(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109563145 B
(45)授权公告日 2024.01.26

(21)申请号 201780049944.X

(22)申请日 2017.07.11

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109563145 A

(43)申请公布日 2019.04.02

(30)优先权数据
62/360,767 2016.07.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.02.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2017/050784 2017.07.11

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/011799 EN 2018.01.18

(73)专利权人 OPKO生物科学有限公司
地址 以色列凯尔耶特盖特

(72)发明人 奥伦·赫什科维茨
劳拉·莫斯科维奇

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限责任公司 11240
专利代理师 沈敬亭 陈知宇

(51)Int.Cl.
C07K 14/59(2006.01)
C07K 14/61(2006.01)

(56)对比文件
JP 2015508771 A,2015.03.23
US 2016168588 A1,2016.06.16
WO 2016092549 A1,2016.06.16
US 2015368630 A9,2015.12.24
US 2012208759 A1,2012.08.16
US 2013295072 A1,2013.11.07
CN 104427994 A,2015.03.18
CN 102639144 A,2012.08.15
CN 104704118 A,2015.06.10
Bar-Ilan A等.In vitro characterization of MOD-5014, a novel long-acting carboxy-terminal peptide (CTP)-modified activated FVII.《Haemophilia》.2018,第24卷(第03期),477-486.

(续)

审查员 张华

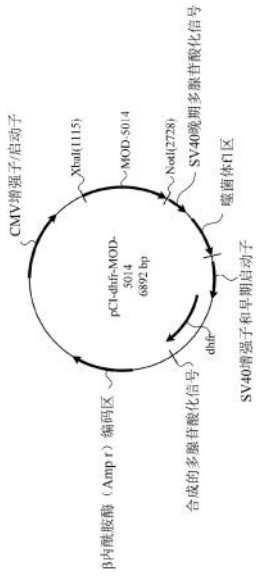
权利要求书2页 说明书81页
序列表15页 附图20页

(54)发明名称

长效凝血因子及其制备方法

(57)摘要

公开了包含至少一个与凝血因子的羧基末端连接但不与凝血因子的氨基末端连接的绒毛膜促性腺激素的羧基末端肽(CTP)的多肽和编码它们的多核苷酸。还公开了包含本公开的多肽和多核苷酸的药物组合物和药物制剂及其使用和生产方法。



CN 109563145 B

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Lior Binder等.Mod-5014, a Long-Acting FVIIa-CTP, Proposing a Novel Prophylactic Treatment Supporting Less Frequent Subcutaneous or Intravenous Injections with a Similar Mechanism of Action to rFVIIa: Proof-of-Concept in Hemophilic Animal Models.《Blood》.2015,第126卷(第23期),4670.

Calo D等.Enhancing the longevity and in vivo potency of therapeutic proteins: the power of CTP.《Precision Medicine》.2015,(第01期),e989.

1.一种制备人绒毛膜促性腺激素肽(CTP)修饰的人活性因子VII(FVIIa)多肽的方法,其中,所述多肽包含与FVII的C-末端串联连接的三个CTP分子,所述方法包括以下步骤:

I.将从最佳表达和分泌所述CTP修饰的FVII的工作细胞库(WCB)或主细胞库(MCB)获得的细胞克隆在溶液中扩增;

II.收获含有所述克隆的所述溶液;

III.过滤含有所述克隆的所述溶液以获得含有所述CTP修饰的FVII的澄清收获溶液;以及

IV.通过以下纯化所述澄清收获溶液:将所述澄清收获溶液依次通过亲和柱、多模型或混合模式柱、疏水相互作用柱和阴离子交换柱;和

V.从所述澄清收获溶液活化CTP修饰的FVII以得到具有所需浓度的所述CTP修饰的FVIIa的纯化蛋白质溶液;

其中,所述制备的CTP修饰的FVIIa包含以下:

a.至少90%的纯度;

b.由小于5%氧化形式组成的所述CTP修饰的FVIIa的低氧化形式;

c.由至少90%羧化谷氨酸(Gla)残基组成的高百分比的羧化谷氨酸(Gla)残基;

d.至少60%带电荷N-聚糖;或

e.至少10,500U/mg的效力;

从而制备CTP修饰的FVIIa,并且其中,所述制备的CTP修饰的FVIIa的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。

2.根据权利要求1所述的方法,其中,所述CTP修饰的FVIIa多肽的所述纯度选自由97.3%、97.6%、97.4%和97.0%组成的组。

3.根据权利要求1所述的方法,其中,所述制备方法是无动物过程。

4.根据权利要求1所述的方法,其中,所述克隆以至少40mg/L的水平表达和分泌CTP修饰的FVII。

5.根据权利要求1所述的方法,其中,所述克隆在溶液中通过一系列亚培养步骤扩增至生产生物反应器水平。

6.根据权利要求5所述的方法,其中,所述生物反应器包括一次性生物反应器或不锈钢生物反应器,或者其中,所述生物反应器按照补料分批模式生物反应器运行。

7.根据权利要求1所述的方法:

其中,所述阴离子交换洗脱液经过超滤/渗滤步骤;并且

其中,在所述纯化步骤之后,灭活存在于所述澄清收获物中或在任何所述色谱柱或其任何组合后收集的洗脱液中的病毒,其中,灭活病毒包括在对所述病毒有毒的溶液中温育或纳米过滤,或其任何组合;

从而得到纯化的CTP修饰的FVII。

8.根据权利要求7所述的方法,其中,病毒清除显示病毒对数减少因子(LRF)为至少22。

9.根据权利要求1所述的方法,其中,所述制备的CTP修饰的FVIIa是高糖基化的。

10.根据权利要求9所述的方法,其中,所制备的CTP修饰的FVIIa包括每个CTP的至少4个O-连接的糖基化位点的糖基化模式。

11.根据权利要求1所述的方法,其中

a.所述CTP修饰的FVIIa包含由至少15mol/mol组成的所述高唾液酸含量;

b.所述带电荷N-聚糖的百分比选自由85.3％和84.2％组成的组;

c.所述效力选自由15,563U/mg、16,720U/mg、22,478U/mg和23,608U/mg组成的组;

或它们的任何组合。

12.根据权利要求1所述的方法,其中,所述制备的CTP修饰的FVIIa是高唾液酸化的。

13.根据权利要求1所述的方法,其中,所述制备的CTP修饰的FVIIa包含高O-聚糖含量。

14.根据权利要求13所述的方法,其中,所述高O-聚糖含量包含由至少10mol/mol组成的O-聚糖含量。

15.根据权利要求1所述的方法,其中,至少60％的所述CTP修饰的FVIIa包含高糖基化形式。

16.根据权利要求1所述的方法,其中,至少60％的所述CTP修饰的FVIIa包含高百分比的羧化谷氨酸残基。

17.根据权利要求1所述的方法,其中,所述方法实现高糖基化的CTP修饰的FVIIa的至少20％回收率。

18.根据权利要求1所述的方法,其中,所述CTP修饰的FVIIa多肽的回收率为至少90％。

19.根据权利要求1-18中任一项所述的方法,其中,所述制备的CTP修饰的FVIIa的氨基酸序列在结构上以二硫键连接的双链异二聚体存在,其包含SEQ ID NO:7的半胱氨酸残基135和半胱氨酸残基262之间的二硫键(S-S)桥,并且其中所述两条链包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸1-152的轻链和含有SEQ ID NO:7的氨基酸153-490的重链。

长效凝血因子及其制备方法

技术领域

[0001] 公开了包含至少一个与凝血因子的羧基末端连接的绒毛膜促性腺激素的羧基末端肽(CTP)的多肽和编码该多肽的多核苷酸。还公开了包含本公开的多肽和多核苷酸的药物组合物和药物制剂以及使用和生产它们的方法。

背景技术

[0002] 凝血因子替代疗法的发展已经改变了许多患有血友病的个体的生活。血友病是一组遗传性遗传疾病,会损害身体控制血液凝固或凝血的能力。血友病患者不能产生足够量的因子VIII或因子IX蛋白,这些蛋白是有效血液凝固所必需的。在重度血友病患者中,即使轻微的损伤也可能导致失血持续数天或数周,并且可能不会发生完全愈合,导致可能使得关节和其它器官永久性损伤,以及过早死亡。

[0003] 血友病是由凝血级联中的关键因子的缺陷或缺乏引起的遗传的X染色体相关的出血性疾病。在血友病患者中,凝血酶生成和纤维蛋白凝块形成严重受损,导致最常见于关节和内脏器官的自发性出血事件,以及手术或创伤期间和之后的过度出血。频繁出血还可导致血友病患者的关节肿胀、关节损伤、严重畸形、频繁感染和行动不便(梅奥诊所)。血友病A由因子VIII表达缺陷或缺乏引起,而血友病B由因子IX表达缺陷或缺乏引起。

[0004] 血友病B导致FIX的促凝固活性缺乏。血友病B患者有自发性软组织出血和复发性关节积血,往往导致重度关节病。目前对这些患者的治疗包括静脉内施用重组FIX。然而,FIX的成本和相对快速清除的问题使得开发长效FIX成为一项具有挑战性的任务。FVIII和FIX的商业可用性使得对危及生命的出血事件的控制得到改善。许多患者接受预防性治疗,可降低出血风险及其相关并发症。然而,显著比例的患者(10-30%)产生针对外源施用FVIII和FIX的抑制性抗体。施用作为旁路产物的FVIIa可以诱导体内平衡并为具有抑制性抗体的患者提供有效的治疗。

[0005] 重组FVIIa(NovoSeven®)是可商购的并且在1996年被批准用于治疗具有抑制因子的血友病患者的出血事件。然而,rFVIIa迅速清除,终末半衰期为2.5小时。因此,患者通常需要多次频繁的输注(2-3小时间隔内给予2-3次剂量)以在轻度至中度出血后实现足够的体内平衡。因此,人们对开发长效形式的FVIIa非常感兴趣,这种方式可以延长单剂量后止血活动的持续时间,并且允许少得多的给药频率。长效FVIIa也会增加长期预防性治疗的可行性。

[0006] 正在开发各种技术来延长FVIIa的半衰期。然而,仍然需要实现该蛋白质的延长半衰期,同时保持其生物活性并确保该修饰不会诱导显著的免疫原性。本发明通过将促性腺激素羧基末端肽(CTP)与FVIIa连接,从而对其进行修饰以延长其半衰期和生物活性来满足这种需要。

发明内容

[0007] 在一个方面,公开了一种制备人绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)修饰的人因

子VII(FVII)多肽的方法,其中所述多肽在FVII的C-末端上包含串联连接的三个CTP分子,该方法包括以下步骤:用包含编码所述CTP修饰的FVII的编码部分的表达载体稳定转染预定数量的细胞,其中所述转染的细胞表达并分泌所述CTP修饰的FVII;获得过表达所述CTP修饰的FVII的细胞克隆;将所述克隆在溶液中扩增到预定的规模;收获含有所述克隆的所述溶液;过滤含有所述克隆的所述溶液以获得澄清的收获溶液;以及从所述澄清的收获溶液中纯化所述多肽以得到具有所需浓度的CTP修饰的FVII的纯化蛋白质溶液;从而制备CTP修饰的FVII,其中制备的CTP修饰的FVII的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。

[0008] 另一方面,公开了一种制备人绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)修饰的人活性因子VII(FVIIa)多肽的方法,其中所述多肽在FVII的C-末端上包含串联连接的三个CTP分子,该方法包括以下步骤:用包含编码CTP修饰的FVII的编码部分的表达载体稳定转染预定数量的细胞,其中所述转染的细胞表达并分泌所述CTP修饰的FVII;获得过表达所述CTP修饰的FVII的细胞克隆;将所述克隆在溶液中扩增到预定的规模;收获含有所述克隆的所述溶液;过滤含有所述克隆的所述溶液以获得澄清的收获溶液;以及从所述澄清的收获溶液中纯化和活化所述多肽以得到具有所需浓度的CTP修饰的FVIaI的纯化蛋白质溶液;从而制备CTP修饰的FVIIa,其中制备的CTP修饰的FVIIa的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。

[0009] 另一方面,公开了人绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)修饰的人因子VII(FVII)多肽,其包含与FVII的C-末端串联连接的三个CTP分子,其中所述CTP修饰的FVII通过包括以下步骤的方法制备:用包含编码所述CTP修饰的FVII的编码部分的表达载体稳定转染预定数量的细胞,其中所述转染的细胞表达并分泌所述CTP修饰的FVII;获得过表达所述CTP修饰的FVII的细胞克隆;将所述克隆在溶液中扩增到预定的规模;收获含有所述克隆的所述溶液;过滤含有所述克隆的所述溶液以获得澄清的收获溶液;以及从所述澄清的收获溶液中纯化所述多肽以得到具有所需浓度的CTP修饰的FVII的纯化蛋白质溶液;其中所述制备的CTP修饰的FVII包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。

[0010] 另一方面,公开了人绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)修饰的人活化因子VII(FVIIa)多肽,其包含与FVII的C-末端串联连接的三个CTP分子,其中所述CTP修饰的FVIIa通过包括以下步骤的方法制备:用包含编码所述CTP修饰的FVII的编码部分的表达载体稳定转染预定数量的细胞,其中所述转染的细胞表达并分泌所述CTP修饰的FVII;获得过表达所述CTP修饰的FVII的细胞克隆;将所述克隆在溶液中扩增到预定的规模;收获含有所述克隆的所述溶液;过滤含有所述克隆的所述溶液以获得澄清的收获溶液;以及从所述澄清的收获溶液中纯化和活化所述多肽以得到具有所需浓度的CTP修饰的FVIIa的纯化蛋白质溶液;其中所述制备的CTP修饰的FVIIa包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。

[0011] 在相关方面,制备的人绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)修饰的人因子VII(FVII)多肽是高糖基化的。在另一个相关方面,制备的CTP修饰的FVII的糖基化模式包括每个CTP具有至少4个O-连接的糖基化位点的糖基化。在另一个相关方面,所述CTP修饰的FVII包含高百分比的带电荷N-聚糖。在另一个相关方面,制备的人绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)修饰的人因子VII(FVII)多肽是高唾液酸化的。

[0012] 在相关方面,制备的人绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)修饰的人因子VII(FVII)多肽包含高百分比的羧化谷氨酸残基。

[0013] 在相关方面,扩增克隆包括扩增从工作细胞库(WCB)或从主细胞库(MCB)获得的克

隆。在另一个相关方面,所述克隆以至少600mg/L的水平表达和分泌CTP修饰的FVII。在另一个相关方面,所述克隆在溶液中通过一系列亚培养步骤扩增至生产生物反应器水平。在另一个相关方面,生物反应器包括一次性生物反应器或不锈钢生物反应器。在另一个相关方面,所述生物反应器按照补料分批模式生物反应器运行。

[0014] 在相关方面,来自所述澄清收获物的至少60%的纯化的人绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)修饰的人因子VII(FVII)多肽包含高糖基化形式的CTP修饰的FVII。在相关方面,来自所述澄清收获物的至少60%的纯化的人绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)修饰的人因子VII(FVII)多肽包含高百分比的羧化谷氨酸残基。

[0015] 在相关方面,纯化包括依次进行包括以下的步骤:使所述澄清的收获物通过亲和柱、多模或混合模式柱、疏水相互作用柱和阴离子交换柱;灭活澄清的收获物或在柱色谱后的洗脱收集物,或其任何组合中存在的病毒,其中灭活病毒包括在对所述病毒有毒的溶液中温育或纳米过滤,或其任何组合;并且其中阴离子交换洗脱液经历超滤/渗滤步骤。

[0016] 在相关方面,制备的(CTP)修饰的人因子VII(FVII)多肽包含活性CTP修饰的FVII多肽(CTP修饰的FVIIa多肽)。

[0017] 在相关方面,制备方法实现高糖基化的CTP修饰的FVII的至少20%回收率。

[0018] 在另一个方面,组合物包含制备的CTP修饰的FVII,和药学上可接受的载体。

[0019] 另一方面,本文公开了人绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)修饰的人活性因子VII(FVIIa)多肽,其包含与FVIIa的C-末端串联连接的三个CTP分子,其中所述CTP修饰的FVIIa多肽是基本上纯净的和活性的形式,所述CTP修饰的FVIIa多肽包含:(a)高唾液酸含量;(b)低氧化形式;(c)高糖基化形式;(d)高百分比的羧化谷氨酸残基;(e)高比例的带电荷N-聚糖;(f)高效力;或其任何组合,其中所述CTP修饰的FVIIa包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。

[0020] 在相关方面,高唾液酸含量由至少15mol/mol组成。在另一个相关方面,高糖基化形式包含至少10mol/mol的O-聚糖含量。在另一个相关方面,基本上纯净的和活性的形式包含至少60%的所述活性CTP修饰的FVIIa的高糖基化形式。在另一个相关方面,至少60%的基本上纯的和CTP修饰的FVIIa形式包含高百分比的羧化谷氨酸(Gla)残基。在另一个相关方面,高百分比的羧化谷氨酸(Gla)残基由至少90%Gla残基组成。在另一个相关方面,低百分比的氧化形式由小于5%组成。在另一个相关方面,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的纯度为至少90%。在另一个相关方面,纯度百分比选自由97.3%、97.6%、97.4%和97.0%组成的组。在另一个相关方面,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的效力为至少10,500U/mg。在进一步相关的方面,效力选自由15,563U/mg、16,720U/mg、22,478U/mg和23,608U/mg组成的组。

[0021] 另一方面,本文公开了包含CTP修饰的FVIIa的组合物,其包含:(a)高唾液酸含量;(b)低氧化形式;(c)高糖基化形式;(d)高百分比的羧化谷氨酸残基;(e)高比例的带电荷N-聚糖;(f)高效力;或其任何组合,其中所述CTP修饰的FVIIa包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列,和药学上可接受的载体。

[0022] 根据以下详细描述、实施例和附图,其它特征和优点将变得显而易见。然而,应该理解的是,在说明本公开的优选实施方式的同时,详细描述和具体示例仅以说明的方式给出,因为在本公开的精神和范围内对于来自该详细描述的各种改变和修改对于本领域技术

人员将变得显而易见。

附图说明

[0023] 该专利或申请文件包含至少一幅彩色附图。具有彩色附图的本专利或专利申请公开的副本将在请求和支付必要费用后由办公室提供。

[0024] 图1.显示了pCI-dhfr-MOD-5014质粒的图谱。

[0025] 图2A.显示了FVII-CTP_3纯化过程的示意图。制备批次31用于PK/PD研究。

[0026] 图2B.显示了FVII-CTP_3纯化过程的示意图。制备批次38用于存活研究。

[0027] 图3A.显示了最终FVII和FVIIa的SDS-PAGE和蛋白质免疫印迹。将10μg(批次31)或5μg(批次38)加载到考马斯染色的SDS-PAGE的每个泳道中。1.FVII-CTP_3多肽;2.重链,包括3x CTP;3.轻链。所有三种抗体都检测FVII。

[0028] 图3B.显示了最终FVII和FVIIa的SDS-PAGE和蛋白质免疫印迹。将10μg(批次31)或5μg(批次38)加载到考马斯染色的SDS-PAGE的每个泳道中。1.FVII-CTP_3多肽;2.重链,包括3x CTP;3.轻链。

[0029] 图3C.显示了最终FVII和FVIIa的SDS-PAGE和蛋白质免疫印迹。将10μg(批次31)或5μg(批次38)加载到考马斯染色的SDS-PAGE的每个泳道中。1.FVII-CTP_3多肽;2.重链,包括3x CTP;3.轻链。

[0030] 图3D.显示了最终FVII和FVIIa的SDS-PAGE和蛋白质免疫印迹。将10μg(批次31)或5μg(批次38)加载到考马斯染色的SDS-PAGE的每个泳道中。1.FVII-CTP_3多肽;2.重链,包括3x CTP;3.轻链。

[0031] 图3E.显示了最终FVII和FVIIa的SDS-PAGE和蛋白质免疫印迹。将10μg(批次31)或5μg(批次38)加载到考马斯染色的SDS-PAGE的每个泳道中。1.FVII-CTP_3多肽;2.重链,包括3x CTP;3.轻链。

[0032] 图3F.显示了最终FVII和FVIIa的SDS-PAGE和蛋白质免疫印迹。在蛋白质免疫印迹的每个泳道中加载1μg蛋白质。1.FVII-CTP_3多肽;2.重链,包括3x CTP;3.轻链。所有三种抗体都检测FVII。用α-FVII检测FVIIa轻链。

[0033] 图3G.显示了最终FVII和FVIIa的SDS-PAGE和蛋白质免疫印迹。在蛋白质免疫印迹的每个泳道中加载1μg蛋白质。1.FVII-CTP_3多肽;2.重链,包括3x CTP;3.轻链。所有三种抗体都检测FVII。通过α-CTP检测FVIIa重链。

[0034] 图3H.显示了最终FVII和FVIIa的SDS-PAGE和蛋白质免疫印迹。在蛋白质免疫印迹的每个泳道中加载1μg蛋白质。1.FVII-CTP_3多肽;2.重链,包括3x CTP;3.轻链。所有三种抗体都检测FVII。通过α-Gla检测FVIIa重链。

[0035] 图4.显示了由于在陶瓷羟基磷灰石(HA)柱上纯化,FVII-CTP_3显色活性增强。使用市售的显色活性测试试剂盒BIOPHEN(Hyphen BioMed 221304)进行FVII-CTP_3收获物、过程中级分和纯化的FVII-CTP_3与人库正常血浆的体外效力的比较评估。连续稀释FVII-CTP_3收获物和蛋白质,并通过比较剂量-反应曲线与正常人血浆的参照制剂来评估效力。

[0036] 图5.显示了FVIII缺陷小鼠中FVIIa-CTP_3与NovoSeven®的PK曲线。FVIIa-CTP_3在FVII选择、HA纯化过程和活化后产生。将FVIIa-CTP_3或NovoSeven®单次静脉内注射施用于FVIII-/-血友病小鼠。在给药后0.083、0.5、2、8、24、48和72小时处抽取血样。取样后立

即制备柠檬酸盐血浆(0.38%)并在-20℃下储存直至分析,并使用STACLOT商业试剂盒基于FVIIa凝固活性建立PK曲线。

[0037] 图6A.显示了FVIIa-CTP3在FVII选择、HA纯化过程和活化后产生。将FVIIa-CTP_3或NovoSeven®单次静脉内注射施用于FVIII-/-血友病小鼠。在给药后0.083、0.5、2、8、24、48和72小时后抽取血样。取样后立即制备柠檬酸盐血浆(0.38%)并储存在-20℃直至分析。在PK实验期间评估凝血酶产生参数,并评估包括最大峰值量的参数。

[0038] 图6B.显示了FVIIa-CTP3在FVII选择、HA纯化过程和活化后产生。将FVIIa-CTP_3或NovoSeven®单次静脉内注射施用于FVIII-/-血友病小鼠。在给药后0.083、0.5、2、8、24、48和72小时后抽取血样。取样后立即制备柠檬酸盐血浆(0.38%)并储存在-20℃直至分析。在PK实验期间评估凝血酶产生参数,并评估包括凝血酶的量与时间点的参数。

[0039] 图6C.显示了FVIIa-CTP3在FVII选择、HA纯化过程和活化后产生。将FVIIa-CTP_3或NovoSeven®单次静脉内注射施用于FVIII-/-血友病小鼠。在给药后0.083、0.5、2、8、24、48和72小时后抽取血样。取样后立即制备柠檬酸盐血浆(0.38%)并储存在-20℃直至分析。在PK实验期间评估凝血酶产生参数,并评估包括凝血酶产生速率的参数。

[0040] 图7A.显示了尾部无效横切(TVT)后的血友病小鼠存活曲线。TVT在施用后15分钟进行。在TVT后24小时观察小鼠存活,并在前12小时和24小时后每小时记录一次。对照组数据(载体)是5只小鼠/实验的3次实验的总和。

[0041] 图7B.显示了尾部无效横切(TVT)后的血友病小鼠存活曲线。TVT在施用后24小时进行。在TVT后24小时观察小鼠存活,并在前12小时和24小时后每小时记录一次。对照组数据(载体)是5只小鼠/实验的3次实验的总和。

[0042] 图7C.显示了尾部无效横切(TVT)后的血友病小鼠存活曲线。TVT在施用后48小时进行。在TVT后24小时观察小鼠存活,并在前12小时和24小时后每小时记录一次。对照组数据(载体)是5只小鼠/实验的3次实验的总和。

[0043] 图7D.总结了TVT后24小时记录的小鼠存活率。

[0044] 图8.显示了FVIIa(NovoSeven)和CTP修饰的因子VIIa(MOD-5014)之间的底物(Pefachrome FVIIa)裂解活性的比较。

[0045] 图9.显示了当与组织因子结合时FVIIa(NovoSeven)和CTP修饰的因子VIIa(MOD-5014)之间的底物(Pefachrome FVIIa)活性的比较。

[0046] 图10.显示了鉴于因子VIIa浓度,通过FVIIa(NovoSeven)或CTP修饰的FVIIa(MOD-5014)产生活化因子X的比较。

[0047] 图11.显示了鉴于因子X浓度,通过FVIIa(NovoSeven)或CTP修饰的FVIIa(MOD-5014)产生活化因子X的比较。

[0048] 图12A和12B.显示了在没有组织因子和鉴于脂质浓度下,通过FVIIa(NovoSeven)或CTP修饰的FVIIa(MOD-5014)产生活化因子X的速率的比较(图12A)。显示了在没有组织因子和鉴于脂质浓度下,通过FVIIa(NovoSeven)或CTP修饰的FVIIa(MOD-5014)产生活化因子X的比较(图12B)。

[0049] 图13.显示了在没有组织因子和鉴于因子X浓度下,FVIIa(NovoSeven)和MOD-5014之间活化因子X的产生的比较。

[0050] 图14.显示了鉴于聚凝胺,FVIIa(NovoSeven)和CTP修饰的FVIIa(MOD-5014)对底

物(Pefachrome FVIIa)裂解的抑制的比较。

[0051] 图15A-15C.显示了鉴于TFPI浓度(图15A)以及FVIIa(图15B)和MOD-5014(图15C)的TFPI暴露持续时间,FVIIa(NovoSeven)和CTP修饰的FVIIa(MOD-5014)对底物(Pefachrome FXa)裂解的抑制的比较。

[0052] 图16.显示了CTP修饰的FVII-CTP_3的上游过程流程生产图表。

[0053] 图17.显示了CTP修饰的FVII-CTP_3的纯化过程的流程图表。

[0054] 图18.显示了纯化的CTP修饰的FVII-CTP_3的降低的SDS-PAGE结果。

[0055] 图19.显示了在纯化过程期间的带电荷N-聚糖占总N-聚糖的百分比是一致的,初始带电荷N-聚糖百分比受上游细胞培养过程影响。

[0056] 图20.显示了在整个纯化过程中氧化形式和其它相关形式的含量降低。多模型和HIC色谱柱对氧化形式和相关形式的降低具有最显著影响的纯化步骤。

[0057] 图21.显示了通过多模型柱除去非γ羧化蛋白质。CHT柱通过除去非γ羧化蛋白来富集γ羧化级分。

[0058] 图22.显示了在整个纯化过程中唾液酸的含量。唾液酸含量在纯化过程期间是一致的,初始唾液酸含量受上游细胞培养过程影响。

具体实施方式

[0059] 在一个实施方式中,公开了一种制备人绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)修饰的人因子VII(FVII)多肽的方法,其中所述FVII在其C-末端上包含串联连接的三个CTP分子,该方法包括以下步骤:用包含编码所述CTP修饰的FVII的编码部分的表达载体稳定转染预定数量的细胞,其中所述转染的细胞表达并分泌所述CTP修饰的FVII;获得过表达所述CTP修饰的FVII的细胞克隆;将所述克隆在溶液中扩增到预定的规模;收获含有所述克隆的所述溶液;过滤含有所述克隆的所述溶液以获得澄清的收获溶液;以及纯化所述澄清的收获溶液以得到具有所需浓度的CTP修饰的FVII的纯化蛋白质溶液;从而制备CTP修饰的FVII,其中制备的CTP修饰的FVII的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。

[0060] 在一个实施方式中,公开了人绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)修饰的人因子VII(FVII),其包含与其C-末端串联连接的三个CTP分子,其中所述CTP修饰的FVII通过包括以下步骤的方法制备:用包含编码所述CTP修饰的FVII的编码部分的表达载体稳定转染预定数量的细胞,其中所述转染的细胞表达并分泌所述CTP修饰的FVII;获得过表达所述CTP修饰的FVII的细胞克隆;将所述克隆在溶液中扩增到预定的规模;收获含有所述克隆的所述溶液;过滤含有所述克隆的所述溶液以获得澄清的收获溶液;以及纯化所述澄清的收获溶液以得到具有所需浓度的CTP修饰的FVII的纯化蛋白质溶液;其中所述制备的CTP修饰的FVII包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。

[0061] 在一个实施方式中,公开了包含人绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)修饰的人因子VII(FVII)的组合物,其包含与其C-末端串联连接的三个CTP分子。在另一个实施方式中,CTP修饰的FVII包含活化的CTP修饰的FVII(CTP修饰的FVIIa)。

[0062] 人绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)修饰的因子VII多肽

[0063] 凝血因子VII(FVII)是通过肝细胞分泌到血流中作为无活性的原酶(酶原)的444个氨基酸的糖蛋白(50KDa)。在组织损伤和暴露于循环血液时,FVII与组织因子(TF)形成复

合物,TF是FVII的真正受体蛋白,并且由位于血管壁的较深层中的各种细胞表达。该FVII-TF复合物的形成导致FVII的活化。活化的FVII(FVIIa)通过活化因子IX和因子X启动外源性凝血途径。

[0064] FVII属于与凝血系统相关的一组维生素K依赖性糖蛋白。合成FVII作为具有N-末端前肽的前体,然后是成熟氨基酸序列。前肽含有γ羧化酶的停泊位点,其将谷氨酸残基(Glu)转化为γ羧基谷氨酸残基(Gla)。羧基谷氨酸(Gla)是通过谷氨酸残基的翻译后羧化引入蛋白质中的不常见氨基酸。该修饰引入了对钙离子的亲和力,其中需要维生素K来引入凝血因子的γ-羧化,包括因子FVII。Gla结构域负责钙离子的高亲和力结合,其在凝血中起重要作用。该结构域之后是两个表皮生长因子样(EGF)结构域、连接区(CR)和C-末端丝氨酸蛋白酶结构域。在分泌之前,FVII前肽裂解,其中除去信号肽,形成406个氨基酸的单链酶原FVII糖蛋白。分泌后,通过CR中的裂解,蛋白质可被活化成二硫键连接的双链异二聚体FVIIa。FVII的血浆浓度为10nM,并且大约1%在健康个体中以活性形式循环。

[0065] 在一个实施方式中,本文提供了延长生物半衰期的方法或改善FVII或FVIIa的曲线下面积(AUC)的方法,其包括将三个CTP连接至FVII或FVIIa的羧基末端的步骤,从而延长生物半衰期或改善FVII或FVIIa的AUC。

[0066] 在另一个实施方式中,本文公开了降低因子VIIa(FVIIa)多肽的给药频率的方法,其包括将三个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)连接至所述FVIIa多肽的羧基末端的步骤,从而降低所述FVIIa多肽的给药频率。

[0067] 在另一个实施方式中,本文公开了降低因子VIIa(FVIIa)多肽的清除率的方法,其包括将三个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)连接至所述FVIIa多肽的羧基末端的步骤,从而降低所述FVIIa多肽的清除率。

[0068] 在一个实施方式中,本文公开了产生活化的CTP修饰的因子VII(FVIIa)多肽的方法,其包括将三个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)连接至所述FVIIa多肽的羧基末端的步骤,从而产生CTP修饰的FVIIa多肽。

[0069] 在另一个实施方式中,本公开的凝血因子是蛋白质。在另一个实施方式中,本公开的凝血因子是肽。在另一个实施方式中,本公开的凝血因子是多肽。在另一个实施方式中,凝血因子是酶。在另一个实施方式中,凝血因子是丝氨酸蛋白酶。在另一个实施方式中,凝血因子是糖蛋白。在另一个实施方式中,凝血因子是维生素K依赖性糖蛋白。在另一个实施方式中,凝血因子是维生素K非依赖性糖蛋白。在另一个实施方式中,凝血因子是转谷氨酰胺酶。在另一个实施方式中,凝血因子是无活性的酶原。在另一个实施方式中,凝血因子是本领域技术人员已知的任何凝血因子。在另一个实施方式中,凝血因子是因子VIIa(FVIIa)。

[0070] 在另一个实施方式中,凝血因子是重组蛋白。在另一个实施方式中,凝血因子是重组糖蛋白。在另一个实施方式中,凝血因子是重组FVII。在另一个实施方式中,凝血因子是重组FVIIa。在另一个实施方式中,凝血因子包含信号肽。在另一个实施方式中,重组凝血因子不包含信号肽。在另一个实施方式中,活化的凝血因子不包含信号肽。

[0071] 在另一个实施方式中,凝血因子包含连接至C-末端的3个CTP重复序列,并且没有连接至N-末端的CTP。

[0072] 在另一个实施方式中,本文公开了CTP修饰的因子VIIa(FVIIa)多肽,其由FVIIa多

肽和连接至所述FVIIa的羧基末端的三个促性腺激素羧基末端肽(CTP)组成。

[0073] 在另一个实施方式中,凝血因子是包含与FVII的结构域组织相似或相同的结构域组织的凝血因子。在另一个实施方式中,凝血因子作为具有N-末端前肽(信号序列)的前体合成。在另一个实施方式中,本文所述的凝血因子是无活性的酶前形式。在另一个实施方式中,本文所述的凝血因子是无活性的酶原,其已经从细胞分泌并且缺乏N-末端信号序列。在另一个实施方式中,本文所述的凝血因子是活化的凝血因子。在另一个实施方式中,本文所述的CTP修饰的FVII处于无活性的酶前形式,直至其被活化。在另一个实施方式中,本文所述的CTP修饰的FVII是无活性的酶原,其已经从细胞分泌并且缺乏N-末端信号序列。在另一个实施方式中,本文所述的CTP修饰的FVII是活化的凝血因子。在另一个实施方式中,凝血因子在肝细胞中产生。在另一个实施方式中,凝血因子包括γ-羧化酶的停泊位点,其将谷氨酸(Glu)转化为γ-羧基谷氨酸(Gla)。在另一个实施方式中,本文所用的凝血因子是可商购的凝血因子。

[0074] 在一个实施方式中,本文公开了人绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)修饰的人活性因子VII(FVIIa)多肽,其包含与FVIIa的C-末端串联连接的三个CTP分子,其中所述CTP修饰的FVIIa多肽是基本上纯净的和活性的形式,所述CTP修饰的FVIIa多肽包含:(a)高唾液酸含量;(b)低氧化形式;(c)高糖基化形式;(d)高百分比的羧化谷氨酸残基;(e)高比例的带电荷N-聚糖;(f)高效力;或其任何组合,其中所述CTP修饰的FVIIa包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。

[0075] 在一个实施方式中,本文公开了人绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)修饰的人活性因子VII(FVIIa)多肽,其包含与FVIIa的C-末端串联连接的三个CTP分子,其中所述CTP修饰的FVIIa多肽是基本上纯净的和活性的形式,所述CTP修饰的FVIIa多肽包含:(a)高唾液酸含量;(b)低氧化形式;(c)高糖基化形式;(d)高百分比的羧化谷氨酸残基;(e)高比例的带电荷N-聚糖;(f)效力为至少10U/mg;或其任何组合,其中所述CTP修饰的FVIIa包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。

[0076] 在相关实施方式中,高唾液酸含量由至少15mol/mol组成。在另一个相关方面,高糖基化形式包含至少10mol/mol的O-聚糖含量。在另一个相关方面,基本上纯净的和活性的形式包含至少60%的所述活性CTP修饰的FVIIa的高糖基化形式。在另一个相关方面,至少60%的基本上纯的和CTP修饰的FVIIa形式包含高百分比的羧化谷氨酸(Gla)残基。在另一个相关方面,高百分比的羧化谷氨酸(Gla)残基由至少90%Gla残基组成。在另一个相关方面,低百分比的氧化形式由小于5%组成。在另一个相关方面,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的纯度为至少90%。在另一相关方面,纯度百分比选自由97.3%、97.6%、97.4%和97.0%组成的组。在另一个相关方面,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的效力为至少10,500U/mg。在进一步相关的方面,效力选自由15,563U/mg、16,720U/mg、22,478U/mg和23,608U/mg组成的组。

[0077] 在另一个实施方式中,本文公开了包含CTP修饰的FVIIa的组合物,其包含:(a)高唾液酸含量;(b)低氧化形式;(c)高糖基化形式;(d)高百分比的羧化谷氨酸残基;(e)高比例的带电荷N-聚糖;(f)高效力;或其任何组合,其中所述CTP修饰的FVIIa包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列,和药学上可接受的载体。

[0078] 在另一个实施方式中,本文公开了包含CTP修饰的FVIIa的组合物,其包含:(a)高

唾液酸含量;(b)低氧化形式;(c)高糖基化形式;(d)高百分比的羧化谷氨酸残基;(e)高比例的带电荷N-聚糖;(f)至少10500U/mg的效力;或其任何组合,其中所述CTP修饰的FVIIa包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列,和药学上可接受的载体。

[0079] 在另一个实施方式中,本文公开了包含CTP修饰的FVIIa的组合物,其中所述CTP修饰的FVIIa多肽是基本上纯净的和活性的形式,所述CTP修饰的FVIIa多肽包含:

[0080] a.高唾液酸含量;

[0081] b.高糖基化形式;其中所述CTP修饰的FVIIa还包含以下中的至少一种:

[0082] c.低氧化形式;

[0083] d.高百分比的羧化谷氨酸残基;

[0084] e.至少60%带电荷N-聚糖;或

[0085] f.至少10500U/mg的效力;

[0086] 或其任何组合;并且

[0087] 其中所述CTP修饰的FVIIa包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。

[0088] 在另一个实施方式中,本文公开了包含CTP修饰的FVIIa的组合物,其中所述CTP修饰的FVIIa多肽是基本上纯净的和活性的形式,所述CTP修饰的FVIIa多肽包含:

[0089] a.高唾液酸含量;

[0090] b.高糖基化形式;其中所述CTP修饰的FVIIa还包含以下中的至少一种:

[0091] c.低氧化形式;

[0092] d.高百分比的羧化谷氨酸残基;

[0093] e.至少60%带电荷N-聚糖;或

[0094] f.至少10500U/mg的效力;

[0095] 或其任何组合;并且

[0096] 其中所述CTP修饰的FVIIa包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列,其中所述CTP修饰的FVIIa的氨基酸序列在结构上以二硫键连接的双链异二聚体存在,所述双链异二聚体在SEQ ID NO:7的半胱氨酸残基135和半胱氨酸残基262之间包含二硫键(S-S)桥,并且其中所述双链包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸1-152的轻链和含有SEQ ID NO:7的氨基酸153-490的重链。

[0097] 在一个实施方式中,编码凝血因子VII的核酸序列包含以下核酸序列:ctcgaggac
atggtctcccaggccctcaggctcctctgccttctgcttgggcttcagggctgcctggctgcagtcttcgtaaccc
aggaggaagcccacggcgtcctgcaccggcgccggcgcgccaacgcgttcctggaggagctgcggccgggctccct
ggagagggagtgcaaggaggagcagtgctccttcgaggaggcccgggagatcttcaaggacgcggagaggacgaag
ctgttctggatttcttacagtgatggggaccagtgtgcctcaagtccatgccagaatgggggctcctgcaaggacc
agctccagtcctatatctgcttctgcctccctgccttcgagggccggaactgtgagacgcacaaggatgaccagct
gatctgtgtgaacgagaacggcggctgtgagcagtactgcagtgaccacacgggcaccaagcgctcctgtcggtgc
cacgaggggtactctctgctggcagacggggtgtcctgcacacccacagttgaatatccatgtggaaaaatacctа
ttctagaaaaaagaaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtgggggcaaggtgtgccccaaaggggagtgtcc
atggcaggtcctgttgttggtgaatggagctcagttgtgtgggggaccctgatcaacaccatctgggtggtctcc
gcggcccactgtttcgacaaaatcaagaactggaggaacctgatcgcggtgctgggcgagcacgacctcagcgagc
acgacggggatgagcagagccggcgggtggcgcaggtcatcatccccagcacgtacgtcccgggcaccaccaacca

cgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggtcctcactgaccatgtggtgcccctctgcctgcccgaacgg
acgttctctgagaggacgctggccttcgtgcgcttctcattggtcagcggctggggccagctgctggaccgtggcg
ccacggccctggagctcatggtcctcaacgtgccccggctgatgacccaggactgcctgcagcagtcacggaaggt
gggagactccccaaatatcacggagtacatgttctgtgccggctactcggatggcagcaaggactcctgcaagggg
gacagtggaggcccacatgccacccactaccggggcacgtggtacctgacgggcatcgtcagctggggccagggct
gcgcaaccgtgggccactttggggtgtacaccagggtctcccagtacatcgagtggctgcaaaagctcatgcgctc
agagccacgcccaggagtcctcctgcgagccccatttccctgaggatgcggccgc(SEQ ID NO:1)。

[0098] 在另一个实施方式中,因子VII的氨基酸序列包含以下氨基酸序列:MVSQALRLLCL
LLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ
CASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGV
SCTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNW
RNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRLHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVR
FSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYR
GTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP(SEQ ID NO:2)。

[0099] 在另一个实施方式中,因子VII的氨基酸序列包含以下氨基酸序列:MVSQALRLLCL
LLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ
CASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGV
SCTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNW
RNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRLHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVR
FSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYR
GTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPGCGR(SEQ ID NO:3)。

[0100] 在另一个实施方式中,编码凝血因子VII-CTP-CTP-CTP(连接至羧基末端)的核酸
序列包含以下核酸序列:ctcgaggacatggtctcccaggccctcaggctcctctgccttctgcttgggcttc
agggctgcctggctgcagtcttcgtaacccaggaggaagcccacggcgtcctgcaccggcgccggcgcgccaacgc
gttcctggaggagctgcggccgggctccctggagagggagtgcaaggaggagcagtgctccttcgaggaggcccgg
gagatcttcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggatttcttacagtgatggggaccagtgtgcctcaagtc
catgccagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagtcctatatctgcttctgcctccctgccttcgagggccg
gaactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaacggcggctgtgagcagtactgcagtgac
cacacgggcaccaagcgctcctgtcggtgccacgaggggtactctctgctggcagacggggtgtcctgcacaccca
cagttgaatatccatgtggaaaaatacctattctagaaaaaagaaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtggg
gggcaaggtgtgccccaaaggggagtgtccatggcaggtcctgttgttggtgaatggagctcagttgtgtgggggg
accctgatcaacaccatctgggtggtctccgcggcccactgtttcgacaaaatcaagaactggaggaacctgatcg
cggtgctgggcgagcacgacctcagcgagcacgacggggatgagcagagccggcgggtggcgcaggtcatcatccc
cagcacgtacgtcccgggcaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggtcctcactgac
catgtggtgcccctctgcctgcccgaacggacgttctctgagaggacgctggccttcgtgcgcttctcattggtca
gcggctggggccagctgctggaccgtggcgccacggccctggagctcatggtcctcaacgtgccccggctgatgac
ccaggactgcctgcagcagtcacggaaggtgggagactccccaaatatcacggagtacatgttctgtgccggctac
tcggatggcagcaaggactcctgcaaggggacagtggaggcccacatgccacccactaccggggcacgtggtacc
tgaccggcatcgtgagctggggccagggctgcgccaccgtgggccacttcggcgtgtacaccagggtgtcccagta

catcgagtggctgcagaaactgatgagaagcgagcccagacccggcgtgctgctgagagccccttccccagcagc agctccaaggcccctcccctagcctgcccagccctagcagactgcctgggcccagtgacacccctatcctgcctc agtccagctccagcaaggccccacccctagcctgccttctccttctcggctgcctggccccagcgatactccaat tctgccccagtcctccagcagtaaggctccccctccatctctgccatcccccagcagactgccaggcccttctgat acacccatcctcccacagtgatgaggatccgcggccgcttaattaa(SEQ ID NO:4)。

[0101] 在另一个实施方式中,因子VII-CTP-CTP-CTP的氨基酸序列(连接至羧基末端)包括下列氨基酸序列:MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQ CSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVN GAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRLH QPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITE YMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLL RAPFPSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPS RLPGPSDTPILPQ(SEQ ID NO:5)。在另一个实施方式中,SEQ ID NO:5的氨基酸1-38包含信号序列。在另一个实施方式中,信号序列的氨基酸序列包含MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEE AHGVLHRRRR(SEQ ID NO:6)。

[0102] 在另一个实施方式中,缺乏信号肽的因子VII-CTP-CTP-CTP(连接至羧基末端)的氨基酸序列包含以下氨基酸序列:ANAFLEELRP

GSLERECKEE QCSFEEAREI FKDAERTKLF WISYSDGDQC
ASSPCQNGGS CKDQLQSYIC FCLPAFEGRN CETHKDDQLI
CVNENGGCEQ YCSDHTGTKR SCRCHEGYSL LADGVSCTPT
VEYPCGKIPI LEKRNASKPQ GRIVGGKVCP KGECPWQVLL
LVNGAQLCGG TLINTIWVVS AAHCFDKIKN WRNLIAVLGE
HDLSEHDGDE QSRRVAQVII PSTYVPGTTN HDIALLRLHQ
PVVLTDHVVP LCLPERTFSE RTLAFVRFSL VSGWGQLLDR
GATALELMVL NVPRLMTQDC LQQSRKVGDS PNITEYMFCA
GYSDGSKDSC KGDSGGPHAT HYRGTWYLTG IVSWGQGCAT
VGHFGVYTRV SQYIEWLQKL MRSEPRPGVL LRAPFPSSSS
KAPPPSLPSP SRLPGPSDTP ILPQSSSSKA PPPSLPSPSR LPGPSDTPIL
PQSSSSKAPP PSLPSPSRLP GPSDTPILPQ（SEQ ID NO：7)。

[0103] 在另一个实施方式中,活化因子VII-CTP-CTP-CTP(连接至羧基末端)(FVIIa-CTP_3)的氨基酸序列缺乏信号肽并且包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列。在另一个实施方式中,FVIIa-CTP_3缺乏信号肽并且包含SEQ ID NO:7的同源物。在另一个实施方式中,FVIIa-CTP_3缺乏信号肽并且包含SEQ ID NO:7的变体。在另一个实施方式中,FVIIa-CTP_3的氨基酸序列在残基152处的精氨酸(R)和残基153处的异亮氨酸(I)之间裂解。在另一个实施方式中,FVIIa-CTP_3的氨基酸序列在结构上作为二硫键连接的双链异二聚体存在,其包含存在于每条链上的半胱氨酸残基之间的二硫键S-S桥。在另一个实施方式中,FVIIa-CTP_3的氨基酸序列在结构上作为异二聚体存在,其包含通过轻链中存在的半胱氨酸残基与重链中

存在的半胱氨酸残基之间的二硫-S-S-键连接的轻链和重链。在另一个实施方式中,轻链包含FVIIa-CTP$_3$氨基酸序列的N-末端片段,重链包含FVIIa-CTP$_3$氨基酸序列的C-末端片段。在另一个实施方式中,半胱氨酸残基可以是任一链中的任何半胱氨酸残基。在另一个实施方式中,FVIIa-CTP$_3$的氨基酸序列在结构上作为二硫键连接的双链异二聚体形式存在,其包含SEQ ID NO:7的半胱氨酸残基135和半胱氨酸残基262之间的S-S桥,其中所述双链包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸1-152的轻链和含有SEQ ID NO:7的氨基酸153-490的重链。

[0104] 在另一个实施方式中,轻链在变性条件下在SDS-PAGE中以约25kDA迁移。在另一个实施方式中,重链在变性条件下在SDS-PAGE中以约50kDA迁移。在另一个实施方式中,重链在变性条件下在SDS-PAGE中以约60kDA迁移。

[0105] 在另一个实施方式中,通过在其C-末端上连接3个CTP而修饰的活化的FVII的轻链(FVIIa-CTP-CTP-CTP)包含SEQ ID NO:8。

[0106] ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGR(SEQ ID NO:8)。

[0107] 在另一个实施方式中,通过在其C-末端上连接3个CTP而修饰的活化的FVII的重链(FVIIa-CTP-CTP-CTP)包含SEQ ID NO:9。

[0108] IVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRLHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ(SEQ ID NO:9)

[0109] 在另一个实施方式中,将弗林蛋白酶加入到表达本公开的凝血因子-CTP的细胞中。在另一个实施方式中,弗林蛋白酶增加了细胞中本公开的凝血因子-CTP的生产效率。在另一个实施方式中,弗林蛋白酶与包含本公开的凝血因子-CTP的编码序列的载体共转染。在另一个实施方式中,弗林蛋白酶由单独的载体编码。在另一个实施方式中,弗林蛋白酶和凝血因子-CTP由同一个载体编码。在另一个实施方式中,将弗林蛋白酶的编码序列插入pCI-DHFR中。在另一个实施方式中,弗林蛋白酶的编码序列在pCI-dhfr/smaI+NotI、Furin/AsisI F.I.+NotI中工程化。

[0110] 在另一个实施方式中,编码弗林蛋白酶的核酸序列包含以下核酸序列:tctagagtcgaccccgccatggagctgaggccctggttgctatgggtggtagcagcaacaggaaccttggtcctgctagcagctgatgctcagggccagaaggtcttcaccaacacgtgggctgtgcgcatccctggaggcccagcggtggccaacagtgtggcacggaagcatgggttcctcaacctgggccagatcttcggggactattaccacttctggcatcgaggagtgacgaagcggtccctgtcgcctcaccgcccgcggcacagccggctgcagagggagcctcaagtacagtggctggaacagcaggtggcaaagcgacggactaaacgggacgtgtaccaggagcccacagaccccaagtttcctcagcagtggtacctgtctggtgtcactcagcgggacctgaatgtgaaggcggcctgggcgcagggctacacagggcacggcattgtggtctccattctggacgatggcatcgagaagaaccacccggacttggcaggcaattatgatcctggggccagttttgatgtcaatgaccaggaccctgacccccagcctcggtacacacagatgaatgacaacaggcacggcacacggtgtgcgggggaagtggctgcggtggccaacaacggtgtctgtggtgtaggtgtggcctacaacgcccgcattggaggggtgcgcatgctggatggcgaggtgacagatgcagtggaggcacgctcgctgggcctgaaccccaaccacatccacatctac

agtgccagctggggccccgaggatgacggcaagacagtggatgggccagcccgcctcgccgaggaggccttcttcc
gtggggttagccagggccgaggggggctgggctccatctttgtctgggcctcggggaacgggggccgggaacatga
cagctgcaactgcgacggctacaccaacagtatctacacgctgtccatcagcagcgccacgcagtttggcaacgtg
ccgtggtacagcgaggcctgctcgtccacactggccacgacctacagcagtggcaaccagaatgagaagcagatcg
tgacgactgacttgcggcagaagtgcacggagtctcacacgggcacctcagcctctgccccttagcagccggcat
cattgctctcaccctggaggccaataagaacctcacatggcgggacatgcaacacctggtggtacagacctcgaag
ccagcccacctcaatgccaacgactgggccaccaatggtgtgggccggaaagtgagccactcatatggctacgggc
ttttggacgcaggcgccatggtggccctggcccagaattggaccacagtggcccccagcggaagtgcatcatcga
catcctcaccgagcccaaagacatcgggaaacggctcgaggtgcggaagaccgtgaccgcgtgcctgggcgagccc
aaccacatcactcggctggagcacgctcaggcgcggctcaccctgtcctataatcgccgtggcgacctggccatcc
acctggtcagccccatgggcacccgctccaccctgctggcagccaggccacatgactactccgcagatgggtttaa
tgactgggccttcatgacaactcattcctgggatgaggatccctctggcgagtgggtcctagagattgaaaacacc
agcgaagccaacaactatgggacgctgaccaagttcaccctcgtactctatggcaccgcccctgaggggctgcccg
tacctccagaaagcagtggctgcaagaccctcacgtccagtcaggcctgtgtggtgtgcgaggaaggcttctccct
gcaccagaagagctgtgtccagcactgccctccaggcttcgccccccaagtcctcgatacgcactatagcaccgag
aatgacgtggagaccatccgggccagcgtctgcgccccctgccacgcctcatgtgccacatgccaggggccggccc
tgacagactgcctcagctgccccagccacgcctccttggaccctgtggagcagacttgctcccggcaaagccagag
cagccgagagtccccgccacagcagcagccacctcggctgcccccggaggtggaggcggggcaacggctgcgggca
gggctgctgccctcacacctgcctgaggtggtggccggcctcagctgcgccttcatcgtgctggtcttcgtcactg
tcttcctggtcctgcagctgcgctctggctttagttttcgggggggtgaaggtgtacaccatggaccgtggcctcat
ctcctacaaggggctgccccctgaagcctggcaggaggagtgcccgtctgactcagaagaggacgagggccggggc
gagaggaccgcctttatcaaagaccagagcgccctctgaacgcggccgc(SEQ ID NO:10)。

[0111] 在另一个实施方式中,弗林蛋白酶的氨基酸序列包含以下氨基酸序列:MELRPWLL
WVVAATGTLVLLAADAQGQKVFTNTWAVRIPGGPAVANSVARKHGFLNLGQIFGDYYHFWHRGVTKRSLSPHRPRH
SRLQREPQVQWLEQQVAKRRTKRDVYQEPTDPKFPQQWYLSGVTQRDLNVKAAWAQGYTGHGIVVSILDDGIEKNH
PDLAGNYDPGASFDVNDQDPDPQPRYTQMNDNRHGTRCAGEVAAVANNGVCGVGVAYNARIGGVRMLDGEVTDAVE
ARSLGLNPNHIHIYSASWGPEDDGKTVDGPARLAEEAFFRGVSQGRGGLGSIFVWASGNGGREHDSCNCDGYTNSI
YTLSISSATQFGNVPWYSEACSSTLATTYSSGNQNEKQIVTTDLRQKCTESHTGTSASAPLAAGIIALTLEANKNL
TWRDMQHLVVQTSKPAHLNANDWATNGVGRKVSHSYGYGLLDAGAMVALAQNWTTVAPQRKCIIDILTEPKDIGKR
LEVRKTVTACLGEPNHITRLEHAQARLTLSYNRRGDLAIHLVSPMGTRSTLLAARPHDYSADGFNDWAFMTTHSWD
EDPSGEWVLEIENTSEANNYGTLTKFTLVLYGTAPEGLPVPPESSGCKTLTSSQACVVCEEGFSLHQKSCVQHCPP
GFAPQVLDTHYSTENDVETIRASVCAPCHASCATCQGPALTDCLSCPSHASLDPVEQTCSRQSQSSRESPPQQQPP
RLPPEVEAGQRLRAGLLPSHLPEVVAGLSCAFIVLVFVTVFLVLQLRSGFSFRGVKVYTMDRGLISYKGLPPEAWQ
EECPSDSEEDEGRGERTAFIKDQSAL(SEQ ID NO:11)。

[0112] 在一个实施方式中,术语凝血因子还包括已知凝血因子的同源物。在一个实施方式中,同源物具有凝结活性。在一些实施方式中,根据本发明的同源性还包括缺失、插入或取代变体,包括其氨基酸取代和其生物活性多肽片段。在一个实施方式中,变体包含保守取代、或缺失、插入或取代,其不显著改变凝血因子的三维结构。在另一个实施方式中,缺失、插入或取代不改变凝血因子的目的功能,在一个实施方式中,凝血因子与特定结合配偶体

结合。

[0113] 在另一个实施方式中,本公开包括凝血因子的同源物。在另一个实施方式中,本公开包括具有凝固活性的凝血因子的同源物。在另一个实施方式中,本公开包括具有功能性结合的凝血因子的同源物。在另一个实施方式中,本公开包括具有凝固活性的本文所述的凝血因子的同源物。在另一个实施方式中,本公开包括具有功能性结合的本文所述的凝血因子的同源物。在另一个实施方式中,如使用国家生物技术信息中心(NCBI)的BlastP软件在默认参数下确定,同源物,例如多肽,与凝血因子至少50%,至少55%,至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少87%,至少89%,至少91%,至少93%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%或至少99%同源。

[0114] 在另一个实施方式中,本文所述的[(CTP)n>1-凝血因子]包含通过其羧基末端上的肽键与至少一个CTP单元连接的全长凝血因子或其活性片段,其中没有CTP在其氨基末端上。在另一个实施方式中,本文所述的[(CTP)n>1-凝血因子]包含通过肽键与至少一个CTP单元连接的凝血因子或其活性片段,所述CTP单元通过肽键与另外的CTP单元连接,其中没有CTP在其氨基末端上。在另一个实施方式中,一种核酸分子编码工程化凝血因子,其包含与其C-末端连接的至少一个CTP,并且没有CTP在其氨基末端上。

[0115] 在另一个实施方式中,CTP通过接头与凝血因子连接。在另一个实施方式中,将CTP序列连接至凝血因子的接头是共价键。在另一个实施方式中,将CTP序列连接至凝血因子的接头是肽键。在另一个实施方式中,将CTP序列连接至凝血因子的接头是取代的肽键。在另一个实施方式中,CTP序列包含:DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL(SEQ ID NO:12)。在另一个实施方式中,CTP序列包含:SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ(SEQ ID NO:13)。在另一个实施方式中,CTP序列包含选自SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13所示序列的氨基酸序列。

[0116] 在另一个实施方式中,本文公开的羧基末端肽(CTP)肽包含人绒毛膜促性腺激素的氨基酸112至145位的氨基酸序列,如SEQ ID NO:12所示。在另一个实施方式中,本文公开的CTP序列包含人绒毛膜促性腺激素的氨基酸118至145位的氨基酸序列,如SEQ ID NO:13所示。在另一个实施方式中,CTP序列也从112-118位之间的任何位置开始并终止于人绒毛膜促性腺激素的145位。在一些实施方式中,CTP序列肽长为28、29、30、31、32、33或34个氨基酸并且开始于CTP氨基酸序列的112、113、114、115、116、117或118位。

[0117] 在另一个实施方式中,CTP肽是绒毛膜促性腺激素CTP的变体,其与天然CTP的不同之处在于1-5个保守氨基酸的取代,如美国专利号5,712,122中所述,其通过引用并入本文。在另一个实施方式中,CTP肽是绒毛膜促性腺激素CTP的变体,其与天然CTP的不同之处在于1个保守氨基酸取代。在另一个实施方式中,CTP肽是绒毛膜促性腺激素CTP的变体,其与天然CTP的不同之处在于2个保守氨基酸取代。在另一个实施方式中,CTP肽是绒毛膜促性腺激素CTP的变体,其与天然CTP的不同之处在于3个保守氨基酸取代。在另一个实施方式中,CTP肽是绒毛膜促性腺激素CTP的变体,其与天然CTP的不同之处在于4个保守氨基酸取代。在另一个实施方式中,CTP肽是绒毛膜促性腺激素CTP的变体,其与天然CTP的不同之处在于5个保守氨基酸取代。

[0118] 在另一个实施方式中,本文公开的CTP肽氨基酸序列与天然CTP氨基酸序列或其肽具有至少70%的同源性。在另一个实施方式中,本文公开的CTP肽氨基酸序列与天然CTP氨基酸序列或其肽具有至少80%的同源性。在另一个实施方式中,本文公开的CTP肽氨基酸序

列与天然CTP氨基酸序列或其肽具有至少90％的同源性。在另一个实施方式中,本文公开的CTP肽氨基酸序列与天然CTP氨基酸序列或其肽具有至少95％的同源性。在另一个实施方式中,本文公开的CTP肽氨基酸序列与天然CTP氨基酸序列或其肽具有至少98％的同源性。

[0119] 在另一个实施方式中,编码本文公开的CTP肽的多核苷酸与天然人CTP DNA序列或其肽具有至少70％的同源性。在另一个实施方式中,编码本文公开的CTP肽的多核苷酸与天然人CTP DNA序列或其肽具有至少80％的同源性。在另一个实施方式中,编码本文公开的CTP肽的多核苷酸与天然CTP DNA序列或其肽具有至少90％的同源性。在另一个实施方式中,编码本文公开的CTP肽的多核苷酸与天然CTP DNA序列或其肽具有至少95％的同源性。在另一个实施方式中,编码本文公开的CTP肽的多核苷酸与天然CTP DNA序列或其肽具有至少98％的同源性。

[0120] 在一个实施方式中,至少一个绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列是截短的。在另一个实施方式中,2个绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列都是截短的。在另一个实施方式中,2个绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列是截短的。在另一个实施方式中,3个绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列是截短的。在另一个实施方式中,4个绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列是截短的。在另一个实施方式中,5个绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列是截短的。在另一个实施方式中,2个或更多个绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列是截短的。在另一个实施方式中,所有绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列都是截短的。在一个实施方式中,截短的CTP包含SEQ ID NO:14的前10个氨基酸。在另一个实施方式中,SEQ ID NO:14包含以下氨基酸(AA)序列:SSSSKAPPPSLP。在另一个实施方式中,SEQ ID NO:14的前10个氨基酸如SEQ ID NO:15中所示:SSSSKAPPPS。

[0121] 在一个实施方式中,截短的CTP包含SEQ ID NO:13的前10个氨基酸。

[0122] 在一个实施方式中,截短的CTP包含SEQ ID NO:13的前11个氨基酸。在一个实施方式中,截短的CTP包含SEQ ID NO:13的前12个氨基酸。在一个实施方式中,截短的CTP包含SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14的前8个氨基酸。在一个实施方式中,截短的CTP包含SEQ ID NO:13的前13个氨基酸。在一个实施方式中,截短的CTP包含SEQ ID NO:13的前14个氨基酸。在一个实施方式中,截短的CTP包含SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14的前6个氨基酸。在一个实施方式中,截短的CTP包含SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14的前5个氨基酸。

[0123] 在一个实施方式中,至少一个绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列是糖基化的。在另一个实施方式中,2个绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列是糖基化的。在另一个实施方式中,3个绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列是糖基化的。在另一个实施方式中,4个绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列是糖基化的。在另一个实施方式中,5个绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列是糖基化的。在另一个实施方式中,2个或更多个绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列是糖基化的。在另一个实施方式中,所有绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列都是糖基化的。

[0124] 在一个实施方式中,本文公开的CTP序列包含至少一个糖基化位点。在一个实施方式中,本文公开的CTP序列包含2个糖基化位点。在一个实施方式中,本文公开的CTP序列包含3个糖基化位点。在一个实施方式中,本文公开的CTP序列包含4个糖基化位点。在一个实施方式中,一个或多个绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列是完全糖基化的。在另一个实施方式中,一个或多个绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列是部分糖基化的。在一个实施方式中,部分糖基化表明CTP糖基化位点之一是糖基化的。在另一个实施方式中,两个CTP糖基化位

点是糖基化的。在另一个实施方式中,三个CTP糖基化位点是糖基化的。

[0125] 在一些实施方式中,CTP序列修饰在允许使用较低剂量方面是有利的。在一些实施方式中,CTP序列修饰在允许较少剂量方面是有利的。在一些实施方式中,CTP序列修饰在允许安全的长效作用方面是有利的。

[0126] 在一些实施方式中,本文所用的"多肽"、"工程化凝血因子"或"蛋白质"包括天然多肽(降解产物、合成性地合成多肽或重组多肽)和肽模拟物(通常为合成性地合成的多肽),以及作为多肽类似物的类肽和半类肽,其在一些实施方式中具有修饰,使得包含凝血因子的多肽在体内更加稳定或更能够渗透到细胞中。

[0127] 在一些实施方式中,修饰包括但不限于C-末端修饰,多肽键修饰,包括但不限于CH2-NH,CH2-S,CH2-S=O,O=C-NH,CH2-O,CH2-CH2,S=C-NH,CH=CH或CF=CH,骨架修饰和残基修饰。用于制备拟肽化合物的方法是本领域熟知的,并且例如在Quantitative Drug Design,C.A.Ramsden Gd.,Chapter 17.2,F.Choplin Pergamon Press(1992)中,其通过引用并入本文,如同在本文中完全阐述一样。在下文中提供了这方面的进一步细节。

[0128] 在一些实施方式中,多肽内的多肽键(-CO-NH-)被取代。在一些实施方式中,多肽键被N-甲基化键(-N(CH_3)-CO-)取代。在一些实施方式中,多肽键被酯键(-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-)取代。在一些实施方式中,多肽键被酮亚甲基键(-CO-CH2-)取代。在一些实施方式中,多肽键被α-氮杂键(-NH-N(R)-CO-)取代,其中R是任何烷基,例如甲基,Carba键(-CH2-NH-)。在一些实施方式中,多肽键被羟基乙烯键(-CH(OH)-CH2-)取代。在一些实施方式中,多肽键被硫代酰胺键(-CS-NH-)取代。在一些实施方式中,多肽键被烯属双键(-CH=CH-)取代。在一些实施方式中,多肽键被反式酰胺键(-NH-CO-)取代。在一些实施方式中,多肽键被多肽衍生物(-N(R)-CH2-CO-)取代,其中R是天然存在于碳原子上的"正常"侧链。在一些实施方式中,这些修饰发生在沿多肽链的任何键上,并且在一个实施方式中同时有若干(2-3个键)。

[0129] 在一些实施方式中,多肽的天然芳族氨基酸如Trp、Tyr和Phe取代合成的非天然酸如苯基甘氨酸、TIC、萘基丙氨酸(Nol)、Phe的环甲基化衍生物,Phe的卤代衍生物或邻甲基-Tyr。在一些实施方式中,本文公开的多肽包括一种或多种修饰的氨基酸或一种或多种非氨基酸单体(例如脂肪酸、复合碳水化合物等)。

[0130] 在一些实施方式中,天然氨基酸谷氨酸(Glu)是翻译后羧化的,导致本文所述的CTP修饰的FVII或CTP修饰的FVIIa中羧基谷氨酸(Gla)的存在。

[0131] 在一个实施方式中,"氨基酸"或"氨基酸序列"应理解为包括20个天然存在的氨基酸;该类氨基酸经常在体内翻译后修饰,包括例如羟脯氨酸、磷酸丝氨酸和磷酸苏氨酸;和其它不常见的氨基酸,包括但不限于2-氨基己二酸、羟赖氨酸、异锁链素、正缬氨酸、正亮氨酸和鸟氨酸。在一个实施方式中,"氨基酸"包括D-和L-氨基酸。

[0132] 在一些实施方式中,本文公开的多肽用于治疗中,其需要以可溶形式包含凝血因子的多肽。在一些实施方式中,本文公开的多肽包括一种或多种非天然或天然极性氨基酸,包括但不限于丝氨酸和苏氨酸,其由于其含羟基侧链而能够增加多肽溶解度。

[0133] 在一些实施方式中,本文公开的工程化凝血因子以线形形式使用,但本领域技术人员将理解,在环化不严重干扰工程化凝血因子特征的情况下,也可以使用环形形式的工程化凝血因子。

[0134] 在一些实施方式中,本文公开的工程化凝血因子是生物化学合成的,例如通过使用标准固相技术。在一些实施方式中,这些生物化学方法包括排他性固相合成、部分固相合成、片段缩合或经典溶液合成。

[0135] 在一些实施方式中,重组蛋白质技术用于产生本文公开的工程化凝血因子。在一些实施方式中,重组蛋白质技术用于产生相对长的多肽(例如长于18-25个氨基酸)。在一些实施方式中,重组蛋白质技术用于产生大量本文公开的工程化凝血因子。在一些实施方式中,Bitter等,(1987)Methods in Enzymol.153:516-544,Studier等,(1990)Methods in Enzymol.185:60-89,Brisson等,(1984)Nature 310:511-514,Takamatsu等(1987)EMBO J.6:307-311,Coruzzi等(1984)EMBO J.3:1671-1680和Brogli等,(1984)Science 224:838-843,Gurley等,(1986)Mol.Cell.Biol.6:559-565和Weissbach&Weissbach,1988,Methods for Plant Molecular Biology,Academic Press,NY,第VIII节,第421-463页描述了重组技术,其通过引用整体并入本文。

[0136] 在另一个实施方式中,本公开提供了多核苷酸分子,其包含编码多肽的基因的编码部分,所述多肽包含凝血因子和连接至凝血因子的羧基末端的促性腺激素羧基末端肽,如上文所述。在另一个实施方式中,本发明提供了多核苷酸分子,其由编码多肽的基因的编码部分组成,所述多肽包含凝血因子和连接至凝血因子的羧基末端的促性腺激素羧基末端肽,如上文所述。在另一个实施方式中,本公开提供了多核苷酸分子,其基本上由编码多肽的基因的编码部分组成,所述多肽包含凝血因子和连接至凝血因子的羧基末端的促性腺激素羧基末端肽,如上文所述。

[0137] 在另一个实施方式中,本发明提供了编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含凝血因子和连接至凝血因子的羧基末端的三个促性腺激素羧基末端肽,如上文所述。在另一个实施方式中,本公开提供了编码多肽的多核苷酸,所述多肽由凝血因子和连接至凝血因子的羧基末端的三个促性腺激素羧基末端肽组成,如上文所述。在另一个实施方式中,本发明提供了编码多肽的多核苷酸,所述多肽基本上由凝血因子和连接至凝血因子的羧基末端的三个促性腺激素羧基末端肽组成,如上文所述。在一个实施方式中,多核苷酸是多核苷酸序列。在一个实施方式中,多核苷酸是多核苷酸分子。

[0138] 在另一个实施方式中,本公开提供了包含本文所述的多核苷酸分子的表达载体。在另一个实施方式中,本文公开了包含编码CTP修饰的多肽的多核苷酸的表达载体,所述多肽由因子VII多肽和连接至所述FVII多肽的羧基末端的三个促性腺激素羧基末端肽(CTP)组成。在另一个实施方式中,可以在表达后的某个时间点活化从本文所述的表达载体表达的CTP修饰的FVII,以产生CTP修饰的FVIIa。

[0139] 在另一个实施方式中,本公开提供了包含本文所述的表达载体的细胞。在另一个实施方式中,本文公开了包含表达载体的细胞,所述表达载体包含编码CTP修饰的多肽的多核苷酸,所述多肽由因子VII(FVII)多肽和连接至所述FVIIa多肽的羧基末端的三个促性腺激素羧基末端肽(CTP)组成。在另一个实施方式中,可以在从细胞分泌后活化从本文所述的表达载体表达并包含在细胞内的CTP-FVII。

[0140] 在另一个实施方式中,本公开提供了包含本文所述的表达载体的组合物。在另一个实施方式中,本文公开了包含表达载体的组合物,所述表达载体包含编码CTP修饰的多肽的多核苷酸,所述多肽由因子VII(FVII)多肽和连接至所述FVIIa多肽的羧基末端的三个促

性腺激素羧基末端肽(CTP)组成。

[0141] 在另一个实施方式中,本公开提供了包含本文所述的细胞的组合物。在另一个实施方式中,细胞是真核细胞。在另一个实施方式中,细胞是原核细胞。

[0142] 在一个实施方式中,本文公开了产生CTP修饰的FVII的方法,其包括将三个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)连接至所述FVII的羧基末端的步骤,从而产生CTP修饰的FVII。

[0143] 在另一个实施方式中,使用编码本文公开的多肽的多核苷酸分子合成本文公开的工程化凝血因子。在一些实施方式中,将编码工程化凝血因子的多核苷酸分子连接至表达载体中,所述表达载体包含顺式调节序列(例如启动子序列)的转录控制。在一些实施方式中,顺式调节序列适合于指导本文公开的工程化凝血因子的组成型表达。在一些实施方式中,顺式调节序列适合于指导工程化凝血因子的组织特异性表达。在一些实施方式中,顺式调节序列适合于指导工程化凝血因子的诱导型表达。

[0144] 在一些实施方式中,适用于本公开的组织特异性启动子包括在一个或多个特定细胞群中有功能的序列。实例包括但不限于启动子,例如肝脏特异性的白蛋白[Pinkert等,(1987)Genes Dev.1:268-277],淋巴特异性启动子[Calame等,(1988)Adv.Immunol.43:235-275];特别是T细胞受体的启动子[Winoto等,(1989)EMBO J.8:729-733]和免疫球蛋白;[Banerji等(1983)Cell 33729-740],神经元特异性启动子如神经细丝启动子[Byrne等(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:5473-5477],胰腺特异性启动子[Edlunch等(1985)Science 230:912-916]或乳腺特异性启动子如乳清乳清促进剂(美国专利号4,873,316和欧洲申请公开号264,166)。适用于本发明的诱导型启动子包括例如四环素诱导型启动子(Srour,M.A.等,2003.Thromb.Haemost.90:398-405)。

[0145] 在一个实施方式中,短语“多核苷酸分子”是指单链或双链核酸序列,其以RNA序列、互补多核苷酸序列(cDNA)、基因组多核苷酸序列和/或复合多核苷酸序列(例如上述的组合)的形式分离并提供。

[0146] 在一个实施方式中,“互补多核苷酸序列”是指使用逆转录酶或任何其它RNA依赖性DNA聚合酶从信使RNA逆转录产生的序列。在一个实施方式中,随后可以使用DNA聚合酶在体内或体外扩增序列。

[0147] 在一个实施方式中,“基因组多核苷酸序列”是指从染色体衍生(分离)的序列,因此它代表染色体的连续部分。

[0148] 在一个实施方式中,“复合多核苷酸序列”是指至少部分互补且至少部分基因组的序列。在一个实施方式中,复合序列可包括编码本文公开的多肽所需的一些外显子序列,以及介于其间的一些内含子序列。在一个实施方式中,内含子序列可以是任何来源,包括其它基因,并且通常包括保守的剪接信号序列。在一个实施方式中,内含子序列包括顺式作用表达调节元件。

[0149] 在一个实施方式中,在表达之后和分泌之前,信号肽从前体工程化凝血因子裂解,导致缺乏信号肽的成熟工程化凝血因子。在另一个实施方式中,在分泌后,所述成熟工程化凝血因子被活化。

[0150] 在一些实施方式中,使用PCR技术或本领域技术人员已知的任何其它方法或程序制备本文公开的多核苷酸。在一些实施方式中,该方法包括连接两种不同的DNA序列(参见

例如,“Current Protocols in Molecular Biology”,eds.Ausubel等,John Wiley&Sons,1992)。

[0151] 在一个实施方式中,将编码工程化凝血因子的本文公开的多核苷酸插入表达载体(即核酸构建体)中以使重组多肽能够表达。在一个实施方式中,本文公开的表达载体包括使该载体适于在原核生物中复制和整合的额外序列。在一个实施方式中,本文公开的表达载体包括使该载体适于在真核生物中复制和整合的额外序列。在一个实施方式中,本文公开的表达载体包括使该载体适于在原核生物和真核生物中复制和整合的穿梭载体。在一些实施方式中,克隆载体包含转录和翻译起始序列(例如启动子、增强子)和转录和翻译终止子(例如多腺苷酸化信号)。

[0152] 在一个实施方式中,多种原核或真核细胞可用作宿主表达系统以表达本文公开的凝血因子。在一些实施方式中,这些包括但不限于微生物,例如用重组噬菌体DNA转化的细菌,含有多肽编码序列的质粒DNA或粘粒DNA表达载体;用含有多肽编码序列的重组酵母表达载体转化酵母;用重组病毒表达载体感染的植物细胞系统(例如花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒,TMV)或用含有多肽编码序列的重组质粒表达载体如Ti质粒转化。

[0153] 在一些实施方式中,使用非细菌表达系统(例如哺乳动物表达系统,例如CHO细胞)来表达本文公开的凝血因子。在一个实施方式中,用于在哺乳动物细胞中表达本文公开的多核苷酸的表达载体是包含CMV启动子和新霉素抗性基因的pCI-DHFR载体。根据一个实施方式,在国际申请号PCT/IL2016/050645中描述了pCI-dhfr载体的构建,其全部内容并入本文。

[0154] 在一些实施方式中,在本文公开的细菌系统中,可以有利地选择许多表达载体,这取决于表达的多肽的用途。在一个实施方式中,需要大量的多肽。在一个实施方式中,期望指导高水平蛋白质产物表达的载体,可能作为与疏水信号序列的融合,其将表达的产物导入细菌的外周胞质或培养基中,其中蛋白质产物易于纯化。在一个实施方式中,某些融合蛋白工程化为具有特异性裂解位点以帮助回收多肽。在一个实施方式中,适合于这种操作的载体包括但不限于pET系列的大肠杆菌表达载体[Studier等,Methods in Enzymol.185:60-89(1990)]。

[0155] 在一个实施方式中,使用酵母表达系统。在一个实施方式中,许多含有组成型或诱导型启动子的载体可以用于酵母中,如美国专利申请号5,932,447中所公开的,其通过引用整体并入本文。在另一个实施方式中,使用促进外源DNA序列整合到酵母染色体中的载体。

[0156] 在一个实施方式中,本文公开的表达载体可以进一步包括另外的多核苷酸序列,其允许例如来自单个mRNA的几种蛋白质的翻译,例如内部核糖体进入位点(IRES)和用于基因组整合启动子-嵌合多肽的序列。

[0157] 在一些实施方式中,重组病毒载体可用于体内表达本文公开的凝血因子,因为它们提供诸如横向感染和靶向特异性的优点。在一个实施方式中,横向感染是例如逆转录病毒的生命周期中固有的,并且是单个感染细胞产生许多后代并发芽和感染相邻细胞的过程。在一个实施方式中,结果是大面积变得迅速感染,其中大部分最初未被原始病毒颗粒感染。在一个实施方式中,产生不能横向扩散的病毒载体。在一个实施方式中,如果所需目的是仅将特定基因引入小范围数量的靶细胞中,则该特征可能是有用的。

[0158] 在一个实施方式中,可以使用各种方法将本文公开的表达载体引入细胞中。这些

方法一般描述于Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Springs Harbor Laboratory,New York(1989,1992),Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley和Sons,Baltimore,Md.(1989),Chang等,Somatic Gene Therapy,CRC Press,Ann Arbor,Mich.(1995),Vega等,Gene Targeting,CRC Press,Ann Arbor Mich.(1995),Vectors:A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses,Butterworths,Boston Mass.(1988)和Gilboa等[Biotechniques 4(6):504-512,1986]并包括例如稳定或瞬时转染、脂质转染、电穿孔和用重组病毒载体感染。另外,参见美国专利号5,464,764和5,487,992,其通过引用并入本文,用于阳性-阴性选择方法。

[0159] 在一些实施方式中,通过病毒感染引入核酸提供了优于其它方法(例如脂质转染和电穿孔)的若干优点,因为由于病毒的感染性质可以获得更高的转染效率。

[0160] 在一个实施方式中,应当理解,本文公开的工程化凝血因子也可以从使用上文所述的任何合适的施用方式(即体内基因治疗)而施用于个体的核酸构建体中表达。在一个实施方式中,根据需要通过适当的基因递送载体/方法(转染、转导、同源重组等)和表达系统将核酸构建体引入合适的细胞中,然后将修饰的细胞在培养物中扩增并返回个体(即离体基因治疗)。

[0161] 在一个实施方式中,使用植物表达载体。在一个实施方式中,多肽编码序列的表达由许多启动子驱动。在一些实施方式中,使用病毒启动子如CaMV的35S RNA和19S RNA启动子[Brisson等,Nature 310:511-514(1984)],或TMV的外壳蛋白启动子[Takamatsu等,EMBO J.6:307-311(1987)]。在另一个实施方式中,使用植物启动子,例如RUBISCO的小亚基[Coruzzi等,EMBO J.3:1671-1680(1984);和Brogli等,Science 224:838-843(1984)]或热休克启动子,例如大豆hsp17.5-E或hsp17.3-B[Gurley等,Mol.Cell.Biol.6:559-565(1986)]。在一个实施方式中,使用Ti质粒、Ri质粒、植物病毒载体、直接DNA转化、显微注射、电穿孔和本领域技术人员熟知的其它技术将构建体引入植物细胞中。参见例如,Weissbach&Weissbach[Methods for Plant Molecular Biology,Academic Press,NY,Section VIII,第421-463页(1988)]。本领域熟知的其它表达系统如昆虫和哺乳动物宿主细胞系统也可用于本发明。

[0162] 应当理解,除了含有插入的编码序列(编码多肽)的转录和翻译所必需的要素之外,本文公开的表达构建体还可以包括工程化的序列以优化表达多肽的稳定性、产生、纯化、产量或活性。

[0163] 在一些实施方式中,在有效条件下培养转化细胞,其允许表达大量重组工程化凝血因子。在一些实施方式中,有效培养条件包括但不限于允许蛋白质产生的有效培养基、生物反应器、温度、pH和氧条件。在一个实施方式中,有效培养基是指培养细胞以产生本文公开的重组多肽的任何培养基。在一些实施方式中,培养基通常包括具有可同化的碳、氮和磷酸盐源、以及适当的盐、矿物质、金属和其它营养素如维生素的水溶液。在一些实施方式中,本文公开的细胞可以在常规发酵生物反应器、摇瓶、试管、微量滴定皿和培养皿中培养。在一些实施方式中,培养在适合重组细胞的温度、pH和氧含量下进行。在一些实施方式中,培养条件的确定在本领域普通技术人员的专业知识范围内。

[0164] 在一些实施方式中,取决于用于生产的载体和宿主系统,本文公开的所得工程化凝血因子保留在重组细胞内,分泌到发酵培养基中,分泌到两个细胞膜之间的空间中,例如

大肠杆菌的周质空间;或保留在细胞或病毒膜的外表面上。

[0165] 在一个实施方式中,在培养的预定时间后,实现回收重组工程化凝血因子。

[0166] 在一个实施方式中,本文使用的短语“回收重组工程化凝血因子”是指收集含有多肽的完整发酵培养基,并且不需要暗示另外的分离或纯化步骤。

[0167] 在一个实施方式中,使用多种标准蛋白质纯化技术纯化本文公开的工程化凝血因子,例如但不限于亲和色谱,离子交换色谱,过滤,电泳,疏水相互作用色谱(HIC),凝胶过滤色谱,反相色谱,伴刀豆球蛋白A色谱,色谱聚焦和差异溶解。

[0168] 在一个实施方式中,一类疏水相互作用柱是Capto Phenil Impress(CIP)柱。

[0169] 在一个实施方式中,为了促进回收,可以工程化表达的编码序列以编码本文公开的工程化凝血因子和融合的可裂解部分。在一个实施方式中,可以设计融合蛋白,使得可以通过亲和色谱容易地分离多肽;例如通过固定在对可裂解部分特异的柱上。在一个实施方式中,在工程化凝血因子和可裂解部分之间工程化裂解位点,并且通过用在该位点特异性裂解融合蛋白的适当酶或试剂处理,可以从色谱柱释放多肽[例如参见Booth等,Immunol.Lett.19:65-70(1988);和Gardella等,J.Biol.Chem.265:15854-15859(1990)]。

[0170] 在一个实施方式中,本文公开的工程化凝血因子以“基本上纯的”形式回收。在另一个实施方式中,基本上纯的工程化凝血因子可以进一步包含凝血因子的活性形式。在另一个实施方式中,基本上纯的形式是至少90%纯度。在另一个实施方式中,基本上纯的形式是至少95-99%纯度。

[0171] 在一个实施方式中,本文公开的工程化凝血因子也可以使用体外表达系统合成。在一个实施方式中,体外合成方法是本领域熟知的,并且该系统的组分是可商购的。

[0172] 在一些实施方式中,合成并纯化重组工程化凝血因子;它们的治疗功效可以在体内或体外测定。在一个实施方式中,本文公开的重组工程化凝血因子的结合活性可以使用本领域技术人员已知的各种测定来确定。

[0173] 应当理解,本文公开的包含本文所述的要素或步骤的多肽、组合物、制剂和方法在另一个实施方式中可以由那些要素或步骤组成,或者在另一个实施方式中基本上由这些要素或步骤组成。在一些实施方式中,术语“包含”是指包含所示活性剂,例如CTP修饰的凝血因子,以及包含其它活性剂,和药学上可接受的载体、赋形剂、润肤剂、稳定剂等,如制药业中所知的。在一些实施方式中,术语“基本上由……组成”是指组合物,其唯一的活性成分是指定的活性成分,然而,可以包括其它化合物用于稳定、保存等制剂,但不直接参与所示活性成分的治疗效果。在一些实施方式中,术语“基本上由……组成”可以指促进活性成分释放的组分。在一些实施方式中,术语“由……组成”是指组合物,其含有活性成分和药学上可接受的载体或赋形剂。

[0174] 在另一个实施方式中,本文公开了编码CTP修饰的多肽的多核苷酸,所述多肽由因子VII(FVII)多肽和连接至所述FVII多肽的羧基末端的三个促性腺激素羧基末端肽(CTP)组成。在另一个实施方式中,本文公开了包含表达载体的组合物,所述表达载体包含编码因子VII(FVII)多肽的多核苷酸和连接至所述FVIIa多肽的羧基末端的三个促性腺激素羧基末端肽(CTP)。在一个实施方式中,CTP修饰的FVII包括信号肽。在另一个实施方式中,CTP修饰的FVII不包含信号肽。

[0175] 在一个实施方式中,本文公开了上文所述的重组凝血因子。在一个实施方式中,本

文公开了上文所述的工程化凝血因子。在一个实施方式中,上文所述的工程化凝血因子被称为CTP修饰的凝血因子。

[0176] 在一个实施方式中,连接至凝血因子的羧基末端的CTP串联连接至羧基末端。

[0177] 在一个实施方式中,与非CTP修饰的凝血因子相比,本文所述的工程化凝血因子具有等同或改善的生物活性。在另一个实施方式中,与非CTP修饰的凝血因子相比,本文所述的工程化凝血因子具有等同或改善的药理学测量。在另一个实施方式中,与非CTP修饰的凝血因子相比,本文所述的工程化凝血因子具有等同或改善的药代动力学。在另一个实施方式中,与非CTP修饰的凝血因子相比,本文所述的工程化凝血因子具有等同或改善的药效学。

[0178] 在另一个实施方式中,术语“CTP肽”、“羧基末端肽”和“CTP序列”在本文中可互换使用。在另一个实施方式中,羧基末端肽是全长CTP。

[0179] 在其它实施方式中,术语工程化凝血因子是指成熟凝血因子的氨基酸序列。在其它实施方式中,术语工程化凝血因子是指凝血因子的氨基酸序列,包括其信号序列或信号肽。

[0180] 在另一个实施方式中,“信号序列”和“信号肽”在本文中可互换使用,具有所有相同的质量和含义。在另一个实施方式中,当提及多核苷酸分子时,“序列”可以指编码部分。在另一个实施方式中,与没有至少一个CTP的相同凝血因子相比,包含至少一个本文所述的CTP的工程化凝血因子具有增强的体内生物活性。在一个实施方式中,增强的生物活性源于工程化凝血因子的较长半衰期,同时保持至少一些生物活性。在另一个实施方式中,增强的生物活性源于由CTP修饰产生的增强生物活性。在另一个实施方式中,增强的生物活性源于CTP修饰的凝血因子的较长半衰期和增强功能性。

[0181] 在一些实施方式中,凝血因子羧基末端的至少一个CTP序列提供增强的抗凝血因子降解的保护作用。在一些实施方式中,凝血因子的羧基末端处的至少一个CTP序列提供增强的抗清除保护。在一些实施方式中,凝血因子的羧基末端处的至少一个CTP序列提供延长的清除时间。在一些实施方式中,凝血因子羧基末端处的至少一个CTP序列增强其Cmax。在一些实施方式中,凝血因子羧基末端处的至少一个CTP序列增强其Tmax。在一些实施方式中,凝血因子的羧基末端处的至少一个CTP序列延长其T1/2。

[0182] 在另一个实施方式中,本发明的缀合凝血因子以与未修饰的缀合凝血因子相同的方式使用。在另一个实施方式中,本发明的缀合凝血因子具有增加的循环半衰期和血浆停留时间、降低的清除率和增加的体内临床活性。在另一个实施方式中,由于本文所述的缀合凝血因子的改善性质,该缀合物的施用频率低于相同凝血因子的未修饰形式。

[0183] 在另一个实施方式中,降低的施用频率将导致改善的治疗策略,在一个实施方式中,其将导致改善的患者依从性,从而导致改善的治疗结果,以及改善的患者生活质量。在另一个实施方式中,与凝血因子的常规缀合物相比,已发现具有本发明缀合物的分子量和接头结构的缀合物具有改善的效力、改善的稳定性、升高的AUC水平和增强的循环半衰期。

[0184] 组合物和使用方法

[0185] 在另一个实施方式中,本文公开的工程化凝血因子本身可以提供给个体。在一个实施方式中,本文公开的工程化凝血因子可作为药物组合物的一部分提供给个体,其中药物组合物与药学上可接受的载体混合。

[0186] 在一个实施方式中,“药物组合物”或“药物制剂”是指本文所述的一种或多种活性成分与其它化学组分(例如生理学上合适的载体和赋形剂)的制剂。药物组合物或“药物制剂”的目的是促进化合物向生物体的施用。在某些实施方式中,“药物组合物”或“药物制剂”提供药物的药物剂型。在某些实施方式中,“药物组合物”或“药物制剂”包括缓释技术、透皮贴剂或本领域任何已知的剂型。

[0187] 在另一个实施方式中,“活性成分”是指感兴趣的多肽序列,其对生物学效应负责。

[0188] 在另一个实施方式中,本文公开的任何组合物将包含至少一个CTP序列,其以任何形式仅与工程化凝血因子的羧基末端结合。在一个实施方式中,本文公开了组合制剂。在一个实施方式中,“组合制剂”尤其定义“组分试剂盒”,其意义在于如上定义的组合配偶体可以独立给药或通过使用具有不同量的组合配偶体的不同固定组合给药,即同时、一起、分开或依次给药。在一些实施方式中,组分试剂盒的部分然后可以例如同时或按时间顺序交错施用,即在不同时间点并且对于组分试剂盒的任何部分具有相同或不同的时间间隔。在一些实施方式中,组合配偶体的总量的比例可以以组合制剂施用。在一个实施方式中,组合制剂可以变化,例如以便应对待治疗的患者亚群的需要或单个患者的需要,其中不同需要可能是由于特定疾病、疾病的严重性、年龄、性别或体重,可由本领域技术人员容易地做出。

[0189] 在另一个实施方式中,本文公开了包含CTP修饰的因子VIIa(FVIIa)多肽的药物组合物或药物制剂,所述多肽由FVIIa多肽和连接至所述FVIIa的羧基末端的三个促性腺激素羧基末端肽(CTP)组成。

[0190] 在另一个实施方式中,本文提供了包含本文所述的缀合凝血因子的组合物。在另一个实施方式中,本文提供了包含本文所述的缀合凝血因子的药物组合物。在另一个实施方式中,本文提供了包含治疗有效量的本文所述的缀合凝血因子的药物组合物。在一个实施方式中,根据诸如所治疗的具体病症、所治疗患者的病症以及组合物中的其它成分等因素确定治疗有效量的缀合凝血因子。

[0191] 在一个实施方式中,本公开提供了用于本公开的组合物、制剂和方法的药物制剂。在另一个实施方式中,本公开提供了药物制剂,其包含由凝血因子和连接至凝血因子的羧基末端的三个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽组成的多肽。在另一个实施方式中,药物制剂还包含缓冲剂和张力剂。在另一个实施方式中,缓冲液是20mM柠檬酸盐和13.3mM甘氨酸,并且张力剂是150mM NaCl。在另一个实施方式中,制剂的pH约为6.4。在另一个实施方式中,缓冲液是20mM柠檬酸盐和13.3mM甘氨酸,并且张力剂是150mM NaCl,并且pH是6.4。在另一个实施方式中,缓冲液是20mM柠檬酸盐,100mM精氨酸,2%海藻糖,并且pH为6.2。在另一个实施方式中,制剂是液体制剂。在另一个实施方式中,制剂是冻干制剂。在另一个实施方式中,可以使用冻干的CTP修饰的凝血因子形成液体制剂。在另一个实施方式中,CTP修饰的凝血因子是FVII-CTP3。在另一个实施方式中,CTP修饰的凝血因子是FVIIa-CTP3。

[0192] 在另一个实施方式中,本文提供了包含本文提供的药物制剂的每周一次剂型。在另一个实施方式中,本文提供了包含本文提供的药物制剂的每日一次剂型。在另一个实施方式中,本文提供了包含本文提供的药物制剂的隔日剂型。在另一个实施方式中,本文提供了包含本文提供的药物制剂的每三天剂型。在另一个实施方式中,本文提供了包含本文提供的药物制剂的每周两次的剂型。在另一个实施方式中,本文提供了包含本文提供的药物制剂的每周两次的剂型。在另一个实施方式中,本文提供了包含本文提供的药物制剂的每

周剂型。在另一个实施方式中,本文提供了包含本文提供的药物制剂的两周(每两周)剂型。

[0193] 在另一个实施方式中,本文公开了包含多肽的制剂,所述多肽由凝血因子和连接至所述凝血因子的羧基末端的三个绒毛膜促性腺激素CTP组成,并且其中所述多肽任选地由信号肽组成,其中所述制剂具有增加稳定性。在一个实施方式中,制剂稳定至少一年。在另一个实施方式中,制剂稳定至少两年。

[0194] 在一个实施方式中,将由CTP修饰的凝血因子配制成液体制剂。在另一个实施方式中,将由CTP修饰的因子VII配制成液体制剂。在另一个实施方式中,将由CTP修饰的因子VIIa配制成液体制剂。在另一个实施方式中,将由CTP修饰的凝血因子配制成鼻内剂型。在另一个实施方式中,将由CTP修饰的凝血因子配置成可注射剂型。

[0195] 在另一个实施方式中,本公开的方法包括增加凝血因子疗法的使用依从性,包括向需要其的受试者提供由CTP修饰的凝血因子,从而增加凝血因子疗法的使用依从性。

[0196] 在另一个实施方式中,将由CTP修饰的凝血因子每天一次施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含由CTP修饰的凝血因子的多肽每两天一次施用于受试者。在另一个实施方式中,将由CTP修饰的凝血因子每三天一次施用于受试者。在另一个实施方式中,将由CTP修饰的凝血因子每四天一次施用于受试者。在另一个实施方式中,将由CTP修饰的凝血因子每五天一次施用于受试者。在另一个实施方式中,将由CTP修饰的凝血因子每六天一次施用于受试者。在另一个实施方式中,将由CTP修饰的凝血因子每周一次施用于受试者。在另一个实施方式中,将由CTP修饰的凝血因子每7-14天一次施用于受试者。在另一个实施方式中,将由CTP修饰的凝血因子每10-20天一次施用于受试者。在另一个实施方式中,将由CTP修饰的凝血因子每5-15天一次施用于受试者。在另一个实施方式中,将由CTP修饰的凝血因子每15-30天一次施用于受试者。

[0197] 在一个实施方式中,本文公开的制剂配制成通过注射器或笔式装置(Pen device)注射的液体制剂。

[0198] 在一个实施方式中,本文提供的制剂还包含防腐剂,如苯扎氯铵和硫柳汞等;螯合剂,如乙二胺四乙酸钠等;缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐和醋酸盐等;张力剂如氯化钠、氯化钾、甘油、甘露醇等;抗氧化剂如抗坏血酸、乙酰胱氨酸、焦亚硫酸钠等;芳香剂;粘度调节剂,如聚合物,包括纤维素及其衍生物;和聚乙烯醇以及酸和碱,以根据需要调节这些含水组合物的pH。该组合物还包含局部麻醉剂或其它活性物质。该组合物可用作喷雾剂、雾剂和滴剂等。

[0199] 在一个实施方式中,本文所述的凝血因子是人凝血因子。

[0200] 在另一个实施方式中,本文所述的缀合凝血因子可用于治疗患有凝血或凝血障碍的受试者。在另一个实施方式中,凝血或凝血障碍是血友病。在另一个实施方式中,本文所述的缀合凝血因子可用于血友病的预防性治疗,从而降低出血风险和相关并发症。在另一个实施方式中,降低出血风险和相关并发症降低了自发性出血的风险。在另一个实施方式中,降低出血风险和相关并发症降低了过度出血的风险。在另一个实施方式中,本文所述的缀合凝血因子可用于治疗患有血友病的受试者,同时降低产生针对外源施用的凝血因子的抑制性抗体的风险。在另一个实施方式中,本文所述的缀合凝血因子可用于治疗患有血友病的受试者,从而诱导体内平衡。

[0201] 在一个实施方式中,本文公开的CTP修饰的凝血因子具有治疗用途。在另一个实施

方式中,本文公开的CTP修饰的凝血因子具有预防用途。

[0202] 在另一个实施方式中,本文所述的缀合凝血因子可用于治疗经历过度出血或瘀伤或具有延长的凝血酶原时间(PT)或部分促凝血酶原激酶时间(PTT)的受试者。在另一个实施方式中,本文所述的缀合凝血因子可用于治疗具有引起出血的获得性病症的受试者,例如维生素K缺乏症或肝病。在另一个实施方式中,本文所述的缀合凝血因子可用于治疗具有凝血因子缺陷的受试者,所述缺陷是获得(由于其它疾病)或遗传的、轻度或重度的、永久或暂时的。在另一个实施方式中,本文所述的缀合凝血因子可用于治疗患有血友病A的受试者。在另一个实施方式中,本文所述的缀合凝血因子可用于治疗患有血友病B的受试者。在另一个实施方式中,本文所述的缀合凝血因子可用于治疗具有获得性缺陷的受试者,这是由于慢性疾病,如肝病或癌症;由于急性病症,如弥散性血管内凝血(DIC),其迅速消耗凝血因子;或由于缺乏维生素K或用维生素K拮抗剂如华法林治疗(因子II,VII,IX和X的产生需要维生素K)。在另一个实施方式中,本文所述的缀合凝血因子可用于治疗患有引起凝血失衡的疾病的受试者,所述凝血失衡例如但不限于:肝病、尿毒症、癌症、骨髓疾病、暴露于蛇毒、维生素K缺乏症、抗凝治疗、意外摄入抗凝血剂华法林、多次输血(血液储存单位失去一些凝血因子),或其组合。在另一个实施方式中,本文公开了治疗受试者的深静脉血栓形成的方法,包括施用本文公开的CTP修饰的凝血因子。在另一个实施方式中,本文公开了预防血友病患者不受控制的出血的方法,包括施用本文公开的CTP修饰的凝血因子。在另一个实施方式中,本文公开了预防患有血友病的受试者的出血事件的方法,包括施用本文公开的CTP修饰的凝血因子。在另一个实施方式中,本文公开了控制患有血友病B(先天性因子IX缺乏)的受试者的出血事件的方法。

[0203] 在一个实施方式中,本发明的组合物包含本文所述的制剂。在另一个实施方式中,本发明的方法包括施用本文所述的制剂。在另一个实施方式中,本发明的方法包括施用包含本文所述制剂的组合物。

[0204] 在一个实施方式中,本文公开了预防或治疗凝血或凝血障碍的方法。在另一个实施方式中,本文公开了预防或治疗受试者中血友病的方法,包括施用本文公开的CTP修饰的凝血因子。在另一个实施方式中,本文公开了预防和治疗受试者中血友病的方法,包括施用本文公开的CTP修饰的凝血因子。在另一个实施方式中,本文公开了治疗受试者中血友病的方法,包括施用本文公开的CTP修饰的因子VIIa。

[0205] 在一个实施方式中,血友病是血友病A。在另一个实施方式中,血友病是血友病B。在另一个实施方式中,本发明的用于预防或治疗凝血或凝血障碍的方法预防或治疗患有血友病A或B的患者的血友病。分别对FVIII或FIX的抑制剂。在另一个实施方式中,本发明的方法用于预防或治疗患有获得性血友病(没有抑制剂的血友病)的患者。在另一个实施方式中,本发明的用于预防或治疗凝血或凝血障碍的方法在没有抑制剂的情况下预防或治疗血友病A或B。在另一个实施方式中,血友病是重度血友病。在另一个实施方式中,血友病是中度血友病。在另一个实施方式中,血友病是中度至重度血友病,有或没有抑制剂。本领域技术人员将理解,术语“中度至重度血友病”是指具有小于或等于3%FVIII或FIX的受试者。在另一个实施方式中,重度血友病可以包括等于约0-1%的凝血因子水平。在另一个实施方式中,血友病是中度血友病,在另一个实施方式中,其描述凝血因子水平为1-5%的血友病。在另一个实施方式中,血友病是轻度血友病,在另一个实施方式中,其描述凝血因子水平为5-

50％的血友病。

[0206] 在另一个实施方式中,本文公开了预防或治疗受试者的凝血或凝血障碍的方法,包括向所述受试者施用CTP修饰的因子VII(FVII)多肽,所述多肽包含FVIIa多肽和连接至所述FVIIa多肽的羧基末端的三个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP),从而预防或治疗所述受试者的凝血或凝血障碍。

[0207] 在另一个实施方式中,本文公开了预防或治疗受试者中血友病的方法,包括向所述受试者施用CTP修饰的因子VIIa(FVIIa)多肽,所述多肽包含FVIIa多肽和连接至所述FVIIa多肽的羧基末端的三个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP),从而预防或治疗所述受试者的血友病。

[0208] 在另一个实施方式中,本文公开了治疗受试者中血友病的方法,包括向所述受试者施用本文所述的一个或多个CTP修饰的凝血因子。因此,在一个实施方式中,本文公开了治疗受试者中血友病的方法,包括向所述受试者施用CTP修饰的因子VIIa(FVIIa)多肽,所述多肽包含FVIIa多肽和连接至所述FVIIa多肽的羧基末端的三个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP,从而治疗所述受试者的血友病。在一个实施方式中,CTP修饰的FVIIa在相同的时间以相同的组合物施用。在另一个实施方式中,CTP修饰的FVIIa在相同的时间以分开的组合物施用。在另一个实施方式中,CTP修饰的FVIIa在分开的时间以分开的组合物施用。

[0209] 在另一个实施方式中,本文公开了预防或治疗受试者中血友病的方法,包括向所述受试者施用FVIIa多肽和连接至所述FVIIa多肽的羧基末端的三个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP),从而预防或治疗所述受试者的血友病。

[0210] 在另一个实施方式中,本文公开了预防或治疗受试者中血友病的方法,包括向所述受试者皮下或静脉内施用CTP修饰的因子VIIa多肽,所述多肽包含FVIIa多肽和连接至所述FVIIa多肽的羧基末端的三个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)的,从而预防或治疗所述受试者的血友病。在一些实施方式中,本文提供了预防或治疗受试者中血友病的方法,该方法包括向受试者施用CTP修饰的凝血因子的步骤,所述凝血因子包含连接至所述凝血因子多肽的羧基末端的三至五个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP),其中所述CTP修饰的凝血因子的序列选自由SEQ ID NO:5或7组成的组,从而预防所述受试者的血友病。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的凝血因子选自由SEQ ID NO:5或7组成的组。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的凝血因子由SEQ ID NO:7组成。在另一个实施方式中,由SEQ ID NO:7组成的所述CTP修饰的凝血因子包含活化的FVII(FVIIa)。

[0211] 在另一个实施方式中,本文公开了治疗受试者中血友病的方法,包括向所述受试者施用活化的CTP修饰的因子VII(FVIIa)多肽,所述多肽包含FVIIa多肽和连接至所述FVIIa多肽的羧基末端的三个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP),从而治疗所述受试者的血友病。

[0212] 在另一个实施方式中,与重组FVII相比,皮下(SC)施用导致CTP修饰的FVII的更高生物利用度。在另一个实施方式中,与SC施用NovoSeven®相比,FVIIa-CTP3SC施用后半衰期更长并且生物利用度(AUC SC/AUC IV)更高。在另一个实施方式中,与重组FVII(NovoSeven®)相比,皮下注射的MOD-5014显示出改善的小鼠存活率。

[0213] 在一个实施方式中,MOD-5014是FVIIa-CTP_3(具有在C-末端处连接的三个CTP肽)。在一个实施方式中,MOD-5014提供长效凝血因子。在一个实施方式中,与重组人FVIIa相比,

MOD-5014提供更持久和延长的血液凝固反应。本领域技术人员应理解,术语MOD-5014或FVIIa-CTP_3可互换使用,具有所有相同的性质和含义,并且在一个实施方式中,是指包含氨基酸SEQ ID NO:7的二硫键连接的双链异二聚体结构。此外,技术人员将理解,在描述本文的凝血因子或CTP修饰的凝血因子时,例如FVII-CTP_3,术语FVII-CTP_3在某些情况下可以指FVII-CTP_3的无活性形式。本领域技术人员肯定会基于诸如活性的相关细节来识别所指的形式。类似地,虽然术语MOD-5014可与术语FVIIa-CTP_3互换,即代表CTP修饰的凝血因子的活性形式,但在某些情况下,术语MOD-5014可用于表示活性形式的FVII或编码FVII-CTP_3的核苷酸序列,其然后从细胞中表达和分泌,并在体外纯化和活化,导致活性形式的FVIIa存在于MOD-5014分子中。

[0214] 在一个实施方式中,组织因子途径抑制剂(TFPI)对MOD-5014的失活是剂量依赖性的。在一个实施方式中,TFPI对MOD-5014的失活显示出与TFPI对重组FVIIa(NovoSeven®)相似的剂量依赖性失活模式。在一个实施方式中,MOD-5014被抗凝血酶III抑制。在一个实施方式中,抗凝血酶III对MOD-5014的抑制在肝素存在下增强。在一个实施方式中,在存在或不存在肝素的情况下,抗凝血酶III对MOD-5014的抑制显示出与重组FVIIa(NovoSeven®)相似的抑制模式。

[0215] 在一个实施方式中,MOD-5014以剂量依赖性方式产生凝血酶。在一个实施方式中,MOD-5014降低凝血酶产生的滞后期。在一个实施方式中,MOD-5014减少血液凝固时间。在一个实施方式中,MOD-5014提高血凝块形成的效率。在一个实施方式中,施用MOD-5014减少受试者的血液凝固时间。在一个实施方式中,施用MOD-5014增加受试者中血凝块形成的效率。在一个实施方式中,MOD-5014产生的凝血酶与重组FVIIa(NovoSeven®)产生的相似。在一个实施方式中,MOD-5014降低凝血酶产生的滞后期与重组FVIIa(NovoSeven®)产生的相似。在一个实施方式中,MOD-5014减少凝血时间与重组FVIIa(NovoSeven®)产生的相似。在一个实施方式中,MOD-5014增加血凝块形成效率与重组FVIIa(NovoSeven®)产生的相似。

[0216] 如本文所提供,血液凝血因子的CTP连接物,例如因子FVII,增加凝血因子的半衰期。实施例示出了CTP连接物,例如连接至FVIIA的三个CTP,似乎不影响血液凝固活性。在一个实施方式中,FVII的CTP连接物不干扰血凝块形成。在一个实施方式中,FTP的CTP连接物不干扰血凝块形成的增加效率。在一个实施方式中,FVII的CTP连接物不干扰血液凝固时间的减少。在一个实施方式中,在将CTP连接至血液凝血因子后维持磷脂与FVII的结合。在一个实施方式中,FTPIIA的CTP连接物不干扰血凝块形成。在一个实施方式中,FTPIIA的CTP连接物不干扰血凝块形成的增加效率。在一个实施方式中,FTPIIA的CTP连接物不干扰血凝块形成的减少。在一个实施方式中,在将CTP连接至凝血因子后维持磷脂与FVIIA的结合。

[0217] 在另一个实施方式中,本文公开了治疗受试者中血友病的方法,包括向所述受试者施用本文所述的CTP修饰的凝血因子。

[0218] 在其它实施方式中,工程化凝血因子用于治疗血友病B患者。将MOD-5014施用于大型哺乳动物(狗)的结果。MOD-5014施用提供了用于血液凝固的有效且安全的长效FVIIa(参见国际申请号PCT/IL2016/050645,其全部并入本文。使用MOD-5014的治疗可以是预防性的或按需进行的。本文公开的实施方式是治疗受试者中血友病的方法,包括向所述受试者施

用MOD-5014,从而治疗所述受试者的血友病。在一个实施方式中,本文公开了预防受试者过量出血的方法,包括向所述受试者施用MOD-5014,从而预防所述受试者的过量出血。在一个实施方式中,本文公开了预防性治疗受试者中血友病的方法,包括向所述受试者施用MOD-5014,从而预防性地治疗所述受试者的血友病。

[0219] 在一个实施方式中,与重组FVIIa(NovoSeven®)相比,用MOD-5014治疗受试者的血友病包括降低MOD-5014的施用频率。在一个实施方式中,与重组FVIIa(NovoSeven®)相比,用MOD-5014预防性治疗受试者的血友病包括降低MOD-5014的施用频率。在一个实施方式中,与重组FVIIa(NovoSeven®)相比,用MOD-5014预防受试者的过量出血包括降低MOD-5014的施用频率。

[0220] 在一个实施方式中,在其羧基末端串联包含3个CTP的凝血因子VII表现出改善的PK曲线,同时相对于NovoSeven®保持其凝固活性。

[0221] 在另一个实施方式中,本文公开的组合物、制剂和方法用于治疗患有FVIII或FIX抑制剂的血友病A或B患者和患有获得性血友病的患者的出血事件;在患有FVIII或FIX抑制剂的血友病A或B患者和获得性血友病患者的外科手术或侵入性手术中预防出血;治疗先天性FVII缺乏症患者的出血事件和预防先天性FVII缺乏患者的外科手术干预或侵入性手术的出血。获得性血友病是一种自发性自身免疫性疾病,其中先前正常止血的患者发展出针对凝血因子的自身抗体,最常见的是FVIII。针对FVIII的自身抗体的发展导致FVIII缺乏,这导致因子IXa和因子VIIIa复合物通过凝血级联的内在途径产生的凝血酶不足。以下情况可能与获得性血友病A有关:特发性、妊娠、自身免疫性疾病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、皮肤病(如牛皮癣、天疱疮)、呼吸系统疾病(如哮喘、慢性阻塞性肺病)、过敏性药物反应、糖尿病、急性乙型肝炎感染、急性丙型肝炎感染、恶性肿瘤-实体瘤(前列腺癌、肺癌、结肠癌、胰腺癌、胃癌、胆管癌、头颈癌、宫颈癌、乳腺癌、黑色素瘤、肾癌)、血液系统恶性肿瘤。本领域技术人员将理解、自身免疫疾病可包括类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化、颞动脉炎、干燥综合征、自身免疫性溶血性贫血、良性疾病综合征、重症肌无力、格雷夫斯病、自身免疫性甲状腺功能减退症。本领域技术人员应理解、过敏反应可发生于施用青霉素及其衍生物、磺胺类、苯妥英、氯霉素、甲基多巴、长效噻吨、干扰素α、氟达拉滨、卡介苗(BCG)疫苗接种、去甲文拉法辛的受试者。本领域技术人员将理解、血液恶性肿瘤可包括慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、骨髓增生异常综合征、骨髓纤维化和红白血病。因此,在一个实施方式中,本文提供了治疗受试者中获得性血友病的方法,包括向受试者施用本文提供的任何组合物。

[0222] 在另一个实施方式中,本文公开的组合物、制剂和方法用于治疗或预防肌肉出血。在另一个实施方式中,本文公开的组合物、制剂和方法用于治疗或预防关节出血。在另一个实施方式中,本文公开的组合物、制剂和方法提供鼻出血和牙龈出血、粘膜出血、中枢神经系统出血的治疗性或预防性治疗。在另一个实施方式中,本文公开的组合物、制剂和方法提供胃肠道或脑出血的治疗性或预防性治疗。在另一个实施方式中,本文公开的组合物、制剂和方法提供低频轻度出血的治疗性或预防性治疗。在另一个实施方式中,本文公开的组合物、制剂和方法提供低频中度出血的治疗性或预防性治疗。在另一个实施方式中,本文公开的组合物、制剂和方法提供高频轻度出血的治疗性或预防性治疗。在另一个实施方式中,本

文公开的组合物、制剂和方法提供高频中度出血的治疗性或预防性治疗。

[0223] 在一个实施方式中,本文公开的组合物、制剂和方法提供无症状血友病的治疗性或预防性治疗。在另一个实施方式中,本文公开的组合物、制剂和方法提供轻度至中度血友病的治疗性或预防性治疗。在另一个实施方式中,本文公开的组合物、制剂和方法提供重度血友病的治疗性或预防性治疗。

[0224] 在一个实施方式中,本文公开的组合物、制剂和方法提供出血的治疗性或预防性治疗,在一个实施方式中,其是不可控制的出血,并且在另一个实施方式中,是脑内出血。在另一个实施方式中,本文公开的组合物、制剂和方法提供新生儿凝血病;重度肝病;高危外科手术;创伤性失血;骨髓移植;血小板减少症和血小板功能障碍;急性逆转口服抗凝药;因子V、VII、X和XI的先天性缺陷;或者血管性血友病(von Willebrand disease)的治疗性或预防性治疗,在一个实施方式中,血管性血友病具有对血管性血友病因子的抑制剂。

[0225] 在一个实施方式中,本文公开的CTP修饰的凝血因子用于治疗受试者中本文所述的血友病或相关疾病。在一个实施方式中,受试者是人。在另一个实施方式中,受试者是人儿童。在另一个实施方式中,受试者是驯养动物。在另一个实施方式中,受试者是哺乳动物。在另一个实施方式中,受试者是农场动物。在另一个实施方式中,受试者是猴子。在另一个实施方式中,受试者是马。在另一个实施方式中,受试者是牛。在另一个实施方式中,受试者是小鼠。在另一个实施方式中,受试者是大鼠。在另一个实施方式中,受试者是犬科动物。在另一个实施方式中,受试者是猫科动物。在另一个实施方式中,受试者是牛,绵羊,猪,马,鼠或鹿。在一个实施方式中,受试者是男性。在另一个实施方式中,受试者是女性。在一个实施方式中,受试者是儿童,在另一个实施方式中,是青少年,在另一个实施方式中,是成年人,或者在另一个实施方式中,是老年受试者。在另一个实施方式中,受试者是儿科受试者,在另一个实施方式中,是老年受试者。

[0226] 在另一个实施方式中,可互换使用的短语“生理学上可接受的载体”和“药学上可接受的载体”是指不会对生物体造成显著刺激并且不会消除所施用化合物的生物活性和性质的载体或稀释剂。这些短语包括佐剂。在一个实施方式中,药学上可接受的载体中包含的成分之一可以是例如聚乙二醇(PEG),一种在有机和水性介质中具有广泛溶解度的生物相容性聚合物。

[0227] 在另一个实施方式中,“赋形剂”是指添加到药物组合物中以进一步促进活性成分施用的惰性物质。在一个实施方式中,赋形剂包括碳酸钙,磷酸钙,各种糖和各种类型的淀粉,纤维素衍生物,明胶,植物油和聚乙二醇。

[0228] 用于配制和施用药物的技术可在“Remington’s Pharmaceutical Sciences”,Mack Publishing Co.,Easton,PA,最新版本中找到,其通过引用并入本文。

[0229] 本发明考虑了剂量范围的各种实施方式。在一个实施方式中,本文公开的工程化凝血因子的剂量范围为0.005-100mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为0.005-5mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为0.01-50mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为0.1-20mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为0.1-10mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为0.01-5mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为0.001-0.01mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为0.001-0.1mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为0.1-5mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为0.5-50mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为0.2-15mg/天。在

另一个实施方式中,剂量范围为0.8-65mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为1-50mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为5-10mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为8-15mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为10-20mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为20-40mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为60-120mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为12-40mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为40-60mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为50-100mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为1-60mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为15-25mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为5-10mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为55-65mg/天。

[0230] 在另一个实施方式中,剂量范围为50-500mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为50-150mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为100-200mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为150-250mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为200-300mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为250-400mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为300-500mg/天。在另一个实施方式中,剂量范围为350-500mg/天。

[0231] 在一个实施方式中,剂量为20mg/天。在一个实施方式中,剂量为30mg/天。在一个实施方式中,剂量为40mg/天。在一个实施方式中,剂量为50mg/天。在一个实施方式中,剂量为0.01mg/天。在另一个实施方式中,剂量为0.1mg/天。在另一个实施方式中,剂量为1mg/天。在另一个实施方式中,剂量为0.530mg/天。在另一个实施方式中,剂量为0.05mg/天。在另一个实施方式中,剂量为50mg/天。在另一个实施方式中,剂量为10mg/天。在另一个实施方式中,剂量为20-70mg/天。在另一个实施方式中,剂量为5mg/天。

[0232] 在一个实施方式中,CTP修饰的凝血因子的剂量为1-5mg/天。在一个实施方式中,CTP修饰的凝血因子的剂量为1-3mg/天。在另一个实施方式中,CTP修饰的凝血因子的剂量为2mg/天。

[0233] 在另一个实施方式中,剂量为1-90mg/天。在另一个实施方式中,剂量为1-90mg/2天。在另一个实施方式中,剂量为1-90mg/3天。在另一个实施方式中,剂量为1-90mg/4天。在另一个实施方式中,剂量为1-90mg/5天。在另一个实施方式中,剂量为1-90mg/6天。在另一个实施方式中,剂量为1-90mg/周。在另一个实施方式中,剂量为1-90mg/9天。在另一个实施方式中,剂量为1-90mg/11天。在另一个实施方式中,剂量为1-90mg/14天。

[0234] 在另一个实施方式中,凝血因子剂量为10-50mg/天。在另一个实施方式中,剂量为10-50mg/2天。在另一个实施方式中,剂量为10-50mg/3天。在另一个实施方式中,剂量为10-50mg/4天。在另一个实施方式中,剂量为10-50微克mg/5天。在另一个实施方式中,剂量为10-50mg/6天。在另一个实施方式中,剂量为10-50mg/周。在另一个实施方式中,剂量为10-50mg/9天。在另一个实施方式中,剂量为10-50mg/11天。在另一个实施方式中,剂量为10-50mg/14天。

[0235] 在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽配制成鼻内剂型。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽配制成可注射剂型。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽以0.0001mg至0.6mg的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽以0.001mg至0.005mg的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽以0.005mg至0.01mg的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含

凝血因子和至少一个CTP单元的多肽以0.01mg至0.3mg的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽以0.2mg至0.6mg剂量的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,凝血因子在其氨基末端不含CTP。

[0236] 在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽以1-100微克的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽以10-80微克的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽以20-60微克的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽以10-50微克的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽以40-80微克的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽以10-30微克的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽以30-60微克的剂量施用于受试者。

[0237] 在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽以0.2mg至2mg的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽以2mg至6mg的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽以4mg至10mg的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽以5mg至15mg的剂量施用于受试者。

[0238] 在一个实施方式中,由CTP修饰的凝血因子以10μg/kg-1000μg/kg的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,由CTP修饰的凝血因子以25μg/kg-600μg/kg的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,由CTP修饰的凝血因子以50μg/kg-400μg/kg的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,由CTP修饰的凝血因子以约25μg/kg的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,由CTP修饰的凝血因子以约50μg/kg的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,由CTP修饰的凝血因子以约100μg/kg的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,由CTP修饰的凝血因子以约200μg/kg的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,由CTP修饰的凝血因子以约300μg/kg的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,由CTP修饰的凝血因子以约400μg/kg的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,由CTP修饰的凝血因子以约500μg/kg的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,由CTP修饰的凝血因子以约600μg/kg的剂量施用于受试者。

[0239] 在一个实施方式中,CTP修饰的FVIIa的剂量包含在相同时间段内向患者施用推荐剂量的重组FVIIa(例如NovoSeven®)中50%的FVIIa量。在一个实施方式中,CTP修饰的FVII的剂量包含在相同时间段内向患者施用推荐剂量的重组FVII中50%的FVII量。例如,如果NovoSeven®在手术前或手术后每两小时以90mcg/kg的剂量给予患者(即每2小时7.65mg或12小时期间内6个剂量45.9mg,用于85kg患者),则本文公开的CTP修饰的凝血因子可以以患者12小时剂量的重组FVIIa的50%剂量给予(即在12小时期间内给予一次23mg的剂量)。

[0240] 在另一个实施方式中,CTP修饰的凝血因子的剂量使得其含有凝血因子量的45%,而不是使用非CTP修饰的凝血因子施用的量。在另一个实施方式中,CTP修饰的凝血因子的剂量使得其含有凝血因子量的10%,而不是使用非CTP修饰的凝血因子施用的量。在另一个实施方式中,CTP修饰的凝血因子的剂量使得其含有凝血因子量的25%,而不是使用非CTP修饰的凝血因子施用的量。在另一个实施方式中,CTP修饰的凝血因子的剂量使得其含有凝

血因子量的35％,而不是使用非CTP修饰的凝血因子施用的量。在另一个实施方式中,CTP修饰的凝血因子的剂量使得其含有凝血因子量的75％,而不是使用非CTP修饰的凝血因子施用的量。在另一个实施方式中,CTP修饰的凝血因子的剂量使得其含有100％的凝血因子量,而不是使用非CTP修饰的凝血因子施用的量。然而,即使剂量含有与非CTP修饰相同量的凝血因子(例如FIX),对于受试者而言仍然是有利的,因为与重组凝血因子相比,其受体半衰期延长,使得施用次数将较少。

[0241] 在另一个实施方式中,对于FVIIa,治疗有效量的缀合凝血因子在10μg/Kg-500μg/Kg之间。在另一个实施方式中,治疗有效量的缀合凝血因子为150-250IU/kg体重,每天施用一次。在另一个实施方式中,包含缀合凝血因子的药物组合物以通过各种方式有效施用于患者的强度配制。

[0242] 在一个实施方式中,CTP修饰的凝血因子基于每周施用于受试者。在另一个实施方式中,CTP修饰的凝血因子每周两次施用于受试者。在另一个实施方式中,CTP修饰的凝血因子基于每两周(每两周一次)施用于受试者。在另一个实施方式中,CTP修饰的凝血因子每月两次施用于受试者。在另一个实施方式中,CTP修饰的凝血因子每月一次施用于受试者。在另一个实施方式中,CTP修饰的凝血因子基于每天施用于受试者。在另一个实施方式中,CTP修饰的凝血因子每两天施用于受试者。

[0243] 在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽每三天一次施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽每四天一次施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽每五天一次施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽每六天一次施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽每7-14天施用于受试者一次。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽每10-20天施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽每5-15天施用于受试者。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽每15-30天施用于受试者。

[0244] 在另一个实施方式中,本公开的方法包括增加凝血因子疗法的使用依从性,包括向需要其的受试者提供包含凝血因子和连接至凝血因子的羧基末端的至少一个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽的多肽(CTP),从而增加凝血因子疗法的使用依从性。

[0245] 在另一个实施方式中,本公开的方法包括增加患有需要凝血因子疗法的慢性疾病的患者的依从性。在另一个实施方式中,本公开的方法能够通过用如上所述的CTP修饰凝血因子来降低凝血因子的给药频率。

[0246] 在另一个实施方式中,术语依从性包括顺应性。在另一个实施方式中,本公开的方法包括通过降低凝血因子的施用频率来增加需要凝血因子疗法的患者的依从性。在另一个实施方式中,由于CTP修饰使得CTP修饰的凝血因子更稳定,实现了凝血因子施用频率的降低。在另一个实施方式中,由于凝血因子的$T_{1/2}$增加,实现了凝血因子施用频率的降低。在另一个实施方式中,由于增加清除时间或降低凝血因子的清除率,实现了凝血因子施用频率的降低。

[0247] 在另一个实施方式中,作为增加凝血因子的AUC量度的结果,实现了凝血因子施用频率的降低。

[0248] 在另一个实施方式中,本文提供了降低凝血因子的给药频率的方法,包括将一至十个CTP连接至凝血因子的羧基末端的步骤,从而降低凝血因子的给药频率。在另一个实施方式中,本文提供了降低凝血因子的给药频率的方法,包括将一至五个CTP连接至凝血因子的羧基末端的步骤,从而降低凝血因子的给药频率。在另一个实施方式中,本文提供了降低凝血因子的给药频率的方法,包括将三个CTP连接至凝血因子的羧基末端的步骤,从而降低凝血因子的给药频率。在另一个实施方式中,本文提供了降低凝血因子的给药频率的方法,包括将三至五个CTP连接至凝血因子的羧基末端的步骤,从而降低凝血因子的给药频率。

[0249] 在另一个实施方式中,本文提供了增加凝血因子疗法的依从性的方法,包括向有此需要的受试者提供包含凝血因子和连接至凝血因子的羧基末端的一至十个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽的多肽,从而增加凝血因子疗法的使用依从性。在另一个实施方式中,本文提供了增加凝血因子疗法的使用依从性的方法,包括向有需要的受试者提供包含凝血因子和连接至凝血因子的羧基末端的一至五个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽的多肽,从而增加凝血因子疗法的使用依从性。在另一个实施方式中,本文提供了增加凝血因子疗法的依从性的方法,包括向需要其的受试者提供包含凝血因子的多肽和连接至凝血因子的羧基末端的三个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽,从而提高凝血因子疗法的使用依从性。在另一个实施方式中,本文提供了增加凝血因子疗法的依从性的方法,包括向需要其的受试者提供包含凝血因子和连接至凝血因子的羧基末端的三至五个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽的多肽,从而增加凝血因子疗法的使用依从性。

[0250] 在另一个实施方式中,本文提供了预防或治疗受试者的凝血或凝血障碍的方法,包括向所述受试者提供包含凝血因子和连接至凝血因子的末端羧基的一至十个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽的多肽,从而治疗所述受试者的血液凝固或凝血障碍。在另一个实施方式中,本文提供了预防或治疗受试者的凝血或凝血障碍的方法,包括向有需要的受试者提供包含凝血因子和连接至凝血因子的羧基末端的一至五个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽的多肽,从而预防或治疗所述受试者的血液凝固或凝血障碍。在另一个实施方式中,本文提供了预防或治疗受试者的凝血或凝血障碍的方法,包括向需要其的受试者提供包含凝血因子和连接至凝血因子的羧基末端的三个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽的多肽,从而预防或治疗所述受试者的血液凝固或凝血障碍。

[0251] 在另一个实施方式中,本文提供了预防受试者中血友病的方法,包括向需要其的受试者提供包含凝血因子和连接至凝血因子的羧基末端的三个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽的多肽,从而预防所述受试者的血友病。在另一个实施方式中,本文提供了预防受试者中血友病的方法,包括向需要其的受试者提供包含凝血因子和连接至凝血因子的羧基末端的三至五个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽的多肽,从而预防所述受试者的血友病。

[0252] 在另一个实施方式中,在SC施用后令人惊讶地更有效地将本文提供的组合物吸收到血流中(参见PCT/IL2016/050645,其通过引用整体并入本文)。能够皮下施用FVIIa具有优势,因为它可用于预防性应用。皮下注射对于患者自我注射也更容易,并且当患者非常年轻并且他们的静脉很小并且难以发现时是有利的。

[0253] 在另一个实施方式中,本文提供了治疗受试者中血友病的方法,包括向所述受试者提供包含凝血因子和连接至凝血因子羧基末端的一至十个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽的多肽,从而治疗所述受试者的血友病。在另一个实施方式中,本文提供了治疗受试者中

血友病的方法,包括向需要其的受试者提供包含凝血因子和连接至凝血因子羧基末端的一至五个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽的多肽,从而治疗所述受试者的血友病。在另一个实施方式中,本文提供了治疗受试者中血友病的方法,包括向需要其的受试者提供包含凝血因子和连接至凝血因子羧基末端的三个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽的多肽,从而治疗所述受试者中的血友病。在另一个实施方式中,本文提供了治疗受试者中血友病的方法,包括向需要其的受试者提供包含凝血因子和连接至凝血因子羧基末端的三至五个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽的多肽,从而治疗所述受试者的血友病。

[0254] 在一个实施方式中,口服施用包含单位剂型,其包含片剂、胶囊、锭剂、咀嚼片、悬浮液和乳液等。此类单位剂型包含安全有效量的本公开的所需凝血因子,在一个实施方式中,每个为约0.7或3.5mg至约280mg/70kg,或在另一个实施方式中,约0.5或10mg至约210mg/70kg。适于制备用于口服施用的单位剂型的药学上可接受的载体是本领域熟知的。在一些实施方式中,片剂通常包含常规的药学上相容的佐剂作为惰性稀释剂,如碳酸钙、碳酸钠、甘露醇、乳糖和纤维素;粘合剂如淀粉,明胶和蔗糖;崩解剂如淀粉,海藻酸和交联羧甲基纤维素;润滑剂如硬脂酸镁,硬脂酸和滑石粉。在一个实施方式中,助流剂如二氧化硅可用于改善粉末混合物的流动特性。在一个实施方式中,可以加入着色剂用于外观,例如FD&C染料。甜味剂和调味剂是可咀嚼片剂的有用佐剂,例如阿斯巴甜、糖精、薄荷醇、薄荷和水果调味剂。胶囊通常包含一种或多种上文公开的固体稀释剂。在一些实施方式中,载体组分的选择取决于诸如味道、成本和贮存稳定性之类的次要考虑因素,其对于本发明的目的并不重要,并且可由本领域技术人员容易地制备。

[0255] 在一个实施方式中,口服剂型包含预定的释放曲线。在一个实施方式中,本文公开的口服剂型包含延长释放片剂,胶囊,锭剂或咀嚼片剂。在一个实施方式中,本文公开的口服剂型包含缓慢释放片剂,胶囊,锭剂或咀嚼片剂。在一个实施方式中,本文公开的口服剂型包含立即释放片剂,胶囊,锭剂或咀嚼片剂。在一个实施方式中,口服剂型根据本领域技术人员已知的药物活性成分的所需释放曲线配制。

[0256] 在一些实施方式中,口服组合物包含液体溶液,乳液和悬浮液等。在一些实施方式中,适用于制备此类组合物的药学上可接受的载体是本领域熟知的。在一些实施方式中,液体口服组合物包含约0.001%至约0.933%的所需化合物,或在另一个实施方式中,约0.01%至约10%。

[0257] 在一些实施方式中,用于本发明方法的组合物包含溶液或乳液,其在一些实施方式中是包含安全且有效量的本文公开的化合物和任选的其它化合物的水溶液或乳液,用于局部鼻内施用。在一些实施方式中,此类组合物包含约0.001%至约10.0%w/v的主题化合物,更优选约0.01%至约2.0,其用于通过鼻内途径全身递送化合物。

[0258] 在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽注射到肌肉中(肌内注射)。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽注射到皮肤下方(皮下注射)。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽注射到肌肉中。在另一个实施方式中,将包含凝血因子和至少一个CTP单元的多肽注射到皮肤中。在另一个实施方式中,通过全身施用以施用本文所述的凝血因子。在另一个实施方式中,通过静脉内注射施用本文所述的凝血因子。在另一个实施方式中,施用可以是肠胃外、肺部、口服、局部、皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、经鼻、眼内、眼科、硬膜外、口腔、直

肠、经粘膜、肠或肠胃外递送，包括髓内注射以及鞘内或直接心室内施用。

[0259] 在另一个实施方式中，制剂以局部而非全身方式施用，例如，通过将制剂直接注射到患者身体的特定区域中。

[0260] 在一个实施方式中，施用途径可以是肠内施用。在另一个实施方式中，途径可以是结膜、透皮、皮内、动脉内、阴道、直肠、肿瘤内、parcanceral、透粘膜、肌肉内、血管内、心室内、颅内、鼻内、舌下或其组合。

[0261] 在另一个实施方式中，药物组合物和药物制剂通过静脉内、动脉内或肌肉内注射液体制剂施用。在一些实施方式中，液体制剂包括溶液、悬浮液、分散液、乳液和油等。在一个实施方式中，药物组合物和药物制剂通过静脉内施用，因此配制成适于静脉内施用的形式。在另一个实施方式中，药物组合物和药物制剂通过动脉内施用，因此配制成适于动脉内施用的形式。在另一个实施方式中，药物组合物和药物制剂通过肌肉内给药，因此配制成适于肌肉内施用的形式。

[0262] 此外，在另一个实施方式中，药物组合物和药物制剂局部施用于体表，因此配制成适于局部施用的形式。合适的局部制剂包括凝胶、软膏、乳膏、洗剂和滴剂等。对于局部施用，将本文公开的化合物与另外的适当治疗剂组合，在有或没有药物载体下制备并用作在生理学上可接受的稀释剂中的溶液、悬浮液或乳液。

[0263] 在一个实施方式中，本文公开的药物组合物和药物制剂通过本领域熟知的方法制备，例如，通过常规混合、溶解、制粒、制糖衣丸、研磨、乳化、包封、包埋或冻干方法。

[0264] 在一个实施方式中，根据本发明使用的药物组合物和药物制剂使用一种或多种生理学上可接受的载体以常规方式配制，所述载体包括赋形剂和助剂，其有助于将活性成分加工成可以在药学上使用的制剂。在一个实施方式中，制剂取决于所选择的施用途径。

[0265] 在一个实施方式中，将本公开的注射剂配制成水溶液。在一个实施方式中，将本公开的注射剂配制成生理学上相容的缓冲液，例如Hank溶液，Ringer溶液或生理盐缓冲液。在一些实施方式中，对于经粘膜施用，在制剂中使用适合于待渗透屏障的渗透剂。这种渗透剂在本领域中通常是已知的。

[0266] 在一个实施方式中，将本文所述的制剂配制用于肠胃外施用，例如通过推注或连续输注。在一些实施方式中，用于注射的制剂以单位剂型存在，例如在安瓿或多剂量容器中，任选地，添加防腐剂。在一些实施方式中，组合物是在油性或水性载体中的悬浮液、溶液或乳液，并含有配制剂，例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。

[0267] 在一些实施方式中，组合物还包含防腐剂，如苯扎氯铵和硫柳汞等；螯合剂，如乙二胺四乙酸钠等；缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐和醋酸盐等；张力剂如氯化钠、氯化钾、甘油、甘露醇等；抗氧化剂，如抗坏血酸、乙酰胱氨酸、焦亚硫酸钠等；芳香剂；粘度调节剂，如聚合物，包括纤维素及其衍生物；和聚乙烯醇以及酸和碱，以根据需要调节这些含水组合物的pH。在一些实施方式中，组合物还包含局部麻醉剂或其它活性物质。该组合物可用作喷雾剂，雾剂和滴剂等。

[0268] 在一些实施方式中，用于肠胃外施用的药物组合物和药物制剂包括水溶性形式的活性制剂的水溶液。另外，在一些实施方式中，将活性成分的悬浮液制备成适当的油或水基注射悬浮液。在一些实施方式中，合适的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油，例如芝麻油，或合成脂肪酸酯，例如油酸乙酯、甘油三酯或脂质体。在一些实施方式中，水性注射悬浮液含有

增加悬浮液粘度的物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。在另一个实施方式中,悬浮液还含有合适的稳定剂或增加活性成分溶解度的试剂,以制备高浓度溶液。

[0269] 在另一个实施方式中,活性化合物可以在囊泡中递送,特别是脂质体(参见Langer,Science 249:1527-1533(1990);Treat等,in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer,Lopez-Berestein和Fidler(编辑),Liss,New York,第353-365页(1989);Lopez-Berestein,同上,第317-327页;J.E.Diederichs等,Pharm./nd.(1994)267-275)。

[0270] 在另一个实施方式中,在控释系统中递送的药物组合物配制用于静脉内输注,可植入的渗透泵,透皮贴剂,脂质体或其它施用方式。在一个实施方式中,使用泵(参见Langer,同上;Sefton,CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201(1987);Buchwald等,Surgery 88:507(1980);Saudek等,N.Engl.J.Med.321:574(1989)。在另一个实施方式中,可以使用聚合物材料。在另一个实施方式中,控释系统可以放置在治疗靶标即大脑附近,因此仅需要一小部分全身剂量(参见例如,Goodson,in Medical Applications of Controlled Release,同上,第2卷,第115-138页(1984)。其它控释系统在Langer(Science 249:1527-1533(1990)的综述中讨论。

[0271] 在一些实施方式中,活性成分为粉末形式,用于在使用前用合适的载体(例如无菌、无热原的水基溶液)构建。在一些实施方式中,组合物被配制用于雾化和吸入施用。在另一个实施方式中,组合物包含在具有附着的雾化装置的容器中。

[0272] 在一个实施方式中,使用例如常规栓剂基质如可可脂或其它甘油酯将本文公开的制剂配制成直肠组合物,例如栓剂或保留灌肠剂。

[0273] 在一些实施方式中,适用于本文公开的上下文的药物组合物和药物制剂包括其中活性成分以有效实现预期目的的量包含的组合物。在一些实施方式中,治疗有效量是指有效预防、缓解或改善疾病症状或延长所治疗对象存活的活性成分的量。

[0274] 在一个实施方式中,治疗有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内。

[0275] 可用作药学上可接受的载体或其组分的物质的一些实例是糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和甲基纤维素;粉末黄蓍草;麦芽;明胶;滑石;固体润滑剂,如硬脂酸和硬脂酸镁;硫酸钙;植物油,如花生油、棉籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和可可油;多元醇,如丙二醇、甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇;海藻酸;乳化剂,如Tween™牌乳化剂;润湿剂,如十二烷基硫酸钠;着色剂;调味剂;压片剂,稳定剂;抗氧化剂;防腐剂;无热原水;等渗盐水;和磷酸盐缓冲溶液。与化合物联合使用的药学上可接受的载体的选择基本上由化合物的待施用方式决定。如果要注射主题化合物,在一个实施方式中,药学上可接受的载体是无菌的生理盐水,具有与血液相容的悬浮剂,其pH值已经调节至约7.4。

[0276] 此外,组合物还包含粘合剂(例如阿拉伯胶、玉米淀粉、明胶、卡波姆、乙基纤维素、瓜尔胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚维酮),崩解剂(例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸、二氧化硅、交联羧甲基纤维素钠、交联聚维酮、瓜尔胶、羟基乙酸淀粉钠),各种pH和离子强度的缓冲剂(例如Tris-HCl、醋酸盐、磷酸盐),添加剂如白蛋白或明胶以防止吸收到表面,清洁剂(例如吐温20、吐温80、Pluronic F68、胆汁酸盐),蛋白酶抑制剂,表面活性剂(例如十二烷基硫酸钠),渗透增强剂,增溶剂(例如甘油、聚乙二醇甘油),抗氧化剂(例如抗

坏血酸、偏亚硫酸氢钠、丁基化羟基苯甲醚),稳定剂(例如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素),增粘剂(例如卡波姆、胶体二氧化硅、乙基纤维素、瓜尔胶),甜味剂(例如阿斯巴甜、柠檬酸),防腐剂(例如硫柳汞、苯甲醇、对羟基苯甲酸酯),润滑剂(例如硬脂酸、硬脂酸镁、聚乙二醇、十二烷基硫酸钠),流动助剂(例如胶体二氧化硅),增塑剂(例如邻苯二甲酸二乙酯、柠檬酸三乙酯),乳化剂(例如卡波姆、羟丙基纤维素、十二烷基硫酸钠),聚合物涂层(例如泊洛沙姆或泊洛沙胺),涂层和成膜剂(例如乙基纤维素、丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯)和/或佐剂。

[0277] 用于糖浆、酏剂、乳剂和悬浮液的载体的典型组分包括乙醇、甘油、丙二醇、聚乙二醇、液体蔗糖、山梨糖醇和水。对于悬浮液,典型的悬浮剂包括甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、纤维素(例如Avicel™、RC-591)、黄蓍胶和海藻酸钠;典型的润湿剂包括卵磷脂和聚环氧乙烷脱水山梨糖醇(例如聚山梨醇酯80)。典型的防腐剂包括对羟基苯甲酸甲酯和苯甲酸钠。在另一个实施方式中,口服液体组合物还含有一种或多种组分,例如上面公开的甜味剂、调味剂和着色剂。

[0278] 该组合物还包括将活性材料掺入聚合物化合物(例如聚乳酸、聚乙二醇酸、水凝胶等)的颗粒制剂中或之上,或掺入脂质体、微乳液、胶束、单层或多层囊泡,红细胞鬼或原生质球之上。这种组合物将影响物理状态,溶解度,稳定性,体内释放速率和体内清除速率。

[0279] 本发明还包括用聚合物(例如泊洛沙姆或泊洛沙胺)包衣的颗粒组合物和与针对组织特异性受体、配体或抗原的抗体偶联或与组织特异性受体的配体偶联的化合物。

[0280] 在一些实施方式中,通过共价连接水溶性聚合物如聚乙二醇、聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物,羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮或聚脯氨酸而修饰化合物。在另一个实施方式中,与相应的未修饰化合物相比,经修饰的化合物在静脉内注射后在血液中显示出显著更长的半衰期。在一个实施方式中,修饰还增加化合物在水溶液中的溶解度,消除聚集,增强化合物的物理和化学稳定性,并大大降低化合物的免疫原性和反应性。在另一个实施方式中,通过比未修饰的化合物更频繁地或以更低的剂量施用这种聚合物-化合物外延物来实现所需的体内生物活性。

[0281] 在一些实施方式中,最初可以从体外测定估计有效量或剂量的制备。在一个实施方式中,可以在动物模型中配制剂量,并且这种信息可以用于更准确地确定人中的有用剂量。

[0282] 在一个实施方式中,本文所述活性成分的毒性和治疗功效可通过体外、细胞培养物或实验动物中的标准药学方法测定。在一个实施方式中,从这些体外和细胞培养测定和动物研究中获得的数据可用于配制用于人的一系列剂量。在一个实施方式中,剂量根据使用的剂型和所用的施用途径而变化。在一个实施方式中,确切制剂、施用途径和剂量可以由个体医师根据患者的病情选择。[参见例如,Fingl等,(1975)“The Pharmacological Basis of Therapeutics”,Ch.1p.1]。

[0283] 在一个实施方式中,取决于待治疗病症的严重性和反应性,给药可以是单次或多次施用,治疗过程持续数天至数周或直至实现治愈或实现减少疾病状态。

[0284] 在一个实施方式中,待施用的组合物的量将当然取决于所治疗的受试者,痛苦的严重程度,施用方式,处方医师的判断等。

[0285] 在一个实施方式中,还制备包含在相容的药物载体中配制的本文公开的制剂的组

合物,将其置于合适的容器中,并标记用于治疗指定的病症。

[0286] 在另一个实施方式中,本文所述的凝血因子与复合有机赋形剂和稳定剂如非离子表面活性剂(即表面活性剂),各种糖,有机多元醇和/或人血清白蛋白结合的冻干(即冷冻干燥)制剂。在另一个实施方式中,药物组合物包含如无菌注射用水中所述的冻干凝血因子。在另一个实施方式中,药物组合物包含如无菌PBS注射液中所述的冻干凝血因子。在另一个实施方式中,药物组合物包含如无菌0.9%NaCl注射液中所述的冻干凝血因子。

[0287] 在另一个实施方式中,药物组合物包含本文所述的凝血因子和复合载体,例如人血清白蛋白,多元醇,糖和阴离子表面活性稳定剂。在另一个实施方式中,药物组合物包含本文所述的凝血因子和乳糖酸和乙酸盐/甘氨酸缓冲液。在另一个实施方式中,药物组合物包含本文所述的凝血因子和增加干扰素组合物在水中的溶解度的氨基酸,例如精氨酸或谷氨酸。在另一个实施方式中,药物组合物包含本文所述的冻干凝血因子和甘氨酸或人血清白蛋白(HSA),缓冲液(例如乙酸盐)和等渗剂(例如NaCl)。在另一个实施方式中,药物组合物包含本文所述的冻干凝血因子和磷酸盐缓冲剂,甘氨酸和HSA。

[0288] 在另一个实施方式中,当置于pH为约4至7.2之间的缓冲溶液中时,包含本文所述的凝血因子的药物组合物是稳定的。在另一个实施方式中,包含凝血因子的药物组合物在pH为约4至8.5之间的缓冲溶液中。在另一个实施方式中,包含凝血因子的药物组合物在pH为约6至7之间的缓冲溶液中。在另一个实施方式中,包含凝血因子的药物组合物在pH为约6.5的缓冲溶液中。在另一个实施方式中,包含凝血因子的药物组合物在pH为约6.4的缓冲溶液中。在另一个实施方式中,包含本文所述的凝血因子的药物组合物用氨基酸作为稳定剂稳定,并且在一些情况下是盐(如果氨基酸不含带电侧链)。

[0289] 在另一个实施方式中,包含本文所述的凝血因子的药物组合物是包含稳定剂的液体组合物,所述稳定剂为约0.3%至5%之间重量,其为氨基酸。

[0290] 在另一个实施方式中,包含本文所述的凝血因子的药物组合物提供给药准确性和产品安全性。在另一个实施方式中,包含本文所述的凝血因子的药物组合物提供用于可注射应用的生物活性且稳定的液体制剂。在另一个实施方式中,药物组合物包含本文所述的非冻干凝血因子。

[0291] 在另一个实施方式中,包含本文所述的凝血因子的药物组合物提供了液体制剂,其允许在液体状态下长时间储存,从而便于在施用前储存和运输。

[0292] 在另一个实施方式中,包含本文所述的凝血因子的药物组合物包含固体脂质作为基质材料。在另一个实施方式中,包含本文所述的凝血因子的可注射药物组合物包含固体脂质作为基质材料。在另一个实施方式中,Speiser(Speiser等,Pharm.Res.8(1991)47-54)描述了通过喷雾凝固产生脂质微粒,随后是用于口服施用的脂质纳米小球(Speiser EP 0167825(1990))。在另一个实施方式中,使用的脂质被身体很好地耐受(例如由存在于乳剂中的脂肪酸组成的甘油酯用于肠胃外营养)。

[0293] 在另一个实施方式中,包含本文所述的凝血因子的药物组合物包含聚合物微粒。在另一个实施方式中,包含本文所述的凝血因子的药物组合物包含纳米颗粒。在另一个实施方式中,包含本文所述的凝血因子的药物组合物包含脂质体。在另一个实施方式中,包含本文所述的凝血因子的药物组合物包含脂质乳剂。在另一个实施方式中,包含本文所述的凝血因子的药物组合物包含微球。在另一个实施方式中,包含本文所述的凝血因子的药物

组合物包含脂质纳米颗粒。在另一个实施方式中,包含本文所述的凝血因子的药物组合物包含脂质纳米颗粒,其包含两亲脂质。在另一个实施方式中,包含本文所述的凝血因子的药物组合物包含脂质纳米颗粒,其包含药物、脂质基质和表面活性剂。在另一个实施方式中,脂质基质具有至少50%w/w的甘油单酯含量。

[0294] 在一个实施方式中,本文公开的组合物存在于包装或分配器装置中,例如FDA批准的试剂盒,其含有一种或多种含有活性成分的单位剂型。在一个实施例中,包装例如包括金属或塑料箔,例如泡罩包装。在一个实施方式中,包装或分配器装置附有施用说明。在一个实施方式中,包装或分配器通过与容器相关联的通知以由监察管理药品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式容纳,该通知反映了该机构批准该组合物或人或兽医施用的形式。在一个实施方式中,这种通知是美国食品和药物管理局批准的用于处方药或批准的产品插页的标签。

[0295] 在一个实施方式中,应当理解,与每种药剂本身的治疗相比,本文公开的凝血因子可以与另外的活性剂一起提供给个体,以实现改善的治疗效果。在另一个实施方式中,采取措施(例如给药和选择补充剂)以避免与组合疗法相关的不良副作用。

[0296] 制备

[0297] 在一个实施方式中,公开了一种制备人绒毛膜促性腺激素肽(CTP)修饰的因子VIIa多肽的方法,该方法包括以下步骤:(a)用包含编码所述CTP修饰的因子VII的编码部分的表达载体稳定转染预定数量的细胞,其中所述转染的细胞表达并任选地分泌所述CTP修饰的因子VII;(b)获得过表达所述CTP修饰的因子VII的细胞克隆;(c)将所述克隆在溶液中扩增到预定的规模;(d)收获含有所述克隆的所述溶液;(e)过滤含有所述克隆的所述溶液以获得澄清的收获溶液;以及(f)纯化和活化所述澄清的收获溶液以得到具有所需浓度的CTP修饰的因子VIIa的纯化蛋白质溶液,从而制备人绒毛膜促性腺激素肽(CTP)修饰的因子VIIa多肽。在另一个实施方式中,分泌CTP修饰的因子VII。在另一个实施方式中,不分泌CTP修饰的因子VII。在CTP修饰的因子VII的制备中,转染是早期步骤。一旦选择了最终的高表达克隆,每个产物包括解冻主细胞库(MCB),扩增,收获和纯化。(参见实施例3,描述了通过收获克隆扩增的步骤1-5;描述了纯化和活化的步骤6-14)。在一个实施方式中,公开了制备人绒毛膜促性腺激素羧基末端肽(CTP)修饰的人活性因子VII(FVIIa)多肽的方法,其中所述多肽包含与FVII的C-末端串联连接的三个CTP分子,该方法包括以下步骤:用包含编码所述CTP修饰的FVII的编码部分的表达载体稳定转染预定数量的细胞,其中所述转染的细胞表达并分泌所述CTP修饰的FVII;获得过表达所述CTP修饰的FVII的细胞克隆;将所述克隆在溶液中扩增到预定的规模;收获含有所述克隆的所述溶液;过滤含有所述克隆的所述溶液以得到含有所述CTP修饰的FVII的澄清的收获溶液;以及从所述澄清的收获溶液中纯化和活化CTP修饰的FVII以得到具有所需浓度的CTP修饰的FVIIa的纯化蛋白质溶液;其中所述制备的CTP修饰的FVIIa包含以下中的至少一种:

[0298] a.低氧化形式;

[0299] b.高百分比的羧化谷氨酸残基;

[0300] c.至少60%带电荷N-聚糖;或

[0301] d.效力至少为10,500U/mg;

[0302] 从而制备CTP修饰的FVIIa,并且其中制备的CTP修饰的FVIIa的氨基酸序列如SEQ

ID NO:7所示。

[0303] 在一个实施方式中,将本文公开的多核苷酸插入表达载体(即核酸构建体)中以使重组多肽能够表达。在一个实施方式中,本文公开的表达载体包括使该载体适于在原核生物中复制和整合的额外序列。在一个实施方式中,本文公开的表达载体包括使该载体适于在真核生物中复制和整合的额外序列。在一个实施方式中,本文公开的表达载体包括使该载体适于在原核生物和真核生物中复制和整合的穿梭载体。在一些实施方式中,克隆载体包含转录和翻译起始序列(例如启动子、增强子)和转录和翻译终止子(例如多腺苷酸化信号)。

[0304] 在一个实施方式中,制备CTP修饰的FVIIa多肽的方法包括使用表达载体的步骤,其中所述表达载体包含启动子,CTP修饰的FVII多肽的编码序列,和多腺苷酸化序列。在另一个实施方式中,多腺苷酸化序列是猿猴病毒(SV)40多腺苷酸化序列。

[0305] 在一个实施方式中,多种原核或真核细胞可用作宿主表达系统以表达本文公开的多肽。在一些实施方式中,这些包括但不限于微生物,例如用含有多肽编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌;用含有多肽编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母;用重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒,TMV)感染或用含有多肽编码序列的重组质粒表达载体如Ti质粒转化的植物细胞系统。

[0306] 在一个实施方式中,使用非细菌表达系统(例如哺乳动物表达系统,例如CHO细胞或衍生自CHO细胞的细胞)来表达本文公开的多肽。在一个实施方式中,用于在哺乳动物细胞中表达本文公开的多核苷酸的表达载体是包含CMV启动子和新霉素抗性基因的pCI-DHFR载体。

[0307] 在一个实施方式中,本文公开的表达载体可以进一步包括额外的多核苷酸序列,其允许例如几种蛋白质的翻译,其来自单个mRNA例如内部核糖体进入位点(IRES)和用于基因组整合启动子-嵌合多肽的序列。

[0308] 在一些实施方式中,哺乳动物表达载体包括但不限于可从Invitrogen获得的pcDNA3、pcDNA3.1(+/-)、pGL3、pZeoSV2(+/-)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHBB、pNMT1、pNMT41、pNMT81,可从Promega获得的pCI,可从Strategene获得的pMbac、pPbac、pBK-RSV和pBK-CMV,可从Clontech获得的pTRES,及其衍生物。

[0309] 在一些实施方式中,含有来自真核病毒如逆转录病毒的调节元件的表达载体通过本文公开的方法使用。SV40载体包括pSVT7和pMT2。在一些实施方式中,衍生自牛乳头瘤病毒的载体包括pBV-1MTHA,衍生自Epstein Bar病毒的载体包括pHEBO和p205。其它示例性载体包括pMSG,pAV009/A^+,pMT010/A^+,pMAMneo-5,杆状病毒pDSVE,以及任何其它载体,其允许在SV-40早期启动子,SV-40后期启动子,金属硫蛋白启动子,小鼠乳腺肿瘤病毒启动子,劳氏肉瘤病毒启动子,多角体蛋白启动子或其它显示有效在真核细胞中表达的启动子的指导下表达蛋白质。

[0310] 在一个实施方式中,可以使用各种方法将编码本文公开的CTP修饰的因子VII的表达载体引入细胞中。用多核苷酸或表达载体“转染”真核宿主细胞,产生遗传修饰的细胞或转基因细胞,可以通过本领域熟知的任何方法进行并描述于例如Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Springs Harbor Laboratory,New York(1989,

1992),Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley and Sons,Baltimore,Md.(1989),Chang等,Somatic Gene Therapy,CRC Press,Ann Arbor,MI.(1995),Vega等,Gene Targeting,CRC Press,Ann Arbor Mich.(1995),Vectors:A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses,Butterworths,Boston Mass.(1988)以及Gilboa等[Biotechniques 4(6):504-512,1986]并且包括例如稳定或瞬时转染和电穿孔。另外,参见美国专利号5,464,764和5,487,992的正-负选择方法。转染方法还包括但不限于脂质体介导的转染,磷酸钙共沉淀,电穿孔,聚阳离子(例如DEAE-葡聚糖)介导的转染,原生质体融合,病毒感染(包括重组病毒感染)和显微注射。优选地,转染是稳定的转染。提供最佳转染频率和在特定宿主细胞系和类型中编码本文公开的目的肽的异源基因的表达的转染方法是有利的。合适的方法可以通过常规方法确定。对于稳定的转染子,构建体整合到宿主细胞的基因组中或人工染色体/小染色体中或者以游离方式定位以便稳定地保持在宿主细胞内。

[0311] 除非另有说明,否则本文公开的实践将采用本领域技术人员熟知的细胞生物学,分子生物学,细胞培养和免疫学等常规技术。这些技术在现有文献中完全公开。参见例如Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2次编辑,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989);Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology(1987,更新);Brown编辑,Essential Molecular Biology,IRL Press(1991);Goeddel编辑,Gene Expression Technology,Academic Press(1991);Bothwell等编辑,Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes,Bartlett Publ.(1990);Wu等编辑,Recombinant DNA Methodology,Academic Press(1989);Kriegler,Gene Transfer and Expression,Stockton Press(1990);McPherson等,PCR:A Practical Approach,IRL Press at Oxford University Press(1991);Gait编辑,Oligonucleotide Synthesis(1984);Miller&Calos编辑,Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(1987);Butler编辑,Mammalian Cell Biotechnology(1991);Pollard等编辑,Animal Cell Culture,Humana Press(1990);Freshney等编辑,Culture of Animal Cells,Alan R.Liss(1987);Studzinski编辑,Cell Growth and Apoptosis,A Practical Approach,IRL Press at Oxford University Press(1995);Melamed等编辑,Flow Cytometry and Sorting,Wiley-Liss(1990);Current Protocols in Cytometry,John Wiley&Sons,Inc.(更新);Wirth&Hauser,Genetic Engineering of Animals Cells,in:Biotechnology第2卷,Pühler编辑,VCH,Weinheim 663-744;the series Methods of Enzymology(Academic Press,Inc.)和Harlow等编辑,Antibodies:A Laboratory Manual(1987)。

[0312] 可以通过各种方法将编码CTP修饰的因子VII的异源目的基因引入本文公开的细胞中,例如通过病毒转化、转染或显微注射。可以将异源目的基因作为线性DNA或作为表达载体的一部分引入细胞中。已知许多真核表达载体允许多个克隆位点插入一个或多个异源基因及其表达。商业供应商包括例如Stratagene,La Jolla,Calif.,USA;Invitrogen,Carlsbad,Calif.,USA;Promega,Madison,Wis.,USA或BD Biosciences Clontech,Palo Alto,Calif.,USA等公司。用编码一种或多种目的基因的DNA或表达载体转染细胞是通过常规方法进行的,如Sambrook等,1989或Ausubel等,1994所述。转染方法包括例如脂质体介导的转染、磷酸钙共沉淀、电穿孔、聚阳离子-(例如DEAE葡聚糖)介导的转染、原生质体融合、

显微注射和病毒感染。优选地,进行稳定转染,其中DNA分子整合到宿主细胞的基因组或人工染色体/微染色体中,或以稳定的方式游离地包含在宿主细胞中。优选是转染方法,其在所讨论的宿主细胞中提供最佳转染频率和一种或多种目的异源基因的表达。

[0313] 在一些实施方式中,通过病毒感染引入核酸提供了优于其它方法(例如脂质转染和电穿孔)的若干优势,因为由于病毒的感染性质可以获得更高的转染效率。

[0314] 在一个实施方式中,应当理解,本文公开的多肽还可以使用上文所述的任何合适的施用方式(即体内基因治疗)从施用于个体的核酸构建体表达。在一个实施方式中,根据需要通过适当的基因递送载体/方法(转染、转导、同源重组等)和表达系统将核酸构建体引入合适的细胞中,然后将修饰的细胞在培养物中扩增并返回个体(即离体基因治疗)。

[0315] 异源目的基因通常与能够转录目的基因的启动子功能性连接,并与能够转录和翻译(表达)目的基因或提高其效率的其它调节元件连接。

[0316] 技术人员会理解,术语“启动子”可以包括多核苷酸序列,其能够并控制与其功能性连接的基因或序列的转录。启动子含有结合RNA聚合酶的识别序列和转录的起始位点(转录起始位点)。为了在某种细胞类型或宿主细胞中表达所需的序列,必须选择合适的功能性启动子。技术人员将熟悉来自各种来源的各种启动子,包括组成型、诱导型和阻抑型启动子。它们例如保存在诸如GenBank的数据库中,并且可以作为从商业或个体来源克隆在多核苷酸序列内的单独元件或元件获得。在诱导型启动子中,启动子的活性可以响应于信号而降低或增加。诱导型启动子的一个实例是四环素(tet)启动子。这包含四环素操纵子序列(tetO),其可以由四环素调节的反式活化蛋白(tTA)诱导。在四环素存在下,tTA与tetO的结合受到抑制。其它诱导型启动子的实例是jun,fos,金属硫蛋白和热激启动子(参见Sambrook,J.,Fritsch,EF&Maniatis,T.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY,1989;Gossen,M.等,Curr Opi Biotech 1994,5,516-520)。在特别适合在真核生物中高表达的启动子中,存在例如仓鼠的泛素/S27a启动子(WO97/15664),SV 40早期启动子,腺病毒主要晚期启动子,小鼠金属硫蛋白-1启动子,长劳氏肉瘤病毒的末端重复区和人巨细胞病毒的早期启动子。其它异源哺乳动物启动子的实例是肌动蛋白,免疫球蛋白或热休克启动子。

[0317] 例如,启动子可以与增强子序列功能性连接,以增加转录活性。为此,可以使用一种或多种增强子和/或增强子序列的几个拷贝,例如CMV或SV40增强器。例如,启动子可以与增强子序列功能性连接,以增加转录活性。为此,可以使用一种或多种增强子和/或增强子序列的几个拷贝,例如CMV或SV40增强器。

[0318] 本领域技术人员将理解,术语增强子可以包括多核苷酸序列,其在顺式定位中作用于启动子的活性,从而刺激与该启动子功能性连接的基因的转录。与启动子不同,增强子的作用与位置和方向无关,因此它们可以位于转录单元的前面或后面,内含子内或甚至编码区内。增强子可以位于转录单元的紧邻区域并且距离启动子相当远。也可以与启动子具有物理和功能重叠。本领域技术人员将了解来自各种来源的许多增强子(并且保藏在诸如GenBank的数据库中,例如SV40增强子、CMV增强子、多瘤增强子、腺病毒增强子),其可作为独立元件或克隆在多核苷酸序列内的元件(例如存放在ATCC或来自商业和个人来源)。许多启动子序列还含有增强子序列,例如常用的CMV启动子。人CMV增强剂是迄今为止鉴定的最强增强剂之一。诱导型增强子的一个实例是金属硫蛋白增强剂,其可以被糖皮质激素或重

金属刺激。

[0319] 基本上,调节元件包括启动子,增强子,终止和多腺苷酸化信号以及其它表达控制元件。诱导型和组成型调节序列对于各种细胞类型是已知的。“转录调节元件”通常包含待表达的基因序列上游的启动子,转录起始和终止位点以及多腺苷酸化信号。

[0320] 技术人员将理解,术语“转录起始位点”可以包括构建体中的核酸,其对应于掺入初级转录物中的第一核酸,即mRNA前体。转录起始位点可以与启动子序列重叠。

[0321] 本领域技术人员将理解,术语“转录终止位点”可以包括通常位于目的基因的或待转录的基因区段的3’末端,并且其导致通过RNA聚合酶终止转录。

[0322] 本领域技术人员将理解,术语“多腺苷酸化信号”可以包括信号序列,其在真核mRNA的3’末端的特定位点处引发裂解,并且在裂解的3’-末端处转录后掺入大约100-200个腺嘌呤核苷酸(polyA尾)的序列。多腺苷酸化信号包含裂解位点上游约10-30个核苷酸的序列AATAAA和位于下游的序列。已知各种聚腺苷酸化元件,例如tk polyA,SV40晚期和早期polyA或BGH polyA(例如描述于美国专利号5,122,458中)。

[0323] “翻译调节元件”包括待表达的每种多肽的翻译起始位点(AUG)、终止密码子和polyA信号。为了获得最佳表达,建议去除、添加或改变待表达的核酸序列的5’-和/或3’-非翻译区,以消除任何可能不合适的额外翻译起始密码子或其它序列。可能会影响转录或表达水平的表达。为了促进表达,核糖体共有结合位点可以替代地直接插入起始密码子的上游。为了产生分泌的多肽,目的基因通常含有编码信号前体肽的信号序列,该信号前体肽将合成的多肽转运到ER膜并通过ER膜。信号序列通常但不总是位于分泌蛋白的氨基末端,并且在蛋白质已通过ER膜过滤后被信号肽酶裂解。基因序列通常但不一定含有其自身的信号序列。如果不存在天然信号序列,则可以以已知方式引入异源信号序列。许多这种信号序列是本领域技术人员已知的并且保存在序列数据库例如GenBank和EMBL中。

[0324] 技术人员将理解,术语“各多肽”、“多肽”或其语法等同可互换使用以包括氨基酸序列或蛋白质,并且可包括任何长度的氨基酸聚合物。该术语还包括通过诸如糖基化、磷酸化、乙酰化或蛋白质加工的反应在翻译后修饰的蛋白质。多肽的结构可以被修饰,例如,通过氨基酸的取代、缺失或插入以及与其它蛋白质的融合,同时保留其生物学活性。

[0325] 为了在细胞中产生一种或多种目的基因产物,可以在允许表达目的基因的条件下使细胞在无血清培养基和悬浮培养中生长。例如,如果目的基因处于组成型启动子的控制下,则不需要添加特殊的诱导物。例如,如果目的基因的表达处于诱导型启动子的控制下,则必须以足够但无毒的浓度将相应的诱导物加入细胞培养基中。可以根据需要通过多次亚传代并转移到合适的细胞培养容器中来扩增细胞。基因产物作为细胞、膜结合或分泌产物产生。

[0326] 在一个实施方式中,制备CTP修饰的因子VIIa的步骤包括用包含编码CTP修饰的因子VII的编码部分的表达载体稳定转染预定数量的细胞。在另一个实施方式中,制备CTP修饰的因子VIIa的步骤包括用包含编码所述CTP修饰的因子VII的编码部分的表达载体稳定转染细胞。在一个实施方式中,细胞是CHO细胞。在另一个实施方式中,细胞是DG44细胞。在另一个实施方式中,细胞是本领域已知的适合于CTP修饰的因子VII的表达和分泌的任何细胞。在一个实施方式中,表达的CTP修饰的FVII是缺乏信号肽的FVII-CTP3酶原。在另一个实施方式中,表达的CTP修饰的FVII的氨基酸序列示于SEQ ID NO:7中

[0327] 本领域技术人员将理解,虽然CTP修饰的FVII可以表达为处于非活性状态的酶原,但酶原可以在纯化过程期间或之后活化。术语“CTP修饰的FVII”可以与“CTP修饰的FVII/FVIIa”互换使用,并且可包括CTP修饰的FVII多肽的无活性和活性形式。类似地,单独的CTP修饰的因子VII多肽例如FVII/FVIIa-CTP3也可以使用命名法FVII/FVIIa来表示无活性或活性形式或两者。在一个实施方式中,包含活化的FVIIa-CTP_3的CTP修饰的多肽包含通过二硫键连接的轻链和重链。

[0328] 在另一个实施方式中,转染的细胞表达CTP修饰的因子VII。在另一个实施方式中,表达和产生的FVII/FVIIa-CTP3由连接至所述因子VII/VIIa的羧基末端的两个CTP和连接至所述因子VII/VIIa的氨基末端的一个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽组成。在另一个实施方式中,表达和制备并表达的CTP修饰的因子VII/VIIa由连接至所述因子VII/FVIIa的羧基末端的一个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽组成。在其它实施方式中,CTP修饰的因子VII的表达处于高表达水平。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa是高糖基化的。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa是高唾液酸化的。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa具有高O-聚糖含量。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa具有高N-聚糖含量。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa具有高带电荷N-聚糖含量。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa具有高百分比的羧基-谷氨酸。本文所述,CTP修饰的因子VIIa可具有不同的糖基化含量和模式。通过本文公开的方法制备的CTP修饰的因子VIIa可包括本文公开的任何糖基化模式和含量。通常,本文提出的制备方法提供CTP修饰的因子VIIa,其具有高糖基化含量和高百分比的糖基化的糖基化位点。

[0329] 在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高O-聚糖含量为至少2mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高O-聚糖含量为至少4mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高O-聚糖含量为至少5mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高O-聚糖含量为至少6mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高O-聚糖含量为至少8mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高O-聚糖含量为至少10mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高O-聚糖含量为至少12mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高O-聚糖含量为至少14mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高O-聚糖含量为至少16mol/mol。

[0330] 在一个实施方式中,O-聚糖的高水平或含量由本文公开的制备过程中的上游过程驱动。在另一个实施方式中,O-聚糖的高水平或含量由本文公开的制备过程中的克隆驱动。在另一个实施方式中,维持高O-聚糖含量或水平直至获得最终药物物质。

[0331] 在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII/VIIa具有高唾液酸含量。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高唾液酸含量为至少4mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高唾液酸含量为至少6mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高唾液酸含量为至少8mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高唾液酸含量为至少10mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高唾液酸含量为至少12mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高唾液酸含量为至少14mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰

的因子VII/VIIa的高唾液酸含量为至少15mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高唾液酸含量为至少17mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高唾液酸含量为至少18mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高唾液酸含量为至少20mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高唾液酸含量为至少22mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高唾液酸含量为至少25mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高唾液酸含量为至少27mol/mol。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高唾液酸含量为至少30mol/mol。

[0332] 在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高百分比羧基-谷氨酸为至少40%。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高百分比羧基-谷氨酸为至少50%。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高百分比羧基-谷氨酸为至少60%。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高百分比羧基-谷氨酸为至少70%。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高百分比羧基-谷氨酸为至少80%。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高百分比羧基-谷氨酸为至少85%。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高百分比羧基-谷氨酸为至少90%。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高百分比羧基-谷氨酸为至少91%。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高百分比羧基-谷氨酸为至少92%。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高百分比羧基-谷氨酸为至少93%。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高百分比羧基-谷氨酸为至少94%。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高百分比羧基-谷氨酸为至少95%。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高百分比羧基-谷氨酸为至少96%。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高百分比羧基-谷氨酸为至少97%。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高百分比羧基-谷氨酸为至少98%。在另一个实施方式中,所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高百分比羧基-谷氨酸为至少99%。本领域技术人员会理解,羧基-谷氨酸残基的百分比可以与%羧基-谷氨酸残基无结构域(Gla无结构域)相反地表达,其中,例如如果高百分比的Gla是40%,则Gla无结构域是60%。

[0333] 在一个实施方式中,制备CTP修饰的因子VIIa的步骤包括获得过表达CTP修饰的因子VII的细胞克隆。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII的表达是最佳的。在另一个实施方式中,表达水平为30-1500mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为至少30mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为至少40mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为至少50mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为至少60mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为至少70mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为50-70mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为至少200mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为至少300mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为至少400mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为至少500mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为至少600mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为至少700mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为至少800mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为至少900mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为至少1000mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为至少1100mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为至少1200mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为至少

1300mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为至少1400mg/L。在另一个实施方式中,表达水平为至少1500mg/L。在另一个实施方式中,克隆在培养基中繁殖以形成主细胞库(MCB)和工作细胞库(WCB)。在一个实施方式中,步骤(c)的克隆获自MCB。在另一个实施方式中,克隆获自WCB。

[0334] CTP修饰的FVII作为分泌的基因产物从细胞培养基中获得。然而,如果在没有分泌信号的情况下表达蛋白质或多肽,也可以从细胞裂解物中分离基因产物。为了获得基本上不含其它重组蛋白和宿主细胞蛋白的纯同质产物,进行常规纯化步骤。首先,经常从培养基或裂解物中除去细胞和细胞碎片。然后可以使所需的基因产物免于污染可溶性蛋白质、多肽和核酸,例如通过在免疫亲和和离子交换柱上分级,亲和柱,乙醇沉淀,反相HPLC或在Sephadex、羟基磷灰石、二氧化硅或阳离子交换树脂如DEAE上的色谱(参见本文的实施例)。本领域已知的并且导致纯化由重组宿主细胞表达的异源蛋白质的一般方法是本领域技术人员已知的并且在文献中描述,例如由Harris等(Harris等,Protein Purification:A Practical Approach,Pickwood and Hames,编辑,IRL Press,Oxford,1995)和Scopes(Scopes,R.,Protein Purification,Springer Verlag,1988)。这些方法可以全部或部分用于本文公开的方法中。

[0335] 在另一个实施方式中,本文公开了在无血清条件下在哺乳动物细胞中制备CTP修饰的FVII的方法,其特征在于(i)哺乳动物细胞含有编码CTP修饰的FVII的基因;(ii)哺乳动物细胞在无血清条件下生长,该条件允许哺乳动物细胞复制;(iii)在每种情况下,至少一(1)个这些哺乳动物细胞在无血清条件下沉积在细胞培养容器中;(iv)在无血清条件下复制适当沉积的哺乳动物细胞;(v)在无血清条件下培养复制的细胞,其中表达CTP修饰的FVII;以及(vi)然后从细胞或培养上清液中分离CTP修饰的FVII产物并纯化和活化。在该方法的另一个实施方式中,哺乳动物细胞是转染的哺乳动物细胞,其中已引入CTP修饰的FVII的基因。因此,本文公开的方法还涉及制备重组基因产物的方法,其特征在于在上述方法的步骤(i)之前,用至少编码CTP修饰的FVII的核酸转染哺乳动物细胞。优选稳定转染相应的哺乳动物细胞。

[0336] 无血清、蛋白质或化学成分确定的培养基的实例包括例如商业上可获得的培养基Ham's F12(Sigma,Deisenhofen,DE),RPMI 1640(Sigma),Dulbecco's Modified Eagle's培养基(DMEM;Sigma),Minimal必需培养基(MEM;Sigma),Iscove's Modified Dulbecco's培养基(IMDM;Sigma),CDCHO(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA),CHO-S-SFMII(Invitrogen),无血清CHO培养基(Sigma),CD-PowerCHO2培养基(Lonza)和无蛋白CHO培养基(Sigma)。如果需要,这些培养基中的每一种都可以补充各种化合物,例如激素和/或其它生长因子(例如胰岛素,转铁蛋白,表皮生长因子,胰岛素样生长因子),盐(例如氯化钠,钙,镁,磷酸盐),缓冲液(例如HEPES),核苷(例如腺苷,胸苷),谷氨酰胺,葡萄糖或其它等效营养素,抗生素和/或微量元素或市售饲料如Power Feed A(Lonza)。如果可复制细胞是表达一种或多种可选择标记的重组细胞,也可以向培养基中加入一种或多种合适的选择剂如抗生素。

[0337] 应当理解,除了包含插入的编码序列(编码多肽)的转录和翻译所必需的元件之外,本文公开的表达构建体还可以包括工程化以优化稳定性、产生、纯化、产量或表达多肽的活性。在一个实施方式中,编码CTP修饰的FVII的核苷酸序列示于SEQ ID NO:4中。

[0338] 在一些实施方式中,在有效条件下培养转化细胞,其允许表达大量重组多肽。在一

些实施方式中,有效培养条件包括但不限于允许蛋白质产生的有效培养基、生物反应器、温度、pH和氧条件。技术人员会理解,术语“有效培养基”可以包括培养细胞以产生本文公开的重组多肽的任何培养基。在一些实施方式中,培养基通常包括具有可同化的碳、氮和磷酸盐源以及适当的盐、矿物质、金属和其它营养素例如维生素的水溶液。在一些实施方式中,本文公开的细胞可以在常规发酵生物反应器、摇瓶、试管、微量滴定皿和培养皿中培养。在一些实施方式中,培养在适合重组细胞的温度、pH和氧含量下进行。在一些实施方式中,培养条件在本领域普通技术人员的专业知识范围内。

[0339] 在一个实施方式中,培养条件包含约20-80%的溶解氧(DO)含量。在另一个实施方式中,DO含量为约20-30%。在另一个实施方式中,DO含量为约30-40%。在另一个实施方式中,DO含量为约40-50%。在另一个实施方式中,DO含量为约50-60%。在另一个实施方式中,DO含量为约60-70%。在另一个实施方式中,DO含量为约70-80%。

[0340] 在一个实施方式中,培养条件包括在一个温度下开始的pH并且在制备期间转变为另一个温度。在另一个实施方式中,pH在约7.3开始并在生物反应器温育期间转变为约6.7。在另一个实施方式中,pH在约7.3、约7.2或约7.1开始,并在生物反应器温育期间转变为约6.7、约6.8、约6.9或约7.0。

[0341] 在一些实施方式中,取决于用于生产的载体和宿主系统,本文公开的所得多肽保留在重组细胞内,或分泌到培养基中。

[0342] 在一个实施方式中,在培养的预定时间后,实现回收重组多肽。

[0343] 技术人员将理解,本文使用的短语“回收重组多肽”可以包括收集含有多肽的完整培养基,并且可以暗示分离或纯化的其它步骤。

[0344] 在一个实施方式中,使用多种标准蛋白质纯化技术纯化本文公开的多肽,例如但不限于亲和色谱,离子交换色谱,过滤,电泳,疏水相互作用色谱,凝胶过滤色谱,反相色谱,刀豆蛋白A色谱,羟基磷灰石色谱,色谱聚焦和差异溶解。

[0345] 在一个实施方式中,每个柱可以在受控或不受控制的温度下运行。

[0346] 在一个实施方式中,所有色谱步骤均以下流模式进行。在另一个实施方式中,所有色谱步骤以上流模式进行。

[0347] 在一个实施方式中,为了促进回收,可以工程化表达的编码序列以编码本文公开的多肽并与可裂解部分融合。在一个实施方式中,可以设计融合蛋白,使得可以通过亲和色谱容易地分离多肽;例如,通过固定在对可裂解部分特异的柱上。在一个实施方式中,在多肽和可裂解部分之间工程化裂解位点,并且通过用在该位点特异性裂解融合蛋白的适当酶或试剂处理,可以从色谱柱释放多肽[例如,参见Booth等,Immunol.Lett.19:65-70(1988);和Gardella等,J.Biol.Chem.265:15854-15859(1990)]。

[0348] 在一个实施方式中,本文公开的多肽以“基本上纯的”形式回收。本领域技术人员将理解,短语“基本上纯的”可包括允许在本文所述的应用中有效使用蛋白质的纯度。这种形式还可包括本文所公开的高糖基化(O-聚糖和/或N-聚糖)和高唾液酸化形式。在另一个实施方式中,这种形式可包括具有高百分比羧化谷氨酸残基的形式和/或低百分比氧化形式。在另一个实施方式中,本文公开的CTP修饰的FVII多肽可包含基本上纯净的和活性的形式的多肽。

[0349] 在另一个实施方式中,本文所述的CTP修饰的FVII/FVIIa的氧化百分比低于20%

被氧化。在另一个实施方式中,本文所述的CTP修饰的FVII/FVIIa的氧化百分比低于15％被氧化。在另一个实施方式中,本文所述的CTP修饰的FVII/FVIIa的氧化百分比低于10％被氧化。在另一个实施方式中,本文所述的CTP修饰的FVII/FVIIa的氧化百分比低于8％被氧化。在另一个实施方式中,本文所述的CTP修饰的FVII/FVIIa的氧化百分比低于5％被氧化。在另一个实施方式中,本文所述的CTP修饰的FVII/FVIIa的氧化百分比低于4％被氧化。在另一个实施方式中,本文所述的CTP修饰的FVII/FVIIa的氧化百分比低于3％被氧化。

[0350] 在一个实施方式中,氧化形式的减少和对氧化形式水平的控制在整个制备过程中从上游到最终的药物物质进行。

[0351] 在另一个实施方式中,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的纯度为至少40％。在另一个实施方式中,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的纯度为至少50％。在另一个实施方式中,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的纯度为至少60％。在另一个实施方式中,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的纯度为至少70％。在另一个实施方式中,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的纯度为至少75％。在另一个实施方式中,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的纯度为至少80％。在另一个实施方式中,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的纯度为至少85％。在另一个实施方式中,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的纯度为至少90％。在另一个实施方式中,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的纯度为至少91％。在另一个实施方式中,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的纯度为至少92％。在另一个实施方式中,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的纯度为至少93％。在另一个实施方式中,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的纯度为至少94％。在另一个实施方式中,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的纯度为至少95％。在另一个实施方式中,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的纯度为至少96％。在另一个实施方式中,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的纯度为至少97％。在另一个实施方式中,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的纯度为至少98％。在另一个实施方式中,所述基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽的纯度为至少99％。在进一步的实施方式中,纯度百分比选自由97.3％,97.6％,97.4％和97.0％组成的组。

[0352] 在一个实施方式中,本文公开的受试者是人受试者。在另一个实施方式中,受试者是驯养动物。在另一个实施方式中,受试者是宠物。在另一个实施方式中,受试者是哺乳动物。在另一个实施方式中,受试者是农场动物。在另一个实施方式中,受试者是猴子。在另一个实施方式中,受试者是马。在另一个实施方式中,受试者是牛。在另一个实施方式中,受试者是小鼠。在另一个实施方式中,受试者是大鼠。在另一个实施方式中,受试者是犬科动物。在另一个实施方式中,受试者是猫科动物。在另一个实施方式中,受试者是牛、绵羊、猪、马、鼠或鹿。在一个实施方式中,受试者是男性。在另一个实施方式中,受试者是女性。在一个实施方式中,受试者是儿童,在另一个实施方式中,青少年,在另一个实施方式中,是成年人,或者在另一个实施方式中,是老年受试者。在另一个实施方式中,受试者是儿科受试者,在另一个实施方式中,是老年受试者。

[0353] 在一个实施方式中,使用体外表达系统合成本文公开的CTP修饰的FVII多肽。在一个实施方式中,体外合成方法是本领域熟知的,并且该系统的组分是可商购的。

[0354] 在一个实施方式中,进行使用重组DNA技术以产生CTP修饰的因子VIIa。

[0355] 在一些实施方式中,合成和纯化重组多肽;它们的治疗功效可以在体内或体外测定。在一个实施方式中,可以使用各种测定法确定本文公开的CTP修饰的重组因子VII/VIIa的结合活性。

[0356] 在一个实施方式中,制备CTP修饰的因子VIIa的方法包括获得克隆并扩增所述克隆的步骤,所述克隆从所述WCB最佳地表达所述CTP修饰的因子VII。在另一个实施方式中,制备CTP修饰的因子VIIa的方法包括获得克隆并扩增所述克隆的步骤,所述克隆从所述MCB最佳地表达所述CTP修饰的因子VII。在另一个实施方式中,细胞克隆在溶液中通过一系列亚培养步骤扩增至生产生物反应器水平。在另一个实施方式中,将含有所述亚培养的克隆的溶液接种在生物反应器中。在另一个实施方式中,生物反应器是一次性生物反应器。在另一个实施方式中,生物反应器包括不锈钢生物反应器、摇摆运动生物反应器(rocking motion bioreactor)例如来自GE的Wave系统、灌注生物反应器,或本领域已知的任何其它生物反应器系统。在一个实施方式中,通过使用一次性过滤系统完成从生物反应器中去除细胞。如果进行大规模生产,可以在使用过滤系统之前使用连续离心。

[0357] 在一个实施方式中,通过以增加的生物反应器尺寸连续培养所述细胞直至达到所需的规模,进一步扩增或扩大细胞克隆。在另一个实施方式中,生物反应器以补料分批模式运行。在另一个实施方式中,生物反应器以分批模式运行。在另一个实施方式中,生物反应器以重复分批模式运行。在另一个实施方式中,生物反应器以灌注模式运行。

[0358] 峰值活细胞密度根据所用生物反应器的类型而不同。在一个实施方式中,本文公开的制备方法中使用的生物反应器的峰值活细胞密度为约0.2×10^6-1.4×10^6个细胞/ml。在另一个实施方式中,本文公开的制备方法中使用的生物反应器的峰值活细胞密度为约0.05×10^6-100×10^6。在另一个实施方式中,生物反应器的峰值活细胞密度为约0.05×10^6-0.5×10^6。在另一个实施方式中,生物反应器的峰值活细胞密度为约0.5×10^6-5×10^6。在另一个实施方式中,生物反应器的峰值活细胞密度为约5.0×10^6-50×10^6。在另一个实施方式中,生物反应器的峰值活细胞密度为约50×10^6-100×10^6。

[0359] 用于生物反应器的进料方案可以是不同的,例如,从某一天重复每日喂食,或在几天内固定,另外添加的饲料的百分比可以从几%到甚至50%或更多不同。

[0360] 如本领域已知的,可以将DMSO以不同浓度添加到生物反应器中。在一个实施方式中,在其使用期间将0.1-3%DMSO加入生物反应器中。在另一个实施方式中,加入0.1-0.5%DMSO。在另一个实施方式中,加入0.5-1.0%DMSO。在另一个实施方式中,加入1.0-1.5%DMSO。在另一个实施方式中,加入1.5-2.0%DMSO。在另一个实施方式中,加入2.0-2.5%DMSO。在另一个实施方式中,加入2.5-3.0%DMSO。

[0361] 在一个实施方式中,制备CTP修饰的因子VIIa的方法包括纯化和活化澄清的收获溶液以获得纯化的活性CTP修饰的FVII溶液的步骤。在另一个实施方式中,使用本文提供的方法制备的纯化蛋白质溶液包含至少5-95%CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,使用本文提供的方法制备的纯化蛋白质溶液包含至少5%CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,使用本文提供的方法制备的纯化蛋白质溶液包含至少10%CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,使用本文提供的方法制备的纯化蛋白质溶液包含至少20%CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,使用本文提供的方法制备的纯化蛋

白质溶液包含至少30％CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,使用本文提供的方法制备的纯化蛋白质溶液包含至少40％CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,纯化的蛋白质溶液包含至少50％CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,纯化的蛋白质溶液包含至少60％CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,纯化的蛋白质溶液包含至少70％CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,纯化的蛋白质溶液包含至少80％CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,纯化的蛋白质溶液包含至少90％CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,使用本文提供的方法制备的纯化蛋白质溶液包含至少95％CTP修饰的因子VII/VIIa。

[0362] 在一个实施方式中,澄清的收获物在2-25℃下保持24小时。在另一个实施方式中,澄清的收获物在至少5℃下储存长达一个月。

[0363] 在一个实施方式中,测试步骤中获得的澄清收获物的生物负载,细菌内毒素,特定蛋白质含量,残留DNA,病毒,病毒样颗粒和/或支原体,或其任何组合。

[0364] 在一个实施方式中,澄清收获物的纯化通过依次进行包括以下的步骤来完成:(g)浓缩、渗滤和纯化所述澄清的收获溶液,其中所述浓缩、渗滤和纯化通过中空纤维盒或切向流盒依次使所述澄清的收获溶液通过阴离子交换柱和疏水相互作用柱来完成;(h)获得以下步骤获得的所述澄清收获物;(i)通过在对所述病毒有毒的溶液中温育,灭活存在于所述澄清收获物中的病毒;(j)从(h)中获得所述澄清的收获溶液并浓缩、渗滤和纯化所述澄清的收获溶液,其中所述浓缩、渗滤、活化和纯化之后依次使所述澄清的收获溶液通过亲和柱、多模型或混合模式柱、疏水相互作用柱(HIC)和阴离子交换柱;(j)在步骤(i)之后获得所述澄清的收获溶液,并通过纳米过滤从病毒中物理除去所述澄清的收获溶液;(k)在步骤(j)之后获得所述澄清的收获溶液,并浓缩、渗滤和纯化所述澄清的收获溶液,以得到含有所述高糖基化形式的CTP修饰的FVII/FVIIa的最大纯化的澄清收获物。

[0365] 在一个实施方式中,CTP修饰的FVII在纯化期间被活化。在另一个实施方式中,CTP修饰的FVII在纯化后被活化。在另一个实施方式中,CTP修饰的FVII与任何纯化步骤同时被活化。

[0366] 在一个实施方式中,可以使用中空纤维药筒或等效的基于TFF的UFDF步骤进行超滤和渗滤以浓缩和过滤澄清的收获物。药筒标称分子量截止尺寸为10,000kDa。在另一个实施方式中,膜药筒可以符合PES/PS/RC膜,截止值为3kDa至30kDa。在另一个实施方式中,UFDF步骤可以在色谱步骤之间进行。在另一个实施方式中,UFDF步骤可以在使用阴离子交换柱之前进行。在另一个实施方式中,UFDF步骤可以在使用疏水相互作用色谱(HIC)之前进行。在另一个实施方式中,UFDF步骤可以在使用疏水相互作用色谱(HIC)之后进行。在另一个实施方式中,UFDF可以在多个步骤进行,例如UFDF可以在杂交后、在色谱步骤之间、或者作为通过纳米过滤除去病毒后的步骤进行,或其任何组合。

[0367] 在另一个实施方式中,阴离子交换柱是DEAE-Sepharose Fast Flow柱。在另一个实施方式中,DEAE柱纯化所述CTP修饰的因子VII/VIIa的高糖基化形式。在一个实施方式中,糖基化越高,CTP修饰的因子VII/VIIa的药效学越好。在另一个实施方式中,阴离子交换柱可包含本领域已知的其它阴离子交换柱,例如Capto DEAE阴离子交换柱或其它树脂如Eshmuno Q.

[0368] 在一个实施方式中,疏水柱是苯基疏水相互作用色谱(HIC)柱。苯基HIC的使用循

环数可在约1-10之间。在一个实施方式中,进行1-3个循环。在另一个实施方式中,进行1-5个循环。在另一个实施方式中,进行1-6个循环。在另一个实施方式中,进行1-7个循环。在另一个实施方式中,进行1-8个循环。在另一个实施方式中,进行1-9个循环。在另一个实施方式中,进行1-10个循环。在另一个实施方式中,使用本领域已知的缓冲液进行洗涤和洗脱。在一个实施方式中,洗脱缓冲液包含硫酸铵和丙二醇。在一个实施方式中,洗脱缓冲液包含硫酸铵和乙二醇。

[0369] 在一个实施方式中,羟基磷灰石混合模式柱包含陶瓷羟基磷灰石混合模式柱(CHT)。CHT的使用循环数可在约1-10之间。在一个实施方式中,进行1-3个循环。在另一个实施方式中,进行1-5个循环。在另一个实施方式中,进行1-6个循环。在另一个实施方式中,进行1-7个循环。在另一个实施方式中,进行1-8个循环。在另一个实施方式中,进行1-9个循环。在另一个实施方式中,进行1-10个循环。可以用约3-10个柱体积(CV)进行CHT柱的洗脱。在一个实施方式中,用约3个CV进行洗脱。在另一个实施方式中,用约4个CV进行洗脱。在另一个实施方式中,用约5个CV进行洗脱。在另一个实施方式中,用约6个CV进行洗脱。在另一个实施方式中,用约7个CV进行洗脱。在另一个实施方式中,用约8个CV进行洗脱。在另一个实施方式中,用约9个CV进行洗脱。在另一个实施方式中,用约10个CV进行洗脱。

[0370] 在一个实施方式中,由于污染而可能存在于澄清的收获物中的病毒在澄清的收获物中失活。在另一个实施方式中,使用1%Triton-X 100溶液灭活病毒。在另一个实施方式中,使用0.2至2%Triton-X 100溶液灭活病毒。在另一个实施方式中,使用0.5%Triton-X 100溶液灭活病毒。在另一个实施方式中,使用1-4%Triton-X 100溶液灭活病毒。在另一个实施方式中,使用0.2-0.5%Triton-X 100溶液灭活病毒。在另一个实施方式中,使用0.5-1.0%Triton-X 100溶液灭活病毒。在另一个实施方式中,使用2%Triton-X 100溶液灭活病毒。在另一个实施方式中,使用3%Triton-X 100溶液灭活病毒。在另一个实施方式中,使用4%Triton-X 100溶液灭活病毒。在另一个实施方式中,使用5-10%Triton-X 100溶液灭活病毒。在另一个实施方式中,Triton-X 100溶液中的病毒灭活持续约0.5至24小时。在另一个实施方式中,Triton-X溶液中的病毒灭活持续约0.5至1小时。在另一个实施方式中,Triton-X溶液中的病毒灭活持续约1至2小时。在另一个实施方式中,Triton-X溶液中的病毒灭活持续约2至3小时。在另一个实施方式中,Triton-X溶液中的病毒灭活持续约3至4小时。在另一个实施方式中,Triton-X溶液中的病毒灭活持续约4至6小时。在另一个实施方式中,Triton-X溶液中的病毒灭活持续约6至8小时。在另一个实施方式中,Triton-X溶液中的病毒灭活持续约8至10小时。在另一个实施方式中,Triton-X溶液中的病毒灭活持续约10至12小时。在另一个实施方式中,Triton-X溶液中的病毒灭活持续约12至24小时。

[0371] 本领域技术人员将理解,本领域可获得的并且对这些病毒有毒的其它浓度或其它溶液,包括但不限于胆酸钠和吐温80,可用于本文公开的方法中。在另一个实施方式中,在步骤(h)中使用磷酸三正丁酯(TNBP)和聚山梨醇酯80(吐温80)的混合物灭活病毒。

[0372] 在一个实施方式中,通过使用纳米过滤物理除去病毒。本领域技术人员将理解,本领域已知的用于去除病毒的任何过滤器可以应用于本文公开的方法中。在另一个实施方式中,使用Planova或Planova型滤筒(1-60mm^2)进行纳米过滤。在这些方法之后,使用本领域已知的方法确认来自澄清收获物的病毒清除。

[0373] 在一个实施方式中,本文公开的方法实现高糖基化的CTP修饰的因子VII/VIIa的

至少20％回收率。在另一个实施方式中,所述方法实现高糖基化的CTP修饰的因子VII/VIIa的至少5％、至少10％、至少15％、20％、至少25％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.9％回收率。

[0374] 在一个实施方式中,在高糖基化的CTP修饰的因子VII/VIIa的纯化后,本文公开的方法还包括表征所述CTP修饰的多肽。在另一个实施方式中,测定CTP修饰的因子VII/VIIa的纯度。在另一个实施方式中,测定糖基化含量。在另一个实施方式中,确定糖基化位点占据率。在一个实施方式中,在制备的CTP修饰的因子VII/VIIa中测定纯度、糖基化含量和糖基化位点占据率。

[0375] 在另一个实施方式中,将本文公开的方法中使用的细胞克隆储存在冷冻细胞库中。在另一个实施方式中,细胞克隆储存在冻干细胞库中。

[0376] 在另一个实施方式中,本文公开的方法和组合物的细胞库是主细胞库。在另一个实施方式中,细胞库是工作细胞库。在另一个实施方式中,细胞库是良好制造规范(GMP)细胞库。在另一个实施方式中,细胞库用于生产临床级材料。在另一个实施方式中,细胞库符合人类使用的调节实践。在另一个实施方式中,细胞库是本领域已知的任何其它类型的细胞库。

[0377] 在另一个实施方式中,“良好制造规范”由美国联邦法规的(21CFR210-211)定义。在另一个实施方式中,“良好制造规范”由用于生产临床级材料或供人消费的其它标准定义;例如美国以外的国家的标准。每种可能性代表本文公开的单独实施方式

[0378] 在另一个实施方式中,用于繁殖细胞的培养基含有甲氨蝶呤(MXT)。在另一个实施方式中,培养基是不含甲氨蝶呤的培养基。在另一个实施方式中,培养基中存在的MXT浓度为约0.1-2μM。在另一个实施方式中,培养基中存在的MXT浓度为约0.1-0.5μM。在另一个实施方式中,培养基中存在的MXT浓度为约0.5-1.0μM。在另一个实施方式中,培养基中存在的MXT浓度为约1.0-1.5μM。在另一个实施方式中,培养基中存在的MXT浓度为约1.5-2.0μM。应当充分理解,术语“培养基”可以包括适合于包含本文公开的CTP修饰的因子VII的细胞的生长或培养的液体或凝胶或粉末。这种培养基可以替代地称为“生长培养基”或“培养基”,并且可以包括但不限于营养培养基,富集培养基,基本培养基,差异培养基,运输培养基或选择性培养基。在另一方面,选择性培养基可适用于在制备过程中选择特定的一组细胞。

[0379] 在一个实施方式中,纯化的蛋白质溶液含有至少5-95％CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,纯化的蛋白质溶液含有至少5％CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,纯化的蛋白质溶液含有至少10％CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,纯化的蛋白质溶液含有至少15％CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,纯化的蛋白质溶液含有至少20％CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,纯化的蛋白质溶液含有至少30％CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,纯化的蛋白质溶液含有至少40％CTP修饰的因子VIIa。在另一个实施方式中,纯化的蛋白质溶液含有至少50％CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,纯化的蛋白质溶液含有至少60％CTP修饰的因子VIIa。在另一个实施方式中,纯化的蛋白质溶液含有至少70％CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,纯化的蛋白质溶液含有至少80％CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,纯化的溶液含有至少90-95％CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,

纯化的溶液含有95.1-99.9％CTP修饰的因子VII/VIIa。在另一个实施方式中,纯化的溶液含有100％CTP修饰的因子VII/VIIa。

[0380] 在一个实施方式中,制备的CTP修饰的凝血因子包含高％γ-羧化。技术人员会理解,凝血因子的百分比(％)γ羧化可能与CTP修饰的凝血因子的效力有直接关系。在一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含至少50％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含至少60％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含至少70％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含至少80％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含至少90％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含至少92％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含至少93％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含至少94％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含至少95％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含至少96％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含至少97％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含至少98％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含至少99％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含100％γ羧化。

[0381] 在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含40-50％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含50-60％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含60-70％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含70-80％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含80-85％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含85-90％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含90-92％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含90-95％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含95-97％γ羧化。在另一个实施方式中,FVII-CTP3或FVIIa-CTP3的％γ羧化包含95-100％γ羧化。

[0382] 在一个实施方式中,在本文公开的制备方法的多模式或混合模式色谱步骤中进行低γ羧化的去除(参见步骤9,图17)。

[0383] 在一个实施方式中,制备的CTP修饰的因子VII/VIIa是高糖基化的。本领域技术人员将充分理解,当提及CTP修饰的因子VII/VIIa时,术语“高糖基化”可包括总CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的约70-80％的糖基化水平。在另一个实施方式中,高糖基化的CTP修饰的因子VII/VIIa a具有至少70％的糖基化水平。在另一个实施方式中,高糖基化的CTP修饰的因子VII/VIIa a具有至少80％的糖基化水平。在另一个实施方式中,该术语可以包括总CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的约81-90％的糖基化水平。在另一个实施方式中,高糖基化的CTP修饰的因子VII/VIIa具有至少90％的糖基化水平。在另一个实施方式中,该术语可以包括总CTP修饰的因子VIIa多肽的约91-95％的糖基化水平。在另一个实施方式中,该术语可以包括总CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的约95.1-99％的糖基化水平。在另一个实施方式中,该术语可以包括总CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的100％的糖基化水平。高糖基化的CTP

修饰的因子VII/VIIa多肽在长效因子VII/VIIa的使用方法中可具有有益的性质,支持降低的施用频率。与重组因子VII/VIIa相比,高糖基化水平有助于CTP修饰的因子VII/VIIa(例如CTP修饰的因子VIIa)的显著增加的流体动力学体积。这可能导致CTP修饰的因子VIIa的循环时间延长。

[0384] 在一个实施方式中,每个CTP的O-聚糖的数量为至少4-6。在另一个实施方式中,每个CTP的O-聚糖的数量在4-6之间。在另一个实施方式中,每个CTP的O-聚糖的数量为至少4-8。在另一个实施方式中,每个CTP的O-聚糖的数量在4-8之间。在一个实施方式中,每个CTP的O-聚糖的数量为至少6-8。在一个实施方式中,每个CTP的O-聚糖的数量在6-8之间。在另一个实施方式中,每个CTP的O-聚糖的数量为至少4。在另一个实施方式中,每个CTP的O-聚糖的数量为至少5。在另一个实施方式中,每个CTP的O-聚糖的数量为至少6。在另一个实施方式中,每个CTP的O-聚糖的数量为至少7。在另一个实施方式中,每个CTP的O-聚糖的数量为8。

[0385] 在一个实施方式中,每个连接有一个CTP的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少4-6。在另一个实施方式中,每个连接有一个CTP的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少6-8。在另一个实施方式中,每个连接有一个CTP的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少4-8。在另一个实施方式中,每个连接有两个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少8-12。在另一个实施方式中,每个连接有两个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少12-16。在另一个实施方式中,每个连接有两个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少8-16。在另一个实施方式中,每个连接有三个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少12-18。在另一个实施方式中,每个连接有三个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少18-24。在另一个实施方式中,每个连接有三个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少12-24。在另一个实施方式中,每个连接有四个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少16-24。在另一个实施方式中,每个连接有四个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少24-32。在另一个实施方式中,每个连接有四个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少16-32。在另一个实施方式中,每个连接有五个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少20-30。在另一个实施方式中,每个连接有五个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量为至少30-40。在另一个实施方式中,每个连接有五个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少20-40。在另一个实施方式中,每个连接有六个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少24-36。在另一个实施方式中,每个连接有六个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少36-48。在另一个实施方式中,每个连接有六个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少24-48。在另一个实施方式中,每个连接有七个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少28-35。在另一个实施方式中,每个连接有七个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少42-56。在另一个实施方式中,每个连接有七个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少28-56。在另一个实施方式中,每个连接有八个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少32-48。在另一个实施方式中,每个连接有八个

CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少48-64。在另一个实施方式中,每个连接有八个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少32-64。在另一个实施方式中,每个连接有九个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少36-54。在另一个实施方式中,每个连接有九个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少54-72。在另一个实施方式中,每个连接有九个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少36-72。在另一个实施方式中,每个连接有十个CTP单元连接的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少40-60。在另一个实施方式中,每个连接有十个CTP单元连接的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少60-80。在另一个实施方式中,每个连接有五个CTP单元的CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的O-聚糖的数量是至少40-80。

[0386] 在一个实施方式中,每CTP的O-聚糖占据率为至少70%。在另一个实施方式中,每CTP的O-聚糖占据率为至少80%。在另一个实施方式中,每CTP的O-聚糖占据率为至少90%。在另一个实施方式中,每CTP的O-聚糖占据率为100%。

[0387] 在一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的高百分比的N-聚糖带电荷。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含至少40%。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含至少50%。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含至少60%。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含至少70%。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含至少80%。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含至少85%。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含至少90%。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含至少95%。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含100%。

[0388] 在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含约40%。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含约50%。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含约60%。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含约70%。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含约80%。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含约85%。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含约90%。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含约95%。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含约100%。

[0389] 在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含在约10%和30%之间。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比含量在约20%和40%之间。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含在约30%和40%之间。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含在约20%和50%之间。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含在约40%和50%之间。在另一个实施方式

中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含在约30％和60％之间。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含在约50％和60％之间。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含在约40％和70％之间。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含在约60％和70％之间。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含在约50％和80％之间。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含在约70％和80％之间。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含在约55％和85％之间。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含在约80％和85％之间。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含在约60％和90％之间。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含在约85％和90％之间。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含在约65％和95％之间。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含在约90％和95％之间。在另一个实施方式中,每个CTP修饰的FVII/FVIIa的带电荷N-聚糖的百分比包含在约95％和100％之间。

[0390] 在一个实施方式中,高水平的带电荷N-聚糖由本文公开的制备过程中的上游过程驱动。在另一个实施方式中,在早期DSP阶段达到更多60％的带电荷N-聚糖,并且保持该水平直至获得最终的药物物质。

[0391] 在一个实施方式中,高水平的带电荷N-聚糖由本文公开的制备过程中的上游过程驱动。在另一个实施方式中,在早期DSP阶段达到更多60％的带电荷N-聚糖,并且保持该水平直至获得最终的药物物质。

[0392] 在一个实施方式中,CTP修饰的因子VII/VIIa是高唾液酸化的。本领域技术人员应理解,当提及CTP修饰的因子VII/VIIa时,术语“高唾液酸化”可以包括总CTP修饰的因子VIIa多肽的约70-80％的唾液酸化水平。在另一个实施方式中,该术语可以包括总CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的约80-90％的唾液酸化水平。在另一个实施方式中,该术语可以包括总CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的约90-95％的唾液酸化水平。在另一个实施方式中,该术语可以包括总CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的约95.1-99％的唾液酸化水平。在另一个实施方式中,该术语可以包括总CTP修饰的因子VII/VIIa多肽的100％的唾液酸化水平。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VIIa中的O-聚糖结构包含单唾液酸化的核心1。

[0393] 在一个实施方式中,本文所述的CTP修饰的FVII/FVIIa的高百分比的唾液酸化和O-连接的聚糖含量增加CTP修饰的FVII/FVIIa的效力。在另一个实施方式中,本文所述的CTP修饰的FVII/FVIIa的高百分比的唾液酸化和O-连接的聚糖含量增加CTP修饰的FVII/FVIIa的流体动力学体积。

[0394] 在一个实施方式中,本文所述的CTP修饰的FVII/FVIIa具有效力。在另一个实施方式中,CTP修饰的FVII/FVIIa是基本上纯净的和活性的CTP修饰的FVII多肽。在另一个实施方式中,使用本文所述的方法制备CTP修饰的FVII/FVIIa。在另一个实施方式中,效力为至少5000U/mg。在另一个实施方式中,效力为至少7500U/mg。在另一个实施方式中,效力为至少10000U/mg。在另一个实施方式中,效力为至少10,500U/mg。在另一个实施方式中,效力为至少15000U/mg。在另一个实施方式中,效力为至少20000U/mg。在另一个实施方式中,效力

为至少25000U/mg。在另一个实施方式中,效力为至少27500U/mg。在另一个实施方式中,效力为至少30000U/mg。在另一个实施方式中,效力为至少35000U/mg。在另一个实施方式中,效力为至少40000U/mg。在进一步的实施方式中,效力选自由15,563U/mg,16,720U/mg,22,478U/mg和23,608U/mg组成的组。

[0395] 在一个实施方式中,CTP修饰的因子VII/VIIa多肽由连接至所述因子VII/VIIa的羧基末端的两个CTP和连接至所述因子VII/VIIa的氨基末端的一个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽组成。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII/VIIaα多肽由连接至所述因子VII/VIIa的羧基末端的一个绒毛膜促性腺激素羧基末端肽组成。

[0396] 在一个实施方式中,包含编码所述CTP修饰的因子VII/VIIa的编码部分的表达载体还包含启动子、所述CTP修饰的多肽的编码序列和多腺苷酸化序列。在一个实施方式中,多腺苷酸化序列是猿猴病毒(SV)40多腺苷酸化序列。

[0397] 在一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以30-1500mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少30mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少40mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少50mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少60mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少70mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少50-70mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少80mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少90mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少70-100mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少100mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少200mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少100-200mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少300mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少200-300mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少400mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少300-400mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少500mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少500-600mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少600mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少600-700mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少700mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少701-800mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少800mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少801-900mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少900mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少901-1000mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少1000mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少1001-1100mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少1100mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少1101-1200mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少1200mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少1201-1300mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少1300mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少1301-1400mg/L的水

平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少1400mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少1401-1500mg/L的水平表达。在另一个实施方式中,CTP修饰的因子VII以至少1500mg/L的水平表达。

[0398] 本领域技术人员应理解,术语“表达”可包括宿主细胞内异源核酸序列的转录和/或翻译。可以基于细胞中存在的相应mRNA或cDNA的量或者通过本实施例中所选序列编码的所需目的多肽/蛋白质的量来确定宿主细胞中所需目的产物/蛋白质的表达水平。例如,可以通过Northern印迹杂交,核糖核酸酶RNA保护,与细胞RNA的原位杂交或通过PCR来定量从所选序列转录的mRNA(参见Sambrook等,1989;Ausubel等,1987更新)。由所选序列编码的蛋白质可以通过各种方法定量,例如通过ELISA,通过蛋白质印迹,通过放射免疫测定,通过免疫沉淀,通过测定蛋白质的生物活性,通过蛋白质的免疫染色然后FACS分析(参见Sambrook等,1989;Ausubel等,1987更新),或通过均相时间分辨荧光(HTRF)测定。在一个实施方式中,CTP修饰的因子VIIa的定量包括使用反相高效液相色谱(RP-HPLC)。在另一个实施方式中,RP-HPLC包含C-18柱。在另一个实施方式中,RP-HPLC包含C-8柱。在另一个实施方式中,本文公开的方法使用RP-HPLC定量收获物中CTP修饰的因子VII(参见实施例3步骤2至5)。在另一个实施方式中,本文公开的方法使用RP-HPLC在纯化期间定量CTP修饰的因子VII。

[0399] 在另一个实施方式中,本文公开的细胞库或冷冻原种在解冻时表现出大于90%的存活率。在另一个实施方式中,储存是无限长的时间。

[0400] 在另一个实施方式中,储存持续2周。在另一个实施方式中,储存持续3周。在另一个实施方式中,储存持续1个月。在另一个实施方式中,储存持续2个月。在另一个实施方式中,储存持续3个月。在另一个实施方式中,储存持续5个月。在另一个实施方式中,储存持续6个月。在另一个实施方式中,储存持续9个月。在另一个实施方式中,储存持续1年。

[0401] 在另一个实施方式中,通过一种方法冷冻保存本文公开的细胞库或冷冻原种,所述方法包括在本文公开的定义培养基中培养细胞培养物,在包含甘油的溶液中冷冻培养物,并在-20摄氏度以下储存细胞克隆。在另一个实施方式中,温度为约-70摄氏度。在另一个实施方式中,温度为约-70至-80摄氏度。在另一个实施方式中,本文公开的任何定义培养基可用于该方法。每个定义培养基代表本文公开的单独实施方式。

[0402] 在本文公开的方法和组合物的另一个实施方式中,从细胞库接种培养物。在另一个实施方式中,从冷冻原种接种培养物。在另一个实施方式中,从起子培养物接种培养物。在另一个实施方式中,从菌落接种培养物。在另一个实施方式中,培养物在对数生长中期接种。在另一个实施方式中,培养物在大约对数生长中期接种。在另一个实施方式中,培养物在另一个生长期接种。

[0403] 在本文公开的方法和组合物的另一个实施方式中,用于冷冻的溶液包含DMSO的量为2-20%。在另一个实施方式中,该量为2%。在另一个实施方式中,该量为20%。在另一个实施方式中,该量为1%。在另一个实施方式中,该量为1.5%。在另一个实施方式中,该量为3%。在另一个实施方式中,该量为4%。在另一个实施方式中,该量为5%。在另一个实施方式中,该量为2%。在另一个实施方式中,该量为2%。在另一个实施方式中,该量为7%。在另一个实施方式中,该量为7.5%。在另一个实施方式中,该量为9%。在另一个实施方式中,该量为10%。在另一个实施方式中,该量为12%。在另一个实施方式中,该量为14%。在另一个实施方式中,该量为16%。在另一个实施方式中,该量为18%。在另一个实施方式中,该量为

22％。在另一个实施方式中,该量为25％。在另一个实施方式中,该量为30％。在另一个实施方式中,该量为35％。在另一个实施方式中,该量为40％。

[0404] 在另一个实施方式中,添加剂是蔗糖。在另一个实施方式中,添加剂是本领域已知的任何其它具有防冻性能的依数性添加剂或添加剂。每种可能性代表本文公开的单独实施方式

[0405] 在一个实施方式中,本文公开的方法和组合物中使用的冷冻溶液包含条件培养基和DMSO。在一个实施方式中,本文公开的方法和组合物中使用的冷冻溶液包含约46.255％条件培养基和7.5％DMSO。

[0406] 在一个实施方式中,通过本领域常规技术培养细胞培养物。在另一个实施方式中,在细胞培养物的生长过程中保持恒定的pH。在另一个实施方式中,pH维持在约7.0。在另一个实施方式中,pH为约6。在另一个实施方式中,pH为约6.5。在另一个实施方式中,pH为约7.5。在另一个实施方式中,pH为约8。在另一个实施方式中,pH为6.5-7.5。在另一个实施方式中,pH为6-8。在另一个实施方式中,pH为6-7。在另一个实施方式中,pH为7-8。

[0407] 在另一个实施方式中,在培养物生长期间保持恒定温度。在另一个实施方式中,温度保持在约37℃。在另一个实施方式中,温度为37℃。在另一个实施方式中,温度为25℃。在另一个实施方式中,温度为27℃。在另一个实施方式中,温度为28℃。在另一个实施方式中,温度为30℃。在另一个实施方式中,温度为32℃。在另一个实施方式中,温度为34℃。在另一个实施方式中,温度为35℃。在另一个实施方式中,温度为36℃。在另一个实施方式中,温度为38℃。在另一个实施方式中,温度为39℃。

[0408] 在另一个实施方式中,在培养物生长期间保持恒定的溶解氧浓度。在另一个实施方式中,溶解氧浓度保持在饱和度的20％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的15％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的16％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的18％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的22％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的25％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的30％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的35％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的40％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的45％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的50％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的55％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的60％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的65％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的70％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的75％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的80％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的85％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的90％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的95％。在另一个实施方式中,浓度为饱和度的100％。在另一个实施方式中,浓度接近饱和度的100％。

[0409] 在本文公开的方法和组合物的另一个实施方式中,培养物在最大体积为每个容器2升(L)的培养基中生长。在另一个实施方式中,培养基的最大体积为每个容器200ml。在另一个实施方式中,培养基的最大体积为每个容器300ml。在另一个实施方式中,培养基的最大体积为每个容器500ml。在另一个实施方式中,培养基的最大体积为每个容器750ml。在另一个实施方式中,培养基的最大体积为每个容器1L。在另一个实施方式中,培养基的最大体积为每个容器1.5L。在另一个实施方式中,培养基的最大体积为每个容器2.5L。在另一个实施方式中,培养基的体积为每个容器3L。在另一个实施方式中,培养基的体积为每个容器

5L。在另一个实施方式中,培养基的体积为每个容器至少5L。在另一个实施方式中,培养基的体积为每个容器至少10L。

[0410] 在另一个实施方式中,培养基的最小体积为每个容器2L。在另一个实施方式中,培养基的最小体积为每个容器500ml。在另一个实施方式中,培养基的最小体积为每个容器750ml。在另一个实施方式中,培养基的最小体积为每个容器1L。在另一个实施方式中,培养基的最小体积为每个容器1.5L。在另一个实施方式中,培养基的最小体积为每个容器2.5L。在另一个实施方式中,培养基的最小体积为每个容器3L。在另一个实施方式中,培养基的最小体积为每个容器4L。在另一个实施方式中,培养基的最小体积为每个容器5L。在另一个实施方式中,培养基的最小体积为每个容器6L。在另一个实施方式中,培养基的最小体积为每个容器8L。在另一个实施方式中,培养基的最小体积为每个容器10L。

[0411] 在另一个实施方式中,当培养物具有1×10^6个活细胞(VC)/ml的密度时,进行冷冻步骤。在另一个实施方式中,生物质为1.5×10^6VC/ml。在另一个实施方式中,生物质为1.5×10^6VC/ml。在另一个实施方式中,生物质为2×10^6VC/ml。在另一个实施方式中,生物质为3×10^6VC/ml。在另一个实施方式中,生物质为4×10^6VC/ml。在另一个实施方式中,生物质为5×10^6VC/ml。在另一个实施方式中,生物质为7×10^6VC/ml。在另一个实施方式中,生物质为9×10^6VC/ml。在另一个实施方式中,生物质为10×10^6VC/ml。在另一个实施方式中,生物质为12×10^6VC/ml。在另一个实施方式中,生物质为15×10^6VC/ml。在另一个实施方式中,生物质为20×10^7VC/ml。在另一个实施方式中,生物质为25×10^6VC/ml。在另一个实施方式中,生物质为30×10^7VC/ml。在另一个实施方式中,生物质为33×10^6VC/ml。在另一个实施方式中,生物质为40×10^6VC/ml。在另一个实施方式中,生物质为50×10^6VC/ml。在另一个实施方式中,生物质大于50×10^6VC/ml。

[0412] 在本文公开的方法和组合物的另一个实施方式中,将细胞培养物在液氮中快速冷冻,然后在最终冷冻温度下储存。在另一个实施方式中,培养物以更缓慢的方式冷冻;例如通过在最终储存温度下放入培养瓶中。在另一个实施方式中,通过本领域已知的用于冷冻细胞培养的任何其它方法冷冻培养物。

[0413] 本领域技术人员将理解,术语“细胞培养”和“组织培养”可互换使用,并且表示在体外、在液体培养基中的悬浮培养物中、或在提供有液体培养基的诸如玻璃、塑料或琼脂的表面上维持细胞。通常,“细胞培养”需要缓冲的培养基以维持恒定的合适pH。通常将细胞培养中使用的培养基配制成包括足够的必需营养素供应,并且可以根据所维持的特定细胞进行渗透调整,温度和气相也控制在合适的限度内。细胞培养技术是本领域熟知的。参见例如,Morgan等,1993,Animal Cell Culture,BIOS Scientific Publishers,Oxford,UK;和Adams,R.L.P.1990 Cell Culture for Biochemists,Second Edition,Elsevier。

[0414] 本领域技术人员将理解,术语“传代”可以包括传代培养细胞群的行为。本领域技术人员将理解,术语“传代培养”可以包括通过接种无菌培养基与来自先前培养物的样品而建立的细胞培养物,在一个实施方式中,所述无菌培养基是新鲜的无菌培养基。

[0415] 本领域技术人员还应理解,术语“细胞株”可以包括使用传代培养技术衍生自原代培养物的细胞群。因此,可以将原代培养物传代培养到两种或更多种新培养物中,并且以定期间隔重复传代培养数月以维持细胞株。可以使用已建立的细胞培养技术进行传代培养。

[0416] 在一个实施方式中,传代细胞株和永生化细胞系的特征在于其特定功能标志物如

角蛋白、激素和生长因子受体等的表达。

[0417] 在一些方面,培养物可以在具有添加的生长因子的无血清限定培养基中进行。在其它方面,培养基含有血清,有或没有添加的生长因子。这些修饰可以由技术人员凭经验确定,以优化细胞增殖。

[0418] 本领域技术人员应理解,术语“细胞系”可以包括衍生自单个外植体的细胞群,其特征在于具有体外无限增殖的潜力。基于其存活并在培养中继续生长的能力,可以从原代培养物中分离细胞系。已最初源自肿瘤组织的细胞系可能已在体内转化,尽管并非所有肿瘤细胞群都具有在体外无限生长的能力。此外,细胞系通常通过多轮分裂保持其分化特征。

[0419] 合适的细胞培养基质通常是可以灭菌的容器,不会浸出有毒因子并且不会使显微镜图像变形。因此,由玻璃和塑料形成的板是本文中合适的基材。可以使用本领域已知的技术进一步处理塑料容器以促进细胞附着(Ramsey等,1984In vitro 20:802)。合适的组织培养基通常由等渗的、缓冲的、基础营养培养基组成,其提供能量源,与无机盐、氨基酸、维生素和各种补充剂结合。补充剂可以包括血清(例如胎牛血清等)各种抗生素以防止污染或提供选择性条件、附着和生长因子等。许多培养基制剂是本领域已知的,例如但不限于最小必需培养基(MEM)、Rosewell Park Memorial Institute(RPMI)1640或Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)。合适的组织培养条件也是本领域已知的。参见例如,Morgan等,1993,Animal Cell Culture,BIOS Scientific Publishers Ltd.,Oxford,UK,和Adams,R.L.P.1990 Cell Culture for Biochemists,Second Edition,Elsevier。在本文公开的另一个实施方式中,CTP修饰的因子VIIa的制备方法是无血清方法。在本文公开的另一个实施方式中,CTP修饰的因子VIIa的制备方法是无动物源的方法。

[0420] 在本文公开的方法和组合物的另一个实施方式中,培养物的储存温度在-20和-80摄氏度(℃)之间。在另一个实施方式中,温度显著低于-20℃。在另一个实施方式中,温度不高于-70℃。在另一个实施方式中,温度为-70℃。在另一个实施方式中,温度为约-70℃。在另一个实施方式中,温度为-20℃。在另一个实施方式中,温度为约-20℃。在另一个实施方式中,温度为-30℃。在另一个实施方式中,温度为-40℃。在另一个实施方式中,温度为-50℃。在另一个实施方式中,温度为-60℃。在另一个实施方式中,温度为-80℃。在另一个实施方式中,温度为-30至-70℃。在另一个实施方式中,温度为-40至-70℃。在另一个实施方式中,温度为-50至-70℃。在另一个实施方式中,温度为-60至-70℃。在另一个实施方式中,温度为-30至-80℃。在另一个实施方式中,温度为-40至-80℃。在另一个实施方式中,温度为-50至-80℃。在另一个实施方式中,温度为-60至-80℃。在另一个实施方式中,温度为-70至-80℃。在另一个实施方式中,温度低于-70℃。在另一个实施方式中,温度低于-80℃。

[0421] 在另一个实施方式中,为了冷冻保存,将细胞缓慢冷冻直至它们在包含冷冻保护剂的培养基中达到低于-70℃的温度,然后将小瓶转移到液氮冷冻器中以将它们保持在低于-130℃的温度。

[0422] 在本文公开的方法和组合物的另一个实施方式中,冷冻保存或冷冻储存持续最多24小时。在另一个实施方式中,冷冻保存或冷冻储存持续最多2天,持续最多3天,持续最多4天,持续最多1周,持续最多2周,持续最多3周,持续最多1个月,持续最多2个月,持续最多3个月,持续最多5个月,持续最多6个月,持续最多9个月,或持续最多1年。上面列出的每种可能性是本文公开的实施方式。

[0423] 在另一个实施方式中,冷冻保存或冷冻储存持续最少1周,持续最少2周,持续最少3周,持续最少1个月,持续最少2个月,持续至少3个月,持续最少5个月,持续最少6个月,持续最少9个月,持续最少1年,持续最少1.5年,持续最少2年,持续最少3年,持续最少5年,持续最少7年,持续最少10年,或持续最少10年。上面列出的每种可能性是本文公开的实施方式。

[0424] 在本文公开的方法和组合物的另一个实施方式中,细胞在长时间冷冻保存或冷冻储存后的解冻后表现出生长。在另一个实施方式中,细胞在用来自细胞库或起始培养物的细胞接种新鲜培养基后的约15-22小时内表现出生长。在另一个实施方式中,细胞在用来自细胞库或起始培养物的细胞接种新鲜培养基后的约12-20小时内表现出生长。在一个实施方式中,为了确保存活率、遗传稳定性和表型稳定性,需要将细胞系维持在指数生长期(通过定期传代培养)。

[0425] 在另一个实施方式中,冷冻保存或冷冻储存的“延长期”是1个月。在另一个实施方式中,该时期是2个月。在另一个实施方式中,该时期为3个月。在另一个实施方式中,该时期是5个月。在另一个实施方式中,该时期是6个月。在另一个实施方式中,该时期是9个月。在另一个实施方式中,该期限为1年。在另一个实施方式中,该时期为1.5年。在另一个实施方式中,该时期为2年。在另一个实施方式中,该时期为2-7年。在另一个实施方式中,该时期持续至少7年。在另一个实施方式中,该时期持续至少10年。

[0426] 在另一个实施方式中,本文公开的方法和组合物的细胞在冷冻保存后的解冻后保持超过90%的存活率。在另一个实施方式中,在冷冻保存后的解冻后的存活率接近100%。在另一个实施方式中,解冻后的存活率接近90%。在另一个实施方式中,解冻后的存活率为至少90%。在另一个实施方式中,解冻后的存活率超过80%。

[0427] 在另一个实施方式中,本文公开的细胞库、冷冻原种或疫苗剂量批次在限定的细胞培养基中生长。此类培养基是本领域已知的,并且可包括但不限于Dulbecco改进的Eagle培养基(DMEM)(ATCC®30-2002),Iscove改进的Dulbecco培养基(IMDM)(ATCC®30-2005),Hybri-Care培养基(ATCC®No.46-X),McCoy 5A和RPMI-1640(ATCC®30-2007),Ham's营养混合物(ATCC®CCL-61™),PowerCHO™化学定义的无血清CHO培养基(Lonza Cat.No.12-771Q);或本领域已知的任何其它培养基。在另一个实施方式中,这些培养基可以补充抗生素或动物血清,这将由技术人员凭经验确定。

[0428] 在一个实施方式中,本文公开了生物反应器和方法,其允许以大规模体积培养哺乳动物细胞。此外,在另一个实施方式中,所述生物反应器和方法允许即使以大规模体积生长也在最佳条件下培养哺乳动物细胞,并因此允许工艺性能和产品质量不依赖于生物反应器的大小。生物反应器内温育的持续时间可以通过改变规模和生物反应器系统而变化,例如持续时间可以在8-9天之间,或者可以在15-16天之间。在另一个实施方式中,在生物反应器中温育的持续时间为约7天、约8天、约9天、约10天、约11天、约12天、约13天、约14天、约15天、约16天、约17天、约18天、约19天、约20天或更长时间。在另一个实施方式中,当使用灌注生物反应器时,温育的持续时间可长达7-120天。

[0429] 在另一个实施方式中,本文公开了大规模生物反应器,其允许在相同的环境中培养哺乳动物细胞,所述环境涉及诸如pH、溶解氧张力(DOT)和温度的工艺参数,以在生物反应器中维持良好混合的细胞悬浮液并混合营养物质。在另一个实施方式中,生物反应器是

一次性生物反应器。

[0430] 本文公开的方法通过提供生物反应器、生物反应器系统和用于培养真核细胞特别是哺乳动物细胞(根据权利要求)的方法,解决了本文公开的方法的技术问题。

[0431] 在一个实施方式中,生物反应器具有至少250升(L)的体积。在另一个实施方式中,生物反应器具有至少500L的体积。在另一个实施方式中,体积为至少1000L,至少2000L,至少5000L,至少10000L,至少12000L或至少15000L。

[0432] 在另一个实施方式中,细胞在增加体积的生物反应器中传代培养(参见实施例)。

[0433] 如本领域通常已知的,取决于所需的应用,本公开的经修饰的肽和蛋白质可以与标记、药物、靶向剂、载体和固体支持物等偶联。经修饰的生物制剂的标记形式可用于追踪其代谢归宿;用于此目的的合适标记尤其包括放射性同位素标记,例如碘131、锡99和铟111等。标记也可用于介导测定系统中修饰的蛋白质或肽的检测;在这种情况下,也可以使用放射性同位素以及酶标记、荧光标记和显色标记等。如果肽或蛋白质本身是靶向剂,例如抗体或受体配体,则使用这种标记是特别有用的。

[0434] 可以采用类似的连接技术以及其它技术将本发明的修饰的肽和蛋白质偶联到固体支持物上。当偶联时,这些修饰的肽和蛋白质然后可以用作亲和试剂,用于分离显示特定反应的所需组分。

[0435] 最后,本公开的修饰的肽和蛋白质可用于产生与这些新化合物特异性免疫反应的抗体。这些抗体可用于各种诊断和治疗应用,这取决于未修饰的肽或蛋白质的生物活性的性质。应理解,本公开提供了与本文所述的FVII或FVIIa免疫反应的抗体。在一个实施方式中,此类抗体可用于区分或鉴定由内源性凝血因子施用的CTP修饰的凝血因子。在另一个实施方式中,抗体可用于定位施用的CTP修饰的凝血因子。

[0436] 本领域普通技术人员在研究以下实施例后,其它目的、优点和新颖特征将变得显而易见,这些实施例不是限制性的。另外,上文描述的和下面的权利要求部分中要求保护的本文公开的各种实施方式和方面中的每一个在以下实施例中找到实验支持。

[0437] 实施例

[0438] 通常,本文使用的命名法和本发明中使用的实验室程序包括分子、生物化学、微生物学和重组DNA技术。这些技术在文献中有详尽的解释。参见例如,“Molecular Cloning:A laboratory Manual”,Sambrook等,(1989);“Current Protocols in Molecular Biology”第I-III卷,Ausubel,R.M.,编辑(1994);Ausubel等,“Current Protocols in Molecular Biology”,John Wiley和Sons,Baltimore,Maryland(1989);Perbal,“A Practical Guide to Molecular Cloning”,John Wiley&Sons,纽约(1988);Watson等,“Recombinant DNA”,Scientific American Books,New York;Birren等(编辑)“Genome Analysis:A Laboratory Manual Series”,第1-4卷,Cold Spring Harbor Laboratory Press,纽约(1998年);美国专利号4,666,828;4,683,202;4801531;5,192,659和5,272,057中所述的方法;“Cell Biology:A Laboratory Handbook”,第I-III卷,Cellis,J.E.,编辑(1994);“Culture of Animal Cells-A Manual of Basic Technique”,Freshney,Wiley-Liss,N.Y.(1994),第三版;“免疫学现行方案”,第I-III卷,Coligan J.E.,编辑(1994);Stites等(编辑),“Basic and Clinical Immunology”(第8版),Appleton&Lange,Norwalk,CT(1994);Mishell和Shiigi(编辑),“Selected Methods in Cellular Immunology”,

W.H.Freeman and Co.,纽约(1980);在专利和科学文献中广泛描述了可用的免疫测定法,参见例如,美国专利号3,791,932;3,839,153;3,850,752;3,850,578;3,853,987;3,867,517;3,879,262;3,901,654;3,935,074;3,984,533;3,996,345;4,034,074;4,098,876;4,879,219;5,011,771和5,281,521;"Oligonucleotide Synthesis"Gait,M.J.,编辑(1984);"Nucleic Acid Hybridization",Hames,BD和Higgins SJ,编辑(1985);"Transcription and Translation"Hames,BD和Higgins SJ,编辑(1984);"Animal Cell Culture"Freshney,R.I.,编辑(1986);"Immobilized Cells and Enzymes"IRL Press,(1986);"A Practical Guide to Molecular Cloning"Perbal,B.,(1984)和"Methods in Enzymology"第1-317卷,Academic Press;"PCR Protocols:A Guide To Methods And Applications",Academic Press,San Diego,CA(1990);Marshak等,"Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual"CSHL出版社(1996);所有这些都通过引用并入。在整个本文档中提供了其它一般参考文献。

[0439] 实施例1

[0440] FVII-CTP_3在FVIII缺陷型血友病小鼠中的可行性研究

[0441] 进行了测试FVII-CTP、FVII-CTP_2和FVII-CTP_3收获物PK曲线和凝固活性相对于商业FVII的研究。相对于FVII-CTP和FVII-CTP_2收获物或rhFVII,FVII-CTP_3表现出改善的PK曲线,同时保持其凝固活性。为了进一步表征FVII-CTP_3的体外和体内特性,产生了表达和分泌蛋白质的小稳定库,并开发了纯化和活化过程。

[0442] 在目前的研究中,在FVIII缺陷型小鼠中测试了FVIIa-CTP_3的药代动力学和药效学特性。评估蛋白质的PK曲线。建立基于FVIIa特异性活性的PK概况并与商业产品NovoSeven®进行比较。此外,测试了在尾部无效横切(存活研究)后FVIIa-CTP_3在FVIII缺陷小鼠中诱导凝固的长效体内止血能力。

[0443] 研究目标:

[0444] 在相似活性剂量的单次IV给药后,以评价FVIIa-CTP_3与商业rhFVIIa(NovoSeven®)在FVIII缺陷小鼠中的药物动力学和药效动力学参数。

[0445] 通过以相似活性剂量单次静脉内施用FVIIa-CTP_3和NovoSeven®,然后进行尾静脉横切的攻击,以确定FVIIa-CTP_3在FVIII缺陷型小鼠中保持稳态的体内能力(存活研究)。

[0446] FVII-CTP_3收获物的产生:

[0447] 使用pCI-DHFR载体使FgII-CTP_3在Dg44细胞中内部表达(图1)。在25ng/L维生素K3(Sigma)存在下,将稳定转染的库#71在摇瓶中培养。培养细胞悬浮液并在存活率下降至60-80%后收获。过滤收获物并在-70℃冷冻。

[0448] 收获物FVII抗原水平的测定:

[0449] 使用人FVII ELISA试剂盒(Zymotest HyPhen)测定FVII抗原水平(表1)。以每个合并的收获批次计算抗原水平。

[0450] 表1:FVII-CTP3抗原水平

[0451]

FVII 抗原水平			
	PK-PD 研究		存活研究
	收获物 31A	收获物 31B	收获物 38
Av (μg/ml)	16.0	15.9	16.6
STD	1.5	0.0	0.8
%CV	9.1	0.1	4.9

[0452] FVII-CTP_3纯化过程(图2A-2B)

[0453] 过程概要

[0454] 在短暂的纯化研究之后,进行使用2个柱的以下纯化过程。纯化VII-Select亲和柱(GE)和陶瓷羟基磷灰石1型(HA),40μm(Bio Rad),FVII-CTP_3γ-羧化富集蛋白。通过在2-8℃下在$CaCl_2$存在下温育纯化的FVII-CTP_3过夜以诱导自动活化。纯化过程处于其最终发育阶段并且正在优化,因此尽管大多数纯化步骤是相似的,但是两个批次中的一些部分纯化步骤不相同。

[0455] 使用10kDa中空纤维或Pellicon盒的超滤/渗滤(UFDF)

[0456] 将澄清的收获物在整个周末(2-3天)在4℃下解冻。

[0457] 在批次31中,使用截留分子量为10KDa的中空纤维筒(GE Healthcare Catalog# UFP-10-C-4X2MA)将澄清的收获物(12升)浓缩4倍(在两次连续运行中)。将浓缩的收获物用1-2倍体积的TBS(50mM Tris 150mM NaCl pH 7.4)进行渗滤。

[0458] 在批次38中,使用截留分子量为10KDa的Pellicon 2(Millipore)盒将澄清的收获物(8.5升)浓缩4倍。将浓缩的收获物直接加载到VII-Select柱上。

[0459] 两次超滤均在冰冷的缓冲液上进行。在加载之前将UFDF样品过滤0.22μm。

[0460] 在FVII-Select柱上捕获

[0461] 将UFDF或浓缩的收获物加载到用TBS pH 7.4预平衡的VII-Select柱(XK16/20,CV18ml)上。用50mM Tris-HCl,0.5M NaCl pH 7.5洗涤柱子,并用50mM Tris-HCl,1M NaCl 50%(v/v),丙二醇pH 7.5洗脱FVII-CTP_3。使用相同的柱在两个连续的循环中进行该过程。

[0462] 基于γ-羧基化的陶瓷羟基磷灰石柱分离

[0463] 用pH 6.8的10mM磷酸钠以1:10稀释洗脱的产物,并加载到陶瓷羟基磷灰石柱(XK16/20,CV 24ml)上。用pH 6.8的59mM磷酸钠洗涤柱子,并用pH 6.8的500mM磷酸钠洗脱因子VII的γ-羧化富集部分。该过程在同一柱子上以两个连续循环进行。在每批中,合并两个循环的洗脱液并浓缩至1.7-2mg/ml,并用20mM Tris-HCl,100mM NaCl pH 8.2进行渗滤以减少体积并制备用于活化步骤的材料。

[0464] FVII活化

[0465] 将纯化的FVII-CTP_3稀释至1mg/ml,并在20mM Tris-HCl、100mM NaCl和1mM $CaCl_2$pH 8.2中于2-8℃温育24小时。通过缓冲液交换(UFDF)至初步制剂缓冲液(20mM柠檬酸缓冲液,240mM NaCl,13.3mM甘氨酸,pH 6.9)以终止活化。

[0466] FVII-CTP_3和FVIIa-CTP_3分析性质:

[0467] SDS-PAGE和蛋白质免疫印迹

[0468] 使用Precision Plus双色蛋白质标记物(Bio-Rad)将纯化的FVII-CTP_3和FVIIa-

CTP_3加载到12％Tris-甘氨酸凝胶上。通过用考马斯亮蓝试剂染色凝胶进行SDS-PAGE考马斯分析(5或10μg蛋白质/泳道)。使用抗人FVII多克隆抗体(R&D系统;AF2338),抗人γ羧化单克隆抗体(American Diagnostics Catalog#499,3570)和抗CTP多克隆抗体进行蛋白质印迹分析(1μg蛋白质/泳道)。在还原条件下,FVII-CTP_3以75KDa迁移,并且FVIIa-CTP_3迁移为两个主要条带:50kDa的重链和25kDa的轻链,分别在图3A-3H中表示为条带2和3。

[0469] 纯化程序显著富集FVII-CTP3部分,同时减少杂质。纯化过程产率为25-30％FVII(根据ELISA)。纯化过程中损失的大部分蛋白质具有低FVII显色活性或无活性。基于考马斯染色的SDS-PAGE,还原的FVIIa-CTP_3含有超过预测的条带。迁移至约75kDa的条带代表未活化的FVII(图3A-3H,条带1)。该条带由两个具有较小MW差异的条带组成,这可能反映了不同的γ-羧化含量。观察到MW低于20kDa的其它条带。以前报道过这是重链的降解产物。

[0470] FVII-CTP_3显色活性:

[0471] 使用市售的显色活性测试试剂盒BIOPHEN(Hyphen BioMed 221304)进行FVII-CTP_3收获物、过程中级分和纯化的FVII-CTP_3对人库正常血浆的体外效力的比较评估。连续稀释FVII-CTP_3收获物和蛋白质,并通过比较剂量-反应曲线与正常人血浆的参照制剂来评估效力。在FVII-CTP_3纯化后,显色活性显著提高,且非活性级分主要通过HA柱分离(图4)。观察到FVII显色活性与蛋白质免疫印迹中单克隆抗Gla抗体检测FVII之间的强相关性。由收获的EC50值反映的FVII显色活性的效力受羧化和非羧化FVII级分两者的影响。在纯化和富集FVII-CTP_3 γ-羧化级分后,活性得到改善,证明γ-羧化对FVII活性的重要贡献(图4)。该参数对于正确的FVII体内活性是至关重要的,并且将在克隆开发程序中进一步解决。

[0472] 通过A280测定蛋白质

[0473] 使用ProtParam算法(http://web.expasy.org/protparam)计算FVIIa-CTP_3和NovoSeven®的理论消光系数。计算基于氨基酸序列。计算出的FVII-CTP_3和NovoSeven®的消光系数分别为1.186和1.406。这些值表示在280nm处1g/L的吸光度。

[0474] 两种蛋白质之间的消光系数差异仅源于FVIIa-CTP_3与NovoSeven®相比分子量的增加,因为CTP缺乏芳香族和半胱氨酸残基,因此对吸光度没有贡献。

[0475] 通过A280的蛋白质测定用于最终的FVII,并且用于纯化的过程中样品,从VII-Select柱的洗脱开始。

[0476] FVIIa抗原水平的测定

[0477] 使用人FVIIa ELISA试剂盒(IMUBIND,American Diagnostica)测定FVIIa抗原水平。以每批次计算抗原水平。然而,该工具对于确定注射剂量没有用,因为它不代表活性产物的量。

[0478] FVII-Staclot®VIIa-rTF的凝固测定

[0479] FVIIa衍生自单链FVII的链内裂解。天然组织因子(TF)是FVIIa的辅因子。在与TF结合后,FVII介导因子X至Xa的活化,同时其自身转化为FVIIa。可溶性组织因子是天然组织因子的细胞外部分。它不能再通过自动活化来活化FVII,但与组织因子结合的FVIIa可以活化FX至FXa。

[0480] 在该测定中使用的重组可溶性组织因子(rsTF)利用FVIIa特异性来构建FVIIa凝固测试。rsTF在FVIIa、钙和磷脂存在下导致血浆凝固,而不活化FVII至FVIIa。

[0481] 在该系统中观察到的凝固时间与测试样品中的FVIIa含量成反比关系,而样品中

没有FVII存在的干扰。

[0482] 该测定由Omri Laboratories(Nes-Ziona,Israel)进行。在每次研究之前,对重建后的NovoSeven®和FVIIa-CTP$_3$两者评估FVIIa活性。NovoSeven®活性与小瓶上报告的预期活性不相关,但差异可能是由于活性评估的方法不同。表39总结了每体积的FVIIa凝固活性,而没有考虑蛋白质浓度。

[0483] 表2:批次产物的FVIIa凝固活性

[0484]

	PK 研究		存活研究	

[0485]

	FVIIa-3*CTP (FVIIa 31)	NovoSeven®	FVIIa-3*CTP (FVIIa 38)	NovoSeven®
活性(U/ml)	1.3E+06	2.5E+05	1.3E+06	7.4E+05

[0486] FVIIa-CTP$_3$的比活性

[0487] 基于A280计算FVIIa比活性(其以活性/ml除以蛋白质浓度计算)并且在表3中给出。当比较两种不同MW的分子的比活性时,必须进行补偿以使活性标准化(即由于分子量差异,1mg NovoSeven®中活性位点的数量比FVIIa-CTP$_3$高1.185倍)。转换因子的计算如下式所示:

[0488]

$$\text{标准化}_SA = \frac{SA(FVIa\text{-}CTP_3)}{MW.(FVII\ \ CTP_3)} \times MW(\text{天然}_FVII) =$$

$$= \frac{SA(FVIIa\ \ CTP_3)}{53419.5Da} \times 45079.1Da = SA(FVIIa\text{-}CTP_3) * 1.185$$

[0489] 表3:与NovoSeven®相比的FVIIa-CTP$_3$比活性

[0490]

样品	平均A280	STDV (n=9)	%CV	消光系数	蛋白质浓度(mg/ml)	U/ml	比活性		从NovoSeven®的倍数降低
							U/mg蛋白质	U/mg FVIIa	
NovoSeven®	1.274	0.031	2.398	1.406	0.906	8.36E+05	9.23E+05	9.23E+05	1.0
FVIIa-CTP$_3$	4.396	0.092	2.094	1.186	3.706	7.23E+05	1.95E+05	2.31E+05	4.0

[0491] FVIIa-CTP$_3$PK-PD研究:

[0492] 研究概要

[0493] 将FVIIa-CTP$_3$和rhFVIIa(NovoSeven,NS)以6.4E6U/kg体重(160000U/动物)的剂量单次静脉内注射施用于C57B FVIII缺陷小鼠。在给药后0.166、0.5、2、4、8、12、24、34、48、58和72小时交替地从4只小鼠中逆行地抽取血液样品(表4)。取样后立即制备柠檬酸盐血浆(0.32%)并储存在-20℃直至分析。评估FVIIa凝固活性水平,并进行详细的PK分析。该研究由Omri Laboratories(Nes-Ziona,以色列)进行。

[0494] 表4:研究概要

[0495]

处理组	测试物品	动物/组/时间点的编号	给药途径	单位/动物的量	注射体积(μl)	时间点(给药后小时数)
A	rhFVIIa	4	IV	1.6e5	200	0(给药前)0.166、0.5、2、4、8、12、24、34、48、58、72
B	FVIIa-CTP$_3$	4	IV	1.6e5	200	0(给药前)0.166、0.5、2、4、8、12、24、34、48、58、72

[0496] FVIII缺陷小鼠中的FVIIa-CTP$_3$PK谱

[0497] 使用Staclot®VIIa-rTF试剂盒(Stago,Parsippany,NJ)定量血液样品中的FVIIa活性。计算每种蛋白质的药代动力学曲线,并代表每个时间点4只动物的平均值。图5显示了整个实验中FVIIa的PK曲线。表6中显示了FVIIa回收率。表7中显示了PK参数的总结。

[0498] 表5总结了施用NovoSeven®或FVIIa-CTP$_3$后的凝固活性值。FVIIa-CTP$_3$和NovoSeven®在给药后半小时达到最大活性。NovoSeven®的最高活性值仅达到FVIIa-CTP$_3$最大活性值的43%。FVIIa-CTP$_3$凝固活性维持较长时间,表现出延长的活性。NovoSeven®处理的小鼠的凝固活性在晚于12小时的时间点不可测,而FVII-CTP$_3$处理的小鼠在给药后48小时继续保持可测量的活性(表5和图5)。

[0499] 向FVIIa添加三个串联CTP拷贝使得回收率提高100%(表6),如通过给药后的最高活性测量并与基于体外分析的预期活性相比,并且增加半衰期和平均保留时间(MRT)5倍。暴露时间(AUC)增加3倍(表7)。

[0500] 表5:单次IV注射后的FVIIa凝固活性

[0501]

施用后时间(小时)	平均 FVIIa 凝固活性(U/ml)	
	FVIIa-CTP$_3$	NovoSeven®

[0502]

0.16	6.8E+07	3.2E+07
0.5	9.7E+07	4.3E+07
2	2.1E+07	3.9E+06
4	7.7E+06	7.3E+05
8	2.7E+06	4.2E+04
12	3.7E+05	6.2E+03
24	2.4E+04	BLQ
34	4.6E+03	BLQ
48	1.5E+03	BLQ

[0503] 表6:FVIIa-CTP3回收率

[0504]

处理组	测试物品	单位/动物的量	实际施用剂量(U/ml)	*预期的Cmax(U/ml血液)	Cmax(U/ml)	%回收率
A	rFVIIa	1.60E+05	1.20E+06	1.40E+05	4.25E+04	**30**
B	FVIIa-CTP$_3$	1.60E+05	1.29E+06	1.50E+05	9.74E+04	**64.6**

[0505] *预期的Cmax来源于施用剂量除以血体积

[0506] 表7:FVIIa-CTP$_3$与NovoSeven®的PK参数

[0507]

PK 参数	NovoSeven®	FVIIa-CTP$_3$
半衰期-$_\alpha$ (0.5-12hr)	**0.94**	1.57
半衰期-$_\beta$ (12-48hr)	NA	**4.62**
AUC (mU*hr/ml)	5.80E+07	1.80E+08
Vd/Kg (ml/Kg)	1408	2375
CL/Kg (ml/hr/Kg)	1034	356
MRT (hr)	1.3	6.7

[0508] 凝血酶产生测定(TGA)

[0509] 凝血酶的产生是凝血级联的基本部分,因此对特定个体能产生凝血酶的程度的估计可能与出血或血栓形成的风险相关。分析凝血酶产生时常用的变量包括:滞后时间,凝血酶产生峰值的时间,峰值,内源性凝血酶潜能[ETP](即曲线和尾部下的面积),血栓形成的时间过程("TG")。在滞后时间后,观察到凝血酶的爆发。然而,凝血发生在滞后时间结束时,此时尚未形成超过95%的所有凝血酶。凝血酶产生测定在Omri Laboratories使用补充有人血友病血浆的凝血酶镜试剂进行。TGA反映了小鼠血浆中的凝血能力,来源于注射NovoSeven®和FVIIa-CTP$_3$。图6A-6C显示了施用FVIIa-CTP$_3$或NovoSeven®后小鼠血浆的TGA参数值。在施用FVIIa-CTP$_3$后,所有三个参数(凝血酶产生速率,产生的凝血酶和KIIa的最大量)证明了FVII-CTP$_3$优于NovoSeven®治疗的优势。与NovoSeven®相比,这进一步强化了FVII-CTP$_3$潜在的长效优势的概念。

[0510] FVIIa-CTP3尾静脉横切(TVT)研究:

[0511] 研究概要

[0512] 从FVIIa-CTP$_3$的PK/PD测试获得的数据提供了对FVIIa-CTP$_3$的功能性的了解,并且证明了与NovoSeven®相比,FVIIa-CTP$_3$具有药代动力学优势。然而,在创伤事件之后,蛋白质在体内诱导凝块的能力尚未得到证实。为了评估FVIIa-CTP$_3$止血的能力,使用相同的FVIII缺陷小鼠模型进行出血攻击。

[0513] 向FVIII缺陷小鼠施用单次静脉内注射FVIIa-CTP$_3$或NovoSeven®。按照在FVIIa凝块活性测定中评估的每种药物的效力计算,给予小鼠药物,其量提供相等的FVIIa活性(1.6E05单位,200μl)(表8)。由于FVIIa-CTP3的活性降低,施用剂量为9mg/kg的NovoSeven®和40mg/kg的FVII-CTP$_3$。对照组注射200μl载体。

[0514] 尾静脉在施用后15分钟(注射1),24小时(注射2)或48小时(注射3)从尾尖横切2.7cm,记录小鼠存活24小时。

[0515] 表8:注射样品的评估

[0516]

	NovoSeven®			*FVIIa-CTP$_3$*			
注射编号	蛋白质浓度(mg/ml)	活性(U/ml)	比活性(U/mg)	蛋白质浓度(mg/ml)	活性(U/ml)	比活性(U/mg)	比活性(标准化)

[0517]

1	0.91	8.0E+05	8.8E+05	3.63	6.6E+05	1.8E+05	2.2E+05
2	0.92	8.3E+05	9.0E+05	3.81	7.8E+05	2.0E+05	2.4E+05
3	0.89	8.8E+05	9.9E+05	3.68	7.3E+05	2.0E+05	2.3E+05

[0518] 通过A280测定蛋白质浓度。

[0519] 结果

[0520] 对来自注射媒介物的对照组的三次注射(5只动物×3次注射)的数据进行总结,并示于图7A-7D中。尾静脉横切后24小时观察到30%的存活率。

[0521] 在施用FVIIa后15分钟进行尾静脉横切后,NovoSeven®和FVIIa-CTP$_3$处理的小鼠表现出适当的止血活性。在FVIIa-CTP$_3$和NovoSeven®处理的动物中观察到100%存活率(图7A-7D)。

[0522] 在施用后24小时进行尾静脉横切后,在PK/PD研究中证实的FVII-CTP$_3$的清除率降低最清楚。观察到NovoSeven®的存活率下降。与对照组相似,在10小时内观察到50%死亡。同时,90%的FVIIa-CTP$_3$处理的小鼠存活(图7A-7D)。该结果强调了FVIIa-CTP$_3$治疗的长效功效。

[0523] 施用后48小时,在用FVIIa-CTP$_3$或NovoSeven®处理的组中证实存活率下降(图7C)。观察到FVIIa-CTP小鼠略有改善,但差异未达到统计学显著性。

[0524] 讨论:

[0525] CTP与重组蛋白的融合延长了蛋白质的循环半衰期,同时保持了相当的活性。虽然在肾清除率方面很好地理解了蛋白质清除率降低到70KDa阈值以上的机制,但在CTP融合后实现了额外的保护。据信CTP融合扫过蛋白质屏蔽并保护其免受蛋白水解裂解,以由于高负电荷而增加其径向分子量并降低其对肝清除受体的亲和力。

[0526] 本研究旨在提供关于CTP融合至FVII对蛋白质半衰期和清除的影响的具体见解,并且还解决了在该修饰后其特定活性的范例。向FVIII缺陷小鼠施用相似剂量(基于单位)的单次IV注射FVIIa-CTP$_3$或重组商业FVIIa(NovoSeven®),并进行基于PK活性的分析。FVIIa-CTP$_3$表现出优异的寿命,反映为其半衰期和AUC分别增加了5倍和3.5倍。通过Staclot活性试剂盒计算的FVIIa-CTP的比活性(U/mg)除以通过A280测量的蛋白质浓度显示为比NovoSeven®的比活性低4-5倍。

[0527] 为了建立对CTP如何影响体内FVIIa的止血作用的理解,研究了FVIIa-CTP$_3$减少出血的能力。在血友病小鼠模型的尾静脉横切出血模型中,rFVIIa施用可以提高受攻击动物的存活率并避免其出血至死亡。在本文所述的研究中,向动物施用FVIIa-CTP$_3$或NovoSeven®。当在给药后0.25小时进行横切时,两种分子都能够维持体内平衡。当在给药后24小时进行尾部横切时,证实了FVIIa-CTP$_3$处理组的活性持续时间显著延长。载体治疗组的存活率高于预期,并高于先前研究中获得的存活率(50%对比于先前研究中的20%,数据未显示)。在较早的时间点,包括在给药后36小时,进一步评估处理动物的存活百分比。

[0528] 总之,证实了FVIIa-CTP$_3$与NovoSeven®相比在血友病小鼠中具有增加的活性持续时间,其转化为更长的止血效果持续时间。收集的数据表明,CTP与FVII的融合是一项有可能显著改善血友病患者预防性治疗的技术。

[0529] 实施例2

[0530] MOD-5014相对于商业重组hFVIIa的生化特性-羧基末端肽(CTP)对因子VIIa活性的影响

[0531] 项目理由和总结

[0532] 设计这些研究以评估MOD-5014相对于商业重组hFVIIa(本文中称为MOD-5000)的生化特性。

[0533] 研究检查:

[0534] • MOD-5014的合成底物裂解

[0535] • 通过合成底物裂解测量的MOD-5014的组织因子(TF)结合

[0536] • 通过因子X(FX)活化测量的MOD-5014的TF结合

[0537] • TF结合的MOD-5014对FX活化的动力学

[0538] • 通过FX活化测量的MOD-5014的脂质结合

[0539] • 脂质结合的MOD-5014对因子活化的动力学

[0540] • 抗凝血酶(AT)对MOD-5014的灭活

[0541] • TFPI对MOD-5014的灭活

[0542] 总的数据表明,相对于MOD-5000,MOD-5014具有类似的作用机制,具有略微降低的催化活性。这些结果表明TF结合的MOD-5014的活性略微降低,并且有些活性更多降低,与TF无关。

[0543] 这些效果主要通过反应速率而不是反应程度来反映,并且可以测量整个时间过程的反应以确实完成。

[0544] AT抑制率略微降低表明MOD-5014体内半衰期延长,具有适当的抑制反应。

[0545] 实验材料

[0546] • MOD-5014GMP-1:2.5mg/ml(基于A280)

[0547] • NovoSeven批号#CU60430:0.943mg/ml(基于A280),称为MOD-5000。

[0548] mod-5014的合成底物裂解

[0549] 基本原理:合成底物的裂解应完全取决于功能活性位点的可用性。

[0550] 方法:将MOD-5000和MOD-5014以摩尔基准稀释至相等浓度。然后将相同的浓度加入到固定浓度的底物Pefachrome FVIIa(甲基磺酰基-D-环己基丙氨酰基-2-氨基丁酰基-精氨酸-对硝基苯胺)中,并通过出现黄色来监测底物的裂解。

[0551] 结果

[0552] 浓度:FVIIa 360nM;底物500μM

[0553] 分析:使用已知的消光系数将405nm处的吸光度转换为对硝基苯胺的浓度。将硝基苯胺的浓度相对于时间作图,以确定底物裂解速率。

[0554] 数据拟合于:

[0555] 速率$=k_1$[VLIa]

[0556] $k_1=27.5$mol pNA/min/mol VIIa

[0557] 结论:以摩尔计,MOD-5000和MOD-5014具有相同的底物裂解速率(图8)。对于后续研究,底物裂解的测量用作稀释和移液的对照。

[0558] 通过合成底物裂解测量的mod-5014的Tf结合

[0559] 基本原理:当因子VIIa结合TF时,在因子VIIa中发生构象变化,这导致底物裂解速

率的增加。这意味着增加的底物裂解可用于监测因子VIIa与TF的结合。

[0560] 方法:将不同浓度的MOD-5000和MOD-5014加入到固定浓度的TF并温育5分钟。加入底物(Pefachrome FVIIa)。通过出现黄色在405nm处监测底物裂解。

[0561] 结果:

[0562] 浓度:FVIIa 0-25nM;TF 8.7nM;底物500μM

[0563] 分析:由于TF的浓度远高于预期的Kd,在低浓度下,所有FVIIa都应与TF结合。底物裂解的速率将是VIIa/TF复合物的裂解速率。一旦FVIIa的浓度超过TF的浓度,底物裂解的速率应降至游离FVIIa的速率。由于FVIIa和TF形成1:1摩尔复合物,因此发生底物裂解速率变化的FVIIa浓度是对FVIIa估计浓度的检查。

[0564] 数据拟合于:

[0565] 速率$=k_1[VIIa]+k_2[VIIa/TF]$

[0566]

	MOD-5000	MOD-5014	
k_1	27.5	27.5	mol pNA/min/mol VIIa
k_2	365	357	mol pNA/min/mol VIIa/TF

[0567] 结论:MOD-5000(Novoseven)和MOD-5014在预期的TF浓度(8.7nM)下显示相同的拐点(图9)。这证实了通过底物裂解预测的MOD-5000和MOD-5014的摩尔浓度是正确的。当与TF(98%)结合时,MOD-5014相对于TF-5000具有非常低的底物裂解速率(图9)。

[0568] 通过因子x活化测量的mod-5014的Tf结合

[0569] 基本原理:相对于FVIIa/TF复合物的裂解,FVIIa对FX的裂解是缓慢的。因此,可以通过测量FX活化速率来评估FVIIa与TF的结合。

[0570] 方法:将不同浓度的MOD-5000和MOD-5014加入固定浓度的TF中并测量FX活化速率。通过裂解合成底物Pefachrome FXa(甲氧基羰基-D-环己基丙氨酰-甘氨酰-精氨酸对硝基苯胺)来评估因子X的活化。通过标准曲线将合成底物的裂解转化为FXa浓度。FVIIa和FVIIa/TF都不能以可观的速率裂解FX底物。

[0571] 结果

[0572] 浓度:FVIIa 0-2nM;TF 10pM;FX 135nM;底物500μM

[0573] 血浆中因子X浓度为8μg/mL(~135nM)。

[0574] 分析:当FVIIa与TF结合时,FX活化速率应该增加。一旦所有TF被FVIIa饱和,FX活化速率将达到最大值(图10)。

[0575] 数据拟合于:

[0576] $$v=V_{max}\frac{[VIIa]^n+[TF]+K_d{}^n-\sqrt{([VIIa]^n+[TF]+K_d{}^n)^2-4[VIIa]^n[TF]}}{2[TF]}$$

[0577]

	MOD-5000	MOD-5014	
V_{max}	1.40	1.30	nM FXa/min
K_d	3.3	3.0	pM
希尔值	0.93	0.91	

[0578] 结论:FVIIa与TF的结合存在非常轻微的负协同性(Hill值<1)。这与MOD-5000和MOD-5014相同。当与TF结合时,MOD-5014相对于MOD-5000具有略微降低的FX活化速率(93%)。MOD-5014对TF的亲和力等同于MOD-5000的亲和力(图10)。

[0579] FX活化速率根据FX浓度的变化

[0580] 基本原理:当与TF结合时,MOD-5014活化速率略微降低可能是FXa亲和力降低或FX与复合物结合后转化率降低的结果。测量FX活化速率根据FX浓度的变化确定了复合物的动力学参数。

[0581] 方法:将不同浓度的FX与固定浓度的FVIIa/TF复合物一起温育。

[0582] 通过裂解合成底物(Pefachrome FXa)来评估因子X活化。通过标准曲线将合成底物的裂解转化为FXa浓度。

[0583] 结果

[0584] 浓度:FVIIa 1nM;TF 5pM;FX 0-1500nM;底物500μM

[0585] 分析:随着更多FX的添加,更多的FVIIa/TF复合物应具有FX结合直到所有FVIIa/TF复合物已结合FX的点。此时,反应受到FX活化速率的限制。因此,FX活化速率应该随着FX浓度的增加而增加,曲线的形状渐近接近最大速率(图123)。

[0586] 数据拟合于:

[0587] $$v = V_{max}\left(\frac{[S]}{K_m + [S]}\right)$$

[0588]

	MOD-5000	MOD-5014	
V_{max}	1.78	1.64	nM FXa/min
K_m	140	120	nM

[0589] 结论:当与TF结合时,MOD-5014相对于MOD-5000具有略微降低的FX转化率(92%)。FX与MOD-5014/TF复合物的结合与其与MOD-5000/TF复合物的结合相同(图11)。

[0590] 通过FX活化测量的MOD-5014的脂质结合

[0591] 基本原理:血小板上的因子X活化被认为有助于FVIIa的止血作用。认为这种血小板活性发生在低TF环境中或没有TF下。可以在脂质囊泡上研究没有TF下的因子X活化。

[0592] 方法:FVIIa对脂质的因子X活化是根据酶(FVIIa)和蛋白质底物(FX)结合。脂质比为PC:PE:PS 41:44:14,旨在模拟高活化血小板的组成。将脂质制备成大的单层囊泡(200nm)。将增加浓度的囊泡加入FVIIa和FX。通过裂解合成底物(Pefachrome FXa)来评估因子X活化。通过标准曲线将合成底物的裂解转化为FXa浓度。

[0593] 结果

[0594] 浓度:FVIIa 20nM;FX 500nM;脂质0-1000μM;底物500μM。

[0595] 分析:将FXa产生的速率相对于脂质囊泡的浓度作图(图12A)。正如预期的那样,FXa的产生随着脂质浓度的增加而增加,因为更多的表面积可用于反应。在足够高浓度的脂质下,随着FVIIa和FX分离到不同的脂质囊泡上,反应速率降低。此模板响应可用于此系统。数据未拟合于等式,所示的线仅供视觉参考。MOD-5000和MOD-5014之间FXa产生速率的差异不是由于对脂质的亲和力差异。这显示在图12B中,其中将相对于每种的最大值的FXa产生速率相对于脂质浓度作图。

[0596] 结论:相对于MOD-5000,在没有TF下MOD-5014的FX活化速率较低(~60%)。MOD-5014对脂质的亲和力与MOD-5000相同。

[0597] 脂质结合的MOD-5014活化FX的动力学

[0598] 基本原理:相对于MOD-5000,在没有TF下MOD-5014的FX活化速率降低可能是FXa亲

和力降低或FX与脂质表面上的酶结合后转化率降低的结果。

[0599] 方法:将改变的FX浓度与固定浓度的FVIIa和脂质囊泡一起温育。通过裂解合成底物(Pefachrome FXa)来评估因子X活化。通过标准曲线将合成底物的裂解转化为FXa浓度。

[0600] 结果

[0601] 浓度:FVIIa 20nM;FX 0-2500nM;脂质100μM;底物500μM。

[0602] 分析:随着添加更多FX,脂质表面上的更多FVIIa应具有FX结合直到所有FVIIa与FX结合的点。此时,反应受到FX活化速率的限制。因此,FX活化速率应随着FX浓度的增加而增加,曲线的形状渐近接近最大速率。正如预期的,在没有TF下FVIIa对FX的亲和力降低(更高的Km),并且在没有TF下FXa产生的速率降低(图13)。

[0603] 数据适合于:

[0604] $$v=V_{max}\left(\frac{[S]}{K_m+[S]}\right)$$

[0605]

	MOD-5000	MOD-5014	
V_{max}	0.253	0.115	nM FXa/min
K_m	878	848	nM FXa/min

[0606] 结论:相对于MOD-5000,在没有TF下MOD-5014的脂质表面上FX活化速率较低(45%)。FX与MOD-5014在脂质表面上的结合与其与MOD-5000的结合相同(图13)。

[0607] AT对MOD-5014的失活

[0608] 基本原理:体内FVIIa清除的重要部分被认为是通过与AT形成FVIIa复合物。当FVIIa与TF结合时,该反应的速率可在体外测量。为了以可测量的速率进行,体外反应还需要高浓度的肝素,其被认为模拟天然存在的糖胺聚糖的作用。

[0609] 方法:将因子VIIa与TF一起温育以允许形成复合物。将复合物与AT和肝素一起温育。通过加入聚凝胺(溴化己二甲铵)以中和肝素,从而定时间隔停止反应。通过裂解合成底物(Pefachrome FVIIa)测量残留的FVIIa/TF活性。在测定中使用的浓度下,聚凝胺不会改变底物裂解。

[0610] 结果

[0611] 浓度:FVIIa 10nM;TF 11nM;AT 1μM;肝素5U/mL;FVIIa/TF 8.2nM;凝聚胺100μg/mL;底物500μM。

[0612] 分析:将FVIIa/TF的浓度(以底物裂解速率测量)相对于以分钟计的时间作图(图14)。如所预期的,AT/肝素抑制FVIIa,导致FVIIa/TF活性的丧失。

[0613] 数据拟合于:

[0614] $v=V_{t=0}e^{-k\cdot时间}$

[0615]

	MOD-5000	MOD-5014	
V_0	11.89	11.93	
k	0.354	0.217	min^{-1}

[0616] 结论:在T=0时活性的类似值表明反应中存在等量的MOD-5000和MOD-5014。与MOD-5000相比,MOD-5014的抑制稍微缓慢(62%)(图14)。两种反应都进行到完全抑制。

[0617] TFPI对MOD-5014的灭活

[0618] 基本原理:TFPI是FVIIa/TF复合物的生理抑制剂。TFPI的K2结构域与FXa形成初始

复合物。该复合物结合FVIIa/TPI,其中TFPI的K1结构域与FVIIa相互作用。因此,FVIIa/TF的FX活化应导致抑制的复合物和FVIIa-TFPI的关闭。

[0619] 方法:将因子VIIa和TF一起温育以形成复合物。将该复合物添加到TFPI/FX/FXa底物中。通过裂解合成底物(Pefachrome FXa)来评估因子X活化。通过标准曲线将合成底物的裂解转化为FXa浓度。

[0620] 结果

[0621] 浓度-抑制:FVIIa 1nM;TF 20pM;FX 135nM;TFPI 0-5nM;底物500μM。

[0622] 分析:如所预期的,在所有反应中初始FXa产生以相同的速率发生(图15A-C)。在存在TFPI的情况下,随着FFPII/TFPI复合物被TFPI/FXa抑制,FXa产生速率减慢(下两图)。在较高浓度的TFPI下,TFPI复合物的关闭发生得更快(下两图)。在关闭FVIIa/TFPI之前形成的FXa量是TFPI与FVIIa/TF相互作用的量度。由于MOD-5014的FXa产生速率略有降低,因此会减缓FXa/TFPI复合物的形成,因此MOD-5014的反应需要比MOD-5000更长的时间才能达到平稳。

[0623] 结论:如上图所示,FXa的MOD-5014/TF产生的TFPI抑制的浓度依赖性非常类似于MOD-5000的浓度依赖性。MOD-5014可能对TFPI抑制稍微敏感(124%);或者,这可能是FXa产生速率稍慢的假象。

[0624] 实施例3

[0625] 生产CTP修饰的活化因子VII

[0626] 目的

[0627] 制备方法的目的是通过重组DNA技术在化学成分确定的培养基中使用CHO细胞开发补料分批上游方法,然后进行稳健且可扩展的下游方法,以纯化高糖基化和高γ-羧化的MOD-5014。换句话说,生产和纯化具有最高γ-羧化含量的MOD-5014并有效去除与工艺和生产相关的杂质。重要的是分析O-聚糖,N-聚糖,唾液酸百分比,氧化相关形式,效力(通过STA-CLOT分析测试),Gla结构域的百分比(或未羧化的谷氨酸残基的百分比,以及未活化的FVII的百分比)。

[0628] 生产程序

[0629] 转染和稳定克隆选择

[0630] 将编码MOD-5014的cDNA转染到CHO细胞(dhfr-阴性CD DG44细胞,其适于在无蛋白质培养基和悬浮液生长中生长),并通过有限稀释步骤产生稳定的克隆。扩增产量最高的克隆并选择最终克隆用于进一步开发。

[0631] 在整个主细胞库和工作细胞库(MCB;WCB)的衍生过程中使用无动物成分的培养基。通过细胞培养中的有限稀释步骤分离稳定的克隆。随着选择剂浓度的增加,产量最高的克隆被扩增。基于克隆群体倍增水平(PDL)、CTP修饰的因子VII的生产力(皮克/细胞/天,PCD)和所选培养基中达到的最大细胞密度,分离出产量最高的克隆并用于制备R&D库,随后制造合格的主细胞库(MCB)和工作细胞库(WCB)。

[0632] 上游过程:

[0633] 从单小瓶的主细胞库(MCB)接种表达MOD-5014的CHO细胞的稳定克隆(图16的步骤1),并逐步扩增至1000L或2000L生物反应器,在无血清化学定义培养基中补充维生素K并使用补料分批方法(图16的步骤2-4)。

[0634] 测试生产细胞培养上清液的生物负载,细菌内毒素,生产力和外来病毒。使用50L和200L生物反应器进行该过程以接种生物反应器(图16的步骤3)以及1000或2000升生物反应器以进行扩大(图16的步骤4)。所有产品接触表面都是一次性的,而非一次性产品接触设备是产品专用的。这些设备在批次之间进行清洁和消毒。在接种于1000L或2000L生物反应器之前,将培养物扩增至50L和200L生物反应器。在2000L的一次性生物反应器中进行最终扩大和补料分批生物反应器生产。使用一次性过滤系统(Millipore深度过滤器)完成细胞的去除。

[0635] 细胞繁殖在生产生物反应器中进行,1000或2000升(步骤4,图16)。

[0636] 将培养物在生物反应器中在37℃、50%溶解氧(DO)和pH 7.1下温育约11天(取决于细胞的存活率)。在运行期间,将pH调至6.9直至收获,加入补料(Cell Boost 6),并加入维生素K3。此外,将DMSO加入生物反应器中。将葡萄糖进料溶液加入培养物中以保持所需浓度,并加入一团1M的碳酸氢钠以维持所需的培养物浓度。使用预定标准进行收获。在前四天,每天对细胞培养物进行取样用于细胞计数、存活率和代谢分析。从第5天开始,每天两次对培养物进行取样用于细胞计数、存活率和代谢分析,并且从第9天开始,也用于通过Elisa或HPLC亲和力方法得到比生产率。

[0637] 本文提供的实施例使用补料分批模式,但是本领域技术人员可以使用通常类似的生长和纯化方案来开发灌注模式。或者,本领域技术人员可以开发灌注方法,其中温育的持续时间甚至可以长达7-120天。

[0638] 细胞收获和储存(图16的步骤5)

[0639] 使用一次性过滤工艺系列进行收获。为了澄清收获物,进行深度过滤和0.2μm过滤。澄清之后是0.45/0.2μm过滤。冲洗深度过滤器并用空气将残留的液体吹出系统。在泵速≤15L/min和最大限定压力下进行过滤过程。然后将过滤器用Tris-HCl缓冲液洗涤并用加压空气吹扫以提高产物回收率。

[0640] 通过ELISA或HPLC亲和力方法,SDS-PAGE,蛋白质免疫印迹,HCP ELISA测定,残留DNA,体外病毒测定,病毒样颗粒,S+L-和支原体测试澄清的收获物的生物负载,细菌内毒素,特定蛋白质含量。

[0641] 纯化和活化过程

[0642] 纯化方案描述于图17中。纯化过程基于四个色谱柱。使用亲和色谱,混合模式色谱,疏水相互作用色谱和阴离子交换色谱纯化蛋白质。在阴离子交换色谱步骤中活化蛋白质。纯化过程还包括病毒灭活和纳米过滤步骤。

[0643] 超滤和渗滤1-UFDF1(步骤6)

[0644] 使用基于切向流过滤(TFF)的超滤和渗滤(UF/DF)步骤浓缩和渗滤澄清的收获物。药筒标称分子量截止尺寸为30kDa。通过ELISA、HPLC亲和力方法测试浓缩和渗滤的收获物的特定蛋白质含量,并使用SDS-PAGE、蛋白质免疫印迹和/或HCP ELISA评估内毒素和生物负载。

[0645] 通过温育进行病毒灭活(步骤7)

[0646] 将材料通过0.22μm过滤器过滤到无菌混合袋中。接下来,添加溶液以灭活病毒含量,例如将Tris/10%Triton溶液加入到最终滤液体积中,使Triton浓度达到1%(w/w)。温育后,在加载到亲和柱上之前,使用0.2μm过滤单元再次过滤产物溶液。使用SDS-PAGE和蛋

白质免疫印迹分析测试过滤的病毒灭活产物的内毒素和生物负载。

[0647] 亲和色谱(步骤8)

[0648] 亲和柱用于该步骤。将柱填充至预定的床高。该步骤根据产品数量在2-4个循环中进行。由于在测定中由Triton引起的干扰,在加入Triton之前测定负载中的特定蛋白质。将亲和柱平衡并加载病毒灭活库,然后洗涤。进行第二次洗涤并洗脱物质,然后在2-8℃下储存,用于第二天进行处理。所有色谱步骤均以下流模式进行。

[0649] 使用本领域熟知的技术测试洗脱液的特定蛋白质产物,内毒素,残留DNA,唾液酸含量,γ-羧基化百分比,带电荷N-聚糖,残留浸出亲和配体和生物负载,所述技术包括280nm吸光度,RP-HPLC,AIEX HPLC,SEC-HPLC,HCP ELISA,SDS-PAGE和蛋白质免疫印迹。

[0650] 多模型或混合模式色谱(步骤9)

[0651] 将填充有多模型或混合模式色谱树脂的柱用于该步骤。将柱填充至预定的床高。根据产品数量,该步骤在1-4个循环中进行。将柱平衡并加载稀释的亲和洗脱液,洗涤,收集洗脱液并在2-8℃下储存直至进一步处理。使用包括280nm吸光度,RP-HPLC,AIEX HPLC,SEC-HPLC,HCP ELISA,SDS-PAGE和蛋白质免疫印迹的技术测试洗脱液的特定蛋白质产物,内毒素,残留DNA,唾液酸含量,γ-羧基化百分比,带电荷N-聚糖,残留浸出亲和配体和生物负载。

[0652] 疏水相互作用色谱(HIC)(步骤10)

[0653] HIC树脂用于该步骤。将柱填充至预定的床高。根据产物量,HIC色谱在1-4个循环中进行。通过用硫酸铵调节多模型或混合模式蛋白质柱洗脱液来制备HIC负载。将柱平衡并加载调节的0.2μm过滤的多模或混合模式柱洗脱液,然后洗涤。洗脱产物,然后在2-8℃下储存直至进一步处理。通过280nm吸光度和SEC-HPLC测试洗脱液的特定蛋白质浓度。同样测试洗脱液的内毒素和生物负载。

[0654] HIC洗脱液的超滤和渗滤(步骤11)

[0655] 将HIC洗脱液浓缩并渗滤以减小体积并制备用于阴离子交换柱步骤的材料。一旦确定pH和电导率在范围内,就将系统排空并使用0.5/0.2μm过滤步骤过滤到无菌袋中。将浓缩的最终体积和渗滤的HIC洗脱液储存在2-8℃直至进一步处理。使用包括280nm吸光度,RP-HPLC,AIEX HPLC,SEC-HPLC,HCP ELISA,SDS-PAGE和蛋白质免疫印迹的技术测试洗脱液的特定蛋白质产物,内毒素,残留DNA,唾液酸含量,γ-羧基化百分比,带电荷N-聚糖,残留浸出亲和配体和生物负载。

[0656] 阴离子交换色谱(步骤12)

[0657] 将填充有阴离子交换树脂的柱用于该步骤。将柱填充至预定的床高。负载是浓缩渗滤的HIC洗脱液部分。在阴离子交换柱上发生FVII至FVIIa的活化。在活化和洗涤步骤后,洗脱产物并收集用于进一步处理。如果需要,将洗脱液调节pH。然后将洗脱液通过0.45/0.2μm过滤器过滤。将材料储存在2-8℃直至进一步处理。所有色谱步骤均以下流模式完成。通过280nm吸光度,RP-HPLC,AIEX HPLC,SEC-HPLC,HCP ELISA,SDS-PAGE和蛋白质免疫印迹测试洗脱液的特定蛋白质浓度,残留DNA和生物负载。

[0658] 通过纳米过滤除去病毒(步骤13)

[0659] 使用Asahi Planova 20N病毒过滤器进行病毒去除。使用0.45/0.2μm或0.1μm膜的过滤器作为纳米过滤器(Planova 20N过滤器)的预过滤器。将Asashi Planova 20N过滤器

预平衡并用阴离子交换洗脱缓冲液或用制剂缓冲液制备的最终制剂引发。将阴离子交换洗脱液以连续压力通过过滤器系列并收集在无菌生物过程袋中。用阴离子交换洗脱缓冲液或制剂缓冲液冲洗过滤器系列(planova过滤器)以最大化产物回收。根据制造商推荐的程序,在使用前后对过滤器进行完整性测试。使用后测试包括金颗粒测试,也是按照制造商的程序。通过280nm吸光度,RP-HPLC,AIEX HPLC,SEC-HPLC,SDS-PAGE测试病毒滤液的特定蛋白质。同样,测试病毒滤液的内毒素和生物负载。

[0660] UFDF-3和药物物质(DS)的过滤和储存(步骤14)

[0661] 将病毒滤液浓缩至目标DS浓度(其可以在2-100mg/ml之间变化)以准备大量过滤和填充。最后一步包括通过0.2μm过滤器过滤无菌过滤。一次性或可重复使用的盒子用于该步骤,截止值为3-30KDa。将产物在第一步中浓缩至5-25mg/ml蛋白质并渗滤(DF)至20mM柠檬酸盐,150mM NaCl,13.3mM甘氨酸,pH 6.4或20mM柠檬酸盐,100mM精氨酸,2%海藻糖,pH 6.2(≥7DF体积)。通过280nm吸光度测试UFDF-3库的特定蛋白质。此外,UFDF-3库还测试了前毒素和生物负载。

[0662] 调节最终产物浓度并加入聚山梨醇酯-80(PS-80)至终浓度为0.04%。或者,不进行添加。用Millipak 100或Millipak 200过滤器过滤调节的UFDF-3产物。将过滤的产物溶液等分并在70±5℃的温度下冷冻。通过A280测试制剂库的产物浓度。制剂缓冲液是20mM柠檬酸盐,100mM精氨酸,2%Trehelose,0.04%PS80,pH 6.2。

[0663] 结果

[0664] 使用的纯化方法在多模型步骤(图21)期间捕获并纯化高γ-羧化的MOD-5014,高糖基化的MOD-5014产物。此外,高糖基化的MOD-5014的初始百分比是从上游细胞培养过程实现的,并且在整个纯化过程中保持恒定(图19)。该方法显示出在多模型和HIC纯化步骤(图20)期间去除与工艺相关的杂质(例如氧化形式和其它相关形式)的高容量,并产生高质量的产物。

[0665] 纯化的MOD-5014产物的还原SDS-PAGE分析显示在图18中。鉴定了以下的分离产物(参见右侧编号):75kDa-未活化形式的MOD-5014(1);55kDa-MOD-5014重链-CTP-CTP-CTP(2);25kDa-MOD-5014轻链(4);低分子量(LMW)形式(3,5和6)。

[0666] 表9显示了两个不同的合同制造组织(CMO)中的工程运行(ER)和不同GMP运行(良好制造过程)的生产过程的结果。细节包括效力,未活化的MOD-5014的百分比(%),氧化形式的百分比(%);未羧化的谷氨酸残基(Gla无结构域)的百分比(%),唾液酸含量(mol/mol)和O-聚糖含量(mol/mol)。

[0667] 表9:纯化的MOD-5014质量属性

[0668]

方法	CMO-1		CMO-2	
	ER	GMP1	GMP1	GMP2
效力(U/mg)	15,563	16,720	22,478	23,608
未活化的FVII	2.7	2 4	2.6	3 0
氧化形式(%)	4.0	4.9	2.9	3.9
Gla无结构域(%)	5.4	5 5	0 6	0 6
唾液酸(mol/mol)	17.1	17.1	18.4	17.2
O-聚糖(mol/mol)	12.3	13.2	13.2	12.5

[0669] 另外,CMO-1结果显示了带电荷N-聚糖的百分比是85.3(ER)和84.2(GMP1)。

[0670] 结论

[0671] 总之,开发了适于支持MOD-5014的临床开发和商业制造的大规模补料分批制造过程。该结果支持该过程作为可重复的补料分批制造过程,用于生产高糖基化的长效FVIIa-CTP(MOD-5014)。纯化的MOD-5014产品具有高含量的O-聚糖和唾液酸。纯化的产物具有最低水平的未活化的FVII和Gla无结构域(未羧化的Glu残基)。

[0672] 实施例4

[0673] 药物产品(DP)制造

[0674] 药物产品(DP)过程的制剂从药物物质(DS)的解冻开始。药物产品是通过使用制剂缓冲液将药物物质(DS)稀释至所需浓度或无需稀释、无菌过滤和填充标准2R小瓶或其它初级包装(例如药筒或预填充注射器)来实现的。技术人员会理解,术语“药物物质”(DS)可以包括或等同于活性药物成分(API)。在一个实施方式中,本文所述的CTP修饰的因子VII是包含本体纯化药物的药物物质(DS)。本领域技术人员还将理解,一旦在无菌条件下分配到最终容器例如小瓶中,术语“药物产品”(DP)可以包括最终配制的药物。在一个实施方式中,本文所述的CTP修饰的因子VII是包含最终配制的CTP修饰的因子VII的药物产品(DP)。

[0675] CTP修饰的因子VII的表征

[0676] 通过特定的RP-HPLC方法测定收获物中CTP修饰的多肽含量和高糖基化形式的百分比。通过Bradford分析确定收获物中的总蛋白质。由选择克隆产生的收获物中的特定蛋白质百分比相对于收获物中的总蛋白质高于70%。此外,与低糖基化形式相比,开发了制造上游方法以使高百分比的高糖基化的CTP修饰的蛋白质成为可能。高糖基化形式是靶形式,因为它导致CTP修饰的多肽半衰期延长。

[0677] O-聚糖含量

[0678] 通过释放聚糖然后用2-氨基苯甲酰胺(2AB)进行聚糖标记、清洁并通过NP-HPLC分析来进行糖模拟。简而言之,进行O-聚糖含量测定以计算每摩尔CTP修饰的因子VII的O-聚糖摩尔数。O-聚糖的末端半乳糖单元通过β-半乳糖苷酶从蛋白质中酶促裂解。这些游离的半乳糖单元在CarboPac PA20柱上分离,并用脉冲安培法检测。使用半乳糖参考标准的外部校准来量化半乳糖(Gal)。半乳糖的含量可以与O-聚糖结构Gal-GalNAc的含量直接相关。对药物物质和药物产品批次的分析证明了批次间的一致性。这种意想不到的强烈糖基化含量是显著的,表明每个CTP的O-聚糖数量比本领域已知的更多。

[0679] 完整的分子量分析样品

[0680] 进行不同DS批次的分子量分析,目的是获得关于O-连接的糖基化位点数的信息。通过在线LC/ES-MS,使用神经氨酸酶对完整样品和去唾液酸化样品以及使用O-糖苷酶对去-O-糖基化样品进行分析。与本领域已知的水平(只有4个丝氨酸糖基化,而在本文制备的CTP修饰的因子VII中最多6个)相比,显示高%的丝氨酸占据率的结果是出乎意料的。

[0681] CTP修饰的蛋白质样品的O-连接的糖基化位点占据

[0682] 在M-扫描中进行4种不同DS批次的O-糖基化位点占据,目的是获得每分子O-连接的糖基化位点数的信息。使用神经氨酸酶对样品进行去唾液酸化,然后用还原/羧甲基化样品进行胰蛋白酶消化。最后,对处理过的样品进行在线LC/ES-MS,并使用指定的软件进行MS数据的解释。评估从分析胰蛋白酶消化混合物获得的数据导致允许100%蛋白质序列被定位的信号。O-糖基化可以在N-末端和C-末端CTP区域发生。占据位点被鉴定为脯氨酸后的丝氨酸残基以及丝氨酸重复区域中的四个丝氨酸中的两个。总共多达18个丝氨酸残基可用作O-聚糖的附着位点。检测到批次之间没有显著差异。

[0683] 纯度

[0684] RP-HPLC根据其极性分离分子。从极性较大到极性较小的溶剂的流动相梯度用于洗脱具有比极性较小的分子具有更强极性的分子。使用220nm的UV检测将相关形式与天然蛋白质分离。可以通过对相应的峰面积进行积分来计算相关形式和主峰的相对峰面积(面积%)。药物物质和药物产品的主峰由超过97%的峰面积组成,表明高纯度产品和有效的纯化过程。

[0685] 尺寸排阻HPLC是根据尺寸分离分子的色谱技术。在选择的分馏范围内,较大的分子比较小的分子更早洗脱。分离机制是非吸附性的,分子在等度条件下洗脱。SEC使得单体能够与靶分子的较高分子量形式(例如二聚体和聚合物)分离。开发SEC方法以分析药物物质和药物产品中二聚体和聚合物的含量。

[0686] RP-HPLC含量方法

[0687] 该方法用于中间体样品的含量测定和通过反相色谱测定中间体样品中未糖基化的CTP修饰的多肽的百分比。反相HPLC由于其极性而分离分子。相对非极性分子与柱材料连接,同时带电和极性分子被洗脱而不完成与柱的相互作用。

[0688] 借助于从极性到较小极性的溶液的梯度洗脱连接的分子。首先洗脱极性最强的分子,然后是极性较小的分子。通过214nm的吸光度进行检测。

[0689] 病毒清除率

[0690] 制造过程用内源性和外源性病毒解决和减轻最终药物产品污染的能力已经成为初步评估的主题。符合GLP标准的研究是根据适用于研究产品的指南进行的,这些产品使用三种模型病毒加入到制造过程的缩小部分,以量化这些步骤灭活或清除加标病毒群的能力。当病毒量表示为log10调整滴度时,log10清除因子简单地通过从输入值中减去输出值来确定。作为log10数,清除因子是相加的,以得出所有评估步骤的总清除因子。A-MuLV被认为是代表可能存在CHO逆转录病毒的模型病毒,用于灭活和去除污染的A-MuLV病毒所采取的措施实现了至少反log10的清除因子,例如,病毒对数减少因子(LRF)约为22,表明整个过程具有特殊的病毒去除能力。对于作为抗性无包膜小病毒的PPV,获得了通过纳米过滤步骤的强力去除。

[0691] 虽然本文已经说明和描述了本公开的某些特征,但是本领域普通技术人员现在将

想到许多修改、替换、改变和等同。因此,应理解,所附权利要求旨在覆盖落入本公开的真实精神内的所有这些修改和变化。

[0001] 序列表

[0002] <110> OPKO生物科学有限公司(OPKO BIOLOGICS LTD.)

[0003] 奥伦·赫什科维茨(HERSHKOVITZ, Oren)

[0004] 劳拉·莫斯科维奇(MOSCHCOVICH, Laura)

[0005] <120> 长效凝血因子及其制备方法

[0006] <130> P-9520-PC9

[0007] <150> 62/360,767

[0008] <151> 2016-07-11

[0009] <160> 15

[0010] <170> PatentIn version 3.5

[0011] <210> 1

[0012] <211> 1356

[0013] <212> DNA

[0014] <213> 智人(Homo sapiens)

[0015] <400> 1

[0016] ctcgaggaca tggtctccca ggccctcagg ctcctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60

[0017] tgcctggctg cagtcttcgt aacccaggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg 120

[0018] cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag 180

[0019] gagcagtgct ccttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg 240

[0020] ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc 300

[0021] tcctgcaagg accagctcca gtcctatatc tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg 360

[0022] aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag 420

[0023] cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480

[0024] ctgctggcag acggggtgtc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540

[0025] attctagaaa aaagaaatgc cagcaaaccc caaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600

[0026] cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg 660

[0027] gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag 720

[0028] aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780

[0029] gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840

[0030] aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtggtg 900

[0031] cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgcttctca 960

[0032] ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020

[0033] ctcaacgtgc cccggctgat gacccaggac tgcctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080

[0034] tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc 1140

[0035] tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacg 1200

[0036] ggcatcgtca gctggggcca gggctgcgca accgtgggcc actttggggt gtacaccagg 1260

[0037] gtctcccagt acatcgagtg gctgcaaaag ctcatgcgct cagagccacg cccaggagtc 1320

[0038] ctcctgcgag ccccatttcc ctgaggatgc ggccgc 1356

[0039] <210> 2

[0040] <211> 444

[0041] <212> PRT

[0042] <213> 智人(Homo sapiens)

[0043] <400> 2

[0044] Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln

[0045] 1 5 10 15

[0046] Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val

[0047] 20 25 30

[0048] Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro

[0049] 35 40 45

[0050] Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu

[0051] 50 55 60

[0052] Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile

[0053] 65 70 75 80

[0054] Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly

[0055] 85 90 95

[0056] Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro

[0057] 100 105 110

[0058] Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile

[0059] 115 120 125

[0060] Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr

[0061] 130 135 140

[0062] Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala

[0063] 145 150 155 160

[0064] Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile

[0065] 165 170 175

[0066] Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val

[0067] 180 185 190

[0068] Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu

[0069] 195 200 205

[0070] Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile

[0071] 210 215 220

[0072] Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg

[0073] 225 230 235 240

[0074] Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly

[0075] 245 250 255

[0076] Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr

[0077] 260 265 270

[0078] Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln

[0079] 275 280 285

[0080] Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg

[0081] 290 295 300

[0082] Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser

[0083] 305 310 315 320

[0084] Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
[0085] 325 330 335
[0086] Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
[0087] 340 345 350
[0088] Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
[0089] 355 360 365
[0090] Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
[0091] 370 375 380
[0092] Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
[0093] 385 390 395 400
[0094] Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
[0095] 405 410 415
[0096] Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
[0097] 420 425 430
[0098] Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
[0099] 435 440
[0100] <210> 3
[0101] <211> 448
[0102] <212> PRT
[0103] <213> 智人(Homo sapiens)
[0104] <400> 3
[0105] Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
[0106] 1 5 10 15
[0107] Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
[0108] 20 25 30
[0109] Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
[0110] 35 40 45
[0111] Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
[0112] 50 55 60
[0113] Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
[0114] 65 70 75 80
[0115] Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
[0116] 85 90 95
[0117] Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
[0118] 100 105 110
[0119] Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile
[0120] 115 120 125
[0121] Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr
[0122] 130 135 140
[0123] Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
[0124] 145 150 155 160
[0125] Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile

[0126] 165 170 175

[0127] Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val

[0128] 180 185 190

[0129] Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu

[0130] 195 200 205

[0131] Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile

[0132] 210 215 220

[0133] Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg

[0134] 225 230 235 240

[0135] Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly

[0136] 245 250 255

[0137] Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr

[0138] 260 265 270

[0139] Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln

[0140] 275 280 285

[0141] Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg

[0142] 290 295 300

[0143] Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser

[0144] 305 310 315 320

[0145] Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met

[0146] 325 330 335

[0147] Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser

[0148] 340 345 350

[0149] Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala

[0150] 355 360 365

[0151] Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly

[0152] 370 375 380

[0153] Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val

[0154] 385 390 395 400

[0155] Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr

[0156] 405 410 415

[0157] Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu

[0158] 420 425 430

[0159] Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Gly Cys Gly Arg

[0160] 435 440 445

[0161] <210> 4

[0162] <211> 1621

[0163] <212> DNA

[0164] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0165] <220>

[0166] <223> CTP修饰的因子VII

[0167] <400> 4

[0168] ctcgaggaca tggtctccca ggccctcagg ctcctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60

[0169] tgcctggctg cagtcttcgt aacccaggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg 120

[0170] cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag 180

[0171] gagcagtgct ccttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg 240

[0172] ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc 300

[0173] tcctgcaagg accagctcca gtcctatatc tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg 360

[0174] aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag 420

[0175] cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480

[0176] ctgctggcag acggggtgtc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540

[0177] attctagaaa aaagaaatgc cagcaaaccc caaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600

[0178] cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg 660

[0179] gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag 720

[0180] aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780

[0181] gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840

[0182] aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtggtg 900

[0183] cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgcttctca 960

[0184] ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020

[0185] ctcaacgtgc cccggctgat gacccaggac tgcctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080

[0186] tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc 1140

[0187] tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacc 1200

[0188] ggcatcgtga gctggggcca gggctgcgcc accgtgggcc acttcggcgt gtacaccagg 1260

[0189] gtgtcccagt acatcgagtg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccggcgtg 1320

[0190] ctgctgagag ccccccttccc cagcagcagc tccaaggccc ctccccctag cctgcccagc 1380

[0191] cctagcagac tgcctgggcc cagtgacacc cctatcctgc ctcagtccag ctccagcaag 1440

[0192] gccccacccc ctagcctgcc ttctccttct cggctgcctg gccccagcga tactccaatt 1500

[0193] ctgccccagt cctccagcag taaggctccc cctccatctc tgccatcccc cagcagactg 1560

[0194] ccaggcccct ctgatacacc catcctccca cagtgatgag gatccgcggc cgcttaatta 1620

[0195] a 1621

[0196] <210> 5

[0197] <211> 528

[0198] <212> PRT

[0199] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0200] <220>

[0201] <223> CTP修饰的因子VII

[0202] <400> 5

[0203] Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln

[0204] 1 5 10 15

[0205] Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val

[0206] 20 25 30

[0207] Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro

[0208] 35 40 45

[0209] Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu

[0210] 50 55 60

[0211] Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile

[0212] 65 70 75 80

[0213] Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly

[0214] 85 90 95

[0215] Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro

[0216] 100 105 110

[0217] Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile

[0218] 115 120 125

[0219] Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr

[0220] 130 135 140

[0221] Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala

[0222] 145 150 155 160

[0223] Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile

[0224] 165 170 175

[0225] Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val

[0226] 180 185 190

[0227] Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu

[0228] 195 200 205

[0229] Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile

[0230] 210 215 220

[0231] Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg

[0232] 225 230 235 240

[0233] Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly

[0234] 245 250 255

[0235] Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr

[0236] 260 265 270

[0237] Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln

[0238] 275 280 285

[0239] Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg

[0240] 290 295 300

[0241] Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser

[0242] 305 310 315 320

[0243] Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met

[0244] 325 330 335

[0245] Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser

[0246] 340 345 350

[0247] Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala

[0248] 355 360 365

[0249] Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly

[0250] 370 375 380

[0251] Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val

[0252] 385 390 395 400
[0253] Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
[0254] 405 410 415
[0255] Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
[0256] 420 425 430
[0257] Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser Ser
[0258] 435 440 445
[0259] Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro
[0260] 450 455 460
[0261] Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro
[0262] 465 470 475 480
[0263] Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro
[0264] 485 490 495
[0265] Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro
[0266] 500 505 510
[0267] Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
[0268] 515 520 525
[0269] <210> 6
[0270] <211> 38
[0271] <212> PRT
[0272] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0273] <220>
[0274] <223> 信号序列
[0275] <400> 6
[0276] Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
[0277] 1 5 10 15
[0278] Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
[0279] 20 25 30
[0280] Leu His Arg Arg Arg Arg
[0281] 35
[0282] <210> 7
[0283] <211> 490
[0284] <212> PRT
[0285] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0286] <220>
[0287] <223> CTP修饰的因子VII
[0288] <400> 7
[0289] Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
[0290] 1 5 10 15
[0291] Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
[0292] 20 25 30
[0293] Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp

[0294] 35 40 45

[0295] Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln

[0296] 50 55 60

[0297] Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn

[0298] 65 70 75 80

[0299] Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly

[0300] 85 90 95

[0301] Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys

[0302] 100 105 110

[0303] Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr

[0304] 115 120 125

[0305] Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg

[0306] 130 135 140

[0307] Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro

[0308] 145 150 155 160

[0309] Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln

[0310] 165 170 175

[0311] Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala

[0312] 180 185 190

[0313] His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu

[0314] 195 200 205

[0315] Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg

[0316] 210 215 220

[0317] Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn

[0318] 225 230 235 240

[0319] His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp

[0320] 245 250 255

[0321] His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr

[0322] 260 265 270

[0323] Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu

[0324] 275 280 285

[0325] Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg

[0326] 290 295 300

[0327] Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser

[0328] 305 310 315 320

[0329] Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser

[0330] 325 330 335

[0331] Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr

[0332] 340 345 350

[0333] Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys

[0334] 355 360 365

[0335] Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile

[0336] 370 375 380

[0337] Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu

[0338] 385 390 395 400

[0339] Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser

[0340] 405 410 415

[0341] Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu

[0342] 420 425 430

[0343] Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro

[0344] 435 440 445

[0345] Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser

[0346] 450 455 460

[0347] Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro

[0348] 465 470 475 480

[0349] Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

[0350] 485 490

[0351] <210> 8

[0352] <211> 152

[0353] <212> PRT

[0354] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0355] <220>

[0356] <223> CTP修饰的因子VII – 轻链

[0357] <400> 8

[0358] Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu

[0359] 1 5 10 15

[0360] Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys

[0361] 20 25 30

[0362] Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp

[0363] 35 40 45

[0364] Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln

[0365] 50 55 60

[0366] Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn

[0367] 65 70 75 80

[0368] Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly

[0369] 85 90 95

[0370] Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys

[0371] 100 105 110

[0372] Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr

[0373] 115 120 125

[0374] Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg

[0375] 130 135 140

[0376] Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg

[0377] 145 150

[0378] <210> 9

[0379] <211> 338

[0380] <212> PRT

[0381] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0382] <220>

[0383] <223> CTP修饰的因子VII - 重链

[0384] <400> 9

[0385] Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val

[0386] 1 5 10 15

[0387] Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn

[0388] 20 25 30

[0389] Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn

[0390] 35 40 45

[0391] Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His

[0392] 50 55 60

[0393] Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser

[0394] 65 70 75 80

[0395] Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu

[0396] 85 90 95

[0397] His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro

[0398] 100 105 110

[0399] Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu

[0400] 115 120 125

[0401] Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu

[0402] 130 135 140

[0403] Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln

[0404] 145 150 155 160

[0405] Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe

[0406] 165 170 175

[0407] Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser

[0408] 180 185 190

[0409] Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly

[0410] 195 200 205

[0411] Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val

[0412] 210 215 220

[0413] Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg

[0414] 225 230 235 240

[0415] Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser

[0416] 245 250 255

[0417] Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro

[0418] 260 265 270

[0419] Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala

[0420] 275 280 285

[0421] Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp

[0422] 290 295 300

[0423] Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser

[0424] 305 310 315 320

[0425] Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu

[0426] 325 330 335

[0427] Pro Gln

[0428] <210> 10

[0429] <211> 2413

[0430] <212> DNA

[0431] <213> 智人(Homo sapiens)

[0432] <400> 10

[0433] tctagagtcg accccgccat ggagctgagg ccctggttgc tatgggtggt agcagcaaca 60

[0434] ggaaccttgg tcctgctagc agctgatgct cagggccaga aggtcttcac caacacgtgg 120

[0435] gctgtgcgca tccctggagg cccagcggtg gccaacagtg tggcacggaa gcatgggttc 180

[0436] ctcaacctgg gccagatctt cggggactat taccacttct ggcatcgagg agtgacgaag 240

[0437] cggtccctgt cgcctcaccg cccgcggcac agccggctgc agagggagcc tcaagtacag 300

[0438] tggctggaac agcaggtggc aaagcgacgg actaaacggg acgtgtacca ggagcccaca 360

[0439] gaccccaagt ttcctcagca gtggtacctg tctggtgtca ctcagcggga cctgaatgtg 420

[0440] aaggcggcct gggcgcaggg ctacacaggg cacggcattg tggtctccat tctggacgat 480

[0441] ggcatcgaga agaaccaccc ggacttggca ggcaattatg atcctggggc cagttttgat 540

[0442] gtcaatgacc aggaccctga cccccagcct cggtacacac agatgaatga caacaggcac 600

[0443] ggcacacggt gtgcgggggа agtggctgcg gtggccaaca acggtgtctg tggtgtaggt 660

[0444] gtggcctaca acgcccgcat tggaggggtg cgcatgctgg atggcgaggt gacagatgca 720

[0445] gtggaggcac gctcgctggg cctgaacccc aaccacatcc acatctacag tgccagctgg 780

[0446] ggccccgagg atgacggcaa gacagtggat gggccagccc gcctcgccga ggaggccttc 840

[0447] ttccgtgggg ttagccaggg ccgaggggгg ctgggctcca tctttgtctg ggcctcgggg 900

[0448] aacgggggcc gggaacatga cagctgcaac tgcgacggct acaccaacag tatctacacg 960

[0449] ctgtccatca gcagcgccac gcagtttggc aacgtgccgt ggtacagcga ggcctgctcg 1020

[0450] tccacactgg ccacgaccta cagcagtggc aaccagaatg agaagcagat cgtgacgact 1080

[0451] gacttgcggc agaagtgcac ggagtctcac acgggcacct cagcctctgc ccccttagca 1140

[0452] gccggcatca ttgctctcac cctggaggcc aataagaacc tcacatggcg ggacatgcaa 1200

[0453] cacctggtgg tacagacctc gaagccagcc cacctcaatg ccaacgactg ggccaccaat 1260

[0454] ggtgtgggcc ggaaagtgag ccactcatat ggctacgggc ttttggacgc aggcgccatg 1320

[0455] gtggccctgg cccagaattg gaccacagtg gcccccccagc ggaagtgcat catcgacatc 1380

[0456] ctcaccgagc ccaaagacat cgggaaacgg ctcgaggtgc ggaagaccgt gaccgcgtgc 1440

[0457] ctgggcgagc ccaaccacat cactcggctg gagcacgctc aggcgcggct caccctgtcc 1500

[0458] tataatcgcc gtggcgacct ggccatccac ctggtcagcc ccatgggcac ccgctccacc 1560

[0459] ctgctggcag ccaggccaca tgactactcc gcagatgggt ttaatgactg ggccttcatg 1620

[0460] acaactcatt cctgggatga ggatccctct ggcgagtggg tcctagagat tgaaaacacc 1680

[0461] agcgaagcca acaactatgg gacgctgacc aagttcaccc tcgtactcta tggcaccgcc 1740

[0462] cctgaggggc tgcccgtacc tccagaaagc agtggctgca agaccctcac gtccagtcag 1800

[0463] gcctgtgtgg tgtgcgagga aggcttctcc ctgcaccaga agagctgtgt ccagcactgc 1860

[0464] cctccaggct tcgcccccca agtcctcgat acgcactata gcaccgagaa tgacgtggag 1920

[0465] accatccggg ccagcgtctg cgccccctgc cacgcctcat gtgccacatg ccaggggccg 1980

[0466] gccctgacag actgcctcag ctgccccagc cacgcctcct tggaccctgt ggagcagact 2040

[0467] tgctcccggc aaagccagag cagccgagag tccccgccac agcagcagcc acctcggctg 2100

[0468] cccccggagg tggaggcggg gcaacggctg cgggcagggc tgctgccctc acacctgcct 2160

[0469] gaggtggtgg ccggcctcag ctgcgccttc atcgtgctgg tcttcgtcac tgtcttcctg 2220

[0470] gtcctgcagc tgcgctctgg ctttagtttt cgggggggtga aggtgtacac catggaccgt 2280

[0471] ggcctcatct cctacaaggg gctgcccccct gaagcctggc aggaggagtg cccgtctgac 2340

[0472] tcagaagagg acgagggccg gggcgagagg accgccttta tcaaagacca gagcgccctc 2400

[0473] tgaacgcggc cgc 2413

[0474] <210> 11

[0475] <211> 793

[0476] <212> PRT

[0477] <213> 智人(Homo sapiens)

[0478] <400> 11

[0479] Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr

[0480] 1 5 10 15

[0481] Leu Val Leu Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn

[0482] 20 25 30

[0483] Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val

[0484] 35 40 45

[0485] Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe Gly Asp Tyr

[0486] 50 55 60

[0487] Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His

[0488] 65 70 75 80

[0489] Arg Pro Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu

[0490] 85 90 95

[0491] Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu

[0492] 100 105 110

[0493] Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr

[0494] 115 120 125

[0495] Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly

[0496] 130 135 140

[0497] His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His

[0498] 145 150 155 160

[0499] Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn

[0500] 165 170 175

[0501] Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn

[0502] 180 185 190

[0503] Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn

[0504] 195 200 205

[0505] Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Gly Val

[0506] 210 215 220

[0507] Arg Met Leu Asp Gly Glu Val Thr Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu

[0508] 225 230 235 240

[0509] Gly Leu Asn Pro Asn His Ile His Ile Tyr Ser Ala Ser Trp Gly Pro

[0510] 245 250 255

[0511] Glu Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Gly Pro Ala Arg Leu Ala Glu Glu

[0512] 260 265 270

[0513] Ala Phe Phe Arg Gly Val Ser Gln Gly Arg Gly Gly Leu Gly Ser Ile

[0514] 275 280 285

[0515] Phe Val Trp Ala Ser Gly Asn Gly Gly Arg Glu His Asp Ser Cys Asn

[0516] 290 295 300

[0517] Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala

[0518] 305 310 315 320

[0519] Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr

[0520] 325 330 335

[0521] Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val

[0522] 340 345 350

[0523] Thr Thr Asp Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser

[0524] 355 360 365

[0525] Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala

[0526] 370 375 380

[0527] Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr

[0528] 385 390 395 400

[0529] Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val

[0530] 405 410 415

[0531] Gly Arg Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly

[0532] 420 425 430

[0533] Ala Met Val Ala Leu Ala Gln Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg

[0534] 435 440 445

[0535] Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg

[0536] 450 455 460

[0537] Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His

[0538] 465 470 475 480

[0539] Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn

[0540] 485 490 495

[0541] Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg

[0542] 500 505 510

[0543] Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe

[0544] 515 520 525

[0545] Asn Asp Trp Ala Phe Met Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser

[0546] 530 535 540

[0547] Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr

[0548] 545 550 555 560

[0549] Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu

[0550] 565 570 575

[0551] Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser Gly Cys Lys Thr Leu Thr Ser

[0552] 580 585 590

[0553] Ser Gln Ala Cys Val Val Cys Glu Glu Gly Phe Ser Leu His Gln Lys

[0554] 595 600 605

[0555] Ser Cys Val Gln His Cys Pro Pro Gly Phe Ala Pro Gln Val Leu Asp

[0556] 610 615 620

[0557] Thr His Tyr Ser Thr Glu Asn Asp Val Glu Thr Ile Arg Ala Ser Val

[0558] 625 630 635 640

[0559] Cys Ala Pro Cys His Ala Ser Cys Ala Thr Cys Gln Gly Pro Ala Leu

[0560] 645 650 655

[0561] Thr Asp Cys Leu Ser Cys Pro Ser His Ala Ser Leu Asp Pro Val Glu

[0562] 660 665 670

[0563] Gln Thr Cys Ser Arg Gln Ser Gln Ser Ser Arg Glu Ser Pro Pro Gln

[0564] 675 680 685

[0565] Gln Gln Pro Pro Arg Leu Pro Pro Glu Val Glu Ala Gly Gln Arg Leu

[0566] 690 695 700

[0567] Arg Ala Gly Leu Leu Pro Ser His Leu Pro Glu Val Val Ala Gly Leu

[0568] 705 710 715 720

[0569] Ser Cys Ala Phe Ile Val Leu Val Phe Val Thr Val Phe Leu Val Leu

[0570] 725 730 735

[0571] Gln Leu Arg Ser Gly Phe Ser Phe Arg Gly Val Lys Val Tyr Thr Met

[0572] 740 745 750

[0573] Asp Arg Gly Leu Ile Ser Tyr Lys Gly Leu Pro Pro Glu Ala Trp Gln

[0574] 755 760 765

[0575] Glu Glu Cys Pro Ser Asp Ser Glu Glu Asp Glu Gly Arg Gly Glu Arg

[0576] 770 775 780

[0577] Thr Ala Phe Ile Lys Asp Gln Ser Ala

[0578] 785 790

[0579] <210> 12

[0580] <211> 32

[0581] <212> PRT

[0582] <213> 智人(Homo sapiens)

[0583] <400> 12

[0584] Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser

[0585] 1 5 10 15

[0586] Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu

[0587] 20 25 30

[0588] <210> 13

[0589] <211> 28

[0590] <212> PRT

[0591] <213> 智人(Homo sapiens)

[0592] <400> 13

[0593] Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg

[0594] 1 5 10 15

[0595] Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

[0596] 20 25

[0597] <210> 14

[0598] <211> 12

[0599] <212> PRT

[0600] <213> 智人(Homo sapiens)

[0601] <400> 14

[0602] Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro

[0603] 1 5 10

[0604] <210> 15

[0605] <211> 10

[0606] <212> PRT

[0607] <213> 智人(Homo sapiens)

[0608] <400> 15

[0609] Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser

[0610] 1 5 10

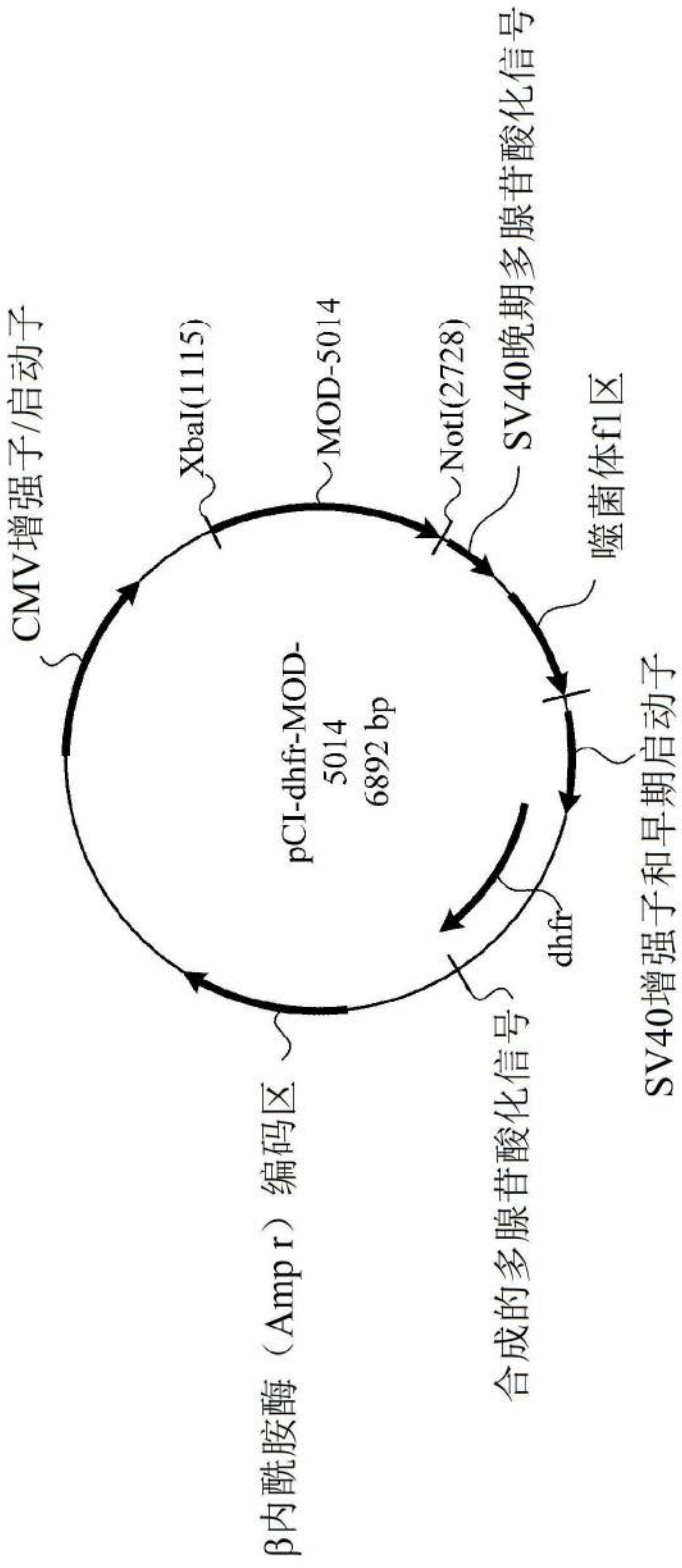

CMV增强子/启动子
XbaI(1115)
MOD-5014
NotI(2728)
SV40晚期多腺苷酸化信号
噬菌体f1区
SV40增强子和早期启动子
dhfr
合成的多腺苷酸化信号
β内酰胺酶（Amp r）编码区
pCI-dhfr-MOD-5014
6892 bp

图1

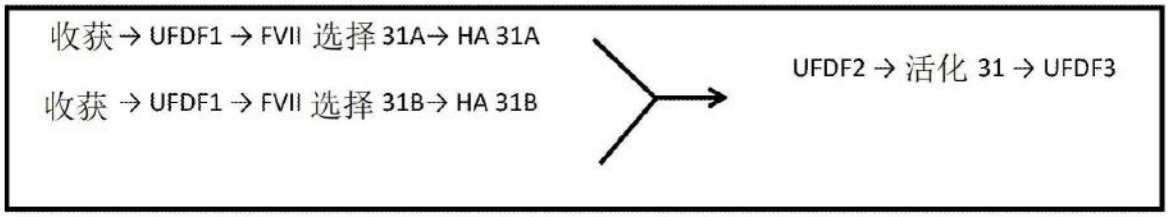

收获→UFDF1→FVII 选择 31A→ HA 31A
收获 →UFDF1→FVII 选择 31B→ HA 31B
UFDF2→活化 31→UFDF3

图2A

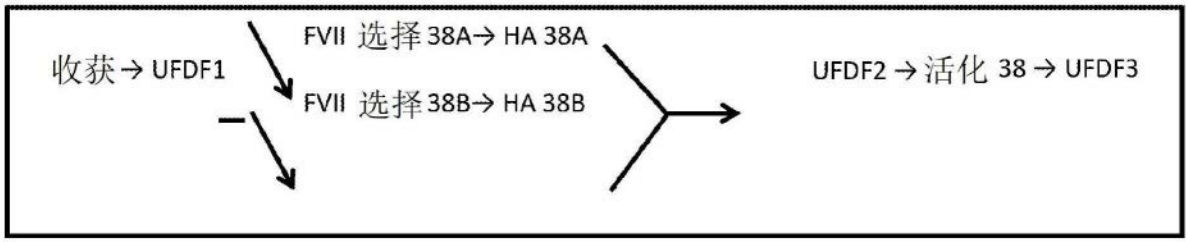

收获→UFDF1
FVII 选择 38A→ HA 38A
FVII 选择 38B→ HA 38B
UFDF2→活化 38→UFDF3

图2B

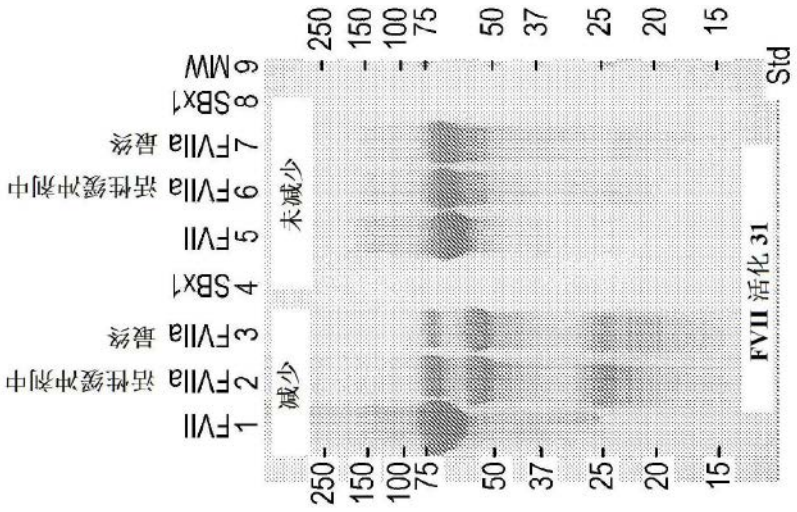

250
150
100
75
50
37
25
20
15
Std
MW
SBX1
FVIIa 最终
FVIIa 活性缓冲剂中
FVII
未减少
减少
FVII 活化 31

图3A

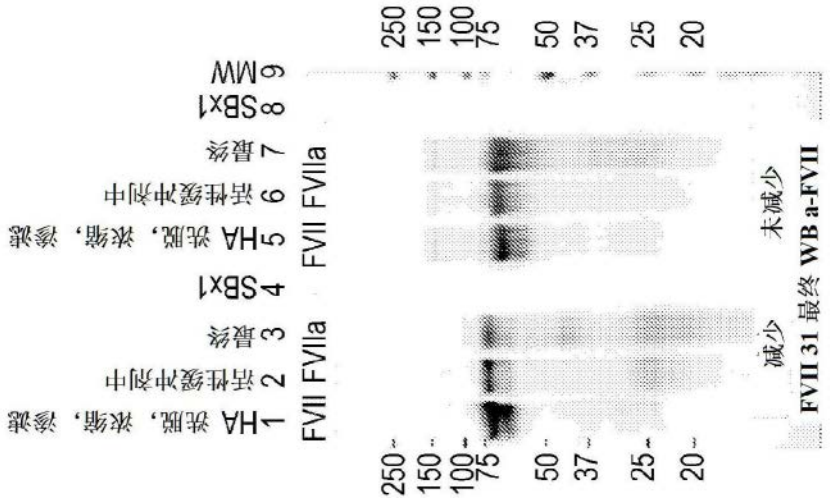

MW 1
HA 洗脱，浓缩，渗滤 2
活性缓冲剂中 3
最终 4
SBx1 5
HA 洗脱，浓缩，渗滤 6
活性缓冲剂中 7
最终 8
SBx1 9
MW
FVII FVIIa
FVII FVIIa
250
150
100
75
50
37
25
20
减少
未减少
FVII 31 最终 WB a-FVII

图3B

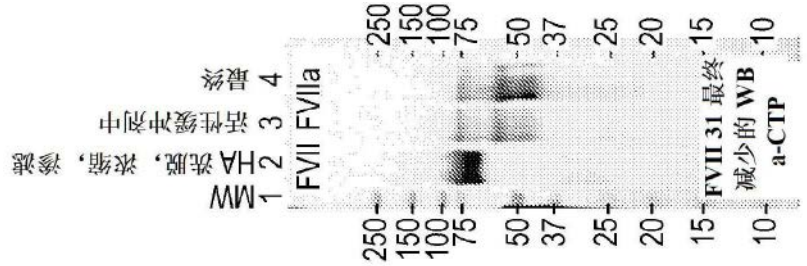

MW 1
HA 洗脱，浓缩，渗滤 2
活性缓冲剂中 3
最终 4
FVII FVIIa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
FVII 31 最终
减少的 WB
a-CTP

图3C

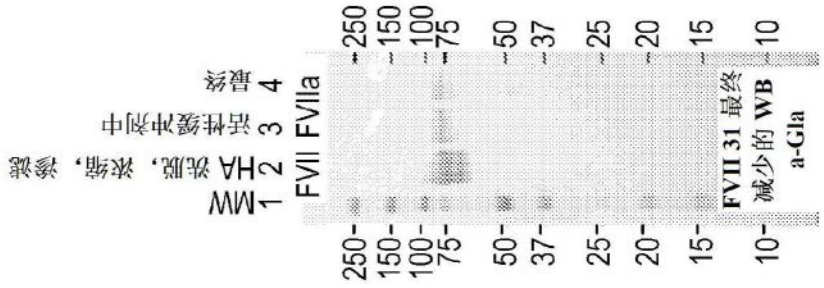

MW 1
HA 洗脱，浓缩，渗滤 2
活性缓冲剂中 3
最终 4
FVII FVIIa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
FVII 31 最终
减少的 WB
a-Gla

图3D

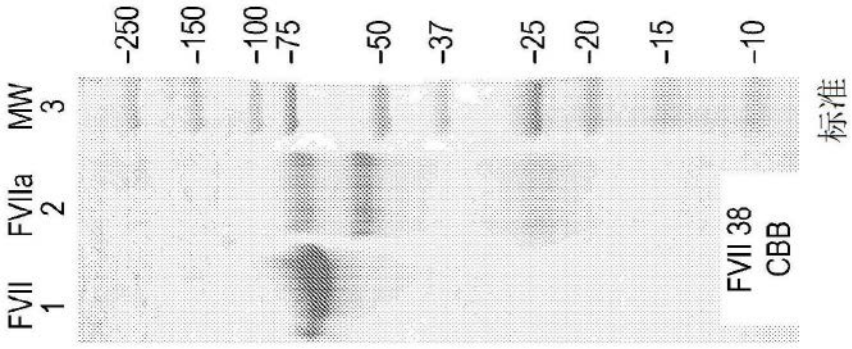

-250
-150
-100
-75
-50
-37
-25
-20
-15
-10
MW
3
FVIIa
2
FVII
1
FVII 38
CBB
标准

图3E

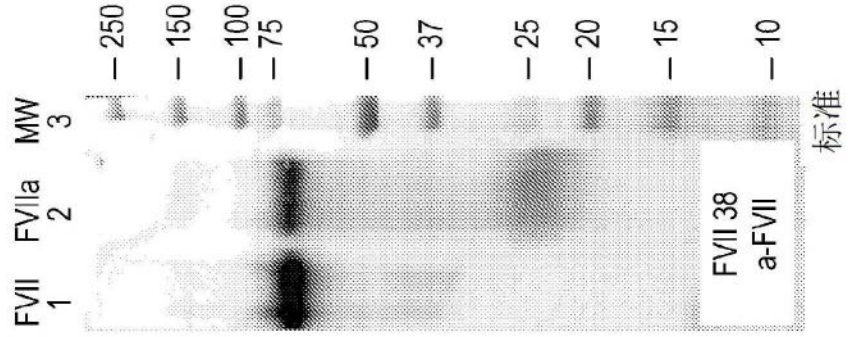

250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
MW
3
FVIIa
2
FVII
1
FVII 38
a-FVII
标准

图3F

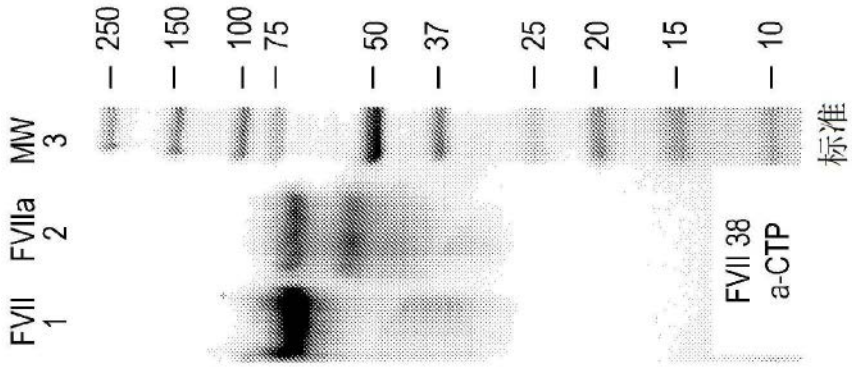

250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
MW
3
FVIIa
2
FVII
1
FVII 38
a-CTP
标准

图3G

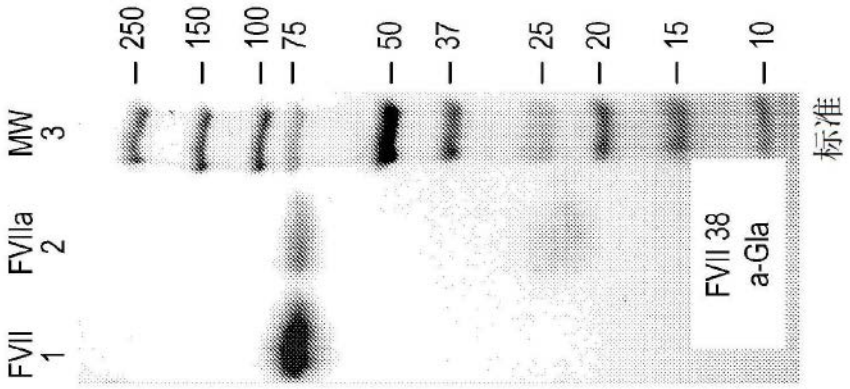


图3H

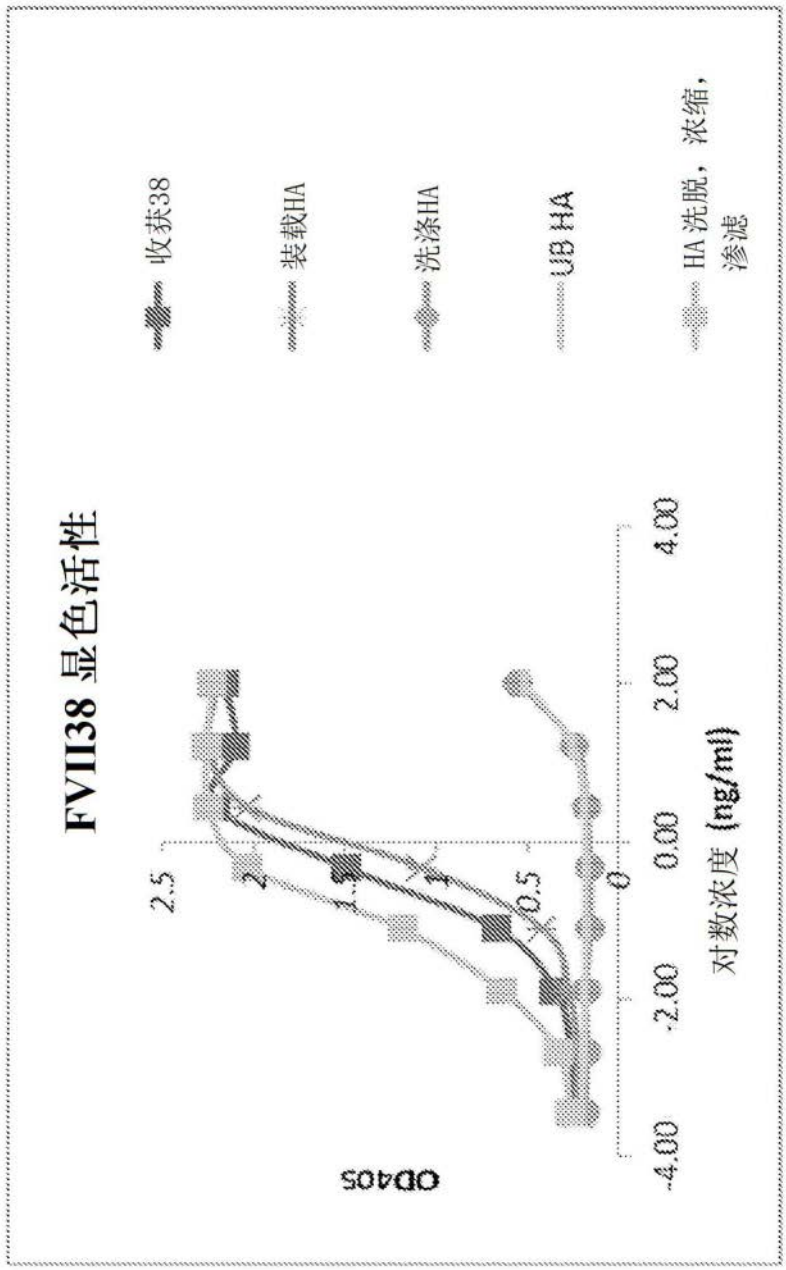

FVIII38 显色活性
收获38
装载HA
洗涤HA
UB HA
HA 洗脱，浓缩，渗滤
OD405
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-4.00
-2.00
0.00
2.00
4.00
对数浓度 (ng/ml)

图4

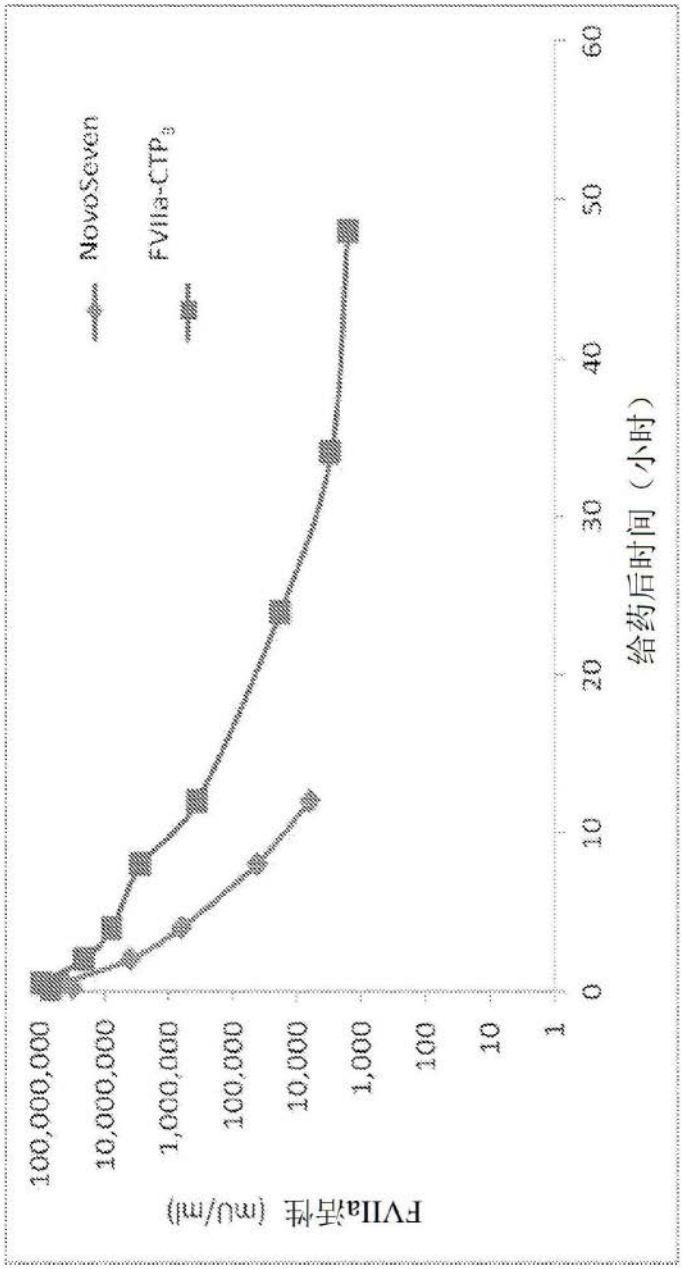

NovoSeven
FVIIa-CTP
FVIIa活性 (mU/ml)
100,000,000
10,000,000
1,000,000
100,000
10,000
1,000
100
10
1
0
10
20
30
40
50
60
给药后时间（小时）

图5

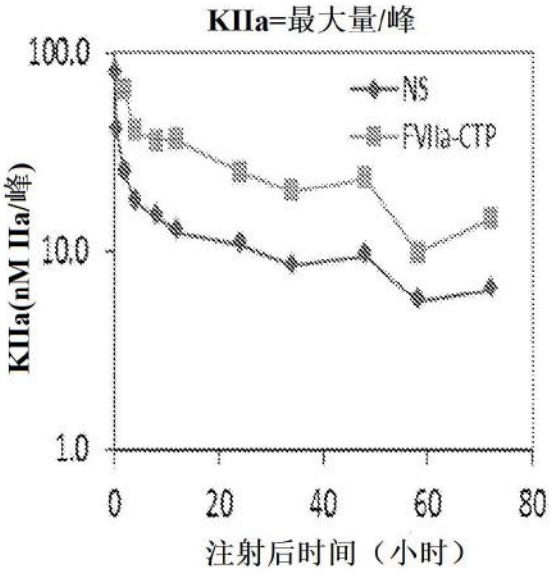

KIIa=最大量/峰
100.0
10.0
1.0
KIIa(nM IIa/峰)
NS
FVIIa-CTP
0
20
40
60
80
注射后时间（小时）

图6A

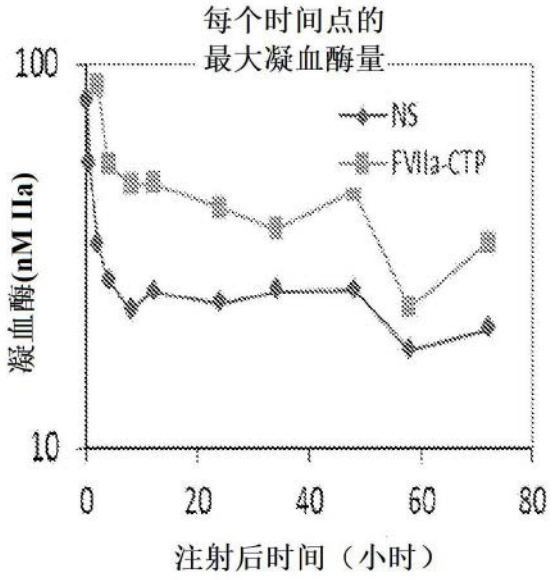

每个时间点的
最大凝血酶量
100
10
凝血酶(nM IIa)
NS
FVIIa-CTP
0
20
40
60
80
注射后时间（小时）

图6B

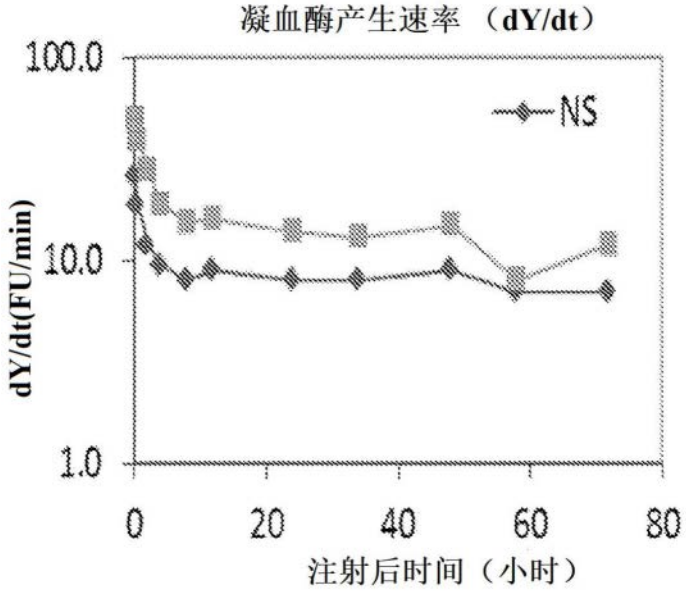

凝血酶产生速率 （dY/dt）
100.0
10.0
1.0
dY/dt(FU/min)
NS
0
20
40
60
80
注射后时间（小时）

图6C

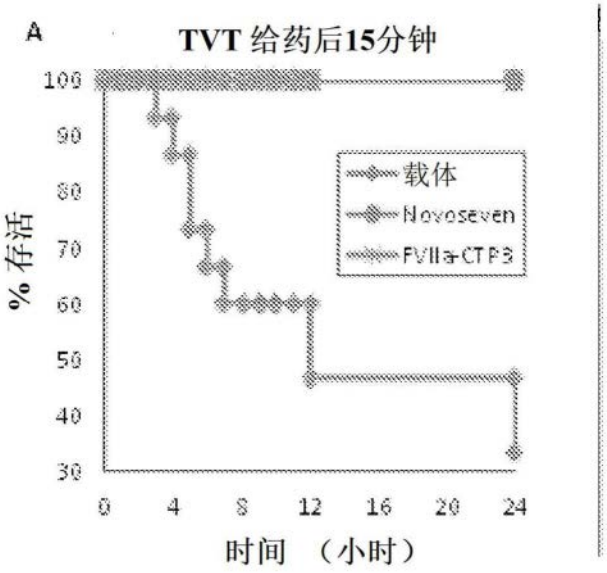

A
TVT 给药后15分钟
100
90
80
70
60
50
40
30
% 存活
载体
Novoseven
FVIIa-CTP3
0
4
8
12
16
20
24
时间 （小时）

图7A

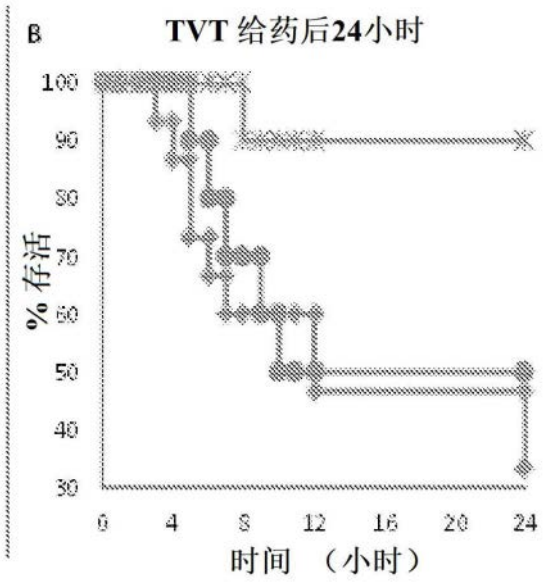

B
TVT 给药后24小时
100
90
80
70
60
50
40
30
% 存活
0
4
8
12
16
20
24
时间 （小时）

图7B

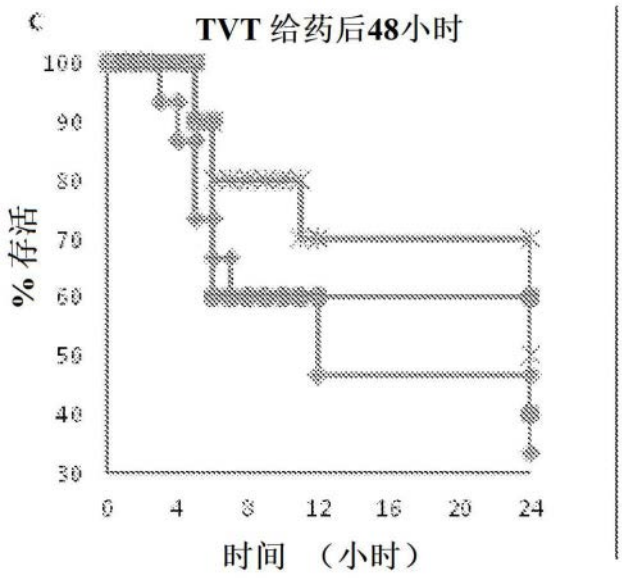

C
TVT 给药后48小时
100
90
80
70
60
50
40
30
% 存活
0
4
8
12
16
20
24
时间 （小时）

图7C

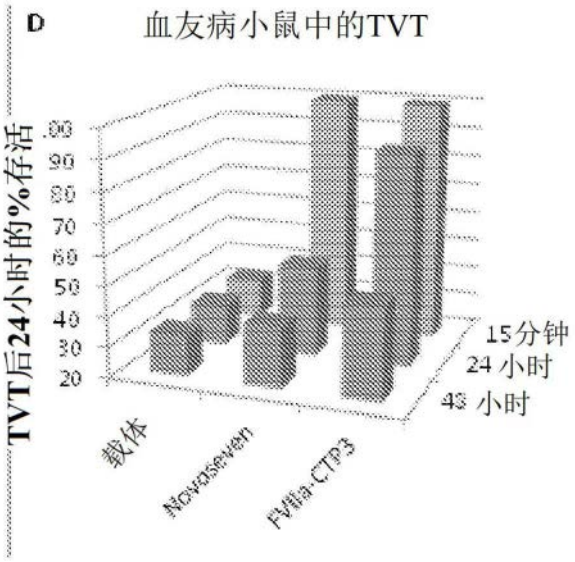

D
血友病小鼠中的TVT
TVT后24小时的%存活
100
90
80
70
60
50
40
30
20
载体
Novoseven
FVIIa-CTP3
15分钟
24 小时
48 小时

图7D

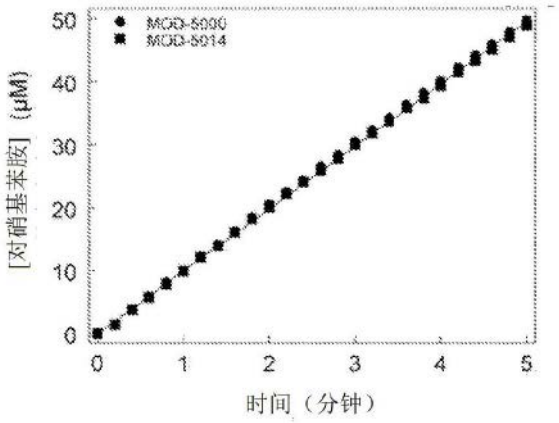

MOD-5000
MOD-5014
[对硝基苯胺]（μM）
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
5
时间（分钟）

图8

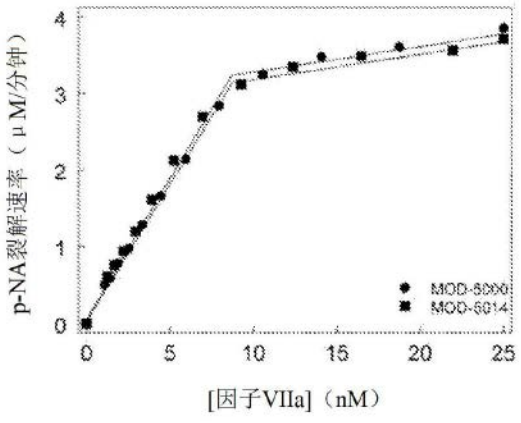

p-NA裂解速率（μM/分钟）
4
3
2
1
0
0
5
10
15
20
25
MOD-5000
MOD-5014
[因子VIIa]（nM）

图9

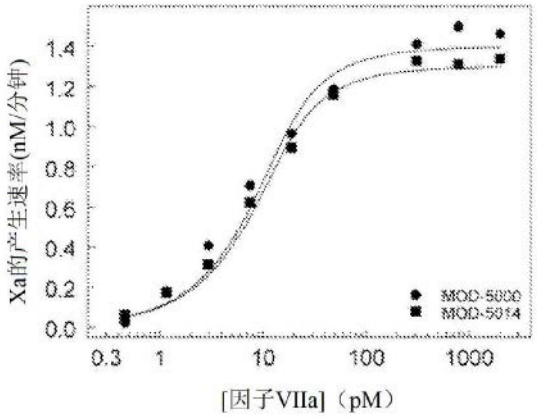

Xa的产生速率(nM/分钟)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.3
1
10
100
1000
[因子VIIa]（pM）
MOD-5000
MOD-5014

图10

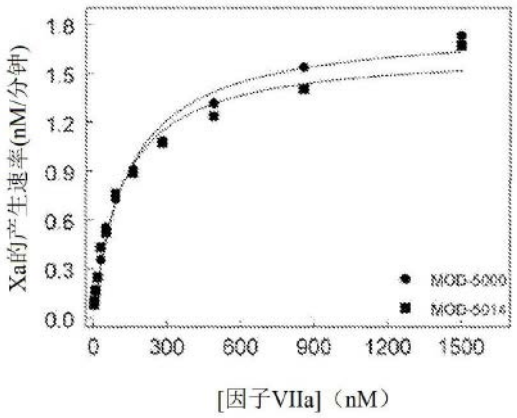

Xa的产生速率(nM/分钟)
1.8
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
0
300
600
900
1200
1500
[因子VIIa]（nM）
MOD-5000
MOD-5014

图11

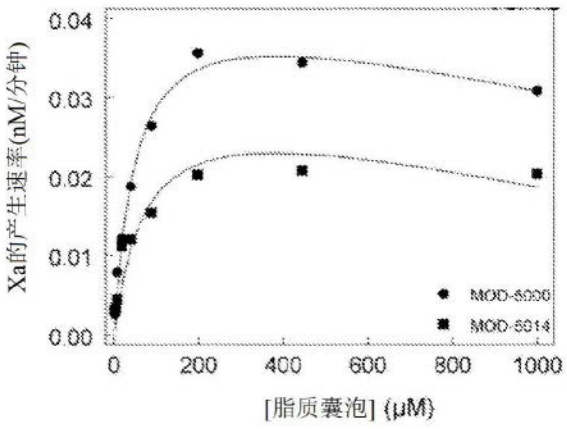

Xa的产生速率(nM/分钟)
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
0
200
400
600
800
1000
[脂质囊泡] (μM)
MOD-5000
MOD-5014

图12A

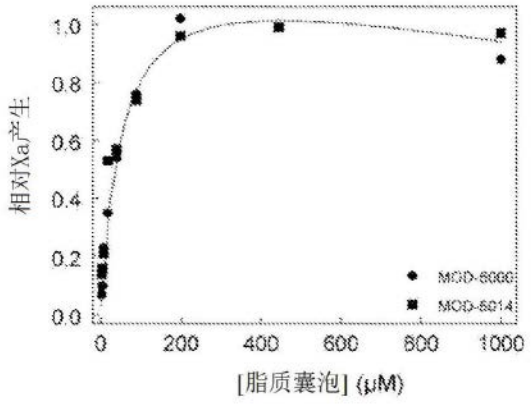

相对Xa产生
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
200
400
600
800
1000
[脂质囊泡] (μM)
MOD-5000
MOD-5014

图12B

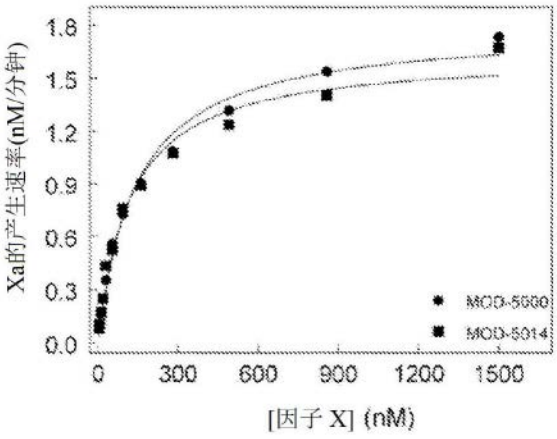

Xa的产生速率(nM/分钟)
1.8
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
0
300
600
900
1200
1500
[因子 X] (nM)
MOD-5000
MOD-5014

图13

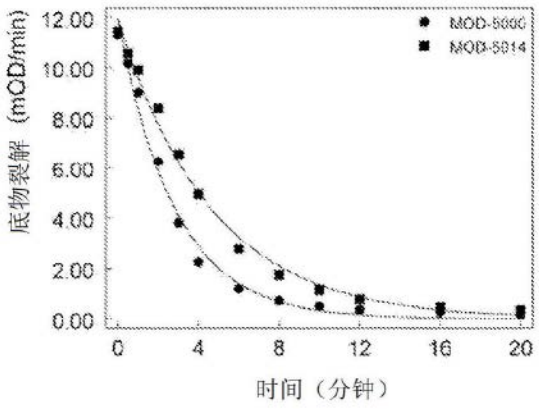

底物裂解 (mOD/min)
12.00
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
0
4
8
12
16
20
时间（分钟）
MOD-5000
MOD-5014

图14

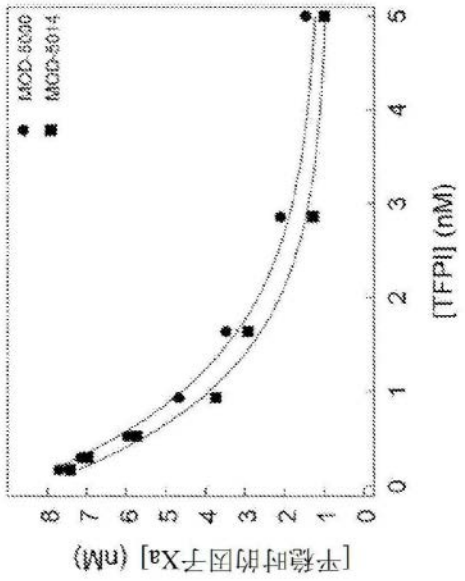

MOD-5030
MOD-5014
[TFPI] (nM)
[平稳时的因子Xa] (nM)

图15A

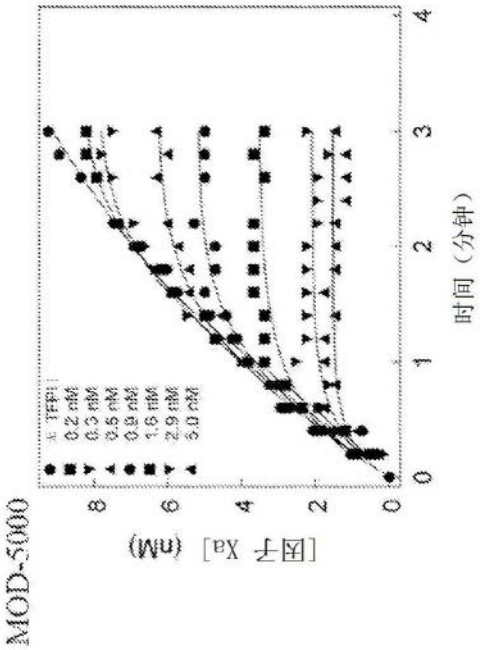

MOD-5000
[因子 Xa] (nM)
时间（分钟）
0.2 nM
0.3 nM
0.5 nM
0.9 nM
1.6 nM
2.9 nM
5.0 nM

图15B

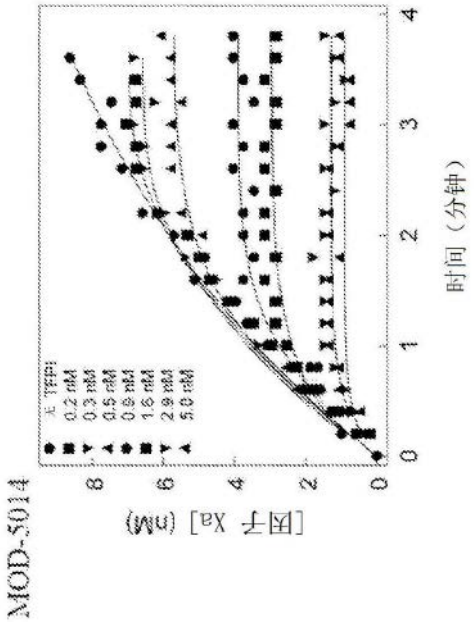

MOD-5014
[因子 Xa] (nM)
时间（分钟）
0
1
2
3
4
0
2
4
6
8
0.2 nM
0.3 nM
0.5 nM
0.9 nM
1.6 nM
2.9 nM
5.0 nM

图15C


MCB/WCB小瓶解冻，步骤1
亚培养；增殖
步骤2
在50L生物反应器接种然后转入200L生物反应器
步骤3
生产生物反应器
1000L或2000L生物反应器
步骤4
收获、澄清和储存
步骤5

图16


超滤渗滤1
（UFDF-1）
步骤6
病毒灭活
步骤7
亲和色谱
步骤8
多模型或混合模式色谱（步骤9）
疏水相互作用色谱（HIC）步骤10
超滤和渗滤
HIC洗脱液的UF/DF-2
步骤11
阴离子交换色谱
步骤12
通过纳米过滤的病毒去除
步骤13
UF/DF3和过滤（0.22μm过滤器）和药物物质储存（-70℃）
步骤14

图17

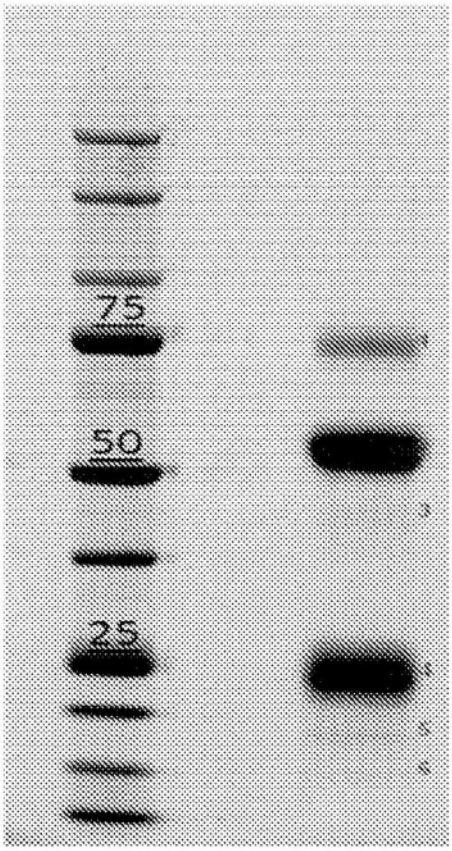


图18

纯化步骤	带电荷N-聚糖 (%)
收获	NA
病毒灭活 + VII亲和色谱	80.01
多模型或混合模式 色谱	79.4
UF/DF2	78.5
UF/DF3	79.5

图19

纯化步骤	RP-HPLC(%)		
	主峰	氧化形式	其它相关形式
收获	NA	NA	NA
病毒灭活 + VII亲和色谱	89.10	4.66	6.23
多模型或混合模式色谱	91.31	4.38	4.31
疏水相互作用色谱（HIC）	94.03	2.68	3.29
阴离子交换色谱	94.69	2.48	2.83

图20

纯化步骤	γ羧化(%)
收获	NA
病毒灭活 + VII亲和色谱	95.4
多模型或混合模式 色谱	100

图21

纯化步骤	唾液酸（mol/mol产物）
收获	NA
病毒灭活 + VII亲和色谱	15.25
CHT	16.6
UF/DF2	16.6
UF/DF3	16.4

图22