



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I670072 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：106107483

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 10 月 21 日

(51)Int. Cl. : A61K38/16 (2006.01)

A61K9/19 (2006.01)

C12N15/11 (2006.01)

(30)優先權：2008/10/21 美國

61/107,273

(71)申請人：美商巴克斯歐塔公司 (美國) BAXALTA INCORPORATED (US)

美國

瑞士商巴克斯歐塔有限公司 (瑞士) BAXALTA GMBH (CH)

瑞士

(72)發明人：史耐克 克特 SCHNECKER, KURT (AT)；海德衛傑 伊娃 HAIDWEGER, EVA

(AT)；杜瑞柴克 彼得 TURECEK, PETER (AT)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

(56)參考文獻：

EP 1522312B1

US 6005077

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：17 項 圖式數：3 共 78 頁

(54)名稱

凍乾的重組 V W F 調配物

LYOPHILIZED RECOMBINANT VWF FORMULATIONS

(57)摘要

本發明提供凍乾的重組馮威里氏因子(recombinant von-Willebrand Factor；rVWF)之長期穩定醫藥調配物以及製造及投予該等調配物之方法。

The present invention provides long-term stable pharmaceutical formulations of lyophilized recombinant von-Willebrand Factor (rVWF) and methods for making and administering said formulations.

指定代表圖：

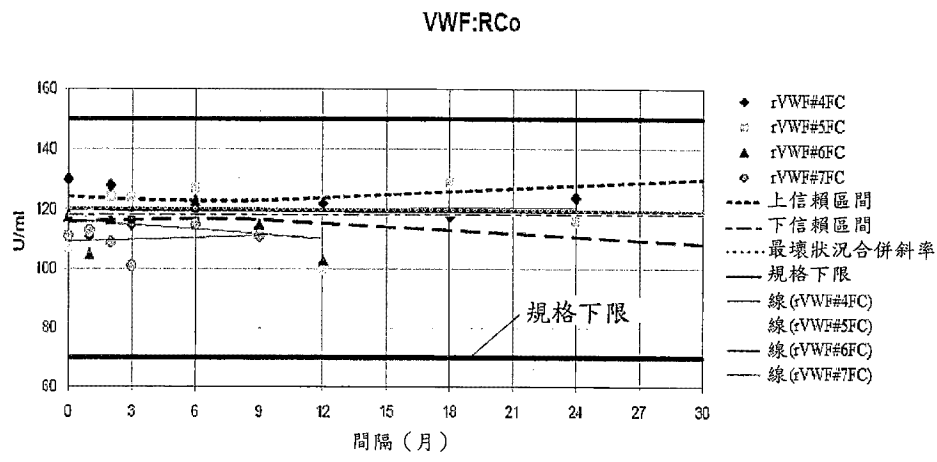


圖 1

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

凍乾的重組 VWF 調配物

LYOPHILIZED RECOMBINANT VWF FORMULATIONS

【技術領域】

一般而言，本發明係關於凍乾的重組 VWF 調配物及製造包含重組 VWF 之凍乾組成物的方法。

【先前技術】

馮威里氏因子 (Von Willebrand factor, VWF) 為在血漿中以大小介於約 500 至 20,000 kD 範圍內之一系列多聚體形式進行循環的糖蛋白。VWF 之多聚體形式由藉由二硫鍵連接在一起之 250 kD 多肽子單元構成。VWF 介導血小板與受損血管壁之內皮下組織的初期黏著。僅較大多聚體展現止血活性。假定內皮細胞分泌 VWF 之較大多聚形式，且具有低分子量之彼等 VWF 形式 (低分子量 VWF) 由蛋白質水解分裂產生。具有較大分子質量的多聚體儲存在內皮細胞之魏貝爾-帕拉德體 (Weibel-Pallade body) 中，且在受刺激之後即釋放。

VWF 係由內皮細胞及巨核細胞合成，呈基本上由重複結構域組成之前原 VWF (prepro-VWF) 形式。在信號肽分裂之後，原 VWF 即在其 C 末端區域藉由二硫鍵進行二聚。該等二聚體充當多聚作用之原體，多聚作用受自由末端之間之二硫鍵支配。組合成多聚體之後，蛋白質水解移除肽原序列 (Leyte 等人, Biochem. J. 274 (1991), 257-261)。

預計可得自 VWF 之選殖 cDNA 的主要轉譯產物為 2813 個殘基的前驅

體多肽（前原 VWF）。前原 VWF 由 22 個胺基酸信號肽及 741 個胺基酸肽原組成，而成熟 VWF 包含 2050 個胺基酸（Ruggeri Z.A., 及 Ware, J., FASEB J., 308-316 (1993)）。

VWF 缺陷導致馮威里氏病（VWD），該疾病特性在於在某種程度上已經斷定之出血性表型。3 型 VWD 為最嚴重之形式，其中 VWF 完全失去，而 1 型 VWD 與 VWF 之定量損失有關且其表型可能極其輕微。2 型 VWD 與 VWF 之定性缺陷有關，且可能與 3 型 VWD 同樣嚴重。2 型 VWD 具有許多亞型，其中有些與高分子量多聚體之損失或減少有關。2a 型馮威里氏症候群（VWS-2A）之特性在於中間及大型多聚體二者之損失。VWS-2B 之特性在於分子量最高之多聚體的損失。與 VWF 相關之其他疾病及病症在此項技術中眾所周知。

美國專利第 6,531,577 號、第 7,166,709 號及歐洲專利申請案第 04380188.5 號描述血漿來源之 VWF 調配物。然而，血漿來源之 VWF 除了具有數量及純度問題之外，亦存在血液攜帶病原體（例如病毒及變異型克亞二氏病（Creutzfeldt-Jakob disease；vCJD））之風險。此外，已知 VWF 在應力條件下會形成聚集體。

因而，此項技術中需要開發一種包含重組 VWF 之穩定醫藥調配物。

【發明內容】

本發明提供適用於凍乾重組 VWF 以產生高度穩定之醫藥組成物的調配物。該穩定醫藥組成物適用作治療劑用於治療罹患可受益於投予重組 VWF 之病症或病狀的個人。

在一個具體實例中，提供重組馮威里氏因子（rVWF）之穩定凍乾醫藥

調配物，其包含：(a) rVWF；(b) 一或多種緩衝劑；(c) 一或多種胺基酸；(d) 一或多種穩定劑；及 (e) 一或多種界面活性劑；該 rVWF 包含選自由下列組成之群的多肽：a) 在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；b) a) 之生物學活性類似物、片段或變異體；c) 由在 SEQ ID NO: 1 中所列出之多核苷酸編碼的多肽；d) c) 之生物學活性類似物、片段或變異體；及 e) 由在中度嚴格雜交條件下與在 SEQ ID NO: 1 中所列出之多核苷酸雜交之多核苷酸編碼的多肽；該緩衝液包含在約 0.1 mM 至約 500 mM 範圍內的 pH 緩衝劑，且該 pH 值在約 2.0 至約 12.0 範圍內；該胺基酸之濃度為約 1 至約 500 mM；該穩定劑之濃度為約 0.1 至約 1000 mM；且該界面活性劑之濃度為約 0.01 g/L 至約 0.5 g/L。

在另一具體實例中，rVWF 包含在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列。在另一具體實例中，緩衝劑係選自由檸檬酸鹽、甘胺酸、組胺酸、HEPES、Tris 及此等緩衝劑之組合組成之群。在又一具體實例中，緩衝劑為檸檬酸鹽。在許多具體實例中，pH 值在約 6.0 至約 8.0、約 6.5 至約 7.5 範圍內或為約 7.3。在另一具體實例中，pH 值為約 7.3。

在另一具體實例中，上述胺基酸係選自由甘胺酸、組胺酸、脯胺酸、絲胺酸、丙胺酸及精胺酸組成之群。在另一具體實例中，胺基酸之濃度在約 0.5 mM 至約 300 mM 範圍內。在另一具體實例中，胺基酸為約 15 mM 濃度之甘胺酸。

在本發明之一個具體實例中，rVWF 包含在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；其中緩衝劑為檸檬酸鹽，且 pH 值為約 7.3；且其中胺基酸為約 15 mM 濃度之甘胺酸。

在本發明之另一具體實例中，上述一或多種穩定劑係選自由甘露醇、乳糖、山梨醇、木糖醇、蔗糖、海藻糖、甘露糖、麥芽糖、乳糖、葡萄糖、棉子糖、纖維二糖、龍膽二糖、異麥芽糖、阿拉伯糖 (arabinose)、葡糖胺、果糖及此等穩定劑之組合組成之群。在一個具體實例中，穩定劑為約 10 g/L 濃度之海藻糖及約 20 g/L 濃度之甘露醇。

在本發明之又一具體實例中，上述界面活性劑係選自由毛地黃皂苷、Triton X-100、Triton X-114、TWEEN-20、TWEEN-80 及此等界面活性劑之組合組成之群。在另一具體實例中，界面活性劑為約 0.01 g/L 之 TWEEN-80。

在本發明之另一具體實例中，rVWF 包含在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；其中緩衝劑為約 15 mM 濃度、約 pH 7.3 之檸檬酸鹽；其中胺基酸為約 15 mM 濃度之甘胺酸；其中穩定劑為約 10 g/L 濃度之海藻糖及約 20 g/L 濃度之甘露醇；且其中界面活性劑為約 0.1 g/L 之 TWEEN-80。

【圖式簡單說明】

圖 1 展示用於評估穩定性之批次（在 $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 儲存）的合併 VWF:RC₀ 活性之 ANCOVA 分析。

圖 2 展示在 $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 儲存之 rVWF FDP 中殘餘水分增加。

圖 3 展示在 $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 儲存之 rVWF FDP 中殘餘水分增加。

【實施方式】

術語定義

除非另外定義，否則本文中所使用之所有技術及科學術語均與一般熟習本發明所屬技術領域者通常所理解之含義相同。以下參考文獻向熟習此項技術者提供用於本發明之許多術語的一般定義：Singleton, 等人,

DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (第2版, 1994); THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker 編, 1988); THE GLOSSARY OF GENETICS, 第5版, R. Rieger, 等人 (編), Springer Verlag (1991); 及 Hale 及 Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991)。

本文中所引用之各公開案、專利申請案、專利及其他參考文獻係以不與本發明不一致之程度以全文引用之方式併入本文中。

在此應注意，除非本內容中另外明確規定，否則如本說明書及隨附申請專利範圍中所使用之單數形式「一」及「該」包括複數個指代物。

如本文中所使用，除非另外規定，否則以下術語具有歸屬於其之含義：

術語「包含」對於肽化合物意謂化合物可能在指定序列之胺基及羧基末端中之一或二者處包括其他胺基酸。固然，此等其他胺基酸不應顯著干擾該化合物之活性。對於本發明之組成物，術語「包含」意謂組成物可能包括其他組份。此等其他組份不應顯著干擾該組成物之活性。

術語「藥理活性」意謂如此描述之物質經測定具有可影響醫學參數（例如（但不限於）血壓、血球計數、膽固醇含量）或疾病病況（例如（但不限於）癌症、自體免疫性病症）的活性。

如本文中所使用，術語「表現」意謂允許或導致基因或 DNA 序列中之資訊顯現，例如藉由活化涉及相應基因或 DNA 序列之轉錄及轉譯的細胞功能而產生蛋白質。DNA 序列在細胞中表現或由細胞表現，以便形成諸如蛋白質之「表現產物」。表現產物自身（例如所得蛋白質）亦可說成是「經表現」。表現產物可特性化為細胞內、細胞外或分泌產物。術語「細胞內」意

謂在細胞內部。術語「細胞外」意謂在細胞外部，諸如跨膜蛋白。若物質在很大程度上出現在細胞外部、自細胞上某處或在細胞內部，則其係由細胞「分泌」。

如本文中所使用，「多肽」係指由胺基酸殘基、結構變異體、相關天然存在之結構變異體及其非天然存在之合成類似物經由肽鍵連接所構成的聚合物。合成多肽係藉由例如使用自動化多肽合成器製備。術語「蛋白質」通常係指大多肽。術語「肽」通常係指短多肽。

如本文中所使用，多肽之「片段」意欲指小於全長多肽或蛋白質表現產物的任何多肽或蛋白質部分。

如本文中所使用，「類似物」係指在結構上實質上類似且具有相同生物活性，但可能對整個分子或其片段具有不同程度之活性的任何兩種或兩種以上多肽。類似物因一或多個突變（涉及一或多種胺基酸對於其他胺基酸之取代、缺失、插入及/或添加）而在其胺基酸序列組成方面不同。根據被置換之胺基酸與用於進行置換之胺基酸的物理化學或功能相關性，取代可為保守性或非保守性。

如本文中所使用，「變異體」係指經修飾以包含通常並非分子之一部分的其他化學部分的多肽、蛋白質或其類似物。該等部分可調節分子之溶解度、吸收、生物半衰期，等等。或者，該等部分可降低分子毒性，並消除或削弱該分子之任何不想要的副作用，等等。能夠介導該等作用之部分揭示於 Remington's Pharmaceutical Sciences (1980)中。將該等部分偶合至分子的程序在此項技術中眾所周知。例如（但不限於），在一個態樣中，變異體為具有可賦予蛋白質更長活體內半衰期之化學修飾的凝血因子。在多個態樣

中，多肽係藉由糖基化、聚乙二醇化及/或唾液酸化 (polysialylation) 來修飾。

重組 VWF

前原 VWF 之多核苷酸及胺基酸序列分別在 SEQ ID NO:1 及 SEQ ID NO:2 中列出，且分別可以基因庫 (GenBank) 登記號 NM_000552 及 NP_000543 獲得。對應成熟 VWF 蛋白質之胺基酸序列在 SEQ ID NO: 3 中列出 (對應於全長前原 VWF 胺基酸序列之胺基酸 764-2813)。

適用 rVWF 之一種形式至少具有在活體內穩定 (例如結合) 至少一種 VIII 因子 (FVIII) 分子且視情況具有藥理學上可接受之糖基化模式的性質。其特定實例包括無 A2 結構域因而可抗蛋白質水解之 VWF (Lankhof 等人, *Thromb. Haemost.* 77: 1008-1013, 1997); 及自 Val 449 至 Asn 730 之 VWF 片段, 包括糖蛋白 1b 結合域以及膠原蛋白及肝素之結合位點 (Pietu 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 1339-1347, 1989)。在一個態樣中，測定 VWF 穩定至少一種 FVIII 分子之能力係在缺乏 VWF 之哺乳動物中根據此項技術現狀中已知的方法進行。

本發明之 rVWF 係藉由此項技術中已知之任何方法產生。一個特定實例揭示於在 1986 年 10 月 23 日公開之 WO86/06096 及 1990 年 7 月 23 日申請之美國專利申請案第 07/559,509 號中，該等文獻之關於產生重組 VWF 的方法係以引用之方式併入本文中。因而，在此項技術中已知進行下列之方法：

- (i) 藉由基因工程 (例如經由 RNA 逆轉錄及/或 DNA 擴增) 產生重組 DNA；
- (ii) 藉由轉染 (例如經由電穿孔或微量注射) 向原核或真核細胞中引入重組 DNA；
- (iii) 培養轉型細胞，例如以連續或間歇方式；
- (iv) 表現 VWF，例如組成性表現或在誘導之後表現；及
- (v) 分離 VWF，例如自培養基或藉

由收集轉型細胞，以便 (vi) 獲得純化 rVWF，例如經由陰離子交換層析或親和層析。在一個態樣中，重組 VWF 係在轉型宿主細胞中使用此項技術眾所周知的重組 DNA 技術製造。例如，可使用適合限制酶自 DNA 切除編碼多肽之序列。或者，在另一態樣中，DNA 分子係使用化學合成技術（諸如胺基磷酸酯法）合成。又，在另一態樣中，使用此等技術之組合。

本發明亦提供在適當宿主中編碼本發明多肽之載體。該載體包含編碼多肽之多核苷酸，其可操作地與適當表現控制序列連接。在多核苷酸插入載體中之前或之後實現此可操作連接的方法眾所周知。表現控制序列包括啟動子、活化子、強化子、操縱子、核糖體結合位點、起始信號、中止信號、加帽信號 (cap signal)、聚腺苷酸化信號，及涉及轉錄或轉譯控制的其他信號。所得載體（其中具有多核苷酸）係用於使適當宿主轉型。此轉型可使用此項技術眾所周知的方法進行。

許多可利用且眾所周知的宿主細胞中任一者均可用於實施本發明。特定宿主之選擇取決於此項技術中已公認的許多因素，包括例如與所選表現載體的相容性、DNA 分子所編碼之肽的毒性、轉型率、肽之易回收性、表現特性、生物安全性及成本。在理解並非所有宿主細胞對於表現特定 DNA 序列均具有相等效果的情況下，必須尋得此等因子之平衡。在此等一般準則內，適用微生物宿主細胞包括（但不限於）細菌、酵母及其他真菌、昆蟲、植物、培養中之哺乳動物（包括人類）細胞，或此項技術中已知之其他宿主。

轉型宿主細胞在習知醱酵條件下培養以便表現所要化合物。該等醱酵條件在此項技術中眾所周知。最終，藉由此項技術中眾所周知的方法自培

養基或宿主細胞自身純化多肽。

視用於表現本發明化合物之宿主細胞而定，糖（寡醣）基視情況與蛋白質中已知的待糖基化位點連接。一般而言，O 連接之寡醣與絲胺酸（Ser）或蘇胺酸（Thr）殘基連接，而當天冬醯胺酸（Asn）殘基為序列 Asn-X-Ser/Thr（其中 X 可為除脯胺酸以外的任何胺基酸）之一部分時，N 連接之寡醣與天冬醯胺酸（Asn）殘基連接。X 較佳為 19 個天然存在之胺基酸（不計脯胺酸）之一。N 連接寡醣及 O 連接寡醣之結構以及在各類型中發現之糖殘基均不同。通常在 N 連接寡醣及 O 連接寡醣上發現之一種糖為 N-乙醯基神經胺酸（稱為唾液酸）。唾液酸通常為 N 連接寡醣及 O 連接寡醣之末端殘基，且在一個態樣中，由於其負電荷而賦予糖基化化合物酸性。該（等）位點可併入本發明化合物之連接子中，且較佳在重組產生多肽化合物期間藉由細胞進行糖基化（例如，在哺乳動物細胞中，諸如 CHO、BHK、COS）。在其他態樣中，該等位點係藉由此項技術中已知的合成或半合成程序而糖基化。

或者，藉由合成方法使用例如固相合成技術製造化合物。適合之技術在此項技術中眾所周知，及包括下列文獻中所描述之彼等：Merrifield (1973), *Chem. Polypeptides*, 第335-61 頁 (Katsoyannis 及 Panayotis 編); Merrifield (1963), *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149; Davis 等人 (1985), *Biochem. Intl.* 10: 394-414; Stewart 及 Young (1969), *Solid Phase Peptide Synthesis*; 美國專利第 3,941,763 號; Finn 等人 (1976), *The Proteins* (第 3 版) 2: 105-253; 及 Erickson 等人 (1976), *The Proteins* (第 3 版) 2: 257-527。固相合成為製造個別肽的較佳技術，此係由於其為製造小肽的最成本有效之方法。

VWF 之片段、變異體及類似物

製備多肽片段、變異體或類似物之方法在此項技術中眾所周知。

多肽片段係使用（但不限於）酶分裂（例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶）以及使用重組法製備，以產生具有特定胺基酸序列之多肽片段。可產生包含具有特定活性之蛋白質區域（諸如多聚域）或此項技術中已知之任何其他可識別之 VWF 域的多肽片段。

製造多肽類似物之方法亦為眾所周知。多肽之胺基酸序列類似物可為取代、插入、添加或缺失類似物。缺失類似物（包括多肽片段）缺乏天然蛋白質之一或多個殘基，該等殘基對於功能或免疫原活性並非必需的。插入類似物包括在多肽中之非末端點添加例如胺基酸。此類似物可包括例如（但不限於）插入免疫活性抗原決定基或僅插入單個殘基。添加類似物（包括多肽片段）包括在蛋白質之一或兩個末端添加一或多個胺基酸，且包括例如融合蛋白質。亦涵蓋上述類似物之組合。

取代類似物通常在蛋白質內之一或多個位點用一種野生型胺基酸交換另一種，且可經設計以便在未完全損失其他功能或性質的情況下調節多肽之一或多種性質。在一個態樣中，取代為保守性取代。「保守性胺基酸取代」為以具有側鏈或類似化學特性的胺基酸取代胺基酸。用於進行保守性取代之類似胺基酸包括具有下列側鏈之胺基酸：酸性側鏈（麩胺酸、天門冬胺酸）；鹼性側鏈（精胺酸、離胺酸、組胺酸）；極性醯胺側鏈（麩醯胺酸、天冬醯胺酸）；疏水性脂族側鏈（白胺酸、異白胺酸、纈胺酸、丙胺酸、甘胺酸）；芳族側鏈（苯丙胺酸、色胺酸、酪胺酸）；小側鏈（甘胺酸、丙胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、甲硫胺酸）；或脂族羥基側鏈（絲胺酸、蘇胺酸）。

在一個態樣中，類似物實質上與重組 VWF 同源，或實質上與重組 VWF 相同，該等類似物係來源於重組 VWF。類似物包括保留野生型多肽之至少某些生物活性（例如凝血活性）的類似物。

所涵蓋之多肽變異體包括（但不限於）藉由諸如下列技術進行化學修飾的多肽：泛素化；糖基化，包括多唾液酸化（polysialation）；與治療劑或診斷劑結合；標記；共價聚合物連接，諸如聚乙二醇化（以聚乙二醇衍生）；引入不可水解之鍵；及藉由化學合成胺基酸（諸如鳥胺酸，其通常並不存在於人類蛋白質中）進行插入或取代。變異體保留未經修飾之本發明分子的相同或基本上相同之結合性質。該化學修飾可包括藥劑直接或間接（例如經由連接子）與 VWF 多肽連接。在間接連接情況下，涵蓋連接子可水解或不可水解。

在一個態樣中，製備聚乙二醇化多肽類似物將包含以下步驟：（a）在結合構築體多肽與一或多個 PEG 基團連接的條件下，使多肽與聚乙二醇（諸如 PEG 之反應性酯或醛衍生物）反應；及（b）獲得反應產物。一般而言，醯化反應之最優反應條件係根據已知參數及所要結果確定。例如，PEG:蛋白質之比愈大，聚-聚乙二醇化產物（poly-pegylated product）之百分比愈大。在一些具體實例中，結合構築體在 N 末端具有單一 PEG 部分。聚乙二醇（PEG）可與凝血因子連接以例如獲得更長活體內半衰期。PEG 基團可能具有任何適宜分子量，且為直鏈或分支鏈。PEG 之平均分子量介於約 2 千道爾頓（kiloDalton，「kD」）至約 100 kDa、約 5 kDa 至約 50 kDa，或約 5 kDa 至約 10 kDa 範圍內。在某些態樣中，PEG 基團係藉由 PEG 部分上之天然或工程反應性基團（例如醛基、胺基、硫醇基，或酯基）與凝血因子上之反

應性基團（例如醛基、胺基，或酯基）的醯化或還原性烷基化反應，或藉由此項技術中已知之任何其他技術而與凝血因子連接。

製備聚唾液酸化多肽之方法描述於美國專利公開案 20060160948，Fernandes et Gregoriadis；Biochim. Biophys. Acta 1341: 26-34, 1997，及 Saenko 等人, Haemophilia 12:42-51, 2006 中。簡言之，在室溫下於暗處攪拌含 0.1 M NaIO_4 之多聚乙醯神經氨糖酸（CA）溶液以氧化 CA。活化之 CA 溶液在暗處相對於例如 0.05 M 磷酸鈉緩衝液（pH 7.2）進行透析，且此溶液添加至 rVWF 溶液中並在室溫下於暗處在溫和搖動下培育 18 小時。視情況藉由例如超濾/滲濾自 rVWF-唾液酸結合物分離自由試劑。rVWF 與唾液酸之結合物係使用戊二醛作為交聯試劑而獲得（Migneault 等人, Biotechniques 37: 790-796, 2004）。

在另一態樣中，進一步涵蓋本發明多肽為與第二藥劑（其為多肽）形成之融合蛋白質。在一個具體實例中，第二藥劑（其為多肽）為（但不限於）酶、生長因子、抗體、細胞激素、超化因子、細胞表面受體、細胞表面受體之細胞外域、細胞黏著分子，或上述蛋白質之片段或活性域。在相關具體實例中，第二藥劑為凝血因子，諸如因子 VIII、因子 VII、因子 IX。所涵蓋之融合蛋白質係藉由此項技術中眾所周知的化學或重組技術製造。

在另一態樣中，亦涵蓋前原 VWF 及原 VWF 多肽在本發明調配物中將提供治療效益。例如，美國專利第 7,005,502 號描述一種醫藥製劑，其包含大量的可在試管內誘導凝血酶產生之原 VWF。除天然存在之成熟 VWF 的重組生物學活性片段、變異體，或其他類似物之外，本發明亦涵蓋在本文所述之調配物中使用前原 VWF（在 SEQ ID NO:2 中列出）或原 VWF 多肽

(SEQ ID NO: 2 之胺基酸殘基 23 至 764) 的重組生物學活性片段、變異體，或類似物。

編碼片段、變異體及類似物之多核苷酸可由熟習編碼與天然存在之分子具備相同或相似之生物活性的天然存在分子之生物學活性片段、變異體或類似物的工作者容易地產生。在多個態樣中，此等多核苷酸係使用 PCR 技術、DNA 編碼分子之消化/接合及類似技術來製備。因而，熟習此項技術者將能夠使用此項技術中已知之任何方法（包括（但不限於）位點特異性突變誘發）在 DNA 股中產生單鹼基變化，以產生經改變之密碼子及錯義突變。如本文中所使用，片語「中度嚴格雜交條件」意謂例如在 42°C 下於 50% 甲醯胺中雜交，及在 60°C 下於 0.1×SSC、0.1% SDS 中洗滌。熟習此項技術者應理解，可根據待雜交序列之長度及 GC 核苷酸鹼基含量而改變此等條件。此項技術中之標準公式適用於確定準確雜交條件。參看 Sambrook 等人, 9.47-9.51, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)。

凍乾

在一個態樣中，包含本發明 VWF 多肽之調配物在投藥之前經凍乾。凍乾係使用此項技術中常見之技術進行，且應針對所開發之組成物進行優化 [Tang 等人, Pharm Res. 21:191-200, (2004) 及 Chang 等人, Pharm Res. 13:243-9 (1996)]。

在一個態樣中，凍乾週期由三個步驟構成：凍結、初步乾燥及二次乾燥 [A.P. Mackenzie, Phil Trans R Soc London, Ser B, Biol 278:167 (1977)]。在凍結步驟中，冷卻溶液以引發結冰。此外，此步驟誘發膨脹劑結晶。冰在初步

乾燥階段中昇華，此係藉由降低腔室壓力至低於冰之蒸氣壓、使用真空及引入熱以促進昇華來進行。最終，在二次乾燥階段，在低腔室壓力及高存放溫度（shelf temperature）下除去附著水或結合水。該處理產生稱為凍乾塊之物質。此後，該凍乾塊可用無菌水或適合稀釋劑復原供注射。

凍乾週期不僅決定賦形劑之最終物理狀態，而且亦影響其他參數，諸如復原時間、外觀、穩定性及最終含水量。呈凍結狀態之組成物結構經受在特定溫度下發生之若干轉移（例如玻璃轉移、濕化及結晶），且該結構可用於理解及優化凍乾處理。玻璃轉移溫度（ T_g 及/或 T_g' ）可提供關於溶質之物理狀態的資訊，且可藉由差示掃描量熱術（DSC）測定。當設計凍乾週期時， T_g 及 T_g' 為必須考慮的重要參數。例如， T_g' 對於初步乾燥至關重要。此外，在乾燥狀態下，玻璃轉移溫度提供關於最終產物之儲存溫度的資訊。

一般調配物及賦形劑

賦形劑為賦予或增強藥品（例如蛋白質）之穩定性及遞送的添加劑。不管包含其原因如何，賦形劑為調配物之必需組份，且因此必需安全且為患者良好耐受。對於蛋白質藥物，賦形劑之選擇尤其重要，此係由於其可影響藥物之效力及免疫原性。因此，需要開發具有適當選擇之賦形劑且提供適合穩定性、安全性及市場性的蛋白質調配物。

在一個態樣中，凍乾調配物至少包含一或多種緩衝液、膨脹劑，及穩定劑。在此態樣中，在聚集成為凍乾步驟期間或復原期間之間題的情況下，評估且選擇界面活性劑之效用。包括適當緩衝劑以在凍乾期間維持調配物在 pH 值穩定區內。涵蓋用於液體及凍乾蛋白質調配物之賦形劑組份的比較提供於表 A 中。

表 A：凍乾蛋白質調配物之賦形劑組份

賦形劑組份	在凍乾調配物中的功能
緩衝液	○在凍乾期間及復原之後維持調配物之 pH 值
張力劑/穩定劑	○穩定劑包括低溫保護劑及凍乾保護劑 ○實例包括多元醇、糖及聚合物 ○低溫保護劑保護蛋白質不受凍結應力損壞 ○凍乾保護劑在凍乾狀態下穩定蛋白質
膨脹劑	○用於增加產物精緻性且防噴 ○向凍乾塊提供結構強度 ○實例包括甘露醇及甘胺酸
界面活性劑	○若在凍乾處理期間存在聚集問題，則採用 ○可用於減少復原時間 ○實例包括聚山梨醇酯 20 及聚山梨醇酯 80
抗氧化劑	○通常不採用，可大幅延遲凍乾塊中之分子反應
金屬離子/螯合劑	○若僅作為輔助因子包括特定金屬離子，或若蛋白酶活性需要金屬，則可包括在內 ○在凍乾調配物中一般不需要螯合劑
防腐劑	○僅用於多劑量調配物 ○在調配物中防止微生物生長 ○通常包括在復原稀釋劑（例如 bWFI）中

在開發蛋白質調配物時，主要挑戰為針對製造、運輸及儲存之應力而穩定產物。調配物賦形劑之作用為提供針對此等應力之穩定作用。亦採用賦形劑來降低高濃度蛋白質調配物之黏度，以使其能夠遞送並增加患者便利性。一般而言，賦形劑可根據其針對各種化學及物理性應力而穩定蛋白質的機制進行分類。一些賦形劑係用於減輕特定應力之效應或用於調節特定蛋白質之特定感受性。其他賦形劑對蛋白質之物理及共價穩定性具有更一般之作用。本文所述之賦形劑係藉由其化學類型或其在調配物中之功能作用而組織。當論述各賦形劑類型時，提供穩定模式之簡要描述。

根據本文所提供之教示及導則，熟習此項技術者應瞭解在任何特定調配物中可包括多少量或範圍之賦形劑來獲得本發明之生物醫藥調配物，該賦形劑之量或範圍有助於該生物醫藥（例如蛋白質）穩定性之保持。例如，

包括在本發明生物醫藥調配物中之鹽的量及類型係根據最終溶液之所要滲透壓（亦即，等滲透壓、低滲透壓或高滲透壓）以及待要包括在該調配物中之其他組份的量及滲透壓進行選擇。

舉例而言，包括約 5%山梨醇可達成等滲透壓，而需要約 9%蔗糖賦形劑才能達成等滲透壓。可包括在本發明生物醫藥調配物內的一或多種賦形劑濃度之量或範圍的選擇已參考鹽、多元醇及糖而例示於上文。然而，熟習此項技術者應瞭解，本文所描述及參考特定賦形劑進一步例示之考慮因素同樣可用於賦形劑之所有類型及組合，例如包括鹽、胺基酸、其他張力劑、界面活性劑、穩定劑、膨脹劑、低溫保護劑、凍乾保護劑、抗氧化劑、金屬離子、螯合劑及/或防腐劑。

此外，若以莫耳濃度報導特定賦形劑，則熟習此項技術者應認可亦涵蓋溶液之當量百分率（%）w/v（例如，（溶液樣本中物質之公克數/溶液之毫升數） $\times 100\%$ ）。

固然，一般熟習此項技術者應認可，本文所述之賦形劑濃度在特定調配物內具有互依性。舉例而言，若例如蛋白質濃度較高，或若例如穩定劑濃度較高，則可降低膨脹劑之濃度。此外，一般熟習此項技術者應認可，為了維持不含膨脹劑之特定調配物的等滲透壓性，因此要調節穩定劑之濃度（亦即，使用「張力調節（tonicifying）」量之穩定劑）。常用賦形劑在此項技術中眾所周知，且可在 Powell 等人，Compendium of Excipients for Parenteral Formulations (1998), PDA J. Pharm. Sci. Technology, 52:238-311 中找到。

緩衝液及緩衝劑

通常在較窄 pH 值範圍內觀察到藥理學活性蛋白質調配物之穩定性最大。此最優穩定性之 pH 值範圍需要在預調配研究早期確定。若干方法適用於此意圖，諸如加速穩定性研究及量熱篩檢研究 (Remmele R.L. Jr., 等人, *Biochemistry*, 38(16): 5241-7 (1999))。調配物一旦最終製成，即必須製造蛋白質且維持整個存放期。因此，在調配物中幾乎總是採用緩衝劑來控制 pH 值。

緩衝物質之緩衝能力在 pH 值等於 pKa 時最大，且隨 pH 值自此值增加或降低而降低。在其 pKa 之 1 個 pH 單位內，存在 90% 緩衝能力。緩衝能力亦隨緩衝液濃度增加而按比例增加。

當選擇緩衝液時，需要考慮若干因素。首先，需要根據緩衝液之 pKa 及所要調配物 pH 值來確定緩衝液種類及其濃度。保證緩衝液與蛋白質及其他調配物賦形劑相容，且不催化任何降解反應同樣重要。要考慮之第三重要態樣為投藥之後緩衝液可能誘發之刺痛感及刺激感。例如，已知檸檬酸鹽在注射之後會導致刺痛 (Laursen T, 等人, *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 98(2): 218-21 (2006))。對於經由皮下 (SC) 或肌肉內 (IM) 途徑投予之藥物，其中與藉由靜脈內 (IV) 途徑投藥 (調配物在投藥之後快速稀釋至血液中) 時相比，藥物溶液保持在注射位點之時段相對更長，刺痛及刺激之可能性更大。對於藉由直接 IV 輸注投藥之調配物，需要監控緩衝液 (及任何其他調配物組份) 之總量。不得不尤其留心以磷酸鉀緩衝液形式投予之鉀離子，其可能在患者中誘發心血管效應 (Hollander-Rodriguez JC, 等人, *Am. Fam. Physician.*, 73(2): 283-90 (2006))。

用於凍乾調配物之緩衝液需要額外考慮。一些緩衝液 (如磷酸鈉) 在凍結期間可能自蛋白質無定形相結晶析出，從而導致 pH 改變。其他常見緩

衝液（諸如乙酸酯及咪唑）在凍乾處理期間可能會昇華或蒸發，從而在凍乾期間或復原之後改變調配物之 pH 值。

組成物中所存在之緩衝系統應加以選擇使得生理學上相容且可維持醫藥調配物之所要 pH 值。在一個具體實例中，溶液之 pH 值介於 pH 2.0 與 pH 12.0 之間。例如，溶液之 pH 值可能為 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。

pH 緩衝化合物可以適合維持調配物之 pH 值處於預定水準的任何量存在。在一個具體實例中，pH 緩衝液濃度介於 0.1 mM 與 500 mM（1 M）之間。例如，涵蓋 pH 緩衝劑為至少 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、25、30、40、50、60、70、80、90、100、200，或 500 mM。

如本文中所陳述，用於緩衝調配物之例示性 pH 緩衝劑包括（但不限於）有機酸、甘胺酸、組胺酸、麩胺酸、丁二酸鹽、磷酸鹽、乙酸鹽、檸檬酸鹽、Tris、HEPES，及胺基酸或胺基酸混合物，包括（但不限於）天門冬胺酸、組胺酸及甘胺酸。在本發明之一個具體實例中，緩衝劑為檸檬酸鹽。

穩定劑及膨脹劑

在本發明醫藥調配物之一個態樣中，添加穩定劑（或穩定劑之組合）以防止或減少儲存導致之聚集及化學降解。復原後之混濁或不透明溶液表明蛋白質已沈澱或至少已聚集。術語「穩定劑」意謂在水溶液狀態下能夠防止聚集或物理降解（包括化學降解，例如自溶作用、脫鹽胺作用、氧化

作用，等等）的賦形劑。所涵蓋之穩定劑包括（但不限於）蔗糖、海藻糖、甘露糖、麥芽糖、乳糖、葡萄糖、棉子糖、纖維二糖、龍膽二糖、異麥芽糖、阿拉伯糖、葡糖胺、果糖、甘露醇、山梨醇、甘胺酸、鹽酸精胺酸、多羥基化合物（包括多醣，諸如聚葡萄糖、澱粉、羥乙基澱粉、環糊精、N-甲基吡咯啉酮（pyrrolidene）、纖維素及玻尿酸）、氯化鈉[Carpenter 等人, Develop. Biol. Standard 74:225, (1991)]。在本發明調配物中，穩定劑係以約 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 1000 mM 之濃度併入。在本發明之一個具體實例中，甘露醇及海藻糖用作穩定劑。

必要時調配物亦包括適量膨脹劑及滲透壓調節劑。膨脹劑包括例如（但不限於）甘露醇、甘胺酸、蔗糖、諸如聚葡萄糖、聚乙烯吡咯啉酮之聚合物、羧甲基纖維素、乳糖、山梨醇、海藻糖，或木糖醇。在一個具體實例中，膨脹劑為甘露醇。膨脹劑係以約 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 1000 mM 之濃度併入。

界面活性劑

蛋白質具有與表面相互作用的較高傾向，從而使其對於空氣-液體、小瓶-液體，及液體-液體（矽油）界面處之吸附及變性較為敏感。已觀察到此降解途徑視蛋白質濃度而可逆，且導致形成可溶性及不可溶性蛋白質聚集體，或因表面吸附而損失溶液中之蛋白質。除容器表面吸附之外，表面導

致之降解作用因物理攪動而加劇，這會在產品運輸及處理期間經歷。

界面活性劑通常用於蛋白質調配物中以防止表面導致之降解作用。界面活性劑為能夠在與蛋白質競爭界面位置時勝出的兩性分子。界面活性劑分子之疏水性部分佔據界面位置（例如空氣/液體），同時該分子之親水性部分仍定向主體溶劑。在充分濃度（通常約為清潔劑之臨界微胞濃度）下，界面活性劑分子之表層用於防止蛋白質分子吸附在界面處。從而將表面導致之降解作用減至最低。本文中所涵蓋之界面活性劑包括（但不限於）聚乙氧基化去水山梨醇之脂肪酸酯，亦即，聚山梨醇酯 20 及聚山梨醇酯 80。二者之不同僅在於賦予分子疏水性特性之脂肪鏈長度分別為 C-12 及 C-18。因此，與聚山梨醇酯-20 相比，聚山梨醇酯-80 更具表面活性，且具有更低臨界微胞濃度。

清潔劑亦可影響蛋白質之熱力學構形穩定性。再次說明，指定清潔賦形劑之作用應具蛋白質特異性。例如，聚山梨醇酯已顯示可降低一些蛋白質之穩定性並增加其他蛋白質之穩定性。清潔劑使蛋白質不穩定可以清潔劑分子之疏水性尾部（其可參加與部分或完全未摺疊蛋白質狀態的特異性結合）的觀點進行解釋。此等類型之相互作用可導致構形平衡變為更膨脹之蛋白質狀態（亦即，增加互補蛋白質分子之疏水性部分暴露至結合聚山梨醇酯）。或者，若蛋白質天然狀態展現一些疏水表面，則與天然狀態結合之清潔劑可穩定該構形。

聚山梨醇酯之另一態樣在於其固有地對氧化降解敏感。其（作為原料）往往含有足量過氧化物從而導致蛋白質殘基側鏈（尤其甲硫胺酸）氧化。由添加穩定劑所產生的氧化破壞之可能性著重表明，應在調配物中使用最

低有效濃度的賦形劑。對於界面活性劑，針對指定蛋白質的有效濃度將視穩定機制而定。

在凍結及乾燥期間，亦添加適量界面活性劑以防止與表面相關之聚集現象[Chang, B, J. Pharm. Sci. 85:1325, (1996)]。因而，例示性界面活性劑包括（但不限於）陰離子、陽離子、非離子、兩性離子，及兩性界面活性劑，包括來源於天然存在之胺基酸的界面活性劑。陰離子界面活性劑包括（但不限於）月桂基硫酸鈉、二辛基磺基丁二酸鈉及二辛基磺酸鈉、鵝去氧膽酸、N-月桂醯基肌胺酸鈉鹽、十二烷基硫酸鋰、1-辛烷磺酸鈉鹽、水合膽酸鈉、去氧膽酸鈉，及甘胺去氧膽酸鈉鹽。陽離子界面活性劑包括（但不限於）苯甲烷氯化銨或苯乙烷氯化銨、單水合十六烷基氯化吡啶鎘，及十六烷基三甲基溴化銨。兩性離子界面活性劑包括（但不限於）CHAPS、CHAPSO、SB3-10，及 SB3-12。非離子界面活性劑包括（但不限於）毛地黃皂苷、Triton X-100、Triton X-114、TWEEN-20，及 TWEEN-80。界面活性劑亦包括（但不限於）聚桂醇（lauromacrogol）400；硬脂酸聚乙二醇酯 40；聚氧化乙烯氫化蓖麻油 10、40、50 及 60；單硬脂酸甘油酯；聚山梨酸酯 40、60、65 及 80；大豆卵磷脂及其他磷脂，諸如二油基磷脂醯膽鹼（DOPC）、二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油（DMPG）、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼（DMPC）及二油基磷脂醯甘油（DOPG）；蔗糖脂肪酸酯；甲基纖維素；及羧甲基纖維素。因此，進一步提供以個別形式或不同比率之混合物形式包含此等界面活性劑之組成物。在本發明之一個具體實例中，界面活性劑為 TWEEN-80。在本發明調配物中，界面活性劑係以約 0.01 g/L 至約 0.5 g/L 之濃度併入。在所提供之調配物中，界面活性劑濃度為 0.005、0.01、0.02、0.03、0.05、

0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 或 1.0 g/L。

鹽

通常添加鹽以增加調配物之離子濃度，此舉對於蛋白質溶解度、物理穩定性及等滲透壓性可能較為重要。鹽可以各種方式影響蛋白質之物理穩定性。離子可藉由與蛋白質表面上之帶電殘基結合來穩定蛋白質之天然狀態。或者，鹽可藉由沿蛋白質骨架與肽基 (-CONH-) 結合來穩定變性狀態。鹽亦可藉由屏蔽蛋白質分子內殘基之間的靜電相互排斥作用來穩定蛋白質天然構形。蛋白質調配物中之鹽亦可屏蔽蛋白質分子之間的靜電相互吸引作用，該相互作用會導致蛋白質聚集且不溶解。在所提供之調配物中，鹽濃度介於 0.1、1、10、20、30、40、50、80、100、120、150、200、300，與 500 mM 之間。

其他常見賦形劑組份

胺基酸

胺基酸在蛋白質調配物中已尋得多種用途，如緩衝液、膨脹劑、穩定劑及抗氧化劑。因而，在一個態樣中，分別採用組胺酸及麩胺酸來緩衝 pH 值範圍為 5.5-6.5 及 4.0-5.5 的蛋白質調配物。組胺酸之咪唑基之 $pK_a=6.0$ ，且麩胺酸側鏈之羧基之 pK_a 為 4.3，此使得此等胺基酸適用於在其各別 pH 值範圍內進行緩衝。在該等情況下，麩胺酸尤其適用。組胺酸在市售蛋白質調配物中較為常見，且此胺基酸可替代檸檬酸，眾所周知，檸檬酸為注射後導致刺痛的緩衝液。有趣的是，亦已報導當以高濃度液體及凍乾形式使用時，組胺酸對聚集具有穩定效應 (Chen B, 等人, *Pharm Res.*, 20(12): 1952-60 (2003))。其他人亦觀察到組胺酸可降低高蛋白質濃度調配物之黏度。然而，

在同一研究中，在於不鏽鋼容器中進行抗體凍融研究期間，作者在含組胺酸調配物中觀察到聚集及變色增加。關於組胺酸之另一注意事項為其在金屬離子存在下會光氧化（Tomita M, 等人, *Biochemistry*, 8(12): 5149-60 (1969)）。甲硫胺酸在調配物中用作抗氧化劑看似有前景的；已觀察到其對許多氧化應力有效（Lam XM, 等人, *J Pharm Set*, 86(11): 1250-5 (1997)）。

在許多態樣中，提供包括一個或多種胺基酸之調配物，甘胺酸、脯胺酸、絲胺酸、精胺酸及丙胺酸已顯示可藉由優先排除機制穩定蛋白質。甘胺酸亦為凍乾調配物中之常用膨脹劑。已證明精胺酸為抑制聚集之有效藥劑，且其已用於液體及凍乾調配物中。

在所提供之調配物中，胺基酸濃度介於 0.1、1、10、20、30、40、50、80、100、120、150、200、300，與 500 mM 之間。在本發明之一個具體實例中，胺基酸為甘胺酸。

抗氧化劑

蛋白質殘基氧化由許多不同的原因引起。除了添加特定抗氧化劑以外，預防蛋白質氧化破壞包括在整個製造處理及產物儲存期間小心控制許多因素，諸如大氣氧、溫度、光曝露，及化學污染。因此，本發明涵蓋使用醫藥抗氧化劑，包括（但不限於）還原劑、氧/自由基捕捉劑，或螯合劑。在一個態樣中，蛋白質治療調配物中之抗氧化劑可溶於水，且在整個產品存放期仍具活性。還原劑及氧/自由基捕捉劑藉由除去溶液中之活性氧物質而起作用。螯合劑（諸如 EDTA）藉由結合可促進自由基形成之痕量金屬污染物而有效。例如，在酸性纖維母細胞生長因子之液體調配物中利用 EDTA 抑制半胱胺酸殘基之金屬離子催化氧化。

除各種賦形劑預防蛋白質氧化之效果以外，亦關心抗氧化劑自身導致蛋白質之其他共價或物理變化的可能性。例如，還原劑會導致分子內二硫鍵分裂，該分裂又會導致二硫化物改組。在過渡金屬離子存在下，抗壞血酸及 EDTA 已顯示可在許多蛋白質及肽中促進甲硫胺酸氧化 (Akers MJ, 及 Defelippis MR. *Peptides and Proteins as Parenteral Solutions*. Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins. Sven Frokjaer, Lars Hovgaard 編. Pharmaceutical Science. Taylor 及 Francis, UK (1999)); Fransson J.R., *J. Pharm. Sci.* 86(9): 4046-1050 (1997); Yin J, 等人, *Pharm Res.*, 21(12): 2377-83 (2004))。已報導硫代硫酸鈉可降低 rhuMab HER2 中光及溫度誘導之甲硫胺酸氧化的程度；然而，此研究中亦報導硫代硫酸鹽-蛋白質加合物之形成 (Lam XM, Yang JY, 等人, *J Pharm Sci.* 86(11): 1250-5 (1997))。選擇適當抗氧化劑係根據蛋白質之特定應力及敏感度進行。在某些態樣中，所涵蓋之抗氧化劑包括（但不限於）還原劑及氧/自由基捕捉劑、EDTA，及硫代硫酸鈉。

金屬離子

一般而言，在蛋白質調配物中不需要過渡金屬離子，此係由於其可催化蛋白質中之物理及化學降解反應。然而，當特定金屬離子為蛋白質輔因子時，其可包括在調配物中；且若其形成配位錯合物，則可包括在蛋白質之懸浮液調配物中（例如胰島素之鋅懸浮液）。最近，已建議使用鎂離子（10-120 mM）抑制天門冬胺酸異構化形成異天門冬胺酸 (WO 2004039337)。

金屬離子賦予蛋白質穩定性或增加蛋白質活性的兩個實例為人類脫氧核糖核酸酶 (rhDNase, Pulmozyme®) 及因子 VIII。在 rhDNase 情況下，Ca⁺² 離子（至多 100 mM）藉由特定結合位點增加酶之穩定性 (Chen B, 等人, *J*

Pharm Sci., 88(4): 477-82 (1999))。實際上，用 EGTA 自溶液移除鈣離子會導致脫醯胺作用及聚集增加。然而，經觀察此作用僅與 Ca^{+2} 離子相關；經觀察，其他二價陽離子 Mg^{+2} 、 Mn^{+2} 及 Zn^{+2} 使 rhDNase 不穩定。在因子 VIII 中觀察到類似效應。 Ca^{+2} 及 Sr^{+2} 離子穩定蛋白質；而其他如 Mg^{+2} 、 Mn^{+2} 及 Zn^{+2} 、 Cu^{+2} 及 Fe^{+2} 使酶不穩定 (Fatouros, A., 等人, *Int. J. Pharm.*, 155, 121-131 (1997))。在關於因子 VIII 之獨立研究中，在 Al^{+3} 離子存在下觀察到聚集率顯著增加 (Derrick TS, 等人, *J. Pharm. Sci.*, 93(10): 2549-57 (2004))。作者指出，其他賦形劑（如緩衝鹽）通常經 Al^{+3} 離子污染，且說明需要在調配產物中使用具適當品質之賦形劑。

防腐劑

當開發多次用量非經腸調配物（其涉及自同一容器取出一次以上）時，必需防腐劑。其主要功能為在整個存放期內或使用藥品時，抑制微生物生長且確保產品無菌。常用防腐劑包括（但不限於）苯甲醇、苯酚及間甲酚。雖然防腐劑具有較長使用歷史，但開發包括防腐劑之蛋白質調配物仍具挑戰性。防腐劑幾乎一向具有使蛋白質不穩定之效應（聚集），且此已變成限制其在多劑量蛋白質調配物中使用的主要因素 (Roy S, 等人, *J Pharm Sci.*, 94(2): 382-96 (2005))。

迄今為止，大部分蛋白質藥物已經調配僅供單次使用。然而，當多劑量調配物有可能存在時，其賦予患者便利之優勢將增加，且增加市場性。一個良好實例為人類生長激素 (hGH)，所開發之防腐調配物已將更便利、可多次使用之注射筆形式商業化。在市場上現可獲得至少 4 種含有 hGH 防腐調配物之該等筆器件。Norditropin®（液體，Novo Nordisk）、Nutropin AQ®

(液體，Genentech) & Genotropin (凍乾雙腔藥筒，Pharmacia & Upjohn) 含有苯酚，而 Somatrop® (Eli Lilly) 係以間甲酚調配。

在防腐劑型之調配物開發期間需要考慮若干態樣。在藥品中，有效防腐劑濃度必須經優化。此需要在具有賦予抗微生物效果而不損害蛋白質穩定性之濃度範圍的劑型中測試指定防腐劑。例如，在開發介白素-1 受體 (I 型) 之液體調配物時，藉由使用差示掃描量熱術 (DSC) 成功篩檢出三種防腐劑。根據防腐劑在通常用於市售產品中之濃度下對穩定性之影響將其按順序分級 (Remmele RL Jr., 等人, *Pharm Res.*, 15(2): 200-8 (1998))。

與凍乾調配物相比，開發含防腐劑之液體調配物更具挑戰性。凍乾產品可在無防腐劑的情況下凍乾，且在使用時用含防腐劑之稀釋劑復原。此顯著縮短防腐劑與蛋白質接觸之時間，從而將相關穩定性風險最小化。對於液體調配物，不得不在整個產品存放期內維持防腐效果及穩定性(約 18-24 個月)。一個重要注意點為，在含活性藥物及所有賦形劑組份之最終調配物中必須顯示防腐效果。

一些防腐劑可引起注射位點反應，此為選擇防腐劑時需要考慮的另一因素。在聚焦於評估 Norditropin 中之防腐劑及緩衝液的臨床試驗中，與含間甲酚之調配物相比，在含苯酚及苯甲醇之調配物中觀察到疼痛感降低 (Kappelgaard A.M., *Horm Res.* 62 Suppl 3:98-103 (2004))。有趣的是，在常用防腐劑中，苯甲醇具備麻醉性 (Minogue SC, 及 Sun DA., *Anesth Analg.*, 100(3): 683-6 (2005))。在多個態樣中，防腐劑之使用提供比任何副作用均重要的效益。

製備方法

本發明進一步涵蓋製備醫藥調配物之方法。

本發明方法進一步包含一個或多個以下步驟：在凍乾之前向該混合物中添加如本文所描述之穩定劑；在凍乾之前向該混合物中添加至少一種選自膨脹劑、等滲透壓調節劑及界面活性劑之藥劑，各藥劑均如本文所描述。

凍乾物質之標準復原實務為回添一定體積的注射用純水或無菌水（WFI）（通常等於在凍乾期間移除之體積），雖然抗細菌劑之稀釋溶液有時用於產生供非經腸投藥之醫藥 [Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, 18:1311-1354 (1992)]。因此，提供製備復原 rVWF 組成物之方法，該方法包含向本發明之凍乾 rVWF 組成物中添加稀釋劑的步驟。

凍乾物質可復原成水溶液。各種水性載劑，例如注射用無菌水、用於多劑量使用的具有防腐劑之水，或具有適量界面活性劑之水（例如，含有活性化合物與適用於製造水性懸浮液之賦形劑之混合物的水性懸浮液）。在許多態樣中，該等賦形劑為懸浮劑，例如（但不限於）羧甲基纖維素鈉、甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、海藻酸鈉、聚乙烯吡咯啉酮、黃耆膠（gum tragacanth）及阿拉伯膠（gum acacia）；分散劑或潤濕劑為天然存在之磷脂（例如（但不限於）卵磷脂），或環氧烷與脂肪酸之縮合產物（例如（但不限於）聚氧化乙烯硬脂酸酯），或環氧乙烷與長鏈脂族醇（例如（但不限於）十七伸乙基氧基十六醇）之縮合產物，或環氧乙烷與衍生自脂肪酸及己糖醇之偏酯的縮合產物（諸如聚氧化乙烯山梨醇單油酸酯），或環氧乙烷與衍生自脂肪酸及己糖醇酐之偏酯的縮合產物（例如（但不限於）聚乙烯脫水山梨醇單油酸酯）。在多個態樣中，水性懸浮液亦含有一或多種防腐劑，例如（但不限於）對羥基苯甲酸乙酯或對羥基苯甲酸正丙酯。

投藥

在一個態樣中，為了向人類或試驗動物投予組成物，組成物包含一或多種醫藥學上可接受之載劑。片語「醫藥學上」或「藥理學上」可接受係指當使用此項技術中眾所周知的途徑投藥（如下文所描述）時，分子整體及組成物穩定、可抑制蛋白質降解（諸如聚集及分裂產物），且此外不產生過敏或其他有害反應。「醫藥學上可接受之載劑」包括任何及所有臨床上適用之溶劑、分散介質、包衣劑、抗細菌劑及抗真菌劑、等滲透壓及吸收延遲劑及類似物，包括上文所揭示之藥劑。

醫藥調配物係經口、局部、經皮、非經腸、藉由吸入噴霧、經陰道、經直腸或藉由顱內注射而投予。如本文中所使用之術語非經腸包括皮下注射、靜脈內注射、肌肉內注射、腦池內注射或輸注技術。亦涵蓋在特定部位藉由靜脈內、皮內、肌肉內、乳房內、腹膜內、鞘內、眼球後、肺內注射及/或外科植入進行投藥。一般而言，組成物基本上不含熱原以及可能對接受者有害的其他雜質。

組成物之單次或多次投藥係根據治療醫師所選擇之劑量濃度及模式來進行。出於預防或治療疾病之目的，適當劑量取決於待治療之疾病類型，如上文所定義；疾病之嚴重程度及進程；是出於預防還是出於治療目的投予藥物；先前療法；患者之臨床病史及對藥物之反應；及主治醫師之判斷。

套組

作為附加態樣，本發明包括包含一或多種凍乾組成物之套組，該等組成物係以有助於其投予個體使用的方式包裝。在一個具體實例中，該套組包括本文所描述之醫藥調配物（例如包含治療蛋白質或肽的組成物），該調

配物包裝在諸如密封瓶或密封器皿之容器中，描述化合物或組成物在實施該方法中之用途的標籤係黏貼至容器或包括在該包裝中。在一個具體實例中，醫藥調配物係包裝在容器中，以致容器中之頂部空間量（例如，液體調配物與容器頂部之間的空氣量）極小。頂部空間量較佳可忽略（亦即，幾乎為零）。在一個具體實例中，套組含有具有治療蛋白質或肽組成物的第一容器及具有該組成物之生理學上可接受之復原溶液的第二容器。在一個態樣中，醫藥調配物係包裝在單位劑型中。套組可進一步包括適用於根據特定投藥途徑投予醫藥調配物的器件。套組較佳含有描述醫藥調配物之用途的標籤。

劑量

涉及治療本文所描述之病狀之方法的用藥方案將由主治醫師考慮可改變藥物作用的各種因素來確定，該等因素例如患者年齡、病狀、體重、性別及飲食、任何感染之嚴重程度、投藥時間及其他臨床因素。舉例而言，本發明之重組 VWF 的典型劑量為約 50 U/kg，等於 500 μ g/kg。

在一個態樣中，本發明調配物係藉由初始快速推注接著連續輸注來進行投藥，以維持藥品之治療循環濃度。作為另一實例施，本發明化合物係以一次劑量形式投藥。一般熟習此項技術者將容易地優化有效劑量及投藥方案，如根據良好醫學實務及個別患者之臨床病狀所確定。用藥頻率取決於藥劑之藥物動力學參數及投藥途徑。最優醫藥調配物係由熟習此項技術者視投藥途徑及所要劑量來確定。例如參看 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版 (1990, Mack Publishing 公司, Easton, PA 18042) 第 1435-1712 頁，該文獻之揭示內容以引用的方式併入本文中。該等調配物影響所投予

之藥劑的物理狀態、穩定性、活體內釋放速率，及活體內清除速率。視投藥途徑不同，適合劑量係根據體重、身體表面積或器官大小來計算。可藉由使用用於測定血液濃度劑量之既定檢定連同適當劑量反應資料來確定適當劑量。最終用藥方案係由主治醫師考慮可改變藥物作用的各種因素來確定，該等因素例如藥物之比活性、損傷之嚴重程度及患者之反應性、患者年齡、病狀、體重、性別及飲食、任何感染之嚴重程度、投藥時間及其他臨床因素。隨著研究進行，將出現關於各種疾病及病狀之適當劑量濃度及治療持續時間的其他資訊。

以下實施例不意欲具有限制意義，而是僅例示本發明之特定具體實例。

實施例 1

搖動實驗

為了測定 rVWF 在各種調配物中之沈澱量，在各種條件下測試 rVWF 在紊亂搖動之後的聚集程度。

如下表 1 中所示，在 20 mM 檸檬酸鹽緩衝液(pH 7.3)中評定各種 rVWF 調配物。設計搖動實驗以模擬機械應力條件。1-2 ml 各調配物用實驗室搖動器以 1200 rpm 搖動 10 分鐘。

表 1

Lyo25	離胺酸	組胺酸	甘胺酸	絲胺酸	甘露醇	PEG 1500	Tween 80	蔗糖	海藻糖	棉子糖
18	30 mM				5 g/L					
19		30 mM			5 g/L					
20			30 mM		5 g/L					
21				30 mM	5 g/L					
22	30 mM					5 g/L				
23		30 mM				5 g/L				
24			30 mM			5 g/L				
25				30 mM		5 g/L				
26	30 mM						0.1 g/L			
27		30 mM					0.1 g/L			
28			30 mM				0.1 g/L			
29				30 mM			0.1 g/L			
30	30 mM				5 g/L	5 g/L				
31		30 mM			5 g/L	5 g/L				
32			30 mM		5 g/L	5 g/L				
33				30 mM	5 g/L	5 g/L				
34	30 mM				5 g/L		0.1 g/L			
35		30 mM			5 g/L		0.1 g/L			
36			30 mM		5 g/L		0.1 g/L			
37				30 mM	5 g/L		0.1 g/L			
38	30 mM				5 g/L	5 g/L	0.1 g/L			
39		30 mM			5 g/L	5 g/L	0.1 g/L			
40			30 mM		5 g/L	5 g/L	0.1 g/L			
41				30 mM	5 g/L	5 g/L	0.1 g/L			
42					5 g/L					
43								5 g/L		
44									5 g/L	
45										5 g/L
46					5 g/L	5 g/L				
47						5 g/L		5 g/L		
48						5 g/L			5 g/L	
49						5 g/L				5 g/L
50					5 g/L		0.1 g/L			
51							0.1 g/L	5 g/L		
52							0.1 g/L		5 g/L	
53							0.1 g/L			5 g/L

可見 VWF 聚集物之評定係根據以下所示之方案進行。在大部分情況下，「可見聚集物」為大小介於約 100 nm 至 1-2 cm 範圍內的凝膠纖維。

方案

顆粒	
A	無顆粒
B	若干顆粒，幾乎不可見（點）
B1	許多顆粒，幾乎不可見（點）
C	若干顆粒，易見（纖維）
D	許多顆粒，易見（纖維）
E	可見顆粒（>1 mm 纖維）
E1	絨毛狀白色沈澱物（浮游在表面上）
E2	膠狀

搖動實驗之結果示於下表 2 中。

表 2

Lyo25 樣本	離胺酸	組胺酸	甘胺酸	絲胺酸	甘露醇	PEG 1500	Tween 80	搖動 1-2 mL， 1200 rpm，30 min
18	30 mM				5 g/L			E1
19		30 mM			5 g/L			E1
20			30 mM		5 g/L			E1
21				30 mM	5 g/L			E1
22	30 mM					5 g/L		E1
23		30 mM				5 g/L		E1
24			30 mM			5 g/L		E1
25				30 mM		5 g/L		E1
26	30 mM						0.1 g/L	E2 大
27		30 mM					0.1 g/L	E2 大
28			30 mM				0.1 g/L	E2 約 6mm
29				30 mM			0.1 g/L	E2 約 3mm
30	30 mM				5 g/L	5 g/L		E1
31		30 mM			5 g/L	5 g/L		E1
32			30 mM		5 g/L	5 g/L		E1
33				30 mM	5 g/L	5 g/L		E1
34	30 mM				5 g/L		0.1 g/L	B1
35		30 mM			5 g/L		0.1 g/L	B
36			30 mM		5 g/L		0.1 g/L	E2 大
37				30 mM	5 g/L		0.1 g/L	E2 大

38	30 mM				5 g/L	5 g/L	0.1 g/L	D
39		30 mM			5 g/L	5 g/L	0.1 g/L	D
40			30 mM		5 g/L	5 g/L	0.1 g/L	B
41				30 mM	5 g/L	5 g/L	0.1 g/L	B

總之，上述搖動實驗表明，含有 Tween-80 及甘露醇之調配物提供最佳結果（亦即，聚集量最小）。

實施例 2

凍融實驗

設計凍融實驗以評定由重複凍結及解凍所導致之應力的影響。除了用於搖動實驗之上述調配物（表 1）以外，亦評定以下調配物（表 3 及表 4）：

表 3

Lyo25 樣本	甘露醇	PEG 1500	Tween 80	蔗糖	海藻糖	棉子糖
42	5 g/L					
43				5 g/L		
44					5 g/L	
45						5 g/L
46	5 g/L	5 g/L				
47		5 g/L				
48		5 g/L				
49		5 g/L				
50	5 g/L		0.1 g/L			
51			0.1 g/L	5 g/L		
52			0.1 g/L		5 g/L	
53			0.1 g/L			5 g/L

表 4

Lyo25 樣本	離胺酸	組胺酸	甘胺酸	絲胺酸	甘露醇	PEG 1500	Tween-80	蔗糖	海藻糖	棉子糖
76					20 g/L		0.2 g/L	20 g/L		
77					20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
78					20 g/L		0.2 g/L			10 g/L
79		15 mM			20 g/L		0.2 g/L	20 g/L		

80		15 mM			20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
81		15 mM			20 g/L		0.2 g/L			10 g/L
82		15 mM	15 mM		20 g/L		0.2 g/L	20 g/L		
83		15 mM	15 mM		20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
84		15 mM	15 mM		20 g/L		0.2 g/L			10 g/L
85		15 mM	15 mM		20 g/L	5 g/L	0.2 g/L			
86		15 mM	15 mM		20 g/L	5 g/L	0.2 g/L		10 g/L	
87		15 mM	15 mM		20 g/L	15 g/L	0.2 g/L		10 g/L	
88		15 mM	15 mM		20 g/L		0.2 g/L			5 g/L
89		15 mM	15 mM		20 g/L		0.2 g/L			15 g/L
90		15 mM			20 g/L		0.2 g/L			15 g/L
92		15 mM	15 mM		20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
93	30 mM				20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
94		30 mM			20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
95			30 mM		20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
96				30 mM	20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
97		15 mM			20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
98		15 mM	15 mM		20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
99		15 mM	15 mM		20 g/L		0.2 g/L		5 g/L	
100		15 mM			20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
		15 mM			20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	

所有調配物均在冰箱中於-20℃下凍結約 1 小時，且接著在室溫下解凍。結果示於下表 5 中。

表 5

Lyo25 樣本	離胺 酸	組胺 酸	甘胺 酸	絲胺 酸	甘露 醇	PEG 1500	Tween-80	蔗糖	海藻 糖	棉子 糖	凍/融（4 次）	凍/融（約 10 次）
18	30 mM				5 g/L						E1	15
19		30 mM			5 g/L						E1	19
20			30 mM		5 g/L						C	20
21				30 mM	5 g/L						C	21
22	30 mM					5 g/L					C	22
23		30 mM				5 g/L					C/B1	23

24			30 mM			5 g/L					C	24
25				30 mM		5 g/L					C	25
26	30 mM						0.1 g/L				B	26
27		30 mM					0.1 g/L				B-B1	27
28			30 mM				0.1 g/L				B	28
29				30 mM			0.1 g/L				E	29
30	30 mM				5 g/L	5 g/L					E	30
31		30 mM			5 g/L	5 g/L					D	31
32			30 mM		5 g/L	5 g/L					B1-C	32
33				30 mM	5 g/L	5 g/L					C/D	33
34	30 mM				5 g/L		0.1 g/L				E2 (剩餘 之 B)	34
35		30 mM			5 g/L		0.1 g/L				E	35
36			30 mM		5 g/L		0.1 g/L				E	36
37				30 mM	5 g/L		0.1 g/L				B	37
38	30 mM				5 g/L	5 g/L	0.1 g/L				B	38
39		30 mM			5 g/L	5 g/L	0.1 g/L				B	39
40			30 mM		5 g/L	5 g/L	0.1 g/L				B	40
41				30 mM	5 g/L	5 g/L	0.1 g/L				A	41
42					5 g/L						D	42
43								5 g/L			D	43

44								5 g/L		E1	44
45									5 g/L	E1	45
46					5 g/L	5 g/L				D	46
47						5 g/L		5 g/L		D	47
48						5 g/L			5 g/L	D-E	48
49						5 g/L				5 g/L	49
50					5 g/L		0.1 g/L			B1	50
51							0.1 g/L	5 g/L		C-D	51
52							0.1 g/L		5 g/L	B1	52
53							0.1 g/L			5 g/L	53

如上所示，海藻糖提供最佳結果（亦即，聚集量最小）。

實施例 3

凍乾實驗

設計凍乾實驗以評定各種調配物形成凍乾塊的能力，該凍乾塊在 10 分鐘內溶解且獲得澄清溶液。亦進行加速穩定性研究以證明生物活性無顯著損失。

下表 6 中所示之調配物係用氮氣凍乾器 TS20002 根據製造商說明書凍乾。凍乾總時間約為 72 小時。以下調配物亦各含有 20 g/L 甘露醇及 0.1 g/L Tween-80。

表 6

Lyo 26	檸檬酸 鹽	HEPE S	甘 胺 酸	組胺酸	乙 酸 鹽	Tris	磷 酸 鹽	離胺酸	組 胺 酸	甘 胺 酸	海 藻 糖	棉 子 糖
1	15 mM										10 g/L	
2	15 mM							15 mM			10 g/L	
3	15 mM								15 mM		10 g/L	
4	15 mM									15 mM	10 g/L	
5	15 mM							15 mM		15 mM	10 g/L	
6	15 mM							30 mM			10 g/L	
7	15 mM											10 g/L
8	15 mM								15 mM			10 g/L
9		15 mM									10 g/L	
10		15 mM						15 mM			10 g/L	
11		15 mM							15 mM		10 g/L	
12		15 mM								15 mM	10 g/L	
13		15 mM						15 mM		15 mM	10 g/L	
14		15 mM						15 mM		15 mM		10 g/L
15			15 mM								10 g/L	
16			15 mM						15 mM		10 g/L	
17				15 mM							10 g/L	
18				15 mM				15 mM			10 g/L	
19					15 mM			15 mM		15 mM	10 g/L	
20						15 mM		15 mM		15 mM	10 g/L	
21							15 mM	15 mM		15 mM	10 g/L	

凍乾實驗之結果示於下表 7 中。

表 7

			緩 衝 液					--	賦 形 劑	--	--	--
Lyo 26	檸檬酸 鹽	HEPES	甘 胺 酸	組 胺 酸	乙 酸 鹽	Tris	磷 酸 鹽	離 胺 酸	組 胺 酸	甘 胺 酸	海 藻 糖	棉 子 糖
1	15 mM										10 g/L	
2	15 mM							15 mM			10 g/L	
3	15 mM								15 mM		10 g/L	
4	15 mM									15 mM	10 g/L	
5	15 mM							15 mM			10 g/L	
6	15 mM							30 mM			10 g/L	
7	15 mM											10 g/L
8	15 mM								15 mM			10 g/L
9		15 mM									10 g/L	
10		15 mM						15 mM			10 g/L	
11		15 mM							15 mM		10 g/L	
12		15 mM								15 mM	10 g/L	
13		15 mM						15 mM		15 mM	10 g/L	
14		15 mM						15 mM		15 mM		10 g/L
15			15 mM								10 g/L	
16			15 mM						15 mM		10 g/L	
17				15 mM							10 g/L	
18				15 mM				15 mM			10 g/L	
19					15 mM			15 mM		15 mM	10 g/L	
20						15 mM		15 mM		15 mM	10 g/L	
21							15 mM	15 mM		15 mM	10 g/L	

如上所示，檸檬酸鹽或 HEPES 緩衝液與胺基酸組合獲得澄清溶液。

為了評定經復原之凍乾 rVWF 的穩定性，進行 VWF:Ag 及 VWF:RCo 測試。VWF:Ag 對應可在 VWF 特異性 ELISA 中使用多株抗 VWF 抗體偵測到的 VWF 量；而 VWF:RCo 對應在瑞斯特黴素（ristocetin）存在下導致穩定之血小板凝集的 VWF 量。樣本在 40°C 下儲存。假定阿瑞尼氏方程式（Arrhenius equation）適用，則在 40°C 下一個月之穩定性約與在 4°C 下一年之穩定性相等。穩定性實驗之結果示於下表 8 及表 9 中。

表 8

rVWF:Ag 調配物		週 (40°)			
		0	4	5	8
1		121.1	89.8	113.0	106.6
2		121.8	102.0	114.0	112.8
3		119.9	102.0	105.,0	112.7
4		117.3	100.0	108.0	114.4
5		121.2	98.2	117.0	114.9
6		123.8	96.6	107.0	--
7		135.2	96.6	112.0	112.4
8		130.6	82.2	108.0	115.7
9		112.0	89.5	109.0	107.0
10		122.4	87.1	106.0	107.7
11		119.3	97.5	115.0	114.2
12		124.2	109.0	109.0	103.4
13		110.2	92.3	106.0	112.4
14		108.9	107.0	103.0	109.0

表 9

rVWF:RCo 調配物	週 (40°)				
	0	4	5	8	
1	86	102	97.0	93.0	
2	84	97	88.0	89.0	
3	85	100	87.0	93.0	
4		102	81.0	98.0	
5	85	89	88.0	98.0	
6	83	102	88.0		
7		92	97.0	95.0	
8	88	94	90.0	104.0	
9	93	91	97.0	100.0	
10	95	87	87.0	87.0	
11	86	93	89.0	99.0	
12	84	91	89.0	95.0	
13	88	87	96.0	89.0	
14	90	91	86.0	92.0	

ELISA 之標準偏差在 10%-20%範圍內。上述結果表明，所有測試調配物在 40℃ 下經 8 週均具有良好穩定性。

若在調配物中使用不同的胺基酸（例如 15 mM 或 20 mM 之甘胺酸、離胺酸或組胺酸），且若改變檸檬酸鹽緩衝液（例如，15、20 或 25 mM），則又進行穩定性實驗。如上所述，使用 VWF:RCo 活性檢定監控 rVWF 之穩定性。即使在 13 個月之後，對於在 40℃ 下儲存之 rVWF 穩定性樣本亦未觀察到 VWF:RCo 活性值顯著差異。量測值之顯著性用 t-檢驗進行檢驗。檢定之中間精密度係藉由計算變異數係數來確定。在所有系列穩定性資料中，CV 均小於 20%，且滿足 CV<20%之驗證標準。基於以上所述，可得出以下結論：rVWF 在所測試之所有檸檬酸鹽緩衝系統中均穩定，而與緩衝液莫耳濃度及所添加之胺基酸無關。即使當在 40℃ 下儲存至少 13 個月時，rVWF 仍穩定。

使用 VWF:RC₀ 活性檢定進行之效力測定在 CV 值小於 20%的情況下顯示良好中間精密度。

因而，鑒於本文中呈現之資料，建議包括 15 mM 檸檬酸鹽（二水合檸檬酸三鈉）、15 mM 甘胺酸、10 g/L 海藻糖、20 g/L 甘露醇、0.1 g/L Tween-80（pH 7.3）的 rVWF 調配物。

實施例 4

長期穩定性

加速穩定性測試及長期穩定性測試

進行研究以評估在推薦儲存條件及高儲存條件下儲存之 rVWF 最終藥品(FDP)的穩定性。來自高儲存條件之資料保證溫度偏差將不會影響 rVWF FDP 之品質，且將在不存在即時、真實條件穩定性資料時用於外推該物質之可接受有效條件。

當前規格為 $\leq 3.0\%$ 殘餘水分（如使用卡爾·費歇爾法（Karl Fischer Method）所測定）。批次 rVWFF#4FC、rVWFF#5FC、rVWFF#6FC 及 rVWFF#7FC 分別釋放 1.2%、1.3%、1.2%及 1.5%之水分含量。基於過去對具有類似小瓶及塞子構造之其他產品的經驗，預計在建議存放期（亦即，在 $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 之預定儲存溫度下 24 個月）末期，釋放約 1.3%殘餘水分的任何 rVWF 批次均將符合 $\leq 3.0\%$ 之規格界限。

使用已製成之 4 個 rVWF FDP 批次，在所推薦之儲存條件（亦即 $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ）及高溫（亦即 $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ）下進行長期穩定性研究。此等研究已提供充分資料，以便比較個別臨床批次之穩定性特性。

在表 10 中可獲得穩定性方案，包括穩定性指示檢定及穩定性接受標準

之描述，表 10 亦含有與穩定性研究中所評估之 rVWF FDP 批次相關的資訊。

表 10

儲存條件 (°C)	批號	完成 (及建議) 測試間隔
5°C±3°C	rVWF#1FC	0、1、2、3、6、9、12、18、24 個月
30°C	rVWF#1FC	0、1、3、6 個月
5°C±3°C	rVWF#2FC	0、1、2、3、6 個月
5°C±3°C	rVWF#3FC	0、1、2、3、6、9、12、18、24 個月
30°C	rVWF#3FC	0、0.5、1、2、3、6 個月
40°C	rVWF#3FC	0、0.5、1、2、3 個月
5°C±3°C	rVWF#4FC	0、1、2、3、6、9、12、18、24、(30) 個月
40°C	rVWF#4FC	0、1、2、3、6、9 個月
5°C±3°C	rVWF#5FC	0、1、2、3、6、9、12、18、(24、30) 個月
40°C	rVWF#5FC	0、1、2、3、6、9 個月
5°C±3°C	rVWF#6FC	0、1、2、3、6、9、12、(18、24、30) 個月
40°C	rVWF#6FC	0、1、2、3、6、9 個月
5°C±3°C	rVWF#7FC	0、1、2、3、6、9、12、(18、24、30) 個月
40°C	rVWF#7FC	0、1、2、3、6、9 個月

總體穩定性 (24 個月) 之匯總及論述

所呈現之 rVWF FDP 穩定性資料包含下列：

1. 批次 rVWF#1FC 在 5°C±3°C (完成測試) 下之 24 個月長期研究資料及在 30°C±2°C (完成測試) 下之 6 個月中間資料；
2. 批次 rVWF#2FC 在 5°C±3°C (完成測試) 下之 6 個月資料；
3. 批次 rVWF#3FC 在 2-8°C (完成測試) 下之 24 個月長期研究資料，在 30°C±2°C 下之 6 個月資料，及在 40°C±2°C (完成測試) 下之 3 個月資料；
4. 批次 rVWF#4FC 在 5°C±3°C 下之 24 個月穩定性資料及在 40°C±2°C 下之 9 個月資料；
5. 批次 rVWF#5FC 在 5°C±3°C 下之 24 個月穩定性資料及在 40°C±2°C 下之 9 個月資料；

6. 批次 rVWFF#6FC 在 $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下之 12 個月穩定性資料及在 $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下之 9 個月資料；及

7. 批次 rVWFF#7FC 在 $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下之 12 個月穩定性資料及在 $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下之 9 個月資料。

在批次 rVWFF#4FC、rVWFF#5FC、rVWFF#6FC 及 rVWFF#7FC 之殘餘水分中所觀察到之變化仍遠低於接受標準 $\leq 3\%$ ，且不影響功能活性 (VWF:RCo)。對於適用於非臨床研究及臨床研究中的所製造批次，定性分析技術（亦即外觀、SDS-PAGE 分析，等等）之穩定性結果中不存在可觀察到的變化。類似地，對於總蛋白質分析、VWF:Ag 分析或在儲存期間所觀察之 VWF 多聚體數目，不存在穩定性降低之趨勢。

批次 rVWF#1FC、rVWF#2FC 及 rVWF#3FC 所呈現之 VWF:RCo 活性與 VWF:Ag 活性之比及 VWF:RCo 資料二者的變化可能為測試方法變化之結果，實際上，個別 VWF:RCo 穩定性測試結果由一個穩定性樣本之單次測定資料及/或來自不符合歐洲藥典 (non-Ph. Eur.-conforming) 法之檢定方法的資料組成。在將檢定方法變成符合歐洲藥典之檢定之後，使用原檢定方法及新檢定方法測試非臨床批次之所有測試時間點。

大規模製造出之 rVWF FDP 展現與實驗規模下製造出之 rVWF FDP 批次相似的穩定性特性。此等 rVWF FDP 批次在 $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下儲存高達 24 個月仍維持 VWF:RCo 活性。當前，甚至在 $30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下儲存 6 個月或在 $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下儲存 9 個月之後，大規模批次樣本中 VWF 多聚體類型在穩定性方面亦無變化。表 11 展示在 $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 於應力條件下儲存之批次 rVWF#4FC、rVWF#5FC、rVWF#6FC 及 rVWF#7FC 之 VWF:RCo、VWF:Ag、VWF 多聚體類型的結果。

該等結果表明，在高溫儲存條件下穩定性為 9 個月可外推成在環境溫度下或甚至在冷藏條件下存放期為 3 年以上。

表 11

rVWF#4FC 在 40°C±2°C 下之穩定性資料							
屬性	規格	在各時間（月）之結果					
		0	1	2	3	6	9
VWF:RCo 活性[U/ml] ^b	70-150	130	117	118	127	132	142
VWF:Ag ELISA (U/ml)	報導結果	86	87	79	81	79	86
VWF 多聚體分析	報導結果	21	20	20	20	21	18
rVWF#5FC 在 40°C±2°C 下之穩定性資料							
屬性	規格	在各時間（月）之結果					
		0	1	2	3	6	9
VWF:RCo 活性[U/ml] ^b	70-150	107	119	120	116	132	134
VWF:Ag ELISA (U/ml)	報導結果	94	86	84	91	90	79
VWF 多聚體分析	報導結果	20	20	18	19	20	19
rVWF#6FC 在 40°C±2°C 下之穩定性資料							
屬性	規格	在各時間（月）之結果					
		0	1	2	3	6	9
VWF:RCo 活性[U/ml] ^b	70-150	118	111	126	129	130	119
VWF:Ag ELISA (U/ml)	報導結果	85	95	86.3	73.5	80.8	70.3
VWF 多聚體分析	報導結果	20	19	20	20	20	n.t.
rVWF#7FC 在 40°C±2°C 下之穩定性結果							
屬性	規格	在各時間（月）之結果					
		0	1	2	3	6	9
VWF:RCo 活性[U/ml] ^b	70-150	111	115	122	105	99	112
VWF:Ag ELISA (U/ml)	報導結果	87.3	85.3	77.5	68.8	75	73.8
VWF 多聚體分析	報導結果	21	20	20	19	19	19

協方差分析(ANCOVA 分析)顯示,回歸線之斜率差(批次 rVWFF#4FC、rVWFF#5FC、rVWFF#6FC 及 rVWFF#7FC, 在 $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 儲存)不顯著($p=0.906$),從而可按照 ICH Q1A(R2)中所描述合併 VWF:RCo 活性資料。個別批次之趨勢線的高度差亦不顯著。如圖 1 所示,對所合併之最壞狀況斜率(worse case slope)進行外推,顯示信賴區間完全處於最少 24 個月之接受標準內。平均曲線之下信賴區間在 51 個月時降低至 80%初始活性(在歐洲藥典中,對於人類馮威里氏因子,80%亦為估計效力與所陳述效力之間的最大差異)。所合併之最壞狀況斜率顯示,VWF:RCo 每月降低 0.0344 U。此比較顯示,rVWF FDP 之穩定性特性,特別是 VWF:RCo 活性不會由於產生方法之變化而改變。上述外推支持當在推薦儲存溫度下儲存時,rVWF FDP 之臨時存放期可擴充至 24 個月。

水分自塞子向凍乾製品轉移取決於塞子材料,且受塞子在滅菌後的殘餘水分、儲存樣本時的濕度及塞子固有水分轉移速率影響。如圖 2 中所示,在 $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 儲存之批次 rVWFF#4FC、rVWFF#5FC、rVWFF#6FC 及 rVWFF#7FC 的殘餘水分類似(斜率比較之差異不顯著, $p=0.734$)。在高溫條件 $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下儲存之批次亦顯示,經 9 個月之殘餘水分增加類似(圖 3)。在此,ANCOVA 分析顯示,回歸線斜率之差異類似($p=0.546$)。圖 3 顯示最壞狀況合併斜率外推至多達 24 個月。

當在 $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下儲存時,此等資料足以支持使用批次 rVWFF#6FC 及 rVWFF#7FC 持續所描述之 24 個月有效期。

建議儲存條件及存放期

rVWF FDP 之推薦儲存條件為 $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 。因此，當在所推薦儲存條件下儲存時，建議 rVWF FDP 之臨時存放期為 24 個月。rVWF FDP 批次之存放期有可能根據其他資料進一步延長以獲得更長儲存期。

【符號說明】

無

序列表

- <110> 史耐克等人
- <120> 凍乾的重組VWF調配物
- <130> TW103141771
- <150> US-61/107,273
- <151> 2008-10-21
- <160> 3
- <170> PatentIn 3.5 版
- <210> 1
- <211> 8833
- <212> DNA
- <213> 智慧人

<400> 1	
agctcacagc tattgtggtg ggaaaggag ggtggttgtt ggatgtcaca gcttgggctt	60
tatctcccc agcagtgggg actccacagc ccttgggcta cataacagca agacagtccg	120
gagctgtagc agacctgatt gagcctttgc agcagctgag agcatggcct aggggtggcg	180
gcaccattgt ccagcagctg agtttccag ggaccttgga gatagccgca gccctcattt	240
gcaggggaag atgattcctg ccagatttgc cggggtgctg ctgtctctgg ccctcatttt	300
gccagggacc ctttgtgcag aaggaaactcg cggcagggtca tccacggccc gatgcagcct	360
tttcggaagt gacttcgtca acacctttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg	420
cagttacctc ctggcagggg gctgccagaa acgctccttc tcgattattg gggacttcca	480
gaatggcaag agagttagcc tctccgtgia tcttggggaa tttttgaca tccatttgtt	540
tgtcaatggt accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgccctatg cctccaaagg	600
gctgtatcta gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggctttgt	660
ggccaggatc gatggcagcg gcaactttca agtcctgctg tcagacagat acttcaacaa	720
gacctgcggg ctgtgtggca actttaacat ctttgcctgaa gatgacttta tgaccaaga	780
agggaccttg acctcgacc cttatgactt tgccaactca tgggctctga gcagtggaga	840
acagtgggtgt gaacgggcat ctctctccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat	900
gcagaagggc ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcggtgt ttgcccgtg	960
ccacctctg gtggaccccg agccttttgt ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagt	1020
tgttgggggg ctggagtgcg cctgccctgc cctcctggag tacgcccga cctgtgccca	1080
ggagggaatg gtgtgttacg gctggaccga ccacagcgcg tgcagcccag tgtgccctgc	1140
tggtatggag tataggcagt gtgtgtcccc ttgcgccagg acctgccaga gcctgcacat	1200
caatgaaatg tgtcaggagc gatgcgttga tggctgcagc tgccttgagg gacagctcct	1260
ggatgaaggc ctctgcgttg agagcaccga gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgcta	1320
ccctccgggc acctccctct ctgcagactg caaacctgc atttgccgaa acagccagt	1380
gatctgcagc aatgaagaat gtccagggga gtgccttgtc acaggtcaat cacacttcaa	1440
gagctttgac aacagatact tcaccttcag tgggatctgc cagtacctgc tggcccggga	1500
ttgccaggac cactccttct ccattgtcat tgagactgtc cagtgtgtgt atgaccgcga	1560
cgctgtgtgc acccgctccg tcaccgtccg gctgcctggc ctgcacaaca gccttgtgaa	1620
actgaagcat ggggcaggag ttgcatgga tggccaggac gtccagctcc ccctctgaa	1680

aggtagacctc cgcattccagc atacagtgcg ggcctccgtg cgcctcagct acggggagga	1740
cctgcagatg gactgggatg gccgcgggag gctgctgggtg aagctgtccc ccgtctatgc	1800
cgggaagacc tgcggccgtg gtgggaatta caatggcaac caggggcgacg acttccttac	1860
ccccctctggg ctggcgggagc cccgggttga ggaacttcggg aacgcctgga agctgcacgg	1920
ggactgccag gacctgcaga agcagcacag cgatccctgc gccctcaacc cgcgcattgc	1980
caggttctcc gaggaggcgt gcgcgggtcct gacgtccccc acattcgagg cctgccatcg	2040
tgcctgcagc ccgtctgccct accctgggaa ctgccgttac gacgtgtgct cctgctcgga	2100
cggccgcgag tgcctgtgcg gcgcccctggc cagctatgcc gcggcctgcg cggggagagg	2160
cgtgcgcgtc gcgtggcgcg agccaggccg ctgtgagctg aactgccccg aaggccaggt	2220
gtacctgcag tgcgggaccc cctgcaacct gacctgccgc tctctctctt acccggaatga	2280
ggaatgcaat gaggccctgcc tggagggtcg ctctgcccc ccagggtctt acatggatga	2340
gaggggggac tgcgtgcccc agggccagtg cccctgttac tatgacggtg agatcttcca	2400
gccagaagac atcttctcag accatcacac catgtgttac tgtgaggatg gcttcatgca	2460
ctgtacatg agtggagtc ccggaagctt gctgcctgac gctgtcctca gcagtcacct	2520
gtctcatcgc agcaaaagga gcctatcctg tcggcccccc atggtcaagc tgggtgtgtcc	2580
cgctgacaac ctgcgggtcg aagggtctga gtgtacaaa acgtgccaga actatgacct	2640
ggagtgcag agcatgggct gtgtctctgg ctgcctctgc cccccgggca tgggtccggca	2700
tgagaacaga tgtgtggccc tggaaagggt tccctgcttc catcagggca aggagtatgc	2760
ccctggagaa acagtgaaga ttggctgcaa cacttgtgtc tgtcgggacc ggaagtggaa	2820
ctgcacagac catgtgtgtg atgccacgtg ctccacgac ggcatggccc actacctcac	2880
cttcgacggg ctcaaatacc tgttccccgg ggagtgccag tacgttctgg tgcaggatta	2940
ctgcggcagt aaccttgga ccttcggat cctagtgggg aataagggat gcagccaccc	3000
ctcagtgaat tgcaagaaac gggtcacat cctgttgagg ggaggagaga ttgagctgtt	3060
tgacggggag gtgaatgtga agaggcccat gaaggatgag actcactttg aggtggtgga	3120
gtctggccgg tacatcattc tgcctgtggg caaagccctc tccgtggctt gggaccgcca	3180
cctgagcatt tccgtggtcc tgaagcagac ataccaggag aaagtgtgtg gcctgtgtgg	3240
gaattttgat ggcattccaga acaatgacct caccagcagc aacctccaag tggaggaaga	3300
ccctgtggac ttggggaact cctggaaagt gagctcgag tgtgtgaca ccagaaaagt	3360
gcctctggac tcatccccctg ccacctgccg taacaacatc atgaagcaga cgatggtgga	3420
ttcctcctgt agaatcctta ccagtgcagt ctccaggac tgcaacaagc tgggtggacc	3480
cgagccatat ctggatgtct gcatttacga cacctgctcc tgtgagtcca ttggggactg	3540
cgcctgcttc tgcgacacca ttgtgccta tgcacacgtg tgtgcccagc atggcaaggt	3600
ggtgacctgg aggacggcca cattgtgccc ccagagctgc gaggagagga atctccggga	3660
gaacgggtat gagtgtgagt ggcgtataa cagctgtgca cctgcctgtc aagtcacgtg	3720
tcagcacctt gagccactgg cctgcccgtg gcagtgtgtg gagggtgcc atgccactg	3780
ccctccaggg aaaatcctgg atgagctttt gcagacctgc gttgacctg aagactgtcc	3840
agtgtgtgag gtggctggcc ggcgttttgc ctgaggaaag aaagtcacct tgaatcccag	3900
tgacctgag cactgccaga ttgccactg tgatgtgtc aacctcact gtgaagcctg	3960

ccaggagccg ggaggcctgg tgggtcctcc cacagatgcc ccggtgagcc ccaccactct	4020
gtatgtggag gacatctcgg aaccgccgtt gcacgatttc tactgcagca ggctactgga	4080
cctggtcttc ctgctggatg gctcctccag gctgtccgag gctgagtttg aagtgtgaa	4140
ggcctttgtg gtggacatga tggagcggct gcgcatctcc cagaagtggg tccgcgtggc	4200
cgtggtggag taccacgacg gctcccacgc ctacatcggg ctcaaggacc ggaagcgacc	4260
gtcagagctg cggcgcatth ccagccaggt gaagtatgcg ggcagccagg tggcctccac	4320
cagcgaggtc ttgaaataca cactgtttcca aatcttcagc aagatcgacc gccctgaagc	4380
ctcccgcatc accctgctcc tgatggccag ccaggagccc caacggatgt cccggaactt	4440
tgtccgctac gtccagggcc tgaagaagaa gaaggtcatt gtgatcccg tgggcattgg	4500
gccccatgcc aacctcaagc agatccgcct catcgagaag caggccccctg agaacaaggc	4560
cttcgtgctg agcagtgctg atgagctgga gcagcaaagg gacgagatcg ttagctacct	4620
ctgtgacctt gccccgaag cccctcctcc tactctgccc cccgacatgg cacaagtcac	4680
tgtgggcccg gggctcttgg gggtttcgac cctggggccc aagaggaact ccatggttct	4740
ggatgtggcg ttcgtcctgg aaggatcgga caaaattggt gaagccgact tcaacaggag	4800
caaggagttc atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca gcatccacgt	4860
cacggtgctg cagtactcct acatgggtgac tgtggagtac cccttcagcg aggcacagtc	4920
caaagggggac atcctgcagc ggggtgcgaga gatccgctac caggggcgga acaggaccaa	4980
cactgggctg gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc aggggtgaccg	5040
ggagcaggcg cccaacctgg tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa	5100
gaggctgcct ggagacatcc aggtgggtgcc cattggagtg ggccctaag ccaacgtgca	5160
ggagctggag aggattggct ggcccaatgc ccctatcctc atccaggact ttgagacgct	5220
cccccgagag gctcctgacc tgggtgctgca gaggtgctgc tccggagagg ggctgcagat	5280
ccccaccctc tccccgcac ctgactgcag ccagcccctg gacgtgatcc ttctcctgga	5340
tggctcctcc agtttcccag cttcttattt tgatgaaatg aagagtttcg ccaaggcttt	5400
catttcaaaa gccaatatag ggcctcgtct cactcagggt tcagtgtcgc agtatggaag	5460
catcaccacc attgacgtgc catggaacgt ggtcccggag aaagcccatt tgctgagcct	5520
tgtggacgtc atgcagcggg agggaggccc cagccaaatc ggggatgcct tgggctttgc	5580
tgtgcgatac ttgacttcag aaatgcatgg tgccaggccg ggagcctcaa aggcgggtgt	5640
catcctggtc acggacgtct ctgtggattc agtggatgca gcagctgatg ccgccaggtc	5700
caacagagtg acagtgttcc ctattggaat tggagatcgc tacgatgcag ccagctacg	5760
gatcttgga gggccagcag gcgactccaa cgtgggtgaag ctccagcgaa tcgaagacct	5820
ccctaccatg gtcaccttgg gcaattcctt cctccacaaa ctgtgctctg gatttgttag	5880
gatttgcatt gatgaggatg ggaatgagaa gagggccggg gacgtctgga ccttgccaga	5940
ccagtgccac accgtgactt gccagccaga tggccagacc ttgctgaaga gtcacgggt	6000
caactgtgac cgggggctga ggccttcgtg ccctaacagc cagtcctctg ttaaagtgga	6060
agagacctgt ggctgccgct ggacctgccc ctgcgtgtgc acaggcagct ccactcggca	6120
catcgtgacc ttgatgggc agaatttcaa gctgactggc agctgttctt atgtcctatt	6180
tcaaaacaag gagcaggacc tggagggtgat tctccataat ggtgcctgca gccctggagc	6240

aaggcagggc tgcattgaaat ccatcgaggt gaagcacagt gccctctccg tcgagctgca	6300
cagtgcacatg gaggtgacgg tgaatgggag actgggtctct gttccttacg tgggtgggaa	6360
catggaagtc aacgtttatg gtgccatcat gcatgaggtc agattcaatc accttgggtca	6420
catcttcaca ttacttccac aaaacaatga gtccaactg cagctcagcc ccaagacttt	6480
tgttcaaag acgtatggtc tgtgtgggat ctgtgatgag aacggagcca atgacttcat	6540
gctgagggat ggcacagtca ccacagactg gaaaacactt gttcaggaat ggactgtgca	6600
gcggccaggg cagacgtgcc agcccatcct ggaggagcag tgtctgtcc cgcacagctc	6660
ccactgccag gtccctctct taccactgtt tgcitgaatgc cacaaggctc tggctccagc	6720
cacattctat gccatctgcc agcaggacag ttgccaccag gagcaagtgt gtgaggtgat	6780
cgcctcttat gccaccctct gtccggacca cggggctctg gttgactgga ggacacctga	6840
tttctgtgct atgtcatgcc caccatctct ggtctacaac cactgtgagc atggctgtcc	6900
ccggcactgt gatggcaacg tgagctcctg tggggacat cctccgaag gctgtttctg	6960
ccctccagat aaagtcatgt tgggaaggcag ctgtgtccct gaagaggcct gcactcagt	7020
cattgggtgag gatggagtcc agcaccagtt cctggaagcc tgggtcccg accaccagcc	7080
ctgtcagatc tgcacatgcc tcagcgggag gaaggtaac tgcacaacgc agccctgccc	7140
cacggccaaa gctcccacgt gtggcctgtg tgaagtagcc cgcctccgcc agaattcaga	7200
ccagtgtgct ccgagatag agtgtgtgtg tgaccagtg agctgtgacc tgccccagt	7260
gcctcactgt gaacgtggcc tccagccac actgaccaac cctggcgagt gcagacccaa	7320
cttcacctgc gccctgcagga agggaggagt caaaagagt tccccacct cctgcccccc	7380
gcaccgtttg cccacccttc ggaagacca gtgctgtgat gagtatgagt gtgcctgcaa	7440
ctgtgtcaac tccacagtga gctgtccct tgggtacttg gcctcaactg ccaccaatga	7500
ctgtggctgt accacaacca cctgccttcc cgacaagggt tgtgtccacc gaagcacat	7560
ctacctgtg ggccagtctt gggaggaggg ctgcgatgtg tgcacctgca ccgacatgga	7620
ggatgccgtg atgggcttcc gcgtggccca gtgtctccag aagccctgtg aggacagctg	7680
tgggtcgggc ttactttacg ttctgcatga aggcgagctg tgtggaagggt gcctgccatc	7740
tgcctgtgag gtggtgactg gctcaccgag gggggactcc cagtcttctt ggaagagtgt	7800
cggctcccag tgggcttccc cggagaacct ctgcctcatc aatgagtgtg tccgagtga	7860
ggaggaggtc ttatataaac aaaggaacgt ctctgcccc cagctggagg tccctgtctg	7920
cccctcgggc ttctagctga gctgtaagac ctacagctgc tgcccaagct gtcgctgtga	7980
gcgcatggag gccctgcatg tcaatggcac tgtcatlgtg cccgggaaga ctgtgatgat	8040
cgatgtgtgc acgacctgcc gctgcatggt gcagggtggg gtcatctctg gattcaagct	8100
ggagtgcagg aagaccacct gcaacccctg ccccttgggt tacaaggaag aaaataacac	8160
aggatgaatgt tgtgggagat gtttgcctac ggcttgacc attcagctaa gaggaggaca	8220
gatcatgaca ctgaagcgtg atgagacgct ccaggatggc tgtgatactc acttctgcaa	8280
ggtcaatgag agaggagagt acttctggga gaagagggtc acaggctgcc caccctttga	8340
tgaacacaag tgtctggctg agggaggtaa aattatgaaa attccaggca cctgtctgtga	8400
cacatgtgag gagcctgagt gcaacgacat cactgccagg ctgcagtatg tcaagggtggg	8460
aagctgtaag tctgaagtag aggtggatat ccactactgc cagggcaa atgtccagcaa	8520

agccatgtac tccattgaca tcaacgatgt gcaggaccag tgctcctgct gctctccgac 8580
acggacggag cccatgcagg tggccctgca ctgcaccaat ggctctgttg tgtaccatga 8640
ggttctcaat gccatggagt gcaaattgctc cccaggaag tgcagcaagt gaggtgctg 8700
cagctgcatg ggtgcctgct gctgcctgcc ttggcctgat ggccaggcca gagtgtgcc 8760
agtcctctgc atgttctgct cttgtgccct tctgagccca caataaaggc tgagctctta 8820
tcttgcaaaa ggc 8833

<210> 2
<211> 2783
<212> PRT
<213> 智慧人

<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
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
 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

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

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
 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
 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			
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
 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
 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			
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			
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

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> 智慧人

<400> 3

Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp
1 5 10 15

3

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	
			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					320	

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
 385 390 395 400
 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
 465 470 475 480
 Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val
 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
 545 550 555 560
 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

3

•	Gln	Glu	Pro	Gln	Arg	Met	Ser	Arg	Asn	Phe	Val	Arg	Tyr	Val	Gln	Gly
	625					630					635					640
	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					720
	Gly	Val	Ser	Thr	Leu	Gly	Pro	Lys	Arg	Asn	Ser	Met	Val	Leu	Asp	Val
					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
						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
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
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
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
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			

9

•	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
	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								

I670072

發明摘要

※ 申請案號：106107483（由103141771分割）

※ 申請日：098/10/21

※IPC 分類：**A61K 38/16** (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

【發明名稱】（中文/英文）

凍乾的重組 VWF 調配物

LYOPHILIZED RECOMBINANT VWF FORMULATIONS

【中文】

本發明提供凍乾的重組馮威里氏因子（recombinant von-Willebrand Factor；rVWF）之長期穩定醫藥調配物以及製造及投予該等調配物之方法。

【英文】

The present invention provides long-term stable pharmaceutical formulations of lyophilized recombinant von-Willebrand Factor (rVWF) and methods for making and administering said formulations.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

1. 一種重組馮威里氏因子 (recombinant von Willebrand Factor ; rVWF) 之穩定凍乾醫藥調配物，其包含：(a) rVWF；(b) 一或多種緩衝劑；(c) 一或多種胺基酸；(d) 一或多種穩定劑；及 (e) 一或多種界面活性劑；其中該調配物係藉由將包含以下者之溶液凍乾來製備：

(a) 該 rVWF 包含選自由以下者所組成之群組的多肽：

(1) 在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；

(2) (1) 之類似物、片段或變異體，其能夠在瑞斯特黴素 (ristocetin) 的存在下使經穩定化之血小板凝集，或能夠結合至因子 VIII；

(3) 由在 SEQ ID NO: 1 中所列出之多核苷酸編碼的多肽；

(4) (3) 之類似物、片段或變異體，其能夠在瑞斯特黴素的存在下使經穩定化之血小板凝集，或能夠結合至因子 VIII；

(5) 由在中度嚴格雜交條件下與 SEQ ID NO: 1 中所列出之多核苷酸雜交的多核苷酸編碼的多肽，其中該多肽能夠在瑞斯特黴素的存在下使經穩定化之血小板凝集，或能夠結合至因子 VIII；

(b) 該緩衝液包含在約 0.1 mM 至約 500 mM 的範圍內的 pH 緩衝劑，且其 pH 在約 2.0 至約 12.0 的範圍內；其中該緩衝劑為檸檬酸鹽；

(c) 該胺基酸之濃度為約 1 mM 至約 500 mM；其中該胺基酸為甘胺酸；

(d) 該穩定劑之濃度為約 0.1 mM 至約 1000 mM；其中該一或多種穩定劑為甘露醇及海藻糖；及

(e) 該界面活性劑之濃度為約 0.01 g/L 至約 0.5 g/L；其中該界面活性劑是 TWEEN-80。

2. 根據請求項 1 的調配物，其中該 rVWF 包含在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列。

3. 根據請求項 1 的調配物，其中該溶液之 pH 是在約 6.0 至約 8.0 的範圍。

圍內，或約 6.5 至約 7.5 的範圍內。

4. 根據請求項 1 的調配物，其中該緩衝劑是檸檬酸鹽且該 pH 為約 7.3。

5. 根據請求項 1 的調配物，其中該胺基酸在溶液中的濃度在約 0.5 mM 至約 300 mM 的範圍內。

6. 根據請求項 5 的調配物，其中該胺基酸是在溶液中濃度為約 15 mM 的甘胺酸。

7. 根據請求項 1 的調配物，其中該 rVWF 包含在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；其中該溶液之緩衝劑為檸檬酸鹽且該 pH 為約 7.3；且其中該胺基酸是在溶液中濃度為約 15 mM 的甘胺酸。

8. 根據請求項 1 的調配物，其中該穩定劑是在溶液中濃度為約 10 g/L 的海藻糖及在溶液中濃度為約 20 g/L 的甘露醇。

9. 根據請求項 1 的調配物，其中該界面活性劑是在溶液中約 0.01 g/L 的 TWEEN-80。

10. 根據請求項 1 的調配物，其中該 rVWF 包含在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；其中該溶液之緩衝劑是在溶液中濃度為約 15 mM、pH 約 7.3 的檸檬酸鹽；其中該胺基酸是在溶液中濃度為約 15 mM 的甘胺酸；其中該穩定劑是在溶液中濃度為約 10 g/L 的海藻糖及在溶液中濃度為約 20 g/L 的甘露醇；且其中該界面活性劑是在溶液中約 0.1 g/L 的 TWEEN-80。

11. 一種重組馮威里氏因子 (rVWF) 之穩定凍乾醫藥調配物，其包含：
(a) rVWF；(b) 一或多種緩衝劑；(c) 一或多種胺基酸；(d) 一或多種穩定劑；及 (e) 一或多種界面活性劑；其中該調配物係藉由將包含以下者之溶液凍乾來製備：

(a) 該 rVWF 包含選自由以下者所組成之群組的多肽：

(1) 在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；

(2) (1)之類似物、片段或變異體，其能夠在瑞斯特黴素的存在下使經穩

定化之血小板凝集，或能夠結合至因子 VIII；

(3) 由在 SEQ ID NO: 1 中所列出之多核苷酸編碼的多肽；

(4) (3)之類似物、片段或變異體，其能夠在瑞斯特黴素的存在下使經穩定化之血小板凝集，或能夠結合至因子 VIII；

(5) 由在中度嚴格雜交條件下與 SEQ ID NO: 1 中所列出之多核苷酸雜交的多核苷酸編碼的多肽，其中該多肽能夠在瑞斯特黴素的存在下使經穩定化之血小板凝集，或能夠結合至因子 VIII；

(b) 該緩衝液包含在約 0.1 mM 至約 500 mM 的範圍內的 pH 緩衝劑，且其 pH 在約 6.5 至約 7.5 的範圍內；其中該緩衝劑為檸檬酸鹽；

(c) 該胺基酸之濃度為約 1 mM 至約 500 mM；其中該胺基酸為甘胺酸；

(d) 該穩定劑之濃度為約 0.1 mM 至約 1000 mM；其中該一或多種穩定劑為甘露醇及海藻糖；及

(e) 該界面活性劑之濃度為約 0.01 g/L 至約 0.5 g/L；其中該界面活性劑是 TWEEN-80。

12.一種重組馮威里氏因子 (rVWF) 之穩定凍乾醫藥調配物，其包含：

(a) rVWF；(b) 一或多種緩衝劑；(c) 一或多種胺基酸；(d) 一或多種穩定劑；及 (e) 一或多種界面活性劑；其中該調配物係藉由將包含以下者之溶液凍乾來製備：

(a) 該 rVWF 包含選自由以下者所組成之群組的多肽：

(1) 在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；

(2) (1)之類似物，其能夠在瑞斯特黴素的存在下使經穩定化之血小板凝集，或能夠結合至因子 VIII；

(3) 由在 SEQ ID NO: 1 中所列出之多核苷酸編碼的多肽；

(4) (3)之類似物，其能夠在瑞斯特黴素的存在下使經穩定化之血小板凝集，或能夠結合至因子 VIII；

(5) 由在中度嚴格雜交條件下與 SEQ ID NO: 1 中所列出之多核苷酸雜交的多核苷酸編碼的多肽，其中該多肽能夠在瑞斯特黴素的存在下使經穩定化之血小板凝集，或能夠結合至因子 VIII；

(b) 該緩衝液包含在約 0.1 mM 至約 500 mM 的範圍內的 pH 緩衝劑，且其 pH 在約 6.5 至約 7.5 的範圍內；其中該緩衝劑為檸檬酸鹽；

(c) 該胺基酸之濃度為約 1 mM 至約 500 mM；其中該胺基酸為甘胺酸；

(d) 該穩定劑之濃度為約 0.1 mM 至約 1000 mM；其中該一或多種穩定劑為甘露醇及海藻糖；及

(e) 該界面活性劑之濃度為約 0.01 g/L 至約 0.5 g/L；其中該界面活性劑是 TWEEN-80。

13.一種重組馮威里氏因子 (rVWF) 之穩定凍乾醫藥調配物，其包含：

(a) rVWF；(b) 一或多種緩衝劑；(c) 一或多種胺基酸；(d) 一或多種穩定劑；及 (e) 一或多種界面活性劑；其中該調配物係藉由將包含以下者之溶液凍乾來製備：

(a) 該 rVWF 包含選自由以下者所組成之群組的多肽：

(1) 在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；

(2) (1)之類似物，其能夠在瑞斯特黴素的存在下使經穩定化之血小板凝集，或能夠結合至因子 VIII；

(3) 由在 SEQ ID NO: 1 中所列出之多核苷酸編碼的多肽；

(4) (3)之類似物，其能夠在瑞斯特黴素的存在下使經穩定化之血小板凝集，或能夠結合至因子 VIII；

(5) 由在中度嚴格雜交條件下與 SEQ ID NO: 1 中所列出之多核苷酸雜交的多核苷酸編碼的多肽，其中該多肽能夠在瑞斯特黴素的存在下使經穩定化之血小板凝集，或能夠結合至因子 VIII；

(b) 該溶液的緩衝劑是濃度為 15 mM 的檸檬酸鹽，且 pH 為約 7.3；

(c) 該胺基酸是在溶液中濃度為約 15 mM 的甘胺酸；

(d) 該穩定劑是在溶液中濃度為約 10 g/L 的海藻糖及在溶液中濃度為約 20 g/L 的甘露醇；及

(e) 該界面活性劑是在溶液中約 0.1 g/L 的 TWEEN-80。

14.一種重組馮威里氏因子 (rVWF) 之穩定凍乾醫藥調配物，其包含：

(a) rVWF；(b) 一或多種緩衝劑；(c) 一或多種胺基酸；(d) 一或多種穩定劑；及 (e) 一或多種界面活性劑；其中該調配物係藉由將包含以下者之溶液凍乾來製備：

(a) 該 rVWF 包含選自由以下者所組成之群組的多肽：

(1) 在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；

(2) (1)之類似物，其能夠結合至因子 VIII；

(3) 由在 SEQ ID NO: 1 中所列出之多核苷酸編碼的多肽；

(4) (3)之類似物，其能夠結合至因子 VIII；

(5) 由在中度嚴格雜交條件下與 SEQ ID NO: 1 中所列出之多核苷酸雜交的多核苷酸編碼的多肽，其中該多肽能夠結合至因子 VIII；

(b) 該溶液的緩衝劑是濃度為 15 mM 的檸檬酸鹽，且 pH 為約 7.3；

(c) 該胺基酸是在溶液中濃度為約 15 mM 的甘胺酸；

(d) 該穩定劑是在溶液中濃度為約 10 g/L 的海藻糖及在溶液中濃度為約 20 g/L 的甘露醇；及

(e) 該界面活性劑是在溶液中約 0.1 g/L 的 TWEEN-80。

15.一種重組馮威里氏因子 (rVWF) 之穩定凍乾醫藥調配物，其由以下者組成：(a) rVWF；(b) 一或多種緩衝劑；(c) 一或多種胺基酸；(d) 一或多種穩定劑；及 (e) 一或多種界面活性劑；其中該調配物係藉由將溶液凍乾來製備；

其中該 rVWF 包含在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；其中該緩

衝劑是 pH 約 7.3、在溶液中濃度為約 15 mM 的檸檬酸鹽；其中該胺基酸是在溶液中濃度為約 15 mM 的甘胺酸；其中該穩定劑是在溶液中濃度為約 10 g/L 的海藻糖及在溶液中濃度為約 20 g/L 的甘露醇；且其中該界面活性劑是在溶液中約 0.1 g/L 的 TWEEN-80。

16.一種重組馮威里氏因子 (rVWF) 之穩定凍乾醫藥調配物，其由以下者組成：(a) rVWF；(b) 一或多種緩衝劑；(c) 一或多種胺基酸；(d) 一或多種穩定劑；及 (e) 一或多種界面活性劑；其中該調配物係藉由將溶液凍乾來製備；

其中該 rVWF 包含在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；其中該緩衝劑是 pH 約 7.3、在溶液中濃度為約 15 mM 的檸檬酸鹽；其中該胺基酸是在溶液中濃度為約 15 mM 的甘胺酸；其中該穩定劑是在溶液中濃度為約 10 g/L 的海藻糖及在溶液中濃度為約 20 g/L 的甘露醇；且其中該界面活性劑是在溶液中約 0.1 g/L 的 TWEEN-80，其係用於靜脈內投予。

17.一種重組馮威里氏因子 (rVWF) 之穩定凍乾醫藥調配物，其包含：(a) rVWF；(b) 一或多種緩衝劑；(c) 一或多種胺基酸；(d) 一或多種穩定劑；及 (e) 一或多種界面活性劑；其中該調配物係藉由將溶液凍乾來製備；

其中該 rVWF 包含在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；其中該緩衝劑是 pH 約 7.3、在溶液中濃度為約 15 mM 的檸檬酸鹽；其中該胺基酸是在溶液中濃度為約 15 mM 的甘胺酸；其中該穩定劑是在溶液中濃度為約 10 g/L 的海藻糖及在溶液中濃度為約 20 g/L 的甘露醇；且其中該界面活性劑是在溶液中約 0.1 g/L 的 TWEEN-80，其係用於靜脈內投予。

圖式

VWF:RCo

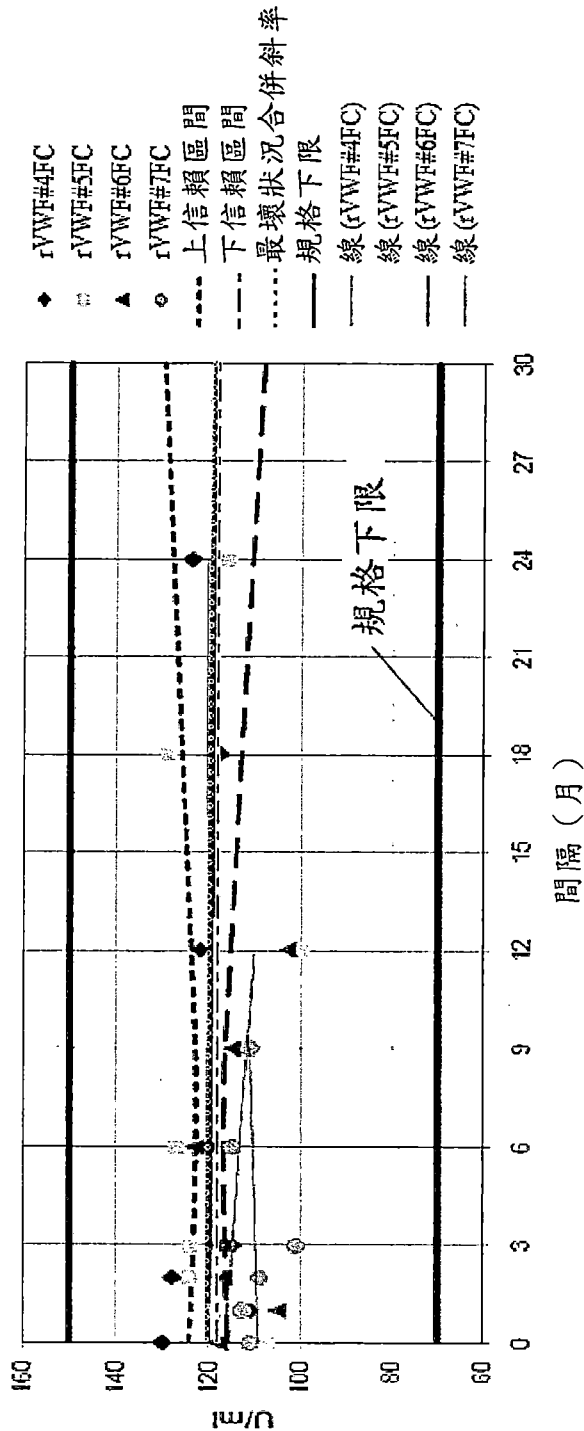


圖1

殘餘水分 2-8℃

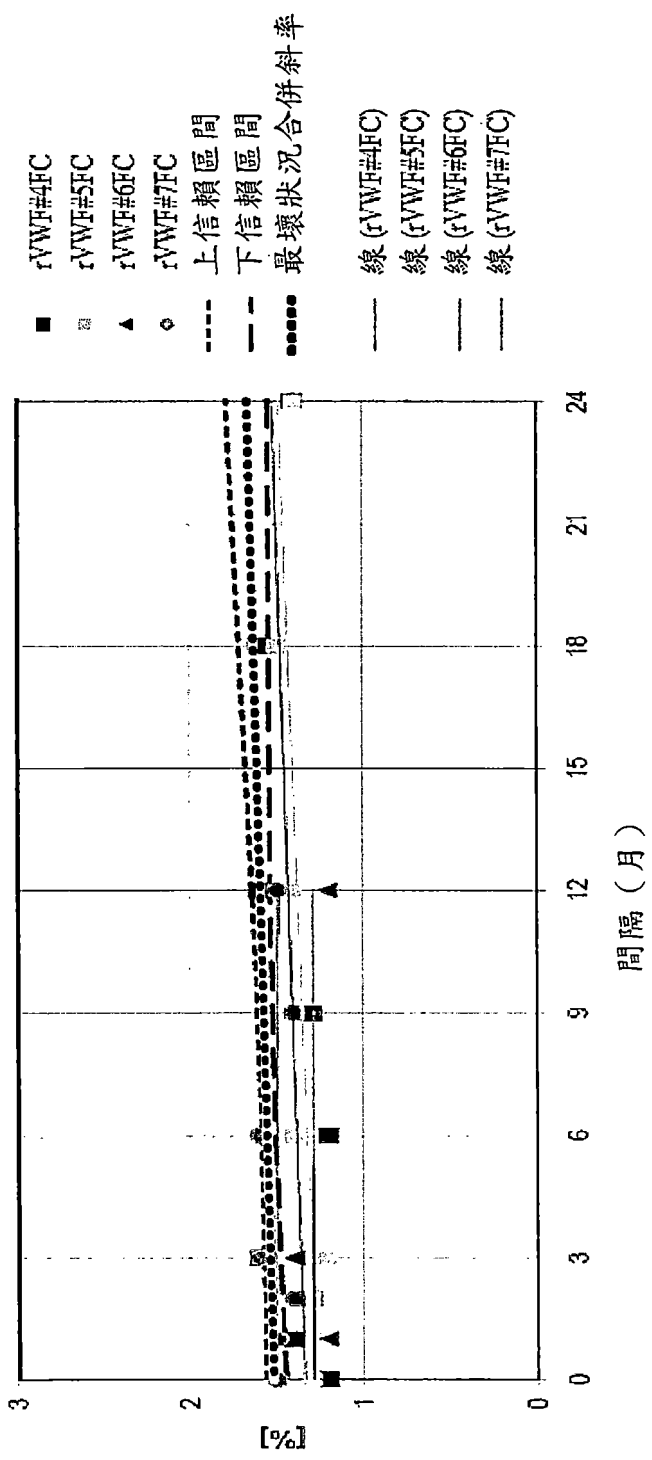


圖2

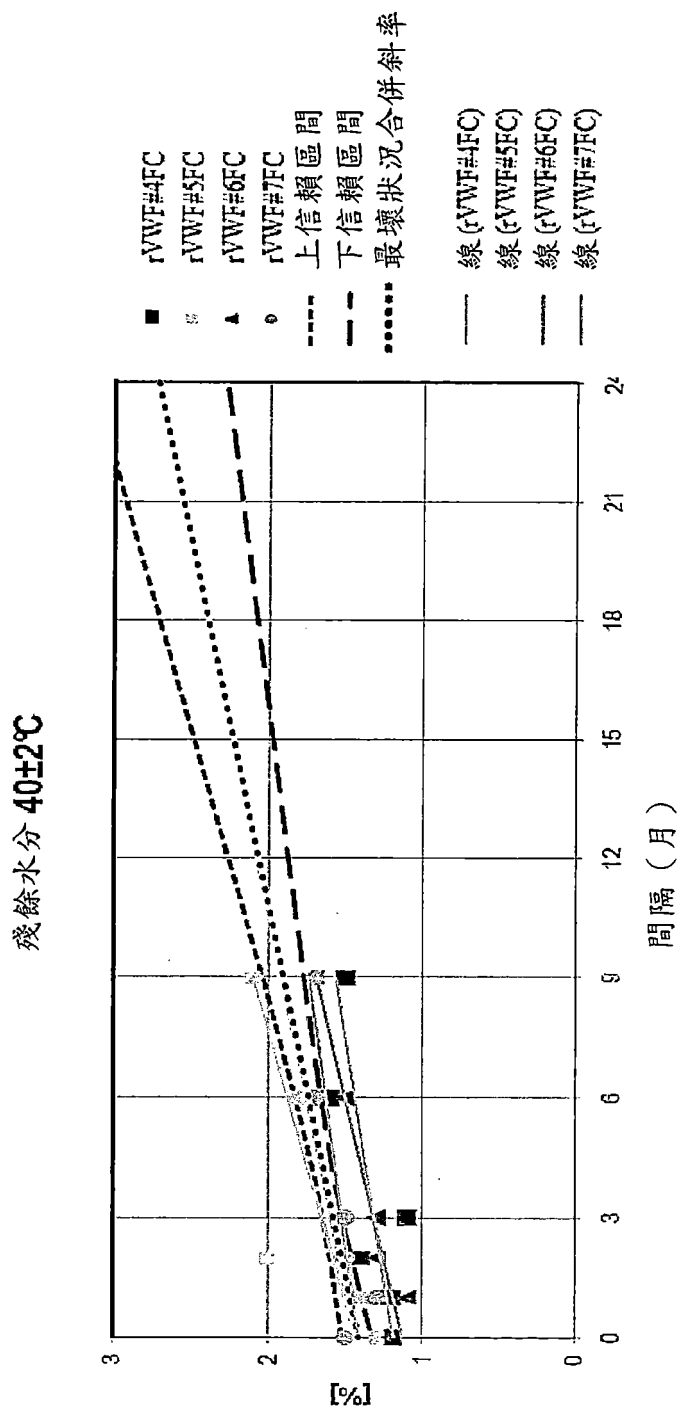


圖3