

• 综 述 •

长效重组人凝血因子 研究现状及进展

鲁丹^{1,2}, 曾凡一^{1,2,3}

1 上海市儿童医院 上海交通大学附属儿童医院医学遗传研究所, 上海 200040

2 卫生部医学胚胎分子生物学重点实验室暨上海市胚胎与生殖工程重点实验室, 上海 200040

3 上海交通大学医学院 医学科学院发育生物学研究室, 上海 200025

鲁丹, 曾凡一. 长效重组人凝血因子Ⅷ研究现状及进展. 生物工程学报, 2018, 34(1): 34-43.

Lu D, Zeng FY. Status and advances of long-acting factor VIII. Chin J Biotech, 2018, 34(1): 34-43.

摘 要: 重组凝血因子Ⅷ (rFⅧ) 替代疗法是目前临床上治疗 A 型血友病最为有效的方法。过去十几年的临床试验已经验证了 rFⅧ替代疗法的安全性和有效性, 但由于 FⅧ的半衰期较短, 患者需要隔天或者每周 3 次进行静脉注射治疗。长期频繁静脉注射治疗不仅给患者带来肉体上的痛苦, 还容易产生 FⅧ抗体, 严重影响治疗效果。以下就目前长效型重组凝血因子Ⅷ的研究进展及存在的主要问题进行了综述。

关键词: 长效重组人凝血因子Ⅷ, 血友病 A, 重组蛋白, 血管性血友病因子, FⅧ与 vWF 相互作用

Status and advances of long-acting factor VIII

Dan Lu^{1,2}, and Fanyi Zeng^{1,2,3}

1 Shanghai Institute of Medical Genetics, Shanghai Children's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200040, China

2 Key Laboratory of Embryo Molecular Biology, Ministry of Health & Shanghai Key Laboratory of Embryo and Reproduction Engineering, Shanghai 200040, China

3 Institute of Medical Science, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China

Abstract: Current treatment for hemophilia A is based on replacement therapy that is the most effective method by using recombinant clotting factor FⅧ (rFⅧ). Although the safety and effectiveness of replacement therapy has been proved by clinical practice for the last decades, FⅧ products are temporally limited because of a short half-life and requiring prophylactic injections frequently for most patients, usually three times per week or every other day. Frequent intravenous injection not only brings physical pain to the patient, but also produces FⅧ antibodies that seriously affect the treatment effect. In this paper, we review the present status, research progress and main problems of the long-acting recombinant factor VIII.

Keywords: long-acting clotting factor VIII, hemophilia A, recombinant protein, von Willebrand factor, interaction between FⅧ and vWF

Received: April 11, 2017; **Accepted:** June 7, 2017

Supported by: National Science and Technology Major Project (No. 2013ZX09102037), Project of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (No. 20164Y0070).

Corresponding author: Fanyi Zeng. Tel: +86-21-62472308; Fax: +86-21-62475476; E-mail: fzen@sjtu.edu.cn

国家科技重大专项 (No. 2013ZX09102037), 上海市卫生和计划生育委员会科研课题计划 (No. 20164Y0070) 资助。

凝血因子 VIII (Factor VIII, FVIII) 是由肝脏中的肝窦内皮细胞和血管内皮细胞合成的糖蛋白, 它在止血过程中发挥着至关重要的作用^[1]。由于 FVIII 缺乏引起的血友病称之为血友病 A (Haemophilia A, HA), 是临床上最普遍的血友病类型, 约占血友病患者总数的 80% 以上, 其中男性发病率约为 1/5 000^[2]。HA 患者病情严重程度与 FVIII 缺乏程度密切相关, 其中重度 HA 患者体内 FVIII 的含量小于正常人含量的 1%, 临床上表现为关节、肌肉、内脏及深部组织等自发性出血或外部损伤后出血不易凝固, 出血量偏高, 严重时甚至会危及患者生命^[3]。

目前, 对于 HA 患者的主要治疗方法为 FVIII 替代疗法, 即定期给 HA 患者输入 FVIII, 维持患者体内 FVIII 的含量最小为 1%。但是 FVIII 的半衰期较短, 约为 12 h 左右, 在儿童体内更短, 患者需要隔天或者每周 3 次进行静脉注射治疗^[4]。传统的 FVIII 制备方法是从人血液中进行提取和纯化 FVIII 纯品, 但该方法血液来源有限, 成本很高, 此外血液容易受到病毒污染, 导致 FVIII 制品的安全性问题。为了解决上述问题, 人们利用基因工程技术生产长效重组 FVIII (rFVIII), 通过结构改造不断改善重组蛋白的活性、稳定性和延长其半衰期。下面就 FVIII 的结构和作用机理、目前延长 FVIII 半衰期的方法、FVIII 与血管性血友病因子 (von Willebrand Factor, vWF) 相互作用对延长 FVIII 半衰期的影响以及未来长效 rFVIII 研发的策略等几个方面对长效重组人凝血因子 VIII 研究现状及进展进行综述。

1 FVIII 结构和作用机理

FVIII 基因位于 X 染色体长臂上 (Xq28), 全长约为 186 kb, 包含 26 个外显子和 25 个内含子。FVIII 的 mRNA 长约 9 kb, 其编码的蛋白前体含有 2 351 个氨基酸残基 (其中信号肽由 19 个氨基酸残基组

成), 而成熟的 FVIII 蛋白由 2 332 个氨基酸残基组成^[5]。成熟的 FVIII 蛋白空间上含有 A、B 和 C 三种结构域, 在一级结构上的排列顺序为 A1-A2-B-A3-C1-C2^[6]。三个 A 结构域均由约 330 个氨基酸残基组成, 结构域间以及与血铜蓝蛋白间的同源性约为 40%。C 结构域偏小, 由约 160 个氨基酸残基组成, 与多种盘状蛋白质折叠家族成员具有相对较远的同源关系。B 结构域含有较多的糖基化修饰, 具有较低的同源性^[7]。在 B 结构域上存在着蛋白酶 furin 的识别位点 R1313 和 R1648^[6]。在 FVIII 分泌前, 蛋白酶 furin 会在 R1648 对单链 FVIII 进行剪切, 产生一条由 A3-C1-C2 组成的轻链 (80 kDa) 和一条由 A1-A2-B 组成的重链 (90~210 kDa)^[8]。由于蛋白在加工过程中 furin 也可能对 R1313 或其前后进行酶切, 导致分泌后 FVIII 的重链长短不一。FVIII 的轻链和重链以二价金属离子结合形成异质二聚体糖蛋白。图 1 显示了凝血因子 VIII 蛋白结构的示意图。

分泌后的 FVIII 会与 vWF 结合形成 FVIII/vWF 复合物, 共同进行血液循环。一旦血管发生损伤, FVIII 将进一步发生酶解产生活化的 FVIII 复合物 (Activate FVIII, FVIIIa), 并与 vWF 解离结合到活化的血小板上^[9]。凝血级联反应主要包括两种途径——内源性凝血途径和外源性凝血途径。FVIII 作为启动因子和调节因子参与到内源性凝血途径中。血管发生出血性损伤后, 在活化的 FX (Activated FX, FXa) 或者凝血酶的激活下被蛋白酶剪切, 去掉 B 结构域并断开 A1 和 A2 结构域, 同时去除位于 A3 结构域 N 端的 a3 酸性肽, 使得 FVIII 与 vWF 分离, 从而形成由 A1/A2/A3-C1-C2 组成的 FVIIIa^[9-10]。FVIIIa 随后与活化的 FIX (Activated FIX, FIXa) 组成复合物, 通过 C2 结构域 C 端结合位点与活化的血小板结合, 并激活 FX。活化后的 FX 进一步激活凝血酶从而完成凝血的作用^[7]。

2 延长 FVIII 半衰期的方法

凝血因子 VIII 在人体内的半衰期仅为 12 h 左右, 因此 HA 患者在预防和治疗过程中需要长期反复注射 rFVIII 制剂。长期频繁静脉注射治疗不仅给患者带来肉体上的痛苦, 还容易产生 FVIII 抗体, 严重影响治疗效果。因此, 有效地延长 rFVIII 制品的半衰期对于临床治疗和缓解患者痛苦具有十分重要的意义。目前已报道的成功延长 rFVIII 半衰期的 HA 替代治疗药物开发采用的方法主要有: rFVIII-Fc 融合蛋白、聚乙二醇 (PEG) 聚合物修饰和单链结

构 rFVIII^[2,11-12]。

2.1 rFVIII-Fc 融合蛋白

IgG 与新生儿 Fc 受体 (FcRn) 结合的区域主要是 Fc 结构域, 与该结构域融合蛋白药物能够进行 FcRn 介导的细胞内吞和再循环过程, 从而免受细胞内降解, 延长半衰期^[13-14]。2002 年, 百健研发团队 Dumont 等将人 IgG1 的 Fc 结构域与 B 结构域缺失的 FVIII 的 C 末端直接连接融合表达制备 rFVIII-Fc (图 2A), 经蛋白酶解后, rFVIII-Fc 能够产生 90 kDa 的重链和 130 kDa 的 Fc 融合轻

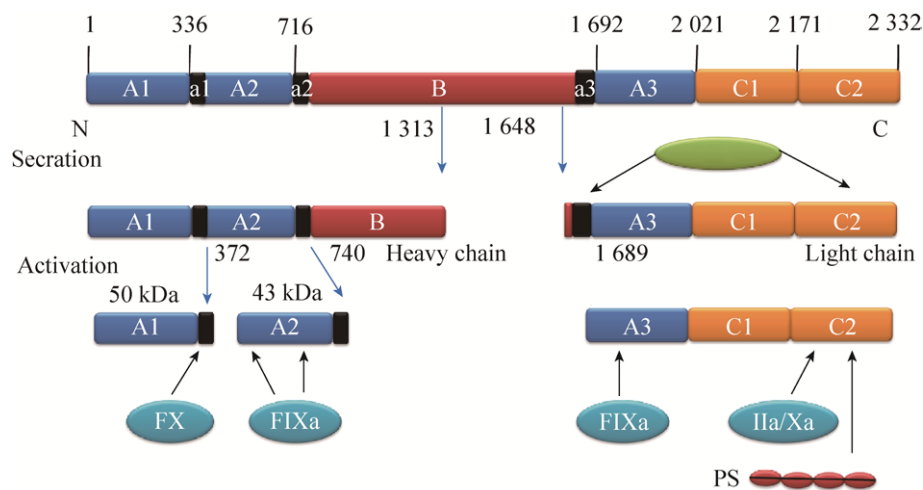


图 1 凝血因子 VIII 蛋白结构示意图^[7]

Fig. 1 Domain structure of FVIII^[7]. The position of domain boundaries and main proteolytic processing sites when FVIII secretion and activation are denoted by residue numbers and blue arrows. The black arrows indicate the position that different proteases interact with the activated heterotrimer.

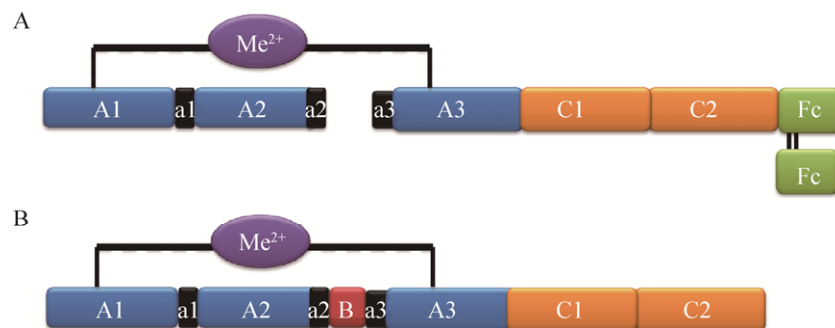


图 2 rFVIII-Fc 融合蛋白和单链 rhFVIII 的结构示意图

Fig. 2 Structure of rFVIII-Fc and Single chain rhFVIII. (A) The recombinant fusion protein linking factor VIII with Fc (rFVIII-Fc). (B) The single chain factor VIII.

链，轻链和重链通过金属非共价键连接。经过活化部分凝血活酶时间（APTT）和显色分析，Fc 结构域与 FVIII 融合并没有影响到 rFVIII Fc 的活性。随后，该课题组进行了动物体内实验，发现 rFVIII Fc 在 HA 小鼠和 HA 狗体内的半衰期分别延长了 1 倍和 0.5–1.0 倍^[15]。rFVIII Fc 在 HA 患者体内的安全性研究表明 rFVIII Fc 的摄入不会使患者产生抗体或抑制剂，且 rFVIII Fc 体内的半衰期与 rFVIII 相比延长了 0.5–1.0 倍，使得患者的给药频率减少到每周 1–2 次^[16-17]。此外，最新长期临床 III 期研究（A-LONG 研究）结果表明，rFVIII Fc 对成年 HA 患者和儿童，以及重度 HA 患者进行长期的预防和治疗过程中，均表现出良好的安全性、有效性和耐受性，进一步保证了 rFVIII Fc 长期用药的安全性^[18-19]。2014 年 6 月，百健公司宣布 rFVIII Fc 通过了 FDA 上市审批，将其命名为 ELOCTATE[®]，成为首个长效重组 A 型血友病药物。

2.2 PEG 修饰

聚乙二醇（PEG）是一种不带电荷的亲水线性大分子，通过选择性地将它与蛋白的非必需基团共价结合，可以保护蛋白质不易被蛋白酶水解，减少免疫原性，延长蛋白药物的半衰期。目前 PEG 修饰的 rFVIII 制品主要包括 N8-GP、BAX 855（Adynovate, Baxalta US Inc., Westlake Village, CA）和 BAY 94-9027（表 1）。2015 年 11 月，Baxalta 公司的长效 rFVIII 药物 Adynovate 获得了 FAD 的上

市批准，这是首个 PEG 化长效 rFVIII 类产品。Adynovate 是由 Turecek 等在百特公司的商品化重组全长 FVIII（ADVATE[®]）基础上进行特殊的定点 PEG 化修饰，药代动力学研究表明在 HA 小鼠、大鼠和猕猴体内，Adynovate 的半衰期为 FVIII 的 2 倍左右^[20]。临床实验结果表明，在 HA 患者体内，Adynovate 的半衰期与 ADVATE[®]（半衰期约 12 h）相比延长了 1.4–1.5 倍，而且在 HA 成人和儿童预防与治疗或者重度 HA 患者手术过程中，均表现出良好的止血效果和安全性^[21-22]。

拜耳公司研发团队生产了位点特异 PEG 修饰的 B 区缺失 FVIII 突变体（BAY 94-9027），体外实验表明该突变体具有完整的凝血功能并能够正常与 vWF 结合^[23]。动物实验表明，PEG 化 FVIII 突变体在 HA 小鼠和兔子体内均明显延长了 rFVIII 的半衰期。临床试验中，rFVIII 在 HA 患者体内的半衰期延长到 19 h^[24-25]。

诺和诺德公司 Agersoe 等制备 PEG 修饰 rFVIII 是将 PEG 连接在 N8 唯一的 O-糖链处，该 PEG 化 FVIII 具有与天然 FVIII 相似活性，在 HA 狗模型中的评估结果显示，其半衰期较标准 rFVIII 的半衰期增加了约 1 倍时间^[26]，在 HA 患者体内 N8-GP 的平均半衰期为 19 h，延长到原来的 1.6 倍^[27]。目前，N8-GP 正处在临床 III 期试验阶段，已完成对重度 HA 患者安全性和有效性评估，结果显示 N8-GP 具有良好预防和治疗效果，同时不存在安全性问题^[28]。

表 1 现阶段临床试验长效重组 FVIII 药物比较

Table 1 Half-life extended factor VIII products in clinical trials

Modification	Product	Characteristics	Manufacturer	Fold increase vs. comparator	Phase	Reference
Fc fusion	ELOCTATE [®]	factor VIII Fc fusion protein	Biogen Idec	1.5–1.7	Marketed	[17]
PEGylation	BAX 855	PEGylated rFVIII	Baxter	1.4–1.5	Marketed	[20]
	NN7088 (N8-GP)	O-glycoPEGylation	Novo Nordisk	1.6	Phase III	[27,33]
	BAY 94-9027	K1804C directed PEGylation	Bayer	1.6	Phase III	[23,25]
PSA modification	PSA factor VIII	PSA added to rFVIII	Baxter	1.4–2.0	Preclinical	[29]
rVIII-single chain	AFSTYLA	Single chain rFVIII	CSL Behring	1.4	Marketed	[30]

此外,百特公司还开发了与 PEG 化延长蛋白药物半衰期方法相似的聚唾液酸 (PSA) 化 rFVIII, 其半衰期是内源 FVIII 的 1.4 倍左右, 目前该 rFVIII 正处于临床前研究阶段^[29]。

2.3 单链结构 rFVIII

杰特贝林致力于单链结构 rhFVIII 的研发, 他们将 FVIII 的重链和轻链以共价键进行连接从而形成单链结构 rhFVIII (Afstyla, CSL627) (图 2B), 单链结构的 rhFVIII 加强了重链和轻链间的相互作用, 同时表现出与 vWF 更强的亲和力。临床前研究表明, 与全长 rhFVIII 相比, CSL627 表现出了更好的药代动力学性质, 清除率降低了 2 倍而半衰期延长了 1 倍。CSL627 与全长结构 rhFVIII 在动物体内具有相当的生物活性, 静脉注射也没有观察到动物的不良反应^[11,30]。临床 I 期实验比较了单剂量 (50 IU/kg) CSL627 和 rFVIII 的药代动力学性质, 结果表明, 与 rFVIII 相比, CSL627 在所有患者体内均表现出较低的清除速度, 93% 的病人体内表现出更长的半衰期^[31]。CSL627 在临床 III 期实验中也表现出了良好的治疗和预防作用^[32]。2016 年 5 月, FDA 批准了 Afstyla 用于 A 型血友病患者的治疗, 成为首个获批的重组单链凝血因子 VIII 产品。表 1 是对现阶段处于已上市或临床试验阶段的长效重组 FVIII 药物的比较。表 2 是对多种长效重组 FVIII 药物部分临床试验结果的比较。

3 FVIII 与 vWF 相互作用对延长 FVIII 半衰期的影响

vWF 是由内皮细胞和巨核细胞合成和分泌的一种糖蛋白, 在止血过程中发挥着重要的作用^[34]。vWF 是 FVIII 体内的天然结合载体, FVIII 分泌到血液后, 会与 vWF 结合, 以 FVIII/vWF 复合物的形式进行血液循环^[35], 调节血小板凝聚以及血液凝块的形成。FVIII 与 vWF 的结合对于 FVIII 在血液循环过程中的稳定是至关重要的。

FVIII 与 vWF 间具有很高的亲和力, vWF 与 FVIII 的结合位点位于轻链上, 与 FVIII 的 a3、C1 和 C2 结构域相互作用^[35-37]。vWF 与 hFVIII 蛋白轻链的相互作用既能增强 hFVIII 蛋白轻链和重链的结合^[38], 也增强了 FVIII 的稳定性和延长 hFVIII 半衰期约 2-12 h: 一方面 vWF 结合的 hFVIII 不能与磷脂和血小板结合而延长了 hFVIII 在血浆中的时间; 另一方面由于 FVIII/vWF 复合物的形成隐藏了位于 hFVIII 轻链上的蛋白酶结合位点, 从而使 FVIII 免受凝血酶以外的蛋白酶降解^[35]。

临床研究表明, 血管性血友病 I 型或 III 型患者的 FVIII 水平会随着血液中 vWF 的减少而降低, 而血管性血友病 2N 型患者由于 vWF 基因的突变而干扰了 FVIII 与 vWF 的结合, 虽然患者体内的 vWF 水平正常, 但是 FVIII 的水平却显著降低。通

表 2 长效重组 FVIII 药物部分临床试验结果

Table 2 Results from clinical trial programs of half-life extended factor VIII products

Product	Clinical trial program	Number of patients	Prophylaxis arm	ABR
ELOCTATE®	A-LONG	118	65 IU/kg per week (fixed regimen)	1.6
BAX 855	PROLONG-ATE	137	(45±5) IU/kg 2× per week	1.9
NN7088	Pathfinder™	175	50 IU/kg every 4th day	1.33
BAY 94-9027	PROTECT FVIII	141	25 IU/kg 2× per week for 10 weeks	1.9-4.1
AFSTYLA	AFFINITY	173	Determined by treating physician	Ongoing

ABR, annualized bleeding rate.

过将 HA 患者的血浆输入到一些血管性血友病患者体内,发现这些血管性血友病患者的 FVIII 水平有所恢复,这是由于输入的血液中 vWF 补充了患者体内缺失的 vWF,增加了患者 FVIII 在血液中的稳定性,表明外源的 vWF 能够稳定内源的 FVIII。同样的,利用外源重组 FVIII 治疗 HA 患者,患者体内的 vWF 也能够与外源重组 FVIII 相互作用,增加重组 FVIII 在血液中的稳定性,从而也能够达到稳定血液中 FVIII 水平的作用^[39]。

vWF 除了在体内能够起到稳定 FVIII 半衰期的作用外,在体外也起到了延长 FVIII 半衰期的作用。笔者所在单位上海交通大学医学遗传研究所利用动物乳腺生物反应器在转基因小鼠乳腺中实现了 FVIII 与 vWF 的共表达,实验结果表明,在相同条件下,共表达 vWF 的 FVIII 转基因小鼠乳汁中 FVIII 比单独表达 FVIII 的转基因小鼠乳汁中 FVIII 的体外半衰期延长了约 1 倍^[40]。

3.1 FVIII/vWF 复合物的清除

人和动物实验表明 vWF 的缺失会导致 FVIII 的半衰期降低 6 倍,而 FVIII 的存在并没有影响 vWF 的半衰期。这一结果与大部分 FVIII 和 vWF 结合并被清除的观点相一致,进一步表明了 vWF 能够保护 FVIII 免受最初的降解。FVIII 的清除速率直接影响着 FVIII 的稳定性和半衰期。因为 FVIII/vWF 以复合物形式进行血液循环,评价 FVIII 在血液中的清除过程就变得比较复杂。直至今日,人们仍然没有探明 FVIII 和 vWF 这两个蛋白在血液中的清除机理。但有一点是毋庸置疑的,即影响 vWF 清除率的因素会直接或者间接影响 FVIII 的清除率。vWF 和 FVIII 具有一些共同的清除受体,这些受体既可以与 FVIII 结合,也可以与 vWF 结合,如 LRP1^[41]、ASGPR^[42]、Siglec-5^[43] 和 STAB2^[1] 等。研究还发现在体外 vWF 的存在常常会影响 FVIII 与其适合受体 (LRP1, ASGPR, Siglec-5) 的结合。但这并不

代表 FVIII 不能够与这些受体单独发生作用。vWF 与 FVIII 的相互作用是高度动态变化的,二者具有很高的结合和解离速率。这个动态平衡表明 FVIII 会频繁地与 vWF 解离,使得 FVIII 可以从一个 vWF 分子移动到另一个 vWF 分子。

3.2 半衰期延长的 rFVIII 与 vWF 的作用

临床前和临床试验研究均发现 PEG 修饰的 rFVIII、rFVIII-Fc 和单链结构的 rFVIII 仍需要与内源性的 vWF 相互作用,并受到该相互作用的调控,rFVIII 大部分以 FVIII/vWF 复合物的形式被清除,因此 vWF 对长效型 rFVIII 的稳定性具有重要作用。

3.2.1 PEG 修饰 rFVIII

与 FVIII 相比,PEG 化的长效 rFVIII 半衰期延长到 1.5 倍左右。临床前研究表明 FVIII 和 vWF 的相互作用对 PEG 修饰 FVIII 半衰期的延长作出了贡献。Tang 等突变了 FVIII (PEG 化的 B 结构域缺失的 FVIII, PEG-FVIII-BDD) 与 vWF 结合的结构域获得 PEG-F8V,发现在 HA 小鼠和大鼠体内 PEG-F8V 的半衰期与 PEG-FVIII-BDD 相比均降低了 1 倍^[39]。

3.2.2 rFVIII-Fc

在 vWF 敲除小鼠中发现,rFVIII-Fc 的半衰期与 rFVIII 相比延长了 5 倍,而当 vWF 存在时,rFVIII-Fc 的半衰期与 rFVIII 相比仅延长了 1.8 倍,vWF 的清除导致了与其结合的 rFVIII-Fc 的清除^[44]。此外,临床研究发现 vWF 的水平与 rFVIII-Fc 的清除存在很强的关联性^[16,45],当内源性 vWF 水平增加时,rFVIII-Fc 表现出清除率降低,半衰期延长。

3.2.3 单链结构 rFVIII

单链结构 rFVIII 能够有效避免 FVIII 两条链的自发解离,从而改善 FVIII 的稳定性。Sabine 等制备的单链结构 FVIII (rVIII-single chain, CSL627) 使其在体内的半衰期与 FVIII 相比延长了 1 倍,原因在于相比于 rFVIII, rVIII-single chain 与 vWF 的亲合力增加了 3 倍,只有一小部分未与 vWF 结合的游离

rFVIII被迅速清除^[11]。该药物动力学现象在最近的临床实验中被进一步重复和证实^[46]。

4 未来长效 rFVIII 研发的策略

目前,研发的长效 rFVIII 制品在后期临床研究中与 FVIII 相比仅在一定程度上延长了 FVIII 的半衰期。越来越多的研究表明, vWF 的半衰期 (约 15 h) 是 FVIII 半衰期延长效果的关键限制因素, 血浆中 FVIII 的清除主要是通过 vWF 依赖的清除途径进行的。为了克服 vWF 依赖的限制, 研究者通过以下两种途径进行新策略的尝试: 一种是延长 vWF 的半衰期, 另一种是限制 FVIII 的 vWF 依赖的清除途径。

Yee 发现包含 vWF 的 hFVIII 结合区域的截短型 vWF 变体 D'D3 区域 (764–1 247 aa) 是稳定 hFVIII 的必需区域。Yee 等又设计生产了与 Fc 融合的 D'D3 (D'D3-Fc), 使其能在体内循环利用。研究发现, 在 vWF 缺陷的小鼠体内, 注射 D'D3-Fc 能使内源性凝血因子 VIII 持续稳定, 较不注射 D'D3-Fc 的 vWF 缺陷小鼠其血浆内的 hFVIII 蛋白水平增长 10 倍, 并能在注射后至少持续 7 d。然而, 在 HA 小鼠体内共注射 D'D3-Fc 和 rFVIII 却没有有效延长 rFVIII 的半衰期。通过动力学研究发现, 与 D'D3 或 D'D3-Fc 相比, 内源性的 vWF 与 FVIII 具有更高的亲和力^[47]。Bendetowicz 和 Yee 等的研究表明, vWF 的 N 端前导肽结构以及 C 端的 D3 到 CK 之间的片段对维持 FVIII 稳定均发挥了作用^[47-48]。基于 Yee 等的研究, 笔者已采用全长 vWF 和 Fc 融合表达重组蛋白 vWF-Fc 来延长 vWF 的半衰期, 以期望实现 vWF-Fc 在 HA 小鼠体内提高 FVIII 稳定性和延长其半衰期的作用, 同时有效克服内源性 vWF 的竞争作用。此外, 人血清白蛋白融合的 vWF (vWF-albumin) 已经在哺乳动物细胞中得以表达, 并在体内显示出了显著的半衰期延长效果^[49]。

另一种新的策略试图绕过 FVIII 依赖 vWF 的降解途径, 即通过制备一种新型 rFVIII 分子, 它由两部分多肽组成: 含有 XTEN (一种亲水性、非结构化的多肽, 可延长融合蛋白半衰期) 的 B 结构域缺失的单链结构 FVIII (BDD-FVIII), 和 vWF 的 D'D3 结构域。这些多肽与 IgG1 的 Fc 结构域融合, 以使 D'D3 结构域能够与 FVIII 部分正确连接。该策略在动物模型中表现出了良好的药代动力学, 与 BDD-FVIII 相比, 它的半衰期延长了 4 倍^[50]。

5 总结和展望

HA 的主要治疗和预防方法为 rFVIII 替代疗法, 也是目前临床上使用最为广泛和安全的方法, 而延长 FVIII 的半衰期和提高 FVIII 的稳定性仍是替代疗法最需要解决的问题之一。长效 rFVIII 的开发一方面可以解决 FVIII 半衰期短的问题, 另一方面也可以减少患者用药量, 改善目前 FVIII 药物紧缺的现状。因此, 长效 rFVIII 的开发蕴藏着巨大的经济和社会效益。令人欣喜的是在过去的几年里已有 3 种长效 rFVIII 药物上市, 多种长效 rFVIII 制品正处于不同的临床试验阶段, 它们已经成功地将 FVIII 的半衰期延长到内源 FVIII 半衰期的 1.4–2.0 倍, 在一定程度上改善了 HA 替代疗法, 缓解了 HA 患者的痛苦和经济压力, 大幅提高了 HA 患者的生活质量。目前, 我国长效型 rFVIII 制品的研究还基本处于起步阶段, 因此, 我国科研工作者应该加强新型长效型凝血因子药物的研发, 争取在未来凝血因子药物市场获得一席之地。

随着对长效 rFVIII 制品机理的深入研究发现, FVIII 半衰期的延长仍有很大的提升空间。已有的临床前和临床试验结果表明, 目前制约长效型 rFVIII 半衰期的主要限制因素在于内源 vWF 与 rFVIII 的相互作用。因此, 未来长效型 rFVIII 研发的重点是更加深入了解 FVIII 和 vWF 相互作用及其复合物的分解代谢途径。随着将来对 FVIII 和 vWF 之间关系

的进一步认识, 结合生物技术的不断创新, 延长 rFVIII 半衰期将会有更好的解决方法, 从而改善 HA 的治疗并造福 HA 患者。

REFERENCES

- [1] Pipe SW, Montgomery RR, Pratt KP, et al. Life in the shadow of a dominant partner: the FVIII-vWF association and its clinical implications for hemophilia A. *Blood*, 2016, 128(16): 2007–2016.
- [2] Carr ME, Tortella BJ. Emerging and future therapies for hemophilia. *J Blood Med*, 2015, 6: 245–255.
- [3] Peyvandi F, Garagiola I, Young G. The past and future of haemophilia: diagnosis, treatments, and its complications. *Lancet*, 2016, 388(10040): 187–197.
- [4] Savage N. Clotting factors: stretching time. *Nature*, 2014, 515(7528): S162–S164.
- [5] Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor. *Nature*, 1984, 312(5992): 342–347.
- [6] Thompson AR. Structure and function of the factor VIII gene and protein. *Semin Thromb Hemost*, 2003, 29(1): 11–22.
- [7] Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, et al. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood*, 2008, 111(3): 1240–1247.
- [8] Fang H, Wang LM, Wang HB. The protein structure and effect of factor VIII. *Thromb Res*, 2007, 119(1): 1–13.
- [9] Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry*, 1986, 25(2): 505–512.
- [10] Lollar P, Hill-Eubanks DC, Parker CG. Association of the factor VIII light chain with von Willebrand factor. *J Biol Chem*, 1988, 263(21): 10451–10455.
- [11] Zollner S, Raquet E, Claar P, et al. Non-clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of rFVIII-single chain, a novel recombinant single-chain factor VIII. *Thromb Res*, 2014, 134(1): 125–131.
- [12] Buyue Y, Liu TY, Kulman JD, et al. A single chain variant of factor VIII Fc fusion protein retains normal *in vivo* efficacy but exhibits altered *in vitro* activity. *PLoS ONE*, 2014, 9(11): e113600.
- [13] Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(9): 715–725.
- [14] Levin D, Golding B, Strome SE, et al. Fc fusion as a platform technology: potential for modulating immunogenicity. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(1): 27–34.
- [15] Dumont JA, Liu TY, Low SC, et al. Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs. *Blood*, 2012, 119(13): 3024–3030.
- [16] Mahlangu J, Powell JS, Ragni MV, et al. Phase 3 study of recombinant factor VIII Fc fusion protein in severe hemophilia A. *Blood*, 2014, 123(3): 317–325.
- [17] Powell JS, Josephson NC, Quon D, et al. Safety and prolonged activity of recombinant factor VIII Fc fusion protein in hemophilia A patients. *Blood*, 2012, 119(13): 3031–3037.
- [18] Nolan B, Mahlangu J, Perry D, et al. Long-term safety and efficacy of recombinant factor VIII Fc fusion protein (rFVIII-Fc) in subjects with haemophilia A. *Haemophilia*, 2016, 22(1): 72–80.
- [19] Shapiro AD, Mahlangu JN, Perry D, et al. Treatment of bleeding episodes with recombinant factor VIII Fc fusion protein in A-LONG study subjects with severe haemophilia A. *Haemophilia*, 2017, 23(3): 392–399.
- [20] Turecek PL, Bossard MJ, Graninger M, et al. BAX 855, a PEGylated rFVIII product with prolonged half-life. Development, functional and structural characterisation. *Haemostaseologie*, 2012, 32 Suppl 1: S29–S38.
- [21] Brand B, Gruppo R, Wynn TT, et al. Efficacy and safety of pegylated full-length recombinant factor VIII with extended half-life for perioperative haemostasis in haemophilia A patients. *Haemophilia*, 2016, 22(4): e251–e258.
- [22] Konkle BA, Stasyshyn O, Chowdary P, et al. Pegylated, full-length, recombinant factor VIII for prophylactic and on-demand treatment of severe hemophilia A. *Blood*, 2015, 126(9): 1078–1085.
- [23] Mei BS, Pan C, Jiang HY, et al. Rational design of a fully active, long-acting PEGylated factor VIII for

- hemophilia A treatment. *Blood*, 2010, 116(2): 270–279.
- [24] Gu JM, Ramsey P, Evans V, et al. Evaluation of the activated partial thromboplastin time assay for clinical monitoring of PEGylated recombinant factor VIII (BAY 94-9027) for haemophilia A. *Haemophilia*, 2014, 20(4): 593–600.
- [25] Coyle TE, Reding MT, Lin JC, et al. Phase I study of BAY 94-9027, a PEGylated B-domain-deleted recombinant factor VIII with an extended half-life, in subjects with hemophilia A. *J Thromb Haemost*, 2014, 12(4): 488–496.
- [26] Agersø H, Stennicke HR, Pelzer H, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of turoctocog alfa and N8-GP in haemophilia A dogs. *Haemophilia*, 2012, 18(6): 941–947.
- [27] Tiede A, Brand B, Fischer R, et al. Enhancing the pharmacokinetic properties of recombinant factor VIII: first-in-human trial of glycoPEGylated recombinant factor VIII in patients with hemophilia A. *J Thromb Haemost*, 2013, 11(4): 670–678.
- [28] Giangrande P, Andreeva T, Chowdary P, et al. Clinical evaluation of glycoPEGylated recombinant FVIII: Efficacy and safety in severe haemophilia A. *Thromb Haemost*, 2017, 117(2): 252–261.
- [29] Tiede A. Half-life extended factor VIII for the treatment of hemophilia A. *J Thromb Haemost*, 2015, 13 Suppl 1: S176–S179.
- [30] Zollner SB, Raquet E, Müller-Cohrs J, et al. Preclinical efficacy and safety of rVIII-single chain (CSL627), a novel recombinant single-chain factor VIII. *Thromb Res*, 2013, 132(2): 280–287.
- [31] Zhang Y, Limsakun T, Bensen-Kennedy DM, et al. Population pharmacokinetic modeling and simulation of recombinant single-chain factor VIII (r VIII-single chain) in patients with hemophilia A. *Blood*, 2014, 124(21): 2814.
- [32] Zhang Y, Roberts J, Tortorici M, et al. Population pharmacokinetics of recombinant coagulation factor VIII-single chain in patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost*, 2017, doi: 10.1111/jth.13662.
- [33] Stennicke HR, Kjalke M, Karpf DM, et al. A novel B-domain O-glycoPEGylated FVIII (N8-GP) demonstrates full efficacy and prolonged effect in hemophilic mice models. *Blood*, 2013, 121(11): 2108–2116.
- [34] Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood*, 2015, 125(13): 2019–2028.
- [35] Terraube V, O'Donnell JS, Jenkins PV. Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia*, 2010, 16(1): 3–13.
- [36] Chiu PL, Bou-Assaf GM, Chhabra ES, et al. Mapping the interaction between factor VIII and von Willebrand factor by electron microscopy and mass spectrometry. *Blood*, 2015, 126(8): 935–938.
- [37] Yee A, Oleskie AN, Dosey AM, et al. Visualization of an N-terminal fragment of von Willebrand factor in complex with factor VIII. *Blood*, 2015, 126(8): 939–942.
- [38] Shiltagh N, Kirkpatrick J, Cabrita LD, et al. Solution structure of the major factor VIII binding region on von Willebrand factor. *Blood*, 2014, 123(26): 4143–4151.
- [39] Tang L, Leong L, Sim D, et al. von Willebrand factor contributes to longer half-life of PEGylated factor VIII *in vivo*. *Haemophilia*, 2013, 19(4): 539–545.
- [40] Ren XY, Gong XL, Cai Q, et al. Efficient stabilization of recombinant human coagulation factor VIII in the milk of transgenic mice using *hF VIII* and *vWF* co-expression vector transduction. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(6): 1187–1194.
- [41] Rastegarlar G, Pegon JN, Casari C, et al. Macrophage LRP1 contributes to the clearance of von Willebrand factor. *Blood*, 2012, 119(9): 2126–2134.
- [42] Bovenschen N, Rijken DC, Havekes LM, et al. The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. *J Thromb Haemost*, 2005, 3(6): 1257–1265.
- [43] Pegon JN, Kurdi M, Casari C, et al. Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5. *Haematologica*, 2012, 97(12): 1855–1863.
- [44] van der Flier A, Liu Z, Tan SY, et al. FcRn rescues recombinant factor VIII Fc fusion protein from a VWF independent FVIII clearance pathway in mouse hepatocytes. *PLoS ONE*, 2015, 10(4): e0124930.
- [45] Shapiro AD, Ragni MV, Kulkarni R, et al. Recombinant factor VIII Fc fusion protein:

- extended-interval dosing maintains low bleeding rates and correlates with von Willebrand factor levels. *J Thromb Haemost*, 2014, 12(11): 1788–1800.
- [46] Mahlangu J, Kuliczowski K, Karim FA, et al. Efficacy and safety of rVIII-single chain: results of a phase 1/3 multicenter clinical trial in severe hemophilia A. *Blood*, 2016, 128(5): 630–637.
- [47] Yee A, Gildersleeve RD, Gu SF, et al. A von Willebrand factor fragment containing the D'D3 domains is sufficient to stabilize coagulation factor VIII in mice. *Blood*, 2014, 124(3): 445–452.
- [48] Bendetowicz AV, Morris JA, Wise RJ, et al. Binding of factor VIII to von willebrand factor is enabled by cleavage of the von Willebrand factor propeptide and enhanced by formation of disulfide-linked multimers. *Blood*, 1998, 92(2): 529–538.
- [49] Schulte S. Innovative coagulation factors: albumin fusion technology and recombinant single-chain factor VIII. *Thromb Res*, 2013, 131 (Suppl 2): S2–S6.
- [50] Liu TY, Chhabra ES, Kulman J, et al. Prolonged efficacy in hemophilia A mouse bleeding models of a recombinant FVIII-XTEN/D'D3 heterodimer with four-fold extended half-life in circulation. *Haemophilia*, 2014, 20: 76.

(本文责编 郝丽芳)