



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107082806 A

(43)申请公布日 2017.08.22

(21)申请号 201610838893.6

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2005.11.14

C07K 14/755(2006.01)

(30)优先权数据

C07K 1/107(2006.01)

60/627277 2004.11.12 US

A61K 47/60(2017.01)

(62)分案原申请数据

200580046469.8 2005.11.14

(71)申请人 拜尔健康护理有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 潘小群 J.E.墨菲 梅柏松

J.S.斯特劳斯 H.坦德拉 陈建敏

T.巴内特 唐亮 汪德潜

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 翟建伟 万雪松

权利要求书3页 说明书26页

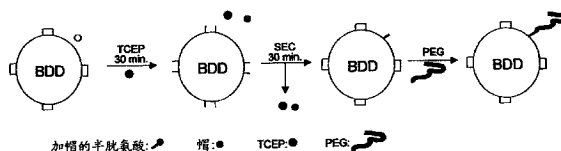
序列表19页 附图35页

(54)发明名称

FVIII的位点定向修饰

(57)摘要

本发明涉及FVIII的位点定向修饰,还涉及因子VIII突变蛋白,其在非N-末端胺的预定位点共价结合到一个或多个生物相容的聚合物,如聚乙二醇上。突变蛋白缀合物保留了FVIII前凝血剂活性,且具有提高的药物代谢动力学性质。



1. 具有因子VIII前凝血剂活性的缀合物,其包含在多肽上的一个或多个预定位点共价附着到一个或多个生物相容的聚合物的功能因子VIII多肽,其中所述预定位点不是N-末端胺。

2. 权利要求1的缀合物,其中所述生物相容的聚合物包含聚乙二醇。

3. 权利要求2的缀合物,其中所述聚乙二醇包含甲氧基聚乙二醇。

4. 权利要求3的缀合物,其中所述甲氧基聚乙二醇的大小范围为5 kD -64 kD。

5. 权利要求1的缀合物,其中所述生物相容的聚合物共价附着在功能因子VIII多肽的下述位置处或附近的氨基酸残基上:(a) 因子VIII清除受体的结合位点,(b) 能降解因子VIII的蛋白酶的结合位点,和/或(c) 因子VIII 抑制性抗体的结合位点。

6. 权利要求1的缀合物,其中所述生物相容的聚合物共价附着在功能因子VIII多肽的预定位点,从而使得低密度脂蛋白受体相关蛋白与多肽的结合小于与未缀合时的多肽的结合。

7. 权利要求6的缀合物,其中所述低密度脂蛋白受体相关蛋白与缀合物的结合不到与未缀合时的多肽的结合的1/2。

8. 权利要求1的缀合物,其中所述生物相容的聚合物共价附着在功能因子VIII多肽的预定位点,从而使得硫酸乙酰肝素蛋白聚糖与多肽的结合小于与未缀合时的多肽的结合。

9. 权利要求8的缀合物,其中所述硫酸肝素蛋白聚糖与缀合物的结合不到与未缀合时的多肽的结合的1/2。

10. 权利要求1的缀合物,其中所述生物相容的聚合物共价附着在功能因子VIII多肽的预定位点,从而使得因子VIII 抑制性抗体与多肽的结合小于与未缀合时的多肽的结合。

11. 权利要求10的缀合物,其中所述因子VIII 抑制性抗体与缀合物的结合不到与未缀合时的多肽的结合的1/2。

12. 权利要求1的缀合物,其中所述生物相容的聚合物共价附着在功能因子VIII多肽的预定位点,从而使得低密度脂蛋白受体与多肽的结合小于与未缀合时的多肽的结合。

13. 权利要求12的缀合物,其中所述低密度脂蛋白受体与缀合物的结合不到与未缀合时的多肽的结合的1/2。

14. 权利要求1的缀合物,其中所述生物相容的聚合物共价附着在功能因子VIII多肽的预定位点,从而使得血浆蛋白酶对多肽的降解小于对未缀合时的多肽的降解。

15. 权利要求14的缀合物,其中所述血浆蛋白酶对多肽的降解不到当多肽未缀合时在相同条件下经相同时间段测得的对多肽的降解的1/2。

16. 权利要求1的缀合物,其中所述生物相容的聚合物共价附着在多肽的因子VIII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之一处。

17. 权利要求1的缀合物,其中所述生物相容的聚合物共价附着在多肽的一个或多个因子VIII氨基酸位置377、378、468、491、504、556、1795、1796、1803、1804、1808、1810、1864、1903、1911和2284,且其中:(1) 缀合物与低密度脂蛋白受体相关蛋白的结合小于未缀合的多肽与低密度脂蛋白受体相关蛋白的结合;(2) 缀合物与低密度脂蛋白受体的结合小于未缀合的多肽与低密度脂蛋白受体的结合;或(3) 缀合物与低密度脂蛋白受体相关蛋白和低密度脂蛋白受体的结合小于未缀合的多肽与低密度脂蛋白受体相关蛋白和低密度脂蛋白

受体的结合。

18. 权利要求1的缀合物,其中所述生物相容的聚合物共价附着在多肽的一个或多个因子VIII氨基酸位置377、378、468、491、504、556和711,且另外其中所述缀合物与硫酸肝素蛋白聚糖的结合小于未缀合的多肽与硫酸肝素蛋白聚糖的结合。

19. 权利要求1的缀合物,其中所述生物相容的聚合物共价附着在多肽的一个或多个因子VIII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,且所述缀合物具有比未缀合的多肽更小的与因子VIII 抑制性抗体的结合。

20. 权利要求1的缀合物,其中所述生物相容的聚合物共价附着在多肽的一个或多个因子VIII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,且该缀合物具有比未缀合的多肽更少的来自能降解因子VIII的血浆蛋白酶的降解。

21. 权利要求20的缀合物,其中所述血浆蛋白酶是激活的C蛋白。

22. 权利要求1的缀合物,其中所述功能因子VIII多肽是B-结构域缺失的因子VIII。

23. 权利要求22的缀合物,其中所述生物相容的聚合物共价附着在B-结构域缺失的因子VIII的氨基酸位置129、491、1804和/或1808。

24. 权利要求1的缀合物,其中所述生物相容的聚合物附着在多肽的因子VIII氨基酸位置1804,且包含聚乙二醇。

25. 权利要求1的缀合物,其中所述生物相容的聚合物附着的一个或多个预定位点由位点特异性的半胱氨酸突变控制。

26. 制备权利要求 1的缀合物的方法,其包含:

突变编码功能因子VIII多肽的核苷酸序列,以在预定位点用半胱氨酸残基的编码序列替代;

表达所述突变的核苷酸序列,以产生半胱氨酸增强的突变蛋白;

纯化所述突变蛋白;

使所述突变蛋白与生物相容的聚合物反应,所述聚合物已经被激活,以与多肽在基本上仅还原的半胱氨酸残基处反应,从而形成缀合物;和

纯化该缀合物。

27. 权利要求26的方法,其中所述生物相容的聚合物包含聚乙二醇。

28. 权利要求27的方法,其中通过加入可以与蛋白中的半胱氨酸特异性地反应的马来酰亚胺基因,激活聚乙二醇。

29. 用于肠胃外施用的药物组合物,其包含治疗有效量的权利要求1的缀合物和可药用佐剂。

30. 治疗血友病的方法,其包含,给需要的患者施用有效量的权利要求 29的组合物。

31. 位点定向PEG化因子VIII突变蛋白的方法,其包含:

(a) 表达位点定向因子VIII 突变蛋白,其中所述突变蛋白在因子VIII 突变蛋白的暴露表面上用半胱氨酸替代氨基酸残基,且该半胱氨酸被加帽;

(b) 在温和地还原半胱氨酸突变蛋白和释放帽的条件下,使半胱氨酸突变蛋白接触还原剂;

(c) 从半胱氨酸突变蛋白去除帽和还原剂;和

(d) 去除还原剂后至少约5分钟,在产生PEG化的因子VIII突变蛋白的条件下,用包含巯基偶联部分的PEG处理半胱氨酸突变蛋白。

32. 权利要求31的方法,其中在步骤(c)中,通过尺寸排阻或离子交换层析,从半胱氨酸突变蛋白去除帽和还原剂。

33. 权利要求31的方法,其中所述因子VIII 突变蛋白是B-结构域缺失的因子VIII的突变蛋白。

34. 权利要求31的方法,其中所述PEG-马来酰亚胺的大小范围为5 kD -64 kD。

35. 权利要求31的方法,其中PEG的巯基部分选自:硫羟、三氟甲磺酸、2,2,2-三氟乙磺酸、氮丙啶、环氧乙烷、S-吡啶基和马来酰亚胺部分。

## FVIII的位点定向修饰

[0001] 本申请是申请日为2005年11月14日、申请号为201310125428.4、发明名称为“FVIII的位点定向修饰”的PCT申请的分案申请。

[0002] 与相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求享有2004年11月12日提交的美国专利申请系列号60/627,277的优先权利益,其在这里整体引作参考。

### 技术领域

[0004] 本发明涉及因子VIII (FVIII) 突变蛋白,其允许在确定的位点偶联一个或多个生物相容的聚合物如聚乙二醇。另外,提供了用于治疗目的的相关的制剂、其剂量及施用方法。这些修饰的FVIII变体和相关的组合物和方法用于给遭受血友病A的个体提供具有减少的注射频率和减少的免疫原性应答的治疗选择。

### 背景技术

[0005] 血友病A是最常见的遗传性凝结障碍,估计的发病率为1/5000男性。它的原因是FVIII的缺乏或结构缺陷,所述FVIII是血液凝结的固有途径中的关键组分。目前血友病A的治疗包含静脉内注射人FVIII。已经重组地生产了人FVIII,作为约300kD的单链分子。它由结构域A1-A2-B-A3-C1-C2组成(Thompson,2003,Semin.Hematol.29,pp.11-22)。前体产物在高尔基体中被加工成200kD(重链)和80kD(轻链)的2条多肽链,这2条链通过金属离子结合到一起(Kaufman等,1988,J.Biol.Chem.263,p.6352;Andersson等,1986,Proc.Natl.Acad.Sci.83,p.2979)。

[0006] FVIII的B-结构域似乎是可有可无的,因为还已经显示B-结构域缺失的FVIII(BDD,90kD A1-A2重链+80kD轻链)可以有效地用作血友病A的替补疗法。B-结构域缺失的FVIII序列含有B-结构域的14个氨基酸以外的所有缺失。

[0007] 目前,通过根据需要静脉内施用FVIII来治疗血友病A患者,或者作为预防疗法每周施用几次。关于预防治疗,每周施用15-25IU/kg体重的因子VIII 3次。患者总是需要它。因为它在人的半衰期短,所以必须频繁地施用FVIII。尽管全长蛋白具有大于300kD的大尺寸,但FVIII具有仅约11小时的人中的半衰期(Ewenstein等,2004,Semin.Hematol.41,pp.1-16)。对频繁的静脉内注射的需要造成患者顺应性的巨大障碍。如果可以开发具有更长的半衰期且因而需要更低频率的施用的FVIII产物,则会更方便患者。另外,如果提高了半衰期,那么由于需要更低的剂量,可以降低治疗费用。

[0008] 现有疗法的另一个缺点是,约25-30%患者发展抑制FVIII活性的抗体(Saenko等,2002,Haemophilia 8,pp.1-11)。抑制性抗体的主要表位定位于A2结构域中的残基484-508、A3结构域中的残基1811-1818和C2结构域。抗体发展阻止FVIII作为替补疗法的应用,迫使该组患者寻求使用高剂量重组因子VIIa的甚至更昂贵的治疗和免疫耐受疗法。

[0009] 下面的研究鉴别出了抑制性抗体的FVIII表位。在25份抑制性血浆样品的研究中,发现11份结合凝血酶产生的73kD轻链片段A3C1C2,4份结合A2结构域,且10份结合二者

(Fulcher, C. 等, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2 (22), pp. 7728-32)。在另一项研究中, 重组A2多肽中和了8种来自患者的A2结构域抑制剂中的6种 (Scandella, D. 等, 1993, *Blood* 82 (6), pp. 1767-75)。将9种来自患者的抑制剂中的6种的表位作图到A2残基379-538 (Scandella, D. 等, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 (16), pp. 6152-6)。18种重链抑制剂的表位定位于相同的A2结构域N-末端18.3kD区域 (Scandella, D. 等, 1989, *Blood* 74 (5), pp. 1618-26)。

[0010] 通过用同源猪序列替代人A2结构域残基387-604产生的有活性的重组杂种人/猪FVIII分子, 对患者A2抑制剂是抗性的 (Lubin, I. 等, 1994, *J. Biol. Chem.* 269 (12), pp. 8639-41), 且对与患者A2抑制剂竞争结合A2的鼠单克隆抗体mAB 413IgG是抗性的 (Scandella, D. 等, 1992, *Thromb Haemost.* 67 (6), pp. 665-71)。当实验表明mAB 413IgG和4种患者抑制剂不抑制其中用猪序列替代A2结构域残基484-508的杂种人/猪FVIII时, 该A2结构域表位进一步定位于A2结构域残基484-508 (Healey, J. 等, 1995, *J. Biol. Chem.* 270 (24), pp. 14505-9)。该杂种FVIII还对筛选的23份患者血浆的至少一半是更高抗性的 (Barrow, R. 等, 2000, *Blood* 95 (2), pp. 564-8)。丙氨酸扫描诱变鉴别的残基487对结合测试的所有5种患者抑制剂都是关键的, 而残基484、487、489和492对于与mAB 413 IgG的相互作用都是重要的 (Lubin, I., *J. Biol. Chem.* 272 (48), pp. 30191-5)。在接受R484A/R489A/P492A突变体 (而不是R484A/R489A突变体) 的小鼠中的抑制性抗体效价, 显著低于接受对照人BDD FVIII的小鼠 (Parker, E. 等, 2004, *Blood* 104 (3), pp. 704-10)。总之, A2结构域的484-508区域似乎是FVIII活性的抑制剂的结合位点。

[0011] 除了发展对FVIII的免疫应答以外, 常规疗法的另一个问题是, 其需要频繁的给药, 因为FVIII的体内半衰期短。已经研究了从循环清除FVIII的机理。

[0012] 从循环清除FVIII, 已部分地归因于向低密度脂蛋白受体-相关蛋白 (LRP) 的特异性结合, 所述LRP是具有广泛配体特异性的肝清除受体 (Oldenburg等, 2004, *Haemophilia* 10 Suppl 4, pp. 133-139)。最近, 还表明低密度脂蛋白 (LDL) 受体在FVIII清除中起作用, 如通过与LRP协同调节FVIII的血浆水平 (Bovenschen等, 2005, *Blood* 106, pp. 906-910)。两种相互作用都被结合细胞表面硫酸肝素蛋白聚糖 (HSPG) 所促进。当LRP被封闭时, 可以使小鼠中的血浆半衰期延长3.3倍, 或者当LRP和细胞表面HSPG都被封闭时, 可以延长5.5倍 (Sarafanov等, 2001, *J. Biol. Chem.* 276, pp. 11970-11979)。推测HSPG将FVIII集中在细胞表面上, 并将其呈递给LRP。FVIII上的LRP结合位点已经被定位在A2残基484-509 (Saenko等, 1999, *J. Biol. Chem.* 274, pp. 37685-37692)、A3残基1811-1818 (Bovenschen等, 2003, *J. Biol. Chem.* 278, pp. 9370-9377) 和C2结构域中的表位 (Lenting等, 1999, *J. Biol. Chem.* 274, pp. 23734-23739)。

[0013] 通过蛋白酶的作用, 也可以将FVIII从循环中清除。为了理解该作用, 人们必须理解FVIII参与血液凝结的机理。FVIII作为结合vWF的重链和轻链的异源二聚体而循环。vWF结合包含FVIII残基1649-1689 (Foster等, 1988, *J. Biol. Chem.* 263, pp. 5230-5234) 和C1 (Jacquemin等, 2000, *Blood* 96, pp. 958-965) 和C2结构域 (Spiegel, P. 等, 2004, *J. Biol. Chem.* 279 (51), pp. 53691-8) 的部分。FVIII被凝血酶激活, 该凝血酶切割残基372、740和1689之后的肽键, 以产生A1、A2和A3-C1-C2结构域的异源三聚体 (Pitman等, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 276, pp. 12434-12439)。激活后, FVIII从vWF解离, 并通过结合磷脂, 集中在血小板细胞表面。磷脂结合包含FVIII残基2199、2200、2251和2252 (Gilbert等,

2002, *J. Biol. Chem.* 277, pp. 6374-6381)。在这里,它通过与FVIII残基558-565 (Fay等, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, pp. 20522-20527) 和1811-1818 (Lenting等, 1996, *J. Biol. Chem.* 271, pp. 1935-1940) 的相互作用,结合FIX,并通过与FVIII残基349-372 (Nogami等, 2004, *J. Biol. Chem.* 279, pp. 15763-15771) 的相互作用,结合FX,并作为FX的FIX激活的辅因子,所述FX是内源性凝集途径的基本组分。激活的FVIII (FVIIIa) 受到蛋白酶激活的蛋白C (APC) 的部分灭活,这通过在FVIII残基336和562后面的切割来实现 (Regan等, 1996, *J. Biol. Chem.* 271, pp. 3982-3987)。但是,灭活的主要决定因素是A2结构域从A1和A3-C1-C2解离 (Fay等, 1991, *J. Biol. Chem.* 266, pp. 8957-8962)。

[0014] 已经证实增加蛋白的体内半衰期的一种方法是PEG化 (PEGylation)。PEG化是长链聚乙二醇 (PEG) 分子向蛋白或其它分子的共价附着。PEG可以是线性形式或分支形式,以产生具有不同特征的不同分子。除了增加肽或蛋白的半衰期以外,PEG化已经用于减少抗体发展,保护蛋白免受蛋白酶消化,和保持材料在肾滤液的外面 (Harris等, 2001, *Clinical Pharmacokinetics* 40, pp. 539-51)。另外,PEG化也可以增加蛋白的总稳定性和溶解度。最后,PEG化蛋白的持续的血浆浓度,可以通过减少药物的低谷至顶点水平降低不利的副作用的程度,从而消除对在早期时间点引入超生理水平的蛋白的需要。

[0015] 通过用大聚合物 (如PEG和葡聚糖) 靶向伯胺 (N-末端和赖氨酸) 来随机修饰FVIII的尝试,已经取得不同程度的成功 (W094/15625、美国专利4970300、美国专利6048720)。在1994年专利申请 (W094/15625) 中公开的最显著的提高,显示了4倍半衰期提高,但是代价是,在全长FVIII与50倍摩尔过量的PEG反应后,丧失2倍活性。W02004/075923公开了通过随机修饰生成的FVIII和聚乙二醇的缀合物。在过去,已经批准随机地PEG化的蛋白如干扰素 $\alpha$  (Kozlowski等, 2001, *BioDrugs* 15, pp. 419-429) 用作治疗剂。

[0016] 但是,对于异源二聚体的FVIII,该随机方案更容易出问题。FVIII具有数百个潜在的PEG化位点,包括158个赖氨酸,2个N-末端和多个组氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸,它们都可能被主要靶向伯胺的试剂PEG化。例如,显示PEG化的干扰素 $\alpha$ -2b的主要位置异构体是组氨酸 (Wang等, 2000, *Biochemistry* 39, pp. 10634-10640)。此外,全长FVIII的不均匀加工,可以导致原材料的混合物,这导致PEG化的产物的进一步复杂性。不控制FVIII上的PEG化位点的另一个缺点是,如果PEG附着在关键的活性位点处或附近,尤其是如果超过一个PEG或单个大PEG缀合到FVIII上,那么潜在的活性降低。因为随机的PEG化总是产生大量多重PEG化的产物,所以仅仅得到单-PEG化的产物的纯化会急剧降低总得率。最后,产物概况的巨大异质性使每批的一致合成和表征几乎不可能。因为良好生产需要一致的、充分表征的产品,所以产物异质性是商业化的屏障。鉴于所有这些原因,需要更特异性的PEG化FVIII的方法。

[0017] 在近期的综述中 (Kochendoerfer, G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2005, 可在线以 Oct. 15, 2005, direct object identifier doi:10.1016/j.cbpa.2005.10.007得到),已经总结了各种位点定向蛋白PEG化策略。一种方法包含,通过化学合成或重组表达,将非天然氨基酸掺入蛋白,随后添加将与非天然氨基酸特异性地反应的PEG衍生物。例如,非天然氨基酸可以是含有不存在于天然蛋白中的酮基的氨基酸。但是,蛋白的化学合成对于如FVIII这样大的蛋白不可行。目前肽合成的界限是约50个残基。可以连接几个肽,以形成更大的多肽片,但是生产甚至B-结构域缺失的FVIII,会需要超过20次连接,这会导致小于1%回收,

甚至在理想的反应条件下。迄今为止,含有非天然氨基酸的蛋白的重组表达主要限于非哺乳动物表达系统。对于需要在哺乳动物系统中表达的大且复杂的蛋白如FVIII,预期该方法有问题。

[0018] 蛋白的位点特异性的PEG化的另一种方法是,用PEG-醛靶向N-末端主链胺。在该方法中需要低pH来实现超过其它胺基团的特异性。但是,这与FVIII的稳定性所需的狭窄的接近中性的pH范围不相容(Wang等,2003,International J.Pharmaceutics 259,pp.1-15)。此外,FVIII的N-末端PEG化不会导致提高的血浆半衰期,如果该区域不参与血浆清除的话。实际上,FVIII轻链的N-末端区域已经参与结合von Willebrand因子(vWF),后者是对FVIII在循环中的存活至关重要的载体蛋白。通过因子VIII的N-末端修饰,可以破坏或减弱与vWF的至关重要的结合。因而,FVIII的N-末端PEG化可能具有降低FVIII的血浆半衰期的相反作用。

[0019] W090/12874公开了人IL-3、粒细胞集落刺激因子和促红细胞生成素多肽的位点特异性的修饰,这如下实现:插入半胱氨酸,或用半胱氨酸替代另一种氨基酸,然后加入具有巯基反应基团的配体。该配体选择性地偶联半胱氨酸残基。没有公开FVIII或其任何变体的修饰。

[0020] 鉴于上述原因,仍然需要具有更大的体内作用持续时间和降低的免疫原性、同时保持功能活性的改良的FVIII变体。此外,希望以一致的方式将这样的蛋白生产为均质产物。

## 发明内容

[0021] 本发明的一个目的是,提供生物相容的聚合物-缀合的功能性FVIII多肽,其具有提高的药物代谢动力学特性和治疗特性。

[0022] 本发明的另一个目的是,提供生物相容的聚合物-缀合的B结构域缺失的FVIII蛋白,其具有提高的药物代谢动力学特性。

[0023] 本发明的另一个目的是,提供生物相容的聚合物-缀合的功能性FVIII多肽,其具有降低的与低密度脂蛋白受体-相关蛋白(LRP)、低密度脂蛋白(LDL)受体、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG)和/或针对FVIII的抑制性抗体的结合。

[0024] 本发明的另一个目的是,提供改良的FVIII变体,其具有更大的体内作用持续时间和降低的免疫原性,其能以一致的方式生产为均质产物。

[0025] 在本发明的一个方面,提供了具有因子VIII前凝血剂活性的缀合物,其包含在多肽上的一个或多个预定位点共价附着到一个或多个生物相容的聚合物的功能因子VIII多肽,其中所述预定位点不是N-末端胺。本发明也包括制备该缀合物的方法,该方法包含:突变编码功能因子VIII多肽的核苷酸序列,以在预定位点用半胱氨酸残基的编码序列替代;表达突变的核苷酸序列,以产生半胱氨酸增强的突变蛋白;纯化该突变蛋白;使突变蛋白与生物相容的聚合物反应,所述聚合物已经被激活,以基本上仅在导入的半胱氨酸残基处与多肽反应,从而形成缀合物;和纯化该缀合物。本发明也涉及包含所述缀合物和可药用佐剂的药物组合物和治疗血友病的方法,所述方法通过施用治疗有效量的这些药物组合物给需要的哺乳动物来实现。

[0026] 本发明也涉及因子VIII突变蛋白的位点定向PEG化的方法,该方法包含:(a)表达

位点定向因子VIII突变蛋白,其中所述突变蛋白具有在因子VIII突变蛋白的暴露表面上的氨基酸残基的半胱氨酸替代,且该半胱氨酸被加帽;(b)在温和地还原半胱氨酸突变蛋白和释放帽的条件下,使半胱氨酸突变蛋白接触还原剂;(c)从半胱氨酸突变蛋白去除帽和还原剂;和(d)去除还原剂后至少约5分钟,在产生PEG化的因子VIII突变蛋白的条件下,用包含巯基偶联部分的PEG处理半胱氨酸突变蛋白。

## 附图说明

[0027] 图1.PEG突变蛋白的载体图谱和诱变策略。

[0028] 图2.经单克隆FVIII抗体层析柱纯化的PEG2蛋白关于时间的280nm UV吸光度谱。使用来自Amersham Bioscience的AKTA®Explorer 100层析系统,进行层析。

[0029] 图3三步位点定向PEG化方法。PEG代表着半胱氨酸-反应性PEG,如PEG-马来酰亚胺。封闭条代表着二硫键形成,而开口条代表着还原的半胱氨酸。

[0030] 图4.PEG2的位点定向PEG化。

[0031] 图5.PEG6的位点定向PEG化。

[0032] 图6a.BDD、PEG2、4、5和6的位点定向PEG化。上图用重(H)链抗体染色,而下图用轻(L)链抗体染色。“U”是未经加工的含有H和L两者的材料。

[0033] 图6b.PEG15和PEG7的PEG化,用PEG2和PEG6作为对照。用TCEP还原起始纯化的PEG突变蛋白(“S”),并在去除还原剂后,用12kD(“12”)或22kD(“22”)PEG进行PEG化(“R”)。在6%Tris-甘氨酸SDS PAGE上电泳样品,并用重链(“HC”)抗体(左图)或轻链(“LC”)抗体(右图)染色。“U”是未经加工的含有HC和LC两者的材料。用点突出显示PEG化的带。

[0034] 图6c.PEG2+6的PEG化,用PEG2和PEG6作为对照。用TCEP还原PEG2、PEG6或PEG2+6,并在去除还原剂后,用5kD(“5”)或43kD(“43”)PEG进行PEG化(“R”)。还用12、22和33kD PEG将PEG2+6 PEG化。在6%Tris-甘氨酸SDS PAGE上电泳样品,并在左图用针对蛋白的考马斯或用重链(H)或轻链(L)抗体进行染色。“U”是未经加工的含有H和L两者的材料。用点突出显示PEG化的带。

[0035] 图6d.野生型全长FVIII(KG-2)的PEG化,用PEG2作为对照。左凝胶用考马斯染料对蛋白进行染色,而右凝胶用碘对PEG进行染色。“BDD U”是未经加工的含有H和L两者的BDD材料。用点突出显示PEG化的带。

[0036] 图7.PEG化的PEG2的凝血酶切割。A2结构域的N-末端一半颜色为蓝色,而C-末端一半为绿色,R8B12抗体表位突出显示为深绿色(正确的FVIII模型)。用凝血酶处理PEG2(泳道1)和22kD PEG化的PEG2(泳道2)(分别是泳道3和4),然后在7%Tris-乙酸盐凝胶(Invitrogen)上电泳,并用R8B12抗体染色。每个泳道含有约50ng FVIII。

[0037] 图8.PEG化的野生型全长FVIII(KG-2)的凝血酶切割。“S”=起始KG-2材料。“R”=还原的KG-2,且去除了还原剂。“P”=用43kD PEG进行PEG化的“R”。“Pure”=从过量PEG纯化出来的“P”。“L”=轻链。用点突出显示PEG化的带。

[0038] 图9.PEG化的PEG2的碘染色。在6%Tris甘氨酸凝胶上电泳22或43kD PEG化的PEG2,并用R8B12 FVIII抗体(泳道1和2)或碘(泳道3和4)染色。根据它们的分子量标记泳道,排列2种染色。泳道1和2各自含有约30ng FVIII,而泳道3和4含有约2μg。

[0039] 图10.PEG化的和未PEG化的PEG2的MALDI质谱法分析。在PEG2(图10a)或22kD PEG

化的PEG2(图10b)上进行MALDI质谱法。PEG化后,PEG2的重(H)链峰显著减少,且出现新峰(H+PEG),其集中在111kD(22kD PEG+89kD重链)。没有检测到PEG化的轻(L)链峰,预期它集中在100kD(22kD PEG+83kD轻链)。

[0040] 图11.凝血酶切割后PEG化的和未PEG化的PEG2的MALDI质谱法。

[0041] 图12.凝血酶切割之前和之后PEG化的PEG6的MALDI质谱法。

[0042] 图13.在尺寸排阻柱上纯化的PEG化的PEG2的280nm UV吸收谱。

[0043] 图14.在阳离子交换柱上纯化的PEG化的和未PEG化的PEG6的280nm UV吸收谱。

[0044] 图15.在尺寸排阻柱上纯化的PEG化的和未PEG化的PEG6的280nm UV吸收谱。

[0045] 图16.通过生色测定和凝结测定测得的与未PEG化的蛋白活性相比PEG化的蛋白活性。纯化的全长FVIII表示为KG-2。通过用还原和去除还原剂之后PEG处理的样品的值除以缓冲对照处理的样品的值,其中考虑PEG化得率,确定报告的百分比活性。

[0046] 图17.与PEG2相比,PEG化的PEG2的兔PK研究。

[0047] 图18.与BDD和PEG2相比,PEG化的PEG2的兔PK研究。在PEG化的PEG2和BDD之间对比P-值。

[0048] 图19.与BDD和PEG6相比,PEG化的PEG6的兔PK研究。

[0049] 图20.与未修饰的f1 FVIII相比,PEG化的野生型全长("f1")FVIII的兔PK研究。

[0050] 图21.与PEG6和BDD相比,PEG化的PEG6的血友病小鼠PK研究。

[0051] 图22.与BDD相比,22和43kD PEG化的PEG2的正常小鼠PK研究。

[0052] 图23.与BDD相比,22kD PEG化的PEG2的全时程正常小鼠PK研究。

[0053] 图24.血友病小鼠(BDD)因子VIII回收柱状图,它描绘了在血友病小鼠测定中两种BDD因子VIII的半衰期的药物代谢动力学(PK)评价。

[0054] 图25.与BDD相比,22kD PEG化的PEG2的血友病小鼠肾撕裂伤研究。载体处理的小鼠具有25uL/g体重的失血。

[0055] 图26.在有递增量的FVIII抗体存在下,PEG化的PEG2和BDD的生色活性。抗体表位在括号中指明。

[0056] 图27.在有递增量的FVIII mAb 413抗体存在下,PEG化的PEG2的生色活性。

[0057] 图28.在有源自已经发展对FVIII的抑制剂的患者的血浆存在下,BDD、43kD PEG化的PEG2、33kD PEG化的PEG6和33kD双PEG化(diPEGylation)的PEG2+6的生色活性。在上面记录了抑制剂效价和血液收集日期。上面的2个图包括从5-405倍患者血浆稀度收集的数据。左下图集中在患者HRF-828血浆的1:15倍稀度。右下图证实,为上面的2个图中的每个FVIII样品使用的0.064IU/mL不是饱和剂量。

[0058] 图29.PEG化筛选方法和验证。上图显示了瞬时表达的PEG突变蛋白的PEG化筛选示意图。下图显示了使用重链("H")-特异性的抗体(左)或轻链("L")特异性的抗体(右)对PEG化的产物的蛋白印迹分析。用点突出显示PEG化的带。"U"是未经加工的含有H和L两者的材料。

[0059] 图30.PEG15-17的PEG化筛选。使用重链("H")-特异性的抗体(R8B12和58.12)或轻链("L")特异性的抗体(C7F7和GM),对PEG化的产物进行蛋白印迹分析。所有3种突变蛋白都是对重链选择性的,相对PEG化效率是PEG15~PEG16>PEG17。用点突出显示PEG化的带。"U"是未经加工的含有H和L两者的材料。

[0060] 图31. 该凝胶显示了作为还原剂浓度函数的PEG2+14的PEG化。在4℃, 用67-670uM的TCEP处理PEG2+14 30分钟。通过旋转柱去除还原剂, 随后用12kD PEG进行PEG化。FVIII的重链和轻链分别突出显示为“H”和“L”。2个印迹指出了PEG化的重链和轻链。

[0061] 图32. 用67-670uM TCEP处理、随后去除还原剂的PEG2+14的解卷质谱。

### 具体实施方式

[0062] 本发明是基于下述发现, 即具有FVIII活性的多肽可以在非N-末端胺的预定位点共价附着到生物相容的聚合物上, 且这样的多肽基本上保留它们的凝血剂活性。此外, 这些多肽缀合物具有提高的循环时间和降低的抗原性。本发明的缀合物胜过现有技术的具有随机附着到FVIII或附着在N-末端的聚合物的缀合物。位点定向附着允许人们设计避开生物学活性所需区域并从而维持相当大的FVIII活性的修饰。它也允许设计成附着聚合物, 来阻断在参与FVIII清除的位点的结合。位点定向结合也允许通过随机的聚合物偶联, 生成均匀的产物, 而不是现有技术生成的异质缀合物。通过避免在轻链N-末端胺处的附着, 本发明的缀合物避免了因为将配体附着在FVIII多肽的活性位点可能产生的活性损失。认为轻链N-末端区域参与vWF因子与FVIII的结合, 这是循环中的稳定结合。

[0063] 定义

[0064] 生物相容的聚合物。生物相容的聚合物包括聚环氧烷, 例如但不限于聚乙二醇(PEG)、葡聚糖、多聚乙酰神经氨酸或其它基于碳水化合物的聚合物、氨基酸聚合物、生物素衍生物、聚乙烯醇(PVA)、聚羧酸酯、聚乙烯吡咯烷酮、乙烯-马来酸酐共聚物、苯乙烯-苹果酸酐共聚物、聚噁唑啉、聚丙烯酰吗啉、肝素、清蛋白、纤维素、壳聚糖水解产物、淀粉如羟乙基-淀粉和羟丙基-淀粉、糖原、琼脂糖和其衍生物、瓜耳胶、支链淀粉、菊粉、黄原胶、角叉藻聚糖、果胶、藻酸水解产物、其它生物聚合物和其任意等同物。优选的是聚乙二醇, 且更优选的是甲氧基聚乙二醇(mPEG)。其它有用的聚(亚烷基)二醇化合物是聚丙二醇(PPG)、聚丁二醇(PBG)、PEG-缩水甘油醚(Epoxy-PEG)、PEG-氧羰基咪唑(CDI-PEG)、分支的聚乙二醇、线性的聚乙二醇、分叉的聚乙二醇和多臂的或“超分支的”聚乙二醇(星形-PEG)。

[0065] 聚乙二醇(PEG)。“PEG”和“聚乙二醇”在本文中可互换地使用, 且包括任意的的水溶性的聚环氧乙烷。一般地, 根据本发明使用的PEG包含下面的结构“--(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>--”, 其中(n)是2-4000。如本文所使用的, 根据末端氧是否已经被置换, PEG也包括“--CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>--O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>--CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>--”和“--(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O--”。在说明书和权利要求全文中, 应当牢记, 术语“PEG”包括具有各种末端或“封端”基团的结构, 例如但不限于羟基或C<sub>1-20</sub>烷氧基。术语“PEG”也指含有大多数(即大于50%)的-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-重复亚基的聚合物。关于具体形式, PEG可以具有任意数目的许多分子量, 以及结构或几何形状, 如分支的、线性的、分叉的、和多功能的。

[0066] PEG化。PEG化是聚乙二醇(PEG)共价附着到诸如蛋白的分子上的过程。

[0067] 激活的或有活性的官能团。当将诸如生物相容的聚合物的官能团描述为激活的时, 该官能团可以容易地与其它分子上的亲电子试剂或亲核试剂反应。

[0068] B结构域缺失的FVIII(BDD)。如本文所使用的, BDD的特征在于, 具有含有FVIII的B-结构域的14个氨基酸以外的所有缺失的氨基酸序列。B-结构域的前4个氨基酸(SFSQ, SEQ ID NO:1)连接到B-结构域的最后10个残基上(NPPVLRHQ, SEQ ID NO:2)(Lind, P. 等,

1995, Eur. J. Biochem. 232, pp. 19-27)。本文使用的BDD具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0069] FVIII. 凝血因子VIII (FVIII) 是在由肝合成并释放进血流中的糖蛋白。在循环血液中, 它结合von Willebrand因子 (vWF, 也称作因子VIII-相关抗原), 以形成稳定的复合物。被凝血酶激活后, 它从复合物解离, 以与凝结核级联中的其它凝血因子相互作用, 这最终导致血栓的形成。人全长FVIII具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列, 尽管等位基因变体是可能的。

[0070] 功能因子VIII多肽。如本文所使用的, 功能因子VIII多肽表示功能多肽或多肽的组合, 其能体内或体外地改正人因子VIII缺陷, 所述缺陷的特征在于例如血友病A。因子VIII具有许多种自然状态的降解或加工形式。它们蛋白水解地源自前体, 即一种链蛋白, 如本文所证实的。功能因子VIII多肽包括这样的单链蛋白, 且还提供了这些具有改正人因子VIII缺陷的生物学活性的各种降解产物。可能存在等位基因变体。功能因子VIII多肽包括所有这样的等位基因变体、糖基化的形式、导致因子VIII的衍生物的修饰和片段, 只要它们含有人因子VIII的功能片段, 且同样基本的特征性人因子VIII功能活性保持未受影响。通过本文所述的简单的体外测试, 可以容易地鉴别出具有必需的功能活性的那些因子VIII衍生物。此外, 功能因子VIII多肽能在因子IXa、钙和磷脂存在下, 催化因子X向Xa的转化, 以及改正源自患血友病A个体的血浆中的凝结核缺陷。从本文的人因子VIII氨基酸序列和功能区域的序列公开内容, 本领域技术人员会明白可以通过DNA的限制酶切割或人因子VIII蛋白的蛋白水解或其它降解衍生的片段。

[0071] FIX。如本文所使用的, FIX指凝结核因子IX, 它也称作人凝血因子IX, 或血浆促凝血酶原激酶组分。

[0072] FX。如本文所使用的, FX指凝结核因子X, 它也称作人凝血因子X和Stuart-Prower因子。

[0073] 药物代谢动力学。“药物代谢动力学”(“PK”) 是用于描述药物在身体中的吸收、分布、代谢和消除的性质的术语。药物的药物代谢动力学的提高, 指使药物在体内更有效地作为治疗剂的这些特征(尤其是它在身体中的有效持续时间)的提高。

[0074] 突变蛋白。突变蛋白是一种基因工程改造的蛋白, 其源自实验室诱导的蛋白或多肽的突变。

[0075] 蛋白。如本文所使用的, 蛋白和多肽是同义词。

[0076] FVIII清除受体。本文所使用的FVIII清除受体指功能性FVIII多肽上的受体区域, 其结合或联合一个或多个其它分子, 以导致从循环清除FVIII。因子VIII清除受体包括但不限于FVIII分子的结合LRP、LDL受体和/或HSPG的区域。

[0077] 讨论

[0078] 根据本发明的方法预见到, 可以在预定位点突变任何功能因子VIII多肽, 然后在该位点共价附着生物相容的聚合物。有用的多肽包括但不限于, 具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的全长因子VIII, 和具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的BDD FVIII。优选的是BDD FVIII。

[0079] 在本发明的缀合物中使用的生物相容的聚合物可以是上面讨论的任意聚合物。选择生物相容的聚合物, 以提供所需的药物代谢动力学的提高。例如, 选择聚合物的特性、大小和结构, 从而提高具有FVIII活性的多肽的循环半衰期, 或降低多肽的抗原性, 而没有不

可接受的活性降低。优选地,聚合物包含PEG,且更优选地其至少50%的分子量是PEG。在一个实施方案中,聚合物是在末端用封端部分(如羟基、烷氧基、取代的烷氧基、链烯氧基、取代的链烯氧基、炔氧基(alkynoxy)、取代的炔氧基、芳基氧和取代的芳基氧)封端的聚乙二醇。更优选的是包含甲氧基聚乙二醇的聚合物。更优选的是包含甲氧基聚乙二醇的聚合物,其大小范围为3kD-100kD,且更优选地5kD-64kD或5kD-43kD。

[0080] 优选地,聚合物具有活性部分。例如,在一个实施方案中,聚合物具有巯基活性部分,其可以与功能因子VIII多肽上的游离半胱氨酸反应,以形成共价键。这样的巯基活性部分包括硫羟、三氟甲磺酸(triflate)、2,2,2-三氟乙磺酸(tresylate)、氮丙啶、环氧乙烷、S-吡啶基或马来酰亚胺部分。优选的是马来酰亚胺部分。在一个实施方案中,聚合物是线性的,且在与巯基不强烈反应的一个末端具有“帽”(如甲氧基),而在另一个末端具有巯基活性部分。在一个优选的实施方案中,缀合物包含PEG-马来酰亚胺,且大小范围为5kD-64kD。

[0081] 在下面的实施例中,提供了选择有用的生物相容的聚合物的其它指导。

[0082] 通过本领域已知的任意方法,可以发生编码具有FVIII活性的多肽的核苷酸序列的位点定向突变。优选的方法包括在选择用于共价附着聚合物的位点处导入半胱氨酸密码子的诱变。这可以如下实现:使用可商业得到的位点定向诱变试剂盒,如Stratagene cQuickChange™ II位点定向诱变试剂盒、Clontech Transformer位点定向诱变试剂盒号K1600-1、Invitrogen GenTaylor位点定向诱变系统号12397014、Promega Altered Sites II体外诱变系统试剂盒号Q6210或Takara Mirus Bio LA PCR诱变试剂盒号TAK RR016。

[0083] 本发明的缀合物可以如下制备:首先用半胱氨酸密码子替代功能性FVIII多肽表面上的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蛋白,使突变蛋白与半胱氨酸-特异性的聚合物试剂反应,和纯化突变蛋白。

[0084] 在该系统中,在半胱氨酸位点添加聚合物,可以通过聚合物上的马来酰亚胺活性的官能度来实现。在下文提供了该技术的实例。使用的巯基活性聚合物的量应当至少与要衍生的半胱氨酸的摩尔量等摩尔,且优选地过量存在。优选地,使用至少5倍摩尔过量的巯基反应性聚合物,且更优选地,使用至少10倍过量的这种聚合物。用于共价附着的其它条件属于本领域技术人员的技术。

[0085] 在下面的实施例中,以本领域常规方式命名突变蛋白。命名突变体的惯例是基于SEQ ID NO:4提供的成熟的全长因子VIII的氨基酸序列的。作为一种分泌蛋白,FVIII含有在翻译过程中被蛋白水解地切割的信号序列。去除19氨基酸信号序列后,分泌的FVIII产物的第一个氨基酸是丙氨酸。

[0086] 正如常规的和本文使用的,当提及BDD FVIII中的突变氨基酸时,通过其在全长FVIII序列中的位置命名突变氨基酸。例如,下面讨论的PEG6突变蛋白命名为K1808C,因为它将在类似于全长序列的1808位置处的赖氨酸(K)改变成半胱氨酸(C)。

[0087] 用于共价结合聚合物的预定位点最好地选自暴露于多肽表面、不参与FVIII活性或不参与体内稳定化FVIII的其它机理(如结合vWF)的位点。这样的位点还最好地选自已知参与灭活FVIII或从循环中清除FVIII的机理的那些位点。下面详细讨论了这些位点的选择。优选位点包括在下述对象的结合位点处或附近的氨基酸残基:(a)低密度脂蛋白受体相关蛋白,(b)硫酸肝素蛋白聚糖,(c)低密度脂蛋白受体和/或(d)因子VIII抑制性抗体。“在结合位点处或附近”指残基与结合位点足够接近,从而使得生物相容的聚合物与该位点的

共价附着导致结合位点的位阻。例如,预期这样的位点是在结合位点的**20 Å**内。

[0088] 在本发明的一个实施方案中,生物相容的聚合物共价附着在功能因子VIII多肽的下述位置处或附近的氨基酸残基上:(a)上面定义的因子VIII清除受体,(b)能降解因子VIII的蛋白酶的结合位点,和/或(c)因子VIII抑制性抗体的结合位点。蛋白酶可以为激活的C蛋白(APC)。在另一个实施方案中,生物相容的聚合物共价附着在功能因子VIII多肽的预定位点,从而使得低密度脂蛋白受体相关蛋白与多肽的结合小于与未缀合时的多肽的结合,且优选地,不到1/2。在一个实施方案中,生物相容的聚合物共价附着在功能因子VIII多肽的预定位点,从而使得硫酸肝素蛋白聚糖与多肽的结合小于与未缀合时的多肽的结合,且优选地,不到1/2。在另一个实施方案中,生物相容的聚合物共价附着在功能因子VIII多肽的预定位点,从而使得因子VIII抑制性抗体与多肽的结合小于与未缀合时的多肽的结合,优选地,不到与未缀合时的多肽的结合的1/2。在另一个实施方案中,生物相容的聚合物共价附着在功能因子VIII多肽的预定位点,从而使得低密度脂蛋白受体与多肽的结合小于与未缀合时的多肽的结合,优选地,不到1/2。在另一个实施方案中,生物相容的聚合物共价附着在功能因子VIII多肽的预定位点,从而使得血浆蛋白酶对多肽的降解小于对未缀合时的多肽的降低。在另一个实施方案中,血浆蛋白酶对多肽的降解不到当多肽未缀合时在相同条件下经相同时间段测得的对多肽的降解的1/2。

[0089] 使用表面等离子体共振技术(Biacore),可以确定LRP、LDL受体或HSPG对FVIII的结合亲和力。例如,可以将FVIII直接地或通过FVIII抗体间接地涂布在Biacore™芯片上,并将各种浓度的LRP传递到芯片上,来测量相互作用的启动速率和关闭速率(Bovenschen N.等,2003,J.Biol.Chem.278(11),pp.9370-7)。两个速率的比给出亲和力的度量。需要PEG化后亲和力的2倍,优选地5倍,更优选地10倍,和更优选地30倍的降低。

[0090] 通过本领域技术人员已知的任意方法,可以测量蛋白酶APC对FVIII的降解。

[0091] 在一个实施方案中,生物相容的聚合物共价附着在多肽的一个或多个因子VIII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。在另一个实施方案中,生物相容的聚合物共价附着在多肽的一个或多个因子VIII氨基酸位置377、378、468、491、504、556、1795、1796、1803、1804、1808、1810、1864、1903、1911和2284,且(1)缀合物与低密度脂蛋白受体相关蛋白的结合小于未缀合的多肽与低密度脂蛋白受体相关蛋白的结合;(2)缀合物与低密度脂蛋白受体的结合小于未缀合的多肽与低密度脂蛋白受体的结合;或(3)缀合物与低密度脂蛋白受体相关蛋白和低密度脂蛋白受体的结合小于未缀合的多肽与低密度脂蛋白受体相关蛋白和低密度脂蛋白受体的结合。

[0092] 在另一个实施方案中,生物相容的聚合物共价附着在多肽的一个或多个因子VIII氨基酸位置377、378、468、491、504、556和711,且该缀合物与硫酸肝素蛋白聚糖的结合小于未缀合的多肽与硫酸肝素蛋白聚糖的结合。在另一个实施方案中,生物相容的聚合物共价附着在多肽的一个或多个因子VIII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,且该缀合物具有比未缀合的多肽更小的与因子VIII抑制性抗体的结合。在另一个实施方案中,生物相容的聚合物共价附着在多肽的一个或多个因子VIII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,且优选地在一个或多个位置377、378、468、491、504、556和711,且该缀合物具有比未缀合的多肽更少的来自能降解因子VIII的血浆蛋白酶的降解。更优选的,血浆蛋白酶是激活的C蛋白。

[0093] 在另一个实施方案中,生物相容的聚合物共价附着在B-结构域缺失的因子VIII的氨基酸位置129、491、1804和/或1808,更优选地,491或1808。在另一个实施方案中,生物相容的聚合物附着在多肽的因子VIII氨基酸位置1804,且包含聚乙二醇。优选地,生物相容的聚合物附着的一个或多个预定位点由位点特异性的半胱氨酸突变控制。

[0094] 功能因子VIII多肽上的一个或多个(优选地,一个或两个)位点,可以是聚合物附着的预定位点。在具体的实施方案中,多肽是单-PEG化的或双PEG化的。

[0095] 本发明也涉及制备缀合物的方法,其包含:突变编码功能因子VIII多肽的核苷酸序列,以在预定位点用半胱氨酸残基的编码序列替代;表达突变的核苷酸序列,以产生半胱氨酸增强的突变蛋白;纯化该突变蛋白;使突变蛋白与生物相容的聚合物反应,所述聚合物已经被激活,以与多肽在基本上仅还原的半胱氨酸残基处反应,从而形成缀合物;和纯化该缀合物。在另一个实施方案中,本发明提供了位点定向PEG化因子VIII突变蛋白的方法,其包含:(a)表达位点定向因子VIII突变蛋白,其中所述突变蛋白在因子VIII突变蛋白的暴露表面上用半胱氨酸替代氨基酸残基,且该半胱氨酸被加帽;(b)在温和地还原半胱氨酸突变蛋白和释放帽的条件下,使半胱氨酸突变蛋白接触还原剂;(c)从半胱氨酸突变蛋白去除帽和还原剂;和(d)去除还原剂后至少约5分钟,且优选地,至少15分钟,更优选地,至少30分钟,在产生PEG化的因子VIII突变蛋白的条件下,用包含巯基偶联部分的PEG处理半胱氨酸突变蛋白。PEG的巯基偶联部分选自:硫羟、三氟甲磺酸、2,2,2-三氟乙磺酸、氮丙啶、环氧乙烷、S-吡啶基和马来酰亚胺部分,优选地,马来酰亚胺。

[0096] 本发明还涉及肠胃外施用的药物组合物,其包含治疗有效量的本发明的缀合物和可药用佐剂。可药用佐剂是可以加入活性成分中来辅助配制或稳定化制剂且不会对患者造成显著的有害毒理学作用的物质。这样的佐剂的实例是本领域技术人员熟知的,且包括水、糖如麦芽糖或蔗糖、清蛋白、盐等。其它佐剂记载在例如E.W.Martin的Remington's Pharmaceutical Sciences中。这样的组合物将含有有效量的缀合物以及适宜量的载体,以制备适合有效地施用给宿主的可药用组合物。例如,缀合物可以肠胃外地施用给遭受血友病A的受试者,其剂量可以随出血发作的严重性而变化。静脉内施用的平均剂量范围是,对于手术前适应症是40单位/kg,对于微量出血是15-20单位/kg,且对于维持剂量是在8小时时间段内施用的20-40单位/kg。

[0097] 在一个实施方案中,本发明的方法包含,用半胱氨酸替代一个或多个表面BDD氨基酸,在哺乳动物表达系统中生产半胱氨酸突变蛋白,还原在表达过程中已经被生长培养基中的半胱氨酸加帽的半胱氨酸,去除还原剂,以允许BDD二硫键重新形成,和与半胱氨酸-特异性的生物相容的聚合物试剂(如PEG-马来酰亚胺)反应。这样的试剂的实例是PEG-马来酰亚胺,其中PEG大小为如5、22或43kD,可以从Nektar Therapeutics of San Carlos,CA得到,Nektar目录号分别是2D2MOH01 mPEG-MAL MW 5,000Da、2D2MOP01 mPEG-MAL MW 20kD、2D3XOP01 mPEG2-MAL MW 40kD,或PEG大小为12或33kD,可以从NOF Corporation,Tokyo,日本得到,NOF目录号分别是Sunbright ME-120MA和Sunbright ME-300MA。使用离子交换层析,纯化PEG化的产物,以去除未反应的PEG,并使用尺寸排阻层析来去除未反应的BDD。该方

法可以用于鉴别和选择性地屏蔽任何与FVIII的不利反应,如受体-介导的清除、抑制性抗体结合和蛋白水解酶的降解。我们注意到,Nektar或NOF提供的5kD PEG试剂在我们实验室测得为6kD,且类似地,作为线性20kD提供的PEG试剂在我们实验室测得为22kD,作为40kD提供的测得为43kD,且作为60kD提供的测得为64kD。为了避免混乱,在本文的讨论中,我们使用在我们实验室测得的分子量,例外是5kD PEG,我们将它记录为与生产商的鉴别相同的5kD。

[0098] 除了在BDD的位置491和1808处的半胱氨酸突变(上面公开的)外,将位置487、496、504、468、1810、1812、1813、1815、1795、1796、1803和1804突变成半胱氨酸,以潜在地允许在PEG化之后阻断LRP结合。同样,将位置377、378和556突变成半胱氨酸,以允许在PEG化之后阻断LRP和HSPG结合。选择位置81、129、422、523、570、1864、1911、2091和2284以使其在BDD上相等地间隔开,从而使得在这些位置用大PEG(>40kD)进行的位点定向PEG化以及在天然糖基化位点(41、239和2118)和LRP结合位点的PEG化完全覆盖BDD的表面,并鉴别BDD的新清除机理。

[0099] 在一个实施方案中,细胞培养基含有半胱氨酸,其通过形成二硫键,“加帽”突变蛋白上的半胱氨酸残基。在缀合物的制备中,在重组系统中生产的半胱氨酸突变蛋白被培养基中的半胱氨酸加帽,且该帽被释放帽的温和还原去除,然后添加半胱氨酸-特异性的聚合物试剂。如本领域技术人员会明白的,也可以使用本领域已知的FVIII位点特异性突变的其它方法。

#### [0100] 实施例

[0101] FVIII的结构活性关系分析。FVIII和BDD FVIII是非常大的复杂分子,具有许多不同的参与生物学反应的位点。以前共价修饰它们以提高药物代谢动力学性质的尝试具有混合的结果。令人惊奇的是,该分子可以被特异性地突变,然后以位点特异性的方式添加聚合物。此外,已知过去的聚合缀合物造成非特异性添加和降低的活性的问题,提高的药物代谢动力学性质和保留的活性的结果也令人惊奇。

[0102] 在一个实施方案中,本发明涉及使用半胱氨酸-特异性的配体(如PEG-马来酰亚胺)的位点定向诱变。未突变的BDD不具有任何可利用的与PEG-马来酰亚胺反应的半胱氨酸,所以仅仅突变的半胱氨酸位置将是PEG化位点。更具体地,BDD FVIII具有19个半胱氨酸,其中16个形成二硫键,且另外3个是游离的半胱氨酸(McMullen等,1995,Protein Sci.4,pp.740-746)。BDD的结构模型表明,所有3个游离半胱氨酸都是隐蔽的(Stoliova-McPhie等,2002,Blood 99,pp.1215-1223)。因为氧化的半胱氨酸不能被PEG-马来酰亚胺PEG化,所以如果不首先还原,BDD中形成二硫键的16个半胱氨酸就不能被PEG化。基于BDD的结构模型,如果不首先使蛋白变性,以将BDD中的3个游离的半胱氨酸暴露于PEG试剂,这些半胱氨酸就不能被PEG化。因而,似乎不可能通过在天然半胱氨酸残基处PEG化来实现BDD的特异性的PEG化,而不显著改变BDD结构,这最可能破坏它的功能。

[0103] 不清楚全长FVIII的B结构域中的4个半胱氨酸的氧化还原状态。B结构域中的4个半胱氨酸如果不形成二硫键且暴露于表面,它们就可能被PEG化。但是,因为全长FVIII和BDD具有类似的药物代谢动力学(PK)特征和类似的体内半衰期(Gruppo等,2003,Haemophilia 9,pp.251-260),B结构域PEG化不太可能导致提高的血浆半衰期,除非PEG的发生也保护非-B结构域区域。

[0104] 为了确定具有FVIII活性的多肽上用于聚合物附着的预定位点,所述附着将保留因子VIII活性和提高药物代谢动力学,基于BDD FVIII提出了下面的指导。修饰应当靶向清除、灭活和免疫原性机理,如LRP、HSPG、APC和抑制性抗体结合位点。Stoilova-McPhie.S.等,2002,Blood 99 (4),pp.1215-23显示了BDD的结构。例如,为了延长半衰期,可以将单个PEG导入在A2残基484-509和A3残基1811-1818中的LRP结合位点处或附近的特异性位点。在这些位点导入大体积的PEG,会破坏FVIII结合LRP的能力,并减少FVIII从循环中的清除。还认为,为了延长半衰期而不显著影响活性,可以将PEG导入残基1648,它位于全长分子中的B结构域和A3结构域的接点和A2和A3结构域之间的BDD的14-氨基酸接头中。

[0105] 通过使用重组DNA诱变技术,将单个半胱氨酸残基工程改造进A2或A3结构域,随后用半胱氨酸-特异性的PEG试剂(如PEG-马来酰亚胺)位点特异性地PEG化导入的半胱氨酸,可以实现PEG化的特异性。在484-509和1811-1818处PEG化的另一个优点是,这两个表位代表着患者的2/3大类抑制性抗原位点。为了达到提高的循环半衰期和免疫原性反应的减少的最大效果,可以将A2和A3 LRP结合位点两者PEG化,以产生双PEG化的产物。应当指出,在1811-1818区域内PEG化,可导致活性的显著损失,因为该区域也参与FIX结合。558-565内的位点定向PEG化应当废除HSPG结合,但是也可减少活性,因为该区域也结合FIX。

[0106] 可以PEG化其它表面位点,以鉴别新的FVIII清除机理。A2结构域的PEG化可以提供另外的优点,因为A2结构域在激活后会从FVIII解离,且推测由于它更小的大小,它可以比FVIII分子剩余部分更快地从循环中去除。另一方面,PEG化的A2可以大得足以逃避肾清除,且具有与FVIII剩余部分相当的血浆半衰期,从而可以体内重建激活的FVIII。

[0107] A2和A3区域中的PEG化位点的鉴别。基于高表面暴露和它们的Ca向CB轨迹的向外方向,选择在推定的A2 LRP结合区域处或附近的5个位置(与PEG1-5位置相对应的Y487、L491、K496、L504和Q468),作为位点定向PEG化的实例。此外,这些残基在分子的三维结构中彼此大致等距,从而它们一起可以代表该整个区域。选择在推定的A3LRP结合区域处或附近的8个位置(与PEG6-14相对应的1808、1810、1812、1813、1815、1795、1796、1803、1804),作为位点定向PEG化的实例。PEG6(K1808)邻近1811-1818和在1810处的天然N-连接的糖基化位点。在位置1810处的PEG化(PEG7)将用PEG替代糖。在PEG8位置T1812处的突变,也将废除糖基化位点。尽管预测PEG9位置(K1813)指向内侧,但在结构模型不正确的情况下选择它。PEG10(Y1815)是在LRP结合环内的大体积的疏水氨基酸,且可以是关键的相互作用残基,因为疏水氨基酸通常存在于蛋白-蛋白相互作用的中心。因为已经报道1811-1818区域会参与LRP和FIX结合两者,所以认为该环内的PEG化可能导致降低的活性。因而,PEG11-PEG14(1795、1796、1803、1804)被设计成在1811-1818环附近,但是不在环内,从而人们可以用不同的PEG大小解离LRP和FIX结合。

[0108] 为了同时阻断两个LRP结合位点,可以生成双PEG化,例如,在PEG2和PEG6位置。

[0109] 因为已经显示558-565区域结合HSPG和FIX两者,在该区域内没有设计位点。相反地,将PEG15-PEG17(377、378和556)设计在A2LRP和HSPG结合区域之间,从而使得附着的PEG可以干扰它们之间的相互作用并破坏可能的相互作用。也可以选择LRP和HSPG结合区域内或附近的表面暴露的且指向外侧的其它位点。为了鉴别新的清除机理,可以将FVIII系统地PEG化。除了PEG1-17以外,3个其它天然糖基化位点,即与PEG18-20相对应的N41、N239和N2118,可以用作PEG化的限定(tethering point),因为它们应当是表面暴露的。除了

vWF、FIX、FX、磷脂和凝血酶的功能性相互作用位点以外,将在离PEG2、PEG6的CB原子20埃半径内的表面积和4个糖基化位点作图到BDD模型上。

[0110] 然后,基于它们覆盖离它们每个CB原子20埃半径的几乎整个剩余BDD表面的能力,选择与Y81、F129、K422、K523、K570、N1864、T1911、Q2091和Q2284相对应的PEG21-29。还选择这些位置,因为它们是完全暴露的,指向外侧的,且远离天然半胱氨酸,以使可能的不正确的二硫键形成最小化。选择20埃半径,因为预期大PEG(如64kD分支的PEG)具有覆盖约20埃半径的球的潜力。一起PEG化PEG21-29以及PEG2和PEG6和糖基化位点PEG18、19和20,可能保护几乎整个无功能的FVIII表面。

[0111] 可以组合导致增强的性质(如提高的PK特征、更大的稳定性或减少的免疫原性)的PEG化位置,以生成具有最大增强性质的多-PEG化产物。通过分别去除A2和A3结构域中暴露的二硫键,设计PEG30和PEG31。PEG30或C630A应释放它的二硫键配偶体C711用于PEG化。同样地,PEG31,C1899A应允许C1903被PEG化。

[0112] 诱变。通过在选择用于PEG化的位点导入半胱氨酸密码子,可以生成FVIII的位点定向PEG化的底物。Stratagene cQuickChange™ II位点定向诱变试剂盒用于制备所有的PEG突变体(Stratagene试剂盒200523,购自Stratagene Corporation,La Jolla CA)。使用**PfuTurbo®**DNA聚合酶和温度循环仪,进行cQuickChange™位点定向诱变方法。使用不置换引物的PfuTurbo延伸两种互补的寡核苷酸引物(其中含有所需的突变)。使用含有野生型FVIII基因的dsDNA作为模板。在多个延伸循环后,用对甲基化的DNA特异性的DpnI内切核酸酶消化产物。新合成的含有突变的DNA是未甲基化的,而亲本野生型DNA是甲基化的。然后,将消化的DNA用于转化XL-1 Blue超感受态细胞。

[0113] 诱变效率是几乎80%。在pSK207+BDD C2.6或pSK207+BDD中进行诱变反应(图1)。通过DNA测序证实成功的诱变,并将含有突变的适当片段转入哺乳动物表达载体pSS207+BDD的FVIII主链中。转移后,将所有突变再次确认序列。对于A3突变蛋白PEG6、7、8、9和10,在载体pSK207+BDD C2.6中进行诱变。通过测序证实后,将突变体片段KpnI/Pme亚克隆进pSK207+BDD中。然后,将BDD突变蛋白亚克隆进pSS207+BDD表达载体中。对于A3突变蛋白PEG11、12、13、14,直接在载体pSK207+BDD中进行诱变,且然后将确认序列的突变体BDD亚克隆进pSS207+BDD中。对于A2突变蛋白PEG1、2、3、4、5,在pSK207+BDD C2.6载体中进行诱变。将确认序列的突变体亚克隆进pSK207+BDD中,且然后亚克隆进pSS207+BDD中。

[0114] 列出了每个反应的诱变所使用的引物(仅有义链):

[0115] PEG1,Y487C:GATGTCCGTCCTTTGTGCTCAAGGAGATTACCA (SEQ ID NO:5)

[0116] PEG2,L491C:TTGTATTCAAGGAGATGCCCAAAAGGTGTAAAAC (SEQ ID NO:6)

[0117] PEG3,K496c:TTACCAAAAGGTGTATGCCATTTGAAGGATTTTC (SEQ ID NO:7)

[0118] PEG4,L504C:AAGGATTTTCCAATTTGCCCAGGAGAAATATTC (SEQ ID NO:8)

[0119] PEG5,Q468C:GATTATATTTAAGAATTGCGCAAGCAGACCATAT (SEQ ID NO:9)

[0120] PEG6,K1808C:TAGAAAAAACTTTGTCTGCCCTAATGAAACCAAAAAC (SEQ ID NO:10)

[0121] PEG7,N1810C:AACTTTGTCAAGCCTTGCGAAACCAAACTTAC (SEQ ID NO:11)

[0122] PEG8,T1812C:GTCAAGCCTAATGAATGCAAACTTACTTTTGGGA (SEQ ID NO:12)

[0123] PEG9,K1813C:CAAGCCTAATGAAACCTGCACTTACTTTTGGAAAG (SEQ ID NO:13)

[0124] PEG10,Y11815C:CTAATGAAACCAAACTTGCTTTTGGAAAGTGCAAC (SEQ ID NO:14)

- [0125] PEG11, D1795C: ATTTCTTATGAGGAATGCCAGAGGCAAGGAGCA (SEQ ID NO: 15)
- [0126] PEG12, Q1796C: TCTTATGAGGAAGATTGCAGGCAAGGAGCAGAA (SEQ ID NO: 16)
- [0127] PEG13, R1803C: CAAGGAGCAGAACCTTGCAAAAACTTTGTCAAGCCT (SEQ ID NO: 17)
- [0128] PEG14, K1804C: GGAGCAGAACCTAGATGCAACTTTGTCAAGCCT (SEQ ID NO: 18)
- [0129] PEG15, K377C: CGCTCAGTTGCCAAGTGTCTATCCTAAAACTTGG (SEQ ID NO: 19)
- [0130] PEG16, H378C: TCAGTTGCCAAGAAGTGTCTAAAACTTGGGTA (SEQ ID NO: 20)
- [0131] PEG 17, K556C: CTCCTCATCTGCTACTGCGAATCTGTAGATCAA (SEQ ID NO: 21)
- [0132] PEG18, N41C: CAAAATCTTTTCCATTCTGCACCTCAGTCGTGTAC (SEQ ID NO: 22)
- [0133] PEG19, N239C: GTCAATGGTTATGTATGCAGGTCTCTGCCAGGT (SEQ ID NO: 23)
- [0134] PEG20, N2118C: CAGACTTATCGAGGATGTTCCACTGGAACCTTA (SEQ ID NO: 24)
- [0135] PEG21, Y81C: ATCCAGGCTGAGGTTTGTGATACAGTGGTCATT (SEQ ID NO: 25)
- [0136] PEG22, F129C: GAAGATGATAAAGTCTGTCTGGTGAAGCCAT (SEQ ID NO: 26)
- [0137] PEG23, K422C: CAGCGGATTGGTAGGTGTTACAAAAAGTCCGA (SEQ ID NO: 27)
- [0138] PEG24, K523C: GAAGATGGGCCAACTTGCTCAGATCCTCGGTGC (SEQ ID NO: 28)
- [0139] PEG25, K570C: CAGATAATGTCAGACTGCAGGAATGTCATCCTG (SEQ ID NO: 29)
- [0140] PEG26, N1864C: CACACTAACACACTGTGTCTCTGCTCATGGGAGA (SEQ ID NO: 30)
- [0141] PEG27, T1911C, CAGATGGAAGATCCCTGCTTTAAAGAGAATTAT (SEQ ID NO: 31)
- [0142] PEG28, Q2091C: ACCCAGGGTGCCGTTGCAAGTTCTCCAGCCTC (SEQ ID NO: 32)
- [0143] PEG29, Q2284C: AAAGTAAAGGTTTTTTGCGGAAATCAAGACTCC (SEQ ID NO: 33)
- [0144] PEG30, C630A: TTGCAGTTGTCAGTTGCTTTGCATGAGGTGGCA (SEQ ID NO: 34)
- [0145] PEG31, C1899A: AATATGGAAAGAAACGCTAGGGCTCCCTGCAAT (SEQ ID NO: 35)

[0146] 突变蛋白表达。在插入赋予对潮霉素B抗性的载体后,按照生产商的说明书,将PEG突变蛋白转染进与293Fectin转染试剂(Invitrogen Corp.目录号12347-019)复合的HKB11细胞(美国专利6,136,599)中。通过Coatest生色测定(Chromogenix Corp.目录号821033,见实施例12生色测定),评价转染后3天的FVIII表达(表1)。然后,在补加了5%FBS的生长培养基中,将转染的细胞置于50 $\mu$ g/ml的潮霉素B选择压力下。当出现潮霉素B抗性的菌落时,手工挑取它们,并通过Coatest生色测定筛选FVIII表达。然后,将FVIII表达稳定的细胞适应到含有HPPS补料的培养基中。扩增细胞,并以 $1 \times 10^6$ 细胞/ml接种进含有新鲜培养基的摇瓶中。3天后收获的组织培养液(TCF)用于纯化FVIII BDD突变蛋白。通过Coatest测定TCF的FVIII活性(表1)。

[0147] PEG突变蛋白效价的总结

突变	突变蛋白 ID	效价 (IU/ml)	
		瞬时的	稳定的细胞
Y487C	PEG1	0.07	N/A
L491C	PEG2	0.60	1.96
K496C	PEG3	0.45	N/A
L504C	PEG4	0.38	5.57
Q468C	PEG5	0.69	8.14
K1808C	PEG6	0.54	2.73
N1810C	PEG7	0.21	0.5
T1812C	PEG8	0.16	N/A
K1813C	PEG9	0.35	7.74
Y1815C	PEG10	0.09	N/A
D1795C	PEG11	0.27	N/A
Q1796C	PEG12	0.29	N/A
R1803C	PEG13	0.11	N/A
K1804C	PEG14	0.18	1.14
L491C/K1808C	PEG2+6	0.11	2.48
L491C/K1804C	PEG2+14	0.13	7.19
K377C	PEG15	0.11	12.58
H378C	PEG16	0.15	0.97
K556C	PEG17	0.09	0.15
N41C	PEG18	0.05	N/A
N239C	PEG19	0.16	N/A
N2118C	PEG20	0.13	N/A
Y81C	PEG21	0.36	N/A
F129C	PEG22	0.25	2.55
K422C	PEG23	0.28	N/A
K523C	PEG24	<0.05	N/A
K570C	PEG25	<0.05	N/A
N1864C	PEG26	0.15	N/A
T1911C	PEG27	0.28	N/A
Q2091C	PEG28	0.20	N/A
Q2284C	PEG29	0.17	N/A
C630A	PEG30	<0.05	0.20
C1899A	PEG31	0.30	1.80

[0148]

[0149] 表1. 来自瞬时的和稳定的转染的PEG突变蛋白的表达水平

[0150] 突变蛋白纯化。收集含有分泌的突变蛋白FVIII蛋白的细胞培养上清液后,通过0.2微米薄膜滤器过滤上清液,去除任何残存细胞。然后,通过超滤或阴离子交换,浓缩上清液。然后,将其应用于免疫亲和柱,在这里去除细胞培养基组分和大部分宿主细胞蛋白杂质。然后通过渗滤,将免疫亲和柱洗脱物缓冲液更换进含有蔗糖的配制缓冲液中,并冷冻。通过生色测定,评定经过单克隆FVIII抗体柱的蛋白得率和回收。测定层析运行的装载、流通(flow through)、各种洗脱物级分、带和渗滤的洗脱物样品的FVIII活性(表2)。表2显示了PEG2突变蛋白从单克隆抗体柱的回收。抗体是C7F7抗体。通过生色测定确定表2的百分比

回收。终得率是73%。在图2中显示了经单克隆FVIII抗体层析柱纯化的PEG2蛋白的280nm UV吸光度关于时间的图。使用来自Amersham Bioscience的AKTA® Explorer 100层析系统,进行层析。该装置采用多波长UV-可见光监控器和2mm流动池。在有高盐存在下,从柱洗脱PEG2突变蛋白,且通过280nm吸光度和FVIII活性测定,指示洗脱峰。

[0151]

步骤	%回收
C7F7装载	100
C7F7流通	1.1
C7F7洗涤	0.2
C7F7洗脱物	86
C7F7带	0.0
UF/DF后	73

[0152] 表2. 来自单克隆FVIII抗体柱的PEG2突变蛋白的回收

[0153] PEG化。不经还原和在超过100倍过量的PEG:蛋白比(未显示数据)变性,半胱氨酸-特异性的PEG不能PEG化天然全长FVIII或BDD,从而证实了下述基于BDD结构模型的假说,即所有天然半胱氨酸都形成二硫键,或隐蔽在FVIII内。使用上述标准方案表达和纯化的FVIII半胱氨酸突变蛋白不能被半胱氨酸-特异性的PEG马来酰亚胺试剂PEG化,推测是因为导入的FVIII半胱氨酸通过与存在于细胞生长培养基中的巯基(如半胱氨酸和β-巯基乙醇)反应而被“加帽”。通过从培养基清除半胱氨酸和β-巯基乙醇,可以潜在地解决该问题,但是这可能导致更低的FVIII生成,且不能预防细胞释放的巯基封闭导入的FVIII半胱氨酸。

[0154] 在本发明的另一个方面,开发了三步方法,以允许FVIII的位点-特异性的PEG化(图3)。在步骤1中,用还原剂如约0.7mM三(2-羧乙基)膦(TCEP)或0.07mM二硫苏糖醇(DTT),在4°C温和地还原约1μM的纯化的FVIII半胱氨酸突变蛋白30分钟,以释放“帽”。在步骤2中,通过尺寸排阻层析(SEC)方法,如使样品运行经过旋转柱(BioRad®),以允许FVIII二硫键重新形成,同时保持导入的半胱氨酸游离并还原,与“帽”一起去掉还原剂。在步骤3中,去除还原剂后至少30分钟,用至少10倍摩尔过量的大小范围为5-64kD的PEG-马来酰亚胺(Nektar Therapeutics和N.O.F. Corporation)在4°C处理游离的FVIII半胱氨酸突变蛋白至少1小时。该方法产生高度一致的产物谱,其对于由不同个体重复的许多反应,具有可再现的数据。

[0155] 因为去除TCEP的旋转柱方法不能改变比例,所以选择凝胶过滤脱盐层析。但是,在使用TCEP掺加样品(spike sample)测试该方法后,显示在柱空隙且不仅仅在盐级分中TCEP以可测量的水平洗脱,正如从具有小分子量的分子所预见到的。蛋白印迹测定显示显著的背景PEG化可能是由于TCEP的不完全去除。同时,分开的实验显示,使用与盐梯度相结合的阴离子交换层析介质,可以从其它蛋白杂质显著地进一步纯化C7F7纯化的材料。然后,决定用如上所述的TCEP还原C7F7材料,然后经阴离子交换柱加工该材料。因为电荷差异,FVIII蛋白会被保留,而TCEP会流过柱,且不会被保留。同时,在梯度盐洗脱的过程中,可以从大部分剩余蛋白杂质中纯化出FVIII蛋白。这意味着,以后发生的PEG化在理论上由于更纯的原材料而更均匀。但是,用TCEP的掺加样品测试后,发现可测量水平的TCEP洗脱在含有FVIII的梯度中。因此,决定在阴离子交换层析后执行凝胶过滤脱盐层析,从而当依次使用这两个

步骤时,导致完全去除TCEP,并消除非特异性的PEG化。

[0156] 通过SDS PAGE和蛋白印迹进行PEG化分析。通过还原6%Tris甘氨酸SDS聚丙烯酰胺凝胶(Invitrogen)上的电泳,可以分析PEG化产物。电泳后,可以用考马斯蓝染色凝胶以鉴别所有蛋白,或进行标准的蛋白印迹规程,以鉴别FVIII的不同区域上的PEG化模式。用分别针对FVIII重链C-末端区域或VIII轻链N-末端区域产生的小鼠单克隆R8B12或C7F7抗体对印迹染色,应鉴别各链的PEG化。用针对FVIII的484-509区域的413抗体染色,将确定PEG化对于突变蛋白如PEG1-4是否确实是位点-特异性的。同样地,用识别FVIII的1801-1823区域的CLB-CAg A抗体染色,将确定PEG化对于突变蛋白如PEG6-10是否确实是位点-特异性的。

[0157] 显示PEG2(L491C)PEG化对重链的选择性高于轻链,且更具体地,对484-509区域是选择性的(图4),同时显示PEG6(K1808C)对轻链的选择性高于重链(图5)。

[0158] 对于图4所述的研究,用TCEP还原PEG2突变蛋白(泳道1和8),随后去除TCEP(泳道2和9),并用5、12、22、33或43kD PEG-马来酰亚胺处理(泳道3-7和10-14)。未PEG化的FVIII作为未经加工的(H+L)和经加工的重(H)和轻(L)链带运行。所有3条带都在考马斯蓝染色的凝胶上可检测到(右下图),而用链-特异性的抗体进行的蛋白印迹染色仅仅揭示了未经加工的和对应的链。使用R8B12染色(左上图),当用PEG-马来酰亚胺处理PEG2时,重链(H)带的强度急剧降低,并产生一条新带,它跑得比与PEG的大小成比例的母H带更高。使用C7F7染色(左下图),轻链(L)带(由于异质糖基化产生的多条带)不改变强度。两条链的未经加工的H+L带发生移动,因为H链是未经加工的FVIII的部分。考马斯染色也证实了比轻链多得多的重链PEG化,即H带强度的降低。最后,PEG化的带以PEG大小-依赖性的方式在413抗体染色上比R8B12染色损失相对更多的强度(右上图),推测是由于491的位点特异性的PEG化,这会阻断413抗体与484-509的结合。对于左边的2个凝胶,每个泳道装载的FVIII的量是约30ng,对于右上凝胶,是约1000ng,且对于右下凝胶,是约2000ng。

[0159] 还原后去除还原剂,不改变FVIII的迁移(泳道1vs.2和8vs.9)。将22kD PEG加入PEG2阻断413抗体的结合,这与491位置处的特异性的PEG化相一致(图4右上凝胶)。这也暗示着,PEG化的PEG2在人体内具有更低的免疫原性,因为已经显示413抗体具有与人A2抑制性抗体相同的表位(Scandella等,1992,Thromb.Haemost.67,pp.665-71)。

[0160] 对于图5所述的研究,用TCEP还原PEG6突变蛋白,随后去除TCEP(泳道1和6),并用5、12、22或33kD PEG-马来酰亚胺处理(泳道2-5和7-10)。未PEG化的FVIII作为未经加工的(H+L)和经加工的重(H)和轻(L)链带运行。因为PEG6(K1808)突变存在于轻链上,所以仅仅在轻链上检测到PEG化,而在重链上未检测到。对于左边的凝胶,每个泳道装载的FVIII的量是约100ng,而对于右边凝胶,是约30ng。

[0161] 在用超过100倍摩尔过量的PEG-马来酰亚胺处理后,甚至在上述的还原和还原剂去除操作后,作为对照运行的BDD没有表现出任何显著的PEG化(图6a)。相同的方法也应用于PEG4和PEG5(图6a)。与PEG2相比,这些突变蛋白未同样有效地PEG化,但是它们对重链的选择性类似于PEG2(L491C)。PEG6(K1808C)PEG化效率相对较低,可能是因为它非常接近N1810处的N-连接的糖基化位点,它会阻断位置1808处的PEG化。因而,我们设计了PEG7(N1810C)来去除1810处的天然糖基化位点。与PEG6相比,在头对头的对比中,PEG7表现出提高的PEG化效率(图6b)。类似地,PEG15表现出比PEG2略微更好的PEG化效率。PEG2+6(BDD的

双重突变体)可以在重链和轻链两者上PEG化,因为PEG2是重链半胱氨酸突变,而PEG6是轻链突变(图6c)。该方法也应用于野生型全长FVIII(图6d)。检测PEG化的最大重链片段,其包括A1、A2和大部分B结构域。PEG化模式暗示着单PEG化,且仅存在单个PEG化的半胱氨酸。

[0162] 通过凝血酶切割和蛋白印迹进行PEG化分析。在37℃用凝血酶(40IU/ug FVIII)处理PEG化的产物30分钟。使用的凝血酶也含有APC作为污染物。凝血酶切割将从重链产生50kD A1和43kD A2结构域,而APC切割将A2结构域进一步分离成21和22kD片段(图7)。用识别重链C-末端的R8B12抗体染色,只能鉴别完整的A2结构域和21kD C-末端片段(FVIII 562-740)。因而,如果PEG2PEG化是对位置491特异性的,那么43kD A2结构域会被PEG化,但是21kD C-末端片段不会。这确实得到了图7所示的22kD PEG化的PEG2的蛋白印迹的证实。因而,通过消除,PEG2PEG化已经定位在A2结构域的N-末端22kD片段(FVIII 373-561)。因为在pH 6.8时PEG-马来酰亚胺对半胱氨酸是完全选择性的,且仅仅在373-561内的天然FVIII半胱氨酸来自528和554之间的隐蔽二硫键,所以PEG2非常可能在位置491导入的半胱氨酸上PEG化。用FVIII重链N-末端抗体对凝血酶-处理的PEG化的PEG2的蛋白印迹染色显示,A1结构域没有PEG化(未显示数据)。对于5、12、33和43kD的PEG,还已经证实了使用凝血酶切割方法对PEG2的选择性PEG化(未显示数据)。PEG化的野生型全长FVIII的凝血酶切割显示,仅仅B结构域被PEG化(图8)。

[0163] 通过碘染色进行PEG化分析。为了证实在考马斯蓝和蛋白印迹染色上新生成的带确实是PEG化的带,使用了钨-碘染色,它对PEG是特异性的(图9)。将PEG化的PEG2在6%Tris甘氨酸凝胶(Invitrogen)上电泳,并用R8B12重链抗体或钨-碘溶液染色(Lee等,Pharm Dev Technol.19994:269-275)。通过使用分子量标记将它们排队,在两种染色之间匹配PEG化的带,从而证实FVIII重链PEG化。

[0164] 通过MALDI-质谱法进行PEG化分析。为了证实重链A2结构域的PEG化,通过基质辅助的激光解吸/离子化(MALDI)质谱法,分析PEG化之前和之后的rFVIII样品。混合样品,并在MALDI靶平板上结晶,其中使用溶于30%乙腈、0.1%TFA中的芥子酸基质。然后在阳性线性模式的Voyager DE-PRO分光计中分析它们。图10显示的结果表明,PEG2的轻链集中在83kD,且重链(HC)集中在89kD。为PEG化的样品获得的光谱显示了HC峰的下降和集中在111kD的新峰的形成。这证实了重链的PEG化。在检出限以上没有观察到PEG化的轻链(在105kD)。

[0165] 然后将两种样品进行凝血酶消化,以20单位凝血酶/mg FVIII,在37℃消化30分钟,随后通过氨基酸分析测定FVIII浓度(Commonwealth Biotechnologies,Inc)。将重链切割成46kD(A1)N-末端级分和43kD(A2)级分。从PEG化的样品(图11)得到的MALDI光谱显示了43kD峰的损失和新的65kD峰的发展,这是由于PEG化的A2结构域。在检出限以上仍然没有观察到LC的PEG化。这些结果再次证实了FVIII的A2结构域的PEG化。将相同的分析应用于PEG化的PEG6,从而证实了轻链A3C1C2片段的PEG化(图12)。

[0166] 活性测量

[0167] 凝结测定。凝固FVIII:C测试方法是基于活化部分凝血激酶时间(aPTT)的一阶段测定。在有因子IXa、钙和磷脂存在下,FVIII起因子X向Xa的酶促转化的辅因子作用。在该测定中,将稀释的测试样品与FVIII缺乏的血浆底物和aPTT试剂的混合物一起在37℃温育。将氯化钙加入温育混合物,并开始凝固。形成凝块所需的时间(秒)和FVIII:C的浓度的对数之

间存在反相关。通过对比测试材料的各种稀度的凝固时间和从已知活性的标准材料的系列稀释构建的曲线,内推未知样品的活性水平,并以国际单位/mL (IU/mL) 为单位进行报告。

[0168] 生色测定。生色测定方法由两个连续步骤组成,其中颜色的强度与FVIII活性成比例。在第一步中,在有最佳量的钙离子和磷脂存在下,FIXa和它的辅因子FVIIIa将因子X活化为FXa。存在过量的因子X,从而使得因子X的活化速率仅仅依赖于FVIII的量。在第二步中,因子Xa水解生色底物,以产生生色团,并在405nm光度测定地读出颜色强度。计算未知物的效能,并用斜率比统计学方法检查该测定的有效性。以国际单位/mL (IU/mL) 为单位报告活性。

[0169] 1811-1818环参与与FIX的结合,但是尚未确定该环内单个位置的重要性。相对于天然FVIII,PEG7-10突变蛋白表现出几乎一致的比生色活性(表3)。表3显示了PEG突变蛋白和PEG化的PEG2或PEG6相对于BDD的百分比比活性(S.A.)。通过将生色、凝结或vWF结合活性除以总抗原ELISA (TAE) 值,确定S.A.。然后,将PEG化的突变蛋白的S.A.除以BDD的S.A. (8IU/ug生色,5IU/ug凝结,和1vWF/TAE),并乘以100,以得到表3中列出的百分比S.A.,标题为生色、凝结和vWF/TAE。

[0170]

	突变	生色	凝结	vWF/TAE
BDD		100	100	100
PEG1	Y487C			
PEG2	L491C	125	130	138
PEG2 red	L491C	137	141	98
PEG2-5 kD PEG	L491C	124	93	125
PEG2-12 kD PEG	L491C	118	25	71
PEG2-22 kD PEG	L491C	103	13	87
PEG2-33 kD PEG	L491C	130	17	59
PEG2-43 kD PEG	L491C	91	9	57
PEG3	K496C			
PEG4	L504C			
PEG5	Q468C	92		
PEG6	K1808C	83	60	100
PEG6-33 kD PEG	K1808C	42	6	90
PEG7	N1810C	100		
PEG8	T1812C	100		
PEG9	K1813C	83		
PEG10	Y1815C	75		
PEG11	D1795C			
PEG12	Q1796C			
PEG13	R1803C			
PEG14	K1804C			
PEG2+6	491C/1808C			
PEG15	K377C	82		
PEG16	H378C	126		
PEG17	K556C	43		
PEG18	N41C	80		
PEG19	N239C			
PEG20	N2118C	127		
PEG21	Y81C			
PEG22	F129C	83		
PEG23	K422C			
PEG24	K523C			
PEG25	K570C			
PEG26	N1864C			
PEG27	T1911C			
PEG28	Q2091C			
PEG29	Q2284C			

[0171] 表3.PEG突变蛋白和PEG化的PEG2和PEG6相对于BDD的百分比比活性(S.A.)

[0172] 如表3中所使用的,“PEG2red”是已经用还原剂处理、然后去除还原剂的PEG2突变蛋白。该还原方法不显著改变FVIII的3种功能活性。缀合到5kD (PEG2-5kD) 至43kD (PEG2-43kD) 的PEG上的PEG2突变蛋白,不损失显著量的生色活性,但是随着PEG大小增加至超过5kD,具有明显更低的凝结活性。对于更大尺寸的PEG化的PEG2,也存在vWF结合的适度降低。

[0173] 总抗原ELISA (TAE)。将FVIII捕获到已经用多克隆FVIII抗体包被的微量滴定板上。用生物素化的多克隆rFVIII抗体和链霉抗生物素蛋白辣根过氧化物酶(HRP) 缀合物,检测结合的FVIII。过氧化物酶-链霉抗生物素蛋白复合物在加入四甲基联苯胺(TMB) 底物后,产生颜色反应。使用4参数拟合模型,从标准曲线内推样品浓度。以 $\mu\text{g/mL}$ 报告FVIII结果。

[0174] vWF结合ELISA。允许FVIII结合严重血友病血浆溶液中的vWf。然后,将FVIII-vWf复合物捕获到已经用vWf-特异性的单克隆抗体包被的微量滴定板上。使用FVIII多克隆抗体和辣根过氧化物酶-抗-兔缀合物,检测结合到vWf上的FVIII。过氧化物酶-缀合的抗体复合物在加入底物后产生颜色反应。使用4参数拟合模型,从标准曲线内推样品浓度。以 $\mu\text{g/mL}$ 报告FVIII结合结果。PEG化后对任何活性没有显著影响,这与在B结构域的PEG化相一致。

[0175]

样品	TAE ug/mL	凝结测定			生色测定			vWF ELISA		
		IU/mL	IU/ug	%起始	IU/mL	IU/ug	%起始	ug/mL vWF/TAE	%起始	
KG-2 起始	1.31	4.8	3.6	100	5.60	4.3	100	0.42	0.32	100
仅降低	0.93	3.1	3.4	93	4.08	4.4	103			
KG-2-5kD PEG	0.71	2.5	3.5	96	3.09	4.3	102			
KG-2-12kD PEG	0.59	2.3	3.9	107	2.99	5.0	118			
KG-2-22kD PEG	0.63	2.5	3.9	108	3.06	4.8	113	0.19	0.30	94
KG-2-30kD PEG	0.59	2.5	4.1	114	3.01	5.1	119	0.19	0.32	100
KG-2-43kD PEG	0.52	2.4	4.6	128	2.86	5.5	129			

[0176] 表4.用不同大小的PEG进行PEG化之前和之后的野生型全长FVIII (KG-2) 的比活性(S.A.)

[0177] 通过离子交换层析纯化PEG化的FVIII。将PEG化的FVIII应用于阴离子交换柱或阳离子交换柱,其中蛋白结合到柱上,同时任何过量的游离PEG试剂不结合,并在流通中去除。然后用氯化钠梯度,从柱洗脱PEG突变蛋白。使用钡-碘染色的装载、流通和梯度级分的4-12%Bis-Tris凝胶,证实柱洗脱级分具有PEG化的突变蛋白。

[0178] 通过尺寸排阻层析纯化PEG化的FVIII。合并含有大部分PEG2突变蛋白的阴离子交换级分,并通过超滤浓缩,然后应用于尺寸排阻柱。然后,使用配制缓冲液洗脱柱。因为蛋白大小和形状的差异取决于PEG是否结合在蛋白上,所以该柱可以分离PEG化的PEG2突变蛋白和任何剩余的未PEG化的PEG2。基于具有大部分FVIII活性,合并PEG化的突变蛋白FVIII级分,然后冷冻用于后续动物研究和分子表征。图13对比了未-PEG化的PEG2突变蛋白的洗脱和43kD PEG化的PEG2突变蛋白的洗脱。PEG化的PEG2洗脱明显更早,这指示着由于共价附着的PEG导致的大小和形状的增加。

[0179] 利用表现出更低PEG化效率(即小于50%)的突变蛋白(如PEG6),产生高纯度单-PEG化产物的最有效纯化方案是,使用阳离子交换层析和随后的尺寸排阻层析的组合。例如,利用PEG6,阳离子交换层析可以从大多数未-PEG化的PEG6(晚期洗脱级分,图15)中纯化出PEG化的PEG6(早期洗脱级分,图14)。然后,尺寸排阻层析从残存的未-PEG化的蛋白(晚期

洗脱级分,图15)中纯化出PEG化的蛋白(早期洗脱级分,图15)。

[0180] PEG大小对活性的作用。为了测试PEG大小是否对PEG化后的FVIII的凝结和生色活性有作用,用TCEP还原纯化的全长FVIII、PEG2、PEG6和PEG14,然后去除还原剂,并与缓冲液对照或6kD-64kD的PEG反应。不经去除过量的PEG或未PEG化的FVIII,直接测定得到的PEG化的FVIII。对照实验表明,过量的PEG对FVIII活性无作用。

[0181] 图16显示了该研究的结果。在图16中,将纯化的全长FVIII表达为KG-2。通过将还原并去除还原剂后用PEG处理的样品的值除以用缓冲液对照处理的样品的值,同时考虑PEG化得率,确定图16中报告的百分比活性。对于任何给定的FVIII构建体,所有PEG的PEG化得率是相当的。对于KG-2、PEG2和PEG14,它们是约80%,对于PEG6,是约40%。例如,PEG14缓冲液对照处理的具有6.8IU/mL的凝结活性,相比而言,12kD PEG化的PEG14样品具有3.2IU/mL。但是,PEG化效率是约80%,这意味着3.2IU/mL代表着约80%PEG化和约20%未PEG化的合计活性。假定未PEG化的样品具有与缓冲液对照处理的PEG14相同的活性,PEG化的PEG14的未PEG化的百分比活性计算为 $34\% = (3.2 - 6.8 \times 20\%) / (6.8 \times 80\%)$ 。

[0182] 当PEG大小增加到超过6kD时,在BDD的PEG2、PEG6或PEG14位置处A2或A3结构域内的PEG化,导致凝结活性的急剧损失。但是,在全长FVIII的天然B-结构域半胱氨酸处B结构域内的PEG化,对凝结活性无作用。令人感兴趣地,所有PEG化的构建体的生色活性不受影响。这可能是由于测定差异。小生色肽底物可能比在凝结测定中使用的更大蛋白底物更容易接近PEG化的FVIII/FIX/FX复合物。或者,PEG可能影响突变蛋白的激活。一阶段凝结测定可以比二阶段生色测定更容易地检测到这一点。

[0183] 为了证实PEG对PEG2、6和14的凝结活性的作用的观察,从过量PEG和未PEG化中纯化出几种PEG化的构建体。由于PEG对生色活性没有任何作用,生色对凝结活性比可以较好地评价PEG对凝结活性的相对作用(表5)。在给定位置(如PEG2)处更大的PEG和更高数目的PEG(如在PEG2+6构建体的情况下),诱导更大的凝结活性损失。

[0184]

PEG化的BDD		生色 IU/mL / 粗比率	凝结 IU/mL / 相对于BDD的比率
样品 ID	PEG		
BDD	无 PEG	1.7	1
PEG2 (库 2)	22kD 491	9	5
PEG2	43kD* 491	25	15
PEG6	12kD 1808	5	3
PEG6 (旧)	33kD 1808	13	7
PEG6 (新)	33kD 1808	8	5
PEG2+6 (LSP25)	33kD 在 491, 单	10	6
PEG2+6 (LSP22)	33kD 在 491/1808, 双	24	14
PEG2+6 (ESP)	33kD 在 491/1808/A3, 三	60	35
PEG22	64kD* 129	14	8
PEG14	12kD 1804	3.2	1.9
PEG14	20kD* 1804	4.2	2.5
PEG14	33kD 1804	5	2.9
PEG2+14 (ESP19)	33kD at 491/1804, 双	21	12

[0185] 表5. 纯化的PEG化的BDD的生色对凝结比。

[0186] \* 分支的PEG

[0187] 兔PK研究。为了理解PEG化对FVIII的药物代谢动力学(PK)的作用,在许多物种中

进行了PK研究。将NZW SPF兔用于研究:10只雌性,每组5只兔,分成2组(PEG2 FVIII和22kD PEG化的PEG2)。在无菌PBS中稀释样品,终浓度为100IU/mL(生色单位)。每只兔子通过边缘耳静脉接受1ml/kg(100IU/kg)剂量的稀释的测试或对照底物。在注射后的各个时间,在给药后确定的时间点,从中央耳动脉抽取血液样品(1mL)到1mL注射器中(装有100 $\mu$ L 3.8%柠檬酸钠)。将血浆样品与包被在96-孔平板上的R8B12重链抗体一起温育,以特异性地捕获给药的人FVIII。通过生色测定,确定捕获的FVIII的活性(图17)。还将PEG化的PEG2和PEG化的PEG6与BDD相对比(图18和19),其中PEG化的突变蛋白表现出与BDD相比血浆回收的提高。PEG化的野生型全长FVIII没有表现出很大提高(图20)。

[0188] 小鼠PK研究。作为第二个物种,在PK研究中使用ICR正常的或血友病的、FVIII缺陷的小鼠(Taconic,Hudson,NY)。在该研究中使用正常小鼠,每个时间点每组5只小鼠。将测试材料稀释进配制缓冲液中,至标称终浓度25IU/mL。通过尾静脉,给每只小鼠施用4mL/kg(约0.1mL总体积)的稀释的测试材料。在指定的时间点,从下腔静脉抽取血液样品(对于正常或血友病小鼠研究,分别是0.45或0.3mL)到1mL注射器中(对于正常或血友病小鼠研究,分别装有50或30 $\mu$ L 3.8%柠檬酸钠)(每份样品一只动物)。使用上述的生色测定方法,测定血浆样品的FVIII浓度。与BDD或PEG6相比,PEG化的PEG6表现出更大的血浆回收(图21)。与BDD相比,PEG化的PEG2表现出更大的血浆回收(图22和23)。

[0189]

构建体	半衰期,小时	物种
BDD	6.6	正常兔子
PEG2	4.8	正常兔子
PEG2-22kD PEG	7.5	正常兔子
PEG2-43kD PEG	8.0	正常兔子
PEG6-12kD PEG	8.2	正常兔子
PEG6-33kD PEG*	9.6	正常兔子
PEG6-33kD PEG	17.4	正常兔子
BDD	4.5	正常小鼠
PEG2-22kD PEG	7.3	正常小鼠
PEG6-12kD	5.3	正常小鼠
PEG14-33kD PEG	7.3	正常小鼠
PEG14-12kD PEG	5.5	正常小鼠
PEG22-64kD	9.2	正常小鼠

[0190] 表6.PEG化的FVIII的PK研究总结,显示了以小时计的血浆半衰期。

[0191] \*在兔中具有9.6小时半衰期的33kD PEG化的PEG6的初始制品(pre)的纯度不如产生17.4小时的晚期制品。

	<u>突变蛋白</u>	<u>PEG</u>	<u>倍数</u>
	PEG 6	12 kD	2.9
	PEG 6	33 kD	2.9
[0192]	PEG 2+6	33 kD	3.3
	PEG 14	33 kD	2.5
	PEG 2+6	33 kD	4.4
	PEG 2+14	33 kD	2.1
	PEG22	64 kD	3.2

[0193] 表7. PEG化的PEG突变蛋白在血友病小鼠中的血浆回收。报告了在注射后16小时的血浆回收与在相同时间进行的BDD对照相比的提高倍数。

[0194] 血友病小鼠 (BDD) 因子VIII回收。图24所示的血友病小鼠 (BDD) 因子VIII回收柱状图描绘了在血友病小鼠测定中两种BDD因子VIII半衰期的药物代谢动力学 (PK) 评价。该测定设计用于在小鼠模型的静脉内施用后的3个时间点, 测量BDD因子VIII (在图24中称作“wt”或野生型BDD因子VIII) 和BDD因子VIII的PEG2+6双PEG化变体 (在本文其它地方称作BDD因子VIII的L491C, K1808C双变体) 的血浆浓度。尽管在0.8和4小时时间点的PK评价是相当的, 但16小时评价是特别值得注意的。在16小时, 与未-PEG化的分子相比, 残存在施用后16小时的小鼠血浆中的双PEG化的BDD因子VIII变体 (PEG2+6) 的量是约4倍 (400%)。

[0195] 肾撕裂伤模型。为了测定PEG化的FVIII突变蛋白是否能有效地终止血友病小鼠的出血, 使用了肾撕裂伤模型。用异氟烷麻醉血友病小鼠 (具有破坏的FVIII基因的C57/BL6), 并称重。暴露下腔静脉, 并使用31号针注射100u1盐水或FVIII。小心地取下针, 压迫注射点30-45秒, 以防止出血。2分钟后, 暴露右肾, 并沿着垂直轴将其保持在镊子间。使用15号解剖刀, 水平地切入肾3mm深度。为了确保损伤的均匀深度, 轻轻将肾保持在中央, 以在镊子的每一侧暴露相等的组织。将暴露的肾表面切至镊子的深度。如上所述定量失血。对小鼠测试不同剂量的FVIII, 以表征FVIII对肾出血的剂量反应关系。在小鼠肾损伤后, PEG化的PEG2表现出与BDD相当的减少失血的效能 (图25)。因而, 尽管PEG化的PEG2的凝结活性低于BDD, 但该肾撕裂伤模型表明, 与BDD相比, PEG化的PEG2的体内效力没有可测量的降低, 这与生色测定数据相一致。

[0196] 抗体抑制测定。在位置491特异性地添加高分子量聚合物如聚乙二醇 (PEG) (即PEG2), 应降低对mAB 413的结合和敏感性, 并扩展至大部分患者抑制性抗体, 因为许多患者发展针对相同mAB 413表位的抑制性抗体。为了测试这一点, 将递增量的mAB 413与非饱和量 (0.003IU/mL) 的BDD或43kD PEG化的PEG2一起温育, 并在生色测定中测试功能活性 (图26)。R8B12 (一种非抑制性抗体) 和ESH4 (一种靶向C2结构域的抑制性抗体) 用作对照。PEG化的PEG2对mAB 413抑制的抗性确实超过对BDD, 并在有不结合491位置附近的对照抗体存在

下,表现出类似的抑制模式。此外,PEG抗mAB 413抑制的保护作用依赖于PEG大小,其中更大的PEG具有更大的作用(图27)。为了测试PEG化的FVIII是否更抗来自患者的抑制剂抗体,在有一组源自血友病A患者(它们已经发展了对FVIII的抑制剂)的血浆存在下,测量生色活性。在测试的8份患者血浆中,43kD PEG化的PEG2对患者血浆抑制的抗性比4份患者血浆样品中的BDD的更高。例如,PEG化的PEG2、PEG6或PEG2+6在一份患者血浆中表现出比BDD更大的残余活性,但是在另一份血浆中并非如此(图28)。双PEG化的PEG2+6似乎比单PEG化的PEG2或PEG6的抗性更高。这些结果表明,PEG化的PEG突变蛋白可以更有效地治疗已经发展对FVIII的抑制剂的患者。

[0197] 高通量PEG化筛选。特定PEG突变蛋白的PEG化效率是不可预测的,特别是由于没有BDD的直接结构信息。例如,基于BDD的结构模型,人们可以预测PEG4和PEG5的PEG化效率非常高,类似于PEG2和PEG15的PEG化效率,因为根据结构,所有3个位置都是表面暴露的,且朝向外侧。因而,为了使用PEG通过系统的PEG化来搜索新的清除机理,需要筛选大量的突变蛋白。

[0198] 为了快速地筛选大量的PEG突变蛋白,已经开发了新的高通量方法,其可以测试来自瞬时转染的突变蛋白的PEG化产物的PEG化效率和功能活性。使用Amicon-centra Ultra装置MWC0 30K,将少至5-10mL的具有低至0.1-0.2IU/mL的FVIII生色值的瞬时表达的PEG突变蛋白浓缩约50倍,从而使得FVIII的浓度达到1nM以上,接近抗体与FVIII相互作用的亲和范围。将浓缩的PEG突变蛋白(约300uL)与约30uL的C7F7FVIII抗体树脂一起在4°C温育过夜,洗涤,洗脱,渗析,并还原。去除还原剂,PEG化还原的PEG突变蛋白,在蛋白印迹上运行,如上所述(图29和30)。瞬时表达的PEG突变蛋白的相对PEG化效率准确地匹配纯化的PEG突变蛋白。

[0199] 通过该方法,在1-2个月内,可以筛选许多PEG突变蛋白。例如,PEG14(K1804C BDD)具有至少约80%用12kD PEG对轻链的PEG化,而没有PEG化的重链(未显示数据),这与位于轻链上的K1804C突变相一致。基于BDD结构,K1804和K1808之间的Ca至Ca距离(PEG6位置)仅是8.4埃,从而表明在该位置导入43kD PEG具有与33kD PEG化的PEG6相似的PK提高,优点是高得多的PEG化得率。在表8中总结了测试的所有PEG突变蛋白的相对PEG化得率。PEG化对其中导入了半胱氨酸突变的特定FVIII链是高度选择性的,因为每个在重链中具有半胱氨酸的突变蛋白仅在重链上被PEG化,而每个在轻链中具有半胱氨酸的突变蛋白仅在轻链上被PEG化。突变蛋白号2-31代表着BDD的半胱氨酸突变,其用半胱氨酸替代在列出的位置处的天然氨基酸。PEG2+6是BDD的双突变蛋白,其中位置491和1808被半胱氨酸替代。A1和A2(和KG-2(即全长FVIII)的B结构域)属于重链,而A3、C1和C2属于轻链。通过在SDS PAGE上电泳PEG化的产物,对比PEG化的带和未PEG化的带的强度,估计PEG化效率:+++约>80%PEG化得率,++约30-70%得率,+约10-30%得率,-约<10%得率。

[0200]

PEG突变蛋白	位置	结构域	H-PEG	L-PEG
2	491	A2	+++	-
4	504	A2	+	-
5	468	A2	+	-
6	1808	A3	-	++

7	1810	A3	-	++
8	1812	A3	-	-
9	1815	A3	-	-
11	1795	A3	-	+
12	1796	A3	-	+
13	1803	A3	-	++
14	1804	A3	-	+++
15	377	A2	+++	-
16	378	A2	+++	-
17	556	A2	++	-
20	2118	A3	-	+
21	81	A1	++	-
22	129	A1	++	-
23	422	A2	-	-
25	570	A2	-	-
26	1864	A3	-	++
27	1911	A3	-	+++
28	2091	C1	-	++
29	2284	C2	-	+
30	711	A2	+	-
31	1903	A3	-	++
2+6	490/1808	A2/A3	+++	++
2+14	490/1804	A2/A3	+++	+++
KG-2		B	+++	-

[0201] 表8各种PEG化的FVIII的PEG化效率

[0202] 还原的PEG突变蛋白的质谱法分析。为了确定预防PEG突变蛋白或全长FVIII的直接PEG化的“帽”的特性，用浓度范围为67 $\mu$ M-670 $\mu$ M的TCEP还原PEG2+14。PEG化得率与递增量的TCEP成比例地增加(图31)。在PEG化之前，还通过质谱法分析相同的样品(图32)。为了得到可以直接研究的蛋白结构域，在37 $^{\circ}$ C，用比率为20单位/mg FVIII的凝血酶消化样品30分钟。凝血酶切割产生A2片段，其包括残基372-740，且没有占据的糖基化位点。将消化的样品注射到C4反相液相层析系统上，且通过电喷射界面，将来自柱的洗脱液直接导入四极飞行时间质谱仪中。解卷积与A2结构域相对应的层析峰以下的质谱，以提供蛋白的完整质量值。在还原之前，PEG2+14的A2结构域产生比理论预测大118道尔顿的质量。随着TCEP浓度的增加，出现一个新峰，它具有A2结构域的准确预测质量。该新峰的比例随着TCEP浓度的增加而增加。118道尔顿差异可以归因于在残基Cys 491处与半胱氨酸(119Da)形成二硫键的半胱氨酰化和仪器准确度。因而，这表明，PEG突变蛋白可以被半胱氨酸加帽，这会阻止直接的PEG化。

[0203] 本文公开的所有文献都在本文中整体引作参考。

序列表

<110> Clark, Pan  
 <120> FVIII的位点定向修饰  
 <130> US 07430-00236  
 <150> US 60/627277  
 <151> 2004-11-12  
 <160> 35  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人因子VIII序列B-结构域的前4个氨基酸  
 <400> 1

Ser Phe Ser Gln  
 1

<210> 2  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人因子VIII序列B-结构域的后10个氨基酸

<400> 2

[0001]

Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg  
 1 5 10

<210> 3  
 <211> 1457  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 源自人因子VIII序列

<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 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

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

[0002]

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  
 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  
 [0003] 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

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

[0004] 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
	Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe 995	1000	1005
	Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn 1010	1015	1020
	Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys 1025	1030	1035
	Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr 1040	1045	1050
	Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr 1055	1060	1065
	Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe 1070	1075	1080
	Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met 1085	1090	1095
	Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met 1100	1105	1110
[0005]	Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly 1115	1120	1125
	Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser 1130	1135	1140
	Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg 1145	1150	1155
	Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro 1160	1165	1170
	Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser 1175	1180	1185
	Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro 1190	1195	1200
	Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe 1205	1210	1215
	Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp 1220	1225	1230
	Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu 1235	1240	1245
	Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn 1250	1255	1260

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  
 [0006] 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> 2332  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo Sapiens)  
 <220>  
 <223> 人因子VIII序列  
 <400> 4  
 Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr  
 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 Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro



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

[0008] 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  
 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



Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp  
 945 950 955 960  
 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  
 [0010] 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  
 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	Asp	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		
[0011]	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
	1415						1420						1425		
	Gln	Glu	Ser	Ser	His	Phe	Leu	Gln	Gly	Ala	Lys	Lys	Asn	Asn	Leu
	1430						1435						1440		
	Ser	Leu	Ala	Ile	Leu	Thr	Leu	Glu	Met	Thr	Gly	Asp	Gln	Arg	Glu
	1445						1450						1455		
	Val	Gly	Ser	Leu	Gly	Thr	Ser	Ala	Thr	Asn	Ser	Val	Thr	Tyr	Lys
	1460						1465						1470		
	Lys	Val	Glu	Asn	Thr	Val	Leu	Pro	Lys	Pro	Asp	Leu	Pro	Lys	Thr
	1475						1480						1485		
	Ser	Gly	Lys	Val	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Val	His	Ile	Tyr	Gln	Lys
	1490						1495						1500		
	Asp	Leu	Phe	Pro	Thr	Glu	Thr	Ser	Asn	Gly	Ser	Pro	Gly	His	Leu

	1505		1510		1515
	Asp Leu Val Glu Gly Ser	Leu Leu Gln Gly Thr	Glu Gly Ala Ile		
	1520		1525		1530
	Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg	Pro Gly Lys Val Pro	Phe Leu Arg		
	1535		1540		1545
	Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala	Lys Thr Pro Ser Lys	Leu Leu Asp		
	1550		1555		1560
	Pro Leu Ala Trp Asp Asn His	Tyr Gly Thr Gln Ile	Pro Lys Glu		
	1565		1570		1575
	Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys	Ser Pro Glu Lys Thr	Ala Phe Lys		
	1580		1585		1590
	Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser	Leu Asn Ala Cys Glu	Ser Asn His		
	1595		1600		1605
	Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu	Gly Gln Asn Lys Pro	Glu Ile Glu		
	1610		1615		1620
	Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly	Arg Thr Glu Arg Leu	Cys Ser Gln		
	1625		1630		1635
[0012]	Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg	His Gln Arg Glu Ile	Thr Arg Thr		
	1640		1645		1650
	Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu	Glu Ile Asp Tyr Asp	Asp Thr Ile		
	1655		1660		1665
	Ser Val Glu Met Lys Lys Glu	Asp Phe Asp Ile Tyr	Asp Glu Asp		
	1670		1675		1680
	Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser	Phe Gln Lys Lys Thr	Arg His Tyr		
	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
[0013]	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 1955 1960 1965
	Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe 1970 1975 1980
	Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val 1985 1990 1995
	Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu 2000 2005 2010
	Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala 2015 2020 2025
	Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr 2030 2035 2040
	Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser 2045 2050 2055
	Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val 2060 2065 2070

Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly  
 2075 2080 2085  
 Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile  
 2090 2095 2100  
 Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn  
 2105 2110 2115  
 Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser  
 2120 2125 2130  
 Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr  
 2135 2140 2145  
 Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg  
 2150 2155 2160  
 Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu  
 2165 2170 2175  
 Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser  
 2180 2185 2190  
 Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala  
 2195 2200 2205  
 Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val  
 2210 2215 2220  
 Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met  
 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

[0014]

	<210> 5	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG1	
	<400> 5	
	gatgtccgctc ctttgtgctc aaggagatta cca	33
	<210> 6	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG2	
	<400> 6	
	ttgtattcna ggagatgcc aaaaggtgia aaac	34
	<210> 7	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG3	
	<400> 7	
	ttacaaaag gtgtatgcc ttigaaggat ttc	34
[0015]	<210> 8	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG4	
	<400> 8	
	aaggattttc caatttgccc aggagaaata ttc	33
	<210> 9	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG5	
	<400> 9	
	gattatattt aagaattgcg caagcagacc atat	34
	<210> 10	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG6	
	<400> 10	
	tagaaaaaac ttigtctgcc ctaatgaaac caaac	36
	<210> 11	
	<211> 33	
	<212> DNA	

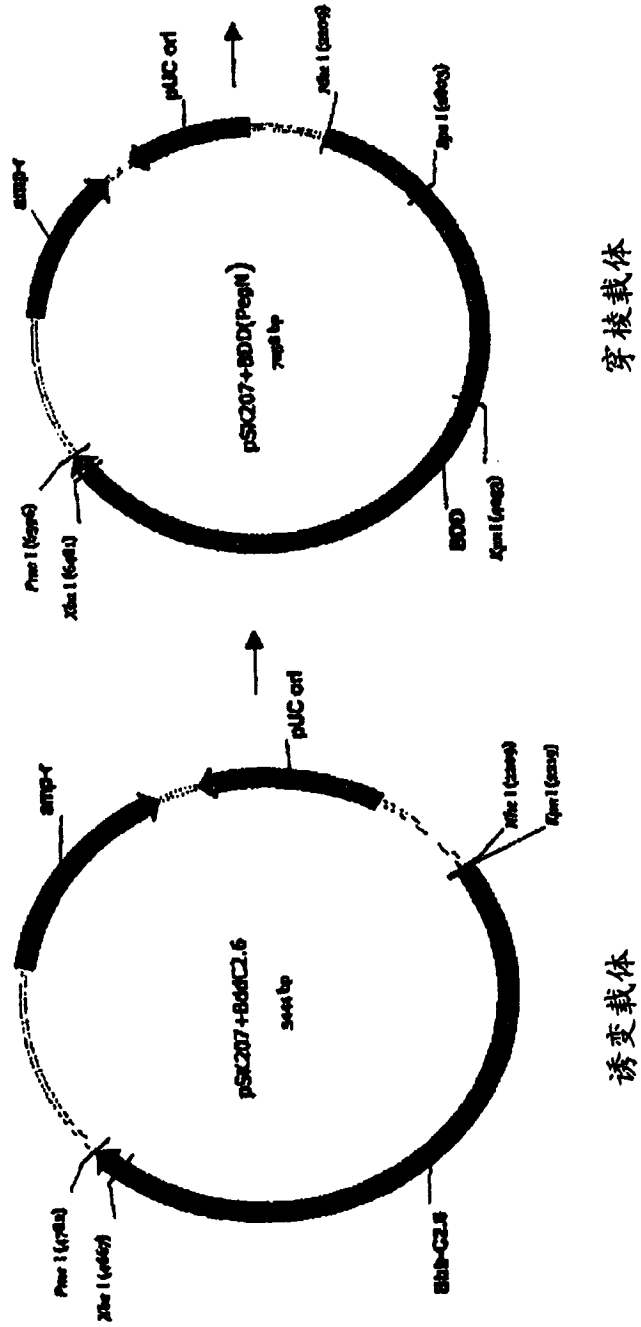
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG7	
	<400> 11	
	aactttgtca agccttgca aacccaaact tac	33
	<210> 12	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG8	
	<400> 12	
	gtcaagccta atgaatgcaa aactfacttt tgga	34
	<210> 13	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的PEG9引物	
	<400> 13	
	caagccta at gaaacctgca cttacttttg gaaag	35
	<210> 14	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0016]	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG10	
	<400> 14	
	ctaataaag caaaacttgc ttttgaaag tgcaac	36
	<210> 15	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG11	
	<400> 15	
	atttcttatg aggaatgcca gaggcaagga gca	33
	<210> 16	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG12	
	<400> 16	
	tcttatgagg aagattgag gcaaggagca gaa	33
	<210> 17	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 用于诱变的引物PEG13	
	<400> 17	
	caaggagcag aaccttgcaa aaactttgtc aagcct	36
	<210> 18	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG14	
	<400> 18	
	ggagcagaac ctagatgcaa ctttgteaag cct	33
	<210> 19	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG15	
	<400> 19	
	cgctcagttg ccaagtgtca tctaaaact tgg	33
	<210> 20	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0017]	<223> 用于诱变的引物PEG16	
	<400> 20	
	tcagttgcc aagaagtgtcc taaaacttgg gta	33
	<210> 21	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG17	
	<400> 21	
	ctcctcatct gctactgcca atctgtagat caa	33
	<210> 22	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG18	
	<400> 22	
	caaaatcttt tcattctgc acctcagteg tgtac	35
	<210> 23	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG19	
	<400> 23	

	gtcaatggtt atgtatgcag gtccttgcga ggt	33
	<210> 24	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG20	
	<400> 24	
	cagacttatac gaggatgttc cactggaacc tta	33
	<210> 25	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG21	
	<400> 25	
	atccaggctg aggtttgtga tacagtggc att	33
	<210> 26	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG22	
	<400> 26	
[0018]	gaagatgata aagtctgtcc tggatggaagc cat	33
	<210> 27	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG23	
	<400> 27	
	cagcggattg gtaggtgtta caaaaaagtc cga	33
	<210> 28	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG24	
	<400> 28	
	gaagatgggc caacttgctc agatcctcgg tgc	33
	<210> 29	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG25	
	<400> 29	
	cagataatgt cagactgcag gaatgtcacc ctg	33

	<210> 30	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG26	
	<400> 30	
	cacaactaaca cactgtgtcc tgctcatggg aga	33
	<210> 31	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG27	
	<400> 31	
	cagatggaag atccctgctt taaagagaat tat	33
	<210> 32	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG28	
	<400> 32	
[0019]	accaggtg cccgttgcaa gttctcagc etc	33
	<210> 33	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG29	
	<400> 33	
	aaagtaaagg ttttttgcgg aaatcaagac tcc	33
	<210> 34	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG30	
	<400> 34	
	ttgcagtigt cagttgcttt gcatgagggtg gca	33
	<210> 35	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于诱变的引物PEG31	
	<400> 35	
	aatatgaaa gaaacgctag ggctcctgc aat	33

BDD-PegN的诱变和亚克隆

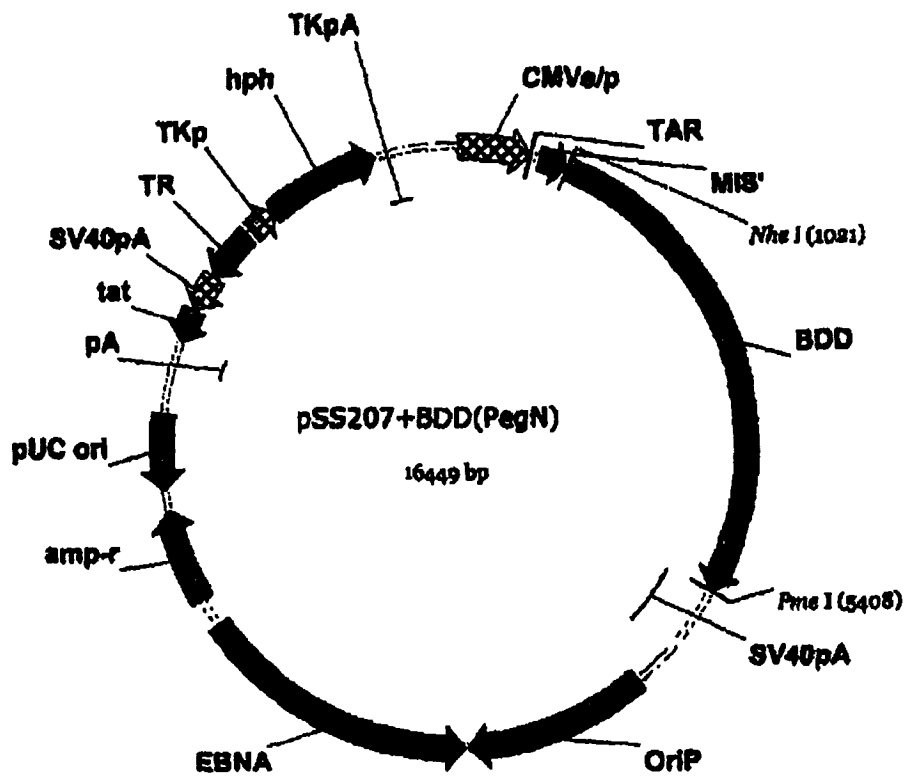


穿梭载体

诱变载体

图 1a

BDD-PegN的诱变和亚克隆



表达载体

图 1b

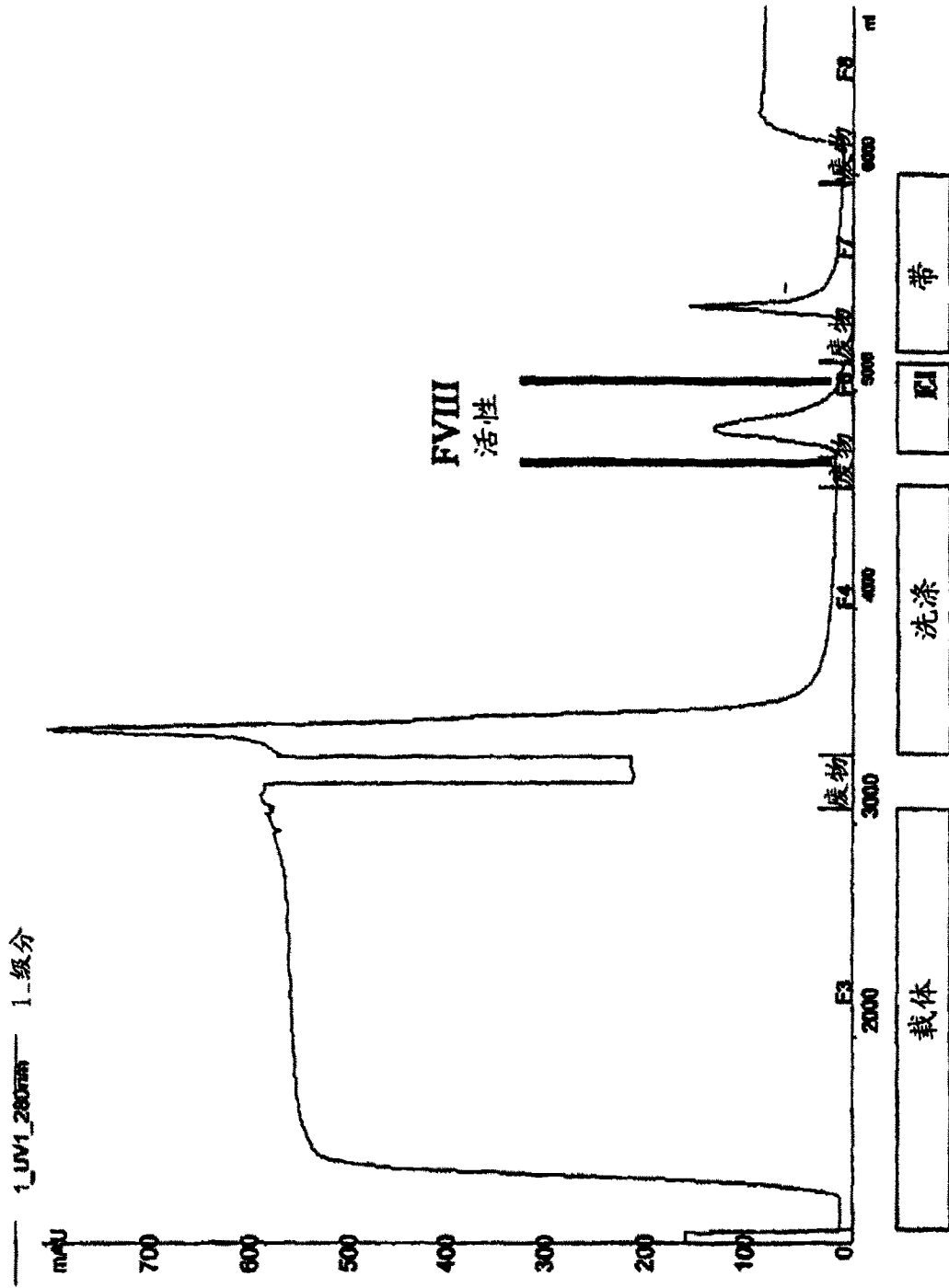


图 2

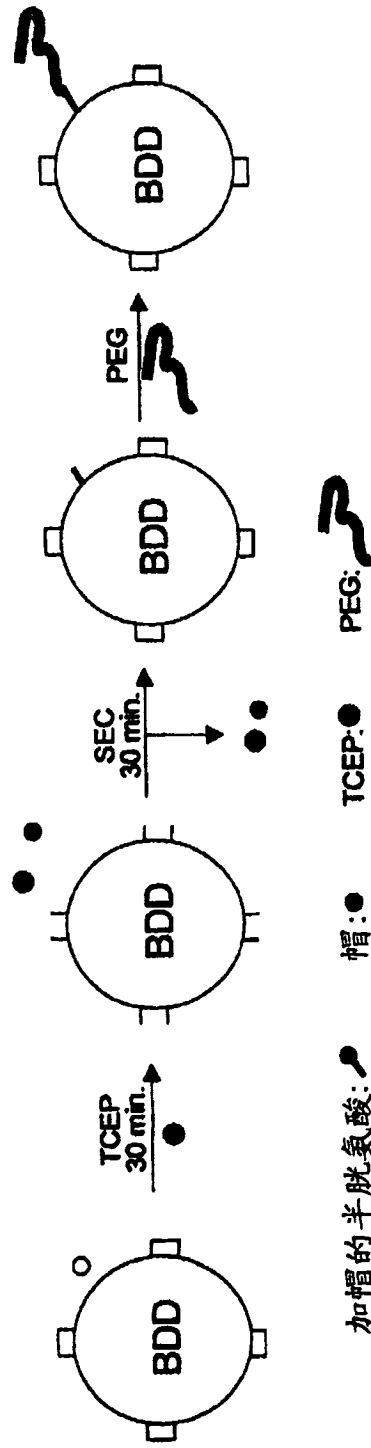


图 3

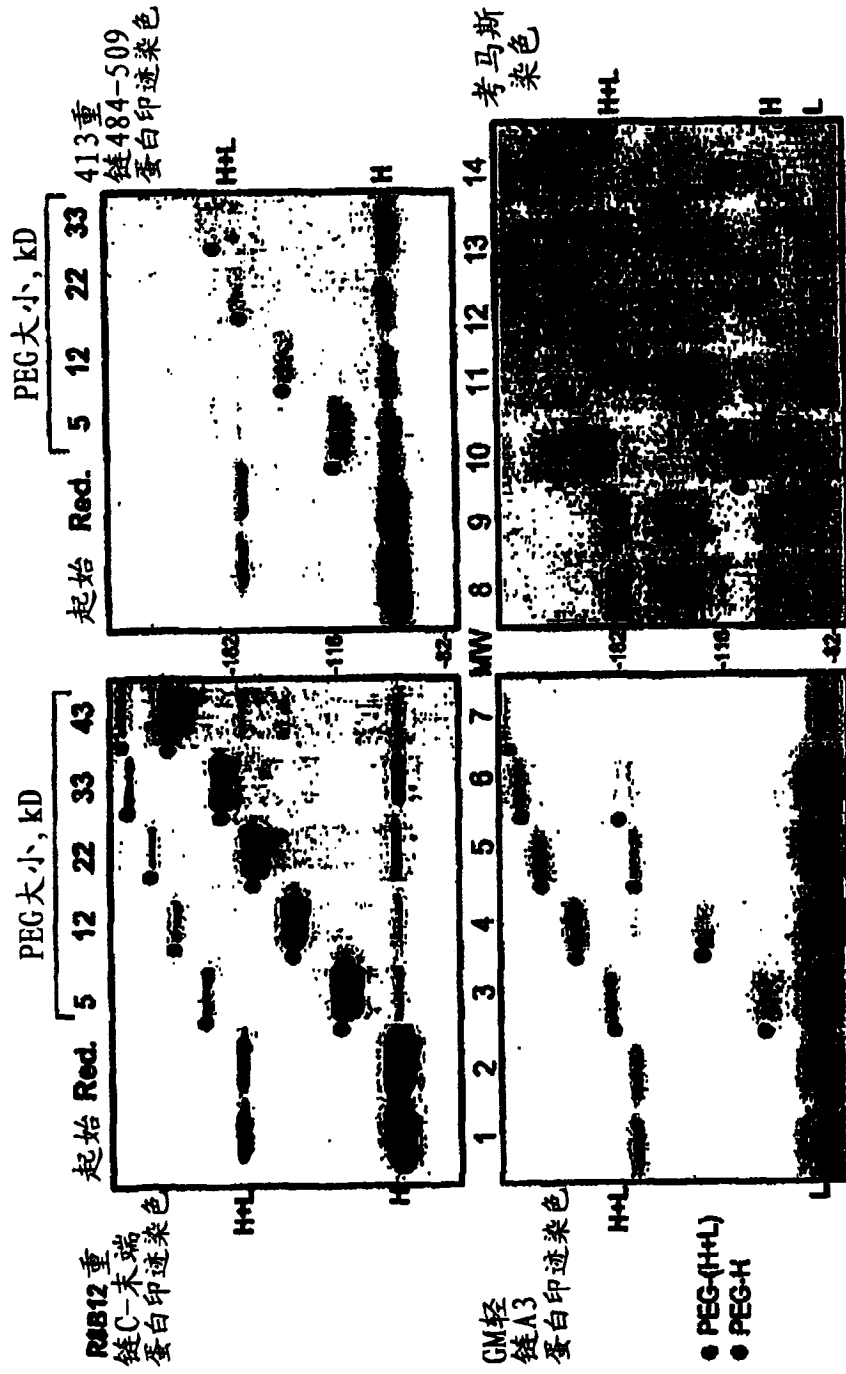


图 4

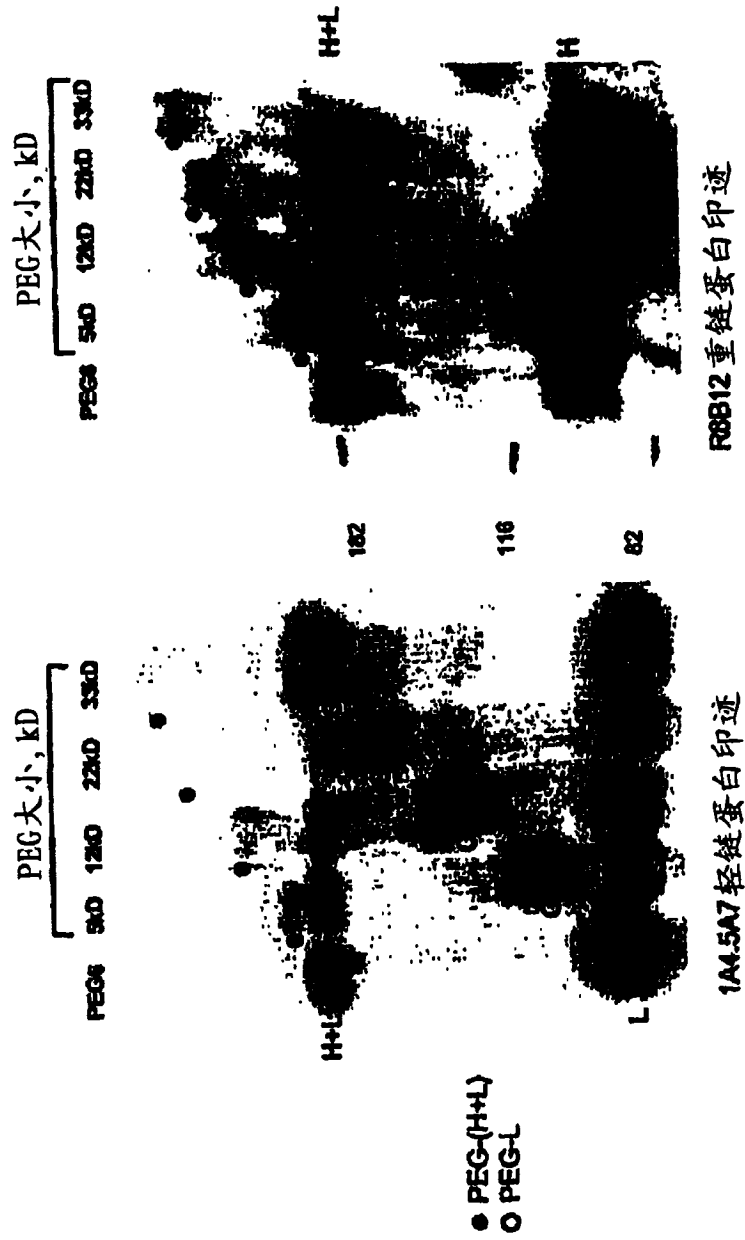


图 5

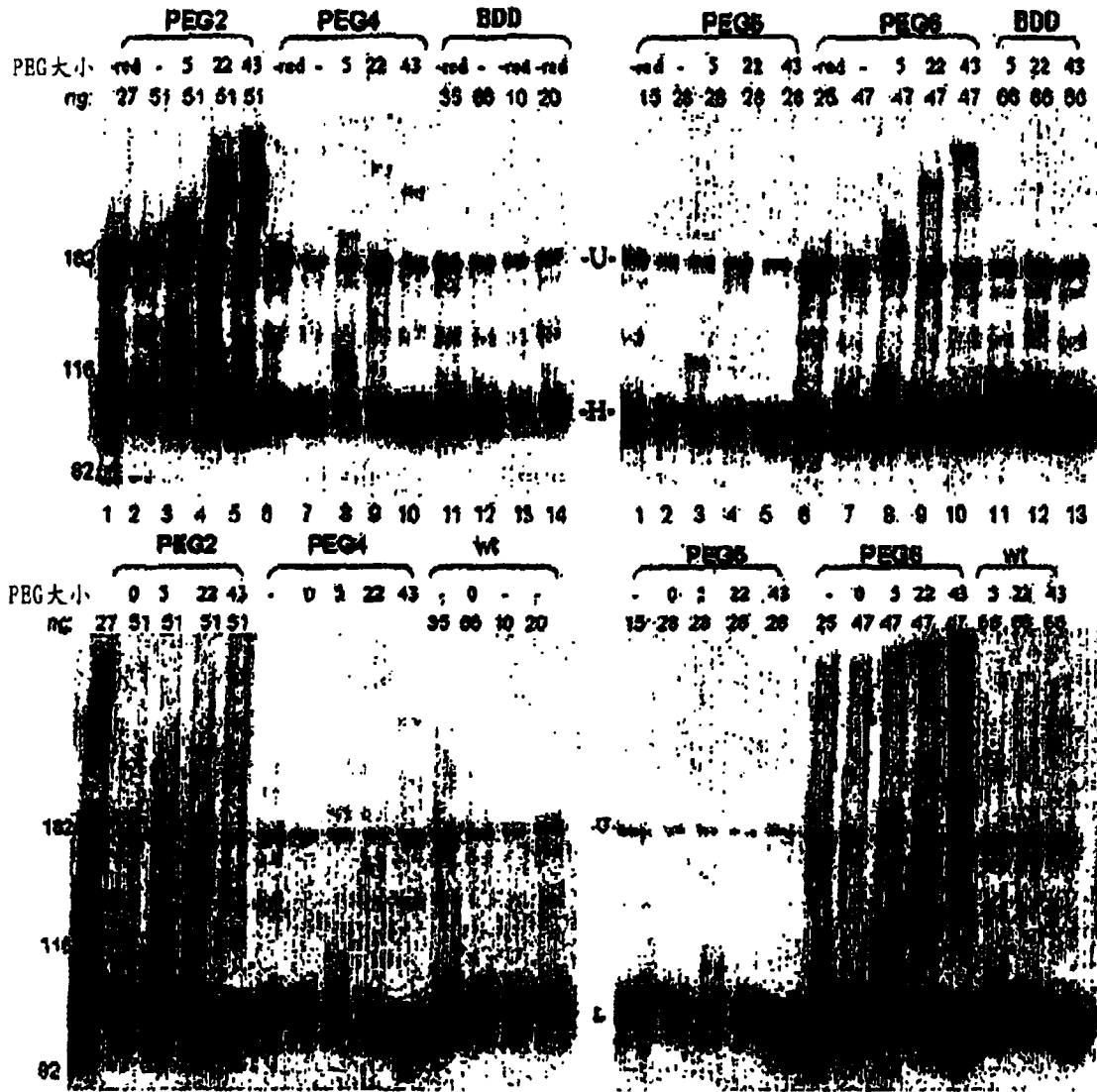


图 6a

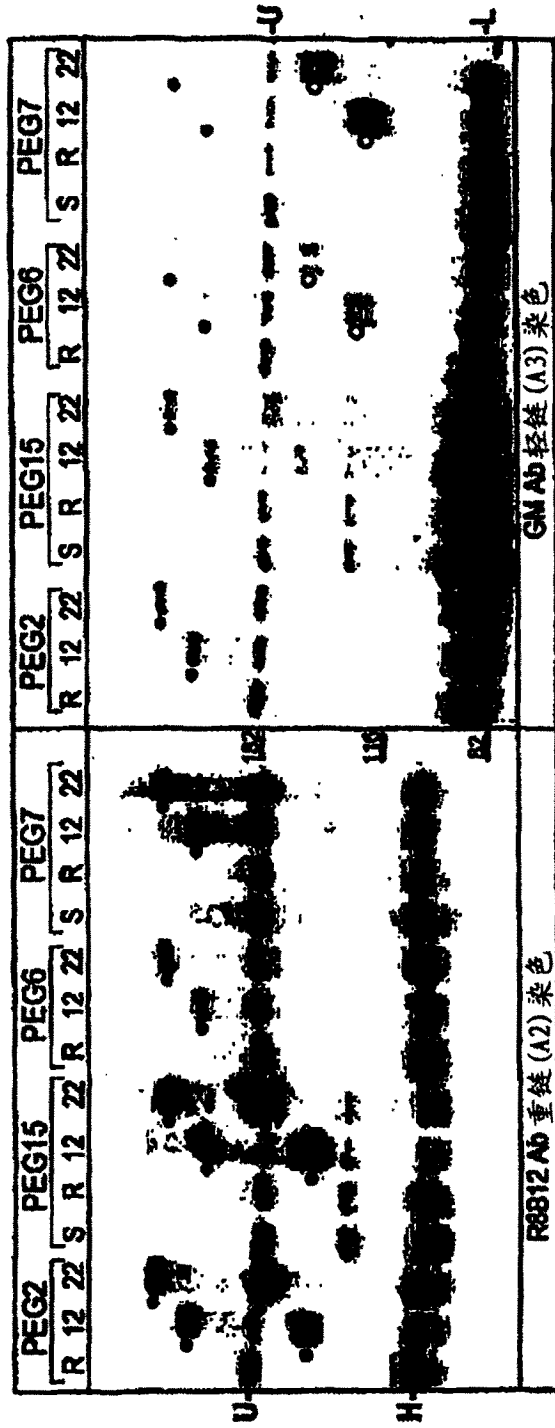


图 6b

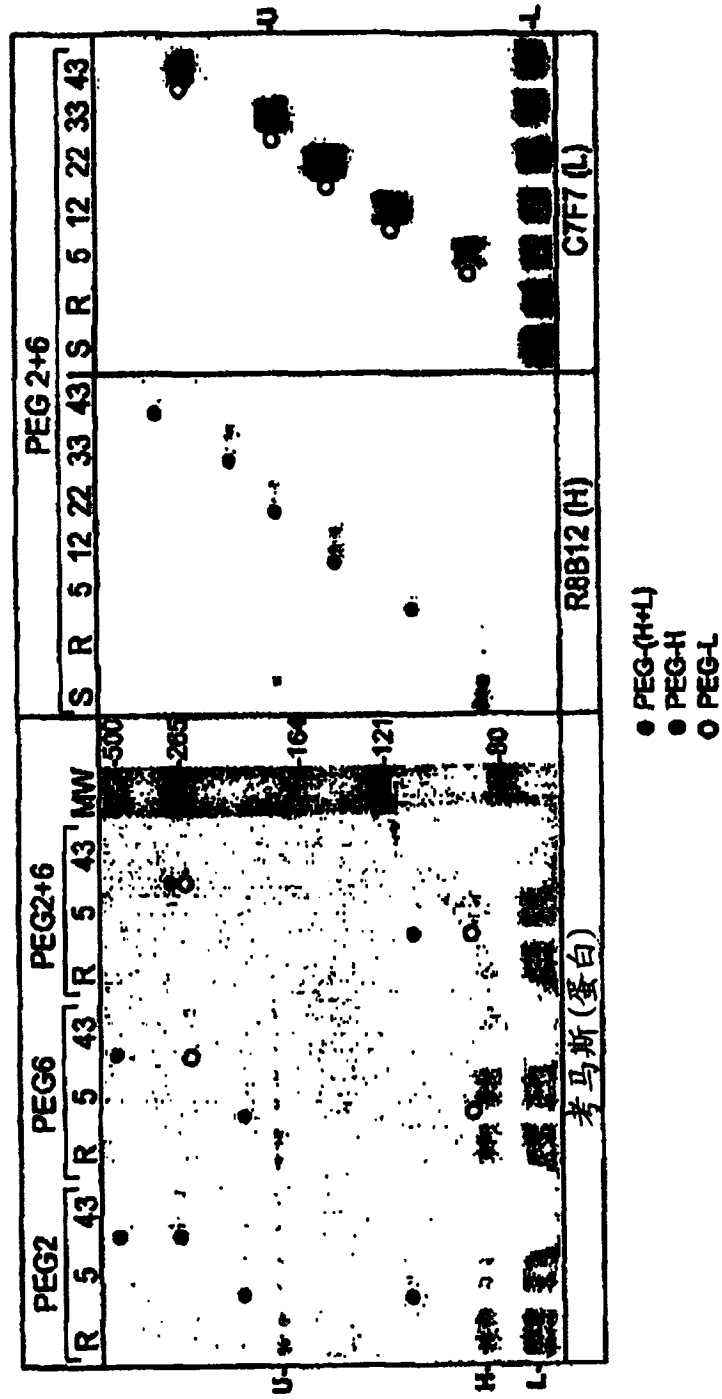


图 6c

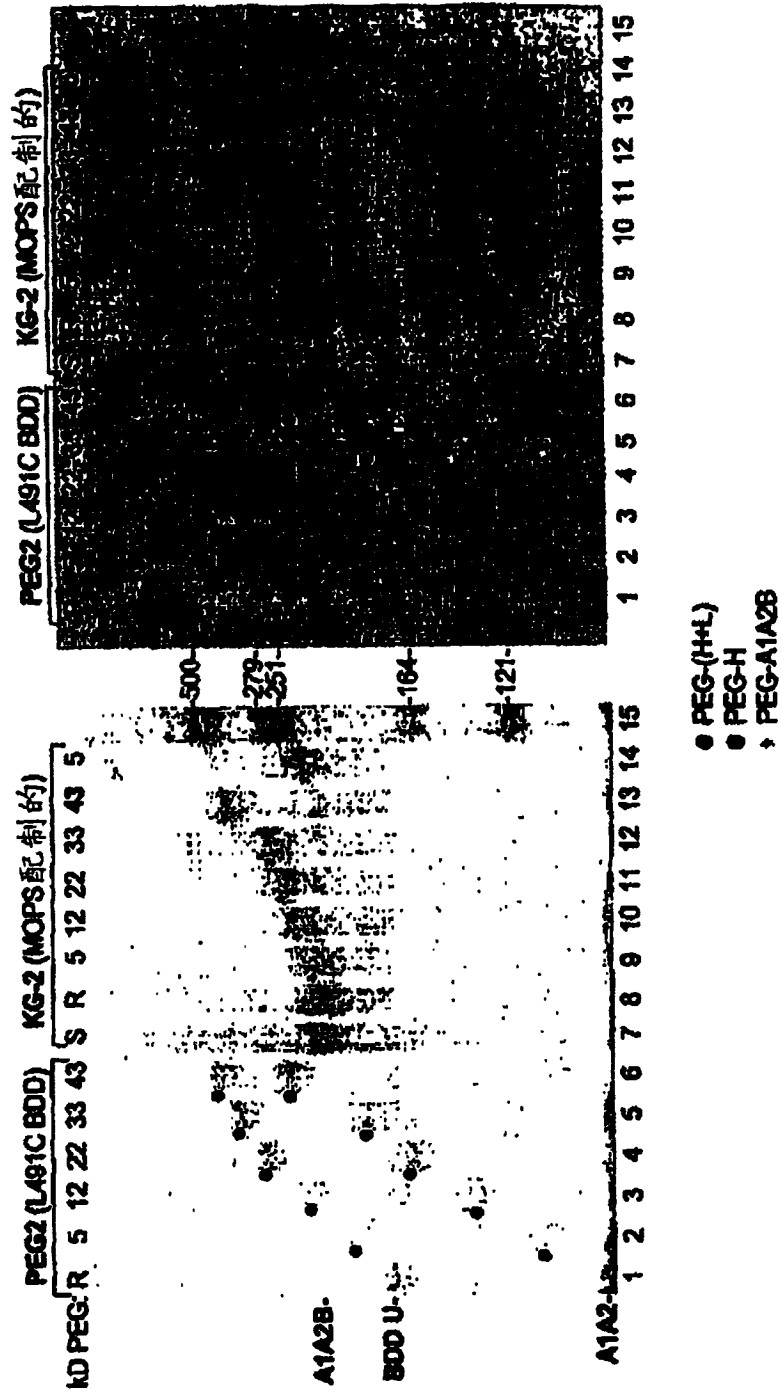


图 6d

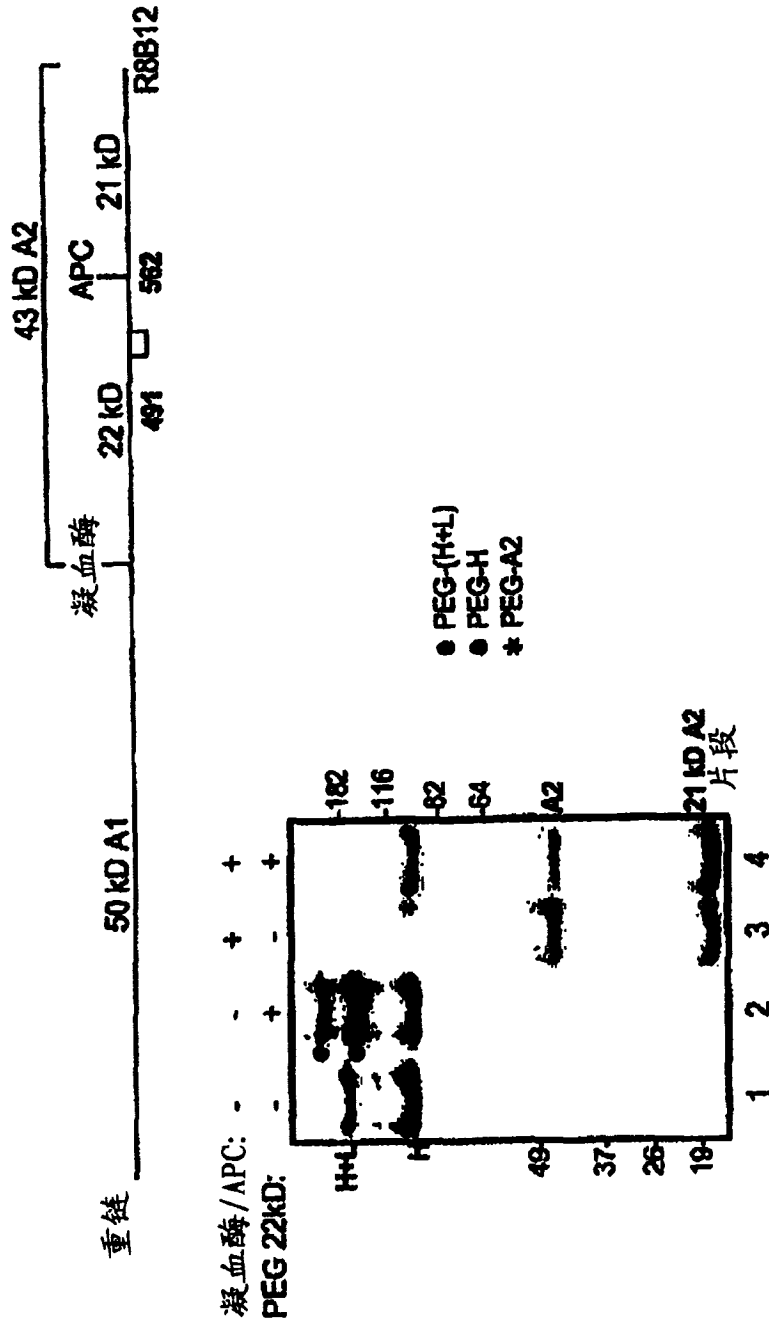


图 7

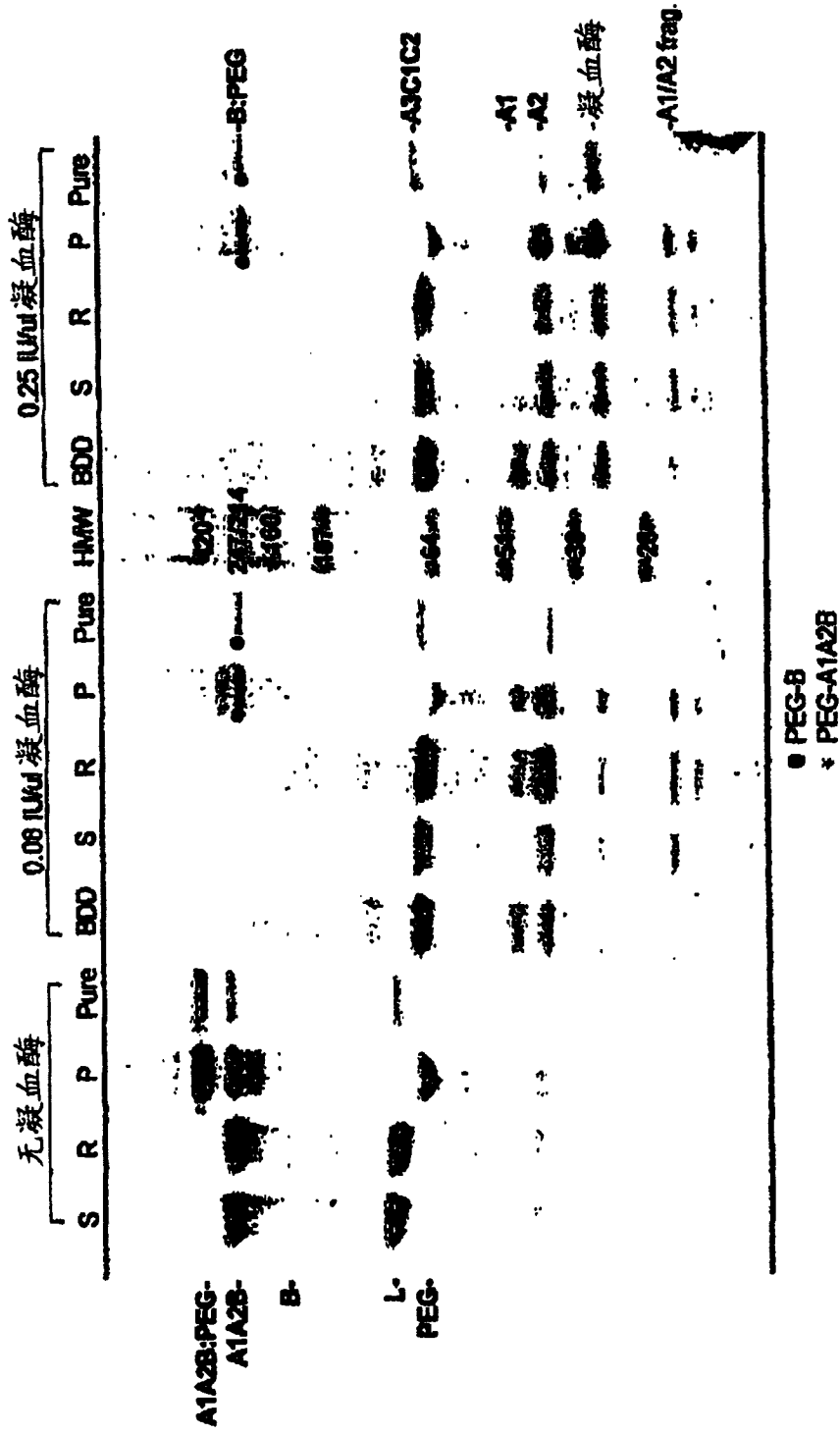


图 8

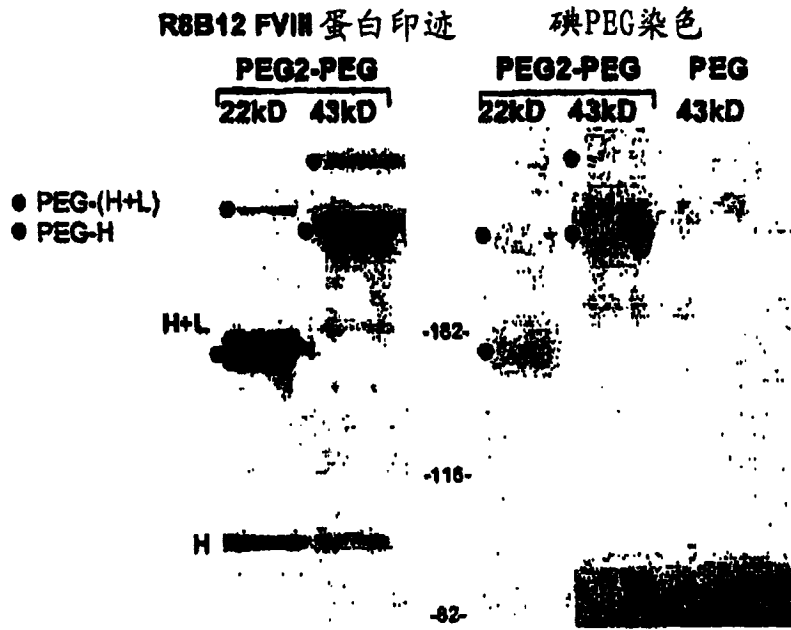


图 9

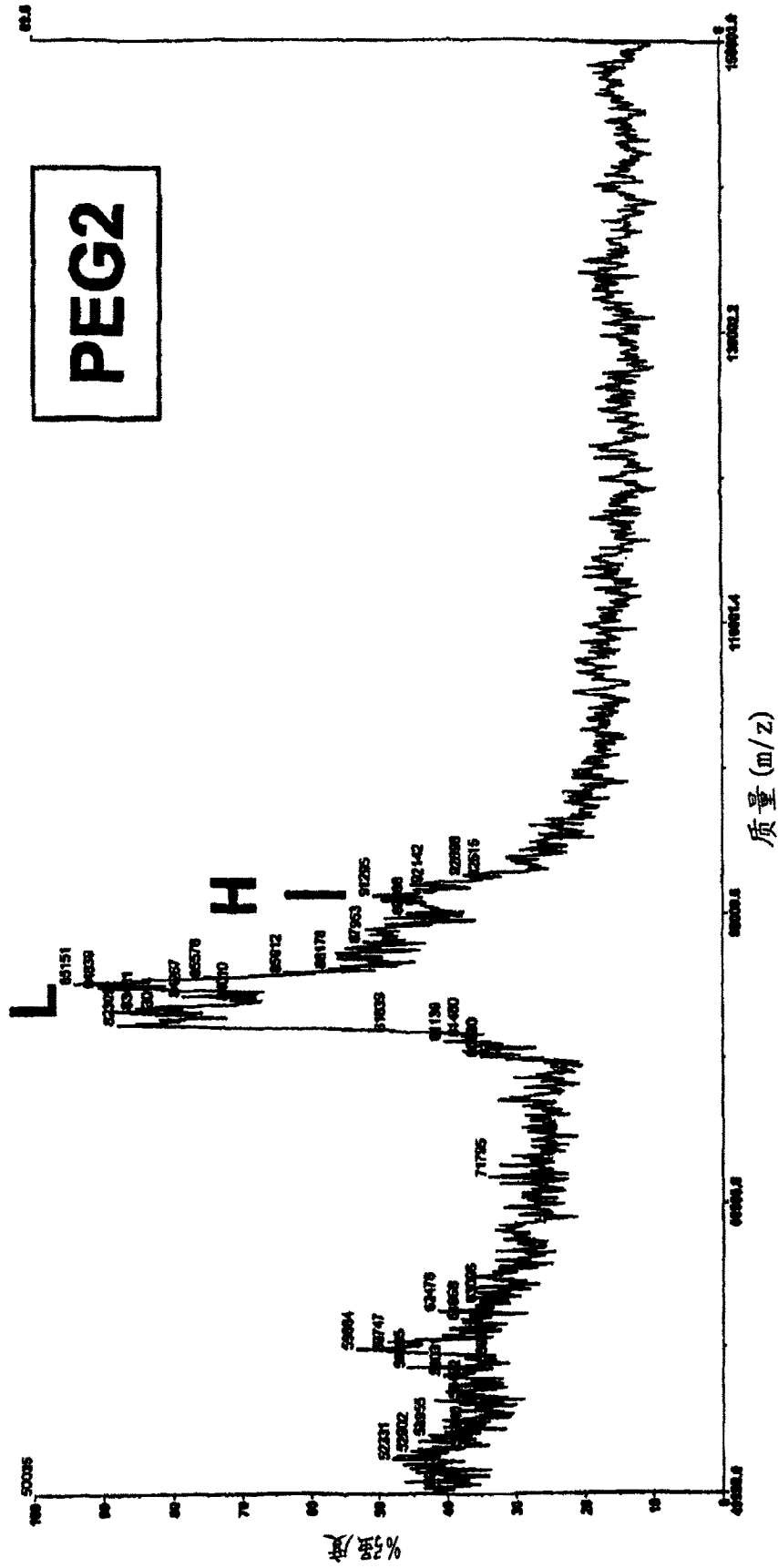
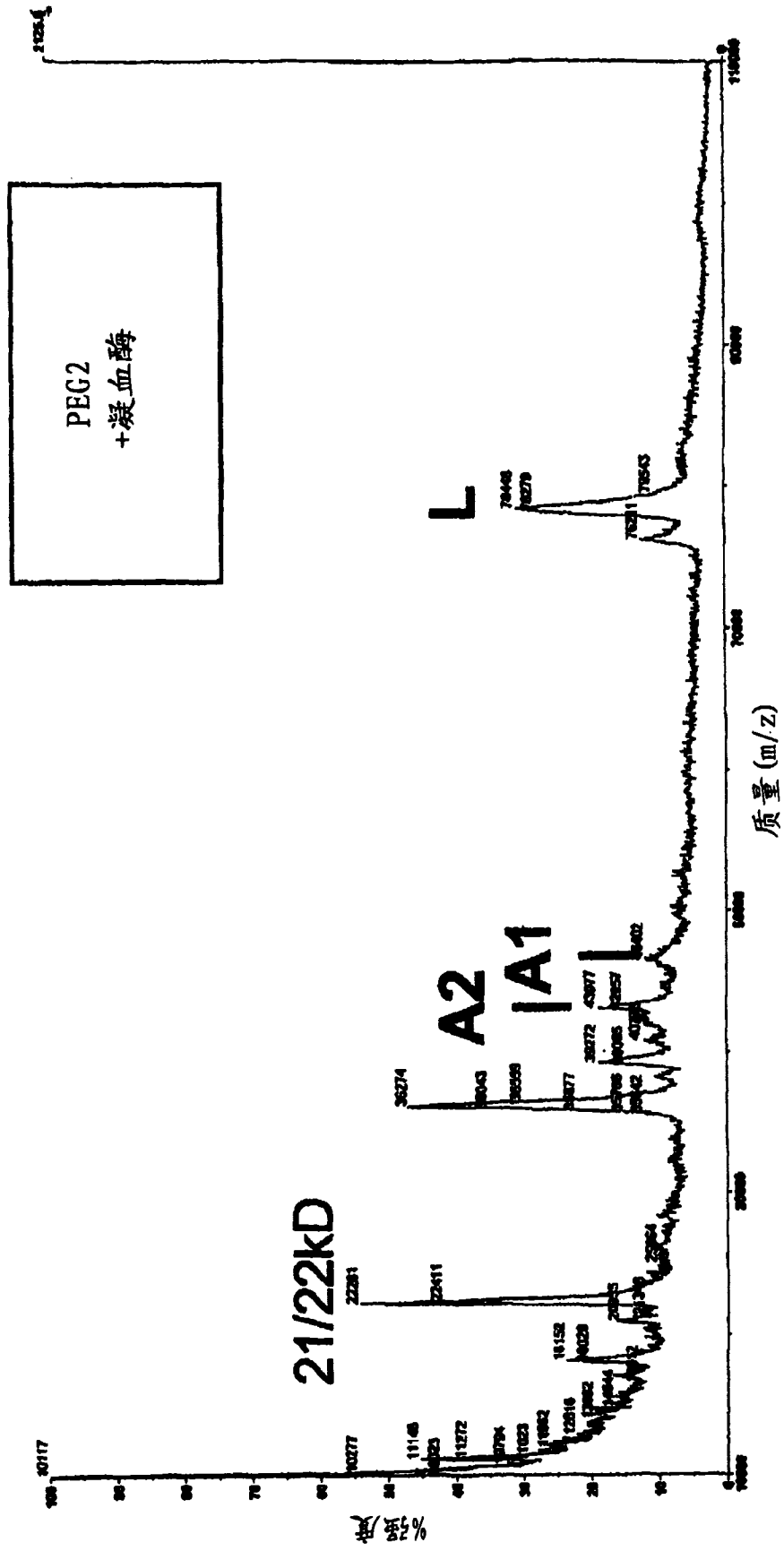
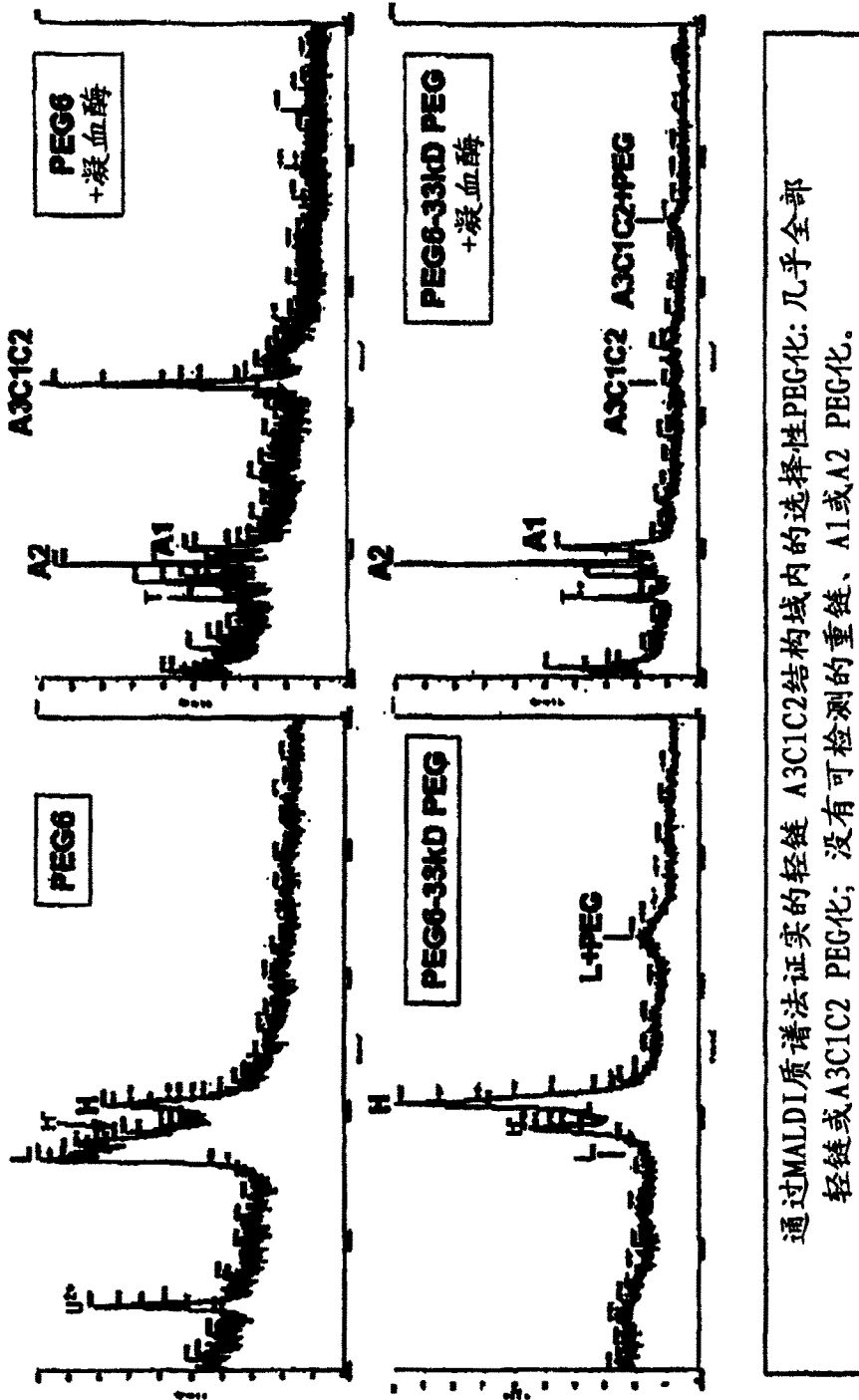


图 10a









通过MALDI质谱法证实的轻链 A3C1C2结构域内的选择性PEG化: 几乎全部轻链或A3C1C2 PEG化; 没有可检测的重链、A1或A2 PEG化。

图 12

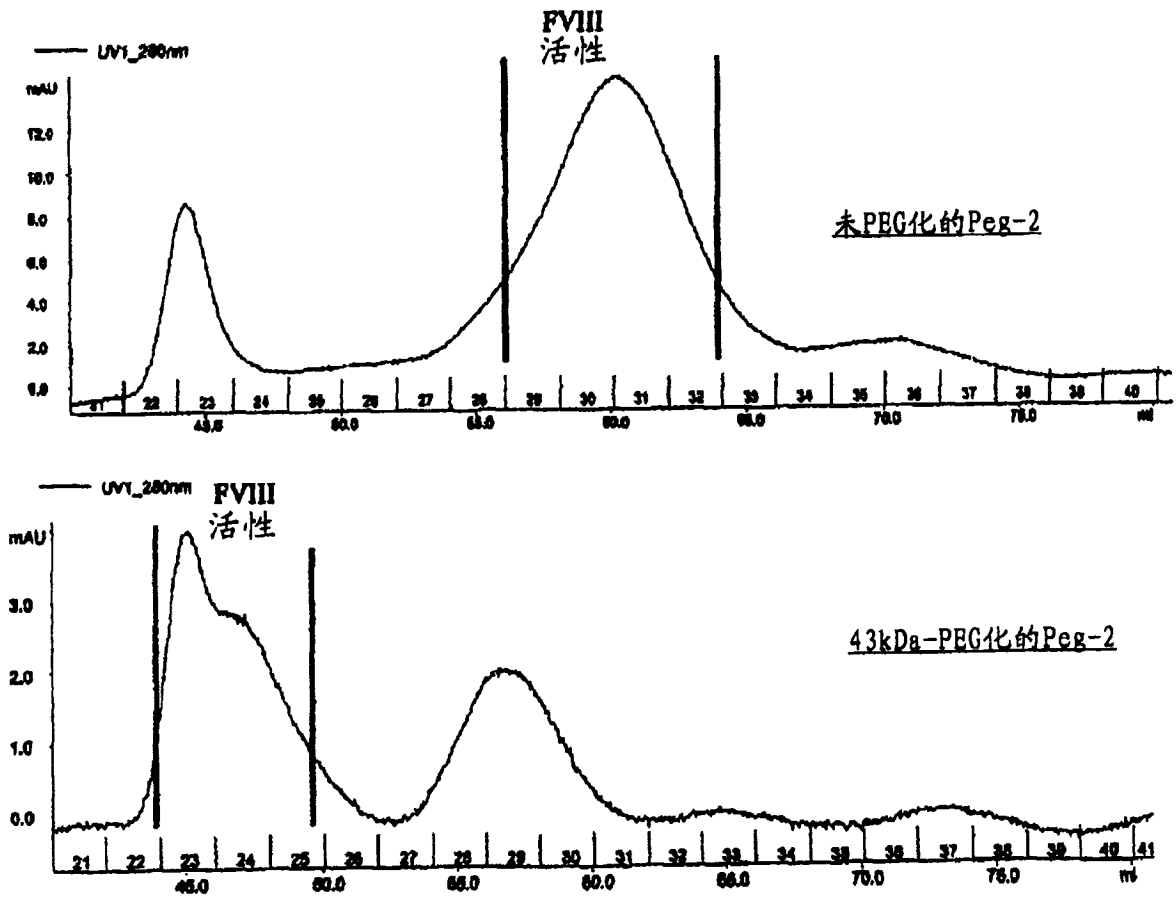


图 13

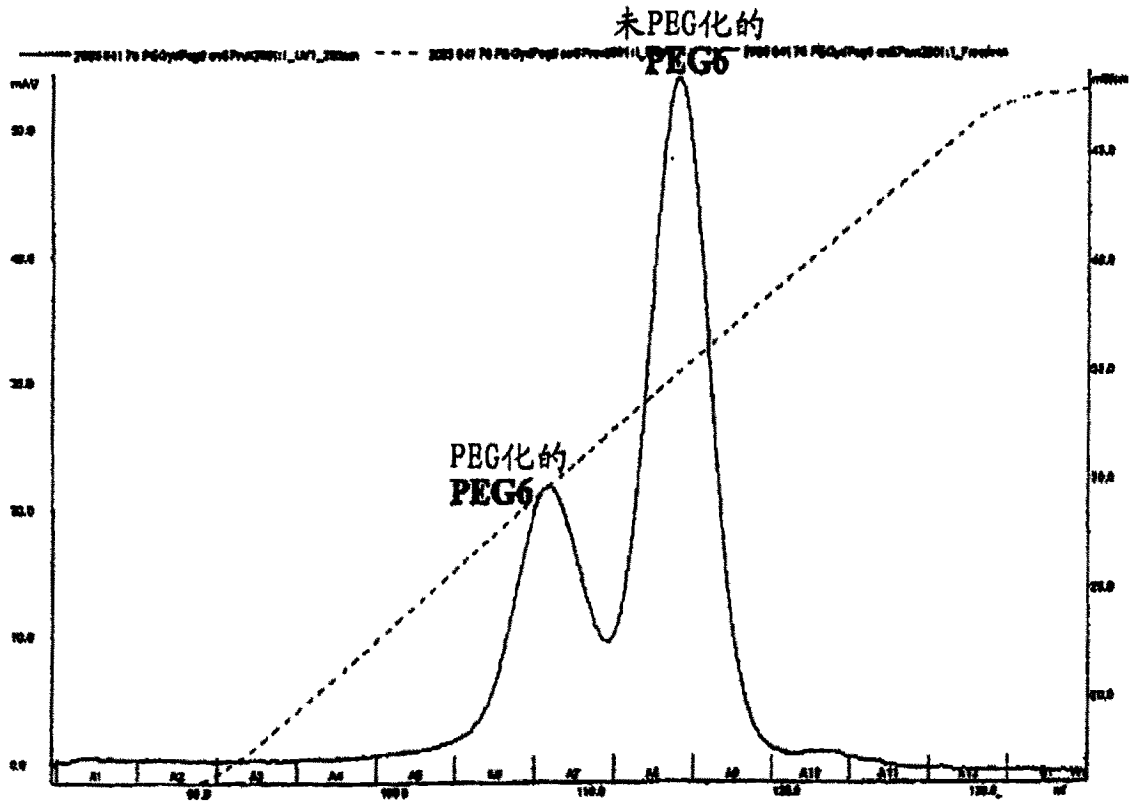


图 14

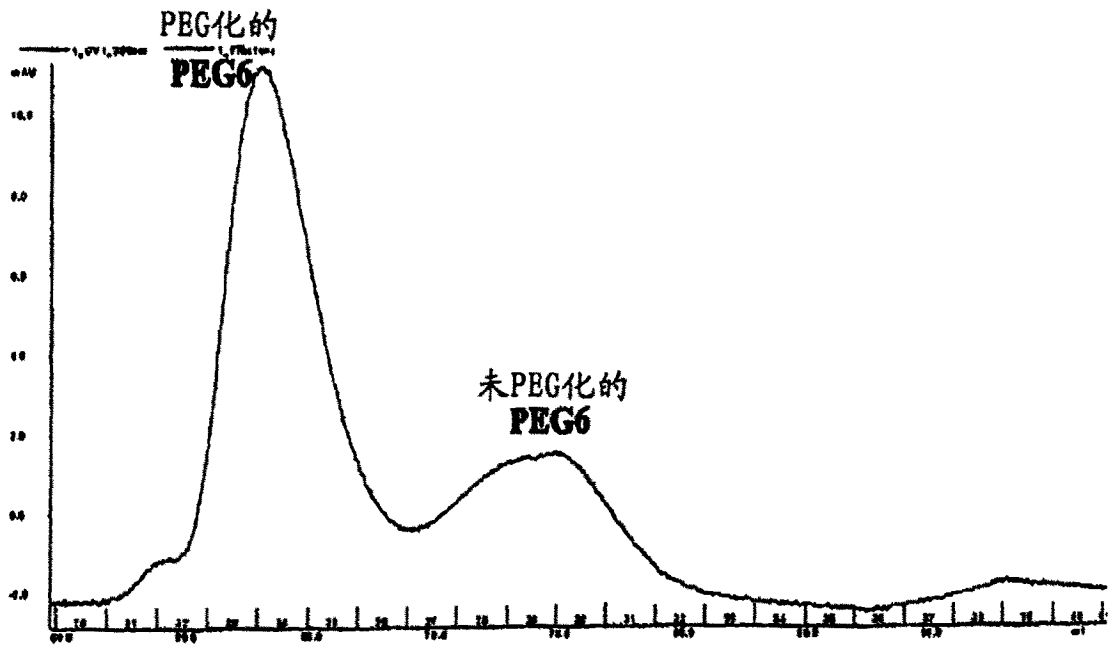


图 15

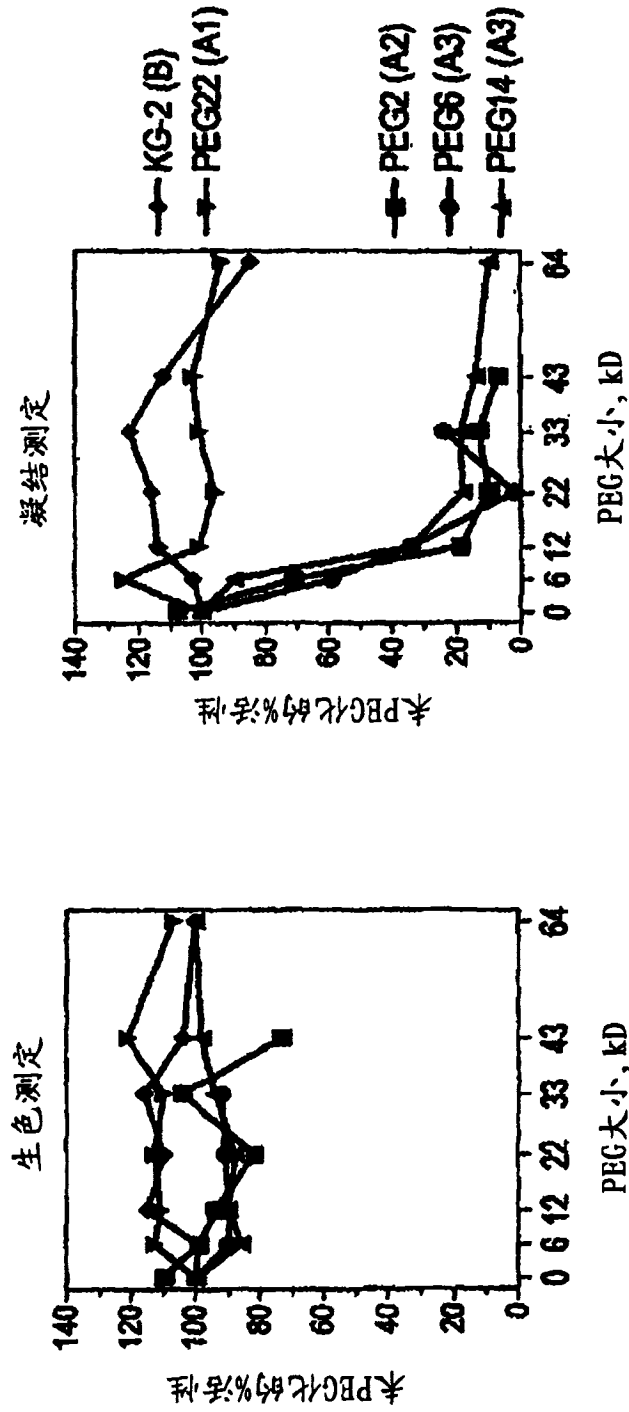


图 16

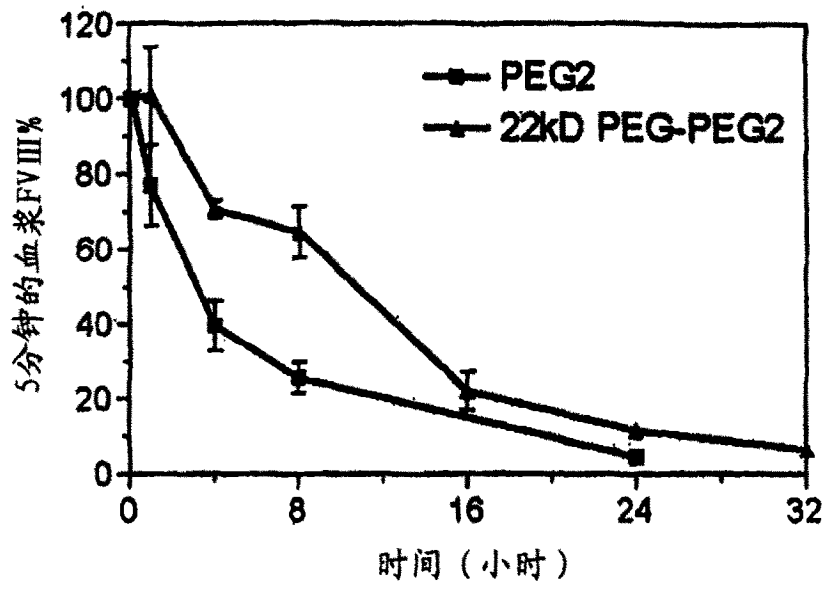


图 17

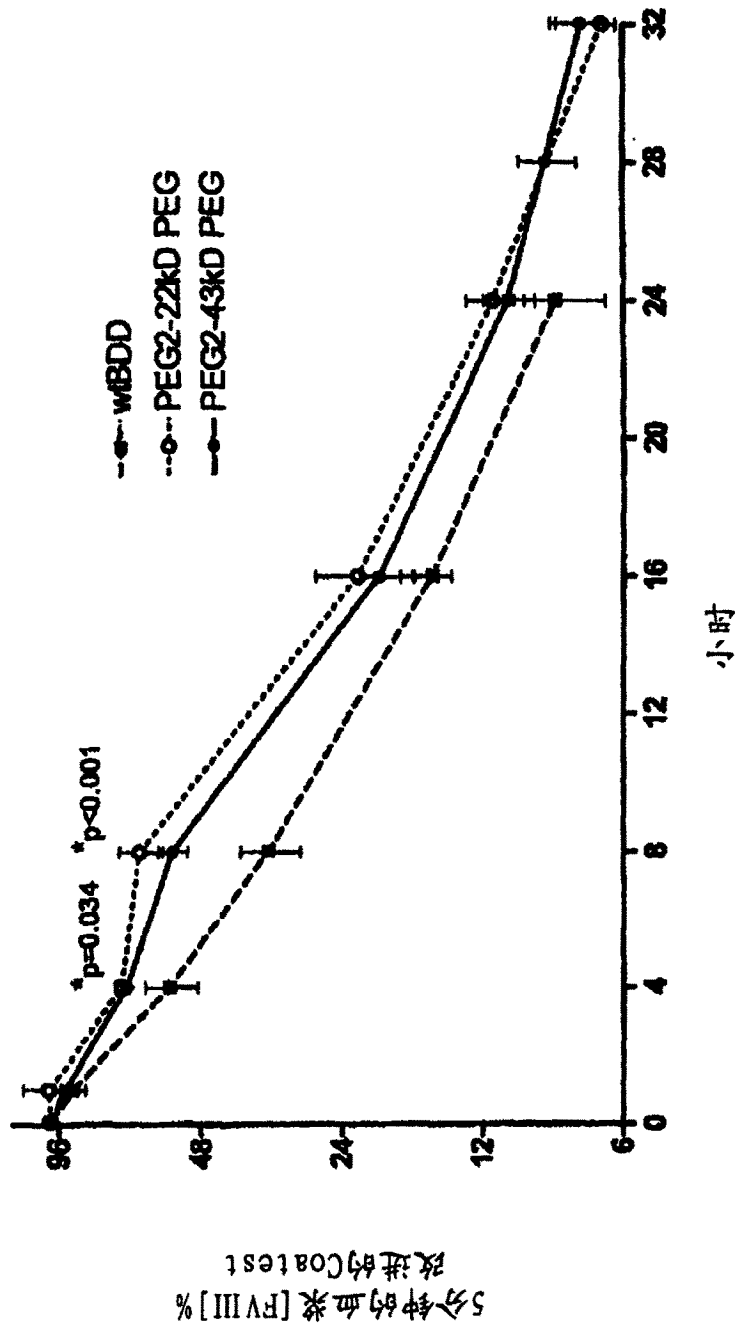


图 18

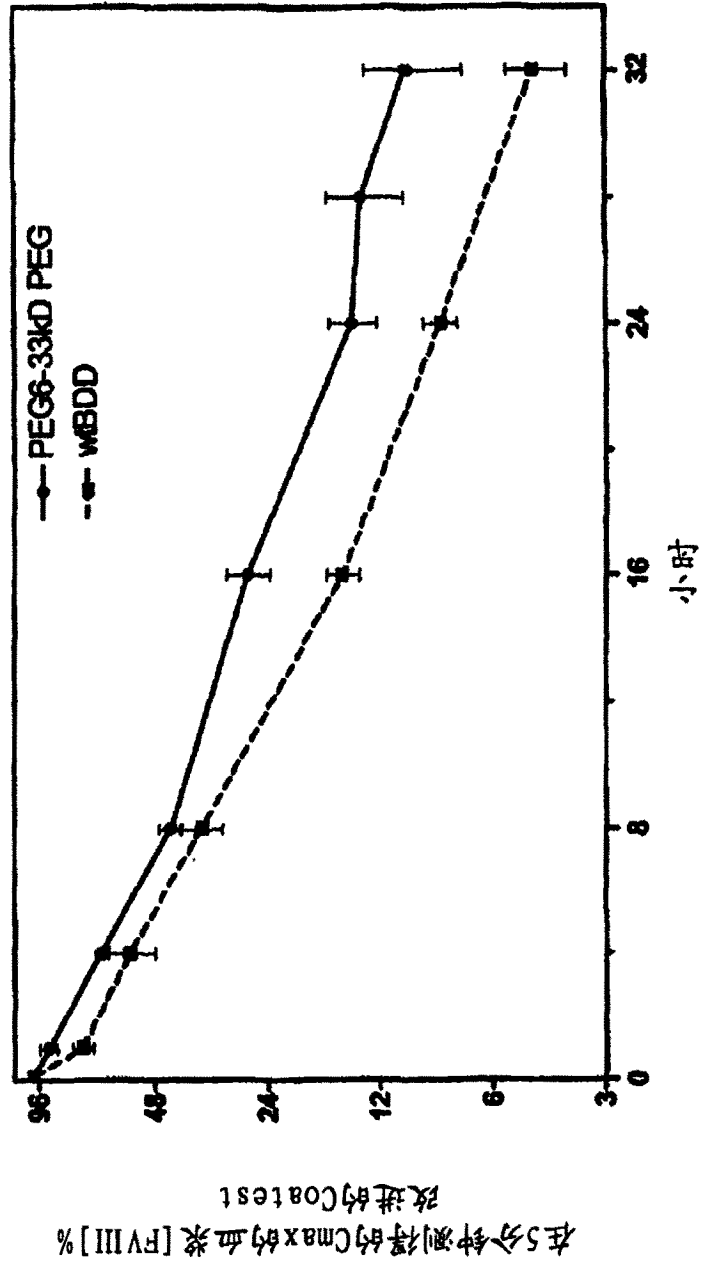


图 19

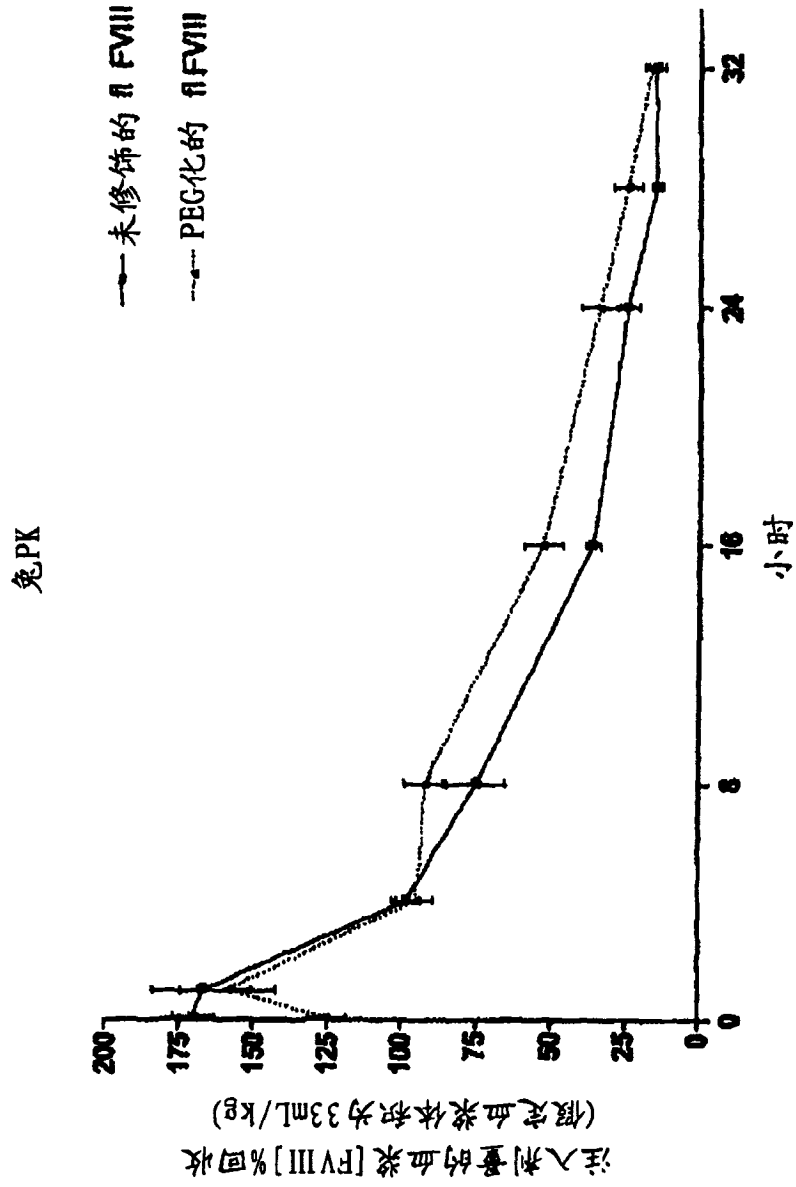


图 20

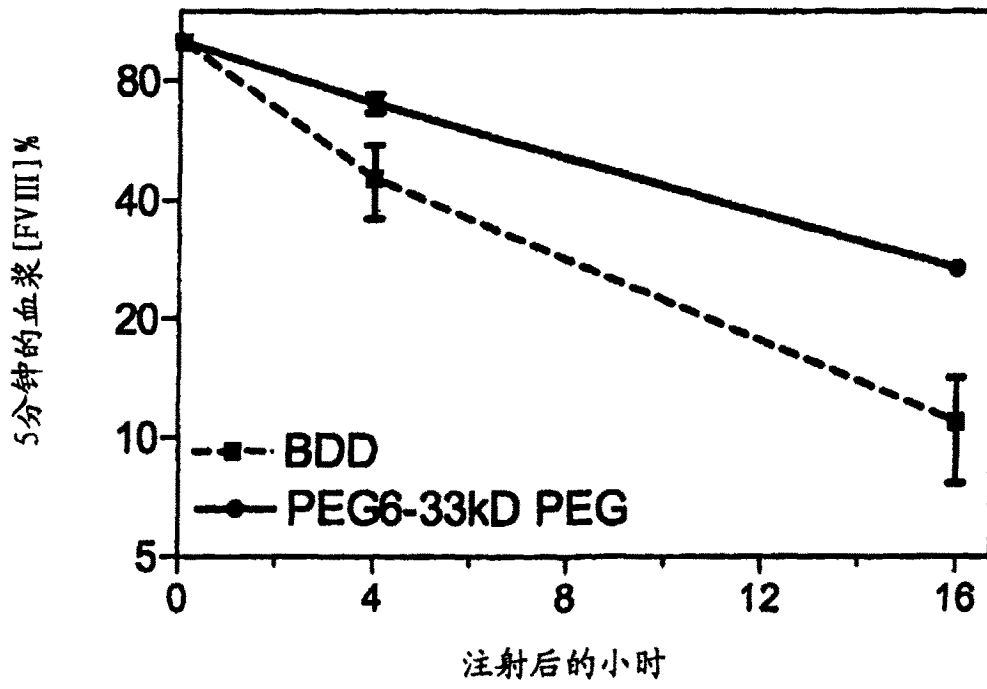


图 21

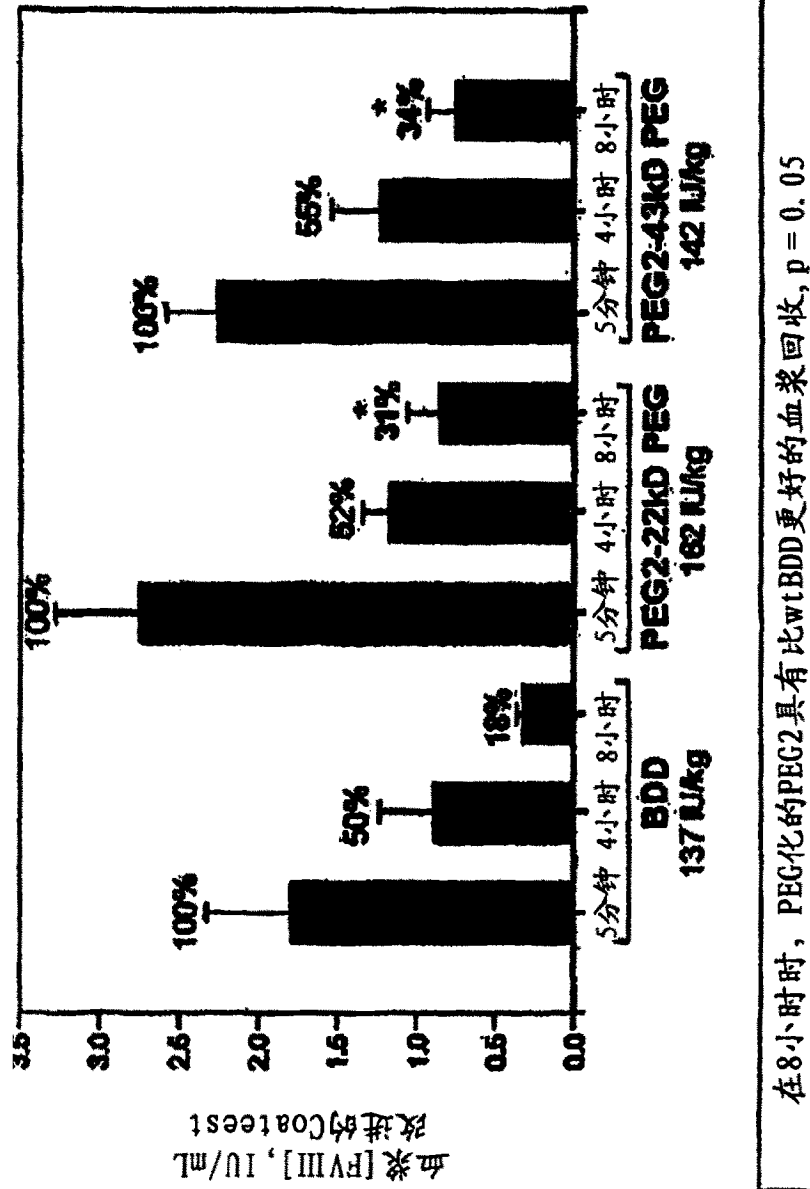


图 22

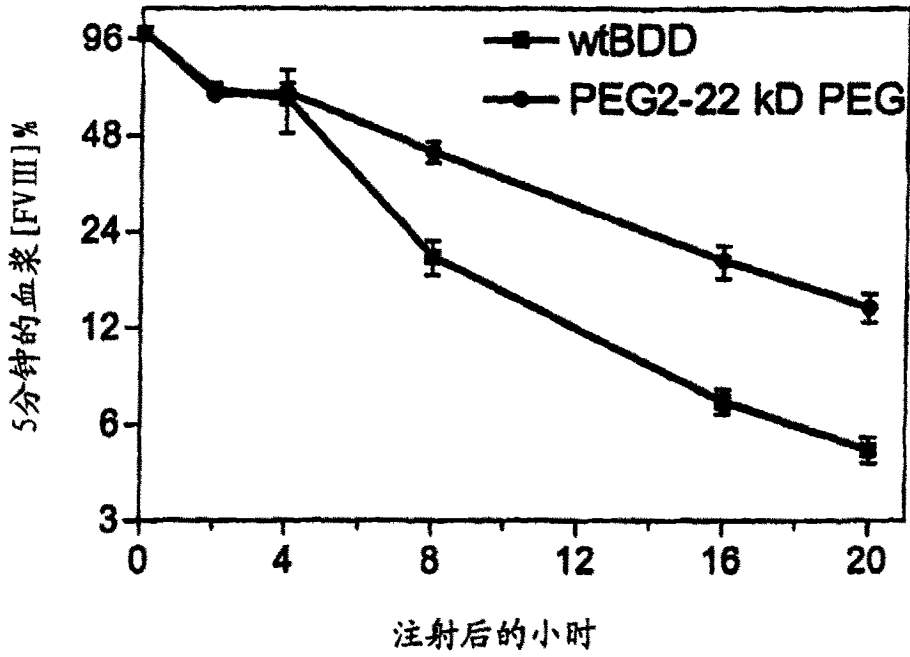


图 23

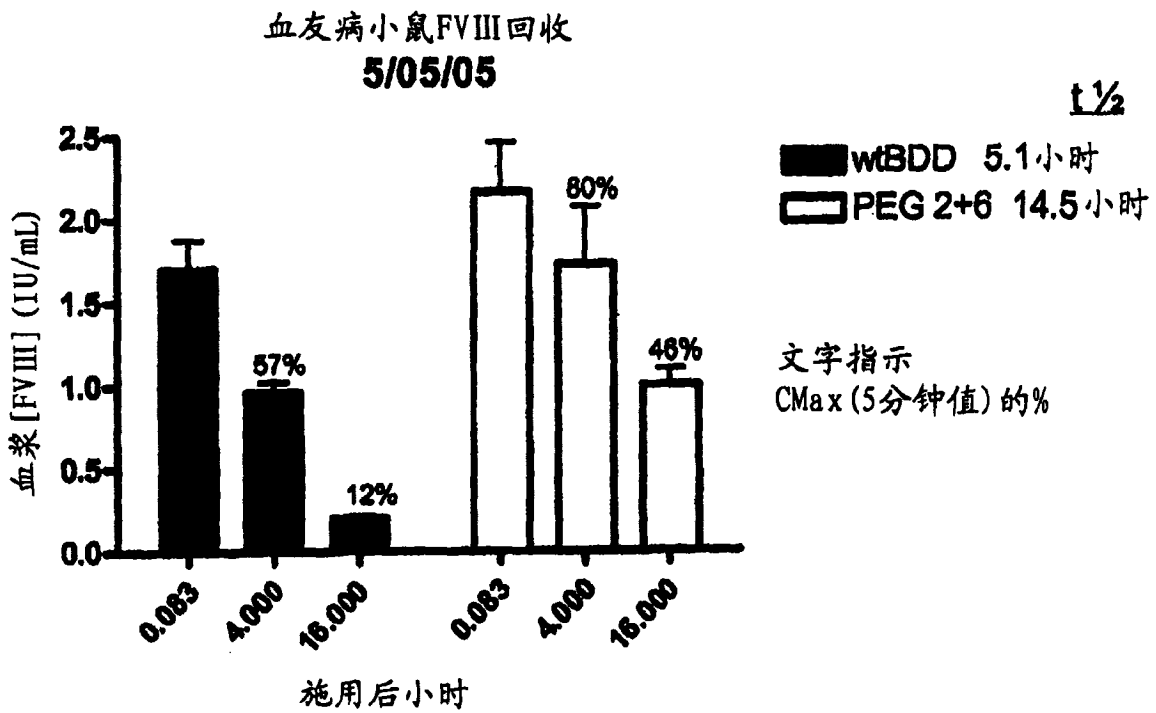


图 24

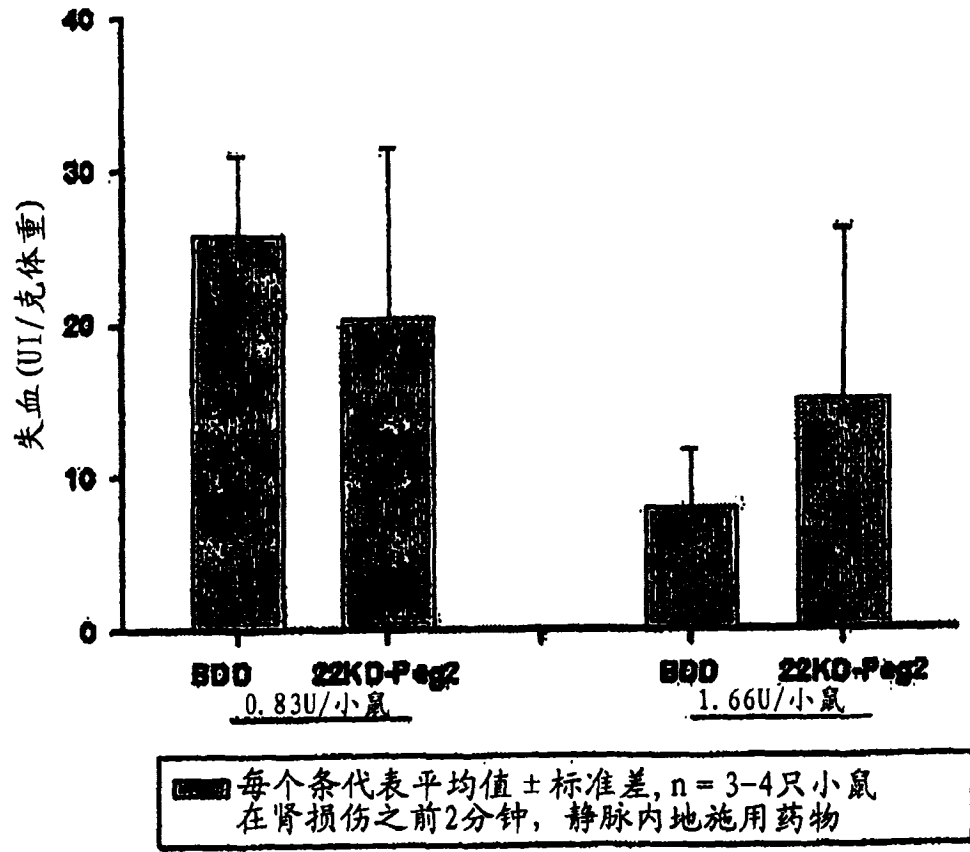


图 25

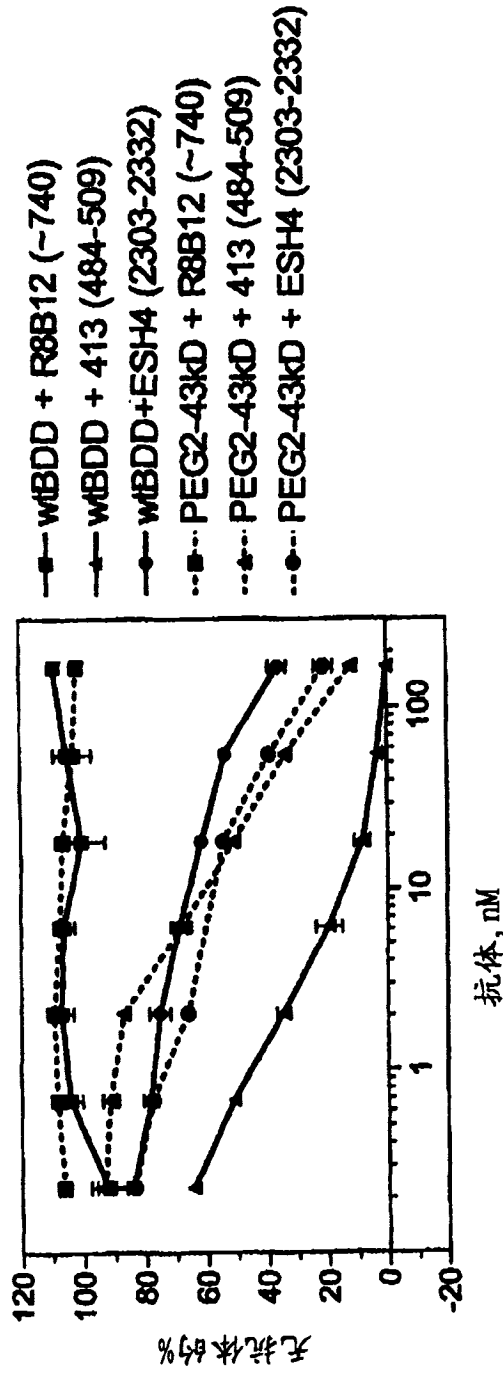


图 26

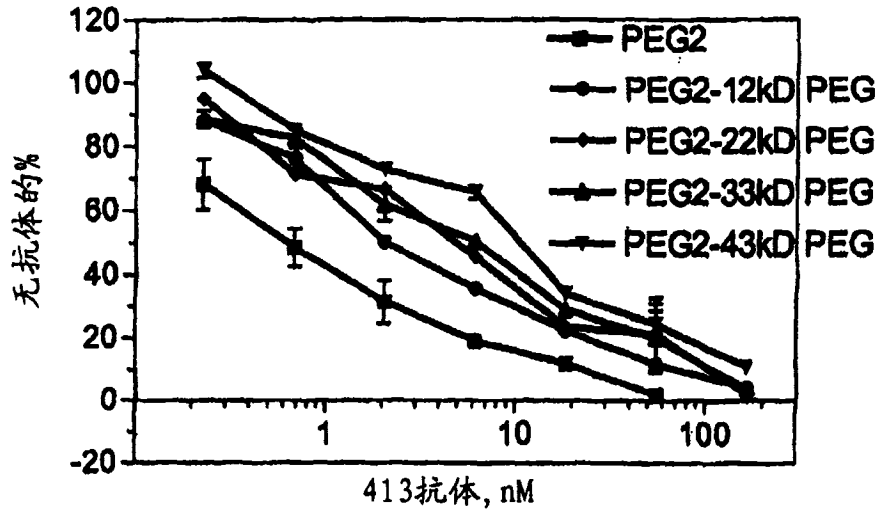


图 27

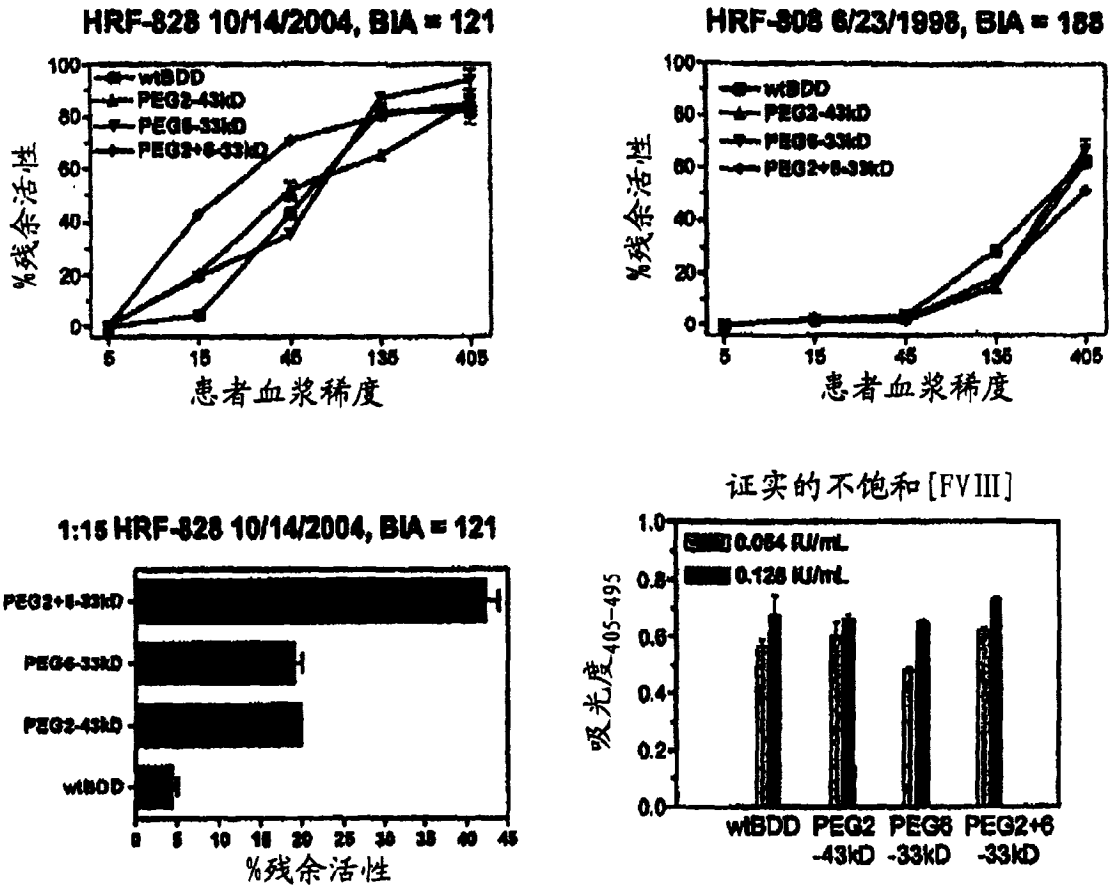


图 28

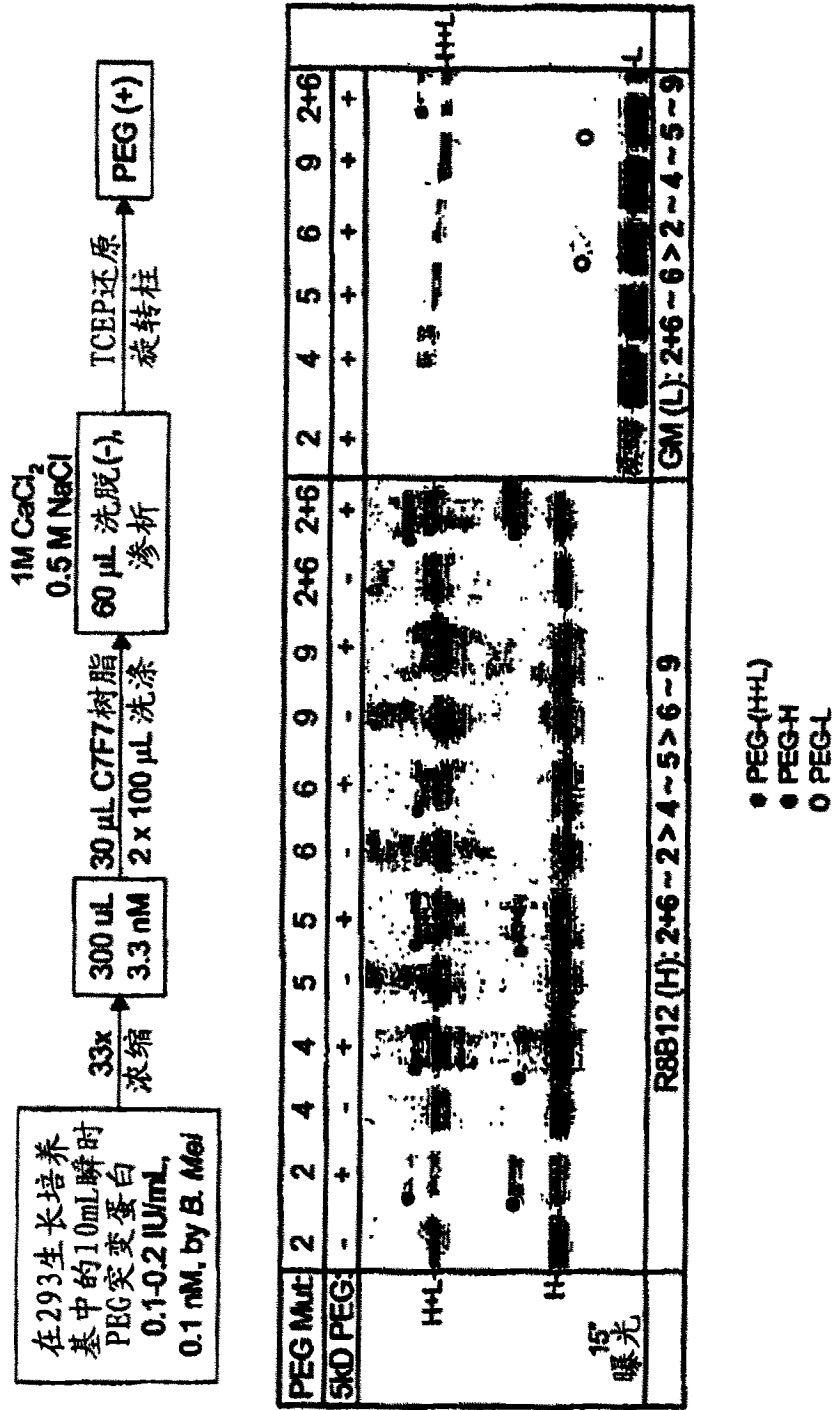


图 29

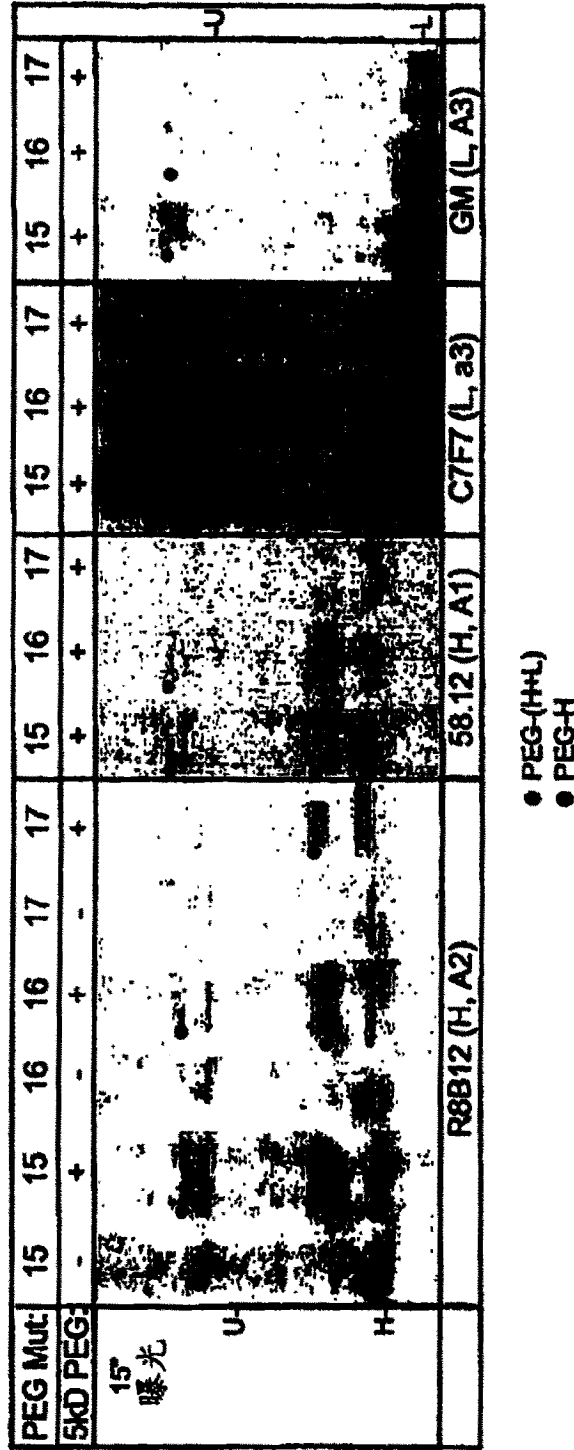


图 30

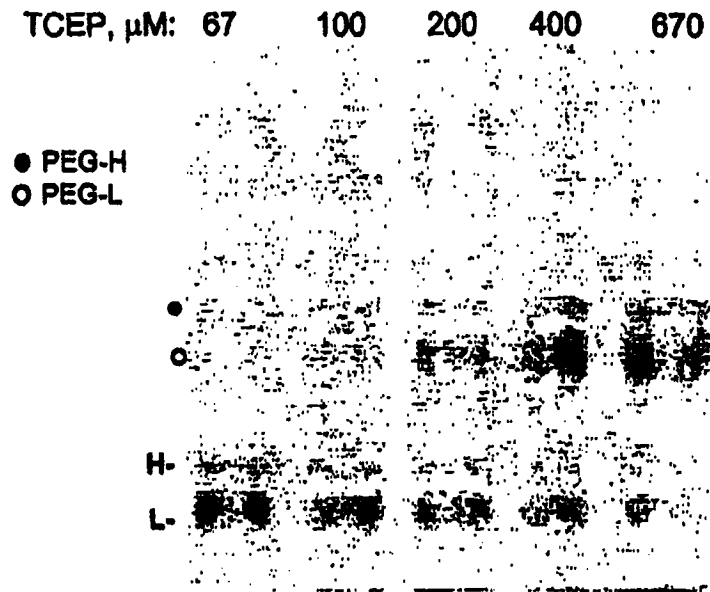


图 31

A2 (43KD) 级分的对比总结

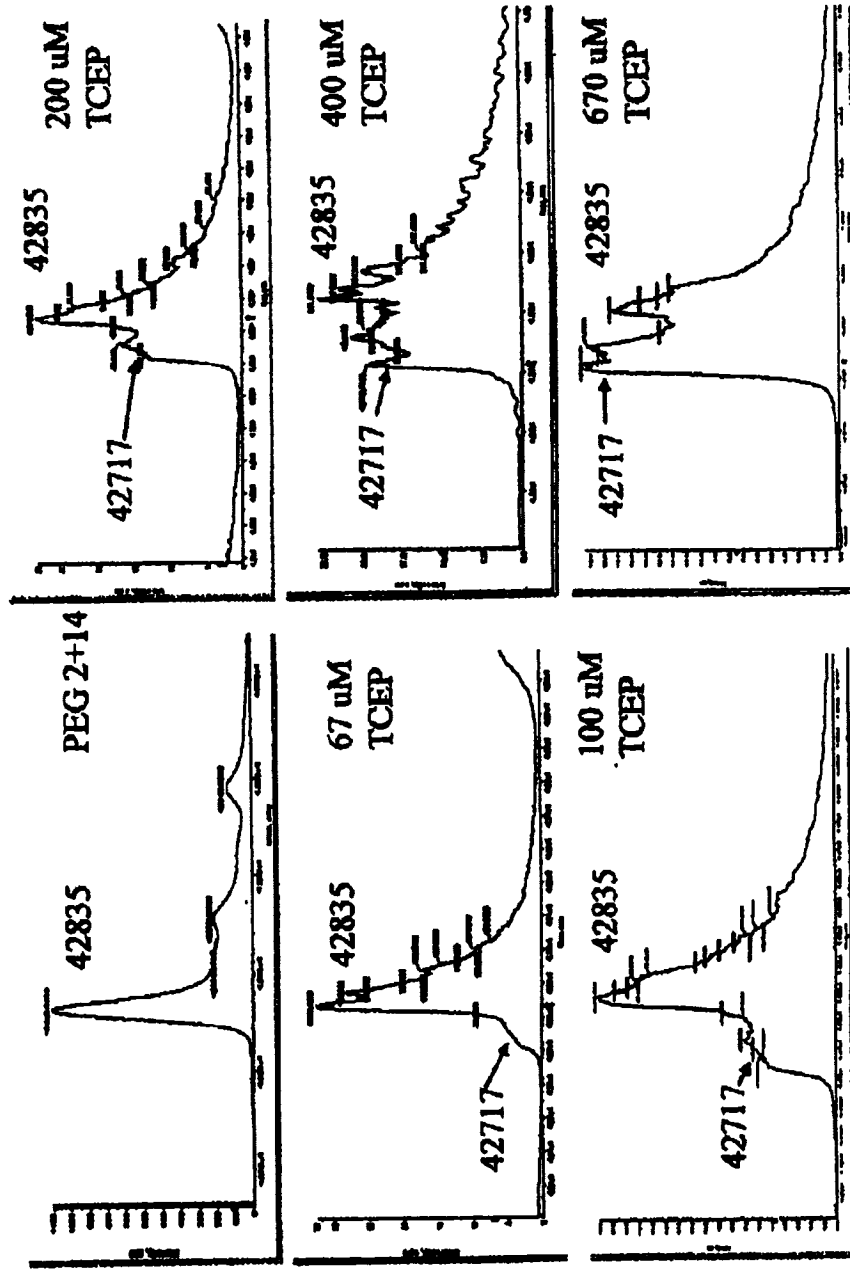


图 32