(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112195169 A
(43)申请公布日 2021.01.08

(21)申请号 202011112690.1

(22)申请日 2014.09.16

(30)优先权数据
61/881,834 2013.09.24 US

(62)分案原申请数据
201480052212.2 2014.09.16

(71)申请人 辉瑞大药厂
地址 美国纽约州

(72)发明人 M·A·扬科斯基 K·A·约翰逊
W·C·皮阿森扎 J·C·罗斯
M·沙马施金 P·J·夏泊
M·B·斯威泽 S·B·韦斯顿

(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
代理人 刘晓东

(51)Int.Cl.
C12N 9/64(2006.01)
C12N 15/57(2006.01)
A61K 38/48(2006.01)
A61P 7/04(2006.01)

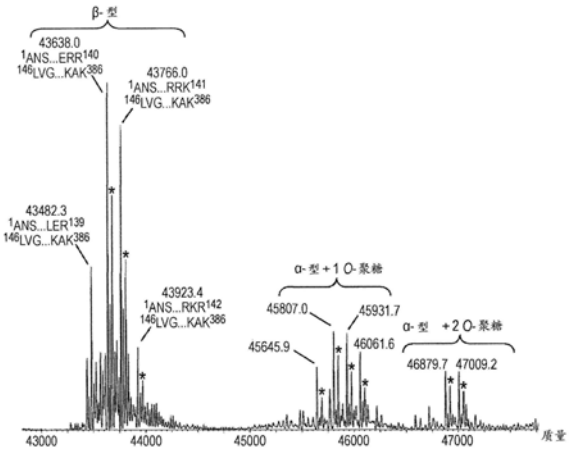
权利要求书4页 说明书39页
序列表20页 附图11页

(54)发明名称

包含重组人凝血因子Xa蛋白的异质性群体的组合物

(57)摘要

本公开内容提供了包含人凝血因子Xa(FXa)的重组变体的组合物。这样的组合物包含FXa的多种同工型和翻译后修饰且可用于治疗需要止血的受试者。



CN 112195169 A

1.一种组合物,其包含至少一种选自由下列所组成的群组的FXa变体蛋白的β型:

其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至139和146至386组成的FXa变体蛋白,

其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至384组成的FXa变体蛋白,

其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至386组成的FXa变体蛋白,

其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至384组成的FXa变体蛋白,

其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至386组成的FXa变体蛋白,

其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至384组成的FXa变体蛋白,

其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至386组成的FXa变体蛋白,

其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至143和146至384组成的FXa变体蛋白,和

其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至143和146至386组成的FXa变体蛋白。

2.一种组合物,其包含至少一种选自由下列所组成的群组的FXa变体蛋白的α型:

其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至139和146至398组成的FXa变体蛋白,

其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至398组成的FXa变体蛋白,

其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至399组成的FXa变体蛋白,

其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至398组成的FXa变体蛋白,

其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至399组成的FXa变体蛋白,

其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至398组成的FXa变体蛋白,和

其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至399组成的FXa变体蛋白。

3.一种包含FXa变体蛋白的组合物,其中所述FXa变体蛋白选自表2所列的FXa变体蛋白种类。

4.一种包含FXa变体蛋白的组合物,其中所述FXa变体蛋白的轻链选自表3所列的轻链种类。

5.一种用于纯化因子Xa(FXa)变体蛋白的方法,其包含下述步骤:

(i)将混合模式色谱(MMC)介质与含有FXa变体蛋白的经过滤的细胞培养基接触，

(ii)洗脱与所述MMC色谱介质结合的FXa变体蛋白，

(iii)将阴离子交换色谱介质与步骤(ii)中洗脱的FXa变体蛋白接触，

(iv)洗脱与所述阴离子交换色谱介质结合的FXa变体蛋白，

(v)将阳离子交换色谱介质与步骤(iv)中洗脱的FXa变体蛋白接触;和

(vi)洗脱与所述阳离子交换色谱介质结合的FXa变体蛋白。

6.一种组合物,其包含两种或更多种选自由下列所组成的群组的重组FXa变体蛋白：

(a)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至139和146至386组成的重组FXa变体蛋白，

(b)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至386组成的重组FXa变体蛋白，

(c)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至386组成的重组FXa变体蛋白，

(d)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至386组成的重组FXa变体蛋白，

(e)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至143和146至386组成的重组FXa变体蛋白，

(f)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至384组成的重组FXa变体蛋白，

(g)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至384组成的重组FXa变体蛋白，

(h)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至384组成的重组FXa变体蛋白,和

(i)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至143和146至384组成的重组FXa变体蛋白。

7.一种组合物,其包含两种或更多种选自由下列所组成的群组的重组FXa变体蛋白：

(a)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至139和146至398组成的重组FXa变体蛋白，

(b)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至398组成的重组FXa变体蛋白，

(c)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至398组成的重组FXa变体蛋白，

(d)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至398组成的重组FXa变体蛋白，

(e)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至399组成的重组FXa变体蛋白，

(f)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至399组成的重组FXa变体蛋白,和

(g)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146

至399组成的重组FXa变体蛋白。

8.重组FXa变体蛋白的组合物,其包含:

(a)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至139和146至386组成的FXa变体蛋白,

(b)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至386组成的FXa变体蛋白,

(c)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至386组成的FXa变体蛋白,

(d)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至386组成的FXa变体蛋白,

(e)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至143和146至386组成的FXa变体蛋白,

(f)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至384组成的FXa变体蛋白,

(g)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至384组成的FXa变体蛋白,

(h)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至384组成的FXa变体蛋白,

(i)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至143和146至384组成的FXa变体蛋白。

(j)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至139和146至398组成的FXa变体蛋白,

(k)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至398组成的FXa变体蛋白,

(l)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至398组成的FXa变体蛋白,

(m)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至398组成的FXa变体蛋白,

(n)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至399组成的FXa变体蛋白,

(o)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至399组成的FXa变体蛋白,和

(p)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至399组成的FXa变体蛋白。

9.一种组合物,其包含权利要求3或权利要求4的变体蛋白。

10.一种分离的核酸,其包含编码选自由下列所组成的群组的FXa变体蛋白的核酸序列:

(a)权利要求3的变体;和

(b)权利要求4的变体。

11.一种表达载体,其包含权利要求10的核酸。

12.一种宿主细胞,其包含权利要求11的表达载体。

13.一种产生FXa变体蛋白的方法,其包括在合适的生长培养基中生长权利要求12的宿主细胞和从培养基分离由所述细胞产生的FXa变体蛋白的步骤。

14.权利要求1-4和6-9中任一项的组合物在制备用于治疗需要止血的受试者的药物中的用途,其中所述组合物的量为使所述受试者止血的有效量。

包含重组人凝血因子Xa蛋白的异质性群体的组合物

[0001] 本申请是申请日为2014年9月16日、发明名称为“包含重组人凝血因子Xa蛋白的异质性群体的组合物”的中国发明专利申请201480052212.2的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求2013年9月24日提交的美国临时申请号61/881,834(其全文以引用方式并入本文)的权益。

[0004] 序列表的参考

[0005] 根据37 CFR§1.821,以计算机可读形式(CRF)经由EFS-Web随本文同时提交的文件名为PC72049_SEQLIST_ST25.txt的序列表以引用方式并入本文。所述序列表的电子复本在2014年9月10日创建,文件大小为31千字节。

[0006] 发明背景

[0007] 对于能够在一系列其中无法通过医疗或外科干预适当地控制出血的临床病况中控制过量出血的有效疗法是有需求的。此种未被满足的需求在患有血友病的患者,尤其是在那些由于产生抑制性抗体而使因子替代疗法的有效性减小的患者中是特别关键的。

[0008] 经活化的凝血因子X(FXa)在内因性和外因性凝血通路会聚处的凝血级联中占据中心位置。与膜结合的FXa在其辅因子Va(FVa)的存在下将凝血酶原转化成凝血酶,该凝血酶活化血小板并将纤维蛋白原转化成纤维蛋白以形成血栓。原则上,直接施用FXa的替代疗法可以矫正出血。然而,由于FXa的血浆半衰期非常短且可能因其它凝血因子的活化而引起过度凝血,所以其治疗潜力受到限制。

[0009] 早期的工作鉴定出一种FXa变体(I16L变体),其中亮氨酸取代野生型FXa重链的氨基末端处的异亮氨酸(在胰凝乳蛋白酶编号方案中的位置16)。所述取代产生具有酶原样特征的FXa变体。Toso,R.等人,The conformational switch from the factor X zymogen to protease state mediates exosite expression and prothrombinase assembly.J.Biol.Chem.283.18627-18635(2008);Ivanciu L.等人,A zymogen-like factor Xa variant corrects the coagulation defect in hemophilia.Nat.Biotechnol.29:1028-33(2011)。

[0010] 当不与其辅因子Va(FVa)掺入凝血酶原酶复合物中时,FXa I16L变体不具有显著的催化活性并且与野生型FXa相比,受到较好的保护而免于被血清蛋白酶抑制剂去活化。因此,与野生型FXa相比,该变体具有较长的血清半衰期。然而,与凝血酶原酶中的FVa结合导致该变体从酶原样状态转换至活性构象,从而恢复该变体催化凝血酶原转化成凝血酶的能力并从而恢复其促凝血活性。在血友病A和血友病B的小鼠模型中,在受伤前施用FXa I16L变体在截割尾巴后以剂量依赖方式减少失血。这些实验的结果表明FXa I16L变体可用于治疗人血友病患者中不受控制的出血。

[0011] 然而,在早期研究中所使用的FXa I16L变体从经稳定转染的HEK293细胞小量制造,再使用鲁塞尔氏蝰蛇毒蛋白酶(Russell's viper venom protease)RVVX活化FX蛋白。Toso,R.,Zhu,H.&Camire,R.M.The conformational switch from the factor X zymogen to protease state mediates exosite expression and prothrombinase

assembly.J.Biol.Chem.283,18627-18635(2008)。虽然对于小规模的研究是有用的,但此方法不适合用于大量制造临床研究和最终供给病人所需的经纯化的FXa变体蛋白。因此,本领域需要制备FXa I16L变体蛋白,所制造的量和纯度使FXa I16L变体蛋白可在临床试验中进行测试且被批准后可提供给需要止血的受试者。

[0012] 发明概述

[0013] 本公开内容通过提供FXa变体蛋白的组合物来解决上述本领域中未被满足的需求,所述FXa变体蛋白以足够的纯度和数量制造而能提供给需要止血的受试者。在多个实施方案中,这些组合物包含FXa变体蛋白的不同的同工型和翻译后修饰。

[0014] 在一个实施方案中,组合物包含FXa变体蛋白的β型,其中轻链和重链蛋白序列分别由下列组成:SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至139和146至386、氨基酸1至140和146至384、氨基酸1至140和146至386、氨基酸1至141和146至384、氨基酸1至141和146至386、氨基酸1至142和146至384、氨基酸1至142和146至386、氨基酸1至143和146至384、以及氨基酸1至143和146至386、所有氨基酸。

[0015] 在另一个实施方案中,组合物包含FXa变体蛋白的α型,其中轻链和重链蛋白序列分别由下列组成:SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至139和146至398、氨基酸1至140和146至398、氨基酸1至140和146至399、氨基酸1至141和146至398、氨基酸1至141和146至399、氨基酸1至142和146至398、以及氨基酸1至142和146至399、所有氨基酸。

[0016] 在上述的FXa变体蛋白的任一个或多个β和α同工型实施方案中,所述蛋白的轻链可经修饰以包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖和9、10或11个Gla残基。在一些实施方案中,存在9个Gla残基。在其它实施方案中,存在10个Gla残基。在其它实施方案中,存在11个Gla残基。

[0017] 在上述的FXa变体蛋白的任一个或多个β同工型实施方案中,重链可经修饰以包含一或两个核心-1O-连接的聚糖。在一些实施方案中,仅第一个、仅第二个或两个核心-1O-连接的聚糖可以是未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的。根据一些实施方案,不存在唾液酸基团。在其它实施方案中,存在一个唾液酸基团。在其它实施方案中,存在两个唾液酸基团。在进一步的实施方案中,存在三个唾液酸基团。在更一步的实施方案中,总共存在四个唾液酸基团。

[0018] 根据一些实施方案,FXa变体蛋白组合物包含本公开内容的表2所列的至少一种FXa变体蛋白种类。在其它实施方案中,本公开内容的组合物包含表2所列出的FXa变体蛋白种类的至少5种、至少10种、至少15种、至少20种、至少25种、至少30种、至少35种、至少40种、至少45种、至少50、至少55种或至少60种。

[0019] 根据其它实施方案,FXa变体蛋白组合物包含至少一种其中轻链为本公开内容的表3所列出的种类的FXa变体蛋白。且在其它实施方案中,FXa变体蛋白组合物包含至少一种其中重链为本公开内容的表4所列出的种类的FXa变体蛋白。

[0020] 在一些实施方案中,本公开内容的任一种或多种FXa变体蛋白可以以相对于可能存在的其它种类而改变的平均丰度存在于组合物中。例如,相较于存在的其它种类,特定的种类可以以主要丰度、次要丰度或微量丰度存在。或者,相较于存在的其它种类,特定的种类可以以高丰度、中等丰度、低丰度或非常低的丰度存在。

[0021] 本公开内容还提供了用于制造和纯化FXa变体蛋白的核酸、载体、宿主细胞和方

法。

[0022] 例如,包括了编码FX变体蛋白的核酸序列,所述FX变体蛋白包含以PACE加工位点替换天然活化肽(AP)序列,从而允许凝血因子的细胞内活化。在一些实施方案中,AP序列被完全去除并被氨基酸序列Arg-Lys-Arg取代。根据一些实施方案,编码FX变体蛋白的cDNA序列由SEQ ID NO:4的核酸序列提供,而由其编码的氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸序列提供。提供了用于通过生长共表达PACE(或类似的蛋白酶)和FX变体蛋白的宿主细胞和随后纯化由宿主细胞产生、加工和分泌的FXa变体蛋白来制造FXa变体蛋白的相关方法。还公开了根据这些方法所产生的FXa变体蛋白。在这些方法的一些实施方案中,宿主细胞为CHO细胞。

[0023] FXa变体蛋白的纯化可通过色谱法来进行,包括将包含所述蛋白的溶液通过混合模式色谱(MMC)柱(例如使用Capto MMC介质),随后进行清洗和洗脱,然后将所述蛋白通过第一个离子交换色谱柱(例如使用Q-Sepharose Fast Flow介质),随后进行清洗和洗脱,然后将所述蛋白通过第二个不同的离子交换色谱柱(例如使用Fractogel SO_3^-介质),随后进行清洗和洗脱。还可能的是使用用于纯化FXa变体蛋白的其它方法。

[0024] 纯化方法可任选地包含病毒去活化的步骤,以及超滤和渗滤的步骤。在将FXa变体蛋白纯化和在一些情况下浓缩后,可将其在任选地含有其它成分(诸如缓冲剂或赋形剂)的药学上可接受的稀释剂中稀释。

[0025] 本公开内容还提供了治疗需要止血的受试者的方法,此方法通过施用止血有效量的包含本公开内容的一种或多种FXa变体蛋白的组合物来进行。在其它实施方案中,在出血前给受试者施用止血有效量的包含本公开内容的一种或多种FXa变体蛋白的组合物,以预防性地防止易感受试者中不受控制的出血。在一些实施方案中,针对血友病A治疗受试者。在其它实施方案中,针对B型血友病治疗受试者。在其它实施方案中,针对外伤或其它类型的不受控制的出血治疗受试者。

[0026] 附图简述

[0027] 图1A提供成熟FX变体蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO:1),其中在位置146的野生型异亮氨酸残基被以粗体显示的亮氨酸取代。位置146对应于胰凝乳蛋白酶编号系统中的位置16。潜在的γ-羧基谷氨酸残基(Gla)下方划线且为斜体字。预测的链内和链间二硫键通过绘于相连接的半胱氨酸之间的线表示。预测的β-羟基化位点由具有实线的框包围。经工程改造以替代活化肽的PACE识别和切割位点由具有虚线的框包围。形成重链的β型的羧基末端氨基酸的赖氨酸(Lys^{386})由具有实线的椭圆形包围。图1B提供成熟FX变体蛋白轻链的预测的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。图1C提供FXa变体蛋白重链的预测的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)。图1D提供编码FX变体蛋白的cDNA的核苷酸序列(SEQ ID NO:4),包括信号序列和前肽。

[0028] 图2提供完整FXa变体蛋白的纯化制剂在还原、烷基化反应和以Lys-C进行蛋白水解消化后所得到的肽的质谱图。使用基于肽在进行RP-HPLC/ESI-QTOF MS分析后所得的质谱图的波峰分配来确认蛋白的氨基酸序列和鉴定表1及本文其它地方所描述的某些翻译后修饰。波峰标记如下。后面跟着数字的“L”指源自轻链的特定的肽。后面跟着数字的“H”指源自重链的特定的肽。“$H20^1$”:终止于Lys^{399}的H链C末端α型,含有两个经二唾液酸化的核心-1O-聚糖。“$H20^2$”:终止于Lys^{399}的H链C末端α型,含有一个经二唾液酸化的核心-1O-聚糖。

“H20^{3}”：终止于Leu^{398}的H链C末端α型，含有一个经二唾液酸化的核心-10-聚糖。“L4^{1Gla}”：含有1个γ-羧基谷氨酸残基的L链肽#4。“L10^{glc}”：含有潜在的O-连接的葡萄糖(己糖)的L链肽#10。“L1^{2Gla}”：具有2个γ-羧基谷氨酸残基的L链肽#1。“L3^{6-8Gla}”：具有6、7或8个γ-羧基谷氨酸残基的L链肽#3。“L8^{b-OH}”：含有β-羟基Asp的L链肽#8。“d”：脱酰胺化。“R”：试剂峰，即，与试剂空白组一致的缓冲剂相关产品。“*”：过烷基化。

[0029] 图3提供完整FXa变体蛋白的纯化制剂的HPLC色谱图并证明在所述制剂中存在不同的FXa变体蛋白同工型。

[0030] 图4提供完整FXa变体蛋白的纯化制剂的HPLC色谱图并证明在所述制剂中存在不同的FXa变体蛋白同工型。还可通过质谱法分析所述制剂。

[0031] 图5提供来自纯化的制剂的完整FXa变体蛋白的质谱图。质谱图确认两种主要同工型(α和β)的存在，以及广泛的质量异质性，所述广泛的质量异质性可归因于PACE切割位点的可变消化和不同类型的翻译后修饰的存在。图中的主峰通过其观察质量(以道尔顿计)来鉴定。使用基于RP-HPLC/ESI-QTOF MS分析后所得的质谱图的波峰分配来确认蛋白同工型的氨基酸序列，并鉴定表2和本文其它地方所描述的某些翻译后修饰。标记“*”的峰表示在轻链Gla结构域中存在11个Gla残基。

[0032] 图6提供FXa变体蛋白的纯化制剂在通过消除链间和链内二硫键将轻链和重链分开的还原和烷基化反应后的HPLC色谱图。所述色谱图证明不同FXa变体蛋白同工型的存在。还通过质谱分析法分析所述制剂。

[0033] 图7A提供FXa变体蛋白轻链在该蛋白的纯化制剂的还原和烷基化反应后的质谱图。该质谱图证明可归因于PACE切割位点的可变消化和不同类型的翻译后修饰的存在的广泛质量异质性。图中的主峰通过其观察质量(以道尔顿计)来鉴定。使用基于RP-HPLC/ESI-QTOF MS分析后所得的质谱图的波峰分配来确认蛋白同工型的氨基酸序列，并鉴定表3和本文其它地方所描述的某些翻译后修饰。

[0034] 第7B图提供FXa变体蛋白重链在该蛋白的纯化制剂的还原和烷基化反应后的质谱图。该质谱图证明可归因于不同类型的翻译后修饰的存在的广泛质量异质性。图中的主峰通过其观察质量(以道尔顿计)来鉴定。使用基于RP-HPLC/ESI-QTOF MS分析后所得的质谱图的波峰分配来确认蛋白同工型的氨基酸序列，并鉴定表4和本文其它地方所描述的某些翻译后修饰。标记“*”的峰表示重链的过烷基化。

[0035] 发明详述

[0036] 本文描述了包含以足以在临床试验中测试和提供给需要止血的受试者的纯度和量产生的FXa变体蛋白的组合物。还描述了制造和纯化FXa变体蛋白的方法。

[0037] 在某些实施方案中，短语“FX变体蛋白”、“FXa变体蛋白”和类似术语分别指(除非从上下文中另外明确得知)人因子X(FX)或活化的因子X(FXa)，其中在重链中紧接活化肽序列之后的异亮氨酸(Ile或I)被亮氨酸(Leu或L)取代。基于FXa重链和胰凝乳蛋白酶的催化结构域之间的序列比对，该取代也被称为使用胰凝乳蛋白酶编号方案的I16L取代突变。该位置对应于SEQ ID NO:1中的氨基酸146和SEQ ID NO:3中的氨基酸1。如上文所讨论的，包含此突变的FXa具有允许其相较于野生型FXa在血液中循环更久的酶原性质，但当被掺入凝血酶原酶复合物中时，还能以高速率切割凝血酶原。

[0038] 根据其它实施方案，FX变体蛋白和FXa变体蛋白分别指人FX或FXa，其中对应于SEQ

ID NO:1中位置146(胰凝乳蛋白酶编号方案中的位置16)的氨基酸被Phe(F)、Asp(D)或Gly(G)取代。根据其它实施方案,FX变体蛋白和FXa变体蛋白分别指人FX或FXa,其中对应于SEQ ID NO:1中位置147(胰凝乳蛋白酶编号方案中的位置17)的缬氨酸(Val或V)被Leu(L)、Ala(A)或Gly(G)取代。以及,在其它实施方案中,FX变体蛋白和FXa变体蛋白分别指人FX或FXa,其中对应于SEQ ID NO:1中位置329(胰凝乳蛋白酶编号方案中的位置194)的氨基酸被Asn(N)或Glu(E)取代。

[0039] 野生型因子X通常以通过二硫键结合在一起的非活性二链酶原形式在血液中循环。二链酶原由成熟FX(即,缺乏信号肽和前肽)在蛋白水解除去肽Arg-Lys-Arg(在成熟蛋白中存在为氨基酸140-142的)之后形成。然而,活化需要在形成凝血块前通过因子IXa或因子VIIa或通过其它蛋白酶诸如RVVX除去活化肽(AP)。AP对应于成熟单链FX的氨基酸143-194。在二链酶原中,它存在于重链的氨基末端。M.Hertzberg,Biochemistry of factor X,Blood Rev.8(1):56-62(1994)。

[0040] 在示例性实施方案中,因子X变体蛋白序列通过下述步骤修饰:除去活化肽并以氨基酸序列Arg-Lys-Arg(单字母代码为RKR)替换其,以生成针对成对碱性氨基酸切割酶(PACE;还称为弗林蛋白酶(furin))的识别和切割位点。当与PACE共表达在宿主细胞中时,AP替换允许FX变体蛋白的细胞内活化,而不是在分开的步骤中活化FXa。这避免需要首先纯化由细胞产生的FX变体,使用蛋白酶(诸如RVVX)单独地活化蛋白,和随后纯化变体FXa。通过避免这些额外的步骤,FXa变体可以以更纯的形式和更大的量产生。

[0041] 成熟的因子X变体氨基酸序列描绘于图1A中(SEQ ID NO:1),其中I16L亮氨酸取代出现在氨基酸位置146(粗体),取代活化肽的RKR序列出现在位置143-145以及PACE加工位点出现在位置140-145(具有虚线的框)。图1B和图1C分别描绘在PACE位点切割后的FXa变体轻链(SEQ ID NO:2)和重链(SEQ ID NO:3)的预测的氨基酸序列。

[0042] 根据本公开内容的方法产生的FXa变体蛋白的多种制剂的分析显示出与预测的结构相比,关于蛋白序列和翻译后修饰的出人意料的异质性程度。虽然如此,包含结构上异质的FXa变体蛋白群体的这样的组合物能够在体外分析中用作有效的促凝血剂。如下文进一步描述的,所述异质性归因于轻链和重链氨基酸序列中的变化和一条链、另一条链或两条链中翻译后修饰的存在。

[0043] 不希望受限于任何特定的操作理论,据信,结构异质性的一个来源归因于经工程改造以替代活化肽的PACE/弗林蛋白酶识别和切割位点的可变切割。在非限制性实施方案中,PACE位点的氨基酸序列为工程改造至FX变体蛋白中的RKRRKR(单字母代码)(SEQ ID NO:5),这通过以残基RKR替代天然AP氨基酸序列,从而与轻链的最后三个残基一起形成蛋白水解识别位点RKRRKR(SEQ ID NO:5)来进行。还可使用其它的PACE识别位点(例如单独的RKR),作为除了PACE/弗林蛋白酶之外的蛋白酶的识别和切割位点。

[0044] 在一些实施方案中,将PACE位点蛋白水解切割以使其从轻链完全除去,从而不留下任何残基(ANS...TLER^{139}/RKRRKR/)(SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:5,分别为轻链和肽片段)。在本段中描述的前述和下列实施方案中,斜线标记(“/”)表示相邻氨基酸之间可能的切割位点并且上标数字表示轻链切割后的羧基末端氨基酸的位置(基于图1A;SEQ ID NO:1)。在其它实施方案中,将PACE位点蛋白水解切割,而留下其轻链C末端的第一个残基(ANS...TLERR^{140}/KRRKR/)(SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8,分别为轻链和肽片段)。在其它实

施方案中，将PACE位点蛋白水解切割，而留下其轻链C末端的前二个残基(ANS...TLERRK^{141}/RRKR/)(SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10，分别为轻链和肽片段)。在其它实施方案中，将PACE位点蛋白水解切割，而留下其轻链C末端的前三个残基(ANS...TLERRKR^{142}/RKR/)(SEQ ID NO:11)。在其它实施方案中，将PACE位点蛋白水解切割，而留下其轻链C末端的前四个残基(ANS...TLERRKRR^{143}/KR/)(SEQ ID NO:12)。在其它实施方案中，将PACE位点蛋白水解切割，而留下其轻链C末端的前五个残基(ANS...TLERRKRRK^{144}/R/)(SEQ ID NO:13)。在其它实施方案中，将PACE位点蛋白水解切割，而留下其轻链C末端的整个序列(ANS...TLERRKRRKR^{145}/)(SEQ ID NO:2)。

[0045] 在其它实施方案中，轻链中的结构异质性还可包括Gla结构域中不同数目的Gla残基的存在，此归因于某些谷氨酸残基的γ-羧基化程度的变化。在某些实施方案中，Gla残基的数目为9、10或11。图1A中指明了Gla结构域中谷氨酸γ-羧基化的潜在位点。根据其它实施方案，轻链结构异质性的额外潜在来源包括在Asp^{63}(第1A图;SEQ ID NO:1)处β-羟基化天冬氨酸残基的存在或不存在，以及O-连接的己糖的存在或不存在。在一些实施方案中，O-连接的己糖为葡萄糖，但在其它实施方案中，其可以是不同的己醛糖，或环形半缩醛、酮己糖或其它O-连接的己糖。

[0046] 重链也可显现出结构异质性。根据某些实施方案，重链的长度可能发生变化。例如，一些重链为终止于K^{399}的较长的α同工型(SEQ ID NO:3)(上标数字表示基于图1A SEQ ID NO:1的重链羧基末端氨基酸的位置)，但在其它情况中末端赖氨酸不存在，以使得蛋白终止于L^{398}(SEQ ID NO:14)。在其它实施方案中，重链为终止于K^{386}或K^{384}的较短的β型(分别为SEQ ID NO:46和SEQ ID NO:45)。

[0047] 重链中异质性的另一来源为O-连接的糖基化的程度。因此，在一些实施方案中，重链为未经糖基化的。在其它实施方案中，重链包含一个或两个核心-1O-聚糖。核心-1O-聚糖是其中N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)连接于丝氨酸或苏氨酸且半乳糖(Gal)连接于GalNAc的O-聚糖。在本公开内容的一些实施方案中，存在GalNAc糖，但缺失Gal糖。根据其它实施方案，所述两个核心-1O-连接的聚糖可各自单独地为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的，以使得重链可拥有总计0至4个唾液酸基团。当存在唾液酸基团时，它们可以连接至GalNAc或Gal，或连接至这两种糖。

[0048] 根据其它实施方案，轻链和重链的不同配对是可能的，由此产生具有不同链长度和翻译后修饰的二链酶原的大量组合集合。

[0049] 在其它实施方案中，不同种类的FXa变体蛋白的相对丰度可不同。在一个实施方案中，各种类的丰度可通过比较完整FXa变体蛋白的质谱中的波峰高度来检测。或者，轻链和重链的丰度可在将完整蛋白还原和烷基化以消除链间和链内二硫键后通过质谱法来单独地分析。如下文实施例中所描述的，不同的FXa变体种类的丰度可通过与质谱图中的最高波峰比较而被评定为主要、次要或微量的。

[0050] 然而，质谱峰高度的比较并非测量丰度的唯一方法。用于测量结构种类的绝对或相对丰度的其它方法在本领域的普通技术人员的知识范围内。在用于分类相对丰度的另一方法的非限制性实例中，如果一种类的质谱峰高度为最丰富种类(即，质谱图中的最高峰)的高度的至少约50％，则该种类被认为具有高丰度。如果一种类的波峰在最丰富种类的波峰的约10-50％之间，则该种类被认为具有中等丰度。如果一种类的波峰在最丰富种类的波

峰的约2-10％之间，则该种类被认为具有低丰度，并且如果其波峰低于最丰富种类的波峰的约2％，则该种类被认为具有非常低的丰度。用于比较相对种类丰度的其它规范也是可用的。

[0051] FXa变体蛋白轻链、重链及其组合中的结构异质性的具体的非限制性实施方案描述于下文中。

[0052] 本公开内容的实施方案包括其中轻链的羧基末端因PACE位点的可变切割而终止于不同氨基酸的FXa变体蛋白。相关的实施方案包括存在不同数量的Gla残基和翻译后修饰，诸如β羟基化的天冬氨酸残基和O-连接的己糖。下文中描述这些实施方案中的一些实施方案。

[0053] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至139组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0054] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0055] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0056] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0057] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至143组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0058] 本公开内容的实施方案包括其中重链的羧基末端终止于不同氨基酸的FXa变体蛋白。相关的实施方案包括不同数量的包含不同唾液酸化程度的O-连接的聚糖。下文中描述了这些实施方案中的一些实施方案。

[0059] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至384组成的FXa变体蛋白。本公开内容的组合物还可包含本公开内容的任何其它FXa变体蛋白。

[0060] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至386组成的FXa变体蛋白。本公开内容的组合物还可包含本公开内容的任何其它FXa变体蛋白。

[0061] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至398组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，重链额外包含一个核心-1聚糖(其可以是未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)，或两个核心-1聚糖(其各自可独立地为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0062] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至399组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，重链额外包含一个核心-1聚糖(其可以是未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)，或两个核心-1聚糖(其各自可独立地为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0063] 本公开内容的实施方案包括其中轻链的羧基末端因PACE位点的可变切割而终止于不同氨基酸并且其中重链的羧基末端也终止于不同氨基酸的FXa变体蛋白。相关的实施方案包括轻链中不同数量的Gla残基和翻译后修饰，诸如β羟基化的天冬氨酸残基和O-连接的己糖，以及重链中不同数量的包含不同唾液酸化程度的O-连接的聚糖。下文描述了这些实施方案中的一些实施方案。

[0064] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至139组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至384组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0065] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至139组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至386组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组

合。

[0066] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至139组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至398组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。在其它相关的实施方案中，重链额外包含一个核心-1聚糖(其可以是未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)，或两个核心-1聚糖(其各自可独立地为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)。在其它相关的实施方案中，将轻链的翻译后修饰的各种可能排列与重链的翻译后修饰的各种可能排列组合。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0067] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至139组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至399组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。在其它相关的实施方案中，重链额外包含一个核心-1聚糖(其可以是未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)，或两个核心-1聚糖(其各自可独立地为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)。在其它相关的实施方案中将轻链的翻译后修饰的各种可能排列与重链的翻译后修饰的各种可能排列组合。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0068] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至384组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0069] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至386组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0070] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至398组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种

翻译后修饰。在其它相关的实施方案中，重链额外包含一个核心-1聚糖(其可以是未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)，或两个核心-1聚糖(其各自可独立地为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)。在其它相关的实施方案中，将轻链的翻译后修饰的各种可能排列与重链的翻译后修饰的各种可能排列组合。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0071] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至399组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。在其它相关的实施方案中，重链额外包含一个核心-1聚糖(其可以是未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)，或两个核心-1聚糖(其各自可独立地为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)。在其它相关的实施方案中，将轻链的翻译后修饰的各种可能排列与重链的翻译后修饰的各种可能排列组合。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0072] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至384组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0073] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至386组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0074] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至398组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。在其它相关的实施方案中，重链额外包含一个核心-1聚糖(其可以是未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)，或两个核心-1聚糖(其各自可独立地为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)。在其它相关的实施方案中，将轻链的翻译后修饰的各种可能排列与重链的翻译后修饰的各种可能排列组合。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组

合,以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0075] 在某些实施方案中,本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至399组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中,轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中,轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。在其它相关的实施方案中,重链额外包含一个核心-1聚糖(其可以是未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的),或两个核心-1聚糖(其各自可独立地为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)。在其它相关的实施方案中,将轻链的翻译后修饰的各种可能排列与重链的翻译后修饰的各种可能排列组合。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白,其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合,以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0076] 在某些实施方案中,本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至384组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中,轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中,轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白,其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合,以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0077] 在某些实施方案中,本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至386组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中,轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中,轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白,其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合,以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0078] 在某些实施方案中,本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至398组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中,轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中,轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。在其它相关的实施方案中,重链额外包含一个核心-1聚糖(其可以是未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的),或两个核心-1聚糖(其各自可独立地为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)。在其它相关的实施方案中,将轻链的翻译后修饰的各种可能排列与重链的翻译后修饰的各种可能排列组合。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白,其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合,以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0079] 在某些实施方案中,本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至399组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中,轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中,轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种

翻译后修饰。在其它相关的实施方案中，重链额外包含一个核心-1聚糖(其可以是未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)，或两个核心-1聚糖(其各自可独立地为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)。在其它相关的实施方案中，将轻链的翻译后修饰的各种可能排列与重链的翻译后修饰的各种可能排列组合。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0080] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至143组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至384组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0081] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至143组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至386组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0082] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至143组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至398组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。在其它相关的实施方案中，重链额外包含一个核心-1聚糖(其可以是未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)，或两个核心-1聚糖(其各自可独立地为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)。在其它相关的实施方案中，将轻链的翻译后修饰的各种可能排列与重链的翻译后修饰的各种可能排列组合。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组合，以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0083] 在某些实施方案中，本公开内容的组合物包含其中轻链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至143组成并且重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸146至399组成的FXa变体蛋白。在相关的实施方案中，轻链额外包含9个Gla残基、10个Gla残基或11个Gla残基。在这些实施方案的每个实施方案中，轻链还可包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖或这两种翻译后修饰。在其它相关的实施方案中，重链额外包含一个核心-1聚糖(其可以是未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)，或两个核心-1聚糖(其各自可独立地为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的)。在其它相关的实施方案中，将轻链的翻译后修饰的各种可能排列与重链的翻译后修饰的各种可能排列组合。本公开内容的组合物可包含本段中所描述的任何FXa变体蛋白，其是单独的或与本段中这样描述的其它FXa变体蛋白组

合,以及与本公开内容的任何其它FXa变体蛋白组合。

[0084] 本公开内容进一步提供了包含编码FX变体蛋白的核酸序列的分离的核酸。根据示例性的非限制性实施方案,本公开内容中所揭示的编码FX变体蛋白的互补DNA序列(cDNA)为SEQ ID NO:4。本领域的普通技术人员将理解,鉴于遗传密码的简并性,可能有许多其它编码FX变体蛋白的核酸序列。

[0085] 在一些实施方案中,编码FX变体蛋白的核酸可用编码位于FX蛋白的氨基末端的信号肽和/或前肽(即,前导序列)的序列来提供,所述信号肽和/或前肽除了其它潜在的功能外,指引新合成的蛋白到达分泌隔室。然后,翻译后的加工在成熟蛋白从细胞中分泌出来之前移除前导序列。在一些实施方案中,这些序列源自天然人FX。可使用非天然前导序列(诸如来自人凝血酶原的序列)。还可使用来自其它蛋白(包括非人类来源)的前导序列。在SEQ ID NO:4的核酸序列的实施方案中,氨基末端前导序列来自人凝血酶原。

[0086] 根据其它实施方案,编码FX变体蛋白的核酸可经修饰以允许细胞内活化凝血因子以产生FXa变体蛋白。

[0087] 如上文所指出的,FX通常以二链酶原的形式循环,其中52个氨基酸的活化肽位于FX重链的氨基末端。形成能够用作凝血酶原酶复合物中的促凝剂的FXa的活化作用(诸如活化的FIX或活化的FVII)需要通过蛋白酶从内部或外部凝血系统进行AP的蛋白水解去除。在先前的研究中使用类似的活化方法。具体地,将FX变体蛋白表达在细胞中,然后在单独的步骤中通过用鲁塞尔氏蝰蛇毒(RVVX)处理来活化,随后纯化FXa变体蛋白用于随后分析。

[0088] 虽然活化的FX变体蛋白原则上可使用类似方法以工业规模生产,但这样做会是非常无效率且昂贵的。例如,会需要严格的纯化以消除任何残余的RVVX。为了避免这些缺点,可移除天然的AP并替换为能在细胞内表达并发挥作用的蛋白酶的识别和切割位点。以此方式,可能将FX变体蛋白在细胞内活化而无需进行额外的加工步骤。随后,可将由宿主细胞分泌至生长培养基中的活化的FX变体蛋白纯化。

[0089] SEQ ID NO:4提供了编码FX变体的核酸序列的非限制性实例,所述FX变体中的AP序列被PACE识别和切割位点替换。由此示例性cDNA序列编码的成熟FX变体蛋白的蛋白序列提供于SEQ ID NO:1中。在这些实施方案中,构成AP的氨基酸(野生型FX蛋白序列的氨基酸143至194)被替换为序列Arg-Lys-Arg(单字母代码为RKR)。此序列与轻链序列的最后三个残基(也是RKR;SEQ ID NO:1的氨基酸140-142)组合生成成对的碱性氨基酸切割酶(PACE)的识别和切割位点(即,RKRRKR)(SEQ ID NO:5)。由此,在表达经修饰的FX变体蛋白的相同宿主细胞中共表达的可溶性PACE酶可在细胞内活化凝血因子。

[0090] 在其中宿主细胞天然表达具有类似于PACE的识别位点的酶的一些实施方案中,可能不必需地共表达外源性蛋白酶。相反地,天然蛋白酶可能足以活化在细胞中表达的FX变体蛋白,从而产生并分泌活化的FX变体蛋白。

[0091] 在其它实施方案中,可使用与PACE不同但也能在细胞内发挥作用的蛋白酶的识别和切割位点来替换AP氨基酸序列。这样的酶可共表达在与FX变体蛋白相同的宿主细胞中以活化经修饰的凝血因子。如果能够切割经工程改造的位点的天然酶在宿主细胞中以足够的水平产生,则可能不需要共表达外源性蛋白酶。

[0092] 编码本公开内容的FX变体蛋白的核酸序列可使用本领域的普通技术人员所熟知的技术来掺入载体中。

[0093] 在某些实施方案中，载体包括质粒(通常为细菌质粒)、真核游离基因、酵母人工染色体和病毒基因组。示例性非限制性病毒包括逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)和植物病毒，诸如花椰菜花叶病毒和烟草花叶病毒。其它类型的载体的可能的。在一些实施方案中，载体能在合适的宿主中自主复制。在其它实施方案中，载体被维持在宿主的染色体外或可被整合入宿主的基因组中，以允许所述载体随着宿主的基因组复制。包含基因和足以维持该基因转录和翻译的控制序列的载体被称为表达载体。根据本公开内容的载体可根据本领域的普通技术人员的知识来选择或设计，以在能够支持FX变体蛋白的表达的任何细胞类型中发挥功能，所述细胞类型包括细菌细胞、其它原核细胞、酵母细胞、其它真菌细胞、植物细胞、动物细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞、CHO细胞和人细胞，或其它细胞。

[0094] 载体可任选地含有一或多个控制序列。某些控制序列允许复制，诸如复制起点。其它控制序列控制或调节转录，诸如启动子、增强子和转录终止位点。启动子或增强子的非限制性实例为源自下列的启动子或增强子：逆转录病毒LTR、巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))或多瘤病毒。另外的实例包括组织特异性启动子和增强子、组成活性启动子和增强子以及诱导型启动子和增强子。还可能为其它启动子和增强子。而其它控制序列控制或调节转录后的RNA加工，例如剪接和多腺苷酸化信号，或增加或减小mRNA稳定性的信号。其它控制序列控制或调节蛋白翻译(诸如翻译起始序列(例如科扎克共有序列))、翻译后加工或蛋白稳定性。

[0095] 载体还可包含选择标记基因，从而允许选择已吸收载体的宿主细胞。非限制性实例包括赋予药物抗性表型的选择标记基因，诸如二氢叶酸还原酶基因(DHFR)(用于$DHFR^-$宿主细胞中，允许使用氨甲蝶呤选择)、neo基因(允许以G418或类似药物选择)、hph基因(允许以潮霉素B选择)和谷氨酸合成酶基因(允许以甲硫氨酸砜亚胺选择)。

[0096] 包含编码本公开内容的FX变体蛋白的核酸序列的载体可被引入一种或多种类型的能够支持FX变体蛋白表达的宿主细胞中。用于将载体引入合适的宿主细胞中的方法为本领域的普通技术人员所熟知的。非限制性实例包括瞬时和稳定转染、转化、转导和病毒感染靶宿主细胞。其它实例包括葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、电穿孔、将多核苷酸封装在脂质体中和直接将DNA显微注射入细胞核中。用于转化植物细胞、细菌和酵母细胞的方法也是本领域所熟知的。

[0097] FX或FXa变体蛋白可与其它蛋白一起表达以优化FX或FXa变体蛋白的表达或翻译后加工。在非限制性实例中，可将包含编码γ-谷氨酰羧化酶的基因的载体与编码FX变体蛋白的载体共同转染入宿主细胞中，以增加轻链Gla结构域中的谷氨酸羧基化。通过这样做，可增加Gla结构域中的羧基化程度和Gla残基的形成，从而提高由细胞产生的活性凝血因子的产率。在上文描述的另一实施方案中，经修饰以用PACE切割位点替换天然AP氨基酸序列的FX变体蛋白可与可溶性PACE酶共表达在相同的宿主细胞中。然后，共表达的PACE可在细胞内切割FX变体蛋白以形成活化的FX变体蛋白，其此后从细胞中分泌出。如上文所指出的，此方法避免需要在单独的步骤中活化FX变体蛋白，其否则会是非常无效率且昂贵的。

[0098] 能够表达FX变体蛋白和用于优化活性形式的FX变体蛋白的表达的其它蛋白的细胞包括哺乳动物细胞。适合作为用于表达蛋白的宿主的哺乳动物细胞系为本领域已知的，包括源自人、大鼠、小鼠和其它哺乳动物的那些。示例性非限制性实例包括可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)或其它来源取得的某些永生化的细胞系，包括中国仓鼠卵巢(CHO)细

胞、NS0细胞、SP2细胞、HEK-293T细胞、NIH-3T3细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、非洲绿猴肾细胞(例如COS、CV-1或Vero细胞)、人肝细胞癌细胞(例如HepG2细胞)、A549细胞、A431细胞、HeLa细胞、L细胞、BHK21细胞、HL-60细胞、U937细胞、HaK细胞、Jurkat细胞等。根据普通技术人员的知识来使用作为用于表达蛋白的宿主细胞的其它哺乳动物细胞是可能的。

[0099] 在其它实施方案中,可使用来自昆虫、植物、细菌或真菌的细胞系。示例性非限制性昆虫细胞包括Sf9或Sf21细胞,其通常与杆状病毒载体表达系统结合使用。示例性非限制性植物细胞包括来自下列的细胞:烟草属(nicotiana)、拟南芥属(arabidopsis)、浮萍(duckweed)、玉米、小麦和马铃薯品种。示例性非限制性细菌包括大肠杆菌(Escherichia coli)、枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)、鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)和链霉菌属(Streptomyces)菌株。示例性非限制性真菌包括粟酒裂殖酵母(Schizosaccharomyces pombe)、酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、毕赤酵母(Pichia pastoris)、克鲁维酵母属(Kluyveromyces)酵母菌株和假丝酵母属(Candida)酵母菌株。根据本领域的普通技术人员的知识来使用其它昆虫、植物、细菌和真菌细胞作为用于表达蛋白的宿主细胞是可能的。

[0100] 用于培养宿主细胞以产生活化的FX变体蛋白的方法、试剂和条件在本领域的普通技术人员的知识范围内且不欲限制于此。在非限制性实例中,可在补充有维生素K的不含血清的培养基的500升培养物中生产FXa变体蛋白。在另一非限制性实例中,可以以工业规模,例如在2500升发酵槽,或甚至更大的体积中,在经过设计以优化表达和回收的条件下生产本公开内容的FXa变体蛋白。

[0101] 在将宿主细胞在支持FX变体蛋白表达和在细胞内活化的培养条件下生长后,可以处理细胞生长培养基以将在细胞生长期间分泌的FXa变体蛋白分离和纯化。在其它实施方案中,尤其是当使用非哺乳动物宿主细胞时,剩余在细胞中的FXa变体蛋白可例如通过机械力、酶或使用洗涤剂打破细胞来释放。

[0102] 细胞培养基可经离心和/或过滤以除去细胞和碎片,例如通过单独的深层过滤或随后进行膜过滤,例如通过平均孔径为0.45微米、0.2微米或某一其它孔径的膜过滤器。通过离心和/或过滤除去细胞碎片后,可处理培养基以进一步纯化FXa变体蛋白。取决于随后的纯化步骤,可能需要将经澄清的上清液或滤液稀释和/或更换缓冲液。

[0103] 用于纯化蛋白的方法为本领域所熟知的。示例性非限制性的蛋白纯化方法包括盐沉淀、尺寸排阻色谱、离子交换色谱和亲和性色谱。例如,可将特异识别FXa变体蛋白的抗体固定至纯化柱以可逆地从周围培养基或缓冲剂中捕捉蛋白。在清洗亲和柱以除去污染物后,可随后将所结合的FXa变体蛋白洗脱。

[0104] 经部分纯化的FXa变体蛋白可按照良好的制造实践或其它的管制要求来进行加工步骤,包括例如将病毒去除或去活化。病毒可根据本领域的普通技术人员的知识,通过超滤来去除或通过用醇和/或洗涤剂处理样品来去活化。例如,可使用可从Sartorius Stedim Biotech获得的**Virosart®**牌病毒过滤器,也可使用来自其它制造商的过滤器。用于将病毒去除或去活化的其它方法是可能的。

[0105] 在一些实施方案中,可单独使用混合模式色谱法(MMC)或与其它纯化步骤组合来纯化FXa变体蛋白。MMC(也称为多模式色谱法)指使用在配体和样品组分之间提供多于一种类型的相互作用的色谱介质。示例性相互作用类型包括静电(阴离子或阳离子交换剂)、疏

水性、pi-pi相互作用、氢键合和亲硫相互作用。这些相互作用可以协作或独立工作。具体地,MMC介质的非限制性实例包括Capto adhere、Capto adhere ImpRes、Capto MMC、Capto MMC ImpRes、Capto Core 700(其全部进一步描述于GE Healthcare Life Sciences所出版的Multimodal Chromatography Handbook(2013)中)。例如,Capto MMC提供亲硫、疏水、氢键合以及阳离子交换静电性质。还可能的是使用来自其它来源的MMC介质。

[0106] 在一些实施方案中,可单独使用离子交换色谱或与其它纯化步骤组合来纯化FXa变体蛋白。离子交换色谱法指使用基于分子的表面净电荷(其可随着pH值、盐和其它条件变化)的差异来使分子分离的色谱介质。在高于蛋白的等电点的pH值下,所述蛋白将与带正电荷的介质(阴离子交换剂)结合,而当pH值低于其等电点时,蛋白会与带负电荷的介质(阳离子交换剂)结合。离子交换介质和缓冲剂条件(例如盐浓度、pH等)可经过选择以使得待纯化的蛋白(例如FXa变体蛋白)优先结合介质,从而允许在相同的结合条件下结合力较弱的污染物被冲洗掉,然后将目标蛋白从色谱柱中洗脱。关于离子交换色谱法的额外信息进一步描述于GE Healthcare出版的Ion Exchange Chromatography&Chromatofocusing Principles and Methods Handbook(2010)中。

[0107] 离子交换剂可被分类为强或弱的,这指示离子交换剂在pH值改变时保持带电的程度。强交换剂在很宽的pH范围内保持带电,而弱交换剂则不是这样。阴离子交换剂官能团的实例包括为强的季铵(Q),和被认为是弱的二乙氨基乙基(DEAE)和二乙氨基丙基(ANX)。阳离子交换剂官能团的实例包括被认为是强的磺丙基(SP)和磺酸甲酯(S),以及弱的羧甲基(CM)。

[0108] 在一个实施方案中,可单独使用阴离子交换色谱步骤或随后进行阳离子交换色谱步骤来纯化FXa变体蛋白。在另一个实施方案中,可单独使用阳离子交换色谱步骤或随后进行阴离子交换色谱步骤来纯化FXa变体蛋白。

[0109] 具体地,离子交换介质的非限制性实例包括Capto DEAE、Capto Q ImpRes、Capto SP ImpRes、Capto S、Capto Q、SOURCE 15Q、SOURCE 15S、SOURCE 30Q、SOURCE 30S、MacroCap SP、MacroCap Q、Mini Q PC、Mini S PC、Mini Q PE、Mini S PE、HR Mono Q、HR Mono S、PC Mono Q、PC Mono S、Mono Q GL、Mono S GL、DEAE Sephacel、CM Sephadex C-25、CM Sephadex C-50、DEAE Sephadex A-25、DEAE Sephadex A-50、QAE Sephadex A-25、QAE Sephadex A-50、SP Sephadex C-25、SP Sephadex C-50、ANX Sepharose 4Fast Flow (High Sub)、ANX Sepharose 4Fast Flow(Low Sub)、CM Sepharose Fast Flow、CM Sepharose High Performance、DEAE Sepharose CL-6B、DEAE Sepharose Fast Flow、Q Sepharose Big Beads、Q Sepharose Fast Flow、Q Sepharose High Performance、Q Sepharose XL、SP Sepharose Big Beads、SP Sepharose Big Beads Food Grade、SP Sepharose High Performance、SP Sepharose Fast Flow和SP Sepharose XL,这些可从GE Healthcare获得。其它离子交换介质可从Merck Millipore获得,包括,例如在**Fractogel®**系列或**Eshmuno®**系列中的那些。**Fractogel®**系列中的实例包括TMAE树脂、TMAE Hicap树脂、TMAE Medcap树脂、DEAE树脂、DMAE树脂、$SO3^-$树脂、SE Hicap树脂和COO^-树脂。**Eshmuno®**系列中的实例包括CPX、S、Q和HCX树脂。还可使用来自其它来源的离子交换介质。

[0110] 在将FXa变体蛋白充分纯化后,可使用超滤和渗滤将纯化的蛋白浓缩在用于包装或进一步处理的制剂中。

[0111] 在一些实施方案中,可将纯化和浓缩的FXa变体蛋白在含有缓冲剂和适合于施用至受试者的其它成分的水溶液中稀释,然后进行包装用于长期储存直至递送。可使用额外的处理步骤。例如,可将包含FXa变体蛋白、赋形剂、缓冲剂和其它药学上可接受的成分的组合物冻干用于长期储存。

[0112] 本公开内容的FXa变体蛋白(无论是根据下列实施例中所描述的方法或通过其它方法产生的)可使用本领域的普通技术人员所熟悉的方法来分析以测定结构异质性的存在和程度。

[0113] 例如,在一些实施方案中,可通过直接蛋白测序(例如使用Edman降解)分析由此制备的完整蛋白或蛋白水解片段。蛋白或肽还可通过液相色谱法(LC)(包括逆相LC(RP-LC))和质谱法(包括电喷雾电离四极杆飞行时间质谱法(ESI-QTOF MS))分析来检测氨基酸序列中的变化和特定翻译后修饰的存在。此外,可使用阴离子交换液相色谱法(AEX-HPLC)检测带电基团(例如γ-羧基化谷氨酸残基(Gla))的存在。

[0114] 当怀疑存在碳水化合物部分时,可通过用特定的糖苷酶除去其来确认它们的存在。随后,经过处理的蛋白(其应不含通过糖苷酶除去的碳水化合物)可例如通过质谱法来重新分析,以确认假设存在的碳水化合物的特性。

[0115] 可使用本领域的普通技术人员所熟悉的其它分析技术来检测FXa变体蛋白中的结构异质性的程度和特性。

[0116] 可测试包含本公开内容的FXa变体蛋白的组合物的促凝血活性。在非限制性实例中,利用因子VIII缺陷型人血浆作为底物,使用一期法凝血测定检测凝血活性。一种这样的测定被称为活化部分凝血活酶时间(APTT)测定,但可根据本领域的普通技术人员的知识使用其它测定。APTT测定在Kamal,.A.F,等人的How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time,activated partial thromboplastin time,and bleeding time in adults,Mayo Clin Proc.82(7):864-873(2007)中有更详细的描述。

[0117] 在某些实施方案中,本公开内容的组合物包括“治疗上有效量”或“预防上有效量”的FXa变体蛋白。“治疗上有效量”指在必要的剂量和时期下,有效实现所需的治疗结果(例如不受控制的出血的止血)的量。FXa变体的治疗上有效量可根据因素诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及FXa变体在个体中引发所需反应的能力而变化。治疗上有效量还是其中FXa变体的治疗有益效果胜过任何毒性或有害效果的量。“预防上有效量”指在必要的剂量和时期下,有效实现所需的预防结果(例如预防易感受试者中不受控制的出血)的量。例如,可在计划的手术之前给予剂量。易感受试者的实例包括患有血友病A或B的受试者,包括产生针对因子替代产品的抑制性抗体的那些受试者。

[0118] 本公开内容的组合物可施用至需要治疗或预防特征在于凝血不足或出血过量的任何病况的受试者(包括人患者)。这样的病况的非限制性实例包括血友病A、血友病B、与抑制性抗体相关的血友病A或B、凝血因子缺乏症、维生素K环氧化物还原酶C1缺乏症、γ羧化酶缺乏症、与外伤相关的出血、损伤、血栓形成、血小板减少、中风、凝血病、弥散性血管内凝血(DIC)、过度抗凝血治疗病症、巨大血小板综合征、血小板无力症(Glanzmann thrombasthenia)和存储池缺乏症。还可能的是治疗或预防特征在于凝血不足或出血过量

的其它病症。

[0119] 剂量方案可经过调整以提供最佳的所需反应(例如治疗或预防反应)。例如,可施用单次大剂量(single bolus),可随时间过去施用几个分次剂量或可根据治疗情况的紧急程度所指示的按比例减少或增加剂量。根据一些实施方案,为了便于施用和均匀剂量,将肠胃外组合物以剂量单位形式配制。剂量单位形式指用作用于待治疗的受试者的单一剂量的物理上离散的单位,其中每个单位含有经计算产生所需治疗效果的预定量的活性化合物以及适当的药物载体。

[0120] 在某些实施方案中,FXa变体蛋白的治疗或预防上有效量为约0.0001至50mg/kg,约0.001至50mg/kg,约0.001至5mg/kg,约0.001至0.5mg/kg,约0.001至0.05mg/kg,约0.01至5mg/kg或约0.01至0.5mg/kg。根据相关的实施方案,FXa变体蛋白的治疗或预防上有效的血清浓度为约0.0003至300nM、约0.003至300nM、约0.03至300nM、约0.003至30nM、约0.03至30nM或约0.3至3nM。FXa变体的血清浓度可通过本领域中已知的任何方法测量。

[0121] 本公开内容的组合物的单位剂量可经过制备以方便地允许给受试者施用治疗或预防上有效量的FXa变体蛋白或在这样的受试者中实现这样的蛋白的所需血清浓度。

[0122] 对于任何特定的受试者,可根据接受治疗的受试者的需求和负责施用组合物或监督组合物的施用的个人的专业判断来随时间过去调整具体的剂量方案或范围。因此,本文所示出的剂量方案和范围仅为示例性的且不欲限制本公开内容的组合物的范围或实践。

[0123] 另外,提供了包含例如本公开内容组合物的一个或多个单位剂量的试剂盒。这样的单位剂量可以是液体形式或为冻干物。如果组合物以冻干形式包装,试剂盒可额外包括填充有用于重悬干燥小丸的稀释剂(诸如无菌水或盐水溶液)的容器。试剂盒还可包含用于施用的物品,包括例如,皮下注射器、或管和蝶形针等。试剂盒可额外包含使用说明、用于消毒皮肤的酒精片或其它组分。

[0124] 包含FXa变体蛋白的组合物可根据普通技术人员的知识施用一或多次,直到出血停止或获得足够的凝血。当使用多次施用时,可每小时、每天、每周或以其它间隔施用。施用可按时间表进行,例如每10分钟、每15分钟、每20分钟、每30分钟、每小时、每两小时、每三小时、每四小时、每日三次、每日两次、每日一次、每两天一次、每三天一次和每周一次。还可例如经由微型泵连续施用FXa变体。FXa变体可经由肠胃外途径(例如静脉内、皮下、腹膜内或肌内)施用。FXa变体可施用一次、两次或更多次,或至少进行实现有效凝血所需的时期。

[0125] 在另一个实施方案中,包含FXa变体蛋白的组合物可与另一种促凝剂共同施用,所述另一种促凝剂包括不同的FXa变体(例如在146号氨基酸处具有不同于亮氨酸的取代的FXa变体)、因子IX、因子XIa、因子XIIa、因子VIII、因子VIIa、FEIBA或凝血酶原复合物浓缩物(PCC)。

[0126] 包含FXa变体蛋白的组合物还可包含药学上可接受的载体或媒介物,所述载体或媒介物可以是溶剂、分散介质、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂以及生理上相容的类似物。仅用于举例说明,药学上可接受的载体的一些实例是水、盐水、磷酸盐缓冲的盐水、右旋糖、甘油、乙醇等以及它们的组合。组合物中还可包含等渗剂,例如盐(例如氯化钠)、糖(例如蔗糖)或多元醇(例如甘露糖醇或山梨糖醇)。药学上可接受的物质的另外实例是增强本发明组合物的稳定性或其它属性的润湿剂、乳化剂、防腐剂或缓冲剂。

[0127] 根据本公开内容使用的组合物可以是用于施用给受试者的任何适合形式,例如,

作为用于注射或输注的液体。所述形式取决于预期的施用方式和治疗应用。

[0128] 治疗组合物在制造和储存条件下通常为无菌且稳定的。组合物可配制成溶液、微乳剂、分散液、脂质体或其它适合高药物浓度的有序结构。无菌注射液可通过将本公开内容的FXa变体蛋白以所需的量与上述的一种成分或成分的组合掺入适当的溶剂中，随后进行过滤灭菌来制备。在用于制备无菌注射液的无菌粉末的情况中，制备方法包括真空干燥或冷冻干燥(冻干)，其从先前无菌过滤的溶液产生活性成分以及任何额外的所需成分的粉末。

[0129] 下列实施例仅用于举例说明的目的，而不应被解释为以任何方式限制权利要求的范围或本文所公开的其它发明的范围。

实施例

[0130] 实施例1：表达和纯化重组FXa变体蛋白

[0131] 使用标准分子生物学技术和试剂产生编码包含I16L突变的FX变体蛋白的cDNA，其中天然因子X活化肽氨基酸序列被氨基酸序列RKR(单字母代码)替换，此氨基酸序列RKR与轻链C末端处的RKR序列共同形成具有氨基酸序列RKRRKR(SEQ ID NO:5)的PACE蛋白水解切割位点。cDNA和由其编码的成熟蛋白的序列分别描述于图1D(SEQ ID NO:4)和图1A(SEQ ID NO:1)中。以此方式，FXa变体的FX前体可由与凝血因子共表达的PACE酶通过细胞内蛋白水解切割来活化。此外，将人FX的天然信号序列和前肽替换为人凝血酶原的天然信号序列和前肽。

[0132] 将编码FX变体的cDNA亚克隆入表达载体中处于组成型启动子的控制下。所述载体还表达新霉素抗性基因，从而允许稳定转染子的抗生素选择。创建第二载体以表达PACE酶的可溶性形式。

[0133] 使CHO K1宿主细胞适应于生长在不含血清的悬浮液中，并用表达FXa变体和可溶性PACE的线性化载体通过脂转染来共同转染所述宿主细胞。通过在补充有G418抗生素和维生素K1的培养基中生长来选择经转染的细胞。就重组FXa变体蛋白表达和活性筛选抗性克隆。使显示出具有相对高的重组FXa变体蛋白表达和活性的克隆适应于在不含血清的悬浮培养物中的生长。选择一个克隆并用于建立前主细胞库(pre-master cell bank)，和随后建立主细胞库，使用化学成分确定的不含动物或人类来源的组分的培养基。

[0134] 为了产生用于进一步研究的药物物质，使用化学成分确定的培养基，以500升(L)或2500L的规模生长表达FXa变体的细胞。开始时，将来自细胞库的细胞小瓶解冻、培养并通过使用化学成分确定的不含动物组分的培养基在体积渐增的小瓶中生长来渐进扩增。在完成扩增后，将培养物保持在小型搅拌槽生物反应器中。对于生产，在500L或2500L规模的生物反应器中持续培养，直到收获。为了收获，将细胞培养基离心以除去细胞和碎片。经由深层过滤和通过0.2微米过滤器的过滤来将培养基进一步澄清。

[0135] 然后，用缓冲剂将过滤的培养基稀释并装载到Capto混合模式色谱(MMC)柱(GE Healthcare Life Sciences)上。清洗后，将产物从柱中洗脱。然后，将部分纯化的产物稀释在洗涤剂溶液中用于将病毒去活化。病毒去活化后，将产物装载到Q-Sepharose Fast Flow色谱柱(GE Healthcare Life Sciences)上，清洗并从柱中洗脱。然后，用缓冲剂稀释洗脱的产物并装载在Fractogel SO_3^-色谱柱(Merck Millipore)上，清洗并从柱中洗脱。然后，使

用Virosart®CPV过滤器(Sartorius Stedim Biotech)过滤洗脱的产物,以除去任何可能存在的残留的病毒。过滤病毒后,使用超滤和渗滤浓缩纯化的产物。然后,测试纯化的药物物质以表征由CHO细胞产生的FXa变体蛋白。

[0136] 实施例2:末端氨基酸序列

[0137] 将通过Edman降解进行的FXa变体的氨基末端测序用于确认轻链氨基末端和重链氨基末端二者的前十个残基。在非还原和还原条件下通过SDS-PAGE解析FXa变体并将其电印迹在聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上后,通过自动化Edman降解进行分析。

[0138] 轻链氨基末端序列为ANSFL(X)(X)MKK(单字母代码)(SEQ ID NO:15)。残基6和7(以X表示)处无信号发生,这与那些位置上γ羧基谷氨酸(Gla)残基的存在相一致。重链氨基末端序列为LVGGQE(Z)KDG(SEQ ID NO:16)。残基7(以Z表示)处无信号发生,这与该位置上半胱氨酸的存在相一致。这些结果确认了轻链和重链相较于理论序列的预期氨基末端序列。

[0139] 实施例3:肽图谱分析以确认一级结构和鉴定翻译后修饰

[0140] 为了确认一级氨基酸序列和检测翻译后修饰,通过肽图谱分析来分析如实施例1中所述产生的FXa变体蛋白。具体而言,将所述蛋白还原、烷基化并用Lys-C赖氨酰内肽酶(水解无色杆菌(Achromobacter lyticus)蛋白酶1)消化,然后,通过逆相高效液相色谱/电喷雾电离四极杆飞行时间质谱法(RP-HPLC/ESI-QTOF MS)分析片段。

[0141] 所产生的肽图特征谱的实例显示于图2中,其中肽根据其相对于图1B中所示的轻链和图1C中所示的重链的理论序列的推断的相对位置进行标记。以字母“L”标记的波峰表示轻链肽,而以字母“H”标记的波峰表示重链肽。代表与缓冲剂相关的产物的次峰被标记为“R”。代表脱酰胺化(d)或过烷基化的肽的几个微量级峰分别被标记为“d”和“*”。

[0142] 通过肽图谱分析检测的肽、其理论质量和观察质量以及氨基酸序列显示于下表1中。氨基酸编号基于图1A(SEQ ID NO:1)。

[0143] 表1

[0144]

肽	残基	理论质量(Da)	观察质量(Da)	确认的序列	实验观察
L1+2 Gla	1-9	1155.475	1155.477	ANSFLEEMK (SEQ ID NO:17)	观察到 2 个 Gla 残基
L2	10	146.105		K	未检测到
L3+8 Gla	11-36	3588.204	3588.208	GHLERECMEETCSYEEAREVFEDSDK (SEQ ID NO:18)	观察到 8 个 Gla 残基; 还观察到微量水平的 6 或 7 个 Gla 残基
L4	37-43	937.429	937.434	TNEFWNK (SEQ ID NO:19)	0 个 Gla 主要种类
L4+1 Gla	37-43	981.419	981.419	TNEFWNK (SEQ ID NO:19)	1 个 Gla 次要种类
L5	44-45	309.169		YK	未检测到
L6	46-60	1724.625	1724.625	DGDQCETSPCQNQGK (SEQ ID NO:20)	
L7	61-62	249.115		CK	未检测到
L8+OH	63-79	1952.766	1952.773	DGLGEYTCTCLEGFEGK (SEQ ID NO:21)	

[0145]

肽	残基	理论质量(Da)	观察质量(Da)	确认的序列	实验观察
L9	80-87	1067.507	1067.512	NCELFTRK (SEQ ID NO:22)	
L10+Hex	88-122	4245.634	4245.639	LCSLDNGDCDQFCHEEQNSVVCSCARGYTLADNGK (SEQ ID NO:23)	
L11	123-134	1321.568	1321.575	ACIPTGPYPCGK (SEQ ID NO:24)	
L12	135-141	929.541	929.542	QTLERRK (SEQ ID NO:25)	还观察到分别为次要和微量种类的QTLERR (SEQ ID NO:26)和QTLER (SEQ ID NO:27)
H1	146-153	890.417	890.417	LVGGQECK (SEQ ID NO:28)	
H2	154-193	4620.081	4620.084	DGECPWQALLINEENEGFCGGTILSEFYILTAAHCLYQAK (SEQ ID NO:29)	
H3	194-196	449.275	449.276	RFK	

[0146]

肽	残基	理论质量(Da)	观察质量(Da)	确认的序列	实验观察
H4	197-221	2777.394	2777.398	VRVGDRNTEQEEGGEAVHEVEVVIK (SEQ ID NO:30)	
H5	222-227	801.424	801.425	HNRFTK (SEQ ID NO:31)	
H6	228-240	1581.840	1581.843	ETYDFDIAVLRLK (SEQ ID NO:32)	
H7	241-268	3263.578	3263.581	TPITFRMNVAPACLPERDWAESTLMTQK (SEQ ID NO:33)	
H8	269-281	1387.721	1387.729	TGIVSGFGRTHEK (SEQ ID NO:34)	
H9	282-289	944.551	944.553	GRQSTRLK (SEQ ID NO:35)	
H10	290-302	1610.743	1610.746	MLEVPYVDRNSCK (SEQ ID NO:36)	
H11	303-321	2182.991	2182.992	LSSSFIITQNMFCAGYDTK (SEQ ID NO:37)	
H12	322-339	1988.865	1988.865	QEDACQGDSGGPHVTRFK (SEQ ID NO:38)	
H13	340-357	2045.952	2045.953	DTYFVTGIVSWGEGCARK (SEQ ID NO:39)	

[0147]

肽	残基	理论质量(Da)	观察质量(Da)	确认的序列	实验观察
H14	358-359	203.127		GK	未检测到
H15	360-365	743.385	743.385	YGIYTK (SEQ ID NO:40)	
H16	366-371	677.411	677.415	VTAFLK (SEQ ID NO:41)	
H17	372-378	934.469	934.470	WIDRSMK (SEQ ID NO:42)	
H18	379-384	670.413	670.413	TRGLPK (SEQ ID NO:43)	
H19	385-386	217.143		AK	未检测到
H20	387-399	2183.958	2183.956	SHAPEVITSSPLK (SEQ ID NO:44)	观察到具有1和2个经二唾液酸化的O-聚糖。主要形式结束于Leu^{398}。次要形式结束于Lys^{399}。

[0148] 用PAWS(Genomic Solutions,Ann Arbor,MI)计算理论质量。从质谱图中最丰富的多电荷离子计算观察质量。所有观察质量与理论质量的相差值在10ppm以下。轻链(LC)和重链(HC)的肽之间的序列覆盖度分别为约94和98％。未检测到来自L链的三种肽(L2、L5、L7)和来自重链的两种肽(H14、H19)。理论和观察的肽质量之间的计算差值允许推断某些翻译后修饰的存在。被发现经历修饰的那些残基通过表1第5列中的下划线表示。

[0149] 轻链中的N-末端Gla结构域共含有9至11个γ羧基化谷氨酸(Gla)残基。主要的轻链种类含有10个Gla残基。虽然肽L1总是羧基化的,但在肽L3和L4中检测到异质性。具体而言,L3肽被观察到具有6、7或8个Gla残基而L4肽被观察到不具有Gla残基或具有1个Gla残基。见表1。

[0150] 关于γ-羧基化的异质性通过使用阴离子交换高效液相色谱法(AEX-HPLC)测量电荷异质性来确认。FXa变体蛋白的AEX-HPLC分离解析出含有9、10和11个γ羧基谷氨酸(Gla)残基的同工型。在所测试的经纯化的FXa变体蛋白的7种制剂中,FXa变体轻链内的Gla残基数的相对频率是一致的。具体地,基于相对峰分布,9个Gla残基的发生频率在10％至17％的

范围内(平均值＝12.1％,SD＝2.5％),10个Gla残基的发生频率在41％至46％的范围内(平均值＝43.0％,SD＝1.8％)以及11个Gla残基的发生频率在36％至46％的范围内(平均值＝42.1％,SD＝3.3％)。

[0151] 在基于APTT的凝血测定中,纯化的10和11个Gla的同工型显示出具同等活性,而9个Gla的同工型的活性降低(当针对质量标准化时,约为10和11个Gla同工型的活性的20％)。

[0152] 还检测到轻链的其它翻译后修饰。具体地,观察到肽L8的质量与位置63处β-羟基化天冬氨酸残基的存在(Asp^{63})(SEQ ID NO:1)相一致。此外,观察到肽L10具有指示O-连接的己糖的添加的质量差。

[0153] 重链还经历O-连接的糖基化。在肽图谱中,观察到重链α同工型C-末端的主要形式终止于氨基酸L^{398},并且观察到C末端的次要形式终止于氨基酸K^{399}。这两种肽被观察到含有一或两个经二唾液酸化的核心-10-聚糖,其中两种肽的主要种类含有一个经二唾液酸化的核心-10-聚糖。在肽图特征谱中,标记“$H20^3$”的波峰对应于终止于L^{398}的H20肽,而标记“$H20^2$”的波峰对应于终止于K^{399}的H20肽,其各自含有一个O-连接的聚糖。标记“$H20^1$”的波峰对应于终止于K^{399}且含有两个O-连接的聚糖的H20肽。终止于L^{398}且具有两个O-连接的聚糖的H20肽以微量水平检测到且未标注在图2中。H20中的O-聚糖通过β-消除和随后的MS片段化定位于Thr^{394}和Ser^{395}。

[0154] 实施例4:通过高效液相色谱法测定结构异质性

[0155] 使用逆相高效液相色谱法(RP-HPLC)来测量完整的纯化FXa变体蛋白的一个制剂中的结构异质性。将纯化的蛋白注射到逆相柱上并用酸化乙腈的梯度液洗脱。与来自肽图谱分析的观察相一致,FXa变体在重链C末端含有结构异质性,从而导致两种主要的结构同工型,α(终止于Lys^{399})和β(终止于Lys^{386})。由于重链在Lys^{281}或Arg^{283}后被剪断而观察到另外一种被称为γ的次要同工型。来自这些实验的HPLC色谱图显示于图3。

[0156] 在所测试的纯化的FXa变体蛋白的7种制剂之间,主要结构同工型的相对频率是一致的。具体地,基于相对峰分布,α同工型的发生频率在54％至74％的范围内(平均值＝66.9％,SD＝7.0％),β同工型的发生频率在24％至42％的范围内(平均值＝31.4％,SD＝6.5％),以及γ同工型的发生频率在1％至3％的范围内(平均值＝2.0％,SD＝0.8％)。

[0157] 使用尺寸排阻HPLC将α和β同工型纯化,并在标准的基于APTT的凝血测定中测试活性。与α同工型相比(标准化为100％),β同工型显示出稍低的活性(79％)。次要的γ种类的活性并未进行测试。

[0158] 实施例5:通过质谱法测定完整蛋白的结构异质性

[0159] 通过RP-HPLC和随后使用高分辨率混合型四极杆飞行时间质谱仪(RP-HPLC/ESI-QTOF MS)进行质谱分析来分析来自纯化蛋白的一个制剂的完整FXa变体的分子量(M_r)。用Waters MaxEnt-1软件将多电荷数据解卷积后从零电荷质谱图测定M_r值。理论的和观察到的主要和次要质量值之间的相对误差均在±60ppm内,这与Waters Q-ToF质谱仪的性能规格一致。HPLC色谱图显示于图4中。完整FXa变体蛋白的质谱图显示于图5中,基于质谱图的波峰分配列于下表2中。氨基酸编号基于图1A(SEQ ID NO:1)。^{1}ANS...LER^{139}对应于SEQ ID NO:6;^{1}ANS...ERR^{140}对应于SEQ ID NO:7;^{1}ANS...RRK^{141}对应于SEQ ID NO:9;^{1}ANS...RKR^{142}对应于SEQ ID NO:11;^{1}ANS...KRR^{143}对应于SEQ ID NO:12;^{146}LVG...LPK^{384}对应于SEQ ID

NO:45;^{146}LVG...KAK^{386}对应于SEQ ID NO:46;^{146}LVG...SPL^{398}对应于SEQ ID NO:14;且^{146}LVG...PLK^{399}对应于SEQ ID NO:3。

[0160] 表2

[0161]

轻链	重链	重链 O-聚糖	Gla No.	观察到的 M_r	丰度
^{1}ANS...ERR^{140}	(β)^{146}LVG...LPK^{384}	0	9	43394.6	微量
			10	43438.6*	次要
			11	43482.3*	主要
^{1}ANS...LER^{139}	(β)^{146}LVG...KAK^{386}	0	9	43438.6*	次要
			10	43482.3*	主要
^{1}ANS...RRK^{141}	(β)^{146}LVG...LPK^{384}	0	9	43525.0	次要
			10	43566.4	次要
			11	43610.0	微量
^{1}ANS...ERR^{140}	(β)^{146}LVG...KAK^{386}	0	9	43594.3	微量
			10	43638.0	主要
			11	43681.1*	主要
^{1}ANS...RKR^{142}	(β)^{146}LVG...LPK^{384}	0	9	43681.1*	主要
			10	43722.3	次要
			11	43766.0*	主要
^{1}ANS...RRK^{141}	(β)^{146}LVG...KAK^{386}	0	9	43722.3	次要
			10	43766.0*	主要
			11	43810.2	主要

[0162]

轻链	重链	重链 O-聚糖	Gla No.	观察到的 M_r	丰度
^{1}ANS…RKR^{142}	(β)^{146}LVG…KAK^{386}	0	9	43879.8*	微量
			10	43923.4*	次要
			11	43966.7	次要
^{1}ANS…KRR^{143}	(β)^{146}LVG…LPK^{384}	0	9	43879.8*	微量
			10	43923.4*	次要
			11	43966.7	次要
^{1}ANS…KRR^{143}	(β)^{146}LVG…KAK^{386}	0	10	44079.7	微量
^{1}ANS…ERR^{140}	(α)^{146}LVG…SPL^{398}	1+1NeuAc – Gal	10	45353.0	次要
^{1}ANS…RRK^{141}	(α)^{146}LVG…SPL^{398}	1+1NeuAc – Gal	10	45477.6*	次要
^{1}ANS…ERR^{140}	(α)^{146}LVG…PLK^{399}	1+1NeuAc – Gal	10	45477.6*	次要
^{1}ANS...LER^{139}	(α)^{146}LVG…SPL^{398}	1+1NeuAc	10	45356.0	微量
^{1}ANS…ERR^{140}	(α)^{146}LVG…SPL^{398}	1+1NeuAc	10	45514.4	次要
			11	45557.5	次要
^{1}ANS...LER^{139}	(α)^{146}LVG…SPL^{398}	1+2NeuAc	9	45603.5	次要
			10	45645.9	次要
			11	45690.9	次要
^{1}ANS…ERR^{140}	(α)^{146}LVG…SPL^{398}	1+2NeuAc	10	45807.0	次要
			11	45848.0	次要
^{1}ANS…RRK^{141}	(α)^{146}LVG…SPL^{398}	1+2NeuAc	9	45886.7	次要
			10	45931.7	次要
			11	45975.3	次要

[0163]

轻链	重链	重链 O-聚糖	Gla No.	观察到的 M_r	丰度
^{1}ANS…RRK^{141}	(α)^{146}LVG…PLK^{399}	1+2NeuAc	9	46016.1	微量
			10	46061.6	次要
			11	46102.9	次要
^{1}ANS…RKR^{142}	(α)^{146}LVG…SPL^{398}	1+2NeuAc	11	46132.4	次要
^{1}ANS…RRK^{141}	(α)^{146}LVG…PLK^{399}	1+2NeuAc	9	46172.3*	微量
^{1}ANS…RKR^{142}	(α)^{146}LVG…PLK^{399}	1+2NeuAc	9	46172.3*	微量
			10	46218.1	次要
			11	46261.7	次要
^{1}ANS…ERR^{140}	(α)^{146}LVG…PLK^{399}	2+2NeuAc	10	46297.4*	微量
^{1}ANS…RRK^{141}	(α)^{146}LVG…SPL^{398}	2+2NeuAc	10	46297.4*	微量
^{1}ANS…RRK^{141}	(α)^{146}LVG…PLK^{399}	2+2NeuAc	10	46427.8	次要
			11	46469.6	次要
^{1}ANS…ERR^{140}	(α)^{146}LVG…PLK^{399}	2+3NeuAc	10	46591.8*	次要
			11	46633.7*	次要
^{1}ANS…RRK^{141}	(α)^{146}LVG…SPL^{398}	2+3NeuAc	10	46591.8*	次要
			11	46633.7*	次要
^{1}ANS…RRK^{141}	(α)^{146}LVG…PLK^{399}	2+3NeuAc	10	46718.1	次要
			11	46760.5	次要
^{1}ANS…ERR^{140}	(α)^{146}LVG…SPL^{398}	2+4NeuAc	11	46796.3	微量
^{1}ANS…ERR^{140}	(α)^{146}LVG…PLK^{399}	2+4NeuAc	10	46879.7	次要
			11	46924.6	次要
^{1}ANS…RRK^{141}	(α)^{146}LVG…SPL^{398}	2+4NeuAc	10	46879.7	次要
			11	46924.6	次要

[0164]

轻链	重链	重链 O-聚糖	Gla No.	观察到的 M_r	丰度
^{1}ANS...RRK^{141}	(α)^{146}LVG...PLK^{399}	2+4NeuAc	9	46965.4	微量
			10	47009.2	次要
			11	47053.1	次要
^{1}ANS...RKR^{142}	(α)^{146}LVG...PLK^{399}	2+4NeuAc	10	47165.7	次要

[0165] HPLC再次证明FXa变体蛋白的结构异质性(图4)。标记为A的波峰对应于γ种类。标记为B的波峰对应于包含两个O-聚糖的蛋白的α型。标记为C的波峰对应于包含一个O-聚糖的蛋白的α型。标记为D的波峰对应于其中重链终止于K^{386}的蛋白的β型。标记为E的波峰对应于其中重链终止于K^{384}的蛋白的β型。

[0166] 在质谱图中观察到三个区域(图5)。在质谱图下端(左)的第一区对应于含有重链β同工型的完整FXa变体蛋白。此区还含有基于相对峰强度相较于其它种类更丰富的所谓的主要种类。该主要种类包括含有终止于K^{386}的重链的β型的那些,其中轻链的羧基末端残基为R^{139}、R^{140}或K^{141},这显然是由于PACE切割位点的可变切割导致的。其中轻链终止于R^{142}(同样显然是由于可变切割导致的)的种类还以次要种类存在。在这些主要和次要种类中,轻链包含β-羟基Asp^{63}和O-连接的己糖,以及10或11个Gla残基。

[0167] 质谱图中还出现两个较大质量的区域,此两者均对应于含有重链α同工型(终止于L^{398}或K^{399})的完整FXa变体蛋白的次要种类。一组这样的种类进一步包含单个O-聚糖,而第二组进一步包含两个O-聚糖翻译后修饰(分别在图5的中央和右边)。

[0168] 图5中明确指出的分配对应于其中轻链含有10个Gla残基、β-羟基Asp^{63}和O-连接的葡萄糖的完整FXa变体蛋白种类。波谱中标记“*”的相邻峰代表含有11个Gla残基(其增加质量44.0Da)的种类。

[0169] 表2中列出从上述质谱图鉴定的主要和次要种类,以及从质谱数据鉴定出的众多其它次要和微量种类。在表2中,具有相同的观察到的M_r值且不能与表中类似的同量异序同工型区分开来的种类被指示为“*”。基于来自质谱数据的相对峰强度将不同种类的表观丰度分配为主要、次要和微量。标题为“O-聚糖”的栏中列出了表中所鉴定的多种FXa变体蛋白种类的重链的糖基化状态。如本文其它地方所讨论的,轻链含有O-连接的己糖。在该表中,“0”表示重链中没有O-连接的聚糖存在;“1+1NeuAc”表示存在一个核心-1单唾液酸化的O-聚糖;“1+1NeuAc-Gal”表示存在一个核心-1单唾液酸化的O-聚糖,其中末端半乳糖(Gal)不存在;“1+2NeuAc”表示存在一个核心-1二唾液酸化的O-聚糖;“2+2NeuAc”表示存在两个核心-10-聚糖,其中之一为经二唾液酸化的或二者均为经单唾液酸化的;“2+3NeuAc”表示存在两个核心-10-聚糖,其中之一为经单唾液酸化的,而另一为经二唾液酸化的;“2+4NeuAc”表示存在两个核心-10-聚糖,其各自为经二唾液酸化的。

[0170] 实施例6:通过质谱法测定经还原和烷基化的蛋白的结构异质性

[0171] 为了确认上述分析,将纯化的完整FXa变体蛋白还原和烷基化,以消除链间和链内二硫键。然后,通过RP-HPLC/ESI-QTOF MS分析所分开的轻链和重链,以测定其氨基酸结构

和翻译后修饰。

[0172] HPLC色谱图显示于图6中，其中标记轻链和重链。重链的α和β同工型洗脱为多重色谱峰。观察到微量水平的γ种类(在氨基酸K^{281}或R^{283}后被截短的β重链)在色谱图中约48-50分钟处的重链之前洗脱。

[0173] 轻链的零电荷质谱图显示于图7A中，并且从波谱中鉴定的种类(包括其主要、次要或微量的相对丰度)列于下表3中。氨基酸编号基于图1A(SEQ ID NO:1)。^{1}ANS...LER^{139}对应于SEQ ID NO:6;^{1}ANS...ERR^{140}对应于SEQ ID NO:7;^{1}ANS...RRK^{141}对应于SEQ ID NO:9;^{1}ANS...RKR^{142}对应于SEQ ID NO:11;以及^{1}ANS...KRR^{143}对应于SEQ ID NO:12。

[0174] 表3

[0175]

轻链	Gla No.	观察到的 M_r	丰度
^{1}ANS...LER^{139}	9	17169.8	微量
	10	17213.4	次要
	11	17257.5	微量
^{1}ANS...ERR^{140}	9	17326.1	次要
	10	17370.0	主要
	11	17413.7	主要
^{1}ANS...RRK^{141}	9	17454.2	次要
	10	17498.0	主要
	11	17542.0	主要
^{1}ANS...RKR^{142}	9	17610.0	微量
	10	17654.2	次要
	11	17698.0	微量
^{1}ANS...KRR^{143}	10	17810.0	微量

[0176] 如对于完整FXa变体蛋白所见的，观察到所有轻链种类包含β-羟基化的Asp^{63}和O-连接的己糖。然而，Gla结构域中的谷氨酸羧基化和PACE切割是可变的，产生具有9、10或11个Gla残基和由PACE位点的不规则切割所产生的羧基末端异质性的轻链种类。

[0177] 重链的零电荷质谱示于图7B中且从波谱中鉴定的多种种类(包括其主要、次要或微量的相对丰度)列于下表4中。氨基酸编号基于图1A(SEQ ID NO:1)。^{146}LVG...LPK^{384}对应于SEQ ID NO:45;^{146}LVG...KAK^{386}对应于SEQ ID NO:46;^{146}LVG...SPL^{398}对应于SEQ ID NO:14;以及^{146}LVG...PLK^{399}对应于SEQ ID NO:3。

[0178] 表4

[0179]

重链	O-聚糖	观察到的 M_r	丰度
$(\beta)^{146}$LVG...LPK^{384}	0	27484.2	次要
$(\beta)^{146}$LVG...KAK^{386}	0	27683.9	主要
$(\alpha)^{146}$LVG...SPL^{398}	1 核心-1	29558.7	次要
$(\alpha)^{146}$LVG...SPL^{398}	1 核心-1 + 1 NeuAc	29687.4	次要
$(\alpha)^{146}$LVG...SPL^{398}	1 核心-1 + 2 NeuAc	29851.0	次要
$(\alpha)^{146}$LVG...PLK^{399}	1 核心-1 + 2 NeuAc	29978.8	次要
$(\alpha)^{146}$LVG...PLK^{399}	2 核心-1 + 2 NeuAc	30344.9	次要
$(\alpha)^{146}$LVG...PLK^{399}	2 核心-1 + 3 NeuAc	30635.2	次要
$(\alpha)^{146}$LVG...SPL^{398}	2 核心-1 + 4 NeuAc	30799.9	微量
$(\alpha)^{146}$LVG...PLK^{399}	2 核心-1 + 4 NeuAc	30926.7	次要

[0180] 在质谱图中，观察到重链为对应于β和α同工型的三个主要区域。观察到的最丰富的重链同工型的M_r(27683.9Da)与全部9个半胱氨酸残基均被烷基化的β重链同工型的理论质量(27684.3Da；^{146}LVG...KAK^{386})相当。另外的质量异质性由于α同工型的羧基末端残基和O-糖基化中的变化而产生。具体地，某些峰对应于终止于L^{398}或K^{399}的α同工型，而其它峰对应于具有一个或两个核心-10-聚糖的重链，所述一个或两个核心-10-聚糖可变地为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的。在图7B中，“*”的出现表示与通过FXa变体蛋白的肽图谱分析(参见实施例3)观察到的峰相一致的重链过烷基化。

[0181] 在还原和烷基化反应后在轻链和重链中所观察到的结构异质性与使用完整FXa变体蛋白所观察到的结果相一致。

[0182] 用PAWS软件(2000.06.08,Genomic Solutions,Ann Arbor,MI)计算理论质量。用Waters MaxEnt-1软件将多电荷数据解卷积后从零电荷质谱图测定观察到的质量。理论的和观察到的主要和次要质量值之间的相对误差均少于60ppm，这与用于完整糖蛋白分析的

Waters Q-ToF质谱仪的性能规格一致。主要、次要和微量种类的分配基于各自的峰强度，其与同工型丰度相关。

[0183] 实施例7：体外凝血测定

[0184] 利用因子VIII缺陷型人血浆作为底物，使用一期法凝血测定(APTT测定)检测FXa变体蛋白的七种不同制剂的凝血活性。通过将凝血活性(mg/ml)除以蛋白浓度(mg/ml)来测定比活性。制剂间的平均凝血活性为1.52mg/ml，标准偏差为0.09。平均比活性为101.3％，标准偏差为5.9。

[0185] 本公开内容并不受限在本文所描述的具体实施方案的范围内。事实上，除了本文所描述的那些以外，本领域的普通技术人员还可从前文的描述和附图清楚明白本公开内容的各种修改。这样的修改意欲落在所附的权利要求范围内。

[0186] 本发明涉及以下实施方式：

[0187] 1.一种组合物，其包含至少一种选自由下列所组成的群组的FXa变体蛋白的β型：

[0188] 其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至139和146至386组成的FXa变体蛋白，

[0189] 其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至384组成的FXa变体蛋白，

[0190] 其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至386组成的FXa变体蛋白，

[0191] 其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至384组成的FXa变体蛋白，

[0192] 其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至386组成的FXa变体蛋白，

[0193] 其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至384组成的FXa变体蛋白，

[0194] 其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至386组成的FXa变体蛋白，

[0195] 其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至143和146至384组成的FXa变体蛋白，和

[0196] 其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至143和146至386组成的FXa变体蛋白。

[0197] 2.一种组合物，其包含至少一种选自由下列所组成的群组的FXa变体蛋白的α型：

[0198] 其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至139和146至398组成的FXa变体蛋白，

[0199] 其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至398组成的FXa变体蛋白，

[0200] 其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至399组成的FXa变体蛋白，

[0201] 其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至398组成的FXa变体蛋白，

[0202] 其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至399组成的FXa变体蛋白，

[0203] 其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至398组成的FXa变体蛋白，和

[0204] 其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至399组成的FXa变体蛋白。

[0205] 3.实施方式1的组合物，其中所述蛋白的轻链经修饰以包含β-羟基Asp^{63}、O-连接的己糖和9、10或11个Gla残基。

[0206] 4.实施方式3的组合物，其中所述蛋白的轻链经修饰以包含9个Gla残基。

[0207] 5.实施方式3的组合物，其中所述蛋白的轻链经修饰以包含10个Gla残基。

[0208] 6.实施方式3的组合物，其中所述蛋白的轻链经修饰以包含11个Gla残基。

[0209] 7.实施方式2的组合物，其中所述蛋白的轻链经修饰以包含β羟基Asp^{63}、O-连接的己糖和9、10或11个Gla残基。

[0210] 8.实施方式7的组合物，其中所述蛋白的轻链经修饰以包含9个Gla残基。

[0211] 9.实施方式7的组合物，其中所述蛋白的轻链经修饰以包含10个Gla残基。

[0212] 10.实施方式7的组合物，其中所述蛋白的轻链经修饰以包含11个Gla残基。

[0213] 11.实施方式2的组合物，其中所述蛋白的重链经修饰以包含一个核心-10-连接的聚糖。

[0214] 12.实施方式11的组合物，其中所述核心-10-连接的聚糖为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的。

[0215] 13.实施方式12的组合物，其中所述核心-10-连接的聚糖为未经唾液酸化的。

[0216] 14.实施方式12的组合物，其中所述核心-10-连接的聚糖为经单唾液酸化的。

[0217] 15.实施方式12的组合物，其中所述核心-10-连接的聚糖为经二唾液酸化的。

[0218] 16.实施方式2的组合物，其中所述蛋白的重链经修饰以包含两个核心-10-连接的聚糖。

[0219] 17.实施方式16的组合物，其中所述两个核心-10-连接的聚糖的第一个为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的。

[0220] 18.实施方式17的组合物，其中所述第一个核心-10-连接的聚糖为未经唾液酸化的。

[0221] 19.实施方式17的组合物，其中所述第一个核心-10-连接的聚糖为经单唾液酸化的。

[0222] 20.实施方式17的组合物，其中所述第一个核心-10-连接的聚糖为经二唾液酸化的。

[0223] 21.实施方式16的组合物，其中所述两个核心-10-连接的聚糖的第二个为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的。

[0224] 22.实施方式21的组合物，其中所述第二个核心-10-连接的聚糖为未经唾液酸化的。

[0225] 23.实施方式21的组合物，其中所述第二个核心-10-连接的聚糖为经单唾液酸化的。

[0226] 24.实施方式21的组合物，其中所述第二个核心-10-连接的聚糖为经二唾液酸化的。

[0227] 25.实施方式7的组合物，其中所述蛋白的重链经修饰以包含一个核心-10-连接的聚糖。

[0228] 26.实施方式25的组合物，其中所述核心-10-连接的聚糖为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的。

[0229] 27.实施方式26的组合物，其中所述核心-10-连接的聚糖为未经唾液酸化的。

[0230] 28.实施方式26的组合物，其中所述核心-10-连接的聚糖为经单唾液酸化的。

[0231] 29.实施方式26的组合物，其中所述核心-10-连接的聚糖为经二唾液酸化的。

[0232] 30.实施方式7的组合物，其中所述蛋白的重链经修饰以包含两个核心-10-连接的聚糖。

[0233] 31.实施方式30的组合物，其中所述两个核心-10-连接的聚糖的第一个为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的。

[0234] 32.实施方式31的组合物，其中所述第一个核心-10-连接的聚糖为未经唾液酸化的。

[0235] 33.实施方式31的组合物，其中所述第一个核心-10-连接的聚糖为经单唾液酸化的。

[0236] 34.实施方式31的组合物，其中所述第一个核心-10-连接的聚糖为经二唾液酸化的。

[0237] 35.实施方式30的组合物，其中所述两个核心-10-连接的聚糖的第二个为未经唾液酸化、经单唾液酸化或经二唾液酸化的。

[0238] 36.实施方式35的组合物，其中所述第二个核心-10-连接的聚糖为未经唾液酸化的。

[0239] 37.实施方式35的组合物，其中所述第二个核心-10-连接的聚糖为经单唾液酸化的。

[0240] 38.实施方式35的组合物，其中所述第二个核心-10-连接的聚糖为经二唾液酸化的。

[0241] 39.一种包含FXa变体蛋白的组合物，其中所述FXa变体蛋白选自表2所列的FXa变体蛋白种类。

[0242] 40.实施方式39的组合物，其中所述组合物包含至少5个表2所列的FXa变体蛋白种类。

[0243] 41.实施方式39的组合物，其中所述组合物包含至少10个表2所列的FXa变体蛋白种类。

[0244] 42.实施方式39的组合物，其中所述组合物包含至少15个表2所列的FXa变体蛋白种类。

[0245] 43.实施方式39的组合物，其中所述组合物包含至少20个表2所列的FXa变体蛋白种类。

[0246] 44.实施方式39的组合物，其中所述组合物包含至少25个表2所列的FXa变体蛋白种类。

[0247] 45.实施方式39的组合物,其中所述组合物包含至少30个表2所列的FXa变体蛋白种类。

[0248] 46.实施方式39的组合物,其中所述组合物包含至少35个表2所列的FXa变体蛋白种类。

[0249] 47.实施方式39的组合物,其中所述组合物包含至少40个表2所列的FXa变体蛋白种类。

[0250] 48.实施方式39的组合物,其中所述组合物包含至少45个表2所列的FXa变体蛋白种类。

[0251] 49.实施方式39的组合物,其中所述组合物包含至少50个表2所列的FXa变体蛋白种类。

[0252] 50.实施方式39的组合物,其中所述组合物包含至少55个表2所列的FXa变体蛋白种类。

[0253] 51.实施方式39的组合物,其中所述组合物包含至少60个表2所列的FXa变体蛋白种类。

[0254] 52.一种包含FXa变体蛋白的组合物,其中所述FXa变体蛋白的轻链选自表3所列的轻链种类。

[0255] 53.实施方式52的组合物,其中所述FXa变体蛋白的重链选自表4所列的重链种类。

[0256] 54.实施方式1-53和63-96中任一项的组合物在制备用于治疗需要止血的受试者的药物中的用途,其中所述组合物的量为使所述受试者止血的有效量。

[0257] 55.实施方式54的用途,其中所述受试者患有血友病A。

[0258] 56.实施方式54的用途,其中所述受试者患有血友病B。

[0259] 57.实施方式54的用途,其中所述受试者具有外伤。

[0260] 58.一种用于纯化因子Xa(FXa)变体蛋白的方法,其包含下述步骤:

[0261] (i)将混合模式色谱(MMC)介质与含有FXa变体蛋白的经过滤的细胞培养基接触,

[0262] (ii)洗脱与所述MMC色谱介质结合的FXa变体蛋白,

[0263] (iii)将阴离子交换色谱介质与步骤(ii)中洗脱的FXa变体蛋白接触,

[0264] (iv)洗脱与所述阴离子交换色谱介质结合的FXa变体蛋白,

[0265] (v)将阳离子交换色谱介质与步骤(iv)中洗脱的FXa变体蛋白接触;和

[0266] (vi)洗脱与所述阳离子交换色谱介质结合的FXa变体蛋白。

[0267] 59.实施方式58的方法,其中所述混合模式色谱介质能够经由静电相互作用、疏水性相互作用、氢键合和亲硫相互作用与蛋白相互作用。

[0268] 60.实施方式58的方法,其进一步包含至少一个将病毒去活化或移除的额外步骤。

[0269] 61.实施方式58的方法,其中所述混合模式色谱介质为Capto MMC,所述阴离子交换色谱介质为Q-Sepharose Fast Flow,且所述阳离子交换色谱介质为**Fractogel®**SO_3^-。

[0270] 62.实施方式60的方法,其进一步包含超滤和渗滤的步骤以浓缩经纯化的FXa变体蛋白。

[0271] 63.一种组合物,其包含两种或更多种选自由下列所组成的群组的重组FXa变体蛋白:

[0272] (a)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至139

和146至386组成的重组FXa变体蛋白，

[0273] (b)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至386组成的重组FXa变体蛋白，

[0274] (c)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至386组成的重组FXa变体蛋白，

[0275] (d)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至386组成的重组FXa变体蛋白，

[0276] (e)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至143和146至386组成的重组FXa变体蛋白，

[0277] (f)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至384组成的重组FXa变体蛋白，

[0278] (g)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至384组成的重组FXa变体蛋白，

[0279] (h)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至384组成的重组FXa变体蛋白，和

[0280] (i)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至143和146至384组成的重组FXa变体蛋白。

[0281] 64.一种组合物，其包含两种或更多种选自由下列所组成的群组的重组FXa变体蛋白：

[0282] (a)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至139和146至398组成的重组FXa变体蛋白，

[0283] (b)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至398组成的重组FXa变体蛋白，

[0284] (c)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至398组成的重组FXa变体蛋白，

[0285] (d)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至398组成的重组FXa变体蛋白，

[0286] (e)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至399组成的重组FXa变体蛋白，

[0287] (f)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至399组成的重组FXa变体蛋白，和

[0288] (g)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至399组成的重组FXa变体蛋白。

[0289] 65.实施方式63或64的组合物，其中所述FXa变体蛋白的轻链包含β-羟基Asp^{63}和O-连接的己糖。

[0290] 66.实施方式63或64的组合物，其中所述FXa变体蛋白的轻链包含9、10或11个Gla残基。

[0291] 67.实施方式65的组合物，其中所述FXa变体蛋白的轻链还包含9、10或11个Gla残基。

[0292] 68.实施方式67的组合物,其中所述FXa变体蛋白的轻链包含9个Gla残基。

[0293] 69.实施方式67的组合物,其中所述FXa变体蛋白的轻链包含10个Gla残基。

[0294] 70.实施方式67的组合物,其中所述FXa变体蛋白的轻链包含11个Gla残基。

[0295] 71.实施方式64的组合物,其中所述FXa变体蛋白的重链包含一个或两个核心-10-连接的聚糖。

[0296] 72.实施方式71的组合物,其中一个核心-10-连接的聚糖为经单唾液酸化或经二唾液酸化的。

[0297] 73.实施方式72的组合物,其中所述一个核心-10-连接的聚糖为经单唾液酸化的。

[0298] 74.实施方式72的组合物,其中所述一个核心-10-连接的聚糖为经二唾液酸化的。

[0299] 75.实施方式71的组合物,其中如果存在的话,所述两个核心-10-连接的聚糖各自为经单唾液酸化的。

[0300] 76.实施方式71的组合物,其中如果存在的话,所述两个核心-10-连接的聚糖各自为经二唾液酸化的。

[0301] 77.实施方式71的组合物,其中如果存在的话,所述两个核心-10-连接的聚糖中的一个为经单唾液酸化,并且另一个为经二唾液酸化的。

[0302] 78.实施方式63的组合物,其包含选自所述群组的3、4、5、6、7、8或所有9种重组FXa变体蛋白。

[0303] 79.实施方式64的组合物,其包含选自所述群组的3、4、5、6、或所有7种重组FXa变体蛋白。

[0304] 80.重组FXa变体蛋白的组合物,其包含:

[0305] (a)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至139和146至386组成的FXa变体蛋白,

[0306] (b)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至386组成的FXa变体蛋白,

[0307] (c)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至386组成的FXa变体蛋白,

[0308] (d)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至386组成的FXa变体蛋白,

[0309] (e)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至143和146至386组成的FXa变体蛋白,

[0310] (f)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至384组成的FXa变体蛋白,

[0311] (g)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至384组成的FXa变体蛋白,

[0312] (h)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至384组成的FXa变体蛋白,

[0313] (i)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至143和146至384组成的FXa变体蛋白。

[0314] (j)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至139

和146至398组成的FXa变体蛋白，

[0315] (k)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至398组成的FXa变体蛋白，

[0316] (l)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至398组成的FXa变体蛋白，

[0317] (m)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至398组成的FXa变体蛋白，

[0318] (n)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至140和146至399组成的FXa变体蛋白，

[0319] (o)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至141和146至399组成的FXa变体蛋白，和

[0320] (p)其中轻链和重链蛋白序列分别由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸1至142和146至399组成的FXa变体蛋白。

[0321] 81.实施方式80的组合物，其中所述FXa变体蛋白的轻链包含β-羟基Asp^{63}和O-连接的己糖。

[0322] 82.实施方式80的组合物，其中所述FXa变体蛋白的轻链包含9、10或11个Gla残基。

[0323] 83.实施方式81的组合物，其中所述FXa变体蛋白的轻链还包含9、10或11个Gla残基。

[0324] 84.实施方式83的组合物，其中所述FXa变体蛋白的轻链包含9个Gla残基。

[0325] 85.实施方式83的组合物，其中所述FXa变体蛋白的轻链包含10个Gla残基。

[0326] 86.实施方式83的组合物，其中所述FXa变体蛋白的轻链包含11个Gla残基。

[0327] 87.实施方式80的组合物，其中具有α型重链的所述FXa变体蛋白的重链包含一个或两个核心-10-连接的聚糖。

[0328] 88.实施方式87的组合物，其中一个核心-10-连接的聚糖为经单唾液酸化或经二唾液酸化的。

[0329] 89.实施方式88的组合物，其中所述一个核心-10-连接的聚糖为经单唾液酸化的。

[0330] 90.实施方式88的组合物，其中所述一个核心-10-连接的聚糖为经二唾液酸化的。

[0331] 91.实施方式87的组合物，其中如果存在的话，所述两个核心-10-连接的聚糖各自为经单唾液酸化的。

[0332] 92.实施方式87的组合物，其中如果存在的话，所述两个核心-10-连接的聚糖各自为经二唾液酸化的。

[0333] 93.实施方式87的组合物，其中如果存在的话，所述两个核心-10-连接的聚糖中的一个为经单唾液酸化，并且另一个为经二唾液酸化的。

[0334] 94.一种组合物，其包含实施方式63和实施方式64的变体蛋白。

[0335] 95.实施方式63的组合物，其中各自包含10个Gla残基的FXa变体蛋白(a)、(b)、(c)和(d)的相对丰度为(b)>(c)>(a)>(d)，如使用质谱法测定的。

[0336] 96.实施方式64的组合物，其中各自包含10个Gla残基和一个核心-10-连接的聚糖的FXa变体蛋白(a)、(b)、(c)和(f)的相对丰度为(b)>(c)>(f)>(a)，如使用质谱法测定的。

[0337] 97.一种分离的核酸，其包含编码选自由下列所组成的群组的FXa变体蛋白的核酸

序列：

[0338] (a)实施方式63的变体；和

[0339] (b)实施方式64的变体。

[0340] 98.一种表达载体，其包含实施方式97的核酸。

[0341] 99.一种宿主细胞，其包含实施方式98的表达载体。

[0342] 100.一种产生FXa变体蛋白的方法，其包括在合适的生长培养基中生长实施方式99的宿主细胞和从培养基分离由所述细胞产生的FXa变体蛋白的步骤。

[0343] 本文引用了多种参考资料，包括专利申请、专利和技术出版物。这样的参考资料的各自公开内容通过引用以其整体并入本文中。

序列表

<110> Pfizer Inc.

<120> 包含重组人凝血因子Xa蛋白的异质性群体的组合物

<130> PC72049

<150> US 61/881,834

<151> 2013-09-24

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 399

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经修饰的人蛋白序列

<400> 1

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu
20 25 30
Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly
50 55 60
Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn
65 70 75 80
Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys
85 90 95
Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala
100 105 110
Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly
115 120 125
Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys Arg Arg Lys
130 135 140
Arg Leu Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln
145 150 155 160
Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile
165 170 175
Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala

180 185 190
Lys Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu
195 200 205
Gly Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg
210 215 220
Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys
225 230 235 240
Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu
245 250 255
Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val
260 265 270
Ser Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu
275 280 285
Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser
290 295 300
Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr
305 310 315 320
Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr
325 330 335
Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu
340 345 350
Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala
355 360 365
Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys
370 375 380
Ala Lys Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
385 390 395

<210> 2
<211> 145
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 经修饰的人蛋白序列
<400> 2
Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu
20 25 30
Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp

35 40 45

Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly
50 55 60

Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn
65 70 75 80

Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys
85 90 95

Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala
100 105 110

Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly
115 120 125

Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys Arg Arg Lys
130 135 140

Arg
145

<210> 3
<211> 254
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 经修饰的人蛋白序列
<400> 3

Leu Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala
1 5 10 15

Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu
20 25 30

Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys
35 40 45

Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly
50 55 60

Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe
65 70 75 80

Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr
85 90 95

Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg
100 105 110

Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser
115 120 125

Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys

130 135 140

Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser
145 150 155 160
Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys
165 170 175
Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg
180 185 190
Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly
195 200 205
Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe
210 215 220
Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala
225 230 235 240
Lys Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
245 250

<210> 4
<211> 1329
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 经修饰的人DNA序列
<400> 4

atggcgcacg tccgaggctt gcagctgcct ggctgcctgg ccctggctgc cctgtgtagc 60
cttgtgcaca gccagcatgt gttcctggct cctcagcaag cacggtcgct gctccagcgg 120
gtccggcgag ccaattcctt tcttgaagag atgaagaaag gacacctcga aagagagtgc 180
atggaagaga cctgctcata cgaagaggcc cgcgaggtct ttgaggacag cgacaagacg 240
aatgaattct ggaataaata caaagatggc gaccagtgtg agaccagtcc ttgccagaac 300
cagggcaaat gtaaagacgg cctcggggaa tacacctgca cctgtttaga aggattcgaa 360
ggcaaaaact gtgaattatt cacacggaag ctctgcagcc tggacaacgg ggactgtgac 420
cagttctgcc acgaggaaca gaactctgtg gtgtgctcct gcgcccgcgg gtacaccctg 480
gctgacaacg gcaaggcctg cattcccaca gggccctacc cctgtgggaa acagaccctg 540
gaacgcagga agaggcgtaa gcgtctcgtg ggaggccagg aatgcaagga cggggagtgt 600
ccctggcagg ccctgctcat caatgaggaa aacgagggtt tctgtggtgg aactattctg 660
agcgagttct acatcctaac ggcagcccac tgtctctacc aagccaagag attcaaggtg 720
agggtaggtg accggaacac ggagcaggag gagggcggtg aggcggtgca cgaggtggag 780
gtggtcatca agcacaaccg gttcacaaag gagacctatg acttcgacat cgccgtgctc 840
cggctcaaga cccccatcac cttccgcatg aacgtggcgc ctgcctgcct ccccgagcgt 900
gactgggccg agtccacgct gatgacgcag aagacgggga ttgtgagcgg cttcgggcgc 960
acccacgaga agggccggca gtccaccagg ctcaagatgc tggaggtgcc ctacgtggac 1020

cgcaacagct gcaagctgtc cagcagcttc atcatcaccc agaacatgtt ctgtgccggc 1080
tacgacacca agcaggagga tgcctgccag ggggacagcg ggggcccgca cgtcacccgc 1140
ttcaaggaca cctacttcgt gacaggcatc gtcagctggg gagagggctg tgcccgtaag 1200
gggaagtacg ggatctacac caaggtcacc gccttcctca agtggatcga caggtccatg 1260
aaaaccaggg gcttgcccaa ggccaagagc catgccccgg aggtcataac gtcctctcca 1320
ttaaagtga 1329

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> PACE位点
<400> 5

Arg Lys Arg Arg Lys Arg
1 5

<210> 6
<211> 139
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 经修饰的人蛋白序列
<400> 6

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu
20 25 30
Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly
50 55 60
Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn
65 70 75 80
Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys
85 90 95
Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala
100 105 110
Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly
115 120 125
Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg

130 135

<210> 7
<211> 140
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 经修饰的人蛋白序列
<400> 7

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu
20 25 30
Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly
50 55 60
Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn
65 70 75 80
Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys
85 90 95
Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala
100 105 110
Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly
115 120 125
Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg
130 135 140

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 蛋白水解片段
<400> 8

Lys Arg Arg Lys Arg
1 5

<210> 9
<211> 141
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 经修饰的人蛋白序列
<400> 9
Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu
20 25 30
Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly
50 55 60
Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn
65 70 75 80
Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys
85 90 95
Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala
100 105 110
Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly
115 120 125
Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys
130 135 140
<210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 蛋白水解片段
<400> 10
Arg Arg Lys Arg
1
<210> 11
<211> 142
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 经修饰的人蛋白序列
<400> 11
Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15

Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu
20 25 30
Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly
50 55 60
Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn
65 70 75 80
Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys
85 90 95
Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala
100 105 110
Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly
115 120 125
Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys Arg
130 135 140

<210> 12
<211> 143
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 经修饰的人蛋白序列
<400> 12

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu
20 25 30
Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly
50 55 60
Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn
65 70 75 80
Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys
85 90 95
Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala
100 105 110
Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly
115 120 125

Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys Arg Arg
130 135 140

<210> 13
<211> 144
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 经修饰的人蛋白序列
<400> 13

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15
Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu
20 25 30
Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp
35 40 45
Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly
50 55 60
Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn
65 70 75 80
Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys
85 90 95
Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala
100 105 110
Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly
115 120 125
Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys Arg Arg Lys
130 135 140

<210> 14
<211> 253
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 经修饰的人蛋白序列
<400> 14

Leu Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala
1 5 10 15
Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu
20 25 30
Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys

35 40 45

Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly
50 55 60
Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe
65 70 75 80
Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr
85 90 95
Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg
100 105 110
Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser
115 120 125
Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys
130 135 140
Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser
145 150 155 160
Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys
165 170 175
Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg
180 185 190
Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly
195 200 205
Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe
210 215 220
Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala
225 230 235 240
Lys Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu
245 250

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(7)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<400> 15
Ala Asn Ser Phe Leu Xaa Xaa Met Lys Lys

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽片段

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 16

Leu Val Gly Gly Gln Glu Xaa Lys Asp Gly

1 5 10

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽片段

<400> 17

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys

1 5

<210> 18

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽片段

<400> 18

Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu

1 5 10 15

Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys

20 25

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽片段
<400> 19
Thr Asn Glu Phe Trp Asn Lys
1 5
<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 20
Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys
1 5 10 15
<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 21
Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly
1 5 10 15
Lys
<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 22
Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys
1 5
<210> 23
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 23

Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu
1 5 10 15
Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp
20 25 30
Asn Gly Lys
35
<210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 24
Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys
1 5 10
<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 25
Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys
1 5
<210> 26
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 26
Gln Thr Leu Glu Arg Arg
1 5
<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段

<400> 27
Gln Thr Leu Glu Arg
1 5
<210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 28
Leu Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys
1 5
<210> 29
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 29
Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu
1 5 10 15
Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala
20 25 30
Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys
35 40
<210> 30
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 30
Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala
1 5 10 15
Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys
20 25
<210> 31
<211> 6
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 31
His Asn Arg Phe Thr Lys
1 5
<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 32
Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys
1 5 10
<210> 33
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 33
Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu
1 5 10 15
Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys
20 25
<210> 34
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 34
Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys
1 5 10
<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽片段
<400> 35
Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys
1 5
<210> 36
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 36
Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys
1 5 10
<210> 37
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 37
Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr
1 5 10 15
Asp Thr Lys
<210> 38
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 38
Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg
1 5 10 15
Phe Lys
<210> 39
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 肽片段
<400> 39
Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala
1 5 10 15
Arg Lys
<210> 40
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 40
Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
1 5
<210> 41
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 41
Val Thr Ala Phe Leu Lys
1 5
<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 42
Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys
1 5
<210> 43
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 43

Thr Arg Gly Leu Pro Lys
1 5

<210> 44
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽片段
<400> 44
Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
1 5 10

<210> 45
<211> 239
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 经修饰的人蛋白序列
<400> 45
Leu Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala
1 5 10 15
Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu
20 25 30
Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys
35 40 45
Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly
50 55 60
Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe
65 70 75 80
Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr
85 90 95
Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg
100 105 110
Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser
115 120 125
Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys
130 135 140
Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser
145 150 155 160
Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys

165 170 175
Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg
180 185 190
Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly
195 200 205
Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe
210 215 220
Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys
225 230 235

<210> 46
<211> 241
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 经修饰的人蛋白序列
<400> 46

Leu Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala
1 5 10 15
Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu
20 25 30
Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys
35 40 45
Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly
50 55 60
Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe
65 70 75 80
Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr
85 90 95
Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg
100 105 110
Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser
115 120 125
Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys
130 135 140
Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser
145 150 155 160
Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys
165 170 175
Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg

180 185 190

Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly

195 200 205

Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe

210 215 220

Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala

225 230 235 240

Lys

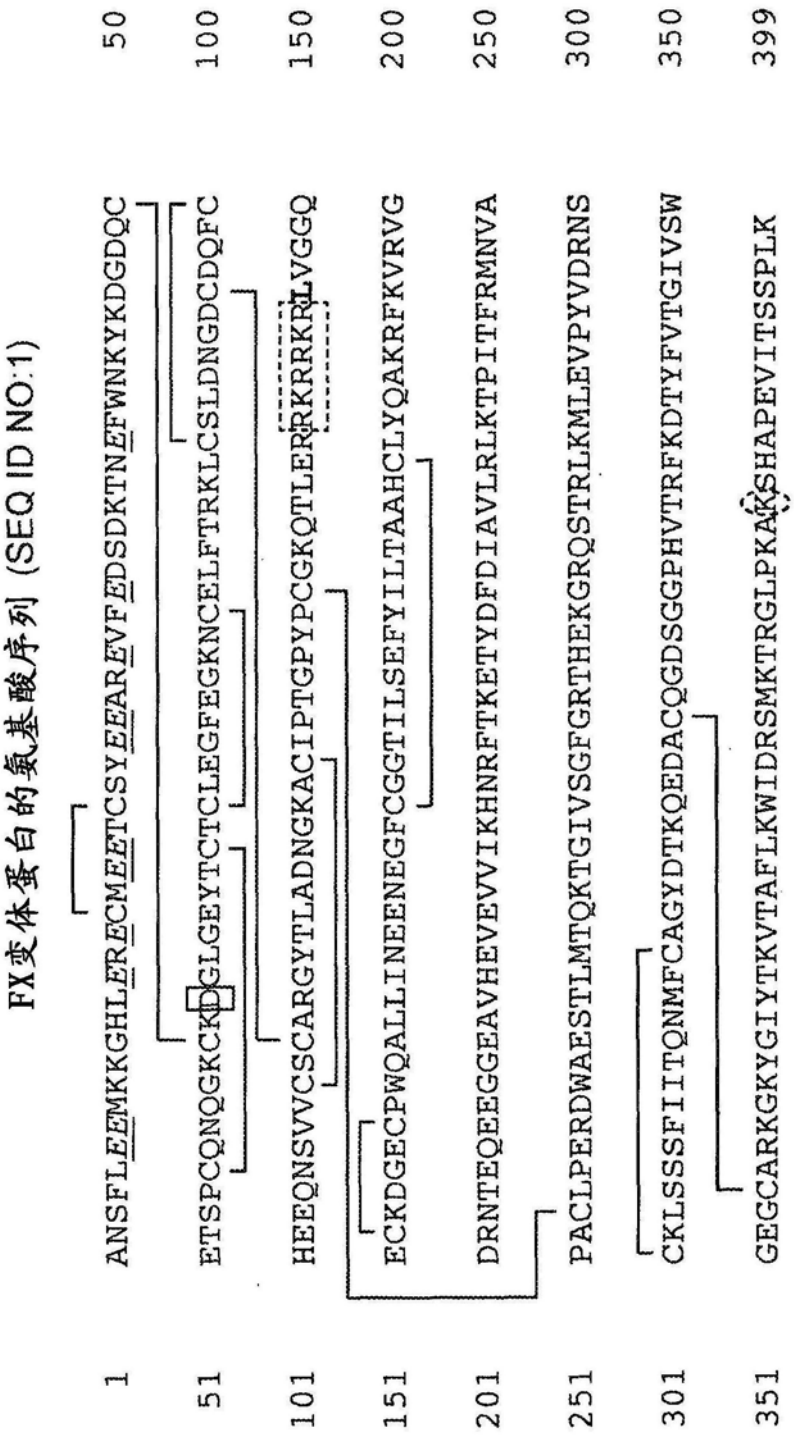

FX变体蛋白的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1)
1 ANSFLEEMKKGHLERECMEETCSYEEAREVFEDSDKTNEFWNKYKDGDQC 50
51 ETSPCQNQGKCKDGLGEYTCTCLEGFEGKNCELFTRKLCSLDNGDCDQFC 100
101 HEEQNSVVCSCARGYTLADNGKACIPTGPYPCGKQTLERRKRRKRLVGGQ 150
151 ECKDGECPWQALLINEENEGFCGGTILSEFYILTAAHCLYQAKRFKVRVG 200
201 DRNTEQEEGGEAVHEVEVVIKHNRFTKETYDFDIAVLRLKTPITFRMNVA 250
251 PACLPERDWAESTLMTQKTGIVSGFGRTHEKGRQSTRLKMLEVPYVDRNS 300
301 CKLSSSFIITQNMFCAGYDTKQEDACQGDSGGPHVTRFKDTYFVTGIVSW 350
351 GEGCARKGKYGIYTKVTAFLKWIDRSMKTRGLPKAKSHAPEVITSSPLK 399

图1A

FXa变体蛋白轻链的预测氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)

001 A N S F L E E M K K G H L E R E C M E E T C S Y E E A R E V 030

031 F E D S D K T N E F W N K Y K D G D Q C E T S P C Q N Q G K 060

061 C K D G L G E Y T C T C L E G F E G K N C E L F T R K L C S 090

091 L D N G D C D Q F C H E E Q N S V V C S C A R G Y T L A D N 120

121 G K A C I P T G P Y P C G K Q T L E R R K R R K R 145

图1B

FXa变体蛋白重链的预测氨基酸序列 (SEQ ID NO:3)

001 LVGGQECKDGECPWQALLINEENEGFCGGT 030
031 ILSEFYILTAAHCLYQAKRFKVRVGDRNTE 060
061 QEEGGEAVHEVEVVIKHNRFTKETYDFDIA 090
091 VLRLKTPITFRMNVAPACLPERDWAESTLM 120
121 TQKTGIVSGFGRTHEKGRQSTRLKMLEVPY 150
151 VDRNSCKLSSSFIITQNMFCAGYDTKQED A 180
181 CQGDSGGPHVTRFKDTYFVTGIVSWGEGCA 210
211 RKGKYGIYTKVTAFLKWIDRSMKTRGLPKA 240
241 KSHAPEVITSSPLK 254

图1C

编码FX变体蛋白的cDNA (SEQ ID NO:4)

ATGGCGCACGTCCGAGGCTTGCAGCTGCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGTGTAGCCTTG

TGCACAGCCAGCATGTGTTCCTGGCTCCTCAGCAAGCACGGTCGCTGCTCCAGCGGGTCCGGCG

AGCCAATTCCTTTCTTCTTGAAGAGATGAAGAAGGACACCTCGAAAGAGAGTGCATGGAAGAGACC

TGCTCATACGAAGAGGCCCGCGAGGTCTTTGAGGACAGCGACAAGACGAATGAATTCTGGAATA

AATACAAAGATGGCGACCAGTGTGAGACCAGTCCTTGCCAGAACCAGGGCAAATGTAAAGACGG

CCTCGGGGAATACACCTGCACCTGTTTAGAAGGATTCGAAGGCAAAAACTGTGAATTATTCACA

CGGAAGCTCTGCAGCCTGGACAACGGGGACTGTGACCAGTTCTGCCACGAGGAACAGAACTCTG

TGGTGTGCTCCTGCGCCCGCGGGTACACCCTGGCTGACAACGGCAAGGCCTGCATTCCCACAGG

GCCCTACCCCCTGTGGGAAACAGACCCTGGAACGCAGGAAGAGGCGTAAGCGTCTCGTGGGAGGC

CAGGAATGCAAGGACGGGGAGTGTCCCTGGCAGGCCCTGCTCATCAATGAGGAAAACGAGGGTT

TCTGTGGTGGAACTATTCTGAGCGAGTTCTACATCCTAACGGCAGCCCACTGTCTCTACCAAGC

CAAGAGATTCAAGGTGAGGGTAGGTGACCGGAACACGGAGCAGGAGGAGGGCGGTGAGGCGGTG

CACGAGGTGGAGGTGGTCATCAAGCACAACCGGTTCACAAAGGAGACCTATGACTTCGACATCG

CCGTGCTCCGGCTCAAGACCCCCATCACCTTCCGCATGAACGTGGCGCCTGCCTGCCCTCCCCGA

GCGTGACTGGGCCGAGTCCACGCTGATGACGCAGAAGACGGGGATTGTGAGCGGCTTCGGGCGC

ACCCACGAGAAGGGCCGGCAGTCCACCAGGCTCAAGATGCTGGAGGTGCCCTACGTGGACCGCA

ACAGCTGCAAGCTGTCCAGCAGCTTCATCATCACCCAGAACATGTTCTGTGCCGGCTACGACAC

CAAGCAGGAGGATGCCTGCCAGGGGGACAGCGGGGGCCCGCACGTCACCCGCTTCAAGGACACC

TACTTCGTGACAGGCATCGTCAGCTGGGGAGAGGGCTGTGCCCGTAAGGGGAAGTACGGGATCT

ACACCAAGGTCACCGCCTTCCTCAAGTGGATCGACAGGTCCATGAAAACCAGGGGCTTGCCCAA

GGCCAAGAGCCATGCCCCGGAGGTCATAACGTCCTCTCCATTAAAGTGA

图1D

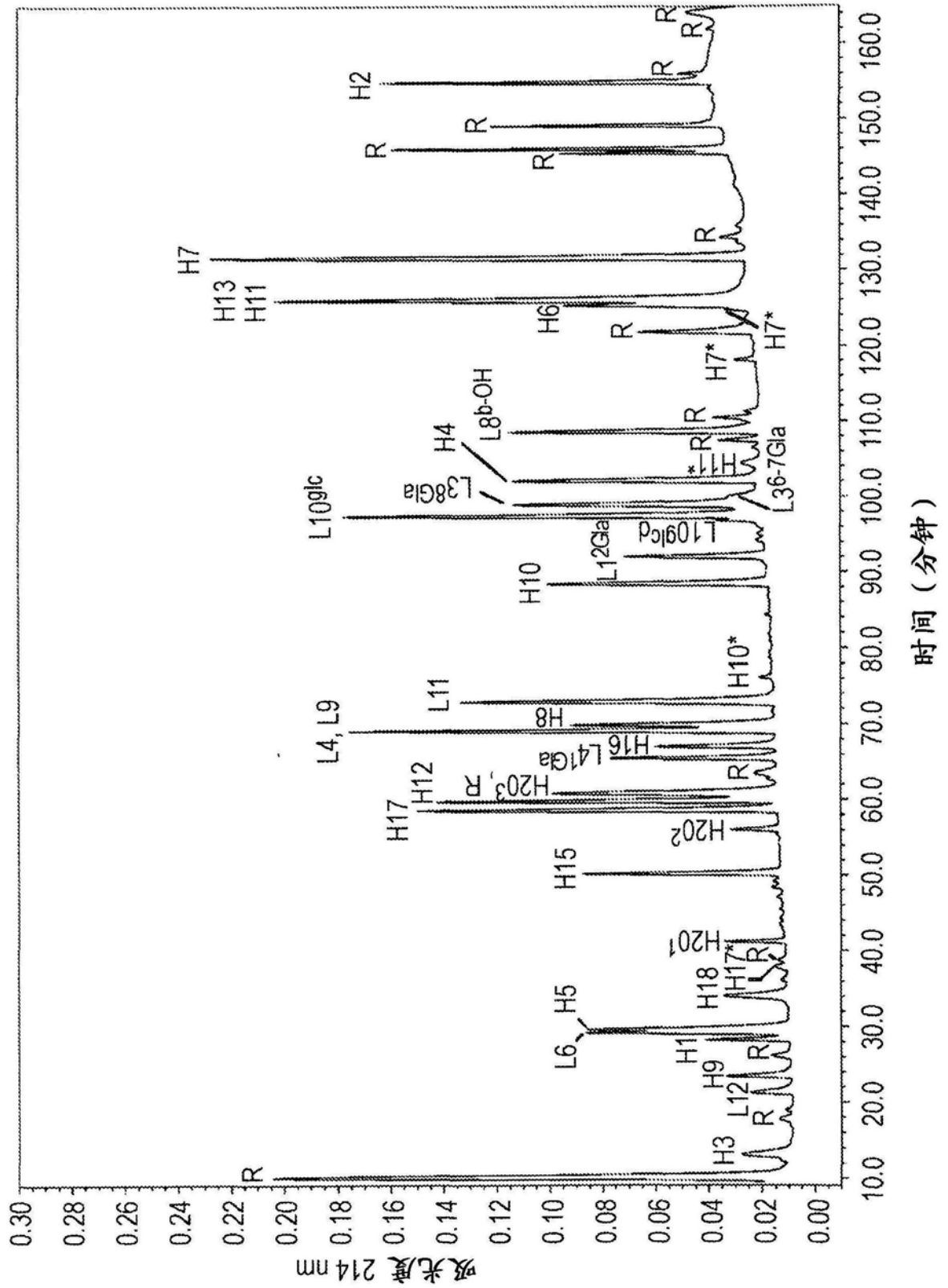

吸光度 214 nm
时间（分钟）
H3
L12
H9
H1
L6
H5
H18
H17*
H20¹
H15
H20²
H17
H12
H20³, R
L41Gla
H16
H8
L4, L9
L11
H10*
H10
L12Gla
L10glcd
L10glc
L38Gla
H4
L8b-OH
H11*
L36-7Gla
H7*
H6
H13
H11
H7
H2
R

图2

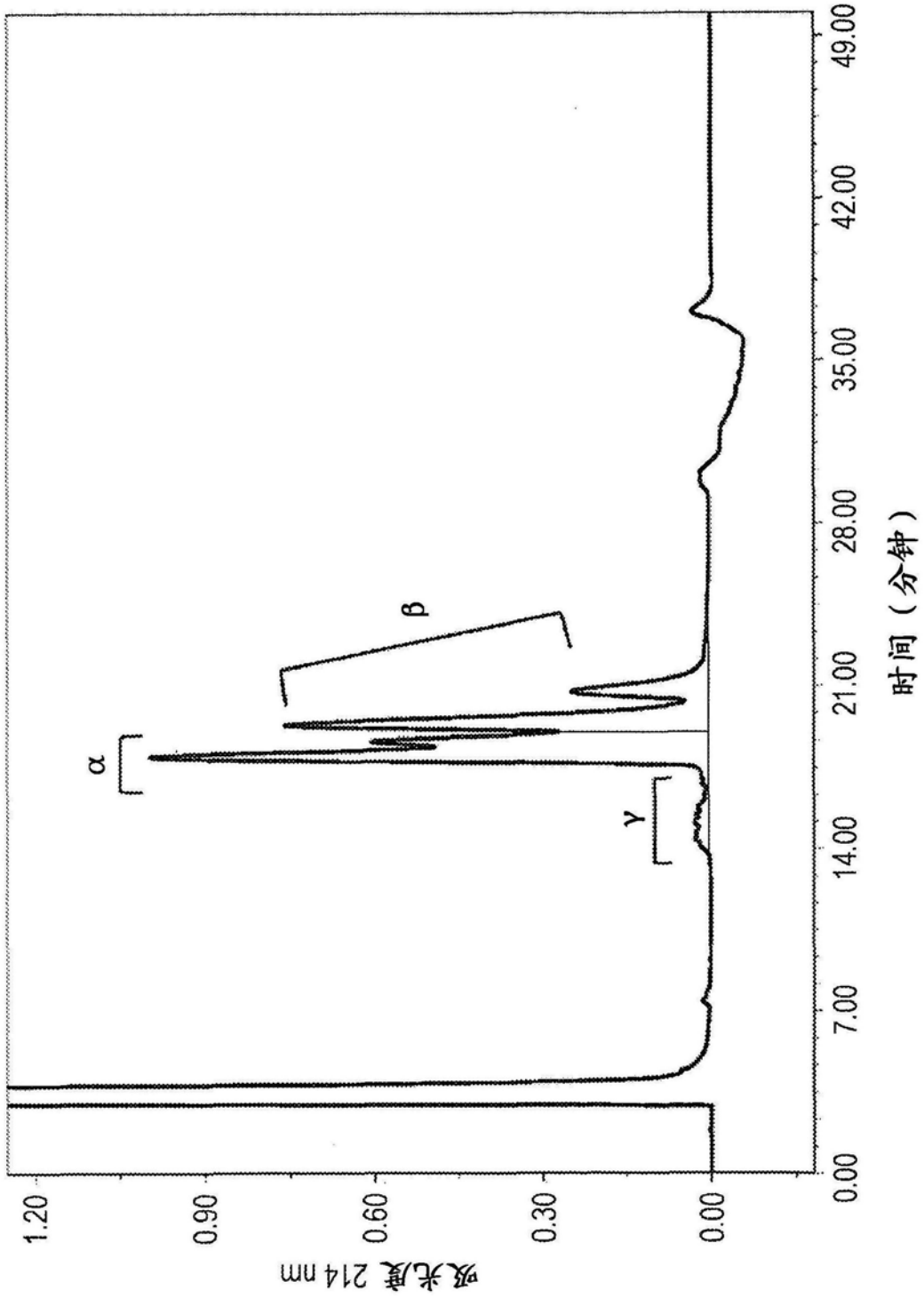

吸光度 214 nm
1.20
0.90
0.60
0.30
0.00
0.00
7.00
14.00
21.00
28.00
35.00
42.00
49.00
时间（分钟）
α
β
γ

图3

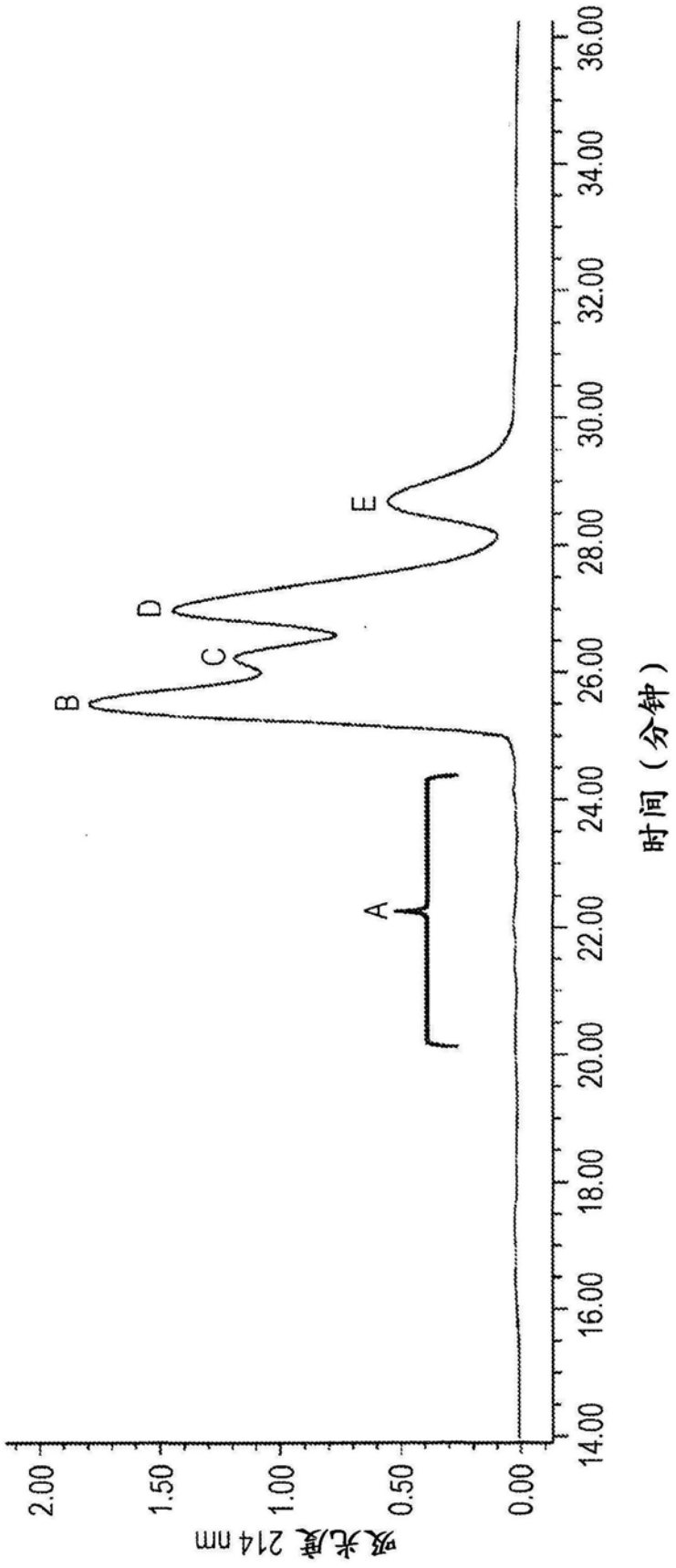

2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
吸光度 214 nm
14.00
16.00
18.00
20.00
22.00
24.00
26.00
28.00
30.00
32.00
34.00
36.00
时间（分钟）
A
B
C
D
E

图4

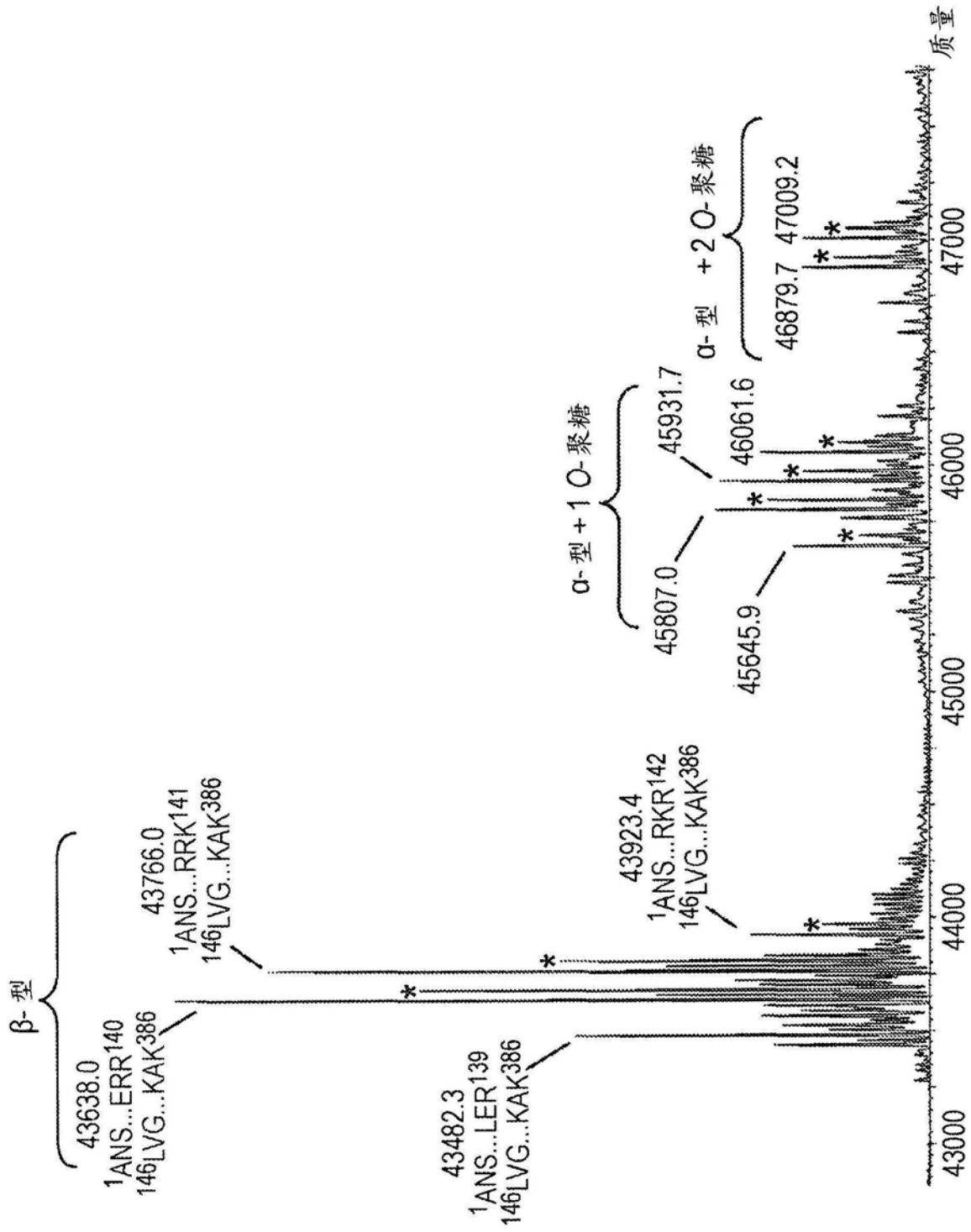

β-型
43638.0
1ANS...ERR140
146LVG...KAK386
43766.0
1ANS...RRK141
146LVG...KAK386
43482.3
1ANS...LER139
146LVG...KAK386
43923.4
1ANS...RKR142
146LVG...KAK386
α-型 + 1 O-聚糖
45807.0
45931.7
45645.9
α-型 + 2 O-聚糖
46061.6
46879.7
47009.2
43000
44000
45000
46000
47000
质量

图5

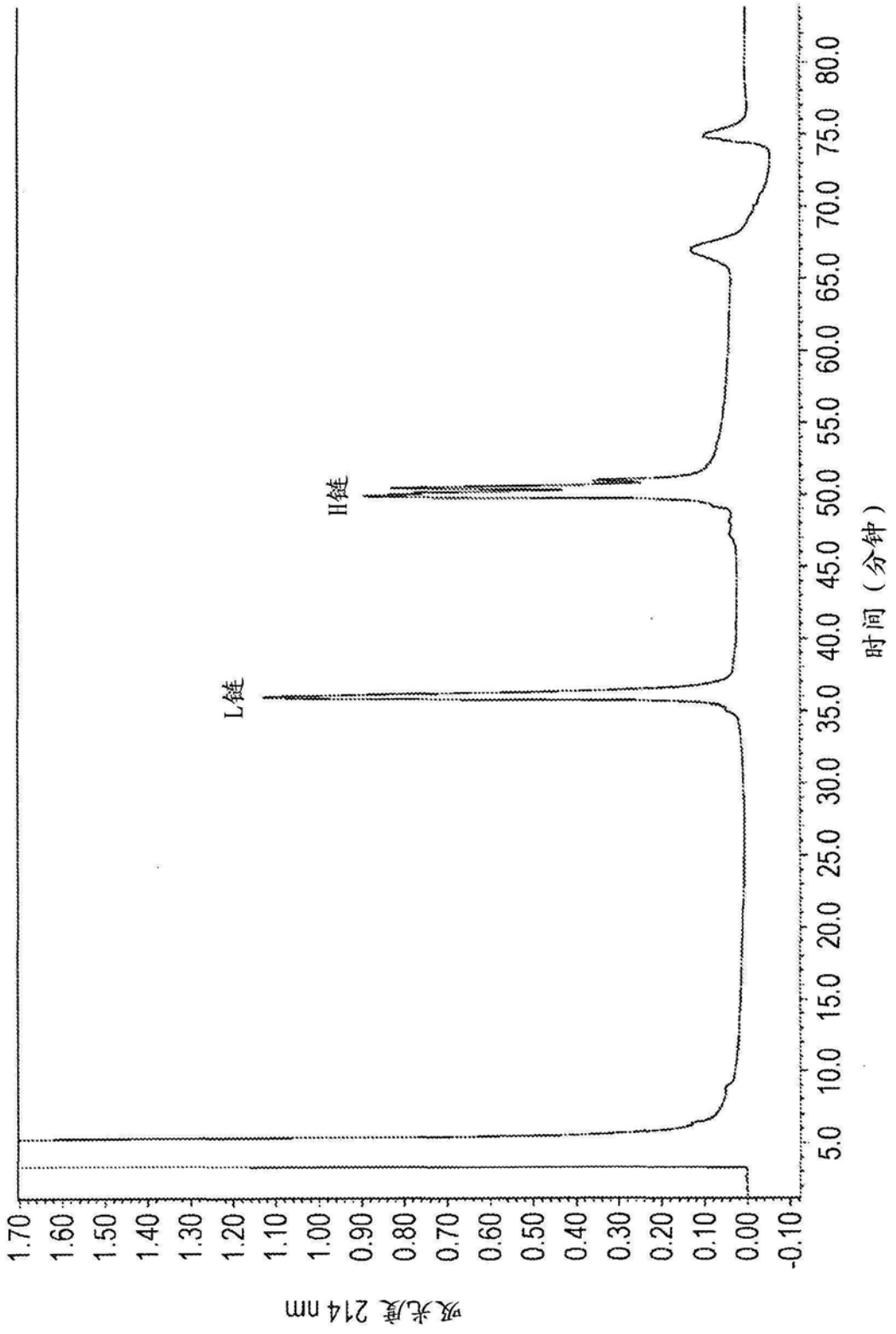

L链
H链
吸光度 214 nm
1.70
1.60
1.50
1.40
1.30
1.20
1.10
1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
-0.10
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
50.0
55.0
60.0
65.0
70.0
75.0
80.0
时间（分钟）

图6

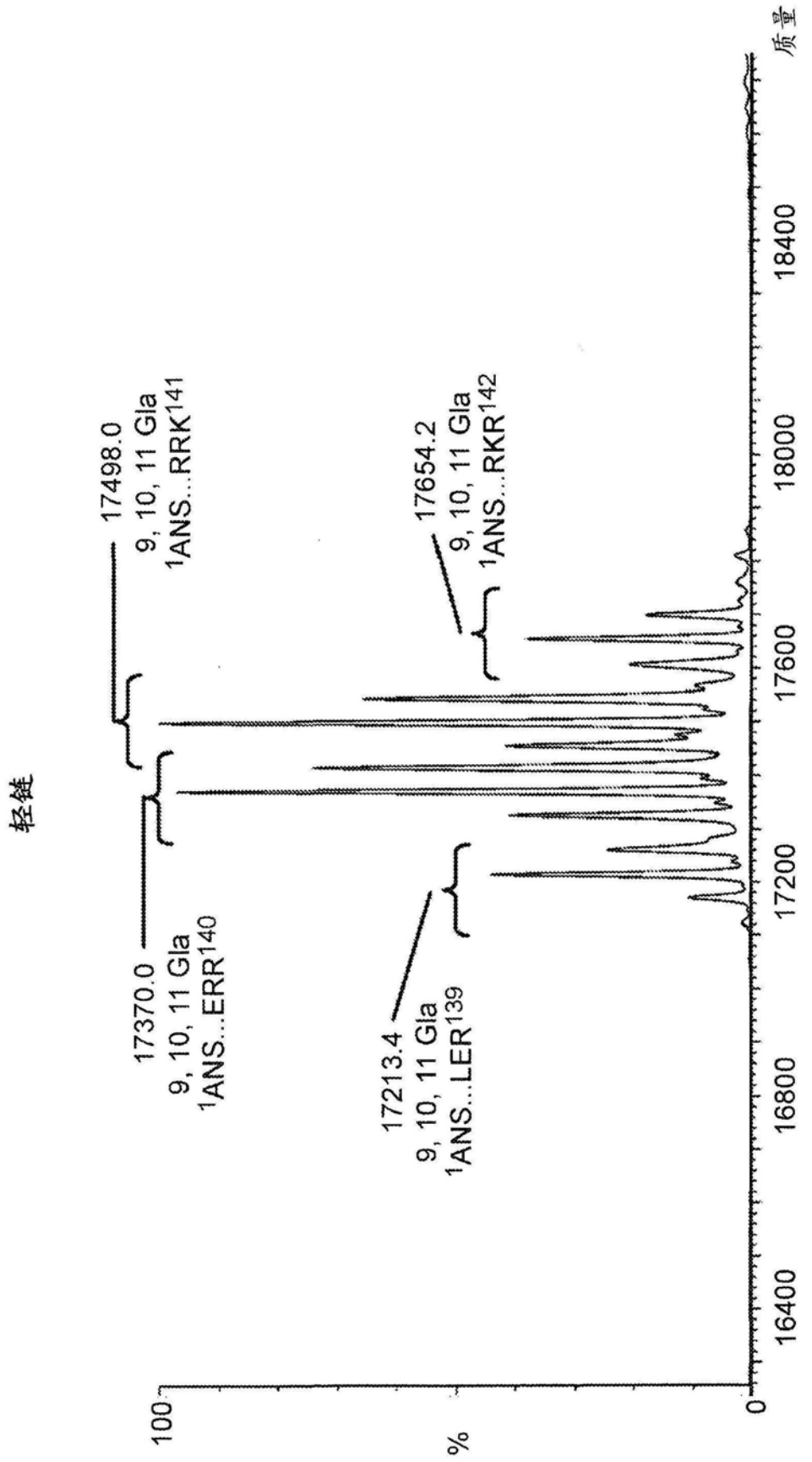

轻链
17498.0
9, 10, 11 Gla
1ANS...RRK141
17654.2
9, 10, 11 Gla
1ANS...RKR142
17370.0
9, 10, 11 Gla
1ANS...ERR140
17213.4
9, 10, 11 Gla
1ANS...LER139
100
%
0
16400
16800
17200
17600
18000
18400
质量

图7A

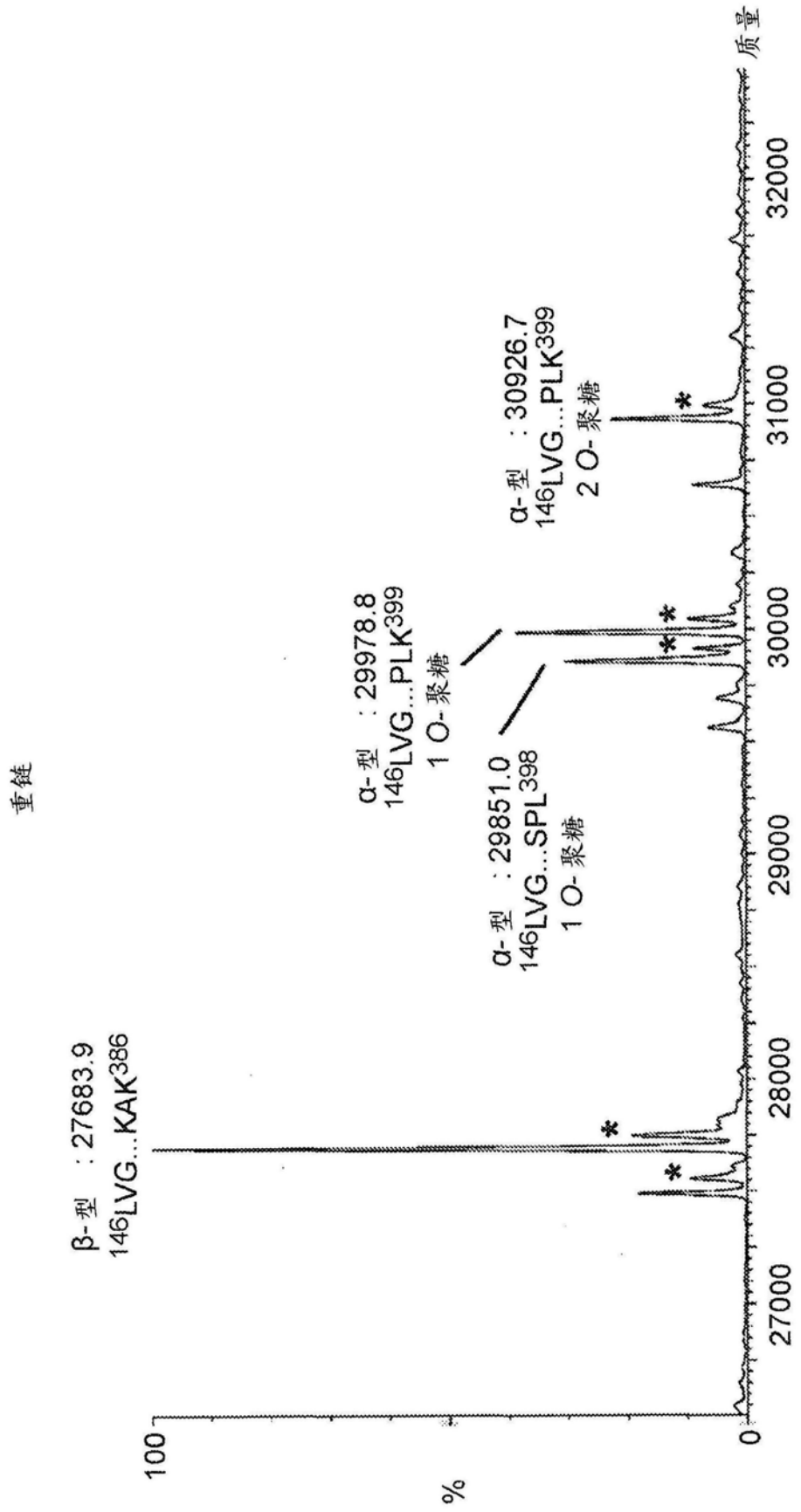

重链
β-型 ：27683.9
146LVG...KAK386
α-型 ：29851.0
146LVG...SPL398
1 O-聚糖
α-型 ：29978.8
146LVG...PLK399
1 O-聚糖
α-型 ：30926.7
146LVG...PLK399
2 O-聚糖
100
%
0
27000
28000
29000
30000
31000
32000
质量

图7B