



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101952016 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 19

(21) 申请号 200880127339. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 12. 23

B01D 61/22 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 9/08 (2006. 01)

61/017, 418 2007. 12. 28 US

A61K 9/00 (2006. 01)

61/017, 881 2007. 12. 31 US

A61K 38/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 08. 20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/088201 2008. 12. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02009/086400 EN 2009. 07. 09

(71) 申请人 巴克斯特国际公司

地址 美国伊利诺伊州

申请人 巴克斯特保健股份有限公司

(72) 发明人 皮特·马特提森 皮特·图雷切克

汉斯-皮特·施瓦茨

库尔特·施尼科

(74) 专利代理机构 上海市华诚律师事务所

31210

代理人 傅强国

权利要求书 2 页 说明书 20 页 序列表 29 页

附图 9 页

(54) 发明名称

重组 VWF 配方

(57) 摘要

本发明提供了长期稳定的重组冯维勒布兰特因子 (rVWF) 的药物配方、其制造方法以及所述配方给药方法。

1. 一种重组冯维勒布兰特因子 (rVWF) 的稳定液态药物配方, 其包含 : (a) rVWF ; (b) 缓冲剂 ; (c) 一种以上盐 ; (d) 可任选的稳定剂 ; 以及 (e) 可任选的表面活性剂 ;

其中, 所述 rVWF 包含选自下组的多肽 :

a) SEQ ID NO : 3 所示的氨基酸序列 ;

b) a) 的生物学活性类似物、片段或变体 ;

c) 被 SEQ ID NO : 1 所示的多核苷酸编码的多肽 ;

d) c) 的生物学活性类似物、片段或变体 ; 以及

e) 被一种多聚核苷酸所编码的多肽, 所述多聚核苷酸可在适度严格的杂交条件下杂交至 SEQ ID NO : 1 所示多聚核苷酸 ;

其中所述缓冲液由在约 0.1mM 至约 500mM 范围内、且其中 pH 在约 2.0 至约 12.0 范围内的 pH 缓冲剂组成 ;

其中所述盐的浓度为约 1 至 500mM ;

其中所述稳定剂的浓度为约 0.1 至 1000mM ; 并且

其中所述表面活性剂的浓度为约 0.01g/L 至 0.5g/L。

2. 如权利要求 1 所述的配方, 其特征在于, 所述 rVWF 包含 SEQ ID NO : 3 所示的氨基酸序列。

3. 如权利要求 1 所述的配方, 其特征在于, 所述缓冲剂选自下组 : 柠檬酸钠、甘氨酸、组氨酸、Tris 以及这些试剂的组合。

4. 如权利要求 3 所述的配方, 其特征在于, 所述缓冲剂是浓度为 15mM 的柠檬酸钠。

5. 如权利要求 1 所述的配方, 其特征在于, pH 范围为 6.0-8.0。

6. 如权利要求 5 所述的配方, 其特征在于, pH 范围为 6.5-7.3。

7. 如权利要求 4 所述的配方, 其特征在于, pH 为 7.0。

8. 如权利要求 1 所述的配方, 其特征在于, 所述缓冲剂是柠檬酸盐, 且 pH 是 7.0。

9. 如权利要求 1 所述的配方, 其特征在于, 所述盐选自由氯化钙、氯化钠和氯化镁所构成的组。

10. 如权利要求 9 所述的配方, 其特征在于, 所述盐的浓度范围是 0.5 至 300mM。

11. 如权利要求 10 所述的配方, 其特征在于, 所述盐是浓度为 10mM 的氯化钙。

12. 如权利要求 1 所述的配方, 其特征在于, 所述 rVWF 包含 SEQ ID NO : 3 所示的氨基酸序列 ; 其中, 所述缓冲剂是柠檬酸盐且 pH 是 7.0 ; 并且其中, 所述盐是浓度为 10mM 的氯化钙。

13. 如权利要求 1 所述的配方, 其特征在于, 所述 rVWF 包含 SEQ ID NO : 3 所示的氨基酸序列 ; 其中, 所述缓冲剂是浓度为 15mM 的柠檬酸钠且 pH 是 7.0 ; 并且其中, 所述盐是浓度为 10mM 的氯化钙和浓度为 100mM 的 NaCl。

14. 如权利要求 3 所述的配方, 其特征在于, 所述一种以上缓冲剂是浓度各自是 3.3mM 的组氨酸和 Tris。

15. 如权利要求 3 所述的配方, 其特征在于, pH 是 7.0。

16. 如权利要求 9 所述的配方, 其特征在于, 所述一种以上盐是浓度为 30mM 的氯化钠和浓度为 0.56mM 的氯化钙。

17. 如权利要求 1 所述的配方, 其特征在于, 所述稳定剂选自下组 : 甘露醇、乳糖、山梨

糖醇、木糖醇、蔗糖、海藻糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖、棉籽糖、纤维二糖、龙胆二糖、异麦芽糖、阿拉伯糖、葡糖胺、果糖以及这些稳定剂的组合。

18. 如权利要求 17 所述的配方,其特征在于,所述稳定剂是浓度为 7.8mM 的海藻糖和浓度为 58.6mM 的甘露醇。

19. 如权利要求 1 所述的配方,其特征在于,所述表面活性剂选自下组:毛地黄皂苷、TRITON X-100、TRITON X-114、吐温-20、吐温-80 以及这些表面活性剂的组合。

20. 如权利要求 1 所述的配方,其特征在于,所述表面活性剂是浓度为 0.03g/L 的吐温-80。

21. 如权利要求 1 所述的配方,其特征在于,所述 rVWF 包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列;其中,所述缓冲剂是浓度为 3.3mM 的组氨酸和浓度为 3.3mM 的 Tris,且 pH 为 7.0;其中,所述盐是浓度为 30mM 的氯化钠和浓度为 0.56mM 的氯化钙;其中,所述稳定剂是浓度为 7.8mM 的海藻糖和浓度为 58.6mM 的甘露醇;并且其中所述表面活性剂是浓度为 0.03g/L 的吐温-80。

重组 VWF 配方

[0001] 本申请要求于 2007 年 12 月 28 日提交的美国临时申请 No. 61/017, 418、以及于 2007 年 12 月 31 日提交的美国临时申请 No. 61/017, 881 的优先权, 在此将其全部内容并入本文以作为参考。

技术领域

[0002] 本发明一般涉及重组 VWF 的配方和制备包含重组 VWF 的组合物的方法。

背景技术

[0003] 冯维勒布兰特因子 (VWF) 被是在血浆中循环的糖蛋白, 是一系列大小在约 500 至 20, 000kD 范围内的多聚体。多聚体形式的 VWF 由通过二硫键连接在一起的 250kD 的多肽亚基组成。VWF 介导原始血小板粘附至受损血管壁的内皮下。仅较大的多聚体显示出止血活性。根据假设, 内皮细胞分泌大聚合体形式的 VWF, 并且那些具有低分子量的 VWF 形式 (低分子量 VWF) 由蛋白水解切割而产生。具有大分子质量的多聚体储藏在内皮细胞的怀布尔-帕拉德 (Weibel-Pallade) 体中, 并且一旦受到刺激就被释放出来。

[0004] VWF 是作为基本上由重复的结构域组成的预前体 VWF (prepro-VWF) 由内皮细胞和巨核细胞合成的。一旦切割信号肽, 前 VWF 就通过位于 C- 末端区域的二硫键发生二聚化。该二聚体用作为用于多聚化的原聚体, 这取决于在自由末端之间的二硫键。组装成多聚体之后, 蛋白水解除去前体肽序列 (Leyte et al., Biochem. J. 274 (1991), 257-261)。

[0005] 由克隆的 VWF cDNA 预测的最初翻译产物是 2813 个残基的前体多肽 (预前体 VWF)。预前体 VWF 由一个有 22 个氨基酸的信号肽和一个有 741 个氨基酸的前体肽组成, 成熟 VWF 包含 2050 个氨基酸 (Ruggeri Z. A. 和 Ware, J., FASEB J., 308-316 (1993))。

[0006] 在 VWF 中的缺失与冯维勒布兰特疾病 (VWD) 有因果关系, 其特征为或多或少呈现出出血表现型。3 型 VWD 是最严重的形式, 其中 VWF 完全消失; 而 1 型 VWD 涉及 VWF 的定量丢失, 并且其表现型能够非常温和。2 型 VWD 涉及 VWF 的定性缺失, 并且能够像 3 型 VWD 一样严重。2 型 VWD 具有许多子形式, 一些子形式与高分子量多聚体的丧失或降低有关。2a 型冯维勒布兰特综合症 (VWS-2A) 的特征为中等和大的多聚体的同时丢失。VWS-2B 的特征为最大分子量的多聚体的丢失。与 VWF 有关的其他疾病和紊乱在本技术领域是已知的。

[0007] 美国专利 No. 6, 531, 577、7, 166, 709, 以及欧洲专利申请 No. 04380188.5 描述了源于血浆的 VWF 配方。然而, 除源于血浆的 VWF 数量和纯度结果之外, 还存在血液携带的病原体 (例如, 病毒和变异性克罗伊茨费尔特-雅各布病 (vCJD)) 的风险。

[0008] 因此, 存在开发稳定的包含重组 VWF 的药物配方的需要。

发明内容

[0009] 本发明提供了对包含重组 VWF 的组合物有用的配方, 可得到高度稳定的药物组合物。稳定的药物组合物可用作治疗剂, 用于遭受能够受益于给药重组 VWF 的紊乱或状况的个体的治疗。

[0010] 在一种实施方式中,本发明提供了一种重组冯维勒布兰特因子(rVWF)的稳定液态药物配方,其包含:(a)rVWF;(b)缓冲剂;(c)一种以上盐;(d)可任选的稳定剂;以及(e)可任选的表面活性剂;其中,rVWF包含选自下组的多肽:a)SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;b)a)的生物学活性类似物、片段或变体;c)被SEQ ID NO:1所示的多核苷酸编码的多肽;d)c)的生物学活性类似物、片段或变体;以及e)被一种多聚核苷酸所编码的多肽,所述多聚核苷酸可在适度严格的杂交条件下杂交至SEQ ID NO:1所示多聚核苷酸上;其中缓冲液由在约0.1mM至约500mM范围内、并且其中pH在约2.0至约12.0范围内的pH缓冲剂组成;其中盐的浓度为约1至500mM;其中稳定剂的浓度为约0.1至1000mM;并且其中表面活性剂的浓度为约0.01g/L至0.5g/L。

[0011] 在另一个实施方式中,提供的上述配方中,rVWF包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。在另一个实施方式中,提供的上述配方中缓冲剂选自由柠檬酸钠、甘氨酸、组氨酸、Tris和这些试剂的组合物所构成的组。在又一个实施方式中,提供的上述配方中,缓冲剂是柠檬酸盐。在本发明的再一个实施方式中,提供的上述配方中,pH在6.0-8.0、或6.5-7.3的范围内。在相关实施方式中,提供的上述配方中,pH是7.0。在另一个实施方式中,提供的上述配方中,缓冲剂是柠檬酸盐并且pH是7.0。

[0012] 在再一个实施方式中,提供的上述配方中,盐选自由氯化钙、氯化钠和氯化镁所构成的组。在另一个实施方式中,提供的上述配方中,盐的浓度范围是0.5至300mM。在另一个实施方式中,提供的上述配方中,盐是浓度为10mM的氯化钙。

[0013] 在另一个实施方式中,提供的上述配方中,rVWF包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;其中,缓冲剂是柠檬酸盐并且pH是7.0;并且其中,盐是浓度为10mM的氯化钙。在再一个实施方式中,提供的上述配方中,rVWF包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;其中,缓冲剂是柠檬酸钠并且pH是7.0;并且其中,盐是浓度为10mM的氯化钙和浓度为100mM的NaCl。

[0014] 本发明也可预期其他配方。例如,在一种实施方式中,提供的上述配方中,所述一种以上缓冲剂是浓度各自是3.3mM的组氨酸和Tris。在另一个实施方式中,提供的上述配方中,pH是7.0。在又一个实施方式中,提供的上述配方中,第一种盐是浓度为30mM的氯化钠并且第二种盐是浓度为0.56mM的氯化钙。

[0015] 在本发明的再一个实施方式中,提供的上述配方中,稳定剂选自下组:甘露醇、乳糖、山梨糖醇、木糖醇、蔗糖、海藻糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖、棉籽糖、纤维二糖、龙胆二糖、异麦芽糖、阿拉伯糖、葡糖胺、果糖以及这些稳定剂的组合物。在另一个实施方式中,提供的上述配方中,稳定剂是浓度为7.8mM的海藻糖和浓度为58.6mM的甘露醇。

[0016] 在另一个实施方式中,提供的上述配方中,表面活性剂选自下组:毛地黄皂苷、TRITON X-100、TRITON X-114、吐温-20、吐温-80以及这些表面活性剂的组合物。在另一个实施方式中,提供的上述配方中,表面活性剂是浓度为0.03g/L的吐温-80。

[0017] 在本发明的一个具体实施方式中,提供的上述配方中,rVWF包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;其中,缓冲剂是浓度为3.3mM的组氨酸和浓度为3.3mM的Tris,pH 7.0;其中,第一种盐是浓度为30mM的氯化钠并且第二种盐是浓度为0.56mM的氯化钙;其中,稳定剂是浓度为7.8mM的海藻糖和浓度为58.6mM的甘露醇;并且其中,表面活性剂是0.03g/L的吐温-80。

附图说明

[0018] 图 1 显示,由于谷胱甘肽的存在,rVWF 在 Advate 缓冲液中 26 周后是不稳定的。

[0019] 图 2 显示,rVWF 在 Advate 1 : 3 缓冲液中在 4℃ 下直到 12 周仍是稳定的。

[0020] 图 3 显示,基于柠檬酸盐的配方的稳定性比含有 0.1M 谷胱甘肽的 Advate 1 : 3 缓冲液配方要好。

[0021] 图 4 显示,在 Advate 缓冲液中在整个 26 周期间 rVWF 浓度是稳定的。

[0022] 图 5 显示,在 Advate 1 : 3 缓冲液中随时间过去 rVWF 浓度是稳定的。[0022] 图 6 显示,在基于柠檬酸盐的缓冲液中随时间过去 rVWF 浓度是稳定的。

[0023] 图 7 显示,大多数赋形剂使 rVWF 的解叠温度 (unfolding temperature) 提高约 1 或 2℃。

[0024] 图 8 显示,10mM CaCl_2 使 rVWF 的解叠温度提高约 8℃ 至约 67℃。

[0025] 图 9 显示,在 pH 7.3 下和在 pH 6.5 下 CaCl_2 的效果是类似的。

具体实施方式

[0026] 术语的定义

[0027] 除非另外定义,在此使用的所有技术术语和科学术语的意义与本发明所属领域普通技术人员通常知道的意义相同。下述参考文献为本领域技术人员提供了在本发明中使用的许多术语的一般定义: Singleton 等,《微生物学和分子生物学词典》(第 2 版,1994);《剑桥科学技术词典》(Walker 编,1988);《遗传学词汇》(第 5 版),R Rieger 等(编著),Springer Verlag(1991) 以及 Hale 和 Marham,《HARPER COLLINS 生物学词典》(1991)。

[0028] 在此引用的每个公开、专利申请、专利、以及其他参考文献通过参考方式将其全部内容并入本文,该合并达到与本发明公开可以不一致的程度。

[0029] 需注意的是,当在本说明书和附后的权利要求中使用,单数形式“一”、“一种”和“该”包括复数引用,除非上下文另外清楚地指定。

[0030] 在此使用时,除非特别说明,下述术语具有它们被给予的意义。

[0031] 术语“包含”,就肽化合物而言,是指化合物可以在给定序列的氨基和羧基末端之一或两者处包括额外的氨基酸。当然,这些附加的氨基酸将不会显著地干涉该化合物的活性。就本发明的组合物而言,术语“包含”是指组合物可以包括附加成分。这些附加成分将不会显著地干涉组合物的活性。

[0032] 术语“药学活性的”是指,描述的物质被确定具有影响医疗参数(例如,但不限于,血压、血细胞数、胆固醇含量)或疾病状态(例如,但不限于,癌症、自身免疫紊乱)的活性。

[0033] 在此使用的术语“表达”是指,允许或者引起在基因或者 DNA 序列中的信息变得被表现出来,例如,通过活化细胞的功能而产生蛋白质,该功能涉及对应的基因或 DNA 序列的转录和翻译。DNA 序列在细胞中或者被细胞表达从而形成“表达产物”比如蛋白质。该表达产物本身,例如,得到的蛋白质,还可以被说成是被“表达的”产物。表达产物能够作为胞内的、胞外的或分泌的产物而被表征。术语“胞内”是指在细胞里面。术语“胞外”是指在细胞外面,比如横跨膜的蛋白质。如果物质由细胞上某处或者里面大量地出现在细胞外侧,其就是被细胞“分泌”。

[0034] 在此使用的“多肽”，指的是经由肽键连接由氨基酸残基、结构变体、相关天然产生的结构变体、以及其合成的非天然产生类似物所组成的聚合物。例如，通过使用自动多肽合成仪，能够制备出合成多肽。术语“蛋白质”典型地是指大的多肽。术语“肽”典型地是指短的多肽。

[0035] 在此使用的多肽的“片段”，指的是多肽或蛋白质的任何部分，其小于全长的多肽或蛋白质表达产物。

[0036] 在此使用的“类似物”，指的是在结构上基本相似并且具有相同的生物活性、但是活性程度可能不同的任何两个以上多肽，或者指的是整个分子或其片段。基于包括一个以上氨基酸取代其他氨基酸的一种以上突变，类似物在它们的氨基酸序列组成方面会有差异。基于正被置换的氨基酸以及用于置换的氨基酸的物理化学关系或功能性关系，取代可能是保守型的或者非保守型的。

[0037] 在此使用的“变体”，指的是被修饰得包含附加的、通常不是分子一部分的化合物部分的多肽、蛋白质或其类似物。这些部分可以调节分子的溶解性、吸附性、生物半衰期等。这些部分可以可选地降低分子的毒性，并且除去或者削弱分子的任何不期望有的副作用等。能够调节这些效果的部分在 Remington 编著的《药物科学》(1980) 中被公开。用于这样的部分偶联至分子的工艺为本领域技术人员所熟知。例如，变体可以是具有赋予蛋白质更长体内半衰期的化学修饰的凝血因子。在本发明的多个方面，多肽通过糖基化、PEG 化和 / 或聚唾液酸化而被修饰。

[0038] 重组 VWF

[0039] 预前体 VWF 的多核苷酸序列和氨基酸序列分别在 SEQ ID NO :1 和 SEQIDNO :2 中被显示出来，并且可分别购买，GenBank 登记号为 NM 000552 和 NP 000543。对应于成熟 VWF 蛋白质的氨基酸序列在 SEQ ID NO :3 (对应于全长预前体 VWF 氨基酸序列中的氨基酸 764-2813) 中被显示出来。

[0040] 一种有用的 rVWF 形式至少具有体内稳定化例如结合至少一种因子 VIII (FVIII) 分子、并任选地具有药理学可接受的糖基化模式的特性。其具体的例子包括无 A2 结构域、因此耐蛋白水解的 VWF (Lankhof 等, Thromb. Haemost. 77 :1008-1013, 1997), 以及包括糖蛋白 1b 结合结构域和胶原及肝素结合位点在内的从 Val 449 至 Asn 730 的 VWF 片段 (Pietu et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 164 :1339-1347, 1989)。测定 VWF 稳定化至少一种 FVIII 分子的能力能够根据本技术领域已知的方法在缺乏 VWF 的哺乳动物中进行。

[0041] 通过本技术领域任何已知的方法，可以生产出本发明的 rVWF。在申请日为 1986 年 10 月 23 日的 WO 86/06096 和申请日为 1990 年 7 月 23 日的美国专利申请 No. 07/559, 509 中公开了一个具体例子，就生产重组 VWF 的方法而言，将其引入本发明作为参考。因此，本技术领域已知的方法为：(i) 例如经由 RNA 逆转录和 / 或 DNA 扩增，通过基因工程产生重组 DNA；(ii) 通过转染将重组 DNA 导入原核或真核细胞，例如经由电穿孔技术或微注射；(iii) 例如以连续方式或分批方式培养所述转化细胞；(iv) 例如组成性地或诱导性地表达 VWF；以及 (v) 例如从培养基中或者通过收获转化细胞来分离所述 VWF；以便 (vi) 例如经由阴离子交换层析法或者亲和色谱法得到纯化的 rVWF。通过使用本技术领域众所周知的重组 DNA 技术，可以在转化的寄主细胞中制备重组 VWF。例如，通过使用合适的限制性内切酶，能够从 DNA 上切除编码多肽的序列。

[0042] 可选地,通过使用化学合成技术,比如氨基磷酸酯方法,能够合成出 DNA 分子。而且,能够使用这些技术的组合。

[0043] 本发明还在合适的寄主中提供了编码本发明多肽的载体。该载体包含编码可操作地连接于合适的表达控制序列的多肽的多核苷酸。在多核苷酸被插入载体中之前或者之后影响这种可操作的连接的方法是众所周知的。表达控制序列包括启动子、激活剂、增强子、操纵子、核糖体结合位点、起始信号、终止信号、帽信号、聚腺苷酸化信号、以及其他涉及控制转录或翻译的信号。得到的其中具有多核苷酸的载体被用于转化合适的寄主。该转化可以通过使用本技术领域众所周知的方法进行。

[0044] 大量可购买的和众所周知的寄主细胞中的任何一种可以在本发明的实践中使用。具体寄主的选择取决于许多被本技术领域认可的因素,包括:例如,与被选择的表达载体的相容性、被 DNA 分子编码的肽的毒性、转化比率、肽的容易回收、表达特征、生物安全性和成本。考虑到并非所有的寄主细胞都具有同样的表达特定 DNA 序列的效果,必须达到这些因素的平衡。在这些通用准则之内,有用的微生物寄主细胞包括培养物形式的细菌、酵母和其他真菌、昆虫细胞、植物细胞、哺乳动物(包括人类)细胞、或者本技术领域已知的其他寄主。

[0045] 接下来,培养被转化的寄主并且提纯。寄主细胞可以在普通的发酵条件下培养,以使得期望的化合物被表达。这些发酵条件为本领域技术人员所熟知。最后,通过本技术领域众所周知的方法从培养物中提纯多肽。

[0046] 取决于用来表达本发明的化合物的寄主细胞,可以方便地将碳水化合物(低聚糖)基团附接于已知是蛋白质中糖基化位点的位点。一般来讲,当残基是序列 Asn-X-Ser/Thr 的一部分时,0-连接的低聚糖被附接于丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)残基,同时 N-连接的低聚糖被附接于天门冬酰胺(Asn)残基,其中 X 可能是除脯氨酸外的任何氨基酸。X 优选是除脯氨酸之外 19 个天然产生的氨基酸之一。N-连接的低聚糖和 0-连接的低聚糖以及每个类型中发现的糖残基的结构是不同的。通常同时在两个类型上发现的一个糖类型是 N-乙酰神经氨酸(称作唾液酸)。唾液酸通常是 N-连接的低聚糖和 0-连接的低聚糖两者的末端残基,并且其借助于负电荷可以赋予糖基化化合物酸性特性。这样的位点可以被并入本发明化合物的连接物中,并且优选在多肽化合物的重组生产(例如,在哺乳动物细胞比如 CHO、BHK、COS 中)期间被细胞糖基化。然而,这样的位点可以进一步通过本技术领域已知的合成工艺或半合成工艺被糖基化。

[0047] 可选地,化合物可以通过合成方法制备。例如,可以使用固相合成技术。合适的技术为本领域技术人员所熟知,并且包括下述文献中所述的技术:Merrifield(1973),化学多肽,第 335-61 页(Katsoyannis 和 Panayotis 编著);Merrifield(1963),J. Am. Chem. Soc. 85:2149;Davis et al. (1985),Biochem. Intl. 10:394-414;Stewart 和 Young(1969),固相多肽合成;美国专利 No. 3,941,763;Finn 等(1976),蛋白质(第 3 版),2:105-253;以及 Erickson 等(1976),蛋白质(第 3 版),2:257-527。固相合成是优选的制造单个肽的技术,因为其是成本效益最好的制造小肽的方法。

[0048] VWF 的片段、变体和类似物

[0049] 用于制备多肽片段、变体或类似物的方法是本技术领域众所周知的。

[0050] 通过使用,但不限于,酶切割(例如,胰蛋白酶、糜蛋白酶)、以及通过使用可产生

具有特定氨基酸序列的多肽片段的重组手段,制备多肽片段。产生的多肽片段可以包含具有特定活性的蛋白质区域,比如多聚化结构域或者任何其他本技术领域已知可看作是与 VWF 结构域相同的结构域。

[0051] 制造多肽类似物的方法也是众所周知的。多肽的氨基酸序列类似物可能是取代型类似物、插入型类似物、添加型类似物或缺失型类似物。包括多肽片段在内的缺失型类似物缺乏天然蛋白质中一个以上对功能或免疫原性活性不是必需的残基。插入型类似物包括例如在多肽中非末端点氨基酸的添加。该类似物可以包括插入免疫活性的表位或仅仅单一残基。包括多肽片段在内的添加型类似物包括在蛋白质两个末端中任何一个处添加一个以上氨基酸,并且例如包括融合蛋白。

[0052] 取代型类似物典型地在蛋白质内一个以上位点处将一个野生型氨基酸交换成另一种氨基酸,并且可以被设计成在不丧失其他功能或特性的情况下调节多肽的一种以上特性。在一个方面,取代是保守性取代。术语“保守性氨基酸取代”,是指一个氨基酸用一个具有化学特性类似的侧链的氨基酸取代。用于进行保守性取代的类似的氨基酸包括:具有酸性侧链的氨基酸(谷氨酸、天冬氨酸);具有碱性侧链的氨基酸(精氨酸、赖氨酸、组氨酸);具有极性酰胺侧链的氨基酸(谷氨酰胺、天门冬酰胺);具有疏水性的脂肪族侧链的氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、甘氨酸);具有芳香族侧链的氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸);具有较小侧链的氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸);或者具有脂肪族羟基侧链的氨基酸(丝氨酸、苏氨酸)。

[0053] 类似物可以与来源于其的重组 VWF 是基本上同源的或者基本上相同的。优选的类似物是这样的类似物:其至少保留野生型多肽的一些生物活性例如凝血活性。

[0054] 预期的多肽变体包括通过下述技术进行化学修饰的多肽:泛素化、包括聚唾液酸化在内的糖基化、共轭至治疗性试剂或诊断试剂、标记、共价多聚体附着比如 PEG 化(用聚乙二醇衍生化)、导入不可水解性键、以及通常在人类蛋白质中不会发生的通过化学合成氨基酸比如鸟氨酸来插入或取代。变体保留了相同的或者基本上相同的结合未修饰的本发明分子的特性。这些化学修饰可以包括将试剂直接或间接(例如,经由连接物)附着于 VWF 多肽。就间接附着而言,期待连接物可以是可水解的或者是不可水解的。

[0055] 制备 PEG 化多肽类似物一般地将包含如下步骤:(a) 在结合性构建体多肽变成附接于一个以上 PEG 基团的条件下使多肽与聚乙二醇(比如反应性酯或 PEG 的醛类衍生物)反应;以及(b) 得到反应产物。一般来讲,用于酰化反应的最佳反应条件将基于已知的参数和期望的结果而被确定。例如,PEG:蛋白质的比率越大,聚 PEG 化产物的百分比就越大。在一些实施方式中,结合性构建体将在 N-末端具有单一的 PEG 部分。聚乙二醇(PEG)可以被附接于凝血因子,提供更长的体内半衰期。PEG 基团可以有任何适当的分子量,并且可以是直链型或支链型。PEG 的平均分子量范围是从约 2 千道尔顿(“kD”)至约 100kDa、从约 5kDa 至约 50kDa、或者从约 5kDa 至约 10kDa。通过在 PEG 部分上的天然反应基团或工程化反应基团(例如,醛类、氨基、硫醇、或者酯基)与在凝血因子上的反应基团(例如,醛类、氨基、或者酯基),或者通过本技术领域已知的任何其他技术,PEG 基团经由酰化或还原性烷基化作用被附接于凝血因子。

[0056] 用于制备聚唾液酸化多肽的方法在下述文献中有描述:美国专利公开 20060160948, Feraandes et Gregoriadis;Biochim. Biophys. Acta 1341:26-34, 1997, 以

及 Saenko et al., Haemophilia. 12:42-51, 2006。简言之,在室温下避光搅拌含有 0.1M NaIO_4 的多聚乙酸神经氨酸溶液以便氧化 CA。该活化的 CA 溶液用例如,0.05M 磷酸钠缓冲液, pH 7.2 避光透析,并且将该溶液加至 rVWF 溶液,在轻轻振荡下在室温下避光保温 18h。然后游离的试剂能够通过超滤 / 渗滤与 rVWF- 聚唾液酸偶联物分离。rVWF 与聚唾液酸的结合还可以通过使用戊二醛作为交联试剂来完成 (Migneault 等, Biotechniques. 37: 790-796, 2004)。

[0057] 进一步预期本发明的多肽可以是与作为多肽的第二试剂一起的融合蛋白。在一种实施方式中,第二试剂是多肽,不限于是酶、生长因子、抗体、细胞因子、趋化因子、细胞表面受体、细胞表面受体的胞外结构域、细胞粘附分子、或如上所述蛋白质的片段和活性结构域。在一个相关的实施方式中,第二试剂是凝血因子比如因子 VIII、因子 VII、因子 IX。预期的融合蛋白通过本技术领域所周知的化学或重组技术制备。

[0058] 还预期预前体 VWF 和前 VWF 多肽可以提供一种本发明配方的治疗性有益效果。例如,美国专利 No. 7, 005, 502 描述了一种药物制剂,其包含可体外诱导凝血酶产生的基本含量的前 VWF。除了天然产生的成熟 VWF 的重组体、生物学活性片段、变体、或类似物之外,本发明预期在此处描述的配方中可使用预前体 VWF (SEQ ID NO:2 所示) 或前 VWF 多肽 (SEQ ID NO:2 中氨基酸残基 23 至 764) 的重组体、生物学活性片段、变体、或类似物。

[0059] 编码片段、变体和类似物的多核苷酸可以由本领域技术人员容易地产生,以便编码具有与天然产生的分子相同或相似生物活性的天然产生的分子的生物学活性片段、变体、或类似物。这些多核苷酸能够通过使用 PCR 技术、消化 / 连接编码分子的 DNA 等制备。因此,通过使用本技术领域任何已知的方法,包括但不限于定点突变,本领域的技术人员将能在 DNA 链中产生单一碱基的改变,从而得到改变的密码子和错义突变。这里使用的术语“适度严格的杂交条件”,是指,例如,在 42°C 下在 50% 甲酰胺中杂交并且在 60°C 下在 0.1x SSC、0.1% SDS 中洗涤。本领域的技术人员应理解,基于待杂交的序列的长度和其中 GC 核苷酸碱基的含量,这些条件可发生变化。本技术领域的公式标准适合用于确定精确的杂交条件。参见 Sambrook 等,《分子克隆》,9.47-9.51 节。冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约 (1989)。

[0060] 一般配方和赋形剂

[0061] 赋形剂是被包含于配方中的添加剂,因为它们或者赋予或者增强药物产物的稳定性和释放。无论包含它们的理由如何,赋形剂是药物产物中不可缺少的成分,因此要求是安全的并且被病人很好地忍受。对于蛋白质药物,赋形剂的选择特别重要,因为它们能够同时影响药物的效力和免疫原性。因而,蛋白质配方需要开发成具有适当选择的赋形剂,该赋形剂可提供合适的稳定性、安全性、以及适销性。

[0062] 在开发用于治疗性蛋白的配方中的主要挑战是稳定化产物,能承受制造、寄送和储存的压力。配方赋形剂的作用在于提供承受这些压力的稳定性。还可以使用赋形剂来降低高浓度蛋白质配方的粘度,以便使它们能释放并增强病人便利性。一般来讲,赋形剂能够基于它们稳定化蛋白质承受各种化学和物理压力而分类。一些赋形剂被用于减轻特定压力的效果或者用于调控特定蛋白质的特定易感性。其他赋形剂具有更普通的在物理学和蛋白质共价稳定性上的效果。在此描述的赋形剂或者通过它们的化合物类型或者通过它们在配方中的功能作用而被组配。当讨论每个赋形剂类型时,会提供稳定模式的简单描述。

[0063] 给出在此提供的教导和指导后,本领域的技术人员将知道,什么含量或范围的赋形剂能够被包含于任何特定的配方中从而获得本发明的生物药物配方,该配方可促进生物药物(例如,多肽)稳定性的保持。例如,待被包括在本发明的生物药物配方中的盐的含量和类型能够基于期望的最终溶液的渗透压度(即,等渗、低渗或高渗)以及待包括在配方中的其他成分的含量和渗透压度而被选择。类似地,作为例证,就包括在配方中的多元醇或蔗糖类型而言,这样的赋形剂的含量将取决于其渗透压度。

[0064] 举例来说,包含约5%的山梨糖醇能够获得等渗性,而要获得等渗性需要包含约9%的蔗糖赋形剂。能够被包括在本发明的生物药物配方内的一种以上赋形剂的含量或浓度范围的选择已经通过参考上述的盐、多元醇和蔗糖而举例。然而,本领域的技术人员应理解,在此描述的考虑内容和对特定赋形剂的参考同样地可适用于所有类型和组合的赋形剂,赋形剂包括:例如,盐、氨基酸、其他张力剂、表面活性剂、稳定剂、填充剂、冷冻保护剂、冻干保护剂、抗氧化剂、金属离子、螯合剂和/或防腐剂。

[0065] 进一步地,当报道特定赋形剂的克分子浓度时,本领域的技术人员将认识到,还预期溶液的当量百分比(%)w/v(例如,(溶液样品中物质的克数/mL溶液) $\times$ 100%)。

[0066] 当然,本领域技术人员将认识到,在此描述的赋形剂浓度在特定的配方内共享互相依赖性。举例来说,例如当有较高多肽浓度时、或者例如当有较高稳定剂浓度时,填充剂的浓度可以较低。另外、本领域技术人员将认识到,为了保持其中没有填充剂的特定配方的等渗性,稳定剂的浓度将因此被调节(即,将采用稳定剂的“张力性”含量)。普通的赋形剂在本技术领域是已知的,并且能够在下述文献中找到:Powell等,《用于肠胃外配方的赋形剂概要》(1998);PDA, J. Pharm. Sci. Technology, 52:238-311。

[0067] 缓冲液和缓冲剂

[0068] 药学活性多肽配方的稳定性通常在狭窄pH范围中观察到最大。该最佳稳定性的pH范围需要在预配制研究早期就确定。数种方法比如稳定性加速研究和测热筛选研究已经显示对这些努力是有用的(Remmele R.L. Jr., et al., Biochemistry, 38(16):5241-7(1999))。一旦配方最后被定下来,药物产品就必须被制造并且在其整个贮藏期内被保持。因而,通常使用缓冲剂来控制配方的pH。

[0069] 有机酸、磷酸盐和Tris已经习惯性地作为缓冲液被使用在蛋白质配方中。缓冲液种类的缓冲能力在等于pKa的pH处是最大的,并且当pH提高或下降离开该数值时缓冲能力会下降。缓冲能力的90%存在于其pKa的一个pH单位内。随着缓冲液浓度上升,缓冲能力也相应地提高。

[0070] 当选择缓冲液时,需要考虑几个因素。首先、也是最重要的,需要基于其pKa和期望的配方pH来限定缓冲液种类及其浓度。同样重要的是,要确保缓冲液与多肽及其他配方赋形剂相容,并且不会催化任何降解反应。需考虑的第三个重要的方面是一旦给药时缓冲液可能诱导的刺痛感觉和刺激性。例如,已知当注射柠檬酸盐时会引起刺痛(Laursen T, et al., Basic Clin Pharmacol Toxicol., 98(2):218-21(2006))。用于经皮下注射(SC)或肌肉注射(IM)途径给药的药物的潜在的刺痛和刺激性是更大的,因为药物溶液保持给药位点处的时间周期比经由IV(静脉注射)途径时相对更长,其中IV途径中一旦给药,配方就被快速地稀释进入血液中。对于通过直接静脉内注射给药的配方,需要监控缓冲液(以及任何其他的配方成分)的总量。人们不得不特别留意以磷酸钾缓冲溶液形式给药的

钾离子,其能够在病人中诱导心血管性影响 (Hollander-Rodriguez JC, et al., Am.Fam. Physician., 73(2) :283-90 (2006))。

[0071] 选择的存在于组合物中的缓冲体系是生理学相容的,并且可保持药物配方的期望 pH。在一种实施方式中,溶液的 pH 在 pH 2.0 和 pH 12.0 之间。例如,溶液的 pH 可以是 2.0、2.3、2.5、2.7、3.0、3.3、3.5、3.7、4.0、4.3、4.5、4.7、5.0、5.3、5.5、5.7、6.0、6.3、6.5、6.7、7.0、7.3、7.5、7.7、8.0、8.3、8.5、8.7、9.0、9.3、9.5、9.7、10.0、10.3、10.5、10.7、11.0、11.3、11.5、11.7、或 12.0。

[0072] pH 缓冲性化合物可以以任何适于维持配方的 pH 在预定水平下的量存在。在一种实施方式中,pH 缓冲液浓度是在 0.1mM 和 500mM(1M) 之间。例如,预期 pH 缓冲剂浓度至少是 0.1、0.5、0.7、0.80、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500mM。

[0073] 在此列出的用于缓冲配方的示例性 pH 缓冲剂,包括,但不限于:甘氨酸、组氨酸、谷氨酸、琥珀酸盐、磷酸盐、醋酸酯、柠檬酸盐、Tris、以及氨基酸或氨基酸混合物,所述氨基酸包括,但不限于,天冬氨酸、组氨酸、以及甘氨酸。

[0074] 盐

[0075] 盐经常被添加来提高配方的离子强度,这对于蛋白质溶解性、物理稳定性、以及等渗性可能很重要。盐能够以多种方式影响蛋白质的物理稳定性。离子能够通过结合于蛋白质表面上的带电荷的残基来稳定化蛋白质的天然状态。作为另一种选择,盐能够通过结合于沿着蛋白质骨架(-CONH-)的肽基团来稳定化变性状态。盐还可以通过屏蔽在蛋白质分子内部残基之间的排斥性静电相互作用而稳定化蛋白质天然构型。在蛋白质配方中的盐还可以屏蔽在蛋白质分子之间能够导致蛋白质聚集和不溶解的吸引力静电相互作用。在提供的配方中,盐浓度是在 0.1、1、10、20、30、40、50、80、100、120、150、200、300、以及 500mM 之间。

[0076] 稳定剂和填充剂

[0077] 在本发明的药物配方中,可以加入稳定剂(或稳定剂的组合物)来抑制或者降低储存导致的聚集和化学降解。一旦重新配制就模糊的或混浊的溶液表明蛋白质已经沉淀或者至少聚集。术语“稳定剂”,是指能够抑制水溶液状态中的聚集或其他物理性解、以及化学降解(例如,自溶、脱酰胺、氧化等)的赋形剂。通常在药物组合物中使用的稳定剂包括,但不限于:蔗糖、海藻糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖、棉籽糖、纤维二糖、龙胆二糖、异麦芽糖、阿拉伯糖、葡糖胺、果糖、甘露醇、山梨糖醇、甘氨酸、精氨酸盐酸盐、多羟基化合物。所述多羟基化合物包括:多糖比如葡聚糖、淀粉、羟乙基淀粉、环糊精、N-甲基吡咯烷(N-methyl pyrrolidene)、纤维素和透明质酸、氯化钠 [Carpenter et al., Develop. Biol. Standard 74 :225, (1991)]。在本发明的配方中,加入的稳定剂浓度为约 0.1、0.5、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、700、900、或 1000mM。

[0078] 如需要,配方还包括适当含量的填充和渗透压调节剂。填充剂包括:例如,甘露醇、甘氨酸、蔗糖、多聚体比如葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素、乳糖、山梨糖醇、海藻糖、或木糖醇。在一种实施方式中,填充剂是甘露醇。加入的填充剂浓度为约 0.1、0.5、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、

30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、700、900、或 1000mM。

[0079] 表面活性剂

[0080] 蛋白质分子高度倾向于与表面相互作用,使得它们在空气-液体、小瓶-液体、以及液体-液体(硅油)界面处对吸附和变性敏感。已经观察到这种降解途径是逆反地取决于蛋白质浓度,并且导致形成可溶性的和不可溶性的蛋白聚集或者蛋白质经吸附至表面而从溶液中损失。除了容器表面吸附之外,表面诱导的降解随着物理搅拌而被加重,在产品寄送和处理期间将经受物理搅拌。

[0081] 在蛋白质配方中通常使用表面活性剂来抑制表面诱导的降解。表面活性剂是两亲性分子,具有相对于界面位置向外竞争蛋白质的能力。表面活性剂分子中疏水性部分占据界面位置(例如,空气/液体),同时分子的亲水性部分保持朝向溶剂本体。在足够的浓度(典型地大约洗涤剂的临界胶束浓度)下,表面活性剂分子的表面层具有抑制蛋白质分子吸附在界面处的作用。因此,表面诱导的降解被最小化。最常使用的表面活性剂是脱水山梨醇聚乙氧基化脂肪酸酯,即聚山梨酸酯 20 和聚山梨酸酯 80。两者不同之处仅在于赋予分子疏水特性的脂肪链的长度,分别是 C-12 和 C-18。因此,聚山梨酸酯-80 更具表面活性,并且具有比聚山梨酸酯-20 更低的临界胶束浓度。

[0082] 洗涤剂还可以影响蛋白质的热力学构型的稳定性。再次,给定洗涤剂赋形剂的影响将是蛋白质特异性的。例如,聚山梨酸酯已经显示出可降低一些蛋白质的稳定性并且提高其它蛋白质的稳定性。蛋白质的洗涤剂去稳定作用,能够根据洗涤剂分子的疏水性尾部末端被合理地说明,该洗涤剂分子能够参与与部分地或者全部地解叠的蛋白质状态的特异性结合。这些类型的相互作用能够引起朝向更膨胀的蛋白状态的构造平衡变化(即,提高在配合中的蛋白质分子中疏水性部分暴露于结合性聚山梨酸酯)。作为另一种选择,如果蛋白质天然状态显示出一些疏水表面,则结合于天然状态的洗涤剂可以稳定化该构型。

[0083] 聚山梨酸酯的另一个方面是它们对氧化降解固有地敏感。通常,作为原材料,它们含有足量的过氧化物以引起蛋白质残基侧链、尤其是甲硫氨酸的氧化。该潜在的由添加稳定剂引起的氧化损害强调了这样一点:应该在配方中使用最低有效浓度的赋形剂。对于表面活性剂,用于给定蛋白质的有效浓度将取决于稳定机制。根据假定,如果表面活性剂稳定作用机制涉及到抑制表面变性,则有效浓度将大约是洗涤剂的临界胶束浓度。相反,如果稳定作用的机制与特异性的蛋白质-洗涤剂相互作用有关,则有效的表面活性剂浓度将涉及到蛋白质浓度和相互作用的化学计量学(Randolph T.W., et al., Pharm Biotechnol, 13: 159-75 (2002))。

[0084] 还可以加入适量的表面活性剂来抑制在冻干期间与表面相关的聚集现象(Chang, B, J. Pharm. Sci. 85:1325, (1996))。例举的表面活性剂包括阴离子型、阳离子型、非离子型、两性离子型,并且两性表面活性剂包括由天然产生的氨基酸衍生的表面活性剂。阴离子型表面活性剂包括,但不限于:十二烷基硫酸钠、琥珀磺酸二辛钠和二辛基磺酸钠、鹅脱氧胆酸、N-月桂基肌氨酸钠、十二基硫酸锂、1-辛烷磺酸钠、胆酸钠水合物、脱氧胆酸钠、以及脱氧甘胆酸钠。阳离子型表面活性剂包括,但不限于:苯扎氯铵或氯化苄乙氧铵、氯化十六烷吡啶一水合物、以及溴化六癸基三甲基铵。两性表面活性剂包括,但不限于:CHAPS、CHAPSO、SB3-10、以及 SB3-12。非离子型表面活性剂包括,但不限于:毛地黄皂苷、Triton X-100、Triton X-114、吐温-20、以及吐温-80。表面活性剂还包括,但不限于:聚桂醇 400,聚氧

40 硬脂酸酯, 聚氧化乙烯氢化蓖麻油 10、40、50 和 60, 单硬脂酸甘油酯, 聚山梨酸酯 40、60、65 和 80, 大豆卵磷脂及其他磷脂比如二油基磷脂酰胆碱 (DOPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油 (DMPG)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC)、以及二油基磷脂酰甘油 (DOPG); 脂肪酸糖酯、甲基纤维素和羧甲基纤维素。因此进一步提供或者各个地或者作为混合物以不同的比率包含这些表面活性剂的组合物。在本发明的配方中, 表面活性剂加入的浓度为约 0.01 至约 0.5g/L。

[0085] 其他普通的赋形剂成分

[0086] 氨基酸

[0087] 已经发现氨基酸在蛋白质配方中作为缓冲液、填充剂、稳定剂和抗氧化剂而多方面使用。组氨酸和谷氨酸被使用于 pH 范围分别为 5.5–6.5 和 4.0–5.5 的缓冲蛋白质配方中。组氨酸中的咪唑基的 $pK_a = 6.0$, 并且谷氨酸侧链的羧基的 pK_a 为 4.3, 这使得这些氨基酸适用于在它们各自 pH 范围内的缓冲。在此情况下谷氨酸是特别有用的 (例如, **Stemgen[®]**)。在市售蛋白质配方 (例如, **Xolair[®]**、**Herceptin[®]**、**Recombinate[®]**) 中通常发现有组氨酸, 并且该氨基酸提供了柠檬酸盐的代替物, 已知柠檬酸盐是一旦注射就刺痛的缓冲液。有趣的是, 还报道了当在具有 ABX-IL8 (IgG2 抗体) 配方中观察时, 当在液体和冻干品中在高浓度下使用时, 就聚集而言, 组氨酸具有稳定化作用 (Chen B, et al., Pharm Res., 20(12): 1952–60 (2003))。也观察到组氨酸 (高达 60mM) 可降低该抗体的高浓度制剂的粘度。然而, 在相同的研究中, 作者观察到, 在不锈钢容器中抗体的冻融研究期间含有组氨酸的配方中提高了聚集和变色。作者将该现象表征为由钢材腐蚀容器浸出的铁离子的作用。另一个当心使用组氨酸的注意事项是, 在存在金属离子的条件下其遭受光氧化 (Tomita M 等, Biochemistry, 8(12): 5149–60 (1969))。甲硫氨酸在配方中作为抗氧化剂的使用表现出具有前景; 已经观察到可有效地对抗许多氧化压力 (Lam XM, et al., J Pharm Sci, 86(11): 1250–5 (1997))。

[0088] 氨基酸甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸和丙氨酸已经显示通过优先排除机制可以稳定化蛋白质。甘氨酸也是在冻干配方 (例如, **Neumega[®]**, **Genotropin[®]**, **Humatrope[®]**) 中常用的填充剂。精氨酸已经被证明是抑制聚集的有效试剂, 并且已经在液体和冻干配方 (例如, **Activase[®]**, **Avonex[®]**, **Enbrel[®]** 液体) 中使用。另外, 在精氨酸存在的条件下增强特定蛋白质的再次折叠的效率已经归因于其在再次折叠期间可抑制竞争性聚集反应的作用。

[0089] 抗氧化剂

[0090] 蛋白质残基的氧化由许多不同的来源引起。通过添加特定的抗氧化剂, 氧化性蛋白质损害的抑制包括在产物的整个生产工艺和储存期间对许多因素比如大气氧、温度、曝光量、以及化学污染的仔细控制。最常用的药物抗氧化剂是还原剂、氧清除剂 / 自由基清除剂、或螯合剂。在治疗性蛋白配方中的抗氧化剂是水溶性的, 并且在整个产品贮藏期限内保持活性。还原剂和氧清除剂 / 自由基清除剂通过除去溶液中的活性氧而发挥作用。螯合剂比如 EDTA 通过结合可促进自由基形成的痕量金属杂质而有效果。例如, 在酸性成纤维细胞生长因子的液体配方中使用 EDTA 来抑制金属离子催化半胱氨酸残基氧化。EDTA 已经在市售产物比如 **Kineret[®]** 和 **Ontak[®]** 中使用。

[0091] 除各种赋形剂抑制蛋白质氧化的效果之外, 抗氧化剂本身用于诱导蛋白质其他的共价或物理变化的潜力是有意义的。例如, 还原剂能够引起分子内二硫键的解离, 这可能导

致二硫化物重排。当存在过渡金属离子时,抗坏血酸和 EDTA 已经显示出在许多蛋白质和多肽中可促进甲硫氨酸氧化 (Akers MJ 和 Defelippis MR. 《药物配方开发的肽并且和蛋白质》,作为肠胃外溶液的肽和蛋白质。Sven Frokjaer、Lars Hovgaard 编。《药物科学》。Taylor 和 Francis,英国 (1999) ;Fransson J. R. , J. Pharm. Sci. 86(9) :4046-1050(1997) ; Yin J, et al. , Pharm Res. ,21(12) :2377-83(2004))。已经报告硫代硫酸钠用于降低在 rhuMabHER2 中光和温度诱导的甲硫氨酸氧化水平 ;然而,该研究中也报告了硫代硫酸盐-蛋白质加合物的形成 (Lam XM,Yang JY,et al. , J Pharm Sci. 86(11) :1250-5(1997))。根据蛋白质的特定的压力和灵敏度选择适当的抗氧化剂。

[0092] 金属离子

[0093] 一般来讲,在蛋白质配方中,过渡金属离子是不希望有的,因为它们可能催化在蛋白质中的物理和化学降解反应。然而,当作为蛋白质和在蛋白质悬浮液配方中的辅因子时,特定的金属离子可被包含于配方中,在其中它们形成了配位络合物 (例如,胰岛素的锌悬浮液)。最近,已经建议使用镁离子 (10-120mM) 来抑制天冬氨酸异构化成异天冬氨酸 (WO 2004039337)。

[0094] 其中金属离子赋予稳定性或者提高蛋白质活性的两个例子是人脱氧核糖核酸酶 (rhDNase、**Pulmozyme**[®])、以及因子 VIII。就 rhDNase 而言, Ca^{+2} 离子 (高达 100mM) 通过特异性的结合位点提高了酶的稳定性 (Chen B, et al. , J Pharm Sci. ,88(4) :477-82(1999))。实际上,用 EGTA (双乙烷四乙酸) 从溶液中除去钙离子引起了脱酰胺作用和聚集的增强。然而,该作用仅在 Ca^{+2} 离子中观察到 ;其他的二价阳离子 Mg^{+2} 、 Mn^{+2} 和 Zn^{+2} 观察到会使 rhDNase 不稳定。在因子 VIII 中观察到类似的影响。 Ca^{+2} 和 Sr^{+2} 离子使蛋白质稳定化,同时其它的离子比如 Mg^{+2} 、 Mn^{+2} 和 Zn^{+2} 、 Cu^{+2} 和 Fe^{+2} 使酶不稳定 (Fatouros, A. , et al. , Int. J. Pharm. , 155,121-131(1997))。在单独的使用因子 VIII 的研究中,观察到在 Al^{+3} 离子存在的条件下聚集速率会有显著的提高 (Derrick TS, et al. , J. Pharm. Sci. ,93(10) :2549-57(2004))。作者注意到,其他的赋形剂比如缓冲盐经常被 Al^{+3} 离子污染,并且显示出在配制的产品中使用适当质量的赋形剂。

[0095] 防腐剂

[0096] 当开发涉及从相同容器中抽取一次以上的多次使用肠胃外配方时,防腐剂是需要的。它们的主要功能是抑制微生物生长,并且确保在整个贮藏期间或药物产品使用期间产品无菌。通常使用的防腐剂包括苯甲醇、苯酚和间甲酚。尽管防腐剂具有悠久的历史,但包含防腐剂的蛋白质配方的开发可能是挑战性的。防腐剂通常对蛋白质具有不稳定效应 (聚集),这已经变成限制它们在多剂量蛋白质配方中使用的主要因素 (Roy S, et al. , J Pharm Sci. ,94(2) :382-96(2005))。[0096] 迄今为止,大多数蛋白质药物已经仅配制成为用于单次使用。然而,当可能是多次剂量配方时,它们的附加优点是能够使病人便利,并且提高了适销性。一个较好的例子是人生长激素 (hGH),其中防腐配方的开发已经得到商业化更方便的、多次使用的注射笔型产品。目前至少四种这样的含有防腐 hGH 配方的笔型装置可在市场上购买。**Norditropin**[®] (液体,Novo Nordisk)、**Nutropin AQ**[®] (液体,Genentech) 和 **Genotropin** (冻干-双室药筒,Pharmacia & Upjohn) 含有苯酚,而**Somatropo**[®] (礼来) 被配制得具有间甲酚。

[0097] 在开发防腐剂量形式的配方期间需要考虑几个方面。必须优化在药物产品中有效

的防腐剂浓度。这要求测试剂量形式中给定的防腐剂,其浓度范围可在不损害蛋白质稳定性的情况下赋予抗微生物效果。例如,在开发用于白介素-1受体(I型)液体配方的过程中,通过使用差示扫描量热法(DSC),成功地筛选出三种防腐剂。基于它们在市售产品中常用浓度下对稳定性的影响,这些防腐剂分等级次序(Remmele RL Jr., et al., Pharm. Res., 15(2):200-8(1998))。

[0098] 一些防腐剂可能引起注射部位反应,这是当选择防腐剂时需要考虑的另一个因素。在集中于评价 Norditropin 中防腐剂和缓冲液的临床试验中,观察发现,与含有间甲酚的配方相比,在含有苯酚和苯甲醇的配方中疼痛知觉较低(Kappelgaard A.M., Horm Res. 62Suppl 3:98-103(2004))。有趣的是,在常用的防腐剂当中,苯甲醇具有麻醉性(Minogue SC,和 Sun DA., Anesth Analg., 100(3):683-6(2005))。

[0099] 冻干

[0100] 还预期包含本发明的 VWF 多肽的配方在给药之前可以冻干。通过使用本领域的普通技术进行冻干,并且应该优化用于被开发的组合物(Tang et al., Pharm Res. 21:191-200, (2004) 以及 Chang et al., Pharm Res. 13:243-9(1996))。

[0101] 在一个方面,冻干周期由三个步骤组成:冷冻、初级干燥、以及二级干燥(A.P.Mackenzie, Phil Trans R Soc London, Ser B, Biol 278:167(1977))。在冷冻步骤中,将溶液冷却至开始结冰。另外,该步骤诱导填充剂的结晶。冰在初级干燥阶段升华,这通过使用真空并且导入热量以促进升华、降低内腔压力低于冰的蒸气压而进行。最后,在二级干燥阶段,在降低腔室压力、并且在提高的搁板温度的条件下,被吸附或结合的水被除去。该工序生产出被称为冻干饼的材料。此后,冻干饼可能用无菌水或用于注射的合适稀释剂重新配制。

[0102] 冻干周期不仅确定了赋形剂的最终物理状态,而且影响其他的参数比如重新配制时间、外观、稳定性和最终水分含量。在冻结状态中的组合物结构通过几个过渡(例如,玻璃化转变、润湿、以及结晶)进行,这些过渡在特定的温度下发生,并且可能被用于理解和优化冻干工艺。玻璃态转化温度(T_g 和 / 或 T_g')能够提供关于溶解物物理状态的信息,并且可以通过差示扫描量热法(DSC)确定。 T_g 和 T_g' 是重要的参数,当设计冻干周期时必须被考虑。例如, T_g' 对初级干燥很重要。另外,在干燥状态中,玻璃态转化温度可提供有关最终产品贮存温度的信息。

[0103] 制备方法

[0104] 本发明进一步预期用于制备药物配方的方法。许多水溶液载体,例如,灭菌注射水、具有用于多次剂量用途的防腐剂的水、或具有适量表面活性剂(例如,聚山梨酸酯-20)的水、0.4%盐水、0.3%甘氨酸、或水悬浮液,可以在具有适用于制造水悬浮液的赋形剂的混合物中含有活性化合物。在多个方面,这样的赋形剂是悬浮剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍树胶和阿拉伯树胶;分散剂或润湿剂可以是天然产生的磷脂,例如卵磷脂、或烯化氧与脂肪酸的缩合产物例如聚氧化乙烯硬脂酸酯、或环氧乙烷与长链脂族醇的缩合产物例如七-癸烯氧十六烷醇、或环氧乙烷与由脂肪酸和己糖醇衍生的偏酯的缩合产物比如聚氧化乙烯山梨糖醇一油酸酯、或环氧乙烷与由脂肪酸和己糖醇酸酐衍生的偏酯的缩合产物例如聚乙烯单油酸山梨醇酐酯。该水悬浮液还可以含有一种以上防腐剂,例如对羟基苯甲酸乙酯、或正丙酯。

[0105] 给药

[0106] 为了将组合物给药于人类或试验用动物,在一个方面,组合物包含一种以上药学可接受的载体。术语“药学”或“药理学”可接受的,指的是稳定的分子实体和组合物,其可抑制蛋白质降解比如聚集和分裂产物,并且另外当通过使用本技术领域众所周知的途径给药时不会产生过敏反应或者其他不良反应,如下所述。术语“药学可接受的载体”包括任选的临床使用的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗试剂和吸收延迟剂等,包括上述公开的那些试剂。

[0107] 药物配方可以通过下述途径给药:口服、体表、透皮、肠胃外、吸入喷雾、阴道给药、直肠、或者颅内注射。在此使用的术语“肠胃外”包括皮下注射、静脉注射、肌肉注射、脑池内注射、或者输液技术。通过静脉注射、皮内注射、肌肉注射、乳房内注射、腹膜内注射、鞘内注射、眼球后注射、肺内注射和/或特定位点处手术植入的给药同样是可预期的。一般来讲,组合物基本上不含热原、以及可能对受试者有害的其他杂质。

[0108] 可以进行组合物的单一给药或者多次给药,剂量水平和模式由主治医师选择。为了预防或治疗疾病,如上述所限定,适当的剂量将取决于被治疗的疾病类型、严重程度和疾病过程,药物给药是用于预防目的还是治疗目的、先前的治疗、病人的病历和对药物的反应、以及主治医师的判断。

[0109] 试剂盒

[0110] 作为附加的方面,本发明包括试剂盒,其包含以可促进向个体给药的方式包装的一种以上药物配方。在一种实施方式中,这样的试剂盒包括被包装在容器比如密封瓶子或密封容器中的在此描述的药物配方(例如,包含治疗性蛋白或者肽的组合物),带有附着于容器、或者包括在包装中的标签,用于描述在实施该方法时化合物或组合物的使用。在一种实施方式中,该药物配方被包装在容器中,以使得容器中液面上空间(例如,在液体配方和容器顶部之间的空气量)非常小。优选液面上空间可以忽略不计(即,几乎没有)。在一种实施方式中,试剂盒含有具有治疗性蛋白或肽组合物的第一容器、和具有用于组合物的生理学可接受的重配溶液的第二容器。在一个方面,药物配方以单位剂量形式被包装。该试剂盒可以进一步包括适合于根据特定的给药途径而给药药物配方的装置。优选地,试剂盒含有描述药物配方的使用的标签。

[0111] 剂量

[0112] 与用于在此描述的治疗病况的方法有关的剂量摄入将被主治医师确定,该主治医师会考虑到改变药物作用的各种因素,例如年龄、状况、体重、性别和病人的饮食、任何感染的严重程度、给药时间及其他临床因素。举例来说,本发明的重组 VWF 的典型剂量是大约 50U/kg、等于 500 μ g/kg。

[0113] 本发明的配方可以通过原始丸剂、接着连续输液以便维持药物产品的治疗循环水平而被给药。在另一个例子中,本发明的化合物可以作为一次性剂量而被给药。本领域技术人员将容易地优化有效的剂量和给药摄入,通过较好的医疗实践和病人个体的临床状况来确定。剂量给药频率将取决于试剂的药物动力学参数和给药途径。最佳的药物配方将被本领域的技术人员根据给药途径和期望的剂量而确定。参见,例如,《雷明顿药物科学》,第十八版(1990,Mack 出版公司,Easton,宾夕法尼亚州 18042)第 1435-1712 页。其公开内容通过引用方式并入本文。这些配方可以影响被给药的试剂的物理状态、稳定性、体内释放速

度、以及体内清除速度。取决于给药途径,根据体重、体表面积或者器官大小可以计算出合适的剂量。通过使用建立的用于确定血液水平剂量的测定方法,连同适当的剂量-反应数据,可以确定适当的剂量。最终的剂量摄入将被主治医师确定,该主治医师会考虑到改变药物作用的各种因素,例如药物比活力、损伤严重程度和病人的应答、年龄、状况、体重、性别和病人的饮食、任何感染的严重程度、给药时间及其他临床因素。随着研究进行,关于适当剂量水平以及各种疾病和状况的治疗持续时间的进一步信息将会被披露。

[0114] 下述实施例并不是用于限制本发明,而仅是示例性的本发明的具体实施方式。

[0115] 实施例 1

[0116] 摇动实验

[0117] 为了确定在各种配方中 rVWF 的沉淀量,测试在多种状况下剧烈摇动后 rVWF 的回收率。

[0118] 在摇床上于室温下 (RT) 对含 rVWF 的 Advate 缓冲液 (90mM NaCl、1.68mM CaCl₂、10mM L-组氨酸、10mM Tris、0.26mM 谷胱甘肽、23.4mM 海藻糖、175.7mM 甘露醇、以及 0.1g/L 吐温 -80, pH 7.0) 或 Advate 1 : 3 缓冲液 (在水中稀释 3 倍的 Advate 缓冲液) 进行剧烈摇动 0 分钟、1 分钟、2.5 小时、或 4 天,并且测量 rVWF 相对于摇动前起始原料的回收百分率。如表 1 所示,观察发现在 Advate 缓冲液中损失了约 40-80%,同时观察发现在 Advate 1 : 3 缓冲液中损失了约 20-30%。VWF 抗原 VWF:Ag 对应于在 VWF 特异性的使用多克隆抗 VWF 抗体的 ELISA 中能够被检测出来的 VWF 的含量,而 VWF:RCo 对应于在存在瑞斯托菌素的存在下引起稳定化血小板凝集的 VWF 的含量。在两种情况下,依照实际的世界卫生组织标准校准的人类参照血浆被用作标准品 (1mL 参照血浆通常含有 1U VWF)。

[0119] 表 1. 剧烈摇动时间对 rVWF 回收率的影响

[0120]

rVWF	室温下剧烈摇动	VWF:Ag [U/mL]	回收率 [%]	VWF:RCo [U/mL]	回收率 [%]	RCo/VWF:Ag [U/U]
Advate	0 分钟	213	100%	104	100%	0.49
	1 分钟	120	56%			
	2.5 小时	139	65%			
	4 天	37	17%	7	7%	0.19
Advate 1:3	0 分钟	206	100%	134	100%	0.65
	1 分钟	152	74%			
	2.5 小时	170	82%			
	4 天	138	67%	131	98%	0.95

[0121] 在摇动实验中还测试了冷冻 / 解冻和冻干法的影响。在 -20℃ 冷藏室中或者在干冰上在 -20℃ 下进行冷冻, 而解冻在室温下的两种情况下进行, 并且两者都是从液体配方开始。对于冻干, 在此描述的配制的 VWF 样品在中试规模冻干器内于 ≤ -40℃ 下进行冷冻, 并且使用标准冻干程序进行冷冻干燥。直接用液体配方 (在 5mL 小瓶中 2mL) 进行摇动。如表 2 所示, 在 Advate 1 : 3 缓冲液中 rVWF 的回收百分率比在 Advate 缓冲液中更高。

[0122] 表 2。

[0123]

rVWF		VWF:Ag [U/mL]	VWF:Ag 回收率 [%]	VWF:RCo [U/mL]	VWF:Rco 回收率 [%]	RCo:Ag [U/U]
Advate	冷冻	213	100%	104	100%	0.49
	-20 °C 下冷冻-3x	229	107%	84	81%	0.37
	干冰冷冻-3x	231	108%	72	69%	0.31
	冻干	242	113%	61	59%	0.25
	起始原料	213	100%	104	100%	0.49
	室温下剧烈摇动 4 天	37.0	17%	7.2	6.9%	0.19
Advate 1:3	冷冻	206	100%	134	100%	0.65
	-20 °C 下冷冻-3x	184	89%	132	99%	0.72
	干冰冷冻-3x	195	94%	128	96%	0.66
	冻干	195	94%	107	80%	0.55
	起始原料	206	100%	134	100%	0.65
	室温下剧烈摇动 4 天	138	67%	131	98%	0.95

[0124] 在摇动实验中, 还对分别被储藏在有液面上空间、以及没有液面上空间的注射器

中的 rVWF 测量了回收百分率。有趣的是,当 rVWF 被储藏在没有液面上空间的注射器中并且按如上所述摇动时,没有观察到 rVWF 沉淀。相反,当 rVWF 被储藏在具有液面上空间的注射器中时,观察到一些沉淀。

[0125] 总之,剧烈摇动导致在 Advate 缓冲液或 Advate 1 : 3 缓冲液中损失至少 30% 的 rVWF,使用 Advate 缓冲液显示出比 Advate 1 : 3 缓冲液损失更高的回收率。有趣的是,在剧烈摇动中观察到沉淀,但当 rVWF 被储藏并在汽车中运输大约 5000km 时却未观察到相同的沉淀(代表期望的运输期间摇动)。通过储存在没有液面上空间的注射器中, rVWF 的沉淀物能够被除去。

[0126] 实施例 2

[0127] 重组 VWF 的稳定性

[0128] 通过评估存在于各种配方中的 rVWF 活性水平,测试 rVWF 的稳定性。

[0129] 如图 1 所示,由于存在 0.3mM 的谷胱甘肽, rVWF 在 Advate 缓冲液中 26 周后是不稳定的。然而,如图 2 所示, rVWF 在 Advate 1 : 3 缓冲液中更稳定(例如,在 4℃ 下长达 12 周)。

[0130] 如图 3 所示,基于柠檬酸盐的配方(15mM 柠檬酸钠、10mM CaCl_2 、100mM NaCl, pH 7.0) 的稳定性比含有 0.1M 谷胱甘肽的 Advate 1 : 3 缓冲液配方要好。

[0131] 同样地,测量 rVWF 在各种缓冲液中随时间的浓度。如图 4、图 5 和图 6 所示,分别在 Advate 缓冲液、Advate 1 : 3 缓冲液、以及基于柠檬酸盐的缓冲液中的 rVWF 浓度随时间是稳定的。

[0132] 实施例 4

[0133] 液体配方的表征

[0134] 差示扫描量热法(DSC)被用于评估蛋白质(rVWF)在各种缓冲液中解叠的程度。如表 3 所示, Advate 缓冲液 pH 7.0 对于稳定化是最佳的。

[0135] DSC 是一种热分析技术,其中测量提高温度样品所需热量与提高参比物温度所需热量的差异与温度的关系。DSC 实验的结果是热通量相对于温度或者相对于时间的曲线。

[0136] 差示扫描量热计能够扫描整个加热和冷却的温度范围,并且其通过测量达到设定的温度所需的热量来确定相转变即熔化、结晶、或玻璃化转变。该热量计用一组纯金属(锌、铜、以及锡)校准,所述金属具有已知热容 C_p 和熔点 T_m 。把各个参比缓冲液放入参比毛细管中,并且把 rVWF 样品放入仪器中的样品毛细管中。

[0137] 表 3. 在各种缓冲液中的解叠温度

[0138]

批次	缓冲液	pH	解叠温度(℃)
rVWF161A	Advate	7.0	66.0
rVWF161B	Immunate	6.8	64.5
rVWF161C	柠檬酸盐	6.8	61.2
rVWF161D	NovoSeven	6.8	64.9

rVWF158	Hepes	7.4	61.3
---------	-------	-----	------

[0139] 缓冲剂成分和浓度：

- [0140] A) Advate : 5.26g/L NaCl
 [0141] 0.248g/L CaCl_2
 [0142] 32g/L D-甘露醇
 [0143] 8g/L 海藻糖
 [0144] 1.56g/L L-组氨酸
 [0145] 1.2g/L Tris
 [0146] 0.08g/L 谷胱甘肽 pH = 7.0
 [0147] B) Immunate : 5.25g/L 甘氨酸
 [0148] 2.2g/L NaCl
 [0149] 5.25g/L NaCit3
 [0150] 5.25g/L 赖氨酸盐酸盐
 [0151] 0.62g/L CaCl_2 pH = 6.8
 [0152] C) 柠檬酸盐 : 3g/L 甘氨酸
 [0153] 2.92g/L NaCl
 [0154] 2.5g/L NaCit3
 [0155] 30g/L D-甘露醇
 [0156] 10g/L 海藻糖 pH = 6.8
 [0157] D) NovoSeven : 0.75g/L 甘氨酸
 [0158] 2.92g/L NaCl
 [0159] 1.47g/L CaCl_2
 [0160] 30g/L D-甘露醇 pH = 6.8
 [0161] rVWF 158 : 20mM Hepes
 [0162] 150mM NaCl
 [0163] 5g/L 蔗糖 pH = 7.4

[0164] 另外,如图 7 所示,大多数配方赋形剂使 rVWF 的解叠温度提高约 1-2°C。图 8 显示,10mM CaCl_2 使解叠温度提高了约 8°C 至约 67°C,也可以由 Advate 缓冲液达到解叠温度。 CaCl_2 的这种作用在 pH 7.3 和 pH6.5 处是相似的,如图 9 所示。最后,分析了海藻糖和蔗糖对解叠温度的影响。与单独的柠檬酸盐相比,海藻糖和蔗糖两者都未提高 rVWF 的解叠温度。在存在不同赋形剂的条件下对于 rVWF 的解叠温度 ($T_{\max}$) 数据的总结在表 4 中被显示出来。

[0165] 表 4

[0166]

15 mM 柠檬酸钠 缓冲液	-	15 mM Tris	15 mM 甘氨酸	50 mM NaCl
ΔH [kJ/mol]	128494.3	656259.7	157352.2	124985.8
解叠温度[°C]-峰 1	58.6		59.1	61
峰 2	65.2	68.5	65.5	
峰 3	80.4		80.1	81
峰 4				
15 mM 柠檬酸钠 缓冲液	15 mM 组氨酸	20.52 g/L 甘露醇	10.26 g/L 海藻糖	
ΔH [kJ/mol]	134044.5	1588590.1	612235.9	
解叠温度[°C]-峰 1	59.2	58.5	58.5	
峰 2	65.2	65.5	71.3	
峰 3	79.3	78.2	81.5	
峰 4	88.5		92.7	
15 mM 柠檬酸钠 缓冲液	1 mM CaCl_2	10 mM CaCl_2	32 g/L 蔗糖	0.25 mM 蔗糖
ΔH [kJ/mol]	266008.2	308171.3	115082.4	246904.6
解叠温度[°C]-峰 1	64.5	67.2	59.2	60
峰 2			66	67
峰 3	81	83.1	81.1	81.7
峰 4	91.8	93		
15 mM 柠檬酸钠 缓冲液	0.1 g/L 吐温-80	32 g/L 棉籽糖	$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaHPO}_4$	7.8 mM 海藻糖
ΔH [kJ/mol]	338792.7	127329.2	197967.5	135573.3
解叠温度[°C]-峰 1	58.7	60.1	61.4	58.4
峰 2	64.4	65.8		65.4
峰 3	81.6	80.3	80.4	80.4
峰 4			89.2	

[0167] 除不同的缓冲液之外, DSC 被用于估定在 Advate 缓冲液中在不同的 pH 值下 rVWF 的解叠温度。结果如下述表 5 所示。对于 rVWF 的稳定化, Advate 缓冲液 pH 7.0 是最佳的 (即, 最高的解叠温度; 峰 1)。

[0168] 表 5。

[0169]

pH	峰 1	峰 2
5.0	59.5	62.0
6.0	65.2	75.4
7.0	67.2	82.8
8.0	66.6	85.6
9.0	65.0	84.9

[0170] 在不同温度下储存不同的持续时间之后,评估了在 Advate 缓冲液中和在 Advate 1 : 3 缓冲液中的 rVWF 荧光光谱。在 Advate 缓冲液或 Advate 1 : 3 缓冲液中于 40℃ 下储存 0 到 28 天之后,没有观察到 (或者仅略微观察到) 荧光光谱的变化。在其他温度下没有观察到差异。

[0171] 同样地,使用胶滤 (Superose 6) 评估 rVWF 的降解。在 Advate 缓冲液中于 4℃ 下 26 周之后,观察到一些降解,而在 Advate 1 : 3 缓冲液中于 4℃ 下 26 周之后则几乎没有观察到 rVWF 的降解。在 40℃ 下,谷胱甘肽随时间过去提高了降解量 (虽然在 Advate 1 : 3 缓冲液中提高程度较慢)。

[0172] 基于以上所述实施例,就冷冻 / 解冻和冻干后回收率而言,Advate 1 : 3 缓冲液与未稀释的 Advate 缓冲液相比较具有优势。另外,在 40℃ 下孵育期间 Advate 1 : 3 缓冲液能够稳定化 rVWF 活性 (例如,维持生物活性),比 Advate 缓冲液更好。在 Advate 1 : 3 缓冲液中的 rVWF 在 4℃ 下孵育 4 周是稳定的。最后,DSC 已经表明,pH 7.0 是抑制 rVWF 降解的最佳值 (即,显示出最高的解叠温度)。

[0173] 因而,考虑到本发明的数据,建议用于 rVWF 的配方包括 15mM 柠檬酸盐 (或者甘氨酸或组氨酸)、10mM CaCl_2 , pH 6.5-7.3,通过 NaCl 将其调节到期望的渗透压度。例如,在一种实施方式中,基于柠檬酸盐的配方是 15mM 柠檬酸钠、10mM CaCl_2 、100mM NaCl, pH 7.0。

[0174] 可选地,不含谷胱甘肽的 Advate 或 Advate 1 : 3 缓冲液也被预期是:Advate : 90mM NaCl、1.68mM CaCl_2 、10mm L- 组氨酸、10mM Tris、0.26mM 谷胱甘肽、23.4mM 海藻糖、175.7mM 甘露醇、以及 0.1g/L 吐温 -80, pH 7.0 ;Advate 1 : 3 : 30mM NaCl、0.56mM CaCl_2 、3.3mM L- 组氨酸、3.3mM Tris、7.8mM 海藻糖、58.6mM 甘露醇、以及 0.03g/L 吐温 -80, pH 7.0。

[0001]

序列表

<110> 巴克斯特国际公司
巴克斯特保健股份有限公司

<120> 重组 VWF 配方

<130> PUSMG1001518S

<150> 61/017,881

<151> 2007-12-31

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8833

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<223> 预前体 vWF

<400> 1

agctcacagc tattgtggtg ggaaaggag ggtggttggg ggatgtcaca gcttgggctt	60
tatctccccc agcagtgggg actccacagc ccctgggcta cataacagca agacagtccg	120
gagctgtagc agacctgatt gagcctttgc agcagctgag agcatggcct aggggtgggcg	180
gcaccattgt ccagcagctg agtttcccag ggaccttgga gatagccgca gccctcattt	240
gcaggggaag atgattcctg ccagatttgc cggggtgctg cttgctctgg ccctcatttt	300
gccagggacc ctttgtgcag aaggaactcg cggcaggtea tccacggccc gatgcagcct	360
tttcggaagt gacttcgtca acacctttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg	420
cagttacctc ctggcagggg gctgccagaa acgctccttc tcgattattg gggacttcca	480

[0002]

gaatggcaag agagtgagcc tctccgtgta tcttggggaa ttttttgaca tccatttgtt	540
tgtcaatggt accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgccctatg cctccaaagg	600
gctgtatcta gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggctttgt	660
ggccaggatc gatggcagcg gcaactttca agtcctgtcg tcagacagat acttcaacaa	720
gacctgcggg ctgtgtggca actttaacat ctttgcctga gatgacttta tgaccaaga	780
agggaccttg acctcggacc cttatgactt tgccaactca tgggctctga gcagtggaga	840
acagtgggtg gaacgggcat ctctcccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat	900
gcagaagggc ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcgggtg ttgcccgctg	960
ccacctctg gtggaccccg agccttttgt ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagtg	1020
tgttgggggg ctggagtgcg cctgccctgc cctcctggag tacgcccgga cctgtgcccc	1080
ggagggaatg gtgctgtacg gctggaccga ccacagcgcg tgcagcccag tgtgccctgc	1140
tggtatggag tataggcagt gtgtgtcccc ttgccccagg acctgccaga gcctgcacat	1200
caatgaaatg tgtcaggagc gatgcgtgga tggtcgcagc tgccctgagg gacagctcct	1260
ggatgaaggc ctctgcgtgg agagcaccga gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgcta	1320
ccctcccggc acctccctct ctcgagactg caacacctgc atttgccgaa acagccagtg	1380
gatctgcagc aatgaagaat gtccagggga gtgccttgtc acaggicaat cacacttcaa	1440
gagctttgac aacagatact tcaccttcag tgggatctgc cagtacctgc tggcccggga	1500
ttgccaggac cactccttct ccattgtcat tgagactgtc cagtgtgtg atgaccgga	1560
cgctgtgtgc acccgctccg tcaccgtccg gctgcctggc ctgcacaaca gccttgtaa	1620
actgaagcat ggggcaggag ttgccatgga tggccaggac gtccagctcc ccctcctgaa	1680
aggtgacctc cgcattccagc atacagtac ggccctccgtg cgcctcagct acggggagga	1740
cctgcagatg gactgggatg gccgcgggag gctgtggtg aagctgtccc ccgtctatgc	1800
cgggaagacc tgcggcctgt gtgggaatta caatggcaac cagggcgacg acttccttac	1860

[0003]

cccctctggg ctggcggagc cccgggtgga ggacttcggg aacgcctgga agctgcacgg	1920
ggactgccag gacctgcaga agcagcacag cgatccctgc gccctcaacc cgcgcatgac	1980
caggttctcc gaggaggcgt gcgcggtcct gacgtccccc acattcgagg cctgccatcg	2040
tgccgtcagc ccgctgccct acctgcggaa ctgccgtac gacgtgtgct cctgctcgga	2100
cggccgcgag tgcctgtgcg gcgccctggc cagctatgcc gcggcctgcg cggggagagg	2160
cgtgcgcgtc gcgtggcgcg agccaggccg ctgtgagctg aactgcccga aaggccaggt	2220
gtacctgcag tgcgggacct cctgcaacct gacctgccgc tctctctctt acccgatga	2280
ggaatgcaat gaggcctgcc tggagggtg cttctgcccc ccagggtctt acatggatga	2340
gaggggggac tgcgtgcccaggccagtg cccctgttac tatgacggtg agatcttcca	2400
gccagaagac atcttctcag accatcacac catgtgtac tgtgagatg gcttcatgca	2460
ctgtaccatg agtggagtcc ccggaagctt gctgcctgac gctgtcctca gcagtcacct	2520
gtctcatcgc agcaaaagga gcctatcctg tcggccccc atggtcaagc tgggtgtgctc	2580
cgctgacaac ctgcgggctg aagggtcga gtgtacaaa acgtgccaga actatgacct	2640
ggagtgcatt agcatgggt gtgtctctgg ctgcctctgc cccccggga tggtcggga	2700
tgagaacaga tgtgtggccc tggaaagggt tccctgcttc catcaggga aggagtatgc	2760
ccctggagaa acagtgaaga ttggctgcaa cacttgtgtc tgcgggacc ggaagtggaa	2820
ctgcacagac catgtgtgtg atgccacgtg ctccacgac gccatggccc actacctcac	2880
cttcgacggg ctcaaatacc tgttccccgg ggagtgccag tacgttctgg tgcaggatta	2940
ctgcggcagt aaccctggga ccttcggat cctagtgggg aataagggt gcagccacc	3000
ctcagtgaat tgcaagaaac gggtcacat cctggtggag ggaggagaga ttgagctgtt	3060
tgacggggag gtgaatgtga agaggcccat gaaggatgag actcactttg aggtggtgga	3120
gtctggccgg tacatcattc tgctgtggg caaagccctc tccgtgtgtt gggaccgcca	3180

[0004]

cctgagcadc tccgtggtcc tgaagcagac ataccaggag aaagtgtgtg gcctgtgtgg	3240
gaattttgat ggcatccaga acaatgacct caccagcagc aacctccaag tggaggaaga	3300
ccctgtggac tttgggaact cctggaaagt gagctcgcag tgtgctgaca ccagaaaagt	3360
gcctctggac tcacccctg ccacctgcca taacaacatc atgaagcaga cgaatgttga	3420
ttcctcctgt agaatcctta ccagtgcgt cttccaggac tgcaacaagc tgggtggacc	3480
cgagccatat ctggatgtct gcatttacga cacctgctcc tgtgagtcca ttggggactg	3540
cgctgtcttc tgcgacacca ttgtgccta tgcccacgtg tgtgcccagc atggcaaggt	3600
ggtgacctgg aggacggcca cattgtgccc ccagagctgc gaggagagga atctccggga	3660
gaacgggtat gagtgtgagt ggcgtataa cagctgtgca cctgcctgtc aagtcacgtg	3720
tcagcacctt gagccactgg cctgccctgt gcagtgtgtg gagggtgcc atgccactg	3780
ccctccaggg aaaatcctg atgagctttt gcagacctgc gttgacctg aagactgtcc	3840
agtgtgtgag gtggctggcc ggcgttttgc ctcaggaaag aaagtcacct tgaatccag	3900
tgacctgag cactgccaga ttgcccactg tgatgttgc aacctacct gtgaagcctg	3960
ccaggagccg ggaggcctgg tggtgctcc cacagatgcc ccgtgagcc ccacctct	4020
gtatgtggag gacatctcg aaccgccgtt gcacgattt tactgcagca ggctactgga	4080
cctggtcttc ctgctggatg gtcctccag gctgtccag gctgagttt aagtgtgaa	4140
ggcctttgtg gtggacatga tggagcggt gcgcatctcc cagaagtggg tccgcgtggc	4200
cgtggtggag taccacgacg gctcccacgc ctacatcggg ctcaaggacc ggaagcgacc	4260
gtcagagctg cggcgcatg ccagccaggt gaagtatcg ggcagccagg tggcctccac	4320
cagcgaggtc ttgaaataca cactgttcca aatcttcagc aagatcgacc gccctgaagc	4380
ctcccgcatc acctgctcc tgatggccag ccaggagccc caacggatgt cccggaactt	4440
tgtccgtac gtccagggcc tgaagaagaa gaagtcatt gtgatcccg tgggcattgg	4500
gccccatgcc aacctcaagc agatccgct catcgagaag caggccctg agaacaaggc	4560

[0005]

cttcgtgctg agcagtgtgg atgagctgga gcagcaaagg gacgagatcg ttagctacct	4620
ctgtgacctt gcccctgaag cccctcctcc tactctgccc cccgacatgg cacaagtcac	4680
tgtgggcccc gggtctcttg gggtttcgac cctggggccc aagaggaact ccatggttct	4740
ggatgtggcg ttcgtccttg aaggatcgga caaaattggt gaagccgact tcaacaggag	4800
caaggagttc atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca gcatccacgt	4860
cacggtgctg cagtactcct acatggtgac tgtggagtac cccitcagcg aggcacagtc	4920
caaaggggac atcctgcagc ggggtgcgaga gatccgctac cagggcggca acaggaccaa	4980
cactgggctg gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc agggtgaccg	5040
ggagcaggcg cccaacctgg tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa	5100
gaggtgcct ggagacatcc aggtggtgcc cattggagtg ggccctaata ccaacgtgca	5160
ggagctggag aggattggt ggcccaatgc ccctatcctc atccaggact ttgagacgt	5220
cccccgagag gctcctgacc tgggtctgca gaggtgctgc tccggagagg ggctgcagat	5280
ccccaccctc tccctgcac ctgactgcag ccagcccctg gacgtgatcc ttctcctgga	5340
tggctcctcc agtttcccag cttcttattt tgatgaaatg aagagtttcg ccaaggcttt	5400
catttcaaaa gccaatatag ggctcgtct cactcaggtg tcagtgtgc agtatggaag	5460
catcaccacc attgacgtgc catggaacgt ggtcccggag aaagcccatt tgctgagcct	5520
tgtggacgtc atgcagcggg agggaggccc cagccaaatc ggggatgcct tgggctttgc	5580
tgtgcgatac ttgacttcag aaatgcatgg tgccaggccg ggagcctcaa aggcggtggt	5640
cactctggtc acggacgtct ctgtggattc agtggatgca gcagctgatg ccgccaggtc	5700
caacagagtg acagtgttcc ctattggaat tggagatcgc tacgatgcag cccagctacg	5760
gatcttggca ggcccagcag gcgactccaa cgtggtgaag ctccagcgaa tcgaagacct	5820
ccctaccatg gtcaccttgg gcaattcctt cctccacaaa ctgtgctctg gatttgtag	5880

[0006]

gatttgcacg gatgaggatg ggaatgagaa gagggccggg gacgtctgga ccttgccaga	5940
ccagtgccac accgtgactt gccagccaga tggccagacc ttgctgaaga gtcacgggt	6000
caactgtgac cgggggctga ggccttcgtg ccctaacagc cagtccctg ttaaagtga	6060
agagacctgt ggctgccgt ggacctgccc ctgcgtgtgc acaggcagct ccactcggca	6120
catcgtgacc ttgatgggc agaatttcaa gctgactggc agctgttctt atgtcctatt	6180
tcaaaacaag gagcaggacc tggaggtgat tctccataat ggtgcctgca gccctggagc	6240
aaggcagggc tgcataaat ccatcgaggt gaagcacagt gccctctccg tcgagctgca	6300
cagtgcacatg gaggtgacgg tgaatgggag actggtctct gtcccttacg tgggtgggaa	6360
catggaagtc aacgtttatg gtgccatcat gcatgaggtc agattcaatc accttggtca	6420
catcttcaca ttactccac aaaacaatga gtccaactg cagctcagcc ccaagacttt	6480
tgcttcaaag acgtatggc tgtgtgggat ctgtgatgag aacggagcca atgacttcat	6540
gctgagggat ggcacagtca ccacagactg gaaaacactt gttcaggaat ggactgtgca	6600
gcggccaggg cagacgtgcc agcccatcct ggaggagcag tgtcttgtcc ccgacagctc	6660
ccactgccag gtcctcctct taccactgtt tgctgaatgc cacaaggtec tggctccagc	6720
cacattctat gccatctgcc agcaggacag ttgccaccag gagcaagtgt gtgaggtgat	6780
cgctcttat gccacctct gtccgaccaa cggggtctgc gttgactgga ggacacctga	6840
tttctgtgct atgtcatgcc caccatctct ggtctacaac cactgtgagc atggctgtcc	6900
ccggcactgt gatggcaacg tgagctcctg tggggacat ccctccgaag gctgtttctg	6960
ccctccagat aaagtcatgt tggaggcag ctgtgtccct gaagaggcct gcactcagtg	7020
cattggtgag gatggagtcc agcaccagtt cctggaagcc tgggtcccgg accaccagcc	7080
ctgtcagatc tgcacatgcc tcagcgggag gaaggtcaac tgcacaacgc agccctgccc	7140
cacggccaaa gtcaccacgt gtggcctgtg tgaagtagcc cgcctccgcc agaattgcaga	7200
ccagtgtgc cccgagtatg agtgtgtgtg tgaccagtg agctgtgacc tgccccagt	7260

[0007]

gcctcactgt gaacgtggcc tccagcccac actgaccaac cctggcgagt gcagacccaa	7320
cttcacctgc gcctgcagga aggaggagt caaaagagtg tccccaccct cctgcccccc	7380
gcaccgtttg cccacccttc ggaagaccca gtgctgtgat gagtatgagt gtgcctgcaa	7440
ctgtgtcaac tccacagtga gtgtccccct tgggtacttg gcctcaactg ccaccaatga	7500
ctgtggctgt accacaacca cctgccttcc cgacaagggtg tgtgtccacc gaagcaccat	7560
ctaccctgtg ggccagttct gggaggagggt ctgcgatgtg tgcacctgca ccgacatgga	7620
ggatgccgtg atgggcctcc gcgtggccca gtgtcccag aagccctgtg aggacagctg	7680
tcggctgggc ttcaattacg ttctgcatga aggcgagtgc tgtggaaggt gcctgccatc	7740
tgccctgtgag gtggtgactg gctcaccgcg gggggactcc cagtcttcct ggaagagtgt	7800
cggctcccag tgggcctccc cggagaacct ctgcctcatc aatgagtgtg tccgagtga	7860
ggaggaggtc ttatataaac aaaggaacgt ctctgcccc cagctggagg tccctgtctg	7920
cccctcgggc ttccagctga gctgtaagac ctacgcgtgc tgcccaagct gtcgctgtga	7980
gcgcatggag gcctgcatgc tcaatggcac tgtcattggg cccgggaaga ctgtgatgat	8040
cgatgtgtgc acgacctgcc gctgcatggt gcaggtgggg gtcattctctg gattcaagct	8100
ggagtgcagg aagaccacct gcaaccctg ccccctgggt tacaaggaag aaaataacac	8160
aggtgaatgt tgtgggagat gttgcctac ggcttgacc attcagctaa gaggaggaca	8220
gatcatgaca ctgaagcgtg atgagacgct ccaggatggc tgtgatactc acttctgcaa	8280
ggtcaatgag agaggagagt acttctggga gaagagggtc acaggctgcc cacccttga	8340
tgaacacaag tgtctggctg agggaggtaa aattatgaaa attccaggca cctgctgtga	8400
cacatgtgag gagcctgagt gcaacgacat cactgccagg ctgcagtatg tcaaggtggg	8460
aagctgtaag tctgaagtag aggtggatat ccactactgc cagggcaaat gtgccagcaa	8520
agccatgtac tccattgaca tcaacgatgt gcaggaccag tgctcctgct gctctccgac	8580

[0008]

acggacggag cccatgcagg tggccctgca ctgcaccaat ggctctgttg tgtaccatga 8640

ggttctcaat gccatggagt gcaaatgctc ccccaggaag tgcagcaagt gaggtctctg 8700

cagctgcatg ggtgcctgct gctgcctgcc ttggcctgat ggccaggcca gagtctgcc 8760

agtcctctgc atgttctgct cttgtgccct tctgagccca caataaaggc tgagctctta 8820

tcttgcaaaa ggc 8833

<210> 2
 <211> 2783
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> 预前体 vWF

<400> 2

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Leu Ile Leu Pro Gly
 1 5 10 15

Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr Ala Arg Cys
 20 25 30

Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly Ser Met Tyr
 35 40 45

Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly Cys Gln Lys
 50 55 60

Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys Arg Val Ser
 65 70 75 80

Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu Phe Val Asn
 85 90 95

Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro Tyr Ala Ser
 100 105 110

[0009]

Lys	Leu	Glu	Thr	Glu	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Lys	Leu	Ser	Gly	Glu	Ala	Tyr	115	120	125	
Gly	Phe	Val	Ala	Arg	Ile	Asp	Gly	Ser	Gly	Asn	Phe	Gln	Val	Leu	Leu	130	135	140	
Ser	Asp	Arg	Tyr	Phe	Asn	Lys	Thr	Cys	Gly	Leu	Cys	Gly	Asn	Phe	Asn	145	150	155	160
Ile	Phe	Ala	Glu	Asp	Asp	Phe	Met	Thr	Gln	Glu	Gly	Thr	Leu	Thr	Ser	165	170	175	
Asp	Pro	Tyr	Asp	Phe	Ala	Asn	Ser	Trp	Ala	Leu	Ser	Ser	Gly	Glu	Gln	180	185	190	
Trp	Cys	Glu	Arg	Pro	Ser	Ser	Ser	Cys	Asn	Ile	Ser	Ser	Gly	Glu	Met	195	200	205	
Gln	Lys	Gly	Leu	Trp	Glu	Gln	Cys	Gln	Leu	Leu	Lys	Ser	Thr	Ser	Val	210	215	220	
Phe	Ala	Arg	Cys	His	Pro	Leu	Val	Asp	Pro	Glu	Pro	Phe	Cys	Glu	Lys	225	230	235	240
Thr	Leu	Cys	Glu	Cys	Ala	Gly	Gly	Leu	Glu	Cys	Ala	Cys	Pro	Ala	Leu	245	250	255	
Leu	Glu	Tyr	Ala	Arg	Thr	Cys	Ala	Gln	Glu	Gly	Met	Val	Leu	Tyr	Gly	260	265	270	
Trp	Thr	Asp	His	Ser	Ala	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Pro	Ala	Gly	Met	Glu	275	280	285	
Tyr	Arg	Gln	Cys	Val	Ser	Pro	Cys	Ala	Arg	Thr	Cys	Gln	Ser	Leu	His	290	295	300	
Ile	Asn	Glu	Met	Cys	Gln	Glu	Arg	Cys	Val	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Pro	305	310	315	320
Glu	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Glu	Gly	Leu	Cys	Val	Glu	Ser	Thr	Glu	Cys	325	330	335	
Pro	Cys	Val	His	Ser	Gly	Lys	Arg	Tyr	Pro	Pro	Gly	Thr	Ser	Leu	Ser	340	345	350	

[0010]

Arg Asp Cys Asn Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser
355 360 365

Asn Glu Glu Cys Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe
370 375 380

Lys Ser Phe Asp Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr
385 390 395 400

Leu Leu Ala Arg Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu
405 410 415

Thr Val Gln Cys Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val
420 425 430

Thr Val Arg Leu Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His
435 440 445

Gly Ala Gly Val Ala Met Asp Gly Gln Asp Val Gln Leu Pro Leu Leu
450 455 460

Lys Gly Asp Leu Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu
465 470 475 480

Ser Tyr Gly Glu Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu
485 490 495

Leu Val Lys Leu Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys
500 505 510

Gly Asn Tyr Asn Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly
515 520 525

Leu Ala Glu Pro Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His
530 535 540

Gly Asp Cys Gln Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu
545 550 555 560

Asn Pro Arg Met Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr
565 570 575

Ser Pro Thr Phe Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr
580 585 590

[0011]

Leu Arg Asn Cys Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu			
595	600	605	
Cys Leu Cys Gly Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg			
610	615	620	
Val Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly			
625	630	635	640
Gln Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser			
	645	650	655
Leu Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys			
	660	665	670
Phe Cys Pro Pro Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys Ala Gln			
	675	680	685
Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp Ile Phe			
	690	695	700
Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met His Cys			
705	710	715	720
Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val Leu Ser			
	725	730	735
Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro			
	740	745	750
Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu			
	755	760	765
Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met Ser Met			
	770	775	780
Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg His Glu			
785	790	795	800
Asn Arg Cys Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala			
	805	810	815
Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp			
	820	825	830

[0012]

Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr			
835	840	845	
Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe			
850	855	860	
Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn			
865	870	875	880
Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro			
	885	890	895
Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu			
	900	905	910
Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp			
915	920	925	
Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu			
930	935	940	
Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser			
945	950	955	960
Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly			
	965	970	975
Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln			
	980	985	990
Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser			
	995	1000	1005
Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala			
1010	1015	1020	
Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser			
1025	1030	1035	
Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu			
1040	1045	1050	
Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val Cys Ile Tyr Asp Thr Cys			
1055	1060	1065	

[0013]

Ser Cys	Glu Ser Ile Gly Asp	Cys Ala Cys Phe Cys	Asp Thr Ile
1070	1075	1080	
Ala Ala	Tyr Ala His Val Cys	Ala Gln His Gly Lys	Val Val Thr
1085	1090	1095	
Trp Arg	Thr Ala Thr Leu Cys	Pro Gln Ser Cys Glu	Glu Arg Asn
1100	1105	1110	
Leu Arg	Glu Asn Gly Tyr Glu	Cys Glu Trp Arg Tyr	Asn Ser Cys
1115	1120	1125	
Ala Pro	Ala Cys Gln Val Thr	Cys Gln His Pro Glu	Pro Leu Ala
1130	1135	1140	
Cys Pro	Val Gln Cys Val Glu	Gly Cys His Ala His	Cys Pro Pro
1145	1150	1155	
Gly Lys	Ile Leu Asp Glu Leu	Leu Gln Thr Cys Val	Asp Pro Glu
1160	1165	1170	
Asp Cys	Pro Val Cys Glu Val	Ala Gly Arg Arg Phe	Ala Ser Gly
1175	1180	1185	
Lys Lys	Val Thr Leu Asn Pro	Ser Asp Pro Glu His	Cys Gln Ile
1190	1195	1200	
Cys His	Cys Asp Val Val Asn	Leu Thr Cys Glu Ala	Cys Gln Glu
1205	1210	1215	
Pro Gly	Gly Leu Val Val Pro	Pro Thr Asp Ala Pro	Val Ser Pro
1220	1225	1230	
Thr Thr	Leu Tyr Val Glu Asp	Ile Ser Glu Pro Pro	Leu His Asp
1235	1240	1245	
Phe Tyr	Cys Ser Arg Leu Leu	Asp Leu Val Phe Leu	Leu Asp Gly
1250	1255	1260	
Ser Ser	Arg Leu Ser Glu Ala	Glu Phe Glu Val Leu	Lys Ala Phe
1265	1270	1275	
Val Val	Asp Met Met Glu Arg	Leu Arg Ile Ser Gln	Lys Trp Val
1280	1285	1290	

[0014]

Arg Val	Ala Val Val Glu Tyr	His Asp Gly Ser His	Ala Tyr Ile
1295	1300	1305	
Gly Leu	Lys Asp Arg Lys Arg	Pro Ser Glu Leu Arg	Arg Ile Ala
1310	1315	1320	
Ser Gln	Val Lys Tyr Ala Gly	Ser Gln Val Ala Ser	Thr Ser Glu
1325	1330	1335	
Val Leu	Lys Tyr Thr Leu Phe	Gln Ile Phe Ser Lys	Ile Asp Arg
1340	1345	1350	
Pro Glu	Ala Ser Arg Ile Thr	Leu Leu Leu Met Ala	Ser Gln Glu
1355	1360	1365	
Pro Gln	Arg Met Ser Arg Asn	Phe Val Arg Tyr Val	Gln Gly Leu
1370	1375	1380	
Lys Lys	Lys Lys Val Ile Val	Ile Pro Val Gly Ile	Gly Pro His
1385	1390	1395	
Ala Asn	Leu Lys Gln Ile Arg	Leu Ile Glu Lys Gln	Ala Pro Glu
1400	1405	1410	
Asn Lys	Ala Phe Val Leu Ser	Ser Val Asp Glu Leu	Glu Gln Gln
1415	1420	1425	
Arg Asp	Glu Ile Val Ser Tyr	Leu Cys Asp Leu Ala	Pro Glu Ala
1430	1435	1440	
Pro Pro	Pro Thr Leu Pro Pro	Asp Met Ala Gln Val	Thr Val Gly
1445	1450	1455	
Pro Gly	Leu Leu Gly Val Ser	Thr Leu Gly Pro Lys	Arg Asn Ser
1460	1465	1470	
Met Val	Leu Asp Val Ala Phe	Val Leu Glu Gly Ser	Asp Lys Ile
1475	1480	1485	
Gly Glu	Ala Asp Phe Asn Arg	Ser Lys Glu Phe Met	Glu Glu Val
1490	1495	1500	
Ile Gln	Arg Met Asp Val Gly	Gln Asp Ser Ile His	Val Thr Val
1505	1510	1515	

[0015]

Leu Gln	Tyr Ser Tyr Met Val	Thr Val Glu Tyr Pro	Phe Ser Glu
1520	1525	1530	
Ala Gln	Ser Lys Gly Asp Ile	Leu Gln Arg Val Arg	Glu Ile Arg
1535	1540	1545	
Tyr Gln	Gly Gly Asn Arg Thr	Asn Thr Gly Leu Ala	Leu Arg Tyr
1550	1555	1560	
Leu Ser	Asp His Ser Phe Leu	Val Ser Gln Gly Asp	Arg Glu Gln
1565	1570	1575	
Ala Pro	Asn Leu Val Tyr Met	Val Thr Gly Asn Pro	Ala Ser Asp
1580	1585	1590	
Glu Ile	Lys Arg Leu Pro Gly	Asp Ile Gln Val Val	Pro Ile Gly
1595	1600	1605	
Val Gly	Pro Asn Ala Asn Val	Gln Glu Leu Glu Arg	Ile Gly Trp
1610	1615	1620	
Pro Asn	Ala Pro Ile Leu Ile	Gln Asp Phe Glu Thr	Leu Pro Arg
1625	1630	1635	
Glu Ala	Pro Asp Leu Val Leu	Gln Arg Cys Cys Ser	Gly Glu Gly
1640	1645	1650	
Leu Gln	Ile Pro Thr Leu Ser	Pro Ala Pro Asp Cys	Ser Gln Pro
1655	1660	1665	
Leu Asp	Val Ile Leu Leu Leu	Asp Gly Ser Ser Ser	Phe Pro Ala
1670	1675	1680	
Ser Tyr	Phe Asp Glu Met Lys	Ser Phe Ala Lys Ala	Phe Ile Ser
1685	1690	1695	
Lys Ala	Asn Ile Gly Pro Arg	Leu Thr Gln Val Ser	Val Leu Gln
1700	1705	1710	
Tyr Gly	Ser Ile Thr Thr Ile	Asp Val Pro Trp Asn	Val Val Pro
1715	1720	1725	
Glu Lys	Ala His Leu Leu Ser	Leu Val Asp Val Met	Gln Arg Glu
1730	1735	1740	

[0016]

Gly Gly	Pro Ser Gln Ile Gly	Asp Ala Leu Gly Phe	Ala Val Arg
1745	1750	1755	
Tyr Leu	Thr Ser Glu Met His	Gly Ala Arg Pro Gly	Ala Ser Lys
1760	1765	1770	
Ala Val	Val Ile Leu Val Thr	Asp Val Ser Val Asp	Ser Val Asp
1775	1780	1785	
Ala Ala	Ala Asp Ala Ala Arg	Ser Asn Arg Val Thr	Val Phe Pro
1790	1795	1800	
Ile Gly	Ile Gly Asp Arg Tyr	Asp Ala Ala Gln Leu	Arg Ile Leu
1805	1810	1815	
Ala Gly	Pro Ala Gly Asp Ser	Asn Val Val Lys Leu	Gln Arg Ile
1820	1825	1830	
Glu Asp	Leu Pro Thr Met Val	Thr Leu Gly Asn Ser	Phe Leu His
1835	1840	1845	
Lys Leu	Cys Ser Gly Phe Val	Arg Ile Cys Met Asp	Glu Asp Gly
1850	1855	1860	
Asn Glu	Lys Arg Pro Gly Asp	Val Trp Thr Leu Pro	Asp Gln Cys
1865	1870	1875	
His Thr	Val Thr Cys Gln Pro	Asp Gly Gln Thr Leu	Leu Lys Ser
1880	1885	1890	
His Arg	Val Asn Cys Asp Arg	Gly Leu Arg Pro Ser	Cys Pro Asn
1895	1900	1905	
Ser Gln	Ser Pro Val Lys Val	Glu Glu Thr Cys Gly	Cys Arg Trp
1910	1915	1920	
Thr Cys	Pro Cys Val Cys Thr	Gly Ser Ser Thr Arg	His Ile Val
1925	1930	1935	
Thr Phe	Asp Gly Gln Asn Phe	Lys Leu Thr Gly Ser	Cys Ser Tyr
1940	1945	1950	
Val Leu	Phe Gln Asn Lys Glu	Gln Asp Leu Glu Val	Ile Leu His
1955	1960	1965	

[0017]

Asn Gly	Ala Cys Ser Pro Gly	Ala Arg Gln Gly Cys	Met Lys Ser
1970	1975	1980	
Ile Glu	Val Lys His Ser Ala	Leu Ser Val Glu Leu	His Ser Asp
1985	1990	1995	
Met Glu	Val Thr Val Asn Gly	Arg Leu Val Ser Val	Pro Tyr Val
2000	2005	2010	
Gly Gly	Asn Met Glu Val Asn	Val Tyr Gly Ala Ile	Met His Glu
2015	2020	2025	
Val Arg	Phe Asn His Leu Gly	His Ile Phe Thr Phe	Thr Pro Gln
2030	2035	2040	
Asn Asn	Glu Phe Gln Leu Gln	Leu Ser Pro Lys Thr	Phe Ala Ser
2045	2050	2055	
Lys Thr	Tyr Gly Leu Cys Gly	Ile Cys Asp Glu Asn	Gly Ala Asn
2060	2065	2070	
Asp Phe	Met Leu Arg Asp Gly	Thr Val Thr Thr Asp	Trp Lys Thr
2075	2080	2085	
Leu Val	Gln Glu Trp Thr Val	Gln Arg Pro Gly Gln	Thr Cys Gln
2090	2095	2100	
Pro Glu	Gln Cys Leu Val Pro	Asp Ser Ser His Cys	Gln Val Leu
2105	2110	2115	
Leu Leu	Pro Leu Phe Ala Glu	Cys His Lys Val Leu	Ala Pro Ala
2120	2125	2130	
Thr Phe	Tyr Ala Ile Cys Gln	Gln Asp Ser Cys His	Gln Glu Gln
2135	2140	2145	
Val Cys	Glu Val Ile Ala Ser	Tyr Ala His Leu Cys	Arg Thr Asn
2150	2155	2160	
Gly Val	Cys Val Asp Trp Arg	Thr Pro Asp Phe Cys	Ala Met Ser
2165	2170	2175	
Cys Pro	Pro Ser Leu Val Tyr	Asn His Cys Glu His	Gly Cys Pro
2180	2185	2190	

[0018]

Arg His	Cys Asp Gly Asn Val	Ser Ser Cys Gly Asp	His Pro Ser
2195	2200	2205	
Glu Gly	Cys Phe Cys Pro Pro	Asp Lys Val Met Leu	Glu Gly Ser
2210	2215	2220	
Cys Val	Pro Glu Glu Ala Cys	Thr Gln Cys Ile Gly	Glu Asp Gly
2225	2230	2235	
Val Gln	His Gln Phe Leu Glu	Ala Trp Val Pro Asp	His Gln Pro
2240	2245	2250	
Cys Gln	Ile Cys Thr Cys Leu	Ser Gly Arg Lys Val	Asn Cys Thr
2255	2260	2265	
Thr Gln	Pro Cys Pro Thr Ala	Lys Ala Pro Thr Cys	Gly Leu Cys
2270	2275	2280	
Glu Val	Ala Arg Leu Arg Gln	Asn Ala Asp Gln Cys	Cys Pro Glu
2285	2290	2295	
Tyr Glu	Cys Val Cys Asp Pro	Val Ser Cys Asp Leu	Pro Pro Val
2300	2305	2310	
Pro His	Cys Glu Arg Gly Leu	Gln Pro Thr Leu Thr	Asn Pro Gly
2315	2320	2325	
Glu Cys	Arg Pro Asn Phe Thr	Cys Ala Cys Arg Lys	Glu Glu Cys
2330	2335	2340	
Lys Arg	Val Ser Pro Pro Ser	Cys Pro Pro His Arg	Leu Pro Thr
2345	2350	2355	
Leu Arg	Lys Thr Gln Cys Cys	Asp Glu Tyr Glu Cys	Ala Cys Asn
2360	2365	2370	
Cys Val	Asn Ser Thr Val Ser	Cys Pro Leu Gly Tyr	Leu Ala Ser
2375	2380	2385	
Thr Ala	Thr Asn Asp Cys Gly	Cys Thr Thr Thr Thr	Cys Leu Pro
2390	2395	2400	
Asp Lys	Val Cys Val His Arg	Ser Thr Ile Tyr Pro	Val Gly Gln
2405	2410	2415	

[0019]

Phe Trp	Glu Glu Gly Cys Asp	Val Cys Thr Cys Thr	Asp Met Glu
2420	2425	2430	
Asp Ala	Val Met Gly Leu Arg	Val Ala Gln Cys Ser	Gln Lys Pro
2435	2440	2445	
Cys Glu	Asp Ser Cys Arg Ser	Gly Phe Thr Tyr Val	Leu His Glu
2450	2455	2460	
Gly Glu	Cys Cys Gly Arg Cys	Leu Pro Ser Ala Cys	Glu Val Val
2465	2470	2475	
Thr Gly	Ser Pro Arg Gly Asp	Ser Gln Ser Ser Trp	Lys Ser Val
2480	2485	2490	
Gly Ser	Gln Trp Glu Asn Pro	Cys Leu Ile Asn Glu	Cys Val Arg
2495	2500	2505	
Val Lys	Glu Glu Val Phe Ile	Gln Gln Arg Asn Val	Ser Cys Pro
2510	2515	2520	
Gln Leu	Glu Val Pro Val Cys	Pro Ser Gly Phe Gln	Leu Ser Cys
2525	2530	2535	
Lys Thr	Ser Ala Cys Cys Pro	Ser Cys Arg Cys Glu	Arg Met Glu
2540	2545	2550	
Ala Cys	Met Leu Asn Gly Thr	Val Ile Gly Pro Gly	Lys Thr Val
2555	2560	2565	
Met Ile	Asp Val Cys Thr Thr	Cys Arg Cys Met Val	Gln Val Gly
2570	2575	2580	
Val Ile	Ser Gly Phe Lys Leu	Glu Cys Arg Lys Thr	Thr Cys Asn
2585	2590	2595	
Pro Cys	Pro Leu Gly Tyr Lys	Glu Glu Asn Asn Thr	Gly Glu Cys
2600	2605	2610	
Cys Gly	Arg Cys Leu Pro Thr	Ala Cys Thr Ile Gln	Leu Arg Gly
2615	2620	2625	
Gly Gln	Ile Met Thr Leu Lys	Arg Asp Glu Thr Leu	Gln Asp Gly
2630	2635	2640	

[0020]

Cys Asp Thr His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe
2645 2650 2655

Trp Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys
2660 2665 2670

Cys Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys
2675 2680 2685

Cys Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg
2690 2695 2700

Leu Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val
2705 2710 2715

Asp Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr
2720 2725 2730

Ser Ile Asp Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser
2735 2740 2745

Pro Thr Arg Thr Glu Pro Met Gln His Cys Thr Asn Gly Ser Val
2750 2755 2760

Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro
2765 2770 2775

Arg Lys Cys Ser Lys
2780

<210> 3

<211> 2050

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 成熟 vWF

<400> 3

Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp

[0021]

1	5	10	15
Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr			
20	25	30	
Asp Leu Glu Cys Met Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro			
35	40	45	
Pro Gly Met Val Arg His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys			
50	55	60	
Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys			
65	70	75	80
Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr			
85	90	95	
Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr			
100	105	110	
Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr			
115	120	125	
Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile			
130	135	140	
Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys			
145	150	155	160
Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly			
165	170	175	
Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val			
180	185	190	
Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser			
195	200	205	
Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr			
210	215	220	
Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln			
225	230	235	240
Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val			

[0022]

245	250	255
Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val	Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg	
260	265	270
Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met		
275	280	285
Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val		
290	295	300
Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val		
305	310	315
Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys		
325	330	335
Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly		
340	345	350
Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu		
355	360	365
Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn		
370	375	380
Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu		
385	390	395
Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro		
405	410	415
Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp		
420	425	430
Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys		
435	440	445
Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys		
450	455	460
Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu		
465	470	475
Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val		

[0023]

485	490	495
Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu		
500	505	510
Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala		
515	520	525
Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu		
530	535	540
Arg Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp		
545	550	555
Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu		
565	570	575
Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala		
580	585	590
Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys		
595	600	605
Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu Leu Met Ala Ser		
610	615	620
Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly		
625	630	635
Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His		
645	650	655
Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn		
660	665	670
Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp		
675	680	685
Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro		
690	695	700
Thr Leu Pro Pro Asp Met Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu		
705	710	715
Gly Val Ser Thr Leu Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val		

[0024]

	725	730	735
Ala Phe Val Leu Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn			
740	745	750	
Arg Ser Lys Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly			
755	760	765	
Gln Asp Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr			
770	775	780	
Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln			
785	790	795	800
Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly			
805	810	815	
Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly			
820	825	830	
Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro			
835	840	845	
Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro			
850	855	860	
Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly			
865	870	875	880
Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg			
885	890	895	
Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu			
900	905	910	
Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp			
915	920	925	
Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe			
930	935	940	
Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile			
945	950	955	960
Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr			

[0025]

965						970						975					
Thr	Ile	Asp	Val	Pro	Trp	Asn	Val	Val	Pro	Glu	Lys	Ala	His	Leu	Leu		
980						985						990					
Ser	Leu	Val	Asp	Val	Met	Gln	Arg	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Gln	Ile	Gly		
995						1000						1005					
Asp	Ala	Leu	Gly	Phe	Ala	Val	Arg	Tyr	Leu	Thr	Ser	Glu	Met	His			
1010						1015						1020					
Gly	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Lys	Ala	Val	Val	Ile	Leu	Val	Thr			
1025						1030						1035					
Asp	Val	Ser	Val	Asp	Ser	Val	Asp	Ala	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg			
1040						1045						1050					
Ser	Asn	Arg	Val	Thr	Val	Phe	Pro	Ile	Gly	Ile	Gly	Asp	Arg	Tyr			
1055						1060						1065					
Asp	Ala	Ala	Gln	Leu	Arg	Ile	Leu	Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Asp	Ser			
1070						1075						1080					
Asn	Val	Val	Lys	Leu	Gln	Arg	Ile	Glu	Asp	Leu	Pro	Thr	Met	Val			
1085						1090						1095					
Thr	Leu	Gly	Asn	Ser	Phe	Leu	His	Lys	Leu	Cys	Ser	Gly	Phe	Val			
1100						1105						1110					
Arg	Ile	Cys	Met	Asp	Glu	Asp	Gly	Asn	Glu	Lys	Arg	Pro	Gly	Asp			
1115						1120						1125					
Val	Trp	Thr	Leu	Pro	Asp	Gln	Cys	His	Thr	Val	Thr	Cys	Gln	Pro			
1130						1135						1140					
Asp	Gly	Gln	Thr	Leu	Leu	Lys	Ser	His	Arg	Val	Asn	Cys	Asp	Arg			
1145						1150						1155					
Gly	Leu	Arg	Pro	Ser	Cys	Pro	Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Val	Lys	Val			
1160						1165						1170					
Glu	Glu	Thr	Cys	Gly	Cys	Arg	Trp	Thr	Cys	Pro	Cys	Val	Cys	Thr			
1175						1180						1185					
Gly	Ser	Ser	Thr	Arg	His	Ile	Val	Thr	Phe	Asp	Gly	Gln	Asn	Phe			

[0026]

1190	1195	1200
Lys Leu Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu		
1205	1210	1215
Gln Asp Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly		
1220	1225	1230
Ala Arg Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala		
1235	1240	1245
Leu Ser Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly		
1250	1255	1260
Arg Leu Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn		
1265	1270	1275
Val Tyr Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly		
1280	1285	1290
His Ile Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln		
1295	1300	1305
Leu Ser Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly		
1310	1315	1320
Ile Cys Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly		
1325	1330	1335
Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val		
1340	1345	1350
Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys		
1355	1360	1365
Leu Val Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu		
1370	1375	1380
Phe Ala Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala		
1385	1390	1395
Ile Cys Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val		
1400	1405	1410
Ile Ala Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val		

[0027]

1415	1420	1425
Asp Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser		
1430	1435	1440
Leu Val Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp		
1445	1450	1455
Gly Asn Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe		
1460	1465	1470
Cys Pro Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu		
1475	1480	1485
Glu Ala Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln		
1490	1495	1500
Phe Leu Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys		
1505	1510	1515
Thr Cys Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys		
1520	1525	1530
Pro Thr Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg		
1535	1540	1545
Leu Arg Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val		
1550	1555	1560
Cys Asp Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu		
1565	1570	1575
Arg Gly Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro		
1580	1585	1590
Asn Phe Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser		
1595	1600	1605
Pro Pro Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr		
1610	1615	1620
Gln Cys Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser		
1625	1630	1635
Thr Val Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn		

[0028]

1640	1645	1650
Asp Cys Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys		
1655	1660	1665
Val His Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu		
1670	1675	1680
Gly Cys Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met		
1685	1690	1695
Gly Leu Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser		
1700	1705	1710
Cys Arg Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys		
1715	1720	1725
Gly Arg Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro		
1730	1735	1740
Arg Gly Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp		
1745	1750	1755
Ala Ser Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val		
1760	1765	1770
Lys Glu Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln		
1775	1780	1785
Leu Glu Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys		
1790	1795	1800
Thr Ser Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala		
1805	1810	1815
Cys Met Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met		
1820	1825	1830
Ile Asp Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val		
1835	1840	1845
Ile Ser Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro		
1850	1855	1860
Cys Pro Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys Cys		

[0029]

1865	1870	1875
Gly Arg Cys Leu Pro Thr Ala	Cys Thr Ile Gln Leu	Arg Gly Gly
1880	1885	1890
Gln Ile Met Thr Leu Lys Arg	Asp Glu Thr Leu Gln	Asp Gly Cys
1895	1900	1905
Asp Thr His Phe Cys Lys Val	Asn Glu Arg Gly Glu	Tyr Phe Trp
1910	1915	1920
Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys	Pro Pro Phe Asp Glu	His Lys Cys
1925	1930	1935
Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile	Met Lys Ile Pro Gly	Thr Cys Cys
1940	1945	1950
Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu	Cys Asn Asp Ile Thr	Ala Arg Leu
1955	1960	1965
Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser	Cys Lys Ser Glu Val	Glu Val Asp
1970	1975	1980
Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys	Cys Ala Ser Lys Ala	Met Tyr Ser
1985	1990	1995
Ile Asp Ile Asn Asp Val Gln	Asp Gln Cys Ser Cys	Cys Ser Pro
2000	2005	2010
Thr Arg Thr Glu Pro Met Gln	Val Ala Leu His Cys	Thr Asn Gly
2015	2020	2025
Ser Val Val Tyr His Glu Val	Leu Asn Ala Met Glu	Cys Lys Cys
2030	2035	2040
Ser Pro Arg Lys Cys Ser Lys		
2045	2050	

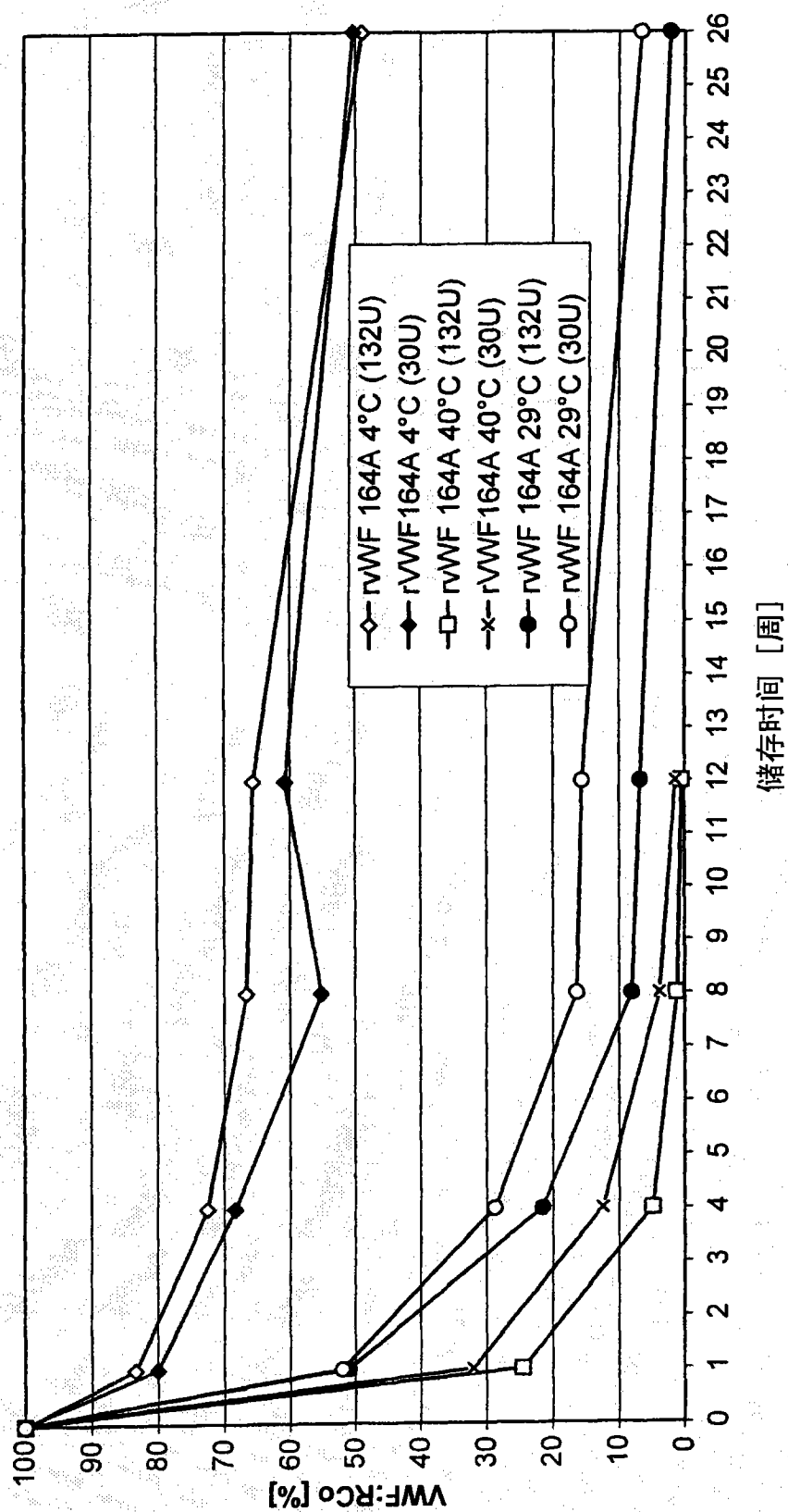


图 1

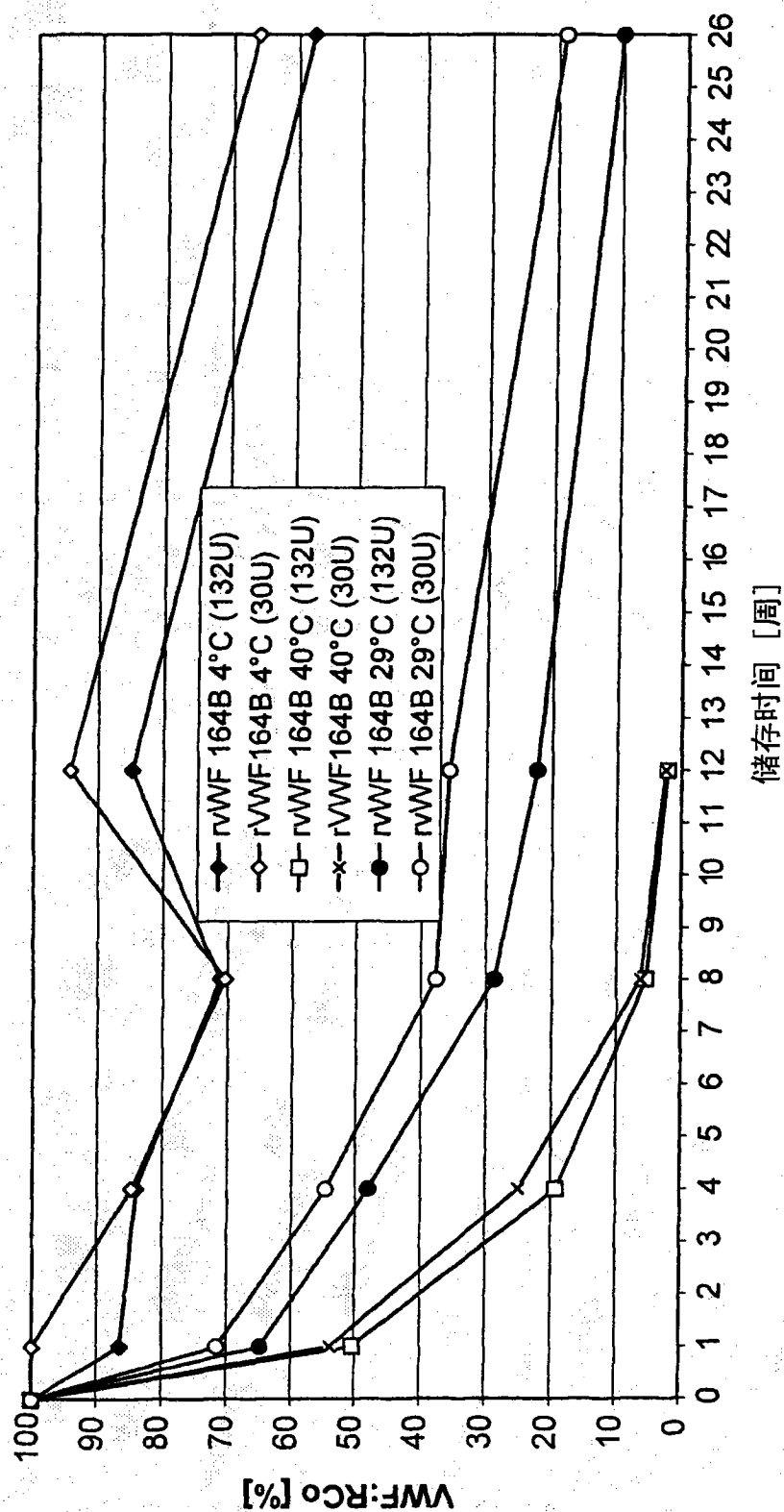


图 2

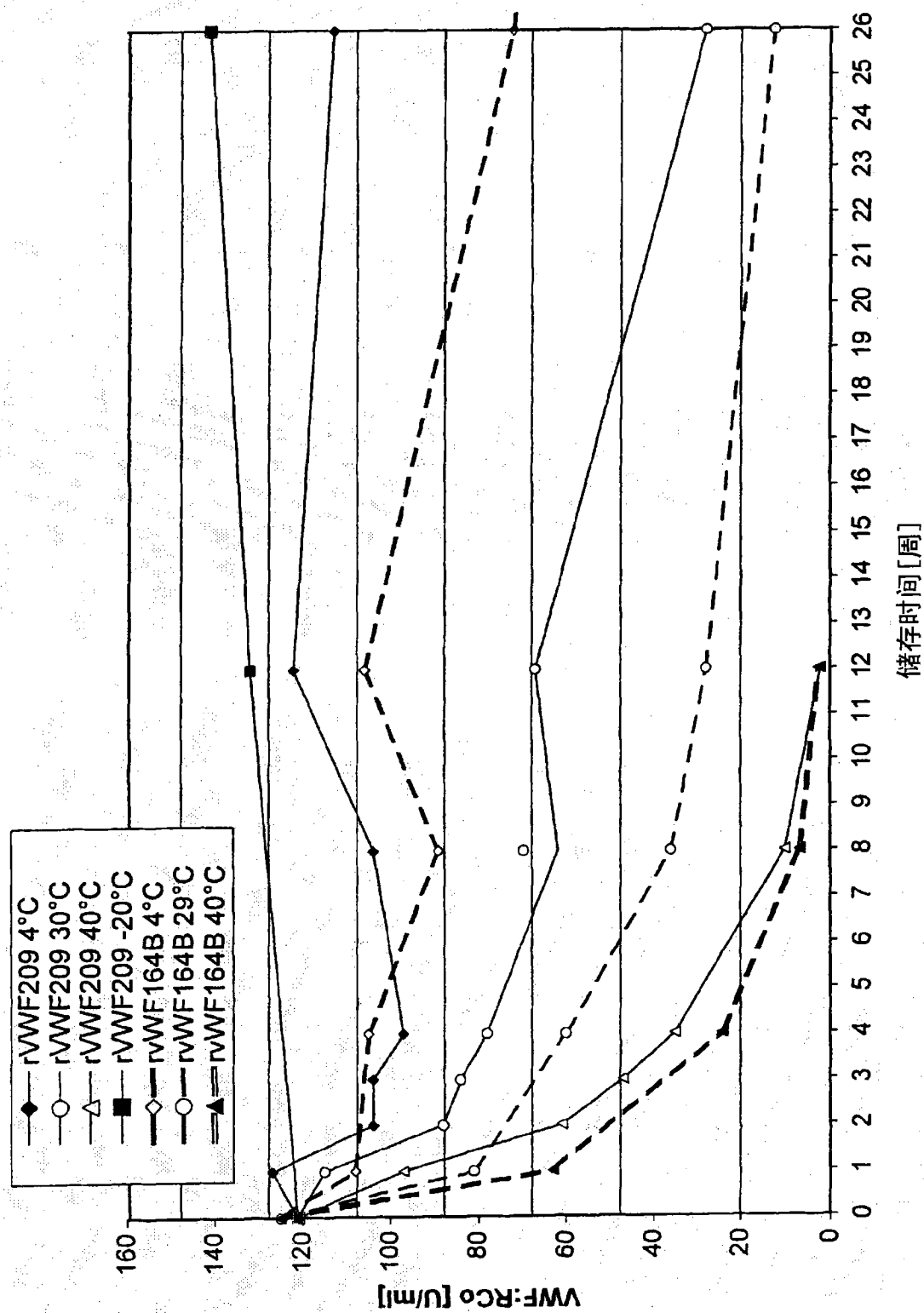


图 3

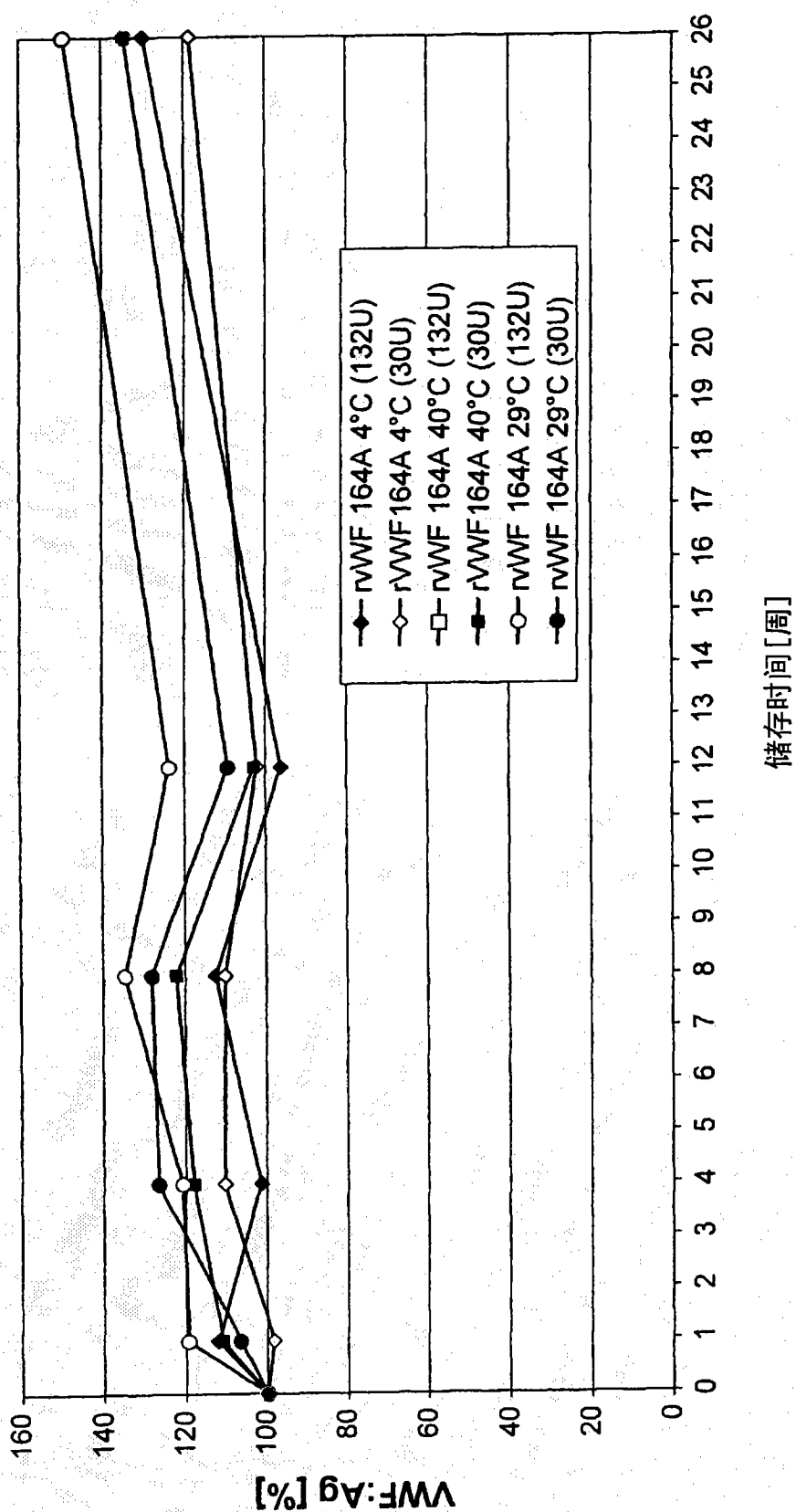


图 4

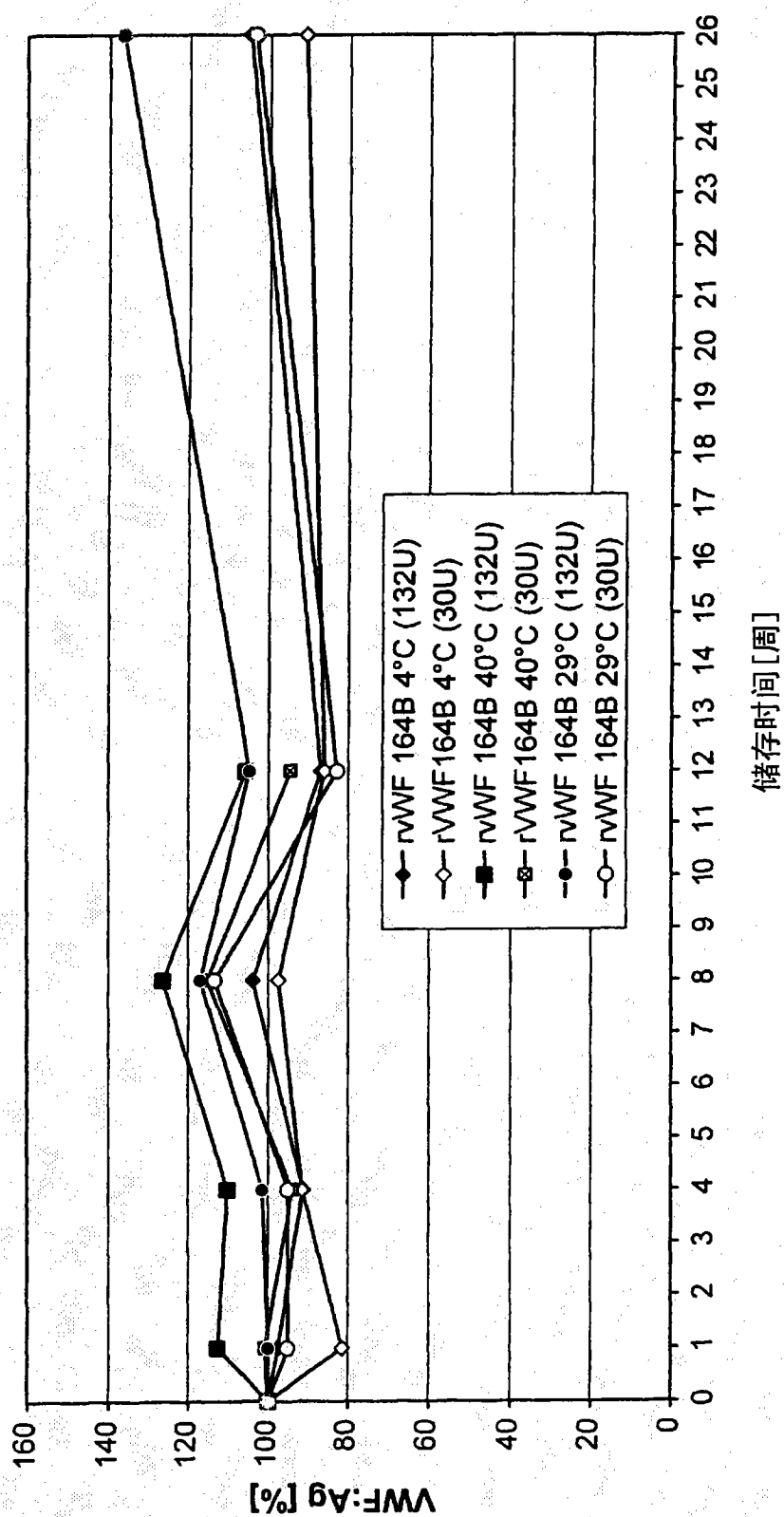


图 5

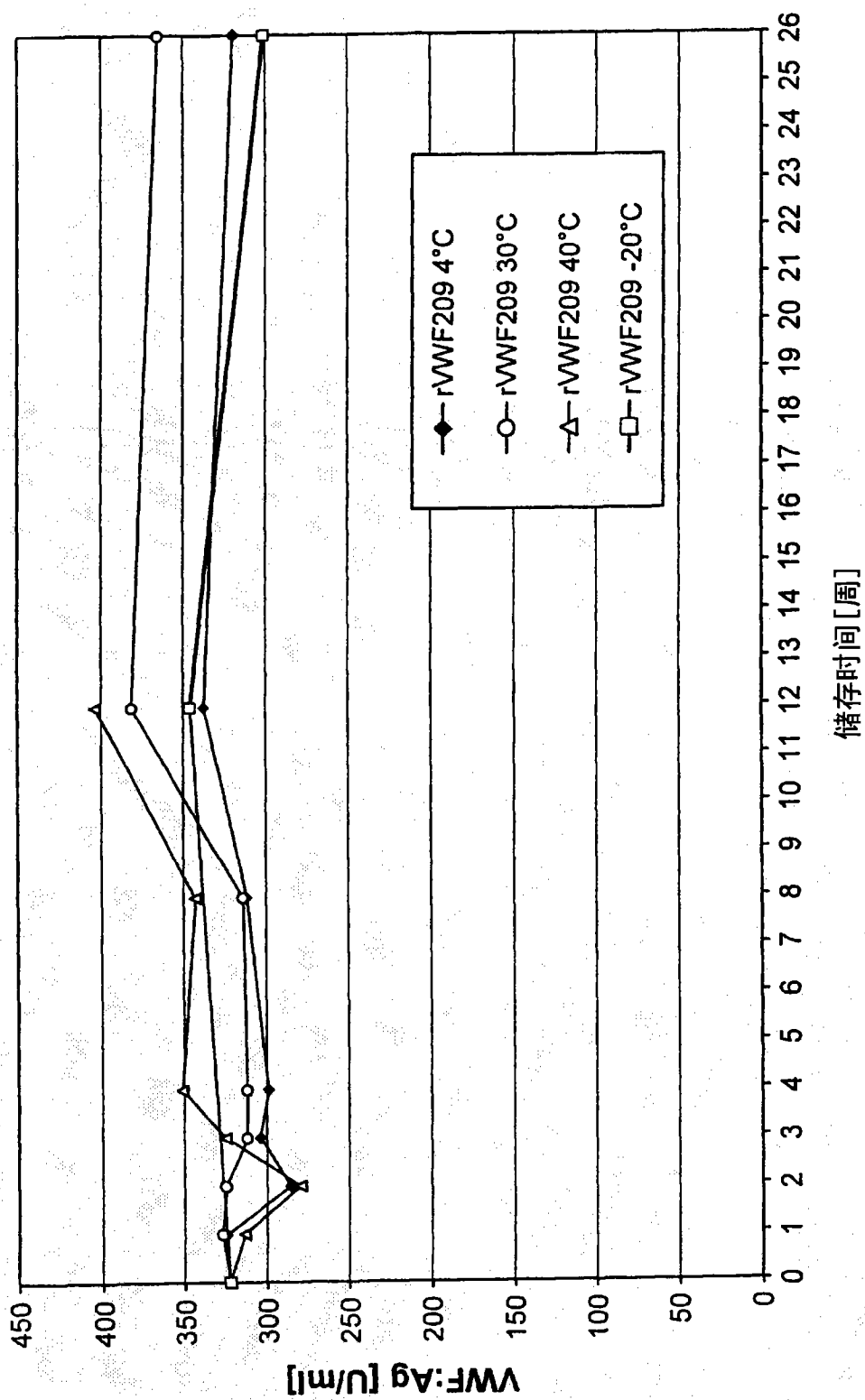


图 6

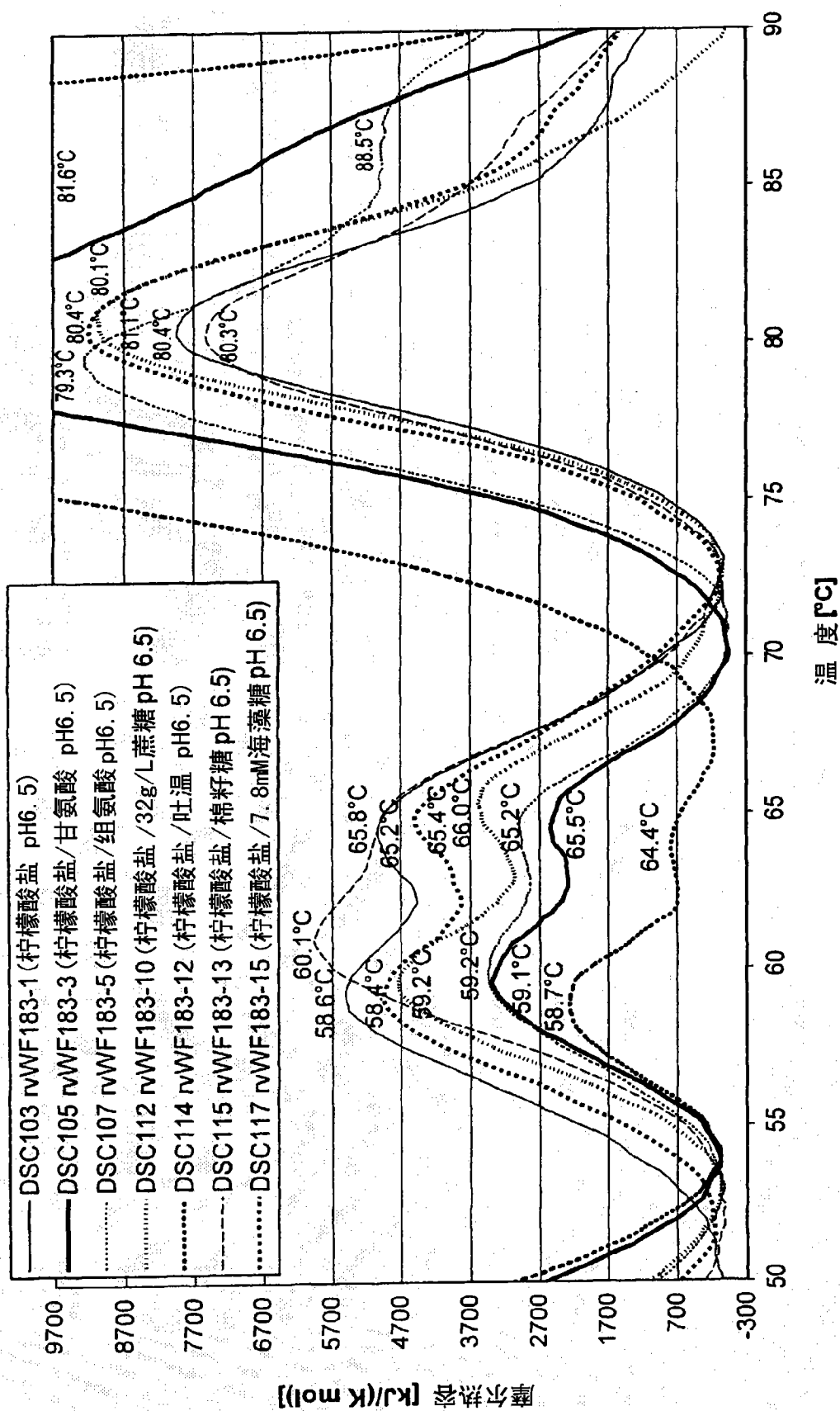


图 7

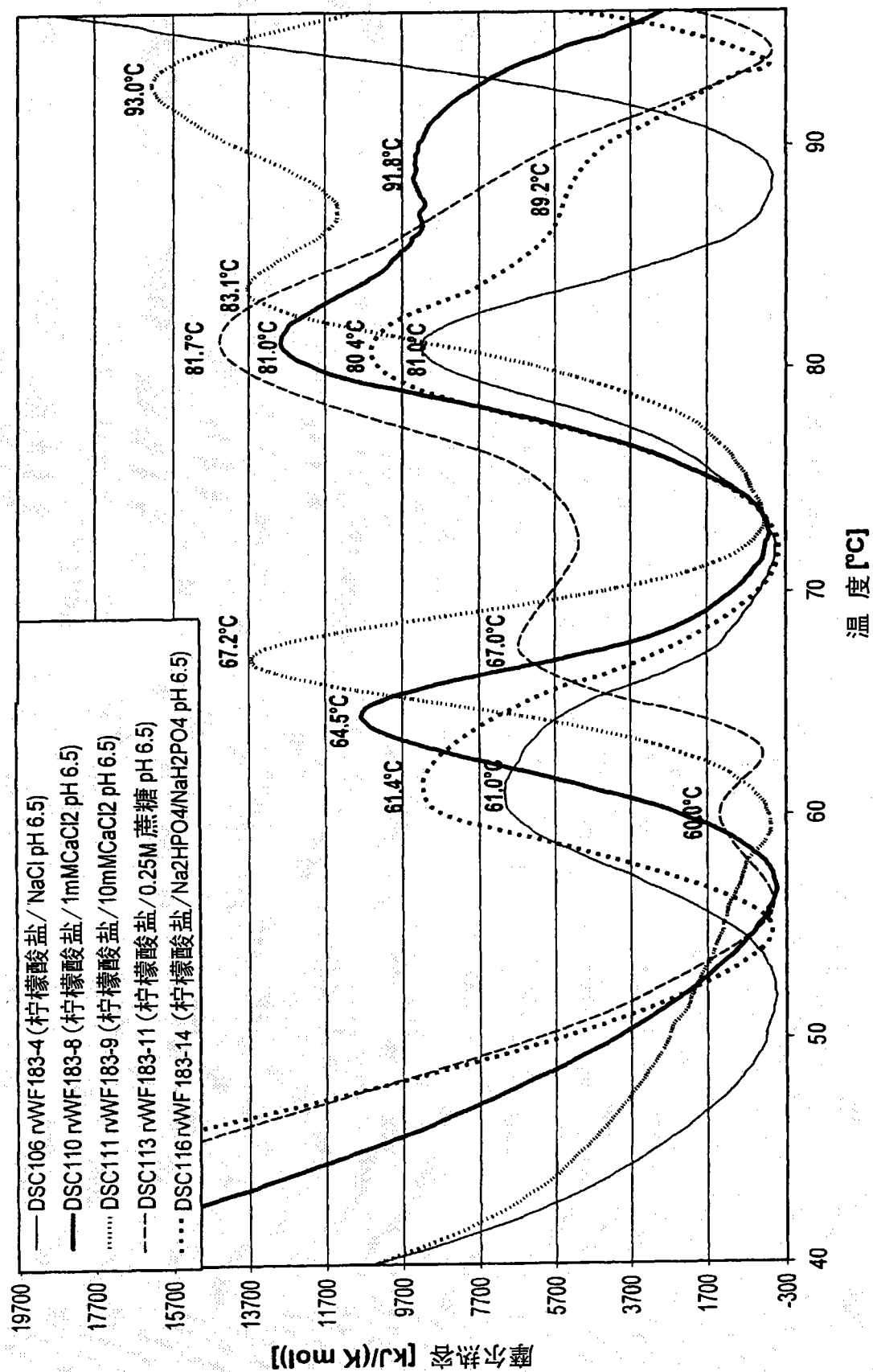


图 8

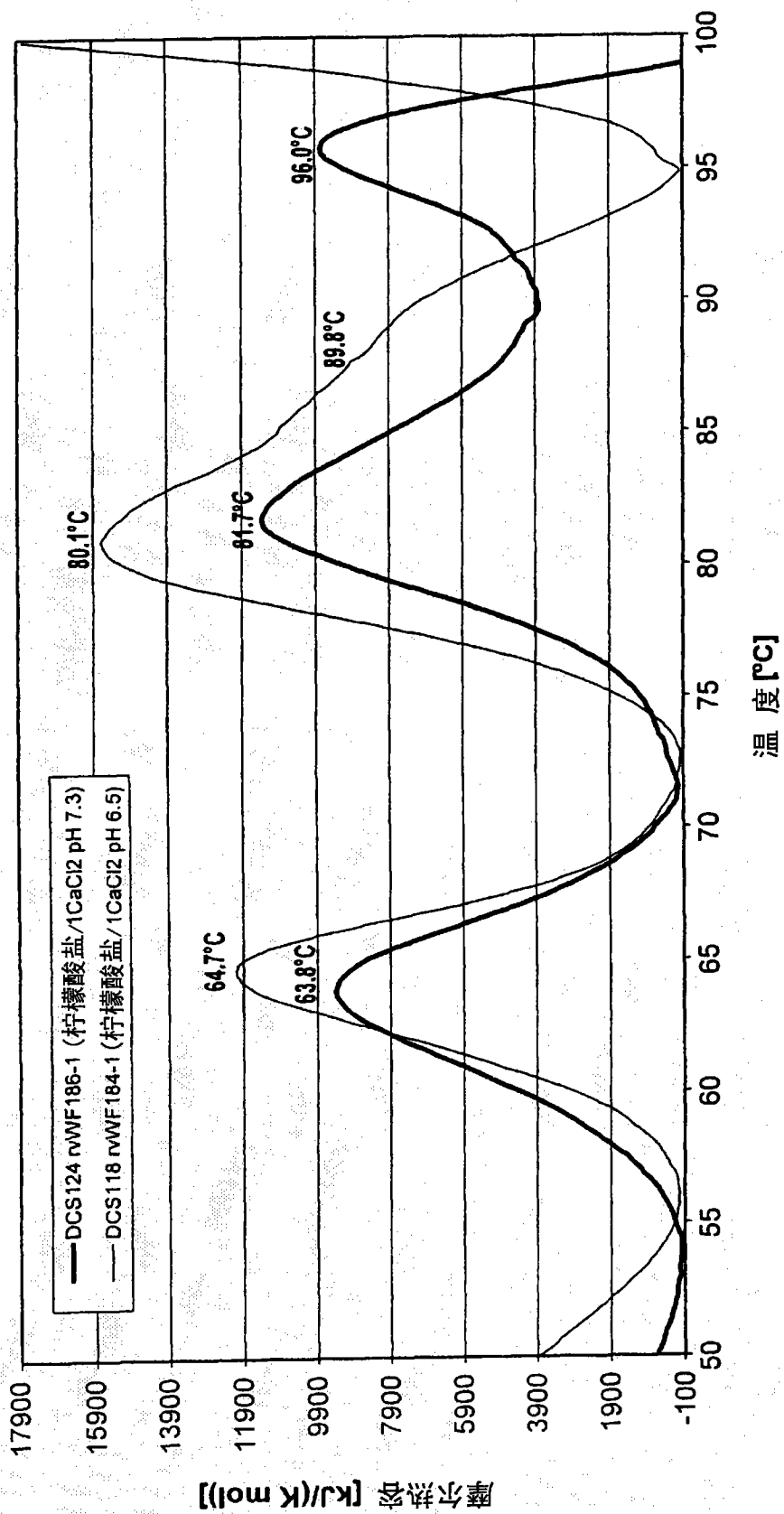


图 9