

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 97150160

※ 申請日期： 97.12.23

※IPC 分類：

A61k 38/17 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

重組 VWF 調配物

RECOMBINANT VWF FORMULATIONS

二、申請人：(共 2 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 巴克斯特國際公司 / BAXTER INTERNATIONAL INC.

2. 巴克斯特保健公司 / BAXTER HEALTHCARE S.A.

代表人：(中文/英文)

1.2. 哈拉德 布斯 / BOOS, HARALD

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 美國伊利諾州 60015，鹿場，巴克斯特公園路 1 號

One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois 60015, U.S.A.

2. 瑞士 8304 華利瑟倫 赫提斯街 2 號

Hertistrasse 2, CH-8304 Wallisellen, Switzerland

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 / U.S.A.

2. 瑞士 / Switzerland

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 彼得 麥西艾森 / MATTHIESSEN, Peter

2. 彼得 杜瑞柴克 / TURECEK, Peter

3. 漢斯 彼得 史瓦茲 / SCHWARZ, Hans-Peter

4. 克特 史耐克 / SCHNECKER, Kurt

國 籍：(中文/英文)

1. 德國 / Germany
2. 奧地利 / Austria
3. 奧地利 / Austria
4. 奧地利 / Austria

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國專利 、 2007.12.28 、 61/017,418
2. 美國專利 、 2007.12.31 、 61/017,881

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明提供重組溫韋伯氏因子（rVWF）之長期穩定醫藥調配物及製備及投予該等調配物之方法。

六、英文發明摘要：

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

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (3) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

九、發明說明：

本申請案主張 2007 年 12 月 28 日申請之美國臨時申請案第 61/017,418 號及 2007 年 12 月 31 日申請之美國臨時申請案第 61/017,881 號之優先權，該等申請案中之每一者皆以全文引用的方式併入本文中。

【發明所屬之技術領域】

大體而言，本發明係關於重組 VWF 之調配物及製備包含重組 VWF 之組合物的方法。

【先前技術】

溫韋伯氏因子（Von Willebrand factor，VWF）為以尺寸範圍為約 500 至 20,000 kD 之一系列多聚物形式於血漿中循環的醣蛋白。多聚形式之 VWF 包含藉由二硫鍵連接在一起之 250 kD 多肽亞單位。VWF 介導初始血小板黏著於受損血管壁之下內皮細胞。僅較大多聚物展現止血活性。咸假定內皮細胞分泌大聚合形式之 VWF 且 VWF 中具有低分子量形式者（低分子量 VWF）由蛋白水解裂解產生。具有大分子量之多聚物係儲存於內皮細胞之魏貝爾-帕拉德小體（Weibel-Pallade body）中且在刺激之後釋放。

VWF 係由內皮細胞及巨核細胞以基本上由重複域組成之前原 VWF（prepro-VWF）形式合成。信號肽裂解之後，原 VWF（pro-VWF）經由其 C 末端區處之二硫連接二聚化。二聚體充當多聚化之原聚體，該多聚化受制於游離末端之

間的二硫連接。繼組裝為多聚體後，蛋白水解移除前肽序列（Leyte 等人，Biochem. J. 274 (1991), 257-261）。

自 VWF 之經選殖 cDNA 預測出的主要轉譯產物為 2813 個殘基之前驅多肽（前原 VWF）。前原 VWF 由 22 個胺基酸之信號肽及 741 個胺基酸之前肽組成，而成熟 VWF 包含 2050 個胺基酸（Ruggeri Z.A. 及 Ware, J., FASEB J., 308-316 (1993)）。

VWF 之缺失為溫韋伯氏病（Von Willebrand disease, VWD）之病因，該疾病之特徵在於程度不同之顯著出血表型。第 3 型 VWD 為 VWF 完全丟失之最嚴重形式，而第 1 型 VWD 與 VWF 之定量損失有關且其表型可極輕微。第 2 型 VWD 與 VWF 之定性缺失有關且可與第 3 型 VWD 同樣嚴重。第 2 型 VWD 具有多種亞型，一些亞型與高分子量多聚體之損失或減少相關。第 2a 型溫韋伯氏症候群（Von Willebrand syndrome type 2a, VWS-2A）之特徵在於中間體與大多聚體皆損失。VWS-2B 之特徵在於最高分子量多聚體損失。與 VWF 有關之其他疾病及病症為技術領域中所已知。

美國專利第 6,531,577 號、第 7,166,709 號及歐洲專利申請案第 04380188.5 號描述血漿衍生之 VWF 調配物。然而，除關於血漿衍生 VWF 之量及純度問題外，亦存在血液傳播病原體之風險（例如，病毒及變異型庫賈氏病（Variant Creutzfeldt-Jakob disease, vCJD））。

因此，於技術領域中對開發包含重組 VWF 之穩定醫藥調配物存在需求。

【發明內容】

本發明提供適用於包含重組 VWF 之組合物的調配物，其產生高度穩定之醫藥組合物。該穩定醫藥組合物適用作治療患有可受益於重組 VWF 投藥之病症或病狀的個體之治療劑。

在一具體態樣中，本發明提供一種重組溫韋伯氏因子 (rVWF) 之穩定液體醫藥調配物，其包含：(a) rVWF；(b) 緩衝劑；(c) 一或多種鹽；(d) 視情況的穩定劑；及 (e) 視情況的界面活性劑；其中該 rVWF 包含選自由以下者所組成之群組的多肽：a) SEQ ID NO: 3 中所示之胺基酸序列；b) a) 之生物活性類似物、片段或變異體；c) 由 SEQ ID NO: 1 中所示之聚核苷酸編碼的多肽；d) c) 之生物活性類似物、片段或變異體；及 e) 由在中等嚴格雜交條件下與 SEQ ID NO: 1 中所示之聚核苷酸雜交之聚核苷酸編碼的多肽；其中該緩衝液包含約 0.1 mM 至約 500 mM 範圍內之 pH 緩衝劑且其中 pH 在約 2.0 至約 12.0 之範圍內；其中該鹽濃度為約 1 mM 至 500 mM；其中該穩定劑濃度為約 0.1 mM 至 1000 mM；且其中該界面活性劑濃度為約 0.01 g/L 至 0.5 g/L。

在另一具體態樣中，提供上述調配物，其中 rVWF 包含 SEQ ID NO: 3 中所示之胺基酸序列。在另一具體態樣中，提供上述調配物，其中緩衝劑係選自由檸檬酸鈉、甘胺酸、組胺酸、Tris 及此等藥劑之組合所組成之群組。在又一具體

態樣中，提供上述調配物，其中緩衝劑為檸檬酸鹽。在本發明之又一具體態樣中，提供上述調配物，其中 pH 在 6.0-8.0 或 6.5-7.3 之範圍內。在一相關具體態樣中，提供上述調配物，其中 pH 為 7.0。在另一具體態樣中，提供上述調配物，其中緩衝劑為檸檬酸鹽且 pH 為 7.0。

在又一具體態樣中，提供上述調配物，其中鹽係選自由氯化鈣、氯化鈉及氯化鎂所組成之群組。在另一具體態樣中，提供上述調配物，其中鹽濃度在 0.5 mM 至 300 mM 之範圍內。在另一具體態樣中，提供上述調配物，其中鹽為濃度為 10 mM 之氯化鈣。

在另一具體態樣中，提供上述調配物，其中 rVWF 包含 SEQ ID NO: 3 中所示之胺基酸序列；其中緩衝劑為檸檬酸鹽且 pH 為 7.0；且其中鹽為濃度為 10 mM 之氯化鈣。在又一具體態樣中，提供上述調配物，其中 rVWF 包含 SEQ ID NO: 3 中所示之胺基酸序列；其中緩衝劑為檸檬酸鈉且 pH 為 7.0；且其中鹽為濃度為 10 mM 之氯化鈣及濃度為 100 mM 之 NaCl。

其他調配物亦涵蓋於本發明中。舉例而言，在一具體態樣中，提供上述調配物，其中一或多種緩衝劑為濃度各自為 3.3 mM 之組胺酸及 Tris。在另一具體態樣中，提供上述調配物，其中 pH 為 7.0。在又一具體態樣中，提供上述調配物，其中第一鹽為濃度為 30 mM 之氯化鈉且第二鹽為濃度為 0.56 mM 之氯化鈣。

在本發明之又一具體態樣中，提供上述調配物，其中

穩定劑係選自由以下者所組成之群組：甘露糖醇、乳糖、山梨糖醇、木糖醇、蔗糖、海藻糖、甘露糖、麥芽糖、乳糖、葡萄糖、棉子糖、纖維二糖、龍膽二糖、異麥芽糖、阿拉伯糖、葡糖胺、果糖及此等穩定劑之組合。在另一具體態樣中，提供上述調配物，其中穩定劑為濃度為 7.8 mM 之海藻糖及濃度為 58.6 mM 之甘露糖醇。

在另一具體態樣中，提供上述調配物，其中界面活性劑係選自由毛地黃皂苷 (digitonin)、Triton X-100、Triton X-114、TWEEN-20、TWEEN-80 及此等界面活性劑之組合所組成之群組。在另一具體態樣中，提供上述調配物，其中界面活性劑為 0.03 g/L 之 TWEEN-80。

在本發明之一具體態樣中，提供上述調配物，其中 rVWF 包含 SEQ ID NO: 3 中所示之胺基酸序列；其中緩衝劑為濃度為 3.3 mM 之組胺酸及濃度為 3.3 mM 之 Tris (pH 7.0)；其中第一鹽為濃度為 30 mM 之氯化鈉且第二鹽為濃度為 0.56 mM 之氯化鈣；其中穩定劑為濃度為 7.8 mM 之海藻糖及濃度為 58.6 mM 之甘露糖醇；且其中界面活性劑為 0.03 g/L 之 TWEEN-80。

【實施方式】

術語之定義

除非另外定義，否則本文所使用之所有技術及科學術語具有與本發明所屬技術領域內之一般熟習此項技術者通常所理解相同的含義。以下參考案對熟習技能者提供本發

明中所使用之許多術語的通用定義：Singleton 等人，
 DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR
 BIOLOGY (第 2 版 1994); THE CAMBRIDGE DICTIONARY
 OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker 編，1988); THE
 GLOSSARY OF GENETICS，第 5 版，R. Rieger 等人(編)，
 Springer Verlag (1991); 及 Hale 及 Marham, THE HARPER
 COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991)。

各公開案、專利申請案、專利及本文所引用之其他參
 考案均以全文引用的方式併入本文中，該引用的程度並非
 與本揭示案不一致。

此處應注意，除非上下文另外明確規定，否則如本說
 明書及隨附申請專利範圍中所使用，單數形式「一 (a/an)」
 及「該 (the)」包括複數個指代物。

如本文中所使用，除非另外規定，否則以下術語具有
 歸於其之含義。

關於肽化合物之術語「包含 (comprising)」意謂化合
 物可於給定序列之胺基與羧基末端中任一者或兩者處包括
 額外胺基酸。當然，此等額外胺基酸應不顯著干擾該化合
 物之活性。關於本發明之組合物，術語「包含 (comprising)」
 意謂組合物可包括額外組份。此等額外組份應不顯著干擾
 該組合物之活性。

術語「藥理學活性 (pharmacologically active)」意謂
 如此所述之物質經測定具有影響醫學參數 (例如，但不限
 於血壓、血細胞計數、膽固醇含量) 或疾病病況 (例如，

但不限於癌症、自體免疫病症)之活性。

如本文中所使用，術語「表現 (express/expressing/expression)」意謂允許或使基因或 DNA 序列中之資訊變得顯現，例如藉由活化轉錄及轉譯相應基因或 DNA 序列所涉及之細胞功能來產生蛋白質。DNA 序列表現於細胞中或藉由細胞表現以形成諸如蛋白質之「表現產物 (expression product)」。表現產物自身 (例如所得蛋白質) 亦可稱為「經表現 (expressed)」。表現產物之特徵可為細胞內、細胞外或分泌型產物。術語「細胞內 (intracellular)」意謂在細胞內。術語「細胞外 (extracellular)」意謂在細胞外，諸如跨膜蛋白。若物質在很大程度上自細胞上或細胞內之某處出現在細胞外，則其由細胞「分泌 (secreted)」。

如本文中所使用，「多肽 (polypeptide)」係指包含經由肽鍵連接之胺基酸殘基、結構變異體、相關天然存在之結構變異體及其合成非天然存在類似物的聚合物。合成多肽可例如使用自動多肽合成器來製備。術語「蛋白質 (protein)」通常指大的多肽。術語「肽 (peptide)」通常指短的多肽。

如本文中所使用，多肽之「片段 (fragment)」欲指多肽或蛋白質之小於全長多肽或蛋白質表現產物的任何部分。

如本文中所使用，「類似物 (analog)」係指結構實質上類似且具有相同生物活性、但可具有不同程度之活性之兩種或兩種以上多肽中的任一者，完整分子，或其片段。

基於涉及一或多個胺基酸取代其他胺基酸之一或多個突變，類似物在其胺基酸序列之組成方面不同。基於經置換之胺基酸及置換其之胺基酸的物理化學或功能相關性，取代可為保守或非保守的。

如本文中所使用，「變異體 (variant)」係指經修飾以包含通常不為分子之一部分之其他化學部分的多肽、蛋白質或其類似物。該等部分可調節分子之可溶性、吸收、生物半衰期等。或者，該等部分可降低分子之毒性且消除或減少分子之不良副作用等。能夠介導該等作用之部分揭示於 Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 中。用於使該等部分偶合於分子之程序為技術領域中所熟知。舉例而言，變異體可為具有賦予蛋白質較長活體內半衰期之化學修飾的凝血因子。在各種態樣中，多肽藉由糖基化、聚乙二醇化及/或聚唾液酸化來修飾。

重組 VWF

前原 VWF 之聚核苷酸及胺基酸序列分別於 SEQ ID NO:1 及 SEQ ID NO:2 中闡明，且分別可以 GenBank 寄存編號 NM_000552 及 NP_000543 獲得。對應於成熟 VWF 蛋白質之胺基酸序列於 SEQ ID NO: 3 中闡明（對應於全長前原 VWF 胺基酸序列之胺基酸 764-2813）。

一種形式之適用 rVWF 至少具有活體內穩定（例如結合）至少一種因子 VIII (FVIII) 分子及視情況的具有藥理學上可接受之糖基化模式的特性。其特定實例包括無 A2 域、因此抗蛋白水解之 VWF (Lankhof 等人, Thromb.

Haemost. 77: 1008-1013, 1997) , 及包括醣蛋白 1b 結合域及對膠原蛋白及肝素之結合位點的 Val 449 至 Asn 730 之 VWF 片段(Pietu 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. 164: 1339-1347, 1989) 。對 VWF 穩定至少一種 FVIII 分子之能力的測定可根據現有技術中已知之方法在 VWF 缺陷型哺乳動物中進行。

本發明之 rVWF 可藉由技術領域中已知之任何方法來產生。一特定實例揭示於 1986 年 10 月 23 日公開之 WO86/06096 及 1990 年 7 月 23 日申請之美國專利申請案第 07/559,509 號中, 該等案關於產生重組 VWF 之方法以引用的方式併入本文中。因此, 用於下述之方法為技術領域中所已知: (i) 藉由遺傳工程化產生重組 DNA, 例如經由 RNA 之逆轉錄及/或 DNA 之擴增; (ii) 藉由轉染將重組 DNA 引入原核或真核細胞, 例如經由電穿孔或顯微注射; (iii) 培養該等經轉形之細胞, 例如以連續或分批方式; (iv) 表現 VWF, 例如原構性表現或在誘導之後表現; 及 (v) 分離該 VWF, 例如自培養基或藉由收穫經轉形之細胞; 以便 (vi) 獲得經純化之 rVWF, 例如經由陰離子交換層析法或親和力層析法。重組 VWF 可在經轉形之宿主細胞中使用技術領域中熟知之重組 DNA 技術來產生。舉例而言, 可使用合適限制酶自 DNA 切離編碼多肽之序列。

或者, DNA 分子可使用化學合成技術合成, 諸如胺基磷酸酯方法。又, 可使用此等技術之組合。

本發明亦提供在適當宿主中編碼本發明之多肽的載

體。該載體包含編碼多肽的操作性連接於適當表現控制序列之聚核苷酸。在聚核苷酸插入載體中之前或之後實現此操作性連接之方法眾所周知。表現控制序列包括啟動子、活化子、增強子、操縱子、核糖體結合位點、起始信號、終止信號、帽信號、聚腺苷酸化信號及控制轉錄或轉譯所涉及之其他信號。其中具有聚核苷酸之所得載體用於使宿主轉形。此轉形可使用技術領域中熟知之方法來執行。

大量可獲得且熟知之宿主細胞中的任一者可用於實施本發明。特定宿主之選擇取決於由技術領域公認之多種因素，包括（例如）與所選表現載體之相容性、由 DNA 分子編碼之肽的毒性、轉形速率、肽回收容易性、表現特徵、生物安全性及成本。必須達到此等因素之平衡，其條件為並非所有宿主細胞同樣有效地表現特定 DNA 序列。在此等通用準則中，適用微生物宿主細胞包括培養物中之細菌、酵母及其他真菌、昆蟲、植物、哺乳動物（包括人類）細胞，或技術領域中已知之其他宿主。

隨後，培養及純化經轉形之宿主。可在習知醱酵條件下培養宿主細胞以使所需化合物得以表現。該等醱酵條件為技術領域中所熟知。最後，藉由技術領域中熟知之方法自培養物中純化多肽。

視用於表現本發明之化合物的宿主細胞而定，碳水化合物（寡糖）基團可便利地連接於已知為蛋白質中之糖基化位點的位點。一般而言，當其為序列 Asn-X-Ser/Thr 之一部分時，其中 X 可為除脯氨酸外之任何胺基酸，O-連接的

寡糖連接於絲胺酸 (Ser) 或蘇胺酸 (Thr) 殘基，而 N-連接的寡糖連接於天冬醯胺 (Asn) 殘基。X 較佳為不包括脯胺酸之 19 種天然存在胺基酸中之一者。各類型中存在之 N-連接的及 O-連接的寡糖之結構及糖殘基不同。通常在兩者上均存在之一種類型之糖為 N-乙醯神經胺酸 (稱為唾液酸)。唾液酸通常為 N-連接的與 O-連接的寡糖之末端殘基且藉助於其負電荷可賦予糖基化化合物酸性特性。可將該 (該等) 位點併入本發明之化合物的連接子中且較佳在重組產生多肽化合物期間藉由細胞糖基化 (例如在諸如 CHO、BHK、COS 之哺乳動物細胞中)。然而，該等位點可進一步藉由技術領域中已知之合成或半合成程序來糖基化。

或者，化合物可藉由合成方法製備。舉例而言，可使用固相合成技術。合適技術為技術領域中所熟知，且包括以下文獻中所述者：Merrifield (1973), Chem. Polypeptides, 第 335-61 頁 (Katsoyannis 及 Panayotis 編); Merrifield (1963), J. Am. Chem. Soc. 85: 2149; Davis 等人 (1985), Biochem. Intl. 10: 394-414; Stewart 及 Young (1969), Solid Phase Peptide Synthesis; 美國專利第 3,941,763 號; Finn 等人 (1976), The Proteins (第 3 版) 2: 105-253; 及 Erickson 等人 (1976), The Proteins (第 3 版) 2: 257-527。固相合成為製備個別肽之較佳技術，因為其為製備小肽之最成本有效方法。

VWF 之片段、變異體及類似物

用於製備多肽片段、變異體或類似物之方法為技術領

域中所熟知。

使用（但不限於）酶促裂解（例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶）以及使用重組方法以產生具有特定胺基酸序列之多肽片段來製備多肽之片段。可產生包含具有特定活性之蛋白質區域（諸如多聚化域或技術領域中已知之任何其他可鑑別 VWF 域）的多肽片段。

製備多肽類似物之方法亦眾所周知。多肽之胺基酸序列類似物可為取代、插入、添加或缺失類似物。包括多肽片段之缺失類似物缺乏天然蛋白質之一或多個對於功能或免疫原性活性非必需之殘基。插入類似物包括於多肽中之非末端點處添加（例如）胺基酸。此類似物可包括插入免疫活性抗原決定基或僅單個殘基。包括多肽片段之添加類似物包括於蛋白質之兩個末端中的任一者處添加一或多個胺基酸且包括（例如）融合蛋白。

取代類似物通常於蛋白質內之一或多個位點處將野生型之一個胺基酸換成另一胺基酸，且可經設計以調節多肽之一或多種特性而不損失其他功能或特性。在一態樣中，取代為保守性取代。「保守性胺基酸取代（conservative amino acid substitution）」意謂將一胺基酸用具有類似化學特性之側鏈的胺基酸取代。用於產生保守性取代之類似胺基酸包括具有以下側鏈者：酸性側鏈（麩胺酸、天冬胺酸）；鹼性側鏈（精胺酸、離胺酸、組胺酸）；極性醯胺側鏈（麩胺醯胺、天冬醯胺）；疏水性脂族側鏈（白胺酸、異白胺酸、纈胺酸、丙胺酸、甘胺酸）；芳族側鏈（苯丙胺酸、

色胺酸、酪胺酸)；小側鏈(甘胺酸、丙胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、甲硫胺酸)；或脂族羥基側鏈(絲胺酸、蘇胺酸)。

類似物可實質上同源或實質上與其所來源之重組 VWF 相同。較佳類似物為保留野生型多肽之至少一些生物活性(例如凝血活性)者。

所涵蓋之多肽變異體包括藉由諸如以下技術化學修飾之多肽：泛素化、包括聚唾液酸化(polysialation)之糖基化、與治療劑或診斷劑接合、標記、諸如聚乙二醇化(用聚乙二醇衍生)之共價聚合物連接、引入不可水解之鍵及藉由化學合成通常人類蛋白質中不存在之胺基酸(諸如鳥胺酸)的插入或取代。變異體保留本發明之未經修飾之分子的相同或基本上相同之結合特性。該化學修飾可包括使藥劑直接或間接(例如經由連接子)連接於 VWF 多肽。在間接連接之情況下，預期連接子可為可水解或不可水解連接子。

製備聚乙二醇化多肽類似物通常將包含以下步驟：(a) 在使結合構築體多肽連接於一或多個 PEG 基團的條件下使多肽與聚乙二醇(諸如 PEG 之反應性酯或醛衍生物)反應；及(b) 獲得反應產物。一般而言，醯化反應之最佳反應條件將根據已知參數及所需結果來確定。舉例而言，PEG:蛋白質之比率愈大，聚聚乙二醇化產物之百分比愈大。在一些具體態樣中，結合構築體將於 N-末端處具有單一 PEG 部分。聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)可連接於凝血因子以提供較長活體內半衰期。PEG 基團可具有任何適宜

分子量且可為線性或分枝基團。PEG 之平均分子量在約 2 千道爾頓 (kiloDalton, 「kD」) 至約 100 kDa、約 5 kDa 至約 50 kDa 或約 5 kDa 至約 10 kDa 之範圍內。藉由經由 PEG 部分上之天然或工程化反應性基團 (例如醛、胺基、硫醇或酯基) 與凝血因子上之反應性基團 (例如醛、胺基或酯基) 醯化或還原烷基化或藉由技術領域中已知之任何其他技術使 PEG 基團連接於凝血因子。

用於製備聚唾液酸化多肽之方法描述於美國專利公開案 20060160948, Fernandes et Gregoriadis; Biochim. Biophys. Acta 1341: 26-34, 1997, 及 Saenko 等人, Haemophilia 12:42-51, 2006 中。簡言之, 於室溫下在黑暗中攪拌含有 0.1 M NaIO_4 之多聚乙醯神經胺糖酸的溶液以使 CA 氧化。在黑暗中以例如 0.05 M 磷酸鈉緩衝液 (pH 7.2) 透析經活化之 CA 溶液且將此溶液添加至 rVWF 溶液中且於室溫下在黑暗中在平緩震盪下培養 18 h。隨後可藉由超濾/透濾將游離試劑自 rVWF-聚唾液酸接合物分離。rVWF 與聚唾液酸之接合亦可使用戊二醛作為交聯試劑來達成 (Migneault 等人, Biotechniques 37: 790-796, 2004)。

進一步預期本發明之多肽可為與第二藥劑之融合蛋白, 該第二藥劑為多肽。在一具體態樣中, 為多肽之第二藥劑為 (但不限於) 酶、生長因子、抗體、細胞激素、趨化因子、細胞表面受體、細胞表面受體之胞外域、細胞黏著分子或上述蛋白質之片段或活性域。在一相關具體態樣中, 第二藥劑為凝血因子, 諸如因子 VIII、因子 VII、因子

IX。所預期之融合蛋白藉由技術領域中熟知之化學或重組技術來製備。

亦預期前原 VWF 及原 VWF 多肽可提供本發明之調配物的治療益處。舉例而言，美國專利第 7,005,502 號描述一種醫藥製劑，其包含大量誘導活體外產生凝血酶之原 VWF。除天然存在之成熟 VWF 的重組生物活性片段、變異體或類似物外，本發明亦涵蓋前原 VWF (SEQ ID NO:2 中所示) 或原 VWF 多肽 (SEQ ID NO: 2 之胺基酸殘基 23 至 764) 之重組生物活性片段、變異體或類似物於本文所述之調配物中的用途。

編碼片段、變異體及類似物之聚核苷酸可易於藉由熟習技術者產生以編碼天然存在分子之具有與天然存在分子相同或類似之生物活性的生物活性片段、變異體或類似物。此等聚核苷酸可使用 PCR 技術、DNA 編碼分子之消化/連接及其類似技術來製備。因此，熟習此項技術者將能夠使用技術領域中已知之任何方法 (包括，但不限於位點特异性突變誘發) 產生 DNA 股之單一鹼基改變以產生經改造密碼子及錯義突變。如本文中所使用，片語「中等嚴格雜交條件 (moderately stringent hybridization conditions)」意謂 (例如) 於 42°C 下在 50% 甲醯胺中雜交及於 60°C 下在 0.1×SSC、0.1% SDS 中洗滌。熟習此項技術者應瞭解，基於欲雜交之序列的長度及 GC 核苷酸鹼基含量進行此等條件之變化。技術領域中之配方標準適於確定確切雜交條件。參見 Sambrook 等人，9.47-9.51，於 Molecular Cloning, Cold

Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) 中。

通用調配物及賦形劑

賦形劑為包括於調配物中之添加劑，因為其賦予或增強藥品之穩定性及傳遞。不考慮包括其之理由，賦形劑為藥品之必要組份且因此需要為安全的且患者良好耐受。對於蛋白質藥物而言，賦形劑之選擇尤為重要，因為其會影響藥物之功效與免疫原性。因此，需要在適當選擇提供合適之穩定性、安全性及可銷售性的賦形劑情況下開發蛋白質調配物。

開發用於治療性蛋白質之調配物的主要挑戰在於使產品相對於製造、運輸及儲存之壓力穩定。調配物賦形劑之作用在於提供相對於此等壓力之穩定化作用。亦可利用賦形劑以降低高濃度蛋白質調配物之黏度以便使其能夠傳遞且增強患者便利性。一般而言，賦形劑可基於其使蛋白質相對於各種化學及物理壓力穩定之機制加以分類。一些賦形劑用於減輕特定壓力之作用或調節特定蛋白質之特定敏感性。其他賦形劑對蛋白質之物理及共價穩定性具有更普遍作用。本文所述之賦形劑藉由其化學類型或其於調配物中之功能作用來編組。當論述各賦形劑類型時，提供對穩定化方式之簡短描述。

鑒於本文提供之教示內容及指導，熟習此項技術者將瞭解何量或何範圍之賦形劑可包括於任何特定調配物中以得到促進保留生物藥物（例如多肽）之穩定性的本發明之

生物醫藥調配物。舉例而言，欲包括於本發明之生物醫藥調配物中之鹽的量及類型可根據最終溶液之所需滲透壓度（亦即等滲、低滲或高滲）以及欲包括於調配物中之其他組份的量及滲透壓度來選擇。類似地，藉由參考包括於調配物中之多元醇或糖的類型來例示，該賦形劑之量將視其滲透壓度而定。

舉例而言，包括約 5% 山梨糖醇可達成等滲性，而需要約 9% 蔗糖賦形劑達成等滲性。可包括於本發明之生物醫藥調配物內的一或多種賦形劑之濃度之量或範圍的選擇已在上文參考鹽、多元醇及糖加以例示。然而，熟習此項技術者應瞭解，本文所述且進一步參考特定賦形劑加以例示之考慮因素同樣適用於賦形劑之所有類型及組合，包括（例如）鹽、胺基酸、其他滲透劑、界面活性劑、穩定劑、膨化劑、冷凍保護劑、凍乾保護劑、抗氧化劑、金屬離子、螯合劑及/或防腐劑。

此外，當以莫耳濃度報導特定賦形劑時，熟習此項技術者將認識到亦涵蓋溶液之當量百分比（%）w/v（例如（溶液樣品中之物質的公克數/溶液毫升數） $\times 100\%$ ）。

當然，一般熟習此項技術者將認識到本文所述之賦形劑的濃度在特定調配物中具有互依性。舉例而言，當例如存在高多肽濃度時或當例如存在高穩定劑濃度時，可降低膨化劑之濃度。另外，一般熟習此項技術者將認識到為維持不存在膨化劑之特定調配物的等滲性，將相應地調節穩定劑之濃度（亦即，將使用「滲透（tonicifying）」量之穩

定劑)。常見賦形劑為技術領域中所已知且可見於 Powell 等人, *Compendium of Excipients for Parenteral Formulations* (1998), *PDA J. Pharm. Sci. Technology*, 52:238-311 中。

緩衝液及緩衝劑

通常觀察到藥理學活性多肽調配物之穩定性在窄 pH 範圍內最大。最佳穩定性之此 pH 範圍需要早先在預調配物研究期間鑑別。已證明諸如加速穩定性研究及量熱篩選研究之數種方法適用於此目的 (Remmele R.L. Jr. 等人, *Biochemistry*, 38(16): 5241-7 (1999))。完成調配物之後, 藥品須在其整個儲存期限內製造及保存。因此, 幾乎總是利用緩衝劑來控制調配物之 pH。

通常將有機酸、磷酸鹽及 Tris 用作蛋白質調配物中之緩衝液。緩衝物質之緩衝能力在等於 pKa 之 pH 下最大且當 pH 增加或減小遠離此值時緩衝能力降低。90%之緩衝能力存在於其 pKa 之一個 pH 單位內。緩衝能力亦隨緩衝濃度增加而相稱地增加。

當選擇緩衝液時需要考慮數種因素。首先, 緩衝液物質及其濃度需要根據其 pKa 及所需調配物 pH 來確定。確保緩衝液與多肽及其他調配物賦形劑相容且不催化任何降解反應同樣重要。欲考慮之第三重要態樣為投藥之後緩衝液可能誘發之刺痛及刺激的感覺。舉例而言, 已知檸檬酸鹽在注射之後引起刺痛 (Laursen T 等人, *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 98(2): 218-21 (2006))。刺痛及刺激之可能性對於經由皮下 (SC) 或肌肉內 (IM) 途徑投予之藥物 (在此情

況下藥物溶液殘留於部位處歷時相對較長時間段)而言比藉由靜脈內(IV)途徑投予(在此情況下調配物在投藥之後迅速稀釋至血液中)更大。對於藉由直接IV輸液投予之調配物而言,需要監控緩衝液(及任何其他調配物組份)之總量。須尤其留意以磷酸鉀緩衝液之形式投予的鉀離子,其可誘發患者之心血管作用(Hollander-Rodriguez JC等人, *Am. Fam. Physician.*, 73(2): 283-90 (2006))。

選擇生理學上相容且維持醫藥調配物之所需pH的存在於組合物中之緩衝系統。在一具體態樣中,溶液之pH介於pH 2.0與pH 12.0之間。舉例而言,溶液之pH可為2.0、2.3、2.5、2.7、3.0、3.3、3.5、3.7、4.0、4.3、4.5、4.7、5.0、5.3、5.5、5.7、6.0、6.3、6.5、6.7、7.0、7.3、7.5、7.7、8.0、8.3、8.5、8.7、9.0、9.3、9.5、9.7、10.0、10.3、10.5、10.7、11.0、11.3、11.5、11.7或12.0。

pH緩衝化合物可以適合於使調配物之pH維持在預定層面的任何量存在。在一具體態樣中,pH緩衝濃度介於0.1 mM與500 mM(1 M)之間。舉例而言,預期pH緩衝劑為至少0.1 mM、0.5 mM、0.7 mM、0.8 mM、0.9 mM、1.0 mM、1.2 mM、1.5 mM、1.7 mM、2 mM、3 mM、4 mM、5 mM、6 mM、7 mM、8 mM、9 mM、10 mM、11 mM、12 mM、13 mM、14 mM、15 mM、16 mM、17 mM、18 mM、19 mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM、100 mM、200 mM、500 mM。

用於緩衝本文所述之調配物的例示性pH緩衝劑包括

(但不限於) 甘胺酸、組胺酸、麩胺酸鹽、丁二酸鹽、磷酸鹽、乙酸鹽、檸檬酸鹽、Tris 及胺基酸或胺基酸之混合物，包括(但不限於) 天冬胺酸、組胺酸及甘胺酸。

鹽

通常添加鹽以增加調配物之離子強度，其對於蛋白質可溶性、物理穩定性及等滲性可為重要的。鹽可以多種方式影響蛋白質之物理穩定性。離子可藉由結合於蛋白質表面上之帶電殘基來使蛋白質之天然狀態穩定。或者，鹽可藉由結合於沿蛋白質骨架之肽基團 (-CONH-) 來使變性狀態穩定。鹽亦可藉由屏蔽蛋白質分子內之殘基之間的排斥靜電相互作用來使蛋白質天然構形穩定。蛋白質調配物中之鹽亦可屏蔽蛋白質分子之間的可導致蛋白質凝集及不溶之吸引靜電相互作用。在所提供之調配物中，鹽濃度介於 0.1 mM、1 mM、10 mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM、80 mM、100 mM、120 mM、150 mM、200 mM、300 mM 與 500 mM 之間。

穩定劑及膨化劑

在本發明之醫藥調配物中，可添加穩定劑(或穩定劑之組合)以防止或減少儲存誘發之凝集及化學降解。重構後之混濁或渾濁溶液表示蛋白質已沈澱或至少凝集。術語「穩定劑(stabilizer)」意謂能夠防止在水溶液狀態下凝集或其他物理降解以及化學降解(例如自溶、脫鹽胺、氧化等)之賦形劑。習用於醫藥組合物中之穩定劑包括(但不限於)蔗糖、海藻糖、甘露糖、麥芽糖、乳糖、葡萄糖、

棉子糖、纖維二糖、龍膽二糖、異麥芽糖、阿拉伯糖、葡糖胺、果糖、甘露糖醇、山梨糖醇、甘胺酸、精胺酸 HCl、多羥基化合物（包括多醣，諸如葡聚糖、澱粉、羥乙基澱粉、環糊精、N-甲基吡咯啉酮、纖維素及玻璃醛酸）、氯化鈉 [Carpenter 等人，Develop. Biol. Standard 74:225, (1991)]。在本發明之調配物中，穩定劑係以約 0.1 mM、0.5 mM、0.7 mM、0.8 mM、0.9 mM、1.0 mM、1.2 mM、1.5 mM、1.7 mM、2 mM、3 mM、4 mM、5 mM、6 mM、7 mM、8 mM、9 mM、10 mM、11 mM、12 mM、13 mM、14 mM、15 mM、16 mM、17 mM、18 mM、19 mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM、100 mM、200 mM、500 mM、700 mM、900 mM 或 1000 mM 之濃度併入。

需要時，調配物亦包括適量膨化劑及滲透壓度調節劑。膨化劑包括（例如）甘露糖醇、甘胺酸、蔗糖、聚合物（諸如葡聚糖）、聚乙烯吡咯啉酮、羧甲基纖維素、乳糖、山梨糖醇、海藻糖或木糖醇。在一具體態樣中，膨化劑為甘露糖醇。膨化劑係以約 0.1 mM、0.5 mM、0.7 mM、0.8 mM、0.9 mM、1.0 mM、1.2 mM、1.5 mM、1.7 mM、2 mM、3 mM、4 mM、5 mM、6 mM、7 mM、8 mM、9 mM、10 mM、11 mM、12 mM、13 mM、14 mM、15 mM、16 mM、17 mM、18 mM、19 mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM、100 mM、200 mM、500 mM、700 mM、900 mM 或 1000 mM 之濃度併入。

界面活性劑

蛋白質分子具有與使其易受空氣-液體、小瓶-液體及液體-液體（矽油）界面處之吸附及變性影響的表面相互作用之高傾向。已觀察到此降解路徑逆向取決於蛋白質濃度且導致形成可溶性及不溶性蛋白質聚集體或經由吸附於表面而自溶液損失蛋白質。除容器表面吸附外，在物理攪拌下加劇表面誘發之降解，如將在產品之運輸及處置期間所經歷。

界面活性劑常用於蛋白質調配物中以防止表面誘發之降解。界面活性劑為具有與蛋白質競爭界面位置之能力的兩性分子。界面活性劑分子之疏水性部分佔據界面位置（例如空氣/液體），而分子之親水性部分保持面向本體溶劑。於足夠濃度（通常近似清潔劑之臨界微胞濃度）下，界面活性劑分子之表面層用以防止蛋白質分子吸附於界面。由此，使表面誘發之降解減至最少。最常用界面活性劑為脫水山梨糖醇聚乙氧基化物之脂肪酸酯，亦即聚山梨醇酯 20 及聚山梨醇酯 80。兩者僅在賦予分子疏水性特徵之脂族鏈的長度方面不同，分別為 C-12 及 C-18。因此，聚山梨醇酯-80 之表面活性更大且具有比聚山梨醇酯-20 低的臨界微胞濃度。

清潔劑亦可影響蛋白質之熱力學構形穩定性。在此處同樣，特定清潔劑賦形劑之作用將具有蛋白質特異性。舉例而言，已展示聚山梨醇酯降低一些蛋白質之穩定性且增加其他蛋白質之穩定性。蛋白質之清潔劑去穩定可根據清潔劑分子之可參與與部分或完全展開之蛋白質狀態之特異

性結合的疏水性尾來合理化。此等類型之相互作用會引起構形平衡移向更膨脹之蛋白質狀態（亦即增加蛋白質分子之疏水性部分暴露，此與結合聚山梨醇酯相反）。或者，若蛋白質天然狀態展現一些疏水性表面，則清潔劑與天然狀態之結合可使該構形穩定。

聚山梨醇酯之另一態樣為其本身易於氧化降解。通常，作為原材料，其含有足夠量之過氧化物以使蛋白質殘基側鏈（尤其甲硫胺酸）氧化。由添加穩定劑引起之氧化性損害的可能性強調調配物中應使用最低有效濃度之賦形劑。對於界面活性劑而言，給定蛋白質之有效濃度將取決於穩定化之機制。已假定若界面活性劑穩定化之機制與防止表面變性有關，則有效濃度將近似清潔劑之臨界微胞濃度。相反地，若穩定化之機制與特異性蛋白質-清潔劑相互作用相關，則有效界面活性劑濃度將與蛋白質濃度及相互作用之化學計量有關（Randolph T.W. 等人，*Pharm Biotechnol.*, 13:159-75 (2002)）。

亦可添加適量之界面活性劑以防止冷凍及乾燥期間之表面相關凝集現象 [Chang, B, J. Pharm. Sci. 85:1325, (1996)]。例示性界面活性劑包括陰離子、陽離子、非離子、兩性離子及兩性界面活性劑，包括衍生自天然存在胺基酸之界面活性劑。陰離子界面活性劑包括（但不限於）月桂基硫酸鈉、二辛基磺基丁二酸鈉及二辛基磺酸鈉、鵝去氧膽酸、N-月桂醯基肌胺酸鈉鹽、十二烷基硫酸鋰、1-辛烷磺酸鈉鹽、水合膽酸鈉、去氧膽酸鈉及甘去氧膽酸鈉鹽。陽

離子界面活性劑包括（但不限於）氯苄烷銨或苄索氯銨、單水合氯化十六烷基吡啶及溴化十六烷基三甲基銨。兩性離子表面活性劑包括（但不限於）CHAPS、CHAPSO、SB3-10及SB3-12。非離子界面活性劑包括（但不限於）毛地黃皂苷、Triton X-100、Triton X-114、TWEEN-20及TWEEN-80。界面活性劑亦包括（但不限於）聚桂醇400，聚煙氧40硬脂酸酯，聚氧乙烯氫化蓖麻油10、40、50及60，單硬脂酸甘油酯，聚山梨醇酯40、60、65及80，大豆卵磷脂及其他磷脂，諸如二油基磷脂醯膽鹼（dioleoyl phosphatidyl choline，DOPC）、二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油（dimyristoylphosphatidyl glycerol，DMPG）、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼（dimyristoylphosphatidyl choline，DMPC）及二油基磷脂醯甘油（dioleoyl phosphatidyl glycerol，DOPG）；蔗糖脂肪酸酯、甲基纖維素及羧甲基纖維素。因此進一步提供包含個別或呈不同比率之混合物形式的此等界面活性劑之組合物。在本發明之調配物中，界面活性劑係以約0.01 g/L至約0.5 g/L之濃度併入。

其他常見賦形劑組份

胺基酸

已發現胺基酸在蛋白質調配物中作為緩衝劑、膨化劑、穩定劑及抗氧化劑之多種用途。使用組胺酸及麩胺酸分別在5.5-6.5及4.0-5.5之pH範圍內緩衝蛋白質調配物。組胺酸之咪唑基具有 $pK_a = 6.0$ 且麩胺酸側鏈之羧基具有4.3之 pK_a ，其使此等胺基酸適合於在其各自pH範圍內緩

衝。麩胺酸尤其適用於該等情況（例如 Stemgen®）。組胺酸通常見於市售蛋白質調配物（例如 Xolair®、Herceptin®、Recombinate®）中，且此胺基酸提供檸檬酸鹽（已知在注射後刺痛之緩衝劑）之替代物。有趣地，亦已報導相對於在液體與凍乾呈現中以高濃度使用時之凝集，如在具有 ABX-IL8（IgG2 抗體）之調配物中所觀察到，組胺酸具有穩定作用（Chen B 等人，*Pharm Res.*, 20(12): 1952-60 (2003)）。亦觀察到組胺酸（至多 60 mM）降低此抗體之高濃度調配物的黏度。然而，在相同研究中，作者觀察到在不鏽鋼容器中之抗體的凍融研究期間含有組胺酸之調配物的凝集增加及褪色。作者將此歸因於自鋼容器腐蝕浸出之鐵離子的作用。關於組胺酸之另一注意在於其在金屬離子存在下經歷光氧化（Tomita M 等人，*Biochemistry*, 8(12): 5149-60 (1969)）。在調配物中使用甲硫胺酸作為抗氧化劑顯現前景；已觀察到其有效抵抗多種氧化壓力（Lam XM 等人，*J Pharm Sci.*, 86(11): 1250-5 (1997)）。

已展示胺基酸甘胺酸、脯胺酸、絲胺酸及丙胺酸藉由優選排斥機制來穩定蛋白質。甘胺酸亦為凍乾調配物（例如 Neumega®、Genotropin®、Humatrope®）中之常用膨化劑。已展示精胺酸為抑制凝集之有效藥劑且已用於液體與凍乾調配物中（例如 Activase®、Avonex®、Enbrel®液體）。此外，在精胺酸存在下某些蛋白質之再摺疊的效率增強已歸因於其在再摺疊期間對競爭凝集反應之抑制。

抗氧化劑

蛋白質殘基之氧化由多種不同來源引起。除添加特定抗氧化劑外，防止氧化性蛋白質損傷包括在產物之整個製造過程及儲存中謹慎控制多種因素，諸如大氣氧、溫度、曝光及化學污染。最常用之醫藥抗氧化劑為還原劑、氧/自由基淨化劑或螯合劑。治療性蛋白質調配物中之抗氧化劑為水溶性的且在整個產品儲存期內保持活性。還原劑及氧/自由基淨化劑藉由除去溶液中之活性氧物質而起作用。諸如 EDTA 之螯合劑藉由結合促進自由基形成之痕量金屬污染物而有效。舉例而言，EDTA 用於酸性纖維母細胞生長因子之液體調配物中以抑制半胱胺酸殘基之金屬離子催化氧化。EDTA 已用於如 Kineret®及 Ontak®之市售產品中。

除各種賦形劑防止蛋白質氧化之有效性外，抗氧化劑本身誘導蛋白質之其他共價或物理變化的可能性受到關注。舉例而言，還原劑會引起分子內二硫鍵斷裂，此會導致雙硫改組。在過渡金屬離子存在下，已證明抗壞血酸及 EDTA 促進多種蛋白質及肽中之甲硫胺酸氧化 (Akers MJ, 及 Defelippis MR. *Peptides and Proteins as Parenteral Solutions*. 於: *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins* 中. Sven Frokjaer, Lars Hovgaard 編 *Pharmaceutical Science*. Taylor and Francis, UK (1999); Fransson J.R., *J. Pharm. Sci.* 86(9): 4046-1050 (1997); Yin J 等人, *Pharm Res.*, 21(12): 2377-83 (2004))。已報導硫代硫酸鈉降低 rhuMab HER2 中光及溫度誘發之甲硫胺酸氧化的程度；然而，在此研究中亦報導硫代硫酸鹽-蛋白質加合

物之形成 (Lam XM, Yang JY 等人, *J Pharm Sci.* 86(11): 1250-5 (1997))。根據蛋白質之特定壓力及敏感性進行對適當抗氧化劑之選擇。

金屬離子

一般而言，過渡金屬離子於蛋白質調配物中為不合需要的，因為其會催化蛋白質中之物理及化學降解反應。然而，當特定金屬離子為蛋白質之輔因子時其包括於調配物中，且當特定金屬離子形成配位錯合物時其包括於蛋白質之懸浮液調配物（例如胰島素之鋅懸浮液）中。最近，已提出使用鎂離子（10-120 mM）來抑制天冬胺酸異構化為異天冬胺酸（WO 2004039337）。

金屬離子賦予蛋白質穩定性或增強之活性的兩個實例為人類脫氧核糖核酸酶（rhDNase, Pulmozyme®）及因子 VIII。在 rhDNase 之情況下， Ca^{+2} 離子（至多 100 mM）經由特異性結合位點增強酶之穩定性（Chen B 等人, *J Pharm Sci.*, 88(4): 477-82 (1999)）。事實上，自具有 EGTA 之溶液移除鈣離子使得脫鹽胺及凝集增加。然而，僅在 Ca^{+2} 離子情況下觀察到此作用；觀察到其他二價陽離子 Mg^{+2} 、 Mn^{+2} 及 Zn^{+2} 使 rhDNase 不穩定。在因子 VIII 中觀察到類似作用。 Ca^{+2} 及 Sr^{+2} 離子使蛋白質穩定，而如 Mg^{+2} 、 Mn^{+2} 及 Zn^{+2} 、 Cu^{+2} 及 Fe^{+2} 之其他離子使酶不穩定（Fatouros, A. 等人, *Int. J. Pharm.*, 155, 121-131 (1997)）。在關於因子 VIII 之獨立研究中，在 Al^{+3} 離子存在下觀察到凝集速率之顯著增加（Derrick TS 等人, *J. Pharm. Sci.*, 93(10): 2549-57

(2004))。作者注意到如緩衝鹽之其他賦形劑通常受 Al^{+3} 離子污染，且說明需要在經調配產物中使用具有適當品質之賦形劑。

防腐劑

當開發包括一種以上來自相同容器之萃取物的多用途非經腸調配物時，防腐劑為必需的。其主要功能在於抑制微生物生長且確保在整個藥品之儲存期或使用期內產物無菌。常用防腐劑包括苺醇、苯酚及間甲酚。儘管防腐劑具有悠久的使用歷史，但包括防腐劑之蛋白質調配物之開發可具有挑戰性。防腐劑對蛋白質幾乎總是具有去穩定作用（凝集），且此已變成限制其用於多劑量蛋白質調配物中之主要因素（Roy S 等人，*J Pharm Sci.*, 94(2): 382-96 (2005)）。

迄今為止，大多數蛋白質藥物已經調配僅用於單一用途。然而，當多劑量調配物為可能時，其具有賦予患者便利性之附加優勢及增加之市場性。一良好實例為人類生長激素（human growth hormone, hGH），其中經防腐處理之調配物的開發已產生更方便、多用途注射筆呈現之商業化時。目前市場上可得到至少四種含有 hGH 之經防腐處理之調配物的該等筆裝置。Norditropin®（液體，Novo Nordisk）、Nutropin AQ®（液體，Genentech）及 Genotropin（凍乾雙腔藥筒，Pharmacia & Upjohn）含有苯酚，而 Somatrop®（Eli Lilly）以間甲酚調配。

在經防腐處理之劑型的調配物開發期間需要考慮數個

態樣。須優化藥品中之有效防腐劑濃度。此需要測試劑型中之給定防腐劑之賦予抗微生物有效性而不損害蛋白質穩定性的濃度範圍。舉例而言，在介白素-1 受體（第 I 型）之液體調配物的開發中使用差示掃描熱量測定（differential scanning calorimetry, DSC）成功地篩選三種防腐劑。根據防腐劑於常用於市售產品中之濃度下對穩定性之影響，將其分級（Remmele RL Jr.等人，*Pharm Res.*, 15(2): 200-8 (1998)）。

一些防腐劑會引起注射部位反應，其為需要在選擇防腐劑時加以考慮之另一因素。在致力於評估 Norditropin 中之防腐劑及緩衝劑的臨床試驗中，觀察到疼痛感覺在含有苯酚及苄醇之調配物中與含有間甲酚之調配物相比較低（Kappelgaard A.M., *Horm Res.* 62 Suppl 3:98-103 (2004)）。有趣地，在常用防腐劑中，苄醇具有麻醉特性（Minogue SC 及 Sun DA., *Anesth Analg.*, 100(3): 683-6 (2005)）。

凍乾

亦預期包含本發明之 VWF 多肽的調配物可在投藥之前凍乾。凍乾係使用技術領域中常見之技術進行且應關於所開發之組合物加以優化[Tang 等人，*Pharm Res.* 21:191-200, (2004)及 Chang 等人，*Pharm Res.* 13:243-9 (1996)]。

在一態樣中，凍乾循環包含三個步驟：冷凍、第一乾燥及第二乾燥[A.P. Mackenzie, *Phil Trans R Soc London, Ser B, Biol* 278:167 (1977)]。在冷凍步驟中，冷卻溶液以引

發結冰。此外，此步驟誘發膨化劑之結晶。冰在第一乾燥階段中昇華，其係藉由使用真空及引入熱量以促進昇華而使腔室壓力降低至冰之蒸氣壓以下來進行。最後，在第二乾燥階段中在降低之腔室壓力下及於升高之儲存溫度下移除吸附或結合之水。該過程產生稱為凍乾餅之物質。此後，該餅可用無菌水或適於注射之稀釋劑來重構。

凍乾循環不僅確定賦形劑之最終物理狀態且亦影響其他參數，諸如重構時間、外觀、穩定性及最終含水量。冷凍狀態下之組合物結構經歷數次轉變（例如玻璃轉移、濕潤及結晶），其於特定溫度下發生且可用於理解及優化凍乾過程。玻璃轉移溫度（ T_g 及/或 T_g' ）可提供關於溶質之物理狀態之資訊且可藉由差示掃描熱量測定（DSC）來測定。 T_g 及 T_g' 為當設計凍乾循環時必須考慮之重要參數。舉例而言， T_g' 對於第一乾燥為重要的。此外，在乾燥狀態下，玻璃轉移溫度提供關於最終產物之儲存溫度之資訊。

製備方法

本發明進一步涵蓋製備醫藥調配物之方法。例如無菌注射用水、用於多劑量用途之具有防腐劑的水或具有適量界面活性劑（例如聚山梨醇酯-20）之水、0.4%生理食鹽水、0.3%甘氨酸或水性懸浮液的各種水性載劑可含有活性化合物與適合於製造水性懸浮液之賦形劑的混合物。在各種態樣中，該等賦形劑為懸浮劑，例如羧甲基纖維素鈉、甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、海藻酸鈉、聚乙基吡咯啉酮、黃耆膠及阿拉伯膠；分散劑或濕潤劑可為天然存在之

磷脂（例如卵磷脂），或氧化烯與脂肪酸之縮合產物（例如聚氧乙烯硬脂酸酯），或氧化乙烯與長鏈脂族醇之縮合產物（例如十七伸乙基氧基十六醇），或氧化乙烯與衍生自脂肪酸及己糖醇之偏酯的縮合產物（諸如聚氧乙烯山梨糖醇單油酸酯），或氧化乙烯與衍生自脂肪酸及己糖醇酸酐之偏酯的縮合產物（例如聚乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯）。水性懸浮液亦可含有一或多種防腐劑，例如對羥基苯甲酸乙酯或對羥基苯甲酸正丙酯。

投藥

為向人類或測試動物投予組合物，在一態樣中，組合物包含一或多種醫藥學上可接受之載劑。如下文所述，片語「醫藥學上（pharmaceutically）」或「藥理學上（pharmacologically）」可接受係指穩定、抑制蛋白質降解（諸如凝集）且裂解產物，且另外當使用技術領域中熟知之途徑投藥時不產生過敏反應或其他不良反應的分子實體及組合物。「醫藥學上可接受之載劑（pharmaceutically acceptable carriers）」包括任何及所有臨床上適用之溶劑、分散介質、塗層、抗菌劑及抗真菌劑、等滲劑及吸收延遲劑及其類似物，包括上文所揭示之彼等藥劑。

醫藥調配物可經口、局部、經皮、非經腸、藉由吸入噴霧、經陰道、經直腸或藉由顱內注射來投予。如本文中所使用，術語非經腸包括皮下注射、靜脈內、肌肉內、腦池內注射或輸液技術。亦涵蓋藉由靜脈內、皮內、肌肉內、乳房內、腹膜內、鞘內、眼球後、肺內注射進行投藥及/或

於特定部位處進行手術植入。通常，組合物基本上無熱原質，以及會對受體有害之其他雜質。

組合物之單次或多次投藥可以治療醫師所選之劑量含量及模式來進行。對於預防或治療疾病而言，適當劑量將取決於如以上所定義之欲治療的疾病類型、疾病之嚴重程度及病程、藥物是出於預防性目的或出於治療性目的投予、先前療法、患者之臨床病史及對藥物之反應及主治醫師之判斷。

套組

作為另一態樣，本發明包括套組，其包含一或多種以有利於其向個體投藥之用途的方式包裝之醫藥調配物。在一具體態樣中，該套組包括包裝於諸如密封瓶或管之容器中的本文所述之醫藥調配物（例如，包含治療性蛋白質或肽之組合物），以及描述化合物或組合物在實施方法中之用途的貼於該容器上或包括於包裝中之標籤。在一具體態樣中，該醫藥調配物包裝於容器中以使得容器中頂空之量（例如液體調配物與容器頂部之間的空氣量）極小。較佳地，頂空之量可忽略不計（亦即，幾乎無）。在一具體態樣中，該套組含有具有治療性蛋白質或肽組合物之第一容器及具有用於該組合物之生理學上可接受之重構溶液的第二容器。在一態樣中，醫藥調配物係以單位劑型包裝。套組可進一步包括適合於根據特定投藥途徑投予醫藥調配物之裝置。較佳地，套組含有描述醫藥調配物之用途的標籤。

劑量

治療本文所述之病狀之方法所涉及的給藥方案將由主治醫師考慮改變藥物作用之各種因素來加以判定，例如患者之年齡、病狀、體重、性別及飲食、任何感染之嚴重程度、投藥時間及其他臨床因素。舉例而言，本發明之重組VWF的典型劑量為約 50 U/kg，相當於 500 μ g/kg。

本發明之調配物可藉由初始大丸劑、接著連續輸液來投予以維持藥品之治療循環含量。作為另一實例，本發明之化合物可以單次劑量形式投予。一般熟習此項技術者將易於優化如藉由良好醫學規範及個別患者之臨床病狀所判定的有效劑量及投藥方案。給藥頻率將視藥劑之藥物動力學參數及投藥途徑而定。最佳醫藥調配物將由熟習此項技術者根據投藥途徑及所需劑量加以判定。參見例如，Remington's Pharmaceutical Sciences，第 18 版（1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042）第 1435-1712 頁，其揭示內容以引用的方式併入本文中。該等調配物可影響所投予之藥劑的物理狀態、穩定性、活體內釋放速率及活體內清除速率。視投藥途徑而定，合適之劑量可根據體重、體表面積或器官尺寸來計算。適當劑量可經由使用測定血液含量劑量以及適當劑量-反應資料之既定檢定來確定。最終給藥方案將由主治醫師考慮改變藥物作用之各種因素來判定，例如藥物之特定活性、患者之損傷嚴重程度及反應性、患者之年齡、病狀、體重、性別及飲食、任何感染之嚴重程度、投藥時間及其他臨床因素。當進行研究時，將出現關於用於各種疾病及病狀之適當劑量含量及治療持續時間

的其他資訊。

以下實施例不欲具有限制性，而僅例示本發明之特定具體態樣。

實施例 1

震盪實驗

為測定各種調配物中 rVWF 之沈澱量，在多種條件下測試在劇烈震盪後 rVWF 之回收百分比。

於室溫 (RT) 下使於 Advate 緩衝液 (90 mM NaCl、1.68 mM CaCl_2 、10 mM L-組胺酸、10 mM tris、0.26 mM 麩胱甘肽、23.4 mM 海藻糖、175.7 mM 甘露糖醇及 0.1 g/L TWEEEN-80, pH 7.0) 或 Advate 1:3 緩衝液 (於水中稀釋 3 倍之 Advate 緩衝液) 中之 rVWF 於震盪器上經受劇烈震盪歷時 0 min、1 min、2.5 小時或 4 天，且相對於震盪之前的起始物質測量 rVWF 之回收百分比。如表 1 中所示，在 Advate 緩衝液中觀察到約 40-80% 之損失，而在 Advate 1:3 緩衝液中觀察到約 20-30% 之損失。VWF 抗原 VWF:Ag 對應於可在 VWF 特異性 ELISA 中使用多株抗-VWF 抗體偵測之 VWF 的量，而 VWF:RCo 對應於在瑞斯托菌素 (ristocetin) 存在下引起穩定血小板之凝集之 VWF 的量。在兩種情況下，使用相對於實際 WHO 標準校準之人類參考血漿作為標準 (1 ml 參考血漿通常含有 1U VWF)。

表 1.劇烈震盪時間對 rVWF 回收率之影響

rVWF	於室溫下劇烈震盪	VWF:Ag [U/ml]	回收率 [%]	VWF:RCO [U/ml]	回收率 [%]	RCO/VWF:Ag [U/U]
Advate	0 min	213	100%	104	100%	0.49
	1 min	120	56%			
	2.5 hr	139	65%			
	4 d	37	17%	7	7%	0.19
Advate 1:3	0 min	206	100%	134	100%	0.65
	1 min	152	74%			
	2.5 hr	170	82%			
	4 d	138	67%	131	98%	0.95

亦在震盪實驗中測試冷凍/解凍及凍乾之影響。於 -20°C 下在 -20°C 冷室中或於乾冰上執行冷凍，在兩種情況下於室溫下執行解凍且兩者皆自液體調配物開始。對於凍乾而言，將本文所述之經調配 VWF 樣品在試驗規模凍乾器中於 $\leq -40^{\circ}\text{C}$ 下冷凍且使用標準凍乾程式來凍乾。直接對液體調配物 (2 ml 於 5 ml 小瓶中) 執行震盪。如表 2 中所示，rVWF 之回收百分比在 Advate 1:3 緩衝液中與 Advate 緩衝液相比較高。

表 2.

RVWF		VWF:Ag [U/ml]	VWF:Ag 回收率 [%]	VWF:RCO [U/ml]	VWF:RCO 回收率 [%]	RCO:Ag [U/U]
Advate	冷凍	213	100%	104	100%	0.49
	於 -20°C 下	229	107%	84	81%	0.37
	冷凍 3 次					
	用乾冰冷凍	231	108%	72	69%	0.31
	3 次					
	凍乾	242	113%	61	59%	0.25
	起始物質	213	100%	104	100%	0.49
Advate 1:3	於室溫下猛	37.0	17%	7.2	6.9%	0.19
	烈震盪 4 天					
	冷凍	206	100%	134	100%	0.65
	於 -20°C 下	184	89%	132	99%	0.72
	冷凍 3 次					
	用乾冰冷凍	195	94%	128	96%	0.66
	3 次					
	凍乾	195	94%	107	80%	0.55
	起始物質	206	100%	134	100%	0.65
	於室溫下猛	138	67%	131	98%	0.95
	烈震盪 4 天					

亦在震盪實驗中對儲存於有頂空及無頂空之注射器中的 rVWF 量測回收百分比。有趣地，當將 rVWF 儲存於無頂空之注射器中且如上所述震盪時，未觀察到 rVWF 沈澱。相比之下，當將 rVWF 儲存於有頂空之注射器中時，觀察到一些沈澱。

總而言之，劇烈震盪導致在 Advate 緩衝液或 Advate 1:3 緩衝液中 rVWF 損失至少 30%，其中 Advate 緩衝液展示回

收率損失與 Advate 1:3 緩衝液相比較高。有趣地，當將 rVWF 儲存且在汽車中運輸約 5000 km(代表在運輸期間之預期震盪)時，未觀察到劇烈震盪實驗中所觀察到之相同沈澱。rVWF 之沈澱可藉由儲存於無頂空之注射器中來消除。

實施例 2

重組 VWF 之穩定性

藉由評估各種調配物中存在之 rVWF 的活性含量來測試 rVWF 之穩定性。

如圖 1 中所示，在 Advate 緩衝液中 26 週後 rVWF 不穩定，此係歸因於 0.3 mM 麩胱甘肽之存在。然而，如圖 2 中所示，在 Advate 1:3 緩衝液中 rVWF 較穩定(例如於 4°C 下歷時 12 週)。

如圖 3 中所示，基於檸檬酸鹽之調配物(15 mM 檸檬酸鈉、10 mM CaCl_2 、100 mM NaCl, pH 7.0)的穩定性好於含有 0.1 M 麩胱甘肽之 Advate 1:3 緩衝液調配物。

同樣，隨時間在各種緩衝液中量測 rVWF 之濃度。如圖 4、圖 5 及圖 6 中所示，在 Advate 緩衝液、Advate 1:3 緩衝液及基於檸檬酸鹽之緩衝液中 rVWF 濃度分別隨時間穩定。

實施例 4

定液體調配物之特徵

使用差示掃描熱量測定(DSC)評估蛋白質(rVWF)在各種緩衝液中展開之程度。如表 3 中所示，Advate 緩衝液 pH 7.0 對於穩定化最佳。

DSC 為將增加樣品及參考物之溫度所需之熱量之量的

差以溫度函數形式量測之熱分析技術。DSC 實驗之結果為熱通量對比溫度或對比時間之曲線。

差示掃描熱量計可在加熱及冷卻的同時掃描一定溫度範圍，且其藉由量測達到設定溫度所需之熱量的量來測定相變，亦即熔融、結晶或玻璃轉移。用一組具有已知熱容量 C_p 及熔點 T_m 之純金屬（鋅、銦及錫）來校準熱量計。將各個參考緩衝液置於參考毛細血管中且將 rVWF 樣品置於儀器之樣品毛細血管中。

表 3.在各種緩衝液中之展開溫度

批號	緩衝液	pH	展開溫度[°C]
rVWF161A	Advate	7.0	66.0
rVWF161B	Immunate	6.8	64.5
rVWF161C	檸檬酸鹽	6.8	61.2
rVWF161D	NovoSeven	6.8	64.9
rVWF158	Hepes	7.4	61.3

緩衝液組份及濃度：

A) Advate :	5.26 g/l NaCl	pH=7.0
	0.248 g/l CaCl ₂	
	32 g/l D-甘露糖醇	
	8 g/l 海藻糖	
	1.56g/l L-組胺酸	
	1.2 g/l Tris	
	0.08 g/l 還原型麩胱甘肽	
B) Immunate :	5.25 g/l 甘胺酸	pH=6.8
	2.2 g/l NaCl	
	5.25 g/l NaCit ₃	
	5.25 g/l 離胺酸-HCl	
	0.62 g/l CaCl ₂	

C) 檸檬酸鹽： 3 g/l 甘胺酸
2.92 g/l NaCl
2.5 g/l NaCit₃
30g/l D-甘露糖醇
10g/l 海藻糖 pH=6.8

D) NovoSeven： 0.75 g/l 甘胺酸
2.92 g/l NaCl
1.47 g/l CaCl₂
30 g/l D-甘露糖醇 pH=6.8

rVWF158： 20 mM Hepes、150 mM NaCl、5 g/L 蔗糖，
pH 7.4

此外，如圖 7 中所示，大多數調配物賦形劑使展開溫度增加約 1-2°C。圖 8 展示 10 mM CaCl₂ 使展開溫度增加約 8°C 至約 67°C，此為亦可藉由 Advate 緩衝液達到之展開溫度。如圖 9 中所示，CaCl₂ 之此作用於 pH 7.3 及 6.5 下類似。最後，分析海藻糖及蔗糖對展開溫度之影響。與單獨檸檬酸鹽相比，海藻糖與蔗糖皆不增加 rVWF 之展開溫度。對於 rVWF 在各種賦形劑存在下之展開溫度 (T_{max}) 資料的總結在表 4 中陳述。

表 4.

15 mM 檸檬 酸鈉緩衝液	-	15 mM Tris	15 mM 甘胺酸	50 mM NaCl
ΔH [kJ/mol]	128494.3	656259.7	157352.2	124985.8
展開溫度 [°C]-峰值 1	58.6		59.1	61
峰值 2	65.2	68.5	65.5	
峰值 3	80.4		80.1	81
峰值 4				
15 mM 檸檬 酸鈉緩衝液	15 mM 組胺 酸	20.52 g/L 甘露糖醇	10.26 g/L 海藻糖	
ΔH [kJ/mol]	134044.5	1588590.1	612235.9	
展開溫度 [°C] 峰值 1	59.2	58.5	58.5	
峰值 2	65.2	65.5	71.3	
峰值 3	79.3	78.2	81.5	
峰值 4	88.5		92.7	
15 mM 檸檬 酸鈉緩衝液	1 mM CaCl ₂	10 mM CaCl ₂	32 g/L 蔗糖	0.25 mM 蔗糖
ΔH [kJ/mol]	266008.2	308171.3	115082.4	246904.6
展開溫度 [°C]-峰值 1	64.5	67.2	59.2	60
峰值 2			66	67
峰值 3	81	83.1	81.1	81.7
峰值 4	91.8	93		
15 mM 檸檬 酸鈉緩衝液	0.1 g/L TWEEN-80	32 g/L 棉子 糖	Na ₂ HPO ₄ / NaHPO ₄	7.8 mM 海藻糖
ΔH [kJ/mol]	338792.7	127329.2	197967.5	135573.3
展開溫度 [°C]-峰值 1	58.7	60.1	61.4	58.4
峰值 2	64.4	65.8		65.4
峰值 3	81.6	80.3	80.4	80.4
峰值 4			89.2	

除各種緩衝液外，使用 DSC 評估 rVWF 在 Advate 中於各種 pH 值下之展開溫度。結果在下 5 表中展示。Advate 緩衝液 pH 7.0 對於 rVWF 之穩定化為最佳的（亦即，最高展開溫度；峰值 1）。

表 5.

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

於各種溫度下儲存各種時間長度後評估 rVWF 在 Advate 緩衝液及 Advate 1:3 緩衝液中之螢光光譜。於 40°C 下在 Advate 或 Advate 1:3 緩衝液中儲存 0 至 28 天後觀察到螢光光譜無（或僅略微）變化。於其他溫度下未觀察到差異。

同樣，使用膠濾（Superose 6）評估 rVWF 之降解。雖然於 4°C 下在 Advate 緩衝液中 26 週後觀察到一些降解，但於 4°C 下 26 週後觀察到 rVWF 在 Advate 1:3 緩衝液中幾乎無降解。於 40°C 下，麩胱甘肽隨時間增加降解之量（儘管在 Advate 1:3 緩衝液中程度較慢）。

根據以上實施例，與未經稀釋之 Advate 緩衝液相比，Advate 1:3 緩衝液提供關於凍乾後冷凍/解凍及回收率之優勢。此外，Advate 1:3 緩衝液可在於 40°C 下培養期間比 Advate 緩衝液更好地穩定（例如，維持生物活性）rVWF 活

性。在 Advate 1:3 緩衝液中之 rVWF 對於於 4°C 下培養 4 週為穩定的。最後，DSC 已證明 pH 7.0 對於防止 rVWF 降解為最佳的（亦即，展示最高展開溫度）。

因此，鑒於本文所提供之資料，對於 rVWF 推薦藉由 NaCl 調整至所需滲透壓度之包括 15 mM 檸檬酸鹽（或甘胺酸或組胺酸）、10 mM CaCl_2 （pH 6.5-7.3）的調配物。舉例而言，在一具體態樣中，基於檸檬酸鹽之配方為 15 mM 檸檬酸鈉、10 mM CaCl_2 、100 mM NaCl，pH 7.0。

或者，亦涵蓋無麩胱甘肽之 Advate 或 Advate 1:3 緩衝液：Advate：90 mM NaCl、1.68 mM CaCl_2 、10 mM L-組胺酸、10 mM Tris、0.26 mM 麩胱甘肽、23.4 mM 海藻糖、175.7 mM 甘露糖醇及 0.1 g/L TWEEN-80，pH 7.0；Advate 1:3：30 mM NaCl、0.56 mM CaCl_2 、3.3 mM L-組胺酸、3.3 mM tris、7.8 mM 海藻糖、58.6 mM 甘露糖醇及 0.03 g/L TWEEN-80，pH 7.0。

【圖式簡單說明】

圖 1 展示由於麩胱甘肽之存在，26 週後 rVWF 在 Advate 緩衝液中不穩定。

圖 2 展示於 4°C 下 rVWF 在 Advate 1:3 緩衝液中穩定持續至多 12 週。

圖 3 展示基於檸檬酸鹽之調配物的穩定性好於含有 0.1 M 麩胱甘肽之 Advate 1:3 緩衝液調配物。

圖 4 展示在 Advate 緩衝液中在 26 週期間 rVWF 濃度穩

定。

圖 5 展示在 Advate 1:3 緩衝液中 rVWF 濃度隨時間穩定。

圖 6 展示在基於檸檬酸鹽之緩衝液中 rVWF 濃度隨時間穩定。

圖 7 展示大多數賦形劑使 rVWF 之展開溫度增加約 1°C 或 2°C 。

圖 8 展示 10 mM CaCl_2 使 rVWF 之展開溫度增加約 8°C 至約 67°C 。

圖 9 展示 CaCl_2 之作用在 pH 7.3 及 pH 6.5 下類似。

【主要元件符號說明】

無

序列表

- <110> 麥西艾森等人
- <120> 重組VWF調配物
- <130> 31315/43550
- <150> 61/017,881
- <151> 2007-12-31
- <160> 3
- <170> PatentIn 3.5版
- <210> 1
- <211> 8833
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成的聚核苷酸

- <220>
- <221> misc 特徵
- <223> 前原vWF

<400> 1
agctcacagc tattgtggtg ggaaaggag ggtggttggg ggatgtcaca gcttgggctt 60
tatctcccc agcagtggg actccacagc ccctgggcta cataacagca agacagtccg 120
gagctgtagc agacctgatt gagcctttgc agcagctgag agcatggcct aggggtgggcg 180
gcaccattgt ccagcagctg agtttcccag ggaccttga gatagccgca gccctcattt 240
gcaggggaag atgattcctg ccagatttgc cggggtgctg cttgctctgg ccctcatttt 300
gccagggacc ctttgtgcag aaggaaactg cggcaggtca tccacggccc gatgcagcct 360
tttcggaagt gacttcgtca acaccttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg 420
cagttacctc ctggcagggg gctgccagaa acgtcccttc tcgattattg gggacttcca 480
gaatggcaag agagtgaacc tctccgtgta tcttggggaa ttttttgaca tccatttggt 540
tgtcaatggt accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgccctatg cctccaaagg 600
gctgtatcta gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggctttgt 660
ggccaggatc gatggcagcg gcaactttca agtcctgctg tcagacagat acttcaacaa 720
gacctgcggg ctgtgtggca actttaacat ctttgtgaa gatgacttta tgaccaaga 780
agggaccttg acctcggaacc cttatgactt tgccaactca tgggctctga gcagtggaga 840
acagtgggtg gaacgggcat ctccctccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat 900
gcagaagggc ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcgggtg ttgcccgtg 960
ccaccctctg gtggacccc agccttttgt ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagtg 1020
tgctgggggg ctggagtgcg cctgccctgc cctcctggag tacgcccgga cctgtgcca 1080
ggagggaaat gtgtgttacg gctggaccga ccacagcgcg tgacgcccag tgtgccctgc 1140
tggatatggag tataggcagt gtgtgtcccc ttgcgccagg acctgccaga gcctgcacat 1200
caatgaaatg tgtcaggagc gatgcgtgga tggctgcagc tgccctgagg gacagctcct 1260



ggatgaaggc ctctgcgtgg agagcaccca gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgcta	1320
ccctcccggc acctccctct ctcgagactg caacacctgc atttgccgaa acagccagtg	1380
gatctgcagc aatgaagaat gtccagggga gtgccttgtc acaggtcaat cacacttcaa	1440
gagctttgac aacagatact tcaccttcag tgggatctgc cagtacctgc tggcccggga	1500
ttgccaggac cactccttct ccattgtcat tgagactgtc cagtgtgctg atgaccgca	1560
cgctgtgtgc acccgctccg tcaccgtccg gctgcctggc ctgcacaaca gccttgtaaa	1620
actgaagcat ggggcaggag ttgcatgga tggccaggac gtccagctcc ccctcctgaa	1680
aggtgacctc cgcattccagc atacagtgc ggcctccgtg cgcctcagct acggggagga	1740
cctgcagatg gactgggatg gccgcgggag gctgctgggtg aagctgtccc ccgtctatgc	1800
cggaagacc tgcggcctgt gtgggaatta caatggcaac caggggcagc acttccttac	1860
cccctctggg ctggcggagc cccgggtgga ggacttcggg aacgcctgga agctgcacgg	1920
ggactgccag gacctgcaga agcagcacag cgatccctgc gccctcaacc cgcgcattgc	1980
caggttctcc gaggaggcgt gcgcggctct gacgtccccc acattcgagg cctgccatcg	2040
tgccgtcagc ccgtgcctct acctgcgga ctgccgtac gacgtgtgct cctgctcgga	2100
cggccgcgag tgctgtgctg gcgccctggc cagctatgcc gcggcctgcg cggggagagg	2160
cgtgcgcgtc gcgtggcgcg agccaggccg ctgtgagctg aactgcccga aaggccaggt	2220
gtacctgcag tgccgggacc cctgcaacct gacctgccgc tctctctctt acccgatga	2280
ggaatgcaat gaggcctgcc tggagggtct cttctgcccc ccagggtctt acatggatga	2340
gaggggggac tgctgtccca agggccagtgc cccctgttac tatgacggtg agatcttcca	2400
gccagaagac atcttctcag accatcacac catgtgctac tgtgaggatg gcttcatgca	2460
ctgtaccatg agtggagtcc ccggaagctt gctgcctgac gctgtcctca gcagtcccct	2520
gtctcatcgc agcaaaagga gcctatcctg tcggcccccc atggtcaagc tgggtgtgtcc	2580
cgtgacaac ctgcgggctg aagggtctga gtgtacaaa acgtgccaga actatgacct	2640
ggagtgcatt agcatgggct gtgtctctgg ctgcctctgc cccccgggca tgggtccggca	2700
tgagaacaga tgtgtggccc tggaaagggtg tccctgcttc catcagggca aggagtatgc	2760
ccctggagaa acagtgaaga ttggctgcaa cacttggtgc tgtcgggacc ggaagtggaa	2820
ctgcacagac catgtgtgtg atgccacgtg ctccacgacg ggcattggccc actacctcac	2880
cttcgacggg ctcaaatacc tgttccccgg ggagtgccag tacgttctgg tgcaggatta	2940
ctgcggcagt aaccctggga ccttcgggat cctagtgggg aataagggat gcagccaccc	3000
ctcagtgaat tgcaagaaac gggtcacat cctggtggag ggaggagaga ttgagctgtt	3060
tgacggggag gtgaatgtga agaggcccat gaaggatgag actcactttg aggtggtgga	3120
gtctggccgg tacatcattc tgctgctggg caaagccctc tccgtggtct gggaccgcca	3180
cctgagcatc tccgtggtcc tgaagcagac ataccaggag aaagtgtgtg gcctgtgtgg	3240
gaatcttgat ggcattccaga acaatgacct caccagcagc aacctccaag tggaggaaga	3300
ccctgtggac tttgggaact cctggaaagt gagctcgag tgtgctgaca ccagaaaagt	3360
gcctctggac tcatccctg ccacctgcca taacaacatc atgaagcaga cgatggtgga	3420

ttcctcctgt agaatcctta ccagtgacgt cttccaggac tgcaacaagc tggtaggaccc	3480
cgagccatat ctggatgtct gcatttacga cacctgctcc tgtgagtcca ttggggactg	3540
cgcttgcttc tgcgacacca ttgctgccta tgcccacgtg tgtgcccagc atggcaaggt	3600
ggtgacctgg aggacggcca cattgtgccc ccagagctgc gaggagagga atctccggga	3660
gaacgggtat gagtgtgagt ggcgctataa cagctgtgca cctgcctgtc aagtcacgtg	3720
tcagcaccct gagccactgg cctgcctgtg gcagtgtgtg gagggtgccc atgcccactg	3780
ccctccaggg aaaatcctgg atgagctttt gcagacctgc gttgaccctg aagactgtcc	3840
agtgtgtgag gtggctggcc ggcgttttgc ctcaggaaag aaagtcacct tgaatcccag	3900
tgaccctgag cactgccaga tttgccactg tgatgttgtc aacctcacct gtgaagcctg	3960
ccaggagccg ggaggcctgg tggtagcctcc cacagatgcc ccggtgagcc ccaccactct	4020
gtatgtggag gacatctcgg aaccgccgtt gcacgatttc tactgcagca ggctactgga	4080
cctggtcttc ctgctggatg gctcctccag gctgtccgag gctgagtttg aagtgtgaa	4140
ggcctttgtg gtggacatga tggagcggct gcgcatctcc cagaagtggg tccgcgtggc	4200
cgtggtggag taccacgacg gctcccacgc ctacatcggg ctcaaggacc ggaagcgacc	4260
gtcagagctg cggcgcattg ccagccaggt gaagtatgcg ggcagccagg tggcctccac	4320
cagcgaggtc ttgaaataca cactgttcca aatcttcagc aagatcgacc gccctgaagc	4380
ctcccgcac accctgctcc tgatggccag ccaggagccc caacggatgt cccggaactt	4440
tgtccgctac gtccagggcc tgaagaagaa gaaggtcatt gtgatcccg tgggcattgg	4500
gccccatgcc aacctcaagc agatccgcct catcgagaag caggcccctg agaacaaggc	4560
cttcgtgctg agcagtgtgg atgagctgga gcagcaaagg gacgagatcg ttagctacct	4620
ctgtgacctt gccctgaag cccctcctcc tactctgccc cccgacatgg cacaagtcac	4680
tgtggggccc gggctcttgg gggtttcgac cctggggccc aagaggaact ccatgtttct	4740
ggatgtggcg ttcgtcctgg aaggatcgga caaaattggt gaagccgact tcaacaggag	4800
caaggagttc atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca gcatccacgt	4860
cacggtgctg cagtactcct acatggtgac tgtggagtac cccttcagcg aggcacagtc	4920
caaaggggac atcctgcagc ggggtgcgaga gatccgctac cagggcggca acaggaccaa	4980
cactgggctg gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc aggggtgaccg	5040
ggagcaggcg cccaacctgg tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa	5100
gaggctgcct ggagacatcc aggtggtgcc cattggagtg ggccctaata ccaacgtgca	5160
ggagctggag aggattggct ggcccaatgc ccctatcctc atccaggact ttgagacgct	5220
ccccgagag gtcctgacc tggtagtgca gaggtgctgc tccggagagg ggctgcagat	5280
ccccaccctc tcccctgcac ctgactgcag ccagcccctg gacgtgatcc ttctcctgga	5340
tggctcctcc agtttcccag cttcttattt tgatgaaatg aagagtttcg ccaaggcttt	5400
catttcaaaa gccaatatag ggcctcgtct cactcaggtg tcagtgtctg agtatggaag	5460
catcaccacc attgacgtgc catggaacgt ggtcccgag aaagcccatt tgctgagcct	5520

tgtggacgtc atgcagcggg agggaggccc cagccaaatc ggggatgcct tgggctttgc	5580
tgtgcgatac ttgacttcag aaatgcatgg tgccaggccg ggagcctcaa aggcggtggt	5640
catcctggtc acggacgtct ctgtggattc agtggatgca gcagctgatg ccgccaggtc	5700
caacagagtg acagtgttcc ctattggaat tggagatcgc tacgatgcag cccagctacg	5760
gatcttggca ggcccagcag gcgactccaa cgtggtgaag ctccagcgaa tcgaagacct	5820
ccctaccatg gtcaccttgg gcaattcctt cctccacaaa ctgtgctctg gatttgttag	5880
gatttgcatt gatgaggatg ggaatgagaa gagggccggg gacgtctgga ccttgccaga	5940
ccagtgccac accgtgactt gccagccaga tggccagacc ttgctgaaga gtcacgggt	6000
caactgtgac cgggggctga ggccttcgtg ccctaacagc cagtcacctg ttaaagtga	6060
agagacctgt ggctgccgct ggacctgcc ctgcgtgtgc acaggcagct ccactcggca	6120
catcgtgacc tttgatgggc agaatttcaa gctgactggc agctgttctt atgtcctatt	6180
tcaaaacaag gagcaggacc tggaggtgat tctccataat ggtgcctgca gccctggagc	6240
aaggcagggc tgcataaaat ccatcgaggt gaagcacagt gccctctccg tcgagctgca	6300
cagtgcattg gaggtgacgg tgaatgggag actggtctct gttccttacg tgggtgggaa	6360
catggaagtc aacgtttatg gtgccatcat gcatgaggtc agattcaatc accttggta	6420
catcttcaca ttcactccac aaaacaatga gttccaactg cagctcagcc ccaagacttt	6480
tgcttcaaag acgtatggc tgtgtgggat ctgtgatgag aacggagcca atgacttcat	6540
gctgagggat ggcacagtca ccacagactg gaaaacactt gttcaggaat ggactgtgca	6600
gcggccaggc cagacgtgcc agcccactct ggaggagcag tgtcttgctc ccgacagctc	6660
ccactgccag gtcctctctt taccactgtt tgctgaatgc cacaaggctc tggctccagc	6720
cacattctat gccatctgcc agcaggacag ttgccaccag gagcaagtgt gtgaggtgat	6780
cgcctcttat gccacactct gtcggaccaa cggggctctg gttgactgga ggacacctga	6840
tttctgtgct atgtcatgcc caccatctct ggtctacaac cactgtgagc atggctgtcc	6900
ccggcactgt gatggcaacg tgagctcctg tggggacctt ccctccgaag gctgtttctg	6960
ccctccagat aaagtcatgt tggaaggcag ctgtgtccct gaagaggcct gcactcagt	7020
cattggtgag gatggagtcc agcaccagtt cctggaagcc tgggtcccgg accaccagcc	7080
ctgtcagatc tgcacatgcc tcagcgggcg gaaggtaaac tgcacaacgc agccctgccc	7140
cacggccaaa gctccacagt gtggcctgtg tgaagtagcc cgcctccgcc agaattgcaga	7200
ccagtgtgct cccgagtatg agtgtgtgtg tgaccagtg agctgtgacc tgccccagt	7260
gcctcactgt gaacgtggcc tccagcccac actgaccaac cctggcgagt gcagacccaa	7320
cttcacctgc gcctgcagga aggaggagt gaaaagagt tccccacct cctgcccccc	7380
gcaccgtttg cccacccttc ggaagaccca gtgctgtgat gattatgagt gtgcctgcaa	7440
ctgtgtcaac tccacagtga gctgtccctt tgggtacttg gcctcaactg ccaccaatga	7500
ctgtggctgt accacaacca cctgccttcc cgacaagggt tgtgtccacc gaagcaccat	7560
ctaccctgtg ggccagttct gggaggagg ctgcgatgtg tgcacctgca ccgacatgga	7620
ggatgccgtg atgggcctcc gcgtggccca gtgctccag aagccctgtg aggacagctg	7680

tcggtcgggc ttcacttacg ttctgcatga aggcgagtg tgtggaaggt gcctgccatc 7740
tgctgtgag gtggtgactg gctcaccgcg gggggactcc cagtcttctt ggaagagtgt 7800
cggctcccag tgggcctccc cggagaaccc ctgcctcatc aatgagtgtg tccgagtgaa 7860
ggaggaggtc ttataacaac aaaggaacgt ctctgcccc cagctggagg tccctgtctg 7920
cccctcgggc tttcagctga gctgtaagac ctacagcgtg tgcccaagct gtcgctgtga 7980
gcgcatggag gcctgcatgc tcaatggcac tgtcattggg cccgggaaga ctgtgatgat 8040
cgatgtgtgc acgacctgcc gctgcatggt gcagggtggg gtcctctctg gattcaagct 8100
ggagtgcagg aagaccacct gcaaccctg cccctgggt tacaaggaag aaaataacac 8160
aggatgaatgt tgtgggagat gtttgcctac ggcttgacc attcagctaa gaggaggaca 8220
gatcatgaca ctgaagcgtg atgagacgct ccaggatggc tgtgatactc acttctgcaa 8280
ggtcaatgag agaggagagt acttctggga gaagagggtc acaggctgcc caccctttga 8340
tgaacacaag tgtctggctg agggaggtaa aattatgaaa attccaggca cctgctgtga 8400
cacatgtgag gagcctgagt gcaacgacat cactgccagg ctgcagtatg tcaaggtggg 8460
aagctgtaag tctgaagtag aggtggatat ccactactgc cagggcaa atgtgccagcaa 8520
agccatgtac tccattgaca tcaacgatgt gcaggaccag tgctcctgct gctctccgac 8580
acggacggag cccatgcagg tggccctgca ctgcaccaat ggctctgttg tgtaccatga 8640
ggttctcaat gccatggagt gcaaatgctc cccaggaag tgcagcaagt gaggctgctg 8700
cagctgcatg ggtgcctgct gctgcctgcc ttggcctgat ggccaggcca gagtgtgccc 8760
agtcctctgc atgttctgct cttgtgccct tctgagccca caataaaggc tgagctctta 8820
tcttgcaaaa ggc 8833

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

<220>
<223> 合成的多肽

<220>
<221> MISC 特徴
<223> 前原vWF

<400> 2

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

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

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

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



2025/11/11 14:11

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

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

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

Lys Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys Leu Ser Gly Glu Ala Tyr
115 120 125

Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly Asn Phe Gln Val Leu Leu
130 135 140

Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asn
145 150 155 160

Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln Glu Gly Thr Leu Thr Ser
165 170 175

Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala Leu Ser Ser Gly Glu Gln
180 185 190

Trp Cys Glu Arg Pro Ser Ser Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met
195 200 205

Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val
210 215 220

Phe Ala Arg Cys His Pro Leu Val Asp Pro Glu Pro Phe Cys Glu Lys
225 230 235 240

Thr Leu Cys Glu Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu
245 250 255

Leu Glu Tyr Ala Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly
260 265 270

Trp Thr Asp His Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu
275 280 285

Tyr Arg Gln Cys Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His
290 295 300

Ile Asn Glu Met Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro
305 310 315 320

Glu Gly Gln Leu Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys
325 330 335

Pro Cys Val His Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser

340										345					350				
Arg	Asp	Cys	Asn	Thr	Cys	Ile	Cys	Arg	Asn	Ser	Gln	Trp	Ile	Cys	Ser				
		355					360					365							
Asn	Glu	Glu	Cys	Pro	Gly	Glu	Cys	Leu	Val	Thr	Gly	Gln	Ser	His	Phe				
	370					375					380								
Lys	Ser	Phe	Asp	Asn	Arg	Tyr	Phe	Thr	Phe	Ser	Gly	Ile	Cys	Gln	Tyr				
385					390					395					400				
Leu	Leu	Ala	Arg	Asp	Cys	Gln	Asp	His	Ser	Phe	Ser	Ile	Val	Ile	Glu				
				405					410					415					
Thr	Val	Gln	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Asp	Ala	Val	Cys	Thr	Arg	Ser	Val				
			420					425					430						
Thr	Val	Arg	Leu	Pro	Gly	Leu	His	Asn	Ser	Leu	Val	Lys	Leu	Lys	His				
		435					440					445							
Gly	Ala	Gly	Val	Ala	Met	Asp	Gly	Gln	Asp	Val	Gln	Leu	Pro	Leu	Leu				
	450					455					460								
Lys	Gly	Asp	Leu	Arg	Ile	Gln	His	Thr	Val	Thr	Ala	Ser	Val	Arg	Leu				
465					470					475					480				
Ser	Tyr	Gly	Glu	Asp	Leu	Gln	Met	Asp	Trp	Asp	Gly	Arg	Gly	Arg	Leu				
				485					490					495					
Leu	Val	Lys	Leu	Ser	Pro	Val	Tyr	Ala	Gly	Lys	Thr	Cys	Gly	Leu	Cys				
			500					505					510						
Gly	Asn	Tyr	Asn	Gly	Asn	Gln	Gly	Asp	Asp	Phe	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly				
		515					520					525							
Leu	Ala	Glu	Pro	Arg	Val	Glu	Asp	Phe	Gly	Asn	Ala	Trp	Lys	Leu	His				
	530					535					540								
Gly	Asp	Cys	Gln	Asp	Leu	Gln	Lys	Gln	His	Ser	Asp	Pro	Cys	Ala	Leu				
545					550					555					560				
Asn	Pro	Arg	Met	Thr	Arg	Phe	Ser	Glu	Glu	Ala	Cys	Ala	Val	Leu	Thr				
				565					570					575					
Ser	Pro	Thr	Phe	Glu	Ala	Cys	His	Arg	Ala	Val	Ser	Pro	Leu	Pro	Tyr				
			580					585					590						
Leu	Arg	Asn	Cys	Arg	Tyr	Asp	Val	Cys	Ser	Cys	Ser	Asp	Gly	Arg	Glu				
		595					600					605							
Cys	Leu	Cys	Gly	Ser	Tyr	Ala	Ala	Ala	Cys	Ala	Gly	Arg	Gly	Val	Arg				
	610					615					620								

Val	Ala	Trp	Arg	Glu	Pro	Gly	Arg	Cys	Glu	Leu	Asn	Cys	Pro	Lys	Gly	625	630	635	640
Gln	Val	Tyr	Leu	Gln	Cys	Gly	Thr	Pro	Cys	Asn	Leu	Thr	Cys	Arg	Ser	645	650	655	
Leu	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Glu	Cys	Asn	Glu	Ala	Cys	Leu	Glu	Gly	Cys	660	665	670	
Phe	Cys	Pro	Pro	Met	Asp	Glu	Arg	Gly	Asp	Cys	Val	Pro	Lys	Ala	Gln	675	680	685	
Cys	Pro	Cys	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Glu	Ile	Phe	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Phe	690	695	700	
Ser	Asp	His	His	Thr	Met	Cys	Tyr	Cys	Glu	Asp	Gly	Phe	Met	His	Cys	705	710	715	720
Thr	Met	Ser	Gly	Val	Pro	Gly	Ser	Leu	Leu	Pro	Asp	Ala	Val	Leu	Ser	725	730	735	
Ser	Pro	Leu	Ser	His	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Leu	Ser	Cys	Arg	Pro	Pro	740	745	750	
Met	Val	Lys	Leu	Val	Cys	Pro	Ala	Asp	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Gly	Leu	755	760	765	
Glu	Cys	Thr	Lys	Thr	Cys	Gln	Asn	Tyr	Asp	Leu	Glu	Cys	Met	Ser	Met	770	775	780	
Gly	Cys	Val	Ser	Gly	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro	Gly	Met	Val	Arg	His	Glu	785	790	795	800
Asn	Arg	Cys	Glu	Arg	Cys	Pro	Cys	Phe	His	Gln	Gly	Lys	Glu	Tyr	Ala	805	810	815	
Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Cys	Asn	Thr	Cys	Val	Cys	Arg	Asp	820	825	830	
Arg	Lys	Trp	Asn	Cys	Thr	Asp	His	Val	Cys	Asp	Ala	Thr	Cys	Ser	Thr	835	840	845	
Ile	Gly	Met	Ala	His	Tyr	Leu	Thr	Phe	Asp	Gly	Leu	Lys	Tyr	Leu	Phe	850	855	860	
Pro	Gly	Glu	Cys	Gln	Tyr	Val	Leu	Val	Gln	Asp	Tyr	Cys	Gly	Ser	Asn	865	870	875	880
Pro	Gly	Thr	Phe	Arg	Ile	Leu	Val	Gly	Asn	Lys	Gly	Cys	Ser	His	Pro	885	890	895	
Ser	Val	Lys	Cys	Lys	Lys	Arg	Val	Thr	Ile	Leu	Val	Glu	Gly	Gly	Glu	900	905	910	

Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp
915 920 925

Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu
930 935 940

Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser
945 950 955 960

Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly
965 970 975

Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln
980 985 990

Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser
995 1000 1005

Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala
1010 1015 1020

Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser
1025 1030 1035

Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu
1040 1045 1050

Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val Cys Ile Tyr Asp Thr Cys
1055 1060 1065

Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys Phe Cys Asp Thr Ile
1070 1075 1080

Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly Lys Val Val Thr
1085 1090 1095

Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu Glu Arg Asn
1100 1105 1110

Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn Ser Cys
1115 1120 1125

Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu Ala
1130 1135 1140

Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro
1145 1150 1155

Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu
1160 1165 1170

Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly
1175 1180 1185

Lys	Lys	Val	Thr	Leu	Asn	Pro	Ser	Asp	Pro	Glu	His	Cys	Gln	Ile
	1190					1195					1200			
Cys	His	Cys	Asp	Val	Val	Asn	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Cys	Gln	Glu
	1205					1210					1215			
Pro	Gly	Gly	Leu	Val	Val	Pro	Pro	Thr	Asp	Ala	Pro	Val	Ser	Pro
	1220					1225					1230			
Thr	Thr	Leu	Tyr	Val	Glu	Asp	Ile	Ser	Glu	Pro	Pro	Leu	His	Asp
	1235					1240					1245			
Phe	Tyr	Cys	Ser	Arg	Leu	Leu	Asp	Leu	Val	Phe	Leu	Leu	Asp	Gly
	1250					1255					1260			
Ser	Ser	Arg	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Phe	Glu	Val	Leu	Lys	Ala	Phe
	1265					1270					1275			
Val	Val	Asp	Met	Met	Glu	Arg	Leu	Arg	Ile	Ser	Gln	Lys	Trp	Val
	1280					1285					1290			
Arg	Val	Ala	Val	Val	Glu	Tyr	His	Asp	Gly	Ser	His	Ala	Tyr	Ile
	1295					1300					1305			
Gly	Leu	Lys	Asp	Arg	Lys	Arg	Pro	Ser	Glu	Leu	Arg	Arg	Ile	Ala
	1310					1315					1320			
Ser	Gln	Val	Lys	Tyr	Ala	Gly	Ser	Gln	Val	Ala	Ser	Thr	Ser	Glu
	1325					1330					1335			
Val	Leu	Lys	Tyr	Thr	Leu	Phe	Gln	Ile	Phe	Ser	Lys	Ile	Asp	Arg
	1340					1345					1350			
Pro	Glu	Ala	Ser	Arg	Ile	Thr	Leu	Leu	Leu	Met	Ala	Ser	Gln	Glu
	1355					1360					1365			
Pro	Gln	Arg	Met	Ser	Arg	Asn	Phe	Val	Arg	Tyr	Val	Gln	Gly	Leu
	1370					1375					1380			
Lys	Lys	Lys	Lys	Val	Ile	Val	Ile	Pro	Val	Gly	Ile	Gly	Pro	His
	1385					1390					1395			
Ala	Asn	Leu	Lys	Gln	Ile	Arg	Leu	Ile	Glu	Lys	Gln	Ala	Pro	Glu
	1400					1405					1410			
Asn	Lys	Ala	Phe	Val	Leu	Ser	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Glu	Gln	Gln
	1415					1420					1425			
Arg	Asp	Glu	Ile	Val	Ser	Tyr	Leu	Cys	Asp	Leu	Ala	Pro	Glu	Ala
	1430					1435					1440			
Pro	Pro	Pro	Thr	Leu	Pro	Pro	Asp	Met	Ala	Gln	Val	Thr	Val	Gly

1445		1450		1455
Pro Gly 1460	Leu Leu Gly Val	Ser Thr Leu Gly 1465	Pro Lys 1470	Arg Asn Ser
Met Val 1475	Leu Asp Val Ala	Phe Val Leu Glu Gly 1480	Ser Asp Lys Ile 1485	
Gly Glu 1490	Ala Asp Phe Asn	Arg Ser Lys Glu Phe 1495	Met Glu Glu Val 1500	
Ile Gln 1505	Arg Met Asp Val	Gly Gln Asp Ser Ile 1510	His Val Thr Val 1515	
Leu Gln 1520	Tyr Ser Tyr Met	Val Thr Val Glu Tyr 1525	Pro Phe Ser Glu 1530	
Ala Gln 1535	Ser Lys Gly Asp	Ile Leu Gln Arg Val 1540	Arg Glu Ile Arg 1545	
Tyr Gln 1550	Gly Gly Asn Arg	Thr Asn Thr Gly Leu 1555	Ala Leu Arg Tyr 1560	
Leu Ser 1565	Asp His Ser Phe	Leu Val Ser Gln Gly 1570	Asp Arg Glu Gln 1575	
Ala Pro 1580	Asn Leu Val Tyr	Met Val Thr Gly Asn 1585	Pro Ala Ser Asp 1590	
Glu Ile 1595	Lys Arg Leu Pro	Gly Asp Ile Gln Val 1600	Val Pro Ile Gly 1605	
Val Gly 1610	Pro Asn Ala Asn	Val Gln Glu Leu Glu 1615	Arg Ile Gly Trp 1620	
Pro Asn 1625	Ala Pro Ile Leu	Ile Gln Asp Phe Glu 1630	Thr Leu Pro Arg 1635	
Glu Ala 1640	Pro Asp Leu Val	Leu Gln Arg Cys Cys 1645	Ser Gly Glu Gly 1650	
Leu Gln 1655	Ile Pro Thr Leu	Ser Pro Ala Pro Asp 1660	Cys Ser Gln Pro 1665	
Leu Asp 1670	Val Ile Leu Leu	Leu Asp Gly Ser Ser 1675	Ser Phe Pro Ala 1680	
Ser Tyr 1685	Phe Asp Glu Met	Lys Ser Phe Ala Lys 1690	Ala Phe Ile Ser 1695	
Lys Ala 1700	Asn Ile Gly Pro	Arg Leu Thr Gln Val 1705	Ser Val Leu Gln 1710	

Tyr	Gly	Ser	Ile	Thr	Thr	Ile	Asp	Val	Pro	Trp	Asn	Val	Val	Pro
	1715					1720					1725			
Glu	Lys	Ala	His	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Asp	Val	Met	Gln	Arg	Glu
	1730					1735					1740			
Gly	Gly	Pro	Ser	Gln	Ile	Gly	Asp	Ala	Leu	Gly	Phe	Ala	Val	Arg
	1745					1750					1755			
Tyr	Leu	Thr	Ser	Glu	Met	His	Gly	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Lys
	1760					1765					1770			
Ala	Val	Val	Ile	Leu	Val	Thr	Asp	Val	Ser	Val	Asp	Ser	Val	Asp
	1775					1780					1785			
Ala	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg	Ser	Asn	Arg	Val	Thr	Val	Phe	Pro
	1790					1795					1800			
Ile	Gly	Ile	Gly	Asp	Arg	Tyr	Asp	Ala	Ala	Gln	Leu	Arg	Ile	Leu
	1805					1810					1815			
Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Asp	Ser	Asn	Val	Val	Lys	Leu	Gln	Arg	Ile
	1820					1825					1830			
Glu	Asp	Leu	Pro	Thr	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Asn	Ser	Phe	Leu	His
	1835					1840					1845			
Lys	Leu	Cys	Ser	Gly	Phe	Val	Arg	Ile	Cys	Met	Asp	Glu	Asp	Gly
	1850					1855					1860			
Asn	Glu	Lys	Arg	Pro	Gly	Asp	Val	Trp	Thr	Leu	Pro	Asp	Gln	Cys
	1865					1870					1875			
His	Thr	Val	Thr	Cys	Gln	Pro	Asp	Gly	Gln	Thr	Leu	Leu	Lys	Ser
	1880					1885					1890			
His	Arg	Val	Asn	Cys	Asp	Arg	Gly	Leu	Arg	Pro	Ser	Cys	Pro	Asn
	1895					1900					1905			
Ser	Gln	Ser	Pro	Val	Lys	Val	Glu	Glu	Thr	Cys	Gly	Cys	Arg	Trp
	1910					1915					1920			
Thr	Cys	Pro	Cys	Val	Cys	Thr	Gly	Ser	Ser	Thr	Arg	His	Ile	Val
	1925					1930					1935			
Thr	Phe	Asp	Gly	Gln	Asn	Phe	Lys	Leu	Thr	Gly	Ser	Cys	Ser	Tyr
	1940					1945					1950			
Val	Leu	Phe	Gln	Asn	Lys	Glu	Gln	Asp	Leu	Glu	Val	Ile	Leu	His
	1955					1960					1965			
Asn	Gly	Ala	Cys	Ser	Pro	Gly	Ala	Arg	Gln	Gly	Cys	Met	Lys	Ser
	1970					1975					1980			

Ile Glu Val Lys His Ser Ala Leu Ser Val Glu Leu His Ser Asp
1985 1990 1995

Met Glu Val Thr Val Asn Gly Arg Leu Val Ser Val Pro Tyr Val
2000 2005 2010

Gly Gly Asn Met Glu Val Asn Val Tyr Gly Ala Ile Met His Glu
2015 2020 2025

Val Arg Phe Asn His Leu Gly His Ile Phe Thr Phe Thr Pro Gln
2030 2035 2040

Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln Leu Ser Pro Lys Thr Phe Ala Ser
2045 2050 2055

Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly Ile Cys Asp Glu Asn Gly Ala Asn
2060 2065 2070

Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr
2075 2080 2085

Leu Val Gln Glu Trp Thr Val Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln
2090 2095 2100

Pro Glu Gln Cys Leu Val Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu
2105 2110 2115

Leu Leu Pro Leu Phe Ala Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala
2120 2125 2130

Thr Phe Tyr Ala Ile Cys Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln
2135 2140 2145

Val Cys Glu Val Ile Ala Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn
2150 2155 2160

Gly Val Cys Val Asp Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser
2165 2170 2175

Cys Pro Pro Ser Leu Val Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro
2180 2185 2190

Arg His Cys Asp Gly Asn Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser
2195 2200 2205

Glu Gly Cys Phe Cys Pro Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser
2210 2215 2220

Cys Val Pro Glu Glu Ala Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly
2225 2230 2235

Val Gln His Gln Phe Leu Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro
2240 2245 2250

Cys	Gln	Ile	Cys	Thr	Cys	Leu	Ser	Gly	Arg	Lys	Val	Asn	Cys	Thr
2255						2260					2265			
Thr	Gln	Pro	Cys	Pro	Thr	Ala	Lys	Ala	Pro	Thr	Cys	Gly	Leu	Cys
2270						2275					2280			
Glu	Val	Ala	Arg	Leu	Arg	Gln	Asn	Ala	Asp	Gln	Cys	Cys	Pro	Glu
2285						2290					2295			
Tyr	Glu	Cys	Val	Cys	Asp	Pro	Val	Ser	Cys	Asp	Leu	Pro	Pro	Val
2300						2305					2310			
Pro	His	Cys	Glu	Arg	Gly	Leu	Gln	Pro	Thr	Leu	Thr	Asn	Pro	Gly
2315						2320					2325			
Glu	Cys	Arg	Pro	Asn	Phe	Thr	Cys	Ala	Cys	Arg	Lys	Glu	Glu	Cys
2330						2335					2340			
Lys	Arg	Val	Ser	Pro	Pro	Ser	Cys	Pro	Pro	His	Arg	Leu	Pro	Thr
2345						2350					2355			
Leu	Arg	Lys	Thr	Gln	Cys	Cys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Cys	Ala	Cys	Asn
2360						2365					2370			
Cys	Val	Asn	Ser	Thr	Val	Ser	Cys	Pro	Leu	Gly	Tyr	Leu	Ala	Ser
2375						2380					2385			
Thr	Ala	Thr	Asn	Asp	Cys	Gly	Cys	Thr	Thr	Thr	Thr	Cys	Leu	Pro
2390						2395					2400			
Asp	Lys	Val	Cys	Val	His	Arg	Ser	Thr	Ile	Tyr	Pro	Val	Gly	Gln
2405						2410					2415			
Phe	Trp	Glu	Glu	Gly	Cys	Asp	Val	Cys	Thr	Cys	Thr	Asp	Met	Glu
2420						2425					2430			
Asp	Ala	Val	Met	Gly	Leu	Arg	Val	Ala	Gln	Cys	Ser	Gln	Lys	Pro
2435						2440					2445			
Cys	Glu	Asp	Ser	Cys	Arg	Ser	Gly	Phe	Thr	Tyr	Val	Leu	His	Glu
2450						2455					2460			
Gly	Glu	Cys	Cys	Gly	Arg	Cys	Leu	Pro	Ser	Ala	Cys	Glu	Val	Val
2465						2470					2475			
Thr	Gly	Ser	Pro	Arg	Gly	Asp	Ser	Gln	Ser	Ser	Trp	Lys	Ser	Val
2480						2485					2490			
Gly	Ser	Gln	Trp	Glu	Asn	Pro	Cys	Leu	Ile	Asn	Glu	Cys	Val	Arg
2495						2500					2505			
Val	Lys	Glu	Glu	Val	Phe	Ile	Gln	Gln	Arg	Asn	Val	Ser	Cys	Pro

2510	2515	2520
Gln Leu Glu Val Pro Val Cys 2525	Pro Ser Gly Phe 2530	Gln Leu Ser Cys 2535
Lys Thr Ser Ala Cys Cys 2540	Pro Ser Cys Arg Cys 2545	Glu Arg Met Glu 2550
Ala Cys Met Leu Asn Gly Thr 2555	Val Ile Gly Pro 2560	Gly Lys Thr Val 2565
Met Ile Asp Val Cys Thr 2570	Thr Cys Arg Cys Met 2575	Val Gln Val Gly 2580
Val Ile Ser Gly Phe Lys 2585	Leu Glu Cys Arg Lys 2590	Thr Thr Cys Asn 2595
Pro Cys Pro Leu Gly Tyr 2600	Lys Glu Glu Asn Asn 2605	Thr Gly Glu Cys 2610
Cys Gly Arg Cys Leu Pro 2615	Thr Ala Cys Thr Ile 2620	Gln Leu Arg Gly 2625
Gly Gln Ile Met Thr Leu 2630	Lys Arg Asp Glu Thr 2635	Leu Gln Asp Gly 2640
Cys Asp Thr His Phe Cys 2645	Lys Val Asn Glu Arg 2650	Gly Glu Tyr Phe 2655
Trp Glu Lys Arg Val Thr 2660	Gly Cys Pro Pro Phe 2665	Asp Glu His Lys 2670
Cys Leu Ala Glu Gly Gly 2675	Lys Ile Met Lys Ile 2680	Pro Gly Thr Cys 2685
Cys Asp Thr Cys Glu Glu 2690	Pro Glu Cys Asn Asp 2695	Ile Thr Ala Arg 2700
Leu Gln Tyr Val Lys Val 2705	Gly Ser Cys Lys Ser 2710	Glu Val Glu Val 2715
Asp Ile His Tyr Cys Gln 2720	Gly Lys Cys Ala Ser 2725	Lys Ala Met Tyr 2730
Ser Ile Asp Ile Asn Asp 2735	Val Gln Asp Gln Cys 2740	Ser Cys Cys Ser 2745
Pro Thr Arg Thr Glu Pro 2750	Met Gln His Cys Thr 2755	Asn Gly Ser Val 2760
Val Tyr His Glu Val Leu 2765	Asn Ala Met Glu Cys 2770	Lys Cys Ser Pro 2775



Arg Lys Cys Ser Lys
2780

<210> 3
<211> 2050
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<220>
<221> MISC_特徴
<223> 成熟vWF

<400> 3

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

Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr
20 25 30

Asp Leu Glu Cys Met Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro
35 40 45

Pro Gly Met Val Arg His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys
50 55 60

Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys
65 70 75 80

Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr
85 90 95

Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr
100 105 110

Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr
115 120 125

Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile
130 135 140

Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys
145 150 155 160

Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly
165 170 175

Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val
180 185 190

Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser
195 200 205

Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr
210 215 220

Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln
225 230 235 240

Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val
245 250 255

Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg
260 265 270

Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met
275 280 285

Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val
290 295 300

Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val
305 310 315 320

Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys
325 330 335

Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly
340 345 350

Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu
355 360 365

Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn
370 375 380

Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu
385 390 395 400

Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro
405 410 415

Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp
420 425 430

Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys
435 440 445

Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys
450 455 460

Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu
465 470 475 480

Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val
485 490 495

Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu
 500 505 510
 Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala
 515 520 525
 Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu
 530 535 540
 Arg Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp
 545 550 555 560
 Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu
 565 570 575
 Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala
 580 585 590
 Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys
 595 600 605
 Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu Leu Met Ala Ser
 610 615 620
 Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly
 625 630 635 640
 Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His
 645 650 655
 Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn
 660 665 670
 Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp
 675 680 685
 Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro
 690 695 700
 Thr Leu Pro Pro Asp Met Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu
 705 710 715 720
 Gly Val Ser Thr Leu Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val
 725 730 735
 Ala Phe Val Leu Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn
 740 745 750
 Arg Ser Lys Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly
 755 760 765
 Gln Asp Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr
 770 775 780

Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln
785 790 795 800

Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly
805 810 815

Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly
820 825 830

Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro
835 840 845

Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro
850 855 860

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

Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg
885 890 895

Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu
900 905 910

Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp
915 920 925

Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe
930 935 940

Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile
945 950 955 960

Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr
965 970 975

Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu
980 985 990

Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly
995 1000 1005

Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His
1010 1015 1020

Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr
1025 1030 1035

Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg
1040 1045 1050

Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr

1055		1060		1065
Asp Ala 1070	Ala Gln Leu Arg	Ile Leu Ala Gly Pro 1075	Ala Gly Asp Ser 1080	
Asn Val 1085	Val Lys Leu Gln	Arg Ile Glu Asp Leu Pro 1090	Thr Met Val 1095	
Thr Leu 1100	Gly Asn Ser Phe	Leu His Lys Leu Cys Ser 1105	Gly Phe Val 1110	
Arg Ile 1115	Cys Met Asp Glu	Asp Gly Asn Glu Lys Arg 1120	Pro Gly Asp 1125	
Val Trp 1130	Thr Leu Pro Asp	Gln Cys His Thr Val Thr 1135	Cys Gln Pro 1140	
Asp Gly 1145	Gln Thr Leu Leu	Lys Ser His Arg Val Asn 1150	Cys Asp Arg 1155	
Gly Leu 1160	Arg Pro Ser Cys	Pro Asn Ser Gln Ser Pro 1165	Val Lys Val 1170	
Glu Glu 1175	Thr Cys Gly Cys	Arg Trp Thr Cys Pro Cys 1180	Val Cys Thr 1185	
Gly Ser 1190	Ser Thr Arg His	Ile Val Thr Phe Asp Gly 1195	Gln Asn Phe 1200	
Lys Leu 1205	Thr Gly Ser Cys	Ser Tyr Val Leu Phe Gln 1210	Asn Lys Glu 1215	
Gln Asp 1220	Leu Glu Val Ile	Leu His Asn Gly Ala Cys 1225	Ser Pro Gly 1230	
Ala Arg 1235	Gln Gly Cys Met	Lys Ser Ile Glu Val Lys 1240	His Ser Ala 1245	
Leu Ser 1250	Val Glu Leu His	Ser Asp Met Glu Val Thr 1255	Val Asn Gly 1260	
Arg Leu 1265	Val Ser Val Pro	Tyr Val Gly Gly Asn Met 1270	Glu Val Asn 1275	
Val Tyr 1280	Gly Ala Ile Met	His Glu Val Arg Phe Asn 1285	His Leu Gly 1290	
His Ile 1295	Phe Thr Phe Thr	Pro Gln Asn Asn Glu Phe 1300	Gln Leu Gln 1305	
Leu Ser 1310	Pro Lys Thr Phe	Ala Ser Lys Thr Tyr Gly 1315	Leu Cys Gly 1320	

Asn	Phe	Thr	Cys	Ala	Cys	Arg	Lys	Glu	Glu	Cys	Lys	Arg	Val	Ser
1595						1600					1605			
Pro	Pro	Ser	Cys	Pro	Pro	His	Arg	Leu	Pro	Thr	Leu	Arg	Lys	Thr
1610						1615					1620			
Gln	Cys	Cys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Cys	Ala	Cys	Asn	Cys	Val	Asn	Ser
1625						1630					1635			
Thr	Val	Ser	Cys	Pro	Leu	Gly	Tyr	Leu	Ala	Ser	Thr	Ala	Thr	Asn
1640						1645					1650			
Asp	Cys	Gly	Cys	Thr	Thr	Thr	Thr	Cys	Leu	Pro	Asp	Lys	Val	Cys
1655						1660					1665			
Val	His	Arg	Ser	Thr	Ile	Tyr	Pro	Val	Gly	Gln	Phe	Trp	Glu	Glu
1670						1675					1680			
Gly	Cys	Asp	Val	Cys	Thr	Cys	Thr	Asp	Met	Glu	Asp	Ala	Val	Met
1685						1690					1695			
Gly	Leu	Arg	Val	Ala	Gln	Cys	Ser	Gln	Lys	Pro	Cys	Glu	Asp	Ser
1700						1705					1710			
Cys	Arg	Ser	Gly	Phe	Thr	Tyr	Val	Leu	His	Glu	Gly	Glu	Cys	Cys
1715						1720					1725			
Gly	Arg	Cys	Leu	Pro	Ser	Ala	Cys	Glu	Val	Val	Thr	Gly	Ser	Pro
1730						1735					1740			
Arg	Gly	Asp	Ser	Gln	Ser	Ser	Trp	Lys	Ser	Val	Gly	Ser	Gln	Trp
1745						1750					1755			
Ala	Ser	Pro	Glu	Asn	Pro	Cys	Leu	Ile	Asn	Glu	Cys	Val	Arg	Val
1760						1765					1770			
Lys	Glu	Glu	Val	Phe	Ile	Gln	Gln	Arg	Asn	Val	Ser	Cys	Pro	Gln
1775						1780					1785			
Leu	Glu	Val	Pro	Val	Cys	Pro	Ser	Gly	Phe	Gln	Leu	Ser	Cys	Lys
1790						1795					1800			
Thr	Ser	Ala	Cys	Cys	Pro	Ser	Cys	Arg	Cys	Glu	Arg	Met	Glu	Ala
1805						1810					1815			
Cys	Met	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Ile	Gly	Pro	Gly	Lys	Thr	Val	Met
1820						1825					1830			
Ile	Asp	Val	Cys	Thr	Thr	Cys	Arg	Cys	Met	Val	Gln	Val	Gly	Val
1835						1840					1845			
Ile	Ser	Gly	Phe	Lys	Leu	Glu	Cys	Arg	Lys	Thr	Thr	Cys	Asn	Pro
1850						1855					1860			

Cys Pro Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys Cys
1865 1870 1875

Gly Arg Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly Gly
1880 1885 1890

Gln Ile Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys
1895 1900 1905

Asp Thr His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp
1910 1915 1920

Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys
1925 1930 1935

Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys
1940 1945 1950

Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu
1955 1960 1965

Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp
1970 1975 1980

Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser
1985 1990 1995

Ile Asp Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro
2000 2005 2010

Thr Arg Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly
2015 2020 2025

Ser Val Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys
2030 2035 2040

Ser Pro Arg Lys Cys Ser Lys
2045 2050

十、申請專利範圍：

公告本

(本)

1.一種重組溫韋伯氏因子 (recombinant von Willebrand Factor, rVWF) 之穩定液體醫藥調配物，其包含：(a) rVWF；(b) 緩衝液；及 (c) 濃度為 1 至 500 mM 之包含氯化鈉及氯化鈣的鹽；

其中該醫藥調配物中的 rVWF 在 4°C 下穩定至少 26 週且包含分子量 250 kD 之選自由以下者所組成之群組的多肽：

a) SEQ ID NO: 3 中所示之胺基酸序列；

b) a) 之生物活性類似物、片段或變異體，其中該生物活性類似物、片段或變異體之胺基酸序列與 SEQ ID NO: 3 具有至少 90% 之同一性；

c) 由 SEQ ID NO: 1 中所示之聚核苷酸編碼的多肽；

d) c) 之生物活性類似物、片段或變異體，其中編碼該生物活性類似物、片段或變異體的聚核苷酸之序列與 SEQ ID NO: 1 具有至少 90% 之同一性；及

e) 由在高等嚴格雜交條件下與 SEQ ID NO: 1 中所示之聚核苷酸雜交之聚核苷酸編碼的多肽；

其中該緩衝液包含在 0.1 mM 至 500 mM 的範圍內之 pH 緩衝劑且其中 pH 在 2.0 至 12.0 之範圍內；

其中該緩衝劑為檸檬酸鈉。

2.如申請專利範圍第 1 項之調配物，其中該 rVWF 包含 SEQ ID NO: 3 中所示之胺基酸序列。

3.如申請專利範圍第 1 項之調配物，其中該緩衝劑濃度

為 15 mM。

4.如申請專利範圍第 1 項之調配物，其中 pH 在 6.0-8.0 之範圍內。

5.如申請專利範圍第 4 項之調配物，其中 pH 在 6.5-7.3 之範圍內。

6.如申請專利範圍第 3 項之調配物，其中 pH 為 7.0。

7.如申請專利範圍第 1 項之調配物，其中該鹽濃度在 0.5 mM 至 300 mM 之範圍內。

8.如申請專利範圍第 7 項之調配物，其中該鹽為濃度為 10 mM 之氯化鈣及濃度為 100 mM 之 NaCl。

9.如申請專利範圍第 1 項之調配物，其中該 rVWF 包含 SEQ ID NO: 3 中所示之胺基酸序列；其中 pH 為 7.0；且其中該鹽為濃度為 10 mM 之氯化鈣及濃度為 100 mM 之 NaCl。

10.如申請專利範圍第 1 項之調配物，其中該 rVWF 包含 SEQ ID NO: 3 中所示之胺基酸序列；其中該緩衝劑濃度為 15 mM 且該 pH 為 7.0；且其中該鹽為濃度為 10 mM 之氯化鈣及濃度為 100 mM 之 NaCl。

11.如申請專利範圍第 1 項之調配物，其中該 pH 為 7.0。

12.如申請專利範圍第 1 項之調配物，其中該鹽為濃度為 30 mM 之氯化鈉及濃度為 0.56 mM 之氯化鈣。

十一、圖式：

如次頁

公告本

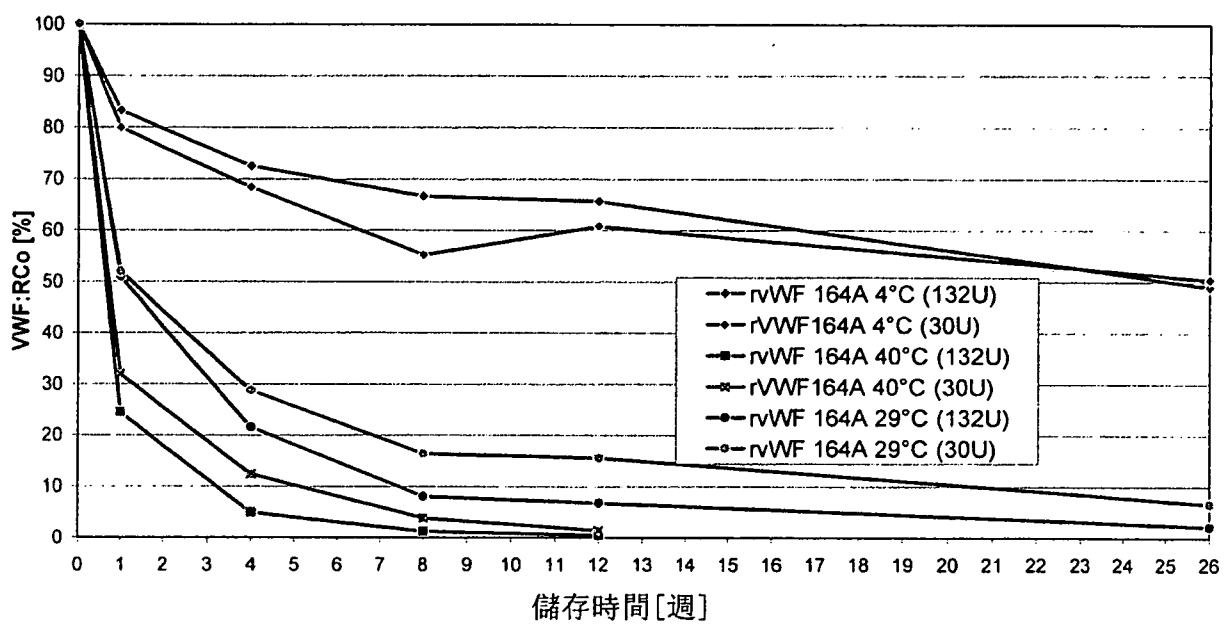


圖1

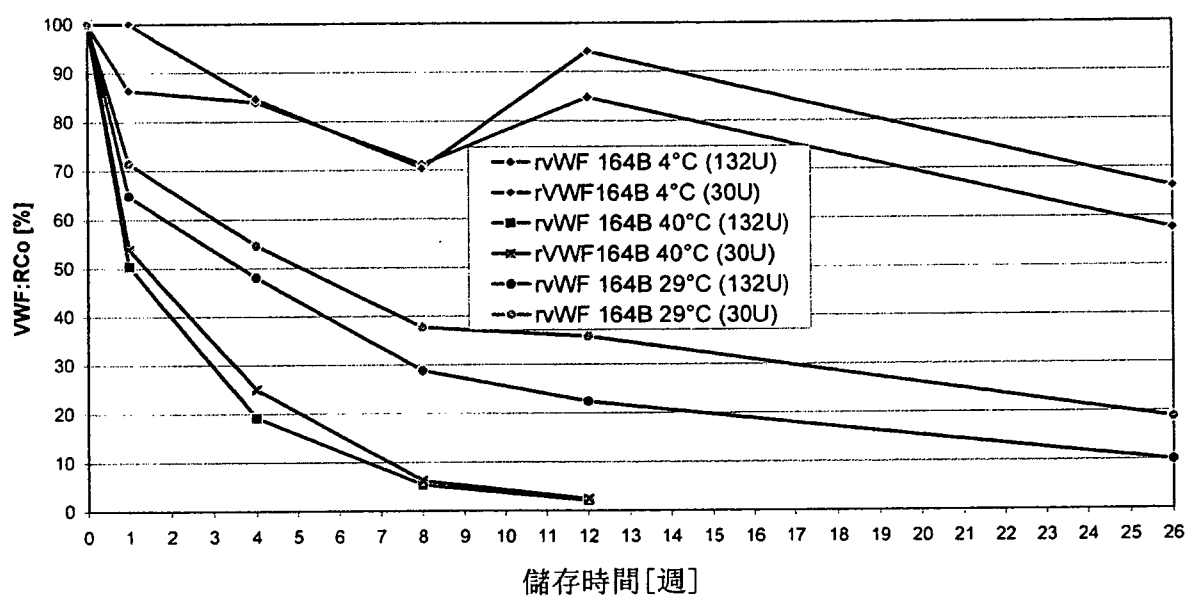


圖2

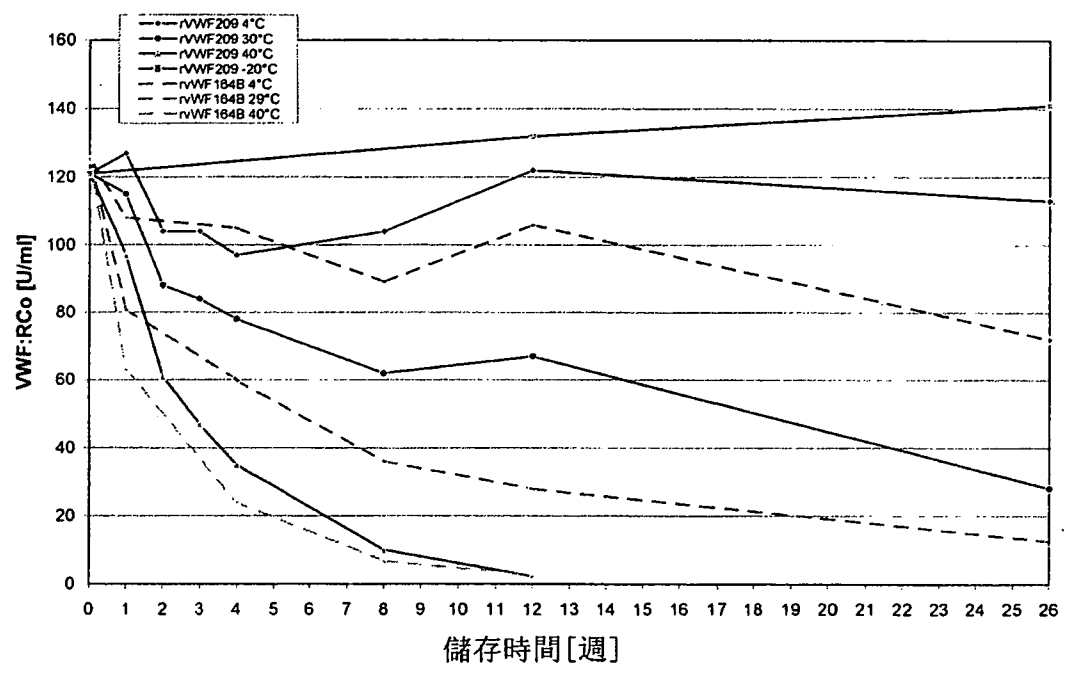


圖3

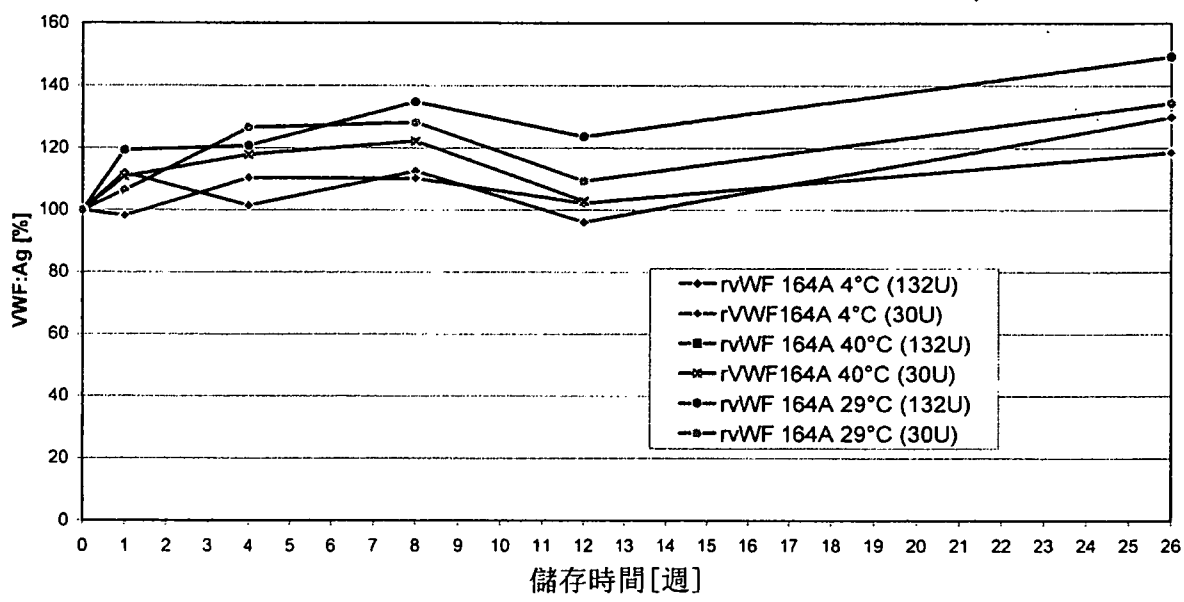


圖4

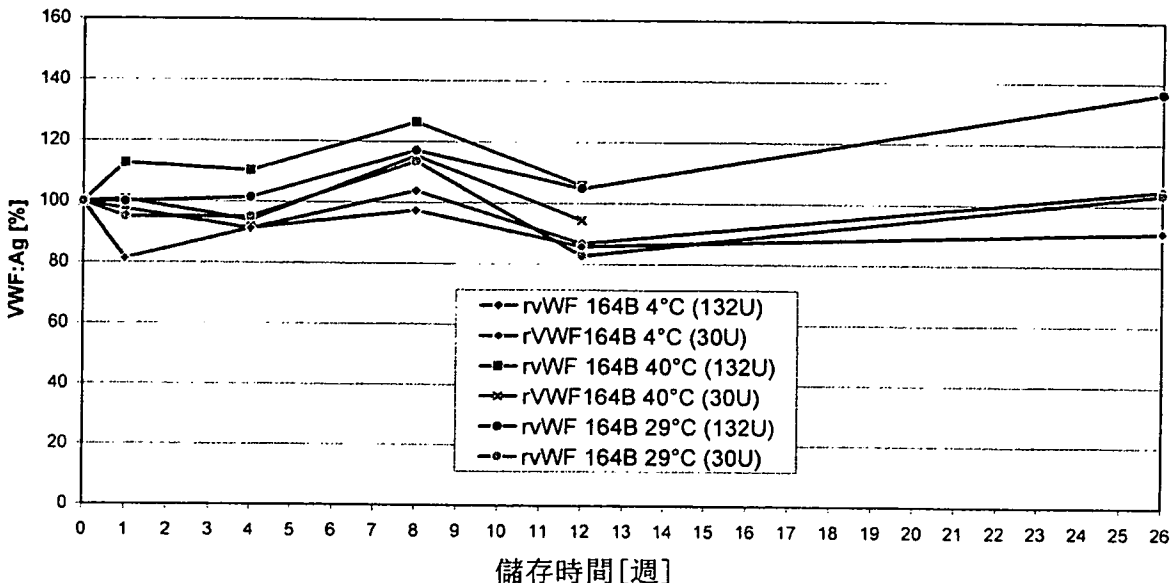


圖5

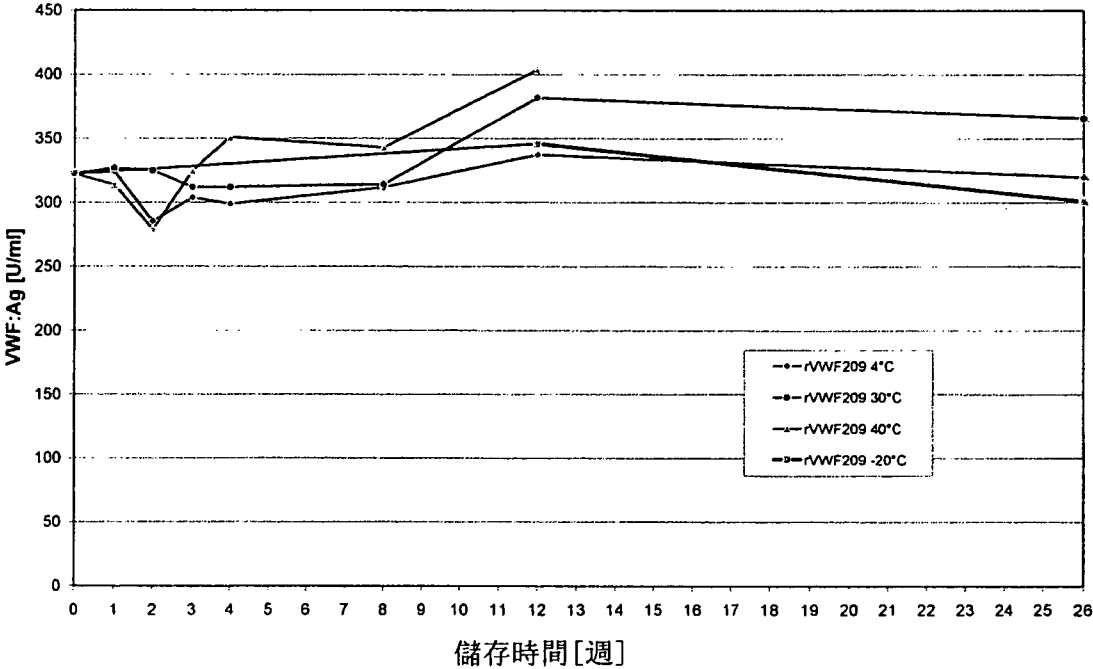


圖6



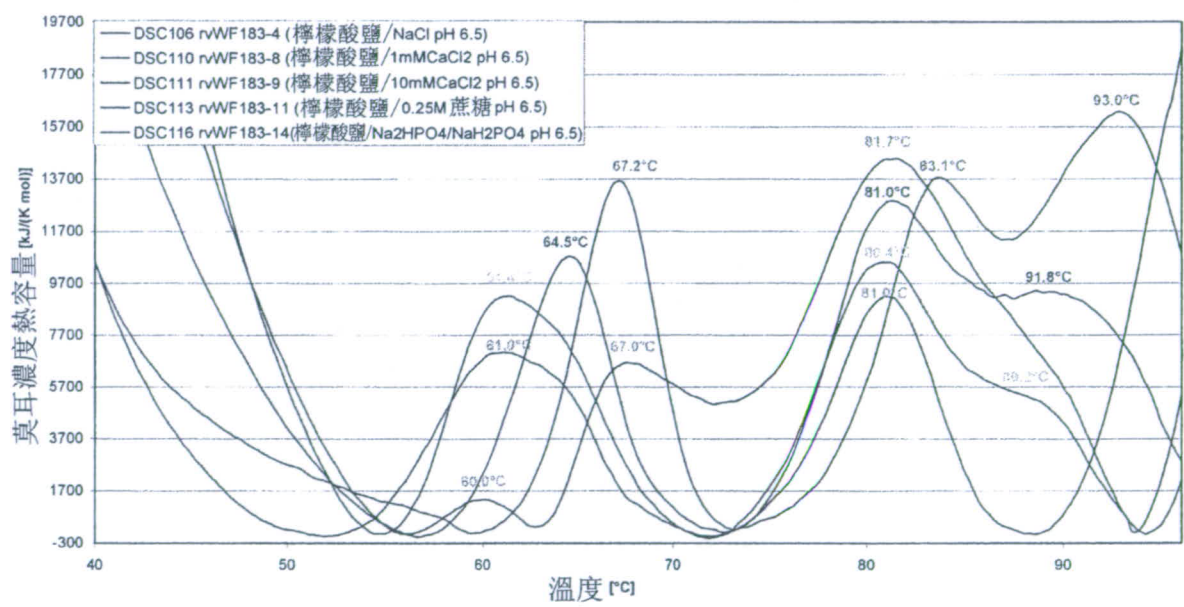


圖8

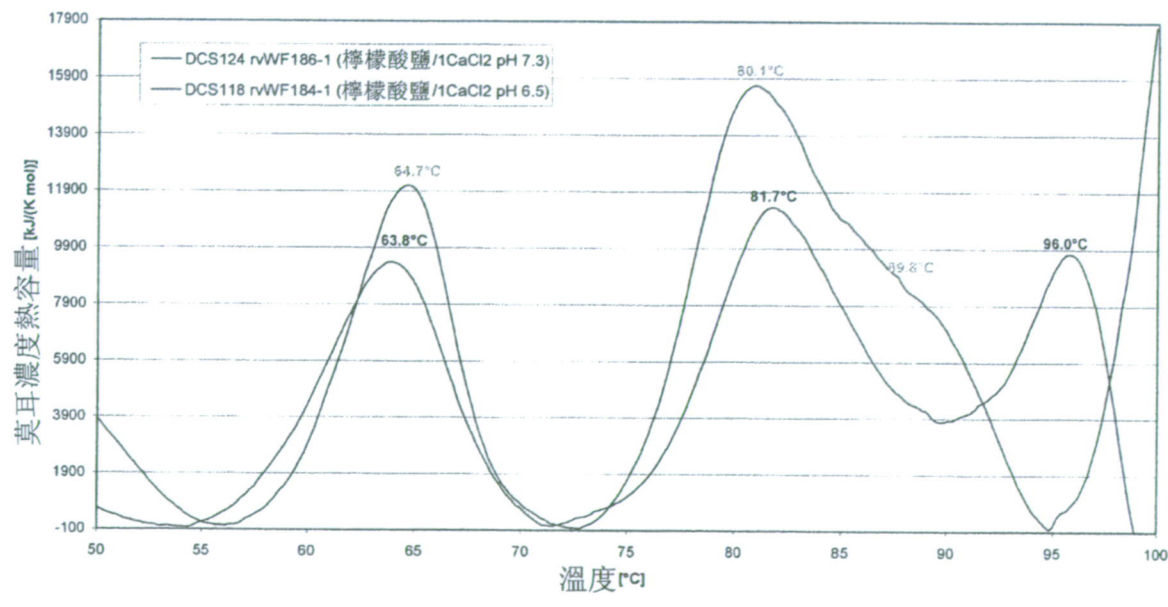


圖9