



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104411323 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 11

(21) 申请号 201380033402. 5

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2013. 03. 13

代理人 初明明 杨思捷

(30) 优先权数据

12165296. 0 2012. 04. 24 EP

13150575. 2 2013. 01. 09 EP

61/641439 2012. 05. 02 US

61/752614 2013. 01. 15 US

(51) Int. Cl.

A61K 38/37(2006. 01)

A61K 38/36(2006. 01)

A61P 7/04(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 12. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/055107 2013. 03. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/160005 EN 2013. 10. 31

(71) 申请人 诺和诺德 A/S (股份有限公司)

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 G. 博特 D. M. 卡普特 F. 罗德

J. 哈亚宁 K. 罗伊普斯托夫

L. 蒂姆 M. 佩特森 M. 克贾科

O. 维斯特奥森 P. 里斯拜诺拜

J. J. 汉森

权利要求书2页 说明书57页 附图8页

(54) 发明名称

适用于治疗血友病的药物组合物

(57) 摘要

本发明涉及适用于治疗血友病的药物组合物。

1. 包含 FVIII 分子的药物组合物在治疗血友病中的用途,其中所述 FVIII 分子包含长度为 100-400 个氨基酸的截短的 B 结构域,其中所述截短的 B 结构域的氨基酸序列源自 wt FVIII B 结构域氨基酸序列,和其中所述 FVIII 分子经皮下给予的生物利用度为至少 10%。

2. 权利要求 1 的 FVIII 分子,其中所述 B 结构域包含连接到 SEQ ID NO 1 中的 Ser 750 氨基酸残基的 O-聚糖。

3. 前述权利要求中任一项的 FVIII 分子,其中所述 FVIII 分子的氨基酸序列如 SEQ ID NO 3 所示。

4. 权利要求 1 的 FVIII 分子,其中所述 FVIII B 结构域的氨基酸序列选自:氨基酸 741-857 + 1637-1648;氨基酸 741-914 + 1637-1648;氨基酸 741-954 + 1637-1648;氨基酸 741-965 + 1637-1648;氨基酸 741-965 + 1637-1648;氨基酸 741-1003 + 1637-1648;氨基酸 741-1003 + 1637-1648;氨基酸 741-1020 + 1637-1648;氨基酸 741-1079 + 1637-1648;氨基酸 741-1206 + 1637-1648;氨基酸 741-1261 + 1637-1648;氨基酸 741-1309 + 1637-1648;氨基酸 741-914 + 1637-1648;氨基酸 741-954 + 1637-1648;氨基酸 741-968 + 1637-1648;氨基酸 741-1003 + 1637-1648;氨基酸 741-1018 + 1637-1648;氨基酸 741-1070 + 1637-1648;氨基酸 741-1230 + 1637-1648;氨基酸 741-1301 + 1637-1648;氨基酸 741-965 + 1637-1648;氨基酸 741-965 + 1637-1648;氨基酸 741-965 + 1637-1648;和氨基酸 741-965 + 1637-1648。

5. 前述权利要求中任一项的 FVIII 分子,其中至少一个半寿期延长部分与所述 FVIII 分子共价连接。

6. 前述权利要求中任一项的 FVIII 分子,其中至少一个水溶性聚合物与 B 结构域中存在的聚糖共价连接。

7. 权利要求 5-6 中任一项的 FVIII 分子,其中所述水溶性聚合物选自:PEG 和多糖。

8. 前述权利要求中任一项的药物组合物,其中所述组合物进一步包含 VWF 或 VWF 片段。

9. 权利要求 8 的药物组合物,其中所述 VWF 片段包含至多 1200 个氨基酸,和其中所述 VWF 片段包含 TIL' 结构域。

10. 权利要求 8-9 中任一项的药物组合物,其中所述 VWF 片段不含 1099 和 / 或 C1142 半胱氨酸。

11. 权利要求 8-10 中任一项的药物组合物,其中小于 5% 的所述 VWF 片段呈寡聚物和 / 或多聚体形式。

12. 权利要求 8-10 中任一项的药物组合物,其中所述 VWF 片段是二聚体。

13. 权利要求 8-12 中任一项的药物组合物,其中所述 VWF 片段的氨基酸序列选自:SEQ ID NO 4、SEQ ID NO 5、SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 7、SEQ ID NO 8、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 10、SEQ ID NO 11、SEQ ID NO 12、SEQ ID NO 13、SEQ ID NO 14、SEQ ID NO 15、SEQ ID NO 16、SEQ ID NO 17、SEQ ID NO 18、SEQ ID NO 19、SEQ ID NO 20 和 SEQ ID NO 21。

14. 权利要求 8-13 中任一项的药物组合物,其中 FVIII 和 VWF 的比例为 1:1。

15. 前述权利要求中任一项的药物制剂,其中 FVIII 浓度为至少 500 IU/ml。

16. 前述权利要求中任一项的药物制剂,其中与 VWF 片段结合的 FVIII 的量占所述制剂中的 FVIII 总量的至少 70%。

17. 前述权利要求中任一项的药物组合物在经皮下给予用于治疗血友病中的用途。
18. 权利要求 17 的药物组合物在经血管外给予用于治疗冯维勒布兰德氏病中的用途。

适用于治疗血友病的药物组合物

技术背景

[0001] 本发明涉及血友病的治疗和 / 或预防。

[0002] 背景

经静脉内给予凝血因子的蛋白质替代疗法目前用于治疗血友病患者。对于患者的方便性和依从性而言,血管外(例如,皮下(s. c.)或皮内)给药优于现有的静脉内(i. v.)注射。血管外给予还具有潜在的安全性优势,因为许多患者能够避免静脉内端口手术以及这类导管插入相关的感染和凝血风险。

[0003] 在FVIII缺乏的小鼠中经皮下给予FVIII,公开于Shi等人, Haemophilia, 2012, DOI :10. 1111/j. 1365-2516. 2011. 02735. x。FVIII的生物利用度在此文中据报告为低(大约1%)。

[0004] 经皮下给予FVIII和VWF另外公开于W008151817,但未公开FVIII剂量和所达到的循环FVIII浓度间的剂量反应关系。在W0815817中,VWF与FVIII的(单位)比率大于5:1,相当于VWF蛋白浓度比FVIII浓度有150-250倍摩尔过量。然而,从实践和经济上的观点看,这种类型的比例并不理想。在W008151817中,进一步证明了当将FVIII与VWF共同配制时,经皮下给予FVIII的小鼠的免疫原性明显降低。

[0005] 在W010062768中,公开了FVIII的聚乙二醇化可以改进经皮下注射给小鼠的FVIII的生物利用度,而与VWF共同配制却没有改进FVIII的生物利用度。

[0006] 本领域需要这样的化合物和 / 或药物组合物:其适用于经血管外给予,以在有或无抑制剂时治疗和 / 或预防患有凝血疾病例如A型血友病的患者,和 / 或治疗和 / 或预防患有冯维勒布兰德氏病的患者,因为这样的给予形式将会减轻经静脉内治疗的负担,这两者的静脉内治疗都同样涉及到输注并且也涉及到因植入便携式导管所致的感染风险。这样的化合物和组合物优选是安全的(即具有低的免疫原性风险)和 / 或具有高生物利用度和 / 或优选是在生产和配制过程中容易处理的。

[0007] 概述

本发明涉及包含FVIII分子的药物组合物在治疗血友病中的用途,其中所述FVIII分子包含长度为100-700个氨基酸的截短的B结构域,其中所述截短的B结构域的氨基酸序列源自wt FVIII B结构域氨基酸序列,和其中所述FVIII分子经血管外给予的生物利用度为至少20%。

[0008] 描述

本发明人惊奇地发现了以下观察结果:与例如具有整个B结构域完整的FVIII以及没有或仅有少数氨基酸(例如,15-30个氨基酸)的B结构域截短 / 缺失的FVIII分子相比,本发明的FVIII分子在经皮下给予时具有令人惊奇的高FVIII生物利用度。

[0009] 本发明的发明人还惊奇地发现了以下观察结果:当与VWF或VWF片段共同给予时可以改善本发明的FVIII分子经皮下的生物利用度。优选地,VWF应当呈VWF片段的形式,其包含TIL'结构域和任选地包含C1099和 / 或C1142半胱氨酸的氨基酸取代,以减少多聚体的形成。

[0010] 附图简述

图 1:在有或无共同给予相对于 N8-GP 而言的 7.7 倍摩尔剂量的 VWF TIL' /E' /D3/A1 时,在皮下给予 10000 U/kg “N8-GP”后,血浆中的 FVIII 活性。数据是在每一时间点来自 n=2 FVIII KO 小鼠的测量的平均值和标准差。“N8-GP”是如 W02009108806 的实施例 1+2 所述而制备的糖-聚乙二醇化 FVIII 分子。

[0011] 图 2:在有或无共同给予相对于 N8-GP 而言的 7.7 倍摩尔剂量的 VWF TIL' /E' /D3/A1 时,在皮下给予 10000 U/kg N8-GP 后,血浆中的 FVIII 抗原。数据是在每一时间点来自 n=2 FVIII KO 小鼠的测量的平均值和标准差。

[0012] 图 3:在有或无共同给予相对于 N8-GP 而言的 7.7 倍摩尔剂量的 VWF TIL' /E' /D3/A1 时,在皮下给予 2500 U/kg N8-GP 后,血浆中的 FVIII 活性。数据是在每一时间点来自 n=2 FVIII KO 小鼠的测量的平均值和标准差。

[0013] 图 4:在有或无共同给予相对于 N8-GP 而言的 7.7 倍摩尔剂量的 VWF TIL' /E' /D3/A1 时,在皮下给予 2500 U/kg N8-GP 后,血浆中的 FVIII 抗原。数据是在每一时间点来自 n=2 FVIII KO 小鼠的测量的平均值和标准差。

[0014] 图 5:在有或无共同给予相对于 FVIII 而言的 7.7 倍摩尔剂量的 VWF TIL' /E' /D3/A1 时,在皮下分别给予 5000 或 20000 IU/kg wt FVIII (N8, turoctocog alfa) 后,血浆中的 FVIII 活性。数据是在每一时间点来自 n=2 FVIII KO 小鼠的测量的平均值和标准差。“N8”/“turocotog alfa”是如 W02009108806 的实施例 1 中所述而制备的 B 结构域截短的 FVIII 分子。

[0015] 图 6:在有或无共同给予相对于 FVIII 而言的 7.7 倍摩尔剂量的 VWF TIL' /E' /D3/A1 时,在皮下给予 5000 或 20000 IU/kg wt FVIII (N8, turoctocog alfa) 后,血浆中的 FVIII 抗原。数据是在每一时间点来自 n=2 FVIII KO 小鼠的测量的平均值和标准差。

[0016] 图 7:在有或无共同给予相对于 FVIII 而言的 7.7 倍摩尔剂量的 VWF TIL' /E' /D3/A1 时,在皮下给予 5000 IU/kg FVIII (N8, turoctocog alfa) 后,血浆中的 FVIII 抗原。数据是在每一时间点来自 n=2 FVIII KO 小鼠的测量的平均值和标准差。

[0017] 图 8:在有或无共同给予相对于 FVIII 而言的 7.7 倍摩尔剂量的 VWF TIL' /E' /D3/A1 时,在皮下给予 5000 IU/kg FVIII (N8, turoctocog alfa) 后,血浆中的 FVIII 活性。数据是在每一时间点来自 n=2 FVIII KO 小鼠的测量的平均值和标准差。

[0018] 图 9:在 20°C 与 FVIII (N8, turoctocog alfa) 结合的 VWF 片段 (764-865 SEQ ID NO 5)。上图面显示每次滴定后释放热量的原始数据。下图面显示得自积分原始数据的结合等温线。数据分析表明 VWF 片段 (SEQ ID NO 5) 在放热反应中与 FVIII 结合,其化学计量学为 1.14, ΔH 为 -5.82 kcal/mole, ΔS 为 9.8 cal/mol/deg 和 K_d 为 0.33 μM 。“F8/N8/turoctocog alfa”是如 W02009108806 的实施例 1 中所公开而制备的 B 结构域截短的 FVIII 分子。

[0019] 图 10:经皮下给予的 N8-GP 在体内能有效止血。左图面显示在尾巴横切前 24 小时经皮下 N8-GP 或溶媒治疗,或在尾巴横切前 5 分钟经静脉内治疗的 FVIII KO 小鼠中的血液损失。N8-GP”是如 W02009108806 的实施例 1+2 中所述而制备的糖-聚乙二醇化 FVIII 分子。右图面显示在来自小鼠离体全血中的凝血时间,使用 ROTEM。

[0020] 图 11:在 25°C, FVIII、TIL' /E' /D3/A1 III、以及 FVIII 和 TIL' /E' /D3/A1 III

的混合物在 155 mM NaCl、10 mM 乙酸钙、10 % 异丙醇中的 SEC-UV (280 nm) 色谱图。

[0021] 图 12: 在 25°C, FVIII、TIL' /E' /D3 II、以及 FVIII 和 TIL' /E' /D3 II 的混合物在 155 mM NaCl、10 mM 乙酸钙、10% 异丙醇中的 SEC-UV (280 nm) 色谱图。

[0022] 定义

本文使用的术语“治疗”指任何有需要的人或其他脊椎动物受试者的医学治疗。预期所述受试者已经历医生或兽医进行的身体检查, 医生或兽医已给出试验性或明确的诊断, 表明使用所述特定治疗对治疗所述人或其他脊椎动物的疾病有益。根据受试者健康状况, 所述治疗的时机和目的可因个体的不同而异。因此, 所述治疗可以是预防性的、缓和性的、对症的和 / 或治愈性的。

[0023] 给药方式: 本发明的化合物和药物组合物可经胃肠外给予, 例如, 经静脉内或血管外 (例如, 皮内、肌内、皮下等) 给予。本发明的化合物和药物组合物可以是预防性和 / 或治疗性地给予和 / 或按需要给予。根据本发明, 血管外给予本发明的化合物 / 药物组合物具有若干优势。血管外给予对所有患者的可能益处、尤其是对儿童和小婴儿的特定益处是, 更容易、简单, 更少疼痛, 更少麻烦和并发症 (并因此可能带来较好的依从性)。有可能避免导管手术并且有可能使用更方便的药盒和装置, 用于使用血管外给药途径来给予产品。

[0024] 联合治疗 / 共同给予: 可以以许多不同方式完成两种或更多种活性化合物 (例如, 本发明的 FVIII 分子和具有与 FVIII 结合能力的 VWF (例如, VWF 片段)) 的联合给予。在一个实施方案中, 两种活性化合物可以在单个组合物中一起给予。在另一个实施方案中, 两种活性化合物可以在单独组合物中给予, 作为联合治疗的组成部分。例如, 第一种化合物可以在第二种化合物之前、之后或同时给予。在 FVIII 和 VWF 作为两种单独的药物组合物经血管外 (例如, 皮下) 给予的情况下, 它们优选地是靠近地给予, 以便得益于这两种类型的化合物同时给予时所获得的改进的生物利用度 (即注射部位应当间隔不超过 5 cm、优选地不超过 4 cm、优选地不超过 3 cm、优选地不超过 2 cm 和最优选地不超过 1 cm)。两种化合物还应当优选地在大约 1 小时内、优选大约 30 分钟内、优选大约 15 分钟内、和最优选地大约 5 分钟内注射。

[0025] 因子 VIII: 因子 VIII (FVIII) 是主要由肝细胞产生的大的复杂糖蛋白。人 FVIII 的序列编码 2351 个氨基酸, 包括信号肽, 并包含若干个不同的结构域, 如通过同源性所限定。有 3 个 A- 结构域、1 个唯一的 B- 结构域和 2 个 C- 结构域。结构域顺序可列为 NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH。通过二价金属离子结合将链连接在一起。A1-A2-B 链命名为重链 (HC), 而 A3-C1-C2 命名为轻链 (LC)。A1 (a1 区) 和 A2 (a2 区) 的小的酸性区 C- 末端和 A3 结构域的 N- 末端 (a3 区) 在其与其它凝血蛋白质的相互作用中起到重要作用, 所述其它凝血蛋白质包括凝血酶和冯维勒布兰德因子 (von Willebrandt Factor) (VWF), FVIII 的载体蛋白。

[0026] 内源 VIII 分子以具有不同尺寸的 B- 结构域的分子库 (最短的具有在位置 740 的 C- 末端, 即在 A2-a2 的 C- 末端, 并因此不含 B 结构域) 在体内循环。这些具有不同长度的 B 结构域的 FVIII 分子都具有全部促凝血活性。一旦用凝血酶活化, 在位置 372 的 A1-a1 的 C- 末端、在位置 740 的 A2-a2 的 C- 末端、和在位置 1689 的介于 a3 和 A3 之间切割 FVIII, 后一切割释放 a3 区, 同时失去对 VWF 的亲合力。活化的 FVIII 分子称为 FVIIIa。活化允许 FVIIIa 与磷脂表面样活化的血小板和活化的因子 IX (FIXa) 相互作用, 即形成 tenase 复合

物,允许有效活化因子 X (FX)。

[0027] 术语“因子 VIII(a)”和“FVIII(a)”包括 FVIII 和 FVIIIa 两者。同样,术语“因子 VIII”和“FVIII”可包括 FVIII 和 FVIIIa 两者。本文使用的“因子 VIII”或“FVIII”是指作为内在凝血途径的成员并对血液凝固必需的人血浆糖蛋白。“野生型(wt)/天然 FVIII”是源自如 SEQ ID NO:1 (氨基酸 1-2332) 所示的全长序列的人 FVIII 分子。“FVIII(a)”包括可以在个体之间存在并出现的 FVIII(a) 的天然等位变体。本发明的 FVIII 分子优选是经重组产生的,使用众所周知的生产和纯化方法。糖基化、酪氨酸硫酸化和其它翻译后修饰的程度和位置可以随所选择的宿主细胞及其生长环境的不同而变。

[0028] 本发明的药物组合物可包含这样的 B 结构域-截短的 FVIII 分子:其中剩余结构域接近相当于如 SEQ ID NO:3 的氨基酸编号 1-740 和 1649-2332 所示的序列。在这类分子中,可以引入突变。可将氨基酸修饰例如取代、插入和缺失引入分子中,以便修饰 FVIII 与多种其他组分的结合能力,所述多种其他组分例如低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP)和相关受体、多种其他受体、其他凝血因子、细胞表面、糖基化位点的引入和/或取消等。不取消 FVIII 活性的其它突变也可在本文的 FVIII 分子中提供。

[0029] 本发明的 FVIII 分子(分子/变体/衍生物/类似物/缀合物)在凝血级联中能够起作用,其方式在功能上类似于或等同于 wt/内源 FVIII,导致 FXa 的形成(经由与活化血小板上的 FIXa 相互作用)和支持血凝块的形成。可使用本领域众所周知的技术,在体外评价 FVIII 活性。凝血分析、FX 活化测定法(通常称为显色测定法)、凝血酶产生测定法和全血血栓-弹性成像是这类体外技术的实例。本发明的 FVIII 分子具有的 FVIII 活性是天然人 FVIII 的至少大约 10%、至少大约 20%、至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50%、至少大约 60%、至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90%、100% 或甚至超过 100%。

[0030] 将内源全长 FVIII 合成为单链前体分子。在分泌之前,将前体切割为重链和轻链。可从两种不同的策略产生重组 B 结构域缺失或截短的 FVIII。将无 B-结构域的重链和轻链单独合成为两条不同的多肽链(两条链策略),或将 B-结构域缺失或截短的 FVIII 合成为单一前体多肽链(单条链策略),其以与全长 FVIII 前体相同的方式被切割为重链和轻链。

[0031] 在经单条链策略产生的 B 结构域缺失或截短的 FVIII 前体多肽中,通常通过接头分开重链和轻链部分。为了使在本发明的 B 结构域缺失/截短的 FVIII 中导入免疫原性表位的风险最小化,接头的序列优选来源于 FVIII B 结构域。在全长 FVIII 的 B 结构域中,氨基酸 1644-1648 组成该识别位点。在 B 结构域缺失的 FVIII 活化时导致接头移除的凝血酶切割位点位于重链中。因此,接头的尺寸和氨基酸序列不太可能影响通过凝血酶活化将其从残余 FVIII 分子中移除。B 结构域的缺失/截短对于产生 FVIII 是有利的。然而,可在接头中包含部分 B 结构域而不降低生产能力。B 结构域对生产能力的负面效应不能归因于 B 结构域的任何特定尺寸或序列。

[0032] SEQ ID NO:1:wt 人 FVIII (Ser750 残基以黑体显示)

ATRRYYLGAVELSDYMQSDLGELPVDARFPVRPKSFPFNTSVVYKKT⁷⁵⁰LFVEFTDHLFNI⁷⁵⁰AKPRPPWMGLL
GPTIQAEVYD⁷⁵⁰TVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFP⁷⁵⁰GGSH⁷⁵⁰TYVWQVLKENGPMAS
DPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASAR
AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDL
GQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD⁷⁵⁰DDNSPSFIQIRSVAKKHPK

TWVHYIAAEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEV
GDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYS
SFVNMERDLASGLIGPLLI CYKESVDQRGNQIMSDKRNVI LFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQAS
NIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLW
ILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSSQNSRHPSTRQKQFNATTIPEND
IEKTDPWFHARTPMPKI QNVSSDDLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNLSMETHFRPQLH
HSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTAAATELKKLDFKVSSTSNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDT
TLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENDSKLLSGLMNSQESSWGKNVSTESGRLFKGKRAHGPAALLTKDNALFKVVIS
LLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNI LESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTSSKN
MEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKV
VVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNFLTNLDNLHENNTHNQEKKI QEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNL
FLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQ
NFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIP
QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQRE
VGS LGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTS GKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKW
NEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWSQEKSPKTAFFKKKDTILSLNACESNHAI AA
INEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPVLKRHRQREITRRTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPR
SFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPQFKKVVFQEFDTGDSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAE
VEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLSIYEEDQRQGAEPKRFVKPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCAWAYFSDVDL
EKDVHSGLIGPLL VCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHA
INGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWR
VECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVD
LLAPMI IHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRL
HPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKE
WLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRY
LRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

FVIII 的 B 结构域跨越 SEQ ID NO :1 的氨基酸 741-1648。B- 结构域在若干不同位点上被切割,在循环的血浆 FVIII 分子中产生大的异质性。高度糖基化的 B- 结构域的确切功能未知。所知道的是 B 结构域在凝血级联中对 FVIII 活性是非必要的。因此经常以 B 结构域缺失 / 截短的变体形式产生重组 FVIII。例如,可由表达载体产生 FVIII 分子,所述载体编码具有以下序列的 21 个氨基酸残基 L (接头) 序列 :SEQ ID NO 2 :SFSQNSRHPSQNPVLKRHRQ (0- 聚糖连接到下划线的 S)。优选的本发明的 FVIII 分子是 B 结构域缺失 / 截短的变体,其包含连接到 SEQ ID NO 1 中的 Ser 750 残基的 0- 聚糖,任选经由该 0- 聚糖缀合到聚合物 (半寿期延长) 部分上。

[0033] 本发明的发明人惊奇地发现了以下观察结果 :与例如具有整个 B 结构域完整的 FVIII 以及没有或仅有少数氨基酸 (例如,15-30 个氨基酸) 完整的 FVIII 分子相比,本发明的具有以下长度的 B 结构域的 B 结构域缺失 / 截短的 FVIII 分子当经血管外 (例如皮下) 给予时,具有惊人高的生物利用度 : 大约 100 至大约 700 个氨基酸 ((优选 150-650、更优选 150-600、更优选 150-550、更优选 150-500、更优选 150-450、更优选 150-400、更

优选 150-350、更优选 200-700、更优选 200-600、更优选 200-500、更优选 200-400、更优选 200-300、和最优选大约 200-250)。这样的分子可以包含或不包含 SEQ ID NO 1 的 Ser750 残基。因此提供了在皮下 / 皮内给予后具有改善的生物利用度的 FVIII 的简单而安全的生产方式。通过将所述分子与半寿期延长部分缀合 / 融合可延长本发明的 FVIII 分子的体内循环半寿期是似乎合理的。本发明的包含 226 个氨基酸的 B 结构域的 FVIII 分子的实例见 SEQ ID NO 3:

SEQ ID NO 3:(226 个氨基酸的 B 结构域分子):

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPVRPKSFPFNTSVVYKKTFLFVEFTDHLFNIAPRPPWMGLL
GPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMAS
DPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASAR
AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLLMDL
GQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPK
TWVHYIAEEEDWDYAPLVLPDDRYSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLYGEV
GDLLIIFKNQASRPYNIYPHGI TDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYS
SFVNMERDLASGLIGPLLI CYKESVDQRGNQIMSDKRNVI LFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQAS
NIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMYEDTLTLFPFSGETVFMSPENPGLW
ILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTIPEND
IEKTDPPWFAHRTMPKIQNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDQLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLH
HSGDMVFTPEGLQLRLNEKLGTAAATELKKLDFKVSSTNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDT
TLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNSKLLSGLMNSQESSWGKNVSHHHHHHSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEE
IDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPQFKKVVQEF
TDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLSYEEDQRQGAEPKRNFKPNETKTY
FWKVQHMAPTKDEFDCAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT
ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRI RWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKE
EYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQW
APKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI IHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTL
MVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPHTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMF
ATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQN
GKVVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

表 a: 本发明的 FVIII 分子的 B 结构域的实例。His- 标签是任选的并在化合物纯化 / 分离后可被移除。

化合物	B 结构域氨基酸	B 结构域中的 N-聚糖
F8-500E-His	741-857 + 1637-1648	3
F8-500L-His	741-914 + 1637-1648	4
F8-500M-His	741-954 + 1637-1648	5
F8-500D-His	741-965 + 1637-1648	6
F8-500G-His	741-965 + 1637-1648 氨基酸取代: N757Q-N784Q-N828Q-N900Q-N943Q-N963Q	0
F8-500N-His	741-1003 + 1637-1648	7
F8-500H-His	741-1020 + 1637-1648	8

F8-500I-His	741-1079 + 1637-1648	10
F8-500J-His	741-1206 + 1637-1648	11
F8-500F-His	741-1261 + 1637-1648	13
F8-500K-His	741-1309 + 1637-1648	15
	741-1394 + 1637-1648	16
F8-500-His2-4N	741-914 + 1637-1648	4
F8-500-His2-5N	741-954 + 1637-1648	5
F8-500-His2-6N	741-968 + 1637-1648	6
F8-500-His2-7N	741-1003 + 1637-1648	7
F8-500-His2-8N	741-1018 + 1637-1648	8
F8-500-His2-10N	741-1070 + 1637-1648	10
F8-500-His2-11N	741-1230 + 1637-1648	11
F8-500-His2-15N	741-1301 + 1637-1648	15
F8-500D-His-D519V-E1984A	741-965 + 1637-1648	6
F8-500D-His-C2 连接的 -(GGGS)6-hFc(IgG1)	741-965 + 1637-1648	6
F8-500D-His-C2 连接的 -(GGGS)6-mFc(IgG2a)	741-965 + 1637-1648	6
F8-500D-His-C2 连接的 -(GGGS)6-白蛋白	741-965 + 1637-1648	6
F8-500C	741-966 + 1637-1638 + 1648	6

[0034] 冯维勒布兰德因子 (VWF) 是涉及到止血的一种血液糖蛋白。在最常见的遗传性出血障碍冯维勒布兰德氏病中该因子缺乏或有缺陷。VWF 是存在于血浆中的大的多聚体糖蛋白, 在内皮、巨核细胞和内皮下结缔组织中组成型地产生。基本 VWF 单体是 2050 个氨基酸的蛋白。每个单体含有具有特定功能的许多特定结构域, 包括与 FVIII 结合的 TIL' 或 TIL' / E' 结构域 (Zhou 等人, Blood 2012 ;120 (2) :449-458)。FVIII 与 VWF 结合, 同时在循环中失活并通过凝血酶作用从 VWF 中释放。不与 VWF 结合的 FVIII (a) 被快速清除和 / 或降解。本文证明了, 全长 VWF 没有显著增加血管外共同给予的 FVIII 的生物利用度的能力, 尽管它具有固有的 FVIII 保护作用。

[0035] 因此全长 VWF 分子是非常复杂的蛋白质。前原 VWF (prepro VWF) 由 2813 个氨基酸残基 (SEQ ID NO 22) 组成。在分泌期间, 氨基酸残基 1-22 的信号肽和氨基酸残基 23-763 的前肽被切割, 得到 2050 个氨基酸残基的成熟 VWF。因此氨基酸编号通常是根据前原 VWF, 因此氨基酸 S764 是成熟分子中的第一个氨基酸。认为成熟分子含有 12 个 Asn- 连接的和 10 个 Thr/Ser 连接的寡糖侧链。此外该分子可以形成二聚体、三聚体等, 使得最终产物可由

2050 个氨基酸残基的数个单元组成,多聚体分子量至多达几百万道尔顿。在人体中已发现不同的等位 VWF 变体,因此可以理解,本发明的 VWF 片段可以源自这些天然发生的变体的任一个。

[0036] 对于全长 VWF 的药物组合物而言,全长分子的糖基化异质性,以及多聚体形成性能,使得构建表达系统和下游纯化过程颇具挑战性。

[0037] 对 VWF 中的组织和结构域边界的理解尚未完成。仅仅所谓 A 结构域被良好表征并测定了它们的晶体结构。VWF 内的二硫化物的化学安排是有限的。然而,近期对 VWF 中的结构域与其它蛋白中的结构域的同源性的研究表明可以形成若干二硫键。Zhou 等人, Blood 2012 ;120, 449-458 所述的 VWF 的结构域定义用于本文中。

[0038] VWF 片段比全长分子更容易产生。本文的 VWF 片段还更优选地具有增加经皮下共同给予的 FVIII 的生物利用度的能力。VWF 片段优选地包含 TIL' 结构域 / 亚结构域 (跨越 SEQ ID NO 22 的氨基酸 764-828 或 SEQ ID NO 22 的氨基酸 764-829) 或 TIL' /E' 结构域 / 亚结构域 (跨越 SEQ ID NO 22 的氨基酸 764-865) 并且尺寸小于 1500 个氨基酸、优选小于 1400 个氨基酸、优选小于 1300 个氨基酸、优选小于 1200 个氨基酸、优选小于 1100 个氨基酸、优选小于 1000 个氨基酸、优选小于 900 个氨基酸、优选小于 800 个氨基酸、优选小于 700 个氨基酸、优选小于 600 个氨基酸、优选小于 500 个氨基酸、优选小于 400 个氨基酸、优选小于 300 个氨基酸、优选小于 275 个氨基酸、优选小于 250 个氨基酸、优选小于 225 个氨基酸、优选小于 200 个氨基酸、优选小于 175 个氨基酸、优选小于 150 个氨基酸、优选小于 125 个氨基酸、优选小于 100 个氨基酸、优选小于 95 个氨基酸、优选小于 90 个氨基酸、优选小于 85 个氨基酸、或优选小于 80 个氨基酸。本文的 VWF 片段优选地包含 TIL' /E' /D3 结构域 (其中 D3 分为亚结构域 VWD3-C8-3-TIL-3-E3),其跨越 SEQ ID NO 22 的氨基酸 764-1250 或氨基酸 764-1261 或氨基酸 764-1268。本文的 VWF 片段优选地包含 TIL'、TIL' 或 TIL' /E' 结构域的至少 15 个 N-末端氨基酸 (SEQ ID NO 22 的氨基酸 764-778、764-828 或氨基酸 764-865)。VWF 片段还可以含有较少潜在抗原性区。VWF 片段二聚体的分子量可以自然是单体片段的大约两倍 (本发明的二聚体因此包含至多大约 2400 个氨基酸,如果单体尺寸是 1200 个氨基酸的话)。

[0039] 优选地,VWF 片段包含至少氨基酸 764-828 (SEQ ID NO 4),或至少氨基酸 764-865 (SEQ ID NO 5),或至少氨基酸 764-1035 (SEQ ID NO 6),或至少氨基酸 764-1041 (SEQ ID NO 7),或至少氨基酸 764-1045 (SEQ ID NO 8),或至少氨基酸 764-1128 (SEQ ID NO 9),或至少氨基酸 764-1198 (SEQ ID no 10),或至少氨基酸 764-1250 (SEQ ID NO 11),或至少氨基酸 764-1261 (SEQ ID NO 14),或至少氨基酸 764-1268 (SEQ ID NO 22)。

[0040] 在一个实施方案中,在 VWF 片段中的 C1099 和 / 或 C1142 半胱氨酸可以突变。这些半胱氨酸残基据信负责 VWF 蛋白的寡聚化 / 二聚化。具有这两个半胱氨酸的 VWF 片段可以形成二聚体和同型寡聚物。这两个半胱氨酸的修饰可以导致产生由单体 VWF 片段组成的产物,而一个或另一个的缺失可以导致二聚体 VWF 片段。以上两种情况都可导致比全长蛋白更简单的产物纯化过程。

[0041] 在另一个实施方案中,VWF C1099 和 C1142 半胱氨酸两者都保持完整,其可以导致优选的二聚体或甚至多聚体 VWF 片段。包括 C1099 和 C1142 半胱氨酸的天然序列可具有安全性优势。

[0042] 惊奇的是,与 FVIII 和全长 VWF 分子的共同配制相比,本发明的 FVIII 分子和 VWF 片段的共同配制显示了改进的生物利用度。本发明的共同配制显示了经皮下注射的因子 VIII 的增加了的生物利用度。VWF 片段优选包含 D' 结构域(跨越 SEQ ID NO:22 的氨基酸 764-865/866),其被认为是主要的 FVIII 结合部位,其中 FVIII 可以通过静电偶极-偶极样相互作用停靠在 D'。VWF 片段优选地包含 D' 结构域和 / 或 D3- 结构域(D3 结构域跨越 SEQ ID NO:15 的氨基酸 865/866-1250/1261/1268)。根据本文的发现,可能 D' 和 D' D3 结构域两者都具有与 FVIII 结合的能力。本文的 VWF 片段没有任何明显程度地(即优选小于 5%、更优选小于 4%、优选小于 3%、优选小于 2%、更优选小于 1%)形成多聚体(即具有超过两个单元,例如寡聚物),因为多聚体装配所必需的半胱氨酸(C1099 和 C1142)不存在或已经突变 / 取代。本发明的一些 VWF 片段在任何明显程度上不再形成二聚体,尤其是其中 C1099 和 / 或 C1142 半胱氨酸不存在的那些。

[0043] 然而,在某些情况下,形成二聚体的 VWF 片段也可用于本发明,TIL' /E' /D3/A1 二聚体例如已经证明具有比单体更高的 FVIII 亲和力。VWF 片段二聚体还可以是相对同质的产物,其可被相对容易地生产。

[0044] 本文的 VWF 片段的一个优势就是在工业规模上更容易生产作为相对同质产物的所述化合物,因为低程度的多聚化和因为以下事实:与全长 VWF 相比,所述化合物是具有较少的翻译后修饰的较小的化合物。“更容易”意味着更容易达到高表达水平,并且因分子更简单而导致纯化方法将会更简单。另外,与在哺乳动物细胞系中的生产相比,在简单生物体例如酵母中的重组肽和蛋白质的产生是更快和更便宜的生产方法,某些 VWF 片段可以在酵母中生产。

[0045] 本发明的 VWF 片段可以呈单链 VWF 片段的形式(例如,跨越 SEQ ID NO 22 的氨基酸 764-1459 的完整 TIL' /E' /D3/A1 区)或呈多组来自 VWF 的连续氨基酸融合在一起并因此缺失中间片段的形式(例如,跨越 SEQ ID NO 22 的氨基酸 764-828+764-865 的 TIL' 和 TIL' /E' 结构域的“融合物”)。另一实例可以是 SEQ ID NO 22 的氨基酸 764-828+1127-1197。本发明的 VWF 片段或者还可以呈重复序列的形式。可将同源或异源“间隔基(spacer)”序列引入融合的 VWF 片段 / 序列之间(例如, TIL' /E' 结构域的多重融合物,例如 TIL' /E' TIL' /E' TIL' /E')。VWF 片段还可以在 VWF 衍生的序列中包含一个或多个氨基酸交替(alternation)(例如,取代、缺失、添加)。

[0046] 可以通过将 FVIII 与至少一个半寿期延长部分缀合而进一步改进经血管外共同给予 FVIII 和 VWF 时的 FVIII 的生物利用度。因此, VWF 和与至少一个半寿期延长部分缀合的 FVIII 分子的血管外共同给予与相对高的 FVIII 生物利用度有关。

[0047] 本文的 VWF 片段的实例(使用来自 Zhou 等人的结构域注释)如以下 SEQ ID NO 4-21 中所示。TIL' /E' /VWD3 I、TIL' /E' /VWD3 II 和 TIL' /E' /VWD3 III 表示 3 种形式(不同长度)的 TIL' /E' /VWD3。

[0048] SEQ ID NO 4:氨基酸 764-828 (TIL'):

SLSCRPPMVKLVCADNLRAEGLECTKTCQNYDLECMSMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCP

SEQ ID NO 5:氨基酸 764-865 (TIL' /E'):

SLSCRPPMVKLVCADNLRAEGLECTKTCQNYDLECMSMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQG
KEYAPGETVK IGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDA

SEQ ID NO 6 :氨基酸 764-1035 (TIL' /E' /VWD3 I) :

SLSCRPPMVKLVCADNLRAGLECKTKCQNYDLECMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQKE
YAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNK
GCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYI ILLLGKALS VVWDRHLSISVVLKQTYQ
EKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQ VEEDPVDFGN SWKVSSQCADTR

SEQ ID NO 7 :氨基酸 764-1041 (TIL' /E' /VWD3 II) :

SLSCRPPMVKLVCADNLRAGLECKTKCQNYDLECMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQKE
YAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNK
GCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYI ILLLGKALS VVWDRHLSISVVLKQTYQ
EKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQ VEEDPVDFGN SWKVSSQCADTRKVPLDS

SEQ ID NO 8 :氨基酸 764-1045 (TIL' /E' /VWD3 III) :

SLSCRPPMVKLVCADNLRAGLECKTKCQNYDLECMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQKE
YAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNK
GCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYI ILLLGKALS VVWDRHLSISVVLKQTYQ
EKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQ VEEDPVDFGN SWKVSSQCADTRKVPLDSSPAT

SEQ ID NO 9 :氨基酸 764-1128 (TIL' /E' /VWD3/C8-3) - 半胱氨酸 1099 用黑体标明。
该半胱氨酸可以被另一氨基酸例如 Ser 取代 :

SLSCRPPMVKLVCADNLRAGLECKTKCQNYDLECMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQKE
YAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNK
GCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYI ILLLGKALS VVWDRHLSISVVLKQTYQ
EKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRILTSD
VFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHKGKVVWRTATLCPQ

SEQ ID NO 10 :氨基酸 764-1198 (TIL' /E' /VWD3/C8-3/TIL-3) - 半胱氨酸 1099 和
1142 用黑体标明。这两个半胱氨酸中的一个或两个可以被另一氨基酸例如 Ser 取代 :

SLSCRPPMVKLVCADNLRAGLECKTKCQNYDLECMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQKE
YAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNK
GCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYI ILLLGKALS VVWDRHLSISVVLKQTYQ
EKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRILTSD
VFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHKGKVVWRTATLCPQSCEERNLRENGYECE
WRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPV

SEQ ID NO 11 :氨基酸 764-1250 (TIL' /E' /D3 I) - 半胱氨酸 1099 和 1142 用黑体标
明。这两个半胱氨酸中的一个或两个可以被另一氨基酸例如 Ser 取代 :

SLSCRPPMVKLVCADNLRAGLECKTKCQNYDLECMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQK
EYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILV
NKGCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYI ILLLGKALS VVWDRHLSISVVLKQ
TYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRI
LTSDVFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHKGKVVWRTATLCPQSCEERNLRE
NGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKV
TLNPSDPEHCQ ICHCDVVNLTCEACQEPGGL VVPPTDA

SEQ ID NO 12:氨基酸 864-1250 (D3 I)-半胱氨酸 1099 和 1142 用黑体标明。这两个半胱氨酸中的一个或两个可以被另一氨基酸例如 Ser 取代:

ATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIEL
FDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYIILLGKALSVMWRHLSISVVLKQTYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQ
VEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRILTSDVFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTC
CESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHKGKVVWRTATLCPQSCEERNLRENGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPV
QCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICHCDVVNLTCEACQEPGGL
VVPPTDA

SEQ ID NO 13:氨基酸 864-1268 (D3 II) -半胱氨酸 1099 和 1142 用黑体标明。这两个半胱氨酸中的一个或两个可以被另一氨基酸例如 Ser 取代:

ATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIEL
FDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYIILLGKALSVMWRHLSISVVLKQTYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQ
VEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRILTSDVFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTC
CESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHKGKVVWRTATLCPQSCEERNLRENGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPV
QCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICHCDVVNLTCEACQEPGGL
VVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHD

SEQ ID NO 14:氨基酸 764-1261 (TIL' /E' /D3 II) -半胱氨酸 1099 和 1142 用黑体标明。这两个半胱氨酸中的一个或两个可以被另一氨基酸例如 Ser 取代:

SLSCRPPMVKLVCADNLRAEGLECTKTCQNYDLECMSMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQGK
EYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILV
NKGCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYIILLGKALSVMWRHLSISVVLKQ
TYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCR
ILTSDVFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHKGKVVWRTATLCPQSCEERNL
RENGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKK
VTLNPSDPEHCQICHCDVVNLTCEACQEPGGL VVPPTDAPVSPTTLYVED

SEQ ID NO 15:氨基酸 764-1264 (TIL' /E' /D3 III) -半胱氨酸 1099 和 1142 用黑体标明。这两个半胱氨酸中的一个或两个可以被另一氨基酸例如 Ser 取代:

SLSCRPPMVKLVCADNLRAEGLECTKTCQNYDLECMSMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQGK
EYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILV
NKGCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYIILLGKALSVMWRHLSISVVLKQ
TYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCR
ILTSDVFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHKGKVVWRTATLCPQSCEERNL
RENGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKK
VTLNPSDPEHCQICHCDVVNLTCEACQEPGGL VVPPTDAPVSPTTLYVEDISEP

SEQ ID NO 16:氨基酸 764-1268 (TIL' /E' /D3 IV) -半胱氨酸 1099 和 1142 用黑体标明。这两个半胱氨酸中的一个或两个可以被另一氨基酸例如 Ser 取代:

SLSCRPPMVKLVCADNLRAEGLECTKTCQNYDLECMSMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQGK
EYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILV
NKGCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYIILLGKALSVMWRHLSISVVLKQ

TYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRI
LTSDVVFQDCNKLVDPPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHKGKVVWRTATLCPQSCEERNLRE
NGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKV
TLNPSDPEHCQ ICHCDVVNLTCEACQEPGGL VVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHD

SEQ ID NO 17:氨基酸 764-1459 (TIL' /E' /D3/A1 I) - 半胱氨酸 1099 和 1142 用黑体标明。这两个半胱氨酸中的一个或两个可以被另一氨基酸例如 Ser 取代:

SLSCRPPMVKLVCADNLRAGLECKTKCQNYDLECMSMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQ GK
EYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVG
NKGCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYI ILLLGKALS VVWDRHLSISVVLKQ
TYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRI
LTSDVVFQDCNKLVDPPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHKGKVVWRTATLCPQSCEERNLRE
NGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKV
TLNPSDPEHCQ ICHCDVVNLTCEACQEPGGL VVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSR
LSEAEFEVLKAFVVDMMERLRISQKWVRVAVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSELRRIASQVKYAGSQVASTSEVLKYT
LFQIFSKIDRPEASRITLLLMASQEPQRMSRNFVRYVQGLKKKKVIVIPVIGIPHANLKQIRLIEKQAPENKAFVLS
SVDELEQQRDEI VSYLCD

SEQ ID NO 18:氨基酸 764-1463 (TIL' /E' /D3/A1 II) - 半胱氨酸 1099 和 1142 用黑体标明。这两个半胱氨酸中的一个或两个可以被另一氨基酸例如 Ser 取代:

SLSCRPPMVKLVCADNLRAGLECKTKCQNYDLECMSMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQ GK
EYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVG
NKGCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYI ILLLGKALS VVWDRHLSISVVLKQ
TYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRI
LTSDVVFQDCNKLVDPPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHKGKVVWRTATLCPQSCEERNLRE
NGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKV
TLNPSDPEHCQ ICHCDVVNLTCEACQEPGGL VVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSR
SEAEFEVLKAFVVDMMERLRISQKWVRVAVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSELRRIASQVKYAGSQVASTSEVLKYTL
FQIFSKIDRPEASRITLLLMASQEPQRMSRNFVRYVQGLKKKKVIVIPVIGIPHANLKQIRLIEKQAPENKAFVLSS
VDELEQQRDEI VSYLCDLAPE

SEQ ID NO 19:氨基酸 764-1464 (TIL' /E' /D3/A1 III) - 半胱氨酸 1099 和 1142 用黑体标明。这两个半胱氨酸中的一个或两个可以被另一氨基酸例如 Ser 取代:

SLSCRPPMVKLVCADNLRAGLECKTKCQNYDLECMSMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQ GK
EYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVG
NKGCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYI ILLLGKALS VVWDRHLSISVVLKQ
TYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRI
LTSDVVFQDCNKLVDPPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHKGKVVWRTATLCPQSCEERNLRE
NGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKV
TLNPSDPEHCQ ICHCDVVNLTCEACQEPGGL VVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSR
LSEAEFEVLKAFVVDMMERLRISQKWVRVAVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSELRRIASQVKYAGSQVASTSEVLKYT
LFQIFSKIDRPEASRITLLLMASQEPQRMSRNFVRYVQGLKKKKVIVIPVIGIPHANLKQIRLIEKQAPENKAFVLS

SVDELEQQRDEI VSYLCDLAPEA

SEQ ID NO 20 :氨基酸 764-1683 (TIL' /E' /D3/A1/A2) - 半胱氨酸 1099 和 1142 用黑体标明。这两个半胱氨酸中的一个或两个可以被另一氨基酸例如 Ser 取代：

SLSCRPPMVKLVCADNLRAEGLECTKTCQNYDLECMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQ GK
EYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVG
NKGCSHPSVKCKKRVTLVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYI ILLLGKALS VVWDRHLSISVVLKQ
TYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRI
LTSDVFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESI GDCACFCDTIAAYAHVCAQH GKVV TWRTATLCPQSCEERNLRE
NGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKV
TLNPSDPEHCQICHCDVVNL TCEACQEPGGL VVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSRL
SEAEFEVLKAFVVDMMERLRISQKWVRVAVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSSELRRIASQVKYAGSQVASTSEVLKYTL
FQIFSKIDRPEASRITLLLMSAQEPQRMSRNFVRYVQGLKKKKVIVIPVGIGPHANLKQIRLIEKQAPENKAFVLSS
VDELEQQRDEIVSYLCDLAPEAPPTLPPDMAQVTVGPGLLGVSTLGPKRNSMVLDAFVLEGS DKIGEADFNRSKE
FMEEVIQRMDVGQDSIHVTVLQYSYMTVEYPFSEAQSKGDILQRVREIRYQGGNRTNTGLALRYLSDHSFLVSQGD
REQAPNLVYMTGNPASDEIKRLPGDIQVVPIGVGPANVQELERIGWPNAPILI QDFETLPREAPDLVLQRCCSGE
GLQIPTLSPA

SEQ ID NO 21 :氨基酸 764-1873 (TIL' /E' /D3/A1/A2/A3) - 半胱氨酸 1099 和 1142 用黑体标明。这两个半胱氨酸中的一个或两个可以被另一氨基酸例如 Ser 取代：

SLSCRPPMVKLVCADNLRAEGLECTKTCQNYDLECMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQ GK
EYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVG
NKGCSHPSVKCKKRVTLVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYI ILLLGKALS VVWDRHLSISVVLKQ
TYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRI
LTSDVFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESI GDCACFCDTIAAYAHVCAQH GKVV TWRTATLCPQSCEERNLRE
NGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKV
TLNPSDPEHCQ ICHCDVVNL TCEACQEPGGL VVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSR
LSEAEFEVLKAFVVDMMERLRISQKWVRVAVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSSELRRIASQVKYAGSQVASTSEVLKYT
LFQIFSKIDRPEASRITLLLMSAQEPQRMSRNFVRYVQGLKKKKVIVIPVGIGPHANLKQIRLIEKQAPENKAFVLS
SVDELEQQRDEIVSYLCDLAPEAPPTLPPDMAQVTVGPGLLGVSTLGPKRNSMVLDAFVLEGS DKIGEADFNRSK
EFMEEVIQRMDVGQDSIHVTVLQYSYMTVEYPFSEAQSKGDILQRVREIRYQGGNRTNTGLALRYLSDHSFLVSQGD
DREQAPNLVYMTGNPASDEIKRLPGDIQVVPIGVGPANVQELERIGWPNAPILI QDFETLPREAPDLVLQRCCSG
EGLQIPTLSPAPDCSQPLDVILLDGS SFPASYFDEMKSFAKAFISKANIGPRLTQVSVLQYGSIT TIDVPWNVVP
EKAHLLSLVDVMQREGGPSQIGDALGFAVRYLTSEM HGARPGASKAVVILVTDVSVDSVDAAADAARSNRVTVPFIG
IGDRYDAAQLRILAGPAGDSNVVKLQRIEDLPTMTLGN SFLHKLCS

SEQ ID NO 22 :根据 UniProtKB/Swiss-Prot 数据库的野生型人 VWF (登录 P04275) - 位置 1099 和 1142 的半胱氨酸残基用黑体标明：

MIPARFAGVLLALALILPGTLCAEGTRGRSSTARCSLFGSDFVNTFDGSMYSFAGYCSYLLAGGCQKRSFSI
IGDFQNGKRVLSVYLGEFFDIHLFVNGTVTQGDQRVSMPYASKGLYLETEAGYYKLSGEAYGFVARIDGSGNFQVL
LSDRYFNKTCGLCGNFNIFAEDDFMTQEGTLTSDPYDFANSWALSSGEQWCERASPPSSSCNISSGEMQKGLWEQCQ
LLKSTSVFARCHPLVDPEPFVALCEKTLCECAGGLECACPALLEYARTCAQEGMVLYGWT DHSACSPVCPAGMEYRQ

CVSPCARTCQSLHINEMCQERCVDGCSCEPGLLDEGLCVESTECPCVHSGKRYPPGTSLSRDCNTCICRNSQWICS
NEECPEGELVTGQSHFKSFDNRYFTFSGICQYLLARDCQDHSFSIIVETVQCADDRDAVCTRSTVRLPGLHNSLVK
LKHGAGVAMDGDVQLPLLKGDRLRIQHTVTASVRLSYGEDLQMDWDGRGRLLVKLSPVYAGKTCGLCGNYNGNQDD
FLTPSGLAEPRVEDFGNAWKLHGDCQDLQKQHSDFPCALNPRMTRFSEEACAVLTSPTFEACHRAVSPLPYLRNCRYD
VCSCSDGRECLCGALASYAAAACAGRGVRVAWREPGRCELNCPKGQVYLQCGTPCNLTCSRSLSPDEECNEACLEGCF
CPPGLYMDERGDVCPKAQCPCYYDGEIFQPEDIFSDHHTMCYCEDGFMHCTMSGVPGSLLPDAVLSSPLSHRSKRSL
SCRPPMVKLVCADNLRAGLECTKTCQNYDLECMSMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQKEYAPGETV
KIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECCQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGCSHPSV
KCKKRVTLILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYIILLGKALSVMWRHLSISVVLKQTYQEKVCGLC
GNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRILTSDFVQDCNK
LVDPEPYLDVCIYDTCSESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHGVVWTRTATLCPQSCEERNLRENGYCEWRYNSCA
PACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICH
DVVNLTCACQEPGLVVPPTDAPVSPPTLYVEDISEPPLHDFYCSRLDLVFLLDGSSRLSEAEFEVLKAFVDDMM
ERLRISQKWVRVAVVEYHDSHAYIGLKDRKRPSSELRRIASQVKYAGSQVASTSEVLKYTLFQIFSKIDRPEASRIT
LLLMAEQEPQRMSRNFVRYVQGLKKKKVIVIPVIGPHANLKQIRLIEKQAPENKAFVLSSVDELEQQRDEIVSYLC
DLAPEAPPPTLPPDMAQVTVGPGLLGVSTLGPKRNSMVLDAFVLEGSCKIGEADFNRSKEFMEEVIQRMDVGQDSI
HVTVLQYSYMTVEYPFSEAQSKGDIQVRVREIRYQGGNRTNTGLALRYLSHSLVSGDREQAPNLVYMTGNPA
SDEIKRLPGDIQVVPVIGVGNANVQELERIGWPNAPILIQDFETLPREAPDLVLRCCSGEGLQIPTLSPAPDCSQP
LDVILLLDGSSSPFASYFDEMKSFAKAFISKANIGPRLTQVSVLQYGSITIDVPWNVPEKAHLLSLVDVMQREGG
PSQIGDALGFAVRYLTSEMHGARGASKAVVILVTDVSVDSVDAADAARSNRVTVPFVIGIGDRYDAAQLRILAGPA
GDSNVVKLQRIEDLPTMTLGNLHKLCSGFVRIEMDEDGNEKRPDGVWTLPDQCHTQVTCQPDGQTLKSHRVNCD
RGLRPSCPNSSQSPVKVEETCGCRWTCPCVCTGSSTRHIVTFDQGNFKLTGSCSYVLFQNKEDLEVLHNGACSPGA
RQCGMKSIIEVKHSALSVELHSDMEVTVNGRLVSVPYVGGNMEVNVYGAIMHEVRFNHLGHIFTFTPNNEFQLQLSP
KTFASKTYGLCGICDENGANDFMLRDGTVTDDWKTLLVQEWTVQRPQTCPPILEECLVPDSSHQVLLLPLFAECH
KVLAPATFYAICQQDSCHQEQVCEVIAASYAHLCRTNGVCVDWRTPDFCAMSCPPSLVYNHCEHGCPRHCDGNVSSCG
DHPSEGCFCPPDKVMLEGSCVPEEACTQCIGEDGVQHGFLEAWVPDHPQCQICTCLSGRKVNCTTQPCPTAKAPT
LCEVARLRQADQCCPEYECVCDPVSCDLPPVPHCERGLQPTLTNPGECPNFTCACRKEECKRVSPSPCPPHRLPT
LRKTQCCDEYECACNCVNSTVSCPLGYLASTATNDGCTTTCLPDKVCVHRSTIYPVGQFWEEGCDVCTCTDMEDA
VMGLRVAQCSQKPCEDSCRSFTYVLHEGECCGRCLPSACEVVTGSPRGDSQSSWKSQVSGWASPENPCLINECVRV
KEEVFIQQRNVSCPQLEVPVCPSPGFQLSCKTSACCPSCRCERMEACMLNGTVIGPGKTMIDVCTTCRCMVQVGVIS
GFKLECRKTTNCPCLGYKEENNTGECCGRCLPTACTIQLRGGQIMTLKRDETLQDGCDFHCKVNERGEYFWEKRV
TGCPPFDEHKCLAEGGKIMKIPGTCCDTCEEPECNDITARLQYVKVGSCKSEVEVDIHYCQKGCASKAMYSIDINDV
QDQCSCCSPTRTEPMQVALHCTNGSVVYHEVLNAMECKCSPRKCSK

FVIII 分子 / 变体 / 衍生物 / 类似物 : 本文使用的术语“FVIII”意图指具有 FVIII 活性的任何 FVIII 分子, 包括 wt FVIII、B 结构域缺失 / 截短的 FVIII 分子、表现出与 wt FVIII 基本相同的或改进的生物活性的 FVIII 变体和 FVIII 相关多肽, 其中已经通过例如以下方式对母肽的一个或多个氨基酸进行了化学修饰: 蛋白: 蛋白融合、烷基化、聚乙二醇化、HES 化、PAS 化、PSA 化、酰化、酯形成或酰胺形成等, 和 / 或缀合到半寿期延长部分。

[0049] 半寿期延长部分 / 延长基 (protractive group) : 术语“半寿期延长部分”在本文

中理解为是指经由例如 -SH、-OH、-COOH、-CONH₂、-NH₂ 或一个或多个 N- 和 / 或 O- 聚糖结构与 FVIII 共价连接的一个或多个化学基团,所述基团当与这些蛋白缀合时可以增加体内循环半寿期。适合与本发明的 FVIII 缀合的延长基 / 半寿期延长部分的实例包括:生物相容性的脂肪酸及其衍生物、聚乙二醇 (PEG)、多糖 (例如,羟基烷基淀粉 (HAS) 例如,羟基乙基淀粉 (HES)、透明质酸 (HA)、Heparosan 聚合物 (HEP)、葡聚糖、聚唾液酸 (PSA) 等)、聚 (Glyx-Sery)_n (HAP)、基于磷酸胆碱的聚合物 (PC 聚合物)、Fleximers、Fc 结构域、Fc 受体、转铁蛋白、白蛋白、弹性蛋白样肽、XTEN 聚合物、白蛋白结合肽、CTP 肽及其任意组合。一般而言,与无半寿期延长部分的 FVIII 相比, FVIII 与一个或多个半寿期延长部分 (例如,亲水性聚合物,例如多糖和 PEG 的组合) 的缀合当与本发明的 VWF 片段经皮下 / 皮内共同给予时惊人地显示出具有更好的生物利用度。

[0050] 本发明的聚乙二醇化 FVIII 分子可具有连接到 FVIII 蛋白包括任何氨基酸残基或碳水化合物部分的任何部分上的一个或多个聚乙二醇 (PEG) 分子。可以使用化学和 / 或酶促方法将 PEG 或其它半寿期延长部分 / 聚合物基团与 FVIII 上的聚糖缀合。酶促缀合过程的实例描述于例如 W003031464。聚糖可以是天然发生的,或者可使用本领域众所周知的方法,通过例如插入 N- 连接的和 / 或 O- 连接的聚糖而将聚糖插入。本发明的“半胱氨酸-聚乙二醇化 FVIII”具有缀合到 FVIII 中存在的半胱氨酸的巯基上的一个或多个 PEG 分子。本发明的“半胱氨酸-酰化的 FVIII”具有缀合到 FVIII 中的半胱氨酸的巯基上的一个或多个疏水性半寿期延长部分,可通过遗传工程引入该半胱氨酸残基或者该半胱氨酸可以是天然氨基酸序列的一部分。还有可能将半寿期延长部分与其它氨基酸残基连接。

[0051] 融合蛋白: 本发明的融合蛋白是通过将两个或更多个最初编码 FVIII 和融合配偶体的 DNA 序列的框内连接而产生的蛋白。该融合蛋白 DNA 序列的翻译将产生具有来源于各最初蛋白或肽的功能性质的单一蛋白序列。编码融合蛋白的 DNA 序列可通过标准生物学方法 (例如重叠 PCR 或 DNA 连接) 经人工产生,并进行装配,不包括最初 5'-端 DNA 序列的终止密码子而保留 3' 端 DNA 序列的终止密码子。可将所得融合蛋白 DNA 序列插入到合适的表达载体中,所述载体支持异源融合蛋白在标准宿主生物体中的表达。

[0052] 融合蛋白可含有将限定融合蛋白的蛋白或肽部分分隔开的接头或间隔基肽序列。接头或间隔基肽序列可促进单个蛋白或肽部分的正确折叠并且使得单个蛋白或肽部分保留其各自的功能性更加成为可能。可在组成完整融合蛋白 DNA 序列的单个 DNA 片段的框内装配期间即在重叠 PCR 或 DNA 连接期间将接头或间隔基肽序列插入到融合蛋白 DNA 序列。包含 FVIII 和融合配偶体的融合蛋白的实例参见 W02011101284。

[0053] Fc 融合蛋白: 术语“Fc 融合蛋白”在本文中是指包含与源自任何抗体同种型的 Fc 结构域融合的 FVIII。由于 IgG 抗体的相对长的循环半寿期,通常将优选 IgG Fc 结构域。此外,为了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),可修饰 Fc 结构域。FVIII 与具有与 FcRn 受体结合的能力的 Fc 结构域的融合,通常将导致延长的体内循环半寿期。IgG Fc 结构域中的位置 234、235 和 237 的突变通常将导致与 Fc γ RI 受体 (亦可为 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, FcRn 受体通过内吞再循环途径促进长的循环体内半寿期。优选地,本发明融合蛋白的修饰的 IgG Fc 结构域包含一种或多种下述突变,所述突变将分别导致与某些 Fc 受体的亲和力降低 (L234A、L235E 和 G237A) 和 C1q 介导的补体结合降低 (A330S 和 P331S)。或者, Fc 结

构域可以是 IgG4 Fc 结构域,优选地包含 S241P/S228P 突变。

[0054] (FVIII 的)生物利用度:术语“生物利用度”描述了在血管外给予后吸收到血液中的 FVIII 百分率。根据经皮下给予后 FVIII 浓度曲线下面积除以剂量计算生物利用度,相对于经静脉内给予后浓度曲线下面积除以同样的 FVIII 化合物剂量。按照本发明,FVIII 分子的生物利用度(经皮下/皮内共同给予 FVIII 和本发明的 VWF 片段)为至少 3%、优选地至少 5%、优选地至少 6%、优选地至少 7%、优选地至少 8%、优选地至少 9%、优选地至少 10%、优选地至少 11%、优选地至少 12%、优选地至少 13%、优选地至少 14%、优选地至少 15%、优选地至少 16%、优选地至少 17%、优选地至少 18%、优选地至少 19%、优选地至少 20%、优选地至少 21%、优选地至少 22%、优选地至少 23%、优选地至少 24%、优选地至少 25%、优选地至少 26%、优选地至少 27%、优选地至少 28%、优选地至少 29%、优选地至少 30%、优选地至少 31%、优选地至少 32%、优选地至少 33%、优选地至少 34%、优选地至少 35%、优选地至少 36%、优选地至少 37%、优选地至少 38%、优选地至少 39%、优选地至少 40%、优选地至少 41%、优选地至少 42%、优选地至少 43%、优选地至少 44%、优选地至少 45%、优选地至少 46%、优选地至少 47%、优选地至少 48%、优选地至少 49%、优选地至少 50%、优选地至少 55%、优选地至少 60%、优选地至少 65%、优选地至少 70%、和最优选地至少 75%。生物利用度可以如本文所述地测定。优选地,本发明制剂的 FVIII 生物利用度(FVIII 抗原和/或活性)将会足够高,以在正常活性条件下发挥预防作用,当所述制剂经血管外(例如,皮下或皮内)给予例如每天 1 次或 2 次或每周 1、2 或 3 次时。优选地,FVIII 剂量可比得上经静脉内给予 FVIII 所用的剂量,优选是后者的 2 倍,更优选 3 倍、更优选 4 倍、更优选大约 10 倍、更优选大约 15 倍、更优选大约 20 倍、和最优选大约 25 倍。对于剂量的确定,可以考虑安全性和成本上的考虑。

[0055] FVIII 对 VWF 的饱和:FVIII 对 VWF 或 VWF 片段的饱和/与 VWF 结合或复合的 FVIII 的相对量/与 VWF 结合的 FVIII 的量除以 FVIII 的总量。该计算是基于 FVIII 与所述蛋白之间结合的 KD 值。对于 FVIII 与 VWF 片段的结合,所测 KI 值用作 KD。

[0056] 以下(二次)方程式可用于根据总浓度 $[A]_t$ $[B]_t$ 计算 FVIII (A) 与另一蛋白 (B) 结合的浓度。

$$\begin{aligned}
 K_D &= \frac{[A] \times [B]}{[AB]} \\
 [A] &= [A]_t - [AB] \\
 [B] &= [B]_t - [AB] \\
 [AB]^2 - (K_D + [A]_t + [B]_t) \times [AB] + [A]_t \times [B]_t &= 0 \\
 \alpha \times [AB]^2 + \beta \times [AB] + \delta &= 0 \\
 \alpha &= 1, \beta = -(K_D + [A]_t + [B]_t), \delta = [A]_t \times [B]_t \\
 [AB] &= \frac{-\beta \pm \sqrt{\beta^2 - 4 \times \alpha \times \delta}}{2 \times \alpha}
 \end{aligned}$$

[0057] 药物组合物:本发明提供包含本发明的 FVIII 分子和任选地 VWF 的组合物。因此,本发明的一个目标就是提供包含浓度 40 IU/ml 至 25,000 IU/ml 的 FVIII 分子的药物组合物,和其中所述组合物的 pH 为 2.0-10.0。在一个优选的实施方案中,FVIII 分子与 VWF 或 VWF 片段共同给予。因此,本发明的药物组合物可包含以下浓度的 FVIII:

40 IU/ml 至 25,000 IU/ml, 例如 50-25,000 IU/ml、100-25,000 IU/ml、250-25,000 IU/ml、500-25,000 IU/ml、1000-25,000 IU/ml、2000-25,000 IU/ml、3000-25,000 IU/ml、4000-25,000 IU/ml、5000-25,000 IU/ml、6000-25,000 IU/ml、7000-25,000 IU/ml、8000-25,000 IU/ml、9000-25,000 IU/ml、10,000-25,000 IU/ml、50-20,000 IU/ml、100-20,000 IU/ml、250-20,000 IU/ml、500-20,000 IU/ml、1000-20,000 IU/ml、2000-20,000 IU/ml、3000-20,000 IU/ml、4000-20,000 IU/ml、5000-20,000 IU/ml、6000-20,000 IU/ml、7000-20,000 IU/ml、8000-20,000 IU/ml、9000-20,000 IU/ml、10,000-20,000 IU/ml、50-15,000 IU/ml、100-15,000 IU/ml、250-15,000 IU/ml、500-15,000 IU/ml、1000-15,000 IU/ml、2000-15,000 IU/ml、3000-15,000 IU/ml、4000-15,000 IU/ml、5000-15,000 IU/ml、6000-15,000 IU/ml、7000-15,000 IU/ml、8000-15,000 IU/ml、9000-15,000 IU/ml、10,000-15,000 IU/ml、50-10,000 IU/ml、100-10,000 IU/ml、250-10,000 IU/ml、500-10,000 IU/ml、1000-10,000 IU/ml、2000-10,000 IU/ml、3000-10,000 IU/ml、4000-10,000 IU/ml、5000-10,000 IU/ml、50-5000 IU/ml、100-5000 IU/ml、250-5000 IU/ml、500-5000 IU/ml 和 1000-5000 IU/ml。本发明的组合物还可以进一步包含一种或多种药学上可接受的赋形剂, 例如, 缓冲系统、防腐剂、张度剂、螯合剂、稳定剂或表面活性剂及其多种组合。防腐剂、等张剂、螯合剂、稳定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。参考文献可见 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 19 版, 1995。

[0058] 在一个实施方案中, 药物组合物是水性组合物。这类组合物通常是溶液剂或混悬剂, 但也可包括胶剂、分散剂、乳剂和多相材料。术语“水性组合物”定义为包含至少 50% w/w 水的组合物。同样, 术语“水性溶液剂”定义为包含至少 50% w/w 水的溶液剂, 术语“水性混悬剂”定义为包含至少 50% w/w 水的混悬剂。

[0059] 在另一个实施方案中, 药物组合物是冻干组合物, 在使用前由医师或患者向其中加入溶剂和 / 或稀释剂。

[0060] 又一方面, 药物组合物包含这类抗体和缓冲剂的水性溶液剂, 其中所述抗体的浓度为 1 mg/ml 或以上, 和其中所述组合物的 pH 为大约 2.0 至大约 10.0。

[0061] 本发明的药物组合物优选地是在凝血疾病的预防性 / 治疗性治疗中适用于经血管外给予 (例如, 经皮下或皮内给予)。

[0062] “FVIII:VWF 的比例”: 根据本发明, FVIII 和 VWF/VWF 片段的优选比例包括 0.5:1 至 1:50 的 FVIII/VWF 比例 (摩尔比), 例如, 1:1 至 1:50、例如, 1:1 至 1:25、例如, 1:1 至 1:20、或 1:1 至 1:15、或 1:1 至 1:10、或 1:1 至 1:7.5、或 1:7 至 1:8、或 1:6 至 1:8、或 1:6 至 1:9、或 1:5 至 1:10。因此优选的比例包括: 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5; 1:5.5; 1:6; 1:6.5; 1:7; 1:7.1; 1:7.2; 1:7.3; 1:7.4; 1:7.5; 1:7.6; 1:7.7; 1:7.8; 1:7.9; 1:8; 1:9; 1:10; 1:15; 1:20; 1:25; 1:30; 1:35; 1:40; 1:45 和 1:50。优选的比例包括: 0.5:1; 0.6:1; 0.7:1; 0.8:1; 0.9:1; 1:1; 1.1:1; 1.2:1; 1.3:1 和 1.5:1。接近 1:1 的摩尔比通常具有使活性物的所需量最小化的优势。根据 VWF 变体对讨论中的 FVIII 种类的结合亲和力, 可通过计算在某些蛋白浓度时结合的 FVIII:VWF 的量来测定在共同配制的混合物中的 FVIII 和 VWF 片段的最佳比例。可通过例如 ELISA、SPR 或通过 ITC 来确定结合亲和力。

[0063] “血友病”: 血友病 / 凝血疾病是一组遗传性遗传障碍, 其损害了机体控制血液凝固

或凝血的能力(“出血障碍”),该能力用于在血管遭到破坏时止血。A型血友病(凝血因子VIII缺乏)是这类障碍的最常见的形式,在5,000-10,000个男性出生时有大约1例。对于本发明,术语“血友病”包括冯维勒布兰德氏病。

[0064] 实施方案列表

1. 包含FVIII分子的药物组合物在治疗血友病中的用途,其中所述FVIII分子包含长度为100-400个氨基酸的截短的B结构域,其中所述截短的B结构域的氨基酸序列源自wt FVIII B结构域氨基酸序列,和其中所述FVIII分子经血管外给予(例如,经皮下给予)的生物利用度为至少3、5或10%。

[0065] 2. 本发明的FVIII分子,其中所述FVIII分子在截短的B结构域中包含O-连接的聚糖,其中所述O-连接的聚糖与SEQ ID NO 1所示的Ser 750残基连接。

[0066] 3. 本发明的FVIII分子,其中FVIII变体的氨基酸序列如SEQ ID NO 3所示。

[0067] 4. 本发明的FVIII分子,其中FVIII B结构域的氨基酸序列选自:SEQ ID NO 1所示的氨基酸序列的氨基酸741-857 + 1637-1648;氨基酸741-914 + 1637-1648;氨基酸741-954 + 1637-1648;氨基酸741-965 + 1637-1648;氨基酸741-965 + 1637-1648;氨基酸741-1003 + 1637-1648;氨基酸741-1003 + 1637-1648;氨基酸741-1020 + 1637-1648;氨基酸741-1079 + 1637-1648;氨基酸741-1206 + 1637-1648;氨基酸741-1261 + 1637-1648;氨基酸741-1309 + 1637-1648;氨基酸741-914 + 1637-1648;氨基酸741-954 + 1637-1648;氨基酸741-968 + 1637-1648;氨基酸741-1003 + 1637-1648;氨基酸741-1018 + 1637-1648;氨基酸741-1070 + 1637-1648;氨基酸741-1230 + 1637-1648;氨基酸741-1301 + 1637-1648;氨基酸741-965 + 1637-1648;氨基酸741-965 + 1637-1648;氨基酸741-965 + 1637-1648;和氨基酸741-965 + 1637-1648。

[0068] 5. 本发明的FVIII分子,其中至少一个半寿期延长部分与所述FVIII分子共价连接。

[0069] 6. 本发明的FVIII分子,其中至少一个水溶性聚合物与B结构域中存在的聚糖共价连接。优选地,所述水溶性聚合物是多糖和/或PEG。

[0070] 7. 本发明的FVIII分子,其中所述水溶性聚合物选自:PEG、PSA和HSA。

[0071] 8. 本发明的药物组合物,其中所述组合物还包含VWF或VWF片段。

[0072] 9. 本发明的药物组合物,其中所述VWF片段包含至多1200个氨基酸,和其中所述VWF片段包含TIL'结构域或TIL'/E'结构域。

[0073] 10. 本发明的药物组合物,其中所述VWF片段不包含1099和/或C1142半胱氨酸。

[0074] 11. 本发明的药物组合物,其中所述VWF片段包含SEQ ID NO 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21的任一个的氨基酸序列。

[0075] 12. 本发明的药物组合物,其中所述VWF片段不包含SEQ ID NO 22的位置1099和/或1142的半胱氨酸残基。这些半胱氨酸残基可以经氨基酸取代和/或缺失而缺失。

[0076] 13. 本发明的药物组合物,其中所述VWF片段包含SEQ ID NO 9,其中1099半胱氨酸残基被例如以下的另一氨基酸取代:组氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、精氨酸、亮氨酸、天冬酰胺、赖氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、色氨酸、甘氨酸、缬氨酸、脯氨酸、丝氨酸、牛磺酸和酪氨酸。优选地,1099半胱氨酸残基被丝氨酸取代。

[0077] 14. 本发明的药物组合物,其中所述 VWF 片段包含选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO 10、SEQ ID NO 11、SEQ ID NO 12、SEQ ID NO 13、SEQ ID NO 14、SEQ ID NO 15、SEQ ID NO 16、SEQ ID NO 17、SEQ ID NO 18、SEQ ID NO 19、SEQ ID NO 20 和 SEQ ID NO 21,其中 1099 和 1142 半胱氨酸残基被例如以下的另一氨基酸取代:组氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、精氨酸、亮氨酸、天冬酰胺、赖氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、色氨酸、甘氨酸、缬氨酸、脯氨酸、丝氨酸、牛磺酸和 / 或酪氨酸。优选地,1099 和 1142 半胱氨酸残基被丝氨酸取代。

[0078] 15. 本发明的药物组合物,其中小于 10%、优选小于 9%、优选小于 8%、优选小于 7%、优选小于 6%、优选小于 5%、优选小于 4%、优选小于 3%、优选小于 2%、优选小于 1% 的所述 VWF 片段呈寡聚物和 / 或多聚体形式。

[0079] 16. 本发明的药物组合物,其中所述 VWF 片段是二聚体。二聚体形成的百分率可以是至少 5%、优选地至少 10%、优选地至少 15%、优选地至少 20%、优选地至少 25%、优选地至少 30%、优选地至少 35%、优选地至少 40%、优选地至少 45%、优选地至少 50%、优选地至少 55%、优选地至少 60%、优选地至少 65%、优选地至少 70%、优选地至少 75%、优选地至少 80%、优选地至少 85%、优选地至少 90%、最优选地至少 95%。

[0080] 17. 本发明的药物组合物,其中 FVIII 和 VWF 的比例是 0.5:1 - 1:50。优选地所述比例是大约 0.5:1、1:1 或 1:2。

[0081] 18. 本发明的药物组合物,其中所述组合物包含 1、2、3、4、5 或更多不同的 VWF 片段和 / 或 1、2、3、4 或 5 种不同的本发明的 FVIII 分子。

[0082] 19. 本发明的药物制剂,其中所述 FVIII 分子的浓度为至少大约 100、150、200、250、300、350、400、500、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、15,000、16,000、17,000、18,000、19,000、20,000、20,000、21,000、22,000、23,000、24,000、25,000、26,000、27,000、28,000、29,000 或 30,000 IU/ml。

[0083] 20. 本发明的药物制剂,其中与 VWF 片段结合的 FVIII 的量占所述制剂中的 FVIII 总量的至少 20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90 或 95%。

[0084] 21. 本发明的药物组合物在经血管外(例如,皮下)给药治疗血友病中的用途。本发明的药物组合物也可经皮内给予。本发明的药物组合物还可以经静脉内给予。

[0085] 22. 治疗血友病的方法,其中所述方法包括给有需要的患者经皮下给予治疗有效量的本发明的药物组合物。

[0086] 23. 治疗冯维勒布兰德氏病的方法,其中所述方法包括给有需要的患者经皮下给予治疗有效量的本发明的药物组合物。

[0087] 24. 本发明的药物组合物,其中所述组合物包含 VWF 片段或 VWF-样多肽,其包含 TIL' 序列 764-778 的 15 个 N 末端氨基酸或更多。所述 VWF 片段或多肽可以任选地缀合到一个或多个半寿期延长部分,任选通过 N- 和 / 或 O 连接的聚糖。

[0088] 25. 本发明的药物组合物,其中所述组合物包含一个或多个 VWF 片段,其中对于与 FVIII 的结合,所述 VWF 片段至少与 SEQ ID NO 1 所示的 FVIII 氨基酸序列的残基 C1858-Q1874、S2063-D2074 和 V2125-A2146 相互作用。

实施例

[0089] 尽管本文已经说明和描述了本发明的某些特征,但是对于本领域技术人员而言可进行许多修改、取代、改变和等同方案。因此,可以理解,所附权利要求书意图覆盖所有这些落入本发明真实精神内的修改和改动。

[0090] 实施例 1:

在 FVIII 敲除小鼠中的皮下给予 (1):

制备了 2 种试验化合物:

a) 糖聚乙二醇化 FVIII, 即“N8-GP” (基本上按照 W02009108806 的实施例 1+2 中公开的而制备) 2000 U FVIII/ml, 经显色活性测定, 根据蛋白含量相当于 1.2 μ M。

[0091] b) 糖聚乙二醇化 FVIII, 即 N8-GP (2000 U FVIII/ml 或 1.2 μ M, 与 0.74 mg/ml VWF 片段 TIL'/E'/D3/A1 (相当于 9.3 μ M) 共同配制。

[0092] 将这两种试验化合物配制在 18 mg/ml NaCl、3 mg/ml 蔗糖、1.5 mg/ml L-组氨酸、0.1 mg/ml 聚山梨酯 80、0.25 mg/ml CaCl_2 , pH 7.3 中。

[0093] 将 12 只 FVIII KO 小鼠 (在 C57Bl/6 和 SV129 的混合背景中外显子 16 敲除, 在 Taconic M&B (B6.129S4-F8tm1Kaz/J) 繁育, 体重大约 22 g), 在侧面经皮下给予 10000 IU/kg FVIII 或 FVIII/VWF, 每种测试化合物 6 只小鼠。

[0094] 在给药后 1、3、7、17、24、30、48、72 和 96 小时采集血液样品。采血前用异氟烷/ $\text{O}_2/\text{N}_2\text{O}$ 经由眼眶后丛 (retroorbital plexus) 麻醉小鼠。每只小鼠采集三个样品。血液 (45 μ l) 用 5 μ l 柠檬酸钠 (0.13 M) 稳定并加入 200 μ l FVIII coatest SP 缓冲液 (50mM TRIS-HCl、1% BSA、环丙沙星 10 mg/L, pH 7.3)。在室温下在 4000 g 离心 5 分钟后, 将上清液立即在干冰上冷冻, 然后贮存于 -80°C , 然后进行分析。

[0095] 在 Ovlisen K 等人. J. Thromb. Haemost, 2008, 6:969-975 所述的显色测定法中, 并在 FVIII LOCI 测定法 (发光氧通道免疫测定法 (Luminescence oxygen channelling immunoassay)) 中通过 FVIII 抗原分析, 使用 2 种 FVIII 轻链抗体 (4F45 和 4F11), 分析样品的 FVIII 活性。

[0096] 通过非室分析来分析平均血浆浓度与时间数据, 使用 WinNonlin Phoenix (Pharsight Corporation) 评价指定的药代动力学参数。使用先前在 FVIII KO 小鼠中的 N8-GP 的经静脉内药代动力学研究, 评价生物利用度。

[0097] FVIII 活性的循环分布图见图 1 所示, FVIII 抗原的循环浓度见图 2。

[0098] 在本实验中, 糖聚乙二醇化 FVIII 单用的生物利用度经计算为 27% (根据活性) 和 19% (根据抗原)。与 VWF 的共同配制将生物利用度分别增加至 40 和 47%。

[0099] 实施例 2:

在 FVIII 敲除小鼠中的皮下给予 (2):

制备了 2 种试验化合物:

a) 糖聚乙二醇化 FVIII (500 IU FVIII/ml, 经显色活性测定相当于 0.3 μ M)

b) 糖聚乙二醇化 FVIII (500 IU FVIII/ml 或 0.3 μ M, 与 0.185 mg/ml VWF 片段 TIL'/E'/D3/A1 (相当于 2.3 μ M) 共同配制

根据所测的 1.5 nM VWF 片段对 FVIII 的 IC_{50} 并假定所测的 IC_{50} 等于 K_d , 在该组合中 99% 的 FVIII 应当与 VWF 结合。

[0100] 将这两种试验化合物配制在 18 mg/ml NaCl、3 mg/ml 蔗糖、1.5 mg/ml L-组氨酸、

0.1 mg/ml 聚山梨酯 80、0.25 mg/ml CaCl_2 (pH ~7.3) 中。

[0101] 将 12 只 FVIII KO 小鼠 (在 C57Bl/6 和 SV129 的混合背景中外显子 16 敲除, 在 Taconic M&B (B6.129S4-F8tm1Kaz/J) 繁育, 体重大约 22 g), 在侧面经皮下给予 2500 IU/kg FVIII 或 FVIII/VWF, 每种测试化合物 6 只小鼠。

[0102] 在给药后 1、3、7、17、24、30、48、72 和 96 小时采集血液样品。采血前用异氟烷/ O_2 / N_2O 经由眼眶后丛麻醉小鼠。每只小鼠采集三个样品。45 μl 血液用 5 μl 柠檬酸钠 (0.13 M) 稳定并加入 200 μl FVIII coatest SP 缓冲液 (50mM TRIS-HCl、1% BSA、环丙沙星 10 mg/L, pH 7.3)。在室温下在 4000 g 离心 5 分钟后, 将样品立即在干冰上冷冻, 然后贮存于 -80°C , 然后进行分析。

[0103] 在 Ovlisen K 等人. J. Thromb. Haemost, 2008, 6 :969-975 所述的显色测定法中, 并在 FVIII LOCI 测定法 (发光氧通道免疫测定法) 中通过 FVIII 抗原分析, 使用 2 种 FVIII 轻链抗体 (4F45 和 4F11), 分析样品的 FVIII 活性。

[0104] 通过非室分析来分析平均血浆浓度与时间数据, 使用 WinNonlin Phoenix (Pharsight Corporation) 评价指定的药代动力学参数。使用先前在 FVIII KO 小鼠中的 N8-GP 的经静脉内药代动力学研究, 评价生物利用度。

[0105] FVIII 活性的循环分布图见图 3 所示, FVIII 抗原的循环浓度见图 4。

[0106] 在本实验中, 糖聚乙二醇化 FVIII 单用的生物利用度经计算为 29% (根据活性) 和 14% (根据抗原)。与 VWF 的共同配制将生物利用度增加至 36% (抗原测定)。

[0107] 实施例 3:

经皮下给予的共同配制的 FVIII 化合物和 VWF 化合物的止血功效:

研究概述:

动物: FVIII k/o 小鼠, 8-18 周龄, 雄性和雌性

尾巴出血: n=6-12/ 时间点 / 组

血栓-弹性成像: n=2-4/ 时间点 / 组

给药途径: 经皮下在颈部或侧面 (对于对照组, 在尾静脉经静脉内)

剂量体积 1-10ml/kg

分组:

在损伤前 24 小时给予溶媒对照

在损伤前 5 分钟经静脉内给予对照

在损伤前 5 分钟、1、3、5、12、24、48、72、96、120、144 或 168 小时经皮下给予与 VWF 化合物共同配制的 FVIII 化合物。

[0108] 程序:

将目标化合物在缓冲液 (10 mM L- 组氨酸、8.8 mM 蔗糖、0.01 % 聚山梨酯 80、308 mM NaCl、1.7 mM CaCl_2 (二水合物)、0.37 mM L- 甲硫氨酸, pH 6.9) 中制备为介于 40 和 10000U/ml 之间的浓度并贮存于 -80°C 直到使用。

[0109] 在尾巴横切前, 小鼠用异氟烷麻醉并放在加热垫上。

[0110] 将尾巴放在 37°C 预热的盐水中 10 min。

[0111] 在损伤前 5 min、24 或 48hr 经静脉内注射对照。

[0112] 在距离尾尖 4 mm 处切断尾巴。

[0113] 就在切断尾巴之前从眼眶周丛 (peri-orbital plexus) 抽取 20 μ l 血液样品,用于 FVIII 测定。

[0114] 在 30 min 内采集血液并通过分光光度法在 550 nm 处测定血红蛋白浓度。

[0115] 平行动物用于血液采样和它们的凝血参数的后续分析 (离体功效)。

[0116] 结果:

在皮下给予后某时间点 (5min 到 168hr), 在 30min 研究周期期间将血液损失与以下相比, 确定共同配制的预防效果: 1, 溶媒对照, 和 2, 经静脉内给予 FVIII 或糖聚乙二醇化 FVIII 的对照组。图 10 显示糖聚乙二醇化 FVIII 在经皮下给予 2500 U/kg 后 24 hr 能有效止血, 正如血液损失减少和离体凝血时间缩短所示。对于与 VWF 片段共同配制的 FVIII 观察到类似效果。

[0117] 实施例 4:

FVIII 的生物利用度的评价:

可以根据在实施例 1 和 2 中所述的 PK 实验中对生物利用度的效果的评价以及在实施例 3 中所述的预防效果的评价, 测定本发明的 FVIII 和 VWF/VWF 片段的共同组合物 (co-composition) 的生物利用度。

[0118] 根据组合物中的 FVIII 化合物的浓度并根据评价 VWF 片段化合物与 FVIII 化合物的结合亲和力的实验例如表面等离子体共振实验, 可以测定与一定浓度的 VWF 片段共同配制的 FVIII 化合物的生物利用度, 所述一定浓度的 VWF 片段能够使注射组合物中的大部分 FVIII 与 VWF 片段化合物结合。

[0119] 实施例 5:

FVIII:VWF 共同组合物的剂量测定:

可以按照实施例 1-3 中公开进行剂量测定。简而言之, 在 FVIII k/o 小鼠中经皮下给予 70、100、150、280、500、1000 和 2500IU/kg (FVIII 单位) 剂量单用或与 VWF 片段联用后, 评价 FVIII 的血浆浓度。

[0120] 实施例 6:

FVIII 化合物和 VWF 化合物间的比例的测定:

可以按照类似于实施例 1 和 2 的实验中公开的和实施例 3 中描述的, 进行 FVIII 和 VWF 间的比例的测定。

[0121] 对于 PK 评价, 280、500、1000 或 2500IU/kg 剂量的 FVIII 化合物将与 VWF 片段共同配制, 其摩尔比为 1:1、1:1.5、1:2、1:3、1:4、1:5、1:7.7 或至多 1:100 (FVIII 比 VWF 片段), 并在经皮下给予后在 FVIII k/o 小鼠中评价 FVIII 的血浆浓度。根据所述片段与讨论中的 FVIII 化合物的结合亲和力测定 VWF 片段对于 FVIII 的最大摩尔过量; 所用的最高摩尔过量将是导致至少 99% 的所用 FVIII 与 VWF 片段结合的摩尔过量。

[0122] 对于预防效果, 在功效模型例如实施例 3 所述的尾巴出血中评价来自 PK 实验的候选组合物。

[0123] 实施例 7:

VWF 对 FVIII 免疫原性的作用

相对于单用野生型 FVIII 和 FVIII 化合物而言, 评价与 FVIII 化合物共同配制的 VWF 的免疫调节作用。

[0124] 在给予后某时间点,在体内,根据 FVIII 结合抗体效价和中和抗体(抑制剂)水平的测定来评价相对免疫原性。用于测定 FVIII 结合抗体的测定法是放射免疫测定法(RIA)。简而言之,来自样品的抗 FVIII 抗体与放射性 ^{125}I -标记的 rFVIII 结合。免疫球蛋白和免疫复合物与蛋白 G-琼脂糖结合并通过离心而沉淀。测定沉淀物中的放射性,这与样品中的抗 FVIII 抗体的量成比例。结果表示为所加入的放射性总量的百分率,即 % 结合 / 总量 (%B/T)。

[0125] 使用显色测定法,对于抗 FVIII 抗体呈阳性的样品,分析 FVIII 中和抗体的存在。简而言之,将样品与 1 IU/ml FVIII 孵育 1 小时。通过加入 FIX、FX、凝血酶、 CaCl_2 和磷脂,测定剩余 FVIII 活性。孵育后,通过加入显色底物 S-2760 并测定光密度(OD)的变化,测定所产生的 FXa 的量。OD 的变化与样品中的 FVIII 活性成比例,并将其与含有已知量的 FVIII 和无抑制剂的样品进行比较。与未添加抑制剂 / 抗 FVIII 抗体的参考样品相比,计算试验样品中 % 剩余活性。此外,通过 ELISA,使用与鼠 VWF 无交叉反应的单克隆或多克隆的抗人 VWF 抗体,测定抗 VWF 抗体的存在。如果检测到强烈抗 VWF 反应,可以预期这会干扰 VWF 与 FVIII 的结合并使用鼠 VWF 片段重复体内分析。

[0126] 在首次用于实验的小鼠中,在 FVIII k/o 小鼠中,以及在耐受人 FVIII 的小鼠中,重复(例如每周 1 次共 4 周,或每周 1 次共 3 周)经皮下给予所述化合物后,评价抗药物抗体的表现。在第一次和 / 或最后一次给予后的某个时间点(例如,1、2、3、4、5、6、7 或 8 周),读出的是具有阳性效价的动物比例。给 FVIII k/o 小鼠每周注射例如 1000 IU/kg FVIII 单用或与 VWF 联用,其摩尔比确保至少例如 87% 的 FVIII 与 VWF 结合。对于每天给药, FVIII 剂量较低并根据 FVIII-VWF 复合物的生物利用度。给耐受 hFVIII 的小鼠每周注射例如共 8 周经皮下给予例如 1000 IU/kg FVIII,有或无 VWF,并且在某些实验中包括第一次注射用完全弗氏佐剂(CFA)的额外攻击,随后用不完全弗氏佐剂(IFA)每周攻击。

[0127] 此外,在人 CD4⁺ T 细胞测定法中,在体外评价 VWF 与 VWF 片段以及野生型 FVIII 与同 VWF 共同配制的 FVIII 化合物的相对免疫原性。这使用耗尽 CD8⁺ T 细胞的外周血单核细胞(PBMC)而完成。将 FVIII 加入到细胞培养物中,例如达 8 天。在测定过程中评价 T 细胞增殖,即通过例如用 ^3H -胸苷在来自培养物的亚样品中脉冲 18 小时并随后测定 ^3H -胸苷的掺入。在测定结束时,使用来自例如 R&D Systems 的 ELISPOT IL-2 试剂盒,按照制造商的说明书,测定白介素 2 的产生。将测定中得到的数据转化为“刺激指数”,描述经化合物刺激的细胞与未经刺激的细胞之间的比例。

[0128] 使用 HLA-结合性质的计算机分析(in silico analysis),已经评价了 VWF 的 HLA 结合能力。对经修饰 VWF 中的序列的强烈结合可能指示新的 T 细胞表位,尽管计算机分析工具预测可不被天然存在的蛋白酶加工的表位。为了预测 Cys→Ser 突变是否会导致 VWF-突变体中的免疫原性降低的风险,将 VWF 蛋白序列应用于计算机上的肽/HLA-II 结合预测软件。肽/HLA-II 结合预测软件是基于 2 种不同算法:NetMHCIIpan 2.1 (NetMHCIIpan-2.0 - 改进的泛特异性 HLA-DR 预测,使用新的并行比对和权重优化训练程序 (Nielsen M, Lundegaard C, Justesen S, Lund O, 和 Buus S. Immunome Res. 2010 Nov 13;6(1):9) 进行泛特异性 HLA-DR 预测),以及 NetMHCII 2.0 (NN-align - 一种基于神经网络的比对算法,用于 MHC II 类肽结合预测 (Nielsen M 和 Lund O. BMC Bioinformatics. 2009 Sep 18;10:296) 进行 HLA-DP/DQ 预测)。

[0129] 在位置 12 具有突变点的 23 个氨基酸长度的肽用作算法的输入。经优化处理的肽被假定为 15 聚体肽,其具有与 HLA-II 结合的 9 个氨基酸核心肽。输出是 15 个氨基酸长度的肽,其具有 9 个氨基酸长度的核心肽(与 HLA-II 接触)和预测的结合亲和力为毫微摩尔级别。

[0130] VWF 突变肽的预测的结合亲和力的范围与野生型序列的结合亲和力范围相同(数据未显示) - 并且因为预测了所述肽以相对差的亲和力与 HLA-II 分子结合,所以认为导致新的 CD4+ T 细胞表位的风险非常低。

[0131] 注意,在计算机上的肽/HLA-II 结合预测是基于实验性的肽/HLA-II 结合数据,其中测试富含半胱氨酸的肽是非常具有挑战性的(因为所述肽的性质)。因此,富含半胱氨酸的肽在用于训练不同的预测算法的数据组中未被充分代表。因此,这些富含半胱氨酸的 VWF 肽的肽/HLA-II 结合预测是不确定的,应当使用其他免疫原性预测平台(等,体外肽/HLA-II 结合测定法或离体 T 细胞测定法)对其做进一步分析。

[0132] 实施例 8:

在 FVIII 敲除小鼠中的皮下给予 (3):

制备了 2 种试验化合物:

A) B- 结构域截短的 FVIII (“turoctocog alfa”/“N8” - 基本上按照 W02009108806 的实施例 1 中公开的而制备) (4000 IU FVIII/ml, 经显色活性测定法测定, 相当于 2.4 μ M)

B) B- 结构域截短的 FVIII (turoctocog alfa) (1000 IU FVIII/ml, 经显色活性测定法测定, 相当于 0.6 μ M) 与 0.37 mg/ml VWF 片段 TIL’/E’/D3/A1 (相当于 4.6 μ M) 共同配制

根据所测的 1.5nM VWF 片段与 FVIII 的结合亲和力,在该组合中 99% 的 FVIII 应当与 VWF 结合。

[0133] 将这两种试验化合物配制在 18 mg/ml NaCl、3 mg/ml 蔗糖、1.5 mg/ml L-组氨酸、0.1 mg/ml 聚山梨酯 80、0.25 mg/ml CaCl₂, pH ~7.3 中。

[0134] 将 12 只 FVIII KO 小鼠(在 C57Bl/6 和 SV129 的混合背景中外显子 16 敲除,在 Taconic M&B (B6.129S4-F8tm1Kaz/J) 繁育,体重大约 22 g),在侧面经皮下给予 10000 IU/kg FVIII 或 FVIII/VWF,每种测试化合物 6 只小鼠。

[0135] 在给药后 1、3、7、17、24、30、48、72 和 96 小时采集血液样品。采血前用异氟烷/O₂/N₂O 经由眼眶后丛麻醉小鼠。每只小鼠采集三个样品。45 μ l 血液用 5 μ l 柠檬酸钠 (0.13 M) 稳定并加入 200 μ l FVIII coatest SP 缓冲液 (50mM TRIS-HCl、1% BSA、环丙沙星 10 mg/L、pH 7.3)。在室温下在 4000 g 离心 5 分钟后,将上清液立即在干冰上冷冻,然后贮存于 -80°C,然后进行分析。

[0136] 在 Ovlisen K 等人. J. Thromb. Haemost, 2008, 6:969-975 所述的显色测定法中,并在 FVIII LOCI 测定法(发光氧通道免疫测定法)中通过 FVIII 抗原分析,使用 2 种 FVIII 轻链抗体 (4F45 和 4F11),分析样品的 FVIII 活性。

[0137] 通过非室分析来分析平均血浆浓度与时间数据,使用 WinNonlin Phoenix (Pharsight Corporation) 评价指定的药代动力学参数。使用先前在 FVIII KO 小鼠中的 N8-GP 的经静脉内药代动力学研究,评价生物利用度。

[0138] FVIII 活性的循环分布图见图 5 所示,抗原水平见图 6。

[0139] 在本实验中, B- 结构域截短的 FVIII 单用的生物利用度经计算为 0, 9% (根据活性)。与 VWF 片段的共同配制将生物利用度增加至 11%。

[0140] 实施例 9:

在 FVIII 敲除小鼠中的皮下给予 (4):

制备了 2 种试验化合物:

A) 226 个氨基酸 B 结构域分子 (1000 IU FVIII/ml, 经显色活性测定法测定, 相当于 2.4 μ M)

B) 226 个氨基酸 B 结构域分子 (1000 IU FVIII/ml, 经显色活性测定法测定, 相当于 0.6 μ M) 与 0.37 mg/ml VWF 片段 TIL' /E' /D3/A1 (相当于 4.6 μ M) 共同配制

根据所测的 1.5 nM VWF 片段与 FVIII 的结合亲和力, 在该组合物中 99% 的 FVIII 应当与 VWF 结合。

[0141] 将这两种试验化合物配制在 18 mg/ml NaCl、3 mg/ml 蔗糖、1.5 mg/ml L-组氨酸、0.1 mg/ml 聚山梨酯 80、0.25 mg/ml CaCl_2 , pH ~7.3 中。

[0142] 将 12 只 FVIII KO 小鼠 (在 C57Bl/6 和 SV129 的混合背景中外显子 16 敲除, 在 Taconic M&B (B6.129S4-F8tm1Kaz/J) 繁育, 体重大约 22 g), 在侧面经皮下给予 10000 IU/kg FVIII 或 FVIII/VWF, 每种测试化合物 6 只小鼠。

[0143] 在给药后 1、3、7、17、24、30、48、72 和 96 小时采集血液样品。采血前用异氟烷 / O_2 / N_2O 经由眼眶后丛麻醉小鼠。每只小鼠采集三个样品。45 μ l 血液用 5 μ l 柠檬酸钠 (0.13 M) 稳定并加入 200 μ l FVIII coatest SP 缓冲液 (50mM TRIS-HCl、1% BSA、环丙沙星 10 mg/L, pH 7.3)。在室温下在 4000 g 离心 5 分钟后, 将上清液立即在干冰上冷冻, 然后贮存于 -80°C, 然后进行分析。

[0144] 在 Ovlisen K 等人. J. Thromb. Haemost, 2008, 6 :969-975 所述的显色测定法中, 并在 FVIII LOCI 测定法 (发光氧通道免疫测定法) 中通过 FVIII 抗原分析, 使用 2 种 FVIII 轻链抗体 (4F45 和 4F11), 分析样品的 FVIII 活性。

[0145] 通过非室分析来分析平均血浆浓度与时间数据, 使用 WinNonlin Phoenix (Pharsight Corporation) 评价指定的药代动力学参数。使用先前在 FVIII KO 小鼠中的 N8-GP 的经静脉内药代动力学研究, 评价生物利用度。

[0146] 在本实验中, 226 个氨基酸 B 结构域 FVIII 分子单用的生物利用度类似于与 VWF 共同配制所得的生物利用度。因此, 对于具有较长 B- 结构域的该分子而言, VWF 不增加生物利用度。

[0147] 实施例 10

编码 FVIII 分子的表达载体的构建

具有编码 F8-500 FVIII 分子 (F8-500 相当于 turoctocog alfa/N8 编码序列) 的插入序列的质粒用于产生 FVIII。在 N- 端开始, F8-500 载体编码无 B 结构域的 FVIII 重链 (氨基酸 1-740)、21 个氨基酸接头 (SFSQNSRHPSQNPPVLKRHQR - SEQ ID NO 2) 和 FVIII 轻链 (全长野生型人 FVIII 的氨基酸 1649-2332)。该 21 个氨基酸接头的序列源自 FVIII B 结构域并由全长野生型人 FVIII 的氨基酸 741-750 和 1638-1648 组成。从全长 FVIII cDNA 扩增 FVIII cDNA 的片段并插入到 F8-500 编码质粒中, 得到编码 BDD FVIII 的 DNA 构建体。

[0148] 如下所述, 建立了编码 F8-500D-HIS-C2- 连接的 -(GGGS)6-hFc(IgG1)、

F8-500D-HIS-C2- 连接的 -(GGGS)6-mFc (IgG2A) 和 F8-500D-HIS-C2- 连接的 -(GGGS)6- 白蛋白的构建体。通过定点诱变, 消除了 F8-500 编码 DNA 中的内部 BamHI 位点 (aa 604-606), 并将编码柔性 (GGGS)₆ 接头的 DNA 插入到编码区的 3'。在接头-编码 DNA 的 3' 端引入新 BamHI 位点, 以便在 BamHI 和 NotI 位点之间容易克隆 C- 末端融合配偶体。因此, 产生了编码 F8-500-C2- 连接的 -(GGGS)6 的构建体。扩增了编码人 Fc (IgG1)、小鼠 Fc (IgG2a) 和人血清白蛋白的 DNA。

[0149] 将 PCR 产物插入到 F8-500-C2- 连接的 -(GGGS)6 编码载体的 BamHI 和 NotI 位点之间, 得到编码 F8-500-C2- 连接的 -(GGGS)6-hFc (IgG1)、F8-500-C2- 连接的 -(GGGS)6-mFc (IgG2A) 和 F8-500-C2- 连接的 -(GGGS)6- 白蛋白的构建体。将来自后一构建体的 SphI/ClaI 限制片段转入 F8-500D-His 编码构建体, 以产生 F8-500D-HIS-C2- 连接的 -(GGGS)6-hFc (IgG1)-、F8-500D-HIS-C2- 连接的 -(GGGS)6-mFc (IgG2A)- 和 F8-500D-HIS-C2- 连接的 -(GGGS)6- 白蛋白的编码构建体。

[0150] 对于实施例 11 中所述的瞬时表达, 使用由哺乳动物表达载体 pTT5 以及编码 BDD FVIII 的插入序列组成的 DNA 构建体。对于制备 BDD FVIII 的稳定细胞系的产生, 使用载体 pTSV7。该载体编码二氢叶酸还原酶, 允许选择经转染的具有二氢叶酸还原酶系统的细胞。将来自编码 F8-500D-His 的 pTT5- 衍生的载体的 SpeI/AgeI 限制片段转入编码 F8-500 的 pTSV7- 衍生的载体, 导致由 pTSV7 以及编码 F8-500D-His 的插入序列组成的构建体 #1917。

[0151] 实施例 11

FVIII 的瞬时表达

密度为 $0.9 - 1.1 \times 10^6$ 的 HKB11 细胞用质粒 (0.7 mg/l 或 1.0 mg/l) 和转染剂 293Fectin (Invitrogen) (1.0 ml/l 或 1.4 ml/l) 的复合物转染。通过分别稀释质粒和转染剂, 将这两种溶液混合并在室温下将混合物孵育 20 分钟, 制备转染复合物。将复合混合物加入到细胞悬液中并将悬液在振荡器培养箱中在 36.5°C 或 37°C 和 5% 或 8% CO₂ 中孵育 4 或 5 天。通过实施例 14 所述的显色 FVIII 测定法分析细胞培养收获物和 / 或将细胞培养收获物在 0.22μm 膜滤器上过滤并用于按照实施例 13 所述进行 FVIII 纯化。

[0152] 实施例 12

表达 FVIII 的稳定的细胞系

适应无血清的 CHO-DUKX-B11 细胞用实施例 10 所述的并编码 FVIII F8-500D-His 的表达质粒构建体 #1917 转染。转染后的细胞用二氢叶酸还原酶系统选择并通过有限稀释而克隆。通过 ELISA 和显色活性测定法来筛选产生 FVIII 的克隆。选择克隆 GedT019A 用于扩大规模 (upscaling)。将细胞移至生物反应器。按照实施例 13 所述, 从细胞培养收获物中纯化 F8-500D-His 蛋白。

[0153] 实施例 13

FVIII 的纯化

给柱填充树脂 VIIISelect (GE Healthcare), 其尺寸为: 直径 1.6cm 和床高 4cm, 共 8mL, 并将柱用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl₂ + 0.01% Tween80+250mM NaCl, pH7.3 以 500cm/h 平衡。将按照实施例 3 所述制备的培养物滤液上柱, 然后先用平衡缓冲液洗涤柱子, 再用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl₂ + 0.01% Tween80+1.5M NaCl, pH7.3 洗涤柱子。结合的 FVIII 用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl₂ + 0.01% Tween80 + 1M 乙酸铵 + 6.5M 丙二醇, pH7.3 以

90cm/h 等度洗脱。合并含有 FVIII 的流分并用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% Tween80, pH7.3 进行 1:10 稀释,然后上样到填装有 F25- 琼脂糖的柱上 (Thim 等人., Haemophilia, 2009)。柱尺寸为直径 1.6cm 和床高 2cm,柱体积 4mL。上样前,柱子用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% Tween80 + 150mM NaCl + 1M 甘油, pH7.3 以 180cm/h 平衡。上样后,先用平衡缓冲液洗涤柱子,再用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% Tween80 + 650mM NaCl, pH7.3 洗涤柱子。结合的 FVIII 用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% Tween80 + 2.5M NaCl + 50%(v/v) 乙二醇, pH7.3 以 30cm/h 等度洗脱。合并含有 FVIII 的流分并用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% Tween80, pH7.3 进行 1:15 稀释,除了缺失 a3 结构域的 FVIII- 分子之外,其在相同缓冲液中进行 1:45 稀释。将稀释的合并液上样到填装有 Poros 50HQ (PerSeptive Biosystem) 的柱子上,柱尺寸为直径 0.5cm 和床高 5cm,柱体积 1mL。上样前,柱子用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% Tween80 + 50mM NaCl + 1M 甘油, pH7.3 以 300cm/h 平衡。柱子用平衡缓冲液洗涤,然后用从平衡缓冲液至以下溶液的在 5 倍柱体积内的线性梯度洗脱:20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% Tween80 + 1M NaCl + 1M 甘油, pH7.3。合并含有 FVIII 的流分并将合并液贮存于 -80°C 直至使用。

[0154] 基本上如上所述地纯化具有 HIS- 标签的 FVIII 分子,然而第二纯化步骤 (F25- 琼脂糖) 替换为装有 2 倍柱体积的 1M NiSO_4 的螯合琼脂糖 FF (GE Healthcare)。柱尺寸为直径 0.5cm 和床高 5cm,柱体积 1mL。上样前,柱子用 30mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% Tween80 + 1.5M NaCl, pH7.3 以 180cm/h 平衡。上样后,柱子用 30 倍柱体积的平衡缓冲液洗涤,然后用在 5 倍柱体积内至以下溶液的线性梯度洗脱:250mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% Tween80 + 1.5M NaCl, pH7.3。合并含有 FVIII 的流分并用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% Tween80, pH7.3 进行 1:30 稀释。最终的纯化步骤 (Poros 50HQ) 如上所述地进行。

[0155] 实施例 14

通过显色测定法而测定的细胞培养收获物中的 FVIII 活性

在显色 FVIII 测定法中,使用 Coatest SP 试剂 (Chromogenix) 如下评价 rFVIII 化合物的 FVIII 活性 (FVIII:C):将 rFVIII 样品和 FVIII 标准品 (Coagulation reference, Technoclone) 在 Coatest 测定缓冲液 (50 mM Tris、150 mM NaCl、1 % BSA, pH 7.3, 含防腐剂) 中稀释。将 50 μl 样品、标准品和缓冲液阴性对照加入到 96 孔微量滴定板 (Spectraplates MB, Perkin Elmer)。所有样品都以 1:100、1:400、1:1600 和 1:6400 稀释度测定。将来自 Coatest SP 试剂盒的因子 IXa/ 因子 X 试剂、磷脂试剂和 CaCl_2 按照 5:1:3 (体积比) 混合,并取 75 μl 加入到孔中。在室温下孵育 15 min 之后,加入 50 μl 因子 Xa 底物 S-2765/ 凝血酶抑制剂 I-2581 混合物并将反应物在室温下孵育 5 min,然后加入 25 μl 1 M 柠檬酸, pH 3。在 Envision 微量滴定板读板器 (Perkin Elmer) 上测定在 405 nm 处的吸光度,并用在 620 nm 处的吸光度用作参考波长。从所有样品中减去阴性对照值并通过吸光度值对 FVIII 浓度作图的线性回归来制作标定曲线。存在的 FVIII 相对于 F8-500 蛋白的收率见表 1。

[0156] 实施例 15

通过显色测定法而测定的纯化样品中的 FVIII 活性

在显色 FVIII 测定法中,使用 Coatest SP 试剂 (Chromogenix) 如下评价 rFVIII 化合

物的 FVIII 活性 (FVIII:C) :将 rFVIII 样品和 FVIII 标准品 (例如, 针对来自 NIBSC 的第 7 次国际 FVIII 标准品而标定的纯化的野生型 rFVIII) 在 Coatest 测定缓冲液 (50 mM Tris、150 mM NaCl、1 % BSA、pH 7.3、含防腐剂) 中稀释。将 50 μ l 样品、标准品和缓冲液阴性对照加入到 96 孔微量滴定板 (Nunc), 一式两份。将来自 Coatest SP 试剂盒的因子 IXa/ 因子 X 试剂、磷脂试剂和 CaCl₂ 按照 5:1:3 (体积比) 混合, 并取 75 μ l 加入到孔中。在室温下孵育 15 min 之后, 加入 50 μ l 因子 Xa 底物 S-2765/ 凝血酶抑制剂 I-2581 混合物并将反应物在室温下孵育 10 min, 然后加入 25 μ l 1 M 柠檬酸, pH 3。在 Spectramax 微量滴定板读板器 (Molecular Devices) 上测定在 415 nm 处的吸光度, 并用 620 nm 处的吸光度用作参考波长。从所有样品中减去阴性对照值并通过吸光度值对 FVIII 浓度作图的线性回归来制作标定曲线。通过样品活性除以经 HPLC 测得的蛋白质浓度而计算比活。对于 HPLC, 通过将色谱图中对应于轻链的峰下面面积积分确定样品浓度, 并与在野生型 rFVIII 的平行分析中的相同峰的面积比较, 其中通过氨基酸分析确定浓度。结果见表 1。

[0157] 实施例 16

通过一期凝血测定法 (one-stage clot assay) 而测定的纯化样品中的 FVIII 活性

在一期凝血测定法中, 如下所述地进一步评价 rFVIII 化合物的 FVIII 活性 (FVIII:C) : 将 rFVIII 样品和 FVIII 标准品 (例如, 针对来自 NIBSC 的第 7 次国际 FVIII 标准品而标定的纯化的野生型 rFVIII) 在 HBS/BSA 缓冲液 (20 mM hepes、150 mM NaCl, pH 7.4, 含 1% BSA) 中稀释至大约 10 U/ml, 接着在含有 VWF 的 FVIII- 缺乏的血浆 (Dade Behring 或 Siemens) 中进行 10 倍稀释。随后将样品在 HBS/BSA 缓冲液中稀释。使用单因素程序, 在 ACL300R 或 ACL9000 仪器 (Instrumentation Laboratory) 上测量 APTT 凝血时间。含有 VWF 的 FVIII- 缺乏的血浆 (Dade Behring 或 Siemens) 用作测定血浆, 并将 SynthASil (HemosIL™, Instrumentation Laboratory) 用作 aPTT 试剂。在凝血仪器中, 将稀释的样品或标准品在 37°C 与 FVIII- 缺乏的血浆、aPTT 试剂混合。测定氯化钙并通过浊度确定至凝血形成的时间。基于 FVIII 标准品稀释物的凝血形成时间的标准曲线, 计算样品中的 FVIII 活性。结果见表 1。

[0158] 表 1: 不同的 BDD FVIII 分子 (“His- 标记的”以便更容易纯化) 的收率和比活。

化合物	B 结构域氨基酸	瞬时转染 的收率 (相对于 F8-500)	通过显 色测定 法测定 的比活 (IU/mg)	通过一 期凝血 测定法 测定的 比活 (IU/mg)
F8-500E-His	741-857 + 1637-1648	0.7	10501	9122
F8-500L-His	741-914 + 1637-1648	0.6	10330	8282

F8-500M-His	741-954 + 1637-1648	0.6	12404	10259
F8-500D-His	741-965 + 1637-1648	0.3	9015	9579
F8-500G-His	741-965 + 1637-1648 氨基酸取代: N757Q- N784Q- N828Q-N900Q- N943Q-N963Q	0.7	11507	9822
F8-500N-His	741-1003 + 1637-1648	0.4	-	-
F8-500H-His	741-1020 + 1637-1648	0.7	10027	10541
F8-500I-His	741-1079 + 1637-1648	0.7	-	-
F8-500J-His	741-1206 + 1637-1648	0.6	-	-
F8-500F-His	741-1261 + 1637-1648	0.3	5691	4855
F8-500K-His	741-1309 + 1637-1648	0.4	-	-
F8-500-His2-4N	741-914 + 1637-1648	0.6	-	-
F8-500-His2-5N	741-954 + 1637-1648	0.7	-	-
F8-500-His2-6N	741-968 + 1637-1648	0.6	14088	12784
F8-500-His2-7N	741-1003 + 1637-1648	0.5	7211	7542
F8-500-His2-8N	741-1018 + 1637-1648	0.7	8664	7481
F8-500-His2-10N	741-1070 + 1637-1648	0.6	12391	8253
F8-500-His2-11N	741-1230 + 1637-1648	0.5	-	-
F8-500-His2-15N	741-1301 + 1637-1648	0.4	-	-
F8-500D-His-D519V-E1984A	741-965 + 1637-1648	0.5	15282	9729

F8-500D-His-C2 连接的 -(GGGS)6-hFc(IgG1)	741-965 + 1637-1648	0.6	-	-
F8-500D-His-C2 连接的 -(GGGS)6-mFc(IgG2a)	741-965 + 1637-1648	0.6	13509	8858
F8-500D-His-C2 连接的 -(GGGS)6-白蛋白	741-965 + 1637-1648	0.7	12226	5852

[0159] 实施例 17

编码 VWF 片段的表达载体的构建

通过聚合酶链式反应 (PCR), 使用质粒 pLC095 作为模板 (质粒 pLLC095 描述于实施例 26), 产生 DNA 片段, 其编码 VWF 信号肽、接着是不同的 C-末端截短的形式、VWF D' 结构域和 VWF D3 结构域、Ala-Leu-Ala 间隔基和 HPC4 标签。在所有 PCR 反应中, 引物 JP1000 用作正向引物, 连同反向引物 JP1001- JP1008, 见表 2。

[0160] 表 2

正向引物	正向引物序列(5'-3')
JP1000 VWF-HindIII S	CTAAGCGTAAGCTTGCCACCATGATTCCTGCCA GATTTGCCGG (SEQ ID NO 23)
反向引物	反向引物序列(5'-3')
JP1001 VWF 764-828	TGGTCCTCAGCTAGCGCGGGACACCTTTCCAGG GCCACAC (SEQ ID NO 24)
JP1002 VWF 764-865	TGGTCCTCAGCTAGCGCGGCATCACACACATG GTCTGTGC (SEQ ID NO 25)
JP1003 VWF 764-1035	TGGTCCTCAGCTAGCGCTCTGGTGTGACACAC TGCGAGCTC (SEQ ID NO 26)
JP1004 VWF 764-1041	TGGTCCTCAGCTAGCGCTGAGTCCAGAGGCACT TTTCTGG (SEQ ID NO 27)
JP1005 VWF 764-1045	TGGTCCTCAGCTAGCGCGGTGGCAGGGGATGA GTCCAGAG (SEQ ID NO 28)
JP1006 VWF 764-1250	TGGTCCTCAGCTAGCGCGCATCTGTGGGAGG CACCACC (SEQ ID NO 29)
JP1007 VWF 764-1261	TGGTCCTCAGCTAGCGCGTCCTCCACATACAGA GTGGTG (SEQ ID NO 30)
JP1008 VWF 764-1268	TGGTCCTCAGCTAGCGCATCGTGCAACGGCGGT TCCGAG (SEQ ID NO 31)

使用快速DNA连接试剂盒(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany),将PCR产物用HindIII和NheI消化,随后克隆到经HindIII和NheI消化的pJSV164载体中。pJSV164是基于pTT5的表达载体(Yves Durocher, CNRC, Montreal, Canada),其含有CD33信号肽和HPC4标签。用HindIII和NheI消化pJSV164,去除了CD33信号肽并允许将目标基因与HPC4标签在读框内克隆,以产生编码C-末端HPC4标记的目标基因的表达盒,其中目标基因和HPC4标签被Ala-Leu-Ala接头肽间隔开来。将连接反应物转化Top10细胞(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)。

[0161] 所得8个质粒命名如表3。所产生的蛋白质的氨基酸序列概述于SEQ ID NO 4、5、6、7、8、11和16。

[0162] 表3

载体名称	插入序列
pJSV343	VWF764-828-HPC4 (SEQIDN04)
pJSV344	VWF764-865-HPC4 (SEQIDN05)
pJSV345	VWF764-1035-HPC4 (SEQIDN06)
pJSV346	VWF764-1041-HPC4 (SEQIDN07)
pJSV347	VWF764-1045-HPC4 (SEQIDN08)
pJSV348	VWF764-1250-C1099/1142S-HPC4 (SEQIDN011)
pJSV349	VWF764-1261-C1099/1142S-HPC4 (SEQIDN014)

pJSV350	VWF764-1268-C1099/1142S-HPC4 (SEQ ID NO 15)
---------	---

实施例 18：

编码 VWF 片段的表达载体的构建 (2)

通过连接非依赖性克隆 (LIC)，使用 pJSV348 (参见实施例 17) 作为模板，产生了 3 个额外的 HPC4 标记的截短的 VWF 分子。3 次独立 PCR 反应在 pJSV438 上进行，使用表 4 中所示的引物。

[0163] 表 4

片段	引物名称	引物序列(5'-3')
VWF(864-1250)-HPC4 (SEQ ID NO 12)	VWF(864-1250)-HPC4 S	GGGACCCTTTGTGATGCCACGTGCTCCACGATCGG (SEQ ID NO 32)
	VWF(864-1250)-HPC4 AS	GCACGTGGCATCACAAAGGGTCCC TGGCAAATGAG (SEQ ID NO 33)
VWF(764-1128)-HPC4 (SEQ ID NO 9)	VWF(764-1128)-HPC4 S	TTGTGCCCCCAGGAGGACCAAGTAGATCCGCGGCTC (SEQ ID NO 33)
	VWF(764-1129)-HPC4 AS	TACTTGGTCCTCCTGGGGGCACAATGTGGCCGTC (SEQ ID NO 34)
VWF(764-1198)-HPC4 (SEQ ID NO 10)	VWF(764-1198)-HPC4 S	GACTGTCCAGTGGAGGACCAAGTAGATCCGCGG (SEQ ID NO 35)
	VWF(764-1198)-HPC4 AS	TTGGTCCTCCACTGGACAGTCTTCAGGGTCAA (SEQ ID NO 36)

这 3 个 PCR 片段 VWF(864-1250)-HPC4、VWF(764-1128)-HPC4 和 VWF(764-1198)-HPC4 在大小上分别为 5685/5610/5817 bp。PCR 片段经 DpnI 处理后除去甲基化模板 DNA。随后从凝胶上纯化 PCR 片段并通过 LIC 自我连接，使用 In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA) 以产生环状 DNA 片段，然后转化到 Top10 细胞 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)。

[0164] 所得 3 个质粒的名称见表 5。所产生的蛋白质的氨基酸序列概述于 SEQ ID NO 12、

9 和 10。

[0165] 表 5

载体名称	插入序列
pJSV405	VWF (864-1250)-C1099/1142S-HPC4 单体 (SEQIDN012)
pJSV406	VWF (764-1128)-C1099S-HPC4 单体 (SEQIDN09)
pJSV407	VWF (764-1198)-C1099/1142S-HPC4 单体 (SEQIDN010)

实施例 19：

VWF 片段的瞬时表达

密度为 $0.9 - 1.1 \times 10^6$ 细胞 /ml 的人胚肾 293 6E 悬浮细胞用编码 VWF 片段的质粒 (0.7 mg/l 或 1.0 mg/l) 和转染剂 293Fectin (Invitrogen) (1.0 ml/l 或 1.4 ml/l) 的复合物转染。通过分别稀释质粒和转染剂,将这两种溶液混合并在室温下将混合物孵育 20 分钟,制备转染复合物。将复合混合物加入到细胞悬液中并将悬液在振荡器培养箱中在 36.5℃或 37℃和 5%或 8% CO₂ 中孵育 5 天。将细胞培养收获物在 0.22μm 膜滤器上过滤并用于按照实施例 22 所述进行 VWF 片段纯化。

[0166] 实施例 20：

VWF 片段的二聚体形式的制备

在天然全长 VWF 分子 (SEQ ID NO 22) 中,认为在分子的 N- 末端部分的 2 个半胱氨酸残基参与 VWF 的二聚化和 / 或多聚化 :Cys1099 和 Cys1142。

[0167] 在序列 (SEQ ID NO 10、SEQ ID NO 11、SEQ ID NO 12、SEQ ID NO 13、SEQ ID NO 14、SEQ ID NO 15、SEQ ID NO 16、SEQ ID NO 17、SEQ ID NO 18、SEQ ID NO 19、SEQ ID NO 20 和 SEQ ID NO 21) 的所有单体片段中,两个半胱氨酸残基 (Cys1099 和 Cys1142) 突变为其它氨基酸残基,使得所表达的分子不能形成二聚体 / 多聚体。通过使 Cys 1099 突变为另一氨基酸残基,产生 SEQ ID NO 9 的单体片段。

[0168] 在某些情况下,想要 VWF 片段的二聚体形式。这可以以若干方式来实现：

实现二聚体形成的一种方法是使位置 1099 和位置 1142 的两个残基保持为半胱氨酸。为了制备重组二聚体分子,编码所需 VWF 片段的 cDNA 包括 VWF 的前序列,例如 VWF 的 D1D2 序列 (SEQ ID NO 22 的氨基酸残基 23-763)。在高尔基体中加工期间,这将会对齐指定 VWF 片段的两个单体,其构型允许用两个二硫键形成二聚体分子,其中单体 1 中的 Cys1099 与单体 2 中的 Cys1099 连接,而单体 1 中的 Cys1142 与单体 2 中的 Cys1142 连接。

[0169] 实现二聚体形成的另一种方法是避免包括前序列 (SEQ ID NO 22 的氨基酸残基 23-763) 和仅允许具有位置 1099 和 1142 的 Cys 的重组 VWF 片段形成二聚体分子。这在原则上可以产生一系列不同的二聚体,例如：

Cys1099-Cys1099/Cys1142-Cys1142 (两个二硫键 - 如上)

Cys1099-Cys1142/Cys1099-Cys1142 (两个二硫键)

Cys1099-Cys1099 (一个二硫键)

Cys1142-Cys1142 (一个二硫键)

Cys1099-Cys1142 (一个二硫键)

实现二聚体形成的再一种方法可以用其它氨基酸残基 (例如,丝氨酸、精氨酸) 取代半胱氨酸残基 1099 或 1142 中的一个。

[0170] 如果 Cys1099 被非 - 半胱氨酸残基取代,则所述分子可以通过在单体 1 中的

Cys1142 与单体 2 中的 Cys1142 之间建立二硫键而形成二聚体。

[0171] 如果 Cys1142 被非 - 半胱氨酸残基取代, 则所述分子可以通过在单体 1 中的 Cys1099 与单体 2 中的 Cys1099 之间建立二硫键而形成二聚体。

[0172] 用或不用 VWF 的 D1D2 前序列 (SEQ ID NO 22 的氨基酸残基 23-763), 都可构建上述二聚体形式。

[0173] 不同的单体形式和二聚体形式在与 FVIII 结合、生产的容易性、和对 FVIII 生物利用度的影响 (当共同配制并经皮下注射时) 方面具有不同性质。

[0174] 实施例 21:

使用竞争 ELISA, 评价 VWF 和 VWF 片段与 FVIII 的结合

为了研究不同的 VWF 片段与 FVIII 的结合, 使用以下方法。简而言之, 用人 VWF 包被微量滴定板并在 4°C 孵育过夜。封闭后, 将含有预孵育的 FVIII (1nM) 和 VWF/VWF- 片段的溶液加入到板中, 然后用生物素化抗 FVIII 抗体和链霉抗生物素 - 过氧化物酶 S-POD (1:20000) 进行检测。在 450/620nm 处测定吸光度。IC₅₀ 值见表 6。

[0175] 表 6:

化合物 编号	结构域/注释	VWF 片段序列	衍生自 SEQ ID NO	IC50 (Ki)
2304	TIL'E'	VWF(764-865)-ALA-HPC4 单体	5	2.0 μ M
2306	TIL'E'/VWD3 II	VWF(764-1041)-ALA-HPC 4 单体	7	2.2 μ M
2307	TIL'E'/VWD3 III	VWF(764-1045)-ALA-HPC 4 单体	8	2.0 μ M
2308	TIL'E'/D3 I	VWF(764-1250)-C1099/114 2S-ALA-HPC4 单体	11	12 nM
2309	TIL'E'/D3 II	VWF(764-1261)-C1099/114 2S-ALA-HPC4 单体	14	10 mM
2310	TIL'E'/D3 III	VWF(764-1268)-C1099/114 2S-ALA-HPC4 单体	16	15 nM
0170	TIL'E'/D3/A1 III	VWF(764-1464)-C1099/114 2S-HPC4 单体	19	12 nM
0194	TIL'E'/D3/A1 III	VWF(764-1464)-C1099S-H PC4 单体	19	8.0 nM
0240	TIL'E'/D3/A1 III 二聚体	VWF(764-1464)-HPC4 二聚 体	19	0.7 nM
0001	D3 I	VWF(864-1250)-C1099/114 2S-ALA-HPC4 单体	12	20 μ M
0003	TIL'E'/VWD3/C8 -3/TIL-3	VWF(764-1198)-C1099/114 2S-ALA-HPC4 单体	10	28 nM
0314	血浆衍生的全长 VWF	VWF (764-2813)	22	1.1 nM

不同片段之间的FVIII 结合的这些差异能够指示共同配制的经皮下给予的FVIII 的不同效果。IC50 值也用于确定共同配制混合物中的最佳 VWF 和 FVIII 浓度。

[0176] 实施例 22：

HPC4- 标记的 VWF 片段的纯化和表征

克隆和表达了一些 VWF 片段,其具有 C- 末端 HPC4 标签 :EDQVDPRLIDGK (SEQ ID NO 37)。有时将具有 ALA 序列的额外接头引入 VWF 片段和 HPC4 标签之间。克隆、表达和细胞

培养后,向细胞培养基中加入 CaCl_2 至终浓度 1mM。使培养基通过抗 HPC4 柱。该柱用 20mM HEPES、100mM NaCl、1mM CaCl_2 , pH=7.5 平衡。细胞培养基上样后,将柱子用 20mM HEPES、1M NaCl、1mM CaCl_2 , pH=7.5 洗涤,随后 HPC4- 标记的 VWF 片段用 20mM HEPES、100mM NaCl、5mM EDTA, pH=7.5 洗脱。向来自抗 HPC4 柱的合并液中加入 3 倍体积的水以降低电导率并上样到 Mono Q 柱。上样之前,将 Mono Q 柱用 20mM HEPES、100mM NaCl、5mM EDTA, pH=7.5 平衡。Mono Q 柱用 20mM HEPES、100mM NaCl, pH=7.5 洗涤,VWF 片段用从 100mM NaCl 至 2M NaCl 的 20mM HEPES、10mM CaCl_2 , pH=7.5 的梯度洗脱。

[0177] 纯化的蛋白经以下方法表征:1) SDS- 凝胶电泳,2) 分析型 HPLC,和 3) 氨基酸序列分析。

[0178] 无标记的 VWF 片段的纯化和表征

克隆、表达和细胞培养后,使细胞培养基通过抗 VWF 柱。抗 VWF 抗体识别 VWF (SEQ ID NO 5) 的氨基酸残基编号 764-865。该柱用 20mM HEPES、100mM NaCl, pH=7.5 平衡。细胞培养基上样后,将柱子用 20mM HEPES、1M NaCl, pH=7.5 洗涤,随后 VWF 片段用 50mM 乙酸、100mM NaCl, pH=4.0 洗脱。将来自抗 VWF 柱的合并液调节至 pH=7.5 并上样到 Mono Q 柱。上样之前,将 Mono Q 柱用 20mM HEPES、100mM NaCl、pH=7.5 平衡。Mono Q 柱用 20mM HEPES、100mM NaCl, pH=7.5 洗涤,VWF 片段用从 100mM NaCl 至 2M NaCl 的 20mM HEPES, pH=7.5 的梯度洗脱。

[0179] 纯化的 VWF 片段经以下方法表征:1) SDS- 凝胶电泳,2) 分析型 HPLC,和 3) 氨基酸序列分析。

[0180] 实施例 23:

通过使用等温滴定量热法,评价 VWF 片段与 VWF 的结合

所有蛋白样品在 50 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl、10 mM CaCl_2 缓冲液中透析。每次 iTC 实验都包括用 FVIII (大约 250 μL) 填充 iTC 池并注射 VWF 分子 (大约 40 μL)。温度按需要来设定,允许在指定实验条件下平衡蛋白样品 (大约 10 分钟)。典型地,向含有 FVIII 的池中注射 17 - 20 次 (2 - 2.5 μL) VWF 分子。第一次注射通常为 0.2 μL 并将其从最终数据分析中弃去,以负责平衡步骤期间的扩散。搅拌速度设定在 700 - 1000 rpm。数据采集的过滤周期为 5 秒,按照高反馈模式设定。每次滴定间隔 120 秒。进行合适的对照实验。原始数据经处理以设定基线并积分以获得最终的等温线。将该结合等温线拟合到单位点模型,得到 K_d 、化学计量学 (n)、 ΔH 和 ΔS 值,以完成与 FVIII 结合的 VWF 分子的表征。结合等温线的实例见图 9。这些数据被用于确定共同配制并经皮下给予的 FVIII 和 VWF 片段的最佳浓度。

[0181] 实施例 24

在 FVIII 敲除小鼠中的皮下给予

试验化合物制备如下:将试验化合物配制在 18 mg/ml NaCl、3 mg/ml 蔗糖、1.5 mg/ml L- 组氨酸、0.1 mg/ml 聚山梨酯 80、0.25 mg/ml CaCl_2 , pH ~7.3 中。对于含有 VWF 或 VWF 片段的试验制剂而言,计算在共同配制中的 VWF 所结合的 % FVIII,使用以上实施例 21 (表 6) 所述的可得的 IC_{50} (K_i) 值,假定 $K_i=K_d$ 或如实施例 23 中所述而得到的 K_d 值。

[0182] FVIII KO 小鼠 (在 C57Bl/6 和 SV129 的混合背景中外显子 16 敲除,在 Taconic M&B (B6.129S4-F8tm1Kaz/J) 繁育,体重大约 22 g),在侧面经皮下给予 FVIII 以及不同的

蛋白质,每种测试化合物 6-9 只小鼠。剂量体积为 5ml/kg 或 0.25ml/kg,如果表 7 中指明的话。

[0183] 在稀疏的采样方案中,在从 0 至 96 小时的 9 个时间点采集血液样品,n= 2-3 只小鼠 / 时间点,每只小鼠采集 3 份血液样品。采血前用异氟烷 /O₂/N₂O 经由眼眶后丛麻醉小鼠。45 μl 血液用 5 μl 柠檬酸钠 (0.13 M) 稳定并加入 200 μl FVIII Coatest SP 缓冲液 (50mM TRIS-HCl、1% BSA、环丙沙星 10 mg/L, pH 7.3)。在室温下在 4000 g 离心 5 分钟后,将上清液立即在干冰上冷冻,然后贮存于 -80℃,然后进行分析。

[0184] 按照 Ovlisen K 等人. J. Thromb. Haemost, 2008, 6 :969-975 所述,并在 FVIII LOCI 测定法 (发光氧通道免疫测定法) 中通过 FVIII 抗原分析,使用 2 种 FVIII 轻链抗体 (4F45 和 4F11),分析样品的 FVIII 显色活性。

[0185] 通过非室分析来分析平均血浆浓度与时间数据,使用 WinNonlin Phoenix (Pharsight Corporation) 评价指定的药代动力学参数。使用先前在 FVIII KO 小鼠品系中的 N8 或 N8-GP 的经静脉内药代动力学研究,评价生物利用度。

[0186] 试验化合物的经皮下 FVIII 生物利用度见下表 7 和图 7 和 8。

[0187] 表 7. 一系列不同的 FVIII 分子和 FVIII/VWF 片段共同配制并经皮下给予 FVIII k/o 小鼠所得的 FVIII 生物利用度值。左栏“FVIII”是指本实验所用的 FVIII 化合物。标为“FVIII 剂量”的一栏是指本实验中所用的 FVIII 剂量 (IU/kg),标为“共同配制蛋白”的一栏是指本实验所用的共同配制的蛋白 (如果有的话)。标为“摩尔比”的一栏是指共同配制中的 FVIII 与蛋白的摩尔比。标为“FVIII 饱和度”的一栏是指在实验所用浓度时与共同配制的蛋白结合的 FVIII 的计算部分。标为“F%”的一栏是指实验中得到的 FVIII 的生物利用度。

FVIII	FVIII 剂量	共同配制蛋白	摩尔比	FVIII 饱和度	F%
Turoctocog alfa	5000	(764-1464) 单体 VWF	1	87%	7.3
rFVIII, 衍生自全长序列 (Kogenate®)	2500	(764-1464) 二聚体 VWF	1	82%	7.4

Turoctocog alfa	2500	(764-1250) 单体 VWF	1	82%	7.6
Turoctocog alfa	2500	(764-1041) 单体 VWF	34	82%	7.8
Turoctocog alfa	2500	(764-828) 单体 VWF	1	12%	1.4
Turoctocog alfa	2500	(764-865) 单体 VWF	1	12%	2.7
Turoctocog alfa	2500	(764-1045) 单体 VWF	1	12%	2.0
Turoctocog alfa	2500	(764-865) 单体 VWF	34	83.3%	4.3
Turoctocog alfa	2500/ 0.25 ml/kg	(764-1041) 单体 VWF	3x	85.5%	5.03
Turoctocog alfa	2500/ 0.25 ml/kg	(764-865) 单体 VWF	3x	86.5%	1.9
Turoctocog alfa	2500/ 0.25 ml/kg	(764-1464) 二聚体 VWF	1x	99%	8.4
Turoctocog alfa	2500	(764-1464) 鼠单体 VWF	1	82%	5.6
Turoctocog alfa	2500	人血清白 蛋白	611	不适用	3.7
Turoctocog alfa	2500	血浆衍生 的全长 VWF	1	99%	0.0
Turoctocog alfa	5000	(764-1464) 单体 VWF	7.7	99%	8.2

Turoctocog alfa	5000	(764-1464) 单体 VWF	3	99%	6.7
Turoctocog alfa	5000	(764-1464) 单体 VWF	1	87%	7.3
Turoctocog alfa	5000	无	不适用	不适用	2.3
FVIII, 具有 226 aa B 结构域	5000	无	不适用	不适用	4.3
FVIII, 具有 -226 aa B 结构域	5000	(764-1464) 单体 VWF	7.7	0.99	7.0
N8-GP	2500	(764-1464) 单体 VWF	1	0.82	27
N8-GP	10000	(764-1464) 单体 VWF	7.7	0.99	47
N8-GP	2500	(764-1464) 单体 VWF	7.7	0.99	36
N8-GP	2500	(764-1464) 二聚体 VWF	1	0.99	33
FVIII-K1804-Hep 157	2500	(764-1464) 单体 VWF	1	0.82	50
FVIII-K1804-Hep 157	2500	无	不适用	不适用	27
PSA40Kd-O-聚糖 -N8	2500	(764-1464) 单体 VWF	1	0.82	8.8
PSA40Kd-O-聚糖 -N8	2500	无	不适用	不适用	6.1
40kDa-PEG-FVIII -K2092A+F2093A	10000	无	不适用	不适用	20
N8-GP	10000	4F30 FVIII	5	0.99	11

		减少的摄取抗体			
N8-GP	1000	水蛭素	0.5mg/kg	不适用	7.6
N8-GP	10000	透明质酸酶	0.5 活性比	不适用	8.4
N8-GP	20000	无	不适用	不适用	28
N8-GP	10000	无	不适用	不适用	19
N8-GP	2500	无	不适用	不适用	14
N8-GP	1000	无	不适用	不适用	17

[0188] 与 VWF 片段共同配制的 FVIII 的经皮下生物利用度看来依赖于共同配制中的 FVIII VWF 结合部位的饱和度,而不是 VWF 片段长度。最短的 VWF 片段(其中达到 >80% 的 FVIII 饱和度)是 764-865 - 该配制显示出 FVIII 生物利用度为 4.3% (对 VWF 片段而言的 34 摩尔过量的 N8/turoctocog alfa)。在有关饱和度的类似条件下所测的最长 VWF 片段是 764-1464 片段,其导致 FVIII 生物利用度为 7.3%。764-1464 的二聚体形式以 0.25ml/kg 的较低体积给予,导致 FVIII 生物利用度为 8.4%。

[0189] 短于 764-1250 的片段(其不含完整 D3 区)与 FVIII 结合的 IC₅₀ (K_i) 大于较长片段。因此, FVIII 和短于 764-1250 的 VWF 片段的 1 比 1 摩尔的配制表现出较低的 FVIII 生物利用度,即为小于 4%。

[0190] 因此可以得到本发明 VWF 片段的经皮下 FVIII 生物利用度的改善效果,即通过 FVIII VWF 结合部位的 VWF- 片段的饱和。因此,具有相对低 FVIII 结合亲和力的短 VWF 片段应当以高于具有较好的 FVIII 结合性能的较长 VWF 片段的比例来使用,以得到高度的生物利用度。

[0191] 当与 764-1464 VWF 片段共同配制时,衍生自全长序列的 FVIII (Kogenate®) 表现出与具有截短的 B 结构域的 FVIII (turoctocog alfa/N8) 相同程度的生物利用度。这表明高 FVIII 生物利用度不依赖于与 turoctocog alfa/N8 的共同配制,而依赖于 VWF 片段的存在。

[0192] FVIII (turoctocog alfa/N8) 与全长血浆衍生的人 VWF 的共同配制,导致 FVIII 生物利用度为大约 0%,由此证明仅 VWF 片段能够增强 FVIII 的生物利用度。全长 VWF 缺乏效果的原因可能是因为 A3 结构域中的胶原结合部位的存在,其可导致结合和捕获。因此,本发明的优选的 VWF 片段不包含 A3 结构域。或者或另外,全长 VWF 的多聚化能力产生大的多聚体,其因复合物的尺寸而限制了系统吸收。数据表明比表 7 中测试的那些更长的 VWF 片段(优选无 A3 结构域)对 FVIII 生物利用度亦将具有相同的有益效果。

[0193] 血清白蛋白不改善 FVIII (turoctocog alfa/N8) 的经皮下生物利用度。因此,在 FVIII 配制中的额外蛋白的存在看来不增加 FVIII 的经皮下生物利用度,除非该蛋白是本发明的 VWF 片段。

[0194] VWF 剂量对 FVIII 经皮下生物利用度而言并非至关重要,正如在 FVIII:VWF 片段的摩尔比在 1:1 和 1:7.7 时所观察到的。因此,达到高 FVIII 生物利用度的关键性因素看来是与 VWF 片段的高度的 FVIII 饱和度(结合)。在包括 N8 的计算饱和度为至少 86.8% 的这些实验中的所有组合物因此都得到类似的生物利用度。本发明的 VWF 片段因此可以在皮下注射部位保护 FVIII。

[0195] 具有 226 个氨基酸(aa) B 结构域的 FVIII (SEQ ID NO 3),表现出比 turoctocog alfa/N8 更高的经皮下 FVIII 生物利用度。然而,这种具有 226 个 aa B- 结构域的 FVIII 的生物利用度可比得上 turoctocog alfa/N8,当与 VWF- 片段 764-1464 (TIL'/E'/D3/A1) 单体一起经皮下共同给予时。因此,可以推断,当经血管外给予它们时,在 226 aa B- 结构域中的额外氨基酸(与 turoctocog alfa/N8 相比)可以保护 FVIII 的清除部位,意味着这样的 FVIII 分子可用于经皮下给予(有或无本发明的 VWF)。

[0196] FVIIIK1804C-HEP157,表现出生物利用度为 50% (当与 VWF- 片段 764-1464 (TIL'/E'/D3/A1) 单体共同给予时)和生物利用度为 27% (当单用时)。PSA40Kd-0- 聚糖 -N8,表现出生物利用度为 8.8% (当与 VWF- 片段 764-1464 (TIL'/E'/D3/A1) 单体共同给予时)和 6.11% (当单用时)。因此可以推断,Heparosan 聚合物和聚唾液酸聚合物在皮下组织保护 FVIII 免于分解/摄取或者增强经皮下的吸收。Heparosan 比唾液酸聚合物在增强经皮下生物利用度上更有效,并且当与 VWF 片段共同给予时,这两种 FVIII 变体都表现出更高的生物利用度。

[0197] N8-GP 和 FVIIIK1804C-HEP157 + 764-1464 (TIL'/E'/D3/A1) 单体和二聚体,导致得到最高的生物利用度。因此可以通过增加共同配制中的剂量或浓度,而增加 N8-GP 的生物利用度。在所有剂量中,剂量体积是 5ml/kg,因此在剂量溶液中的 N8-GP 浓度在 20000 IU/kg 中比在 10000IU/kg 中高 2 倍。这分别导致 28% 和 19% 的生物利用度。

[0198] 764-1464 二聚体 VWF 片段不含任何突变。764-1464 二聚体 VWF 片段与 Turoctocog alfa 和 N8-GP 结合更强(表 6),但导致的 FVIII 生物利用度类似于所述片段的单体形式。这表明取代本发明的 VWF 片段中的 Cys1099 和/或 Cys1142 不影响 FVIII 的生物利用度。另外,VWF 片段与 N8-GP 的结合亲和力不影响对 N8-GP 的生物利用度的效果,只要在共同配制中超过 80% 的 FVIII 分子与 VWF 片段复合。另外,因为 VWF 片段 764-1464 的二聚体形式改善了生物利用度,所以,所需 VWF 片段的最大分子量可以是等于或大于 158.8 KDa。

[0199] N8-GP 与透明质酸酶的共同配制不增加 FVIII 生物利用度,表明皮下组织中的胞外基质中的透明质酸酶网络不阻碍 FVIII 进入血流。同样,以在体内抑制凝血酶活性的水平给予的水蛭素不影响 N8-GP 生物利用度。FVIII 的凝血酶活化因此看来不影响经皮下 FVIII 生物利用度。

[0200] 抗体 4F30 (在 W02012035050 中进一步表征)(其与 C1 结合并抑制 FVIII 的细胞摄取)不改善 N8-GP 的生物利用度。在该配制中,将 2000 IU/ml N8-GP 与 1 mg/ml 4F30 共同配制,这意味着在体内稀释后 99.6% FVIII 与 mAb 结合,假定 K_d 为 0.6 nM,体内稀释 20x, FVIII (turoctocog alfa/N8) 的分子量为 170000 g/mol,对于 turoctocog alfa/N8 的比活为 10000 IU/mg,4F30 的分子量为 150000 g/mol。另外,具有 K2092A+F2093A 突变的聚乙二醇化 FVIII 表现出减少的细胞摄取,但与 N8-GP 相比,所述突变不改善生物利用度。因此对细胞 FVIII 摄取的抑制看来不是共同配制的 VWF 片段导致 FVIII 经皮下生物利用度增加

的机制。

[0201] 实施例 25：

在新西兰白兔中的皮下给予

将试验化合物配制在 18 mg/ml NaCl、3 mg/ml 蔗糖、1.5 mg/ml L- 组氨酸、0.1 mg/ml 聚山梨酯 80、0.25 mg/ml CaCl₂, pH ~7.3 中。对于含有 VWF 或 VWF 片段的试验配方而言, 使用可得的 IC₅₀ 值 (表 6), 假定 IC₅₀=K_i=K_d, 计算 VWF 所结合的 % FVIII。

[0202] 体重大约 2-3 kg 的雌性新西兰白兔用于研究。让动物自由进食和饮水。兔子在大腿上经皮下给予 FVIII 以及不同蛋白, 每种测试化合物 4-5 只兔子。剂量体积为 0.2ml/kg 或 1ml/kg。

[0203] 在从 0 至 96 小时的 11 个时间点采集血液样品, n= 4-5 只兔子 / 时间点。在每个采样时间点, 使用 21G 针头和 EDTA 包被的管, 从耳动脉采集 1ml 血液。将各管在采血后 10 分钟内在 4000 G 离心 5 分钟并分离血浆。将样品立即在干冰上冷冻, 然后贮存于 -80℃, 然后进行分析。在 FVIII LOCI 测定法 (发光氧通道免疫测定法) 中, 通过 FVIII 抗原分析, 使用 2 种 FVIII 轻链抗体 (4F45 和 4F11), 分析样品。

[0204] 通过非室分析来分析平均血浆浓度与时间数据, 使用 WinNonlin Phoenix (Pharsight Corporation) 评价指定的药代动力学参数。使用经静脉内给予兔子的 FVIII (turoctocog alfa/N8) 和 N8-GP 的药代动力学, 评价生物利用度。

[0205] 所得生物利用度见表 8。

[0206] 表 8:

FVIII	FVIII 剂量/ 剂量体积	共同配制 蛋白	共同配制 蛋白 :FVIII 的摩尔比	FVIII 对共 同配制的 蛋白的饱 和度(%)	F%
FVIII (turoctocog alfa/N8) +VWF	2000/0.2ml /kg	TIL'/E'/D3 /A1	3	99	6.2
N8-GP	700/0.2ml/ kg	-	-	-	40
N8-GP+VW F	700/0.2ml/ kg	TIL'/E'/D3 /A1	3	99	59
N8-GP+VW F	500/ 1ml/kg	TIL'/E'/D3 /A1	3	82	34

剂量体积为 0.2ml/kg 的 N8-GP 和与 VWF 片段 TIL' /E' /D3/A1 共同配制的 N8-GP 的兔子经皮下生物利用度分别为 40 和 59%。剂量体积为 1 ml/kg 的 N8-GP + VWF 的生物利用度为 34%。N8-GP 的生物利用度因此可以受到种类或者受到剂量体积 (在小鼠中为 5ml/kg, 在

兔子中为 0.2ml/kg 或 1ml/kg) 的差异的影响。相对于人类,0.2 ml/kg 是最接近的给药体积。与 VWF 片段 TIL' /E' /D3/A1 共同给予的 FVIII (turoctocog alfa/N8) 在兔子中表现出与在小鼠中类似的生物利用度,尽管给予浓度更高。

[0207] 实施例 26:

编码 VWF 片段的表达载体的构建

由 pZEMHygro 载体以及包含野生型人 VWF cDNA 的插入序列组成的质粒 #796 用作起点,用于产生表达截短的人 VWF 蛋白的 DNA 构建体。

[0208] 通过聚合酶链式反应 (PCR),使用质粒 #796 作为模板,正向引物 oLLC089 VWF 正向和反向引物 oLLC092 VWF A1 HPC4 反向,产生 DNA,其编码 VWF 信号肽、接着是 VWF TIL' E' 结构域、VWF D3 结构域、VWF A1 结构域和 HPC4 标签。这些引物分别含有 Nhe I 和 Not I 限制位点。将所得 PCR 产物插入到 pCR2.1-TOPO 载体 (Invitrogen) 中。从这里,用 Nhe I 和 Not I 限制酶切割 VWF (TIL' /E' /D3/A1)-HPC4 编码 DNA 并插入到已用同样限制酶消化的 pZEM219b 中。因此,建立了 pLLC089 构建体,其由 pZEM219b 以及编码 VWF (TIL' /E' /D3/A1)-HPC4 的插入序列组成。

[0209] 通过 pLLC089 的定点诱变,使用 QuikChange XL 定点诱变试剂盒 (Stratagene) 和 oLLC101-f、oLLC102-r、oLLC103-f 和 oLLC104-r 诱变引物,引入核苷酸取代,导致 pLLC089 编码的 VWF VWF (TIL' /E' /D3/A1)-HPC4 蛋白中的氨基酸取代 C1099/1142S。定点诱变产生 pLLC095 载体,其由 pZEM219b 以及编码 VWF (TIL' /E' /D3/A1)C1099/1142S-HPC4 的插入序列组成。

[0210] 表 9:用于产生 VWF 片段编码 DNA 构建体的寡核苷酸引物

引物名称	引物序列(5'-3')
oLLC089 VWF 正向	CCGCTAGCCCATGATTCCTGCCAGATTTGCCGGGG TGCTGCTTGCTCTGGCCCTCATTTTGCCAGGGACC CTTTGTAGCCTATCCTGTCGGCCCCCATG (SEQ ID NO 38)
oLLC092 VWF A1 HPC4 反向	GATGCGGCCGCCTACTACTATTTGCCATCAATCAG ACGCGGATCCACCTGATCTTCGGCTTCAGGGGCAA GGTCACAGAGGTAGC (SEQ ID NO 39)
oLLC101-f	CATTGGGGACTGCGCCTCCTTCTGCGACACCATTG CTGCC (SEQ ID NO 40)
oLLC102-r	GGCAGCAATGGTGTGCGAGAAGGAGGCGCAGTCC CCAATG (SEQ ID NO 41)
oLLC103-f	CGGGAGAACGGGTATGAGTCTGAGTGGCGCTATA ACAGCTGTGC (SEQ ID NO 42)
oLLC104-r	GCACAGCTGTTATAGCGCCACTCAGACTCATACCC GTTCTCCCG (SEQ ID NO 43)

实施例 27：

表达 VWF 片段的稳定的细胞系

在含 10% 胎牛血清的 Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基上生长的幼仓鼠肾 (BHK) 细胞, 用 pLL095 转染, 使用 Genejuice 转染试剂 (Merck)。通过用 1.5 μ M 甲氨蝶呤选择, 产生转染的细胞库, 得到产生 VWF (TIL' /E' /D3/A1)C1099/1142S-HPC4 的非克隆的 BHK 细胞系。将细胞接种在生物发酵器中, 并且如实施例 22 所述, 从细胞培养上清液中纯化 VWF (TIL' /E' /D3/A1)C1099/1142S-HPC4 蛋白。

[0211] 通过电穿孔, 用 pLLC095 转染在悬浮液中生长的 CHO-DUKX-B11 悬浮细胞。通过无核苷培养基中适应生长, 产生转染的细胞库。随后, 所述库在 100 mM 甲氨蝶呤存在时适应生长, 得到产生 VWF (TIL' /E' /D3/A1)C1099/1142S-HPC4 的非克隆的 CHO-DUKX-B11 细胞系 MBML001。将细胞接种在生物发酵器中, 并且如实施例 22 所述, 从细胞培养上清液中纯化 VWF (TIL' /E' /D3/A1)C1099/1142S-HPC4 蛋白。

[0212] 实施例 28：

VWF 片段保护 FVIII 以免被细胞摄取

在人单核细胞衍生的巨噬细胞或树突细胞 (两者均为抗原呈递细胞) 或 U87 MG 细胞中, 评价了血浆衍生的 (pd) VWF 和 VWF 片段对 FVIII 细胞摄取的作用。U87 MG 细胞得自 ATCC (HTB-14)。将细胞在补充有 10% 热灭活 FCS 的 EMEM 中, 在纤连蛋白-包被的 24-孔板上, 在 37°C 在 5% CO₂ 中培养 48 小时。细胞用缓冲液 A (10 mM HEPES、150 mM NaCl、4 mM KCl、11 mM 葡萄糖, pH 7.4) 仔细洗涤并与缓冲液 B (补充有 5 mM CaCl₂ 和 1 mg/ml BSA 的缓冲液 A) 一起孵育 15 分钟。将放射性标记的 FVIII (¹²⁵I-FVIII, 终浓度 1 nM) 单独孵育或与不同浓度的 pdVWF (American Diagnostica, 终浓度 0.001 nM - 50 nM, 根据单体含量) 或 TIL' /E' /D3/A1 (终浓度 0.25 nM - 500 nM 或 1000 nM) 预混合 10 分钟, 然后加入到 U87 MG 细胞中并与细胞在 37°C 孵育 1 小时, 以允许结合和内在化。随后细胞用冰冷的缓冲液 B 洗涤 3 次。通过将细胞在含有 100 μ g/ml 胰蛋白酶、50 μ g/ml 蛋白酶 K、5 mM EDTA (pH 7.4) 的 PBS 中在冰上孵育 1 小时, 切去表面结合的蛋白。将脱附的细胞转移至管中并离心以沉淀细胞。将表现出细胞结合 FVIII 的上清液转移至新管中。在 gamma 计数器中定量测定具有上清液 (结合的 FVIII) 和细胞沉淀物 (内在化的 FVIII) 的各管中的放射性, 并且基于 ¹²⁵I-FVIII, 使用标准曲线, 计算 FVIII 浓度值。在 VWF 不存在时的结合的 ¹²⁵I-FVIII 设定为 100%。

[0213] 根据制造商的说明书, 使用磁性抗 CD14- 珠 (Miltenyi Biotec) 和 MACS 柱 (Miltenyi Biotec), 通过磁性分离, 从血沉棕黄层中分离的单核细胞中, 分化出树突细胞和巨噬细胞。将单核细胞 (0.5 $\times 10^6$ 细胞 /ml) 接种在 T-75 组织培养瓶中并在含有 10% FBS、1% 青霉素 / 链霉素和 3.3 ng/ml M-CSF (R&D Systems) 的 IMDM 培养基 (GIBCO) 中培养, 以便将细胞分化为巨噬细胞。培养 3 天后加入额外的 3.3 ng/ml M-CSF。或者, 可通过用 40 ng/ml GM-CSF (R&D Systems) 和 40 ng/ml IL-4 刺激 5 天, 将单核细胞分化为树突细胞。将树突细胞在缓冲液 B 中洗涤并移入低结合的 Nunc 管中, 0.5 $\times 10^6$ 细胞 / 管。加入荧光标记的 FVIII, 例如, Oregon-Green FVIII (例如, 30 和 100 nM) 并在 37°C 孵育 1 小时。将细胞洗涤 1 次并通过流式细胞术分析, 使用 LRS Fortessa 仪器 (BD)。巨噬细胞在培养 6 天后用 PBS 洗涤, 并在 4°C 与含有 5% FCS 的 2.5 mM EDTA 的 PBS 孵育 10-20 分钟,

以使细胞脱附。将巨噬细胞 ($7 \times 10^5/\text{well}$) 接种在纤连蛋白 - 包被的 96 孔玻璃底组织培养板 (Perkin Elmer ViewPlate Black)。接种后 24 小时, 将细胞用缓冲液 B 洗涤 1 次, 然后单独或在增加浓度 (15-240 nM) 的 pdVWF (American Diagnostica) 或 TIL' /E' /D3/A1 存在时加入 30 nM 荧光标记的 FVIII (例如, OregonGreen-FVIII)。将巨噬细胞在 37°C 孵育 1 小时。随后, 将细胞用缓冲液 B 洗涤 2 次, 以去除非内在化材料, 然后加入含有 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst33342 (Molecular Probes) 的 PBS, 以观察细胞核。然后立即在 Operetta® 高内涵筛选系统 (Perkin Elmer, Hamburg) 上, 以宽场荧光模式, 使用 20X 高的 NA 物镜, 对板成像。每孔成像 10 个视野并进行分析。在 Harmony® 软件中的图像分析方法是根据统计核 (Hoechst 通道), 然后结构分析 (FVIII 通道), 使用 “find particle” 方法, 以测定小泡的 FVIII。根据核碎片和 / 或 FVIII 与质膜的过量结合, 从分析中去掉死亡或凋亡细胞。为了定量测定内在化的 FVIII, 计算小泡 FVIII 信号的积分的荧光强度并针对时间作图。

[0214] 对 U87 MG 细胞和巨噬细胞的 FVIII 结合和内在化的抑制的 IC50 值见表 10。pdVWF 和 TIL' /E' /D3/A1 两者都能抑制这两种细胞类型的 FVIII 细胞结合 / 摄取, 只要使用足够高的浓度。

[0215] 因为抗原呈递细胞的摄取是将 FVIII 呈递给免疫系统的初始步骤, 所以数据可表明在 FVIII 与 VWF 片段共同配制后可以实现降低的免疫应答。

[0216] 表 10. pdVWF 和 TIL' /E' /D3/A1 片段对 U87 MG 细胞的 FVIII 结合和内在化以及巨噬细胞的摄取的作用。

细胞类型	IC50 (nM)		最大抑制 (%)	
	pdVWF	TIL' /E' /D3/A1	pdVWF	TIL' /E' /D3/A1
U87 (n=3-4) 结合	1.2±0.9	17.6±13.0	34.3±4.2	39.8±7.8
U87 (n=3-4) 内在化	1.3±1.2	22.1±19.2	32.2±7.0	41.2±11.5
巨噬细胞 (n=3)	15.6±3.5	31.5±6.1	32.6±11.4	47.2±11.7

[0217] 实施例 29:

在皮下给予后, 与 VWF 分子共同配制的 FVIII 化合物的功效:

将 FVIII 缺乏的、FVIII-KO 小鼠 (12-16 周龄, 雄性和雌性) 分为 3 组, 每组 12 只动物。在每组中, 8 只动物经历尾巴出血和 4 只动物平行使用, 用于离体功效测试, 使用 ROTEM 分析。

[0218] 在尾巴横切前 24 小时, 经皮下给予糖聚乙二醇化 FVIII 或溶媒。作为阳性对照, 在损伤前 5 分钟, 经静脉内给予糖聚乙二醇化 FVIII。皮下注射在颈部进行, 静脉内注射在侧尾静脉进行。剂量体积为 5 ml/kg。

[0219] 将糖聚乙二醇化 FVIII 在缓冲液 (10 mM L- 组氨酸、8.8 mM 蔗糖、0.01 % 聚山梨酯 80、308 mM NaCl、1.7 mM CaCl_2 (二水合物)、0.01% 聚山梨酯 80 0.1 mg/ml, pH 6.9) 中制备为 40 和 500 U/ml 的浓度并贮存于 -80°C 直到使用。

[0220] 在尾巴横切前,小鼠用异氟烷麻醉并放在加热垫上。将尾巴放在 37°C 预热的盐水中 10 min。在距离尾尖 4 mm 处切断尾巴。

[0221] 就在切断尾巴之前从眼眶周丛抽取 20 μl 血液样品,用于 FVIII 测定。

[0222] 在 30 min 内采集血液并通过分光光度法在 550 nm 处测定血红蛋白浓度。

[0223] 平行动物用于血液采样和它们的凝血参数的后续分析 (离体功效)。用 20 μL 毛细管从眼眶周丛抽取血液样品,无添加剂。将血液样品在 0.13M 柠檬酸钠中稀释 1:10 并小心混合并贮存于室温,并用于通过 ROTEM 进行立即血栓弹性成像。通过加入 7 μL CaCl_2 到小杯 (StarTEM) 中将血液样品再次钙化。然后,将 105 μL 血液加入到小杯中并混合。进行分析,直到达到最大振幅。

[0224] 结果:

在皮下给予后 24 小时,在 30min 研究周期期间将血液损失与以下相比,确定经皮下给予 FVIII 的预防效果:1) 溶媒对照组和 2) 用糖聚乙二醇化 FVIII 的经静脉内对照组。在经皮下给予糖聚乙二醇化 FVIII 组的血液损失与经静脉内给予的组的血液损失相当 (图 10,左图面)。测定凝血参数例如凝血时间的离体功效平行研究支持了血液损失数据 (图 10,右图面)。

[0225] 结论是,经皮下给予 FVIII 看来具有止血活性,根据 PK 分布图和来自离体活性的结果。因此,与 VWF 片段共同配制的经皮下给予的 FVIII 被认为也具有止血活性,这可根据其药代动力学分布图来预测。

[0226] 实施例 30:

经皮下给予的 FVIII $\pm$ VWF 片段在 FVIII- 缺乏的小鼠中的效果。

[0227] 试验化合物:将试验化合物在 10 mM L- 组氨酸 (1.55 mg/ml)、8.8 mM 蔗糖 (3.0 mg/ml)、308 mM NaCl (18 mg/ml)、1.7 mM CaCl_2 二水合物 (0.25 mg/ml)、0.01% 聚山梨酯 80 (0.1 mg/ml), pH 7.3 中制备。

[0228] 动物:使用 F8 敲除 (FVIII k/o) 小鼠组 (129/C57BL/6 或 C57BL/6, 外显子 16 已破坏),进行实验。将 12-18 周龄,体重大约 18 - 25 克的动物包括在实验中。每组包括 12-15 只动物。

[0229] 试验化合物的给予:试验化合物经皮下给予 (或静脉内给予用于对照),使用剂量体积最大为 10 ml/kg (或 5 ml/kg 用于对照)。

[0230] 出血模型:在完全异氟烷麻醉下用小鼠进行尾静脉横切 (TVT) 出血模型。简而言之,麻醉后,出血攻击包括在尾巴直径 2.7 mm 处的侧尾静脉的模板定向横切。将尾巴浸入 37°C 盐水,允许直观记录出血达 60 min,其中在血液分离后,通过如“实施例 3”所述测定血红蛋白浓度,测定血液损失。当可行和经调整后,采集血液样品,用于如上所述地评价血浆中的 FVIII 活性 (FVIII:C)。

[0231] 剂量反应:在 TVT 前,在指定时间点经皮下注射不同剂量的 FVIII 或与 VWF 片段共同配制的 FVIII (例如, N8-GP/VWF)。包括了溶媒和静脉内对照组 / 治疗组,分别用于无效果和最大效果。

[0232] 作用持续时间:经皮下注射 FVIII 或 FVIII/VWF,以鉴定治疗后的延长的效果,即改进的出血表型。在给药后的若干时间点,例如 24、48、72、96 小时,进行 TVT。

[0233] 重复剂量:经皮下给予 FVIII 或 FVIII/VWF 片段,每天一次,共若干天。在不同的时间点进行 TVT 以评价出血表型中的任何改进。

[0234] 数据处理和分析:在整个实验中物理地记录数据。然后,在 GraphPad Prism 第 5 版(GraphPad Software, Inc, CA, USA) 分析之前使用 MS Excel (Microsoft, WA, USA) 汇集数据,用于分析。

[0235] 实施例 31:

经皮下 FVIII ± VWF 片段在其它 FVIII- 缺乏的物种中的效果。

[0236] 在其它物种中进行额外的药效动力学实验,以证实在 A 型血友病的非鼠动物模型例如大鼠和狗中,在皮下给予后的效果。在评价离体效果之前,在诱导出血攻击之前,或作为治疗或预防自发出血的方法,经皮下注射 FVIII 或 FVIII/VWF。

[0237] 试验化合物:将试验化合物在 10 mM L- 组氨酸 (1.55 mg/ml)、8.8 mM 蔗糖 (3.0 mg/ml)、308 mM NaCl (18 mg/ml)、1.7 mM CaCl₂ 二水合物 (0.25 mg/ml)、0.01% 聚山梨酯 80 (0.1 mg/ml), pH 7.3 中制备。

[0238] 动物:在患有 A 型血友病的青春期大鼠 (~12 周龄) 或狗 (6+ 月龄) 中进行实验。

[0239] 试验化合物的给予:试验化合物经皮下给予 (或静脉内给予用于对照),使用剂量体积最大为 10 ml/kg (或 5 ml/kg, 对于对照)。

[0240] 狗的效果模型:在患有 A 型血友病的狗中,离体评价效果,使用替代标记,例如先前所述的血栓弹性成像 (Knudsen 等人, 2011;Haemophilia, 17, 962 - 970),或在体内评价效果,例如按照所述 (Scola 等人, 2011;Ultrasound in Med. & Biol., 37(12), 2126 - 2132),使用通过声力辐射力脉冲 (acoustic force radiation force impulse, ARFI) 超声而监测的标准化的出血攻击。能力允许,给予测试化合物以治疗自发出血的狗。通过评价临床表现的解决来监测效果,与经静脉内治疗的历史数据进行比较。

[0241] 大鼠的效果模型:在患有 A 型血友病的大鼠中,离体评价效果,使用替代标记,例如如上所述用于小鼠和狗的血栓弹性成像,或者在体内评价效果,例如,使用如用于小鼠所述的标准化的出血攻击。能力允许,给予测试化合物以治疗自发出血的大鼠。通过评价临床表现的解决来监测效果,与经静脉内治疗的历史数据进行比较。

[0242] 在其它物种中进行额外的药效动力学实验,以证实在 A 型血友病的非鼠动物模型例如大鼠和狗中,在皮下给予后的效果。

[0243] 实施例 32:

编码 VWF 片段的表达载体的构建

通过基于 PCR 的定点诱变,使用 VWF 1099C S 和 VWF 1099C AS 引物 (表 P),引入核苷酸取代,产生实施例 17 中所述的 pJSV348 编码的 VWF (764-1250)-C1099/1142 S-ALA-HPC4 蛋白中的氨基酸取代 S1142C。这产生 pGB237 载体,其由 pTT5 以及编码 VWF (764-1250)-C1099S-ALA-HPC4 (SEQ ID NO 11) 的插入序列组成。位置 1142 的半胱氨酸允许蛋白二聚化,如实施例 20 所述。

[0244] 同样,通过基于 PCR 的定点诱变,使用 VWF 1142C S 和 VWF 1142C AS 引物 (表 P),引入核苷酸取代,产生实施例 17 中所述的 pJSV348 编码的 VWF (764-1250)-C1099/1

142S-ALA-HPC4 蛋白中的氨基酸取代 S1099C。这产生 pGB238 载体,其由 pTT5 以及编码 VWF(764-1250)-C1142S-ALA-HPC4 (SEQ ID NO 11) 的插入序列组成。位置 1099 的半胱氨酸允许蛋白二聚化,如实施例 20 所述。

[0245] 以类似方式,将 S1099C 氨基酸取代引入实施例 18 中所述的 pJSV406 编码的 VWF(764-1128)-C1099S-HPC4 蛋白,得到 pGB249 载体,其由 pTT5 以及编码 VWF(764-1128)-HPC4 (SEQ ID NO 9) 的插入序列组成。位置 1099 的半胱氨酸允许蛋白二聚化,如实施例 20 所述。

[0246] 经 PCR 扩增编码人 VWF 氨基酸 1-1250 的 cDNA,使用质粒 #796 (描述于实施例 26) 作为模板,正向引物 JP1000 VWF-HindIII S (表 2),和反向引物 JP1006 VWF764-1250 (表 2)。引物 JP1006 VWF764-1250 含有 *Nhe* I 位点。将所得 PCR 产物插入到 pCR4BLUNT-TOPO 载体 (Invitrogen) 的 *Pme* I 限制位点的下游。从这里,用 *Pme* I 和 *Nhe* I 限制酶切割 vWF(1-1250) 编码 DNA 并插入到实施例 17 中所述的 pJSV164 中,产生 pGB242 载体,其由 pTT5 以及编码 vWF(1-1250)-ALA-HPC4 的插入序列组成。位置 1099 和 1142 的半胱氨酸允许蛋白二聚化,如实施例 20 所述,并且前序列的蛋白水解去除将产生 vWF(764-1250)-ALA-HPC4 (SEQ ID NO 11)。

[0247] pJSV348 的 DNA 序列 (描述于实施例 17) 和构建体 #796 (描述于实施例 26) 经 PCR 逆向扩增,使用重叠引物。扩增 pJSV348 序列,使用引物 2764pJSV348 和 1202pJSV348R (表 P),同时扩增构建体 #796 序列,使用引物 221#796F 和 3537#796R (表 P)。从琼脂糖凝胶中切下来自 pJSV348 (受体) 和构建体 #796 (供体) 的扩增产物,并通过连接非依赖性克隆 (LIC) 将其连接在一起,使用 In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech),得到环状 DNA,随后转化到 Stellar 感受态细胞 (Clontech)。所得表达载体称为 pGB252,是由 PTT5 以及编码 VWF(1-1128)-ALA-HPC4 的插入序列组成。位置 1099 的半胱氨酸允许蛋白二聚化,如实施例 20 所述,并且前序列的蛋白水解去除将产生 vWF(764-1128)-ALA-HPC4 (SEQ ID NO 9)。

[0248] 同样,使用 pJSV348 (描述于实施例 17) 作为模板,使用引物 2764pJSV348 和 1202pJSV348R (表 P) 进行扩增,并且使用 #796 (描述于实施例 26) 作为模板,使用引物 221#796F 和 3747#796R (表 P) 进行扩增,产生 pJSV348 (受体) 和构建体 #796 (供体) 扩增产物,其也从琼脂糖凝胶中切下来并通过连接非依赖性克隆 (LIC) 将其连接在一起,使用 In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech),得到环状 DNA,随后转化到 Stellar 感受态细胞 (Clontech)。所得表达载体称为 pGB253,是由 PTT5 以及编码 VWF(1-1198)-ALA-HPC4 的插入序列组成。位置 1099 和 1142 的半胱氨酸允许蛋白二聚化,如实施例 20 所述,并且前序列的蛋白水解去除将产生 vWF(764-1198)-ALA-HPC4 (SEQ ID NO 10)。

[0249] 以类似方式,pJSV348 的 DNA 序列 (描述于实施例 17) 和构建体 #796 (描述于实施例 26) 经 PCR 逆向扩增,使用重叠引物。扩增 pJSV348 序列,使用引物 2764pJSV348 和 2420pJSV348R (表 11),同时扩增构建体 #796 序列,使用引物 3666#796F 和 5203#796R (表 P)。从琼脂糖凝胶中切下来自 pJSV348 (受体) 和构建体 #796 (供体) 的扩增产物,并通过连接非依赖性克隆 (LIC) 将其连接在一起,使用 In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech),得到环状 DNA,随后转化到 Stellar 感受态细胞 (Clontech)。所得表达载体称为 pGB250,是由 PTT5 以及编码 VWF(764-1873)-C1099/1142C-ALA-HPC4 (SEQ ID NO 20) 的插入序列组

成。

[0250] 将从构建体 #796 (描述于实施例 26) 扩增的人 VWF cDNA 序列合并, 产生 pLLC122 载体, 其由 pZEM219b 以及编码 vWF (1-1464)-HPC4 的插入序列组成。位置 1099 和 1142 的半胱氨酸允许蛋白二聚化, 如实施例 20 所述, 并且前序列的蛋白水解去除将产生 vWF (764-1464)-HPC4 (SEQ ID NO 19)。

[0251] 表 11: 用于产生 VWF 片段编码 DNA 构建体的寡核苷酸引物

引物名称	引物序列(5'-3')
VWF 1099C S	GGGGACTGCGCCTGCTTCTGCGACACC (SEQ ID NO 44)
VWF 1099C AS	GGTGTCGCAGAAGCAGGCGCAGTCCCC (SEQ ID NO 45)
VWF 1142C S	GAACGGGTATGAGTGTGAGTGGCGCTATA (SEQ ID NO 46)
VWF 1142C AS	TATAGCGCCACTCACACTCATACCCGTTC (SEQ ID NO 47)
2764pJSV348F	GCGCTAGCTGAGGACCAAGTAGATCCGCGGCTCATTGATGG (SEQ ID NO 48)
1202pJSV348R	GGGCCAGAGCAAGCAGCACCCCGGCAAATCTGGCAGG (SEQ ID NO 49)
221#796F	CCTGCCAGATTTGCCGGGGTGCTGCTTGCTCTGGCCC (SEQ ID NO 50)
3537#796R	TACTTGGTCCTCAGCTAGCGCCTGGGGGCACAATGTGGCCGTCCTCC (SEQ ID NO 51)
3747#796R	TACTTGGTCCTCAGCTAGCGCCACTGGACAGTCTTCAGGGTCAACGC (SEQ ID NO 52)
2420pJSV348R	GGCTCAGGGTGCTGACACGTGACTTGACAGGCAGGTGC (SEQ ID NO 53)
3666#796F	GCACCTGCCTGTCAAGTCACGTGTCAGCACCCCTGAGCC (SEQ ID NO 54)
5203#796R	TACTTGGTCCTCAGCTAGCGCTGCAGGGGAGAGGGTGGGATCTGC (SEQ ID NO 55)

实施例 33

VWF 片段抑制人树突细胞的 FVIII 摄取。

[0252] 如实施例 28 所述, 制备人单核细胞 - 衍生的树突细胞。通过流式细胞术控制树突细胞标记 CD209 和 CD86 的表达, 使用 LRS Fortessa 仪器 (BD)。将荧光标记的 FVIII (Oregon green- FVIII, 30 nM 终浓度) 与不同浓度的血浆衍生的 VWF 或 VWF 片段预混合, 然后在 37°C 与树突细胞一起孵育 1 小时。活 / 死细胞试剂盒 (Invitrogen # L10119, APC-Cy7) 用于门控活树突细胞, 并且定量测定该细胞群内的 FVIII 摄取。每一个实验的数据经标准化处理。无 VWF 样品中的信号定义为 100% FVIII 摄取, 而具有最高浓度的血浆衍生的 VWF (240 nM, 根据单体含量) 的样品中的信号定义为 0%。将来自 3-5 次实验的值合并并在 Prism 软件中使用非线性回归 (log(抑制剂) vs. 反应 - 可变斜率 (4 个参

数)) 计算 IC₅₀ 值。所得 IC₅₀ 值见表 12。数据表明所有所测 VWF 片段都能抑制树突细胞的 FVIII 摄取,只要使用足够高的浓度。因为抗原呈递细胞的 FVIII 摄取是将 FVIII 呈递给免疫系统的初始步骤,所以数据表明 FVIII 与足够高浓度的 VWF 片段的共同配制可能具有降低 FVIII 的免疫原性的潜力。

[0253] 表 12. 血浆衍生的 VWF 和 VWF 片段对树突细胞的 FVIII 摄取的影响。

结构域/注释	VWF 片段序列	IC ₅₀ (nM)*
TIL'/E'/VWD3	VWF(764-1041)-ALA-HPC4 单体	570 (400-820)
TIL'/E'/D3	VWF(764-1250)-C1099/1142S-ALA-HPC4 单体	31 (25-39)
TIL'E'/D3/A1 单体	VWF(764-1464)-C1099/1142S-HPC4 单体	31 (18-52)
TIL'E'/D3/A1 二聚体	VWF(764-1464)-HPC4 二聚体**	16 (11-22)
血浆衍生的 VWF	VWF (764-2813)	9.8 (7.6-13)

[0254] *) 来自 3-5 次实验的数据的最佳拟合值和 95% 置信区间

**) 基于二聚体的摩尔浓度的 IC₅₀ 值,意即将 IC₅₀ 乘以 2,反映了基于 VWF 单体片段含量的 IC₅₀ 值。

[0255] 实施例 34:

在动物中的经皮下 FVIII ± VWF 片段的效果,使用针对 FVIII 的抑制性抗体。

[0256] 目标是使用针对 FVIII 的抑制剂,评价药物组合物治疗 A 型血友病患者的潜力。我们将 FVIII 单用或与 VWF 片段共同配制,经皮下给予首次进行实验的 FVIII-KO 小鼠或 FVIII-KO 小鼠,其中在用所述组合物治疗前通过重复皮下或静脉内给予 FVIII,或通过注射多克隆或单克隆抗 FVIII 抗体,而诱导抑制剂。在麻醉的小鼠中在侧尾静脉横切后评价治疗效果。将尾巴放在 37℃ 预热的盐水中并观察出血达 60 分钟。实验期间的血液损失就是组合物效果的度量。

[0257] 实施例 35:

将 VWF 片段给予 VWF 敲除小鼠:

测试化合物:

鼠 VWF 片段 TIL'/E'/D3/A1 1.829 nmol/ml, 0.015mg/ml

将测试化合物配制在 20mM 咪唑,150mM NaCl、0.02% Tween80、1.1M 甘油、10 mM CaCl₂, pH 7.3 中

6 只 VWF 敲除小鼠 (体重大约 25 g) 在尾巴经静脉内给予 9.48 nmol/kg 鼠 VWF 片段 TIL'/E'/D3/A1。

[0258] 在稀疏的样品设计中,在给药前和在给药后 0.08、0.33、0.5、1、2、4、7、18 和 24 小时采集血液样品,每一时间点对 2 只小鼠采集样品。采血前用异氟烷/ O_2/N_2O 经由眼眶后丛麻醉小鼠。每只小鼠采集三个样品。血液 (45 μ l) 用 5 μ l 柠檬酸钠 (0.13 M) 稳定并加入 200 μ l FVIII coatest SP 缓冲液 (50mM TRIS-HCl、1% BSA、环丙沙星 10 mg/L, pH 7.3)。在室温下在 4000 g 离心 5 分钟后,将上清液立即在干冰上冷冻,然后贮存于 -80°C ,然后进行分析。

[0259] 在抗原 LOCI 测定法 (发光氧通道免疫测定法) 中分析样品的 FVIII 浓度。

[0260] 相对于预剂量值,分析平均血浆浓度与时间数据。

[0261] 给药后相对平均 FVIII 浓度随时间的变化见表 13。

[0262] 表 13. 在 VWF KO 小鼠中,鼠 D' D3A1 IV 对 FVIII 血液浓度的效果。

时间 (h)	FVIII 增加 (% 预剂量)
0.08	174
0.33	190
0.5	176
1	163
2	274
4	250
7	330
18	225
24	207

[0263] 在静脉内给予 VWF 片段后,FVIII 浓度随时间逐渐增加, $T_{\max}$ 在 7 小时后。该发现支持 VWF 片段用于治疗 VWF 疾病以及血友病障碍的潜力。

[0264] 实施例 36:

通过 vWF 片段 TIL' /E' /D3/A1、TIL' /E' /D3、TIL' E' 和 TIL' /E' /VWD3 对 Turoctocog alfa (FVIII) 以及 Turoctocog alfa (FVIII) 对 vWF 片段 TIL' /E' /D3/A1 的 HX-MS 进行相互关系作图

HX-MS 介绍

HX-MS 技术利用蛋白的氢交换 (HX) 可以容易地接着质谱法 (MS)。通过将含氢的含水溶剂替换为含氘的含水溶剂,在蛋白质中的给定位点处的氘原子掺入将引起 1 Da 质量的增加。这种质量增加可以在交换反应的猝灭样品中通过质谱法作为时间的函数进行监控。通过在猝灭条件下用胃蛋白酶消化和接下来所得肽的质量增加,氘标记的信息可被亚定位至蛋白质中的区域。

[0265] HX-MS 的一个用途是通过鉴定在蛋白质-蛋白质复合物形成后具有减少的氢交换的区域,探测涉及分子相互作用的位点。通常,由于溶剂的立体排阻,将通过氢交换中的显著减少而揭示结合界面。简单地通过测量在各自结合配偶体的存在和不存在下作为时间的函数的掺入任一蛋白质成员中的总氘量,可以通过 HX-MS 检测蛋白质-蛋白质复合物形成。HX-MS 技术使用天然组分,即蛋白质和抗体或 Fab 片段,并且在溶液中执行。因此,HX-MS 提供了用于模拟体内条件的可能性 (关于 HX-MS 技术的近期综述,参见 Wales 和 Engen, Mass Spectrom. Rev. 25, 158 (2006))。

[0266] 材料

所用的蛋白批号是:

所用的 FVIII 蛋白批号是:

FVIII (N8, Turoctocog alfa, SEQ ID NO 2) 批号 0155-0000-0004-37A

vWF 片段

D' D3A1 (SEQ ID NO 19 ;Cys1099Ser ;Cys1142Ser) 批号 0129-0000-0170-6B ;2304 (SEQ ID NO 5) 批号 0129-0000-2304-1B ;2307 (SEQ ID NO 8) 批号 0129-0000-2307-1B ; 2308 (SEQ ID NO 11) 批号 0129-0000-2308 2B。

[0267] 所有蛋白质都缓冲液交换到在实验前调整至 pH 7.3 的 20 mM 咪唑、500 mM NaCl、10 mM CaCl₂ 中。

[0268] 方法 :HX-MS 实验

仪器使用和数据记录

HX 实验在 nanoACQUITY UPLC 系统上进行,用 HDX 技术 (Waters Inc.) 联合 Synapt G2 质谱仪 (Waters Inc.)。Waters HDX 系统含有由 LeapShell 软件 (Leap Technologies Inc./Waters Inc.) 操作的 Leap 自动仪 (H/D-x PAL ;Waters Inc.),其执行氘交换反应的起始、反应时间控制、猝灭反应、注射到 UPLC 系统上和消化时间控制。Leap 自动仪配备有分别维持在 20℃ 用于贮存缓冲液和 HX 反应以及维持在 2℃ 用于贮存蛋白质和猝灭溶液的两个温度控制堆。Waters HDX 系统还含有温度控制室,其将前置和分析柱、和 LC 管道系统和切换阀维持在 1℃。单独的温度控制室将胃蛋白酶柱维持在 25℃。对于在线胃蛋白酶消化,装载含有 100 pmol hIL-21 的 100 μL 猝灭的样品并通过放置在 25℃ 的 Poroszyme® 固定化胃蛋白酶柱 (2.1 × 30 mm (Applied Biosystems)),使用等度流速为 100 μL/min (0.1% 甲酸 :CH₃CN 95:5)。在 VanGuard 前置柱 BEH C18 1.7 μm (2.1 × 5 mm (Waters Inc.)) 上捕获所得肽并对其脱盐。随后,将阀切换到使前置柱置于与分析柱 UPLC-BEH C18 1.7 μm (1 × 100 mm (Waters Inc.)) 联机,并且使用以 120 μL/ 分钟递送的 8 min 的 8-45% B 梯度,从 nanoAQUITY UPLC system (Waters Inc.) 上分离肽。移动相由 A: 0.1% 甲酸和 B: 0.1% 甲酸的 CH₃CN 溶液组成。使用 Synapt G2 质谱仪 (Waters Inc.),以阳离子模式获得 ESI MS 数据和单独的升高能量 (MS^E) 的实验。亮氨酸-脑啡肽用作锁定质量 (以 m/z 556.2771 的 [M+H]⁺ 离子),并且以连续集模式收集数据 (有关进一步描述,参见 Andersen 和 Faber, Int. J. Mass Spec., 302, 139 - 148 (2011))。

[0269] 数据分析

使用标准 MS^E 方法在单独实验中鉴定消化性肽,在所述方法中使用 Synapt G2 (Waters Inc.) 的离子迁移性质,进一步比对肽和片段。使用 ProteinLynx Global Server 第 2.5 版 (Waters Inc.) 处理 MS^E 数据。在 DynamX 软件 (Waters Inc.) 中处理 HX-MS 原始数据文件。DynamX 自动进行锁定质量校正和氘掺入测定,即氘化肽的质心测定。此外,通过软件手工检查所有肽,以确保正确的峰和氘分配。

[0270] 表位作图实验

通过在 vWF 片段 (即 D' D3A1、2308、2307 或 -2304) 不存在或存在时,在零时将 FVIII 10 倍稀释在 20 mM 咪唑、150 mM NaCl、10 mM CaCl₂, pH 7.3 (未校正值) 中,在随后的时间点稀释在相应氘化缓冲液 (即 20 mM 咪唑、150 mM NaCl、10 mM CaCl₂, 在 D₂O 中制备, 最终 98% D₂O, pH 7.3 (未校正值)) 中,开始酰胺氢 / 氘交换 (HX)。所有 HX 反应都在 20℃ 进行,并且在 4.5 μM vWF 片段不存在或存在时含有 3 μM FVIII,因此得到 1.5 倍摩尔过量的 vWF 片段结合配偶体。在范围为 10 秒至 240 秒的合适的时间间隔,通过 50 μl 冰冷

的猝灭缓冲液 (1.36 M TCEP、2 M 尿素) 猝灭 50 μ l HX 反应的等分试样, 导致最终 pH 为 2.5 (未校正的值))。

[0271] 结果和讨论

2304 和 2307 对 FVIII 的相互作用作图

在 vWF 片段 2304 或 2307 不存在或存在时监测 191 种肽 (覆盖 FVIII 的 83% 的一级结构) 的 HX 时间进程达 10、20、30、40、60、120 和 240 秒。

[0272] vWF 片段 2304 和 2307 都诱导 FVIII 交换特性的相同改变并且在本文中可一起描述。在 2304/2307 存在或不存在时, 在时间点 (即 10、20、30、40、60、120 和 240 秒) 观察到的交换模式可分为不同组: 一组肽表现出交换模式不受 2304/2307 结合的影响。相比之下, FVIII 中的另一组肽表现出在 2304/2307 结合后保护其不进行交换。

[0273] 在 2304/2307 结合后表现出保护作用的区域包括覆盖残基 1855-1875、1857-1875、2062-2070、2125-2147、2125-2148、2127-2147、2275-2291、2275-2302、2275-2305、2292-2305 和 2293-2312 的肽 (表 14)。然而, 通过比较结合 2304/2307 后每种肽中的交换保护作用的相对量和这些区域内的重叠和相邻肽中的表位效应的缺乏, 表现出减少的氘掺入的区域可缩窄至残基 1862-1875、2062-2070、2125-2147 和 2285-2299。

D' D3A1 和 2308 对 FVIII 的相互作用作图

在 vWF 片段 D' D3A1 或 2308 不存在或存在时监测 185 种肽 (覆盖 FVIII 的 79% 的一级结构) 的 HX 时间进程达 10、20、30、40、60、120 和 240 秒。

[0275] vWF 片段 D' D3A1 和 2308 都诱导 FVIII 交换特性的相同改变并且在本文中将会一起描述。

[0276] 在 D' D3A1 或 2308 结合后表现出保护作用的区域包括覆盖残基 1669-1680、1738-1765、1743-1765、1856-1869、1870-1874、2061-2074、2063-2074、2123-2146 和 2260-2280 的肽 (表 15)。

[0277] 然而, 通过比较结合 D' D3A1 或 2308 后每种肽中的交换保护作用的相对量和这些区域内的重叠和相邻肽中的表位效应的缺乏, 表现出减少的氘掺入的区域可缩窄至残基 1671-1680、1745-1754、1858-1874、2063-2074、2125-2146、2262-2280。

FVIII 对 D' D3A1 的相互关系作图

在 FVIII 不存在或存在时监测 82 种肽 (覆盖 VWF 片段 D' D3A1 的 58% 的一级结构) 的 HX 时间进程达 10、20、30、40、60、120 和 240 秒。

[0279] 在 FVIII 结合后表现出交换保护作用的区域包括覆盖残基 768-778 的肽 (表 16)。

[0280] 然而, 通过比较结合 FVIII 后每种肽中的交换保护作用的相对量和这些区域内的重叠和相邻肽中的表位效应的缺乏, 表现出减少的氘掺入的区域可缩窄至残基 770-778。

[0281] 结论

当 2304 或 2307 结合后, FVIII 的所有区域都表现出类似的反应。在早期时间点, 同一组肽受到 vWF 片段结合的影响。

[0282] 此外, 已经发现, 在 2304/2307 结合后经鉴定的这些受影响的区域与在结合至 D' D3A1/2308 后 FVIII 结构域 A3 和 C1 中的受到影响的区域有重叠。

[0283] 因为缺乏在 2304/2307 结合的 HX-MS 时间进程进行的消化性肽图谱的序列覆盖, 所以对于残基 1671-1680, 交换特征是不可能的。因此不能证实 2304/2307 结合是否导致对

该区的交换保护作用,如 D' D3A1/2308 结合后所鉴定的。

[0284] FVIII 结合后,覆盖 D' D3A1 的残基 770-778 的区域显示出交换保护作用。通过进行 FVIII 结合的 HXMS 分析的消化性肽提供的 D' D3A1 的 58% 的所得序列覆盖,不允许忽略 D' D3A1/2308 中存在更多相互作用位点。

[0285] 结论

当作图到晶体结构 PDB :2R7E 时,在与 vWF 片段 D' D3A1、2308、2304 或 2307 结合后显示出保护作用的 FVIII 的经鉴定的区域,在结构上位于远程距离。这使得以下成为高度不可能:可将它们都指派到由 FVIII 和 vWF 片段 D' D3A1、2308、2304 或 2307 之间的结合界面所诱导的保护作用上。HX-MS 分析不能区分由结合界面所导致的交换保护作用以及由快速构象变化所导致的交换保护作用。

[0286] 因此,可能合理的是,结合界面和 FVIII 的构象变化这两者诱导了在与 vWF 片段 D' D3A1、2308、2304 或 2307 结合后显示出交换保护作用的所观察的区域。

[0287] FVIII 与 vWF 片段 D' D3A1、2308、2304 或 2307 结合的 HXMS 研究揭示了结构域 A3 和 C1 内的重叠区,因此与 FVIII 的该部分的复合物结合与对于所研究的 vWF 片段而言是相同的。

[0288] 在结构域 C2 中观察到的差异表明 FVIII 的该部分在与 vWF- 片段的复合物形成后经历了构象变化。此外,所得结果表明 D' D3A1/2308 和 2304/2307 之间的截短差异导致结构域 C2 的不同构象变化。相比之下,2304 和 2307 之间的截短差异看来不影响 C2 的构象定向,因为对于与这些 vWF- 片段种类的结合,观察到了结构域 C2 的相同交换特性。

[0289] 众所周知,结构域 C1 和 C2 对 FVIII 的膜结合亲和力是必不可少的。可以推断, FVIII 的这些部分的构象变化将会降低 FVIII 的膜结合能力。与 VWF 片段结合的 FVIII 复合物的结构域 C1 和 C2 的构象位置可能不利于 FVIII 的膜结合亲和力。此外,高度可能的是,在与 FVIII 的复合物中的片段将遮蔽 FVIII 的膜结合亲和力,因为对于与内源 VWF 结合的 FVIII 复合物的膜结合特征,这是已经被确定的。与游离 FVIII 相比,与 VWF 片段结合的 FVIII 复合物的膜结合亲和力的降低,将会导致 FVIII 与免疫系统(例如抗原呈递细胞)的细胞膜结合的减少。这会减少 MHC II 类上的 FVIII- 衍生的肽的呈递,并且因此可以推断与 VWF 片段结合的 FVIII 复合物将会比游离 FVIII 具有更低的免疫原性。

[0290] 表 14: 与 vWF 片段 2304 (SEQ ID 5) 或 2307 (SEQ ID 8) 结合的 FVIII (Turoctocog alfa; seq. no. 使用 wt FVIII) (SEQ ID 2) 的 HXMS 分析。在氘交换反应后。用胃蛋白酶消化 FVIII,得到本发明的消化性肽,其经鉴定显示出在 2304 或 2307 存在时的交换保护作用。

序列	结构域	2304	2307
L1855-E1875	A3	EX	EX
V1857-E1875	A3	EX	EX
W2062-W2070	A3	EX	EX
V2125-R2147	C1	EX	EX
V2125-Y2148	C1	EX	EX
F2127-R2147	C1	EX	EX
F2275-T2291	C2	EX	EX
F2275-L2302	C2	EX	EX
F2275-Y2305	C2	EX	EX
P2292-Y2305	C2	EX	EX

V2293-S2312	C2	EX	EX
-------------	----	----	----

[0291] 实例：在 2304 或 2307 结合后 FVIII 残基的交换保护作用表明相互作用区（在 D20 中 40 秒孵育，> 0.4 Da）。

[0292] 表 15：与 vWF 片段 D'D3A1 (SEQ ID 19 ;Cys1099Ser ;Cys1142Ser) 或 2308 (SEQ ID 11 ;Cys1099Ser ;Cys1142Ser) 结合的 FVIII (Turoctocog alfa ;seq. no. 使用 wt FVIII) (SEQ ID 2) 的 HXMS 分析。在氘交换反应后。用胃蛋白酶消化 FVIII, 得到本发明的消化性肽, 其经鉴定显示出在 D' D3A1 或 2308 存在时的交换保护作用。

序列	结构域	D' D3A1	2308
S1669-Y1680	a3	EX	EX
F1738-E1765	A3	EX	EX
F1743-E1765	A3	EX	EX
L1856-R1869	A3	EX	EX
Q1870-Q1874	A3	EX	EX
A2061-D2074	C1	EX	EX
S2063-D2074	C1	EX	EX
L2123-A2146	C1	EX	EX
F2260-V2280	C2	EX	EX

[0293] 实例：在 D' D3A1 或 2308 结合后 FVIII 残基的交换保护作用表明相互作用区（在 D20 中 40 秒孵育，> 0.4 Da）。

[0294] 表 16：与 FVIII (Turoctocog alfa (SEQ ID 2) 结合的 vWF 片段 D'D3A1 (SEQ ID 19 ;Cys1099Ser ;Cys1142Ser) 的 HXMS 分析。在氘交换反应后。用胃蛋白酶消化 D' D3A1, 得到本发明的消化性肽, 其经鉴定显示出在 FVIII 存在时的交换保护作用。

序列	结构域	FVIII
R768-A778	D'	EX

[0295] 实例：在 FVIII 结合后 D' D3A1 残基的交换保护作用表明相互作用区（在 D20 中 40 秒孵育，> 0.4 Da）。

[0296] 实施例 37

通过 SEC-UV 分析 FVIII (SEQ ID 2) 与 TIL'/E'/D3/A1 III (SEQ ID 19 ;Cys1099Ser ;Cys1142Ser) 的复合物形成以及 FVIII (SEQ ID 2) 与 TIL'/E'/D3 II (SEQ ID 14 ;Cys1099Ser ;Cys1142Ser) 的复合物形成。

[0297] 材料

所用的蛋白批号是：

所用的 FVIII 蛋白批号是：

FVIII (N8, Turoctocog alfa, SEQ ID NO 2) 批号 0155-0000-0004-37A ;TIL'/E'/D3/A1 III (SEQ ID NO 19 ;Cys1099Ser ;Cys1142Ser) 批号 0129-0000-0170-6B ;TIL'/E'/D3 II (SEQ ID 14 ;Cys1099Ser ;Cys1142Ser) 批号 0129-0000-2309-1B。

[0298] 方法

在 25°C, 在 Waters Biosuite, 4.6 X 300mm 柱上进行大小排阻色谱, 使用流速为 0.3 ml/min 和运行缓冲液为 155 mM NaCl、10 mM 乙酸钙、10 % 异丙醇。通过 UV 检测器在 280 nm 处监测流出液的吸光度。进行 FVIII、TIL'/E'/D3/A1 III、TIL'/E'/D3 II、和 FVIII - TIL'/E'/D3/A1 III 的 1:2 复合物以及 FVIII - TIL'/E'/D3 II 的 1:2 复合物的 SEC-UV 表征。制备 FVIII 10 μM、TIL'/E'/D3/A1 III 20 μM、TIL'/E'/D3 II 20 μM 的样品和在

复合物中的样品,并将 15 μL 上样到柱上。

[0299] 结果和结论

FVIII - TIL'/E'/D3/A1 III 和 FVIII - TIL'/E'/D3 II 的混合物的 SEC-UV 显示复合物的重要流份,将其从柱上完全洗脱下来。预计复合物将比 FVIII 稍微早一点洗脱下来;在两个实例中也都观察到这一点。

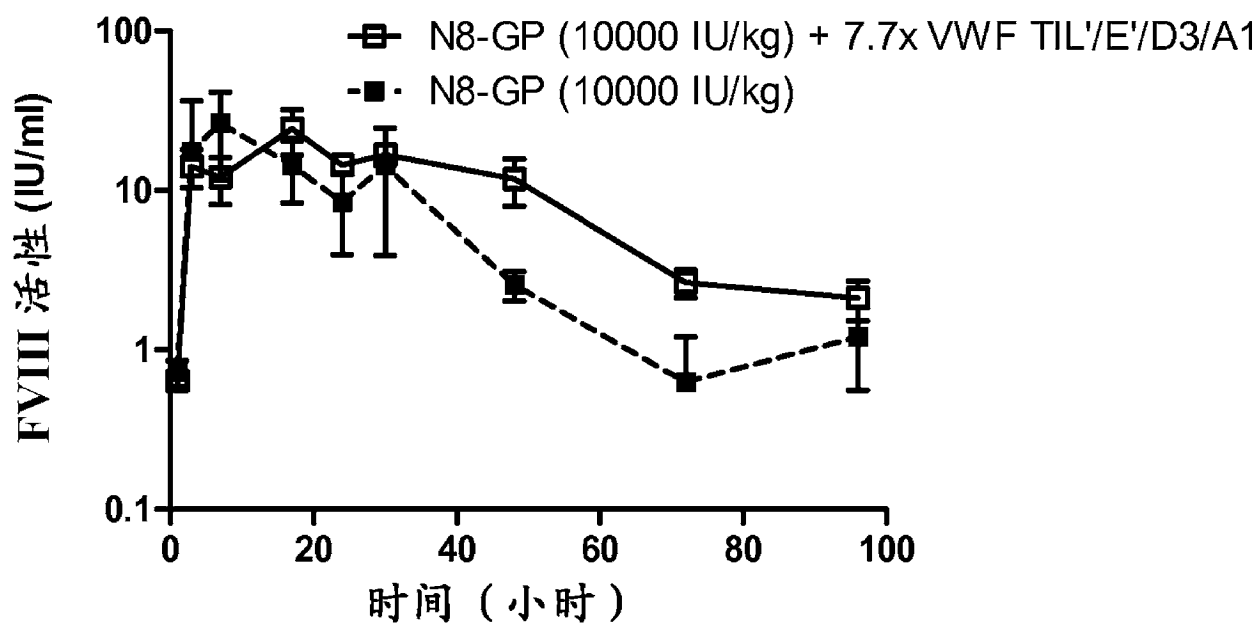


图 1

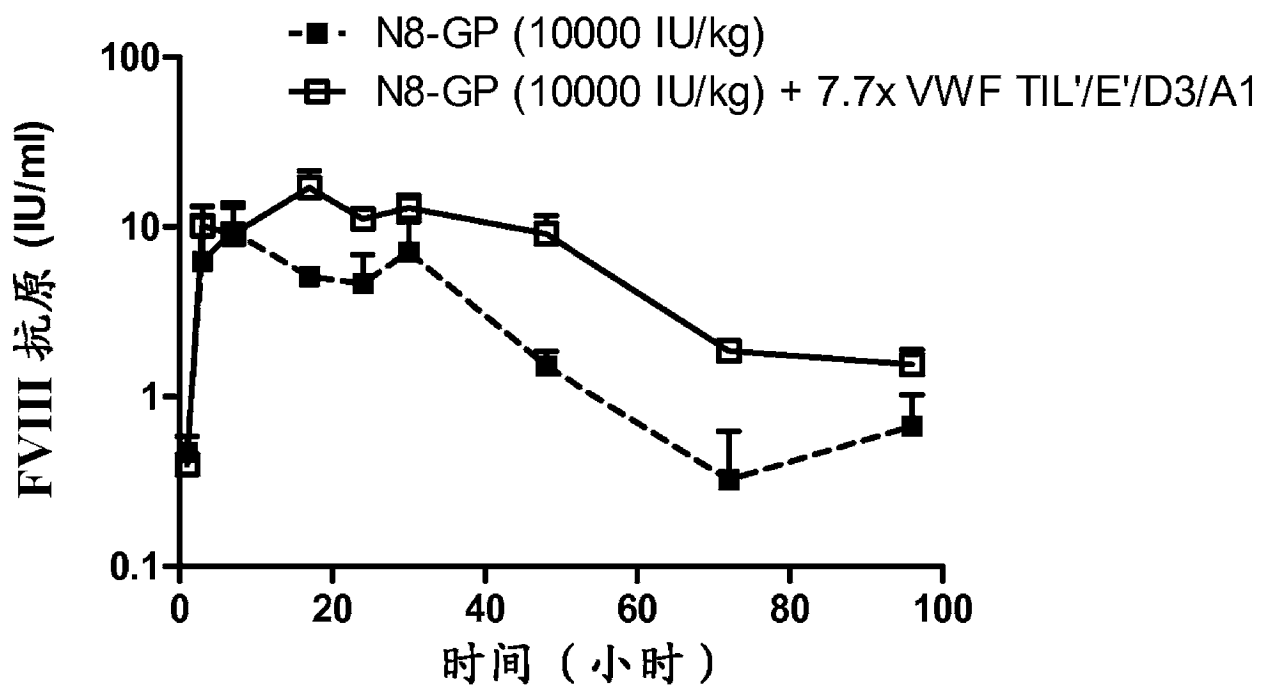


图 2

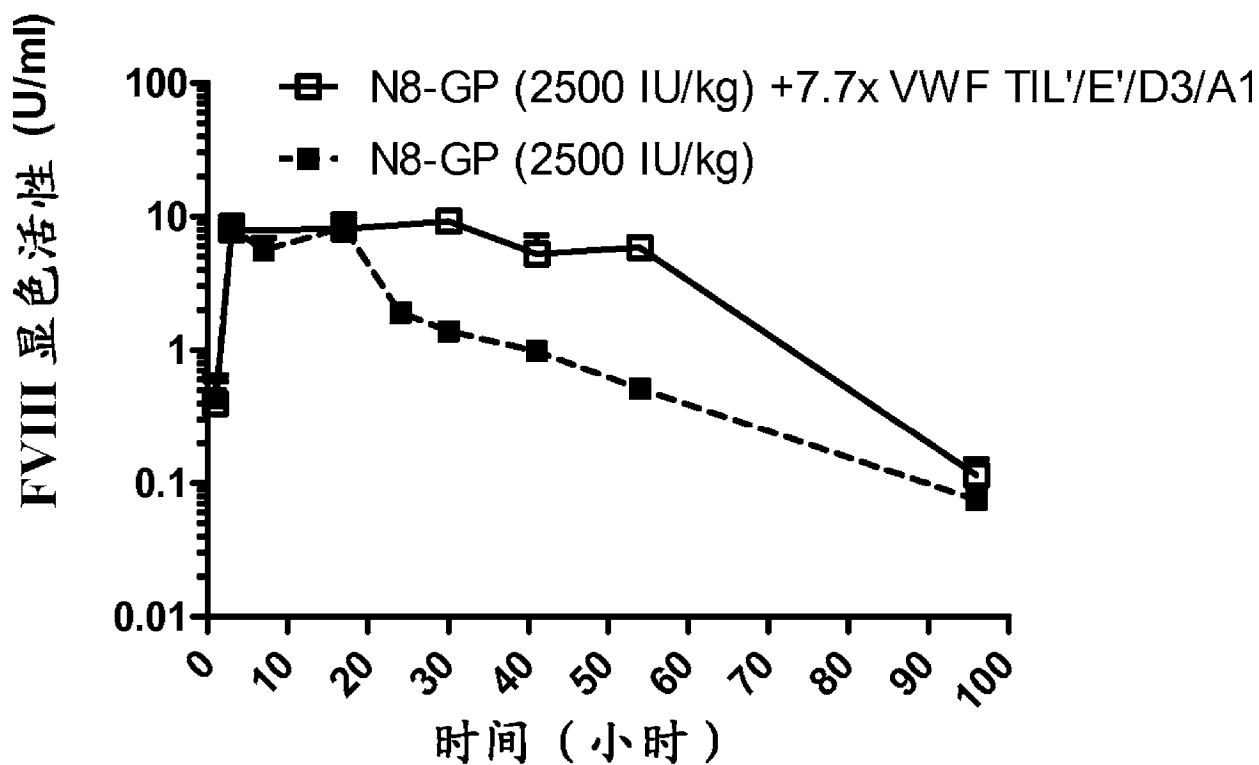


图 3

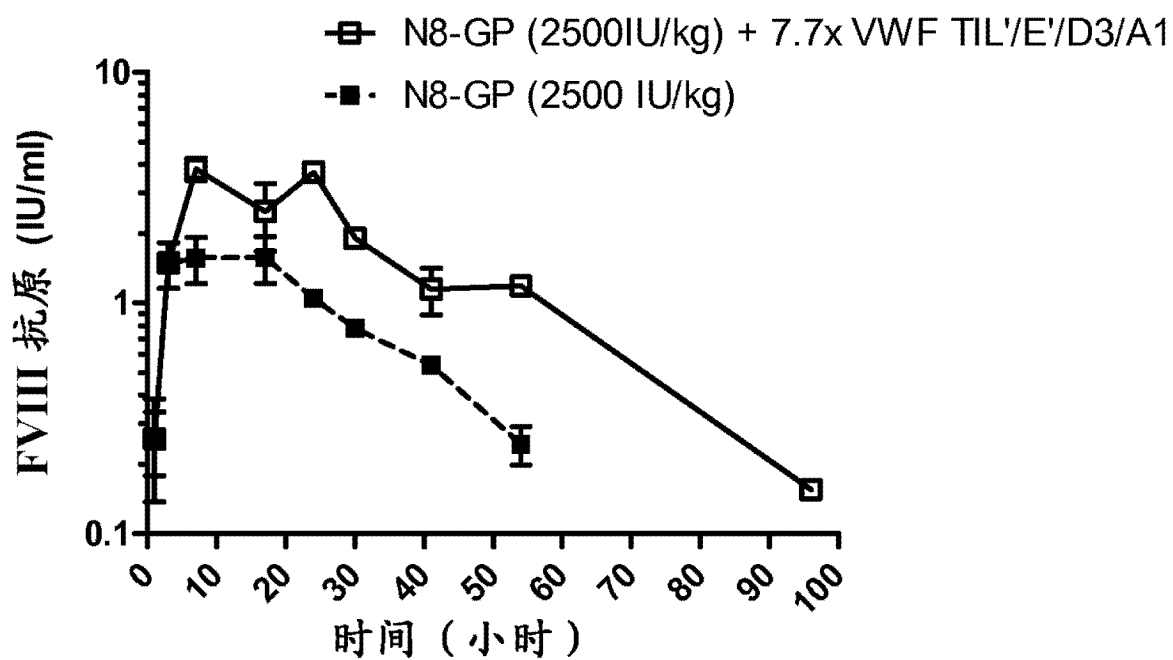


图 4

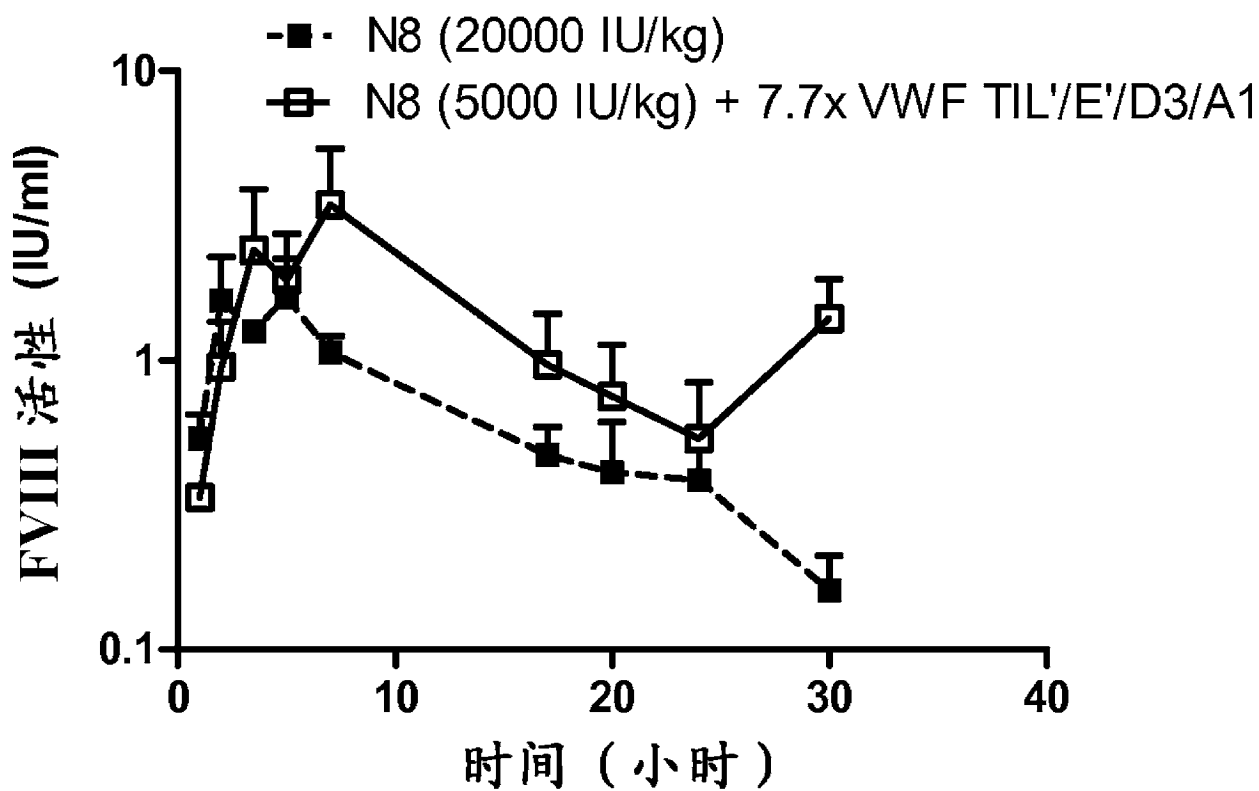


图 5

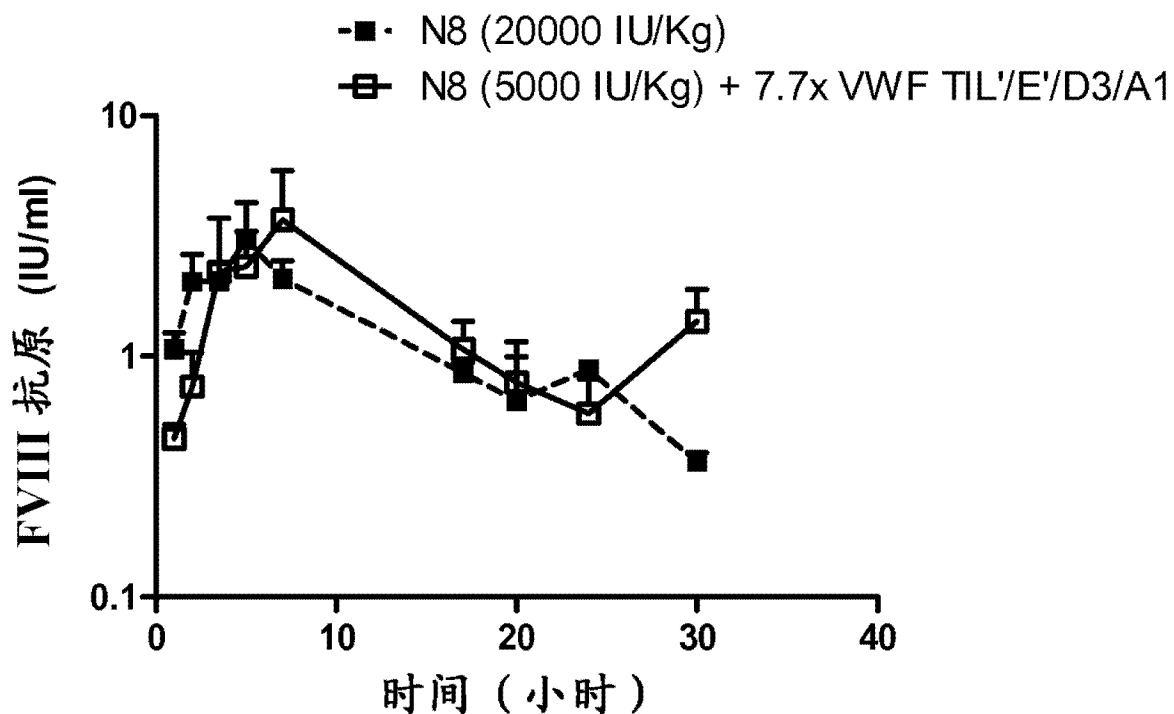


图 6

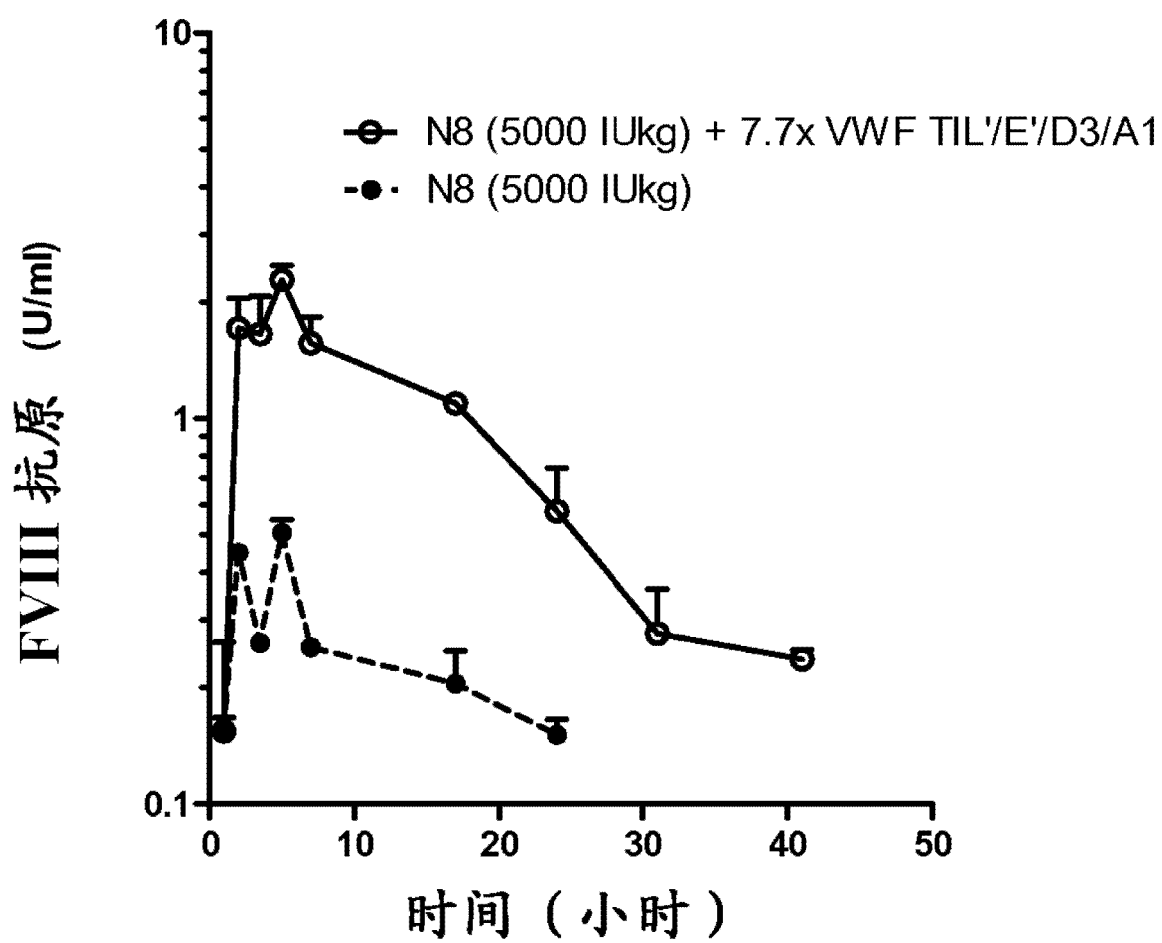


图 7

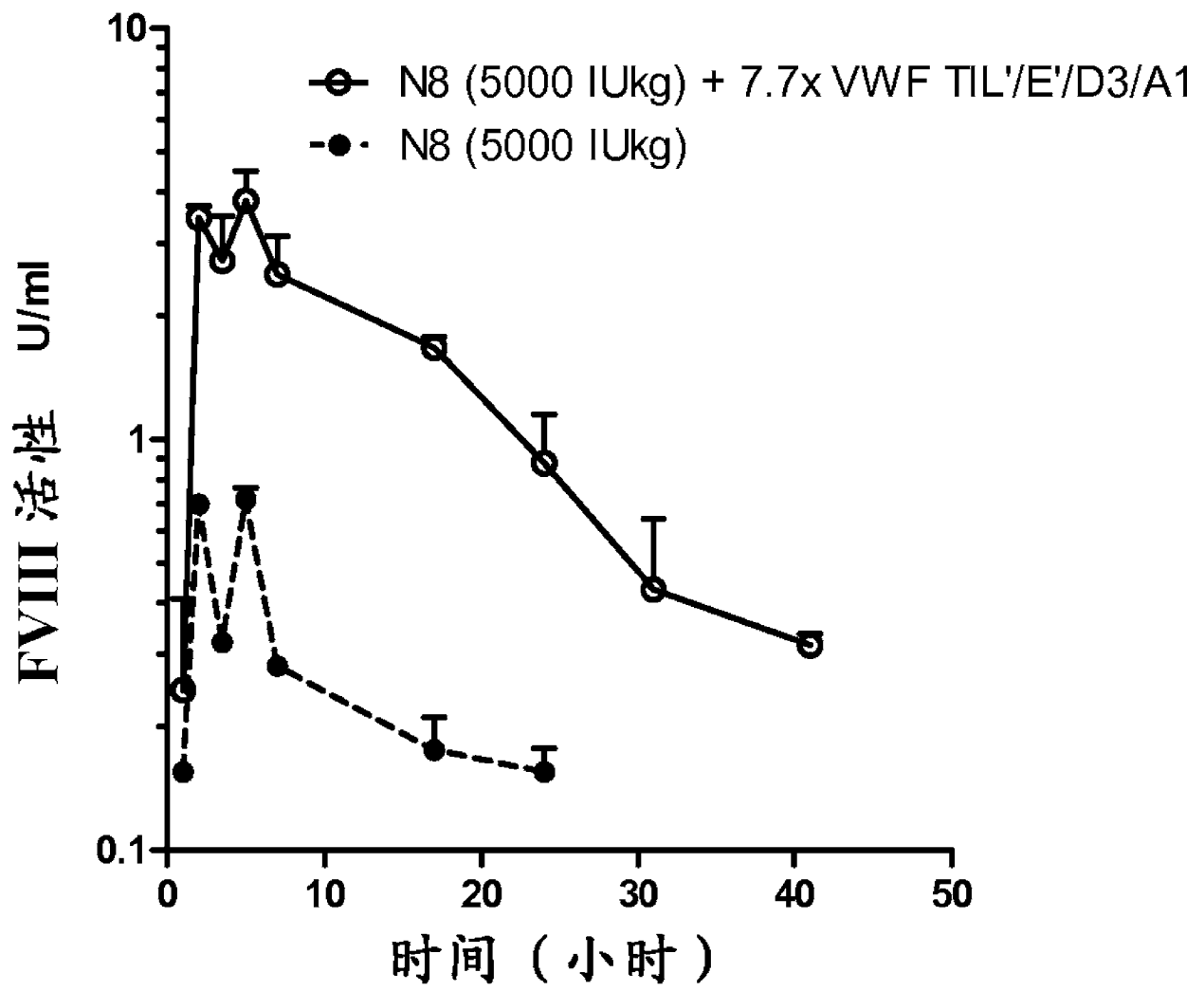


图 8

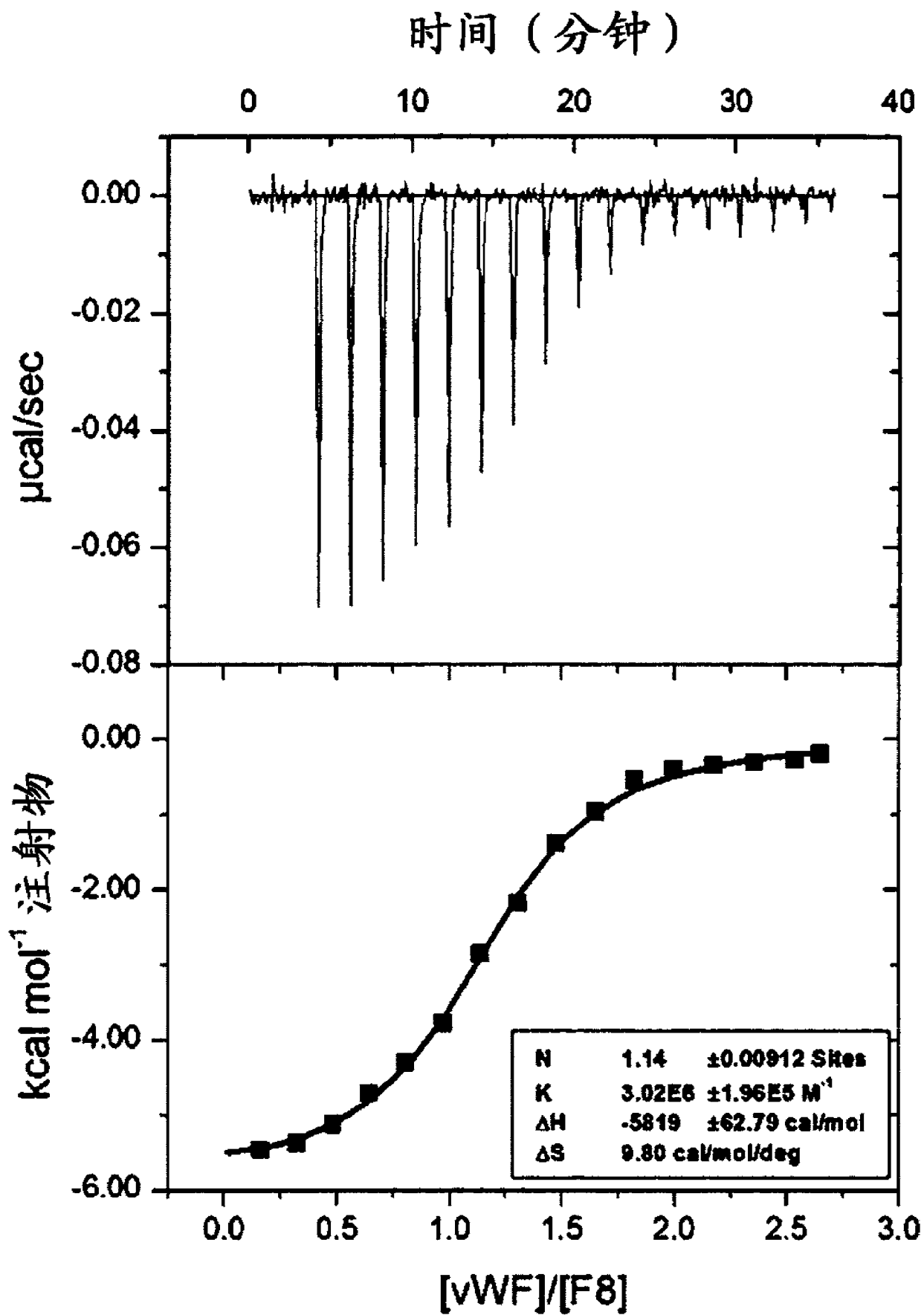


图 9

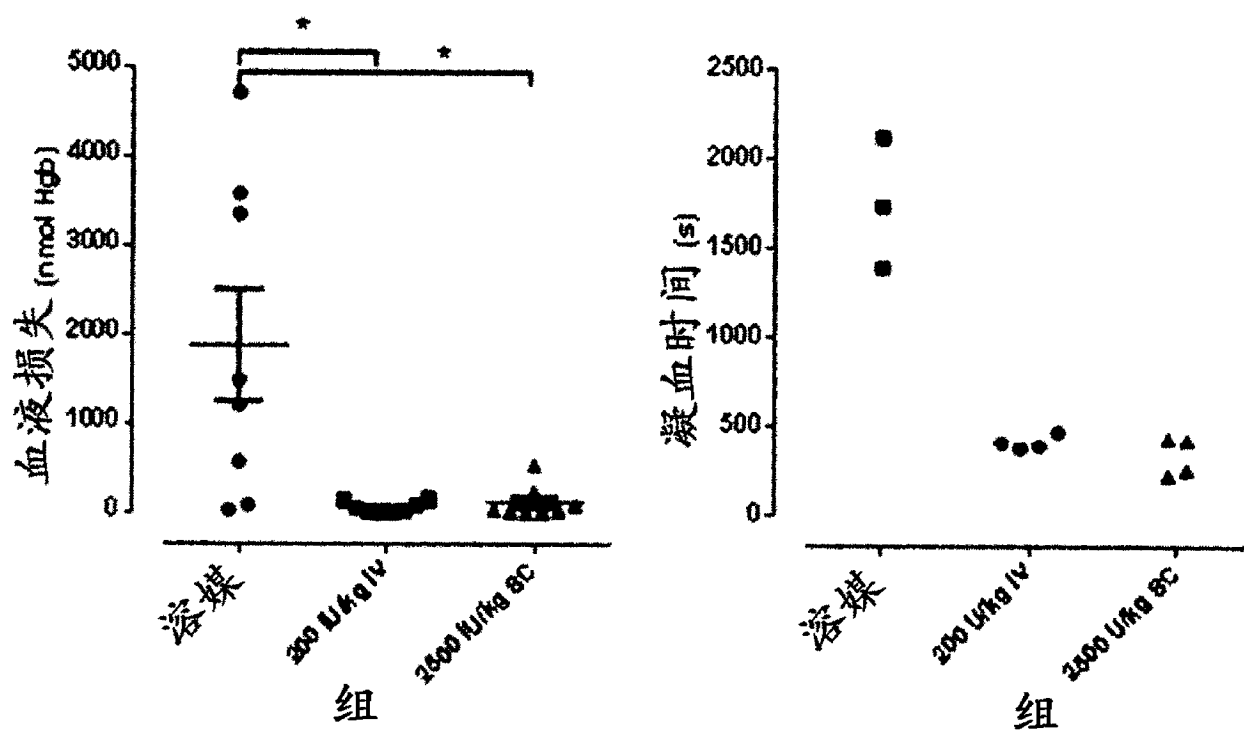


图 10

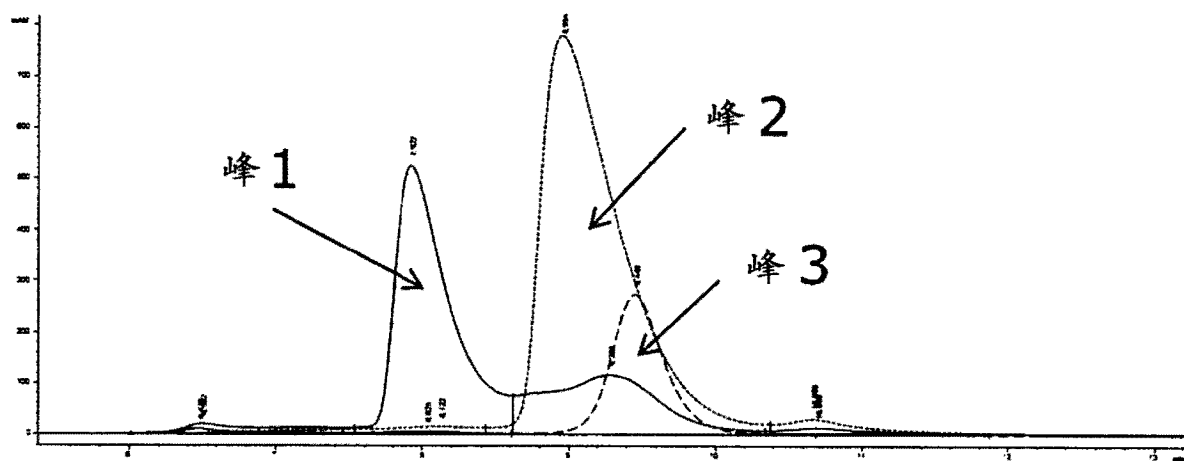


图 11

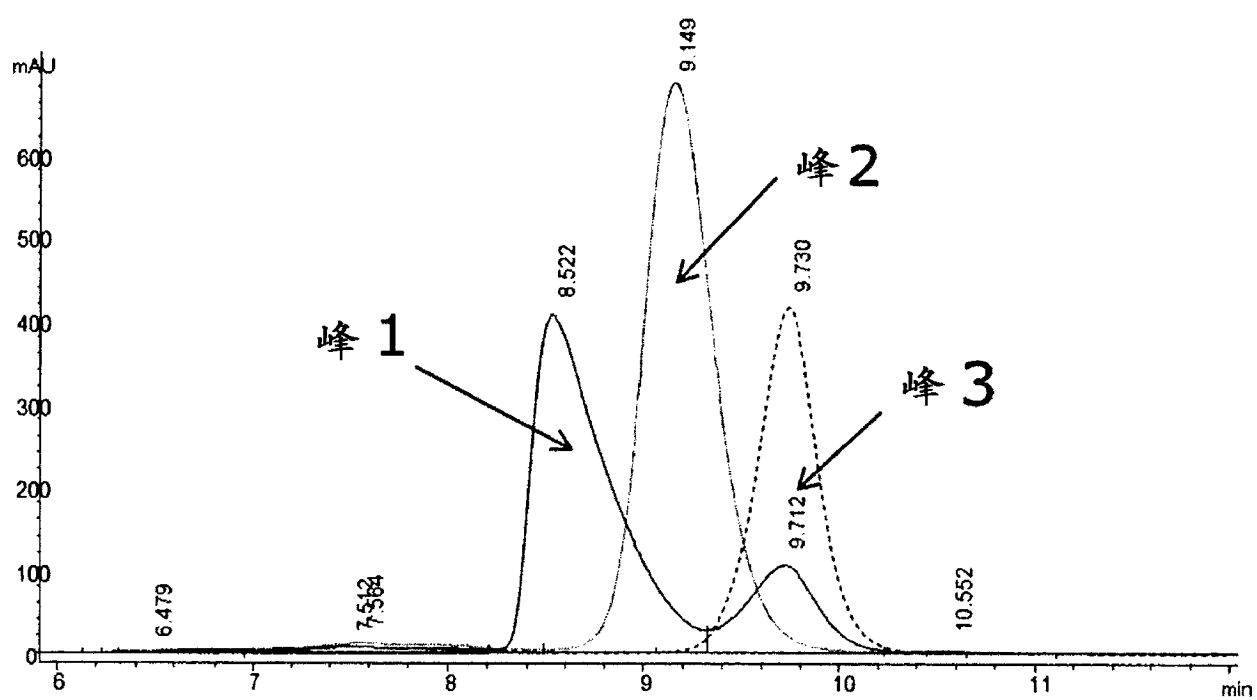


图 12