(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102766668 B
(45)授权公告日 2016.03.16

(21)申请号 201210226379.9
(22)申请日 2001.10.02
(30)优先权数据
PA200001456 2000.10.02 DK
PA200100262 2001.02.16 DK
PA200100430 2001.03.14 DK
PA200100751 2001.05.14 DK
(62)分案原申请数据
01816746.2 2001.10.02
(73)专利权人 诺沃挪第克健康护理股份公司
地址 瑞士苏黎世
(72)发明人 汉斯.K.平格尔 尼尔斯.K.克劳森
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 岑晓东
(51)Int.Cl.
C12N 9/74(2006.01)
C12P 21/00(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
A61K 38/36(2006.01)
A61P 7/04(2006.01)
C12R 1/91(2006.01)
(56)对比文件
US 4784950 A,1988.11.15,
WO 0028065 A1,2000.05.18,
审查员 靳春鹏

权利要求书1页 说明书20页

(54)发明名称

凝血因子 VII 的糖基型

(57)摘要

本发明涉及凝血因子 VII 的糖基型。本发明涉及包含凝血因子 VII 和其它凝血因子的制剂，所述因子具有改变的天冬酰胺－连接型糖基化模式。

CN 102766668 B

1. 制备包含多种因子 VII 多肽或因子 VII 相关多肽的组合物的方法，所述方法包括使经编程而由重组基因表达因子 VII 多肽或因子 VII 相关多肽的中国仓鼠卵巢 K1(CHO-K1) 细胞 ATCC CCL61 适应在血清缺失下生长并在生长期和生产期都缺失血清下培养所述细胞。

2. 依照权利要求 1 的方法，其中所述组合物包含选自人 S52A- 因子 VII ；人 S60A- 因子 VII ；已经在残基 290 和 291 之间蛋白水解切割的因子 VII ；已经在残基 315 和 316 之间蛋白水解切割的因子 VII ；已经氧化的因子 VII ；R152E- 因子 VII，S344A- 因子 VII，FFR- 因子 VII 和缺少 Gla 结构域的因子 VIIa 的多肽。

3. 包含多种因子 VII 多肽或因子 VII 相关多肽的组合物，其中所述组合物通过依照权利要求 1 至 2 任一项的方法获得。

4. 依照权利要求 3 的组合物，其包含多种因子 VII 多肽或因子 VII 相关多肽，在血清缺失下在中国仓鼠卵巢 K1(CHO-K1) 细胞中生成，其中使所述细胞适应在血清缺失下生长并在生长期和生产期都缺失血清下培养所述细胞。

5. 依照权利要求 3 或 4 的组合物，其中所述组合物所具有的生物利用度是参照制剂的生物利用度的至少 110％。

6. 依照权利要求 5 的组合物，其中所述组合物所具有的生物利用度是参照制剂的生物利用度的 (a) 至少 120％，(b) 至少 130％，或 (c) 至少 140％。

7. 依照权利要求 3 或 4 的组合物，其中所述组合物所展现的生物利用度是参照制剂的生物利用度的至少 110％，其中参照制剂中 93％或更少的寡糖链包含至少一个唾液酸部分。

8. 药用配制剂，其包含依照权利要求 3 至 7 任一项的组合物和可药用载体或稀释剂。

9. 经编程而由重组基因表达因子 VII 多肽或因子 VII 相关多肽的中国仓鼠卵巢 K1(CHO-K1) 细胞 ATCC CCL61 在制备包含多种因子 VII 多肽或因子 VII 相关多肽的组合物中的用途，其中使所述 CHO-K1 细胞适应在血清缺失下生长并在生长期和生产期都缺失血清下培养所述 CHO-K1 细胞。

凝血因子 VII 的糖基型

[0001] 本申请是申请日为2001年10月02日、中国申请号为01816746.2、发明名称为“凝血因子 VII 的糖基型”的发明申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及包含凝血因子 VII 以及其它具有改变的天冬酰胺连接型糖基化模式的凝血因子的组合物。

背景技术

[0003] 与凝血级联反应有关的蛋白包括，例如凝血因子 VII，凝血因子 VIII，凝血因子 IX，凝血因子 X，以及蛋白 C，它们经证实都可以作为有效治疗剂用于治疗各种病症。因此，对包含这些蛋白并预先确定了临床效力的单一形式可药用配制剂的需求不断增长。

[0004] 由于使用人血浆作为药用产物的来源有诸多不利，优选在重组系统中制备这些蛋白。但凝血蛋白都有多种多样的翻译和翻译后修饰，包括，例如 glu 残基的天冬酰胺连接的 (N- 连接的) 糖基化；O- 连接的糖基化；以及 γ - 羧基化。当使用异源细胞作为宿主来大量制备所述蛋白时，这些修饰可能存在质或量的差异。特别是，在异源细胞中的制备通常导致糖基型 (glycoform) 的不同排列，即相同的多肽具有不同的共价连接的寡糖结构。

[0005] 在不同的系统中，治疗性蛋白的寡糖结构的变化至少与致免疫性和体内清除的改变有关。因此，本领域需要能提供凝血蛋白制剂的组合物和方法，尤其是包含重组人凝血因子 VII，修饰的凝血因子 VII，或凝血因子 VII 相关多肽的制剂，且所述制剂具有预先确定的糖基型模式。

[0006] 发明简述

[0007] 本发明涉及包含凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽的制剂，它们表现出预先确定的糖基型模式。本文中，凝血因子 VII 或凝血因子 VII 相关制剂是指已经从合成它们的细胞中分离出来的多种凝血因子 VII 或凝血因子 VII 相关多肽，包括变体和化学修饰形式，以及经蛋白裂解活化的形式 (如凝血因子 VIIa)。糖基型是指制剂中具有多样化结构、并与凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽共价连接的寡糖链的分布。

[0008] 本发明一个方面提供了包含多种凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽的制剂，其中所述多肽包含天冬酰胺连接的寡糖链并且具有以下一或多种特征：(i) 约 94-100％的寡糖链包含至少一个唾液酸部分；(ii) 约 0-7％的寡糖链为电中性；(iii) 约 16％以下 (如约 6-16％) 的寡糖链包含至少一个末端半乳糖残基；(iv) 约 25％以下 (如约 6-9％) 的寡糖链包含至少一个末端 N- 乙酰半乳糖胺残基；或 (v) 约 30％以下 (如约 11-23％) 的寡糖链包含至少一个末端半乳糖残基或 N- 乙酰半乳糖胺残基。在一些实施方案中，除了 (i)-(v) 的一或多项以外：寡糖链中的所有唾液酸残基与半乳糖经由 α 2->3 键连接；至少部分唾液酸残基除了包含 N- 乙酰神经氨酸 (Neu5Ac) 以外，还包含 N- 乙醇酰神经氨酸 (Neu5Gc)；和 / 或寡糖链包含岩藻糖残基，它通过 α 1->6 键与核心 N- 乙酰葡糖胺连接。在一个实施方案中，本发明包括一种含野生型凝血因子 VIIa 的制剂，其中约 94-100％

的寡糖链具有至少一个唾液酸残基，且所有的唾液酸残基都经由 α 2->3 键与半乳糖连接。在另一个实施方案中，本发明包括一种含野生型凝血因子 VIIa 的制剂，其中约 94-100％的寡糖链具有至少一个唾液酸残基，且至少一部分唾液酸残基为 N- 乙醇酰神经氨酸。在另一实施方案中，本发明包括一种含野生型凝血因子 VIIa 的制剂，其中约 94-100％的寡糖链具有至少一个唾液酸残基，且至少部分所述链包含 N- 乙酰半乳糖胺。本发明的制剂因此不包含已从人血浆中分离出来但未在体外经糖苷酶处理而被修饰的野生型凝血因子 VII 或凝血因子 VIIa。

[0009] 本发明另一方面提供了包含多种凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽的制剂，其中所述多肽包含天冬酰胺连接的寡糖链且其中至少约 2％的寡糖链包含至少一个与天线式 (antennary)N- 乙酰葡糖胺残基（即，与 Man 残基经由 β 1->2,4 或 6 键连接的 N- 乙酰葡糖胺残基）经由 α 1->3 键连接的岩藻糖。优选至少约 5％的寡糖链包含至少一个上述天线式岩藻糖残基；更优选至少约 10％或 20％；最优选至少约 40％。

[0010] 本发明的制剂可包含一或多种下述物质：未经修饰的野生型凝血因子 VII；经过化学修饰和 / 或酶修饰的野生型凝血因子 VII；以及在相对于野生型凝血因子 VII 的氨基酸序列中包含一或多个改变的凝血因子 VII 变体。本发明的制剂可以衍生自，由其内源性凝血因子 VII 基因表达凝血因子 VII 的人类细胞，或经编程而由重组基因表达凝血因子 VII 或凝血因子 VII 相关多肽的细胞。

[0011] 本发明另一方面提供了包含凝血因子 VII 或凝血因子 VII 相关多肽的制剂，所述凝血因子 VII 或凝血因子 VII 相关多肽表现出一或多种改进的功能特性，包括，但不限于，保存稳定性、生物可利用度和 / 或半寿期都提高。

[0012] 本发明另一方面包括对凝血因子 VII 和凝血因子 VII 相关多肽的糖基型模式进行测定和 / 或最优化的方法，包括以下步骤：

[0013] (a) 在第一组预定的培养条件下培养能表达凝血因子 VII 或凝血因子 VII 相关多肽的细胞；

[0014] (b) 从上述培养中回收凝血因子 VII 或凝血因子 VII 相关多肽，以便获得包含所述多肽的制剂；和

[0015] (c) 分析与所述多肽相连的寡糖的结构，以便确定该制剂的糖基型模式。

[0016] 本发明还可包括：将步骤 (a) 的培养条件变为第二组预定培养条件；以及重复所述步骤，直至获得所需的糖基型模式。备选地，所述方法还可包括对制剂进行化学处理或酶处理，以改变寡糖的结构；并重复所述步骤，直至获得所需糖基型模式。所述方法还可以进一步包括以下步骤：对具有预定的糖基型模式的制剂进行至少一种检测生物活性或其它功能（如药代动力学特性谱或稳定性）的试验，并将特定的糖基型模式与特定的生物活性或功能特性联系起来。

[0017] 本发明另一方面提供了制备包含凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽的制剂的方法，所述凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽具有预定的 N- 连接的糖基化模式。在一些实施方案中，所述方法通过培养能表达所述多肽的细胞来进行，其中与凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽连接的至少约 94％的天冬酰胺 - 连接型寡糖包含至少一个唾液酸残基，例如，1、2、3、或 4 个唾液酸残基。在一些实施方案中，所述方法通过培养能表达所述多肽的细胞来进行，其中至少约 5％的寡糖链包含至少一个与天线式 N- 乙酰葡糖

胺残基以 α 1->3 键相连的岩藻糖。在一些实施方案中，凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽，不管是何种来源，都接受酶处理，以便获得所需糖基型模式。

[0018] 本发明另一方面提供了包含本发明制剂的药用配制剂以及预防和 / 或治疗那些应答凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽而出现的综合征的方法。所述方法包括，在增强或抑制凝血效应的条件下，对需要治疗的患者给药所述药用配制剂。在一组实施方案中，在希望增强凝血的情况下，给药凝血因子 VII 制剂，所述情况如血友病 A，血友病 B，凝血因子 XI 缺陷，凝血因子 VII 缺陷，血小板减少症，或 von Willebrand 病；伴有凝血因子抑制剂存在的综合征；外科手术或抗凝血治疗之前、期间、或之后；或受创后。在另一组实施方案中，给药凝血因子 VII 相关多肽的制剂（即相对于野生型凝血因子 VII 具有降低的或改变的生物活性的制剂）以便减少凝血，这类情况例如，接受血管成形术的患者，或罹患以下疾病的患者：深部静脉血栓症，肺栓塞，休克，弥漫性血管内凝血 (DIC)，与革兰氏阴性内毒素血症相关的肺部和肾脏纤维蛋白沉积，或心肌梗塞。根据本发明，还可以在需要改变（如降低）经由组织因子 (TF) 介导的途径进行的细胞内信号传递的情况中给药凝血因子 VII 相关多肽的制剂，以便治疗，例如急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)，系统性炎症应答综合征 (SIRS)，溶血性尿毒综合征 (HUS)，多发性器官功能衰竭 (MOF)，以及血小板减少性紫癜 (TTP)。

[0019] 本申请涉及下述各项。

[0020] 1. 含有多种凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽的制剂，其中所述多肽包含天冬酰胺 - 连接的寡糖链，并且其中 94-99％的寡糖链包含至少一个唾液酸部分。

[0021] 2. 含有多种凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽的制剂，其中所述多肽包含天冬酰胺 - 连接的寡糖链，并且其中约 1-7％的寡糖链为电中性。

[0022] 3. 含有多种凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽的制剂，其中所述多肽包含天冬酰胺 - 连接的寡糖链，并且其中约 6-16％的寡糖链包含至少一个末端半乳糖残基。

[0023] 4. 含有多种凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽的制剂，其中所述多肽包含天冬酰胺 - 连接的寡糖链，并且其中约 6-9％的寡糖链包含至少一个末端 N- 乙酰半乳糖胺残基。

[0024] 5. 含有多种凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽的制剂，其中所述多肽包含天冬酰胺 - 连接的寡糖链，并且其中约 11-23％的寡糖链包含至少一个末端半乳糖或 N- 乙酰半乳糖胺残基。

[0025] 6. 含有多种凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽的制剂，其中所述多肽包含天冬酰胺 - 连接的寡糖链，并且其中约 2％的寡糖链包含至少一个以 α 1->3 构型与天线式 N- 乙酰葡糖胺连接的岩藻糖部分。

[0026] 7. 项 1-6 任一项的制剂，其中所述寡糖链中的唾液酸残基以 α 2->3 键与半乳糖连接。

[0027] 8. 项 1-7 任一项的制剂，其中所述唾液酸残基包含 N- 乙酰神经氨酸 (Neu5Ac) 和 N- 乙醇酰神经氨酸 (Neu5Gc)。

[0028] 9. 项 1-8 任一项的制剂，其中所述寡糖包含以 α 1->6 键与核心 N- 乙酰葡糖胺连接的岩藻糖。

[0029] 10. 项 1-9 任一项的制剂，其中约 95-98％的寡糖链包含至少一个唾液酸残基。

[0030] 11. 项 1-10 任一项的制剂，其中约 96-97％的寡糖链包含至少一个唾液酸残基。

[0031] 12. 项 1-11 任一项的制剂，其中约 2-4％的寡糖链为电中性。

[0032] 13. 项 1-12 任一项的制剂，其中约 8-12％的寡糖链包含至少一个末端半乳糖残基。

[0033] 14. 项 1-13 任一项的制剂，其中约 7-8％的寡糖链包含至少一个末端 N- 乙酰半乳糖胺残基。

[0034] 15. 项 1-14 任一项的制剂，其中约 12-18％的寡糖链包含至少一个末端半乳糖或 N- 乙酰半乳糖胺残基。

[0035] 16. 项 1-15 任一项的制剂，其中至少约 5％的寡糖链包含至少一个以 α 1->3 键与天线式 N- 乙酰葡糖胺连接的岩藻糖部分。

[0036] 17. 项 1-16 任一项的制剂，其中至少约 10％的寡糖链包含至少一个以 α 1->3 键与天线式 N- 乙酰葡糖胺连接的岩藻糖部分。

[0037] 18. 项 1-17 任一项的制剂，其中至少约 20％的寡糖链包含至少一个以 α 1->3 键与天线式 N- 乙酰葡糖胺连接的岩藻糖部分。

[0038] 19. 项 1-18 任一项的制剂，其中至少约 40％的寡糖链包含至少一个以 α 1->3 键与天线式 N- 乙酰葡糖胺连接的岩藻糖部分。

[0039] 20. 项 1-19 任一项的制剂，其中所述多肽具有野生型凝血因子 VII 的氨基酸序列。

[0040] 21. 项 1-20 任一项的制剂，其中所述多肽是野生型凝血因子 VIIa。

[0041] 22. 项 1-19 任一项的制剂，其中所述凝血因子 VII 多肽选自 :S52A- 凝血因子 VII，S60A- 凝血因子 VII，在残基 290 和 291 之间被蛋白裂解的凝血因子 VII，在残基 315 和 316 之间被蛋白裂解的凝血因子 VII ;以及氧化型凝血因子 VII。

[0042] 23. 项 1-19 任一项的制剂，其中所述凝血因子 VII 相关多肽选自 :R152E- 凝血因子 VII，S344A- 凝血因子 VII，FFR- 凝血因子 VII，以及缺乏 Gla 结构域的凝血因子 VIIa。

[0043] 24. 包含多种凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽的制剂，其中所述多肽包含天冬酰胺 - 连接的寡糖链，并且其中 (i) 约 94-100％的寡糖链包含至少一个唾液酸部分，且 (ii) 约 6-9％的寡糖链包含至少一个末端 N- 乙酰半乳糖胺残基。

[0044] 25. 项 24 的制剂，其中所述凝血因子 VII 多肽具有野生型凝血因子 VII 的序列。

[0045] 26. 包含多种凝血因子 VIIa 多肽的制剂，所述多肽具有野生型凝血因子 VII 的序列，并且所述多肽包含天冬酰胺 - 连接的寡糖链，其中约 94-99％的寡糖链包含至少一个唾液酸残基。

[0046] 27. 包含多种凝血因子 VIIa 多肽的制剂，所述多肽具有野生型凝血因子 VII 的序列，并且所述多肽包含天冬酰胺 - 连接的寡糖链，其中至少约 2％的寡糖链包含至少一个以 α 1->3 键与天线式 N- 乙酰葡糖胺连接的岩藻糖部分。

[0047] 28. 项 1-27 任一项的制剂，其中所述多肽产生于选自真菌细胞、昆虫细胞或脊椎动物细胞的宿主细胞。

[0048] 29. 项 28 的制剂，其中所述细胞是哺乳动物的细胞。

[0049] 30. 项 29 的制剂，其中所述哺乳动物细胞来自仓鼠。

[0050] 31. 项 30 的制剂，其中所述仓鼠细胞选自 CHO 细胞或 BHK 细胞。

[0051] 32. 项 29 的制剂，其中所述哺乳动物细胞来自人类。

[0052] 33. 项 32 的制剂，其中所述人类细胞是 HEK 细胞。

[0053] 34. 项 1-33 任一项的制剂，其中所述制剂具有参照制剂的至少约 110％的生物可利用度，其中参照制剂中约 93％或更少的寡糖链包含至少一个唾液酸部分。

[0054] 35. 项 34 的制剂，其中所述制剂具有参照制剂的至少约 120％的生物可利用度。

[0055] 36. 项 35 的制剂，其中所述制剂具有参照制剂的至少约 130％的生物可利用度。

[0056] 37. 项 36 的制剂，其中所述制剂具有参照制剂的至少约 140％的生物可利用度。

[0057] 38. 测定凝血因子 VII 和凝血因子 VII 相关多肽的糖基型模式的方法，该方法包括：

[0058] (a) 在第一组预定的培养条件下培养能表达凝血因子 VII 或凝血因子 VII 相关多肽的细胞；

[0059] (b) 从上述培养中回收凝血因子VII或凝血因子VII相关多肽，以获得包含这些多肽的制剂；和

[0060] (c) 分析与这些多肽连接的寡糖的结构，从而确定所述制剂的糖基型模式。

[0061] 39. 项 38 的方法，还包括：

[0062] (d1) 改变步骤 (a) 的培养条件，得到第二组预定的培养条件；

[0063] (e1) 重复步骤 (b)-(d1)，直至获得所需的糖基型模式。

[0064] 40. 项 38 的方法，还包括：

[0065] (d2) 对所述制剂进行化学处理或酶处理，以改变寡糖的结构；和

[0066] (e2) 重复步骤 (b)-(d2)，直至获得所需糖基型模式。

[0067] 41. 制备含有凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII- 相关多肽的制剂的方法，所述多肽具有预定的 N- 连接型糖基化模式，所述方法包括培养能表达所述多肽的细胞，所用的培养条件使所述多肽上至少约 94％的天冬酰胺 - 连接型寡糖包含至少一个唾液酸残基。

[0068] 42. 一种药用配制剂，其包含项 1-37 任一项的制剂和一种可药用载体或添加剂。

[0069] 43. 治疗凝血因子VII-应答性综合征的方法，所述方法包括，在使出血减少和 / 或使凝血增加的条件下，对需要相应治疗的患者给药项 42 所述的药用配制剂，其中所述配制剂包含凝血因子 VII 多肽。

[0070] 44. 项 43 的方法，其中所述综合征选自血友病 A，血友病 B，凝血因子 XI 缺陷，凝血因子 VII 缺陷，血小板减少症，von Willebrand 病，凝血因子抑制剂的存在，外科手术，创伤或抗凝治疗。

[0071] 45. 预防不希望发生的出血的方法，所述方法包括，在使出血减少和 / 或使凝血增加的条件下，对需要相应治疗的患者给药项 42 所述的药用配制剂，其中所述配制剂包含凝血因子 VII 多肽。

[0072] 46. 预防不希望发生的凝血的方法，所述方法包括，在能有效抑制凝血的条件下，对需要相应治疗的患者给药项 42 所述的药用配制剂，其中所述配制剂包含凝血因子 VII 相关多肽。

[0073] 47. 预防组织因子介导的反应的方法，所述方法包括，在能有效抑制凝血的条件下，对需要相应治疗的患者给药项 42 所述的药用配制剂，其中所述配制剂包含凝血因子 VII 相关多肽。

[0074] 48. 项 46 的方法，其中所述不希望发生的凝血与选自下组的疾病有关：血管成形

术，深部静脉血栓，肺栓塞，休克，弥散性血管内凝血 (DIC)，与革兰氏阴性内毒素血症有关的肺或肾内纤维蛋白沉积，或心肌梗塞。

[0075] 49. 项 47 的方法，其中所述组织因子介导的反应与选自 SIRS，ARDS，MOF，HUS，或 TTP 的疾病有关。

[0076] 50. 项 1-37 任一项所述的包含凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽的制剂的用途，用于制备治疗凝血因子 VII 应答性综合征的药物。

[0077] 51. 项 50 的用途，其中所述综合征选自血友病 A，血友病 B，凝血因子 XI 缺陷，凝血因子 VII 缺陷，血小板减少症，von Willebrand 病，凝血因子抑制剂的存在，外科手术，创伤或抗凝治疗。

[0078] 52. 项 1-37 任一项所述的包含凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽的制剂的用途，用于制备预防不希望发生的出血的药物。

[0079] 53. 项 1-37 任一项所述的包含凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽的制剂的用途，用于制备预防不希望发生的凝血的药物。

[0080] 54. 项 53 的用途，其中所述不希望发生的凝血与选自下组的疾病有关：血管成形术，深部静脉血栓，肺栓塞，休克，弥散性血管内凝血 (DIC)，与革兰氏阴性内毒素血症有关的肺或肾内纤维蛋白沉积，或心肌梗死。

[0081] 55. 项 1-37 任一项所述的包含凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽的制剂的用途，用于制备预防组织因子介导的反应的药物。

[0082] 56. 项 55 的用途，其中所述组织因子介导的反应与选自 SIRS，ARDS，MOF，HUS，或 TTP 的疾病有关。

[0083] 发明详述

[0084] 本发明者发现，具有预定的糖基型模式的凝固蛋白的制剂表现出改进的功能特性。相应地，本发明涉及提供这些蛋白制剂的方法和组合物。具体地，本发明涉及包含凝血因子 VII 多肽和凝血因子 VII 相关多肽的制剂，所述制剂具有预定的特异性天冬酰胺 - 连接型 (N- 连接型）寡糖模式。本发明的制剂表现出改变的特性，包括，但不限于，改进的药代动力学特性和改进的临床效力。本发明还包括含有这些制剂的药用配制剂，以及应用这些配制剂进行的治疗方法。

[0085] 凝血因子 VII 多肽和凝血因子 VI1 相关多肽

[0086] 本发明涉及凝血因子 VII 多肽，如具有美国专利 4,784,950 中公开的氨基酸序列的那些（野生型凝血因子 VII)。本文中，“凝血因子 VII”或“凝血因子 VII 多肽”包括野生型凝血因子 VII，以及生物学活性与野生型凝血因子 VII 相比实质上相同或有改进的凝血因子 VII 变体。术语“凝血因子 VII”旨在包括凝血因子 VII 多肽的未切割形式（酶原形式），以及经过蛋白裂解性加工产生了各自的生物活性形式的那些多肽，它们可称为凝血因子 VIIa。通常，凝血因子 VII 在残基 152 和 153 之间切割而产生凝血因子 VIIa。

[0087] 本文中，“凝血因子 VII 相关多肽”包括多肽和变体，其中凝血因子 VIIa 的生物学活性与野生型凝血因子 VIIa 相比得到实质上的修饰或已减弱。这些多肽包括，但不限于，经过化学修饰的凝血因子 VII 或凝血因子 VIIa，以及引入了特异性氨基酸序列改变从而修饰或破坏了该多肽的生物活性的凝血因子 VII 变体。

[0088] 凝血过程中，凝血因子 VIIa 的生物学活性源于其以下能力：(i) 与组织因子 (TF)

结合，和 (ii) 催化凝血因子 IX 或凝血因子 X 的蛋白裂解性切割，从而产生活化的凝血因子 IX 或 X(分别为凝血因子 IXa 或 Xa)。为了本发明的目的，凝血因子 VIIa 的生物学活性可以通过利用凝血因子 VII- 缺陷型血浆和凝血酶致活酶测量制剂促进凝血的能力来定量，如美国专利 5,997,864 所述。在该试验中，将生物学活性表示为凝血时间相对于对照样品的减少，并将其与含有 1 单位 /ml 凝血因子 VII 活性的人血清标准品进行比较而转换为“凝血因子 VII 单位”。定量凝血因子 VIIa 的生物学活性的另一种方法是 :(i) 测量凝血因子 VIIa 在含有包埋于脂质膜中的 TF 的系统中产生凝血因子 Xa 的能力以及产生凝血因子 X 的能力 (Persson 等，J.Biol.Chem.272:19919-19924,1997) ;(ii) 测量凝血因子 X 在含水系统中的水解 (参见下文实施例 5) ;(iii) 测量其与 TF 的物理结合，使用基于表面胞质团共振 (surface plasmon resonance) 的仪器 (Persson,FEBS Letts.413:359-363,1997) ;(iv) 测量合成底物的水解 (参见下文实施例 4) ;和 (v) 测量 TF- 非依赖性体外系统中凝血酶的产生。

[0089] 具有与野生型凝血因子 VIIa 相比实质上相同或有改进的生物学活性的凝血因子 VII 变体包括 :在上述凝血试验、蛋白裂解试验和 / 或 TF 结合试验中测得，比活性为相同细胞类型产生的野生型凝血因子 VIIa 的至少约 25%，优选至少约 50%，更优选至少约 75%，最优选至少约 90% 的那些。具有与野生型凝血因子 VIIa 相比实质上减弱的生物学活性的凝血因子 VII 变体包括 :在上述凝血试验、蛋白裂解试验和 / 或 TF 结合试验中测得，比活性为相同细胞类型产生的野生型凝血因子 VIIa 的至少约 25%，优选至少约 10%，更优选至少约 5%，最优选至少约 1% 的那些。具有与野生型凝血因子 VII 相比有实质修饰的生物学活性的凝血因子 VII 变体包括，但不限于，具有 TF- 非依赖性凝血因子 X 的蛋白裂解活性的凝血因子 VII 变体，以及结合 TF 但不裂解凝血因子 X 的那些。

[0090] 凝血因子 VII 的变体，无论是具有与野生型凝血因子 VII 实质上相同或更好的生物活性，还是具有与野生型凝血因子 VII 相比有实质修饰的或减弱的生物活性，这样的变体可包括，但不限于具有因插入、缺失、或取代一或多个氨基酸而不同于野生型凝血因子 VII 的氨基酸序列的多肽。具有与野生型凝血因子 VII 相比实质上相同的生物学活性的凝血因子 VII 变体包括 :S52A-FVIIa,S60A-FVIIa(Iino 等，Arch.Biochem.Biophys.352:182-192,1998) ;具有增强的蛋白裂解稳定性的 FVIIa 变体，其公开在美国专利 5,580,560 中 ;已经在残基 290 和 291 之间或残基 315 和 316 之间被蛋白裂解的那些凝血因子 VIIa(Mollerup 等，Biotechnol.Bioeng.48:501-505,1995) ;以及氧化型凝血因子 VIIa(Kornfelt 等，Arch.Biochem.Biophys.363:43-54,1999)。具有与野生型凝血因子 VII 相比实质上减弱或有修饰的生物学活性的凝血因子 VII 变体包括 :R152E-FVIIa(Wildgoose 等，Biochem 29:3413-3420,1990)，S344A-FVIIa(Kazama 等，J.Biol.Chem.270:66-72,1995)，FFR-FVIIa(Holst 等，Eur.J.Vasc.Endovasc.Surg.15:515-520,1998)，以及缺乏 Gla 结构域的凝血因子 VIIa(Nicolaisen 等，FEBS Letts.317:245-249,1993)。化学修饰的凝血因子 VII 多肽以及序列变体的非限制性实例参见，例如，美国专利 5,997,864。

[0091] 天冬酰胺 - 连接型糖基化

[0092] 本发明提供了凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII- 相关多肽的制剂，它包含特定谱的凝血因子 VII 糖基型，即具有预定的天冬酰胺 - 连接型 (N- 型) 寡糖链的凝血因子 VII

多肽或凝血因子 VII 相关多肽。

[0093] 本文中，N- 连接型糖基化的“模式”或糖基型“模式”，“分布”，或“谱”，是指给定的凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽群体内具体的寡糖结构。这类模式的非限制性实例包括寡糖链的以下相关部分：(i) 具有至少一个唾液酸残基；(ii) 缺乏任何唾液酸残基（即，为电中性）；(iii) 具有至少一个末端半乳糖残基；(iv) 具有至少一个末端 N 乙酰半乳糖胺残基；(v) 具有至少一个“未加帽”的天线 (antenna)，即，具有至少一个末端半乳糖或 N- 乙酰半乳糖胺残基；或 (vi) 具有至少一个以 α 1->3 键与天线式 N- 乙酰葡糖胺残基连接的岩藻糖。

[0094] 本文中，寡糖链是指与单个天冬酰胺残基共价连接的整个寡糖结构。凝血因子 VII 通常在 Asn 145 和 Asn 322 发生糖基化。人体中原位产生的凝血因子 VII 上的 N- 连接型寡糖链可以是双 -，三，或四天线式，每一天线中，Neu5Ac(α 2->3 或 α 2->6)Gal(β 1->4)GlcNAc 与 Man 残基以 (β 1->2,4, 或 6) 连接，所述 Man 残基与 Man(β 1->4)GlcNAc(β 1->4)GlcNAc-Asn 以 (α 1->3 或 6) 连接。(Neu5Ac 表示 N- 乙酰神经氨酸（唾液酸），Gal 表示半乳糖，GlcNAc 表示 N- 乙酰葡糖胺，Man 表示甘露糖）。寡糖链还可包含岩藻糖残基，其可与 GlcNAc 以 α 1->6 连接。当凝血因子 VII 在人体中原位产生时，一些寡糖链缺失核心的岩藻糖残基；所有链缺乏天线式岩藻糖残基；且所有链都几乎被彻底唾液酸化，即，每一天线的末端糖是与半乳糖经 α 2->3 或 α 2->6 键连接的 N- 乙酰神经氨酸。

[0095] 但是，在其它情况下产生时，凝血因子 VII 可能包含以下寡糖链，它们在一或多个天线上具有不同末端结构，如缺乏唾液酸残基；包含 N- 乙醇酰神经氨酸 (Neu5Gc) 残基；包含末端 N- 乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 残基以替代半乳糖；等等。如果是在有牛血清时培养的 BHK 细胞中产生，凝血因子 VII 具有以下寡糖模式：

[0096] --87-93％的寡糖链包含至少一个单个的唾液酸残基；

[0097] --7-13％为中性（无任何唾液酸）；

[0098] --9-16％包含至少一个末端半乳糖残基；

[0099] --19-29％包含至少一个末端 N- 乙酰半乳糖胺残基；和

[0100] --30-39％包含至少一个未加帽的天线，即，包含至少一个末端半乳糖或 N- 乙酰半乳糖胺残基。

[0101] 本发明人制备了包含预定的特异性寡糖模式的凝血因子 VII 制剂，其寡糖模式不同于已经描述的那些。本发明涉及含有凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII- 相关多肽的制剂，所述多肽具有一或多种下述糖基型模式：

[0102] (i) 约 94-100％的寡糖链包含至少一个唾液酸残基，如约 94-99％，约 95-98％，或约 96-97％。在不同的实施方案中，至少约 94％，95％，96％，或 97％的寡糖链包含至少一个唾液酸残基。

[0103] (ii)6％或更少的寡糖链为中性，如约 1.5-6％或约 2-4％。

[0104] (iii) 约 16％以下，优选约 10％以下的寡糖链包含至少一个末端半乳糖，如约 6-10％或约 8-9％；

[0105] (iv) 约 25％以下，优选约 10％以下的寡糖链包含至少一个末端 GalNAc 残基，如约 69％或约 7-8％；

[0106] (v) 约 30％以下，优选约 25％以下的寡糖链包含至少一个未加帽的天线，如约

11-23％或约 12-18％ ;和

[0107] (vi) 至少约 2％,优选至少约 5％,更优选至少约 10％或 20％,最优选至少约 40％的寡糖链包含至少一个与天线式 N- 乙酰葡糖胺残基以 α 1->3 连接的岩藻糖 (即,以 β 1->2,4, 或 6 键与 Man 残基连接的 N- 乙酰葡糖胺残基)。

[0108] 可以理解,上述 (i)-(vi) 的每一项代表了包含在本发明中的一种不同的糖基型模式,即,本发明的制剂可以用上述 (i)-(vi) 中的仅一项来描述。也可以根据具体的糖基型模式,用上述 (i)-(vi) 的不止一项来描述本发明的制剂。

[0109] 此外,本发明的制剂可以用上述 (i)-(vi) 中的一或多项结合一或多个其它结构特征来描述。例如,本发明包括含凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽的制剂,所述多肽中的唾液酸残基 (Neu5Ac 或 Neu5Gc) 与半乳糖仅以 α 2->3 构型连接。本发明还包括含凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽的制剂,所述多肽包含以 α 1->6 键与核心的 N- 乙酰葡糖胺连接和 / 或以 α 1->3 键与天线式 N- 乙酰葡糖胺连接的岩藻糖。在一系列实施方案中,本发明的制剂包含下述凝血因子 VII 或凝血因子 VII 相关多肽,其中 99％以上的寡糖链包含至少一个唾液酸残基且 (a) 所述唾液酸残基仅以 α 2->3 构型连接和 / 或 (b) 具有与核心 N- 乙酰葡糖胺连接的岩藻糖残基和 / 或 (c) 可检测的数量的天线止于 N- 乙酰半乳糖胺。在一个实施方案中,本发明涉及含有野生型凝血因子 VIIa 的制剂,所述因子中,99％以上的寡糖链包含至少一个唾液酸残基且该唾液酸残基与半乳糖仅以 α 2->3 构型连接。在另一实施方案中,本发明涉及包含野生型凝血因子 VIIa 的制剂,所述因子中,99％以上的寡糖链包含至少一个唾液酸残基且至少部分寡糖链包含 N- 乙酰半乳糖胺。本发明不涉及从人血浆中分离出来并且未通过用糖苷酶处理而回体 (ex vivo) 修饰的野生型凝血因子 VII 或野生型凝血因子 VIIa。

[0110] 在一个实施方案中,凝血因子 VIIa 制剂包含下述寡糖链,其有单个岩藻糖以 α 1->3 构型与 N- 乙酰葡糖胺连接。在另一实施方案中,凝血因子 VIIa 制剂包含下述寡糖链,其具有以 α 1->3 构型与双天线寡糖的每一天线 N- 乙酰葡糖胺残基连接的岩藻糖残基 (唾液酸 Lewis X 结构)。在另一实施方案中,凝血因子 VIIa 制剂包含下述寡糖链 :(i) 具有与核心 N- 乙酰葡糖胺连接的岩藻糖,和 (ii) 具有以 α 1->3 构型与一个天线式 N- 乙酰葡糖胺连接的单个岩藻糖。在另一实施方案中,凝血因子 VIIa 包含以下寡糖链 :(i) 具有与核心 N- 乙酰葡糖胺连接的岩藻糖,和 (ii) 具有以 α 1->3 构型与双天线寡糖的每一天线式 N- 乙酰葡糖胺连接的岩藻糖残基。

[0111] 在实施本发明时,N- 连接的寡糖的模式可以用本领域任何已知方法确定,如 :高效液相层析 (HPLC) ;毛细电泳 (CE) ;核磁共振 (NMR) ;利用诸如高速粒子 (fast-atom) 轰击或电喷射等离子化技术,或基质辅助激光解析 (MALDI) 进行的质谱分析 (MS) ;气相色谱 (GC) ;以及用外切糖苷酶进行处理并结合阴离子交换 (AIE)-HPLC,大小排阻层析 (SEC), 或 MS。 参 见, 例 如 Weber 等, Anal.Bio-chem.225:135(1995) ;Klausen 等, J.Chromatog.718:195(1995) ;Morris 等, in Mass Spectrometry of Biological Materials,McEwen 等 编 ,Marcel Dekker,(1990),pp 137167 ;Conboy 等, Biol.Mass Spectrom.21:397,1992 ;Hellerqvist,Meth.EnzymoL 193:554(1990) ;Sutton 等, Anal. Biohcem.318:34(1994) ;Harvey 等, Organic Mass Spectrometry 29:752(1994)。

[0112] 在用上述任一种方法 (或能分辨具有不同结构的寡糖链的其它任何方法) 分辨

出凝血因子 VII- 衍生的寡糖链之后，可将分辨出的种类分配到上述 (i)-(v) 中。将上述 (i)-(v) 中每一种的相对含量计算为，被分配到该组的寡糖总量相对于样品中寡糖链总含量的比率。

[0113] 例如，利用 AIE-HPLC 进行分辨时，可从 BHK 产生的重组凝血因子 VII 制剂中分辨出 13 个或更多个 N- 连接型寡糖峰，例如，参见 Klausen 等，Mol. Biotechnol. 9:195, 1998。其中 5 个峰（在 Klausen 等人的文章中命名为 1-5）不包含唾液酸，有 8 个峰 (6, 7, 和 10-15) 包含唾液酸。

[0114] 可以理解，在具体的分析中，包含唾液酸的链和缺乏唾液酸的链的数量和分布取决于 (a) 所要表达的多肽；(b) 细胞类型和培养条件；以及 (c) 所采用的分析方法，而且所得到的模式也会因此有所不同。

[0115] 任何情况下，一旦将含有唾液酸的寡糖与不含唾液酸的寡糖分辨清楚，就可以用常规数据分析程序来计算每一峰以下的面积；总的峰面积；以及具体的峰占总峰面积的百分比。如此一来，对于给定的制剂而言，含唾液酸的峰的总面积 / 总的峰面积 ×100 就是本发明制剂的 % 唾液酸化值（即，具有至少一个唾液酸残基的寡糖链的比例）。用类似的方法可以计算不具有唾液酸或至少有一个半乳糖或 N- 乙酰葡糖胺的链的百分比。

[0116] 制备具有预定的 N 连接型寡糖模式的凝血因子 VII 制剂的方法

[0117] 具有预定的 N- 连接型寡糖模式的凝血因子 VII、凝血因子 VII 变体、或凝血因子 VII 相关多肽的制剂，可以用表达凝血因子 VII 或凝血因子 VII 相关多肽的任何合适的宿主细胞来产生。

[0118] 宿主细胞：在一些实施方案中，宿主细胞是表达内源性凝血因子 VII 基因的人类细胞。在这些细胞中，所述内源基因可以是完整的或者可以被原位修饰，或者凝血因子 VII 基因以外的一种序列可以被原位修饰，使该内源性凝血因子 VII 基因的表达被改变。可以使用任何能表达内源性凝血因子 VII 基因的人类细胞。

[0119] 在其它实施方案中，异源宿主细胞经过改造后能由重组基因表达人凝血因子 VII。所述宿主细胞可以是脊椎动物、昆虫或真菌的细胞。优选所述细胞是能表达哺乳动物的 N- 连接型糖基化；O- 连接型糖基化；和 γ- 羧基化的所有形式的哺乳动物细胞。参见，例如美国专利 4,784,950。优选的哺乳动物细胞系包括 CHO (ATCC CCL 61), COS-1 (ATCC CRL 1650), 幼年仓鼠肾细胞 (BHK) 和 HEK293 (ATCC CRL 1573；Graham 等，J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977) 细胞系。优选的 BHK 细胞系是 tk ts13 BHK 细胞系 (Waechter 和 Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1106-1110, 1982)，后文称 BHK 570 细胞。BHK 570 细胞系可从美国典型培养物保藏中心，12301Parklawn Dr., Rockville, MD 20852 获得，其 ATCC 保藏号为 CRL 10314。tk ts13BHK 细胞系也可以选用 ATCC CRL 1632。还可使用其它多种细胞系，包括大鼠 Hep I（大鼠肝细胞癌；ATCC CRL 1600)，大鼠 Hep II（大鼠肝细胞癌；ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), 人肺 (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1) 和 DUKX 细胞 (CHO 细胞系）(Urlaub 和 Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980)。(DUKX 细胞也称为 CXB11 细胞），和 DG44 (CHO 细胞系）(Cell, 33:405, 1983，和 Somatic Cell and Molecular Genetics 12:555, 1986)。也可以使用 3T3 细胞，Namalwa 细胞，骨髓瘤以及骨髓瘤与其它细胞的融合体。在一个特别优选的实施方案中，宿主细胞是已经适应了在没有血清的条件下生长、并已经经过改造能表达凝血

因子 VII 的 BHK 21 细胞。在一些实施方案中，所述细胞可以是表达糖基化酶（糖基转移酶和 / 或糖苷酶）的突变细胞或重组细胞，但其表达的量或质量不同于天然表达这些酶的细胞类型。所述细胞也可以被改造为表达其它异源肽或蛋白，包括，如截短型凝血因子 VII。

[0120] 在一个实施方案中，宿主细胞是下述 CHO 细胞，其经过改造可以共表达所需凝血因子 VII 多肽（即，凝血因子 VII 或凝血因子 -VII 相关多肽）和另一种异源肽或多肽，如修饰酶或凝血因子 VII 片段。

[0121] 方法：本发明涉及制剂制备方法，所述制剂包含上述 (i)-(vi) 的任一种糖基型模式，在进一步的实施方案中，本发明涉及使凝血因子 VII 和凝血因子 VII 相关多肽的糖基型分布最优化的方法。这些方法包括以下步骤：

[0122] (a) 在第一组预定的培养条件下培养能表达凝血因子 VII 或凝血因子 VII 相关多肽的细胞；

[0123] (b) 从上述培养中回收凝血因子 VII 或凝血因子 VII 相关多肽，以获得包含这些多肽的制剂；和

[0124] (c) 分析与这些多肽连接的寡糖的结构，从而确定糖基型模式。

[0125] 所述方法还包括：

[0126] (d1) 改变步骤 (a) 的培养条件，得到第二组预定的培养条件；

[0127] (e1) 重复步骤 (b)-(d1)，直至获得所需的糖基型模式。

[0128] 或者，所述方法还包括

[0129] (d2) 对所述制剂进行化学处理和 / 或酶处理，以改变寡糖的结构；和

[0130] (e2) 重复步骤 (b)-(d2)，直至获得所需糖基型模式。

[0131] 这些方法可能还包括，使具有预定糖基型模式的制剂接受至少一种有关生物活性（包括，如凝血活性，使凝血因子 X 裂解的活性，或 TF 结合的活性）或其它功能（如动力学谱或稳定性）的检验，并将具体的糖基型模式与具体的生物活性或功能特性相关联，从而鉴定出所需糖基型模式。

[0132] 步骤 (d1) 中可能被改变的培养条件包括，但不限于：细胞来源，如来自不同于起始物种的另一物种；或突变细胞或重组细胞，它们在糖基化机制中的一或多种糖基转移酶或糖苷酶或其它成分中具有改变（参见，Grabenhorst 等，Glycoconjugate J. 16:81, 1999；Bragonzi 等，Biochem. Biophys. Acta 1474:273, 2000；Weikert, Nature Biotechnol. 17:1116, 1999）；多肽的表达水平；代谢条件，如葡萄糖或谷氨酰胺浓度；有或无血清；维生素 K 的浓度；蛋白水解物，激素，痕量金属，盐以及诸如温度、溶氧量和 pH 等参数。

[0133] 步骤 (d2) 中可能用于改变制剂的寡糖模式的酶处理包括，但不限于，依次用一或多种唾液酸酶（神经氨酸酶），半乳糖苷酶，岩藻糖苷酶；半乳糖基转移酶，岩藻糖基转移酶，和 / 或唾液酸转移酶，在能使具有特定末端结构的寡糖链的分布发生所需改变的条件下，进行处理。糖基转移酶可以购自 Calbiochem(La Jolla, CA)，糖苷酶可以购自 Glyko, Inc., (Novato, CA)。

[0134] 在一系列实施方案中，表达凝血因子 VII 或相关多肽的宿主细胞在特定的培养条件下培养，所述条件能使所述细胞分泌具有所需寡糖结构的所需模式的糖基化凝血因子 VII 多肽，如上述 (i)-(vi) 任一项所述。这样的培养条件包括，但不限于，血清减量或

完全缺乏。优选宿主细胞经过适应后能在无血清的条件下生长，并且是在生长期和生产期都缺乏血清的条件下培养。对这类适应过程的描述参见 Scharfenberg 等，Animal Cell Technology Developments towards the 21St Century, E.C. Beuvery 等（编），Kluwer Academic Publishers, pp. 619-623, 1995（BHK 和 CHO 细胞）；Cruz, Biotechnol Tech. 11:117-120, 1997（昆虫细胞）；Keen, Cytotechnol. 17:203-211, 1995（骨髓瘤细胞）；Berg 等，Biotechniques 14:972-978, 1993（人类肾 293 细胞）。在一优选实施方案中，细胞培养基不含蛋白或分离自动物组织或动物细胞培养的任何成分。参见，例如以下实施例 1。一般情况下，除了常规成分以外，适于制备凝血因子 VII 的培养基包含 0.1-50mg/L 维生素 K，这是凝血因子 VII 中的谷氨酰胺残基发生 γ- 羧基化所必需的。

[0135] 在另一系列的实施方案中，本发明的糖基型是通过对凝血因子 VII 或凝血因子 VII 相关多肽的制剂中的 N- 连接型寡糖进行酶修饰和 / 或化学修饰而制备的。

[0136] 凝血因子 VII 制剂

[0137] 本文中，“凝血因子 VII 制剂”是指多种凝血因子 VII 多肽，凝血因子 VIIa 多肽，或凝血因子 VII 相关多肽，包括变体和化学修饰形式，它们已经从合成它们的细胞中被分离出来。

[0138] 将多肽从它们的细胞来源中分离可以用本领域已知的任何方法实现，包括，但不限于，从贴壁细胞培养物上取出包含所需产物的细胞培养基；离心或过滤以便除去未贴壁的细胞；等等。

[0139] 任选地，凝血因子 VII 多肽可以被进一步纯化。纯化可以用本领域任何已知方法实现，包括，但不限于，在诸如抗 - 凝血因子 VII 抗体柱上进行亲和层析（参见，例如 Wakabayashi 等，J. Biol. Chem. 261:11097, 1986；和 Thim 等，Biochem. 27:7785, 1988）；疏水相互作用层析；离子交换层析；大小排阻层析；电泳（如制备型等电聚焦 (IEF)），差异溶解（如硫酸铵沉淀），或提取等等。一般性描述参见，Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, New York, 1982；和 Protein Purification, J.-C. Janson 和 Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989。纯化后，制剂中可能含有总重量的约 10％以下、更优选约 5％以下、最优选约 1％以下的、来源于宿主细胞的非 - 凝血因子 VII 蛋白。

[0140] 凝血因子 VII 和凝血因子 VII 相关多肽可通过蛋白裂解性切割来活化，其使用凝血因子 XIIa 或其它具有胰蛋白酶 - 样特异性的蛋白酶，如凝血因子 IXa，激肽释放酶，凝血因子 Xa，和凝血酶。参见，例如 Osterud 等，Biochem. 11:2853 (1972)；Thomas，美国专利 4,456,591；和 Hedner 等，J. Clin. Invest. 71:1836 (1983)。或者，凝血因子 VII 可以因通过离子交换层析柱，如 Mono Q® (Pharmacia) 等而被活化。所得活化的凝血因子 VII 然后可以如下配制并给药。

[0141] 凝血因子 VII 制剂的功能特性

[0142] 本发明具有预定的寡糖模式的凝血因子 VII 多肽和凝血因子 VII 相关多肽的制剂，具有相对于参照制剂改进的功能特性。所述改进的功能特性可包括，但不限于 a) 物理特性，如保存稳定性；b) 药代动力学特性，如生物可利用度和半寿期；和 c) 在人体中的致免疫性。

[0143] 参照制剂是指与将要用于比较的本发明制剂包含相同的多肽、但具有不同的天冬

酰胺 - 连接型糖基化模式的制剂（如野生型凝血因子 VII 或具体变体或化学修饰形式）。例如，参照制剂通常包含一或多种以下糖基型模式：(i) 约 93％以下（如约 92％以下或约 90％以下）的寡糖链包含至少一个唾液酸残基；(ii) 至少约 6％（如至少约 7.5％或至少约 10％）的寡糖链不含任何唾液酸（即，为中性）；(iii) 至少约 10％（如至少约 12.5％或至少约 15％）的寡糖链包含至少一个末端半乳糖残基；(iv) 至少约 15％（如至少约 20％至少约 25％）的寡糖链包含至少一个 N- 乙酰半乳糖胺残基；(v) 至少约 25％（如至少约 30％或至少约 35％）的寡糖链包含至少一个未加帽的天线（即，包含至少一个末端半乳糖或 N- 乙酰半乳糖胺残基）；或 (vi) 基本上不可能检测到的（如约 0.2％以下）的天线式岩藻糖残基。

[0144] 凝血因子 VII 制剂的保存稳定性可以通过测定如下特性来评估：(a) 制剂在 25℃以干粉形式保存时，损失 20％的生物活性所需的时间；和 / 或 (b) 使制剂中凝血因子 VIIa 聚集物的比例加倍所需的时间。

[0145] 在一些实施方案中，在 25℃以干粉形式保存时，本发明的制剂损失 20％的生物活性所需的时间，比参照制剂发生同样现象所需的时间增加至少约 30％，优选至少约 60％，更优选至少约 100％。生物活性可以用以下任一种试验来测定：凝血试验、蛋白裂解试验、TF- 结合试验，或 TF- 非依赖性凝血酶生成的试验。

[0146] 在一些实施方案中，在 25℃以干粉形式保存时，本发明的制剂使聚集物加倍所需的时间比参照制剂增加至少约 30％，优选至少约 60％，更优选至少约 100％。聚集物的含量可通过在 Protein Pak 300SW 柱 (7.5x 300mm)(Waters,80013) 上进行凝胶渗透 HPLC 而确定，方法如下：将层析柱用洗脱液 A(0.2M 硫酸铵，5％异丙醇，用磷酸将 pH 调至 2.5，然后用三乙胺将 pH 调至 7.0) 平衡，然后加载 25μg 样品。用洗脱液 A 以 0.5ml/min 的流速洗脱 30min，检测 215nm 的吸光值。聚集物的含量用凝血因子 VII 聚集物的峰面积 / 所有凝血因子 VII（单体和聚集物）的峰的总面积来计算。

[0147] “生物可利用度”是指在凝血因子 VII 或凝血因子 VII 相关制剂给药后的预定时间点可检测到的给药剂量的比例。通常，生物可利用度如下检测：对动物给药约 25-250μg/kg 该制剂；在给药后的预定时间点获得血浆样品；和用凝血试验（或任何生物试验）、免疫分析或等效的试验中的一或多种试验测定样品中凝血因子 VII 或凝血因子 VII 相关多肽的含量。数据通常用 [凝血因子 VII] 对时间的图来表示，生物可利用度则表示为曲线下的面积 (AUC)。待测制剂的相对生物可利用度是指，待测制剂与参照制剂的 AUC 之比。

[0148] 在一些实施方案中，本发明的制剂具有参照制剂的生物可利用度的至少约 110％，优选至少约 120％，更优选至少约 130％，最优选至少约 140％。生物可利用度可以在任何哺乳动物物种中测定，优选狗，用于计算 AUC 的预定时间点从 10min 渐增至 8h。

[0149] “半寿期”是指凝血因子 VII 多肽或凝血因子 VII 相关多肽的血浆浓度从一个具体值减少至它的一半所需的时间。半寿期可以用测定生物可利用度的方法来测定。在一些实施方案中，本发明制剂比参照制剂的半寿期增加至少约 0.25h，优选至少约 0.5h，更优选至少约 1h，最优选至少约 2h。

[0150] 制剂的“致免疫性”是指该制剂给药至人体后，激发有害的体液和 / 或细胞免疫的能力。目前不清楚凝血因子 VIIa 多肽和凝血因子 VIIa 相关多肽能否在人体内激发可检测的免疫应答。但是在任何亚人群中，可能存在对具体给药蛋白敏感的个体。致免疫性可以

如下检测：用本领域已知的常规方法定量敏感个体中抗－凝血因子 VII 抗体和／或凝血因子 VII- 应答型 T- 细胞的存在。在一些实施方案中，本发明制剂对敏感个体的致免疫性为参照制剂对敏感个体的致免疫性的至少约 10％，优选至少约 25％，更优选至少约 40％，最优选至少约 50％。

[0151] 药用组合物和应用方法

[0152] 本发明制剂可用于治疗任何凝血因子 VII- 应答性综合征，如出血疾病，包括但不限于，因凝血因子缺乏所致的疾病（如血友病 A 和 B 或凝血因子 XI 或 VII 缺陷）；血小板减少症或 von Willebrand 病，或因凝血因子抑制剂所致疾病，或因任何原因所致过量出血。所述制剂还可以配合手术或其它创伤来给药，或给药至接受抗凝治疗的患者。

[0153] 包含本发明凝血因子 VII 相关多肽的制剂相对于野生型凝血因子 VII 的生物活性实质上减弱，它们可用作抗凝剂，用于例如正在接受血管形成术或其它有可能增加血栓或血管阻塞危险的手术的患者（如在再狭窄中发生的那样）。其它可以开出抗凝剂处方的临床指征包括，但不限于，深部静脉血栓，肺栓塞，休克，弥散性血管内凝血 (DIC)，与革兰氏阴性内毒素血症有关的肺或肾内纤维蛋白沉积，或心肌梗塞；急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)，系统性炎症应答综合征 (SIRS)，溶血性尿毒综合征 (HUS)，MOF，和 TTP。

[0154] 包含本发明凝血因子 VII 和凝血因子 VII 相关制剂的药用组合物，主要用于非胃肠道给药，从而进行预防性和／或治疗性处理。优选所述药用组合物通过非胃肠道途径给药，即，静脉给药，皮下给药或肌肉内给药。它们可以通过连续或脉动型 (pulsatile) 输注方式给药。

[0155] 药用组合物或配制剂包含本发明的制剂，其组合了，优选溶于，可药用载体，优选含水载体或稀释剂。有多种含水载体可以使用，如水，缓冲水，0.4％的盐水，0.3％的甘油等等。本发明的制剂也可以配制成用于运送或靶向损伤部位的脂质体制剂。脂质体制剂的一般性描述可参见美国专利 4,837,028、4,501,728, 和 4,975,282。所述组合物可以通过常规的已知灭菌技术灭菌。所得含水溶液可以包装备用或在无菌条件下过滤并冻干，冻干制剂可以在给药前与无菌水溶液混合。

[0156] 所述组合物可以包含可药用的辅助物质或添加剂，包括但不限于，pH 调节剂和缓冲剂和／或渗透压调节剂，如乙酸钠，乳酸钠，氯化钠，氯化钾，氯化钙等。

[0157] 这些配制剂中凝血因子 VII 或凝血因子 VII 相关多肽的浓度可以有很大差异（即，从 0.5％重量以下，通常为或至少约 1％重量至 15 或 20％重量），主要依据与所选的具体给药方式相应的流体体积、粘度等来选择。

[0158] 因此，用于静脉输注的典型药用组合物可包含 250ml 无菌 Ringer 溶液和 10mg 所述制剂。可以进行非胃肠道给药的组合物的真实制备方法为本领域已知或很明显，更详细的描述可参见 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1990)。

[0159] 包含本发明制剂的组合物可以为了预防性和／或治疗性处理的目的而给药。在治疗性处理中，组合物是给予如上所述的已经患病的受试者，给药量足以治愈、缓解或部分控制所述疾病及其并发症。足以完成这些目的的量就是“治疗有效量”。每种目的的有效量取决于疾病或损伤的严重性以及受试者的体重和总体状态。但一般情况下，有效量通常为约 0.05mg －约 500mg 制剂／日 /70kg 受试者，更常用的是约 1.0mg －约 200mg 制剂／日。可

以理解的是，能用常规试验确定合适的剂量，方法是构建关于值的矩阵，并测试该矩阵中的不同点。

[0160] 本发明制剂的局部运送，例如，局部应用，可以，例如通过喷射、灌注、双气囊导管(double balloon catheters)、支架、掺入脉管移植物或支架、用于包被气囊导管的水凝胶、或其它成熟的方法来进行。在任一种情况中，所述药用组合物应该提供足以有效治疗受试者的制剂量。

[0161] 本发明的药用组合物还可以包含其它生物活性制剂，如非-凝血因子VII-相关的凝血剂或抗凝剂。

[0162] 以下实施例旨在举例说明本发明，并非限制。

[0163] 实施例1：制备并分析具有改变的糖基型模式的凝血因子VII制剂

[0164] 用以下实验制备具有改变的糖基型模式的凝血因子VII制剂。

[0165] I. 制备：用编码凝血因子VII的质粒转化的BHK细胞系经过适应，能在没有血清的情况下在悬浮培养中生长。将所述细胞在旋转培养(spinner culture)中连续传代，随着细胞数的增加，体积因加入新培养基而逐渐增大。

[0166] 最后，将6L育种(seed)培养物接种至含有大孔Cytopore 1载体(Pharmacia)的100-升制备型反应器中，悬浮细胞因此被固定在所述载体上。将培养物维持在36℃、pH 6.7-6.9和50％的DO中。随着细胞数的增加，制备型反应器中的体积因加入新培养基而逐渐增大。当细胞密度达到约2×10^6细胞/ml时，开始进入生产期，每24小时更换培养基：终止搅拌，使含有细胞的载体沉降，然后收获80％的培养上清，代之以新的培养基。所收获的培养上清经过滤除去未被捕获的细胞和细胞残渣，然后转移以备进一步加工。

[0167] 在生产期，细胞达到3-6$\times10^6$细胞/ml，滴度为2-7mg凝血因子VII/升。

[0168] II. 对重组凝血因子VII的糖基型模式的分析

[0169] 比较以下制剂的寡糖模式：(a)第I部分中所述的重组凝血因子VII制剂(n＝7)；以及两种参照制剂；(b)在有牛血清的情况下于BHK细胞中产生的重组凝血因子VII制剂(n＝10)；和(c)从人血浆纯化得到的凝血因子VII制剂。

[0170] 所述多肽经过化学切割(肼解作用，使用GlycoPrep1000设备，Oxford GlycoSciences)或酶切割(N-糖苷酶F，如来自Boehringer Mannheim)而释放N-连接型寡糖。将所释放的寡糖用2-氨基苯甲酰胺进行标记(使用单个标记试剂盒，K-404，Oxford Glyco-Sciences或Glyko)。被标记的寡糖在配有保护柱(4x50mm，Dionex，P/N 43054)的CarboPac PA100柱(4x250mm，Dionex，P/N 43055)上通过阴离子交换HPLC进行分析。该柱用150mM氢氧化钠平衡，用0-150mM乙酸钠的梯度、150mM氢氧化钠来洗脱。寡糖用荧光来检测，激发波长为330nm，发射波长为420nm。

[0171] 各种凝血因子VII的寡糖结构(Klausen等，1998)的相对含量用阴离子交换HPLC分析中糖峰的相对峰面积来计算。根据每种寡糖的结构元素，将其如下分配：(i)包含至少一个唾液酸的链；(ii)缺乏任何唾液酸(即，中性)的链；(iii)含有至少一个半乳糖残基的链；(iv)含有至少一个末端N-乙酰半乳糖胺残基的链；和(v)含有至少一个未加帽的天线(即，至少一个末端半乳糖或N-乙酰半乳糖胺残基)的链。最后，分配至每一组的寡糖链的相对含量的总和用总寡糖链的百分比来计算。测定值的标准差为0.08％(一天内的差异)；0.7％(不同天之间的差异)；和0.5％(1-100μg间隔)。

[0172] 所得糖基型模式见下表：

[0173]

	(i)	(ii)	(iii)	(iv)	(v)
a	93.1-98.7	1.3-6.9	5.9-16.4	5.9-8.7	11.7-23.9
b	88.3-92.5	7.5-12.9	9.4-16.8	19.0-28.6	30.1-39.0
c	99.5％	＜0.5％	2-3％	0％	2-3％

[0174] 本实施例所得重组凝血因子 VII 制剂（即，在不含血清的情况下所得）具有不同于有血清的情况下所制备的重组凝血因子 VII 以及从人血浆中分离的天然凝血因子 VII 的糖基型模式。在无血清的情况下制备的重组凝血因子 VII，其寡糖的唾液酸化程度高于在有血清的情况下所得，并且其包含更少的中性链和更少的末端半乳糖或 N- 乙酰半乳糖胺。

[0175] III. 生物可利用度：

[0176] 以下实验用来比较上述 (I 和 II) 制备的两种凝血因子 VII 制剂与两种参照凝血因子 VII 制剂（即，在有血清的情况下制备的制剂）(A 和 B) 的生物可利用度。

[0177] 以 N- 甘氨酰甘氨酸缓冲液 (pH 7.4) 中 25μg/kg（～ 100μg/ 大鼠）的剂量，对多个动物组（每组 8 只大鼠）给药试验制剂或参照制剂，所述缓冲液含有氯化钠 (7.87mg/ml)，二水氯化钙 (1.48mg/ml)，甘露醇 (2.5mg/ml) 和 polysorbate 80。在给药后的 10min 和 30min 时取血样。从血样中获得血浆，用 ELISA 定量凝血因子 VII。根据 10 和 30-min 所取样品得到凝血因子 VII 的血浆浓度曲线，每一样品的生物可利用度表示为该曲线以下的经剂量调整的面积 ($AUC_{10\ 30}$/ 剂）。相对生物可利用度表示为试验样品和参照样品的平均 $AUC_{10\ 30}$/ 剂 ×100 的比例。相对生物可利用度的 90％置信限根据不同制剂之间的差异的 90％置信限来计算。

[0178] 结果见下表。（如上述测得的每一制剂的唾液酸化百分比示于括号中）。

[0179]

测试	参考	相对生物可利用度	90％置信下限	90％置信上限
I(97.5％)	A(93％)	128.6	116.1	141.1
1(97.5％)	B(86％)	154.9	141.2	168.5
II(96.7％)	A 93％	117.3	104.8	129.8
II(96.7％)	B(86％)	141.2	127.5	154.8

[0180] 结果表明，即使具有至少一个唾液酸残基的寡糖链所占比例只有很小的差异，例如 93％与 96 或 97％之间这样的差异，也可以显著影响生物可利用度（增加 20-30％）。更有甚者，唾液酸化百分比增加 10％将导致生物可利用度增加 40-50％。

[0181] 实施例 2：对具有改变的糖基型模式的凝血因子 VII 制剂进行分析

[0182] 如实施例 1 所述制备凝血因子 VII，不同的是从 500-1 培养物中收获凝血因子 VII。如实施例 1 所述进行糖基型分析。分析了三种不同的制剂 (A, B, 和 C)，并将它们与参

照制剂 (D) 比较。

[0183] 生物可利用度在犬模型中如下测定 :将 12 只 Beagle 犬分为 4 组,进行四肢交叉研究。以 N- 甘氨酰甘氨酸缓冲液 (pH 5.5) 中约 90 μg/kg 的剂量,对每一动物给药试验制剂 A,B,或 C,或者给药参照制剂 D,所述缓冲液含有氯化钠 (2.92mg/ml),二水氯化钙 (1.47mg/ml),甘露醇 (30mg/ml) 和 polysorbate 80。在给药后的 10,30, 和 60 分钟时以及 2,3,4,6 和 8 小时之时取血样。从这些血样中获得血浆,用 ELISA 定量凝血因子 VII。

[0184] 每一样品的生物可利用度表示为凝血因子 VII 的血浆浓度曲线以下的经剂量调整的面积 (AUC/ 剂)。相对生物可利用度表示为试验制剂和参照制剂的平均 AUC/ 剂 ×100 的比例,并计算相对生物可利用度的 90% 置信限。

[0185] 结果见下表。如上述测得的每一制剂的唾液酸化百分比示于括号中。

[0186]

Test	参照	相对生物可利用度	90% 置信下限	90% 置信上限
A(98.7%)	D(88.2%)	144	135	153
B(95.9%)	D(88.2%)	127	119	136
C(93.1%)	D(88.2%)	112	105	120

[0187] 结果表明,即使具有至少一个唾液酸残基的寡糖链所占比例只有很小的差异,也可以显著影响凝血因子 VII 的生物可利用度。更有甚者,唾液酸化百分比增加 10% 将导致生物可利用度增加 30-50%,且三种试验制剂以及参照制剂的线性关系非常接近。

[0188] 实施例 3: 具有改变的糖基型模式的凝血因子 VII 制剂

[0189] 以下实验用于制备具有改变的糖基型模式的凝血因子 VII 制剂。

[0190] I. 构建细胞系和制备凝血因子 VII :

[0191] 用于表达人 FVII 的质粒载体 pLN174 参见 Persson 和 Nielsen. 1996. FEBS Lett. 385:241-243)。简言之,它携带编码人 FVII 的 cDNA 核苷酸序列,其中包括在小鼠金属硫蛋白启动子控制之下的原肽 (用于转录所插入的 cDNA),以及在 SV40 早期启动子控制之下的小鼠二氢叶酸还原酶 cDNA(用作选择标记)。

[0192] 为了构建编码 γ- 羧基化识别序列的质粒载体,使用含有编码 FVII 的 cDNA 包括其原肽的克隆载体 (pBluescript II KS+, Stratagene)(pLN171)。(Persson 等 1997. J. Biol. Chem. 272:1991919924)。在所述编码 FVII 的 cDNA 中,于 FVII 原肽之后,用上述克隆载体经过反向 PCR- 介导的诱变插入一个编码终止密码子的核苷酸序列。模板质粒用 NaOH 处理使之变性,随后用 Pwo(Boehringer-Mannheim) 和 Taq(Perkin-Elmer) 聚合酶以及以下引物进行 PCR :

[0193] a)5'-AGC GTT TTA GCG CCG GCG CCG GTG CAG GAC-3'

[0194] b)5'-CGC CGG CGC TAA AAC GCT TTC CTG GAG GAG CTG CGG CC-3'

[0195] 所得混合物用 DpnI 处理,以便消化残余的模板 DNA,用所述 PCR 产物转化大肠杆菌 (Escherichia coli)。通过测序检测克隆中是否存在突变。将来自正确克隆的 cDNA 以 BamHI-EcoRI 片段的形式转移至表达质粒 pcDNA3(Invitrogen) 中。将所得质粒命名为 pLN329。用等量的 pLN174 和 pLN329 经 Fugene6 法 (Boehriner-Mannheim) 转染 CHO K1 细

胞 (ATCC CCl61)。转染体通过添加氨甲喋呤至 μM 并添加 G-418 至 0.45mg/ml 来进行筛选。通过有限稀释对汇集的转染体进行克隆，测定这些克隆的 FVII 表达。

[0196] 对一例高产克隆进行进一步克隆，选出在含有 10％胎牛血清的 Dulbecco- 改良型 Eagle 培养基中以 2.4pg/ 细胞 / 天的水平特异性表达 FVII 的克隆 E11。使该克隆在不含动物来源的成分的市售 CHO 培养基 (JRH Bioscience) 中适应无血清的悬浮培养。

[0197] 经过适应后的细胞在旋转培养中连续传代，随着细胞数的增加，体积因加入新培养基而逐渐增大。25 天后，将 6L 旋转培养物接种至 50- 升的生物反应器中。使所述细胞在该生物反应器中繁殖，随着细胞数的增加，体积因加入新培养基而逐渐增大。

[0198] 最后，将 50L 育种培养物接种至含有大孔 Cytopore 1 载体 (Pharmacia) 的 500- 升制备型反应器中，悬浮细胞因此被固定在所述载体上。将培养物维持在 36℃、pH 7.0-7.1 和 50％饱和的溶解氧张力 (Dissolved Oxygen Tension, DOT) 中。随着细胞数的增加，制备型反应器中的体积因加入新培养基而逐渐增大。当细胞密度达到约 10-12×10^5细胞 /ml 时，开始进入生产期，每 24 小时更换培养基：终止搅拌，使含有细胞的载体沉降，然后收获 80％的培养上清，代之以新的培养基。所收获的培养上清经过滤除去未被捕获的细胞 (即，未固定在载体上的细胞) 和细胞残渣，然后转移以备进一步加工。

[0199] 在生产期，细胞达到 2-3×10^7细胞 /ml，滴度为 8mg 凝血因子 VII/ 升。

[0200] II. 糖基型分析：

[0201] A. 将上述 (a) 所制备的凝血因子 VII 制剂的寡糖模式与下列进行比较：(b) 在有牛血清的情况下于 BHK 细胞中产生的重组凝血因子 VII 制剂；和 (c) 从人血浆纯化得到的凝血因子 VII 制剂。所用方法基本如实施例 1 所述。

[0202] 结果见下表。将寡糖如下分配：(i) 包含至少一个唾液酸的链；(ii) 缺乏任何唾液酸 (即，中性) 的链；(iii) 含有至少一个半乳糖残基的链；(iv) 含有至少一个末端 N- 乙酰半乳糖胺残基的链；和 (v) 含有至少一个未加帽的天线 (即，至少一个末端半乳糖或 N- 乙酰半乳糖胺残基) 的链。

[0203]

	(i)	(ii)	(iii)	(iv)	(V)
a	95.2	4.8	22.9	0.1	23.0
b	88.3-92.5	7.5-12.9	9.4-16.8	19.0-28.6	30.1-39.0

[0204]

c	99.5％	＜0.5％	2-3％	0％	2-3％

[0205] B. 将本实施例 (a) 中制备的 5 种不同凝血因子 VII 制剂的寡糖模式与下列进行比较：(b) 在有牛血清的情况下于 BHK 细胞中产生的重组凝血因子 VII 制剂；和 (c) 从人血浆纯化得到的凝血因子 VII 制剂。所用分析方法如实施例 1 所述。

[0206] 根据每种寡糖的结构元素，将其如下分配：(i) 包含至少一个唾液酸的链；(ii) 缺乏任何唾液酸 (即，中性) 的链；(iii) 含有至少一个与天线连接的岩藻糖的链。最后，每一组的寡糖链的相对含量的总和用总寡糖链的百分比来计算。测定值的标准差为 0.08％ (一天内的差异)；0.7％ (不同天之间的差异)；和 0.5％ (1-100 μg 间隔)。

[0207] 所得糖基型模式见下表：

[0208]

	(i)	(ii)	(iii)
a	89.0-97.9 %	2.1-11.0 %	6.3-21.3 %
b	88.3-92.5 %	7.5-12.9 %	0 %
c	99. 5 %	< 0.5 %	0 %

[0209] 实施例 1 制备的重组凝血因子 VII 制剂（即，在无血清的情况下由 CHO 细胞系产生的制剂）具有不同于有血清的情况下所制备的重组凝血因子 VII 以及从人血浆分离的天然凝血因子 VII 的糖基型模式。在无血清的情况下由 CHO 细胞系 282.4 产生的重组凝血因子 VII 包括以下结构，其中岩藻糖与天线连接，而两种参照制剂都没有这样的结构。纯化其中的两种结构，并通过如下方法进行鉴定：基质辅助激光解析电离 (ionization) 质谱分析，用键特异性岩藻糖苷酶进行处理，以及进行阴离子交换 HPLC，如上所述。结果，两种结构都包含唾液酸 Lewis x 结构，即，在唾液酸化的寡糖中，岩藻糖以 α 1->3 键与天线式 N- 乙酰葡糖胺连接。

[0210] III. 生物活性：

[0211] 分析本实施例制备的 5 种凝血因子 VII 制剂的：(a) 凝血酶的生成和 (b) 与组织因子 (TF) 的结合，并与在有血清的情况下于 BHK 细胞中产生的重组凝血因子 VII（参照）进行比较。下表显示糖基型模式（含唾液酸的寡糖链的百分比以及含岩藻糖式天线的寡糖链的百分比）与两种生物活性有关。

[0212]

凝血因子 VII	寡糖模式		凝血酶生成 (% 参照)	TF 结合 Kd (nM)
	唾液化百分比	岩藻糖化百分比		
1	98	6	125	2.8
2	94	13	123	2.0
3	93	14	126	1.8
4	88	16	145	3.3
5	86	21	158	2.8
参照	86-93	0	100	2.2-6.6

[0213] 结果表明，具有岩藻糖式天线的凝血因子 VII 制剂比缺乏岩藻糖式天线的凝血因子 VII 制剂具有较高的 TF- 非依赖性凝血因子 VII 活性（如凝血酶生成试验所示）。

[0214] 实施例 4：体外水解试验

[0215] 以下方法可用于分析凝血因子 VIIa 的生物活性。该试验在微滴板 (MaxiSorp, Nunc, 丹麦）中进行。将生色底物 D-Ile-Pro-Arg- 对硝基苯胺 (p-nitroanilide) (S-2288, Chromogenix, 瑞典）以终浓度 1mM 加入 50mM Hepes, pH 7.4 中的凝血因子 VIIa（终浓度 100nM）中，所述 Hepes 中还含有 0.1M NaCl, 5mM $CaCl_2$ 和 1mg/ml 牛血清白蛋白。用 SpectraMax 340 读板仪 (Molecular Devices, USA) 连续读取 405nm 处的吸光值。将 20 分钟保温期间的吸光值减去不含酶的空白孔的吸光值后，用于计算试验凝

血因子 VIIa 和对照凝血因子 VIIa 的活性比。

[0216] 实施例 5 :体外蛋白裂解试验

[0217] 以下方法可用于分析凝血因子 VIIa 的生物活性。该试验在微滴板 (MaxiSorp, Nunc, 丹麦) 中进行。将 100 μl 50mM Hepes, pH 7.4 中的凝血因子 VIIa(10nM) 和凝血因子 X(0.8 μM) 保温 15 分钟,所述 Hepes 中还含有 0.1M NaCl,5mM $CaCl_2$ 和 1mg/ml 牛血清白蛋白。然后,通过加入 50 μl 含 0.1M NaCl,20mM EDTA 和 1mg/ml 牛血清白蛋白的 50mM Hepes, pH 7.4 而终止凝血因子 X 的裂解。所产生的凝血因子 Xa 的量通过添加终浓度为 0.5mM 的生色底物 Z-D-Arg-Gly-Arg- 对硝基苯胺 (S-2765, Chromogenix, 瑞典) 来测量。用 SpectraMax™340 读板仪 (Molecular Devices, USA) 连续读取 405nm 处的吸光值。将 10 分钟保温期间的吸光值减去不含 FVIIa 的空白孔的吸光值后,用于计算试验凝血因子 VIIa 和对照凝血因子 VIIa 的蛋白裂解活性之比。

[0218] 本文引用的所有专利、专利申请以及参考文献都以其全文引入作为参考。

[0219] 本领域技术人员根据本说明书的上述详细描述,可以对本发明进行多种改动。这些显而易见的改动都包括在所附权利要求的范围内。