



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108348458 A

(43)申请公布日 2018.07.31

(21)申请号 201680064803.0

(22)申请日 2016.11.03

(30)优先权数据

15193099.7 2015.11.05 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.05.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/076548 2016.11.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/076967 EN 2017.05.11

(71)申请人 诺和诺德股份有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72)发明人 T.N.克罗格 M.B.詹森 H.W.巴格

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 彭昶 周齐宏

(51)Int.Cl.

A61K 9/00(2006.01)

A61K 38/37(2006.01)

A61K 47/02(2006.01)

A61K 47/18(2006.01)

A61K 47/26(2006.01)

A61K 9/19(2006.01)

权利要求书2页 说明书49页
序列表24页

(54)发明名称

FVIII制剂

(57)摘要

本发明涉及药物制剂,特别是FVIII制剂。本发明还涉及产生这类组合物的方法。

1. 冷冻干燥的药物FVIII制剂,其中所述制剂包含与野生型FVIII相比具有延长的体内循环半衰期的FVIII分子,其中所述制剂在重建后为包含250-10,000IU/mL的所述FVIII分子、2-7mg NaCl/mL、0.5-5.0mg CaCl₂ · 2H₂O/mL和50-110mg蔗糖/mL的水性等渗制剂。

2. 根据权利要求1所述的药物制剂,其中所述制剂不含任何防腐剂。

3. 根据任一项前述权利要求所述的药物制剂,其中所述制剂进一步包含0.5-5mg组氨酸/mL、0.5-15mg甲硫氨酸/mL和0.05-0.4mg表面活性剂/mL,并且其中所述重建的制剂的体积为0.3-1.2mL,且重量摩尔渗透压浓度为350-500mOsm/kg。

4. 根据任一项前述权利要求所述的药物制剂,其中所述FVIII分子为具有15-25个氨基酸的B结构域连接体的B结构域截短分子,其中所述FVIII分子经由与根据SEQ ID NO 1的Ser750氨基酸残基连接的O-聚糖而与半衰期延长部分缀合,并且其中所述FVIII分子与选自PEG和肝素前体的水溶性聚合物缀合。

5. 根据任一项前述权利要求所述的药物制剂,其中所述FVIII分子为融合分子,并且其中所述融合分子的融合配偶体选自:白蛋白、Fc结构域和Fc受体。

6. 根据任一项前述权利要求所述的药物制剂,其中所述制剂包含250-10,000IU/mL、3.1mg组氨酸/mL、2.5mg甲硫氨酸/mL、3.0mg NaCl/mL、80mg蔗糖/mL、0.4mg非离子型表面活性剂/mL和3mg CaCl₂ · 2H₂O/mL。

7. 根据任一项前述权利要求所述的药物制剂,其中所述制剂包含250-10,000IU FVIII/mL、3.1mg组氨酸/mL、2.5mg甲硫氨酸/mL、3.5mg NaCl/mL、70mg蔗糖/mL、0.4mg非离子型表面活性剂/mL和0.5-2mg CaCl₂ · 2H₂O/mL。

8. 根据任一项前述权利要求所述的药物制剂,其中所述制剂包含250-10,000IU FVIII/mL的所述FVIII分子、3.1mg组氨酸/mL、2.5mg甲硫氨酸/mL、3.5mg NaCl/mL、90mg蔗糖/mL、0.4mg非离子型表面活性剂/mL和2mg CaCl₂ · 2H₂O/mL。

9. 根据任一项前述权利要求所述的药物制剂,其中所述制剂包含250-10,000IU FVIII/mL、3.1mg组氨酸/mL、2.5mg甲硫氨酸/mL、4mg NaCl/mL、80-100mg蔗糖/mL、0.1-0.4mg非离子型表面活性剂/mL和2mg CaCl₂ · 2H₂O/mL。

10. 根据任一项前述权利要求所述的药物制剂,其中所述制剂包含250-10,000IU FVIII/mL、3.1mg组氨酸/mL、2.5mg甲硫氨酸/mL、4-6mg NaCl/mL、100mg蔗糖/mL、0.1-0.4mg非离子型表面活性剂/mL和2mg CaCl₂ · 2H₂O/mL。

11. 根据任一项前述权利要求所述的药物制剂,其中所述制剂包含250-10,000IU FVIII/mL、3.1mg组氨酸/mL、2.5mg甲硫氨酸/mL、4mg NaCl/mL、70-90mg蔗糖/mL、0.1-0.4mg非离子型表面活性剂/mL和1-5mg CaCl₂ · 2H₂O/mL。

12. 根据任一项前述权利要求所述的药物制剂,其中所述制剂包含250-10,000IU FVIII/mL、1-4mg组氨酸/mL、2.5mg甲硫氨酸/mL、7mg NaCl/mL、100mg蔗糖/mL、0.4mg非离子型表面活性剂/mL和2mg CaCl₂ · 2H₂O/mL。

13. 根据任一项前述权利要求所述的药物制剂,其中所述制剂包含250-10,000IU FVIII/mL、1.5mg/ml组氨酸、2.5mg甲硫氨酸/mL、3.5mg NaCl/mL、70mg蔗糖/mL、0.4mg非离子型表面活性剂/mL和0.5-1mg CaCl₂ · 2H₂O/mL。

14. 根据任一项前述权利要求所述的药物制剂,其中所述制剂在30℃下储存三个月后,氧化FVIII轻链分子的量低于FVIII总量的5%。

15. 根据任一项前述权利要求所述的药物制剂,其中所述制剂在10mM组氨酸溶液中重建,并且其中所述重建的制剂的体积最高为1mL。

16. 根据任一项前述权利要求所述的药物制剂,其中所述冷冻干燥的制剂在重建前是药学上精致的冷冻干燥块,其体积基本上相当于冷冻干燥之前的填充体积。

17. 根据任一项前述权利要求所述的冷冻干燥的药物FVIII制剂,其中在30℃下储存3个月后,氧化FVIII轻链分子的量低于FVIII总量的5%。

18. 制备根据任一项前述权利要求所述的冷冻干燥药物制剂的方法,其中所述方法包括以下步骤:(i)在低压下使液体制剂脱气,(ii)用惰性气体对经脱气的制剂进行压力平衡,以及(iii)冷冻干燥所述经脱气的制剂。

19. 通过根据权利要求18所述的方法获得的药物制剂。

20. 根据任一项前述权利要求所述的药物制剂,其中所述制剂用于皮下给药。

21. 根据权利要求1-18中任一项所述的药物制剂,其中所述制剂用于静脉内给药。

22. 根据权利要求1-18中任一项所述的药物制剂,其用于A型血友病的治疗。

FVIII制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及药物制剂,特别是FVIII制剂。

背景技术

[0002] 血友病是一种遗传性出血性病症:在患者中血块的形成正常发生,但是血块由于继发凝血酶形成不足而不稳定。该疾病通过静脉内(iv)注射从血液中分离出的或重组产生的凝血因子,例如因子FVII(FVII)、因子VIII(FVIII)或因子IX(FIX)来治疗。静脉内凝血因子制剂为使用前在水、盐水或缓冲液中重建的冷冻干燥的制剂。目前的血友病治疗建议正在从传统的按需治疗向预防转变,优选使用具有延长的体内循环半衰期的长效FVIII变体。

[0003] 静脉内(iv)输注凝血因子,特别是频繁的静脉内输注,被认为是不方便的、应激的、疼痛的,并且可能甚至使患者受到损伤和/或伴随感染的风险。一些血友病患者的静脉通路较差,并且许多患者是婴幼儿。此外,静脉内给药可能伴随低顺应性。

[0004] 另一方面,皮下(sc)给药通常被认为是方便且无痛的,或几乎无痛的。此外,FVIII的皮下给药被认为给患者提供了例如与每日给药有关的相对较高且恒定的低谷FVIII水平。然而,由于与皮下给药有关的蛋白质的(过)低生物利用度,以及由于与所述制剂有关的其他类型的障碍,凝血因子(例如,FVIII)的皮下给药到目前为止是不可行的。

[0005] 目前可获得的FVIII静脉内制剂的特征通常在于具有相对较高的重量摩尔渗透压浓度(约400-600mOsm/kg,以及约4-5mL的相对较大的重建体积)、高含盐量、相对较低的碳水化合物含量(例如,糖/蔗糖)、相对较高的注射体积(4-5mL)和相对较低的药物浓度(50-750IU/mL)。

[0006] 相反,用于皮下给药的药物制剂应优选地具有相对较低的注射体积。皮下制剂的注射体积应限于2mL或更少,优选1.5mL或更少,最优选1mL或少于1mL。

[0007] 与静脉内制剂相比,用于皮下给药的制剂应优选地具有较低的重量摩尔渗透压浓度,例如,是等渗或接近等渗的。高渗制剂(例如,包含高含盐量的制剂)可引起与皮下给药有关的注射部位反应和/或疼痛。皮下注射伴随的疼痛和局部刺激可能是由过高或过低的渗透压加上相对较高的注射体积引起的。因此,目前可获得的静脉内FVIII制剂不适合于皮下给药。

发明内容

[0008] 本发明涉及药物FVIII制剂,其中所述制剂包含与野生型FVIII相比具有延长的体内循环半衰期的FVIII分子(“长效FVIII”),其中所述制剂在重建(重建为与皮下给药相关的体积)后为水性的、基本上等渗的制剂,并且其中所述制剂包含250-10,000IU(/mL)的所述FVIII分子、2-7mg NaCl/mL、3.4-34mM CaCl₂(0.5-5.0mg CaCl₂ • 2H₂O/mL)、50-110mg蔗糖/mL和可选的0.5-15mg甲硫氨酸/mL。

[0009] 此外,本发明涉及产生这类组合物的方法,以及通过这类方法产生的产品及其治疗用途。

[0010] 详述

[0011] 市场上的大多数重组FVIII产品(例如, NovoEight®、 Refacto®、 Kogenate®、 Advate®等)为冷冻干燥的产品。这些FVIII制剂已被设计为用于静脉内输注, 具有相对较大的重建体积和相对较大的注射体积。冷冻干燥的静脉内FVIII产品通常在4-5mL无菌注射用水(WFI)或水性盐水/缓冲溶液中重建。在重建后, 所得的重建FVIII制剂/溶液具有约400-600mOsm/kg的重量摩尔渗透压浓度。这可以被描述为轻微高渗至高渗的静脉内溶液, 不具有与静脉内输注有关的安全性问题, 其中制剂在血流中被立即稀释。

[0012] 在重建的静脉内FVIII产品中, 药物的浓度相对较低, 约为50-750IU/mL(大致相当于5-80μg/mL), 因此需要注射相对较大的体积来提供目标剂量。

[0013] 目前可获得的用于静脉内输注的FVIII制剂通常不适合于皮下给药。这主要是由于关于注射体积和渗透压(重量摩尔渗透压浓度)的安全性限制。每次皮下注射的体积限度通常约为1-2mL, 且优选少于1mL。用于皮下给药的制剂应优选为等渗的, 或接近等渗的。大注射体积和高渗性的结合不被认为是安全的皮下注射剂。由于重量摩尔渗透压浓度主要受溶解的组分(蛋白质和赋形剂)的重量摩尔浓度的控制, 因此对于目前可获得的重组静脉内FVIII产品而言, 使重建体积减少至1mL是不可取的, 因为这将导致重量摩尔渗透压浓度约为1-1.50sm/kg (1000-1500mOsm/kg)的极高渗溶液。此外, 商购可得的FVIII产品通常含有聚山梨酯80/“吐温®80”——在皮下给药时可增大注射部位反应/刺激风险的表面活性剂。

[0014] 与皮下给药有关的FVIII的生物利用度非常低, 但是发明人最近已发现, 与野生型FVIII的皮下给药相比, 长效FVIII分子(例如, 某些FVIII融合蛋白、缀合的FVIII等)的皮下生物利用度出人意料地高。此外, 发明人在此发现, 长效FVIII分子可被配制、冷冻干燥并且随后以约1mL(或更少, 例如0.8mL、0.5mL或0.3mL)的体积重建, 同时具有可接受的FVIII浓度和约350-500mOsm/kg的重量摩尔渗透压浓度(接近等渗或轻微高渗的)。然而, 发明人还发现, 对于某些皮下FVIII制剂, FVIII轻链具有氧化的倾向。与提供皮下FVIII制剂有关的其他障碍是如何提供具有稳定的长效FVIII的外观良好的冷冻干燥制剂, 所述制剂在用1mL或更低体积重建时具有低重量摩尔渗透压浓度(等渗或接近等渗的)。

[0015] 冷冻干燥制剂中的赋形剂应形成基质, 从而提供配制的蛋白质所必需的稳定。一些赋形剂在冷冻干燥过程中倾向于形成晶体。晶体的自身相互作用性质可降低制剂中结晶的赋形剂的稳定和低温保护特性。应避免冷冻干燥过程中的融化, 因为其可导致冷冻干燥块坍塌或部分坍塌。冷冻干燥块的体积应优选地相当于制剂在冷冻干燥前的(填充)体积。

[0016] 冷冻干燥制剂应优选地形成稳定、均匀、外观良好和/或蓬松/多孔的冷冻干燥块(这样的特性通常被称为“药学上精致的(pharmaceutically elegant)”冷冻干燥块——技术人员公知的一种概念)。此外, 冷冻干燥制剂应优选地易于重建, 并且溶解的FVIII蛋白质应在“使用期间”(重建与给药之间的时间范围)是稳定的。

[0017] 发明人在此提供了用于皮下给药的FVIII制剂, 其中与目前可获得的FVIII静脉内制剂相比, 钠盐的量显著降低, 而碳水化合物或糖(优选非还原性二糖, 例如蔗糖)以及优选抗氧化剂(特别是甲硫氨酸)的量显著增加。

[0018] 发现降低钠盐的量并同时降低蔗糖/碳水化合物的量(以便降低重量摩尔渗透压浓度)在冷冻干燥过程中诱导FVIII聚集(例如, HMWP——高分子量蛋白质)。然而, 在本文中

证明,增加“低盐制剂”中糖/碳水化合物(优选蔗糖)的量能够实现等渗(或接近等渗)制剂的制备,其具有低含量的蛋白质聚集体(通过SE-HPLC测量为HMWP%),并且在冷冻干燥和储存过程中聚集增加量少。高蔗糖含量促成了对于FVIII的稳定基质,并且导致了具有有利特性的药学上精致的冷冻干燥块。此外,发现高蔗糖浓度使FVIII分子在重建之后稳定。

[0019] 然而,发现在具有高浓度蔗糖和低浓度盐的制剂中化学稳定性降低。这一问题以氧化FVIII轻链的含量增加的形式被观察到。发明人能够通过向基于蔗糖的制剂中加入甲硫氨酸以及通过增加脱气作为该过程的一部分来降低氧化的FVIII的量。

[0020] 正常的冷冻干燥过程包括使冷冻的水性样品暴露于低压/真空条件,从而使冷冻的水升华(固相→气相)并去除气体(包括氧气和水)。在压力平衡时,小瓶中存在的气体可因此与氮气交换。因此,通常假设冷冻干燥本身足以限制冷冻干燥产品的蛋白质氧化。

[0021] 发明人在此意外地发现,在冷冻干燥过程的冷冻步骤之前使低盐/高蔗糖FVIII制剂(任选地包含约1-10mg/mL甲硫氨酸)在冷冻干燥器中脱气,导致在储存过程中与(例如)氧化(特别是FVIII轻链的氧化)有关的FVIII稳定性提高。在冷冻干燥过程之前脱气对于FVIII的物理稳定性(聚集倾向和链离解)似乎没有不利影响。因此,可通过包括脱气步骤的冷冻干燥过程来制备稳定的冷冻干燥FVIII制剂(提供稳定且活性的FVIII)。

[0022] 在冷冻之前对氧气的脱气/去除优选在冷冻干燥器中通过在低于40℃的温度下,例如在约4-5℃下或室温(例如,20℃)下施加低压(例如100mbar)约5-60分钟(例如,20分钟)来进行。用惰性气体如氮气使压力平衡至约1atm(1013mbar)。该脱气过程在冷冻步骤之前优选进行一次,优选两次、三次、四次或五次,以提高FVIII稳定性和/或减少FVIII的氧化。

[0023] 定义

[0024] 等渗通常意指在被透水膜例如细胞膜隔开的两种溶液之间没有或几乎没有渗透压梯度。人血浆具有约300mOsm/kg的重量摩尔渗透压浓度,因此等渗溶液一般具有约300mOsm/kg的重量摩尔渗透压浓度,并因此具有约300mOsm/L溶液的体积摩尔渗透压浓度(重量摩尔渗透压浓度和体积摩尔渗透压浓度在低赋形剂浓度下具有相似的值)。重量摩尔渗透压浓度与水的化学势以及溶质例如糖、蛋白质、氨基酸、离解的电解质的重量摩尔浓度直接相关。重量摩尔渗透压浓度是量化溶质添加效果的水/水溶液的基本物理性质,并且它可通过冰点下降或通过蒸气压渗透压测定法来测定。

[0025] 降低皮下制剂(与目前的静脉内制剂相比)的重量摩尔渗透压浓度(和注射体积)的主要目的是避免或减少不希望的注射部位反应。文献检索表明,对于皮下给药,具有约280-450mOsm/kg的重量摩尔渗透压浓度的溶液被认为是等渗的,并且如本文所用的术语“等渗制剂”因此包括约280-450mOsm/kg的制剂,这类制剂适合于静脉内和血管外给药,例如皮下给药。重量摩尔渗透压浓度>300mOsm/kg的溶液的耐受性还依赖于注射体积:较高的注射体积增加了注射部位反应的风险,例如,重量摩尔渗透压浓度为600mOsm/kg且目标注射体积为0.5mL的溶液可被视为安全的。如本文所用的等渗制剂包括约280-600mOsm/kg,或者300-600、400-600、500-600、300-500、350-500、400-500、300-400、320-400、340-400、350-400、280-380、300-380、320-380、340-380、350-380、280-360、300-380、300-360、300-350、320-380、350-380、280-600、300-600、400-600、500-600、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、

440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590或600mOsm/kg的制剂。

[0026] 因子VIII：因子VIII (FVIII) 是大型、复杂的糖蛋白，其主要由包括肝窦内皮细胞 (LSEC) 在内的内皮细胞产生，并且还可能由肝细胞产生。人FVIII编码2351个氨基酸(包括信号肽)，并含有由同源性所限定的数种不同的结构域。存在三个A结构域、唯一的B结构域和两个C结构域。结构域顺序可以列为NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH。小的酸性区——A1的C-末端(a1区)和A2的C-末端(a2区)以及A3结构域的N-末端(a3区)在FVIII与包括凝血酶和 von Willebrand因子 (VWF) 在内的其他凝血蛋白质的相互作用中发挥重要作用。

[0027] 在细胞加工过程中，弗林蛋白酶在a3区之前切割。得到的A1-a1-A2-a2-B链被称为重链(HC)，而a3-A3-C1-C2被称为轻链(LC)。这些链通过二价金属离子结合而连接。

[0028] 表1：FVIII结构域和区域。因子VIII中的结构域、区域和单个氨基酸残基的编号遵循全长因子VIII的编号(如果B结构域截短，或者如果融合配偶体加入到该分子中，也是这样)。

[0029]

结构域	区域	氨基酸编号*)	氨基酸残基数
A1		1-336	336
	a1	337-372	36
A2		373-710	338
	a2	711-740	30
B **)		741-1648	908
***)	a3	1649-1689	41

[0030]

A3		1690-2020	331
C1		2021-2173	153
C2		2174-2332	159
总FVIII		1-2332	2332

[0031] *) 结构域、区域和单个氨基酸残基的编号遵循uniprot:P00451。具有FVIII活性的其他FVIII等位基因也存在于人群中，并且也是本发明的一部分。

[0032] **) 编码全长因子VIII的核苷酸序列编码908个氨基酸残基的B结构域。在蛋白质合成过程中，对全长FVIII中的B结构域进行处理，从而产生附接有不同长度的B结构域的重链的混合物(Jankowski MA等人Haemophilia 2007;13:30-37)。具有截短的B结构域的rFVIII可包含明显短于908个氨基酸的B结构域，截短的B结构域的一个实例为根据SEQ ID NO 2的21个氨基酸的B结构域连接体。

[0033] ***) 一些天然存在的FVIII变体包含跨越氨基酸1655-1689和1658-1689的a3区 (Lind P等人Eur J Biochem 1995;232:19-27)。这样的FVIII蛋白质以及其他天然存在的FVIII变体也是本发明的一部分。

[0034] 内源性FVIII分子作为具有不同大小的B结构域的分子池在体内循环,最短的FVIII分子在位置740处具有C-末端,即在A2-a2的C-末端,因此不含B结构域。具有不同长度的B结构域的FVIII分子全部保持促凝血活性。在用凝血酶激活时,FVIII在位置372处的A1-a1的C-末端、在位置740处的A2-a2的C-末端以及在a3与A3之间的位置1689处裂解,后者的裂解释放a3区,伴随着对VWF的亲合力的丧失。活化的FVIII分子被称为FVIIIa。该活化允许FVIIIa与磷脂表面如活化的血小板并与活化的因子IX (FIXa) 相互作用,即形成tenase复合物,从而允许有效激活因子X (FX),从而导致凝血酶生成并最终形成纤维蛋白稳定的止血性血凝块。

[0035] “野生型 (wt) /天然FVIII”是由SEQ ID NO:1 (氨基酸1-2332) 所示的全长序列衍生的人FVIII分子,包括其等位基因变体。通常认为B结构域的缺失/截短对于FVIII的重组产生是有利的。

[0036] SEQ ID NO:1:野生型人FVIII (Ser750残基以粗体和下划线显示)

[0037]

ATTRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTS
VVYKKTLFVEFTDHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKN
MASHPVSLHAVGVSYWKASEGAHEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSH
YVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCRE
GSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNLSLMQDRDAASARA
WPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEG
HTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGME
AYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSP
SFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYL
NNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD
TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKG VKHLKDFPILPGEIF
KYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSSFVNMERDLASGLIGPLLYCYK
ESVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL
EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSV
FFSGYTFFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMMSMENPGLWILGCHNSDFR
NRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSF SQN
SRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPM PKIQNVSSSDLLML
LRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNLSLSEMTHERPQL
HHSGDMVFTPEGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTI
PSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLS
LSEENND SKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALL
TKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNI
LESDFEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMV
QQKKEGPIPPDAQNPDMSSFFKMLFLPESARWIQRT HGKNSLNSGQGP
SPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGFTKDVGLKEMVFPS

[0038]

SRNLFLTNDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVT
GTKNFMKNLFLSTRQNVESYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKH
TAHFSSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRS
KRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNE
KEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQ
DNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKNNLSLAILTLEMTGDQ
REVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSKGVELLPKVHIYQK
DLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVA
TESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPKTAFFKKKDT
ILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPVLR
HQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQK
KTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFT
DGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYS
SLISYEEDQRQGAEPKRNFKPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCK
AWAYFSDVDLEKDVHSLIGPLL VCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALF
FTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIM
DTLPGLVMAQDQIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKKEEYK
MALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYS
NKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQGQWAPKLARLHYSGSINAWST
KEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKW
QTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIENPPIIARYIRLHPHTHYSIRST
LRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSK
ARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSL
LTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSL
DPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

[0039] 术语“B结构域截短的”和“B结构域缺失的”(BDD)FVIII在本文中可互换使用。FVIII中的B结构域跨越SEQ ID NO:1的氨基酸741-1648。如以上以及在Jankowski等人, *Haemophilia* 2007;13:30-37和D'Amici等人, *Electrophoresis* 2010;31:2730-2739中所描述的, B结构域在几个不同位点处经历内切蛋白酶解, 从而在循环血浆FVIII分子中产生了巨大的异质性。尽管B结构域在FVIII的细胞内表达中发挥作用, 但是高度糖基化的B结构域的确切细胞外功能(如果有的话)是未知的。已知的是, B结构域对于凝血级联中的FVIII活性是非必需的。因此, 重组FVIII经常以B结构域缺失/截短的变体的形式产生。在一个实施方案中, FVIII蛋白质可由编码FVIII分子的表达载体产生, 该FVIII分子包含具有以下序

列的21个氨基酸残基的连接体(B结构域连接体)序列:SEQ ID NO 2:SFSQNSRHPSQNPVLRHQ。0-聚糖附接至SEQ ID NO 2中加下划线的S,该残基对应于SEQ ID NO1中的位置S750。在另一个实施方案中,本文中的FVIII蛋白质包含具有以下序列的连接体序列:SEQ ID NO:3:SFSQNSRHPSQNPVLRHQ。在另一个实施方案中,本文中的FVIII蛋白质包含具有以下序列的连接体序列:SEQ ID NO:4:FSQNSRHPSQNPVLRHQ。在另一个实施方案中,本文中的FVIII蛋白质是包含附接至SEQ ID NO 1中显示的Ser 750的0-聚糖的B结构域缺失/截短的FVIII变体。许多其他0-聚糖被认为附接至FVIII分子的B结构域,但这些其他0-聚糖的确切位置尚未确定。

[0040] 具有延长的体内循环半衰期的FVIII(长效FVIII):根据本发明的FVIII分子为长效FVIII蛋白质——通常是例如与融合配偶体融合、与半衰期延长部分缀合的重组蛋白质,以获得FVIII的延长的体内循环半衰期(“长效FVIII”)。野生型FVIII的体内半衰期约为12-14小时,根据本发明的FVIII分子(长效FVIII)的体内循环半衰期延长了(至少)10%,优选(至少)15%,更优选(至少)20%、更优选(至少)25%、更优选(至少)30%、更优选(至少)40%、更优选(至少)50%、更优选(至少)60%、更优选(至少)70%、更优选(至少)80%、更优选(至少)90%、更优选(至少)100%。可以例如在合适的动物模型中测量体内循环半衰期。

[0041] “半衰期延长部分”有时被称为“侧链”、“取代基”等。具有延长的体内循环半衰期的FVIII分子有时还被称为“延长的FVIII分子”或“长效FVIII分子”。半衰期延长部分包括多种类型的多肽、肽化合物、聚合化合物、水溶性聚合物,例如聚乙二醇(PEG)、聚唾液酸(PSA)、多糖(例如,葡聚糖、淀粉、肝素前体(heparosan)等)。或者,半衰期延长部分在性质上可以主要为疏水性的,并且包括亲脂性组分,例如脂肪酸、二脂肪酸等(亲脂性部分有时被称为“白蛋白结合体”)。此外,半衰期延长部分可以在FVIII分子与半衰期延长部分之间包含连接体。

[0042] 长效FVIII分子还可经由重组方法或经由化学/酶促缀合而与融合配偶体融合。融合配偶体的实例包括白蛋白、抗体Fc结构域、Fc受体、FVIII B结构域片段、合成肽等。例如,可使用化学和/或酶促方法将半衰期缀合部分附接至FVIII分子中存在的聚糖。在FVIII中,特别是在B结构域中存在若干聚糖。在一个实施方案中,半衰期延长部分经由附接至根据SEQ ID NO 1中氨基酸编号的S750残基的0-联聚糖而与B结构域缺失/截短的FVIII分子缀合。优选地,使用例如W02009108806中公开的酶促糖缀合方法将半衰期缀合部分与FVIII缀合。

[0043] 根据本发明的FVIII融合配偶体的氨基酸序列:

[0044] SEQ ID no.5 (FVIII氨基酸741-966) “226个”氨基酸的FVIII B结构域:

[0045] SFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPPFAHRTMPKIQNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQ
EAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTFRPQLHHSGDMVFTPEGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNLI
STIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDITLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNSKLLSEGLMNSQESSWGKN
VSS

[0046] SEQ ID NO 6-人血清白蛋白:

[0047] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTL
FGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQKQEPERNECF LQHKDDNP NLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRH
PYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA CLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRF

PKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPA
DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEF
KPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLS
VVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVE
LVKHKPKATKEQLKAVMDFAAFVEKCKADDKETCFEEGKKLVAASQAALGL

[0048] SEQ ID NO 7:人Fc γ RI的胞外区(CD64):

[0049] QVDTTKAVITLQPPWVSFQEETVTLHCEVLHLPSSSTQWFLN GTATQTSTPSYRITSASVNDSEY
RCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYRNGKAFKFFHWNSNLTILKTNI
SHNGTYHCSEGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNLVTLSCEKLLLRPGLQLYFSFYMGSKTLR
GRNTSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGLQLPTP

[0050] SEQ ID NO 8:人IgG1 Fc结构域:

[0051] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0052] SEQ ID NO 9:人绒毛膜促性腺激素的 β -链的C-末端28个氨基酸(hCG C-末端):

[0053] SSSSKAPPPSLPSPRLPGSDTPILPQ

[0054] SEQ ID NO 10:序列A/XTEN(可以使用具有不同长度的重复序列):

[0055] GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG
SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA
TPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE
EGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST
EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS
ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGS
PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT
PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP
GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSES
ATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE
TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG

[0056] 生物活性:包含在本发明制剂中的FVIII分子能够以在功能上类似于或等同于人FVIII的方式在凝血级联中起作用,从而经由与活化血小板上的FIXa相互作用来诱导FXa的形成,以及支持血块的形成。可在体外使用本领域公知的技术评估FVIII活性。凝块分析、FX激活试验(通常称为显色测定)、凝血酶生成试验和全血凝血弹性描记法是这类体外技术的实例。用于在本发明的制剂中使用的FVIII分子可具有特定的FVIII活性,当在例如显色测定(FVIII活性测定)中与例如人FVIII比较时,该活性为天然人FVIII的活性的至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、100%或甚至大于100%。

[0057] FVIII的降解

[0058] FVIII制剂中存在的因子VIII可通过几种机制进行降解,这些机制包括氧化、聚集以及两个非共价缔合的蛋白质亚单位——重链(HC)与轻链(LC)——之间的离解。

[0059] 可通过反相高效液相色谱法(RP-HPLC)来测量FVIII(例如,缀合的B结构域缺失的FVIII)的氧化。在RP-HPLC过程中,非共价相互作用是不稳定的,因此LC和HC作为单独的峰洗脱下来。观察到的LC氧化主要是由于轻链中存在的甲硫氨酸残基的氧化。氧化的LC在色谱图中被检测为单独的峰。将LC氧化量化为氧化的轻链(LC)相对于FVIII蛋白质总量的百分比(在本文中也称为氧化LC%、氧化形式%或ox.形式%)。

[0060] 可通过公知的技术,例如通过大小排阻高效液相色谱法(SE-HPLC),来评估FVIII(例如,缀合的B结构域缺失/截短的FVIII)的聚集。聚集的FVIII通过SE-HPLC被检测为一个峰或两个峰,其保留时间短于主峰(包含由缔合的HC-LC组成的单体FVIII)。通过将该峰/这些峰积分为相对于色谱图中峰的总面积的HMWP%(高分子量蛋白质%)对聚集的FVIII进行量化。HC-LC离解也可以通过SE-HPLC来检测,因为游离LC作为在主峰之后洗脱的单独的峰而出现。

[0061] 应当注意,FVIII降解(主要为氧化和聚集)可在所有过程(例如,处理和冷冻干燥)中发生,并在冷冻干燥之后以及在本文的药物组合物的储存过程中继续。本发明组合物中降解的FVIII的含量在冷冻干燥之后应优选地小于或不大于10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%,在5℃下储存2年、在30℃下12个月、在40℃下3个月之后应优选地小于或不大于15%、14%、13%、12%、11%。根据本发明的组合物在30℃下对于氧化形式(氧化的FVIII LC)而言应优选地具有小于每月一个百分点的降解速率,而对于HMWP(蛋白质聚集)而言应优选地具有小于每月0.5个百分点的降解速率。

[0062] 冷储存条件(例如,0℃、1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃、0-10℃、0-5℃或0-4℃)有利于根据本发明的组合物的较长保质期(例如,长达一年或两年或更长时间)。根据本发明的药物组合物的保质期为室温(25-30℃)下至少3个月。

[0063] 药物制剂:本文的药物制剂包含多种化学物质/赋形剂,包括长效FVIII,并且构成最终的医药产品。本文的药物制剂为水性制剂,这意味着在冷冻干燥制剂在水或水溶液(例如缓冲液)中重建之后,其包含至少75%的水、优选至少80%的水、优选至少85%的水、优选至少90%、91%、92、93%、94%、95%、96%的水(%w/w)。

[0064] 因此,本文的制剂是在施用于有需要的患者之前进行重建的冻干/冷冻干燥的制剂。重建可在施用前的几乎任何时间点进行,但在大多数实施方案中,在向患者施用该制剂之前提前一天或不到一天、提前12小时或不到12小时、提前6小时或不到6小时、提前5小时或不到5小时、提前4小时或不到4小时、提前3小时或不到3小时、提前2小时或不到2小时、提前1小时或不到1小时、提前30分钟或不到30分钟、提前20分钟或不到20分钟、提前10分钟或不到10分钟、或者提前5分钟或不到5分钟进行重建。因此,该制剂可以是在药房、诊所或医院购买或移交之前已在水溶液/水/缓冲液中重建的制剂。该重建的制剂优选在低温(例如,等于或低于40℃、30℃、25℃、20℃、15℃、10℃、5℃、4℃、3℃、2℃、1℃)下保持。

[0065] 重建后,本文提供的制剂适合用作旨在用于例如静脉内或血管外给药(例如,肌肉内、真皮内和皮下给药)的肠胃外制剂。如本文所述,某些优点与本文制剂对于血管外(优选皮下)给药的用途有关。

[0066] 一小瓶根据本发明的药物制剂优选用作患者的单剂量给药。关于皮下给药,每位

患者每天优选使用一个剂量,以便使用简单、方便且几乎无痛的方案提供相对稳定的低谷FVIII水平。然而,可以采用其他给药方案,例如每周一次、每周两次、每两天一次、每三天一次、每日两次、每日三次等,并且给药方案还可以根据患者的具体需要——例如,增加/减少的身体活动的时间、身体状况——进行调整。

[0067] 本发明的(重建的)制剂中长效因子VIII的浓度通常约为250-10,000IU FVIII/mL、1000-10,000、2000-10,000、3000-10,000、4000-10,000、5000-10,000、6000-10,000、7000-10,000、8000-10,000,或500-10,000,或500-5000IU FVIII/mL,例如1000-3000、1500-3000、2000-3000、2500-3000、2000-3000、2500-3000、1000-2500、1000-2000、500-2500、500-2000、250-3000、250-4000、250-5000、250-6000、500-6000、1000-6000、2000-6000、3000-40000、500-8000、500-7000或5000-6000IU FVIII/mL。优选地,该制剂中因子VIII的浓度为250、300、350、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900,或3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500或10,000IU FVIII/mL。

[0068] FVIII的浓度还可以以g FVIII/mL来度量,但是FVIII活性/mL的度量更准确地反映活性成分的有效量。一个IU/U(国际单位/单位)被定义为在1mL的新鲜、合并的正常人血浆中发现的(活性)FVIII的量。术语“IU”和“U”在本文中可互换使用。

[0069] 通常,在本文中一小瓶相当于一个剂量。通常,在本文中浓度或FVIII强度被表示为U/mL,如果在冷冻干燥前小瓶中的填充体积低于1mL,则每只小瓶的强度将因此更低。

[0070] 盐:根据本发明的制剂包含钠盐和钙盐,优选NaCl和CaCl₂·2H₂O。在重建的溶液中,根据本发明的制剂具有低总盐浓度:约3-12mg/mL(优选约5-10mg/mL)。或者,在重建的溶液中,总盐含量约为3-11、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-11、4-10、4-9、4-8、4-7、4-6、4-5、5-11、5-10、5-9、5-8、5-7、5-6、6-11、6-10、6-9、6-8、6-7、7-11、7-10、7-9、7-8、8-11、8-10、8-9、9-11、9-10或10-11mg总盐/mL,或mg总盐/mL(或mg盐/小瓶(剂量单位))。

[0071] 所述钠盐优选为NaCl,其存在量约为1-10mg/mL,例如1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、2-10、2-9、2-8、2-7、2-6、2-5、2-4、2-3、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-10、4-9、4-8、4-7、4-6、4-5、5-10、5-9、5-8、5-7、5-6、6-10、6-9、6-8、6-7、7-10、7-9、7-8、8-10、8-9或9-10mg NaCl/mL。优选地,NaCl的浓度约为1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10.0mg NaCl/mL。NaCl的摩尔量为58.44g/mol,因此1-10mg/mL NaCl相当于约17-171mM。如果使用小于1ml的填充体积,那么可容易计算NaCl总量/小瓶——如果例如NaCl以5mg/ml的量存在且小瓶中的填充体积约为0.5ml,那么每只小瓶的NaCl量约为2.5mg/小瓶或mg/剂量。

[0072] 已知NaCl对FVIII具有增溶和稳定作用,因此在目前的FVIII制剂中使用相对较高浓度的NaCl。NaCl的另一个优点是可以肠胃外施用其相对较高的量,而不会引起任何副作用,相反,例如钾盐即使在相对较低的浓度下也可能是有毒的。

[0073] 钙盐(优选CaCl₂·2H₂O)存在于本文的制剂中,其量约为0.5-5.0mg/mL,例如0.50、0.55、0.60、0.65、0.70、0.75、0.80、0.85、0.90、0.95、or 1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、0.5-5、1-5、1.5-5、

2-5、2.5-5、3-5、3.5-5、4-5、0.5-4、1-4、1.5-4、2-4、2.5-4、3-4、0.5-3、1-3、1.5-3或2-3mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /mL。 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的摩尔量为147.03g/mol,因此0.5-5mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /mL相当于3.4-34mM。

[0074] 如果使用小于1ml的填充体积,那么可容易计算 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 总量/小瓶,如果例如 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 以5mg/ml的量存在且小瓶中的填充体积约为0.5ml,那么每只小瓶的 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的量约为2.5mg/小瓶或mg/剂量。

[0075] 二价阳离子例如 Ca^{2+} 的存在对于稳定HC与LC之间的非共价相互作用和对于防止FVIII聚集是至关重要的,因而对于维持FVIII活性也是至关重要的。在此可以使用供替代的钙盐,例如乙酸钙(CaOAc_2)和技术人员已知的其他盐。本文表明低于约0.5或0.4mg/mL的钙盐浓度与聚集增加有关。

[0076] 碳水化合物/糖类和多元醇: 本文的制剂包含相对较高浓度的碳水化合物或糖类或糖,特别是单糖和/或二糖,以及(或备选地)糖醇和/或多糖。单糖的实例包括葡萄糖(右旋糖)、果糖(左旋糖)、半乳糖、甘露糖等。本文的二糖的实例包括蔗糖、乳糖和海藻糖。多糖的实例包括葡聚糖、棉子糖、水苏糖、淀粉。糖醇的实例包括甘露醇、山梨醇、肌醇、半乳糖醇、卫矛醇、木糖醇和阿拉伯糖醇、糖醇(例如甘油(丙三醇)、1,2-丙二醇、2,5-丙二醇、1,3-丙二醇、1,3-丁二醇)和聚乙二醇。碳水化合物/糖提供本文冷冻干燥制剂中的主要组分,并且有助于在冷冻过程中、在干燥/去除水的过程中以及在储存过程中稳定溶液中的FVIII。不是所有糖醇都适合于FVIII制剂。例如,高甘露醇浓度可使FVIII分子在冷冻干燥过程中不稳定。在含有高甘露醇浓度的冷冻干燥制剂中检测到增加量的蛋白质聚集体。观察到甘露醇的这种去稳定化作用被稳定化赋形剂/碳水化合物例如蔗糖所抵消。

[0077] 本文的制剂在重建的制剂中包含30-110mg碳水化合物/mL(30-100mg蔗糖/ml相当于87-292mM),例如30-90、30-85、30-80、30-75、30-70、30-60、30-50、40-100、40-90、40-80、40-85、40-75、40-70、40-60、40-50、50-100、50-90、50-85、50-80、50-75、50-70、50-60、60-100、60-90、60-85、60-80、60-75、60-70、70-100、70-90、70-85、70-80、75-80、40-110、50-110、60-110、70-110、80-110、90-110、100-110、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109或110mg蔗糖(碳水化合物)/mL。蔗糖的摩尔质量为342.30g/mol。根据本发明的制剂中还可以存在其他碳水化合物/糖,例如非还原性二糖,例如海藻糖,在应激研究中发现海藻糖防止蛋白质聚集(GP-BDD-FVIII的聚集)。在其他实施方案中,蔗糖是本文制剂中存在的唯一的碳水化合物/糖。

[0078] 如果使用小于1ml的填充体积,那么可容易计算蔗糖的总量,如果例如蔗糖以100mg/ml的浓度存在且小瓶中的填充体积约为0.5ml,那么每只小瓶的蔗糖量约为50mg/小瓶或mmg/剂量。

[0079] 缓冲液: 本文的制剂可包含缓冲液/缓冲体系。缓冲液可以是冻干组合物/制剂的一部分,并且/或者其可以加入到冻干制剂中以用于其重悬/重建。缓冲物质/体系可以选自苯甲酸盐、甘氨酸、甘氨酸、组氨酸或组氨酸的衍生物、Hepes、甘氨酸、三(羟甲基)-氨基甲烷(TRIS)、N,N-二(羟乙基)甘氨酸(bicine)、N-三(羟甲基)甲基甘氨酸(tricine)、天冬氨酸、

谷氨酸或其混合物。在本发明的一个实施方案中,缓冲物质的浓度为1mM、5mM、10 mM、15mM、20 mM、25mM、30 mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、1-100mM,例如,1-50mM,或1-25mM,或1-20mM,或5-20mM,或5-15mM、10-20mM、10-30mM。

[0080] 在本发明的一个实施方案中,所述制剂包含组氨酸,优选L-组氨酸。在本发明的一个实施方案中,在重建的制剂中,组氨酸/L-组氨酸的浓度为1-10mg/mL(相当于6.4-64.5mM),例如1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、2-10、2-9、2-8、2-7、2-6、2-5、2-4、2-3、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-10、4-9、4-8、4-7、4-6、4-5、5-10、5-9、5-8、5-7、5-6、6-10、6-9、6-8、6-7、7-10、7-9、7-8、8-10或9-10mg/mL。组氨酸的摩尔质量约为155g/mol。还可以使用缓冲溶液重建本文的冷冻干燥制剂。在应激研究中发现组氨酸防止蛋白质聚集(GP-BDD-FVIII的聚集)。相反,在这些应激研究中观察到,其他氨基酸如精氨酸和谷氨酰胺以及其他缓冲剂如琥珀酸盐对GP-BDD-FVIII没有影响。

[0081] 本文制剂(重建后)的pH约为6.0-7.0、6.0-7.5,或6.2-6.8,或6.3-6.7,或者6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5。因此,本文制剂具有接近中性的pH,这对于旨在用于注射例如皮下给药的制剂是理想的。

[0082] 抗氧化剂/还原剂:本文的制剂(可)包含抗氧化剂。抗氧化剂用来在制备、冷冻干燥或储存过程中防止或减少蛋白质氧化。在本发明的一个实施方案中,可加入还原剂如甲硫氨酸(或其他含硫氨基酸或含硫氨基酸类似物)来抑制/减少氧化(主要是甲硫氨酸残基向甲硫氨酸亚砷的转化)。待加入的量应当是足以抑制氧化的量。在本发明的一个实施方案中,所述制剂包含甲硫氨酸,例如,L-甲硫氨酸。在本发明的一个实施方案中,在重建的制剂中甲硫氨酸/L-甲硫氨酸的浓度为0.5-100mM或1.5-100mM,例如0.5-15、0.5-10、0.5-5、1-15、1-10、1-5、2.0-20.0、5.0-20.0、10-20、15-20、10-50、15-50、20-50、20-100、30-100、50-100、50-90、50-80、1.5-15、2.0-15、5-15、10-15、1.5-10.0、2.0-10.0、5-10、15-50、20-50、0.5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、50、60、70、80、90或100mM抗氧化剂,例如甲硫氨酸。在重建的制剂中,1.5-100mM甲硫氨酸相当于约0.22-15mg甲硫氨酸/mL,或者g甲硫氨酸/小瓶(剂量单位)。甲硫氨酸的摩尔质量约为149.21g/mol。可以使用供替代的抗氧化剂,例如抗坏血酸。

[0083] 其他赋形剂:本文的制剂可进一步含有额外的赋形剂。供本发明的药物制剂中使用的标准赋形剂的实例是防腐剂,如苯酚、甲酚、间甲酚、苯甲醇和苯氧乙醇,以及表面活性剂。然而,本文的制剂优选地基本上没有任何防腐剂,因为发明人已发现即使少量的标准防腐剂(例如,甲酚和苯酚)也可导致FVIII分子的去稳定化。

[0084] 适于在此使用的典型表面活性剂(在括号[]中给出商品名)是聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯,如聚山梨酯20[吐温20]、聚山梨酯40[吐温40]、聚山梨酯80[吐温80],泊洛沙姆如聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段共聚物[Pluronic F68/泊洛沙姆188]、聚乙二醇辛基苯基醚[Triton X-100]或聚氧乙二醇十二烷基醚[Brij35]。在药物制剂中使用表面活性剂是技术人员公知的。对于蛋白质制剂,通常优选使用温和的表面活性剂(例如非离子型表面活性剂),例如聚山梨酯(例如吐温20)。在一个实施方案中,表面活性剂例如吐温20以0.00-1.00、0.01-0.10、0.01-0.05、0.05-0.10、0.05-1.00、0.1-1.0、0.2-1.0、0.3-1.0、0.4-1.0、0.5-1.0、0.6-1.0、0.7-1.0、0.8-1.0、0.9-1.0、0.05-0.80、0.1-0.8、0.2-0.8、0.3-0.8、0.4-0.8、0.5-0.8、0.6-0.8、0.7-0.8、0.05-0.50、0.1-0.5、0.2、-0.5、0.3-0.5、0.4-0.5、

0.00、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或1.0mg表面活性剂/mL的量存在于重建的制剂中。对于本发明,优选相对较低量(0.05-0.4)的表面活性剂。

[0085] 抗氧化/脱气:通过在与本文制剂的接触中置换氧气(空气)(脱气)可获得抗氧化作用。在本文的冷冻干燥过程开始之前,可在平衡至或没有平衡至例如大气压的情况下进行脱气。FVIII/长效FVIII对氧化的敏感性可完全或部分地受大气的排除或受置换氧气(空气)的控制。这可通过在冷冻和冷冻干燥之前用例如氮气、氦气或氩气使液体制剂达到饱和来实现。氧气(空气)的置换可以例如作为“脱气”过程来进行,其中溶液经历如下步骤的一个或多个循环:(i)暴露于惰性气体(氩气、氦气或氮气)和/或(ii)暴露于低压,低于大气压的压力。本文的制剂可被过滤除菌、分配在小瓶中,并且通过例如将小瓶暴露于0.1巴(在冷冻干燥/FD室中)、然后用N₂(g)平衡压力来脱气。在N₂(或另一种惰性气体)下密封小瓶(在腔室中)之前,可进行一个、两个、三个、四个或五个循环。

[0086] 或者,可通过在无氧气氛中制备制剂并通过无氧水中溶解/重建赋形剂来使本文的制剂脱气。这种类型的制剂随后被冷冻干燥,并优选通过例如用惰性气体填充密封的小瓶而储存在无氧条件下。

[0087] 抗氧化剂的使用可与大气的排除/脱气相结合。此外,本文的制剂可以避光;与大气的排除和/或抗氧化剂的使用相结合。因此,本发明还提供了含有如本文定义的冷冻干燥或重建的制剂以及可选的惰性气体的气密容器(例如,小瓶或筒匣(如用于笔式涂药器的筒匣))。该惰性气体可选自氮气、氦气或氩气。术语“气密容器”意指对氧气(空气)具有低通透性的容器。该容器(例如,小瓶或筒匣或注射器)通常由玻璃或塑料制成,特别是由玻璃制成,任选地通过橡胶隔片或其他封闭手段进行封闭,以允许用例如针穿透,而保持药物制剂的完整性。在进一步的实施方案中,该容器为封装在密封袋例如密封塑料袋如层压袋(例如,金属(如铝)层压塑料袋)中的小瓶或筒匣。

[0088] 本发明还包括治疗A型血友病的方法,该方法包括向有需要的受试者施用根据本发明的制剂。如本文所用的术语“受试者”包括任何人类患者或非人类脊椎动物。如本文所用的,术语“治疗”或“处理”是指对任何有需要的人类或其他脊椎动物受试者的药物疗法。所述受试者预期已经经历了由执业医师或执业兽医进行的体格检查,该医师或兽医已经给出了初步或明确的诊断,该诊断指明本文制剂的使用对所述人类或其他脊椎动物的健康是有益的。根据受试者的健康现状,这类治疗的时机和目的可随个体的不同而不同。因此,所述治疗可以是预防性的、姑息性的、对症的和/或治愈性的。就本发明而言,预防性的、姑息性的、对症的和/或治愈性的治疗可代表本发明的单独的方面。

[0089] A型血友病的临床严重程度根据血液中FVIII的功能单位的浓度来确定,并且将其分类为轻度、中度或重度。重度血友病根据凝血因子水平 $<0.01\text{U/mL}$ 来定义,其相当于 $<$ 正常水平的1%,而中度和轻度患者分别具有1%-5%和 $>5\%$ 的水平。

[0090] 在冷冻干燥之前和之后的蛋白质浓度:本文制剂在冷冻干燥之前的体积(填充体积)和在冷冻干燥之后的体积(重建体积)可以例如为1:1或接近1:1。在一个实施方案中,重建之前与之后的体积比可以约为1.0:1.1、1.0-1.2、1.0-1.2、1.0-1.3、1.0-1.4、1.0-1.5、1.0-1.6、1.0-1.7、1.0-1.8、1.0-1.9、1.0-2.0、1.0-2.5、1.0-3.0、1:0.9、1:0.8、1:0.7、1:0.6、1:0.5、1:0.4或1:0.3。

[0091] 冷冻干燥制剂:根据本发明的药物制剂是使用前在无菌水或水溶液(例如缓冲液)

中重建的冷冻干燥制剂。本文的冷冻干燥制剂在重建前看起来结构均匀,并且快速且容易重建(“药学上精致的”冷冻干燥块)。冷冻干燥块的基质或主体主要由冷冻干燥的赋形剂组成,此外,冷冻干燥基质的体积基本上相当于在冷冻干燥前填充小瓶的溶液的体积。

[0092] 重建的制剂的总体积非常接近于重建溶液(缓冲液/水)的体积,因而在此不对总体积相对于重建体积进行调整。如果例如本文的制剂在1ml缓冲液/水中重建,那么重建的制剂的总体积将会非常接近于1ml,例如,约1.01-1.05ml,因此,此处的计算不将这些微小的差异考虑在内。

[0093] 实施方案列表:

[0094] 应当理解,本发明的所有方面和实施方案可以进行组合,并且不应以任何限制性的方式来理解。

[0095] 实施方案1:(冷冻干燥的或重建的冷冻干燥的)药物FVIII制剂,其中所述制剂包含与野生型FVIII相比具有延长的体内循环半衰期的FVIII分子(“长效FVIII”),其中所述制剂在重建后为水性等渗的(或接近等渗的)制剂,并且其中所述制剂包含250-10,000IU/mL的所述FVIII分子(优选1000、1500、2000、2500、3000、4000或5000IU/mL)、2-7mg NaCl/mL、0.5-5.0mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /mL和50-110mg蔗糖/mL。或者,在根据本发明的制剂中,蔗糖可以完全或部分地被海藻糖代替。

[0096] 实施方案2:根据本发明的药物制剂,其中所述制剂进一步包含0.5-15、0.5-10、0.5-5、1-5或2-4mg组氨酸,或者mg组氨酸/mL(重建后)。根据本发明所述的药物制剂任选地还包含0.5-15、0.5-10、0.5-5、1-5或2-5mg甲硫氨酸(或者mg甲硫氨酸/mL(重建后))。

[0097] 实施方案3:根据本发明的药物制剂,其中所述制剂进一步包含0.05-0.5mg表面活性剂,或者0.1-0.5mg表面活性剂/mL(重建后)。该表面活性剂优选为非离子型(温和的)表面活性剂,例如吐温[®]20。

[0098] 实施方案4:根据本发明的药物制剂,其中所述重建的制剂的体积约为0.2-1.5mL,优选0.3-1.5,优选0.4-1.5,优选0.5-1.5,优选0.5-1.0,优选0.5-1.2,优选0.4-1.0,优选0.4-1.2,优选0.8-1.2mL,例如0.2mL、0.3mL、0.4mL、0.5mL、0.6mL、0.7mL、0.8mL、0.9mL或1mL,并且其中所述(重建的)制剂的重量摩尔渗透压浓度约为280-400或300-500mOsm/kg。该制剂可以在水(纯水和/或无菌水)或缓冲液中重建。优选地,一个剂量(优选在玻璃小瓶中)的根据本发明所述的重建的药物制剂用于患者的一次给药/注射。

[0099] 实施方案5:根据本发明的药物制剂,其中所述FVIII分子为包含15-25个氨基酸(优选17-22个氨基酸,优选19-21个氨基酸)的B结构域连接体的B结构域截短分子,其中所述FVIII分子经由与对应于根据SEQ ID NO 1的Ser750残基的丝氨酸氨基酸残基连接的O-聚糖而与半衰期延长部分缀合。优选地,该FVIII B结构域连接体的序列如SEQ ID NO 2、SEQ ID NO 3或SEQ ID NO 4所示。经由S750残基的糖缀合可利用例如酶促或化学方法进行。例如,在W009108806中描述了FVIII分子的酶促糖缀合。

[0100] 实施方案6:根据本发明的药物制剂,其中所述FVIII分子与水溶性聚合物缀合。

[0101] 实施方案7:根据本发明的药物制剂,其中所述水溶性聚合物为PEG。PEG聚合物的大小优选约为20-100kDa,更优选约为30-50kDa,例如20、30、40、50、60、70、80、90或100kDa。

[0102] 实施方案8:根据本发明的药物制剂,其中所述水溶性聚合物为肝素前体。肝素前体聚合物的大小优选约为20-150kDa、50-150kDa、50-100kDa,更优选30-50kDa,更优选70-

90kDa,例如20、30、40、50、60、70、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、100、120、140或150kDa。

[0103] 实施方案9:根据本发明的药物制剂,其中所述FVIII分子为融合蛋白(与融合配偶体融合的FVIII)。

[0104] 实施方案10:根据本发明的药物制剂,其中所述融合分子的融合配偶体选自:白蛋白、Fc结构域、Fc受体和约200-400个氨基酸的FVIII B结构域片段。

[0105] 实施方案11:根据本发明的药物制剂,其中所述制剂包含250-10,000IU FVIII/mL、3.1mg组氨酸/mL、2.5mg甲硫氨酸/mL、3.0mg NaCl/mL、80mg蔗糖/mL、0.4mg非离子型表面活性剂/mL和3mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /mL。

[0106] 实施方案12:根据本发明的药物制剂,其中所述制剂包含250-10,000IU FVIII/mL、3.1mg组氨酸/mL、2.5mg甲硫氨酸/mL、3.5mg NaCl/mL、70mg蔗糖/mL、0.4mg非离子型表面活性剂/mL和0.5-1mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /mL。

[0107] 实施方案13:根据本发明的药物制剂,其中所述制剂包含250-10,000IU FVIII/mL、3.1mg组氨酸/mL、2.5mg甲硫氨酸/mL、3.5mg NaCl/mL、90mg蔗糖/mL、0.4mg非离子型表面活性剂/mL和2mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /mL。

[0108] 实施方案14:根据本发明的药物制剂,其中所述制剂包含250-10,000IU FVIII/mL、3.1mg组氨酸/mL、2.5mg甲硫氨酸/mL、4mg NaCl/mL、100mg蔗糖/mL、0.1-0.4mg非离子型表面活性剂/mL和2mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /mL。

[0109] 实施方案15:根据本发明的药物制剂,其中所述制剂包含1000-10,000IU FVIII/mL、1-4mg组氨酸/mL、2.5mg甲硫氨酸/mL、7mg NaCl/mL、100mg蔗糖/mL、0.4mg非离子型表面活性剂/mL和2mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /mL。

[0110] 实施方案16:根据本发明的药物制剂,其中所述制剂包含250-10,000IU FVIII/mL、1.5mg/ml组氨酸、2.5mg甲硫氨酸/mL、3.5mg NaCl/mL、70mg蔗糖/mL、0.4mg非离子型表面活性剂/mL和0.5-1mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /mL。

[0111] 实施方案17:根据本发明的药物制剂,其中所述制剂在重建后包含2.5-3.5mg组氨酸/mL,例如3.1mg组氨酸/mL。

[0112] 实施方案18:根据本发明的药物制剂,其中所述制剂在重建后包含3-4mg NaCl/mL,例如3.5mg NaCl/mL。

[0113] 实施方案19:根据本发明的药物制剂,其中所述制剂在重建后包含0.3-1.0mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /mL,例如0.5mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /mL。

[0114] 实施方案20:根据本发明的药物制剂,其中所述制剂在重建后包含2-3mg甲硫氨酸/mL,例如2.5mg甲硫氨酸/mL。

[0115] 实施方案21:根据本发明的药物制剂,其中所述制剂在重建后包含60-80mg或70-80mg蔗糖/mL,例如70mg蔗糖/mL。

[0116] 实施方案22:根据本发明的药物制剂,其中所述制剂在重建后包含0.2-0.4mg非离子型(和/或温和的)表面活性剂/mL,例如0.4mg聚山梨酯20(吐温® 20)/mL。

[0117] 实施方案23:根据本发明的药物制剂,其中氧化的FVIII轻链分子的量低于FVIII总量的10%,优选低于9%、优选低于8%、优选低于7%、优选低于6%、优选低于5%、优选低于4%、优选低于3%、优选低于2%或优选低于1%。优选地,在20-30℃下储存3个月、4个月、

5个月或6个月后测量氧化的FVIII轻链产品的量。

[0118] 实施方案24:根据本发明的药物制剂,其中该制剂在0.5–15mM (优选0.5–5mM) 组氨酸溶液中重建:重建的制剂的体积优选约为0.2mL、0.3mL、0.4mL、0.5mL、0.6mL、0.7mL、0.8mL、0.9mL、1.0mL、1.1mL、1.2mL、1.3mL、1.4mL或1.5mL。

[0119] 实施方案25:根据本发明的药物制剂,其中所述制剂在重建后包含250–10,000IU FVIII/mL、3.5mg NaCl/mL、0.5–1.0mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /mL、3.1mg组氨酸/mL、2.5mg甲硫氨酸/mL、70mg蔗糖/mL、0.4mg吐温20/聚山梨酯20/mL、350–400mOsm/kg,其中所述制剂在10mM组氨酸溶液中重建。

[0120] 实施方案26:根据本发明的药物制剂,其中所述冷冻干燥的制剂在重建之前为药学上精致的冷冻干燥块。将冷冻干燥块优选放置在剂量小瓶如玻璃小瓶的底部。冷冻干燥块的体积优选地基本上相当于冷冻干燥之前的填充体积。

[0121] 实施方案27:(冷冻干燥的或重建的冷冻干燥的) 药物FVIII制剂,其中所述制剂包含与野生型FVIII相比具有延长的体内循环半衰期的FVIII分子,其中所述制剂在重建后为水性等渗制剂,并且其中所述制剂包含250–10,000IU/mL的所述FVIII分子(重建后)、低NaCl浓度(例如1–5mg NaCl/mL(重建后))、高糖/蔗糖浓度(例如60–80mg蔗糖/mL(重建后))、约0.5–1mg/mL $\text{CaCl}_2 (2\text{H}_2\text{O})$,并且其中氧化的FVIII轻链分子的量低于FVIII总量的10%,优选5%,优选1%。重建的制剂的总体积优选约为1mL或少于1mL,例如0.3或0.5mL。优选地,在30°C下储存三个月后,氧化的FVIII轻链的量低于5%。

[0122] 实施方案28:制备根据本发明的(冷冻干燥的或重建的冷冻干燥的) 药物制剂的方法,其中所述方法包括在液体制剂的冷冻干燥之前通过将(液体) 制剂暴露于低压(显著低于1atm.,例如0.01–0.50atm.)、然后用惰性气体平衡压力来使液体制剂脱气的步骤。在冷冻和冷冻干燥前使液体制剂脱气的步骤可以进行一次、两次、三次、四次或甚至五次或更多次,持续约1–120分钟,优选1–60分钟、优选1–45分钟、优选1–40分钟、优选1–30分钟、优选1–20分钟、优选1–15分钟、优选1–10分钟、优选5–120分钟、优选5–60分钟、优选5–45分钟、优选5–40分钟、优选5–30分钟、优选5–20分钟、优选5–15分钟、优选10–120分钟、优选10–60分钟、优选10–45分钟、优选10–40分钟、优选10–30分钟、优选10–20分钟、优选10–15分钟、优选15–120分钟、优选15–60分钟、优选15–45分钟、优选15–30分钟、优选15–20分钟或优选20–40分钟。在施用于患者前,将冷冻干燥制剂在水或水溶液/缓冲液中重建。该制剂以及优选用于重建的溶液在脱气和冷冻干燥前优选经历过滤除菌步骤。

[0123] 实施方案29:制备根据本发明的(冷冻干燥的或重建的冷冻干燥的) 药物制剂的方法,其中所述方法包括以下步骤:使赋形剂(FVIII、糖、盐等) 溶解于基本上没有氧气的水(例如脱气水) 中,然后冷冻干燥所得的液体制剂。该方法优选在基本上没有氧气的气氛(例如 N_2) 下进行。

[0124] 实施方案30:通过根据本发明的方法产生或获得的,或可获得的药物制剂。

[0125] 实施方案31:根据本发明的药物制剂,其中所述制剂旨在用于血管外给药,优选皮下给药。旨在用于皮下给药的制剂优选地每月一次、每月两次、每周一次、每周两次、每日一次、每日两次或每日三次施用。

[0126] 实施方案32:根据本发明的药物制剂,其中所述制剂旨在用于静脉内给药。旨在用于静脉内给药的制剂优选地每月一次、每两周一次、每周一次、每周两次、每周三次、每日一

次、每日两次或每日三次施用或按需施用。

[0127] 实施方案33:根据本发明的药物制剂,其中所述制剂旨在用于每日一次或每周一次给药。

[0128] 实施方案34:根据本发明的药物制剂,其用于A型血友病的治疗。

[0129] 实施方案35:血友病,优选A型血友病的治疗方法,其中所述方法包括向有需要的患者施用根据本发明的药物制剂。

实施例

[0130] 在本文的实施例中,使用以下冷冻干燥器: Steris Lyovac FCM10、Usifroid SMH 45S或Genesis 25LSQ EL-85。冷冻干燥制剂的外观或稳定性的差异均与冷冻干燥设备的类型(冷冻干燥器的类型)无关。

[0131] 实施例1脱气过程:

[0132] 脱气:将装有液体制剂的小瓶放置在冷冻干燥器的架子上,并将架子冷却至5℃。随后将压力降至100mBar,并维持该压力20分钟。随后用氮气将压力升至900mBar,并维持该压力20分钟。随后再次将压力降至100mBar,并将压力维持在100mBar下20分钟。随后用氮气将压力升至大气压,并开始冷冻干燥。

[0133] 脱气之前制剂中的氧含量约为320微摩尔/L。该脱气过程之后(开始冷冻干燥之前),制剂中的氧含量约为30微摩尔/L。脱气之前和之后氧浓度的差异表明本文的脱气过程是降低制剂中氧含量的有效方法。

[0134] 还在不对架子进行初始冷却的情况下在室温下进行该脱气过程,获得类似的结果:脱气之后测得氧含量约为30微摩尔/L。

[0135] 实施例2测试化合物的产生:

[0136] 可以如例如W009108806的实施例1所公开的那样产生糖缀合的、B结构域截短/缺失的FVIII。

[0137] 实施例3通过反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定氧化轻链的百分比:

[0138] 通过RP-HPLC评价糖聚乙二醇化的、B结构域缺失的因子VIII(根据实施例2产生的GP-BDD-FVIII)的化学稳定性。该方法用来量化氧化轻链(LC)相对于一个样品中蛋白质总量的百分比。氧化LC%用来比较在不同条件下(例如,在冷冻干燥前进行和不进行脱气的情况下)产生的GP-BDD-FVIII的化学稳定性。氧化LC%进一步用来比较不同制剂中GP-BDD-FVIII的化学稳定性。

[0139] 对于反相HPLC分析,使用了二甲基丁基二甲基硅烷C4柱(DMeBuDMeSi, FEF Chemicals, Denmark)。孔径:300Å,粒度:5μm,柱尺寸2.1×250mm。流动相A:0.15%TFA,流动相B:0.14%TFA,80%MeCN。流速:0.5mL/min。梯度:时间/%B:0/3528/80.529/10034/10035/35。

[0140] 实施例4通过大小排阻高效液相色谱法(SE-HPLC)测定FVIII HMWP%:

[0141] 通过SE-HPLC评价GP-BDD-FVIII的物理稳定性、聚集倾向。该方法用来量化聚集蛋白质/高分子量蛋白质相对于一个样品中蛋白质总量的百分比(HMWP%)。HMWP%用来比较多种制剂中GP-BDD-FVIII的物理稳定性。对于SE-HPLC分析(在实施例6-14、21中),使用了Sepax Zenix, SEC-300柱。孔径:300Å,柱尺寸:300×7.8mm,洗脱缓冲液:10mM Bis-Tris

丙烷、500mM NaCl、10mM乙酸钙、10%2-丙醇,pH 6.8,流速:0.3mL/min,运行时间60min。HMWP%被量化为在主峰前洗脱的单个峰/多个峰的积分峰面积相对于色谱图的总积分峰面积的百分比。

[0142] 对于SE-HPLC分析(在实施例15-18、20、22-24中),使用了Sepax,SRT SEC-500柱。孔径:500Å,柱尺寸:300×7.8mm,洗脱缓冲液:10mM Tris、300mM NaCl、10mM氯化钙、5%2-丙醇,pH 7,流速:0.3mL/min,运行时间60min。HMWP%被量化为在主峰前洗脱的单个峰/多个峰的积分峰面积相对于色谱图的总积分峰面积的百分比。

[0143] 实施例5浓度测定方法

[0144] 可根据主峰/GP-BDD-FVIII单体峰的面积测定GP-BDD-FVIII的浓度。将SE-HPLC色谱图中的该峰面积与使用具有已知浓度(通过正交法测定)的参考物质获得的标准曲线进行比较。用于浓度测定的SE-HPLC方法与实施例4中描述的方法相同。

[0145] 实施例6脱气的作用

[0146] 制备含有糖聚乙二醇化的、B结构域缺失的因子VIII (GP-BDD-FVIII)的制剂,其具有以下组成:1000IU/mL GP-BDD-FVIII、70mg/mL蔗糖、3.5mg/mL NaCl、0.5mg/mL CaCl₂、0.22mg/mL甲硫氨酸、1.55mg/mL L-组氨酸、0.4mg/mL聚山梨酯20。将制剂分配至小瓶中。将小瓶分成两组:一组在冷冻干燥前进行脱气,而另一组在不进行预先脱气的情况下冷冻干燥。所有小瓶均使用相同的冷冻干燥程序(参见表6.1)进行冷冻干燥。

[0147] 脱气过程:在冷冻步骤前在冷冻干燥器中进行脱气。通过在+20℃下在20分钟期间施加低压(100mbar)从液体中去除氧气。用氮气将压力平衡至1atm(1013mbar)。在冷冻步骤之前重复该脱气过程。

[0148] 表6.1:冷冻干燥程序

[0149]

工艺步骤	步骤	时间H: Min	°C	报警压力	压力hPa ¹	渐变/保持步骤
加载	01	-	+5	-	环境压力	保持
平衡	02	01:00	+5	-	环境压力	保持
冷冻	03	01:00	-45	-	环境压力	渐变 (Ramp)
冷冻	04	03:00	-45	-	环境压力	保持
退火	05	01:00	-8	-	环境压力	渐变
退火	06	12:00	-8	-	环境压力	保持
退火	07	01:00	-45	-	环境压力	渐变
退火	08	03:00	-45	-	环境压力	保持
抽真空	09	00:15	-45	0.1	0.05	渐变
初级干燥	10	01:00	-30	0.1	0.05	渐变
初级干燥	11	45:00	-30	0.1	0.05	保持
次级干燥	12	14:00	+40	0.1	0.05	渐变
次级干燥	11	12:00	+40	0.1	.05	保持

[0150] 总时间:约94小时

[0151] ¹MKS压力表,电容压力计

[0152] 在进行和不进行预先脱气的情况下冷冻干燥之后,用1.1mL 10 mM组氨酸(pH 6.0)重建冷冻干燥制剂,并通过RP-HPLC分析氧化形式(如实施例3中所述)。在冷冻干燥之后立刻(在T=0时)以及在30°C和40°C下(储存冷冻干燥制剂)3周后测定氧化LC的百分比,参见表6.2中的数据。

[0153] 表6.2.在进行和不进行预先脱气的情况下,GP-BDD-FVIII冷冻干燥制剂中氧化LC的百分比。

[0154]

储存	在进行预先脱气的情况下 通过冷冻干燥产生的制剂	在不进行预先脱气的情况下通 过冷冻干燥产生的制剂
冷冻干燥之前	3.1%氧化LC	3.2%氧化LC
T=0	3.0 %氧化LC	4.0 %氧化LC
30°C下3周	4.1 %氧化LC	8.0 %氧化LC
40°C下3周	4.7 %氧化LC	9.9 %氧化LC

[0155] 因此,在冷冻干燥前经过脱气,GP-BDD-FVIII的氧化显著减少。在T=0时(在冷冻干燥之后立刻),特别是在30°和40°C下储存3周之后检测到氧化LC的百分比较低(数据示于表6.2中)。

[0156] 实施例7脱气的作用

[0157] 制备含有糖聚乙二醇化的、B结构域缺失的因子VIII (GP-BDD-FVIII) 的制剂,其具有以下组成:1000IU/mL GP-BDD-FVIII、70mg/mL蔗糖、3.5mg/mL NaCl、0.5mg/mL CaCl₂、2.5mg/mL甲硫氨酸、1.55mg/mL L-组氨酸、0.4mg/mL聚山梨酯20。该制剂与实施例6中描述的制剂类似,但其含有超过10倍的甲硫氨酸。

[0158] 将制剂分到小瓶中并使用相同的冷冻干燥程序(参见表6.1)进行冷冻干燥。在冷冻干燥前将小瓶分成两组:一组在冷冻干燥前脱气,而另一组不进行脱气。

[0159] 脱气过程:如实施例6所述在冷冻步骤前在冷冻干燥器中进行脱气。

[0160] 在进行和不进行预先脱气的情况下冷冻干燥之后,用1.1mL 10mM组氨酸(pH6.0)重建冷冻干燥制剂,并分析氧化形式。在冷冻干燥之后立刻(T=0)以及在30°C和40°C下(储存冷冻干燥制剂)1个月后通过RP-HPLC测定氧化LC的百分比,参见表7.1中的数据。

[0161] 表7.1:在进行和不进行预先脱气的情况下,GP-BDD-FVIII冷冻干燥制剂中氧化LC的百分比。

[0162]

储存	在进行预先脱气的情况下 通过冷冻干燥产生的制剂	在不进行预先脱气的情况下通 过冷冻干燥产生的制剂
T=0	2.8 %氧化LC	3.9 %氧化LC
30°C下1个月	3.3 %氧化LC	5.4 %氧化LC
40°C下1个月	3.3 %氧化LC	7.2 %氧化LC

[0163] 观察到在冷冻干燥前经过脱气,GP-BDD-FVIII的氧化显著减少。在T=0时(在冷冻干燥之后立刻),特别是在30°和40°C下储存1个月之后,检测到氧化LC的百分比较低(数据示于表7.1中)。

[0164] 表6.2和表7.1中的数据的比较显示,当甲硫氨酸从0.22mg/mL(实施例6中研究的制剂)增加至2.5mg/mL(实施例7中研究的制剂)时,氧化形式的含量降低。然而,具有最高甲

硫氨酸浓度 (2.5mg/mL, 16.8mM) 的制剂仍需要脱气来使FVIII氧化保持在可接受的水平下 (例如, 氧化形式低于5%)。

[0165] 实施例8甲硫氨酸的加入:

[0166] 制备含有糖聚乙二醇化的、B结构域缺失的因子VIII (GP-BDD-FVIII) 的一系列制剂, 以研究甲硫氨酸对LC氧化的影响。这些制剂具有以下组成: 1000IU/mL GP-BDD-FVIII、70mg/mL蔗糖、3.5mg/mL NaCl、0.5mg/mL CaCl₂、1.55mg/mL L-组氨酸、0.4mg/mL聚山梨酯20。这些制剂在甲硫氨酸浓度方面不同, 如表8.1和表8.2中的结果所示。

[0167] 通过表6.1所示的冷冻干燥程序将这些制剂冷冻干燥。这些制剂在不进行预先脱气的情况下冷冻干燥。

[0168] 表8.1: 在含有不同量的甲硫氨酸的GP-BDD-FVIII冷冻干燥制剂中氧化LC的百分比。

[0169]

制剂	#1	#2	#3	#4
甲硫氨酸	0.06 mg/mL	0.22 mg/mL	2.5 mg/mL	10 mg/mL
5°C下1个月	4.6 %	8.3 %	4.4 %	3.6 % (30°C下3周)

[0170]

30°C下1个月	8.0 %	7.5 %	5.8 %	3.4 % (30°C下3周)
40°C下1个月	10.8 %	9.2 %	7.9 %	3.8 % (40°C下3周)

[0171] 观察到并且表8.1中的数据显示, 在甲硫氨酸浓度增加时, GP-BDD-FVIII的氧化显著减少。对于含有10mg/mL甲硫氨酸的稳定样品, 观察到氧化GP-BDD-FVIII的水平最低。

[0172] 此外, 观察到并且表8.2中的数据显示, 在所研究的GP-BDD-FVIII制剂中HMWP%在所有时间点均低 (在加速稳定性研究中), 含有10mg/mL甲硫氨酸的制剂除外。这一制剂, 即#4, 在冷冻干燥后 (在T=0时) 和储存3周后具有意外的高HMWP值。在实施例16中进行了包括额外的甲硫氨酸浓度的附加实验。

[0173] 表8.2: 在含有不同量的甲硫氨酸的GP-BDD-FVIII冷冻干燥制剂中HMWP的百分比。

[0174]

制剂	#1	#2	#3	#4
甲硫氨酸	0.06mg/mL	0.22mg/mL	2.5mg/mL,	10mg/mL
冷冻干燥之前	0.9%	0.9%	0.9%	0.8%
T=0	0.7%	1.0%	0.7%	5.8%
5°C下1个月	1.0%	1.0%	1.0%	
30°C下1个月	1.0%	1.0%	1.0%	5.6% (30°C下3周)
40°C下1个月	1.0%	1.0%	1.5%	6.1% (40°C下3周)

[0175] 实施例9减小赋形剂浓度以降低重量摩尔渗透压浓度

[0176] 制备两种不同的制剂, 以研究当减小赋形剂浓度 (以降低重量摩尔渗透压浓度) 时对GP-BDD-FVIII的物理稳定性的影响。表9.1中描述了这两种制剂 (#1和#2) 中赋形剂的组成。

[0177] 表9.1: 制剂#1和#2在冷冻干燥之前的组成以及这些制剂在重建 (在重建过程中稀

释三倍)之后估算的重量摩尔渗透压浓度

[0178]

	制剂#1	制剂#2
GP-BDD-FVIII	3000 U/mL	3000 U/mL
蔗糖	12 mg/mL	9 mg/mL
NaCl	36 mg/mL	27 mg/mL
CaCl₂ (2H₂O)	1 mg/mL	0.5 mg/mL
甲硫氨酸	0.22 mg/mL	0.17 mg/mL
L-组氨酸	1.55 mg/mL	1.55 mg/mL
聚山梨酯20	0.4 mg/mL	0.3 mg/mL
重建(1:3)之后估算的重量摩尔渗透压浓度	约440 mOsm/kg	约330 mOsm/kg

[0179] 根据表9.2中描述的冷冻干燥程序冷冻干燥这两种制剂(表9.1中描述的#1和#2)。

[0180] 表9.2:冷冻干燥程序

[0181]

工艺步骤	步骤	时间H: Min	温度°C	报警压力	压力hPa ¹	渐变/保持步骤
加载	01	-	+5	-	环境压力	保持
平衡	02	00:40	+5	-	环境压力	保持
冷冻	03	06:00	-48	-	环境压力	渐变
冷冻	04	02:00	-48	-	环境压力	保持
退火	05	01:00	-30	-	环境压力	渐变
退火	06	10:00	-30	-	环境压力	保持
退火	07	01:00	-48	-	环境压力	渐变
退火	08	02:00	-48	-	环境压力	保持
抽真空	09	00:01	-48	0.3	0.15	渐变
初级干燥	10	01:00	-30	0.3	0.15	渐变
初级干燥	11	16:00	-30	0.3	0.15	保持

[0182]

工艺步骤	步骤	时间H: Min	温度°C	报警压力	压力hPa ¹	渐变/保持步骤
次级干燥	12	08:00	+25	0.3	0.15	渐变
次级干燥	11	06:00	+25	0.3	0.15	保持

[0183] 总时间:约53:40小时

[0184] ¹MKS压力表,电容压力计

[0185] 在SE-HPLC分析(HMWP%的测定)前,将冷冻干燥制剂在1.2mL pH6.0的组氨酸缓冲液中重建(其为冷冻干燥前小瓶的填充体积的3倍)。制剂#1和#2(表9.1)的SE-HPLC分析结果示于表9.3中。

[0186] 在储存过程中观察到当NaCl和蔗糖的浓度都增加时,HMWP的形成(GP-BDD-FVIII聚集)显著增加。

[0187] 表9.3:在加速稳定性研究中的不同时间点,两种不同制剂(表9.1中描述的#1和#2)中聚集GP-BDD-FVIII的百分比。

[0188]

稳定性数据	制剂#1	制剂#2
在T=0时的HMWP%	1.2%	1.5%
30°C下1个月之后的HMWP	1.5%	2.0%
40°C下1个月之后的HMWP	1.9%	3.7%

[0189] 实施例10高盐+低蔗糖或低盐+高蔗糖

[0190] 制备一系列不同的制剂,以研究蔗糖和NaCl对冷冻干燥过程中HMWP的形成的影响。制剂之间的主要变化是NaCl和蔗糖的浓度。制剂的组成示于表10.3中。

[0191] 由于NaCl和蔗糖浓度的不同,必须使用不同的冷冻干燥程序来维持外观良好的冷冻干燥块(其在冷冻干燥过程中不坍塌)。表10.1中描述的冷冻干燥程序用于制剂#1、#2、#3和#4,而制剂#5和#6使用表10.2中描述的冷冻干燥程序进行冷冻干燥。

[0192] 表10.1:用于制剂#1、#2、#3和#4(表10.3中描述)的冷冻干燥程序

[0193]

工艺步骤	步骤	时间H: Min	温度°C	报警压力	压力hPa ¹	渐变/保持步骤
加载	01	-	+5	-	环境压力	保持
平衡	02	00:40	+5	-	环境压力	保持
冷冻	03	06:00	-48	-	环境压力	渐变
冷冻	04	02:00	-48	-	环境压力	保持
退火	05	01:00	-30	-	环境压力	渐变
退火	06	10:00	-30	-	环境压力	保持
退火	07	01:00	-48	-	环境压力	渐变
退火	08	02:00	-48	-	环境压力	保持
抽真空	09	00:01	-48	0.3	0.15	渐变
初级干燥	10	01:00	-30	0.3	0.15	渐变
初级干燥	11	16:00	-30	0.3	0.15	保持
次级干燥	12	08:000	+25	0.3	0.15	渐变
次级干燥	11	06:00	+25	0.3	0.15	保持

[0194] 总时间:约53:40小时

[0195] ¹MKS压力表,电容压力计

[0196] 表10.2:用于制剂#5和#6(表10.3中描述)的冷冻干燥程序

[0197]

工艺步骤	步骤	时间H: Min	温度°C	报警压力	压力hPa ¹	渐变/保持步骤
加载	01	-	+5	-	环境压力	保持
平衡	02	01:00	+5	-	环境压力	保持
冷冻	03	01:00	-45	-	环境压力	渐变

[0198]

冷冻	04	03:00	-45	-	环境压力	保持
退火	05	01:00	-8	-	环境压力	渐变
退火	06	12:00	-8	-	环境压力	保持
退火	07	01:00	-45	-	环境压力	渐变
退火	08	03:00	-45	-	环境压力	保持
抽真空	09	00:15	-45	0.1	0.05	渐变
初级干燥	10	01:00	-30	0.1	0.05	渐变
初级干燥	11	45:00	-30	0.1	0.05	保持
次级干燥	12	10:00	+48	0.1	0.05	渐变
次级干燥	11	10:00	+48	0.1	0.05	保持

[0199] 总时间:约82:15小时

[0200] ¹MKS压力表,电容压力计

[0201] 所述制剂被设计为在重建之后具有相对类似的重量摩尔渗透压浓度(重量摩尔渗透压浓度<450mOsm/kg)和类似的蛋白质浓度。因此,需要使用不同的重建体积和冷冻干燥前的蛋白质浓度。

[0202] 对于具有相对较高NaCl浓度的制剂,冷冻干燥前含有36-30mg/mL NaCl的制剂#1、#2、#3和#4在重建过程中需要稀释3倍(意味着重建体积是冷冻干燥前的小瓶填充体积的三倍)。对于在冷冻干燥前重量摩尔渗透压浓度<450mOsm/kg的制剂(例如具有8mg/mL NaCl的#5和具有3.5mg/mL NaCl的#6),重建体积等于填充体积。所有制剂均用pH6.0的10mM组氨酸缓冲液来重建。

[0203] 在冷冻干燥之前以及在冷冻干燥之后立即通过SE-HPLC测定制剂中HMWP的百分比。结果呈现在表10.3中。

[0204] 表10.3:显示了六种GP-BDD-FVIII制剂(#1→#6)的HMWP百分比以及由冷冻干燥诱导的HMWP的增加。表中的赋形剂浓度以mg/mL来定义。表中以mg/mL为单位的浓度和重量摩尔渗透压浓度值涉及重建之后的浓度和重量摩尔渗透压浓度。

[0205]

制剂	#1	#2	#3	#4	#5	#6
填充体积:重建 体积	1:3	1:3	1:3	1:3	1:1	1:1
GP-BDD-FVIII (IU/mL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
蔗糖	4	6	6	8	45	70
NaCl	12	12	10	10	8	3.50
CaCl ₂ (2H ₂ O)	0.33	0.33	0.33	0.33	0.50	0.50
甲硫氨酸	0.07	0.07	0.07	0.07	0.22	2.50
L-组氨酸	2.07	2.07	2.07	2.07	3.10	3.10
聚山梨酯20	0.13	0.13	0.13	0.13	0.40	0.40

重量摩尔渗透 压浓度	426 mOsm/kg	418 mOsm/kg	364 mOsm/kg	361 mOsm/kg	424 mOsm/kg	372 mOsm/kg
HMWP (冷冻 干燥之后)	1.2 %	0.9 %	0.7 %	0.6 %	0.7 %	0.9 %
HMWP (冷冻 干燥之前)	0.4%	0.4%	0.4%	0.4%	0.5%	0.7%

[0206] 表10.3中的数据显示出HMWP值的相对较小的变化。这表明当蔗糖浓度增加至70mg/mL时(制剂#6),NaCl可以减少超过10倍(制剂#1和#2在冷冻干燥前含有36mg/mL NaCl),而不损害冷冻干燥过程中GP-BDD-FVIII的稳定性。相反,发现NaCl浓度和蔗糖浓度均减小则降低了冷冻干燥和储存过程中GP-BDD-FVIII的稳定性(实施例9中呈现的数据)。

[0207] 冷冻干燥块具有良好的外观,坍塌的#5除外。进行附加研究以研究多种蔗糖和NaCl浓度下冷冻干燥块结构的稳定性(实施例19)。

[0208] 数据表明,如果使用蔗糖作为蛋白质稳定剂,则NaCl浓度可以显著减小以降低重量摩尔渗透压浓度,从而允许1:1重建。注意到与1mg NaCl相比,1mg蔗糖/mL水导致重量摩尔渗透压浓度的增加低得多,这是由于其较高的分子量以及非盐的事实(因此其不会离解为各自有助于增加重量摩尔渗透压浓度的单独的离子)。

[0209] 实施例11甘露醇的加入

[0210] 制备三种不同的含甘露醇的制剂(F9a、F9b和F9d),以研究甘露醇是否可用作NaCl

(和蔗糖)的潜在替代物。研究了甘露醇对冷冻干燥过程中形成HMWP的影响。GP-BDD-FVIII制剂含有如表11.3所示的赋形剂。这些制剂含有作为主要组分(按干物质的百分比)的蔗糖和甘露醇,以产生冷冻干燥制剂中的基质。制剂被设计为在重建之后的重量摩尔渗透压浓度 $<400\text{mOsm/kg}$ 。

[0211] 用表11.1和表11.2描述的两种不同的冷冻干燥程序测试制剂。

[0212] 表11.1:冷冻干燥程序

[0213]

工艺步骤	步骤	时间H: Min	温度 °C	报警压力	压力hPa ¹	渐变/保持步骤
加载	01	-	+5	-	环境压力	保持
平衡	02	01:00	+5	-	环境压力	保持
冷冻	03	01:00	-45	-	环境压力	渐变
冷冻	04	03:00	-45	-	环境压力	保持
退火	05	01:00	-8	-	环境压力	渐变
退火	06	12:00	-8	-	环境压力	保持
退火	07	01:00	-45	-	环境压力	渐变
退火	08	03:00	-45	-	环境压力	保持
抽真空	09	00:15	-45	0.1	0.05	渐变

[0214]

初级干燥	10	01:00	-30	0.1	0.05	渐变
初级干燥	11	45:00	-30	0.1	0.05	保持
次级干燥	12	10:00	+48	0.1	0.05	渐变
次级干燥	11	10:00	+48	0.1	0.05	保持

[0215] 总时间:约82:15小时

[0216] ¹MKS压力表,电容压力计

[0217] 表11.2:冷冻干燥程序

[0218]

工艺步骤	步骤	时间H:Min	温度°C	报警压力	压力hPa ¹	渐变/保持步骤
加载	01	-	+5	-	环境压力	保持
平衡	02	01:00	+5	-	环境压力	保持
冷冻	03	01:00	-45	-	环境压力	渐变
冷冻	04	03:00	-45	-	环境压力	保持
退火	05	01:00	-20	-	环境压力	渐变
退火	06	05:00	-20	-	环境压力	保持
退火	07	01:00	-45	-	环境压力	渐变
退火	08	03:00	-45	-	环境压力	保持
抽真空	09	00:15	-45	0.3	0.15	渐变
初级干燥	10	01:00	-25	0.3	0.15	渐变
初级干燥	11	25:00	-25	0.3	0.15	保持
次级干燥	12	10:00	+48	0.3	0.15	渐变
次级干燥	11	06:00	+48	0.3	0.15	保持

[0219] 总时间:约57小时

[0220] ¹MKS压力表,电容压力计

[0221] (表11.4中的)HMWP数据表明,对于两个测试的冷冻干燥程序(表11.1和表11.2),与不含甘露醇的制剂(参见表10.3中呈现的数据)相比,含有甘露醇的制剂具有较高的HMWP百分比。

[0222] 发现对于含甘露醇的制剂(表11.3中的F9a、F9b、F9d),与低蔗糖(10mg/mL蔗糖+25mg/mL甘露醇)相比,高蔗糖(20mg/mL蔗糖+20mg/mL甘露醇)导致较低的HMWP百分比。这与实施例10中的观察结果一致,表明蔗糖是冷冻干燥过程中的稳定赋形剂。

[0223] 表11.3:制备三种不同的含甘露醇的GP-BDD-FVIII制剂(#F9a、#F9b和#F9d),并在本实施例中呈现为F9a、F9b和F9d。

[0224]

制剂	F9a	F9b	F9d
GP-BDD-FVIII (U/mL)	1000	2000	2000
蔗糖 (mg/mL)	10	10	20
NaCl (mg/mL)	3.5	3.5	3.5
甘露醇 (mg/mL)	25	25	20
CaCl ₂ (2H ₂ O) (mg/mL)	0.5	0.5	0.5
甲硫氨酸 (mg/mL)	2.5	2.5	2.5
L-组氨酸	1.55	1.55	1.55
聚山梨酯20 (mg/mL)	0.4	0.4	0.4
估算的重量摩尔渗透压 浓度 (mOsm)	333	333	335

[0225] 表11.4: 在冷冻干燥 (FD) 之前和FD之后以及在40℃下储存1个月之后, 通过SE-HPLC量化的制剂9a、9b和9d中的HMWP%。

[0226]

制剂	F9a	F9b	F9d
FD之前的HMWP	0.8 %	1.3 %	1.1 %
FD (FD程序11.1) 之后的HMWP	2.1 %	2.3 %	1.6 %
40℃下1个月 (FD程序11.1) 之后的HMWP	2.8 %	3.4 %	1.8 %

[0227]

FD (FD程序11.2) 之后的HMWP	5.6 %	4.7 %	2.8 %
40℃下1个月 (FD程序11.2) 之后的HMWP	6.7 %	5.3 %	3.3 %

[0228] 实施例12海藻糖对GP-BDD-FVIII的稳定作用

[0229] 制备四种制剂 (制剂#63、#64、#65、#66) 来研究海藻糖的潜在稳定作用。这些制剂含有0.5mg/mL GP-BDD-FVIII (约5000U/mL)、3.5mg/mL NaCl、2mg/mL CaCl₂ • 2H₂O、1.6mg/mL组氨酸、2.5mg/mL甲硫氨酸、15mg/mL蔗糖、0.2mg/mL吐温20, pH 7。这些制剂在海藻糖浓度方面不同, 分别为: 60mg/mL、80mg/mL、90mg/mL和100mg/mL。

[0230] 这些制剂没有被冷冻干燥, 而是作为液体样品在50℃下进行应激 (stress) 30分钟, 以比较热暴露过程中GP-BDD-FVIII的物理稳定性。通过SE-HPLC分析样品在热暴露之前和之后的HMWP%量化。数据示于表12.1中。

[0231] 表12.1四种不同的含海藻糖的制剂的HMWP%

[0232]

	具有 60 mg/mL 海藻糖的制剂 #63	具有 80 mg/mL 海藻糖的制剂 #64	具有 90 mg/mL 海藻糖的制剂 #65	具有 100 mg/mL 海藻糖的制剂 #66
应激之前的 HMWP%	*未分析	1.8 %	1.8 %	1.8 %
50°C 下 30 min 之后的 HMWP%	7.9 %	6.5 %	4.8 %	4.2 %

[0233] *在该样品的分析过程中由于色谱问题而未量化HMWP

[0234] 观察到海藻糖的明确的稳定作用,其表现为在接受应激的样品中HMWP%较低(在海藻糖的浓度增加时)。

[0235] 实施例13组氨酸对GP-BDD-FVIII的稳定作用

[0236] 制备三种制剂(制剂#54、#55、#56)来研究组氨酸的潜在稳定作用。这些制剂含有0.5mg/mL GP-BDD-FVIII(约5000U/mL)、3.5mg/mL NaCl、2mg/mL CaCl₂·2H₂O、2.5mg/mL甲硫氨酸、70mg/mL蔗糖、0.2mg/mL吐温20,pH 7。这些制剂在组氨酸浓度方面不同,分别为:3mg/mL、5mg/mL和7mg/mL。

[0237] 这些制剂没有被冷冻干燥,而是作为液体样品在50°C下进行应激(stress)30分钟,以比较热暴露过程中GP-BDD-FVIII的物理稳定性。通过SE-HPLC分析样品在热暴露之前和之后的HMWP%量化。数据示于表13.1中。

[0238] 表13.1四种不同的含组氨酸的制剂的HMWP%

[0239]

	具有 3 mg/mL 组 氨酸的制剂#54	具有 5 mg/mL 组氨 酸的制剂#55	具有 7 mg/mL 组氨 酸的制剂#56
应激之前的 HMWP%	1.9 %	1.8 %	1.8 %
50°C 下 30 min 之后的 MWP%	7.4 %	5.8 %	4.2 %

[0240] 观察到组氨酸的明确的稳定作用,其表现为在接受应激的样品中HMWP%较低(在组氨酸的浓度增加时)。相反,在暴露于相同应激条件的类似制剂中没有观察到精氨酸、谷氨酰胺和琥珀酸盐的作用。

[0241] 实施例14两种不同脱气过程的作用

[0242] 在开始冷冻干燥过程之前施加60分钟的脱气时间以及在进行/不进行用氮气平衡至大气压的情况下,研究了脱气过程对GP-BDD-FVIII氧化的影响。根据表25.1中描述的程

序将所有制剂冷冻干燥。GP-BDD-FVIII制剂含有：2000IU/mL GP-BDD-FVIII、3.5mg/mL NaCl、0.5mg/mL CaCl₂、1.55mg/mL L-组氨酸、2.5mg/mL甲硫氨酸、70mg/mL蔗糖和0.4mg/mL聚山梨酯20。

[0243] 将装有液体制剂的小瓶放置在冷冻干燥器的架子上,并将架子冷却至5℃。在冷冻步骤前根据以下过程将制剂在两个单独的冷冻干燥器中脱气:

[0244] 冷冻干燥器1:通过在+20℃下在60分钟期间施加低压(100mbar)从液体中去除氧气。用氮气将压力平衡至1atm(1013mbar)。在冷冻步骤之前该脱气过程只进行一次。

[0245] 冷冻干燥器2:通过在+20℃下在60分钟期间施加低压(100mbar)从液体中去除氧气。在冷冻步骤之前该脱气过程只进行一次。冷冻步骤在脱气过程之后立即开始,而不将压力升至大气压。

[0246] 表14.1在压力平衡/不平衡至1atm(1013mbar)的情况下脱气1次60分钟的GP-BDD-FVIII冷冻干燥制剂中氧化蛋白质的百分比。

[0247]

用于 RP-HPLC 分析的样品	氧化形式的含量 (%)	
	进行平衡	不进行平衡
在配制为药物产品之前的药物物质	2.3	2.3
冷冻干燥之前	2.3	2.3
冷冻干燥之后 T=0	2.5	2.6
冷冻干燥小瓶在+40℃下储存3周	4.4	4.5

[0248] 数据显示,与2次各20分钟的脱气时间相比,使用60分钟的脱气时间得到更高含量的氧化形式。此外,数据显示,是否平衡至大气压对于氧化形式的含量是不重要的。

[0249] 实施例15具有糖-HEP化-BDD-FVIII的皮下制剂

[0250] 在一个实验中,冷冻干燥不同强度的多种长效FVIII分子并进行研究。所研究的长效FVIII蛋白质为:GP-BDD-FVIII和HEP化形式的相同BDD FVIII分子(糖-HEP化的、B结构域缺失的FVIII,GH-BDD-FVIII)。

[0251] 与在先前的实施例中不同,将该实施例中的蛋白质纯化并在配制工作前储存在高盐缓冲液中:12mg/mL蔗糖、36mg/mL NaCl、1mg/mL CaCl₂、6mg/mL L-组氨酸、0.22mg/mL甲硫氨酸、0.4mg/mL吐温80。将蛋白质的缓冲更换为含有以下物质的缓冲液:70mg/mL蔗糖、3.5mg/mL NaCl、0.5mg/mL CaCl₂、1.55mg/mL L-组氨酸、2.5mg/mL甲硫氨酸、0.4mg/mL聚山梨酯20。将蛋白质浓缩至约9000IU/mL(储备溶液)。通过稀释9000IU/mL储备溶液制备不同强度(250IU/mL、2000IU/mL、6000IU/mL)的FVIII分子。

[0252] 根据表15.1中描述的程序将所有蛋白质溶液冷冻干燥。在冷冻步骤前根据以下过程将制剂在冷冻干燥器中脱气:通过在+20℃下在20分钟期间施加低压(100mbar)从液体中

去除氧气。用氮气将压力平衡至1atm(1013mbar)。在冷冻步骤之前该过程重复两次。

[0253] 表15.1,冷冻干燥程序

[0254]

工艺步骤	步骤	时间 H: Min	°C	报警压力	压力 hPa ¹	渐变/保持步骤
加载	01	-	+5	-	环境压力	保持
平衡	02	01:00	+5	-	环境压力	保持
冷冻	03	01:00	-45	-	环境压力	渐变
冷冻	04	03:00	-45	-	环境压力	保持
退火	05	01:00	-8	-	环境压力	渐变
退火	06	12:00	-8	-	环境压力	保持
退火	07	01:00	-45	-	环境压力	渐变
退火	08	03:00	-45	-	环境压力	保持
抽真空	09	00:15	-45	0.1	0.05	渐变
初级干燥	10	01:00	-30	0.1	0.05	渐变
初级干燥	11	45:00	-30	0.1	0.05	保持

[0255]

工艺步骤	步骤	时间 H: Min	°C	报警压力	压力 hPa ¹	渐变/保持步骤
次级干燥	12	14:00	+40	0.1	0.05	渐变
次级干燥	11	12:00	+40	0.1	05	保持

[0256] 总时间:约94小时

[0257] ¹MKS压力表,电容压力计

[0258] 在冷冻干燥前向小瓶中装入1mL制剂。在冷冻干燥之后,将冷冻干燥制剂用1mL 10mM组氨酸缓冲液重建,并通过SE-HPLC分析以量化聚集蛋白质的含量(HMWP%)。这些数据示于表15.2中。

[0259] 表15.2,在冷冻干燥之前和冷冻干燥之后,GP-BDD-FVIII和GH-BDD-FVIII制剂中以HMWP%表示的蛋白质聚集体的含量。

[0260]

通过 SE-HPLC 测定的 HMWP%	GP-BDD-FVIII			GH-BDD-FVIII		
	250 IU/小 瓶	2000 IU/小 瓶	6000 IU/小 瓶	250 IU/ 小瓶	2000 IU/小 瓶	6000 IU/小 瓶
冷冻干燥之前	1.6%	2.3%	2.9%	2.2%	1.7%	2.3%
在冷冻干燥并在-80°C 下储 存冷冻干燥小瓶 4 周之后	2.1%	3.2%	4.6%	1.5%	1.8%	3.3%

[0261] 观察到可以配制不同的长效FVIII分子 (GP-BDD-FVIII和GH-BDD-FVIII), 并将其冷冻干燥为含有高强度 (6000IU/mL)、高浓度的蔗糖和低重量摩尔渗透压浓度 (350-400mOsm/kg, 在冷冻干燥之前和重建之后) 的 (皮下) 制剂。

[0262] 实施例16脱气、甲硫氨酸的加入和FVIIIILC氧化的减少

[0263] 在一个实验中, 制备含有1000IU/mL GP-BDD-FVIII、70mg/mL蔗糖、3.5mg/mL NaCl、0.5mg/mL CaCl₂、1.55mg/mL L-组氨酸、0.4mg/mL聚山梨酯20的冷冻干燥制剂, 其具有不同浓度的甲硫氨酸: 0.25、0.5、1、2.5、5、7.5、10mg/mL。

[0264] 将制剂装入填充体积为1mL的冷冻干燥小瓶中。根据表15.1中描述的程序将制剂冷冻干燥。在进行和不进行预先脱气的情况下将所有制剂均冷冻干燥。在冷冻步骤前根据实施例15中描述的过程在冷冻干燥器中进行脱气。

[0265] 在冷冻干燥之后, 将小瓶在-80°C、+30°C和+40°C三种不同的温度下储存1个月。在储存之后, 将冷冻干燥制剂用1mL pH 6.0的组氨酸缓冲液重建, 并直接通过SE-HPLC分析以量化聚集蛋白质的含量 (HMWP%)。将重建的制剂的等分试样在-80°C下储存, 直到通过RP-HPLC分析进行蛋白质氧化的量化 (氧化形式%)。数据示于表16.1 (HMWP%)、表16.2 (在冷冻干燥前未脱气的制剂中的氧化形式%) 和表16.3 (在经脱气的制剂中的氧化形式%)。

[0266] 表16.1, 在冷冻干燥之前和冷冻干燥之后, GP-BDD-FVIII制剂中以HMWP%表示的蛋白质聚集体的含量。显示了冷冻干燥之后在不同温度下储存的具有不同甲硫氨酸浓度的六种制剂的HMWP%。

[0267]

HMWP% (甲硫氨酸)	0.25 mg/mL	1 mg/mL	2.5 mg/mL	5 mg/mL	7.5 mg/mL	10 mg/mL
冷冻干燥之前	1.5 %	1.5 %	1.5 %	1.5 %	1.5 %	1.4 %
-80°C 下 1 个月 (在冷冻干燥之前脱气)	1.6 %	1.5 %	1.6 %	1.6 %	1.7 %	2.4 %
-80°C 下 1 个月 (在不进行预先脱气的情况下冷冻干燥)	1.7 %	1.6 %	1.6 %	1.7 %	1.8 %	2.1 %
+30°C 下 1 个月 (在冷冻干燥之前脱气)	1.8 %	1.7 %	1.7 %	1.9 %	2.0 %	2.4 %
+30°C 下 1 个月 (在不进行预先脱气的情况下冷冻干燥)	1.8 %	1.7 %	1.7 %	1.8 %	1.9 %	2.2 %

[0268]

行预先脱气的情况下冷冻干燥)						
+40°C 下 1 个月 (在冷冻干燥之前脱气)	1.8 %	1.7 %	1.8 %	2.0 %	2.3 %	2.5 %
+40°C 下 1 个月 (在不进行预先脱气的情况下冷冻干燥)	1.9 %	1.7 %	1.8 %	1.9 %	2.2 %	2.4 %

[0269] 在冷冻干燥之前和之后,在研究的整个甲硫氨酸浓度范围内观察到低百分比的聚集蛋白质(HMWP% < 3%)。然而,在冷冻干燥之后,在含有最高甲硫氨酸浓度的制剂中观察到最高的HMWP量。数据显示,就限制HMWP形成而言,最佳甲硫氨酸浓度为0.25-7.5mg/mL。数据进一步显示,在冷冻干燥前脱气对GP-BDD-FVIII聚集没有影响。

[0270] 表16.2,在冷冻干燥之前和冷冻干燥之后,GP-BDD-FVIII制剂中以氧化形式%表示的氧化蛋白质的含量。在冷冻干燥前未进行脱气

[0271]

氧化形式% (甲硫氨酸)	0.25 mg/mL	1 mg/mL	2.5 mg/mL	5 mg/mL	7.5 mg/mL	10 mg/mL
冷冻干燥之前	2.8%	2.8%	2.7%	2.7%	2.7%	2.8%
-80°C 下 1 个月 (在不进行预先脱气的情况下冷冻干燥)	3.5%	3.3%	3.1%	2.9%	3%	2.9%
+30°C 下 1 个月 (在不进行预先脱气的情况下冷冻干燥)	5.3%	5.6%	5.0%	4.1%	3.9%	3.4%
+40°C 下 1 个月 (在不进行预先脱气的情况下冷冻干燥)	7.0%	6.2%	6.4%	4.8%	4.4%	4.2%

[0272] 表16.2中的数据显示,当储存温度升高时冷冻干燥之后的FVIII氧化(氧化形式%)增加(数据的纵向比较),而当甲硫氨酸的浓度增加时该氧化减少(数据的横向比较)。

[0273] 在30°C和40°C下储存时,在冷冻干燥前脱气对于减少GP-BDD-FVIII氧化是必要的(尤其当甲硫氨酸浓度低时)。比较表16.2中的数据(在冷冻干燥前未脱气的制剂)与表16.3中的数据(经脱气的制剂)可见,显然脱气减少了FVIII氧化。GP-BDD-FVIII的氧化主要在升高的温度下储存的过程中发生,但在制剂未脱气且含有少于5mg/mL甲硫氨酸的情况下也在冷冻干燥过程中或在80°C下观察到GP-BDD-FVIII的氧化。

[0274] 数据表明,脱气和甲硫氨酸对于所研究的冷冻干燥制剂的储存稳定性是必需的。

[0275] 这些系列数据中的一个数据点可能会受到质疑。含有10mg/mL甲硫氨酸的制剂(在冷冻干燥之前脱气并在30°C下储存1个月)中氧化形式的含量高于预期,并且似乎是在例如贴标签过程中发生了操作错误。

[0276] 表16.3,在冷冻干燥之前和冷冻干燥之后,GP-BDD-FVIII制剂中以氧化形式%表示的氧化蛋白质的含量。冷冻干燥包括样品的脱气

[0277]

氧化形式% (甲硫氨酸变化)	0.25 mg/mL	1 mg/mL	2.5 mg/mL	5 mg/mL	7.5 mg/mL	10 mg/mL
冷冻干燥之前	2.8%	2.8%	2.7%	2.7%	2.7%	2.8%
-80°C 下 1 个月 (在冷冻干燥之前脱气)	2.9%	3.0%	2.8%	2.8%	2.9%	2.8%
+30°C 下 1 个月 (在冷冻干燥之前脱气)	4.1%	3.3%	3.3%	3.2%	3.1%	(4.2%)
+40°C 下 1 个月 (在冷冻干燥之前脱气)	5.1%	4.2%	4.0%	3.8%	4%	3.2%

[0278] 实施例17 CaCl_2 的稳定作用

[0279] 在一个实验中,制备含有GP-BDD-FVIII、70mg/mL蔗糖、3.5mg/mL NaCl 、2.5mg/mL甲硫氨酸、1.55mg/mL L-组氨酸、0.4mg/mL聚山梨酯20的冷冻干燥制剂,其具有不同浓度的 CaCl_2 :1.2mM、2.3mM、4.1mM、6.8mM、12.2mM (0.17mg/mL、0.34mg/mL、0.6mg/mL、1mg/mL和1.8mg/mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。制剂含有0.11mg/mL或0.17mg/mL GP-BDD-FVIII (由表17.1中的数据显示)。

[0280] 将制剂装入填充体积为1mL的冷冻干燥小瓶中。根据表15.1中描述的程序将制剂冷冻干燥。所有制剂均暴露于预先脱气。在冷冻步骤前根据实施例15中描述的过程在冷冻干燥器中进行脱气。

[0281] 在冷冻干燥之后,将小瓶在-80°C、+30°C和+40°C三种不同的温度下储存1个月。在储存之后,将冷冻干燥制剂用1mL pH 6.0的组氨酸缓冲液重建,并直接通过SE-HPLC分析以量化聚集蛋白质的含量(HMWP%)。

[0282] 表17.1,在冷冻干燥之前和之后在GP-BDD-FVIII制剂中的蛋白质聚集体含量(HMWP%)。显示了五种具有不同 CaCl_2 浓度的制剂的HMWP%。冷冻干燥制剂在不同温度下储存。

[0283]

HMWP%	CaCl ₂ 浓度:	1.2 mM	2.3 mM	4.1 mM	6.8 mM	12.2 mM
	GP-BDD-FVIII 浓度:	0.11 mg/mL	0.11 mg/mL	0.17 mg/mL	0.17 mg/mL	0.17 mg/mL
冷冻干燥之前		2.14 %	2.09 %	1.91 %	1.77 %	1.63 %
冷冻干燥小瓶在-80°C 下储存 1 个月		2.60 %	2.37 %	2.02 %	1.78 %	1.63 %
冷冻干燥小瓶在+30°C 下储存 1 个月		2.73 %	2.42 %	2.05 %	1.79 %	1.63 %
冷冻干燥小瓶在+40°C 下储存		2.80 %	2.48 %	2.09 %	1.78 %	1.64 %

[0284]

1 个月					
------	--	--	--	--	--

[0285] CaCl₂的增加使GP-BDD-FVIII在冷冻干燥过程中和冷冻干燥GP-BDD-FVIII制剂的储存过程中稳定。在本研究中CaCl₂从1.2mM增加至12.2mM,并且数据表明,在具有6.8mM CaCl₂ (1mg/mL CaCl₂ • 2H₂O) 的制剂中,较高的GP-BDD-FVIII聚集不受冷冻干燥以及在升高的温度下储存1个月的影响。

[0286] 实施例18吐温20浓度的变化

[0287] 在一个实验中,制备含有2000IU/mL GP-BDD-FVIII、70mg/mL蔗糖、3.5mg/mL NaCl、2.5mg/mL甲硫氨酸、1.55mg/mL L-组氨酸、3.4mg/mL CaCl₂的冷冻干燥制剂,其具有不同浓度的吐温20(聚山梨酯20):0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL和0.4mg/mL。

[0288] 将制剂装入填充体积为1mL的冷冻干燥小瓶中。根据实施例15中描述的过程在冷冻干燥前将制剂脱气。根据表15.1中描述的程序将制剂冷冻干燥。

[0289] 在冷冻干燥之后,将小瓶在-80°C、+30°C和+40°C三种不同的温度下储存1个月。在储存之后,将冷冻干燥制剂用1mL pH 6.0的组氨酸缓冲液重建,并直接通过SE-HPLC分析以量化蛋白质浓度(以mg/mL为单位的GP-BDD-FVIII)和聚集蛋白质的含量(HMWP%)。将重建的制剂的等分试样在-80°C下储存,直到通过RP-HPLC分析进行蛋白质氧化的量化(氧化形式%)。数据示于表18.1(HMWP%)、表18.2(蛋白质浓度)和18.3(氧化形式%)。

[0290] 表18.1GP-BDD-FVIII制剂中的HMWP%。显示了四种制剂(吐温20浓度不同)在冷冻干燥之前和之后以及在不同温度下储存1个月之后的HMWP%。

[0291]

HMWP%	0.1 mg/mL	0.2 mg/mL	0.3 mg/mL	0.4 mg/mL
	吐温 20	吐温 20	吐温 20	吐温 20

[0292]

冷冻干燥之前	2.3 %	2.5 %	2.2 %	2.1 %
冷冻干燥小瓶在-80°C 下储存 1 个月	2.2 %	2.3 %	2.3 %	2.4 %
冷冻干燥小瓶在+30°C 下储存 1 个月	2.4 %	2.4 %	2.5 %	2.5 %
冷冻干燥小瓶在+40°C 下储存 1 个月	2.5 %	2.5 %	2.6 %	2.6 %

[0293] 表18.2在冷冻干燥之前以及在冷冻干燥并重建之后的GP-BDD-FVIII浓度。制剂含有四种不同的吐温20浓度并且在所示的三种不同温度下储存1个月。

[0294]

[GP-BDD-FVIII]	0.1 mg/mL 吐温 20	0.2 mg/mL 吐温 20	0.3 mg/mL 吐温 20	0.4 mg/mL 吐温 20
冷冻干燥之前	0.22 mg/mL	0.23 mg/mL	0.23 mg/mL	0.23 mg/mL
冷冻干燥小瓶在-80°C 下储存 1 个月	0.22 mg/mL	0.22 mg/mL	0.22 mg/mL	0.22 mg/mL
冷冻干燥小瓶在+30°C 下储存 1 个月	0.22 mg/mL	0.22 mg/mL	0.22 mg/mL	0.22 mg/mL
冷冻干燥小瓶在+40°C 下储存 1 个月	0.22 mg/mL	0.22 mg/mL	0.22 mg/mL	0.22 mg/mL

[0295] 表18.3在含有不同浓度的吐温20的GP-BDD-FVIII冷冻干燥制剂中氧化蛋白质的百分比

[0296]

氧化形式%	0.1 mg/mL 吐温 20	0.2 mg/mL 吐温 20	0.3 mg/mL 吐温 20	0.4 mg/mL 吐温 20
冷冻干燥之前	2.4 %	2.3 %	2.4 %	2.4 %

[0297]

冷冻干燥小瓶在-80°C 下储存 1 个月	2.5 %	2.5 %	2.5 %	2.5 %
冷冻干燥小瓶在+30°C 下储存 1 个月	3.1 %	3.1 %	3.0 %	3.0 %
冷冻干燥小瓶在+40°C 下储存 1 个月	3.0 %	3.0 %	3.2 %	2.9 %

[0298] HMWP、蛋白质浓度和蛋白质氧化不受吐温20浓度在所研究的浓度范围0.1-0.4mg/mL内变化的影响。

[0299] 实施例19NaCl和蔗糖之比对冷冻干燥块结构的影响

[0300] 在一个实验中,制备含有2.5mg/mL甲硫氨酸、1.55mg/mL L-组氨酸、0.4mg/mL聚山梨酯20的冷冻干燥安慰剂制剂,其具有如下表所示的不同浓度的CaCl₂、NaCl和蔗糖。制备这些制剂是为了研究冷冻干燥块的外观。

[0301] 将制剂装入填充体积为1mL的冷冻干燥小瓶中。根据表15.1中描述的程序将制剂冷冻干燥。不进行预先脱气步骤。

[0302] 在冷冻干燥之后,将小瓶在5°C下储存。在冷冻干燥之后以及在储存2年之后对小瓶进行目视检查,以评价冷冻干燥块的外观。结果呈现在表19.1和表19.2中。

[0303] 表19.1,显示了冷冻干燥安慰剂制剂在室温下储存2年之后的目视外观。外观良好的块结构用“+”表示,坍塌或部分坍塌的块结构用“-”表示,而未测试的制剂用“NT”表示。

[0304]

NaCl (mg/mL)	2.5	2.9	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5
CaCl ₂ 0.5 mg/mL, 蔗糖 48 mg/mL	+	+	+	+	-	-	-	-	-
CaCl ₂ 0.75 mg/mL, 蔗糖 48 mg/mL	NT	NT	+	+	-	NT	NT	NT	NT

[0305]

CaCl ₂ 0.5 mg/mL, 蔗糖 58 mg/mL	+	+	+	+	+	+	+	-	-
CaCl ₂ 0.75 mg/mL, 蔗糖 58 mg/mL	NT	NT	+	+	+	NT	NT	NT	NT
CaCl ₂ 0.5 mg/mL, 蔗糖 68 mg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CaCl ₂ 0.75 mg/mL, 蔗糖 68 mg/mL	NT	NT	+	+	-	NT	NT	NT	NT
CaCl ₂ 0.5 mg/mL, 蔗糖 78 mg/mL	+	+	+	+	+	+	+	-	+
CaCl ₂ 0.75 mg/mL, 蔗糖 78 mg/mL	NT	NT	+	+	+	NT	NT	NT	NT
CaCl ₂ 0.5 mg/mL, 蔗糖 88 mg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CaCl ₂ 0.75 mg/mL, 蔗糖 88 mg/mL	NT	NT	+	+	+	NT	NT	NT	NT
CaCl ₂ 0.5 mg/mL, 蔗糖 98 mg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CaCl ₂ 0.75 mg/mL, 蔗糖 98 mg/mL	NT	NT	+	+	+	NT	NT	NT	NT
CaCl ₂ 0.5 mg/mL, 蔗糖 108 mg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CaCl ₂ 0.75 mg/mL, 蔗糖 108 mg/mL	NT	NT	+	+	+	NT	NT	NT	NT
CaCl ₂ 0.5 mg/mL, 蔗糖 116 mg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CaCl ₂ 0.75 mg/mL, 蔗糖 116 mg/mL	NT	NT	+	+	+	NT	NT	NT	NT

[0306] 冷冻干燥并储存之后的小瓶的目视检查表明,68-116mg/mL逐渐增加的蔗糖浓度

提高了外观良好的冷冻干燥块的数目(不依赖于NaCl和CaCl₂)。当NaCl浓度“高”(4.5–6.5mg/mL)时观察到较低蔗糖浓度48–58mg/mL的FD(冷冻干燥)块坍塌(结果呈现在表19.1中)。因此,NaCl>5.5mg/mL和“低”蔗糖浓度≤58mg/mL的组合(表19.1)不能提供稳定的冷冻干燥块结构(不能提供外观良好的冷冻干燥块)。

[0307] 增加蔗糖/NaCl之比改善了冷冻干燥块结构。对于含有88mg/mL蔗糖且不含NaCl、含有81mg/mL蔗糖和0.75mg/mL NaCl、含有73

[0308] mg/mL蔗糖和1.5mg/mL NaCl、含有68mg/mL蔗糖和2.5mg/mL NaCl的制剂,没有观察到坍塌的冷冻干燥块。没有观察到在3.4–13.6mM(0.5–2mg/mL CaCl₂·2H₂O)范围内的CaCl₂对目视外观的影响(表19.2)。

[0309] 表19.2,显示了冷冻干燥安慰剂制剂在室温下储存2年之后的目视外观。外观良好的块结构用“+”表示,而坍塌或部分坍塌的块结构用“-”表示。

[0310]

蔗糖/NaCl (mg/mL)	88/0	81/0.75	73/1.5	68/2	63/2.5	58/3	53/3.5	48/4	43/4.5	38/6
CaCl ₂ (2·H ₂ O) 0.5 mg/mL	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
CaCl ₂ (2·H ₂ O) 0.75 mg/mL	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
CaCl ₂ (2·H ₂ O) 1 mg/mL	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
CaCl ₂ (2·H ₂ O) 1.5 mg/mL	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
CaCl ₂ (2·H ₂ O) 2 mg/mL	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

[0311] 实施例20GP-BDD-FVIII制剂和稳定性

[0312] 在一个实验中,制备含有0.2mg/mL和0.4mg/mL GP-BDD-FVIII的冷冻干燥制剂。赋形剂含量为:70mg/mL蔗糖、3.5mg/mL NaCl、2.5mg/mL甲硫氨酸、1.55mg/mL L-组氨酸、3.4mM CaCl₂、0.4mg/mL吐温20。将制剂装入填充体积为1mL的冷冻干燥小瓶中。根据表15.1中描述的程序将制剂冷冻干燥。在冷冻干燥前将所有制剂脱气。在冷冻步骤前根据实施例15中描述的过程在冷冻干燥器中进行脱气。

[0313] 冷冻干燥之后,将小瓶在+5℃、+30℃和+40℃三种不同的温度下储存,以研究若干个月内的稳定性。在预期的储存时间(1个月、3个月或6个月)之后,用1mL pH 6.0的组氨酸缓冲液重建冷冻干燥制剂,并直接分析。包括三种不同的分析方法:用于量化蛋白质聚集(HMWP%)的SE-HPLC、用于量化蛋白质氧化/FVIII LC氧化(氧化形式%)的RP-HPLC以及用于量化制剂中的FVIII活性的显色FVIII测定。在该测定中,在因子IXa、Ca²⁺和磷脂的存在下

激活因子X中,FVIII起辅因子的作用。因子Xa使显色底物(S-2765)水解,发色团pNA得到释放,并在读板仪上测量415nm处的吸光度。因子Xa和形成的pNA的量与所分析的样品中因子VIII的含量成比例。利用这种线性相关性,通过与平行分析的参考物进行比较来确定样品中活性因子VIII的含量。

[0314] 在冷冻干燥之前、冷冻干燥之后和储存之后,进行如下表数据所示的这些分析:表20.1(FVIII活性)、表20.2(HMWP%)、表20.3(氧化形式%)。

[0315] 表20.1,浓度为0.2mg/ml的GP-BDD-FVIII制剂中生物活性的分析。在冷冻干燥之后(在t=0时)和在+30℃下储存1、3和6个月之后进行分析。

[0316]	生物活性	GP-BDD-FVIII 0.2 mg/mL
	T=0	2250 IU/ml
	冷冻干燥小瓶在+30℃下储存1个月	2086 IU/ml
	冷冻干燥小瓶在+30℃下储存3个月	2297 IU/ml
	冷冻干燥小瓶在+30℃下储存6个月	2280 IU/ml

[0317] 所研究的制剂在30℃下储存至少6个月内提供完全活性的GP-BDD-FVIII。

[0318] 表20.2,具有两种不同浓度的GP-BDD-FVIII制剂中的HMWP%。在冷冻干燥之前、冷冻干燥之后(在t=0时)和在三种不同温度下储存1个月之后进行分析。

[0319]	HMWP%	GP-BDD-FVIII 0.2 mg/mL	GP-BDD-FVIII 0.4 mg/mL
	冷冻干燥之前	2.3 %	2.1 %
	T=0	2.5 %	3.1 %
	冷冻干燥小瓶在+5℃下储存1个月	2.8 %	2.9 %
	冷冻干燥小瓶在+30℃下储存1个月	2.5 %	3.1 %
	冷冻干燥小瓶在+40℃下储存1个月	2.3 %	2.8 %

[0320] 表20.3,具有两种不同浓度的GP-BDD-FVIII制剂中的氧化形式%。在冷冻干燥之前、冷冻干燥之后(在t=0时)、在三种不同温度下储存1个月和3个月之后进行分析。

[0321]

氧化蛋白质%	GP-BDD-FVIII 0.22 mg/mL	GP-BDD-FVIII 0.41 mg/mL
冷冻干燥之前	2.9 %	2.9 %
T=0	2.8 %	3.0 %
冷冻干燥小瓶在+5°C 下储存 1 个月	3.0 %	2.9 %
冷冻干燥小瓶在+30°C 下储存 1 个月	3.4 %	3.4 %
冷冻干燥小瓶在+40°C 下储存 1 个月	3.8 %	3.7 %
冷冻干燥小瓶在+5°C 下储存 3 个月	3.0 %	3.2 %
冷冻干燥小瓶在+30°C 下储存 3 个月	3.8 %	3.7 %
冷冻干燥小瓶在+40°C 下储存 3 个月	4.2 %	4.3 %

[0322] 所研究的制剂在不同的强度(蛋白质浓度)下提供GP-BDD-FVIII的稳定性。观察到两种研究强度的GP-BDD-FVIII在冷冻干燥过程中以及在冷冻干燥之后是稳定的。当比较0.2mg/mL药物产品(相当于约2000IU/mL)与0.4mg/mL药物产品(相当于约4000IU/mL)时,没有观察到冷冻干燥GP-BDD-FVIII的稳定性差异。在30°C下,氧化形式在三个月内增加了约1个百分点,而在40°C下,该值约为1.2-1.3个百分点。

[0323] 另外,FVIII活性数据表明,(适合于皮下给药的)冷冻干燥制剂中的GP-BDD-FVIII在30°C下储存至少6个月的过程中是完全活性的。

[0324] 实施例21具有与Fab片段糖缀合的FVIII的皮下制剂

[0325] 在一个实验中,冷冻干燥并研究了多种FVIII分子。所研究的FVIII蛋白质为:GP-BDD-FVIII和Fab-BDD-FVIII(其中抗体的Fab片段所附接的位置与GP-BDD-FVIII的PEG聚合物和GH-BDD-FVIII的HEP聚合物相同)。

[0326] 在冷冻干燥工作前,将Fab-BDD-FVIII以1124U/mL在含有3mg/mL蔗糖、18mg/mL NaCl、0.25mg/mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1.5mg/mL L-组氨酸、0.1mg/mL吐温80,pH7.3的缓冲液中冷冻储存。将GP-BDD-FVIII以5412U/mL在含有12mg/mL蔗糖、36mg/mL NaCl、1mg/mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、6mg/mL L-组氨酸、0.4mg/mL吐温80,pH6.9的缓冲液中冷冻储存。将两种蛋白质的缓冲液均更换为含有以下物质的缓冲液:70mg/mL蔗糖、3.5mg/mL NaCl、0.5mg/mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1.55mg/mL L-组氨酸、2.5mg/mL甲硫氨酸、0.4mg/mL吐温80。在缓冲液更换之后稀释GP-BDD-FVIII,使得这两种蛋白质均具有通过SE-HPLC确认的700IU/mL的强度和约0.07mg/mL的蛋白质浓度。

[0327] 将这两种制剂装入填充体积为1mL的冷冻干燥小瓶中。根据表15.1中描述的程序将制剂冷冻干燥。在冷冻干燥前将两种制剂脱气。在冷冻步骤前根据实施例15中描述的过程在冷冻干燥器中进行脱气。

[0328] 在冷冻干燥之后,对小瓶进行SE-HPLC分析以对HMWP%进行量化。

[0329] 表21.1.重建的GP-BDD-FVIII和Fab-BDD-FVIII冷冻干燥制剂中HMWP的百分比

[0330]

HMWP	GP-BDD-FVIII 700 IU/mL	Fab-BDD-FVIII 700 IU/mL
冷冻干燥之前	1.5%	0.19%
T=0	2.2%	0.26%

[0331] 这两种延长的FVIII分子均可以配制为皮下相关制剂,脱气,冷冻干燥,并且易于重建(填充体积:重建体积为1:1),而对HMWP%仅有很小的影响。

[0332] 实施例22蔗糖的作用

[0333] 在一个实验中,冷冻干燥制剂#3、#4、#5、#6、#7和#8含有2000 IU/mL GP-BDD-FVIII、3.5mg/mL NaCl、2.5mg/mL甲硫氨酸、1.55mg/mL L-组氨酸、0.1mg/mL聚山梨酯20、1mg/mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 以及不同量的蔗糖:40mg/mL (#3)、60mg/mL (#4)、70mg/mL (#5)、80mg/mL (#6)、90mg/mL (#7)、110mg/mL (#8)。制剂#1含有2000 IU/mL GP-BDD-FVIII、17mg/mL蔗糖、36mg/mL NaCl、0.6mg/mL甲硫氨酸、6mg/mL L-组氨酸、0.4mg/mL聚山梨酯20和1mg/mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,参见表22.1。

[0334] 表221

[0335]

制剂	#1	#3	#4	#5	#6	#7	#8
N8-GP	2000 IU/mL	2000 IU/mL	2000 IU/mL	2000 IU/mL	2000 IU/mL	2000 IU/mL	2000 IU/mL
蔗糖	17	40	60	70	80	90	110
NaCl	36	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5

[0336]

$\text{CaCl}_2 (2 \cdot \text{H}_2\text{O})$	1	1	1	1	1	1	1
L-组氨酸	6	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55
L-甲硫氨酸	0.6	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
吐温 20	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
pH 6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9

[0337] 将制剂装入填充体积为1mL的冷冻干燥小瓶中。根据表15.1中描述的程序将所有制剂冷冻干燥,并如实施例15中所述对这些小瓶中的一半进行预先脱气。

[0338] 冷冻干燥之后,对小瓶进行目视检查,并将其在-80℃、+30℃和+40℃三种不同的温度下储存3周。观察到几乎所有小瓶都含有外观良好的冷冻干燥块,含有制剂#3的冷冻干燥小瓶除外。含有制剂#3的大部分小瓶含有坍塌或部分坍塌的冷冻干燥块。

[0339] 储存之后,用1mL milliQ水重建冷冻干燥制剂,并直接通过冰点渗透压测定法进行分析以测量重量摩尔渗透压浓度(表22.2)。将重建的制剂的等分试样在-80℃下储存3周,直到通过RP-HPLC分析对氧化蛋白质(氧化形式%)进行量化,以及通过SE-HPLC分析对

HMWP%进行量化。这些HPLC数据示于表22.3、表22.4、表22.5中。

[0340] 表22.2,七种2000IU/mL GP-BDD-FVIII制剂在冷冻干燥之前以及在冷冻干燥(包括脱气)并重建之后的重量摩尔渗透压浓度。以上描述了制剂#1-#8的含量。

[0341]

制剂	#1	#3	#4	#5	#6	#7	#8
重建后的重量摩尔渗透压浓度 (mOsm/kg)	1252	280	345	374	406	438	510

[0342] 表22.3,七种2000IU/mL GP-BDD-FVIII制剂中的HMWP%。在冷冻干燥之前、在冷冻干燥并且冷冻干燥小瓶在-80℃、30℃和40℃下储存3周之后对HMWP%进行量化。

[0343]

HMWP%	#1	#3	#4	#5	#6	#7	#8
冷冻干燥之前	1.6%	2.1%	1.9%	1.9%	1.9%	1.9%	1.9%
-80℃下3周	1.9%	20%	21%	20%	20%	2.1%	2.0%
+30℃下3周	2.0%	2.1%	2.0%	2.0%	2.0%	2.0%	2.0%
+40℃下3周	2.0%	2.0%	19%	1.9%	1.8%	1.8%	1.7%

[0344] 制剂#1的重量摩尔渗透压浓度非常高,并且该制剂不适合于皮下给药。

[0345] 对于在冷冻干燥之前和冷冻干燥并储存之后均进行分析的所有制剂,GP-BDD-FVIII的SE-HPLC色谱图非常类似。对于F1(含有高NaCl浓度以及低蔗糖浓度)观察到与冷冻干燥相关的色谱变化最大。观察到F1的HMWP%增加量最高。

[0346] 具有40mg/mL蔗糖的制剂F3坍塌。F4-F8制剂的SE-HPLC色谱图之间的相似性表明,当研究的制剂含有1.55mg/ml L-组氨酸、1mg/mL CaCl₂、2.5mg/mL甲硫氨酸、3.5mg/mL NaCl和0.1mg/mL吐温20时,蔗糖(60-110mg/mL)不影响冷冻干燥制剂中的HMWP%(示于表22.3中)、单体%和LMWP%。

[0347] 表22.4,七种2000IU/mL GP-BDD-FVIII制剂中的氧化蛋白质%。在冷冻干燥之前、在冷冻干燥并在-80℃、30℃和40℃下储存3周之后对氧化蛋白质的百分比进行量化。制剂在冷冻干燥前进行脱气。

[0348]

氧化蛋白顶%	#1	#3	#4	#5	#6	#7	#8
冷冻干燥之前	1.9%	2.1%	2.2%	2.2%	2.2%	2.1%	2.1%
-80℃下3周	2.3%	2.4%	2.5%	2.5%	2.4%	2.4%	2.6%
+30℃下3周	2.3%	2.9%	2.9%	2.9%	2.8%	3.2%	3.0%
+40℃下3周	2.5%	3.3%	3.4%	3.3%	3.6%	3.5%	3.7%

[0349] 表22.5,八种2000IU/mL GP-BDD-FVIII制剂中的氧化蛋白质%。在冷冻干燥之前、在冷冻干燥并且冷冻干燥小瓶在30℃和40℃下储存(1个月)之后对氧化蛋白质的百分比进行量化。制剂在冷冻干燥前未进行脱气。

[0350]

氧化蛋白质%	#1	#3	#4	#5	#6	#7	#8
冷冻干燥之前	1.9%	2.1%	2.2%	2.2%	2.2%	2.1%	2.1%
-80℃下3周	2.3%	3.1%	2.9%	3.1%	3.0%	3.0%	3.2%
+30℃下3周	2.5%	5.1%	4.8%	4.5%	4.8%	5.2%	5.3%
+40℃下3周	2.6%	6.4%	6.0%	6.5%	7.4%	7.5%	7.9%

[0351] 数据意外地表明,只有在NaCl浓度从高浓度(例如36mg/mL)降低至低浓度(例如3.5mg/mL)的情况下,制剂才需要脱气。当比较表22.4与表22.5中的数据时,观察到制剂#1的氧化形式%之间仅有微小的差异。

[0352] 相反,表22.4与表22.5中数据的比较显示了制剂#3-#8的脱气对于蛋白质氧化的显著影响,如同在其他研究中观察到的(实施例6和实施例7)。当制剂在冷冻干燥前未进行脱气时,观察到在30℃和40℃下储存之后,这些制剂中GP-BDD-FVIII氧化形式的百分比大幅增加。

[0353] 出乎意料的是,FVIII的氧化形式的含量与蔗糖浓度有关(主要针对40℃下储存的制剂)。蔗糖的含量越高,氧化形式的含量越高。这一趋势对于在冷冻干燥前未进行脱气且在40℃下储存的制剂最为明显。由此证明蔗糖增加冷冻干燥制剂中氧化FVIII形式的量。然而,经过脱气后,蔗糖可用作稳定赋形剂,以允许在重建为小体积之后具有低重量摩尔渗透压浓度。

[0354] 实施例23重建之后的使用稳定性/稳定性

[0355] 该实施例通过研究与实施例22中描述的相同的制剂而涉及先前的实施例(实施例22),但本实施例聚焦于重建之后的HMWP形成。将已在40℃下储存3周以及重建并在重建后在-80℃下储存(如实施例22中描述的)的冷冻干燥GP-BDD-FVIII制剂#1、#3-#8(实施例22中描述的)解冻并置于40℃下,随后在40℃下4小时后通过SE-HPLC分析以进行HMWP量化。

[0356] 表23.1. 八种2000IU/mL GP-BDD-FVIII制剂中的HMWP%。在冷冻干燥制剂储存(在40℃下3周)之后以及在重建的制剂额外储存(在40℃下4小时)之后对HMWP%进行量化。

[0357]

HMWP%	#1	#3	#4	#5	#6	#7	#8
+40℃下3周(也呈现在实施例22中)	2.0%	2.0%	1.9%	1.9%	1.8%	1.8%	1.7%
重建的产品在40℃下4小时	3.4%	3.0%	2.8%	2.9%	2.7%	2.6%	2.4%

[0358] 数据表明,HMWP在40℃下(重建的制剂的)储存过程中略微增加,并且这一增加量在蔗糖浓度增加时较低。这表明与具有高NaCl浓度(和高重量摩尔渗透压浓度)的制剂的使用稳定性相比,具有高浓度蔗糖的皮下GP-BDD-FVIII制剂的使用稳定性增加。

[0359] 实施例24填充体积/重建体积:0.3、0.5和0.8mL

[0360] 在一个实验中,制备含有250、1500和3500IU/mL GP-BDD-FVIII的冷冻干燥制剂,其具有70mg/mL蔗糖、3.5mg/mL NaCl、2.5mg/mL甲硫氨酸、1.55mg/mL L-组氨酸、0.4mg/mL聚

山梨酯20和0.5mg/mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

[0361] 向具有上述制剂的冷冻干燥小瓶中装入不同的体积(填充体积):0.3mL、0.5mL、0.8mL。

[0362] 根据表15.1中描述的程序将所有蛋白质溶液冷冻干燥。在进行预先脱气的情况下将所有制剂冷冻干燥。实施例15中描述了脱气过程。

[0363] 在冷冻干燥之后,通过目视检查评估所有小瓶,并确认在任何小瓶中都没有观察到块坍塌。随后用与相应填充体积(0.3、0.5或0.8mL)相同的体积的10mM组氨酸重建所有冷冻干燥制剂。通过SE-HPLC分析重建的制剂以对HMWP百分比进行量化,数据呈现在表24.1中。

[0364] 表24.1,具有三种不同强度和三种不同填充体积的制剂中的HMWP%。在冷冻干燥之前和之后($t=0$)对HMWP%进行量化。

[0365]

HMWP%	250IU/mL	1500IU/mL	3500IU/mL
冷冻干燥之前	1.6%	2.1%	2.2%
$t=0$, 填充体积0.3mL	1.6%	2.2%	2.2%
$t=0$, 填充体积0.5mL	1.7%	2.3%	2.3%
$t=0$, 填充体积0.8mL	1.7%	2.3%	2.3%

[0366] 表24.1中的数据表明,填充体积(每只小瓶的体积)对冷冻干燥过程中形成的HMWP%没有影响。

[0367] 数据进一步表明,在冷冻干燥之前和之后的HMWP%在含有250IU/mL的制剂中较低(与较高的强度相比)。然而,对于1500IU/mL和3500IU/mL, HMWP%是类似的。这与实施例20中的观察结果一致。

[0368] 实施例25备选的脱气过程

[0369] 研究了脱气过程对GP-BDD-FVIII的氧化的影响。在该实施例中,GP-BDD-FVIII制剂含有:2000IU/mL GP-BDD-FVIII、3.5mg/mL NaCl 、0.5mg/mL CaCl_2 、1.55mg/mL L-组氨酸、2.5mg/mL甲硫氨酸、70mg/mL蔗糖和0.4mg/mL聚山梨酯20。将装有液体制剂的小瓶放置在冷冻干燥器的架子上,并将架子冷却至5℃。根据表15中描述的程序将所有制剂冷冻干燥。在冷冻步骤前根据以下过程将制剂在冷冻干燥器中脱气:通过在+20℃下在10分钟期间施加低压(100mbar)从液体中去除氧气。用氮气将压力平衡至1atm(1013mbar)。在冷冻步骤之前重复该脱气过程。

[0370] 在脱气并冷冻干燥之后,用1.1mL 10mM组氨酸(pH6.0)重建冷冻干燥制剂,并通过RP-HPLC分析氧化形式(如实施例3中所述)。在冷冻干燥之前(BFD)、在冷冻干燥之后立刻(在 $T=0$ 时)以及在30℃和40℃下储存之后测定氧化LC的百分比,参见表14.2中的数据。

[0371] 表25.1脱气2次各10分钟的GP-BDD-FVIII冷冻干燥制剂中氧化蛋白质的百分比

[0372]

用于 RP-HPLC 分析的样品	氧化形式 (%)
冷冻干燥之前	无数据
冷冻干燥之后 T=0	2.7 %
冷冻干燥小瓶在+30°C 下储存 3 周	3.1 %
冷冻干燥小瓶在+40°C 下储存 3 周	3.9 %

[0373] 数据表明,与未脱气的类似制剂(实施例7中的数据)相比,2次各10分钟的脱气过程使得在30°C以及40°C下储存3周之后的氧化形式的含量降低。

序列表

<110> 诺和诺德股份有限公司
Bagger, Heidi Westh
Jensen, Michael Bech
Krogh, Thomas Nylandsted

<120> FVIII 制剂

<130> 150060

<150> EP15193099.7

<151> 2015-11-05

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2332

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

[0001]

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
35 40 45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
50 55 60

Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Gln Val
65 70 75 80

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val
85 90 95

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Gln Gly Ala
100 105 110

Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val
115 120 125

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn
130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
145 150 155 160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
165 170 175

Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
180 185 190

His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp
195 200 205

His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
210 215 220

Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg
225 230 235 240

[0002]

Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
245 250 255

Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
260 265 270

Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile
275 280 285

Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
290 295 300

Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
305 310 315 320

Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
325 330 335

Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp

[0003]

Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
565 570 575

Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
580 585 590

Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
595 600 605

Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
610 615 620

Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
625 630 635 640

Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
645 650 655

Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
660 665 670

[0004]

Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
675 680 685

Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
690 695 700

Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
705 710 715 720

Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
725 730 735

Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Arg
740 745 750

Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys
755 760 765

Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn
770 775 780

Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro
785 790 795 800

His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe
805 810 815

Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser
820 825 830

Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val
835 840 845

Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly
850 855 860

Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser
865 870 875 880

Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala
885 890 895

[0005]

Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His
900 905 910

Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro
915 920 925

Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp
930 935 940

Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp
945 950 955 960

Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys
965 970 975

Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys
980 985 990

Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala
995 1000 1005

Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu
1010 1015 1020

Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu
1025 1030 1035

Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp
1040 1045 1050

Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr
1055 1060 1065

Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly
1070 1075 1080

Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys
1085 1090 1095

Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His
1100 1105 1110

[0006]

Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln
1115 1120 1125

Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe
1130 1135 1140

Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr
1145 1150 1155

Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn
1160 1165 1170

Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His
1175 1180 1185

Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys Lys Glu Thr
1190 1195 1200

Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr Val Thr

1205	1210	1215
Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg		
1220	1225	1230
Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu		
1235	1240	1245
Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys		
1250	1255	1260
His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu		
1265	1270	1275
Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys		
1280	1285	1290
Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr		
1295	1300	1305
[0007]		
Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu		
1310	1315	1320
Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr		
1325	1330	1335
Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr		
1340	1345	1350
Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser		
1355	1360	1365
Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser Ile Pro Gln Ala		
1370	1375	1380
Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser		
1385	1390	1395
Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser		
1400	1405	1410

Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val
1415 1420 1425

Gln Gln Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys Lys Asn Asn Leu
1430 1435 1440

Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln Arg Glu
1445 1450 1455

Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys
1460 1465 1470

Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr
1475 1480 1485

Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys
1490 1495 1500

Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu
1505 1510 1515

[0008]

Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile
1520 1525 1530

Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg
1535 1540 1545

Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp
1550 1555 1560

Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu
1565 1570 1575

Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys
1580 1585 1590

Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His
1595 1600 1605

Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu
1610 1615 1620

Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg Leu Cys Ser Gln
1625 1630 1635

Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr
1640 1645 1650

Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile
1655 1660 1665

Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp
1670 1675 1680

Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr
1685 1690 1695

Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser
1700 1705 1710

Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro
1715 1720 1725

[0009]

Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe
1730 1735 1740

Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu
1745 1750 1755

Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val
1760 1765 1770

Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser
1775 1780 1785

Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg
1790 1795 1800

Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys
1805 1810 1815

Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys
1820 1825 1830

Ala Trp	Ala Tyr Phe Ser Asp	Val Asp Leu Glu Lys	Asp Val His
1835	1840	1845	
Ser Gly	Leu Ile Gly Pro Leu	Leu Val Cys His Thr	Asn Thr Leu
1850	1855	1860	
Asn Pro	Ala His Gly Arg Gln	Val Thr Val Gln Glu	Phe Ala Leu
1865	1870	1875	
Phe Phe	Thr Ile Phe Asp Glu	Thr Lys Ser Trp Tyr	Phe Thr Glu
1880	1885	1890	
Asn Met	Glu Arg Asn Cys Arg	Ala Pro Cys Asn Ile	Gln Met Glu
1895	1900	1905	
Asp Pro	Thr Phe Lys Glu Asn	Tyr Arg Phe His Ala	Ile Asn Gly
1910	1915	1920	
Tyr Ile	Met Asp Thr Leu Pro	Gly Leu Val Met Ala	Gln Asp Gln
1925	1930	1935	
Arg Ile	Arg Trp Tyr Leu Leu	Ser Met Gly Ser Asn	Glu Asn Ile
1940	1945	1950	
His Ser	Ile His Phe Ser Gly	His Val Phe Thr Val	Arg Lys Lys
1955	1960	1965	
Glu Glu	Tyr Lys Met Ala Leu	Tyr Asn Leu Tyr Pro	Gly Val Phe
1970	1975	1980	
Glu Thr	Val Glu Met Leu Pro	Ser Lys Ala Gly Ile	Trp Arg Val
1985	1990	1995	
Glu Cys	Leu Ile Gly Glu His	Leu His Ala Gly Met	Ser Thr Leu
2000	2005	2010	
Phe Leu	Val Tyr Ser Asn Lys	Cys Gln Thr Pro Leu	Gly Met Ala
2015	2020	2025	
Ser Gly	His Ile Arg Asp Phe	Gln Ile Thr Ala Ser	Gly Gln Tyr

[0010]

2030	2035	2040
Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu	Ala Arg Leu His Tyr	Ser Gly Ser
2045	2050	2055
Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys	Glu Pro Phe Ser Trp	Ile Lys Val
2060	2065	2070
Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile	Ile His Gly Ile Lys	Thr Gln Gly
2075	2080	2085
Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser	Leu Tyr Ile Ser Gln	Phe Ile Ile
2090	2095	2100
Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys	Lys Trp Gln Thr Tyr	Arg Gly Asn
2105	2110	2115
Ser Thr Gly Thr Leu Met Val	Phe Phe Gly Asn Val	Asp Ser Ser
2120	2125	2130
[0011]		
Gly Ile Lys His Asn Ile Phe	Asn Pro Pro Ile Ile	Ala Arg Tyr
2135	2140	2145
Ile Arg Leu His Pro Thr His	Tyr Ser Ile Arg Ser	Thr Leu Arg
2150	2155	2160
Met Glu Leu Met Gly Cys Asp	Leu Asn Ser Cys Ser	Met Pro Leu
2165	2170	2175
Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile	Ser Asp Ala Gln Ile	Thr Ala Ser
2180	2185	2190
Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe	Ala Thr Trp Ser Pro	Ser Lys Ala
2195	2200	2205
Arg Leu His Leu Gln Gly Arg	Ser Asn Ala Trp Arg	Pro Gln Val
2210	2215	2220
Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu	Gln Val Asp Phe Gln	Lys Thr Met
2225	2230	2235

Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr
2240 2245 2250

Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly
2255 2260 2265

His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe
2270 2275 2280

Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp
2285 2290 2295

Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp
2300 2305 2310

Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala
2315 2320 2325

Gln Asp Leu Tyr
2330

[0012]

<210> 2
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 2

Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu
1 5 10 15

Lys Arg His Gln Arg
20

<210> 3
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 3

Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu
1 5 10 15

Lys Arg His Gln
20

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 4

Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys
1 5 10 15

Arg His Gln Arg
20

[0013]

<210> 5
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 5

Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe
1 5 10 15

Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp
20 25 30

Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser
35 40 45

Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro His Gly Leu Ser
50 55 60

Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro
65 70 75 80

Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser Glu Met Thr His
85 90 95

Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val Phe Thr Pro Glu
100 105 110

Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala
115 120 125

Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn
130 135 140

Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn
145 150 155 160

Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His Tyr Asp Ser Gln
165 170 175

[0014]

Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser
180 185 190

Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu
195 200 205

Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp Gly Lys Asn Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 6
<211> 585
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 6

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Gln
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125

[0015]

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
210 215 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
245 250 255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
340 345 350

[0016]

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
355 360 365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
420 425 430

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

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His

69

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

Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Pro
65 70 75 80

Ile Gln Leu Glu Ile His Arg Gly Trp Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser
85 90 95

Arg Val Phe Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Ala Trp
100 105 110

Lys Asp Lys Leu Val Tyr Asn Val Leu Tyr Tyr Arg Asn Gly Lys Ala
115 120 125

Phe Lys Phe Phe His Trp Asn Ser Asn Leu Thr Ile Leu Lys Thr Asn
130 135 140

Ile Ser His Asn Gly Thr Tyr His Cys Ser Gly Met Gly Lys His Arg
145 150 155 160

[0018]

Tyr Thr Ser Ala Gly Ile Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Phe Pro Ala
165 170 175

Pro Val Leu Asn Ala Ser Val Thr Ser Pro Leu Leu Glu Gly Asn Leu
180 185 190

Val Thr Leu Ser Cys Glu Thr Lys Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu
195 200 205

Gln Leu Tyr Phe Ser Phe Tyr Met Gly Ser Lys Thr Leu Arg Gly Arg
210 215 220

Asn Thr Ser Ser Glu Tyr Gln Ile Leu Thr Ala Arg Arg Glu Asp Ser
225 230 235 240

Gly Leu Tyr Trp Cys Glu Ala Ala Thr Glu Asp Gly Asn Val Leu Lys
245 250 255

Arg Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Leu Gln Leu Pro Thr

260

265

270

Pro

<210> 8

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 8

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

[0019]

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 9
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工的

[0020]

<220>
<223> 合成的

<400> 9

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg
1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
20 25

<210> 10
<211> 865
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 10

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu
1 5 10 15

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu

20	25	30
Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu 35	40	45
Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr 50	55	60
Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro 65	70	75 80
Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro 85	90	95
Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala 100	105	110
Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro 115	120	125
[0021]		
Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro 130	135	140
Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala 145	150	155 160
Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu 165	170	175
Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro 180	185	190
Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr 195	200	205
Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro 210	215	220
Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro 225	230	235 240

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
245 250 255

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
260 265 270

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
275 280 285

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu
290 295 300

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly
305 310 315 320

Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
325 330 335

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
340 345 350

[0022]

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
355 360 365

Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
370 375 380

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
385 390 395 400

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
405 410 415

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
420 425 430

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
435 440 445

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
450 455 460

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
465 470 475 480

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr
485 490 495

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
500 505 510

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
515 520 525

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala
530 535 540

Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
545 550 555 560

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
565 570 575

[0023]

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
580 585 590

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
595 600 605

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
610 615 620

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr
625 630 635 640

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
645 650 655

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
660 665 670

Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu
675 680 685

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
690 695 700

Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
705 710 715 720

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu
725 730 735

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
740 745 750

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
755 760 765

Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro
770 775 780

[0024]

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
785 790 795 800

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
805 810 815

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Glu Pro
820 825 830

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
835 840 845

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
850 855 860

Gly
865