



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102202684 A

(43) 申请公布日 2011. 09. 28

(21) 申请号 200980142604. 7

C07K 14/745 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 11. 03

(30) 优先权数据

61/110, 809 2008. 11. 03 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 04. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/063151 2009. 11. 03

(87) PCT申请的公布数据

W02010/062768 EN 2010. 06. 03

(71) 申请人 拜耳医药保健有限公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 蒋海燕 刘彤瑶 张欣

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51) Int. Cl.

A61K 38/36 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

用于治疗血友病的方法

(57) 摘要

本发明涉及治疗血友病的方法, 包括对有所需要的患者皮下或皮内施用有效量的凝固因子或其突变蛋白, 其在一个或多个氨基酸位点处共价附接于一种或多种生物相容性聚合物。

1. 一种治疗血友病的方法,包括对有所需要的患者皮下或皮内施用有效量的凝固因子或其突变蛋白,其在一个或多个氨基酸位点处共价附接于一种或多种生物相容性聚合物。

2. 权利要求1的方法,其中所述生物相容性聚合物选自:聚环氧烷、右旋糖酐、多聚乙酰神经氨酸、基于碳水化合物的聚合物、氨基酸的聚合物、生物素衍生物、聚乙烯醇、聚羧酸盐、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯-马来酸酐共聚物、聚苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚噁唑啉、聚丙烯酰吗啉、肝素、清蛋白、纤维素、壳聚糖的水解物、淀粉、糖原、琼脂糖及其衍生物、瓜尔胶、支链淀粉、菊粉、黄胞胶、角叉菜胶、果胶、和藻酸水解物。

3. 权利要求2的方法,其中所述聚环氧烷包括聚乙二醇。

4. 权利要求3的方法,其中所述聚乙二醇包括甲氧基聚乙二醇。

5. 权利要求3的方法,其中所述甲氧基聚乙二醇具有5kDa至150kDa的大小范围。

6. 权利要求2的方法,其中所述淀粉包括羟乙基淀粉和羟丙基淀粉。

7. 权利要求1的方法,其中将所述生物相容性聚合物共价附接于所述凝固因子或其突变蛋白上的预定位点。

8. 权利要求1的方法,其中所述凝固因子选自:FVII、FVIII、和FIX、及其突变蛋白。

9. 权利要求8的方法,其中将所述生物相容性聚合物在选自下组的一个或多个氨基酸位点处共价附接于FVIII:81、129、377、378、468、487、491、504、556、570、711、1648、1795、1796、1803、1804、1808、1810、1864、1903、1911、2091、2118和2284。

10. 权利要求9的方法,其中用位点特异性半胱氨酸突变取代供生物相容性聚合物附接用的所述一个或多个位点。

11. 权利要求8的方法,其中FVIII是B域缺失型FVIII。

12. 权利要求11的方法,其中B域缺失型FVIII包含选自下组的一处或多处氨基酸取代:81、129、377、378、468、487、491、504、556、570、711、1648、1795、1796、1803、1804、1808、1810、1864、1903、1911、2091、2118和2284。

13. 权利要求12的方法,其中将生物相容性聚合物在一个或多个氨基酸位点取代处共价附接于B域缺失型FVIII。

14. 权利要求1的方法,其中预防性施用凝固因子或其突变蛋白。

用于治疗血友病的方法

[0001] 本申请要求 2008 年 11 月 3 日提交的美国临时申请流水号 61/110,809 的权益,通过提及而将其内容完整收入本文。

发明领域

[0002] 本发明涉及用于治疗血友病的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 血友病 A 是最常见的遗传性凝固病症,估计发病率为每 5,000 名男性 1 例。它是由因子 VIII (FVIII) (即血液凝固的固有途径的一种成分) 的缺乏或结构缺陷引起的。人 FVIII 已经以重组方式生成,而且已经显示其作为代替疗法用于血友病 A 是有效的。

[0005] 血友病 A 的目前治疗牵涉静脉内注射或输注 FVIII。患者可以在流血事件发生时治疗(“按需疗法”(on-demand therapy)) 或者作为预防性疗法一周施用数次。例如,为了预防性处理,FVIII 可以每周给予三次。另外,可以用手术植入静脉通路装置(venous access device) 以进行施用。然而,感染可以是这些装置的一项问题。因此,这些麻烦的施用模式对患者顺从性产生巨大的障碍。

[0006] 因此,需要开发备选的施用模式来鼓励患者顺次性。本发明提供了此类治疗方法。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明涉及一种治疗血友病的方法,包括皮下施用有效量的凝固因子或其突变蛋白,其在一个或多个氨基酸位点处共价附接于一种或多种生物相容性聚合物。凝固因子的例子包括但不限于 FVIII、因子 VII (FVII)、或因子 IX (FIX)。一种或多种生物相容性聚合物可以附接于随机位点或者可以是位点特异性的。

[0009] 在一个实施方案中,生物相容性聚合物选自聚环氧烷 (polyalkyleneoxide)、右旋糖酐、多聚乙酰神经氨酸 (colominic acid)、基于碳水化合物的聚合物、氨基酸的聚合物、生物素衍生物、聚乙烯醇、聚羧酸盐、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯-马来酸酐共聚物 (polyethylene-co-maleic acid anhydride)、聚苯乙烯-马来酸酐共聚物 (polystyrene-co-malic acid anhydride)、聚噁唑啉 (polyoxazoline)、聚丙烯酰吗啉 (polyacryloylmorpholine)、肝素、清蛋白、纤维素、壳聚糖的水解物、淀粉、糖原、琼脂糖及其衍生物、瓜尔胶 (guar gum)、支链淀粉 (pullulan)、菊粉、黄胞胶、角叉菜胶 (carrageenan)、果胶、和藻酸水解物。作为一个例子,聚环氧烷可以是聚乙二醇。此外,聚乙二醇可以具有 5kDa 至 150kDa 或更大的大小范围。

[0010] 在另一个实施方案中,生物相容性聚合物是淀粉诸如羟乙基淀粉或羟丙基淀粉。作为一个例子,羟乙基淀粉的大小范围可以是 150kDa 或更大。

[0011] 在又一个实施方案中,将所述生物相容性聚合物共价附接于所述凝固因子或其突变蛋白上的预定位点。例如,可以将生物相容性聚合物共价附接于 FVIII 多肽或 FVIII 突变蛋白中选自下组的一个或多个氨基酸位点:81、129、377、378、468、487、491、504、556、570、711、1648、1795、1796、1803、1804、1808、1810、1864、1903、1911、2091、2118 和 2284。

[0012] 在一个实施方案中, FVIII 突变蛋白是 B 域缺失型因子 VIII。在另一个实施方案

中, FVIII 突变蛋白进一步包含一处或多处氨基酸取代, 其选自 81、129、377、378、468、487、491、504、556、570、711、1648、1795、1796、1803、1804、1808、1810、1864、1903、1911、2091、2118 和 2284。例如, 氨基酸取代是半胱氨酸。

[0013] 在另一个实施方案中, 生物相容性聚合物共价附接于 FVII 或 FIX 或其突变蛋白上的随机或预定位点。

[0014] 在另一个实施方案中, 预防性施用凝固因子或突变蛋白。在又一个实施方案中, 以初始负荷剂量接着以低维持剂量每日施用凝固因子或突变蛋白。在另一个实施方案中, 以维持谷水平为正常水平约 1-2% 的剂量施用凝固因子或突变蛋白。

[0015] 附图简述

[0016] 图 1。对未处理的 HemA 小鼠皮内施用因子 VIII。然后, 通过 Coatest 测定法测定血浆 FVIII 活性。

[0017] 发明详述

[0018] 应当理解, 本发明不限于所描述的具体方法、方案、细胞系、动物物种或属、构建体、和试剂, 并且因此可以有所变化。还应当理解, 本文中所使用的术语仅出于描述具体实施方案的目的, 而且并不意图限制本发明的范围, 本发明的范围仅会以所附权利要求书限制。

[0019] 必须注意到, 如本文中和所附权利要求书中所使用的, 单数形式“一个”、“一种”、和“所述”包括复数提及物, 除非上下文另有明确规定。如此, 例如, 提及“一种药剂”指提及一种或多种药剂, 而且包括本领域技术人员已知的其等同物, 等等。

[0020] 除非另有定义, 本文中所使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域普通技术人员的通常理解具有相同的意义。虽然可以在本发明的实践或测试中使用与本文中所描述的方法、装置和材料相似或等同的任何方法、装置和、材料, 但是现在描述了优选的方法、装置和材料。

[0021] 为了描述和披露例如出版物中描述的可以与目前描述的发明结合使用的方法, 在此通过提及而将本文中所提及的所有出版物和专利收入本文。上文及整个文本所讨论的出版物仅提供其在本申请的提交日前的公开内容。凭借在先发明, 本文中的任何文字都不应解释为承认本发明没有资格早于所述公开。

[0022] 血友病 A 的预防性处理需要频繁的静脉内注射或输注 FVIII, 这由于其短的体内半衰期 (8-12 小时) 而成为必要。用大体积进行频繁的静脉内注射是不方便的, 难以对年幼的儿童施用, 而且经常导致静脉导管相关感染。

[0023] 皮下施用提供了一种备选的施用模式, 而且提供了未满足的医学需要。然而, 在人中作为治疗的皮下可注射 FVIII 目前是不可行的, 很大程度上是由于其极端低的生物利用度 (< 5%)。低生物利用度需要高剂量, 这在经济上令人望而却步的。此外, 注射体积的限制使技术上具有挑战性的高浓缩性配制剂成为必要。

[0024] 如本文中所描述的, FVIII 的 PEG 化显著改善皮内施用的 FVIII 在血友病 A 小鼠模型中的生物利用度。小鼠中的皮内施用与人中的皮下注射类似。

[0025] 本发明证明了在一个或多个氨基酸位点处共价附接于一种或多种生物相容性聚合物的 FVIII 或其突变蛋白实现功能活性 FVIII 的体内回收改善。

[0026] 本发明涉及与一种或多种生物相容性聚合物诸如聚乙二醇 (PEG)、羟乙基淀粉

(HES)、多聚唾液酸 (PSA)、其它亲水性聚合物偶联的凝固因子或其突变蛋白、或用亲水性聚合物配制的 FVIII (FVIII formulated with hydrophilic polymer)。可以皮下施用这些偶联物以预防性处理血友病 A。另外,偶联物可以每周进行皮下施用或者可以以初始负荷剂量接着以小体积的低维持剂量每日施用以维持正常水平约 1-2% 的稳定有效的谷水平。

[0027] 生物相容性聚合物包括但不限于聚环氧烷,诸如但不限于聚乙二醇 (PEG)、甲基聚乙二醇 (mPEG)、右旋糖酐、多聚乙酰神经氨酸或其它基于碳水化合物的聚合物、氨基酸的聚合物、生物素衍生物、聚乙烯醇 (PVA)、聚羧酸盐、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯-马来酸酐共聚物、聚苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚噁唑啉、聚丙烯酰吗啉、肝素、清蛋白、纤维素、壳聚糖的水解物、淀粉诸如羟乙基淀粉和羟丙基淀粉、糖原、琼脂糖及其衍生物、瓜尔胶、普、菊粉、黄胞胶、角叉菜胶、果胶、藻酸水解物、其它生物聚合物及其任何等同物。其它有用的聚乙二醇化合物是聚丙二醇 (PPG)、聚丁二醇 (PBG)、PEG-缩水甘油醚 (Epox-PEG)、PEG-氧基羰基咪唑 (CDI-PEG)、分支聚乙二醇、线性聚乙二醇、分叉聚乙二醇和多臂或“超分支”聚乙二醇 (星-PEG)。

[0028] 如本文中所使用的,“PEG”和“聚乙二醇”可互换使用,包括任何水溶性聚(环氧乙烷)。通常,依照本发明使用的 PEG 包含以下结构:“ $-(OCH_2CH_2)_n-$ ”,其中 (n) 是 2 至 4000。如本文中所使用的,PEG 还包括“ $-CH_2CH_2-O(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$ ”和“ $-(OCH_2CH_2)_nO-$ ”,这取决于末端氧是否已经被置换。贯穿整个说明书和权利要求书,应当记住,术语“PEG”包括具有各种末端或“末端加帽”基团诸如但不限于羟基或 C_{1-20} 烷氧基基团的结构。术语“PEG”还指含有大多数(换言之,大于 50%) $-OCH_2CH_2-$ 重复亚基的聚合物。就特定的形式而言,PEG 可以采用许多分子量及结构或几何学诸如分支、线性、分叉、和多功能。

[0029] PEG 化是长链聚乙二醇 (PEG) 分子共价附接于蛋白质或其它分子。PEG 可以是线性形式或分支形式。另外,PEG 化可以是随机的(例如靶向伯胺诸如 N 端和赖氨酸)或位点特异性的(例如靶向特定的氨基酸)。

[0030] 例如,在本发明的一个实施方案中,生物相容性聚合物(例如 PEG)在一个或多个氨基酸位置处共价附接于 FVIII,所述氨基酸位置诸如但不限于 81、129、377、378、468、487、491、504、556、570、711、1648、1795、1796、1803、1804、1808、1810、1864、1903、1911、2091、2118 和 2284。

[0031] 凝固因子的例子包括但不限于 FVII、FVIII、FIX 及其突变蛋白。

[0032] 因子 VIII 包括人全长 FVIII 分子。FVIII 的突变蛋白包括例如,但不限于 B 域缺失型 FVIII (BDD)、功能活性 FVIII 片段、和在如下位置处包含一处或多处氨基酸取代的 FVIII 分子或其片段:81、129、377、378、468、487、491、504、556、570、711、1648、1795、1796、1803、1804、1808、1810、1864、1903、1911、2091、2118 和 2284。作为一个例子,氨基酸取代可以包括在一个或多个如下位置处的半胱氨酸:81、129、377、378、468、487、491、504、556、570、711、1648、1795、1796、1803、1804、1808、1810、1864、1903、1911、2091、2118 和 2284。

[0033] 其它 FVIII 突变蛋白的例子和生成此类突变蛋白的方法记载于美国专利申请公开文本号 2006/0115876,将其收入本文。

[0034] FVII 的例子包括人全长 FVII 分子及 FVII 突变蛋白,其记载于 W099/20767、W000/66753、W001/58935、W003/093465、W004/029091、W004/083361、和 W004/111242。

[0035] FIX 的例子包括人全长 FIX 分子及 FIX 突变蛋白,其记载于美国专利号 6,531,298;

美国专利申请流水号 PCT/US09/40691 ;及美国专利申请流水号 PCT/US09/40813。

[0036] 突变蛋白的生成

[0037] 突变蛋白是由于对蛋白质或多肽进行实验室诱导突变生成的经遗传工程化改造的蛋白质。

[0038] 氨基酸序列变化可以通过多种技术,诸如例如通过位点特异性诱变修饰相应的氨基酸序列来实现。用于位点特异性诱变的技术是本领域中公知的,并且记载于例如 Zoller 等, (DNA 3 :479-488,1984) 或 Horton 等, (Gene 77 :61-68,1989,第 61 页 - 第 68 页)。例如,本领域中公认保守取代是用一个氨基酸取代另一个具有相似特性的氨基酸,包括例如丙氨酸改变为丝氨酸或者精氨酸改变为赖氨酸。如此,使用 FVIII、FVII、或 FIX 的核苷酸和氨基酸序列,可以引入选择的变化。同样地,使用特异性引物使用聚合酶链式反应来制备 DNA 构建体的方法是本领域技术人员公知的(参见例如 PCR Protocols,1990,Academic Press, San Diego, California, USA)。

[0039] 编码突变蛋白的核酸构建体也可以通过已建立的标准方法,例如由 Beaucage 等, (Gene Amplif. Anal. 3 :1-26,1983) 所描述的亚磷酰胺方法来合成制备。根据亚磷酰胺方法,在例如自动化 DNA 合成仪中合成寡核苷酸,将其纯化、退火、连接、并在合适的载体中克隆。编码突变蛋白的 DNA 序列也可以使用特异性引物通过聚合酶链式反应来制备,例如如记载于美国专利号 4,683,202 或 Saiki 等, (Science 239 :487-491,1988) 的。此外,核酸构建体可以是混合的合成和基因组、混合的合成和 cDNA、或混合的基因组和 cDNA 起源的,其通过依照标准的技术连接与整个核酸构建体的各部分对应的合成、基因组、或 cDNA 起源(在合适时)对应的片段来制备。

[0040] 可以使用重组 DNA 方法来将编码突变蛋白的 DNA 序列插入重组载体中。载体的选择常常会取决于载体要导入的宿主细胞。载体可以是自主复制型载体或整合型载体。自主复制型载体以染色体外实体存在,并且其复制不依赖于染色体复制,例如质粒。整合型载体是整合入宿主细胞基因组中,并与其已经整合入的染色体一起复制的载体。

[0041] 载体可以是表达载体,其中编码突变蛋白的 DNA 序列与转录、翻译、或 DNA 加工需要的别的区段诸如启动子、终止子、和多聚腺苷酸化位点可操作连接。一般地,表达载体可以衍生自质粒或病毒 DNA,或者可以含有这两者的元件。术语“可操作连接”指明布置区段以使它们出于其意图的目的地一致地运行,例如,转录在启动子中启动,并行进通过编码多肽的 DNA 序列。

[0042] 表达突变蛋白中使用的表达载体可以包含能够指导克隆基因或 cDNA 转录的启动子。启动子可以是在选择的宿主细胞中显示转录活性,而且可以衍生自编码对于宿主细胞而言同源或异源的蛋白质的基因的任何 DNA 序列。适合用于在哺乳动物细胞中指导编码突变蛋白的 DNA 转录的启动子的例子是例如 SV40 启动子 (Subramani 等, Mol. Cell Biol. 1 : 854-864,1981)、MT-I (金属硫蛋白基因) 启动子 (Palmiter 等, Science 222 :809-814, 1983)、CMV 启动子 (Boshart 等, Cell 41 :521-530,1985)、骨髓增殖性肉瘤病毒 (MPSV) LTR 启动子 (Lin 等, Gene. 147 :287-92,1994)、或腺病毒 2 主要晚期启动子 (Kaufman 等, Mol. Cell. Biol. 2 :1304-1319,1982)。

[0043] 若必要的话,也可以将编码突变蛋白的 DNA 序列可操作连接至合适的终止子,诸如人生长激素终止子 (Palmiter 等, Science 222 :809-814,1983) 或 TPII (Alber 等,

J. Mol. Appl. Gen. 1 :419-434, 1982)、或 ADH3(McKnight 等, EMBO J. 4 :2093-2099, 1985) 终止子。表达载体还可以含有位于插入位点下游的多聚腺苷酸化信号。多聚腺苷酸化信号包括来自 SV40 的早期或晚期多聚腺苷酸化信号、来自腺病毒 5 E1b 区的多聚腺苷酸化信号、人生长激素基因终止子 (DeNoto 等, Nucl. Acids Res. 9 :3719-3730, 1981)、或来自人 TF 基因或人凝血调节蛋白基因的多聚腺苷酸化信号。表达载体还可以包括增强子序列, 诸如 SV40 增强子。

[0044] 用于连接编码突变蛋白的 DNA 序列、启动子、和任选地终止子, 并将它们插入含有复制必需的信息的合适载体中的方法是本领域技术人员公知的 (参见例如 Sambrook 等, Molecular Cloning :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989)。

[0045] 转染哺乳动物细胞并表达导入细胞中的 DNA 序列的方法记载于例如 Kaufman 等, (J. Mol. Biol. 159 :601-621, 1982); Southern 等, (J. Mol. Appl. Genet. 1 :327-341, 1982); Loyter 等, (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 :422-426, 1982); Wigler 等, (Cell 14 :725-731, 1978); Corsaro 等, (Somatic Cell Genetics 7 :603-616, 1981), Graham 等, (Virology 52 :456-467, 1973); 及 Neumann 等, (EMBO J. 1 :841-845, 1982)。克隆 DNA 序列可以通过例如脂转染、DEAE- 右旋糖酐介导的转染、微注射、原生质体融合、磷酸钙沉淀、逆转录病毒投递、电穿孔、声穿孔 (sonoporation)、激光照射、磁转染 (magnetofection)、天然转染、和生物射弹转化来导入培养的哺乳动物细胞中 (参见例如 Mehier-Humbert 等, Adv. Drug Deliv. Rev. 57 :733-753, 2005)。为了鉴定并选择表达外源 DNA 的细胞, 一般将赋予可选择表型 (选择标志) 的基因与感兴趣的基因或 cDNA 一起导入细胞中。合适的标志物包括例如赋予对药物诸如新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、和甲氨蝶呤的抗性的基因。选择标志可以是可扩增选择标志, 其在连接序列时容许扩增标志物和外源 DNA。例示性的可扩增选择标志包括二氢叶酸还原酶 (DHFR) 和腺苷脱氨酶。选择合适的选择标志在本领域技术人员的技术范围内 (参见例如美国专利号 5, 238, 820)。

[0046] 用 DNA 转染细胞后, 将它们在合适的生长培养基中培养以表达感兴趣的基因, 如本文中所使用的, 术语“合适的生长培养基”指含有细胞生长和突变蛋白表达需要的营养物质和其它成分的培养基。

[0047] 培养基一般包含例如碳源、氮源、必需氨基酸、必需糖类、维生素、盐、磷脂、蛋白质; 而且还可以提供生长因子。然后, 应用药物选择来选择以稳定方式表达选择标志的细胞生长。对于已经用可扩增选择标志转染的细胞, 可以提高药物浓度以选择拷贝数增加的克隆序列, 由此提高表达水平。然后, 对经稳定转染的细胞的克隆筛选突变蛋白表达。

[0048] 用于本发明的哺乳动物细胞系的例子是 COS-1 (ATCC CRL 1650)、幼仓鼠肾 (BHK)、HKB11 (Cho 等, J. Biomed. Sci, 9 :631-638, 2002)、和 HEK-293 (ATCC CRL 1573; Graham 等, J. Gen. Virol. 36 :59-72, 1977) 细胞系。另外, 可以在本发明内使用许多其它细胞系, 包括大鼠 Hep I (大鼠肝癌; ATCC CRL1600)、大鼠 Hep II (大鼠肝癌; ATCC CRL 1548)、TCMK-1 (ATCC CCL 139)、Hep-G2 (ATCC HB 8065)、NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1)、CHO-K1 (ATCC CCL61)、和 CHO-DUKX 细胞 (Urlaub 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :4216-4220, 1980)。

[0049] 可以从细胞培养基回收突变蛋白, 然后通过本领域中已知的多种方法将其纯化, 所述方法包括但不限于层析 (例如离子交换、亲和力、疏水、层析聚焦、和大小排阻)、电泳方法 (例如制备等电聚焦 (preparative isoelectric focusing, IEF)、差别溶解度 (例

如硫酸铵沉淀))、提取(参见例如 Protein Purification, Janson 和 Lars Ryden 编, VCH Publishers, New York, 1989), 或其各种组合。可以通过常规的化学纯化手段, 诸如高效液相层析来实现别的纯化。其它纯化方法是本领域中已知的, 而且可以适用于突变蛋白的纯化(参见例如 Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N. Y., 1982)。

[0050] 一般而言, “纯化的”应当指已经进行过分级以除去各种其它成分, 而且基本上保留其表达的生物学活性的蛋白质、多肽、或肽组成。在使用术语“基本上纯化的”的情况中, 此名称应当指如下的组合物, 其中蛋白质、多肽、或肽形成组合物的主要成分, 诸如构成组合物中约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%、约 95%、约 99%、或更多的蛋白质。

[0051] 多种用于量化蛋白质纯化程度的方法是本领域技术人员已知的。这些包括例如测定活性级分的比活, 或通过 SDS/PAGE 分析来评估级分内的多肽量。用于评估级分纯度的例示性方法是计算级分的比活, 与初始提取物的比活比较活性, 并且如此计算在本文中通过“倍值纯化数目”评估的纯度。当然, 用于表示活性量的实际单位会取决于特定的测定技术。

[0052] “同源性”指两种蛋白质或多核苷酸序列之间的相似性程度。通过本领域中已知的技术来测定两种序列间的对应性。例如, 可以通过直接比较多核苷酸或蛋白质序列的序列信息来测定同源性。通常, 若两种序列展现出至少 75% 序列同一性、80% 序列同一性、85% 序列同一性、90% 序列同一性、或 95% 序列同一性, 则所述序列可以是同源的。

[0053] 为了测定两种蛋白质序列或两种多核苷酸序列的百分比同源性, 为了最佳比较目的而比对所述序列。例如, 为了与另一种蛋白质或多核苷酸进行最佳比对, 可以在一种蛋白质或多核苷酸的序列中引入缺口。然后, 比较在相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。在一种序列中的位置被与另一序列中相应位置的相同氨基酸残基或核苷酸占据时, 则分子在所述位置处是同源的。如本文中所使用的, 氨基酸或核酸“同源性”与氨基酸或核酸“同一性”是等同的。两种序列间的百分比同源性是由序列共享的相同位置的数目的函数, 即百分比同源性等于相同位置数目 / 位置总数的 100 倍。

[0054] 本发明还涵盖具有较低程度的同一性, 但是具有足够的相似性以实施由本发明的突变蛋白实施的一项或多项相同功能的突变蛋白。通过保守氨基酸取代来测定相似性。此类取代是用相似特征的另一种氨基酸取代蛋白质中给定的氨基酸的取代。通常, 视为保守取代的是脂肪族氨基酸 Ala、Val、Leu、和 Ile 间的彼此取代; 羟基残基 Ser 与 Thr 的互换; 酸性残基 Asp 与 Glu 的互换; 酰胺残基 Asn 与 Gln 间的取代; 碱性残基 Lys 与 Arg 的交换和芳香族残基 Phe、Trp、和 Tyr 间的取代。

[0055] 特定氨基酸的单字母缩写、其相应的氨基酸、和三字母缩写如下: A, 丙氨酸 (Ala); C, 半胱氨酸 (Cys); D, 天冬氨酸 (Asp); E, 谷氨酸 (Glu); F, 苯丙氨酸 (Phe); G, 甘氨酸 (Gly); H, 组氨酸 (His); I, 异亮氨酸 (Ile); K, 赖氨酸 (Lys); L, 亮氨酸 (Leu); M, 甲硫氨酸 (Met); N, 天冬酰胺 (Asn); P, 脯氨酸 (Pro); Q, 谷氨酰胺 (Gln); R, 精氨酸 (Arg); S, 丝氨酸 (Ser); T, 苏氨酸 (Thr); V, 缬氨酸 (Val); W, 色氨酸 (Trp); Y, 酪氨酸 (Tyr); 和正亮氨酸 (Nle)。

[0056] 同一性和相似性两者都可以容易计算 (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M. 编, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W. 编, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of sequence Data, 部分 I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G. 编, Humana Press,

New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 及 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编, M. Stockton Press, New York, 1991)。用于测定两种序列间的同一性和相似性的计算机程序方法包括但不限于 GCG 程序包 (Devereux 等, Nucleic Acids Res. 12 :387, 1984)、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul 等, J. Molec. Biol. 215 :403, 1990)。

[0057] 突变蛋白可以在氨基酸序列上相差一处或多处取代、缺失、插入、倒位、融合、和截短或任何这些的组合。另外, 变型可以提供掺入突变蛋白的肽标签或肽表达标签。肽标签可以是 FLAG 标签、c-myc 标签、E 标签、6xHis 标签、或相似肽标签。肽标签可以存在于 N 端、C 端或突变蛋白中的别处。肽标签在体内和在体外都可用于检测、纯化、或鉴定突变蛋白。本领域技术人员一般会理解的是, 肽标签序列通常会从最终药物物质的制备或表达中使用的序列除去。

[0058] 使用方法

[0059] 如本文中所使用的, 下文定义了多项术语。

[0060] 术语“治疗 / 处理”包括任何方法、作用、应用、疗法等, 其中以直接或间接改善受试者的状况或者减缓受试者中的状况或病症进展的目的, 给受试者 (或患者) (包括人) 提供医学帮助。

[0061] 短语“治疗有效的”指施用的如下药剂量, 其会实现改善疾病、状况、和 / 或病症严重性的目的, 而避免与给定治疗性处理有关的不利副作用或者使所述副作用最小化。

[0062] 术语“药学可接受的”指主题项适合于在药物产品中使用。

[0063] 因而, 本发明的实施方案包括一种在患者中治疗血友病的方法, 其包括对所述患者皮下施用含有一定量的偶联的 FVIII、FVII、FIX、或其突变蛋白的组合物。

[0064] 术语“联合疗法”或“综合疗法 (co-therapy)”指施用两种或更多种治疗剂以治疗疾病、状况、和 / 或病症。此类施用涵盖以基本上同时的方式共施用两种或更多种治疗剂或者以序贯方式施用每类治疗剂。

[0065] 联合疗法包括施用含有偶联的 FVIII、FVII、FIX、或其突变蛋白和一种或多种别的治疗剂的药学单剂配制剂, 及施用其自身分开的药学剂量配制剂中的偶联的 FVIII、FVII、FIX、或其突变蛋白和每种别的治疗剂。例如, 可以在单剂组合物中对患者一起施用偶联的 FVIII、FVII、FIX、或其突变蛋白和治疗剂或者可以在分开的剂量配制剂中施用每种药剂。

[0066] 在使用分开的剂量配制剂的情况中, 可以在基本上相同的时间 (例如并发地) 或在交错分开的时间 (例如序贯地) 施用偶联的 FVIII、FVII、FIX、或其突变蛋白和一种或多种别的治疗剂。

[0067] 药物组合物

[0068] 可以在包含药学可接受载体的药物组合物中提供如本文中所描述的偶联的 FVIII、FVII、FIX、或其突变蛋白。药学可接受载体可以是无热原的。可以单独地或者与至少一种其它药剂诸如稳定化合物联合施用组合物, 所述其它药剂可以在任何无菌的、生物相容性药物载体 (包括但不限于盐水、缓冲盐水、右旋糖酐、和水) 中施用。可以采用多种水性载体, 包括但不限于盐水、甘氨酸等。这些溶液是无菌的, 而且一般没有颗粒物质。这些溶液可以通过常规的公知灭菌技术 (例如过滤) 来灭菌。组合物可以含有如合适的生理学条件所需要的药学可接受辅助物质, 诸如 pH 调节和缓冲剂等。依照特定的施用模式, 偶

联的 FVIII、FVII、FIX、或其突变蛋白在此类药物配制剂中的浓度可以广泛变化,而且可以主要基于流体体积、粘性等进行选择。

[0069] 可以单独地或者与其它药剂、药物或激素联合施用组合物。在活性成分外,这些药物组合物可以含有合适的药学可接受载体,其包括促进活性化合物加工成可药学使用的制剂中的赋形剂和辅助剂 (auxiliary)。本发明的药物组合物可以通过皮下手段施用。

[0070] 适合于皮下、静脉内、肌肉内等的配制剂;合适的药物载体;和用于配置和施用的技术可以通过本领域公知的任何方法来准备(参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 第 20 版, 2000)。

[0071] 治疗有效剂量的确定

[0072] 治疗有效剂量的确定在本领域技术人员的能力范围内。治疗有效剂量指与缺乏治疗有效剂量情况中明显的功效相比,可以用于有效治疗疾病(例如血友病)的药剂量。

[0073] 治疗有效剂量可以最初在动物模型(例如大鼠、小鼠、兔、犬、或猪)中评估。还可以使用动物模型来测定合适的浓度范围和施用模式。然后,可以使用此类信息来在人中测定有用的剂量和施用路径。

[0074] 从业人员根据与需要治疗的患者相关的因素来确定精确的剂量。可以调节剂量和施用以提供足够的药剂水平或维持想要的效果。可以考虑的因素包括疾病状态的严重性、受试者的一般健康、受试者的年龄、重量、和性别、饮食、施用时间和频率、药物组合、反应敏感性、和耐受性/对疗法的响应。

[0075] 通过提及而明确收录本公开内容中所提及的所有专利和专利申请。上述公开内容广泛地描述了本发明。通过提及以下具体的实施例来获得更完整的理解,所述具体的实施例仅为了例示目的而提供,而且并不意图限制本发明的范围。

实施例

[0076] 为了使本发明可以得到更好的理解,列出了以下实施例。这些实施例仅为了例示目的,而不应以任何方式解释为限制本发明的范围。通过提及而完整收录本文中所提及的所有出版物。

[0077] 实施例 1:对皮内施用的 FVIII 的活性的分析

[0078] 给未处理的 (naive) 血友病 A 小鼠皮内施用 13 个 IU/ 小鼠的 rFVIII、在 PEG- 脂质体 (FVIII-Lip) 中配制的 14 个 IU/ 小鼠的 rFVIII、12 个 IU/ 小鼠的 PEG 化的 FVIII (PEG-FVIII)、和以 1 : 2 的摩尔比率与 vWF 预混合的 15 个 IU/ 小鼠的 rFVIII。然后在剂量给药后 1、4、和 8 小时时(每个时间点每个处理 3 只小鼠)对动物实施安乐死,并获得血液样品。然后通过 Coatest 测定法来测定血浆 FVIII 活性。图 1 中显示了结果。

[0079] 与 rFVIII、FVIII-Lip、和 FVIII/vWF 复合物(其仅具有勉强可检测的血浆 FVIII 活性水平,而且其在所检查的所有三个时间点时是各输入剂量的约 0.1-0.4%)相比,PEG-FVIII 在所有时间点时实现平均高 10 倍的回收,范围为输入剂量的 1-5%。

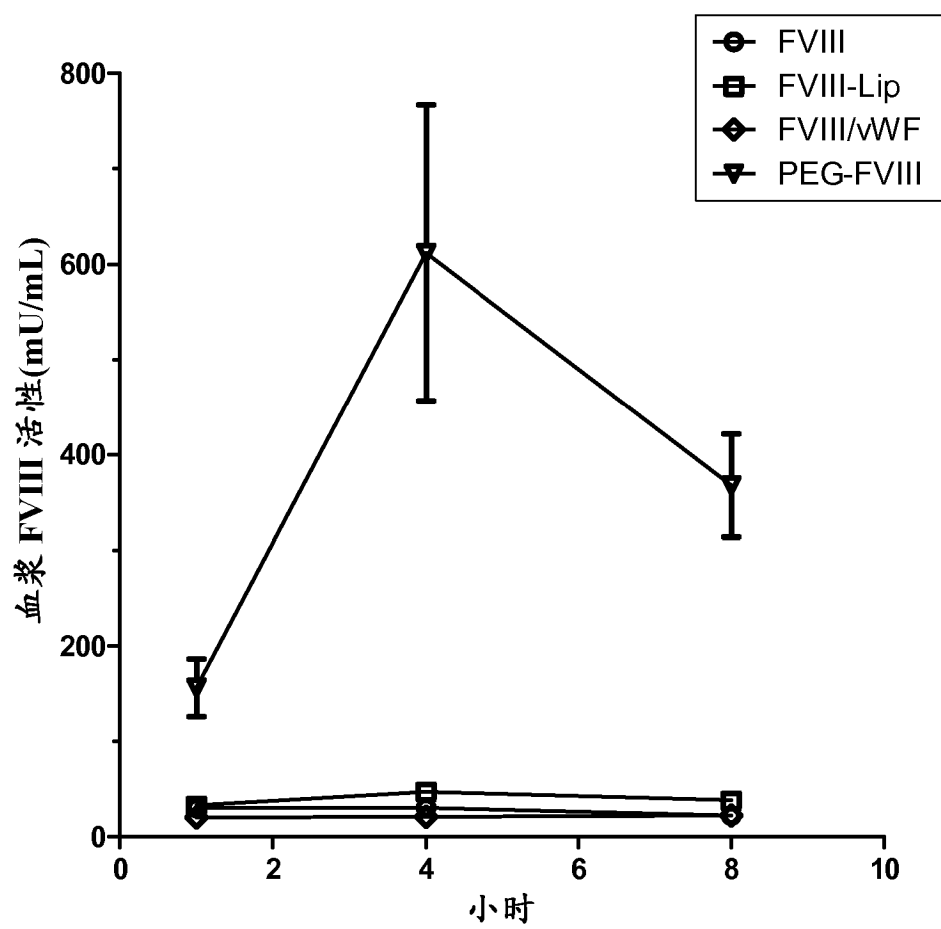


图 1