



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102770449 B

(45) 授权公告日 2016. 02. 24

(21) 申请号 201180009856. X

A61K 38/37(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 02. 02

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

10153718. 1 2010. 02. 16 EP

61/305608 2010. 02. 18 US

WO 2009108806 A1, 2009. 09. 03,

WO 2009108806 A1, 2009. 09. 03,

CN 1128168 A, 1996. 08. 07,

L. THIM et al. Purification and

characterization of a new recombinant

factor VIII(N8). 《Haemophilia》. 2009, 第 16

卷 (第 2 期),

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 08. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/051438 2011. 02. 02

审查员 赵天

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/101242 EN 2011. 08. 25

(73) 专利权人 诺沃—诺迪斯克有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 B. 佩施克 M. 科福德—汉森

J. 布查特 H. R. 施特尼克

H. 奥斯特加尔德 M. 克贾尔克

E. H. N. 奥尔森 J. J. 汉森

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公

司 72001

代理人 孔青 林森

(51) Int. Cl.

C07K 14/755(2006. 01)

权利要求书1页 说明书29页

序列表32页 附图2页

(54) 发明名称

具有降低的 VWF 结合的因子 VIII 分子

(57) 摘要

本发明涉及一种重组因子 VIII 分子, 其中所述分子具有降低的 vWF 结合能力, 且其中所述分子与至少一种侧基共价缀合。

1. 一种重组因子 VIII 分子, 其中所述分子具有降低的 vWF 结合能力, 且其中所述分子与至少一种侧基共价缀合, 该重组因子 VIII 分子是序列如 SEQ ID NO:1 所示的 B- 结构域截短的因子 VIII 分子的变体, 且该重组因子 VIII 分子仅包含 Y1680F 或 Y1680C 突变。

2. 权利要求 1 的分子, 其中所述侧基选自以下的一种或多种: 亲水聚合物、白蛋白结合剂、抗体或其片段和白蛋白。

3. 权利要求 1-2 中任一项的分子, 其中侧基与截短的 B- 结构域共价缀合, 且其中因子 VIII 活化导致共价缀合的侧基的移除。

4. 权利要求 3 的分子, 其中所述分子与亲水聚合物通过截短的 B 结构域中的 O- 连接寡糖共价缀合, 且其中因子 VIII 活化导致共价缀合的亲水聚合物的移除。

5. 权利要求 4 的分子, 其中所述 O- 连接寡糖与通过截短 B- 结构域而产生的 O- 糖基化位点连接。

6. 权利要求 1-2 中任一项的分子, 其中所述侧基是 PEG。

7. 一种制备权利要求 1-6 中任一项的分子的方法, 其中所述方法包括将侧基与具有降低的结合 vWF 的能力的因子 VIII 分子连接。

8. 一种分子, 其由权利要求 7 的方法获得。

9. 权利要求 1-6 和 8 中任一项的分子用于制备治疗血友病的药物的用途。

10. 一种药物组合物, 其包含权利要求 1-6 和 8 中任一项的分子。

具有降低的 VWF 结合的因子 VIII 分子

发明领域

[0001] 本发明涉及重组因子 VIII (FVIII) 分子。特别地,本发明涉及与内源性 FVIII 相比具有降低的 von Willebrand 因子 (vWF) 结合的 FVIII 分子。本发明还涉及这样的分子的用途以及用于获得这样的分子的方法。

[0002] 发明背景

[0003] A 型血友病是由凝血因子 VIII (FVIII) 活性缺乏或功能异常引起的遗传性出血性疾病。临床表现不是基于初级止血(通常发生血凝块的形成),而是由于缺乏次级凝血酶形成,凝块不稳定。通过静脉内注射分离自血液或重组产生的凝血因子 FVIII 治疗该病。

[0004] 当前的治疗推荐正从传统应要求治疗转向预防。与 von Willebrand 因子结合的内源性 FVIII 循环半寿期是 12-14 小时,因此将进行一周数次的预防治疗以便让患者获得实际上无症状的生活。对于许多人,尤其是儿童和少年,静脉内给药与显著不方便和/或疼痛联系在一起。因此本领域需要新的具有因子 VIII 活性的因子 VIII 产品,其优选结构上同源,优选安全并优选具有显著延长的循环半寿期以便降低因子 VIII 每周给药的次数。此外,本领域中需要相对简单的用于获得和生产这样的分子的方法。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明涉及一种重组因子 VIII 分子,其中所述分子具有降低的 vWF 结合能力,且其中所述分子与至少一种侧基共价缀合。本发明还涉及用于制备这样的分子的方法以及这样的分子的用途。这样的分子具有改变的循环半寿期。

[0007] 发明详述

[0008] 附图简述

[0009] 图 1 NNC129-0000-9105 和 Advate[®]在 FeCl₃诱导的 FVIII-K0 小鼠 (n=6-10) 损伤模型中的剂量反应关系。*与溶媒处理显著不同。*P < 0.05。

[0010] 图 2 NNC0129-000-9105 和 Advate[®] (20 和 280 IU/kg) 在 FVIII-K0 小鼠 (n=5-6) 的尾巴出血模型中的作用。*与溶媒处理显著不同。*P < 0.05。

[0011] 定义:

[0012] von Willebrand 因子 (vWF): vWF 是存在于血浆中的大的单体/多聚体糖蛋白,并基本上在内皮(在怀布尔-帕拉德体中)、巨核细胞(血小板的 α -颗粒)和内皮下结缔组织中产生。它的主要功能是与其它蛋白(特别是因子 VIII)结合,且它在血小板与伤口部位粘附中重要。

[0013] 当在循环中无活性时,因子 VIII 与 vWF 结合;当不与 vWF 结合时,因子 VIII 迅速降解或被清除。由此可见,降低或废除 vWF 在 FVIII 中的结合能力迄今被认为是获得具有延长循环半寿期的因子 FVIII 变体的高度不合意的方法。

[0014] 术语“降低的结合 vWF 的能力”本文意在涵盖其中结合 vWF 的能力降低至少 50% (优选至少 60%,更优选至少 70%,更优选至少 80%,更优选至少 90% 和最优选约 100%) 的因子 VIII 变体。可通过 ELISA 样测定来测量 FVIII 与 vWF 的结合,或使用表面等离子共振测量为与固定化 vWF 的直接结合。在因子 VIII 中负责与 vWF 结合的区域是如 EP0319315 中

公开的跨越残基 1670-1684 的区。设想涉及该区域的因子 VIII 点突变体和 / 或缺失突变体将改变与 vWF 结合的能力。根据本发明,特别优选的点突变的实例包括含下述点突变的变体:Y1680F、Y1680R、Y1680N、Y1680C 和 E1682T。

[0015] W009156137 公开了具有降低的 vWF 结合的融合蛋白,所述融合蛋白不与侧基(例如 PEG)缀合。其中的蛋白关于各种比较测定似乎有用。

[0016] 因子 VIII 分子:FVIII/ 因子 VIII 是由肝细胞产生的大的复杂糖蛋白。FVIII 由 2351 个氨基酸(包含信号肽)组成,并包含若干个不同的结构域,如通过同源性所限定。有 3 个 A- 结构域、1 个唯一的 B- 结构域和 2 个 C- 结构域。结构域顺序可列为 NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH。FVIII 在血浆中在 B-A3 边缘处分开的两条链循环。通过二价金属离子结合将链连接。A1-A2-B 链命名为重链(HC),而 A3-C1-C2 命名为轻链(LC)。

[0017] 内源性因子 VIII 分子体内以具有不同尺寸的 B- 结构域的分子库循环。可能是体内发生 B 结构域的逐渐酶促移除,产生具有不同尺寸的 B- 结构域的分子库。一般认为在位置 740 上切割(由此移除 B- 结构域的最后部分)与凝血酶活化一起发生。然而,不能排除其中例如在位置 740 上的切割位点已被损坏的因子 VIII 变体可能有活性。

[0018] 本文使用的“因子 VIII”或“FVIII”指,为内在凝血途径的成员并对血液凝固必需的人血浆糖蛋白。“天然 FVIII”是如在 SEQ ID NO: 1 (氨基酸 1-2332)中所示的全长人 FVIII 分子。在 SEQ ID NO: 1 中 B- 结构域跨越氨基酸 741-1648。

[0019] SEQ ID NO 1:

[0020]

```
ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFPRVPKSFPFNTSVVYKKTILFVEFT
DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDD
QTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALL
VCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGY
VNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLL
MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRF
DDDNPSFSIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGR
KYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDITLLIFKNQASRPYNIYPHGITDVRP
LYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSFVNMERDLASGLI
GPLLICYESVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA
SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPF
SGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKN
```

NAIEPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTMPKIQNVSSSDLLMLLRQ
SPTPHGLSLSDLOEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSQDMVFTPESSGLQL
RLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQDIT
LFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDKLLSGLMNSQESSWGKNVSSSTESGRLFKGKRAHG
PALLTKDNALFKVSIKLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESOTEFKKVTP
LIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSEFFKMLFLPES
ARWIORTHGKNSLNSGQGPSKQLVSLGPEKSVGQNFLEKKNKVVVGKGEFTKDVGLKE
MVFPSSRNLFNTLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLF
LLSTRQNVESGYDGAAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVE
KYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTL
TQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPISIRPIYLTRVLFQDNSSHL
PAASYRKQDSGVQESSHFLOGAKKNLSLAILTLEMTGDQREVGS LGTSATNSVTYKKVEN
TVLPKPDLPKTSKGVLLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLOGTEGAIKWNEAN
RPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPKTAFFKKDTILSL
NACESNHAIAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSONPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEID
YDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRQAQS
GSVPQFKKVVFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFY
SSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKVQHMHMAPTKDEFDCKAWAYFSQVLEKD
VHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNQME
DPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEE
YKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTFLVYSNKCQTPLGMASGHI
RDFQITASGQYQGWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFS
SLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNFNPPIARYIRLHPHTYSIR
STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAW
RPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGK
VKVFOGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

[0021] SEQ ID NO 2:

[0022]

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFRVPKSFPENTSVVYKKTLEFVEFT
DHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDD
QTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALL
VCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGY
VNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTL
MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVR
DDDNPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLPDDRYSYKSQYLNNGPORIGR

KYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD~~T~~LLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRP
LYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSSFVNMERDLASGLI
GPLLIC~~Y~~KESVDQQRGNQIMSDKRN~~V~~ILFSVFDENRSWYL~~T~~ENIQRF~~L~~PNPAGVQLEDPEFQA
SNIMHSINGYVFDSLQ~~L~~SVCLHEVAYWYILSIGAQTD~~F~~LSVFFSGYTFKH~~K~~MVYEDTLTLFPF
SGETVFM~~S~~MENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKN
NAIEPRFSQNSRHPSQNP~~P~~V~~L~~KRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDI~~E~~DEDE
NQSPRSFQK~~K~~TRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSV~~P~~QFKKVV~~F~~QEFTDGSFT
QPLYRGELNEHLG~~L~~LGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSS~~L~~ISYEEDQRQGAEP~~R~~KNF
VKPNETKTYFWKVQH~~H~~MAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSG~~L~~IGPLL~~V~~CHTNTLNPAH
GRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTL
PGLVMAQDQ~~R~~IRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYK~~M~~ALYNLYPGVFETVEMLP
SKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQY~~G~~QWAPKLA
RLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHG~~I~~KTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTY
RGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKH~~N~~IFNPPIARYIRLHP~~T~~HYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPL
GMESKAISDAQITASSYFTNM~~F~~ATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTM
KVTGVTTQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKV~~F~~QGNQDSFTPVVNSLDP
PLLTRYLR~~I~~HPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

[0023] SEQ ID NO 3:

[0024]

ATTRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFP~~P~~RV~~P~~KSFPFNTSVVYK~~K~~TLFVEFT
DHLFNI~~A~~KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTV~~V~~ITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDD
QTSQREKEDDKVFP~~G~~GSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALL
VCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGY
VNRSLPGLIGCHRKS~~V~~YWHVIGMGTTP~~E~~VHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLL
MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDV~~V~~RF
DDDN~~S~~PSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV~~L~~APDDRSYKSQYLNNGPQRIGR
KYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD~~T~~LLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRP
LYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSSFVNMERDLASGLI
GPLLIC~~Y~~KESVDQQRGNQIMSDKRN~~V~~ILFSVFDENRSWYL~~T~~ENIQRF~~L~~PNPAGVQLEDPEFQA
SNIMHSINGYVFDSLQ~~L~~SVCLHEVAYWYILSIGAQTD~~F~~LSVFFSGYTFKH~~K~~MVYEDTLTLFPF
SGETVFM~~S~~MENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKN
NAIEPRFSQNSRHPSQNP~~P~~V~~L~~KRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDI~~C~~DED
ENQSPRSFQK~~K~~TRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSV~~P~~QFKKVV~~F~~QEFTDGSF
TQPLYRGELNEHLG~~L~~LGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSS~~L~~ISYEEDQRQGAEP~~R~~KN
FVKPNETKTYFWKVQH~~H~~MAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSG~~L~~IGPLL~~V~~CHTNTLNPA

HGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDT
LPGLVMAQDQIRRWYLLSMGSENENHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEML
PSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKL
ARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQT
YRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFFNPPIIARYIRLHPHTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMP
LGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKT
MKVTGVTTQGVKSLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSL
DPPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAODLY

[0025] 本发明的因子 VIII 分子可为 B 结构域截短的因子 FVIII 分子,其中残余结构域密切对应于如在 SEQ ID NO: 1 的氨基酸编号 1-740 和 1649-2332 中所示的序列,然而在残基 1670-1684 之间的 vWF 结合区内当然有一个或多个改变。然而,本发明的 B 结构域截短的分子可与如在 SEQ ID NO: 1 中所示的序列稍不同,意指残余结构域(即 3 个 A 结构域和 2 个 C 结构域)可与如在 SEQ ID NO: 1 (氨基酸 1-740 和 1649-2332)中所示的氨基酸序列稍(例如约 1%、2%、3%、4% 或 5%)不同,因为突变被导入以便降低 vWF 结合能力。此外,为了改变因子 VIII 与各种其他组分(例如 LPR、各种受体、其他凝血因子、细胞表面、导入和/或废除的糖基化位点等)的结合能力,在分子的其他位置中导入氨基酸修饰(置换、缺失等)似乎可行。

[0026] 本发明的因子 VIII 分子具有因子 VIII 活性,意即在凝血级联中以功能上类似或等价于 FVIII 的方式起作用,通过在活化的血小板上与 FIXa 相互作用来诱导 FXa 形成,并支持血凝块形成的能力。通过本领域中公知的技术(例如凝块分析、内源性凝血酶潜能分析等),可体外评估该活性。本发明的因子 VIII 分子具有的 FVIII 活性是天然人 FVIII 活性的至少约 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90% 和 100% 或甚至超过 100%。

[0027] 融合蛋白:融合蛋白/嵌合蛋白是通过将两个以上最初编码单独蛋白的基因连接而产生的蛋白。该融合基因的翻译产生具有来源于各最初蛋白的功能性质的单一多肽。本发明的融合蛋白包含 FVIII 多肽和至少一种其他多肽。融合蛋白可任选包含至少一个接头。因此,FVIII 多肽可不与其他多肽部分直接连接。其他多肽部分可与 FVIII 多肽链的 N 端或 C 端连接,或者插入在 FVIII 多肽链的内部位置上。

[0028] 在一个优选实施方案中,将其他多肽部分插入到 B 结构域缺失的 FVIII 的 B 结构域接头中。在另一个优选实施方案中,其他多肽部分在 FVIII 轻链的 N 端置换 vWF 结合 a3 区。在另一个优选实施方案中,其他多肽部分与 FVIII 轻链的 C 端连接。

[0029] 其他多肽可包含一种或多种氨基酸序列,其来源于例如人血清白蛋白、抗体结合多肽、Fc 受体、人 Fc γ RI (CD64)、人绒毛膜促性腺激素、抗体(免疫球蛋白)的 Fc 部分、转铁蛋白、白蛋白结合多肽或转铁蛋白结合多肽。

[0030] B 结构域:因子 VIII 中的 B-结构域跨越 SEQ ID NO: 1 中的氨基酸 741-1648。将 B-结构域在若干不同位点上切割,在循环的血浆 FVIII 分子中产生大的异质性。高度糖基化的 B-结构域的确切功能未知。所知道的是该结构域在凝血级联中对 FVIII 活性是非必要的。通过以下事实支持该表面上功能的缺失:B 结构域缺失/截短的 FVIII 似乎具有与全长天然 FVIII 所观察到的性质相同的体内性质。据说至少在无血清的条件下有 B-结构

域可降低与细胞膜缔合的迹象。

[0031] B结构域截短 / 缺失的因子 VIII 分子：将内源性全长 FVIII 合成为单链前体分子。分泌之前，将前体切割为重链和轻链。可从两种不同的策略产生重组 B 结构域缺失的 FVIII。将无 B- 结构域的重链和轻链单独合成为两条不同的多肽链（两条链策略），或将 B- 结构域缺失的 FVIII 合成为单一前体多肽链（单一链策略），其可以与全长 FVIII 前体相同的方式被切割为重链和轻链。

[0032] 在 B 结构域缺失的 FVIII 前体多肽中，通常通过接头分开重链和轻链部分。为了使在 B 结构域缺失的 FVIII 中导入免疫原性表位的风险最小化，接头的序列优选来源于 FVIII B 结构域。作为最低限度，接头必须包含使 B 结构域缺失的 FVIII 前体多肽分为重链和轻链的蛋白酶的识别位点。在全长 FVIII 的 B 结构域中，氨基酸 1644-1648 组成该识别位点。在 B 结构域缺失的 FVIII 活化时导致接头移除的凝血酶位点位于重链中。因此，接头的尺寸和氨基酸序列不太可能影响通过凝血酶活化将其从残余 FVIII 分子中移除。B 结构域的缺失对于产生 FVIII 是有利的。然而，可在接头中包含部分 B 结构域而不降低生产能力。B 结构域对生产能力的负面效应不能归因于 B 结构域的任何特定尺寸或序列。

[0033] 截短的 B- 结构域可包含若干 O- 糖基化位点。然而，根据优选的实施方案，分子在截短的 B- 结构域中包含仅 1 个、备选地 2、3 或 4 个 O- 连接寡糖。

[0034] 根据优选的实施方案，截短的 B 结构域仅包含 1 个潜在的 O- 糖基化位点并且亲水聚合物与该 O- 糖基化位点共价缀合。

[0035] 可将本发明的 B- 结构域截短的分子中的 O- 连接寡糖与 O- 糖基化位点连接，O- 糖基化位点通过重组方法和 / 或通过截短 B- 结构域暴露“隐藏的”O- 糖基化位点人工产生。在两种情况下，通过设计 B- 结构域截短的因子 VIII 氨基酸序列并随后使氨基酸序列经受预测截短的 B- 结构域中 O- 糖基化位点可能性的计算机模拟分析，均可制备这样的分子。可在合适的宿主细胞中合成具有这样的糖基化位点的可能性相对高的分子，然后分析糖基化模式并随后选择在截短的 B- 结构域中具有 O- 连接糖基化的分子。

[0036] 因子 VIII 分子亦包含许多可充当使用酶促或化学缀合法的缀合位点的 N- 连接寡糖，例如，与唾液酸衍生物组合的唾液酸转移酶或通过选择试剂氧化聚糖来形成用于随后修饰的醛。

[0037] 为了保证分子是糖基化的，用于产生重组因子 VIII 蛋白的合适宿主细胞优选为哺乳动物来源。在实践本发明时，细胞为哺乳动物细胞，更优选为建立的哺乳动物细胞系，包括但不限于 CHO（例如，ATCC CCL 61）、COS-1（例如，ATCC CRL 1650）、幼仓鼠肾（BHK）和 HEK293（例如，ATCC CRL 1573；Graham 等，J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977）细胞系。优选的 BHK 细胞系是 tk- ts13 BHK 细胞系（Waechter 和 Baserga, Proc.Natl.Acad. Sci. USA 79:1106-1110, 1982），在下文中称为 BHK570 细胞。BHK570 细胞系可以 ATCC 保藏号 CRL 10314 从美国典型培养物保藏中心，12301 Park-lawn Dr., Rockville, MD 20852 获得。tk- ts13 BHK 细胞系亦可以保藏号 CRL 1632 从 ATCC 获得。优选的 CHO 细胞系是 CHO K1 细胞系（以保藏号 CC161 从 ATCC 获得）以及细胞系 CHO-DXB11 和 CHO-DG44。

[0038] 其他合适的细胞系包括但不限于，大鼠 Hep I（大鼠肝细胞瘤；ATCC CRL 1600）、大鼠 Hep II（大鼠肝细胞瘤；ATCC CRL 1548）、TCMK（ATCC CCL 139）、人肺（ATCC HB 8065）、NCTC 1469（ATCC CCL 9.1）、DUKX 细胞（CHO 细胞系）（Urlaub 和 Chasin, Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980) (DUKX 细胞亦被称为 DXB11 细胞) 和 DG44 (CHO 细胞系) (Cell, 33: 405, 1983, 和 Somatic Cell and Molecular Genetics 12: 555, 1986)。同样有用的是 3T3 细胞、Namalwa 细胞、骨髓瘤和骨髓瘤与其他细胞的融合物。在一些实施方案中,细胞可为突变体或重组细胞,例如,与所来源的细胞类型相比,表达质量上或数量上不同范围的催化蛋白翻译后修饰的酶(例如,糖基化酶(例如糖基转移酶和/或糖苷酶),或加工酶(例如前肽))的细胞。特别优选 DUKX 细胞(CHO 细胞系)。

[0039] 普遍优选的细胞是 HEK293、COS、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、幼仓鼠肾(BHK)和骨髓瘤细胞,尤其是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0040] 因此,通过截短 B- 结构域似乎可活化因子 VIII B- 结构域中的“隐藏的”O- 糖基化位点。虽然不希望被任何理论所束缚,但是该现象可归因于截短的 B- 结构域中被改变的分子的三级结构。因此在截短的 B- 结构域中可使“隐藏的”O- 糖基化位点易受糖基化。该方法的一个优点是提供的重组分子相对于例如变应原性具有有利的安全性。另一个优点可为,由于糖基化位点在 B- 结构域中的固有丰余度,它可能代表获得在 B- 结构域中具有 O- 连接寡糖的 B- 结构域截短的变体的较简单的方法,因为之前已证明在重组蛋白中工程化人工 O- 糖基化位点是困难的。

[0041] 在 wt FVIII 分子中 B- 结构域的长度为约 907 个氨基酸。本发明的分子中截短的 B- 结构域的长度可变化于约 10- 约 800 个氨基酸,例如约 10 个氨基酸- 约 700 个氨基酸,例如约 12-500 个氨基酸、12-400 个氨基酸、12-300 个氨基酸、12-200 个氨基酸、15-100 个氨基酸、15-75 个氨基酸、15-50 个氨基酸、15-45 个氨基酸、20-45 个氨基酸、20-40 个氨基酸或 20-30 个氨基酸。截短的 B- 结构域可包含重链和/或轻链的片段和/或未在 wt FVIII 分子中发现的人工导入的序列。术语“B- 结构域截短的”和“B- 结构域缺失的”可在本文中交换使用。

[0042] 改变的循环半寿期: 本发明的分子相比于野生型因子 VIII 分子具有改变的循环半寿期,优选具有增加的循环半寿期。循环半寿期优选增加至少 10%、优选至少 15%、优选至少 20%、优选至少 25%、优选至少 30%、优选至少 35%、优选至少 40%、优选至少 45%、优选至少 50%、优选至少 55%、优选至少 60%、优选至少 65%、优选至少 70%、优选至少 75%、优选至少 80%、优选至少 85%、优选至少 90%、优选至少 95%、优选至少 100%、更优选至少 125%、更优选至少 150%、更优选至少 175%、更优选至少 200% 和最优选至少 250% 或 300%。更更优选地,这样的分子具有增加至少 400%、500%、600% 或甚至 700% 的循环半寿期。

[0043] 侧链/侧基: 本发明的 FVIII 变体可与侧基通过翻译后修饰或以融合蛋白的形式共价缀合。因此可进行 FVIII 的一种或多种下述侧基修饰: 烷基化、酰基化、酯形成、二硫化物或酰胺形成等。其包括 PEG 化的 FVIII、半胱氨酸-PEG 化的 FVIII 及其变体。本发明的 FVIII 变体亦可与生物相容性的脂肪酸及其衍生物、亲水聚合物(羟乙基淀粉、聚乙二醇、透明质酸、基于磷酸胆碱的聚合物、fleximer、葡聚糖、聚唾液酸)、多肽(抗体、抗体的抗原结合片段、Fc 结构域、转铁蛋白、白蛋白、弹性蛋白样肽(MacEwan SR, Chilkoti A. Biopolymers. 2010 ;94:60)、XTEN 聚合物(Schellenberger V 等 Nat Biotechnol. 2009 ; 27:1186)、PAS 化或 HAP 化(Schlapschy M 等 Protein Eng Des Sel. 2007 ;20 :273)、白蛋白结合肽(Dennis MS 等 J Biol Chem. 2002, 277:35035)) 等缀合。

[0044] 本发明的 FVIII 可为一种或多种疏水侧基所缀合 - 任选经由接头。在本发明的

上下文中具有 $-(CH_2)_{12}-$ 部分的化合物是可能的白蛋白结合剂。由于这样的侧基可能与白蛋白形成非共价复合体,有时疏水侧基可称为“白蛋白结合剂”,由于修饰的 FVIII 变体和白蛋白的复合体仅缓慢分解来释放 FVIII 变体,从而促进修饰的 FVIII 变体在血流中的循环。使用化学法以及基本上按照如 W003031464 中公开的方法的酶促“糖修饰”法,可修饰 FVIII。酶促法具有避免使用任何有机溶剂以及通常非常位点特异的优点。

[0045] 术语“PEG 化的 FVIII”意指与 PEG 分子缀合的 FVIII。应该理解,PEG 分子可与 FVIII 的任何部分(包括任何氨基酸残基或碳水化合物部分)连接。术语“半胱氨酸-PEG 化的 FVIII”意指具有与 FVIII 中导入的半胱氨酸的巯基缀合的 PEG 分子的 FVIII。

[0046] PEG 是合适的聚合物分子,因为它相比于多糖(例如葡聚糖)仅具有很少的能够交联的反应基。特别地,单官能团 PEG,例如甲氧基聚乙二醇(mPEG),是令人感兴趣的,因为其偶联化学相对简单(仅一个反应基可用于与多肽上的连接基团缀合)。因此,消除了交联的风险,所产生的多肽缀合物更加均质并且聚合物分子与多肽的反应较容易控制。

[0047] 为了实现聚合物分子与多肽的共价连接,以活化形式提供聚合物分子的羟基末端基团,即具有反应官能团。PEG 化可针对与多肽上所有可得连接基团(即这种连接基团暴露于多肽表面)的缀合,或可针对一个或多个特定连接基团,例如 N 端氨基(美国专利号 5,985,265)、N- 和 / 或 O- 连接聚糖等。此外,可以一步法或逐步法实现缀合(例如如 WO 99/55377 中所述)。用于将侧基与 O- 和 / 或 N- 连接聚糖偶联的酶促方法公开于 W003031464。

[0048] 融合蛋白:融合蛋白 / 嵌合蛋白,是通过将两个以上最初编码单独蛋白的基因连接而产生的蛋白。该融合基因的翻译产生具有来源于各最初蛋白的功能性质的单一多肽。本发明的 FVIII 变体的侧链可因此为与 FVIII 融合的多肽的形式。本发明的 FVIII 变体可因此与可赋予 FVIII 延长的半寿期的肽(例如抗体和“Fc 融合衍生物”或“Fc 融合蛋白”)融合。

[0049] Fc 融合蛋白在本文中意在涵盖与可来源于任何抗体同种型的 Fc 结构域融合的 FVIII,然而,由于 IgG 抗体的相对长的循环半寿期,通常将优选 IgG Fc 结构域。此外,为了调节特定效应子功能(例如补体结合和 / 或与特定 Fc 受体结合),可修饰 Fc 结构域。具有与 FcRn 受体结合的能力的 FVIII 与 Fc 结构域的融合,将通常得到与 wt FVIII 蛋白的半寿期相比延长循环半寿期的融合蛋白。在 IgG Fc 结构域的位置 234、235 和 237 中的突变将通常导致与 Fc γ RI 受体(亦可能 Fc γ RIIa 和 Fc γ RIII 受体)的结合降低。这些突变不改变与 FcRn 受体的结合,FcRn 受体通过内吞再循环途径促进长的循环半寿期。优选地,本发明融合蛋白的修饰的 IgG Fc 结构域包含一种或多种下述突变,突变将分别导致与特定 Fc 受体的亲和力降低(L234A、L235E 和 G237A)和 C1q 介导的补体结合降低(A330S 和 P331S)。

[0050] 不受理论所束缚,设想为什么它更有效地起作用来将侧基与具有降低的 vWF 结合能力的因子 VIII 分子连接而不是将侧基与具有正常的 vWF 结合能力的因子 VIII 分子连接的原因是,侧基的相对尺寸在大的因子 VIII/vWF 复合体中相对小。假设相对大的侧基在保护游离因子 VIII 免受清除中更有效地起作用。另外假设 FVIII 的半寿期与 vWF 的半寿期相关。具有降低的结合 vWF 的能力的 FVIII 分子最可能具有暴露的清除表位,该表位通常被 vWF 所保护。通过连接侧基,因此假设可恢复该“清除保护”。在其他情况下,通过例如将分子与具有相对长循环半寿期的蛋白、细胞或血小板连接,连接侧基(例如抗体片段)可起

作用。

[0051] 亲水聚合物：本发明的修饰基团 / 亲水聚合物优选是非天然存在的。在一个实例中，“非天然存在的修饰基团”是聚合物修饰基团，其中至少一种聚合物部分是非天然存在的。在另一实例中，非天然存在的修饰基团是修饰的碳水化合物。选择用修饰基团功能化的位点，使得它不阻止“修饰的糖”被酶促加入到多肽中。“修饰的糖”亦指用修饰基团功能化和为天然或修饰酶（例如糖基转移酶）的底物的任何糖基模拟部分。

[0052] 将聚合物修饰基团加入到多肽中可改变这样的多肽的性质，例如其生物利用度、生物活性或其体内半寿期。本发明的例示性聚合物包括水溶性聚合物，其可为直链或支链的并可包括一种或多种独立选择的聚合物部分，例如聚亚烷基二醇及其衍生物。本发明的聚合物修饰基团可包括水溶性聚合物，例如聚乙二醇及其衍生物（PEG、m-PEG）、聚丙二醇及其衍生物（PPG、m-PPG）等。

[0053] 术语“水溶性”指在水中具有一些可检测度的溶解度的部分。用于检测和 / 或定量水溶解度的方法在本领域中是公知的。本发明的例示性水溶性聚合物包括肽、糖类、聚醚、聚胺、聚羧酸等。肽可具有混合的序列并可由单一氨基酸（例如，聚赖氨酸）组成。例示性的多糖是聚唾液酸。例示性的聚醚是聚乙二醇，例如 m-PEG。聚乙烯亚胺是一种例示性的聚胺，和聚丙烯酸是一种代表性的聚羧酸。

[0054] 本发明的水溶性聚合物的聚合物骨架可为聚乙二醇（即 PEG）。与本发明有关的术语 PEG 包括任何形式的聚乙二醇，包括烷氧基 PEG、双官能团 PEG、多臂 PEG、分叉的 PEG、支链的 PEG、侧链的 PEG（pendent PEG）（即具有一个或多个相对于聚合物骨架为侧基的官能团的 PEG 或相关聚合物），或其中具有可降解键的 PEG。

[0055] 聚合物骨架可为直链或支链的。支链的聚合物骨架在本领域是公知的。通常，支链的聚合物具有中枢支链核心部分和与中枢支链核心连接的多条线性聚合物链。PEG 通常以支链形式使用，其可通过将环氧乙烷加入到各种多元醇（例如甘油、季戊四醇和山梨糖醇）中制备。中枢支链部分亦可来源于若干氨基酸，例如赖氨酸或半胱氨酸。在一个实例中，支链聚乙二醇可以通式 $R(-\text{PEG}-\text{OH})_m$ 表示，其中 R 代表核心部分，例如甘油或季戊四醇，和 m 代表臂的数量。多臂 PEG 分子亦可作为聚合物骨架，例如在美国专利号 5,932,462 中描述的那些多臂 PEG 分子，其通过引用以其整体结合到本文中。许多其他聚合物亦适用于本发明。在本发明中可特别使用非肽和水溶性的聚合物骨架。合适聚合物的实例包括但不限于，其他聚亚烷基二醇（例如聚丙二醇（“PEG”）、乙二醇和丙二醇的共聚物等、聚氧乙基化多元醇、聚烯醇（poly(olefinic alcohol)）、聚乙烯吡咯烷酮、聚羟丙基甲基丙烯酸酯、聚[α]-羟酸、聚乙烯醇、聚磷腈、聚噁唑啉、聚 N-丙烯酰吗啉（例如在美国专利号 5,629,384 中描述，其通过引用以其整体结合到本文中）以及其共聚物、三元共聚物和混合物。

[0056] 虽然聚合物骨架的各链的分子量可不同，但是它通常在约 100 Da - 约 160,000 Da 的范围内，例如约 5,000 Da - 约 100,000 Da。更具体而言，本发明的各缀合的亲水聚合物的尺寸可变化于约 500 Da - 约 80,000 Da，例如约 1000 Da - 约 80,000 Da、约 2000 Da - 约 70,000 Da、约 5000 - 约 70,000 Da、约 5000 - 约 60,000 Da、约 10,000 - 约 70,000 Da、约 20,000 - 约 60,000 Da、约 30,000 - 约 60,000 Da、约 30,000 - 约 50,000 Da 或约 30,000 - 约 40,000 Da。应该理解，这些尺寸代表估量而不是精确测量。根据优选的实施方案，本发明的分子与异质群体的亲水聚合物缀合，例如尺寸为例如

10,000、40,000 或 80,000 Da $\pm$ 约 5000、约 4000、约 3000、约 2000 或约 1000 Da 的 PEG。

[0057] 白蛋白结合剂缀合物/侧基

[0058] 已知通过使用白蛋白结合侧链可改善蛋白的体内性质。这样的侧链或白蛋白结合剂可在给药前与蛋白连接,并可例如使蛋白体内稳定或者改进或延伸蛋白的体内半寿期。

[0059] 白蛋白结合剂可藉此促进衍生物与血流的循环。白蛋白结合剂可具有延伸或延长与其结合的蛋白的作用时间的作用,因为肽衍生物和白蛋白的复合体仅缓慢分解来释放活性药物成分。因此,优选的取代物或侧链,总体上可被称为白蛋白结合部分。

[0060] 白蛋白结合剂(白蛋白结合部分)可包含与白蛋白结合特别相关并藉此与在血流中延长循环相关的部分,该部分可因此被称为延长部分。与其连接肽的位点相比,延长部分优选位于或靠近白蛋白结合部分的相对端。

[0061] 在一个优选实施方案中,白蛋白结合剂是或包含能够与白蛋白形成非共价复合体的侧链。白蛋白结合剂可与白蛋白非共价和/或可逆结合。白蛋白结合剂可与白蛋白特异性结合。从下文所述的方法中可明白,白蛋白结合剂可与环糊精结合。白蛋白结合剂可共价和/或可逆结合环糊精。白蛋白结合剂可特异性结合环糊精。

[0062] 本文所述的白蛋白结合剂通常是疏水基。

[0063] 白蛋白结合部分的其他部分(即在延长部分与连接肽的位点中间的部分),可被称为接头部分、接头或间隔区等。然而,这样的接头的存在是任选的,并因此白蛋白结合部分可与延长部分相同。

[0064] 在特定实施方案中,白蛋白结合部分和/或延长部分是亲脂性的和/或在生理 pH (7.4) 下带负电荷。

[0065] 白蛋白结合部分和/或延长部分可与肽的氨基通过缀合化学(例如通过烷基化、酰基化或酰胺形成)共价连接,或与羟基例如通过酯化、烷基化、腈化共价连接。

[0066] 在一个优选实施方案中,白蛋白结合部分和/或延长部分的活性酯与唾液酸残基或唾液酸衍生物的氨基在酰胺键的形成下共价连接。

[0067] 为了本发明目的,术语“白蛋白结合部分”、“延长部分”和“接头”包括这些分子的未反应以及反应的形式。意指一种还是另一种形式从该术语使用的上下文看是清楚的。

[0068] 白蛋白结合部分可为或可包含脂肪酸或脂肪二酸或者其任一衍生物。

[0069] 术语“脂肪酸”指具有 4-28 个碳原子(例如 16 个碳原子)的脂肪族单羧酸。它优选是未分枝的和/或甚至编号的,且它可为饱和或不饱和的。

[0070] 术语“脂肪二酸”指,如上文定义但在 ω 位置中具有另外的羧酸基的脂肪酸。因此脂肪二酸是二羧酸。

[0071] 命名与本领域中通常一样,例如 $-\text{COOH}$ 以及 $\text{HOOC}-$ 指羧基; $-\text{C}_6\text{H}_4-$ 指亚苯基; $-\text{CO}-$ 以及 $-\text{OC}-$ 指羰基($\text{O}=\text{C}<$);和 $\text{C}_6\text{H}_5-\text{O}-$ 指苯氧基。

[0072] 在一个优选实施方案中,接头部分,如果存在,具有 2-80 个 C 原子,优选 5-70 个 C 原子。在另外优选的实施方案中,接头部分,如果存在,具有 4-20 个杂原子,优选 2-40 个杂原子,更优选 3-30 个杂原子。特别优选的杂原子的实例是 N- 和 O- 原子。H- 原子不是杂原子。

[0073] 在另一个实施方案中,接头包含至少一个 OEG 分子和/或至少一个谷氨酸残基,更确切地说相应的基(OEG 表示 8-氨基-3,6-二氧杂辛酸,即该基: $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{C}$

H₂-CO-)。

[0074] 在一个优选实施方案中,接头部分包含通过酰胺键与唾液酸残基连接的二羧基残基。在优选的实例中,二羧基残基具有 2-30 个 C 原子,优选 4-20 个 C 原子,更优选 4-10 个 C 原子。在另外优选的实例中,二羧基残基具有 0-10 个杂原子,优选 0-5 个杂原子。

[0075] 在另一个优选实例中,接头部分包含含有氨基和远端羧基两者的基团,其通过其远端羧基经酰胺键与唾液酸残基连接。在一个优选实施方案中,该基团是 OEG 基团。

[0076] 氨基酸谷氨酸 (Glu) 包含两个羧基。它的 γ -羧基优选用于与唾液酸残基或唾液酸衍生物的氨基,或者与 OEG 分子的氨基 (如果存在),或者与另一 Glu 残基的氨基 (如果存在) 形成酰胺键。Glu 的氨基进而与延长部分的羧基,或者与 OEG 分子的羧基 (如果存在),或者与另一 Glu 的 γ -羧基 (如果存在) 形成酰胺键。这种方式包含的 Glu 偶尔简称为“ γ -Glu”。

[0077] 0-连接寡糖:通过产生蛋白的细胞将 N-聚糖和 O-聚糖两者与蛋白连接。细胞的 N-糖基化机器识别并糖基化氨基酸链中的 N-糖基化信号 (N-X-S/T 基序),如同将新生蛋白从核糖体转移至内质网 (Kiely 等 1976 ;Glabe 等 1980)。

[0078] 同样地,将 O-聚糖与氨基酸链中的特定 O-糖基化位点连接,但引起 O-糖基化的基序比 N-糖基化信号异质得多,且我们预测氨基酸序列中的 O-糖基化位点的能力仍不够 (Julenius 等 2004)。因此人工 O-糖基化位点的构建与一些不确定性相关。

[0079] 在截短的因子 VIII B 结构域中的 O-连接寡糖可因此与天然存在的 O-连接糖基化序列或通过重组技术人工构建的 O-连接糖基化序列共价连接。

[0080] 根据本发明的一个优选实施方案, O-连接寡糖与天然存在的 O-连接糖基化序列连接,该序列在野生型因子 VIII 分子中不暴露于糖基化但由于 B-结构域的截短变得易受 O-糖基化。其实例是 B-结构域截短的因子 VIII 变体,其中 B-结构域对应于 SEQ ID NO: 1 中的氨基酸 742-763。似乎可行的是,即使在略微不同之处截短 B 结构域 (即如果截短的 B-结构域与 742-763 接头相比稍微较短 (例如短 1、2、3、4 或 5 个氨基酸) 或较长 (例如长 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 个氨基酸)), 那么在该截短的变体中“隐藏的”O-糖基化位点还是将变成糖基化的。通过截短 B-结构域而不是产生人工的 O-糖基化位点来活化“隐藏的”O-糖基化位点的该方法具有产生具有有利的安全性特征 (即降低的变应原性等) 的分子的优点。通过以不同的方法截短分子,在因子 VIII B-结构域中的其他 O-糖基化位点可同样变成活化的。

[0081] 唾液酸转移酶:唾液酸转移酶是将唾液酸转移到初生寡糖上的酶。各唾液酸转移酶对特定的糖底物有特异性。唾液酸转移酶将唾液酸加到唾液酸化糖脂 (神经节苷脂) 的末端部分上或加到糖蛋白的 N-或 O-连接糖链上。有约 20 种不同的唾液酸转移酶,基于它们起作用的受体结构和它们形成的糖键类型可将它们区分。本发明的优选唾液酸转移酶是 ST3Gal-I (对 O-聚糖特异) 和 ST3Gal-III (对 N-聚糖特异)。因此,可通过例如选择特异性唾液酸转移酶和 / 或以特定糖基化模式将因子 VIII 分子工程化,工程化本发明的缀合因子 VIII 分子的结构。

[0082] O-连接寡糖的糖 PEG 化:在生物合成相对早期加入唾液酸残基,可改变和终止 O-聚糖的生物合成。特定唾液酸转移酶能够在核心 1 GalT 作用后作用于 GalNAc α -Ser/Thr 或早期 O-聚糖核心亚型。术语 T 抗原与 Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr 二糖的存在

相关。这些结构的产生涉及糖基转移酶之间对相同底物的竞争,并因此高尔基体内的糖基转移酶的表达水平和亚细胞分布确定 O- 聚糖生物合成和多样化中的结构结果。仅 Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr 二糖受糖 PEG 化的影响。

[0083] 然而,通过用唾液酸酶或核心 1 GalT 或者其组合处理蛋白,可极大增加该结构的可得量。由于糖 PEG 化过程,唾液酸 PEG 通过与靶蛋白的 Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr 二糖键合的 α 3 加入到天然结构中。

[0084] 其他亲水聚合物亦可与 O- 连接寡糖连接。用于通过 O- 聚糖将其他亲水聚合物与 FVIII 酶促缀合的基本要求是将它们与甘氨酸唾液酸衍生物通过如 W003031464 中公开的游离氨基偶联的能力。这可通过本领域技术人员已知的多种偶联化学来实现。活化的生物相容性聚合物的实例包括聚环氧烷,例如不限于聚乙二醇 (PEG)、2-(甲基丙烯酰氧基) 乙基磷酸胆碱 (mPC) 聚合物 (如在 W003062290 中所述)、葡聚糖、多聚乙酰神经氨酸或其他基于碳水化合物的聚合物、氨基酸或特定肽序列的聚合物、生物素衍生物、聚乙烯醇 (PVA)、聚羧酸酯、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯 - 共 - 顺丁烯二酸酐、聚苯乙烯 - 共 - 顺丁烯二酸酐、聚噁唑啉、聚丙烯酰吗啉、肝素、白蛋白、纤维素、壳聚糖的水解产物、淀粉 (例如羟乙基淀粉和羟丙基淀粉)、糖原、琼脂糖及其衍生物、瓜尔胶、普鲁分支葡聚糖、菊粉、黄原胶、角叉菜胶、果胶、藻酸水解产物、其他生物聚合物及其任何等价物。

[0085] 可将侧基与如例如 W00331464 中公开的 N- 连接寡糖连接。这样的方法经常导致若干侧基与因子 VIII 分子连接。

[0086] 药物组合物: 药物组合物在本文中优选意在涵盖含有适合于胃肠外给药的本发明的因子 VIII 分子的组合物,例如即用型无菌水性组合物或可在例如水或水性缓冲液中复溶的干燥无菌组合物。本发明的药物组合物可包含各种药理学上可接受的赋形剂、稳定剂等。

[0087] 这种组合物中的另外成分可包括润湿剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、张度调节剂、螯合剂、金属离子、含油溶媒、蛋白 (例如人血清白蛋白、明胶或蛋白质) 和两性离子 (例如氨基酸,例如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸)。当然这种另外成分不应该有害地影响本发明药物制剂的总体稳定性。可凭借注射器 (任选笔样注射器) 通过皮下、肌肉内、腹膜内或静脉内注射来进行胃肠外给药。备选地,可凭借输注泵进行胃肠外给药。另外的选择是组合物可为用于以鼻或肺喷雾的形式给予 FVIII 化合物的溶液剂或混悬剂。作为又一选择,包含本发明 FVIII 化合物的药物组合物亦可适合于经皮给药 (例如通过无针注射或从贴剂 (任选是离子渗透贴剂)) 或经粘膜 (例如经口) 给药。

[0088] 本文使用的术语“治疗”指任何有需要的人或其他动物受试者的医学治疗。预期所述受试者已经历医生进行的身体检查,医生已给出试验性或明确的诊断,该诊断表明使用所述特定治疗对所述人或其他动物受试者的健康有益。根据受试者健康的现状,所述治疗的时机和效果可因人而异。因此,所述治疗可为预防的、缓和的、针对症状的和 / 或治愈的。

[0089] 在第一方面,本发明因此涉及一种重组因子 VIII 分子,其中所述分子具有降低的 vWF 结合能力,且其中所述分子与至少一种侧基共价缀合。在一个实施方案中,侧基选自: 亲水聚合物、白蛋白结合剂、抗体或其片段、转铁蛋白和白蛋白。

[0090] 在一个优选实施方案中,因子 VIII 分子是 B- 结构域截短的变体且侧基任选与截短的 B- 结构域共价缀合,由此因子 VIII 活化导致共价缀合的侧基的移除。在另一个实施

方案中, B- 结构域截短的分子与亲水聚合物通过截短的 B 结构域中的 O- 连接寡糖共价缀合, 和其中因子 VIII 活化导致共价缀合的亲水聚合物的移除。这种 O- 糖基化位点优选通过截短 B- 结构域构建。

[0091] 在又一个优选实施方案中, 本发明的分子在残基 1680 中包含点突变。在另一个优选实施方案中, 因子分子在跨越残基 1670-1684 的区中缺失一个或多个氨基酸。由此可见, 本发明的分子可在 vWF 结合结构域内包含点突变和缺失两者。依据一个特别优选的实施方案, 侧基是 PEG。

[0092] 本发明的另一方面涉及一种制备本发明分子的方法, 其中所述方法包括将侧基与具有降低的结合 vWF 的能力的因子 VIII 分子连接。通过这样的方法可获得或获得的分子亦是本发明的一部分。

[0093] 本发明的第三方面涉及一种治疗血友病的方法, 其包括向有需要的患者给予治疗有效量的本发明的分子。

[0094] 本发明的第四方面涉及本发明的分子作为药物的用途。

[0095] 第五方面涉及本发明的分子用于制备治疗血友病的药物的用途。

[0096] 最后一个方面涉及一种包含本发明的分子的药物组合物。

实施例

[0097] 实施例 1 *重组 B 结构域截短的 O- 糖基化的因子 VIII 及其变体 (例如因子 VIII (Y1680F) 或因子 VIII (Y1680C)) 的产生*

[0098] 细胞系和培养方法

[0099] 使用因子 VIII cDNA, 构建哺乳动物表达质粒。质粒编码包含 Y1680F 突变的 B- 结构域缺失的因子 VIII, 因子 VIII 重链包含全长人因子 VIII 的氨基酸 1-740, 和因子 VIII 轻链包含全长人因子 VIII 的氨基酸 1649-2332。通过包含全长人因子 VIII 氨基酸 741-750 和 1638-1648 的序列的 21 个氨基酸接头 (SFSQNSRHPSQNPPVLKRHQR — SEQ ID NO: 4) 将重链和轻链序列连接。本文亦可将包含在 SEQ ID NO: 4 中定义的接头的 FVIII 变体称为“N8”。由该质粒编码的因子 VIII 氨基酸序列在 SEQ ID NO: 1 (wt)、SEQ ID NO: 2 (Y1680F)、SEQ ID NO: 3 (Y1680C) 中示出。

[0100] 用质粒转染中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞并用二氢叶酸还原酶系统选择, 最后得到在无动物组分的培养基中培养的克隆悬浮生产细胞。

[0101] 该方法中的第一步是将来自工作细胞库小瓶的细胞小瓶接种到化学组分确知并不含动物成分的生长培养基中。最初, 融化后, 将细胞在方瓶中孵育。融化后 1 或 2 天, 将细胞转移到摇瓶中, 为了保持细胞密度在 $0.2-3.0 \times 10^6$ 细胞 /ml, 通过连续稀释扩大培养物体积。下一步是将摇瓶培养物转移到种子生物反应器中。在最后转移到生产生物反应器中前, 这里进一步扩大培养物体积。对于所有的接种物扩繁步骤, 使用相同的化学成分确知并不含动物组分的培养基。在转移到生产生物反应器中后, 用增加产物浓度的组分补充培养基。在生产生物反应器中, 将细胞以具有 3 天循环时间的重复分批方法培养。在收获时, 将 80-90% 的培养物体积转移到收获箱中。然后将残余培养液用新鲜培养基稀释, 以便获得最初的细胞密度, 然后开始新的生长期。通过离心和过滤澄清收获批产物, 并在开始纯化过程前转移到存储箱中。将缓冲液加入到存储箱中的无细胞收获物中以稳定 pH。

[0102] 到生产运行结束时,收集并冷冻细胞,以便制备最终的生产细胞库。针对支原体、无菌性和病毒污染测试该细胞库。

[0103] 纯化

[0104] 为了从细胞培养基中分离 B- 结构域缺失的因子 VIII (Y1680F),使用四步纯化步骤,其包括:在 Capto MMC 柱上的浓缩步骤、免疫吸附色谱步骤、阴离子交换色谱和最后的凝胶过滤步骤。通常使用下述步骤:将 11 升无菌过滤的培养基以 15 ml/min 的流速泵到在缓冲液 A (20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、50mM NaCl、0.02% Tween 80, pH = 7.5) 中平衡的 Capto MMC (GE Healthcare, Sweden) 的柱 (1.6×12 cm) 上。将柱用 75 ml 的缓冲液 A 洗涤后用 75 ml 含有 1.5 M NaCl 的缓冲液 A 洗涤。将蛋白用 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% Tween 80、2.5 M NaCl、8 M 乙二醇, pH 7.5 以 1 ml/min 的流速洗脱。收集 8 ml 的流分并在显色测定(参见实施例 3)中测定因子 VIII 活性 (FVIII:C)。将包含因子 VIII 的流分合并,并通常获得大约 50 ml 的合并物体积。

[0105] 针对因子 VIII 的单克隆抗体已被开发 (Kjalke Eur J Biochem 234 773, Hansen, J Thromb Haemost 2009; 7, 增刊 2: 摘要号 PP-WE-572)。通过进一步表位作图(结果未显示),发现该抗体 F25 识别重链远 C 端序列(氨基酸 725-740)。基本上如制造商所述,将 F25 抗体与 NHS 活化的 Sepharose 4 FF (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) 以每 ml 的凝胶 2.4mg 的密度偶联。将来自上一步的合并物用 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% Tween 80, pH = 7.3 稀释 10 倍并以 0.5 ml/min 的流速装载到用 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、150 mM NaCl、0.02% Tween 80、1 M 甘油 pH = 7.3 平衡的 F25 Sepharose 柱 (1.6×9.5 cm) 上。将柱用平衡缓冲液洗涤直至 UV 信号不变然后用 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.65 M NaCl, pH = 7.3 洗涤直至 UV 信号再次不变。将因子 VIII 用 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% Tween 80、2.5 M NaCl、50% 乙二醇, pH 7.3 以 1 ml/min 的流速洗脱。收集 1 ml 的流分并测定因子 FVIII:C (参见实施例 3)。将包含因子 VIII 的流分合并,并通常获得大约 25 ml 的合并物体积。

[0106] 制备缓冲液 A (20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02 % Tween 80、1 M 甘油, pH = 7.3) 和缓冲液 B (20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02 % Tween 80、1 M 甘油、1 M NaCl, pH = 7.3) 用于离子交换步骤。用 85% 缓冲液 A/15% 缓冲液 B 以 2 ml/min 的流速平衡 Macro-Prep 25Q Support (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 柱 (1×10 cm)。将来自上一步的合并物用缓冲液 A 稀释 10 倍并以 2 ml/min 的流速泵到柱上。将柱用 85% 缓冲液 A/15% 缓冲液 B 以 2 ml/min 的流速洗涤并用 15% 缓冲液 B - 70% 缓冲液 B 的线性梯度(在 120 ml 内)以 2 ml/min 的流速洗脱因子 VIII。收集 2 ml 的流分并如实施例 3 中所述测定因子 VIII 活性 (FVIII:C)。将包含因子 VIII 的流分合并,并通常获得大约 36 ml 的合并物体积。

[0107] 将来自上一步的合并物装载到 Superdex 200, 制备级 (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) 柱 (2.6×60 cm) 上,该柱用 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02 % Tween 80、1 M 甘油、150 mM NaCl, pH = 7.3 平衡并以 1ml/min 洗脱。收集 3 ml 的流分并测定因子 FVIII:C (参见实施例 3)。将包含因子 VIII 的流分合并,并通常获得大约 57 ml 的合并物体积。将包含因子 VIII 的合并物在 - 80 °C 保存。

[0108] 使用上文的四步纯化步骤,如通过 FVIII:C 和 ELISA 测量结果判断,获得大约 15%

的总产率。

[0109] 实施例 2 用于 PEG化重组 O-糖基化的因子 VIII 的步骤

[0110] 使用下述步骤将实施例 1 中获得的重组因子 VIII 分子与聚乙二醇 (PEG) 缀合：

[0111] 为了糖 PEG 化反应是高效的,要求 FVIII 浓度 > 5mg/ml。因为 FVIII 通常在该浓度下不溶,所以进行所选缓冲液组合物的筛查 (参见表 1)。基于这些考虑,发现包含 50 mM MES、50 mM CaCl₂、150 mM NaCl、20% 甘油, pH 6.0 的缓冲液为合适的反应缓冲液。

[0112] 表 1 反应条件对 FVIII 溶解度和聚集的影响评价

[0113]

反应缓冲液组合物	沉淀	% 聚集
10 mM 组氨酸、250 mM 甘氨酸、 1% 蔗糖、10 mM CaCl ₂	是	n.d.
50 mM HEPES、10 mM CaCl ₂ 、150 mM NaCl, pH 7;	是	n.d.
50 mM MES、10 mM CaCl ₂ 、150 mM NaCl, pH 6.0	是	n.d.
50 mM MES、50 mM CaCl ₂ 、150 mM NaCl, pH 6.0	否	8
50 mM MES、50 mM CaCl ₂ 、150 mM NaCl、10% 甘油, pH 6.0	否	5
50 mM MES、50 mM CaCl ₂ 、150 mM NaCl、20% 甘油, pH 6.0	否	1.0-1.7

[0114] 将如上文所述纯化的重组 FVIII 在反应缓冲液中通过在 Poros 50 HQ 柱上使用步骤洗脱的离子交换、在 Sartorius Vivaspin (PES) 过滤器上 (10 kDa 截止值 (cut-off)) 或在 Amicon 10 kDa MWC PES 过滤器上浓缩至 6-10 mg/mL 的浓度。通过在反应缓冲液 (50 mM MES、50 mM CaCl₂、150 mM NaCl、20% 甘油、0.5 mM 抗蛋白酶, pH 6.0) 中将因子 VIII (BDD) (最终约 4.7mg/mL) 与唾液酸酶 (产脉节杆菌 (*A. ureafaciens*)) (159 mU/mL)、CMP-SA-甘油-PEG-40 kDa (参见 WO2007/056191) (5 mol. eq.) 和 MBP-ST3Gal1 (540 mU) (WO 2006102652) 混合,开始 FVIII 的糖 PEG 化。将反应混合物在 32 °C 孵育直至总转化产率为约 20-30%。

[0115] 孵育后将样品用缓冲液 A (25 mM Tris、5 mM CaCl₂、20 mM NaCl、20% 甘油, pH 7.5) 稀释并装载到 Source 15Q 柱 (1 cm id × 6 cm, 4.7 mL, 1 mL/min, 280 nm) 上。将结合物质用缓冲液 A 洗涤并使用缓冲液 B (25 mM Tris、5 mM CaCl₂、1 M NaCl、20% 甘油, pH 7.5) 的步骤梯度洗脱。在约 25% 缓冲液 B 下从柱上洗脱糖 PEG 化的因子 VIII-(O)-SA-甘油-PEG-40 kDa。

[0116] 为了在唾液酸酶处理期间封闭暴露在 N-聚糖上的游离半乳糖部分,将因子 VIII-SA-甘油-PEG-40 kDa 的合并流分 (最终 1.0mg/mL) 与 CMP-SA (2,000 mol eq) 和 MBP-SBD-ST3Gal3 (WO 2006102652) (400 mU/mL) 在反应缓冲液 (50 mM MES、20 mM CaCl₂、150 mM NaCl、10 mM MnCl₂、20% 甘油, pH 6.0) 中混合并在 32 °C 孵育 11 小时。

[0117] 在用 50 mM MES、50mM CaCl₂、150 mM NaCl、10 % 甘油, pH 6.0 平衡的 Superdex

200 柱 (10 cm id × 300 mm; 280 nm) 上通过凝胶过滤将所产生的加帽的糖 PEG 化因子 VIII-SA-甘油-PEG-40 kDa 与 cmp-SA 和 ST3GalIII 分开;流速为 0.25 mL/min。在 38 分钟洗脱产物因子 VIII-SA-甘油-PEG-40 kDa。收集、等分峰流分并使其经受接着的分析。

[0118] *O*-聚糖 40 kDa-糖 PEG- BDD-FVIII Y1680F

[0119] 在由水中的咪唑 (20 mM)、氯化钙 (10 mM)、Tween 80 (0.02%)、氯化钠 (500 mM) 和甘油 (1 M) 组成的缓冲液 (pH 7.3) 中融化 BDD-FVIII Y1680F (1.18 mg, 0.85 mg/ml)。

[0120] 加入来自产脲节杆菌 (*Arthrobacter ureafaciens*) 的唾液酸酶 (2.4 U, 在 20 微升缓冲液中)、唾液酸转移酶 (His-ST3Gal-I, 2.5 mg/ml, 6.75 U, 125 微升, EC 2.4.99.4, WO 2006102652) 和胞苷一磷酸 *N*-5'-PEG-甘油-神经氨酸、CMP-SA-甘油-PEG-40 kDa (1.9 mM, 41 微升缓冲液, 78 nmol; 参见 WO2007/056191)。终体积是 1.5 ml。将所产生的混合物在 32 摄氏度放置 24 小时。将混合物用缓冲液 A (水中的咪唑 (20 mM)、氯化钙 (10 mM)、Tween 80 (0.02%) 和甘油 (1 M) (pH 7.3)) 稀释至 20 ml。

[0121] 将所产生的混合物装载到 MonoQ 5/50 GL 柱 (GE Healthcare Bio-Sciences, Hillerød, Denmark) 上。将固定化的物质用缓冲液 A (10 倍柱体积) 洗涤,在这之后使用 0-100% 缓冲液 B (水中的咪唑 (20 mM)、氯化钙 (10 mM)、Tween 80 (0.02%)、氯化钠 (1 M) 和甘油 (1 M) (pH 7.3)) 的梯度 (10 CV 100% A、10 CV 0-20% 缓冲液 B、10 CV 20% 缓冲液 B、25 CV 20 - 100% 缓冲液 B 和 5 CV 100% 缓冲液 B) 从柱上洗脱。

[0122] 将收集的物质与胞苷一磷酸 *N*-5' 乙酰基-神经氨酸 (53 微克) 和唾液酸转移酶 (MBP-SBD-ST3Gal-III, EC 2.4.99.6, 参见 WO 2006102652) 混合。终体积和浓度分别是 2.56 ml 和 0.46 mg/ml (FVIII), 0.132 mg/ml (MBP-SBD-ST3Gal-III) 和 54 微摩尔 (胞苷一磷酸 *N*-5' 乙酰基-神经氨酸)

[0123] 将混合物在 32 摄氏度放置 1 小时,此时将混合物用缓冲液 A 稀释至 20 ml。将所产生的混合物装载到 MonoQ 5/50 GL 柱 (GE Healthcare Bio-Sciences) 上。将固定化的物质用缓冲液 A 洗涤,在这之后使用 0-100% 的梯度 (10 CV 100% A、10 CV 0-20% 缓冲液 B、10 CV 20% 缓冲液 B、25 CV 20-100% 缓冲液 B 和 5 CV 100% 缓冲液 B) 从柱上洗脱。使用 SDS-PAGE 凝胶 (Invitrogen, 7 % Tris-Acetate, NuPAGE Tris-Acetate 运行缓冲液, 70 分钟, 150 V, 非还原条件) 评估分离的流分中的蛋白含量。

[0124] 将选择的流分合并并使用 Amicon 超离心管 (Millipore, 截止值: 50 kDa) 浓缩。浓缩后的体积是 0.5 ml。将所产生的溶液装载到已用由水中的组氨酸 (1.5 g/l)、氯化钙 (250 mg/l)、Tween 80 (0.1 g/l)、氯化钠 (18 g/l) 和蔗糖 (3 g/l) 组成的缓冲液 (pH 7.0) 预平衡的 Superose 6 10/300 GL 柱 (GE Healthcare Bio-Sciences, Hillerød, Denmark; 柱体积 24 ml) 上。使用提及的缓冲液和 0.6 ml/min 的流速,将混合物的组分在 1.5 倍柱体积内分成 1 ml 尺寸的流分。将所选择的流分 (0.015 mg/ml, 2ml) 合并。

[0125] 实施例 3 用 Peg-30K-马来酰亚胺来 PEG 化 Y1680C (参考 US2006/0115876 A1)

[0126] 试剂:

[0127] 1) BDD-FVIII N8-Y1680C (MW 178,000), 1200 μ l, 浓度 80 μ g/ml, 96 μ g, 0.54 nmol, 在缓冲液 (20 mM 咪唑 + 10 mM CaCl_2 + 0.02% Tween 80 + 1 M NaCl, 1 M 甘油, pH 7.3) 中

[0128] 2) 三羧乙基膦 (TCEP, MW 287): 700eq; 0.0315 μ mol; 9 μ g。将 1 mg TCEP

溶解在 1 ml 的缓冲液 (20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% Tween 80、1 M 甘油, pH 7.3、1 M NaCl) 中。使用 109 μl 该溶液。

[0129] 3) 30 kDa PEG- 马来酰亚胺 (来自 NOF Corp. 的 Sunbright Me-300Ma, MW 29300), 10 eq., 180 μg 。将 4.8 mg 30 kDa PEG- 马来酰亚胺溶解在 2.4 ml 的缓冲液 (20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% Tween 80、1 M 甘油, pH 7.3、1 M NaCl) 中。使用 90 μl 该溶液。

[0130] 用于 VivaP pure 旋转柱 (强阴离子交换) 和 Pro-spin (旋转柱) 的缓冲液:

[0131] 缓冲液 A: 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% Tween 80、1M 甘油, pH 7.3

[0132] 缓冲液 B: 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% Tween 80、1M 甘油, pH 7.3、25mM NaCl

[0133] 缓冲液 C: 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% Tween 80、1M 甘油, pH 7.3、50mM NaCl

[0134] 缓冲液 D: 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% Tween 80、1M 甘油, pH 7.3、200mM NaCl

[0135] 缓冲液 E: 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% Tween 80、1M 甘油, pH 7.3、1M NaCl

[0136] 在室温融化 BDD-FVIIIIN8 - Y1680C 并在 5 ml 管中合并。加入 109 μl TCEP 溶液的量。将混合物在 5 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 分钟。

[0137] 然后, 移除 TCEP。将反应混合物用 42ml 的 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% Tween 80、1M 甘油, pH 7.3 稀释, 使得盐浓度为 31 mM。将溶液装载到 Viva pPure Q maxi M (Sartorius, 强阴离子交换) 上。

[0138] 平衡: 装载 10 ml 缓冲液 A。以 2000 g (1500 RCF) 旋转 2 分钟。

[0139] 样品装载: 装载 4 $\times$ 11 ml 稀释的样品。对于各样品, 以 2000g 旋转 2 分钟。

[0140] 洗脱缓冲液 B (25 mM NaCl): 加入 10 ml 缓冲液 B。以 2000g 旋转 2 分钟。

[0141] 洗脱缓冲液 C (50 mM NaCl): 加入 10 ml 缓冲液 C。以 2000g 旋转 2 分钟。

[0142] 洗脱缓冲液 D (200 mM NaCl): 加入 10 ml 缓冲液 D。以 2000g 旋转 2 分钟。

[0143] 洗脱缓冲液 E (1 M NaCl): 加入 2 $\times$ 750 μl 缓冲液 E。以 2000g 旋转 1 分钟。
(重复 2X)

[0144] 在来自用缓冲液 E 洗脱的第一流分中收集去封闭的蛋白; 通过 Nanodrop 测量为 103 μg , 137 $\mu\text{g/ml}$ 。然后使用 NAP-10 柱 (GE Healthcare) 进行缓冲液交换, 并将 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% Tween 80、1M 甘油, pH 7.3、1 M NaCl 作为洗脱液。收集 1200 μl 包含所有物质的单一流分。

[0145] 向该流分中加入 90 μl 的 30 kDa PEG- 马来酰亚胺溶液。将反应混合物在 5 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 小时的时间, 在这之后, SDS-PAGE 凝胶分析显示 FVIII LC 条带的密度降低, 同时存在一条具有增加的分子量的新条带。

[0146] 然后将反应混合物用 42 ml 的缓冲液 (20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% Tween 80、1M 甘油, pH 7.3) 稀释, 装载到 Viva pure Q maxi M (强阴离子交换) 旋转柱上并用如上所述的缓冲液 B-E 洗脱。收集 67 μg 蛋白衍生物的量, 浓度 89 $\mu\text{g/ml}$, 750 μl , 将其装载到 Superdex 200 10/300 柱上并用组氨酸 (1.5 mg/ml)、 CaCl_2 (0.25 mg/

ml)、Tween 80 (0.1 mg/ml)、NaCl (18 mg/ml)、蔗糖 (3 mg/ml), pH 7 洗脱。收集在 9.5-12 分钟保留时间洗脱的物质, 提供单 PEG 化的 BDD-FVIII N8-Y1680C 突变体 35 μ g, 14 μ g/ml。流分的 SDS-PAGE 分析显示化合物的正确结构, 具有与 LC 连接的 PEG。

[0147] 使用上述方案, 制备了单 PEG 化的 BDD-FVIII Y1680C 化合物。在该化合物中, PEG 基团与 BDD-FVIII 中的 1680 位置连接。该特定修饰引起两种同时的效应: 降低的 vWF 结合和 PEG 介导的半寿期延长。

[0148] 实施例 4: 在显色测定中测量的 FVIII:C

[0149] 如下使用 Coatest SP 试剂 (Chromogenix), 在显色 FVIII 测定中评价 rFVIII 化合物的 FVIII 活性 (FVIII:C): 将 rFVIII 样品和 FVIII 标准品 (例如, 针对来自 NIBSC 的第 7 种国际 FVIII 标准品校准的纯化野生型 rFVIII) 在 Coatest 测定缓冲液 (50 mM Tris、150 mM NaCl、1 % BSA, pH 7.3, 具有防腐剂) 中稀释。将 50 μ l 的样品、标准品和缓冲液阴性对照一式两份加入到 96 孔微量滴定板 (Nunc) 中。将来自 Coatest SP 试剂盒的因子 IXa/因子 X 试剂、磷脂试剂和 CaCl_2 以 5:1:3 (体积:体积:体积) 混合并将 75 μ l 该混合物加入孔中。在室温孵育 15 分钟后, 加入 50 μ l 的因子 Xa 底物 S-2765/凝血酶抑制剂 I-2581 混合物, 并在加入 25 μ l 1 M 柠檬酸, pH 3 前将反应在室温孵育 10 分钟。在 Spectramax 微量滴定板读数仪 (Molecular Devices) 上测量 415 nm 的吸光度, 其中 620 nm 的吸光度用作参考波长。从所有样品中减去阴性对照值, 并通过针对 FVIII 浓度绘制的吸光度值的线性回归, 制作校正曲线。通过将样品的活性除以由 HPLC 确定的蛋白浓度, 计算比活性。通过将色谱图中对应于轻链的峰下面积积分并与在野生型未修饰 rFVIII 的平行分析 (其中通过氨基酸分析确定浓度) 中的相同峰的面积比较, 确定样品的浓度。表 1 中的数据显示, 对于 0-糖 PEG 化的 rFVIII 化合物, 维持 FVIII:C 比活性。

[0150] 实施例 5: 在二期凝固测定中测量的 FVIII:C

[0151] 在如下的一期 FVIII 凝固测定中进一步评估 rFVIII 化合物的 FVIII:C: 将 rFVIII 样品和 FVIII 标准品 (例如, 针对来自 NIBSC 的第 7 种国际 FVIII 标准品校准的纯化野生型 rFVIII) 在 HBS/BSA 缓冲液 (20 mM hepes、150 mM NaCl, pH 7.4, 具有 1 % BSA) 中稀释至大约 10 U/ml 后, 在包含 VWF (Dade Behring) 的 FVIII-缺乏的血浆中稀释 10 倍。随后将样品在 HBS/BSA 缓冲液中稀释。使用单因素程序, 在 ACL300R 或 ACL5000 仪器 (Instrumentation Laboratory) 上测量 APTT 凝固时间。将具有 VWF (Dade Behring) 的 FVIII-缺乏的血浆用作测定血浆, 并将 SynthASil (HemosIL™, Instrumentation Laboratory) 用作 PTT 试剂。在凝固仪器中, 将稀释的样品或标准品在 37 °C 与 FVIII-缺乏的血浆、PTT 试剂混合。测定氯化钙并通过浊度确定至凝固形成的时间。基于 FVIII 标准品稀释物的凝固形成时间的标准曲线, 计算样品中的 FVIII:C。表 1 中的数据显示凝固与显色活性之间的比。

[0152] 表 1 显色比活性和相对于显色活性的凝固活性

[0153]

糖 PEG 化的 N8 化合物	显色比活性 (IU/mg)	凝固活性与显色 活性之间的比
N8	11819 ± 727 (5)	1.02 ± 0.12 (3)
10K-PEG-[O]-N8	大约 8331 (1)	1.01 ± 0.10 (3)
40K-PEG-[O]-N8	9760 ± 886 (8)	0.78 ± 0.06 (3)
80K-PEG-[O]-N8	12129 ± 2643 (3)	0.45 ± 0.03 (3)
80K-PEG-[N]-N8	8819 ± 1683 (3)	0.46 (1)
(80K-PEG) ₂ -[N]-N8	3058 ± 318 (2)	0.32 (1)
(40K-PEG) ₂ -[N,O]-N8	10077 ± 1089 (2)	0.31 ± 0.05 (3)
40K-PEG-[O]-FVIII (Y1680F)	4901 (1)	1.58 (1)
30K-PEG-FVIII (Y1680C)	8736 ± 600 (2)	0.80 ± 0.05 (2)

[0154] 实施例 6: rFVIII 在 FVIII-和 vWF-缺乏的小鼠中的药代动力学

[0155] 在 FVIII- 缺乏的小鼠 (具有 c57bl/6 背景的 FVIII 外显子 16 敲除 (KO) 小鼠, 在 Taconic m&b 饲养) 中或在 vWF- 缺乏的小鼠 (具有 c57bl/6 背景的 vWF 外显子 4 + 5 KO 小鼠, 在 Charles River, Germany 饲养) 中评估 rfVIII 变体的药代动力学。vWF-KO 小鼠具有 13% 的正常 FVIII:C, 而 FVIII-KO 小鼠不具有可检测的 FVIII:C。使用具有大约 25g 重量和 16-28 周龄的雄性和雌性 (大约 1:1) 的混合物。小鼠在尾静脉接受 rFVIII 的单次静脉内注射 (280 iu/kg)。在给药后直至 64 小时的时间点, 使用无涂层毛细玻璃管从眼眶丛取血。从每只小鼠中取 3 种样品, 并在各时间点收集 2-4 个样品。将血液立即用柠檬酸钠稳定并在以 4000 × g 离心 5 分钟前在 4 倍体积的 FVIII coatest sp 缓冲液 (参见实施例 4) 中稀释。将获自稀释血液的血浆在干冰上冷冻并在 -80 °C 保存。在如实施例 4 中所述的显色测定中确定 FVIII:C。使用 winnonlin 专业版 4.1 软件, 通过非房室法 (NCA), 进行药代动力学分析。表 2 显示对药代动力学参数的估计: 半寿期 ($t^{1/2}$), 清除率 (cl) 和平均滞留时间 (MRT)。数据显示在 PEG 化时清除率降低但半寿期和平均滞留时间增加。

[0156] BDD-FVIII 在 vWF KO 小鼠中清除迅速 ($T^{1/2}$ 为 0.5 小时), 其符合 vWF 在循环中作为 FVIII 载体和稳定剂的普遍接受的假设。当用 10K-80K 糖 PEG 化的 BDD-FVIII 静脉内给予 vWF KO 小鼠时, 观察到终末 $T^{1/2}$ 的增加 (在 2.7-11 小时的范围内), 与 BDD-FVIII 相比, 对应于 5-22 倍增加 (表 2), 表明糖 PEG 化降低 FVIII 与 vWF 结合的重要性。这与 BDD-FVIII-PEG-vWF 结合获得的初步数据一致, 初步数据显示随着连接的 PEG 部分增加 BDD-FVIII 与 vWF 的结合降低。

[0157] 表 2 用不同尺寸的 PEG 进行糖 PEG 化的 FVIII 在静脉内给予 vWF KO 小鼠后基于 ELISA 的药代动力学参数估计

[0158]

化合物	FVIII 剂量 (IU/kg)	$T_{1/2}$ (小时)	CL (ml/h/kg)	MRT (小时)
N8	280	0.45-0.53	151-186	0.6
10K-PEG-[O]-N8	280	2.7	52.1	2.5
40K-PEG-[O]-N8	280	8.3	13.8	9.3
(40K-PEG) ₂ -[N,O]-N8	280	11	5.7	17.3
80K-PEG-[N]-N8	280	9.8	8.7	11.6

[0159] 令人感兴趣地,与FVIII KO小鼠相比,糖PEG化在vWF KO小鼠中几乎使BDD-FVIII的暴露概况“正常化”。连接的PEG基团越大,FVIII KO和vWF KO小鼠之间的药代动力学差异越小。随着PEG基团的尺寸增加,糖PEG化的BDD-FVIII变体的半寿期之间的比降低。这表明,与未修饰的BDD-FVIII相比,糖PEG化的变体的暴露较少依赖于vWF。当使用没有vWF结合的FVIII变体时,在FVIII KO小鼠中可观察到类似的趋势(表3)。

[0160] 表3用不同尺寸的PEG进行糖PEG化的FVIII在静脉内给予FVIII KO小鼠后基于活性的药代动力学参数估计

[0161]

化合物	FVIII 剂量 (IU/kg)	$T_{1/2}$ (小时)	CL ml/h/kg	MRT (小时)
40K-PEG-O-F8-500-Y1680F	280	6.13	12.30	8.06
N8	280	6.1-7.8	8.5-11	9.4-11
F8-500-Y1680F	280	0.48	217	0.85
F8-500-Y1680C-30K-PEG	240	4.36	34.9	4.73
40K-PEG-O-N8	280	12-16	3.0-4.4	16-22

[0162] 实施例7 没有结合vWF的能力的FVIII变体在FeCl₃诱导的A型血友病小鼠损伤模型中的止血作用

[0163] 将小鼠用氯胺酮(Ketaminol® Vet. (Intervet);100 mg/kg)、甲苯噻嗪(Narcoxy1® Vet. 注射液(Intervet);5.6 mg/kg)和阿托品(硫酸阿托品(Phoenix Pharma);0.3 mg/kg)的混合物麻醉,并放置在电热垫(37℃)上来维持体温。接着暴露颈动脉并在动脉周围放置0.5PSB纳米探针(Nanoprobe)。在诱导FeCl₃损伤前5分钟,将测试化合物注射到侧面尾静脉。通过将短暂浸泡在10% FeCl₃溶液中的滤纸(2×5 mm)放置在邻近探针的动脉周围并在3分钟后移除,诱导FeCl₃损伤。将动脉用0.9% NaCl洗涤三次并最后应用Surgilube(一种声音耦合器)以便排出流动探针中的空气并在移除FeCl₃饱和的滤纸后获得优化的血流量测量。如果最初血流量太低(低于0.4 ml/min)或者如果在移除FeCl₃后不能测量流量,那么排除小鼠。在移除FeCl₃饱和的滤纸后,使用来自AD instruments的软件Chart5(版本5.5.5.20),记录血流量(ml/min)25分钟。

[0164] 数据分析

[0165] 除非另有说明,数据以平均值±SEM呈现,并使用GraphPad Prism 版本5(La Jolla, CA, USA)分析。使用单向ANOVA比较两种化合物的作用后,使用Tukey测试用于多

重比较。P < 0.05 被认为统计上显著。

[0166] 结果

[0167] 在 FeCl₃ 损伤后, 在 3.3 分钟内阻塞具有正常功能的凝血系统的小鼠 (C57BL/6NTac) 中的所有血管, 其中平均至阻塞时间为 2.4 ± 0.2 分钟 (n=6; 图 1)。在 25 分钟观察期内, 未阻塞 FVIII 敲除小鼠 (n=6)。NNC 0129-0000-9105 剂量依赖地减少至阻塞时间 (NNC 0129-0000-9105 对应于: 在截短的 B- 结构域中的 O- 连接聚糖上的 F8-500 Y1680F 40 kDa-PEGylated)。在用 5 或 10 IU/kg 处理后, 与溶媒处理的动物相比, 至阻塞时间显著较短。Advate® 观察到相似的作用, Advate® 和 NNC 0129-0000-9105 的作用之间无统计学差异 (图 1)。

[0168] 实施例 8 没有结合 vWF 的能力的 FVIII 变体在 A 型血友病小鼠尾巴事务性 (transverse) 出血模型中的止血作用

[0169] 将小鼠用戊巴比妥 (100 mg/kg, 腹膜内; Nomocon, Roskilde, Denmark) 麻醉, 并放置在电热垫上来维持体温。通过用锋利的解剖刀切除 4 mm 的尾巴尖, 诱导出血。在切除前 10 分钟, 将尾巴放在包含 14 mL 盐水 (37 °C) 中的试管中, 并在切除前 5 分钟, 以 5 mL/kg 的体积通过尾静脉注射给予测试化合物 (20 或 280 U/kg)。将 A 型血友病小鼠和具有正常凝血的动物用相同体积的溶媒处理。使动物安乐死后, 在 30 分钟的时间内收集血液。通过定量血红蛋白的量确定失血。因此, 通过在 4000× 离心 5 分钟分离红细胞。丢弃上清液并将细胞用血红蛋白试剂 (ABX Lysebio; HORIBA, ABX, Roedovre, Denmark) 裂解。通过在 4000 × g 离心 5 分钟移除细胞碎片。在 550 nm 对样品进行读数并从标准曲线中确定血红蛋白的总量 (血红蛋白标准品; J. T. Baker 3074; Bie & Berntsen, Roedovre, Denmark)。

[0170] 数据分析

[0171] 除非另有说明, 数据以平均值 ± SEM 呈现, 并使用 GraphPad Prism 版本 5 (La Jolla, CA, USA) 分析。使用单向 ANOVA 比较两种化合物的作用后, 使用 Tukey 测试用于多重比较。P < 0.05 被认为统计上显著。

[0172] 结果

[0173] 之前已彻底研究了 Advate® 在 FVIII 敲除小鼠尾巴出血模型中的剂量反应关系 (Documentum ObjectID: 0900c76e80e3e7a5)。200 IU/kg Advate® 使失血和出血时间两者正常化, 对于失血和出血时间的 ED₅₀ 值分别是 39 和 28 IU/kg。为了测试 NNC 0129-0000-9105 的止血作用, 将 20 和 280 IU/kg 与相同剂量的 Advate® 的作用比较。与溶媒处理动物相比, NNC0129-0000-9105 (20 和 280 IU/kg) 显著减少失血和出血时间 (图 2)。在 Advate® 和 NNC 0129-0000-9105 的作用之间未观察到差异。

[0174] 20 IU/kg 的 Advate® 的作用比根据之前研究 (Documentum ObjectID: 0900c76e80e3e7a5) 预期的更明显。这最可能是由于 Advate® 的实际给予活性和一般变化在尾巴出血模型中的不同引起的联合作用。因此, 在两种研究中的预期剂量为 20 IU/kg, 然而, 在给予溶液中的 FVIII 活性 (Chromogenix®) 分析显示, 活性比在当前和之前研究中所预期的分别高 20 % (ELN15876-199) 和低 15%。然而这不能改变研究的总结论, NNC 0129-0000-9105 和 Advate® 具有可比较的作用, 因为在当前研究中给予两种化合物呈现可比较的 FVIII 活性。

[0175] 实施例 9 产生不与 vWF 结合的具有血小板结合性质的 FVIII 变体

[0176] 使用 SMART[™] RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech, Ca), 从分离自表达 AP3 抗体的杂交瘤细胞的 RNA 中扩增抗 -GPIIa/IIIB 抗体 AP3 的重链和轻链可变区。用于扩增两条 AP3 链的可变区的引物是:

[0177] 重链:

[0178] 通用引物混合物 A (Clontech, CA):

[0179] 长的 (0.4 μ M):

[0180] 5' - ctaatacgactcactatagggcAAGCAGTGGTATCACGCAGAGT - 3' (SEQ ID NO: 5)

[0181] 短的 (2 μ M):

[0182] 5' - ctaatacgactcactatagggc - 3' (SEQ ID NO: 6)

[0183] 引物 69 (10 μ M)

[0184] 5' - gctctagactaacactcattcctgttgagctcttg-3' (SEQ ID NO: 7)

[0185] 轻链

[0186] 通用引物混合物 A (Clontech:

[0187] 长的 (0.4 μ M):

[0188] 5' - ctaatacgactcactatagggcAAGCAGTGGTATCACGCAGAGT - 3' (SEQ ID NO: 8)

[0189] 短的 (2 μ M):

[0190] 5' - ctaatacgactcactatagggc - 3' (SEQ ID NO: 9)

[0191] 引物 312 (10 μ M)

[0192] 5' - gtctaccacaacacagtgac-3' (SEQ ID NO: 10)

[0193] 使用用于测序的 Zero Blunt[®] TOP0[®] PCR 克隆试剂盒 (- 目录号 K287520, 来自 Invitrogen, CA) 将可变区克隆到 pCR4 载体中。随后在基于 pTT5 的表达载体中将可变区亚克隆到鼠 IgG1 框架中。将编码全长 AP3 抗体的两条链在 Hek293 6E 细胞中瞬时表达。通过 FACS 分析证实全长抗体与静息血小板的结合。

[0194] 基于编码 AP3 抗体轻链和重链可变区的 DNA 序列, 产生 AP3 抗体的两条单链抗体形式 (AP3 LC-HC scFV 和 AP3 HC-LC scFV) (SEQ 1 和 SEQ 2)。随后将 AP3 抗体的两条单链形式亚克隆到基于 pTT5 的表达载体中。通过 FACS 分析证实两条单链抗体与静息血小板的 GPIIa/IIIB 的结合。

[0195] 使用标准分子生物学方法, 通过将 AP3 LC-HC scFV 或 AP3 HC-LC scFV 插入到 BDD FVIII 的氨基酸 R761 和 Q1686 之间 (分别是 SEQ 3 和 SEQ 4), 在 AP3 LC-HC scFV 或 AP3 HC-LC scFV 与 B- 结构域缺失 -a3 结构域缺失的 FVIII 之间制备融合蛋白。

[0196] SEQ ID NO 11: AP3-LC-HC scFV-FLAG

[0197]

```
DIVMTQAAPSVPVTPGESVSI SCRSSRSLLHSNGNTYLCWFLQRPQGSPQLLIYRMSNLAS  
GVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIKRGGGGSGGG  
GSGGGGSQVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYFTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYP  
GGGYNKYNENFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREYGNFYDYAMDSWQQ  
GTSVTVSSDYKDDDDK*
```

[0198] SEQ ID NO 12: AP3-HC-LC scFV-FLAG

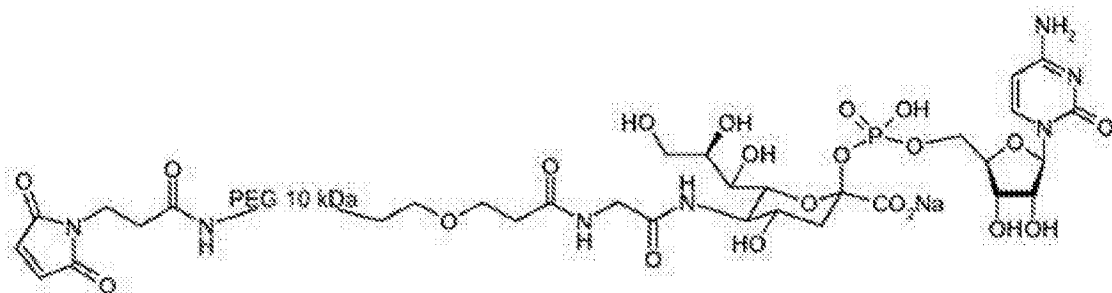
[0199]

QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYNKY
 NENFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREYGNVDYAMDSWGQGTSTVTVSS
 GGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQAAPSPVPTPGESVSISCRSSRSLHNSGNTYLCWFLQR
 PGQSPQLLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGS
 GTKLEIKRDYKDDDDK*

[0200] 基于这些构建体,使用标准分子生物学方法,可产生变体 AP3 scFv LC-HC C34S S248C。

[0201] N-((3-(ω -(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酰基氨基)10 kDa PEG基)丙酰基氨基)乙酰基)-O²-[5']胞苷酰- ξ -神经氨酸的产生

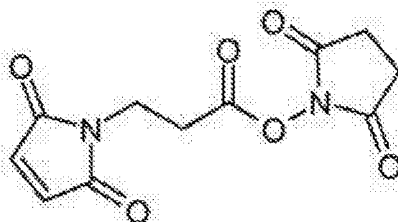
[0202]



[0203] 步骤 1 :

[0204] 3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯

[0205]



[0206] 将 3-马来酰亚胺基丙酸 (1.0 g, 5.9 mmol) 溶解在四氢呋喃 (20 ml) 中。随后加入 2-琥珀酰亚胺基-1,1,3,3-四甲基脲鎓四氟硼酸盐 (TSTU, 2.14 g, 7.1 mmol) 和乙基二异丙胺 (1.24 ml, 7.1 mmol)。加入 N,N-二甲基甲酰胺 (5 ml)。当变得缓慢时,将反应混合物在室温搅拌。将混合物搅拌 2 分钟。加入 N,N-二甲基甲酰胺 (5 ml)。将混合物在室温搅拌 2.5 小时。将其用二氯甲烷 (150 ml) 稀释并随后用 10 % 硫酸氢钠水溶液 (150 ml)、硫酸氢钠饱和水溶液 (150 ml) 和水 (150 ml) 洗涤。将其在硫酸镁上干燥。在真空中移除溶剂。从乙酸乙酯中重结晶粗产物以提供 1.20 g 3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯。

[0207] MS :m/z = 289, [M+Na]⁺要求 :289[0208] ¹H-NMR (CDCl₃) δ 2.82 (m, 4 H) ;3.02 (t, 2 H) ;3.94 (t, 2 H), 6.73 (s, 2 H)。

[0209] 步骤 2 :

[0210] 将 N-((3-(ω -氨基 10 kDa PEG 基)丙酰基氨基)乙酰基)-O²-[5']胞苷酰- ξ -神经氨酸 (100 mg, 0.009 mmol) 溶解在四氢呋喃 (2 ml) 和二氯甲烷 (10 ml) 的混合物中。加入 3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯 (50 mg,

0.18 mmol) 的二氯甲烷 (3 ml) 溶液。加入乙基二异丙胺 (0.005 ml, 0.028 mmol)。将反应混合物在室温搅拌 16 小时。加入二氯甲烷 (2 ml) 和乙基二异丙胺 (0.5 ml)。加入氨基甲基化的聚苯乙烯树脂 (在例如 Novabiochem 市售, 装载 0.85 mmol/g, 438 mg, 0.372 mmol)。将混合物在室温缓慢搅拌 1 小时。通过过滤移除树脂。在具有 25 °C 浴温度的真空中移除溶剂。将残留物溶解在二氯甲烷 (4 ml) 中。加入乙醚 (200 ml)。为了使形成的沉淀变老, 将混合物在室温放置 2 小时。通过过滤分离沉淀并在真空中干燥以提供 38mg 标题化合物。在 DMSO-d₆ 中的 ¹H-NMR 谱显示马来酰亚胺基的存在。

[0211] AP3 scFv LC-HC C34S S248C 与 FVIII (NNC 0129-0000-3270) 的缀合

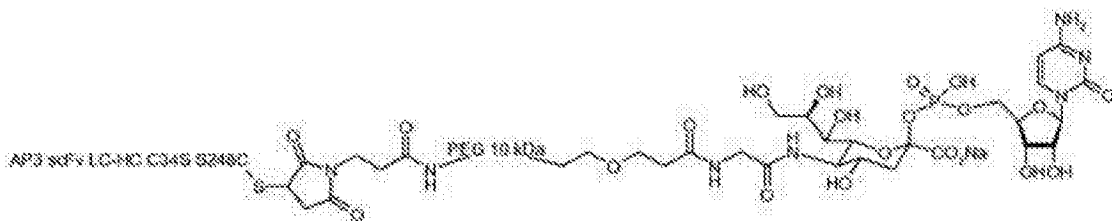
[0212]



[0213] 步骤 1 :

[0214] N-((3-(ω-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酰基氨基)10 kDa PEG基)丙酰基氨基)乙酰基)-O²-[5']胞苷酰-ξ-神经氨酸与 AP3 scFV C24S S248C 的 Cys 248 的连接

[0215]



[0216] 将三(2-羧基乙基)膦盐酸盐 (0.40 mg) 的缓冲液 (由 20 mM 咪唑、10 mM CaCl₂、0.02% Tween 80、1 M 甘油组成, 已调节至 pH 7.35) (0.40 ml) 溶液加入到浓度为 0.53 mg/ml 的 AP3 scFv LC-HC C34S S248C (在其 C 端具有 Flag 标签, 并具有与位置 248 上的半胱氨酸通过 S-S 桥连接的额外 Cys) 溶液 (100 mM HEPES 和 150 mM NaCl, 已调节至 pH 7.5) (4 ml, 2.12 mg, 76 nmol) 中。将反应混合物在 20 °C 轻摇。将混合物分成两部分。将每一部分加入到 PD-10 柱 (GE-Healthcare) 上, 使用已调节至 pH 7.0 的 25 mM HEPES 缓冲液。将柱的洗脱物合并 (每一部分 3.5 ml)。

[0217] 将 N-((3-(ω-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酰基氨基)10 kDa PEG基)丙酰基氨基)乙酰基)-O²-[5']胞苷酰-ξ-神经氨酸 (3.3 mg, 305 nmol) 的缓冲液 (25 mM HEPES, 已调节至 pH 7.0) (0.43 ml) 溶液加入到蛋白溶液中。将反应混合物在 20 °C 轻摇 4 小时。将混合物放置在具有 10 kDa 截止值的 Amicon 超速离心设备中。使其在 10 °C 以 4000 rpm 经受超速离心 10 分钟。将混合物在冰箱中保存直至纯化。

[0218] 为了纯化, 融化混合物。以 1 ml/min 的流速使用具有床尺寸直径为 16 mm 且长度为 60 cm 的 Superdex 200 凝胶, 并使用已调节至 pH 8.0 的 25 mM TRIS 和 150 mM NaCl 的缓冲液, 使其经受尺寸排阻色谱。将包含所需产物的流分合并以提供 1.61 mg 所需蛋白。SDS-PAGE 凝胶与预期一致。

[0219] 步骤 2 :

[0220] 将 B- 结构域缺失的 FVIII (其在重链的 C 端上具有残留的 B- 结构域序列 SFSQNSRHPSQNPPVLKRHR) (1 mg, 5.64 mmol) 的缓冲液 (由 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、150 mM NaCl、0.02% Tween 80 和 1 M 甘油组成, 已调节至 pH 7.35) (0.018 ml) 溶液放置在具有 10 kDa 截止值的 Amicon 超速离心设备中。加入 N-((3-(ω -(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酰基氨基)10 kDa PEG 基)丙酰基氨基)乙酰基)-O²-[5'] 胞苷酰- ξ -神经氨酸与 AP3 scFv C24S S248C 的 Cys 248 的连接产物 (1.29 mg, 34 nmol) 在 25 mM TRIS 和 150 mM NaCl 溶液 (已调节至 pH 8.0) (0.680 ml) 中的溶液, 并随后加入已调节至 pH 6.07 的由 20 mM 组氨酸、10 mM CaCl_2 、10 % 甘油、0.02% Tween80、500 mM NaCl 组成的缓冲液 (3 ml)。使混合物在 10 °C 以 4000 rpm 经受超速离心 20 分钟。残余体积对于 FVIII 是 0.800 ml 或 1.25 mg/ml。随后加入来自产豚节杆菌的唾液酸酶溶液 (0.43 mg/ml, 302 U/mg, 0.0049 ml, 0.645 U) 和 ST3-Gal-I 溶液 (2.5 mg/ml, 0.105 mg, 0.042 ml)。将反应混合物在 32 °C 轻摇 1 分钟, 并之后在 32 °C 放置 18 小时。将其在冰箱中保存直至纯化。

[0221] 将反应混合物融化。将其分为两部分, 以 0.30 ml/min 的流速使用具有床尺寸直径为 10 mm 且长度为 300 mm 的 Superose 6 凝胶, 并使用已调节至 pH 7.35 的由 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% Tween80、150 mM NaCl 和 1 M 甘油组成的缓冲液作为洗脱液, 使每一部分经受尺寸排阻色谱。将包含所需产物的两次运行的所有流分合并。将它们放置在具有 10 kDa 截止值的 Amicon 超速离心设备中并使其在 10 °C 以 4000 rpm 经受超速离心 18 分钟。

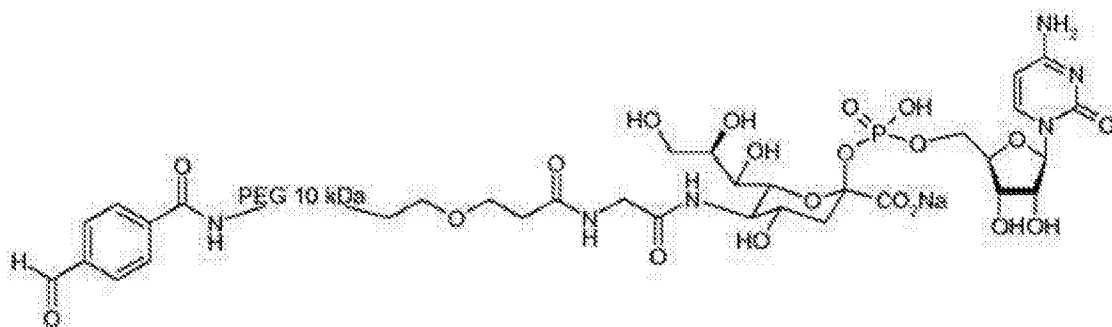
[0222] 随后加入 CMP-N-乙酰神经氨酸 (CMP NeuNac, 1.5 mg, 2597 nmol) 的缓冲液 (由 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% Tween80、150 mM NaCl 和 1 M 甘油组成, 已调节至 pH 7.35) (0.100 ml) 溶液和 0.33 mg/ml 的 ST3Gal-III (0.10 ml, 0.033 mg) 溶液。将反应混合物以 300 rpm 轻摇, 并之后在冰箱保存直至纯化。

[0223] 将反应混合物分成两部分。将每一部分通过 0.00045 mm 过滤器过滤。在用 CNBr 活化后, 将它们装载到具有床尺寸直径为 5 mm 且长度为 5 cm 的已连接 F25 抗体的琼脂糖柱上。F25 是抗 FVIII 的已知抗体。装载后, 将柱用已调节至 pH 7.35 的由 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% Tween80、150 mM NaCl 和 1 M 甘油组成的缓冲液以 0.6 ml/min 的流速洗涤 3 CV。之后将其用已调节至 pH 7.35 的由 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% Tween80 和 650 mM NaCl 组成的缓冲液以 0.6 ml/min 的流速洗涤 3 CV。最后, 将化合物用已调节至 pH 7.35 的缓冲液 (由 50%v/v 乙二醇/水溶液中的 20 mM 咪唑、10 mM CaCl_2 、0.02% Tween80、2.5M NaCl 组成) 以 0.1 ml/min 的流速在 6 CV 内洗脱。将包含所需产物的两次运行的流分合并。将它们放置在具有 10 kDa 截止值的 Amicon 超速离心设备中。使其在 10 °C 以 4000 rpm 经受超速离心 14 分钟。使用已调节至 pH 7 的由 10 mM 组氨酸、1.7 mM CaCl_2 、0.01% Tween80、0.3 M NaCl、8.8 mM 蔗糖组成的缓冲液, 以 0.50 ml/min 的流速在具有床尺寸直径为 10 mm 且长度为 30 cm 的 Superose 6 材料上, 使剩余的溶液经受尺寸排阻色谱。将包含所需合适纯度的化合物流分合并, 并将它们放置在具有 10 kDa 截止值的 Amicon 超速离心设备中。使其在 9 °C 以 4000 rpm 经受超速离心 12 分钟。使用 14.46 的摩尔吸光度, 发现产量 0.0176 mg 的 AP3 scFv LC-HC C34S S248C 与 FVIII 的缀合物。在非还原条件下的 SDS-PAGE 凝胶分析与预期一致。

[0224] N-((3-(ω -(4-甲酰基苯甲酰基氨基)10 kDa PEG 基)丙酰基氨基)乙酰

基)-O²-[5']胞苷酰-ξ-神经氨酸的产生

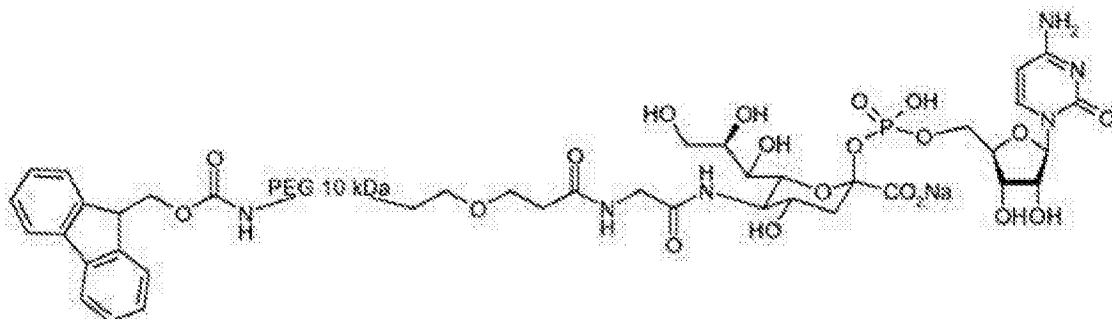
[0225]



[0226] 步骤 1

[0227] N-((3-(ω-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)10 kDa PEG 基)丙酰基氨基)乙酰基)-O²-[5']胞苷酰-ξ-神经氨酸 (NNC 0129-0000-3219)

[0228]



[0229] 将N-(氨基乙酰基)-O²-[5']胞苷酰-ξ-神经氨酸 (18 mg, 0.029 mmol) 溶解在已调节至 pH 8.9 的由 50 mM TRIS 组成的缓冲液 (4 ml) 中。检查当前 pH 并通过加入 0.1 N 盐酸调节至 pH 8.9。加入 THF (16 ml)。加入 3-(ω-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)10 kDa PEG 基)丙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯 (例如在 Rapp Polymere GmbH 市售, 总计 200 mg, 0.019 mmol) 最终量的大约一半。将反应混合物在室温搅拌。1 小时后, 加入 3-(ω-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)10 kDa PEG 基)丙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯的另一半。将反应混合物在室温搅拌 16 小时。在具有 25 °C 的浴温度的真空中移除 THF。将剩余的混合物过滤, 并使用 25 mM 碳酸氢铵缓冲液, 以 7 ml/min 的流速使用具有床尺寸直径为 26 mm 且长度为 10 cm 的 G25 凝胶, 使其经受尺寸排阻色谱。将包含所需化合物的流分合并, 并冻干以提供 453 mg 包含 N-((3-(ω-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)10 kDa PEG 基)丙酰基氨基)乙酰基)-O²-[5']胞苷酰-ξ-神经氨酸的物质。

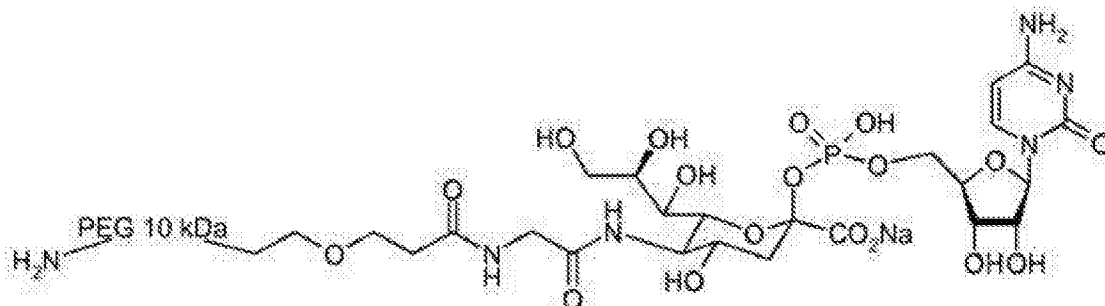
[0230] 在 DMSO-d₆ 中进行的 ¹H-NMR 谱显示胞苷酰部分以及芴基-9-基甲氧基羰基部分的存在。将该物质在冰箱中保存。

[0231] 用 1g 3-(ω-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)10 kDa PEG 基)丙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯和 90 mg O²-[5']胞苷酰-ξ-神经氨酸重复该反应。使用 30-50% 的混合物 (由 50 mM 碳酸氢铵水溶液中的 5 mM 碳酸氢铵水性乙腈溶液组成) 梯度, 在直径为 2 cm 的 HPLC C4 柱上进行纯化。将包含所需化合物的流分收集并冻干以提供 288 mg 所需的化合物。¹H-NMR 谱对应于在上文所述的实验中发现的 ¹H-NMR 谱。

[0232] 步骤 2 :

[0233] N-((3-(ω -氨基 10 kDa PEG 基)丙酰基氨基)乙酰基)-O²-[5'] 胞苷酰- ξ -神经氨酸 (NNC 0129-0000-3227)

[0234]

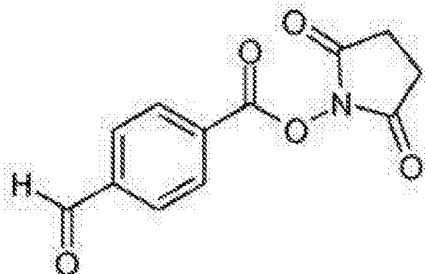


[0235] 将N-((3-(ω -(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)10 kDa PEG 基)丙酰基氨基)乙酰基)-O²-[5'] 胞苷酰- ξ -神经氨酸 (453 mg) 溶解在N,N-二甲基甲酰胺 (12 ml) 中。加入哌啶 (1.25 ml)。将透明溶液在室温搅拌 20 分钟。加入乙醚 (200 ml)。为了使形成的沉淀变老,将混合物在室温放置 1.5 小时。通过过滤分离沉淀。将其溶解在二氯甲烷 (4 ml) 中。加入乙基二异丙胺 (1 ml)。加入乙醚 (250 ml)。为了使形成的沉淀变老,将混合物在室温放置 16 小时。通过过滤分离沉淀并在真空中干燥。在DMSO-d₆中的¹H-NMR谱显示无9H-芴-9-基甲氧基羰基的信号,然而可发现分配给胞苷酰部分的信号。将该物质在冰箱中保存。

[0236] 步骤 3:

[0237] 4-甲酰基苯甲酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯

[0238]



[0239] 将三乙基胺 (2.04 ml, 14.65 mmol) 和 2-琥珀酰亚氨基-1,1,3,3-四甲基脲鎓四氟硼酸盐 (TSTU, 4.44g, 14.65 mmol) 依次加入到 4-甲酰基苯甲酸 (2.0 g, 13.3 mmol) 的N,N-二甲基甲酰胺 (30 ml) 溶液中。将反应混合物在室温搅拌 16 小时。将其用乙酸乙酯 (150 ml) 稀释并用 10% 硫酸氢钠水溶液 (100 ml) 洗涤。将水相用乙酸乙酯 (2 × 30 ml) 萃取。将合并的有机层用盐水 (50 ml) 和水 (50 ml) 的混合物洗涤。将合并的有机层在硫酸镁上干燥。在真空中移除溶剂。从乙酸乙酯中重结晶粗产物以提供 1.89 g 4-甲酰基苯甲酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯。

[0240] ¹H-NMR (CDCl₃)。δ 2.95 (s, 4 H); 8.04 (d, 2 H), 8.32 (d, 2 H); 10.15 (s, 1 H)。

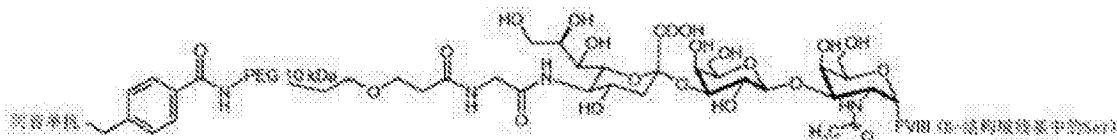
[0241] 步骤 4:

[0242] 将N-((3-(ω -氨基 10 kDa PEG 基)丙酰基氨基)乙酰基)-O²-[5'] 胞苷酰- ξ -神经氨酸 (42 mg, 0.004 mmol) 溶解在二氯甲烷 (2 ml) 中。将乙基二异丙胺 (0.002 ml, 0.012 mmol) 加入到溶液中。加入 4-甲酰基苯甲酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯 (19.32

mg, 0.078 mmol) 的二氯甲烷 (0.5 ml) 溶液。将反应混合物在室温搅拌 16 小时。在具有 25 °C 浴温度的真空中移除溶剂。将残留物悬浮在 25 mM 碳酸氢铵水溶液 (15 ml) 中。通过过滤移除不溶性物质。将其分为 5 部分。使用 25 mM 碳酸氢铵缓冲液, 用 7 ml/min 的流速在直径为 26 mm 且长度为 10 cm 的柱上使用 G25 使每一部分经受尺寸排阻色谱。将包含所需物质的所有流分合并并冻干。在 DMSO-d₆ 中的 ¹H-NMR 谱显示醛部分和胞苷酰部分两者的存在。将获得的物质在冰箱中保存。

[0243] 阿昔单抗与 FVIII 在 O-聚糖上的缀合 (NNC 0129-0000-3279)

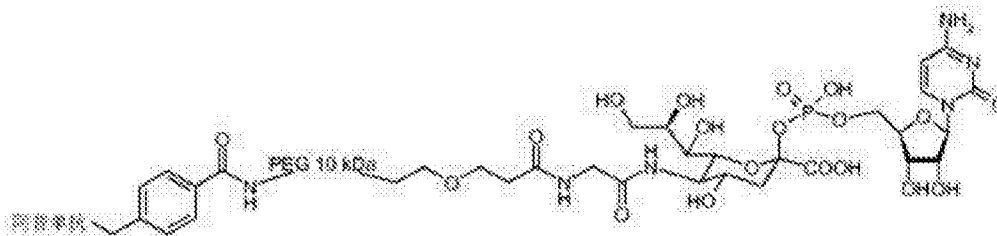
[0244]



[0245] 步骤 1 :

[0246] N-((3-(ω-(4-甲酰基苯甲酰基氨基)10 kDa PEG 基)丙酰基氨基)乙酰基)-O²-[5'] 胞苷酰-ξ-神经氨酸与阿昔单抗的一个 N 端缀合

[0247]



[0248] 将市售阿昔单抗溶液 (ProReo, 10 mg, 215 nmol, 在 2 mg/ml 商业缓冲溶液中) 放置在具有 10 kDa 截止值的 Amicon 超速离心设备中。加入已调节至 pH 7.4 的由 25 mM HEPES 组成的缓冲液 (5 ml)。在 10 °C 以 4000 rpm 进行超速离心 10 分钟。加入已调节至 pH 7.4 的由 25 mM HEPES 组成的缓冲液 (10 ml)。在 10 °C 以 4000 rpm 进行超速离心 10 分钟。加入已调节至 pH 7.4 的由 25 mM HEPES 组成的缓冲液 (10 ml)。在 10 °C 以 4000 rpm 进行超速离心 10 分钟。将 0.65 ml 剩余溶液放置在塑料反应器中。加入已调节至 pH 7.4 的由 25 mM HEPES 组成的缓冲液 (3.85 ml)。加入 N-((3-(ω-(4-甲酰基苯甲酰基氨基)10 kDa PEG 基)丙酰基氨基)乙酰基)-O²-[5'] 胞苷酰-ξ-神经氨酸 (14 mg, 1290 nmol) 的缓冲液 (由 25 mM HEPES 组成, 已调节至 pH 7.0) (1.5 ml) 溶液。将反应混合物在 20 °C 以 300 rpm 轻摇 3 分钟。加入新鲜制备的 1.0 M 氰基硼氢钠水 (0.025 ml) 溶液。将反应混合物在 20 °C 以 300 rpm 轻摇。1 小时后, 加入另一部分氰基硼氢钠溶液 (0.025 ml)。1 小时后, 加入另一部分氰基硼氢钠溶液 (0.025 ml)。1 小时后, 加入另一部分氰基硼氢钠溶液。将溶液在 20 °C 以 300 rpm 轻摇 16 小时。将反应混合物放置在具有 10 kDa 截止值的 Amicon 超速离心设备中。使其在 18 °C 以 4000 rpm 经受超速离心 10 分钟。将 0.360 ml 的剩余溶液过滤, 并使用已调节至 pH 8.0 的 25 mM TRIS、150 mM NaCl 的缓冲液作为洗脱液, 以 1 ml/min 的流速在具有床尺寸为 16 mm × 60 cm 的 Superdex200 凝胶上使其经受尺寸排阻色谱。将包含所需产物的流分合并为两批。将每一批放置在具有 10 kDa 截止值的 Amicon 超速离心设备中。使其在 10 °C 以 4000 rpm 经受超速离心 10 分钟, 分别产生 2.67 mg 和 3.27 mg。在 Nanodrop[®] 分光光度计上使用 10.94 的摩尔吸光度用于定量。

通过 SDS-PAGE 对产物的分析与对 N-((3-(ω -(4-甲酰基苯甲酰基氨基)10 kDa PEG 基)丙酰基氨基)乙酰基)-O²-[5'] 胞苷酰- ξ -神经氨酸与阿昔单抗的一个 N 端缀合物的预期一致。

[0249] 步骤 2:

[0250] 阿昔单抗与 FVIII 的 O-聚糖的缀合

[0251] 将已调节至 pH 7.35 的由 20 mM 组氨酸、10 mM CaCl₂、150 mM NaCl、0.02% Tween80 和 1 M 甘油组成的缓冲液 (2.5 ml) 加入到 B-结构域缺失的 FVIII (其在重链的 C 端上具有残留的 B-结构域序列 SFSQNSRHPSQNPPVLKRHR) (5.7 mg/ml, 1 mg, 5.6 nmol) 的缓冲液 (由 20 mM 咪唑、10 mM CaCl₂、150 mM NaCl、0.02% Tween 80 和 1 M 甘油组成, 已调节至 pH 7.35) 溶液中。加入 N-((3-(ω -(4-甲酰基苯甲酰基氨基)10 kDa PEG 基)丙酰基氨基)乙酰基)-O²-[5'] 胞苷酰- ξ -神经氨酸与阿昔单抗的一个 N 端的缀合物 (2.3 mg, 39.5 nmol) 的缓冲液 (由 25 mM TRIS、150 mM NaCl 组成, 已调节至 pH 8.0) (0.323 ml) 溶液。将溶液放置在具有 10 kDa 截止值的 Amicon 超速离心设备中。使其在 10 °C 以 4000 rpm 经受超速离心 20 分钟。加入已调节至 pH 7.35 的由 20 mM 组氨酸、10 mM CaCl₂、150 mM NaCl、0.02% Tween80 和 1 M 甘油组成的缓冲液 (2 ml)。使溶液在 10 °C 以 4000 rpm 经受超速离心 30 分钟, 剩下具有体积为 1.4 ml 的溶液。随后加入产脉节杆菌的唾液酸酶溶液 (0.4 mg/ml, 242 U/mg, 0.0066 ml) 和 ST3Gal-I 溶液 (2.5 mg/ml, 0.042 ml)。将反应混合物在 32 °C 轻摇 15 分钟。然后将反应混合物在 32 °C 静置 20.5 小时。将反应混合物放置在具有 10 kDa 截止值的 Amicon 超速离心设备中。使其在 10 °C 以 4000 rpm 经受超速离心 15 分钟。使 0.300 ml 的剩余溶液经受尺寸排阻色谱, 以 0.5 ml/min 的流速使用具有床尺寸为 10 mm $\times$ 300 mm 的 Superose 6 材料, 并使用已调节至 pH 7 的由 10 mM 组氨酸、1.7 mM CaCl₂、0.01% Tween80、0.3 M NaCl、8.8 mM 蔗糖组成的缓冲液作为洗脱液。将包含所需产物的流分合并, 并放置在具有 10 kDa 截止值的 Amicon 超速离心设备中。加入已调节至 pH 6.07 的由 20 mM 组氨酸、10 mM CaCl₂、10% 甘油、0.02% Tween80、500 mM NaCl 组成的缓冲液 (2.5 ml)。使溶液在 10 °C 以 4000 rpm 经受超速离心 15 分钟。加入已调节至 pH 6.07 的由 20 mM 组氨酸、10 mM CaCl₂、10% 甘油、0.02% Tween80、500 mM NaCl 组成的缓冲液 (1.5 ml)。使溶液在 10 °C 以 4000 rpm 经受超速离心 15 分钟。将 0.220 ml 的剩余溶液放置在塑料反应器中。加入市售 CMP NeuNAc (1.73 mg, 2800 nmol) 的缓冲液 (由 20 mM 组氨酸、10 mM CaCl₂、10% 甘油、0.02% Tween80、500 mM NaCl, 已调节至 pH 6.07) (0.173 ml) 溶液。将反应混合物在 32 °C 以 300 rpm 轻摇 1 小时。以 0.5 ml/min 的流速使用具有床尺寸为 10 mm $\times$ 300 mm 的 Superose 6 材料, 并使用已调节至 pH 7 的由 10 mM 组氨酸、1.7 mM CaCl₂、0.01% Tween80、0.3 M NaCl、8.8 mM 蔗糖组成的缓冲液作为洗脱液, 使其经受尺寸排阻色谱。将包含所需产物的流分合并, 并放置在具有 10 kDa 截止值的 Amicon 超速离心设备中。使合并物在 10 °C 以 4000 rpm 经受超速离心 5 分钟以提供 0.275 ml 的 0.0358 mg 阿昔单抗与 FVIII 在 O-聚糖上的缀合产物的溶液。在 Nanodrop[®] 分光光度计上使用 13.15 的摩尔吸光度用于定量。SDS-PAGE 分析与对阿昔单抗与 FVIII 在 O-聚糖上的缀合产物的 SDS-PAGE 预期一致。

[0001]

CPCH1261837P

序 列 表

<110> 诺沃—诺迪斯克有限公司

<120> 具有降低的 VWF 结合的因子 VIII 分子

<130> 7887.204-W0

<160> 4

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 2332

<212> PRT

<213> 人(homo sapiens)

<400> 1

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
35 40 45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
50 55 60

Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
65 70 75 80

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val
85 90 95

[0002]

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala
100 105 110

Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val
115 120 125

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn
130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
145 150 155 160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
165 170 175

Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
180 185 190

His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp
195 200 205

His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
210 215 220

Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg
225 230 235 240

Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
245 250 255

Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
260 265 270

[0003]

Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile
275 280 285

Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
290 295 300

Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
305 310 315 320

Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
325 330 335

Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
340 345 350

Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
355 360 365

Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
370 375 380

Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu
385 390 395 400

Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
405 410 415

Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
420 425 430

Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
435 440 445

[0004]

Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
450 455 460

Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
465 470 475 480

Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
485 490 495

His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
500 505 510

Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
515 520 525

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
530 535 540

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
545 550 555 560

Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
565 570 575

Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
580 585 590

Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
595 600 605

Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
610 615 620

[0005]

Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
625 630 635 640

Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
645 650 655

Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
660 665 670

Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
675 680 685

Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
690 695 700

Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
705 710 715 720

Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
725 730 735

Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Arg
740 745 750

Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys
755 760 765

Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn
770 775 780

Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro
785 790 795 800

[0006]

His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe
805 810 815

Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser
820 825 830

Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val
835 840 845

Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly
850 855 860

Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser
865 870 875 880

Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala
885 890 895

Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His
900 905 910

Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro
915 920 925

Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp
930 935 940

Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp
945 950 955 960

Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys
965 970 975

[0007]

Arg	Ala	His	Gly	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Lys	Asp	Asn	Ala	Leu	Phe	Lys
						980			985				990		

Val	Ser	Ile	Ser	Leu	Leu	Lys	Thr	Asn	Lys	Thr	Ser	Asn	Asn	Ser	Ala
						995			1000				1005		

Thr	Asn	Arg	Lys	Thr	His	Ile	Asp	Gly	Pro	Ser	Leu	Leu	Ile	Glu
						1010			1015				1020	

Asn	Ser	Pro	Ser	Val	Trp	Gln	Asn	Ile	Leu	Glu	Ser	Asp	Thr	Glu
						1025			1030				1035	

Phe	Lys	Lys	Val	Thr	Pro	Leu	Ile	His	Asp	Arg	Met	Leu	Met	Asp
						1040			1045				1050	

Lys	Asn	Ala	Thr	Ala	Leu	Arg	Leu	Asn	His	Met	Ser	Asn	Lys	Thr
						1055			1060				1065	

Thr	Ser	Ser	Lys	Asn	Met	Glu	Met	Val	Gln	Gln	Lys	Lys	Glu	Gly
						1070			1075				1080	

Pro	Ile	Pro	Pro	Asp	Ala	Gln	Asn	Pro	Asp	Met	Ser	Phe	Phe	Lys
						1085			1090				1095	

Met	Leu	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Ala	Arg	Trp	Ile	Gln	Arg	Thr	His
						1100			1105				1110	

Gly	Lys	Asn	Ser	Leu	Asn	Ser	Gly	Gln	Gly	Pro	Ser	Pro	Lys	Gln
						1115			1120				1125	

Leu	Val	Ser	Leu	Gly	Pro	Glu	Lys	Ser	Val	Glu	Gly	Gln	Asn	Phe
						1130			1135				1140	

[0008]

Leu Ser	Glu Lys Asn Lys Val	Val Val Gly Lys Gly	Glu Phe Thr
1145	1150	1155	

Lys Asp	Val Gly Leu Lys Glu	Met Val Phe Pro Ser	Ser Arg Asn
1160	1165	1170	

Leu Phe	Leu Thr Asn Leu Asp	Asn Leu His Glu Asn	Asn Thr His
1175	1180	1185	

Asn Gln	Glu Lys Lys Ile Gln	Glu Glu Ile Glu Lys	Lys Glu Thr
1190	1195	1200	

Leu Ile	Gln Glu Asn Val Val	Leu Pro Gln Ile His	Thr Val Thr
1205	1210	1215	

Gly Thr	Lys Asn Phe Met Lys	Asn Leu Phe Leu Leu	Ser Thr Arg
1220	1225	1230	

Gln Asn	Val Glu Gly Ser Tyr	Asp Gly Ala Tyr Ala	Pro Val Leu
1235	1240	1245	

Gln Asp	Phe Arg Ser Leu Asn	Asp Ser Thr Asn Arg	Thr Lys Lys
1250	1255	1260	

His Thr	Ala His Phe Ser Lys	Lys Gly Glu Glu Glu	Asn Leu Glu
1265	1270	1275	

Gly Leu	Gly Asn Gln Thr Lys	Gln Ile Val Glu Lys	Tyr Ala Cys
1280	1285	1290	

Thr Thr	Arg Ile Ser Pro Asn	Thr Ser Gln Gln Asn	Phe Val Thr
1295	1300	1305	

[0009]

Gln Arg	Ser Lys Arg Ala Leu	Lys Gln Phe Arg Leu	Pro Leu Glu
1310	1315	1320	

Glu Thr	Glu Leu Glu Lys Arg	Ile Ile Val Asp Asp	Thr Ser Thr
1325	1330	1335	

Gln Trp	Ser Lys Asn Met Lys	His Leu Thr Pro Ser	Thr Leu Thr
1340	1345	1350	

Gln Ile	Asp Tyr Asn Glu Lys	Glu Lys Gly Ala Ile	Thr Gln Ser
1355	1360	1365	

Pro Leu	Ser Asp Cys Leu Thr	Arg Ser His Ser Ile	Pro Gln Ala
1370	1375	1380	

Asn Arg	Ser Pro Leu Pro Ile	Ala Lys Val Ser Ser	Phe Pro Ser
1385	1390	1395	

Ile Arg	Pro Ile Tyr Leu Thr	Arg Val Leu Phe Gln	Asp Asn Ser
1400	1405	1410	

Ser His	Leu Pro Ala Ala Ser	Tyr Arg Lys Lys Asp	Ser Gly Val
1415	1420	1425	

Gln Glu	Ser Ser His Phe Leu	Gln Gly Ala Lys Lys	Asn Asn Leu
1430	1435	1440	

Ser Leu	Ala Ile Leu Thr Leu	Glu Met Thr Gly Asp	Gln Arg Glu
1445	1450	1455	

Val Gly	Ser Leu Gly Thr Ser	Ala Thr Asn Ser Val	Thr Tyr Lys
1460	1465	1470	

[0010]

Lys Val	Glu Asn Thr Val	Leu	Pro Lys Pro Asp Leu	Pro Lys Thr
1475		1480		1485

Ser Gly	Lys Val Glu Leu Leu	Pro Lys Val His Ile	Tyr Gln Lys
1490		1495	1500

Asp Leu	Phe Pro Thr Glu Thr	Ser Asn Gly Ser Pro	Gly His Leu
1505		1510	1515

Asp Leu	Val Glu Gly Ser Leu	Leu Gln Gly Thr Glu	Gly Ala Ile
1520		1525	1530

Lys Trp	Asn Glu Ala Asn Arg	Pro Gly Lys Val Pro	Phe Leu Arg
1535		1540	1545

Val Ala	Thr Glu Ser Ser Ala	Lys Thr Pro Ser Lys	Leu Leu Asp
1550		1555	1560

Pro Leu	Ala Trp Asp Asn His	Tyr Gly Thr Gln Ile	Pro Lys Glu
1565		1570	1575

Glu Trp	Lys Ser Gln Glu Lys	Ser Pro Glu Lys Thr	Ala Phe Lys
1580		1585	1590

Lys Lys	Asp Thr Ile Leu Ser	Leu Asn Ala Cys Glu	Ser Asn His
1595		1600	1605

Ala Ile	Ala Ala Ile Asn Glu	Gly Gln Asn Lys Pro	Glu Ile Glu
1610		1615	1620

Val Thr	Trp Ala Lys Gln Gly	Arg Thr Glu Arg Leu	Cys Ser Gln
1625		1630	1635

[0011]

Asn Pro	Pro Val	Leu Lys	Arg His	Gln Arg	Glu Ile	Thr Arg	Thr
1640			1645			1650	
Thr Leu	Gln Ser	Asp Gln	Glu Glu	Glu Ile	Asp Tyr	Asp Thr	Ile
1655			1660			1665	
Ser Val	Glu Met	Lys Lys	Glu Asp	Phe Asp	Ile Tyr	Asp Glu	Asp
1670			1675			1680	
Glu Asn	Gln Ser	Pro Arg	Ser Phe	Gln Lys	Lys Thr	Arg His	Tyr
1685			1690			1695	
Phe Ile	Ala Ala	Val Glu	Arg Leu	Trp Asp	Tyr Gly	Met Ser	Ser
1700			1705			1710	
Ser Pro	His Val	Leu Arg	Asn Arg	Ala Gln	Ser Gly	Ser Val	Pro
1715			1720			1725	
Gln Phe	Lys Lys	Val Val	Phe Gln	Glu Phe	Thr Asp	Gly Ser	Phe
1730			1735			1740	
Thr Gln	Pro Leu	Tyr Arg	Gly Glu	Leu Asn	Glu His	Leu Gly	Leu
1745			1750			1755	
Leu Gly	Pro Tyr	Ile Arg	Ala Glu	Val Glu	Asp Asn	Ile Met	Val
1760			1765			1770	
Thr Phe	Arg Asn	Gln Ala	Ser Arg	Pro Tyr	Ser Phe	Tyr Ser	Ser
1775			1780			1785	
Leu Ile	Ser Tyr	Glu Glu	Asp Gln	Arg Gln	Gly Ala	Glu Pro	Arg
1790			1795			1800	

[0012]

Lys Asn	Phe Val	Lys Pro	Asn	Glu Thr	Lys Thr	Tyr	Phe Trp	Lys
1805			1810			1815		

Val Gln	His His	Met Ala	Pro	Thr Lys	Asp Glu	Phe	Asp Cys	Lys
1820			1825			1830		

Ala Trp	Ala Tyr	Phe Ser	Asp	Val Asp	Leu Glu	Lys	Asp Val	His
1835			1840			1845		

Ser Gly	Leu Ile	Gly Pro	Leu	Leu Val	Cys His	Thr	Asn Thr	Leu
1850			1855			1860		

Asn Pro	Ala His	Gly Arg	Gln	Val Thr	Val Gln	Glu	Phe Ala	Leu
1865			1870			1875		

Phe Phe	Thr Ile	Phe Asp	Glu	Thr Lys	Ser Trp	Tyr	Phe Thr	Glu
1880			1885			1890		

Asn Met	Glu Arg	Asn Cys	Arg	Ala Pro	Cys Asn	Ile	Gln Met	Glu
1895			1900			1905		

Asp Pro	Thr Phe	Lys Glu	Asn	Tyr Arg	Phe His	Ala	Ile Asn	Gly
1910			1915			1920		

Tyr Ile	Met Asp	Thr Leu	Pro	Gly Leu	Val Met	Ala	Gln Asp	Gln
1925			1930			1935		

Arg Ile	Arg Trp	Tyr Leu	Leu	Ser Met	Gly Ser	Asn	Glu Asn	Ile
1940			1945			1950		

His Ser	Ile His	Phe Ser	Gly	His Val	Phe Thr	Val	Arg Lys	Lys
1955			1960			1965		

[0013]

Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu	Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe
1970	1975 1980

Glu Thr Val Glu Met Leu Pro	Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val
1985	1990 1995

Glu Cys Leu Ile Gly Glu His	Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu
2000	2005 2010

Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys	Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala
2015	2020 2025

Ser Gly His Ile Arg Asp Phe	Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr
2030	2035 2040

Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu	Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser
2045	2050 2055

Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys	Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val
2060	2065 2070

Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile	Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly
2075	2080 2085

Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser	Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile
2090	2095 2100

Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys	Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn
2105	2110 2115

Ser Thr Gly Thr Leu Met Val	Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser
2120	2125 2130

[0014]

Gly Ile	Lys His Asn Ile Phe	Asn Pro Pro Ile Ile	Ala Arg Tyr
2135	2140	2145	

Ile Arg	Leu His Pro Thr His	Tyr Ser Ile Arg Ser	Thr Leu Arg
2150	2155	2160	

Met Glu	Leu Met Gly Cys Asp	Leu Asn Ser Cys Ser	Met Pro Leu
2165	2170	2175	

Gly Met	Glu Ser Lys Ala Ile	Ser Asp Ala Gln Ile	Thr Ala Ser
2180	2185	2190	

Ser Tyr	Phe Thr Asn Met Phe	Ala Thr Trp Ser Pro	Ser Lys Ala
2195	2200	2205	

Arg Leu	His Leu Gln Gly Arg	Ser Asn Ala Trp Arg	Pro Gln Val
2210	2215	2220	

Asn Asn	Pro Lys Glu Trp Leu	Gln Val Asp Phe Gln	Lys Thr Met
2225	2230	2235	

Lys Val	Thr Gly Val Thr Thr	Gln Gly Val Lys Ser	Leu Leu Thr
2240	2245	2250	

Ser Met	Tyr Val Lys Glu Phe	Leu Ile Ser Ser Ser	Gln Asp Gly
2255	2260	2265	

His Gln	Trp Thr Leu Phe Phe	Gln Asn Gly Lys Val	Lys Val Phe
2270	2275	2280	

Gln Gly	Asn Gln Asp Ser Phe	Thr Pro Val Val Asn	Ser Leu Asp
2285	2290	2295	

[0015]

Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp
2300 2305 2310

Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala
2315 2320 2325

Gln Asp Leu Tyr
2330

<210> 2

<211> 1445

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
35 40 45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
50 55 60

Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
65 70 75 80

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val
85 90 95

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala

[0016]

	100		105		110
Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val					
115		120		125	
Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn					
130		135		140	
Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser					
145		150		155	160
His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu					
165		170		175	
Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu					
180		185		190	
His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp					
195		200		205	
His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser					
210		215		220	
Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg					
225		230		235	240
Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His					
245		250		255	
Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu					
260		265		270	
Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile					

[0017]

275	280	285
Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly		
290	295	300
Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met		
305	310	315 320
Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg		
325	330	335
Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp		
340	345	350
Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe		
355	360	365
Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His		
370	375	380
Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu		
385	390	395 400
Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro		
405	410	415
Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr		
420	425	430
Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile		
435	440	445
Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile		

[0018]

450	455	460
Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile		
465	470	475 480
Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys		
	485	490 495
His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys		
	500	505 510
Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys		
	515	520 525
Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala		
	530	535 540
Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp		
	545	550 555 560
Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe		
	565	570 575
Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln		
	580	585 590
Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe		
	595	600 605
Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser		
	610	615 620
Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu		

[0019]

625	630	635	640
Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr			
645	650	655	
Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro			
660	665	670	
Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp			
675	680	685	
Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala			
690	695	700	
Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu			
705	710	715	720
Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala			
725	730	735	
Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Gln Asn			
740	745	750	
Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu			
755	760	765	
Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu			
770	775	780	
Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Phe Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser			
785	790	795	800
Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val			

[0020]

805	810	815
Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg		
820	825	830
Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe		
835	840	845
Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu		
850	855	860
Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val		
865	870	875 880
Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr		
885	890	895
Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly		
900	905	910
Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr		
915	920	925
Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp		
930	935	940
Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val		
945	950	955 960
His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu		
965	970	975
Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe		

[0021]

980	985	990
Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys	Ser Trp Tyr Phe Thr	Glu Asn Met
995	1000	1005
Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro	Cys Asn Ile Gln Met	Glu Asp Pro
1010	1015	1020
Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg	Phe His Ala Ile Asn	Gly Tyr Ile
1025	1030	1035
Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu	Val Met Ala Gln Asp	Gln Arg Ile
1040	1045	1050
Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met	Gly Ser Asn Glu Asn	Ile His Ser
1055	1060	1065
Ile His Phe Ser Gly His Val	Phe Thr Val Arg Lys	Lys Glu Glu
1070	1075	1080
Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn	Leu Tyr Pro Gly Val	Phe Glu Thr
1085	1090	1095
Val Glu Met Leu Pro Ser Lys	Ala Gly Ile Trp Arg	Val Glu Cys
1100	1105	1110
Leu Ile Gly Glu His Leu His	Ala Gly Met Ser Thr	Leu Phe Leu
1115	1120	1125
Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln	Thr Pro Leu Gly Met	Ala Ser Gly
1130	1135	1140
His Ile Arg Asp Phe Gln Ile	Thr Ala Ser Gly Gln	Tyr Gly Gln

[0022]

1145	1150	1155
Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg	Leu His Tyr Ser Gly	Ser Ile Asn
1160	1165	1170
Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro	Phe Ser Trp Ile Lys	Val Asp Leu
1175	1180	1185
Leu Ala Pro Met Ile Ile His	Gly Ile Lys Thr Gln	Gly Ala Arg
1190	1195	1200
Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr	Ile Ser Gln Phe Ile	Ile Met Tyr
1205	1210	1215
Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp	Gln Thr Tyr Arg Gly	Asn Ser Thr
1220	1225	1230
Gly Thr Leu Met Val Phe Phe	Gly Asn Val Asp Ser	Ser Gly Ile
1235	1240	1245
Lys His Asn Ile Phe Asn Pro	Pro Ile Ile Ala Arg	Tyr Ile Arg
1250	1255	1260
Leu His Pro Thr His Tyr Ser	Ile Arg Ser Thr Leu	Arg Met Glu
1265	1270	1275
Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn	Ser Cys Ser Met Pro	Leu Gly Met
1280	1285	1290
Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp	Ala Gln Ile Thr Ala	Ser Ser Tyr
1295	1300	1305
Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr	Trp Ser Pro Ser Lys	Ala Arg Leu

[0023]

1310	1315	1320
His Leu Gln Gly Arg Ser Asn	Ala Trp Arg Pro Gln	Val Asn Asn
1325	1330	1335
Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val	Asp Phe Gln Lys Thr	Met Lys Val
1340	1345	1350
Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly	Val Lys Ser Leu Leu	Thr Ser Met
1355	1360	1365
Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile	Ser Ser Ser Gln Asp	Gly His Gln
1370	1375	1380
Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn	Gly Lys Val Lys Val	Phe Gln Gly
1385	1390	1395
Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro	Val Val Asn Ser Leu	Asp Pro Pro
1400	1405	1410
Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg	Ile His Pro Gln Ser	Trp Val His
1415	1420	1425
Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu	Val Leu Gly Cys Glu	Ala Gln Asp
1430	1435	1440
Leu Tyr		
1445		
<210>	3	
<211>	1445	
<212>	PRT	
<213>	人	

[0024]

<400> 3

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
35 40 45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
50 55 60

Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
65 70 75 80

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val
85 90 95

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala
100 105 110

Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val
115 120 125

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn
130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
145 150 155 160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
165 170 175

[0025]

Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
180 185 190

His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp
195 200 205

His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
210 215 220

Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg
225 230 235 240

Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
245 250 255

Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
260 265 270

Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile
275 280 285

Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
290 295 300

Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
305 310 315 320

Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
325 330 335

Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
340 345 350

[0026]

Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
355 360 365

Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
370 375 380

Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu
385 390 395 400

Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
405 410 415

Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
420 425 430

Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
435 440 445

Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
450 455 460

Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
465 470 475 480

Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
485 490 495

His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
500 505 510

Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
515 520 525

[0027]

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
530 535 540

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
545 550 555 560

Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
565 570 575

Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
580 585 590

Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
595 600 605

Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
610 615 620

Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
625 630 635 640

Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
645 650 655

Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
660 665 670

Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
675 680 685

Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
690 695 700

[0028]

Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
705 710 715 720

Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
725 730 735

Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Gln Asn
740 745 750

Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu
755 760 765

Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu
770 775 780

Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Cys Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser
785 790 795 800

Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val
805 810 815

Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg
820 825 830

Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe
835 840 845

Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu
850 855 860

Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val
865 870 875 880

[0029]

Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr
885 890 895

Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly
900 905 910

Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr
915 920 925

Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp
930 935 940

Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val
945 950 955 960

His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu
965 970 975

Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe
980 985 990

Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met
995 1000 1005

Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro
1010 1015 1020

Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile
1025 1030 1035

Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile
1040 1045 1050

[0030]

Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser
1055 1060 1065

Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu
1070 1075 1080

Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr
1085 1090 1095

Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys
1100 1105 1110

Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu
1115 1120 1125

Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly
1130 1135 1140

His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln
1145 1150 1155

Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn
1160 1165 1170

Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu
1175 1180 1185

Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg
1190 1195 1200

Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr
1205 1210 1215

[0031]

Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr
1220 1225 1230

Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile
1235 1240 1245

Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg
1250 1255 1260

Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu
1265 1270 1275

Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met
1280 1285 1290

Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr
1295 1300 1305

Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu
1310 1315 1320

His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn
1325 1330 1335

Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val
1340 1345 1350

Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met
1355 1360 1365

Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln
1370 1375 1380

[0032]

Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly
1385 1390 1395

Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro
1400 1405 1410

Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His
1415 1420 1425

Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp
1430 1435 1440

Leu Tyr
1445

<210> 4
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 21 个氨基酸的截短的 FVIII B 结构域

<400> 4

Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu
1 5 10 15

Lys Arg His Gln Arg
20

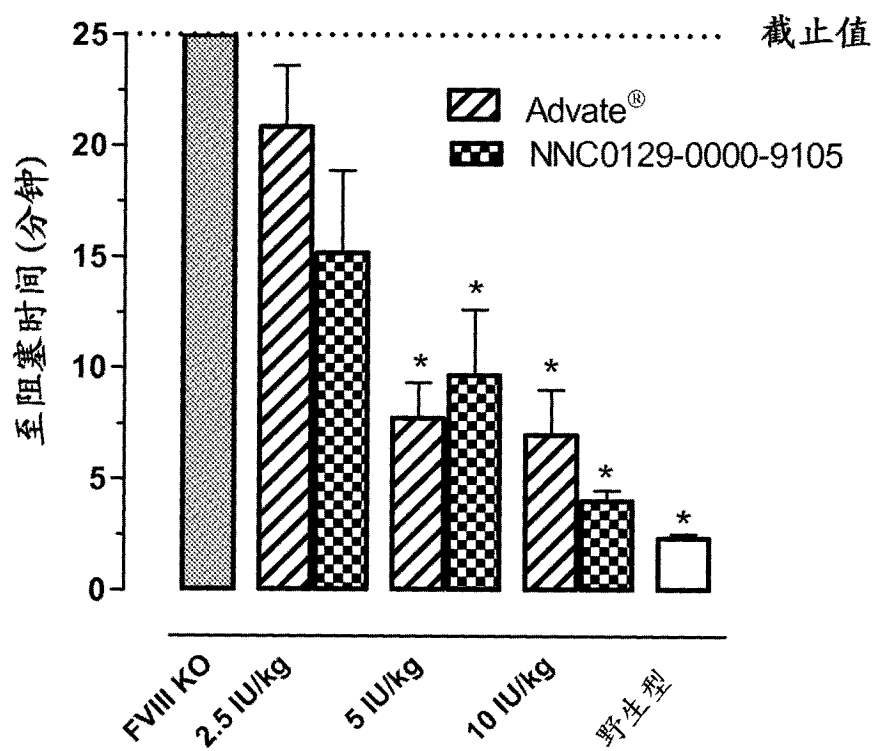


图 1

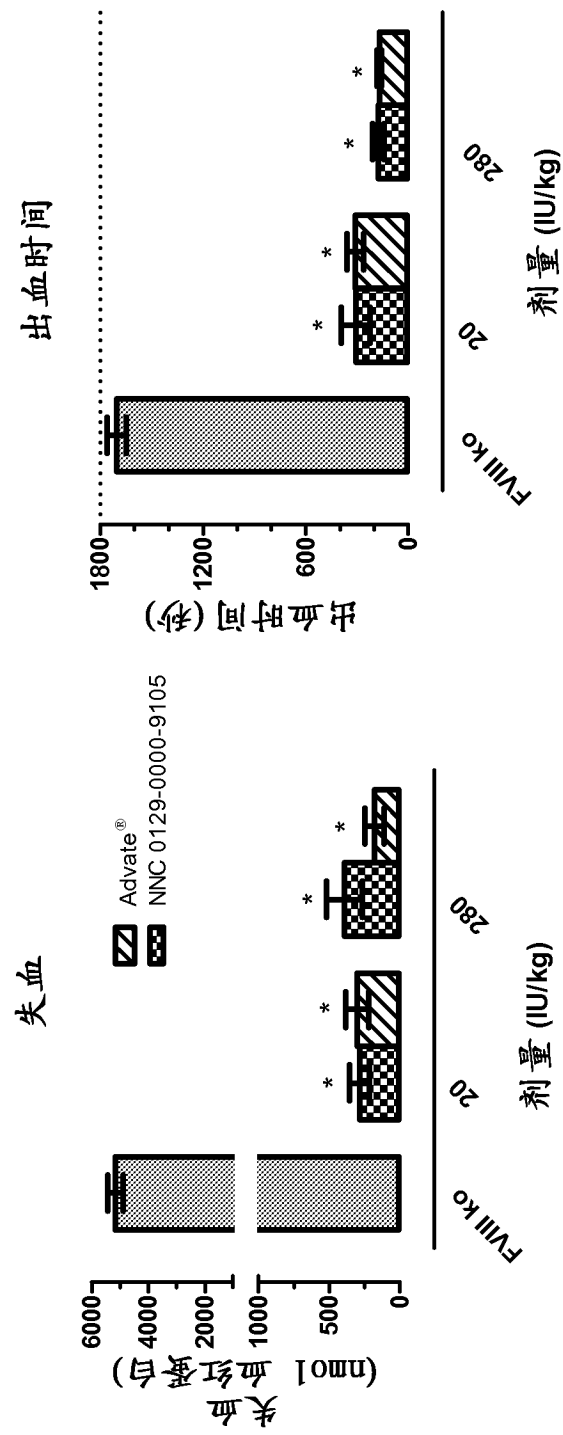


图 2