



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102939108 A

(43) 申请公布日 2013. 02. 20

(21) 申请号 201180021888. 1

A61P 7/04 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 04. 28

A61K 38/37 (2006. 01)

(30) 优先权数据

1007357. 5 2010. 04. 30 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 10. 30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2011/000662 2011. 04. 28

(87) PCT申请的公布数据

W02011/135307 EN 2011. 11. 03

(71) 申请人 剑桥生物制药专利有限公司

地址 马耳他瓦莱塔

(72) 发明人 W · 亨利

(74) 专利代理机构 北京润平知识产权代理有限

公司 11283

代理人 王凤桐 周建秋

(51) Int. Cl.

A61K 47/48 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 14 页 附图 5 页

(54) 发明名称

缀合的凝血因子 VIII

(57) 摘要

本发明提供了一种生物相容性聚合物, 该生物相容性聚合物通过一个或多个半胱氨酸残基与 FVIII 缀合, 适当地通过 FVIII 中还原的二硫键间的连接基与 FVIII 缀合, 本发明还提供了一种药物组合物, 该药物组合物含有这种缀合形式的 FVIII。

1. 一种生物相容性聚合物, 该生物相容性聚合物通过一个或多个半胱氨酸残基与 FVIII 缀合。

2. 根据权利要求 1 所述的生物相容性聚合物, 其中, 所述生物相容性聚合物通过一个或多个还原的半胱氨酸二硫键与 FVIII 缀合。

3. 根据权利要求 2 所述的生物相容性聚合物, 其中, 所述生物相容性聚合物通过连接基团与 FVIII 缀合, 所述连接基团桥接在 FVIII 中形成二硫键的两个半胱氨酸残基的硫残基。

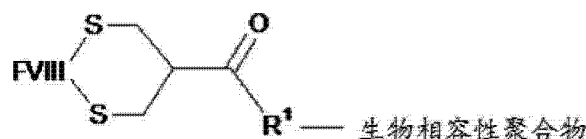
4. 根据权利要求 3 所述的生物相容性聚合物, 其中, 所述连接基团通过基团 R^1 和所述生物相容性聚合物缀合, R^1 是直接的键、 C_{1-10} 亚烷基、或者可任选取代的芳基或杂芳基。

5. 根据权利要求 4 所述的生物相容性聚合物, 其中, R^1 选自苯基、苯甲酰基、萘基、吡啶、吡咯、呋喃、吡喃、咪唑、吡唑、噁唑、哒嗪、嘧啶或嘌呤。

6. 根据权利要求 3-5 中任意一项所述的生物相容性聚合物, 其中, 在 FVIII 的半胱氨酸残基之间的原始二硫键的两个硫原子之间的连接基团含有 3- 碳桥。

7. 根据权利要求 3-6 中任意一项所述的生物相容性聚合物, 其中, 在 FVIII 的半胱氨酸残基之间的原始二硫键的两个硫原子之间的连接基团是 $(CH_2)_2CHC(O)-$ 。

8. 根据权利要求 1-7 中任意一项所述的生物相容性聚合物, 所述生物相容性聚合物与 FVIII 缀合, 其中, 缀合物具有如下结构:



其中 R^1 为取代基, 该取代基为直接的键、亚烷基 (优选 C_{1-10} 亚烷基)、或可任选取代的芳基或杂芳基; 其中所述芳基包括苯基、苯甲酰基和萘基; 其中适当的杂芳基包括吡啶、吡咯、呋喃、吡喃、咪唑、吡唑、噁唑、哒嗪、嘧啶和嘌呤; 其中与聚合物的连接为通过水解不稳定的键的连接或通过稳定的键的连接。

9. 根据权利要求 1-8 中任意一项所述的生物相容性聚合物, 其中, 所述生物相容性聚合物具有大约 5-100kDa 的分子量。

10. 一种药物组合物, 该药物组合物含有前述权利要求任意一项所述的生物相容性聚合物, 所述生物相容性聚合物通过一个或多个半胱氨酸残基与 FVIII 缀合。

11. 根据权利要求 10 所述的药物组合物, 其中, 所述药物组合物含有药学上可接受的稀释剂、佐剂或载体。

12. 根据权利要求 10 或 11 所述的药物组合物, 所述药物组合物还含有其他药物活性剂。

13. 根据权利要求 10-12 中任意一项所述的药物组合物, 所述药物组合物适于肠外给药。

14. 根据权利要求 10-13 中任意一项所述的药物组合物, 所述药物组合物适于皮内注射、皮下注射、肌肉注射以及静脉输注或骨内输注。

15. 根据权利要求 10-14 中任意一项所述的药物组合物, 所述药物组合物以药水、悬浮液或乳液的形式存在。

16. 根据权利要求 10-15 中任意一项所述的药物组合物, 其中, 与未经修饰的 FVIII 相

比, FVIII 缀合物具有更长的半衰期。

17. 根据权利要求 10-16 中任意一项所述的药物组合物, 其中, 与未经修饰的 FVIII 相比, FVIII 缀合物具有更高的 AUC。

18. 根据权利要求 10-17 中任意一项所述的药物组合物, 其中, 与未经修饰的 FVIII 相比, FVIII 缀合物具有更高的生物利用率。

19. 根据权利要求 10-17 中任意一项所述的药物组合物, 其中, 与未经修饰的 FVIII 相比, FVIII 缀合物具有更低的免疫原性。

20. 一种治疗凝血病或创伤的方法, 该方法包括用权利要求 10-19 中任意一项所述的药物组合物对有需要的患者进行给药。

21. 根据权利要求 20 所述的治疗方法, 其中, 所述凝血病是血友病 A。

22. 降低患有血友病 A 或创伤的哺乳动物的关节积血、出血、胃肠道出血和经血过多的风险的方法, 该方法包括用权利要求 12-21 中任意一项所述的含有 FVIII 缀合物的药物组合物对有需要的患者进行给药。

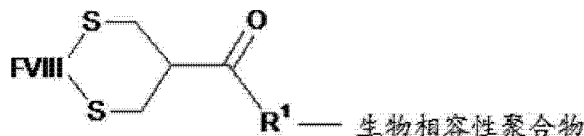
23. 根据权利要求 22 所述的方法, 其中, 所述组合物通过皮下途径给药。

24. 根据权利要求 22 所述的方法, 其中, 所述组合物通过静脉途径给药。

25. 根据权利要求 22 所述的方法, 其中, 每一至十四天用所述组合物进行给药一次。

26. 生物相容性聚合物在治疗以 FVIII 功能丧失为特征的凝血病或治疗创伤中的用途, 所述生物相容性聚合物通过一个或多个半胱氨酸残基与 FVIII 缀合。

27. 一种制备以下生物相容性聚合物和 FVIII 的缀合物的方法,

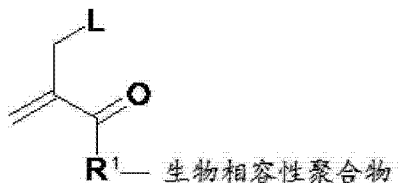


其中 R¹ 为取代基, 该取代基为直接的键、亚烷基 (优选 C₁₋₁₀ 亚烷基) 或可任选取代的芳基或杂芳基; 其中所述芳基包括苯基、苯甲酰基和萘基; 其中适当的杂芳基包括吡啶、吡咯、呋喃、吡喃、咪唑、吡唑、噁唑、哒嗪、嘧啶和嘌呤; 其中与聚合物的连接为通过水解不稳定的键的连接或通过稳定的键的连接, 并且

其中, 所述方法包括:

- (a) 还原 FVIII 的两个半胱氨酸残基之间的天然二硫键, 以产生两个游离的硫醇基;
- (b) 含有缀合双键和离去基团的缀合反应物间发生第一次硫醇盐加成反应;
- (c) 消去离去基团, 产生缀合双键; 以及
- (d) 第二次硫醇盐加成反应, 在两个硫原子之间形成 3-碳桥。

28. 根据权利要求 27 所述的方法, 其中, 所述缀合反应物具有以下分子式,



其中 R¹ 是取代基, 该取代基为直接的键、亚烷基 (优选 C₁₋₁₀ 亚烷基) 或可任选取代的芳基或杂芳基; 其中所述芳基包括苯基、苯甲酰基和萘基; 其中适当的杂芳基包括吡啶、吡咯、呋喃、吡喃、咪唑、吡唑、噁唑、哒嗪、嘧啶和嘌呤; 其中与聚合物的连接为通过水解不稳定的键的连接或通过稳定的键的连接, 并且

定的键的连接或通过稳定的键的连接,且 L 是离去基团。

缀合的凝血因子 VIII

技术领域

[0001] 本发明涉及缀合形式的凝血因子 VIII。

背景技术

[0002] 因子 VIII (FVIII) 是必不可少的凝血因子,也被称为抗血友病因子 (AHF)。对人类而言,因子 VIII 由 F8 基因编码。在该基因上的缺陷会导致血友病 A,这是一种众所周知的隐性 X 染色体连锁的凝血异常,影响着大约 1/5000 的男性。

[0003] X 染色体连锁的 F8 基因编码来自 26 个外显子的具有 2351 个氨基酸的多肽,该多肽在被切割了信号肽之后形成具有 2332 个氨基酸的成熟 FVIII 分子 (Wang et al. Int. J. Pharmaceutics, 259:1-15 (2003))。已经发现 FVIII 被合成并通过肝脏的血管细胞、血管小球细胞 (glomerular cells)、管状内皮细胞 (tubular endothelium cells) 和窦内皮细胞 (sinusoidal cells) 释放到血液中,但是人体内 FVIII 的初始释放位点在哪里仍然存在很大争议。FVIII 分子由六个蛋白结构域组成;NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH。成熟的分子含有许多翻译后修饰,包括 N-连接和 O-连接的糖基化,磺基化以及二硫键的形成。FVIII 总共含有 23 个半胱氨酸残基,其中 16 个半胱氨酸残基在蛋白质的 A 和 C 结构域中形成了 8 个二硫键 (McMullen et al. Protein Science, 4:740-746 (1995))。由于蛋白质的翻译后修饰,基于糖基化的水平和类型,它的循环分子量 (circulation molecular weight) 能够多达 330kDa。FVIII 也会经历蛋白水解过程,从而使得血液循环中的种类是由重链 (A1-A2-B) 和轻链 (A3-C1-C2) 组成的异二聚体。当 FVIII 被分泌进入血液循环时,它以非共价的形式与血管性血友病因子 (von Willebrand Factor, vWF) 结合。两个分子的结合涉及 FVIII 的轻链的 A3 和 C2 结构域 (Lacroix-Desmazes et al. Blood, 112:240-249 (2008))。与 vWF 的结合增加了 FVIII 的稳定性和循环半衰期 (circulating half-life)。虽然与 vWF 的结合能够增加 FVIII 的循环半衰期,它的天然半衰期仅为 15-19 小时。

[0004] 因子 VIII 是参与内源性凝血途径必不可少的辅因子。在凝血级联反应中它的作用是作为“成核模板”,以使得 FX 酶复合物的组分在活化的血小板的表面以正确的空间方向有机排布 (Shen et al. Blood, 111:1240-1247 (2008))。FVIII 首先由凝血酶 (因子 II a) 或者 FXa 活化,然后它以 FVIIIa 的形式从 vWF 解离。然后, FVIIIa 在血管损伤的位置与活化的血小板结合,并通过 A2 和 A3 介导的相互作用与 FIXa 结合。当血小板表面存在 Ca²⁺ 离子时, FIXa 与 FVIII 的结合使得 FIXa 的蛋白水解活性增加了大约 200000 倍。然后,该复合物将 FX 活化为 FXa。然后因子 Xa 和它的辅因子因子 Va 活化更多的凝血酶。凝血酶转而对纤维蛋白原切割为纤维蛋白,然后纤维蛋白聚合并交联 (利用因子 XIII) 成为纤维蛋白血块。

[0005] 由于不再受 vWF 的保护,在过程中活化的 FVIII 被蛋白水解而失活 (最主要是通过活化的蛋白质 C 和因子 IXa) 并迅速从血流中被清除。

[0006] 蛋白质聚乙二醇化方法已由 PolyTherics 有限公司开发,并被称为 TheraPEG™,在该产品中,通过蛋白质中的一对半胱氨酸残基的还原型二硫键,PEG 聚合物与目的蛋白相连

接(WO 2005/007197)。这一技术已被用于制备无因子FIXa污染的因子IX的聚乙二醇化变体(WO 2009/130602)。

[0007] 然而,对于使用同样的技术制备聚乙二醇化的FVIII而言,则被认为是重要的或者非常规的。

[0008] 从活性角度来看,FVIII与FIX存在某些关键的区别,这就意味着这种蛋白质和生物相容性聚合物的缀合并不是一个简单的步骤。

[0009] 例如,FIXa是一种丝氨酸蛋白酶,而FVIII则没有酶活性。一旦活化,FIX仅需要与它的辅因子形成结合,而FVIII则需要参与凝血级联反应。

[0010] 而且,FVIII是辅因子,且能够形成“模板”,其它凝血因子(包括FIXa)组装在该“模板”上从而增强它们的催化活性。

[0011] 为了发挥FVIII的功能,它必须能够与FX、FXa、FIXa和磷脂相结合。而且,为了使FVIII在血液循环中稳定,它必须能够与血管性血友病因子结合。因此,由于实现分子间相互作用的FVIII所有的结构域中都有二硫化物存在,该蛋白的半胱氨酸残基上的二硫化物进行聚乙二醇化就会在空间上阻碍这些相互作用。

[0012] 因而,因子FVIII的聚乙二醇化存在一些不同于FIX的独特的和不同的挑战。

[0013] 使用TheraPEG™技术对FIX进行聚乙二醇化获得成功的事实,对于使用同样的方法能否成功制备聚乙二醇化的FVIII而言并没有指导意义,因为FVIII是结构和功能上都不相同的蛋白质。

[0014] 已经发现,通过将FVIII和一种或多种生物相容性聚合物缀合可以增强因子VIII(本文中称为FVIII)的操作性。增强的操作性能也包括制备高纯度FVIII缀合物的能力。

发明内容

[0015] 根据本发明的第一方面,提供了通过一个或多个半胱氨酸残基与FVIII缀合的生物相容性聚合物。

[0016] 生物相容性聚合物可选自由:聚乙二醇(PEG)、聚磷脂酰胆碱(PC)、聚丙二醇(PPG)、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚环氧乙烷(PEO)、聚氧乙烯醇(polyoxyethylated polyol)、聚烯醇(polyolefinic alcohol)、聚羟烷基丙烯酸甲酯(polyhydroxyalkylmethacrylate)、多糖、聚 α -羟基酸、聚乙烯醇、聚磷脂(polyphosphosphazene)、聚N-丙烯酰吗啉、聚烯氧化物聚合物(polyalkylene oxide polymers)、聚马来酸、聚DL-丙氨酸、羧甲基纤维素、右旋糖酐、淀粉或淀粉衍生物、透明质酸甲壳素(hyaluronic acid chitin)、聚甲基丙烯酸酯、聚唾液酸(PSA)、聚羟基羧酸钠(polyhydroxy alkanoates)、聚氨基酸以及它们的组合组成的组中。所述生物相容性聚合物可以具有线性或分支状结构。

[0017] 在另一种实施方式中,所述生物相容性聚合物为蛋白质,选自但不限于由:FVII、白蛋白、转铁蛋白、免疫球蛋白(包括单克隆抗体)、抗体片段如单结构域抗体、 V_L 、 V_H 、Fab、 $F(ab')_2$ 、Fab'、Fab3、scFv、di-scFv、sdAb、Fc以及它们的组合组成的组中。

[0018] 如果需要,每个FVIII分子可以通过一个或多个半胱氨酸残基与一种或多种生物相容性聚合物缀合。游离的半胱氨酸残基是还原胱氨酸二硫键的产物。本发明的生物相容

性聚合物可以通过一个或多个还原的半胱氨酸二硫键与 FVIII 缀合。所述缀合可以是通过将 FVIII 中形成二硫键的两个半胱氨酸残基的硫残基桥接的连接基团的方式。因而,二硫键可以是天然二硫键或者是重组引入的二硫键。

[0019] PEG 分子可以具有任何适当的分子量,例如 5-100kDa,10-500kDa。适当地为 5-30kDa 或者 10-30kDa。某些适当的分子量包括 10、20 或者 30kDa。

[0020] 适当地,FVIII 缀合物的生物相容性聚合物部分可以与两个半胱氨酸残基结合,从而在 FVIII 中形成二硫键。这样,含有 PEG 的连接物桥接了所述二硫键。WO 2005/007197、WO 2009/047500 和 WO 2010/010324 描述了这种缀合过程。

[0021] 在本发明的一种实施方式中,可以根据图 2 中所示的方案将生物相容性聚合物与 FVIII 缀合。在图 2 中,显示了生物相容性聚合物和连接基团之间的基团 R1,所述连接基团跨越(spanning)了 FVIII 分子上二硫键的硫原子。

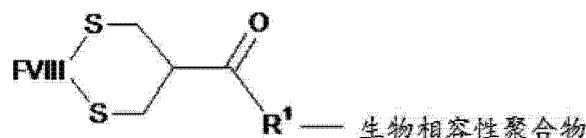
[0022] R1 代表取代基团,所述取代基团可以是直接的键(direct bond)、亚烷基(优选 C_{1-10} 亚烷基)或可任选取代的芳基或杂芳基(heteroaryl groups);其中所述芳基包括苯基、苯甲酰基和萘基;其中适当的杂芳基包括吡啶、吡咯、呋喃、吡喃、咪唑、吡唑、噁唑(oxazole)、哒嗪、嘧啶和嘌呤;其中与聚合物的连接可为通过水解不稳定的键的方式的连接或通过稳定的键的连接。

[0023] 在可任选取代的芳基或者杂芳基上存在的具体取代基包括例如选自 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-CO_2R$ 、 $-COH$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-COR$ 、 $-OR$ 、 $-OCOR$ 、 $-OCO_2R$ 、 $-SR$ 、 $-SOR$ 、 $-SO_2R$ 、 $-NHCOR$ 、 $-NRCOR$ 、 $-NHCO_2R$ 、 $-NR'CO_2R$ 、 $-NO$ 、 $-NHOH$ 、 $-NR'OH$ 、 $-C=N-NHCOR$ 、 $-C=N-NR'COR$ 、 $-N^+R_3$ 、 $-N^+H_3$ 、 $-N^+HR_2$ 、 $-N^+H_2R$ 、卤素例如氟或氯、 $-C \equiv CR$ 、 $-C=CR_2$ 和 $^{13}C=CHR$ 中的一种或多种相同或不同的取代基,其中每个 R 或 R' 独立地代表氢原子或者烷基(优选 C_{1-6})或者芳基(优选苯基)。特别优选地存在吸电子取代基。在一种实施方式中,R1 中可任选取代的芳基或杂芳基包括被酰胺基(NHCO)取代的芳基或杂芳基,所述酰胺基将 R1 单元与生物相容性聚合物连接。

[0024] 因此,在 FVIII 半胱氨酸残基之间的原始二硫键的两个硫原子之间的连接基团可以含有 3-碳桥。在一种实施方式中,在 FVIII 半胱氨酸残基之间的原始二硫键的两个硫原子之间的连接基团是 $(CH_2)_2CHC(O)-$ 。

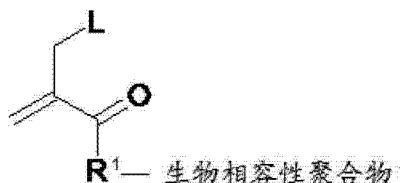
[0025] 在本发明的一种实施方式中,生物相容性聚合物如上所述的进行缀合,其中包括与生物相容性聚合物相缀合的 FVIII 的组合物具有以下结构:

[0026]



[0027] 从本发明最广泛的意义上讲,反应物可表示为:

[0028]

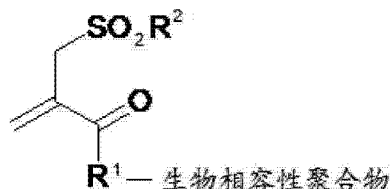


[0029] 其中 R1 如上述定义所述,且 L 是离去基团。

[0030] L 可以是 $-\text{SR}$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}$ 、 $-\text{OSO}_2\text{R}$ 、 $-\text{N}^+\text{R}_3$ 、 $-\text{N}^+\text{HR}_2$ 、 $-\text{N}^+\text{H}_2\text{R}$ 、卤素（例如氟或氯）或者 $-\text{OW}$ ，其中每个 R 独立地代表氢原子或者烷基（例如 C_{1-6} 的烷基）或者芳基（例如苯基），且 W 代表包括至少一个吸电子取代基的被取代的芳基（例如苯基）。

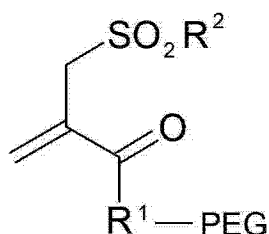
[0031] 在一种实施方式中，离去基团 L 是 SO_2R^2 ，其中每个 R^2 独立地代表氢原子或者烷基（例如 C_{1-6} 的烷基）或者芳基（例如苯基），且 R^1 如上述定义所述，缀合反应物可以具有以下分子式：

[0032]



[0033] 在一种实施方式中，生物相容性聚合物可以是 PEG，且离去基团可以是 $-\text{SO}_2\text{R}^2$ ， R^2 如上述定义所述，所述反应物如下所示：

[0034]



[0035] 在本发明的一种实施方式中，所述缀合反应物可以由通过酰胺部分 (CONH) 与生物相容性聚合物连接的专门的结构形成，其中 L 是如上所定义的离去基团。也就是说， R^1 是 R_3-CONH 且反应物具有以下分子式：

[0036]



[0037] R_3 代表取代基，所述取代基可以为：直接的键、亚烷基（优选 C_{1-10} 亚烷基）或者可任选取代的芳基或杂芳基；其中所述芳基包括苯基、苯甲酰基和萘基；其中适当的杂芳基包括吡啶、吡咯、呋喃、吡喃、咪唑、吡唑、噁唑、哒嗪、嘧啶和嘌呤；其中与所述聚合物的连接可为通过水解不稳定的键的方式的连接或通过稳定的键的连接。

[0038] 在可任选取代的芳基或者杂芳基上存在的具体取代基包括例如选自 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}$ 、 $-\text{COH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{COR}$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{OCOR}$ 、 $-\text{OCO}_2\text{R}$ 、 $-\text{SR}$ 、 $-\text{SOR}$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}$ 、 $-\text{NHCOR}$ 、 $-\text{NRCOR}$ 、 $-\text{NHCO}_2\text{R}$ 、 $-\text{NR}'\text{CO}_2\text{R}$ 、 $-\text{NO}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{NR}'\text{OH}$ 、 $-\text{C}=\text{N}-\text{NHCOR}$ 、 $-\text{C}=\text{N}-\text{NR}'\text{COR}$ 、 $-\text{N}^+\text{R}_3$ 、 $-\text{N}^+\text{H}_3$ 、 $-\text{N}^+\text{HR}_2$ 、 $-\text{N}^+\text{H}_2\text{R}$ 、卤素例如氟或氯、 $-\text{C}\equiv\text{CR}$ 、 $-\text{C}=\text{CR}_2$ 和 $^{13}\text{C}=\text{CHR}$ 中的一种或多种相同或不同的取代基，其中每个 R 或 R' 独立地代表氢原子或者烷基（优选 C_{1-6} ）或者芳基（优选苯基）。特别优选地存在吸电子取代基。

[0039] 在存在 CONH 部分，且离去基团 L 是 $-\text{SO}_2\text{R}^2$ ， R^2 和 R_3 如上述定义所述的实施方式中，所述反应物如下所示：

[0040]



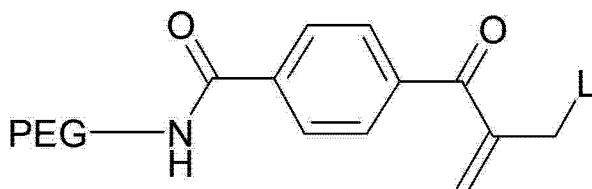
[0041] 在这样的实施方式中,当缀合反应物的如上定义所述的R1中可任选取代的芳基或杂芳基包括由酰胺(NHCO)基团取代的芳基或杂芳基,R3如上述定义所述时,缀合蛋白的结构如下所示:

[0042]



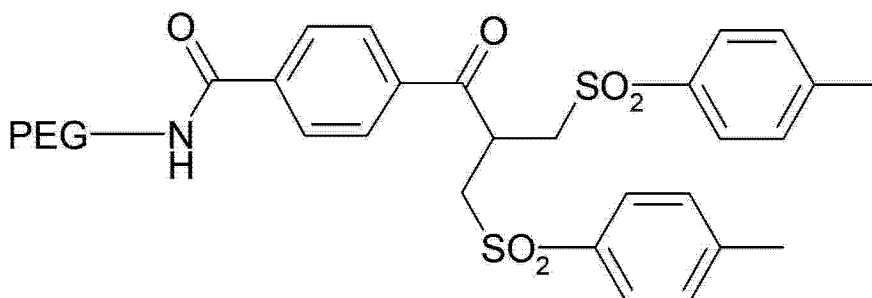
[0043] 当生物相容性聚合物是PEG,而PEG是聚乙烯部分,且L是如上定义的离去基团时,本发明这一实施方式的缀合反应物如下所示:

[0044]



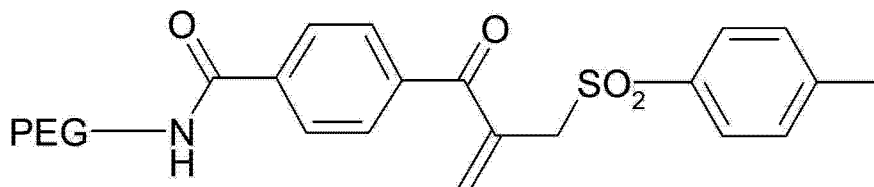
[0045] 当反应条件是中性或弱碱性时,可以使用下述反应物:

[0046]



[0047] 在较酸性的条件下,上述反应物可以形成如下所示的分子,PEG单磺(mono-sulfone),它也适合在本文所述的缀合反应中使用。

[0048]



[0049] 因子VIII可以来自任何适当的来源。可以使用DNA重组技术制备因子VIII,或从血浆中纯化获得。它包括任何活性片段或它的突变蛋白质。

[0050] 本文中使用的术语“突变蛋白质”指的是FVIII蛋白质的类似物,其中FVIII的天然存在的组件中的一个或多个氨基酸残基被不同的氨基酸残基取代,或缺失,或者一个或多个氨基酸残基被插入到FVIII的原始序列上,而所得的产物与原始FVIII相比活性并未

发生显著变化。因此这些突变蛋白质由已知的合成技术和 / 或定点诱变技术或任何其它已知的适当的技术制备。

[0051] 根据本发明的突变蛋白质包括由核酸(例如根据本发明,在严格条件下与编码 FVIII 的 DNA 或 RNA 杂交的 DNA 或 RNA) 编码的蛋白质。术语“严格条件”是指杂交条件和随后的洗涤条件,也就是本领域普通技术人员所指的“严格”(Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Interscience, N. Y., sections 63 and 6.4 (1987, 1992); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989))。

[0052] 严格条件的例子包括但不限于洗涤条件为比计算出的所研究的杂合体的 T_m 低 12–20°C, 在例如 2×SSC 和 0.5%SDS 中洗涤 5 分钟, 在 2×SSC 和 0.1%SDS 中洗涤 15 分钟; 在 0.1 倍的 SSC 和 0.5%SDS 中在 37°C 下洗涤 30–60 分钟, 然后 0.1×SSC 和 0.5%SDS 中在 68°C 下洗涤 30–60 分钟。本领域普通技术人员能够理解的是: 严格条件也取决于 DNA 序列、寡核苷酸探针(如 10–40 个碱基)或者混合的寡核苷酸探针的长度。如果使用混合探针, 优选使用四甲基氯化铵 (TMAC) 代替 SSC。

[0053] 优选地, 任何这种突变蛋白质都具有充分复制的 FVIII 的氨基酸序列, 因而与 FVIII 具有大体相似的活性或者更好的活性。

[0054] FVIII 的一个特征活性是参与凝血级联反应的能力, 且本文中描述了检测 FVIII 活性的分析方法。只要突变蛋白质具有基本的 FVIII 活性, 就可以认为它具有与 FVIII 大体上相似的活性。因此, 可以通过常规的实验手段(包括用本文所述的分析方法分析这样的突变蛋白质)来测定任何给定的突变蛋白质是否与 FVIII 具有至少大体相同的活性。

[0055] 在优选的实施方式中, 任何这种突变蛋白质与 FVIII 的氨基酸序列相比具有至少 40% 的同一性或同源性。更优选地具有至少 50%, 至少 60%, 至少 70%, 至少 80%, 或者最优选地具有至少 90%、95% 或者 99% 的同一性或同源性。

[0056] 同一性反映了两种或多种多肽序列之间或者两种或多种多核苷酸序列之间的关系, 通过比较序列来测定。通常, 同一性涉及在被比较的序列的长度上, 分别准确地比较两种多核苷酸序列的核苷酸与核苷酸之间的对应或者多肽序列的氨基酸与氨基酸之间的对应。

[0057] 对于没有准确对应的序列, 则可以用“百分比同一性”测定。通常, 将待比较的两个序列进行比对以给出序列间的相关性最大值。这可以包括在一个序列或者两个序列间插入“空位 (gap)”来提高对齐的程度。百分比同一性可以在所比较的每个序列的全长上进行测定(所谓的总体比对), 这种比对尤其适合具有相同或非常相似长度的序列; 百分比同一性也可以在限定的较短长度上进行测定(所谓的局部比对), 这种比对更适合于不等长的序列。

[0058] 比较两个或多个序列的同一性和同源性的方法在本领域是公知的。例如, 可以使用 Wisconsin 序列分析包 9.1 版的软件 (Devereux, et al., *Nucleic Acids Research*, 12:387 (1984)), 例如可以使用 BESTFIT 和 GAP 软件来测定两个多核苷酸之间的百分比同一性, 和测定两个多肽序列之间的百分比同一性和百分比同源性。BESTFIT 使用 Smith 和 Waterman 的“局部同源性”算法 (*Advances in Applied Mathematics*, 2:482–489 (1981)), 并找出两个序列之间的最佳相似性单一区域。其

它用来测定序列之间的同一性和 / 或相似性的软件在本领域是已知的, 如 BLAST 家族的软件 (Atschul et al., J. Molec. Biol. 215:403(1990), 通过进入 NCBI 的主页 www.ncbi.nlm.nih.gov 就能使用) 和 FASTA 软件 (Pearson W R, Methods in Enzymology, 183:63-98(1990))。

[0059] 根据本发明, 可以使用的 FVIII 突变蛋白质包括置换多肽形式的有限的一组基本相对应的序列, 基于本发明的教导和指导, 本领域普通技术人员无需经过过多的试验就能够得到这些突变蛋白质。

[0060] 优选地, 根据本发明的突变蛋白质中的改变是已知的“保守”置换。FVIII 的保守氨基酸置换可以包括在具有足够相似的物理化学性能的组内的同义氨基酸, 组内成员间的置换能够保留分子的生物功能。很明显, 也可以在上述限定的序列中进行氨基酸的插入和缺失, 而不改变它们的功能, 尤其是当插入或缺失仅仅涉及少许的氨基酸, 如 30 个以内, 优选 10 个以内, 并且没有移除或取代对功能构象很重要的氨基酸, 如半胱氨酸残基时。由这种缺失和 / 或插入制得的蛋白质和突变蛋白质都属于本发明的保护范围。

[0061] 因此, 氨基酸甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸经常能够互相置换 (具有脂肪族侧链的氨基酸)。这些可能的置换中, 优选使用甘氨酸和丙氨酸互相置换 (因为它们具有相对短的侧链), 使用缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸互相置换 (因为它们具有较大的疏水脂肪族侧链)。其它通常能够互相置换的氨基酸包括: 苯基丙氨酸、酪氨酸和色氨酸 (具有芳香族侧链的氨基酸); 赖氨酸、精氨酸和组氨酸 (具有碱性侧链的氨基酸); 天冬氨酸和谷氨酸 (具有酸性侧链的氨基酸); 天冬酰胺和谷氨酰胺 (具有酰胺侧链的氨基酸); 半胱氨酸和蛋氨酸 (具有含硫侧链的氨基酸)。这种性质的置换通常被称为是“保守的”或“半保守的”氨基酸置换。

[0062] 可以利用任何适当的技术例如使用定点诱变技术来实现相对于本发明的融合蛋白序列的氨基酸改变。

[0063] 能够理解的是, 可以通过使用天然存在或非天然存在的氨基酸, 来实现本发明范围内的氨基酸置换和插入。无论使用的是天然的还是合成的氨基酸, 优选仅存在 L- 氨基酸。

[0064] 另外, 也可以使用包括 FVIII 和其他肽或蛋白片段的融合蛋白, 只要所述融合蛋白保留了 FVIII 的活性。一般而言, 本文中的术语“融合蛋白”是指通过包括氢键或盐桥的化学方法、或通过由蛋白质合成的肽键、或是通过上述两种方法连接在一起的一种或多种蛋白质。

[0065] 本文所使用的术语“功能衍生物”涵盖了 FVIII 的衍生物和它们的突变蛋白质, 可以通过本领域已知的手段, 由在残基上以侧链的形式存在的功能基团或附加于 N- 或 C- 端基团的功能基团制得, 只要它们保持药理学上可接受的性质, 也就是它们没有破坏蛋白质大体上与 FVIII 相似的活性, 也没有将毒性赋予含有它的组合物, 就都属于本发明的内容。

[0066] 例如, 这些衍生物可以包括羧基的脂肪族酯、羧基通过与氨或伯胺或仲胺反应生成的酰胺、氨基酸残基中的游离氨基与酰基部分 (例如烷酰基或羧基芳酰基 (carboxylic aroyl groups)) 形成的 N- 酰基衍生物、或由游离羟基 (例如丝氨酰残基或苏氨酰残基的游离羟基) 与酰基部分形成的 O- 酰基衍生物, 包括例如可利用羟基残基的糖基化。

[0067] 根据本发明的“FVIII 的活性片段”可以是本文定义的 FVIII 或突变蛋白质的片

段。术语片段是指分子的任何亚基(subset),也就是保持所需生物活性的较短的肽。可以很容易地通过从 FVIII 分子的任何一端消除氨基酸而得到片段并通过本文所述的方法测定所得片段的性质。用于从多肽的 N-端或 C-端消除一个氨基酸的蛋白酶是已知的,并且测定保持所需生物活性的片段仅涉及常规实验。

[0068] 在本发明中,FVIII 的活性部分、它的突变蛋白质和活性片段涵盖了任何单独的或与相关分子或残基(例如糖或磷酸盐残基)连接的蛋白质分子多肽链的片段或前体,或蛋白质分子的聚集物或它们的糖残基,只要所述部分与 FVIII 具有大体相似的活性。

[0069] 本文中的术语“盐”指的是羧基盐和 FVIII 分子或其类似物的氨基的酸加成盐(acid addition salts)。羧基盐可用本领域已知的方法制备,羧基盐包括无机盐和有机盐,无机盐例如钠盐、钙盐、铵盐、铁盐或锌盐等,有机盐可用胺类制备,如三乙醇胺、精氨酸或赖氨酸、哌啶、普鲁卡因等。酸加成盐包括例如与矿物酸(例如盐酸或硫酸)形成的盐和与有机酸(例如醋酸或草酸)形成的盐。当然,这些盐必须保留如上所述的 FVIII 的生物活性。

[0070] 本文中使用的术语“因子 VIII 缀合物”或“FVIII 缀合物”指的是经修饰后包括生物相容性聚合物部分的因子 VIII,与未经修饰的因子 VIII 相比,缀合物具有改进的药物动力学特性。从下面一种或多种参数的改进可以观察到改进的药物动力学特性:效力、稳定性、曲线下面积、循环半衰期和免疫原性或交叉反应性。

[0071] 与未经修饰的 FVIII 相比,本发明的 FVIII 缀合物可以在药物动力学特性的一种或多种参数上显示出改进,包括曲线下面积(AUC)、峰值浓度、清除率(CL)、半衰期、血浆停留时间和生物利用率。

[0072] 在用多肽药物对患者进行给药的情况下,本文中使用的术语“曲线下面积”或“AUC”的定义为:把患者体循环内的药物浓度作为从零到无限大的时间的函数,所得到的曲线下方的总面积。本文中使用的术语“清除率”或“肾清除率”的定义为每分钟排出的含有一定量药物的血浆的体积。

[0073] 在用多肽药物对患者进行给药的情况下,本文中使用的术语“半衰期”或“ $t_{1/2}$ ”的定义为:患者体内的药物血浆浓度减少至一半所需要的时间。根据多种清除机理、重新分配和其它本领域已知的机理,与肽药物相关的半衰期可以多于一种。通常, α 和 β 半衰期定义为 α 相和重新分配有关,且 β 相与清除率有关。然而,对大部分情况而言,蛋白质药物局限于血流中,就可能有至少两种清除率半衰期。如本领域所熟知的,聚乙二醇化对 α 相和 β 相半衰期的精确影响会随着分子大小和其它参数而变化。对“半衰期”的更多解释可参见《Pharmaceutical Biotechnology》(1997,DFA Crommelin and RD Sindelar,eds.,Harwood Publishers,Amsterdam,pp 101-120)。

[0074] 在用多肽药物对患者进行给药的情况下,本文使用的术语“停留时间”的定义为:从给药后算起药物在患者体内停留的平均时间。

[0075] 在用多肽药物对患者进行给药的情况下,本文使用的术语“免疫原性”的定义为:对患者给药后或重复给药后在患者体内药物引发免疫反应的倾向。

[0076] 在用多肽药物对患者进行给药的情况下,本文使用的术语“交叉反应性”的定义为:对患者给予或重复给予非缀合药物后产生的药物与抗体结合的倾向。

[0077] 例如与非缀合 FVIII 相比,FVIII 缀合物具有疗效。这种疗效包括但不限于增加

循环半衰期、降低免疫原性、降低交叉反应性、提高活性、降低剂量需求和允许通过其他途径（例如皮下）进行给药。

[0078] 根据本发明，FVIII 和生物相容性聚合物的缀合增强了 FVIII 在药物组合物中的效用。而且，生物相容性部分可以保护 FVIII 免受降解和抗体反应。FVIII 缀合物可具有延长的循环半衰期，节省了剂量和降低了给药频率。

[0079] 使用 PolyTherics 有限公司的用于二硫键和 PEG 缀合的 TheraPEG™ 技术，能够使因子 VIII 聚乙二醇化。使用例如 10、20 和 30kDa 的 PEG 反应物能够批次制备单-聚乙二醇化的因子 VIII（FVIII）。

[0080] 在体外利用凝血试验能够测定聚乙二醇化的 FVIII 的缀合活性。

[0081] 因子 FVIII 已经商用数十年，能够从供体血浆中以血液制品的形式纯化或通过 DNA 重组技术制备。

[0082] 存在几种能够和 FVIII 形成缀合物的不同类型的聚乙二醇聚合物。有包括单聚乙二醇链的线性 PEG 聚合物，也有分枝的或多臂的 PEG 聚合物。分枝聚乙二醇包括 2 个或多个通过统一的基团连接在一起的单独的线性 PEG 链。例如，两个 PEG 聚合物可以通过赖氨酸残基连接在一起。一个线性 PEG 链与 α -氨基连接，而另一个 PEG 链与 ϵ -氨基连接。剩下的赖氨酸核心的羧基可用于与蛋白质共价连接。各种分子量的线性和分枝的聚乙二醇聚合物都是市售可得的。

[0083] 在本发明的一个方面，FVIII-PEG 缀合物包括一个或多个与 FVIII 连接的线性聚乙二醇聚合物，其中每个 PEG 具有大约 2kDa 至大约 100kDa 的分子量。在本发明的另一个方面，FVIII-PEG 缀合物包括一个或多个与 FVIII 连接的线性聚乙二醇聚合物，其中每个线性 PEG 具有大约 5kDa 至大约 40kDa 的分子量。在某些实施方式中，每个线性 PEG 具有大约 10kDa 至大约 30kDa 的分子量。在某些实施方式中，每个线性 PEG 具有大约 20kDa 的分子量。在某些实施方式中，每个线性 PEG 具有大约小于 10kDa 的分子量。在特定的实施方式中，其中 FVIII-PEG 缀合物包括一个以上的与 FVIII 连接的线性 PEG 聚合物，例如两个、三个、或多达八个的与 FVIII 连接的线性 PEG 聚合物。在一些实施方式中，FVIII-PEG 缀合物包括多种线性 PEG 聚合物，其中每一线性 PEG 具有大约 10-30kDa 的分子量。

[0084] 本发明的 FVIII-PEG 缀合物可以包括一个或多个与 FVIII 连接的分枝 PEG 聚合物，其中每个分枝 PEG 具有大约 2kDa 至大约 100kDa 的分子量。在本发明的另一个方面，FVIII-PEG 缀合物包括一个或多个与 FVIII 连接的分枝聚乙二醇聚合物，其中每个分枝 PEG 具有大约 5kDa 至大约 40kDa 的分子量。在某些实施方式中，每个分枝 PEG 具有大约 5kDa 至大约 30kDa 的分子量。在某些实施方式中，每个分枝 PEG 具有大约 20kDa 的分子量。在某些实施方式中，每个分枝 PEG 具有大约小于 10kDa 的分子量。在特定的实施方式中，其中 FVIII-PEG 缀合物包括一个以上的与 FVIII 连接的分枝 PEG 聚合物，例如两个、三个、或多达八个的与 FVIII 连接的分枝 PEG 聚合物。在一些实施方式中，FVIII-PEG 缀合物包括多达八个的分枝 PEG 聚合物，其中每个分枝 PEG 具有大约 10-30kDa 的分子量。

[0085] 可以通过本领域已知的色谱方法纯化 FVIII-PEG 缀合物，所述色谱方法包括但不限于离子交换色谱法和尺寸排阻色谱法、亲和色谱法、沉淀和膜分离法（membrane-based separations）。

[0086] 如上所述，PolyTherics 已经开发了被称为 TheraPEG™ 的技术，这种技术能够利用

在蛋白质中天然存在的硫原子的选择性化学来进行位点特异性的聚乙二醇化。这种技术也能够应用于通过重组或其它方法引入了新的含硫基团的蛋白质和多肽。PolyTherics 表明了通过增加 PEG- 连接的碳桥能够制备更稳定的二硫键,并且可以对蛋白质中的二硫键进行这种修饰,同时保留三级结构和维持蛋白质的功能。这是人们首次能够利用形成二硫键的两个硫原子的缀合硫醇选择性,从而在天然蛋白质或选择性工程蛋白中位点特异性地使生物相容性聚合物与目的蛋白缀合。这种方法的一个实例是使用这种技术将 PEG 部分附加至 FVIII 蛋白质(或“聚乙二醇化的”FVIII 蛋白质)上。

[0087] 二硫化物桥接的缀合反应物是潜在的能够经历交互式 Michael 反应和逆-Michael 反应的交叉缀合系统。这使得通过还原天然二硫基生成的两个游离的硫醇能够再退火连接 3 碳桥,所述 3 碳桥将原始二硫键的两个硫基连接在一起(例如参见图 2,图 2 示出了增加 PEG 部分的缀合反应的原理图)。当包括的 PEG 作为生物相容性聚合物用作聚乙二醇化 FVIII 蛋白质时,缀合反应物可以描述为“聚乙二醇化”反应物。

[0088] 从原理上讲,需要缀合反应物中的缀合双键以启动一系列的加成反应。硫醇盐的加成一旦发生,就可能消去剩余的硫磺酸(sulphinic acid)部分。这就生成了另一个缀合双键,以用于第二硫醇阴离子的加成和两个硫原子之间的 3- 碳桥的形成。最终结果是在碳桥的两侧形成两个非常稳定的硫醚键(thiol-ether bonds)。

[0089] 根据本发明的第二方面,提供了包括与 FVIII 缀合的生物相容性聚合物的药物组合物,如本发明第一方面所述,所述生物相容性聚合物通过一个或多个半胱氨酸残基与 FVIII 缀合。

[0090] 本发明的药物组合物还可以含有药学上可接受的稀释剂、佐剂或载体。

[0091] 适于口服的药物组合物可以以独立的单元存在,如胶囊、汤剂、糖浆剂或悬浮液(在水性液体或非水性液体中;或作为可食用泡沫状物(foams)或搅拌泡沫状物(whips);或作为乳剂)。用于片剂或硬胶质胶囊(hard gelatine capsules)的适当赋形剂包括乳糖、玉米淀粉或其衍生物、硬脂酸或它的盐。与软胶质胶囊(soft gelatine capsules)一起使用的适当赋形剂包括例如植物油、蜡、油脂、半固体或液体多元醇等。为了制备汤剂和糖浆剂,可以使用的赋形剂包括例如水、多元醇和糖。为了制备悬浮液,可以使用油(例如植物油)来提供水包油或油包水悬浮液。

[0092] 适于鼻腔给药且载体是固体的药物组合物包括例如具有粒度在 20-500 微米范围内的粗粉剂(coarse powder),使用鼻吸的方式给药,也就是将容器靠近鼻子并将容器内的粉剂迅速吸入鼻腔内。通过喷鼻剂或滴鼻剂给药且载体是液体的药物组合物包括活性成分的水性或油性溶液。适于吸入给药的药物组合物包括由各种压力定量气溶胶(metered dose pressurised aerosols)、喷雾器或吹药器产生的微粒粉剂或雾剂。

[0093] 适于注射给药的药物组合物包括水性或非水性的无菌注射液,注射液可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使剂型大体上与目标受体的血液等渗的溶质;可以含有分散剂和增稠剂的水性和非水性无菌悬浮液。可以用于可注射的药水的赋形剂包括例如水、醇、多元醇、丙三醇和植物油。所述组合物可以置于单位剂量或多剂量的容器内,例如密封的安瓿和小瓶中,并可以储藏于冷冻干燥(冻干的)的条件下,仅需添加无菌液体载体,例如注射用水,就可以立即使用。可以用无菌粉剂、颗粒剂和片剂制备即时的注射药水和悬浮液。

[0094] 通常,药物组合物可以含有防腐剂、增溶剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、甜味剂、着色

剂、香味剂(odourants)、盐(本发明的物质本身就可以以可药用盐的形式提供)、缓冲剂、包被剂或抗氧化剂。所述药物组合物还可以含有除本发明物质之外的有治疗活性的试剂。本发明的药物组合物可以和药学上可接受的稀释剂、佐剂或载体一起使用。这类赋形剂可以包括但不限于生理盐水、缓冲液(例如磷酸盐缓冲液)、葡萄糖、脂质体、水、丙三醇、乙醇以及上述物质的组合。

[0095] 药物组合物可以以任何有效便捷的方式给药,以治疗患者的疾病,所述给药方式包括例如:口服给药途径、静脉给药途径、皮下给药途径、肌肉给药途径、骨内给药途径、鼻内给药途径或其它常规的给药方式。在治疗或预防应用中,活性剂可以以可注射组合物的形式对个体进行给药,例如以无菌水性分散液的形式,优选等渗分散液。

[0096] 对于哺乳动物特别是人类的给药而言,预计的活性成分的日剂量是 0.01mg/kg 体重,通常大约为 1mg/kg。在任何情况下都可由临床医生决定最适合于个体的实际剂量,这取决于包括年龄、体重、性别和个体反应在内的因素。上述剂量是平均情况的示例性剂量。当然,也可能有需要更高或更低的剂量的情况,这些情况也属于本发明的范围。

[0097] 本发明物质的剂量可在较宽范围内变化,这要取决于待治疗的疾病或病变,待治疗个体的年龄和身体状况等。临床医生最终能够决定所使用的合适剂量。

[0098] 可以按照适当的频率重复剂量。根据正常临床实践,如果产生副作用,可以减少剂量的总量和/或频率。在一种实施方式中,每一至十四天用所述药物组合物进行给药一次。

[0099] 根据本发明的第三方面,提供了第二方面和其他药物活性剂的药物组合物。所述其他药物活性剂可以促进或提高 FVIII 的活性,例如其他凝血因子。

[0100] 本发明的药物组合物可以单独使用或与其它化合物一起使用,所述其他化合物例如治疗化合物或分子,如消炎药、止痛剂或抗生素。和其它化合物一起使用时的给药可以是同时给药、分别给药或连续给药。组分可以以包括适当的说明书的药盒(kit)的形式制备。

[0101] 优选地,用本发明的药物组合物和其它的治疗化合物直接对有需要的患者进行给药。

[0102] 本发明还提供了套装药盒(kit of parts),所述套装药盒包括本发明的药物组合物和给药工具,所述给药工具包括但不限于用于口服给药的胶囊、用于肺部给药的吸入器和用于静脉给药的可注射药水。

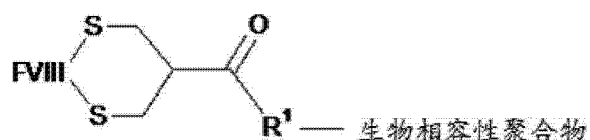
[0103] 根据本发明的第四方面,提供了治疗凝血病的方法,其中,所述方法包括用本发明的组合物对有需要的患者进行给药。因此本发明的这个方面也包括所述组合物在所述方法中的用途。

[0104] 凝血病的特征是凝血因子的功能丧失或自身抗体的产生。凝血病的实例包括血友病 A 和获得性血友病 A。

[0105] 本文中使用的术语“治疗”包括任何有益于人类或非人类动物的方式。“非人类动物”的治疗可以延伸至家养动物的治疗,所述家养动物包括马和宠物(例如猫和狗),农场/农用动物(包括绵羊、山羊、猪、牛和马科的成员)。治疗可以是针对任何已存在疾病和病变,或可以是预防(预防性治疗)。可以治疗遗传性或获得性疾病。可以治疗急性或慢性疾病。

[0106] 根据本发明的第五方面,提供了制备以下生物相容性聚合物和 FVIII 的缀合物的方法,

[0107]



[0108] 其中所述方法包括：

[0109] (a) 还原 FVIII 的两个半胱氨酸残基之间的天然二硫键，以产生两个游离的硫醇基；

[0110] (b) 含有缀合双键和离去基团的缀合反应物间发生第一次硫醇盐加成反应；

[0111] (c) 消去离去基团，产生缀合双键；以及

[0112] (d) 第二次硫醇盐加成反应，在两个硫原子之间形成 3- 碳桥。

[0113] 在所述方法中，所述缀合反应物可以具有如上所述的分子式，即：

[0114]

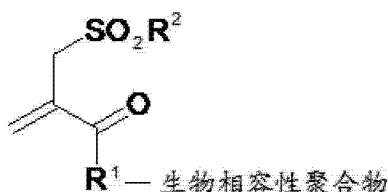


[0115] 其中 R1 如上所述，且 L 是如上所述的离去基团。

[0116] 本发明这一实施方式的另一方面如以上涉及缀合反应物的各种结构所述。

[0117] 可以使用的缀合反应物的一个实例如下所示，具有如上所述的取代基，其中 R1 和 R2 如上所述，即：

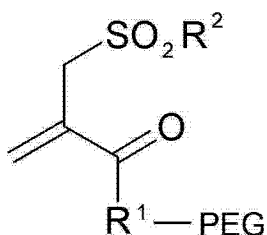
[0118]



[0119] 其中离去基团是磺酰基，由 SO_2R^2 表示。

[0120] 当所述生物相容性聚合物是 PEG、R2 和 R1 如上所述时，所述缀合反应物如下所示：

[0121]



[0122] 本发明第二方面和后几方面中的优选特征适应于第一方面中所述。

[0123] 下面将参照下述实施例对本发明进行进一步的描述，本发明所包括的实施例是用于参照目的的，而不应被理解为是对要保护的发明的限制。

附图说明

[0124] 在本说明书中包括多个附图，附图中：

[0125] 图 1 显示了凝血因子级联反应。缩写词:HMWK- 高分子量激肽原;PK- 前激肽释放酶;PL- 磷脂。

[0126] 图 2 显示了涉及二硫化物-特异性聚乙二醇化的化学过程(取自 Shaunaket al. in Nat Chem Biol. 2006;2(6):312-313)。

[0127] 图 3 显示了 aPTT 凝血试验所涉及的步骤的示意图。缩写词:HMWK- 高分子量激肽原;PK- 前激肽释放酶;PL- 磷脂。

[0128] 图 4 显示了显色凝血试验所涉及的步骤的示意图。

[0129] 图 5 显示了本发明缀合物的两个任选的示意性结构,黑色曲线表示 FVIII, (C) 表示 FVIII 的半胱氨酸残基,且如本文所述地用连接物将 FVIII 与生物相容性聚合物缀合。

具体实施方式

[0130] 下面参照以下实施例进一步描述本发明,实施例的存在仅以说明为目的。

[0131] 实施例 1:FVIII 的二硫化物聚乙二醇化

[0132] 根据 Shaunak 等人在 Nat Chem Biol. 2006;2(6):312-313 中所述步骤的改进版本进行人 FVIII 的二硫化物聚乙二醇化。

[0133] 实施例 2:二硫键的还原

[0134] TheraPEG™ 的聚乙二醇化过程需要还原二硫键。使用适合的还原剂例如二巯苏糖醇 (DTT)、2- 巯基乙醇或三 (2- 羧乙基) 膦 (TCEP), 在存在或不存在硒代胱胺 (selenocystamine, SeCys) 的条件下进行还原,所使用的还原剂的浓度例如为 0.5-5mM DTT 或低摩尔过量的 TCEP。

[0135] 实施例 3:FVIII 的聚乙二醇化

[0136] 在小规模反应(例如 5-20 μg 的 FVIII) 中对用于 FVIII 的聚乙二醇化的 TheraPEG™ 的使用进行初步评估。这能够帮助鉴定可以利用 PEG 反应物可再生地制备聚乙二醇化的 FVIII 所采用的条件。可以添加苯甲脒或其它赋形剂来防止蛋白质水解或促进蛋白质的稳定。

[0137] 扩大反应规模(例如 0.2-0.32mg 的 FVIII) 来生产聚乙二醇化的 FVIII, 以用于初步体外测试。制备一系列具有不同 PEG 分子量(例如 10、20 和 30kDa) 和不同数目的缀合 PEG 部分(例如 1-8 个) 的 PEG-FVIII 样品,用于体外分析。

[0138] 可以评估温度对聚乙二醇化反应的影响来确定温度是否会影响 FVIII 向 PEG-FVIII 的转化。然而,如果初步体外评估表明较高温(例如 10-30℃) 对聚乙二醇化的产物的活性有负面影响,则随后的反应将在较低温度(例如 2-10℃) 下进行。

[0139] 可以使用本领域已知的各种纯化技术来分离和纯化聚乙二醇化的物质。这类技术包括但不限于:离子交换色谱法、尺寸排阻色谱法、亲和色谱法、沉淀或膜分离技术。

[0140] 为了制备较大量的材料以用于进一步的体外评估,将反应的规模扩大到例如 1mg 的 FVIII。使用在较小规模反应中确定的条件制备了 FVIII 的聚乙二醇化变体。

[0141] 纯化后,通过例如 SDS-PAGE 或 SE-HPLC 分析聚乙二醇化的产物来证明纯度,并通过合适的蛋白质分析例如 BCA 测定进行定量。所有的这些方法对本领域技术人员而言都是已知的。

[0142] 实施例 4:聚乙二醇化的 FVIII 活性的体外评估

[0143] 使用显色试验和经改进的活化部分组织促凝血酶原激酶的时间凝固试验(activated partial thromboplastin time coagulation assay)来测定 FVIII 和聚乙二醇化的 FVIII 的活性。

[0144] 显色试验

[0145] 显色试验(Hyphen Biomed, 产品目录编号 221402)通过有色底物的形成来测量 FVIII 的活性,并且不涉及血块的形成。参见图 3,图 3 是显色试验所涉及的步骤的示意图。

[0146] 当被凝血酶活化时,因子 VIII:C 与因子 IXa、磷脂和钙形成酶复合物,将因子 X 活化为因子 Xa。因子 VIII:C 是用于测试因子 VIII:C 的辅因子活性的显色试验手段。当存在恒定量的因子 IXa、磷脂(PLPs)和钙时,被凝血酶活化的因子 VIII:C 形成酶复合物,该复合物将在试验过程中以恒定量和过量的浓度提供的因子 X 活化为因子 Xa。当存在恒定量和过量的因子 IXa 时,这种活性就直接和 VIII:C 因子的量相关,并且是反应的限制因子。然后在特异性因子 Xa 显色基质(SXa-11)上精确测量所生成的因子 Xa 的活性。因子 Xa 切割基质并释放 pNA。生成的 pNA 的量与因子 Xa 的活性直接成正比。最后,试验样品中的因子 VIII:C 的量与生成的因子 Xa 的活性之间存在直接的联系,因子 Xa 的活性由释放的 pNA 的量来测量,通过在 405nm 波长处显色而测定。

[0147] Butenas 等人使用 5 种药用的因子 VIII 产品对基于因子 VIII 活性的试验进行了比较研究(Blood(ASH 年度会议摘要)2004104:摘要 4012)。

[0148] 凝血试验

[0149] 基于活化部分组织促凝血酶原激酶时间(aPTT)的凝血 FVIII 试验方法是一步分析试验(one-stage assay)。在存在因子 IXa、钙和磷脂时,FVIII 是因子 X 向 Xa 的酶促转化过程中的辅因子。凝块形成的时间(秒)和 FVIII 浓度的对数成反比。

[0150] 组合物

[0151] 1. 因子 VIII 缺陷型血浆,Helena Biosciences,产品目录编号 5193

[0152] 2. aPTT-ES 反应物,Helena Biosciences,产品目录编号 5397

[0153] 3. 氯化钙溶液,0.025mol/L

[0154] 将 25 μ l 稀释的待测样品和 25 μ l 的 FVIII 缺陷型血浆与 50 μ l 预热的 aPTT-ES 反应物进行温育。活化剂启动接触系统。然后,在存在磷脂的条件下进行内源性途径的其他步骤。于 37°C 下精确温育 3 分钟后,添加 50 μ l 的 0.025mol/L 的氯化钙溶液并开始凝血。使用 Sysmex CA-50 血凝分析仪测定凝固时间。

[0155] 对照 WHO 国际 FVIII 标准(NIBSC)测定 FVIII 和聚乙二醇化的 FVIII 的活性。对照由已知活性的一系列稀释的 FVIII 标准材料制得的标准曲线,通过比较不同稀释的试验材料的凝血时间来内推未知样品的活性水平,并以国际单位/mL(IU/mL)来表示结果。还计算了聚乙二醇化的 FVIII 所保留的特异性凝血活性的百分比。

[0156] 为了确定聚乙二醇化的 FVIII 凝血是否和未修饰的 FVIII 凝血的速率一样,测量了散射光检测结果在 2 至 80% 的变化区间内的凝血时间,并以凝血时间相对于散射光的变化百分比进行作图。曲线的斜率是凝血反应的速率。使用具有相同的四个浓度的 FVIII 和聚乙二醇化的 FVIII 进行上述测定。

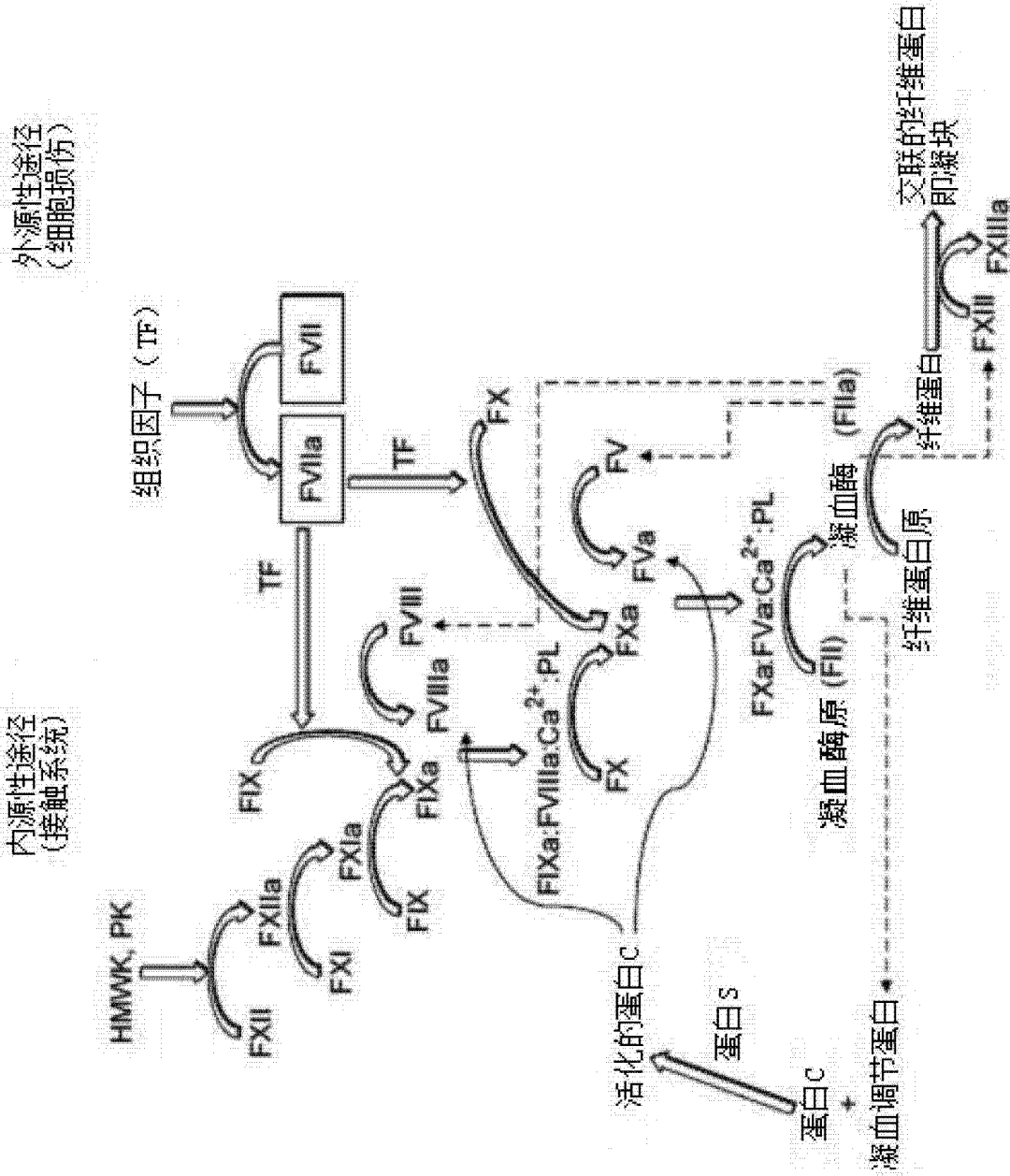


图 1

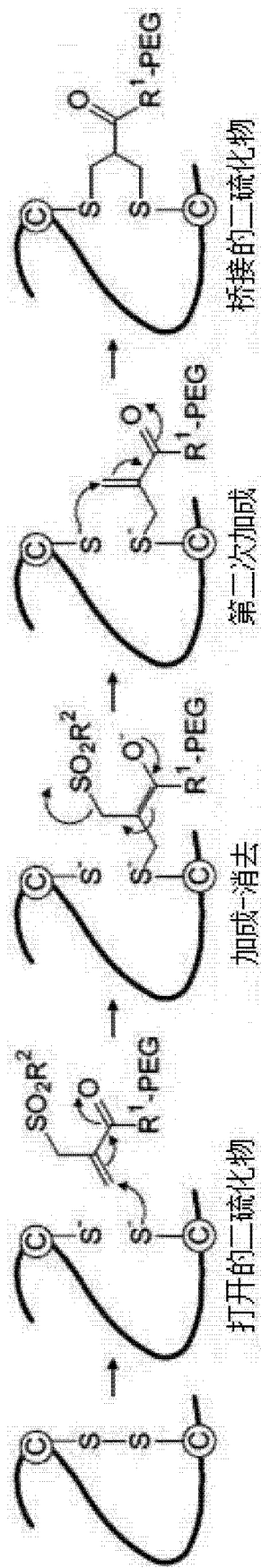


图 2

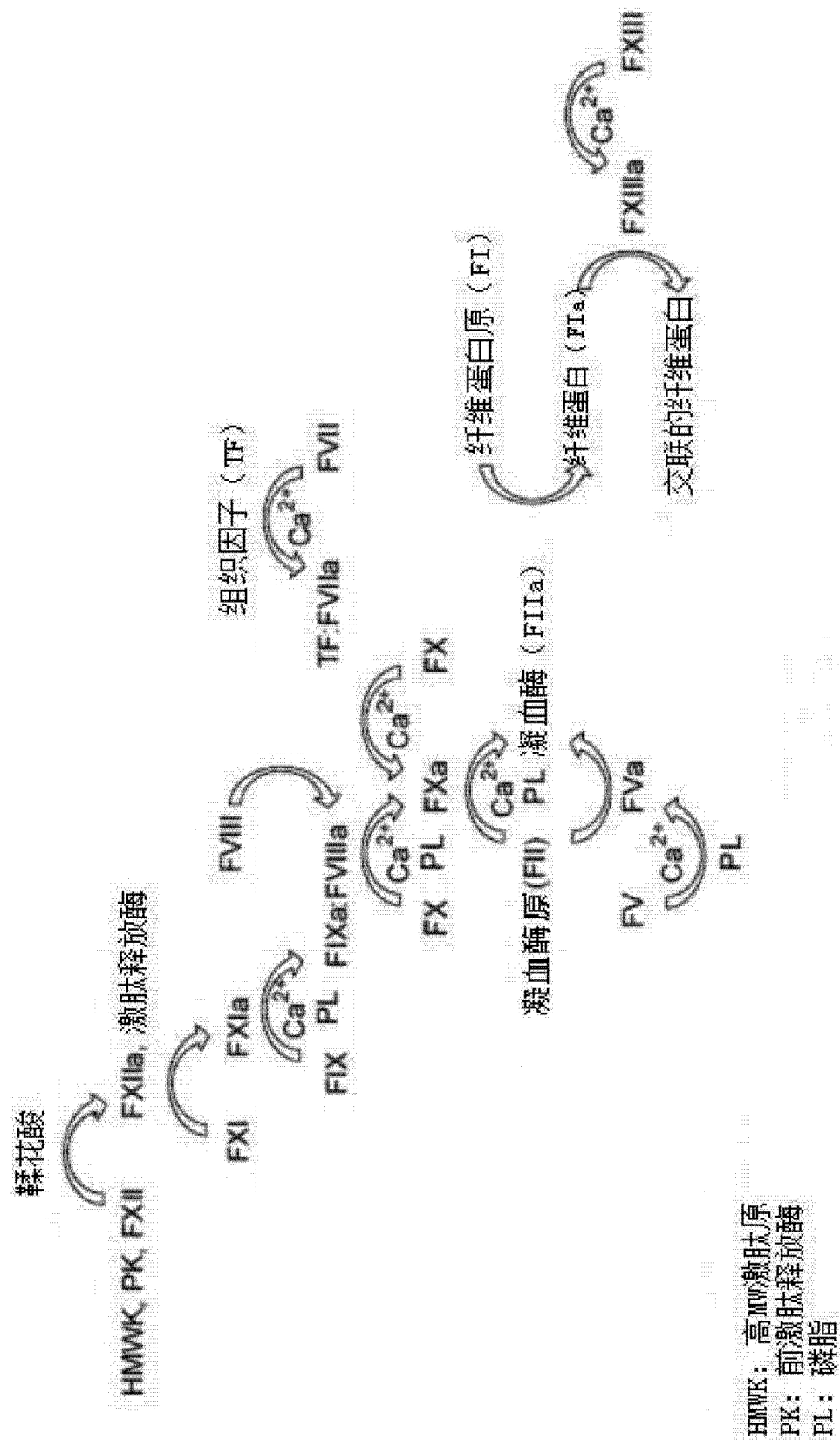


图 3

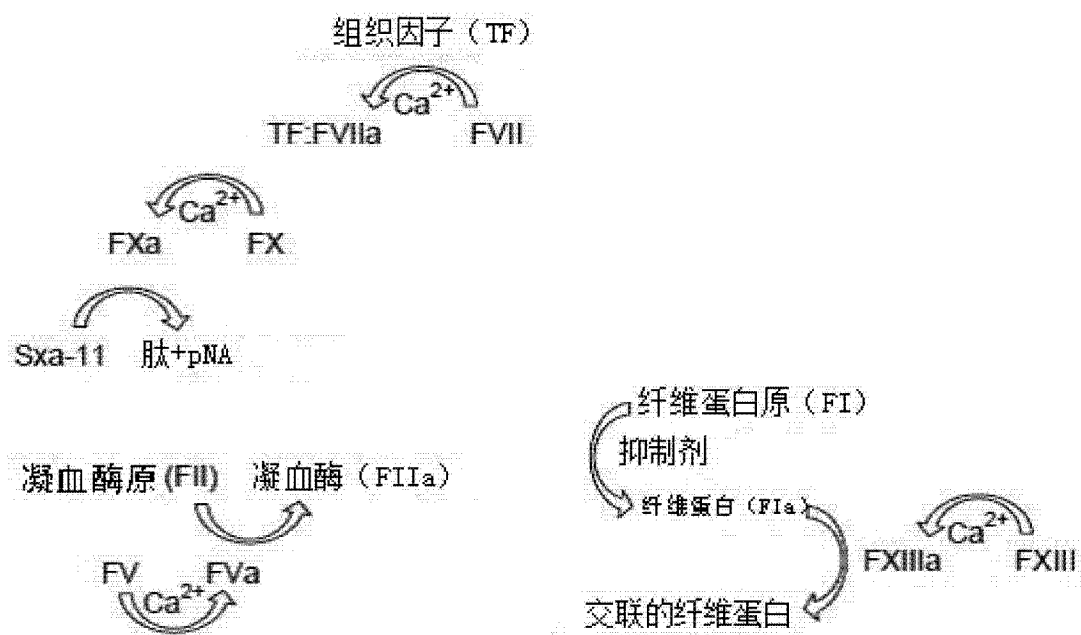


图 4

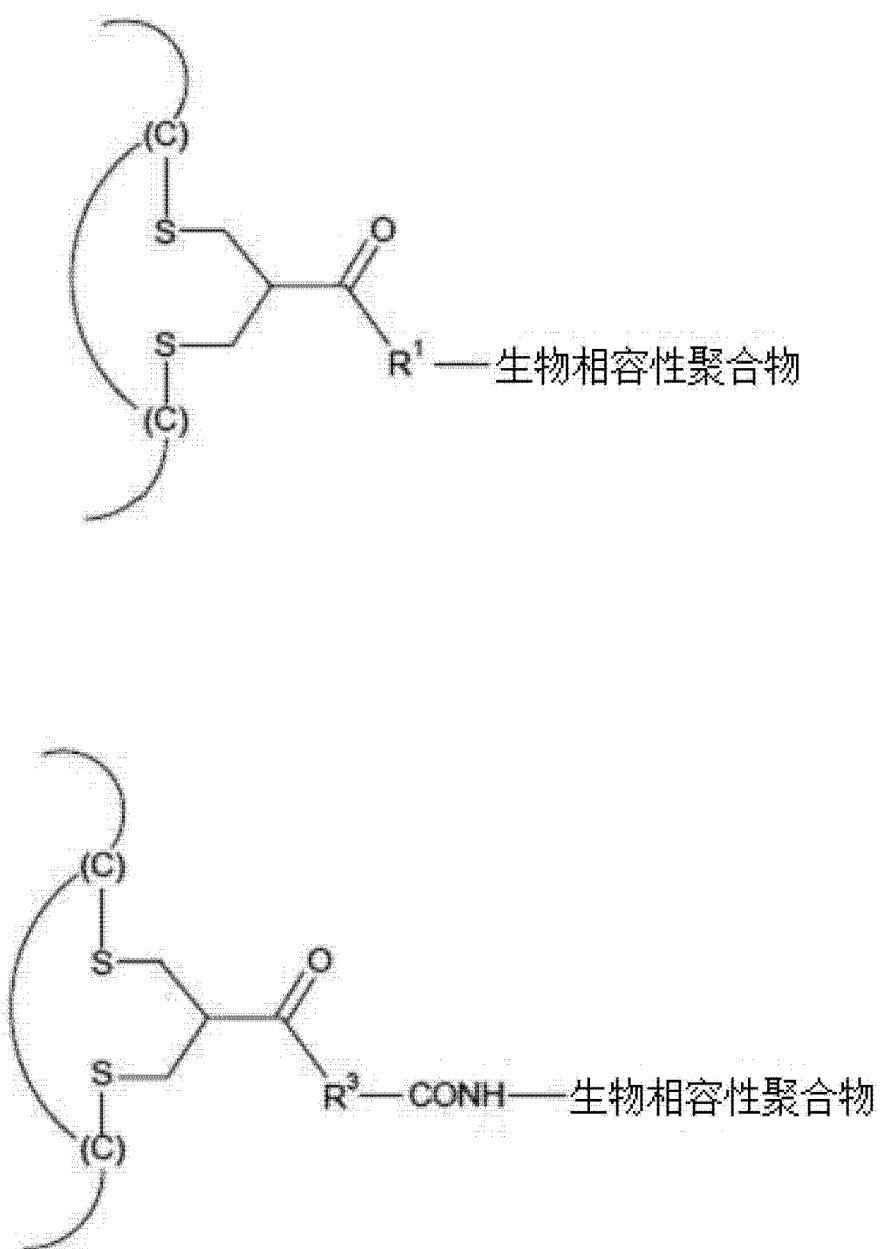


图 5