(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111670202 A
(43)申请公布日 2020.09.15

(21)申请号 201980011292.X

(22)申请日 2019.02.06

(30)优先权数据
62/627,082 2018.02.06 US
62/662,381 2018.04.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.07.31

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/052929 2019.02.06

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/154867 EN 2019.08.15

(71)申请人 埃博灵克斯股份有限公司
地址 比利时茨维纳德

(72)发明人 菲利普·卡勒韦尔特
希尔德·德温特

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
代理人 柴云峰 张莹

(51)Int.Cl.
C07K 16/36(2006.01)
A61P 7/02(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)

权利要求书2页 说明书79页
序列表42页 附图5页

(54)发明名称

以免疫球蛋白单可变结构域治疗TTP初次发作的方法

(57)摘要

本发明基于以下发现:向患有血栓性血小板减少性紫癜(TTP)发作施用包含针对冯维勒布兰德因子(vWF)的两个免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)之多肽会产生改善的结果,包括较快的血小板计数响应时间、治疗期间患者死亡、复发或重度血栓栓塞事件(TE)之比例较低、较低的复发率及预防不应性。本发明提供一种包含两个针对vWF之ISVD之多肽,其用于治疗有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP。本发明进一步涉及用于治疗TTP的单位剂型、试剂盒及医学用途。

CN 111670202 A

1.一种包含两个抗人类冯维勒布兰德因子(vWF)免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)的多肽,其用于通过向人类施用1至80mg,优选5至40mg,甚至更优选10mg或11mg的剂量的所述多肽治疗人类vWF相关疾病的初次发作(的症状)。

2.权利要求1的多肽,其用于治疗人类vWF相关疾病的初次发作(的症状),其中施用本发明的所述多肽的所述步骤重复至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天,或甚至超过10天,诸如20天,优选超过30天,诸如2个月、3个月、4个月、5个月、6个月或甚至更久(治疗期)。

3.权利要求2的多肽,其用于治疗人类vWF相关疾病的初次发作(的症状),其中所述治疗产生较快的血小板计数响应时间、治疗期间患者死亡、复发或重度TE事件的比例较低、较低的复发率,及/或预防不应性。

4.权利要求1至3任一项的多肽,其用于治疗人类vWF相关疾病的初次发作(的症状),其中所述多肽包含至少一个结合SEQ ID NO:20的ISVD。

5.权利要求1至4任一项的多肽,其用于治疗人类vWF相关疾病的初次发作(的症状),其中至少一个ISVD由SEQ ID NO:19(12A02H1)表示。

6.权利要求1至5任一项的多肽,其用于治疗人类vWF相关疾病的初次发作(的症状),其中所述多肽与SEQ ID NO:1有至少90%同一性。

7.权利要求1至6任一项的多肽,其用于治疗人类vWF相关疾病的初次发作(的症状),其中所述多肽为ALX 0081(SEQ ID NO:1)或ALX 0081-A(SEQ ID NO:24)。

8.权利要求1至7任一项的多肽,其用于治疗人类vWF相关疾病的初次发作(的症状),其中所述剂量每天施用1次或每天施用2次。

9.权利要求1至8任一项的多肽,其用于治疗人类vWF相关疾病的初次发作(的症状),其中所述治疗包括重复施用所述多肽直至所述人类中血小板数为至少150,000/μl。

10.权利要求9的多肽,其用于治疗人类vWF相关疾病的初次发作(的症状),其中所述治疗包含重复施用所述多肽直至所述人类中血小板数在至少2次连续测量时为至少150,000/μl。

11.权利要求10的多肽,其用于治疗人类vWF相关疾病的初次发作(的症状),其中在所述血小板数在至少2次连续测量时为至少150,000/μl之后,所述施用本发明多肽的步骤重复至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天,或甚至超过10天,诸如20天,优选超过30天或甚至更久。

12.权利要求10或11的多肽,其用于治疗人类vWF相关疾病的初次发作(的症状),其中所述2次连续测量相隔至少24小时,更优选48小时,诸如相隔至少3天,或甚至更久,诸如相隔4、5、6或甚至7天,优选相隔一周。

13.权利要求1至12任一项的多肽,其用于治疗人类vWF相关疾病的初次发作(的症状),其中所述治疗包括重复施用所述多肽直至所述人类中ADAMTS13活性为ADAMTS13参考活性的至少10%,诸如至少15%、20%、25%、30%、35%、45%或甚至50%。

14.权利要求1至13任一项的多肽,其用于治疗人类vWF相关疾病的初次发作(的症状),其中所述治疗包括重复施用所述多肽直至所述人类中器官损伤标记物的水平,诸如LDH水平、肌钙蛋白T水平、肌钙蛋白I水平及/或肌酐水平恢复至正常水平的至少40%,或甚至至少50%,诸如60%、70%、80%、90%或甚至100%。

15.权利要求1至14任一项的多肽,其用于治疗人类vWF相关疾病的初次发作(的症状),其中所述治疗包括进行血浆交换。

16.权利要求1至14任一项的多肽，其用于治疗人类vWF相关疾病的初次发作(的症状)，其中所述vWF相关疾病选自急性冠状动脉综合征(ACS)、暂时性大脑缺血性发作、不稳定或稳定心绞痛、中风、心肌梗死或血栓性血小板减少性紫癜(TTP)，优选TTP。

17.一种试剂盒或制品，其包含：含有根据权利要求1至16的多肽的容器，和使用说明书。

以免疫球蛋白单可变结构域治疗TTP初次发作的方法

技术领域

[0001] 本发明系基于以下发现:向患有血栓性血小板减少性紫癜(TTP)发作,例如TTP初次发作及/或复发性发作之人类患者施用包含针对冯维勒布兰德因子(von Willebrand Factor;vWF)之至少一个免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)的多肽会产生改善结果,包括较快的血小板计数响应时间、治疗期间患者死亡、复发或重度血栓栓塞事件(TE)之比例较低、较低的复发率及预防不应性。本发明提供一种包含至少一个针对vWF之ISVD的多肽,其用于治疗有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP。本发明进一步涉及用于治疗TTP的单位剂型、试剂盒及医学用途。

[0002] 发明背景

[0003] vWF在血小板凝集中之作用

[0004] 血管损伤时,多聚体血浆蛋白质vWF在将循环血小板募集到受损血管壁是至关重要的。此募集系经由vWF A1-结构域与血小板受体糖蛋白GPIb-IX-V之结合所介导。

[0005] vWF通过内皮细胞表达后,会以超大多聚体或超大vWF(ULvWF)形式分泌至循环中。此等多聚体经由具有凝血栓蛋白重复序列13(ADAMTS13)之解联蛋白样及金属蛋白酶的酶促裂解而加工成较小规则尺寸多聚体。在vWF之此等规则尺寸多聚体中,A1结构域中之GPIb-IX-V血小板受体结合位点为隐藏的且不会与血小板产生自发反应。A1结构域中之GPIb-IX-V血小板受体结合位点之构象活化通过固定或在剪切应力之条件下触发,导致血小板黏着及随后血栓形成。

[0006] TTP的病理生理学中之vWF及vWF处理的作用

[0007] TTP为凝血系统之罕见且危及生命的疾病,其中涉及ULvWF多聚体积聚,导致归因于过度血小板凝集较小血管中之血栓形成之风险提高。病况之特征在于微循环中之全身性血小板凝集,在多个器官中产生波动局部缺血。若持续,则此可导致与显著血小板减少及红血球碎裂相关之组织梗塞。

[0008] ULvWF多聚体具有与血小板受体GPIb-IX-V自发相互作用之天然能力。发现遗传性TTP以及获得性特发性TTP(aTTP)中之ADAMTS13活性严重不足。大部分具有TTP的患者具有针对ADAMTS13之自体抗体,导致ULvWF多聚体之受损处理。因此,ULvWF之A1结构域组成型活性的且容易与GPIb-IX-V血小板受体相互作用。此最终使得形成TTP患者群体中发现之特征性血凝块。

[0009] 以血浆交换(本文中缩写为“PE”或“PEX”)及输血之TTP目前疗法可提供替换物ADAMTS13且移除针对酶之抗体,因此逐渐地导致ULvWF处理之标准化。然而,此治疗需要历时多天之多次交换及输血,在此期间不存在ULvWF介导之血小板凝集之活性过程之直接药理学靶向。

[0010] 尽管在最近三十年来引入PE及输血已明显降低TTP死亡率,但病况仍带有死亡率及发病率之显著风险。用目前疗法处理之患者中之急性特发性TTP的急性发作之死亡率仍为约10%至30%(Vesely等人Blood 2003;102:60-68;Allford等人Br.J.Haematol.2003;120:556-573;Sadler等人Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.2004;407-423)。在

继发性TTP的情况下，认为PE及输血效率不高且死亡率明显较高。在疾病为妊娠继发性之情况下(其中PE视为相当有效)，TTP的急性发作之死亡率为约25％，在并发性先兆子痫之情况下升高至超过40％(Martin等人Am.J.Obstet.Gynecol.2008;199:98-104)。然而，在为例如基本恶性病或骨髓移植继发之情况下，尽管使用此类治疗方案(上文Sadler等人2004;Elliott等人Mayo Clin.Proc.2003;78:421-430;Kremer Hovinga及Meyer Curr.Opin.Hematol.2008;15:445-450)死亡率仍在40％至60％下。

[0011] 考虑到TTP死亡率之继续明显水平及观测到PE及输血之并发症，明显需要额外治疗方法进行补充，或潜在地减少对同时治疗方法之需求。

[0012] 在最近三十年来对TTP进行之研究已改善疾病病理生理学之理解，允许靶向潜在疾病过程之新颖药剂之潜在研发。

[0013] 针对/结合vWF之免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)已描述于例如WO2004/015425、WO2004/062551、WO2006/074947、WO2006/122825、WO2009/115614及WO2011/067160中。

[0014] 以Ablynx名义之WO2015/193326尤其描述以下出人意料之发现：向人类TTP患者施用包含至少一个结合vWF之ISVD的多肽使得响应时间缩短，通过血小板恢复≥150,000/μL体现。此由2.2之风险(或血小板计数标准化)比率反映，意谓用卡帕珠单抗(caplacizumab)治疗之个体在任何给定时间点实现血小板计数响应之可能性的2.2倍。由此减少由该疾病特征性的血小板-vWF复合体引发之血栓性过程。因此，本发明的多肽之概念证据以统计显著且临床上有意义的实现确诊血小板响应之时间缩短展现。此外，恶化数目自安慰剂组中之11个减少至治疗组中之3个。相比于安慰剂组中之2例死亡，治疗组中无死亡。实际上，已在针对vWF之ISVD(例如ALX 0081)之阶段II(TITAN)及阶段III(HERCULES)研究中在治疗TTP患者方面显示有效及安全。

[0015] 然而，WO2015/193326及关于TITAN及HERCULES结果之通讯对具有aTTP的初次发作之患者无相关报导。

[0016] 若未经处理，则TTP死亡率为90％，其可随着血浆交换之迅速递送降低。然而，早期死亡仍然存在：地区性英国注册中约一半死亡在24小时表现内发生，主要在女性中(Scully等人，2008BJH 142:819-826)。因此，具有aTTP发作之正确诊断极其重要(参见Bindi等人2010 Transf Aph Sci 43:167-170)。然而，诊断可与溶血性尿毒症综合征(HUS)、自体免疫疾病及一系列妊娠相关问题之临床重叠一样困难(参见Scully等人，2012BJH 158:323-335;George及Al-Nouri 2012 Hematology 604-609,Scully等人2017J Thromb Haem 15:312-322)。实际上，诊断TTP及相关微血管病之指南近年来已改变若干次，血小板减少、MAHA(微血管病溶血性贫血)、波动神经迹象、肾损伤及发热之五单元组，通常伴随隐伏发作(基于临床病史、检验患者及血液膜之诊断)(Scully等人，2012BJH 158:323-335)至包括以下之诊断：(i)经分离之MAHAT(微血管病溶血性贫血及血小板减少)；(ii)新病灶性神经症状、癫痫或心肌梗死(MI)与不可解释的MAHAT，及(iii)TTP的先前病史(Scully等人2017J Thromb Haem 15:312-322)。ADAMTS13分析可协助确认诊断，监测疾病病程及甚至引导进一步治疗选项。

[0017] TTP在人群罕见的频率使得正确诊断变得复杂，因为大部分医师不熟悉症状，尤其当个体是TTP初次发作时。实际上，TTP的初次发作通常是在复发性发作后才被诊断出来。以复发性发作而言，患者及医学工作人员了解病史且更易于识别症状。因此，具有TTP初次发

作之患者在进入诊所时与具有复发性疾病之彼等者相比具有延迟的表现及更严重的疾病。

[0018] 因此,尚待阐明的是,包含至少一个针对vWF之ISVD的多肽,诸如ALX 0081或ALX 0081-A是否有利于具有TTP的初次发作之患者,包含至少一个针对vWF之ISVD的多肽,诸如ALX 0081或ALX 0081-A无论具有积极作用,及有效治疗及给药方案将为何样。

[0019] TTP患者需要改善疗法,尤其在个体呈现TTP的初次发作时。

[0020] 发明概述

[0021] 本发明系基于以下出人意料之发现:向人类TTP患者施用包含至少一个针对vWF之ISVD的多肽可改善具有TTP初次发作之患者之结果,该患者与具有复发性疾病,亦即,TTP的复发性发作之彼等者相比在基线时具有延迟的表现及更严重的疾病(参见实施例7.11)。

[0022] 另外,本发明亦展现,本发明的多肽(例如ALX 0081或ALX 0081-A)产生血小板计数之更快标准化、预防恶化且预防患者变得难以治疗。此尤其反映在血浆交换参数降低、在医院及重症监护室(ICU)中花费的天数(参见实施例7.12)。

[0023] 另外,本发明显示利用本发明的多肽(例如ALX 0081或ALX 0081-A)之开放标记(OL)疗法在经历aTTP加重之患者方面为有效的(参见实施例7.13)。

[0024] 因此,目前可用的数据表明,在使用本发明的多肽自身无明显不良作用之情况下实现PE及输血及其相关并发症减少。此表示在治疗患有TTP的患者时使用本发明的多肽之明显可见的安全益处。

[0025] 因此,向人类TTP患者施用包含至少一个针对vWF之ISVD的多肽使得响应时间出乎意料地缩短,作用持续且延长,恶化减少,住院缩短,包括ICU占有、发病率降低、死亡降低及/或具有TTP发作,例如TTP的初次发作及/或复发性发作之患者之PE次数减少。

[0026] 基于广泛机制之药代动力学-药效学(PKPD)建模,详细描述不同情形来支持给药方案。该模型充分描述随时间推移之药物-vWF复合物相互作用,包括aTTP患者中之疾病进展及由PE治疗决定之作用。成功地应用该模型以便于理解目标群体中卡帕珠单抗与vWF之间的PKPD相互作用,且通过使用模拟支持成年及儿科患者中合理之给药且允许桥连日本aTTP患者(参见实施例7.18)。aTTP患者中之群体药代动力学分析显示,年龄、性别、人种及血型不影响卡帕珠单抗之药代动力学。如肌酐清除(CrCL)所表达之体重及肾功能对药代动力学具有统计学显著作用,较低体重及CrCL之患者中具有预期的较高暴露。然而,具有此等共变量之极端值之患者群体中之预期暴露范围大部分重叠且认为不需要特定剂量调节。基线vWF含量对药物暴露具有统计学显著作用,但具有提高的vWF的患者的提高药物暴露不会产生不同的药效学作用,且认为不需要单独的剂量调节(参见实施例7.16.5)。

[0027] 因为儿科患者未入选卡帕珠单抗临床试验,此PKPD模型亦用于青少年及儿童给药建议。与上文相反,12-18岁、体重≥40kg之青少年之建议剂量为10及5mg(若<40kg)。因为基于年龄差异预期vWF:Ag抑制无差异,相同给药建议适用于2-12岁儿童:10mg(若体重≥40kg)及5mg(若<40kg)(参见实施例7.19)。

[0028] 利用PE及输血之TTP目前疗法提供替代物ADAMTS13且移除针对酶之抗体,因此逐渐地导致ULvWF处理之标准化。然而,此治疗需要历时多天之多次交换及输血,在此期间不存在ULvWF介导之血小板凝集之活性过程之直接药理学靶向。

[0029] 在患有aTTP的患者之临床试验期间,卡帕珠单抗在PE之前以10mg静脉内(i.v.)推注形式施用,继而在每日PE时间段期间及其后至少30天10mg每日皮下(s.c.)剂量形式施

用。亦研究第一次i.v.推注与后续PE之间的不同时间间隔之潜在作用及不同PE时程之作用。令人惊奇地，在卡帕珠单抗之第一次i.v.剂量之后，预期有效药物水平直至PE开始长达5小时。为了实现更长的推迟，可在PE之前设想额外10mg或11mg s.c.剂量。在bid(一天两次)PE持续7天之情况下，卡帕珠单抗之s.c.施用时程可在各次PE处理之后用bid卡帕珠单抗调节(参见实施例7.17)。

[0030] 在管理获取程序(MAP)期间，患者接受卡帕珠单抗作为一线疗法或用于治疗aTTP的难治性病程。自发性安全报导与临床研究中观测到的安全概况一致，而无新安全信号。aTTP患者之卡帕珠单抗之第一现实世界证据确认临床试验中观测到之卡帕珠单抗之重要益处，尤其若作为一线疗法开始。

[0031] 本发明的多肽并不干扰通过血浆输血置换的酶。可利用本发明的多肽(例如ALX 0081或ALX 0081-A)以及PE及输血以直接抑制微血管中较小血栓之继续形成及血小板消耗。这准许更快速控制基本血栓性过程及随附血小板消耗，益处为缺血及出血性并发症的程度降低。亦使得临床恢复更快速及发病率更低与时间段更短及PE及输血次数缩短。实际上，对特定及临床相关器官损伤生物标记物LDH、肌钙蛋白T或I及肌酐之分析表明更快速减少微血管组织局部缺血具有临床益处。另外，通过本发明的多肽(例如ALX 0081或ALX 0081-A)展现之ULvWF介导之血小板相互作用抑制及观测到的抗血栓剂作用在患者由TTP的急性发作，例如TTP的初次发作及/或复发性发作恢复以预防疾病复发及/或恶化之后显示其长期用途之积极作用。急性TTP发作，例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之缩短频率表示明显益处，其具有与TTP相关之死亡率及发病率下降及在患者寿命内对PE及输血之需求进一步减少的潜能。

[0032] 尽管自TTP更快速恢复及恶化及复发减少在治疗疗效方面为明显可见的临床益处，PE及输血之持续时间及频率降低亦在患者安全方面提供额外益处。尽管PE及输血目前视为TTP处理中之标准治疗(Scully等人Br.J.Haem.2012;158:323-335)，程序携带明显并发症之风险。PE程序需要较高流体体积及流动速率，因此需要使用中央静脉双腔血液透析导管。程序并发症包括导管插入出血、败血症、导管血栓、气胸、流体超负荷、低氧症及低血压(Fontana等人Semin.Hematol.2004;41:48-59;George J.Intensive Care Med.2007;22:82-91;Howard等人Transfusion 2006;46:154-156;Rizvi等人Transfusion 2000;40:896-901;Nguyen等人Transfusion 2009;49:392-394)。类过敏性反应使程序复杂化0.25％至0.5％(上文Allford等人2003;上文George 2007)。另外，注入含有血液产品之血浆可导致非感染性输血相关之急性肺损伤(TRALI)。此条件识别为输血相关死亡之最频繁病因中之一者，其发生率经估计为每含有血浆之单元0.02％至0.05％。在17个血浆单位之每日平均值之情况下，每日风险可计算为0.34％至0.85％之范围。具有TTP的大部分患者需要多次PE及输血。具有急性特发性TTP的患者需要每日治疗，且需要约16次治疗之平均值来实现缓解(上文Allford等人2003)。在难治性情况中，治疗频率可提高至每日两次(上文Allford等人2003)。在具有家族TTP的患者之情况下，建议两周至三周时间间隔之规则预防性血浆输注(Lammle等人J.Thromb.Haemost.2005;3:1663-1675)。因此，过敏反应及TRALI表示具有TTP的患者之明显可见的风险，其治疗需要此类PE及输血频率及规则性。尽管据认为，若使用新鲜冷冻血浆代替经溶剂/去污剂(S/D)处理之血浆，则此风险可能较低，使用较大体积之S/D血浆可能与静脉血栓栓塞之提高的风险相关(上文Allford等人2003;上文Fontana等

人2004)。总体而言,据估计,约30%至40%患者将经历PE及输血之不良作用,且程序死亡率为约2%至3%(George等人Semin.Hematol.2004;41:60-67;上文George 2007;上文George及Al-Nouri 2012)。因此,PE及输血之持续时间及频率降低亦在患者安全方面提供额外益处。

[0033] 在自TTP发作,例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作恢复之后,多名患者描述认知异常持续多年且报导记忆、注意力、体力下降及疲劳之麻烦问题。此类症状对患者每日生活质量具有不利影响。此外,此生活质量不足可能出现在具有TTP的所有患者中,与病因及严重程度无关(Lewis等人Transfusion 2009;49:118-124)。据认为,此等症状可反映组织局部缺血之残留作用。在此基础上,可合理地提出,本发明的多肽,诸如ALX 0081或ALX 0081-A所提供之自TTP更快速恢复及微血管中之血栓形成之限制在患者生活质量方面为患者产生改善的长期结果。

[0034] 令人惊奇地,在各种活体外实验、比较性核磁共振(NMR)及表面等离振子共振(SPR)研究中显示卡帕珠单抗及C端延伸之卡帕珠单抗具有类似特征且具有类似结合特征以靶向vWF,但C端延伸之卡帕珠单抗具有较少预先存在抗体结合。鉴于卡帕珠单抗与C端延伸之卡帕珠单抗之间的类似特性及特征,预期此等C端延伸之卡帕珠单抗化合物可同样用于治疗及/或预防aTTP(参见实施例7.21),与卡帕珠单抗类似。

[0035] 因此,本发明提供通过向个体施用包含至少一个针对vWF之ISVD的多肽来治疗或减轻个体之vWF相关疾病,诸如TTP的方法,其中多肽施用量能有效地缩短响应时间,减少恶化,减少复发,减少住院,包括ICU占有,减少局部缺血,减少死亡人数及/或减少PE所需次数。本发明提供产生vWF相关疾病,诸如TTP的此等有利效果中之一或多者的本发明的多肽之特定剂量范围及给药时间表。具体而言,本发明提供药理学活性剂、组合物、方法及/或给药时间表,其相比于目前使用及/或本领域中已知之药剂、组合物、方法及/或给药时间表具有某些优点,包括以更低频率给予PE之需要。此等优点将由以下进一步描述变得明显可见。

[0036] 在一优选方面中,本发明涉及包含两个抗人类vWF免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)的多肽,其通过向人类施用10mg或11mg之剂量的该多肽(若该人类具有≥40kg之体重)及5mg之剂量的该多肽(若该体重<40kg)而用于治疗人类的vWF相关疾病,优选TTP(其症状)。

[0037] 在一方面中,本发明涉及包含两个抗人类冯维勒布兰德因子(vWF)免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)的多肽,其通过向人类施用1-80mg,优选5-40mg,甚至更优选10mg或11mg之剂量的该多肽而用于治疗人类的vWF相关疾病,优选TTP的初次发作(其症状)。

[0038] 在一方面中,本发明涉及包含两个抗人类冯维勒布兰德因子(vWF)免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)的多肽,其通过向人类施用1-80mg,优选5-40mg,甚至更优选10mg或11mg之剂量的该多肽而用于人类的vWF相关疾病,优选TTP的一线治疗。

[0039] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于治疗人类的vWF相关疾病,优选TTP的初次发作(其症状),其中施用本发明的多肽的该步骤重复至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天,或甚至超过10天,诸如20天,优选超过30天,诸如2个月、3个月、4个月、5个月、6个月或甚至更久(治疗期)。

[0040] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于治疗人类的vWF相关疾病,优选TTP的初次发作(其症状),其中该治疗产生较快的血小板计数响应时间、治疗期间患者

死亡、复发或重度TE事件之比例较低、较低的复发率及/或预防不应性。

[0041] 在另一方面中，本发明涉及本文所描述的多肽，其用于治疗人类的vWF相关疾病，优选TTP的初次发作(其症状)，其中该多肽包含至少一个结合人类vWF之ISVD(SEQ ID NO:20)。

[0042] 在另一方面中，本发明涉及本文所描述的多肽，其用于治疗人类的vWF相关疾病，优选TTP(其症状)，其中该多肽与SEQ ID NO:1有至少90％同一性，且包含C端延伸部分(X)n，其中n为1至10，优选1至5，诸如1、2、3、4或5(且优选1或2，诸如1)；且各X为(优选天然存在之)氨基酸残基，其独立地选自且优选独立地选自由以下组成之群：丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)或异亮氨酸(I)；甚至更优选丙氨酸。

[0043] 在另一方面中，本发明涉及本文所描述的多肽，其用于治疗人类的vWF相关疾病的初次发作(其症状)，其中至少一个ISVD由SEQ ID NO:19(12A02H1)表示。

[0044] 在另一方面中，本发明涉及本文所描述的多肽，其用于治疗人类的vWF相关疾病，优选TTP的初次发作(其症状)，其中该多肽与SEQ ID NO:1有至少90％同一性。

[0045] 在另一方面中，本发明涉及本文所描述的多肽，其用于治疗人类的vWF相关疾病，优选TTP的初次发作(其症状)，其中该多肽为ALX 0081(SEQ ID NO:1)或ALX 0081-A(SEQ ID NO:24)。

[0046] 在另一方面中，本发明涉及本文所描述的多肽，其用于治疗人类的vWF相关疾病，优选TTP的初次发作(其症状)，其中该剂量每天施用1次或每天施用两次。

[0047] 在另一方面中，本发明涉及本文所描述的多肽，其用于治疗人类的vWF相关疾病，优选TTP的初次发作(其症状)，其包含重复施用该多肽直至该人类中之血小板数为至少150,000/μl。

[0048] 在另一方面中，本发明涉及本文所描述的多肽，其用于治疗人类的vWF相关疾病的初次发作(其症状)，其包含重复施用该多肽直至在两个连续测量中所述人类中的血小板数目为至少150,000/μl。

[0049] 在另一方面中，本发明涉及本文所描述的多肽，其用于治疗人类的vWF相关疾病，优选TTP的初次发作(其症状)，其中该血小板数在至少2次连续量测时为至少150,000/μl之后，施用本发明的多肽的该步骤重复至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天，或甚至超过10天，诸如20天，优选超过30天或甚至更久。

[0050] 在另一方面中，本发明涉及本文所描述的多肽，其用于治疗人类的vWF相关疾病的初次发作(其症状)，其中该2次连续测量相隔至少24小时，更优选相隔48小时，诸如相隔至少3天，或甚至相隔诸如4、5、6或甚至7天，优选相隔一周。

[0051] 在另一方面中，本发明涉及本文所描述的多肽，其用于治疗人类的vWF相关疾病，优选TTP的初次发作(其症状)，其包含重复施用该多肽直至该人类中之ADAMTS13活性为ADAMTS13参考活性之至少10％，诸如至少15％、20％、25％、30％、35％、45％或甚至50％。

[0052] 在另一方面中，本发明涉及本文所描述的多肽，其用于治疗人类的vWF相关疾病，优选TTP的初次发作(其症状)，其包含重复施用该多肽直至该人类中之器官损伤标记物水平，诸如LDH水平、肌钙蛋白T水平、肌钙蛋白I水平及/或肌酐水平恢复至正常水平之至少40％，或甚至至少50％，诸如60％、70％、80％、90％或甚至100％。

[0053] 在另一方面中，本发明涉及本文所描述的多肽，其用于治疗人类的vWF相关疾病，

优选TTP的初次发作(其症状),其包含进行血浆交换。

[0054] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于治疗人类的vWF相关疾病的初次发作(其症状),其中该vWF相关疾病选自急性冠状动脉综合征(ACS)、暂时性大脑缺血性发作、不稳定或稳定心绞痛、中风、心肌梗死或血栓性血小板减少性紫癜(TTP),优选TTP。

[0055] 在一方面中,本发明涉及包含两个抗人类冯维勒布兰德因子(vWF)免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)的多肽,其用于减少在治疗有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作期间在医院及/或重症监护室(ICU)中的天数,其包含向人类施用1-80mg,优选5-40mg,甚至更优选10mg或11mg剂量的该多肽。

[0056] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于减少在治疗有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作期间在医院及/或重症监护室(ICU)中的天数,其中施用本发明的多肽的该步骤重复至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天,或甚至超过10天,诸如20天,优选超过30天,诸如2个月、3个月、4个月、5个月、6个月或甚至更久(治疗期)。

[0057] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于减少在治疗有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作期间在医院及/或重症监护室(ICU)中的天数,其中该治疗产生较快的血小板计数响应时间、治疗期间患者死亡、复发或重度TE事件之比例较低、较低的复发率及/或预防不应性。

[0058] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于减少在治疗有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作期间在医院及/或重症监护室(ICU)中的天数,其中该多肽包含至少一个结合SEQ ID NO:20的ISVD。

[0059] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于减少在治疗有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作期间在医院及/或重症监护室(ICU)中的天数,其中至少一个ISVD由SEQ ID NO:19(12A02H1)表示。

[0060] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于减少在治疗有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作期间在医院及/或重症监护室(ICU)中的天数,其中该多肽与SEQ ID NO:1有至少90%同一性。

[0061] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于减少在治疗有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作期间在医院及/或重症监护室(ICU)中的天数,其中该多肽为ALX 0081(SEQ ID NO:1)或ALX 0081-A(SEQ ID NO:24)。

[0062] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于减少在治疗有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作期间在医院及/或重症监护室(ICU)中的天数,其中该剂量每天施用1次或每天施用两次。

[0063] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于减少在治疗有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作期间在医院及/或重症监护室(ICU)中的天数,其包含重复施用该多肽直至该人类中之血小板数为至少150,000/μl。

[0064] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于减少在治疗有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作期间在医院及/或重症监护室(ICU)中的天数,其包含重复施用该多肽直至该人类中血小板数在至少两次连续测量时为至少150,000/μl。

[0065] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于减少在治疗有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作期间在医院及/或重症监护室(ICU)中的天数,其中在

该血小板数在至少2次连续量测时为至少150,000/μl之后,施用本发明的多肽的该步骤重复至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天,或甚至超过10天,诸如20天,优选超过30天或甚至更久。

[0066] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于减少在治疗有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作期间在医院及/或重症监护室(ICU)中的天数,其中该2次连续量测相隔至少24小时,更优选相隔48小时,诸如相隔至少3天,或甚至相隔诸如4、5、6或甚至7天,优选相隔一周。

[0067] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于减少在治疗有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作期间在医院及/或重症监护室(ICU)中的天数,其包含重复施用该多肽直至该人类中之ADAMTS13活性为ADAMTS13参考活性之至少10%,诸如至少15%、20%、25%、30%、35%、45%或甚至50%。

[0068] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于减少在治疗有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作期间在医院及/或重症监护室(ICU)中的天数,其包含重复施用该多肽直至该人类中之器官损伤标记物水平,诸如LDH水平、肌钙蛋白T水平、肌钙蛋白I水平及/或肌酐水平恢复至正常水平之至少40%,或甚至至少50%,诸如60%、70%、80%、90%或甚至100%。

[0069] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于减少在治疗有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作期间在医院及/或重症监护室(ICU)中的天数,其包含进行血浆交换。

[0070] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于减少在治疗有需要的人类的vWF相关疾病之急性发作期间在医院及/或重症监护室(ICU)中的天数,其中该vWF相关疾病选自急性冠状动脉综合征(ACS)、暂时性大脑缺血性发作、不稳定或稳定心绞痛、中风、心肌梗死或血栓性血小板减少性紫癜(TTP),优选TTP。

[0071] 在一方面中,本发明涉及包含两个抗人类冯维勒布兰德因子(vWF)免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)的多肽,其用于预防患者变得对有需要之人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作,例如初次发作及/或复发性发作治疗难治,其包含向人类施用1-80mg,优选5-40mg,甚至更优选10mg或11mg之剂量的该多肽。

[0072] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于预防患者变得对有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作,例如初次发作及/或复发性发作治疗难治,其中施用本发明的多肽之该步骤重复至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天,或甚至超过10天,诸如20天,优选超过30天,诸如2个月、3个月、4个月、5个月、6个月或甚至更久(治疗期)。

[0073] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于预防患者变得对有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作,例如初次发作及/或复发性发作治疗难治,其中该治疗产生较快的血小板计数响应时间、治疗期间患者死亡、复发或重度TE事件之比例较低、较低的复发率及/或预防不应性。

[0074] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于预防患者变得对有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作,例如初次发作及/或复发性发作治疗难治,其中该多肽包含至少一个结合SEQ ID NO:20之ISVD。

[0075] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于预防患者变得对有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作,例如初次发作及/或复发性发作治疗难治,其中

至少一个ISVD由SEQ ID NO:19(12A02H1)表示。

[0076] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于预防患者变得对有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作,例如初次发作及/或复发性发作治疗难治,其中该多肽与SEQ ID NO:1有至少90%同一性。

[0077] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于预防患者变得对有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作,例如初次发作及/或复发性发作治疗难治,其中该多肽为ALX 0081(SEQ ID NO:1)或ALX 0081-A(SEQ ID NO:24)。

[0078] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于预防患者变得对有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作,例如初次发作及/或复发性发作治疗难治,其中该剂量每天施用1次或每天施用两次。

[0079] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于预防患者变得对有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作,例如初次发作及/或复发性发作治疗难治,其包含重复施用该多肽直至该人类中之血小板数为至少150,000/μl。

[0080] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于预防患者变得对有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作,例如初次发作及/或复发性发作治疗难治,其包含重复施用该多肽直至该人类中之血小板数在至少2次连续测量时为至少150,000/μl。

[0081] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于预防患者变得对有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作,例如初次发作及/或复发性发作治疗难治,其中在至少2次连续测量时该血小板数为至少150,000/μl之后,施用本发明的多肽的该步骤重复至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天,或甚至超过10天,诸如20天,优选超过30天或甚至更久。

[0082] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于预防患者变得对有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作,例如初次发作及/或复发性发作治疗难治,其中该2次连续测量相隔至少24小时,更优选相隔48小时,诸如相隔至少3天,或甚至相隔诸如4、5、6或甚至7天,优选相隔一周。

[0083] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于预防患者变得对有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作,例如初次发作及/或复发性发作治疗难治,其包含重复施用该多肽直至该人类中之ADAMTS13活性为ADAMTS13参考活性之至少10%,诸如至少15%、20%、25%、30%、35%、45%或甚至50%。

[0084] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于预防患者变得对有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作,例如初次发作及/或复发性发作治疗难治,其包含重复施用该多肽直至该人类中之器官损伤标记物水平,诸如LDH水平、肌钙蛋白T水平、肌钙蛋白I水平及/或肌酐水平恢复至正常水平之至少40%,或甚至至少50%,诸如60%、70%、80%、90%或甚至100%。

[0085] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于预防患者变得对有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP的急性发作,例如初次发作及/或复发性发作治疗难治,其包含进行血浆交换。

[0086] 在另一方面中,本发明涉及本文所描述的多肽,其用于预防患者变得对有需要的人类的vWF相关疾病之急性发作,例如初次发作及/或复发性发作治疗难治,其中该vWF相关疾病选自急性冠状动脉综合征(ACS)、暂时性大脑缺血性发作、不稳定或稳定心绞痛、中风、

心肌梗死或血栓性血小板减少性紫癜(TTP),优选TTP。

[0087] 因此,本发明提供包含至少一个针对vWF之ISVD,优选2个ISVD的多肽,甚至更优选ALX 0081或ALX 0081-A,其用于治疗及/或预防如本文所描述之有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP,其包含向该人类施用1-80mg,诸如5-40mg,优选10mg或11mg之第一剂量之该多肽。

[0088] 本发明提供如本文所描述的多肽,其用于治疗及/或预防如本文所描述之有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP,其中该施用该多肽之后5分钟至8小时内进行第一次PE。

[0089] 本发明提供如本文所描述的多肽,其用于治疗及/或预防如本文所描述之有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP,其中在该第一剂量之该施用之前进行先前的PE,优选在该第一次PE之36小时内,诸如在32小时、30小时、28小时、26小时、24小时、22小时、20小时、18小时、16小时、14小时、12小时、10小时、8小时内,例如在7小时、6小时、5小时、4小时、3小时、3小时、1小时、45分钟、30分钟、20分钟、15分钟、10分钟或甚至5分钟内。

[0090] 本发明提供如本文所描述的多肽,其用于治疗及/或预防如本文所描述之有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP,其中在该第一次PE之后优选通过皮下注射,优选在该第一次PE之1-60分钟内,更优选在30分钟内施用1-80mg,诸如5-40mg,优选10mg或11mg之第二剂量之该多肽。

[0091] 本发明提供如本文所描述的多肽,其用于治疗及/或预防如本文所描述之有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP,其中该先前的PE在该第一次PE之36小时,优选32、30、28、26、24、22、20、18或16小时,优选约24小时内进行。

[0092] 本发明提供如本文所描述的多肽,其用于治疗及/或预防如本文所描述之有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP,其中该多肽肠胃外,优选通过皮下、腹膜内、静脉内或肌肉内注射,优选通过静脉内(i.v.)快速推送注射施用。

[0093] 本发明提供如本文所描述的多肽,其用于治疗及/或预防如本文所描述之有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP,其中在施用该多肽之后5分钟至8小时内,诸如在10分钟至6小时或15分钟至4小时内,例如在8小时、7小时、6小时、5小时、4小时、3小时、3小时、1小时、45分钟、30分钟、20分钟、15分钟、10分钟或甚至5分钟内,优选在小于5小时内进行PE。

[0094] 本发明提供如本文所描述的多肽,其用于治疗及/或预防如本文所描述之有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP,其中该治疗有需要之人类的vWF相关疾病(诸如TTP),优选TTP,进一步包含:

[0095] (i)进行PE;及(继而)

[0096] (ii)在步骤(i)之该PE之后施用1-80mg,诸如5-40mg之剂量之该多肽5分钟至4小时;及

[0097] (iii)任选地测量该患者之血小板计数及/或ADAMTS 13活性,

[0098] 其中步骤(i)及步骤(ii)每天重复一次,优选直至该患者之血小板计数为≥150000/μl及/或该ADAMTS13活性为ADAMTS13参考活性之至少10%,诸如至少15%、20%、25%、30%、35%、45%或甚至50%。

[0099] 本发明提供如本文所描述的多肽,其用于治疗及/或预防如本文所描述之有需要的人类的vWF相关疾病,优选TTP,其进一步包含在该患者之血小板计数第一次为≥150000/μl之后每天一次施用1-80mg,诸如5-40mg,优选10mg或11mg之剂量的该多肽持续至少5、10、

15、20、25、30、40、50、60、90或甚至120天。

[0100] 本发明提供如本文所描述的多肽，其用于治疗及/或预防如本文所描述之有需要的人类的vWF相关疾病，优选TTP，其进一步包含每天一次施用1-80mg，诸如5-40mg，优选10mg或11mg之剂量的该多肽直至该人类进入缓解期。

[0101] 本发明提供如本文所描述的多肽，其用于治疗及/或预防如本文所描述之有需要的人类的vWF相关疾病，优选TTP，其包含施用该多肽直至ADAMTS13活性为ADAMTS13参考活性之至少10％，诸如至少15％、20％、25％、30％、35％、45％或甚至50％。

[0102] 本发明提供如本文所描述的多肽，其中该剂量为约1-80mg，或5-40mg，诸如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、60、70或80mg，优选约10mg或11mg该多肽。

[0103] 本发明提供如本文所描述的多肽，其用于治疗及/或预防如本文所描述之有需要的人类的vWF相关疾病，优选TTP，其中该人类遭受TTP发作(例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作)、TTP恶化及/或TTP复发。

[0104] 在一优选方面中，本发明提供包含至少一个针对vWF之ISVD的多肽，其用于治疗有需要的人类的vWF相关疾病，诸如TTP，优选TTP，如本文所描述，包含

[0105] (1)任选地进行前述PE；

[0106] (2)向该人类施用1-80mg，诸如5-40mg，优选10mg或11mg之第一剂量的该多肽，且若进行步骤(1)，则优选在步骤(1)之36小时内，诸如在32小时、30小时、28小时、26小时、24小时、22小时、20小时、18小时、16小时、14小时、12小时、10小时、8小时内，例如在7小时、6小时、5小时、4小时、3小时、3小时、1小时、45分钟、30分钟、20分钟、15分钟、10分钟或甚至5分钟(结束)内。

[0107] (3)任选地在步骤(2)之5分钟至8小时内，诸如在10分钟至6小时或15分钟至4小时内，例如在8小时、7小时、6小时、5小时、4小时、3小时、3小时、1小时、45分钟、30分钟、20分钟、15分钟、10分钟或甚至5分钟内进行PE；

[0108] (4)优选在步骤(3)之5分钟至8小时内，诸如在10分钟至6小时或15分钟至4小时内，例如在8小时、7小时、6小时、5小时、4小时、3小时、3小时、1小时、45分钟、30分钟、20分钟、15分钟、10分钟或甚至5分钟(结束)内施用1-80mg，诸如5-40mg，优选10mg或11mg之另一剂量之该多肽；

[0109] (5)每天一次重复步骤(3)及步骤(4)；任选地直至该患者之血小板计数为≥150000/μl及/或该ADAMTS13活性为ADAMTS13参考活性之至少10％，诸如至少15％、20％、25％、30％、35％、45％或甚至50％。

[0110] (6)在该患者之血小板计数第一次为≥150,000/μl之后任选地每天一次施用1-80mg，诸如5-40mg，优选10mg或11mg之剂量的该多肽持续至少5、10、15、20、25、30、40、50、60、90或甚至120天或直至ADAMTS13活性为ADAMTS13参考活性之至少10％，诸如至少15％、20％、25％、30％、35％、45％或甚至50％。

[0111] 若步骤(3)在步骤(2)之后5小时进行，则施用1-80mg，诸如5-40mg，优选10mg或11mg之另一剂量的该多肽。

[0112] 在另一优选方面中，本发明提供包含至少一个针对vWF之ISVD的多肽，其用于治疗有需要的人类的vWF相关疾病，诸如TTP，优选TTP，如本文所描述，包含

[0113] (1)一天两次进行PE;

[0114] (2)在步骤(1)之每次PE之后向该人类施用1-80mg,诸如5-40mg,优选10mg或11mg之剂量的该多肽。

[0115] 另外,本发明提供包含两个抗人类vWF ISVD的多肽,其通过向人类施用1-80mg,诸如5-40mg,优选10mg或11mg剂量之该多肽用于预防人类的vWF相关疾病之复发(其症状)。

[0116] 本发明提供如本文所描述的多肽,其中该针对vWF之ISVD包含至少一个结合至SEQ ID NO:20之免疫球蛋白单可变结构域。

[0117] 本发明提供如本文所描述的多肽,其中该针对vWF之ISVD包含来源于常规四链抗体之重链可变结构域或来源于重链抗体或纳米抗体之重链可变结构域。

[0118] 本发明提供如本文所描述的多肽,其中该纳米抗体为VHH。

[0119] 本发明提供如本文所描述的多肽,其中该针对vWF之ISVD基本上由4个构架区(分别FR1至FR4)及3个互补决定区(分别CDR1至CDR3)组成,其中:

[0120] a)CDR1包含以下或基本上由以下组成:

[0121] -氨基酸序列YNPMG;或

[0122] -与氨基酸序列YNPMG具有2个或仅1个氨基酸差异之氨基酸序列;

[0123] 及

[0124] b)CDR2包含以下或基本上由以下组成:

[0125] -氨基酸序列AISRTGGSTYYPDSVEG;或

[0126] -与氨基酸序列AISRTGGSTYYPDSVEG具有至少80%,优选至少90%,更优选至少95%,甚至更优选至少99%序列同一性之氨基酸序列;或

[0127] -与氨基酸序列AISRTGGSTYYPDSVEG具有2个或仅1个氨基酸差异之氨基酸序列;

[0128] 及

[0129] c)CDR3包含以下或基本上由以下组成:

[0130] -氨基酸序列AGVRAEDGRVRTLPSEYTF;或

[0131] -与氨基酸序列AGVRAEDGRVRTLPSEYTF具有至少80%,优选至少90%,更优选至少95%,甚至更优选至少99%序列同一性之氨基酸序列;或

[0132] -与氨基酸序列AGVRAEDGRVRTLPSEYTF具有2个或仅1个氨基酸差异之氨基酸序列。

[0133] 本发明提供如本文所描述的多肽,其中:

[0134] a)CDR1为YNPMG(SEQ ID NO:21);

[0135] b)CDR2为AISRTGGSTYYPDSVEG(SEQ ID NO:22);及

[0136] c)CDR3为AGVRAEDGRVRTLPSEYTF(SEQ ID NO:23)。

[0137] 本发明提供如本文所描述的多肽,其中针对vWF之ISVD由SEQ ID NO:19(12A02H1)表示。

[0138] 本发明提供如本文所描述的多肽,其包含至少两个针对vWF之ISVD或由其组成。

[0139] 本发明提供如本文所描述的多肽,其中该至少两个针对vWF之ISVD之各ISVD基本上由4个构架区(分别FR1至FR4)及3个互补决定区(分别CDR1至CDR3)组成,其中:

[0140] a)CDR1包含以下或基本上由以下组成:

[0141] -氨基酸序列YNPMG;或

[0142] -与氨基酸序列YNPMG具有2个或仅1个氨基酸差异之氨基酸序列;

[0143] 及

[0144] b)CDR2包含以下或基本上由以下组成：

[0145] -氨基酸序列AISRTGGSTYYPDSVEG;或

[0146] -与氨基酸序列AISRTGGSTYYPDSVEG具有至少80％,优选至少90％,更优选至少95％,甚至更优选至少99％序列同一性之氨基酸序列;或

[0147] -与氨基酸序列AISRTGGSTYYPDSVEG具有2个或仅1个氨基酸差异之氨基酸序列;

[0148] 及

[0149] c)CDR3包含以下或基本上由以下组成：

[0150] -氨基酸序列AGVRAEDGRVRTLPSEYTF;或

[0151] -与氨基酸序列AGVRAEDGRVRTLPSEYTF具有至少80％,优选至少90％,更优选至少95％,甚至更优选至少99％序列同一性之氨基酸序列;或

[0152] -与氨基酸序列AGVRAEDGRVRTLPSEYTF具有2个或仅1个氨基酸差异之氨基酸序列。

[0153] 本发明提供如本文所描述的多肽,其中每个针对vWF之ISVD基本上由4个构架区(分别FR1至FR4)及3个互补决定区(分别CDR1至CDR3)组成,其中：

[0154] a)CDR1为YNPMG(SEQ ID NO:21)；

[0155] b)CDR2为AISRTGGSTYYPDSVEG(SEQ ID NO:22)；及

[0156] c)CDR3为AGVRAEDGRVRTLPSEYTF(SEQ ID NO:23)。

[0157] 本发明提供如本文所描述的多肽,其中该多肽包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:1-18或24,优选SEQ ID NO:1或24。

[0158] 本发明提供如本文所描述的多肽,其中该针对vWF之ISVD为包含一或多个免疫球蛋白单可变结构域之单链多肽。

[0159] 本发明提供如本文所描述的多肽,其中该针对vWF之ISVD为单价或多价的。

[0160] 本发明提供如本文所描述的多肽,其中该针对vWF之ISVD为单特异性或多特异性的。

[0161] 本发明提供如本文所描述的多肽,其中一或多个免疫球蛋白单可变结构域是CDR移植的、人源化、骆驼化、去免疫的或通过噬菌体展示选择的。

[0162] 本发明提供如本文所描述的多肽,其中该针对vWF之ISVD包含与SEQ ID NO:1有至少90％同一性之氨基酸序列。

[0163] 本发明提供如本文所描述的多肽,其包含两个抗人类vWF免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)及抗人类血清白蛋白(HSA)ISVD。

[0164] 本发明提供如本文所描述的多肽,其中该多肽配制于药学上可接受之制剂中。

[0165] 本发明提供如本文所描述的多肽,其中该制剂包含pH在5.0至7.5范围内之柠檬酸盐或磷酸盐缓冲液。

[0166] 本发明提供如本文所描述的多肽,其中该制剂适合于肠胃外施用,诸如选自静脉内注射、皮下注射、肌肉内注射或腹膜内注射之一或多者。

[0167] 本发明提供如本文所描述的多肽,其中该制剂呈液体、冻干、喷雾干燥、复原冻干或冷冻形式。

[0168] 本发明提供一种试剂盒或制品,其包含含有如本文所描述之多肽或如本文所描述之制剂及使用说明书的容器。

[0169] 本发明提供如本文所描述之试剂盒或制品，其中制剂存在于小瓶或可注射注射器中。

[0170] 本发明提供如本文所描述之试剂盒或制品，其中制剂存在于预填充可注射注射器中。

[0171] 本发明提供如本文所描述之试剂盒或制品，其中该注射器或小瓶由玻璃、塑料或选自环烯烃聚合物或共聚物之聚合材料构成。

[0172] 本发明提供一种制剂，其包含：

[0173] (a)如本文所描述的多肽，其浓度为约0.1mg/mL至约80mg/mL；

[0174] (b)赋形剂，其选自蔗糖、甘氨酸、甘露糖醇、海藻糖或NaCl，浓度为约1％至约15％(w/v)；

[0175] (c)Tween-80，其浓度为约0.001％至0.5％(v/v)；及

[0176] (d)缓冲液，其选自：柠檬酸盐缓冲液，浓度为约5mM至约200mM以使得制剂之pH为约6.0至7.0；及磷酸盐缓冲液，浓度为约10mM至约50mM以使得制剂之pH为约6.5至7.5，

[0177] 该制剂通过向人类施用1-80mg，诸如5-40mg剂量，优选10mg或11mg该多肽而用于治疗有需要之人类之vWF相关疾病，优选TTP，其中该剂量任选地在第一血浆交换(PE)之前5分钟至8小时，诸如15分钟至4小时内。

[0178] 本发明提供一种适合于向患者，优选人类患者肠胃外施用之医药单位剂型，其包含如本文所描述之多肽或如本文所描述之制剂。

[0179] 本发明提供如本文所描述之多肽，其中该vWF相关疾病选自急性冠状动脉综合征(ACS)、暂时性大脑缺血性发作、不稳定或稳定心绞痛、中风、心肌梗死或(获得性及/或先天性)血栓性血小板减少性紫癜(TTP)，优选TTP。

[0180] 本发明提供一种用于治疗易患或诊断患有vWF相关疾病，诸如TTP之人类患者之方法，其包含向人类患者施用有效量之包含至少一个针对冯维勒布兰德因子(vWF)之免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)的多肽。

[0181] 本发明提供一种治疗或预防vWF相关疾病，诸如TTP之方法，其包含向人类施用1-80mg，诸如5-40mg，优选10mg或11mg剂量之包含至少一个针对冯维勒布兰德因子(vWF)之免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)的多肽，由此减少与vWF相关疾病相关之一或多个症状。

[0182] 本发明提供如本文所描述之治疗，其中在该施用如本文所描述之多肽之后5分钟至8小时，诸如15分钟至4小时内进行第一次血浆交换(PE)。

[0183] 本发明提供如本文所描述之治疗，其中在如本文所描述之多肽之该施用之前进行先前的血浆交换(PE)，在该第一次PE之36小时，优选32、30、28、26、24、22、20、18或16小时，优选约24小时内。

[0184] 本发明提供如本文所描述之治疗，其中在该第一次PE之后在5分钟至8小时内，诸如在10分钟至6小时或15分钟至4小时内，例如在8小时、7小时、6小时、5小时、4小时、3小时、3小时、1小时、45分钟、30分钟、20分钟、15分钟、10分钟或甚至5分钟内施用1-80mg，诸如5-40mg，优选10mg或11mg之第二剂量之如本文所描述之多肽，例如其中该第二剂量之该多肽在该第一次PE之1-60分钟，诸如30分钟内优选通过皮下注射施用。

[0185] 本发明提供如本文所描述之治疗，其进一步包含：

[0186] (i)进行PE；(继而)

[0187] (ii)在步骤(i)之该PE之后施用1-80mg,诸如5-40mg,优选10mg或11mg之剂量之如本文所描述之多肽15分钟至4小时;及

[0188] (iii)任选地测量该患者之血小板计数及/或ADAMTS13活性,

[0189] 其中步骤(i)及步骤(ii)每天重复一次,任选地直至该患者之血小板计数为≥150000/μl及/或该ADAMTS13活性为ADAMTS13参考活性之至少10%,诸如至少15%、20%、25%、30%、35%、45%或甚至50%。

[0190] 本发明亦提供如本文所描述之治疗,其进一步包含在该患者之血小板计数为≥150,000/μl之后每天一次施用1-80mg,诸如5-40mg,优选10mg或11mg之剂量之如本文所描述之多肽持续至少5、10、15、20、25或甚至30天。

[0191] 本发明提供如本文所描述之治疗,其进一步包含每天一次施用1-80mg,诸如5-40mg,优选10mg或11mg之剂量之如本文所描述之多肽直至该人类进入缓解期。

[0192] 本发明提供如本文所描述之治疗,其包含施用该多肽直至该ADAMTS13活性为ADAMTS13参考活性之至少10%,诸如至少15%、20%、25%、30%、35%、45%或甚至50%。

[0193] 在一个实施方案中,本发明涉及一种用于降低有需要之人类之vWF相关疾病之急性发作,诸如TTP发作,例如TTP初次发作及/或复发性发作之风险及/或预防发作的方法,该方法包含以下或由以下组成:(i)向该人类施用5-40mg,优选10mg或11mg之剂量之多肽,其包含至少一个针对冯维勒布兰德因子(vWF)之免疫球蛋白单可变结构域(ISVD);其中该多肽之施用降低vWF相关疾病之急性发作,诸如TTP发作,例如TTP初次发作及/或复发性发作之风险及/或预防发作。优选地,该风险降低1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.75倍、1.8倍、2倍或大于2倍,诸如3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或甚至10倍,或甚至诸如20倍、50倍或甚至100倍。优选地,该风险降低10%或甚至诸如20%、30%、40%、50%、60%或大于60%,诸如80%或甚至100%。

[0194] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所描述之方法,其中施用本发明之多肽之该步骤(i)重复至少1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次或10次,或甚至超过10次,诸如20次,优选超过30次或甚至更多次。

[0195] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所描述之方法,其中施用本发明之多肽之该步骤(i)重复至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天,或甚至超过10天,诸如20天,优选超过30天,诸如2个月、3个月、4个月、5个月、6个月或甚至更久。

[0196] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所描述之方法,其中该剂量每天施用1次或每天施用两次(bid)。

[0197] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所描述之方法,其进一步包含

[0198] (ii)任选地测量该患者之ADAMTS13活性;

[0199] (iii)任选地将该患者之ADAMTS13活性与参考ADAMTS13活性进行比较;及

[0200] (iv)若该ADAMTS13活性低于该参考ADAMTS13活性之30%,诸如20%、15%或10%,则重复施用本发明之多肽之该步骤(i)。

[0201] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所描述之方法,其中每天或每2、3、4、5、6、7、8、9或10天,优选至少每周一次测量该患者之该ADAMTS13活性。

[0202] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所描述之方法,其中重复施用本发明之多肽之该步骤直至该ADAMTS13活性为该参考ADAMTS13活性之至少10%、15%,诸如20%或甚

至30％或更高。

[0203] 在一个实施方案中，本发明涉及如本文所描述之方法，其中重复步骤(i)直至该ADAMTS13活性在至少2次连续测量时为该参考ADAMTS13活性之至少10％、15％，诸如20％或30％。优选地，该2次连续测量相隔至少24小时，更优选48小时，诸如相隔至少3天，或甚至相隔诸如4、5、6或甚至7天，优选相隔一周。

[0204] 在一个实施方案中，本发明涉及如本文所描述之方法，其中在该ADAMTS13活性在至少2次连续测量时为该参考活性之至少10％或15％，诸如20％或30％之后，施用本发明之多肽之该步骤(i)重复至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天，或甚至超过10天，诸如20天，优选超过30天或甚至更久。

[0205] 在一个实施方案中，本发明涉及如本文所描述之方法，其进一步包含

[0206] -任选地测量该患者之ADAMTS13活性；

[0207] -任选地将该患者之ADAMTS13活性与参考ADAMTS13活性进行比较；及

[0208] -若该ADAMTS13活性≥该参考ADAMTS13活性之10％，诸如大于15％，或大于20％或30％，则重复施用本发明之多肽之该步骤(i)至多30天，诸如至多20天，或甚至15、10、9、8、7、6、5、4、3、2天或甚至1天。

[0209] 在一个实施方案中，本发明涉及一种用于降低有需要之人类之vWF相关疾病之急性发作，诸如TTP发作，例如TTP初次发作及/或复发性发作之风险及/或预防发作的方法，该方法至少包含以下步骤：

[0210] (i)测量该患者之ADAMTS13活性；

[0211] (ii)将该ADAMTS13活性与参考ADAMTS13活性进行比较；及

[0212] (iii)若该ADAMTS13活性低于该参考活性之30％、20％、15％或10％，则向该人类施用5-40mg，诸如10mg或11mg之剂量之包含至少一个针对冯维勒布兰德因子(vWF)之免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)的多肽；

[0213] 在一个实施方案中，本发明涉及如本文所描述之方法，其中

[0214] -器官损伤、缺血损伤及/或微血栓形成之风险降低10％、20％、30％，优选至少40％，或甚至至少50％，诸如60％、70％、80％、90％或甚至100％；

[0215] -器官损伤、缺血损伤及/或微血栓形成之风险降低1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.75倍、2倍或大于2倍，诸如3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或甚至10倍，或甚至诸如20倍、50倍或甚至100倍；

[0216] -器官损伤、缺血损伤及/或微血栓形成降低优选至少10％、20％、30％、40％，或甚至至少50％，诸如60％、70％、80％、90％或甚至100％；

[0217] -器官损伤、缺血损伤及/或微血栓形成降低一倍、2倍或大于2倍，诸如3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或甚至10倍，或甚至诸如20倍、50倍或甚至100倍；

[0218] -器官损伤标记物，诸如LDH水平、肌钙蛋白T、肌钙蛋白I水平及/或肌酐水平恢复至正常水平之至少40％，或甚至至少50％，诸如60％、70％、80％、90％或甚至100％；

[0219] -器官损伤标记物，诸如LDH水平、肌钙蛋白T、肌钙蛋白I水平及/或肌酐水平改善正常水平之至少20％，诸如30％或甚至较高，诸如40％，或甚至至少50％，诸如60％、70％、80％、90％或甚至100％。优选地，该器官损伤，诸如LDH水平、肌钙蛋白T、肌钙蛋白I水平及/或肌酐水平、标记物在小于30天治疗内，优选在小于20天治疗内，诸如在小于15、10、9、8、7、

6、5、4、3、2天或甚至1天内改善。

[0220] -血小板之数目保持在≥150000/μl。

[0221] -恶化风险降低至少10％、20％、30％、40％或甚至至少50％，诸如60％、70％、80％、90％或甚至100％；

[0222] -恶化风险降低一倍、2倍或大于2倍，诸如3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或甚至10倍，或甚至诸如20倍、50倍或甚至100倍；

[0223] -归因于该vWF相关疾病之死亡率降低10％、20％、30％，优选至少40％或甚至至少50％，诸如60％、70％、80％、90％或甚至100％；

[0224] -归因于该vWF相关疾病之死亡率降低1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.75倍、1.8倍、2倍或大于2倍，诸如3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或甚至10倍，或甚至诸如20倍、50倍或甚至100倍；

[0225] -不应性降低优选至少10％、20％、30％、40％或甚至至少50％，诸如60％、70％、80％、90％或甚至100％；及/或

[0226] -不应性降低一倍、2倍或大于2倍，诸如3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或甚至10倍，或甚至诸如20倍、50倍或甚至100倍。

[0227] 在一个实施方案中，本发明涉及如本文所描述之方法，其进一步包含测量血小板数；且若该血小板数低于150,000/μl，则重复施用本发明之多肽之该步骤。

[0228] 在一个实施方案中，本发明涉及如本文所描述之方法，其中该患者之该血小板数每天或每2、3、4、5、6、7、8、9或10天，优选至少每周测量。

[0229] 在一个实施方案中，本发明涉及如本文所描述之方法，其中施用本发明之多肽之该步骤重复直至该血小板数为至少150,000/μl。

[0230] 在一个实施方案中，本发明涉及如本文所描述之方法，其中施用本发明之多肽之该步骤重复直至该血小板数在至少2次连续测量时为至少150,000/μl。优选地，该2次连续测量相隔至少24小时，更优选48小时，诸如相隔至少3天，或甚至相隔诸如4、5、6或甚至7天，优选相隔一周。

[0231] 在一个实施方案中，本发明涉及如本文所描述之方法，其中在该血小板数在至少2次连续测量时为至少150,000/μl之后，施用本发明之多肽之该步骤重复至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天，或甚至大于10天，诸如20天，优选大于30天或甚至更久。优选地，该2次连续测量相隔至少24小时，更优选48小时，诸如相隔至少3天，或甚至相隔诸如4、5、6或甚至7天，优选相隔一周。

[0232] 在一个实施方案中，本发明涉及如本文所描述之方法，其进一步包含测量该患者之血小板数；且若该血小板数≥150,000/μl，则重复施用本发明之多肽之该步骤(i)至多30天，诸如至多20天，或甚至15、10、9、8、7、6、5、4、3、2天或甚至1天。

[0233] 在一个实施方案中，本发明涉及一种用于降低有需要之人类之vWF相关疾病之急性发作，诸如TTP发作，例如TTP初次发作及/或复发性发作(优选TTP)之风险及/或预防发作的方法，该方法至少包含以下步骤：

[0234] (i)测量该患者之血小板数；及

[0235] (ii)若该血小板数低于150,000/μl，则向该人类施用5-40mg，诸如10mg或11mg之剂量之包含至少一个针对冯维勒布兰德因子(vWF)之免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)的多

肽；

[0236] 其中施用该多肽降低vWF相关疾病之急性发作，诸如TTP发作，例如TTP初次发作及/或复发性发作(优选TTP)之风险及/或预防发作。

[0237] 在一个实施方案中，本发明涉及一种用于治疗有需要之人类之TTP发作，例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作(优选TTP)的方法，其至少包含以下步骤；

[0238] (i)向该人类施用5-40mg，优选10mg或11mg之第一剂量之包含至少一个针对冯维勒布兰德因子(vWF)之免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)的多肽。

[0239] (ii)进行第一次血浆交换(PE)，优选在步骤(i)之5分钟至8小时内，优选在5小时内。

[0240] 在一个实施方案中，本发明涉及一种用于治疗有需要之人类之TTP发作，例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作(优选TTP)之方法，如本文所描述，其中在步骤(i)(亦即，向该人类施用本发明之多肽)之前进行前述PE，优选在步骤(ii)(亦即，进行第一次PE)之24小时内。

[0241] 在一个实施方案中，本发明涉及一种用于治疗有需要之人类之TTP发作，例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作(优选TTP)之方法，其至少包含以下步骤：(i)进行血浆交换(PE)；(ii)向该人类施用5-40mg，优选10mg或11mg之剂量之包含至少一个针对冯维勒布兰德因子(vWF)之免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)的多肽。优选地，该步骤(i)(亦即，进行PE)及该步骤(ii)(亦即，向该人类施用该本发明之多肽)每天重复一次或两次，持续至多1、2、3、4、5、6或7天。

[0242] 在一个实施方案中，本发明涉及一种用于治疗如本文所描述之有需要之人类之TTP发作，例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之方法，其中步骤(ii)(亦即，向该人类施用该本发明之多肽)在步骤(i)(亦即，进行PE)之15分钟至4小时内进行。

[0243] 在一个实施方案中，本发明涉及一种用于治疗如本文所描述之有需要之人类之TTP发作，例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之方法，其进一步包含优选在步骤(ii)(亦即，向该人类施用该本发明之多肽)之后测量该人类之血小板计数；及若该血小板计数为<150,000/μl，则重复该步骤(i)(亦即，进行PE)及该步骤(ii)(亦即，向该人类施用该多肽)。

[0244] 在一个实施方案中，本发明涉及一种用于治疗如本文所描述之有需要之人类之TTP发作，例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之方法，其进一步包含测量该人类之血小板计数[优选在步骤(ii)(亦即，向该人类施用该本发明之多肽)之后]；及重复步骤(i)(亦即，进行PE)及步骤(ii)(亦即，向该人类施用该多肽)[每天一次/两次]直至该血小板数在至少2次连续测量时为至少150,000/μl。优选地，该2次连续测量相隔至少24小时，更优选48小时，诸如相隔至少3天，或甚至相隔诸如4、5、6或甚至7天，优选相隔一周。

[0245] 在一个实施方案中，本发明涉及一种用于治疗如本文所描述之有需要之人类之TTP发作，例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之方法，其进一步包含在该人类之血小板计数第一次≥150.000/μl之后每天一次施用5-40mg，优选10mg或11mg之剂量之该多肽持续至少1-30天。

[0246] 在一个实施方案中，本发明涉及一种用于治疗如本文所描述之有需要之人类之TTP发作，例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之方法，其进一步包含优选在步骤(ii)(亦即，向该人类施用该多肽)之后测量该人类之ADAMTS13活性。

[0247] 在一个实施方案中，本发明涉及一种用于治疗如本文所描述之有需要之人类之TTP发作，例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之方法，其中重复步骤(i)(亦即，进行PE)及步骤(ii)(亦即，向该人类施用该本发明之多肽)直至ADAMTS13活性[第一次]大于参考ADAMTS13活性之15％或20％或甚至30％。

[0248] 在一个实施方案中，本发明涉及一种用于降低有需要之人类之缺血损伤、器官损伤、不应性及/或微血栓形成[因vWF相关疾病，诸如TTP，TTP发作，例如TTP初次发作及/或复发性发作引起]之风险及/或预防其的方法，该方法至少包含以下步骤：(i)向该人类施用5-40毫克/天，优选10毫克/天或11毫克/天之剂量之包含至少一个针对vWF之ISVD的多肽；其中该多肽之施用使缺血损伤、器官损伤、不应性及/或微血栓形成之风险降低及/或预防10％、20％、30％，优选至少40％，或甚至至少50％，诸如60％、70％、80％、90％或甚至100％。优选地，该多肽之施用使缺血损伤、器官损伤、不应性及/或微血栓形成之风险降低及/或预防1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.75倍、1.8倍、2倍或大于2倍，诸如3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或甚至10倍，或甚至诸如20倍、50倍或甚至100倍。

[0249] 在一个实施方案中，本发明涉及一种方法，其中施用该多肽之该步骤重复至少1、2、3、4、5、6、7天，或甚至更久，诸如1周、2周、3周或甚至更久，诸如1个月或甚至2个月。

[0250] 在一个实施方案中，本发明涉及一种进一步包含优选每周一次测量该患者之ADAMTS13活性的方法。

[0251] 在一个实施方案中，本发明涉及一种方法，其中当ADAMTS13活性[第一次]≥参考ADAMTS13活性之10％，诸如大于15％或甚至大于20％时，施用该多肽之该步骤重复至少1、2、3、4、5、6、7天，或甚至更久，诸如1周、2周、3周或甚至更久，诸如1个月或甚至2个月。

[0252] 在一个实施方案中，本发明涉及一种治疗罹患该疾病之人类之vWF相关疾病，诸如TTP之症状的方法，其包含以能有效地治疗罹患该疾病之人类之vWF相关疾病之症状的量向个体施用本发明之多肽。

[0253] 在一个实施方案中，本发明涉及一种抑制人类之vWF相关疾病，诸如TTP之发病或进展的方法，其抑制通过包含至少一个针对冯维勒布兰德因子(vWF)之免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)之多肽结合至vWF来实现，该方法包含以预定时间间隔向人类施用有效抑制性剂量之该多肽，其中每次施用多肽向人类递送0.1mg/kg至25mg/kg人类体重，优选10mg或11mg之该多肽(若该人类具有≥40kg之体重)及5mg(若该体重＜40kg)，以便由此抑制人类之疾病之发病或进展。

[0254] 在一个实施方案中，本发明涉及一种降低vWF相关疾病所导致之人类收缩性缺血器官损伤之可能性的方法，该方法包含向人类施用预定剂量之包含至少一个针对冯维勒布兰德因子(vWF)之免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)的多肽，其中每次施用抗体向人类递送0.1mg/kg至25mg/kg人类体重，优选10mg或11mg之该多肽(若该人类具有≥40kg之体重)及5mg(若该体重＜40kg)，以便由此降低人类收缩性缺血器官损伤之可能性。

[0255] 详述

[0256] 如技术人员清楚，除非另外指明，否则所有未特定详细描述之方法、步骤、技术及操作可以本身已知之方式进行且已以本身已知之方式进行。例如再次参考标准手册及本文中提及之一般背景技术及其中引用之其他参考文献；以及例如以下评述上文Scully等人2017及Presta，Adv.Drug Deliv.Rev.2006，58(5-6)：640-56；Levin及Weiss，

Mol.Biosyst.2006,2(1):49-57;Irving等人,J.Immunol.Methods,2001,248(1-2),31-45;Schmitz等人,Placenta,2000,21Suppl.A,S106-12,Gonzales等人,Tumour Biol.,2005,26(1),31-43,其描述蛋白质工程,诸如亲和力成熟之技术及用于改善诸如免疫球蛋白之蛋白质之特异性及其他所需特性之其他技术。除非另外指明,否则本文中未尤其详细定义之所有术语在相关领域中已知且将为技术人员明显可见的;以及例如上文Scully等人2017,其描述TTP及相关血栓性微血管病中之术语标准化一致。

[0257] 必须注意,如本文所使用,除非上下文另外明确指示,否则单数形式“一(a/an)”及“该(the)”包括复数个提及物。因此,例如对”试剂”之提及包括此类不同试剂中之一或多者,且对”方法”之提及包括提及一般技术人员已知的可对本文所描述之方法进行修改或取代的等效步骤及方法。

[0258] 除非另外指示,否则在一系列要素之前的术语”至少”应理解为指系列中之每个元素。技术人员将认识到或能够仅使用常规实验即可确定本文所描述之本发明特定实施方案的许多等同方案。此类等同方案欲由本发明涵盖。

[0259] 本文各处所用之术语”及/或”包括含义”及”、”或”及”由该术语连接之要素之所有或任何其他组合”。

[0260] 如本文所使用,术语”约”或”大致”意谓在既定值或范围之20%内、优选15%内、更优选10%内且最优选5%内。

[0261] 在整个本说明书及随后之申请专利范围中,除非本文另有规定,否则”包含(comprise)”一词及变化形式(诸如”包含(comprises/comprising)”)应理解为暗示包括所述整体或步骤或整体或步骤之群组但不排除任何其他整体或步骤或步骤或整体或步骤之群组。当在本文中使用时,术语”包含”可以用术语”含有”或”包括”取代,或有时当在本文中使用时,用术语”具有”取代。

[0262] 在TTP情况中,阶段III(海格立斯(Hercules))研究中进一步评估及展现本发明之多肽,尤其ALX 0081之治疗潜能。

[0263] 已展现,具有初次aTTP发作之患者在基线时与具有复发性疾病发作之彼等者相比具有延迟的表现及更严重的疾病。甚至在此更严重疾病情况中,显示用卡帕珠单抗治疗改善结果(实施例7.11)。特定言之,已展现,本发明之多肽,诸如ALX 0081及ALX 0081-A改善结果,包括相比于安慰剂具有较快的血小板计数响应时间、治疗期间患者死亡、复发或重度TE事件之比例较低、较低的总体治疗期期间之复发率及预防不应性。

[0264] TTP为具有复发性发作或爆发,亦即,需要每次发作之即刻治疗之单独的复发性疾病事件之急性疾病。如本文所使用,”TTP初次发作”(亦表示为”初次TTP发作”)为个体第一次呈现TTP发作或爆发。如本文所使用,”TTP复发性发作”(亦表示为”复发性TTP发作”)为初次TTP发作之后的任何TTP发作。

[0265] 本发明亦至少部分地基于以下发现:通过本发明之多肽,诸如ALX 0081或ALX 0081-A,经由快速阻断vWF介导之血小板黏着,提供aTTP之新颖治疗选择方案。特定言之,卡帕珠单抗治疗改善治疗结果,如健康护理资源利用有意义的降低所反映,包括PE天数、住院持续时间及ICU中花费之天数(实施例7.12)。

[0266] 进一步展现,包含至少一个结合vWF之ISVD的本发明之多肽,诸如ALX 0081或ALX 0081-A之施用在经历aTTP恶化之患者中有效(实施例7.13)。

[0267] 另外，展现包含至少一个结合vWF之ISVD的本发明之多肽，诸如ALX 0081或ALX 0081-A之施用在不应性降低之患者中有效。

[0268] 尽管利用PE及输血之TTP之目前疗法已明显降低TTP死亡率，显示施用包含至少一个结合vWF之ISVD的本发明之多肽，诸如ALX 0081或ALX 0081-A之一线疗法为特别有利的。举例而言，当使用卡帕珠单抗作为一线疗法时，有价值的时间可能增加。

[0269] 因此，本发明使得作用出乎意料地持续及延长，恶化减少，住院缩短，罹病率降低，所需PE次数减少，局部缺血减少，不应性降低，器官损伤减少及/或死亡人数减少，即使在初次TTP发作之更严重疾病情况中。

[0270] 因此，本发明涉及本发明之多肽之用途，其用于治疗或改善患者之vWF相关疾病，诸如TTP，响应时间出乎意料地较大降低，通过血小板恢复加速所展现。本发明亦提供不太频繁的PE，同时仍在出乎意料地延长的时间段下保持人类患者之血小板恢复。因此，提供通过向该患者施用本发明之多肽减少人类患者之响应时间的方法，其中多肽施用量能有效地改变TTP之一或多个疾病标记物，诸如血小板数目、血小板减少、神经认知功能、ADAMTS13水平及抗ADAMTS13抗体滴度、ADAMTS13活性水平、心脏标记物(肌钙蛋白T(TnT或cTnT)或肌钙蛋白I(TnI或cTnI))、BNP(大脑利尿钠肽)或N端促大脑利尿钠肽(NT proBNP)及大脑损伤标记物(诸如NSE(神经元特异性烯醇酶)及Sβ100(S100beta))，优先血小板之数目提高。

[0271] 另外，当向人类TTP患者施用时，本发明之多肽为安全的，如通过安全实验室标记物，诸如RICO、vWF及FVIII染色体基因所检验。尽管有出血风险提高的可能，但此为完全可处理的。

[0272] 可使用技术人员已知及使用之标准方法测量标记物，诸如各种基于免疫学之分析，包括酶联免疫吸附测定(ELISA;亦称为酶免疫测定法(EIA))、放射免疫测定或免疫酶测定。适合时，亦可使用基于化学、比色及酶促之测定。

[0273] 因此，本发明提供一种包含至少一个针对vWF之ISVD之多肽，优选ALX 0081或ALX 0081-A，其通过向人类重复施用5-40mg剂量之该多肽而用于治疗有需要之人类之vWF相关疾病，诸如TTP，其中在该剂量之后15分钟至4小时内进行第一次PE。

[0274] 相对于PE程序，施用本发明之多肽作为特定时间之辅助治疗以治疗或预防(例如减少或改善与其相关的一或多个症状)vWF相关疾病，例如TTP。

[0275] 术语”治疗”(treating、treatment)系指以能有效地改善与疾病相关之病况、症状或参数或预防疾病进展直至统计显著程度或技术人员可检测之程度的量、方式及/或模式施用疗法。在治疗用途之情况下，治疗可使得个体之疾病或病况改善、治愈、维持或持续时间缩短。在治疗用途中，个体可具有症状之部分或完全表现。在典型的案例中，治疗改善个体之疾病或病况直至医师可检测之程度或预防疾病或病况恶化。举例而言，如表1中所描绘或如TTP治疗指南(上文Scully等人2012)中所提供之TTP之急性发作之临床特征及迹象得到改善。举例而言，归因于治疗，血小板计数标准化，ADAMTS13自体抗体滴度降低及/或ADAMTS13活性提高，全部在本领域中已知及/或本文中进一步详述(参见下文)。有效量、方式或模式可视个体而变化且可调适于个体。

[0276] 术语”治疗期”系指患者经治疗之时间间隔，其可包括PE及/或施用本发明之多肽及任选地其他药物，诸如类固醇或利妥昔单抗(rituximab)。在一优选实施方案中，治疗期系指向有需要之患者施用本发明之多肽，其中该施用重复至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天，

或甚至超过10天，诸如20天，优选超过30天，诸如2个月、3个月、4个月、5个月、6个月或甚至更久。

[0277] 如本文所使用，术语”预防”意谓缓解所提及之病症之症状。特定言之，该术语涵盖向个体施用本发明之多肽之治疗学上积极的作用之完整范围，包括vWF相关病症，例如TTP及其症状减少、缓解及减轻。术语”预防”包括预防或推迟疾病发育，预防或推迟症状发育及/或降低将或预期产生之此类症状之严重程度。此等进一步包括改善现有症状，预防额外症状及改善或预防症状之潜在病因。

[0278] 如本文所使用，术语”个体”及”患者”可互换地使用。如本文所使用，术语”个体(subject)”及”个体(subjects)”系指动物，例如哺乳动物，包括非灵长类动物(例如牛、猪、马、驴、山羊、骆驼、猫、狗、天竺鼠、大鼠、小鼠、绵羊)及灵长类动物(例如猴，诸如食蟹猕猴；大猩猩黑猩猩及人类)。”患者”优选系指人类。该患者可包括任何年龄之老年人、成人、青少年及儿童，例如2岁至小于12岁范围内之儿童；12岁至小于18岁范围内之青少年；18岁至小于65岁范围内之成人；及65岁及65岁以上的老年人。

[0279] 可治疗之vWF相关疾病之非限制性实例包括(但不限于)例如急性冠状动脉综合征(ACS)、暂时性大脑缺血性发作、不稳定或稳定心绞痛、中风、心肌梗死、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)及厄普肖-舒尔曼综合征(Upshaw-Schülman syndrome)，优选TTP。

[0280] 治疗或预防vWF相关疾病，诸如TTP之PE程序已描述于关于诊断及处理TTP及其他血栓性微血管病之共识及指南(上文Scully等人2017)中，其以引用之方式明确并入本文中。完全缓解定义为正常血小板计数，亦即，≥150,000/μl，且任选地不存在恶化(参见上文Scully等人2012,2017)。

[0281] 如本文所使用，”响应时间”为具有TTP急性发作，例如TTP初次发作及/或复发性发作之患者的第一次治疗与≥150,000/μl之血小板计数之间的时间，其中第一次治疗为PE或施用本发明之多肽或两者，无论哪个最早。

[0282] 如本文所使用，术语”不应性”或”难治性”系指持续性血小板减少，缺少持续血小板计数递增或血小板计数＜50×109 L-1，且LDH含量(>1.5ULN)持久升高，尽管有5次PE及类固醇治疗，包括个体未能达到缓解或其血小板计数及LDH含量改善，尽管持续进行治疗，但恶化。

[0283] 术语”血浆交换”(“PE”或”PEX”)系指经由移除大量血浆来治疗多种疾病，包括TTP之治疗程序，亦即，移除较大体积之血浆(通常1至1.5血浆体积量，其经替代流体置换)之程序(Winters 2012Hematology ASH Education Book 1:7-12)。经由血浆大量移除及替代，PE可移除病理性物质，诸如针对ADAMTS13及ULvWF之自体抗体，以及某些血小板。当治疗TTP时，血浆可用作代替ADAMTS13之替代流体(McLeod Best Pract Res Clin Haematol.2006;19:157-167)。血浆大量移除及替代亦牵涉到实验室测试，因此使患者测试变得错综复杂。

[0284] 因为PE涉及血浆大量移除，因此血浆中所循环的任何物质都会被移除。因此，此程序为非选择性的，正常及病理性血浆组分两者都会被移除，以及PE之前施用的治疗TTP之任何药物也会被移除。

[0285] 不管PE在治疗TTP方面之益处，在本发明中，显示卡帕珠单抗在作为一线疗法开始时为有利的。术语”一线”疗法(或一线治疗)系指针对疾病，例如TTP给出之第一次治疗(亦称为”第一线”治疗)。紧接于一线疗法，可添加或替代使用额外治疗，诸如PE及辅助免疫抑

制治疗(例如皮质类固醇,诸如(甲基)-泼尼松龙(prednisolone)或(甲基)-泼尼松;或利妥昔单抗)、抗血小板药剂(例如阿司匹林(aspirin))、具有红血球输注或叶酸补充之支持疗法、长春新碱(vincristine)或环孢素(cyclosporin)治疗、抗自体ADAMTS13抗体或ADAMTS13。

[0286] 技术人员非常熟悉测定血小板之数目。可通过本领域中已知之任何方法,诸如手动地使用血细胞计数器或用自动化分析器进行血小板计数,例如电子计数。在血液涂片检验期间亦可评估计数。显微镜方法使用相差显微镜来在血球计载玻片上检视血液。血小板之电子计数为最常见方法。存在两种类型之电子计数,电压脉冲及电光学计数系统。举例而言,ADVIA®血液学分析器可用于获得血小板计数且通过在Wright's染色血液涂片上估算计数来检验所获得之计数。ADVIA通过流式细胞测量术,基于光散射原理测量血小板。举例而言,通过血小板尺寸(＜30FL,低角度光散射)及折射率(n＝1.35至n＝1.40或高角度光散射)来鉴别血小板。

[0287] 在TTP急性发作,例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之后的各种患者中,在该患者已接受PE(“先前的PE”;施用第一剂量之本发明之多肽之前的PE)之后施用包含至少一个针对vWF之ISVD的本发明之多肽,例如ALX 0081或ALX 0081-A。

[0288] 因此,本发明涉及对有需要之患者,例如具有TTP急性发作,例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之患者进行PE(先前的PE),继而在该先前的PE 24小时内进行下一次PE,且在开始该下一次PE之前约8小时、7小时、6小时、5小时、4小时、3小时、3小时、1小时、45分钟、30分钟、20分钟、15分钟、10分钟或甚至5分钟,诸如在开始该下一次PE(“第一次PE”)之前6小时至15分钟施用本发明之多肽(“第一剂量”)。在本发明中,术语”第一剂量”意谓例如在TTP急性发作,例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之后向有需要之患者第一次施用本发明之多肽。

[0289] 在一个实施方案中,在向患者施用优选第一剂量之本发明之多肽之后5分钟至8小时,诸如10分钟至6小时或15分钟至4小时内,例如8小时、7小时、6小时、5小时、4小时、3小时、3小时、1小时、45分钟、30分钟、20分钟、15分钟、10分钟或甚至5分钟内进行PE。

[0290] 在本发明中,术语”第一次PE”意谓在向患者施用第一剂量之本发明之多肽之后(或在一些情况下同时)进行的第一次PE。

[0291] 本发明之多肽可施用或用于以液体溶液(例如可注射及可输注溶液)形式施用。此类组合物可通过肠胃外模式(例如皮下、腹膜内或肌肉内注射)或通过吸入施用。如本文所使用之词组”肠胃外施用”及”肠胃外地施用”意谓肠内及局部施用除外之施用模式,通常通过注射,且包括皮下(s.c.)或肌肉内施用以及静脉内(i.v.)、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、表皮下、囊下、蛛膜下、脊柱内、硬膜外及胸骨内注射及输注。优选地,本文所描述之本发明之多肽之第二或另一剂量皮下施用。

[0292] 优选地,在TTP急性发作,例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之后,第一剂量之本发明之多肽之施用为静脉内推注注射,例如经由静脉内管线递送多肽,在一分钟或两分钟之时间段内全部一次施用。甚至更优选地,在TTP急性发作,例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之后,第一剂量之本发明之多肽之施用为静脉内推送注射,例如经由静脉内管线递送多肽,在约30秒或更短的时间段内全部一次施用。

[0293] 本发明人考虑到,本发明之多肽使用安全,如先前研究中健康志愿者及TTP患者

(参见实施例)之目前研究中所展现;TTP可能难以诊断,尤其初次TTP发作;及在开始治疗之前损失的任何时间导致困境,推断此发现具有以下益处:本发明之多肽治疗可已适时开始,甚至在患者进入医院,诸如在救护车中之前。优选地,本发明之多肽,诸如ALX 0081或ALX 0081-A通过静脉内推送注射施用,因为此可容易在医院外进行,因此节省宝贵的时间。

[0294] 因此,本发明涉及在开始PE之前约8小时、7小时、6小时、5小时、4小时、3小时、3小时、1小时、45分钟、30分钟、20分钟、15分钟、10分钟或甚至5分钟,诸如在开始PE("第一剂量")之前6小时至15分钟向需要其之患者,诸如具有TTP急性发作(acute episodes)(急性发作(acute bouts)),例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之患者施用本发明之多肽。

[0295] 在一个实施方案中,在TTP急性发作,例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之后,施用第一剂量之本发明之多肽,继而进行PE("第一次PE")。此第一次PE(无论是否在先前的PE之前)之后为施用第二或进一步剂量之本发明之多肽("第二剂量"或"另一剂量")。优选地,第二剂量或另一剂量在第一次PE之后120、90或60分钟内,诸如1-60分钟内,例如50、45、40、35、30、25、20、15、10、5、4、3、2或甚至1分钟内施用。在一些情况下,可能有利的是,与替代流体,例如PE之血浆一起或同时施用第二或另一剂量。

[0296] 在额外实施方案中,本发明之多肽之第一剂量、第二剂量或另一剂量为约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35或40、50、60、70或80mg,优选5-40mg,甚至更优选10mg或11mg,其可优选每天向有需要之患者施用。对于向青少年患者,诸如儿童及青少年施用,剂量可调节适于患者之重量。在特定实施方案中,剂量为约0.01、0.025、0.05、0.075、0.1、0.12、0.14、0.15、0.16、1.08、0.2、0.22、0.24或0.25mg/kg,优选0.143mg/kg,其对应于70kg成年人中之10mg剂量。在其他实施方案中,若该儿童或青年之体重为<40kg,则剂量为约5mg。

[0297] 在一个实施方案中,本发明涉及在PE程序,例如第一次PE、第二次PE或再一次PE之后1-60分钟内施用约5至40mg,优选10mg或11mg本发明之多肽,例如ALX 0081或ALX 0081-A。

[0298] 在一个实施方案中,每天一次或每天两次向有需要之TTP患者,优选血小板计数低于100,000/μl血浆之患者及/或ADAMTS13活性≤10%,诸如≤5%之患者施用本发明之多肽,例如ALX 0081或ALX 0081-A。

[0299] 在另一实施方案中,有需要之TTP患者用以下治疗:(i)PE;及(ii)在步骤(i)之该PE之后5-40mg,优选10mg或11mg之剂量之该多肽持续60分钟至1分钟,其中步骤(i)及步骤(ii)每天重复一次或两次直至该患者之血小板计数为至少50,000/μl血浆,诸如每μl血浆75,000、100,000、125,000或甚至150,000。

[0300] 在一些情况下,可能有利的是,在完全缓解(≥150,000/μl血浆之血小板计数)之后重复步骤(i)及步骤(ii)持续至少两天。

[0301] 在一个实施方案中,在该患者之血小板计数为≥150.000/μl血浆之后,尤其当该患者之ADAMTS13活性≤10%,诸如≤5%时,或在最后一次PE之后,每日或每天两次施用5-40mg本发明之多肽持续至少5、10、15、20、25、30、60、90或甚至120天。

[0302] 因此,在TTP急性发作,例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之后向人类TTP患者施用包含至少一个针对vWF之ISVD之多肽,诸如ALX 0081或ALX 0081-A使得响应时间出人意料地降低,其与该多肽之施用及该PE之次序无关,例如无论在施用第一剂量之本发明之

多肽之前或之后进行PE。

[0303] 进一步出人意料地发现，当患者切换为开放标记(“OL”)卡帕珠单抗以及再引发每日血浆交换(PEX)及免疫抑制，同时初次治疗配置保持不知情(参见实施例7.13)时，双盲(DB)治疗期间恶化次数降低。

[0304] 如本文所使用之术语”恶化”系指在确认的血小板响应之后的复发性血小板减少且需要在≥1天之后但在最后一次每日PE之后≤30天再引发每日PE治疗。

[0305] 此指示本发明之多肽，诸如ALX 0081或ALX 0081-A可单独负责治疗及/或缓解TTP(症状)。

[0306] 因此，本发明涉及一种包含至少一个针对vWF之ISVD之多肽，诸如ALX 0081或ALX 0081-A，其通过向人类施用1-80mg或5-40mg，诸如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、60、70或80mg，优选10mg或11mg之剂量之该多肽(若该人类具有≥40kg之体重)及5mg(若该体重为＜40kg)而用于治疗有需要之人类之vWF相关疾病，诸如TTP。

[0307] 基于本文中之惊人的观测结果，本发明人本质上基于以下想法设计另一优化处理方案：与安慰剂组相比，在CAP(卡帕珠单抗)组中，确认的血小板响应时间之分布较短且无偏斜且偏向右边(实现响应之时间更长)。在进一步优化处理方案中，所有个体用固定PE治疗期治疗，其设定3-5天，诸如3天或4天或5天，优选3天。在此情况下，PE治疗期可与血小板恢复(≥150,000/μl)无关。在进一步优化治疗方案中，患者负荷及成本降低。

[0308] 因此，本发明涉及一种包含至少一个针对vWF之ISVD之多肽，诸如ALX 0081或ALX 0081-A，其用于治疗有需要之人类之vWF相关疾病，其包含：(i)进行PE；及(ii)在步骤(i)之该PE之后施用5-40mg，诸如10mg或11mg之剂量之本发明之多肽15分钟至4小时，其中步骤(i)及步骤(ii)每天重复一次持续3-5天，诸如3天、4天或5天，优选3天；继而进一步包含在该患者之血小板计数第一次为≥150.000/μl之后每天一次施用5-40mg，诸如10mg或11mg之剂量之该多肽持续至少10天，诸如至少20天或至少30天及/或至少10天，诸如至少20天或至少30天。

[0309] 在本发明研究中，已随访观察TTP患者之缓解长达一年。如本文所使用之术语”缓解”称作确认的血小板响应且不存在恶化。如本文所使用之术语”确认的血小板响应”系指如通过≥150,000/μL之血小板恢复所定义之治疗响应时间，该响应必须在通过从头测量血小板≥150,000/μL及优选LDH≤2X ULN而初次报导血小板恢复高于150,000/μL之后48小时确认。

[0310] 如上所指出，血小板计数为用于评定缓解之主要手段。具有典型TTP病史之患者中之ADAMTS13活性之测量为重要的，因为较低水平已显示预测复发。然而，目前不清楚(且数据冲突)ADAMTS13抑制性抗体之滴度为明显的，亦即，与具有较低滴度之彼等者相比具有较高滴度抗ADAMTS13抗体之彼等个体更可能复发。技术人员了解，ADAMTS13之目前测试在静态条件下进行且并不始终精确反映活体内发生之生理变化(http://practical-haemostasis.com/Miscellaneous/Miscellaneous%20Tests/adamts13_assays.html)。

[0311] 当开始治疗，例如施用第一剂量之本发明之多肽，诸如ALX 0081或ALX 0081-A时，较低基线ADAMTS13活性(亦即，小于10%，诸如小于5%)之个体之亚组的缓解似乎更明显。

[0312] 因此，本发明涉及一种包含至少一个针对vWF之ISVD之多肽，其通过向该人类施用

1-40mg，优选10mg或11mg之第一剂量之该多肽直至该人类之血小板计数为≥150000/μl而用于治疗有需要之人类之vWF相关疾病。在一优选方面中，当施用该多肽时，该人类具有小于10％，诸如小于5％之ADAMTS13活性。

[0313] 如本文所使用之术语"复发"系指晚于最后一次每日PE之后30天发生之TTP之从头事件。

[0314] ADAMTS13活性为TTP复发及其治疗决定可能性之预测标记物。ADAMTS13活性能够预测停止卡帕珠单抗治疗后不久发生之复发。此等复发视为呈现之TTP发作之复发(未消退的疾病活性，基于连续较低ADAMTS13活性)。30天卡帕珠单抗治疗期(PE后)已展现对恶化次数具有明显影响。因此，延长处于复发风险下之彼等患者(亦即，基于ADAMTS13活性，具有潜在疾病活性)之卡帕珠单抗治疗期将维持卡帕珠单抗之保护性作用直至潜在疾病经恰当治疗及消退。相反地，卡帕珠单抗预防治疗将降低TTP新的急性发作之风险。

[0315] 因此，相比于具有较高ADAMTS13活性之患者，本发明之多肽，诸如ALX 0081或ALX 0081-A治疗应继续更长时间段。应向TTP患者施用本发明之多肽以降低复发风险及/或预防复发机会直至ADAMTS13活性为相比于正常或参考活性之至少10％，诸如至少15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％或甚至50％。

[0316] 因此，本发明涉及一种包含至少一个针对vWF之ISVD之多肽，其用于降低有需要之人类之TTP急性发作，例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之风险及/或预防发作，其包含步骤(i)：向该人类施用5-40mg，优选10mg或11mg之剂量之该多肽。优选地，该风险降低至少1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.75倍、1.8倍、2倍或大于2倍，诸如3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或甚至10倍，或甚至诸如20倍、50倍或甚至100倍。优选地，该风险降低10％或甚至诸如20％、30％、40％、50％、60％或多于60％，诸如80％或甚至100％。

[0317] 因此，本发明涉及如本文所描述之多肽，其用于治疗及/或预防如本文所描述之有需要之人类之vWF相关疾病，其中向该人类施用该多肽之该步骤重复至少1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次或10次或甚至超过10次，诸如20次，优选超过30次或甚至更多次。

[0318] 因此，本发明涉及如本文所描述之多肽，其用于治疗及/或预防如本文所描述之有需要之人类之vWF相关疾病，其中向该人类施用该多肽之该步骤重复至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天，或甚至超过10天，诸如20天，优选超过30天，诸如2个月、3个月、4个月、5个月、6个月或甚至更久。

[0319] 因此，本发明涉及如本文所描述之多肽，其用于治疗及/或预防如本文所描述之有需要之人类之vWF相关疾病，其中该剂量每天施用1次或每天施用两次。

[0320] 因此，本发明涉及如本文所描述之多肽，其用于治疗及/或预防如本文所描述之有需要之人类之vWF相关疾病，其进一步包含

[0321] (ii)将ADAMTS13活性与参考ADAMTS13活性进行比较；及

[0322] (iii)若该ADAMTS13活性低于该参考ADAMTS13活性之30％，诸如20％、15％、10％或5％，则重复向该人类施用该多肽之该步骤(i)。

[0323] 因此，本发明涉及如本文所描述之多肽，其用于治疗及/或预防如本文所描述之有需要之人类之vWF相关疾病，其中该患者之该ADAMTS13活性每天或每2、3、4、5、6、7、8、9或10天，优选至少每周一次进行测量及/或比较。

[0324] 因此，本发明涉及如本文所描述之多肽，其用于治疗及/或预防如本文所描述之有

需要之人类之vWF相关疾病，其中重复向该人类施用本发明之多肽之步骤直至该ADAMTS13活性为该参考ADAMTS13活性之至少5％、10％、15％，诸如20％，或甚至30％或更高。

[0325] 因此，本发明涉及一种包含两个抗人类冯维勒布兰德因子(vWF)免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)之多肽，其用于治疗人类之vWF相关疾病之恶化(的症状)，其包含向该人类施用1-80mg，优选5-40mg，甚至更优选10mg或11mg之剂量之该多肽，每天1次或每天2次，直至ADAMTS13活性高于参考ADAMTS13活性之10％；任选地重复该施用步骤直至该ADAMTS13活性高于参考ADAMTS13活性之10％持续至少2天，诸如至少5天、7天或甚至更长，诸如14天、21天或甚至至少1个月。

[0326] 因此，本发明涉及一种包含两个抗人类冯维勒布兰德因子(vWF)免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)之多肽，其用于治疗人类之vWF相关疾病之复发(的症状)，其包含向该人类施用1-80mg，优选5-40mg，甚至更优选10mg或11mg之剂量之该多肽，每天1次或每天2次，直至ADAMTS13活性高于参考ADAMTS13活性之10％；任选地重复该施用步骤直至该ADAMTS13活性高于参考ADAMTS13活性之10％持续至少2天，诸如至少5天、7天或甚至更长，诸如14天、21天或甚至至少1个月。

[0327] 因此，本发明涉及如本文所描述之多肽，其用于治疗及/或预防如本文所描述之有需要之人类之vWF相关疾病，其中重复向该人类施用该多肽之步骤直至该ADAMTS13活性在至少2次连续测量时为该参考ADAMTS13活性之至少5％、10％、15％，诸如20％或30％。优选地，该2次连续测量相隔至少24小时，更优选48小时，诸如相隔至少3天，或甚至相隔诸如4、5、6或甚至7天，优选相隔一周。

[0328] 因此，本发明涉及如本文所描述之多肽，其用于治疗及/或预防如本文所描述之有需要之人类之vWF相关疾病，其中在该ADAMTS13活性在至少2次连续测量时为该参考活性之至少5％，至少10％，至少15％，诸如20％或至少30％之后，重复向该人类施用该多肽之该步骤至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天，或甚至超过10天，诸如20天，优选超过30天或甚至更久。

[0329] 因此，本发明涉及一种包含至少一个针对vWF之ISVD之多肽，其用于降低有需要之人类之TTP急性发作，例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之风险及/或预防发作，其包含步骤(i)：向该人类施用5-40mg，优选10mg或11mg之剂量之该多肽，进一步包含

[0330] -测量该患者之ADAMTS13活性；

[0331] -将该ADAMTS13活性与参考ADAMTS13活性进行比较；及

[0332] -若该ADAMTS13活性为≥该参考ADAMTS13活性之5％，诸如≥10％，或甚至≥15％，或大于20％或30％，则重复该步骤(i)至多30天，诸如至多20天，或甚至15、10、9、8、7、6、5、4、3、2天或甚至1天。

[0333] 因此，本发明涉及一种包含至少一个针对vWF之ISVD之多肽，其用于降低有需要之人类之TTP急性发作，例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之风险及/或预防发作，其至少包含以下步骤：

[0334] (i)任选地测量该患者之ADAMTS13活性；

[0335] (ii)任选地将该ADAMTS13活性与参考ADAMTS13活性进行比较；及

[0336] (iii)若该ADAMTS13活性低于该参考活性之30％、20％、15％、10％或5％，则向该人类施用5-40mg，优选10mg或11mg之剂量之包含至少一个针对vWF之ISVD之该多肽。

[0337] 如本文所使用，对于相比于相关，例如未经治疗之对照群体之个体或在根据本发

明之治疗之前的同一个体中，降低风险或发病率包括降低vWF相关疾病，诸如TTP之适应症、症状或结果的机率或发病率。

[0338] 如本文所使用，vWF相关疾病，诸如TTP之适应症、症状或结果包括以下各者中之任一者：器官损伤、缺血损伤、微血栓形成、恶化、死亡率、复发、不应性；一或多个vWF相关疾病，诸如TTP之疾病标记物，包括血小板数目、血小板减少、神经认知功能、ADAMTS13水平及抗ADAMTS13抗体滴度、ADAMTS13活性水平、心脏标记物(肌钙蛋白T或肌钙蛋白I)、BNP(大脑利尿钠肽)或N端促大脑利尿钠肽(NT proBNP)、肌酐及及大脑损伤标记物(诸如NSE(神经元特异性烯醇酶)及Sβ100(S100beta))，优先器官损伤标记物，诸如LDH水平、肌钙蛋白T及/或肌钙蛋白I水平及/或肌酐水平。

[0339] 降低的风险或发病率可包括延迟或预防vWF相关疾病，诸如TTP之适应症、症状或结果之发病。若vWF相关疾病，诸如TTP之适应症、症状或结果之严重程度降低至使得其不具有临床相关性之水平，则风险或发病率亦可降低。亦即，vWF相关疾病，诸如TTP之适应症、症状或结果可存在，但其水平不会危及个体寿命、活动及/或健康。在某些情况下，在治疗期间及/或治疗期之后，vWF相关疾病，诸如TTP之出现降低至一定程度以使得个体不存在vWF相关疾病，诸如TTP之任何迹象。

[0340] 应了解，不可获得个体之风险降低之实际证明，因为若提供治疗，则无法判断vWF相关疾病，诸如TTP之适应症、症状或结果是否将发生或在此类治疗不存在下将更早发生。因此，风险概念及提高或降低的风险仅系指统计值。另外，vWF相关疾病，诸如TTP之适应症、症状或结果之风险降低可反映于vWF相关疾病，诸如TTP之适应症、症状或结果之严重程度降低中以及vWF相关疾病，诸如TTP之适应症、症状或结果之观测结果不存在或观测结果延迟。

[0341] 应了解，本发明之多肽降低TTP急性发作，例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之风险及/或预防发作。因此，TTP急性发作，例如初次TTP发作及/或复发性TTP发作之适应症、症状或结果亦减轻。给定获得性TTP之病理生理学，由此ULvWF串在微血栓形成时消耗血小板，推论认为血小板计数之恢复为预防进一步微血栓形成之间接量度。与获得性TTP相关之发病率及急性死亡率为此等微血栓之结果。

[0342] 实际上，此推理通过器官损伤标记物之标准化支持。特定言之，结果指示，与接受安慰剂之个体(参见实施例)中相比，在接受本发明之多肽，例如ALX 0081或ALX 0081-A之个体中，诸如肌钙蛋白I及T、LDH及肌酐之器官损伤标记物更快恢复至正常水平。

[0343] 因此，结果表明，此等器官损伤标记物之更快标准化速率与更好临床结果相关，亦即，归因于微血栓引起的器官局部缺血之风险降低及较少器官损伤及不应性降低。

[0344] 因此，本发明涉及如本文所描述之方法，其中

[0345] -器官损伤、缺血损伤及/或微血栓形成之风险降低10％、20％、30％，优选至少40％，或甚至至少50％，诸如60％、70％、80％、90％或甚至100％(例如不存在归因于vWF相关疾病之器官损伤、缺血损伤及/或微血栓形成)；

[0346] -器官损伤、缺血损伤及/或微血栓形成之风险降低1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.75倍、1.8倍、2倍或大于2倍，诸如3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或甚至10倍，或甚至诸如20倍、50倍或甚至100倍；

[0347] -器官损伤、缺血损伤及/或微血栓形成降低优选至少10％、20％、30％、40％，或甚

至至少50％，诸如60％、70％、80％、90％或甚至100％；

[0348] -器官损伤、缺血损伤及/或微血栓形成减少1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.75倍、1.8倍、2倍或大于2倍，诸如3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或甚至10倍，或甚至诸如20倍、50倍或甚至100倍；

[0349] -器官损伤标记物，诸如LDH水平、肌钙蛋白T、肌钙蛋白I水平及/或肌酐水平恢复至正常水平之至少40％，或甚至至少50％，诸如60％、70％、80％、90％或甚至100％；

[0350] -器官损伤标记物，诸如LDH水平、肌钙蛋白T、肌钙蛋白I水平及/或肌酐水平改善正常水平之至少20％，诸如30％或甚至较高，诸如40％，或甚至至少50％，诸如60％、70％、80％、90％或甚至100％。优选地，该器官损伤，诸如LDH水平、肌钙蛋白T、肌钙蛋白I水平及/或肌酐水平、标记物在小于30天治疗内，优选在小于20天治疗内，诸如在小于15、10、9、8、7、6、5、4、3、2天或甚至1天内改善。

[0351] -血小板之数目保持在≥150000/μl下。

[0352] -实现血小板标准化(≥150000/μl)之时间降低至少10％、20％、30％、35％、39％，优选至少40％，或甚至至少50％，诸如60％、70％、80％。

[0353] -恶化风险降低至少10％、20％、30％、40％或甚至至少50％，诸如60％、70％、80％、90％或甚至100％；

[0354] -恶化风险降低一倍、2倍或大于2倍，诸如3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或甚至10倍，或甚至诸如20倍、50倍或甚至100倍；

[0355] -归因于该vWF相关疾病之死亡率降低10％、20％、30％，优选至少40％或甚至至少50％，诸如60％、70％、80％、90％或甚至100％；

[0356] -归因于该vWF相关疾病之死亡率降低一倍、2倍或大于2倍，诸如3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或甚至10倍，或甚至诸如20倍、50倍或甚至100倍；

[0357] -缓解提高1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.75倍、1.8倍、2倍或大于2倍，诸如3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或甚至10倍，或甚至诸如20倍、50倍或甚至100倍-不应性降低优选至少10％、20％、30％、40％或甚至至少50％，诸如60％、70％、80％、90％或甚至100％；及/或

[0358] -不应性降低一倍、2倍或大于2倍，诸如3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或甚至10倍，或甚至诸如20倍、50倍或甚至100倍。

[0359] 如本文所使用，术语”参考活性”系指在进行的分析(其设定为100％)中5个健康个体之平均ADAMTS13活性。举例而言，在荧光共振能量转移(FRET)-vWF73分析中，使用正常人类血浆池产生校准曲线，其中计算各校准样品之消退曲线斜率且用于产生校准曲线(趋势线：y＝ax+b；其中x＝ADAMTS13(％)且y＝△RFU/△时间)。样品之ADAMTS13活性(％)随后计算为：(y-b)×1/a，例如如Kokame等人(Br J Haematol.2005,129:93-100)所描述。实际上，一般而言，与未复发的患者相比，复发的患者具有更低的ADAMTS13活性。

[0360] 因此，本发明涉及一种用于降低有需要之人类之缺血损伤、器官损伤及/或微血栓形成(例如因vWF相关疾病，诸如TTP，TTP发作，例如TTP初次发作及/或复发性发作引起)之风险及/或预防其的多肽，其至少包含以下步骤(i)：向该人类施用5-40毫克/天，优选10毫克/天或11毫克/天之剂量之包含至少一个针对冯维勒布兰德因子(vWF)之免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)的多肽；其中该多肽之施用使缺血损伤、器官损伤及/或微血栓形成之风险

降低及/或预防至少10％、20％、30％，优选至少40％，或甚至至少50％，诸如60％、70％、80％、90％或甚至100％。优选地，该多肽之施用使缺血损伤、器官损伤、不应性及/或微血栓形成之风险降低及/或预防1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.75倍、1.8倍、2倍或大于2倍，诸如3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或甚至10倍，或甚至诸如20倍、50倍或甚至100倍。

[0361] 因此，本发明涉及如本文所描述之用于降低缺血损伤、器官损伤、不应性及/或微血栓形成之风险及/或预防其的多肽，其中施用该多肽之该步骤重复至少1、2、3、4、5、6、7天或甚至更久，诸如1周、2周、3周或甚至更久，诸如1个月或甚至2个月。

[0362] 因此，本发明涉及如本文所描述之用于降低缺血损伤、器官损伤、不应性及/或微血栓形成之风险及/或预防其的多肽，其进一步包含优选每周一次测量该患者之ADAMTS13活性。

[0363] 因此，本发明涉及如本文所描述之用于降低缺血损伤、器官损伤、不应性及/或微血栓形成之风险及/或预防其的多肽，其中当ADAMTS13活性[第一次]为≥参考ADAMTS13活性之5％，诸如≥10％，或甚至≥15％时，施用该多肽之该步骤(i)重复至少1、2、3、4、5、6、7天，或甚至更久，诸如1周、2周、3周或甚至更久，诸如1个月或甚至2个月。

[0364] 因此，本发明涉及本发明之多肽，其用于治疗罹患该疾病之人类之如本文所描述之vWF相关疾病，诸如TTP的症状，包含以能有效地治疗罹患该疾病之人类之vWF相关疾病之症状的量向个体施用本发明之多肽。

[0365] 因此，本发明涉及本发明之多肽，其用于抑制人类之vWF相关疾病，诸如TTP之发病或进展，如本文所描述，其抑制通过包含至少一个针对vWF之ISVD的多肽结合至vWF来实现，包含以预定时间间隔向人类施用有效抑制性剂量之该多肽，其中每次施用抗体向人类递送0.1mg/kg至25mg/kg人类体重，优选10mg或11mg之该多肽(若该人类具有≥40kg之体重)及5mg(若该体重＜40kg)，以便由此抑制人类之疾病之发病或进展。

[0366] 因此，本发明涉及用于降低vWF相关疾病所导致之人类收缩性缺血器官损伤之可能性的多肽，如本文所描述，其包含向人类施用预定剂量之包含至少一个针对冯维勒布兰德因子(vWF)之免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)的多肽，其中每次施用抗体向人类递送0.1mg/kg至25mg/kg人类体重，优选10mg或11mg之该多肽(若该人类具有≥40kg之体重)及5mg(若该体重＜40kg)，以便由此降低人类收缩性缺血器官损伤之可能性。

[0367] 基于此等结果之建模指示保持施用多肽持续本发明之较长时间将在预防急性发作方面为有效的。此有利的特征使得健康风险降低。因此，可推断，本发明之多肽预防复发。

[0368] 因此，本发明涉及优选在预防TTP急性发作时，每1、2、3、4、5、6、7天或甚至2、4、6或8周以1-80mg，诸如5-40mg范围内之剂量施用本发明之多肽。特定有效剂量为10-20mg。在特定实施方案中，剂量包含约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、60、70或80mg，优选10mg或11mg包含至少一个针对vWF之ISVD的多肽，诸如ALX 0081或ALX 0081-A。在体重＜40kg之人类，诸如儿童及青少年体内之特定有效剂量为2-10mg。在特定实施方案中，剂量包含约2、3、4、5、6、7、8、9或10mg，优选5mg包含至少一个针对vWF之ISVD的多肽，诸如ALX 0081或ALX 0081-A。

[0369] 在一个实施方案中，本发明涉及一种预防TTP患者复发之方法，其包含

[0370] (1)任选地通过分析，诸如直接或间接分析测量TTP患者之ADAMTS13活性；

[0371] (2)任选地将TTP患者之ADAMTS1313活性与参考值(正常值)进行比较；及

[0372] (3)若TTP患者之ADAMTS13活性小于参考值之15％,诸如小于10％及小于5％,则施用本发明之多肽,例如ALX 0081或ALX 0081-A;

[0373] 由此预防复发。

[0374] 初步结果表明在第一次PE之前施用第一剂量之本发明之多肽已使得血小板之数目提高。

[0375] 因此,本发明涉及向有需要之患者,诸如经历TTP急性发作,诸如TTP初次及/或复发性发作之患者施用本发明之多肽,其为约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、60、70或80mg,优选10mg或11mg之剂量之包含至少一个针对vWF之ISVD的多肽,诸如ALX 0081或ALX 0081-A。

[0376] 包含至少一个针对vWF之ISVD的本发明之多肽,例如ALX 0081或ALX 0081-A可单独或与第二药剂,例如第二治疗学上或药理学上活性剂组合向个体(例如人类个体)施用以治疗或预防(例如减少或改善与其相关的一或多个症状)vWF相关疾病,例如TTP。

[0377] 可用作第二治疗学上或药理学上活性剂或共配置或具有包含至少一个针对vWF之ISVD的本发明之多肽,例如ALX 0081或ALX 0081-A之药剂之非限制性实施例包括例如辅助免疫抑制治疗(例如皮质类固醇,诸如(甲基)-泼尼松龙或(甲基)-泼尼松;或利妥昔单抗)、抗血小板药剂(例如阿司匹林)、具有红血球输注或叶酸补充之支持疗法、长春新碱或环孢素治疗、抗自体ADAMTS13抗体或ADAMTS13。此类组合疗法可有利地利用较低剂量之所施用的治疗剂,因此避免与各种单一疗法相关之可能的毒性或并发症。

[0378] 在一个实施方案中,本发明涉及本发明之多肽以及免疫抑制治疗,尤其利妥昔单抗之组合疗法,其高效地预防TTP患者复发。优选地,提供组合疗法直至ADAMTS13活性为至少≥正常活性之5％,诸如≥10％、>15％、>20％、25％、30％、35％、40％、45％,或甚至标准化,诸如≥50％。

[0379] 基于临床病史、检验患者及血液膜,TTP保持诊断。ADAMTS13分析帮助确认诊断且监测疾病病程及对额外治疗可能的需求。TTP急性发作可根据表1及例如Scully等人(上文2012,2017)之指南诊断

[0380] 表1TTP急性发作之临床迹象及症状(初次或复发性).

[0381]

血小板减少	紫癜、流鼻血、瘀伤、皮下血斑症、齿龈出血、血尿、 月经过多、胃肠道出血等
神经病征	意识模糊、头痛、轻瘫、失语、发音困难、视觉问题、 脑病、昏迷等
发热	体温>37.5℃
非特异性症状	苍白、黄疸、疲劳、关节痛或肌痛等
肾损伤	蛋白尿、微血尿症等
心脏	胸痛、心脏衰竭、低血压等
胃肠道	腹痛等

[0382] 本发明之任何特定多肽或给药方案之疗效可通过技术人员可使用的方法测定。简言之,在临床试验期间,医学人员可观测患者且通过任何标准组合评定疾病病况。在众多时间点,基于此等标准判定患者之疾病病况之改善,且绘制对患者群体之此等判定组合以评定治疗功效。

[0383] 在例示性实施方案中,可通过任何或全部下文所阐述之标准测量疗效之评定:

[0384] • 治疗之响应时间,由≥150,000/μL之血小板恢复所定义。此响应必须在通过从头测量血小板≥150,000/μL及优选LDH≤2X ULN而初次报导血小板恢复高于150,000/μL之后48小时确认

[0385] • 完全缓解个体之数目

[0386] • TTP恶化之数目(个体)及实现第一次TTP恶化之时间。恶化定义为响应之后的复发性血小板减少且在≥1天之后但≤最后一次每日PE后30天需要再引发每日PE治疗。

[0387] • TTP复发最多1年之个体之数目(定义为稍晚于最后一次每日PE之后30天发生的TTP从头开始事件)及实现第一次TTP复发之时间

[0388] • 每日PE数据,包括与每日PE治疗相关之严重不良事件(SAE)

[0389] • 在完全缓解及1年随访时之神经认知功能,如通过神经认知测试电池所测量。此测试将在Glasgow昏迷评分之前以测量个体意识状态

[0390] • 器官功能障碍之改善及TTP相关病征及症状之改善

[0391] • 在每日PE治疗期内及在后续研究药物治疗期内之总死亡率(包括逐渐降低)

[0392] • TTP之生物标记物之测定,该等生物标记物包括(但不限于)具有血小板反应蛋白重复序列13(ADAMTS13)水平及抗ADAMTS13抗体滴度之解联蛋白样及金属蛋白酶。

[0393] 技术人员熟悉测定功效。

[0394] 举例而言,ADAMTS13活性可使用vWF多聚体之电泳评估以检测蛋白酶未裂解之超大多聚体(Moake等人(1982)The New England journal of medicine 307,1432-1435;Furlan等人(1997)Blood 89,3097-3103 7,8)。可采用FRETS-vWF73(经化学修饰以在被ADAMTS13裂解时发出荧光之vWF片段)测试ADAMTS13活性。在分析中,将FRETS-vWF73添加至患者血浆样品中,且随时间推移测量荧光改变以测定ADAMTS13活性。若存在抑制剂,则常常中和针对ADAMTS13之IgG抗体,其可通过ELISA测量(Kokame等人(2005)British journal of haematology 129,93-100)。备选地或另外,可如例如Vesely等人(上文2003)、Fontana等人(上文2004)或Remuzzi等人(Blood 2002;100:778-7852002)中所描述测定ADAMTS13活性。举例而言,间接ADAMTS13活性分析涉及检测涵盖VWF之A2结构域中之ADAMTS13裂解位点的全长VWF分子或VWF片段中之任一者的产物裂解。(1)胶原蛋白结合分析。在使VWF变性之BaCl2及1.5M脲存在下将正常血浆或纯化VWF与测试血浆样品一起温育。通过ADAMTS13使VWF裂解且通过其结合至胶原蛋白III型测量残余VWF。使用缀合的抗VWF抗体之ELISA分析对结合的VWF进行定量。(2)利托菌素诱导之凝集。此与上述胶原蛋白结合分析类似,但通过利托菌素诱导之血小板凝集,使用血小板凝集器测量残余VWF。(3)功能性ELISA分析。在此分析中,使用VWF上之标记物之抗体将重组VWF片段固定于ELISA平板上。VWF片段编码Tyr1605-Met1606处之A2结构域及ADAMTS13裂解位点且用谷胱甘肽-S-转移酶[GST]-组氨酸[GST-VWF73-His]标记。将血浆添加至固定的GST-VWF73-His片段中且在ADAMTS13裂解位点处发生固定片段之裂解。通过使用仅识别裂解的VWF片段而非交互片段之第二单株抗体测量残余裂解的VWF片段。因此,ADAMTS13活性与残余底物浓度成反比。此方法形成TECHNOZYM®ADAMTS13活性ELISA之基础。

[0395] 技术人员熟悉测定针对ADAMTS13之自体抗体,例如抗ADAMTS13自体抗体可通过ELISA,诸如TECHNOZYM®ADAMTS13 INH ELISA(Technoclone)测定。

[0396] 技术人员熟悉测定人类样品中之利托菌素辅因子活性,例如利托菌素辅因子可在凝集器PAP-8E分析器(Bio/Data corp.)上由Bio/Data corp.之vW Select®测定。

[0397] 技术人员熟悉例如使用Coamatic因子VIII(Chromogenix)在STA-R逸出分析器(Diagnostica Stago)上测定人类样品中之因子VIII。

[0398] 技术人员熟悉例如使用免疫浊度分析(例如使用STA Lia测试vWF:Ag),在STA-R逸出分析器(Diagnostica Stago)上测定人类样品中之冯维勒布兰德因子抗原。

[0399] 技术人员熟悉测定LDH水平。大部分方法系基于分光光度计上基于乳酸脱氢酶之酶促分析。Medbø等人(2000)"Examination of four different instruments for measuring blood lactate concentration".Scand J Clin Lab Invest 60:367-380提供适宜综述。各种公司提供分析,诸如Abnova(目录号KA1653),其测量通过乳酸及丙酮酸之相互转化之LDH之催化,亦即,基于NADH偶联的酶促反应中之四唑鎓盐MTT还原成MTT之还原形式之非放射性比色LDH分析(其展现565nm处之吸光度最大值)。所形成之紫色之强度与酶活性成正比。类似地,在Sigma Aldrich试剂盒(MAK066-1KT)中,LDH使NAD还原成NADH,其尤其通过比色(450nm)分析检测。正常水平提供于以下表1.1中。

[0400] 技术人员熟悉测定肌钙蛋白I及T。一般而言,肌钙蛋白T及I通过免疫分析方法测量,其在多种不同免疫分析平台,例如DPC Immulite、Abbott AxSYM、Bayer ACS:Centaur、Ortho Vitros、Roche Elecsys(第三代)上可供使用。Wu等人(1999)National Academy of

Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice:recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases.Clin Chem.1999年7月;45(7):1104-21提供适宜综述。正常水平提供于以下表1.1中。

[0401] 技术人员熟悉测定肌酐。Peake及Whiting“Measurement of Serum Creatinine-Current Status and Future Goals”Clin Biochem Rev.2006年11月;27(4):173-184提供适宜综述。举例而言,可通过Abcam肌酐分析试剂盒(ab65340)或BioVision's肌酐分析试剂盒测定肌酐含量。在分析中,肌酐通过肌酸酐酶转化成肌酸,肌酸转化成肌氨酸,其尤其氧化以产生与探针反应之产物,产生红色(λ最大=570nm)及荧光(Ex/Em=538/587nm)。正常水平提供于以下表1.1中。因为血液中之肌酐之量与肌肉质量一起提高,所以男性通常具有高于女性之肌酐水平。

[0402] 表1.1:正常值

[0403]

测试	样本	常规单位	SI单位
肌酐	血清	0.7-1.3 mg/dL	61.9-115 μmol/L
乳酸脱氢酶(LDH)	血清	60-160 U/L	1-1.67 μkat/L
肌钙蛋白I	血浆	< 0.1 ng/mL	< 0.1 μg/L
肌钙蛋白T	血清	≤ 0.03 ng/mL	≤ 0.03 μg/L

[0404] 应了解,表1.1中所提供之正常水平可因实验室、男性及女性及年龄不同而不同。然而,技术人员将考虑,视所使用之分析而定,制造商提供之正常水平可通常用作参考,或备选地,在特定情况中如临床师所评定之正常水平。

[0405] 本发明之多肽典型地包含至少一个针对vWF之ISVD。本发明之ISVD结合至vWF及/或对vWF具有亲和力(“针对vWF”)。在本发明之上下文中,”vWF”包括(但不限于)猕猴、狒狒、猪、豚鼠、小鼠及/或人类vWF,且最优选为人类vWF,亦即,SEQ ID NO:20或Genbank条目:NP_000543。

[0406] 优选地,针对vWF之ISVD基本上由4个构架区(分别FR1至FR4)及3个互补决定区(分别CDR1至CDR3)组成,其中:

[0407] a)CDR1包含以下或基本上由以下组成:

[0408] -氨基酸序列YNPMG;或

[0409] -与氨基酸序列YNPMG具有2个或仅1个氨基酸差异之氨基酸序列;

[0410] 及

[0411] b)CDR2包含以下或基本上由以下组成:

[0412] -氨基酸序列AISRTGGSTYYPDSVEG;或

[0413] -与氨基酸序列AISRTGGSTYYPDSVEG具有至少80%,优选至少90%,更优选至少

95％,甚至更优选至少99％序列同一性之氨基酸序列;或

[0414] -与氨基酸序列AISRTGGSTYYPDSVEG具有2个或仅1个氨基酸差异之氨基酸序列;

[0415] 及

[0416] c)CDR3包含以下或基本上由以下组成:

[0417] -氨基酸序列AGVRAEDGRVRTLPSEYTF;或

[0418] -与氨基酸序列AGVRAEDGRVRTLPSEYTF具有至少80％,优选至少90％,更优选至少95％,甚至更优选至少99％序列同一性之氨基酸序列;或

[0419] -与氨基酸序列AGVRAEDGRVRTLPSEYTF具有2个或仅1个氨基酸差异之氨基酸序列。

[0420] 甚至更优选地,针对vWF之ISVD基本上由4个构架区(分别FR1至FR4)及3个互补决定区(分别CDR1至CDR3)组成,其中:

[0421] a)CDR1为YNPMG(SEQ ID NO:21);

[0422] b)CDR2为AISRTGGSTYYPDSVEG(SEQ ID NO:22);及

[0423] c)CDR3为AGVRAEDGRVRTLPSEYTF(SEQ ID NO:23)。

[0424] 甚至更优选地,针对vWF之ISVD由SEQ ID NO:19(12A02H1)表示。

[0425] 优选地,本发明之多肽包含至少两个针对vWF之ISVD或由其组成。

[0426] 甚至更优选地,本发明之多肽包含以下或由以下组成:两个针对vWF之ISVD,其由SEQ ID NO:1-18或24且最优选SEQ ID NO:1(ALX 0081;INN"卡帕珠单抗")或SEQ ID NO:24定义。ALX 0081为二价纳米抗体,其由靶向vWF之两个相同单价建构件组成。ALX 0081-A为ALX 0081加C端丙氨酸。

[0427] 包含至少一个针对vWF之ISVD之多肽(例如SEQ ID NO:1至19或24)可用于治疗vWF相关疾病,尤其血栓性血小板减少性紫癜(TTP)。

[0428] 术语"多肽"及"氨基酸序列"在本文中可互换使用。

[0429] 因此,举例而言,用于本发明中之适合的多肽可包括表A-1中之化合物,例如SEQ ID NO:1-19或24;或与表A-1中之SEQ ID NO:1-19或24中之任一者所定义之化合物具有80％或超过80％,更优选85％或超过85％,最优选90％、95％、96％、97％、98％、99％或超过99％氨基酸序列同一性的化合物(参见关于"序列同一性"之定义章节)。

[0430] 优选地,用于本发明之多肽中之针对vWF之ISVD为12A02H1样化合物。出于本说明书之目的,12A02H1样化合物为包含12A02H1(亦即,SEQ ID NO:19)之化合物或与12A02H1(SEQ ID NO:19)具有80％或超过80％,更优选85％或超过85％,最优选90％、95％、96％、97％、98％、99％或超过99％氨基酸序列同一性之化合物。包含两个针对vWF之ISVD的尤其优选多肽为ALX 0081(SEQ ID NO:1)或ALX 0081-A(SEQ ID NO:24)。

[0431] 诸如骆驼VHH结构域、骆驼化VH结构域或人源化VHH结构域之免疫球蛋白单可变结构域表示快速生长种类之治疗剂。举例而言,针对vWF之免疫球蛋白单可变结构域已描述于WO2004/015425、WO2004/062551、WO2006/074947、WO2006/122825、WO2009/115614及WO2011/067160中。用于本发明之多肽中之更优选免疫球蛋白单可变结构域包括WO06/122825中所描述之改善的纳米抗体。

[0432] 除非另外指明,否则术语"免疫球蛋白序列"无论在本文中是否用于指代重链抗体或常规4-链抗体均用作一般术语以包括全尺寸抗体、其个别链以及其所有部分、结构域或片段(包括(但不限于)抗原结合结构域或片段,分别诸如VHH结构域或VH/VL结构域)。另外,

除非需要更有限解释之情境，否则如本文所使用之术语”序列”(例如在如”免疫球蛋白序列”、”抗体序列”、”可变结构域序列”、”VHH序列”或”蛋白质序列”之术语中)应一般理解为包括相关氨基酸序列以及编码其之核酸或核苷酸序列。

[0433] 术语”免疫球蛋白单可变结构域”(“ISVD”)与”单可变结构域”可互换使用，其定义其中抗原结合位点存在于单一免疫球蛋白结构域上且由单一免疫球蛋白结构域形成之分子。此组免疫球蛋白单可变结构域隔开”常规”免疫球蛋白或其片段，其中两个免疫球蛋白结构域，尤其两个可变结构域相互作用，形成抗原结合位点。典型地，在常规免疫球蛋白中，重链可变结构域(VH)与轻链可变结构域(VL)相互作用，形成抗原结合位点。在此情况下，VH及VL两者之互补决定区(CDR)将造成抗原结合位点，亦即，将涉及抗原结合位点形成之总共6个CDR。

[0434] 相比之下，免疫球蛋白单可变结构域之结合位点由单一VH或VL结构域形成。因此，免疫球蛋白单可变结构域之抗原结合位点由不超过三个CDR形成。

[0435] 因此，术语”免疫球蛋白单可变结构域”不包含常规免疫球蛋白或其片段，其需要至少两个可变结构域之相互作用以便形成抗原结合位点。此亦为”包含”或”含有”免疫球蛋白单可变结构域之本发明之实施方案的情况。在本发明之上下文中，此类实施方案不包括常规免疫球蛋白或其片段。因此，”包含”或”含有”免疫球蛋白单可变结构域之多肽或组合物可涉及例如包含超过一个免疫球蛋白单可变结构域之构建体。备选地，可能存在除免疫球蛋白单可变结构域外之其他成分，例如不同种类之辅助剂、蛋白质标签、着色剂、染料等。然而，此等术语包含常规免疫球蛋白之片段，其中抗原结合位点由单可变结构域形成。

[0436] 一般而言，单可变结构域将为基本上由4个构架区(分别FR1至FR4)及3个互补决定区(分别CDR1至CDR3)组成之氨基酸序列。此类单可变结构域及片段为最优选的以使得其包含免疫球蛋白折叠或能够在适合的条件下用于形成免疫球蛋白折叠。如此，单可变结构域可例如包含轻链可变结构域序列(例如VL序列)或其适合的片段；或重链可变结构域序列(例如VH序列或VHH序列)或其适合的片段；只要其能够形成单一抗原结合单元(亦即，基本上由单可变结构域组成之功能性抗原结合单元，以使得单一抗原结合结构域不需要与另一可变结构域相互作用以形成功能性抗原结合单元，正如例如需要与另一可变结构域相互作用(例如经由VH/VL相互作用)以形成功能性抗原结合结构域之例如常规抗体及scFv片段(单链可变片段)中存在的可变结构域之情况)。

[0437] 在本发明之一个实施方案中，免疫球蛋白单可变结构域为轻链可变结构域序列(例如VL序列)或重链可变结构域序列(例如VH序列)；更具体言之，免疫球蛋白单可变结构域可为来源于常规四链抗体之重链可变结构域序列或来源于重链抗体(例如VHH)之重链可变结构域序列。

[0438] 对于重链抗体及其可变结构域之一般描述，尤其参考本文中引用之现有技术以及WO 08/020079第59页上提及之现有技术及国际申请WO 06/040153第41页至第43页上提及之参考文献列表，其现有技术及参考文献以引用之方式并入本文中。如此等参考文献中所描述，纳米抗体(尤其VHH序列及部分人源化纳米抗体)可尤其由一或多个构架序列中一或多个”标志残基”之存在表征。可在例如WO 08/101985及WO 08/142164中找到纳米抗体之进一步描述，包括纳米抗体之人源化及/或骆驼化，以及其他修饰、部分或片段、衍生物或”纳米抗体融合物”、多价构建体(包括连接序列之一些非限制性实例)及不同修饰以提高纳米

抗体及其制剂之半衰期。

[0439] 举例而言，单可变结构域或免疫球蛋白单可变结构域(或适用作免疫球蛋白单可变结构域之氨基酸序列)可为(单一)结构域抗体(或适用作(单一)结构域抗体之氨基酸序列)、"dAb"或dAb(或适用作dAb之氨基酸序列)或纳米抗体(如本文所定义，且包括(但不限于)VHH序列)；其他单可变结构域或其任一者之任何适合的片段。对于(单一)结构域抗体之一般描述，亦参考本文中引用之现有技术以及EP 0 368 684。对于术语"dAb's"，参考例如Ward等人1989(Nature 341(6242):544-6)、Holt等人2003(Trends Biotechnol.21(11):484-490)以及例如WO 04/068820、WO 06/030220、WO 06/003388及Domantis Ltd.之其他公开专利申请案。亦应注意，虽然由于不来源于哺乳动物而在本发明之情形下不太佳，但单可变结构域可来源于某些鲨鱼物种(例如所谓的"IgNAR结构域"，参见例如WO 05/18629)。

[0440] 特定言之，免疫球蛋白单可变结构域可为Nanobody®(如本文所定义)或其适合的片段。[注意：Nanobody®、Nanobodies®及Nanoclone®为Ablynx N.V.之注册商标]对于纳米抗体之一般描述，参考下文进一步描述以及本文中引用之现有技术，诸如描述于WO 08/020079(第16页)中。

[0441] 免疫球蛋白序列，尤其免疫球蛋白单可变结构域之氨基酸序列及结构可视为(然而不限于此)由四个构架区或"FR's"(其在本领域中及本文中分别称作"构架区1"或"FR1"；"构架区2"或"FR2"；"构架区3"或"FR3"；及"构架区4"或"FR4")构成；该等构架区间杂有三个互补决定区或"CDR's"(其在本领域中分别称作"互补决定区1"或"CDR1"；"互补决定区2"或"CDR2"；及"互补决定区3"或"CDR3")。

[0442] 免疫球蛋白单可变结构域中之氨基酸残基之总数目可在110-120，优选112-115且最优选113之区域中。然而，应注意，免疫球蛋白单可变结构域之部分、片段、类似物或衍生物之长度及/或尺寸不受特别限制，只要此类部分、片段、类似物或衍生物符合本文中概述之其他需求且亦优选适合于本文所描述之目的。

[0443] 因此，在本发明之含义中，术语"免疫球蛋白单可变结构域"或"单可变结构域"包含来源于非人类来源，优选骆驼，优选骆驼重链抗体之肽。其可如先前例如WO 08/101985及WO 08/142164中所描述经人源化。另外，术语包含来源于非骆驼来源，例如小鼠或人类之多肽，其如先前例如WO 08/101985及WO 08/142164中所描述已经"骆驼化"。

[0444] 术语"免疫球蛋白单可变结构域"涵盖不同来源之免疫球蛋白序列，包含小鼠、大鼠、家兔、驴、人类及骆驼免疫球蛋白序列。其亦包括全人类、人源化或嵌合免疫球蛋白序列。举例而言，其包含骆驼免疫球蛋白序列及人源化骆驼免疫球蛋白序列或骆驼化免疫球蛋白单可变结构域，例如骆驼化dAb，如Ward等人(参见例如WO 94/04678及Davies及Riechmann 1994,Febs Lett.339:285及1996,Protein Engineering 9:531)所描述。

[0445] 所有上文所提及之针对vWF之ISVD(或vWF结合剂)已自文献熟知。此包括其制造(尤其参见例如WO2006/122825以及WO2004/062551)。举例而言，ALX 0081或ALX 0081-A如例如WO2006/122825或WO2009/115614中所描述制备。

[0446] 本发明提供之免疫球蛋白单可变结构域优选呈分离形式或基本上分离形式或本发明之蛋白质或多肽之形式部分，其可包含一或多个免疫球蛋白单可变结构域或基本上由一或多个免疫球蛋白单可变结构域组成且其可任选地进一步包含一或多个其他氨基酸序

列(所有任选地经由一或多个适合的接头连接)。举例而言且(但不限于),一或多个免疫球蛋白单可变结构域可用作此类蛋白质或多肽中之结合单元,其可任选地含有一或多个可充当结合单元之其他氨基酸序列(亦即,针对一或多个除细胞相关抗原外之其他靶标),以便分别提供本发明之单价、多价或多特异性多肽,全部如本文所描述。此类蛋白质或多肽亦可呈分离或基本上分离形式。因此,根据本发明,免疫球蛋白单可变结构域包含含有两个或多于两个呈如上文所概述之单一结构域形式之抗原结合单元的构建体。举例而言,具有相同或不同抗原特异性之两个(或更多)免疫球蛋白单可变结构域可连接形成例如二价、三价或多价构建体。通过组合两个或多于两个特异性、双特异性、三特异性等之免疫球蛋白单可变结构域,可形成构建体。举例而言,根据本发明之多肽可包含两个针对靶标A之免疫球蛋白单可变结构域及一个针对靶标B之免疫球蛋白单可变结构域,使其为二价的(对于A)及单价的(对于B)。本发明全部涵盖技术人员可容易设想之此类构建体及其修饰。在特定实施方案中,本发明涉及包含至少两个针对相同靶抗原内之不同表位的免疫球蛋白单可变结构域之双互补位构建体。

[0447] 所有此等分子亦称为"本发明之多肽",其与本发明之"免疫球蛋白序列"或"免疫球蛋白单可变结构域"同义。

[0448] 另外,除非需要更有限解释之情境,否则如本文所使用之术语"序列"(例如在如"免疫球蛋白序列"、"抗体序列"、"可变结构域序列"、"VHH序列"或"蛋白质序列"之术语中)应一般理解为包括相关氨基酸序列以及编码其之核酸序列或核苷酸序列。

[0449] 根据本发明之一个非限制性实施方案,免疫球蛋白序列、Nanobody®或本发明之多肽经糖基化。根据本发明之另一非限制性实施方案,免疫球蛋白序列、Nanobody®或本发明之多肽未经糖基化。

[0450] 如上文所提及,本发明涉及典型地包含至少一个,诸如2个或大于2个针对vWF之ISVD,亦即,结合如本文所定义之抗原(例如冯维勒布兰德因子(vWF)及优选人类vWF(SEQ ID NO:20))及/或对其具有亲和力之ISVD的多肽。

[0451] 在本发明之上下文中,"结合至"某一抗原"及/或对"某一抗原"具有亲和力"具有如例如在抗体及其对应抗原之上下文中理解之本领域中之常见意义。

[0452] 在本发明之特定实施方案中,术语"结合至及/或具有亲和力"意谓免疫球蛋白序列尤其与抗原相互作用,且可与"针对"该抗原之免疫球蛋白序列互换使用。

[0453] 术语"特异性"系指可结合特定免疫球蛋白序列、抗原结合分子或抗原结合蛋白(诸如Nanobody®或本发明之多肽)之不同类型的抗原或抗原决定簇之数目。抗原结合蛋白之特异性可基于亲和力及/或亲合力进行测定。由抗原与抗原结合蛋白之解离平衡常数(KD)表示之亲和力为抗原决定簇与抗原结合蛋白上的抗原结合位点之间的结合强度之量度:KD值愈小,抗原决定簇与抗原结合分子之间的结合强度愈强(或者,亲和力亦可表示为亲和力常数(KA),其为1/KD)。如技术人员将清楚(例如基于本文中之其他揭示内容),亲和力可以本身已知的方式进行测定,其视目的特异性抗原而定。亲合力为抗原结合分子(诸如Nanobody®或本发明之多肽)与相关抗原之间的结合强度之量度。亲合力与抗原决定簇与抗原结合分子上之其抗原结合位点之间的亲和力及抗原结合分子上所存在的相关结合位点之数目两者有关。

[0454] 典型地，本发明之免疫球蛋白序列(诸如氨基酸序列、Nanobodies®及/或本发明之多肽)将结合至其抗原，解离常数(KD)为10-5至10-12摩尔/升或更小，且优选10-7至10-12摩尔/升或更小，且更优选10-8至10-12摩尔/升(亦即，缔合常数(KA)为105至1012升/摩尔或更大，且优选107至1012升/摩尔或更大且更优选108至1012升/摩尔)，及/或结合至如本文所定义之细胞相关抗原，kon速率在102M-1s-1至约107M-1s-1之间，优选103M-1s-1与107M-1s-1之间，更优选104M-1s-1与107M-1s-1之间，诸如105M-1s-1与107M-1s-1之间；及/或如本文所定义之结合至细胞相关抗原，koff速率在1s-1(t1/2＝0.69s)与10-6s-1(提供具有多天之t1/2之接近不可逆复合物)之间，优选在10-2s-1与10-6s-1之间，更优选在10-3s-1与10-6s-1之间，诸如在10-4s-1与10-6s-1之间。

[0455] 大于10-4M之任何KD值(或小于104M-1之任何KA值)一般考虑指示非特异性结合。

[0456] 优选地，本发明之单价免疫球蛋白序列将结合至亲和力小于500nM，优选小于200nM，更优选小于10nM，诸如小于500pM之所需抗原。

[0457] 可以本身已知之任何合适方式，包括例如史卡查(Scatchard)分析及/或竞争性结合分析，诸如放射性免疫分析(RIA)、酶免疫分析(EIA)及夹心竞争分析及本领域中本身已知之其不同变体，以及本文中提及之其他技术，测定诸如抗原结合蛋白与抗原或抗原决定簇之特异性结合。

[0458] 解离常数(KD)可为实际或表观解离常数，如技术人员将明显可见。用于测定解离常数之方法将为技术人员明显可见的，且例如包括本文中提及之技术。在此方面中，亦将明显可见，不可能测量超过10-4摩尔/升或10-3摩尔/升(例如10-2摩尔/升)之解离常数。任选地，技术人员将亦明显可见，可基于(实际或表观)缔合常数(KA)，藉助于关系式[KD＝1/KA]计算(实际或表观)解离常数。

[0459] 亲和力表示分子相互作用之强度或稳定性。亲和力通常以KD或解离常数给出，其单位为摩尔/升(或M)。亲和力亦可表示为缔合常数KA，其等于1/KD且单位为(摩尔/升)-1(或M-1)。在本说明书中，两个分子(诸如氨基酸序列、免疫球蛋白序列、Nanobody®或本发明之多肽及其预期靶标)之间的相互作用稳定性将主要表现在其相互作用之KD值；技术人员明显可见，鉴于关系式KA＝1/KD，通过其KD值指定分子相互作用强度亦可用于计算对应KA值。KD值亦在热力学意义上表征分子相互作用之强度，因为通过熟知关系式DG＝RT.ln(KD)(等效地，DG＝-RT.ln(KA))，其与结合自由能(DG)相关，其中R等于气体常数，T等于绝对温度且ln表示自然对数。

[0460] 对于生物学相互作用，诸如本发明之免疫球蛋白序列与如本文所定义之细胞相关抗原之结合之KD(其考虑为有意义的(例如特定))典型地在10-10M(0.1nM)至10-5M(10000nM)范围内。相互作用愈强，其KD愈低。

[0461] KD亦可表示为复合物之解离速率常数(表示为koff)与其缔合速率(表示为kon)之比率(从而使得KD＝koff/kon及KA＝kon/koff)。解离速率koff单位为s-1(其中s为秒之SI单位符号)。缔合速率kon单位为M-1s-1。

[0462] 关于本发明之免疫球蛋白序列，缔合速率可在102M-1s-1至约107M-1s-1之间变化，接近双分子相互作用之扩散有限缔合速率常数。解离速率通过关系式t1/2＝ln(2)/koff与给定分子相互作用之半衰期相关。本发明之免疫球蛋白序列之解离速率可在10-6s-1(具有多天之t1/2之接近不可逆复合物)至1s-1(t1/2＝0.69s)之间变化。

[0463] 两个分子之间的分子相互作用之亲和力可经由本身已知之不同技术测量，诸如熟知之表面等离振子共振(SPR)生物传感技术(参见例如Ober等人，Intern.Immunology，13，1551-1559，2001)，其中一个分子固定在生物传感芯片上且另一分子在流动条件下穿过固定分子，产生kon、koff测量值，因此得到KD(或KA)值。此可例如使用熟知Biacore仪器进行。

[0464] 技术人员亦清楚，若测量方法例如通过与一分子之生物传感器上之涂层相关的假像而在某种程度上影响所牵涉分子之内在结合亲和力，则所测量之KD可对应于表观KD。此外，若一分子含有超过一个针对另一分子之识别位点，则可测量表观KD。在此类情况下，所测量之亲和力可受两个分子之相互作用之亲合力影响。

[0465] 可用于评定亲和力之另一途径为Friguet等人(J.Immunol.Methods，77，305-19，1985)之2步骤ELISA(酶联免疫吸附测定)程序。此方法建立溶液相结合平衡测量且避免与分子中之一者吸附在诸如塑料之支持体上相关的可能假像。

[0466] 然而，KD之准确测量可能劳动强度非常大，且因此常常测定表观KD值以评估两个分子之结合强度。应注意只要所有测量以一致方式进行(例如保持分析条件不变)，那么表观KD测量值可用作真正KD之近似值，因此在本文件中KD及表观KD应以相同重要性或相关性对待。

[0467] 最后，应注意在许多情况下有经验之科学家可判断宜相对于一些参考分子测定结合亲和力。举例而言，为评估分子A与B之间的结合强度，可例如使用参考分子C，已知分子C结合于B且适合经荧光团或生色团或诸如生物素之其他化学部分标记，用于在ELISA或FACS(荧光激活细胞分选)或其他格式中进行简单检测(荧光团用于荧光检测，生色团用于光吸收检测，生物素用于链霉亲和素介导之ELISA检测)。典型地，参考分子C保持在固定浓度下，且A浓度相对于B之给出浓度或量变化。因此，获得与A浓度相对应的IC50值，在该IC50下在A不存在下针对C测量到之信号减半。假定已知KD ref(参考分子之KD)以及参考分子之总浓度cref，可自下式获得相互作用A-B之表观KD:KD＝IC50/(1+cref/KD ref)。应注意，若cref<<KD ref，则KD≈IC50。假定对于所比较之结合剂而言，测量IC50之方式一致(例如保持cref固定)，那么可通过IC50评估分子相互作用之强度或稳定性，且判断在本文全篇中此测量值等于KD或表观KD。

[0468] 本发明涉及WO2004/015425、WO2004/062551、WO2006/074947、WO2006/122825、WO2009/115614或WO2011/067160中所描述之免疫球蛋白单可变结构域或可通过如所述专利中所揭示之方法获得，所有所述专利均在本申请人名下。

[0469] 本发明亦涵盖此等氨基酸序列之优化变体。一般而言，根据本发明之氨基酸序列之”优化变体”为包含一或多个有利取代，诸如提高i)”人源化”程度、ii)化学稳定性及/或iii)表达水平之取代的变体；而效能(例如通过如WO2006/122825之实验部分中所描述之效能分析测量)与野生型12A02(如WO2006/122825中所定义)保持相当(亦即，在10％偏差内)或与变体12A02H1(SEQ ID NO:19)相当，亦如WO2006/122825所定义。优选地，相比于12A02之野生型序列，本发明之氨基酸序列含有至少一个此类取代及优选至少两个此类取代及优选至少三个人源化取代及优选至少10个此类人源化取代。

[0470] 在一特定方面中，相比于野生型序列12A02，本发明之氨基酸序列含有总共1至15，优选2至14，诸如9至13，例如10、11或12个氨基酸取代。如所提及，此等差异优选至少包含一个及优选至少两个，诸如三个、四个或五个或十个人源化取代，且可任选地包含一或多个其

他取代(诸如如本文中所提及之其他取代(a)至(c)中之任一者或中之任何两者或多于两者之任何适合组合)。再次,基于本文中之揭示内容且任选地在有限程度之试错法之后,技术人员将能够选择(适合的组合)一或多个此类适合的人源化及/或其他取代。

[0471] 本发明涵盖与本文所提供之特定实施例中之任一者或参考上文所定义之特定实施例中之任一者高度类似的多肽序列。高度类似意谓至少90%,例如95、97、98或99%之氨基酸同一性。高度类似多肽序列将具有与来源于vWF(亦即,其将结合至vWF,更尤其结合至且抑制vWF与血小板之间的相互作用),诸如来源于ALX 0081之ALX 0081-A的序列相同的功能。

[0472] 在一特定实施方案中,本发明涉及与SEQ ID NO:1至19或24中之任一者,尤其SEQ ID NO:1高度类似的序列。然而,对于各变异序列,必须评估如本文所定义之制剂之稳定性以使得本发明尤其系指如本文所定义之制剂中稳定之变体或高度类似序列。

[0473] 用以产生本发明之多肽序列之方法为广泛已知的且包括例如重组表达或合成。技术人员非常熟悉适合的表达技术,例如适合的重组载体及宿主细胞,例如细菌或酵母宿主细胞。技术人员亦非常熟悉适合的纯化技术及方案。

[0474] 本发明亦提供包含至少一个针对vWF之免疫球蛋白单可变结构域的多肽,例如ALX 0081或ALX 0081-A之制剂,其为稳定的且优选适合于医药用途,包括药物制备(亦称作"本发明之医药制剂"或"本发明之制剂")。

[0475] 在特定实施方案中,制剂包含一或多个选自SEQ ID NO:1至19或24,优选SEQ ID NO:1之多肽。

[0476] 术语"医药制剂"系指呈准许其中所含活性成分之生物活性有效之形式的制剂,且其不含对制剂将施用之个体具有不可接受毒性之额外组分。此类制剂为无菌的。"医药学上可接受之"赋形剂(载体、添加剂)为可合理地施用个体哺乳动物以提供有效剂量之所用活性成分的那些。

[0477] 如本文所使用之术语"赋形剂"系指赋予制剂有利物理特性、常用作化合物之稀释剂、载体、防腐剂、冻干保护剂、表面活性剂、黏合剂、载体或稳定剂之惰性物质。技术人员熟悉适合于医药目的之赋形剂,其可在制剂中具有特定作用,诸如冻干保护、稳定、保存等。

[0478] "无菌"制剂无菌,或不含或基本上不含所有活微生物及其孢子。此容易通过无菌过滤膜过滤来完成。

[0479] "稳定"制剂为其中蛋白质在储存时基本上保持其物理稳定性及/或化学稳定性及/或生物活性的制剂。优选地,制剂在储存后基本上保持其物理及化学稳定性以及其生物活性。一般基于制剂之预期保质期选择储存期限。本领域中可获得用于测量蛋白质稳定性之各种分析技术且综述于例如Peptide and Protein Drug Delivery,247-301,Vincent Lee编,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,Pubs.(1991)及Jones,A.Adv.Drug Delivery Rev.10:29-90(1993)中。可在所选温度下持续所选时间段测量稳定性。在某些实施方案中,制剂在约40℃下稳定至少约1、2、3、4、5、6、7、8或更多周。此外,制剂优选在冷冻(至例如-20℃或-70℃)及解冻制剂之后,例如在1、2、3、4或5次冷冻及解冻周期后稳定。可以技术人员已知的多种不同方式定性地及/或定量地评估稳定性。稳定性研究显示ALX 0081或ALX 0081-A在-20℃下稳定至少3年。

[0480] 制剂包含水性载体。水性载体在特定缓冲液中。

[0481] 如本文所使用,”缓冲液”系指通过其酸-碱共轭组分之作用来抵抗pH变化的缓冲溶液。本发明之制剂包含选自柠檬酸盐或磷酸盐缓冲液中之至少一者的缓冲液,优选柠檬酸盐缓冲液。如此前所测定,此等缓冲液增强vWF结合剂之稳定性。

[0482] 根据本发明之制剂包含浓度在5-200mM,优选7.5-80mM,甚至更优选10-50范围内,例如10、15、20、25或30mM,且最优选20mM之柠檬酸盐缓冲液,其中各值应理解为任选地涵盖±5mM之范围。备选地,根据本发明之制剂可包含浓度在5-200mM,优选5-80mM,更优选7.5-60mM,甚至更优选10-40范围内,例如10、15、20、25或30mM,且最优选10mM之磷酸盐缓冲液,其中各值应理解为任选地涵盖±5mM之范围。应理解,较低浓度之缓冲液对最终重量摩尔渗透压浓度及相对应地可能必须添加之额外溶质具有作用。

[0483] 本发明之制剂之pH在5.0至7.5范围内,其中各值应理解为涵盖±0.2之范围。最有利的pH将视制剂中所包含之缓冲液而定。因此,本发明尤其关于包含磷酸盐缓冲液之制剂,其优选具有6.5至7.5范围内,优选6.9、7.0、7.1,例如7.1之pH。显示包含柠檬酸盐缓冲液之制剂显著地适合于储存及使用。因此,本发明涉及包含柠檬酸盐缓冲液之制剂,其优选具有6.0与7.0之间,更优选6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8或6.9,例如6.5的pH,其中各值应理解为任选地涵盖±0.2之范围。

[0484] 本发明之制剂将包含本发明之多肽,尤其免疫球蛋白单可变结构域或包含至少一个针对vWF之免疫球蛋白单可变结构域的多肽,诸如ALX 0081或ALX 0081-A,其浓度适合于临床目的,其包括在用于患者身上之前用于稀释之储备溶液中使用之浓度。除改善的稳定之外,本发明之制剂实现高浓度之包含至少一个针对vWF之ISVD的多肽,诸如ALX 0081或ALX 0081-A。

[0485] 本发明之制剂中活性剂(例如包含至少一个针对vWF之ISVD的多肽,诸如ALX 0081或ALX 0081-A)之典型的浓度包含浓度在0.1至150mg/mL,诸如1-100mg/mL,5-80mg/mL,或10-40mg/mL,优选10mg/mL或11mg/ml范围内之非限制性实例,其中各值应理解为任选地涵盖±20%之范围(例如10之值任选地涵盖8至12mg/mL之范围)。

[0486] 在本发明之又一实施方案中,根据本发明之任何方面之制剂可进一步包含去污剂或表面活性剂。

[0487] 本文中,”表面活性剂”系指表面活性剂,优选非离子表面活性剂。本文中之表面活性剂之实例包括聚山梨醇酯;泊洛沙姆(poloxamer)(例如泊洛沙姆188);曲拉通(Triton);十二烷基硫酸钠(SDS);月桂基硫酸钠;辛基糖苷钠;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油醇基-或硬脂酰基-磺基甜菜碱;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油醇基-或硬脂酰基-肌氨酸;亚油醇基-、肉豆蔻基-或十六基-甜菜碱;月桂酸酰氨基丙基-、椰油酰氨基丙基-、亚油酰氨基丙基-、肉豆蔻酰氨基丙基-、棕榈酰氨基丙基-或异硬脂酰氨基丙基-甜菜碱(例如月桂酸酰氨基丙基);肉豆蔻酰氨基丙基-、棕榈酰氨基丙基-或异硬脂酰氨基丙基-二甲胺;甲基椰油酰基牛磺酸钠或甲基油基牛磺酸二钠;及MONAQUAT®系列(Mona Industries,Inc.,Paterson,N.J.);聚乙二醇、聚丙二醇及乙二醇及丙二醇之共聚物(例如Pluronics,PF68等);等。在一个实施方案中,本文中之表面活性剂为聚山梨醇酯80。与本发明一起使用之优选适合的去污剂或表面活性剂包括(但不限于)聚氧化乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯,例如聚山梨醇酯-20、聚山梨醇酯-40、聚山梨醇酯-60、聚山梨醇酯-65、聚山梨醇酯-80或聚山梨醇酯-85。聚山梨醇酯之共同品牌名称包括Alkest、Canarcel及Tween。技术人员已知去污剂之其他非限制性实

例，诸如例如WO2010/077422中列出之彼等者。在一优选实施方案中，去污剂为非离性去污剂。更具体言之，去污剂为聚山梨醇酯-80，亦在下文指定Tween-80。技术人员可容易地测定适合的浓度之本发明之制剂之去污剂。典型地，浓度将尽可能低，同时保持去污剂之有利效果，例如在剪切力(例如搅拌)之条件下使作用稳定化，其减少本发明之配制多肽之凝聚。在例示性非限制性实施方案中，去污剂之浓度可在0.001至0.5％，例如0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.01、0.015、0.02、0.025、0.03、0.035、0.04、0.045、0.05％、0.1％、0.2％、0.3％、0.4％或0.5％范围内，优选浓度在0.01与0.05％之间，更优选在0.01与0.02％之间，例如0.01％(v/v)。

[0488] 本发明之制剂可进一步包含赋形剂，诸如防腐剂。

[0489] “防腐剂”为可任选地包括于制剂中以基本上减少其中的细菌作用，因此促进产生例如多次使用之制剂的化合物。潜在的防腐剂之实例包括十八烷基二甲基苄基氯化铵、氯化六甲双铵、苯扎氯铵(烷基苄基二甲基氯化铵之混合物，其中烷基为长链化合物)及苄索氯铵。其他类型之防腐剂包括芳族醇(诸如苯酚)、丁醇及苄醇、对羟苯甲酸烷基酯(诸如对羟苯甲酸甲酯或对羟苯甲酸丙酯)、儿茶酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇及间甲酚。在一个实施方案中，本文中之防腐剂为苯甲醇。

[0490] 本发明之制剂可进一步包含稳定剂，诸如多元醇。

[0491] “多元醇”为多个羟基之物质，且包括糖(还原性及非还原性糖)、糖醇及糖酸。多元醇可任选地包括于制剂中以例如改善稳定性。在某些实施方案中，本文中之多元醇具有小于约600kD之分子量(例如在约120至约400kD范围内)。”还原性糖”为含有半缩醛基团之一种糖，其可使金属离子还原或与赖氨酸及蛋白质中之其他氨基共价反应，且”非还原性糖”为不具有还原性糖之此等特性之一种糖。还原性糖之实例为果糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖及葡萄糖。非还原性糖包括蔗糖、海藻糖、山梨糖、松三糖及棉子糖。甘露糖醇、木糖醇、赤藻糖醇、苏糖醇、山梨糖醇及丙三醇为糖醇之实例。关于糖酸，此等包括L-葡糖酸盐及其金属盐。在需要制剂冻融稳定之情况下，多元醇优选为不会在冷冻温度(例如-20℃)下结晶之多元醇以使得其使制剂中之抗体不稳定。在某些实施方案中，诸如蔗糖及海藻糖之非还原性糖为多元醇之实例，其中蔗糖优选，不管海藻糖之溶液稳定性如何。

[0492] 通过将具有所需纯度之多肽与呈冻干制剂或水性溶液形式之任选地存在之医药学上可接受之载体、赋形剂或稳定剂(Remington’s Pharmaceutical Sciences第16版，Osol,A.编[1980])混合来制备根据本发明使用之本发明之治疗剂化合物以便储存。可接受之载体、赋形剂或稳定剂在所用剂量及浓度下对接受者无毒。因此，根据本发明之制剂亦可任选地包含一或多种赋形剂。

[0493] 常用稳定剂及防腐剂已为技术人员所熟知(参见例如WO2010/077422)。可用于此等组合物中之医药学上可接受之载体包括(但不限于)离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白质(诸如人类血清白蛋白)、缓冲物质(诸如磷酸盐)、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸、水、盐或电解液之部分甘油酯混合物(诸如硫酸鱼精蛋白)、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶态二氧化硅、三硅酸镁、亲水性聚合物(诸如聚乙烯吡咯啶酮)、基于纤维素之物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、明胶、聚乙烯聚氧化丙烯嵌段共聚物、聚乙二醇及羊毛脂。包括抗坏血酸及甲硫氨酸之抗氧化剂；防腐剂；低分

子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质;及氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸。在有利实施方案中,赋形剂可为选自由以下组成之列表的一或多者:NaCl、海藻糖、蔗糖、甘露糖醇或甘氨酸。

[0494] 亦可例如通过凝聚技术或通过界面聚合将活性成分包埋于所制备之微胶囊中,例如羟基甲基纤维素或明胶微胶囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊分别包埋于胶状药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子及纳米囊剂)中或于大乳液中。此类技术揭示于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编(1980)中。

[0495] 本发明之多肽可配制至任何医药学上可接受之制剂中。制剂可为液态或干燥。制剂可经由用于配制药物组合物之混合、干燥、冻干、真空干燥或任何已知的方法产生。

[0496] 本发明之优选制剂在磷酸盐缓冲溶液(pH 7.1)中包含含有至少一个针对vWF之ISVD的多肽,诸如ALX 0081或ALX 0081-A。甚至更优选地,本发明之制剂在磷酸盐缓冲溶液(pH 7.1)、甘氨酸(0.2M)及聚山梨醇酯80(0.02%v/v)中包含含有至少一个针对vWF之ISVD的多肽,诸如ALX 0081或ALX 0081-A。

[0497] 本发明之多肽可进一步如WO 2014/184352中所描述配制。

[0498] 一种尤其优选制剂,其包含:

[0499] (a)包含至少一个针对vWF之ISVD的多肽,诸如ALX 0081或ALX 0081-A,浓度为约0.1mg/mL至约80mg/mL,优选5mg或10mg或11mg;

[0500] (b)赋形剂,其选自蔗糖、甘氨酸、甘露糖醇、海藻糖或NaCl,浓度为约1%至约15%(w/v);

[0501] (c)Tween-80,其浓度为约0.001%至0.5%(v/v);及

[0502] (d)柠檬酸盐缓冲液,其浓度为约5mM至约200mM以使得制剂之pH为约6.0至7.0。

[0503] 本发明之另一优选制剂包含:包含至少一个针对vWF之ISVD的多肽,诸如ALX 0081或ALX 0081-A,优选浓度为5mg/ml、10mg/ml或11mg/ml;柠檬酸盐缓冲液,其浓度为20mM(pH 6.5);进一步包含7%蔗糖(w/v)及Tween-80,其浓度为0.01%(v/v)。

[0504] 在一些实施方案中,制剂以液体形式储存。在其他实施方案中,制剂以液体形式制备,且随后例如通过冻干或喷雾干燥而干燥,随后储存。经干燥之制剂可用作干燥化合物,例如呈气溶胶或粉末形式或例如使用水、缓冲液或其他适当的液体复原至其初始或另一浓度。

[0505] 本发明亦关于包含填充有含有12.5mg卡帕珠单抗之冻干物及用于注射溶液之赋形剂的小瓶。赋形剂(每mL复原溶液):每小瓶0.21mg柠檬酸、5.58mg柠檬酸三钠二-水合物、70mg蔗糖、0.11mg聚山梨醇酯-80(pH 6.5+/-0.5)。在用1mL注射用水(WFI)复原之后,强度为12.5mg/mL卡帕珠单抗(对于10mg或11mg之施用标称剂量)。

[0506] 本发明亦涵盖可通过进一步处理液体制剂获得之产物,诸如冷冻、冻干或喷雾干燥产物。在复原后,此等固体产物可变为如本文所描述(但不限于)之液体制剂。就其最广义而言,因此,术语"制剂"涵盖液体及固体制剂两者。然而,固体制剂理解为衍生自液体制剂(例如通过冷冻、冷冻干燥或喷雾干燥),且因此具有由本文中之液体制剂指定之特征定义之各种特性。本发明不排除在例如冷冻或喷雾干燥之前导致组合物偏离初始组合物之复原。因此,视相对于原先冷冻干燥之液体体积添加至冻干产物中之水或稀释剂之量而定,冻干制剂可复原以产生具有与初始浓度(亦即,在冻干之前)不同之浓度之制剂。适合的制剂

可通过分析抗体完整性之一或多个参数鉴别。

[0507] 在一优选实施方案中，根据本发明之制剂相对于人类血液等渗。等渗溶液具有与血浆相同的渗透压，且因此可在不改变个体血浆之渗透压之情况下静脉内输注至个体中。张力可以重量摩尔渗透压浓度表示，其可为理论重量摩尔渗透压浓度或优选以实验方式测定之重量摩尔渗透压浓度。典型地，重量摩尔渗透压浓度将在290±60mOsm/kg，优选290±20mOsm/kg范围内。

[0508] 本发明之制剂亦可包含在冷冻干燥期间尤其适用于保护本发明之多肽之化合物。此类化合物亦称为冻干保护剂且已为技术人员所熟知。特定实施方案包括(但不限于)糖类，如蔗糖、山梨糖醇或海藻糖；氨基酸，诸如谷氨酸盐，尤其谷氨酸单钠或组氨酸；甜菜碱、硫酸镁、糖醇、丙二醇、聚乙二醇及其组合。通过理解本发明，技术人员可容易地在考虑呈液体形式之制剂之稳定性且在经受冻干时测定待添加之所需量之此类化合物。尤其适合于冷冻干燥之制剂可此外包含膨胀剂。适合的药剂为技术人员广泛已知。已显示，包含蔗糖之制剂在例如vWF结合剂之储存及冷冻-解冻期间不仅尤其适合于保持物理稳定性，且亦适用作冻干保护剂。

[0509] 如所概述，上述制剂中之任一者可例如通过冻干、喷雾干燥或冷冻，例如整体冷冻而经进一步处理。所得经处理之产物具有来源于如上文所定义之液体起始制剂之特性。必要时，可包括额外药剂以供进一步处理，诸如冻干保护剂等。

[0510] 本发明之制剂在保持本发明之多肽(尤其ALX 0081或ALX 0081-A)之化学及物理完整性之冻干之后，亦即，甚至在延长储存之后在-70℃与+40℃之间的温度下具有作用，例如持续如上文所定义之持续时间，产物之纯度/杂质特征基本上不改变。举例而言，在冻干之后延长储存对反相高效液相层析(RP-HPLC)、尺寸排阻高效液相层析(SE-HPLC)或毛细管等电聚焦(cIEF)特征不具有明显作用。

[0511] 本发明之多肽可通过任何常用方法产生。典型的实施方案包括适合的宿主系统，例如细菌或酵母中之重组表达。本发明之多肽将经受适合的纯化方案，之后根据本发明配制。

[0512] 一般而言，本发明之多肽通过已经基因工程改造以产生多肽之活性宿主细胞产生。基因工程改造细胞以产生蛋白质之方法为本领域中众所周知的。参见例如Ausubel等人，编(1990)，Current Protocols in Molecular Biology(Wiley,New York)。此类方法包括将编码且允许多肽表达之核酸引入至活性宿主细胞中。此等宿主细胞可为培养物中生长之细菌细胞、真菌细胞或动物细胞。细菌宿主细胞包括(但不限于)大肠杆菌细胞。适合的大肠杆菌菌株之实例包括：HB101、DH5a、GM2929、JM109、KW251、NM538、NM539及未能使外来DNA裂解之任何大肠杆菌菌株。可使用之真菌宿主细胞包括(但不限于)酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)及曲霉细胞(Aspergillus cell)。可使用之动物细胞系之几个实例为CHO、VERO、BHK、HeLa、Cos、MDCK、293、3T3及WI38。新颖动物细胞系可使用技术人员众所周知之方法(例如通过转化作用、病毒感染及/或选择)确立。任选地，多肽可通过宿主细胞分泌至培养基中。

[0513] 在一些实施方案中，多肽可在细菌细胞，例如大肠杆菌细胞中产生。举例而言，若多肽由在展示实体与噬菌体蛋白质(或其片段)之间包括可抑制的终止密码子之噬菌体展示载体中之序列编码，则载体核酸可转移至无法抑制终止密码子之细菌细胞中。在此情况

下,多肽未与基因III蛋白质融合且分泌于胞外质及/或培养基中。

[0514] 多肽亦可在真核细胞中产生。在一个实施方案中,多肽在诸如毕赤酵母属(Pichia)(参见例如Powers等人2001 J Immunol Methods 251:123-35)、汉森酵母(Hansenula)或酵母菌属(Saccharomyces)之酵母细胞中表达。

[0515] 在一个实施方案中,多肽在哺乳动物细胞中产生。用于表达克隆抗体或其抗原结合片段之典型的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括与例如如Kaufman及Sharp,1982Mol.Biol.159:601-621中所描述之DHFR可选择标记物一起使用之Urlaub及Chasin,1980Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216-4220中所描述之dhfr-CHO细胞)、淋巴细胞系,例如NS0骨髓瘤细胞及SP2细胞、COS细胞及来自转基因动物(例如转基因哺乳动物)之细胞。举例而言,细胞为乳腺上皮细胞。

[0516] 除了编码多肽之核酸序列之外,重组表达载体可携带额外序列,诸如调节宿主细胞中之载体(例如复制起点)及可选择标记物基因之复制的序列。可选择标记物基因促进已引入载体的宿主细胞的选择(参见例如美国专利第4,399,216号、第4,634,665号及第5,179,017号)。举例而言,在已引入载体之宿主细胞上,可选择标记基因通常赋予对诸如G418、潮霉素或甲氨蝶呤之药物之抗性。

[0517] 使用标准分子生物学技术来制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化体、培养宿主细胞及自培养基回收抗体分子。举例而言,本发明之多肽可通过亲和性层析分离。

[0518] 在一个实施方案中,本发明之多肽如WO 10/056550中所描述纯化。在一示例性实施方案中,通过以下步骤自一或多种污染物纯化多肽:使多肽及污染物之混合物与基于蛋白质A之支持体及/或离子交换支持体在允许多肽结合至或吸附至支持体之条件下接触;通过在多肽保持结合至支持体之条件下洗涤结合的支持体来移除一或多种污染物,且通过用洗脱缓冲液洗脱吸附的多肽分子来选择性地自支持体洗脱多肽。

[0519] 本发明之多肽亦可通过转基因动物产生。举例而言,美国专利第5,849,992号描述一种在转基因哺乳动物之乳腺中表达抗体之方法。构建包括乳汁特异性启动子及编码抗体分子之核酸及用于分泌之信号序列的转基因。此类转基因哺乳动物之雌性产生之乳汁包括其中分泌的目的单一结构域。抗体分子可自乳汁纯化,或直接用于某些应用。

[0520] 本发明涵盖产生如本文所定义之制剂之方法。

[0521] 纯化及制剂步骤可重合,例如当使用根据本发明之缓冲液自管柱洗脱本发明之多肽时。备选地,本发明之制剂可通过以任何适合的手段,例如本领域中广泛使用之手段,诸如透析、超滤等更换缓冲液制备。

[0522] 在一些实施方案中,产生本发明之制剂之方法亦可涉及例如通过添加水或适合的缓冲液(其可任选地包含其他赋形剂)使冻干或喷雾干燥制剂复原。

[0523] 用于制备根据本发明之制剂之方法可涵盖其他步骤,诸如将其填充至适合于临床用途之小瓶中,诸如密封容器;及/或使其成型为单位剂型。方法亦可包含其他步骤,诸如喷雾干燥、冻干或冷冻,例如整体冷冻。本发明亦涵盖可通过本文所列举之方法中之任一者获得之容器、单位剂型或其他产物。

[0524] 本发明之制剂可用于储存本发明之多肽,例如如本文所定义之包含至少一个针对vWF之ISVD的多肽,诸如ALX 0081或ALX 0081-A。因此,本发明涵盖一种储存如本文所使用之本发明之多肽的方法,其特征为使用如本文所定义之制剂。更具体言之,本发明涵盖用于

使本发明之多肽稳定化以便储存之方法，其包含例如制备如本文所描述之制剂。储存可为1-36个月，诸如1、1.5、3、6、9、12、18、24、30或36个月，例如至少12个月，任选地在-70℃与+40℃之间，诸如-70℃、-20℃、+5℃、+25℃或+40℃的温度下，优选-70℃与+25℃之间的温度，更优选在-20℃与+5℃之间的温度下。因此，储存可涵盖冷冻、冷冻干燥(冻干)及/或喷雾干燥。储存方法可进一步包含评定如本文所定义之vWF结合剂之物理及化学完整性。

[0525] 本发明还涉及用于分析包含如本文所定义之vWF结合剂中之至少一者之制剂的方法。可分析制剂之如本文所定义之vWF结合剂之化学或物理不稳定性的任何迹象。举例而言，可评定制剂之降解产物之存在，例如低分子量衍生物，诸如蛋白分解片段；及/或化学衍生物，例如焦谷氨酸盐变体；及/或高分子量衍生物，诸如聚集物、团聚物等。亦可评定制剂之总蛋白质含量及/或效能。如本文所提及之各种分析方法中之每一者可用于本发明之分析方法中。

[0526] 因此，本发明还涉及一种用于例如在制造、储存及使用中之一或多者期间监测及/或评定制剂之质量及/或稳定性的方法。本发明还涉及一种制剂之质量控制之方法，例如以评定制剂符合如本文进一步描述之产物规格。此等方面中之任一者中之本发明包含选自以下之一或多者：与一或多种参考样品之比较、批次间变化之分析及制造方法之进行中的监测。

[0527] 本发明涉及例如通过包含其或通过为其产生或成型所需而与本发明之制剂相关之任何产物，而无任何限制。

[0528] 举例而言，本发明涉及一种制品，例如包含本发明之制剂中之一或多者的密封容器。

[0529] 本发明还涉及医药单位剂型，例如适合于向患者，优选人类患者肠胃外施用(例如皮内、肌内、腹膜内、静脉内及皮下)之剂型，其包含根据本文所描述之任何实施方案之制剂中之一或多者。

[0530] 单位剂型可例如呈预填充注射器、安瓿、套筒或小瓶之形式。

[0531] 亦提供包含本发明之制剂及例如保健专家之使用说明书的试剂盒或制品。试剂盒或制品可包括含有如本文所描述之本发明之制剂之小瓶或注射器。

[0532] 优选地，小瓶或注射器由玻璃、塑料或选自环烯烃聚合物或共聚物之聚合材料构成。可由任何适合的材料，诸如玻璃或塑料制造注射器、安瓿、套筒或小瓶，且可包括橡胶材料，诸如小瓶之橡胶塞子及注射器及套筒之橡胶柱塞及橡胶密封件。本发明还涉及一种包含本发明之制剂中之一或多者的试剂盒。该试剂盒可进一步包含使用说明书及/或临床封装小册。在如本文所定义之产物之任何实施方案中，本发明亦涵盖存在封装材料、使用说明书及/或临床封装小册，例如如调节方面所需。

[0533] 出于比较两个或多于两个氨基酸序列之目的，可通过[在第二氨基酸序列中之对应位置处与氨基酸残基相同之第一氨基酸序列中之氨基酸残基之数目]除以[第一氨基酸序列中之氨基酸残基之总数目]且乘以[100％]来计算第一氨基酸序列与第二氨基酸序列之间的”序列同一性”百分比(在本文中亦称为”氨基酸同一性”)，其中第二氨基酸序列中之氨基酸残基之各缺失、插入、取代或添加(相比于第一氨基酸序列)视为单一氨基酸残基(位置)处之差异，亦即，如本文所定义之”氨基酸差异”。

[0534] 备选地，两个氨基酸序列之间的序列同一性程度可使用已知之计算机算法，诸如

上文提及之用于测定核苷酸序列之序列同一性程度的算法,再使用标准设置来计算。

[0535] 通常,出于根据上文概述之计算方法测定两种氨基酸序列之间之"序列同一性"之百分比之目的,具有最大氨基酸残基数目之氨基酸序列将视为"第一"氨基酸序列且另一氨基酸序列将视为"第二"氨基酸序列。

[0536] 此外,在测定两个氨基酸序列之间的序列同一性程度时,技术人员可能考虑所谓的"保守"氨基酸取代,其一般可描述为氨基酸残基经具有类似化学结构之另一氨基酸残基替换且对多肽之功能、活性或其他生物特性几乎无影响或基本上无影响的氨基酸取代。此类保守氨基酸取代为本领域中众所周知的,例如WO 04/037999、GB-A-3 357 768、WO 98/49185、WO 00/46383及WO 01/09300中;且此类取代之(优选)类型及/或组合可基于例如WO 04/037999以及WO 98/49185及其中引用之进一步参考文献中之相关教导选择。此类保守取代优选为其中以下组(a)-(e)内之一个氨基酸经相同组内之另一氨基酸残基取代的取代:(a)较小脂族、非极性或略微极性残基:Ala、Ser、Thr、Pro及Gly;(b)极性、带负电残基及其(不带电)酰胺:Asp、Asn、Glu及Gln;(c)极性、带正电残基:His、Arg及Lys;(d)较大脂族、非极性残基:Met、Leu、Ile、Val及Cys;及(e)芳族残基:Phe、Tyr及Trp。尤其优选保守取代如下:Ala取代为Gly或Ser;Arg取代为Lys;Asn取代为Gln或His;Asp取代为Glu;Cys取代为Ser;Gln取代为Asn;Glu取代为Asp;Gly取代为Ala或Pro;His取代为Asn或Gln;Ile取代为Leu或Val;Leu取代为Ile或Val;Lys取代为Arg、Gln或Glu;Met取代为Leu、Tyr或Ile;Phe取代为Met、Leu或Tyr;Ser取代为Thr;Thr取代为Ser;Trp取代为Tyr;Tyr取代为Trp;及/或Phe取代为Val、Ile或Leu。应用于本文所描述之多肽之任何氨基酸取代亦可基于Schulz等人,Principles of Protein Structure,Springer-Verlag,1978研发之不同物种之同源蛋白质之间的氨基酸变化形式之频率的分析;Chou及Fasman,Biochemistry 13:211,1974及Adv.Enzymol.,47:45-149,1978研发之结构形成潜力之分析;及Eisenberg等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:140-144,1984;Kyte&Doolittle;J Molec.Biol.157:105-132,1981及Goldman等人,Ann.Rev.Biophys.Chem.15:321-353,1986研发之蛋白质中之疏水性图案之分析,全部以全文引用之方式并入本文中。关于Nanobodies®之一级、二级及三级结构之信息在本文中之说明书中及上文所引用之一般背景技术中给出。此外,出于此目的,来自骆马之VHH结构域之晶体结构通过例如Desmyter等人,Nature Structural Biology,第3卷,9,803(1996);Spinelli等人,Natural Structural Biology(1996);3,752-757;及Decanniere等人,Structure,第7卷,4,361(1999)给出。关于在常规VH结构域中形成VH/VL界面之一些氨基酸残基及此等位置上之可能骆驼化取代的进一步信息可见于上文所引用之现有技术中。

[0537] 本发明还涉及一种治疗或预防vWF相关疾病,诸如急性冠状动脉综合征(ACS)、暂时性大脑缺血性发作、不稳定或稳定心绞痛、中风、心肌梗死或血栓性血小板减少性紫癜(TTP)之方法;该方法包含向个体施用包含本发明之制剂的药物组合物,由此减少与该vWF相关疾病相关之一或多个症状。特定言之,该vWF相关疾病为TTP。

[0538] 在本发明之另一实施方案中,提供含有适用于治疗如上文所描述之疾病之材料的制品。该制品包含内含的标签及包装插页。适合的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可由各种材料形成,诸如玻璃或塑料。容器容纳对于治疗病况有效之组合物且可具有无菌入口(例如容器可为静脉内溶液袋或具有皮下注射针可刺穿之塞子的小瓶)。组合物中之至

少一种活性剂为本发明之多肽，诸如ALX 0081或ALX 0081-A。容器上或与容器相关联之标签指示该组合物用于治疗所选病况。制品可进一步包含第二容器，其包含医药学上可接受之缓冲液，诸如如本文所描述之磷酸盐缓冲盐水或柠檬酸盐缓冲盐水。其可进一步包括就使用者或商业观点而言所需之其他材料，包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针及注射器。

[0539] 本发明提供一种试剂盒或制品，其包含含有如本文所描述之多肽或如本文所描述之制剂及使用说明书的容器。

[0540] 本发明提供如本文所描述之试剂盒或制品，其中制剂存在于小瓶或可注射注射器中。

[0541] 本发明提供如本文所描述之试剂盒或制品，其中制剂存在于预填充可注射注射器中。

[0542] 本发明提供如本文所描述之试剂盒或制品，其中该注射器或小瓶由玻璃、塑料或选自环烯烃聚合物或共聚物之聚合材料构成。

[0543] 在本说明书中说明及讨论之实施方案仅意欲教示技术人员本发明人已知的进行及使用本发明之最佳方式。在不脱离本发明之情况下，上文所描述之本发明之实施方案之修饰及变化为可能的，如技术人员鉴于上述教示内容所了解。因此，应理解，在权利要求范围及其等同方案之范畴内，本发明可以除经特定描述之外的方式实施。

[0544] 本发明现将藉助于以下非限制性优选方面、实施方案及图进一步描述。

[0545] 在本申请案全篇引用之所有参考文献(包括文献参考、颁予之专利、公开之专利申请案及共同待决的专利申请案)的全部内容以引用的方式明确地并入本文中，尤其上文提及之教导内容。

[0546] 缩写

[0547] 本说明书中之常用缩写之解释列表提供于表5中。

[0548] 附图简述

[0549] 图1.实现意图治疗群体中之血小板计数之确认标准化之时间。双盲每日血浆交换时间段直至截止点之数据用于分析主要终点。数据截止点由以下决定:在研究药物开始之后每日血浆交换之45天、每日血浆交换之中止或研究药物治疗之中止;无论哪个首先发生。

[0550] 图2.根据复发之ADAMTS13活性。图A及B显示分别在每日血浆交换结束之后当周及在研究药物治疗结束时个别患者之ADAMTS13活性类别。在各图中，呈现不同治疗组中之患者之ADAMTS13类别(抑制≤10％，或标准化>10％)。各图之左侧部分指示未复发之患者之数据，各图之右侧部分指示复发之患者，且当相对于每日PE结束或治疗结束时，此发生。

[0551] 图3.健康志愿者之卡帕珠单抗之7天重复皮下10mg每日给药期间(上图)及aTTP患者之重复皮下每日施用10mg卡帕珠单抗期间(下图)的平均vWF:Ag水平与时间曲线。aTTP:获得性血栓性血小板减少性紫癜;PE:血浆交换;FU:随访;vWF:冯维勒布兰德因子。

[0552] 图4.阶段II ALX-0681-2.1/10(“TITAN”，上图)及阶段III ALX0681-C301(“海格立斯”，下图)中之平均(±SD)RICO活性。<20％之RICO值表示卡帕珠单抗之药理学活性之阈值;出于图示之目的，低于15％之定量之下限的值设定为15％，高于120％之定量之上限的值设定为120％。曲线图显示平均值±平均值之标准误。PE:血浆交换;FU:随访;RICO:利托菌素辅因子(ristocetin cofactor);SD:标准差;vWF:冯维勒布兰德因子。

[0553] 图5.在施用单个递增皮下剂量(A)之后及在单个及重复施用10mg每日皮下剂量七

天(B)之后健康志愿者中之卡帕珠单抗血浆浓度与时间曲线。

7.实施例

[0554] 7.1可应用的规定

[0555] 实施例章节中使用之所有人类样品获自市售来源或人类志愿者(在全部需要同意及获得批准之后)且根据可应用的法律及管制需求(包括关于医学秘密及患者隐私之彼等者)使用。

[0556] 根据可应用的法律及规定(包括赫尔辛基宣言(Declaration of Helsinki)及医学秘密原则及患者隐私保护)进行临床试验且在全部需要批准(包括相关伦理学委员会批准)及获得同意(包括所涉及之个体之知情同意书)之后。

[0557] 此临床研究之目标及内容以及其结果视为机密且第三方不能访问。参与研究之雇员受机密性约束。所有未使用的药物返回至本申请人或毁坏。

[0558] 7.2合格标准

[0559] 患者必须实现符合阶段III研究中之研究准入条件的以下全部标准：

[0560] 纳入标准

[0561] 1.在签署知情同意书(ICF)时≥18岁之成年男性或女性

[0562] 2.获得性TTP之临床诊断,其包括血小板减少及红血细胞碎裂(例如裂血球)之显微镜证据

[0563] 3.需要每日PE治疗之引发且在随机分组之前已接收1次PE治疗

[0564] 排除标准

[0565] • 血小板计数≥100×109/L

[0566] • 在血小板计数＞30×109/L之情况下血清肌酐水平>200μmol/L(以排除非典型性溶血性尿毒症综合征之可能的情况[非典型HUS])

[0567] • 血小板减少之已知其他病因包括(但不限于)：

[0568] -大肠杆菌0157或相关生物体之肠溶性感染之临床迹象-非典型HUS

[0569] -造血干细胞、骨髓或器官移植相关血栓性微血管病

[0570] -已知或疑似败血症

[0571] -诊断散播性血管内凝血

[0572] • 先天性TTP(在研究进入时已知)

[0573] • 妊娠或母乳喂养

[0574] • 临床上明显的活动性出血或高出血风险(排除血小板减少)

[0575] • 利用无法安全停止(中断)之抗凝血剂治疗之已知慢性治疗,包括(但不限于)：

[0576] -维生素K拮抗剂

[0577] -肝素或低分子量肝素(LMWH)

[0578] -非乙酰基水杨酸非类固醇抗炎性分子

[0579] • 恶性动脉高血压

[0580] • 除与TTP相关外之临床病况,其寿命预期＜6个月,诸如末期恶性病

[0581] • 此前入选具有卡帕珠单抗及接受卡帕珠单抗之临床研究中之个体或指定治疗组之个体未知。

[0582] 7.3研究设计

[0583] 本发明研究经设计为阶段III、双盲、安慰剂对照、随机分组研究以评估除了具有获得性TTP之急性发作之个体之护理标准治疗(海格立斯)之外施用时卡帕珠单抗治疗之疗效及安全。研究评估卡帕珠单抗在更快速恢复正常血小板计数方面之疗效;及卡帕珠单抗治疗对TTP相关死亡率之综合终点之作用;在研究药物治疗期间呈现的TTP发作复发之预防及重度血栓栓塞事件(TE)之预防。在确认研究参与之合格性(参见实施方案7.2)之后且在PE治疗开始之后,将个体以1:1之比率随机分组,接受卡帕珠单抗或安慰剂以及护理标准疗法。通过神经症状严重程度将随机分组分层(格拉斯哥昏迷量表[Glasgow coma scale,GCS])。

[0584] 在治疗延长及每日PE时间段后30天期间恶化或在治疗延长期间复发之情况下,每个个体之研究持续时间为约2个月直至约6个月。

[0585] 在此研究期间不同阶段随访患者:

[0586] -筛选时间段:自签署知情同意书(ICF)直至随机分组;

[0587] -研究药物治疗期:涵盖每日PE时间段(不同持续时间)及每日PE时间段后30天;

[0588] -治疗延长时间段:7天延伸,最多28天,亦即,4×7天;

[0589] -开放标记:在30天治疗期间恶化或在治疗延长时间段期间复发发生(第一次恶化或复发)之情况下,个体接受开放标记(OL)卡帕珠单抗以及再引发每日PE及优化免疫抑制治疗。卡帕珠单抗治疗时程及问诊时程与初步研究药物治疗期(涵盖每日PE[不同持续时间]及每日PE时间段后30天)及可能的治疗延长时间段相同;

[0590] -4周随访(FU)时间段:在研究药物施用之最后一天之后第一次FU问诊7天及最后一次FU问诊28天。

[0591] 患者接受各地调查员判断且根据TTP治疗指南适当的最佳医学护理及治疗。

[0592] 相对于PE程序,在特定时间施用研究药物作为辅助治疗。研究药物由10mg卡帕珠单抗(“处理组”或”CAPLA”)或安慰剂(“安慰剂组”)组成,每天一次或两次。

[0593] 7.4海格立斯研究之研究药物治疗:

[0594] 起始i.v.剂量:在随机分组后进行的第一次PE之前6小时至15分钟个体通过i.v.快速注射接受单一起始剂量之推注接受单一起始剂量之10mg研究药物;在进行第1次PE以用于治疗第一次恶化或复发之前亦给予10mg之i.v.推注。

[0595] • 每日皮下(s.c.)剂量:在完成各每日PE之后,在整个PE治疗之全部持续时间期间每日施用10mg研究药物之s.c.注射液。

[0596] • 在每日PE中止之后继续10mg研究药物之每日s.c.施用持续30天之时间段。此时间段没有进行调节以便PE逐渐减小。

[0597] • 超出此等30天之研究药物治疗延长由呈现TTP发作复发之多种风险因素引导,包括ADAMTS13活性特征以及持续潜在疾病活动之其他迹象及症状。

[0598] • 在呈现TTP发作之第一次恶化之情况下,个体接受开放标记卡帕珠单抗与每日PE。

[0599] • 在个体具有第一次TTP复发,同时仍在治疗延长时间段中接受研究药物之情况下,则开始每日PE作为护理标准治疗与适当的免疫抑制治疗之部分。

[0600] • 在完成研究药物治疗(亦即,在FU时间段中)之后个体已有第一次或后续TTP复

发之情况下,每日PE护理标准治疗及适当的免疫抑制治疗根据现场操作发起。

[0601] 7.5终点

[0602] 此阶段III研究之主要终点为血小板计数响应之时间,其定义为初次血小板计数≥150×109/L,在5天内随后中止每日PE。关键次要终点列于如下:

[0603] 1.在研究药物治疗期(包括延长期)期间经历TTP相关死亡、TTP复发或至少一次治疗引发之重度血栓栓塞事件(例如心肌梗死、脑血管意外、肺栓塞或深静脉血栓形成[DVT])之个体的比例。

[0604] 2.在整个研究时间段(包括4周FU时间段)中经历TTP复发之个体的比例。

[0605] 3.具有难治性TTP之个体之比例,其在研究中定义为在标准治疗4天及LDH>ULN之后不存在血小板计数倍增。

[0606] 4.实现以下器官损伤标记物水平中之全部3个之标准化之时间:实现LDH≤1×正常值上限(ULN)及cTnI≤1×ULN及血清肌酐≤1×ULN之时间

[0607] 5.其他终点包括血浆交换之持续时间及体积、医院及重症监护室停留之持续时间、死亡、药效学及药代动力学参数及免疫原性。

[0608] 6.在研究药物治疗及随访时间段期间进行安全评定且包括生命迹象、物理检验、临床实验室测试及12导联心电图。使用来自Medical Dictionary for Regulatory Activities,版本20.0之优选术语编码报导的不良事件。

[0609] 7.6统计分析

[0610] 在海格立斯研究中,指定132名患者之计划样品以提供80%之功率,从而使用在5%显著性水平下之双侧对数秩检验,假定10%中途退出率,检测到实现卡帕珠单抗之血小板计数标准化之中值时间降低40%。亦设定132名个体之样品尺寸以提供83%功率,使用具有大样品逼近及5%显著性水平之双侧卡方检验,检测出第一关键次要终点降低20%。对意图治疗群体(由所有随机分组患者组成)进行所有疗效分析,且对安全群体(由接受至少一次剂量之研究药物之所有患者组成)进行安全及免疫原性分析。通过进行双侧分层对数秩检验,基于卡本-麦尔分析(其中神经受累之严重程度作为分层因素),比较卡帕珠单抗及安慰剂组中实现血小板计数响应之时间。

[0611] 应用固定序列途径分析关键次要终点。使用Cochran-Mantel-Haenszel试验分析TTP相关死亡、重度血栓栓塞事件及TTP复发(恶化),其中调节神经受累之严重程度,而使用分层对数秩检验,基于卡本-麦尔分析(其中调节神经受累之基线严重程度及LDH)分析第四次实现器官损伤标记物之标准化之时间。

[0612] 7.7测定ADAMTS13活性

[0613] 通过荧光分析,使用FRETS-VWF73底物(Kokame等人2005.Br J Haematol 129(1):93-100;Kremer Hovinga等人2006 J Thromb Haemost 4(5):1146-8)测量ADAMTS13活性及功能性抑制剂活性。

[0614] 简言之,FRETS-VWF73分析基本上如(上文Kokame等人2005)所描述进行,其中进行以下修改:以1mmol L-1之最终浓度,将Pefabloc SC(Boehringer,Mannheim,Germany)添加至分析缓冲液(5mmol L-1 Bis-Tris,25mmol L-1 CaCl2,0.005%Tween-20,pH 6.0)中。通过在分析缓冲液中使用经1:25(100%)稀释之正常人类血浆池(NHP;Swiss Red Cross Blood Services,Bern,Switzerland)获得分析校准。在加热失活的NHP中,通过3:4(75%)、

1:2(50%)、1:4(25%)、1:10(10%)、1:20(5%)、1:50(2%)及1:100(1%)之NHP之连续预稀释液获得进一步校准样品,在56℃下培育30分钟,继而在15 000×g)下离心15分钟以校正标准曲线之较低活性范围中之血浆基质作用。所有此等标准样品以及加热失活的NHP(0% ADAMTS13活性)及所有测试样品随后在分析缓冲液中经1:25稀释。随后,将25μL各经稀释之标准品或患者样品在37℃下在384孔白色平板(NUNC,Roskilde,Denmark)中培育。在10分钟之后,将溶解于分析缓冲液中之25μl 4μmol L-1 FRETS-VWF73肽底物添加至各孔中,且在37℃下在装备有340nm激发滤光器(带宽35nm)及450nm发射滤光器(带宽25nm)之荧光微板读出器(GENios,Tecan,Zürich,Switzerland)中记录荧光演变。随时间推移测量荧光演变(每5分钟,持续42周期)。随时间推移,自5(第2周期)至60分钟(第13周期),通过荧光演变之线性回归分析(Passing-Bablok)计算反应速率。计算各校准样品之回归曲线之斜率,且用于产生校准曲线(趋势线:y=ax+b;其中x=ADAMTS13(%)及y=△RFU/△时间)。随后样品之ADAMTS13活性(%)经计算为:(y-b)x 1/a。

[0615] 通过相同荧光FRETS-VWF73方法,通过测定在37℃下用加热失活患者血浆(在56℃下30分钟)1:1(v:v)培育2小时之后正常人类血浆之残余ADAMTS13活性,测量ADAMTS13功能性抑制剂活性。

[0616] 对于各分析批次,在分析缓冲液中使用经1:25(100%)稀释之正常人类血浆池(NHP;Swiss Red Cross Blood Services,Bern,Switzerland)产生校准曲线。在加热失活NHP中,通过1:2(50%)、1:4(25%)、1:10(10%)、1:20(5%)、1:50(2%)及1:100(1%)之NHP之连续预稀释液获得进一步校准样品。所有校准点以单倍应用。接受标准:(1)标准曲线管线之最后回归之斜率必须为>6.0;及(2)最后曲线之回归之R2必须为>0.98(或R>0.9899)。否则,剔除分析。

[0617] 研究群体

[0618] 在本发明海格立斯研究中,145名患者随机分配以接受卡帕珠单抗(n=72)或安慰剂(n=73)。所有患者接受研究药物,除了卡帕珠单抗组中之一名患者,其在第一次给药之前撤回同意书。总体而言,108名患者完成研究(亦即,完成所有预约治疗问诊并且已完成其最后随访问诊),而37名患者中断研究(卡帕珠单抗组中14名,安慰剂组中23名)。研究中断之最常见原因为不良事件、撤回同意书及医师决策。

[0619] 2个研究组之人口统计资料及基线疾病特性一般类似(表7.8),先前TTP发作及ADAMTS13活性除外。总共,97%(140/145)患者接受糖皮质激素且其中24%(35/145)在每日血浆交换期间开始利妥昔单抗治疗(17%或12/72(卡帕珠单抗组)及32%或23/73(安慰剂组))。

[0620] 表7.8.意图治疗群体中之人口统计资料及基线疾病特性*

[0621]

特性	卡帕珠单抗 (N=72)	安慰剂 (N=73)	总计 (N=145)
平均年龄(范围)-岁	45 (18-77)	47 (21-79)	46 (18-79)
女性-数目(%)	49 (68)	51 (70)	100 (69)
平均身体质量指数(范围)-kg/m2	30 (18-53)	30 (19-59)	30 (18-59)
人种或种族-数目(%)§			
白人	47 (68)	50 (78)	97 (73)
黑人	15 (22)	13 (20)	28 (21)
亚洲人	4 (6)	0	1 (1)
西班牙人或拉丁美洲人	4 (6)	2 (3)	6 (4)
呈现TTP发作-数目(%)			
初次	48 (67)	34 (47)	82 (57)
复发	24 (33)	39 (53)	63 (43)
平均血小板计数(范围)-109/L	32 (3-119)	39 (9-133)	24 (3-133)

[0622]

平均LDH (范围)- U/L	613 (120-2525)	517 (151-3343)	565 (120-3343)
平均cTnI (范围)- μg/L	3.46 (0.01-75.96)	0.63 (0.01-7.28)	2.05 (0.01-75.96))
血清肌酐(范围)- μmol/L	100 (35-717)	102 (52-482)	101 (35-717)
ADAMTS13活性-数目(%)¶			
< 10%	58 (82)	65 (90)	123 (86)
≥ 10%	13 (18)	7 (10)	20 (14)
缺失	1	1	2
格拉斯哥昏迷量表评分-数目(%)			
≤ 12	6 (8)	5 (7)	11 (8)
13-15	65 (91)	67 (93)	132 (92)
缺失	1	1	1

[0623] *基线定义为第一次施用研究药物之前;所有患者具有基线前的先前PEX。

[0624] §人种及种族由调查员测定。

[0625] ¶由于先前PEX,在一些情况下,基线ADAMTS13活性高于准入时局部测量结果。在可供使用之情况下,采集准入时局部测量ADAMTS13活性水平且表示基线及准入值之较低

值。

[0626] 7.9主要及关键次要终点

[0627] 基于卡本麦尔分析及分层对数秩检验,卡帕珠单抗组中之血小板计数响应时间明显缩短(图1)。在任何给定时间点,接受卡帕珠单抗之患者比用安慰剂处理之患者实现血小板计数响应的可能性高1.55倍(血小板计数标准化比率,1.55;95%CI,1.09至2.19;P=0.01)。在研究药物治疗期间,卡帕珠单抗治疗使得经历TTP相关死亡、TTP复发或重度血栓栓塞事件之患者之数目降低74%(P<0.0001,表7.9)。在整个研究时间段(包括28天无治疗随访时间段)期间,安慰剂组中之28名患者经历复发对比卡帕珠单抗组中之9名患者,降低67%(P<0.001,表7.9)。在随访时间段期间,在经历TTP复发之卡帕珠单抗组中之所有6名患者中(亦即,在每日血浆交换结束之后超过30天时复发),在研究药物治疗结束时ADAMTS13活性水平为<10%,表明当研究药物停止时潜在疾病仍具有活性。无经卡帕珠单抗治疗之患者难以治疗,而3名接受安慰剂之患者难以治疗(P=0.057)。卡帕珠单抗治疗亦与朝向3种器官损伤标记物:LDH、cTnI及血清肌酐之更快标准化的趋势相关。

[0628] 表7.9:意图治疗群体中之主要及关键次要疗效终点

[0629]

终点	卡帕珠单抗 (N=72)	安慰剂 (N=73)
主要终点 响应时间：卡帕珠单抗对比安慰剂 血小板计数标准化比率(95% CI) P值	1.55 (1.09-2.19) 0.01	
关键次要终点 当接受盲法研究药物治疗时以下事件中之至少一者-数目(%) TTP相关死亡 重度血栓栓塞事件 TTP复发(恶化) P值	9 (12.7) 0 6 (8.5) 3 (4.2) <0.0001	36 (49.3) 3 (4.1) 6 (8.2) 28 (38.4)
在整个研究时间段期间的TTP复发*-数目(%) 当接受盲法研究药物时(恶化) 在随访时间段期间(复发) P值	9 (12.7) 3 (4.2) 6 (9.1) <0.001	28 (38.4) 28 (38.4) 0
难以治疗§-数目(%) P值	0 0.0572	3 (4.2)
实现器官损伤标记物之标准化之时间		

[0630]

中值时间-天数(95% CI)	2.86 (1.93-3.86)	3.36(1.88-7.71)

[0631] *复发定义为在初次血小板计数标准化之后的血小板计数新下降，迫使再引发PEX。根据共识术语，在每日PEX结束之后30天内复发为恶化，而在每日PEX结束之后超过30天出现之彼等者称为复发(Scully等人,2017 J Thromb Haemost 5:312-22)。

[0632] §对于此终点，不应性定义为在4天治疗及高于正常水平之LDH之后不存在倍增的血小板计数(Benhamou等人2015 J Thromb Haemost 13:293-302)。

[0633] 7.10关于复发之ADAMTS13活性

[0634] 恶化：在本发明海格立斯研究中随机分组之145名患者中，129名实现血小板计数响应且完成每日血浆交换时间段(卡帕珠单抗组中65名及安慰剂组中64名)。在每日血浆交换结束之后当周，在42％(54/129)患者中，ADAMTS13活性已恢复至高于10％，但在其他58％(75/129)中保持抑制于10％以下。总共，31名患者经历恶化，其中2名具有标准化ADAMTS13

活性且其中29名具有未消退的潜在疾病，如通过<10％之ADAMTS13活性水平所证明(图2，图A)。

[0635] 复发：在研究药物治疗结束时之ADAMTS13活性水平可用于120名患者(在双盲卡帕珠单抗治疗结束时60名，在双盲安慰剂治疗结束时34名，及在开放标记卡帕珠单抗治疗结束时26名)。在此等患者中，74％(89/120)在治疗停止时具有标准化ADAMTS13活性水平。在研究药物治疗结束之后28天随访期间，此等患者中无一者复发。其他26％(31/120)患者在研究药物治疗停止时仍具有受抑制的ADAMTS13活性。总共，此等31名患者中9名在随后28天中复发，9名中6名在双盲卡帕珠单抗治疗结束之后复发且9名中3名在开放标记卡帕珠单抗治疗结束之后复发(图2，图B)(参见实施例7.13)。

[0636] 7.11患有初次或复发性疾病之aTTP患者之表征及结果

[0637] 背景：获得性血栓性血小板减少性紫癜(aTTP)为危及生命的自体免疫血液凝固病症。在每次发作期间，患者处于显著发病率及死亡风险下。在具有aTTP之患者之卡帕珠单抗阶段III海格立斯研究中获得疗效及安全资料(Scully等人，Blood 2017 130:LBA-1)。

[0638] 目标：入选具有初次或复发性aTTP发作之海格立斯研究中之患者之疾病表现表征及治疗结果评估。

[0639] 方法：使用描述性概述评估两个亚组之人口统计资料、基线疾病特性及治疗结果(实现血小板计数响应之时间、死亡率、复发、重度血栓栓塞事件(TE)及不应性)。根据标准方法测定血小板计数、LDH水平及心脏肌钙蛋白-I水平(参见具体实施方式)。

[0640] 结果：将145名患者随机分组，82名具有初次aTTP发作且63名具有复发性疾病。人口统计资料在组之间一般均衡，而基线疾病特性在初次与复发性发作中更严重：平均血小板计数(28.8×109/L与44.4×109/L)、平均LDH(598U/L与523U/L)及中值心脏肌钙蛋白-I(0.119μg/L与0.036μg/L)。相对于复发性彼等者(3.9天)，经历初次发作(6.5天)之彼等者的第一症状直至诊断之时间亦更长。相对于安慰剂组(46.6％)，卡帕珠单抗组中更多患者具有其第一次aTTP发作(66.7％)。相比于安慰剂，在两个亚组中，卡帕珠单抗治疗改善结果[亦即，更快的血小板计数响应时间、更低的治疗期间具有死亡、复发或重度TE事件之患者之比例、更低的总体研究时间段期间之复发率及预防不应性](关于详细结果，参见表7.11)。

[0641] 结论：与具有复发性疾病之彼等患者相比，在基线时，具有初次aTTP发作之患者具有延迟的表现及更严重的疾病。卡帕珠单抗治疗改善两个亚组中之结果。

[0642] 表7.11通过先前TTP发作之疗效结果(意图治疗群体)

[0643]

疗效结果	初次发作		复发性发作	
	卡帕珠单抗 N=48*	安慰剂 N=34	卡帕珠单抗 N=24	安慰剂 N=39
实现血小板计数响应之时间	1.67 (1.025至2.722)		1.64 (0.951至2.818)	

[0644]

血小板计数标准化速率比(95% CI)				
在研究药物治疗期期间的TTP相关死亡、TTP复发或重度TE事件	6 (12.8)	19 (55.9)	3 (12.5)	17 (43.6)
在整个研究时间段期间之TTP复发-n (%)	6 (12.8)	15 (44.1)	3 (12.5)	13 (33.3)
难治性TTP- n (%)	0	1 (2.9)	0	2 (5.1)

[0645] *百分比系基于47名患者(1名个体在研究药物治疗之前撤回同意书)

[0646] 7.12用抗vWF纳米抗体治疗获得性TTP使得健康护理资源利用明显降低

[0647] 背景:针对获得性血栓性血小板减少性紫癜(aTTP)之治疗,评估卡帕珠单抗、抗冯维勒布兰德因子(vWF)纳米抗体之疗效及安全(Scully等人,Blood 2017 130:LBA-1)。

[0648] 目标:为了研究卡帕珠单抗治疗对以下健康护理资源利用之作用:血浆交换(PE)参数、在医院中且在重症监护室(ICU)中花费之天数。

[0649] 方法:概述PE之体积及天数、在医院及ICU中之天数且使用威尔科克森(Wilcoxon)秩和检验之正态近似比较整个研究药物治疗期之卡帕珠单抗及安慰剂组。

[0650] 结果:在海格立斯研究中随机分组145名患者,安慰剂73名且卡帕珠单抗72名。卡帕珠单抗治疗使得血小板计数更快标准化,预防恶化且预防患者变得难以治疗。此反映在卡帕珠单抗组(n=71)对比安慰剂组(n=73)中之PE天之平均(±SE)数目之38%降低:5.8(±0.51)天对比9.4(±0.81)天($p<0.001$)。血浆交换之平均(±SE)总体积类似地降低41%:21.3(±1.6)L对比35.9(±4.2)L($p<0.001$)。卡帕珠单抗组(n=71)对比安慰剂组(n=73)之平均住院持续时间(±SE)降低31%:9.9(±0.7)天对比14.4(±0.7)天($p=0.0025$)。

[0651] 三分之一患者进入ICU(卡帕珠单抗组中之28名患者及安慰剂组中之27名患者)。在卡帕珠单抗组中,ICU中花费之平均(±SE)天数降低65%:3.4(±0.4)天对比9.7(±2.1)天($p=0.0098$)。

[0652] 结论:经由快速阻断vWF介导之血小板黏着,卡帕珠单抗表示aTTP之新颖治疗。卡帕珠单抗治疗产生改善结果,如健康护理资源利用有意义的降低所反映。

[0653] 7.13具有aTTP恶化之患者中之开放标记卡帕珠单抗之疗效及安全

[0654] 背景:在单盲阶段2研究中已展现卡帕珠单抗在患有获得性血栓性血小板减少性紫癜(aTTP)之患者中之疗效及安全(Peyvandi等人,2016 N Engl J Med 374:511-522)且在双盲阶段3研究中(Scully等人,Blood 2017 130:LBA-1)得到确认。

[0655] 目标:本文中呈现接受开放标记(OL)卡帕珠单抗之患者之疗效及安全结果。

[0656] 方法:在在双盲(DB)治疗期期间复发之情况下,患者切换为OL卡帕珠单抗,以及再引发每日血浆交换(PEX)及免疫抑制,同时初次治疗分配保持不知情。根据标准方法测定血

小板计数(参见具体实施方式)。如实施例7.7中所描述测定ADAMTS13活性。

[0657] 结果:在DB时间段期间,31名患者经历恶化:安慰剂组中28名及卡帕珠单抗组3名。其中28名切换为利用卡帕珠单抗之OL治疗(28名经安慰剂治疗之患者中之26名及3名经卡帕珠单抗治疗之患者中之2名)。截至第6天,81%接受OL卡帕珠单抗之患者实现确认的血小板计数响应(亦即,截至每日PE停止5天内确认之血小板计数≥150×109/L)。不存在死亡。在OL治疗期期间,一名患者(3.6%)经历TTP恶化且1名患者(3.6%)经历重度血栓栓塞事件(腔静脉血栓形成)。在OL治疗结束之后,3名患者具有TTP复发且全部3名在治疗停止时具有<10%之ADAMTS13活性。OL卡帕珠单抗组中之安全概况与DB卡帕珠单抗组中之观测结果一致。总共,25名患者(89.3%)报导有至少一个治疗引发不良事件。

[0658] 结论:利用卡帕珠单抗之开放标记疗法在经历aTTP恶化之患者中有效。安全概况与双盲时间段中之观测结果一致(参见实施例7.14)。

[0659] 7.14整个研究时间段:安全及免疫原性。

[0660] 归因于海格立斯研究设计(其包括在TTP复发之情况下切换为开放标记卡帕珠单抗治疗,同时接受双盲研究药物),且在安慰剂组中几乎全部复发(参见实施例7.13),与安慰剂组相比,卡帕珠单抗组中之中值暴露持续时间更长:35(范围1至65)对比23(范围2至66)天。

[0661] 在整个研究时间段期间,卡帕珠单抗组中之69名患者(97.2%)及安慰剂组中之71名患者(97.3%)报导至少一个不良事件。调查员考虑不良事件至少可能与卡帕珠单抗组中之41名患者(57.7%)及安慰剂组中之32名患者(43.8%)中之研究药物相关。

[0662] 在研究期间,四名患者具有导致死亡之不良事件,卡帕珠单抗组中之1名(1.4%)(在无治疗随访时间段期间,调查员考虑为与研究药物无关)及安慰剂组中之3名(4.1%)(全部在研究药物治疗期期间)。

[0663] 在整个研究时间段期间,卡帕珠单抗组中之28名患者(39.4%)及安慰剂组中之39名患者(53.4%)报导严重不良事件。根据方案,复发必须报导为严重不良事件,且数值上为安慰剂组中之主要驱动。调查员考虑严重不良事件至少可能与卡帕珠单抗组中之10名患者(14.1%)及安慰剂组中之4名患者(5.5%)中之研究药物相关。

[0664] 卡帕珠单抗组中之五名患者及安慰剂组中之9名个体报导有导致研究药物中断之不良事件。

[0665] 卡帕珠单抗组中之46名患者(64.8%)及安慰剂组中之35名患者(47.9%)报导出血相关不良事件。最频繁为流鼻血及齿龈出血;此等全部解决,其中大多数未进行干预。此等事件在大部分患者中为轻度或中度的,且在卡帕珠单抗之3名患者及安慰剂之1名患者中为重度的。卡帕珠单抗之8名患者(11.3%)及安慰剂之一名患者(1.4%)报导出血之严重不良事件。在卡帕珠单抗组中之4名患者中,最常报导的出血之严重不良事件为流鼻血。

[0666] 在3.1%用卡帕珠单抗治疗之患者中研发药物诱导之抗药物抗体。未观测到对临床疗效之影响且此等患者中未报导严重不良事件(参见实施例7.21)。

[0667] 7.15卡帕珠单抗之药效学

[0668] 卡帕珠单抗与vWF之相互作用为高度特异性的,且卡帕珠单抗与vWF A1结构域之结合不影响vWF与凝血因子VIII(FVIII)相互作用之能力,其中vWF具有载体功能。类似地,卡帕珠单抗之选择性结合不影响vWF与纤维状胶原蛋白、胶原蛋白类型VI或ADAMTS13相互

作用之能力。另外，卡帕珠单抗不与红血球或血小板交叉反应。归因于此较高特异性，在临床前研究及临床试验中尚未预期及观测到脱靶作用。

[0669] 在单次递增静脉内或皮下施用及多次10mg每日皮下施用之后的健康志愿者中及在多次10mg每日一次皮下剂量之后或安慰剂后接初次10mg静脉内推注或安慰剂的aTTP患者中测量总(游离+药物复合)vWF水平、利托菌素辅因子活性(RICO)及FVIII水平。

[0670] 7.15.1 vWF抗原(vWF:Ag)

[0671] 在基线时，与健康个体相比，aTTP患者中之vWF:Ag水平更高。在用卡帕珠单抗进行之临床研究中，平均(±标准差[SD])血浆vWF:Ag水平在健康个体中为38.5±10.9nM且在aTTP患者中为70.5±30.0nM。卡帕珠单抗治疗影响vWF配置，使得总循环vWF:Ag水平暂时降低。平均起来，在健康志愿者及aTTP患者中，此作用在最终剂量施用之后2至7天内逆转(图3)。

[0672] 总vWF:Ag水平之暂时降低归因于相比于游离靶标，药物-靶标复合物之更快消除。

[0673] 7.15.2 RIPA/RICO

[0674] 活体外分析利托菌素血小板凝集(RIPA)及RICO分析以评估血液中存在之vWF之血小板结合能力。RIPA及RICO分析方法系基于在引起血小板凝集之血小板存在下将利托菌素添加至血浆中。抗生素利托菌素使vWF活化至与较高剪切血流状况类似的程度，且因此调节vWF与血小板受体GP1b之结合。由于体外血小板凝集可通过卡帕珠单抗与vWF之相互作用阻断，选择此等方法以评估卡帕珠单抗在治疗期间之活性。通过RIPA或RICO活性分别降低至低于10％或20％，指明通过卡帕珠单抗vWF介导之血小板黏着之完全抑制。在健康志愿者中之单次皮下剂量≥10mg之后观测到完全稳定靶标抑制持续至少24小时。在整个完整治疗期中，此每日给予之10mg皮下剂量亦诱导具有aTTP之患者中之vWF介导之血小板黏着之完全抑制(图4)。在所有临床研究中，在研究药物中断后7天内RICO活性恢复至基线值。

[0675] 7.15.3 FVIII

[0676] vWF充当FVIII载体。通过卡帕珠单抗调节总vWF水平亦导致FVIII水平暂时降低，且对于vWF，在最终剂量施用之后2至7天内在健康志愿者及aTTP患者中观测到FVIII恢复至正常范围。

[0677] 7.15.4 QT/QTc研究

[0678] 在非临床研究中未观测到心血管作用。完成的人类研究中无临床上相关心电图(ECG)发现的证据(参见实施例7.13)。

[0679] 给定分子结构及卡帕珠单抗尺寸、其靶标特异性及不存在活体内心血管倾向，预期卡帕珠单抗不会延长QT时间间隔。

[0680] 此尚未观测到。

[0681] 7.16卡帕珠单抗之药代动力学

[0682] 已在健康志愿者及aTTP患者之血浆中测量到总(游离+靶标结合)卡帕珠单抗浓度之水平。在单次递增静脉内输注及单次及重复皮下剂量施用之后的健康个体中获得全部药代动力学概况(图5)。在阶段II及阶段III试验中在aTTP患者中获得稀少血浆样品。已经由标准非区室分析(NCA)在健康志愿者中且在群体药代动力学分析中在健康志愿者及aTTP患者中研究卡帕珠单抗之药代动力学概况。

[0683] 在重复10mg每日皮下施用之后，截至第二次药物施用，快速获得稳态，卡帕珠单抗

有限积聚,视靶标vWF:Ag的表达而定。

[0684] 吸收

[0685] 在健康志愿者或aTTP患者中稳态下预测之模型中在单次剂量之后通过标准非区室方法评估之主要暴露参数报导于表7.16.1A及7.16.1B中。在单次剂量施用之后,暴露程度(曲线下面积;AUC)及暴露速率(最大浓度;Cmax)随着施用剂量提高而提高,但不成比例。在10mg皮下施用之后,给药后4小时获得卡帕珠单抗Cmax。群体药代动力学分析中测定之绝对生物利用度评估为90%(在aTTP患者中)且接近100%(在健康志愿者中)。

[0686] 表7.16.1A.在健康志愿者中单次10mg静脉内或皮下施用卡帕珠单抗之后的药代动力学参数。

[0687]

参数	静脉内剂量 (n=8)	皮下剂量 (n=8)
Tmax，h		
中值(范围)	0.26 (0.25至6)	3.04 (3至9)
Cmax μg/mL		
平均值(±SD)	1.63 (± 0.59)	0.57 (±0.12)
AUCinf，μg*h/mL		
平均值(±SD)	14.5 (± 7.6)	26.7 (+10.7)

[0688] AUCinf:外推至无穷大之浓度-时间曲线下面积;Cmax:最大值

[0689] 浓度;SD:标准差;Tmax:达至Cmax之时间

[0690] 表7.16.1B.在aTTP患者中40天10mg皮下每日施用卡帕珠单抗之后的模拟平均稳态药代动力学暴露参数(AUC、Cmax、Cmin及Cavg)及对应药效学作用(相对于基线的vWF:Ag变化)

[0691]

参数	稳态
AUCτ，μg*h/mL中值(5th-95th %)	12.5 (7.03至23.1)
Cmax，μg/mL中值(5th-95th %)	0.609 (0.355至1.079)
Cmin，μg/mL中值(5th-95th %)	0.436 (0.230至0.843)
Cavg，μg/mL中值(5th-95th %)	0.520 (0.293至0.960)
相对于基线的vWF:Ag变化(%)	-43.8 (-67.7至0.5)

[0692] aTTP:获得性血栓性血小板减少性紫癜;AUCτ:给药时间间隔期间浓度-时间曲线下之面积;Cavg:平均浓度;Cmax:最大浓度;Cmin:最小浓度;vWF:Ag:冯维勒布兰德因子抗原。

[0693] 7.16.2分布及代谢

[0694] 卡帕珠单抗药代动力学呈现两相血浆特征。通过群体药代动力学模型,分别在健康志愿者及aTTP患者中评估5.35及6.33L之分布之中心体积,而外周分布体积经估计为

27L。

[0695] 食蟹猕猴中之临床前研究指明,在全身循环中,卡帕珠单抗在五分钟内结合且中和其vWF活性。卡帕珠单抗-vWF复合物为主要的循环卡帕珠单抗形式,分布于肝脏中且类似于未结合的vWF,其快速通过网状内皮系统分解代谢。临床前研究表明,分布于其他充分灌注器官/组织之过量未结合卡帕珠单抗,其中其通过高容量非特异性代谢降解。MW为28KDa之游离卡帕珠单抗可经由肾小球过滤,但不自由。整体消除较小蛋白质之肾脏作用视其他身体区域中之蛋白分解活性而定。对于卡帕珠单抗,尿液中回收之施用剂量之级分为可忽略的(<0.5%)。

[0696] 7.16.3消除

[0697] 卡帕珠单抗之表观清除率随着施用剂量改变。在10mg单次静脉内剂量之后,在健康志愿者中,使用一模型非依赖性方法估算出769±343mL/h之平均清除率及19.2±7.5h之平均终半衰期。在皮下给药之后,卡帕珠单抗之药代动力学似乎为吸收可控的。在10mg单次皮下剂量之后,在健康志愿者中,平均表观清除率为386±160mL/h平均终末半衰期为38.5±22.2h。

[0698] 7.16.4剂量比例性

[0699] 随着在健康个体中卡帕珠单抗皮下剂量自2mg提高至16mg,Cmax及AUC提高小于剂量比例。对于1.0:2.0:4.0:5.0:8.0之剂量增加比率,平均Cmax比率为1.0:1.8:2.0:2.4:2.8且平均AUC提高比率为1.0:3.9:4.1:5.3:6.1。

[0700] 卡帕珠单抗之总清除率视药物及靶标水平而定且为线性(分解代谢)及非线性(靶标介导)清除率之总和。卡帕珠单抗之终半衰期亦为药物及靶标水平依赖性的。在健康志愿者中,平均表观终末半衰期在单次静脉内剂量(0.5至12mg)之后自13小时提高至40小时,且在单次皮下施用之后自11小时提高至53小时(2至16mg)。

[0701] 7.16.5人口统计因素及体型大小之作用

[0702] aTTP患者中之群体药代动力学分析显示,年龄、性别、人种及血型不影响卡帕珠单抗之药代动力学。如肌酐清除(CrCL)所表现之体重及肾功能对药代动力学具有统计显著作用,较低体重及CrCL之患者中之暴露预期较高。

[0703] 然而,具有此等共变量之极端值之患者群体中之预期暴露范围大部分重叠,如表7.16.5中所示,且认为不需要特异性剂量调节。基线vWF水平对药物暴露具有统计显著作用,但用提高的vWF提高患者药物暴露不会产生不同的药效学作用(相对于基线的vWF水平变化),且认为不需要单独的剂量调节(亦参见实施例7.16.6及7.18)。

[0704] 表7.16.5.在40天10mg皮下每日施用卡帕珠单抗之后在具有较轻体重、较高基线vWF水平及较低CrCL之aTTP患者中的模拟中值稳态药代动力学暴露参数(AUC、Cmax、Cmin)及对应药效学作用(相对于基线的vWF:Ag变化)。

[0705]

参数	BW=50 kg	aTTP患者 vWFb=60 nM	CrCL=15 mL/min
AUCτ，μg*h/mL 中值(5th-95 th %)	13.3 (8.3至24.5)	18.6 (11.9至33.4)	13.3 (7.7至26.1)
Cmax，μg/mL中值(5th-95 th %)	0.662 (0.424至1.159)	0.895(0.579至1.535)	0.643 (0.389至1.193)
Cmin，μg/mL中值(5th-95 th %)	0.452 (0.266至0.884)	0.670 (0.409至1.260)	0.468 (0.257至0.986)
Cavg，μg/mL中值(5th-95 th %)	0.555(0.345至1.021)	0.775 (0.498至1.391)	0.554 (0.322至1.085)
Cavg，μg/mL中值(5th-95 th %)	-45.4 (-69.2至-1.3)	-43.8 (-67.8至-0.6)	-45.2 (-68.4至-1.9)

[0706] aTTP:获得性血栓性血小板减少性紫癜;AUCτ给药时间间隔期间浓度-时间曲线下之面积;BW:体重;Cavg:平均浓度;Cmax:最大浓度;Cmin:最小浓度;CrCL:肌酐清除;vWF:冯维勒布兰德因子;vWF:Ag:冯维勒布兰德因子抗原。

[0707] 表7.16.6.特定群体中之药代动力学

[0708] 未在具有重度急性或慢性肝脏损伤之患者中进行卡帕珠单抗正式研究且关于卡帕珠单抗在此等群体中之用途之数据不可用。与卡帕珠单抗在轻度及中度肝脏受损患者中之用途相关的风险考虑为与整体患者群体中之风险类似,因为预期卡帕珠单抗-vWF复合物经由活化库普弗(Kupffer)细胞而非经由受损肝细胞脑实质清除。然而,使用卡帕珠单抗应注意具有重度肝脏损伤之患者,呈现较高风险之出血。

[0709] 未在卡帕珠单抗之药代动力学上进行肾损伤作用之正式研究。在群体药代动力学/药效学模型中,肾功能(基线CrCL,范围:11.9至>120mL/min)具有统计显著作用,其使得重度肾损伤之预测暴露(AUCss)之有限提高。在具有aTTP之患者之临床研究中,具有降低的肾功能之彼等者不显示不良事件之额外风险。

[0710] 7.16.7药物-药物相互作用

[0711] 未针对卡帕珠单抗进行活体外药物-药物相互作用研究,因为预期呈单可变结构域抗体片段形式之纳米抗体通过普遍存在的蛋白水解酶分解代谢,且并不直接与细胞色素P450同种型或其他代谢酶或转运蛋白相互作用。尽管细胞因子调节可为间接机制,经由该机制纳米抗体可改变CYP表现,对于卡帕珠单抗,不大可能的是细胞介素介导之CYP相关药物-药物相互作用:预期Nanobody®不具有免疫调节特性,因为其选择性地靶向vWF。

[0712] aTTP治疗通常涉及使用皮质类固醇及利妥昔单抗与阿司匹林,且较低MW肝素有时用作血栓预防。更罕见地,已在难治性疾病中使用长春新碱、环磷酰胺或环孢菌素。除了利妥昔单抗,所有此等化合物已知广泛地通过肝脏,经由CYP介导路径清除,但肾清除率路径仅为次要途径,且在此等治疗与卡帕珠单抗组合开始之情况下预期无药物-纳米抗体相互作用。对于其他单克隆抗体,通过非特异性高能力蛋白分解发生利妥昔单抗降解,其中无预

期药物-药物相互作用可能性。

[0713] 卡帕珠单抗选择性地且尤其抑制vWF之A1结构域。活体外，卡帕珠单抗仅部分与肝素竞争结合至vWF。活体内，共同施用之肝素与卡帕珠单抗之间的药效学相互作用预期不为临床上有意义的，因为肝素之主要靶向作用通过结合至酶抑制剂抗凝血酶III介导。

[0714] 7.16.8剂量-反应关系

[0715] 在单次递增静脉内及单次及重复皮下剂量施用之后健康志愿者之研究确认卡帕珠单抗之预期药理学响应及安全。

[0716] 7.17 PE对卡帕珠单抗之药代动力学及药效学之作用.

[0717] 背景:在患有获得性血栓性血小板减少性紫癜之患者之临床试验期间，卡帕珠单抗在血浆交换(PE)之前以10mg静脉内(i.v.)推注形式，继而在每日PE时间段及其后至少30天期间以10mg每日皮下(s.c.)剂量形式施用。

[0718] 目标:已研究第一次iv推注与后续PE之间的不同时间间隔之潜在作用及不同PE时程之作用。

[0719] 方法:使用非线性混合作用建模，研发整合式药代动力学(PK)/药代动力学(PD)模型以描述卡帕珠单抗与vWF之间的相互作用且用于针对不同预定情形模拟所得PK及PD:

[0720] (1)10mgi.v.推注卡帕珠单抗后3、5、11、23小时PE开始

[0721] (2)PE时程:在第一天或在7天期间每日及每天两次(bid)

[0722] 结果:临床试验之数据指明≥500ng/mL之卡帕珠单抗血浆浓度之vWF活性之完全中和。模拟表明，若PE开始直至卡帕珠单抗i.v.推注后5小时，则中值卡帕珠单抗血浆水平将保持高于此临限值。为了实现更长的推迟，中值卡帕珠单抗血浆水平可降至低于500ng/mL，且PE之前额外10mg s.c.剂量可维持有效药物暴露。

[0723] bid PE之作用之模拟7天表明，在PE时间段期间卡帕珠单抗之s.c.给药时程可用在每次PE治疗之后在bid PE治疗时间期间bid 10mg卡帕珠单抗s.c.给药调节。

[0724] 结论:若PE开始直至第一次i.v.剂量之卡帕珠单抗之后5小时，则预期有效药物水平。为了实现更长的推迟，可在PE之前设想额外10mg s.c.剂量。

[0725] 在bid PE 7天之情况下，可在每次PE治疗之后用bid卡帕珠单抗调节卡帕珠单抗s.c.施用时程。

[0726] 7.18通过基于机制之PKPD建模支持之aTTP患者中合理的卡帕珠单抗给药

[0727] 目标:为了描述在治疗后不同成年群体中卡帕珠单抗浓度与其靶标冯维勒布兰德因子抗原(vWF:Ag)之间的相互作用。研发模型应用于模拟假设情形以支持给药方案。

[0728] 方法:分析系基于健康志愿者(n＝100)、经受经皮冠状动脉介入术(PCI)之患者(n＝225)及患有获得性血栓性血小板减少性紫癜之患者(n＝216)中之卡帕珠单抗中之十个阶段I至III研究1-10数据，总共3629个PK及6295个PD观测结果。大部分aTTP患者接受血浆交换(PE)及免疫抑制剂治疗作为护理标准。数据中显示广泛范围的剂量水平、治疗及PE时程。包括i.v.及s.c.施用之后的数据。

[0729] 群体PKPD分析通过非线性混合作用建模，使用NONMEM版本7.3.0进行。分步研发该模型。起初，包括健康志愿者及PCI患者数据之数据组之子集用于模型研发。随后，更新该模型以描述与具有aTTP患者之数据组之子集中之aTTP疾病状况及护理标准、PE相关的特定特性。基于图形评估，藉助于NONMEM中之分层预测校正视觉预测检查及单变量评估，来评估年

龄、性别、人种、血型、体重、肌酐清除及伴随治疗之影响。

[0730] 使用aTTP患者之最终模型进行模拟以评估剂量、患者体重、儿科患者之剂量调节需要之变化的影响。

[0731] 结果:全靶介导之药物配置模型充分描述卡帕珠单抗与vWF:Ag之间的相互作用。该模型包括具有并行缓慢及快速一阶吸收过程及一阶游离药物线性消除之二室药物配置模型。该模型描述形成药物-vWF复合物,其能够形成二聚体及三聚体两者。传输隔室及池隔室中之vWF储存描述vWF之产生及成熟,模拟内皮中之怀布尔-帕拉德(Weibel-Palade)体中之储存及游离vWF之后续快速释放及消除。游离vWF半衰期固定为文献值16小时(Lenting等人2015 Blood 26:2019-2028;Favaloro等人2007 Thromb Haemost 97:922-930;Dobrkovska等人1998Haemophilia 4:33-39;Goudemand等人2005 J Thromb Haemost 3:2219-2227)。包括双回馈机构,其在vWF减少低于个体基线水平时刺激vWF自池之生产速率及释放。

[0732] 对于aTTP患者,疾病进展捕获为vWF:Ag随时间推移暂时提高且PE作用描述为游离vWF、游离药物及药物-vWF复合物之并行移除。在PE下群体典型完全消除速率经估计高3.7倍(对于游离药物)、高3.5倍(对于游离vWF)且高1.7倍(对于药物-vWF复合物)。

[0733] 体重全方位地包括于该模型(固定指数)中且肌酐清除鉴别为统计显著共变量,其中具有低于aTTP患者中之中值CRCL(100ml/min)之CRCL的患者之清除率略微降低。

[0734] 该模型成功地应用于模拟假设情形以支持给药方案、特定群体中之给药及如何处理遗漏给药。亦进行模拟以获悉儿科患者之给药方案且基于体型大小差异预测日本aTTP患者之PKPD行为。亦进行模拟以学习更多关于基线vWF:Ag浓度之影响以及PE时程在计时、强度及持续时间方面之作用。

[0735] 结论:研发半机理性群体PKPD模型以描述卡帕珠单抗与vWF之间的相互作用(基于vWF:Ag观测结果)。该模型充分描述随时间推移之药物-vWF复合物相互作用,包括aTTP患者中之疾病进展及由PE治疗决定之作用。该模型已成功地应用于提高对目标群体中卡帕珠单抗与vWF之间的PKPD相互作用之理解,且通过使用模拟支持成年及儿科患者中合理之给药且允许桥连日本aTTP患者。

[0736] 7.19对患有获得性血栓性血小板减少性紫癜之儿科患者之基于卡帕珠单抗模型的给药建议

[0737] 背景:获得性血栓性血小板减少性紫癜(aTTP)为罕见且危及生命的自体免疫血液凝固病症,相比于成人,儿童发病率低许多。已在阶段2及阶段3随机分组临床试验中在患有aTTP之成年患者中评估卡帕珠单抗。

[0738] 目标:因为无儿科患者入选卡帕珠单抗临床试验中,所以使用基于模型之模拟为此群体研发给药建议。

[0739] 方法:已使用非线性混合作用建模研发出一种半机理性药代动力学-药效学(PKPD)群体模型,其描述在不同成年群体中以不同剂量水平静脉内及皮下施用卡帕珠单抗之后卡帕珠单抗与冯维勒布兰德因子抗原(vWF:Ag)之间的相互作用。进行基于全方位按比例调整之PKPD模型之模拟确定青少年及>2岁儿童之适合的给药方案。限定八个年龄类别,每个类别包括1000名个体,且自全国健康及营养研究调查数据库(National Health and Nutrition Examination Survey database)取样对应个体体重。将不同年龄类别中之卡帕

珠单抗之模拟暴露水平与成人中预测之彼等者进行比较。

[0740] 结果:暴露模拟指示,平缓10mg每日给药将在较轻体重之儿童,主要10岁以下儿童中产生较高暴露量。将体重＜40kg之儿童剂量调节至5mg每日将在整个年龄及体重组中产生平均类似暴露量。体重调节给药亦预测在整个不同年龄组中产生高度类似的vWF:Ag抑制。

[0741] 结论:12-18岁、体重≥40kg之青少年之建议剂量为10mg及5mg(若＜40kg)。因为预期基于年龄差异,vWF:Ag抑制无差异,所以相同给药建议适用于2-12岁儿童:10mg(若体重≥40kg)及5mg(若＜40kg)。

[0742] 7.20经由管理获取程序用卡帕珠单抗治疗之aTTP患者之现实世界经历

[0743] 背景:获得性血栓性血小板减少性紫癜(aTTP)为危及生命的免疫介导性血栓性微血管病(TMA)。卡帕珠单抗在患有aTTP之患者中之疗效及安全已显示于随机分组临床试验中。

[0744] 目标:我们描述性报导在管理获取程序(MAP)期间aTTP患者之卡帕珠单抗之第一现实世界经历。

[0745] 方法:MAP合格性标准为:(i)具有aTTP发作之患者,其(ii)不可令人满意地用批准的疗法治疗;(iii)该患者对活性物质或赋形剂中之任一者无已知过敏反应;及(iv)未怀孕。根据需要产品之国家生效的法律及规定,准许获取卡帕珠单抗。根据所有适用的国家药物警戒法规,由请求医师报导安全相关事件。

[0746] 结果:自2018年5月14日直至2019年1月22日,收到118份MAP请求,其中批准75份,拒绝7份,35份未被请求者获取/撤回,且1份在评估中。在批准的请求中,67名患者接受卡帕珠单抗治疗,但最终8名未开始疗法。患者接受卡帕珠单抗作为一线疗法或用于治疗aTTP之难治性病程。疗法在37名患者中成功完成,13患者正在进行中,且17名患者中断(其中5名死亡)。患者发生之所有死亡均由于卡帕珠单抗开始较晚(对于重度难治性病程而言),且无一者视为与卡帕珠单抗相关。自发性安全报导与临床研究中观测到的安全概况一致,而无新安全信号。

[0747] 结论:aTTP患者之卡帕珠单抗之第一现实世界证据确认临床试验中观测到之卡帕珠单抗之重要益处,尤其若作为一线疗法开始。

[0748] 7.21新形式

[0749] 使用经修饰之抗药物抗体(mADA)分析来检测药物诱导之治疗紧急的ADA。mADA采用经修饰之卡帕珠单抗分子作为桥接形式之检测试剂,亦即,卡帕珠单抗-ALA变体(SEQ ID NO:24)。C端丙氨酸延伸的卡帕珠单抗不结合任何预先存在之抗体。

[0750] 在各种活体外实验中,卡帕珠单抗及C端丙氨酸延伸卡帕珠单抗表现等效。

[0751] 藉助于12A2H1(卡帕珠单抗之构件;SEQ ID NO:19)之比较性核磁共振(NMR)分析,展现C端延伸部分(丙氨酸)整体上不影响纳米抗体之构象。

[0752] 此外,在表面等离振子共振(SPR)上,展现类似的卡帕珠单抗及C端丙氨酸延伸的卡帕珠单抗与靶标(vWF)之结合特征。

[0753] 鉴于卡帕珠单抗与C端延伸的卡帕珠单抗之间类似的特性及特征,预期此等C端延伸的卡帕珠单抗化合物可与卡帕珠单抗类似同样用于治疗及/或预防aTTP。

[0754] 7.22结论.

[0755] 在过去二十年间，尽管对aTTP之病理生理学及较新免疫抑制剂之用途的理解有所提高，但治疗结果未改变，显著发病率及报导的死亡率高达20％(Joly等人2017 Blood 129:2836-2846)。卡帕珠单抗为针对vWF之A1结构域之纳米抗体，其阻断vWF-血小板黏着及聚集，且预防导致重度血小板减少及aTTP之组织及器官损伤的微血栓中之血小板之进一步消耗。

[0756] 基于患者病史、物理检验及外周血液涂片检查，aTTP保持临床诊断。实际上，与具有复发性疾病之彼等患者相比，在基线时，具有初次aTTP发作之患者具有延迟的表现及更严重的疾病。

[0757] 在此研究中，具有aTTP之临床诊断之患者入选合格，且在随机分组时进行确认ADAMTS13活性测试。在86％随机分组之彼等者中通过低于10％之ADAMTS13活性确认临床诊断。另外，在基线时20名患者中有13名ADAMTS13活性高于10％，其有TTP诊断基础，诸如TTP病史或研究期间其他时间点之受抑制的ADAMTS13活性。

[0758] 在阶段2TITAN研究中，卡帕珠单抗治疗使得血小板计数更快标准化且预防恶化。然而，具有未消退的潜在疾病活性之患者之子集中出现早期复发。因此，在本研究中，鼓励研究人员与具有持续性自体免疫活性证据之彼等患者中之免疫抑制优化一起延长盲法研究药物治疗。

[0759] 阶段3海格立斯研究结果确认以下假设：卡帕珠单抗治疗通过停止微血栓中之血小板消耗而缩短实现血小板计数响应之时间。其亦展现卡帕珠单抗对TTP相关死亡、TTP复发或重度血栓栓塞事件，同时对研究药物治疗及总体复发具有高度临床上有意义的影响。此研究结果验证了延长研究药物治疗及使具有未消退的潜在疾病之证据之患者中之免疫抑制优化的途径，如通过研究药物治疗之后相比于阶段2研究中之观测结果更低的复发次数所表明。实际上，在中止研究药物之后观测到之复发全部为ADAMTS13活性低于10％之患者。在现实世界情况中，为了保护此类患者不再复发aTTP，应延长卡帕珠单抗治疗直至潜在疾病消退。

[0760] 甚至在经历初次aTTP发作之患者之更严重疾病情况中，显示用卡帕珠单抗治疗改善结果，包括相比于安慰剂更快的血小板计数响应时间、更低的治疗期间具有死亡、复发或重度TE事件之患者之比例、更低的总体治疗期期间之复发率及预防不应性。

[0761] 在阶段2及阶段3研究中，在卡帕珠单抗治疗期间未报导死亡，其在死亡率预防方面为有利的结果。另外，不存在难以用血浆交换治疗之经卡帕珠单抗治疗的患者。此表明，卡帕珠单抗具有预防难治性疾病及此亚群中报导之较差结果的可能性。在用卡帕珠单抗治疗之患者中，亦倾向与器官损伤相关之标记物更快标准化。

[0762] 卡帕珠单抗按时治疗血小板计数响应及复发预防之影响与健康护理资源之可观节约相关。

[0763] 卡帕珠单抗干扰vWF(止血之关键蛋白质)，且基于此药理学作用，其与提高的黏膜皮肤出血风险相关，与冯威里氏病观测到之情况类似(Leebeek&Eikenboom 2016 N Engl J Med 375:2067-2080)。安全结果与此前报导一致。

[0764] ADAMTS13活性在处理aTTP方面逐渐相关，因为其为复发风险之预测标记物(Westwood等人2013 J Thromb Haemost 11:481-490;Peyvandi等人2008 Haematologica 93:232-239;Lammle等人2008 Haematologica 93:172-177;Knovich等人2012 Eur J

Haematol 88:518-525;Kremer Hovinga等人2010 Blood 115:1500-1511;quiz662;Bresin等人2009 Thromb Haemost 101:233-238;Cataland等人2009 Eur J Haematol 83:559-564;Goyal等人2013 J Clin Apher 28:390-394)。其值在目前研究中确认几乎所有复发患者均具有受抑制的ADAMTS13活性。超过50％患者在血浆交换时间段结束时尚未实现ADAMTS13活性标准化，且在此组血浆交换结束之后直至25天发生恶化，支持在实现血小板计数响应之后继续用卡帕珠单抗治疗至少30天的需求。

[0765] 卡帕珠单抗经由vWF介导之血小板黏着之快速阻断而代表为aTTP患者治疗设备之重要添加物。

[0766] 表A-1:包含针对vWF之ISVD及CDR的多肽之实例

[0767]

名称	SEQ ID NO	序列
12A02H1-3a-12A02H1 (ALX 0081)	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSS
12A02-3a-12A02	2	QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVAAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNNLKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFS

[0768]

		YNPMGWFRQAPGKERDLVAAISRTGGSTYYPD SVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNNLKPEDTAVY YCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTV SS
12A02-GS9-12 A02	3	QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYN PMGWFRQAPGKERDLVAAISRTGGSTYYPDSVE GRFTISRDNAKRMVYLQMNNLKPEDTAVYYCA AAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSG GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAA SGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVAAISRTGGS TYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNNLKPE DTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQG TQVTVSS
12A02-GS30-1 2A02	4	QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYN PMGWFRQAPGKERDLVAAISRTGGSTYYPDSVE GRFTISRDNAKRMVYLQMNNLKPEDTAVYYCA AAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPM GWFRQAPGKERDLVAAISRTGGSTYYPDSVEGR FTISRDNAKRMVYLQMNNLKPEGTAVYYCAAA GVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12A05-3a-12A0 5	5	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAM GMYRQAPGKQRELVATITSGGSTNYADPVKGRF TISRDGPKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCYANL KQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGMYR QAPGKQRELVATITSGGSTNYADPVKGRFTISRD GPKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCYANLKQGSY GYRFNDYWGQGTQVTVSS
12A05-GS9-12 A05	6	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAM GMYRQAPGKQRELVATITSGGSTNYADPVKGRF TISRDGPKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCYANL KQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGG

[0769]

		SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGA MGMYRQAPGKQRELVATITSGGSTNYADPVKG RFTISRDGPKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCYAN LKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS
12A05-GS30-12A05	7	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAM GMYRQAPGKQRELVATITSGGSTNYADPVKGRF TISRDGPKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCYANL KQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGMYRQAPGK QRELVATITSGGSTNYADPVKGRFTISRDGPKNT VYLQMNSLKPEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFN DYWGQGTQVTVSS
12B06-3a-12B06	8	QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYN PMGWFRQAPGKERDVVAAISRTGGSTYYARSV EGRFTISRDNAKRMVYLQMNALKPEDTAVYYC AAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS AAAEVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTF SYNPMGWFRQAPGKERDVVAAISRTGGSTYYA RSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNALKPEDTAV YYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQV TVSS
12B06-GS9-12B06	9	QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYN PMGWFRQAPGKERDVVAAISRTGGSTYYARSV EGRFTISRDNAKRMVYLQMNALKPEDTAVYYC AAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGALRLSCA ASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVAAISRTG GSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNALK PEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWG QGTQVTVSS
12B06-GS30-12B06	10	QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYN PMGWFRQAPGKERDVVAAISRTGGSTYYARSV EGRFTISRDNAKRMVYLQMNALKPEDTAVYYC

[0770]

		AAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNP MGWFRQAPGKERDVVAAISRTGGSTYYARSVE GRFTISRDNAKRMVYLQMNALKPEDTAVYYCA AAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS
	12A02H4-3a-12A02H4	11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNP MGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDSVE GRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCA AAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSA AAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSY NPMGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDS VEGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYY CAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVS S
	12B06H2-3a-12B06H2	12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNP MGWFRQAPGKGREVVAAISRTGGSTYYARSVE GRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCA AAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSSA AAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSY NPMGWFRQAPGKGREVVAAISRTGGSTYYARS VEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYY CAAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVS S
	12A02H1-GS9-12A02H1	13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNP MGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDSVE GRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCA AAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSG GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGST YYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAED TAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGT QVTVSS
	12A02H4-GS9-	14	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNP

[0771]

12A02H4		MGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDSVE GRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCA AAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSG GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGST YYPDSVEGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDT AVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQ VTVSS
12B06H2-GS9-12B06H2	15	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNP MGWFRQAPGKGREVVAAISRTGGSTYYARSVE GRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCA AAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSSG GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVVAAISRTGGS TYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAE DTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQG TQVTVSS
12A02H1-GS30-12A02H1	16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNP MGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDSVE GRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCA AAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMG WFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDSVEGRF TISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAA GVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12A02H4-GS30-12A02H4	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNP MGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDSVE GRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCA AAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMG WFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDSVEGRF TISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAG

		VRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
	12B06H2-GS30-12B06H2	18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVVAAISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVVAAISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS
	12A02H1	19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
[0772]	12A02H1 CDR1	21	YNPMG
	12A02H1 CDR2	22	AISRTGGSTYYPDSVEG
	12A02H1 CDR3	23	AGVRAEDGRVRTLPSEYTF
	ALX 0081-A	24	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSA

[0773] 表A-2

[0774]

名称	SEQ ID NO	序列
人 类 vWF	20	MIPARFAGVLLALALILPGTLCAEGTRGRSSTARCSLFG SDFVNTFDGSMYSFAGYCSYLLAGGCQKRSFSIIGDFQ NGKRVSLSVYLGEFFDIHLFVNGTVTQGDQRVSMPYA SKGLYLETEAGYYKLSGEAYGFVARIDGSGNFQVLLSD RYFNKTCGLCGNFNIFAEDDFMTQEGTLTSDPYDFANS WALSSGEQWCERASPPSSSCNISSGEMQKGLWEQCQL LKSTSVFARCHPLVDPEPFVALCEKTLCECAGGLECAC PALLEYARTCAQEGMVLYGWTDHSACSPVCPAGMEY RQCVSPCARTCQSLHINEMCQERCVDGCSCPEGQLLD EGLCVESTECPCVHSGKRYPPGTSLSRDCNTCICRNSQ WICSNEECPGECLVTGQSHFKSFDNRYFTFSGICQYLL ARDCQDHSFSIVIETVQCADDRDAVCTRSVTVRLPGLH NSLVKLKHGAGVAMDGQDIQLPLLKGDLRIQHTVTAS VRLSYGEDLQMDWDGRGRLLVKLSPVYAGKTCGLCG NYNGNQGDDFLTPSGLAEPRVEDFGNAWKLHGDCQD LQKQHSDPCALNPRMTRFSEEACAVLTSPTFEACHRAV SPLPYLRNCRYDVCSCSDGRECLCGALASYAAACAGR GVRVAWREPGRCELNCPKGQVYLQCGTPCNLTCRSLS YPDEECNEACLEGCFCPPGLYMDERGDCVPKAQCPCY YDGEIFQPEDIFSDHHTMCYCEDGFMHCTMSGVPGSL LPDAVLSSPLSHRSKRSLSCRPPMVKLVCPADNLRAEG LECTKTCQNYDLECMSMGCVSGCLCPPGMVRHENRC VALERCPCFHQGKEYAPGETVKIGCNTCVCRDRKWNC TDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQ DYCGSNPGTFRILVGNKGCSHPSVKCKKRVTILVEGGE IELFDGEVNVKRPMKDETHFEVVESGRYIILLLGKALS VVWDRHLSISVVLKQTYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLT SSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPAT CHNNIMKQTMVDSSCRILTSDVFQDCNKLVDPEPYLD VCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHGKVVT WRTATLCPQSCEERNLRENGYECEWRYNSCAPACQVT CQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPE

[0775]

		DCPVCEVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICHCDVVN LTCEACQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHDF YCSRLLDLVFLLDGSSRLSEAEFEVLKAFVVDMMERL RISQKWVRVAVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSELRRIAS QVKYAGSQVASTSEVLKYTLFQIFSKIDRPEASRIALLL MASQEPQRMSRNFVRYVQGLKKKKVIVIPVGIGPHAN LKQIRLIEKQAPENKAFVLSSVDELEQQRDEIVSYLCD LAPEAPPPTLPPHMAQVTVGPGLRNSMVLDVAFVLEG SDKIGEADFNRSKEFMEEVIQRMDVGQDSIHVTVLQY SYMVTVEYPFSEAQSKGDILQRVREIRYQGGNRTNTGL ALRYLSDHSFLVSQGDREQAPNLVYMVTGNPASDEIK RLPGDIQVVPIGVGPNANVQELERIGWPNAPILIQDFET LPREAPDLVLQRCCSGEGLQIPTLSPAPDCSQPLDVILL LDGSSSFPASYFDEMKSFAKAFISKANIGPRLTQVSVLQ YGSITTIDVPWNVVPEKAHLLSLVDVMQREGGPSQIGD ALGFAVRYLTSEMHGARPGASKAVVILVTDVSVDSVD AAADAARSNRVTVFPIGIGDRYDAAQLRILAGPAGDSN VVKLQRIEDLPTMVTLGNSFLHKLCSGFVRICMDEDG NEKRPGDVWTLPDQCHTVTCQPDGQTLLKSHRVNCD RGLRPSCPNSQSPVKVEETCGCRWTCPCVCTGSSTRHI VTFDGQNFKLTGSCSYVLFQNKEQDLEVILHNGACSP GARQGCMKSIEVKHSALSVELHSDMEVTVNGRLVSVP YVGGNMEVNVYGAIMHEVRFNHLGHIFTFTPQNNEFQ LQLSPKTFASKTYGLCGICDENGANDFMLRDGTVTTD WKTLVQEWTVQRPGQTCQPILEEQCLVPDSSHCQVLL LPLFAECHKVLAPATFYAICQQDSCHQEQVCEVIASYA HLCRTNGVCVDWRTPDFCAMSCPPSLVYNHCEHGCPR HCDGNVSSCGDHPSEGCFCPPDKVMLEGSCVPEEACT QCIGEDGVQHQFLEAWVPDHQPCQICTCLSGRKVNCT TQPCPTAKAPTCGLCEVARLRQNADQCCPEYECVCDP VSCDLPPVPHCERGLQPTLTNPGECRPNFTCACRKEEC KRVSPPSCPPHRLPTLRKTQCCDEYECACNCVNSTVSC PLGYLASTATNDCGCTTTTCLPDKVCVHRSTIYPVGQF WEEGCDVCTCTDMEDAVMGLRVAQCSQKPCEDSCRS GFTYVLHEGECCGRCLPSACEVVTGSPRGDSQSSWKS

[0776]

		VGSQWASPENPCLINECVRVKEEVFIQQRNVSCPQLEV PVCPSGFQLSCKTSACCPSCRCERMEACMLNGTVIGPG KTVMIDVCTTCRCMVQVGVISGFKLECRKTTCNPCPL GYKEENNTGECCGRCLPTACTIQLRGGQIMTLKRDETL QDGCDTHFCKVNERGEYFWEKRVTGCPPFDEHKCLA EGGKIMKIPGTCCDTCEEPECNDITARLQYVKVGSCKS EVEVDIHYCQGKCASKAMYSIDINDVQDQCSCCSPTR TEPMQVALHCTNGSVVYHEVLNAMECKCSPRKCSK

[0777] 表5

[0778]

缩写	解释
ACS	急性冠状动脉综合征
ADAMTS13	具有血小板反应蛋白重复序列13之解联蛋白样及金属蛋白酶
ALX 0081	卡帕珠单抗(SEQ ID NO: 1)
ALX 0081-A	卡帕珠单抗加C端丙氨酸(SEQ ID NO: 24)
aTTP	获得性血栓性血小板减少性紫癜
AUC	曲线下面积
bid	一天两次
BNP	脑利尿钠肽
CAP	卡帕珠单抗(SEQ ID NO: 1)
CDR	互补决定区
cIEF	毛细管等电聚焦
Cmax	最大浓度
CrCL	肌酐清除
cTnI	心脏肌钙蛋白I
cTnT	心脏肌钙蛋白T
dAb	单结构域抗体
DB	双盲
DVT	深静脉血栓形成
ECG	心电图
EIA	酶免疫分析法
ELISA	酶联免疫吸附测定
FACS	荧光激活细胞分选
ICF	知情同意书
ICU	重症监护室
ISVD	免疫球蛋白单可变结构域
i.v.	静脉内
FR	构架区
FRET	荧光共振能量转移
FU	随访
GCS	格拉斯哥昏迷量表

[0779]

GST	谷胱甘肽-S-转移酶
HUS	溶血性尿毒综合征
KA	缔合常数
KD	解离常数
LDH	乳酸脱氢酶
LMWH	低分子量肝素
MAHA	微血管病溶血性贫血
MAHAT	微血管病溶血性贫血及血小板减少
MI	心肌梗死
MAP	管理获取程序
NCA	非区室分析
NMR	核磁共振
NSE	神经元特异性烯醇酶
NT proBNP	N端促脑利尿钠肽
OL	开放标记
PCI	经皮冠状动脉介入术
PE或PEX	血浆交换
PKPD	药代动力学-药效学
RIA	放射免疫分析
RICO	利托菌素辅因子活性
RIPA	利托菌素血小板凝集
RP-HPLC	反相高效液相层析
SAE	严重不良事件
s.c.	皮下
scFv	单链可变片段
SD	标准差
S/D	溶剂/去污剂
SE-HPLC	尺寸排阻高效液相层析
SPR	表面等离振子共振
TE	血栓栓塞事件
TMA	血栓性微血管病
TnI	肌钙蛋白I
TnT	肌钙蛋白T
TTP	血栓性血小板减少性紫癜

[0780]

TRALI	输注相关急性肺损伤
TTP	血栓性血小板减少性紫癜
ULN	上限正常值
ULvWF	超大vWF
VH	重链可变结构域
VHH	来源于重链抗体之重链可变结构域序列
VL	轻链可变结构域
vWF	冯维勒布兰德因子

序列表

<110> 埃博灵克斯股份有限公司

<120> 以免疫球蛋白单可变结构域治疗TTP初次发作的方法

<130> P18-002-PCT-1

<150> US62/627,082
<151> 2018-02-06

<150> US62/662,381
<151> 2018-04-25

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 259
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

[0001] <400> 1

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
            20                  25                  30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
        35                  40                  45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
            100                 105                 110
```

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
145 150 155 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
165 170 175

Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro
180 185 190

Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
195 200 205

Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

[0002]

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg
225 230 235 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
245 250 255

Val Ser Ser

<210> 2
<211> 259
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

<400> 2

Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

```
Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
        35                  40                  45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
            100                 105                 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
    130                 135                 140
```

[0003]

```
Ala Gly Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
145                 150                 155                 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg
                165                 170                 175

Asp Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro
            180                 185                 190

Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
        195                 200                 205

Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
    210                 215                 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg
225                 230                 235                 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
                245                 250                 255
```

Val Ser Ser

<210> 3
<211> 265
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

<400> 3

Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

[0004]

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala
145 150 155 160

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln
165 170 175

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly
180 185 190

Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser
195 200 205

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys
210 215 220

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala
225 230 235 240

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly
245 250 255

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265

[0005]

<210> 4
<211> 286
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

<400> 4

Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

```
Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
            100                 105                 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145                 150                 155                 160

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu
                165                 170                 175

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met
            180                 185                 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val Ala Ala
        195                 200                 205
```

[0006]

```
Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly
    210                 215                 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
225                 230                 235                 240

Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Gly Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
                245                 250                 255

Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
            260                 265                 270

Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        275                 280                 285
```

<210> 5
<211> 247
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

<400> 5

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly
20 25 30

Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr
85 90 95

Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp
100 105 110

[0007]

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Val Gln
115 120 125

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
130 135 140

Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly Ala Met Gly
145 150 155 160

Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile
165 170 175

Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly Arg Phe
180 185 190

Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
195 200 205

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala Asn Leu
210 215 220

Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 6
<211> 253
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

<400> 6

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly
20 25 30

Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
[0008] 35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr
85 90 95

Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe

145 150 155 160

Ser Ile Gly Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg
165 170 175

Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp
180 185 190

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr
195 200 205

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
210 215 220

Tyr Cys Tyr Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn
225 230 235 240

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245 250

[0009] <210> 7
<211> 274
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

<400> 7

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly
20 25 30

Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr
85 90 95

Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
145 150 155 160

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala
165 170 175

Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala
180 185 190

[0010]

Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser
195 200 205

Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
210 215 220

Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
225 230 235 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr
245 250 255

Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
260 265 270

Ser Ser

〈210〉 8
〈211〉 259
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

<400> 8

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                  10                  15

Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
            20                  25                  30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val
        35                  40                  45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
```

[0011]

```
Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
            100                 105                 110

Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
    130                 135                 140

Ala Gly Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
145                 150                 155                 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg
                165                 170                 175

Asp Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
            180                 185                 190

Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
        195                 200                 205
```

Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg
225 230 235 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
245 250 255

Val Ser Ser

<210> 9
<211> 265
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

<400> 9

[0012]

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala
145                 150                 155                 160

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln
                165                 170                 175

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly
            180                 185                 190

Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser
        195                 200                 205

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys
    210                 215                 220

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala
225                 230                 235                 240
```

[0013]

```
Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly
                245                 250                 255

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
            260                 265
```

<210> 10
<211> 286
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

<400> 10

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
            20                  25                  30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val
        35                  40                  45
```

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145 150 155 160

[0014]

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu
165 170 175

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met
180 185 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val Ala Ala
195 200 205

Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly
210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
225 230 235 240

Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
245 250 255

Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
260 265 270

Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280 285

<210> 11
<211> 259
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

[0015]

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
145 150 155 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
165 170 175

Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro
180 185 190

Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
195 200 205

Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg
225 230 235 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
245 250 255

Val Ser Ser

<210> 12
<211> 259
<212> PRT
[0016] <213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
145 150 155 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
165 170 175

Glu Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
180 185 190

[0017] Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
195 200 205

Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg
225 230 235 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
245 250 255

Val Ser Ser

<210> 13
<211> 265
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

<400> 13

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
            20                  25                  30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
        35                  40                  45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
            100                 105                 110
```

[0018]

```
Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
145                 150                 155                 160

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln
                165                 170                 175

Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly
            180                 185                 190

Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser
        195                 200                 205

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
    210                 215                 220

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala
```

225 230 235 240

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly
245 250 255

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265

<210> 14
<211> 265
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

[0019]

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
130 135 140

```
Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
145                 150                 155                 160

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln
                165                 170                 175

Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly
            180                 185                 190

Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser
        195                 200                 205

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
    210                 215                 220

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala
225                 230                 235                 240

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly
                245                 250                 255
```

[0020]

```
Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
            260                 265
```

〈210〉 15
〈211〉 265
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 纳米抗体序列

〈400〉 15

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
            20                  25                  30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val
        35                  40                  45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val
    50                  55                  60
```

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
145 150 155 160

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln
165 170 175

[0021]

Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly
180 185 190

Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser
195 200 205

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
210 215 220

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala
225 230 235 240

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly
245 250 255

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265

<210> 16
<211> 286
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

<400> 16

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
            20                  25                  30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
        35                  40                  45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
```

[0022]

```
Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
            100                 105                 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145                 150                 155                 160

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
                165                 170                 175

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met
            180                 185                 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala
        195                 200                 205
```

Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly
210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
225 230 235 240

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
245 250 255

Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
260 265 270

Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280 285

<210> 17
<211> 286
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

[0023]

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

```
Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145                 150                 155                 160

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
                165                 170                 175

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met
            180                 185                 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala
        195                 200                 205

Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly
    210                 215                 220
```

[0024]

```
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln
225                 230                 235                 240

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
                245                 250                 255

Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
            260                 265                 270

Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        275                 280                 285
```

〈210〉 18
〈211〉 286
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 纳米抗体序列

〈400〉 18

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
```

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

[0025] Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145 150 155 160

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
165 170 175

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met
180 185 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val Ala Ala
195 200 205

Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly
210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
225 230 235 240

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
245 250 255

Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
260 265 270

Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280 285

<210> 19
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
[0026] 20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 20

<211> 2804
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20

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

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

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
50 55 60

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

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

[0027]

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
100 105 110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
165 170 175

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala
180 185 190

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser
195 200 205

Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln
210 215 220

Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu
225 230 235 240

Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu
245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala
260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His
275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys
290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met
305 310 315 320

[0028]

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu
325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His
340 345 350

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn
355 360 365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys
370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp
385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg
405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys
420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu
435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val
450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu
465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
530 535 540

[0029] Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln
545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
565 570 575

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

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu

660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe
675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys
690 695 700

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp
705 710 715 720

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val
740 745 750

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg
755 760 765

Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu
[0030] 770 775 780

Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
785 790 795 800

Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg
805 810 815

His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
820 825 830

Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr
835 840 845

Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp
850 855 860

Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly
865 870 875 880

Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp
885 890 895

```
Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys
            900                 905                 910

Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu
        915                 920                 925

Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys
    930                 935                 940

Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg
945                 950                 955                 960

Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg
                965                 970                 975

His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val
            980                 985                 990

Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp  Gly Ile Gln Asn Asn  Asp Leu Thr
        995                 1000                1005
```

[0031]

```
Ser Ser  Asn Leu Gln Val Glu  Glu Asp Pro Val Asp  Phe Gly Asn
    1010                1015                1020

Ser Trp  Lys Val Ser Ser Gln  Cys Ala Asp Thr Arg  Lys Val Pro
    1025                1030                1035

Leu Asp  Ser Ser Pro Ala Thr  Cys His Asn Asn Ile  Met Lys Gln
    1040                1045                1050

Thr Met  Val Asp Ser Ser Cys  Arg Ile Leu Thr Ser  Asp Val Phe
    1055                1060                1065

Gln Asp  Cys Asn Lys Leu Val  Asp Pro Glu Pro Tyr  Leu Asp Val
    1070                1075                1080

Cys Ile  Tyr Asp Thr Cys Ser  Cys Glu Ser Ile Gly  Asp Cys Ala
    1085                1090                1095

Cys Phe  Cys Asp Thr Ile Ala  Ala Tyr Ala His Val  Cys Ala Gln
    1100                1105                1110
```

```
His Gly  Lys Val Val Thr Trp  Arg Thr Ala Thr Leu  Cys Pro Gln
    1115                 1120                 1125

Ser Cys  Glu Glu Arg Asn Leu  Arg Glu Asn Gly Tyr  Glu Cys Glu
    1130                 1135                 1140

Trp Arg  Tyr Asn Ser Cys Ala  Pro Ala Cys Gln Val  Thr Cys Gln
    1145                 1150                 1155

His Pro  Glu Pro Leu Ala Cys  Pro Val Gln Cys Val  Glu Gly Cys
    1160                 1165                 1170

His Ala  His Cys Pro Pro Gly  Lys Ile Leu Asp Glu  Leu Leu Gln
    1175                 1180                 1185

Thr Cys  Val Asp Pro Glu Asp  Cys Pro Val Cys Glu  Val Ala Gly
    1190                 1195                 1200

Arg Arg  Phe Ala Ser Gly Lys  Lys Val Thr Leu Asn  Pro Ser Asp
    1205                 1210                 1215
```

[0032]

```
Pro Glu  His Cys Gln Ile Cys  His Cys Asp Val Val  Asn Leu Thr
    1220                 1225                 1230

Cys Glu  Ala Cys Gln Glu Pro  Gly Gly Leu Val Val  Pro Pro Thr
    1235                 1240                 1245

Asp Ala  Pro Val Ser Pro Thr  Thr Leu Tyr Val Glu  Asp Ile Ser
    1250                 1255                 1260

Glu Pro  Pro Leu His Asp Phe  Tyr Cys Ser Arg Leu  Leu Asp Leu
    1265                 1270                 1275

Val Phe  Leu Leu Asp Gly Ser  Ser Arg Leu Ser Glu  Ala Glu Phe
    1280                 1285                 1290

Glu Val  Leu Lys Ala Phe Val  Val Asp Met Met Glu  Arg Leu Arg
    1295                 1300                 1305

Ile Ser  Gln Lys Trp Val Arg  Val Ala Val Val Glu  Tyr His Asp
    1310                 1315                 1320
```

Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser
1325 1330 1335

Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln
1340 1345 1350

Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile
1355 1360 1365

Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu
1370 1375 1380

Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val
1385 1390 1395

Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro
1400 1405 1410

Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile
1415 1420 1425

[0033] Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val
1430 1435 1440

Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys
1445 1450 1455

Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro His Met
1460 1465 1470

Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Arg Asn Ser Met Val Leu
1475 1480 1485

Asp Val Ala Phe Val Leu Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala
1490 1495 1500

Asp Phe Asn Arg Ser Lys Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg
1505 1510 1515

Met Asp Val Gly Gln Asp Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr
1520 1525 1530

Ser Tyr Met Val Thr Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser

1535 1540 1545

Lys Gly Asp Ile Leu Gln Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly
1550 1555 1560

Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp
1565 1570 1575

His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn
1580 1585 1590

Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys
1595 1600 1605

Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro
1610 1615 1620

Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala
1625 1630 1635

[0034]
Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro
1640 1645 1650

Asp Leu Val Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile
1655 1660 1665

Pro Thr Leu Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val
1670 1675 1680

Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe
1685 1690 1695

Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn
1700 1705 1710

Ile Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser
1715 1720 1725

Ile Thr Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala
1730 1735 1740

His Leu Leu Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro
1745 1750 1755

Ser Gln Ile Gly Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr
1760 1765 1770

Ser Glu Met His Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val
1775 1780 1785

Ile Leu Val Thr Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala
1790 1795 1800

Asp Ala Ala Arg Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile
1805 1810 1815

Gly Asp Arg Tyr Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro
1820 1825 1830

Ala Gly Asp Ser Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu
1835 1840 1845

Pro Thr Met Val Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys
1850 1855 1860

[0035]

Ser Gly Phe Val Arg Ile Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys
1865 1870 1875

Arg Pro Gly Asp Val Trp Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val
1880 1885 1890

Thr Cys Gln Pro Asp Gly Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val
1895 1900 1905

Asn Cys Asp Arg Gly Leu Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser
1910 1915 1920

Pro Val Lys Val Glu Glu Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro
1925 1930 1935

Cys Val Cys Thr Gly Ser Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp
1940 1945 1950

Gly Gln Asn Phe Lys Leu Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe
1955 1960 1965

Gln Asn Lys Glu Gln Asp Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala
1970 1975 1980

Cys Ser Pro Gly Ala Arg Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val
1985 1990 1995

Lys His Ser Ala Leu Ser Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val
2000 2005 2010

Thr Val Asn Gly Arg Leu Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn
2015 2020 2025

Met Glu Val Asn Val Tyr Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe
2030 2035 2040

Asn His Leu Gly His Ile Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu
2045 2050 2055

Phe Gln Leu Gln Leu Ser Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr
2060 2065 2070

[0036]

Gly Leu Cys Gly Ile Cys Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met
2075 2080 2085

Leu Arg Asp Gly Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln
2090 2095 2100

Glu Trp Thr Val Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu
2105 2110 2115

Glu Glu Gln Cys Leu Val Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu
2120 2125 2130

Leu Leu Pro Leu Phe Ala Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala
2135 2140 2145

Thr Phe Tyr Ala Ile Cys Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln
2150 2155 2160

Val Cys Glu Val Ile Ala Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn
2165 2170 2175

Gly Val Cys Val Asp Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser
2180 2185 2190

Cys Pro Pro Ser Leu Val Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro
2195 2200 2205

Arg His Cys Asp Gly Asn Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser
2210 2215 2220

Glu Gly Cys Phe Cys Pro Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser
2225 2230 2235

Cys Val Pro Glu Glu Ala Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly
2240 2245 2250

Val Gln His Gln Phe Leu Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro
2255 2260 2265

Cys Gln Ile Cys Thr Cys Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr
2270 2275 2280

[0037] Thr Gln Pro Cys Pro Thr Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys
2285 2290 2295

Glu Val Ala Arg Leu Arg Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu
2300 2305 2310

Tyr Glu Cys Val Cys Asp Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val
2315 2320 2325

Pro His Cys Glu Arg Gly Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly
2330 2335 2340

Glu Cys Arg Pro Asn Phe Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys
2345 2350 2355

Lys Arg Val Ser Pro Pro Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr
2360 2365 2370

Leu Arg Lys Thr Gln Cys Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn
2375 2380 2385

Cys Val Asn Ser Thr Val Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser

2390 2395 2400

Thr Ala Thr Asn Asp Cys Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro
2405 2410 2415

Asp Lys Val Cys Val His Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln
2420 2425 2430

Phe Trp Glu Glu Gly Cys Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu
2435 2440 2445

Asp Ala Val Met Gly Leu Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro
2450 2455 2460

Cys Glu Asp Ser Cys Arg Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu
2465 2470 2475

Gly Glu Cys Cys Gly Arg Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val
2480 2485 2490

Thr Gly Ser Pro Arg Gly Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val
[0038] 2495 2500 2505

Gly Ser Gln Trp Ala Ser Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu
2510 2515 2520

Cys Val Arg Val Lys Glu Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val
2525 2530 2535

Ser Cys Pro Gln Leu Glu Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln
2540 2545 2550

Leu Ser Cys Lys Thr Ser Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu
2555 2560 2565

Arg Met Glu Ala Cys Met Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly
2570 2575 2580

Lys Thr Val Met Ile Asp Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val
2585 2590 2595

Gln Val Gly Val Ile Ser Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr
2600 2605 2610

Thr Cys Asn Pro Cys Pro Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr
2615 2620 2625

Gly Glu Cys Cys Gly Arg Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln
2630 2635 2640

Leu Arg Gly Gly Gln Ile Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu
2645 2650 2655

Gln Asp Gly Cys Asp Thr His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly
2660 2665 2670

Glu Tyr Phe Trp Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp
2675 2680 2685

Glu His Lys Cys Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro
2690 2695 2700

Gly Thr Cys Cys Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile
2705 2710 2715

[0039]

Thr Ala Arg Leu Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu
2720 2725 2730

Val Glu Val Asp Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys
2735 2740 2745

Ala Met Tyr Ser Ile Asp Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser
2750 2755 2760

Cys Cys Ser Pro Thr Arg Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His
2765 2770 2775

Cys Thr Asn Gly Ser Val Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met
2780 2785 2790

Glu Cys Lys Cys Ser Pro Arg Lys Cys Ser Lys
2795 2800

<210> 21
<211> 5
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 21

Tyr Asn Pro Met Gly
1 5

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 22

Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

Gly

[0040]

<210> 23
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3

<400> 23

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

Tyr Thr Phe

<210> 24
<211> 260
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

<400> 24

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
            20                  25                  30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
        35                  40                  45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
            100                 105                 110
```

[0041]

```
Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
    130                 135                 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
145                 150                 155                 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
                165                 170                 175

Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro
            180                 185                 190

Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
        195                 200                 205

Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
    210                 215                 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg
```

225 230 235 240

[0042]

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
245 250 255

Val Ser Ser Ala
260

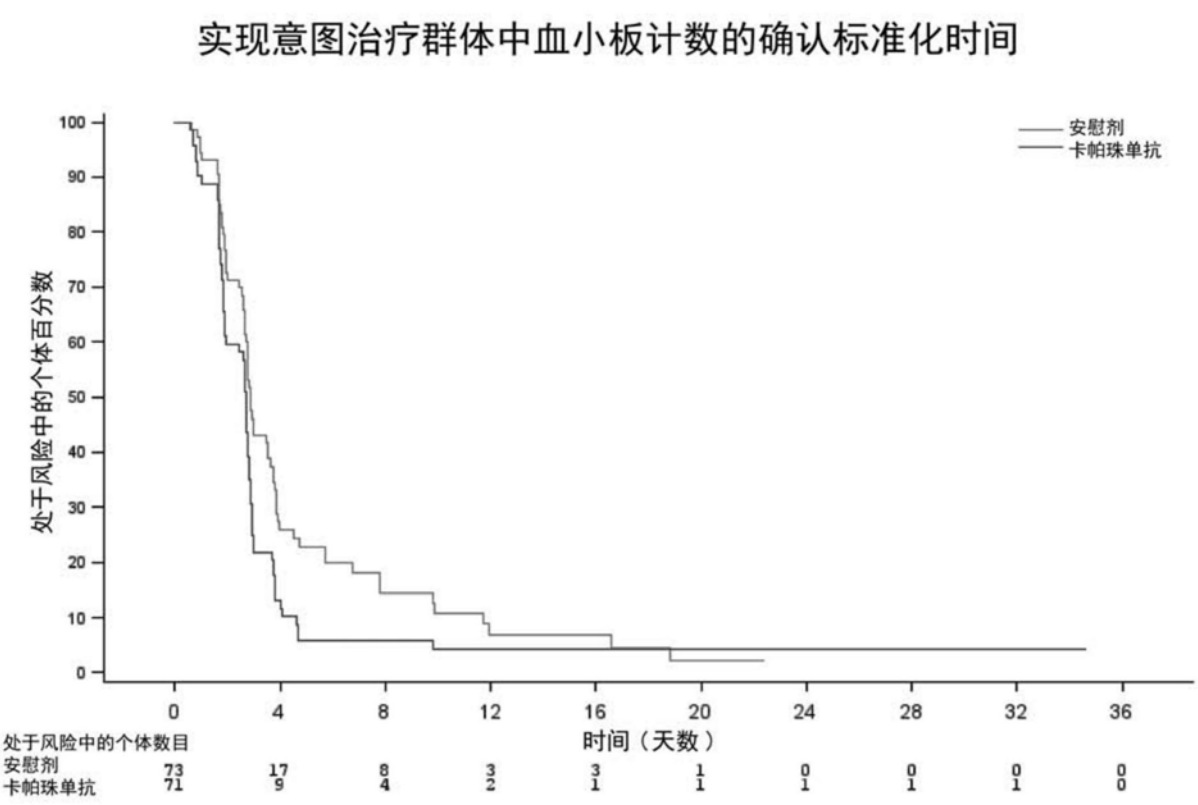

实现意图治疗群体中血小板计数的确认标准化时间
安慰剂
卡帕珠单抗
处于风险中的个体百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
时间（天数）
处于风险中的个体数目
安慰剂 73 17 8 3 3 1 0 0 0 0
卡帕珠单抗 71 9 4 2 1 1 1 1 1 0

图1

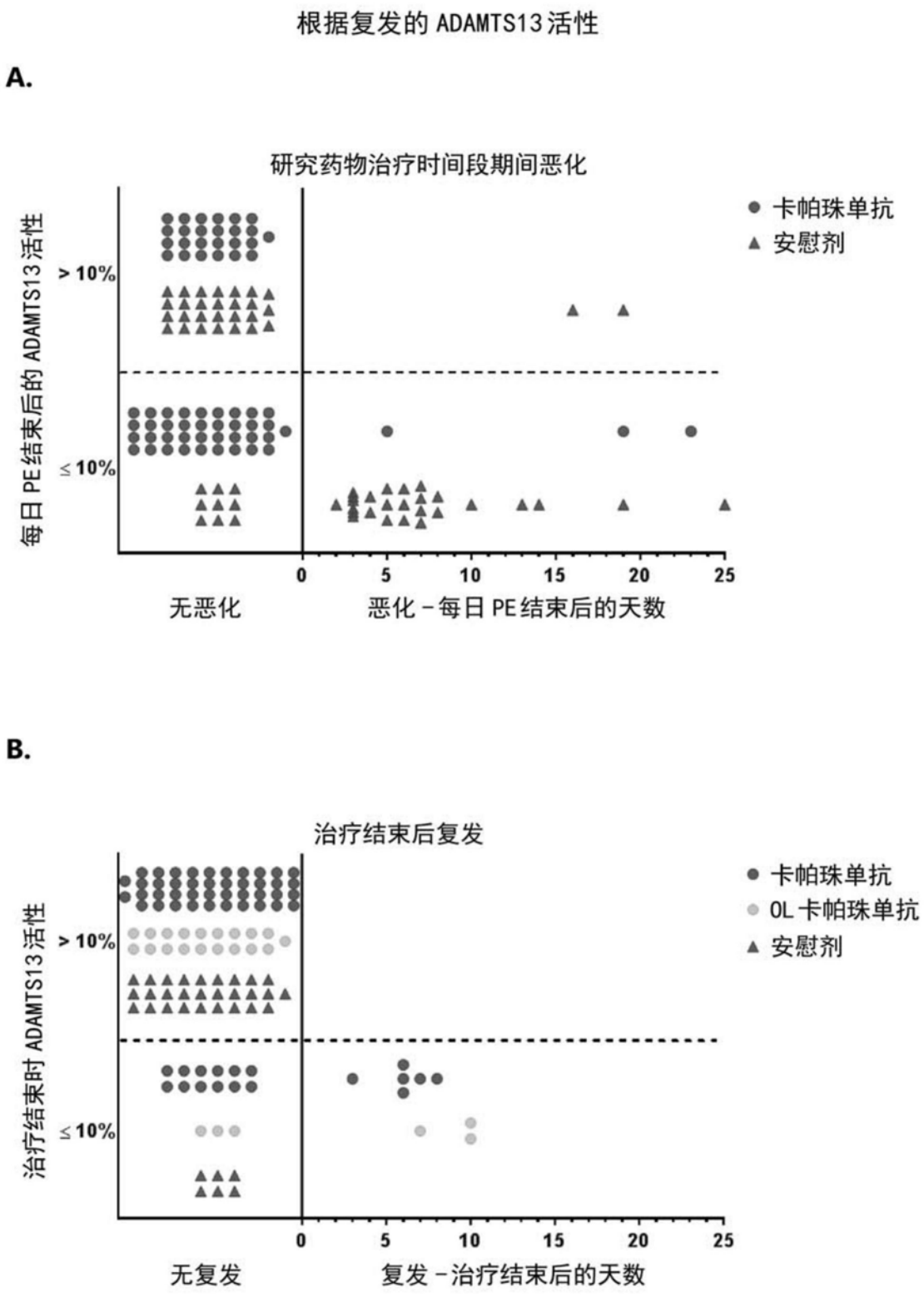
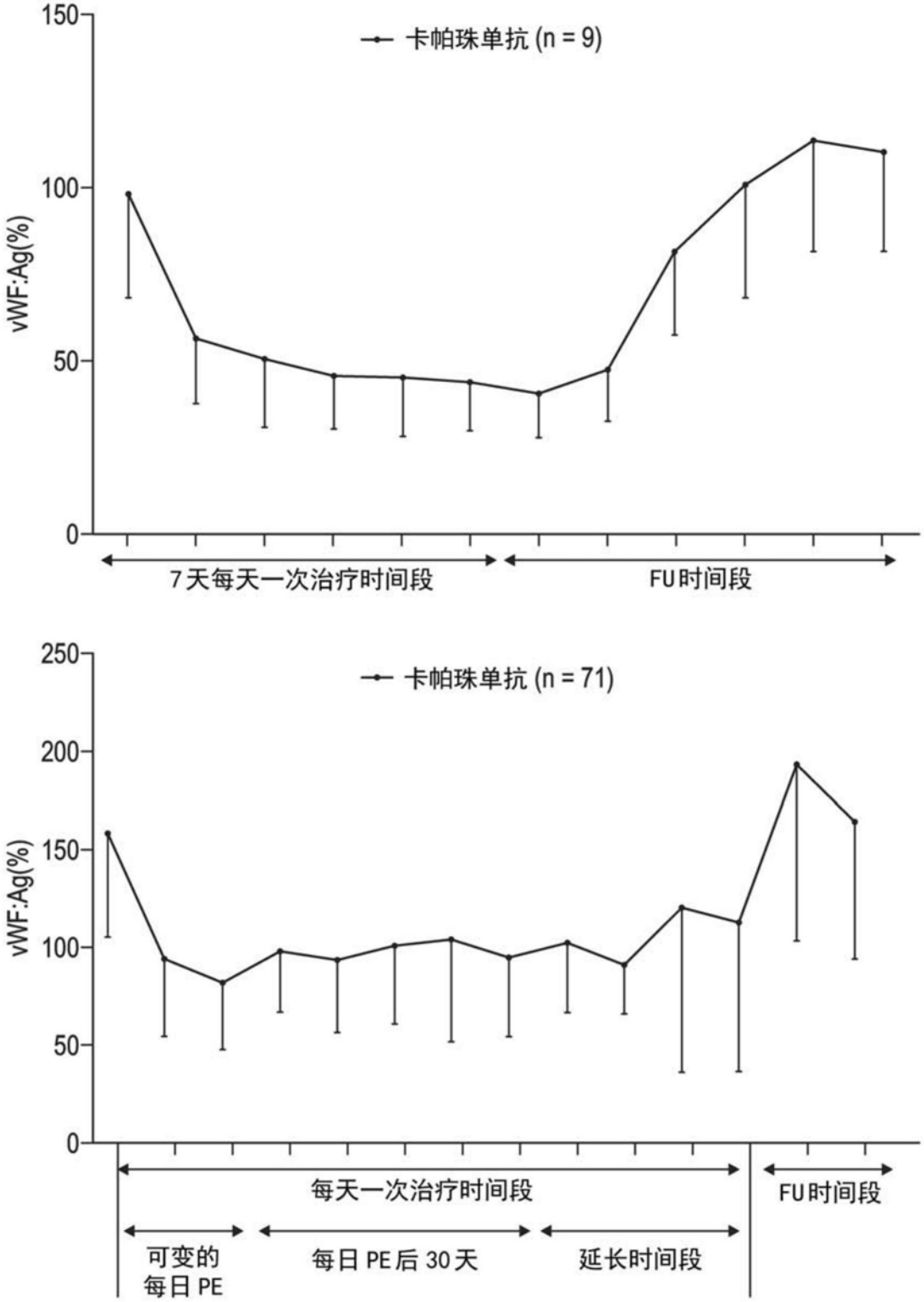
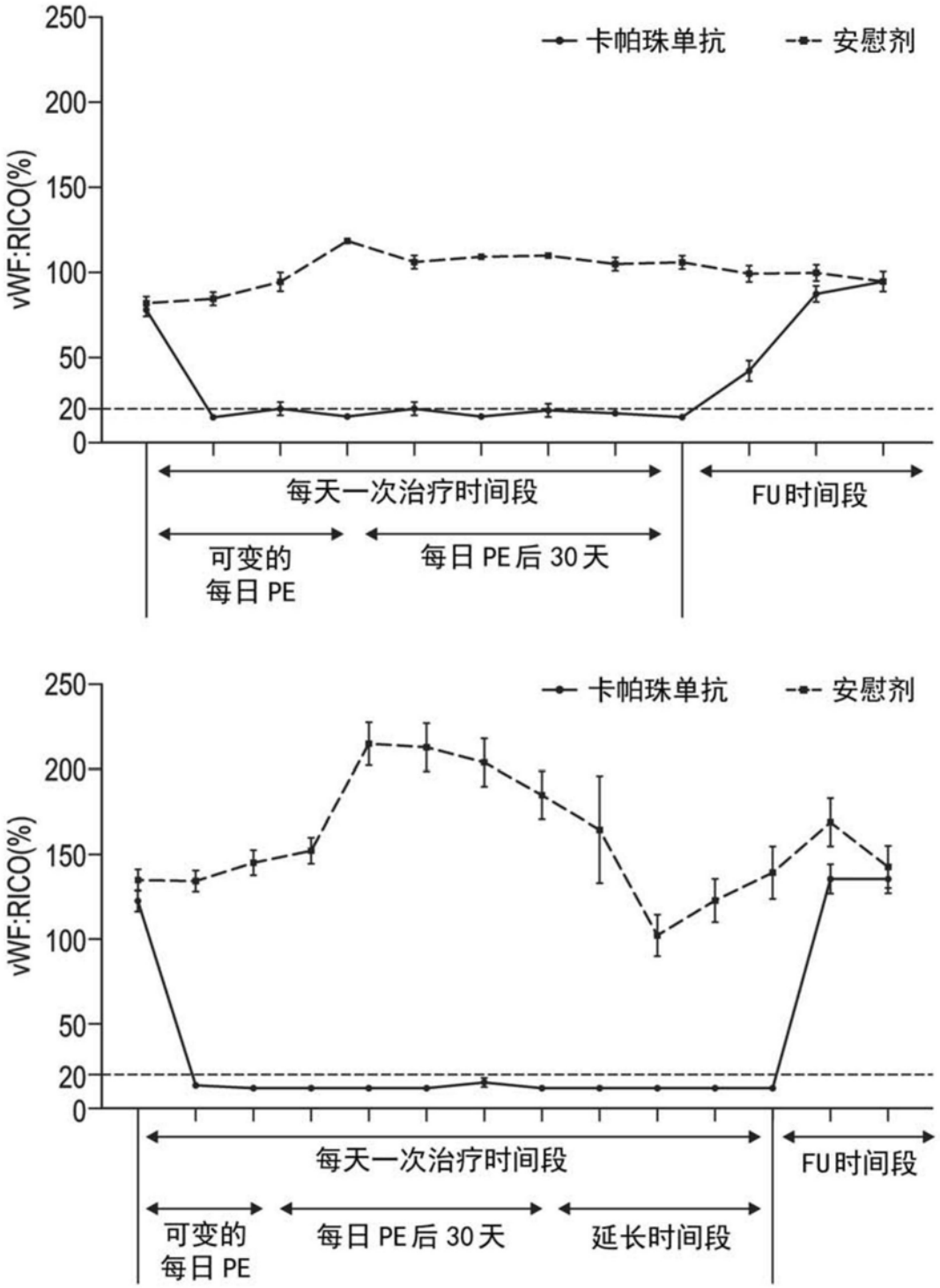

根据复发的 ADAMTS13 活性
A.
研究药物治疗时间段期间恶化
每日 PE 结束后的 ADAMTS13 活性
> 10%
≤ 10%
卡帕珠单抗
安慰剂
0
5
10
15
20
25
无恶化
恶化 - 每日 PE 结束后的天数
B.
治疗结束后复发
治疗结束时 ADAMTS13 活性
> 10%
≤ 10%
卡帕珠单抗
OL 卡帕珠单抗
安慰剂
0
5
10
15
20
25
无复发
复发 - 治疗结束后的天数

图2



健康志愿者中卡帕珠单抗的 7 天重复皮下 10mg 每日给药期间（上图）及 aTTP 患者的重复皮下每日施用 10mg 卡帕珠单抗期间（下图）的平均 vWF:Ag 水平与时间曲线。 aTTP: 获得性血栓性血小板减少性紫癜；PE: 血浆交换；FU: 随访；vWF: 冯维勒布兰德因子。

图3



阶段 II ALX-0681-2.1/10("TITAN", 上图）和阶段 III ALX0681-C301 ("HERCULES", 下图）中的平均值（±SD)RICO活性，<20%的RICO值表示卡帕珠单抗的药理学活性的阈值；出于图示的目的，低于15%的定量下限的值设定为15%，高于120%的定量的上限的值设定为120%。曲线图显示平均值 ± 平均值的标准误。 PE:血浆交换；FU:随访；RICO:利托菌素辅因子；SD:标准差；vWF:冯维勒布兰德因子。

图4

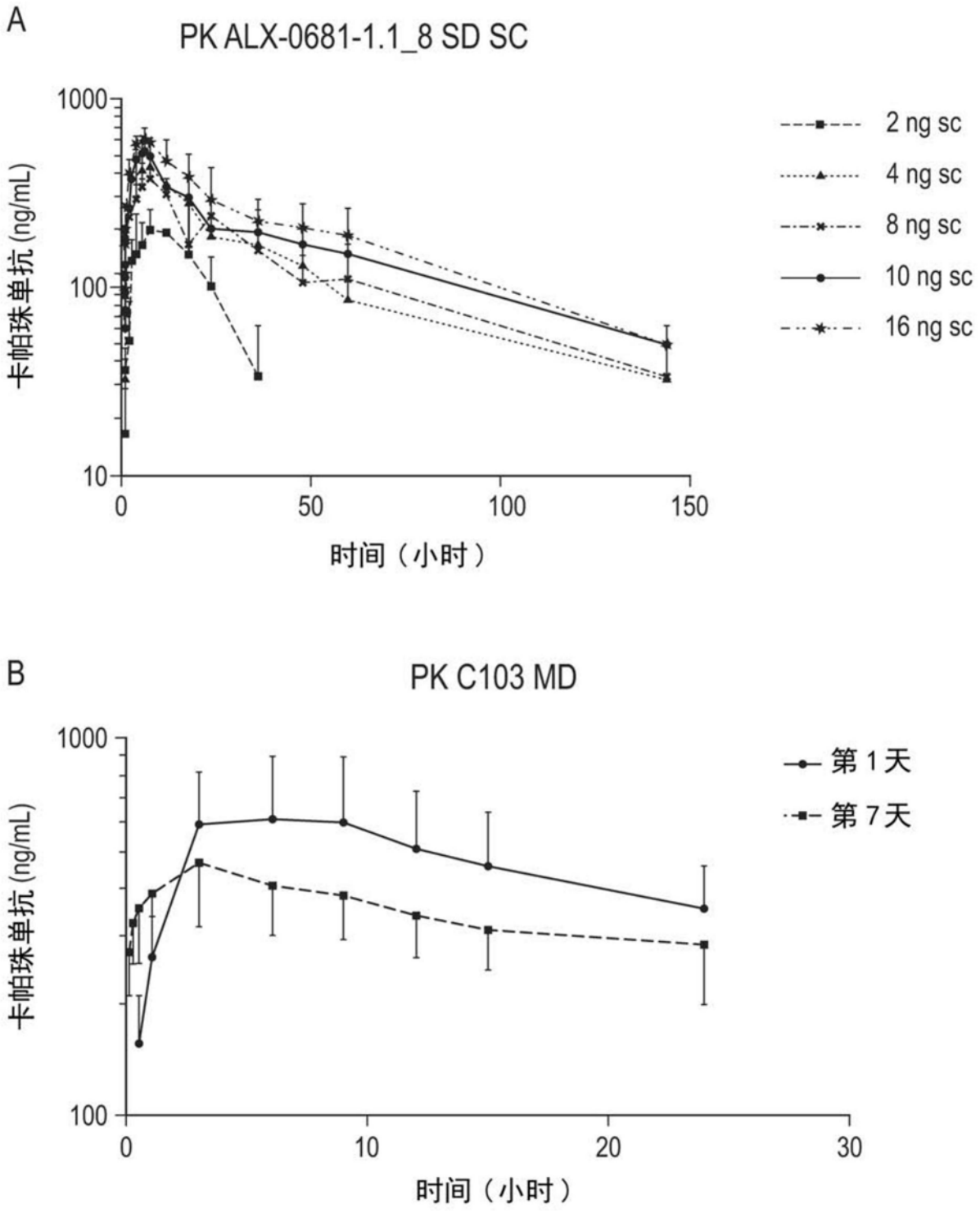

A
PK ALX-0681-1.1_8 SD SC
卡帕珠单抗 (ng/mL)
1000
100
10
0
50
100
150
时间（小时）
2 ng sc
4 ng sc
8 ng sc
10 ng sc
16 ng sc
B
PK C103 MD
卡帕珠单抗 (ng/mL)
1000
100
0
10
20
30
时间（小时）
第 1 天
第 7 天

图5