



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105816858 B

(45) 授权公告日 2024.10.18

(21) 申请号 201610221805.8

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限公司

11219

(22) 申请日 2008.12.23

专利代理人 杨青 缪正煜

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105816858 A

(51) Int.CI.

A61K 38/36 (2006.01)

(43) 申请公布日 2016.08.03

A61K 9/08 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 47/12 (2006.01)

61/017,418 2007.12.28 US

A61K 47/02 (2006.01)

61/017,881 2007.12.31 US

A61K 47/26 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61K 47/36 (2006.01)

200880127339.0 2008.12.23

A61P 7/04 (2006.01)

(73) 专利权人 武田药品工业株式会社

(56) 对比文件

WO 93/00107 A1, 1993.01.07

地址 日本大阪

US 5900476 A, 1999.05.04

(72) 发明人 皮特·马特提森 皮特·图雷切克

US 6005077 A, 1999.12.21

汉斯-皮特·施瓦茨

EP 1522312 A1, 2005.04.13

库尔特·施尼科

审查员 田颖

权利要求书2页 说明书20页

序列表26页 附图9页

(54) 发明名称

重组VWF配方

(57) 摘要

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

1. 一种重组冯维勒布兰特因子(rVWF)的稳定液态药物制剂,其包含:rVWF和缓冲液;其中所述rVWF能够在瑞斯托菌素的存在下引起稳定化血小板的凝集;其中,所述rVWF包含选自下组的多肽:
a) SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;以及
b) 被SEQ ID NO:1所示的多核苷酸编码的多肽;
其中所述缓冲液是柠檬酸钠缓冲液、Advate缓冲液或者Advate 1:3缓冲液;其中柠檬酸钠缓冲液的配方为15mM柠檬酸钠、10mM CaCl₂、100mM NaCl,且pH为7.0;其中Advate缓冲液的配方为90mM NaCl、1.68mM CaCl₂、10mM L-组氨酸、10mM Tris、0.26mM谷胱甘肽、23.4mM海藻糖、175.7mM甘露醇、0.1g/L吐温-80,且pH为7.0。
2. 一种重组冯维勒布兰特因子(rVWF)的稳定液态药物制剂,其包含:(a) rVWF;(b) 缓冲剂;(c) 一种以上盐;(d) 可任选的稳定剂;以及(e) 可任选的表面活性剂;
其中所述rVWF能够在瑞斯托菌素的存在下引起稳定化血小板的凝集;
其中,所述rVWF包含选自下组的多肽:
a) SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;以及
b) 被SEQ ID NO:1所示的多核苷酸编码的多肽;
其中所述缓冲剂由在0.1mM至500mM范围内、且其中pH在2.0至12.0范围内的pH缓冲剂组成;其中所述缓冲剂是柠檬酸钠或含浓度各自是3.3mM的组氨酸和Tris的缓冲剂;
其中所述盐的浓度为0.5至300mM并且所述盐选自氯化钙和氯化钠;
其中所述稳定剂的浓度为0.1至1000mM并且所述稳定剂选自甘露醇、蔗糖、海藻糖、棉籽糖以及这些稳定剂的组合;并且
其中所述表面活性剂是浓度为0.01g/L至0.5g/L的吐温-80。
3. 如权利要求1或2所述的制剂,其特征在于,所述rVWF包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。
4. 如权利要求2所述的制剂,其特征在于,所述缓冲剂是柠檬酸钠。
5. 如权利要求4所述的制剂,其特征在于,所述缓冲剂是浓度为15mM的柠檬酸钠。
6. 如权利要求2所述的制剂,其特征在于,pH范围为6.0-8.0。
7. 如权利要求6所述的制剂,其特征在于,pH范围为6.5-7.3。
8. 如权利要求5所述的制剂,其特征在于,pH为7.0。
9. 如权利要求2所述的制剂,其特征在于,所述缓冲剂是柠檬酸钠,且pH是7.0。
10. 如权利要求2所述的制剂,其特征在于,所述盐是浓度为10mM的氯化钙。
11. 如权利要求2所述的制剂,其特征在于,所述rVWF包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;其中,所述缓冲剂是柠檬酸钠且pH是7.0;并且其中,所述盐是浓度为10mM的氯化钙。
12. 如权利要求2所述的制剂,其特征在于,所述rVWF包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;其中,所述缓冲剂是浓度为15mM的柠檬酸钠且pH是7.0;并且其中,所述盐是浓度为10mM的氯化钙和浓度为100mM的NaCl。
13. 如权利要求2所述的制剂,其特征在于,pH是7.0。
14. 如权利要求2所述的制剂,其特征在于,所述一种以上盐是浓度为30mM的氯化钠和浓度为0.56mM的氯化钙。
15. 如权利要求2所述的制剂,其特征在于,所述稳定剂是浓度为7.8mM的海藻糖和浓度

为58.6mM的甘露醇。

16. 如权利要求2所述的制剂,其特征在于,所述表面活性剂是浓度为0.03g/L的吐温-80。

17. 如权利要求2所述的制剂,其特征在于,所述rVWF包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;其中,所述缓冲剂是浓度为3.3mM的组氨酸和浓度为3.3mM的Tris,且pH为7.0;其中,所述盐是浓度为30mM的氯化钠和浓度为0.56mM的氯化钙;其中,所述稳定剂是浓度为7.8mM的海藻糖和浓度为58.6mM的甘露醇;并且其中所述表面活性剂是浓度为0.03g/L的吐温-80。

18. 如权利要求2所述的制剂,其特征在于,

其中所述缓冲剂是浓度为15mM的柠檬酸钠;并且

其中所述盐是浓度为10mM的氯化钙。

重组VWF配方

[0001] 本申请为国际申请日2008年12月23日、国际申请号PCT/US2008/088201于2010年8月20日进入中国国家阶段、申请号200880127339.0、发明名称“重组VWF配方”的分案申请。

[0002] 本申请要求于2007年12月28日提交的美国临时申请No. 61/017,418、以及于2007年12月31日提交的美国临时申请No. 61/017,881的优先权,在此将其全部内容并入本文以作为参考。

技术领域

[0003] 本发明一般涉及重组VWF的配方和制备包含重组VWF的组合物的方法。

背景技术

[0004] 冯维勒布兰特因子(VWF)被是在血浆中循环的糖蛋白,是一系列大小在约500至20,000kD范围内的多聚体。多聚体形式的VWF由通过二硫键连接在一起的250kD的多肽亚基组成。VWF介导原始血小板粘附至受损血管壁的内皮下。仅较大的多聚体显示出止血活性。根据假设,内皮细胞分泌大聚合体形式的VWF,并且那些具有低分子量的VWF形式(低分子量VWF)由蛋白水解切割而产生。具有大分子质量的多聚体储藏在内皮细胞的怀布尔-帕拉德(Weibel-Palade)体中,并且一旦受到刺激就被释放出来。

[0005] VWF是作为基本上由重复的结构域组成的前体VWF (prepro-VWF)由内皮细胞和巨核细胞合成的。一旦切割信号肽,前VWF就通过位于C-末端区域的二硫键发生二聚化。该二聚体用作为用于多聚化的原聚体,这取决于在自由端末端之间的二硫键。组装成多聚体之后,蛋白水解除去前体肽序列(Leyte et al., Biochem. J. 274 (1991), 257-261)。

[0006] 由克隆的VWF cDNA预测的最初翻译产物是2813个残基的前体多肽(前体VWF)。前体VWF由一个有22个氨基酸的信号肽和一个有741个氨基酸的前体肽组成,成熟VWF包含2050个氨基酸(Ruggeri Z.A.和Ware, J., FASEB J., 308-316 (1993))。

[0007] 在VWF中的缺失与冯维勒布兰特疾病(VWD)有因果关系,其特征为或多或少呈现出血表现型。3型VWD是最严重的形式,其中VWF完全消失;而1型VWD涉及VWF的定量丢失,并且其表现型能够非常温和。2型VWD涉及VWF的定性缺失,并且能够像3型VWD一样严重。2型VWD具有许多子形式,一些子形式与高分子量多聚体的丧失或降低有关。2a型冯维勒布兰特综合症(VWS-2A)的特征为中等和大的多聚体的同时丢失。VWS-2B的特征为最大分子量的多聚体的丢失。与VWF有关的其他疾病和紊乱在本技术领域是已知的。

[0008] 美国专利No.6,531,577、7,166,709,以及欧洲专利申请No. 04380188.5描述了源于血浆的VWF配方。然而,除源于血浆的VWF数量和纯度结果之外,还存在血液携带的病原体(例如,病毒和变异性克罗伊茨费尔特-雅各布病(vCJD)的风险。

[0009] 因此,存在开发稳定的包含重组VWF的药物配方的需要。

发明内容

[0010] 本发明提供了对包含重组VWF的组合物有用的配方,可得到高度稳定的药物组合

物。稳定的药物组合物可用作治疗剂,用于遭受能够受益于给药重组VWF的紊乱或状况的个体的治疗。

[0011] 在一种实施方式中,本发明提供了一种重组冯维勒布兰特因子(rVWF)的稳定液态药物配方,其包含:(a) rVWF;(b) 缓冲剂;(c) 一种以上盐;(d) 可任选的稳定剂;以及(e) 可任选的表面活性剂;其中,rVWF包含选自下组的多肽:a) SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;b) a) 的生物学活性类似物、片段或变体;c) 被SEQ ID NO:1所示的多核苷酸编码的多肽;d) c) 的生物学活性类似物、片段或变体;以及e) 被一种多聚核苷酸所编码的多肽,所述多聚核苷酸可在适度严格的杂交条件下杂交至SEQ ID NO:1所示多聚核苷酸上;其中缓冲液由在约0.1mM至约500mM范围内、并且其中pH在约2.0至约12.0范围内的pH缓冲剂组成;其中盐的浓度为约1至500mM;其中稳定剂的浓度为约0.1至1000mM;并且其中表面活性剂的浓度为约0.01g/L至0.5g/L。

[0012] 在另一个实施方式中,提供的上述配方中,rVWF包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。在另一个实施方式中,提供的上述配方中缓冲剂选自由柠檬酸钠、甘氨酸、组氨酸、Tris和这些试剂的组合物所构成的组。在又一个实施方式中,提供的上述配方中,缓冲剂是柠檬酸盐。在本发明的再一个实施方式中,提供的上述配方中,pH在6.0-8.0、或6.5-7.3的范围内。在相关实施方式中,提供的上述配方中,pH是7.0。在另一个实施方式中,提供的上述配方中,缓冲剂是柠檬酸盐并且pH是7.0。

[0013] 在再一个实施方式中,提供的上述配方中,盐选自由氯化钙、氯化钠和氯化镁所构成的组。在另一个实施方式中,提供的上述配方中,盐的浓度范围是0.5至300mM。在另一个实施方式中,提供的上述配方中,盐是浓度为10mM的氯化钙。

[0014] 在另一个实施方式中,提供的上述配方中,rVWF包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;其中,缓冲剂是柠檬酸盐并且pH是7.0;并且其中,盐是浓度为10mM的氯化钙。在再一个实施方式中,提供的上述配方中,rVWF包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;其中,缓冲剂是柠檬酸钠并且pH是7.0;并且其中,盐是浓度为10mM的氯化钙和浓度为100mM的NaCl。

[0015] 本发明也可预期其他配方。例如,在一种实施方式中,提供的上述配方中,所述一种以上缓冲剂是浓度各自是3.3mM的组氨酸和Tris。在另一个实施方式中,提供的上述配方中,pH是7.0。在又一个实施方式中,提供的上述配方中,第一种盐是浓度为30mM的氯化钠并且第二种盐是浓度为0.56mM的氯化钙。

[0016] 在本发明的再一个实施方式中,提供的上述配方中,稳定剂选自下组:甘露醇、乳糖、山梨糖醇、木糖醇、蔗糖、海藻糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖、棉籽糖、纤维二糖、龙胆二糖、异麦芽糖、阿拉伯糖、葡糖胺、果糖以及这些稳定剂的组合物。在另一个实施方式中,提供的上述配方中,稳定剂是浓度为7.8mM的海藻糖和浓度为58.6mM的甘露醇。

[0017] 在另一个实施方式中,提供的上述配方中,表面活性剂选自下组:毛地黄皂苷、TRITON X-100、TRITON X-114、吐温-20、吐温-80以及这些表面活性剂的组合物。在另一个实施方式中,提供的上述配方中,表面活性剂是浓度为0.03g/L的吐温-80。

[0018] 在本发明的一个具体实施方式中,提供的上述配方中,rVWF包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;其中,缓冲剂是浓度为3.3mM的组氨酸和浓度为3.3mM的Tris,pH 7.0;其中,第一种盐是浓度为30mM的氯化钠并且第二种盐是浓度为0.56mM的氯化钙;其中,稳定剂是浓度为7.8mM的海藻糖和浓度为58.6mM的甘露醇;并且其中,表面活性剂是0.03g/L的吐温-

80。

附图说明

- [0019] 图1显示,由于谷胱甘肽的存在,rVWF在Advate缓冲液中26周后是不稳定的。
- [0020] 图2显示,rVWF在Advate 1:3缓冲液中在4°C下直到12周仍是稳定的。
- [0021] 图3显示,基于柠檬酸盐的配方的稳定性比含有0.1M谷胱甘肽的Advate 1:3缓冲液配方要好。
- [0022] 图4显示,在Advate缓冲液中在整个26周期间rVWF浓度是稳定的。
- [0023] 图5显示,在Advate 1:3缓冲液中随时间过去rVWF浓度是稳定的。图6显示,在基于柠檬酸盐的缓冲液中随时间过去rVWF浓度是稳定的。
- [0024] 图7显示,大多数赋形剂使rVWF的解叠温度(unfolding temperature)提高约1或2°C。
- [0025] 图8显示,10mM CaCl₂使rVWF的解叠温度提高约8°C至约67°C。
- [0026] 图9显示,在pH 7.3下和在pH 6.5下CaCl₂的效果是类似的。

具体实施方式

- [0027] 术语的定义
- [0028] 除非另外定义,在此使用的所有技术术语和科学术语的意义与本发明所属领域普通技术人员通常知道的意义相同。下述参考文献为本领域技术人员提供了在本发明中使用的许多术语的一般定义:Singleton等,《微生物学和分子生物学词典》(第2版,1994);《剑桥科学技术词典》(Walker编,1988);《遗传学词汇》(第5版),R Rieger等(编著),Springer Verlag(1991)以及Hale和Marham,《HARPER COLLINS生物学词典》(1991)。
- [0029] 在此引用的每个公开、专利申请、专利、以及其他参考文献通过参考方式将其全部内容并入本文,该合并达到与本发明公开可以不一致的程度。
- [0030] 需注意的是,当在本说明书和权利要求中使用时,单数形式“一”、“一种”和“该”包括复数引用,除非上下文另外清楚地指定。
- [0031] 在此使用时,除非特别说明,下述术语具有它们被给予的意义。
- [0032] 术语“包含”,就肽化合物而言,是指化合物可以在给定序列的氨基和羧基末端之一或两者处包括额外的氨基酸。当然,这些附加的氨基酸将不会显著地干涉该化合物的活性。就本发明的组合物而言,术语“包含”是指组合物可以包括附加成分。这些附加成分将不会显著地干涉组合物的活性。
- [0033] 术语“药学活性的”是指,描述的物质被确定具有影响医疗参数(例如,但不限于,血压、血细胞数、胆固醇含量)或疾病状态(例如,但不限于,癌症、自身免疫紊乱)的活性。
- [0034] 在此使用的术语“表达”是指,允许或者引起在基因或者DNA序列中的信息变得被表现出来,例如,通过活化细胞的功能而产生蛋白质,该功能涉及对应的基因或DNA序列的转录和翻译。DNA序列在细胞中或者被细胞表达从而形成“表达产物”比如蛋白质。该表达产物本身,例如,得到的蛋白质,还可以被说成是被“表达的”产物。表达产物能够作为胞内的、胞外的或分泌的产物而被表征。术语“胞内”是指在细胞里面。术语“胞外”是指在细胞外面,比如横跨膜的蛋白质。如果物质由细胞上某处或者里面大量地出现在细胞外侧,其就是被

细胞“分泌”。

[0035] 在此使用的“多肽”，指的是经由肽键连接由氨基酸残基、结构变体、相关天然产生的结构变体、以及其合成的非天然产生类似物所组成的聚合物。例如，通过使用自动多肽合成仪，能够制备出合成多肽。术语“蛋白质”典型地是指大的多肽。术语“肽”典型地是指短的多肽。

[0036] 在此使用的多肽的“片段”，指的是多肽或蛋白质的任何部分，其小于全长的多肽或蛋白质表达产物。

[0037] 在此使用的“类似物”，指的是在结构上基本相似并且具有相同的生物活性、但是活性程度可能不同的任何两个以上多肽，或者指的是整个分子或其片段。基于包括一个以上氨基酸取代其他氨基酸的一种以上突变，类似物在它们的氨基酸序列组成方面会有差异。基于正被置换的氨基酸以及用于置换的氨基酸的物理化学关系或功能性关系，取代可能是保守型的或者非保守型的。

[0038] 在此使用的“变体”，指的是被修饰得包含附加的、通常不是分子一部分的化合物部分的多肽、蛋白质或其类似物。这些部分可以调节分子的溶解性、吸附性、生物半衰期等。这些部分可以可选地降低分子的毒性，并且除去或者削弱分子的任何不期望有的副作用等。能够调节这些效果的部分在Remington编著的《药物科学》(1980)中被公开。用于这样的部分偶联至分子的工艺为本领域技术人员所熟知。例如，变体可以是具有赋予蛋白质更长体内半衰期的化学修饰的凝血因子。在本发明的多个方面，多肽通过糖基化、PEG化、和/或聚唾液酸化而被修饰。

[0039] 重组VWF

[0040] 预前体VWF的多核苷酸序列和氨基酸序列分别在SEQ ID NO:1和SEQID NO:2中被显示出来，并且可分别购买，GenBank登记号为NM 000552和NP 000543。对应于成熟VWF蛋白质的氨基酸序列在SEQ ID NO:3 (对应于全长预前体VWF氨基酸序列中的氨基酸764-2813)中被显示出来。

[0041] 一种有用的rVWF形式至少具有体内稳定化例如结合至少一种因子VIII (FVIII) 分子、并任选地具有药理学可接受的糖基化模式的特性。其具体的例子包括无A2结构域、因此耐蛋白水解的VWF (Lankhof等, Thromb. Haemost. 77:1008-1013, 1997), 以及包括糖蛋白1b结合结构域和胶原及肝素结合位点在内的从Val 449至Asn 730的VWF片段 (Pietu et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 164:1339-1347, 1989)。测定VWF稳定化至少一种FVIII分子的能力能够根据本技术领域中已知的方法在缺乏VWF的哺乳动物中进行。

[0042] 通过本技术领域任何已知的方法，可以生产出本发明的rVWF。在申请日为1986年10月23日的WO 86/06096和申请日为1990年7月23日的美国专利申请No. 07/559,509中公开了一个具体例子，就生产重组VWF的方法而言，将其引入本发明作为参考。因此，本技术领域已知的方法为：(i) 例如经由RNA逆转录和/或DNA扩增，通过基因工程产生重组DNA；(ii) 通过转染将重组DNA导入原核或真核细胞，例如经由电穿孔技术或微注射；(iii) 例如以连续方式或分批方式培养所述转化细胞；(iv) 例如组成性地或诱导性地表达VWF；以及(v) 例如从培养基中或者通过收获转化细胞来分离所述VWF；以便(vi) 例如经由阴离子交换层析法或者亲和色谱法得到纯化的rVWF。通过使用本技术领域众所周知的重组DNA技术，可以在转化的寄主细胞中制备重组VWF。例如，通过使用合适的限制性内切酶，能够从DNA上切除编码

多肽的序列。

[0043] 可选地,通过使用化学合成技术,比如氨基磷酸酯方法,能够合成出DNA分子。而且,能够使用这些技术的组合。

[0044] 本发明还在合适的寄主中提供了编码本发明多肽的载体。该载体包含编码可操作地连接于合适的表达控制序列的多肽的多核苷酸。在多核苷酸被插入载体中之前或者之后影响这种可操作的连接的方法是众所周知的。表达控制序列包括启动子、激活剂、增强子、操纵子、核糖体结合位点、起始信号、终止信号、帽信号、聚腺苷酸化信号、以及其他涉及控制转录或翻译的信号。得到的其中具有多核苷酸的载体被用于转化合适的寄主。该转化可以通过使用本技术领域众所周知的方法进行。

[0045] 大量可购买的和众所周知的寄主细胞中的任何一种可以在本发明的实践中使用。具体寄主的选择取决于许多被本技术领域认可的因素,包括:例如,与被选择的表达载体的相容性、被DNA分子编码的肽的毒性、转化比率、肽的容易回收、表达特征、生物安全性和成本。考虑到并非所有的寄主细胞都具有同样的表达特定DNA序列的效果,必须达到这些因素的平衡。在这些通用准则之内,有用的微生物寄主细胞包括培养物形式的细菌、酵母和其他真菌、昆虫细胞、植物细胞、哺乳动物(包括人类)细胞、或者本技术领域已知的其他寄主。

[0046] 接下来,培养被转化的寄主并且提纯。寄主细胞可以在普通的发酵条件下培养,以使得期望的化合物被表达。这些发酵条件为本领域技术人员所熟知。最后,通过本技术领域众所周知的方法从培养物中提纯多肽。

[0047] 取决于用来表达本发明的化合物的寄主细胞,可以方便地将碳水化合物(低聚糖)基团附接于已知是蛋白质中糖基化位点的位点。一般来讲,当残基是序列Asn-X-Ser/Thr的一部分时,0-连接的低聚糖被附接于丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)残基,同时N-连接的低聚糖被附接于天门冬酰胺(Asn)残基,其中X可能是除脯氨酸外的任何氨基酸。X优选是除脯氨酸之外19个天然产生的氨基酸之一。N-连接的低聚糖和0-连接的低聚糖以及在每个类型中发现的糖残基的结构是不同的。通常同时在两个类型上发现的一个糖类型是N-乙酰神经氨酸(称作唾液酸)。唾液酸通常是N-连接的低聚糖和0-连接的低聚糖两者的末端残基,并且其借助于负电荷可以赋予糖基化化合物酸性特性。这样的位点可以被并入本发明化合物的连接物中,并且优选在多肽化合物的重组生产(例如,在哺乳动物细胞比如CHO、BHK、COS中)期间被细胞糖基化。然而,这样的位点可以进一步通过本技术领域已知的合成工艺或半合成工艺被糖基化。

[0048] 可选地,化合物可以通过合成方法制备。例如,可以使用固相合成技术。合适的技术为本领域技术人员所熟知,并且包括下述文献中所述的技术:Merrifield(1973),化学多肽,第335-61页(Katsoyannis和Panayotis编著);Merrifield(1963),J.Am.Chem.Soc.85:2149;Davis et al.(1985),Biochem.Intl.10:394-414;Stewart和Young(1969),固相多肽合成;美国专利No.3,941,763;Finn等(1976),蛋白质(第3版),2:105-253;以及Erickson等(1976),蛋白质(第3版),2:257-527。固相合成是优选的制造单个肽的技术,因为其是成本效益最好的制造小肽的方法。

[0049] VWF的片段、变体和类似物

[0050] 用于制备多肽片段、变体或类似物的方法是本技术领域众所周知的。

[0051] 通过使用,但不限于,酶切割(例如,胰蛋白酶、糜蛋白酶)、以及通过使用可产生具

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

[0052] 制造多肽类似物的方法也是众所周知的。多肽的氨基酸序列类似物可能是取代型类似物、插入型类似物、添加型类似物或缺失型类似物。包括多肽片段在内的缺失型类似物缺乏天然蛋白质中一个以上对功能或免疫原性活性不是必需的残基。插入型类似物包括例如在多肽中非末端点氨基酸的添加。该类似物可以包括插入免疫活性的表位或仅仅单一残基。包括多肽片段在内的添加型类似物包括在蛋白质两个末端中任何一个处添加一个以上氨基酸,并且例如包括融合蛋白。

[0053] 取代型类似物典型地在蛋白质内一个以上位点处将一个野生型氨基酸交换成另一种氨基酸,并且可以被设计成在不丧失其他功能或特性的情况下调节多肽的一种以上特性。在一个方面,取代是保守性取代。术语“保守性氨基酸取代”,是指一个氨基酸用一个具有化学特性类似的侧链的氨基酸取代。用于进行保守性取代的类似的氨基酸包括:具有酸性侧链的氨基酸(谷氨酸、天冬氨酸);具有碱性侧链的氨基酸(精氨酸、赖氨酸、组氨酸);具有极性酰胺侧链的氨基酸(谷氨酰胺、天门冬酰胺);具有疏水性的脂肪族侧链的氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、甘氨酸);具有芳香族侧链的氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸);具有较小侧链的氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸);或者具有脂肪族羟基侧链的氨基酸(丝氨酸、苏氨酸)。

[0054] 类似物可以与来源于其的重组VWF是基本上同源的或者基本上相同的。优选的类似物是这样的类似物:其至少保留野生型多肽的一些生物活性例如凝血活性。

[0055] 预期的多肽变体包括通过下述技术进行化学修饰的多肽:泛素化、包括聚唾液酸化在内的糖基化、共轭至治疗性试剂或诊断试剂、标记、共价多聚体附着比如PEG化(用聚乙二醇衍生化)、导入不可水解性键、以及通常在人类蛋白质中不会发生的通过化学合成氨基酸比如鸟氨酸来插入或取代。变体保留了相同的或者基本上相同的结合未修饰的本发明分子的特性。这些化学修饰可以包括将试剂直接或间接(例如,经由连接物)附着于VWF多肽。就间接附着而言,期待连接物可以是可水解的或者是不可水解的。

[0056] 制备PEG化多肽类似物一般地将包含如下步骤: (a) 在结合性构建体多肽变成附接于一个以上PEG基团的条件下使多肽与聚乙二醇(比如反应性酯或PEG的醛类衍生物)反应; 以及 (b) 得到反应产物。一般来讲,用于酰化反应的最佳反应条件将基于已知的参数和期望的结果而被确定。例如,PEG:蛋白质的比率越大,聚PEG化产物的百分比就越大。在一些实施方式中,结合性构建体将在N-末端具有单一的PEG部分。聚乙二醇(PEG)可以被附接于凝血因子,提供更长的体内半衰期。PEG基团可以有任何适当的分子量,并且可以是直链型或支链型。PEG的平均分子量范围是从约2千道尔顿(“kD”)至约100kDa、从约5kDa至约50kDa、或者从约5kDa至约10kDa。通过在PEG部分上的天然反应基团或工程化反应基团(例如,醛类、氨基、硫醇、或者酯基)与在凝血因子上的反应基团(例如,醛类、氨基、或者酯基),或者通过本技术领域已知的任何其他技术,PEG基团经由酰化或还原性烷基化作用被附接于凝血因子。

[0057] 用于制备聚唾液酸化多肽的方法在下述文献中有描述:美国专利公开20060160948, Feraandes et Gregoriadis; *Biochim.Biophys.Acta* 1341:26-34, 1997, 以及

Saenko et al., *Haemophilia* 12:42-51, 2006。简言之,在室温下避光搅拌含有0.1M NaIO₄的多聚乙酸神经氨酸溶液以便氧化CA。该活化的CA溶液用例如,0.05M磷酸钠缓冲液, pH 7.2避光透析,并且将该溶液加至rVWF溶液,在轻轻振荡下在室温下避光保温18h。然后游离的试剂能够通过超滤/渗滤与rVWF-聚唾液酸偶联物分离。rVWF与聚唾液酸的结合还可以通过使用戊二醛作为交联试剂来完成(Migneault等, *Biotechniques* 37:790-796, 2004)。

[0058] 进一步预期本发明的多肽可以是与作为多肽的第二试剂一起的融合蛋白。在一种实施方式中,第二试剂是多肽,不限于酶、生长因子、抗体、细胞因子、趋化因子、细胞表面受体、细胞表面受体的胞外结构域、细胞粘附分子、或如上所述蛋白质的片段和活性结构域。在一个相关的实施方式中,第二试剂是凝血因子比如因子VIII、因子VII、因子IX。预期的融合蛋白通过本技术领众所周知的化学或重组技术制备。

[0059] 还预期前体VWF和前VWF多肽可以提供一种本发明配方的治疗性有益效果。例如,美国专利No. 7,005,502描述了一种药物制剂,其包含可体外诱导凝血酶产生的基本含量的前VWF。除了天然产生的成熟VWF的重组体、生物学活性片段、变体、或类似物之外,本发明预期在此处描述的配方中可使用前体VWF (SEQ ID NO:2所示) 或前VWF多肽 (SEQ ID NO:2中氨基酸残基23至764) 的重组体、生物学活性片段、变体、或类似物。

[0060] 编码片段、变体和类似物的多核苷酸可以由本领域技术人员容易地产生,以便编码具有与天然产生的分子相同或相似生物活性的天然产生的分子的生物学活性片段、变体、或类似物。这些多核苷酸能够通过使用PCR技术、消化/连接编码分子的DNA等制备。因此,通过使用本技术领域任何已知的方法,包括但不限于定点突变,本领域的技术人员将能在DNA链中产生单一碱基的改变,从而得到改变的密码子和错义突变。这里使用的术语“适度严格的杂交条件”,是指,例如,在42°C下在50%甲酰胺中杂交并且在60°C下在0.1x SSC、0.1% SDS中洗涤。本领域的技术人员应理解,基于待杂交的序列的长度和其中GC核苷酸碱基的含量,这些条件可发生变化。本技术领域的公式标准适合用于确定精确的杂交条件。参见Sambrook等,《分子克隆》,9.47-9.51节。冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约(1989)。

[0061] 一般配方和赋形剂

[0062] 赋形剂是被包含于配方中的添加剂,因为它们或者赋予或者增强药物产物的稳定性和释放。无论包含它们的理由如何,赋形剂是药物产物中不可缺少的成分,因此要求是安全的并且被病人很好地忍受。对于蛋白质药物,赋形剂的选择特别重要,因为它们能够同时影响药物的效力和免疫原性。因而,蛋白质配方需要开发成具有适当选择的赋形剂,该赋形剂可提供合适的稳定性、安全性和适销性。

[0063] 在开发用于治疗性蛋白的配方中的主要挑战是稳定化产物,能承受制造、寄送和储存的压力。配方赋形剂的作用在于提供承受这些压力的稳定性。还可以使用赋形剂来降低高浓度蛋白质配方的粘度,以便使它们能释放并增强病人便利性。一般来讲,赋形剂能够基于它们稳定化蛋白质承受各种化学和物理压力而分类。一些赋形剂被用于减轻特定压力的效果或者用于调控特定蛋白质的特定易感性。其他赋形剂具有更普通的在物理学和蛋白质共价稳定性上的效果。在此描述的赋形剂或者通过它们的化合物类型或者通过它们在配方中的功能作用而被组配。当讨论每个赋形剂类型时,会提供稳定模式的简单描述。

[0064] 给出在此提供的教导和指导后,本领域的技术人员将知道,什么含量或范围的赋形剂能够被包含于任何特定的配方中从而获得本发明的生物药物配方,该配方可促进生物

药物(例如,多肽)稳定性的保持。例如,待被包括在本发明的生物药物配方中的盐的含量和类型能够基于期望的最终溶液的渗透压度(即,等渗、低渗或高渗)以及待包括在配方中的其他成分的含量和渗透压度而被选择。类似地,作为例证,就包括在配方中的多元醇或蔗糖类型而言,这样的赋形剂的含量将取决于其渗透压度。

[0065] 举例来说,包含约5%的山梨糖醇能够获得等渗性,而要获得等渗性需要包含约9%的蔗糖赋形剂。能够被包括在本发明的生物药物配方内的一种以上赋形剂的含量或浓度范围的选择已经通过参考上述的盐、多元醇和蔗糖而举例。然而,本领域的技术人员应理解,在此描述的考虑内容和对特定赋形剂的参考同样地可适用于所有类型和组合的赋形剂,赋形剂包括:例如,盐、氨基酸、其他张力剂、表面活性剂、稳定剂、填充剂、冷冻保护剂、冻干保护剂、抗氧化剂、金属离子、螯合剂和/或防腐剂。

[0066] 进一步地,当报道特定赋形剂的克分子浓度时,本领域的技术人员将认识到,还预期溶液的当量百分比(%)w/v(例如,(溶液样品中物质的克数/mL溶液)×100%)。

[0067] 当然,本领域技术人员将认识到,在此描述的赋形剂浓度在特定的配方内共享互相依赖性。举例来说,例如当有较高多肽浓度时、或者例如当有较高稳定剂浓度时,填充剂的浓度可以较低。另外、本领域技术人员将认识到,为了保持其中没有填充剂的特定配方的等渗性,稳定剂的浓度将因此被调节(即,将采用稳定剂的“张力性”含量)。普通的赋形剂在本技术领域是已知的,并且能够在下述文献中找到:Powell等,《用于肠胃外配方的赋形剂概要》(1998);PDA, J. Pharm. Sci. Technology, 52:238-311。

[0068] 缓冲液和缓冲剂

[0069] 药学活性多肽配方的稳定性通常在狭窄pH范围内观察到最大。该最佳稳定性的pH范围需要在预配制研究早期就确定。数种方法比如稳定性加速研究和测热筛选研究已经显示对这些努力是有用的(Remmele R.L.Jr., et al., Biochemistry, 38 (16):5241-7 (1999))。一旦配方最后被定下来,药物产品就必须被制造并且在其整个贮藏期内被保持。因而,通常使用缓冲剂来控制配方的pH。

[0070] 有机酸、磷酸盐和Tris已经习惯性地作为缓冲液被使用在蛋白质配方中。缓冲液种类的缓冲能力在等于pKa的pH处是最大的,并且当pH提高或下降离开该数值时缓冲能力会下降。缓冲能力的90%存在于其pKa的一个pH单位内。随着缓冲液浓度上升,缓冲能力也相应地提高。

[0071] 当选择缓冲液时,需要考虑几个因素。首先、也是最重要的,需要基于其pKa和期望的配方pH来限定缓冲液种类及其浓度。同样重要的是,要确保缓冲液与多肽及其他配方赋形剂相容,并且不会催化任何降解反应。需考虑的第三个重要的方面是一旦给药时缓冲液可能诱导的刺痛感觉和刺激性。例如,已知当注射柠檬酸盐时会引起刺痛(Laursen T, et al., Basic Clin Pharmacol Toxicol., 98 (2):218-21 (2006))。用于经皮下注射(SC)或肌内注射(IM)途径给药的药物的潜在的刺痛和刺激性是更大的,因为药物溶液保持给药位点处的时间周期比经由IV(静脉注射)途径时相对更长,其中IV途径中一旦给药,配方就被快速地稀释进入血液中。对于通过直接静脉内注射给药的配方,需要监控缓冲液(以及任何其他的配方成分)的总量。人们不得不特别留意以磷酸钾缓冲溶液形式给药的钾离子,其能够在病人中诱导心血管性影响(Hollander-Rodriguez JC, et al., Am. Fam. Physician., 73 (2):283-90 (2006))。

[0072] 选择的存在于组合物中的缓冲体系是生理学相容的,并且可保持药物配方的期望pH。在一种实施方式中,溶液的pH在pH 2.0和pH 12.0之间。例如,溶液的pH可以是2.0、2.3、2.5、2.7、3.0、3.3、3.5、3.7、4.0、4.3、4.5、4.7、5.0、5.3、5.5、5.7、6.0、6.3、6.5、6.7、7.0、7.3、7.5、7.7、8.0、8.3、8.5、8.7、9.0、9.3、9.5、9.7、10.0、10.3、10.5、10.7、11.0、11.3、11.5、11.7、或12.0。

[0073] pH缓冲性化合物可以以任何适于维持配方的pH在预定水平下的量存在。在一种实施方式中,pH缓冲液浓度是在0.1mM和500mM(1M)之间。例如,预期pH缓冲剂浓度至少是0.1、0.5、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500mM。

[0074] 在此列出的用于缓冲配方的示例性pH缓冲剂,包括,但不限于:甘氨酸、组氨酸、谷氨酸、琥珀酸盐、磷酸盐、醋酸酯、柠檬酸盐、Tris、以及氨基酸或氨基酸混合物,所述氨基酸包括,但不限于,天冬氨酸、组氨酸、以及甘氨酸。

[0075] 盐

[0076] 盐经常被添加来提高配方的离子强度,这对于蛋白质溶解性、物理稳定性、以及等渗性可能很重要。盐能够以多种方式影响蛋白质的物理稳定性。离子能够通过结合于蛋白质表面上的带电荷的残基来稳定化蛋白质的天然状态。作为另一种选择,盐能够通过结合于沿着蛋白质骨架(-CONH-)的肽基团来稳定化变性状态。盐还可以通过屏蔽在蛋白质分子内部残基之间的排斥性静电相互作用而稳定化蛋白质天然构型。在蛋白质配方中的盐还可以屏蔽在蛋白质分子之间能够导致蛋白质聚集和不溶解的吸引性静电相互作用。在提供的配方中,盐浓度是在0.1、1、10、20、30、40、50、80、100、120、150、200、300、以及500mM之间。

[0077] 稳定剂和填充剂

[0078] 在本发明的药物配方中,可以加入稳定剂(或稳定剂的组合物)来抑制或者降低储存导致的聚集和化学降解。一旦重新配制就模糊的或混浊的溶液表明蛋白质已经沉淀或者至少聚集。术语“稳定剂”,是指能够抑制水溶液状态中的聚集或其他物理性解、以及化学降解(例如,自溶、脱酰胺、氧化等)的赋形剂。通常在药物组合物中使用的稳定剂包括,但不限于:蔗糖、海藻糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖、棉籽糖、纤维二糖、龙胆二糖、异麦芽糖、阿拉伯糖、葡糖胺、果糖、甘露醇、山梨糖醇、甘氨酸、精氨酸盐酸盐、多羟基化合物。所述多羟基化合物包括:多糖比如葡聚糖、淀粉、羟乙基淀粉、环糊精、N-甲基吡咯烷(N-methyl pyrrolidene)、纤维素和透明质酸、氯化钠[Carpenter et al., Develop.Biol.Standard 74:225, (1991)]。在本发明的配方中,加入的稳定剂浓度为约0.1、0.5、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、700、900、或1000mM。

[0079] 如需要,配方还包括适当含量的填充和渗透压调节剂。填充剂包括:例如,甘露醇、甘氨酸、蔗糖、多聚体比如葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素、乳糖、山梨糖醇、海藻糖、或木糖醇。在一种实施方式中,填充剂是甘露醇。加入的填充剂浓度为约0.1、0.5、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、700、900、或1000mM。

[0080] 表面活性剂

[0081] 蛋白质分子高度倾向于与表面相互作用,使得它们在空气-液体、小瓶-液体、以及

液体-液体(硅油)界面处对吸附和变性敏感。已经观察到这种降解途径是逆反地取决于蛋白质浓度,并且导致形成可溶性的和不可溶性的蛋白聚集或者蛋白质经吸附至表面而从溶液中损失。除了容器表面吸附之外,表面诱导的降解随着物理搅拌而被加重,在产品寄送和处理期间将经受物理搅拌。

[0082] 在蛋白质配方中通常使用表面活性剂来抑制表面诱导的降解。表面活性剂是两亲性分子,具有相对于界面位置向外竞争蛋白质的能力。表面活性剂分子中疏水性部分占据界面位置(例如,空气/液体),同时分子的亲水性部分保持朝向溶剂本体。在足够的浓度(典型地大约洗涤剂的临界胶束浓度)下,表面活性剂分子的表面层具有抑制蛋白质分子吸附在界面处的作用。因此,表面诱导的降解被最小化。最常使用的表面活性剂是脱水山梨醇聚乙氧基化脂肪酸酯,即聚山梨酸酯20和聚山梨酸酯80。两者不同之处仅在于赋予分子疏水特性的脂肪链的长度,分别是C-12和C-18。因此,聚山梨酸酯-80更具表面活性,并且具有比聚山梨酸酯-20更低的临界胶束浓度。

[0083] 洗涤剂还可以影响蛋白质的热力学构型的稳定性。再次,给定洗涤剂赋形剂的影响将是蛋白质特异性的。例如,聚山梨酸酯已经显示出可降低一些蛋白质的稳定性并且提高其它蛋白质的稳定性。蛋白质的洗涤剂去稳定作用,能够根据洗涤剂分子的疏水性尾部末端被合理地说明,该洗涤剂分子能够参与与部分地或者全部地解叠的蛋白质状态的特异性结合。这些类型的相互作用能够引起朝向更膨胀的蛋白状态的构造平衡变化(即,提高在配合中的蛋白质分子中疏水性部分暴露于结合性聚山梨酸酯)。作为另一种选择,如果蛋白质天然状态显示出一些疏水表面,则结合于天然状态的洗涤剂可以稳定化该构型。

[0084] 聚山梨酸酯的另一个方面是它们对氧化降解固有地敏感。通常,作为原材料,它们含有足量的过氧化物以引起蛋白质残基侧链、尤其是甲硫氨酸的氧化。该潜在的由添加稳定剂引起的氧化损害强调了这样一点:应该在配方中使用最低有效浓度的赋形剂。对于表面活性剂,用于给定蛋白质的有效浓度将取决于稳定机制。根据假定,如果表面活性剂稳定作用机制涉及到抑制表面变性,则有效浓度将大约是洗涤剂的临界胶束浓度。相反,如果稳定作用的机制与特异性的蛋白质-洗涤剂相互作用有关,则有效的表面活性剂浓度将涉及到蛋白质浓度和相互作用的化学计量学(Randolph T.W., et al., Pharm Biotechnol, 13: 159-75 (2002))。

[0085] 还可以加入适量的表面活性剂来抑制在冻干期间与表面相关的聚集现象(Chang, B, J. Pharm. Sci. 85:1325, (1996))。例举的表面活性剂包括阴离子型、阳离子型、非离子型、两性离子型,并且两性表面活性剂包括由天然产生的氨基酸衍生的表面活性剂。阴离子型表面活性剂包括,但不限于:十二烷基硫酸钠、琥珀磺酸二辛钠和二辛基磺酸钠、鹅脱氧胆酸、N-月桂基肌氨酸钠、十二基硫酸锂、1-辛烷磺酸钠、胆酸钠水合物、脱氧胆酸钠、以及脱氧甘胆酸钠。阳离子型表面活性剂包括,但不限于:苯扎氯铵或氯化苄乙氧铵、氯化十六烷吡啶一水合物、以及溴化六癸基三甲基铵。两性表面活性剂包括,但不限于:CHAPS、CHAPSO、SB3-10、以及SB3-12。非离子型表面活性剂包括,但不限于:毛地黄皂苷、Triton X-100、Triton X-114、吐温-20、以及吐温-80。表面活性剂还包括,但不限于:聚桂醇400,聚氧40硬脂酸酯,聚氧化乙烯氢化蓖麻油10、40、50和60,单硬脂酸甘油酯,聚山梨酸酯40、60、65和80,大豆卵磷脂及其他磷脂比如二油基磷脂酰胆碱(DOPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、以及二油基磷脂酰甘油(DOPG);脂肪酸糖酯、甲基纤维素和

羧甲基纤维素。因此进一步提供或者各个地或者作为混合物以不同的比率包含这些表面活性剂的组合物。在本发明的配方中,表面活性剂加入的浓度为约0.01至约0.5g/L。

[0086] 其他普通的赋形剂成分

[0087] 氨基酸

[0088] 已经发现氨基酸在蛋白质配方中作为缓冲液、填充剂、稳定剂和抗氧化剂而多方面使用。组氨酸和谷氨酸被使用于pH范围分别为5.5-6.5和4.0-5.5的缓冲蛋白质配方中。组氨酸中的咪唑基的pKa=6.0,并且谷氨酸侧链的羧基的pKa为4.3,这使得这些氨基酸适用于在它们各自pH范围内的缓冲。在此情况下谷氨酸是特别有用的(例如, **Stemgen[®]**)。在市售蛋白质配方(例如, **Xolair[®]**、 **Herceptin[®]**、 **Recombinate[®]**)中通常发现有组氨酸,并且该氨基酸提供了柠檬酸盐的代替物,已知柠檬酸盐是一旦注射就刺痛的缓冲液。有趣的是,还报道了当在具有ABX-IL8(IgG2抗体)配方中观察时,当在液体和冻干品中在高浓度下使用时,就聚集而言,组氨酸具有稳定化作用(Chen B, et al., Pharm Res., 20(12) :1952-60 (2003))。也观察到组氨酸(高达60mM)可降低该抗体的高浓度制剂的粘度。然而,在相同的研究中,作者观察到,在不锈钢容器中抗体的冻融研究期间含有组氨酸的配方中提高了聚集和变色。作者将该现象表征为由钢材腐蚀容器浸出的铁离子的作用。另一个当心使用组氨酸的注意事项是,在存在金属离子的条件下其遭受光氧化(Tomita M等, Biochemistry, 8(12) :5149-60 (1969))。甲硫氨酸在配方中作为抗氧化剂的使用表现出具有前景;已经观察到可有效地对抗许多氧化压力(Lam XM, et al., J Pharm Sci, 86 (11) :1250-5 (1997))。

[0089] 氨基酸甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸和丙氨酸已经显示通过优先排除机制可以稳定化蛋白质。甘氨酸也是在冻干配方(例如, **Neumega[®]**, **Genotropin[®]**, **Humatrop[®]**)中常用的填充剂。精氨酸已经被证明是抑制聚集的有效试剂,并且已经在液体和冻干配方(例如, **Activase[®]**, **Avonex[®]**, **Enbrel[®]**液体)中使用。另外,在精氨酸存在的条件下增强特定蛋白质的再次折叠的效率已经归因于其在再次折叠期间可抑制竞争性聚集反应的作用。

[0090] 抗氧化剂

[0091] 蛋白质残基的氧化由许多不同的来源引起。通过添加特定的抗氧化剂,氧化性蛋白质损害的抑制包括在产物的整个生产工艺和储存期间对许多因素比如大气氧、温度、曝光量、以及化学污染的仔细控制。最常用的药物抗氧化剂是还原剂、氧清除剂/自由基清除剂、或螯合剂。在治疗性蛋白配方中的抗氧化剂是水溶性的,并且在整个产品贮藏期限内保持活性。还原剂和氧清除剂/自由基清除剂通过除去溶液中的活性氧而发挥作用。螯合剂比如EDTA通过结合可促进自由基形成的痕量金属杂质而有效果。例如,在酸性成纤维细胞生长因子的液体配方中使用EDTA来抑制金属离子催化半胱氨酸残基氧化。EDTA已经在市售产物比如**Kineret[®]**和**Ontak[®]**中使用。

[0092] 除各种赋形剂抑制蛋白质氧化的效果之外,抗氧化剂本身用于诱导蛋白质其他的共价或物理变化的潜力是有意义的。例如,还原剂能够引起分子内二硫键的解离,这可能导致二硫化物重排。当存在过渡金属离子时,抗坏血酸和EDTA已经显示出在许多蛋白质和多肽中可促进甲硫氨酸氧化(Akers MJ和Defelippis MR.《药物配方开发的肽并且和蛋白

质》,作为肠胃外溶液的肽和蛋白质。Sven Frokjaer、Lars Hovgaard编。《药物科学》。Taylor和Francis,英国(1999);Fransson J.R.,J.Pharm.Sci.86(9):4046-1050(1997);Yin J,et al.,Pharm Res.,21(12):2377-83(2004))。已经报告硫代硫酸钠用于降低在rhuMab HER2中光和温度诱导的甲硫氨酸氧化水平;然而,该研究中也报告了硫代硫酸盐-蛋白质加合物的形成(Lam XM,Yang JY,et al.,J Pharm Sci.86(11):1250-5(1997))。根据蛋白质的特定的压力和灵敏度选择适当的抗氧化剂。

[0093] 金属离子

[0094] 一般来讲,在蛋白质配方中,过渡金属离子是不希望有的,因为它们可能催化在蛋白质中的物理和化学降解反应。然而,当作为蛋白质和在蛋白质悬浮液配方中的辅因子时,特定的金属离子可被包含于配方中,在其中它们形成了配位络合物(例如,胰岛素的锌悬浮液)。最近,已经建议使用镁离子(10-120mM)来抑制天冬氨酸异构化成异天冬氨酸(WO 2004039337)。

[0095] 其中金属离子赋予稳定性或者提高蛋白质活性的两个例子是人脱氧核糖核酸酶(rhDNase、Pulmozyme[®])、以及因子VIII。就rhDNase而言,Ca⁺²离子(高达100mM)通过特异性的结合位点提高了酶的稳定性(Chen B,et al.,J Pharm Sci.,88(4):477-82(1999))。实际上,用EGTA(双乙烷四乙酸)从溶液中除去钙离子引起了脱酰胺作用和聚集的增强。然而,该作用仅在Ca⁺²离子中观察到;其他的二价阳离子Mg⁺²、Mn⁺²和Zn⁺²观察到会使rhDNase不稳定。在因子VIII中观察到类似的影响。Ca⁺²和Sr⁺²离子使蛋白质稳定化,同时其它的离子比如Mg⁺²、Mn⁺²和Zn⁺²、Cu⁺²和Fe⁺²使酶不稳定(Fatouros,A.,et al.,Int.J.Pharm.,155,121-131(1997))。在单独的使用因子VIII的研究中,观察到在Al⁺³离子存在的条件下聚集速率会有显著的提高(Derrick TS,et al.,J.Pharm.Sci.,93(10):2549-57(2004))。作者注意到,其他的赋形剂比如缓冲盐经常被Al⁺³离子污染,并且显示出在配制的产品中需要使用适当质量的赋形剂。

[0096] 防腐剂

[0097] 当开发涉及从相同容器中抽取一次以上的多次使用肠胃外配方时,防腐剂是需要的。它们的主要功能是抑制微生物生长,并且确保在整个贮藏期间或药物产品使用期间产品无菌。通常使用的防腐剂包括苯甲醇、苯酚和间甲酚。尽管防腐剂具有悠久的使用历史,但包含防腐剂的蛋白质配方的开发可能是挑战性的。防腐剂通常对蛋白质具有不稳定效应(聚集),这已经变成限制它们在多剂量蛋白质配方中使用的主要因素(Roy S,et al.,J Pharm Sci.,94(2):382-96(2005))。迄今为止,大多数蛋白质药物已经仅配制用于单次使用。然而,当可能是多次剂量配方时,它们的附加优点是能够使病人便利,并且提高了适销性。一个较好的例子是人生长激素(hGH),其中防腐配方的开发已经得到商业化更方便的、多次使用的注射笔型产品。目前至少四种这样的含有防腐hGH配方的笔型装置可在市场上购买。Norditropin[®](液体,Novo Nordisk)、NutropinAQ[®](液体,Genentech)和Genotropin(冻干-双室药筒,Pharmacia&Upjohn)含有苯酚,而Somatropin[®](礼莱)被配制得具有间甲酚。

[0098] 在开发防腐剂量形式的配方期间需要考虑几个方面。必须优化在药物产品中有效的防腐剂浓度。这要求测试剂量形式中给定的防腐剂,其浓度范围可在不损害蛋白质稳定

性的情况下赋予抗微生物效果。例如,在开发用于白介素-1受体(I型)液体配方的过程中,通过使用差示扫描量热法(DSC),成功地筛选出三种防腐剂。基于它们在市售产品中常用浓度下对稳定性的影响,这些防腐剂分等级次序(Remmele RL Jr., et al., Pharm. Res., 15 (2):200-8 (1998))。

[0099] 一些防腐剂可能引起注射部位反应,这是当选择防腐剂时需要考虑的另一个因素。在集中于评价Norditropin中防腐剂和缓冲液的临床试验中,观察发现,与含有间甲酚的配方相比,在含有苯酚和苯甲醇的配方中疼痛知觉较低(Kappelgaard A.M., Horm Res. 62 Suppl 3:98-103 (2004))。有趣的是,在常用的防腐剂当中,苯甲醇具有麻醉性(Minogue SC, 和Sun DA., Anesth Analg., 100 (3):683-6 (2005))。

[0100] 冻干

[0101] 还预期包含本发明的VWF多肽的配方在给药之前可以冻干。通过使用本领域的普通技术进行冻干,并且应该优化用于被开发的组合物(Tang et al., Pharm. Res. 21:191-200, (2004) 以及Chang et al., Pharm. Res. 13:243-9 (1996))。

[0102] 在一个方面,冻干周期由三个步骤组成:冷冻、初级干燥、以及二级干燥(A.P. Mackenzie, Phil Trans R Soc London, Ser B, Biol 278:167 (1977))。在冷冻步骤中,将溶液冷却至开始结冰。另外,该步骤诱导填充剂的结晶。冰在初级干燥阶段升华,这通过使用真空并且导入热量以促进升华、降低内腔压力低于冰的蒸气压而进行。最后,在二级干燥阶段,在降低腔室压力、并且在提高的搁板温度的条件下,被吸附或结合的水被除去。该工序生产出被称为冻干饼的材料。此后,冻干饼可能用无菌水或用于注射的合适稀释剂重新配制。

[0103] 冻干周期不仅确定了赋形剂的最终物理状态,而且影响其他的参数比如重新配制时间、外观、稳定性和最终水分含量。在冻结状态中的组合物结构通过几个过渡(例如,玻璃化转变、润湿、以及结晶)进行,这些过渡在特定的温度下发生,并且可能被用于理解和优化冻干工艺。玻璃态转化温度(T_g 和/或 T_g')能够提供关于溶解物物理状态的信息,并且可以通过差示扫描量热法(DSC)确定。 T_g 和 T_g' 是重要的参数,当设计冻干周期时必须被考虑。例如, T_g' 对初级干燥很重要。另外,在干燥状态中,玻璃态转化温度可提供有关最终产品贮存温度的信息。

[0104] 制备方法

[0105] 本发明进一步预期用于制备药物配方的方法。许多水溶液载体,例如,灭菌注射水、具有用于多次剂量用途的防腐剂的水、或具有适量表面活性剂(例如,聚山梨酸酯-20)的水、0.4%盐水、0.3%甘氨酸、或水悬浮液,可以在具有适用于制造水悬浮液的赋形剂的混合物中含有活性化合物。在多个方面,这样的赋形剂是悬浮剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍树胶和阿拉伯树胶;分散剂或润湿剂可以是天然产生的磷脂,例如卵磷脂、或烯化氧与脂肪酸的缩合产物例如聚氧化乙烯硬脂酸酯、或环氧乙烷与长链脂族醇的缩合产物例如七-癸乙烯氧十六烷醇、或环氧乙烷与由脂肪酸和己糖醇衍生的偏酯的缩合产物比如聚氧化乙烯山梨糖醇一油酸酯、或环氧乙烷与由脂肪酸和己糖醇酸酐衍生的偏酯的缩合产物例如聚乙烯单油酸山梨醇酐酯。该水悬浮液还可以含有一种以上防腐剂,例如对羟基苯甲酸乙酯、或正丙酯。

[0106] 给药

[0107] 为了将组合物给药于人类或试验用动物,在一个方面,组合物包含一种以上药学可接受的载体。术语“药学”或“药理学”可接受的,指的是稳定的分子实体和组合物,其可抑制蛋白质降解比如聚集和分裂产物,并且另外当通过使用本技术领域众所周知的途径给药时不会产生过敏反应或者其他不良反应,如下所述。术语“药学可接受的载体”包括任选的临床使用的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗试剂和吸收延迟剂等,包括上述公开的那些试剂。

[0108] 药物配方可以通过下述途径给药:口服、体表、透皮、肠胃外、吸入喷雾、阴道给药、直肠、或者颅内注射。在此使用的术语“肠胃外”包括皮下注射、静脉注射、肌内注射、脑池内注射、或者输液技术。通过静脉注射、皮内注射、肌内注射、乳房内注射、腹膜内注射、鞘内注射、眼球后注射、肺内注射和/或特定位点处手术植入的给药同样是可预期的。一般来讲,组合物基本上不含热原、以及可能对受试者有害的其他杂质。

[0109] 可以进行组合物的单一给药或者多次给药,剂量水平和模式由主治医生选择。为了预防或治疗疾病,如上述所限定,适当的剂量将取决于被治疗的疾病类型、严重程度和疾病过程,药物给药是用于预防目的还是治疗目的、先前的治疗、病人的病历和对药物的反应、以及主治医师的判断。

[0110] 试剂盒

[0111] 作为附加的方面,本发明包括试剂盒,其包含以可促进向个体给药的方式包装的一种以上药物配方。在一种实施方式中,这样的试剂盒包括被包装在容器比如密封瓶子或密封容器中的在此描述的药物配方(例如,包含治疗性蛋白或者肽的组合物),带有附着于容器、或者包括在包装中的标签,用于描述在实施该方法时化合物或组合物的使用。在一种实施方式中,该药物配方被包装在容器中,以使得容器中液面上空间(例如,在液体配方和容器顶部之间的空气量)非常小。优选液面上空间可以忽略不计(即,几乎没有)。在一种实施方式中,试剂盒含有具有治疗性蛋白或肽组合物的第一容器、和具有用于组合物的生理学可接受的重配溶液的第二容器。在一个方面,药物配方以单位剂量形式被包装。该试剂盒可以进一步包括适合于根据特定的给药途径而给药药物配方的装置。优选地,试剂盒含有描述药物配方的使用的标签。

[0112] 剂量

[0113] 与用于在此描述的治疗病况的方法有关的剂量摄入将被主治医师确定,该主治医师会考虑到改变药物作用的各种因素,例如年龄、状况、体重、性别和病人的饮食、任何感染的严重程度、给药时间及其他临床因素。举例来说,本发明的重组VWF的典型剂量是大约50U/kg、等于500 μ g/kg。

[0114] 本发明的配方可以通过原始丸剂、接着连续输液以便维持药物产品的治疗循环水平而被给药。在另一个例子中,本发明的化合物可以作为一次性剂量而被给药。本领域技术人员将容易地优化有效的剂量和给药摄入,通过较好的医疗实践和病人个体的临床状况来确定。剂量给药频率将取决于试剂的药物动力学参数和给药途径。最佳的药物配方将被本领域的技术人员根据给药途径和期望的剂量而确定。参见,例如,《雷明顿药物科学》,第十八版(1990,Mack出版公司,Easton,宾夕法尼亚州18042)第1435-1712页。其公开内容通过引用方式并入本文。这些配方可以影响被给药的试剂的物理状态、稳定性、体内释放速度、以及体内清除速度。取决于给药途径,根据体重、体表面积或者器官大小可以计算出合适的

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

[0115] 下述实施例并不是用于限制本发明,而仅是示例性的本发明的具体实施方式。

[0116] 实施例1

[0117] 摆动实验

[0118] 为了确定在各种配方中rVWF的沉淀量,测试在多种状况下剧烈摇动后rVWF的回收率。

[0119] 在摇床上于室温下(RT)对含rVWF的Advate缓冲液(90mM NaCl、1.68mM CaCl₂、10mM L-组氨酸、10mM Tris、0.26mM谷胱甘肽、23.4mM海藻糖、175.7mM甘露醇、以及0.1g/L吐温-80, pH 7.0)或Advate 1:3缓冲液(在水中稀释3倍的Advate缓冲液)进行剧烈摇动0分钟、1分钟、2.5小时、或4天,并且测量rVWF相对于摇动前起始原料的回收百分率。如表1所示,观察发现在Advate缓冲液中损失了约40-80%,同时观察发现在Advate 1:3缓冲液中损失了约20-30%。VWF抗原VWF:Ag对应于在VWF特异性的使用多克隆抗VWF抗体的ELISA中能够被检测出来的VWF的含量,而VWF:RCO对应于在存在瑞斯托菌素的存在下引起稳定化血小板凝集的VWF的含量。在两种情况下,依照实际的世界卫生组织标准校准的人类参照血浆被用作标准品(1mL参照血浆通常含有1U VWF)。

[0120] 表1.剧烈摇动时间对rVWF回收率的影响

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

[0122] 在摇动实验中还测试了冷冻/解冻和冻干法的影响。在-20°C冷藏室中或者在干冰上在-20°C下进行冷冻,而解冻在室温下的两种情况下进行,并且两者都是从液体配方开始。对于冻干,在此描述的配制的VWF样品在中试规模冻干器内于≤-40°C下进行冷冻,并且使用标准冻干程序进行冷冻干燥。直接用液体配方(在5mL小瓶中2mL)进行摇动。如表2所示,在Advate 1:3缓冲液中rVWF的回收百分率比在Advate缓冲液中更高。

[0123] 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]
[0124]	Advate	冷冻	213	100%	104	100% 0.49
		-20 °C 下冷冻-3x	229	107%	84	81% 0.37
		干冰冷冻-3x	231	108%	72	69% 0.31
		冻干	242	113%	61	59% 0.25
		起始原料	213	100%	104	100% 0.49
		室温下剧烈摇动 4 天	37.0	17%	7.2	6.9% 0.19
	Advate 1:3	冷冻	206	100%	134	100% 0.65
		-20 °C 下冷冻-3x	184	89%	132	99% 0.72
		干冰冷冻-3x	195	94%	128	96% 0.66
		冻干	195	94%	107	80% 0.55
		起始原料	206	100%	134	100% 0.65
		室温下剧烈摇动 4 天	138	67%	131	98% 0.95

[0125] 在摇动实验中,还对分别被储藏在有液面上空间、以及没有液面上空间的注射器中的rVWF测量了回收百分率。有趣的是,当rVWF被储藏在没有液面上空间的注射器中并且按如上所述摇动时,没有观察到rVWF沉淀。相反,当rVWF被储藏在具有用液面上空间的注射器中时,观察到一些沉淀。

[0126] 总之,剧烈摇动导致在Advate缓冲液或Advate 1:3缓冲液中损失至少30%的rVWF,使用Advate缓冲液显示出比Advate 1:3缓冲液损失更高的回收率。有趣的是,在剧烈摇动中观察到沉淀,但当rVWF被储藏并在汽车中运输大约5000km时却未观察到相同的沉淀(代表期望的运输期间摇动)。通过储存在没有液面上空间的注射器中,rVWF的沉淀物能够被除去。

[0127] 实施例2

[0128] 重组VWF的稳定性

[0129] 通过评估存在于各种配方中的rVWF活性水平,测试rVWF的稳定性。

[0130] 如图1所示,由于存在0.3mM的谷胱甘肽,rVWF在Advate缓冲液中26周后是不稳定的。然而,如图2所示,rVWF在Advate 1:3缓冲液中更稳定(例如,在4°C下长达12周)。

[0131] 如图3所示,基于柠檬酸盐的配方(15mM柠檬酸钠、10mM CaCl₂、100mM NaCl, pH

7.0)的稳定性比含有0.1M谷胱甘肽的Advate1:3缓冲液配方要好。

[0132] 同样地,测量rVWF在各种缓冲液中随时间的浓度。如图4、图5和图6所示,分别在Advate缓冲液、Advate 1:3缓冲液、以及基于柠檬酸盐的缓冲液中的rVWF浓度随时间是稳定的。

[0133] 实施例4

[0134] 液体配方的表征

[0135] 差示扫描量热法(DSC)被用于评估蛋白质(rVWF)在各种缓冲液中解叠的程度。如表3所示,Advate缓冲液pH7.0对于稳定化是最佳的。

[0136] DSC是一种热分析技术,其中测量提高温度样品所需热量与提高参比物温度所需热量的差异与温度的关系。DSC实验的结果是热通量相对于温度或者相对于时间的曲线。

[0137] 差示扫描量热计能够扫描整个加热和冷却的温度范围,并且其通过测量达到设定的温度所需的热量来确定相转变即熔化、结晶、或玻璃化转变。该热量计用一组纯金属(锌、铟、以及锡)校准,所述金属具有已知的热容Cp和熔点Tm。把各个参比缓冲液放入参比毛细管中,并且把rVWF样品放入仪器中的样品毛细管中。

[0138] 表3.在各种缓冲液中的解叠温度

[0139]	批次	缓冲液	pH	解叠温度(℃)
	rVWF161A	Advate	7.0	66.0
	rVWF161B	Immunate	6.8	64.5
	rVWF161C	柠檬酸盐	6.8	61.2
	rVWF161D	NovoSeven	6.8	64.9
	rVWF158	Hepes	7.4	61.3

[0140] 缓冲剂成分和浓度:

[0141] A) Advate: 5.26g/L NaCl

[0142] 0.248g/L CaCl₂

[0143] 32g/L D-甘露醇

[0144] 8g/L海藻糖

[0145] 1.56g/L L-组氨酸

[0146] 1.2g/L Tris

[0147] 0.08g/L谷胱甘肽红 pH=7.0

[0148] B) Immunate: 5.25g/L甘氨酸

[0149] 2.2g/L NaCl

[0150] 5.25g/L NaCit3

[0151] 5.25g/L赖氨酸盐酸盐

[0152] 0.62g/L CaCl₂ pH=6.8

[0153] C) 柠檬酸盐: 3g/L甘氨酸

[0154] 2.92g/L NaCl

[0155] 2.5g/L NaCit3

[0156] 30g/L D-甘露醇

[0157] 10g/L海藻糖 pH=6.8

- [0158] D) NovoSeven: 0.75g/L 甘氨酸
- [0159] 2.92g/L NaCl
- [0160] 1.47g/L CaCl₂
- [0161] 30g/L D-甘露醇 pH=6.8
- [0162] rVWF 158: 20mM Hepes
- [0163] 150mM NaCl
- [0164] 5g/L 蔗糖 pH=7.4

[0165] 另外,如图7所示,大多数配方赋形剂使rVWF的解叠温度提高约1-2℃。图8显示,10mM CaCl₂使解叠温度提高了约8℃至约67℃,也可以由Advate缓冲液达到解叠温度。CaCl₂的这种作用在pH 7.3和pH6.5处是相似的,如图9所示。最后,分析了海藻糖和蔗糖对解叠温度的影响。与单独的柠檬酸盐相比,海藻糖和蔗糖两者都未提高rVWF的解叠温度。在存在不同赋形剂的条件下对于rVWF的解叠温度(Tmax)数据的总结在表4中被显示出来。

[0166] 表4

15 mM 柠檬酸钠 缓冲液	-	15 mM Tris	15 mM 甘氨酸	50 mM NaCl
ΔH [kJ/mol]	128494.3	656259.7	157352.2	124985.8
解叠温度[°C]-峰 1	58.6		59.1	61
峰 2	65.2	68.5	65.5	
峰 3	80.4		80.1	81
峰 4				
15 mM 柠檬酸钠 缓冲液	15 mM 组氨酸	20.52 g/L 甘露 醇	10.26 g/L 海藻糖	
ΔH [kJ/mol]	134044.5	1588590.1	612235.9	
解叠温度[°C]-峰 1	59.2	58.5	58.5	
峰 2	65.2	65.5	71.3	
峰 3	79.3	78.2	81.5	
峰 4	88.5		92.7	

[0167]

15 mM 柠檬酸钠 缓冲液	1 mM CaCl ₂	10 mM CaCl ₂	32 g/L 蔗糖	0.25 mM 蔗糖
ΔH [kJ/mol]	266008.2	308171.3	115082.4	246904.6
解叠温度 [°C]-峰 1	64.5	67.2	59.2	60
峰 2			66	67
峰 3	81	83.1	81.1	81.7
峰 4	91.8	93		
15 mM 柠檬酸钠 缓冲液	0.1 g/L 吐温 -80	32 g/L 棉籽糖	Na ₂ HPO ₄ /NaHPO ₄	7.8 mM 海藻糖
ΔH [kJ/mol]	338792.7	127329.2	197967.5	135573.3
解叠温度 [°C]-峰 1	58.7	60.1	61.4	58.4
峰 2	64.4	65.8		65.4
峰 3	81.6	80.3	80.4	80.4
峰 4			89.2	

[0168] 除不同的缓冲液之外,DSC被用于估定在Advate缓冲液中在不同的pH值下rVWF的解叠温度。结果如下述表5所示。对于rVWF的稳定化,Advate缓冲液pH 7.0是最佳的(即,最高的解叠温度;峰1)。

[0169] 表5。

[0170]

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

[0171] 在不同温度下储存不同的持续时间之后,评估了在Advate缓冲液中和在Advate 1:3缓冲液中的rVWF荧光光谱。在Advate缓冲液或Advate 1:3缓冲液中于40°C下储存0到28天之后,没有观察到(或者仅略微观察到)荧光光谱的变化。在其他温度下没有观察到差异。

[0172] 同样地,使用胶滤(Superose 6)评估rVWF的降解。在Advate缓冲液中于4°C下26周之后,观察到一些降解,而在Advate 1:3缓冲液中于4°C下26周之后则几乎没有观察到rVWF的降解。在40°C下,谷胱甘肽随时间过去提高了降解量(虽然在Advate 1:3缓冲液中提高程度较慢)。

[0173] 基于以上所述实施例,就冷冻/解冻和冻干后回收率而言,Advate 1:3缓冲液与未稀释的Advate缓冲液相比较具有优势。另外,在40°C下孵育期间Advate 1:3缓冲液能够稳定化rVWF活性(例如,维持生物活性),比Advate缓冲液更好。在Advate 1:3缓冲液中的rVWF在4°C下孵育4周是稳定的。最后,DSC已经表明,pH 7.0是抑制rVWF降解的最佳值(即,显示出最高的解叠温度)。

[0175] 因而,考虑到本发明的数据,建议用于rVWF的配方包括15mM柠檬酸盐(或者甘氨酸或组氨酸)、10mM CaCl₂,pH 6.5-7.3,通过NaCl将其调节到期望的渗透压度。例如,在一种实施方式中,基于柠檬酸盐的配方是15mM柠檬酸钠、10mM CaCl₂、100mM NaCl,pH 7.0。

[0176] 可选地,不含谷胱甘肽的Advate或Advate 1:3缓冲液也被预期是:Advate:90mM NaCl、1.68mM CaCl₂、10mm L-组氨酸、10mM Tris、0.26mM谷胱甘肽、23.4mM海藻糖、175.7mM 甘露醇、以及0.1g/L吐温-80,pH 7.0;Advate 1:3:30mM NaCl、0.56mM CaCl₂、3.3mM L-组氨酸、3.3mM Tris、7.8mM海藻糖、58.6mM甘露醇、以及0.03g/L吐温-80,pH 7.0。

序列表

<110> 巴克斯特国际公司
 巴克斯特保健股份有限公司
 <120> 重组 VWF 配方
 <130> SPI162263-71
 <150> 61/017, 881
 <151> 2007-12-31
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 8833
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Polynucleotide

<220>
 <221> misc_feature
 <223> prepro-vWF
 <400> 1

[0001] agtcacacgc tattgtggtg ggaaagggag ggtgggtgg ggtatgtcaca gcttgggctt 60
 tatctccccc agcagtgggg actccacacgc ccctgggcta cataacagca agacagtccg 120
 gagctgttagc agacactgatt gagccttgc agcagcttag agcatggcct aggggtggcg 180
 gcaccattgt ccagcagctg agtttccag ggaccttggaa gatagccgca gccctcattt 240
 gcagggaaag atgattcctg ccagatttgc cggggtgctg cttgctctgg ccctcattt 300
 gccagggacc ctttgtcag aaggaactcg cggcaggta tccacggccc gatgcagcct 360
 tttcggaaat gacttcgtca acaccttga tgggagcatg tacagcttg cgggatactg 420
 cagttacctc ctggcagggg gctgccagaa acgctccctc tcgattattt gggacttcca 480
 gaatggcaag agagtggacc tctccgtta tctggggaa tttttgaca tccattgtt 540
 tgtcaatggt accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgcctatg cctccaaagg 600
 gctgtatcta gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggcttgc 660
 gcccaggatc gatggcagcg gcaactttca agtcctgctg tcagacagat acttcaacaa 720
 gacctgcggg ctgtgtggca actttaacat cttgctgaa gatgacttta tgacccaaga 780
 agggaccttgc acctcggacc cttatgactt tgccaaactca tgggctctga gcagtggaga 840
 acagtgggtt gAACCGGCACTCCTCCAG CAGCTCATGC AACATCTCTT CTGGGGAAAT 900
 gcagaagggc ctgtggggac agtgcacat tctgaagac acctcggtt ttggccctgc 960
 ccaccctctg gtggaccccg agcctttgt gcccctgtt gagaagactt tgtgtgagt 1020
 tgctgggggg ctggagtgcg cctgcctgc cctctggag tacgcccgg a cctgtgcacat 1080
 ggagggaatg gtgcgttacg gctggaccga ccacagcgcg tgcagcccg tgcacat 1140
 tggatggag tataggcagt gtgtgtcccc ttgcgcagg acctgccaga gcctgcacat 1200
 caatgaaatg tgcaggagc gatgcgttgg tggctgcagg tgcacatgg gacagtcct 1260
 ggtatggc acctcggtt agagcaccga gtgcatttgc gtgcatttgc gaaaggccta 1320
 ccctccggc acctccctt ctcgagactt caacacacttgc atttggcggaa acagccactt 1380

[0002]	gatctgcage aatgaagaat gtccagggga gtgccttgc acaggtaat cacactcaa	1440
	gagcttgac aacagatact tcaccttcag tggatctgc cagtacgtc tgcccccggaa	1500
	ttgccaggac cactccttct ccattgtcat ttagactgtc cagtgtgtc atgaccgcga	1560
	cgcgtgtgc acccgctccg tcaccgtccg gtcgcctggc ctgcacaaca gccttgtgaa	1620
	actgaagcat gggcaggag ttgcatgaa tgccaggac gtccagctcc ccctctgaa	1680
	aggtgaccc tcgcacccg atacagtgc ggcctccgtc cgcctcagct acggggagga	1740
	cctgcagatg gactggatg gccgcggag gctgctggta aagctgtccc cgcttatgc	1800
	cggaaagacc tgccgcgtgt gtggaaatta caatggcaac cagggcgcacg acttcctac	1860
	cccccctggg ctggcggagc cccgggtgga ggacttcggg aacgcctgga agctgcacgg	1920
	ggactgccag gacctgcaga agcagcacag cgatccctgc gccctcaacc cgccatgac	1980
	caggttctcc gaggaggcgt gcgcgtctt gacgtcccc acattcgagg cctgcacatcg	2040
	tgccgtcagc cgcgtccctt acctgcggaa ctgcgcgtac gacgtgtgt cctgctcgga	2100
	cggccgcgag tgcctgtcg ggcgcctggc cagctatgcc gccgcctgca cggggagagg	2160
	cgtgcgcgtc gcgtggcgcg agccaggccg ctgtgagctg aactgcccga aaggccaggt	2220
	gtacctgcag tgcgggaccc cctgcacact gacgtccgc tctctctt accggatga	2280
	ggaatgcaat gaggcctgcc tggaggcgt ctctgtcccc ccaggcgtt acatggatga	2340
	gagggggac tgcgtgccc aggcacgtg cccctgttac tatgacgggt agatttcca	2400
	gccagaagac atcttctcag accatcacac catgtgtcact tgtgaggatg gcttcatgca	2460
	ctgtaccatg agtggagttc cggaaagctt gtcgcctgac gctgtctca gcagtcctt	2520
	gtctcatcgc agcaaaagga gcctatcgtg tggcccccc atggtaagc tgggtgtcc	2580
	cgcgtacaac ctgcggcgtg aaggcgtcga gtgtacaaa acgtgccaga actatgac	2640
	ggagtgcgtg agcatggcgt gtgtctctgg ctgcctctgc ccccccggca tggcggca	2700
	tgagaacaga tgtgtggccc tggaaagggtg tccctgttcc catcaggcga aggagtatgc	2760
	ccctggagaa acagtgaaga ttggctgaa cacttgcgtc tgcgggacc ggaagtggaa	2820
	ctgcacagac catgtgtgt atgccacgtg ctccacgtc ggcacgtccc actacccac	2880
	cttcgacggg ctcaaataacc tggccccgg ggagtgcgtg tacgttctgg tgcaggatta	2940
	ctgcggcgt aaccctggaa ctttcggat cctagtgggg aataaggat gcagccaccc	3000
	ctcagtggaaa tgcaggaaac gggtcaccat cctgggtggag ggaggagaga ttgagctgtt	3060
	tgcggggag gtgaatgtga agaggccat gaaggatgag actcaactt aggtgggtgaa	3120
	gtctggccgg tacatcatc tgcgtgtgg caaagccctc tccgtggctt gggaccgca	3180
	cctgagcata tccgtggctt tgaaggcagac ataccaggaa aagtgtgtg gcctgtgtgg	3240
	gaattttgtat ggcacccaga acaatgaccc caccaggcgtc aacctccaa tggaggaaaga	3300
	ccctgtggac tttggaaact cctggaaagt gagctgcgtg tgcgtgaca ccagaaaagt	3360
	gcctgtggac tcatccccctg ccacctgca taacaacatc atgaaggcaga cgatgggtgaa	3420
	ttcctctgtt agaatccta ccagtgcgtt ctccaggac tgcacaacgc tggcaacccc	3480
	cgagccatcgat ctggatgtct gcatttacga caccgtctcc tgcgtgtcc tggggactt	3540
	cgccctgtt tgcgtacca ttgcgtccta tggccacgtg tgcgtgtcc atggcaaggt	3600
	ggtgacgtgg aggacggcca cattgtgcgtt ccagagctgc gaggagagga atctccggaa	3660
	gaacgggtat gagtgcgtt ggcgcataaa cagctgtcgtc cctgcctgtc aagtgcgtg	3720
	tcagcacccctt gagccacttgg cctgcctgtt gcagtgtgtt gagggtgtcc atgcccactt	3780
	ccctccaggaa aaaatccctgg atgagctttt gcagacgttgc gttgaccctt aagactgtcc	3840
	agtgtgttggatgtt gttggctggcc ggcgttttgc ctcaggaaag aaagtgcaccc tgaatcccag	3900
	tgaccctgtt gactgtccaga tttgcacttgc tgcgtgtcc aacctcaccc tgcgtgtcc	3960
	ccaggagccg ggaggcctgg tggcgttcc cacagatgcc cccgtgcgtt ccaccactt	4020

[0003]	gtatgtggag gacatctcg aaccggcgtt gcacgattt tactgcagca ggctactgga	4080
	cctggcttc ctgctggatg gtcctccag gctgtccag gctgagttt aagtgtgaa	4140
	ggcccttgtg gtggacatga tggagccgt ggcacatctcc cagaagtggg tccgcgtgc	4200
	cgtggtggag taccacgacg gctcccacgc ctacatcggtt ctcaggacc ggaagcgacc	4260
	gtcagagctg cggcgcattt ccagccaggat gaagtatgcg ggcagccagg tggcctccac	4320
	cagcgaggctt ttgaaataca cactttcca aatcttcage aagatcgacc gcccgtaa	4380
	ctcccgatc accctgtcc ttagtgcac ccaggagccc caacggatgt cccggactt	4440
	tgtccgctac gtccaggccc tgaagaagaa gaaggatcattt gtatccgg tggcattgg	4500
	gccccatgcc aacctaagc agatccgcct catcgagaag caggcccctg agaacaaggc	4560
	cttcgtctg agcagtgtgg atgagatcgaa gcagcaaagg gacgagatcg ttagctac	4620
	ctgtgacattt gcccctgaag cccctctcc tactctgc cccgacatgg cacaagtcac	4680
	tgtggcccg gggctcttgg gggtttcgac cctggggccc aagaggaact ccatggttct	4740
	ggatgtggcg ttcgtcttgg aaggatcgaa caaaaattggt gaagccgact tcaacaggag	4800
	caaggagttt atggaggagg tgattcagcg gatggatgtt ggcaggaca gcatccacgt	4860
	cacgggtctg cagtaactc acatgtgtac tggatgttcc cccttcagcg aggacacgtc	4920
	caaaggggac atcctgcagc gggcgcgaga gatccgcac cagggcggca acaggacaa	4980
	cactgggctg gcccctgcgtt acctctctga ccacagcttcc ttggcagcc agggtgacc	5040
	ggagcaggcg cccaaacctgg tctacatgtt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa	5100
	gaggctgcct ggagacatcc aggtgtgtt cattggatgtt ggcctaattt ccaacgttca	5160
	ggagctggag aggattggctt ggcccaatgc ccctatccatc atccaggact ttgagacgt	5220
	cccccgagag gtcctgtacc ttgtgtgttca gaggtgttgc tccggagagg ggctgcagat	5280
	ccccaccctt tcccctgcac ctgactgcag ccagcccttgc gacgtgttcc ttctcttgg	5340
	tgtctcttc agtttcccttgc cttcttattttt ttagtgcattt aagagtttgc ccaaggctt	5400
	catttcaaaa gccaatatacg ggcctcgatc cactcaggttgc tcaatgttgc agtatttttt	5460
	catcaccacc attgacgttgc catggaaacgtt ggtcccgagaa aaagccctt tgctgacgtt	5520
	tgtggacgttgc atgcagccggg agggaggccc cagccaaatc gggatgttcc tggccttgc	5580
	tgtgcgatac ttgacttccatc aaatgttgcgatgg tggcaggccc ggagccttcaa aggccgttgc	5640
	catcctggtc acggacgttgc ctgtggatcc agtggatgttca gcaatgttgc ccggcagggtc	5700
	caacagatgttcc acatgtgttcc ctattttttt tggagatgttgc tacatgttgc cccagatc	5760
	gatcttggca gggccagcag ggcactccaa cgtggatgttca gtcggatgttcc tcaagac	5820
	cccttaccatg gtcaccccttgc gcaatttccctt cttccacaaa ctgtgttgc gatgttgc	5880
	gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc	5940
	ccagtggccac accgttgcactt ggcaggccaga tggccagacc ttgtgttca gtcatgggt	6000
	caactgttgc acggggcttgc ggccttgcgtt ccataacatgc cagttccctt taaaatgttca	6060
	agagacgttgc ggctggccgtt ggaccccttgc ctggatgttgc acaggatgttcc ccaactggca	6120
	catcgatgttgc tttgtatggc agaatttca gctgtatgttgc agtgttgc tttgtatggc	6180
	tcaaaacaag gagcaggacc tggaggttgc tctccatataat ggtgttgc gcccgttgg	6240
	aaggcaggcc tgcgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc	6300
	cagtgtatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc	6360
	catggaaatgc aacgtttatgc gtgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc	6420
	catcttcaca ttctactccatc aaaacaatgttca gttccacttgc cagttccatc ccaagactt	6480
	tgttcaaaatgc acgtatgttgc tttgtatggc tttgtatggc gatgttgc gatgttgc gatgttgc	6540
	gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc	6600
	gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc gatgttgc	6660

[0004]

ccactgccag	gtcctccct	taccactgtt	tgctgaatgc	cacaagggcc	tggctccagc	6720
cacattctat	gccatctgcc	agcaggacag	ttgccaccag	gagcaagtgt	gtgagggtat	6780
cgccctttat	gcccacctct	gtcgacca	cgggtctgc	gttgactgga	ggacacctga	6840
tttctgtgt	atgtcatgcc	caccatctct	ggtctacaac	cactgtgagc	atggctgtcc	6900
ccggcactgt	gatggcaacg	tgagctccctg	tgggaccat	ccctccgaag	gctgtttctg	6960
ccctccagat	aaagtcatgt	tggaaggccg	ctgtgtccct	gaagaggcct	gcactcagtg	7020
cattggtag	gatggagttc	agcaccagtt	cctggaagcc	tgggtcccg	accaccagcc	7080
ctgtcagatc	tgcacatgcc	tcagcggcg	gaaggtaaac	tgcacaacgc	agccctgccc	7140
cacggccaaa	gctcccacgt	gtggcctgtg	tgaagtagcc	cgcctccccc	agaatgcaga	7200
ccagtgtgc	ccccagatgt	agtgtgtgt	tgaccaggat	agctgtgacc	tgccccagt	7260
gcctcaactgt	gaacgtggcc	tccagccac	actgaccaac	cctggcgagt	gcagacccaa	7320
cttcacctgc	gcctgcagga	aggaggagtg	caaaagagtg	tccccaccc	cctgcccccc	7380
gcaccgttt	cccacccttc	ggaagaccca	gtgctgtat	gagtagatgt	gtgcctgcaa	7440
ctgtgtcaac	tccacagtga	gctgtccc	tgggtacttg	gcctcaactg	ccaccaatga	7500
ctgtggctgt	accacaacca	cctgccttcc	cgacaaggat	tgtgtccacc	gaagcaccat	7560
ctaccctgt	ggccagttt	gggaggaggg	ctgcgatgt	tgcacctgca	ccgacatgga	7620
ggatgccgt	atggccctcc	gcgtggccca	gtgctccc	aagccctgt	aggacacgt	7680
tcggcgggc	ttcacttacg	ttctgcatga	aggcgagtgc	tgtggaaggt	gcctccatc	7740
tcgcctgt	gtggtgactg	gctcaccgcg	ggggactcc	cagtcttct	ggaagagtgt	7800
cggctcccag	tgggcctccc	cggagaaccc	ctgcctcatc	aatgagtgt	tccgagtgaa	7860
ggaggaggc	tttataacaac	aaaggaacgt	ctcctcccc	cagctggagg	tccctgtctg	7920
cccctcgcc	tttcagctga	gctgtaagac	ctcagcgtgc	tgcctcaagct	gtcgctgt	7980
gcbcgtggag	gcctgcatgc	tcaatggcac	tgtcattgg	cccggaaaga	ctgtgtat	8040
cgatgtgtc	acgacactg	gctgcattgt	gcaggtggg	gtcatctct	gattcaagct	8100
ggagtgcagg	aagaccac	gcaaccct	ccccctgg	tacaaggaa	aaaataacac	8160
aggtgaatgt	tgtggagat	gtttgcctac	ggcttgcacc	attcagctaa	gaggaggaca	8220
gatcatgaca	ctgaagcgt	atgagacgt	ccaggatggc	tgtgatactc	acttctgaa	8280
ggtaaatgag	agaggagat	acttctgg	gaagagggtc	acaggctgc	cacccttga	8340
tgaacacaag	tgtctggctg	agggaggtaa	aattatgaa	attccaggca	cctgctgt	8400
cacatgtgag	gaggctgat	gcaacgacat	cactgccagg	ctgcagttat	tcaagggtgg	8460
aagctgtaa	tctgaagtag	aggtggat	ccactactgc	cagggcaaat	gtgccagcaa	8520
accatgtac	tccattgaca	tcaacgatgt	gcaggaccag	tgcctctgt	gtctccgac	8580
acggacggag	cccatgcagg	tggcctgca	ctgcaccaat	ggctctgt	tgtaccatga	8640
ggttctcaat	gcccgtggat	gcaaatgc	ccccaggaa	tgcagcaat	gaggctgt	8700
cagctgcatt	ggtgcctgt	gctgcctgc	ttggcctgt	ggccaggcc	gagtgtgt	8760
agtccctgc	atgttctgt	cttgcctc	tctgagcc	caataaaggc	tgagcttta	8820
tcttgc	aaaaaa	ggc				8833

<210> 2

<211> 2783

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Polypeptide

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> prepro-vWF
 <400> 2
 Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Leu Ile Leu Pro Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr Ala Arg Cys
 20 25 30
 Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly Ser Met Tyr
 35 40 45
 Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly Cys Gln Lys
 50 55 60
 Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys Arg Val Ser
 65 70 75 80
 Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu Phe Val Asn
 85 90 95
 [0005] 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 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

[0006] 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

[0007] 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		
[0008] 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

[0009] 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		
[0010] 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															
Lys	Lys	Lys	Lys	Val	Ile	Val	Ile	Pro	Val	Gly	Ile	Gly	Pro	His	
1385															
Ala	Asn	Leu	Lys	Gln	Ile	Arg	Leu	Ile	Glu	Lys	Gln	Ala	Pro	Glu	
1400															
Asn	Lys	Ala	Phe	Val	Leu	Ser	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Glu	Gln	Gln	
1415															
Arg	Asp	Glu	Ile	Val	Ser	Tyr	Leu	Cys	Asp	Leu	Ala	Pro	Glu	Ala	
1430															
Pro	Pro	Pro	Thr	Leu	Pro	Pro	Asp	Met	Ala	Gln	Val	Thr	Val	Gly	
1445															
Pro	Gly	Leu	Leu	Gly	Val	Ser	Thr	Leu	Gly	Pro	Lys	Arg	Asn	Ser	
1460															
[0011]	Met	Val	Leu	Asp	Val	Ala	Phe	Val	Leu	Glu	Gly	Ser	Asp	Lys	Ile
	1475														
	Gly	Glu	Ala	Asp	Phe	Asn	Arg	Ser	Lys	Glu	Phe	Met	Glu	Glu	Val
	1490														
	Ile	Gln	Arg	Met	Asp	Val	Gly	Gln	Asp	Ser	Ile	His	Val	Thr	Val
	1505														
	Leu	Gln	Tyr	Ser	Tyr	Met	Val	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Phe	Ser	Glu
	1520														
	Ala	Gln	Ser	Lys	Gly	Asp	Ile	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Glu	Ile	Arg
	1535														
	Tyr	Gln	Gly	Gly	Asn	Arg	Thr	Asn	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Arg	Tyr
	1550														
	Leu	Ser	Asp	His	Ser	Phe	Leu	Val	Ser	Gln	Gly	Asp	Arg	Glu	Gln
	1565														
	Ala	Pro	Asn	Leu	Val	Tyr	Met	Val	Thr	Gly	Asn	Pro	Ala	Ser	Asp
	1580														

Glu	Ile	Lys	Arg	Leu	Pro	Gly	Asp	Ile	Gln	Val	Val	Pro	Ile	Gly	
1595															
Val	Gly	Pro	Asn	Ala	Asn	Val	Gln	Glu	Leu	Glu	Arg	Ile	Gly	Trp	
1610														1620	
Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ile	Gln	Asp	Phe	Glu	Thr	Leu	Pro	Arg	
1625														1635	
Glu	Ala	Pro	Asp	Leu	Val	Leu	Gln	Arg	Cys	Cys	Ser	Gly	Glu	Gly	
1640														1650	
Leu	Gln	Ile	Pro	Thr	Leu	Ser	Pro	Ala	Pro	Asp	Cys	Ser	Gln	Pro	
1655														1665	
Leu	Asp	Val	Ile	Leu	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Ser	Phe	Pro	Ala	
1670														1680	
Ser	Tyr	Phe	Asp	Glu	Met	Lys	Ser	Phe	Ala	Lys	Ala	Phe	Ile	Ser	
1685														1695	
[0012]	Lys	Ala	Asn	Ile	Gly	Pro	Arg	Leu	Thr	Gln	Val	Ser	Val	Leu	Gln
	1700														1710
Tyr	Gly	Ser	Ile	Thr	Thr	Ile	Asp	Val	Pro	Trp	Asn	Val	Val	Pro	
1715														1725	
Glu	Lys	Ala	His	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Asp	Val	Met	Gln	Arg	Glu	
1730														1740	
Gly	Gly	Pro	Ser	Gln	Ile	Gly	Asp	Ala	Leu	Gly	Phe	Ala	Val	Arg	
1745														1755	
Tyr	Leu	Thr	Ser	Glu	Met	His	Gly	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Lys	
1760														1770	
Ala	Val	Val	Ile	Leu	Val	Thr	Asp	Val	Ser	Val	Asp	Ser	Val	Asp	
1775														1785	
Ala	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg	Ser	Asn	Arg	Val	Thr	Val	Phe	Pro	
1790														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		
[0013] 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															
Asn	Asn	Glu	Phe	Gln	Leu	Gln	Leu	Ser	Pro	Lys	Thr	Phe	Ala	Ser	
2045															
Lys	Thr	Tyr	Gly	Leu	Cys	Gly	Ile	Cys	Asp	Glu	Asn	Gly	Ala	Asn	
2060															
Asp	Phe	Met	Leu	Arg	Asp	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	Asp	Trp	Lys	Thr	
2075															
Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Thr	Val	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Thr	Cys	Gln	
2090															
Pro	Glu	Gln	Cys	Leu	Val	Pro	Asp	Ser	Ser	His	Cys	Gln	Val	Leu	
2105															
Leu	Leu	Pro	Leu	Phe	Ala	Glu	Cys	His	Lys	Val	Leu	Ala	Pro	Ala	
2120															
[0014]	Thr	Phe	Tyr	Ala	Ile	Cys	Gln	Gln	Asp	Ser	Cys	His	Gln	Glu	Gln
	2135														
Val	Cys	Glu	Val	Ile	Ala	Ser	Tyr	Ala	His	Leu	Cys	Arg	Thr	Asn	
2150															
Gly	Val	Cys	Val	Asp	Trp	Arg	Thr	Pro	Asp	Phe	Cys	Ala	Met	Ser	
2165															
Cys	Pro	Pro	Ser	Leu	Val	Tyr	Asn	His	Cys	Glu	His	Gly	Cys	Pro	
2180															
Arg	His	Cys	Asp	Gly	Asn	Val	Ser	Ser	Cys	Gly	Asp	His	Pro	Ser	
2195															
Glu	Gly	Cys	Phe	Cys	Pro	Pro	Asp	Lys	Val	Met	Leu	Glu	Gly	Ser	
2210															
Cys	Val	Pro	Glu	Glu	Ala	Cys	Thr	Gln	Cys	Ile	Gly	Glu	Asp	Gly	
2225															
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
[0015]					2360						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															
Gly	Ser	Gln	Trp	Glu	Asn	Pro	Cys	Leu	Ile	Asn	Glu	Cys	Val	Arg	
2495															
Val	Lys	Glu	Glu	Val	Phe	Ile	Gln	Gln	Arg	Asn	Val	Ser	Cys	Pro	
2510															
Gln	Leu	Glu	Val	Pro	Val	Cys	Pro	Ser	Gly	Phe	Gln	Leu	Ser	Cys	
2525															
Lys	Thr	Ser	Ala	Cys	Cys	Pro	Ser	Cys	Arg	Cys	Glu	Arg	Met	Glu	
2540															
Ala	Cys	Met	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Ile	Gly	Pro	Gly	Lys	Thr	Val	
2555															
Met	Ile	Asp	Val	Cys	Thr	Thr	Cys	Arg	Cys	Met	Val	Gln	Val	Gly	
2570															
[0016]	Val	Ile	Ser	Gly	Phe	Lys	Leu	Glu	Cys	Arg	Lys	Thr	Thr	Cys	Asn
	2585														
Pro	Cys	Pro	Leu	Gly	Tyr	Lys	Glu	Glu	Asn	Asn	Thr	Gly	Glu	Cys	
2600															
Cys	Gly	Arg	Cys	Leu	Pro	Thr	Ala	Cys	Thr	Ile	Gln	Leu	Arg	Gly	
2615															
Gly	Gln	Ile	Met	Thr	Leu	Lys	Arg	Asp	Glu	Thr	Leu	Gln	Asp	Gly	
2630															
Cys	Asp	Thr	His	Phe	Cys	Lys	Val	Asn	Glu	Arg	Gly	Glu	Tyr	Phe	
2645															
Trp	Glu	Lys	Arg	Val	Thr	Gly	Cys	Pro	Pro	Phe	Asp	Glu	His	Lys	
2660															
Cys	Leu	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys	Ile	Met	Lys	Ile	Pro	Gly	Thr	Cys	
2675															
Cys	Asp	Thr	Cys	Glu	Glu	Pro	Glu	Cys	Asn	Asp	Ile	Thr	Ala	Arg	

2690	2695	2700
------	------	------

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

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

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

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

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

Arg Lys Cys Ser Lys
2780

<210> 3

[0017] <211> 2050

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Polypeptide

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> mature 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 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			
[0018]	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
 [0019] 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 Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His
 645 650 655

 [0020] 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
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
Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg		
[0021]	885	890
895		
Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu		
900	905	910
Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp		
915	920	925
Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe		
930	935	940
Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile		
945	950	955
960		
Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr		
965	970	975
Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu		
980	985	990
Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly		
995	1000	1005

Asp Ala	Leu Gly Phe Ala Val	Arg Tyr Leu Thr Ser	Glu Met His
1010	1015	1020	
Gly Ala	Arg Pro Gly Ala Ser	Lys Ala Val Val Ile	Leu Val Thr
1025	1030	1035	
Asp Val	Ser Val Asp Ser Val	Asp Ala Ala Ala Asp	Ala Ala Arg
1040	1045	1050	
Ser Asn	Arg Val Thr Val Phe	Pro Ile Gly Ile Gly	Asp Arg Tyr
1055	1060	1065	
Asp Ala	Ala Gln Leu Arg Ile	Leu Ala Gly Pro Ala	Gly Asp Ser
1070	1075	1080	
Asn Val	Val Lys Leu Gln Arg	Ile Glu Asp Leu Pro	Thr Met Val
1085	1090	1095	
Thr Leu	Gly Asn Ser Phe Leu	His Lys Leu Cys Ser	Gly Phe Val
1100	1105	1110	
Arg Ile	Cys Met Asp Glu Asp	Gly Asn Glu Lys Arg	Pro Gly Asp
[0022]	1115	1120	1125
Val Trp	Thr Leu Pro Asp Gln	Cys His Thr Val Thr	Cys Gln Pro
1130	1135	1140	
Asp Gly	Gln Thr Leu Leu Lys	Ser His Arg Val Asn	Cys Asp Arg
1145	1150	1155	
Gly Leu	Arg Pro Ser Cys Pro	Asn Ser Gln Ser Pro	Val Lys Val
1160	1165	1170	
Glu Glu	Thr Cys Gly Cys Arg	Trp Thr Cys Pro Cys	Val Cys Thr
1175	1180	1185	
Gly Ser	Ser Thr Arg His Ile	Val Thr Phe Asp Gly	Gln Asn Phe
1190	1195	1200	
Lys Leu	Thr Gly Ser Cys Ser	Tyr Val Leu Phe Gln	Asn Lys Glu
1205	1210	1215	
Gln Asp	Leu Glu Val Ile Leu	His Asn Gly Ala Cys	Ser Pro Gly
1220	1225	1230	

Ala Arg Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala		
1235	1240	1245
Leu Ser Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly		
1250	1255	1260
Arg Leu Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn		
1265	1270	1275
Val Tyr Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly		
1280	1285	1290
His Ile Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln		
1295	1300	1305
Leu Ser Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly		
1310	1315	1320
Ile Cys Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly		
1325	1330	1335
[0023] Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val		
1340	1345	1350
Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys		
1355	1360	1365
Leu Val Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu		
1370	1375	1380
Phe Ala Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala		
1385	1390	1395
Ile Cys Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val		
1400	1405	1410
Ile Ala Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val		
1415	1420	1425
Asp Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser		
1430	1435	1440
Leu Val Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp		

1445	1450	1455
Gly Asn Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe		
1460	1465	1470
Cys Pro Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu		
1475	1480	1485
Glu Ala Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln		
1490	1495	1500
Phe Leu Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys		
1505	1510	1515
Thr Cys Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys		
1520	1525	1530
Pro Thr Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg		
1535	1540	1545
Leu Arg Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val		
[0024] 1550	1555	1560
Cys Asp Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu		
1565	1570	1575
Arg Gly Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro		
1580	1585	1590
Asn Phe Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser		
1595	1600	1605
Pro Pro Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr		
1610	1615	1620
Gln Cys Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser		
1625	1630	1635
Thr Val Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn		
1640	1645	1650
Asp Cys Gly Cys Thr Thr Thr 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		
[0025] 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

[0026] Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp
 1970 1975 1980

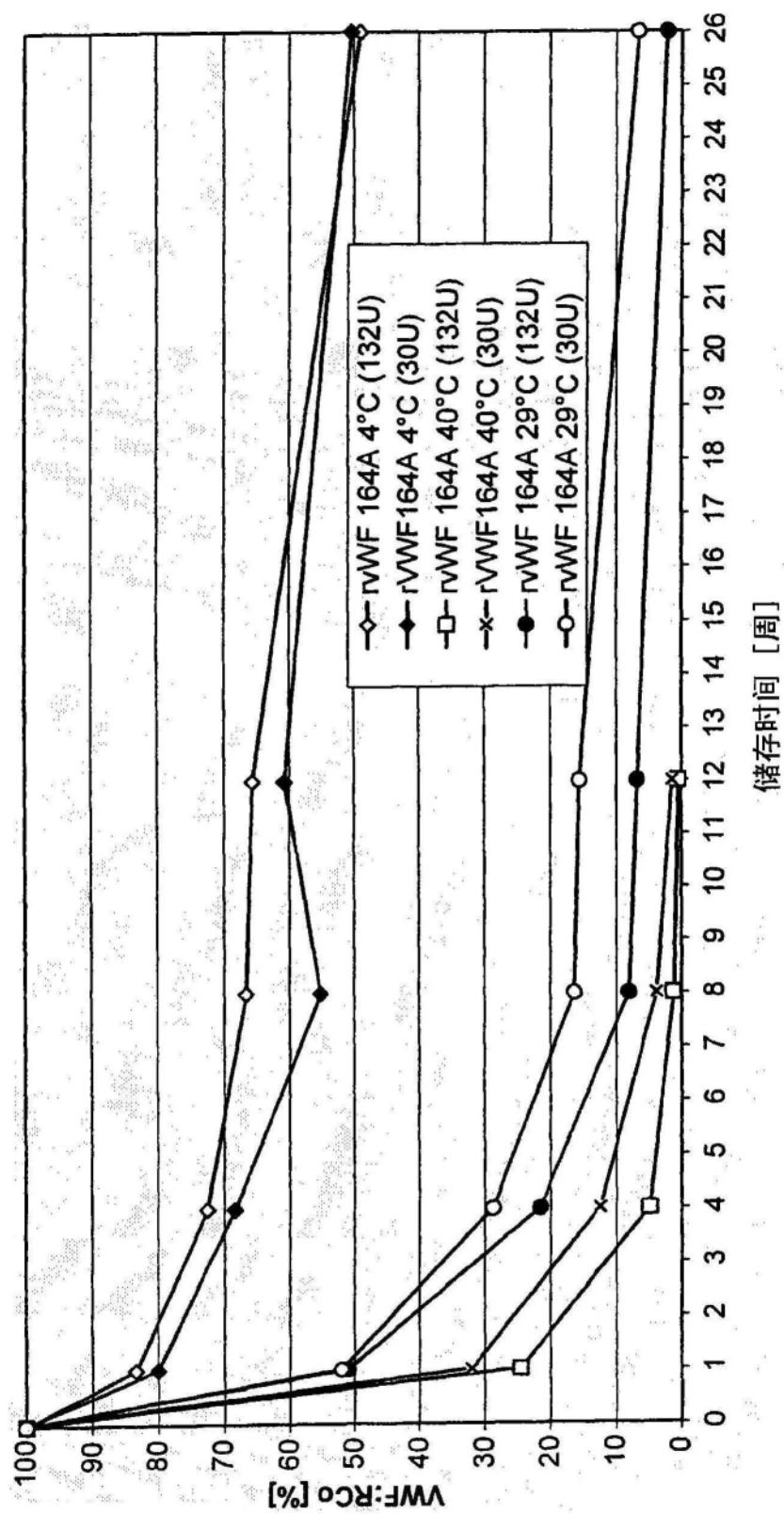
Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser
 1985 1990 1995

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

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

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

Ser Pro Arg Lys Cys Ser Lys
 2045 2050



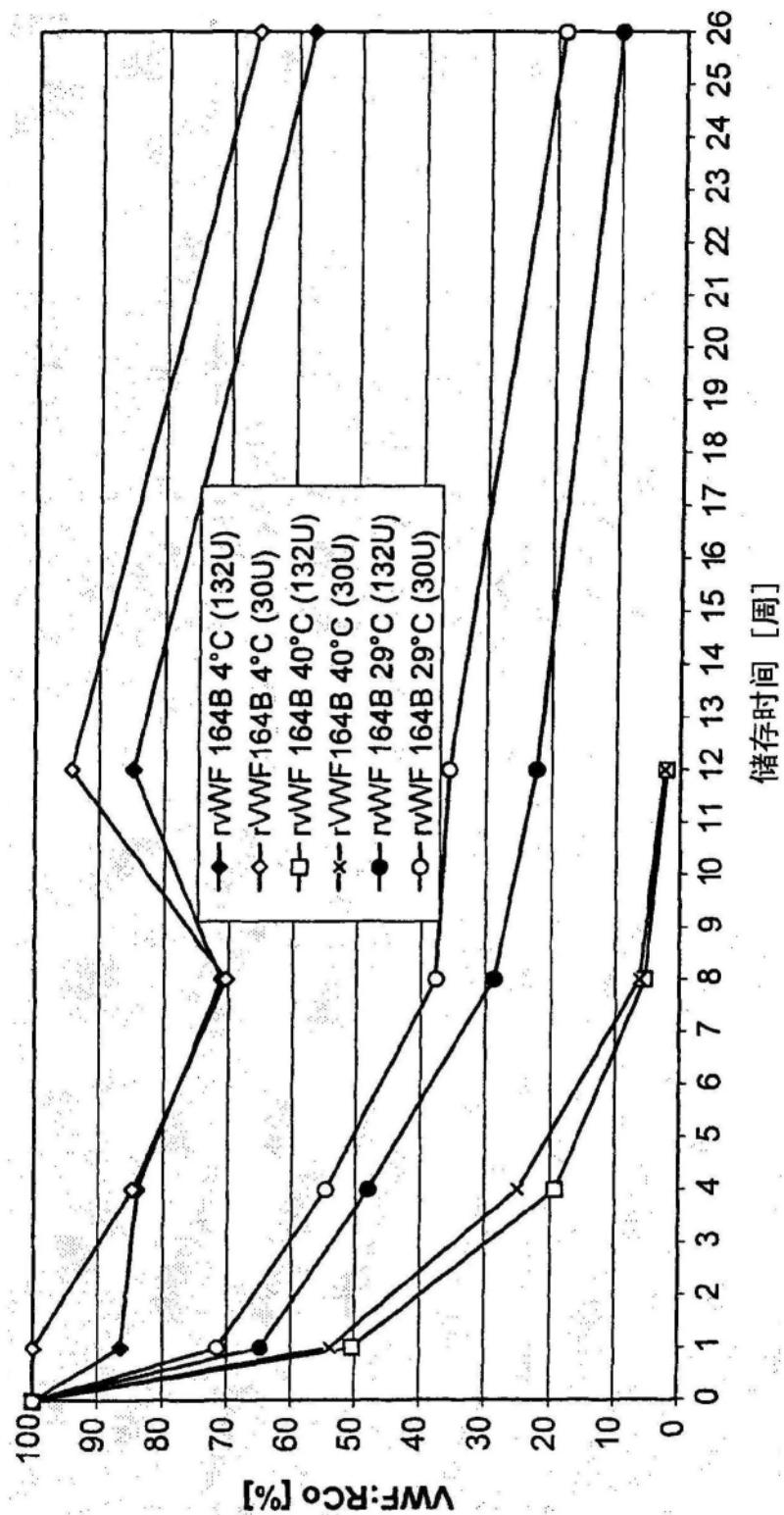


图2

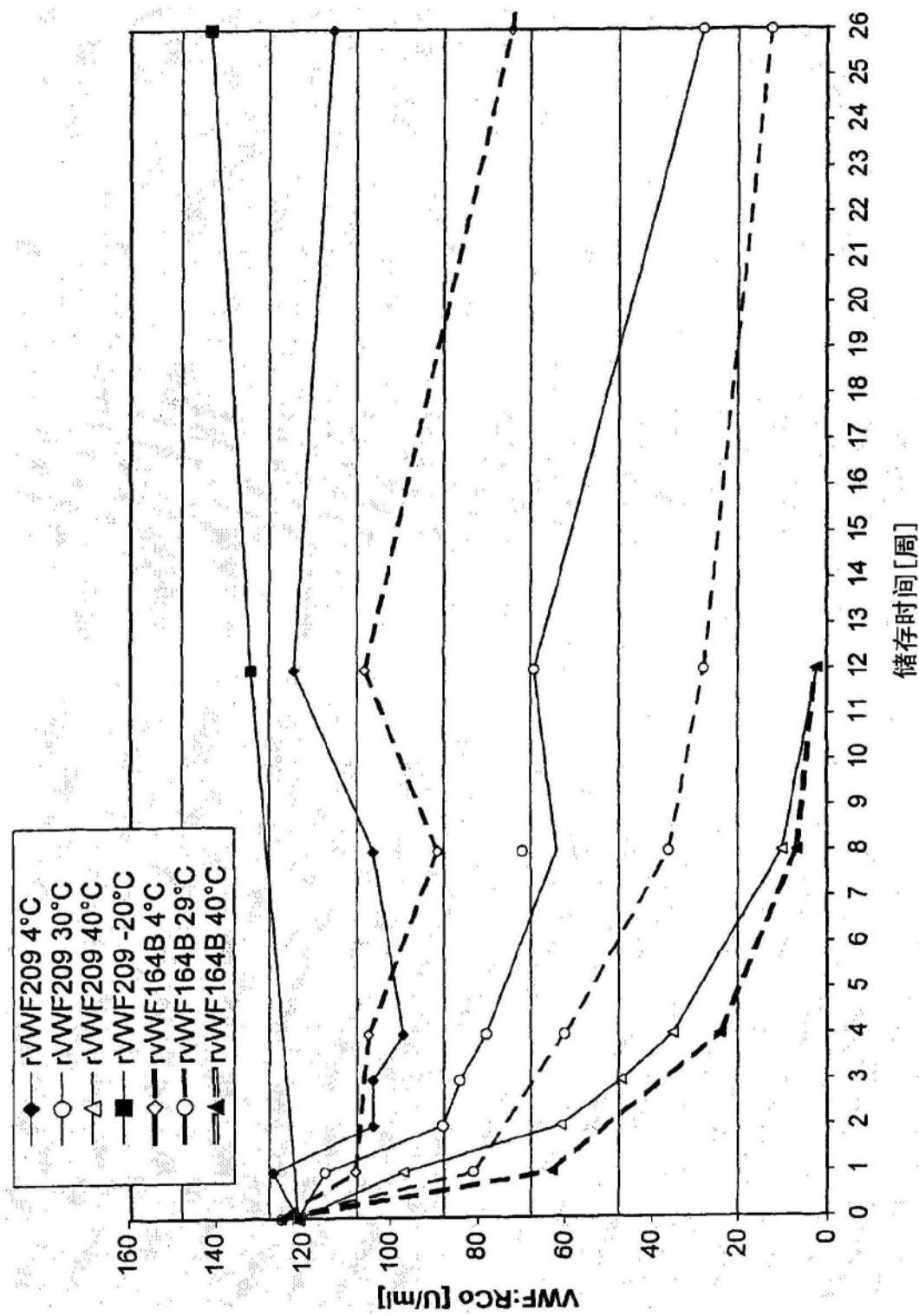


图3

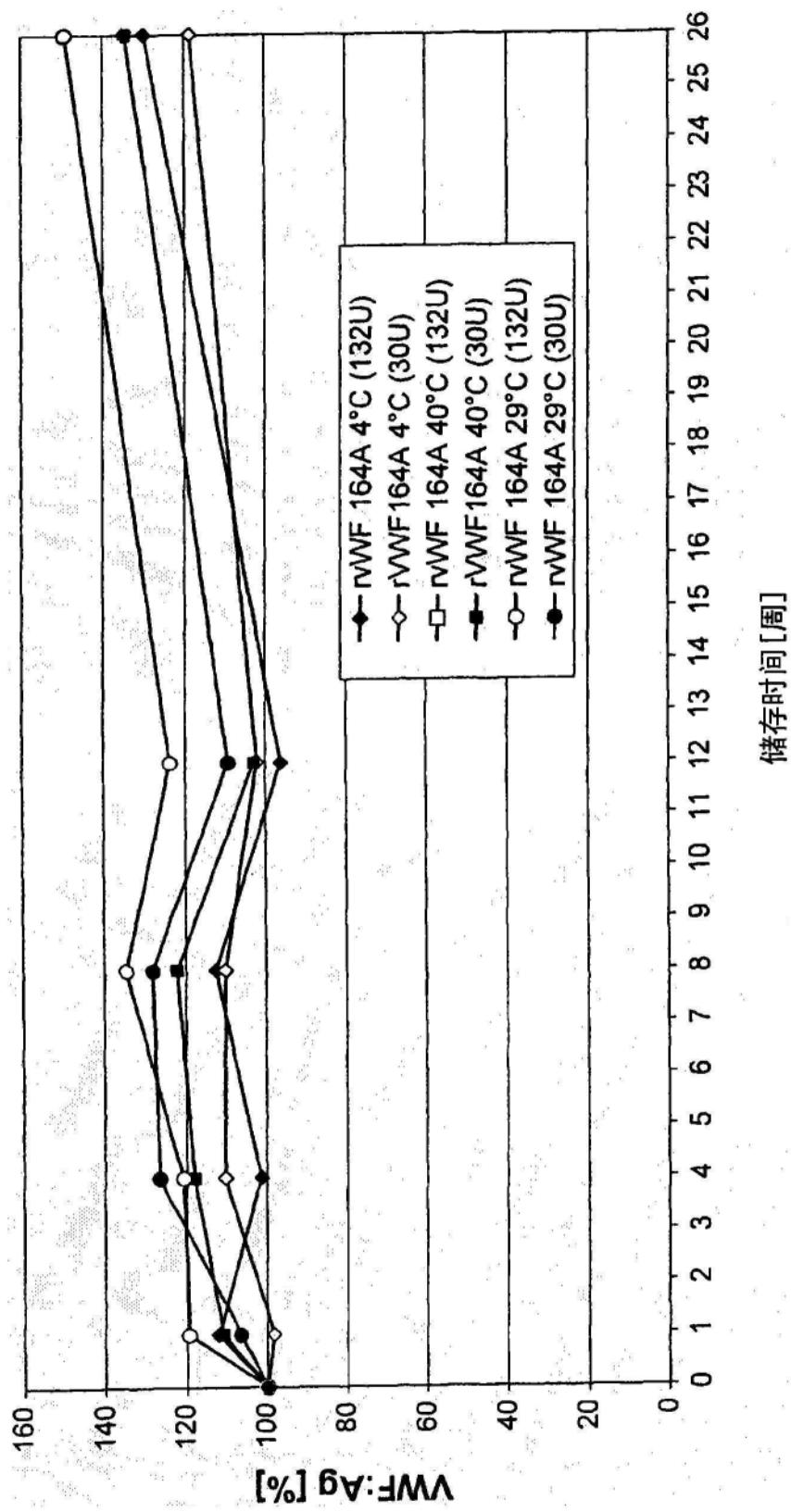


图4

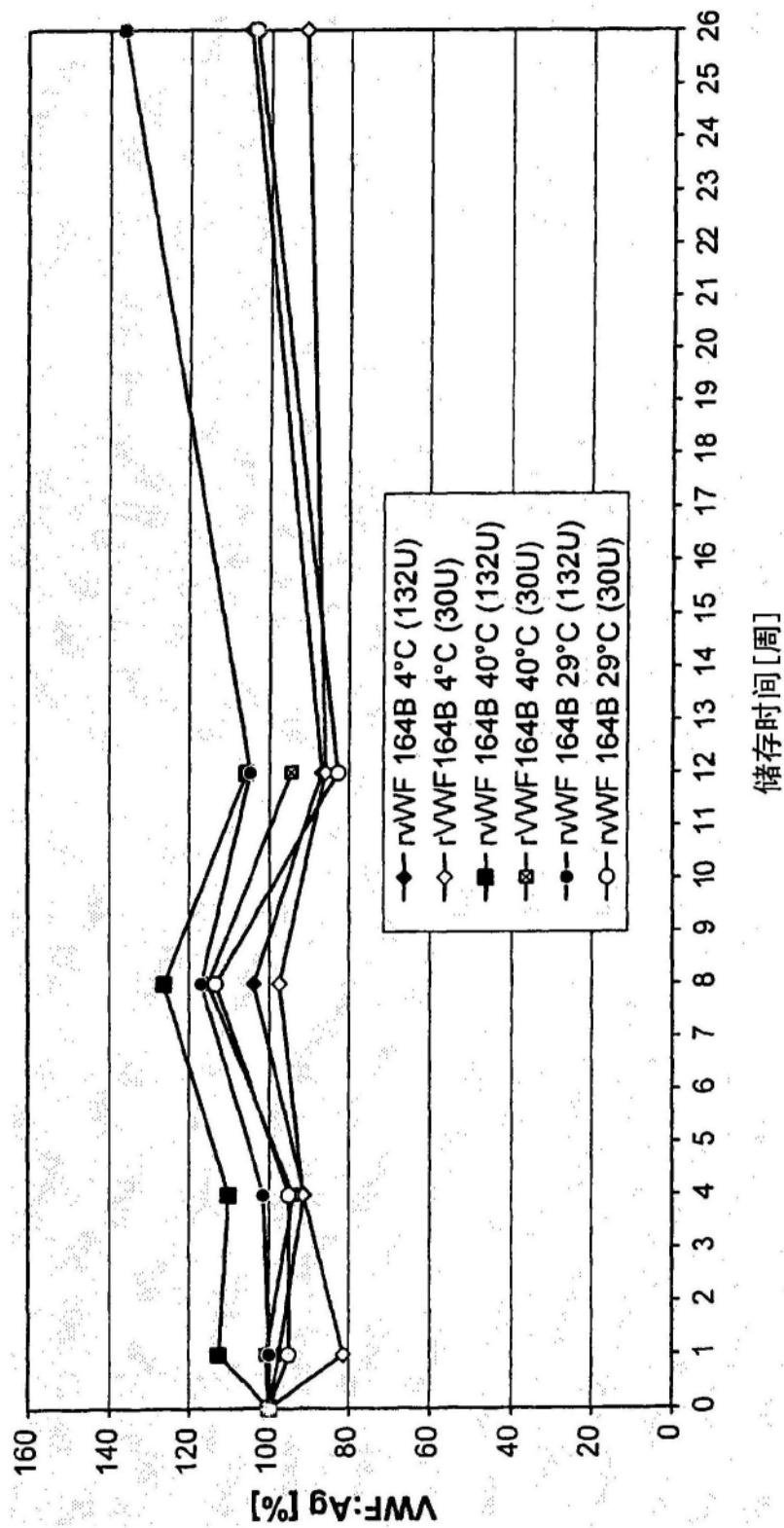


图5

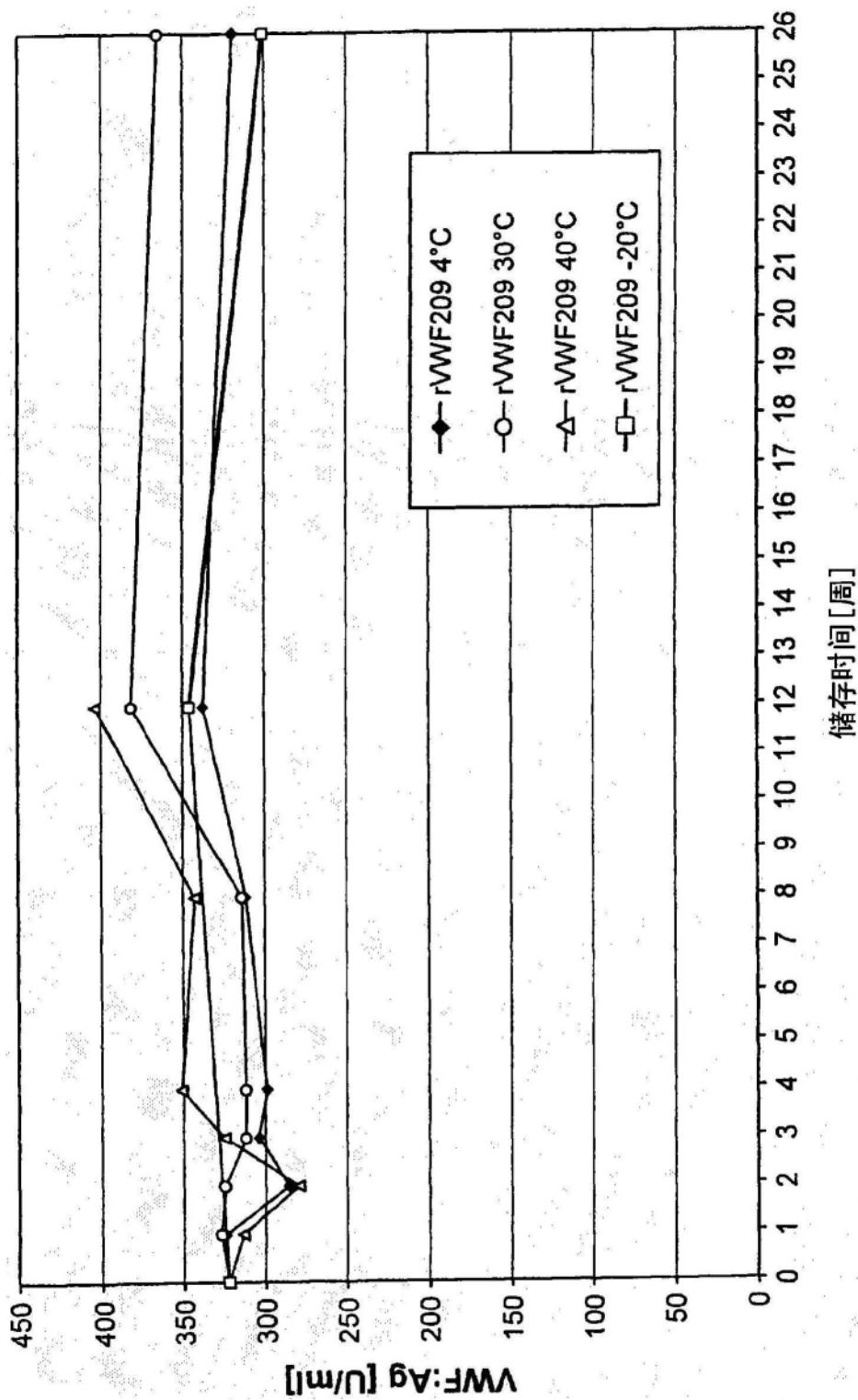


图6

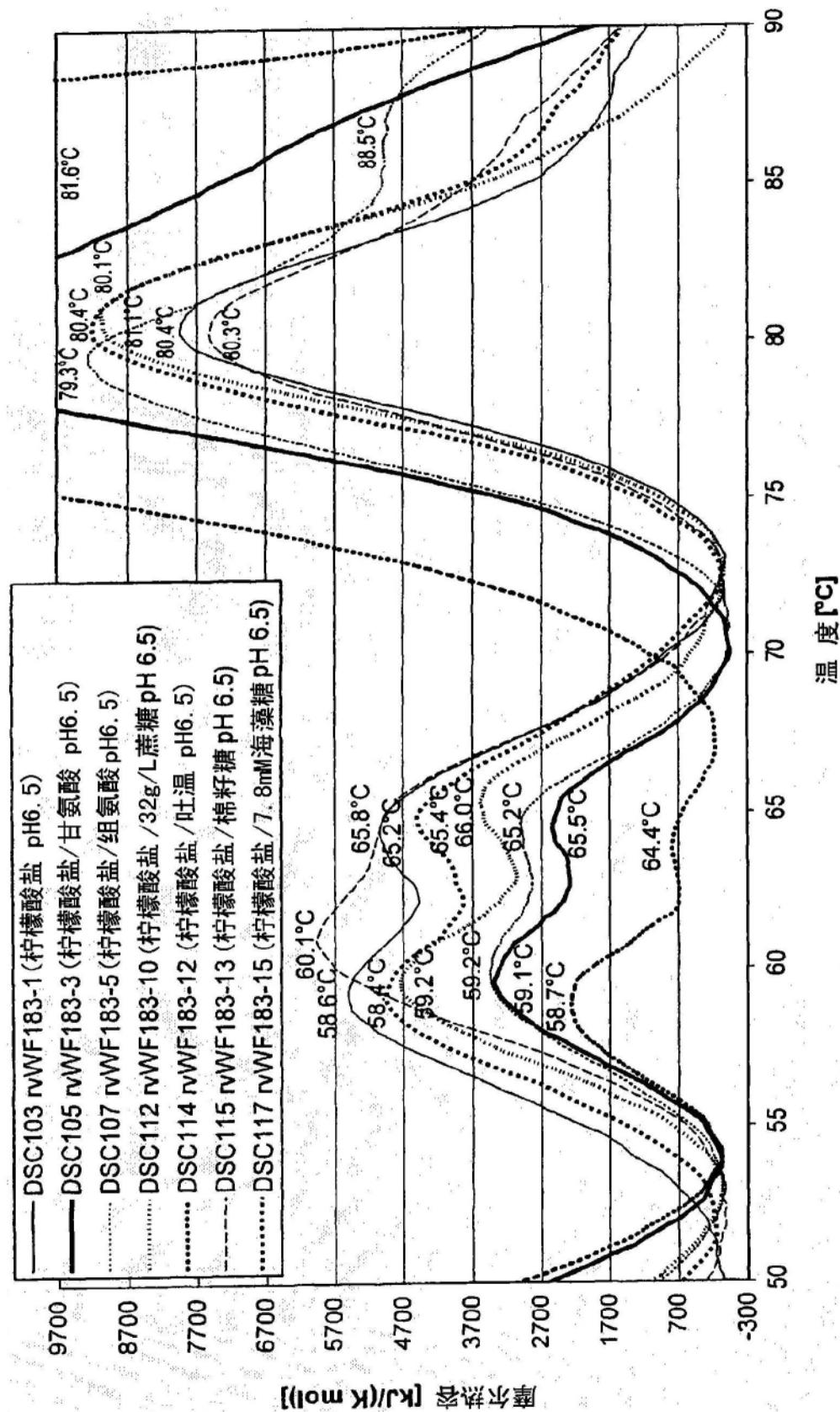


图7

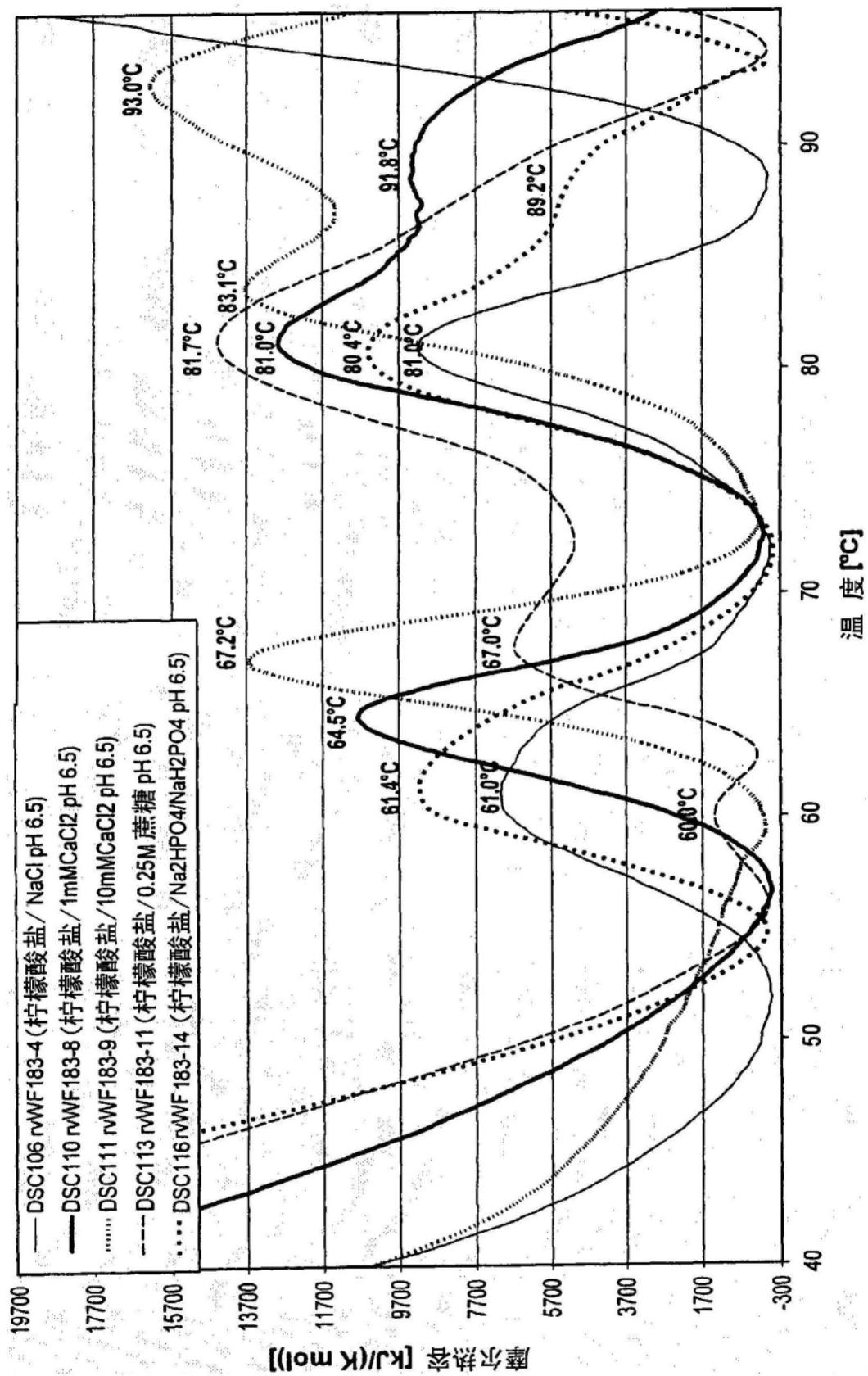


图8

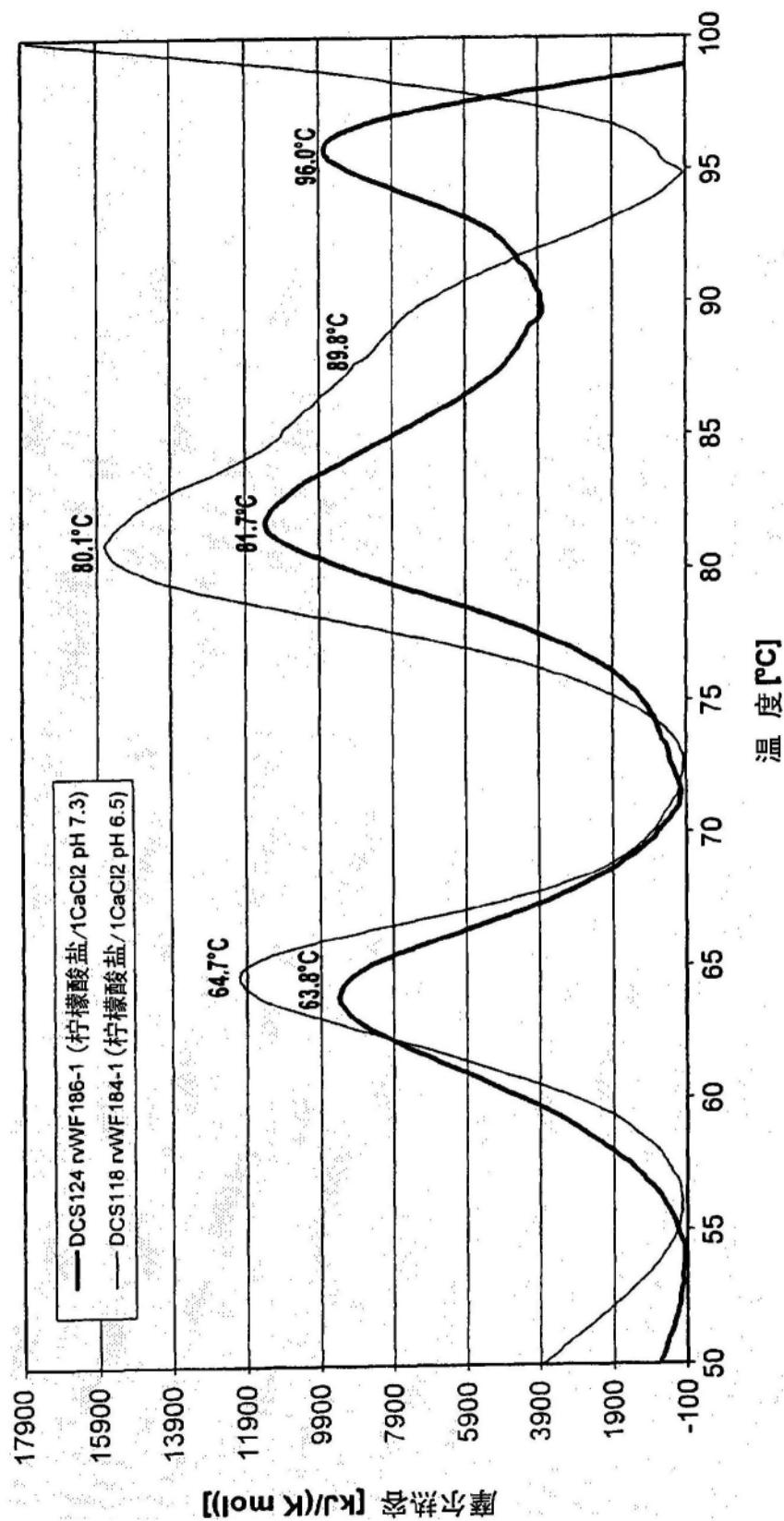


图9