentapharm, Basel, 瑞士) 活化血小板。将 FVIIa 和 FVIIa 变体以 20 μ l 的体积连同 80 μ l 含血小板激动剂的 PRP 一起加入微量滴定板中。通过添加以 16.7 mM 最终浓度的 20 μ l 含 CaCl_2 生荧光凝血酶底物 (FluCa Kit, Thrombinoscope bv, Maastricht, 荷兰) 起始反应。使用 Fluoroscan Ascent[®] 荧光计 (Thermo Fisher Scientific, Helsinki, 芬兰),连续测量凝血酶生成 120 分钟。如所述的 (Hemker 等人 2003),荧光信号在 390 nm (激发) 和 460 nm (发射) 的波长下进行检测,就 α -2-巨球蛋白结合凝血酶校准,且借助于校准器 (Thrombinoscope) 和 Thrombinoscope 软件 (Synapse BV, Maastricht, 荷兰) 转换为生成的凝血酶摩尔 (nM)。凝血酶生成速率计算为凝血酶峰 / (至峰的时间 - 滞后时间)。因为无法获得顶部平台水平,所以无法生成 EC_{50} 值。相反,通过比较获得在曲线图的最陡部分上表示的某一速率所需的化合物浓度,估计相对于野生型 FVIIa 的变体活性。

[0159] 人全血的血栓弹力图 (TEG) - TEG 分析在来自健康供体的全血中执行 (基本上如 Viuff 等人 Thrombosis Research, 2010 ;126-144-149 中所述)。血液用抑制性抗人因子 VIII IgG 进行处理,以诱导 A 型血友病样状况。将 FVIIa、FVIIa 变体或缓冲液 (HEPES 20 mM、NaCl 150 mM、BSA 2%) 加入含有高岭土 (Haemoscope, Niles, IL, USA) 的管中,并且通过管倒置小心地与全血混合。将样品转移至 TEG 杯,并且再钙化以起始凝血。止血过程通过 TEG 凝固分析仪 (5000 系列 TEG 分析仪, Haemoscope Corporation, Chicago, USA) 记录。TEG 凝血时间 (R, 指示从将血液置于样品杯直到凝块开始形成 (2 mm 幅度) 的等待时间,并且凝块形成的速度 (MTG, 最大血栓生成) 用于分析。样品作为单一样品进行分析,并且实验执行两次 (每次不同供体)。数据分析用 Haemoscope Software 版本 4 执行。对于每种参数, EC_{50} 值基于 4 参数逻辑浓度应答曲线拟合进行计算。

[0160] 实施例 9

为了探究鉴定的取代通过其影响抗凝血酶识别的机制,测定代表性变体 (FVIIa Q176K) 的晶体结构。

[0161] 使用依照 (Bjelke 等人 2008) 的悬滴法,使与可溶性组织因子 (片段 1-209) 复合的纯化的 H-D-Phe-Phe-Arg 氯甲基酮 (FFR-cmk ;Bachem, 瑞士) 活性位点抑制的 FVIIa Q176K 结晶。蛋白质缓冲溶液是 10 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、15 mM CaCl₂, pH 7.5 的混合物,并且蛋白质浓度为 5.8 mg/ml。沉淀、孔、溶液为:100 mM 柠檬酸钠, pH 5.6、16.6% PEG 3350 和 12% 1-丙醇。悬滴在 24 孔 VDX 板中设置,使用 1 ml 孔溶液,并且使用 1.5 μ l 蛋白质溶液和 0.5 μ l 孔溶液的混合物。晶体随着薄板生长,其中尺度最高达 0.3 x 0.15 x 0.05 mm。

[0162] 将晶体转移至含有 80 体积% 结晶孔溶液和 20% 甘油 (99% 纯度) 的溶液。使晶体浸泡约 30 秒,这之后将晶体转移至液氮且在液氮中速冻。X 射线衍射数据在束线 911-3、MAX- 实验室同步加速器, Lund, 瑞典 (Mammen 等人, 2002) 处收集。一份晶体是单晶,而其他份显示孪晶。获得来自晶体的非孪生部分的完全数据集。数据通过 XDS 数据简化软件 (Kabsch, 2010) 进行加工,导致 1.95 Å 的最终分辨率截断。晶体学数据、精化和模型统计学显示于表 5 中。

[0163] 来自蛋白质数据库 (Berman 等人, 2000) 的 3ELA 条目 (Bjelke 等人 2008) 的晶体学坐标,用作 CCP4 软件包 (Collaborative Computational Project, 1994) 的 REFMAC5 (Murshudov 等人, 2011) 中的刚体精化的起始模型。精化随后为计算机图形学软件 COOT (Emsley 等人, 2010) 中的相互作用模型校准。坐标精化和模型构建随后转移至 PHENIX 软件包 (Adams 等人, 2010) 和 PHENIX. REFINER 软件 (Afonine 等人, 2012)。获得的最终 R 和 R 游离分别为 0.183 和 0.216。晶体学数据、精化和模型统计学显示于表 5 中。

[0164] 表 5:关于 FVIIa Q176K 结构的晶体学数据、精化和模型统计学

空间群	P 2 ₁
晶胞大小 a, b, c [Å], β [°]	78.37, 69.37, 78.78, 90.46
不对称单元中的复合物分子数目	1
分辨率	29.5-1.95 (2.00-1.95)
测量的反射	229708
独特的反射	61080
^a R _{sym}	6.0 (77.4)
完全性[%]	98.9 (97.9)
I/σ(I)	17.4 (1.9)
威尔逊B因子 [Å ²]	35.3
精化截断	F > 0 σ F
蛋白质原子数目	4219
金属离子	1
碳水化合物原子	21
抑制剂原子	34
甘油原子	54
总体B因子值 [Å ²]	48.3
TLS基团数目	10
^b R _{晶体}	18.3 (32.9)
^b R _{游离}	21.6 (38.0)
均方根差 键 角度	0.018 1.69
^d 坐标误差[Å]	0.27
Ramachandran 图	
有利区	496 (93.4%)
允许区	23 (4.36%)
离群区	9 (1.70%)

^aR_{sym} = $\sum_h \sum_i |I(h, i) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i I(h, i)$, 其中 $I(h, i)$ 是 h 的第 i 次测量的强度, 并且 $\langle I(h) \rangle$ 是所有 i 次测量的相应平均值。

^bR_{cryst} = $\sum_h | |F(h)_o| - |F(h)_c| | / |F(h)_o|$, 其中 F(h)_c 是计算的反射 h 的结构因子, R_{游离} 等价于 R_{晶体}, 但对于随机选择的 5% 反射进行计算, 所述反射从精化过程中省略。

^cR- 游离基于所有反射的 5%。

^d基于的最大似然性。

[0165] 结构分析 - 重链 FVIIa Lys 176 残基位于 β 链 B1 的最开始中的 β 链 A1 和 B1/ 之间的环中。当在似然性加权的 2mFo-DFc 图中使用 1.0 截断时, 重链 Lys 176 残基的电子密度对于主链明确显示, 并且直至 C - 原子的侧链。Lys 176 侧链的取向在重链 293 Thr 残基的方向中, 远离 3.5 Å。FVIIIa Q176K 结构与蛋白质数据库 (Berman, Westbrook, Feng, Gilliland, Bhat, Weissig, Shindyalov, & Bourne, 2000) 1DAN 结构 (Banner 等人, 1996) 的比较显示结构间的高相似性。FVIIa FFR-cmk 抑制且含 Glu 结构域的 Glu 结构在另

一个空间群 $P4_12_12$ 中结晶,并且在结构域间取向中存在小差异。 $C\alpha$ -原子之间的均方根差(RMSD)通过GESAMT(Krissinel,2012)和CCP4软件程序包(Collaborative Computational Project,1994)的LSQKAB进行计算。关于两种复合物的三条共同链,FVIIa重(H)、FVIIa轻(L)和组织因子(T)的总体RMSD为0.796 Å(对于529 $C\alpha$ -原子对),而关于仅FVIIa重链、催化结构域的RMSD为0.347 Å。图6显示了在FVIIa突变体Q176K的催化结构域和1DAN结构的那种之间的LSQKAB叠加运行的个别 $C\alpha$ - $C\alpha$ 距离。

[0166] 为了研究抗凝血酶和FVIIa突变体Q176K之间的可能相互作用,对具有PDB代码2GD4(Johnson等人,2006)的坐标的因子Xa分子作出在FVIIa突变体的叠加。FXa和FVIIa分子之间的同一性位置为34.1%,而共有位置为49.4%。使用GESAMT软件的叠加给出1.05 Å的RMSD,Q=0.783和229个残基的比对长度。根据残留(riding)抗凝血酶分子,随后明确的是如果抗凝血酶与FVIIa(Q176K)相互作用,则两个带正电的氨基酸:抗凝血酶的Arg 399和FVIIa重链的K176将变得非常接近(参见表6)和图7),但是,因为两个残基均是带正电的,则后果是两个残基之间的静电排斥。此外,抗凝血酶Arg 399是抗凝血酶分子的反应中心环(RCL)的部分(Johnson等人2006),并且所述排斥最可能负面影响抗凝血酶将其RCL置于FVIIa的活性位点内的可能性。由此,Q176K突变的FVIIa分子对通过抗凝血酶的抑制更不敏感。这与表2、表3和图3中观察到的一致,并且给出其解释,显示对通过抗凝血酶的失活的抗性增加、延长的半衰期和随后为活性中的轻微减少。

[0167] 表6:两个残基FVIIa的Q176K和复合物的Arg 399之间的距离(Johnson等人2006)已叠加且替换为FVIIa突变体Q176K分子。

FVIIa Q176K			抗凝血酶			距离 [Å]
残基类型	残基#和链	原子名称	残基类型	残基#和链	原子名称	
Lys	176H	CB	Arg	399I	NH1	3.79
Lys	176H	CE	Arg	399I	NH1	3.31
Lys	176H	NZ	Arg	399I	NH1	3.46
Lys	176H	O	Arg	399I	CG	3.82
			Arg	399I	CD	3.04
			Arg	399I	NH1	3.90

[0168] 实施例 10

为了评价抗凝血酶抗性与活性增强取代和化学修饰组合的效应,如下述部分中所述,通过酶促糖缀合使选择的FVIIa变体(参见表2)缀合至40-kDa PEG。

[0169] 基本上如其他地方公开的(Stennicke等人2008)进行N聚糖指导的PEG化。简言之,将4-氨基苯甲脒(Sigma)加入在10 mM组氨酸、50 mM NaCl、10 mM $CaCl_2$, pH 5.8中的溶液中的蛋白质(约1.55 mg/ml)至10 mM的最终浓度。随后加入产脉节杆菌(*A. urifaciens*)唾液酸酶至4 μ g/ml的最终浓度,以去除N聚糖上的末端唾液酸。去唾液酸反应在室温下进行1小时。去唾液酸蛋白质随后通过针对Gla结构域的单克隆抗体亲和层析进行纯化,如其他地方描述的(Thim等人1988),使用50 mM Hepes、100 mM NaCl、10 mM $CaCl_2$, pH 7.4,以洗掉过量苯甲脒和50 mM Hepes、100 mM NaCl、10 mM EDTA pH 7.4作为洗脱缓冲液。立即将氯化钙和苯甲脒加入收集的级分至10 mM的最终浓度。

[0170] 根据制造商的说明书,使用4-12% Bis-Tris Gels (Invitrogen),通过还原和非

还原 SDS-PAGE 分析获得的产物。蛋白质浓度通过轻链 rpHPLC 分析进行测定。所获得的去唾液酸蛋白质基于 SDS-PAGE 和 RP-HPLC 分析是同质的。向去唾液酸蛋白质（最终浓度约 26 μ M）中，加入 40kDa-PEG-GSC（*N*-((2,3-二(20 kDa mPEGyl)丙氧羰基氨基)乙酰基)- β -[5']胞苷酰- ζ -神经氨酸;10 当量)和 ST3Gal-III（最终浓度 0.22U/ml）。反应在 32°C 下进行 3 小时。在糖基 PEG 化 (glycoPEGylated) 产物在 32°C 下由 NAN-CMP（胞苷-5'-单磷酸-*N*-乙酰神经氨酸;3 mM）加帽 1 小时后，如上所述通过抗体亲和层析分离产物。使用 Superdex 200 pg 26/600 柱 (GE Healthcare)，通过尺寸排阻层析进一步纯化糖基 PEG 化产物。合并对应于单-糖基 PEG 化产物的级分，且如上所述通过 SDS-PAGE 分析。随后，使用 Amicon 10 kDa 截断超速离心装置 (Millipore)，使产物浓缩至约 1 mg/ml。

[0171] 通过分析型 SEC HPLC 使用 TSK-Gel G300SW_{XL} 柱评价二糖基 PEG 化 FVIIa 的含量，并且通过荧光（激发 280 nm，发射在 354 nm 处）和吸光度（280 nm）检测。柱温为 30°C，并且流速在 200 mM Na-磷酸盐、300 mM NaCl、10% 异丙醇，pH 6.9 中维持在 1 ml/分钟。

[0172] 测试的所有变体（参见表 4 中的列表）顺应糖基 PEG 化，并且获得占优势的单 PEG 化 (>85%) 产物。体外表征显示 FVIIa 野生型、M298Q 和 V158D/E296V/M298Q 背景下的 Q286N、Q176K 和 T293K 变体显示出在糖基 PEG 化后的抗凝血酶抗性中的轻微增加。另外，观察到蛋白酶解活性的下降。然而，基于 Q176K 和 T293K 的变体与 M298Q 和 V158D/E296V/M298Q 组合仍保留 >100% TF 不依赖性蛋白酶解活性，证实这些突变的优越性。

[0173] 实施例 11

定量方法：

Hepylated FVIIa 缀合物通过 HPLC 分析纯度。基于 FVIIa 参考分子，HPLC 也用于定量分离的缀合物量。样品以非还原或还原形式进行分析。使用 Zorbax 300SB-C3 柱 (4.6x50 mm;3.5 μ m Agilent, 目录号：865973-909)。柱在 30°C 下操作。注入 5 μ g 样品，并且用含有 0.1% 三氟乙酸的水 (A)-乙腈 (B) 溶剂系统洗脱柱。梯度程序如下：0 分钟 (25% B)；4 分钟 (25% B)；14 分钟 (46% B)；35 分钟 (52% B)；40 分钟 (90% B)；40.1 分钟 (25% B)。通过将 10 μ l TCEP/甲酸溶液（在水中的 70 mM 三(2-羧乙基)膦和 10% 甲酸）加入 25 μ l/30 μ g FVIIa（或缀合物）制备还原样品。在 HPLC (5 μ l 注入) 上分析前，反应在 70°C 下静置 10 分钟。

[0174] HEP-马来酰亚胺聚合物的制备

使用两种糖核苷酸 UDP-GlcNAc 和 UDP-GlcUA，通过酶促 (PmHS1) 聚合反应制备限定大小的马来酰亚胺官能化肝素前体聚合物。引发三糖 (GlcUA-GlcNAc-GlcUA)NH₂ 用于起始反应，并且聚合运行直至糖核苷酸构件块耗尽。末端胺（源于引物）随后用合适的反应基团官能化，在这种情况下，设计用于缀合至游离半胱氨酸的马来酰亚胺功能性。试剂例如 *N*-(*g*-马来酰亚胺丁酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯（磺基-GMBS, Pierce）可以用于胺至马来酰亚胺转换。肝素前体聚合物的大小可以通过在糖核苷酸：引物化学计量学中的变化预测定。该技术在 US 2010/0036001 中详细描述。

[0175] FVIIa Q286N 407C 的选择性还原：

使用基于谷胱甘肽的氧化还原缓冲系统，FVIIa Q286N 407C 如 US 20090041744 中所述进行还原。非还原的 FVIIa Q286N 407C (20 mg) 在 5°C 下在含有 0.5 mM GSH、15 μ M GSSG、25 mM 对氨基苯甲脒和 2 μ M Grx2 的 18.2 ml 10 mM Hepes、10 mM CaCl₂、50 mM

NaCl、0.01% Tween80, pH 6.0 的总体积中温育 18 小时。溶液用 20 ml 50 mM Hepes、100 mM NaCl, pH 7.0 稀释且在冰上冷却。随后加入 4.0 ml 100 mM EDTA 溶液, 同时保持 pH 中性。将整个内容物装载到两个连接的 5 ml HiTrap Q FF 柱 (Amersham Biosciences、GE Healthcare) 上, 所述柱在缓冲液 A (50 mM HEPES、100 mM NaCl、1 mM EDTA, pH 7.0) 中平衡, 以捕获 FVIIa Q286N 407C。在用缓冲液 A 洗涤以去除未结合的谷胱甘肽缓冲液和 Grx2p 后, FVIIa Q286N 407C 在一步中用缓冲液 B (50 mM HEPES、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂, pH 7.0) 洗脱。在洗脱物中的 FVIIa Q286N 407C 浓度通过 HPLC 进行测定。17 mg FVIIa Q286N 407C 在 12.2 ml 50 mM Hepes、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂, pH 7.0 中分离。当反应重复第二次时, 50 mM Hepes、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂, pH 7.0 的定量得率 (20 mg) 在 8 ml 50 mM Hepes、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂, pH 7.0 中分离。

[0176] 60k HEP-[C]-FVIIa Q286N 407C 的合成:

单个半胱氨酸还原的 FVIIa Q286N 407C (20 mg) 与 60K HEP-马来酰亚胺 (32 mg) 在 50 mM Hepes、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂, pH 7.0 缓冲液 (8.0 ml) 中在室温下反应 14 小时。随后将反应混合物装载到用 GlA 结构域特异性抗体修饰的 FVIIa 特异性亲和柱 (CV = 25 ml) 上, 并且进行步骤洗脱, 首先使用 2 柱体积的缓冲液 A (50 mM Hepes、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂, pH 7.4), 随后为两柱体积的缓冲液 B (50 mM Hepes、100 mM NaCl、10 mM EDTA, pH 7.4)。该方法基本上遵循由 Thim, L 等人 Biochemistry (1988) 27, 7785-779 描述的的原理。收集具有展开的 GlA 结构域的产物, 并且直接应用于两个连接的 5 ml HiTrap Q FF 离子交换柱 (Amersham Biosciences, GE Healthcare, CV=10 ml), 所述柱用 10 mM His、100 mM NaCl, pH 7.5 平衡。柱用 4 柱体积的 10 mM His、100 mM NaCl, pH 7.5 和 5 柱体积的 10 mM His、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂, pH = 7.5 洗涤, 以洗脱未经修饰的 FVIIa Q286N 407C。pH 随后用 10 mM His、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂, pH = 6.0 (12 柱体积) 降低至 6.0。用 10 柱体积的 40% 缓冲液 A (10 mM His、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂, pH = 6.0) 和 60% 缓冲液 B (10 mM His、1 M NaCl、10 mM CaCl₂, pH = 6.0) 溶剂混合物洗脱 60k-HEP-[C]-FVIIa Q286N 407C。合并含有缀合物的级分, 并且使用 10kD 截断的 Slide-A-Lyzer 盒 (Thermo Scientific), 针对 10 mM His、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂, pH = 6.0 透析。在使用反相 HPLC 的三 (2-羧乙基) 膦还原后, 通过针对 FVIIa 标准定量 FVIIa 轻链含量来测定得率 (2.61 mg, 13%)。还分离 12.6 mg 未经修饰的 FVIIa Q286N 407C。

[0177] FVIIa T293K 407C 的选择性还原:

使用基于谷胱甘肽的氧化还原缓冲系统, FVIIa T293K 407C 如上文对于 FVIIa Q286N 407C 描述的进行还原。总共 22.8 mg FVIIa T293K 407C 在 12 ml 50 mM Hepes、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂, pH 7.0 中分离。

[0178] 40k HEP-[C]-FVIIa T293K 407C 的合成:

单个半胱氨酸还原的 FVIIa T293K 407C (22 mg) 和 40K HEP-马来酰亚胺 (24 mg) 在含有 0.5 mM 对氨基苯甲脒的 8 ml 50 mM Hepes、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂, pH 7.0 缓冲液中在室温下温育 18 小时。随后将反应混合物用 20 ml 50 mM Hepes、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂, pH 7.4 稀释, 并且装载到用 GlA 结构域特异性抗体修饰的 FVIIa 特异性亲和柱 (CV = 64 ml) 上。将柱逐步洗脱, 首先使用两柱体积的缓冲液 A (50 mM Hepes、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂, pH 7.4), 随后为两柱体积的缓冲液 B (50 mM Hepes、100 mM NaCl、10 mM EDTA,

pH 7.4)。收集具有展开的 Gla 结构域的产物,并且直接应用于三个连接的 5 ml HiTrap Q FF 离子交换柱 (Amersham Biosciences, GE Healthcare, CV=15 ml), 所述柱用 10 mM His、100 mM NaCl, pH 7.5 平衡。柱用 4 柱体积的 10 mM His、100 mM NaCl, pH 7.5 和 5 柱体积的 10 mM His、100 mM NaCl、10 mM CaCl_2 , pH = 7.5 洗涤, 以洗脱未经修饰的 FVIIa T293K 407C。pH 随后用 10 mM His、100 mM NaCl、10 mM CaCl_2 , pH = 6.0 (12 柱体积) 降低至 6.0。用 15 柱体积的 40% 缓冲液 A (10 mM His、100 mM NaCl、10 mM CaCl_2 , pH = 6.0) 和 60% 缓冲液 B (10 mM His、1 M NaCl、10 mM CaCl_2 , pH = 6.0) 溶剂混合物洗脱 40k-HEP-[C]-FVIIa T293K 407C。合并含有缀合物的级分, 并且使用 10kD 截断的 Slide-A-Lyzer 盒 (Thermo Scientific), 针对 10 mM His、100 mM NaCl、10 mM CaCl_2 , pH = 6.0 透析。在使用反相 HPLC 的三 (2-羧乙基) 膦还原后, 通过针对 FVIIa 标准定量 FVIIa 轻链含量来测定得率 (15.3 mg, 69%)。

[0179] 实施例 12

在大鼠和犬中执行单独或与 M298Q 和 V158D/E296V/M298Q 和 40k-糖基 PEG 化组合的所鉴定的抗凝血酶抗性突变的药物代谢动力学分析, 以评价其对 FVIIa 的体内存活的作用。Sprague Dawley 大鼠 (三只 / 组) 或小猎犬 (两只 / 组) 静脉内给药。Stabylite™ (TriniLize Stabylite Tubes; Tcoag Ireland Ltd, 爱尔兰) 稳定的血浆样品在适当时间点作为完全概况收集, 并且冷冻直至进一步分析时。血浆样品就凝结活性 (如实施例 7 中所述) 并且通过定量 FVIIa-抗凝血酶复合物的 ELISA 进行分析。使用 WinNonlin (Pharsight Corporation), 通过非区室方法进行药物代谢动力学分析。估计下述参数: FVIIa-抗凝血酶复合物的 $C_{\max}$ (最大浓度), 以及凝结活性的 $T_{1/2}$ (功能终末半衰期) 和 MRT (功能评价停留时间)。

[0180] 简言之, 通过使用酶免疫测定 (EIA) 测量 FVIIa-抗凝血酶复合物。与 EGF 结构域的 N 末端结合且不阻断抗凝血酶结合的单克隆抗 FVIIa 抗体用于捕获复合物 (Dako 丹麦 A/S, Glostrup; 产品代码 09572)。多克隆抗人 AT 抗体过氧化物酶缀合物用于检测 (Siemens Healthcare Diagnostics ApS, Ballerup / 丹麦; 产品代码 OWMG15)。形成的纯化的人野生型或变体 FVIIa 和血浆衍生的人抗凝血酶复合物用作标准, 以构建 EIA 校准曲线。将血浆样品稀释且分析, 并且计算一式两份测量的平均浓度。EIA 的测定间精确度为 1-8%。

[0181] 药物代谢动力学概况显示于图 3 中, 并且估计的参数在表 3 中列出。对于 FVIIa 野生型和 40k-糖基 PEG 化背景下的抗凝血酶抗性变体, FVIIa-抗凝血酶复合物的累积降低至低于检测水平。此外, 这反映为, 与糖基 PEG 化 FVIIa (在大鼠中 7.4 小时和在犬中 8 小时) 相比较, 糖基 PEG 化 FVIIa Q286N (大鼠中 16 小时和在犬中 20 小时) 的显著延长的功能半衰期。类似地, 当变体进一步与 M298Q 和 V158D/E296V/M298Q 组合时, 通过抗凝血酶的体内失活极大缩小。值得注意的是, 与 FVIIa 40k-PEG 的 7.4 小时相比较, FVIIa M298Q T293K 40k-PEG 的半衰期在大鼠中为 13 小时, 同时保留 222% 的不依赖 TF 的蛋白酶解活性 (参见表 3)。

[0182] 实施例 13

以 0.5、2.5 和 10 mg/kg 剂量, 在 FVIII 敲除 (Bi 等人 1996) 小鼠中的尾部出血模型中, 检查与野生型 FVIIa 相比较 Q176K FVIIa 的体内功效。在 FVIIa 或赋形剂 (vehicle) 在尾静脉中静脉内给药后 5 分钟, 通过尾部尖端 4 mm 的横切, 在异氟烷麻醉的大鼠中发起

尾部出血。如其他地方描述的 (Elm 等人 2012), 出血时间和失血在 37°C 盐水中测量 30 分钟时期。结果在图 5 中给出。分别计算失血 ED50, 对于野生型 FVIIa 为 1.8 mg/kg, 并且对于 Q176K FVIIa 为 2.6 mg/kg, $p=0.50$ 。出血时间相对于剂量和失血以及出血时间相对于野生型 FVIIa 和 FVIIa Q176K 的暴露也显示非常相似的剂量应答曲线。总之, 在 FVIII 缺失小鼠中的急性尾部出血中, 在抗凝血酶抗性 FVIIa Q176K 变体和野生型 FVIIa 之间的剂量应答中不存在显著差异。

参考文献

Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., & Zwart, P. H. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst. D* 66, 213-221.

Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T. C., Urzhumtsev, A., Zwart, P. H., & Adams, P. D. (2012). Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* 68, 352-367.

Banner, D.W., D'Arcy, A., Chéne, C., Winkler, F.K. Guha, A., Konigsberg, W.H., Nemerson, Y. and Kirchhofer, D. (1996) The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature* 380, 41-46.

Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235-242.

Bi L., Sarkar R., Naas T., Lawler A.M., Pain J., Shumaker S.L. (2006) Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RNA and protein studies. *Blood* 88, 3446-

Bjelke, J. R., Olsen, O. H., Fodje, M., Svensson, L. A., Bang, S., Bolt, G., Kragelund, B. B., & Persson, E. (2008). Mechanism of the Ca²⁺-induced enhancement of the intrinsic factor VIIa activity. *J Biol Chem* 283, 25863-25870.

Bock, P.E. (1992) Active-site-selective labeling of blood coagulation proteinases with fluorescence probes by the use of thioester peptide chloromethyl ketones. Specificity of thrombin labeling. *J. Biol. Chem.* 267, 14963-14973

Collaborative Computational Project, N. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 50, 760-763.

Elm T., Karpf D.M., Øvlsen K., Pelzer H., Ezban M., Kjalke M., Tranholm M. (2012) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new recombinant FVIII (N8) in haemophilia A mice. *Haemophilia* 18, 139-145.

Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* 66, 486-501.

Freskgard, P.O., Olsen, O.H., and Persson, E. (1996) Structural changes in factor VIIa induced by Ca²⁺ and tissue factor studied using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci.* 5, 1531-1540

Hemker H.C., Giesen P., Al Dieri R., Regnault V., de Smedt E., Wagenvoort R., Lecompte T., Béguin S. (2003) Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 33, 4-15.

Higgins DG, Bleasby AJ, and Fuchs R. (1992) CLUSTAL V: multiple alignment of DNA and protein sequences. *Methods Mol Biol.* 25, 307-318.

Johnson, D.J.D., Li, W., Adams, T.E. and Huntington, J.A. (2006) Antithrombin-S105A factor Xa-heparin structure reveals the allosteric mechanism of antithrombin activation. *EMBO J.* 25, 2029-2037.

Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 66, 125-132

Krissinel, E. (2012). Enhanced fold recognition using efficient short fragment clustering. *Journal of Molecular Biochemistry* 1, 76-85.

Mammen, C. B., Ursby, T., Cerenius, Y., Thunnissen, M., Als-Nielsen, J., Larsen, S., & Liljas, A. (2002). Design of a 5-station macromolecular crystallography beamline at MAX-Lab. *Acta Phys. Pol. A* 101, 595-602.

Murshudov, G. N., Skubak, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F., & Vagin, A. A. (2011). REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 67, 355-367.

Persson, E. and Nielsen, L.S. (1996) Site-directed mutagenesis but not gamma-carboxylation of Glu-35 in factor VIIa affects the association with tissue factor. *FEBS Lett* 385, 241-243

Stennicke, H.R., Ostergaard, H., Bayer, R.J., Kalo, M.S., Kinealy, K., Holm, P.K., Sorensen, B.B., Zopf, D., Bjorn, S.E. (2008) Generation and biochemical characterization of glycoPEGylated factor VIIa derivatives. *Thromb Haemost.* 100, 920-928

Thim, L., Bjoern, S., Christensen, M., Nicolaisen, E.M., Lund-Hansen, T., Pedersen, A.H., and Hedner, U. (1988) Amino acid sequence and posttranslational modifications of human factor VIIa from plasma and transfected baby hamster kidney cells. *Biochemistry* 27, 7785-779

[0183] 本发明进一步通过下述非限定性实施方案进行描述：

实施方案 1：相对于人因子 VII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1)，包含两个或更多个取代

的因子 VII (a) 多肽,其中所述取代中的至少一个是其中 T293 已替换为 Lys(K)、Tyr(Y)、Arg(R) 或 Phe(F);其中 Q176 已替换为 Lys(K)、Arg(R)、Asn(N);和/或 Q286 已替换为 Asn(N),并且其中所述取代中的至少一个是其中 M298 已替换为 Gln(Q)、Lys(K)、Arg(R)、Asn(N)、Gly(G)、Pro(P)、Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Phe(F)、Trp(W)、Tyr(Y)、Asp(D)、Glu(E)、His(H)、Cys(C)、Ser(S) 或 Thr(T)。

[0184] 实施方案 2:根据实施方案 1 的因子 VII (a) 多肽,其中 T293 已替换为 Lys(K)、Tyr(Y)、Arg(R) 或 Phe(F)。

[0185] 实施方案 3:根据实施方案 1 的因子 VII (a) 多肽,其中 Q176 已替换为 Lys(K)、Arg(R) 或 Asn(N)。

[0186] 实施方案 4:根据实施方案 1 的因子 VII (a) 多肽,其中 Q286 已替换为 Asn(N)。

[0187] 实施方案 5:根据实施方案 1-4 的因子 VII (a) 多肽,其中 M298 已替换为 Q。

[0188] 实施方案 6:根据实施方案 5 的因子 VII (a) 多肽,其中作为另外的取代,V158 已替换为 Asp(D),并且 E296 已替换为 Val(V)。

[0189] 实施方案 7:根据实施方案 6 的因子 VII (a) 多肽,其中作为进一步的另外取代,K337 已替换为 Ala(A)。

[0190] 实施方案 8:根据实施方案 1 的因子 VII (a) 多肽,其中所述多肽具有下述取代的组之一:T293K/M298Q、T293Y/M298Q、T293R/M298Q、T293F/M298Q、Q176K/M298Q、Q176R/M298Q、Q176N/M298Q、Q286N/M298Q、T293Y/V158D/E296V/M298Q、T293R/V158D/E296V/M298Q、T293K/V158D/E296V/M298Q、Q176K/V158D/E296V/M298Q 或 Q176R/V158D/E296V/M298Q。

[0191] 实施方案 9:根据实施方案 1-8 的因子 VII (a) 多肽,其中所述因子 VII (a) 多肽与至少一种延长半衰期的部分偶联。

[0192] 实施方案 10:根据实施方案 9 的因子 VII (a) 多肽,其中所述“延长半衰期的部分”选自生物相容性脂肪酸及其衍生物、羟基烷基淀粉(HAS)例如羟乙基淀粉(HES)、聚乙二醇(PEG)、聚(Glyx-Sery)_n(HAP)、透明质酸(HA)、肝素前体聚合物(HEP)、基于磷酸胆碱的聚合物(PC 聚合物)、Fleximers、葡聚糖、聚唾液酸(PSA)、Fc 结构域、转铁蛋白、白蛋白、弹性蛋白样(ELP)肽、XTEN 聚合物、PAS 聚合物、PA 聚合物、白蛋白结合肽、CTP 肽和 FcRn 结合肽。

[0193] 实施方案 11:根据实施方案 10 的因子 VII (a) 多肽,其中所述延长半衰期的部分是 HEP。

[0194] 实施方案 12:根据实施方案 9-11 中任一项的因子 VII (a) 多肽,其中所述因子 VII (a) 多肽具有另外的突变 R396C、Q250C 或 +407C。

[0195] 实施方案 13:根据前述实施方案中任一项的因子 VII (a) 多肽,其中所述因子 VII (a) 多肽与组织因子二硫键连接。

[0196] 实施方案 14:根据前述实施方案中任一项的因子 VII (a) 多肽,其中所述因子 VII (a) 多肽是具有增加的血小板亲和力的因子 VIIa 变体。

[0197] 实施方案 15:多核苷酸构建体,其编码根据实施方案 1-14 中任一项的因子 VII (a) 多肽。

[0198] 实施方案 16:宿主细胞,其包含根据实施方案 15 的多核苷酸构建体。

[0199] 实施方案 17 :用于产生实施方案 1-14 中任一项中限定的因子 VII (a) 多肽的方法。

[0200] 实施方案 18 :药物组合物,其包含如实施方案 1-14 中任一项中限定的因子 VII (a) 多肽。

[0201] 实施方案 19 :根据实施方案 18 的药物组合物,其在 A 或 B 型血友病治疗中作为药物使用。

[0202] 实施方案 20 :如实施方案 1-14 中任一项中限定的因子 VII (a) 多肽用于制备药物的用途,所述药物用于治疗出血障碍或出血发作或者用于增强正常止血系统。

[0203] 实施方案 21 :根据实施方案 20 的用途,其用于治疗 A 或 B 型血友病。

[0204] 实施方案 22 :用于治疗受试者中的出血障碍或出血发作或者用于增强正常止血系统的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用治疗或预防有效量的如实施方案 1-14 中任一项中限定的因子 VII (a) 多肽。

[0205] 实施方案 23 :如实施方案 1-14 中任一项中限定的因子 VII (a) 多肽,其作为药物使用。

[0206] 实施方案 24 :根据实施方案 23 的因子 VII (a) 多肽,其在 A 或 B 型血友病治疗中作为药物使用。

[0001]

序列表

<110> Novo Nordisk A/S

<120> 凝血因子VII多肽

<130> 8473

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 406

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

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

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

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

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

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

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

Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110

Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140

Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160

[0002]

Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln	165	170	175
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala	180	185	190
His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu	195	200	205
Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg	210	215	220
Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn	225	230	235
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp	245	250	255
His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr	260	265	270
Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu	275	280	285
Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg	290	295	300
Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser	305	310	315
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser	325	330	335
Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr	340	345	350
Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys	355	360	365
Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile	370	375	380

[0003]

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

Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro
				405	

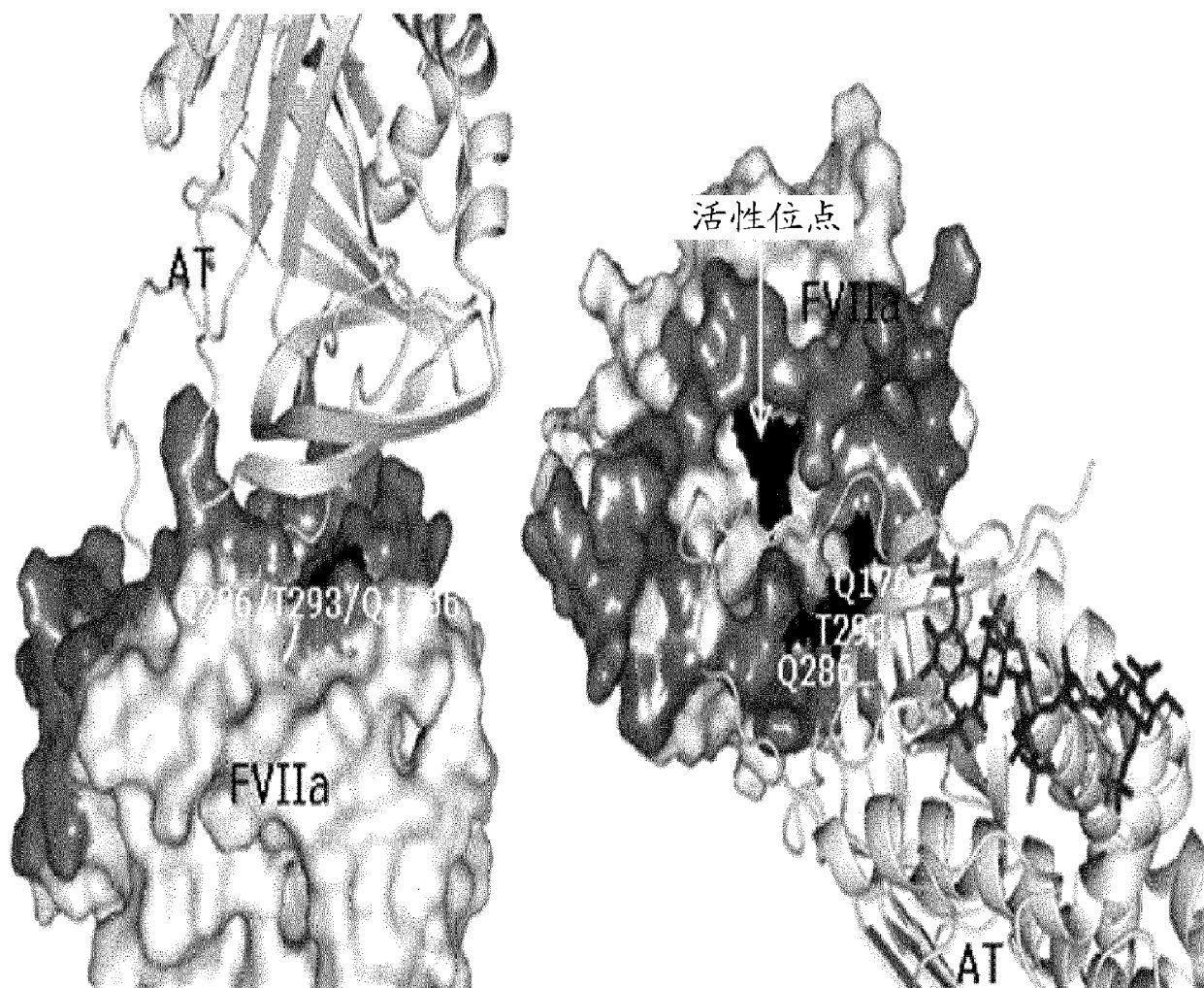


图 1

	16	30	40	50	60	70
	153	167	176	186	196	210
人	IVGGKVC PKGEC PWQVLL <u>LVNGAQL</u> CGGTLINTIWVVSAAHCF <u>DKIKN</u> WRNLI AVLGEHD					
黑猩猩	IVGGKVC PKGEC PWQVLL <u>LVNGAQL</u> CGGTLINTIWVVSAAHCF <u>DKIKN</u> WRNLI AVLGEHD					
猪	IVGGKVC PKGEC PWQA AV <u>KVDGKLL</u> CGGTLIDAAWVVSAAHCF <u>ERIKN</u> WKNLT VVLGEHD					
牛	IVGGKVC PKGEC PWQAML <u>KLKGALL</u> CGGTLNLSWVVSAAHCF <u>DRIRS</u> WKDLT VVLGEHD					
小鼠	IVGGHVC PKGEC PWQAML <u>KLKGALL</u> CGGTLVGPAAWVVSAAHCF <u>ERLRS</u> RGNLT AVLGEHD					
大鼠	IVGGNVC PKGEC PWQAVL <u>KINGLL</u> CGAVLLDARWIVTA AHCF <u>DNIRY</u> WGNIT VVMGEHD					
兔	IVGGYVC PKGEC PWQAVL <u>KFNEALL</u> CGAVLLDTRWIVTA AHCF <u>DKFGK</u> LVNIT VVLGEHD					
	IVGGKVC PKGEC PWQAAL <u>MNGSTLL</u> CGGSLLDTHWVVSAAHCF <u>DKLSS</u> LRNLT IVLGEHD					
	**** *					
	80	90	100	110	120	129
	220	230	240	250	260	269
人	LSEHDGDEQSRRAQV IIPSTY <u>VPGTTH</u> HDIALRLRHQP VVLT DHV VPLCLP ERTF SERT					
黑猩猩	LSEHDGDEQSRRAQV IIPSTY <u>IPGTTH</u> HDIALRLRHQP VVLT DHV VPLCLP ERAF SERT					
犬	LSEDDGDEQERHVARVIVPKY <u>TPLKTH</u> HDIALHLRTPVAYTDHV VPLCLP EKTFSERT					
猪	LSKDEGDEQERPVAQVFPDKY <u>VPKTDH</u> DLALVRLARPVALTDHV VPLCLP ERSF SERT					
牛	LSRVEGPEQERRVAQ IIVPKQY <u>VPQTDH</u> DVALLQLAQFVALGDH VAPLCLP DPDPFADOT					
小鼠	FSEKDGDEQVRRVTQVIMPKY <u>TRGKIN</u> HDIALRLHRPVTFTDY VVPLCLP EKSFSSENT					
大鼠	FSEKEGTEQVRLVEQVIMPNKY <u>TRGRTD</u> HDIALVRLHRPVTFTDY VVPLCLP ERAF SERT					
兔	LSEHEGDEQVRHVAQLIMPKY <u>VPKTDH</u> HDIALRLRLQPAALTNNV VPLCLP ERNFSEST					
	.* . * * * * * * . * * * * . * . * * * * . * . . *					
	137	150	160	170	180	
	280	292	302	312	327	
人	LAFVRFSLVSGW <u>QLDRGATA</u> LELMVLNVPR LMTQDCLQSRKVG <u>DS</u> PNITEYMF CAGY					
黑猩猩	LAFVRFSLVSGW <u>QLDRGATA</u> LELMVLNVPR LMTQDCLQSRKVG <u>DS</u> PNITEYMF CAGY					
犬	LAFIRFSTVSGW <u>QLDRGATA</u> LQLM AIDVPRVMTQDCQE QSRRRS <u>GS</u> PAITENMF CAGY					
猪	LAFIRFSAVSGW <u>RLDRGAKA</u> KVLM AIQVPR LMTQDCLEQARRR <u>GS</u> PSITDNMF CAGY					
牛	LAFVRFSAVSGW <u>QLDRGATA</u> LELMVLNVPR LMTQDCLQSRQRP <u>GG</u> FPVVTDNMF CAGY					
小鼠	LARIRFSRVSGW <u>QLDRGATA</u> LELM SIEVPR LMTQDCLEHAKHS <u>NT</u> PKITENMF CAGY					
大鼠	LASIRFSRVSGW <u>QLDRGATA</u> LELMVIEVPR LMTQDCLEHAKHS <u>NT</u> PRITENMF CAGY					
兔	LATIRFSRVSGW <u>QLLYRGALARE</u> LM AIDVPR LMTQDCVEQSEHKP <u>GS</u> PEVTGNMF CAGY					
	** . * * * * * . * * * * . * * * * * . * * * * * . * * * * * . * * * * *					
	190	200	210	220	230	240
	339	349	359	368	379	389
人	SDGSKDSC KDGSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQCA <u>TV</u> GHFGVYTRVSQYIEWLQKL MR					
黑猩猩	SDGSKDSC KDGSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQCA <u>SV</u> GHFGVYTRVSQYIEWLQKL MR					
犬	LDGSKDACQGD SGGPHATKFG TWYLTGVVSWGEGCA <u>AE</u> GHFGVYTRVSQYIEWLQKL MR					
猪	LDGSKDACQGD SGGPHATKFG TWYLTGVVSWGEGCA <u>AT</u> GRFGVYTRVSRYTAWLLGL MS					
牛	SDGSKDACKGD SGGPHATFRGTWFLTGIVSWGEGCA <u>AA</u> GHFGIYTRVSRYTAWLLGL MS					
小鼠	MDGTDACKGD SGGPHATHYHGTWYLTGVVSWGEGCA <u>AI</u> GHIGVYTRVSQYIDWLVRHM-					
大鼠	MDGTDACKGD SGGPHATHYHGTWYLTGVVSWGEGCA <u>AI</u> GHIGVYTRVSQYIDWLVRHM-					
兔	LDGSKDACKGD SGGPHATSYHGTWYLTGVVSWGEGCA <u>AV</u> GHVGVYTRVSRYTEWLSRLMR					
	** . * * * * * . * * * * . * * * * * . * * * * * . * * * * * . * * * * *					
	250					
	399					
人	SEPRP-GVLLRAPF-P					
黑猩猩	SEPRP-GVLLRAPF-P					
犬	SSHTLR-GLLRAPL-P					
猪	APPPPSEGLLRAPL-P					
牛	GHPPSRQGFFQVPLLP					
小鼠	-DSKLQVGVFRLPL-L					
大鼠	-DSKLRVGISRVSL-L					
兔	S--KLHHGIQRHPP-P					
	. . .					

图 2

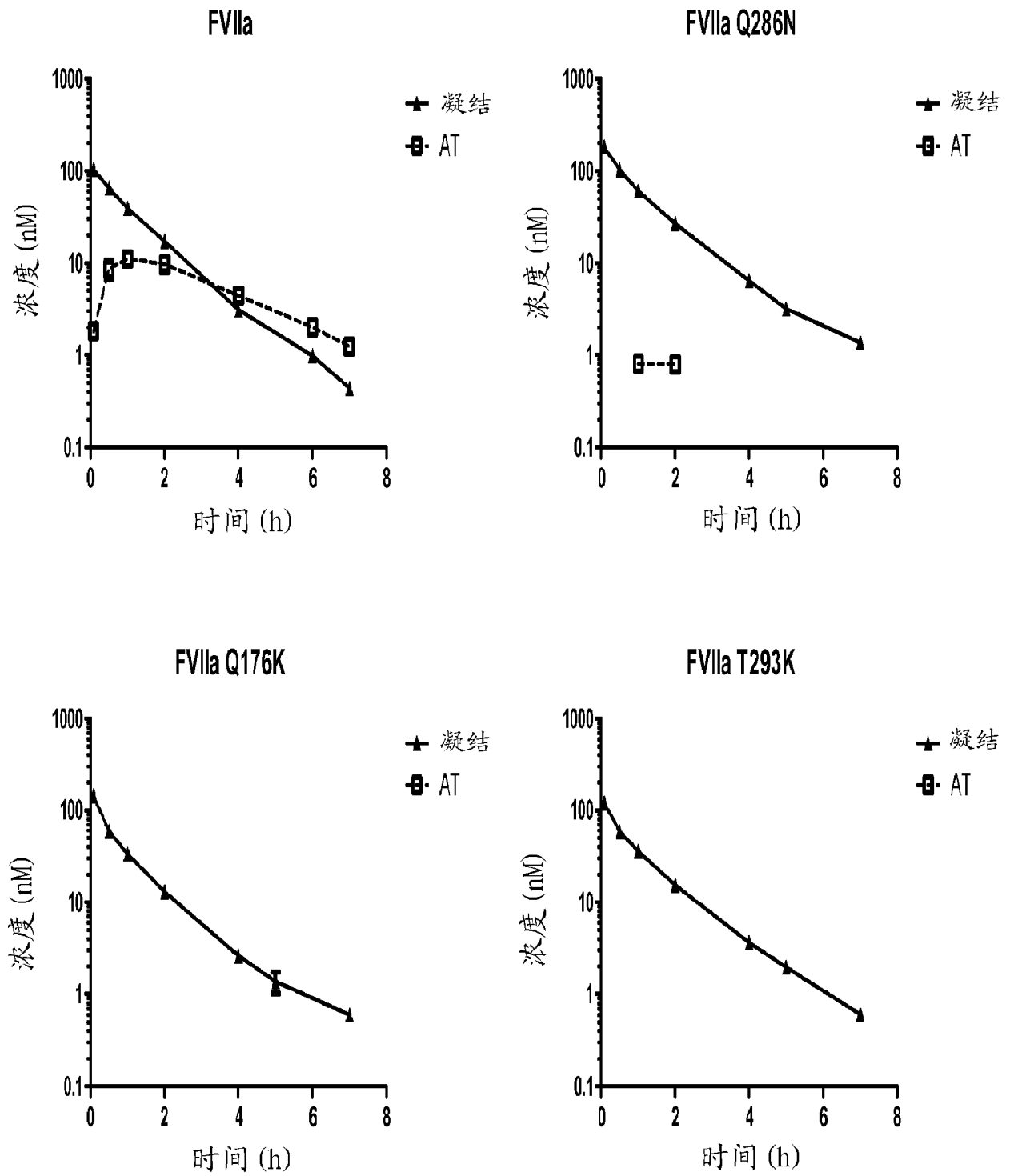


图 3a-3d

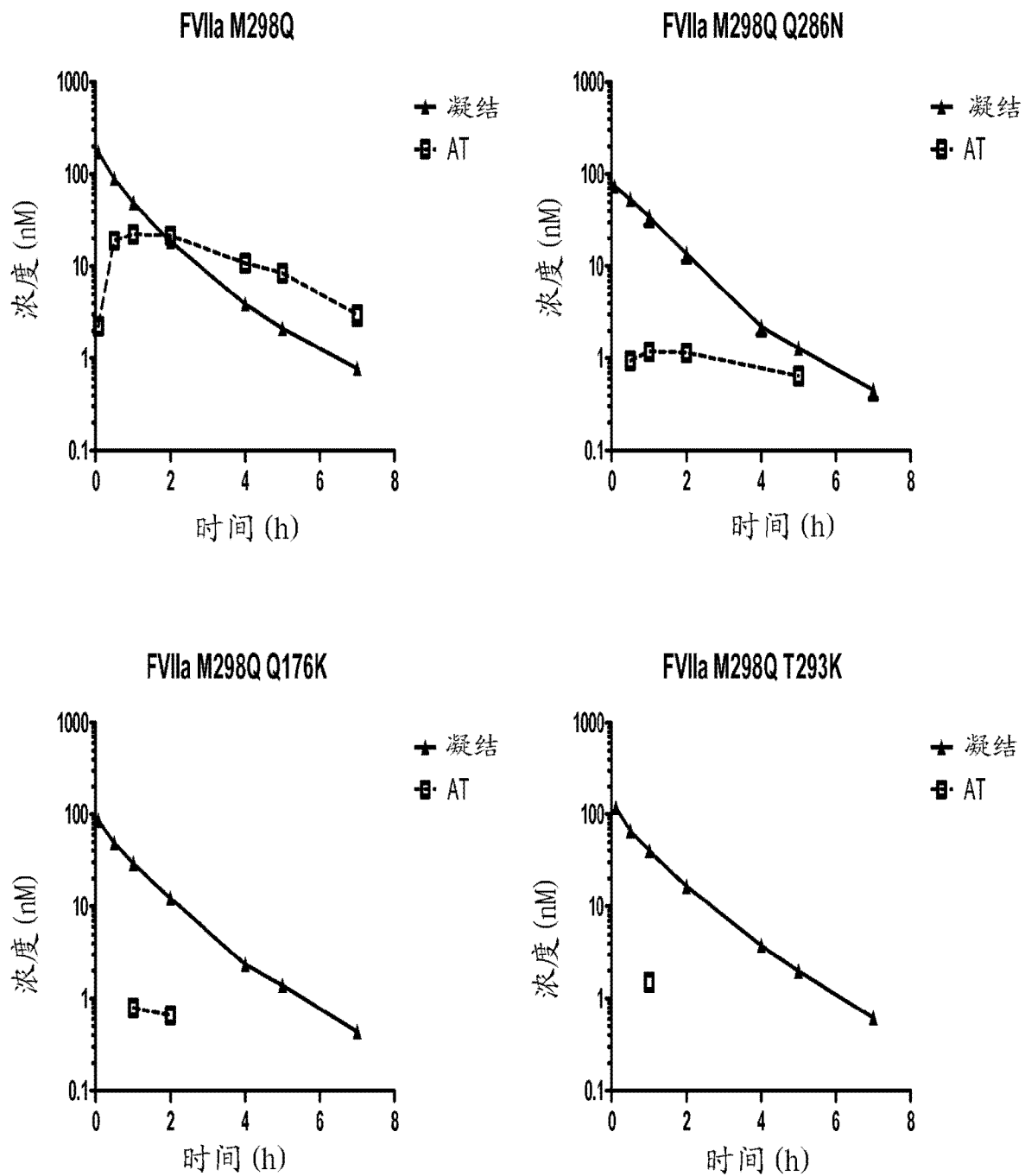


图 3e-3h

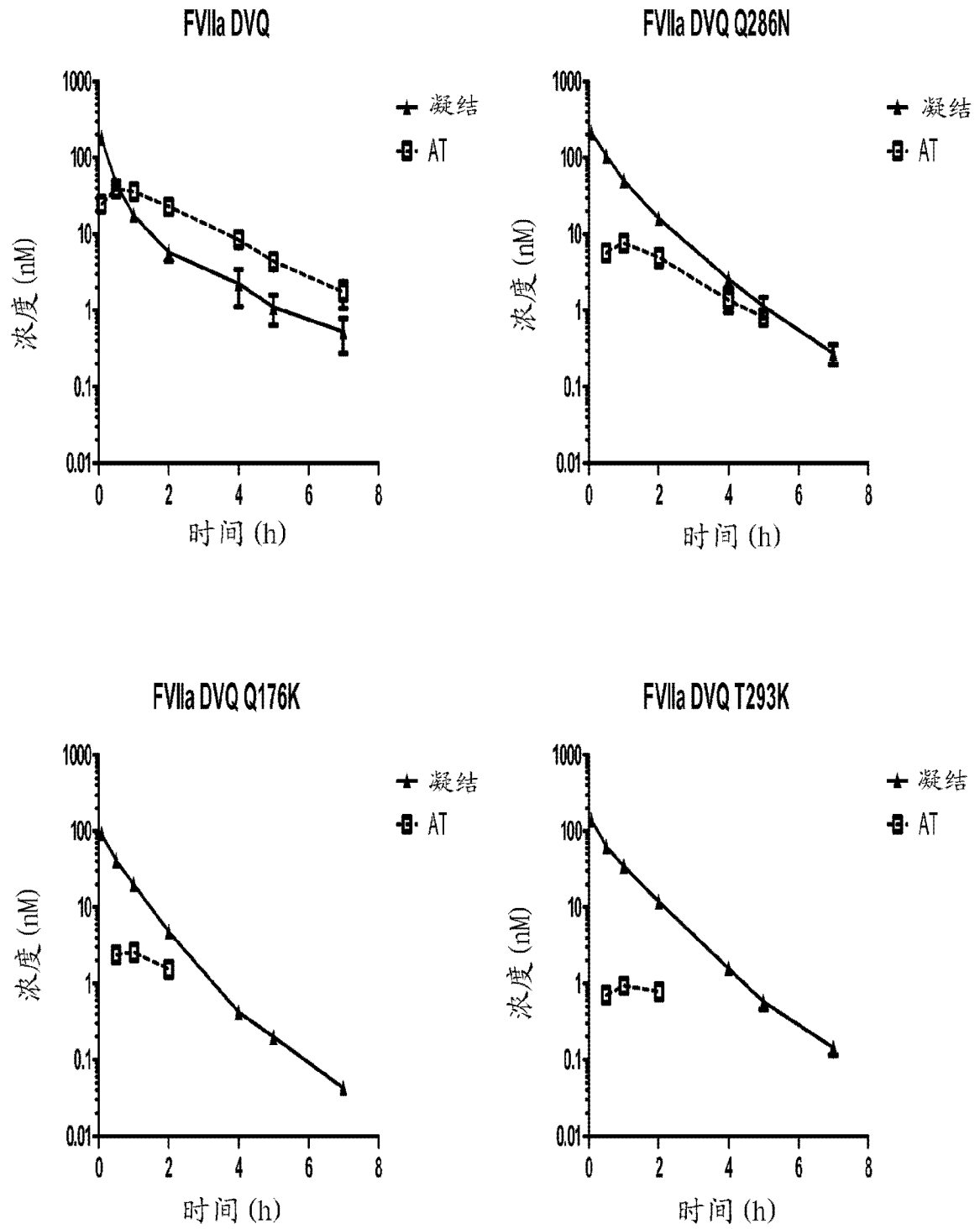


图 3i-31

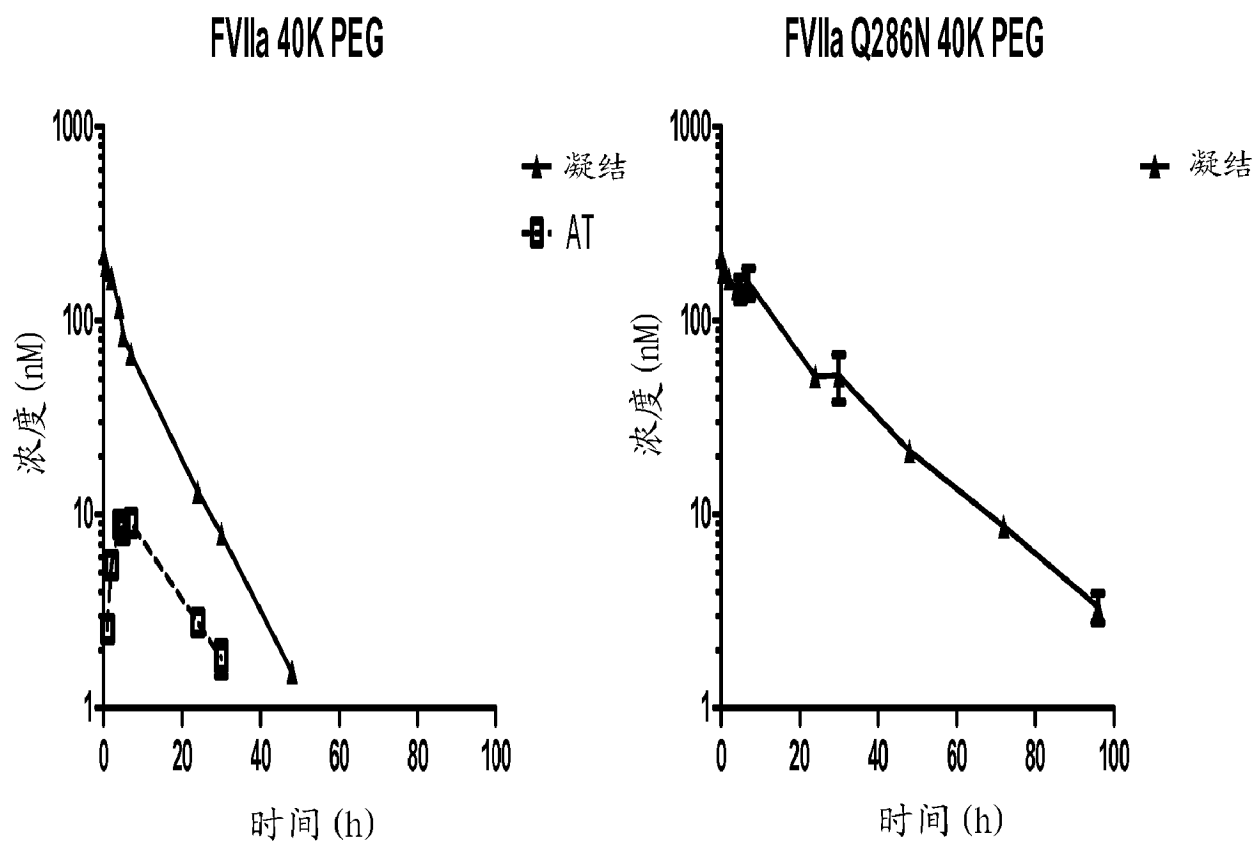


图 3m-3n

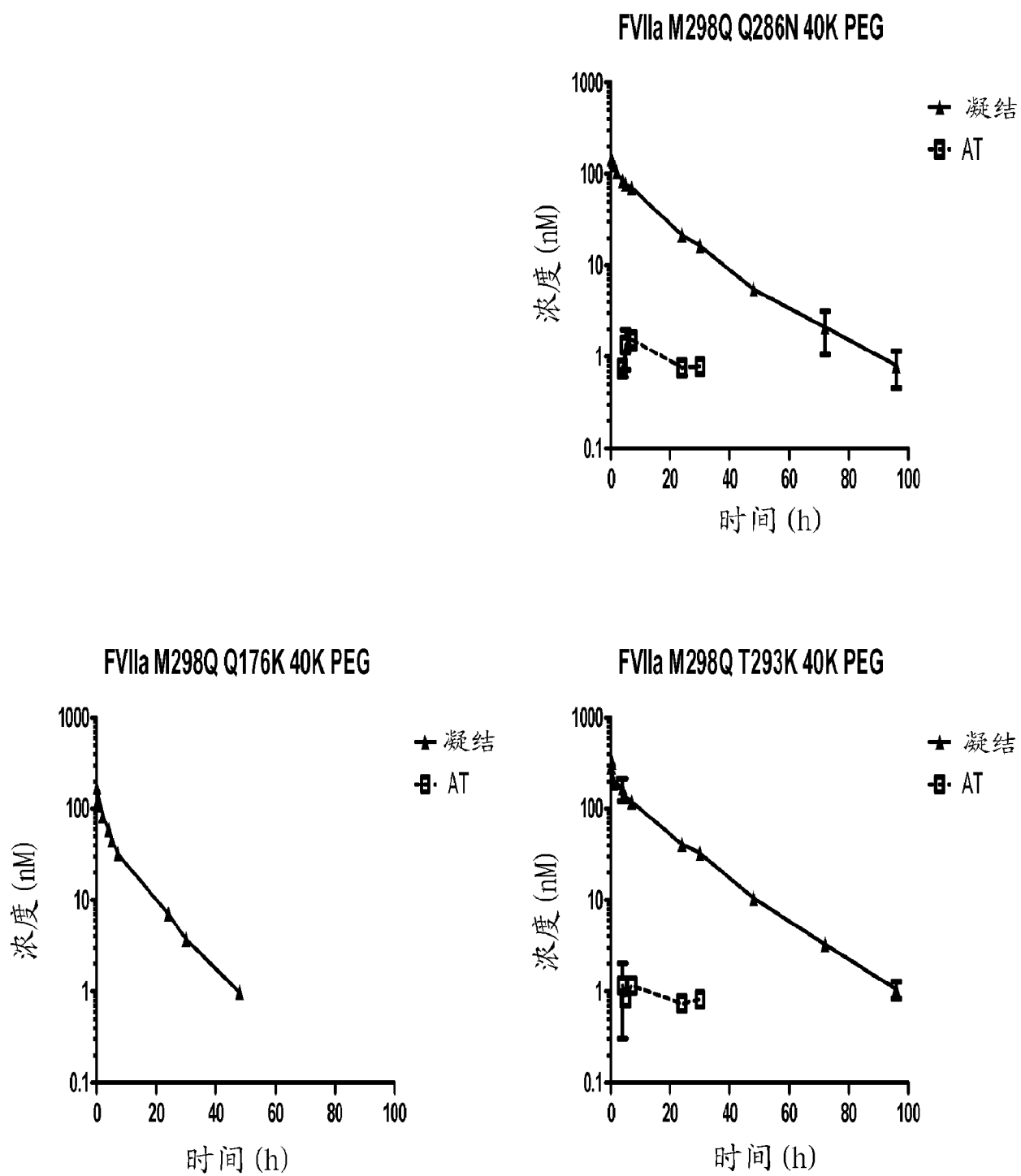


图 3o-3q

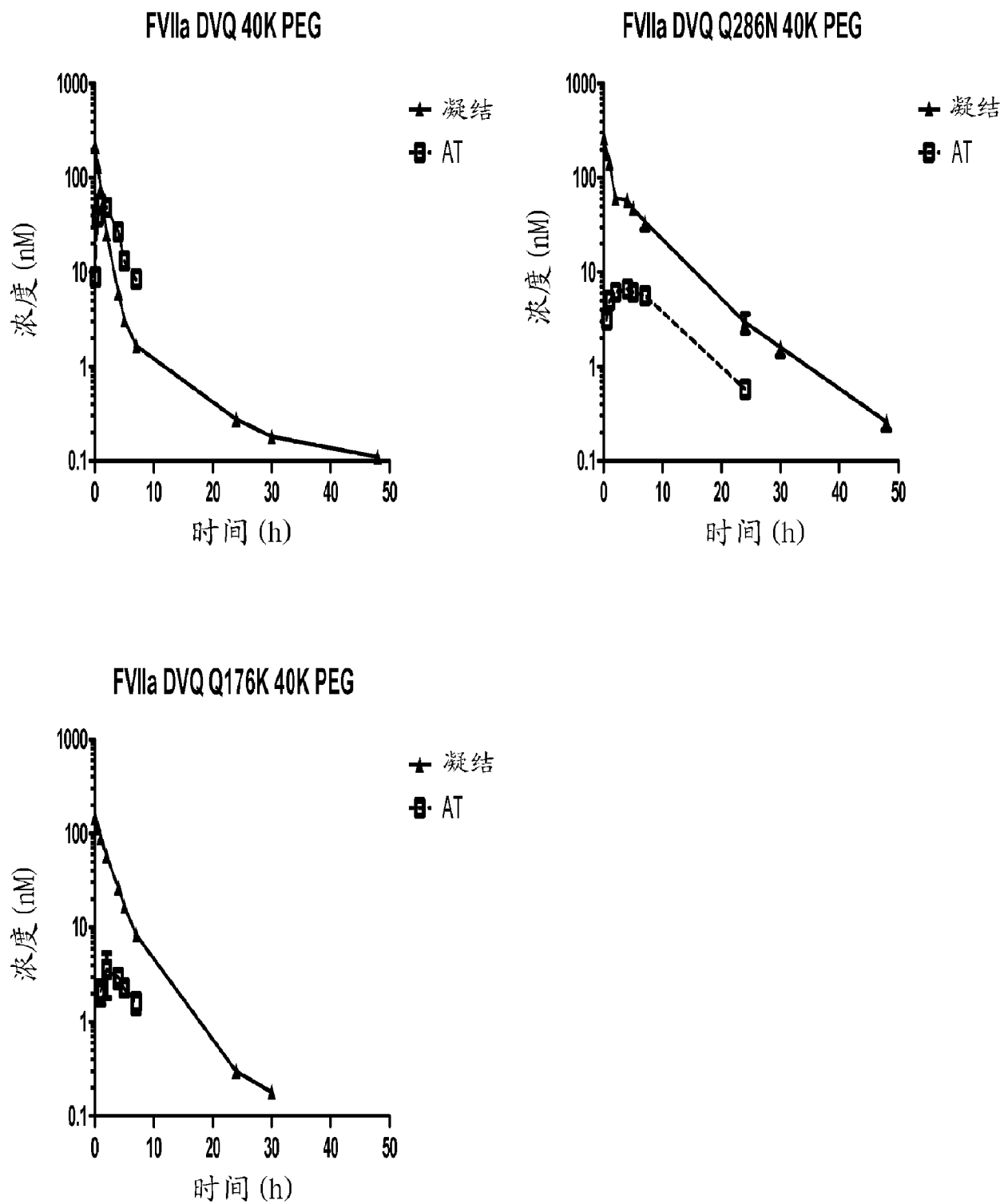


图 3r-3t

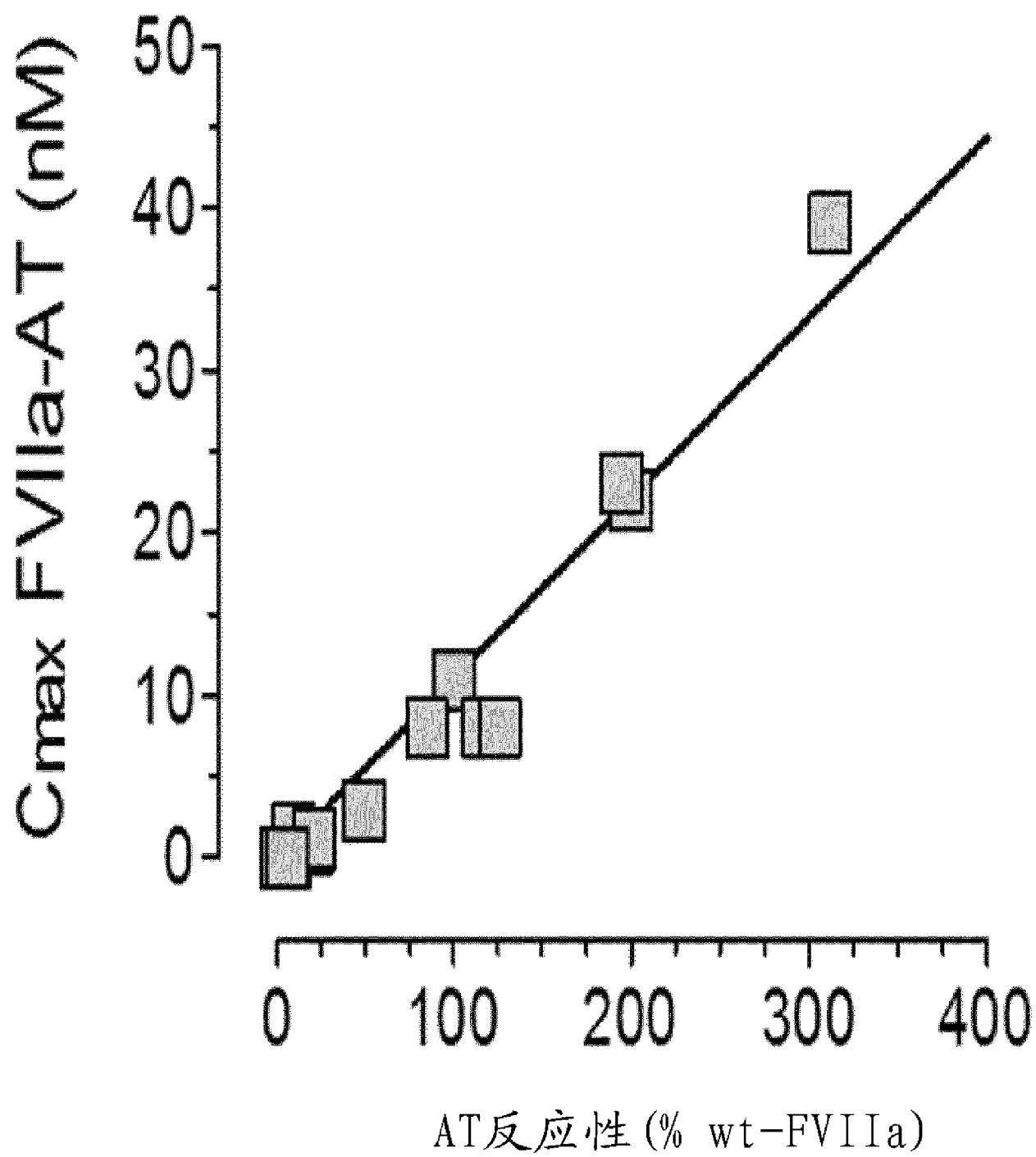


图 4

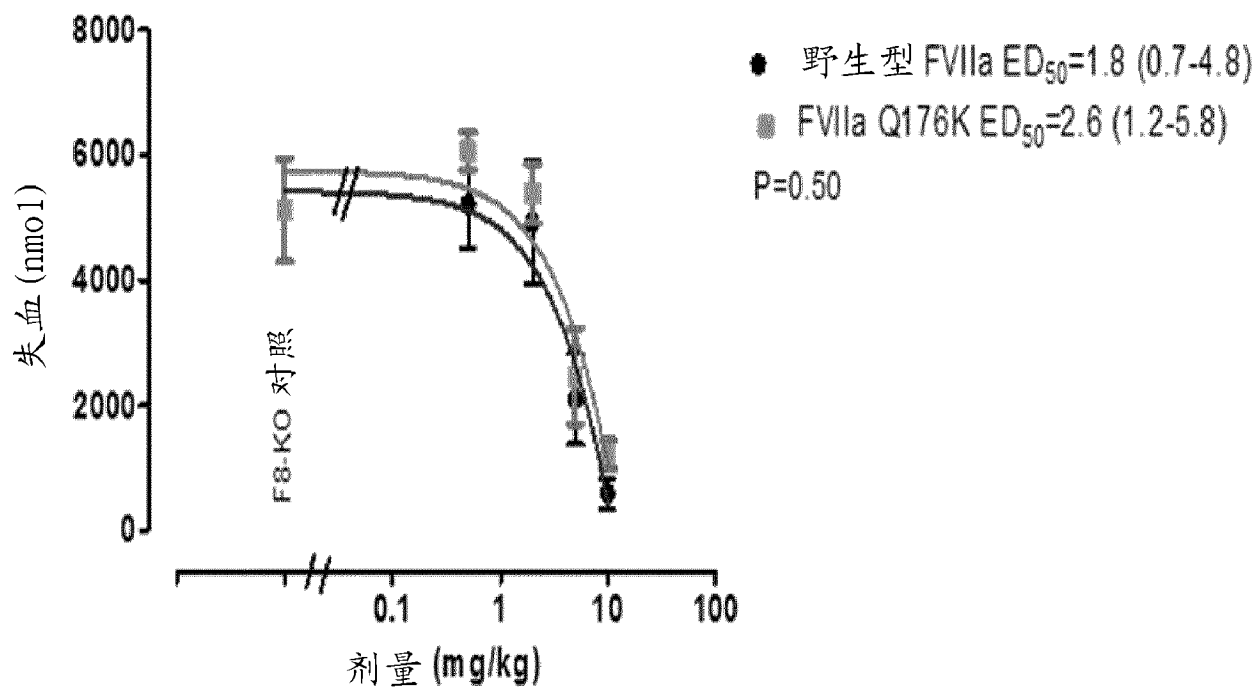


图 5

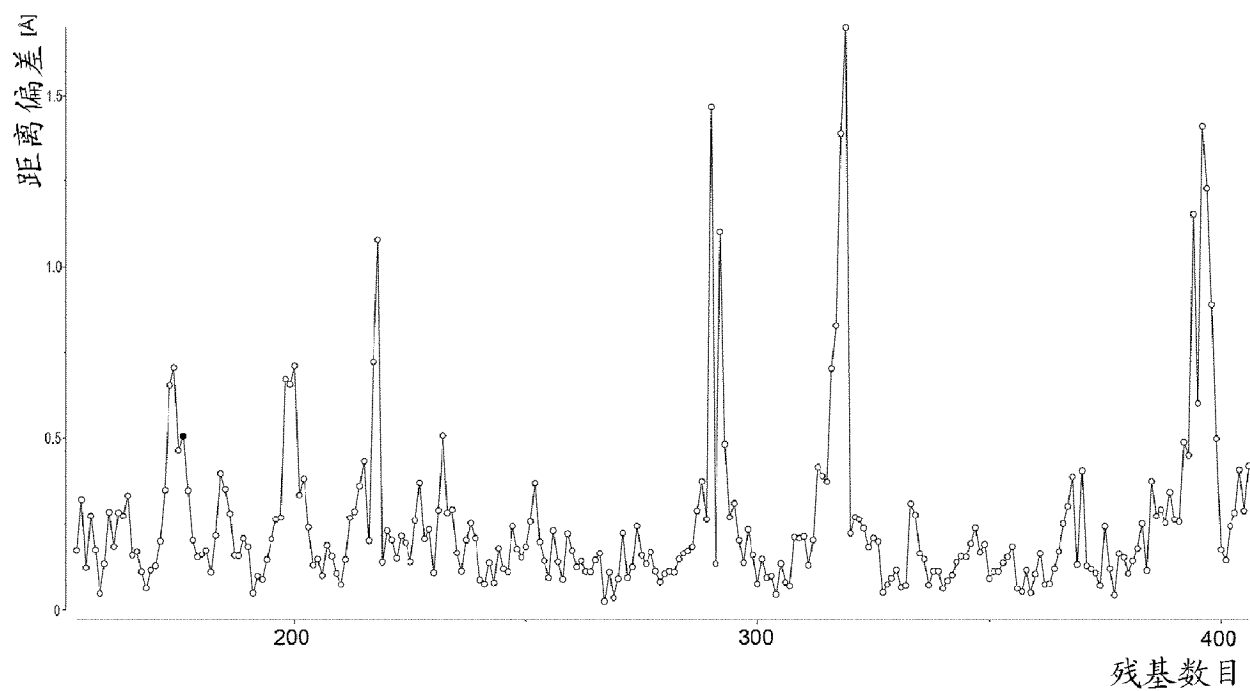


图 6

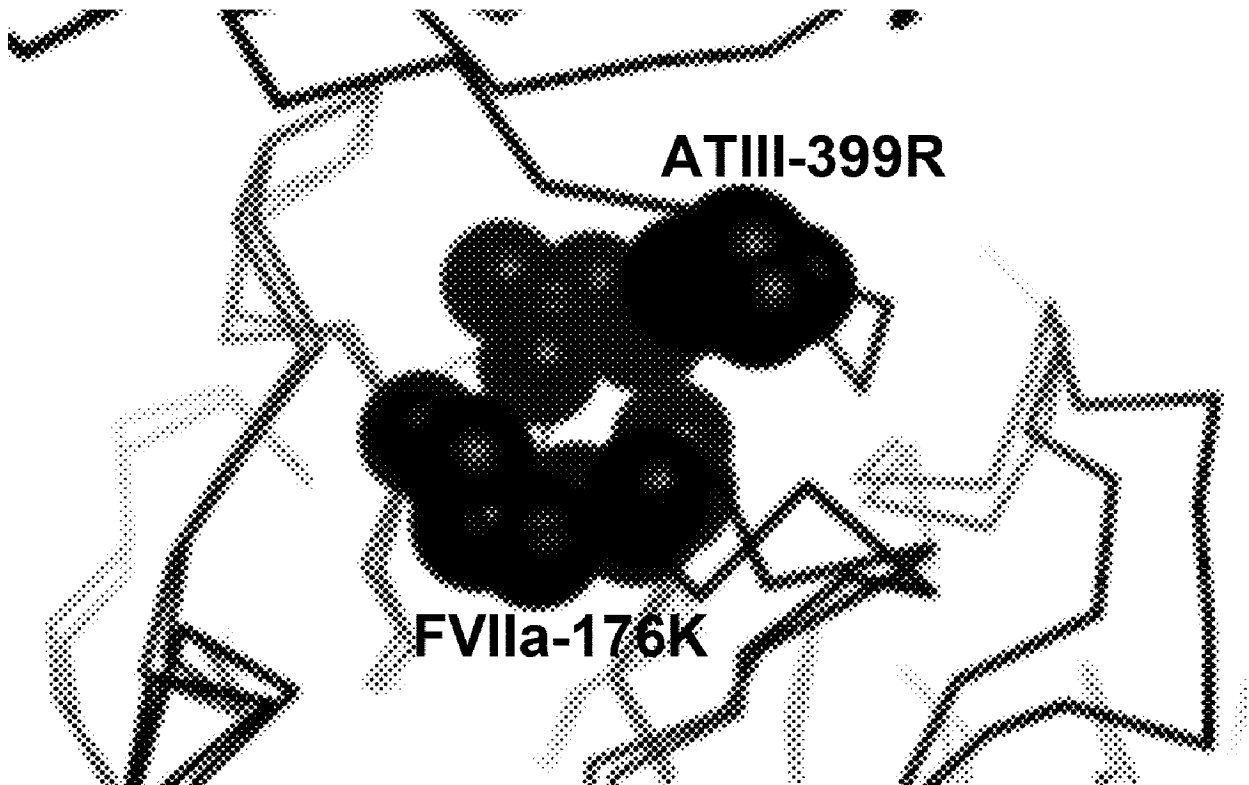


图 7