



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105209487 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 30

(21) 申请号 201480025467. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 03. 11

C07K 14/755(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 38/37(2006. 01)

61/799, 495 2013. 03. 15 US

A61P 7/04(2006. 01)

61/869, 191 2013. 08. 23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 11. 05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/023357 2014. 03. 11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/150477 EN 2014. 09. 25

(71) 申请人 拜耳医药保健有限公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 D. Q. 王 X. 马 N. 茨维特科娃

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

权利要求书2页 说明书24页

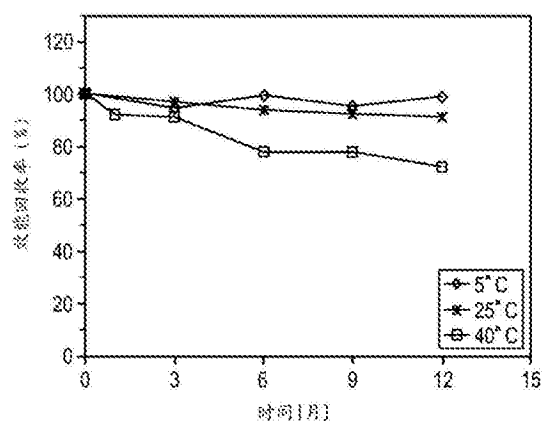
序列表23页 附图13页

(54) 发明名称

重组因子 VIII 制剂

(57) 摘要

本申请提供了液体和冻干的重组因子 VIII 制剂,所述制剂包括聚合物缀合的 FVIII 如 PEG 化的因子 VIII 的制剂。



1. 一种 rFVIII 制剂,所述制剂包含:
 - (a) 范围从约 1mM 至约 5mM 的二价阳离子;
 - (b) 范围从约 150mM 至约 250mM 的氯化钠或氯化钾;
 - (c) 范围从约 50ppm 至约 200ppm 的非离子表面活性剂;和
 - (d) 范围从约 100IU/ml 至约 5000IU/ml 的 rFVIII,其中所述 rFVIII 包含将在 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列中的一个或多个非半胱氨酸残基用半胱氨酸残基取代的氨基酸序列;其中所述 rFVIII 制剂具有范围从约 pH 6.0 至约 pH 7.5 的 pH。
2. 根据权利要求 1 所述的 rFVIII 制剂,所述制剂还包含:
 - (a) 范围从约 10mM 至约 50mM 的组氨酸;
 - (b) 范围从约 10mM 至约 100mM 的糖或糖醇;和
 - (c) 范围从约 150mM 至约 400mM 的甘氨酸。
3. 一种 rFVIII 制剂,所述制剂包含:
 - (a) 范围从 10mM 至 100mM 的 MOPS;
 - (b) 范围从以重量计 0.5% 至 10% 的糖或糖醇;
 - (c) 范围从 0.5mM 至 20mM 的二价阳离子;
 - (d) 范围从 10mM 至 100mM 的氯化钠或氯化钾;
 - (e) 范围从 50 至 150ppm 的非离子表面活性剂;和
 - (f) 范围从约 1000IU/ml 至约 1500IU/ml 的 rFVIII;其中所述 rFVIII 制剂含有以重量计小于 5.0% 的具有伯胺或仲胺基团的 rFVIII 以外的成分。
4. 根据权利要求 3 所述的 rFVIII 制剂,所述制剂基本上不含组氨酸和甘氨酸。
5. 一种用于将 rFVIII 与生物相容性聚合物共价缀合的方法,所述方法包括:
 - (a) 获得权利要求 3 或 4 所述的 rFVIII 制剂;
 - (b) 加入功能化的聚合物以形成反应混合物,其中使用与 rFVIII 上的胺基反应的化学部分将所述聚合物功能化;和
 - (c) 在一定时间和温度的条件下孵育所述反应混合物以使得所述聚合物与所述 rFVIII 发生共价结合。
6. 一种 rFVIII 制剂,所述制剂包含:
 - (a) 范围从 10mM 至 100mM 的 MOPS;
 - (b) 范围从 150mM 至 300mM 的 NaCl;
 - (c) 范围从 1mM 至 20mM 的二价阳离子;和
 - (d) 范围从约 100IU/ml 至约 5000IU/ml 的非缀合的 rFVIII。
7. 根据权利要求 6 所述的 rFVIII 制剂,所述制剂还包含:
 - (a) 范围从 0.5% 至 10% 的糖或糖醇;和
 - (b) 范围从 20ppm 至 250ppm 的非离子表面活性剂。
8. 一种 rFVIII 制剂,所述制剂包含:
 - (a) 范围从 10mM 至 100mM 的 MOPS 或组氨酸;
 - (b) 范围从 25mM 至 200mM 的 NaCl;
 - (c) 范围从 1mM 至 20mM 的二价阳离子;和

- (d) 范围从约 100IU/ml 至约 5000IU/ml 的缀合的 rFVIII。
9. 根据权利要求 8 所述的 rFVIII 制剂,所述制剂还包括:
- (a) 范围从 0.5% 至 10% 的糖或糖醇;和
- (b) 范围从 20ppm 至 250ppm 的非离子表面活性剂。
10. 一种 rFVIII 制剂,所述制剂包含:
- (a) 约 0mM,或范围从约 1mM 至约 20mM 的组氨酸;
- (b) 范围从约 0.5% 至 20% 的蔗糖或海藻糖;
- (c) 范围从约 1mM 至约 5mM 的二价阳离子;
- (d) 约 0mM,或范围从约 10mM 至约 50mM 的氯化钠;
- (e) 约 0mM,或范围从约 20ppm 至约 80ppm 的非离子表面活性剂;
- (f) 约 0%,或范围从约 1.0% 至约 5.0% 的甘氨酸,和
- (g) 范围从约 100IU/ml 至约 5000IU/ml 的缀合的 rFVIII;其中所述 rFVIII 制剂具有范围从约 pH 6.0 至约 pH 7.5 的 pH。
11. 根据权利要求 10 所述的 rFVIII 制剂,其中
- (a) 氯化钠以范围从约 10mM 至约 50mM 存在;
- (b) 蔗糖以范围从 0.5% 至 2.0% 存在,
- (c) 甘氨酸以范围从约 1.0% 至约 5.0% 存在,
- (d) 组氨酸以范围从约 1mM 至约 20mM 存在,和
- (e) 非离子表面活性剂以范围从约 20ppm 至约 80ppm 存在。
12. 根据权利要求 10 所述的 rFVIII 制剂,其中
- (a) 氯化钠以以重量计小于 1.0% 存在或不存在;
- (b) 蔗糖或海藻糖以范围从 0.5% 至 20% 存在,和
- (c) 甘氨酸以以重量计小于 1.0% 存在或不存在。
13. 根据权利要求 12 所述的 rFVIII 制剂,其中蔗糖或海藻糖以范围从 1.0% 至 10.0% 存在。
14. 一种治疗甲型血友病的方法,所述方法包括向需要其的患者施用治疗有效量的权利要求 1、3、6、8 或 10 中任意一项所述的 rFVIII 制剂。

重组因子 VIII 制剂

[0001] 背景

[0002] 本申请要求 2013 年 3 月 15 日提交的美国临时申请号 61/779,495 和 2013 年 8 月 23 日提交的美国临时申请号 61/869,191 的优先权,其全部内容通过引用在此并入本申请。

[0003] 甲型血友病是由凝血因子 VIII (“FVIII”) 缺陷导致并且其是最常见的遗传性凝血疾病,其预计发生率为每 5000 个男性中有 1 个男性。目前对甲型血友病的治疗涉及静脉内注射重组的或血浆来源的人 FVIII。FVIII 的注射应出血事件的需求做出或作为预防性治疗每周施用 2 至 4 次。尽管多项研究显示预防性治疗减少甲型血友病的并发症,需要频繁静脉内注射成为了阻碍患者依从性的屏障并影响患者的生活质量。需要频繁注射主要是由于 FVIII 的循环半衰期较短,其在患者体内为 12 至 14 小时。

[0004] 共价加入长链聚合物如聚乙二醇 (“PEG”) 已显示出使蛋白疗法的半衰期增加,PEG 化是将 PEG 分子与蛋白共价结合。

[0005] 美国专利号 5,763,401 (Nayar) 披露了稳定的、无白蛋白的、全长重组 FVIII 的冻干制剂 (“FL-rFVIII”)。美国专利号 7,632,921 (Pan 等) 和 Mei 等, Rational design of a fully active, long-acting PEGylated factor VII for hemophilia A treatment, 116BLOOD 270-279 (2010) 披露了与一个或多个生物相容性聚合物如 PEG 共价结合的半胱氨酸增加的 FVIII 突变体。美国专利号 7,087,723 (Besman 等) 涉及无白蛋白的 FVIII 制剂。Österberg 等, Development of a freeze-dried albumin-free formulation of recombinant factor VIII SQ, Pharmaceutical Research, vol. 14, No. 7 (1997), pp. 892-898 和 Österberg 等, B-domain deleted recombinant factor VIII formulation and stability, Seminars in Hematology, vol. 38, No. 2, suppl. 4 (April 2001), pp. 40-43 讨论了 B-结构域缺失的 FVIII 冻干制剂, 包括含有氯化钠、蔗糖、组氨酸、脱水氯化钙和聚山梨醇酯 80 的制剂。Fatouros 等, Recombinant factor VIII SQ-influence of oxygen, metal ions, pH and ionic strength on its stability in aqueous solution, Int. J. of Pharmaceutics 155 (1997) 121-131 披露了 rFVIII SQ 在不含白蛋白的溶液中贮存的性质。W02011/027152 (Jezek 等) 披露了 FVIII 的制剂。

[0006] 概述

[0007] 在一个实施方式中, 本发明涉及一种 rFVIII 制剂, 所述制剂包括: (a) 范围从约 1mM 至约 5mM 的二价阳离子; (b) 范围从约 150mM 至约 250mM 的氯化钠或氯化钾; (c) 范围从约 50ppm 至约 200ppm 的非离子表面活性剂; 和 (d) 范围从约 100IU/ml 至约 5000IU/ml 的 rFVIII, 其中所述 rFVIII 包含将在 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列中的一个或多个非半胱氨酸残基用半胱氨酸残基取代的氨基酸序列; 其中所述 rFVIII 制剂具有范围从约 pH 6.0 至约 pH 7.5 的 pH。在另一个实施方式中, 本发明涉及一种 rFVIII 制剂, 所述制剂包括: (a) 范围从 10mM 至 100mM 的 MOPS; (b) 范围从以重量计 0.5% 至 10% 的糖或糖醇; (c) 范围从 0.5mM 至 20mM 的二价阳离子; (d) 范围从 10mM 至 100mM 的氯化钠或氯化钾; (e) 范围从 50 至 150ppm 的非离子表面活性剂; 和 (f) 范围从约 100IU/ml 至约 1500IU/ml 的 rFVIII; 其中所述 rFVIII 制剂含有以重量计小于 5.0% 的具有伯胺或仲胺基团的 rFVIII 以外的成分。

[0008] 在又一个实施方式中,本发明涉及一种 rFVIII 制剂,所述制剂包括:(a) 范围从 10mM 至 100mM 的 MOPS;(b) 范围从 150mM 至 300mM 的 NaCl;(c) 范围从 1mM 至 20mM 的二价阳离子;和 (d) 范围从约 100IU/ml 至约 5000IU/ml 的非缀合的 rFVIII。在又一个实施方式中,本发明涉及一种 rFVIII 制剂,所述制剂包括:(a) 范围从 10mM 至 100mM 的 MOPS 或组氨酸;(b) 范围从 25mM 至 200mM 的 NaCl;(c) 范围从 1mM 至 20mM 的二价阳离子;和 (d) 范围从约 100IU/ml 至约 5000IU/ml 的缀合的 rFVIII。在又一个实施方式中,本发明涉及一种 rFVIII 制剂,所述制剂包括:(a) 约 0mM,或范围从约 1mM 至约 20mM 的组氨酸;(b) 范围从约 0.5%至 20%的蔗糖或海藻糖;(c) 范围从约 1mM 至约 5mM 的二价阳离子;(d) 约 0mM,或范围从约 10mM 至约 50mM 的氯化钠;(e) 约 0mM,或范围从约 20ppm 至约 80ppm 的非离子表面活性剂;(f) 约 0%,或范围从约 1.0%至约 5.0%的甘氨酸,和 (g) 范围从约 100IU/ml 至约 5000IU/ml 的缀合的 rFVIII;其中所述 rFVIII 制剂具有范围从约 pH 6.0 至约 pH 7.5 的 pH。

[0009] 附图简述

[0010] 本领域技术人员将理解下文描述的附图仅用于说明目的。这些附图并非旨在以任何方式限制本申请中提供的发明的范围或权利要求的范围。

[0011] 图 1 示意性显示了全长人因子 VIII 和 BDD-rFVIII 的结构域。

[0012] 图 2 是显示具有由二硫键连接的结构域的 BDD-rFVIII 突变体相对浊度的图。该浊度在包含浓度增加的氯化钠的缓冲液中检测。浊度在 A_{340nm} 下测定。除了氯化钠以外,缓冲液中含有 20mM 组氨酸、2.5mM 氯化钙、29mM 蔗糖、293mM 甘氨酸和 80ppm 聚山梨醇酯 80。

[0013] 图 3 是显示具有由二硫键连接的结构域的 BDD-rFVIII 突变体相对浊度的图。该浊度在包含浓度增加的聚山梨醇酯 80 的缓冲液中检测。浊度在 A_{340nm} 下测定。除了聚山梨醇酯 80 以外,缓冲液中含有 20mM 组氨酸、30mM 氯化钠、2.5mM 氯化钙、29mM 蔗糖和 293mM 甘氨酸。

[0014] 图 4 是显示具有由二硫键连接的结构域的 BDD-rFVIII 突变体相对浊度的图。该浊度在包含浓度增加的人血清白蛋白 (“HSA”) 的缓冲液中检测。浊度在 A_{340nm} 下测定。缓冲液中含有 20mM 组氨酸、30mM 氯化钠、2.5mM 氯化钙、29mM 蔗糖、293mM 甘氨酸和 80ppm 聚山梨醇酯 80。

[0015] 图 5 是显示具有由二硫键连接的结构域的 BDD-rFVIII 突变体相对浊度的图。该浊度在包含浓度增加的氯化钠与聚山梨醇酯 80 和 has 组合的缓冲液中检测。浊度在 A_{340nm} 下测定。除了氯化钠、HSA 和聚山梨醇酯 80 以外,缓冲液中含有 20mM 组氨酸、2.5mM 氯化钙、29mM 蔗糖和 293mM 甘氨酸。

[0016] 图 6 显示了在加入赋形剂前后具有二硫键连接的结构域的 BDD-rFVIII 突变体在溶液中的澄清度变化情况。从左至右:(1) 赋形剂的组合 (HSA、氯化钠和聚山梨醇酯 80)、(2) HSA、(3) 氯化钠、(4) 聚山梨醇酯 80、和 (5) 加入 HSA、聚山梨醇酯 80 和氯化钠之前。

[0017] 图 7 是显示全长 FVIII 在组氨酸、MOPS 和 TEA 缓冲液中在 40℃ 下贮存 7 天的液体稳定性的图。

[0018] 图 8 是显示 rFVIII 在 MOPS 和组氨酸缓冲液中在 25℃ 下稳定性的图。

[0019] 图 9 是显示 PEG 化的 BDD-rFVIII 结构的图。由 A3 区伸出的链表示 PEG 分子。

[0020] 图 10 是显示氯化钠对于 PEG 化的 BDD-rFVIII 在 23℃ 下贮存 6 天的效能回收影响

的图。

[0021] 图 11 是显示氯化钠对于非 PEG 化的 BDD-rFVIII 在 23℃ 下贮存 6 天的效能回收影响的图。

[0022] 图 12 是显示在 26 周后在冻干制剂 A 中的 PEG 化的 BDD-rFVIII 标准化的效能趋势的图。制剂 A 含有 2.5mM 氯化钙、30mM 氯化钠、20mM 组氨酸、293mM 甘氨酸、29mM 蔗糖和 80ppm 聚山梨醇酯 80。

[0023] 图 13 是显示在 26 周后在冻干制剂 B 中的 PEG 化的 BDD-rFVIII 标准化的效能趋势的图。制剂 B 含有 2.5mM 氯化钙、30mM 氯化钠、20mM 组氨酸、346mM 甘氨酸、38mM 蔗糖和 80ppm 聚山梨醇酯 80。

[0024] 图 14 是显示在 26 周后在冻干制剂 C 中的 PEG 化的 BDD-rFVIII 标准化的效能趋势的图。制剂 C 含有 2.5mM 氯化钙、20mM 组氨酸、234mM 蔗糖和 80ppm 聚山梨醇酯 80。

[0025] 图 15 是显示在 26 周后在冻干制剂 D 中的 PEG 化的 BDD-rFVIII 标准化的效能趋势的图。制剂 D 含有 2.5mM 氯化钙、20mM 组氨酸、211mM 海藻糖和 80ppm 聚山梨醇酯 80。

[0026] 图 16 是显示在长达 30 个月时在冻干制剂 A 中的 PEG 化的 BDD-rFVIII 标准化的效能趋势的图。制剂 A 含有 2.5mM 氯化钙、30mM 氯化钠、20mM 组氨酸、293mM 甘氨酸、29mM 蔗糖和 80ppm 聚山梨醇酯 80。

[0027] 图 17 是显示在长达 13 周时在冻干制剂 B 中的 PEG 化的 BDD-rFVIII 标准化的效能趋势的图。制剂 B 含有 2.5mM 氯化钙、30mM 氯化钠、20mM 组氨酸、346mM 甘氨酸、38mM 蔗糖和 80ppm 聚山梨醇酯 80。

[0028] 图 18 是显示在长达 12 个月时在冻干制剂 A 中的 PEG 化的 BDD-rFVIII (200IU/mL) 标准化的效能趋势的图。制剂 A 含有 2.5mM 氯化钙、30mM 氯化钠、20mM 组氨酸、293mM 甘氨酸、29mM 蔗糖和 80ppm 聚山梨醇酯 80。

[0029] 图 19 是显示在长达 9 个月时在冻干制剂 A 中的 PEG 化的 BDD-rFVIII (1200IU/mL) 标准化的效能趋势的图。制剂 A 含有 2.5mM 氯化钙、30mM 氯化钠、20mM 组氨酸、293mM 甘氨酸、29mM 蔗糖和 80ppm 聚山梨醇酯 80。

[0030] 图 20 是 BDD-rFVIII SQ 的氨基酸序 (SEQ ID NO:3) 列。

[0031] 图 21 是 FL-rFVIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1)。

[0032] 详细描述

[0033] 除非另有明示,出于解释本说明书的目的,将应用下述定义。在本申请中引用的所有参考文献均通过引用整体并入本申请。

[0034] 因子 VIII:因子 VIII (“FVIII”) 是一种凝血因子,其作为由约 200kDa 的重链和 80kDa 的轻链组成的异二聚体在循环中存在。重链含有结构相关的 A1 和 A2 结构域,以及独特的 B 结构域,轻链包括 A3、C1 和 C2 结构域。参见例如,Mei 等,116BLOOD 270-279 (2010)。亦参见图 1,其显示了 FVIII 的结构域。在本申请中使用的术语“因子 VIII”或“FVIII”指所有 VIII 分子,无论其来源于血浆还是通过使用重组 DNA 技术生产,其具有野生型人 FVIII 的一些促凝血活性的性质。如在本申请中所使用的,FVIII 包括野生型或重组因子 VIII 的修饰或截短形式,其保留了野生型因子 VIII 或活化的野生型因子 VIII 的一些或全部的促凝血活性,包括具有超过野生型因子 VIII 或活化的野生型因子 VIII 活性的促凝血活性的变体或截短形式。FVIII 还包括含有具有活性的因子 VIII 的融合产物,如与免疫球蛋白片

段或结构域的融合物。市售的含有 FVIII 的治疗性配制品的示例包括以商品名 KOGENATE FS(来自 Bayer Healthcare LLC, Berkeley, CA, U. S. A.) 销售的那些。

[0035] 重组因子 VIII:在本申请中使用的重组因子 VIII(“rFVIII”)指使用重组技术生产的 FVIII,或其具有生物活性的衍生物,并且不包括来自哺乳动物血浆的 FVIII。

[0036] 全长、天然的人因子 VIII(“FL-FVIII”)是一种具有 2,351 个氨基酸的单链糖蛋白。表达 2,351 个氨基酸的序列如 SEQ. ID. NO:1 所示。但是,当表达的多肽转位进入内质网腔时,裂解掉 19 个氨基酸的信号序列,结果产生第二条序列。该第二条序列,在本申请中如 SEQ. ID. NO:2 所示,缺乏 19 个先导氨基酸并且研究人员通常使用该序列指定编码位置(例如 Arg³⁷²)以给定 VIII 的氨基酸残基。因此,除非特别说明,本申请所提供的为氨基酸残基分配的所有编码位置均基于 SEQ. ID. NO:2。例如,根据通常做法和如本申请所使用的,当涉及 BDD rFVIII 中的突变氨基酸时,根据其在全长 FVIII 序列中的位置涉及突变氨基酸。例如,BDD rFVIII 突变体可以包括 K1808C 氨基酸取代,其中在位置类似于全长序列(在本申请中,SEQ ID NO:2)中的 1808 的赖氨酸(K)被半胱氨酸(C)取代。

[0037] B-结构域缺失(“BDD”)的因子 VIII:如在本申请中所使用的,BDD 或 BDD-rFVIII 的特征为具有 B-结构域全部或部分缺失的氨基酸序列。在一个实施方式中,BDD 是称为 BDD-SQ 的分子,其含有因子 VIII 的 B-结构域除 14 个氨基酸以外的全部氨基酸缺失。在 BDD-SQ 中,B-结构域的前 4 个氨基酸(SEQ ID NO:4)与 B 结构域的后 10 个残基(SEQ ID NO:5)连接。参见例如,Lind et al,Novel forms of B-domain-deleted recombinant factor VIII molecules,232EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY 19-27(1995)。亦参见图 1,其以结构域组序显示了 BDD。在本申请中使用的 BDD-SQ 包括 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列。因子 VIII 的 B-结构域似乎是可有可无的,因为具有 90kD A1-A2 重链和 80kD 轻链的 BDD 分子已显示出其能够有效作为甲型血友病的替代疗法。具有 B-结构域其他部分缺失或 B-结构域全部缺失的 FVIII 分子亦包括在本发明的制剂和方法中。

[0038] BDD 突变体或 BDD-rFVIII 突变体:BDD 突变体或 BDD-rFVIII 突变体是 BDD-SQ 的变体,其含有至少一些 FVIII 的促凝血活性和至少一个氨基酸残基不同于 BDD-SQ。BDD 突变体或 BDD-rFVIII 突变体包括氨基酸序列与 BDD-SQ 不同的变体,例如但不限于通过将一个或多个氨基酸残基位点定向突变。不具有限制作用的,BDD 突变体或 BDD-rFVIII 突变体包括引入美国专利号 7,928,199(Griffin 等)中公开的半胱氨酸残基的 FVIII 多肽。

[0039] PEG 化:PEG 化是将长链聚乙二醇(PEG)分子与蛋白共价结合,如通过将具有活性官能团的 PEG 与 FVIII 上存在的位点结合。用于 PEG 化的一种方法是将功能化的 PEG 部分与天然蛋白中存在的赖氨酸残基或 NET-末端胺基连接。由于 FVIII 含有多个胺基残基,因此胺功能化的聚合物随机缀合至 FVIII 上的不同位点。

[0040] 位点定向 PEG 化使得能够将 PEG 分子靶向至特定位点。这些特定位点可以包括引入 PEG 聚合物可以与其缀合的表面暴露的半胱氨酸。参见美国专利号 7,632,921(Pan 等)。还可以通过共价连接至 FVIII 上的糖类,将 PEG 与 FVIII 连接。参见例如,美国专利申请公开号 20110112028(Turecek 等)。通过将 PEG 与 FVIII 上的多糖如 O-多糖酶促偶联,可以将 PEG 与 FVIII 连接。Stennicke 等公开了通过将全长 FVIII 与缓冲液中的唾液酸酶和过量 CMP-SA-甘油-PEG 试剂孵育将 PEG 与 FVIII B-结构域中独特的 O-多糖选择性偶联。Stennicke 等,“A novel B-domain O-glycoPEGylated FVIII(N8-GP) demonstrates

full efficacy and prolonged effect in hemophilic mice models,"121(11)BLOOD 2108-16(2013)。美国专利申请公开号 20130137638(BoIt) 公开了 PEG 与具有截短的 B- 结构域的 FVIII 变体连接。FVIII 分子通过截短的 B- 结构域中的 O- 连接寡糖与亲水性聚合物共价缀合。美国专利申请公开号 20120322738(Behrens) 公开了将聚合物与 FVIII 缀合的方法,包括通过 B- 结构域中的 O- 连接多糖将 PEG 与 FVIII 共价缀合。如在本申请中所使用的,PEG 化的 FVIII 包括通过任意方法 PEG 化,包括上文中讨论的本领域公知的不同方法。

[0041] 国际单位, IU:国际单位或 IU 是根据标准测定方法进行检测的 FVIII 血液凝血活性(效能)检测结果的单位。标准测定包括根据现有技术中描述的一步法测定。参见例如, Lee 等, An effect of predilution on potency assays of Factor VIII concentrates, 30THROMBOSIS RESEARCH 511-519(1983)。一步法测定是基于活化的部分凝血酶原时间(aPTT)。在存在因子 IXa、钙和磷脂的条件下, FVIII 作为因子 X 酶促转化为因子 Xa 的辅因子。在这项测定中, 将经过稀释的待测样品在 37℃ 下与缺乏 FVIII 的血浆底物和 aPTT 试剂的混合物孵育。凝块形成所花费的时间(秒)与 FVIII:C 浓度的对数之间存在负相关。通过对待测物不同稀释物的凝块时间与由使用已知活性的标准物质的一系列稀释物构建的曲线进行比较内插确定位置样品的活性水平并以国际单位每 mL(IU/mL) 报告。显色测定也是有用的, 其可以市售购买, 包括在商品名 COATEST SP FVIII(购自 Chromogenix AB, Molndal, Sweden) 进行的测定。显色测定法由两个连续步骤组成, 其中颜色的强度与 FVIII 活性成正比。在第一步中, 在存在最佳量的钙离子和磷脂的条件下, 通过 FIXa 与其辅因子 FVIIIa 将因子 X 活化成 FXa。存在过量的因子 X, 以使得因子 X 的活化速率仅依赖于 FVIII 的量。在第二步中, 因子 Xa 水解显色底物以产生发色团并在 405nm 下用光度计测定颜色强度。计算未知效能并使用斜率比统计法确认测定的有效性。以国际单位每 mL(IU/mL) 报告活性。

[0042] 冷动干燥、冷冻、冻干:“冷冻-干燥”, 除非其出现的上下文另有明示, 将用于表示冻干工艺的一部分, 其中药物配制品的温度在一次和二次干燥相升高以驱动水脱离该配制品。冻干工艺的“冷冻”步骤是在一次和二次干燥阶段之前出现的那些步骤。除非另有明示, “冻干”指冻干的整个工艺, 包括冷冻步骤和冷冻干燥步骤。

[0043] 在本发明的某些方面中, 可以采用本领域公知的方法学将包含 rFVIII 和 BDD-rFVIII 的制剂冻干, 其包括包含 PEG 化的 FVIII 和 BDD-rFVIII 的制剂。例如, 美国专利号 5, 399, 670 和 5, 763, 401 描述了用于生产稳定性增加的冻干 FVIII 制剂的方法学, 可以使用该方法生产本申请所述的冻干制剂。冻干工艺具有冷冻相、一次干燥相和二次干燥相。在冷冻相, 存在退火步骤。冷冻相在温度不高于 -40℃ 下进行, 退火步骤在温度不高于 -15℃ 下进行, 一次干燥在温度不高于 0℃ 下进行和二次干燥在温度不高于 30℃ 下进行。一旦设定温度达到冷冻温度、退火温度、最终冷冻温度、一次干燥温度和二次干燥温度, 则可以将该温度保持一个合理的时间段, 此时间段是本领域技术人员考虑所涉及的特定蛋白样品易于理解的, 如一小时、两小时、三小时或三小时以上。

[0044] 退火: 术语“退火”用于指示冻干过程中药物配制品冻干工艺中先于配制品冷冻-干燥的一个步骤, 在该步骤中配制品的温度由较低温度上升至较高温度, 然后在一段时间后再次冷却。

[0045] 填充剂 (bulking agent) :对于在本申请中的目的而言,填充剂向“蛋糕”或药物配制品在冻干后残留的固体物质提供结构的那些化学实体并保护其不出现塌陷。可结晶的填充剂指如本申请所述的能够在冻干过程中结晶的填充剂。

[0046] 表面活性剂:如在本申请中所使用的,术语“表面活性剂”包括“非离子表面活性剂”,如聚山梨醇酯包括聚山梨醇酯 20 和聚山梨醇酯 80、泊洛沙姆如泊洛沙姆 184 或 188、普朗尼克多元醇(以商品名 PLURONIC 销售,由 BASF Wyandotte Corporation 生产)以及其他乙烯/聚乙烯嵌段共聚物。非离子表面活性剂在加工和储存期间通过减少界面相互作用和避免蛋白吸附稳定 rFVIII。使用非离子表面活性剂使得制剂暴露于剪切力和表面应力而不会造成 rFVIII 变性。本申请公开的制剂包括具有一种或多种非离子表面活性剂的制剂,本申请中作为示例的是具有聚山梨醇酯的制剂,如聚山梨醇酯 20(以商品名吐温 20 销售)或聚山梨醇酯 80(以商品名吐温 80 销售)。

[0047] 渗透压:如在本申请中所使用的,术语“渗透压”指溶液浓度的测定,其定义为每 kg 溶剂的溶质的渗透压数量。可以通过加入一种或多种稳定剂如糖或糖醇包括甘露醇、右旋糖、葡萄糖、海藻糖和/或蔗糖达到所需的渗透压水平。对适宜提供渗透压的其他稳定剂的描述参见如药物赋形剂手册 (handbook of Pharmaceutical Excipients)(第四版, Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, Science&Practice Publishers)或雷明顿:药物科学与实践 (Remingtons: The Science and Practice of Pharmacy)(第九版, Mack Publishing Company)。本申请中所述的制剂的渗透压范围为从约 240mOsm/kg 至约 450mOsm/kg、或约 750mOsm/kg、或约 1000mOsm/kg,或者从约 270mOsm/kg 至约 425mOsm/kg,或者从约 300mOsm/kg 至约 410mOsm/kg。

[0048] 当适用时,以单数使用的术语还将包括复数并且反之亦然。除非另有明示或者“一个或多个”的使用明显不恰当,本申请中使用的“一个”指“一个或多个”。除非另有明示,“或”的使用指“和/或”。“包括”、“包含”、“含有”可以互换使用并且并非旨在限制。术语“如”亦并非旨在限制。例如,术语“包括”应指“包括,但不限于”。而且,当一个或多个实施方式的描述使用术语“包含”时,本领域技术人员将理解,在一些特定情况下,该一个或多个实施方式可以使用“基本上由……组成”和/或“由……组成”的语言替代性描述。

[0049] 如在本申请中所使用的,术语“约”指所提供的单位值的 $\pm 10\%$ 。如在本申请中所使用的,术语“基本上”指显示出所关注的特征或性质的整体或大约程度的实质性状况。生物领域的普通技术人员将理解生物和化学现象很少(若有)达到或避免绝对结果,因为很多变量影响生物和化学组分的检测、生产和贮存,还因为在生物和化学组分和物质的检测、生产和贮存中使用的仪器和设备存在固有误差。因此在本申请中使用术语基本上以捕捉在很多生物和化学现象中可能固有的完整性缺乏。

[0050] 本申请所述的本发明的制剂可能以以重量计的组分浓度的形式描述,如重量百分率或摩尔浓度。还应理解本发明还包含这些制剂的冻干配制品,当其在适宜稀释剂如生理盐水或水中重构时用于施用或以所报告的浓度贮存。本申请中的范围包括范围的端点。

[0051] 除非另有明示,百分率术语表示重量/体积百分率和温度以摄氏度表示。

[0052] 组合物组分

[0053] 本发明的 FVIII 组合物可以包括稳定剂、缓冲剂、氯化钠、钙盐和有利地其他赋形剂。已对这些赋形剂进行了选择以便使得 FVIII 在冻干配制品和/或液体配制品中的稳定

性最大化。

[0054] 在本组合物中使用的填充剂优选地选自下组：甘露醇、甘氨酸和丙氨酸。甘露醇、甘氨酸或丙氨酸可以以 1-5%、2-3% 和 2.2-2.6% 的量存在。可以将甘氨酸选定为填充剂。涵盖不含填充剂的组合物。

[0055] 在本组合物中使用的稳定剂选自下组：糖或糖醇，包括但不限于蔗糖、甘露醇、右旋糖、葡萄糖和海藻糖。这些试剂在组合物中以 0.5-10%、1-8%、2-7%、3-6%、4-5%、1-5%、1-4%、1-3% 或 1-2% 的量存在。在含有填充剂的组合物中，蔗糖是优选的稳定剂，其以 1-3% 的量存在。在不含填充剂的组合物中，可以选择约 8% 的量的蔗糖或海藻糖作为稳定剂。这些糖或糖醇还具有冷冻保护剂的功能。

[0056] 此外，在某些本发明组合物中存在缓冲剂。缓冲剂可能是有用的，例如在进行冻干的 FVIII 制剂中，因为据信冻干过程中的 pH 迁移可能会对 FVIII 造成不良影响。缓冲剂可以是具有作为缓冲物能力的任意生理上可接受的化学实体或化学实体的组合，包括组氨酸和 MOPS (3-(N-吗啉基)丙磺酸)。可以选择约 20mM 的量的组氨酸作为缓冲剂。

[0057] 为了保持 FVIII 的活性，本发明的组合物还可以包括钙或能够与 FVIII 相互作用并保持其活性的其他二价阳离子，据推测其是通过保持 FVIII 的重链与轻链的结合保持其活性。可以使用 1mM 和 5mM 之间的钙盐。钙盐可以是氯化钙，但也可以是其他钙盐如葡萄糖醛酸钙、葡乳醛酸钙或葡庚糖酸钙。本发明的 FVIII 组合物还可以包括表面活性剂，特别是选自下组的非离子表面活性剂：聚山梨醇酯 20 和聚山梨醇酯 80、泊洛沙姆包括泊洛沙姆 184 或 188、普朗尼克多元醇（以商品名 PLURONIC 销售，由 BASF Wyandotte Corporation 生产）以及其他乙烯/聚乙烯嵌段共聚物。表面活性剂可以是约 80ppm 的量的聚山梨醇酯 80。

[0058] 在本组合物中使用的 FVIII 可以与生物相容性聚合物如 PEG 共价结合。如在本申请中所使用的，术语“聚乙二醇”或“PEG”可以互换使用并且包括任意水溶性聚（环氧乙烷）。PEG 包括下述结构“-(OCH₂CH₂)_n-”，其中 (n) 为 2 至 4000。如在本申请中所使用的，根据末端的氧是否被取代，PEG 还包括“-CH₂CH₂-O(CH₂CH₂)_n-CH₂CH₂-”和“- (OCH₂CH₂)_nO-”。术语“PEG”包括具有不同末端或“封端”基团的结构，例如不限于羟基或 C1-20 烷氧基基团如甲氧基。术语“PEG”还指包括大多数，亦即大于 50% 的 -OCH₂CH₂- 重复亚单位的聚合物。对于特定形式，PEG 可以是任意数量的各种分子量，以及结构或几何形状，例如支链、线性、叉型和多功能型。如在本申请中所使用的，术语“PEG 化”指一种经由其将聚乙二醇 (PEG) 与分子如蛋白共价结合的过程。当将官能团如生物相容性聚合物描述为被活化时，则所述官能团可容易地与另一个分子上的亲电子体或亲核体反应。

[0059] 在本申请的缀合物中使用的生物相容性聚合物可以是本申请中讨论的或现有技术中已知的任意聚合物。对生物相容性聚合物进行选择以提供所需的改进的药代动力学。例如，对所述聚合物的特性、尺寸和结构进行选择，以改善 FVIII 的循环半衰期或者在无不可接受的活性降低下降低 FVIII 的抗原性。聚合物可以包括 PEG。例如，所述聚合物可以是末端以封端部分封端的聚乙二醇，如羟基、烷氧基、取代的烷氧基、烯氧基、取代的烯氧基、炔氧基、取代的炔氧基、芳氧基和取代的芳氧基。在一些实施方式中，所述聚合物可以包括甲氧基聚乙二醇如具有尺寸范围从 3kD 至 200kD 的甲氧基聚乙二醇。

[0060] 所述聚合物可以具有反应性部分。例如，所述聚合物可以具有能够与功能性 FVIII 多肽上的游离半胱氨酸反应以形成共价键的巯基反应性部分。此类巯基反应性部分包括硫

醇、三氟甲磺酸酯、三氟乙磺酸酯、氮丙啶、环氧乙烷、S-吡啶基或马来酰亚胺部分。所述聚合物可以是线性的并在一个末端包括“封端”，其对巯基（如甲氧基）和另一个末端的巯基反应性部分不具有强烈的反应性。缀合物可以包括具有尺寸范围从 5kD 至 64kD 的 PEG-马来酰亚胺。或者，所述聚合物可以具有胺基反应性部分如琥珀酰亚胺丙酸酯、琥珀酰亚胺丁酸酯、苯并三唑碳酸酯、羟基琥珀酰亚胺、醛如丙醛、丁醛、乙缩醛、哌啶酮、甲基酮等（参见例如美国专利 7,199,223 (Bossard)）。

[0061] FVIII 可以通过所述聚合物与 FVIII 的糖类部分的缀合与生物相容性聚合物缀合。参见美国专利申请公开号 20110112028 (Turecek 等)。FVIII 可以通过水溶性聚合物与 FVIII 的氧化的糖类部分缀合与水溶性聚合物缀合。在一些实施方式中，水溶性聚合物选自下组：PEG、聚唾液酸（“PSA”）和右旋糖酐。在又一个方面，活化的水溶性聚合物选自下组：PEG-酰肼、PSA-肼和醛基-活化的右旋糖酐。在本发明的另一个方面，所述糖类部分是通过在含有 NaIO₄ 的缓冲液中孵育氧化的。

[0062] 在本发明中使用的适宜 FVIII 蛋白与特定的已知氨基酸序列具有同源性。例如，在本发明中使用的适宜 FVIII 变体是与已知的 FVIII 氨基酸序列例如与全长 FVIII (SEQ ID NO:1) 或 BDD-FVIII (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列具有至少约 70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99 % 同源性的变体。本发明中还使用与已知的 FVIII 序列有限定的序列差异的基因变体，如当与天然、已知的或对照序列如全长 FVIII (SEQ ID NO:1) 或 BDD-FVIII (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列比较时，包含在氨基酸序列中具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、1-10、1-5、2-6 或 3-8 个不同的氨基酸序列的 FVIII 分子。在本发明中还使用等位基因变体。FVIII 等位基因变体的示例是在美国专利申请公开号 2010/0256062 (Howard 等)；Howard 等，“African-Americans Express Multiple Haplotypic Forms of the Wildtype Factor VIII (FVU1) Protein: A Possible Role for Pharmacogenetics in FVIII Inhibitor Development?” Blood, Vol. 104, 2004, Abstract 384；和 Viçl, K. R. 等，“Inhibitors of Factor VIII in Black Patients with Hemophilia,” The New England Journal of Medicine, Vol. 360, 2009, pp. 1618-27 中公开的那些。等位基因变体包括具有氨基酸取代的那些如在位置 484 使用组氨酸取代精氨酸 (R484H)、在位置 776 使用甘氨酸取代精氨酸 (R776G)、在位置 1241 使用谷氨酸取代天冬氨酸 (D1241E) 以及在位置 2238 使用缬氨酸取代甲硫氨酸 (M2238V)。命名氨基酸取代使用的编码系统基于本申请中的 SEQ ID NO:2。

[0063] 用于比较核苷酸和氨基酸序列的比对方法是本领域所熟知的。本发明的比对可以使用适宜方法检测，包括使用 Smith 和 Waterman, Adv. Appl. Math 2:482 (1981)，的局部同源性算法 (BESTFIT)，其可以进行用于比较的序列最佳比对；使用 Needleman and Wimsch, J. Mol. Biol. 48:443-53 (1970) 的同源性比对算法 (GAP)；或者使用 Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988) 的用于相似性方法 (Tfasta 和 Fasta) 的研究。可以使用这些算法的计算机化执行进行这些算法，包括但不限于：在 Intelligenetics, Mountain View, California PC/基因程序中的 CLUSTAL，在 Wisconsin 遗传学软件包，第 8 版（来自 Genetics Computer Group (GCG®) programs (Accelrys, Inc., San Diego, CA)）中的 GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA 和 TFASTA。CLUSTAL 程序由 Higgins and Sharp, Gene 73:237-44 (1988)；Higgins and Sharp, CABIOS

5:151-3(1989);Corpet et al,Nucleic Acids Res.16:10881-90(1988);Huang et al,Computer Applications in the Biosciences 8:155-65(1992) 以及 Pearson 等,Meth,Mol.Biol.24:307-31(1994) 很好地进行了描述。用于多重序列最佳全局比对的一个程序是 PileUp(Feng and Doolittle,J.Mol.Evol.,25:351-60(1987)),其与 Higgins and Sharp,CABIOS 5:151-53(1989) 描述的方法类似。可以使用 BLAST 程序集合进行数据库相似性检索,如用于鉴定其他适宜的 FVIII 分子。参见 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,第 19 章,Ausubel 等,eds.,Greene Publishing and Wiley-Interscience,New York(1995)。

[0064] 如上文所讨论的,据信 FVIII 的 B- 结构域对于活性是可有可无的。在某些实施方式中,本发明中使用的 FVIII 可以具有全部或一些 B- 结构域缺失。相应地,本发明应用 FVIII 变体或编码此类变体的核苷酸序列,其包含与全长 FVIII(SEQ ID NO:1) 的氨基酸 1-740 具有至少约 70、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%同源性和与全长 FVIII(SEQ ID NO:1) 的氨基酸 1689-2351 具有至少约 70、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%同源性的氨基酸序列或编码氨基酸序列的序列。或者,本发明应用 FVIII 变体或编码此类变体的核苷酸序列,其包含与全长 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列具有至少约 70、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%同源性的氨基酸序列或编码该氨基酸序列的序列。

[0065] 在本发明的某些实施方式中,FVIII 可以是位点定向突变获得的,如在 FVIII 上形成结合位点以共价结合生物相容性聚合物如 PEG。可以采用本领域公知的任意方法进行编码具有 FVIII 活性的多肽的核苷酸序列的位点定向突变。方法包括诱变以便在选择用于共价结合聚合物的位点引入半胱氨酸密码子。其可以使用市售位点定向诱变试剂盒进行,如 STRATAGENE CQUICKCHANGE II 位点定向诱变试剂盒、CLONETECH TRANSFORMER 位点定向诱变试剂盒,编号 K1600-1、INVITROGEN GENTAYLOR 位点定向诱变系统,编号 12397014、PROMEGA ALTERED SITES II 体外诱变系统试剂盒,编号 Q6210 或 TAKARA MIRUS BIO LA PGR 诱变试剂盒,编号 TAK RR016。本申请所述的缀合物可以通过首先使用半胱氨酸密码子取代功能性 FVIII 多肽表面上一个或多个氨基酸的密码子,在重组表达系统中生产半胱氨酸突变体,将所述突变体与半胱氨酸特异性聚合物试剂反应和纯化所述突变体制备。在该系统中,可以通过聚合物上的马来酰亚胺活性官能团实现在半胱氨酸位点上加入聚合物。参见例如美国专利 7,632,921(Pan 等)。

[0066] 所使用的巯基反应性聚合物的量应至少与欲衍生化的半胱氨酸的摩尔量是等摩尔的并且可以过量存在。可以使用 5 倍或 10 倍摩尔过量的巯基反应性聚合物。用于共价结合的其他条件是本领域技术人员公知的。

[0067] 用于与聚合物例如 PEG 共价结合的预先确定的位点可以选自 rFVIII 或 BDD rFVIII 多肽表面上暴露的位点,其不涉及 FVIII 的活性或不涉及在体内稳定 FVIII 的其他机制,如与 vWF 结合。此类位点还最好选自己知涉及将 FVIII 灭活或从循环中清除的机制的那些位点。以半胱氨酸取代氨基酸的位点包括 (a) 低密度脂蛋白受体相关蛋白、(b) 肝素硫酸蛋白聚糖、(c) 低密度脂蛋白受体和 / 或 (d) FVIII 抑制抗体结合位点上或临近其结

合位点的氨基酸残基。“结合位点上或临近其结合位点”指足够接近结合位点,以使得生物相容性聚合物与该位点的共价结合能够造成结合位点的空间位阻。例如,此类位点预计在结合位点的20 Å以内。

[0068] 生物相容性聚合物可以在 FVIII 氨基酸位置 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 中的一个或多个与 rFVIII 或 BDD rFVIII 多肽,或其突变体共价结合。在功能性 FVIII 多肽上的一个或多个位置如一个或两个可以是预先定义的用于与聚合物结合的位点。在特定的实施方式中,所述聚合物是单 PEG 化的或双 PEG 化的,指一个或两个 PEG 分子分别与各 FVIII 连接。

[0069] FVIII 突变体的位点定向 PEG 化还可以经由下述实现:(a) 表达位点定向 FVIII 突变体,其中所述突变体针对 FVIII 突变体暴露表面上的氨基酸残基具有半胱氨酸取代并且该半胱氨酸是封端的;(b) 在温和还原半胱氨酸突变体并释放封端的条件下将所述半胱氨酸突变体与还原剂接触;(c) 从半胱氨酸突变体中除去封端和还原剂;和(d) 在除去还原剂后,在一定条件下使用包含巯基偶联部分的 PEG 处理半胱氨酸突变体以产生 PEG 化的 FVIII 突变体。PEG 的巯基偶联部分选自下组:硫醇、三氟甲磺酸酯、三氟乙磺酸酯、氮丙啶、环氧乙烷、S-吡啶基或马来酰亚胺部分,并且可以是马来酰亚胺。

[0070] 在另一个实施方式中,通过使用胺特异性官能团功能化的聚合物将生物相容性聚合物如 PEG 共价连接。可以使用例如 mPEG 三氟乙磺酸酯或 mPEG 琥珀酰亚胺琥珀酸酯将所述聚合物功能化,以使得在 FVIII 上的赖氨酸具有反应性。通过将固体状态活化的 mPEG 加入 FVIII 溶液中并将室温下回流,可以使偶联出现在 FVIII 的随机的赖氨酸上。可以通过使用过量水平活化的 mPEG 松散地控制修饰程度。Rostin 等,“B-Domain Deleted Recombinant Coagulation Factor VIII Modified with Monomethoxy Polyethylene Glycol,”11Bioconj. Chem., 2000, pp. 387-396。PEG 化的条件和试剂进一步的示例参见美国专利 7,199,223 (Bossard) 和美国专利 4,970,300 (Fulton)。本发明还涉及将生物相容性聚合物与 FVIII 共价结合的方法,其中本发明的液体制剂之一是反应发生的溶液。

[0071] 本发明还提供了用于在患者中治疗甲型血友病的方法,所述方法包括向需要其的患者施用治疗有效量的一种或多种本发明所述的制剂。这些制剂可以经由静脉内注射、皮下注射或通过连续输注给予患者。

[0072] 如在本申请中所使用的,术语 rFVIII 制剂或 PEG 化的 rFVIII 制剂的“治疗有效量”指在施用方案中向需要其的患者提供治疗效应的制剂的量。例如,用于甲型血友病,重组全长 FVIII 静脉内注射的推荐量为 10-30IU/kg 体重。用于预防儿童甲型血友病,重组全长 FVIII 静脉内注射的推荐量为 25IU/kg 体重。手术前,用于儿童甲型血友病的重组全长 FVIII 静脉内注射的推荐量为 15-30IU/kg (小手术) 或 50IU/kg (大手术)。针对本发明制剂中使用的不同 FVIII 分子,本领域技术人员能够确定其相应剂量。优选地,本发明的治疗性 FVIII 制剂以 100、250、300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3200、3400、3600、3800、4000 或 5000IU 的单一使用剂量提供,或这些剂量中任意两个之间的范围,即在从 100 至 250IU、从 100 至 500IU、从 1000 至 2000IU 等的范围中,包括端点。因为其具有较低年度,本发明公开的 rFVIII 和 PEG-rFVIII 制剂可以方便地通过例如超滤和无菌过滤处理并且通过注射给予患者,包括静脉内注射、

皮下注射和连续输注。

[0073] 在本申请中描述的 FVIII 组合物可以冻干并且重构成所示浓度。还可以将这些 FVIII 组合物重构成更加稀释的形式。例如,冻干和 / 或正常重构成 2ml 溶液的根据本发明的配制品还可以以更大的稀释体积重构,如 5ml。当将 FVIII 配制品立即向患者注射时,这是特别适宜的,因为在这种情况下 FVIII 基本不可能失去活性,在更稀的 FVIII 溶液中其可能起效更加迅速。

[0074] 实施方式 1

[0075] 重组 FVIII 在缺乏稳定血浆来源的 FVIII 的血浆蛋白如 von Willebrand 因子 (vWF) 的条件下生产。缺乏此类稳定蛋白使得 rFVIII 极不稳定。此外,rFVIII 在治疗性溶液中以非常低的浓度存在 (对于治疗性剂量 1000IU BDD-SQ 而言,为 0.02mg 蛋白每 ml),这使得表面吸附导致活性丧失。

[0076] 本发明的一个实施方式是 rFVIII、特别是 BDD-rFVIII 和甚至更特别的是在结构域之间如 A1 和 A2 或 A3 结构域之间具有交联的 BDD-rFVIII 突变体的制剂。在一个实施方式中,所述制剂是具有双半胱氨酸突变的 FVIII 的制剂,其交联 A2 和 A1 或 A3 结构域,优选地 A2 和 A3 结构域,如通过 Griffin 等的美国专利 7,928,199 (2011 年 4 月 19 日公布) 中描述的二硫键桥,包括不限于 FVIII 的突变,包括 BDD-SQ (SEQ ID NO:3) 的突变,其中在一个或多个位点引入一个或多个半胱氨酸;以使得至少一对半胱氨酸形成在野生型 FVIII 中不存在的二硫键。在一个实施方式中,所述突变的 FVIII 包含至少一对重组引入的半胱氨酸,其中该半胱氨酸对取代一对选自下组的残基:Met 662 和 Asp 1828、Ser 268 和 Phe 673、Phe 312 和 Pro 672、Ser 313 和 Ala 644、Met 662 和 Lys 1827、Tyr 664 和 Thr 1826、Pro 264 和 Gln 645、Arg 282 和 Thr 522、Ser 285 和 Phe 673、His 311 和 Phe 673、Ser 314 和 Ala 644、Ser 314 和 Gln 645、Val 663 和 Glu 1829、Asn 694 和 Pro 1980 以及 Ser 695 和 Glu 1844。用于本实施方式制剂的适宜 FVIII 分子存在在溶液中聚集和 / 或显示出较高沉淀倾向的缺点。这些缺点形成了制备稳定的治疗性剂型存在的问题。而且,如果对 FVIII 分子进行进一步处理,如与生物相容性聚合物如 PEG 共价结合,则优选在溶液中的 FVIII 以提供良好的处理性能,如好的 PEG 化收率,这要求 FVIII 在混悬液或溶液中并且不产生聚集。在一个实施方式中,本申请的 FVIII 制剂含有其量足以减少或消除沉淀和 / 或聚集并且提供稳定性的氯化钠或氯化钾。

[0077] 实施方式 1 的制剂可以如下所示。rFVIII 制剂包含:

[0078] (a) 范围从约 0mM 至约 20mM、从约 1mM 至约 20mM、从约 1mM 至约 50mM、从约 10mM 至约 50mM、从约 10mM 至约 20mM、从约 10mM 至约 30mM 或者从约 20mM 至约 50mM 的组氨酸;

[0079] (b) 范围从约 0mM 至约 29mM、从约 1mM 至约 29mM、从约 1mM 至约 300mM、从约 10mM 至约 30mM、从约 10mM 至约 100mM、从约 10mM 至约 200mM、从约 10mM 至约 50mM、从约 29mM 至约 58mM、从约 34mM 至约 58mM、从约 58mM 至约 100mM 或从约 100mM 至约 300mM,或者其量为约 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100、200 或约 300mM 的糖或糖醇;

[0080] (c) 范围从约 1mM 至约 2mM、从约 1mM 至约 2.5mM、从约 1.5mM 至约 3.5mM 或者从约 1mM 至约 5mM 的二价阳离子如二价钙盐,包括氯化钙;

[0081] (d) 范围从约 150mM 至约 250mM、从约 150mM 至约 220mM、从约 150mM 至约 250mM、

从约 150mM 至约 220mM、从约 150mM 至约 200mM、从约 150mM 至约 190mM、从约 170mM 至约 250mM、从约 200mM 至约 220mM、从约 170mM 至约 250mM、从约 200mM 至约 220mM、从约 170mM 至约 200mM、从约 200mM 至约 250mM、从约 170mM 至约 220mM、从约 190mM 至约 220mM、从约 210mM 至约 220mM、从约 150mM 至约 180mM、从约 150mM 至约 160mM 或者从约 220mM 至约 250mM 的氯化钠或氯化钾；

[0082] (e) 范围从约 20ppm 至约 200ppm、从约 20ppm 至约 50ppm、从约 20ppm 至约 80ppm、从约 50ppm 至约 80ppm、从约 80ppm 至约 100ppm、从约 80ppm 至约 200ppm、从约 50ppm 至约 100ppm 或者从约 50ppm 至约 200ppm 的非离子表面活性剂，或者约 60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、160、170、180、190、200 或 210ppm 的非离子表面活性剂；

[0083] (f) 范围从约 0mM 至约 50mM、从约 1mM 至约 50mM、从约 50mM 至约 100mM、从约 100mM 至约 150mM、从约 150mM 至约 293mM、从约 150mM 至约 400mM、从约 200mM 至约 300mM、从约 250mM 至约 300mM 或从约 200mM 至约 400mM 的甘氨酸；或者约 100、200、210、230、240、250、260、270、280、290、293、295、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390 或约 400mM 的甘氨酸；以及

[0084] (g) 范围从约 100IU/ml 至约 5000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 2000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 4000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 1200IU/ml、从约 250IU/ml 至约 5000IU/ml、从约 250IU/ml 至约 1000IU/ml、从约 250IU/ml 至约 2000IU/ml、从约 250IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 500IU/ml 至约 1000IU/ml、从约 500IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 1000IU/ml 至约 2000IU/ml、从约 1000IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 1000IU/ml 至约 4000IU/ml 或从约 1000IU/ml 至约 5000IU/ml，或者约 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3200、3500、3800、4000、4200、4500、4800、5000、5500 或 6000IU/ml 的 rFVIII，其选自 rFVIII、BDD-rFVIII、BDD-rFVIII 突变体和 FVIII 结构域之间具有交联的 BDD-rFVIII 突变体，其中 rFVIII 制剂具有范围从约 pH 6.0 至约 pH 6.5、从约 pH 6.0 至约 pH 7.0、从约 pH 6.0 至约 pH 7.5、从约 pH 6.5 至约 pH 7.5 或从约 pH 7.0 至约 pH 7.5 的 pH，或者约 pH 6.0、6.5、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4 或约 pH 7.5 的 pH。

[0085] 在实施方式 1 的另一个版本中，本发明涉及包含下述的 rFVIII 制剂：

[0086] (a) 范围从约 0mM 至约 20mM、从约 1mM 至约 20mM、从约 10mM 至约 50mM 或者从约 10mM 至约 30mM 的组氨酸；

[0087] (b) 范围从约 1mM 至约 29mM、从约 10mM 至约 30mM、从约 10mM 至约 100mM、从约 10mM 至约 200mM、从约 10mM 至约 50mM、从约 29mM 至约 58mM 或从约 34mM 至约 58mM，或者其量为约 25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40mM 的糖或糖醇；

[0088] (c) 范围从约 1mM 至约 2mM、从约 1mM 至约 2.5mM、从约 1.5mM 至约 3.5mM 或者从约 1mM 至约 5mM 的二价阳离子如二价钙盐，包括氯化钙；

[0089] (d) 范围从约 150mM 至约 200mM、从约 150mM 至约 220mM、从约 170mM 至约 250mM 的氯化钠或氯化钾；

[0090] (e) 范围从约 20ppm 至约 80ppm、从约 80ppm 至约 100ppm、从约 50ppm 至约 100ppm 或从约 50ppm 至约 200ppm 的非离子表面活性剂，或者约 70、75、80、85、90、95、100、105、110、

115 或 120ppm 的非离子表面活性剂；

[0091] (f) 范围从约 1mM 至约 50mM、从约 150mM 至约 300mM、从约 150mM 至约 400mM、从约 200mM 至约 300mM 或从约 250mM 至约 300mM，或者约 250、260、270、280、290、293、295、300、310 或约 320mM 的甘氨酸；以及

[0092] (g) 范围从约 100IU/ml 至约 5000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 2000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 4000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 1200IU/ml、从约 250IU/ml 至约 5000IU/ml、从约 250IU/ml 至约 1000IU/ml、从约 250IU/ml 至约 2000IU/ml、从约 250IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 500IU/ml 至约 1000IU/ml、从约 500IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 1000IU/ml 至约 2000IU/ml、从约 1000IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 1000IU/ml 至约 4000IU/ml 或从约 1000IU/ml 至约 5000IU/ml，或者约 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3200、3500、3800、4000、4200、4500、4800、5000、5500 或 6000IU/ml 的 rFVIII，其选自 rFVIII、BDD-rFVIII、BDD-rFVIII 突变体和和在 FVIII 结构域之间具有交联的 BDD-rFVIII 突变体，其中 rFVIII 制剂具有范围从约 pH 6.0 至约 pH 7.5、从约 pH 6.5 至约 pH 7.5 或从约 pH 7.0 至约 pH 7.5 的 pH，或者约 pH 6.0、6.5、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4 或约 pH 7.5 的 pH。

[0093] 在某些实施方式中，所述的糖或糖醇是蔗糖并且存在氯化钠。

[0094] 在实施方式 1 的另一个版本中，本发明涉及包含下述的 rFVIII 制剂：

[0095] (a) 范围从约 10mM 至约 30mM 的组氨酸；

[0096] (b) 范围从约 10mM 至约 30mM、从约 10mM 至约 100mM、从约 10mM 至约 200mM、从约 10mM 至约 50mM、从约 29mM 至约 58mM 或从约 34mM 至约 58mM 的糖或糖醇；

[0097] (c) 范围从约 1mM 至约 2mM、从约 1mM 至约 2.5mM、从约 1.5mM 至约 3.5mM 或从约 1mM 至约 5mM 的二价钙盐，包括氯化钙；

[0098] (d) 范围从约 150mM 至约 220mM、范围从约 170mM 至约 250mM 的氯化钠或氯化钾；

[0099] (e) 范围从约 50ppm 至约 200ppm 的非离子表面活性剂；

[0100] (f) 范围从约 1mM 至约 50mM、从约 150mM 至约 300mM、从约 150mM 至约 400mM、从约 200mM 至约 300mM；或约 250mM 至约 300mM 的甘氨酸；以及

[0101] (g) 范围从约 100IU/ml 至约 5000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 2000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 4000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 1200IU/ml、从约 250IU/ml 至约 5000IU/ml、从约 250IU/ml 至约 1000IU/ml、从约 250IU/ml 至约 2000IU/ml、从约 250IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 500IU/ml 至约 1000IU/ml、从约 500IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 1000IU/ml 至约 2000IU/ml、从约 1000IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 1000IU/ml 至约 4000IU/ml 或从约 1000IU/ml 至约 5000IU/ml，或者约 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3200、3500、3800、4000、4200、4500、4800、5000、5500 或 6000IU/ml 的 rFVIII，其选自 rFVIII、BDD-rFVIII、BDD-rFVIII 突变体和和在 FVIII 结构域之间具有交联的 BDD-rFVIII 突变体，其中 rFVIII 制剂具有范围从约 pH 6.0 至约 pH 7.5、从约 pH 6.5 至约 pH 7.5 或从约 pH 7.0 至约 pH 7.5 的 pH，或者约 pH 6.0、6.5、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4 或约 pH 7.5 的 pH。

[0102] 在实施方式 1 的又一个版本中，本发明涉及包含下述的 rFVIII 制剂：

[0103] (a) 范围从约 10mM 至约 30mM 的组氨酸；

- [0104] (b) 范围从约 10mM 至约 50mM 的蔗糖；
- [0105] (c) 范围从约 1.5mM 至约 3.5mM 的氯化钙；
- [0106] (d) 范围从约 150mM 至约 200mM 或从约 170mM 至约 220mM 的氯化钠；
- [0107] (e) 范围从约 70ppm 至约 90ppm 的非离子表面活性剂；
- [0108] (f) 范围从约 200mM 至约 300mM 或从约 250mM 至约 300mM 的甘氨酸；以及
- [0109] (g) 范围从约 100IU/ml 至约 2000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 250IU/ml 至约 1000IU/ml、从约 250IU/ml 至约 2000IU/ml、从约 250IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 500IU/ml 至约 1000IU/ml、从约 500IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 1000IU/ml 至约 2000IU/ml 或从约 1000IU/ml 至约 3000IU/ml 的 rFVIII，其选自 BDD-rFVIII、BDD-rFVIII 突变体和和在 FVIII 结构域之间具有交联的 BDD-rFVIII 突变体，其中 rFVIII 制剂具有范围从约 pH 6.0 至约 pH 7.5、从约 pH 6.5 至约 pH 7.5 或从约 pH 7.0 至约 pH 7.5 的 pH，或者约 pH 6.0、6.5、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4 或约 pH 7.5 的 pH。

[0110] 实施方式 1 中的 rFVIII 制剂可以任选地含有白蛋白，如 HSA。在某些实施方式中，HSA 以范围从约 10 至约 50mg/mL、从约 15 至约 30mg/mL、从约 20 至约 30mg/mL 或者从约 25 至约 30mg/mL 的范围存在。

[0111] 实施方式 2

[0112] 在将生物相容性聚合物共价地加入 FVIII 的过程中，观察到缓冲液组分可能干扰该共价加入。例如，当使用功能化以具有能够加入赖氨酸残基的胺基反应性基团的 PEG 将 FVIII 与 PEG 共价缀合时，观察到在反应缓冲液中含有胺基的组分干扰反应。因此，本发明包括改进的液体 FVIII 制剂或缓冲液，聚合物可以在其中与 FVIII 发生加成反应。在实施方式 2 的一个版本中，所述液体 FVIII 制剂除了 FVIII 以外不包含，或者包含以重量计少于 10%、或以重量计少于 5%、或以重量计少于 1%、或以重量计少于 0.5% 或者仅微量的具有伯胺或仲胺基团的组分。本实施方式的本发明 FVIII 制剂包括避免使用组氨酸和甘氨酸的制剂。组氨酸和甘氨酸含有可能干扰 PEG 化过程的胺基。

[0113] 本发明实施方式 2 的一个版本是在 pH 6-7 下具有缓冲能力的 rFVIII 制剂，其不形成不溶性复合物或与氯化钙（一种重要的 rFVIII 稳定剂）螯合并且不含具有伯胺或仲胺基团的组分，或含有重量百分率 10% 或更低、5% 或更低、1% 或更低或微量的此类组分。该制剂可以包括范围从 10mM 至 100mM、范围从 10mM 至 70mM、范围从 10mM 至 50mM、范围从 10mM 至 40mM、范围从 10mM 至 30mM、范围从 12mM 至 30mM、范围从 14mM 至 30mM、范围从 16mM 至 30mM、范围从 18mM 至 30mM、范围从 20mM 至 28mM、范围从 12mM 至 28mM、范围从 12mM 至 26mM、范围从 12mM 至 24mM、范围从 12mM 至 22mM、范围从 14mM 至 22mM 或范围从 18mM 至 22mM 的 MOPS，或者可以含有约 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30mM MOPS。该制剂包括范围从约 100IU/ml 至约 1000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 500IU/ml、从约 100IU/ml 至约 2000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 500IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 500IU/ml 至约 2000IU/ml、从约 500IU/ml 至约 2500IU/ml、从约 500IU/ml 至约 1200IU/ml、从约 500IU/ml 至约 1000IU/ml、从约 500IU/ml 至约 1500IU/ml、从约 1000IU/ml 至约 2000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 1000IU/ml 至约 2500IU/ml、从约 1000IU/ml 至约 1500IU/ml、从约 1000IU/ml 至约 6000IU/ml 或从约 1000IU/ml 至约 5000IU/ml 的 rFVIII，或者约 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、

1600、1800、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3200、3500、3800、4000、4200、4500、4800、5000、5500 或 6000IU/ml 的 rFVIII。本发明可以使用具有活性高于 6000IU/ml 的 rFVIII 制剂也是可能的。

[0114] 在实施方式 2 的一个版本中,所述 rFVIII 制剂包含重组生产的 FVIII 或 BDD。在实施方式 2 的另一个版本中,所述制剂包含重组生产的全长 FVIII,如包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1 或其等位基因变体的 FVIII。在实施方式 2 的另一个版本中,所述制剂包含 BDD 的突变体或 FL-FVIII 的突变体。

[0115] 该制剂还可以包括糖或糖醇如蔗糖,以重量计其范围从 0.5% 至 10%、范围从 0.6% 至 10%、范围从 0.7% 至 10%、范围从 0.8% 至 10%、范围从 0.9% 至 10%、范围从 1.0% 至 10%、范围从 0.6% 至 5%、范围从 0.6% 至 2.5%、范围从 0.6% 至 2.0%、范围从 0.6% 至 1.5%、范围从 0.6% 至 1.2%、范围从 0.8% 至 1.2%、范围从 0.9% 至 1.2% 或范围从 0.9% 至 1.1%,或者以重量计约 0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9 或 2.0%。该制剂还包括二价离子如钙盐,如氯化钙,其范围从 0.5mM 至 20mM、范围从 1mM 至 10mM、范围从 1mM 至 5mM、范围从 1.5mM 至 5mM、范围从 2mM 至 5mM、范围从 2.5mM 至 5mM、范围从 3mM 至 5mM、范围从 3.5mM 至 5mM、范围从 4mM 至 5mM、范围从 1.5mM 至 4.5mM、范围从 1.5mM 至 4mM、范围从 1.5mM 至 3.5mM、范围从 1.5mM 至 3mM、范围从 1.5mM、至 2.5mM、范围从 2mM 至 3mM、范围从 2.2mM 至 2.8mM 或范围从 2.4mM 至 2.6mM。该制剂还可以包括氯化钠或氯化钾,其范围从 10mM 至 100mM、范围从 10mM 至 70mM、范围从 10mM 至 50mM、范围从 15mM 至 50mM、范围从 20mM 至 50mM、范围从 25mM 至 50mM、范围从 30mM 至 50mM、范围从 15mM 至 45mM、范围从 15mM 至 40mM、范围从 15mM 至 35mM、范围从 20mM 至 45mM、范围从 20mM 至 40mM、范围从 25mM 至 40mM、范围从 25mM 至 35mM、范围从 25mM 至 30mM 或范围从 30mM 至 35mM。该制剂还可以包括非离子表面活性剂如聚山梨醇酯 20 或聚山梨醇酯 80,其范围从 50 至 150ppm、范围从 60ppm 至 150ppm、范围从 70ppm 至 150ppm、范围从 80ppm 至 150ppm、范围从 60ppm 至 140ppm、范围从 60ppm 至 130ppm、范围从 60ppm 至 120ppm、范围从 60ppm 至 110ppm、范围从 60ppm 至 100ppm、范围从 60ppm 至 90ppm、范围从 70ppm 至 90ppm、范围从 70ppm 至 80ppm 和范围从 80ppm 至 90ppm。该组合物为在溶液中的 rFVIII 提供了可接受的稳定性并且可以作为在使用功能化以使其在胺基残基具有活性的聚合物将聚合物与 FVIII 缀合过程中的反应缓冲液。

[0116] 在实施方式 2 的一个版本中,本发明涉及包含下述的 rFVIII 制剂:

[0117] (a) 范围从 12mM 至 28mM、范围从 12mM 至 22mM 或范围从 18mM 至 22mM 的 MOPS;

[0118] (b) 范围从 100IU/ml 至 3000IU/ml 或范围从 1000-1500IU/ml 的 FVIII;

[0119] (c) 范围从 0.5% 至 5%、范围从 0.6% 至 2.5% 或范围从 0.9% 至 1.1% 的蔗糖;

[0120] (d) 范围从 10mM 至 50mM、范围从 15mM 至 35mM 或范围从 25mM 至 35mM 的氯化钠或氯化钾;

[0121] (e) 范围从 1mM 至 5mM、范围从 1.5mM 至 3.5mM 或范围从 2.4mM 至 2.6mM 的二价钙盐,如氯化钙;以及

[0122] (f) 范围从 60ppm 至 100ppm 或范围从 70ppm 至 90ppm 的非离子表面活性剂如聚山梨醇酯 20 或聚山梨醇酯 80;

[0123] 其中所述 rFVIII 制剂含有低于 10%、低于 5%、低于 1%、低于 0.5% 或低于微量,

或者基本上不含具有伯胺或仲胺基团的组分。

[0124] 本发明还涉及一种将胺基反应性生物相容性聚合物如胺基反应性 PEG 与 FVIII 缀合的方法,所述方法包括将 FVIII 混悬或溶解在实施方式 2 的 rFVIII 制剂中,加入胺基反应性聚合物并且将所得到的混合物在一定时间和温度的条件下孵育,以使得发生缀合。此类条件优选地为约室温。所述聚合物可以以过量于 FVIII 的摩尔量(过量 1-100 倍)加入。可以通过在回流和搅拌条件下共同孵育若干小时将聚合物与 FVIII 缀合。

[0125] 尽管在涉及胺基反应性官能团的聚合物加成过程中已显示出上述实施方式 2 的制剂可以作为反应缓冲液,但是可以想到的是该制剂还可以用于此类反应以外的其他背景下,因此当需要稳定的 FVIII 制剂时,可以使用该制剂。

[0126] 实施方式 3

[0127] 在实施方式 3 中,所述 rFVIII 制剂包含 NaCl、MOPS、二价钙离子或另一种二价阳离子,以及任选地非离子表面活性剂和/或任选地糖或糖醇。特别地,实施方式 3 的制剂显示出提供了无 FVIII 分子聚集的贮存,所述 FVIII 分子未与生物相容性聚合物缀合,如 FVIII 未与 PEG 共价结合和未与野生型 FVIII 中存在的聚糖以外的其他聚合物共价结合。实施方式 3 的制剂特别适于非 PEG 化的 BDD。如在本申请中所使用的,“未缀合的 FVIII”指未与同由其中生产 FVIII 的宿主细胞产生的天然哺乳动物糖基化类型相关的聚糖以外的聚合物缀合的 FVIII。例如,“未缀合的 FVIII”包括在哺乳动物宿主细胞如 BHK 细胞或 CHO 细胞中重组生产的野生型人 FVIII,如市售产品 **KOGENATE®** 和 **RECOMBINATE®** FVIII。

[0128] 本申请所述的实施方式 3 的一个版本的组合物是提供 FVIII 稳定性的组合物并且含有氯化钠,其范围从 150mM 至 300mM、从 150mM 至 275mM、从 150mM 至 250mM、从 150mM 至 225mM、从 150mM 至 200mM、从 150mM 至 175mM、从 175mM 至 300mM、从 175mM 至 275mM、从 175mM 至 250mM、从 175mM 至 225mM、从 175mM 至 200mM、从 175mM 至 190mM;from 200mM 至 300mM、从 200mM 至 275mM、从 200mM 至 250mM、从 200mM 至 225mM、从 200mM 至 210mM、从 250mM 至 300mM;或约 150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290 或 300mM。所述组合物还包括 MOPS 缓冲液,其范围从 10mM 至 100mM、范围从 10mM 至 60mM、范围从 10mM 至 50mM、范围从 10mM 至 40mM、范围从 10mM 至 30mM、范围从 12mM 至 30mM、范围从 14mM 至 30mM、范围从 16mM 至 30mM、范围从 18mM 至 30mM、范围从 12mM 至 28mM、范围从 12mM 至 26mM、范围从 12mM 至 24mM、范围从 16mM 至 24mM、范围从 18mM 至 24mM、范围从 20mM 至 24mM 或者范围从 18mM 至 22mM。所述组合物还包括二价阳离子如氯化钙,其范围从 1mM 至 20mM、范围从 5mM 至 10mM、范围从 1mM 至 30mM、范围从 6mM 至 30mM、范围从 7mM 至 30mM、范围从 8mM 至 30mM、范围从 5mM 至 20mM、范围从 5mM 至 25mM 或范围从 9mM 至 12mM。在实施方式 3 的制剂中存在的 rFVIII 的量可以与在实施方式 1 中提供的量是相同的。

[0129] 所述组合物还可以包括糖或糖醇如蔗糖,其范围从 0.5%至 10%、范围从 0.6%至 10%、范围从 0.7%至 10%、范围从 0.8%至 10%、范围从 0.9%至 10%、范围从 1.0%至 10%、范围从 0.5%至 5%、范围从 0.6%至 5%、范围从 0.7%至 5%、范围从 0.8%至 5%、范围从 0.9%至 5%、范围从 1.0%至 5%、范围从 0.5%至 2.5%、范围从 0.6%至 2.5%、范围从 0.5%至 2.0%、范围从 0.5%至 1.5%、范围从 0.6%至 1.2%、范围从 0.8%至 1.2%、范围从 0.9%至 1.2%或范围从 0.9%至 1.1%。所述组合物还可以包括非离子表面活性剂如聚山梨醇酯 80,其范围从 20ppm 至 250ppm、范围从 50ppm 至 250ppm、范围从 50ppm 至

150ppm、范围从 60ppm 至 150ppm、范围从 70ppm 至 150ppm、范围从 80ppm 至 150ppm、范围从 60ppm 至 140ppm、范围从 60ppm 至 130ppm、范围从 60ppm 至 120ppm、范围从 60ppm 至 110ppm、范围从 60ppm 至 100ppm、范围从 70ppm 至 110ppm、范围从 70ppm 至 105ppm、范围从 70ppm 至 100ppm、范围从 80ppm 至 100ppm 或范围从 90ppm 至 110ppm。

[0130] 在实施方式 3 的某些版本中,所述 FVIII 制剂是无组氨酸和 / 或 (4-(2- 羟乙基)-1- 哌嗪乙磺酸) (“HEPES”) 和 / 或白蛋白,或含有以重量计少于 0.1%、少于 0.5%、少于 0.8%、少于 1.0% 或少于 5.0% 的组氨酸、和 / 或 HEPES、和 / 或白蛋白。实施方式 3 的一个版本是基本上不含组氨酸、HEPES 和白蛋白的 FVIII 制剂。

[0131] 实施方式 4

[0132] 聚合物缀合的 FVIII 如 PEG 化的 FVIII 与相应的未缀合 FVIII 相比可以具有更高的亲水性。因此,缀合的 FVIII 如 PEG 化的 FVIII 的制剂与那些经鉴定的未缀合的 FVIII 相比可能需要不同的组分。申请人在含有水平升高的 NaCl (200mM) 的缓冲液中制备了 PEG 化的 FVIII。观察到此类升高的氯化钠水平在冻干过程中会造成困难。申请人发现针对聚合物缀合的 FVIII 的本发明组合物避免了不利的高水平 NaCl、避免了形成聚集体和当在室温下贮存 6 天以上时基本上保持了 FVIII 的效能。本申请人提供了预料外的结果,可以将氯化钠的浓度由 200mM 降至 50mM,其在室温下贮存后仍能达到 rFVIII 的效价。在实施方式 4 中,所述 rFVIII 制剂包含缓冲剂如组氨酸或 MOPS、NaCl、二价钙离子或另一种二价阳离子,以及任选地非离子表面活性剂和 / 或任选地糖或糖醇。实施方式 4 的制剂特别地显示了未出现与生物相容性聚合物缀合的 FVIII 分子聚集的贮存,特别是亲水性生物相容性聚合物如 PEG。如在本申请中所使用的,“缀合的 FVIII”指未与同由其中生产 FVIII 的宿主细胞产生的天然哺乳动物糖基化类型相关的聚糖以外的聚合物缀合的 FVIII。

[0133] 本申请所述的实施方式 4 的一个版本是含有氯化钠的 rFVIII 组合物,其范围从 25mM 至 200mM、范围从 25mM 至 175mM、范围从 25mM 至 150mM、范围从 25mM 至 125mM、范围从 25mM 至 100mM、范围从 25mM 至 75mM、范围从 25mM 至 50mM、范围从 40mM 至 55mM、范围从 25mM 至 35mM、范围从 25mM 至 30mM、范围从 30mM 至 60mM、范围从 50mM 至 200mM、范围从 50mM 至 175mM、范围从 50mM 至 150mM、范围从 50mM 至 125mM、范围从 50mM 至 100mM,或者范围从 50mM 至 75mM。如果将所述制剂冻干,则上述提供的那些较低水平的 NaCl 是优选的。在实施方式 4 的制剂中存在的 rFVIII 的量可以与在实施方式 1 中提供的量是相同的。

[0134] 所述组合物还包括缓冲剂如组氨酸或 MOPS 缓冲剂,其范围从 10mM 至 100mM、范围从 10mM 至 60mM、范围从 10mM 至 50mM、范围从 10mM 至 40mM、范围从 10mM 至 30mM、范围从 12mM 至 30mM、范围从 14mM 至 30mM、范围从 16mM 至 30mM、范围从 18mM 至 30mM、范围从 12mM 至 28mM、范围从 12mM 至 26mM、范围从 12mM 至 24mM、范围从 16mM 至 24mM、范围从 18mM 至 24mM、范围从 20mM 至 24mM,或者范围从 18mM 至 22mM。所述组合物还包括二价阳离子如氯化钙,其范围从 1mM 至 20mM、范围从 5mM 至 10mM、范围从 1mM 至 30mM、范围从 6mM 至 30mM、范围从 7mM 至 30mM、范围从 8mM 至 30mM、范围从 5mM 至 20mM、范围从 5mM 至 25mM,或者范围从 9mM 至 12mM。

[0135] 所述组合物还可以包括糖或糖醇如蔗糖或海藻糖,其范围从 0.5% 至 10%、范围从 0.6% 至 10%、范围从 0.7% 至 10%、范围从 0.8% 至 10%、范围从 0.9% 至 10%、范围从 1.0% 至 10%、范围从 0.5% 至 5%、范围从 0.6% 至 5%、范围从 0.7% 至 5%、范围从 0.8%

至 5%、范围从 0.9% 至 5%、范围从 1.0% 至 5%、范围从 0.5% 至 2.5%、范围从 0.6% 至 2.5%、范围从 0.5% 至 2.0%、范围从 0.5% 至 1.5%、范围从 0.6% 至 1.2%、范围从 0.8% 至 1.2%、范围从 0.9% 至 1.2%，或者范围从 0.9% 至 1.1%。所述组合物还可以包括非离子表面活性剂如聚山梨醇酯 80，其范围从 20ppm 至 250ppm、范围从 50ppm 至 250ppm、范围从 50ppm 至 150ppm、范围从 60ppm 至 150ppm、范围从 70ppm 至 150ppm、范围从 80ppm 至 150ppm、范围从 60ppm 至 140ppm、范围从 60ppm 至 130ppm、范围从 60ppm 至 120ppm、范围从 60ppm 至 110ppm、范围从 60ppm 至 100ppm、范围从 70ppm 至 110ppm、范围从 70ppm 至 105ppm、范围从 70ppm 至 100ppm、范围从 80ppm 至 100ppm，或者范围从 90ppm 至 110ppm。

[0136] 在实施方式 4 的某些版本中，所述 FVIII 制剂是无组氨酸和 / 或 HEPES 和 / 或白蛋白，或含有以重量计少于 0.1%、少于 0.5%、少于 0.8%、少于 1.0% 或少于 5.0% 的组氨酸、和 / 或 HEPES、和 / 或白蛋白。实施方式 3 的一个版本是基本上不含组氨酸、HEPES 和白蛋白的 FVIII 制剂。

[0137] 实施方式 5

[0138] 本发明还包括适于冻干的 rFVIII 制剂。在该实施方式的某些版本中，所述 FVIII 制剂特别适于缀合的 FVIII、PEG 化的 FVIII、PEG 化的 BDD 或 PEG 化的 BDD 突变体的冻干。该实施方式的 rFVIII 制剂包含：(1) 氯化钠、和 / 或蔗糖、和 / 或海藻糖，(2) 甘氨酸和 / 或蔗糖和 / 或海藻糖；和 (3) 二价阳离子如氯化钙，或任选地含有 (1) 非离子表面活性剂、和 / 或 (2) 组氨酸，和如果存在 NaCl，则任选地还含有糖或糖醇，包括但不限于蔗糖和 / 或海藻糖。

[0139] 本发明包括如下所示的实施方式 5 的制剂。rFVIII 制剂包含：

[0140] (a) 约 0mM，或范围从约 1mM 至约 20mM、1mM 至约 50mM、从约 10mM 至约 50mM、从约 10mM 至约 20mM、从约 10mM 至约 30mM，或者从约 20mM 至约 50mM 组氨酸；

[0141] (b) 范围从 0.5% 至 20%、范围从 1.0% 至 20%、范围从 0.6% 至 10%、范围从 0.7% 至 10%、范围从 0.8% 至 10%、范围从 0.9% 至 10%、范围从 1.0% 至 10%、范围从 0.5% 至 5%、范围从 0.6% 至 5%、范围从 0.7% 至 5%、范围从 0.8% 至 5%、范围从 0.9% 至 5%、范围从 1.0% 至 5%、范围从 0.5% 至 2.5%、范围从 0.6% 至 2.5%、范围从 0.5% 至 2.0%、范围从 0.5% 至 1.5%、范围从 0.6% 至 1.4%、范围从 0.8% 至 1.4%、范围从 0.9% 至 1.2%、范围从 3.0% 至 9.0%、范围从 5.0% 至 9.0%、范围从 6.0% 至 8.0%、范围从 7.0% 至 9.0%，或范围从 0.9% 至 1.1%，或者约 1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%、10.0%、12.0% 或 15.0% 的蔗糖或海藻糖；

[0142] (c) 范围从约 1mM 至约 5mM、从约 1mM 至约 3mM、从约 1.5mM 至约 3.5mM，或者从约 1mM 至约 2.5mM 的二价阳离子如二价钙盐，包括氯化钙；

[0143] (d) 约 0mM，或范围从约 10mM 至约 50mM、从约 10mM 至约 40mM、从约 10mM 至约 35mM、从约 10mM 至约 30mM；从约 10mM 至约 20mM、从约 20mM 至约 50mM、从约 20mM 至约 40mM，或从约 20mM 至约 80mM 的氯化钠；

[0144] (e) 约 0mM，或范围从约 20ppm 至约 50ppm、从约 20ppm 至约 80ppm、从约 50ppm 至约 80ppm、从约 80ppm 至约 100ppm、从约 80ppm 至约 200ppm，或从约 50ppm 至约 100ppm 的非离子表面活性剂，或者约 60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、

140、145、150、160、170、180、190 或 200ppm 的非离子表面活性剂；

[0145] (f) 约 0%，或范围从约 1.0% 至约 5.0%、范围从约 1.0% 至约 4.0%、范围从约 1.0% 至约 3.0%、范围从约 1.0% 至约 2.0%、范围从约 1.0% 至约 1.5%、范围从约 1.0% 至约 1.4%、范围从约 0.5% 至约 5.0%、范围从约 0.5% 至约 4.0%、范围从约 0.5% 至约 3.0%、范围从约 0.5% 至约 2.0%、范围从约 0.5% 至约 1.5% 的甘氨酸，或者约 1.5%、1.8%、2.0%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3.0%、3.3%、3.5% 或 4.0% 的甘氨酸；以及

[0146] (g) 范围从约 100IU/ml 至约 5000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 2000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 4000IU/ml、从约 100IU/ml 至约 1200IU/ml、从约 250IU/ml 至约 5000IU/ml、从约 250IU/ml 至约 1000IU/ml、从约 250IU/ml 至约 2000IU/ml、从约 250IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 500IU/ml 至约 1000IU/ml、从约 500IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 1000IU/ml 至约 2000IU/ml、从约 1000IU/ml 至约 3000IU/ml、从约 1000IU/ml 至约 4000IU/ml，或从约 1000IU/ml 至约 5000IU/ml，或者约 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3200、3500、3800、4000、4200、4500、4600、4800、5000、5500 或 6000IU/ml 的 rFVIII；其中所述 rFVIII 制剂具有范围从约 pH 6.0 至约 pH 6.5、从约 pH 6.0 至约 pH 7.0、从约 pH 6.0 至约 pH 7.5、从约 pH 6.5 至约 pH 7.5 的 pH，或从约 pH 7.0 至约 pH 7.5，或者约 pH 6.0、6.5、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4 或约 pH 7.5 的 pH。

[0147] 在实施方式 5 的一个版本中，所述 rFVIII 制剂包含氯化钠并且含有少于 2.0% 的蔗糖或者蔗糖的范围从 0.5% 至 2.0%，以及含有少于 1.0%、少于 0.5%、少于 0.1% 或无海藻糖。在该版本中，NaCl 可以以范围从约 10mM 至约 50mM、从约 10mM 至约 40mM、从约 10mM 至约 35mM、从约 10mM 至约 30mM；从约 10mM 至约 20mM、从约 20mM 至约 50mM、从约 20mM 至约 40mM 存在，或者含有从约 20mM 至约 80mM 的氯化钠。在实施方式 5 的该版本中，甘氨酸以范围从约 1.0% 至约 5.0%、范围从约 1.0% 至约 4.0%、范围从约 1.0% 至约 3.0%、范围从约 1.0% 至约 2.0%、范围从约 1.0% 至约 1.5%、范围从约 1.0% 至约 1.4%、范围从约 0.5% 至约 5.0%、范围从约 0.5% 至约 4.0%、范围从约 0.5% 至约 3.0%、范围从约 0.5% 至约 2.0%、范围从约 0.5% 至约 1.5% 存在，或者为约 1.5%、1.8%、2.0%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3.0%、3.3%、3.5% 或 4.0%，以及蔗糖以范围从 0.5% 至 5%、范围从 0.6% 至 5%、范围从 0.7% 至 5%、范围从 0.8% 至 5%、范围从 0.9% 至 5%、范围从 1.0% 至 5%、范围从 0.5% 至 2.5%、范围从 0.6% 至 2.5%、范围从 0.5% 至 2.0%、范围从 0.5% 至 1.5%、范围从 0.6% 至 1.4%、范围从 0.8% 至 1.4%、范围从 0.9% 至 1.2%，或范围从 0.9% 至 1.1% 存在，或者蔗糖为约 1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2.0%、3.0%、4.0%。在实施方式 5 的该版本中，组氨酸以范围从约 1mM 至约 20mM、从约 1mM 至约 50mM、从约 10mM 至约 50mM、从约 10mM 至约 20mM、从约 10mM 至约 30mM，或从约 20mM 至约 50mM 存在和非离子表面活性剂如聚山梨醇酯 20 或聚山梨醇酯 80 以范围从约 20ppm 至约 50ppm、从约 20ppm 至约 80ppm、从约 50ppm 至约 80ppm、从约 80ppm 至约 100ppm、从约 80ppm 至约 200ppm 或从约 50ppm 至约 100ppm 的非离子表面活性剂存在，或者约 60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、160、170、180、190 或 200ppm。在实施方式 5 的该版本中，海藻糖以以重

量计低于 1.0%、低于 0.5%、低于 0.1% 存在或不存在。

- [0148] 在实施方式 5 的另一个版本中,氯化钠以以重量计低于 1.0%、低于 0.5%、低于 0.1% 存在或不存在,在这个版本中,蔗糖或海藻糖以范围从 0.5%至 20%、范围从 1.0%至 20%、范围从 0.6%至 10%、范围从 0.7%至 10%、范围从 0.8%至 10%、范围从 0.9%至 10%、范围从 1.0%至 10%、范围从 3.0%至 9.0%、范围从 5.0%至 9.0%、范围从 6.0%至 8.0%,或范围从 7.0%至 9.0% 存在,或者约 5.0%、6.0%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%、10.0%或 12.0%。在实施方式 5 的该版本中,甘氨酸以以重量计低于 1.0%、低于 0.5%、低于 0.1% 存在或不存在。
- [0149] 根据下述实施例可以进一步理解本发明的方面,不应将其解释为以任何方式教导对本发明范围的限制。

实施例

- [0150] 实施例 1:氯化钠、聚山梨醇酯 80 和人血清白蛋白对 BDD-rFVIII 蛋白溶解度和稳定性的作用
- [0151] 氯化钠的作用
- [0152] 在具有引入半胱氨酸残基的 BDD 突变体上进行研究,其通过在 FVIII 的不同结构域之间形成至少一个二硫键使得 FVIII 稳定化。特别地,BDD-SQ(SEQ ID NO:3) 在 Tyr664Cys:Thr1826Cys 突变以形成在本实施例中使用的 C664-BDD 突变体。对于制备方法,参见美国专利 7,928,199 (Griffin 等)。当将 C664-BDD 突变体在含有组氨酸的缓冲液中制剂时,观察到沉淀水平不合格。
- [0153] 进行一项研究以确定当将 C664-BDD 突变体置于组氨酸缓冲液中时是否观察到的沉淀能够逆转。在其中观察到沉淀的缓冲溶液含有 20mM 组氨酸、30mM 氯化钠、2.5mM 氯化钙、29mM 蔗糖、293mM 甘氨酸和 80ppm 聚山梨醇酯 80。存在 145IU/ml 的 C664BDD 突变体。研究的目的是开发一种使 BDD-rFVIII 突变体稳定化的制剂。对增溶剂和稳定剂如氯化钠、聚山梨醇酯 80 和人血清白蛋白 (HSA),针对增加突变体的溶解度或通过减少蛋白聚集改善稳定性进行检测。结果如图 2-6 所示。图 2 和 5 中的实验均涉及对 NaCl 浓度的改进,并且各例子中的结果显示当与含有约 120mM NaCl 的溶液比较时,含有 30mM NaCl 的溶液的浊度显著下降。研究确定了随着氯化钠浓度的增加,包含所述突变体的溶液的浊度降低,表明氯化钠逆转了沉淀过程。当氯化钠的浓度为 176mM 或更高时,混浊溶液变成澄清溶液并且浊度由 0.169 降至 0.029,基于 A_{340nm}下的测定结果其大于 80% (图 2)。这些结果表明氯化钠是 BDD-rFVIII 突变体有效的增溶剂并且能够逆转其沉淀。总而言之,较高的氯化钠浓度改善 BDD-rFVIII 突变体的溶解度。表 2 显示了优选的制剂。在表 2 中的“BDD-rFVIII 突变体”指在 Tyr664Cys:Thr1 826Cys 突变的 BDD-SQ 的制剂。表 2 中的“全长 rFVIII”指具有氨基酸序列 SEQ ID NO:2(全长 FVIII) 的 FVIII 的制剂。
- [0154] 表 2
- [0155] 全长 rFVIII 和 BDD-rFVIII 突变体的制剂组成
- [0156]

组称	BDD-rFVIII 突变体	全长 rFVIII
----	----------------	-----------

氯化钠 (mM)	220	30
蔗糖 (mM)	29	29
组氨酸 (mM)	20	20
甘氨酸 (mM)	293	293
氯化钙 (mM)	2.5	2.5
聚山梨醇酯 80 (ppm)	80	80

[0157] 实施例 2 :通过随机赖氨酸偶联针对 rFVIII PEG 化进行制剂研发

[0158] 使用随机赖氨酸偶联将 PEG 聚合物与 SEQ ID NO:1 所示的全长 rFVIII 缀合。在这种类型的偶联中,反应性基团主要是蛋白中的 N-末端胺基或赖氨酸的 ϵ -氨基基团。在制剂中的其他伯胺或仲胺可能会干扰反应。因为多种全长和 BDD-rFVIII 制剂包含氨基酸,如甘氨酸和组氨酸,因而开发针对这些分子 PEG 化的新的制剂。在全长 rFVIII 制剂中将甘氨酸作为填充剂并且在 PEG 化过程中可以将其消除,而组氨酸是作为缓冲剂组分并且需要使用另一种缓冲剂替代。

[0159] 适宜的缓冲系统符合下述标准:(1) 在 pH 6-7 时能够提供缓冲能力;(2) 不与重要的 rFVIII 稳定剂氯化钙形成不溶性复合物或螯合物;以及(3) 不包含伯胺或仲胺基团。

[0160] 针对 rFVIII 的随机 PEG 化,可以考虑使用若干常用的缓冲剂。如表 3 所示,仅选择两种缓冲系统三乙醇胺(“TEA”)和 MOPS 进行进一步研究。

[0161] 表 3

[0162] 考虑用于 rFVIII 随机 PEG 化的缓冲剂

[0163]

在 pH 7 的缓冲剂	Ca ²⁺ ppt.	Ca ²⁺ 螯合	胺基基团	在冷冻过程中的 pH 改变
柠檬酸盐		X		
磷酸盐	X			X
组氨酸			X	
TRIS			X	
碳酸盐	X			
三乙醇胺 (TEA)				
MOPS 或 MOPSO				
HEPES			X	

[0164] 对于该研究而言,使用表 4 中列出的制剂对全长 rVIII 进行透析。将在三种制剂中透析的 rFVIII 置于 40°C (图 7) 或 25°C (图 8) 以确立在加速条件下的稳定性,并且结果如图 7 和图 8 所示。

[0165] 表 4

[0166] 评估 rFVIII 的随机 PEG 化的缓冲剂

[0167]

	NaCl (mM)	CaCl ₂ (mM)	吐温 80 (ppm)	甘氨酸 (mM)	蔗 糖 (mM)	叠氮钠 (%)	缓 冲 剂 (20mM)
1	30	2.5	80	--	29	0.05	TEA

[0168]

2	30	2.5	80	--	29	0.05	MOPS
3	30	2.5	80	293	29	0.05	组氨酸

[0169] 实施例 3 :BDD-rFVIII 的 PEG 化

[0170] BDD-rFVIII 遭遇制剂挑战,因为其有聚集倾向。因此,设计 PEG 化 rFVIII 制剂的目标之一是确保其在溶液中的稳定性。PEG 化 BDD-rFVIII 的工作制剂包含 200mM 氯化钠、20mM MOPS、10mM CaCl₂、100ppm 聚山梨醇酯 80 和 29mM 蔗糖。200mM 氯化钠将使冻干过程造成困难。因此,在 50 和 250mM 的范围内作为氯化钠浓度的函数评估 PEG 化 BDD-rFVIII 的溶解度和效能。

[0171] 研究中使用的缓冲组成如表 5 所示并且数据汇总于图 10 和 11。在本实施例中使用的 PEG 化的 BDD 包含具有一个氨基酸突变的 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列以形成此处加入 PEG 的游离半胱氨酸。其在图 9 中用图示。在 23℃ 下贮存 6 天期间,PEG 化的 BDD-rFVIII 在包含 50-150mM 氯化钠的制剂中保留了 87% 以上的效能。在 23℃ 下贮存 6 天期间,未 PEG 化的 BDD-rFVIII 在相同制剂中保留了 70% 的效能。在研究期间这两种分子仍是可溶的,未目测检测到沉淀物或乳光。这些和此前的数据表明 100mM 氯化钠能够用于进一步的制剂研发。

[0172] 表 5

[0173] 评估氯化钠影响使用的制剂组分

[0174]

MOPS (mM)	NaCl (mM)	CaCl ₂ (mM)	聚山梨醇酯 80 (ppm)	蔗糖 (mM)
20	250	10	100	29
20	200	10	100	29
20	150	10	100	29
20	100	10	100	29
20	50	10	100	29
20	25	10	100	29
20	0	10	100	29

[0175] 对氯化钠对 PEG 化和未 PEG 化的 BDD-rFVIII 的溶解度和聚集的影响进行了研究。

[0176] PEG 化的 BDD-rFVIII 在包含 25mM、55mM、75mM、125mM 和 200mM 氯化钠的 MOPS 缓冲液中的 UV 吸收显示 PEG 化的 BDD-rFVIII 在所有已检测的氯化钠浓度均未出现散射,这表明不存在聚集。而相反的是,未 PEG 化的 rFVIII 在 25mM、55mM 和 75mM 的氯化钠中显示出

相当多的散射,这非常可能是由于形成了可溶性聚集物导致的。当将氯化钠的浓度增加至 125mM 和 200mM 时,未观察到散射。因此,得出结论较高的盐浓度防止聚集物形成。

[0177] 实施例 4 :PEG 化的 BDD-rFVIII 冻干制剂的研发

[0178] 针对 PEG 化的 BDD-rFVIII 的冻干,筛选了四种候选制剂。在本实施例中使用的 PEG 化的 BDD 包含具有一个氨基酸突变的 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列以形成此处加入 PEG 的游离半胱氨酸。其目标为在这些制剂中评估冻干药物产品的稳定性并且选择用于进行稳定性研究的制剂。所筛选的制剂为 (1) 制剂 A,其成功用于未 PEG 化的全长 rFVIII, (2) 制剂 B,与制剂 A 相比包含固体含量增加, (3) 使用蔗糖代替制剂 A 中使用的 NaCl 的制剂 C,和 (4) 使用海藻糖代替制剂 A 中使用的 NaCl 的制剂 D。后两种制剂提供了用于冻干药物产品的无定形基质。

[0179] 在三个贮存温度下 (5℃、25℃和 40℃) 对稳定性进行评估。表 6 显示了用于稳定性评估的 PEG 化的 BDD-rFVIII 的制剂组分。

[0180] 蔗糖和甘氨酸的浓度由制剂 A 中的 29mM 和 293mM 增加至制剂 B 中的 38mM 和 346mM。加入附加的固体以增强冻干饼的机械强度并且改善最终药物产品的外观。

[0181] 表 6:

[0182] 在稳定性评估中使用的 PEG 化的 BDD-rFVIII 的制剂组成

[0183]

成分	制剂 A	制剂 B	制剂 C	制剂 D
氯化钙	2.5 mM	2.5 mM	2.5 mM	2.5 mM
氯化钠	30 mM	30 mM	X	X
组氨酸	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
甘氨酸	293 mM	346 mM	X	X
聚山梨醇酯 80	80 ppm	80 ppm	80 ppm	80 ppm
蔗糖	29 mM	38 mM	234 mM	X
海藻糖	X	X	X	211 mM
PEG 化的 BDD-rFVIII 的浓度 (IU/mL)	100 IU/mL	100 IU/mL	100 IU/mL	100 IU/mL

[0184] 1:所有制剂的 pH = 6.8

[0185] 设计制剂 C 和 D 以提供相对于其他两种制剂改变的基质。制剂 A 和 B 由于存在作为结构稳定剂和填充剂的氯化钠和甘氨酸在冻干后形成结晶的基质。蔗糖和海藻糖的浓度分别增加至 234mM 和 211mM,以代替包括氯化钠和甘氨酸。由此产生冻干药物产品的无定形基质。

[0186] 将四种候选制剂中的每一个的稳定性计划均设定为 26 周时间段。经由效能、含水量、通过 SEC-HPLC 测得的高分子量 (HMW) 杂质和产品相关总杂质的百分率评估稳定性。四种制剂的效能回收率数据汇总于图 12-15。

[0187] 四种制剂的效能回收率、通过 Karl Fischer 测得的含水量以及通过 SEC-HPLC 测

得的聚集物和产品相关杂质的百分率（在第 26 周检测）数据表明 rFVIII 在四种制剂中是稳定的。

[0188] 使用制剂 A 和 B 进一步评估了 PEG 化的 BDD-rFVIII 的稳定性（制剂组分参见表 6）。在实验室规模制备两个药物产品批次并在 5℃、25℃ 和 40℃ 下考察稳定性。将通过比色法测定的效能、通过 SEC-HPLC 测定的高分子量杂质和产品相关总杂质的百分率以及通过 Karl Fisher 测定的湿度用于药物产品的稳定性评估。在制剂 A 中使用的成分的目标浓度和范围如表 7 所示。

[0189] 表 7：在制剂 A 中使用的成分的目标浓度和范围

[0190]

成分	制剂 A 中的目标浓度	低浓度和高浓度范围
氯化钙	2.5 mM	1.5 mM 至 3.5 mM
氯化钠	30 mM	21 mM 至 43 mM
组氨酸	20 mM	15 mM 至 27 mM
甘氨酸	293 mM	240 mM 至 386 mM
聚山梨醇酯 80	80 ppm	57 ppm 至 103 ppm
蔗糖	29 mM	20 mM 至 41 mM
PEG 化的 BDD-rFVIII 的 浓度 (IU/mL)	200 IU/mL 400 IU/mL 1200 IU/mL	188 IU/mL 至 250 IU/mL 376 IU/mL 至 500 IU/mL 1128 IU/mL 至 1500 IU/mL

[0191] 这些数据表明在这两种制剂中具有相当的药物产品稳定性。使用制剂 A 的研究持续达 30 个月，而使用制剂 B 的研究在 3 个月时终止（分别见图 16 和 17）。在图 18 和 19 中的 rFVIII 浓度为 400IU/mL。

[0192] 选择制剂 A 进行进一步的研发并且使用浓度为 200IU/mL 和 1200IU/mL 的 PEG 化的 rFVIII 进行检测。在 200IU/mL 和 1200IU/mL 的效能性质分别如图 18 和 19 所示。数据表明制剂 A 针对 PEG 化的 rFVIII 提供了持续的稳定性。

[0001]

序列表

<110> 拜耳医药保健有限公司

Wang, De Qian

Ma, Xinghang

Tsvetkova, Nelly

<120> 重组因子 VIII 制剂

<130> BHC 135014 PCT (0081563-000121)

<150> US 61/869,191

<151> 2013-08-23

<150> US 61/779,495

<151> 2013-03-15

<160> 5

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 2351

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
 1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
 20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
 35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
 50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Val His Leu Phe Asn Ile
 65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
 85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
 100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
 115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
 130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
 145 150 155 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
 165 170 175

[0002]

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
 180 185 190
 Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
 195 200 205
 Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
 210 215 220
 Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
 225 230 235 240
 Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
 245 250 255
 Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
 260 265 270
 Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
 275 280 285
 Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
 290 295 300
 Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
 305 310 315 320
 Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
 325 330 335
 Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
 340 345 350
 Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
 355 360 365
 Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
 370 375 380
 Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400
 Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415
 Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 420 425 430
 Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445
 Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460

[0003]

Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480
 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510
 Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540
 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590
 Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
 595 600 605
 Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
 610 615 620
 Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
 645 650 655
 Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
 660 665 670
 Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
 675 680 685
 Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
 690 695 700
 Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
 705 710 715 720
 Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
 725 730 735
 Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
 740 745 750

[0004]

```

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro
 755                               760                               765

Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp
 770                               775                               780

Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys
 785                               790                               795                               800

Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser
 805                               810                               815

Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr
 820                               825                               830

Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn
 835                               840                               845

Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly
 850                               855                               860

Asp Met Val Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu
 865                               870                               875                               880

Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys
 885                               890                               895

Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn
 900                               905                               910

Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met
 915                               920                               925

Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys
 930                               935                               940

Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu
 945                               950                               955                               960

Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu
 965                               970                               975

Ser Ser Trp Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe
 980                               985                               990

Lys Gly Lys Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala
 995                               1000                               1005

Leu Phe Lys Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser
 1010                               1015                               1020

Asn Asn Ser Ala Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser
 1025                               1030                               1035

```

[0005]

Leu 1040	Leu	Ile	Glu	Asn	Ser	Pro 1045	Ser	Val	Trp	Gln	Asn 1050	Ile	Leu	Glu
Ser 1055	Asp	Thr	Glu	Phe	Lys	Lys 1060	Val	Thr	Pro	Leu	Ile 1065	His	Asp	Arg
Met 1070	Leu	Met	Asp	Lys	Asn	Ala 1075	Thr	Ala	Leu	Arg	Leu 1080	Asn	His	Met
Ser 1085	Asn	Lys	Thr	Thr	Ser	Ser 1090	Lys	Asn	Met	Glu	Met 1095	Val	Gln	Gln
Lys 1100	Lys	Glu	Gly	Pro	Ile	Pro 1105	Pro	Asp	Ala	Gln	Asn 1110	Pro	Asp	Met
Ser 1115	Phe	Phe	Lys	Met	Leu	Phe 1120	Leu	Pro	Glu	Ser	Ala 1125	Arg	Trp	Ile
Gln 1130	Arg	Thr	His	Gly	Lys	Asn 1135	Ser	Leu	Asn	Ser	Gly 1140	Gln	Gly	Pro
Ser 1145	Pro	Lys	Gln	Leu	Val	Ser 1150	Leu	Gly	Pro	Glu	Lys 1155	Ser	Val	Glu
Gly 1160	Gln	Asn	Phe	Leu	Ser	Glu 1165	Lys	Asn	Lys	Val	Val 1170	Val	Gly	Lys
Gly 1175	Glu	Phe	Thr	Lys	Asp	Val 1180	Gly	Leu	Lys	Glu	Met 1185	Val	Phe	Pro
Ser 1190	Ser	Arg	Asn	Leu	Phe	Leu 1195	Thr	Asn	Leu	Asp	Asn 1200	Leu	His	Glu
Asn 1205	Asn	Thr	His	Asn	Gln	Glu 1210	Lys	Lys	Ile	Gln	Glu 1215	Glu	Ile	Glu
Lys 1220	Lys	Glu	Thr	Leu	Ile	Gln 1225	Glu	Asn	Val	Val	Leu 1230	Pro	Gln	Ile
His 1235	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Lys 1240	Asn	Phe	Met	Lys	Asn 1245	Leu	Phe	Leu
Leu 1250	Ser	Thr	Arg	Gln	Asn	Val 1255	Glu	Gly	Ser	Tyr	Glu 1260	Gly	Ala	Tyr
Ala 1265	Pro	Val	Leu	Gln	Asp	Phe 1270	Arg	Ser	Leu	Asn	Asp 1275	Ser	Thr	Asn
Arg 1280	Thr	Lys	Lys	His	Thr	Ala 1285	His	Phe	Ser	Lys	Lys 1290	Gly	Glu	Glu
Glu 1295	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly 1300	Asn	Gln	Thr	Lys	Gln 1305	Ile	Val	Glu

[0006]

Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg 1310	Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln 1320
Asn Phe Val Thr Gln Arg Ser 1325	Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg 1335
Leu Pro Leu Glu Glu Thr Glu 1340	Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp 1350
Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser 1355	Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro 1365
Ser Thr Leu Thr Gln Ile Asp 1370	Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala 1380
Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser 1385	Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser 1395
Ile Pro Gln Ala Asn Arg Ser 1400	Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser 1410
Ser Phe Pro Ser Ile Arg Pro 1415	Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe 1425
Gln Asp Asn Ser Ser His Leu 1430	Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys 1440
Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser 1445	Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys 1455
Lys Asn Asn Leu Ser Leu Ala 1460	Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly 1470
Asp Gln Arg Glu Val Gly Ser 1475	Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser 1485
Val Thr Tyr Lys Lys Val Glu 1490	Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp 1500
Leu Pro Lys Thr Ser Gly Lys 1505	Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His 1515
Ile Tyr Gln Lys Asp Leu Phe 1520	Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser 1530
Pro Gly His Leu Asp Leu Val 1535	Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr 1545
Glu Gly Ala Ile Lys Trp Asn 1550	Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val 1560
Pro Phe Leu Arg Val Ala Thr 1565	Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser 1575

[0007]

Lys	Leu	Leu	Asp	Pro	Leu	Ala	Trp	Asp	Asn	His	Tyr	Gly	Thr	Gln
1580						1585					1590			
Ile	Pro	Lys	Glu	Glu	Trp	Lys	Ser	Gln	Glu	Lys	Ser	Pro	Glu	Lys
1595						1600					1605			
Thr	Ala	Phe	Lys	Lys	Lys	Asp	Thr	Ile	Leu	Ser	Leu	Asn	Ala	Cys
1610						1615					1620			
Glu	Ser	Asn	His	Ala	Ile	Ala	Ala	Ile	Asn	Glu	Gly	Gln	Asn	Lys
1625						1630					1635			
Pro	Glu	Ile	Glu	Val	Thr	Trp	Ala	Lys	Gln	Gly	Arg	Thr	Glu	Arg
1640						1645					1650			
Leu	Cys	Ser	Gln	Asn	Pro	Pro	Val	Leu	Lys	Arg	His	Gln	Arg	Glu
1655						1660					1665			
Ile	Thr	Arg	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr
1670						1675					1680			
Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile
1685						1690					1695			
Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys
1700						1705					1710			
Thr	Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp	Tyr
1715						1720					1725			
Gly	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser
1730						1735					1740			
Gly	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr
1745						1750					1755			
Asp	Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Glu
1760						1765					1770			
His	Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu	Val	Glu	Asp
1775						1780					1785			
Asn	Ile	Met	Val	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ser
1790						1795					1800			
Phe	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gln	Arg	Gln	Gly
1805						1810					1815			
Ala	Glu	Pro	Arg	Lys	Asn	Phe	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Lys	Thr
1820						1825					1830			
Tyr	Phe	Trp	Lys	Val	Gln	His	His	Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu
1835						1840					1845			

[0008]

Phe	Asp	Cys	Lys	Ala	Trp	Ala	Tyr	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu
1850						1855					1860			
Lys	Asp	Val	His	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His
1865						1870					1875			
Thr	Asn	Thr	Leu	Asn	Pro	Ala	His	Gly	Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln
1880						1885					1890			
Glu	Phe	Ala	Leu	Phe	Phe	Thr	Ile	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp
1895						1900					1905			
Tyr	Phe	Thr	Glu	Asn	Met	Glu	Arg	Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn
1910						1915					1920			
Ile	Gln	Met	Glu	Asp	Pro	Thr	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His
1925						1930					1935			
Ala	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile	Met	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Met
1940						1945					1950			
Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	Ser
1955						1960					1965			
Asn	Glu	Asn	Ile	His	Ser	Ile	His	Phe	Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr
1970						1975					1980			
Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Glu	Tyr	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr
1985						1990					1995			
Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Thr	Val	Glu	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly
2000						2005					2010			
Ile	Trp	Arg	Val	Glu	Cys	Leu	Ile	Gly	Glu	His	Leu	His	Ala	Gly
2015						2020					2025			
Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro
2030						2035					2040			
Leu	Gly	Met	Ala	Ser	Gly	His	Ile	Arg	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala
2045						2050					2055			
Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro	Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His
2060						2065					2070			
Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Trp	Ser	Thr	Lys	Glu	Pro	Phe	Ser
2075						2080					2085			
Trp	Ile	Lys	Val	Asp	Leu	Leu	Ala	Pro	Met	Ile	Ile	His	Gly	Ile
2090						2095					2100			
Lys	Thr	Gln	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser
2105						2110					2115			

[0009]

Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr
 2120 2125 2130
 Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn
 2135 2140 2145
 Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile
 2150 2155 2160
 Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg
 2165 2170 2175
 Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys
 2180 2185 2190
 Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln
 2195 2200 2205
 Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser
 2210 2215 2220
 Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp
 2225 2230 2235
 Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe
 2240 2245 2250
 Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys
 2255 2260 2265
 Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser
 2270 2275 2280
 Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys
 2285 2290 2295
 Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val
 2300 2305 2310
 Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His
 2315 2320 2325
 Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu
 2330 2335 2340
 Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 2345 2350
 <210> 2
 <211> 2332
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 2
 Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr

[0010]

1	5	10	15
Met Gln Ser	Asp Leu Gly Glu Leu	Pro Val Asp Ala Arg	Phe Pro Pro
	20	25	30
Arg Val Pro	Lys Ser Phe Pro	Phe Asn Thr Ser Val	Val Tyr Lys Lys
	35	40	45
Thr Leu Phe	Val Glu Phe Thr	Val His Leu Phe	Asn Ile Ala Lys Pro
	50	55	60
Arg Pro Pro	Trp Met Gly Leu Leu	Gly Pro Thr Ile	Gln Ala Glu Val
	65	70	75
Tyr Asp Thr	Val Val Ile Thr	Leu Lys Asn Met	Ala Ser His Pro Val
	85	90	95
Ser Leu His	Ala Val Gly Val	Ser Tyr Trp Lys	Ala Ser Glu Gly Ala
	100	105	110
Glu Tyr Asp	Asp Gln Thr Ser	Gln Arg Glu Lys	Glu Asp Asp Lys Val
	115	120	125
Phe Pro Gly	Gly Ser His Thr	Tyr Val Trp Gln	Val Leu Lys Glu Asn
	130	135	140
Gly Pro Met	Ala Ser Asp Pro	Leu Cys Leu Thr	Tyr Ser Tyr Leu Ser
	145	150	155
His Val Asp	Leu Val Lys Asp	Leu Asn Ser Gly	Leu Ile Gly Ala Leu
	165	170	175
Leu Val Cys	Arg Glu Gly Ser	Leu Ala Lys Glu	Lys Thr Gln Thr Leu
	180	185	190
His Lys Phe	Ile Leu Leu Phe	Ala Val Phe Asp	Glu Gly Lys Ser Trp
	195	200	205
His Ser Glu	Thr Lys Asn Ser	Leu Met Gln Asp	Arg Asp Ala Ala Ser
	210	215	220
Ala Arg Ala	Trp Pro Lys Met	His Thr Val Asn	Gly Tyr Val Asn Arg
	225	230	235
Ser Leu Pro	Gly Leu Ile Gly	Cys His Arg Lys	Ser Val Tyr Trp His
	245	250	255
Val Ile Gly	Met Gly Thr Thr	Pro Glu Val His	Ser Ile Phe Leu Glu
	260	265	270
Gly His Thr	Phe Leu Val Arg	Asn His Arg Gln	Ala Ser Leu Glu Ile
	275	280	285
Ser Pro Ile	Thr Phe Leu Thr	Ala Gln Thr Leu	Leu Met Asp Leu Gly

[0011]

290	295	300
Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met 305 310 315 320		
Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg 325 330 335		
Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp 340 345 350		
Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe 355 360 365		
Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His 370 375 380		
Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu 385 390 395 400		
Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro 405 410 415		
Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr 420 425 430		
Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile 435 440 445		
Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile 450 455 460		
Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile 465 470 475 480		
Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys 485 490 495		
His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys 500 505 510		
Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys 515 520 525		
Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala 530 535 540		
Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp 545 550 555 560		
Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe 565 570 575		
Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln		

[0012]

580										585										590										
Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp	Pro	Glu	Phe															
		595					600					605																		
Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val	Phe	Asp	Ser															
	610					615					620																			
Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp	Tyr	Ile	Leu															
	625				630					635					640															
Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe	Ser	Gly	Tyr															
				645					650					655																
Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	Leu	Phe	Pro															
			660					665					670																	
Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro	Gly	Leu	Trp															
		675					680					685																		
Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	Met	Thr	Ala															
	690					695					700																			
Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Glu															
	705				710					715					720															
Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys	Asn	Asn	Ala															
				725					730					735																
Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Pro	Ser	Thr	Arg															
			740					745					750																	
Gln	Lys	Gln	Phe	Asn	Ala	Thr	Thr	Ile	Pro	Glu	Asn	Asp	Ile	Glu	Lys															
		755					760					765																		
Thr	Asp	Pro	Trp	Phe	Ala	His	Arg	Thr	Pro	Met	Pro	Lys	Ile	Gln	Asn															
		770				775					780																			
Val	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu	Leu	Met	Leu	Leu	Arg	Gln	Ser	Pro	Thr	Pro															
					790				795						800															
His	Gly	Leu	Ser	Leu	Ser	Asp	Leu	Gln	Glu	Ala	Lys	Tyr	Glu	Thr	Phe															
				805					810					815																
Ser	Asp	Asp	Pro	Ser	Pro	Gly	Ala	Ile	Asp	Ser	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser															
			820					825					830																	
Glu	Met	Thr	His	Phe	Arg	Pro	Gln	Leu	His	His	Ser	Gly	Asp	Met	Val															
		835					840					845																		
Phe	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Leu	Gln	Leu	Arg	Leu	Asn	Glu	Lys	Leu	Gly															
		850				855					860																			
Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	Lys	Leu	Asp	Phe	Lys	Val	Ser	Ser															

[0013]

865	870	875	880
Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala	885	890	895
Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His	900	905	910
Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro	915	920	925
Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp	930	935	940
Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp	945	950	955
Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys	965	970	975
Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys	980	985	990
Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala	995	1000	1005
Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu	1010	1015	1020
Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu	1025	1030	1035
Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp	1040	1045	1050
Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr	1055	1060	1065
Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly	1070	1075	1080
Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys	1085	1090	1095
Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His	1100	1105	1110
Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln	1115	1120	1125
Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe	1130	1135	1140
Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr			

[0014]

1145	1150	1155
Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn 1160 1165 1170		
Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His 1175 1180 1185		
Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys Lys Glu Thr 1190 1195 1200		
Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr Val Thr 1205 1210 1215		
Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg 1220 1225 1230		
Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Glu Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu 1235 1240 1245		
Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys 1250 1255 1260		
His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu 1265 1270 1275		
Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys 1280 1285 1290		
Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr 1295 1300 1305		
Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu 1310 1315 1320		
Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr 1325 1330 1335		
Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr 1340 1345 1350		
Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser 1355 1360 1365		
Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser Ile Pro Gln Ala 1370 1375 1380		
Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser 1385 1390 1395		
Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser 1400 1405 1410		
Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val		

[0015]

1415	1420	1425
Gln Glu Ser Ser His Phe Leu 1430	Gln Gly Ala Lys Lys Asn Asn Leu 1435	
Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu 1445	Glu Met Thr Gly Asp Gln Arg Glu 1450	
Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser 1460	Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys 1465	
Lys Val Glu Asn Thr Val Leu 1475	Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr 1480	
Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu 1490	Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys 1495	
Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr 1505	Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu 1510	
Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu 1520	Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile 1525	
Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg 1535	Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg 1540	
Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala 1550	Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp 1555	
Pro Leu Ala Trp Asp Asn His 1565	Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu 1570	
Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys 1580	Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys 1585	
Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser 1595	Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His 1600	
Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu 1610	Gly Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu 1615	
Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly 1625	Arg Thr Glu Arg Leu Cys Ser Gln 1630	
Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg 1640	His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr 1645	
Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu 1655	Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile 1660	
Ser Val Glu Met Lys Lys Glu 1670	Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp 1675	
Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser	Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr	

[0016]

1685	1690	1695
Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser 1700 1705 1710		
Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro 1715 1720 1725		
Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe 1730 1735 1740		
Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu 1745 1750 1755		
Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val 1760 1765 1770		
Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser 1775 1780 1785		
Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg 1790 1795 1800		
Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys 1805 1810 1815		
Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys 1820 1825 1830		
Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His 1835 1840 1845		
Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu 1850 1855 1860		
Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu 1865 1870 1875		
Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu 1880 1885 1890		
Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu 1895 1900 1905		
Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly 1910 1915 1920		
Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln 1925 1930 1935		
Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile 1940 1945 1950		
His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys		

[0017]

1955	1960	1965
Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu 1970	Tyr Asn Leu Tyr 1975	Pro Gly Val Phe 1980
Glu Thr Val Glu Met Leu 1985	Pro Ser Lys Ala Gly 1990	Ile Trp Arg Val 1995
Glu Cys Leu Ile Gly Glu 2000	His Leu His Ala Gly 2005	Met Ser Thr Leu 2010
Phe Leu Val Tyr Ser Asn 2015	Lys Cys Gln Thr Pro 2020	Leu Gly Met Ala 2025
Ser Gly His Ile Arg Asp 2030	Phe Gln Ile Thr Ala 2035	Ser Gly Gln Tyr 2040
Gly Gln Trp Ala Pro Lys 2045	Leu Ala Arg Leu His 2050	Tyr Ser Gly Ser 2055
Ile Asn Ala Trp Ser Thr 2060	Lys Glu Pro Phe Ser 2065	Trp Ile Lys Val 2070
Asp Leu Leu Ala Pro Met 2075	Ile Ile His Gly Ile 2080	Lys Thr Gln Gly 2085
Ala Arg Gln Lys Phe Ser 2090	Ser Leu Tyr Ile Ser 2095	Gln Phe Ile Ile 2100
Met Tyr Ser Leu Asp Gly 2105	Lys Lys Trp Gln Thr 2110	Tyr Arg Gly Asn 2115
Ser Thr Gly Thr Leu Met 2120	Val Phe Phe Gly Asn 2125	Val Asp Ser Ser 2130
Gly Ile Lys His Asn Ile 2135	Phe Asn Pro Pro Ile 2140	Ile Ala Arg Tyr 2145
Ile Arg Leu His Pro Thr 2150	His Tyr Ser Ile Arg 2155	Ser Thr Leu Arg 2160
Met Glu Leu Met Gly Cys 2165	Asp Leu Asn Ser Cys 2170	Ser Met Pro Leu 2175
Gly Met Glu Ser Lys Ala 2180	Ile Ser Asp Ala Gln 2185	Ile Thr Ala Ser 2190
Ser Tyr Phe Thr Asn Met 2195	Phe Ala Thr Trp Ser 2200	Pro Ser Lys Ala 2205
Arg Leu His Leu Gln Gly 2210	Arg Ser Asn Ala Trp 2215	Arg Pro Gln Val 2220
Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu 2225	Gln Val Asp Phe Gln 2230	Lys Thr Met 2235

[0018]

2225	2230	2235
Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr		
2240	2245	2250
Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly		
2255	2260	2265
His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe		
2270	2275	2280
Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp		
2285	2290	2295
Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp		
2300	2305	2310
Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala		
2315	2320	2325
Gln Asp Leu Tyr		
2330		
<210> 3		
<211> 1457		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人 FVIII 缺失的变体		
<400> 3		
Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe		
1 5 10 15		
Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser		
20 25 30		
Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg		
35 40 45		
Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val		
50 55 60		
Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile		
65 70 75 80		
Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln		
85 90 95		
Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser		
100 105 110		
His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser		
115 120 125		

[0019]

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
 130 135 140
 Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
 145 150 155 160
 Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
 180 185 190
 Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
 195 200 205
 Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
 210 215 220
 Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
 225 230 235 240
 Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
 245 250 255
 Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
 260 265 270
 Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
 275 280 285
 Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
 290 295 300
 Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
 305 310 315 320
 Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
 325 330 335
 Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
 340 345 350
 Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
 355 360 365
 Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
 370 375 380
 Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400
 Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415

[0020]

```

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
    420                                425                                430

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
    435                                440                                445

Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
    450                                455                                460

Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
    465                                470                                475                                480

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
    485                                490                                495

His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
    500                                505                                510

Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
    515                                520                                525

Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
    530                                535                                540

Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
    545                                550                                555                                560

Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
    565                                570                                575

Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
    580                                585                                590

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
    595                                600                                605

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
    610                                615                                620

Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
    625                                630                                635                                640

Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
    645                                650                                655

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
    660                                665                                670

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
    675                                680                                685

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
    690                                695                                700

```

[0021]

Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
 705 710 715 720
 Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
 725 730 735
 Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
 740 745 750
 Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu
 755 760 765
 Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln
 770 775 780
 Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu
 785 790 795 800
 Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe
 805 810 815
 Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp
 820 825 830
 Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln
 835 840 845
 Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr
 850 855 860
 Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His
 865 870 875 880
 Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile
 885 890 895
 Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser
 900 905 910
 Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg
 915 920 925
 Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val
 930 935 940
 Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp
 945 950 955 960
 Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu
 965 970 975
 Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His
 980 985 990

[0022]

[0023]

Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro
 1265 1270 1275
 Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly
 1280 1285 1290
 Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys
 1295 1300 1305
 Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn
 1310 1315 1320
 Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln
 1325 1330 1335
 Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu
 1340 1345 1350
 Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val
 1355 1360 1365
 Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys
 1370 1375 1380
 Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu
 1385 1390 1395
 Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp
 1400 1405 1410
 Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr
 1415 1420 1425
 Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala
 1430 1435 1440
 Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 1445 1450 1455
 <210> 4
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 4
 Ser Phe Ser Gln
 1
 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 5
 Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg

[0024]

1

5

10

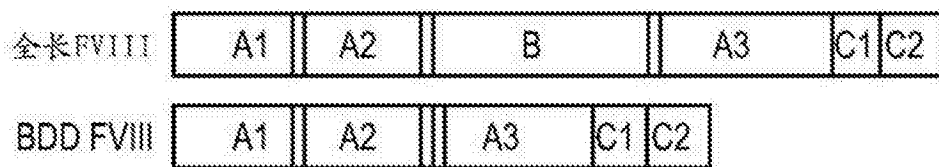


图 1

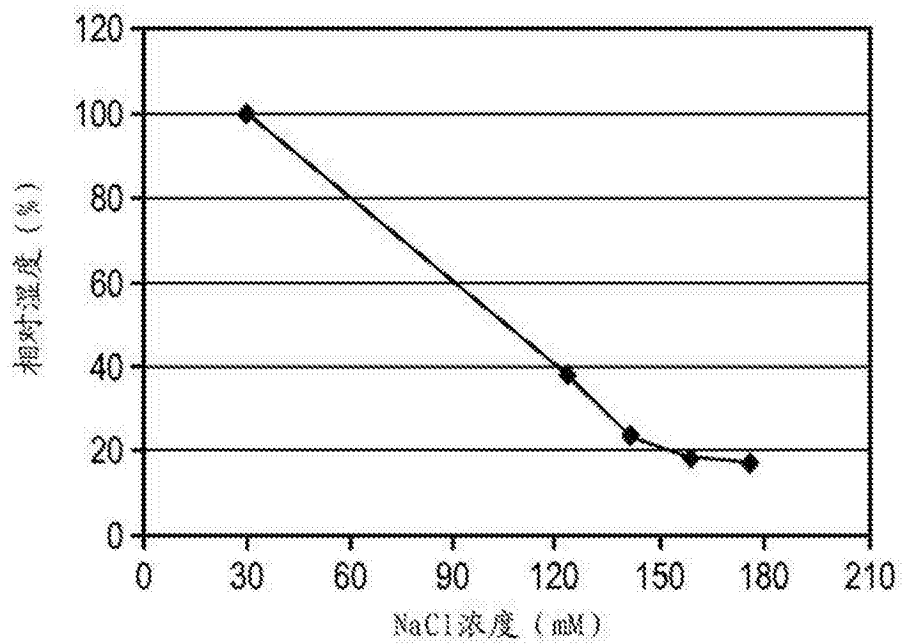


图 2

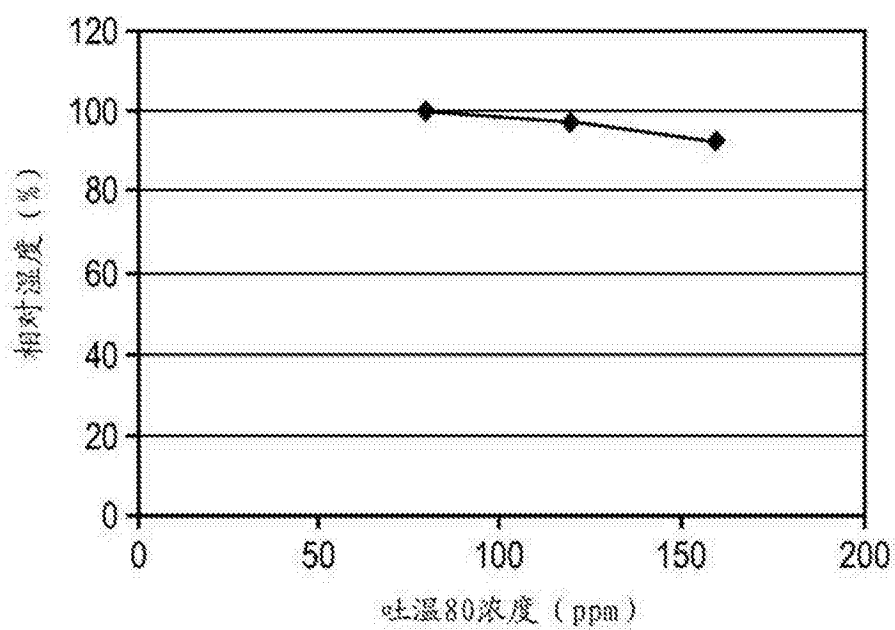


图 3

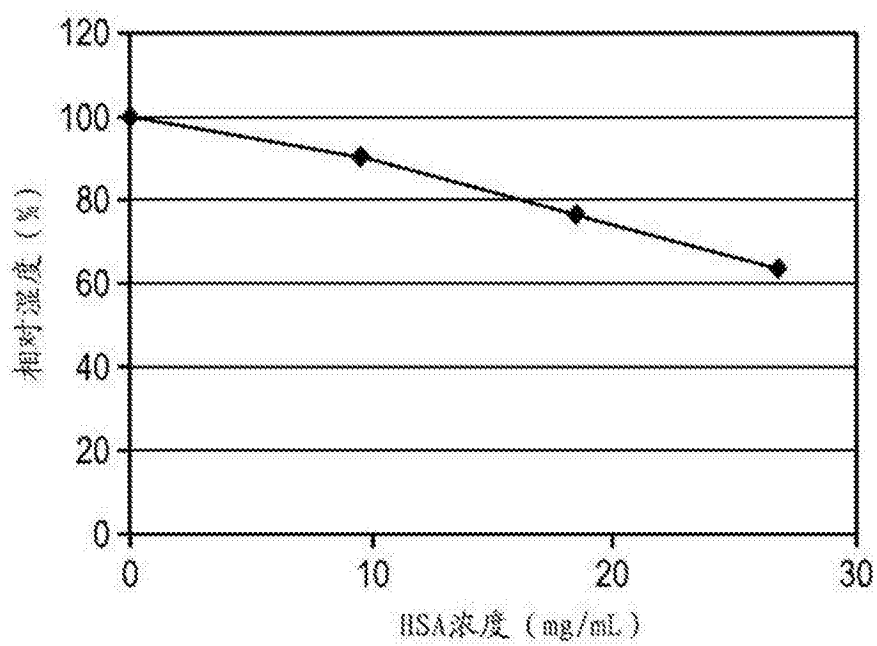


图 4

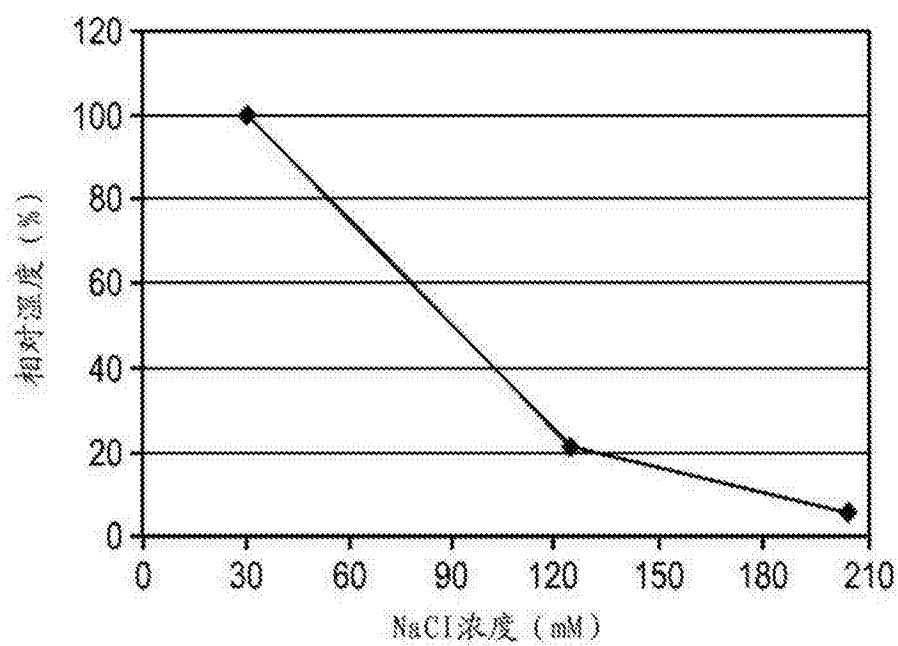


图 5

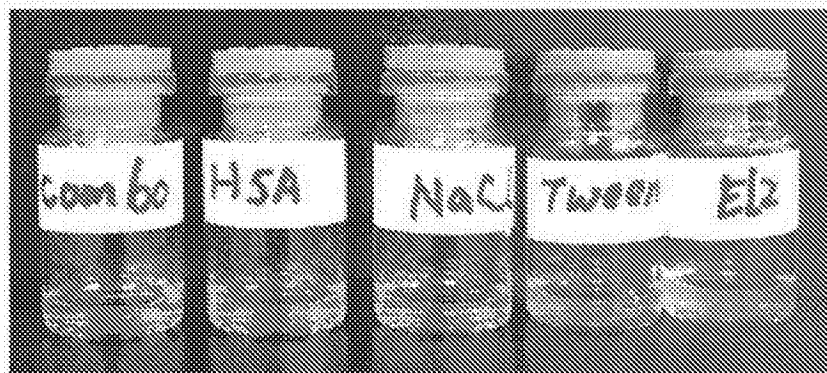


图 6

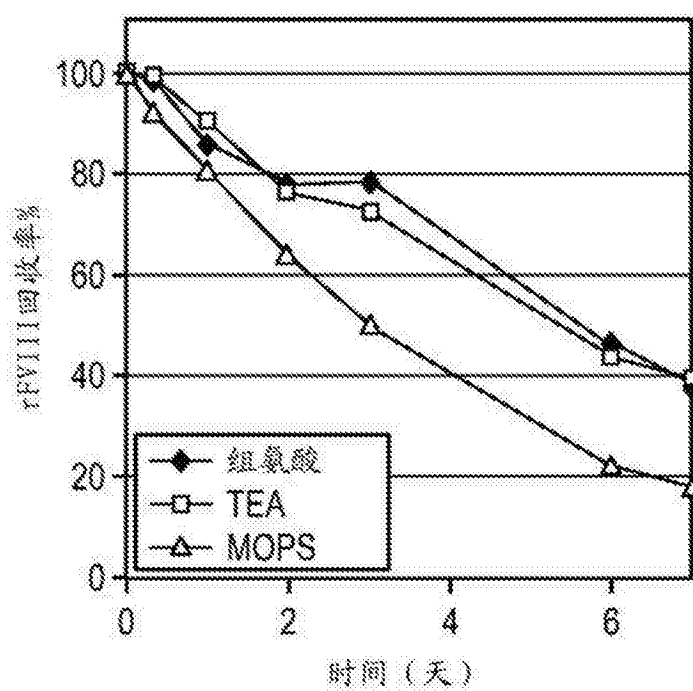


图 7

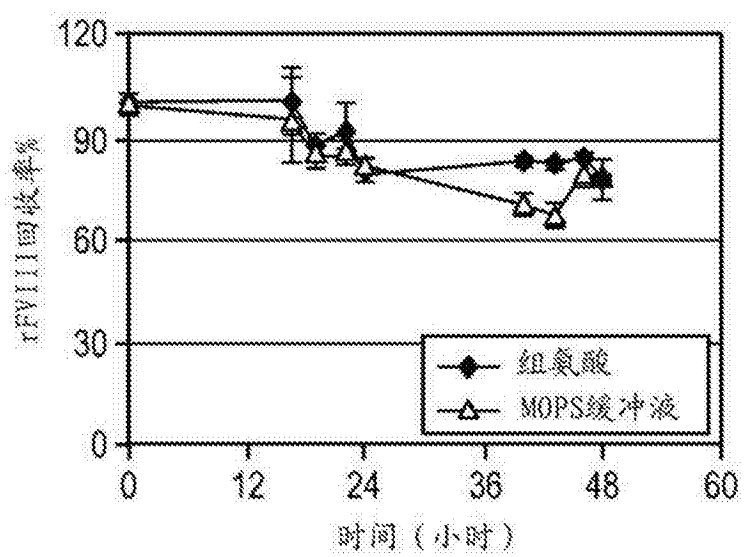


图 8

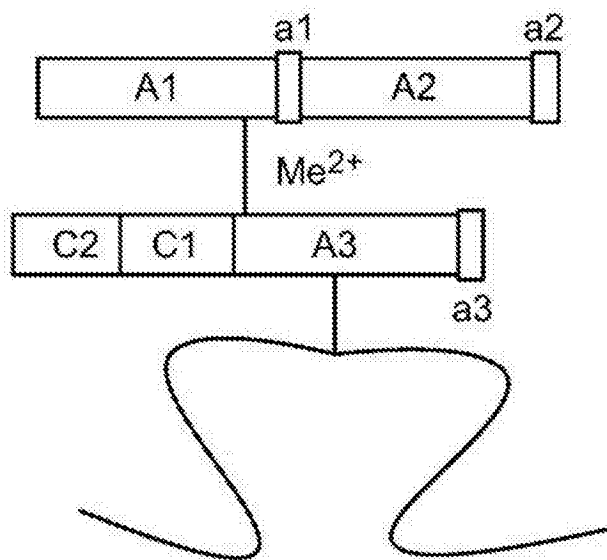


图 9

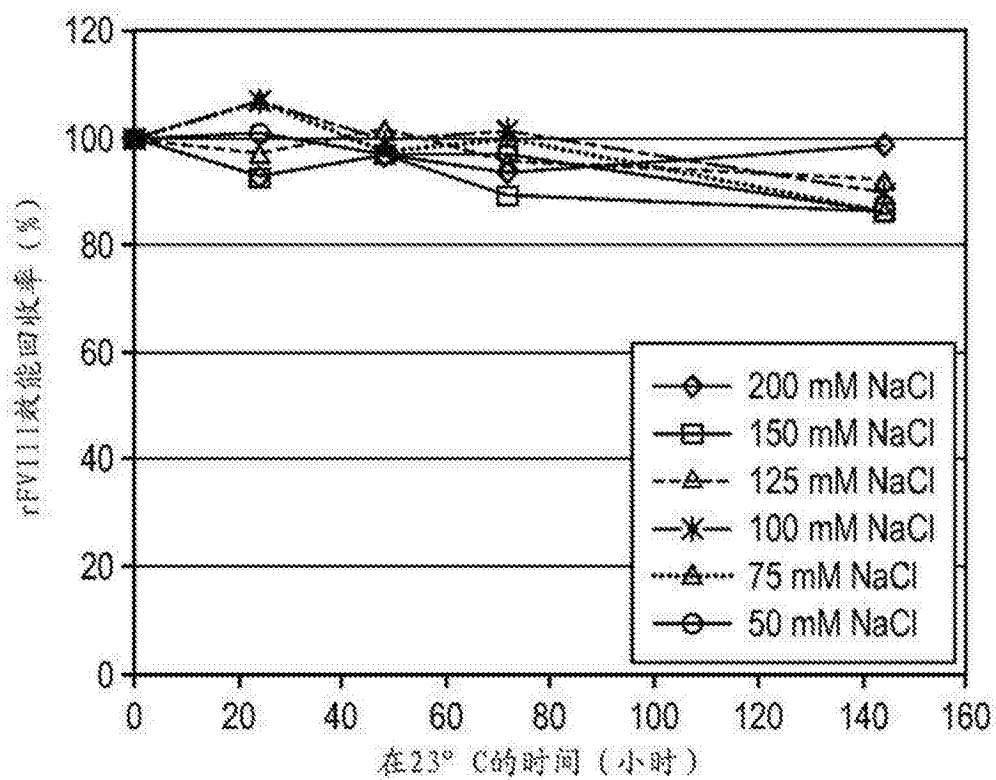


图 10

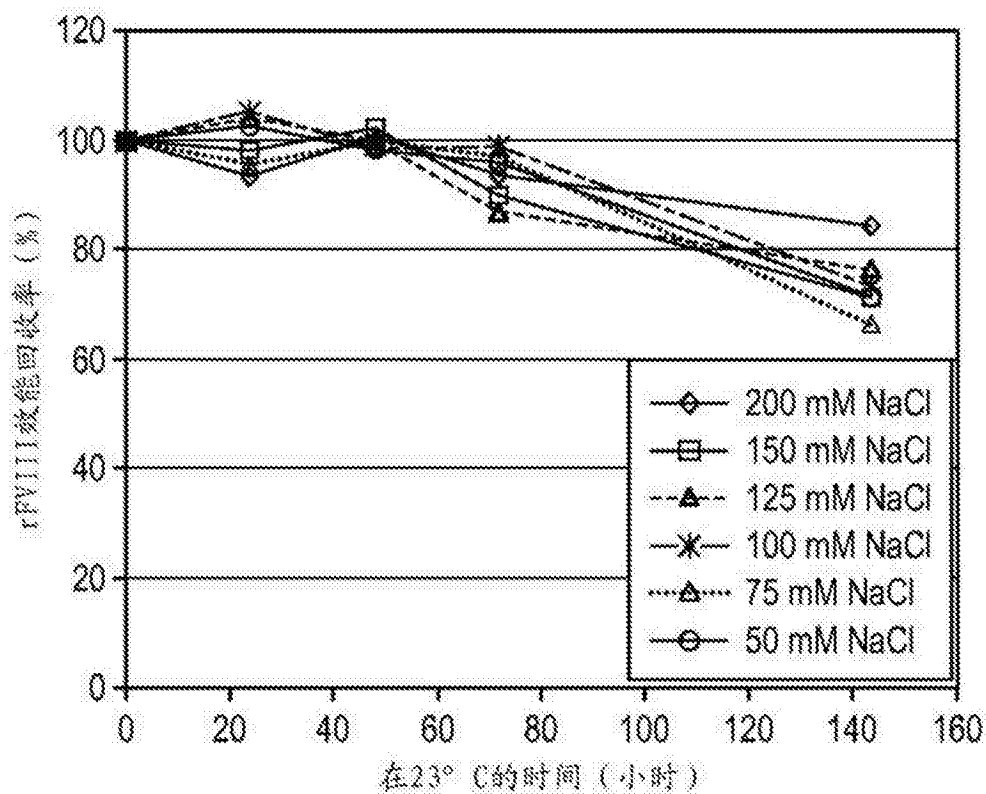


图 11

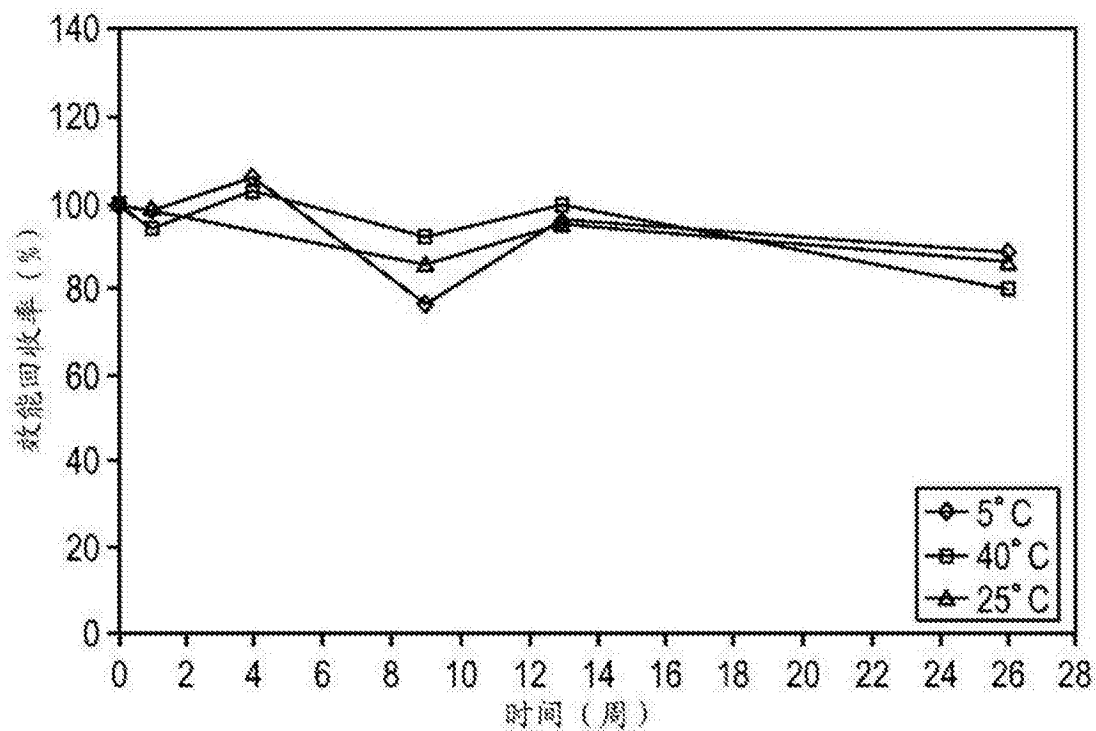


图 12

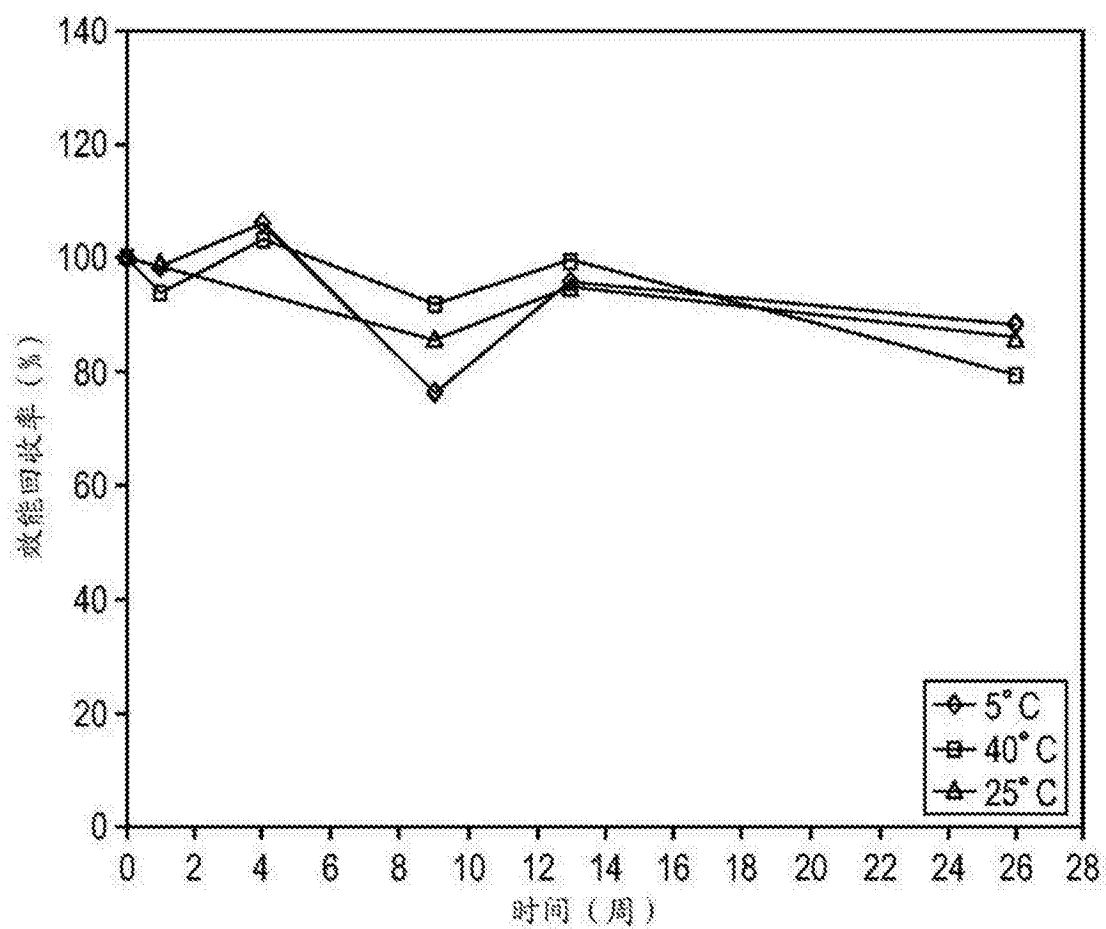


图 13

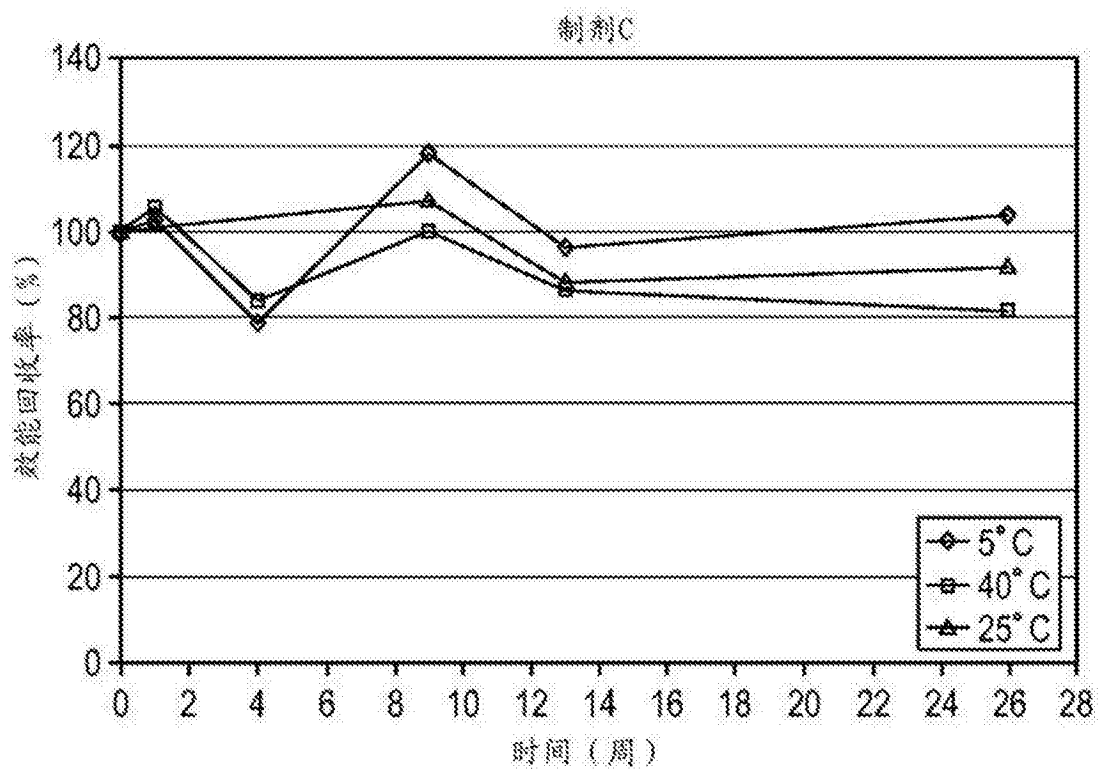


图 14

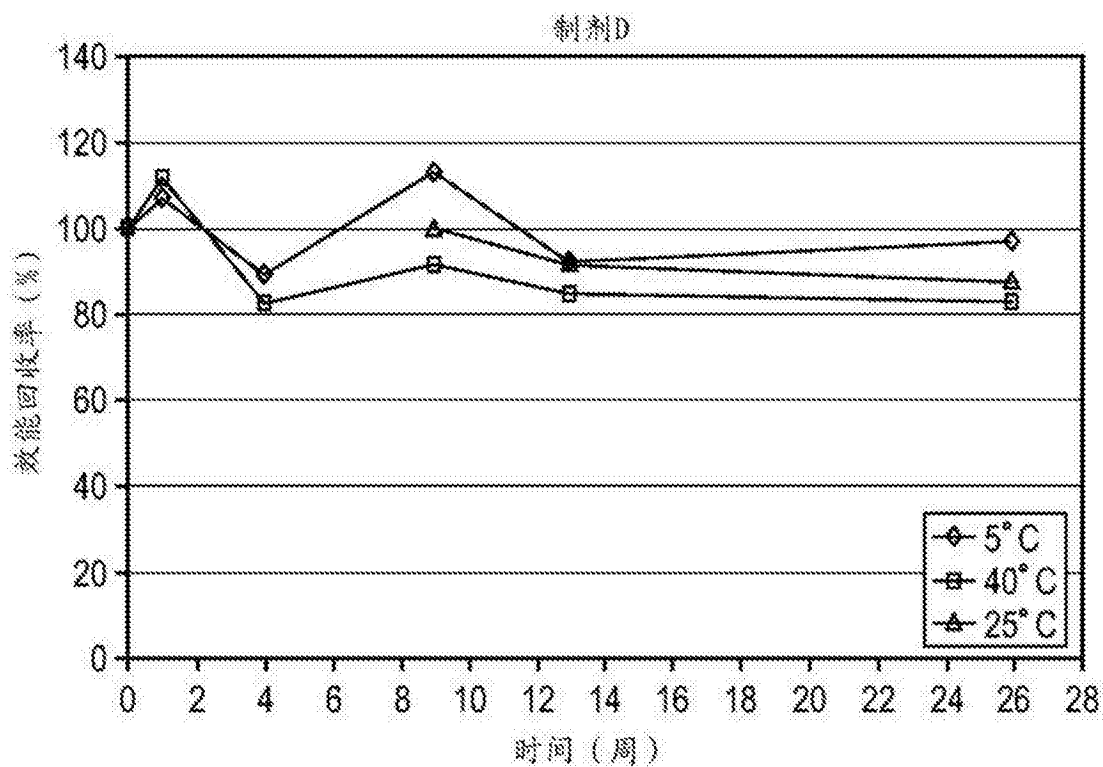


图 15

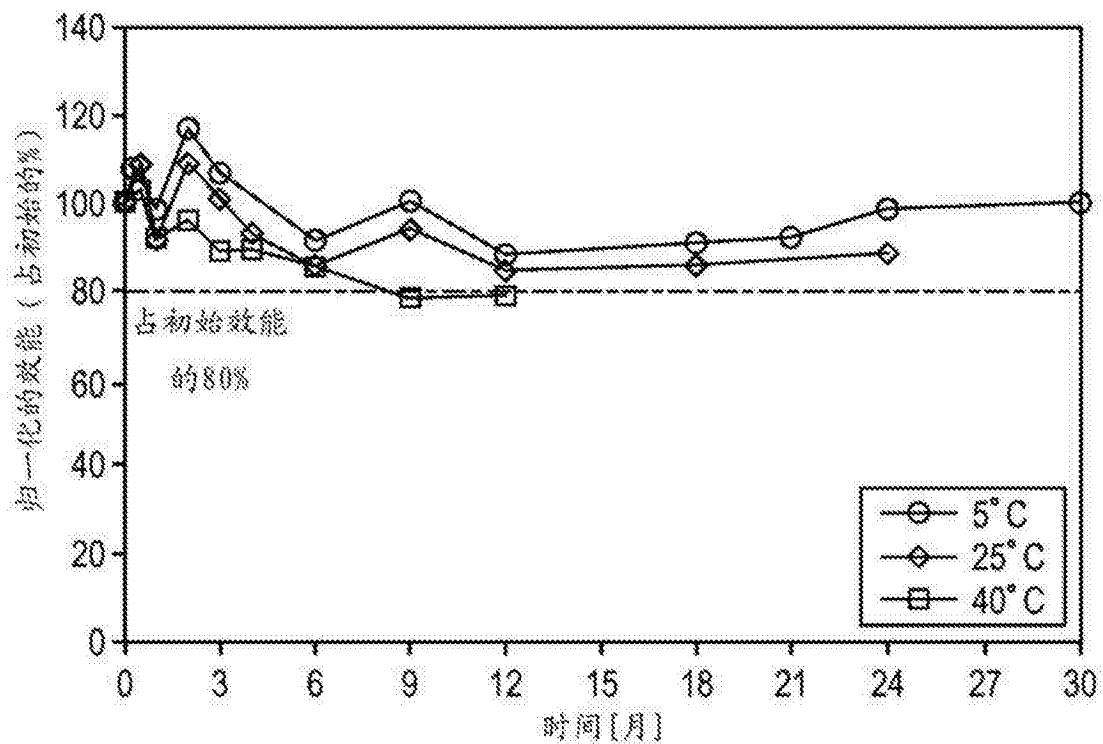


图 16

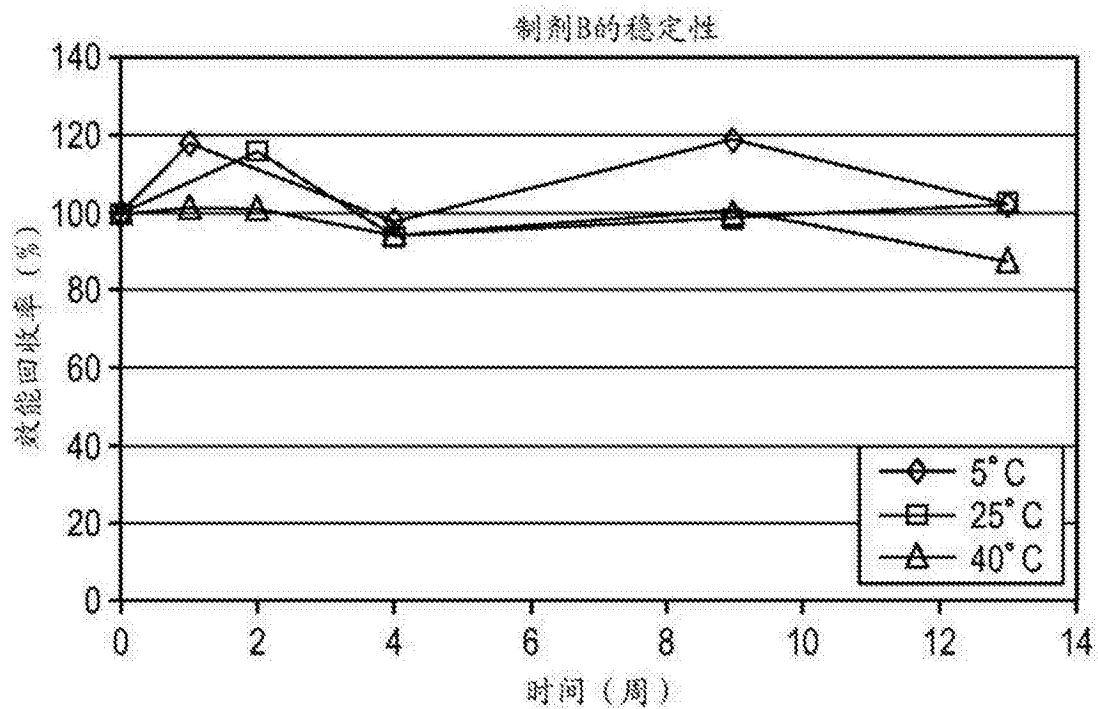


图 17

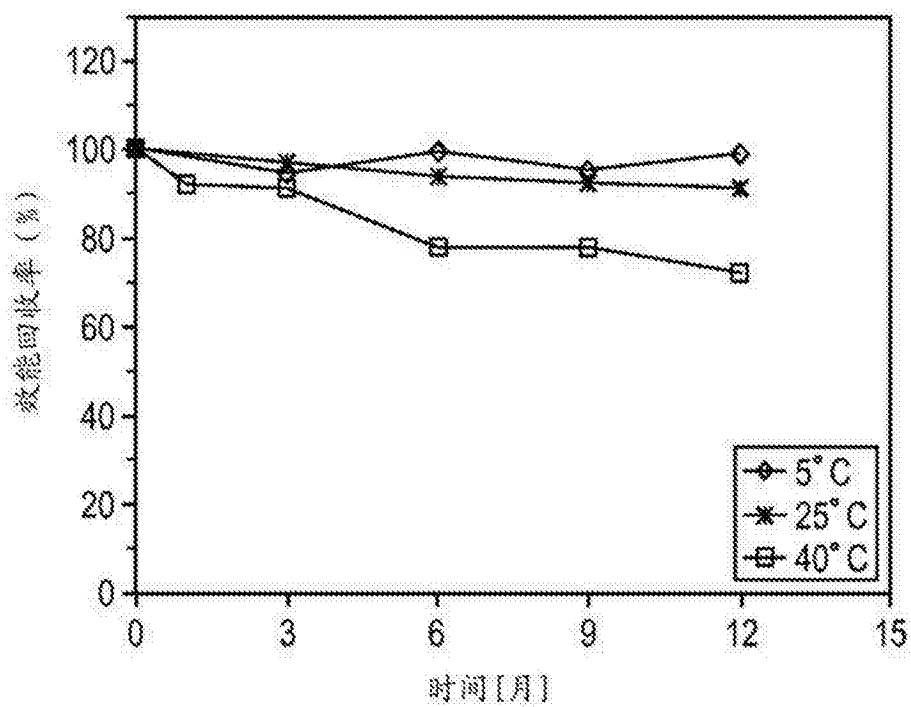


图 18

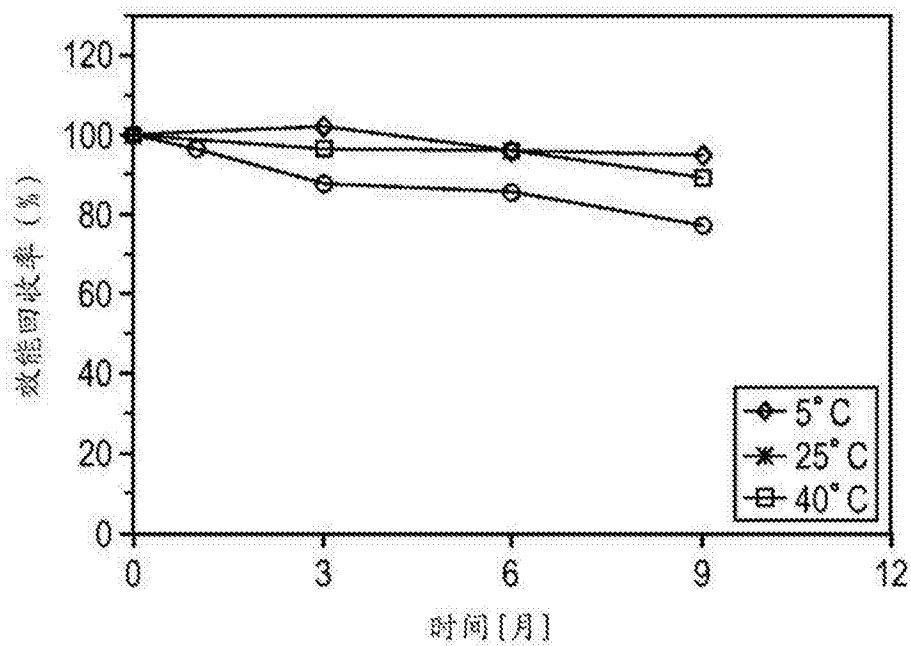


图 19

3 B-结构域缺失的SQ因子VIII

氨基酸序列SEQ ID NO: 3

```

1  mgielstcfff lclllrfcfssa trryylgave lswdymqsdll gelpvdarfp prvpksfpfn
61  tsvvykktlff veftdhlfnl akprppwmgll lgtiqaeevy dtvvtlknm ashpvslhav
121 gvsywkaseg aeyddqtsqr ekeddkvfpg gshtyvwqvl kengpmasdp lcltysylsh
181 vdlvkdlnsg ligallvcre gslakektqt lkhfillfav fdegkshse tknslmqdrd
241 aasarawpkm htvnngyvnrslpgllgchrk svywhvigmgttpevhsifl eghtflvrnh
301 rqsaleispi tfltaqtllm dlqqflfch issqhhdgme aykvdscepe epqlrmkne
361 eaedydddltdsemdvvrfd ddnspsfqi rsvakkhpkttwvhyiaaeedwdyaplvla
421 pddrsyksqy lnnqpqrigr kykkvrfmay tdetfktrea iqhesgilgp llygevgdtl
481 liifknqasr pyniypghgit dvnplysrll pkgvkhkldf pilpgeifky kwtvtvedgp
541 tkdprcltr vyssfvnmerr dlasgligpl licykesvdq rgnqimsdkr nvilfsvfde
601 nrswylteni qrfllnpagv qledpefqas nimhsingyv fdsllqlsvcl hevaywylls
661 igaqtdflsv ffsgytfkhk mvyedtltlf pfsgetvfms menpgllwilg chnsdfnrg
721 mtallkvssc dkntgdyved syedisayll sknnaieprs fsqnpvpvkr hqreitrtil
781 qsdqeeidyd dtisvemkke dfdiydeden qsprsfqkkt rhyfiaaver lwdygmsssp
841 hvlnnraqsg svpqfkkvfv qeftdgsftq plyrgelneh lgllgpyira evednimvtf
901 rnqasrpysf ysslisyeeed qrqgaepkrn fvkpnetkty fwkvqhmap tkdefdcakaw
961 ayfsdvdlek dvhsgligpl lvchtntlnp ahgrqvtvqe falfftifde tkswyftenm
1021 erncrapcni qmedptfken yrfhaingyi mdtlpglvma qdqrirwyll smgsnenihs
1081 ihfsghvftv rkkeeykmal ynlypgvfet vemlpskagi wrvecllige hlagmstlfl
1141 vysnkcqtpl gmasghirdf qitasggygq wapklarlhysgsinawstk epfswikvdl
1201 lapmiihgik tqgarqkfss lyisqfiimy slgdkkwqty rgnstgtlmv ffgnvdssgi
1261 khnifnppii aryirlhpth ysirstlrme lmgedlnscs mplgmeskai sdaqitassy
1321 ftnmfatwsp skarhlhqr snawrpqvnn pkewlqvdfq ktmkvtgvt qgvkslltms
1381 yvkefliss qdghqwtlff qngkvkvfqg nqdsftpvnn sldpplltry lrihpqswvh
1441 qialrmevlq ceaqqdly

```

图 20

1 人因子VIII氨基酸序列

SEQ ID NO: 1

```

1  mqieltstcflclllrfcfsatrrryylgave lswdymqsdllgelpvdarfoprpkspfnp
61  tsvvykktlftveftvhlfniaakprppwmgllgptiqaevydtvvtlknmashpvsilhav
121 gvsywkasegaeyddqtsqrakeddkvfpggshtyvwqvlkengpmasdp lcltysylsh
181 vdlvkdlnsgligallvcregslakektqt lkhfillfavfdegkshse tknslmqdrd
241 aasaraawpkmhtvngyvnrslpglligchrksvywhvigmg ttpevhslf1eghtflvrnh
301 rqaaleispi tfltaqtllm dlqqflfch issqhhdgmeayvkvdscpe epqlrmknne
361 eaedyddlt dsemdvvrfd ddnspsfqi rsvakkhpk twhyiaaeedwdyaplvla
421 pddrsyksq lnnqpqrigr kykkvrfmay tdetfktrea iqhesgilgp llygevgdtl
481 liifknqasr pyniylphgit dvrplysrll pkgvkhkdf pilpgeify kwtvtvedgp
541 tksdprcltr yyssfvnmer dlasgligpl licykesvdq rgnqimsdkr nvilfsvfe
601 nrswylteni qrfllnpagv qledpefqas nimhsingyv fdsllqlsvcl hevaywyils
661 igaqtdflsv ffsgytfkhk myedtltlf pfsgetvfms menpglwilg chnsdfrnrg
721 mtallkvssc dkntgdyed syedisayll sknaieprs fsqnsrhpst rqkqfnatti
781 pendiektdp wfahrtmpk iqnvssd11 mllrqstph glsldlqea kyetfddps
841 pgaidsnns1 semthfrpql hnsghmvftp esglqlrlne klgttaatel kklfdkvsst
901 snnlistips dnlaagdnt sslgppmpv hydsqldtl fggkssplte sggplslsee
961 ndskllesg lmsqesswg knvssesgr lfkgrahgp alltkdnalf kvsislktn
1021 ktsnnsatnr kthidgpl1 ienspsvwqn ilesdtefk vtplihrml mdknata1rl
1081 nhmsnktts knmemvqqkk egpippdaqn pdmsffkmlf lpesarwiqr thgknslnsg

```

图 21A

```

1141 qgpspkqlvs lgpeksvegq nflseknkv vkgfekt dv glkemvfpss rnlfltnldn
1201 lhenntnqe kkiqeeiekk etliqenvvl pqihtvtgtk nfmknlllls trqnvegsye
1261 gayapvlqdf rsIndstnrt kkhtahfskk geeenleglg nqtqkiveky acttrispnt
1321 sqqnfvtrqrs kraikqfrlp leetelekri ivddtstqws knmkhltpst ltqidyneke
1381 kgaitqspls dcltrshsip qanrspipia kvssfpsirp iyltrvlfqd nsshlpaasy
1441 rkkdsgvqes shflqgakkn nlsailitle mtgdqrevgs lgtatsnsvt ykkventvlp
1501 kpdlpktsqk vellpkvhiy qkdlfptets ngspghldlv egslldqteg aikwneanrp
1561 gkvpflrvat essaktpskl ldplawdnhy gtqipkeewk sqekspekta fkkkdtlsl
1621 nacesnhaia ainegqnkpe ievtwakqgr terlcsqnp vlkrhgreit rttlqsdqee
1681 idyddttisve mkkedfdi yd edenqsprsf qkkt rhyfia averlwdygm sssphvlnnr
1741 aqsgsvpqfk kvvfqeftdg sftqplyrge lnehlgllgp yiraevedni mvtfrnqasr
1801 pysfysslis yeedqrqgae prknfvkpne tktyfwkvqh hmaptkdefd ckawayfsdv
1861 dlekdvhs gl igp llvchtn tlnpahgrqv tvqefalf ft ifdetkswyf tenmerncra
1921 pcniqmedpt fkenyrrfhai ngyimdtlpg lvmaqdrir wyllsmgsne nihsihfsgn
1981 vftvrkkeey kmalynlypg vfetvemlps kagiwrvec l ighlhags tflvlvysnkc
2041 qtplgmasgh irdfqitasg ygqwapkla rlyhysina wstkepfswi kvdl lapmii
2101 hgiktqgarq kfsslyisqf iimysldgkk wqtyrgnstg tlmvffgnvd ssgikhnifn
2161 ppiariyirl hpthysirst lrmelmgcdl nscsmp lme skaisdaqit assyftnmfa
2221 twspskarlh lqgrsnawrp qvnpkewlq vdfqktmkvt gvt tggvksl ltsmyvkefl
2281 isssqdghqw tlffqngkvk vfqgnqdsft pvnsl dpp l ltrylrihpq swvhqialrm
2341 evlgceaqdl y

```

图 21B