



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I537006 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 06 月 11 日

(21)申請案號：099124493

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 07 月 26 日

(51)Int. Cl. : *A61K47/48 (2006.01)* *A61K38/36 (2006.01)*
A61K38/37 (2006.01)

(30)優先權：2009/07/27 美國 61/228,828
 2010/05/21 美國 61/347,136

(71)申請人：巴克斯歐塔公司 (美國) BAXALTA INCORPORATED (US)

美國

巴克斯歐塔有限公司 (瑞士) BAXALTA GMBH (CH)

瑞士

(72)發明人：塞克曼 澤楨 SIEKMANN, JUERGEN (DE)；海德 史帝芬 HAIDER, STEFAN (AT)；羅特斯登能 翰斯彼得 ROTTENSTEINER, HANSPETER (AT)；杜瑞柴克 彼得 TURECEK, PETER (AT)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

(56)參考文獻：

US 2009/0076237A1

WO 2005/014024A2

審查人員：吳祖漢

申請專利範圍項數：9 項 圖式數：8 共 79 頁

(54)名稱

凝血蛋白接合物

BLOOD COAGULATION PROTEIN CONJUGATES

(57)摘要

本發明係關於使水溶性聚合物接合於凝血蛋白之氧化之碳水化合物部分的物質及方法，其包含使該氧化之碳水化合物部分與活化之水溶性聚合物在允許接合之條件下接觸。更特定言之，本發明係關於前述物質及方法，其中該水溶性聚合物含有活性胺氧基，且其中肟鍵聯在該氧化之碳水化合物部分與該水溶性聚合物上之活性胺氧基之間形成。在本發明之一具體實例中，該接合在親核性催化劑苯胺存在下進行。另外，所產生之肟鍵聯可藉由用 NaCNBH_3 還原形成烷氧基胺鍵聯來穩定。

The invention relates to materials and methods of conjugating a water soluble polymer to an oxidized carbohydrate moiety of a blood coagulation protein comprising contacting the oxidized carbohydrate moiety with an activated water soluble polymer under conditions that allow conjugation. More specifically, the present invention relates to the aforementioned materials and methods wherein the water soluble polymer contains an active aminooxy group and wherein an oxime linkage is formed between the oxidized carbohydrate moiety and the active aminooxy group on the water soluble polymer. In one embodiment of the invention the conjugation is carried out in the presence of the nucleophilic catalyst aniline. In addition the generated oxime linkage can be stabilized by reduction with NaCNBH_3 to form an alkoxyamine linkage.

指定代表圖：

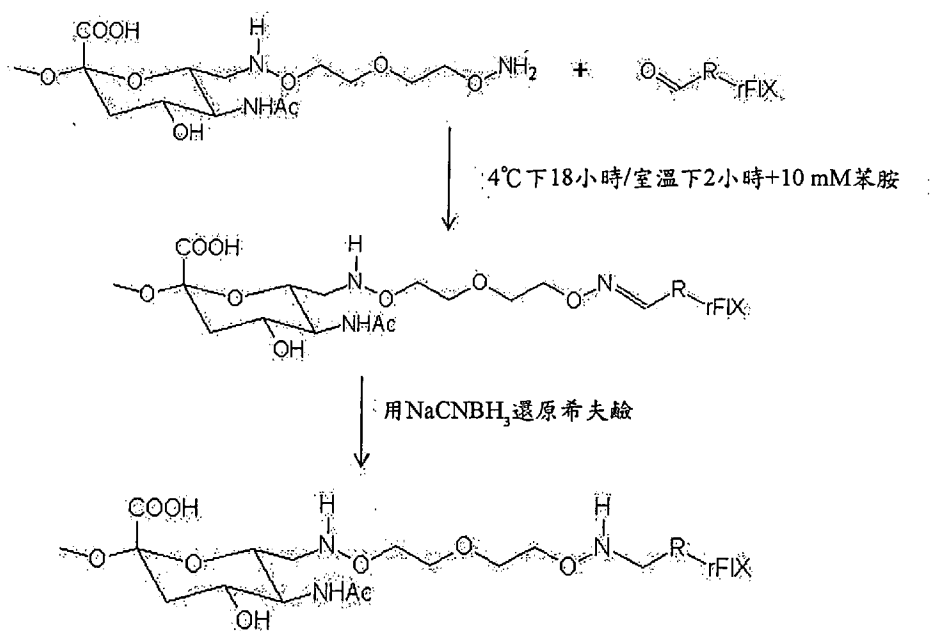


圖 2

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99124493

※申請日：99.7.26

※IPC 分類：

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

凝血蛋白接合物

BLOOD COAGULATION PROTEIN CONJUGATES

二、中文發明摘要：

本發明係關於使水溶性聚合物接合於凝血蛋白之氧化之碳水化合物部分的物質及方法，其包含使該氧化之碳水化合物部分與活化之水溶性聚合物在允許接合之條件下接觸。更特定言之，本發明係關於前述物質及方法，其中該水溶性聚合物含有活性胺氧基，且其中胺鍵聯在該氧化之碳水化合物部分與該水溶性聚合物上之活性胺氧基之間形成。在本發明之一具體實例中，該接合在親核性催化劑苯胺存在下進行。另外，所產生之胺鍵聯可藉由用 NaCNBH_3 還原形成烷氧基胺鍵聯來穩定。

三、英文發明摘要：

The invention relates to materials and methods of conjugating a water soluble polymer to an oxidized carbohydrate moiety of a blood coagulation protein comprising contacting the oxidized carbohydrate moiety with an activated water soluble polymer under conditions

that allow conjugation. More specifically, the present invention relates to the aforementioned materials and methods wherein the water soluble polymer contains an active aminooxy group and wherein an oxime linkage is formed between the oxidized carbohydrate moiety and the active aminooxy group on the water soluble polymer. In one embodiment of the invention the conjugation is carried out in the presence of the nucleophilic catalyst aniline. In addition the generated oxime linkage can be stabilized by reduction with NaCNBH_3 to form an alkoxyamine linkage.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖 2。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

六、發明說明：

本申請案主張 2010 年 5 月 21 日申請之美國臨時申請案第 61/347,136 號及 2009 年 7 月 27 日申請之美國臨時申請案第 61/228,828 號之權益，該等申請案全部以全文引用之方式併入本文中。

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於使水溶性聚合物接合於凝血蛋白之物質及方法。

【先前技術】

治療性多肽諸如凝血蛋白（包括因子 IX (FIX)、因子 VIII(FVIII)、因子 VIIa(FVIIa)、馮威裏因子(Von Willebrand Factor, VWF)、因子 FV(FV)、因子 X(FX)、因子 XI(FXI)、因子 XII(FXII)、凝血酶(FII)、蛋白質 C、蛋白質 S、tPA、PAI-1、組織因子(TF)及 ADAMTS 13 蛋白酶)，會被蛋白水解酶快速降解並被抗體中和。此會縮短其半生期及循環時間，從而限制其治療效能。必需相對較高之劑量及投藥頻率來達到並持續此等凝血蛋白之期望治療或防治效果。因此，難以實現適當的劑量調節，且對頻繁靜脈內投藥之需要對患者之生活方式造成限制。

多肽藥物之聚乙二醇化在循環中對該等藥物進行保護，且改善其藥效學及藥物動力學特性(Harris 及 Chess, Nat Rev Drug Discov. 2003;2:214-21)。聚乙二醇化過程使乙二

醇重複單元（聚乙二醇（PEG））連接至多肽藥物。PEG 分子具有大流體動力學體積（球狀蛋白大小之 5-10 倍），具有高度水溶性且為水合的、無毒性、非免疫原性的，並快速自身體內清除。分子之聚乙二醇化可增強藥物對酶促降解之抗性，增加活體內半生期、減少給藥頻率、降低免疫原性、增強物理及熱穩定性、增強溶解性、增強液體穩定性及減少聚集。第一種聚乙二醇化藥物在 20 世紀 90 年代早期獲得 FDA 批准。此後，FDA 批准了數種聚乙二醇化藥物用於經口、注射及局部投藥。

聚唾液酸（PSA）（亦稱為多聚乙醯神經胺糖酸（colominic acid, CA））為天然存在之多醣。其為含 $\alpha(2 \rightarrow 8)$ 酮苷鍵聯之 N-乙醯基神經胺糖酸的同聚物且在其非還原末端含有鄰二醇基團。其帶負電且為人體之天然組成部分。其可容易地由細菌以大量及預定生理特徵製造（美國專利第 5,846,951 號）。因為細菌產生之 PSA 在化學及免疫方面與人體所產生之 PSA 相同，所以細菌 PSA 即使與蛋白質偶合亦為非免疫原性的。不同於某些聚合物，聚唾液酸為生物可降解的。多聚乙醯神經胺糖酸與過氧化氫酶及天門冬醯胺酶之共價偶合已顯示增強在蛋白水解酶或血漿存在下之酶穩定性。用聚唾液酸化天門冬醯胺酶與未經修飾之天門冬醯胺酶進行的活體內比較研究揭示聚唾液酸化增加酶之半生期（Femandes 及 Gregoriadis, *Int J Pharm.* 2001;217:215-24）。

藉由在水溶性聚合物與治療性蛋白質之間形成共價鍵

聯來製備接合物可利用多種化學方法進行。舉例而言，Roberts 等人 (Adv Drug Deliv Rev 2002;54:459-76) 回顧了 PEG 衍生物與肽或蛋白質之偶合。一種使水溶性聚合物與治療性蛋白質偶合之方法為使聚合物經由蛋白質之碳水化合物部分接合。可容易地用過碘酸鈉 (NaIO_4) 氧化蛋白質中碳水化合物之鄰羥基 (OH) 以形成活性醛基 (Rothfus et Smith, J Biol Chem 1963; 238:1402-10; van Lenten et Ashweli, J Biol Chem 1971;246:1889-94)。接著，可藉由使用含有例如活性醯肼基之試劑使聚合物與碳水化合物之醛基偶合 (Wilchek M 及 Bayer EA, Methods Enzymol 1987;138:429-42)。新近技術為使用含有與醛反應形成肟鍵聯之胺氧基的試劑 (WO 96/40662、WO2008/025856)。

描述使水溶性聚合物接合於治療性蛋白質的其他實例描述於以下文獻中：WO 06/071801，教示氧化馮威裏因子中之碳水化合物部分，並接著使用醯肼化學與 PEG 偶合；美國公開案第 2009/0076237 號，教示氧化 rFVIII，並接著使用醯肼化學與 PEG 及其他水溶性聚合物（例如 PSA、HES、葡聚糖）偶合；WO 2008/025856，教示氧化不同凝血因子（例如 rFIX、FVIII 及 FVIIa），並接著使用胺氧基化學經由形成肟鍵聯與例如 PEG 偶合；及美國專利第 5,621,039 號，教示氧化 FIX，並接著使用醯肼化學與 PEG 偶合。

最近，描述了一種改良方法，該方法包含以過碘酸鹽適度氧化唾液酸以產生醛，接著在催化量之苯胺存在下與含胺氧基之試劑反應 (Dirksen A 及 Dawson PE,

Bioconjugate Chem. 2008;19,2543-8; 及 Zeng Y 等人, Nature Methods 2009;6:207-9)。苯胺催化作用顯著加速肽連接，從而允許使用極低濃度之該試劑。

縱使存在可用於使水溶性聚合物接合於治療性蛋白質之方法，但仍需要開發改良蛋白質之藥效學及/或藥物動力學性質同時使與各種試劑相關之成本降至最低的使水溶性聚合物接合於蛋白質的物質及方法。

【發明內容】

本發明提供使聚合物接合於蛋白質的物質及方法，其改善蛋白質之藥效學及/或藥物動力學性質同時使與各種試劑相關之成本降至最低。

在本發明之一具體實例中，使水溶性聚合物接合於凝血蛋白之氧化之碳水化合物部分的方法包含使氧化之碳水化合物部分與活化之水溶性聚合物在允許接合之條件下接觸；該凝血蛋白係選自由以下者所組成之群組：因子 IX (FIX)、因子 VIII (FVIII)、因子 VIIa (FVIIa)、馮威裏因子 (VWF)、因子 FV (FV)、因子 X (FX)、因子 XI (FXI)、因子 XII (FXII)、凝血酶 (FII)、蛋白質 C、蛋白質 S、tPA、PAI-1、組織因子 (TF) 及 ADAMTS 13 蛋白酶或其生物活性片段、衍生物或變異體；該水溶性聚合物含有活性胺氧基且選自由以下者所組成之群組：聚乙二醇 (PEG)、分支 PEG、聚唾液酸 (PSA)、碳水化合物、多醣、普魯蘭 (pullulane)、聚葡萄糖胺糖、玻尿酸、硫酸軟骨素、硫酸皮

膚素、澱粉、葡聚糖、羧甲基-葡聚糖、聚伸烷基氧化物 (PAO)、聚伸烷二醇 (PAG)、聚丙二醇 (PPG)、聚噁唑啉、聚丙烯鹽基咪啉、聚乙烯醇 (PVA)、聚羧酸酯、聚乙烯吡咯啉酮、聚磷氮烯、聚噁唑啉、聚乙烯-共-順丁烯二酸酐、聚苯乙烯-共-順丁烯二酸酐、聚(1-羥基甲基伸乙基-羥基甲基縮甲醛) (PHF)、磷酸 2-甲基丙烯鹽氧基-2'-乙基三甲基銨 (MPC)；且該碳水化合物部分藉由用包含氧化劑之緩衝液培養而氧化，該氧化劑係選自由以下者所組成之群組：過碘酸鈉 (NaIO_4)、四乙酸鉛 ($\text{Pb}(\text{OAc})_4$) 及過鉭酸鉀 (KRuO_4)；其中胍鍵聯在氧化之碳水化合物部分與水溶性聚合物上之活性胺氧基之間形成。

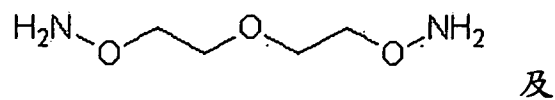
在本發明之另一具體實例中，根據前述方法之水溶性聚合物為 PSA。在一相關具體實例中，PSA 包含約 5-500 或 10-300 個唾液酸單元。在又一具體實例中，根據前述方法之凝血蛋白為 FIX。在另一具體實例中，根據前述方法之凝血蛋白為 FVIIa。在又一具體實例中，根據前述方法之凝血蛋白為 FVIII。在又一具體實例中，提供一種前述方法，其中氧化劑為過碘酸鈉 (NaIO_4)。在另一具體實例中，根據前述方法之凝血蛋白的氧化之碳水化合物部分位於凝血蛋白之活化肽中。

在本發明之又一具體實例中，提供一種前述方法，其中該 PSA 係藉由使活化之胺氧基連接基團與氧化之 PSA 反應來製備；

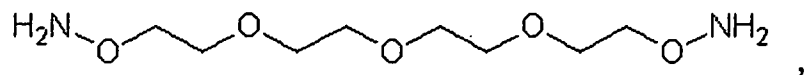
其中該胺氧基連接基團係選自由以下者所組成之群

組：

下式之 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺連接基團：



下式之 3,6,9-三氧雜-十一烷-1,11-二氧基胺連接基團：



其中該 PSA 藉由用氧化劑培養來氧化以在 PSA 之非還原末端形成末端醛基。在又一具體實例中，提供一種前述方法，其中活化之胺氧基連接基團包含 1-50 個乙二醇單元。

在又一具體實例中，提供一種前述方法，其中胺氧基連接基團為 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺。在一相關具體實例中，氧化劑為 NaIO_4 。

在本發明之另一具體實例中，提供一種前述方法，其中該氧化之碳水化合物部分與該活化之水溶性聚合物的接觸在包含選自由苯胺及苯胺衍生物所組成之群組的親核性催化劑之緩衝液中進行。

在本發明之又一具體實例中，提供一種前述方法，其進一步包含藉由在包含選自由氰基硼氫化鈉 (NaCNBH_3) 及抗壞血酸 (維生素 C) 所組成之群組之還原化合物的緩衝液中培養接合之凝血蛋白來還原接合之凝血蛋白中之肽鍵聯的步驟。在一相關具體實例中，還原化合物為氰基硼氫化鈉 (NaCNBH_3)。

在本發明之另一具體實例中，提供一種由前述方法產生之經修飾凝血蛋白。

在本發明之又一具體實例中，提供一種經修飾 FIX，其包含 FIX 分子或其生物活性片段、衍生物或變異體；及至少一個結合至 FIX 分子之胺氧基 PSA，其中該胺氧基 PSA 經由一或多個碳水化合物部分連接至 FIX。

在本發明之另一具體實例中，提供一種經修飾 FVIIa，其包含 FVIIa 分子或其生物活性片段、衍生物或變異體；及至少一個結合至 FVIIa 分子之胺氧基 PSA，其中該胺氧基 PSA 經由一或多個碳水化合物部分連接至 FVIIa。

在本發明之又一具體實例中，提供一種經修飾 FVIII，其包含 FVIII 分子或其生物活性片段、衍生物或變異體；及至少一個結合至 FVIII 分子之胺氧基 PSA，其中該胺氧基 PSA 經由一或多個碳水化合物部分連接至 FVIII。

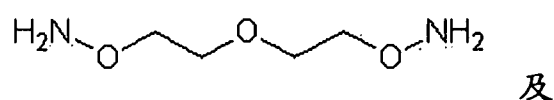
在本發明之又一具體實例中，提供一種經修飾 FIX，其包含 FIX 分子或其生物活性片段、衍生物或變異體；及至少一個結合至 FIX 分子之胺氧基 PEG，其中該胺氧基 PEG 經由一或多個碳水化合物部分連接至 FIX。

在本發明之另一具體實例中，提供一種經修飾 FVIIa，其包含 FVIIa 分子或其生物活性片段、衍生物或變異體；及至少一個結合至 FVIIa 分子之胺氧基 PEG，其中該胺氧基 PEG 經由一或多個碳水化合物部分連接至 FVIIa。

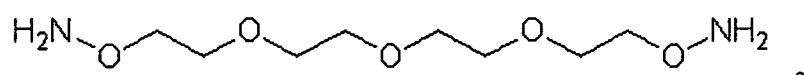
在本發明之又一具體實例中，提供一種經修飾 FVIII，其包含 FVIII 分子或其生物活性片段、衍生物或變異體；及至少一個結合至 FVIII 分子之胺氧基 PEG，其中該胺氧基 PEG 經由一或多個碳水化合物部分連接至 FVIII。

在又一具體實例中，提供一種包含活性胺氧基連接基團之水溶性聚合物；該水溶性聚合物選自由以下者所組成之群組：聚乙二醇（PEG）、分支 PEG、聚唾液酸（PSA）、碳水化合物、多醣、普魯蘭、聚葡萄糖胺糖、玻尿酸、硫酸軟骨素、硫酸皮膚素、澱粉、葡聚糖、羧甲基-葡聚糖、聚伸烷基氧化物（PAO）、聚伸烷二醇（PAG）、聚丙二醇（PPG）、聚吡啶啉、聚丙烯醯基咪啉、聚乙烯醇（PVA）、聚羧酸酯、聚乙烯吡咯啶酮、聚磷氮烯、聚吡啶啉、聚乙烯-共-順丁烯二酸酐、聚苯乙烯-共-順丁烯二酸酐、聚（1-羥基甲基伸乙基-羥基甲基縮甲醛）（PHF）、磷酸 2-甲基丙烯醯氧基-2'-乙基三甲基銨（MPC）；該活性胺氧基連接基團係選自由以下者所組成之群組：

下式之 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺連接基團：



下式之 3,6,9-三氧雜-十一烷-1,11-二氧基胺連接基團：



在又一具體實例中，提供一種前述方法，其中活化之胺氧基連接基團包含 1-50 個乙二醇單元。

【實施方式】

治療性蛋白質之藥理學及免疫性質可藉由化學修飾及與聚合化合物接合來改善，該等聚合化合物為諸如聚乙二醇（PEG）、分支 PEG、聚唾液酸（PSA）、碳水化合物、多

醣、普魯蘭、聚葡萄糖、玻尿酸、硫酸軟骨素、硫酸皮膚素、澱粉、葡聚糖、羧甲基-葡聚糖、聚伸烷基氧化物 (PAO)、聚伸烷二醇 (PAG)、聚丙二醇 (PPG)、聚噁唑啉、聚丙烯鹽基咪啉、聚乙烯醇 (PVA)、聚羧酸酯、聚乙烯吡咯啉酮、聚磷氮烯、聚噁唑啉、聚乙烯-共-順丁烯二酸酐、聚苯乙烯-共-順丁烯二酸酐、聚(1-羥基甲基伸乙基-羥基甲基縮甲醛) (PHF)、磷酸 2-甲基丙烯鹽氧基-2'-乙基三甲基銨 (MPC)。所得接合物之性質一般高度取決於聚合物之結構及大小。因此，在此項技術中，具有確定且狹窄大小分佈之聚合物通常較佳。如 PEG 之合成聚合物可容易地製成具有狹窄大小分佈，而 PSA 可以使得產生具有狹窄大小分佈之最終 PSA 製劑的方式純化。另外，具有確定聚合物鏈及狹窄大小分佈之聚乙二醇化試劑市場有售且可以合理的價格購得。

藉由諸如聚唾液酸化來添加可溶性聚合物為一種改善諸如 FIX 之凝血蛋白以及其他凝血蛋白（例如 VWF、FVIIa（參見例如 US 2008/0221032A1，以引用之方式併入本文中）及 FVIII）之性質的方法。

凝血蛋白

如本文所述，本發明涵蓋以下凝血蛋白，包括（但不限於）因子 IX (FIX)、因子 VIII (FVIII)、因子 VIIa (FVIIa)、馮威裏因子 (VWF)、因子 FV (FV)、因子 X (FX)、因子 XI、因子 XII (FXII)、凝血酶 (FII)、蛋白質 C、蛋白質 S、

tPA、PAI-1、組織因子 (TF) 及 ADAMTS 13 蛋白酶。如本文所使用之術語「凝血蛋白 (blood coagulation protein)」係指展現與特定天然凝血蛋白相關之生物活性的任何因子 IX (FIX)、因子 VIII (FVIII)、因子 VIIa (FVIIa)、馮威裏因子 (VWF)、因子 FV (FV)、因子 X (FX)、因子 XII (FXII)、凝血酶 (FII)、蛋白質 C、蛋白質 S、tPA、PAI-1、組織因子 (TF) 及 ADAMTS 13 蛋白酶。

凝血級聯分為三個不同的節段：內在路徑、外在路徑及共同路徑 (Schenone 等人, Curr Opin Hematol. 2004; 11:272-7)。該級聯涉及一系列絲胺酸蛋白酶 (酶原) 及蛋白質輔因子。需要時，非活性酶原前驅體轉化為活性形式，從而轉化級聯中之後續酶。

內在路徑需要凝血因子 VIII、IX、X、XI 及 XII。當前激肽釋放酶、高分子量激肽原、因子 XI (FXI) 及因子 XII (FXII) 暴露於帶負電之表面時，發生內在路徑之啟始。亦需要自血小板分泌之鈣離子及磷脂。

當血管之血管內腔受損時，啟始外在路徑。膜糖蛋白組織因子暴露，並隨後結合於循環之因子 VII (FVII) 及少量預先存在之其活化形式 FVIIa。此結合有利於 FVII 完全轉化成 FVIIa，及接著在鈣及磷脂存在下因子 IX (FIX) 轉化成因子 IXa (FIXa)，及因子 X (FX) 轉化成因子 Xa (FXa)。FVIIa 與組織因子之締合藉由使 FVII 之受質 (FIX 及 FX) 結合位點更靠近且誘導構形變化 (此增強 FVIIa 之酶促活性) 來增強蛋白水解活性。

FX 之活化為兩個路徑之共點。因子 Va (FVa) 及 Xa 連同磷脂及鈣一起使凝血酶原轉化成凝血酶 (凝血酶原酶複合物)，凝血酶隨後裂解纖維蛋白原形成纖維蛋白單體。該等單體聚合形成纖維蛋白股。因子 XIIIa (FXIIIa) 使該等股相互共價鍵結形成剛性網狀物。

FVII 轉化成 FVIIa 亦受若干蛋白酶催化，該等蛋白酶包括凝血酶、FIXa、FXa、因子 XIa (FXIa) 及因子 XIIa (FXIIa)。為對級聯之早期進行抑制，組織因子路徑抑制劑靶向 FVIIa/組織因子/FXa 產物複合物。

A. 多肽

在一態樣中，本發明之起始物質為可來源於人類血漿或由如專利中所述之重組工程改造技術製備之凝血蛋白，該等專利為美國專利第 4,757,006 號；美國專利第 5,733,873 號；美國專利第 5,198,349 號；美國專利第 5,250,421 號；美國專利第 5,919,766 號；及 EP 306 968。如本文所述，術語凝血蛋白係指展現與天然凝血蛋白相關之生物活性的任何凝血蛋白分子。在本發明之一具體實例中，凝血蛋白分子為全長凝血蛋白。

預期之凝血蛋白分子包括全長蛋白質、全長蛋白質之前驅體、全長蛋白質之生物活性次單元或片段以及任何此等凝血蛋白形式之生物活性衍生物及變異體。因此，凝血蛋白包括滿足以下條件者：(1) 具有在至少約 25 個、約 50 個、約 100 個、約 200 個、約 300 個、約 400 個或更多胺

基酸之區域內與本文所述之參考核酸或胺基酸序列編碼之多肽的胺基酸序列具有大於約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%或約 99%或更高一致性的胺基酸序列；及/或(2)特異性結合於針對包含如本文所述之參考胺基酸序列之免疫原、其免疫原性片段及/或其保守性修飾變異體產生的抗體，例如多株或單株抗體。

根據本發明，術語「重組凝血蛋白(recombinant blood coagulation protein)」包括經由重組 DNA 技術獲得之任何凝血蛋白。在某些具體實例中，該術語涵蓋如本文所述之蛋白質。

如本文所使用之「內源性凝血蛋白(endogenous blood coagulation protein)」包括起源於意欲接受治療之哺乳動物之凝血蛋白。該術語亦包括自該哺乳動物中所存在之轉殖基因或任何其他外來 DNA 轉錄的凝血蛋白。如本文所使用之「外源性凝血蛋白(exogenous blood coagulation protein)」包括並非起源於意欲接受治療之哺乳動物之凝血蛋白。

如本文所使用之「血漿來源之凝血蛋白(plasma-derived blood coagulation protein)」或「血漿性(plasmatic)」包括自哺乳動物獲得之血液中可見的具有參與凝血路徑之性質之蛋白質的所有形式。

如本文所使用之「生物活性衍生物(biologically active derivative)」或「生物活性變異體(biologically active

variant)」包括分子之與該分子具有實質上相同之功能及/或生物性質（諸如結合性質）及/或相同結構基礎（諸如肽主鏈或基礎聚合單元）的任何衍生物或變異體。

「類似物（analog）」、「變異體（variant）」或「衍生物（derivative）」為與天然存在之分子在結構上實質上類似且具有相同生物活性之化合物，但在某些情況下，程度不同。舉例而言，多肽變異體係指與參考多肽共享實質上類似之結構且具有相同之生物活性的多肽。變異體或類似物與衍生物該類似物之天然存在多肽相比基於一或多個突變而在胺基酸序列組成方面不同，該一或多個突變涉及（i）多肽之一或多個末端處及/或天然存在多肽序列之一或多個內部區域（例如片段）中缺失一或多個胺基酸殘基，（ii）在多肽之一或多個末端處（典型地為「添加（addition）或「融合（fusion）」）及/或天然存在多肽序列之一或多個內部區域（典型地為「插入（insertion）」）中插入或添加一或多個胺基酸，或（iii）天然存在多肽序列中之一或多個胺基酸被取代成其他胺基酸。舉例而言，「衍生物（derivative）」係指已經修飾（例如化學修飾）之與參考多肽共享相同或實質上類似之結構的多肽。

變異體或類似物多肽包括插入變異體，其中向本發明之凝血蛋白胺基酸序列添加一或多個胺基酸殘基。插入可位於蛋白質之任一個或兩個末端，及/或可位於凝血蛋白胺基酸序列之內部區域中。任一個或兩個末端具有額外殘基之插入變異體包括例如融合蛋白及包括胺基酸標籤或其他

胺基酸標記之蛋白質。在一態樣中，凝血蛋白分子視情況含有 N 末端 Met，尤其當分子重組表現於諸如大腸桿菌 (E. coli) 之細菌細胞中時。

在缺失變異體中，在如本文所述之凝血蛋白多肽中一或多個胺基酸殘基經移除。缺失可在凝血蛋白多肽之一個或兩個末端實現，及/或移除凝血蛋白胺基酸序列內部之一或多個殘基。因此，缺失變異體包括凝血蛋白多肽序列之片段。

在取代變異體中，凝血蛋白多肽之一或多個胺基酸殘基經移除並用替代殘基置換。在一態樣中，取代在性質上為保守性的，且該類型之保守性取代在此項技術中為熟知的。或者，本發明包涵亦為非保守性之取代。例示性保守性取代描述於 Lehninger, [Biochemistry, 第 2 版; Worth Publishers 公司, New York (1975), 第 71-77 頁] 中，且緊接著陳述如下。

保守性取代

側鏈特徵	胺基酸
非極性 (疏水性):	
A.脂族	ALIVP
B.芳族	FW
C.含硫	M
D.邊界	G
不帶電極性:	
A.羥基	STY
B.醯胺	NQ
C.硫氫基	C
D.邊界	G
帶正電 (鹼性)	KRH
帶負電 (酸性)	DE

或者，例示性保守性取代緊接著陳述如下。

保守性取代 II

初始殘基	例示性取代
Ala (A)	Val、Leu、Ile
Arg (R)	Lys、Gln、Asn
Asn (N)	Gln、His、Lys、Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
His (H)	Asn、Gln、Lys、Arg
Ile (I)	Leu、Val、Met、Ala、Phe,
Leu (L)	Ile、Val、Met、Ala、Phe
Lys (K)	Arg、Gln、Asn
Met (M)	Leu、Phe、Ile
Phe (F)	Leu、Val、Ile、Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp、Phe、Thr、Ser
Val (V)	Ile、Leu、Met、Phe、Ala

B. 聚核甘酸

本發明之編碼凝血蛋白之核酸包括例如（但不限於）基因、前 mRNA、mRNA、cDNA、多形變異體、對偶基因、合成及天然存在之突變體。

本發明之編碼凝血蛋白之聚核甘酸亦包括（但不限於）滿足以下條件者：（1）在嚴格雜交條件下與編碼本文所述之參考胺基酸序列的核酸及其保守性修飾變異體特異性雜交；（2）具有在至少約 25 個、約 50 個、約 100 個、約 150

個、約 200 個、約 250 個、約 500 個、約 1000 個或更多核苷酸之區域(至多成熟蛋白質之 1218 個核苷酸的全長序列)內與本文所述之參考核酸序列具有大於約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%或更高核苷酸序列一致性的核酸序列。例示性「嚴格雜交 (stringent hybridization)」條件包括在 42°C 下於 50%甲醯胺、5×SSC、20 mM Na₂PO₄, pH 6.8 中雜交；及在 55°C 下以 1×SSC 洗滌 30 分鐘。應瞭解，此等例示性條件之變化可基於欲雜交之序列的長度及 GC 核苷酸含量進行。此項技術中之標準式適於確定適當雜交條件。參見 Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) §§ 9.47-9.51。

「天然存在 (naturally-occurring)」聚核苷酸或多肽序列典型地來自哺乳動物，包括 (但不限於) 靈長類動物，例如人類；齧齒動物，例如大鼠、小鼠、倉鼠；牛、豬、馬、綿羊或任何哺乳動物。本發明之核酸及蛋白質可為重組分子 (例如為異源的且編碼野生型序列或其變異體，或為非天然存在的)。

在本發明之某些具體實例中，前述多肽及聚核苷酸例如為以下凝血蛋白。

因子 VIIa

FVII (亦稱為穩定因子或前轉化素) 為在止血及凝血中具有關鍵作用之維生素 K 依賴性絲胺酸蛋白酶醣蛋白

(Eigenbrot, Curr Protein Pept Sci. 2002;3:287-99)。

FVII 在肝臟中合成且以 48 kD 之單鏈醣蛋白形式分泌。FVII 與所有維生素 K 依賴性絲胺酸蛋白酶醣蛋白共享由類似的以下組成之蛋白質域結構：具有 9-12 個殘基負責蛋白質與脂膜交互作用之胺基端 γ -羧基麩胺酸 (Gla) 域、羧基端絲胺酸蛋白酶域 (催化域)、及兩個含有介導與組織因子交互作用之鈣離子結合位點的表皮生長因子樣域。 γ -麩胺醯羧化酶催化分子胺基端部分中 Gla 殘基的羧化。羧化酶之作用依賴於維生素 K 之還原形式，該維生素 K 氧化成環氧化物形式。需要維生素 K 環氧化物還原酶使維生素 K 之環氧化物形式轉化回還原形式。

大比例之 FVII 以酶原形式在血漿中循環，且此形式之活化導致精胺酸 152 與異白胺酸 153 之間的肽鍵裂解。所得活化之 FVIIa 由經由單一雙硫鍵 (Cys 135 與 Cys 262) 鍵聯的 NH_2 衍生之輕鏈 (20 kD) 及 COOH 端衍生之重鏈 (30 kD) 組成。輕鏈含有膜結合 Gla 域，而重鏈含有催化域。

遺傳及環境因素決定之 FVII 血漿濃度為約 0.5 mg/mL (Pinotti 等人, Blood. 2000;95:3423-8)。不同 FVII 基因型之平均 FVII 含量可相差數倍。健康女性之血漿 FVII 含量在妊娠期間升高，而且血漿 FVII 含量會隨年齡而增加，且在女性及患高甘油三酯血症者中較高。FVII 在所有促凝血因子中半生期最短 (3-6 h)。健康個體之平均 FVIIa 血漿濃度為 3.6 ng/mL，且 FVIIa 之循環半生期與其他凝血因子相比相對較長 (2.5 h)。

遺傳性 FVII 缺乏為一種罕見常染色體隱性出血病症，據估算總群體之發病率為每 500,000 個人 1 例 (Acharya 等人, J Thromb Haemost. 2004;2248-56)。抑制劑所致之後天性 FVII 缺乏亦極罕見。亦已報導缺乏之發生與諸如頭孢菌素 (cephalosporin)、青黴素 (penicillin) 及口服抗凝血劑之藥物相關的病例。此外，已報導後天性 FVII 缺乏自發發生，或伴隨其他病狀 (諸如骨髓瘤、敗血症、再生障礙性貧血)、伴隨白細胞介素-2 及抗胸腺細胞球蛋白療法而發生。

參考聚核苷酸及多肽序列包括例如 GenBank 寄存編號 J02933 (基因組序列)、M13232 (cDNA) (Hagen 等人, PNAS 1986; 83:2412-6) 及 P08709 (多肽序列) (參考文獻全文併入本文中)。已描述 FVII 之多種多形現象，例如參看 Sabater-Lleal 等人 (Hum Genet. 2006; 118:741-51) (參考文獻全文併入本文中)。

因子 IX

FIX 為藉由在鈣離子、磷脂及 FVIIIa 存在下將 FX 轉化成其活性形式來參與凝血內在路徑之維生素 K 依賴性血漿蛋白質。FIX 之主要催化能力為作為對 FX 內之特定精胺酸-異白胺酸鍵具有特異性的絲胺酸蛋白酶。FIX 之活化經由 FXIa 發生，FXIa 引起自 FIX 切除活化肽，從而產生包含兩個經由一或多個雙硫鍵保持在一起之鏈的活化 FIX 分子。FIX 之缺乏為隱性 X 連鎖 B 型血友病之病因。

A 型及 B 型血友病分別為以 FVIII 及 FIX 多肽之缺乏為特徵的遺傳性疾病。缺乏之基礎病因經常為 FVIII 及 FIX 基因突變之結果，FVIII 與 FIX 基因兩者均位於 X 染色體上。血友病之傳統療法通常涉及靜脈內投予來自正常個體之彙集血漿或半純化凝血蛋白。此等製劑可能受病原體或病毒污染，該等病原體或病毒為諸如感染性朊病毒、HIV、小病毒、A 型肝炎及 C 型肝炎。因此，迫切需要不需要使用人類血清之治療劑。

FIX 活性降低之程度與 B 型血友病之嚴重程度成正比。B 型血友病之當前治療由以下組成：用血漿來源之 FIX 或重組 FIX 置換缺乏之蛋白質（所謂的 FIX 替代或置換治療或療法）。

FIX 之聚核苷酸及多肽序列可見於例如 UniProtKB/Swiss-Prot 寄存編號 P00740、美國專利第 6,531,298 號及圖 1 中。

因子 VIII

凝血因子 VIII (FVIII) 以極低濃度在血漿中循環且非共價結合於馮威裏因子 (VWF)。止血期間，FVIII 與 VWF 分離且藉由在鈣及磷脂或細胞膜存在下增強活化速率而充當已活化因子 IX (FIXa) 介導之 FX 活化的輔因子。

FVIII 可以具有域結構 A1-A2-B-A3-C1-C2 之約 270-330 kD 之單鏈前驅體形式合成。當自血漿純化（例如「血漿來源」或「血漿性」）時，FVIII 由重鏈 (A1-A2-B) 及輕鏈

(A3-C1-C2) 構成。輕鏈之分子質量為 80 kD，而歸因於 B 域內存在蛋白水解，重鏈之分子質量在 90-220 kD 範圍內。

FVIII 亦以重組蛋白質形式合成以供在治療上用於止血病症。已設計各種試管內檢定來測定重組 FVIII (rFVIII) 作為治療性藥品之潛在功效。此等檢定模擬內源性 FVIII 之活體內作用。FVIII 之試管內凝血酶處理使得其促凝血活性快速增加，接著降低，如試管內檢定所量測。此活化及失活與重鏈與輕鏈中之特異性受限蛋白水解一致，該蛋白水解改變 FVIII 中不同結合抗原決定基之可用性，例如允許 FVIII 自 VWF 解離並結合於磷脂表面或改變與某些單株抗體之結合能力。

FVIII 之缺乏或功能異常導致最常見的出血病症，A 型血友病。管理 A 型血友病之所選治療為血漿來源或 rFVIII 濃縮物之替代療法，FVIII 含量低於 1% 之重度 A 型血友病患者一般採用防治性療法，目的在於在各劑量之間保持 FVIII 高於 1%。考慮到各種 FVIII 產物在循環中之平均半生期，此結果通常可藉由每週給予 FVIII 兩至三次來達成。

參考聚核苷酸及多肽序列包括例如 UniProtKB/Swiss-Prot P00451 (FA8_HUMAN); Gitschier J 等人, Characterization of the human Factor VIII gene, Nature, 312(5992): 326-30 (1984); Vehar GH 等人, Structure of human Factor VIII, Nature, 312(5992):337-42 (1984); Thompson AR. Structure and Function of the Factor VIII gene and protein, Semin Thromb Hemost, 2003:29; 11-29

(2002)。

馮威裏因子

馮威裏因子 (VWF) 為在血漿中循環之呈一系列大小在約 500 kD 至 20,000 kD 範圍內之多聚體的醣蛋白。VWF 之多聚形式由經由雙硫鍵鍵聯在一起之 250 kD 多肽次單元構成。VWF 介導最初的血小板於受損血管壁內皮下層上之黏附。僅較大多聚體展現止血活性。假定內皮細胞分泌大型多聚形式之 VWF，且具有低分子量之彼等 VWF 形式 (低分子量 VWF) 由蛋白水解裂解而產生。具有大分子質量之多聚體儲存於內皮細胞之韋伯潘力氏小體 (Weibel-Pallade body) 內且在受刺激後釋放。

VWF 由內皮細胞及巨核細胞合成為在很大程度上由重複域組成之前原 VWF。信號肽裂解後，原 VWF 經由其 C 端區之二硫鍵聯二聚化。該等二聚體充當多聚化之原聚體，該多聚化受自由端末端之間的二硫鍵聯控制。組裝成多聚體之後，藉由蛋白水解移除前肽序列 (Leyte 等人, Biochem. J. 274 (1991), 257-261)。

自 VWF 之選殖 cDNA 預測的初級轉譯產物為含 2813 個殘基之前驅體多肽 (前原 VWF)。前原 VWF 由含 22 個胺基酸之信號肽及含 741 個胺基酸之前肽組成，其中成熟 VWF 包含 2050 個胺基酸 (Ruggeri Z.A. 及 Ware, J., FASEB J., 308-316 (1993))。

VWF 之缺乏為特徵在於明顯程度不同的出血表型之馮

威裏病 (Von Willebrand disease, VWD) 的病因。第 3 型 VWD 為最嚴重的形式，其中 VWF 完全缺乏，且第 1 型 VWD 與 VWF 之定量損失相關且其表型可能極輕。第 2 型 VWD 與 VWF 之定性缺乏相關且可能與第 3 型 VWD 一樣嚴重。第 2 型 VWD 具有許多亞形式，其中一些與高分子量多聚體之損失或減少相關。第 2a 型馮威裏病 (VWD-2A) 之特徵在於損失中型與大型多聚體。VWD-2B 之特徵在於損失最高分子量之多聚體。此項技術中已知其他與 VWF 相關之疾病及病症。

前原 VWF 之聚核苷酸及胺基酸序列分別可以 GenBank 寄存編號 NM_000552 及 NP_000543 獲得。

此項技術描述了根據本發明之其他凝血蛋白，例如 Mann KG, Thromb Haemost, 1999;82:165-74。

C. 凝血蛋白之製備

凝血蛋白之製備包括此項技術中已知用於以下之任何方法：(i) 藉由遺傳工程改造製備重組 DNA，(ii) 藉由例如（但不限於）轉染、電穿孔或顯微注射將重組 DNA 引入原核生物或真核生物細胞中，(iii) 培養該等經轉型細胞，(iv) 表現凝血蛋白，例如組成性表現或在誘導後表現，及 (v) 分離該凝血蛋白，例如自培養基中分離或藉由收集經轉型細胞以獲得經純化之凝血蛋白。

在其他態樣中，藉由於以產生藥理學上可接受之凝血蛋白分子為特徵之適合原核生物或真核生物宿主系統中表

現來製備凝血蛋白。真核生物細胞之實例為哺乳動物細胞，諸如 CHO、COS、HEK 293、BHK、SK-Hep 及 HepG2。

多種載體可用於製備凝血蛋白且選自真核生物及原核生物表現載體。用於原核生物表現之載體之實例包括質體，諸如（但不限於）pRSET、pET 及 pBAD，其中用於原核生物表現載體之啟動子包括（但不限於）以下中之一或多個：lac、trc、trp、recA 或 araBAD。用於真核生物表現之載體之實例包括：(i) 用於在酵母中表現時，載體為諸如（但不限於）pAO、pPIC、pYES 或 pMET，使用之啟動子為諸如（但不限於）AOX1、GAP、GAL1 或 AUG1；(ii) 用於在昆蟲細胞中表現，載體為諸如（但不限於）pMT、pAc5、pIB、pMIB 或 pBAC，使用之啟動子為諸如（但不限於）PH、p10、MX、Ac5、OpIE2、gp64 或 polh，及 (iii) 用於在哺乳動物細胞中表現，載體為諸如（但不限於）pSVL、pCMV、pRc/RSV、pcDNA3 或 pBPV，且在一態樣中，載體來源於病毒系統，該等病毒系統為諸如（但不限於）痘瘡病毒、腺關連性病毒、疱疹病毒或反轉錄病毒，使用之啟動子為諸如（但不限於）CMV、SV40、EF-1、UbC、RSV、ADV、BPV 及 β -肌動蛋白。

D. 投藥

在一具體實例中，本發明之接合之凝血蛋白可藉由注射（諸如靜脈內、肌肉內或腹膜內注射）投予。

為投予人類或測試動物包含本發明接合之凝血蛋白之

組成物，在一態樣中，該等組成物包含一或多種醫藥學上可接受之載劑。術語「醫藥學上 (pharmaceutically)」或「藥理學上可接受 (pharmacologically acceptable)」係指分子實體及組成物當如下文所述使用此項技術中熟知之途徑投予時為穩定的，抑制蛋白質降解（諸如聚集及裂解產物），且另外不產生過敏反應或其他不良反應。「醫藥學上可接受之載劑 (Pharmaceutically acceptable carrier)」包括任何及所有臨床上適用之溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、等張劑及吸收延遲劑、及其類似物，包括以上所揭示之彼等藥劑。

如本文所使用之「有效量 (effective amount)」包括適於治療患如本文所述之出血病症之哺乳動物的劑量。

組成物可如下投予：經口、局部、經皮、非經腸、藉由吸入噴霧、經陰道、經直腸或藉由顱內注射。如本文所使用之術語非經腸包括皮下注射、靜脈內、肌肉內、腦池內注射或輸注技術。亦涵蓋如下投藥：靜脈內、皮內、肌肉內、乳房內、腹膜內、鞘內、眼球後、肺內注射及/或外科手術植入特定部位。一般而言，組成物基本上不含致熱原以及可能對接受者有害之其他雜質。

可以治療醫師選擇之劑量及方式進行組成物之單次或多次投藥。預防或治療疾病時，適當劑量將視以下因素而定：如上所述之待治療疾病之類型、疾病之嚴重程度及病程、投予藥物是用於預防性目的抑或治療性目的、先前療法、患者之臨床病史及對藥物之反應、及主治醫師之判斷。

本發明亦關於一種包含有效量之如本文所定義接合之凝血蛋白的醫藥組成物。醫藥組成物可進一步包含醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑、鹽、緩衝劑或賦形劑。醫藥組成物可用於治療以上定義之出血病症。本發明之醫藥組成物可為溶液或凍乾產品。可對醫藥組成物之溶液進行任何適合的凍乾製程。

作為另一態樣，本發明包括包含以有利於本發明組成物用於投予個體之方式包裝之本發明組成物的套組。在一具體實例中，該套組包括包裝於容器（諸如密封瓶或容器）中之本文所述之化合物或組成物（例如包含接合之凝血蛋白之組成物），以及附著於容器上或包括在包裝中的描述使用化合物或組成物實施該方法之標籤。在一具體實例中，套組含有具有包含接合之凝血蛋白之組成物的第一容器及具有用於第一容器中之組成物的生理學上可接受之復原溶液的第二容器。在一態樣中，化合物或組成物以單位劑型包裝。套組可進一步包括適於根據特定投藥途徑投予組成物的裝置。套組較佳含有描述治療性蛋白質或肽組成物之使用的標籤。

水溶性聚合物

在一態樣中，所提供之凝血蛋白衍生物（亦即，接合之凝血蛋白）分子結合於水溶性聚合物，包括（但不限於）聚乙二醇（PEG）、分支 PEG、聚唾液酸（PSA）、碳水化合物、多醣、普魯蘭、聚葡萄糖胺糖、玻尿酸、硫酸軟骨素、

硫酸皮膚素、澱粉、葡聚糖、羧甲基-葡聚糖、聚伸烷基氧化物 (PAO)、聚伸烷二醇 (PAG)、聚丙二醇 (PPG)、聚噁唑啉、聚丙烯鹽基咪啉、聚乙烯醇 (PVA)、聚羧酸酯、聚乙烯吡咯啉酮、聚磷氮烯、聚噁唑啉、聚乙烯-共-順丁烯二酸酐、聚苯乙烯-共-順丁烯二酸酐、聚(1-羥基甲基伸乙基-羥基甲基縮甲醛) (PHF)、磷酸 2-甲基丙烯鹽氧基-2'-乙基三甲基銨 (MPC)。在本發明之一具體實例中，水溶性聚合物由分子量範圍為以下之唾液酸分子組成：350 至 120,000 Da、500 至 100,000 Da、1000 至 80,000 Da、1500 至 60,000 Da、2,000 至 45,000 Da、3,000 至 35,000 Da、及 5,000 至 25,000 Da。水溶性聚合物之偶合可藉由與蛋白質直接偶合或經由連接分子偶合來進行。化學連接基團之一個實例為含碳水化合物選擇性鹽肼及硫氫基反應性順丁烯二鹽亞胺基的 MBPH (4-[4-N-順丁烯二鹽亞胺基苯基]丁酸鹽肼) (Chamow 等人, J Biol Chem 1992;267:15916-22)。其他例示性及較佳連接基團描述如下。

在一具體實例中，衍生物保留天然治療性凝血蛋白產物之全部功能活性，且與天然治療性凝血蛋白產物相比，提供延長之活體內半生期。在另一具體實例中，相對於天然凝血蛋白，衍生物保留至少 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、

79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140 或 150 百分比 (%) 的生物活性。在一相關態樣中，以顯色活性與凝血因子抗原值之比率（凝血因子顯色活性：凝血因子抗原值）測定衍生物及天然凝血蛋白之生物活性。在本發明之又一具體實例中，相對於天然凝血蛋白之活體內半生期，構築體之半生期降至或增至 0.5 倍、0.6 倍、0.7 倍、0.8 倍、0.9 倍、1.0 倍、1.1 倍、1.2 倍、1.3 倍、1.4 倍、1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍或 10 倍。

A. 唾液酸及 PSA

如本文所使用之「唾液酸部分 (sialic acid moiety)」包括可溶於水溶液或懸浮液中且在投予醫藥有效量之 PSA-凝血蛋白接合物之後對哺乳動物幾乎不產生負面影響（諸如副作用）的唾液酸單體或聚合物（「多醣 (polysaccharide)」）。在一態樣中，聚合物之特徵在於具有 1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400 或 500 個唾液酸單元。在某些態樣中，不同唾液酸單元組合於一條鏈中。

在本發明之一具體實例中，多醣化合物之唾液酸部分具有高親水性，且在另一具體實例中，整個化合物具有高親水性。親水性主要由唾液酸單元之側接羧基以及羥基賦予。醣單元可含有其他官能基，諸如胺基、羥基或硫酸酯

基或其組合。此等基團可存在於天然存在之醣化合物上或引入衍生之多醣化合物中。

天然存在之聚合物 PSA 可以顯示寬大小分佈（例如 Sigma C-5762）及高多分散性（PD）之多分散製劑形式獲得。因為多醣通常在具有共純化內毒素之固有風險之細菌中產生，所以長唾液酸聚合物鏈之純化可使內毒素含量增加之機率升高。具有 1-4 個唾液酸單元之短 PSA 分子亦可合成製備（Kang SH 等人, Chem Commun. 2000;227-8; Ress DK 及 Linhardt RJ, Current Organic Synthesis. 2004;1:31-46），從而將高內毒素含量之風險降至最低。然而，現可製造大小分佈狹窄且多分散性低而且亦無內毒素之 PSA 製劑。在一態樣中，特別可用於本發明之多醣化合物為由細菌產生之多醣化合物。此等天然存在多醣中之一些稱為糖脂。在一具體實例中，多醣化合物實質上不含末端半乳糖單元。

B. 聚乙二醇（PEG）及聚乙二醇化

在某些態樣中，凝血因子（例如 FVIII、FVIIa、FIX 或其他凝血因子分子）藉由多種化學方法中之任一種接合於水溶性聚合物（Roberts JM 等人, Advan Drug Delivery Rev 2002;54:459-76）。舉例而言，在一具體實例中，藉由使用 N-羥基丁二醯亞胺（NHS）酯使 PEG 接合於 FVIII、FVIIa 或 FIX 之自由胺基來修飾該蛋白質。在另一具體實例中，使用順丁烯二醯亞胺化學或 PEG 醯肼或 PEG 胺與事先氧化

之後的 FVIII、FVIIa 或 FIX 之碳水化合物部分之偶合，來使水溶性聚合物（例如 PEG）與自由 SH 基團偶合。

在一態樣中，藉由使水溶性聚合物與凝血因子（例如 FVIII、FVIIa 或 FIX）在形成穩定鍵下直接偶合（或經由連接系統偶合）進行接合。另外，在本發明之某些態樣中，使用可降解的、可釋放的或可水解的連接系統（Tsubery 等人, J Biol Chem 2004; 279:38118-24/Greenwald 等人, J Med Chem 1999; 42:3657-67/Zhao 等人, Bioconj Chem 2006; 17:341-51/WO2006/138572A2/US7259224B2/US7060259B2）。

在本發明之一具體實例中，藉由使用含活性 N-羥基丁二醯亞胺酯（NHS）（諸如丁二酸丁二醯亞胺酯、戊二酸丁二醯亞胺酯或丙酸丁二醯亞胺酯）之聚乙二醇衍生物經由離胺酸殘基修飾凝血因子（例如 FVIII、FVIIa 或 FIX）。此等衍生物與 FVIII、FVIIa 或 FIX 之離胺酸殘基在溫和條件下藉由形成穩定的醯胺鍵而反應。在本發明之一具體實例中，PEG 衍生物之鏈長為 5,000 Da。各種具體實例中使用鏈長為 500 至 2,000 Da、2,000 至 5,000 Da、5,000 以上至 10,000 Da、或 10,000 以上至 20,000 Da、或 20,000 以上至 150,000 Da 之其他 PEG 衍生物，包括線性及分支結構。

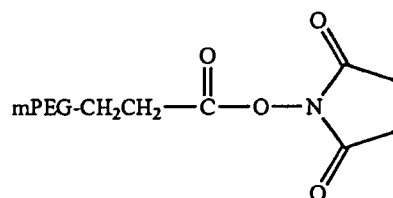
胺基聚乙二醇化之替代方法為（但不限於）藉由形成胺基甲酸酯鍵與 PEG 碳酸酯化學接合，或藉由還原胺化與醛或酮反應從而形成二級醯胺鍵。

在本發明之一具體實例中，使用可購得之 PEG 衍生物

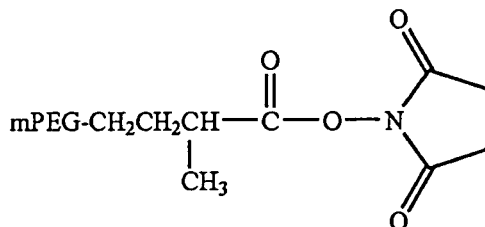
對凝血因子（例如 FVIII、FVIIa、FIX 或其他凝血因子）分子進行化學修飾。在替代態樣中，此等 PEG 衍生物具有線性或分支結構。含 NHS 基團之 PEG 衍生物之實例列於下文。

以下 PEG 衍生物為可自 Nektar Therapeutics(Huntsville, Ala.; 參看 www.nektar.com/PEG 試劑目錄; Nektar Advanced PEGylation, 價格表 2005-2006) 購得之 PEG 衍生物的非限制性實例：

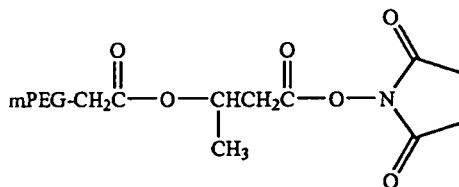
mPEG-丙酸丁二醯亞胺酯 (mPEG-SPA)



mPEG- α -甲基丁酸丁二醯亞胺酯 (mPEG-SMB)

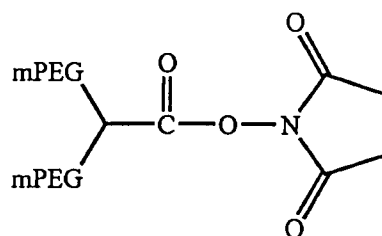


mPEG-CM-HBA-NHS (CM=羧甲基; HBA=羥基丁酸)



分支 PEG 衍生物 (Nektar Therapeutics) 之結構：

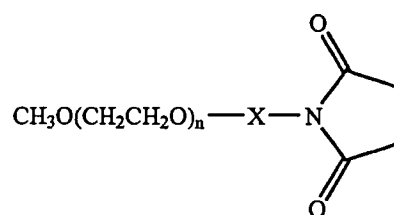
分支 PEG N-羥基丁二醯亞胺 (mPEG2-NHS)



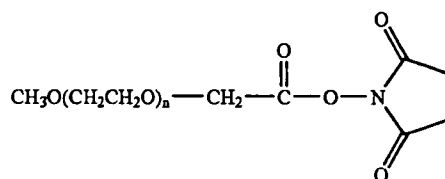
Kozlowski 等人 (BioDrugs 2001;5:419-29) 詳細描述具有分支結構之此試劑。

可自 NOF 公司 (Tokyo, Japan ; 參看 www.nof.co.jp/english: 目錄 2005) 購得 PEG 衍生物之其他非限制性實例。

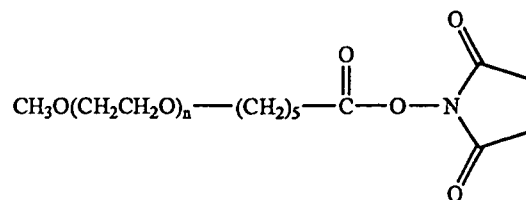
線性 PEG 衍生物 (NOF 公司) 之一般結構：



X=羧甲基



X=羧戊基



x=丁二酸酯基



•



可水解) 連接基團之 PEG 衍生物。

令人驚訝的是，本發明之聚乙二醇化 FVIII、FVIIa、FIX 或其他凝血因子展現功能活性以及延長之活體內半生期。另外，聚乙二醇化 rFVIII、FVIIa、FIX 或其他凝血因子似乎更能抵抗凝血酶失活。

C. 連接方法

凝血蛋白可經由熟習此項技術者已知之各種技術中之任一種共價連接至多醣化合物。在本發明之各種態樣中，唾液酸部分可例如藉由美國專利第 4,356,170 號(以引用之方式併入本文中)中所述之方法結合至凝血蛋白(例如 FIX、FVIII、FVIIa 或 VWF)。

本發明亦已知且涵蓋用於使 PSA 與多肽偶合之其他技術。舉例而言，美國公開案第 2007/0282096 號描述使例如 PSA 之胺或醯肼衍生物接合於蛋白質。另外，美國公開案第 2007/0191597 號描述含有供與受質(例如蛋白質)之還原末端反應之醛基之 PSA 衍生物。此等參考文獻均以全文引用之方式併入本文中。

美國專利第 5,846,951 號(其以全文引用之方式併入本文中)第 7 欄第 15 列至第 8 欄第 5 列揭示各種方法。例示性技術包括經由凝血蛋白或多醣中一者上之羧基與凝血蛋白或多醣之胺基之間的肽鍵或凝血蛋白或多醣之羧基與凝血蛋白或多醣之羥基之間的酯鍵的鍵聯。凝血蛋白共價鍵結至多醣化合物之另一鍵聯係經由凝血蛋白上之自由胺基

與多醣之非還原末端藉由過碘酸鹽氧化形成之醛基之間反應所形成之希夫鹼 (Schiff base) (Jennings HJ 及 Lugowski C, *J Immunol.* 1981;127:1011-8; Fernandes AI 及 Gregoriadis G, *Biochim Biophys Acta.* 1997;1341;26-34)。在一態樣中，所產生之希夫鹼係經用 NaCNBH_3 特異性還原形成二級胺而穩定。替代方法為在事先氧化之後藉由用 NH_4Cl 還原胺化在 PSA 中產生末端自由胺基。雙官能試劑可用於連接兩個胺基或兩個羥基。舉例而言，用如 BS3 (辛二酸雙(磺基丁二醯亞胺基)酯/Pierce, Rockford, IL) 之試劑使含胺基之 PSA 與蛋白質之胺基偶合。另外，使用如磺基-EMCS (N-ε-順丁烯二醯亞胺基己醯氧基)磺基丁二醯亞胺酯/Pierce) 之異雙官能交聯試劑來例如連接胺基與硫醇基。

在另一方法中，製備 PSA 醯肼且使之與事先氧化且產生醛官能基之後的蛋白質之碳水化合物部分偶合。

如上所述，治療性蛋白質之自由胺基與唾液酸殘基之 1-羧基反應形成肽鍵，或在 1-羧酸基團與凝血蛋白上之羥基或其他適合活性基團之間形成酯鍵聯。或者，羧基與去乙醯化 5-胺基形成肽鍵聯，或凝血蛋白分子之醛基與唾液酸殘基之 N-去乙醯化 5-胺基形成希夫鹼。

或者，多醣化合物以非共價方式與凝血蛋白締合。舉例而言，在一態樣中，多醣化合物及醫藥活性化合物經由疏水性相互作用連接。其他非共價締合包括帶相反電荷之離子相互吸引之靜電相互作用。

在各種具體實例中，凝血蛋白與多醣化合物以化學計

算量（例如 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:7、1:8、1:9 或 1:10 等）連接或締合。在各種具體實例中，1-6、7-12 或 13-20 個多醣連接至凝血蛋白。在其它具體實例中，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 個或更多個多醣連接至凝血蛋白。

在各種具體實例中，對凝血蛋白進行修飾以引入糖基化位點（亦即除天然糖基化位點以外的位點）。該修飾可使用此項技術中已知之標準分子生物技術完成。此外，凝血蛋白可在經由一或多個碳水化合物部分接合於水溶性聚合物之前在活體內或試管內糖基化。此等糖基化位點可充當使蛋白質與水溶性聚合物接合之靶點（美國專利申請案第 20090028822 號、美國專利申請案第 2009/0093399 號、美國專利申請案第 2009/0081188 號、美國專利申請案第 2007/0254836 號、美國專利申請案第 2006/0111279 號及 DeFrees S. 等人, *Glycobiology*, 2006, 16, 9, 833-43）。

D. 胺氧基鍵聯

在本發明之一具體實例中，應用羥胺或羥胺衍生物與醛（例如經過碘酸鈉氧化後之碳水化合物部分上的醛）形成肟基之反應來製備凝血蛋白接合物。舉例而言，首先用氧化劑（諸如過碘酸鈉（ NaIO_4 ））氧化醣蛋白（例如本發明之凝血蛋白）（Rothfus JA et Smith EL., *J Biol Chem* 1963, 238, 1402-10；及 Van Lenten L 及 Ashwell G., *J Biol Chem* 1971, 246, 1889-94）。醣蛋白之過碘酸鹽氧化係基於

1928 年描述之經典馬拉普拉德反應 (Malaprade reaction)，亦即用過碘酸鹽氧化鄰二醇以形成活性醛基 (Malaprade L., Analytical application, Bull Soc Chim France, 1928, 43, 683-96)。該種氧化劑之其他實例為四乙酸鉛 ($\text{Pb}(\text{OAc})_4$)、乙酸錳 ($\text{MnO}(\text{Ac})_3$)、乙酸鈷 ($\text{Co}(\text{OAc})_2$)、乙酸亞鉈 (TlOAc)、硫酸鈰 ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$) (US 4,367,309) 或過鈳酸鉀 (KRuO_4) (Marko 等人, J Am Chem Soc 1997, 119, 12661-2)。「氧化劑 (oxidizing agent)」意謂能夠在生理反應條件下氧化碳水化合物中之鄰二醇從而產生活性醛基的適度氧化劑。

第二步為使含胺氧基之聚合物與氧化之碳水化合物部分偶合形成肟鍵聯。在本發明之一具體實例中，此步驟可在催化量之親核性催化劑苯胺或苯胺衍生物存在下進行 (Dirksen A 及 Dawson PE, Bioconjugate Chem. 2008; Zeng Y 等人, Nature Methods 2009; 6:207-9)。苯胺催化作用顯著加速肟連接，從而允許使用極低濃度之試劑。在本發明之另一具體實例中，該肟鍵聯可因經 NaCNBH_3 還原形成烷氧基胺鍵聯而穩定 (圖 2)。

在本發明之一具體實例中，使水溶性聚合物接合於凝血蛋白之各反應步驟分開且依次進行 (亦即在個別反應步驟之間分離起始物質 (例如凝血蛋白、水溶性聚合物等)、試劑 (例如氧化劑、苯胺等) 及反應產物 (例如凝血蛋白上氧化之碳水化合物、活化之胺氧基水溶性聚合物等))。

關於胺氧基技術之其他資訊可見於以下參考文獻中，

各參考文獻全文併入本文中：EP 1681303A1 (HAS 化之促紅細胞生成素)；WO 2005/014024 (聚合物與蛋白質經由肽連接基團連接之接合物)；WO96/40662 (含胺氧基連接化合物及其在接合物中之應用)；WO 2008/025856 (經修飾蛋白質)；Peri F 等人，Tetrahedron 1998, 54, 12269-78；Kubler-Kielb J 及 Pozsgay V., J Org Chem 2005, 70, 6887-90；Lees A 等人，Vaccine 2006, 24(6), 716-29；及 Heredia KL 等人，Macromolecules 2007, 40(14), 4772-9。

在本發明之各種具體實例中，根據本文所述之胺氧基技術連接至凝血蛋白（例如 FVIII、FVIIa 或 FIX）之氧化之碳水化合物部分的水溶性聚合物包括（但不限於）聚乙二醇（PEG）、分支 PEG、聚唾液酸（PSA）、碳水化合物、多醣、普魯蘭、聚葡萄糖胺糖、玻尿酸、硫酸軟骨素、硫酸皮膚素、澱粉、葡聚糖、羧甲基-葡聚糖、聚伸烷基氧化物（PAO）、聚伸烷二醇（PAG）、聚丙二醇（PPG）、聚吡啶啉、聚丙烯醯基咪啉、聚乙醇醇（PVA）、聚羧酸酯、聚乙烯吡咯啉酮、聚磷氮烯、聚吡啶啉、聚乙烯-共-順丁烯二酸酐、聚苯乙烯-共-順丁烯二酸酐、聚(1-羥基甲基伸乙基-羥基甲基縮甲醛)（PHF）、磷酸 2-甲基丙烯醯氧基-2'-乙基三甲基銨（MPC）。

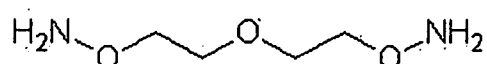
以下實施例不欲具有限制性，而僅例示本發明之特定具體實例。

實施例

實施例 1

製備同雙官能連接基團 $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_2\text{ONH}_2$

根據 Boturnyn 等人 (Tetrahedron 1997;53:5485-92) 以兩步驟有機反應採用一級胺之經修改加百利合成 (Gabriel-Synthesis) 合成含有兩個活性胺氧基之同雙官能連接基團 $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_2\text{ONH}_2$

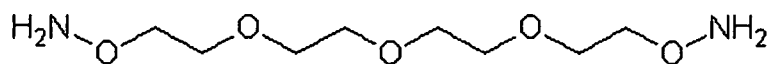


(3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺)(圖3)。在第一步驟中，使一分子 2,2-氯二乙基醚與兩分子內-N-羥基-5-降莖烯-2,3-二甲醯亞胺在二甲基甲醯胺 (DMF) 中反應。藉由在乙醇中肼解自所得中間物製備所要同雙官能產物。

實施例 2

製備同雙官能連接基團 $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_4\text{ONH}_2$

根據 Boturnyn 等人 (Tetrahedron 1997;53:5485-92) 以兩步驟有機反應採用一級胺之經修改加百利合成來合成含有兩個活性胺氧基之同雙官能連接基團 $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_4\text{ONH}_2$



(3,6,9-三氧雜-十一烷-1,11-二氧基胺)(圖3)。在第一步驟中，使一分子雙-(2-(2-氯乙氧基)-乙基)-醚與兩分子內-N-羥基-5-降莖烯-2,3-二甲醯亞胺在 DMF 中反應。藉由在乙醇中肼解自所得中間物製備所要同雙官能產物。

實施例 3

製備胺氧基-PSA

將 500 mg 自印度血清研究所 (Serum Institute of India) (Pune, India) 獲得之氧化 PSA (MW = 18.8 kD) 溶解於 8 ml 50 mM 乙酸鈉緩衝液 (pH 5.5) 中。接著，添加 100 mg 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺。在室溫下振盪 2 小時後，添加 44 mg 氰基硼氫化鈉。再在 4°C 下振盪 4 小時後，將反應混合物裝載於 Slide-A-Lyzer (Pierce, Rockford, IL) 透析卡匣 (3.5 kD 膜，再生纖維素) 中並以 PBS (pH 7.2) 透析 4 天。在 -80°C 下冷凍產物。圖 4 圖解胺氧基-PSA 根據此程序之製備。

製備胺氧基 PSA 之替代程序

將 1000 mg 自印度血清研究所 (Pune, India) 獲得之氧化 PSA (MW = 20 kD) 溶解於 16 ml 50 mM 磷酸鹽緩衝液 (pH 6.0) 中。隨後，向反應混合物中添加 170 mg 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺。在室溫下振盪 2 小時後，添加 78.5 mg 氰基硼氫化鈉且使反應進行 18 小時隔夜。隨後使用由再生纖維素製成之具有 5 kD 截止的膜 (Millipore) 對反應混合物進行超濾/透濾程序 (UF/DF)。

實施例 4

使胺氧基-PSA 與 rFIX 偶合並純化接合物

向 12.6 mg 溶解於 6.3 ml 50 mM 乙酸鈉緩衝液 (pH 6.0) 中之 rFIX 中添加 289 μ l 過碘酸鈉水溶液 (10 mM)。在 4°C

下在黑暗中振盪混合物 1 小時並在室溫下藉由添加 6.5 μ l 1 M 甘油淬滅 15 分鐘。藉由超濾/透濾 (UF/DF) 採用 Vivaspinn (Sartorius, Goettingen, Germany) 濃縮器 (30 kD 膜, 再生纖維素) 移除低分子量污染物。接著, 向 UF/DF 滯留物中添加 43 mg 胺氧基-PSA, 且在 4°C 下振盪混合物 18 小時。利用疏水性相互作用層析 (HIC) 移除過量 PSA 試劑。冷卻之反應混合物的導電率上升至 180 mS/cm, 且將其裝載於經 50 mM HEPES、3 M 氯化鈉、6.7 mM 氯化鈣、0.01% Tween 80 (pH 6.9) 預平衡的 5 ml HiTrap Butyl FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) HIC 管柱 (1.6×2.5 cm) 上。用 2.4 管柱體積 (CV) 50 mM HEPES、6.7 mM 氯化鈣、0.005% Tween 80 (pH 7.4) 以 5 ml/min 之流動速率溶析接合物。藉由量測總蛋白質 (BCA) 及 FIX 顯色活性對該製劑進行分析性示性。對於 PSA-rFIX 接合物, 測定每毫克蛋白質之比活性為 80.2 IU (與天然 rFIX 相比為其 56.4%)。結果概述於表 1 中。

表 1

項目	BCA[mg/ml]	FIX 顯色活性 [IU/ml]	比活性[IU FIX 顯色活性/mg BGA]	比活性 [%]
rFIX	8.58	1221	142.3	100
PSA-rFIX	1.15	92.2	80.2	56.4

圖 5 圖解藉由 SDS-PAGE 利用考馬斯亮藍染色 (Coomassie staining) 對 PSA-rFIX 接合物進行之分析性示性。圖 6 顯示 SDS-PAGE 及隨後採用抗 FIX 及抗 PSA 抗體

進行之西方墨點法 (Western blot)。

實施例 5

胺氧基-PSA 與 rFIX 在苯胺作為親核性催化劑存在下之偶合向 3.0 mg 溶解於 1.4 ml 50 mM 乙酸鈉緩衝液 (pH 6.0) 中之 rFIX 中添加 14.1 μ l 過碘酸鈉水溶液 (10 mM)。在 4°C 下在黑暗中振盪混合物 1 小時並在室溫下藉由添加 1.5 μ l 1 M 甘油淬滅 15 分鐘。藉助於尺寸排阻層析 (SEC) 採用 PD-10 脫鹽管柱 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 移除低分子量污染物。混合 1.2 mg 溶解於 1.33 ml 50 mM 乙酸鈉緩衝液 (pH 6.0) 中之氧化 rFIX 與 70 μ l 苯胺 (200 mM 儲備水溶液) 並在室溫下振盪 45 分鐘。接著，添加 4.0 mg 胺氧基-PSA，且在室溫下振盪混合物 2 小時並再在 4°C 下振盪 16 小時。在 1 小時後、2 小時後及 18 小時後反應結束時抽取樣品。接著，藉助於 HIC 移除過量 PSA 試劑及自由 rFIX。冷卻之反應混合物的導電率上升至 180 mS/cm，且將其裝載於經 50 mM HEPES、3 M 氯化鈉、6.7 mM 氯化鈣、0.01% Tween 80 (pH 6.9) 預平衡的 5 ml HiTrap Butyl FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) HIC 管柱 (1.6 $\times$ 2.5 cm) 上。用 20 CV 線性梯度達到 50 mM HEPES、6.7 mM 氯化鈣、0.005% Tween 80 (pH 7.4) 以 5 ml/min 之流動速率溶析接合物。

實施例 6

使胺氧基-PSA 與 rFIX 偶合且用 NaCNBH₃ 還原

向 10.5 mg 溶解於 5.25 ml 50 mM 乙酸鈉緩衝液 (pH 6.0) 中之 rFIX 中添加 53 μ l 過碘酸鈉水溶液 (10 mM)。在 4°C 下在黑暗中振盪混合物 1 小時並在室溫下藉由添加 5.3 μ l 1 M 甘油淬滅 15 分鐘。藉助於 UF/DF 採用 Vivaspin (Sartorius, Goettingen, Germany) 濃縮器 (30 kD 膜, 再生纖維素) 移除低分子量污染物。接著, 向 UF/DF 滯留物中添加 35.9 mg 胺氧基-PSA, 且在室溫下振盪混合物 2 小時。隨後添加 53 μ l 氰基硼氫化鈉水溶液 (5 M), 且反應再進行 16 小時。隨後, 藉助於 HIC 移除過量 PSA 試劑。冷卻之反應混合物的導電率上升至 180 mS/cm, 且將其裝載於經 50 mM HEPES、3 M 氯化鈉、6.7 mM 氯化鈣、0.01% Tween 80 (pH 6.9) 預平衡的 5 ml HiTrap Butyl FF HIC (GE Healthcare, Fairfield, CT) 管柱 (1.6 $\times$ 2.5 cm) 上。用 2.4 CV 50 mM HEPES、6.7 mM 氯化鈣、0.005% Tween 80 (pH 7.4) 以 5 ml/min 之流動速率溶析接合物。

實施例 7

使胺氧基-PSA (連接基團: $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_4\text{ONH}_2$) 與 rFIX 偶合且純化接合物

向 5.6 mg 溶解於 2.8 ml 50 mM 乙酸鈉緩衝液 (pH 6.0) 中之 rFIX 中添加 102 μ l 過碘酸鈉水溶液 (10 mM)。在 4°C 下在黑暗中振盪混合物 1 小時並在室溫下藉由添加 2.9 μ l 1 M 甘油淬滅 15 分鐘。藉助於 UF/DF 採用 Vivaspin (Sartorius, Goettingen, Germany) 濃縮器 (30 kD 膜, 再生纖維素) 移

除低分子量污染物。隨後，向 UF/DF 滯留物中添加 19 mg 胺氧基-PSA，且在 4°C 下振盪混合物 18 小時。藉助於 HIC 移除過量 PSA 試劑。冷卻之反應混合物的導電率上升至 180 mS/cm，且將其裝載於經 50 mM HEPES、3 M 氯化鈉、6.7 mM 氯化鈣、0.01% Tween 80 (pH 6.9) 預平衡的 5 ml HiTrap Butyl FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) HIC 管柱 (1.6×2.5 cm) 上。用 2.4 CV 50 mM HEPES、6.7 mM 氯化鈣、0.005% Tween 80 (pH 7.4) 以 5 ml/min 之流動速率溶析接合物。

實施例 8

使胺氧基-PSA 與 rFVIII 偶合

向 11 mg 溶解於 11 ml Hepes 緩衝液 (pH 6) (50 mM Hepes, 5 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl, 0.01% Tween) 中之 rFVIII 中添加 57 μl 10 mM 過碘酸鈉。在 4°C 下在黑暗中振盪混合物 30 分鐘並在 4°C 下藉由添加 107 μl 1 M 甘油水溶液淬滅 30 分鐘。隨後，添加 19.8 mg 胺氧基-PSA (18.8 kD)，且在 4°C 下振盪混合物隔夜。藉由添加含有 8 M 乙酸銨之緩衝液 (8 M 乙酸銨、50 mM Hepes、5 mM CaCl_2 、350 mM NaCl、0.01% Tween 80, pH 6.9) 來增加離子強度以得到 2.5 M 乙酸銨之最終濃度。接著，將反應混合物裝載於經平衡緩衝液 (2.5 M 乙酸銨, 50 mM Hepes, 5 mM CaCl_2 , 350 mM NaCl, 0.01% Tween 80, pH 6.9) 平衡之 HiTrap Butyl FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 管柱上。用溶析緩衝液 (50 mM Hepes, 5 mM CaCl_2 , 0.01% Tween 80, pH 7.4) 溶析產

物，且藉由離心過濾使用 MWCO 為 30,000 之 Vivaspin (Sartorius, Goettingen, Germany) 裝置濃縮溶析液。

實施例 9

血友病小鼠中之 PK 研究

用每公斤體重 10 ml 體積劑量之含 rFIX 或 PSA-rFIX (根據實施例 4 製備) 之調配緩衝液 (10 mM 組胺酸、260 mM 甘胺酸、29 mM 蔗糖、0.005% Tween 80, pH 6.8) 注射 FIX 缺乏小鼠。物質注射後 5 分鐘、3 小時、9 小時、16 小時、24 小時及 48 小時處死各組之 6 隻小鼠，且藉由心臟穿刺收集血液。製備含檸檬酸鹽的血漿，且冷凍儲存直至分析 FIX 活性。

用顯色 FIX 檢定 (Biophen FIX 檢定, Hyphen Biomed, Neuville-sur-Oise, France) 測定 FIX 活性，且構築消除曲線 (圖 7)。PSA-rFIX 之實際 FIX 活性劑量為 123 IU FIX/kg，且 rFIX 之實際 FIX 活性劑量為 143 IU FIX/kg。用程式 R (The R Foundation for Statistical Computing, 2008) 計算藥物動力學參數。rFIX 之活體內回收率為 13%，且 PSA-rFIX 之活體內回收率為 29%。PSA-rFIX 之劑量調節之 AUC 相對於 rFIX 增至 6.4 倍，終端半生期增至 1.2 倍，且相比於 rFIX，PSA-rFIX 之 MRT 為 1.7 倍長 (表 2)。

表 2

項目	活體內 回收率[%]	AUC [(IU/ml)/(IU/kg)]	增加 因數	終端半生期 [h]	增加 因子	MRT[h]	增加 因數
rFIX	13	0.0100	=1	8.0	=1	7.3	=1
PSA-rFIX	29	0.0650	6.4×	9.6	1.2×	12.3	1.7×

實施例 10

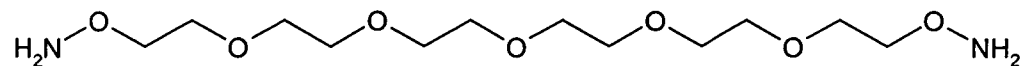
使凝血蛋白聚唾液酸化

如本文所述之聚唾液酸化可擴展至其他凝血蛋白。舉例而言，在本發明之各種態樣中，對諸如 FVIII、FVIIa 及 VWF 之凝血蛋白重複用胺氧基-PSA 進行如以上實施例 5、6 及 9 中所述之聚唾液酸化。

實施例 11

製備同雙官能連接基團 $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_6\text{ONH}_2$

根據 Boturyn 等人 (Tetrahedron 1997;53:5485-92) 以兩步驟有機反應採用一級胺之經修改加百利合成來合成含有兩個活性胺氧基之同雙官能連接基團 $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_6\text{ONH}_2$



(3,6,9,12,15-五氧雜-十七烷-1,17-二氧基胺)。在第一步驟中，使一分子二氯化六乙二醇 (hexaethylene glycol dichloride) 與兩分子內-N-羥基-5-降莖烯-2,3-二甲鹽亞胺在 DMF 中反應。藉由在乙醇中肼解自所得中間物製備所要同雙官能產物。

實施例 12

採用順丁烯二醯亞胺基/胺氧基連接系統使 rFIX 聚唾液酸化

A. 製備修飾試劑

藉由使用順丁烯二醯亞胺基/胺氧基連接系統製備胺氧基-PSA 試劑 (Toyokuni 等人, Bioconjugate Chem 2003; 14, 1253-9)。使用兩步驟程序製備含自由末端 SH-基團之 PSA-SH (20 kD): a) 根據 WO05016973A1 藉由用 NH_4Cl 對氧化之 PSA 進行還原胺化製備 PSA- NH_2 , 及 b) 如 US7645860 所述藉由使末端一級胺基與 2-亞胺基硫雜環戊烷 (尤特奇試劑 (Traut's reagent) /Pierce, Rockford, IL) 反應引入硫氫基。使用 10 倍莫耳過量之連接基團及 50 mg/ml 之 PSA-SH 濃度使 PSA-SH 與連接基團之順丁烯二醯亞胺基在 pH 7.5 下在 PBS 緩衝液中偶合。在室溫下在平緩振盪下保溫反應混合物 2 小時。隨後, 移除過量連接試劑, 且藉由透濾將胺氧基-PSA 緩衝液更換至氧化緩衝液 (50 mM 磷酸鈉, pH 6.0) 中。採用 Pellicon XL5kD 再生纖維素膜 (Millipore, Billerica, MA) 更換緩衝液 25 次。

B. 在用 NaIO_4 事先氧化之後修飾 rFIX

在 50 mM 磷酸鈉緩衝液 (pH 6.0) 中採用含 100 μM 過碘酸鈉之緩衝液對 rFIX 進行氧化。在 4°C 下在黑暗中振盪混合物 1 小時並在室溫下藉由添加甘油至最終濃度為 5 mM 來淬滅 15 分鐘。藉助於尺寸排阻層析 (SEC) 採用 PD-10 脫鹽管柱 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 移除低分子量污染物。隨後, 在氧化之 rFIX 中摻入苯胺以獲得 10 mM 之最

終濃度，並與胺氧基-PSA 試劑混合以達成 5 倍莫耳過量之 PSA。在室溫下在黑暗中在平緩振盪下保溫反應混合物 2 小時。

C. 純化接合物

藉助於 HIC 移除過量之 PSA 試劑及自由 rFIX。反應混合物之導電率上升至 180 mS/cm，且將其裝載於經 50 mM HEPES、3 M 氯化鈉、6.7 mM 氯化鈣、0.01% Tween 80 (pH 6.9) 預平衡的填充有 48 ml 丁基-瓊脂糖 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 之管柱上。接著，用 40 CV 內線性梯度之 60% 溶析緩衝液 (50 mM Hepes, 6.7 mM 氯化鈣, pH 7.4) 溶析接合物。最後，收集含 PSA-rFIX 之溶析份，且使用由再生纖維素製成之 30 kD 膜 (Millipore) 進行 UF/DF。藉由量測總蛋白質 (BCA) 及 FIX 顯色活性對該製劑進行分析性示性。對於由兩種變異體製備之 PSA-rFIX 接合物，測定到比活性大於天然 rFIX 之 50%。

實施例 13

製備胺氧基-PSA 試劑

根據實施例 3 製備胺氧基-PSA 試劑。使用 5 kD 膜 (再生纖維素, Millipore) 以緩衝液 (pH 7.2) (50 mM Hepes) 透濾最終產物，在 -80°C 下冷凍並凍乾。凍乾後，將該試劑溶解於適當體積之水中且用於經由碳水化合物修飾來製備 PSA-蛋白質接合物。

實施例 14

聚唾液酸化 rFVIII 在 FVIII 缺乏剔除小鼠模型中之藥物動力學

根據實施例 8 製備 PSA-FVIII 接合物。接合物顯示比活性為 6237 IU/mg (FVIII 活性由顯色檢定測定；總蛋白質由 Bradford 檢定測定)，且聚唾液酸化度為 6.7 (莫耳 PSA/莫耳 FVIII)，如由間苯二酚檢定 (Svennerholm L, Biochim Biophys Acta 1957; 24: 604-11) 所量測。

使用 Bi 等人 (Nat Genet 1995;10:119-21) 詳細描述之 FVIII 缺乏小鼠作為重度人類 A 型血友病之模型。各組 (每組 6 隻小鼠) 經由尾靜脈接受劑量為每公斤體重 200 IU FVIII 的根據實施例 8 製備之 PSA-rFVIII 或天然 rFVIII (ADVATE, Baxter Healthcare 公司) 的快速注射 (200 IU FVIII/kg)。注射後 5 分鐘、3 小時、6 小時、9 小時、16 小時、24 小時、32 小時及 42 小時，藉由麻醉後心臟穿刺自各別組製備含檸檬酸鹽之血漿。藉由使用顯色檢定量測血漿樣品中之 FVIII 活性程度。此實驗之結果概述於表 3 中且圖解於圖 8 中。用 2.10.1 版本 R (一種統計計算用語言及環境。R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>.) 進行所有計算。結果，平均滯留時間 (MRT) 自 5.4 小時 (Advate 對照組) 增至 11.1 小時 (PSA-rFVIII 接合物)。

表 3

項目	活體內回收率 IVR[%]	AUC 0-24 [(IU/ml·h)/IU/kg]	終端半生期 (h)	平均滯留時間 MRT (h)	清除率 CL (ml/h/kg)
PSA-rFVIII	71	0.161	7.2	11.1	6.0
rFVIII 對照組 (Advate)	58	0.054	4.4	5.4	17.1

實施例 15

胺氧基-PSA 試劑之詳細合成

根據 Botryrn 等人 (Tetrahedron 1997; 53:5485-92) 以實施例 1 中概述之兩步驟有機合成來合成 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺。

步驟 1：

向內-N-羥基-5-降莖烯-2,3-二甲鹽亞胺 (59.0 g; 1.00 當量) 於 700 ml 無水 N,N-二甲基甲鹽胺中之溶液中添加無水 K_2CO_3 (45.51 g; 1.00 當量) 及 2,2-二氯二乙基醚 (15.84 ml; 0.41 當量)。在 50°C 下攪拌反應混合物 22 小時。在減壓下蒸發混合物至乾燥。將殘餘物懸浮於 2 L 二氯甲烷中，並用飽和 NaCl 水溶液萃取兩次 (每次 1 L)。二氯甲烷層經 Na_2SO_4 脫水，並隨後在減壓下蒸發至乾燥並在高真空中乾燥，得到 64.5 g 呈黃白色固體狀之 3-氧雜戊烷-1,5-二氧基-內-2',3'-二羧基二鹽亞胺降莖烯 (中間物 1)。

步驟 2：

向中間物 1 (64.25 g; 1.00 當量) 於 800 ml 無水乙醇中之溶液中添加 31.0 ml 水合肼 (4.26 當量)。隨後使反應混合物回流 2 小時。藉由在減壓下蒸發溶劑濃縮混合物至

起始體積之一半。濾出出現之沈澱。在減壓下蒸發剩餘乙醇層至乾燥。在真空中乾燥含粗產物 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺之殘餘物，得到 46.3 g。藉由管柱層析（矽膠 60；用二氯甲烷/甲醇混合物 9+1 進行等度溶析）進一步純化粗產物，得到 11.7 g 純最終產物 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺。

實施例 16

使用 PSA 醯肼使 rFIX 聚唾液酸化

藉由使用使氧化 PSA 與己二酸二醯肼（ADH）反應製備之 PSA 醯肼試劑使 rFIX 聚唾液酸化。

步驟 1：製備 PSA 醯肼

將 500 mg 自印度血清研究所（Pune, India）獲得之氧化 PSA（MW = 20 kD）溶解於 8 ml 50 mM 乙酸钠緩衝液（pH 5.5）中。隨後添加 100 mg 己二酸二醯肼（ADH）。平緩振盪溶液 2 小時。隨後添加 44 mg 氰基硼氫化鈉。再在 4°C 下保溫反應物 4 小時後，將反應混合物裝載於 Slide-A-Lyzer（Pierce, Rockford, IL）透析卡匣（3.5 kD 膜，再生纖維素）中並以 PBS（pH 7.2）透析 4 天。在 -80°C 下冷凍產物。

步驟 2：使 PSA 醯肼與 rFIX 反應且純化接合物

藉由使用如步驟 1 中所述之 PSA 醯肼試劑使 rFIX 聚唾液酸化。在 4°C 下在黑暗中在平緩振盪下用 NaIO₄（濃度：80 μM）氧化 rFIX（濃度：1 mg/ml）1 小時。藉由添加甘油終止反應，且使用由再生纖維素製成之 30 kD 膜（Vivaspin）對氧化之 FIX 進行 UF/DF。隨後使用 200 倍莫

耳過量之試劑及 1 mg/ml 之蛋白質濃度在 pH 6.5 下使氧化之 rFIX 聚唾液酸化。在室溫下在黑暗中在平緩振盪下保溫 rFIX 及聚唾液酸化試劑 2 小時。最後，利用 HIC 純化 PSA-rFIX 接合物。藉由添加含乙酸銨之緩衝液（50 mM Hepes，350 mM NaCl，5 mM 氯化鈣，8 M 乙酸銨，0.01% Tween 80，pH 6.9）使反應混合物之導電率上升至 130 mS/cm，且將其裝載於經 50 mM Hepes、2.5 M 乙酸銨、350 mM 氯化鈉、5 mM 氯化鈣、0.01% Tween 80（pH 6.9）預平衡之 HiTrap Butyl FF 管柱（5 ml，GE Healthcare, Fairfield, CT）上。接著，用 50 mM Hepes、5 mM 氯化鈣、0.01% Tween 80（pH 7.4）溶析接合物。最後，收集含 PSA-rFIX 之溶析份，且使用由再生纖維素製成之 30 kD 膜（Vivaspin）進行 UF/DF。對於 PEG-rFIX 接合物，測定到比活性大於天然 rFIX 之 50%（顯色檢定）。

實施例 17

使用 PSA 醯肼在苯胺作為親核性催化劑存在下使 rFIX 聚唾液酸化

將 123 mg rFIX 溶解於 60 ml 磷酸鹽緩衝液（50 mM NaPO_4 ，pH 6.5）緩衝液中。隨後添加 1.2 ml 過碘酸鈉水溶液（10 mM），且在 4°C 下在黑暗中在平緩攪拌下保溫混合物 1 小時。接著，藉由添加 600 μl 1 M 甘油水溶液在室溫下淬滅反應 15 分鐘。接著採用 Pellicon XL Ultracel 30 kD 膜對混合物進行 UF/DF。

用 59.6 ml 磷酸鹽緩衝液 (50 mM NaPCU, pH 6.0) 進一步稀釋含氧化之 rFIX 的 UF/DF 滯留物 (63.4 ml), 且與 6.5 ml 苯胺水溶液 (200 mM) 混合並在室溫下保溫 30 分鐘。隨後添加 12.3 ml PSA-醯肼試劑 (根據實施例 16 製備), 得到 5 倍莫耳試劑過量。在室溫下在黑暗中在平緩振盪下保溫此混合物 2 小時。

藉助於 HIC 移除過量之 PSA-醯肼試劑及自由 rFIX。反應混合物之導電率上升至 180 mS/cm, 且將其裝載於經 50 mM HEPES、3 M 氯化鈉、6.7 mM 氯化鈣、0.01% Tween 80 (pH 6.9) 預平衡的填充有 48 ml 丁基-瓊脂糖 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 之管柱上。接著, 用 50 mM Hepes、5 mM 氯化鈣、0.01% Tween 80 (pH 7.4) 溶析接合物。最後, 收集含 PSA-rFIX 之溶析份, 且使用由再生纖維素製成之 30 kD 膜 (Millipore) 進行 UF/DF。藉由量測總蛋白質 (BCA) 及 FIX 顯色活性對該製劑進行分析性示性。對於 PSA-rFIX 接合物, 測定到比活性大於天然 rFIX 之 50%。

實施例 18

使 rFIX 聚唾液酸化並使用兩步驟程序純化

將 140 mg rFIX 溶解於 62 ml 磷酸鹽緩衝液 (50 mM NaPO_4 , pH 6.0) 緩衝液中。隨後添加 1.92 ml 過碘酸鈉水溶液 (10 mM), 且在 4°C 下在黑暗中在平緩攪拌下保溫混合物 1 小時, 且在室溫下藉由添加 64 μl 1 M 甘油水溶液淬滅 15 分鐘。接著採用 Pellicon XL Ultracel 30 kD 膜對混合物

進行 UF/DF。

用 73.8 ml 磷酸鹽緩衝液 (50 mM NaPCU, pH 6.0) 進一步稀釋含氧化之 rFIX 的 UF/DF 滯留物 (69.4 ml), 與 8.2 ml 苯胺水溶液 (200 mM) 混合並在室溫下保溫 30 分鐘。隨後添加 12.3 ml 胺氧基試劑 (根據實施例 3 製備), 得到 2.5 倍莫耳試劑過量。在室溫下在黑暗中在平緩振盪下保溫此混合物 2.5 小時。

藉助於陰離子交換層析 (AIEC) 移除自由 rFIX。用 20 ml 緩衝液 A (50 mM Hepes, 5 mM CaCl_2 , pH 7.5) 稀釋反應混合物, 且裝載於經緩衝液 A 預平衡之 Q-瓊脂糖 FF 26/10 管柱 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 上。隨後用緩衝液 B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl_2 , pH 7.5) 溶析管柱。自由 rFIX 在導電率介於 12-25 mS/cm 之間時溶析, 且接合物在導電率介於 27-45 mS/cm 之間時溶析。接著藉由添加緩衝液 C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, 5 mM CaCl_2 , pH 6.9) 使含接合物之溶析份之導電率上升至 190 mS/cm, 且將其裝載於經緩衝液 D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, 5 mM CaCl_2 , pH 6.9) 預平衡之丁基瓊脂糖 FF 26/10 管柱 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 上。用 5 CV 緩衝液 D 洗除自由 PSA-試劑。接著, 用 100% 緩衝液 E (50 mM Hepes, 5 mM CaCl_2 , pH 7.4) 溶析接合物。使用由再生纖維素製成之 10 kD 膜 (88 cm^2 , 截止點為 10 kD/Millipore) 進行 UF/DF 來濃縮含接合物之溶析份。以含有 150 mM NaCl 及 5 mM CaCl_2 之組胺酸緩衝液 (pH 7.2) 進行最後的透濾步驟。藉由量測總蛋白質 (BCA)

及 FIX 顯色活性對該製劑進行分析性示性。對於 PSA-rFIX 接合物，測定到比活性大於天然 rFIX 之 50%。

實施例 19

使胺氧基-PSA 與 rFVIIa 偶合且純化接合物

混合 10 mg rFVIIa 於 5 ml 反應緩衝液 (50 mM Hepes, 150 mM 氯化鈉, 5 mM 氯化鈣, pH 6.0) 中之溶液與 NaIO₄ 水溶液 (最終濃度: 100 μ M), 且在 4°C 下在黑暗中在平緩攪拌下保溫 1 小時, 且藉由添加半胱胺酸水溶液 (最終濃度: 1 mM) 淬滅 15 分鐘。接著, 對反應混合物進行 UF/DF。向滯留物 (10 ml) 中添加 30 倍莫耳過量之胺氧基試劑 (根據實施例 1 製備)。在室溫下在黑暗中在平緩振盪下進行偶合反應 2 小時。藉由 HIC 移除過量胺氧基試劑。藉由添加含乙酸銨之緩衝液 (50 mM Hepes, 350 mM NaCl, 5 mM 氯化鈣, 8 M 乙酸銨, 0.01% Tween 80, pH 6.9) 使反應混合物之導電率上升至 130 mS/cm, 且將其裝載於經 50 mM Hepes、2.5 M 乙酸銨、350 mM 氯化鈉、5 mM 氯化鈣、0.01% Tween 80 (pH 6.9) 預平衡之 HiTrap Butyl FF 管柱 (5 ml, GE Healthcare, Fairfield, CT) 上。接著, 用 50 mM Hepes、5 mM 氯化鈣、0.01% Tween 80 (pH 7.4) 以 20 CV 之 100% 的溶析緩衝液線性梯度溶析接合物。最後, 收集含 PSA-rFVIIa 之溶析份, 且使用由再生纖維素製成之 30 kD 膜 (Vivaspin) 進行 UF/DF。藉由量測總蛋白質 (BCA) 及 FVIIa 顯色活性 (Staclot 檢定, Diagnostica Stago, Asnieres,

France) 對該製劑進行分析性示性，且顯示比活性大於 rFVIIa 起始物質之 20%。

實施例 20

胺氧基-PSA 與 rFVIIa 在苯胺作為親核性催化劑存在下之偶合
向 3.0 mg 溶解於 1.4 ml 50 mM 乙酸鈉緩衝液 (pH 6.0)
中之 rFVIIa 中添加 14.1 μ l 過碘酸鈉水溶液 (10 mM)。在 4°C
下在黑暗中振盪混合物 1 小時並在室溫下藉由添加 1.5 μ l 1
M 甘油淬滅 15 分鐘。藉助於尺寸排阻層析 (SEC) 採用 PD-10
脫鹽管柱 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 移除低分子量污
染物。混合 3 mg 溶解於 3 ml 50 mM 乙酸鈉緩衝液 (pH 6.0)
中之氧化 rFVIIa 與苯胺 (一種親核性催化劑，最終濃度：
10 mM) 並在室溫下振盪 30 分鐘。接著，添加胺氧基-PSA
以得到 5 倍莫耳過量，且在室溫下振盪混合物 2 小時。接
著，藉助於 HIC 移除過量 PSA 試劑及自由 rFIX。冷卻之反
應混合物的導電率上升至 180 mS/cm，且將其裝載於經 50
mM HEPES、3 M 氯化鈉、6.7 mM 氯化鈣、0.01% Tween 80
(pH 6.9) 預平衡的 5 ml HiTrap Butyl FF (GE Healthcare,
Fairfield, CT) HIC 管柱 (1.6 $\times$ 2.5 cm) 上。用 20 CV 線性
梯度達到 50 mM HEPES、6.7 mM 氯化鈣、0.005% Tween 80
(pH 7.4) 以 5 ml/min 之流動速率溶析接合物。

實施例 21

製備胺氧基-PEG 試劑

使用分支 PEG-醛 (MW 40 kD) 供與如實施例 1 所述製備之二胺氧基連接基團偶合。此 PEG-醛試劑可獲自 NOF (NOF 公司, Tokyo, Japan)。將 500 mg PEG-醛溶解於 8 ml 50 mM 乙酸鈉緩衝液 (pH 5.5) 中。隨後，添加 100 mg 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺。在室溫下振盪 2 小時後，添加 44 mg 氰基硼氫化鈉。再在 4°C 下振盪 4 小時後，將反應混合物裝載於 Slide-A-Lyzer (Pierce, Rockford, IL) 透析卡匣 (3.5 kD 膜，再生纖維素) 中並以 PBS (pH 7.2) 透析 4 天。在 -80°C 下冷凍產物。

實施例 22

用胺氧基 PEG 試劑使 rFIX 聚乙二醇化

藉由使用含胺氧基之線性 20 kD 聚乙二醇化試劑使 rFIX 聚乙二醇化。此類型試劑之實例為來自 NOF 之 Sunbright® CA 系列 (NOF 公司, Tokyo, Japan)。在 4°C 下在黑暗中在平緩振盪下在反應緩衝液 (50 mM Hepes, 150 mM 氯化鈉, 5 mM 氯化鈣, pH 6.0) 中在 2 mg/ml 之蛋白質濃度下用 NaIO₄ (最終濃度: 100 μM) 氧化 rFIX 1 小時且藉由添加甘油水溶液 (最終濃度: 1 mM) 淬滅 15 分鐘。接著，對反應混合物進行 UF/DF。向滯留物中添加 3 倍莫耳過量之胺氧基試劑及苯胺 (親核性催化劑，最終濃度: 10 mM)。在室溫下在黑暗中在平緩振盪下進行偶合反應 2 小時。最後，藉由在 Q-瓊脂糖 FF 上進行之離子交換層析純化 PEG-rFIX 接合物。將每毫升凝膠 1.5 毫克蛋白質加載於經

50 mM Tris (pH 8.0) 預平衡之管柱上。用 20 CV 50 mM Tris 及 1 M 氯化鈉 (pH 8.0) 溶析接合物，並隨後使用 30 kD 膜進行 UF/DF。藉由量測總蛋白質 (BCA) 及 FIX 顯色活性對該製劑進行分析性示性。對於 PEG-rFIX 接合物，測定到比活性大於天然 rFIX 之 75%。

實施例 23

用胺氧基 PEG 試劑使 rFVIII 聚乙二醇化

藉由使用含胺氧基之線性 20 kD 聚乙二醇化試劑使 rFVIII 聚乙二醇化。此類型試劑之實例為來自 NOF 之 Sunbright® CA 系列 (NOF 公司, Tokyo, Japan)。在 4°C 下在黑暗中在平緩振盪下在反應緩衝液 (50 mM Hepes, 150 mM 氯化鈉, 5 mM 氯化鈣, pH 6.0) 中在 1 mg/ml 之蛋白質濃度下用 NaIO_4 (最終濃度: 100 μM) 氧化 rFVIII 1 小時且藉由添加半胱胺酸水溶液 (最終濃度: 1 mM) 淬滅 15 分鐘。接著，對反應混合物進行 UF/DF。向滯留物中添加 20 倍莫耳過量之胺氧基試劑及苯胺 (親核性催化劑，最終濃度: 10 mM)。在室溫下在黑暗中在平緩振盪下進行偶合反應 2 小時。最後，藉由在 Q-瓊脂糖 FF 上進行之離子交換層析純化 PEG-rFVIII 接合物。將每毫升凝膠 1.5 mg 蛋白質加載於經含 5 mM CaCl_2 之 50 mM Hepes 緩衝液 (pH 7.4) 預平衡之管柱上。用含 5 mM CaCl_2 及 500 mM 氯化鈉之 50 mM Hepes 緩衝液 (pH 7.4) 溶析接合物，並隨後使用 30 kD 膜進行 UF/DF。藉由 FVIII 顯色檢定對接合物進行之分析性示

性及測定總蛋白質（BCA 檢定）顯示比活性大於 rFVIII 起始物質之 60%。

實施例 24

用胺氧基 PEG 試劑使 rFVIIa 聚乙二醇化

藉由使用含胺氧基之線性 20 kD 聚乙二醇化試劑使 rFVIIa 聚乙二醇化。此類型試劑之實例為來自 NOF 之 Sunbright® CA 系列（NOF 公司，Tokyo, Japan）。在 4°C 下在黑暗中在平緩振盪下在反應緩衝液（50 mM Hepes, 150 mM 氯化鈉，5 mM 氯化鈣，pH 6.0）中在 2 mg/ml 之蛋白質濃度下用 NaIO₄（最終濃度：100 μM）氧化 rFVIIa 1 小時且藉由添加甘油水溶液（最終濃度：1 mM）淬滅 15 分鐘。接著，對反應混合物進行 UF/DF。向滯留物中添加 5 倍莫耳過量之胺氧基試劑及苯胺（親核性催化劑，最終濃度：10 mM）。在室溫下在黑暗中在平緩振盪下進行偶合反應 2 小時。最後，藉由在 Q-瓊脂糖 FF 上進行之離子交換層析純化 PEG-rFVIIa 接合物。將每毫升凝膠 1.5 毫克蛋白質加載於經含 1 mM CaCl₂ 之 20 mM Hepes 緩衝液（pH 7.4）預平衡之管柱上。用含 1 mM CaCl₂ 及 500 mM 氯化鈉之 20 mM Hepes 緩衝液（pH 7.4）溶析接合物，並隨後使用 30 kD 膜進行 UF/DF。藉由量測 FVIIa 活性（Staclot 檢定，Diagnostic Stago, Asnieres, France）及總蛋白質（BCA 檢定）對接合物進行之分析性示性顯示比活性大於 rFVIIa 起始物質之 25%。

實施例 25

用 PEG-醯肼試劑使 rFIX 聚乙二醇化

藉由使用含醯肼基之線性 20 kD 聚乙二醇化試劑使 rFIX 聚乙二醇化。此類型試劑之實例為來自 NOF 之 Sunbright® HZ 系列 (NOF 公司, Tokyo, Japan)。在 4°C 下在黑暗中在平緩振盪下在反應緩衝液 (50 mM Hepes, 150 mM 氯化鈉, 5 mM 氯化鈣, pH 6.0) 中在 2 mg/ml 之蛋白質濃度下用 NaIO_4 (最終濃度: 100 μM) 氧化 rFIX 1 小時且藉由添加甘油水溶液 (最終濃度: 1 mM) 淬滅 15 分鐘。接著, 對反應混合物進行 UF/DF。向滯留物中添加 50 倍莫耳過量之醯肼試劑及苯胺 (親核性催化劑, 最終濃度: 10 mM)。在室溫下在黑暗中在平緩振盪下進行偶合反應 2 小時。最後, 藉由在 Q-瓊脂糖 FF 上進行之離子交換層析純化 PEG-rFIX 接合物。將反應混合物裝載於經 50 mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) 預平衡之管柱 (每毫升凝膠 1.5 mg 蛋白質) 上。用 20 CV Tris 緩衝液 (pH 8.0) (50 mM Tris, 1 M NaCl) 溶析接合物, 並隨後使用 30 kD 膜進行 UF/DF。藉由量測總蛋白質 (BCA) 及 FIX 顯色活性對該製劑進行分析性示性。對於 PEG-rFIX 接合物, 測定到比活性大於天然 rFIX 之 50% (顯色檢定)。

實施例 26

在 2 mM 苯胺存在下使 rFVIII 聚唾液酸化

將 rFVIII 轉移至反應緩衝液 (50 mM Hepes, 350 mM 氯化鈉, 5 mM 氯化鈣, 0.01% Tween 80, pH 6) 中, 稀釋至蛋白質濃度為 1 mg/ml 且在 4°C 下在黑暗中在平緩振盪下在反應緩衝液 (50 mM Hepes, 150 mM 氯化鈉, 5 mM 氯化鈣, pH 6.0) 中用 NaIO_4 (最終濃度: 100 μM) 氧化 1 小時, 且藉由添加半胱胺酸水溶液 (最終濃度: 1 mM) 淬滅 15 分鐘。接著, 對反應混合物進行 UF/DF。向滯留物中添加 20 倍莫耳過量之胺氧基試劑及苯胺 (親核性催化劑, 最終濃度: 2 mM)。在室溫下在黑暗中在平緩振盪下進行偶合反應 2 小時。藉助於 HIC 移除過量胺氧基試劑。藉由添加含乙酸銨之緩衝液 (50 mM Hepes, 350 mM 氯化鈉, 5 mM 氯化鈣, 8 M 乙酸銨, 0.01% Tween 80, pH 6.9) 使反應混合物之導電率上升至 130 mS/cm, 且將其裝載於經 50 mM Hepes、2.5 M 乙酸銨、350 mM 氯化鈉、5 mM 氯化鈣、0.01% Tween 80 (pH 6.9) 預平衡之填充有 53 ml 丁基-瓊脂糖 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 的管柱上。接著, 用 50 mM Hepes、5 mM 氯化鈣、0.01% Tween 80 (pH 7.4) 溶析接合物。最後, 收集含 PSA-rFIX 之溶析份, 且使用由再生纖維素製成之 30 kD 膜 (Millipore, Billerica, MA) 進行 UF/DF。藉由量測總蛋白質 (BCA) 及 FVIII 顯色活性對該製劑進行分析性示性。對於 PSA-rFVIII 接合物, 測定到比活性為天然 rFVIII 之 80%。

實施例 27

在 10 mM 苯胺存在下使 rFVIII 聚唾液酸化

將 rFVIII 轉移至反應緩衝液 (50 mM Hepes, 350 mM 氯化鈉, 5 mM 氯化鈣, 0.01% Tween 80, pH 6) 中, 稀釋至蛋白質濃度為 1 mg/ml 且在 4°C 下在黑暗中在平緩振盪下在反應緩衝液 (50 mM Hepes, 150 mM 氯化鈉, 5 mM 氯化鈣, pH 6.0) 中用 NaIO_4 (最終濃度: 100 μM) 氧化 1 小時, 且藉由添加半胱胺酸水溶液 (最終濃度: 1 mM) 淬滅 15 分鐘。接著, 對反應混合物進行 UF/DF。向滯留物中添加 20 倍莫耳過量之胺氧基試劑及苯胺 (親核性催化劑, 最終濃度: 10 mM)。在室溫下在黑暗中在平緩振盪下進行偶合反應 2 小時。藉助於 HIC 移除過量胺氧基試劑。藉由添加含乙酸銨之緩衝液 (50 mM Hepes, 350 mM 氯化鈉, 5 mM 氯化鈣, 8 M 乙酸銨, 0.01% Tween 80, pH 6.9) 使反應混合物之導電率上升至 130 mS/cm, 且將其裝載於經 50 mM Hepes、2.5 M 乙酸銨、350 mM 氯化鈉、5 mM 氯化鈣、0.01% Tween 80 (pH 6.9) 預平衡之填充有 53 ml 丁基-瓊脂糖 FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) 的管柱上。接著, 用 50 mM Hepes、5 mM 氯化鈣、0.01% Tween 80 (pH 7.4) 溶析接合物。最後, 收集含 PSA-rFIX 之溶析份, 且使用由再生纖維素製成之 30 kD 膜 (Millipore, Billerica, MA) 進行 UF/DF。藉由量測總蛋白質 (BCA) 及 FVIII 顯色活性對該製劑進行分析性示性。對於 PSA-rFVIII 接合物, 測定到比活性為天然 rFVIII 之 80%。

實施例 28

使用分支 PEG 使凝血蛋白聚乙二醇化

凝血蛋白（諸如實施例 22-25 中所述之 FIX、FVIII 及 FVIIa）之聚乙二醇化可擴展至實施例 21 中所述之由醛及含活性胺氧基之適合連接基團製成的分支或線性聚乙二醇化試劑。

【圖式簡單說明】

圖 1 顯示凝血因子 IX 之一級結構。

圖 2 顯示氧化之 rFIX 與胺氧基-PSA 之偶合。

圖 3 顯示水溶性二胺氧基連接基團 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺及 3,6,9-三氧雜-十一烷-1,11-二氧基胺之合成。

圖 4 顯示胺氧基-PSA 之製備。

圖 5 顯示採用 SDS-PAGE 及考馬斯亮藍染色對 PSA-rFIX 接合物進行之分析性示性。

圖 6 顯示採用利用抗 FIX 及抗 PSA 抗體進行偵測對 PSA-rFIX 接合物進行之分析示性。

圖 7 顯示天然 rFIX 及 PSA-rFIX 接合物相對於輸注後時間之活性。

圖 8 顯示 PSA-rFVIII 及 Advate 相對於輸注後時間之含量。

【主要元件符號說明】

無

七、申請專利範圍：

1.一種經修飾的凝血蛋白，其包含

(a) 選自由以下者所組成之群組的凝血蛋白：

i) 具有因子 IX (FIX) 生物活性的凝血蛋白；及

ii) 具有因子 VIII (FVIII) 生物活性的凝血蛋白；

及

(b) 至少一個含有活性胺氧基的聚唾液酸 (PSA)，其在一或多個經氧化的碳水化合物部分連結至該 (a) 之凝血蛋白；

其中該經修飾的凝血蛋白具有在該一或多個經氧化的碳水化合物部分及該 PSA 上之活性胺氧基之間的肽鍵聯；

其中該經修飾的凝血蛋白相對於未經修飾的凝血蛋白具有至少 50% 的比活性。

2.如申請專利範圍第 1 項之經修飾的凝血蛋白，其中該凝血蛋白為具有 FIX 生物活性的凝血蛋白，且其中該經修飾的凝血蛋白相對於未經修飾的凝血蛋白具有至少 60% 的比活性。

3.如申請專利範圍第 1 項之經修飾的凝血蛋白，其中該凝血蛋白為具有 FVIII 生物活性的凝血蛋白，且其中該經修飾的凝血蛋白相對於未經修飾的凝血蛋白具有至少 70% 的比活性。

4.一種將含有活性胺氧基的聚唾液酸 (PSA) 接合至凝血蛋白之經氧化的碳水化合物部分的方法，其包含在允許接合的條件下使該經氧化的碳水化合物部分與至少一個經

活化之 PSA 接觸；

該凝血蛋白選自由以下者所組成之群組：

- i) 具有 FIX 生物活性的凝血蛋白；及
- ii) 具有 FVIII 生物活性的凝血蛋白；

該碳水化合物部分藉由用包含氧化劑之緩衝液培養來氧化，該氧化劑係選自由以下者所組成之群組：過碘酸鈉 (NaIO_4)、四乙酸鉛 ($\text{Pb}(\text{OAc})_4$) 及過鈳酸鉀 (KRuO_4)；其中胍鍵聯在該經氧化的碳水化合物部分與該 PSA 上之活性胺氧基之間形成；

該經修飾的凝血蛋白相對於未經修飾的凝血蛋白具有至少 50% 的比活性。

5. 如申請專利範圍第 4 項之方法，其中該凝血蛋白為具有 FIX 生物活性的凝血蛋白，且其中該經修飾的凝血蛋白相對於未經修飾的凝血蛋白具有至少 60% 的比活性。

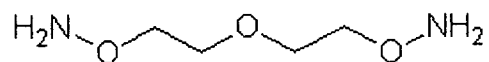
6. 如申請專利範圍第 4 項之方法，其中該凝血蛋白為具有 FVIII 生物活性的凝血蛋白，且其中該經修飾的凝血蛋白相對於未經修飾的凝血蛋白具有至少 70% 的比活性。

7. 如申請專利範圍第 4 項之方法，其中該 PSA 由約 10-300 個唾液酸單元構成。

8. 如申請專利範圍第 4 項之方法，其中該 PSA 係藉由使活化之胺氧基連接基團與氧化之 PSA 反應來製備；

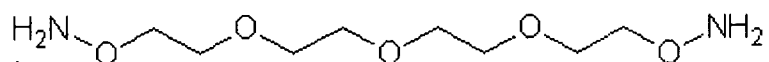
其中該胺氧基連接基團係選自由以下者所組成之群組：

- a) 下式之 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺連接基團：



及

b) 下式之 3,6,9-三氧雜-十一烷-1,11-二氧基胺連接基團：



其中該 PSA 係藉由與氧化劑培養來氧化以在該 PSA 之非還原末端形成末端醛基。

9. 如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該胺氧基連接基團為 3-氧雜-戊烷-1,5-二氧基胺。

八、圖式：

(如次頁)

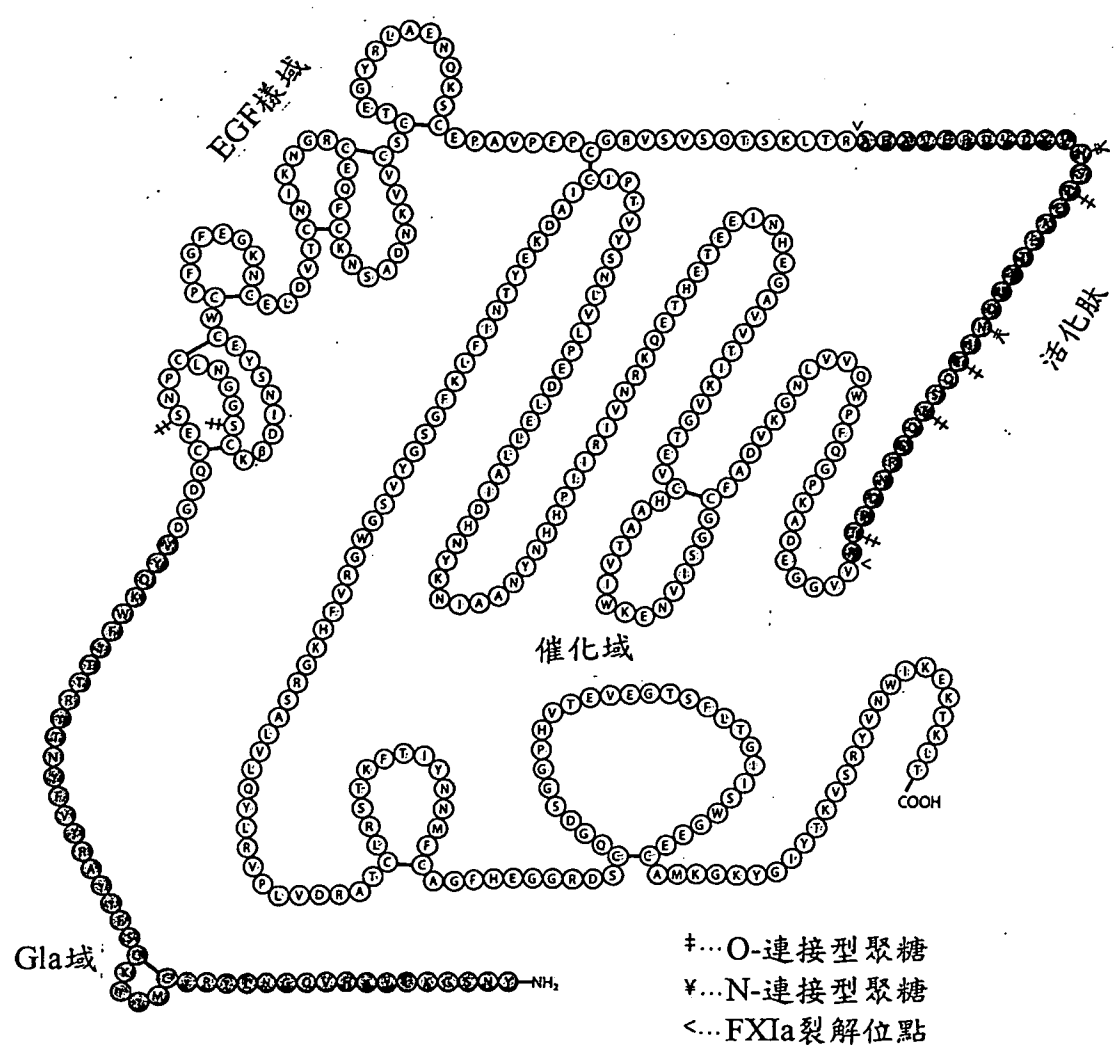
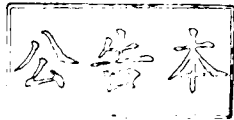


圖 1

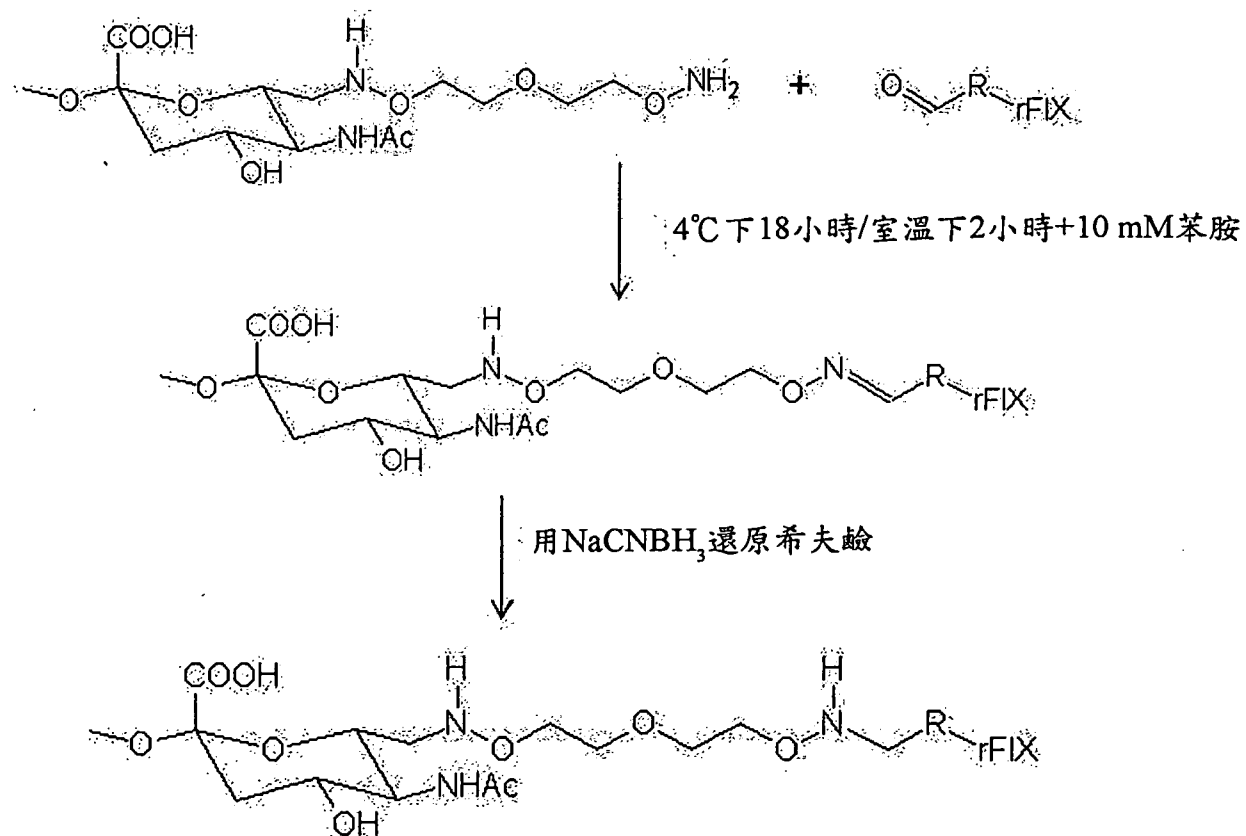


圖 2

圖 3

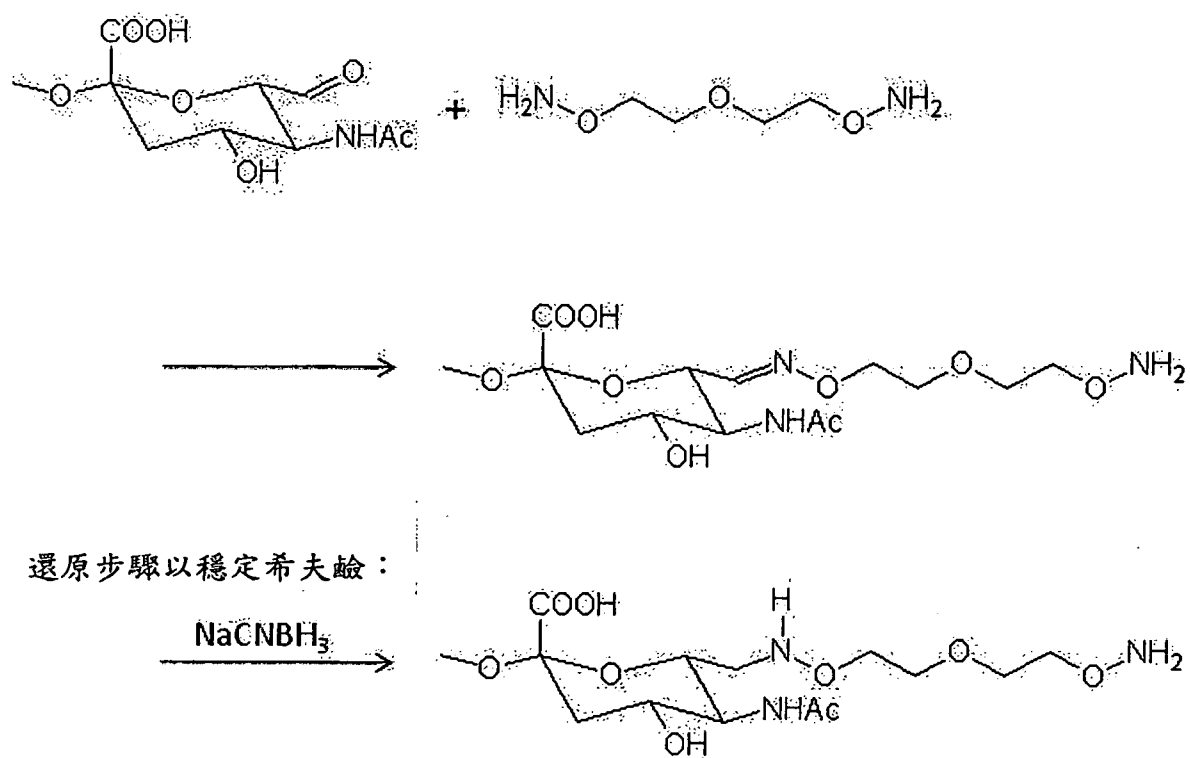


圖 4

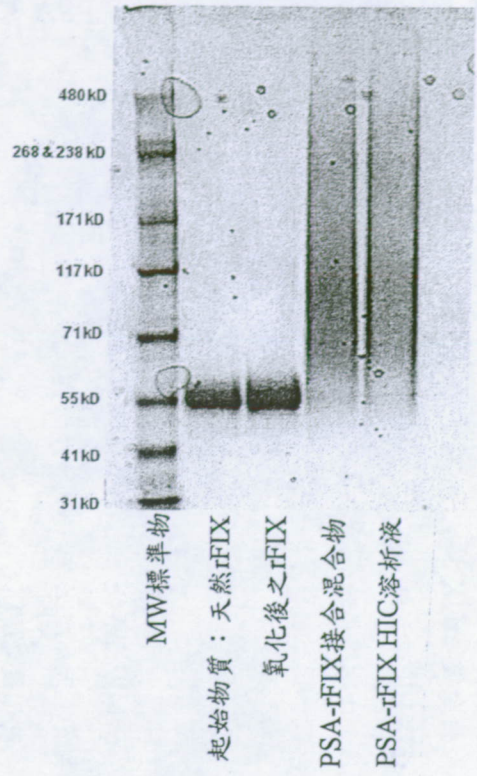


圖 5

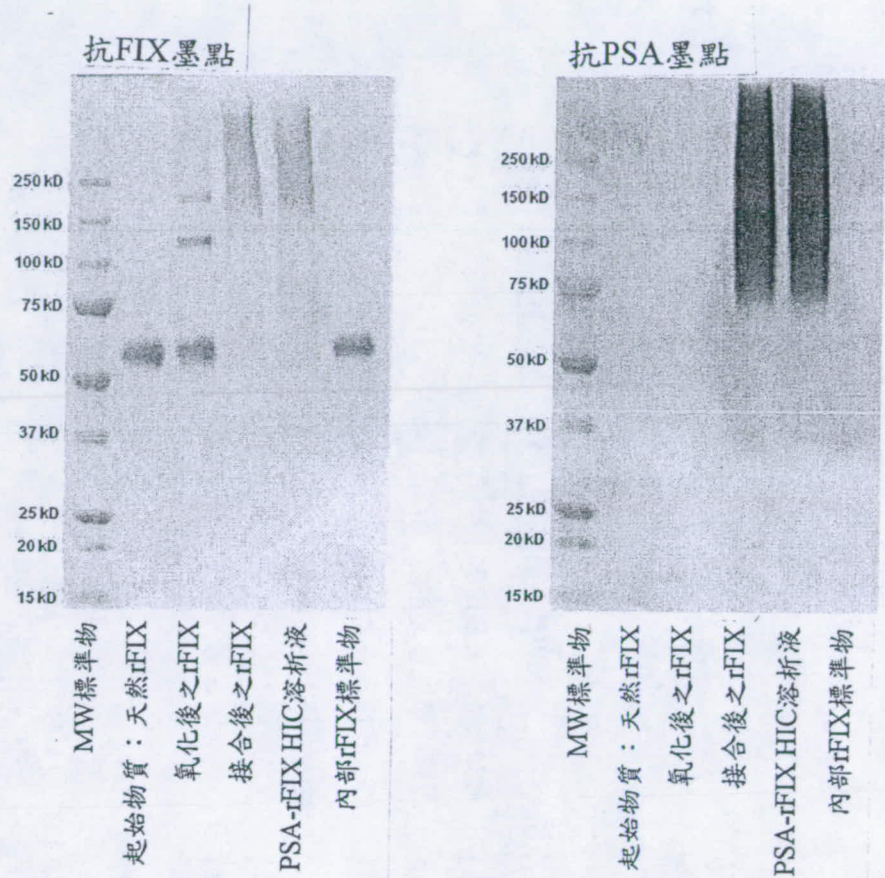


圖 6

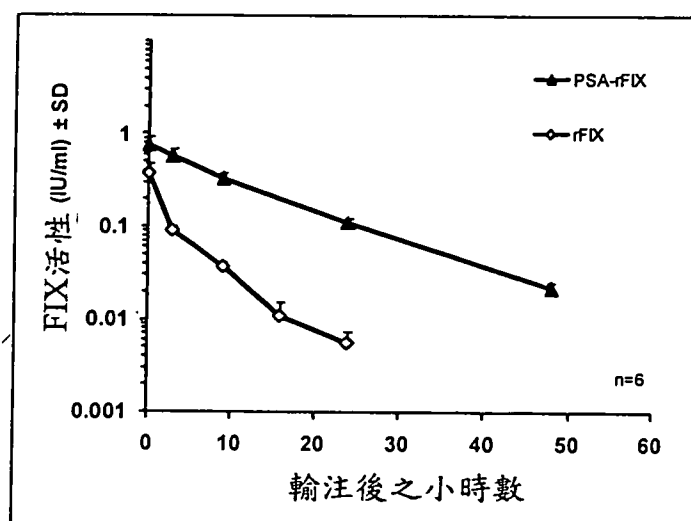


圖 7

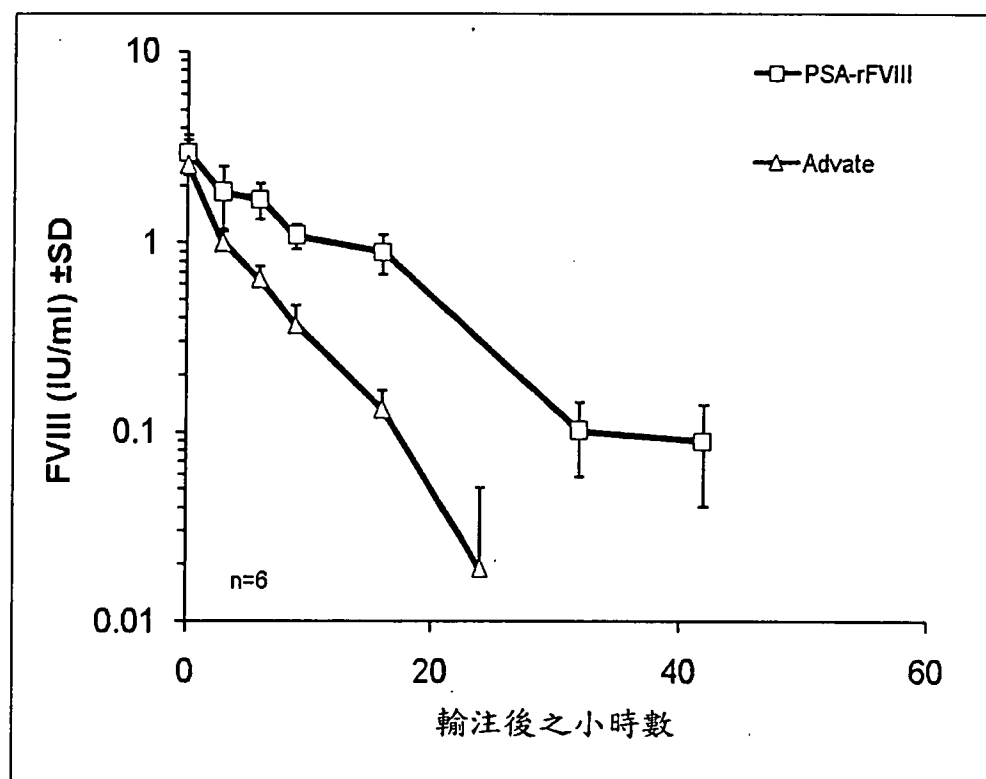


圖 8