



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102333788 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 25

(21) 申请号 201080007495. 0

代理人 马崇德 郭文洁

(22) 申请日 2010. 02. 18

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

09153257. 2 2009. 02. 19 EP

61/161510 2009. 03. 19 US

C07K 14/755(2006. 01)

A61K 38/37(2006. 01)

C12P 21/02(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 08. 12

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2010/052022 2010. 02. 18

(87) PCT申请的公布数据

W02010/102886 EN 2010. 09. 16

(71) 申请人 诺沃—诺迪斯克有限公司

地址 丹麦. 鲍斯韦

(72) 发明人 M. 赞德尔 B. 佩施克

D. M. 卡普夫 K. 马德森

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

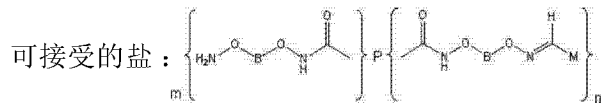
权利要求书 2 页 说明书 36 页

(54) 发明名称

因子 VIII 的修饰

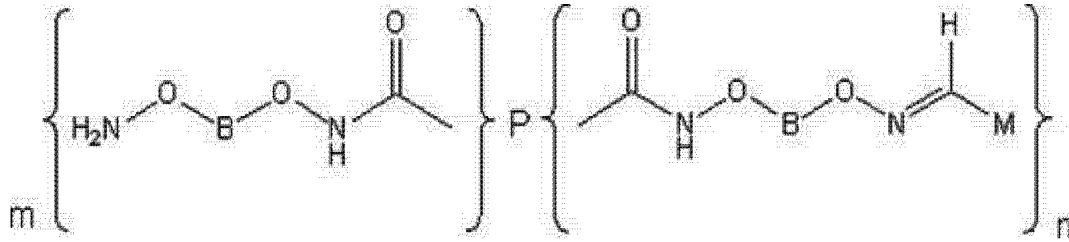
(57) 摘要

一种式 (I) 的因子 VIII 衍生物、或其药学上



(I) 其中 :B 代表 C₂-C₁₀ 亚烷基 ;m 代表 0 或 1-19 的整数,n 代表 1-20 的整数,并且 m 和 n 的总和是 1-20 ;P 代表从因子 VIII 的谷氨酰胺残基侧链去除 m+n 个氨甲酰基后获得的因子 VIII 单或多价 (poly) 残基 ;和 M 代表增加所述因子 VIII 衍生物的血浆半衰期的部分 (M¹),或者报告子部分 (M²)。

1. 式 (I) 的因子 VIII 衍生物、或其药学上可接受的盐：



(I)

其中：

B 代表 C₂-C₁₀ 亚烷基；

m 代表 0 或 1-19 的整数，n 代表 1-20 的整数，并且 m 和 n 的总和是 1-20；

P 代表从因子 VIII 中的谷氨酰胺残基侧链去除 m+n 个氨甲酰基后获得的因子 VIII 单或多价残基；和

M 代表增加所述因子 VIII 衍生物的血浆半衰期的部分 (M¹)，或者报告子部分 (M²)。

2. 根据权利要求 1 的因子 VIII 衍生物，其中所述部分 M¹ 包含一个或多个聚乙二醇 (PEG) 部分、多肽或血浆蛋白质连接子。

3. 根据权利要求 2 的因子 VIII 衍生物，其中所述肽是白蛋白、或抗体或其片段。

4. 根据权利要求 2 的因子 VIII 衍生物，其中所述血浆蛋白质连接子是白蛋白连接子。

5. 根据权利要求 2 的因子 VIII 衍生物，其中所述部分 M¹ 包含聚乙二醇 (PEG) 部分。

6. 根据权利要求 1 的因子 VIII 衍生物，其中所述部分 M² 包含生物素、荧光标记或放射性同位素。

7. 根据前述任一项权利要求的因子 VIII 衍生物，其中 m 代表 0 或 1-9 的整数，n 代表 1-10 的整数，并且 m 和 n 的总和是 1-10。

8. 根据前述任一项权利要求的因子 VIII 衍生物，其中 B 代表 C₂-C₆ 亚烷基。

9. 根据权利要求 1 的因子 VIII 衍生物，其中：

B 代表 C₂-C₄ 亚烷基；

m 代表 0 或 1-5 的整数，n 代表 1-6 的整数，并且 m 和 n 的总和是 1-6；和

M 代表包含了聚乙二醇 (PEG) 部分和 / 或白蛋白连接子的部分 (M¹)。

10. 根据权利要求 1 的因子 VIII 衍生物，其中：

B 代表 C₂-C₄ 亚烷基；

m 代表 0 或 1-5 的整数，n 代表 1-6 的整数，并且 m 和 n 的总和是 1-6；和

M 代表包含了生物素或荧光标记的部分 (M²)。

11. 根据权利要求 9 或 10 的因子 VIII 衍生物，其中 B 代表 C₃ 亚烷基。

12. 药物组合物，其包含前述任一项权利要求所定义的因子 VIII 衍生物和药学上可接受的载体或稀释剂。

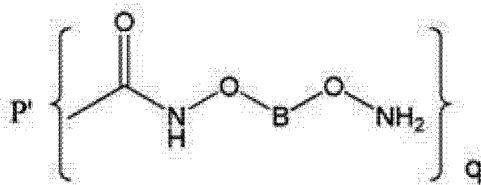
13. 用于对人体或动物体通过医疗进行治疗的权利要求 1-11 任一项所定义的因子 VIII 衍生物。

14. 用于治疗血友病 A 的根据权利要求 13 的因子 VIII 衍生物。

15. 权利要求 1-11 任一项所定义的因子 VIII 衍生物在制备治疗血友病 A 的药物中的用途。

16. 一种治疗血友病 A 患者的方法,该方法包括向所述患者给予治疗有效量的权利要求 1-11 任一项所定义的因子 VIII 衍生物或权利要求 12 定义的药物组合物。

17. 一种式 (II) 的因子 VIII 衍生物、或其药学上可接受的盐:



(II)

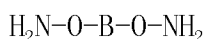
其中:

B 代表 C₂-C₁₀ 亚烷基;

q 代表 1-20 的整数;和

P' 代表从因子 VIII 的谷氨酰胺残基侧链去除 q 个氨甲酰基后获得的因子 VIII 的单或多价残基。

18. 一种权利要求 17 所述的式 (II) 的因子 VIII 衍生物的制备方法,该方法包括使因子 VIII 与式 (III) 化合物在谷氨酰胺转移酶的存在下反应:

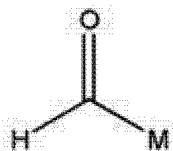


(III)

其中 B 如权利要求 1 或 8-10 任一项所定义。

19. 根据权利要求 18 的方法,其中所述谷氨酰胺转移酶是茂原链轮丝菌 (*Streptomyces mobaraense*) 谷氨酰胺转移酶。

20. 权利要求 1 至 11 任一项所述式 (I) 的因子 VIII 衍生物的制备方法,其包括使权利要求 17 所述的式 (II) 的因子 VIII 衍生物与式 (IV) 的醛反应:



(IV)

其中 M 如权利要求 1 至 6、9 或 10 任一项所定义。

因子 VIII 的修饰

发明领域

[0001] 本发明涉及因子 VIII 衍生物、所述衍生物的制备方法和所述衍生物在治疗中的用途。

[0002] 发明背景

因子 VIII 是凝血级联(cascade)中一种重要的蛋白质。因子 VIII 缺失会导致凝血疾病—血友病 A。可通过在需要时向患者给予因子 VIII 来治疗血友病 A。由于因子 VIII 的血浆半衰期低,使得目前不可能用因子 VIII 有效且便捷地预防性治疗血友病 A。因此,在长时间内维持充足的因子 VIII 活性是困难的。从而,鉴别出具有较长血浆半衰期的新的因子 VIII 衍生物能提供一种安全且便捷地预防性治疗血友病 A 的方法。

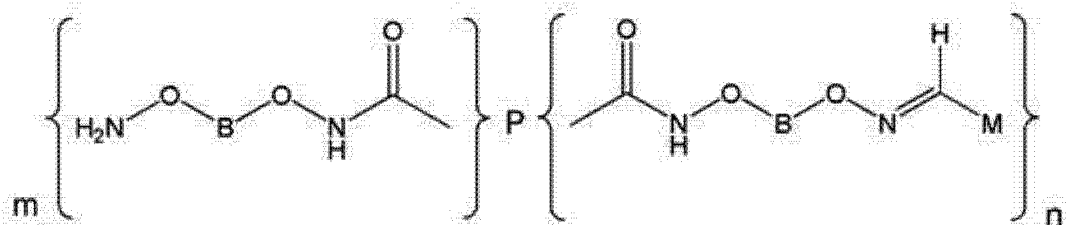
[0003] 有时通过引入合适的化学部分可增加蛋白质的血浆半衰期,所述化学部分能在将该蛋白质从血液中清除的重要位置处保护该蛋白质。将化学部分引入蛋白质中使其作为报告子基团也是有利的。但是,如果这些化学部分被非选择性地引入,则所述蛋白质的生物活性可能会降低或受损。因此,理想的是向蛋白质中区域选择性的引入化学部分。但是实现向诸如因子 VIII 这样的大蛋白质中区域选择性的引入化学部分是困难的。

[0004] 因此需要向因子 VIII 中区域选择性的引入化学部分的新技术。

[0005] 发明概述

本发明人令人意外地已经发现谷氨酰胺转移酶选择性地靶向因子 VIII 中有限数量的谷氨酰胺残基。因此在合成因子 VIII 衍生物时使用谷氨酰胺转移酶使得可以向因子 VIII 中区域选择性的引入化学部分。这些方法已经被用于制备一类新颖的因子 VIII 衍生物。

[0006] 因此,本发明涉及一种式 (I) 的因子 VIII 衍生物、或其药学上可接受的盐:



(I)

其中:

B 代表 C₂-C₁₀ 亚烷基;

m 代表 0 或 1-19 的整数, n 代表 1-20 的整数,并且 m 和 n 的总和是 1-20;

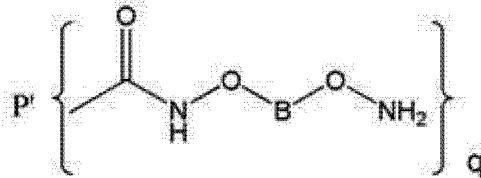
P 代表从因子 VIII 的谷氨酰胺残基侧链去除 m+n 个氨甲酰基后获得的因子 VIII 的单一或多价残基(mono or polyradical);和

M 代表增加所述因子 VIII 衍生物的血浆半衰期的部分(M¹),或者报告子部分(reporter moieties)(M²)。

[0007] 本发明还提供了:

- 一种药物组合物,其包含上述限定的因子 VIII 衍生物和药学上可接受的载体或稀释剂;

- 用于对人体或动物体进行治疗的治疗方法的上述限定的因子 VIII 衍生物；
- 用于治疗血友病 A 的上述限定的因子 VIII 衍生物；
- 上述限定的因子 VIII 衍生物在制备治疗血友病 A 的药物中用途；
- 一种治疗血友病 A 患者的方法，该方法包括向所述患者给予治疗有效量的上述限定的因子 VIII 衍生物或上述限定的药物组合物；
- 一种式 (II) 的因子 VIII 衍生物、或其药学上可接受的盐：



(II)

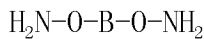
其中：

B 代表 C₂-C₁₀ 亚烷基；

q 代表 1-20 的整数；和

P' 代表从因子 VIII 的谷氨酰胺残基侧链去除 q 个氨甲酰基后获得的因子 VIII 的单或多价残基 (mono or polyradical)；

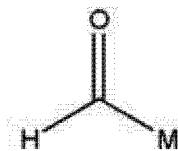
- 一种上述限定的式 (II) 的因子 VIII 衍生物的制备方法，该方法包括让因子 VIII 与式 (III) 化合物在谷氨酰胺转移酶的存在下反应：



(III)

其中 B 如上所定义；以及

- 一种上述限定的式 (I) 的因子 VIII 衍生物的制备方法，该方法包括让上述限定的式 (II) 的因子 VIII 衍生物与式 (IV) 的醛反应：

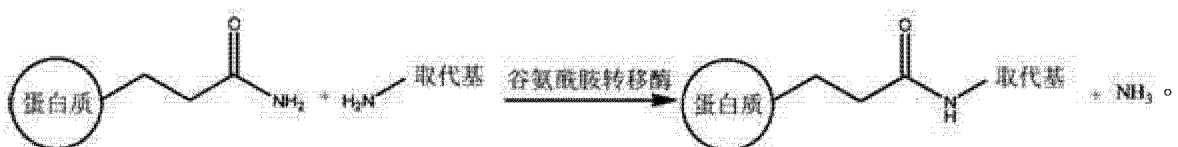


(IV)

其中 M 如上所定义。

[0008] 发明详述

本发明提供了新的因子 VIII 衍生物，其在该蛋白质的有限数量位点上具有取代基团。通过制备方法控制因子 VIII 的区域选择性取代。本发明方法的一个重要步骤是谷氨酰胺转移酶 (Tgase) 的使用。谷氨酰胺转移酶还被称为蛋白质-谷氨酰胺-γ-谷氨酰胺转移酶。谷氨酰胺转移酶催化如下通式反应：

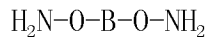


[0009] 如上所示的蛋白质的 -CH₂-CH₂-C(O)-NH₂ 基团是所述蛋白质的谷氨酰胺残基侧链。

[0010] 本发明人令人意外地已经发现谷氨酰胺转移酶选择性地靶向因子 VIII 中有限数

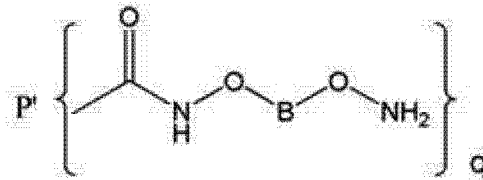
量的谷氨酰胺残基。所述因子 VIII 衍生物的序列包含 64-70 个谷氨酰胺残基。但是,谷氨酰胺转移酶仅靶向这些谷氨酰胺残基中的小部分。通常,谷氨酰胺转移酶靶向 1-20 个谷氨酰胺残基,优选 1-15 个、更优选 1-10 个和最优选 1-7 个谷氨酰胺残基。最优选地,所述 FVIII 衍生物是去除 B 结构域的因子 VIII 化合物,具有 SFSQNSRHPSQNPPVLKRHR 序列的肽连接在其重链的 C- 末端。该因子 VIII 类似物具有 66 个谷氨酰胺残基。所述谷氨酰胺转移酶是来自茂原链轮丝菌(*Streptomyces mobaraense*)的谷氨酰胺转移酶,并且该酶靶向的谷氨酰胺残基数量是 1 至 20 之间。

[0011] 本发明方法的第一步骤涉及因子 VIII 与式 (III) 的二羟胺化合物在谷氨酰胺转移酶的存在下反应:



(III)。

[0012] 所述谷氨酰胺转移酶催化因子 VIII 的谷氨酰胺残基侧链与式 (III) 的二羟胺化合物的氨基的反应,从而得到式 (II) 的因子 VIII 衍生物:



(II)

其中:

B 代表 C_2-C_{10} 亚烷基;

q 代表 1-20 范围的整数;和

P' 代表从因子 VIII 的谷氨酰胺残基侧链去除 q 个氨甲酰基后获得的因子 VIII 的单或多价残基 (mono or polyradical)。

[0013] 在一个实施方式中, B 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 。

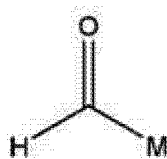
[0014] 对本领域技术人员而言,显然的是式 (II) 的因子 VIII 衍生物形成中涉及因子 VIII 的谷氨酰胺残基“q”条侧链的反应。因此,每个因子 VIII 分子与所述二羟胺化合物“q”个分子反应。

[0015] 通常,该反应步骤在含水溶液中进行,优选缓冲的含水溶液。合适的缓冲溶液是本领域技术人员已知的。所述溶液的温度通常为 0°C 至 60°C , 优选 20°C 至 40°C 。

[0016] 修饰的谷氨酰胺残基的数量可通过各反应物的浓度来控制,一方面是 FVIII 或 FVIII 类似物,另一方面是二羟胺试剂。同样地,酶浓度(根据活性测定)和谷氨酰胺转移酶的来源可用于控制反应的延伸、修饰位点和反应速率。

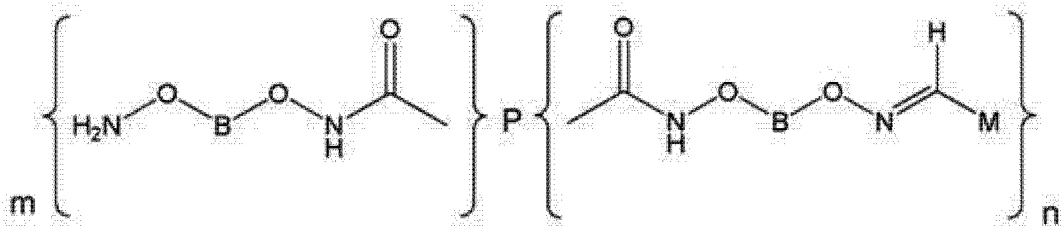
[0017] 粗产物通常利用已知的技术纯化,例如离子交换和 / 或超滤。

[0018] 本发明方法的第二步骤涉及式 (II) 的因子 VIII 衍生物与式 (IV) 的醛反应:



(IV)。

[0019] 式 (IV) 的醛与式 (II) 的因子 VIII 衍生物的 $-C(O)-NH-O-B-O-NH_2$ 部分反应形成式 (I) 的因子 VIII 衍生物:



(I)。

[0020] 本领域技术人员能容易地确定适合上述步骤的反应条件。精确的反应条件将取决于取代基 M 的性质。通常,所述反应在含水溶液中进行,优选缓冲的含水溶液。优选使用适合形成脎的 pH,在该条件下 FVIII 是稳定的。例如 pH6.0-8.5,更优选 pH 6.3-7.5。合适的缓冲溶液是本领域技术人员已知的。所述溶液的温度通常为 0°C 至 60°C,优选 20°C 至 40°C。该反应可利用已知的技术监测以确定最佳的反应时间或孵育时间。在后续步骤之前,粗产物通常利用已知的技术纯化,例如离子交换和 / 或超滤。

[0021] 所述式 (II) 的因子 VIII 衍生物是式 (I) 的因子 VIII 衍生物形成中有用的中间体。

[0022] 所述式 (I) 的因子 VIII 衍生物的 m 和 n 的总和等于作为其来源的所述式 (II) 的因子 VIII 衍生物中的 q。因此, (i) 式 (II) 的因子 VIII 衍生物的 q 个 $-C(O)-NH-O-B-O-NH_2$ 部分中的 n 个与式 (IV) 的醛反应并且 (ii) 式 (II) 的因子 VIII 衍生物的 q 个 $-C(O)-NH-O-B-O-NH_2$ 部分中的 m 个不与式 (IV) 的醛反应。从而,每个式 (II) 的因子 VIII 衍生物分子与 n 个式 (IV) 的醛的分子反应。

[0023] 在式 (II) 化合物中, q 代表 1-20 的整数。通常, q 代表 1-15 的整数。优选, q 代表 1-10 的整数。更优选, q 代表 1-6 的整数。

[0024] 在式 (I) 化合物中, m 代表 0 或 1-19 的整数, n 代表 1-20 的整数, 并且 m 和 n 的总和是 1-20。优选, m 代表 0 或 1-14 的整数, n 代表 1-15 的整数, 并且 m 和 n 的总和是 1-15。更优选, m 代表 0 或 1-9 的整数, n 代表 1-10 的整数, 并且 m 和 n 的总和是 1-10。最优选, m 代表 0 或 1-5 的整数, n 代表 1-6 的整数, 并且 m 和 n 的总和是 1-6。

[0025] 本文所使用的, 一种药学上可接受的盐是一种与药学上可接受的酸或碱形成的盐。药学上可接受的酸包括无机酸例如盐酸、硫酸、磷酸、焦 (di) 磷酸、氢溴酸或硝酸, 和有机酸例如柠檬酸、富马酸、马来酸、苹果酸、抗坏血酸、琥珀酸、酒石酸、苯甲酸、乙酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、或对甲苯磺酸。药学上可接受的碱包括碱金属 (例如钠或钾) 和碱土金属 (例如钙或镁) 的氢氧化物和有机碱例如烷基胺、芳烷基胺和杂环胺。

[0026] 以上讨论的衍生物的因子 VIII 活性通常与活化的人因子 VIII 的活性实质上相同。“FVIII 活性”被定义为在凝固级联中起作用, 通过在活化的血小板上的因子 IXa 之间的相互作用诱导因子 Xa 的形成并支持血凝块的形成能力。因子 VIII 活性可通过如下技术在体外评估, 诸如描述于 Manucci 和 Tripodi, “Factor VIII clotting activity”. E. C. A. T. assay procedures, London: Kluwer Academic Publishers, 1999 的凝块分析; 描述于 Hemker 等, “The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma.”, Thrombosis and haemostasis, 第 83 卷: 589-591 的内源凝血酶潜力分

析;和本领域技术人员已知的其它技术。

[0027] 因此,通常可对本发明的因子 VIII 衍生物进行筛选以评估它们是否维持了与活化的人因子 VIII 实质上相同的活性。

[0028] 本文所使用的,与活化的人因子 VIII 的活性实质上相同的因子 VIII 活性是指所述因子 VIII 活性是人因子 VIII 活性的至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60 %、至少 70 %、至少 80%、至少 90% 例如至少 100%。特别地,所述因子 VIII 活性是人因子 VIII 活性的约 50%-约 75%、约 75%-约 85%、约 85%-约 95%,甚至是大于 100%。

[0029] 谷氨酰胺转移酶

本文所使用的术语“谷氨酰胺转移酶”是指 EC 2.3.2.13 类酶。有用的谷氨酰胺转移酶的例子包括微生物谷氨酰胺转移酶,通常是来自茂原链轮丝菌(*Streptomyces mobaraense*)、肉桂链霉菌(*Streptomyces cinnamoneum*) 和 *Streptomyces griseo-carneum* (均在美国专利 US 5,156,956 中公开,在本文中合并引入作为参考)、薰衣草链霉菌(*Streptomyces lavendulae*) (公开于美国专利 US 5,252,469,在本文中合并引入作为参考)或拉达卡轮枝链霉菌(*Streptomyces ladakanum*) (JP-A-2003199569,在本文中合并引入作为参考)。应注意的是以前的轮枝链霉菌属的成员现在已经包含于链霉菌属了 [Kaempfer, J. Gen. Microbiol., 137, 1831-1892, 1991]。

[0030] 有用的微生物谷氨酰胺转移酶的其他实例是已从枯草杆菌(*Bacillus subtilis*) (公开于 US 5,731,183 中,在本文中合并引入作为参考)和各种粘液菌(*Myxomycetes*) 中分离。有用的微生物谷氨酰胺转移酶的其他实例公开于 WO 96/06931 (例如来自 *Bacillus lylidicus* 的谷氨酰胺转移酶)和 WO 96/22366 中,它们在本文中合并引入作为参考。

[0031] 有用的非微生物谷氨酰胺转移酶包括几内亚猪肝的谷氨酰胺转移酶和来自各种海洋资源例如 flat fish *Pagrus major* (公开于 EP-A-0555649,在本文中合并引入作为参考)、和日本牡蛎 *Crassostrea gigas* (公开于美国专利 US 5,736,356,在本文中合并引入作为参考)的谷氨酰胺转移酶。

[0032] 应提及的其它谷氨酰胺转移酶是人谷氨酰胺转移酶 TG2、TG3、TG7 或 FXIII。

[0033] 其它有用的非微生物谷氨酰胺转移酶是人谷氨酰胺转移酶 TG1 和 TG6。

[0034] 优选来自茂原链轮丝菌(*Streptomyces mobaraense*) 的谷氨酰胺转移酶。

[0035] 因子 VIII

成熟的因子 VIII 分子由 2332 个氨基酸组成,其可分组为三个同源的 A 结构域、2 个同源的 C 结构域和一个 B 结构域,它们以下述顺序排列:A1-A2-B-A3-C1-C2。在因子 VIII 分泌到血浆期间,由于单链因子 VIII 在 B-A3 边界处和 B- 结构域内的不同位点裂解,故而因子 VIII 在胞内被加工成一系列金属离子连接的杂二聚物。该加工过程产生了由 A1、A2 和 B- 结构域的各种部分组成的重链,其分子量大小范围是 90 kDa 至 200 kDa。所述重链通过金属离子与轻链连接,所述轻链由 A3、C1 和 C2 结构域组成。在血浆中,该杂二聚因子 VIII 与血管性假血友病因子 (vWF) 高亲和性地结合,该因子保护该杂二聚因子 VIII 不致过早分解代谢。结合了 vWF 的非活化因子 VIII 在血浆中的半衰期为约 12 小时。

[0036] 在血液凝固过程中,因子 VIII 通过以下过程被激活:利用因子 Xa 和凝血酶在重链的氨基酸 Arg372 和 Arg740 处以及轻链的 Arg1689 处将其蛋白水解裂解,导致血管性假血友病因子释放和产生激活的因子 VIII 杂三聚体,当 Ca²⁺ 存在时所述三聚体将会在磷脂表面

与因子 IXa 和因子 X 形成因子 X 酶复合物 (tenase complex)。所述杂三聚体由 A1 结构域 (50 kDa 的片段)、A2 结构域 (43 kDa 的片段) 和轻链 (A3-C1-C2, 73 kDa 的片段) 组成。因此, 活化形式的因子 VIII (因子 VIIIa) 由通过二价金属离子与凝血酶裂解的 A3-C1-C2 轻链连接的 A1- 亚单元和与所述 A1 和 A3 结构域相对松散地连接的游离 A2 亚单元组成。

[0037] 由与衍生自 B 结构域的小连接体相连的因子 VIII 的重链 (HC) 和轻链 (LC) 组成的因子 VIII 分子 (去除 B 结构域的因子 VIII 或 BDD-FVIII) 仍保留了全长 (天然) 因子 VIII 的生物活性。

[0038] 本文所使用的术语“因子 VIII”包括治疗上有用的, 例如在预防或治疗出血中有效的任何因子 VIII 多肽。其包括, 但不限于, 野生型人因子 VIII、杂交人 / 猪因子 VIII、B 结构域缺失的人因子 VIII 和部分 B 结构域缺失的人因子 VIII。

[0039] 术语“因子 VIII”意在包括, 但不限于, 具有如 Toole 等, Nature 1984, 312 : 342-347 所述的氨基酸序列的多肽 (野生型人因子 VIII)、以及来自其它物种如牛类、猪类、犬类、鼠类的野生型因子 VIII 和鲑鱼因子 VIII。其还包括因子 VIII 的天然等位变体, 其可能存在于从一个个体到另一个个体中。另外, 糖基化或其它转译后的修饰程度和位置会根据所选择的宿主细胞和宿主细胞的环境性质而改变。

[0040] 术语“因子 VIII”还意在包括未裂解的 (酶原) 形式, 以及那些已经被蛋白水解加工得到它们各自的生物活性形式, 它们可被称为因子 VIIIa。

[0041] 术语“因子 VIII”意在包括轻微改变氨基酸序列的多肽, 例如具有修饰的 N- 末端 (包括去除或添加 N- 末端氨基酸) 的多肽、和 / 或相对于人因子 VIII 已经进行化学上修饰的多肽。术语“因子 VIII”意在包括因子 VIII 的变体, 不论是显示与野生型因子 VIII 实质上相同的或更好的活性, 或者显示出相对于野生型因子 VIII 实质上改变或降低的生物活性, 包括但不限于, 通过插入、去除、或取代一个或多个氨基酸而得到与野生型因子 VIII 序列不同的氨基酸序列的多肽。

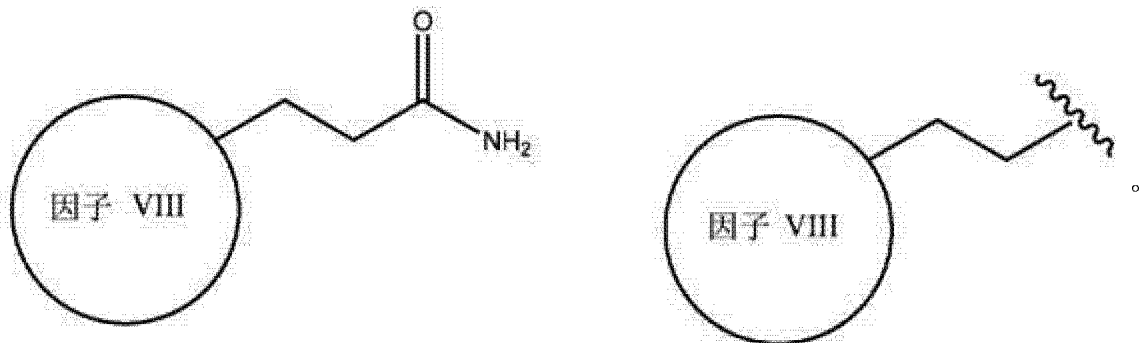
[0042] 因子 VIII 的非限制性实例包括衍生自血浆的人因子 VIII, 例如描述在 Fulcher 等人, Proc. Acad. Nat. Sci. USA 1982; 79 :1648-1652 和 Rotblat 等人, Biochemistry 1985; 24 :4294-4300 中, 和衍生自血浆的猪因子 VIII 描述在 Fass 等人, Blood 1982; 59 : 594-600 和 Knutson 等人, Blood 1982; 59 :615-624 中。因子 VIII 序列变体的非限制性实例例如描述在 Lollar 等人, Blood 2000; 95(2) :564-568 (杂交猪 / 人 FVIII 多肽) 和 Lollar 等人, Blood 2001; 97(1) :169-174 中。

[0043] 因子 VIII 的 cDNA 克隆 (Wood, W. I. 等人, (1984) Nature 312, 330- 336 ; Vehar, G. A. 等人, (1984) Nature 312, 337-342) 使得可以重组表达因子 VIII, 这导致研发出多种重组因子 VIII 产物, 它们已经在 1992 年至 2003 年间被管理权威机构所认可。位于氨基酸 Arg-740 和 Glu-1649 间的因子 VIII 多肽链的中心 B 结构域对整个生物活性不认为是必需的, 所以这一事实还导致研发出了 B 结构域缺失的因子 VIII。参见 Kjalke M, Hedning A, Talbo G, Persson E, Thomsen J and Ezban M (1995), “Amino acid residues 721-729 are required for full Factor VIII activity”. Eur. J. Biochem: 234 :773-779。本文所使用的因子 VIII 包括因子 VIII 的所有变体, 包括其中一个或多个结构域或区域被去除的那些变体。

[0044] 在谷氨酰胺转移酶催化下反应的谷氨酰胺残基的位置可通过用合适的酶例如胰

蛋白酶直接消化, 然后进行肽作图或用报告基团例如生物素或荧光基团例如 Alexa 488 来进行肽作图而确定。通常, 当因子 VIII 与来自茂原链轮丝菌的谷氨酰胺转移酶反应时, 式 (I) 中所示的大多数谷氨酰胺残基来自因子 VIII 重链的谷氨酰胺残基侧链。优选, 所述谷氨酰胺残基大多数位于 A1 结构域。

[0045] 本文所使用的术语氨甲酰基是指残基 $-C(O)-NH_2$, 例如存在于谷氨酰胺残基侧链中。本文所使用的术语“从因子 VIII 的谷氨酰胺残基侧链去除 $m+n$ 个或 q 个氨甲酰基后获得的因子 VIII 的单或多价残基 (mono or polyradical)”是指 $m+n$ 个或 q 个 $-C(O)-NH_2$ 基团被从谷氨酰胺残基侧链中正式地除去。本领域技术人员能理解的是, 这些术语的使用并不是指碳-碳键在谷氨酰胺残基中断裂, 只不过是本文所使用的“因子 VIII 的单或多价残基 (mono or polyradical)”的定义不包括一个或多个谷氨酰胺残基的氨甲酰基部分。下面给出了图示:



[0046] 左图显示了具有谷氨酰胺侧链的因子 VIII。右图显示了“从因子 VIII 的谷氨酰胺残基侧链去除 1 个氨甲酰基后获得的单因子 VIII (mono of Factor VIII)”。

[0047] 增加所述因子 VIII 衍生物的血浆半衰期的部分 (M^1)

式 (II) 的因子 VIII 衍生物与式 (IV) 的醛的反应将部分 M 引入到因子 VIII 中。在一个实施方式中, M 是增加所述因子 VIII 衍生物的血浆半衰期的部分 (M^1)。

[0048] 因子 VIII 具有许多清除位点。本文所使用的术语“清除位点”被定义为被对蛋白质降解负责的生理机制所识别的因子 VIII 分子上的区域。因此, 通过引入取代基 M_1 干扰所述清除位点可增加因子 VIII 的半衰期。“被干扰的清除位点”被定义为, 由于上述修饰对其同源的报告基或相互作用参与者显示出降低的结合的因子 VIII 分子上的清除位点。

[0049] 因此, 通过向因子 VIII 引入一个或多个干扰清除位点的部分可改善因子 VIII 的血浆半衰期。这些部分通常掩藏、掩饰或遮蔽因子 VIII 上的一个或多个清除位点。因此, 在一个实施方式中, 本发明提供了具有改善的血浆半衰期的因子 VIII 衍生物。所述改善是针对相应的未修饰的因子 VIII。

[0050] 因子 VIII 或因子 VIII 衍生物的血浆半衰期可通过测量体内血浆半衰期而确定。人因子 VIII 的血浆半衰期为约 12-14 小时。“体内血浆半衰期”是指 50% 因子 VIII 或因子 VIII 衍生物在被清除前在血浆或血流中循环的时间。测定血浆半衰期通常比测定功能半衰期简单, 并且血浆半衰期的大小通常能较好的指示体内功能半衰期的大小。血浆半衰期的替代术语包括血清半衰期、循环半衰期、流通半衰期、血清清除率、血浆清除率、和清除半衰期。

[0051] 与血浆半衰期相关联使用的术语“增加了”是用于指示因子 VIII 衍生物有关的半

衰期相对于未修饰的因子 VIII 的半衰期统计学上显著的增加了,其是在可对比的条件下测定的。例如,相关的半衰期可增加至少约 25%,例如至少约 50%,例如至少约 100%、150%、200%、250% 或 500%。在一个实施方式中,本发明所述因子 VIII 衍生物显示出相对于母体因子 VIII,其半衰期增加至少约 5 小时,优选至少约 24 小时,更优选至少约 72 小时,最优选至少约 7 天。

[0052] 本文所使用的术语“母体因子 VIII”是指所讨论的因子 VIII 衍生物所来自的具体因子 VIII。

[0053] 体内血浆半衰期的测定可按照文献中所描述的多种方式进行。体内血浆半衰期的增加可用清除率(CL)的减少或平均滞留时间(MRT)的增加来量化。清除率降低至小于母体因子 VIII 的清除率的 70%,例如小于 50%,例如小于 20%,例如小于 10%(由合适的测试确定)的本发明的因子 VIII 衍生物被认为具有增加的体内血浆半衰期。MRT 增加至大于母体因子 VIII 的 MRT 的 130%,例如大于 150%,例如大于 200%,例如大于 500% (在合适的测试中)的本发明的因子 VIII 衍生物被认为具有增加的体内血浆半衰期。清除率和平均滞留时间可在使用合适的测试动物的标准药代动力学研究中评估。对给定的蛋白质选择合适的测试动物是在本领域技术人员的能力范围内的。人类的测试理所当然的代表最终的测试。通常,且例如是向小鼠、大鼠、狗、猴或猪注射所要试的化合物。注射的量取决于测试动物。随后,在适合于 CL 和 MRT 评估的 1 至 5 天期间内取血样。可用 ELISA 技术便捷地分析血样。

[0054] M^1 通常包含一种或多种亲水性聚合物或血浆蛋白质连接子(bindings)。所述聚合物要么是化学聚合物例如聚乙二醇(PEG)部分或者该聚合物可以是二聚合物例如多糖、聚唾液酸部分、透明质酸部分、或多肽。多糖的实例是聚唾液酸。由一种氨基酸组成的多肽的实例是聚甘氨酸。由不同氨基酸组成的多肽也可用作本发明的实例。优选, M^1 包含 (a) 一个 PEG 部分、聚唾液酸多肽或血浆蛋白质连接子,(b) 一个 PEG 部分和一个血浆蛋白质连接子,(c) 一个 PEG 部分和一个多肽,(d) 一个多肽和一个血浆蛋白质连接子,(e) 一个聚唾液酸部分和一个血浆蛋白质连接子,或者 (f) 一个聚唾液酸部分和一个多肽。

[0055] 本文所使用的术语“PEG”是指聚(乙二醇),也称为聚(环氧乙烷)(PEO)或聚氧乙烯(POE)是聚醚。PEG 可通过聚合环氧乙烷而制得,也可以商业购得宽分子量范围为 300 g/mol 至 10,000,000 g/mol 的 PEG。

[0056] 根据聚合方法所使用的引发剂还可获得不同形式的 PEG。最常见形式的 PEG 是单官能的甲基醚 PEG (甲氧基聚(乙二醇)),缩写为 mPEG。

[0057] 还可获得不同几何结构的 PEGs,例如线性、和分支的 PEG。

[0058] PEG 具有结构 $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$, 分子式为 $\text{C}_{2n}\text{H}_{4n+2}\text{O}_{n+1}$, CAS 编号为 [25322-68-3]。当然,分子量取决于 n 。

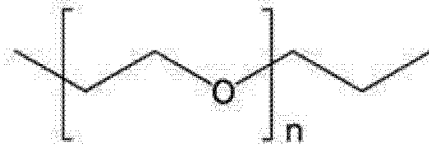
[0059] PEG 名称中通常包含的数字指示了它们的平均分子量,例如 $n=80$ 的 PEG 的平均分子量大约为 3500 道尔顿,其被标注为 PEG 3500。

[0060] 大多数 PEG 包括具有分子量分布的分子,也即它们是多分散的。大小分布可用重均分子量(M_w)和数均分子量(M_n)统计学地表征,它们的比例被称为多分散性指数(M_w/M_n) (例如参见“Polymer Synthesis and Characterization”, J. A. Nairn, University of Utah, 2003)。 M_w 和 M_n 可由质谱测定。

[0061] 因此,多分散性指数是大于或等于 1 的数,并且其还可通过凝胶渗透色谱数据进

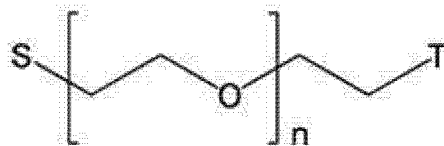
行估算。当多分散性指数是1时,产物是单分散的并且由具有单一分子量的化合物组成。当多分散性指数是大于1时,该聚合物是多分散的,并且多分散性指数将告诉我们具有不同分子量的聚合物分布有多广。通常多分散性指数随 PEG 或 mPEG 的分子量增加。

[0062] 出于本发明目的,术语“PEG”和“Peg”可相互交换使用并且基本上表示包括下述结构的单残基或双残基:



其中 n 是大于 1 的整数。

[0063] 术语 PEG 是指聚(乙二醇)以及聚(乙二醇)单烷基醚,其中烷基是指 C_{1-6} 烷基,例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基和己基。因此,在一个优选的实施方式中,用于本发明的 Peg 由下式表示:



其中 n 是大于 1 的整数,并且 S 和 T 独立地代表烷氧基、羟基、或者不存在。如上解释,该式中 S 代表甲氧基且 T 不存在的化合物也是指 mPEG。

[0064] 用于本发明的 PEG 的分子量优选在大约 100 Da 至大约 1000000 Da 之间。kDa 级的 Peg 的分子量可在括号中给出。例如 mPEG(30k) 是指分子量为大约 30 kDa 的聚(乙二醇)单甲基醚。顺便说一句,该聚合物可能由大约 680 ± 100 个乙二醇单元组成。另一个例子是, mPEG(4k) 中的 n 为 90 并且分子量为 3991 Da, 也即大约 4 kDa。同样地, mPEG(20k) 的平均分子量是 20 kDa 且 n 的平均数是 454。

[0065] 用于本发明的 PEG 是线性或分支的。在具体的实施方式中,用于本发明的 PEG 是 a) 多分散的,或者 b) 单分散的。在具体的实施方式中,用于本发明的 Peg 的多分散性指数是 i) 低于 1.06, ii) 低于 1.05, iii) 低于 1.04, iv) 低于 1.03, 或者 v) 在 1.02-1.03 之间。

[0066] 存在于 M^I 中的聚唾液酸优选为 N -乙酰基神经氨酸以 $\alpha(2 \rightarrow 8)$ 酮苷连接的均聚物(多聚乙酰神经氨酸),其分子量为 8-100kD, 优选 20-40kD。

[0067] 存在于 M^I 中的多肽优选为血浆蛋白质。本文所使用的术语“血浆蛋白质”是指白蛋白、抗体和纤维蛋白原, 优选白蛋白和抗体。

[0068] 本文所使用的术语“白蛋白”是指来自血液血清的血清白蛋白,并且包括人血清白蛋白以及来自其它物种的血清白蛋白。本文所使用的术语“白蛋白”包括任何白蛋白或白蛋白的修饰体的衍生物。

[0069] 所述抗体可以是人抗体或嵌合抗体。优选单克隆抗体。优选地,所述抗体是 IgG1 (例如 IgG1, □)、IgG3 (例如 IgG3, □) 和 IgG4 (例如 IgG4, □) 抗体。但是,其他抗体同型也包含在本发明中,包括 IgG2、IgM、IgA1、IgA2、分泌的 IgA、IgD、和 IgE。这些抗体的合适的抗原结合片段包括 Fab、 $F(ab')_2$ 、Fv、单链 Fv 片段或双特异性抗体。另外,所述抗原结合片段包括连接-结构域免疫球蛋白融合蛋白质,其包含 (i) 与免疫球蛋白铰链区多肽融

合的一个连接-结构域多肽(例如重链的可变区域或轻链的可变区域), (ii) 与所述铰链区融合的免疫球蛋白重链 CH2 固定区域, 和 (iii) 与 CH2 固定区域融合的免疫球蛋白重链 CH3 固定区域。上述连接-结构域免疫球蛋白融合蛋白质还公开在 US 2003/0118592 和 US 2003/0133939 中。可选的, 片段可包含抗体的固定区域; 因此片段可以是 Fc 片段或其部分。

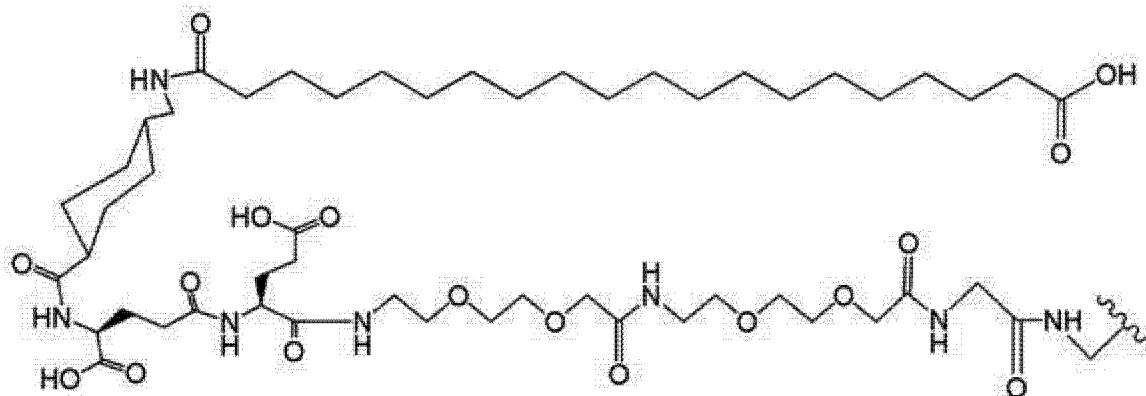
[0070] 本文所使用的术语“血浆蛋白质连接子(binder)”是指任何能连接血浆蛋白质特别是白蛋白的部分。连接至白蛋白的部分是一种“白蛋白连接子”。一种化合物与白蛋白连接的能力可根据 J. Med. Chem, 43, 2000, 1986-1992 中所述的方法确定, 其合并在本文中作为参考。在本文中, 如果 Ru/Da 大于 0.05, 例如大于 0.10, 例如大于 0.12 或者甚至是大于 0.15, 则该化合物被定义为与白蛋白连接。白蛋白连接子通常是高疏水分子, 优选衍生自脂肪酸。因此, 优选白蛋白连接子包含 $-(CH_2)_{12}-$ 部分。

[0071] 包含如下 PEG 部分的优选的 (M_1) 部分是:

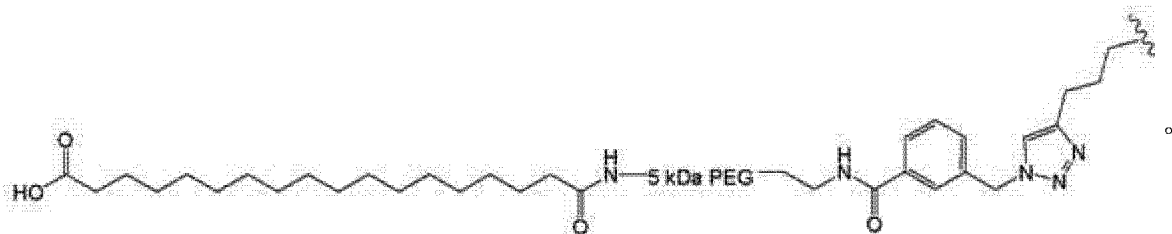


其中 mPEGyl 是多分散的并且分子量大约为 20kDa。

[0072] 包含如下白蛋白连接子的优选的 (M_1) 部分是:



[0073] 包含 PEG 部分和白蛋白连接子的优选的 (M_1) 部分经:



[0074] 报告子部分 (reporter moieties) (M_2)

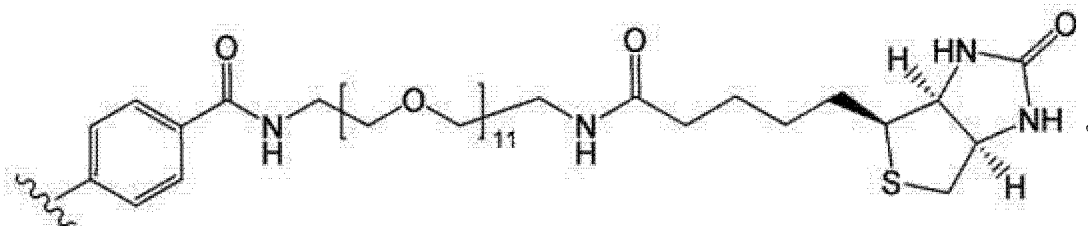
式 (II) 的因子 VIII 衍生物与式 (IV) 的醛的反应将部分 M 引入了因子 VIII 中。在一个实施方式中, M 是报告子部分 (reporter moieties) (M^2)。带有一个或多个报告子部分 (reporter moieties) (M^2) 的式 (II) 的因子 VIII 衍生物通常具有与活化的人因子 VIII 实质上相同的活性。术语“与活化的人因子 VIII 实质上相同的活性”具有上文中所述的含义。

[0075] 所述报告子部分 (reporter moieties) (M^2) 可包含任何可让所述因子 VIII 衍生物被检测到的合适的标记。合适的标记对本领域技术人员而言是公知的, 并包括生物素; 荧光标记如荧光素残基、若丹明残基、得克萨斯红 (Texas Red[®]) 残基、Alexa Fluor[®] 染

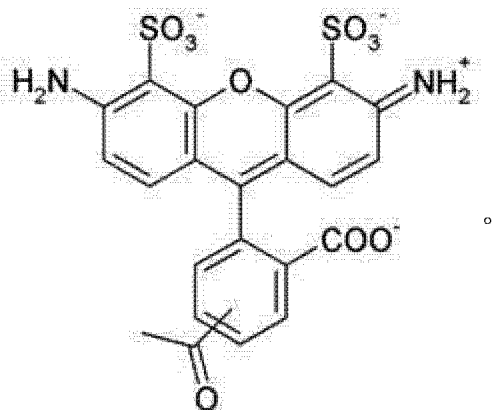
料如 Alex Fluor 488 和藻胆素蛋白质残基；放射性同位素，如 Cu-64、Ga-67、Ga-68、Zr-89、Ru-97、Tc-99、Rh-105、Pd-109、In-111、I-123、I-125、I-131、Re-186、Re-188、Au-198、Pb-203、At-211、Pb-212 和 Bi-212；和酶底物，如对硝基苯酚乙酸酯残基。优选的报告子部分 (reporter moieties) 包含生物素或荧光标记。

[0076] 使用本领域技术人员已知的测试，通常例如在 ALISA 测试中使用链霉亲和素 (streptavidin)，可容易地检测或识别出生物素标记。使用本领域技术人员已知的测试，例如使用流式细胞计数还可检测或识别出荧光标记。使用本领域技术人员已知的测试还可检测或识别出放射性同位素。

[0077] 一种包含生物素的优选的报告子部分 (reporter moieties) (M^2) 是：



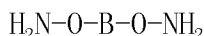
[0078] 一种优选的报告子部分 (reporter moieties) (M^2) 是可从 Invitrogen 购买的 Alexa 系列染料。其中优选的染料是 Alexa 488。用于连接 Alexa 488 的几种试剂可在从 Invitrogen 购买得到。该染料可根据其荧光容易地检测出，该荧光可在激发波长 495 nm 处和发射波长 519 nm 处观测到。Alexa 488 通式结构是：



[0079] 二羟胺试剂

本发明中所用的二羟胺化合物是式 (III) 的化合物：

formula (III) :



(III)

其中 B 代表 C_2 - C_{10} 亚烷基。所述 C_2 - C_{10} 亚烷基是直链或分支的亚烷基，优选直链的。B 通常代表 C_2 - C_6 亚烷基，优选 C_2 - C_4 亚烷基。B 优选是正亚乙基、正亚丙基或正亚丁基，最优选是正亚丙基。因此，优选的二羟胺化合物是 1, 3-二氨基氧基丙烷。

[0080] 通过模拟已知的方法和利用本领域技术人员已知的技术，式 (III) 的二羟胺化合物可由市售的反应试剂容易地制得。

[0081] 药物组合物

本发明还涉及包含式 (I) 的因子 VIII 衍生物的药物组合物。通常，所述药物组合物还

包含药学上可接受的载体或稀释剂。

[0082] 优选的药学上可接受的载体或稀释剂是含水缓冲溶液。因此,本发明涉及一种药物制剂,其包含了因子 VIII 衍生物的含水溶液和缓冲剂,其中所述因子 VIII 衍生物的存在浓度为 0.01 mg/ml 或以上,并且所述制剂的 pH 为约 2.0 至约 10.0。

[0083] 通常,所述缓冲剂选自乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸盐、双甘氨酸、组氨酸、甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠、和三(羟甲基)-氨基甲烷、N-二(羟乙基)甘氨酸、tricine、苹果酸、琥珀酸盐、马来酸、富马酸、酒石酸、天冬氨酸或其混合物。这些特定缓冲剂中的每一种均构成本发明的一种替代实施方式。

[0084] 通常,所述制剂还包含药学上可接受的防腐剂。在本发明另一实施方式中,所述防腐剂选自苯酚、邻甲酚、间甲酚、对甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、2-苯氧乙醇、对羟基苯甲酸丁酯、2-苯基乙醇、苯醇、氯代丁醇、和硫柳汞、溴硝丙二醇、苯甲酸、咪唑、氯己定、甲醋吡喃酮钠、氯甲酚、对羟基苯甲酸乙酯、苜蓿氯铵、chlorphenesine (3p-氯苯氧基丙烷-1,2-二醇)(3p-chlorphenoxypropane-1,2-diol) 或其混合物。在本发明另一实施方式中,所述防腐剂存在的浓度是 0.1 mg/ml-20 mg/ml。在本发明另一实施方式中,所述防腐剂存在的浓度是 0.1 mg/ml-5 mg/ml。在本发明另一实施方式中,所述防腐剂存在的浓度是 5 mg/ml-10 mg/ml。在本发明另一实施方式中,所述防腐剂存在的浓度是 10 mg/ml-20 mg/ml。这些特定防腐剂中的每一种均构成本发明的一种替代实施方式。防腐剂在药物组合物中的使用是本领域技术人员共知的。为了方便,可参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 19 版, 1995。

[0085] 通常,所述制剂还包含等渗剂。在本发明另一实施方式中,所述等渗剂选自盐(例如氯化钠)、糖或糖醇、氨基酸(例如 L-甘氨酸、L-组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸)、醛醇(例如丙三醇(甘油)、1,2-丙二醇(丙二醇)、1,3-丙二醇、1,3-丁二醇)聚乙二醇(例如 PEG400) 或其混合物。可使用任何糖,例如单-、双-或多糖、或水溶性葡聚糖,例如包括果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、右旋糖酐、支链淀粉、糊精、环糊精、可溶淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素钠。在一个实施方式中,所述糖添加剂是蔗糖。糖醇被定义为是具有至少一个 -OH 基团的 C₄-C₈ 烃,例如包括甘露醇、山梨醇、肌醇、半乳糖醇、卫矛醇、木糖醇、和阿拉伯糖醇。在一个实施方式中,所述糖醇添加剂是甘露醇。上述提及的糖或糖醇可单独使用或组合使用。对使用量没有固定的限制,只要所述糖或糖醇在液体制剂中是溶解的并且不会对使用本发明方法达到的稳定效果产生不利地作用。在一个实施方式中,所述糖或糖醇的浓度在约 1 mg/ml 至约 150 mg/ml 之间。在本发明另一实施方式中,所述等渗剂的存在浓度是 1 mg/ml-50 mg/ml。在本发明另一实施方式中,所述等渗剂的存在浓度是 1 mg/ml-7 mg/ml。在本发明另一实施方式中,所述等渗剂的存在浓度是 8 mg/ml-24 mg/ml。在本发明另一实施方式中,所述等渗剂的存在浓度是 25 mg/ml-50 mg/ml。这些特定等渗剂中的每一种均构成本发明的一种替代实施方式。在药物组合物中等渗剂的使用是本领域技术人员共知的。为了方便,可参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 19 版, 1995。

[0086] 通常,所述制剂还包含螯合剂。在本发明另一实施方式中,所述螯合剂选自乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸、天冬氨酸的盐和其混合物。在本发明另一实施方式中,所述螯合剂的存在浓度是 0.1 mg/ml-5 mg/ml。在本发明另一实施方式中,所述螯合剂的存在浓度

是 0.1 mg/ml-2 mg/ml。在本发明另一实施方式中,所述螯合剂的存在浓度是 2 mg/ml-5 mg/ml。这些特定螯合剂中的每一种均构成本发明的一种替代实施方式。在药物组合物中螯合剂的使用是本领域技术人员共知的。为了方便,可参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 19 版, 1995。

[0087] 通常,所述制剂还包含稳定剂。在药物组合物中稳定剂的使用是本领域技术人员共知的。为了方便,可参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 19 版, 1995。

[0088] 通常,本发明的药物组合物还可包含一定量的氨基酸碱,所述含量足以减少该组合物保存过程中由于多肽的聚集形成。“氨基酸碱”是指一种氨基酸或氨基酸的组合,其中任何给定的氨基酸以游离碱形式或盐的形式存在。当使用氨基酸的组合时,所有的氨基酸可以以其游离碱形式、或者所有以其盐的形式存在、或者一部分以其游离碱形式而另一部分以其盐的形式存在。在一个实施方式中,用于制备本发明组合物的氨基酸是带有电荷侧链的氨基酸,例如精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。特定氨基酸(例如甘氨酸、蛋氨酸、组氨酸、咪唑、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸和其混合物)的任何立体异构体(即 L、D 或 LD 异构体)或者这些立体异构体的组合可存在于本发明的药物组合物中,只要所述特定的氨基酸以其游离碱形式或其盐的形式存在。在一个实施方式中,使用 L- 立体异构体。本发明组合物还可以使用这些氨基酸的类似物配制。“氨基酸类似物”是指天然存在的氨基酸的衍生物,其可产生所需的减少本发明液体组合物保存过程中由于多肽的聚集形成的作用。合适的精氨酸类似物例如包括氨基胍、或鸟氨酸和 N- 单乙基 L- 精氨酸,合适的蛋氨酸类似物包括乙硫氨酸和丁硫氨酸。合适的半胱氨酸类似物包括 S- 甲基 -L- 半胱氨酸。与其它的氨基酸一样,所述氨基酸类似物可以其游离碱形式或其盐的形式加入组合物中。在本发明另一实施方式中,所述氨基酸或氨基酸类似物以足以防止或延迟蛋白质聚集的浓度使用。

[0089] 在本发明另一实施方式中,当用作治疗剂的多肽是包含至少一个易于被氧化的蛋氨酸残基的多肽时,可加入蛋氨酸(或其它含硫氨基酸或氨基酸类似物)以抑制蛋氨酸残基被氧化为蛋氨酸亚砷。“抑制”是指随着时间被氧化的蛋氨酸物质最小化的积累。抑制蛋氨酸氧化导致所述多肽以其合适的分子形式较长时间的保留。可使用蛋氨酸的任何立体异构体(L、D 或 LD 异构体)或其组合。加入量应是足以抑制蛋氨酸残基氧化的量,由此蛋氨酸亚砷的量是管理机构能接受的。通常,这意味着所述组合物包含不多于约 10% 至约 30% 的蛋氨酸亚砷。一般,这可通过加入蛋氨酸实现,加入的蛋氨酸与蛋氨酸残基的比例范围是约 1 : 1 至约 1000 : 1,例如 10 : 1- 约 100 : 1。

[0090] 通常,所述制剂还包含选自高分子量聚合物或低分子化合物的稳定剂。

[0091] 在本发明另一实施方式中,所述稳定剂选自聚乙二醇(例如 PEG 3350)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮、羧基 / 羟基纤维素或其衍生物(例如 HPC、HPC-SL、HPC-L 和 HPMC)、环糊精、含硫物质例如单硫代丙三醇、硫代乙醇酸和 2- 甲基硫代乙醇、和不同的盐(例如氯化钠)。这些特定稳定剂中的每一种均构成本发明的一种替代实施方式。

[0092] 所述药物组合物还可以包含添加的稳定剂,以进一步增强其中的治疗活性多肽的稳定性。本发明特别需要的稳定剂包括但不限于蛋氨酸和 EDTA,它们可保护所述多肽不进行蛋氨酸氧化;以及非离子表面活性剂,它们保护多肽对抗与冷冻 - 融化或机械剪切相关

的聚集。

[0093] 在本发明另一实施方式中,所述制剂包含表面活性剂。所述表面活性剂可以是洗涤剂、乙氧基化的蓖麻油、聚乙二醇化甘油酯、乙酰化甘油单酯、山梨聚糖脂肪酸酯、聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段共聚物(例如 Poloxamers 如 Pluronic® F68、poloxamer 188 和 407、Triton X-100)、聚氧乙烯山梨聚糖脂肪酸酯、聚氧乙烯和聚乙烯衍生物例如烷基化和烷氧基化的衍生物(吐温,如吐温-20、吐温-40、吐温-80 和 Brij-35)、甘油单酯或其乙氧基化衍生物、甘油双酯或其聚氧乙烯衍生物、醇类、丙三醇、外源凝集素和磷脂(例如磷脂酰丝氨酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、双磷脂酰甘油和神经鞘磷脂)、磷脂的衍生物(例如双棕榈酰磷脂酸)和溶血磷脂(例如棕榈酰溶血磷脂酰-L-丝氨酸和乙醇胺、胆碱、丝氨酸或苏氨酸的 1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酯)和溶血磷脂酰胆碱和磷脂酰胆碱的烷基、烷氧基(烷基酯)、烷氧基(烷基醚)-衍生物,例如溶血磷脂酰胆碱的月桂酰和肉豆蔻酰衍生物、双棕榈酰磷脂酰胆碱、和极性头部基团的改造物,即是胆碱、乙醇胺、磷脂酸、丝氨酸、苏氨酸、丙三醇、肌醇、和带正电荷的 DODAC、DOTMA、DCP、BISHOP、溶血磷脂酰丝氨酸和溶血磷脂酰苏氨酸、和甘油磷脂(例如脑磷脂)、甘油糖脂(例如半乳糖吡喃糖苷)、神经鞘氨糖脂(例如神经酰胺、神经节苷脂)、十二烷基磷酸胆碱、母鸡蛋溶血卵磷脂、夫西地酸衍生物(例如牛磺双氢褐霉素钠等)、长链脂肪酸和其 C₆-C₁₂ 盐(例如油酸和辛酸)、酰基肉毒碱和衍生物、赖氨酸、精氨酸或组氨酸的 N^α-酰化衍生物、或赖氨酸或精氨酸或组氨酸的侧链酰化衍生物、或赖氨酸或精氨酸的侧链酰化衍生物、包含赖氨酸、精氨酸或组氨酸和中性或酸性氨基酸的任意组合的二肽的 N^α-酰化衍生物、包含一个中性氨基酸和两个带电荷氨基酸的任意组合的三肽的 N^α-酰化衍生物、DSS(多库酯钠:CAS 登记号 [577-11-7])、多库酯钙:CAS 登记号 [128-49-4])、多库酯钾:CAS 登记号 [7491-09-0])、SDS(十二烷基硫酸钠或月桂基硫酸钠)、辛酸钠、胆酸或其衍生物、胆汁酸或其盐和甘氨酸或牛磺酸共轭物、熊果脱氧胆酸、牛胆酸钠、去氧胆酸钠、牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠、N-十六烷基-N,N-二甲基-3-铵-1-丙烷磺酸盐、阴离子(烷基-芳基-磺酸盐)单价表面活性剂、两性离子表面活性剂(例如 N-烷基-N,N-二甲基铵-1-丙烷磺酸盐、3-胆酰胺-1-丙基二甲基铵-1-丙烷磺酸盐、阳离子表面活性剂(季铵碱)(例如溴化十六烷基三甲铵、氯化十六烷基吡啶)、非离子表面活性剂(例如十二烷基-β-D-吡喃葡萄糖苷)、poloxamines(例如 Tetronic's)(其是衍生自环氧丙烷和环氧乙烷顺序添加到乙二胺而得到的四官能的嵌段共聚物)、或者所述表面活性剂可选自咪唑啉衍生物,或其混合物。这些特定表面活性剂中的每一种均构成本发明的一种替代实施方式。

[0094] 在药物组合物中表面活性剂的使用是本领域技术人员共知的。为了方便,可参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 19 版, 1995。

[0095] 其它组分也可存在于本发明的药物组合物中。这些添加的组分可包括润湿剂、乳化剂、抗氧化剂、膨胀剂、张力改性剂、螯合剂、金属离子、油质赋形剂、蛋白质(例如人血清白蛋白、明胶或蛋白质)和两性离子(例如诸如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸的氨基酸)。这些添加的组分当然不应该对本发明药物组合物的整体稳定性产生不利的作用。

[0096] 在一个实施方式中,在使用之前,医师或患者将溶剂和/或稀释剂加入其中,所述因子 VIII 衍生物是呈干燥的形式。“干燥的形式”是指所述液体药物组合物或制剂通过冷

冻干燥(即冻干;例如参见 Williams 和 Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38: 48-59)、喷雾干燥(参见 Masters (1991) 所著喷雾干燥手册(第 5 版;Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), 第 491-676 页; Broadhead 等人,(1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; 和 Mumenthaler 等人,(1994) Pharm. Res. 11:12-20)、或风干(Carpenter 和 Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; 和 Roser (1991) Biopharm. 4:47-53)加以干燥。

[0097] 治疗效用

本发明所述因子 VIII 衍生物通常在治疗遗传性出血紊乱血友病 A (典型的血友病)中是治疗上有用的。

[0098] 血友病 A 是由于染色体 X-连接的血液凝固因子 VIII 的缺乏而导致的、并绝大部分影响男性,发生率在每 10,000 人中有 1-2 人之间。血友病 A 的临床表现是出血可能性增加。

[0099] 因此,本发明所述因子 VIII 衍生物可用于缓解与血友病 A 相关的症状,或者中断这些症状进一步发展或恶化。通常,治疗是指减少患有血友病 A 的患者出血的可能性。

[0100] 所述方法包括向患有血友病 A 的患者给予治疗有效量的本发明因子 VIII 衍生物或药物组合物。本文所使用的“治疗有效量”包括那些能减少患有血友病 A 的患者出血的可能性的量。因此,所述用量应足以导致可察觉该疾病严重度的减轻,即通常是出现趋向减少。优选,本发明的因子 VIII 衍生物以每周一次的剂量给药方案的一部分。

[0101] 本发明的因子 VIII 衍生物可以多种剂型给药。因此,它们可通过非肠道给药、要么皮下、静脉内、肌内、胸骨内、经皮、或输注技术给药。还可以使用呈鼻腔或肺喷雾形式的因子 VIII 衍生物的溶液或混悬液通过鼻腔或肺喷雾给药所述因子 VIII 衍生物。经皮给药包括无针注射或使用贴片如离子电渗贴片。

[0102] 根据特定化合物的活性、待治疗患者的年龄、体重和状况、疾病的类型和严重程度以及给药的频率和途径,常规剂量是约 15-100 U/kg 体重,优选约 20-75 U/kg 体重,更优选约 25-50 U/kg 体重,最优选约 30-40 U/kg 体重。

[0103] 由下述实施例对本发明解释说明。

实施例

[0104] 在中间体的制备和实施例中制备并使用了下述缓冲溶液:

- 缓冲液 A:20mM 咪唑缓冲液, pH7.3, 含有 10mM CaCl_2 、0.02% 吐温 80, 1M 甘油和 0.15M NaCl;

- 缓冲液 B:20mM 咪唑缓冲液, pH7.3, 含有 10mM CaCl_2 、0.02% 吐温 80、1M 甘油和 0.5M NaCl;

- 缓冲液 C:20mM 咪唑缓冲液, pH7.3, 含有 10mM CaCl_2 、0.02% 吐温 80、1M 甘油;

- 缓冲液 D:20mM 咪唑缓冲液, pH7.3, 含有 10mM CaCl_2 、0.02% 吐温 80、1M 甘油和 1M NaCl。

[0105] - 缓冲液 E:100mM 咪唑缓冲液, pH 6.5, 含有 0.02% 吐温 80、10% v/v 甘油、10mM CaCl_2 ;

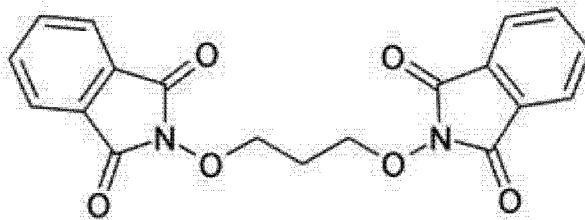
- 缓冲液 F:5% (w/v) 羟丙基 β -环糊精;和

- 缓冲液 G :100mM 咪唑缓冲液, pH6.5, 含有 0.02% 吐温 80、10% v/v 甘油、0.15M NaCl、10mM CaCl₂。

[0106] 中间体 1: 1,3-二氨基氧基丙烷



将 1,8-二氮杂双环 [5,4,0] 十一碳-7-烯 (7.9 ml, 53 mmol) 滴加到羟基苯邻二甲酰亚胺 (8.68 g, 53 mmol) 的 N,N-二甲基甲酰胺 (50 ml) 溶液中。加入 1,3-二溴丙烷 (2.7 g, 26 mmol)。在 85°C 搅拌该溶液 1 小时。将其冷却至室温并倒入冰 (200 ml) 上。搅拌该混合物。过滤分离所形成的沉淀并用冷水 (50 ml) 和冷乙腈 (50 ml) 洗涤。粗产物经丁醇 (150 ml) 重结晶,干燥得到 2.67 g 的 1,3-二-(1,3-二氧代-1,3-二氢异吲哚-2-基氧基)丙烷。



¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.22 (五重峰, 2 H); 4.51 (t, 4 H); 7.75 (m, 4 H); 7.82 (m, 2 H)。

[0107] 在 115°C 下将 1,3-二-(1,3-二氧代-1,3-二氢异吲哚-2-基氧基)丙烷 (2.5 g, 6.8 mmol) 在浓盐酸 (10 ml) 和乙酸 (15 ml) 中的混合物搅拌 3 小时。真空除去溶剂。加入水 (15 ml)。过滤分离沉淀。用 6 M 盐酸 (15 ml) 洗涤。粗产物经乙醇重结晶,得到 480 mg 1,3-二氨基氧基丙烷的盐酸盐。

[0108] ¹H-NMR (D₂O): δ 2.05 (五重峰, 2 H); 4.13 (t, 4 H)。

[0109] 中间体 2:用中间体 1 对因子 VIII 进行氨基交换得到 N^{Gln}-(3-氨基氧基丙氧基)因子 VIII

提供来自茂原链轮丝菌的微生物谷氨酰胺转移酶 (TGase) (购自味之素 (Ajinomoto)),其是含有 1% w/w 蛋白质的粉末。在缓冲液 A 中制成溶液 (11.4μM)。

[0110] 向缓冲液 A 溶液 (11.67ml) 中加入 B 结构域缺失的因子 VIII 化合物在缓冲液 B 中的溶液 (5.4mg/ml, 400μl),所述 B 结构域缺失的因子 VIII 化合物是具有序列为 SFSQNSRHP SQNPPVLKRHR 的肽与其重链的 C-末端连接的化合物。然后,加入 1,3-二氨基氧基丙烷 (中间体 1) 在缓冲液 A 中的溶液 (55mg/ml, 6.97ml)。加入 TGase 酶溶液 (11.4μM, 950μl) 开始反应。在 27°C 孵育反应混合物 4 小时。通过加入 N-乙基马来酰亚胺溶液 (15.6mg/ml 在缓冲液 A 中的溶液, 86μl) 中止该反应并在 27°C 孵育 10 分钟。

[0111] 通过如下离子交换纯化产物。将反应混合物稀释在缓冲液 C (104ml) 中,施加到已经用缓冲液 C 平衡的两个离子交换 Vivapure Q Maxi M 设备 (VivaScience 产品编号 VS-IX20QM08、Vivascience AG,德国) 上。在用相同缓冲液进行了两次洗涤步骤之后,用洗脱液—缓冲液 D (每个设备用 19ml) 洗脱反应产物。在 Amicon Ultra 设备 (截留分子量 50kDa) (Millipore 公司,美国) 超滤浓缩所得洗脱液至 1.3ml。

[0112] 通过在 280nm 测定吸收率 (E1%=14.6 Lg-1cm-1) 来评估蛋白质浓度 (Nanodrop

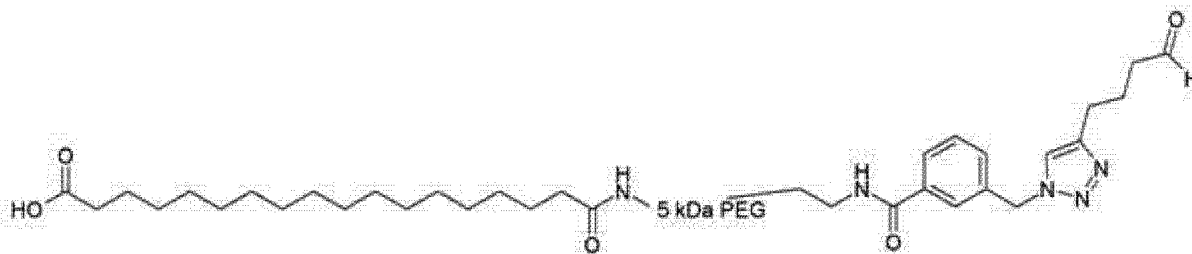
ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc, 美国), 估算得到的蛋白质回收率是 97%。

[0113] 该产物(中间体 2) 被原样用于下面的步骤。

[0114] 中间体 3-7: 醛的制备

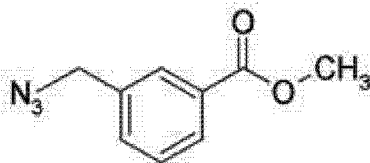
醛中间体使用如下多步合成制备。

[0115] 中间体 3: 7-((Ω -(2-(3-((4-(3-甲酰基丙基)-1,2,3-三唑-1-基)甲基)苯甲酰氨基)乙基)5 kDa PEG 基)氨基甲酰基)十七烷酸



[0116] 中间体 3 含有一个 PEG 基和一个 $-(\text{CH}_2)_{12}-$ 白蛋白连接子。

[0117] 步骤 1: 3-(叠氮甲基)苯甲酸甲酯

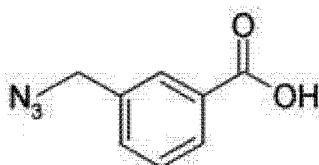


将叠氮化钠 (5.68 g, 87 mmol) 加入 3-(溴代甲基)苯甲酸甲酯 (5.00 g, 22 mmol) 的 *N,N*-二甲基甲酰胺 (50 ml) 溶液中。加入碘化四丁基铵 (81 mg, 0.22 mmol)。将反应混合物加热到 60°C, 保持 16 小时。将其冷却至室温并加入水 (200 ml)。混合物用乙酸乙酯 (400 ml) 萃取。有机层用水 (3 x 200 ml) 洗涤, 然后顺序地用硫酸钠干燥。真空除去溶剂, 得到 4.11 g 粗 3-(叠氮甲基)苯甲酸甲酯, 不必进一步纯化即使用。

[0118] MS : $m/z = 192$ 。

[0119] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 3.92 (s, 3 H); 4.40 (s, 2 H); 7.50 (m, 2 H); 8.00 (m, 2 H)。

[0120] 步骤 2: 3-(叠氮甲基)苯甲酸



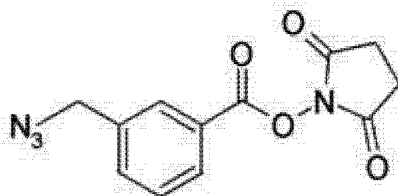
将氢氧化锂 (3.81 g, 21.5 mmol) 在水 (25 ml) 中的溶液加入粗 3-(叠氮甲基)苯甲酸甲酯 (4.11 g, 21.5 mmol) 的 1,4-二氧己环 (25 ml) 溶液中。加入水和 1,4-二氧己环直到得到清澈的溶液。在室温下搅拌反应混合物 16 小时。加入 1M 氢氧化钠水溶液 (100 ml)。用叔丁基甲基醚 (2 x 100 ml) 洗涤反应混合物。水相用 10% 硫酸氢钠水溶液酸化。用乙酸乙酯 (2 x 200 ml) 萃取之。合并乙酸乙酯相, 用硫酸镁干燥。真空除去溶剂, 得到 3.68 g 粗 3-(叠氮甲基)苯甲酸, 不必进一步纯化即使用。

[0121] MS : $m/z = 150$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 4.57 (s, 3 H); 7.55 (m, 2 H); 8.00 (m, 2 H); 13.10 (br,

1 H)。

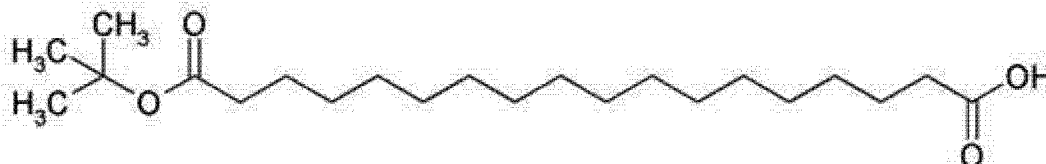
[0122] 步骤 3: 吡咯烷-2,5-二酮-1-基-3-(叠氮甲基)苯甲酸酯



将 2-琥珀酰亚胺基-1,1,3,3-四甲基脲鎓四氟硼酸盐 (TSTU, 32.52 g, 107 mmol) 加入 3-(叠氮甲基)苯甲酸 (19.01 g, 107 mmol) 和三乙胺 (14.96 ml, 107 mmol) 的 *N,N*-二甲基甲酰胺 (50 ml) 溶液中。在室温下搅拌反应混合物 16 小时。用乙酸乙酯 (250 ml) 稀释并用水 (3 x 120 ml) 洗涤。有机层用饱和碳酸氢钠水溶液 (150 ml) 洗涤,并用硫酸钠干燥。真空除去溶剂,得到 25.22 g 3-(叠氮甲基)苯甲酸吡咯烷-2,5-二酮-1-基酯。

[0123] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 2.92 (m, 4 H); 4.45 (s, 2 H); 7.55 (t, 1 H), 7.65 (d, 2 H); 8.10 (m, 2 H)。

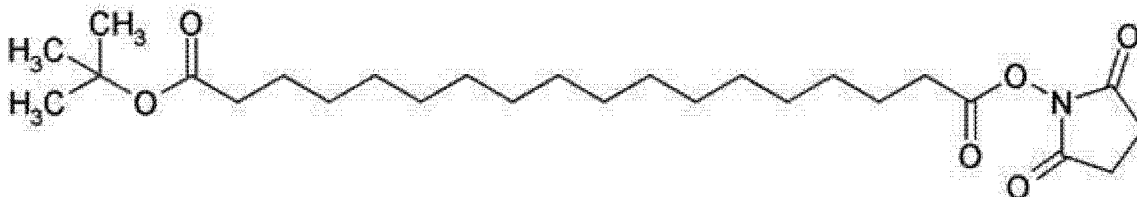
[0124] 步骤 4: 十八烷二酸单叔丁酯



将 *N,N*-二甲基甲酰胺二叔丁基缩醛 (35.2 ml, 147 mmol) 滴加到保持在 95°C 的十八烷二酸 (15.4 g, 49.0 mmol) 的甲苯溶液 (250 ml) 中。在 95°C 保持反应混合物 16 小时。冷却到室温。真空除去溶剂。残留物溶解于二氯甲烷 (150 ml) 中。真空除去溶剂。残留物溶解于二氯甲烷 (150 ml) 中。真空除去溶剂。残留物溶解于二氯甲烷 (150 ml) 中。真空除去溶剂。残留物溶解于二氯甲烷 (85 ml) 中。过滤除去不溶性物质。从滤液中真空除去溶剂。残留物溶解于二氯甲烷 (18 ml) 中。加入庚烷 (180 ml)。过滤除去形成的沉淀。真空除去溶剂。加入庚烷 (150 ml)。形成沉淀。过滤分离沉淀并真空干燥。从母液中真空除去溶剂。过滤分离形成的固体并真空干燥。合并两批分离的固体,并溶解于最可能少量的回流二氯甲烷中。将溶液冷却至室温。加入庚烷 (10 倍于二氯甲烷体积)。在 0°C 保持该混合物。过滤分离形成的沉淀,用庚烷 (30 ml) 洗涤,并真空干燥,得到 4.19 g 十八烷二酸单叔丁酯。

[0125] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 1.23 (m, 24 H); 1.39 (s, 9 H); 1.47 (m, 4 H); 2.16 (m, 4 H)。

[0126] 步骤 5: 十八烷二酸叔丁酯 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯



将 2-琥珀酰亚胺基-1,1,3,3-四甲基脲鎓四氟硼酸盐 (TSTU, 378 mg, 0.71 mmol) 加入到十八烷二酸单叔丁酯 (300 mg, 0.64 mmol) 的二氯甲烷 (10 ml) 溶液中。向反应

混合物中加入乙基二异丙基胺 (0.152 ml, 0.71 mmol)。在室温下搅拌 3 天。用 10% 硫酸氢钠水溶液 (2 x 10 ml)、饱和碳酸氢钠水溶液 (10 ml) 和最后用盐水 (10 ml) 洗涤。有机层用硫酸镁干燥。真空除去溶剂, 得到十八烷二酸叔丁酯 2,5- 二氧化吡咯烷-1-基酯, 不必进一步纯化即使用。

[0127] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1.20-1.65 (m, 26 H); 1.44 (s, 9 H); 1.74 (五重峰, 2 H); 2.20 (t, 2 H); 2.60 (t, 2 H); 2.84 (m, 4 H)。

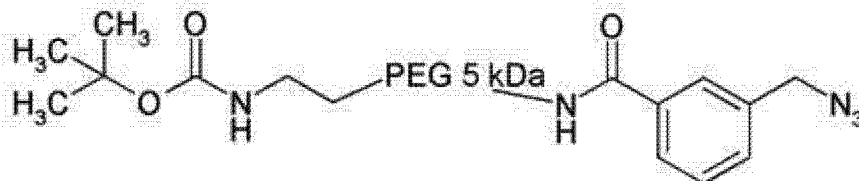
[0128] 步骤 6: 己-5-炔醛



将二甲亚砜 (0.13 ml, 2 mmol) 溶液冷却到 -78°C 。向该溶液中加入草酰氯 (0.12 ml, 1.38 mmol) 的二氯甲烷 (1 ml) 溶液。在 -78°C 搅拌该混合物 20 分钟。向该溶液中加入己-5-炔-1-醇 (0.10 ml, 0.922 mmol) 的二氯甲烷 (0.5 ml) 溶液。在 -78°C 搅拌该混合物 20 分钟。加入三乙胺 (0.51 ml, 3.69 mmol)。在 -78°C 搅拌反应混合物 10 分钟。让该溶液升温至室温。用乙酸乙酯 (40 ml) 稀释, 并用 10% 硫酸氢钠水溶液 (2 x 20 ml) 洗涤。有机层用盐水 (20 ml) 洗涤, 并用硫酸镁干燥。真空除去溶剂, 得到己-5-炔醛

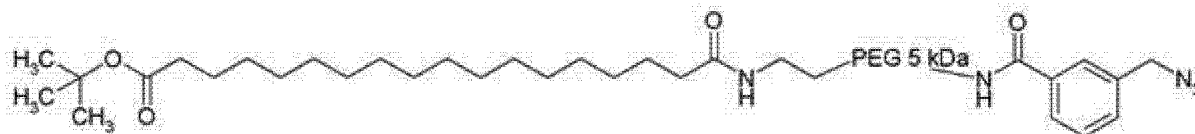
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1.86 (五重峰, 2 H); 2.27 (t, 2 H); 2.62 (t, 2 H), 9.81 (s, 1 H)。

[0129] 步骤 7: 3-(叠氮甲基)-N-(Ω -(2-(叔丁氧羰基氨基)乙基) 5 kDa PEG 基) 苯甲酰胺



将 3-(叠氮甲基) 苯甲酸吡咯烷-2,5-二酮-1-基酯 (64 mg, 0.234 mmol) 和乙基二异丙基胺 (0.10 ml, 0.585 mmol) 依次加入商购的 2-(Ω -(氨基) 5 kDa PEG 基) 乙基氨基甲酸叔丁酯 (例如 Rapp, 1.00 g, 0.195 mmol) 溶液中。在室温下搅拌反应混合物 16 小时。真空除去溶剂。加入醚 (20 ml)。过滤分离形成的沉淀, 并真空干燥得到 3-(叠氮甲基)-N-(Ω -(2-(叔丁氧羰基氨基)乙基) 5 kDa PEG 基) 苯甲酰胺。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 中) 满足预期值。

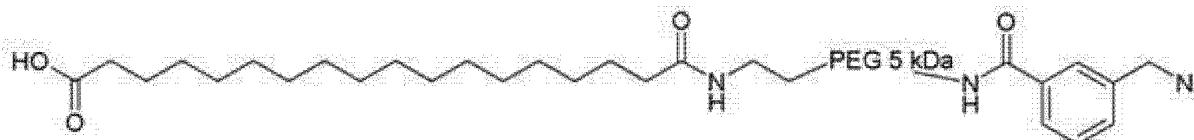
[0130] Step 8: 17-(2-(Ω -(3-(叠氮甲基) 苯甲酰氨基) 5 kDa PEG 基) 乙基氨基甲酰基) 十七烷酸叔丁酯



将三氟乙酸 (5 ml) 加入 3-(叠氮甲基)-N-(Ω -(2-(叔丁氧羰基氨基)乙基) 5 kDa PEG 基) 苯甲酰胺 (1.03 g, 0.19 mmol) 的二氯甲烷 (5 ml) 溶液中。在室温下搅拌反应混合物 15 分钟。真空除去溶剂。将残留物溶于二氯甲烷 (10 ml) 中。真空除去溶剂。将残留物溶于二氯甲烷 (10 ml) 中。真空除去溶剂。将残留物溶于二氯甲烷 (10 ml) 中。真空

除去溶剂。将残留物溶于二氯甲烷 (10 ml) 中。依次加入十八烷二酸叔丁酯 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯 (90 mg, 0.243 mmol) 的二氯甲烷 (5 ml) 溶液和乙基二异丙基胺 (0.83 ml, 4.86 mmol)。在室温下搅拌反应混合物 16 小时。用二氯甲烷 (40 ml) 稀释并用 10% 硫酸氢钠水溶液 (2 x 30 ml) 和盐水 (30 ml) 洗涤。溶液用硫酸镁干燥。真空除去溶剂。用醚 (30 ml) 处理留下的油质。过滤分离形成的固体。用醚 (10 ml) 洗涤并真空干燥, 得到 783 mg 17-(2-(Ω -3-(叠氮甲基)苯甲酰氨基)5 kDa PEG 基)乙基氨基甲酰基)十七烷酸叔丁酯。¹H-NMR (CDCl₃ 中) 满足预期值。

[0131] 步骤 9: 17-(2-(Ω -3-(叠氮甲基)苯甲酰氨基)5 kDa PEG 基)乙基氨基甲酰基)十七烷酸



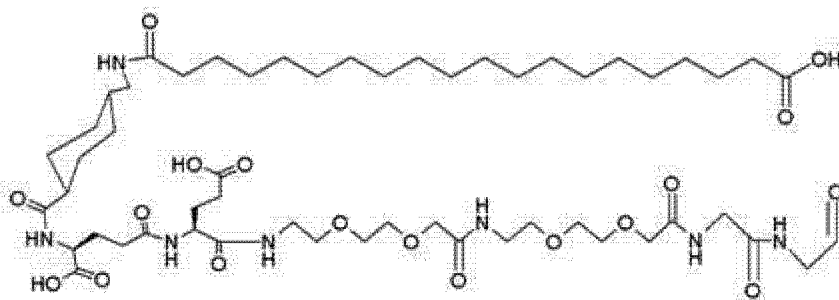
将三氟乙酸 (5 ml) 加入 17-(2-(Ω -3-(叠氮甲基)苯甲酰氨基)5 kDa PEG 基)乙基氨基甲酰基)十七烷酸叔丁酯 (500 mg, 0.09 mmol) 的二氯甲烷 (5 ml) 溶液中。在室温下搅拌反应混合物 45 分钟。真空除去溶剂。将残留物溶于二氯甲烷 (25 ml) 中。依次用饱和碳酸氢钠水溶液 (25 ml) 和盐水 (25 ml) 洗涤。有机层用硫酸镁干燥。真空除去溶剂, 得到 17-(2-(Ω -3-(叠氮甲基)苯甲酰氨基)5 kDa PEG 基)乙基氨基甲酰基)十七烷酸。

[0132] 步骤 10: 17-((Ω -2-(3-((4-(3-甲酰基丙基)-1,2,3-三唑-1-基)甲基)苯甲酰氨基)乙基)5 kDa PEG 基)氨基甲酰基)十七烷酸 (中间体 3)

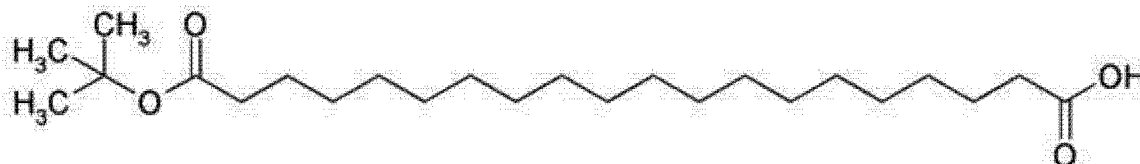
将 17-(2-(Ω -3-(叠氮甲基)苯甲酰氨基)5 kDa PEG 基)乙基氨基甲酰基)十七烷酸 (200 mg, 0.036 mmol) 溶解于由 2% 2,6-二甲基吡啶在水 (3.5 ml) 中组成的缓冲液中。加入己-5-炔醛 (70 mg, 0.725 mmol) 的乙醇 (0.5 ml) 溶液。将硫酸铜 (II) 五水合物 (180 mg) 的水 (2.50 ml) 溶液加入抗坏血酸 (638 mg, 3.626 mmol) 在水 (2.5 ml) 和 2,6-二甲基吡啶 (0.125 ml) 的混合物中的溶液中。在室温下保持该溶液 45 秒, 然后将其加入 17-(2-(Ω -3-(叠氮甲基)苯甲酰氨基)5 kDa PEG 基)乙基氨基甲酰基)十七烷酸和己炔醛的溶液中。在室温下搅拌反应混合物 16 小时。用水 (25 ml) 稀释并用二氯甲烷 (2 x 100 ml) 萃取。二氯甲烷相用 10% 硫酸氢钠水溶液 (2 x 100 ml) 和盐水 (100 ml) 洗涤。用硫酸镁干燥。真空除去溶剂。加入醚 (30 ml)。过滤分离形成的沉淀。将其再次溶解在 50 mM 碳酸氢钠水溶液中 (5 ml), 过滤并经凝胶色谱处理, 使用 HiPrep 26/10 脱盐柱 (GE Healthcare) 和 50 mM 碳酸氢铵缓冲液。收集含有所需物质的级分, 冻干, 得到 17-((Ω -2-(3-((4-(3-甲酰基丙基)-1,2,3-三唑-1-基)甲基)苯甲酰氨基)乙基)5 kDa PEG 基)氨基甲酰基)十七烷酸 (中间体 3)。

[0133] ¹H-NMR 分析显示大约有 10% 的所需醛 (中间体 3)。

[0134] 中间体 4: 19-(((反式-4-((S)-3-((S)-1-(2-(2-((2-(2-(1-(甲酰基甲基氨基甲酰基)甲基氨基甲酰基)甲氧基)乙氧基)乙基氨基甲酰基)甲氧基)乙氧基)乙基氨基甲酰基)-3-羧基丙基氨基甲酰基)-1-羧基丙基氨基甲酰基)环己基)甲基)氨基甲酰基)十九烷酸



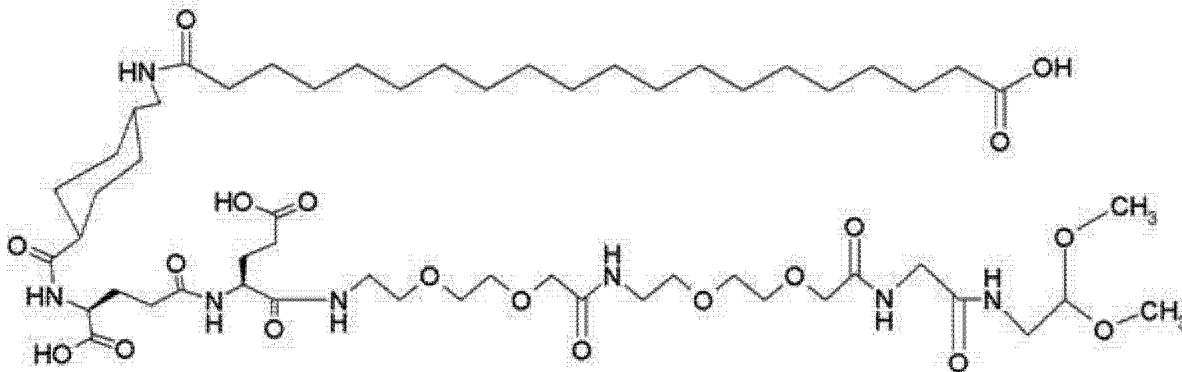
[0135] 步骤 1: 二十烷二酸单叔丁酯



在 115°C 将二十烷二酸 (10 g, 29 mmol) 溶解于甲苯中。将该溶液保持在该温度, 同时用 1 小时滴加 N,N-二甲基甲酰胺二叔丁缩醛。在 115°C 搅拌反应混合物 16 小时。冷却到 0°C。过滤除去形成的沉淀。从滤液中除去溶剂, 得到 7.49 g 二十烷二酸单叔丁酯。

[0136] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.25 (m, 28 H); 1.44 (s, 9 H); 1.59 (m, 4 H); 2.20 (t, 2 H); 2.34 (t, 2 H)。

[0137] 步骤 2: 19-((((反式-4-((S)-3-((S)-1-(2-(2-((2-(2-(((2,2-二甲氧基乙基氨基甲酰基)甲基氨基甲酰基)甲氧基)乙氧基)乙基氨基甲酰基)甲氧基)乙氧基)乙基氨基甲酰基)-3-羧基丙基氨基甲酰基)-1-羧基丙基氨基甲酰基)环己基)甲基)氨基甲酰基)十九烷酸



用三氟乙酸 (10 ml) 简单处理商购的树脂 Boc-Gly-PAM 树脂 (例如 Fluka, 0.25 mmol)。除去溶剂并用 N,N-二甲基甲酰胺 (3 x 10 ml) 洗涤树脂。将该树脂转移到 ABI433 肽合成仪上。在下述偶联标准程序中使用 1-羟基苯并三唑 / 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐作为偶联剂。以下述顺序使用下述酸 (各自为 1 mmol):

- FmocNH-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-COOH
- FmocNH-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-COOH
- Fmoc-Glu(OtBu)-OH
- Fmoc-Glu(OH)-OtBu
- Fmoc-抗血纤溶环酸

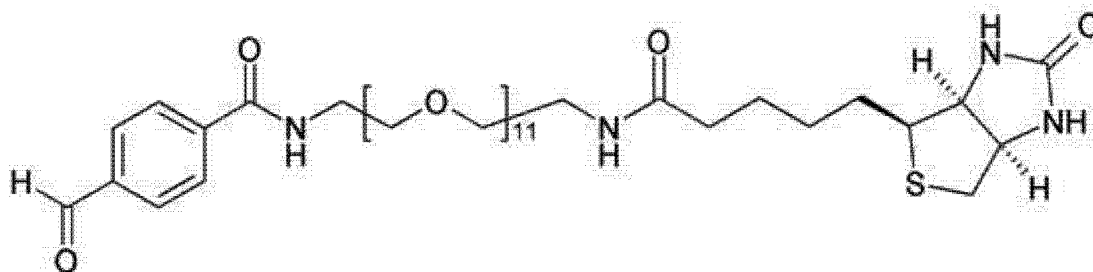
• 二十烷二酸单叔丁酯

然后用三氟乙酸 (2 ml)、三异丙基甲硅烷 (0.050 ml) 和水 (0.050 ml) 的混合物处理树脂 1 小时。除去溶剂。在 45°C 用氯仿和氨基乙醛缩二甲醇的混合物 (比例为 3:2) (2 ml) 处理树脂 20 小时。过滤除去树脂。从滤液中真空除去溶剂。将残留物溶解于 50% 乙腈水溶液中。加入几滴乙酸直到获得微酸性的溶液。用 HPLC 纯化肽, 40-60% 乙腈水溶液梯度洗脱, 其中两种溶剂均用 0.1% 三氟乙酸缓冲。最后冻干分离所得肽。

[0138] 步骤 3: 19-(((反式-4-((S)-3-((S)-1-(2-(2-((2-(2-(1-(甲酰基甲基氨基甲酰基)乙基氨基甲酰基)甲氧基)乙氧基)乙基氨基甲酰基)甲氧基)乙氧基)乙基氨基甲酰基)-3-羧基丙基氨基甲酰基)-1-羧基丙基氨基甲酰基)环己基)甲基)氨基甲酰基)十九烷酸

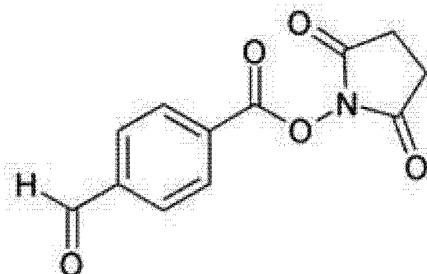
根据 Lelièvre 等, Tetr. Lett. 39 (1998), 9675 所述, 用 TFA 处理得到醛。简要说, 就是用 TFA (50 μ l) 在室温下处理所述二甲缩醛 [19-(((反式-4-((S)-3-((S)-1-(2-(2-((2-(2-((2, 2-二甲氧基乙基氨基甲酰基)甲基氨基甲酰基)甲氧基)乙氧基)乙基氨基甲酰基)甲氧基)乙氧基)乙基氨基甲酰基)-3-羧基丙基氨基甲酰基)-1-羧基丙基氨基甲酰基)环己基)甲基)氨基甲酰基)十九烷酸] (2mg) 6 分钟, 然后真空蒸发干燥。通过加入 EtOH (50 μ l) 并真空蒸发 (重复 3 次) 除去残留的 TFA。将获得的产物溶解于 5% (w/v) 羟丙基 β -环糊精中并立即用于与 N^{61n} -(3-(氨基氧基)丙氧基) FVIII (中间体 2) 偶联。

[0139] 中间体 5: *N*-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(生物素基氨基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-4-甲酰基苯甲酰胺



中间体 5 含有生物素报告子部分 (reporter moieties)。

[0140] 步骤 1: 4-甲酰基苯甲酸 2, 5-二氧代吡咯烷-1-基酯

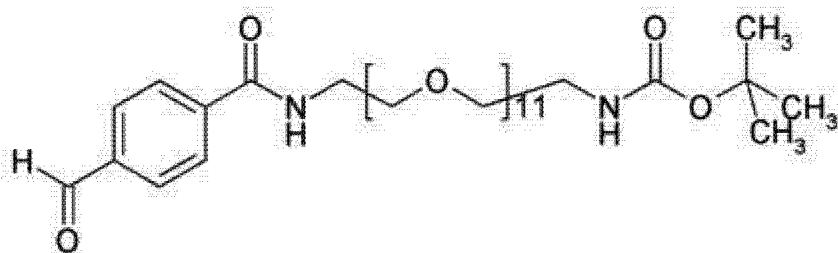


将三乙胺 (2.04 ml, 14.65 mmol) 和 2-琥珀酰亚胺基-1,1,3,3-四甲基脲鎓四氟硼酸盐 (TSTU, 4.44 g, 14.65 mmol) 依次加入 4-甲酰基苯甲酸 (2.0 g, 13.3 mmol) 的 *N,N*-二甲基甲酰胺 (30 ml) 溶液中。在室温下搅拌反应混合物 16 小时。用乙酸乙酯 (150 ml) 稀释, 用 10% 硫酸氢钠水溶液 (100 ml) 洗涤。水相用乙酸乙酯 (2 x 30 ml) 萃取。合

并有机相,用盐水 (50 ml) 和水 (50 ml) 的混合物洗涤。合并的有机相用硫酸镁干燥。真空除去溶剂。粗产物经乙酸乙酯重结晶,得到 1.89 g 4-甲酰基苯甲酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯。

[0141] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 2.95 (s, 4 H); 8.04 (d, 2 H), 8.32 (d, 2 H); 10.15 (s, 1 H)。

[0142] 步骤 2: *N*-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(叔丁氧羰基氨基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-4-甲酰基苯甲酰胺

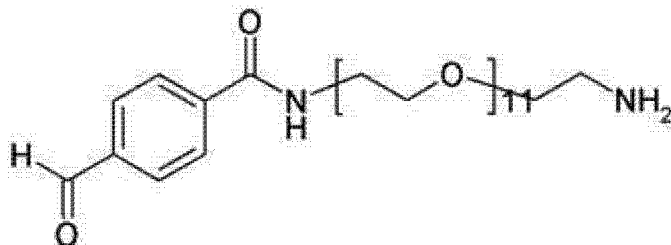


将 4-甲酰基苯甲酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯 (0.767 g, 3.11 mmol) 加入商购的 2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(叔氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基氨基甲酸叔丁酯 (例如 Fluka, 2.0 g, 3.11 mmol) 和乙基二异丙基胺 (0.64 ml, 3.72 mmol) 的二氯甲烷 (30 ml) 溶液中。在室温下搅拌反应混合物 16 小时。用二氯甲烷 (70 ml) 稀释反应混合物。用 10% 硫酸氢钠水溶液 (100 ml) 洗涤。水相用二氯甲烷 (2 x 30 ml) 萃取。合并有机层,用饱和碳酸氢钠水溶液 (70 ml) 洗涤。用硫酸镁干燥。真空除去溶剂,得到 2.15 g 粗 *N*-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(叔丁氧羰基氨基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-4-甲酰基苯甲酰胺,不必进一步纯化用于下面的步骤。

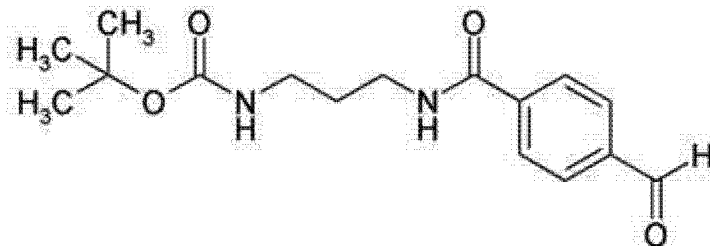
[0143] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.46 (s, 9 H); 3.33 (m, 2 H); 3.54-3.75 (m, 46 H); 5.08 (br, 1 H); 7.20 (br, 1 H); 7.97 (d, 2 H); 8.03 (d, 2 H); 10.10 (s, 1 H)。

[0144] MS: $m/z = 799, 677$, 理论值 $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 799, 理论值 $[\text{M}+1-\text{Boc}]^+$: 677。

[0145] 步骤 3: *N*-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(氨基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-4-甲酰基苯甲酰胺



将三氟乙酸 (15 ml) 加入粗 *N*-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(叔丁氧羰基氨基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-4-甲酰基苯甲酰胺 (2.15 g, 2.77 mmol) 的二氯甲烷 (15 ml) 溶液中。在室温下搅拌反应混合物 75 分钟。真空除去溶剂。将残留物溶于二氯甲烷 (30

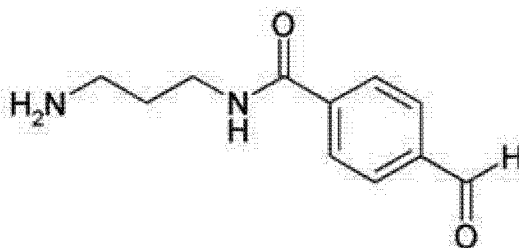
N-[3-(叔丁氧羰基氨基)丙基]-4-甲酰基苯甲酰胺

将 4-甲酰基苯甲酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯 (1.56 g, 6.31 mmol) 加入市售的 3-氨基丙基氨基甲酸叔丁酯 (1.10 ml, 6.31 mmol) 和乙基二异丙基胺 (2.16 ml, 12.62 mmol) 的二氯甲烷 (25 ml) 溶液中。在室温下搅拌反应混合物 24 小时。加入二氯甲烷 (100 ml)。用 10% 硫酸氢钠水溶液 (70 ml) 洗涤混合物。水相用二氯甲烷 (50 ml) 萃取。合并的有机层用盐水 (100 ml) 洗涤并用硫酸镁干燥。真空除去溶剂。所述物质经快速硅胶层析 (90 g) 纯化, 使用乙酸乙酯/庚烷 (3:1) 的混合物作为洗脱液, 得到 1.05 g *N*-[3-(叔丁氧羰基氨基)丙基]-4-甲酰基苯甲酰胺。

[0175] MS : m/z = 329, 理论值 $[M+Na]^+$:329。

[0176] 1H -NMR ($CDCl_3$) : δ 1.46 (s, 9 H); 1.75 (五重峰, 2 H); 3.28 (t, 2 H); 3.54 (t, 2 H); 4.84 (br, 1 H); 7.60 (br, 1 H); 7.96 (d, 2 H); 8.03 (d, 2 H); 10.09 (s, 1 H)。

[0177] 步骤 2:

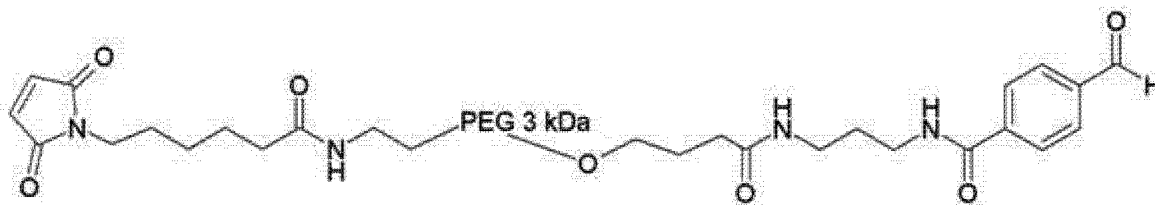
N-[3-氨基丙基]-4-甲酰基苯甲酰胺

将三氟乙酸 (10 ml) 加入 *N*-[3-(叔丁氧羰基氨基)丙基]-4-甲酰基苯甲酰胺 (1.1 g, 3.43 mmol) 的二氯甲烷 (10 ml) 溶液中。在室温下搅拌反应混合物 1.5 小时。真空除去溶剂。将残留物再次溶于二氯甲烷 (50 ml) 中。真空除去溶剂。将残留物再次溶于二氯甲烷 (50 ml) 中。真空除去溶剂。将残留物再次溶于二氯甲烷 (50 ml) 中。真空除去溶剂, 得到 1.76 g 的 *N*-[3-氨基丙基]-4-甲酰基苯甲酰胺的三氟乙酸盐。

[0178] 1H -NMR ($CDCl_3$) : δ 1.46 (s, 9 H); 2.07 (br, 2 H); 3.71 (q, 2 H), 4.20 (br, 2 H); 7.95 (d, 2 H); 8.01 (d, 2 H); 10.11 (s, 1 H)。

[0179] 步骤 3:

N-(3-(ω -(2-(5-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)己酰氨基)乙基)3 kDa PEG 基乙酰基氨基)丙基)-4-甲酰基苯甲酰胺



将*N*-[3-氨基丙基]-4-甲酰基苯甲酰胺的三氟乙酸盐 (57 mg, 0.178 mmol) 加入市售的 (例如 Rapp Polymere GmbH, 德国) (ω -(2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)己酰氨基)乙基)3 kDa PEG 基)乙酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯 (500 mg, 0.149 mmol) 的二氯甲烷 (4 ml) 溶液中。加入乙基二异丙基胺 (0.893 ml, 5.25 mmol)。使用 pH 试纸条检查 pH 在大约 pH 10-11。搅拌反应混合物 1 小时。加入乙醚 (70 ml)。为了使形成的沉淀老化,将该混合物在室温下静置 1 小时。过滤分离沉淀。将其悬浮于乙醚 (50 ml) 中。过滤分离沉淀,得到 475 mg 的*N*-(3-(ω -(2-(5-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)己酰氨基)乙基)3 kDa PEG 基)乙酰基氨基)丙基)-4-甲酰基苯甲酰胺。与所期望的产物对应,¹H-NMR 谱(CDCl₃)显示了存在马来酰亚胺基和对位取代的芳香环和醛基。

[0180] 步骤 4:

将*N*-(3-(ω -(2-(5-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)己酰氨基)乙基)3 kDa PEG 基)乙酰基氨基)丙基)-4-甲酰基苯甲酰胺 (1.6 mg, 452 nmol) 在缓冲液 (1.6 ml, 所述缓冲液由 25 mM HEPES 组成,已加入 1N 氢氧化钠调节 pH 至 7.00) 中的溶液加入具有游离半胱氨酸的重组人血清白蛋白 (hSA, 15 mg, 226 nmol) 的缓冲液 (13.4 ml, 所述缓冲液由 25 mM HEPES 组成,已加入 1N 氢氧化钠调节 pH 至 7.00) 溶液中。在 20-22°C 和 300 rpm 下轻微震荡反应混合物 16 小时。将该物质加入 Amicon 超速离心设备 (截留分子量 10 kDa) 中。加入由 25 mM TRIS 组成的缓冲液 (15 ml) (该缓冲液中已加入 1 N 盐酸调节 pH 至 8.00)。在 4000 rpm 下离心该溶液 10 分钟。加入由 25 mM TRIS 组成的缓冲液 (15 ml) (该缓冲液中已加入 1 N 盐酸调节 pH 至 8.00)。在 4000 rpm 下离心该溶液 10 分钟。用 MonoQ 柱对该物质进行阴离子交换层析,柱床大小为约 8 ml,使用 0-75% 的由 25 mM TRIS 和 2 M NaCl 组成的已调 pH 为 8.00 的缓冲液在由 25 mM TRIS 组成的已调 pH 为 8.00 的缓冲液梯度洗脱 30CV,流速为 4 ml/分钟。往柱中上样的流速为 0.5 ml/分钟。合并含有与 C³⁴-(1-(5-(2-(ω -(3-(4-(甲酰基)苯甲酰氨基)丙基氨基甲酰基甲基)3 kDa PEG 基)乙基氨基甲酰基)戊基)2,5-二氧代吡咯烷-3-基)白蛋白相结合的 SDS-PAGE 分析的馏分。再将合并的馏分进行尺寸排阻色谱,使用 53 ml 的 Superdex G25 材料和由 25 mM 碳酸氢铵组成的缓冲液,流速为 7 ml/分钟。收集、合并以及冻干与 C³⁴-(1-(5-(2-(ω -(3-(4-(甲酰基)苯甲酰氨基)丙基氨基甲酰基甲基)3 kDa PEG 基)乙基氨基甲酰基)戊基)2,5-二氧代吡咯烷-3-基)白蛋白相符合的 SDS-PAGE 分析馏分,得到 0.803 mg 标题化合物。使用 Nanodrop 光度计在 280 nm 利用分子吸收率 4.11 测定产率。

[0181] N^{Gln}-(3-氨基氧基丙氧基)因子 VIII (中间体 2) 与醛(中间体 3, 4, 5, 6, 7, 8 和 9) 的反应

如上制备的中间体 2 与许多醛在脎化反应中反应,形成因子 VIII 衍生物。

[0182] 实施例 1 - 中间体 2 与 3-(mPEG 基)丙醛进行脎化反应得到 N^{Gln}-(3-(3-(mPEG 基)-亚丙基氨基氧基)丙氧基)FVIII

所述 mPEG 基是多分散的,并且分子量大约是 20kDa。制备了下述溶液:

- 中间体 2 溶液:1.74mg/ml 在缓冲液 D 中;
- 3-(mPEG 基)丙醛 (20kDa) ($\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ ME-200AL 来自 NOF):12.9mg/ml 在缓冲液 E 中;和
- 4-羟基苯甲醛 (MW=122.13)。溶液:13.8mg/ml 在缓冲液 E 中。

[0183] 向中间体 2 (77.6 μl , 135 μg) 的溶液中加入缓冲液 E (2.4 μl) 和 3-(mPEG 基)丙醛在缓冲液 E (595 μl , 7.7mg) 中的溶液。在 25 $^\circ\text{C}$ 孵育反应混合物 3 小时。然后加入 4-羟基苯甲醛溶液 (32.8 μl , 453 μg) (对未反应的羟基胺部分进行覆盖(capping))。在 25 $^\circ\text{C}$ 再孵育反应混合物 3 小时。

[0184] 通过如下离子交换纯化产物。将反应混合物在缓冲液 C 中稀释 8 倍,然后上样至已经用缓冲液 C 平衡的两个离子交换 Vivapure Q Maxi M 设备(VivaScience 产品编号 VS-IX01QM24、Vivascience AG,德国)。在用相同缓冲液进行了两次洗涤步骤之后,用洗脱缓冲液 D 洗脱反应产物。

[0185] 通过测定在 280nm 的吸收率 ($E_{1\%}^{1\text{cm}}=14.6 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 来测定蛋白质浓度(Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc, 美国),得到估算的蛋白质回收率是 83%。

[0186] 根据产品使用说明,使用 NuPage 7% Tris-醋酸盐凝胶 (Invitrogen EA03555BOX),将该产物进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(150V 下电泳 70 分钟)。所述凝胶是银着色的 (Invitrogen LC6070)。标准蛋白质来自 Invitrogen (HiMark HMW Standard LC5688)。

[0187] SDS 凝胶显示重链大多数被大量地修饰了。如预期的,出现了较高分子量的多条泳带。最高分子量的泳带出现在约 400kDa。

[0188] 将产物进行凝血酶消化:

将凝血酶 (人凝血酶, Roche diagnostica) 按 20U/ml 溶解于 H_2O 中,然后在缓冲液 A 中再一步稀释至 2U/ml。向实施例 1 产物 (2.9 μl , 1.2 μg) 溶液中加入缓冲液 A (8.9 μl) 和所述凝血酶溶液 (0.24 μl)。在 37 $^\circ\text{C}$ 孵育反应混合物 15 分钟。用凝血酶消化 FVIII 进行平行实验。用 HPLC (Zorbax 300SB-C18, 0.21x15cm, 5 μ) 分析反应混合物,洗脱液是 A:0.1% TFA 的水溶液,和 B:0.07% TFA 的乙腈溶液。流速为 0.2ml/分钟,温度为 40 $^\circ\text{C}$ 。按照如下梯度进行:2 分钟内 0-15%,21 分钟内 15-80%,10 分钟内 80-100%B。在 UV ($\lambda=280\text{nm}$) 下进行检测。

[0189] 所得色谱图显示与凝血酶消化的 FVIII 中的 A1 结构域相对应的峰(蓝线)在凝血酶消化的实施例 1 的 peg 化 (pegylated) 的 FVIII 中几乎完全消失了。因此,A1 结构域的确是强烈地被修饰了。

[0190] 实施例 2 - 中间体 2 与中间体 3 进行脎化反应得到 $\text{N}^{\text{Gln}}\text{-}(3\text{-}(4\text{-}(1\text{-}(3\text{-}((\Omega\text{-}(17\text{-}(\text{羧基})\text{十七烷酰氨基})5 \text{ kDa PEG 基})\text{氨基甲酰基})\text{苄基})1,2,3\text{-三唑-4-基})\text{亚丁基氨基氧基})\text{丙氧基})\text{FVIII}$

制备了下述溶液:

- 中间体 2:2.36mg/ml 在缓冲液 D 中;
- 中间体 3 (MW:5600):1.79mM 在缓冲液 E 中;
- 4-羟基苯甲醛溶液:17.3mg/ml 在缓冲液 E 中;和

- 甲氧基胺盐酸盐 :11mg/ml 在缓冲液 E 中。

[0191] 向中间体 3 (500 μ l, 848nmoles) 在缓冲液 E 中的溶液中加入缓冲液 E (644.3 μ l) 和中间体 2 在缓冲液 E 中的溶液 (105.9 μ l, 250 μ g)。在 25 $^{\circ}$ C 孵育反应混合物 3 小时。然后加入 4-羟基苯甲醛溶液 (50 μ l, 865 μ g) (对未反应的羟基胺部分进行覆盖)。在 25 $^{\circ}$ C 再孵育反应混合物 1 小时。加入甲氧基胺盐酸盐 (62.5 μ l, 687 μ g) 淬灭过量的醛。在 25 $^{\circ}$ C 再孵育反应混合物 30 分钟。

[0192] 通过如下离子交换纯化产物。通过依次稀释(用缓冲液 C)和用 Amicon Ultra 设备 (截留分子量 50kDa) (Millipore Corp., 美国) 浓缩步骤将盐浓度降低至低于 25mM 盐浓度。然后将所得溶液上样至已经用缓冲液 C 预先平衡的两个离子交换 Vivapure Q Maxi M 设备 (VivaScience 产品编号 VS-IX01QM24、Vivascience AG, 德国)。在用相同缓冲液进行了两次洗涤步骤之后,用洗脱缓冲液 D 洗脱反应产物。

[0193] 通过测定在 280nm 的吸收率 ($E_{1\%}^{1\text{cm}}=14.6 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 来估计蛋白质浓度 (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc, 美国), 得到估算的蛋白质回收率是 73%。

[0194] 根据产品使用说明, 使用 NuPage 7% Tris- 醋酸盐凝胶 (Invitrogen EA03555BOX), 将该产物进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (150V 下电泳 70 分钟)。所述凝胶是银着色的 (Invitrogen LC6070)。标准蛋白质来自 Invitrogen (HiMark HMW Standard LC5688)。

[0195] SDS 凝胶显示重链再次大多数被大量地修饰了。出现了较高分子量的多条泳带。最高分子量的泳带出现在约 120kDa。

[0196] 该产物还在 Vydac C4 (0.21x5cm, 5 μ (Vydac n $^{\circ}$:214TP5205)) 上进行了 HPLC。

[0197] 洗脱液是 A :0.1% TFA 的水溶液, 和 B :0.07% TFA 的乙腈溶液。流速为 0.2ml/分钟, 温度为 40 $^{\circ}$ C。按照如下梯度进行 :3 分钟内 30-40%, 60 分钟内 40-50%, 12.5 分钟内 50-100%B。在 UV ($\lambda=280\text{nm}$) 和荧光 ($\lambda_{\text{Exc}}=280\text{nm}$, $\lambda_{\text{Em}}=348\text{nm}$) 下进行检测。

[0198] 所得色谱图证实了重链的确是**被最强地修饰了**。

[0199] 实施例 3 - 中间体 2 与中间体 4 的脎作用化

制备了下述溶液 :

- 中间体 2 :2.36mg/ml 在缓冲液 D 中
- 中间体 4 (MW= 122.1) :5.55mg/ml
- 甲基羟基胺盐酸盐 (MW=83.5) :10.2mg/ml 在缓冲液 E 中

混合中间体 2 溶液 (106.7 μ l, 250 μ g) 和上述获得的醛试剂中间体 4 溶液 (1.144ml, 833.8 μ g) 并在 25 $^{\circ}$ C 孵育 3 小时。通过加入 4-羟基苯甲醛溶液 (63 μ l, 350 μ g) 对可能残留的游离氨基氧基进行覆盖, 然后在 25 $^{\circ}$ C 孵育所得混合物 1 小时。加入甲基羟基胺盐酸盐 (62.5 μ l, 638 μ g) 淬灭过量的醛。在 25 $^{\circ}$ C 再孵育反应混合物 30 分钟。

[0200] 通过如下离子交换纯化产物。加入缓冲液 C (9.625ml) 稀释反应混合物。将所得溶液上样至已经用缓冲液 C 预先平衡的两个离子交换 Vivapure Q Maxi M 设备 (VivaScience 产品编号 VS-IX20QM08、Vivascience AG, 德国)。在用相同缓冲液进行了两次洗涤步骤之后,用洗脱缓冲液 D 洗脱反应产物。

[0201] 通过测定在 280nm 的吸收率 ($E_{1\%}^{1\text{cm}}=14.6 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 来评估蛋白质浓度 (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc, 美国), 得到估算的蛋白质回收率是 96%。

银着色的(Invitrogen LC 6070)。标准蛋白质来自 Invitrogen (HiMark HMW Standard LC5688)。

[0221] FVIII 的重链再次被最强地修饰,所述多聚乙酰神经氨酸 -FVIII 共轭物用 SDS 凝胶鉴定,表现为 93- 约 140kD 间的宽且散布的泳带。

[0222] 实施例 8:中间体 2 与中间体 9 进行脲化反应

向中间体 2 (210 μ g, 1.42nmole) 的缓冲液 E (44 μ l) 溶液中加入 C³⁴-(1-(5-(2-(ω -(3-(4-(甲酰基)苯甲酰氨基)丙基氨基甲酰基甲基)3 kDa PEG 基)乙基氨基甲酰基)戊基)2,5- 二氧化吡咯烷 -3- 基)白蛋白 (100 μ g, 1.41nmole) 在缓冲液 E (10 μ l) 中的溶液。加入 0.3M 苯胺在缓冲液 E 中的溶液 (2 μ l)。在 30 $^{\circ}$ C 孵育反应过夜。

[0223] 通过加入 4- 羟基苯甲醛 (1.46 μ g)(在水 (2 μ l) 中)淬灭过量的中间体 2。在 30 $^{\circ}$ C 静置该混合物 1 小时。

[0224] 用缓冲液 C 按 1:11 (v/v) 稀释该混合物,然后通过 VivaPure Q mini M (Vivascience) 上进行阴离子交换进行纯化:上样后用缓冲液 C 洗涤该物质,并用缓冲液 D 洗脱。然后将洗脱液在 Superdex 200 10/300 GL 柱 (GE Healthcare) 上进行尺寸排阻色谱。流速 0.5ml/ 分钟,洗脱液是由蔗糖 (3g/l)、组氨酸 (1.5g/l)、氯化钠 (18g/l)、吐温 80 (0.1g/l)、氯化钙 (0.25g/l) 组成的缓冲液 (pH7.3)。

[0225] SDS PAGE 分析显示在约 166kD、228kD 和 332kD 存在泳带,这暂时地指示在 FVIII 的重链上分别有 1 个、2 个或 3 个 C³⁴-(1-(5-(2-(ω -(3-(4-(甲酰基)苯甲酰氨基)丙基氨基甲酰基甲基)3 kDa PEG 基)乙基氨基甲酰基)戊基)2,5- 二氧化吡咯烷 -3- 基)白蛋白部分发生偶联。

[0226] FVIII 生色活性分析 - COA 测试

含有 FVIII 的样品的活性可用市售的 COA 测试 (COATEST[®] SP FVIII, Chromogenix Art. No. :82 4086 63) 测定。

[0227] 药物代谢动力学参数的确定:

将 15 只在 Taconic M&B 饲养的大约重 21.8 g 的 FVIII KO 小鼠用于研究。在小鼠的尾静脉单次注射给予所述化合物,并用异氟醚 /O₂/N₂O 对小鼠麻醉取血样。在从眼窝丛给药后的 0.08、0.33、1、3、7、16、24、48、64 h 取血样,每个时间点从 2 只或 3 只小鼠中取血。使用 10 μ l 毛细玻璃管从眼部取四滴血。在第三次取血样后,颈部脱臼杀死小鼠。将 45 μ l 血转移至含有 5 μ l 柠檬酸钠 (0.13 M) 的 Eppendorf 管中。加入 200 μ l FVIII coatest SP 缓冲液并且将稀释的血液在室温 4000 g 离心 5 分钟。使用 ELISA 抗原和生色活性分析对上清液进行分析。

[0228] 表 1 化合物和剂量

化合物描述	实施例编号	剂量 IU/kg	剂量体积 (ml/kg)	浓度* (IU/ml)
中间体2和中间体3的反应产物	2	280	5	56
中间体2和中间体4的反应产物	3	280	5	56
中间体2与3-(mPEG基)丙醛的反应产物	1	280	4.30	65.1

[0229] 表 2 由 NCA 获得的药物动力学 (PK) 参数

分析	实施例	C _{max} (IU/l)	AUC (h*IU/l)	AUC extrap (%)	T _{1/2} (h)	CI (ml/h/kg)	V _{ss} (ml/kg)	MRT (h)
FVIII COA	1	2945	36751	1	11	7.6	116	15
FVIII COA	2	2504	37258	5	13	6.9	137	20
FVIII COA	3	4534	46025	2	9.3	10	121	12
FVIII COA	BDD-FVIII	2740	26000	3	7.8	11	117	11
FVIII ELISA	1	2557	30635	8	13	9.1	160	17
FVIII ELISA	2	2750	39054	4	13	7.2	128	18
FVIII ELISA	3	3020	27927	3	9.6	10	126	13
FVIII ELISA	BDD-FVIII	1990	20000	10	8.2	14	159	12

[0230] FVIII 生色活性和 FVIII ELISA 测试发现, 在静脉给药后, 相对于 B- 结构域缺失的 FVIII (BDD-FVIII) (7.8-8.2 h), 三个化合物的末端半衰期延长了或轻微延长了 (9.3-13 h)。相对于 BDD-FVIII (11-12 h), 三个化合物的平均滞留时间 (MRT) 相似地增加了 (12-20 h)。此外, 相对于 BDD-FVIII (11-14 ml/h/kg), 化合物的清除率减少了 (6.9-10 ml/h/kg)。