



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201629215 A

(43) 公開日：中華民國 105 (2016) 年 08 月 16 日

(21) 申請案號：104131703 (22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 09 月 25 日

(51) Int. Cl. : C12N15/00 (2006.01) C12N5/07 (2010.01)  
 C12N5/071 (2010.01) C12N9/74 (2006.01)  
 A61K38/00 (2006.01) A61P7/00 (2006.01)

(30) 優先權：2014/09/30 美國 62/057,613

(71) 申請人：拜耳保健有限責任公司 (美國) BAYER HEALTHCARE LLC (US)  
 美國

(72) 發明人：麥可林 括克 MCLEAN, KIRK (US)；赫密斯頓 泰瑞 HERMISTON, TERRY  
 (US)；布魯克斯 亞倫 BROOKS, ALAN (GB)；費德曼 理查 FELDMAN,  
 RICHARD (US)

(74) 代理人：林秋琴；陳彥希；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：13 共 34 頁

(54) 名稱

使用凝血酶之組成物及治療方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATMENT WITH HEMOPEXIN

(57) 摘要

使用具有充分唾液酸化及/或缺乏中性聚糖之重組的凝血酶分子，使其得以充份循環以便將游離的血基質從生物體中移除，來提供用於治療性治療之組成物和方法。在其他的實施例中，係提供一用於治療性治療之重組的凝血酶分子，其具有中性聚糖佔總聚糖之百分比係在約百分之 2 至約百分之 30 的範圍，如經螢光素探針 2-胺基苯甲酸標記後以 HPLC 所測。亦描述治療和製造重組凝血酶分子之方法。

Compositions and methods are provided for therapeutic treatment using recombinant Hemopexin molecules having sufficient sialylation and/or absence of neutral glycans to allow for sufficient circulation to remove free heme from a biological organism. In other embodiments, a recombinant Hemopexin molecule is provided for therapeutic treatment having a percentage of neutral glycans to total glycans in a range of from about 2 to about 30 percent as measured by HPLC after labelling with fluorescent probe 2-aminobenzoic acid. Methods of treatment and making a recombinant Hemopexin molecule are also described.

## 發明摘要

※ 申請案號：104131703.

※ 申請日：104.9.25.

※IPC 分類：

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 5/07 (2010.01)

C12N 9/44 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

使用凝血酶之組成物及治療方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATMENT WITH  
HEMOPEXIN

【中文】

使用具有充分唾液酸化及/或缺乏中性聚糖之重組的凝血酶分子，使其得以充份循環以便將游離的血基質從生物體中移除，來提供用於治療性治療之組成物和方法。在其他的實施例中，係提供一用於治療性治療之重組的凝血酶分子，其具有中性聚糖佔總聚糖之百分比係在約百分之2至約百分之30的範圍，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測。亦描述治療和製造重組凝血酶分子之方法。

【英文】

Compositions and methods are provided for therapeutic treatment using recombinant Hemopexin molecules having sufficient sialylation and/or absence of neutral glycans to allow for sufficient circulation to remove free heme from a biological organism. In other embodiments, a recombinant Hemopexin molecule is provided for therapeutic treatment having a percentage of neutral glycans to total glycans in a range of from about 2 to about 30 percent as measured by HPLC after labelling with fluorescent probe 2-aminobenzoic acid. Methods of treatment and making a recombinant Hemopexin molecule are also described.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第（      ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：

無

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

使用凝血酶之組成物及治療方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATMENT WITH  
HEMOPEXIN

## 【技術領域】

使用具有充分唾液酸化及/或缺乏中性聚糖之重組的凝血酶分子，使其得以充份循環以便將游離的血基質從生物體中移除，來提供用於治療性治療之組成物和方法。在其他的實施例中，係提供一用於治療性治療之重組的凝血酶分子，其具有中性聚糖佔總聚糖之百分比係在約百分之2至約百分之30的範圍，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測。亦描述治療和製造重組凝血酶分子之方法。

## 【先前技術】

血基質(heme)在生物體中係提供各種功能。其為血紅素蛋白，例如細胞色素、DNA合成酵素、肌紅蛋白(myoglobin)和血紅蛋白(hemoglobin)之一重要的組份。然而，高量的游離的血基質可能為有毒的，且失控的游離血基質可能造成各種疾病和病症。

在具有加速溶血的疾病中，例如鎌狀細胞疾病(SCD)和 $\beta$ -地中海型貧血(BThall)，相較於正常的對照組係具有升高量的血基質。此升高量的血基質係由溶離的紅血球釋放血紅蛋白所造成，其在輕微氧化後，釋放出血基質基團。游離的血紅蛋白和血基質清除一氧化氮並催化具細胞毒性的活性氧中間物形成及在細胞中引發前-發炎反應。肝臟在幫助調節血基質量上，扮演著重要角色。肝臟係與各種蛋白(包括FLVCR)聯合作用，運出過量的血基質至膽汁和糞便中。在正常的個體中，有二種蛋白，血紅素結合球蛋白(haptoglobin)和凝血酶(Hemopexin)分別清除游離的血紅蛋白和血基質，並因

而降低相關的細胞毒性和前發炎效應。

凝血酶為一種血漿基底的糖蛋白，其係保護對抗與溶血性和感染性疾病有關的血基質媒介毒性。此蛋白在某些臨床環境，例如鎌狀細胞疾病(SCD)和地中海型貧血變得極盡耗竭。凝血酶具有已知最高的血基質結合親和力(據報 $K_d < 1 \text{ pM}$ )。再者，除了降低游離血基質的毒性效應外，凝血酶可降低游離血紅蛋白的負面效應，推測係由於其清除相關毒性血基質之能力。在溶血性疾病中，血紅素結合球蛋白和凝血酶二者變得極盡耗竭，使得血紅蛋白和血基質得以發揮其負面效應。凝血酶亦可作為血基質清除劑，在降低溶血性疾病中用以降低游離血基質之毒性效應。例如，人類血漿衍生的凝血酶在SCD和Bthall小鼠模型中，已顯示降低游離血基質之毒性和前發炎效應並改善血管功能。凝血酶已顯示結合及螯合血管內血基質並降低其相關毒性。

人類血漿衍生的凝血酶為一全唾液酸化的血漿糖蛋白，其具有7天的循環半衰期。在與血基質結合後，在凝血酶中有一形態變化發生，其增加了在肝細胞中對LRP受體之親和力，造成此複合物從循環中快速移除( $T_{1/2} = 7$ 小時)。凝血酶被N和O-連接的碳水化合物大規模地糖基化。N-連接的聚糖上半乳糖殘基之適當的唾液酸化可能對活體內蛋白的清除性質具有顯著的影響。唾液酸化不足可能經由肝細胞上的去唾液酸糖蛋白受體導致更快速的清除，在其有機會遞送一治療性利益之前，將此蛋白從循環中移除。當爭取高表量，其中糖基化和唾液酸化路徑可能無法追上蛋白生產的速度時，此項對於重組蛋白可能特別有問題。

蛋白的生物可利用性為影響或減輕特定疾病或其相關癥狀之重要因子。另外，就治療性治療的另外限制因子，使用凝血酶似乎需要投予高量的蛋白。此項可能係由於在具有加速溶血之疾病中所看到的高迴轉率所致。當血漿衍生的凝血酶可能用作為臨床開發的來源時，其具有固有的風險，例如疾病傳播(例如HCV、HIV)給病患的可能性。重組凝血酶的生產方法之改良可提升使用具商業利益的方法製造此一蛋白的可能性。

對於供治療性治療和從生物體之細胞及血漿中移除血基質的有效組成

物和方法仍有需求。另外，對於從細胞和血漿中運出血基質，以降低過多血基質之毒性及防止與這些失衡有關的各種生物病症，為必要的。

### 【發明內容】

提供用於治療性治療之組成物和方法，其係包括具有充份唾液酸化及/或缺乏中性聚糖而得以充份循環將游離的血基質從生物體中移除之重組的凝血酶分子。

在其他的實施例中，係提供一用於治療性治療的重組凝血酶分子，其包含中性聚糖佔總聚糖的百分比係在從約百分之2至約百分之30的範圍，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測。亦描述治療和製造重組凝血酶分子之方法。在至少一實施例中，此重組的凝血酶分子可由一CHO細胞，例如CHO-K1細胞表現。在至少一實施例中，此重組的凝血酶可包括一哺乳動物凝血酶分子。

在至少一實施例中，此用於治療性治療之重組的凝血酶係包含中性聚糖之百分比係在從約百分之2至約百分之30的範圍，單-唾液酸化聚糖的百分比係在從約百分之2至約百分之40的範圍，及二/三唾液酸化聚糖之百分率係在從約百分之20至約百分之90的範圍，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測。在至少一實施例中，此凝血酶分子係用於治療一疾病，例如鎌狀細胞疾病或 $\beta$ -地中海型貧血中的血基質毒性效應。

在至少一實施例中，此凝血酶分子係包括中性聚糖佔總聚糖的百分比係低於百分之30，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測。在至少一實施例中，中性聚糖佔總聚糖的百分比係低於百分之20，或低於百分之10，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測。

在其他的實施例中，係提供與SEQ ID NO: 1具有90%或更大同源性之重組的凝血酶分子，其中中性聚糖佔總聚糖的百分比係在從約百分之2至約百分之30的範圍，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測。

亦提供製造重組凝血酶分子之方法。在某些實施例中，製造具有中性聚糖佔總聚糖的百分比，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測，

係在從約百分之2至約百分之30範圍的重組凝血酶分子之方法係包括將一適當的插入物和載體插入一CHO細胞中；從該CHO細胞表現此重組的凝血酶分子，其中該重組的凝血酶之中性聚糖百分比係在從約百分之2至約百分之30的範圍，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測。在本方法的至少一實施例中，此CHO細胞係包括一CHO-K1細胞。

在其他的實施例中，亦提供使用凝血酶的治療性治療之方法。在某些實施例中，治療之方法係包括將一具有中性聚糖佔總聚糖的百分比，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測，係在從約百分之2至約百分之30範圍的重組凝血酶分子投予一患者。在至少一實施例中，此重組的凝血酶分子係以足夠結合游離的血基質之半衰期，循環於血液中。

在本揭示文另外的方面，此重組的凝血酶分子係用於降低血管內及/或細胞內血基質，供治療選自鎌狀細胞疾病、 $\beta$ -地中海型貧血、缺血再灌注、促紅血球形成性原紫質症、緩發性皮膚病變紫質症、瘧疾、類風濕性關節炎、與發炎有關的貧血、血鐵沉著症、陣發性夜間血紅素尿症(PNH)、葡萄糖-6-磷酸去氫酶缺乏症、溶血性尿毒症候群(HUS)、栓塞性血小板低下紫斑症(TTP)、妊娠毒血症、敗血症、急性出血和血液或人工血液輸灌有關的併發症，以及與器官移植有關的器官保存之疾病。

在本揭示文另外的方面，此重組的凝血酶分子係用於從細胞運出血基質之方法中，其包括將細胞與包括中性聚糖佔總聚糖的百分比，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測，係在從約百分之2至約百分之30範圍的重組凝血酶分子接觸。在至少一實施例中，此重組的凝血酶分子係用於治療與游離血基質毒性有關的病症之方法中，其係包括將一有效量之包括一中性聚糖佔總聚糖的百分比，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測，係在從約百分之2至約百分之30範圍的重組凝血酶分子投予有此需要的病患。較佳地，此病症係選自鎌狀細胞疾病、 $\beta$ -地中海型貧血、促紅血球形成性原紫質症、緩發性皮膚病變紫質症、缺血性再灌注和瘧疾。

在至少一實施例中，此重組的凝血酶分子係用於治療與過多的血管內和細胞內血基質有關的病症之方法中，其係包括將一有效量之包括一中性

聚糖佔總聚糖的百分比，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測，係在從約百分之2至約百分之30範圍的重組凝血酶分子投予有此需要的病患。較佳地，此病症係選自鎌狀細胞疾病、 $\beta$ -地中海型貧血、類風濕性關節炎、與發炎有關的貧血及其中血基質係堆積在細胞中之其他症狀。

這些和其他本教導文之特性係說明於文中。

## 詳細說明

本說明書係提供使用凝血酶及/或重組的凝血酶治療之組成物和方法。此等組成物和方法可投予具有一或多種疾病或癥狀之患者。在特定的情況中，此等疾病可能與升高量的血基質有關。

就解釋本說明書之目的，將提供下列定義。除非清楚地有一相反意義之意圖(例如在其中最初使用該術語的文件中)，否則在下列所說明的任何定義與任何其他文件，包括併入文中作為參考之任何文件中的詞語用法有相抵觸的情況下，就解釋本說明書及其相關的申請專利範圍之目的，應以下列所說明的定義為主。

在適當時，單數用法的術語亦包括複數形且反之亦然。除非另有說明或「一或多」之用法明顯不適當，否則「一」之用法在文中係指「一或多」。「包括」、「包含」之用法可相互交換並不受限。術語「例如(such as)」亦不希望受限。例如，術語「包括」應指「包括(但不限於)」。

如文中所用，術語「約」係指所提供的單位數值之 $\pm 10\%$ 。如文中所用「實質上」係指展示有關特徵或性質之總計或大約程度的質性上狀況。熟習生物技術之一般技術者應了解，生物和化學現象少有(即使有)達到或避開絕對結果，因為有許多影響生物和化學組成物及材料之試驗、製造和儲存的變數，及因為在生物和化學組成物及材料之試驗、製造和儲存中所用的儀器和設備中固有的誤差。術語實質上，因此，用於文中係抓取在許多生物和化學現象上可能缺乏的固有完整性。

術語「凝血酶」或「血漿衍生的凝血酶」或「HPx」或「pd-HPX」如文中所用係指任何凝血酶的變體、同功酶及/或物類同源物之形式，其係由

細胞自然表現並存在血漿中且與重組的凝血酶不同。

術語「重組的凝血酶」或「rHPx」如文中所用係指任何凝血酶的變體、同功酶及/或物類同源物，其係由細胞表現且與血漿衍生的凝血酶不同。

術語「治療上有效量」係指凝血酶或蛋白組合物之量為活體內有效移除過多的血基質所需，或另外對一有此需要的患者造成活體內可測量的利益。精確的量將依照許多因素而定，包括(但不限於)治療組成物的組份和生理特性、預期的病患族群、個別病思考量等等，且可容易地由熟習本項技術者來決定。

有許多的因素限制了使用凝血酶作為治療性治療之分子或組成物的能力。

第一項限制凝血酶用於治療性治療之用途的因素為需要投予高量的蛋白。此項可能係由於在帶有加速溶血之疾病中所看到的高迴轉率。現存的方法係經由從血漿萃取、純化和濃縮蛋白來得到凝血酶。此舉為一產生有限蛋白之耗時及繁複的方法。

第二項限制血漿衍生的凝血酶之用途的因素係關於疾病傳播所造成的可能問題。例如，當血漿衍生的凝血酶可用作為臨床開發來源的同時，這些組成物具有固有的風險，例如可能傳播疾病(例如HCV、HIV)給病患。另外，血漿衍生的樣本和組成物包括具有各種造成疾病之病毒和細菌的可能性。這些病原在量產之前不移除及/或過濾，則具有潛在的風險。

第三項限制凝血酶作為治療劑之用途的因素係關於無法以有效的生產方法表現高量的蛋白而同時保持蛋白類似活體內運作及/或操作或天然生成蛋白所需的固有性質。游離的血漿衍生凝血酶據報導係具有7天的血漿半衰期。在與血基質結合後，凝血酶的形態改變，增加其在肝細胞上對LRP的親和力，造成更快速從循環中移除( $T_{1/2} = 7$ 小時)。血漿衍生的凝血酶被大量的醣基化含有N-連接的糖基化位置和1或2個O-連結的糖基化位置。就血漿衍生的凝血酶而言，在末端半乳糖碳水化合物上N-連接的碳水化合物被完全唾液酸化，防止在肝臟中被去唾液酸糖蛋白受體(ASGPR)辨識出及移除。在重組製造的凝血酶中N-連接的碳水化合物上末端半乳糖的不完全唾液酸

化預期可產生一更快速從循環中移除的蛋白。因為經由ASGPR之不適當唾液酸化的凝血酶之清除應會更快速發生，與血基質結合無關地，此項預期應可能導致凝血酶分子治療效力降低。以2AA分析所測量的中性N-聚醣(以總N-聚醣為基準)之百分比與唾液酸化的程度成反比且因此含有百分比減低的中性聚醣之組成物具有增加量的唾液酸化。在本申請書中，吾等描述了一製造高量的充份唾液酸化凝血酶之表現系統，顯現對清除特性之唾液酸化下的負面效應，及顯示含有中性N-聚醣百分比在30%以下，25%以下，20%以下，15%以下及10%以下，為治療病患之最有用的組成物。本組成物和方法，因此係提供無法由pd-HPX分子和其他組成物所獲得之意料外的利益。

例如，重組凝血酶的生產方法之改良可提升使用具商業利益的方法製造此一蛋白的可能性。然而，使用一般的表現系統造成凝血酶分子或組成物之不充分的唾液酸化。另外，因此，希望降低存在分子中相對於總聚糖之中性聚糖的量，用以改善整體凝血酶分子之組成物和活體內的循環時間。電荷為中性的分子及/或組成物係藉由肝臟接觸及移除。因此，其在血流中的循環時間應較短且其清除率應較不會被與游離血基質形成複合物所驅動。另外，亦應注意，治療分子或組成物必須具有與血漿衍生或野生型凝血酶足夠類似的特性以緊密結合血流中游離的血基質。本組成物和方法，因此係提供無法由pd-HPX分子和其他組成所獲得之意料外的利益。

N-連接的聚糖上半乳糖殘基的適當唾液酸化，因此對活體內蛋白地清除性質具有顯著的影響。不充份的唾液酸化可能導致經由肝細胞上去唾液酸糖蛋白受體而更快速清除。當爭取高表量時，此項對於重組蛋白可能特別有問題。天然生成和重組的凝血酶二者係以N-和O-連接的碳水化合物大量地糖基化。使用分析方法例如2AA分析可測定中性聚糖的百分比。因而所測定的中性聚糖百分比將與唾液酸化的程度成反比。在單一碳水化合物上存有一個以上的未唾液酸化半乳糖之聚糖結構預期對ASGPR應具有最高的親和力且最快被清除。

在製造重組的凝血酶中，產生不充分唾液酸化物質的細胞造成一快速清除形式的凝血酶。相反的，吾等已顯示，當物質係在產生具有較大程度

唾液酸化之物質的細胞中表現時，則觀察到降低的清除率。在製造充份唾液酸化物質之細胞中表現結合產生含有中性N-聚醣百分比在30%以下，25%以下，20%以下，15%以下及10%以下的重組凝血酶之純化方法，對於治療病患更有用。

有各種方法可用來進一步降低凝血酶分子或組成物之中性聚醣的量及增加唾液酸化的程度。這些方法包括使用各種定義的細胞株，改良含特別賦形劑或營養素之培養基，使用抑制劑包括(但不限於)金屬或其衍生物以阻斷從N-連結的聚糖移除唾液酸之唾液酸酶，及於多肽序列中執行突變，工程化加入或移除各種胺基酸，以影響N-糖基化模式及唾液酸化程度。吾等已顯示，可使用具有將唾液酸加入N-聚糖之增加傾向的細胞株並可使用從具有將唾液酸加入N-聚糖之增加傾向的轉染細胞之族群中選擇選殖株。已知影響唾液酸化過程之編碼蛋白質的DNA之細胞修飾，係包括(但不限於)唾液酸轉運子、唾液酸轉移酶、唾液酸抑制劑或siRNA及等同的技術。

由於需要高量的蛋白，使用重組產生的蛋白之補充治療為一項挑戰，至少部份是。再者，凝血酶具有以適當倍數組合之廣泛的後轉譯修飾，可能差別性衝擊和影響此蛋白個別的性質。本發明在文中係關於生產和使用凝血酶及/或重組的凝血酶來治療疾病。

重組的凝血酶分子可與SEQ ID NO: 1具有90%或更大的同源性。序列的偏差可能係由例如刪除、添加、取代或插入之因素所造成，無論是天然生成的或藉由引導突變所導入或其他合成或重組技術。再者，同源性係指在各別的核酸分子或從其所編碼的蛋白間有一功能上及/或結構上同等性。在至少一實施例中，與SEQ ID NO: 1同源的核酸分子係具有與SEQ ID NO: 1相同的生物功能。

#### 醫藥用途

凝血酶可用於治療目的供治療血基質調節上的遺傳和後天之不足和缺陷。例如，在上述實施例中的蛋白可用於從血液或血漿中移除過多的血基質。

凝血酶在治療血基質病症，例如涉及過多游離的血管血基質之病症和

涉及過多細胞內血基質之病症上，具有治療上的用途。游離的血基質毒性病症包括鎌狀細胞疾病、 $\beta$ -地中海型貧血、缺血再灌注、促紅血球形成性原紫質症、緩發性皮膚病變紫質症和瘧疾。過多的血基質可能導致器官、組織和細胞損傷或由催化活性氧物類所造成的功能障礙。與過多的胞內血基質有關的病症包括類風濕性關節炎、與發炎有關的貧血和其中鐵沉積在巨噬細胞中及無法回收到紅血球中之其他症狀。可能從使用凝血酶而受益的其他具有過多的鐵/鐵承載之疾病包括血鐵沉著症、陣發性夜間血紅素尿症(PNH)、葡萄糖-6-磷酸去氫酶缺乏症或續發現象(例如溶血性尿毒症候群(HUS)、栓塞性血小板低下紫斑症(TTP)、妊娠毒血症、瘧疾、敗血症和其他感染性及/或發炎疾病、急性出血，以及血液或人工血液輸灌有關的併發症，以及與器官移植有關的器官保存。在任何其中具有廣泛的細胞溶離，特別是紅血球溶離之疾病，可能有潛在的利益。釋放出高量的肌球蛋白之與廣泛的肌肉破壞有關之疾病亦可由凝血酶給藥而受益。

此等病症可藉由將一治療上有效量的凝血酶投予有此需要的患者來治療。此凝血酶分子和組成物在治療罕見疾病如SCD上具有治療用途。因此，亦提供治療SCD和其他相關疾病之方法。

凝血酶可經調配供非經腸給藥(例如藉由注射，例如團注或連續輸注)及可以單位劑型存在於安瓶、預充填注射器、小量輸注或添加防腐劑之多劑量容器中。組成物可採例如懸浮液或溶液的形式，且可含有調配劑例如懸浮劑、安定劑及/或分散劑。如文中所用，術語「非經腸」包括皮下、靜脈內、肌肉內、關節內、滑膜內、胸骨內、脊椎內、肝內、損傷區內及顱內給藥。

凝血酶蛋白可用作單一治療或與其他用於血基質病症之治療組合。醫藥組成物可以一劑量和頻率由非經腸投予患有血基質缺陷的患者，或就預防性治療的情況下，可隨鐵缺乏的嚴重性而變。

組成物可以大量或以連續或間歇輸注投予有此需要的病患。例如，凝血酶蛋白之大量給藥典型地可藉由延伸30分鐘至3小時的期間內以輸注來給藥。給藥頻率應依照症狀的嚴重度而定。頻率範圍可從每天一次或二次

至每二周到六個月一次。另外，組成物可經由皮下注射投與病患。例如，1至8000 mg劑量的凝血酶可每天、每週、每二周或每月經由皮下注射投予病患。

### 【圖式簡單說明】

熟習技術者應了解，描述於下的圖式僅供說明之目的。這些圖式並不希望在任何方面限制本教導文之範圍或申請專利範圍。

圖1係顯示在選擇的高表現CHOK1和CHO-S選殖株中重組的人類凝血酶之表現。表現量係經由抗人類凝血酶ELISA套組來測定。

圖2係顯示使用來自各種高表現CHOK1和CHOS衍生的凝血酶之條件培養基，測定抑制血基質依賴的過氧化酶分析之EC50。此等分析係使用市售的血基質依賴過氧化酶分析來進行。

圖3係顯示一彙整的聚糖分析之流程圖。

圖4係顯示來自篩選之選植株子群的唾液酸化N-聚糖MALDI分析。

圖5係顯示來自篩選之選植株子群的中性N-聚糖MALDI分析。

圖6係顯示以2AA分析為基準之各種CHOK1和CHOS選植株的中性聚糖%。

圖7係以圖顯示CHOK1選植株對CHO-S衍生的凝血酶之中性聚糖%。

圖8係顯示中性聚糖%對CHOK1選植株表現量之作圖。選擇的選植株為圓形。CHOK1-76選植株係以箭頭指出。

圖9係顯示血漿衍生的(pd-HPX)，二批CHOK1選植株76(CHOK1批次A和B)，及用於藥物動力學分析之CHOS衍生的凝血酶之中性N-聚糖MALDI分析。

圖10係顯示血漿衍生的(pd-HPX)，二批CHOK1選植株76(CHOK1批次A和B)，及用於藥物動力學分析之CHOS衍生的凝血酶之唾液酸化N-聚糖MALDI分析。

圖11係顯示2AA分析，其係顯現血漿衍生的(pd-HPX)，二批CHOK1選植株76(CHOK1批次A和B)，及用於藥物動力學分析之CHOS衍生的凝血酶

之中性聚糖%。

圖12係顯示2AA分析，其係顯現衍生自生物反應器培養，於第7、11和14天收取的CHOK1選植株76衍生的凝血酶純化蛋白中，中性、單唾液酸化及二和三唾液酸化%。

圖13係顯示在Sprague-Dawley大鼠中重組的(r-HPX)和血漿衍生的凝血酶(pd-HPX)之藥物動力學分析。

## 【實施方式】

### 實例1

#### 重組凝血酶之表現、純化和分析

使用帶有天然凝血酶單一序列之DNA 2.0最適化凝血酶cDNA序列 (SEQ ID NO: 3)於CHO中驗證高量的表現。將一鑑別高表現選殖株之類似方法用於CHOS和CHOK1細胞。用於CHOK1選殖株的方法如下：以含有密碼子最適化的凝血酶cDNA之表現載體轉染CHOK1細胞。藉由限制稀釋選殖於96孔盤中選擇總計300個CHOK1選殖株。使用市售的凝血酶ELISA套組 (ALPCO, 41-HMPHU-E01)分析來自選殖株的條件培養基。從最初的300個選殖株鑑別出21個高生產者及隨後使用一小規模的分批補料表現法(50 ml)，使用來自GE Healthcare Life Sciences公司的ActiCHO培養基評估。使用包括離子交換層析(Q-Sepharose, GE Healthcare Life Sciences)或金屬螯合層析(Ni-IMAC)，接著粒徑排阻層析(SD200, GE Healthcare Life Sciences)之二步驟法純化凝血酶蛋白(至>95%純度)。使用SDS PAGE (4-12% Bis Tris凝膠)及分析式粒徑排阻層析(SD200, 10/300)評估此純化蛋白之純度。亦使用競爭性血基質分析(以血基質依賴的過氧化酶為基準)來分析純化樣本之血基質結合，及然後進行聚糖分析(方法概述於下)。在CHOK1和CHO-S二者細胞株中達到類似的最大蛋白表現量(圖1)。使用市售套組來測定抑制血基質依賴的過氧化酶分析之EC50。所有的選殖株係以類似效力抑制血基質依賴的過氧化酶活性(圖2)。將純化的蛋白進行聚糖分析。由市面上購得之純化的血漿衍生凝血酶(Athens Research Technologies)，亦包括在此聚糖分析中，

作為一對照組。聚糖分析包括鑑別中性和帶電的N-聚糖結構之MALDI分析、鑑別中性聚糖%之2AA分析以及在某些情況下用於測定總唾液酸含量之總唾液酸分析(參見圖3，進一步詳述於實例2中)。

意外地，就由CHO-S和21株CHOK1選殖株所純化的凝血酶之Maldi和2AA聚糖分析揭示在聚糖性質上顯著的差異(參見圖4、5和6)。MALDI唾液酸化N-聚糖分析揭示了相較於CHOK1選殖株，CHO-S衍生的凝血酶更多樣模式的聚糖。再者，存在CHO-S衍生物中的中性聚糖百分比(47.8%)，相較於由CHOK1衍生物所得來者，明顯增加(6.3%至24.6%)。下降的中性聚糖百分比係與唾液酸化程度成反比。因此，來自CHOK1選殖株的物質，以此分析為基礎，係具有較大程度的唾液酸化。所有選殖株之中性聚糖%係如圖7中圖形所示。以中性聚糖百分比和表現量為基準選擇選殖株進行另外的評估(圖8)。

使用CHO-S選殖株和 CHOK1選殖株76來生產用於藥物動力學研究之物質。就這二種製備物(及Athens Research Plasma衍生的)，顯示中性和帶電的N-聚糖之MALDI分析係如圖9和10中所示。來自2AA分析之中性聚糖%數據係如圖11所示。CHO-S所生產的物質具有52%中性聚糖而CHOK1-76 (A批次)生產物質具有10%中性聚糖。從選殖株CHOK1-76條件培養基純化第二批凝血酶，其以2AA分析為基礎係具有增加量的中性聚糖百分比(19%)。一彙整四種重組產生的製備物和由市面購得的血漿衍生凝血酶之中性聚糖百分比係如下表1中所示。具有較低中性聚糖總百分比之製備物亦具有較高量的全唾液酸化N-聚糖及含有二或多個未帶電末端半乳糖基團之降低量的N-聚糖。

**表1**

**用於藥物動力學分析之製備物的中性聚糖%(2AA)和Maldi帶電的N-聚糖分析彙整**

凝血酶批次	全唾液酸化	一個未帶電	二個未帶電	中性聚糖%
血漿衍生的	67%	33%	0%	0%
CHO-S衍生的	11%	64%	25%	52%

CHOK1衍生的A	32%	58%	10%	10%
CHOK1衍生的B	22%	55%	22%	19%

以如下所示之藥物動力學分析來評估來自這些製備之蛋白質。

CHOK1選殖株76之進一步的分析顯示，存在使用由生物反應器培養的條件培養基所純化的蛋白中之中性聚糖百分比係依照培養時間進行的長短而定。吾等將一10L生物反應器(ActiCHOP培養基)以第7、11和14天之選殖株76所得來的條件培養基接種。由這些天所收集的培養基純化凝血酶及然後評估中性聚糖%。數據(圖12)揭示了在生物反應器運作期間中性聚糖%具有時間依賴的增加。此項可能係由於主要的培養基分子消耗或培養基中有唾液酸酶存在造成唾液酸隨時間被移除。可使用修改生長條件、於進料中添加培養基組份或添加唾液酸酶抑制劑至培養基中，進一步最適化條件，用以降低產物中之中性聚糖%。另外亦可設想特定的已知方法或技術，用以添加可增進唾液酸化之各種基因於這些高生產的細胞中。此項可包括(但不限於)唾液酸轉移酶和CMP-唾液酸轉運子。

## 實例2

### 聚糖分析

2AA分析-在以螢光探針2-胺基苯甲酸標記後藉由HPLC來分析中性和唾液酸化N-聚糖。藉由使用糖苷酶F(Oxford Glycosystem)，釋放N-聚糖，接著以2-胺基苯甲酸標記。使用2%乙酸/1%四氫呋喃於乙腈中作為溶劑A及5%乙酸/1%四氫呋喃/3%三乙胺於水中作為溶劑B以螢光偵測(激發光360 nm，發射光425 nm)於NH2P40-2D管柱上分析標記的樣本。

MALDI分析-就測定聚糖之結構，係藉由使用糖苷酶F來釋放N-聚糖，接著MALDI-MS分析。就中性聚糖分析，係使用2,5-二羥基苯甲酸作為基質，同時使用2',4',6'-三羥基苯乙酮單水合物進行唾液酸化聚糖分析。就中性N-聚糖分析，數據採集參數係如下：離子來源1：20 kV，離子來源2：17 kv，鏡頭9 kv，反射器1：26，反射器2：14。就唾液酸化N-聚糖分析，數據採集參數係如下：離子來源1：20 kv，離子來源2：19 kv，鏡頭5kv。

### 實例3

#### PK研究

於意識清醒的雄性 Sprague-Dawley 大鼠中評估重組的(CHO-S和CHOK1衍生的)及血漿衍生的(Athens Research Technologies)凝血酶之藥物動力學和配置態樣。將重組的CHO-K1衍生凝血酶進行聚糖-修飾以降低中性聚糖的百分率。重組的CHO-S衍生凝血酶不進行聚糖-修飾。將凝血酶以3 mg/kg之單一靜脈內劑量投藥至大腿靜脈中。使用一Culex™自動血液採樣系統(Bioanalytical Systems, Inc., Lafayette, IN)進行此研究。給劑後，在預先指定的時間至高72小時，經由頸靜脈將血液樣本連續收集至含有5%檸檬酸鈉作為抗凝血劑之收集試管中。隨後，從這些樣本得到血漿並儲存於-80°C直到分析，使用三明治ELISA分析法以抗-人類-凝血酶抗體作為捕捉測定人類凝血酶的血漿量，及以HRP-抗-人類凝血酶抗體作為偵測，測量大鼠血漿中總人類凝血酶。

各批次之中性聚糖百分比及在大鼠藥物動力學分析所測的清除性質之間具有明確相關性(參見圖13)。具有增加的中性聚糖之凝血酶製備物(降低的唾液酸化)具有較快速的 $\alpha$ 期和清除率、增加的分布體積及降低的AUC(圖13和表2)。此項推測係由於不充分唾液酸化的分子經由去唾液酸糖蛋白受體更快速地清除。不當唾液酸化的物質經由去唾液酸糖蛋白受體之清除可能導致游離的凝血酶，在其清除游離的血基質之前，從循環中快速清除。具有提高的唾液酸化之凝血酶分子可更加緩慢地被清除直到其與血基質結合。在結合血基質後，對LRP受體之親和性增加，使得凝血酶-血基質複合物從循環中移除。藉由透過去唾液酸糖蛋白受體降低清除率，而增進活體中凝血酶的效力。

表2

在Sprague-Dawley大鼠中重組和血漿衍生的人類凝血酶之藥物動力學參數

	CHOS	CHOK1選殖株 76 A	CHOK1選殖株 76 B	pdHX
AUCnorm(kg.h/L)	40	142	237	280

CI(mL/h/kg)	25	5.7	4.2	3.4
Vss(mL/kg)	690	230	170	130
T1/2(h)	28	36	33	33

當本實施例已參照特定實施例和實例加以描述時，應了解，可作各種修改和變化且在不悖離其所附的申請專利範圍之精神和範疇下可以同等物取代。本說明書和實例，因此，應以說明來看待而非限制的觀念。

再者，文中所指的所有文章、書籍、專利申請案和專利之揭示文係以全文引用的方式併入本文中。

**【符號說明】**

無

**【生物材料寄存】**

無

## 序列表

<110> McLean, Kirk  
Feldman, Rick  
Hermiston, Terry  
Brooks, Alan

<120> 使用凝血酶之組成物及治療方法

<130> 17207.0009USP1

<140> New Filing

<141> 2014-09-29

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 462

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Ala Arg Val Leu Gly Ala Pro Val Ala Leu Gly Leu Trp Ser Leu  
1 5 10 15

Cys Trp Ser Leu Ala Ile Ala Thr Pro Leu Pro Pro Thr Ser Ala His  
20 25 30

Gly Asn Val Ala Glu Gly Glu Thr Lys Pro Asp Pro Asp Val Thr Glu  
35 40 45

Arg Cys Ser Asp Gly Trp Ser Phe Asp Ala Thr Thr Leu Asp Asp Asn  
50 55 60

Gly Thr Met Leu Phe Phe Lys Gly Glu Phe Val Trp Lys Ser His Lys  
65 70 75 80

Trp Asp Arg Glu Leu Ile Ser Glu Arg Trp Lys Asn Phe Pro Ser Pro  
85 90 95

Val Asp Ala Ala Phe Arg Gln Gly His Asn Ser Val Phe Leu Ile Lys  
100 105 110

Gly Asp Lys Val Trp Val Tyr Pro Pro Glu Lys Lys Glu Lys Gly Tyr  
115 120 125

Pro Lys Leu Leu Gln Asp Glu Phe Pro Gly Ile Pro Ser Pro Leu Asp  
 130 135 140

Ala Ala Val Glu Cys His Arg Gly Glu Cys Gln Ala Glu Gly Val Leu  
 145 150 155 160

Phe Phe Gln Gly Asp Arg Glu Trp Phe Trp Asp Leu Ala Thr Gly Thr  
 165 170 175

Met Lys Glu Arg Ser Trp Pro Ala Val Gly Asn Cys Ser Ser Ala Leu  
 180 185 190

Arg Trp Leu Gly Arg Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Asn Gln Phe Leu Arg  
 195 200 205

Phe Asp Pro Val Arg Gly Glu Val Pro Pro Arg Tyr Pro Arg Asp Val  
 210 215 220

Arg Asp Tyr Phe Met Pro Cys Pro Gly Arg Gly His Gly His Arg Asn  
 225 230 235 240

Gly Thr Gly His Gly Asn Ser Thr His His Gly Pro Glu Tyr Met Arg  
 245 250 255

Cys Ser Pro His Leu Val Leu Ser Ala Leu Thr Ser Asp Asn His Gly  
 260 265 270

Ala Thr Tyr Ala Phe Ser Gly Thr His Tyr Trp Arg Leu Asp Thr Ser  
 275 280 285

Arg Asp Gly Trp His Ser Trp Pro Ile Ala His Gln Trp Pro Gln Gly  
 290 295 300

Pro Ser Ala Val Asp Ala Ala Phe Ser Trp Glu Glu Lys Leu Tyr Leu  
 305 310 315 320

Val Gln Gly Thr Gln Val Tyr Val Phe Leu Thr Lys Gly Gly Tyr Thr  
 325 330 335

Leu Val Ser Gly Tyr Pro Lys Arg Leu Glu Lys Glu Val Gly Thr Pro  
 340 345 350

His Gly Ile Ile Leu Asp Ser Val Asp Ala Ala Phe Ile Cys Pro Gly

355

360

365

Ser Ser Arg Leu His Ile Met Ala Gly Arg Arg Leu Trp Trp Leu Asp  
 370 375 380

Leu Lys Ser Gly Ala Gln Ala Thr Trp Thr Glu Leu Pro Trp Pro His  
 385 390 395 400

Glu Lys Val Asp Gly Ala Leu Cys Met Glu Lys Ser Leu Gly Pro Asn  
 405 410 415

Ser Cys Ser Ala Asn Gly Pro Gly Leu Tyr Leu Ile His Gly Pro Asn  
 420 425 430

Leu Tyr Cys Tyr Ser Asp Val Glu Lys Leu Asn Ala Ala Lys Ala Leu  
 435 440 445

Pro Gln Pro Gln Asn Val Thr Ser Leu Leu Gly Cys Thr His  
 450 455 460

<210> 2  
 <211> 1410  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 2  
 atggctaggg tactgggagc acccgttgca ctggggttgt ggagcctatg ctggtctctg 60  
 gccattgccca cccctcttcc tccgactagt gcccatggga atgttgctga aggcgagacc 120  
 aagccagacc cagacgtgac tgaacgctgc tcagatggct ggagctttga tgctaccacc 180  
 ctggatgaca atggaacat gctgtttttt aaaggggagt ttgtgtggaa gagtcacaaa 240  
 tgggaccggg agttaatctc agagagatgg aagaatttcc ccagccctgt ggatgctgca 300  
 ttccgtcaag gtcacaacag tgtctttctg atcaaggggg acaaagtctg ggtataccct 360  
 cctgaaaaga aggagaaagg atacccaaag ttgctccaag atgaatttcc tggaatccca 420  
 tccccactgg atgcagctgt ggaatgtcac cgtggagaat gtcaagctga aggcgtcctc 480  
 ttcttccaag gtgaccgca gtggttctgg gacttggcta cgggaacat gaaggagcgt 540  
 tcctggccag ctgttgggaa ctgctcctct gccctgagat ggctgggccg ctactactgc 600  
 ttccagggta accaattcct gcgcttcgac cctgtcaggg gagaggtgcc tcccaggtac 660  
 ccgcgggatg tccgagacta cttcatgccc tggcctggca gaggccatgg acacaggaat 720

gggactggcc atgggaacag taccacat ggccctgagt atatgctg tagccacat 780  
 ctactctgt ctgactgac gtctgacaac catggtgcca cctatgcctt cagtgggacc 840  
 cactactggc gtctggacac cagccgggat ggctggcata gctggcccat tgctcatcag 900  
 tggccccagg gtccttcagc agtggatgct gccttttctt gggaagaaaa actctatctg 960  
 gtccagggca cccaggtata tgtcttcctg acaaaggag gctataacct agtaagcgg 1020  
 tatccgaagc ggctggagaa ggaagtcggg acccctcatg ggattatcct ggactctgtg 1080  
 gatgctgctt ttatctgcc tgggtcttct cggctccata tcatggcagg acggcggctg 1140  
 tgggtggctgg acctgaagtc aggagcccaa gccacgtgga cagagcttcc ttggccccat 1200  
 gagaaggtag acggagcctt gtgtatggaa aagtccttgg gccctaactc atgttccgcc 1260  
 aatggtcccg gcttctacct catccatggt cccaatttgt actgctacag tgatgtggag 1320  
 aaactgaatg cagccaaggc cttccgcaa cccagaatg tgaccagtct cctgggctgc 1380  
 actcaccacc atcaccacca tcatcaccat 1410

<210> 3  
 <211> 1451  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 3  
 accggtgaat tgcggccac catggctcgc gttcttgggtg cccctgttgc cctcggctt 60  
 tggtcctct gttggctact tgctattgcc actccgctgc ctccgaccag cgcgcacgga 120  
 aatgtggccg aaggcgaac taagccagac cctgacgtga ccgagagatg cagcgcacgga 180  
 tggagcttcg acgctactac cctggatgat aacggcacta tgctgttctt taagggggag 240  
 ttcgtgtgga agtcgcataa gtgggaccgg gagctcatct cagaaagggtg gaagaacttt 300  
 ccgtccccgg tcgacgctgc atttcggcag ggacacaatt ccgtgttctt gatcaagggg 360  
 gacaaagtgt ggggtgtacc acctgagaaa aaggagaaag gttaccctaaa gctgctccaa 420  
 gatgagttcc cgggcatccc ctcccccctc gacgcggcag tggaatgcca tagaggcgaa 480  
 tgccaagcag aaggcgtgct gtttttccaa ggggacagag aatggttctg ggacctggct 540  
 acgggaacca tgaaggaacg ctcttgcca gccgtgggaa attgctccag cgcactgcga 600  
 tggctgggaa gatactactg tttccaagga aatcagtttc ttcgcttcga tctgtccgc 660  
 ggagaggtgc cccacggta cccgcgggac gtgcgcgact atttatgcc gtgtccggga 720  
 cggggccatg gccaccgga cggaaccggg catggaaact cgactcatca cggacctgag 780

tacatgaggt gcagcccgca tctcgtgctg tccgccctca cctccgacaa ccatggggct 840  
acctatgcat tctcgggtac tcaactactgg aggctggata cctcacggga tggatggcac 900  
tcgtggccga tcgcgcacca gtggccacag ggcccctcag cagtcatgc cgctttctca 960  
tgggaggaaa agctctacct ggtgcagggt acccaagtct acgtgttctt cactaaggga 1020  
ggctacacgc tcgtgtcggg ctacccaaag agactggaga aggaggtggg gactcccat 1080  
ggaatcatcc tggactcggg cgatgctgca ttcatctgcc cgggaagctc gcggtgcac 1140  
attatggcgg gacgccgctt ttggtggttg gacttgaat ccggcgccca ggcgacttg 1200  
actgaacttc cgtggcctca cgagaaggtc gacggagcgt tgtgcatgga aaaatctctg 1260  
ggaccaaact cctgcagcgc caacggaccg ggattgtacc tgatccacgg accgaatctg 1320  
tactgctact cggatgtcga aaaattgaac gcgccaagg cgctccctca gccgcagaac 1380  
gtgacctcgc tgcttggatg tacacaccac caccatcacc atcatcacca ccattaggcg 1440  
gccgcgctag c 1451

<210> 4  
<211> 462  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 4

Met Ala Arg Val Leu Gly Ala Pro Val Ala Leu Gly Leu Trp Ser Leu  
1 5 10 15

Cys Trp Ser Leu Ala Ile Ala Thr Pro Leu Pro Pro Thr Ser Ala His  
20 25 30

Gly Asn Val Ala Glu Gly Glu Thr Lys Pro Asp Pro Asp Val Thr Glu  
35 40 45

Arg Cys Ser Asp Gly Trp Ser Phe Asp Ala Thr Thr Leu Asp Asp Asn  
50 55 60

Gly Thr Met Leu Phe Phe Lys Gly Glu Phe Val Trp Lys Ser His Lys  
65 70 75 80

Trp Asp Arg Glu Leu Ile Ser Glu Arg Trp Lys Asn Phe Pro Ser Pro  
85 90 95

Val Asp Ala Ala Phe Arg Gln Gly His Asn Ser Val Phe Leu Ile Lys



Leu Val Ser Gly Tyr Pro Lys Arg Leu Glu Lys Glu Val Gly Thr Pro  
 340 345 350

His Gly Ile Ile Leu Asp Ser Val Asp Ala Ala Phe Ile Cys Pro Gly  
 355 360 365

Ser Ser Arg Leu His Ile Met Ala Gly Arg Arg Leu Trp Trp Leu Asp  
 370 375 380

Leu Lys Ser Gly Ala Gln Ala Thr Trp Thr Glu Leu Pro Trp Pro His  
 385 390 395 400

Glu Lys Val Asp Gly Ala Leu Cys Met Glu Lys Ser Leu Gly Pro Asn  
 405 410 415

Ser Cys Ser Ala Asn Gly Pro Gly Leu Tyr Leu Ile His Gly Pro Asn  
 420 425 430

Leu Tyr Cys Tyr Ser Asp Val Glu Lys Leu Asn Ala Ala Lys Ala Leu  
 435 440 445

Pro Gln Pro Gln Asn Val Thr Ser Leu Leu Gly Cys Thr His  
 450 455 460

## 申請專利範圍

1. 一種用於治療性治療之重組的凝血酶分子，其包含中性聚糖佔總聚糖的百分比係在約百分之2至約百分之30的範圍，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測。
2. 如請求項1所述之重組的凝血酶分子，係由CHO細胞表現。
3. 如請求項1所述之重組的凝血酶分子，其中該CHO細胞係包括CHO-K1細胞。
4. 如請求項1所述之重組的凝血酶分子，其中該重組的凝血酶分子係包括哺乳動物凝血酶分子。
5. 一種用於治療性治療之重組的凝血酶分子，其包含中性聚糖之百分比係在從約百分之2至約百分之30的範圍，單-唾液酸化聚糖的百分比係在從約百分之2至約百分之40的範圍，及二/三唾液酸化聚糖之百分比係在從約百分之20至約百分之90的範圍，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測。
6. 如請求項5所述之重組的凝血酶分子，其中該凝血酶分子係用治療疾病中之血基質毒性效應。
7. 如請求項6所述之重組的凝血酶分子，其中該疾病係包括鎌狀細胞疾病。
8. 如請求項6所述之重組的凝血酶分子，其中該疾病係包括 $\beta$ -地中海型貧血。
9. 一種製造具有中性聚糖佔總聚糖的百分比從約百分之2至約百分之30範圍的重組凝血酶分子之方法，該中性聚糖佔總聚糖的百分比如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測，其係包括：
  - (a)將包括重組的凝血酶核酸序列之核酸插入CHO細胞中；及
  - (b)從該CHO細胞表現此重組的凝血酶分子，其中該重組凝血酶之中性聚糖百分比係在從約百分之2至約百分之30的範圍，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測。
10. 如請求項9所述之製造重組的凝血酶分子的方法，其中該CHO細胞係包括CHO-K1細胞。

11. 如請求項1所述之用於治療性治療之重組的凝血酶分子，其中中性聚糖佔總聚糖的百分比係低於百分30，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測。
12. 如請求項1所述之用於治療性治療之重組的凝血酶分子，其中中性聚糖佔總聚糖的百分比係低於百分20，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測。
13. 如請求項1所述之用於治療性治療之重組的凝血酶分子，其中中性聚糖佔總聚糖的百分比係低於百分10，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測。
14. 一種治療性治療之方法，其係包括將具有中性聚糖佔總聚糖的百分比，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測，係在從約百分之2至約百分之30範圍的重組凝血酶分子投予一患者。
15. 如請求項14所述之方法，其中該重組的凝血酶分子係以足夠結合游離的血基質之半衰期循環於血液中。
16. 一種與SEQ ID NO：1具有90%或更大同源性之重組的凝血酶分子，其中中性聚糖佔總聚糖的百分比係在約百分之2至約百分之30的範圍，如經螢光素探針2-胺基苯甲酸標記後以HPLC所測。
17. 如請求項1或16所述之重組的凝血酶分子，其中該分子係用於治療由下列組成之群中選出的疾病：鐮狀細胞疾病、 $\beta$ -地中海型貧血、缺血再灌注、促紅血球形成性原紫質症、緩發性皮膚病變紫質症、瘧疾、類風濕性關節炎、與發炎有關的貧血、血鐵沉著症、陣發性夜間血紅素尿症(PNH)、葡萄糖-6-磷酸去氫酶缺乏症、溶血性尿毒症候群(HUS)、栓塞性血小板低下紫斑症(TTP)、妊娠毒血症、敗血症、急性出血和血液或人工血液輸灌有關的併發症，以及與器官移植有關的器官保存。
18. 一種從細胞運出血基質之方法，其係包括將該細胞與一如請求項1或16所述之重組的凝血酶分子接觸。
19. 一種治療與游離的血基質毒性有關的病症之方法，其係包括將治療上有效量之如請求項1或16所述之重組的凝血酶分子投予有此需要的患者。

20. 如請求項19之方法，其中該病症係選自鎌狀細胞疾病、 $\beta$ -地中海型貧血、促紅血球形成性原紫質症、緩發性皮膚病變紫質症、缺血再灌注和瘧疾。
21. 一種治療與過多的胞內血基質有關的病症之方法，其係包括將治療上有效量之如請求項1或16所述之重組的凝血酶分子投予有此需要的患者。
22. 如請求項21之方法，其中該病症係選自類風濕性關節炎、與發炎有關的貧血以及其中鐵係沉積在巨噬細胞中之症狀。

# 圖式

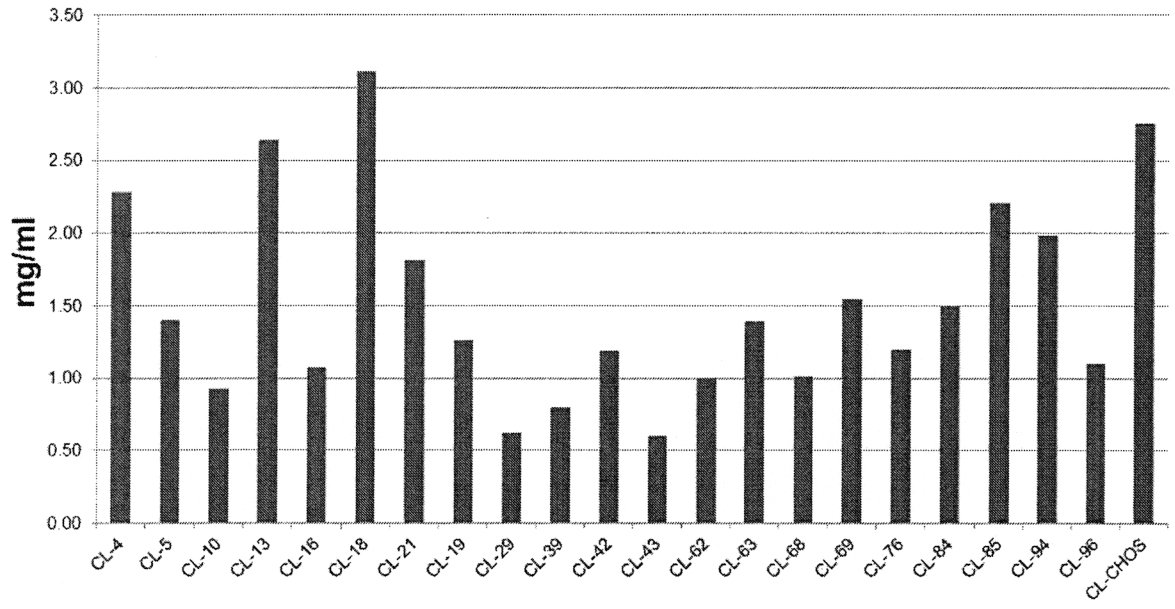


圖 1

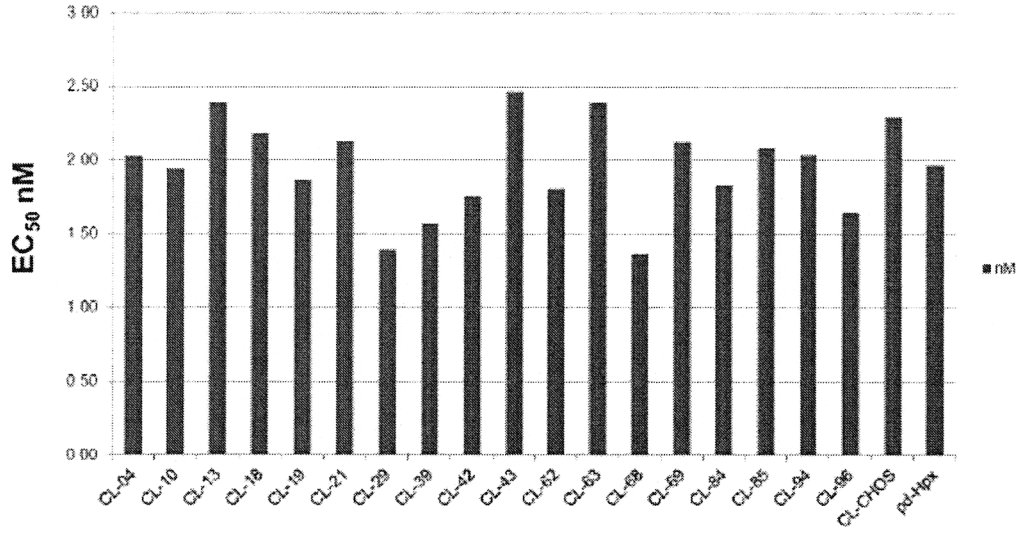


圖 2

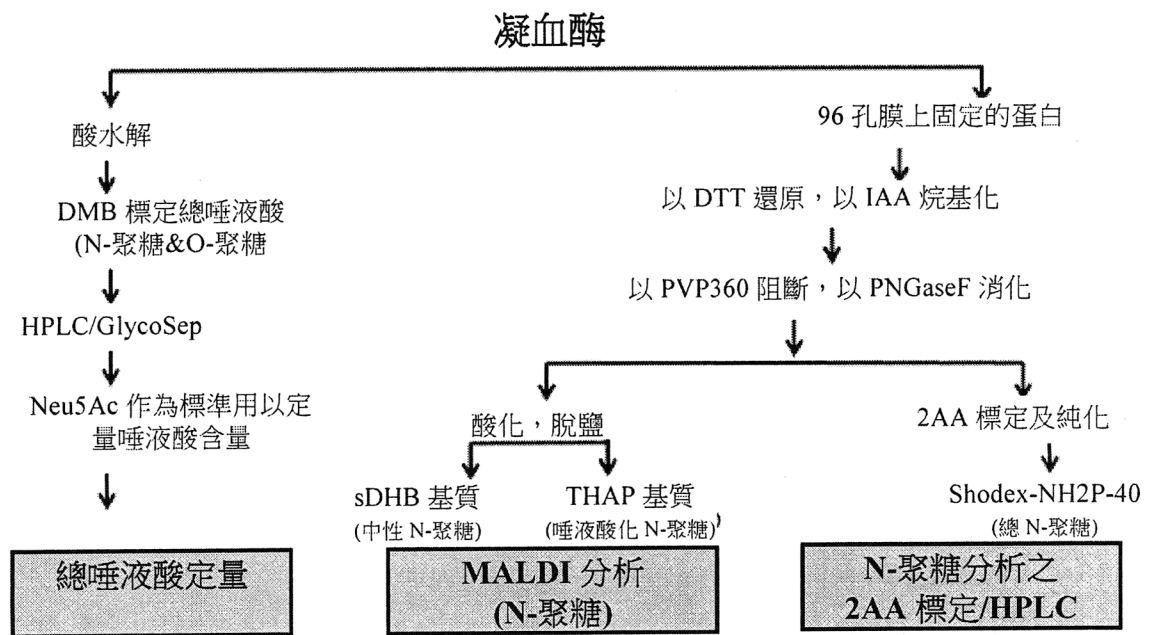


圖 3

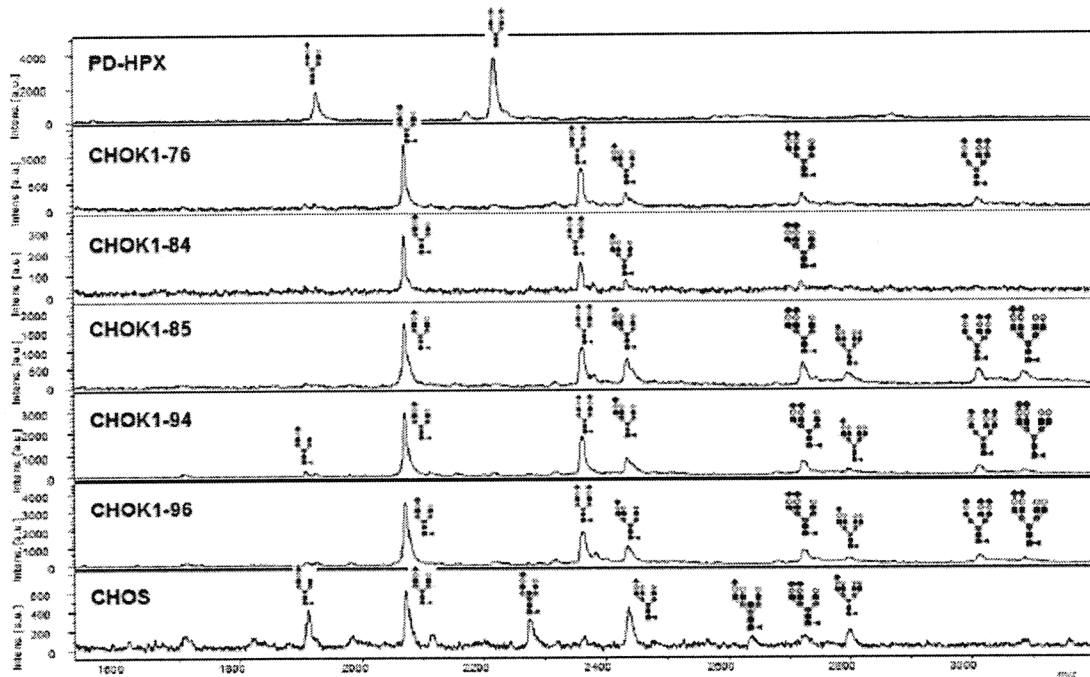


圖 4

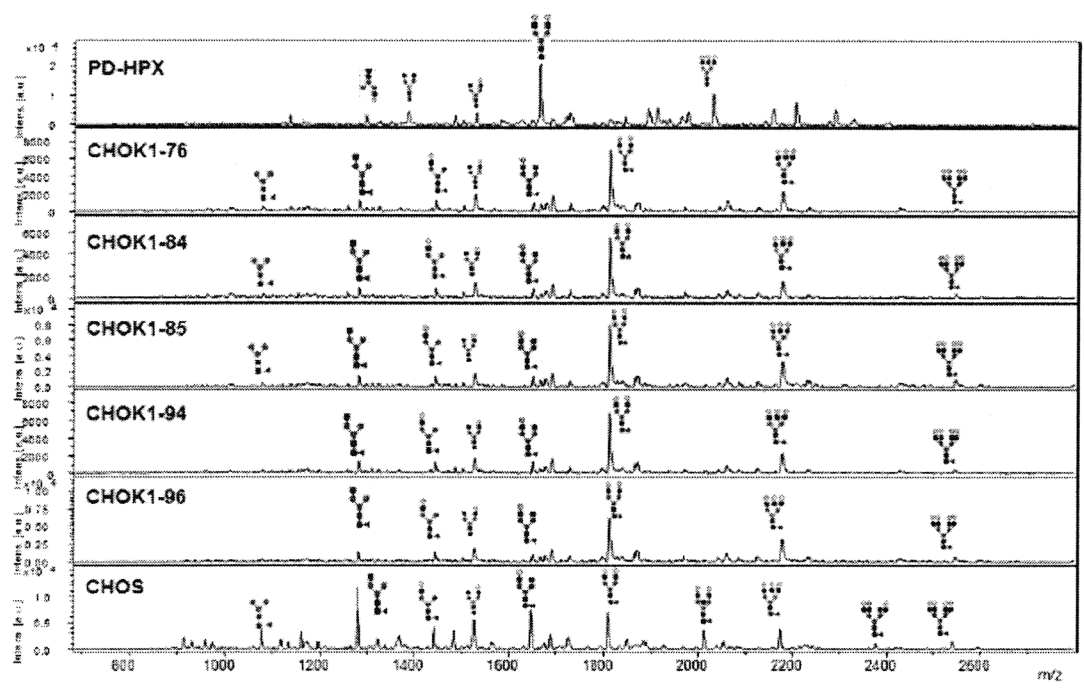


圖 5

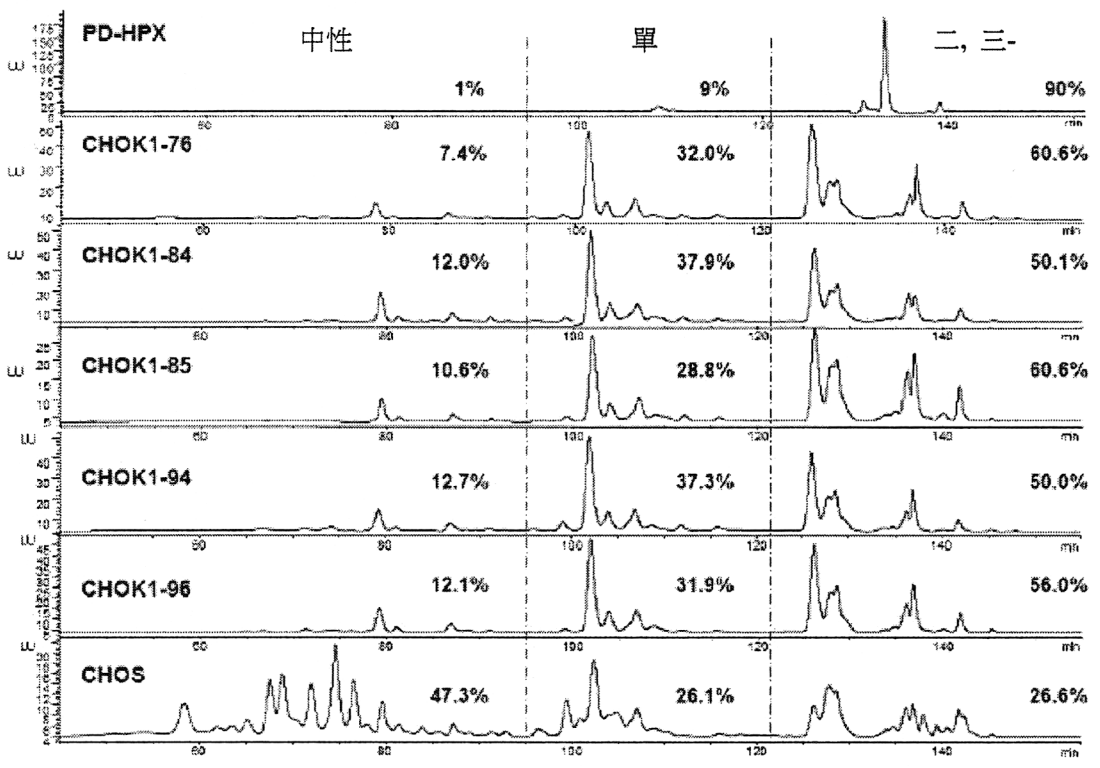


圖 6

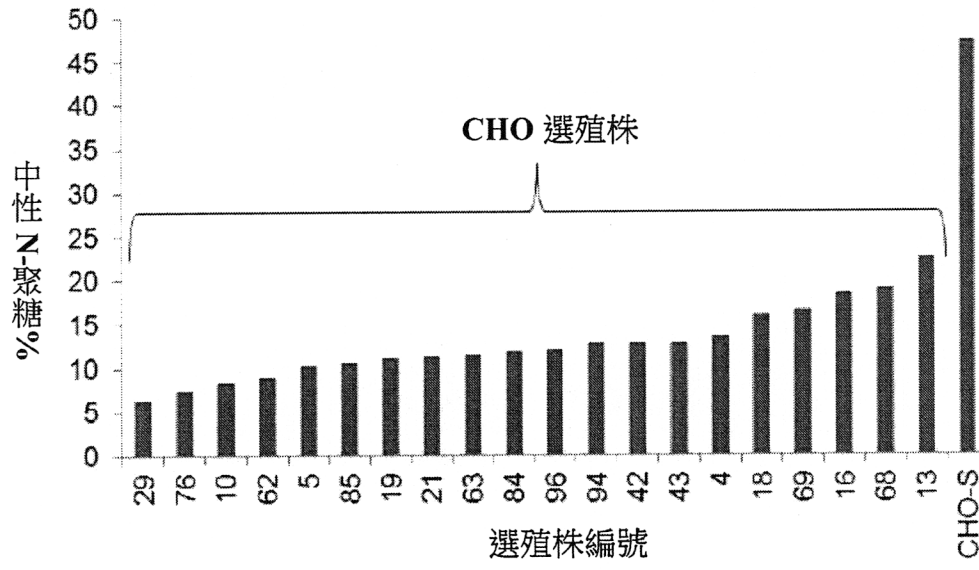


圖 7

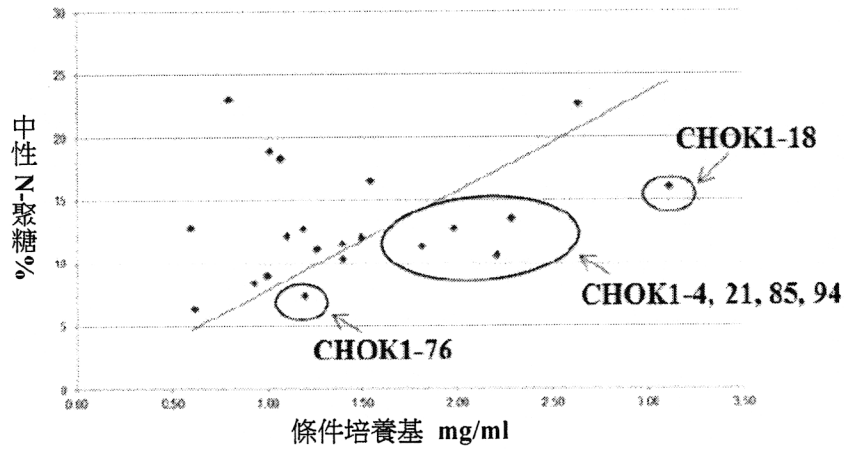


圖 8

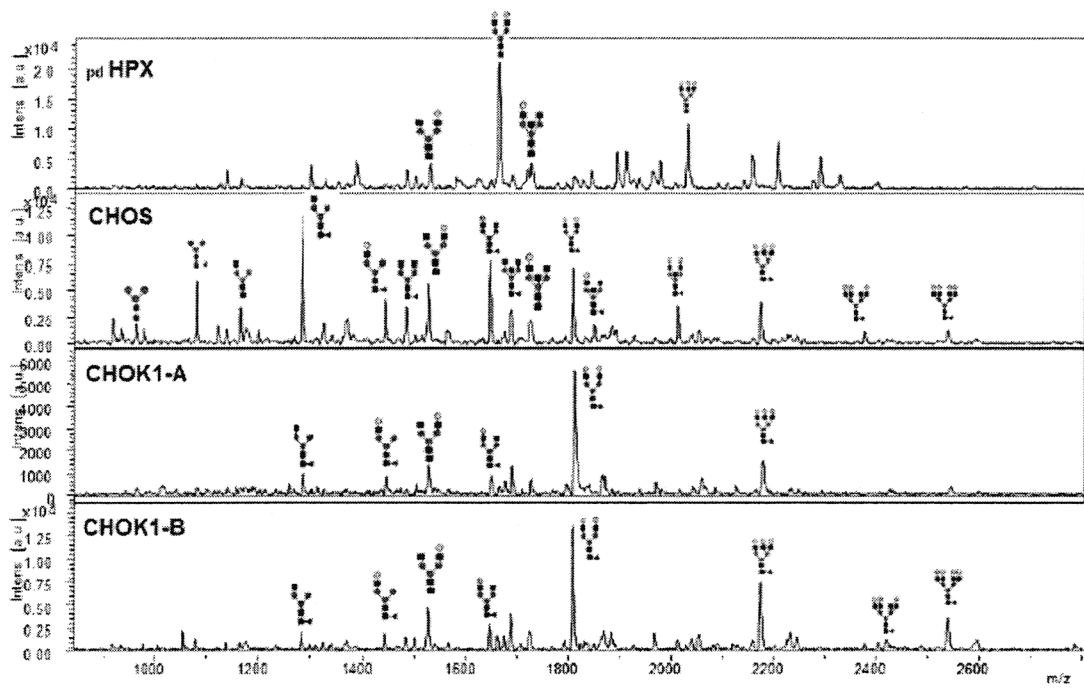


圖 9

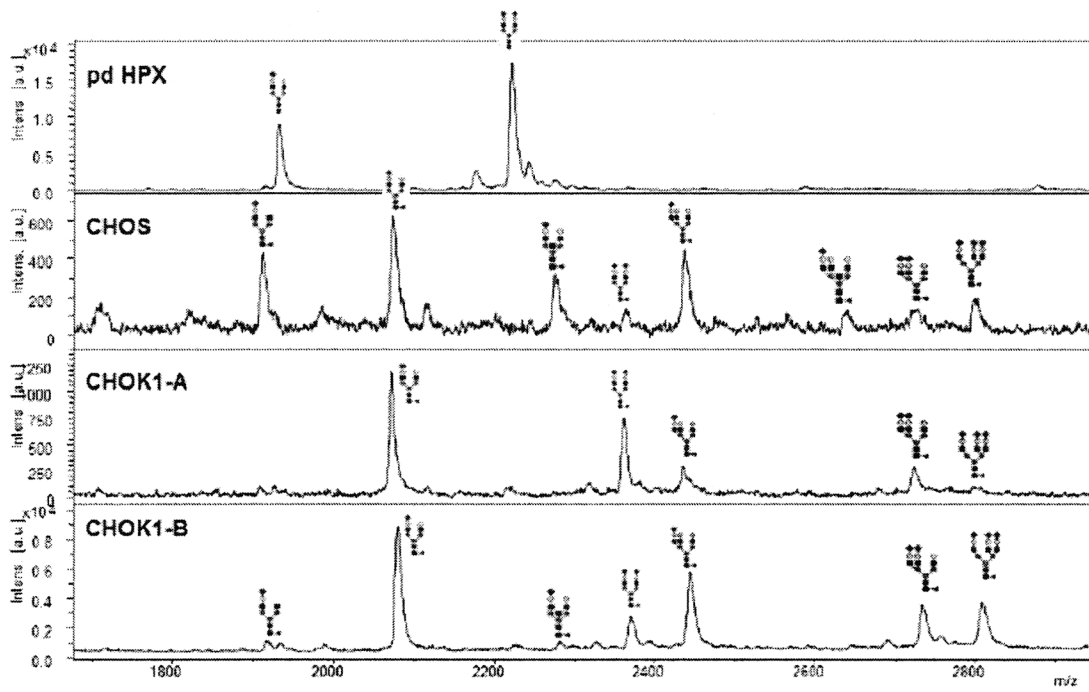


圖 10

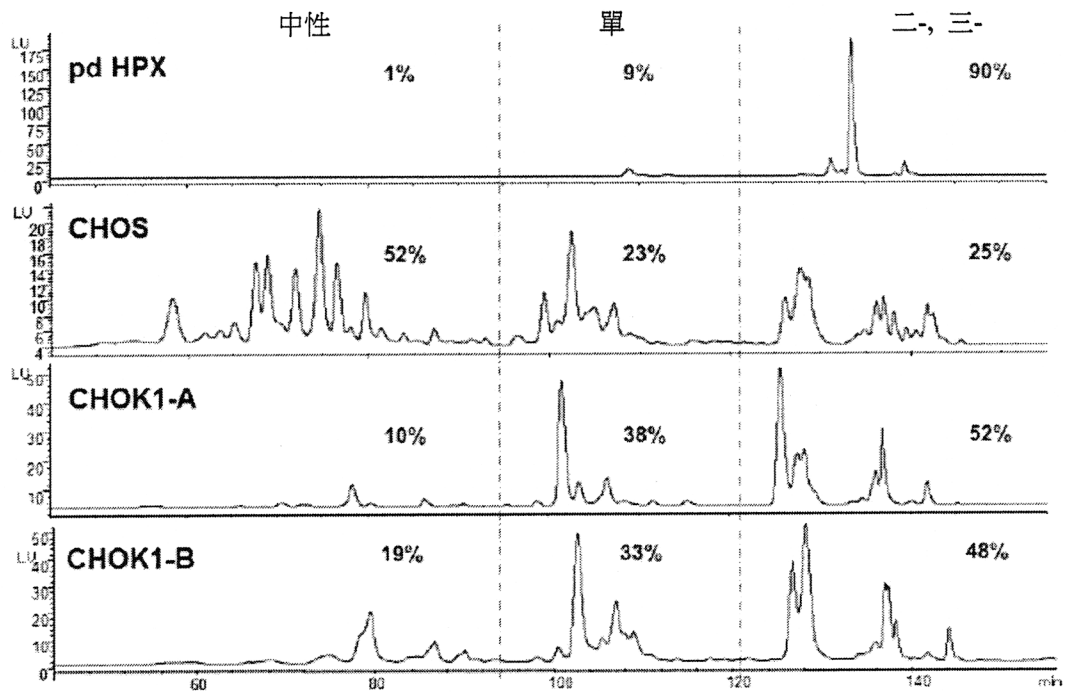


圖 11

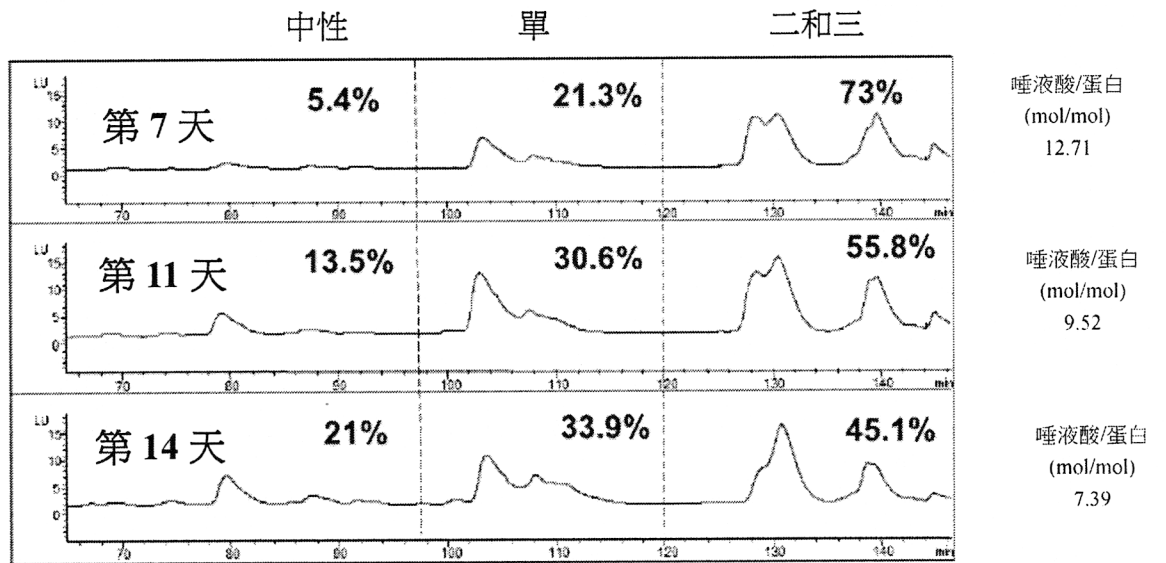


圖 12

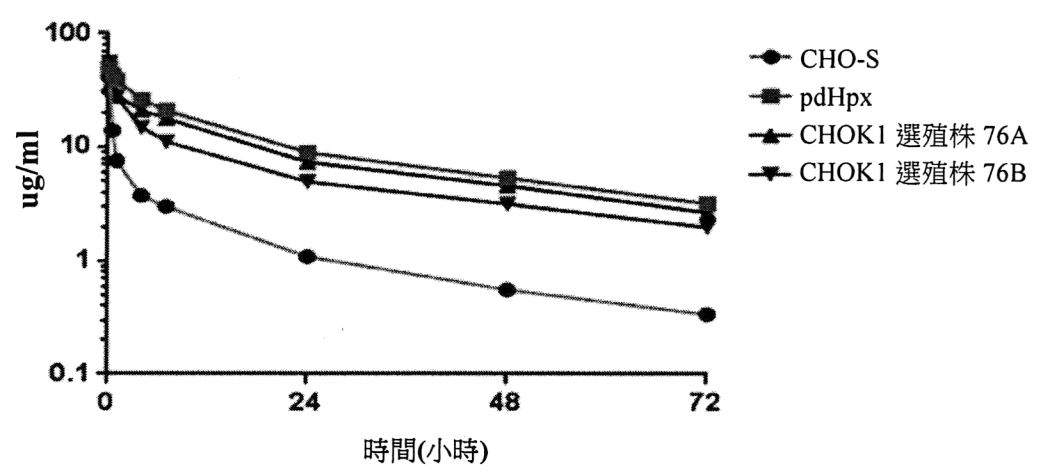


圖 13