



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102791285 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 21

(21) 申请号 201080062950. 7

(22) 申请日 2010. 12. 06

(30) 优先权数据

61/267, 070 2009. 12. 06 US

61/285, 054 2009. 12. 09 US

61/301, 592 2010. 02. 04 US

61/363, 065 2010. 07. 09 US

61/373, 113 2010. 08. 12 US

61/410, 929 2010. 11. 07 US

61/419, 676 2010. 12. 03 US

拜伦·麦金尼 马特·奥特默

于尔格·萨默 卡伦·纽金特 李连

罗伯特·彼得斯

(74) 专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

代理人 李献忠

(51) Int. Cl.

A61K 38/37(2006. 01)

C07K 14/755(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 07. 31

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/059136 2010. 12. 06

(87) PCT申请的公布数据

W02011/069164 EN 2011. 06. 09

(71) 申请人 比奥根艾迪克依蒙菲利亚公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 詹妮弗·A·杜蒙 苏珊·洛

艾伦·J·比通蒂 格伦·皮尔斯

阿尔文·卢克 江海燕

权利要求书 10 页 说明书 52 页 附图 14 页

(54) 发明名称

因子 VIII-Fc 嵌合多肽和杂交多肽及其使用
方法

(57) 摘要

本发明提供了施用因子 VIII 的方法 ;施用包含因子 VIII 的嵌合和杂交多肽的方法 ;包含因子 VIII 的嵌合和杂交多肽 ;编码这类嵌合和杂交多肽的多核苷酸 ;包含这类多核苷酸的细胞 ;和使用这类细胞产生这类嵌合和杂交多肽的方法。

1. 一种给有此需要的受试者施用因子 VIII 的方法,其包括:
以等量的由所述因子 VIII 部分组成的多肽所需的给药间隔的至少约 1.5 倍的给药间隔给所述受试者施用治疗剂量的包含因子 VIII 部分和第二部分的嵌合多肽。
2. 权利要求 1 所述的方法,其中所述嵌合多肽包含 Fc 部分。
3. 权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述给药间隔为等量的由所述因子 VIII 部分组成的多肽所需的给药间隔的至少约 1.5 至 6 倍、1.5 至 5 倍、1.5 至 4 倍、1.5 至 3 倍或 1.5 至 2 倍。
4. 权利要求 3 所述的方法,其中所述给药间隔为等量的由所述因子 VIII 部分组成的多肽所需的给药间隔的至少约 1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5 或 6 倍。
5. 权利要求 1-4 中任一项所述的方法,其中所述嵌合多肽的所述给药间隔为约每 5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 天或更长时间一次。
6. 权利要求 1-5 中任一项所述的方法,其中所述受试者需要预防性治疗。
7. 权利要求 1-4 中任一项所述的方法,其中所述受试者需要按需治疗。
8. 权利要求 7 所述的方法,其中所述受试者需要治疗出血事件。
9. 权利要求 8 所述的方法,其中所述受试者需要治疗关节积血、肌肉出血、口腔流血、出血、至肌肉内的出血、口腔出血、创伤、头创伤、胃肠道出血、颅内出血、腹腔内出血、胸腔内出血、骨折、中枢神经系统出血、咽后间隙出血、腹膜后间隙出血或髂腰肌鞘出血。
10. 权利要求 7 所述的方法,其中所述受试者需要手术预防、围手术期处理或手术治疗。
11. 权利要求 10 所述的方法,其中所述手术为小手术、大手术、拔牙、扁桃体切除术、腹股沟疝切开术、滑膜切除术、全膝置换、穿颅术、骨接合术、创伤性手术、颅内手术、腹内手术、胸内手术或关节置换术。
12. 权利要求 7-11 中任一项所述的方法,其中所述嵌合多肽的所述给药间隔为约每 24-36、24-48、24-72、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71 或 72 小时或更长时间一次。
13. 权利要求 1-12 中任一项所述的方法,其中所述治疗剂量为 10-100IU/kg。
14. 权利要求 12 所述的方法,其中所述治疗剂量为 10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90 或 90-100IU/kg。
15. 权利要求 13 所述的方法,其中所述治疗剂量为 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100IU/kg。
16. 权利要求 1-15 中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。
17. 权利要求 1-16 中任一项所述的方法,其中所述因子 VIII 为人因子 VIII。
18. 权利要求 1-17 中任一项所述的方法,其中所述因子 VIII 具有 B 结构域的完全或部分缺失。
19. 权利要求 17 所述的方法,其中所述嵌合多肽的因子 VIII 部分与表 2 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 1-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 1-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 1-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 1-684) 具有至少 90% 或 95% 的同一性。

20. 权利要求 19 所述的方法,其中所述嵌合多肽的因子 VIII 部分与表 2 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 1-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 1-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 1-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 1-684) 具有同一性。

21. 权利要求 17 所述的方法,其中所述嵌合多肽的因子 VIII 部分与表 2 中显示的具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸序列 -19-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸序列 -19-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸序列 -19-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸序列 -19-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列 -20-684) 具有至少 90% 或 95% 的同一性。

22. 权利要求 21 所述的方法,其中所述嵌合多肽的因子 VIII 部分与表 2 中显示的具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 -19-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 -19-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 -19-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 -19-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 -20-684) 具有同一性。

23. 权利要求 17 或 18 所述的方法,其中所述嵌合多肽的所述第二部分与表 2 中显示的 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1439-1665 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 2333-2559 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 741-967 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 746-972 ;SEQ ID NO:12 的氨基酸 685-924) 具有至少 90% 或 95% 的同一性。

24. 权利要求 23 所述的方法,其中所述嵌合多肽的所述第二部分与表 2 中显示的 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1439-1665 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 2333-2559 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 741-967 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 746-972 ;SEQ ID NO:12 的氨基酸 685-924) 具有同一性。

25. 权利要求 1-24 中任一项所述的方法,其中所述嵌合多肽以包含与所述嵌合多肽结合的第二多肽的杂交体的形式存在,其中所述第二多肽基本上由 Fc 组成。

26. 权利要求 25 所述的方法,其中所述嵌合多肽包含与表 2A(i) 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1665) 具有至少 90% 或 95% 的同一性或具有与表 2A(i) 中显示的具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 -19-1665) 具有至少 90% 或 95% 的同一性的序列。

27. 权利要求 26 所述的方法,其中所述嵌合多肽包含与表 2A(i) 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1665) 具有同一性或具有与表 2A(i) 中显示的具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 -19-1665) 具有同一性的序列。

28. 权利要求 25-27 中任一项所述的方法,其中所述第二多肽基本上由与表 2A(ii) 中显示的不具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 1-227) 具有至少 90% 或 95% 的同一性或具有与表 2A(ii) 中显示的具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 -20-227) 具有至少 90% 或 95% 的同一性的序列组成。

29. 权利要求 28 所述的方法,其中所述第二多肽基本上由与表 2A(ii) 中显示的不具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 1-227) 具有同一性或具有与表 2A(ii) 中显示的具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 -20-227) 具有同一性的序列组成。

30. 权利要求 1-29 中任一项所述的方法,其中将所述嵌合多肽作为包含至少一种赋形剂的药物组合物的部分施用。

31. 一种给有此需要的受试者施用因子 VIII 的方法,其包括
给所述受试者施用治疗剂量的包含因子 VIII 部分和第二部分的嵌合多肽,以获得为通过等量的由所述因子 VIII 部分组成的多肽获得的 AUC 的至少约 1.25 倍的血浆浓度-时间曲线下面积 (AUC)。

32. 权利要求 31 所述的方法,其中以约每 5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 天或更长时间一次的给药间隔施用所述嵌合多肽。

33. 权利要求 31-32 中任一项所述的方法,其中所述受试者需要预防性治疗。

34. 权利要求 31 所述的方法,其中所述受试者需要按需治疗。

35. 权利要求 32 所述的方法,其中所述受试者需要治疗出血事件。

36. 权利要求 33 所述的方法,其中所述受试者需要治疗关节积血、肌肉出血、口腔流血、出血、至肌肉内的出血、口腔出血、创伤、头创伤、胃肠道出血、颅内出血、腹腔内出血、胸腔内出血、骨折、中枢神经系统出血、咽后间隙出血、腹膜后间隙出血或髂腰肌鞘出血。

37. 权利要求 34 所述的方法,其中所述受试者需要手术预防、围手术期处理或手术治疗。

38. 权利要求 37 所述的方法,其中所述手术为小手术、大手术、拔牙、扁桃体切除术、腹股沟疝切开术、滑膜切除术、全膝置换、穿颅术、骨接合术、创伤性手术、颅内手术、腹内手术、胸内手术或关节置换术。

39. 权利要求 34-38 中任一项所述的方法,其中所述嵌合多肽的所述给药间隔为约每 24-36、24-48、24-72、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71 或 72 小时或更长时间一次。

40. 权利要求 31-39 中任一项所述的方法,其中所述治疗剂量为 10-100IU/kg。

41. 权利要求 40 所述的方法,其中所述治疗剂量为 10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90 或 90-100IU/kg。

42. 权利要求 41 所述的方法,其中所述治疗剂量为 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100IU/kg。

43. 权利要求 31-42 中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

44. 权利要求 31-43 中任一项所述的方法,其中所述因子 VIII 为人因子 VIII。

45. 权利要求 31-44 中任一项所述的方法,其中所述因子 VIII 具有 B 结构域的完全或部分缺失。

46. 权利要求 44 所述的方法,其中所述嵌合多肽的因子 VIII 部分与表 2 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 1-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 1-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 1-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 1-684) 具有至少 90% 或 95% 的同一性。

47. 权利要求 46 所述的方法,其中所述嵌合多肽的因子 VIII 部分与表 2 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 1-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 1-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 1-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 1-684) 具有同一性。

48. 权利要求 44 所述的方法,其中所述嵌合多肽的因子 VIII 部分与表 2 中显示的具有

信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸序列 -19-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸序列 -19-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸序列 -19-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸序列 -19-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列 -20-684) 具有至少 90% 或 95% 的同一性。

49. 权利要求 48 所述的方法, 其中所述嵌合多肽的因子 VIII 部分与表 2 中显示的具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 -19-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 -19-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 -19-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 -19-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 -20-684) 具有同一性。

50. 权利要求 43 或 44 所述的方法, 其中所述嵌合多肽的所述第二部分与表 2 中显示的 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1439-1665 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 2333-2559 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 741-967 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 746-972 ;SEQ ID NO:12 的氨基酸 685-924) 具有至少 90% 或 95% 的同一性。

51. 权利要求 50 所述的方法, 其中所述嵌合多肽的所述第二部分与表 2 中显示的 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1439-1665 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 2333-2559 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 741-967 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 746-972 ;SEQ ID NO:12 的氨基酸 685-924) 具有同一性。

52. 权利要求 31-51 中任一项所述的方法, 其中所述嵌合多肽以包含与所述嵌合多肽结合的第二多肽的杂交体的形式存在, 其中所述第二多肽基本上由 Fc 组成。

53. 权利要求 52 所述的方法, 其中所述嵌合多肽包含与表 2A(i) 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1665) 具有至少 90% 或 95% 的同一性或表 2A(i) 中显示的具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 -19-1665) 具有至少 90% 或 95% 的同一性的序列。

54. 权利要求 53 所述的方法, 其中所述嵌合多肽包含与表 2A(i) 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1665) 具有同一性或表 2A(i) 中显示的具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 -19-1665) 具有至少 90% 或 95% 的同一性的序列。

55. 权利要求 52-54 中任一项所述的方法, 其中所述第二多肽基本上由与表 2A(ii) 中显示的不具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 1-227) 具有至少 90% 或 95% 的同一性或表 2A(ii) 中显示的具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 -20-227) 具有至少 90% 或 95% 的同一性的序列组成。

56. 权利要求 55 所述的方法, 其中所述第二多肽基本上由与表 2A(ii) 中显示的不具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 1-227) 具有同一性或表 2A(ii) 中显示的具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 -20-227) 具有至少 90% 或 95% 的同一性的序列组成。

57. 权利要求 31-56 中任一项所述的方法, 其中将所述嵌合多肽作为包含至少一种赋形剂的药物组合物的部分施用。

58. 一种给有此需要的受试者施用因子 VIII 的方法, 其包括

以约每 5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 天或更长时间一次的给药间隔给所述受试者施用治疗剂量的包含因子 VIII 和 Fc 的多肽。

59. 权利要求 58 中任一项所述的方法, 其中所述受试者需要预防性治疗。

60. 权利要求 58-59 中任一项所述的方法,其中所述治疗剂量为 10-100IU/kg。
61. 权利要求 60 所述的方法,其中所述治疗剂量为 10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90 或 90-100IU/kg。
62. 权利要求 61 所述的方法,其中所述治疗剂量为 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100IU/kg。
63. 权利要求 58-62 中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。
64. 权利要求 58-63 中任一项所述的方法,其中所述因子 VIII 为人因子 VIII。
65. 权利要求 58-64 中任一项所述的方法,其中所述因子 VIII 具有 B 结构域的完全或部分缺失。
66. 权利要求 64 所述的方法,其中所述因子 VIII 与表 2 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 1-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 1-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 1-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 1-684) 具有至少 90% 或 95% 的同一性。
67. 权利要求 66 所述的方法,其中所述因子 VIII 与表 2 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 1-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 1-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 1-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 1-684) 具有同一性。
68. 权利要求 64 所述的方法,其中所述因子 VIII 与表 2 中显示的具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸序列 -19-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸序列 -19-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸序列 -19-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸序列 -19-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列 -20-684) 具有至少 90% 或 95% 的同一性。
69. 权利要求 68 所述的方法,其中所述因子 VIII 与表 2 中显示的具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 -19-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 -19-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 -19-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 -19-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 -20-684) 具有同一性。
70. 权利要求 64 或 65 所述的方法,其中所述第二部分与表 2 中显示的 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1439-1665 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 2333-2559 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 741-967 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 746-972 ;SEQ ID NO:12 的氨基酸 685-924) 具有至少 90% 或 95% 的同一性。
71. 权利要求 70 所述的方法,其中所述第二部分与表 2 中显示的 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1439-1665 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 2333-2559 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 741-967 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 746-972 ;SEQ ID NO:12 的氨基酸 685-924) 具有同一性。
72. 权利要求 58-71 中任一项所述的方法,其中所述嵌合多肽为以包含与所述嵌合多肽结合的第二多肽的杂交体的形式存在的因子 VIII-Fc 嵌合多肽,其中所述第二多肽基本上由 Fc 组成。
73. 权利要求 72 所述的方法,其中所述嵌合多肽包含与表 2A(i) 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1665) 具有至少 90% 或 95% 的同一性或与表 2A(i) 中显示的具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 -19-1665) 具有至少 90% 或 95% 的同一性的序列。

74. 权利要求 73 所述的方法,其中所述嵌合多肽包含与表 2A(i) 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1665) 具有同一性或具有与表 2A(i) 中显示的具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 -19-1665) 具有至少 90% 或 95% 的同一性的序列。

75. 权利要求 72-74 中任一项所述的方法,其中所述第二多肽基本上由与表 2A(ii) 中显示的不具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 1-227) 具有至少 90% 或 95% 的同一性或具有与表 2A(ii) 中显示的具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 -20-227) 具有至少 90% 或 95% 的同一性的序列组成。

76. 权利要求 75 所述的方法,其中所述第二多肽基本上由与表 2A(ii) 中显示的不具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 1-227) 具有同一性或具有与表 2A(ii) 中显示的具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 -20-227) 具有至少 90% 或 95% 的同一性的序列组成。

77. 权利要求 58-76 中任一项所述的方法,其中将所述多肽作为包含至少一种赋形剂的药物组合物的部分施用。

78. 一种包含因子 VIII 和 Fc 的多肽,所述因子 VIII 与表 2 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 1-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 1-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 1-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 1-684) 具有至少 90% 或 95% 的同一性。

79. 权利要求 78 所述的多肽,其中所述因子 VIII 与表 2 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 1-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 1-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 1-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 1-684) 具有同一性。

80. 一种包含因子 VIII 和 Fc 的多肽,所述因子 VIII 与表 2 中显示的具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸序列 -19-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸序列 -19-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸序列 -19-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸序列 -19-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列 -20-684) 具有至少 90% 或 95% 的同一性。

81. 权利要求 80 所述的多肽,其中所述因子 VIII 与表 2 中显示的具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 -19-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 -19-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 -19-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 -19-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 -20-684) 具有同一性。

82. 权利要求 78 至 81 中任一项所述的多肽,其中所述 Fc 与表 2 中显示的 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1439-1665 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 2333-2559 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 741-967 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 746-972 ;SEQ ID NO:12 的氨基酸 685-924) 具有至少 90% 或 95% 的同一性。

83. 权利要求 82 所述的多肽,其中所述 Fc 与表 2 中显示的 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1439-1665 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 2333-2559 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 741-967 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 746-972 ;SEQ ID NO:12 的氨基酸 685-924) 具有同一性。

84. 权利要求 78 所述的多肽,其包含与表 2A(i) 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1665) 具有至少 90% 或 95% 的同一性或具有

表 2A(i) 中显示的具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 -19-1665) 具有至少 90% 或 95% 的同一性的序列。

85. 权利要求 84 所述的多肽, 其包含与表 2A(i) 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1665) 具有同一性或表 2A(i) 中显示的具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 -19-1665) 具有至少 90% 或 95% 的同一性的序列。

86. 权利要求 78-85 中任一项所述的多肽, 其以包含第二多肽的杂交体的形式存在, 其中所述第二多肽基本上由 Fc 组成。

87. 权利要求 85 所述的多肽, 其中所述第二多肽基本上由与表 2A(ii) 中显示的不具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 1-227) 具有至少 90% 或 95% 的同一性或表 2A(ii) 中显示的具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 -20-227) 具有至少 90% 或 95% 的同一性的序列组成。

88. 权利要求 86 所述的多肽, 其中所述第二多肽基本上由与表 2A(ii) 中显示的不具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 1-227) 具有同一性或表 2A(ii) 中显示的具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 -20-227) 具有至少 90% 或 95% 的同一性的序列组成。

89. 权利要求 78-88 中任一项所述的多肽, 其具有为由所述因子 VIII 组成的多肽的至少约 1.5 至 6 倍、1.5 至 5 倍、1.5 至 4 倍、1.5 至 3 倍或 1.5 至 2 倍的半衰期。

90. 一种多核苷酸, 其编码权利要求 78-85 中任一项所述的多肽。

91. 权利要求 90 所述的多核苷酸, 其包含表 1 的因子 VIII-Fc 核苷酸序列 (SEQ ID NO:1、5、7、9 或 11)。

92. 一种多核苷酸, 其编码权利要求 86-89 中任一项所述的因子 VIII-Fc 多肽和所述的第二肽。

93. 权利要求 90-92 中任一项所述的多核苷酸, 其为载体、质粒、噬菌体或病毒。

94. 权利要求 90-93 中任一项所述的多核苷酸, 其为 DNA 或 RNA。

95. 一种培养的人胚胎细胞, 其包含权利要求 89-94 中任一项所述的多核苷酸。

96. 权利要求 95 所述的细胞, 其为 HEK293 细胞。

97. 一种产生因子 VIII-Fc 杂交蛋白的方法, 其包括:

在允许编码的因子 VIII-Fc 嵌合多肽和编码的基本上由 Fc 组成的多肽表达的条件下培养权利要求 95 或 96 所述的细胞; 和

回收编码的因子 VIII-Fc 杂交蛋白。

98. 一种蛋白质, 其由权利要求 97 所述的方法产生。

99. 权利要求 1-57 中任一项所述的方法, 其中所述嵌合多肽具有一个或多个选自下列特征的特征:

可与由所述因子 VIII 部分组成的多肽的能力相比较的与磷脂囊泡相互作用的能力;

可与由所述因子 VIII 部分组成的多肽的能力相比较的形成激活因子 X 的 Xase 复合物的能力;

可与由所述因子 VIII 部分组成的多肽的能力相比较的在 5 分钟内被 α -凝血酶激活的能力; 和

可与由所述因子 VIII 部分组成的多肽的能力相比较的与因子 IXa 相互作用的能力。

100. 权利要求 99 所述的方法, 其中所述嵌合多肽具有一个或多个选自下列特征的特征:

以在由所述因子 VIII 部分组成的多肽的 K_m 的约 1 个、约 1.5 个或约 2 个标准差内的 K_m 形成激活因子 X 的 Xase 复合物, 其中将 K_m 测量为因子 X 浓度的函数;

以在由所述因子 VIII 部分组成的多肽的 V_{max} 的约 1 个、约 1.5 个或约 2 个标准差内的 V_{max} 形成激活因子 X 的 Xase 复合物, 其中将 V_{max} 测量为因子 X 浓度的函数;

以在由所述因子 VIII 部分组成的多肽的 K_d 的约 1 个、约 1.5 个或约 2 个标准差内的 K_d 形成激活因子 X 的 Xase 复合物, 其中将 K_d 测量为因子 IXa 浓度的函数; 和

以在由所述因子 VIII 部分组成的多肽的 V_{max} 的约 1 个、约 1.5 个或约 2 个标准差内的 V_{max} 形成激活因子 X 的 Xase 复合物, 其中将 V_{max} 测量为因子 IXa 浓度的函数。

101. 权利要求 58-77 中任一项所述的方法, 其中所述多肽具有一个或多个选自下列特征的特征:

可与由所述因子 VIII 部分组成的多肽的能力相比较的与磷脂囊泡相互作用的能力;

可与由所述因子 VIII 部分组成的多肽的能力相比较的形成激活因子 X 的 Xase 复合物的能力;

可与由所述因子 VIII 部分组成的多肽的能力相比较的在 5 分钟内被 α -凝血酶激活的能力; 和

可与由所述因子 VIII 部分组成的多肽的能力相比较的与因子 IXa 相互作用的能力。

102. 权利要求 101 所述的方法, 其中所述多肽具有一个或多个选自下列特征的特征:

以在由所述因子 VIII 部分组成的多肽的 K_m 的约 1 个、约 1.5 个或约 2 个标准差内的 K_m 形成激活因子 X 的 Xase 复合物, 其中将 K_m 测量为因子 X 浓度的函数;

以在由所述因子 VIII 部分组成的多肽的 V_{max} 的约 1 个、约 1.5 个或约 2 个标准差内的 V_{max} 形成激活因子 X 的 Xase 复合物, 其中将 V_{max} 测量为因子 X 浓度的函数;

以在由所述因子 VIII 部分组成的多肽的 K_d 的约 1 个、约 1.5 个或约 2 个标准差内的 K_d 形成激活因子 X 的 Xase 复合物, 其中将 K_d 其中测量为因子 IXa 浓度的函数; 和

以在由所述因子 VIII 部分组成的多肽的 V_{max} 的约 1 个、约 1.5 个或约 2 个标准差内的 V_{max} 形成激活因子 X 的 Xase 复合物, 其中将 V_{max} 测量为因子 IXa 浓度的函数。

103. 权利要求 78-89 和 98 中任一项所述的多肽, 其具有 1 个、约 1.5 个或约 2 个或更多个选自下列特征的特征:

可与由所述因子 VIII 部分组成的多肽的能力相比较的与磷脂囊泡相互作用的能力;

可与由所述因子 VIII 部分组成的多肽的能力相比较的形成激活因子 X 的 Xase 复合物的能力;

可与由所述因子 VIII 部分组成的多肽的能力相比较的在 5 分钟内被 α -凝血酶激活的能力; 和

可与由所述因子 VIII 部分组成的多肽的能力相比较的与因子 IXa 相互作用的能力。

104. 权利要求 101 所述的方法, 其中所述多肽具有一个或多个选自下列特征的特征:

以在由所述因子 VIII 部分组成的多肽的 K_m 的约 1 个、约 1.5 个或约 2 个标准差内的 K_m 形成激活因子 X 的 Xase 复合物, 其中将 K_m 测量为因子 X 浓度的函数;

以在由所述因子 VIII 部分组成的多肽的 $V_{\max}$ 的约 1 个、约 1.5 个或约 2 个标准差内的 $V_{\max}$ 形成激活因子 X 的 Xase 复合物, 其中将 $V_{\max}$ 测量为因子 X 浓度的函数;

以在由所述因子 VIII 部分组成的多肽的 K_d 的约 1 个、约 1.5 个或约 2 个标准差内的 K_d 形成激活因子 X 的 Xase 复合物, 其中将 K_d 测量为因子 IXa 浓度的函数; 和

以在由所述因子 VIII 部分组成的多肽的 $V_{\max}$ 的约 1 个、约 1.5 个或约 2 个标准差内的 $V_{\max}$ 形成激活因子 X 的 Xase 复合物, 其中将 $V_{\max}$ 测量为因子 IXa 浓度的函数。

105. 权利要求 1-77 中任一项所述的方法, 其中所述剂量具有大于 1.38 IU/dL 每 IU/kg 的平均增量恢复 (K -值) (活性; 观察到的)。

106. 权利要求 1-77 和 104 中任一项所述的方法, 其中所述剂量具有至少约 1.5、至少约 1.85 或至少约 2.46 IU/dL 每 IU/kg 的平均增量恢复 (K -值) (活性; 观察到的)。

107. 权利要求 1-75 和 104-106 中任一项所述的方法, 其中所述嵌合多肽在所述患者群体中或所述受试者中展示一个或多个药代动力学参数, 其选自:

约 2.33 ± 1.08 mL/小时/kg 或更少的所述患者群体中的平均清除率 (CL) (活性);

约 1.8-2.69 mL/小时/kg 的所述患者群体中的平均清除率 (CL) (活性);

为由所述因子 VIII 部分组成的多肽的清除率的约 65% 的所述患者群体中的平均清除率 (CL) (活性);

约 1.22-5.19 mL/小时/kg 的所述受试者中的清除率 (CL) (活性);

至少约 26.3 ± 8.33 小时的所述患者群体中的平均停留时间 (MRT) (活性);

约 25.9-26.5 小时的所述患者群体中的平均 MRT (活性);

为由所述因子 VIII 部分组成的多肽的平均 MRT 的约 1.5 倍的所述患者群体中的平均 MRT (活性);

约 14-41.3 小时的所述受试者中的平均停留时间 (MRT) (活性);

约 18.3 ± 5.79 小时的所述患者群体中的平均 $t_{1/2\beta}$ (活性);

为约 18-18.4 小时的所述患者群体中的平均 $t_{1/2\beta}$ (活性);

为由所述因子 VIII 部分组成的多肽的平均 $t_{1/2\beta}$ 的约 1.5 倍的所述患者群体中的平均 $t_{1/2\beta}$ (活性);

约 11-26.4 小时的所述受试者中的 $t_{1/2\beta}$ (活性);

约 2.01 ± 0.44 IU/dL 每 IU/kg 的所述患者群体中的平均增量恢复 (K 值) (活性; 观察到的);

约 1.85-2.46 IU/dL 每 IU/kg 的所述患者群体中的平均增量恢复 (K 值) (活性; 观察到的);

为由所述因子 VIII 部分组成的多肽的平均增量恢复的约 90% 的所述患者群体中的平均增量恢复 (K 值) (活性; 观察到的);

约 1.38-2.88 IU/dL 每 IU/kg 的所述受试者中的增量恢复 (K 值) (活性; 观察到的);

约 55.1 ± 12.3 mL/kg 的所述患者群体中的平均 V_{ss} (活性);

约 45.3-56.1 mL/kg 的所述患者群体中的平均 V_{ss} (活性);

约 37.7-79.4 mL/kg 的所述受试者中的 V_{ss} (活性);

约 49.9 ± 18.2 IU*h/dL 每 IU/kg 的所述患者群体中的平均 AUC/剂量 (活性);

约 44.8-57.6 IU*h/dL 每 IU/kg 的所述患者群体中的平均 AUC/剂量 (活性); 和

约 19.2-81.7IU*h/dL 每 IU/kg 的所述受试者中的 AUC/ 剂量。

108. 权利要求 1-77 和 104-106 中任一项所述的方法,其中所述第二部分为 XTEN 或白蛋白。

109. 权利要求 1-77 和 104-106 中任一项所述的方法,其中所述治疗剂量为约 10 至约 150、100-110、110-120、120-130、130-140、140-150、110、115、120、125、130、135、140、145 或 150IU/kg。

110. 权利要求 1-77 和 104-106 中任一项所述的方法,其中所述给药间隔为 1.5 至 5、1.5、2、3、4 或 5 天或更长时间。

因子 VIII-Fc 嵌合多肽和杂交多肽及其使用方法

[0001] 发明背景

发明领域

[0002] 本发明一般涉及凝血障碍的治疗领域。

[0003] 背景领域

[0004] 血友病 A 是由因子 VIII (FVIII) 基因的突变和 / 或缺失 (导致 FVIII 活性的缺乏) 引起的 X 连锁出血障碍 (Peyvandi 等人 2006)。该疾病的特征在于创伤后自发性出血和过量流血。随着时间的过去,通常始于幼童时期的至肌肉和关节内的反复出血产生血友病性关节炎病和不可逆的关节损伤。该损伤是渐进的并且可导致严重受限的关节活动性、肌肉萎缩和慢性疼痛 (Rodriguez-Merchan, E. G., Semin. Thromb. Hemost. 29:87-96 (2003) (将其通过引用整体并入本文))。

[0005] A2 结构域是因子 VIII 分子的促凝活性所必需的。研究显示猪因子 VIII 具有为人因子 VIII 6 倍的促凝活性 (Lollar, P. 和 E. T. Parker, J. Biol. Chem. 266:12481-12486 (1991)) 以及人与猪因子 VIII 之间的促凝剂活性的差异似乎基于人与猪 A2 结构域的一个或多个残基之间的氨基酸序列的差异 (Lollar, P. 等人, J. Biol. Chem. 267:23652-23657 (1992)) (将其通过引用整体并入本文))。

[0006] 血友病 A 的治疗是通过靶向使 FVIII 活性恢复至 1 至 5% 的正常水平以防止自发性出血的替代疗法 (Mannucci, P. M. 等人, N. Engl. J. Med. 344:1773-1779 (2001), 将其通过引用整体并入本文)。存在可用于按需治疗出血事件或通过预防性治疗预防出血事件发生的血浆源性 FVIII 和重组 FVIII 产物。基于这类制品的半衰期,治疗方案需要频繁的静脉内施用。这样的频繁施用非常痛苦并且不方便。

[0007] 由于血浆源性 FVIII 和重组 FVIII 的开发,死亡率的降低、关节损伤的预防以及生活质量的改善已取得重要成就。延长的出血保护作用代表血友病 A 患者的治疗中的另一个至关重要的成就。然而,迄今为止,还未开发出允许长期保护的产物。因此,仍然需要比目前疗法更可耐受且更有效的治疗因子 VIII 缺乏而引起的血友病的改进的方法。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了施用因子 VIII 的方法 ;施用包含因子 VIII 的嵌合多肽和这类嵌合多肽的杂交体的方法 ;包含因子 VIII 的嵌合多肽和这类嵌合多肽的杂交体 ;编码这类嵌合多肽和杂交多肽的多核苷酸 ;包含这类多核苷酸的细胞 ;和使用这类细胞产生这类嵌合和杂交多肽的方法。

[0010] 本发明提供了给有此需要的受试者施用因子 VIII 的方法,其包括以等量的不具有非 - 因子 VIII 部分例如无 Fc 部分的所述因子 VIII (由所述因子 VIII 部分组成的部分) 所需的给药间隔的至少约 1.5 倍的给药间隔给受试者施用治疗剂量的嵌合因子 VIII 多肽,例如嵌合因子 VIII-Fc 多肽。

[0011] 给药间隔可以为等量的不具有非 - 因子 VIII 部分例如无 Fc 部分的所述因子 VIII (由所述因子 VIII 部分组成的多肽) 所需的给药间隔的至少约 1.5 至 6 倍、1.5 至 5

倍、1.5 至 4 倍、1.5 至 3 倍或 1.5 至 2 倍。给药间隔可以为等量的不具有非 - 因子 VIII 部分例如无 Fc 部分的所述因子 VIII (由所述因子 VIII 部分组成的多肽) 所需的给药间隔的至少约 1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5 或 6 倍。给药间隔可以为每 5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 天或更长时间一次。

[0012] 给药间隔可以为至少约 1.5 至 5、1.5、2、3、4 或 5 天或更长时间。

[0013] 本发明还提供了给有此需要的受试者施用因子 VIII 的方法, 其包括给受试者施用治疗剂量的嵌合因子 VIII 多肽例如嵌合因子 VIII-Fc 多肽, 以获得为通过等量的不具有非 - 因子 VIII 部分例如无 Fc 部分的所述因子 VIII (由所述因子 VIII 部分组成的多肽) 获得的 AUC 的至少约 1.25 倍的血浆浓度 - 时间曲线下面积 (area under the plasma concentration versus time curve) (AUC)。

[0014] 本发明还提供了给有此需要的受试者施用因子 VIII 的方法, 其包括以约每 5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 天或更长时间一次的给药间隔给受试者施用治疗剂量的包含因子 VIII 和 Fc 的多肽。

[0015] 可对需要预防性治疗或按需治疗的受试者实施本发明的方法。

[0016] 按需治疗包括出血事件、关节积血、肌肉出血、口腔出血、出血、至肌肉内的出血、口腔出血、创伤、头创伤 (trauma capitis) (头创伤)、胃肠道出血、颅内出血、腹腔内出血、, 胸腔内出血、骨折、中枢神经系统出血、咽后间隙出血、腹膜后间隙出血或髂腰肌鞘 (illioipsoas sheath) 出血的治疗。受试者可能需要手术预防、围手术期处理 (perioperative management) 或手术治疗。此类手术包括例如小手术、大手术、拔牙、扁桃体切除术、腹股沟疝切开术、滑膜切除术、全膝置换、穿颅术、骨接合术、创伤性手术 (trauma surgery)、颅内手术、腹内手术、胸内手术或关节置换术。

[0017] 为了进行按需治疗, 所述嵌合多肽的给药间隔为约每 24-36、24-48、24-72、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71 或 72 小时或更长时间一次。

[0018] 可用于本发明的方法的治疗剂量为约 10 至约 100IU/kg, 更具体地, 约 10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90 或 90-100IU/kg, 更具体地约 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100IU/kg。

[0019] 可用于本发明的方法的治疗剂量为约 10 至约 150IU/kg, 更具体地约 100-110、110-120、120-130、130-140、140-150IU/kg, 更具体地, 约 110、115、120、125、130、135、140、145 或 150IU/kg。

[0020] 本发明的方法的受试者可以是人受试者或可以是非人哺乳动物。非人哺乳动物包括例如小鼠、狗、灵长类动物、猴、猫、马、牛、猪和其它家养动物和小动物。给药间隔和 AUC 的确定可在单个受试者或受试者群体中进行。

[0021] 因子 VIII (或嵌合多肽的因子 VIII 部分) 可以是人因子 VIII 或非 - 人因子 VIII, 例如猪、小鼠或犬因子 VIII。因子 VIII (或嵌合多肽的因子 VIII 部分) 可具有 B 结构域的完全或部分缺失。

[0022] 因子 VIII (或嵌合多肽的因子 VIII 部分) 可以与表 2 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1438 ; SEQ ID NO:6 的氨基酸 1-2332 ;

SEQ ID NO:8 的氨基酸 1-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 1-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 1-684) 具有至少 90% 或 95% 的同一性。因子 VIII(或嵌合多肽的因子 VIII 部分) 可与表 2 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 1-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 1-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 1-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 1-684) 具有同一性。

[0023] 因子 VIII(或嵌合多肽的因子 VIII 部分) 可与表 2 中显示的具有信号序列的因子 VIII 氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸序列 -19-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸序列 -19-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸序列 -19-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸序列 -19-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列 -20-684) 具有至少 90% 或 95% 的同一性。因子 VIM(或嵌合多肽的因子 VIII 部分) 可与表 2 中显示的具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 -19-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 -19-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 -19-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 -19-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 -20-684) 具有同一性。

[0024] Fc 部分 (或嵌合多肽的 Fc 部分) 可与表 2 中显示的 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1439-1665 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 2333-2559 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 741-967 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 746-972 ;SEQ ID NO:12 的氨基酸 685-924) 具有至少 90% 或 95% 的同一性。Fc 部分 (或嵌合多肽的 Fc 部分) 可与表 2 中显示的 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1439-1665 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 2333-2559 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 741-967 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 746-972 ;SEQ ID NO:12 的氨基酸 685-924) 具有同一性。

[0025] 嵌合多肽可包含与表 2A(i) 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1665) 具有至少 90% 或 95% 的同一性或具有与表 2A(i) 中显示的具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 -19-1665) 具有至少 90% 或 95% 的同一性的序列。嵌合多肽可包含与表 2A(i) 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1665) 具有同一性或具有与表 2A(i) 中显示的具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 -19-1665) 具有同一性的序列。

[0026] 嵌合多肽可以以包含与所述嵌合多肽结合的第二多肽的杂交体的形式存在, 其中所述第二多肽包含 Fc 或基本上由其组成。

[0027] 第二多肽可包含与表 2A(ii) 中显示的不具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 1-227) 具有至少 90% 或 95% 的同一性或具有与表 2A(ii) 中显示的具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 -20-227) 具有至少 90% 或 95% 的同一性的序列或基本上由所述序列组成。第二多肽可包含与表 2A(ii) 中显示的不具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 1-227) 具有同一性或具有与表 2A(ii) 中显示的具有信号序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4 的氨基酸 -20-227) 具有同一性的序列或基本上由所述序列组成。

[0028] 可将嵌合多肽或杂交体作为包含至少一种赋形剂的药物组合物的部分施用。

[0029] 本发明还提供了上述嵌合多肽和杂交多肽本身、编码它们的多核苷酸、包含所述多核苷酸的培养的人胚胎细胞以及产生这类嵌合和杂交多肽的方法和利用这类方法产生的多肽。

[0030] 附图简述

[0031] 图 1. rFVIIIIFc 单体的示意图。

[0032] 图 2. 在 50IU/kg 的静脉内剂量后, 血友病 A 小鼠中与 **ReFacto**[®] 相比较的 rFVIIIIFc 的 WBCT (n=6 只小鼠 / 组)。

[0033] 图 3. 在 50IU/kg 的 rFVIIIIFc、**ReFacto**[®] 和 **Advate**[®] 的单次 IV 剂量后血友病 A 小鼠的血浆中的生色活性。

[0034] 图 4. 血友病 A 狗中 rFVIIIIFc 和 **ReFacto**[®] 的 WBCT。(A) rFVIIIIFc。(B) 在交叉研究中, 施用 **ReFacto**[®], 然后施用 rFVIIIIFc。

[0035] 图 5. 血友病 A 狗中静脉内 rFVIIIIFc 和 **ReFacto**[®] 的药代动力学 (通过 ELISA 测量的)。

[0036] 图 6. 血友病 A 狗中单次静脉内剂量后 rFVIII 和 **ReFacto**[®] 的活性 (通过 FVIII-特异性生色活性测定测量的)。

[0037] 图 7. 在食蟹猴中, 在单次静脉内剂量 (125IU/kg) 后随时间过去后 rFVIIIIFc 和 Xyntha 的组平均血浆浓度 (n=6, 平均值 $\pm$ SD)。通过 ELISA 测量血浆浓度。

[0038] 图 8. 在食蟹猴中, 单次静脉内剂量 (125IU/kg) 后 rFVIIIIFc 和 Xyntha 的个体血浆浓度对时间曲线 (n=6, 平均值 $\pm$ SD)。通过 ELISA 测量血浆浓度。(A) 通过 ELISA 测量的 rFVIIIIFc。(B) 通过 ELISA 测量的 Xyntha。

[0039] 图 9. 在食蟹猴中, 单次静脉内剂量 (125IU/kg) 后 rFVIIIIFc 和 Xyntha 的组平均血浆生色活性 (n=6, 平均值 $\pm$ SD)。使用 FVIII-特异性生色活性测定法测量的 FVIII 活性活性。

[0040] 图 10. 在食蟹猴中, 单次静脉内剂量 (125IU/kg) 后 rFVIIIIFc 和 Xyntha 的个体血浆生色活性对时间曲线 (n=6, 平均值 $\pm$ SD)。使用 FVIII 特异性生色活性测定法测量 FVIII 活性。(A) rFVIIIIFc 生色活性。(B) Xyntha 生色活性。

[0041] 图 11. rFVIII-Fc 的生物化学表征: 作为因子 X 浓度的函数的因子 X 的激活。

[0042] 图 12. rFVIII-Fc 的生物化学表征: 作为因子 IXa 浓度的函数的因子 X 的激活。

[0043] 图 13. 观察到的平均 FVIII 活性 ($\pm$ SE) (一步测定法, 25IU/kg (A) 或 65IU/kg (B); 和生色测定法, 25IU/kg (C) 或 65IU/kg (D)) 对时间。

[0044] 图 14. 观察到的组平均 FVIII 活性 ($\pm$ SE) (一步测定法 (A) 或生色测定法 (B)) 对时间。

[0045] 发明详述

[0046] 本发明提供了使用更长的给药间隔和 / 或更大的 AUC (与利用目前已知的因子 VIII 产品可能获得的给药间隔和 / 或 AUC 相比较的) 利用因子 VIII 治疗血友病 A 的方法。本发明还提供了改进的因子 VIII 嵌合多肽、因子 VIII 嵌合多核苷酸以及产生方法。

[0047] 血友病 A 的治疗是靶向使 FVIII 活性恢复至 1 至 5% 的正常水平以防止自发性出血的替代疗法 (Mannucci, P. M. 等人, N. Engl. J. Med. 344:1773-9 (2001), 通过引用整体并入本文)。存在可用于按需治疗出血事件或通过预防性治疗防止出血事件发生的血浆源性 FVIII 产物和重组 FVIII 产物。基于这类产物的半衰期 (10-12 小时) (White G. C. 等人, Thromb. Haemost. 77:660-7 (1997); Morfini, M., Haemophilia 9 (增刊):94-99; 论述 100 (2003)), 治疗方案需要通常每周 2 至 3 次 (对于预防) 和每天 1 至 3 次 (对于按需治疗) 的频繁静脉内施用 (Manco-Johnson, M. J. 等人, N. Engl. J. Med. 357:535-544 (2007)),

将所述每一篇文献通过引用整体并入本文。这样的频繁的施用是痛苦且不便的。

[0048] 本发明提供了给有此需要的受试者施用因子 VIII 的方法,其包括以等量的不具有非-因子 VIII 部分例如不具有 Fc 部分的所述因子 VIII(由所述因子 VIII 部分组成的多肽)所需的给药间隔的至少约 1.5 倍的给药间隔给受试者施用治疗剂量的嵌合因子 VIII 多肽,例如嵌合因子 VIII-Fc 多肽或这类多肽的杂交体。

[0049] 给药间隔可以为等量的不具有非-因子 VIII 部分例如不具有 Fc 部分的所述因子 VIII(由所述因子 VIII 部分组成的多肽)所需的给药间隔的至少约 1.5 至 6 倍、1.5 至 5 倍、1.5 至 4 倍、1.5 至 3 倍或 1.5 至 2 倍。给药间隔可为等量的不具有非-因子 VIII 部分例如不具有 Fc 部分的所述因子 VIII(由所述因子 VIII 部分组成的多肽)所需的给药间隔的至少约 1.5 倍、2 倍、2.5 倍、3 倍、3.5 倍、4 倍、4.5 倍、5 倍、5.5 倍或 6 倍。给药间隔可以为约每 5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 天或更长时间一次。

[0050] 给药间隔可以为至少约 1.5 至 5 天、1.5 天、2 天、3 天、4 天或 5 天或更长时间。

[0051] 本发明还提供了给有此需要的受试者施用因子 VIII 的方法,其包括给受试者施用治疗剂量的嵌合因子 VIII 多肽,例如嵌合因子 VIII-Fc 多肽或这类多肽的杂交体,以获得为通过等量的不具有非-因子 VIII 部分例如不具有 Fc 部分的所述因子 VIII(由所述因子 VIII 部分组成的多肽)获得的 AUC 的至少约 1.25 倍的血浆浓度-时间曲线下面积 (AUC)。

[0052] 本发明还提供了给有此需要的受试者施用因子 VIII 的方法,其包括以约每 5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 天或更长时间一次的给药间隔给受试者施用治疗剂量的包含因子 VIII 和 Fc 的多肽或这类多肽的杂交体。

[0053] 可对需要预防性治疗或按需治疗的需要的受试者实施本发明的方法。

[0054] 如本文中所用,“施用”意指通过药学上可接受的途径给受试者提供本发明的药学上可接受的 VIII 多肽。优选施用途是静脉内途径例如静脉注射和静脉内输注。施用的其它途径包括例如皮下、肌内、口服、经鼻和经肺施用。可将嵌合多肽和杂交蛋白作为包含至少一种赋形剂的药物组合物的部分来施用。

[0055] 如本文中所用的“血浆浓度-时间曲线下面积 (AUC)”与药理学领域的术语的含义相同,并且基于施用后因子 VIII 的吸收的速率和程度。使用基于曲线的斜率,使用外推法测定在指定的时间段例如 12、18、24、36、48 或 72 小时、或无穷时间内的 AUC。除非本文中另外指定,否则测定无穷时间的 AUC。可在单个受试者中或在计算其平均值的受试者群体中进行 AUC 的测定。

[0056] 如本文中所用,因子 VIII 的“B 结构域”与本领域已知的 B 结构域相同,其由内部氨基酸序列同一性和被凝血酶切割的蛋白酶水解切割位点界定,例如全长人因子 VIII 的残基 Ser741-Arg1648。其它人因子 VIII 结构域由下列氨基酸残基界定: A1, 残基 Ala1-Arg372; A2, 残基 Ser373-Arg740; A3, 残基 Ser1690-Ile2032; C1, 残基 Arg2033-Asn2172; C2, 残基 Ser2173-Tyr2332。A3-C1-C2 序列包括残基 Ser1690-Tyr2332。其余序列残基 Glu1 649-Arg1689 通常被称为因子 VIII 轻链激活肽。猪、小鼠和犬因子 VIII 的所有结构域(包括 B 细胞域)的定位在本领域也是已知的。优选地,因子 VIII 的 B 结构域缺失(“B 结构域缺失的因子 VIII”或“BDD FVIII”)。BDD FVIII 的实例为 REFACTO(重组 BDD FVIII),其具有与表 2A(i) 中的序列的因子 VIII 部分 (SEQ ID NO:2

的氨基酸 -19-1438 或 1-1438) 相同的序列。

[0057] “B 结构域缺失的因子 VIII” 可具有美国专利 No. 6, 316, 226、6, 346, 513、7, 041, 635、5, 789, 203、6, 060, 447、5, 595, 886、6, 228, 620、5, 972, 885、6, 048, 720、5, 543, 502、5, 610, 278、5, 171, 844、5, 112, 950、4, 868, 112 和 6, 458, 563 中公开的完全或部分缺失, 将所述每一个专利通过引用整体并入本文。在一些实施方案中, 本发明的 B 结构域缺失的因子 VIII 序列包含在美国专利 No. 6, 316, 226 (也在 US 6, 346, 513 中) 的第 4 栏第 4 行至第 5 栏第 28 行和实施例 1-5 中公开的任一缺失。在一些实施方案中, 本发明的 B 结构域缺失的因子 VIII 具有美国专利 No. 5, 789, 203 (也在 US 6, 060, 447、US 5, 595, 886 和 US 6, 228, 620 中) 的第 2 栏第 26-51 行和实施例 5-8 中公开的缺失。在一些实施方案中, B 结构域缺失的因子 VIII 具有美国专利 No. 5, 972, 885 的第 1 栏第 25 行至第 2 栏第 40 行; 美国专利 No. 6, 048, 720 的第 6 栏, 第 1-22 行和实施例; 美国专利 No. 5, 543, 502 的第 2 栏第 17-46 行; 美国专利 No. 5, 171, 844 的第 4 栏第 22 行至第 5 栏第 36 行; 美国专利 No. 5, 112, 950 的第 2 栏第 55-68 行、图 2 和实施例 1; 美国专利 No. 4, 868, 112 的第 2 栏第 2 行至第 19 栏, 第 21 行和表 2; 美国专利 No. 7, 041, 635 的第 2 栏第 1 行至第 3 栏第 19 行、第 3 栏第 40 行至第 4 栏第 67 行、第 7 栏第 43 行至第 8 栏第 26 行以及第 11 栏第 5 行至第 13 栏第 39 行; 美国专利 No. 6, 458, 563 的第 4 栏第 25 至 53 行中描述的缺失。在一些实施方案中, B 结构域缺失的因子 VIII 具有大部分 B 结构域的缺失, 但仍然包含为初级翻译产物至两条多肽链的体内蛋白酶加工所必需的 B 结构域的氨基末端序列, 如 W091/09122 (其通过引用整体并入本文) 中公开。在一些实施方案中, 利用氨基酸 747-1638 的缺失即实际上 B 结构域的完全缺失构建 B 结构域缺失的因子 VIII。Hoeben R. C. 等人, J. Biol. Chem. 265(13):7318-7323(1990), 通过引用整体并入本文。B 结构域缺失的因子 VIII 还可包含因子 VIII 的氨基酸 771-1666 或氨基酸 868-1562 的缺失。Meulien P. 等人 Protein Eng. 2(4):301-6(1988), 通过引用整体并入本文。为本发明的部分的其它 B 结构域缺失包括例如氨基酸 982-1562 或 760-1639 (Toole 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1986) 83, 5939-5942)、797-1562 (Eaton 等人 Biochemistry (1986) 25:8343-8347)、741-1646 (Kaufman (PCT 公布申请 No. WO 87/04187))、747-1560 (Sarver 等人, DNA (1987) 6:553-564)、741-1648 (Pasek (PCT 申请 No. 88/00831))、816-1598 或 741-1689 (Tagner (Behring Inst. Mitt. (1988) No 82:16-25, EP 295597)) (将所述每一篇文献或申请通过引用整体并入本文) 的缺失。可以以任何因子 VIII 序列制备上述缺失的每一个。

[0058] 如本文中所用, “嵌合多肽” 意指在其中包括至少 2 种来自不同来源的多肽 (或子序列或肽)。嵌合多肽可包含例如 2、3、4、5、6、7 或更多种来自不同来源例如不同基因、不同 cDNA 或不同动物或其它物种的多肽。嵌合多肽可包括例如一个或多个连接不同子序列的接头。因此, 可直接连接子序列或在单个嵌合多肽内直接、通过接头或通过这两种方式连接它们。嵌合多肽可包括例如额外的肽例如信号序列和序列例如 6His 和 FLAG (其可帮助蛋白质纯化或缺失)。此外, 嵌合多肽还可具有至 N- 和 / 或 C- 端的氨基酸或肽的添加。

[0059] 在一些实施方案中, 嵌合多肽包含因子 VIII 部分和非 - 因子 VIII 部分。示例性非 - 因子 VIII 部分包括例如 Fc、XTEN 和白蛋白。本发明的示例性嵌合多肽包括例如嵌合因子 VIII-Fc 多肽、嵌合因子 VIII-XTEN 多肽和嵌合因子 VIII- 白蛋白多肽。

[0060] 示例性嵌合因子 VIII-Fc 多肽包括例如 SEQ ID NO:2、6、8、10 和 12(表 2)(具有或不具有它们的信号序列)和 SEQ ID NO:4 的嵌合 Fc 多肽(表 2)。

[0061] 嵌合多肽可包含与表 2A(i) 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列(SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1665)具有至少 90% 或 95% 的同一性或 2A(i) 中显示的具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 氨基酸序列(SEQ ID NO:2 的氨基酸 -19-1665)具有至少 90% 或 95% 的同一性的序列。嵌合多肽可包含与表 2A(i) 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 和 Fc 的氨基酸序列(SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1665)具有同一性或 2A(i) 中显示的具有信号序列 VIII 和 Fc 氨基酸序列(SEQ ID NO:2 的氨基酸 -19-1665)具有同一性的序列。

[0062] 如上所述,示例性嵌合多肽包括融合至一个或多个 XTEN 多肽的因子 VIII。Schellenburger 等人, Nat. Biotech. 27:1186-90(2009)(将其通过引用整体并入本文)。可将因子 VIII 融合至 XTEN 多肽的 N 末端或 XTEN 多肽的 C 末端,只要因子 VIII-XTEN 融合蛋白的 VIII 组分可被蛋白酶加工以产生含有经加工的因子 VIII 的多肽。可将蛋白酶位点包含在 NTEN 部分与因子 VIII 部分之间以允许这样的加工。XTEN 多肽包括例如 WO 2009/023270、WO 2010/091122、WO 2007/103515、US 2010/0189682 和 US 2009/0092582(将所述每一个申请通过引用整体并入本文)中公开的多肽。

[0063] 如上所论述的,示例性嵌合多肽还包括融合至一个或多个白蛋白多肽的因子。优选地白蛋白是人白蛋白。还可将因子 VIII 融合至白蛋白的 N 末端或白蛋白的 C 末端,只要因子 VIII-白蛋白融合蛋白的因子 VIII 组分可被酶促活性前蛋白转化酶(proprotein convertase)加工以产生含有经加工的因子 VIII 的多肽即可。可用于本发明的白蛋白例如其片段的实例在例如美国专利 No. 7, 592, 010;美国专利 No. 6, 686, 179;和 Schulte, Thrombosis Res. 124 增刊. 2:S6-S8(2009)(将每一篇所述专利和文献通过引用整体并入本文)中是已知的。

[0064] 在一些实施方案中,含有因子 VIII 部分的嵌合多肽具有与由相同因子 VIII 部分组成但无非因子 VIII 部分的多肽相比增加的半衰期($t_{1/2}$)。具有增加的 $t_{1/2}$ 的嵌合因子 VIII 多肽在本文中可称为长效因子 VIII。长效嵌合因子 VIII 多肽包括例如融合至 Fc 的因子 VIII(包括例如以杂交体 FVIII-Fc 单体二聚体杂交体形式存在的嵌合因子 VIII 多肽;参见实施例 1, 图 1 和表 2A;和美国专利 No. 7, 404, 956 和 7, 348, 004)、融合至 XTEN 的因子 VIII 和融合至白蛋白的因子 VIII。

[0065] 如本文中所用,“培养”、“进行培养”和“正在培养”意指在允许细胞生长或分裂或将细胞维持在活的状态中的体外条件下温育细胞。如本文中所用,“培养的细胞”意指在体外增殖的细胞。

[0066] 如本文中所用,“因子 VIII”,除非另外指出,否则意指在凝集中以正常作用发挥功能的因子 VIII 多肽。因此,术语因子 VIII 包括具有功能的变异多肽。优选因子 VIII 蛋白是人、猪科动物、犬科动物和鼠因子 VIII 蛋白。如背景领域部分中所述,全长多肽和多核苷酸的序列是已知的,同样地许多功能性片段、突变体和经修饰的形式的序列也是已知的。人因子 VIII 的序列的实例显示为 SEQ ID NO:2、6、8、10 和 12(表 2)中的子序列。因子 VIII 多肽包括例如全长因子 VII、除去 N 末端上的 Met 的全长因子 VIII、成熟因子 VIII(除去信号序列)、在 N 末端上具有额外 Met 的成熟因子 VIII 和 / 或具有 B 结构域的全长或部分缺

失的因子 VIII。优选因子 VIII 变体包括 B 结构域缺失,无论是部分还是完全缺失。

[0067] 许多功能性因子 VIII 变体是已知的,如在上文和下文中论述的。此外,已在血友病患者中鉴定了因子 VIII 的数百个非功能性突变,并且已确定这类突变对因子 VIII 功能的作用更主要地归因于它们在,因子 VIII 的三维结构存在的位置而非置换的性质 (Cutler 等人, Hum. Mutat. 19:274-8(2002)) (通过引用整体并入本文)。此外,人与其它物种的因子 VIII 之间的比较已鉴定了可能是功能所需的保守性残基 (Cameron 等人, Thromb. Haemost. 79:317-22(1998); US6, 251, 632) (通过引用整体并入本文)。

[0068] 人因子 VIII 基因已被分离并且将其在哺乳动物细胞中表达 (Toole, J. J. 等人, Nature 312:342-347(1984); Gitschier, J. 等人, Nature 312:326-330(1984); Wood, W. I. 等人, Nature 312:330-337(1984); Vehar, G. A. 等人, Nature 312:337-342(1984); WO 87/04187; WO 88/08035; WO 88/03558; 美国专利 No. 4, 757, 006) (将所述每一篇文献、申请、专利通过引用整体并入本文), 并且从 cDNA 推断出所述氨基酸序列。Capon 等人, 美国专利 No. 4, 965, 199 (通过引用整体并入本文) 公开了用于在哺乳动物宿主细胞中产生因子 VIII 和纯化人因子 VIII 的重组 DNA 方法。已报导了人因子 VIII 在 CHO (中国仓鼠卵巢) 细胞和 BHKC (幼仓鼠肾细胞) 中的表达。已对人因子 VIII 进行了修饰以缺失部分或全部 B 结构域 (美国专利 No. 4, 994, 371 和 4, 868, 112, 将所述每一个专利通过引用整体并入本文), 并且已进行了人因子 V B 结构域对人因子 VIII B 结构域的替换 (美国专利 No. 5, 004, 803, 通过引用整体并入本文)。编码人因子 VIII 的 cDNA 序列和预测的氨基酸序列分别示于美国申请公布第 2005/0100990 号 (通过引用整体并入本文) 的 SEQ ID NO:1 和 2 中。

[0069] 美国专利 No. 5, 859, 204, Lollar, J. S. (通过引用整体并入本文) 报导了具有减小的抗原性和减小的免疫反应性的因子 VIII 的功能性突变体。美国专利 No. 6, 376, 463, Lollar, J. S. (通过引用整体并入本文) 也报导了具有减小的免疫反应性的因子 VIII 的突变体。美国申请公布第 2005/0100990 号, Saenko 等人 (通过引用整体并入本文) 报导了因子 VIII 的 A2 结构域中的功能性突变。

[0070] 许多功能性因子 VIII 分子 (包含 B 结构域缺失) 公开于下列专利 US6, 316, 226 和 US 6, 346, 513 (两个专利都属于 Baxter); 属于 In2Gen 的 US7, 041, 635; 属于 Chiron 的 US 5, 789, 203、US 6, 060, 447、US 5, 595, 886 和 US6, 228, 620; 属于 Biovitrum 的 US 5, 972, 885 和 US 6, 048, 720、属于 Novo Nordisk 的 US 5, 543, 502 和 US 5, 610, 278; 属于 Immuno Ag 的 US 5, 171, 844; 属于 Transgene S.A 的 US 5, 112, 950; 属于 Genetics Institute 的 US 4, 868, 112, 将所述每一个专利通过引用整体并入本文。

[0071] 猪因子 VIII 序列已被公布 (Toole, J. J. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5939-5942(1986)) (所述文献通过引用整体并入本文), 并且已报导了获自猪脾 cDNA 文库的因子 VIII 序列的 PGR 扩增的完全猪 cDNA 序列 (Healey, J. F. 等人, Blood 88:4209-4214(1996)) (通过引用整体并入本文)。所有结构域、所有亚单位以及特定的氨基酸序列被置换的杂交体人/猪因子 VIII 公开于 Lollar 和 Runge 的美国专利 No. 5, 364, 771 和在 WO 93/20093 (通过引用整体并入本文) 中。更近以来, 在 WO 94/11503 (通过引用整体并入本文) 中报导了用猪 A1 和 / 或 A2 结构域置换了相应的人结构域的猪因子 VIII 和嵌合因子 VIII 的核苷酸和相应的氨基酸序列。美国专利 No. 5, 859, 204, Lollar, J. S. 还公开了猪 cDNA 和推断的氨基酸序列。属于 Emory 的 6, 458, 563 (通过引用整体并入本文) 公

开了了 B- 结构域缺失的猪因子 VIII。

[0072] 因子 VIII (或嵌合多肽的因子 VIII 部分) 可与表 2 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 1-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 1-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 1-745 ;SEQ ID NO:12 的氨基酸 1-684) 具有至少 90% 或 95% 的同一性。因子 VIII (或嵌合多肽的因子 VIII 部分) 可与表 2 中显示的不具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 1-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 1-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 1-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 1-684) 具有同一性。

[0073] 因子 VIII (或嵌合多肽的因子 VIII 部分) 可与表 2 中显示的具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 -19-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 -19-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 -19-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 -19-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 -20-684) 具有至少 90% 或 95% 的同一性。因子 VIII (或嵌合多肽的因子 VIII 部分) 可与表 2 中显示的具有信号序列的因子 VIII 的氨基酸 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 -19-1438 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 -19-2332 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 -19-740 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 -19-745 ;或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 -20-684) 具有同一性。

[0074] 如本文中所用,“等量的”意指以国际单位表示的相同量的因子 VIII 活性,其不依赖于所述多肽的分子量。因子 VIII 活性的一个国际单位 (IU) 大致对应于 1 毫升正常人血浆中的因子 VIII 的量。几个测定法可用于测量因子 VIII 活性,包括欧洲药典生色底物测定法 (European Pharmacopoeia chromogenic substrate assay) 和一步凝集测定法。

[0075] 如本文中所用,“Fc”,除非另外指出,否则意指功能性新生儿 Fc 受体 (FcRn) 结合伴侣。FcRn 结合伴侣是可被 FcRn 受体特异性结合,随后通过 FcRn 结合伴侣的 FcRn 受体主动运输的任何分子。因此,术语 Fc 包括具有功能的 IgG Fc 的任何变体。已基于 X- 射线晶体学描述了结合 FcRn 受体的 IgG 的 Fc 部分的区域 (Burmeister 等人 1994, Nature 372:379,通过引用整体并入本文)。Fc 与 FcRn 的主要接触区域靠近 CH2 与 CH3 结构域的接合处。Fc-FcRn 接触全部在单 Ig 重链内。FcRn 结合伴侣包括例如完整的 IgG、IgG 的 Fc 片段、包括 FcRn 的完整结合区域的 IgG 的其它片段。主要接触位点包括 CH2 结构域的氨基酸残基 248、250-257、272、285、288、290-291、308-311 和 314 以及 CH3 结构域的氨基酸残基 385-387、428 和 433-436。提及的免疫球蛋白或免疫球蛋白片段或区域的氨基酸编号全部基于 Kabat 等人 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 美国公共生部, Bethesda ;MD,通过引用整体并入本文。(已从几种哺乳动物物种 (包括人) 分离了 FcRn 受体。人 FcRn、大鼠 FcRn 和小鼠 FcRn 的序列是已知的 (Story 等人 1994, J. Exp. Med. 180:2377),通过引用整体并入文)。Fc 可包含具有或不具有免疫球蛋白的铰链区的免疫球蛋白的 CH2 和 CH3 结构域。示例性 Fc 变体提供于 WO 2004/101740 和 WO2006/074199 (通过引用整体并入本文) 中。

[0076] Fc (或嵌合多肽的 Fc 部分) 可包含一个或多个突变以及突变的组合。

[0077] Fc (或嵌合多肽的 Fc 部分) 可包含赋予增加的半衰期的突变例如 M252Y、S254T、T256E 及其组合,如 Oganessian 等人, Mol. Immunol. 46:1750 (2009) (将其通过引用整体并入本文) 中公开的 ;H433K、N434F 及其组合,如 Vaccaro 等人, Nat. Biotechnol. 23:1283 (2005) (通过引用整体并入本文) 中公开的 ;US2009/0264627A1 (将其通过引用整体并入本文) 的

第 1-2 页的段落 [0012] 以及实施例 9 和 10 中公开的突变 ;和 US 20090163699A1 (将其通过引用整体并入本文) 的第 2 页段落 [0014] 至 [0021] 中公开的突变体。

[0078] Fc (或嵌合多肽的 Fc 部分) 还可包括下列突变 :IgG 的 Fc 区域可按照公认的方法例如定向诱变等来进行修饰以产生可被 FcRn 结合的经修饰 IgG 或其 Fc 片段或部分。此类修饰包括例如远离 FcRn 接触位点的修饰以及接触位点内的修饰,所述修饰保持或甚至增强对 FcRn 的结合。例如,人 IgG1Fc 中的下列单个氨基酸残基 (Fcyl) 可被置换而无对 FcRn 的 Fc 结合亲和力的显著丢失 :P238A、S239A、K246A、248A、D249A、M252A、T256A、E258A、T260A、D265A、S267A、H268A、E269A、D270A、E272A、L274A、N276A、Y278A、D280A、V282A、E283A、H285A、N286A、T289A、K290A、R292A、E293A、E294A、Q295A、Y296F、N297A、S298A、Y300F、R301A、V303A、V305A、T307A、L309A、Q311A、D312A、N315A、K317A、E318A、K320A、K322A、S324A、K326A、A327Q、P329A、A330Q、A330S、P331A、P331S、E333A、K334A、T335A、S337A、K338A、K340A、Q342A、R344A、E345A、Q347A、R355A、E356A、M358A、T359A、K360A、N361A、Q362A、Y373A、S375AD376A、A378Q、E380A、E382A、S383A、N384A、Q386A、E388A、N389A、N390A、Y391F、K392A、L398A、S400A、D401A、D41 A. 414A、R416A、Q418A、Q419A、N421A、V422A、S424A、E430A、N434A、T437A、Q438A、K439A、S440A、S444A 和 K447A, 其中例如 P238A 代表在位置编号 238 上被置换的野生型脯氨酸。除了丙氨酸外,其它氨基酸可在上文中指定的位点上置换野生型氨基酸。可将突变单个地引入 Fc, 从而产生超过 100 多种与天然 Fc 不同的 FcRn 结合伴侣。此外,可将 2、3 或更多个这类单个突变的组合一起引入,从而产生超过数百种 FcRn 结合伴侣。这类突变的某些突变可赋予 FcRn 结合功能新的功能性。例如,一个实施方案整合 N297A, 从而除去高度保守的 N- 糖基化位点。该突变的效应是减小免疫原性,从而增加 FcRn 结合伴侣的循环半衰期和使得 FcRn 结合伴侣不能结合 FcyRI、FcyRIIA、FcyRIIB 和 FcyRIIIA, 但不损害对于 FcRn 的亲和力 (Routledge 等人 1995, Transplantation60:847, 将其通过引用整体并入本文 ;Friend 等人 1999, Transplantation 68:1632, 将其通过引用度整体并入本文 ;Shields 等人 1995, J. Biol. Chem. 276:6591, 将其通过引用整体并入本文)。此外,至少 3 种人 Fc γ 受体似乎识别 IgG 上的更下方的铰链区内的结合位点 (通常氨基酸 234-237)。因此,新功能性和潜在减小的免疫原性的另一个实例可因该区域的突变而产生,如例如通过来自 IgG2 “PVA” 的相应序列 (具有一个氨基酸缺失) 替代人 IgG1 “ELLG” 的氨基酸 233-236 来产生。已显示当这类突变已被引入时,介导各种效应子功能的 FcyRI、FcyRII 和 FcyRIII 将不结合 IgG1 (Ward 和 Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77, 将其通过引用整体并入本文 ;和 Armour 等人 1999, Eur. J. Immunol. 29:2613, 将其通过引用整体并入本文)。作为由上述突变产生的新功能性的其它实例,对 FcRn 的亲和力在一些情况下可被增加超过野生型的亲和力。该增加的亲和力可反映增加的“结合”率 (on rate)、减小的“离解”率 (off rate) 或增加的“结合率 (on rate)”和减小的“离解率 (off rate)”。据认为赋予增加的对 FcRn 的亲和力的突变包括例如 T256A, T307A, E380A 和 N434A (Shields 等人 2001, J. Biol. Chem. 276:6591, 将其通过引用整体并入本文)。

[0079] Fc (或嵌合多肽的 Fc 部分) 可与表 2 中显示的 Fc 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1439-1665 ;SEQ ID NO:6 的氨基酸 2333-2559 ;SEQ ID NO:8 的氨基酸 741-967 ;SEQ ID NO:10 的氨基酸 746-972 ;SEQ ID NO:12 的氨基酸 685-924) 具有至少 90% 或 95% 的同一

性。Fc(或嵌合多肽的Fc部分)可与表2中显示的Fc的氨基酸序列(SEQ ID NO:2的氨基酸1439-1665;SEQ ID NO:6的氨基酸2333-2559;SEQ ID NO:8的氨基酸741-967;SEQ ID NO:10的氨基酸746-972;SEQ ID NO:12的氨基酸685-924)具有同一性。

[0080] 如本文中所示,“杂交体”多肽和蛋白质意指嵌合多肽与第二多肽的组合。杂交体中的嵌合多肽和第二多肽可通过蛋白质间相互作用例如电荷-电荷或疏水相互作用彼此结合。杂交体中的嵌合多肽和第二多肽可通过二硫键或其它共价键彼此缔合。杂交体描述于WO 2004/101740和WO 2006/074199(将所述每一个申请通过引用整体并入本文)。也参见美国专利No. 7,404,956和7,348,004,将所述每一个专利通过引用整体并入本文。第二多肽可以是相同嵌合多肽的第二拷贝或其可以是非-同一嵌合多肽。参见,例如,图1、实施例1和表2。在优选实施方案中,所述第二多肽是包含Fc的多肽。在优选实施方案中,嵌合多肽为嵌合因子VIII-Fc多肽并且第二多肽基本上由Fc组成,例如实施例1的杂交多肽(其为rFVIII-Fc重组融合蛋白,由融合至人IgG1的二聚Fc结构域的重组B结构域缺失的人FVIII(BDD-rFVIII)的单个分子组成,无间插接头序列)。该杂交多肽在本文中称为FVIII-Fc单体Fc融合蛋白、FVIII-Fc单体杂交体、单体FVIII-Fc杂交体和FVIII-Fc单体-二聚体。参见实施例1、图1和表2。实施例提供了该杂交多肽的临床前和临床数据。

[0081] 杂交体的第二多肽可包含与表2A(ii)中显示的不具有信号序列的氨基酸序列(SEQ ID NO:4的氨基酸1-227)具有至少90%或95%的同一性或具有信号序列的氨基酸序列(SEQ ID NO:4的氨基酸-20-227)具有至少90%或95%的同一性的序列或基本上由所述序列组成。第二多肽可包含与表2A(ii)中显示的不具有信号序列的氨基酸序列(SEQ ID NO:4的氨基酸1-227)具有同一性或具有信号序列的氨基酸序列(SEQ ID NO:4的氨基酸-20-227)具有同一性的序列或基本上由所述序列组成。

[0082] 图1为显示B结合域缺失的因子VIII-Fc嵌合多肽的结构以及其与作为Fc多肽的第二多肽的结合的示意图。为了获得该杂交体,使用FVIII特异性引物通过逆转录聚合酶链多反应(RT-PCR)从人肝poly A RNA(Clontech)获得人重组B结构域缺失的FVIII的编码序列。FVIII序列包括FVIII的天然信号序列。B结构域缺失从丝氨酸743(S743;2287bp)至谷氨酰胺1638(Q1638;4969bp),总共2682bp的缺失。然后,使用Fc特异性引物通过RT-PCR从人白细胞cDNA文库(Clontech)获得人重组Fc的编码序列。设计引物以便将B结构域缺失的FVIII序列直接融合至Fc序列的N端而不用间插接头。在CMV启动子的控制之下将FVIII-Fc DNA序列克隆入哺乳动物双表达载体pBUDCE4.1(Invitrogen)。通过RT-PCR获得包含小鼠Igk信号序列的第二相同的Fc序列,然后将其克隆在表达载体pBUDCE4.1中的第二启动子EF1 α 的下游。

[0083] 使用Lipofectamine 2000转染剂(Invitrogen)将rFVIII-Fc表达载体转染入人胚胎肾293细胞(HEK293H;Invitrogen)。通过用Zeocin(Invitrogen)选择产生稳定克隆细胞系。将一个克隆细胞系3C4-22用于产生FVIII-Fc以进行体内表征。在Biogen Idec(Cambridge,MA)产生和纯化重组FVIII-Fc(McCue等人2009)。预期上述转录策略产生3种产物,即单体rFVIII-Fc杂交体、二聚rFVIII-Fc杂交体和二聚Fc。然而,在来自这类细胞的条件化培养基中基本上不存在可检测的二聚rFVIII-Fc。相反,条件化培养基包含Fc和单体rFVIII-Fc。二聚rFVIII-Fc的尺寸可能太大,从而被阻止从细胞高效分泌。该结果是有

益的,因为其使得单体的纯化比在所有 3 种蛋白质都存在的情况下简单。这类研究中使用的材料具有约 9000IU/mg 的比活性。

[0084] 如本文中所用,“给药间隔”,意指给受试者施用的多个剂量之间逝去的时间的量。可在单个受试者或在受试者群体中进行给药间隔的比较,然后可计算群体中获得的平均值。

[0085] 当施用本发明的嵌合因子 VIII 多肽例如嵌合因子 VIII-Fc 多肽(包含因子 VIII 的多肽或杂交体)时,给药间隔可以为等量的不具有非-因子 VIII 部分例如无 Fc 部分的所述因子 VIII(由所述因子 VIII 组成的多肽)所需的给药间隔的至少约 1.5 倍。给药间隔可以为等量的不具有非因子 VIII 部分例如无 Fc 部分的所述因子 VIII(由所述因子 VIII 组成的多肽)所需的给药间隔的至少约 1.5 至 6 倍、1.5 至 5 倍、1.5 至 4 倍、1.5 至 3 倍或 1.5 至 2 倍。给药间隔可以为等量的不具有非-因子 VIII 部分例如无 Fc 部分的所述因子 VIII(由所述因子 VIII 部分组成的多肽)所需的给药间隔的至少约 1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5 或 6 倍。给药间隔可以为约每 5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 天或更长时间一次。给药间隔可以为至少约 1.5 至 5、1.5、2、3、4 或 5 天或更长时间。对于按需治疗,所述嵌合多肽或杂交体的给药间隔为约每 24-36、24-48、24-72、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71 或 72 小时或更长时间一次。

[0086] 优选地,有效剂量为 25-65IU/kg(25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、62、64 或 65IU/kg) 并且给药间隔为每 3-5、3-6、3-7、3、4、5、6、7 或 8 天或更多天一次,或每周 3 次,或每周不超过 3 次。优选地,有效剂量为 65IU/kg 并且给药间隔为每周一次或每 6-7 天一次。

[0087] “长效因子 VIII”为与参照因子 VIII 相比较具有增加的半衰期(在本文中也称为 $t_{1/2}$ 、 $t_{1/2\beta}$ 、消除半衰期和 HL) 的因子 VIII。长效因子 VIII 的增加的半衰期可归因于至一个或多个非-因子 VIII 多肽例如 Fc、XTEN 或白蛋白的融合。增加的半衰期可归因于一种或多种修饰例如 PEG 化。示例性长效因子 VIII 多肽包括例如包含 Fc 的嵌合因子 VIII 多肽、包含 XTEN 的嵌合因子 VIII 和包含白蛋白的嵌合因子 VIII 多肽。其它示例性长效因子 VIII 多肽包括例如 PEG 化的因子 VIII。

[0088] “参照”多肽,在长效嵌合因子 VIII 多肽的情况下,为基本上由嵌合多肽的因子 VIII 部分组成的多肽,例如无 Fc 部分、无 XTEN 部分或无白蛋白部分的相同因子 VIII 部分。同样地,在修饰因子 VIII 的情况下,参照多肽为不具有修饰的相同因子 VIII,例如不具有 PEG 化的因子 VIII。

[0089] 在一些实施方案中,当给受试者施用,长效因子 VIII 具有下列性质的一个或多个性质:

[0090] 约 14-41.3 小时的所述受试者中的平均停留时间 (MRT) (活性);

[0091] 约 1.22-5.19mL/小时/kg 或更少的所述受试者中的清除率 (CL) (活性);

[0092] 约 11-26.4 小时的所述受试者中的 $t_{1/2\beta}$ (活性);

[0093] 约 1.38-2.88IU/dL 每 IU/g 的所述受试者中的增量恢复 (K 值) (活性;观察到的);

- [0094] 约 37.7-79.4mL/kg 的所述受试者中的 V_{ss} (活性);和
- [0095] 约 19.2-81.7IU*h/dL 每 IU/kg 的所述受试者中的 AUC/ 剂量。
- [0096] 在一些实施方案中,当给患者群体施用时,长效因子 VIII 具有下列性质的一个或多个性质:
- [0097] 大于 1.38IU/dL 每 IU/kg 的平均增量恢复 (K_{-} 值) (活性;观察到的);
- [0098] 至少约 1.5、至少约 1.85 或至少约 2.46IU/dL 每 IU/kg 的平均增量恢复 (K_{-} 值) (活性;观察到的)。
- [0099] 约 2.33 ± 1.08 mL/ 小时 /kg 或更小的所述患者群体中的平均清除率 (CL) (活性);
- [0100] 约 1.8-2.69mL/ 小时 /kg 的所述患者群体中的平均清除率 (CL) (活性);
- [0101] 为包含不具有修饰的所述因子 VIII 的多肽的清除率的约 65% 的所述患者群体中的平均清除率 (CL) (活性);
- [0102] 至少约 26.3 ± 8.33 小时的所述患者中的平均停留时间 (MRT) (活性);
- [0103] 约 25.9-26.5 小时的所述患者群体中的平均 MRT (活性);
- [0104] 为包含不具有修饰的所述因子 VIII 的多肽的平均 MRT 的约 1.5 倍的所述患者群体中的平均 MRT (活性);
- [0105] 约 18.3 ± 5.79 小时的所述患者群体中的平均 $t_{1/2\beta}$ (活性);
- [0106] 为约 18-18.4 小时的所述患者群体中的平均 $t_{1/2\beta}$ (活性);
- [0107] 为包含不具有修饰的所述因子 VIII 的多肽的平均 $t_{1/2\beta}$ 的约 1.5 倍的所述患者群体中的平均 $t_{1/2\beta}$ (活性);
- [0108] 约 2.01 ± 0.44 IU/dL 每 IU/kg 的所述患者群体中的平均增量恢复 (K_{-} 值) (活性;观察到的);
- [0109] 约 1.85-2.46IU/dL 每 IU/kg 的所述患者群体中的平均增量恢复 (K_{-} 值) (活性;观察到的);
- [0110] 为包含不具有修饰的所述因子 VIII 的多肽的平均增量恢复的约 90% 的所述患者群体中的平均增量恢复 (K_{-} 值) (活性;观察到的);
- [0111] 约 55.1 ± 12.3 mL/kg 的所述患者群体中的平均 V_{ss} (活性);
- [0112] 约 45.3-56.1mL/kg 的所述患者群体的平均 V_{ss} (活性);
- [0113] 约 49.9 ± 18.2 IU*h/dL 每 IU/kg 的所述患者群体中的平均 AUC/ 剂量 (活性);
- [0114] 约 44.8-57.6IU*h/dL 每 IU/kg 的所述患者群体中的平均 AUC/ 剂量 (活性)
- [0115] 如本文中所用,“按需治疗”意指有意在短时程内发生和响应现有病况例如出血事件的治疗或感觉性需要 (perceived need) 例如计划的手术 (planned surgery)。可需要按需治疗的病况包括例如出血事件、关节积血、肌肉出血、口腔出血、出血、至肌肉内的出血、口腔出血、创伤、头创伤、胃肠道出血、颅内出血、腹腔内出血、胸腔内出血、骨折、中枢神经系统出血、咽后间隙出血、腹膜后间隙出血或髂腰肌鞘出血。受试者可能需要手术预防、围手术期处理 (perioperative management) 或手术治疗。此类手术包括例如小手术、大手术、拔牙、扁桃体切除术、腹股沟疝切开术、滑膜切除术、全膝置换、穿颅术、骨接合术、创伤性手术、颅内手术、腹内手术、胸内手术或关节置换术。
- [0116] 优选地,按需治疗以单次剂量解决超过 80% (超过 80%、超过 81%、超过 82%、超过 83%、超过 84%、超过 85%、超过 86%、超过 87%、超过 88%、超过 89%、超过 90%、超过 91%、超

过 92%、超过 93%、超过 94%、超过 95%、超过 96%、超过 97%、超过 98%、超过 99% 或 100%) 或 80-100%、80-90%、85-90%、90-100%、90-95% 或 95-100% 的出血 (例如, 自发性出血)。优选地, 超过 80% (超过 81%、超过 82%、超过 83%、超过 84%、超过 85%、超过 86%、超过 87%、超过 88%、超过 89%、超过 90%、超过 91%、超过 92%、超过 93%、超过 94%、超过 95%、超过 96%、超过 97%、超过 98% 或 100%) 或 80-100%、80-90%、85-90%、90-100%、90-95% 或 95-100% 的出血事件在按需治疗后被医生评定为优良或良好。优选地, 超过 5%、(超过 6%、超过 7%、超过 8%、超过 9%、超过 10%、超过 11%、超过 12%、超过 13%、超过 14%、超过 15%、超过 16%、超过 17%、超过 18%、超过 19%、超过 20%) 或 5-20%、5-15%、5-10%、10-20% 或 10-15% 的出血事件在按需治疗后被医生评定为相当好 (fair)。

[0117] “多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用并且是指由共价连接的氨基酸残基组成的多聚化合物。

[0118] “多核苷酸”和“核酸”可互换使用且是指由共价连接的核苷酸残基组成的多聚化合物。多核苷酸可以是 DNA、cDNA、RNA (单链的或双链的)、载体、质粒、噬菌体或病毒。多核苷酸包括例如表 1 中的多核苷酸, 其编码表 2 的多肽 (参见表 1)。多核苷酸还包括例如表 1 的多核苷酸的片段, 例如编码表 2 的多肽的片段例如表 2 的多肽的因子 VIII、Fc、信号序列、6His 和其它片段的那些多核苷酸。

[0119] 如本文中所用, “预防性治疗”意指在一段时间内以多个剂量给受试者施用因子 VIII 多肽以升高受试者的血浆中的因子 VIII 的活性水平。优选地, 升高的水平足以降低自发性出血的发病率或防止出血, 例如在意外损伤的事件中。优选地, 在预防性治疗过程中, 受试者的血浆蛋白质水平不低于受试者的基线水平, 或不低于表征严重血友病的因子 VIII 的水平 (<1IU/dl [1%])。

[0120] 优选地, 给个体患者“定制”预防性方案, 优选通过测定每一个患者的 PK 数据和以维持 1-3%FVIII 活性的波谷水平的给药间隔施用本发明的因子 VIII 来进行。当受试者经历不可接受的流血事件 (定义为在滚动的 2 个月的时期内 ≥ 2 次自发性出血事件) 时可进行调整。在该情况下, 调整将靶向 3-5% 的低谷水平。优选地, 预防性治疗导致出血的预防和控制、出血的持久控制、持久的出血保护作用和 / 或持久的益处。预防, 例如持久的保护作用可通过增加的至最终测量时间点的 AUC (AUC-LAST) 和减少的清除率 (从而导致与短效 FVIII 相比较增加的终 $t_{1/2}$) 来证明。优选地, 预防通过更好的 C_{max} 、更好的 T_{max} 和 / 或更大的平均停留时间对短效 FVIII 来证明。优选地, 预防导致在注射 (例如, 最后一次注射) 后约 24、36、48、72 或 96 小时 (例如 25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、96、87、88、89、90、91、92、93、94、95 或 96 小时, 优选 72 小时内) 内无自发性出血事件。优选, 对于每周给药一次 (例如, 以 65IU/kg), 预防导致大于 30% (例如, 大于 31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、96、87、88、89 或 90%, 优选大于 50%) 的年出血事件的平均减少。

[0121] 如本文中所用, “受试者”意指人或非人哺乳动物。非人哺乳动物包括例如小鼠、狗、灵长类动物、猴、猫、马、牛、猪和其它驯养动物和小动物。

[0122] 如本文中所用,“治疗剂量”意指实现治疗目的的剂量,如本文中所描述的。因子 VIII 的必需剂量的计算基于这样的经验发现:平均地,1IU 因子 VIII/kg 体重升高血浆因子 VIII 活性约 2IU/dL。使用下列公式测定必需剂量:

[0123] 必需单位 = 体重 (kg) x 期望的因子 VIII 升高 (IU/dL 或正常的 %) x 0.5 (IU/kg/IU/dL)

[0124] 可用于本发明的方法的治疗剂量为约 10-100IU/kg,更具体地 10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90 或 90-100IU/kg,更具体地 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100IU/kg。

[0125] 可用于本发明的方法的其它治疗剂量为约 10 至约 150IU/kg,更具体地,约 100-110、110-120、120-130、130-140、140-150IU/kg,更具体地,约 110、115、120、125、130、135、140、145 或 150IU/kg。

[0126] 如本文中所用,“变体”是指与原始多核苷酸或多肽不同但保留其基本性质例如因子 VIII 促凝活性或 Fc (FcRn 结合) 活性的多核苷酸或多肽。通常,变体总体上十分相似,并且在许多区域与原始多核苷酸或多肽相同。变体包括例如原始多肽的多肽和多核苷酸片段、缺失、插入和修饰形式。

[0127] 变体多核苷酸可包含与例如编码这样的核苷酸序列或替代地由所述核苷酸序列组成,所述核苷酸序列与例如 SEQ ID NO:1、3、5、7、9 或 11 中的核苷酸编码序列 (因子 VIII 部分、Fc 部分,单独地或一起地) 或与其互补的链、已知的突变和重组因子 VIII 或 Fc (例如本文中引用的出版物和专利中公开的那些突变和重组因子 VIII 或 Fc) 的核苷酸编码序列或与其互补的链、编码 SEQ IDNO:2、4、6、8、10 或 12 的多肽 (因子 VIII 部分、Fc 部分,单独地或一起地) 的核苷酸序列和 / 或这类核酸分子的任一个的多核苷酸片段 (例如,本文中描述的那些片段) 具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性。与这类核酸分子在严格杂交条件或更低严格条件下杂交的多核苷酸也包括为变体,对于由这类多核苷酸编码的多肽亦如此,只要它们具有功能。

[0128] 变体多肽可包含与 SEQ ID NO:2、4、6、8、10 或 12 中显示的多肽序列 (因子 VIII 部分、Fc 部分,单独地或一起地) 和 / 或这类多肽的任一个的多肽片段 (例如,本文中描述的那些片段) 具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列或替代地由所述氨基酸序列组成。

[0129] 对于具有与参照核苷酸序列具有至少例如 95% 的“同一性”的核苷酸序列的核酸,其意指除核苷酸序列可包含最多 5 个点突变每 100 个参照核苷酸序列的核苷酸外,所述核酸的核苷酸序列与参照序列具有同一性。换句话说,为了获得具有与参照核苷酸序列具有至少 95% 的同一性的核苷酸序列的核酸,参照序列中的最多 5% 核苷酸可缺失或用另一种核苷酸进行置换,或可将参照序列中的最多 5% 总核苷酸的许多核苷酸插入参照序列。查询序列可以是例如 SEQID NO:1 或 3 中显示的完整序列、ORF (开放阅读框架) 或本文中描述的指定的任何片段。

[0130] 作为一个实际问题,任何特定核酸分子或多肽是否与本发明的核苷酸序列或多肽具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性可使用已知的计算机程序来进行常规测定。用于测定查询序列 (参照序列或原始序列) 与受试序列之间的最佳总体匹配的优选方法 (也称为全局序列比对) 可使用基于 Brutlag 等人 (Comp. App. Biosci.

(1990)6:237-245) (将其通过引用整体并入本文) 的算法的 FASTDB 计算机程序来测定。在序列比对中, 查询序列与受试序列都为 DNA 序列。可通过将 U 转变成 T 来比较 RNA 序列。所述全局序列比对的结果以同一性 % 表示。用于 DNA 序列的 FASTDB 算法以计算同一性 % 的优选参数为: 矩阵 =Unitary, k- 元组 =4, 错配罚分 (Mismatch Penalty)=1, 连接罚分 (Joining Penalty)=30, 随机化组长度 (Randomization Group Length)=0, 截止评分 (Cutoff Score)=1, 空位罚分 =5, 空位大小评分 (Gap Size Penalty) 0.05, 窗口大小 (Window Size)=500 或受试核苷酸序列的长度, 择其中较短的。

[0131] 如果受试序列因 5' 或 3' 缺失而非因内部缺失而比查询序列短, 则必须对结果进行手工校正。这是因为当计算同一性 % 时, FASTDB 程序不负责受试者的 5' 和 3' 截短。对于在 5' 或 3' 末端截短的受试序列, 相对于查询序列, 通过将作为受试序列的 5' 和 3' 但不匹配 / 对齐的查询序列的碱基的数目计算为查询序列的总碱基的百分比来校正同一性 %。利用 FASTDB 序列比对的结果来确定核苷酸是否匹配 / 对齐。然后从使用指定的参数通过上述 FASTDB 程序计算的同一性 % 减去该百分比, 以获得最终的同一性 % 评分。该校正的评分就是用于本发明的目的评分。为了手工调整同一性 % 评分, 仅计算受试序列的 5' 和 3' 碱基外的碱基 (如通过 FASTDB 比对显示的), 所述碱基与查询序列不匹配 / 对齐。

[0132] 例如, 将 90 个碱基受试序列与 100 个碱基的查询序列比对以测定同一性 %。缺失在受试序列的 5' 末端上发生, 从而 FASTDB 比对未显示 5' 末端上前 10 个碱基的匹配 / 比对。10 个未配对的碱基代表 10% 的序列 (5' 和 3' 末端上未配对的碱基数 / 查询序列中碱基的总数), 因此从利用 FASTDB 程序计算的同一性 % 评分减去 10%。如果剩余 90 个碱基完全匹配, 则最终同一性 % 可为 90%。在另一个实例中, 将 90 个碱基的受试序列与 100 个碱基的查询序列相比较。这次, 缺失是内部缺失, 这样在受试序列的 5' 或 3' 上不存在不与查询序列匹配 / 对齐的碱基。在该情况下, 通过 FASTDB 计算的同一性 % 未进行手工校正。再次地, 仅手工校正与查询序列不匹配 / 对齐的受试序列的碱基 5' 和 3'。无需为了本发明而进行其它手工校正。

[0133] 对于具有与本发明的查询氨基酸序列具有至少例如 95% 的“同一性”的氨基酸序列的多肽, 其意指除受试多肽序列可包含最多 5 个点突变每 100 个查询核苷酸序列的核苷酸外, 受试多肽的氨基酸序列与参照序列具有同一性。换句话说, 为了获得具有与查询核苷酸序列具有至少 95% 的同一性的氨基酸序列的多肽, 或可将受试序列中的最多 5% 氨基酸可用另一种氨基酸插入、缺失、(插入缺失 (indel)) 或置换。参照序列的这些改变可在参照氨基酸序列的氨基或羧基末端位置上或这些末端位置之间的任何位置上发生, 单个地散布在参照序列的残基之间或以一个或多个连续组散布在参照序列内。

[0134] 作为一个实际问题, 任何特定多肽是否与例如 SEQ ID NO:2 (因子 VIII 部分、Fc 部分, 单独地或一起) 或 4 的氨基酸序列或已知的因子 VIII 或 Fc 多肽序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性, 可常规地使用已知的计算机程序来确定。用于确定查询序列 (参照或原始序列) 与受试序列之间的最佳总体匹配的优选方法 (也称为全局序列比对) 可使用基于 Brutlag 等人, Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990) (通过引用整体并入本文) 的算法的 FASTDB 计算机程序来测定。在序列比对中, 查询序列与受试序列都为核苷酸序列或都为氨基酸序列。所述全局序列比对的结果以同一性 % 表示。FASTDB 氨基酸比对中使用的优选参数为: 矩阵 =PAM 0, k- 元组 =2, 错配罚分 =1, 连接罚分 =20, 随机化组

长度 = 0, 截止评分 = 1, 窗口大小 = 序列长度。空位罚分 = 5, 空位大小罚分 = 0.05, 窗口大小 = 500 或受试氨基酸序列的长度, 择其中较短的。

[0135] 如果受试序列因 N- 或 C- 末端缺失而非因为内部缺失而比查询序列短, 则必须对结果进行手工校正。这是因为当计算全局同一性 % 时 FASTDB 程序不负责受试序列的 N- 和 C- 末端截短。对于在 N- 和 C- 末端上截短的受试序列, 相对于查询序列, 通过将作为受试序列的 N- 和 C- 末端的查询序列的残基的数目 (所述残基与相应的受试残基不配对 / 对齐) 计算为查询序列的总碱基的百分比来校正同一性 %。利用 FASTDB 序列比对的结果来确定残基是否错配 / 对齐。随后从使用指定的参数通过上述 FASTDB 程序计算的同一性 % 减去该百分比, 以获得最终的同一性 % 评分。该最终的同一性 % 评分就是用于本发明的目的的评分。为了手工调整同一性 % 评分仅考虑将受试序列的 N- 和 C- 末端的残基 (所述残基与查询序列不匹配 / 对齐)。即, 仅受试序列的最远 N- 和 C- 末端残基外的查询残基位置。

[0136] 例如, 将 90 个氨基酸残基的受试序列与 100 个残基的查询序列比对以测定同一性 %。缺失在受试者序列的 N- 末端上发生, 从而 FASTDB 比对未显示 N- 末端上的前 10 个残基的匹配 / 比对。10 个未配对的残基代表 10% 的序列 (N- 和 C- 末端上不匹配的残基的数目 / 查询序列中的残基的总数), 因此从利用 FASTDB 程序计算的同一性 % 评分减去 10%。如果剩余的 90 个残基完全匹配, 则最终同一性 % 为 90%。在另一个实例中, 将 90 个残基的受试序列与 100 个残基的查询序列相比较。这次缺失是内部缺失, 这样在受试序列的 N- 或 C- 端上不存在不与所述查询序列匹配 / 对齐的残基。在该情况下, 未对利用 FASTDB 计算的同一性 % 进行手工校正。再次地, 仅手工校正受试序列的 N- 和 C- 末端外的残基位点 (如 FASTDB 比对中显示的), 所述残基位点不与查询序列匹配 / 对齐。无需为本发明进行其它手工校正。

[0137] 多核苷酸变体可包含编码区、非编码区或两者中的改变。特别优选的是包含产生沉默置换、添加或缺失但不改变编码的多肽的性质或活性的改变的多核苷酸变体。通过沉默置换 (归因于遗传密码子的简并性) 产生的核苷酸变体是优选的。此外, 其中以任何组合置换、缺失或添加 5-10、1-5 或 1-2 个氨基酸的变体也是优选的。可因为许多原因例如最优化用于特定宿主的密码子表达 (将人 mRNA 中的密码子改变成细菌宿主例如大肠杆菌 (*E. coli*) 偏爱的密码子) 来产生多核苷酸变体。

[0138] 天然存在的变体称为“等位基因变体”, 是指占据生物体的染色体上给定的基因座的基因的几个备选形式之一 (Genes II, Lewin, B. 编, John Wiley & Sons, New York (1985))。这些等位基因变体可在多核苷酸和 / 或多肽水平上变化并且包括在本发明中。或者, 非天然存在的变体可通过诱变技术或通过直接合成来产生。

[0139] 通过使用蛋白质工程和重组 DNA 技术的已知方法, 可产生变体来改进或改变多肽的特征。例如, 可从分泌型蛋白质的 N- 末端或 C- 末端缺失一个或多个氨基酸而基本上不丢失生物功能。Ron 等人, *J. Biol. Chem.* 268:2984-2988 (1993) (通过引用整体并入本文) 的作者报导了即使在缺失 3、8 或 27 个氨基末端氨基酸残基后仍具有肝素结合活性的变异 KGF 蛋白。类似地, 干扰素 γ 在从该蛋白质的羧基末端缺失 8-10 个氨基酸残基后展示高达 10 倍的活性。(Dobeli 等人, *J. Biotechnology* 7:199-216 (1988), 通过引用整体并入本文)。

[0140] 此外, 充足的证据表明变体通常保留与天然存在的蛋白质的生物活性相似的生物

活性。例如, Gayle 和同事 (J. Biol. Chem 268:22105-22111 (1993), 通过引用整体并入本文) 进行人细胞因子 IL-1a 的广泛的突变分析。它们使用随机诱变来产生 3,500 个以上单独的 IL-1a 突变体, 在分子的整个长度上每变体平均具有 2.5 个氨基酸改变。在第一个可能的氨基酸位置上检查多个突变。研究者发现“大多数分子可被改变而对 [结合或生物活性] 几乎无影响”。(参见 Abstract)。事实上, 在检查的 3,500 多个核苷酸序列中, 只有 23 个独特的氨基酸序列产生在活性上与野生型显著不同的蛋白质。

[0141] 如上文中提及的, 多肽变体包括例如修饰多肽。修饰包括例如乙酰化、酰化、ADP- 核糖基化、酰胺化、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联、环化、二硫键形成、脱甲基化、共价交联的形成、半胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、 γ - 羧化、糖基化、GPI 锚形成、羟化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、PEG 化 (Mei 等人 Blood 116:270-79 (2010), 将其通过引用整体并入本文)、蛋白酶解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒化 (selenoylation)、硫酸化、转运 -RNA 介导的氨基酸至蛋白质的添加例如精氨酸酰化和遍在蛋白化。在一些实施方案中, 在任何方便的位置修饰例如 PEG 化因子 VIII。在一些实施方案中, 在因子 VIII 的表面暴露氨基酸优选表面暴露半胱氨酸上 PEG 化因子 VIII, 所述半胱氨酸可以是工程化半胱氨酸。Mei 等人 (2010)。在一些实施方案中, 修饰因子 VIII 例如 PEG 化的因子 VIII 是长效因子 VIII。

[0142] 如本文中所述, “稳态分布容积 (V_{ss})” 具有与药理学中使用的术语相同的含义, 其为药物分布在其中的表观空间 (apparent space) (容积)。 V_{ss} = 身体中药物的量除以稳态血浆浓度 (plasma concentration at steady state)。

[0143] 如本文中关于范围所用的“约”修饰范围的两端。因此, “约 10-20” 意指“约 10 至约 20”。

[0144] 在现已详细地描述了本发明后, 通过参考下列实施例可更清楚地理解本发明, 随同包括的所述实施例仅为了举例说明而无意限定本发明。本文中提及的全部专利和申请明确地通过引用并入本文。

[0145] 实施例 1

[0146] 摘要

[0147] 产生重组 B 结构域缺失的因子 VIII-Fc (rFVIII-Fc) 融合蛋白以延长 FVIII 的半衰期。在严重血友病 A 的小鼠和狗模型中研究 rFVIII-Fc, 将其与 **rFVIII(ReFacto[®])** 相比较。与 **ReFacto[®]** 相比较, 对于 rFVIII-Fc, 血友病 A 小鼠的全血凝固时间 (WBCT) 被校正约 2 至 3 倍并且血浆的消除半衰期几乎为 2 倍。在血友病 A 狗中, rFVIII-Fc (125 IU/kg) 的静脉内剂量将 WBCT 校正至正常。WBCT 保持少于 20 分钟, 与 FVIII:C >1% 一致的时间, 与利用 **ReFacto[®]** 处理的狗的 48 小时相比较, 持续约 96 小时。当使用 ELISA 或生色活性测定测量时, rFVIII-Fc 在狗血浆中的消除半衰期分别为 15.7 ± 1.7 小时和 15.4 ± 0.3 小时。**ReFacto[®]** 校正的 WBCT 约为 rFVIII-Fc 的一半长, 并且血浆半衰期为 7.0 小时。因此, FVIII 至 Fc 的融合产生了具有增加的血浆半衰期和提供延长的出血保护作用的能力的分子。

[0148] 引言

[0149] 由于血浆衍生以及重组 FVIII 的开发, 死亡率的降低、关节损伤的预防以及生活质量的改善已取得重要成就。延长的出血保护作用代表血友病 A 患者的治疗中的另一个至

关重要的成就。本发明人已产生重组因子 VIII-Fc(rFVIII-Fc) 嵌合蛋白和杂交体作为延长 FVIII 的半衰期的方法。

[0150] rFVIII-Fc 为异二聚体杂交蛋白质,其由重组地融合至人免疫球蛋白 G1(IgG1) 的 Fc 结构域的 B 结构域缺失的 FVIII 组成(图 1, SEQ ID NO:2;表 2A)(该蛋白在本文中也称为 FVIII-Fc 单体 Fc 融合蛋白、FVIII-Fc 单体杂交体、单体 FVIII-Fc 杂交体和 FVIII-Fc 单体-二聚体)。Fc 使得能够结合新生儿 Fc 受体(FcRn),其负责保护 IgG 免受降解并且赋予 IgG 3 周的半衰期(在人中观察到的)(Ghetie V 和 Ward ES., *Annu. Rev. Immunol.* 2000; 18:739-766;Roopenian DC. 和 Akilesh S., *Nature Rev. Immunol.* 2007;7:715-725,将所述每一篇文献通过引用整体并入本文)。

[0151] 已将 IgG1 的 Fc 结构域整合至生长因子、细胞因子、酶和受体的配体结合区(Ashkanazi A 等人, *Int. Rev. Immunol.* 1993:10:219-27;Chamow SM 和 Ashkanazi A, *Trends Biotechnol.* 1996:14:52-60;Fisher 等人, *N. Engl. J. Med.* 1996:334(26):1697-702,将所述每一篇文献通过引用整体并入本文)。这类分子中的几种分子已成为重要的治疗性分子(例如,依那西普、阿来法塞、阿巴他塞)。在这类融合蛋白中,可将两个效应分子与两个 Fc 分子连接。在该实施例中, rFVIII Fc 已被构建为单体 Fc 融合蛋白(一个拷贝的由表 2A(i) (SEQ ID NO:2) 的具有或不具有信号序列的序列组成的多肽和一个拷贝的由表 2A(ii) (SEQ ID NO:4) 的具有或不具有信号序列的序列组成的多肽),即,仅具有一个拷贝的效应分子(参见图 1),并且本文中所示的研究在血友病 A 的小鼠和狗模型中比较该新型蛋白与 rFVIII 的药效学和药代动力学。信号序列在分泌过程中被切割。该蛋白质构建体在本文中称为 FVIII-Fc 单体 Fc 融合蛋白、FVIII-Fc 单体杂交体、单体 FVIII-Fc 杂交体和 FVIII-Fc 单体-二聚体。关于该蛋白质的结构和产生,参见实施例 1、图 1、表 2A;和美国专利 No. 7, 404, 956 和 7, 348, 004,将所述每一个专利通过引用整体并入本文。

[0152] 方法和材料

[0153] FVIII 制剂

[0154] 重组 FVIII-Fc

[0155] 使用 FVIII 特异性引物通过逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR) 从人肝 poly ARNA(Clontech) 获得人重组 B 结构域缺失的 FVIII 的编码序列。所述 FVIII 序列包括 FVIII 的天然信号序列。B 结构域缺失为从丝氨酸 743(S743;2287bp) 至谷氨酰胺 1638(Q1638; 4969bp), 总共 2682bp 的缺失。关于该蛋白质的结构和产生,参见实施例 1、图 1、表 2A;和美国专利 No. 7, 404, 956 和 7, 348, 004,将所述每一个专利通过引用整体并入本文。

[0156] 使用 Fc 特异性引物通过 RT-PCR 从人白细胞 cDNA 文库(Clontech) 获得人重组 Fc 的编码序列。设计使 B 结构域缺失的 FVIII 序列直接融合至 Fc 序列的 N-末端而不用间插接头的引物。将 FVIII-Fc DNA 序列在 CMV 启动子的控制之下克隆入哺乳动物双表达载体 pBUDCE4.1(Invitrogen)。通过 T-PCR 获得包含小鼠 Igk 信号序列的第二相同的 Fc 序列,然后将其克隆在所述表达载体 pBUDCE4.1 的第二启动子 EF1 α 的下游。

[0157] 使用 Lipofectamine 2000 转染剂(Invitrogen) 将 rFVIII Fc 表达载体转染入人胚胎肾 293 细胞(HEK293H;Invitrogen)。通过利用 Zeocin(Invitrogen) 选择产生稳定的克隆细胞系。将一个克隆细胞系 3C4-22 用于产生 FVIII-Fc 以进行体内表征。在 Biogen Idec(Cambridge, MA) 产生和纯化重组 FVIII-Fc(McCueJT 等人, *J. Chromatogr. A* 2009;

7824-7830,通过引用整体并入本文)。预期上述转录策略产生3种产物,即单体rFVIIIIFc杂交体、二聚rFVIIIIFc杂交体和二聚Fc。然而,在来自这类细胞的条件化培养基中基本上不存在可检测的二聚rFVIIIIFc。相反,条件化培养基包含Fc和单体rFVIIIIFc。二聚rFVIIIIFc的尺寸可能太大以至于被阻止从细胞高效分泌。该结果是有益的,因为其使得单体的纯化比在所有3种蛋白质都存在的情况下简单。这类研究中使用的材料具有约9000IU/mg的比活性。此外,这类人细胞产生比在本实验中尝试的其它细胞更高的蛋白质水平。

[0158] 重组FVIII

[0159] 重组B结构域缺失的FVIII(ReFacto[®])购自Novis Pharmaceuticals并且按照制造商的说明书进行制备。ReFacto[®](重组B结构域缺失的FVIII)具有与SEQ ID NO:2的氨基酸1-1438相同的氨基酸序列。

[0160] 血友病A动物

[0161] 血友病A小鼠为129xB6背景上的FVIII外显子16敲除,所述129xB6背景获自University of Pennsylvania的Dr.Kazazian(Bi L等人,Nat.Genet.1995;10(1):119-121,通过引用整体并入本文)并且饲养于Syntonix。这些小鼠展示延长的全血凝固时间(>60分钟),从而是严重血友病A的良好模型。

[0162] 血友病A狗来自在University of North Carolina,Chapel Hill的弗兰西斯欧文血液研究实验室(Francis Owen Blood Research Laboratory)维持的近交群(Graham,JB等人,J.Exp.Med.1949;90:97-111,通过引用整体并入本文)。这些狗具有可与人疾病的严重形式相比较的严重血友病表型(Graham,JB等人,J.Exp.Med.1949;90:97-111;Lozier,JN等人,Proc.Natl.Acad.Sci.2002;99:12991-12996,将所述每一篇文献通过引用整体并入本文)。

[0163] 研究设计

[0164] 血友病A小鼠的研究

[0165] 在FVIII缺陷小鼠中研究rFVIIIIFc和ReFacto[®]对全血凝固时间(WBCT)的影响。以50IU/kg静脉内施用每一种蛋白质,在给药前和给药后不同的时间点上从每一只小鼠的尾静脉收集血。将血液样品在37℃下于微量管中进行温育,每分钟目测检查凝固的存在一次。记录凝固形成的时间。如果到了60分钟无凝固形成,则将凝固时间记录为>60分钟。在WBCT测定中正常小鼠的血液在约4分钟(范围2-7分钟,n=10只小鼠)内凝固。

[0166] 在第二组研究中,给血友病A小鼠静脉内施用单剂50IU/kg rFVIIIIFc、ReFacto[®]或Advate[®](4只小鼠/时间点)。在给药后0.25、8、24、48和72小时通过心脏穿刺刺激将血液收集在1/10体积的3.2%柠檬酸钠中。制备血浆,将其于-80℃下贮存直至使用FVIII特异性生色活性测定法对FVIII活性进行分析。

[0167] 血友病A狗的研究

[0168] 在rFVIIIIFc的单剂量PK/PD研究中,给来自Chapel Hill繁殖群的两条血友病A狗静脉内施用单剂125IU/kg,在给药前和给药后指定的时间点上收集血液样品以用于WBCT、激活部分促凝血酶原激酶时间(activated partial thromboplastin time)(aPTT)、FVIIIIFc血浆浓度、血液学和血清化学。用于WBCT的时间点包括给药前、给药后5和30分钟以及1、2、4、8、24、32、48、72、96、144和168小时。用于凝固活性(aPTT)和FVIIIIFc血浆

浓度的血液收集包括上文对于 WBCT 所列的时间点以及给药后 15 分钟和 3、6、12 小时。

[0169] 进行第二研究,其中静脉内施用**ReFacto**[®] (114IU/g (针对狗 M12) 和 120IU/kg (针对狗 M38))。测量 WBCT 直至凝固时间超过 20 分钟 (与 FVIII:C>1% 一致),随后将 125IU/kg rFVIIIFc 静脉内施用至相同的狗,收集血液样品以进行 WBCT、aPTT、FVIIIFc 血浆浓度、血液学和血清化学。用于 WBCT 的时间点包括给药前、给药后 5 和 30 分钟以及 1、2、4、8、24、32、48、72 小时。还在利用 FVIIIFc 给药后 96、120、144 和 168 小时收集血液。用于凝固活性和 FVIIIFc 血浆浓度的血液收集包括上文所列用于 WBCT 的时间点以及给药后 15 分钟和 3、6、12 小时。

[0170] 血友病 A 狗的 WBCT 过程与血友病 A 小鼠中的略微不同。在用 rFVIIIFc 或 **ReFacto**[®] 给药后,在不同的时间点收集 1mL 的血液,将 0.5mL 稀释入两个硅化玻璃管中,随后将所述玻璃管置于 28°C 水浴中。始于第 1 分钟,将一个管每 30 秒倾斜一次,第二个管保持不动。当凝块在倾斜的管中形成时,随后使第二个管每 30 秒倾斜一次直至凝块形成。将第二个管中完全胶化凝块形成所需的时间记录为 WBCT。

[0171] 血浆中的 FVIII 活性

[0172] 利用 FVIII 特异性生色测定法测量血浆中的 FVIII 活性

[0173] 使用 Sysmex CA1500 仪通过自动生色法测试血浆样品的 FVIII 活性,试剂来自 Siemens Healthcare Diagnostics (Dallas, TX, 试剂盒 #B4238-40)。使用利用浓度范围为 1.5-0.016IU/mL 的掺入人 FVIII- 耗尽的血浆 (Stago USA) 的第 7 国际标准因子 FVIII 浓缩物 (NIBSC 代码 99/678) 产生的标准曲线测定 rFVIIIFc 的活性。

[0174] 利用 ELISA 测量 rFVIIIFc 或 FVIII

[0175] 利用 ELISA 测量狗血浆中的 FVIIIFc

[0176] 将特异于 A1 结构域的 FVIII 抗体 (Green Mountain Antibodies:GMA-8002) 涂覆在 96 孔板上并且在 37°C 下温育 1 小时。在室温下用含有 Tween 20、CaCl₂ 和牛血清白蛋白的 Tris- 缓冲盐溶液封闭涂覆的板 1 小时,随后将标准、对照和在正常狗血浆中制备的样品以 1:10 稀释,然后添加至板中并且在 37°C 下温育 1 小时。洗涤板,随后添加驴 (F(ab)')₂ 抗 - 人 Fc-HRP (Jackson:709-036-098),将其在 37°C 下温育 1 小时。洗涤后,将 TMB (BioRx 超敏底物:TMBS-0100-01) 添加至板中,用酸淬灭底物反应,在 Spectra Max Plus 板读数器 (MolecularDevices) 上于 450nm 处测量吸光度。

[0177] 利用 ELISA 测量狗血浆中的**ReFacto**[®]

[0178] 将特异于重链上的 A1 结构域的 FVIII 抗体 (Green Mountain Antibodies:GMA-8002) 涂覆在 96 孔板上并且在室温下温育 2 小时。在 37°C 下封闭涂覆的板 1 小时,洗涤后,将 1:10 稀释的标准、对照和在正常狗血浆中制备的样品添加至板中并且在室温下温育 2 小时。洗涤板,随后用检测抗体预稀释的抗 -FVIII 辣根过氧化物酶缀合物 (Affinity Biologicals:F8C-EIA-D) 处理板,在室温下温育 1 小时。洗涤后,将 TMB (BioRx 超敏底物:TMBS-0100-01) 添加至板中进行 10 分钟。用酸淬灭底物反应,在 Spectra Max Plus 板读数器 (MolecularDevices) 上于 450nm 的波长处测量信号。

[0179] 血纤蛋白原的测量

[0180] 按照制造商的说明书,使用包括 HemosIL[™] PT-Fibrinogen-HS 试剂 (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, Catalog#0008468210) 和 ACL

7000Coagulation 分析仪 (Beckman Coulter) 的试剂盒在 Esoterix (Research Triangle Park, NC) 上测量血浆中血纤蛋白原的浓度。

[0181] 血小板的测量

[0182] 使用利用物种特异性智能卡编程的 Vet-ABC-Diff Hematology 分析仪 (SCIL Animal Care Co., Gurnee, IL) 通过自动化方法在 EDTA 抗凝全血中对血小板进行计数。

[0183] 药代动力学分析

[0184] 使用来自 Pharsight 的 WinNonlin 软件 5.2 版 (Mountain View, Ca) 通过非房室模型分析 (Noncompartmental Analysis) 计算药代动力学参数。PK 参数包括最大血浆浓度 (C_{max})、血浆浓度 - 时间曲线下面积 (AUC)、消除半衰期 (t_{1/2})、分布容积 (volume of distribution) (V_{ss}) 和清除率 (Cl)。

[0185] 结果

[0186] 重组 FVIII-Fc

[0187] rFVIIIIFc 为人 B 结构域缺失的 FVIII 与来自人 IgG1 的 Fc 的具有无间插接头序列的重组融合物 (rFVIIIIFc ;图 1)。

[0188] 纯化的 rFVIIIIFc 具有约 9000IU/mg 的比活性,如使用生色活性测定法测定的。重组 B 结构域缺失的 **FVIII(ReFacto®)** 具有报导的 9110-13700IU/mg 的比活性。考虑了 FVIIIIFc 与 **ReFacto®** (分别地 216kDa 和 170kDa) 之间的大小差异的比活性至 IU/nmol 的转化表明两种蛋白质具有几乎相等的比活性 (1970IU/nmol (针对 rFVIIIIFc) 和 1521-2287IU/nmol (针对 **ReFacto®**))。因此, rFVIIIIFc 的 FVIII 活性不受人 FVIII 的 C 末端至人 Fc 的 N 末端的融合影响。

[0189] 至血友病 A 小鼠的施用

[0190] 将单次 50IU/kg 剂量的 rFVIIIIFc 或 **ReFacto®** 静脉内施用给 FVIII 缺陷小鼠 (n=6/组)。给药前和在给药后 120 小时的过程中收集血液样品,如材料和方法中所述测定 WBCT。基线 WBCT 大于 60 分钟。来自代表性实验的数据示于图 2 和表 3 中。WBCT 在利用 rFVIIIIFc 或 **ReFacto®** 给药后即刻被校正至 2-17 分钟。来自用 **ReFacto®** 处理的小鼠的血液丧失了 42 小时凝固的能力,然而来自所有用 rFVIIIIFc 处理的小鼠的血液仍然在 96 小时凝固,6 只小鼠中有 1 只的血液在第 113 小时凝固,但全部丧失在 120 小时凝固的能力。这些数据表明 rFVIIIIFc 的作用持续时间约为 **ReFacto®** 的 2 至 3 倍。

[0191] 在单次 50IU/kg 的静脉内注射后在 FVIII 缺陷小鼠中研究 rFVIIIIFc、**ReFacto®** 或 **Advate®** (全长重组 FVIII) 的生色活性。在给药前和给药后第 8、24、48 和 72 小时收集血液。使用 FVIII 特异性生色活性测定法测量活性,所述活性示于图 3 中。药代动力学参数报告于表 4 中。rFVIIIIFc 的循环半衰期为 **Advate®** (7 小时) 和 **ReFacto®** (5 小时) 的约 1.6 至 2 倍 (11.1 小时)。与针对 **Advate®** 的 0.47 ± 0.30 IU/mL 和针对 **ReFacto®** 的 0.67 ± 0.44 IU/mL 相比较,针对 rFVIIIIFc 的 C_{max} 为 1.6 ± 0.36 IU/mL。在血友病 A 小时中,与 **ReFacto®** (6.94 小时 IU/mL) 和 **Advate®** (3.90 小时 IU/mL) 相比较,对于 rFVIIIIFc (22.6 小时 IU/mL), rFVIIIIFc 的全身性暴露显著更大,并且与 **ReFacto®** (7.2mL/小时/kg) 和 **Advate®** (12.8 小时 /mL/kg) 相比较, rFVIIIIFc 的清除率显著更低 (2.09mL/小时/kg)。

[0192] 至血友病 A 狗的施用

[0193] 在血友病 A 狗的 Chapel Hill 繁殖群中研究 rFVIIIIFc 的药效学 (PD) 和药代动力学 (PK)。给 4 只血友病 A 狗的每一只施用 125IU/kg rFVIIIIFc 的单次静脉内剂量, WBCT 立即被校正至正常 (图 4)。正常狗中的 WBCT 的范围为 8-12 分钟。WBCT 保持少于 20 分钟, 与 FVIII:C>1% 一致的时间, 持续约 96 小时 (除一只具有少于 20 分钟的 WBCT 且持续 72 小时的狗外)。此外, aPTT 也立即被校正至正常 (表 6)。使用被设计用以检测分子的 FVIII 和 Fc 部分的特异性 ELISA 测量 rFVIIIIFc 的血浆浓度。血浆浓度-时间曲线示于图 5 中。数据的 PK 分析显示 $t_{1/2}$ 为 15.7 ± 1.7 小时 (表 5)。当使用 FVIII 特异性生色活性测定法测量时, 获得相似的结果 ($t_{1/2}=15.4 \pm 0.3$ 小时, 表 5), 使用两种方法 (图 5 和 6) 产生的血浆浓度-时间曲线相似。当使用 rFVIIIIFc 的比活性将活性数据从 IU/mL 转换成 ng/mL 时, 存在与 ELISA 数据的良好相关性, 从而证明通过 ELISA 测量的蛋白质具有完全活性。

[0194] 在利用 rFVIIIIFc 给药前 72 小时, 两条用 rFVIIIIFc 处理的狗还接受单次剂量的 **ReFacto[®]**, 114IU/kg (针对狗 M12) 和 120IU/kg (针对狗 M38)。在用 **ReFacto[®]** 给药后, WBCT 和 aPTT 立即被校正至正常。然而, 在单次剂量的 rFVIIIIFc 后 WBCT 的正常化持续时间约为 **ReFacto[®]** 的 2 倍 (图 4)。此外, 当利用 ELISA 测量蛋白质的血浆浓度时 (表 5), 对于 rFVIIIIFc, rFVIIIIFc 的血浆半衰期 (15.7 ± 1.7 小时) 约为 **ReFacto[®]** (7.0 和 6.7 小时) 的 2 倍。当利用 FVIII 特异性生色活性测量两种分子时, 获得相似的结果。

[0195] 为了评估凝血活性 (thrombogenicity) 的潜在风险, 测量血小板和血纤蛋白原。在利用 rFVIIIIFc 或 **ReFacto[®]** 给药后, 血小板数目和血浆血纤蛋白原浓度与给前值 (数未显示) 相比较未改变。

[0196] 讨论

[0197] 在来自稳定转染的细胞系的人胚胎肾 293 (HEK 293) 细胞中产生重组 FVIIIIFc, 将其从细胞培养物中纯化。人细胞系中的产生与目前市售的在中国仓鼠卵巢细胞或幼仓鼠肾细胞中产生的 rFVIII 产物相比较显示了制造上的显著变化。该变化的基础理论是预期最佳地配备人细胞以进行该分子的 FVIII 部分的必需翻译后修饰。

[0198] 考虑到 rFVIIIIFc 与重组 B 结构域缺失的 **FVIII(ReFacto[®])** 的分子量的差异的比活性至 IU/nmol 的转换表明两种蛋白质的比活性 (1970IU/nmol (针对 rFVIIIIFc) 和 1521-2287IU/nmol (针对 **ReFacto[®]**)) 是相似的。有点令人惊讶的是 rFVIIIIFc 的比活性不受 FVIII 的 C 末端与 Fc 的 N 末端的融合影响, 因为 FVIII 的 C1 和 C2 结构域参与完全 FVIII 活性所必需的磷脂结合 (Fay, PJ, J. Hematology 83:103-8(2006) 和 Raut, S 等人, Br. J. Haematol. 107:323(1999), 将所述每一篇文献通过引用整体并入本文)。

[0199] 在出血事件发生时按需治疗血友病 A, 或利用预防法治疗血病 A 以预防出血。虽然仍然频繁使用按需治疗, 但存在朝向关节损伤的预防和防止的趋势 (Blanchette P 等人, Haemophilia 2004:10 ;679-683, Manco-Johnson, MJ 等人, N. Engl. J. Med. 2007 ; 357:535-544, 将所述每一篇文献通过引用整体并入本文)。为了进行预防, 现有 FVIII 产品因 10-12 小时的相对短的半衰期而要每 2 或 3 天施用一次以在患者中维持高于 1% 的 FVIII:C (Morfini, M, Haemophilia 2003 ;9 (增刊 1):94-99 ;discussion 100, White GC 等人, Thromb. Haemost. 1997:77:660-7, Blanchette, P 等人, J. Thromb. Haemost. 2008Aug ; 6(8):1319-26, 将所述每一篇文献通过引用整体并入本文)。提供延长的出血保护作用的

长效 FVIII 疗法可代表血友病 A 患者的生活质量的显著提高。延长凝血因子的半衰期的策略包括已成功地用于其它分子的策略,包括 PEG 化 (Rostin J 等人, Bioconj. Chem. 2000 ; 11:387-96,通过引用整体并入本文)、糖聚乙二醇化 (glycopegylation) (Stennicke HR 等人, Thromb. Haemost. 2008 ;100:920-8,通过引用整体并入本文)、利用 PEG 化的脂质体的配制 (Spira J 等人, Blood 2006 ;108:3668-3673, Pan J 等人, Blood 2009 ;114:2802-2811, 将所述每一篇文献通过引用整体并入本文) 和与白蛋白的缀合 (Schulte S., Thromb. Res. 2008 ;122 增刊 4:S14-9,通过引用整体并入本文)。PEG 化代表降低清除率的方法,然而,修饰的体内作用目前尚不清楚。在体内 FVIII 的直接 PEG 化的结果目前尚不清楚,然而已临床研究了利用 PEG 化脂质配制的 rFVIII,所述 rFVIII 显示了对出血事件的中等作用至无作用 (Spira J 等人, Blood 2006 ;108:3668-3673, Spira J 等人, Thromb. Haemost. 2008 Sep ; 100 (3) :429-34,将所述每一篇文献通过引用整体并入本文)。

[0200] 延长 FVIII 的半衰期的本方法是将 FVIII 重组地融合至 IgG1 的 Fc 结构域。Fc 结合天然存在的受体 FcRn,其正常功能是保护 IgG 免受降解。本文中描述的结果代表血友病 A 小鼠和血友病 A 狗中 rFVIII-Fc 与 rFVIII 产物相比较的初始药代动力学和效率的表征。在两个物种中,rFVIII-Fc 的半衰期都为当通过 FVIII 活性或 ELISA (仅用于狗) 测量时的 rFVIII 的半衰期的约 2 倍。这些数据也与来自两个动物模型的 WBCT 结果良好相关,即 rFVIII-Fc 对 WBCT 的作用的持续时间约为 **ReFacto[®]** 的 2 倍。在狗中,rFVIII-Fc 与 **ReFacto[®]** 的 C_{max} 和清除率相似,rFVIII-Fc 的 AUC 和稳态分布容积分别为 **ReFacto[®]** 的约 1.5 倍和 2 倍。在该动物模型中 **ReFacto[®]** 的 PK 参数与文献 (Brinkhous K 等人, Sem. Thromb. Haemost. 2002 ; 28:269-272,通过引用整体并入本文) 中报导的值一致。

[0201] 如果这些发现翻译成成人中半衰期的相同延长,则这可代表血友病 A 患者的治疗中的重大进步。

[0202] 其它参考资料 (将所述每一篇文献通过引用整体并入本文)

[0203] Berkner K., Methods Enzymol. 1993 ;222:450-477.

[0204] Bitonti AJ 和 Dumont JA., Adv. Drug Del. Rev. 2006 ;58:1106-1118.

[0205] Dumont J A 等人, J. Aerosol Med. 2005 ;18:294-303.

[0206] Dumont JA 等人, BioDrugs 2006:20:151-160.

[0207] Ellis CN 和 Krueger GG., N. Engl. J. Med. 2001 ;345:248-55.

[0208] Low SC 等人, Hum Reprod. 2005:7:1805-1813.

[0209] Manco-Johnson, M., Haemophilia 2007 ;13 增刊 ;2:4-9.

[0210] Mannucci, PM. 和 Tuddenham, EGD., N. Engl. J. Med. 2001 ;344:1773-1779.

[0211] Peyvandi F 等人 Haemophilia 2006 ;12 (增刊 3):82-89.

[0212] Rodriguez-Merchan, EC, Semin. Thromb. Hemost. 2003 ;29:87-96.

[0213] Srour MA 等人, Ann. Hematol. 2008 ;87:107-12.

[0214] 实施例 2

[0215] 本研究的目的是测定在单次静脉内剂量后 rFVIII-Fc 和 **BDD-rFVIII(Xyntha[®])** 在食蟹猴中的药代动力学和药效学。

[0216] 材料和方法

[0217] rFVIII-Fc (Biogen Idec), 以 1.2mg/mL 和 9882IU/mL 的浓度作为冷冻液体提供。比

活性为 8235IU/mg。于 -70℃ 下贮存。注射前将其稀释。

[0218] 名称 :Xyntha (Novis Pharmaceuticals), 作为冻干的粉剂 (按照制造商的说明书将其重建以产生具有 525IU/mL 的标称浓度的溶液)。按照制造商的推荐进行贮存。

[0219] 动物

[0220] 使用来自新伊比利亚研究中心 (New Iberia Research Center) (NIRC) 繁殖群的食蟹猴, 本研究在 (NIRC 研究 #8733-0903) 在批准的 NIRC IACUC 方案 (APS2008-8733-058) 下于 New Iberia, LA 的 NIRC 进行。

[0221] 在研究中使用 6 只经确定处于良好健康状况的首次用于实验的食蟹猴 (3 只雄性, 3 只雌性)。

[0222] 按照方案和 UL Lafayette-NIRC 标准操作步骤进行研究。

[0223] 研究设计

[0224] 以 125IU/kg 给 6 只猴 (3 只雄性, 3 只雌性) 的每一只静脉内施用 rFVIIIIFc。在交叉设计中以 125IU/kg 给相同的动物静脉内施用 Xyntha (BDD-rFVIII)。组 1 动物 (n=3) 在第 0 天接受 Xyntha, 在第 3 天接受 rFVIIIIFc, 然而组 2 动物 (n=3) 在第 0 天接受 rFVIIIIFc, 然后在第 4 天接受 Xyntha。用于组 2 的剂量之间多出的一天是为了确保 rFVIIIIFc 具有足够的时间来下降至低于设计的基线水平。在给药前和给药后第 0、25、4、12、24、36、48 和 72 小时将每一只动物的血液收集在 1/10 体积的 3.2% 柠檬酸钠中 (以获得血浆), 以用于通过 ELISA 和 FVIII 特异性生色活性测定法测量 rFVIIIIFc 或 Xyntha。

[0225] 测量血浆中的 rFVIIIIFc 和 FVIII 的 ELISA

[0226] 测量猴血浆中的 rFVIIIIFc 的方法

[0227] 设计该酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 以定量猴血浆中的 rFVIIIIFc。在该 ELISA 法中, 将来自 Bethyl Laboratories (Cat#A80-319A) 的山羊抗 - 人 IgG-(H+L) 抗体 (猴吸收的) 稀释于涂覆缓冲液中, 将其固定在 96 孔微量滴定样品板上。抽吸该板, 通过添加封闭缓冲液 (3%BSA/1xTris) 在 37℃ 下进行约 2 小时来封闭该所有未吸附的位置。用高钙样品稀释缓冲液 (3% 的含有 30mM CaCl₂ 的脱脂干乳 /TBST) 以 1:20 稀释血浆样品, 将其分配至样品板中。将板在 37℃ 下温育约 2 小时。随后洗涤板, 将来自 Green Mountain Antibodies 的小鼠抗 -B 结构域缺失的 (a. BDDA1) 因子 VIII (A1 结构域) 抗体 (Cat#GMA-8002) 添加至板中, 在 37℃ 下温育约 1 小时。洗涤板后, 将来自 Southern Biotech 的缀合有 HRP 的山羊抗 - 小鼠 IgG2a 抗体 (Cat#1080-05) 添加至板中, 在室温下温育约 30 分钟。再次洗涤板, 加入四甲基联苯胺 (TMB) 过氧化物酶底物溶液, 在室温下温育约 30 分钟。通过添加非酸性终止溶液终止反应。颜色显现与样品中的 rFVIIIIFc 的量成正比。使用单检测波长 650nm 在吸收板读数器上读取板。在通过使用 4 参数逻辑曲线拟合程序 (four-parameter logistic curve-fitting program) 将光密度 (OD) 对浓度作图获得的标准曲线上测定 rFVIIIIFc 的浓度。该方法的标准曲线范围是 5% 猴血浆中的 0.400ng/mL-51.2ng/mL (100% 的猴血浆中的 8.00ng/mL-1024ng/mL)。可包括在测定的定量范围外的一个校准点 (5% 猴血浆中的 0.200ng/mL) 来用作有助于曲线拟合的锚点 (anchor point)。可基于曲线的最佳拟合 (即, 在确定的精确度内读取最高数量的标准, %RE) 除去或保留锚点。

[0228] 测量猴血浆中的 FVIII 的方法

[0229] 设计该酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 以定量猴血浆中的 FVIII。在该 ELISA 法

中,将来自 Green Mountain Antibodies (Cat#GMA-8002) 的小鼠 α BDDA1FVIII 抗体稀释于涂覆缓冲液中,并且将其固定在 96 孔微量滴定样品板上。抽吸该板,通过添加封闭缓冲液 (3%BSA/1xTris) 在 37°C 下进行约 1 小时来封闭所有未吸附的位置。用高钙样品稀释缓冲液 (含有 100mM CaCl_2 的封闭缓冲液) 以 1:20 稀释血浆样品,将其分配至样品板上。将板在 37°C 下温育约 2 小时。洗涤板后,将来自 Affinity Biologicals 试剂盒的检测抗体 HRP 标记的多克隆抗体 (Cat#F8C-EIA-D) 进一步稀释于 TBS/0.05%Tween 20 中,然后添加至板并且在室温下温育约 1 小时。再次洗涤板,加入四甲基联苯胺 (TMB) 过氧化物酶底物溶液,在室温下温育约 30 分钟。通过添加酸性终止溶液终止反应。颜色显现与样品中的 FVIII 的量成正比。使用单检测波长 450nm 在吸收板读数器上读取板。在通过使用 4 参数逻辑曲线拟合程序将光密度 (OD) 对浓度作图获得的标准曲线上测定 FVIII 的浓度。该方法的标准曲线范围是 5% 猴血浆中的 0.625ng/mL-20ng/mL (100% 的猴血浆中的 12.5ng/mL-400ng/mL)。可包括在测定的定量范围外的 2 个校准点 (5% 猴血浆中的 0.313 和 0.156ng/mL) 来用作有助于曲线拟合的锚点。可基于曲线的最佳拟合 (即,在确定的精确度内读取最高数量的标准, %RE) 除去或保留锚点。

[0230] FVIII-特异性生色测定

[0231] 基于施用的剂量估计食蟹猴血浆样品中的 FVIII 活性,然后将其在人 FVIII- 缺失的血浆 (Diagnostica Stago) 中稀释至约 0.25-1IU/ml。使用 FVIII chromogenic 试剂盒 (Siemens) 在 Sysmex CA1500 (Siemens Diagnostic Healthcare) 上分析样品。在该生色测定中,血浆中的 rFVIIIIFc 被凝血酶激活。激活的因子 VIII (FVIIIa) 随后在激活的因子 IX (FIXa)、磷脂 (PL) 和钙离子存在的条件下加速因子 X (FX) 至因子 Xa (FXa) 的转化。通过特异于 FXa 的对硝基苯胺底物的水解来评估 FXa 活性。在 405nm 测量的对硝基苯胺 (pNA) 的初始释放速率与 FXa 活性成正比,从而与样品中的 FVIII 活性成正比。在本测定中因 rFVIIIIFc 而产生的 FVIII 活性的定量限为约 0.3IU/ml。所述测定法可测量下限降至约 0.06IU/ml 的总 FVIII 活性,精确度为 $\pm 20\%$ 。从每一个时间点上的值减去个体动物的给药前样品的计算活性以产生 PD 曲线 (FVIII 活性对时间)。

[0232] 从在人 FVIII 缺陷血浆中稀释至 1IU/ml 的 NIBSC 第 7 国际标准 FVIII 浓缩物产生标准曲线。将标准曲线在 Sysmex 仪中进行系列稀释以产生 0.15、0.1、0.05、0.025、0.0053 和 0.0026IU/ml 的浓度。由于仪器在内部以 1:10 稀释所有样品,因此 FVIII 标准浓度相应于 1.5-0.026IU/ml 的血浆浓度,这在可测量的 FVIII 活性的范围内。

[0233] PK 分析

[0234] 使用 WinNonlin 软件系统 (5.2 版, Pharsight Corporation, Mountain View, CA) 中的非房室模型分析模块评估浓度时间谱。

[0235] 结果

[0236] 使用测量分子的 FVIII 和 Fc 部分的夹心 ELISA 形式测量 rFVIIIIFc 的猴血浆浓度,在表 7 中报告数据。所有给药前样品低于定量限。图 7 举例说明随时间过去组平均 rFVIIIIFc 和 Xyntha 血浆浓度,个体血浆浓度-时间曲线示于图 8 中。rFVIIIIFc 和 Xyntha 的 PK 参数的概述分别示于表 9 和 10 中。rFVIIIIFc 的平均 $t_{1/2}$ 为 11.9 ± 1.7 小时 (从 9.3 小时变化至 14.1 小时),对于 Xyntha,平均清除率 $t_{1/2}$ 为 12.7 ± 4.4 小时 (从 9.2 小时变化至 19.9 小时)。

[0237] 使用 FVIII 特异性生色活性测定法测量 FVIII 活性,将数据报告于表 8 中。从所有样品减去因内源 FVIII 而产生的给药前活性。平均组数据的图表示于图 9 中,个体血浆浓度-时间曲线示于图 10 中。rFVIIIFc 和 Xyntha 的 PK 参数的概述分别报告于表 9 和 10 中。平均清除率 $t_{1/2}$ 为 16.1 ± 6.9 小时(从 11.6 小时变化至 29.4 小时)(针对 rFVIIIFc)和 12.5 ± 1.7 小时(从 10.4 小时变化至 14.3 小时)(针对 Xyntha)。

[0238] 讨论和结论

[0239] 在 125IU/kg 的单次静脉内剂量后,无论利用 ELISA 还是利用生色活性测定法来测定检品, rFVIIIFc 与 Xyntha 的消除半衰期都相似。

[0240] 实施例 3

[0241] 这将是设计用以评估单次剂量的 rFVIIIFc 在患有严重(定义为 $<1\text{IU/dL}[1\%]$ 内源因子 VIII[FVIII])血友病 A 的受试者中的安全性、耐受性和药代动力学的 I/IIa 期、开放标记、交叉、剂量递增、多中心和首次在人中的研究。招募总共约 12 个先前治疗的患者,以 25 或 65IU/kg 施用 rFVIIIFc。在筛查(在 Advate® [rFVIII](对照比较试剂)的首次剂量之前 28 天内安排的)和在首次注射之前在无 FVIII 处理的情况下经历最少 4 天(96 小时)后,大约 6 个受试者将接受单次 25IU/kg 剂量的 Advate®,然后进行 3 天(72 小时)的药代动力学(PK)表征,随后进行交叉,然后接受 25IU/kg 的单次开放标记剂量的 rFVIIIFc 以进行 7 天(168 小时)的 PK 表征。顺次地给前 3 个受试者给药。对于前三个(3)利用 25IU/kg rFVIIIFc 给药的受试者,每一个受试者将在 rFVIIIFc 注射后第 14 天(336 小时)经历抑制剂评估。一旦完成抑制剂测试,将对接下来的受试者(仅对于前 3 个受试者)给药。在第 3 个受试者完成 14 天的抑制剂评估后,开始将将其余 3 个受试者(以 25IU/kg)和 6 个受试者(以 65IU/kg)至少相隔 1 天顺次招募入每一个剂量组。

[0242] 在最后一个受试者接受 25IU/kg 剂量的 rFVIIIFc 后 1 周,大约 6 个独特的受试者被招募来用作 65IU/kg 的组群。65IU/kg 组群中的每一个受试者将接受单次 65IU/kg 剂量的 Advate®,然后进行 4 天(96 小时)PK 表征,然后进行交叉表征,接受 65IU/kg 的单次开放标记剂量的 rFVIIIFc,进行 10 天(240 小时)的表征。如果在任何组群中,出血事件在 rFVIIIFc 的首次注射之前发生,则应当将受试者的研究前 FVIII 产物用于治疗,随后必须经历至少 4 天的间隔,然后才开始接受 rFVIIIFc 的首次注射来进行 PK 表征。

[0243] 为安全起见,在施用 rFVIIIFc 25IU/kg 或 65IU/kg 后使所有受试者经历 14 天(336 个小时)和 28 天的安全评估期。所有受试者在将经历给药前和给药后药代动力学取样以及在指定的时间点将血液样品用于 FVIII 活性分析。

[0244] 实施例 4

[0245] Xase 复合物内的活性

[0246] 为了研究 FVIII 蛋白(rBDD FVIII 和 rFVIIIFc)与 FIXa 的结合和测量这类蛋白激活 FX 的能力,进行动力学研究以在 Xase 复合物的背景中检查这些相互作用。该测定包括在钙存在的情况下利用激活的 FIX 和激活的 rBDD FVIII 或 rFVIIIFc 蛋白在磷脂表面上形成 Xase 复合物,监控 FX 至 FXa 的转化,如通过生色或发荧光底物的切割测量的。

[0247] 简而言之,首先用 α -凝血酶激活 FVIII,进行 5 分钟,然后在 Ca^{2+} 和合成磷脂囊泡(25% 磷脂酰丝氨酸(PS)/75% 磷脂酰胆碱(PC))或血小板存在的情况下将其与 FIXa 混合。在下述条件下, FVIIIa 与 FIXa 在磷脂表面和钙离子存在的情况下相互作用以形成活

性 Xase 复合物,该复合物通过蛋白酶解加工介导 FX 至 FXa 的转化。依次地,FXa 切割 FXa 特异性生色或发荧光底物。切割的底物产生颜色,从而溶液中切割的底物的量表示产生的 FXa 的量。这可通过测量 405nm 处的溶液的吸光度来定量。

[0248] A. 因子 X 的激活

[0249] 如上所述在 Xase 复合物的背景中研究 rBDD FVIII 和 rFVIII Fc 激活 FX 的能力。在钙存在的情况下将凝血酶激活的 FVIII 蛋白与 FIXa 和磷脂一起温育,随后在 FX 特异性底物存在的情况下添加至不同浓度的 FX 中,测定 FXa 产生的速率(图 11)。

[0250] 基于这些数据,在 Xase 复合物的背景中计算不同 FVIII 蛋白的 K_m 和 V_{max} (Chang 1997)(表 11)。数据表示为 6 个分析(3 个包括一式两份运行的实验)的平均值 $\pm$ 相应的标准差。基于这些数据,发现在测定的变型内这类蛋白(rBDD FVIII 和 rFVIII Fc)具有相当的 K_m 和 V_{max} 值。因此,利用 rFVIII Fc 形成的 Xase 复合物与利用获得许可的产品 rBDD FVIII (ReFacto) 形成的 Xase 复合物在与磷脂相互作用和激活 FX 的能力方面表现出相似的行为。注意,这些可比较的数据还显示 rFVIII Fc 在用凝血酶短暂温育后被激活至可与 rBDD FVIII 相比较的程度。

[0251] B. 与 FIXa 的相互作用

[0252] 也在 Xase 复合物的背景中检查 rBDD FVIII 和 rFVIII Fc 与 FIXa 之间的相互作用。如上使用固定量的 FX 和变化的 FIXa 水平装配 Xase 复合物,测定 FXa 的产生速率(图 12)。从这些数据测定利用两种 FVIII 蛋白形成的 Xase 复合物对 FIXa 的 K_d 值(Chang 1997)。数据表示为 6 个分析(3 个包含一式两份运行的实验)的平均值 $\pm$ 相应的标准差(表 12)。发现两种蛋白质具有相似的 K_d 和 V_{max} 值,表明 rFVIII Fc 具有可与被许可的 rBDD FVIII 产品相比较的与 FIXa 的相互作用。

[0253] 实施例 5

[0254] 实施例 3 中论述的 I/IIa 期临床试验的临时药代动力学数据(Interim pharmacokinetic data)显示下列 FVIII Fc 的结果。FVIII Fc 与 ADVATE(全长 rFVIII)相比较具有约 50% 的全身性暴露量(systemic exposure) (AUC_{INF}) 的增加、约 50% 的清除率(CI) 的减少以及约 50-70% 的消除半衰期和 MRT 的增加。此外, FVIII Fc 与 ADVATE 相比较显示增加的 C168、TBLP1、TBLP3 和 TBLP5 值。

[0255] AUC_{INF} 从 0 至无穷大的浓度-时间曲线下面积

[0256] β HL 消除期半衰期;也称为 $t_{1/2\beta}$

[0257] C168 在给药后约 168 小时高于基线的估计的 FVIII Fc 活性

[0258] CI 清除率

[0259] MRT 平均停留时间

[0260] TBLP1 给药后当 FVIII Fc 活性下降至约高于基线 1IU/dL 时模型预测的时间

[0261] TBLP3 给药后当 FVIII Fc 活性下降至高于基线约 3IU/dL 时模型预测的时间

[0262] TBLP5 给药后当 FVIII Fc 活性下降至高于基线约 5IU/dL 时模型预测的时间

[0263] 实施例 6

[0264] 重组 B 结构域缺失的因子 VIII-Fc(rFVIII Fc) 融合蛋白已被产生用作延长 FVIII 的半衰期的方法。在血友病 A 小鼠中进行将 rFVIII Fc 与 rFVIII 的药代动力学(PK) 比较。我们发现 rFVIII Fc 的终半衰期为 rFVIII 的 2 倍。为了验证半衰期延长的背后机制归源于

FcRn 对 rFVIIIIFc 的保护作用,在 FcRn 敲除和人 FcRn 转基因小鼠中评估 PK。施用单次静脉内剂量 (125IU/kg),使用生色活性测定法测量血浆浓度。在两个小鼠品系中 rFVIIIIFc 与 rFVIII(XYNTHA®)的 C_{max} 相似。然而,虽然在 FcRn 敲除小鼠中,rFVIIIIFc 的半衰期可与 rFVIII 的相比较,但在 hFcRn 转基因小鼠中,rFVIIIIFc 的半衰期被延长至 rFVIII 的约 2 倍。这些结果确认了 FcRn 介导与 rFVIII 相比较 rFVIIIIFc 的延长的半衰期或是该延长的半衰期的形成原因。由于已显示在血友病小鼠的出血模型以及临床应用中通过旋转血栓弹性测定法 (rotation thromboelastometry) (ROTEM) 测量的全血的动态平衡与凝血因子的效率相关,因此我们寻求使用 ROTEM 来在血友病 A 小鼠评估 rFVIIIIFc 的离体效率。给血友病 A 小鼠施用单次静脉内剂量的 50IU/kg rFVIIIIFc、XYNTHA® (FVIII) 或 ADVATE® (FVIII)。在给药后 5 分钟,凝块形成在凝固时间 (CT)、凝块形成时间 (CFT) 和 α -角上相似。然而,rFVIIIIFc 在给药后 72 和 96 小时显示显著改善的 CT,在 96 小时后与 XYNTHA® (FVIII) 和 ADVATE® (FVIII) 相比较 CFT 和 α -角也得到改善,这与 rFVIIIIFc 的延长的 PK 一致。因此 FVIII 的 Fc 融合的构建产生了具有确定的作用机制的分子,所述分子具有增加的半衰期和提供延长的出血保护作用的潜能。

[0265] 实施例 7

[0266] 本实施例提供来自 16 个用 25 和 65IU/kg FVIII 产品治疗的患者的 FVIII 活性的最终分析结果。参见实施例 3 和 5。

[0267] 在本实施例中,rFVIIIIFc 为重组融合蛋白,其由融合至人 IgG1 的嵌合 Fc 结构域的重组 B 结构域缺失的人 FVIII 的单个分子 (BDD-rFVIII) 组成,该分子无间插接头序列。该蛋白质结构在本文中也称为 rFVIIIIFc 异二聚杂交蛋白、FVIIIIFc 单聚 Fc 融合蛋白、FVIIIIFc 单体杂交体、单体 FVIIIIFc 要交体以及 FVIIIIFc 单体-二聚体。参见实施例 1、图 1 和表 2A。

[0268] 利用 rFVIIIIFc 的临床前研究已显示与商购可得 rFVIII 产品相比较 rFVIII 活性的约 2 倍的半衰期延长。本研究的原理是在严重血友病 A 受试者中评估单次剂量的以冷冻液体制剂形式存在的 rFVIIIIFc 的安全性和耐受性以及提供关于 PK 的数据。为了进行本研究,16 个可评价的受试者可用于 PK 评估。两个剂量 (以 25 (n=6) 和 65IU/kg 的体重 (n=10) 的标称剂量) 的 rFVIIIIFc 和 Advate 的单次施用是在约 10 分钟的时期内进行静脉内输注。在输注之前以及在给药后达到 10 天,获得用于血浆 PK 评估的血液样品。在本研究中使用模型依赖性方法表征 Advate 和 rFVIIIIFc 的 FVIII 活性的 PK。

[0269] 目的

[0270] 本研究的主要目的是在先前治疗的年龄 12 岁以上的严重血友病 A 患者 (PTP) 中评估两个剂量 (25 和 65IU/kg) 的 rFVIIIIFc 的单次施用的安全性和耐受性。

[0271] 第二目的是在一步凝集测定和生色测定中测定 25 或 65IU/kg 的 rFVIIIIFc 的单次施用后随时间过去 FVIII 相对于 Advate 的药代动力学 (PK) 参数 (通过 FVIII 的药效 (PD) 活性测定的)。

[0272] 研究设计 (参见实施例 3)

[0273] 在筛查随访时 (在施用 Advate 之前 28 天内)、在注射当天 (Advate 的注射) 和在注射后第 10 分钟和 30 分钟以及第 1、3、6 和 9 小时、在 Advate 的注射后第 1 天 (第 24 小

时)、在 Advate 注射后第 2 天(第 48 小时)、在 Advate 的注射后第 3 天(第 72 小时)以及在高剂量的 Advate 注射(仅组群 B)后第 4 天(在第 96 小时)收集 Advate 血液样品以进行 FVIII 活性的 PK 评估。

[0274] 在即将施用 rFVIIIIFc 之前在 rFVIIIIFc 注射当天、在 rFVIIIIFc 注射后第 10 分钟和 30 分钟以及第 1、3、6 和 9 小时;在 rFVIIIIFc 注射后第 1 天(第 24 小时);在 rFVIIIIFc 注射后第 2 天至第 5 天(第 48、72、96 和 120 小时)、在 rFVIIIIFc 注射后第 7 天(第 168 小时)、在高剂量的 rFVIIIIFc 注射(仅组群 B)后第 8、9 和第 10 天(第 192、216 和 240 小时)收集血液样品以进行 FVIII 活性的 PK 评估。也在最终的研究随访(rFVIIIIFc 注射后 28 天)时,在 rFVIIIIFc 注射后第 672 小时测量 FVIII 活性。

[0275] 药代动力学建模和计算

[0276] 缩写

[0277] TBLP1= 在给药后当 FVIII 活性下降至高于基线 1IU/dL 时模型预测的时间

[0278] TBLP3= 在给药后当 FVIII 活性下降至高于基线 3IU/dL 时模型预测的时间

[0279] $KV_M = C_{max_M} / \text{实际剂量 (IU/kg)}$

[0280] $KV_OB = C_{max_OB} / \text{实际剂量 (IU/kg)}$

[0281] $IVR_M = 100 \times C_{max_M} \times \text{血浆体积 (dL)} / \text{以 IU 表示的总剂量}$;其中以 ml 表示的血浆体积 $= (23.7 \times Ht (\text{以 cm 表示})) + (9.0 \times Wt (\text{以 kg 表示})) - 1709$ 。

[0282] $IVR_OB = 100 \times C_{max_OB} \times \text{血浆体积 (dL)} / \text{以 IU 表示的总剂量}$;其中以 ml 表示的血浆体积 $= (23.7 \times Ht (\text{以 cm 表示})) + (9.0 \times Wt (\text{以 kg 表示})) - 1709$ 。

[0283] 结果

[0284] 图 13. 观察到的组平均值 (+SE)FVIII 活性-时间曲线,通过剂量水平分选的,通过化合物分组的(一步测定法,25IU/kg(A)和 65IU/g(B))和(生色测定法,25IU/kg(C)和 65IU/kg(D))。

[0285] 图 14. 观察到的组平均值 (+SE)FVIII 活性-时间曲线,通过剂量水平和化合物分组的(一步测定法;A)(生色测定法;B)。

[0286] 单次剂量药代动力学(一步测定法)

[0287] 在 Advate 或 rFVIIIIFc 的短暂 IV 输注后观察到的 FVIII 活性急剧升高,25 和 65IU/kg 剂量组的平均($\pm$ SD)模型预测的 C_{max} 值分别为 56.6 ± 4.74 和 121 ± 28.2 IU/dL(针对 Advate)以及 55.6 ± 8.18 和 108 ± 16.9 IU/dL(针对 rFVIIIIFc)。所有 Advate-和 rFVIIIIFc- 处理的患者具有 FVIII 活性的剂量相关增加。观察到的 C_{max} 和 AUCINF 的增加的程度在评估的剂量范围内略低于剂量的增加。

[0288] 输注结束后,观察到的 FVIII 活性的下降显示单指数衰减(monoexponential decay)特征直至达到基线水平。rFVIIIIFc 的 FVIII 活性的下降速率比 Advate 慢,对于 25 和 65IU/kg 剂量组,平均($\pm$ SD)模型-预测的消除半衰期值分别为 11.9 ± 2.98 和 10.4 ± 3.03 小时(针对 Advate)以及 18.0 ± 3.88 和 18.4 ± 6.99 小时(针对 rFVIIIIFc)。消除半衰期在对两种 FVIII 产品进行评估的剂量范围内表现出不依赖于剂量。

[0289] 在以 25 和 65IU/kg 剂量水平施用 rFVIIIIFc 后,总的全身性 FVIII 暴露(通过 AUCINF 评估的)分别比 Advate 大 $\sim 48\%$ 和 61% 。对于 25 和 65IU/kg 的剂量组,平均($\pm$ SD)模型预测的 AUCINF 值分别为 974 ± 259 和 1810 ± 606 小时 *IU/dL(针对 Advate)以及

1440±316 和 2910±1320 小时 *IU/dL(针对 rFVIIIIFc)。

[0290] 与消除半衰期类似,相对于 Advate, FVIIIIFc 的 MRT 获得延长。对于 25 和 65IU/kg 剂量组,平均(±SD)模型预测的 MRT 值分别为 17.1±4.29 和 14.9±4.38 小时(针对 Advate)以及 25.9±5.60 和 26.5±10.1 小时(针对 rFVIIIIFc)。MRT 值在对两种 FVIII 产物进行评估的剂量范围内表现出不依赖于剂量。

[0291] 此外,测定 CL 和 V 的一级 PK 参数值。rFVIIIIFc 的 CL 值仅约占对于等剂量的 Advate 观察到的 CL 值的 66%。对于 25 和 65IU/kg 剂量组,平均(±SD)模型预测的 CL 值分别为 2.70±0.729 和 4.08±1.69mL/小时/kg(针对 Advate)以及 1.80±0.409 和 2.69±1.25mL/小时/kg(针对 rFVIIIIFc)。Advate 与 rFVIIIIFc 的 V 值相当,对于 25 和 65IU/kg 剂量组,平均(±SD)模型预测的 V 值分别为 43.9±4.27 和 56.1±13.4mL/kg(针对 Advate)以及 45.3±7.23 和 61.6±10.6mL/kg(针对 rFVIIIIFc)。随 Advate 和 rFVIIIIFc 的剂量逐渐增加,注意到平均 CL 和 V 值的略微增加;然而,与有限的剂量水平偶联的 65IU/kg 剂量上的标准差的增加使得这些参数的剂量依赖性的评估含糊不清。例如,rFVIIIIFc 处理组的 CV% 几何平均 CL 值从 23.0%(25IU/kg)增加至 48.6%(65IU/kg)。

[0292] 除了一级 PK 参数外,还测定二级 PK 参数(例如 K-值、IVR 等)以评估效应的 FVIII 持续时间。对于 rFVIIIIFc 也观察到 PK 差异的证据,证明了与等剂量的 Advate 相比较 TBLP1 和 LBLP3 增加。Advate 和 rFVIIIIFc 的 IVR 和 K-值似乎相当。随着 Advate 和 rFVIIIIFc 的剂量逐渐增加,观察到 LBLP1 和 LBLP3 值的略微增加。相反地,随着 Advate 和 rFVIIIIFc 的剂量逐渐增加,注意到平均 IVR 和 K-值的略微减小。如先前所指出的,这些参数的剂量依赖性的评估因有限的剂量水平而含糊不清。

[0293] 对于 25 和 65IU/kg 剂量组,平均(±SD)观察到的 TBLP1 分别为 2.88±0.733 和 2.93±0.848IU/dL 每 IU/kg(针对 Advate)以及 4.28±0.873 和 5.16±2.02IU/dL 每 IU/kg(针对 rFVIIIIFc)。对于 25 和 65IU/kg 剂量组,平均(±SD)观察到的 TBLP3 分别为 2.06±0.527 和 2.26±0.666IU/dL 每 IU/kg(针对 Advate)以及 3.09±0.623 和 3.93±1.59IU/dL 每 IU/kg(针对 rFVIIIIFc)。

[0294] 使用观察到的 C_{max} 值计算的平均 IVR 和 K-值(扣除基线和模型中的残留药物)通常大于使用模型预测的 C_{max} 值测定的值;与使用单室模型(one-compartment model)产生的观察到的峰值活性的略微低估相一致。对于 25 和 65IU/kg 剂量组,平均(±SD)观察到的 K-值分别为 2.57±0.198 和 2.13±0.598IU/dL 每 IU/kg(针对 Advate)以及 2.46±0.330 和 1.85±0.332IU/dL 每 IU/g(针对 rFVIIIIFc)。对于 25 和 65IU/kg 剂量组,平均(±SD)观察到的 IVR 值分别为 94.1±15.6 和 85.8±16.5%(针对 Advate)以及 89.5±11.9 和 74.8±6.72%(针对 rFVIIIIFc)。

[0295] 单次剂量药代动力学(生色测定法)

[0296] 在 Advate 或 rFVIIIIFc 的短暂 IV 输注后观察到的 FVIII 活性急剧升高,对于 25 和 65IU/kg 剂量组,平均(±SD)模型预测的 C_{max} 值分别为 70.2±9.60 和 157±38.6IU/dL(针对 Advate)以及 70.3±10.0 和 158±34.7IU/dL(针对 rFVIIIIFc)。

[0297] 所有 Advate-和 rFVIIIIFc-处理的患者具有 FVIII 活性的剂量相关增加。观察到的 C_{max} 和 AUC_{INF} 的增加的程度在评估的剂量范围内比剂量的增加略低。

[0298] 输注结束后,观察到的 FVIII 活性的下降显示单指数衰减直至达到基线水平。

rFVIIIFc 的 FVIII 活性的下降速率比 Advate 慢,对于 25 和 65IU/kg 剂量组,平均 ($\pm$ SD) 模型 - 预测的消除半衰期值分别为 10.7 ± 1.98 和 10.3 ± 3.27 小时 (针对 Advate) 以及 16.2 ± 2.92 和 19.0 ± 7.94 小时 (针对 rFVIIIFc)。消除半衰期在对两种 FVIII 产品进行评估的剂量范围内表现出不依赖于剂量。

[0299] 在以 25 和 65IU/kg 剂量水平施用 rFVIIIFc 后,总的全身性 FVIII 暴露 (通过 AUCINF 评估的) 分别比 Advate 大 $\sim 53\%$ 和 84% 。对于 25 和 65IU/kg 的剂量组,平均 ($\pm$ SD) 模型预测的 AUCINF 值分别为 1080 ± 236 和 2320 ± 784 小时 *IU/dL (针对 Advate) 以及 1650 ± 408 和 4280 ± 1860 小时 *IU/dL (针对 rFVIIIFc)。

[0300] 与消除半衰期类似,相对于 Advate, rFVIIIFc 的 MRT 获得延长。对于 25 和 65IU/kg 剂量组,平均 ($\pm$ SD) 模型预测的 MRT 值分别为 15.3 ± 2.86 和 14.8 ± 4.72 小时 (针对 Advate) 以及 23.4 ± 4.22 和 27.3 ± 11.4 小时 (针对 rFVIIIFc)。MRT 值在对两种 FVIII 产物进行评估的剂量范围内表现出不依赖于剂量。

[0301] 此外,测定 CL 和 V 的一级 PK 参数值。rFVIIIFc 的 CL 值仅占对于等剂量的 Advate 观察到的 CL 值的 $\sim 58-66\%$ 。对于 25 和 65IU/kg 剂量组,平均 ($\pm$ SD) 模型预测的 CL 值分别为 2.39 ± 0.527 和 3.21 ± 1.40 mL/小时/kg (针对 Advate) 以及 1.57 ± 0.349 和 1.86 ± 0.970 mL/小时/kg (针对 rFVIIIFc)。Advate 与 rFVIIIFc 的 V 值相当,对于 25 和 65IU/kg 剂量组,平均 ($\pm$ SD) 模型预测的 V 值分别为 5.8 ± 5.52 和 43.6 ± 11.2 mL/kg (针对 Advate) 以及 35.9 ± 6.65 和 42.7 ± 8.91 mL/kg (针对 rFVIIIFc)。随 Advate 和 rFVIIIFc 的剂量逐渐增加,注意到平均 CL 和 V 值的增加;然而,与有限的剂量水平偶联的 65IU/kg 剂量上的标准差的增加使得这些参数的剂量依赖性的评估含糊不清。

[0302] 除了一级 PK 参数外,还测定二级 PK 参数 (例如 K_e 值、IVR 等) 以评估效应的 FVIII 持续时间。对于 rFVIIIFc 也观察到 PK 差异的证据,证明了与等剂量的 Advate 相比较 TBLP1 和 LBLP3 增加。Advate 和 rFVIIIFc 的 IVR 和 K_e 值似乎相当。

[0303] 随着 Advate 和 rFVIIIFc 的剂量逐渐增加,观察到 LBLP1 和 LBLP3 值的略微增加。相反地,随着 Advate 和 rFVIIIFc 的剂量逐渐增加,注意到平均 IVR 和 K_e 值的略微减小。如先前所指出的,这些参数的剂量依赖性的评估因有限的剂量水平而含糊不清。

[0304] 对于 25 和 65IU/kg 剂量组,平均 ($\pm$ SD) 观察到的 TBLP1 分别为 2.70 ± 0.511 和 3.09 ± 0.978 IU/dL 每 IU/kg (针对 Advate) 以及 4.06 ± 0.798 和 5.66 ± 2.38 IU/dL 每 IU/kg (针对 rFVIIIFc)。对于 25 和 65IU/kg 剂量组,平均 ($\pm$ SD) 观察到的 TBLP3 分别为 1.98 ± 0.377 和 2.39 ± 0.718 IU/dL 每 IU/kg (针对 Advate) 以及 3.04 ± 0.598 和 4.44 ± 1.84 IU/dL 每 IU/kg (针对 rFVIIIFc)。

[0305] 使用观察到的 C_{max} 值计算的平均 IVR 和 K_e 值 (扣除基线和模型中的残留药物) 通常大于使用模型预测的 C_{max} 值测定的值;与使用单室模型产生的观察到的峰值活性的略微低估相一致。对于 25 和 65IU/kg 剂量组,平均 ($\pm$ SD) 观察到的 K_e 值分别为 3.08 ± 0.429 和 2.85 ± 0.721 IU/dL 每 IU/kg (针对 Advate) 以及 3.12 ± 0.451 和 2.92 ± 0.985 IU/dL 每 IU/kg (针对 rFVIIIFc)。对于 25 和 65IU/g 剂量组,平均 ($\pm$ SD) 观察到的 IVR 值分别为 112 ± 14.5 和 $116 \pm 26.9\%$ (针对 Advate) 以及 113 ± 16.3 和 $117 \pm 33.6\%$ (针对 rFVIIIFc)。

[0306] 结论

[0307] 所有 Advate- 处理和 rFVIIIFc- 处理的患者在评估的剂量范围内具有 C_{max} 和 AUC_{INF} 的剂量相关增加。通常在输注结束后第 1 小时内观察到 Advate 和 rFVIIIFc 的峰值血浆水平,其在给药后数天中仍可被检测到。在输注结束后,基线校正的 FVIII 活性的下降显示单指数衰减直至达到两种产品的基线。在对两种 FVIII 产品进行评估的剂量范围内消除半衰期和 MRT 的参数值表现出不依赖于剂量。随着 Advate 和 rFVIIIFc 的剂量逐渐增加,注意到平均 CL 和 V 值的略微增加;然而,与有限的剂量水平偶联的 65IU/kg 剂量上的受试者间差异性的增加使得这些参数的剂量依赖性的评估含糊不清。

[0308] rFVIIIFc 与 Advate 活性的 PK 的比较显示对于相当剂量的 Advate, rFVIIIFc 的全身性暴露增加约 48-61%(一步测定法)或 53-84%(生色测定法)、清除率减少约 30-40% 以及清除半衰期和 MRT 增加约 50-80%。对于 rFVIIIFc 也观察到 PK 差异的证据,证明了与等剂量的 Advate 相比较 TBLP1 和 LBLP3 增加。Advate 和 rFVIIIFc 的 IVR 和 K_e 值似乎相当。

[0309] 除生色测定产生更高的暴露参数评估(例如 C_{max}、AUC_{INF} 等)外,获自生色测定结果的 PK 参数通常与来自一步测定法的 PK 参数一致。

[0310] 由于观察到的 PK 的提高,rFVIIIFc 可提供延长的出血保护作用,从而允许对患有血友病 A 的个体进行更低频率的注射。

[0311] 实施例 8

[0312] 基于来自 rFVIII:Fc 的首次在人中的研究(实施例 3)的临时 PK 分析,设计 A-LONG 研究。A-LONG 是重组因子 VIII Fc 融合物(FVIII:Fc)在先前治疗的患有严重血友病 A(定义为 <1IU/dL[<1%] 内源 FVIII)的受试者的出血的预防和治疗中的安全性、药代动力学和效率的开放标记、多中心评估。

[0313] 约 106 个受试者被招募入 3 个方案之一:定制的预防性方案 (arm 1)、每周一次的给药方案 (arm 2) 和按需治疗方案 (arm 3)。

[0314] Arm 1: 定制的预防性方案

[0315] Arm 1 可包括总体组和 PK 亚组。招募了大约 66 个受试者。初始方案为每周 2 次,第 1 天以 25IU/kg 施用,然后在该周的第 4 天以 50IU/g 施用。受试者将在该周预防法中施用 rFVIIIFc 直至 rFVIIIFc 的 PK 结果可获得。基于这些结果,将建立每一个个体的定制的预防性方案,其中确定剂量和间隔以维持 1-3% 的波谷水平的 FVIII 活性。随后在整个研究过程中,每一个受试者施用他的单独定制的预防性方案。

[0316] 在整个研究过程中监控受试者,进行剂量和间隔调整。仅当受试者经历不可接受的出血事件(定义为在滚动的 2 个月时期内超过 2 次自发性出血)时进行调整。在该情况下,调整将靶向 3-5% 的波谷水平。

[0317] Arm 2: 每周一次给药的方案

[0318] 大约 20 个受试者被招募/随机化,并且如下经历简短的 rFVIIIFc PK 表征:至少 96 小时的清洗(Washout);单次剂量的 rFVIIIFc 65IU/kg;始于 rFVIIIFc 当天,包括注射前和从注射开始 10(±2) 分钟、3 小时(±15 分钟)、72(±2) 小时[第 3 天]和 96(±2) 小时[第 4 天]的简短取样。在简短的 PK 表征后,受试者可随后每 7 天施用一次固定剂量的 65IU/kg rFVIIIFc。

[0319] Arm 3: 按需方案

[0320] 在本研究中将评估至少 5 个受试者的最少 10 个大手术。大手术定义为包括全身麻醉 (general anesthesia) 和 / 或呼吸援助的任何手术过程 (选择的或应急的 (emergent)), 其中大体腔被穿透并且暴露, 或因为该手术产生了身体或生理功能的重大损伤 (例如, 剖腹手术、开胸术、开颅术、关节置换术和截肢术)。

[0321] 为在手术期间进行预防, 每 12 至 24 小时利 35 至 50IU/kg rFVIIIIFc 处理受试者。在手术之前, 医生将仔细研究受试者的 rFVIIIIFc PK 特征并且估量受试者的计划手术的类型和临床状态通常所需的因子 VIII 替代的剂量方案。在手术治疗期 (包括任何康复时间) 中对 rFVIIIIFc 的适当给药的推荐将考虑这些因素。

[0322] 本研究的主要目的是 (a) 评估作为预防性治疗方案、按需治疗方案和手术治疗方案施用的 rFVIIIIFc 的安全性和耐受性; 和 (b) 评估作为预防性治疗方案、按需治疗方案和手术治疗方案施用的 rFVIIIIFc 的效率。本研究的第二目的是 (a) 表征 rFVIIIIFc 的 PK 特征和比较 FVIIIIFc 与目前市售的产品 ADVATE 的 PK; (b) 评估个体对 FVIIIIFc 的反应; 和 (c) 评估 FVIIIIFc 的消耗。

[0323] 主要目的

[0324] • 评估作为预防性治疗方案、每周一次的治疗方案、按需治疗方案和手术治疗方案施用的 rFVIIIIFc 的安全性和耐受性

[0325] • 评估作为定制的预防性治疗方案、按需治疗方案和手术治疗方案施用的 rFVIIIIFc 的效率

[0326] 次要目的

[0327] • 表征 rFVIIIIFc 的 PK 特征和比较 FVIIIIFc 与目前市售的产品 **Advate®** 的 PK

[0328] • 评估个体对 rFVIIIIFc 的反应

[0329] • 表征足以在预防性方案中预防出血所需的剂量范围和时间安排; 维持外科设置的动态平衡; 或以按需、每周一次的治疗或预防性设置治疗出血事件

[0330] • 评估 rFVIIIIFc 的消耗 (例如, 总的年 rFVIIIIFc 消耗 / 受试者)

[0331] 实施例 9

[0332] 临床 ROTEM 评估

[0333] 在实施例 8 中的研究中, 除通过一步活化部分凝血活酶时间 (one-stage activated partial thromboplastin time) (aPTT) 测定法对血浆 FVIII 活性的测量外, 还开发了全血旋转血栓弹力测定法 (whole blood rotational thromboelastometry) (ROTEM) 来评估 2 个受试者中 (具体地, 1 个在低剂量组群中, 1 个在高剂量组群中) 由 rFVIIIIFc 和 Advate 产生的全局止血 (global hemostasis) 的提高。

[0334] 当在 rFVIIIIFc 治疗之前掺入受试者的血液时, rFVIIIIFc 和 Advate 在血块形成中表现出相当的活性。凝血时间 (CT) 在约 1% 至 100% 的正常的范围内与 rFVIIIIFc 和 Advate 的剂量线性相关, 并且在相同的受试者中 rFVIIIIFc 与 Advate 的剂量反应是相当的。

[0335] 在用 Advate, 随后用 rFVIIIIFc 给药后, 在不同时间点上对柠檬酸化全血采样, 然后利用 ROTEM 监控复钙 (recalcification) 后血块形成。尽管可变基线 CT 归因于 Advate 和 rFVIIIIFc 给药前残留的 FVIII 水平, 但两种产品都在注射后 30 分钟将 CT 有效地校正至可比较水平。此外, CT 的改善在 25IU/kg 的 rFVIIIIFc 注射时和注射后 3 小时相对于 Advate 在以该低剂量给药的受试者中持续更久。然而, 在 65IU/kg 剂量上 rFVIIIIFc 对 Advate 的

差异改善几乎看不出来。

[0336] 表

[0337] 表 1: 多核苷酸序列

[0338] A.B 结构域缺失的 FVIII_{FC}

[0339] (i) B 结构域缺失的 FVIII_{FC} 链 DNA 序列 (FVIII 信号肽用下划线标示, Fc 区用粗体标示) (SEQ ID NO:1, 其编码 SEQ ID NO:2)

[0340]

661				A	TGCAAATAGA	GCTCTCCACC	TGCTTCTTTT
721	TGTGCCTTTT	GCGATTCTGC	TTTAGTGCCA	CCAGAAGATA	CTACCTGGGT	GCAGTGGAAC	
781	TGTCATGGGA	CTATATGCAA	AGTGATCTCG	GTGAGCTGCC	TGTGGACGCA	AGATTTCTCT	
841	CTAGAGTGCC	AAAATCTTTT	CCATTCAACA	CCTCAGTCGT	GTACAAAAAG	ACTCTGTTTG	
901	TAGAATTCAC	GGATCACCTT	TTCAACATCG	CTAAGCCAAAG	GCCACCCTGG	ATGGGTCTGC	
961	TAGGTCTTAC	CATCCAGGCT	GAGGTTTATG	ATACAGTGGT	CATTACACTT	AAGAACATGG	
1021	CTTCCCATCC	TGTCAGTCTT	CATGCTGTTG	GTGTATCCTA	CTGGAAAGCT	TCTGAGGGAG	
1081	CTGAATATGA	TGATCAGACC	AGTCAAAGGG	AGAAAGAAGA	TGATAAAGTC	TTCCCTGGTG	
1141	GAAGCCATAC	ATATGTCTGG	CAGGTCCCTGA	AAGAGAATGG	TCCAATGGCC	TCTGACCCAC	
1201	TGTGCCTTAC	CTACTCATAT	CTTTCTCATG	TGGACCTGGT	AAAAGACTTG	AATTGAGGCC	
1261	TCATTGGAGC	CCTACTAGTA	TGTAGAGAAG	GGAGTCTGGC	CAAGGAAAAG	ACACAGACCT	
1321	TGCACAAATT	TATACTACTT	TTTGCTGTAT	TTGATGAAGG	GAAAAGTTGG	CACTCAGAAA	
1381	CAAAGAACTC	CTTGATGCAG	GATAGGGATG	CTGCATCTGC	TCGGGCCTGG	CCTAAAATGC	
1441	ACACAGTCAA	TGGTTATGTA	AACAGGTCTC	TGCCAGGTCT	GATTGGATGC	CACAGGAAAT	
1501	CAGTCTATTG	GCATGTGATT	GGAATGGGCA	CCACTCCTGA	AGTGCACCTA	ATATTCTCTG	
1561	AAGGTCACAC	ATTCTTGTG	AGGAACCATC	GCCAGGCGTC	CTTGGAATTC	TCGCCAATAA	
1621	CTTTCCTTAC	TGCTCAAACA	CTCTTGATGG	ACCTTGGACA	GTTTCTACTG	TTTTGTCTATA	
1681	TCTCTTCCCA	CCAACATGAT	GGCATGGAAG	CTTATGTCAA	AGTAGACAGC	TGTCCAGAGG	
1741	AACCCCAACT	ACGAATGAAA	AATAATGAAG	AAGCGGAAGA	CTATGATGAT	GATCTTACTG	
1801	ATTCTGAAAT	GGATGTGGTC	AGGTTTGATG	ATGACAACTC	TCCTTCCTTT	ATCCAAATTC	
1861	GCTCAGTTGC	CAAGAAGCAT	CCTAAAACCT	GGGTACATTA	CATTGCTGCT	GAAGAGGAGG	
1921	ACTGGGACTA	TGCTCCCTTA	GTCTCTGCCC	CCGATGACAG	AAGTTATAAA	AGTCAATATT	
1981	TGAACAATGG	CCCTCAGCGG	ATTGGTAGGA	AGTACAAAAA	AGTCCGATTT	ATGGCATACA	
2041	CAGATGAAAC	CTTTAAGACT	CGTGAAAGCTA	TTGAGCATGA	ATCAGGAATC	TTGGGACCTT	
2101	TACTTTATGG	GGAAGTTGGA	GACACACTGT	TGATTATATT	TAAGAATCAA	GCAAGCAGAC	
2161	CATATAACAT	CTACCTCAC	GGAATCACTG	ATGTCCGTCC	TTTGTATTCA	AGGAGATTAC	
2221	CAAAGGTGT	AAAACATTTG	AAGGATTTTC	CAATTCTGCC	AGGAGAAATA	TTCAAATATA	
2281	AATGGACAGT	GACTGTAGAA	GATGGGCCAA	CTAAATCAGA	TCCTCGGTGC	CTGACCCGCT	
2341	ATTACTCTAG	TTTCGTTAAT	ATGGAGAGAG	ATCTAGCTTC	AGGACTCATT	GGCCCTCTCC	
2401	TCATCTGCTA	CAAAGAATCT	GTAGATCAAA	GAGGAAACCA	GATAATGTCA	GACAAGAGGA	
2461	ATGTCATCCT	GTTTCTGTGA	TTTGATGAGA	ACCGAAGCTG	GTACCTCACA	GAGAATATAC	
2521	AACGCTTTCT	CCCCAATCCA	GCTGGAGTGC	AGCTTGAGGA	TCCAGAGTTC	CAAGCCTCCA	
2581	ACATCATGCA	CAGCATCAAT	GGCTATGTTT	TTGATAGTTT	GCAGTTGTCA	GTTTGTGTTG	
2641	ATGAGGTGGC	ATACTGGTAC	ATTCTAAGCA	TTGGAGCACA	GACTGACTTC	CTTCTGTGCT	
2701	TCTTCTCTGG	ATATACTTTC	AAACACAAAA	TGGTCTATGA	AGACACACTC	ACCCTATTCC	
2761	CATTCTCAGG	AGAACTGTCT	TTGATGTCGA	TGGAAAACCC	AGGTCTATGG	ATTCTGGGGT	
2821	GCCACAACCT	AGACTTTCGG	AACAGAGGCA	TGACCGCCTT	ACTGAAGGTT	TCTAGTTGTG	
2881	ACAAGAACAC	TGGTGATTAT	TACGAGGACA	GTTATGAAGA	TATTTGAGCA	TACTTGCTGA	
2941	GTAAAAACAA	TGCCATTGAA	CCAAGAAGCT	TCTCTCAAAA	CCCACAGTCT	TTGAAACGCC	
3001	ATCAACGGGA	AATAACTCGT	ACTACTCTTC	AGTCAGATCA	AGAGGAAATT	GACTATGATG	
3061	ATACCATATC	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG	ATTTTGACAT	TTATGATGAG	GATGAAATC	
3121	AGAGCCCCCG	CAGCTTTCAC	AAGAAAACAC	GACACTATTT	TATTGCTGCA	GTGGAGAGGC	
3181	TCTGGGATTA	TGGGATGAGT	AGCTCCCCAC	ATGTTCTAAG	AAACAGGGCT	CAGAGTGGCA	
3241	GTGTCCCTCA	GTTCAAGAAA	GTTGTTTTCC	AGGAATTTAC	TGATGGCTCC	TTTACTCAGC	
3301	CCTTATACCG	TGGAGAACTA	AATGAACATT	TGGGACTCCT	GGGCCATAT	ATAAGAGCAG	

[0341]

```
3361 AAGTTGAAGA TAATATCATG GTAACCTTCA GAAATCAGGC CTCTCGTCCC TATTCCTTCT
3421 ATTCTAGCCT TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG AGCAGAACCT AGAAAAAACT
3481 TTGTCAAGCC TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGGAAAGT GCAACATCAT ATGGCACCCA
3541 CTAAAGATGA GTTTGACTGC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC TGATGTTGAC CTGGAAAAAG
3601 ATGTGCACTC AGGCCTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA CACTAACACA CTGAACCTTG
3661 CTCATGGGAG ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT TTTCACCATC TTTGATGAGA
3721 CCAAAAGCTG GTACTTCACT GAAAATATGG AAAGAAACTG CAGGGCTCCC TGCAATATCC
3781 AGATGGAAGA TCCCACTTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA TGCAATCAAT GGCTACATAA
3841 TGGATACACT ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG GATTCGATGG TATCTGCTCA
3901 GCATGGGCAG CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTTCA TGGACATGTG TTCACTGTAC
3961 GAAAAAAGA GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT TTTGAGACAG
4021 TGGAAATGTT ACCATCCAAA GCTGGAATTT GCGGGTGGG ATGCCTTATT GCGGAGCATC
4081 TACATGCTGG GATGAGCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTCAG ACTCCCCTGG
4141 GAATGGCTTC TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA TATGGCAGT
4201 GGGCCCCAAA GCTGGCCAGA CTTCAATTAT CCGGATCAAT CAATGCCTGG AGCACAAGG
4261 AGCCCTTTTC TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACC AAT GATTATTCAC GGCATCAAGA
4321 CCCAGGGTGC CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA
4381 GTCTTGATGG GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT
4441 TCTTTGGCAA TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAACCCCT CCAATTATTG
4501 CTCGATACAT CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG CAGCACTCTT CGCATGGAGT
4561 TGATGGGCTG TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT
4621 CAGATGCACA GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT GTTGCCACC TGGTCTCCTT
4681 CAAAAGCTCG ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC
4741 CAAAAGAGTG GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAACTACTC
4801 AGGGAGTAAA ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC TCCAGCAGTC
4861 AAGATGGCCA TCAGTGGACT CTCTTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTTCAGGGAA
4921 ATCAAGACTC CTTACACCT GTGGTGAAC CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGTACC
4981 TTCGAATTCA CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT
5041 GCGAGGCACA GGACCTCTAC GACAAAACCT ACACATGCCC ACCGTGCCCC GCTCCAGAAC
5101 TCCGTGGCGG ACCGTCAGTC TTCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT
5161 CCGGAGCCCC TGAGGTCACA TGGCTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA
5221 AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG
5281 AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCTGCAC CAGGACTGGC
5341 TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA
5401 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT
5461 CCCGGGATGA GCTGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC
5521 CCAGCGGACT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA
5581 CGCCTCCCGT GTTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA
5641 AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA
5701 ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA A
```

[0342] (ii)Fc DNA 序列(小鼠 Ig κ 信号肽用下划线标示)(SEQ ID NO:3,其编码 SEQ ID NO:4)

[0343]

```
7981 ATGGA GACAGACACA
8041 CTCCTGCTAT GGGTACTGCT GCTCTGGGTT CCAGGTTCCA CTGGTGACAA AACTCACACA
8101 TGCCCAACCGT GCCCAGCACC TGAACCTCTG GGAGGACCGT CAGTCTTCTT CTTCGCCCCA
8161 AAACCCAAAG ACACCCCTCAT GATCTCCCGG AOCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC
8221 GTGAGCCACG AAGACCCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT
8281 AATGCCAAGA CAAAGCCCGG GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTCAGCGTC
8341 CTCACCGTCC TGCACCAAGG CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC
8401 AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAGGGGCA GCCCCGAGAA
8461 CCACAGGTGT ACACCCCTGCC CCCATCCCGC GATGAGGTGA CCAAGAACCA GGTACGCTG
8521 ACCTGCCTGG TCAAGGCTT CTATCCCGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG
8581 CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCT CCGGTGTTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC
8641 CTCTACAGCA AGCTCACCCT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC
8701 TCGTGATGTC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
8761 GGTAAA
```

[0344] B.F 全长 FVIIIFc

[0345] (i) 全长 FVIIIFc DNA 序列(FVIII 信号肽用下划线标示,Fc 区用粗体标示)(SEQ ID NO:5,其编码 SEQ ID NO:6)

[0346]

661				ATG	CAAATAGAGC	TCTCCACCTG
721	CTTCTTTCTG	TGCCTTTTGC	GATTCTGCTT	TAGTGCCACC	AGAAGATACT	ACCTGGGTGC
781	AGTGGAAC TG	TCATGGGACT	ATATGCAAAG	TGATCTCGGT	GAGCTGCCTG	TGGACGCAAG
841	ATTTCCCTCCT	AGAGTGCCAA	AATCTTTTCC	ATTCAACACC	TCAGTCGTGT	ACAAAAAGAC
901	TCTGTTTGTA	GAATTCACGG	ATCACCTTTT	CAACATCGCT	AAGCCAAAGC	CACCCTGGAT
961	GGGTCTGCTA	GGTCCTACCA	TCCAGGCTGA	GGTTTATGAT	ACAGTGGTCA	TTACTACTAA
1021	GAACATGGCT	TCCCATCCTG	TCAGTCTTCA	TGCTGTTGGT	GTATCCTACT	GGAAAGCTTC
1081	TGAGGGAGCT	GAATATGATG	ATCAGACCAG	TCAAAGGGAG	AAAGAAGATG	ATAAAGTCTT
1141	CCCTGGTGGA	AGCCATACAT	ATGTCTGGCA	GGTCCTGAAA	GAGAATGGTC	CAATGGCCTC
1201	TGACCCACTG	TGCCTTACCT	ACTCATATCT	TTCTCATGTG	GACCTGGTAA	AAGACTTGAA
1261	TTCAGGCCTC	ATTGGAGCCC	TACTAGTATG	TAGAGAAGGG	AGTCTGGCCA	AGGAAAAGAC
1321	ACAGACCTTG	CACAAATTTA	TACTACTTTT	TGCTGTATTT	GATGAAGGGA	AAAGTTGGCA
1381	CTCAGAAACA	AAGAACTCCT	TGATGCAGGA	TAGGGATGCT	GCATCTGCTC	GGGCCTGGCC
1441	TAAATGTCAT	ACAGTCAATG	GTTATGTAAA	CAGGTCTCTG	CCAGGTCTGA	TTGGATGCCA
1501	CAGGAAATCA	GTCTATTGGC	ATGTGATTGG	AATGGGCACC	ACTCCTGAAG	TGCATCAAT
1561	ATTCCTCGAA	GGTCACACAT	TTCTTGTGAG	GAACCATCGC	CAGGCGTCCT	TGGAAATCTC
1621	GCCAATAACT	TTCTTACTG	CTCAAACACT	CTTGATGGAC	CTTGGACAGT	TTCTACTGTT
1681	TTGTCTATATC	TCTTCCCACC	AACATGATGG	CATGGAAGCT	TATGTCAAAG	TAGACAGCTG
1741	TCCAGAGGAA	CCCCAACTAC	GAATGAAAAA	TAATGAAGAA	GCGGAAGACT	ATGATGATGA
1801	TCTTACTGAT	TCTGAAATGG	ATGTGGTCAG	GTTTGATGAT	GACAACTCTC	CTTCCTTTAT
1861	CCAAATTTCG	TCAGTTGCCA	AGAAGCATCC	TAAAACTTGG	GTACATTACA	TTGCTGCTGA
1921	AGAGGAGGAC	TGGGACTATG	CTCCCTTAGT	CCTCGCCCCC	GATGACAGAA	GTTATAAAAG
1981	TCAATATTTG	AACAATGGCC	CTCAGCGGAT	TGGTAGGAAG	TACAAAAAAG	TCCGATTTAT
2041	GGCATAACACA	GATGAAACCT	TTAAGACTCG	TGAAGCTATT	CAGCATGAAT	CAGGAATCTT
2101	GGGACCTTTA	CTTTATGGGG	AAGTTGGAGA	CACACTGTTG	ATTATATTTA	AGAATCAAGC
2161	AAGCAGACCA	TATAACATCT	ACCCTCACGG	AATCACTGAT	GTCCGTCCCT	TGTATTCAAG
2221	GAGATTACCA	AAAGGTGTAA	AACATTTGAA	GGATTTTCCA	ATTCTGCCAG	GAGAAATATT
2281	CAAATATAAA	TGGACAGTGA	CTGTAGAAGA	TGGGCCAACT	AAATCAGATC	CTCGGTGCCT
2341	GACCCGCTAT	TACTCTAGTT	TCGTTAATAT	GGAGAGAGAT	CTAGCTTCAG	GACTCATTGG
2401	CCCTCTCCTC	ATCTGCTACA	AAGAATCTGT	AGATCAAAGA	GGAAACCAGA	TAACTGCAGA
2461	CAAGAGGAAT	GTCTCCTGT	TTTCTGTATT	TGATGAGAAC	CGAAGCTGGT	ACCTCACAGA
2521	GAATATACAA	CGCTTTCTCC	CCAATCCAGC	TGGAGTGCAG	CTTGAGGATC	CAGAGTTCCA
2581	AGCCTCCAAC	ATCATGCACA	GCATCAATGG	CTATGTTTTT	GATAGTTTGC	AGTTGTCAGT
2641	TTGTTTGCAT	GAGGTGGCAT	ACTGGTACAT	TCTAAGCATT	GGAGCACAGA	CTGACTTCCT
2701	TTCTGTCTTC	TTCTCTGGAT	ATACCTTCAA	ACACAAAATG	GTCTATGAAG	ACACACTCAC
2761	CCTATTCCCA	TTCTCAGGAG	AACTGTCTT	CATGTGATG	GAAAACCCAG	GTCTATGGAT
2821	TCTGGGGTGC	CACAACTCAG	ACTTTCGGAA	CAGAGGCATG	ACCGCCTTAC	TGAAGGTTTC
2881	TAGTTGTGAC	AAGAACACTG	GTGATTATTA	CGAGGACAGT	TATGAAGATA	TTTCAGCATA
2941	CTTGCTGAGT	AAAAACAATG	CCATTGAACC	AAGAAGCTTC	TCCCAGAATT	CAAGACACCC
3001	TAGCACTAGG	CAAAAGCAAT	TTAATGCCAC	CACAATTCCA	GAAAATGACA	TAGAGAAGAC
3061	TGACCCTTGG	TTTGCACACA	GAACACCTAT	GCCTAAAATA	CAAAATGTCT	CCTCTAGTGA
3121	TTTGTTGATG	CTCTTGCGAC	AGAGTCTTAC	TCCACATGGG	CTATCCTTAT	CTGATCTCCA
3181	AGAAGCCAAA	TATGAGACTT	TTTCTGATGA	TCCATCACCT	GGAGCAATAG	ACAGTAATAA
3241	CAGCCTGTCT	GAAATGACAC	ACTTCAGGCC	ACAGCTCCAT	CACAGTGGGG	ACATGGTATT
3301	TACCCCTGAG	TCAGGCCTCC	AATTAAGATT	AAATGAGAAA	CTGGGGACAA	CTGCAGCAAC
3361	AGAGTTGAAG	AAACTTGATT	TCAAAGTTTC	TAGTACATCA	AATAATCTGA	TTTCAACAAT
3421	TCCATCAGAC	AATTTGGCAG	CAGGTACTGA	TAATACAAGT	TCCTTAGGAC	CCCCAAGTAT
3481	GCCAGTTCAT	TATGATAGTC	AATTAGATAC	CACCTCTATTT	GGCAAAAAGT	CATCTCCCTT
3541	TACTGAGTCT	GGTGGACCTC	TGAGCTTGAG	TGAAGAAAAT	AATGATTCAA	AGTTCTTAGA

[0347]

3601	ATCAGGTTTA	ATGAATAGCC	AAGAAAGTTC	ATGGGGAAAA	AATGTATCGT	CAACAGAGAG
3661	TGGTAGGTTA	TTTAAAGGGA	AAAGAGCTCA	TGGACCTGCT	TTGTTGACTA	AAGATAATGC
3721	CTTATTCAAA	GTTAGCATCT	CTTTGTTAAA	GACAAACAAA	ACTTCCAATA	ATTCAGCAAC
3781	TAATAGAAAG	ACTCACATTG	ATGGCCCATC	ATTATTAATT	GAGAATAGTC	CATCAGTCTG
3841	GCAAAATATA	TTAGAAAGTG	ACACTGAGTT	TAAAAAAGTG	ACACCTTTGA	TTCATGACAG
3901	AATGCTTATG	GACAAAAATG	CTACAGCTTT	GAGGCTAAAT	CATATGTCAA	ATAAACTAC
3961	TTCATCAAAA	AACATGGAAA	TGGTCCAACA	GAAAAAAGAG	GGCCCCATTG	CACCAGATGC
4021	ACAAAATCCA	GATATGTGCT	TCTTTAAGAT	GCTATTCTTG	CCAGAATCAG	CAAGGTGGAT
4081	ACAAAGGACT	CATGGAAAGA	ACTCTCTGAA	CTCTGGGCAA	GGCCCCAGTC	CAAAGCAATT
4141	AGTATCCTTA	GGACCAGAAA	AATCTGTGGA	AGGTCAGAAT	TTCTTGCTCTG	AGAAAAACAA
4201	AGTGGTAGTA	GGAAAGGGTG	AATTTACAAA	GGACGTAGGA	CTCAAAGAGA	TGGTTTTTCC
4261	AAGCAGCAGA	AACCTATTTT	TTACTAAGTT	GGATAATTTA	CATGAAAATA	ATACACACAA
4321	TCAAGAAAAA	AAAATTTCAGG	AAGAAATAGA	AAAGAAGGAA	ACATTAATCC	AAGAGAATGT
4381	AGTTTTGCCT	CAGATACATA	CAGTGACTGG	CACATAAGAAT	TTCATGAAGA	ACCTTTTCTT
4441	ACTGAGCACT	AGGCAAAATG	TAGAAGGTTT	ATATGACGGG	GCATATGCTC	CAGTACTTCA
4501	AGATTTTAGG	TCATTAAATG	ATTCAACAAA	TAGAACAAAG	AAACACACAG	CTCATTTCCTC
4561	AAAAAAGGG	GAGGAAGAAA	ACTTGGAAAG	CTTGGGAAAT	CAAACCAAGC	AAATTGTAGA
4621	GAAATATGCA	TGCACCACAA	GGATATCTCC	TAATACAAGC	CAGCAGAATT	TTGTACGCA
4681	ACGTAGTAAG	AGAGCTTTGA	AACAATTCAG	ACTCCCACTA	GAAGAAACAG	AACCTGAAAA
4741	AAGGATAATT	GTGGATGACA	CCTCAACCCA	GTGGTCCAAA	AACATGAAAC	ATTTGACCCC
4801	GAGCACCCTC	ACACAGATAG	ACTACAATGA	GAAGGAGAAA	GGGGCCATTA	CTCAGTCTCC
4861	CTTATCAGAT	TGCCTTACGA	GGAGTCATAG	CATCCCTCAA	GCAAATAGAT	TCCCTTACC
4921	CATTGCAAAG	GTATCATCAT	TTCCATCTAT	TAGACCTATA	TATCTGACCA	GGGTCTTATT
4981	CCAAGACAAC	TCTTCTCATC	TTCCAGCAGC	ATCTTATAGA	AAGAAAGATT	CTGGGGTCCA
5041	AGAAAGCAGT	CATTTCTTAC	AAGGAGCCAA	AAAAAATAAC	CTTCTTTTAG	CCATTCTAAC
5101	CTTGGAGATG	ACTGGTGATC	AAAGAGAGGT	TGGCTCCCTG	GGGACAAGTG	CCACAAATTC
5161	AGTCACATAC	AAGAAAGTTG	AGAACACTGT	TCTCCCGAAA	CCAGACTTGC	CCAAACATC
5221	TGGCAAAGTT	GAATTGCTTC	CAAAAGTTCA	CATTTATCAG	AAGGACCTAT	TCCCTACGGA
5281	AACTAGCAAT	GGGTCTCCTG	GCCATCTGGA	TCTCGTGGAA	GGGAGCCTTC	TTCAGGGAAC
5341	AGAGGGAGCG	ATTAAGTGGG	ATGAAGCAAA	CAGACCTGGA	AAAGTTCCCT	TTCTGAGAGT
5401	AGCAACAGAA	AGCTCTGCAA	AGACTCCCTC	CAAGCTATTG	GATCCTCTTG	CTTGGGATAA
5461	CCACTATGGT	ACTCAGATAC	CAAAAGAAAG	GTGGAAATCC	CAAGAGAAGT	CACCAGAAAA
5521	AACAGCTTTT	AAGAAAAAGG	ATACCATTTT	GTCCCTGAAC	GCTTGTGAAA	GCAATCATGC
5581	AATAGCAGCA	ATAAATGAGG	GACAAAATAA	GCCCCAAATA	GAAGTCACCT	GGGCAAAGCA
5641	AGGTAGGACT	GAAAGGCTGT	GCTCTCAAAA	CCCACCAGTC	TTGAAACGCC	ATCAACGGGA
5701	AATAACTCGT	ACTACTCTTC	AGTCAGATCA	AGAGGAATTT	GACTATGATE	ATACCATATC
5761	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG	ATTTTGACAT	TTATGATGAG	GATGAAAATC	AGAGCCCCCG
5821	CAGCTTTCAA	AAGAAAACAC	GACACTATTT	TATTGCTGCA	GTGGAGAGGC	TCTGGGATTA
5881	TGGGATGAGT	AGCTCCCCAC	ATGTTCTAAG	AAACAGGGCT	CAGAGTGGCA	TGTGCCCTCA
5941	GTTCAAGAAA	GTTGTTTTCC	AGGAATTTAC	TGATGGCTCC	TTTACTCAGC	CCTTATACCG
6001	TGGAGAACTA	AATGAACATT	TGGGACTCCT	GGGGCCATAT	ATAAGAGCAG	AAGTTGAAGA
6061	TAATATCATG	GTAACCTTCA	GAAATCAGGC	CTCTCGTCCC	TATTCCTTCT	ATTCTAGCCT
6121	TATTTCTTAT	GAGGAAGATC	AGAGGCAAGG	AGCAGAACCT	AGAAAAAACT	TTGTCAAGCC
6181	TAATGAAACC	AAAACCTACT	TTTGGAAAGT	GCAACATCAT	ATGGCACCCA	CTAAAGATGA
6241	GTTTGACTGC	AAAGCCTGGG	CTTATTCTCT	TGATGTTGAC	CTGGAAAAAG	ATGTGCACTC
6301	AGGCCTGATT	GGACCCCTTC	TGGTCTGCCA	CACATAACACA	CTGAACCCCTG	CTCATGGGAG
6361	ACAAGTGACA	GTACAGGAAT	TTGCTCTGTT	TTTCACCATC	TTTGATGAGA	CCAAAAGCTG
6421	GTACTTCACT	GAAAATATGG	AAAGAACTTG	CAGGGCTCCC	TGCAATATCC	AGATGGGAAG
6481	TCCCACTTTT	AAAGAGAATT	ATCGCTTCCA	TGCAATCAAT	GGCTACATAA	TGGATACACT
6541	ACCTGGCTTA	GTAATGGCTC	AGGATCAAAG	GATTGATGAG	TATCTGCTCA	GCATGGGCAG
6601	CAATGAAAC	ATCCATTCTA	TTCATTTCAG	TGGACATGTG	TTCACTGTAC	GAAAAAAGA
6661	GGAGTATAAA	ATGGCACTGT	ACAATCTCTA	TCCAGGTGTT	TTTGAGACAG	TGGAAATGTT
6721	ACCATCCAAA	GCTGGAATTT	GGCGGGTGGG	ATGCCTTATT	GGCGAGCATC	TACATGCTGG
6781	GATGAGCACA	CTTTTTCTGG	TGTACAGCAA	TAAGTGTGAG	ACTCCCTGTT	GAATGGCTTC
6841	TGGACACATT	AGAGATTTTC	AGATTACAGC	TTCAGGACAA	TATGGACAGG	GGGCCCCAAA
6901	GCTGGCCAGA	CTTCATTATT	CCGGATCAAT	CAATGCCTGG	AGCACCAAGG	AGCCCTTTTC
6961	TTGGATCAAG	TGGATCTGTG	TGGCACCAAT	GATTATTTCAC	GGCATCAAGA	CCCAGGGTGC
7021	CCGTGAGAAC	TTCTCCAGCC	TCTACATCTC	TCAGTTTATC	ATCATGTATA	GTCTTGATGG
7081	GAAGAAGTGG	CAGACTTATC	GAGGAAATTC	CACTGGAACC	TTAATGGTCT	TCTTTGGCAA

[0348]

```

7141 TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAACCCT CCAATTATTG CTGATACAT
7201 CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG CAGCACTCTT CGCATGGAGT TGATGGGCTG
7261 TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT CAGATGCACA
7321 GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC TGGTCTCCTT CAAAAGCTCG
7381 ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC CAAAAGAGTG
7441 GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAACACTC AGGGAGTAAA
7501 ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC TCCAGCAGTC AAGATGGCCA
7561 TCAGTGGACT CTCTTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGSTT TTTCAGGGAA ATCAAGACTC
7621 CTTACACCTT GTGGTGAAC CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGCTACC TTCGAATTCA
7681 CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT GCGAGGCACA
7741 GSACCTCTAC GACAAAACCT ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCTCCAGAAC TCCTGGGCGG
7801 ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCCAACCC CAAGGACACC CTCATGATCT CCGGACCCCC
7861 TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG
7921 GTACGTGGAC GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA
7981 CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCTCAC CGTCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA
8041 GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACATCTC
8101 CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCA GGTGTACACC CTGCCCCAT CCGGGATGA
8161 GCTGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT
8221 CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGAGGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT
8281 GTTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG
8341 GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC
8401 GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA A

```

[0349] (ii)Fc(与A(ii)(SEQ ID NO:3)相同的序列)]

[0350] C.

[0351] (i)重链(HC)-Fc DNA序列(HC与Fc之间无接头)(信号肽用下划线标示, Fc区用粗体标示)(SEQ ID NO:7,其编码 SEQ ID NO:8)

[0352]

```

1 ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TCGATTCTG CTTTAGTGCC
61 ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTCATGGG ACTATATGCA AAGTGATCTC
121 GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCCT CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC
181 ACCTCAGTCG TGTACAAAAA GACTCTGTTT GTAGAATTCA CGGATCACCT TTTCAACATC
241 GCTAAGCCAA GGCACCCCTG GATGGGCTCG CTAGGTCTTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCACTCT TCATGCTGTT
361 GGTGTATCCT ACTGAAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG ATGATCAGAC CAGTCAAAGG
421 GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTCCCTGGT GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCTCT
481 AAAGAGAATG GTCCAATGGC CTCTGACCCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTCTCAT
541 GTGGACCTGG TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCCTACTAGT ATGTAGAGAA
601 GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT TTTTGCTGTA
661 TTTGATGAAG GGAAGATTG GCACTCAGAA ACAAAGAACT CCTTGATGCA GGATAGGGAT
721 GCTGCATCTG CTCGGGCCCTG GCCTAAAAATG CACACAGTCA ATGGTTATGT AACAGGTCT
781 CTGCCAGGTC TGATTGGATG CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGGATGGGC
841 ACCACTCCCTG AAGTGCATC AATATTCCTC GAAGGTCACA CATTTCTTGT GAGGAACCAT
901 CGCCAGGCGT CTTGGAAAT CTCGCCAATA ACTTTCCTTA CTGCTCAAAC ACTCTTGATG
961 GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCTAT ATCTCTTCCC ACCAACATGA TGGCATGGAA
1021 GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG GAAOCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA
1081 GAAGCGGAAG ACTATGATGA TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT
1141 GATGACAACT CTCCTTCTCT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAACT
1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT AGTCCTCGCC
1261 CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG GCCCTCAGCG GATTGGTAGG
1321 AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATAC ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT
1381 ATTCAGCATG AATCAGGAAT CTTGGGACCT TTACTTTATG GGAAGTTGG AGACACACTG

```

[0353]


```

1441 TTGATTATAT TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCCTCA CGGAATCACT
1501 GATGTCCGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTA CCAAAAGGTG TAAAACATTT GAAGGATTTT
1561 CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATTCAAATAT AAATGGACAG TGA CTGTAGA AGATGGGCCA
1621 ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC TATTACTCTA GTTTCGTTAA TATGGAGAGA
1681 GATCTAGCTT CAGGACTCAT TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAAGAATC TG TAGATCAA
1741 AGAGGAAACC AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTTTCTGT ATTTGATGAG
1801 AACC GAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC TCCCCAATCC AGCTGGAGTG
1861 CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTTC AACATCATGC ACAGCATCAA TGGCTATGTT
1921 TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTGTGTTG CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTCTAAGC
1981 ATTGGAGCAC AGACTGACTT CCTTCTGTG TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA
2041 ATGGTCTATG AAGACACACT CACCCTATTC CCATTCTCAG GAGAACTGT CTTCATGTGG
2101 ATGGA AAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACA ACT CAGACTTTCG GAACAGAGGC
2161 ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACA CTGGTGATTA TTACGAGGAC
2221 AGTTATGAAG ATATTTTCAGC ATACTTGCTG AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAGAC
2281 AAAACTCACA CATGCCCACC GTGCCCAGCT CCAGAACTCC TGGGCGGACC GTCAGTCTTC
2341 CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTACATGC
2401 GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC
2461 GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG CAGTACCGT
2521 GTGGTCAGCG TCCTCACCCT CCTGCACGAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC
2581 AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG
2641 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC
2701 CAGGTACGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG
2761 GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGTT GGACTCCGAC
2821 GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
2881 GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
2941 TCCCTGTCTC CGGGTAAA

```

[0354] C.

[0355] (ii) 重链 (HC)-Fc DNA 序列 (HC 与 Fc 之间的 5 个氨基酸的接头) (信号肽用下划线标示, Fc 区以粗体标示, 5 个氨基酸的接头用双下划线标示) (SEQ ID NO:9, 其编码 SEQ ID NO:10)

[0356]

```

1 ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TGCGATTCTG CTTTAGTGCC
61 ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCACTGGAA CTGTCATGGG ACTATATGCA AAGTGATCTC
121 GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTCCCT COTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC
181 ACCTCAGTCG TGTACAAAAA GACTCTGTTT GTAGAATTCA CGGATCACCT TTCAACATC
241 GCTAAGCCAA GGCCACCCTG GATGGGPTCG CTAGGTCCCTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCAGTCT TCATGCIGTT
361 GGTGTATCCT ACTGGAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG ATGATCAGAC CAGTCAAAGG
421 GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCCTGGT GGAAGOCATA CATATGTCTG GCAGSTCCTG
481 AAAGAGAATG GTCCAATGGC CTCTGACCCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTCTCAT
541 GTGGACCTGG TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCCTACTAGT ATGTAGAGAA
601 GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT TTTTGCCTGA
661 TTTGATGAAG GGAAAAGTTG GCACTCAGAA ACAAAGAACT CTTTGATGCA GGATAGGGAT
721 GCTGCATCTG CTCGGGCCTG GCCTAAAATG CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTCT
781 CTGCCAGGTC TGATTGGATG CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGGAAATGGGC
841 ACCACTCCTG AAGTGCACCT AATATTCCTC GAAGGTACAA CATTCTTGT GAGGAACCAT
901 CGCCAGGCGT CTTTGGAAT CTGCGCAATA ACTTTCCTTA CTGCTCAAAC ACTCTTGATG
961 GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCTAT ATCTCTTCCC ACCAACATGA TGGCATGGAA
1021 GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA
1081 GAAGCGGAAG ACTATGATGA TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT
1141 GATGACAACT CTCCTTCCTT TATCCAAAT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAACF
1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT AGTCTCGCC
1261 CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG GCCCTCAGCG GATTGGTAGG
1321 AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATAC ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT

```

[0357]

```

1381 ATTCAGCATG AATCAGGAAT CTTGGGACCT TTACTTTATG GGGAAAGTTGG AGACACACTG
1441 TTGATTATAT TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCCTCA CGGAATCACT
1501 GATGTCCGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTA CCAAAGGTG TAAAACATTT GAAGGATTTT
1561 CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATTCAAATAT AAATGGACAG TGA CTGTAGA AGATGGGCCA
1621 ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC TATTACTCTA GTTTCGTTAA TATGGAGAGA
1681 GATCTAGCTT CAGGACTCAT TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAAGAATC TGTAGATCAA
1741 AGAGGAAACC AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTTTTCTGT ATTTGATGAG
1801 AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC TCCCCAATCC AGCTGGAGTG
1861 CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC AACATCATGC ACAGCATCAA TGGCTATGTT
1921 TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTGTT CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTCTAAGC
1981 ATTGAGGACAC AGACTGACTT CCTTTCTGTC TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA
2041 ATGGTCTATG AAGACACACT CACCCTATTC CCATTCTCAG GAGAACTGT CTTCATGTCG
2101 ATGGAAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACAAC T CAGACTTTCG GAACAGAGGC
2161 ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACA CTGGTGATTA TTACGAGGAC
2221 AGTTATGAAG ATATTTCAGC ATACTTGCTG AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAGGC
2281 TTCTCCCAGA ATGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCTCCAGA ACTCCTGGGC
2341 GGACCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC
2401 CCTGAGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC
2461 TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCTAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA CGAGCAGTAC
2521 AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC
2581 AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC
2641 TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAT
2701 GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC
2761 ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC
2821 GTGTTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG
2881 TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
2941 ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAA

```

[0358] C.

[0359] (iii) 轻链 (LC)-Fc DNA 序列 (信号肽用下划线标示, Fc 区用粗体标示) (SEQ ID NO:11, 其编码 SEQ ID NO:12)

[0360]

```

1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTA CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACTGGT
61 GAAATAACTC GTACTACTCT TCAGTCAGAT CAAGAGGAAA TTGACTATGA TGATACCATA
121 TCAGTTGAAA TGAAGAAGGA AGATTTTGAC ATTTATGATG AGGATGAAAA TCAGAGCCCC
181 CGCAGCTTTC AAAAGAAAAC ACGACACTAT TTTATTGCTG CAGTGGAGAG GCTCTGGGAT
241 TATGGGATGA GTAGCTCCCC ACATGTTCTA AGAAACAGGG CTCAGAGTGG CAGTGTCCTT
301 CAGTTCAAGA AAGTTGTTTT CCAGGAATTT ACTGATGGCT CCTTTACTCA GCCCTTATAC
361 CGTGGAGAAC TAAATGAACA TTTGGGACTC CTGGGGCCAT ATATAAGAGC AGAAGTTGAA
421 GATAATATCA TGSTAACCTT CAGAAATCAG GCCTCTCGTC CCTATTCTTT CTATTCTAGC
481 CTTATTTCTT ATGAGGAAGA TCAGAGGCAA GGAGCAGAAC CTAGAAAAAA CTTTGTCAAG
541 CCTAATGAAA CCAAAACCTA CTTTTGGAAA GTGCAACATC ATATGGCACC CACTAAAGAT
601 GAGTTTGACT GCAAAGCCTG GGCTTATTTT TCTGATGTTG ACCTGGAAAA AGATGTGCAC
661 TCAGGCCTGA TTGGACCCCT TCTGGTCTGC CACACTAACA CAGTGAACCC TGCTCATGGG
721 AGACAAGTGA CAGTACAGGA ATTTGCTCTG TTTTTCACCA TCTTTGATGA GACCAAAAGC
781 TGGTACTTCA CTGAAAATAT GGAAAGAAAC TGCAGGGCTC CCTGCAATAT CCAGATGGAA
841 GATCCCACTT TTAAAGAGAA TTATCGCTTC CATGCAATCA ATGGCTACAT AATGGATACA
901 CTACCTGGCT TAGTAATGGC TCAGGATCAA AGGATTCGAT GGTATCTGCT CAGCATGGGC
961 AGCAATGAAA ACATCCATTC TATTCATTTT AGTGGACATG TGTTCACTGT ACGAAAAAAA
1021 GAGGAGTATA AAATGGCACT GTACAACTCT TATCCAGGTG TTTTTGAGAC AGTGAAAATG
1081 TTAOCATCCA AAGCTGGAAT TTGGCGGGTG GAATGCCTTA TTGGCGAGCA TCTACATGCT
1141 GGGATGAGCA CACTTTTTCT GGTGACAGC AATAAGTGTC AGACTCCOCT GGGAATGGCT
1201 TCTGGACACA TTAGAGATTT TCAGATTACA GCTTCAGGAC AATATGGACA GTGGGCCCCA
1261 AAGCTGGCCA GACTTCATTA TTCCGGATCA ATCAATGCCT GGAGCACCAA GGAGCCCTTT
1321 TCTTGATCA AGGTGGATCT GTTGGCACCA ATGATTATTC ACGGCATCAA GACCCAGGGT

```

[0361]


```

1381  GCGCGTCAGA AGTTCTCCAG CCTCTACATC TCTCAGTTTA TCATCATGTA TAGTCTTGAT
1441  GGGAGAAGT GGCAGACTTA TCGAGGAAAT TCCACTGGAA CCTTAATGGT CTTCTTTGGC
1501  AATGTGGATT CATCTGGGAT AAAACACAAT ATTTTAAACC CTCCAATTAT TGCTCGATAC
1561  ATCCGTTTGC ACCCAACTCA TTATAGCATT CGCAGCACTC TTCGCATGGA GTTGATGGGC
1621  TGTGATTTAA ATAGTTGCAG CATGCCATTG GGAATGGAGA GTAAAGCAAT ATCAGATGCA
1681  CAGATTACTG CTTTCATCCTA CTTTACCAAT ATGTTTGCCA CCTGGTCTCC TTCAAAGCT
1741  CGACTTCACC TCCAAGGGAG GAGTAATGCC TGGAGACCTC AGGTGAATAA TCCAAAGAG
1801  TGGCTGCAAG TGGACTTCCA GAAGACAATG AAAGTCACAG GAGTAACTAC TCAGGGAGTA
1861  AAATCTCTGC TTACCAGCAT GTATGTGAAG GAGTTCCTCA TCTCCAGCAG TCAAGATGGC
1921  CATCAGTGGA CTCTCTTTTT TCAGAAATGGC AAAGTAAAGG TTTTTCAGGG AAATCAAGAC
1981  TCCTTCACAC CTGTGGTGAA CTCTCTAGAC CCACCGTTAC TGACTCGCTA CCTTCGAATT
2041  CACCCCCAGA GTTGGGTGCA CCAGATTGCC CTGAGGATGG AGGTTCTGGG CTGCGAGGCA
2101  CAGGACCTCT ACGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCTCCAGA ACTCCTGGGC
2161  GGACCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC
2221  CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTC AAC
2281  TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC
2341  AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC
2401  AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG CCCCCCAG GAAAACCATC
2461  TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAT
2521  GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC
2581  ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC
2641  GTGTTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG
2701  TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
2761  ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAA

```

[0362] 表 2: 多肽序列

[0363] A. B 结构域缺失的 FVIII-Fc 单体杂交体 (BDD FVIIIIFc 单体二聚体): 通过表达 BDD FVIIIIFc 和 Fc 链产生的。

[0364] 构建体 =HC-LC-Fc 融合物。将 Fc 表达盒与 BDDFVIII-Fc 一起共转染以产生 BDD FVIIIIFc 单体。对于 BDD FVIIIIFc 链, Fc 序列以粗体显示; HC 序列用双下划线显示; 剩下的 B 结构域序列以斜体字显示。信号肽用下划线标示。

[0365] i) B 结构域缺失的 FVIII-Fc 链 (19 个氨基酸序列用下划线标示) (SEQ ID NO: 2)

[0366]

MQIELSTCFFLCLLRFCFS
 ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSEPFNTSVVYKKTLEFVEFTDHLFNIAPR
 PPWMGLLGPTIOAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFP
 GGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKF
 ILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGM
 GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLLMDLGQFLLEFCHISSHQHDGMEAYVK
 VDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAEE
 EDWDYAPLV LAPDDRSYKSOYLNNQPORIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYG
 EVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDG
 PTKSDPRCLTRYYSSEFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQRGNOIMSDKRNVLFSVFDENRSW
 YLTENIQRFPLNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
 VFFSGYTFKHKMYEDTLTLFPFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNT
 GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNPVLRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKK
 EDFDIYDEENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNRAQSGSVPQFKKVVFQFT
 DGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAERK
 NFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAGR
 QVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVM
 AQDQIRIRWYLLSMGSENENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVE
 CLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMA SGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWST
 KEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGN
 VDSSGIKHNI FNPP IARYIRLHPHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASS
 YFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTOGVKSLTSMYVKE
 FLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVL
 GCEAQDLYDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0367] ii) Fc 链 (来自小鼠 Igκ 链 20 个氨基酸的异源信号肽用下划线标示) (SEQ ID NO:4)

[0368]

METDTLLLVVLLLVPGSTG
 DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0369] B. 全长 FVIII-Fc 单体杂交体 (全长 FVIII-Fc 单体二聚体): 通过表达 FVIII-Fc 和 Fc 链产生的。

[0370] 构建体 =HC-B-LC-Fc 融合物。将 Fc 表达盒与全长 FVIII-Fc 一起共转染以产生全长 FVIII-Fc 单体。对于 FVIII-Fc 链, Fc 序列以粗体显示; HC 序列用双下划线显示; B 结构域序列以斜体字显示。信号肽以下划线标示。

[0371] i) 全长 FVIII-Fc 链 (FVIII 信号肽用下划线标示) (SEQ ID NO:6)

[0372]

MQIELSTCFFLCLLRFCFS
 ATRRYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFRVPKSFNFNTSVVYKKTFLVEFTDHLFNIAPR
 PPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDOTSQREKEDDKVFP
 GGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKF
 ILLFAVFEDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVMYWHVIGM
 GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVK
 VDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVYVRFDDDNPSFQIRSVAKKHPKTWVHYIAEE
 EDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYG
 EVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDG
 PTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQRGNOIMSDKRNVLFSVFEDENRSW
 YLTENIQRFPLNPAGVOLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
 VFFSGYTFKHVMYEDTLTLFPFSGETVFMMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNT
 GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPFWAHRTMP
 KIQNVSSDDLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKEYTFSDDPSPGAIDSNNLSSEMTHFRPQLHHS
 DMVFTPEGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMP
 VHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDKLLSGLMNSQESSWGKNVSTESGRLFKG
 KRAHGPAALLTKDNALFKVSI LKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNI LESTFEK
 KVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPES
 ARWIQORTHGKNSLNSGQGPSKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFP
 SRNFLTLNLDNLHENNTHNQEKIQEIEKKEKTLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLSTRQ
 VEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISP
 TSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAI
 TQSPSLDCLTRSHSIPQANRSLPIAKVSSFPSSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQE
 SSHFLQGAKKNNLSLAITLLEMTGDQREVGSGLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELL
 PKVHIYQKDLFTETSTNGSPGHLDLVEGSLLOGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSK
 LLDPLAWDNHYGTQIPKEEWSQEKSPKTAFFKKKDTILSLNACESNHAI AAINEGONKPEIEVT
 WAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRS
 FQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRQAQSGSVPOFKKVVFQEFDTGSGFTQPLYRGELNEH
 LGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLSIYEEDQRQGAEPKRFVKNETKTYFWKVQ
 HHMAPTKDEFDCAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAGHGRQVTVQEFALFFTIFDE
 TKSIFYTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRWYLLSMGNS
 ENIHSIHFGSHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFL
 VYSNKCQTPGLMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI
 IHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIENPPII
 ARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFFATWSPSKARL

[0373]

HLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFF
 QNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYDKTHTCPP
 CPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0374] ii)Fc 链 (来自小鼠 Ig κ 链的 20 个氨基酸的异源信号肽用下划线标示) (SEQ ID NO:4)

[0375]

METDTLLLWVLLLWVPGSTG
 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0376] C.FVIII-Fc 异二聚体杂交体

[0377] 这可通过共转染 HC-Fc 和 LC-Fc 构建体来产生。已制备了两个 HC-Fc 构建体。一个在 HC 与 Fc 之间不具有接头 (HC-Fc), 而另一个在 HC 与 Fc 之间具有 5 个氨基酸的接头 (HC+5-Fc)。将 FVIII 信号肽用于 HC-Fc 构建体, 然而将小鼠 Ig κ 信号序列用于 LC-Fc 构

建体。

[0378] (i)HC-Fc (Fc 以粗体显示,信号肽用下划线标示)(SEQ ID NO:8)

[0379]

MQIELSTCFFLCLLRFCFS

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFRVPKSFPPNTSVVYKKTLEFVEFTDHLFNIAPR
PPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFP
GGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKF
ILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGM
GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVK
VDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNDSPSFIQIRSVAKKHPKWTWVHYIAAEE
EDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYG
EVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDG
PTKSDPRCLTRYSSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSW
YLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
VFFSGYTFKHKMYEDTLTLFPFSGETVFMSENPGWLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNT
GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0380] (ii)HC+5-Fc (Fc 序列以粗体显示,5个氨基酸的接头序列(来自FVIII的B结构域)以斜体字显示,信号肽用下划线标示)(SEQ ID NO:10)

[0381]

MQIELSTCFFLCLLRFCFS

[0382]

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFRVPKSFPPNTSVVYKKTLEFVEFTDHLFNIAPR
PPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFP
GGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKF
ILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGM
GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVK
VDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNDSPSFIQIRSVAKKHPKWTWVHYIAAEE
EDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYG
EVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDG
PTKSDPRCLTRYSSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSW
YLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
VFFSGYTFKHKMYEDTLTLFPFSGETVFMSENPGWLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNT
GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0383] (iii)LC-Fc6His (Fc 序列以粗体显示,信号肽用下划线标示)(SEQ ID NO:12)

[0384]

METDTLLLWVLLLWVPGSTG
 EITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSS
 SPHVLNRNAQSGSVFQFKKVVFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQ
 ASRPYSFYSSLSIYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDL
 EKDVHSGSLIGPLLCHTNTLNPAGHRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQME
 DPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKM
 ALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFOIT
 ASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFI
 MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIENPPIIARYIRLHPHTHSIRSTLRMELMG
 CDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVD
 FQKTMKVTGVTTQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVQVFQGNQDSFTPVVNSLD
 PPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNQGPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 K

[0385] 表 3. 在单次 50IU/kg rFVIII Fc 或 ReFacto® 的静脉内剂量后血友病 A 小鼠中的全血凝固时间 (WBCT) 测定.

[0386] A.

[0387]

		血液收集的时间, 小时							
处理	动物编号	给药前	0.25	24	36	42	96	113	120
		WBCT, 分钟							
50 IU/kg ReFacto®	1	>60	18	>60	ND	ND			
	2	>60	5	16	>60	ND			
	3	>60	4	7	>60	ND			
	4	>60	7	8	10	>60			
	5	>60	6	9	16	>60			
	6	>60	5	15	>60	ND			
50 IU/kg rFVIII Fc	7	>60	7				8	>60	ND
	8	>60	5				8	>60	ND
	9	>60	4				16	>60	ND
	10	>60	3				11	4	>60
	11	>60	3				9	>60	ND
	12	>60	4				6	>60	ND

[0388] ND= 由于先前时间点超过 60 分钟而未被测定的

[0389] B.

[0390]

		血液收集的时间，小时					
处理	动物编号	给药前	0.25	24	48	96	120
		WBCT, 分钟					
50 IU/kg ReFacto®	1	>60	11	15	>60	>60	ND
	2	>60	3	3	>60	>60	>60
	3	>60	4	6	>60	>60	>60
50 IU/kg rFVIII Fc	4	>60	3	5	5	>60	>60
	5	>60	3	6	7	13	>60
	6	>60	5	8	9	9	>60

[0391] ND= 由于先前时间点超过 60 分钟而未被测定的

[0392] 表 4. 单次静脉内剂量 (50IU/kg) 后血友病 A 小鼠中的 PK 参数

处理	C _{max} (IU/mL)	AUC (hr·IU/mL)	T _{1/2} (hr)	CL (mL/小时/kg)	V _{ss} (mL/kg)
rFVIII Fc	1.56	22.6	11.1	2.09	28.4
ReFacto®	0.67	6.94	5.0	7.2	43.8
Advate®	0.47	3.90	7.1	12.8	103

[0394] 表 5. 单次静脉内剂量 (125IU/kg rFVIII Fc, 114 和 120IU/kg ReFacto®) 后血友病 A 狗中的 PK 参数

[0395] A. 从生色活性数据测定的 PK

处理	C _{max} (IU/mL)	AUC (hr·IU/mL)	T _{1/2} (hr)	CL (mL/小时/kg)	V _z (mL/kg)
rFVIII Fc	2.0±0.54	25.9±6.47	15.4±0.3	5.1±1.4	113±29
ReFacto®*	2.0	18.2	7.4	6.5	68.7

[0397] B. 从 ELISA 数据测定的 PK

处理	C _{max} (ng/mL)	AUC (hr·ng/mL)	T _{1/2} (hr)	CL (mL/小时/kg)	V _z (mL/kg)
[0398] rFVIII-Fc	210±33	2481±970	15.7±1.7	6.2±3.0	144±83
ReFacto®*	211	1545	6.9	8.7	85

[0399] 平均值 ± sd, n=4 (针对 rFVIII-Fc), n=2 (针对 ReFacto®)

[0400] * 由于只有两只狗, 故报告 ReFacto® 的 sd

[0401] 表 6. 用 rFVIII-Fc 或 ReFacto® 单次静脉内给药后通过 aPTT 测量的血友病 A 狗中的凝血活性。

[0402]

狗 ID	治疗	aPTT, 秒	
		给药前	给药后 5 分钟
M10	rFVIII-Fc	86.5	53.6
M11	rFVIII-Fc	99.8	56.4
M12	rFVIII-Fc	119	68.7
	ReFacto®	108	60.7
M38	rFVIII-Fc	115	76.6
	ReFacto®	118	68.0

[0403] 表 7. 通过 ELISA 测量的以 125IU/kg 的单次静脉内剂量施用的猴中 rFVIII-Fc 或 Xyntha 的血浆浓度

[0404] A. 血浆中的 rFVIII-Fc 浓度 (μg/mL)

[0405]

	组1			组2			平均值	SD
时间, 小时	604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362		
Pre	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
0.25	0.400	0.334	0.374	0.348	0.383	0.323	0.360	0.030
4	0.266	0.259	0.236	0.233	0.259	0.217	0.245	0.019
12	0.165	0.152	0.12	0.15	0.161	0.149	0.150	0.016
24	0.079	0.074	0.047	0.08	0.088	0.076	0.074	0.014
36	0.035	0.04	0.022	0.04	0.041	0.046	0.037	0.008
48	0.019	0.021	BLQ	0.021	0.024	0.025	0.022	0.002

[0406] B. 血浆中的 Xyntha 浓度 (μg/mL)

[0407]

	组1			组2				
时间, 小时	604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362	平均值	SD
Pre	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
0.25	0.252	0.074	0.155	0.317	0.217	0.167	0.197	0.084
4	0.197	0.159	0.152	0.229	0.19	0.082	0.168	0.051
12	0.137	0.099	0.104	0.166	0.158	0.081	0.124	0.035
24	0.09	0.068	0.051	0.082	0.08	0.084	0.076	0.014
36	0.037	0.043	0.015	0.041	0.035	BLQ	0.034	0.011
48	0.022	BLQ	BLQ	0.017	0.013	BLQ	0.017	0.005

[0408] 表 8. 施用了 125IU/kg 的单次静脉内剂量的猴的 rFVIII Fc 或 Xyntha 的血浆浓度, 通过 FVIII- 特异性生色活性测定测量的 (以 IU/mL 报告)。

[0409] A. Xyntha

[0410]

时间 (小时)	组 1			组 2		
给药前	604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362
0.25	5.62	4.55	5.01	4.5	5.15	3.77
4	3.9	4.05	3.2	3.19	3.46	2.36
12	2.51	2.82	1.69	2.17	2.5	2.01
24	1.67	1.66	1.18	0.95	1.57	1.5
36	0.7	0.85	0.48	0.44	0.85	0.82
48	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	0.38	0.48

[0411] B. rFVIII Fc

[0412]

时间 (小时)	组 1			组 2		
给药前	604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362
0.25	4.31	3.82	3.54	4.13	4.12	3.68
4	3	3.36	2.53	2.7	2.74	2.81
12	2	2.15	1.42	2.28	2.75	2.22
24	1.01	1.17	0.5	1.5	1.61	1.01
36	BLQ	0.52	0.48	0.88	0.72	0.64
48	0.31	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
72	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	0.31	BLQ

[0413] BLQ= 低于定量限

[0414] 表 9. 单次 125IU/kg 剂量后 rFVIIIIFc 的 PK 参数

[0415]

PK 参数	rFVIIIIFc ELISA 数据								
	单位	组 1			组 2			平均值 SD	
		604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362		
Tmax	小时	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.00
Cmax	μg/mL	0.4	0.334	0.374	0.348	0.383	0.323	0.368	0.030
T _{1/2}	小时	11.4	13.3	9.3	12.7	12.7	14.1	11.9	1.7
AUC	μg* 小时/mL	5.86	5.65	4.37	5.56	4.37	5.58	5.16	0.68
CL	mL/ 小时/kg	2.15	2.23	2.88	2.27	2.07	2.26	2.32	0.29
Vz	mL/kg	35.3	42.5	38.8	37.9	37.9	46.1	38.5	3.9
MRT	小时	15.3	17	12.1	17.1	17.3	19.2	15.8	2.4

[0416]

PK 参数	rFVIII-Fc 生色活性数据								
	单位	组 1			组 2			平均值	SD
		604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362		
T _{max}	小时	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.00
C _{max}	IU/mL	4.31	3.82	3.54	4.13	4.12	3.68	3.93	0.30
T _{1/2}	小时	13.4	12.0	11.6	17.5	12.4	29.4	16.1	6.9
AUC	IU* 小时 /mL	74.7	75.5	53.5	92.9	88.9	92.7	79.7	15.2
CL	mL/ 小时 /kg	1.67	1.65	2.34	1.35	1.41	1.35	1.63	0.38
V _z	mL/kg	32.3	28.7	39.2	33.9	25.2	57.2	36.1	11.4
MRT	小时	17.8	16.8	16.9	25	19.2	33.3	21.5	6.5

[0417] 表 10. 单次 IV 剂量 (125IU/kg) 后 Xyntha 的 PK 参数

[0418]

PK 参数	Xyntha ELISA 数据								
	单位	组 1			组 2			平均值	SD
		604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362		
T _{max}	小时	0.25	4	0.25	0.25	0.25	0.25	0.88	1.53
C _{max}	IU/mL	0.252	0.159	0.155	0.317	0.217	0.167	0.21	0.06
T _{1/2}	小时	13.6	19.9	9.7	11	9.2	nd	12.7	4.4
AUC	IU* 小时 /mL	5.15	4.39	3.17	5.53	4.79	6.32	5.24	0.74
CL	mL/ 小时 /kg	2.21	2.6	3.59	2.06	2.38	nd	2.57	0.61
V _z	mL/kg	43.4	74.7	50.1	32.9	31.5	nd	46.5	17.5
MRT	小时	19	28.4	14	16.1	15.9	nd	18.7	5.7

[0419]

PK 参数	Xyntha 生色活性数据								
	单位	组 1			组 2			平均值	SD
		604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362		
T _{max}	小时	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0
C _{max}	IU/mL	5.62	4.55	5.01	4.5	5.15	3.77	4.77	0.64
T _{1/2}	小时	12.8	14.3	11.4	10.4	11.7	14.6	12.5	1.7
AUC	IU* 小时 /mL	97.1	104.2	71.3	70.7	94.0	82.8	86.7	14.0
CL	mL/ 小时 /kg	1.29	1.20	1.75	1.77	1.33	1.51	1.48	0.24
V _z	mL/kg	23.7	24.8	28.9	26.6	22.5	31.8	26.4	3.5
MRT	小时	17.8	20.1	16.0	14.8	18.4	23.2	18.4	3.0

[0420] 表 11. 因子 X 的激活

[0421]

	K _m (nM)	V _{max} (nM/ 分钟)
rFVIIIIFc	55.0 ± 5.9	65.6 ± 8.6
BDD FVIII	51.0 ± 8.7	73.5 ± 10.1

[0422] 表 12. 与因子 IXa 的相互作用

[0423]

	K _d (nM)	V _{max} (nM/ 分钟)
rFVIIIIFc	2.8 ± 0.4	4.5 ± 0.3
BDD FVIII	2.5 ± 0.3	4.0 ± 1.0

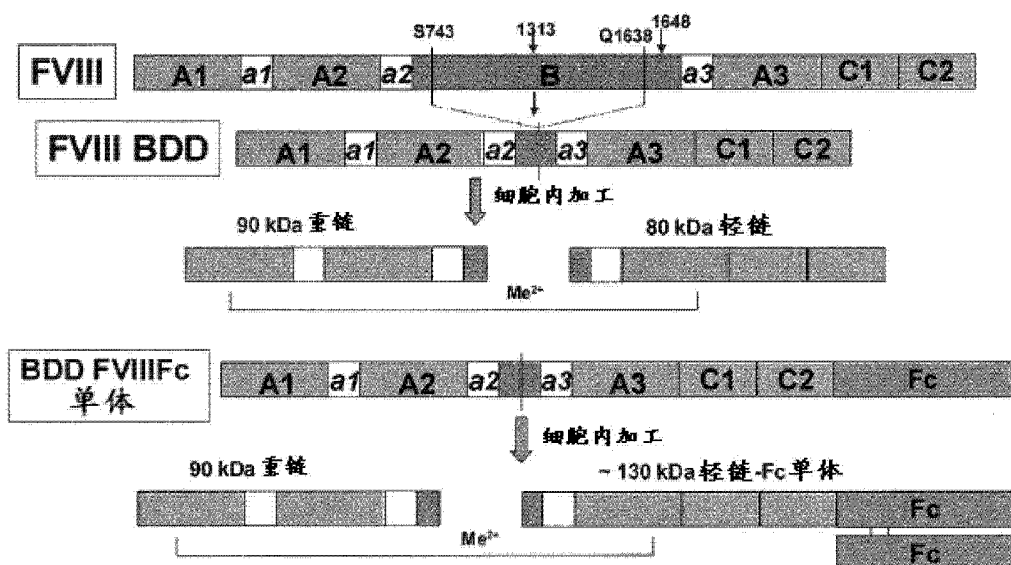


图 1

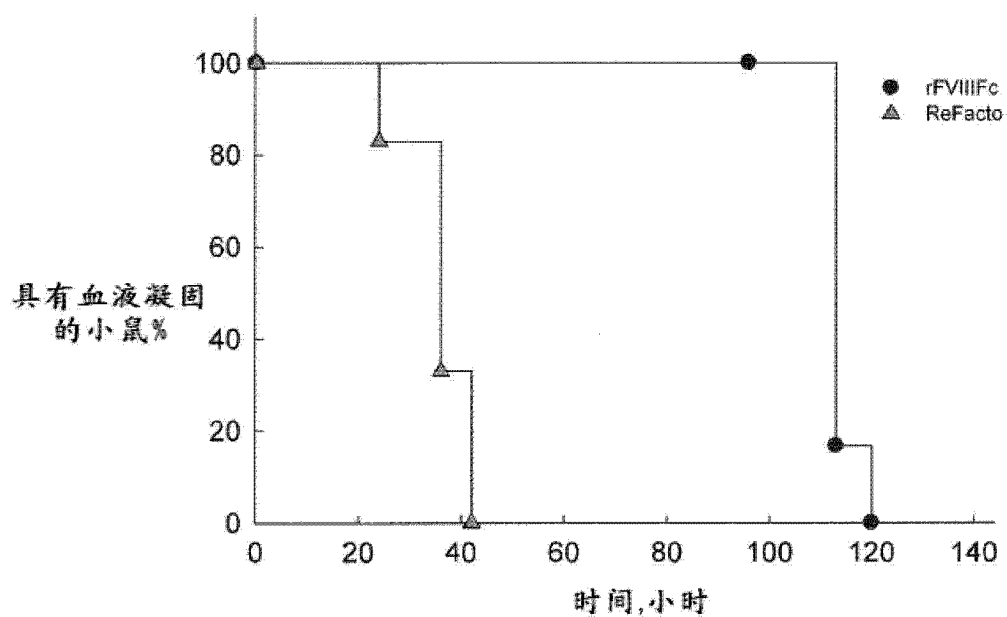


图 2

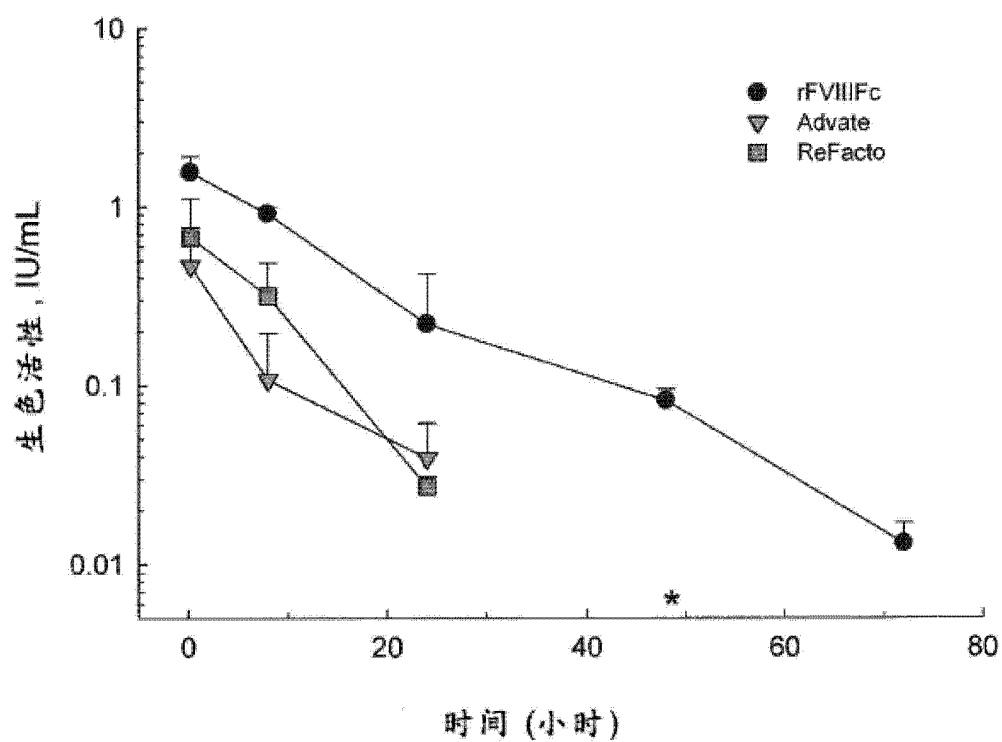


图 3

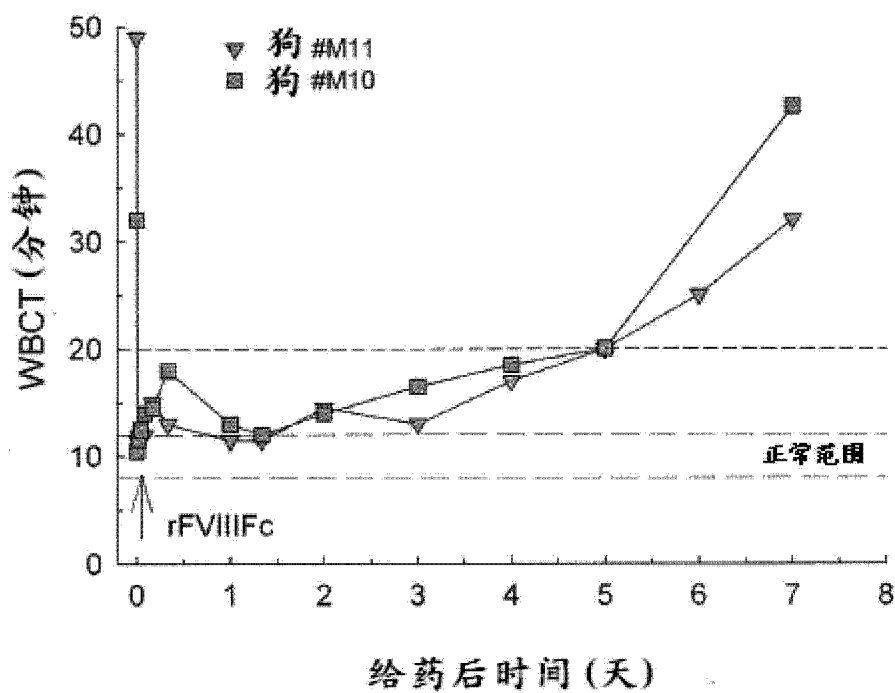


图 4A

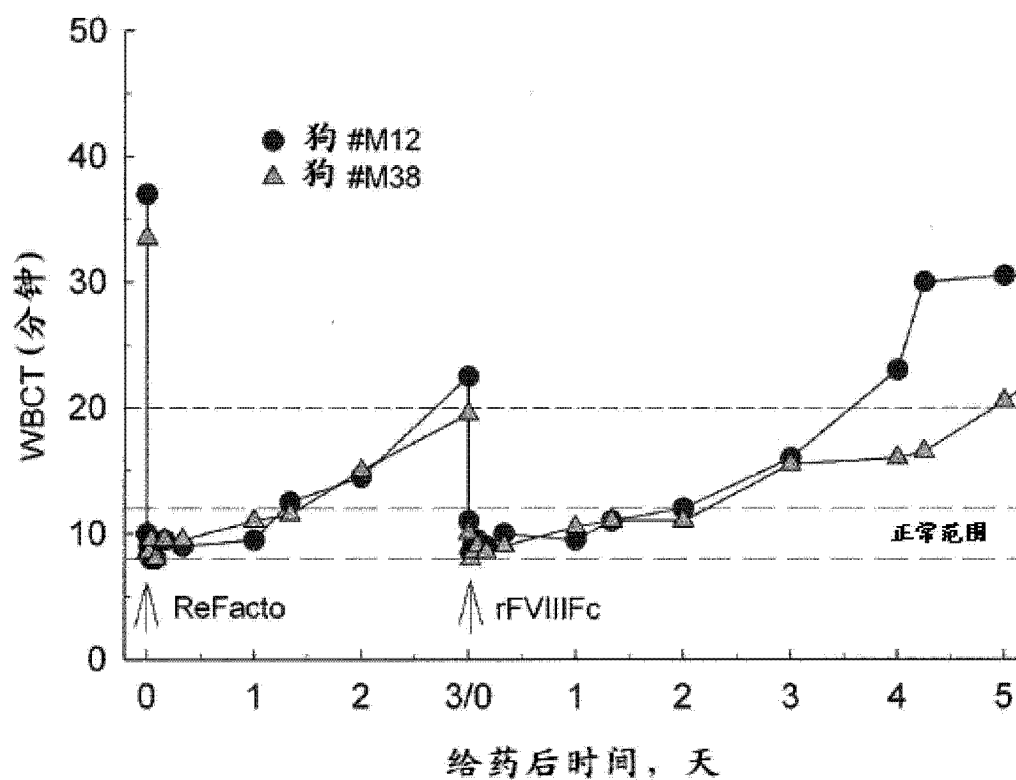


图 4B

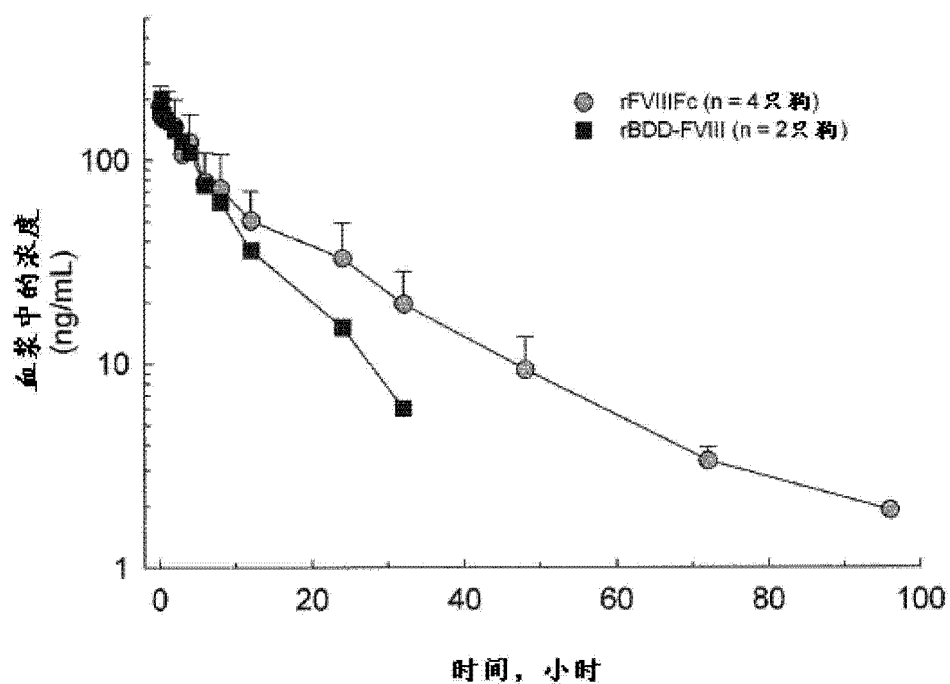


图 5

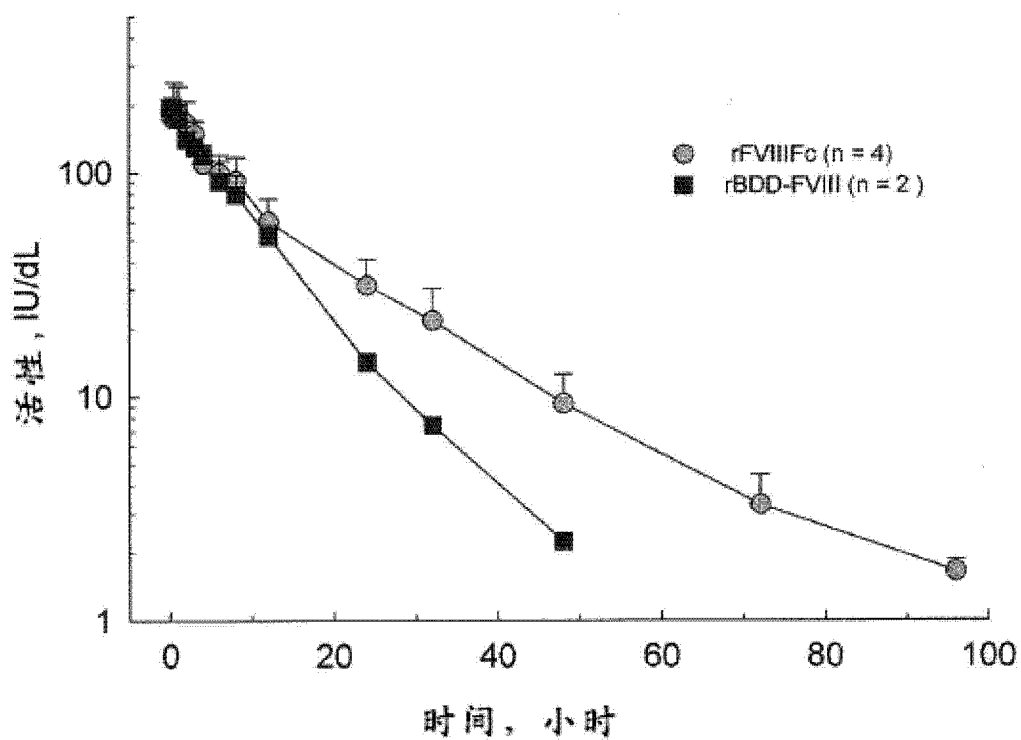


图 6

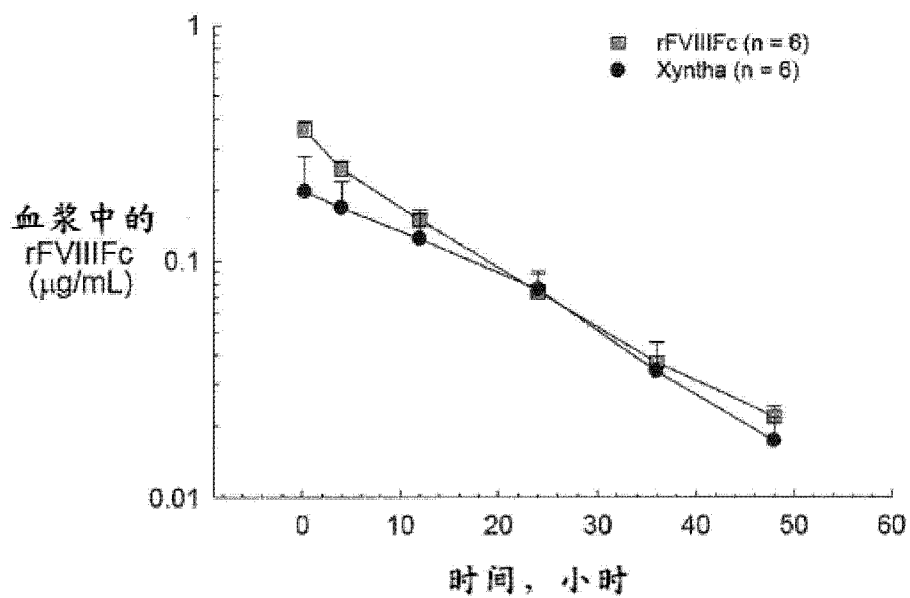


图 7

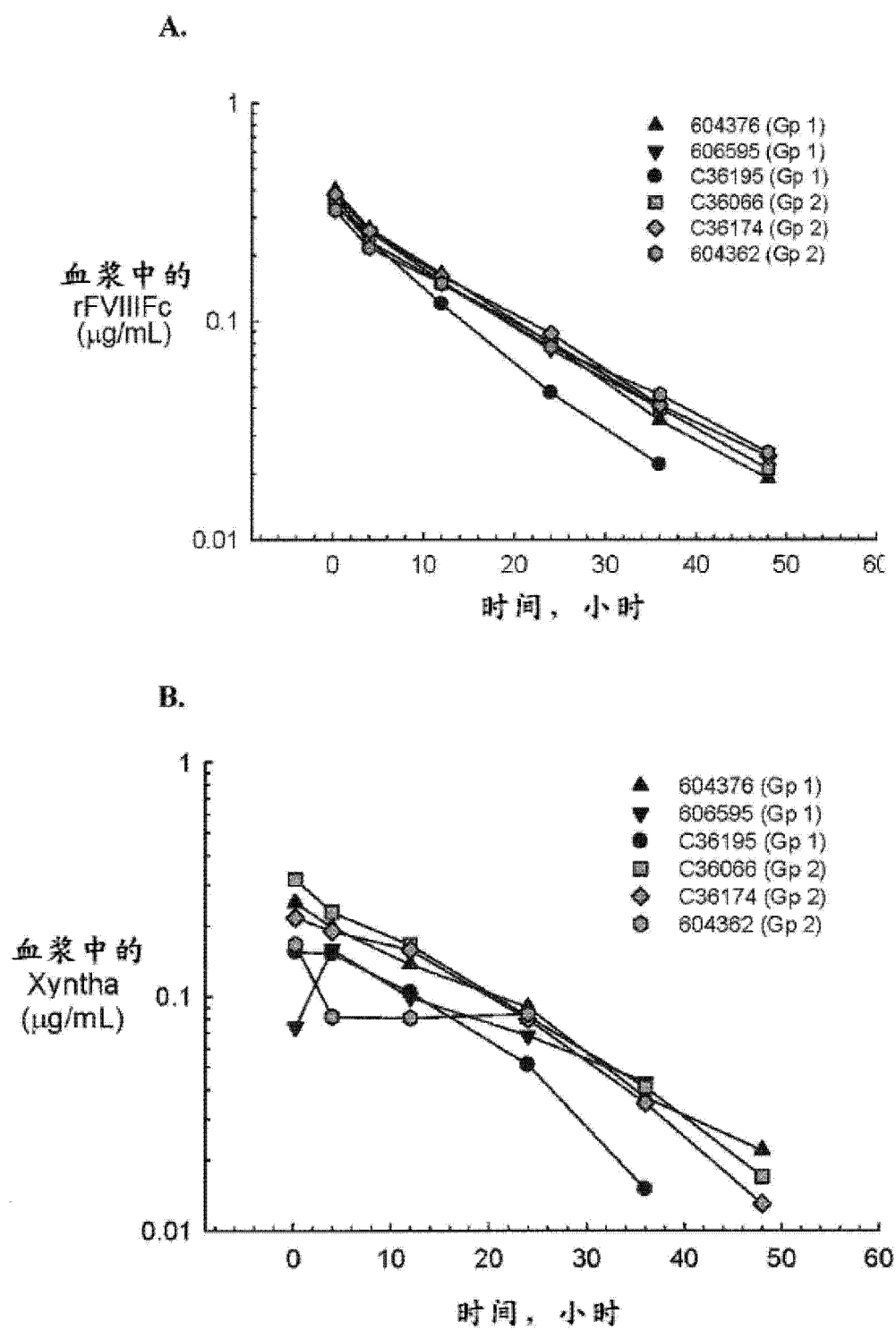


图 8

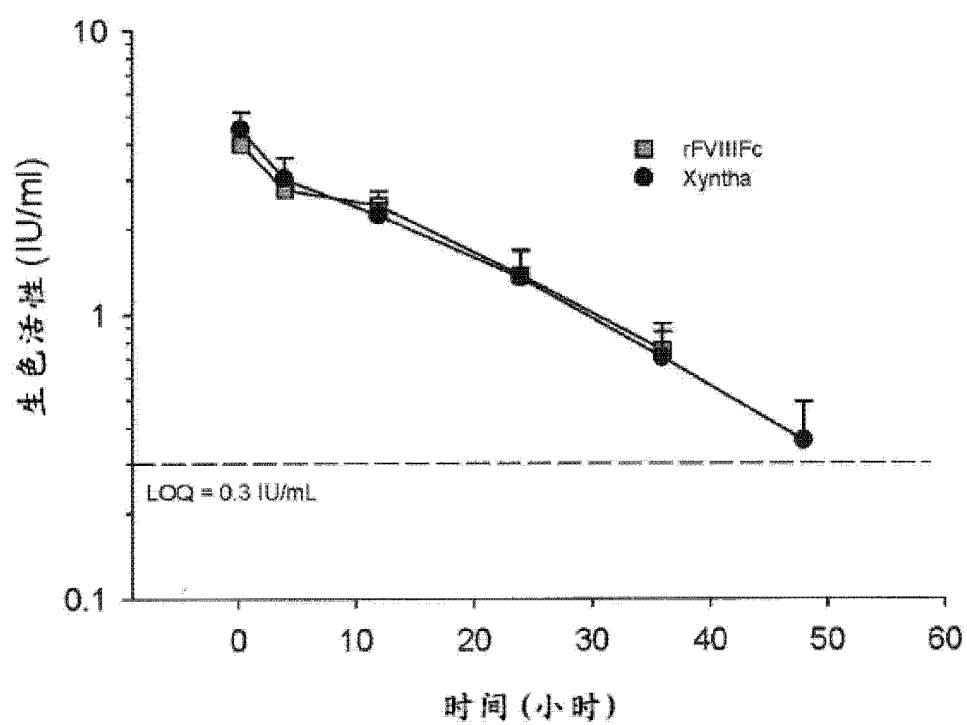
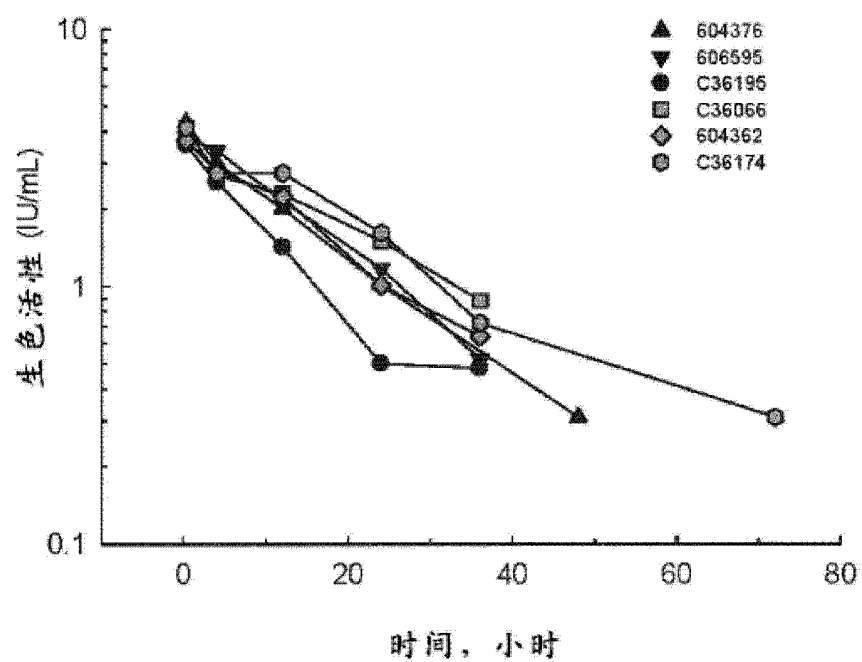


图 9

A.



B.

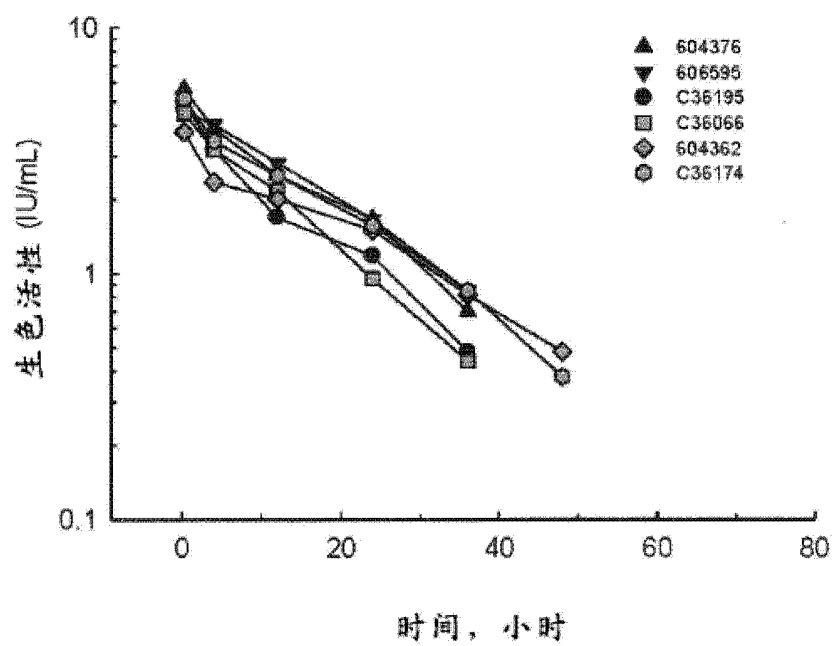


图 10

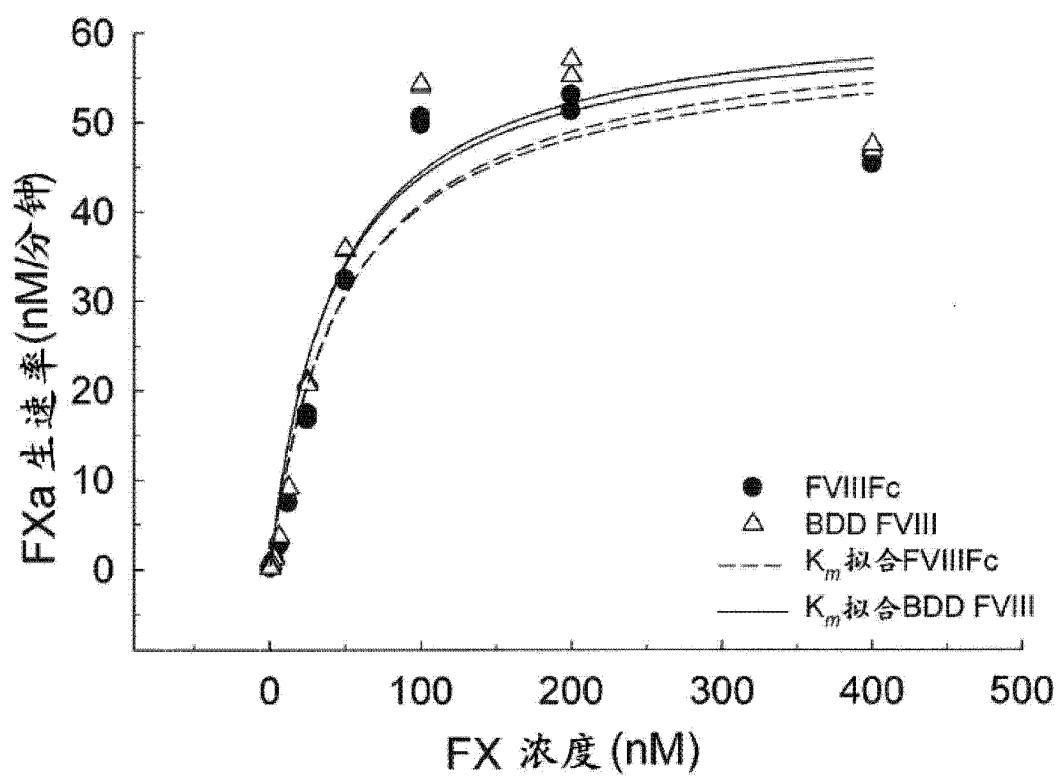


图 11

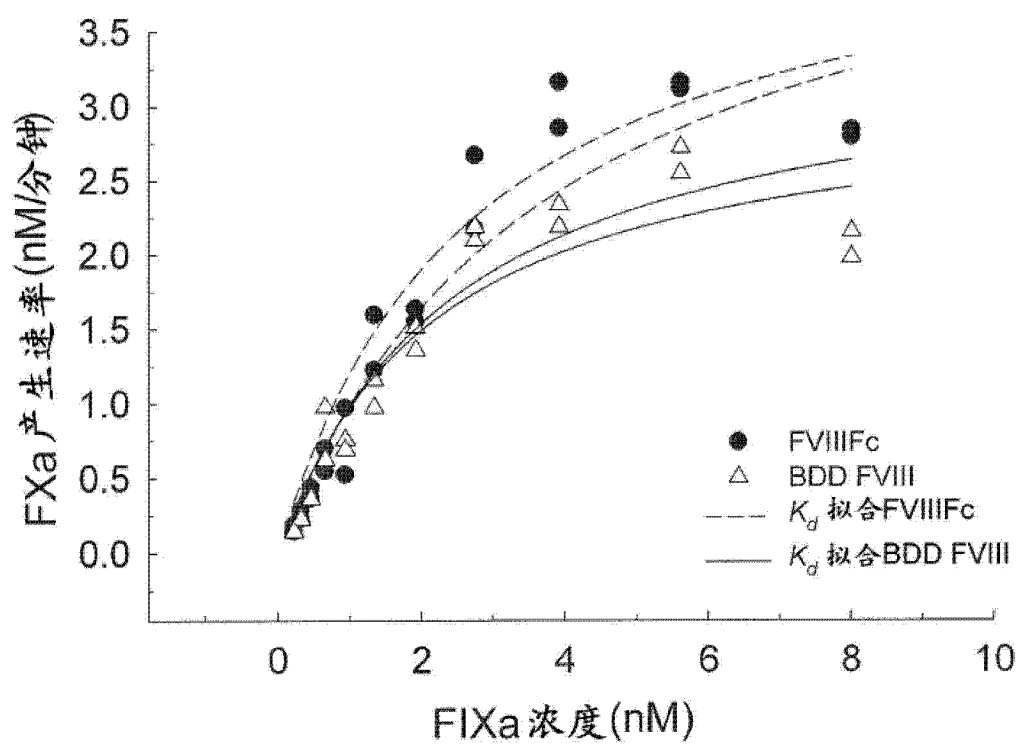


图 12

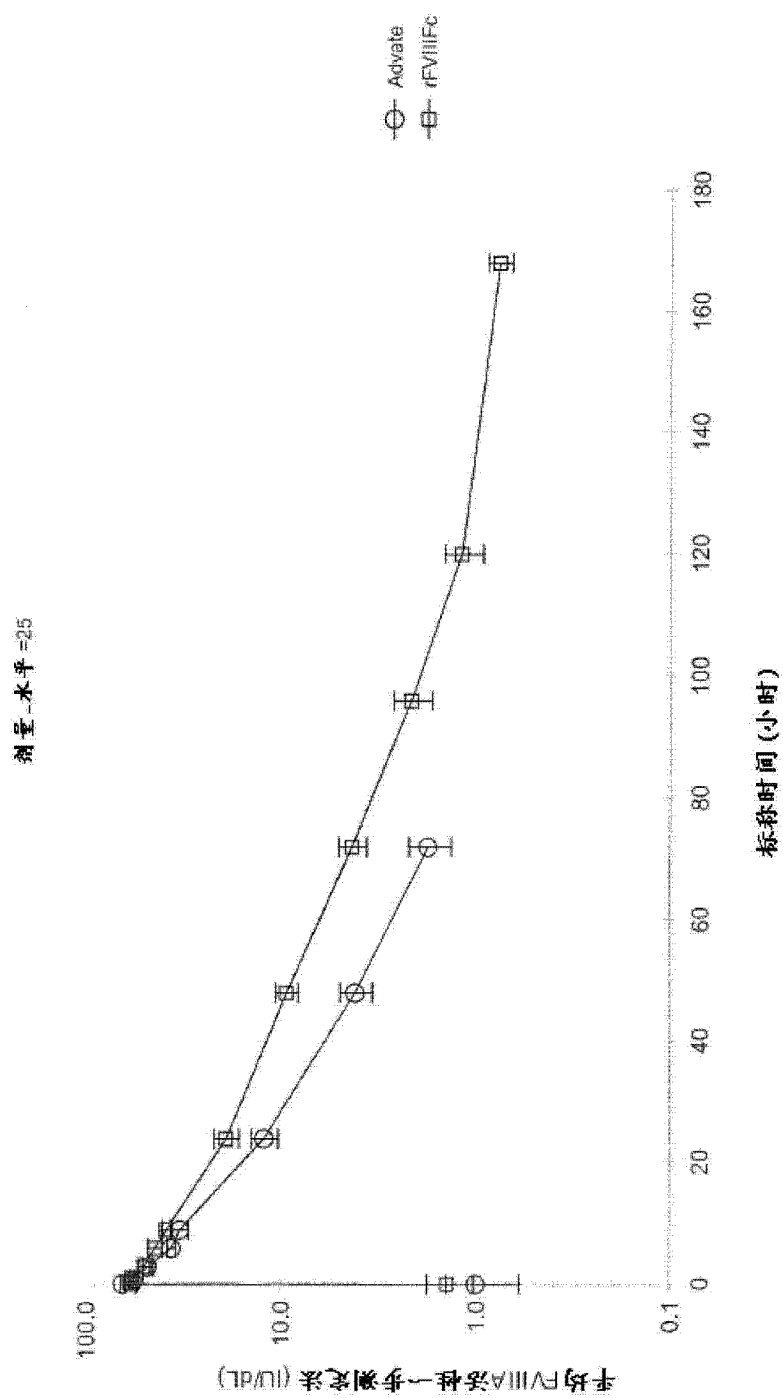


图 13A

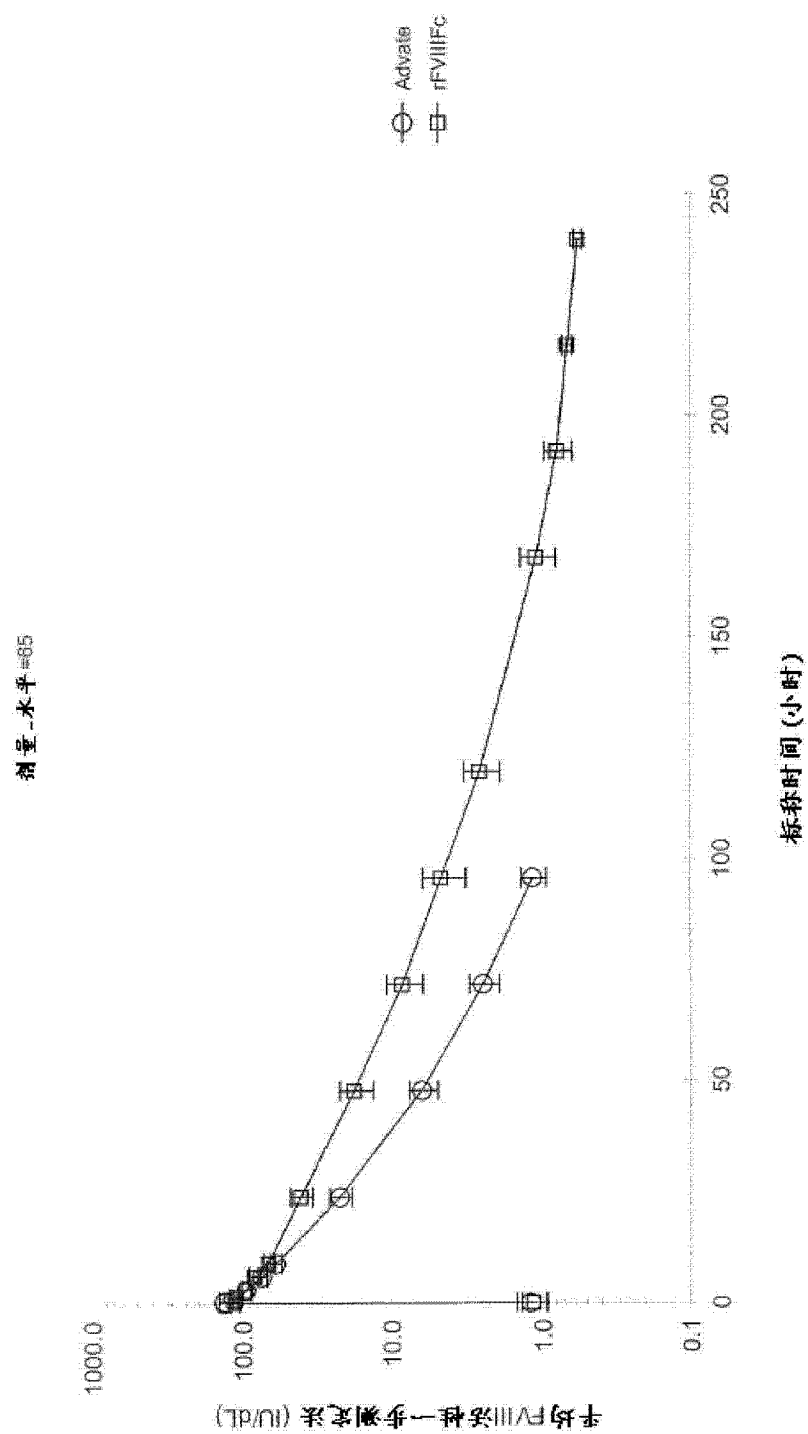


图 13B

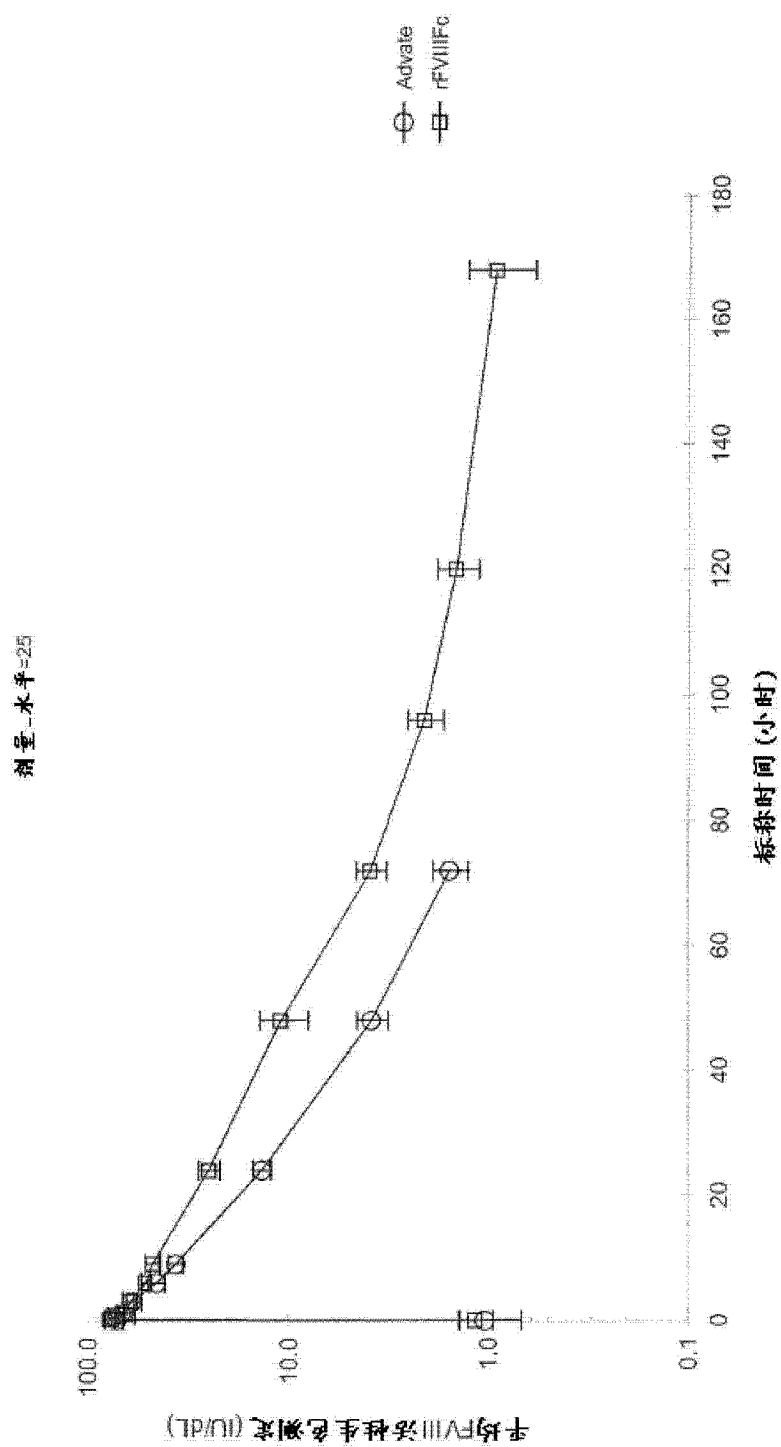


图 13C

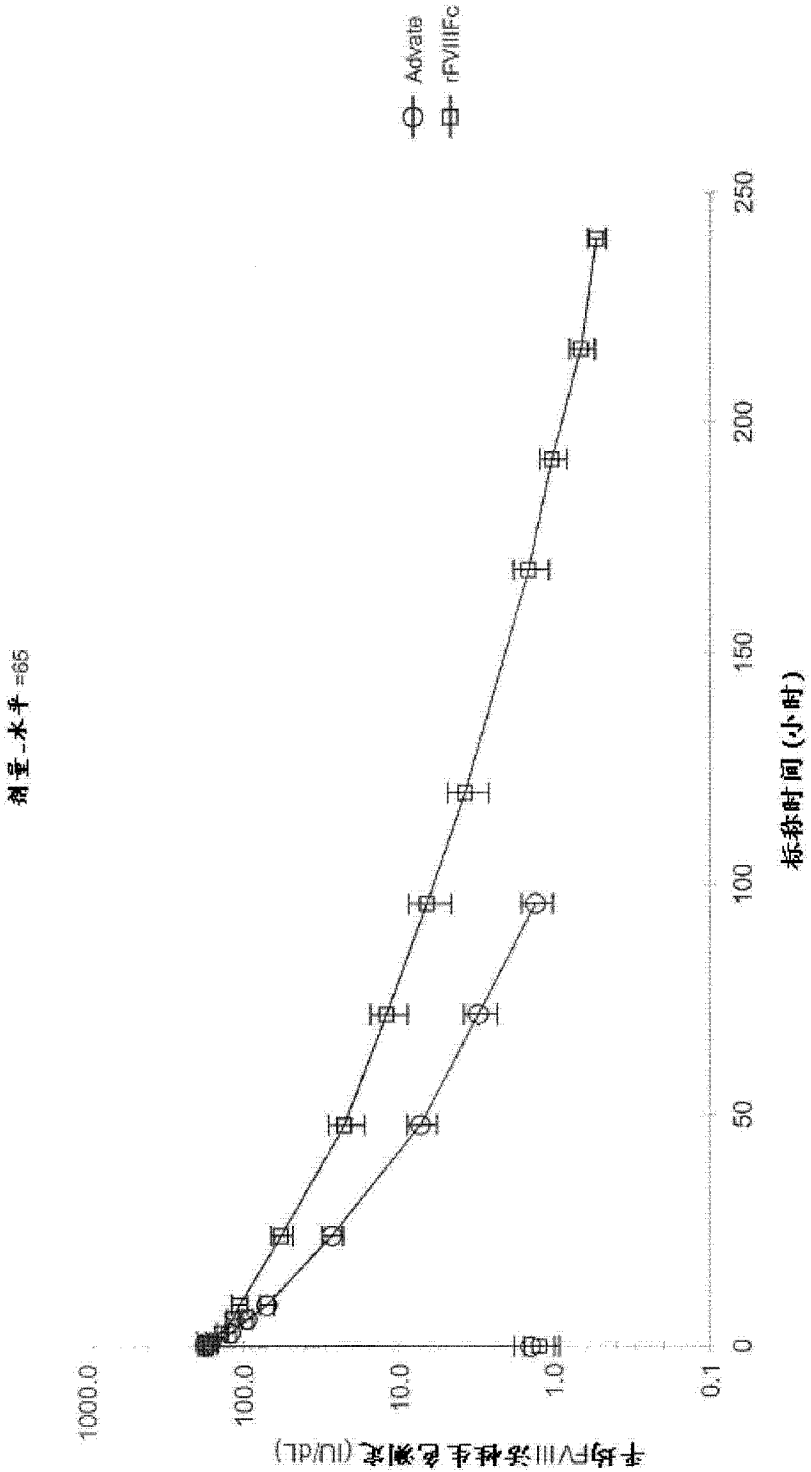


图 13D

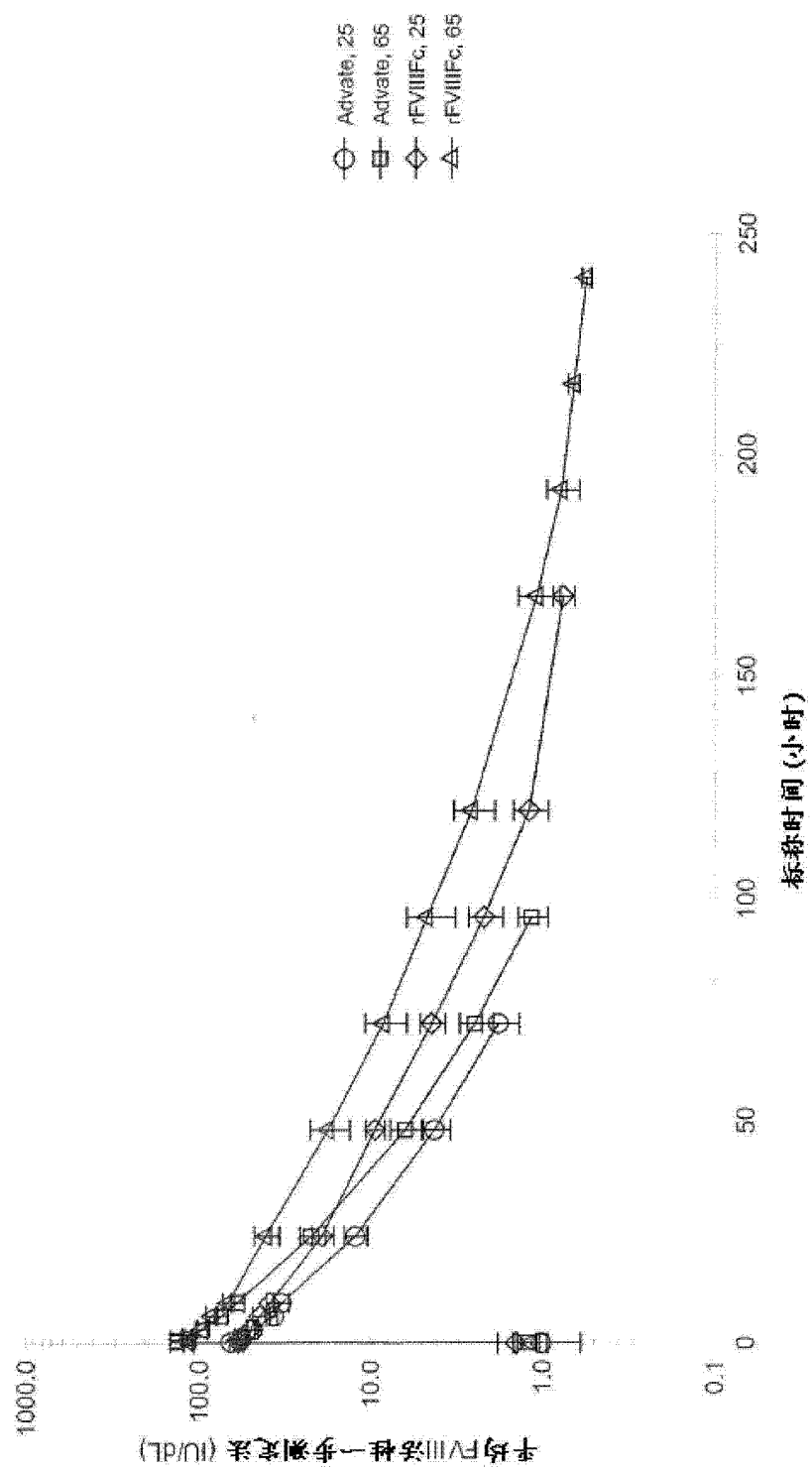


图 14A

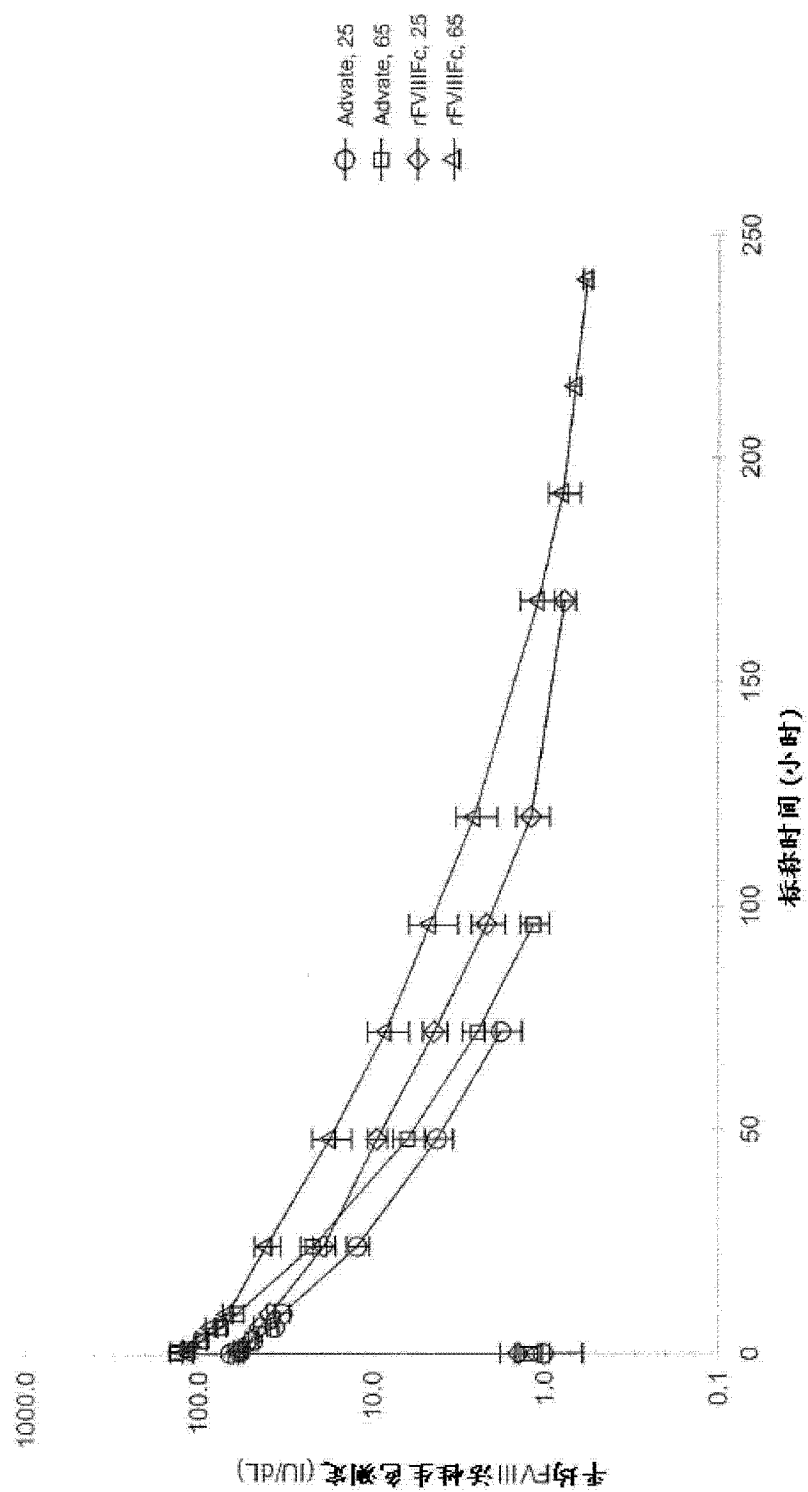


图 14B