



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105838699 A

(43)申请公布日 2016.08.10

(21)申请号 201610304880.0

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2007.12.14

C12N 9/96(2006.01)

(30)优先权数据

C12N 9/64(2006.01)

60/875,217 2006.12.15 US

A61K 47/48(2006.01)

(62)分案原申请数据

A61K 38/48(2006.01)

200780046301.6 2007.12.14

A61P 7/02(2006.01)

(71)申请人 巴克斯艾尔塔公司

地址 美国伊利诺伊州

申请人 巴克斯艾尔塔股份有限公司

(72)发明人 皮特·图雷切克 于尔根·西克曼

弗里德里·沙伊夫林格尔

米歇尔·卡纳瓦焦

(74)专利代理机构 上海市华诚律师事务所

31210

代理人 王金英

权利要求书1页 说明书16页 附图8页

(54)发明名称

具有延长的体内半衰期的因子VIIa-聚唾液酸结合物

(57)摘要

本发明涉及一种蛋白质构建体,其包含源于血浆的或者重组的因子VIIa(FVIIa)或其生物活性衍生物,其被结合于包含1-4个唾液酸单元的碳水化合物部分,其中,与未被结合于碳水化合物部分的FVIIa分子的体内半衰期相比,蛋白质构建体在哺乳动物血液中的体内半衰期被实质上延长。本发明还提供了一种用于控制哺乳动物体内出血的方法,该哺乳动物由于FVIIa、FVIII、或FIX功能性缺陷或缺乏而具有出血病症。本发明还提供了一种用于在外科手术或者外伤期间控制哺乳动物体内出血的方法。

1. 一种化学修饰的FVIIa分子,其包含:

(a)FVIIa分子,其选自由血浆FVIIa和重组FVIIa(rFVIIa)所构成的组;以及

(b)至少一个生理学可接受的碳水化物部分,其包含,被结合于所述FVIIa分子的一个以上氧化碳水化物部分上的1-4个唾液酸部分或聚唾液酸;

其中,与未被化学修饰的FVIIa分子的体内半衰期相比,所述化学修饰的FVIIa分子在哺乳动物血液中的体内半衰期被延长。

2. 如权利要求1所述的化学修饰的FVIIa分子,其特征在于,与未被化学修饰的FVIIa分子的体内半衰期相比,所述化学修饰的FVIIa分子的体内半衰期至少增加至约2倍。

3. 如权利要求1所述的化学修饰的FVIIa分子,其特征在于,与未被化学修饰的FVIIa分子的体内半衰期相比,所述化学修饰的FVIIa分子的体内半衰期至少增加至约3倍。

4. 如权利要求1所述的化学修饰的FVIIa分子,其特征在于,所述生理学可接受的碳水化物部分是聚唾液酸。

5. 一种药物组合物,其包含有效量的如权利要求1所述的化学修饰的FVIIa分子、以及一种以上选自于由药理学可接受的载体、稀释剂、盐、缓冲剂和赋形剂所构成的组的化合物。

6. 如权利要求1所述的化学修饰的FVIIa分子在控制哺乳动物出血的方法中的应用,所述哺乳动物患有与FVIIa、因子VIII(FVIII)和因子IX(FIX)中至少一个的功能性缺陷或缺乏有关的出血病症。

7. 如权利要求1所述的化学修饰的FVIIa分子在外科手术或外伤期间控制哺乳动物出血的方法中的应用。

8. 一种试剂盒,其包括包装在容器中的有效量的如权利要求1所述的化学修饰的FVIIa分子,所述试剂盒任选地含有第二治疗剂;并且还包括附贴于所述容器、或者包装所述容器的标签,所述标签用于描述所述容器的内容物、提供关于所述容器内容物用于控制哺乳动物出血的用法的指示和/或说明书。

9. 如权利要求8所述的试剂盒,其特征在于,所述容器是小瓶或者瓶子或者预先装液的注射器。

10. 一种制备化学修饰的FVIIa分子的方法,其包括:

在允许结合的条件下,将FVIIa分子上的氧化碳水化物部分与至少一个生理学可接受的碳水化物部分相接触,所述碳水化物部分包括1至4个唾液酸部分或聚唾液酸;其中所述FVIIa分子选自由血浆FVIIa和重组FVIIa(rFVIIa)所构成的组。

11. 如权利要求10所述的方法,其特征在于,所述生理学可接受的碳水化物部分是PSA。

具有延长的体内半衰期的因子VIIa-聚唾液酸结合物

[0001] 本申请是申请日为2007年12月14日、申请号为200780046301.6(国际申请号为PCT/US2007/087553)、名称为“具有延长的体内半衰期的因子VIIa-聚唾液酸结合物”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求在2006年12月15日申请的美国临时专利申请No.60/875,217的优先权。

技术领域

[0004] 本发明涉及一种蛋白质构建体,其包含结合于含有1-4个唾液酸单元的链的碳水化合物部分的凝血因子VIIa(FVIIa)。本发明还涉及用于延长哺乳动物血液中凝血蛋白、尤其是FVIIa的体内半衰期的方法,所述哺乳动物患有与至少FVIIa、因子VIII(FVIII)和因子IX(FIX)功能性缺陷或缺乏有关的出血病症。

背景技术

[0005] 凝血级联被分成三个不同的部分:内在的、外在的、以及共同的路径(Schenone等, Curr Opin Hematol.2004;11:272-7)。该级联涉及一系列丝氨酸蛋白酶(酶原)和蛋白质辅助因子。当需要时,无活性的酶原前体被转化为活性形式,从而转换级联中下一个酶。

[0006] 内在路径需要凝血性的因子VIII、IX、X、XI、以及XII。当激肽释放酶原、高分子量激肽原、因子XI(FXI)和因子XII(FXII)暴露于带负电的表面时,内在路径开始启动。还需要钙离子和由血小板分泌的磷脂。

[0007] 当血管的脉管内腔受损伤时,外在路径被启动。细胞膜糖蛋白组织因子被暴露,然后结合于循环性的因子VII(FVII),并且结合于其较小的在先存在量的活化形式FVIIa。这种结合可以促进FVII全部转化为FVIIa,并且随后当钙和磷脂存在时、因子IX(FIX)转化为因子IXa(FIXa),而因子X(FX)转化为因子Xa(FXa)。通过使FVII的结合位点更接近于底物(FX和FIX)、并且通过诱导构型变化,导致FVIIa与组织因子的连接增强了蛋白质水解的活性,其增强了FVIIa的酶活性。通过外在路径的FX活化速率比通过FIXa、FVIIIa、磷脂、以及钙离子的(内在)路径获得的活化速率大约慢50倍。

[0008] FX的活化是两种路径的共同点。随同磷脂和钙,因子Va(FVa)和Xa将凝血酶原转化为凝血酶(凝血酶原酶复合物),然后凝血酶裂解纤维蛋白原,从而形成纤维蛋白单体。该单体发生聚合,从而形成纤维蛋白链。因子XIIIa(FXIIIa)使这些链彼此共价结合,从而形成刚性网格。

[0009] FVII向FVIIa的转化也是通过由包括凝血酶、FIXa、FXa、因子XIa(FXIa)、以及因子XIIa(FXIIa)在内的许多蛋白酶的催化来进行的。对于级联早期的抑制,组织因子路径抑制剂靶向FVIIa/组织因子/FXa产物复合物。

[0010] FVII(亦称稳定因子或者前转化素)是维生素K-依赖性的丝氨酸蛋白酶糖蛋白,在止血和凝血中扮演着关键角色(Eigenbrot, Curr Protein Pept Sci.2002;3:287-99)。

[0011] FVII是在肝脏中合成的,并且被作为48kD的单链糖蛋白被分泌。FVIIa与所有的维生素K-依赖性的丝氨酸蛋白酶糖蛋白共同分享类似的蛋白质结构域结构,该结构域结构包含具有9-12个决定着蛋白质与类脂膜的相互作用的残基的氨基端 γ -羧基谷氨酸(Gla)结构域、羧基端丝氨酸蛋白酶结构域(催化结构域)、以及两种含有介导着与组织因子的交互作用的钙离子结合位点的表皮生长因子状结构域。

[0012] γ -谷氨酰基羧化酶催化在分子的氨基端部分中的Gla残基的羧基化。该羧化酶取决于其作用的维生素K的还原形式,该还原形式被氧化成环氧化物形式。维生素K环氧化物还原酶被要求将维生素K的环氧化物形式反向转化回还原形式。

[0013] 大部分的FVII在血浆中呈酶原形式循环,并且这种形式的活化导致在精氨酸152和异亮氨酸153之间的肽键的裂解。得到的活化的FVIIa包含NH₂-衍生的轻链(20kD)和COOH末端衍生的经由单一二硫键(Cys135至Cys262)连接的重链(30kD)。轻链含有细胞膜结合性Gla结构域,而重链含有催化结构域。

[0014] 被遗传因素和环境因素确定的FVII的血浆浓度是约0.5mg/mL(Pinotti等, Blood. 2000;95:3423-8)。不同的FVII基因型可以导致平均FVII水平中的好几倍差异。血浆FVII水平在健康孕妇怀孕期间被提高,也随着年龄而增加,并且在孕妇中和具有高甘油三酯血症的人中较高。FVII具有所有促凝血的因子当中最短的半衰期(3-6H)。在健康人体中FVIIa的平均血浆浓度是3.6ng/mL,并且FVIIa的循环半衰期与其他的凝血因子相比相对较长(2.5h)。

[0015] 遗传性的FVII缺陷是稀有常染色体隐性出血病症,在一般群体中发病率估计是每500,000人中1例(Acharya等, J Thromb Haemost. 2004;2248-56)。来自抑制剂的获得性FVII缺陷也是非常稀有。也报道了与药物比如头孢菌素、青霉素、以及口服抗凝血剂相关的发生缺陷的病例。另外,已经报告使用白细胞介素-2及抗胸腺细胞球蛋白疗法时获得性的FVII缺陷会自发性地发生或者与其他的状况比如骨髓瘤、脓毒病、再生障碍性贫血一起发生。

[0016] 代替治疗是用于患有FVII缺陷的病人的主要疗法(Mariani等, Semin Hematol. 2006;43(增补1):S42-7)。传统上一直使用新鲜冰冻血浆(FFP)、凝血酶原复合物浓缩物(PCCs)、或源于血浆的FVII浓缩物。然而,重组FVIIa(rFVIIa)现在被广泛用于这些病人的疗法。

[0017] 人们已经开发rFVIIa与抑制剂一起用于治疗甲型和乙型血友病病人的出血,并且已经发现甚至在大型外科手术比如主要的矫形外科手术期间可以诱导止血(Hedner, J Biotechnol. 2006;124:747-57)。rFVIIa是在BHK细胞培养物中生产的,并且已经被证明非常类似于源于血浆的FVIIa。在血友病治疗中使用rFVIIa是基于FVIIa对于凝血酶活化的血小板表面的低亲和性结合。通过给药药理学剂量的外源性rFVIIa,在损伤位置处在血小板表面上的凝血酶产生被增强,这与FVIII/FIX的存在无关。作为这种提高和凝血酶快速形成的结果,形成了紧密的纤维蛋白止血栓子。

[0018] 虽然最初开发用于治疗FVII缺陷和抑制剂综合性的甲型和乙型血友病,但用于rFVIIa的新指征(基于病例报告和较少的临床试验)包括在具有肝脏疾病、血小板减少、或定性的血小板机能障碍的病人中的使用和在未患凝血紊乱但由于大型外科手术或者较大外伤而出血的病人中的使用。

[0019] 治疗性的多肽药物比如包括FVIIa在内的凝血蛋白质会被蛋白水解酶快速降解,并且被抗体中和。这会降低它们的半衰期和循环时间,由此限制了它们的疗效。相对高的剂量和频繁给药对于达到并维持期望的FVIIa的治疗效果或预防效果来说是必要的。最终难以获得足够剂量的调节,并且频繁的静脉注射给药的需要形成了对病人生存途径的限制。因此,具有比较长的循环半衰期的改进的FVIIa分子将会减小必要的给药数量。

[0020] 原则上,对于血液循环中蛋白质的半衰期延长有四个一般选择:

[0021] • 直接的化合物或者酶的改进;

[0022] • 使用载体分子来保护循环中的蛋白质;

[0023] • 构造突变体以延长半衰期;

[0024] • 改进降解路径。

[0025] 本发明介绍了一种通过化学修饰进行的凝血蛋白质、尤其是FVIIa分子的改进。对于化学修饰治疗性的多肽,在过去已经使用了数种方法。

[0026] 多肽药物的PEG化可以保护它们,并且改善它们的药效和药物动力学分布型(Harris和Chess,Nat Rev Drug Discov.2003;2:214-21)。PEG化工艺将聚乙二醇(PEG)的重复单元连接于多肽药物。PEG分子具有很大的流体动力学体积(大小为球状蛋白质的5-10倍),是高度水溶性的和水化的、非常易变、无毒、非免疫原性,并且可从体内快速清除。分子的PEG化可以导致提高药物对酶降解的抗性、提高其在体内的半衰期、降低给药频率、减少免疫原性、提高物理学稳定性和热稳定性、提高溶解性、提高液体稳定性、以及降低聚集性。第一个被FDA(美国食品与药物管理局)批准的PEG化药物在20世纪90年代初获批。同时,FDA批准了数种用于口服、注射、以及体表给药的PEG化药物。

[0027] ClycoPEGylation™技术包括如下方法:在PEG聚合物和肽之间提供肽结合物,使PEG经由完整的糖基连接基团而共价附接于肽。

[0028] 脂质体已被用于包封多种分子比如DNA、反义RNA、抗生素、抗癌症药物、以及抗真菌药物、抑制剂/激活剂、抗体(免疫脂质体)、以及抗原(用于疫苗)。

[0029] 磷脂也可以被结合于(例如经由酰胺键)PEG(PEG-脂质体)、羧基PEG和纯化的大豆磷脂酰乙醇胺(PE)、酯和氨基甲酸酯衍生物。其中氨基甲酸酯衍生物在当今使用最广泛(美国专利No.6,593,294)。最普遍使用的PEG的分子量是2,000和5,000,但是也可使用600至12,000范围内的PEG。

[0030] 被酸性单糖取代的蛋白质首先在美国专利No.3,847,890中被公开。在该专利中,酸性的单糖、即,N-乙酰神经氨酸和葡糖酸盐被取代到胰岛素、人生长激素或者白蛋白的 α -氨基或 ϵ -氨基之上,从而降低多肽的抗原性。

[0031] 聚唾液酸(PSA)、也称为多聚乙酰神经氨酸(CA),是一种天然产生的多糖。其为具有 $\alpha(2\rightarrow8)$ 酮苷键的N-乙酰神经氨酸的均聚物,并且含有位于其非还原性末端的邻接的二醇基团。其带负电,并且是人体的天然组分。其可以由细菌容易地大量制造出来,并且具有预定的物理特性(美国专利No.5,846,951)。因为在化学和免疫学方面与人体中聚唾液酸相同,细菌性的聚唾液酸是非免疫原性的,即使当偶联于蛋白质时。不同于其他的聚合物(例如PEG),聚唾液酸是可生物降解的。多聚乙酰神经氨酸共价偶联于过氧化氢酶和天冬酰胺酶导致了当存在蛋白水解酶或者血浆时酶稳定性的提高。体内聚唾液酸化的(polysialylated)和未改性的天冬酰胺酶的对比性研究显示,聚唾液酸化可以提高酶的半

衰期(Fernandes和Gregoriadis, *Int J Pharm.* 2001; 217: 215-24)。

[0032] 然而,迄今为止,尚没有如美国专利No. 3,847,890所述的包含结合于酸性单糖的多肽的治疗性化合物被商品化。相反,美国专利No. 5,846,951教导说,在聚合体链中化合物的多糖部分应具有至少5个唾液酸残基、并且在其他实施方式中至少20或50个唾液酸残基。因为多糖通常在带有共纯化内毒素的固有风险的细菌中产生,长链唾液酸聚合体的纯化可能会升高提高的内毒素含量的概率。具有1-4个唾液酸单元的较短的PSA分子还可以通过合成法制备(Kang等, *Chem Commun.* 2000; 227-8; Ress和Linhardt, *Current Organic Synthesis.* 2004; 131-46),因此使高内毒素水平的风险最小化。

[0033] WO 98/32466 A1建议,在许多其他蛋白质之中的FVII可以被PEG化,但是其未包含可支持该公开的任何工作实施例。

[0034] WO 01/58935 A3教导,结合物含有至少一个被共价附接于多肽的非多肽部分,其中多肽的氨基酸序列不同于野生型FVII或FVIIa的氨基酸序列,在该野生型序列中至少一个含有用于所述非多肽部分的连接基团的氨基酸残基已经被导入或除去。对于非多肽部分,尤其建议为PEG。

[0035] US 20050113565 A1公开了一种FVII多肽或者与FVII相关的多肽,其中多肽含有一个以上与天门冬酰胺连接的和/或与丝氨酸连接的低聚糖链,并且其中所述低聚糖基团中的至少一个被共价附接于至少一个聚合物基团(PEG,“糖基PEG化(glycoPEGylation)”)。

[0036] 因此,本技术领域仍然需要可以提供凝血性蛋白质制品的组合物和方法,所述制品包含改善的血浆来源制品或与rFVII、改性FVII、或与FVII相关的多肽。

发明内容

[0037] 本发明提供了一种蛋白质构建体,其含有源于血浆的或者重组的因子VIIa (FVIIa)或其生物活性衍生物,所述FVIIa或者所述其生物活性衍生物被结合于具有1-4个唾液酸单元的链,其中,与缺少1-4个唾液酸单元链的FVIIa或其衍生物相比,该蛋白质构建体在哺乳动物、特别是人类血液中的体内半衰期被实质上延长。另外,本发明提供了含有所述蛋白质构建体的药物组合物、以及通过使用所述蛋白质构建体来用于延长FVIIa在哺乳动物血液中的体内半衰期的方法,其中哺乳动物患有与FVIIa、FVII和FIX中的至少一个的功能性缺陷或缺乏有关的出血病症。还可以给药本发明的蛋白质构建体,来控制具有正常水平凝血因子的哺乳动物的外伤或者外科手术病例中的出血。

[0038] 在本发明的一个具体实施方式中,提供一种蛋白质构建体,其包含:(a)活化的Factor VII(FVIIa)分子,其选自由血浆FVIIa、重组FVIIa(rFVIIa)、以及FVIIa的生物活性衍生物所构成的组;以及(b)至少一个生理学上可接受的含有1-4个被结合于所述FVIIa分子的唾液酸单元的碳水化合物部分。其中,与未被结合于所述碳水化合物部分的FVIIa分子的体内半衰期相比,所述构建体在哺乳动物血液中的体内半衰期被延长。

[0039] 在本发明的另一个实施方式中,提供上述的蛋白质构建体,其中,与未被结合于所述碳水化合物部分的FVIIa分子的体内半衰期相比,所述构建体的体内半衰期至少增加至约两倍。在另一个实施方式中,提供上述的蛋白质构建体,其中,与未被结合于所述碳水化合物部分的FVIIa分子的体内半衰期相比,所述构建体的体内半衰期至少增加至约三倍。在再一个实施方式中,提供上述的蛋白质构建体,其中,生理学可接受的碳水化合物部分被直接地共

价连接于所述FVIIa分子的至少一个氨基酸残基上。

[0040] 在本发明的又一个实施方式中,提供上述的蛋白质构建体,其中,生理学可接受的碳水化合物部分被非共价连接于所述FVIIa分子的至少一个氨基酸残基上。在再一个实施方式中,提供上述的蛋白质构建体,其中,所述生理学可接受的碳水化合物部分是聚唾液酸或其衍生物。

[0041] 在本发明的一个具体实施方式中,提供一种药物组合物,其包含有效量的上述的蛋白质构建体和一种或多种选自由药学上可接受的载体、稀释剂、盐、缓冲剂和赋形剂所组成的组的化合物。

[0042] 在本发明的另一个实施方式中,提供一种控制哺乳动物体内出血的方法,所述哺乳动物具有与FVIIa、FVIII和FIX中的至少一个的功能性缺陷或缺乏有关的出血病症,其包括给药上述蛋白质构建体。在又一个实施方式中,提供一种在外科手术或外伤期间控制哺乳动物体内出血的方法,包括给药上述蛋白质构建体。

[0043] 在本发明的再一个实施方式中,提供一种试剂盒,其包括包装在容器中的有效量的上述蛋白质构建体。其中,该试剂盒任选地含有第二治疗剂;并且还包括附贴于容器、或者用容器包装的标签,该标签用于描述容器的内容物、并且提供关于容器内容物用于控制哺乳动物体内的出血的用法的指示和/或说明书。在又一个实施方式中,提供上述试剂盒,其中容器是小瓶或者瓶子或者预先装液的注射器。

[0044] 应当理解,本发明不局限于在此描述的FVII部分。本发明的一个方面涉及一种蛋白质构建体,其包括凝血级联的一个成员--血浆FVIIa(即,源于血浆的FVIIa)和/或重组FVIIa或者其生物活性衍生物(在文中也称为“PSA-FVIIa-结合物”),所述FVII或者所述其生物活性衍生物被结合于1-4个唾液酸部分,其中,所述FVIIa或者所述其生物活性衍生物在哺乳动物血液中的体内半衰期被延长。这里使用的术语“蛋白质构建体”指的是活化的因子VII(FVIIa)分子,选自由血浆FVIIa、重组FVIIa(rFVIIa)、以及FVIIa的生物活性衍生物所构成的组;以及(b)至少一个生理学上可接受的包含1-4个被结合于所述FVIIa分子的唾液酸单元的碳水化合物部分。这里使用的术语“血浆的”指的是“源自血浆的”。

[0045] FVIIa多肽和多核苷酸

[0046] 用于本发明的FVIIa分子包括全长的蛋白质、蛋白质前体、生物学活性的或功能性的蛋白质亚基或片段,和其功能性衍生物。谈及FVIIa,意味着包括这种蛋白质的所有潜在形式。

[0047] 根据本发明,术语“重组因子VIIa”(rFVIIa)并不构成特定的限制,并且可以包括异源的或天然产生的任何rFVIIa,这是经由DNA重组技术而获得的任何rFVIIa、或可以包括其生物活性衍生物。在特定的实施方式中,该术语包括蛋白质和核酸,例如,基因、前mRNA、mRNA、以及多肽、多形态的变体、等位基因、突变体、以及种间同系物,其:(1)具有一氨基酸序列,该氨基酸序列在含有至少约25、50、100、200、300、400、或更多个氨基酸的区域(直到成熟蛋白质的406个氨基酸的全长序列)内,与被在此描述的参照的核酸序列或氨基酸序列进行编码的多肽的一致性约大于60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%、或者更大;(2)特异性地结合于抗免疫原升高的抗体例如多克隆抗体,所述免疫原包含在此描述的作为其免疫原性片段的参照氨基酸序列、及其保守性修饰的变体;(3)在对于编码在此描述的参照氨基酸序列的核酸、及其保守

性地修饰的变体而言严格的杂交条件下进行特异性地杂交；(4)具有一核酸序列，该核酸序列在至少约25、50、100、150、200、250、500、1000、或更多个核苷酸的区域(直到成熟蛋白质的1218个核苷酸的全长序列)内，与在此描述的参照核酸序列的一致性约大于95%、96%、97%、98%、99%、或更高。

[0048] 在此使用的术语“内源FVIIa”包括来源于所述哺乳动物的FVIIa。也包括由转基因或者任何其它存在于所述哺乳动物的外来DNA转录来的FVIIa。在此使用的术语“外源FVIIa”包括并非来源于所述哺乳动物的FVIIa。

[0049] 变体(或类似物)多肽包括嵌合性变体，其中，FVIIa氨基酸序列上补充有一个以上氨基酸残基。嵌合可以位于蛋白质的任何一个末端或两个末端，或者可以位于FVIIa氨基酸序列的内部区域内。在任何一个或两个末端处具有附加残基的嵌合性变体，可以包括，例如，融合蛋白和包含氨基酸标记或标签的蛋白质。例如，FVIIa分子可以任选地含有N-末端Met，尤其当分子在细菌细胞比如大肠杆菌中被通过重组方式表达时。

[0050] 在缺失性变体中，在FVIIa多肽中的一个以上氨基酸残基被除去。在FVIIa多肽的一个或两个末端处、或者随着FVIIa氨基酸序列内部一个以上残基的去除，可能会因起缺失。因此，缺失性变体包括FVIIa多肽序列所有的片段。

[0051] 在取代性变体中，FVIIa多肽中的一个以上氨基酸残基被除去并且用可选的残基取代。在一个方面，取代在本质上是保守性的，并且这种类型的保守性取代为本领域技术人员所熟知。作为另一种选择，本发明包含同时也是非保守性的取代。示例性的保守性取代如Lehninger所述(生物化学第二版。Worth出版公司出版，纽约(1975)，p71-77)并且列于下表。

[0052] 保守性取代

侧链特性	氨基酸
非极性的(疏水性的)：	
A. 脂肪族的	ALIVP
B. 芳香族的	FW
C. 含硫的	M
D. 两可的	G
[0053] 不带电荷的-极性的：	
A. 羟基	STY
B. 酰胺	NQ
C. 硫氢基	C
D. 两可的	G
带正电荷的(碱性的)	KRH
带负电荷的(酸性的)	DE

[0054] 可选地，示例性的保守性取代列于下表。

[0055]	<u>保守性取代II</u>	
	原始残基	示例性的取代基
	Ala (A)	Val, Leu, Ile
	Arg (R)	Lys, Gln, Asn
	Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
[0056]	Asp (D)	Glu
	Cys (C)	Ser
	Gln (Q)	Asn
	Glu (E)	Asp
	His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
	Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe,
	Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
	Lys (K)	Arg, Gln, Asn
	Met (M)	Leu, Phe, Ile
	Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
[0057]	Pro (P)	Gly
	Ser (S)	Thr
	Thr (T)	Ser
	Trp (W)	Tyr
	Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
	Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

[0058] 多核苷酸或者多肽序列典型地是来自哺乳动物,包括但不限于:灵长类动物,例如,人类;啮齿动物,例如,大鼠、小鼠、仓鼠;母牛;猪;马;绵羊;或者任何哺乳动物。本发明的核酸和蛋白质可能是重组体分子(例如,异源的并编码野生型序列或其变体的分子、或者非天然产生的分子)。参照多核苷酸和多肽序列包括,例如,GenBank入藏登记号中基因组序列的J02933、cDNA的M13232(Hagen等,PNAS.1986;83:2412-6)、多肽序列的ad P08709(在此将其全部内容并入本文作为参考)。已经描述了FVII的许多多形性,例如,参见Sabater-Lleal等(Hum Genet.2006;118:741-51)(在此将其全部内容并入本文作为参考)。

[0059] 在此使用的“生物活性衍生物”或者“生物学活性变体”,包括任何具有与所述分子基本上相同功能的和/或生物学特性(比如结合特性)的分子的衍生物或变体、和/或相同结构基体(比如肽骨架)或基本聚合单元的分子的衍生物或变体。

[0060] 在此使用的术语“源于血浆的FVIIa”或者“血浆的”包括从哺乳动物获得的在血液中发现的具有激活凝血路径特性的所有形式的蛋白质。

[0061] 在此使用的术语“重组FVIIa”包括经由DNA重组技术而获得的rFVIIa。其可以通过本技术领域任何已知的方法而产生。在美国专利No.4,784,950中公开了一个具体的例子。该rFVIIa的实例是Novo Nordisk制造并出售的NovoSeven。

[0062] FVIIa产生和表达

[0063] rFVIIa的生产可以包括本技术领域任何已知的下述方法:(i)通过基因工程例如经由RNA逆转录和/或DNA扩增来产生重组DNA,(ii)通过转染例如经电穿孔法或者微量注射法,将重组DNA导入原核或者真核细胞,(iii)例如以连续的或分批的方式培养所述转化细胞,(iv)例如组成性或在诱导下表达FVIIa,和(v)例如从培养基或通过收获转化细胞而分离所述FVIIa,以便(vi)例如经过阴离子交换色谱法或者亲和色谱法得到纯化的rFVIIa。

[0064] 通过在合适的原核或真核寄主系统表达,可以生产出rFVIIa,其特征在于生产药理学可接受的rFVIIa分子。真核细胞的例子是哺乳动物细胞,比如CHO、COS、HEK293、BHK、SK-Hep和HepG2。不具体限制用于生产或分离根据本发明的rFVIIa的试剂或者条件,并且可以使用任何本技术领域已知的或者商品化的系统。

[0065] 多种载体可以用于rFVIIa的制备,并且可以选自真核和原核的表达载体。用于原核表达的载体的例子包括质粒比如pRSET、pET、pBAD等,其中在原核表达载体中使用的启动子包括lac、tre、tip、recA、araBAD等。用于真核表达的载体的例子包括:(i)用于在酵母中表达的载体,比如pA0、pPIC、pYES、pMET,其使用启动子比如AOX1、GAP、GAL1、AUG1等;(ii)用于在昆虫细胞中表达的载体,比如pMT、pAc5、pIB、pMIB、pBAC等,其使用启动子比如PH、p10、MT、Ac5、OpIE2、gp64、polh等;以及(iii)用于在哺乳动物细胞中表达的载体,比如pSVL、pCMV、pRc/RSV、pcDNA3、pBPV等;以及来源于病毒系统的载体,所述病毒比如是牛痘病毒、腺病毒相关病毒、疱疹病毒、反录病毒等,使用的启动子比如是CMV、SV40、EF-1、UbC RSV、ADV、BPV、以及β-肌动蛋白。

[0066] 唾液酸

[0067] 在此使用的术语“唾液酸部分”,包括可溶于水溶液或者悬浮液的唾液酸单体或者聚合物,并且在以药学有效量给药PSA-FVIIa-结合物时,对哺乳动物没有负面影响比如副作用。对于根据本发明使用的唾液酸单元没有具体限制。在一个方面,该聚合物的特点是具有1到4个单元。不同的唾液酸单元也可以被结合在一条链中。

[0068] 例如,通过美国专利no4,356,170所述的方法,可以将唾液酸部分结合于FVIIa,在此将其引入本文以供参考。在本发明的一个具体实施方式中,多糖化合物可以是天然产生的多糖、天然多糖的衍生物、或者多糖的天然衍生物。通常情况下,在化合物中全部糖类残基是唾液酸残基。

[0069] 用于将PSA偶联于多肽的其他方法也是已知的。例如,美国专利公开No.2007/0282096描述了将胺类或者酰肼衍生物例如PSA结合于蛋白质。另外,美国专利公开No.2007/0191597描述了PSA衍生物含有醛基,用于与底物(例如,蛋白质)在还原性的终端处进行反应。

[0070] 在本发明的一个具体实施方式中,多糖化合物的聚唾液酸部分是高度亲水的;并且在另一个实施方式中,整个化合物是高度亲水的。主要通过唾液酸单元的附属羧基以及羟基使化合物具有亲水性。糖单元可以含有其它官能团,比如胺、羟基或者硫酸酯基团,或者其组合。这些基团可以存在于天然糖类化合物上,或者导入衍生的多糖化合物。

[0071] 特别用于本发明的多糖化合物是细菌产生的多糖化合物。某些天然产生的多糖被称为糖脂。尤其有利的是,多糖化合物基本上不含末端半乳糖单元,易于被肝细胞和库柏法细胞(Kupffer cells)的半乳糖受体识别。

[0072] 连接

[0073] FVIIa可以通过本领域的技术人员所熟知的任何各种技术而被共价连接于多糖化合物。多个实施例引证在美国专利No.5,846,951第7栏第15行至第8栏第5行中。

[0074] 这些实施例包括:通过在FVIIa或多糖的任何一种上的羧基与其它物质的胺基之间肽键的连接,或者在一种物质的羧基与其它物质的羟基之间酯键的连接。通过活性成分进行的另一种连接是经由活性成分上游离氨基之间席夫碱的连接,所述活性成分例如FVIIa可以被共价结合于多糖化合物,所述活性成分可与通过高碘酸盐氧化作用而在聚合物的非还原性末端处形成的醛基起反应。(Jennings和Lugowski, *J Immunol.* 1981;127:1011-8;Femandes和Gregonradis, *Biochim Biophys Acta.* 1997;1341;26-34)。产生的席夫碱可以通过与NaCNBH₃的特异性还原反应以形成仲胺而被稳定化。一种可选的途径是,在预先的氧化反应之后,通过与NH₄Cl的还原性胺化作用而在聚唾液酸(PSA)中产生末端游离氨基。双功能试剂可以被用于连接两个氨基或者两个羟基。例如,使用试剂比如BS³(双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯/Pierce公司, Rockford, 伊利诺斯州)可以将含有氨基的PSA偶联于蛋白质的氨基。另外,杂双功能交联试剂比如Sulfo-EMCS(N-ε-马来酰亚胺己酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯/Pierce公司)可以被用于连接例如胺类和硫醇基团。

[0075] 在另一个途径中,可以制备PSA酰肼,并且在预先的氧化反应和产生醛类功能之后将其偶联于蛋白质的碳水化物部分。

[0076] 治疗性蛋白的游离胺基可以与唾液酸残基的1-羧基起反应从而形成肽基键,或者可以在1-羧酸基和活性成分上的羟基或其他合适的活性基团之间形成酯键。作为另一种选择,羧基可以与脱乙酰基的5-氨基形成肽键。药理学活性化合物分子的醛基可以与唾液酸残基上的N-脱乙酰基的5-氨基形成席夫碱。

[0077] 可选地,多糖化合物可以以非共价方式与药理学活性化合物例如FVIIa相连接。例如,多糖化合物和药理学活性化合物可以通过疏水性的相互作用例如通过多糖化合物的脂类组分而与疏水性的药理学活性化合物相连接。其他非共价的连接关系可以通过静电相互作用,这是电荷相反的离子彼此吸引。

[0078] 药理学活性化合物可以以化学计量的含量(例如,1:1)而被直接地共价连接于多糖化合物。作为另一种选择,两个以上分子的多糖化合物可以被连接于一个分子的活性成分上。

[0079] 应用

[0080] 本发明的目的在于,与未被连接于至少一个生理学可接受的唾液酸部分上的FVIIa的体内半衰期相比,提高了凝血蛋白质、尤其FVIIa或其生物活性衍生物的体内半衰期,应用对象患有与FVIIa功能性缺陷或缺乏有关的出血病症。本发明的PSA-FVIIa-结合物可以进一步被用于与FVIII和FIX中至少一个的功能性缺陷或者先天性或获得性缺乏有关的出血病症治疗。

[0081] 按照目前治疗水平,并且根据国际准则和条例,注入的FVIIa的药物动力学被确认并且被视作有效替代的有效性标准参照物(Bjorkman和Berntrop, *Clin*

Pharmacokinet.2001;40:185-32)。

[0082] 这基于已证实的假设,即已经通过机能活动的标准化测试所表征的注入的FVIIa产物将在血流中被发现,并且将按照预期在那里作为凝血级联的组分起作用。因此动物模型中任何药物动力学分析都将预示对于用FVIIa产品治疗的病人的预期功效。

[0083] 半衰期

[0084] 在本发明的一种实施方式中,蛋白质构建体的体内半衰期被延长。在一个相关的实施方式中,与未被结合于唾液酸的FVIIa相比,蛋白质构建体的体内半衰期被延长至少两倍;而在另一个实施方式中,体内半衰期被延长至少三倍。通过在大鼠体内测量药物动力学,可以评估FVIIa半衰期的延长情况,如下述实施例所述。

[0085] 给药

[0086] 给药途径不作具体限制,并且在一种实施方式中,本发明的蛋白质构建体可以注射给药,比如静脉注射、肌肉注射、或者腹膜内注射。

[0087] 为了将本发明包含蛋白质构建体的组合物给药于人类或试验用动物,在一个方面,组合物包含一种以上药物学可接受的载体。术语“药物学”或“药理学可接受的”指的是稳定的分子实体和组合物,其可抑制蛋白质降解比如聚集和分裂产物,另外当通过使用本技术领域众所周知的途径给药时不会产生过敏反应或者其他不良反应,如下所述。术语“药物学可接受的载体”包括任意的临床使用的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗试剂和吸收延迟试剂等,包括上述公开的那些试剂。

[0088] 在此使用的术语“有效量”,包括适合于治疗如上所述患有出血病症的哺乳动物的剂量。

[0089] 组合物可以通过下述途径给药:口服、体表、透皮、肠胃外、吸入喷雾、阴道给药、直肠、或者颅内注射。在此使用的术语“肠胃外”包括皮下注射、静脉注射、肌肉注射、脑池内注射、或者输液技术。通过静脉注射、皮内注射、肌肉注射、乳房内注射、腹膜内注射、鞘内注射、眼球后注射、肺内注射和/或特定位点处手术植入的给药也是可行的。一般来讲,组合物基本上不含热原、以及可能对受试者有害的其他杂质。

[0090] 可以进行组合物的单一给药或者多次给药,剂量水平和模式由主治医师选择。为了预防或治疗疾病,如上所述,适当的剂量将取决于被治疗的疾病类型、严重程度和疾病过程,药物给药是用于预防目的还是治疗目的、先前的治疗、病人的病历和对药物的反应、以及主治医师的判断。

[0091] 药物组合物

[0092] 本发明还涉及一种包含有效量的如上限定的蛋白质构建体的药物组合物。该药物组合物可以进一步包含药物学可接受的载体、稀释剂、盐、缓冲液、或者赋形剂。该药物组合物可以用于治疗如上限定的出血病症。本发明的药物组合物可以是溶液或冻干制品。有许多已知的形成蛋白质特别是FVIIa的稳定溶液的方法。在美国专利No.5,874,408中公开了一个实施例。可以对药物组合物的溶液进行任何合适的冻干加工。

[0093] 试剂盒

[0094] 作为附加的方面,本发明包括试剂盒,其包含以可促进向对象给药的方式进行包装的本发明的组合物。在一种实施方式中,这样的试剂盒包括被包装在容器比如密封瓶子或密封管中的在此描述的化合物或组合物(例如,包含蛋白质构建体的组合物),带有附着

于容器、或者包括在包装中的标签,用于描述在实施该方法时化合物或组合物的使用。在一种实施方式中,试剂盒含有具有包含蛋白质构建体的组合物的第一容器、和具有用于第一容器中组合物的生理学可接受的重建溶液的第二容器。在一个方面,化合物或者组合物以单位剂量形式被包装。该试剂盒可以进一步包括适合于根据特定的给药途径而给药组合物的装置。优选地,试剂盒含有描述治疗性蛋白或肽组合物的使用的标签。

附图说明

- [0095] 图1显示了rFVIIa在与PSA结合后的SDS-PAGE。
- [0096] 图2显示了rFVIIa-PSA-结合物和未修饰的rFVIIa在大鼠体内的药物动力学。
- [0097] 图3显示了rFVIIa-PSA-结合物和未修饰的rFVIIa在大鼠体内的药物动力学(抗原水平)。
- [0098] 图4显示了rFVIIa在N-末端与PSA结合后的SDS-PAGE。
- [0099] 图5显示了单SA-rFVIIa和三SA-rFVIIa的毛细管电泳。
- [0100] 图6A和6B显示了rFVIIa-PSA-结合物和未修饰的rFVIIa在大鼠体内的药物动力学,A:单SA-rFVIIa;B:三SA-rFVIIa。
- [0101] 图7显示了N-乙酰神经氨酸三聚体的毛细管电泳。

具体实施方式

- [0102] 以下用实施例进一步阐明本发明。但并不是对本发明作任何限制。
- [0103] 实施例
- [0104] 实施例1:
- [0105] 用多聚乙酸神经氨酸修饰rFVIIa中的赖氨酸残基
- [0106] 按照Jennings和Lugowski描述的方法(J Immunol.1981;127;1011-8),用唾液酸(多聚乙酸神经氨酸,CA)对赖氨酸残基进行修饰。该过程使用购自Sigma公司(Sigma-Aldrich,圣路易斯市;密苏里州)的CA。将含有0.1M NaIO₄的CA水溶液(浓度:20mg/mL)在室温下避光搅拌15min以氧化CA。每毫升活化的CA溶液中加入2mL乙二醇,并且在室温下避光进一步搅拌30min。溶液在0.05M磷酸钠缓冲液、pH 7.2中、在2-8°C的温度范围内避光透析过夜。
- [0107] 随后将等分的这种溶液加至在0.05M磷酸钠缓冲液、pH 7.2中的rFVIIa溶液(30μg/mL)中,使终浓度为100mg活化CA/每mg rFVIIa。该混合物在室温下避光搅拌180min。添加NaCNBH₃(终浓度10mg/mg rFVIIa),并且在轻轻振荡下将混合物室温下避光保温18h。然后每毫升该混合物中加入2.5mL的1M TRIS-水溶液、pH 7.2,并且搅拌60min以终止反应。
- [0108] 使用QHyperD F 50μm树脂(Pall BioSeptra公司,Cergy,法国)和Pharmacia XK-10柱(Pharmacia XK 10;h=15cm),通过离子交换色谱法,将游离的试剂与rFVIIa-CA酸性结合物相分离。然后用洗脱缓冲液(20mMHEPES/1M NaCl,pH 8.0)洗脱结合CA的蛋白质。最后,使用30kD滤膜(再生纤维素/Millipore公司),在含有150mM NaCl和0.5%蔗糖的20mM HEPES缓冲液、pH 7.4中,通过超滤/渗滤(UF/DF)作用浓缩该洗脱液。
- [0109] 实施例2:
- [0110] 聚唾液酸化的rFVIIa的生物化学表征

[0111] 通过凝血测试方法测定rFVIIa-PSA的酶活性,其中将FVIIa加至人的FVII缺乏的血浆中,并且通过截短的组织因子与FVIIa反应而不是与FVII(Staclot, Diagnostica Stago公司,Asnieres,法国)反应来引发凝结。

[0112] 通过凝血酶产生测定法(TGA)测量rFVII-PSA的FVIII旁路活性,其中当存在凝血酶特异性的荧光肽-底物时,将FVIIa加至含有较高滴度的抗FVIII抑制剂的严重的血友病A血浆中。用组织因子-磷脂复合物引发凝血,并且通过底物荧光团的裂解速度连续地测量凝血酶产生。由峰值凝血酶,即,在测定期间观察到的最大凝血酶浓度计算出凝血酶产生活性。在两个案例中,使用NovoSeven重组FVIIa制品(Novo Nordisk公司,哥本哈根,丹麦)作为参照。

[0113] 如表1所示,在修饰之后PSA-rFVIIa的比活力会降低。

[0114] 表1:在与PSA结合前后rFVIIa的比活力

[0115]

	FVIIa 活性	
	STF (U/mg 蛋白质)	TGA (U/mg 蛋白质)
未修饰的 rFVIIa	45942	44296
rFVIIa-PSA	1003	22

[0116] 在非还原的条件下进行SDS-PAGE,目测修饰。用多克隆抗FVII抗体(Affinity Biologicals公司;Ancaster,加拿大)并且用单克隆抗PSA抗体(Chemicon国际公司, Temecula,加利福尼亚州,美国)进行免疫染色。修饰导致通过与含有蛋白质的PSA相关联的斑迹面积所显示的FVIIa分子量的增加(图1)。

[0117] 实施例3:

[0118] 在大鼠体内rFVIIa-PSA-结合物的药物动力学

[0119] 四个大鼠(Cr1:CD(SD),Charles River实验室公司,Wilmington,马萨诸塞州)被麻醉,并且通过以20mL/每kg的体积剂量经尾部静脉注射入在缓冲液(1.3g/L甘氨酸、3g/L氯化钠、30g/L甘露醇、1.5g/L CaCl₂·2H₂O、0.1g/L吐温80、pH 5.5)中的rFVIIa-PSA-结合物(16.500U FVIIa/kg)。在6个正常大鼠身上将未修饰的rFVIIa以18.000U FVIIa/kg的剂量用作对照。在注射入所施用物质5min、30min、1h、2h、4h、6h、8h和24h后,从眼球后静脉取得血液样本。制备柠檬酸血浆并冷冻,用于进一步分析。

[0120] 然后测量血浆中FVIIa活性(Staclot, Diagnostica Stago公司,Asnieres,法国)。未修饰的rFVIIa的半衰期是1.1h,并且随着与rFVIIa结合增加到2.3h(图2)。

[0121] 在附加的实验中测量FVIIa抗原水平的药物动力学。六个大鼠被麻醉,并且通过以10mL/每kg的体积剂量经尾部静脉注射入在缓冲液(1.3g/L甘氨酸、3g/L氯化钠、30g/L甘露醇、1.5g/L CaCl₂·2H₂O、0.1g/L吐温80、pH 5.5)中的rFVIIa-PSA-结合物(450μg/kg)。在6个正常大鼠身上将未修饰的rFVIIa以390μg/kg的剂量用作对照。在注射入所施用物质5min、30min、1h、2h、4h、6h、8h、12h和24h后,从眼球后静脉取得血液样本。制备柠檬酸血浆并冷冻,用于进一步分析。用ELISA(多克隆抗人FVII抗体)测量血浆中FVII抗原水平。当用在1.1h(对于天然rFVIIa)和3.1h(对于rFVIIa-结合物)内得到的MS Excel确定

时,通过线性回归来计算半衰期。FVII抗原被归一化为在施用5min后获得的平均血浆水平(图3)。

[0122] 实施例4:

[0123] FVIIa的N-末端聚唾液酸化

[0124] 在pH 6.0下进行CA在FVIIa的N-末端处的结合。该过程使用购自Sigma公司(Sigma-Aldrich)的CA,其在Q-Sepharose FF(GE Healthcare公司,慕尼黑,德国)上通过阴离子交换色谱被进一步纯化。将含有0.04M NaIO₄的纯化CA的水溶液(浓度:23mg/mL)在室温下避光搅拌15min以氧化CA。接着,将等分的这种溶液加至在0.05M磷酸钠缓冲液、pH 6.0中的rFVIIa溶液(740μg/mL)中,使终浓度为60mg活化CA/每mg rFVIIa(过量大约150摩尔)。将该混合物在室温下避光搅拌180min。添加NaCNBH₃(25mg/mg rFVIIa),并且在轻轻振荡下将混合物于4℃下避光保温24h。然后每毫升该混合物中加入2.5mL的1M TRIS-水溶液、pH 7.2,并且于4℃下避光搅拌60min以终止反应。

[0125] 使用QHyperD F 50μm树脂(Pall BioSeptra公司,Cergy,法国)和Pharmacia XK-16柱(Pharmacia XK 16;h=14cm),通过离子交换色谱法,将游离的试剂与rFVIIa-CA酸性结合物相分离。然后用洗脱缓冲液(20mM HEPES/0.5M NaCl、pH 8.0)洗脱结合CA的蛋白质。最后,使用10kD滤膜(再生纤维素/Millipore公司)在含有150mM NaCl的20mM HEPES缓冲液、pH 7.4中通过UF/DF浓缩洗脱液。离子交换色谱和UF/DF步骤是在4℃下进行。

[0126] 按照在实施例2中描述的方法,通过凝血测试方法、并且通过凝血酶产生测定来确定N-末端改性的rFVIIa-PSA的酶活性。结果汇总于表2中。

[0127] 表2:在与PSA进行N-末端结合前后rFVIIa的比活力

[0128]

	FVIIa 活性	
	STF (U/mg 蛋白质)	TGA (U/mg 蛋白质)
未修饰的 rFVIIa	52749	56814
rFVIIa-PSA- (N-末端)	25030	12564

[0129] N-末端结合的PSA-rFVIIa的比活力通过STF测定法测量约下降到50%;并且通过TGA测量下降到25%。

[0130] 按照在实施例2中描述的方法,在用多克隆抗FVII抗体、并且用多克隆抗PSA抗体进行免疫染色的非还原条件下用SDS-PAGE来目测修饰。修饰导致与在抗PSA染色的免疫印迹中所显示条带相关联的FVIIa分子量轻微的提高(图4)。

[0131] 实施例5:

[0132] FVIIa与CNBr活化的合成N-乙酰神经氨酸的结合

[0133] 按照美国专利No. 3,487,890.350所述的方法,使rFVIIa与N-乙酰神经氨酸相结合。将350mg合成的N-乙酰神经氨酸(Sigma-Aldrich)溶于10mL的0.1M HEPES缓冲液、pH 9.0中,然后将430mg的CNBr(Fluka公司,Steinhamm,德国)加至这种溶液中,并且在活化过程期间用0.5M NaOH将pH调节到9.5。在30min后,pH值是9.5。然后通过添加0.1M的HCl,把pH值调节到8.4。在整个活化过程期间,通过利用冰浴来控制温度,并且保持在20-25℃。对于

活化N-乙酰神经氨酸与rFVIIa的结合,加入在50mM磷酸盐缓冲液、pH 7.2中的rFVIIa溶液(50mL/0.44mg rFVIIa/mL),并且在轻轻搅拌下于室温下保温30min。然后加入20mL的0.2M Tris缓冲液,用于终止反应并阻断游离的氰酸酯,将混合物在轻轻搅拌下保温15min。最后,使用10kD滤膜(再生纤维素/Millipore公司)在50mM磷酸盐缓冲液、pH 7.2中通过UF/DF浓缩该溶液。

[0134] 实施例6:

[0135] FVIIa与CNBr活化的合成N-乙酰神经氨酸三聚体的结合

[0136] 按照美国专利No.3,487,890所述用于N-乙酰神经氨酸的方法,将rFVIIa结合于从TimTec有限公司(Newark,美国)购得的合成的N-乙酰神经氨酸三聚体。将350mg的N-乙酰神经氨酸三聚体溶于10mL的0.1M HEPES缓冲液、pH 9.0中。然后将430mg的CNBr(Fluka公司)加至这种溶液中,并且在活化过程期间用0.5M NaOH将pH调节到9.5。在30min后,pH值是9.5。然后通过添加0.1M的HCl,把pH值调节到8.4。在整个活化过程期间,通过利用冰浴来控制温度,并且保持在20-25℃。然后按照在实施例5中描述的方法,进行活化的三聚体与FVIIa的结合。

[0137] 实施例7:

[0138] 单SA-FVIIa和三SA-FVIIa的生物化学表征

[0139] 通过凝血测试方法、并且通过如在实施例2中描述的凝血酶产生测定,来测定实施例5中描述的修饰的结合于N-乙酰神经氨酸的rFVIIa(单SA)或者实施例6中描述的结合于N-乙酰神经氨酸三聚体的修饰的rFVIIa(三SA)的酶活性。结果被汇总于表3中。

[0140] 表3:在与PSA进行N-末端结合前后rFVIIa的比活力

[0141]

	FVIIa 活性	
	STF (U/mg 蛋白质)	TGA (U/mg 蛋白质)
未修饰的 rFVIIa	40579	57230
单 SA-rFVIIa	6064	21784
三 SA-rFVIIa	1743	4131

[0142] 通过STF测定法测量的结合少量PSA的rFVIIa的比活性降低,但是通过TGA测量的单SA-rFVIIa约保持50%的其FVIII旁路活性。

[0143] 另外,按照Klausen和Kornfelt描述的方法(J Chromatogr A.1995;718:195-202),通过毛细管电泳(CE)研究了单SA-rFVIIa和三SA-rFVIIa。结果显示于图5中。图中显示,与天然rFVIIa相比,由于附加的负电荷,单SA-rFVIIa和三SA-rFVIIa发生明显的向更高保留时间的位移。

[0144] 实施例8:

[0145] rFVIIa-单SA和rFVIIa-三SA结合物在大鼠体内的药物动力学

[0146] 十二个大鼠被麻醉,并且通过以10mL/每kg的体积剂量经尾部静脉注射入在缓冲液(1.3g/L甘氨酸替甘氨酸、3g/L氯化钠、30g/L甘露醇、1.5g/L CaCl₂·2H₂O、0.1g/L吐温80、pH 5.5)中的rFVIIa-单SA结合物(400μg蛋白质/kg)。四个大鼠用rFVIIa-三SA结合物

(400 μ g蛋白质/kg)处理。在8个正常大鼠身上将未修饰的rFVIIa以400 μ g蛋白质/kg的剂量用作对照。在注射入所施用物质5min、30min、1h、2h、4h、7h、10h和22h后,从眼球后静脉取得血液样本。制备柠檬酸血浆并冷冻,用于进一步分析。用ELISA(多克隆抗人FVII抗体)测量血浆中FVII抗原水平。在注射5min后在血浆中发现的数据被归一化为与浓度相关。在注射7h后,rFVIIa-单SA和三SA-rFVIIa的血浆水平比天然rFVIIa对照物更高。结果被显示于图6A(rFVIIa-单SA)和图6B(rFVIIa-三SA)中。

[0147] 实施例9:

[0148] 通过还原性胺化作用将N-乙酰神经氨酸三聚体偶联于rFVIIa

[0149] rFVIIa通过还原性胺化作用与N-乙酰神经氨酸三聚体的结合按照Biessen等描述的方法(Biochem J.1994;299:291-6)进行。将350mg的N-乙酰神经氨酸三聚体(TimTec公司)溶于10mL的0.1M HEPES缓冲液、pH 7.0中,并且将其加至32mL的在20mM HEPES、70mM NaCl、pH 7.4中的重组FVIIa溶液中(0.3mg/mL)。然后加入NaCNBH₃至终浓度为50mg/mL,并且通过添加0.1M的HCl将pH校正到pH 7.0。将混合物在轻轻搅拌下于37 $^{\circ}$ C保温48h。使用10kD滤膜(再生纤维素/Millipore公司)在含有150mM NaCl的20mM HEPES缓冲液、pH 7.4中通过UF/DF浓缩该溶液。

[0150] 根据Klausen和Kornfelt所述的方法(J Chromatogr A.1995,718:195-202),通过进行CE显示了N-乙酰神经氨酸三聚体结合于rFVIIa的情况。结果显示于图7中。图中显示,与天然rFVIIa相比,衍生物发生明显的向更高保留时间的位移。

[0151] 实施例10:

[0152] 多聚乙酸神经氨酸的纯化和衍生化

[0153] 按照WO 0601616A1所述的方法,在Q-Sepharose FF上通过阴离子交换色谱对CA进行纯化。将5g CA溶于50mL含有25mM NaCl的10mM三乙醇胺缓冲液、pH 7.4中(=起始缓冲液)。该溶液施加到填充有用起始缓冲液平衡的Q-Sepharose FF(GE Healthcare公司)的Pharmacia XK50柱上。然后用8个柱容积(CV)的起始缓冲液洗柱,并且用3个柱容积的在起始缓冲液中的200mM NaCl、350mM NaCl和500mM NaCl逐级洗脱被结合的CA。用350mM NaCl洗脱的部分通过SDS凝胶电泳显示出20kDa的分子量。使用由再生纤维素(Millipore公司)制成的5kD滤膜通过超滤作用对该部分进行浓缩,随后在50mM磷酸盐缓冲液、pH 7.2中进行渗滤。然后按照在实施例1中描述的方法用NaIO₄氧化CA,并且按照WO 05016973A1中描述的方法通过还原性胺化作用导入末端伯氨基团。对于还原性胺化作用,将11mL的2M NH₄Cl溶液加至20mL在50mM磷酸盐缓冲液、pH 7.2中的含有58mg氧化PSA/mL的溶液中。然后加入在1M NaOH中5M NaCNBH₃的溶液,使终浓度为75mM。该反应在室温下于pH 8.0时进行5天。然后混合物在含有10mM NaCl的(NH₄)₂CO₃溶液(50mg/L)中、随后在含有5mM EDTA的50mM磷酸盐缓冲液pH 8.0中进行透析。然后通过末端伯氨基团与2-亚氨基四氢噻吩(iminothiolane)(Traut试剂/Pierce公司)的反应而导入硫氢基。该反应在含有5mM EDTA的50mM磷酸盐缓冲液、pH 8.0中、试剂20倍摩尔过量的情况下于室温下进行1h。最后,使用截流量为5kD、由再生纤维素(Millipore公司)制成的滤膜,对含有末端游离SR基团的PSA溶液进行超滤/渗滤。

[0154] 实施例11:

[0155] 通过利用杂双功能交联剂将PSA偶联于rFVIIa

[0156] 将PSA(Sigma-Aldrich)在Q-Sepharose FF(GE保健公司)上通过阴离子交换色谱

进行纯化,并且通过化学修饰导入末端巯基基团,从而形成如在实施例10中描述的PSA-SH。对于PSA-SH偶联于rFVIIa,使用杂双功能的、水溶性的交联剂Sulfo-EMCS((N-ε-马来酰亚胺己酰氧基)硫代琥珀酰亚胺酯/Pierce公司),其含有两个反应基团:用于结合巯基的顺丁烯二酰亚胺基,和用于结合游离氨基的硫代-NHS-酯基。向2mL在含有150mM NaCl的20mM HEPES缓冲液、pH 7.4中的rFVIIa溶液(1.6mg/mL)中加入Sulfo-EMCS至终浓度为0.07mg交联剂/mg蛋白)。反应在室温下进行30min。接着,加入130mg根据实施例10制备的PSA-SH(100倍过量),并且中间体连接剂/rFVIIa复合物偶联于PSA-SH的偶联反应在室温下进行额外的2h。然后将混合物在丁基-琼脂糖凝胶(GE保健公司)上通过HIC色谱法进行纯化。将5M NaCl溶液加入混合物中至终浓度为3M NaCl。然后将该混合物施加于填充有丁基-琼脂糖凝胶(GE保健公司)的色谱柱中,并且用含有6.7mM CaCl₂的50mM HEPES缓冲液、pH 7.4进行rFVIIa-PSA结合物的洗脱。在洗脱结合物之后,把pH调节到pH 6.9。

[0157] 实施例12:

[0158] PSA-酰肼结合于rFVIIa的碳水化合物部分

[0159] 对于将PSA结合于rFVIIa的碳水化合物部分,制备rFVIIa在20mM HEPES缓冲液、pH 6.0中的溶液(1.6mg/mL)。向9个体积的这种溶液中加入1体积的5mM NaIO₄溶液,并且轻轻地混合。该氧化反应于4℃下避光进行1h,以产生游离醛基。然后加入亚硫酸氢钠(终浓度5mM)以停止反应。随后加入PSA-酰肼(WO 0606168A2)(终浓度10mM),并且对醛基的偶联反应在室温下进行1h。然后按照在实施例1中描述的方法,在QHyperD(Pall BioSeptra公司)上通过阴离子交换色谱对PSA-rFVIIa结合物进行纯化。

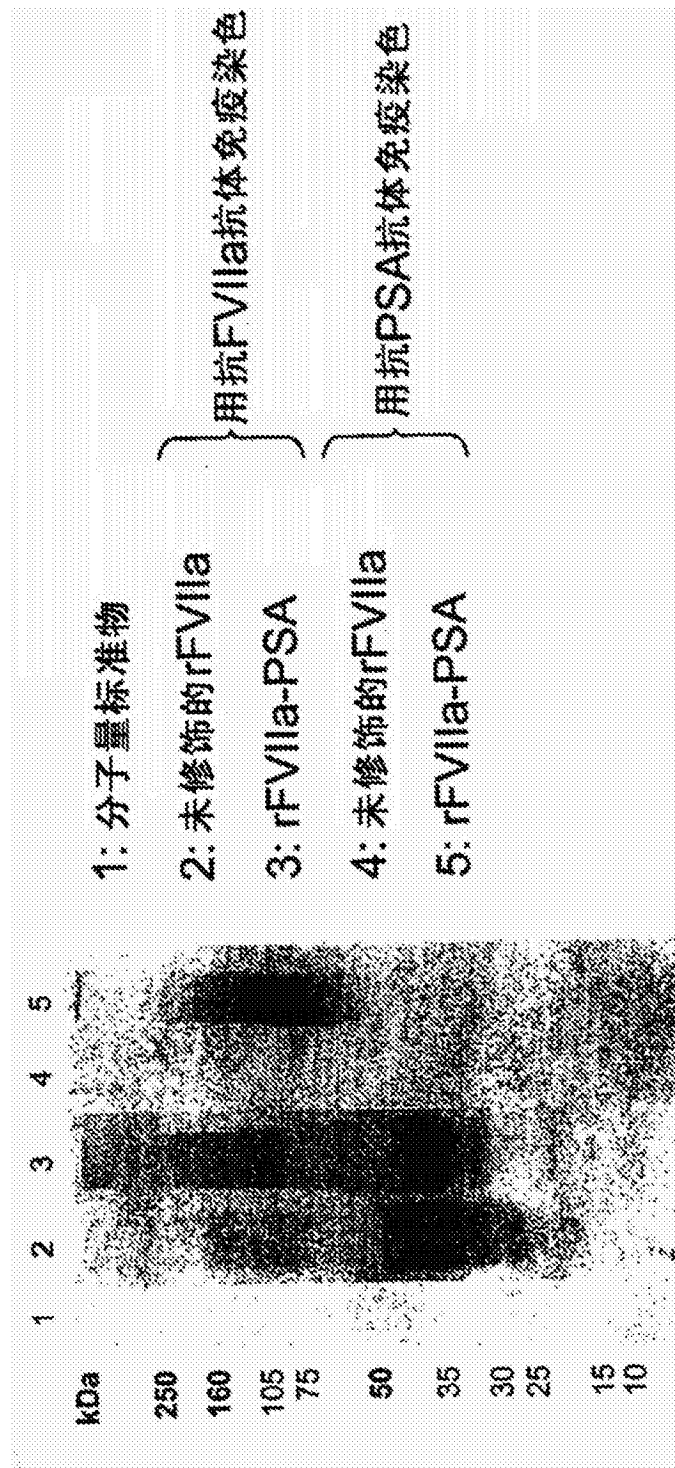


图1

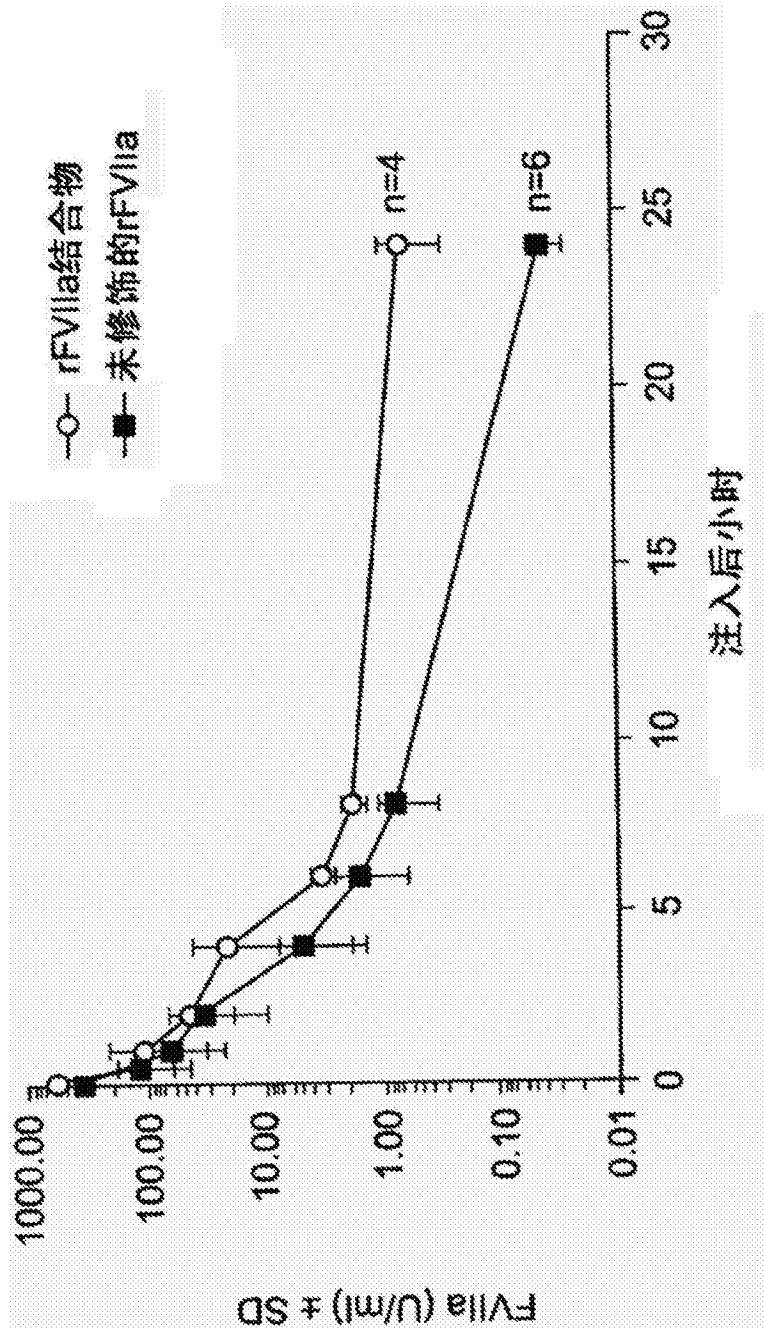


图2

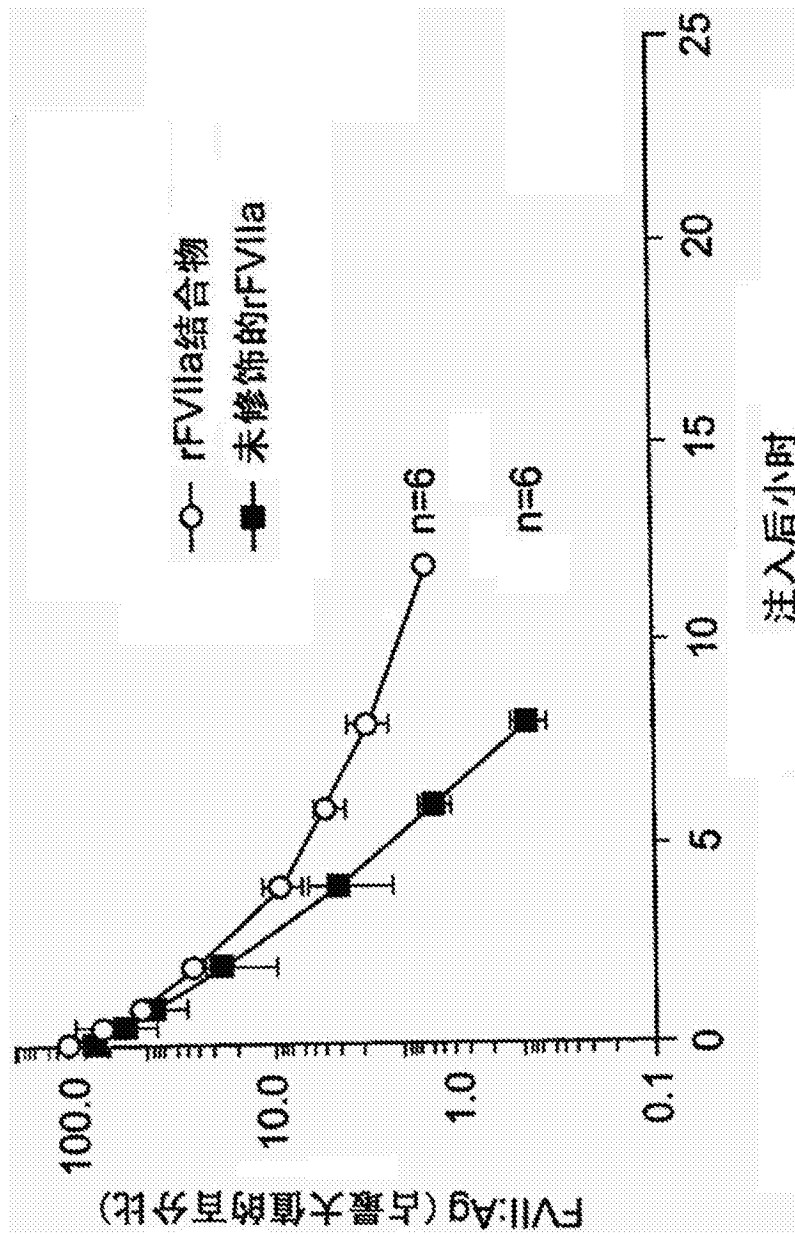


图3

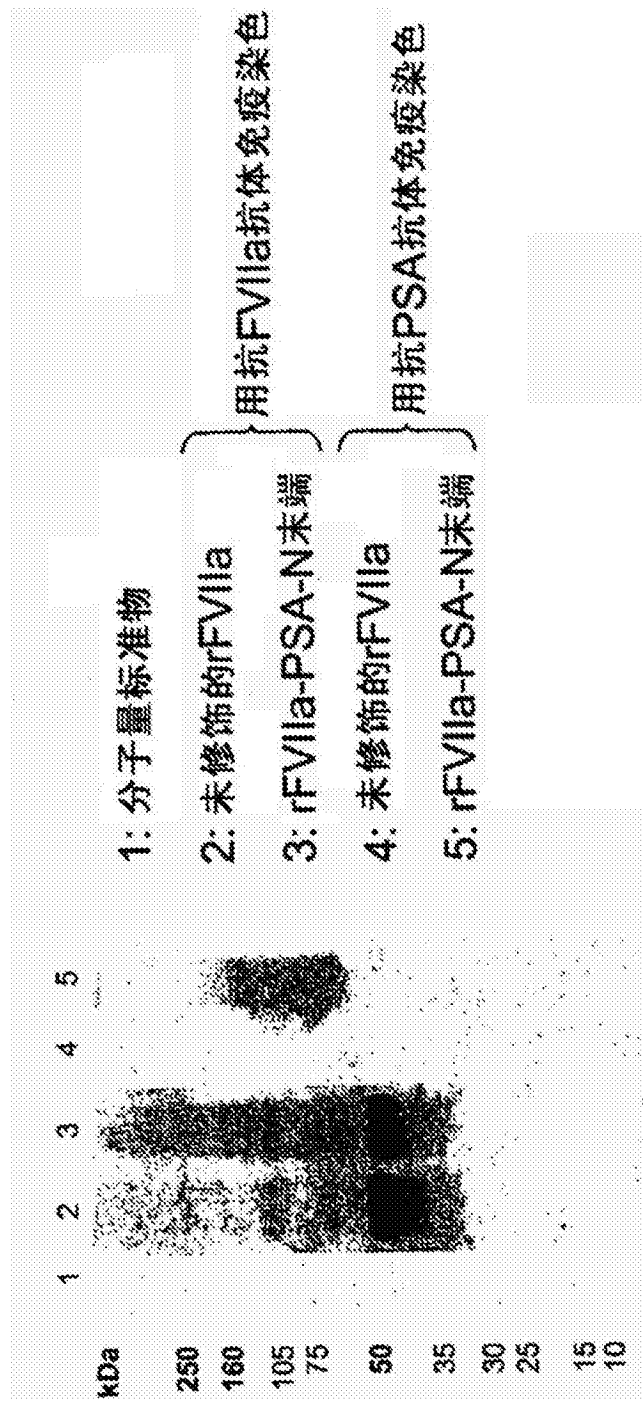


图4

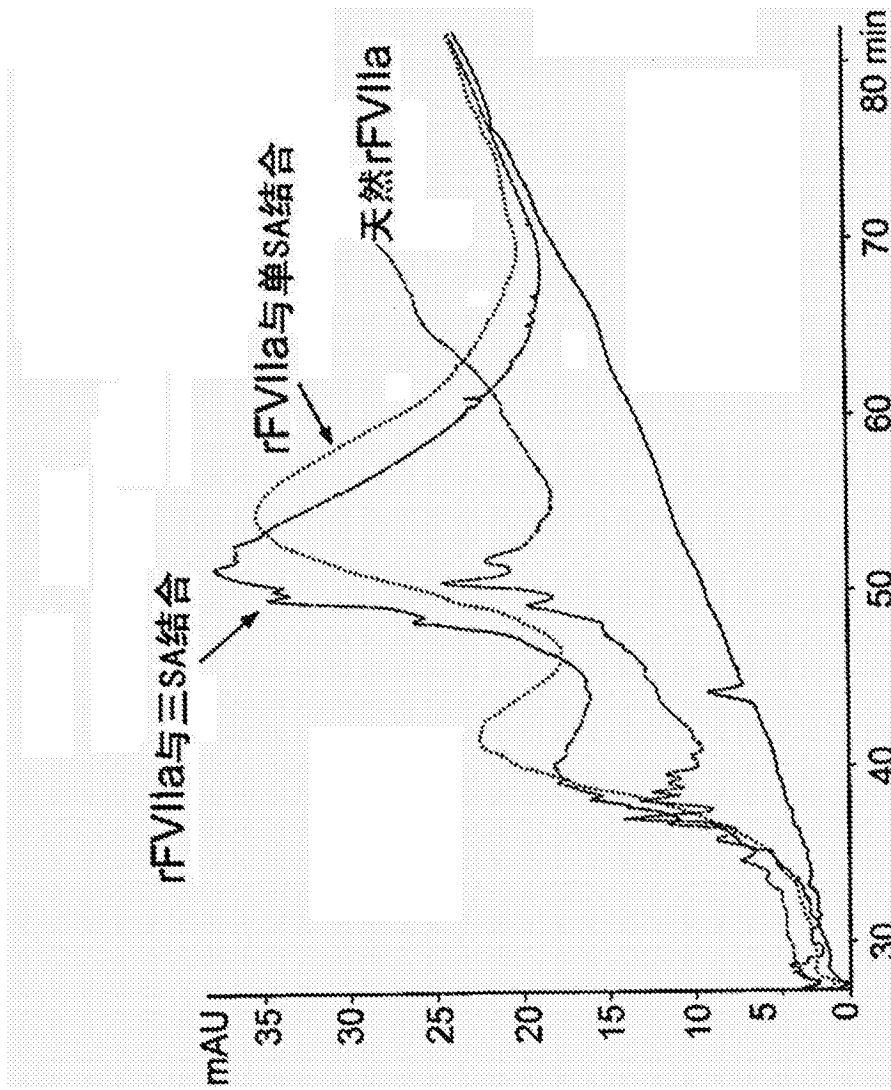


图5

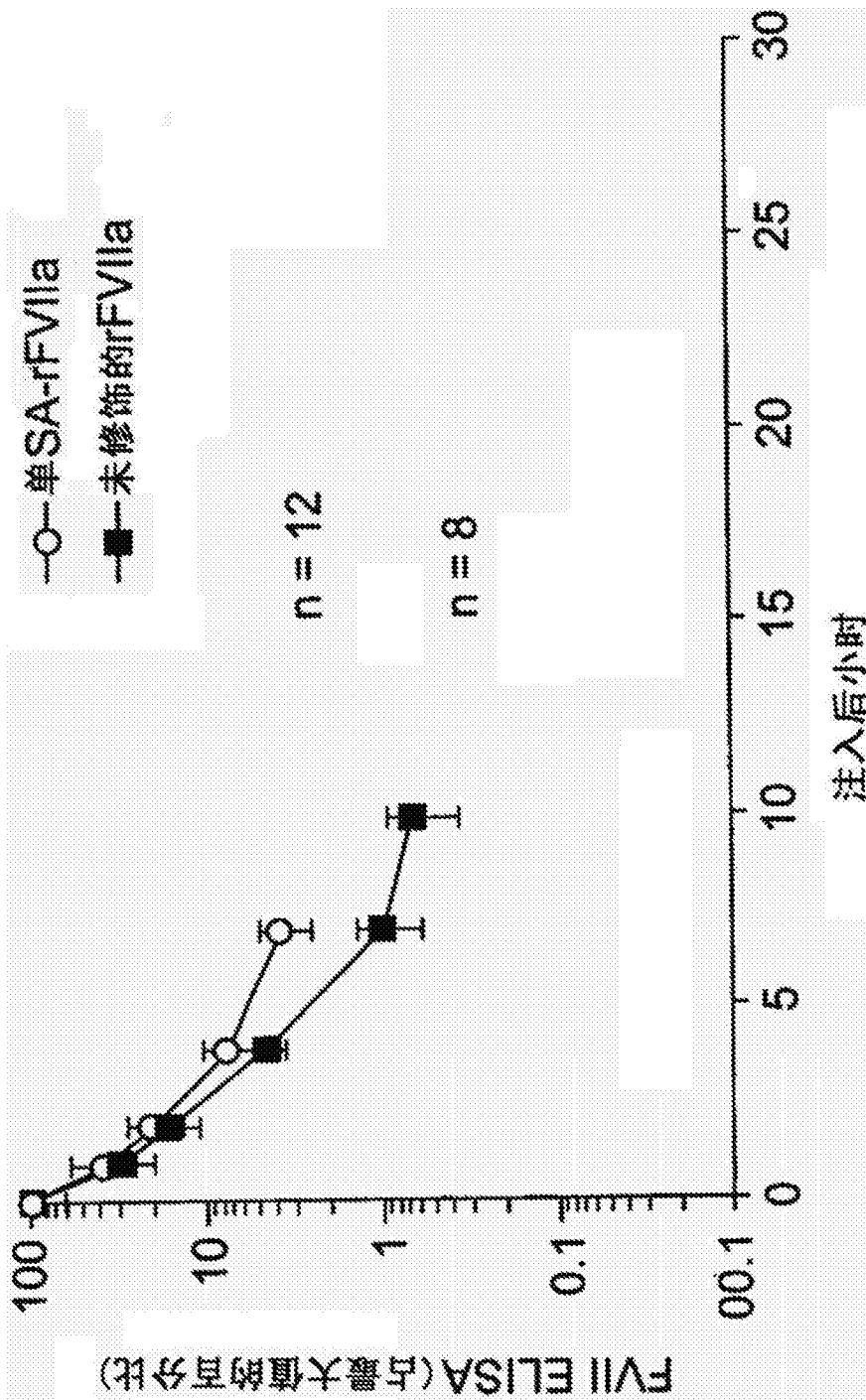


图6A

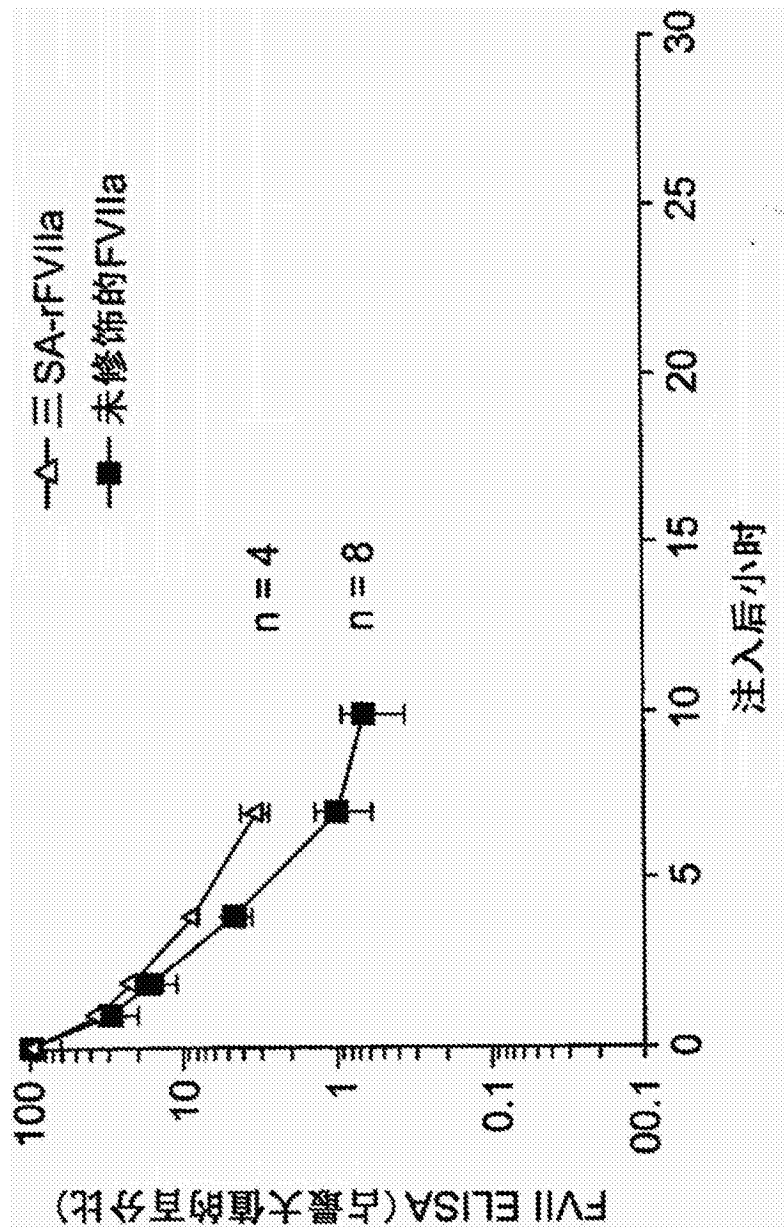


图6B

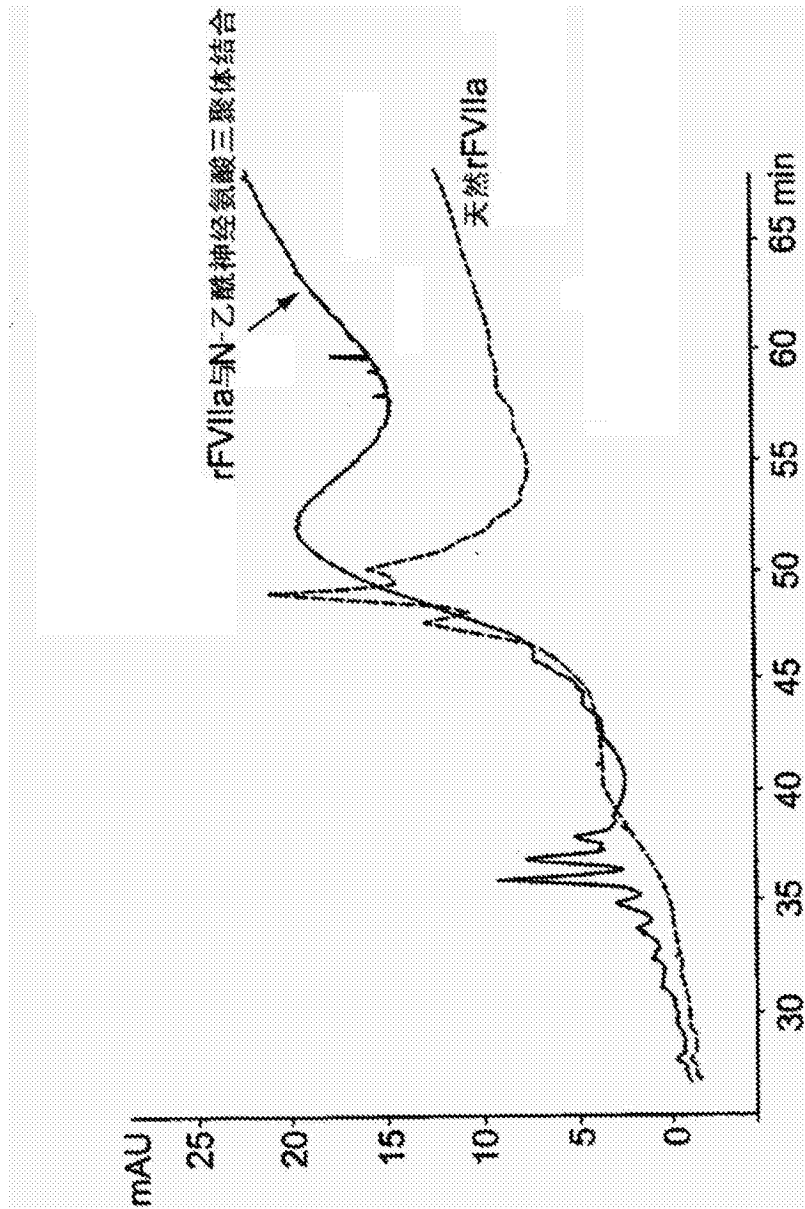


图7