



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110063935 B

(45) 授权公告日 2021. 11. 09

(21) 申请号 201811423557.0
(22) 申请日 2014.05.16
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110063935 A

A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
C07K 16/36 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.07.30
(30) 优先权数据
61/824,523 2013.05.17 US

(56) 对比文件
CN 102753148 A,2012.10.24
US 2012/0225072 A1,2012.09.06
CN 101977654 A,2011.02.16
CN 1628129 A,2005.06.15

(62) 分案原申请数据
201480034630.9 2014.05.16

Hans Ulrichs et al.Antithrombotic drug candidate ALX-0081 shows superior preclinical efficacy and safety compared with currently marketed antiplatelet drugs.《THROMBOSIS AND HEMOSTASIS》.2011,第118卷(第3期),第757-765页.

(73) 专利权人 埃博灵克斯股份有限公司
地址 比利时茨维纳德

Jozef Bartunek et al.Novel Antiplatelet Agents: ALX-0081, a Nanobody Directed towards von Willebrand Factor.《Journal of Cardiovascular Translational Research》.2013,第6卷第355-363页.

(72) 发明人 伊夫·梅维斯
韦罗妮克·德布拉邦德里
汉斯·乌尔里克 安·布里热
菲利普·卡勒韦尔特

审查员 孙妍妍

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

权利要求书2页 说明书65页
序列表29页 附图11页

(51) Int.Cl.
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) 发明名称
免疫球蛋白单可变结构域的稳定制剂及其
应用

剂相容。

(57) 摘要
本发明涉及多肽,例如免疫球蛋白单可变结构域,特别是针对冯维勒布兰德因子(vWF)的免疫球蛋白单可变结构域的稳定制剂。本发明提供的制剂在延长时间的储存后以及在宽范围的温度下是稳定的。本发明的制剂确保多肽的高稳定性,允许进行多次冻融循环,而不发生化学或物理变质,并且提供与机械应力相关的稳定性,所述机械应力例如震动、剪切或搅拌应力。它们适用于药物和诊断制剂,并且与药学可接受的稀释

CN 110063935 B

1. 制剂,其包含冯维勒布兰德因子(vWF)结合剂、柠檬酸盐缓冲液、赋形剂和吐温-80,其中:

- (a) 所述vWF结合剂具有从0.1mg/mL至80mg/mL的浓度;
- (b) 所述赋形剂为蔗糖,其浓度为5w/v%至15w/v%;
- (c) 吐温-80具有0.001v/v%至0.5v/v%的浓度;和
- (d) 所述柠檬酸盐缓冲液具有5mM至200mM的浓度,使得所述制剂的pH为6.0至7.0,和其中所述vWF结合剂由SEQ ID NO:1组成。

2. 根据权利要求1的制剂,其中:

- (a) 所述vWF结合剂具有12.5mg/mL的浓度;
- (b) 蔗糖具有7w/v%的浓度;
- (c) 吐温-80具有0.01v/v%的浓度;
- (d) 所述柠檬酸盐缓冲液具有20mM的浓度;和
- (e) 所述制剂具有pH 6.5。

3. 根据权利要求1的制剂,其具有:

- (i) 在5℃储存至少12个月之后,少于5%的高分子量物质;和/或
- (ii) 在5℃储存至少12个月之后,少于5%的低分子量物质。

4. 根据权利要求1的制剂,其中所述制剂中的vWF结合剂在5℃下储存至少12个月后保持其至少80%的稳定性。

5. 根据权利要求1的制剂,其中与储存之前的结合活性相比,在储存之后,至少80%,至少90%,至少95%或者至少99%的所述vWF结合剂保持其结合活性,所述结合活性通过ELISA和/或Biacore测量。

6. 根据权利要求1的制剂,其是液体制剂或重构的冻干制剂。

7. 根据权利要求6的制剂,其中vWF结合剂的浓度为10mg/ml或12.5mg/mL。

8. 根据权利要求6的制剂,其中蔗糖的浓度为7w/v%。

9. 根据权利要求6的制剂,其中吐温-80的浓度为0.01v/v%。

10. 根据权利要求6的制剂,其中柠檬酸盐缓冲液的浓度为20mM。

11. 根据权利要求6的制剂,其中所述制剂的pH为6.5。

12. 根据权利要求1的制剂,其是散装储存制剂,其中至少100升所述制剂被储存在低于冷冻条件。

13. 根据权利要求12的制剂,其中vWF结合剂的浓度为10mg/ml或12.5mg/mL。

14. 根据权利要求12的制剂,其中蔗糖的浓度为7w/v%。

15. 根据权利要求12的制剂,其中吐温-80的浓度为0.01v/v%。

16. 根据权利要求12的制剂,其中柠檬酸盐缓冲液的浓度为20mM。

17. 根据权利要求12的制剂,其中所述制剂的pH为6.5。

18. 根据权利要求1的制剂,其是液体的、冻干的、喷雾干燥的或冷冻形式。

19. 根据权利要求1的制剂,其是重构的冻干形式。

20. 制备根据权利要求1-19任一项的制剂的方法或工艺,其中所述方法或工艺包括以下步骤:

- 在细胞培养物中表达所述vWF结合剂;

-使所述vWF结合剂通过色谱纯化步骤和超滤/渗滤步骤中至少之一,纯化所述vWF结合剂;

-将所述vWF结合剂的浓度调整至在制剂中为0.1-80mg/mL,所述制剂含有:

(i) 浓度为5w/v%至15w/v%的蔗糖;

(ii) 浓度为0.001v/v%至0.5v/v%的吐温-80;和

(iii) 浓度为5mM至200mM的柠檬酸盐缓冲液,以使得所述制剂的pH为6.0-7.0。

21. 根据权利要求20的方法,其中vWF的浓度为10mg/ml或12.5mg/mL。

22. 根据权利要求20的方法,其中蔗糖的浓度为7w/v%。

23. 根据权利要求20的方法,其中吐温-80的浓度为0.01v/v%。

24. 根据权利要求20的方法,其中柠檬酸盐缓冲液的浓度为20mM。

25. 根据权利要求20的方法,其中所述制剂的pH为6.5。

26. 制备根据权利要求1-19任一项的制剂的方法,其中所述方法包括下述步骤: (i) 将vWF结合剂、冻干保护剂蔗糖、表面活性剂吐温-80和柠檬酸盐缓冲液的混合物冻干,由此形成冻干混合物;和(ii) 在稀释剂中重构所述冻干混合物,由此制备所述制剂,其中重构制剂包含

(a) vWF结合剂,其浓度为0.1mg/mL至80mg/mL;

(b) 蔗糖,其浓度为5w/v%至15w/v%;

(c) 吐温-80,其浓度为0.001v/v%-0.5v/v%;和

(d) 柠檬酸盐缓冲液,其浓度为5mM至200mM,以使得所述制剂的pH为6.0-7.0。

27. 根据权利要求26的方法,其中vWF的浓度为10mg/ml或12.5mg/mL。

28. 根据权利要求26的方法,其中蔗糖的浓度为7w/v%。

29. 根据权利要求26的方法,其中吐温-80的浓度为0.01v/v%。

30. 根据权利要求26的方法,其中柠檬酸盐缓冲液的浓度为20mM。

31. 根据权利要求26的方法,其中所述制剂的pH为6.5。

32. 试剂盒或制品,其包含:含有权利要求1-19任一项的制剂的容器,和使用说明。

33. 权利要求32的试剂盒或制品,其中所述制剂存在于药瓶或注射液注射器中。

免疫球蛋白单可变结构域的稳定制剂及其应用

[0001] 本申请是国际申请号PCT/EP2014/060107,国际申请日2014年5月16日,中国申请号201480034630.9,发明名称为“免疫球蛋白单可变结构域的稳定制剂及其应用”的专利申请的分案申请。

1. 发明领域

[0002] 本发明涉及多肽,例如免疫球蛋白单可变结构域,特别是针对冯维勒布兰德因子(von Willebrand Factor, vWF)的免疫球蛋白单可变结构域,例如根据SEQ ID NO:s 1-19的免疫球蛋白单可变结构域,特别是SEQ ID NO:1,即纳米抗体(Nanobody) ALX-0081的稳定制剂。

[0003] 本发明提供的制剂在延长时间的储存后以及在宽范围的温度下是稳定的。本发明的制剂确保多肽的高稳定性,允许进行多次冻融循环,而不发生化学或物理变质,并且提供与机械应力相关的稳定性,所述机械应力例如震动、剪切或搅拌应力。它们适用于药物和诊断制剂,并且与药学可接受的稀释剂,例如盐水、Ringer's溶液或葡萄糖/右旋糖溶液相容。

[0004] 本发明还涉及该制剂的制备方法、储存方法和应用。本发明进一步涉及该制剂的剂量单位形式、试剂盒和医疗应用。

[0005] 2. 发明背景

[0006] 免疫球蛋白单可变结构域,例如骆驼VHH结构域、骆驼源化VH结构域或人源化VHH结构域,代表了一种迅速增长类别的抗体疗法。例如,针对vWF的免疫球蛋白单可变结构域已在W02004/015425、W02004/062551、W02006/074947、W02006/122825、W02009/115614、和W02011/067160中进行了描述。

[0007] 蛋白质例如免疫球蛋白单可变结构域(ISVDs)在最初的制造和应用如给患者施用之间的过程中通常必须进行储存和运输。运输、制造、储存和分发过程可能对免疫球蛋白单可变结构域施加多种胁迫/应力(stress),例如化学和物理胁迫/应力。在储存过程中可能发生例如,如脱酰胺、外消旋化、水解、氧化、异构化、 β -消除或二硫键交换的化学改变。物理胁迫可能引起变性和去折叠、聚集、微粒形成、沉淀、乳浊或吸附。

[0008] 仍然需要提供用于免疫球蛋白单可变结构域的制剂,例如如本文所定义的,这种制剂提高稳定性,保护活性剂抵抗化学和/或机械胁迫,并且由此使得可以储存和发生温度变化,而不会有显著的物理或化学变质,在延长的时间中保持稳定,和/或是令患者感觉舒适的,例如其中活性剂在高浓度下是可溶的。

[0009] 3. 发明概述

[0010] 已知上述提及的胁迫可影响蛋白质疗法,例如抗体疗法的物理化学完整性。例如,聚集、脱酰胺和氧化被描述是引起抗体降解的最普遍的原因(Cleland等,1993, Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Systems 10,307-377)。同时,提供能保持免疫球蛋白单可变结构域的化学和物理完整性的制剂是有帮助的。化学和物理完整性对于例如治疗剂的使用来说是必需的,而且通常也与生物活性相关。虽然我们对于蛋白质稳定性的知识在增加,但是优化制剂条件以完全抑制这些各种胁迫或使其减至最小,并且确保延长的保存期,仍

然是一个重大挑战。

[0011] 对于免疫球蛋白单可变结构域的合适制剂所知甚少。WO2010/077422描述了TNF结合纳米抗体的制剂,其包含冻干保护剂、表面活性剂和缓冲液,所述缓冲液选自pH在5.0-7.5之间的组氨酸缓冲液和Tris-HCl缓冲液。

[0012] 特定的vWF结合剂,特别是与vWF具有高亲和力的免疫球蛋白单可变结构域例如ALX-0081[INN:caplacizumab],已作为急性冠状动脉综合征(ACS)患者的辅助治疗进行测试,所述患者接受经皮冠状动脉介入治疗(PCI),并且特定vWF结合剂已被开发用于治疗血栓性血小板减少性紫癜(TTP)。已经成功完成I期临床实验,正在进行II期临床实验的测试。到目前为止,ALX-0081是基于磷酸盐的液体制剂,其中含有D-PBS中的5mg/mL的活性药物成分(API)、200mM甘氨酸和0.02%吐温-80(v/v)。

[0013] 虽然这种制剂被证明是有效的,但是它在几个方面还可以改进。首先,目前的浓度可能需要进行多次皮下注射(假设每次皮下注射的体积限制在大约1mL),因此降低了患者舒适感和便利性。其次,可以提高目前的ALX-0081制剂(在下文中也被称为同期ALX-0081)在升高的温度下的储存稳定性和保存期。现在的制剂在高温下的稳定性主要由多肽上的化学改变决定。化学改变可能与效力损失有关。虽然可以通过在-20℃储存产品来获得可行的保存期,但是这对于大部分的实用目的来说不是令人满意的选择。

[0014] 冷冻干燥是蛋白质保存中普遍使用的技术,其用于从感兴趣的蛋白质制备物中除去水分。冷冻干燥(Freeze-drying)或冻干(lyophilization)的过程是这样的:要被干燥的物质首先被冷冻,然后通过真空环境下升华除去冰或冻结的溶剂。在预冻干制剂中可以包括赋形剂,以提高冷冻干燥过程中的稳定性和/或提高冻干产物在储存时的稳定性(Arakawa等Pharm.Res.8(3):285-291(1991))。

[0015] 本发明涉及制剂,其包含冯维勒布兰德因子(vWF)结合剂和柠檬酸盐或磷酸盐缓冲液,优选柠檬酸盐缓冲液,pH在5.0-7.5的范围内。特别地,本发明涉及本文所述的制剂,其中所述vWF结合剂包含至少一个与SEQ ID NO:20结合的免疫球蛋白单可变结构域。

[0016] 所述免疫球蛋白单可变结构域包含下述种类或基本上由它们组成,但不限于它们:免疫球蛋白单可变结构域,其是重链可变结构域序列,更特别是免疫球蛋白单可变结构域,其是来自于常规四链抗体的重链可变结构域序列,或是来自重链抗体或纳米抗体(包括但不限于VHH序列)、优选纳米抗体的重链可变结构域序列。

[0017] 此外,本发明涉及本文所述的制剂,其中所述vWF结合剂包含SEQ ID NO:s 1-19中的至少之一。而且,本发明涉及本文所述的制剂,其中所述vWF结合剂是包含一个或多个免疫球蛋白单可变结构域的单链多肽,优选其中所述vWF-结合剂是单价的或多价的,其中所述vWF-结合剂是单特异性的或多特异性的和/或其中一个或多个免疫球蛋白单可变结构域是CDR-移植的、人源化的、骆驼源化的、去免疫的(de-immunized)、和/或在体外产生的(例如通过噬菌体展示选择的)。本发明还涉及本文所述的制剂,其中所述vWF结合剂包含与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的氨基酸序列。本发明还涉及本文所述的制剂,其中所述vWF结合剂具有0.1-80mg/mL范围内的浓度,和/或其中所述缓冲液具有5-200mM范围内的浓度。

[0018] 此外,本发明涉及本文所述的制剂,其进一步包含赋形剂,优选所述赋形剂具有10-500mM范围内的浓度,更优选地,其中所述赋形剂选自由蔗糖、甘氨酸、甘露醇、海藻糖和NaCl组成的列表,更优选地,其中所述蔗糖具有1-15%范围内的浓度,优选2-12%范围内的

浓度,优选4-10%,例如4、5、6、7、8或9% (w/v),最优选7%。

[0019] 本发明还涉及本文所述的制剂,其中缓冲液选自:柠檬酸盐缓冲液,优选所述柠檬酸盐缓冲液具有6.0-7.0之间,更优选6.5的pH;和磷酸盐缓冲液,优选所述磷酸盐缓冲液具有6.5-7.5之间,优选7.1的pH。

[0020] 此外,本发明涉及本文所述的制剂,其进一步包含非离子洗涤剂,例如吐温-80,优选浓度在0.001和0.5% (v/v) 之间,更优选在0.01-0.02% (v/v) 之间。

[0021] 进一步,本发明涉及本文所述的制剂,其中所述缓冲液是pH为 6.5 ± 0.5 ,例如6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7或6.8,更特别为6.5的柠檬酸盐缓冲液,并且其中所述制剂进一步包含蔗糖,所述蔗糖的浓度在1-15%的范围内,优选2-12%的范围内,优选4-10%的范围内,例如4、5、6、7、8或9% (w/v),最优选7%,并且优选进一步包含非离子洗涤剂例如吐温-80,其浓度优选为0.01% (v/v)。

[0022] 本发明还涉及本文所述的制剂,其中所述制剂具有 290 ± 60 mOsm/kg范围内的摩尔渗透压浓度,更优选在 290 ± 20 mOsm/kg的范围内的摩尔渗透压浓度。

[0023] 本发明进一步涉及制剂,其包含:

[0024] (a) vWF结合剂,浓度为大约0.1mg/mL至大约80mg/mL;

[0025] (b) 赋形剂,其选自蔗糖、甘氨酸、甘露醇、海藻糖或NaCl,浓度为大约1%至大约15% (w/v);

[0026] (c) 吐温-80,浓度为大约0.001%至0.5% (v/v);和

[0027] (d) 缓冲液,其选自:柠檬酸盐缓冲液,浓度为大约5mM至大约200mM,以使得制剂的pH为大约6.0-7.0;和磷酸盐缓冲液,浓度为大约10mM至大约50mM,以使得制剂的pH为大约6.5-7.5,其中制剂中的vWF结合剂在5℃储存至少12个月之后或者在5℃储存甚至24个月之后,保持至少大约80%的其稳定性。

[0028] 本发明还涉及制剂,其在5℃储存至少12个月之后或者在5℃储存甚至24个月之后,具有少于5%的高分子量 (HMW) 物质;和/或在5℃储存至少12个月之后或者甚至在5℃储存24个月之后,具有少于5%的低分子量 (LMW) 物质。

[0029] 本发明进一步涉及制剂,其中与储存之前的结合活性相比,在储存之后,至少80%,优选至少90%,更优选至少95%或者甚至至少99%的vWF结合剂保持其结合活性,所述结合活性如ELISA和/或Biacore所测量。

[0030] 此外,本发明涉及本文所述的制剂,其中所述制剂是液体、冻干的、喷雾干燥的、重构的冻干或冷冻形式,更特别地,本发明涉及液体或重构的冻干制剂,其包含:

[0031] (a) vWF结合剂,浓度为大约0.1mg/mL至大约80mg/mL;

[0032] (b) 蔗糖,浓度为大约1%至大约15% (w/v);

[0033] (c) 吐温-80,浓度为大约0.001%-0.5% (v/v);和

[0034] (d) 柠檬酸盐缓冲液,浓度为大约5mM至大约200mM,以使得制剂的pH为大约6.0-7.0。

[0035] 冻干制剂随后可以根据需要进行重构,通过将冻干形式与稀释剂(例如水)混合,以将原始的制剂组分重新溶解至所希望的浓度。

[0036] 本发明还涉及本文所述的制剂,其中所述制剂是散装储存 (bulk storage) 制剂,包含:

[0037] (a) vWF结合剂,浓度为大约0.1mg/mL至大约80mg/mL;

[0038] (b) 蔗糖,浓度为大约1%至大约15%;

[0039] (c) 吐温-80,浓度为大约0.001%-0.5% (v/v);和

[0040] (d) 柠檬酸盐缓冲液,浓度为大约5mM至大约200mM,以使得制剂的pH为大约6.0-7.0,其中至少100L所述制剂被储存在低于冷冻条件。

[0041] 此外,本发明涉及制剂,其中所述制剂适合于给受试者,例如人受试者(例如患有vWF相关病症的患者)肠胃外给药。该制剂可以通过注射(例如静脉内、皮下、肌内或腹膜内)给患者施用。

[0042] 本发明还提供本文所述的制剂,以用于人或动物受试者的治疗方法,优选用于治疗vWF-相关病症,例如急性冠状动脉综合征(ACS)、短暂性脑缺血发作、不稳定型或稳定型心绞痛、卒中、心肌梗死或血栓性血小板减少性紫癜(TTP),最优选用于治疗TTP或ACS。而且,本发明涉及制备本文所述的制剂的方法或工艺。所述方法或工艺包括在细胞培养物中表达vWF结合剂;纯化vWF结合剂,例如通过使vWF结合剂通过色谱纯化步骤、超滤/渗滤步骤中的至少一个;调整vWF结合剂的浓度,例如调整至在制剂中为大约0.1-80mg/mL,所述制剂含有本文所述的冻干保护剂、表面活性剂和缓冲液,例如浓度为大约1%至大约15%的蔗糖;浓度为大约0.001%至大约0.5% (w/v) 的吐温-80;和浓度为大约5mM至大约200mM的柠檬酸盐缓冲液,以使得制剂的pH为大约6.0-7.0;以及任选地包含将制剂配制成剂量单位形式的步骤。

[0043] 本发明还描述了制备重构制剂的方法或工艺,所述制剂含有本文所述的vWF结合剂,例如ALX-0081。该方法包括:将vWF结合剂、冻干保护剂、表面活性剂和缓冲液的混合物冻干,由此形成冻干混合物;在稀释剂中重构该冻干混合物,由此制备本文所述的制剂。特别地,该制剂包括:(a) vWF结合剂,例如ALX-0081,其浓度为大约0.1至大约80mg/mL;(b) 蔗糖,其浓度为大约1%至大约15% (w/v);(c) 吐温-80,其浓度为大约0.001%至大约0.5% (v/v);和(d) 柠檬酸盐缓冲液,其浓度为大约5至大约200mM,以使得制剂的pH为大约6-7.0;以及任选地包含将制剂配制成剂量单位形式的步骤。

[0044] 本发明进一步涉及使vWF结合剂、优选包含SEQ ID NOs:1-19至少之一的多肽稳定以进行储存的方法,包括制备如本文所述的制剂。

[0045] 此外,本发明涉及储存vWF结合剂、优选包含SEQ ID NOs:1-19至少之一的多肽的方法,包括制备如本文所述的制剂。

[0046] 还提供了药物或诊断组合物,其包含本文所述的或者由本文所述的方法能够获得的任一种制剂。

[0047] 进一步,本发明描述了分析产品或工艺、例如制造工艺的方法。该方法包括提供如本文所述的vWF结合剂、例如ALX-0081的制剂,评估制剂的参数,例如颜色、透明度、粘度或一种或多种HMW、LMW物质的量,如本文所述的。这种评价可以包括一个或多个参数的评估,例如确定该参数是否符合预选的标准,例如确定预选的标准是否存在,或者是否在预选的范围内,由此分析该过程。例如,过程的评价包括vWF结合剂制剂稳定性的测量。如本文所述,可以例如通过聚集体形成、通过颜色、透明度、或粘度测量ALX-0081制剂的稳定性,所述聚集体形成通过,例如尺寸排阻高压液相色谱(SE-HPLC)测定。

[0048] 此外,该方法可以进一步包括:在监视或控制批间差异的方法中比较两个或更多

个样品制剂,将制剂与参考标准比较,在比较的基础上分类、选择、接受或丢弃、放行或扣留、加工成为药品、运输、移至异地、配制、加标签、或包装制剂。该方法还可以进一步包括:提供记录,所述记录包括与制剂的评估参数有关的数据,并且任选地包括制剂批次的标识符;将所述记录提交给决策者;任选地,接收来自所述决策者的通讯;任选地,根据来自决策者的通讯决定是否将该批次的制剂放行或上市。

[0049] 还提供包含本发明制剂和供例如医疗保健专家使用的说明书的试剂盒或制品。该试剂盒或制品可以包括含有本文所述的本发明制剂的药瓶或注射器。优选地,所述药瓶或注射器由玻璃、塑料、或选自环烯烃聚合物或共聚物的聚合物材料组成。而且,该制剂还可以存在于注射液装置(例如注射液(injectable)注射器,例如预装药品的注射液注射器)中。

[0050] 本发明进一步提供药物单位剂型,其包含本发明的稳定制剂,所述剂型适合于将本发明制剂对人患者进行肠胃外给药(例如皮内、肌内、腹膜内、静脉内和皮下)。

[0051] 而且,本发明制剂可用于储存vWF结合剂,优选包含本文所述的SEQ ID NO:s 1-19中的至少之一的多肽,例如ALX-0081,其中所述储存是1-36个月,例如1、1.5、3、6、9、12、18、24、30或36个月,优选至少12个月,例如在-70℃和+40℃之间的温度下,例如-70℃、-20℃、+5℃、+25℃或+40℃,优选在-70℃和+25℃之间的温度下。

[0052] 本发明还涉及治疗或预防vWF-相关病症的方法,例如急性冠状动脉综合征(ACS)、短暂性脑缺血发作、不稳定型或稳定型心绞痛、卒中、心肌梗死或血栓性血小板减少性紫癜(TTP);所述方法包括给受试者施用包含本发明制剂的药物组合物,由此减少与所述vWF-相关病症有关的一个或多个症状。特别地,所述vWF-相关病症是TTP。

[0053] 4.附图简述

[0054] 图1流程图,描述了对ALX-0081进行的标准65h-冻干程序的不同步骤。

[0055] 图2A在-70℃、+5℃和+25℃储存1和2个月之后ALX-0081的RP-HPLC色谱图的相关部分;mAU:毫吸光度单位。

[0056] 图2B在37℃温育0、4和8周之后ALX-0081的RP-HPLC色谱图的相关部分的放大图。观察到由于在37℃的延长的温育(0,4,8w)导致RP-HPLC主峰的分裂;mAU:毫吸光度单位。

[0057] 图3A空白柠檬酸盐缓冲液(bcb)和在20mM pH 7.0的柠檬酸盐中的55.9mg/mL的ALX-0081在冻融之前(a)以及在-20℃(c)和-70℃(b)进行10个冻融(FT)循环之后的SE-HPLC图谱的叠加($\lambda=280\text{nm}$)。对于在运行缓冲液中预稀释的样品,观察到小的柠檬酸盐峰;mAU:毫吸光度单位。

[0058] 图3B空白柠檬酸盐缓冲液(bcb)和在20mM pH 7.0的柠檬酸盐中的55.9mg/mL的ALX-0081在+4℃储存 ± 1 周后的SE-HPLC图谱的叠加($\lambda=280\text{nm}$)。ALX-0081分解为与完整的、未改变的ALX-0081相符的一个主峰(97%)和仅代表总表面积的3%的多个小的前峰。对于在运行缓冲液中预稀释的ALX-0081,观察到小的柠檬酸盐峰;mAU:毫吸光度单位。

[0059] 图4A在+25℃在pH 6.0的50mM的柠檬酸盐中、pH 6.0的50mM的柠檬酸盐+0.01%吐温-80(v/v)中和pH 6.0的50mM的柠檬酸盐+0.02%吐温-80(v/v)中搅拌的ALX-0081样品的散射强度。“+”表示在pH 6.0的50mM的柠檬酸盐中的样品($y=0.0044x+3.5962, R^2=0.9549$);“o”表示在pH6.0的50mM的柠檬酸盐+0.02%吐温-80(v/v)中的样品($y=0.0002x+1.0447, R^2=0.4673$);“x”表示在pH 6.0的50mM的柠檬酸盐+0.01%吐温-80(v/v)中的样品

($y=0.0004x+0.5125$, $R^2=0.6804$) ; (x -周=时间,单位为秒; y -轴=散射强度)。

[0060] 图4B在+25℃在pH 6.5的50mM的柠檬酸盐中、pH 6.5的50mM的柠檬酸盐+0.01%吐温-80 (v/v) 中和pH 6.5的50mM的柠檬酸盐+0.02%吐温-80 (v/v) 中搅拌的ALX-0081样品的散射强度。“+”表示在pH 6.5的50mM的柠檬酸盐中的样品 ($y=0.0041x+4.7667$, $R^2=0.9431$) ; “o”表示在pH6.5的50mM的柠檬酸盐+0.02%吐温-80 (v/v) 中的样品 ($y=0.0004x-0.0208$, $R^2=0.9391$) ; “x”表示在pH 6.5的50mM的柠檬酸盐+0.01%吐温-80 (v/v) 中的样品 ($y=0.0001x-1.8853$, $R^2=0.0376$) ; (x -周=时间,单位为秒; y -轴=散射强度)。

[0061] 图5D-PBS+200mM甘氨酸+0.01%吐温-80中的5mg/mL ALX-0081在+40℃ (a) 和-70℃ (b) 储存1个月之后的cIEF图谱的叠加; ($\lambda=280\text{nm}$)。AU:吸光度单位;pxlpos:像素位置。

[0062] 图6用Milli-Q水重构之前 (A图) 和重构之后 (B图) 冻干ALX-0081制剂 (制剂 (form) 3=柠檬酸盐/蔗糖pH 6.0;制剂7=柠檬酸盐/蔗糖pH 6.5;制剂17=D-PBS/甘氨酸) 的照片。

[0063] 图7冻干的ALX-0081的基于柠檬酸盐/蔗糖的制剂的照片。

[0064] 图8含有pH 6.5的15、20、25、30、40、和50mM柠檬酸盐的28mg/mL的液体ALX-0081制剂在+25℃ (A图) 或+5℃ (B图) 储存4天后的照片。其中包括空白柠檬酸盐缓冲液 (50mM) 作为参考。

[0065] 图9含有pH 6.5的15mM柠檬酸盐和不同量的蔗糖和吐温-80的20mg/mL液体ALX-0081制剂在+25℃ (A图) 或+5℃ (B图) 储存4天后的照片。其中包括空白柠檬酸盐缓冲液 (50mM) 作为参考。

[0066] 图10预测的储存于+5℃时,冻干ALX-0081药品中焦谷氨酸盐百分比随时间变化的函数。

[0067] 图11预测的储存于+25℃时,冻干ALX-0081药品中焦谷氨酸盐百分比随时间变化的函数。

[0068] 5.发明详述

[0069] 除非另外指出,所有没有具体详细描述的方法、步骤、技术和操作都可以并且已经以本身已知的方式进行,这对于技术人员来说将是清楚的。例如再次参考本文中提到的标准手册和一般背景技术以及本文引用的其它参考文献;以及例如参考下面的综述:Presta, Adv.Drug Deliv.Rev.2006,58 (5-6) :640-56;Levin和Weiss,Mol.Biosyst.2006,2 (1) :49-57;Irving等,J.Immunol.Methods,2001,248 (1-2) ,31-45;Schmitz等,Placenta,2000,21Suppl.A,S106-12;Gonzales等,Tumour Biol.,2005,26 (1) ,31-43,它们描述了蛋白质工程技术,例如亲和力成熟和其它用于提高蛋白质如免疫球蛋白的特异性和其它所希望的性质技术。

[0070] 现在已经令人惊讶地发现vWF结合剂,特别是ALX-0081 (SEQ ID NO:1),可以在人在特定的给药方案中被施用。已发现vWF结合剂,特别是ALX-0081产生的药效学作用在给药结束时立即开始快速发生作用,而且其功效保持长达大约12-24h。此外,已发现vWF结合剂,特别是ALX-0081在健康男性志愿者中是耐受良好的和安全的。这些结果表明vWF结合剂、特别是ALX-0081 (SEQ ID NO:1) 适合于对正在接受选择性经皮冠状动脉介入 (以下也称“PCI”) 的患有稳定型心绞痛的患者进行急性治疗,而且适合于对患有血栓性血小板减少性紫癜 (以下也称“TTP”) 的患者进行治疗。

[0071] 虽然如此,目前给人受者使用的vWF结合剂、特别是ALX-0081 (SEQ ID NO:1)的制剂应当进行改进。

[0072] 本文所述的vWF结合剂,特别是ALX-0081的重新配方发明提出了一种新的基于柠檬酸盐/蔗糖的制剂,它具有提高的溶解性(至多80mg/mL)和显著提高的液体储存稳定性(例如当储存新制剂时比液体状态的原始制剂发生更少的氧化)。而且,其冻干形式在+40°C储存12个月后或者在+40°C储存甚至24个月后基本检测不到氧化或asp-异构化。仍然观察到少量焦谷氨酸盐的残余形成。对柠檬酸盐和蔗糖浓度的进一步优化导致冻干产物的水分含量的降低,由此使得残余焦谷氨酸盐形成的速率减至最小。

[0073] 相应地,本发明提供抗-vWF结合剂(例如ALX-0081)的稳定的液体和冻干制剂,以及它们在治疗或预防vWF-相关病症中的应用。

[0074] 5.1本发明的多肽

[0075] 本发明中使用的vWF结合剂典型地是与人冯维勒布兰德因子(vWF, SEQ ID NO:20)结合的蛋白质或多肽。优选地,vWF结合剂是蛋白质或多肽,所述蛋白质或多肽包含至少一种免疫球蛋白序列,例如免疫球蛋白单可变结构域(ISVD),或由其组成。更优选地,本发明的vWF结合剂是蛋白质或多肽,所述蛋白质或多肽包含SEQ ID NOs:1-19,最优选SEQ ID NO:1,或由其组成。vWF结合剂可用作对正在接受PCI的ACS患者的辅助治疗或者用作血栓性血小板减少性紫癜(TTP)的治疗。术语“蛋白质”、“多肽”和“氨基酸序列”在本文中可以互换使用。因此,本发明的氨基酸序列是vWF结合剂。

[0076] 因此,例如,用于本发明的适合的vWF结合剂可以包括表A-1中的化合物,例如SEQ ID NO:1-19,或者与表A-1中的化合物具有80%或更高,更优选85%或更高,最优选90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的氨基酸序列同一性的化合物(参见定义部分的“序列同一性”)。

[0077] 优选用于本发明的vWF结合剂是12A02H1-样化合物。为本说明书的目的,12A02H1-样化合物是这样的化合物,它包括12A02H1(即SEQ ID NO:19)或与12A02H1 (SEQ ID NO:19)具有80%或更高,更优选85%或更高,最优选90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的氨基酸序列同一性(如本文中进一步定义的)的化合物。特别优选的vWF结合剂是ALX-0081 (SEQ ID NO:1)。

[0078] 上述提及的所有vWF结合剂都是众所周知的且来自于文献。这包括它们的制造(具体参见例如W02006/122825还有W02004/062551)。例如,ALX-0081的制备如例如W02006/122825或W02009/115614所述。

[0079] 除非另外指出,术语“免疫球蛋白序列”-无论本文所使用的是否是指重链抗体或是指常规4-链抗体-作为通用术语使用,包括全尺寸抗体,其单个链,以及它的所有部分、结构域或片段(分别包括但不限于抗原结合结构域或片段如 V_{HH} 结构域或 V_H/V_L 结构域)。术语抗原结合分子或抗原结合蛋白用于免疫球蛋白序列时可以互换使用,该术语包括免疫球蛋白单可变结构域,例如Nanobodies[®]。

[0080] 本发明的实施方案涉及免疫球蛋白序列,其是免疫球蛋白单可变结构域,例如轻链可变结构域序列(例如 V_L -序列),或重链可变结构域序列(例如 V_H -序列);更特别地,来自于常规四链抗体的重链可变结构域序列或来自于重链抗体的重链可变结构域序列(例如 V_{HH} -序列)。

[0081] 术语“免疫球蛋白单可变结构域”定义了这样的分子,其中抗原结合部位存在于单个免疫球蛋白结构域或它的适合的片段上,并且由其形成。这形成了与“常规的”免疫球蛋白或它们的片段不同的免疫球蛋白单可变结构域,在“常规的”免疫球蛋白或它们的片段中,两个免疫球蛋白结构域,特别是两个可变结构域相互作用形成抗原结合部位。通常,在常规的免疫球蛋白中,重链可变结构域(V_H)和轻链可变结构域(V_L)相互作用形成抗原结合部位。在这种情况下, V_H 和 V_L 的互补决定区(CDRs)将对抗原结合位点有贡献,即在抗原结合部位的形成中涉及全部6个CDRs。

[0082] 相反,免疫球蛋白单可变结构域的抗原结合部位由单个的 V_H 或 V_L 结构域形成。因此,免疫球蛋白单可变结构域的抗原结合部位由不超过三个CDRs,例如一个、两个或三个CDRs形成。

[0083] 术语“免疫球蛋白单可变结构域”因此不包括常规免疫球蛋白或它们的片段,所述常规免疫球蛋白或它们的片段需要至少两个可变结构域相互作用形成抗原结合部位。对于“包含”或“含有”免疫球蛋白单可变结构域的本发明的实施方案来说也是这样。在本发明的上下文中,这种实施方案排除了常规的免疫球蛋白或它们的片段。因此,“包含”或“含有”免疫球蛋白单可变结构域的组合物可以涉及,例如,包含多于一种免疫球蛋白单可变结构域的构建体。或者,可以存在除免疫球蛋白单可变结构域以外的其它成分,例如不同种类的助剂、蛋白标签、着色剂、染料等。但是,这些术语包括常规免疫球蛋白的片段,其中抗原结合部位由单个可变结构域形成。

[0084] 根据本发明,本发明的多肽,更特别地是免疫球蛋白序列,可以由下述一个或多个组成,或者包含它们:结构域抗体,或适合用作结构域抗体的氨基酸序列,单结构域抗体,或适合用作单结构域抗体的氨基酸序列,“dAbs”,或适合用作dAbs的氨基酸序列,或Nanobodies[®],包括但不限于 V_{HH} 序列,例如人源化 V_{HH} 序列或骆驼源化 V_H 序列,并且优选是Nanobodies[®]。

[0085] 本发明包括免疫球蛋白单可变结构域的适合的片段。免疫球蛋白单可变结构域的“适合的片段”涉及多肽,所述多肽与天然免疫球蛋白单可变结构域相比含有较少的氨基酸,但是仍然显示出抗原结合活性(那么它通常含有形成至少一个CDR的至少一些氨基酸残基,如本文进一步描述的)。这种免疫球蛋白单可变结构域和片段大部分优选包含免疫球蛋白折叠或者在适当的条件下能够形成免疫球蛋白折叠。更特别地,免疫球蛋白单可变结构域和它们的片段能够结合靶抗原。这样,免疫球蛋白单可变结构域可以例如包含轻链可变结构域序列(例如 V_L -序列)或其合适的片段;或者重链可变结构域序列(例如 V_H -序列或 V_{HH} -序列)或其合适的片段;只要它能够形成单个抗原结合单元(即基本由免疫球蛋白单可变结构域组成的功能性抗原结合单元,以使得单个抗原结合域不需要与另一个可变结构域相互作用以形成功能性抗原结合单元,这种情况例如是存在于例如常规抗体和scFv片段中的可变结构域,其需要与另一个可变结构域相互作用-例如通过 V_H/V_L 相互作用-以形成功能性抗原结合域)。

[0086] 本发明的免疫球蛋白序列优选是基本上分离的形式。本发明的免疫球蛋白序列也可以形成本发明的蛋白质或多肽(如本文所定义的)的一部分,所述蛋白质或多肽可以包含本发明的一个或多个氨基酸序列或者由其组成,并且可以任选地进一步包含一个或多个其

它氨基酸序列(所有都任选地通过一个或多个合适的接头连接)。例如,并且不受限制地,本发明的一个或多个氨基酸序列在这种蛋白质或多肽中可以用作结合单元,所述蛋白质或多肽任选地可以含有可作为结合单元的一个或多个其它氨基酸序列,以分别提供本发明的单价的、多价的或多特异性的多肽,所有的都如本文所述。这种蛋白质或多肽也可以是基本上分离的形式。

[0087] 本发明涉及不同来源的免疫球蛋白序列,包括小鼠、大鼠、兔、驴、人和骆驼免疫球蛋白序列。本发明还包括全人源的、人源化的或嵌合的免疫球蛋白序列。例如,本发明包括骆驼免疫球蛋白序列和人源化的骆驼免疫球蛋白序列,或者骆驼源化的结构域抗体,例如骆驼源化的dAb,如Ward等所描述的(参见例如W0 94/04678和Davies&Riechmann (1994和1996))。而且,本发明包括:融合的免疫球蛋白序列,例如,形成多价的和/或多特异性的构建体(对于含有一个或多个 V_{HH} 结构域的多价和多特异性多肽和它们的制备,还参考Conrath等, J. Biol. Chem., Vol. 276, 7346-7350, 2001, 以及参考例如W096/34103和W099/23221); 和含有标签或其它功能性分子,例如毒素、标记物、放射化学试剂等的免疫球蛋白序列,其可以由本发明的免疫球蛋白序列获得。鲨鱼中的免疫球蛋白单可变结构域也已被描述(也被称为“IgNARs”,如例如W003/014161或Streltsov, 2005所述)。

[0088] 在特定的实施方案中,本发明的免疫球蛋白单可变结构域是 **Nanobodies[®]**,特别是骆驼 V_{HH} 结构域、人源化 V_{HH} 结构域或骆驼源化 V_H 结构域。技术人员非常熟悉 V_{HH} 的人源化和/或对 V_H 结构域进行骆驼源化。

[0089] 可以认为免疫球蛋白序列,特别是 **Nanobody[®]**的氨基酸序列和结构-但不受其限制-由四个框架区或“FR’ s”组成,在本领域中以及本文中它们分别是指“框架区1”或“FR1”; “框架区2”或“FR2”; “框架区3”或“FR3”; 和“框架区4”或“FR4”; 框架区中间断分布着三个互补决定区或“CDR’ s”,在本领域中它们分别是指“互补决定区1”或“CDR1”; “互补决定区2”或“CDR2”和“互补决定区3”或“CDR3”。

[0090] **Nanobody[®]**中氨基酸残基的总数量可以是110-120左右,优选为112-115,最优选为113。但是,应当注意, **Nanobody[®]**的部分、片段、类似物或衍生物(如本文进一步描述的)对其长度和/或尺寸没有特别限制,只要这种部分、片段、类似物或衍生物符合本文所述的进一步要求并且也优选适用于本文所述的目的。

[0091] 因此,通常,免疫球蛋白单可变结构域是由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,或者基本上由它们组成的氨基酸序列。本文中“基本上由.....组成”是指可以存在额外的元件例如用于纯化或进行标记的标签,但是这种额外的元件与免疫球蛋白单可变结构域本身相比是小的,并且不会干扰免疫球蛋白单可变结构域的抗原结合活性。

[0092] 如本文所使用的,术语“免疫球蛋白序列”或“免疫球蛋白单可变结构域”都是指编码多肽的核酸序列,以及多肽本身。任何更多的限定意义根据具体的上下文将会是显而易见的。

[0093] 特别地,本发明的氨基酸序列可以是 **Nanobody[®]**或它的适合的片段。对于 V_{HH} ’ s和纳米抗体的进一步描述,参见Muyldermans在Reviews in Molecular Biotechnology 74

(2001), 277-302中的综述文章,以及参见下述专利申请,它们是作为一般背景技术被提及: Vrije Universiteit Brussel的W094/04678, W095/04079和W096/34103; Unilever的W094/25591, W099/37681, W000/40968, W000/43507, W000/65057, W001/40310, W001/44301, EP1134231和W002/48193; Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB)的W097/49805, W001/21817, W003/035694, W003/054016和W003/055527; Algonomics N.V.和Ablynx N.V.的W003/050531; 加拿大国立研究委员会(National Research Council of Canada)的W001/90190; 抗体研究所(Institute of Antibodies)的W003/025020(=EP1433793); 以及Ablynx N.V.的W004/041867, W004/041862, W004/041865, W004/041863, W004/062551, W005/044858, W006/40153, W006/079372, W006/122786, W006/122787和W006/122825以及Ablynx N.V.的进一步公开的专利申请。还参考这些申请中提及的进一步的现有技术,特别是国际申请W006/040153的第41-43页上提及的参考文献列表,该列表和这些文献通过引用合并入文本。如这些文献中所述,纳米抗体(特别是V_{HH}序列以及部分人源化的纳米抗体)的特征尤其在于在一个或多个框架序列中存在“标志残基”。对纳米抗体的进一步描述,包括纳米抗体的人源化和/或骆驼源化,以及其它修饰、部分或片段、衍生物或“纳米抗体融合物”、多价构建体(包括接头序列的一些非限制性实例)和增加纳米抗体半衰期的不同修饰以及它们的制备可以在例如W007/104529中找到。

[0094] 本发明提供的免疫球蛋白单可变结构域优选是分离的形式或基本上分离的形式。本发明的免疫球蛋白序列还可以形成本发明的蛋白质或多肽的一部分,所述蛋白质或多肽可以包含一个或多个免疫球蛋白单可变结构域或者基本上由它们组成,并且所述蛋白质或多肽可以任选地进一步包含一个或多个其它的氨基酸序列(所有都任选地通过一个或多个合适的接头连接)。例如,且不受其限制,所述一个或多个免疫球蛋白单可变结构域在这种蛋白质或多肽中可以用作结合单元,所述蛋白质或多肽任选地可以含有一个或多个可作为结合单元的其它氨基酸序列,以分别提供本发明的单价、多价或多特异性多肽,所有都如本文所述。这种蛋白质或多肽也可以是分离的形式或基本上分离的形式。因此,根据本发明,免疫球蛋白单可变结构域包含构建体,所述构建体包含两个或更多个单结构域形式的抗原结合单元,如上所述。例如,具有相同或不同抗原特异性的两个(或更多个)免疫球蛋白单可变结构域可以连接起来以形成例如,二价、三价或多价构建体。通过组合两种或更多种特异性的免疫球蛋白单可变结构域,可以形成双特异性、三特异性等的构建体。例如,根据本发明的多肽可以包含针对靶A的两种免疫球蛋白单可变结构域,和针对靶B的一种免疫球蛋白单可变结构域,使其对于A是二价的并且对于B是单价的。这种构建体及其修饰,其是技术人员易于掌握的,都包括在本发明中。在特定的实施方案中,本发明涉及双互补位(bi-paratopic)构建体,所述双互补位构建体包含至少两个针对相同靶抗原内的不同表位的免疫球蛋白单可变结构域。

[0095] 所有这些分子也称为“本发明多肽”,它是本发明的“免疫球蛋白序列”或“免疫球蛋白单可变结构域”的同义词。

[0096] 此外,本文使用的术语“序列”(例如术语如“免疫球蛋白序列”、“抗体序列”、“可变结构域序列”、“V_{HH}-序列”或“蛋白质序列”),通常应当理解为包括相关的氨基酸序列以及编码它的核酸序列或核苷酸序列,除非上下文需要更有限制性的解释。

[0097] 根据本发明的非限制性的实施方案,免疫球蛋白序列、Nanobody[®]或本发明多肽

是糖基化的。根据本发明的另一个非限制性的实施方案,免疫球蛋白序列、Nanobody[®]或本发明多肽是非糖基化的。

[0098] 5.2与抗原“结合”

[0099] 本发明涉及能与本文所定义的抗原,例如冯维勒布兰德因子结合和/或对它有亲和力的免疫球蛋白序列。在本发明的范围内,与特定抗原“结合和/或对它有亲和力”具有本领域中的通常含义,例如在抗体和它们各自的抗原的情况下所理解的那样。

[0100] 在本发明的特定实施方案中,术语“结合和/或对它有亲和力”是指免疫球蛋白序列特异性地与抗原相互作用,并且与“针对”所述抗原的免疫球蛋白序列互换使用。

[0101] 术语“特异性”指特定免疫球蛋白序列、抗原结合分子或抗原结合蛋白(例如免疫球蛋白单可变结构域、Nanobody[®]或本发明多肽)可以结合的不同类型的抗原或抗原决定簇的数量。抗原结合蛋白的特异性可以根据亲和力(affinity)和/或抗体亲抗原性(avidity)来确定。亲和力,由抗原和抗原结合蛋白的解离平衡常数(KD)表示,是对抗原决定簇与抗原结合蛋白上的抗原结合部位之间的结合强度的测量:KD的值越小,抗原决定簇与抗原结合分子之间的结合强度越大(或者,亲和力还可以表示为亲和力常数(KA),其是1/KD)。技术人员清楚(例如根据本文进一步的公开),亲和力可以用本身已知的方式测定,这取决于感兴趣的特定抗原。抗体亲抗原性是对抗原结合分子(例如免疫球蛋白单可变结构域、Nanobody[®]或本发明多肽)和相关抗原之间的结合强度的测量。抗体亲抗原性与抗原决定簇与它在抗原结合分子上的抗原结合位点之间的亲和力,以及抗原结合分子上存在的相关结合位点的数量都有关系。

[0102] 通常,本发明的免疫球蛋白序列(例如氨基酸序列、免疫球蛋白单可变结构域、Nanobody[®]和/或本发明多肽)与它们的抗原结合的解离常数(KD)为 10^{-5} - 10^{-12} 摩尔/升或更小,并且优选为 10^{-7} - 10^{-12} 摩尔/升或更小并且更优选为 10^{-8} - 10^{-12} 摩尔/升(即结合常数(KA)为 10^5 - 10^{12} 升/摩尔或更大,并且优选为 10^7 - 10^{12} 升/摩尔或更大并且更优选为 10^8 - 10^{12} 升/摩尔),和/或如本文所定义的,与它们的抗原结合的 k_{on} -速率为在 $10^2 M^{-1} s^{-1}$ 至大约 $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 之间,优选在 $10^3 M^{-1} s^{-1}$ 和 $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 之间,更优选在 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ 和 $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 之间,例如在 $10^5 M^{-1} s^{-1}$ 和 $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 之间;和/或如本文定义的,与它们的抗原结合的 k_{off} 速率在 $1 s^{-1}$ ($t_{1/2}=0.69s$)和 $10^{-6} s^{-1}$ 之间(提供几乎不可逆复合物,其 $t_{1/2}$ 为数天),优选在 $10^{-2} s^{-1}$ 和 $10^{-6} s^{-1}$ 之间,更优选在 $10^{-3} s^{-1}$ 和 $10^{-6} s^{-1}$ 之间,例如在 $10^{-4} s^{-1}$ 和 $10^{-6} s^{-1}$ 之间。

[0103] 任何大于 $10^{-4} M$ 的KD值(或者任何低于 $10^4 M^{-1}$ 的KA值)通常被认为是表示非特异性结合。

[0104] 优选地,本发明的单价免疫球蛋白序列以小于500nM,优选小于200nM,更优选小于10nM,例如小于500pM的亲和力与所希望的抗原结合。

[0105] 抗原结合蛋白与抗原或抗原决定簇的特异性结合可以用任何合适的本身已知的方式测定,包括,例如Scatchard分析和/或竞争结合测定,例如放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定(EIA)和夹心竞争测定,以及本领域本身已知的它们的不同变形形式;以及本文所提及的其它技术。

[0106] 解离常数(KD)可以是实际或表观解离常数,如技术人员所清楚的。确定解离常数

的方法对于技术人员来说是清楚的,例如包括本文提及的技术。在这方面,还应当清楚可能无法测量超过 10^{-4} 摩尔/升或 10^{-3} 摩尔/升(例如 10^{-2} 摩尔/升)的解离常数。任选地,技术人员还应当清楚,(实际或表观)解离常数可以在(实际或表观)结合常数(KA)的基础上,通过 $[KD = 1/KA]$ 的关系来计算。

[0107] 亲和力表示分子相互作用的强度或稳定性。亲和力通常以KD或解离常数给出,其单位是摩尔/升(或M)。亲和力还可以表示为结合常数,KA,其等于 $1/KD$ 并且其单位为(摩尔/升) $^{-1}$ (或 M^{-1})。在本说明书中,两个分子(例如氨基酸序列、免疫球蛋白序列、免疫球蛋白单可变结构域、**Nanobody**[®]或本发明多肽以及它的预定靶)之间相互作用的稳定性主要用它们相互作用的KD值表示;技术人员清楚,基于 $KA = 1/KD$ 的关系,用KD值说明分子相互作用的强度也可以用于计算相应的KA值。KD-值也在热力学意义上表征了分子相互作用的强度,因为它与结合的自由能(DG)有关,它们具有众所周知的关系 $DG = RT \cdot \ln(KD)$ (相当于 $DG = -RT \cdot \ln(KA)$),其中R等于气体常数,T等于绝对温度, \ln 表示自然对数。

[0108] 生物相互作用,例如本文定义的被认为是有意义的(例如特异性的)本发明的免疫球蛋白序列与vWF的结合,的KD通常在 $10^{-10}M$ (0.1nM)至 $10^{-5}M$ (10000nM)的范围内。相互作用越强,其KD越低。

[0109] KD还可以表示为由 k_{off} 表示的复合物的解离速率常数与由 k_{on} 表示的它的缔合速率的比值(因此 $KD = k_{off}/k_{on}$ 并且 $KA = k_{on}/k_{off}$)。解离速率 k_{off} 的单位是 s^{-1} (其中s是秒的SI单位符号)。缔合速率 k_{on} 的单位是 $M^{-1}s^{-1}$ 。

[0110] 本发明的免疫球蛋白序列的缔合速率可以在 $10^2 M^{-1}s^{-1}$ 至大约 $10^7 M^{-1}s^{-1}$ 之间变化,接近生物分子相互作用的扩散限制缔合速率常数。解离速率与给定分子相互作用的半衰期有关,其关系是 $t_{1/2} = \ln(2)/k_{off}$ 。本发明的免疫球蛋白序列的解离速率可以在 $10^{-6} s^{-1}$ (接近不可逆复合物,其 $t_{1/2}$ 为数天)至 $1 s^{-1}$ ($t_{1/2} = 0.69s$)之间变化。

[0111] 两个分子之间的分子相互作用的亲和力可以通过本身已知的各种技术进行测量,例如众所周知的表面等离子体共振(SPR)生物传感器技术(参见例如Ober等,Intern.Immunology,13,1551-1559,2001),其中一个分子被固定在生物传感器芯片上,另一个分子在流动状态下通过固定分子,产生 k_{on} 、 k_{off} 的测量值,由此获得KD(或KA)值。这可以例如使用众所周知的Biacore仪器进行。

[0112] 技术人员还清楚,如果测量过程以某种方式影响了所涉及分子的固有结合亲和力,例如由于将一个分子包被在生物传感器上的人工行为产生影响,则测量的KD可以相应于表观KD。而且,如果一个分子含有超过一个的对另一个分子的识别位点,则可以测量表观KD。在这种情况下,测量的亲和力可能受到两个分子之间相互作用的抗体亲抗原性的影响。

[0113] 另一种可以用于评价亲和力的方法是Friguet等的2-步ELISA(酶联免疫吸附测定)程序(J.Immunol.Methods,77,305-19,1985)。这种方法建立了溶液相结合平衡测量,避免了可能的人工行为,所述人工行为与其中一种分子在支持物例如塑料表面上的吸附有关。

[0114] 但是,KD的准确测量是劳动强度非常大的,并且其结果常常是测定表观KD值来评价两个分子的结合强度。应当注意的是,只要以一致的方式进行所有测量(例如保持测定条件不变),则表观KD测量值可以用作真实KD的近似值,因此在本文中,KD和表观KD应当以同等的重要性或相关性来对待。

[0115] 最后,应当注意的是,在许多情况下,有经验的科学家可以判断是否方便测定相对于一些参考分子的结合亲和力。例如,为了评价分子A和分子B之间的结合强度,可以例如使用参考分子C,已知所述参考分子C与B结合,并且用荧光团或发色团基团或其它化学结构部分,例如生物素进行了适当的标记,使得易于在ELISA或FACS(荧光激活细胞分选)或其他方式(荧光团用于荧光检测,发色团用于光吸收检测,生物素用于链霉亲和素介导的ELISA检测)中进行检测。通常,参考分子C保持在固定浓度,且A的浓度对于给定浓度或量的B来说是变化的。结果获得相应于A的浓度的IC₅₀值,在缺乏A的条件下测量的C的信号在该A的浓度条件下减半。如果K_{D ref},参考分子的K_D已知,而且参考分子的总浓度c_{ref}也已知,则可以根据下式获得相互作用A-B的表观K_D: $K_D = IC_{50} / (1 + c_{ref} / K_{D \text{ ref}})$ 。应注意如果c_{ref} << K_{D ref},则K_D ≈ IC₅₀。如果对于所比较的结合剂来说,以一致的方式(例如保持c_{ref}固定)进行IC₅₀的测量,则可以通过IC₅₀评价分子相互作用的强度或稳定性,而且判定这种测量值等同于本文通篇所述的K_D或表观K_D。

[0116] 5.3靶抗原

[0117] 本发明的免疫球蛋白单可变结构域与vWF结合和/或对它具有亲和力。在本发明的范围内,“vWF”包括但不限于猕猴、狒狒、猪、豚鼠、小鼠、和/或人vWF,最优选是人vWF,即SEQ ID NO:20或GenBank条目:NP_000543。

[0118] 5.4免疫球蛋白序列的特定实施方案

[0119] 本发明涉及免疫球蛋白单可变结构域,所述免疫球蛋白单可变结构域在W02004/015425、W02004/062551、W02006/074947、W02006/122825、W02009/115614、或W02011/067160中描述,或者可以通过这些文献中描述的方法获得,它们所有都在本申请人的名下。

[0120] 本发明还包括这些氨基酸序列的优化变体。通常,根据本发明的氨基酸序列的“优化变体”是包含一个或多个有益取代的变体,所述有益取代是例如增加i)“人源化”程度,ii)化学稳定性,和/或iii)表达水平的取代;而效力(例如通过W02006/122825的实验部分中所述的效力测定测量的)仍与野生型12A02(如W02006/122825所定义的)相当(即偏差在10%以内),或者与变体12A02H1(SEQ ID NO:19)相当,所述变体12A02H1也在W02006/122825中定义。优选地,与12A02的野生型序列相比,本发明的氨基酸序列含有至少一个这种取代,优选至少两个这种取代,优选至少三个人源化取代以及优选至少10个这种人源化取代。

[0121] 在特定的方面,本发明的氨基酸序列与野生型序列12A02相比,含有总共1-15个之间,优选2-14个之间,例如9-13个之间,例如10、11或12个的氨基酸取代。如所述的,这些差异优选至少包含一个并且优选至少两个,例如三个、四个或五个或十个人源化取代,并且可以任选地包含一个或多个其它取代(例如本文所提及的进一步取代(a)至(c)的任意一个,或任意两个或更多的任何适当的组合)。而且,根据本文公开的内容,并且任选地在有限程度的试错之后,技术人员能够选择一个或多个这种适当的人源化和/或进一步取代(的适当的组合)。

[0122] 本发明包括多肽序列,所述多肽序列与本文提供的任何特定实例,或者与上述参考文献定义的任何特定实例高度相似。高度相似是指至少90%,例如95、97、98或99%的氨基酸同一性。高度相似的多肽序列将会与作为它们来源的序列具有相同的功能,即它们结合vWF,更具体地,结合和抑制vWF与血小板之间的相互作用。

[0123] 在特定的实施方案中,本发明涉及与SEQ ID NOs:1-19的任一个,特别是SEQ ID NO:1高度相似的序列。但是,对于每一个变体序列,必须对它在本文所定义的制剂中的稳定性进行评估,以使得本发明特别涉及在本文所定义的制剂中是稳定的变体或高度相似序列。

[0124] 产生本发明的多肽序列的方法是众所周知的,包括例如重组表达或合成。技术人员非常熟悉适合的表达技术,例如适合的重组载体和宿主细胞,例如细菌或酵母宿主细胞。技术人员也非常熟悉适合的纯化技术和方案。

[0125] 5.5本发明的制剂

[0126] 本发明提供针对vWF的多肽的制剂,所述针对vWF的多肽是例如免疫球蛋白单可变结构域(ISVDs)或包含至少一个免疫球蛋白单可变结构域的多肽,所述制剂是稳定的,优选适合于药学应用,包括药物的制备。

[0127] vWF结合剂,例如ISVD的制剂包括ISVD、可作为冷冻保护剂和/或冻干保护剂的化合物、和缓冲液。制剂的pH通常是pH 5-7.5。在一些实施方案中,制剂作为液体储存。在其它实施方案中,制剂被制备为液体,然后在储存前被干燥,例如通过冻干或喷雾干燥。干燥的制剂(即冻干物)可以作为干燥化合物,例如作为气溶胶或粉末使用,或者被重构至其原始浓度或另一种浓度,例如使用水、缓冲液、或其它合适的液体(稀释剂)。

[0128] 设计vWF结合剂的纯化过程以允许将vWF结合剂转移至到适合于长期储存的制剂中,例如作为冷冻液体储存和/或随后用于冷冻干燥(例如使用柠檬酸盐/蔗糖制剂)。制剂被冻干,其中蛋白质,例如vWF结合剂以特定的浓度存在。冻干制剂然后根据需要用合适的稀释剂(例如水)重构,以将原始的制剂成分重新溶解至所希望的浓度,与冻干之前的浓度相比通常是相同或更高的浓度。可以重构冻干制剂以产生浓度与原始浓度(即冻干之前的)不同的制剂,这取决于加入到冻干物中的稀释剂的量相对于最初被冷冻干燥的液体的体积。可以通过测定vWF结合剂完整性的一个或多个参数来鉴别合适的制剂。测定的参数通常是尺寸排阻HPLC(SE-HPLC)测定的高分子量(HMW)物质的百分比或低分子量(LMW)物质的百分比。

[0129] 相应地,本发明提供的制剂的特征在于根据需要的,例如用于药学目的合适的纯度和合适的浓度。所述制剂提供多肽,例如免疫球蛋白单可变结构域或包含至少一种免疫球蛋白单可变结构域的多肽,如本文所定义的,它们在宽浓度范围内,并且在宽储存条件,例如温度范围内处于稳定形式,所述储存条件包括胁迫条件例如升高的温度(例如+25℃或更高)、冻干、震动或其他形式的物理胁迫。

[0130] 制剂包含水性载体。水性载体特别是缓冲液。

[0131] 但是,本发明还包括通过对液体制剂的进一步加工获得的产品,例如冷冻的、冻干的或喷雾干燥的产品。在重构之后,这些固体产品可以成为本文所述的液体制剂(但不限于此)。因此,从最广义来说,术语“制剂”包括液体和固体制剂。但是,固体制剂被理解为来自于液体制剂(例如通过冷冻、冷冻干燥或喷雾干燥),并且因此具有各种由用于描述本文的液体制剂的特征所定义的特性。本发明不排除这样的重构,所述重构获得的组合物与例如冷冻或喷雾干燥之前的原始组合物不同。

[0132] 本发明的制剂包含至少一种vWF结合剂,特别是免疫球蛋白单可变结构域或包含至少一种免疫球蛋白单可变结构域的多肽,如本发明所述的。在特定的实施方案中,所述制

剂包含选自SEQ ID NOs:1-19的一个或多个多肽,优选SEQ ID NO:1。此外,所述多肽的半衰期可以被延长,例如通过加入血清白蛋白结合肽或结合域,其可以是任何适合的能够增加构建体半衰期的血清白蛋白结合肽或结合域(与没有所述血清白蛋白结合肽或结合域的相同构建体相比),并且特别可以是申请人的W02008/068280(以及特别是W02009/127691和W02011/095545,二者都属于申请人)中所述的血清白蛋白结合肽,或血清白蛋白结合免疫球蛋白单可变结构域(例如血清白蛋白结合纳米抗体;例如A1b-1或A1b-1的人源化版本例如A1b-8,例如参考W006/122787)。本发明同样包括的延长半衰期的另一种方法包括例如本领域众所周知的聚乙二醇化(PEG),包括位点特异性或随机聚乙二醇化,优选位点特异性聚乙二醇化。可以使用的PEG的分子量在5000以上,例如在10.000和200.000之间,优选在20.000和100.000的范围内。在半衰期延长的任何方面,认为不会损伤本文所定义的多肽的活性,例如保留不进行半衰期延长的相同多肽的活性的至少75%、80%、85%、90%或95%。活性可以涉及,例如与靶抗原结合、和/或在生物测定中的效力。技术人员也能确定所选择的半衰期延长技术是合适的,因为它不增加、或者甚至降低免疫原性。

[0133] 5.5.1缓冲液

[0134] 本发明的制剂包含缓冲液,所述缓冲液选自柠檬酸盐或磷酸盐缓冲液中的至少一种,优选柠檬酸盐缓冲液。在特定的实施方案中,使用一水柠檬酸和无水柠檬酸三钠,例如0.2154g/L一水柠檬酸和5.5805g/L无水柠檬酸三钠制备柠檬酸盐缓冲液。在非限制性的实例中,如通过测量溶解温度所确定的,这些缓冲液与其它测试的缓冲液相比,增加了vWF结合剂的稳定性。

[0135] 根据本发明的制剂包含柠檬酸盐缓冲液,其浓度在5-200mM范围内,例如5,7.5,10,15,20,25,30,40,50,60,70,80,90,100,110,120,130,140,150,160,170,180,190或200mM,优选5-100mM,更优选7.5-80mM,更优选10-50,例如10,15,20,25或30mM,最优选20mM,其中每一个值应当理解为任选地包含 ± 5 mM的范围。根据本发明的制剂可以包含磷酸盐缓冲液,其浓度在5-200mM范围内,例如5,7.5,10,15,20,25,30,40,50,60,70,80,90,100,110,120,130,140,150,160,170,180,190或200mM,优选5-80mM,更优选7.5-60mM,更优选10-40,例如10,15,20,25或30mM,最优选10mM,其中每一个值应当理解为任选地包含 ± 5 mM的范围。应当理解较低的缓冲液浓度对于最终的摩尔渗透压浓度有影响,并且相应地对可能必须添加的其它溶质有影响。

[0136] 本发明的制剂的pH在5.0-7.5范围内,其中每一个值应当理解为包含 ± 0.2 的范围。本发明的制剂的优选pH值的特定实例可以选自包含5.0,5.5,5.8,6.0,6.2,6.5,6.7,7.0,7.1,7.2或7.5的pH的非限制性列表,优选6.0-7.0,更优选6.1,6.2,6.3,6.4,6.5,6.6,6.7,6.8或6.9,例如6.5,其中每一个值应当理解为任选地包含 ± 0.2 的范围。

[0137] 出人意料地,柠檬酸盐和磷酸盐缓冲液与例如组氨酸和Tris-HCl缓冲液具有重叠的pH范围,但仍然有利于稳定性。

[0138] 最有利的pH将取决于制剂中所含的缓冲液。因此,本发明特别涉及包含磷酸盐缓冲液的制剂,其优选具有6.5-7.5范围内的pH,优选6.9,7.0,7.1,例如7.1。

[0139] 包含柠檬酸盐缓冲液的制剂表现出格外适合于储存和应用。但是,与常规观点相反,包含柠檬酸盐缓冲液的液体制剂在大约6.0的pH最稳定,而包含柠檬酸盐缓冲液的冻干制剂在大约6.5的pH最稳定。因此,本发明涉及一种制剂,其包含柠檬酸盐缓冲液,它的pH优

选为6.0-7.0,更优选6.1,6.2,6.3,6.4,6.5,6.6,6.7,6.8或6.9,例如6.5,其中每一个值应当理解为任选地包含 ± 0.2 的范围。

[0140] 5.5.2浓度

[0141] 本发明的制剂包含如本文所定义的vWF结合剂,特别是免疫球蛋白单可变结构域或包含至少一种免疫球蛋白单可变结构域的多肽,其浓度适合于临床目的,所述浓度包括在储液中使用的浓度,所述储液用于在应用于患者之前进行稀释。除了提高的稳定性之外,本发明的制剂使得vWF结合剂,例如ISVDs或多肽可以有更高的浓度。特别地,本发明的制剂保持物理稳定,即不浑浊和/或没有小的颗粒形成,如目测观察、显微镜检查、SE-HPLC和DLS所证实的。在升高的温度储存延长的时间和反复冻融循环不会明显影响这些制剂中vWF结合剂的物理稳定性。

[0142] 本发明制剂中的活性剂,例如本发明的vWF结合剂或多肽,的典型浓度包括0.1-80mg/mL范围内的浓度的非限制性实例,优选1-70mg/mL,5-60mg/mL,7.5-50mg/mL,或10-40mg/mL,例如5,7.5,10,12.5,15,17.5,20,25,30,35,40,45,50或60mg/mL,优选12.5mg/mL或10mg/mL,其中每一个值应当理解为任选地包含 $\pm 20\%$ 的范围(例如10的值任选地包含8-12mg/mL的范围)。

[0143] 5.5.3赋形剂

[0144] 根据本发明的制剂还可以任选地包含一种或多种赋形剂。本文使用的术语“赋形剂”指惰性物质,其通常用作化合物的稀释剂、载体、防腐剂、冻干保护剂、粘合剂或稳定剂,给制剂赋予有益的物理性质。技术人员熟悉适合于药学目的赋形剂,所述赋形剂在制剂中可以具有特定的功能,例如冻干保护、稳定、防腐等。常用的稳定剂和防腐剂是技术人员熟知的(参见,例如W02010/077422)。这些组合物中可以使用的药学可接受的载体包括,但不限于,离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白,例如人血清白蛋白、缓冲物质例如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质,例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、硅胶、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、基于纤维素的物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯聚氧丙烯嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。在有利的实施方案中,赋形剂可以是选自由NaCl、海藻糖、蔗糖、甘露醇或甘氨酸组成的列表的一个或多个。

[0145] 在对本发明的理解中,技术人员能够容易地确定加入到制剂中的赋形剂的合适浓度。在示例性的实施方案中,NaCl具有10-500mM范围内的浓度,例如25,30,40,50,60,70,100,150,250或500mM,优选50-150mM,例如75或140mM,其中每一个值应当理解为任选地包含 ± 5 mM的范围;和/或甘露醇具有1-10%的浓度,优选2-4%,例如2,3或4%(w/w),其中每一个值应当理解为任选地包含 $\pm 0.5\%$ 的范围;和/或蔗糖具有1-15%的浓度;优选2-12%或4-10%,例如4,5,6,7,8或9%(w/w),最优选7%,其中每一个值应当理解为任选地包含 $\pm 0.5\%$ 的范围;和/或甘氨酸具有10-500mM范围内的浓度,例如25,30,40,50,60,70,75,100,150,250或500mM,优选50-400mM,75-300mM,100-250mM,例如140或200mM,其中每一个值应当理解为任选地包含 ± 5 mM的范围;和/或海藻糖具有10-500mM范围内的浓度,例如25,30,40,50,60,70,75,100,150,250或500mM,优选100-300mM,150-280mM,例如160mM或260mM,其中每一个值应当理解为任选地包含 ± 5 mM的范围。

[0146] 在优选的实施方案中,根据本发明任一方面的制剂与人血液是等渗的。等渗溶液

与血浆具有相同的渗透压,因此能够通过静脉输入给受试者,而不会改变受试者血浆的渗透压。渗透压可以用摩尔渗透压浓度表示,它可以是理论摩尔渗透压浓度,或者优选是实验确定的摩尔渗透压浓度。通常,摩尔渗透压浓度在 $290 \pm 60 \text{ mOsm/kg}$,优选 $290 \pm 20 \text{ mOsm/kg}$ 范围内。

[0147] 因此,在赋形剂(如果有的话)的选择上,技术人员会考虑缓冲液浓度和一种或多种赋形剂的浓度,优选使得获得的制剂具有上述范围内的摩尔渗透压浓度。技术人员熟悉估算摩尔渗透压浓度的计算(参见例如W02010/077422)。如果需要的话,技术人员还可以进一步引入化合物以调整制剂的摩尔渗透压浓度。示例性的化合物包括,但不限于上述提及的赋形剂,和/或山梨醇、甲硫氨酸、右旋糖、肌醇、精氨酸、或盐酸精氨酸中的一种或多种。

[0148] 已表明包含蔗糖的制剂特别适合于在例如储存和冻融过程中保持多肽的物理稳定性。相应地,本发明涉及包含大约5-9%更优选6-8%以及更优选7%蔗糖的制剂,其中每一个值应当理解为任选地包含 $\pm 0.5\%$ 的范围。

[0149] 本发明的制剂还可以包含特别可用于在冷冻干燥过程中保护本发明多肽的化合物。这种化合物也被称为冻干保护剂,并且是技术人员熟知的。特定的实例包括,但不限于:糖如蔗糖、山梨醇或海藻糖;氨基酸例如谷氨酸,特别是谷氨酸一钠或组氨酸;甜菜碱、硫酸镁、糖醇、丙二醇、聚乙二醇及其组合。通过对本发明的理解,要加入的这种化合物的需要量可以容易地由技术人员在考虑了制剂在液体形式时以及在进行冻干时的稳定性之后确定。特别适合于冷冻干燥的制剂可以进一步包含填充剂。合适的试剂对于技术人员来说是众所周知的。已表明包含蔗糖的制剂不仅特别适合于在例如储存和冻融过程中保持保持vWF结合剂的物理稳定性,而且还可以作为冻干保护剂。

[0150] 5.5.4洗涤剂

[0151] 在本发明的进一步的实施方案中,根据本发明的任一方面的制剂可以进一步包含洗涤剂或表面活性剂。用于本发明的合适的洗涤剂或表面活性剂包括,但不限于聚氧化乙烯山梨醇脂肪酸酯,例如聚山梨醇酯-20,-40,-60,-65,-80或-85。聚山梨醇酯的常用品牌名称包括Alkest,Canarcel和吐温。技术人员知道洗涤剂的其它非限制性实例,例如在例如W02010/077422中列举的那些。在优选的实施方案中,洗涤剂是非离子洗涤剂。更特别地,洗涤剂是聚山梨醇酯-80,下文中也称为吐温-80。技术人员可以容易地确定用于本发明制剂的洗涤剂的合适浓度。通常,浓度应尽可能低,同时还保持洗涤剂的有益效果,例如在剪切应力条件,例如搅拌下的稳定效果,它减少配制的vWF结合剂的聚集。在示例性的、非限制性的实施方案中,洗涤剂的浓度可以在0.001-0.5%的范围内,例如0.001%,0.002%,0.003%,0.004%,0.005%,0.01%,0.015%,0.02%,0.025%,0.03%,0.035%,0.04%,0.045%,0.05%,0.1%,0.2%,0.3%,0.4%或0.5%,优选浓度在0.01-0.05%之间,更优选在0.01-0.02%之间,例如0.01% (v/v)。

[0152] 5.5.5组合

[0153] 上述5.5.1至5.5.4节中所述的各个实施方案在本发明的制剂中可以进行组合,没有限制。例如应当包括使用上述任何值的组合作为上限和/或下限的值的范围。但是,制剂的优选的非限制性的实例包括这样的制剂,其中缓冲液是大约pH 6.5的柠檬酸盐缓冲液,优选浓度为20mM,并且所述制剂进一步包含蔗糖,优选蔗糖的浓度为大约7% (w/v),并且任选地进一步包含非离子洗涤剂例如吐温-80,优选其浓度为0.01% (v/v)。

[0154] 5.6进一步处理

[0155] 如所述的,任何上述制剂都可以进行进一步加工,例如冻干、喷雾干燥或冷冻,例如散装冷冻(bulk freezing)。得到的处理产物具有来源于液体起始制剂的特性,如上文所定义的。如果需要的话,可以包含其它试剂以便于进一步处理,例如,如,冻干保护剂等。

[0156] 5.6.1冷冻

[0157] 在一些情况下,含有vWF结合剂的制剂被冷冻以用于储存。相应地,在这种条件下,例如在冻融(FT)循环中相对稳定的制剂是合乎需要的。确定制剂适合性的一种方法是将样品制剂进行至少两次、例如三次、四次、五次、八次、十次、或更多次冷冻(在例如-20℃或-70℃)和融解(例如在25℃水浴中快速融解或在+2℃至+8℃缓慢融解)的循环,确定原始产物的质量回收率和FT循环后积累的LMW物质和/或HMW物质的存在和/或量,并将其与FT程序之前的样品中存在的LMW物质或HMW物质的量进行比较,例如通过SE-HPLC。LMW或HMW物质的增加表明稳定性降低。

[0158] 5.6.2冻干

[0159] 制剂可以在冻干后储存。因此,测试制剂在冻干之后制剂中多肽组分的稳定性可用于确定制剂的稳定性。该方法类似于上述的关于冷冻的方法,除了样品制剂被冻干而不是被冷冻,被重构至原始体积,并且测试LMW物质和/或HMW物质的存在。将冻干样品制剂与相应的没有冻干的样品制剂进行比较。与相应样品相比冻干样品中LMW或HMW物质的增加表明冻干样品的稳定性降低。通常,冻干方案包括将样品加载到冻干器或冷冻干燥器中,预冷期,冷冻,真空启动、缓慢升温至初次干燥温度、初次干燥、缓慢升温至二次干燥温度、二次干燥、以及产物的封闭。虽然冷冻干燥的过程是本领域熟知的,但是各种因素决定了样品的冷冻干燥特性,包括:玻璃转化温度(T_g')和塌陷温度(T_c)。其它可被选择用于冻干方案的参数包括真空度(例如以微米汞柱(microns)表示)和冷凝器温度。

[0160] 适合的升温速率在大约0.1℃/min.至2℃/min.之间,例如0.1℃/min.至1.0℃/min.、0.1℃/min.至0.5℃/min.、0.2℃/min.至0.5℃/min.、0.1℃/min.、0.2℃/min.、0.3℃/min.、0.4℃/min.、0.5℃/min.、0.6℃/min.、0.7℃/min.、0.8℃/min.、0.9℃/min.、和1.0℃/min.。冻干循环中冷冻过程中的合适的搁板温度通常是从大约-55℃至-5℃、-25℃至-5℃、-20℃至-5℃、-15℃至-5℃、-10℃至-5℃、-10℃、-11℃、-12℃、-13℃、-14℃、-15℃、-16℃、-17℃、-18℃、-19℃、-20℃、-21℃、-22℃、-23℃、-24℃、或-25℃。对于初次干燥和二次干燥来说,搁板温度可以是不同的,例如,初次干燥可以在比二次干燥更低的温度下进行。在非限制性的实例中,初次干燥可以在0℃或者在+5℃下进行,并且二次干燥在+25℃下进行。在一些情况下,在冷冻过程中以及在真空启动之前使用退火方案。在这种情况下,必须选择退火时间,而且温度通常高于组合物的玻璃转化温度。通常,退火时间是大约2至20小时、大约3至19小时、大约2至10小时、大约3至5小时、大约3至4小时、大约2小时、大约3小时、大约5小时、大约8小时、大约10小时、大约12小时、大约15小时或大约19小时。退火温度通常是从大约-35℃至大约-5℃,例如从大约-25℃至大约-8℃、大约-20℃至大约-10℃、大约-25℃、大约-20℃、大约-15℃、大约0℃、或大约-5℃。在一些情况下,退火温度通常是从-35℃至+5℃,例如从-25℃至-8℃、-20℃至-10℃、-25℃、-20℃、-15℃、0℃、+5℃。

[0161] 本文所述的制剂的稳定性可以使用多种冻干参数进行测试,包括:从-25℃至+30℃的初次干燥搁板温度,和在0°至+30℃持续2小时至33小时的二次干燥持续时间。二次干

燥的温度应当尽可能高,但不会导致活性药学成分的降解。

[0162] 本发明制剂中使用的赋形剂应当优选满足下述一个或多个参数:是药理学惰性的;与加工要求相容;对患者来说耐受良好;对活性物质没有损伤;提供可溶的、可吸收的产品;提供耐储存的产品;以及提供商业上可接受的产品。

[0163] 在一个实施方案中,本发明的制剂通过冷冻干燥制备,例如图1或表14中所述的。

[0164] 已证明基于柠檬酸盐/蔗糖的制剂的冻干极大地提高了vWF结合剂的稳定性。特别地,基于柠檬酸盐/蔗糖的制剂基本上防止了液体形式中发生的化学改变,除了形成少量的焦谷氨酸盐以外。出人意料地,降低柠檬酸盐浓度并且同时提高蔗糖浓度,提高了化学稳定性,例如减少了焦谷氨酸盐形成。已证明vWF结合剂在冻干之后对于产品温度的极端条件是稳健的。事实上,对于使用各种冷冻干燥循环制备的物质来说,稳定性曲线是相同的。

[0165] 通常,冻干循环可以运行10个小时至100个小时,例如20个小时至80个小时、30个小时至70个小时、40个小时至60个小时、45个小时至50个小时、50个小时至66个小时。

[0166] 在非限制性的实例中,大量配制20mM柠檬酸盐、7%蔗糖、0.01%吐温-80,pH 6.5、蛋白质浓度为12.5mg/mL vWF-结合剂的制剂并冻干。

[0167] 用于储存本发明制剂的温度范围的非限制性实例是大约-20℃至大约+50℃,例如大约-15℃至大约+40℃、大约-15℃至大约+30℃、大约-15℃至大约+20℃、大约+5℃至大约+25℃、大约+5℃至大约+20℃、大约+5℃至大约+15℃、大约+2℃至大约+12℃、大约+2℃至大约+10℃、大约+2℃至大约+8℃、大约+2℃至大约+6℃,或大约+2℃、+3℃、+4℃、+5℃、+6℃、+7℃、+8℃、+10℃、+15℃、+25℃、+30℃或+40℃。虽然有储存温度,在特定情况下,样品在储存和运输条件过程中可能短暂出现的温度变化下是稳定的,所述储存和运输条件对于这种组合物来说是可以预期的。

[0168] 已确定,使用本文所述的本发明的制剂,能够获得干燥粉末产物,它显示的颗粒尺寸适合于活性物质的方便保存和快速溶解。根据本发明的干燥制剂包含的颗粒在整个加工、后处理(final finishing)、储存或分配过程中都保持稳定和均一。所述制剂是耐储存的和自由流动的,当被分发到其最终容器中时不会表现出任何问题,而且患者施用起来很简单。

[0169] 5.6.3喷雾-干燥

[0170] 在一些情况下,制剂被喷雾干燥,然后被储存。喷雾干燥使用本领域已知的方法进行,并且可以被修改以使用液体或冷冻喷雾干燥(例如使用例如来自Niro Inc. (Madison, WI),Upperton Particle Technologies (Nottingham,England),或美国专利公开号Nos.2003/0072718和2003/0082276的方法),或Buchi (Brinkman Instruments Inc., Westbury,NY)。

[0171] 5.6.4稀释剂

[0172] 本文所述的冻干制剂可以根据需要被重构,通过将冻干形式与合适的稀释剂混合以将原始的制剂组分再溶解至所希望的浓度。本文使用的术语“稀释剂”是指药学可接受的(对于给人施用来说是安全的和无毒的)溶剂,用于改变或得到合适的浓度,如本文所述的。示例性的稀释剂包括,但不限于,无菌水(例如WFI、Milli-Q水)、盐水、葡萄糖、右旋糖、Ringer和水性缓冲溶液。

[0173] 5.7药物组合物

[0174] 本发明的制剂优选适用于动物或人体的治疗方法。因此,本发明涉及药物或诊断组合物,所述组合物包含根据本发明任何方面的多肽的制剂或者可由本发明的任何方法或工艺获得的多肽的制剂。

[0175] 本发明的制剂优选为药物制剂。特别地,所述制剂适合于对人进行肠胃外给药,例如皮下、静脉内、肌内、皮内或腹膜内施用,优选静脉内或皮下施用。施用包括施用液体制剂的任何方式,特别是注射。其它形式的系统性施用,例如通过可植入装置,微输液泵(任选地是可植入的),和/或(可植入的)缓释制剂,例如贮库制剂(deposit)、凝胶、生物可降解聚合物制剂也在本发明的范围内。药物组合物在制造和储存过程中是无菌的和稳定的,因为vWF结合剂的衍生/降解产物在临床应用上是不受欢迎的。组合物还可以是高纯度的,例如,排除细菌产物例如LPS的存在。制剂可以通过任何适合的方法进行灭菌,例如过滤灭菌、辐照及其组合。优选地,药物组合物适合于肠胃外(特别是静脉内、动脉内或经皮)施用。静脉内施用被认为是尤其重要的。优选vWF结合剂是肠胃外形式的形式,最优选是静脉内和皮下形式的形式。

[0176] 为了适合作为药物制剂,本发明的制剂通常以适当的体积比包含本发明的多肽(即活性剂)。例如,与静脉注射制剂相比,皮下注射的活性剂浓度可以更高,以允许在更小的体积中施用必要的药物剂量。但是,在一些实施方案中,皮下或静脉注射的活性剂的浓度是相同的,并且可以在本文所定义的示例性的范围之内。

[0177] 在一些实施方案中,本发明的制剂可以包含其它试剂,例如其它活性剂、赋形剂、稳定剂、防腐剂例如抗微生物剂等。

[0178] 本发明的制剂优选为应用于有需要的患者的剂量。尽管如此,可以由主治医生考虑患者的详细情况,特别是年龄、体重、生活方式、活动水平、以及一般医疗条件,视情况选择给药的特定模式和剂量。更特别地,ALX-0081以24h的剂量间隔进行静脉内或皮下给药。更优选地,在考虑了聚集活性,例如通过RIPA,瑞斯托菌素诱导的血小板聚集-(Favaloro EJ.Clin Haematol 2001;14:299-319)和/或瑞斯托菌素辅因子血小板凝集反应测定-(Howard MA,Firkin BG.Ristocetin-a new tool in the investigation of platelet aggregation.Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica 1971;26:362-9)测量的聚集活性之后,ALX-0081以24h的剂量间隔进行静脉内或皮下给药。例如,如果估计在接下来的6个小时,由RIPA测量的聚集活性持续低于10%或者由RICO测量的聚集活性持续低于20%(临床相关抑制),则不进行进一步剂量的给药。

[0179] 但是,通常,vWF结合剂的剂量可以取决于多种因素,例如活性成分的有效性和持续时间、温血物种、和/或性别、年龄、体重和温血动物的个体条件。

[0180] 通常剂量是这样的,例如基于体外结果,或者例如基于在食蟹猴中测试亚慢性毒性的剂量升级研究的结果,估计vWF结合剂的单次剂量。根据这种临床前数据集,可以确定vWF结合剂的起始和后续升级剂量。例如剂量可以从0.5-50mg,特别是1-30mg,给重量为大约75(+/-30)kg的温血动物施用(但也可以与这个标准不同)。如果需要的话,该剂量可以以分几次,以任选等量的、部分剂量的方式使用(“mg”是指每个要治疗的哺乳动物-包括人的mg药物)。

[0181] 上述提及的剂量-或者作为单次剂量施用(是一个实施方案)或者分几次部分剂量施用-可以重复,如上所述,例如每六个小时一次、每12个小时一次或每天一次。换句话说,

药物组合物的施用方案可以是连续的每6个小时的治疗至更长时间间隔的给药治疗。

[0182] 优选地, vWF结合剂施用的剂量与本文中所建议在需要进行PCI的患者的辅助治疗中所使用的ALX-0081量是相同的数量级。例如, 对于优选的含12A02H1的vWF结合剂, 例如ALX-0081及其功能性变体, 对于人患者的急性治疗可以使用大约0.5至大约40mg范围, 优选大约1至大约35mg范围, 或者大约2至大约30mg范围, 甚至更优选大约3至大约25mg范围或者大约4至大约20mg范围, 或者大约5至大约17.5mg范围, 或者甚至大约6至大约16mg范围, 或者大约7.5至大约15mg范围, 或者甚至大约10至大约14mg范围, 更优选大约10, 大约12.5或大约13.8mg的vWF结合剂剂量。

[0183] 单次剂量单位形式的制剂含有优选大约0.5至大约40mg, 优选大约1至大约35mg, 或者大约2至大约30mg, 甚至更优选大约3至大约25mg或大约4至大约20mg, 或者大约5至大约17.5mg, 或者甚至大约6至大约16mg, 或者大约7.5至大约15mg, 或者甚至大约10至大约14mg, 更优选大约10, 或者大约12.5或者大约13.8mg的活性成分, 而非单次剂量单位形式的制剂含有优选大约0.5至大约40mg, 优选大约1至大约35mg, 或者大约2至大约30mg, 甚至更优选大约3至大约25mg或大约4至大约20mg, 或者大约5至大约17.5mg, 或者甚至大约6至大约16mg, 或者大约7.5至大约15mg, 或者甚至大约10至大约14mg, 更优选大约10, 大约12.5或大约13.8mg的活性成分。

[0184] 肠胃外给药的药物制剂是, 例如剂量单位形式的, 例如安瓶。它们以本身已知的方式制备, 例如通过常规的混合、溶解或冻干过程。

[0185] 肠胃外制剂特别是注射液液体, 所述注射液液体以多种方式起效, 例如在PCI的部位、动脉内、肌内、腹膜内、鼻内、皮内、皮下或优选静脉内。这种液体优选是等渗水溶液或混悬液, 其可以在使用前制备, 例如从冻干制剂或者含有单独的活性成分或含有活性成分与药学可接受载体的浓缩物制备。药物制剂可以被灭菌和/或含有辅料, 例如防腐剂、稳定剂、湿润剂和/或乳化剂、增溶剂、用于调节渗透压的盐和/或缓冲液。

[0186] 经皮应用的适合的制剂包括与载体一起的有效量的活性成分。有益的载体包括可吸收的药学可接受的溶剂, 以帮助通过宿主的皮肤。典型地, 经皮装置是绷带的形式, 所述绷带包括背衬部分 (backing member), 含有化合物以及任选的载体的储存池, 任选地速率控制屏障以在延长的时间内将宿主皮肤上的活性成分以控制的和预定的速率递送, 以及将所述装置固定在皮肤上的工具。

[0187] 下表提供了本发明的基于柠檬酸盐和磷酸盐缓冲液的制剂的一些非限制性实例。如果需要的话, 通过加入适当的赋形剂将所有制剂调节为摩尔渗透压浓度为 $290 \pm 60 \text{ mOsm/kg}$ 。制剂可以包含本发明的多肽, 例如SEQ ID NOs:1-19中的任一个或多个, 特别是SEQ ID NO:1。

[0188]

缓冲液	缓冲液浓度 (mM)	pH		缓冲液	缓冲液浓度 (mM)	pH
柠檬酸盐	10	6.0		磷酸盐	10	6.5
柠檬酸盐	10	6.5		磷酸盐	10	7.0
柠檬酸盐	10	7.0		磷酸盐	10	7.5
柠檬酸盐	20	6.0		磷酸盐	20	6.5
柠檬酸盐	20	6.5		磷酸盐	20	7.0
柠檬酸盐	20	7.0		磷酸盐	20	7.5
柠檬酸盐	30	6.0		磷酸盐	30	6.5
柠檬酸盐	30	6.5		磷酸盐	30	7.0
柠檬酸盐	30	7.0		磷酸盐	30	7.5
柠檬酸盐	40	6.0		磷酸盐	40	6.5
柠檬酸盐	40	6.5		磷酸盐	40	7.0
柠檬酸盐	40	7.0		磷酸盐	40	7.5
柠檬酸盐	50	6.0		磷酸盐	50	6.5
柠檬酸盐	50	6.5		磷酸盐	50	7.0
柠檬酸盐	50	7.0		磷酸盐	50	7.5

[0189] 该表中缓冲液浓度应当理解为任选地包含 ± 5 mM。pH值应当理解为任选地包含 ± 0.2 。上述缓冲液的每一种都可以与一种或多种赋形剂和/或表面活性剂组合,所述一种或多种赋形剂选自例如:浓度为例如25,30,40,50,60,70,100,150,250或500mM的NaCl;浓度为例如2,3或4% (w/v) 的甘露醇;浓度为例如25,30,40,50,60,70,100,150,250或500mM的甘氨酸;浓度为例如25,30,40,50,60,70,100,150,250或500mM的海藻糖和浓度为例如4,5,6,7,8或9% (w/v) 蔗糖,所述表面活性剂例如是浓度为例如0.001%,0.002%,0.003%,0.004%,0.005%,0.01%,0.015%,0.02%,0.025%,0.03%,0.035%,0.04%,0.045%,0.05%,0.1%,0.2%,0.3%,0.4%或0.5% (v/v) 的吐温-80。

[0190] 5.8本发明的效果

[0191] 本发明提供vWF结合剂,例如本文所述的免疫球蛋白单可变结构域,例如SEQ ID NOs:1-19,特别是SEQ ID NO:1的稳定制剂。“稳定”通常是指免疫球蛋白单可变结构域在延长时间,例如1个月至36个月的储存之后不会有显著的物理或化学变化,即使是暴露于一种或多种化学或物理胁迫,例如升高的温度(等于高于+25°C),或者物理胁迫例如震动或搅拌中。更特别地,“稳定”是指在一定条件下(如所定义的)在延长时间(如所定义的)的储存之后仅有限地形成(如所定义的)一种或多种降解产物,例如本发明多肽的低分子量(LMW)衍生物(片段);和/或化学衍生物或改变例如焦谷氨酸盐变体;和/或例如通过聚集形成的高分子量(HMW)衍生物(寡聚物或聚合物)。

[0192] 技术人员非常熟悉评估蛋白质尺寸的技术,例如尺寸排阻色谱-HPLC或评估化学衍生物形成的技术,例如反相HPLC。技术人员还熟悉用于进行这种分析的常用仪器和软件工具。例如技术人员知道分析色谱运行,例如依据相对峰面积分析色谱运行的常用软件。实

例包括(但不限于)配备有ChemStation软件的Agilent 1200 HPLC系统(Agilent Technologies,Palo Alto,USA,Rev B)或配备有Chromleon软件的Dionex Ultimate 3000 HPLC系统(Dionex Corporation,Sunnyvale,CA,USA,V6.8)。

[0193] 可用于评估蛋白质稳定性,例如免疫球蛋白单可变结构域的一般技术包括静态光散射、切向流过滤、傅里叶变换红外光谱学、圆二色谱、脲诱导的蛋白质去折叠、固有色氨酸荧光和/或1-苯胺-8-萘磺酸蛋白质结合。此外,本发明的制剂在储存过程中和/或在本发明定义的一种或多种胁迫的影响下表现出几乎没有损失或没有损失效力/生物活性。生物活性和/或效力可以例如如W02006/122825所述测定。

[0194] 5.8.1热稳定性

[0195] 本发明的制剂的特征在于提供高热稳定性的vWF结合剂,例如本文所定义的免疫球蛋白单可变结构域。热稳定性可以例如通过测定熔解温度(T_m)来评价。用于测定熔解温度的适合的技术是已知的,包括例如热漂移测定(TSA),例如如本文所述的。更特别地,本发明的制剂导致与其它制剂相比,由TSA测定的免疫球蛋白单可变结构域的 T_m 的提高。该效果在实验部分的表1中示例说明。

[0196] 如根据实验部分所能确定的,高的热稳定性,即高的 T_m 可以作为储存稳定性的一个指示。

[0197] 根据本发明,本发明的制剂在宽范围的pH值上,例如对于柠檬酸盐缓冲液来说在6.0和7.0之间,对于磷酸盐缓冲液来说在6.5和7.5之间,对于 T_m 具有积极效果。在柠檬酸盐缓冲液为6-7,特别是pH 6.5 \pm 0.2时,以及磷酸盐缓冲液为pH 6.5-7.5,特别是pH 7.1 \pm 0.2时,观察到对 T_m 具有最有利的效果。

[0198] 赋形剂的加入可以对于 T_m 具有进一步的积极或消极效果(表1)。例如,海藻糖可以提高 T_m (在特定缓冲液中),例如在150mM和300mM之间的海藻糖。甘露醇或蔗糖对于 T_m 也具有明显的积极效果。这些赋形剂可以在本发明的特定实施方案中应用,例如这样的制剂:其中填充剂或冻干保护剂是有利。这些示例性的实施方案不排除使用其它的已知冻干保护剂或填充剂,它们可以单独使用或与甘露醇或蔗糖一起使用。

[0199] 如本说明书实验部分所证明的,由TSA测定的 T_m 作为vWF结合剂,例如本发明的免疫球蛋白单可变结构域的稳定性一个有价值的指标。

[0200] 5.8.2就机械应力而言的稳定性

[0201] 本发明的制剂的特征在于对于机械应力,例如搅拌、震动或剪切应力的高的稳定性。评价机械应力下的稳定性的可能的测定是在荧光分光光度计上监视500nm散射信号,或者通过紫外分光光度计评价,例如在340nm。散射或紫外吸收的增加反映聚集体的形成。当聚集体形成时(HMW),随时间的增加遵循线性曲线,可以测定该曲线的斜率(散射强度/时间或吸收单位/s)。优选地,本发明的制剂的特征在于斜率小于0.0006,例如小于0.0005,例如在0和0.0004之间(参照图4A和B)。

[0202] 包含柠檬酸盐缓冲液的制剂是特别优选的,其对于例如如本文所定义的搅拌之后的蛋白质回收率具有积极效果。例如,质量回收率是至少90%,95%,98%或100%。蛋白质回收率可以通过与样品受胁迫,例如通过搅拌使样品受胁迫之前的总蛋白质含量相比较来确定。包含磷酸盐缓冲液的制剂导致的回收率是在如上所定义的搅拌之后的至少75%,80%,85%或甚至更高。

[0203] 在5mg/mL的示例性的、非限制性的浓度时,本发明的制剂在缺乏吐温的条件下进行搅拌之后仅仅形成可逆的聚集体。因此,本发明的制剂防止在机械应力下形成不可逆聚集体。相应地,在本发明的进一步的实施方案中,本发明的制剂可以包含如上所定义的非离子洗涤剂,例如吐温-80,其浓度例如上文所定义的,例如在0.01%和0.02% (v/v) 之间。洗涤剂的加入可以进一步提高制剂的物理稳定性。例如,在5mg/mL的非限制性示例性浓度时,洗涤剂的加入可以防止形成聚集体(可逆的或不可逆的),如例如通过在荧光分光光度计上监视500nm散射信号或通过紫外分光光度计(340nm)所测定的(图4A和B)。

[0204] 本发明制剂的物理稳定性也可以通过SE-HPLC证明。本发明的免疫球蛋白单可变结构域的非限制性制剂可以抵抗机械应力,例如搅拌应力,而不形成寡聚体(HMW)或降解产物(LMW)。本发明的制剂保持稳定,不会降解或寡聚化,如例如在搅拌1.5小时之后通过SE-HPLC分析所测定的。

[0205] 在任何所述制剂中没有检测到寡聚化或降解(例如由RP-HPLC(仅测降解)或SE-HPLC图谱所测定的)。因此,根据本发明的优选实施方案,所述制剂包含柠檬酸盐缓冲液并且显示出至少70%,75%,80%,85%,90%,95%,98%,或甚至大约100%的回收率,例如在上述的条件下,其中回收率通过例如RP-HPLC或SE-HPLC并与非胁迫样品进行比较来测定。有利地是,柠檬酸盐缓冲液中的赋形剂可以是蔗糖,且如上所定义的回收率是至少80%,85%,90%,95%,98%,或者甚至大约100%。

[0206] 5.8.3液体制剂的稳定性测试

[0207] 5.8.3.1储存稳定性

[0208] 本发明的液体制剂在储存时,例如在-70℃,-20℃,+5℃,+25℃或+40℃储存例如1-36个月,如1,1.5,3,6,9,12,18,24,30或36个月时,提供良好的稳定性。用基于柠檬酸盐缓冲液的制剂可以获得最有利的结果,如表5中例示的。

[0209] 技术人员将会进一步认识到在+25℃,以及更特别地在+40℃进行储存代表胁迫性的储存条件。预期这样的条件会增加和加速不稳定性,例如化学或物理不稳定性的任何表现。因此,相对短时间地储存于例如+25或+40℃为较温和条件下(例如+5℃或冷冻)的延长的储存稳定性提供了良好的指示。

[0210] 5.8.3.2就蛋白质回收率而言的储存稳定性

[0211] 例如,本发明的制剂提供在-70℃和+40℃之间的温度储存之后至少95%,例如至少96,97,98,99或者甚至大约100%的蛋白质回收率。蛋白质回收率的测定可以通过任何已知的定量蛋白的手段,例如通过RP-HPLC或SE-HPLC,如表5所例示的,并与保持在-70℃的参考样品进行比较。例如在所指出的温度储存1个月、1.5个月、3个月、6个月、9个月、12个月、18个月、24个月、30个月或者甚至在36个月,可以观察到这些结果。

[0212] 5.8.3.3就化学衍生物降解产物而言的储存稳定性

[0213] 而且,本发明的制剂将化学衍生物,例如焦谷氨酸盐变体的产生减至最少,由例如RP-HPLC测定的峰尺寸小于5.0%(参考表5)。在这种类型的分析中,将给定峰的面积与色谱图的总面积进行比较,对于每个峰有一个相对面积。技术人员知道合适的分析手段,例如合适的软件,以分析色谱图(特定的,非限制性的实例包括配备有ChemStation软件的Agilent 1200 HPLC系统(Agilent Technologies,Palo Alto,USA,Rev B)或配备有Chromeleon软件的Dionex Ultimate 3000 HPLC系统(Dionex Corporation,Sunnyvale,CA,USA,V6.8)。因

此,优选地,在-70℃和+40℃之间的温度,例如+40℃储存之后,例如在储存上述定义的时间,例如1个月之后,焦谷氨酸盐变体对峰面积的贡献小于5%,优选小于4.6%,例如4.5,4.3,4.2,4.0或者甚至小于3.8%,如RP-HPLC所测定的。

[0214] 本发明的制剂还使氧化减至最少,所述氧化是例如在-70℃和+40℃之间的温度下经过上述定义的储存期,例如1个月之后氧化产物的形成(如例如通过RP-HPLC所测定的)(参照表5)。因此,在-70℃和+40℃之间的温度,例如+40℃储存之后,例如在储存上述定义的时间,例如1个月之后,本发明的制剂导致的氧化变体的峰面积小于3%,优选小于2.7%,优选小于2.5%,例如小于2.3%,2.2%,例如2.0,或者甚至小于例如1.7%或1.5%(如例如通过RP-HPLC所测定的)。

[0215] 5.8.3.4就寡聚化而言的储存稳定性

[0216] 本发明的制剂还提供了储存稳定性,例如在-70℃和+40℃之间的储存温度下,在如上所定义的储存时间,例如1个月之后,没有明显的可溶性寡聚物质形成(如例如由SE-HPLC所定义的);或者在-70℃和+40℃之间的储存温度,例如+40℃下,在如上所定义的储存时间,例如1个月之后,形成少于1%,优选少于0.5%,例如0.3%的可溶性寡聚物质。

[0217] 本发明还具有的效果是在-70℃或+40℃储存如上所定义的时间,例如1个月之后,提供保持低于0.15,优选低于0.1的聚集指数,所述聚集指数由吸光度值测定 $[(100 \times A_{340}) / (A_{280} - A_{340})]$ 。

[0218] 5.8.3.5如主产物回收率所反映的储存稳定性

[0219] 本发明制剂具有这样的效果:在-70℃和+40℃之间并且在如上所指出的储存时间,例如1个月储存之后,主产物峰面积,如例如由RP-HPLC所测定的(参见表5),是大约90%;或者主产物峰,如例如由RP-HPLC所测定的(参见表5),是至少85%或更多,例如86%,87%或88%。更优选地,在-70℃和+40℃之间,例如+40℃并且在如上所述的储存时间,例如1个月储存之后,主峰是90%,92%或95%,例如至少97%,更优选100%;或者在-70℃和+40℃之间,例如+40℃并且在如上所指出的储存时间,例如1个月储存之后,主峰,如例如由SE-HPLC所测定的,是至少85%,至少90%,优选至少95%,例如至少98%或甚至大约100%。

[0220] 根据本发明的制剂还具有这样的效果:例如在-70℃和+25℃之间以高达20mg/mL的浓度储存1-3个月之后,由RP-HPLC测定的主峰面积与储存之前的制剂相比仍然保持不变,并且为总峰的至少90%,更优选至少95%,其中参考样品的主峰为例如95%。在+40℃储存1个月后,本发明的制剂保留至少80%,85%或90%的主峰,如RP-HPLC所测定的;在储存2个月后,保留至少80%或85%,以及在储存3个月后保留至少75%或80%。

[0221] 而且,如cIEF所测定的,本发明的制剂具有这样的效果:例如在-70℃和+40℃之间以高达20mg/mL的浓度储存1-3个月之后,提供与参考样品(不进行储存的制剂,主峰为至少98%)相当的主产物回收率,例如主峰为至少85%或更多,例如86%,87%或88%。更优选地,在-70℃和+40℃之间储存之后,主峰为90%,92%或95%,例如至少97%,更优选100%。

[0222] 5.8.3.6在冻融条件下的稳定性

[0223] 与在随时间保持恒定的储存条件(例如储存于+5℃)下,或者包括单次FT循环(例如储存于-20℃或-70℃)的条件下提供制剂的稳定性不同,本发明的进一步的效果是在重复FT循环条件下的稳定性。冷冻和液体状态之间的每一次转变以及反向的转变给免疫球蛋白单可变结构域施加特别胁迫性的条件。

[0224] 本发明的制剂还具有这样的效果：它提供在FT条件下的良好的稳定性。例如本发明的制剂可以经受-70℃和室温(例如+25℃)，或者-20℃和室温之间的例如10次FT循环。制剂中所含有的免疫球蛋白单可变结构域能经受住这些条件，而不发生显著的变质，如通过RP-HPLC或SE-HPLC所确定的。评价了重复FT循环对于本发明制剂的不同的非限制性实施方案的效果，表明在所有情况下，vWF结合剂，例如免疫球蛋白单可变结构域的化学和物理完整性都得以保存。总体回收率在95-100%范围内，优选为至少95,98或99%。与只经过一次FT循环的对照相比，不同峰的相对比例保持不变。

[0225] 更特别地，在5mg/mL和20mg/mL之间的浓度，10次FT循环导致多肽的回收率(在例如总峰面积的基础上测定的，所述总峰面积即AU，如RP-HPLC或SE-HPLC测定的，为至少90%，95%，98%或100%；其中在特定的实施方案中，RP-HPLC或SE-HPLC图谱与参考样品(1个FT循环)相比无变化。

[0226] 5.8.3.7就效力而言的稳定性

[0227] 技术人员知道多种确定vWF结合剂，特别是免疫球蛋白单可变结构域，更特别是根据SEQ ID NOs:1-19任一种的多肽，例如SEQ ID NO:1的效力的方法(参见，例如，W02006/122825的实验部分，例如，实施例3-6、18和19，或W02009/115614的实验部分)。

[0228] 在一个实施方案中，本发明多肽的效力可以通过与其抗原的结合通过常规测定，例如ELISA、Biacore、RIA、FACS等来测定。

[0229] 在本发明的制剂中，所测试的vWF结合剂的效力在胁迫条件下，即在+40℃储存4周，仍然是可接受的。

[0230] 5.8.3.8就相容性而言的稳定性

[0231] 本发明的制剂还与多种不同的稀释剂相容。例如所述制剂可以与这些稀释剂混合/用这些稀释剂稀释，而不会影响免疫球蛋白单可变结构域的化学和物理稳定性。

[0232] 因此，本发明的制剂还提供在宽范围浓度上的稳定性，如本文所定义的。

[0233] 5.8.3.9稳定效果总结

[0234] 本发明制剂具有保持本发明多肽的化学和物理完整性的效果，甚至是在-70℃和+25℃之间的温度下在延长的储存，例如上述定义的储存时间之后。

[0235] 对于本发明的任何制剂来说，在-70℃将本文所定义的免疫球蛋白单可变结构域，特别是ALX-0081储存1个月不会影响它们的物理化学特性，特别是实验部分测试的缓冲液的非限制性实例。储存对于RP-HPLC、SE-HPLC或cIEF图谱没有显著的影响。

[0236] 5.8.4冻干制剂的稳定性测试

[0237] 此外，本发明提供了vWF结合剂，例如本文所定义的免疫球蛋白单可变结构域，例如SEQ ID NOs:1-19，优选SEQ ID NO:1的稳定制剂，所述制剂特别可用于冻干。本发明的制剂导致冻干之后具有提高的溶解性和提高的储存稳定性。

[0238] 5.8.4.1储存稳定性

[0239] 当储存于例如-70℃，-20℃，+5℃，+25℃或+40℃的温度，储存例如1-36个月，例如1,1.5,3,6,9,12,18,24,30或36个月时，本发明的制剂在冻干之后可以提供良好的稳定性。用基于柠檬酸盐缓冲液的制剂，例如实验部分例示的制剂3和7，可以获得最有利的结果(例如良好的饼状物形成并且没有可见的腐败迹象，图6)。技术人员能够认识到，在下面的讨论中，优选值反映柠檬酸盐缓冲液组成，例如如表8中所例示的。

[0240] 技术人员还会认识到,在+25℃以及更特别地在+40℃储存表示胁迫的储存条件。预期这种条件会增加和加速任何不稳定性,例如化学或物理不稳定性的表现。因此,相对短时间地储存于例如+25℃或+40℃为较温和条件下(例如+5℃或冷冻)的延长的储存稳定性提供了良好的指示。

[0241] 5.8.4.2就蛋白质回收率而言的储存稳定性

[0242] 例如,本发明的制剂提供在-70℃和+40℃之间的温度储存之后至少95%,例如至少96,97,98,99或者甚至大约100%的蛋白质回收率。蛋白质回收率的测定可以通过任何已知的定量蛋白的手段,例如通过含量、RP-HPLC或SE-HPLC。例如在所指出的温度储存1-36个月,例如1,1.5,3,6,9,12,18,24,30或36个月之后,可以观察到这些结果。

[0243] 5.8.4.3就化学衍生物/降解产物而言的储存稳定性

[0244] 而且,本发明的制剂可以防止冻干后化学衍生物的产生并且将其减至最少,如例如通过SE-HPLC所证实的。

[0245] 5.8.4.4就寡聚化而言的储存稳定性

[0246] 本发明的制剂在冻干后还提供了这样的储存稳定性,在-70℃和+40℃之间的储存温度下,在如上所定义的储存时间,例如1个月之后,没有明显的可溶性寡聚物质形成(如例如由SE-HPLC所定义的);或者在-70℃和+40℃之间的储存温度,例如+40℃下,在如上所定义的储存时间,例如1-36个月,例如1,1.5,3,6,9,12,18,24,30或36个月之后,形成少于1%,优选少于0.5%,例如0.3%的可溶性寡聚物质(如例如由SE-HPLC所定义的)。

[0247] 5.8.4.5如主产物回收率所反映的储存稳定性

[0248] 本发明的制剂还具有这样的效果:在冻干之后,在-70℃和+40℃之间并且在如上所指出的储存时间,例如1,3,6,9,12,18或24个月储存之后,主产物峰,如例如由SE-HPLC所测定的(参见表18和表27-29),是大约100%;或者主产物峰,如例如由SE-HPLC所测定的(参见表18和表27-29),是至少85%或更多,例如86%,87%或88%。更优选地,在-70℃和+40℃之间,例如+25℃并且在如上所指出的储存时间,例如1,3,6,9,12,18或24个月储存之后,主峰是90%,92%或95%,例如至少97%,更优选100%;或者在-70℃和+40℃之间,例如+40℃并且在如上所指出的储存时间,例如1,3,6,9,12,18或24个月储存之后,主产物峰,如例如由SE-HPLC所测定的,是至少85%,至少90%,优选至少95%,例如至少98%或甚至大约100%。

[0249] 根据本发明的制剂还具有这样的效果:在冻干后,例如在-70℃和+40℃之间以12.5mg/mL的浓度储存1-12个月之后,由RP-HPLC测定的主峰与储存之前的制剂相比仍然保持不变,并且为总峰的至少90%,更优选至少93%,其中参考样品的主峰为例如93%(参见表15)。在冻干之后在+40℃储存达12个月之后,本发明的制剂保留了至少91%,92%或93%的主峰,如RP-HPLC所测定的。

[0250] 而且,如cIEF所测定的(参见表27-29),本发明的制剂具有这样的效果:在冻干后,在-70℃和+40℃之间的温度以例如12.7mg/mL的浓度储存1-24个月之后,提供与参考样品(不进行储存的制剂,主峰为至少96%)相当的主产物回收率,例如主峰为至少85%或更多,例如86%,87%或88%。更优选地,在-70℃和+40℃之间储存之后,主峰为90%,92%,93%,94%,95%或96%,例如至少97%,更优选100%。

[0251] 5.8.4.6在冻融条件下的稳定性

[0252] 本发明的制剂还具有这样的效果：在冻干之后，它提供在FT条件下的良好的稳定性。例如本发明的制剂可以经受-20℃和室温（例如+25℃）之间的例如5次FT循环。制剂中所含有的免疫球蛋白单可变结构域能经受住这些条件，而不发生显著的变质，如通过RP-HPLC或SE-HPLC所确定的。在所有情况下，vWF结合剂，例如免疫球蛋白单可变结构域的化学和物理完整性都得以保存。与储存于-70℃的液体对照样品相比，总体回收率在95-100%范围内，优选为至少95,98或99%。

[0253] 更特别地，在浓度为16mg/mL时，5次FT循环导致多肽的回收率（在例如总面积的基础上测定的，所述总面积即AU），如RP-HPLC或SE-HPLC测定的，为至少90%，95%，98%，99%或100%；其中在特定的实施方案中，RP-HPLC或SE-HPLC图谱与参考样品（储存于-70℃的液体对照样品）相比无变化（参见表12）。

[0254] 5.8.4.7就效力而言的稳定性

[0255] 技术人员知道多种确定vWF结合剂的效力的方法，所述vWF结合剂特别是免疫球蛋白单可变结构域，更特别是根据SEQ ID NOs:1-19任一种的多肽，例如SEQ ID NO:1（参见，例如，W02006/122825的实验部分，例如，实施例3-6、18和19，或W02009/115614的实验部分）。在制剂中，vWF结合剂在冻干后的效力不受重复FT循环的影响。特别地，在本发明的制剂中，所测试的vWF结合剂的效力在胁迫条件下，即在+40℃储存达12个月（表23）以及在+40℃储存甚至高达24个月（表29）的条件下保持稳定。在一个实施方案中，本发明多肽的效力可以通过与其抗原的结合通过常规测定，例如ELISA、Biacore、RIA、FACS等来测定。更特别地，在本发明的制剂中，在上述胁迫条件下储存后，与储存之前的结合活性相比，至少80%，优选至少90%，更优选至少95%或甚至至少99%的vWF结合剂保持其结合活性。

[0256] 在进一步的方面，当将ALX-0081的液体制剂与冻干制剂相比，本发明的制剂几乎没有表现出生物活性的损失，如通过各种免疫测定所评估的，包括但不限于Biacore测定、酶联免疫吸附测定（ELISA），瑞斯托菌素诱导的辅因子活性测定（RICO）和/或基于Gyrolab的测定（参见7.13节和表24）。

[0257] 5.8.4.8稳定效果总结

[0258] 本发明制剂在冻干后具有保持本发明多肽，特别是ALX-0081的化学和物理完整性的效果，甚至是在-70℃和+40℃之间的温度下在延长的储存，例如上述定义的储存时间之后，产物的纯度/杂质分布基本上没有变化。例如，在冻干后进行长时间的储存对于RP-HPLC、SE-HPLC或cIEF图谱没有显著影响，如实验部分所证实的。

[0259] 5.9本发明的方法

[0260] 本发明的vWF结合剂可以通过任何常用方法生产。典型的实例包括在合适的宿主系统，例如细菌或酵母中重组表达。根据本发明，vWF结合剂在进行配制之前会经过适当的纯化。

[0261] 本发明包括生产如本文所定义的制剂的方法。

[0262] 纯化和配制步骤可以同时进行，例如在使用本发明的缓冲液从柱洗脱本发明的vWF结合剂时。或者，本发明的制剂可以通过任何适当的手段通过交换缓冲液来制备，例如本领域中广泛使用的手段例如透析、超滤等。

[0263] 在一些实施方案中，生产本发明制剂的方法还可以涉及冻干或喷雾干燥制剂的重构，例如通过加入水或合适的缓冲液（其可以任选地包含其它赋形剂）。

[0264] 制备根据本发明制剂的方法可以包括其它步骤,例如将其填装到适合于临床应用的小瓶中,例如密封容器和/或将其配制成剂量单位形式。该方法还可以包括其它步骤例如喷雾干燥、冻干、或冷冻,例如散装(bulk)冷冻。本发明还包括容器、剂量单位形式、或通过本文所述的任何方法可获得的其它产品。

[0265] 本发明的制剂可用于储存vWF结合剂,例如本文所定义的ISVDs。因此,本发明包括储存如本文所使用的vWF结合剂的方法,其特征在于使用本文所定义的制剂。更特别地,本发明包括使本文所定义的vWF结合剂稳定以用于储存的方法,包括例如本发明所述的制剂的制备。储存可以是1-36个月,例如1,1.5,3,6,9,12,18,24,30或36个月,例如至少12或甚至24个月,任选地在-70℃和+40℃之间的温度下,例如-70℃,-20℃,+5℃,+25℃或+40℃,优选-70℃和+25℃之间的温度,更优选在-20℃和+5℃之间的温度下。因此,储存可以包括冷冻、冷冻干燥(冻干)和/或喷雾干燥。储存方法可以进一步包括评估本文所定义的vWF结合剂的物理和化学完整性。

[0266] 本发明还涉及分析制剂的方法,所述制剂包含至少一种本文所定义的vWF结合剂。可以分析所述制剂中如本文所定义的vWF结合剂的化学或物理不稳定性的任何表现。例如,可以评估制剂中降解产物的存在,例如低分子量衍生物如蛋白水解片段;和/或化学衍生物,例如焦谷氨酸盐变体;和/或高分子量衍生物如聚集体、聚团等。还可以评估制剂中总蛋白含量和/或效力。在本发明的分析方法中可以使用本文所提及的各种方法的每一种。

[0267] 因此,本发明还涉及监视和/或评估制剂的质量和/或稳定性,例如在制造、储存和使用的一个或多个过程中的质量和/或稳定性的方法。本发明还涉及制剂的质量控制方法,例如评估制剂符合本文进一步所述的产品标准。在这些方面的任一方面中,本发明包括选自下述各项的一项或多项:与一个或多个参考样品的比较,批间差异的分析,和进行生产过程的监视。

[0268] 本发明涉及与本发明制剂相关的任何产品,例如包含它们的产品,或对于它们的生产或配制来说是必需的产品,不受任何限制。

[0269] 例如,本发明涉及制品,例如包含根据本发明的一种或多种制剂的密封容器。本发明还涉及药物单位剂型,例如适合于对患者,优选人患者肠胃外给药的剂型,包括根据本文所述的任何实施方案的一种或多种制剂。剂量单位形式可以是,例如载药注射器、安瓶、盒或小瓶的形式。注射器、安瓶、盒或小瓶可以用任何适合的材料制造,例如玻璃或塑料,并且可以包括橡胶材料,例如小瓶的橡胶塞和注射器或盒的橡胶活塞或橡胶密封件。本发明还涉及包含根据本发明的一种或多种制剂的试剂盒。所述试剂盒可以进一步包含使用说明书和/或临床包装说明书。在本文所定义的产品中的任何实施方案中,本发明还包括存在包装材料、使用说明书和/或临床包装说明书,例如管理方面所需要的。

[0270] 5.10定义

[0271] 5.10.1同一性

[0272] 为比较两个或更多个氨基酸序列的目的,第一氨基酸序列和第二氨基酸序列之间的“序列同一性”(在本文中也称为“氨基酸同一性”)的百分比可以这样计算:用[第一氨基酸序列中与第二氨基酸序列中相应位置的氨基酸残基相同的氨基酸残基的数量]除以[第一氨基酸序列中氨基酸残基的总数量]并乘以[100%],其中第二氨基酸序列中氨基酸残基的每一个缺失、插入、取代或添加-与第一氨基酸序列相比-被认为是单个氨基酸残基[位

点]上的差异,即本文所定义的“氨基酸差异”。

[0273] 或者,两个或更多个氨基酸序列之间的序列同一性程度可以通过已知的用于序列比对的计算机算法来计算,例如使用标准设置的NCBI Blastv2.0.。

[0274] 用于确定序列同一性程度的一些其它技术、计算机算法和设置在例如W004/037999,EP0967284,EP1085089,W000/55318,W000/78972,W098/49185和GB2357768-A中描述。

[0275] 通常,为了根据上文所述的计算方法确定两个氨基酸序列之间的“序列同一性”的百分比的目的,将具有最多数量的氨基酸残基的氨基酸序列作为“第一”氨基酸序列,将另一个氨基酸序列作为“第二”氨基酸序列。

[0276] 而且,在确定两个氨基酸序列的序列同一性程度上,技术人员可以考虑所谓的“保守”氨基酸取代,其通常可以被描述为一个氨基酸残基被另一个具有相似化学结构的氨基酸残基替换并且对多肽的功能、活性或其它生物学特性只有极少影响或基本上没有影响的氨基酸取代。这种保守氨基酸取代是本领域熟知的,例如从W004/037999,GB2357768-A,W098/49185,W000/46383和W001/09300可知;并且这种取代的(优选)类型和/或组合可以根据来自W004/037999以及W098/49185和来自本文所述的其它参考文献的相关教导来选择。这种保守取代优选是下述(a)-(e)组内的一个氨基酸被同一组内的另一个氨基酸取代的取代:(a)小的脂肪族的、非极性的或轻微极性的残基:Ala,Ser,Thr,Pro和Gly;(b)极性的、带负电荷的残基和它们的(不带电荷的)酰胺:Asp,Asn,Glu和Gln;(c)极性的、带正电荷的残基:His,Arg和Lys;(d)大的脂肪族的、非极性的残基:Met,Leu,Ile,Val和Cys;和(e)芳香族的残基:Phe,Tyr和Trp。特别优选的保守取代如下:Ala替换为Gly或替换为Ser;Arg替换为Lys;Asn替换为Gln或替换为His;Asp替换为Glu;Cys替换为Ser;Gln替换为Asn;Glu替换为Asp;Gly替换为Ala或替换为Pro;His替换为Asn或替换为Gln;Ile替换为Leu或替换为Val;Leu替换为Ile或替换为Val;Lys替换为Arg,替换为Gln或替换为Glu;Met替换为Leu、替换为Tyr或替换为Ile;Phe替换为Met、替换为Leu或替换为Tyr;Ser替换为Thr;Thr替换为Ser;Trp替换为Tyr;Tyr替换为Trp;和/或Phe替换为Val、替换为Ile或替换为Leu。应用于本文所述的多肽的任何氨基酸取代还可以在Schulz等,Principles of Protein Structure, Springer-Verlag,1978研究的不同物种的同源蛋白之间的氨基酸变异的频率的分析的基础上进行,在Chou和Fasman,Biochemistry 13:211,1974和Adv.Enzymol.,47:45-149,1978研究的对结构形成电势的分析的基础上进行,以及在Eisenberg等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:140-144,1984;Kyte&Doolittle;J Molec.Biol.157:105-132,1981和Goldman等,Ann.Rev.Biophys.Chem.15:321-353,1986研究的对蛋白质中疏水模式的分析的基础上进行,它们所有都通过引用将其全文合并入本文。在本文的描述中以及在上述引用的一般背景技术中给出了Nanobodies[®]的一级、二级和三级结构的信息。而且,为此目的,美洲驼的V_{HH}结构域的晶体结构例如由Desmyter等,Nature Structural Biology,Vol.3,9,803(1996);Spinelli等,Nature Structural Biology(1996);3,752-757和Decanniere等,Structure,Vol.7,4,361(1999)给出。在上述的现有技术中可以找到有关在常规V_H结构域中形成V_H/V_L接触面的一些氨基酸残基以及在这些位置上的可能的骆驼源化取代的其它信息。

[0277] 6.缩写

[0278]	API	活性药物成分
[0279]	cIEF	毛细管等点聚焦
[0280]	DLS	动态光散射
[0281]	DOE	实验设计
[0282]	DP	药品
[0283]	DS	药品物质
[0284]	FT	冻融
[0285]	HMW	高分子量
[0286]	LMW	低分子量
[0287]	MALS	多角度光散射
[0288]	RH	相对湿度
[0289]	RPC	反相色谱
[0290]	RP-HPLC	反相高效液相色谱
[0291]	SE-HPLC	尺寸排阻高效液相色谱
[0292]	SOP	标准操作程序
[0293]	T _m	熔解温度(°C)
[0294]	TSA	热漂移测定
[0295]	vWF	冯维勒布兰德因子
[0296]	WFI	注射用水

[0297] 本发明现在通过下述非限制性的优选方面、实施例和附图进行进一步描述。

[0298] 本申请通篇引用的所有参考(包括文献参考、授权专利、公开的专利申请、以及共同待审的专利申请)的全文内容在此明确通过引用的方式合并进来,特别是对于上文中引用的教导。

7. 实施例

[0299] 设计一组实验以获得改进的制剂缓冲液,其目的是为了满足不同并且看似有矛盾的目标。特别地,本文提供了示例性的制剂,其能够保持ALX-0081的稳定性、生物活性、纯度和质量,并且这在延长的时间内,对于各种胁迫例如冷冻、冻干、加热和/或重构来说是稳定的。

[0300] 同期的ALX-0081 DS已显示为是液体制剂的形式,其含有在基于磷酸盐的(D-PBS)缓冲液中的5mg/mL的活性药物成分(API),所述缓冲液含有200mM甘氨酸和0.02%吐温-80(v/v),pH 7.1(DS)。虽然在最初的临床实验中已经使用了这种制剂,但是它还可以在几个方面进行改进。首先,相对低的浓度可能使得必须进行多次皮下注射(假设每次皮下注射的体积限制在大约1mL),因此降低了患者使用的舒适性。第二,目前的ALX-0081制剂在3-8°C或室温的储存稳定性是有限的。在该制剂中,有限的保存期主要是由化学改变(参见7.2节)决定的。化学改变可能与效力的损失相关。虽然可以通过在-20°C储存产品获得可行的保存期,但是这对于大多数实用目的来说并不被认为是一种有利的选择。

[0301] 7.1方法

[0302] 基本上根据标准操作程序来分析样品,所述标准操作程序用于评估含量、效力和

纯度、沉淀、浓缩、降解、聚集和效力。此外,所有样品通过目测检查浑浊度或蛋白质聚集体或沉淀物的存在。通过Karl-Fischer滴定法测定特定冻干样品的残余水分含量。

[0303] 在本研究中使用三种不同的冻干程序来冷冻干燥ALX-0081-标准的65h运行(图1),缩短的37h运行和加长的66h冻干循环,其被优化以减少残余的水分含量,如表14所述。

[0304] 简短来说,在缩短的37h冻干过程开始时,搁板温度是+20℃,并2小时内降至-50℃。接下来,在1小时内产生0.04毫巴的真空度。达到0.04毫巴的真空度之后,搁板温度在-50℃保持4小时。在这4小时之后,温度在15小时内逐渐升高至0℃(即初次干燥步骤,除去冷冻的水)。搁板温度在0℃保持7小时,同时保持0.04毫巴的真空度。7小时后,温度在3小时内升高至+25℃,然后在25℃保持5小时(即二次干燥步骤,除去未冷冻的水)。在±0.400毫巴的真空度下封闭小瓶,然后恢复常压。

[0305] 对于标准65h运行应用相同的方法,仅在二次干燥步骤有所不同,其中二次干燥步骤在真空下在+25℃延长28h,导致整个循环为大约65h。标准65h冻干运行中不同步骤的概述图显示在图1中。在冻干过程中,监视关键位置上的三个小瓶中的产品温度。最终,根据温度探头的读数修改标准65h运行,得到延长的冻干循环,如表14所述。

[0306] 7.2同期的ALX-0081制剂的化学稳定性

[0307] RP-HPLC是用于评估药品物质(DS)的化学稳定性的信息量最大的方法之一。

[0308] RP-HPLC将ALX-0081DS分解为多种不同物质。除了主峰之外,可以分辨出前峰(在完整的未改变的物质之前洗脱的物质)和多个后峰。在到目前为止生产的批次中,前峰和后峰1始终分别占DS的大约2%和3.6%,而其它后峰占DS的不到1%。

[0309] 但是,在加速(+5℃)或胁迫(+25℃和+37℃/+40℃)条件下储存期间,特定产品相关变体的相对丰度随时间和温度而增加,如图2A所示。此外,在延长的温育之后RP-HPLC主峰似乎分裂为几种不同物质,特别是在升高的温度($\geq +25^\circ\text{C}$)下(图2B)。该数据表明在储存过程中产生了一些较早洗脱的新分子物质。

[0310] ALX-0081DS在制造时存在的或者在储存过程中产生的最重要的改变是下述改变:(i) 前锋1(氧化);(ii) 后峰1(正-leu(nor-leu)变体);(iii) 后峰2(焦谷氨酸盐的形成),和(iv) 主峰的分裂(异构化)。改变(i),(ii)和(iii)对效力没有显著影响(数据未显示)。相反,表明SEQ ID NO:1的位于CDR3区域的105和236位的天冬氨酸残基的异构化是导致ALX-0081的可能效力损失的主要分子机制(参见上述(iv))。

[0311] 在制造时存在的或者在储存过程中产生的一些ALX-0081产品相关变体,还可以通过cIEF检测。这是焦谷氨酸盐改变的情况,其表现为后峰(参见上述(iii))。而且,与RP-HPLC分析中所观察到的类似,在两个12A02H1结构域中在位置105的异构化事件均导致主峰加宽并最终导致主cIEF峰的分裂(参见上述(iv))。

[0312] 7.3缓冲液和赋形剂筛选

[0313] 为了进一步研究vWF结合剂的制剂,设计了一组复杂的实验,以研究所有相互影响的不同参数,包括(i)不同的缓冲液,(ii)以不同的浓度,(iii)各种pH的每种缓冲液;和(iv)具有不同赋形剂的每种组合。

[0314] 缓冲系统应当具有尽可能低的缓冲能力,以在注射时不显著干扰身体的缓冲系统。此外,必须非常小心地评估缓冲液类型和浓度对活性药物成分(API)的活性的影响。

[0315] 通常,提高的蛋白质稳定性水平是由于高的熔解温度。相应地,在各种组合物存在

的条件下监视ALX-0081的热性能。特别地,在192种不同的等渗制剂中进行TSA实验,根据其结果进行实验设计(DOE)以评价缓冲液、浓度、离子强度、pH和赋形剂对于ALX-0081的热稳定性的效果。读出是ALX-0081的熔解温度(T_m),其反映了各种测试组合中蛋白质的热稳定性。

[0316] 简短地说,在荧光染料,例如宝石橙的信号改变之后进行所使用的热漂移测定(TSA),其中蛋白质经热诱导去折叠。当向正确折叠的蛋白质溶液中加入宝石橙时,它不能与蛋白质上的任何表面结合,它的荧光淬灭。当温度上升时,蛋白质经热诱导去折叠并暴露它的疏水内核区域。随后宝石橙与疏水区域结合并不再淬灭,导致荧光信号的增加。在含有要测试的不同制剂的溶液中进行测定,ALX-0081为0.2mg/mL以及10x宝石橙。该程序由下述步骤组成:以4.4°C/s的升温速率加热至37°C并保持10s;以0.02°C/s的连续升温速率加热至90°C(每°C采集20次);以及以2.2°C/s的降温速率冷却至37°C并保持10s。

[0317] 在本文中研究了下述组的具有不同浓度(10-200mM)、pH值和赋形剂的缓冲液:

[0318] -柠檬酸盐 pH 6.0-6.5-7.0

[0319] -组氨酸 pH5.5-6.0-6.5

[0320] -磷酸盐 pH 6.5-7.0-7.5

[0321] --Tris-HCl pH 7.4-7.7-8.0

[0322] -NaCl 0-140mM浓度范围

[0323] -甘氨酸 0-270mM浓度范围

[0324] -甘露醇 0-270mM浓度范围

[0325] -蔗糖 0-270mM浓度范围

[0326] -海藻糖 0-270mM浓度范围

[0327] 得到的熔解温度(T_m)被输入到设计专家程序(Design Expert program)中,用于进行因子筛选实验的分析,以预测具有最高热稳定性的50种制剂(参见表1)。

[0328] 预测最高 T_m 值是含有海藻糖、蔗糖、甘露醇或甘氨酸的磷酸盐(pH 7.0-7.5)和柠檬酸盐(pH 6.2-7.0)。完全出乎意料地是,研究结果表明基于Tris-HCl(pH 7.8-8.0)和组氨酸-HCl(pH 6.5)的缓冲液具有明显较低的熔解温度,虽然它们先前被选为用于控制免疫球蛋白单可变结构域的溶液pH的精选缓冲系统,如W02010/077422中所述。

[0329] 相应地,推断含有海藻糖、蔗糖、甘氨酸或甘露醇的磷酸盐和柠檬酸盐制剂在稳定vWF结合剂,例如ALX-0081方面会有特别好的表现。

[0330] 7.4溶解性测试

[0331] 为了评价是否能够进一步提高ALX-0081的溶解性,在几种制剂中进行了初始筛选。ALX-0081的缓冲液被更换为感兴趣的制剂(不包括吐温-80)并且在带有5kDa截止过滤器的搅拌室(例如型号Amicon)中进一步浓缩。一旦发生可见的沉淀或浑浊,就过滤样品并测量蛋白质浓度。表2总结了所获得的结果。

[0332] 在基于磷酸盐和组氨酸的缓冲液中的浓缩导致在相对低的蛋白浓度(<10mg/mL)下发生样品浑浊和沉淀形成。相反,ALX-0081在柠檬酸盐缓冲液中保持物理稳定,甚至是在达到~56mg/mL的浓度之后。除了目测观察,通过荧光显微镜检查证实没有颗粒物质或HMW物质(用尼罗红染色,通过SE-HPLC和DLS测定)。而且,将~56mg/mL的溶液在-20°C或-70°C进行10次FT循环,或者在+4°C储存大约1周,没有表现出对分子物理稳定性的影响,如通过

SE-HPLC分析所证明的(分别参见图3A和3B)。

[0333] ALX-0081在柠檬酸盐缓冲液中的相对高的溶解性通过PEG沉淀测定所证实(数据未显示)。

[0334] 7.5吐温-80

[0335] 为了确定ALX-0081的制剂中是否需要非离子表面活性剂聚山梨醇酯,也称为吐温, (聚氧化乙烯(N) 去水山梨醇单月桂酸酯;其中N=20,40,60,65,80或85), 在pH 6.0和6.5的50mM柠檬酸盐缓冲液中进行了几次搅拌应力实验。通过在荧光分光光度计上监视500nm散射信号,评估不同浓度的吐温-80(没有吐温-80相对于0.01%相对于0.02% (v/v)) 对于5mg/mL的ALX-0081的物理稳定性的影响。

[0336] 吐温-80在两种缓冲液中都防止了散射信号的增加,这证明了它的保护效果(图4A和4B)。在含有0.01%或0.02%吐温-80 (v/v) 的样品之间没有观察到显著差异。而且,搅拌之前和之后的样品的SE-HPLC图谱没有显示出任何差异:达到了95-100%的回收率并且没有检测到寡聚化或降解。

[0337] 根据这些结果,决定在vWF结合剂,例如ALX-0081的制剂中包含0.01%的吐温-80 (v/v)。

[0338] 7.6吐温

[0339] 为了确定抗-vWF的结合剂的制剂中是否需要聚山梨醇酯范围内的其它成员,在pH6.0和6.5的50mM柠檬酸盐缓冲液中进行了几次搅拌应力实验,基本上如上述7.5节中所述,其中所述聚山梨醇酯范围内的其它成员的聚氧乙烯链的长度和脂肪酸酯结构部分有所不同,例如吐温-20,吐温-40,吐温-60,吐温-65和吐温-85。通过在荧光分光光度计上监视500nm散射信号,评估不同浓度的(没有吐温相对于0.01%相对于0.02% (v/v)) 不同吐温-成员对于5mg/mL的vWF结合剂的物理稳定性的效果。

[0340] 吐温-20,吐温-40,吐温-60,吐温-65和吐温-85与吐温-80基本上给出相同的有益效果。

[0341] 7.7液体制剂的稳定性测试

[0342] 进行了更全面的研究以评估浓度为20mg/mL的ALX-0081在不同的基于柠檬酸盐的等渗制剂中的稳定性。表3给出了所测试的不同制剂的概况。

[0343] 主要目的是评价pH(6.0-6.5-7.0)和赋形剂类型(NaCl、甘露醇、蔗糖或甘氨酸)对于液体产品的稳定性的效果。为了控制和直接比较的目的,该研究还包括以5mg/mL在D-PBS和甘氨酸中配制的同期ALX-0081(与目前的制剂相同,除了吐温-80浓度较低)以及先前提到的不同的基于柠檬酸盐的等渗ALX-0081溶液,但是配制浓度为5mg/mL而不是20mg/mL。这总共获得了17种不同的液体制剂(制剂编号1-17),对它们进行深度稳定性研究。为了排除吐温浓度差异的影响,所有的制剂都含有0.01%吐温-80 (v/v)。

[0344] 7.7.1冻融稳定性

[0345] 评价了重复FT循环对于ALX-0081的液体制剂的稳定性的效果。将不同制剂的等分样品(0.5mL/管)在-70℃或-20℃进行高达10次FT循环。每个循环包括冷冻±20分钟,然后在+25℃水浴中在5分钟内溶解。这样处理之后,所有制剂目测都保持澄清。RP-HPLC分析显示了良好的回收率(95-100%)并且没有检测到图谱有显著差异,这表明在测试的17种不同的液体制剂中,vWF结合剂,例如ALX-0081的质量没有受到反复冻融的影响。

[0346] 7.7.2 储存稳定性

[0347] 还通过在胁迫条件下,即在+40℃环境中储存等分样品(0.5mL/管)来评估17种不同制剂的稳定性;将-70℃长期储存条件作为参考。分析集中于RP-HPLC,因为该方法通常被认为是用于揭示在储存过程中发生的化学改变的信息量特别大的方法(参见表4)。这一节说明了在储存1个月之后获得的数据;结果证实了在更早时间点,即1周和2周后的发现。

[0348] (a) RP-HPLC

[0349] 如上述7.2节在前面所指出的,RP-HPLC分析将同期的ALX-0081DS(D-PBS/甘氨酸制剂)分解为一些产品相关变体和杂质。简单地说,在胁迫条件下(例如+40℃),纯度(主峰%)降低,同时一些已有的前峰/后峰以及另外形成的一些峰升高。

[0350] 本研究获得的RP-HPLC数据显示于表5中。

[0351] 总的来说,得到的结果表明,在不同的柠檬酸盐缓冲液中发生的改变与现有的制剂缓冲液(即D-PBS/甘氨酸)中观察到的基本上相同,虽然可以观察到在相对峰面积上有一些差异。特别是,与D-PBS/甘氨酸制剂相比,在柠檬酸盐制剂(特别是在pH 6.0时)中前峰面积(氧化)的增加更缓慢。对于这种前峰的增强,在不同的赋形剂中,甘氨酸似乎是最不利的。对于所有制剂,在+40℃储存1个月之后,不同后峰的图谱都是类似的,虽然第二后峰(即焦谷氨酸盐变体)似乎在pH 7.0比pH 6.0-6.5更明显。主峰加宽/分裂的程度-asp异构化的结果-难以量化,因为分辨率很低;肩峰的面积百分比无法准确估计,因此被包括在表5中报告的主峰的相对表面面积中。虽然如此,相应的RP-HPLC色谱图(数据未显示)允许进行定性评估;这些数据表明在不同的制剂中异构化的程度非常相似。

[0352] (b) cIEF

[0353] 与RP-HPLC类似,cIEF方法使得能够检测在胁迫条件下储存的过程中发生的特定产品变体(细节参见7.2节)。在图5中对此进行了例示,比较了在-70℃和+40℃储存一个月之后的同期ALX-0081的电泳图。

[0354] 本研究中得到的cIEF数据(数据未显示)基本上证实了RP-HPLC分析获得的结论,即在不同的柠檬酸盐缓冲液中发生的改变与现有的制剂缓冲液中观察到的具有相同的类型,并且程度大致相同,所述现有的制剂缓冲液在本文中由制剂17代表,如图5所示(即D-PBS/甘氨酸)。但是,可以观察到相对峰面积上有一些差异。特别是,后峰(即焦谷氨酸盐变体)似乎在pH 7.0比pH 6.0-6.5更明显,这与先前总结在表5中的由RP-HPLC获得的发现一致。

[0355] (c) SE-HPLC

[0356] 进行SE-HPLC分析以检查ALX-0081的物理稳定性,即检测在胁迫条件下储存过程中可能形成的HMW物质和/或降解产物。对于这里测试的所有制剂,胁迫测试对于SE-HPLC色谱图均没有表现出具有显著影响。

[0357] (d) 结论

[0358] 关于不同的液体ALX-0081制剂的储存稳定性的最重要的发现的总结显示在表5中。只列出了信息量最大的基于RP-HPLC分析的数据。这些数据表明在pH 6.0-6.5的50mM柠檬酸盐中具有较高的化学稳定性。除了甘氨酸以外,赋形剂的类型对稳定性没有显著影响。对于物理稳定性,在不同制剂之间没有观察到差异。后者由所有样品在各种HPLC分析中观察到的±100%的回收率证明并由SE-HPLC色谱图证明,所述SE-HPLC色谱图证明没有聚集/

降解。

[0359] 根据上述结果,决定进一步研究pH 6.0-6.5的柠檬酸盐/蔗糖制剂的潜力。

[0360] 7.8冻干制剂的稳定性测试

[0361] 通过比较液体的和冻干的柠檬酸盐/蔗糖制剂 (20mg/mL API, pH 6.0-6.5) 中的ALX-0081的储存稳定性,评估冻干的效果。测试的试剂的概况在表6中给出。使用现有技术的基于D-PBS/甘氨酸的制剂 (5mg/mL API) 进行比较。液体的 (即冻干之前) 和冻干的ALX-0081保持冷冻 (对于液体样品是-70℃, 对于冻干制剂是-20℃) 以及保持在+5℃, +25℃和+40℃, 并且在储存2周和1.5个月之后分析样品。

[0362] 图6的A图显示了通过如图1所示的标准65h运行进行冻干过程之后的小瓶的照片。含有柠檬酸盐/蔗糖的制剂的冻干导致良好的饼状物形成, 而配制在D-PBS/甘氨酸中的样品没有产生合适的饼状物。所有样品用Milli-Q水都能够容易地再溶解, 而且溶液是澄清的和无色的 (图6, B图)。

[0363] 7.8.1冻干之前和之后产品的评价

[0364] RP-HPLC和SE-HPLC分析表明, 对于任何一个测试的制剂, 在液体起始产品 (保持在≤-70℃) 和冻干并重构之后的产品之间的物理化学特性上没有显著差异。进一步, 对于所有的制剂, 都证明有完全的样品回收率 (表7)。

[0365] 7.8.2储存1.5个月之后冻干产品的评价

[0366] (a) 目测检查和含量

[0367] 在-20℃, +5℃, +25℃或+40℃储存1.5个月之后, 冻干样品的饼没有显示可见的腐败迹象。

[0368] 样品在用Milli-Q水重构后是澄清的和无色的。而且, 储存对于重构之后测定的含量也没有显著影响 (表8)。

[0369] (b) RP-HPLC

[0370] 分别在-20℃, +5℃, +25℃或+40℃储存1.5个月之后, 比较3种不同冻干制剂 (编号3、7和17) 的图谱。在最激烈的条件 (+40℃) 下进行的比较最好地显示了冻干对于化学稳定性的影响。

[0371] 相应的结果总结于表8。可以看出, 在本研究中进行测试的任何一种制剂中, 以冷冻形式进行储存似乎不影响ALX-0081。

[0372] 总的来说, 从所获得的数据中得出的一般结论是基于柠檬酸盐/蔗糖的制剂的冻干阻止了液体形式中发生的化学改变, 除了一些小量的焦谷氨酸盐改变以外。在这些冻干制剂中, 既没有前峰面积百分比的增加, 也没有主峰加宽/分裂的表现。相反, 基于D-PBS/甘氨酸的制剂的冻干没有导致化学稳定性的显著提高。柠檬酸盐/蔗糖冻干制剂中焦谷氨酸盐的形成似乎在pH 6.0比pH 6.5稍稍更明显一点。这由+25℃的数据证明, 在该温度下焦谷氨酸盐形成的速率较低, 但是显示出相同的pH依赖性。正如所预期的, 在-20℃或+5℃储存高达1.5个月不会导致冻干ALX-0081有任何可检测到的变质 (数据未显示)。

[0373] 令人惊讶的是, 在+40℃, 在基于柠檬酸盐/蔗糖的制剂中, 与基于D-PBS/甘氨酸的制剂相比, 获得了提高的稳定性, 基于柠檬酸盐/蔗糖的制剂显示出明显更容易发生化学改变。

[0374] 对于液体制剂, 在-70℃, +5℃和+25℃储存高达1.5个月对于ALX-0081没有显著影

响(数据未显示)。在+40℃储存1.5个月之后观察到的变质基本与之前的观察一致(参见7.7.2节)。

[0375] (c) cIEF

[0376] 通过cIEF分析得到的结果与RP-HPLC的结果一致。最值得注意的是,基于柠檬酸盐/蔗糖的制剂的冻干不能完全防止焦谷氨酸盐改变。事实上,将冻干产品在+40℃储存1.5个月导致后峰的升高。再一次地,在柠檬酸盐/蔗糖中在pH 6.0观察到比在pH6.5更快的焦谷氨酸盐形成。

[0377] (d) SE-HPLC/MALS/DLS

[0378] 在-70℃/-20℃,+5℃和+25℃储存高达1.5个月对于ALX-0081的冻干或液体制剂的SE-HPLC图谱没有影响(数据未显示)。但是,在所有液体制剂中,在+40℃都能够观察到峰加宽和肩峰的形成。MALS分析显示这些肩峰相应于单体ALX-0081(数据未显示)。这个数据暗示胁迫性储存导致一个亚群的ALX-0081中的构象变化。令人惊讶的是,冻干的柠檬酸盐/蔗糖制剂的SE-HPLC图谱没有受到+40℃胁迫测试的影响,这表明这些冻干制剂还提高了ALX-0081的物理稳定性。但是,对于冻干的D-PBS/甘氨酸制剂来说,情况并不是这样;在+40℃使这种制剂受胁迫不仅导致肩峰,而且明显导致一些更高分子量种类的物质,显示为宽的前峰(表8)。在任何制剂中,DLS分析都没有检测到任何大的寡聚物(数据未显示)。

[0379] (e) 结论

[0380] 关于测试的冻干ALX-0081制剂的储存稳定性的最重要的发现的总结显示在表8中。总的来说,在柠檬酸盐/蔗糖制剂之间稳定性仅有有限的差异,虽然出人意料地,ALX-0081似乎在pH 6.5时比在pH 6.0时更不易于形成焦谷氨酸盐。因此,ALX-0081的进一步的重新配方工作集中于pH 6.5的基于柠檬酸盐/蔗糖的制剂。

[0381] 7.9基于柠檬酸盐/蔗糖的制剂的进一步优化

[0382] 到目前为止收集的数据表明基于柠檬酸盐/蔗糖的制剂提高了溶解性,这种制剂的冻干极大地提高了ALX-0081的储存稳定性。但是,在较高温度下冻干ALX-0081的储存,虽然是有限的,仍然导致焦谷氨酸盐的形成。合理的假设是,这种改变可能限制冻干产品的储存期(甚至是储存于+5℃时)。冻干为何不能阻止这种改变还有待解释。

[0383] 猜想冷冻干燥产品中剩余的水分具有关键的作用。

[0384] 如果这种猜想是真的,那么可以通过优化物理冻干参数,例如上述列举的干燥时间、温度、真空度等来使剩余的水分减至最少,但同时vWF结合剂的其它参数保持不变。另一种方法是改变制剂,但仍然是同时vWF结合剂的其它参数保持不变。此外,可以将调整物理冻干参数和改变制剂结合使用。

[0385] 7.9.1优化冻干参数

[0386] 优化物理冻干参数,包括(i)干燥时间次数,(ii)不同步骤的温度,(iii)真空度以及(i)-(iii)的组合并不令人满意,即对于残余水分含量没有效果或效果不够,或者影响了vWF结合剂的参数。

[0387] 7.9.2关于冻干优化制剂

[0388] 通过调整柠檬酸盐缓冲液和蔗糖赋形剂的浓度,研究了水分含量对于冻干产品的化学稳定性的影响。此外,研究了冻干程序中的二次干燥时间。

[0389] 7.10水分含量对于冻干产品的稳定性的影响

[0390] 对三种具有不同柠檬酸盐和蔗糖浓度的不同的ALX-0081等渗制剂(所有三种的pH都是6.5)进行两种不同的冻干程序:一方面是标准的65h运行,另一方面是缩短的37h运行。所测试的制剂的概述在表9中给出。图7显示了冻干之后得到的小瓶。对于所有制剂冻干都导致了良好的饼状物形成。

[0391] 在-20℃和+40℃两种温度下储存2和4周之后,分析ALX-0081的冻干产品。在本实验中,决定进行穷尽测试,以进一步证实制剂的有用性。

[0392] 首先,在+40℃储存达4周的过程中,冻干产品的饼保持完整,重构产生澄清的溶液。冻干循环对于含量(在277nm用分光光度计法测量)或摩尔渗透压浓度似乎没有显著影响。与较早的实验一致,根据SE-HPLC,MALS和DLS分析,在+40℃储存4周对于ALX-0081的物理稳定性没有影响(数据未显示)。此外,发现由基于Biacore的测定确定的ALX-0081的效力未受冻干过程和后续的储存的影响(数据未显示)。但是,RP-HPLC分析证明,储存再次导致一些-虽然是少量的-焦谷氨酸盐变体的形成。对于含有最高浓度的柠檬酸盐和最低浓度的蔗糖的制剂来说,这稍微更明显一点(表10)。此外,对于每一个冻干制剂,通过Karl Fisher滴定法测定总体水分含量。这些数据以及相应的胁迫样品中检测到的焦谷氨酸盐的量总结显示于表10中。根据分别从每个冻干程序获得的数据,可以看出较高的水分含量导致更容易形成焦谷氨酸盐。这表明冻干产品中的存在的残余水分促进了化学改变。

[0393] 总之,结果表明:减少冻干vWF结合剂,例如ALX-0081的水分含量,对其化学稳定性有益。

[0394] 7.11降低缓冲强度和提高蔗糖含量的效果

[0395] 前一节中获得的数据表明降低柠檬酸盐浓度同时提高蔗糖浓度(由此保持等渗溶液)对于冻干产品的稳定性有益。同时,获得了这样的证据:ALX-0081需要足够高浓度的柠檬酸盐以获得提高的溶解性。因此,决定评估柠檬酸盐和蔗糖浓度对于溶液在+5℃和+25℃的储存过程中的表现的影响,并且再评价在存在较低浓度的柠檬酸盐的条件下的冻融稳定性。

[0396] 7.11.1评估柠檬酸盐/蔗糖浓度的影响

[0397] 在第一个实验中,12种不同的ALX-0081制剂在+5℃和+25℃储存高达4天。定期检查样品是否浑浊或存在沉淀物。储存4天后给样品拍的照片显示在图8和图9中。对不同制剂和相应结果的概况显示在表11中。在+25℃储存4天后,所有样品保持澄清和无色(图8,A图)。相反,在+5℃,大部分没有赋形剂的柠檬酸盐制剂变得浑浊(图8,B图)。很明显,浑浊的程度与柠檬酸盐的浓度成反比,50mM柠檬酸盐的制剂保持澄清。而且,含有15mM柠檬酸盐的样品的样品回收率是68%(在储存20h后根据A277获得),而其它回收率从90到100%各不相同(数据未显示)。向15mM柠檬酸盐制剂中加入蔗糖防止样品浑浊,虽然在最低的蔗糖浓度(即5%),在+5℃检测到一些轻微的浑浊(图9,B图)。

[0398] 观察证实足够高浓度的柠檬酸盐在保持ALX-0081可溶上的重要性,特别是在低的温度下。尽管如此,提高柠檬酸盐浓度导致增加的水分含量。出人意料地是,降低柠檬酸盐浓度可以通过加入蔗糖而得到补偿。没有观察到吐温-80对于溶解性的影响。

[0399] 7.11.2评估FT稳定性

[0400] 后续实验集中于几种基于柠檬酸盐/蔗糖的制剂的FT稳定性。使9种不同的ALX-0081制剂在-20℃进行5个连续的FT循环。测试的制剂和相应结果的概述显示于表12中。根

据含量分析和SE-HPLC数据,所有样品保持澄清,FT循环不影响vWF结合剂,例如ALX-0081的物理稳定性。

[0401] 7.11.3考虑等渗性而优化蔗糖和柠檬酸盐浓度

[0402] 根据上述提及的储存和FT结果,选择最佳的柠檬酸盐缓冲液浓度为20mM。在蔗糖浓度不同的三种制剂上进行最终的实验。该实验的目的是确定用于获得等渗配方的最佳蔗糖浓度,和证实20mg/mL的ALX-0081的FT稳定性。除了5个连续的FT循环之外,每个制剂在+25℃储存24h之后还进行1个FT循环,以及额外的FT循环,以模拟制造工艺中的处理步骤。

[0403] 对结果的总结在表13中给出。所有测试的制剂都是澄清的,不同的处理对于含量/回收率或摩尔渗透压浓度没有影响。根据摩尔渗透压浓度的值,似乎7%的蔗糖浓度对于获得等渗溶液是最佳的。

[0404] 7.12在不同温度下储存达12个月的冻干ALX-0081制剂的稳定性研究

[0405] 根据表14中设置的条件对在20mM pH 6.5的柠檬酸盐缓冲液、7%蔗糖(w/v)和0.01%吐温-80(v/v)中配制的12.5mg/mL ALX-0081进行冻干。样品随后储存在-20℃(±5℃),+5℃(±3℃),+25℃(±2℃/60±5%RH)和+40℃(±2℃/75±5%RH)。

[0406] 在不同的时间点评估冻干制剂的稳定性,即初始、1个月、3个月、6个月、9个月和12个月,并且评价其纯度、外观、物理化学特性和效力。

[0407] 详细的样品特征数据在表15至23中提供。

[0408] 通过RP-HPLC评估样品的纯度,其中确定主峰(mean peak)面积的百分比和前峰和后峰面积的百分比。通过紫外吸收确定蛋白质浓度。

[0409] 进一步,对冻干样品进行目测检查,重构,并对重构的制剂进行目测检查。测量重构后样品的pH,并通过库仑滴定法(Karl Fischer)测定冻干粉末的水分含量。进行颗粒物计数测量以对≥10μm和≥25μm的颗粒进行计数。使用基于biacore的测定进一步表征样品的生物学功能。效力表示为参考物质的相对效力百分比。

[0410] 获得的稳定性数据表明冻干ALX-0081产品的特性没有显著受到在-20℃或+5℃储存12个月的影响。发现在整个稳定性研究中在这些温度收集的数据与零时刻产生的数据相当。

[0411] 对于在+25℃或+40℃储存的样品来说,观察到几种微小的变化,这些变化可能是因为加速的或胁迫的储存条件。主要的观察结果是:

[0412] ○在+25℃和在+40℃,在12个月的储存过程中,在RP-HPLC上观察到后峰2的升高,分别对应于焦谷氨酸盐变体的形成从0.7%增加到1.1%或增加到2.4%。

[0413] ○在+40℃,注意到在储存12个月之后水分含量从0.7%增加到2.1%(w/w)。这可能是因为塞子从储存环境(即75%RH)中吸收水分,后来逐渐扩散到产品中。

[0414] 在胁迫条件下得到的结果表明在产品的水分含量和化学稳定性之间存在相关性;这符合之前在7.10节报道的数据。

[0415] 因此,这些数据表明在储存过程中控制DP产品的水分含量的重要性。

[0416] 考虑到在+40℃储存可以看作是对在+25℃的长期稳定性的预测,本文所包括的12个月的稳定性数据为室温的长期储存稳定性(例如18,24,30或36个月)以及较温和条件下(例如+5℃或冷冻)的甚至延长的稳定性提供了良好的指示。

[0417] 7.13对于抗-vWF纳米抗体caplacizumab(ALX-0081)的液体和冻干药品制剂的生

物活性的体外比较研究

[0418] 7.13.1目的

[0419] 对于生物活性和靶结合,使用多种测定来评价同时配制的ALX-0081DP[含有5mg/mL活性药物成分(API)的液体制剂,所述活性药物成分在含有200mM甘氨酸和0.02%吐温-80(v/v)的pH 7.1的基于磷酸盐(D-PBS)的缓冲液中]和上述提及的冻干ALX-0081 DP制剂[配制为12.5mg/mL,在pH 6.5的20mM柠檬酸盐缓冲液、7%蔗糖(w/v)和0.01%吐温-80(v/v)中]的体外比较:

[0420] a) 基于Biacore的效力测定

[0421] b) 基于ELISA的效力测定

[0422] c) 瑞斯托菌素(Ristocetin)诱导的辅因子活性(RICO)药效学生物标志物测定

[0423] d) 基于Gyrolab的亲和力测定

[0424] 这些测定允许对ALX-0081(caplacizumab)的液体和冻干药品进行并列比较。使用预定义的比较标准来评价每个测定的可比性,并列在表24中。

[0425] 7.13.2方法

[0426] a) Biacore测定是基于表面等离子体共振(SPR)技术,测量ALX-0081与固定在传感器芯片上的人vWF A1-结构域的抗体亲抗原性结合。选择该测定用于释放时的效力测试和稳定性。

[0427] b) 基于ELISA的效力测定是ALX-0081效力测试的正交方法,它的开发是用于对caplacizumab的靶中和能力的进一步表征。该测定测量caplacizumab对瑞斯托菌素诱导的冯维勒布兰德因子(vWF)与结合的血小板的结合的抑制。

[0428] c) RICO测定是用作caplacizumab的药理活性的药效动力学标志物。该测定测量人冻干血小板在加入抗生素瑞斯托菌素之后形成聚集体的速率和程度,这模拟了剪切诱导的vWF的激活。

[0429] d) 基于Gyrolab的测定分析caplacizumab与它的多聚体靶vWF的动力学相互作用,并确定caplacizumab与人多聚体vWF的亲和力常数。简单地说,如下所述建立Gyrolab平台上的亲和力测定:使用Gyrolab Bioaffy 1000 CDs。作为捕获工具,在柱上加上3000nM内部生物素化的纯化的vWF(通过尺寸排阻色谱纯化的HaemateP),所述柱预装链霉亲和素包被的珠子。含有0.01%吐温-20的过滤灭菌的D-PBS被用于稀释捕获工具。在转速为600rpm的转头上的96孔板中,1/3系列稀释的纯化的vWF HaemateP与AD1缓冲液(用于剂量反应曲线的测定稀释缓冲液)中固定浓度的caplacizumab(5pM)在RT(+20°C)预温育24小时。24小时后,将板在200g离心1min。将70μL含有游离caplacizumab分子的预温育混合物放入深孔PCR板中。然后,使该混物流过柱以使游离caplacizumab可以与固定在柱上的生物素化的vWF结合。Gyrolab系统自动将该混合物一式三份地转移到CDs。用在Rexxip F缓冲液(可商购的检测缓冲液)中稀释的50nM AlexaFluor647-标记的抗-caplacizumab单克隆抗体检测游离的caplacizumab。进行三次独立的实验,以确定最终的KD。用红色激光激发荧光色素,由此获得荧光信号并通过光电倍增管(PMT)放大。该测定的放大水平是1%PMT。对于caplacizumab的KD测定使用未知配体分析模型。用Gyrolab工作站的XL适配软件进行分析。

[0430] 7.13.3结果

[0431] a) 在Biacore效力测定中测量液体和冻干ALX-0081测试样品的相对效力,其是相

对于效力测定中使用的ALX-0081参考物质,该物质也被称为主参考标准2(MRS-2)。相对效力分别是102.8%和102.9%,表明通过Biacore确定的生物学效力完全是相当的(参见表24)。

[0432] b) 在基于ELISA的效力测定中确定液体和冻干ALX-0081测试样品的相对效力,其是相对于MRRS-2的。相对效力分别是99.4%和109.5%,因此完全在可比性标准之内(参见表24)。因此,这些结果表明通过ELISA测定的两种制剂的效力是相当的。

[0433] c) 对液体和冻干ALX-0081测试样品的RICO-活性进行并列比较测量,确定完全阻断RICO活性(<20%)的浓度。两种制剂完全阻断RICO活性(<20%)的浓度都是 $\leq 0.4\mu\text{g/mL}$ 。这些结果完全在可比性标准之内(参见表24),并且表明两种制剂的药效动力学活性完全是相当的。

[0434] d) 还在基于Gyrolab的测定中对液体和冻干ALX-0081测试样品的亲和力常数(K_D -值)进行了并列比较测量。 K_D -值分别是6.84pM和4.46pM,具有重叠的置信区间。因此,这些结果表明这些制剂对于多靶vWF的亲和力完全是相当的(参见表24)。

[0435] 7.13.4结论

[0436] 本研究的目的是通过四种能评估体外生物活性和靶结合的测定,评价ALX-0081(caplacizumab)的液体和冻干药品的体外可比性:

[0437] a) 基于Biacore的效力测定

[0438] b) 基于ELISA的效力测定

[0439] c) 瑞斯托菌素诱导的辅因子活性(RICO)药效动力学生物标志物测定

[0440] d) 基于Gyrolab的亲和力测定

[0441] 所有体外测定都符合预设的接受标准,并且表明ALX-0081的两种制剂在生物活性和靶结合上都是相当的(参见表24)。所测试的液体和冻干ALX-0081DP制剂显示出:

[0442] ●相似的相对效力,其通过Biacore和ELISA测定确定

[0443] ●相当的药效动力学活性,其在体外(靶中和)通过RICO测定来确定

[0444] ●相当的靶亲和力,其通过Gyrolab测定来确定。

[0445] 7.14液体和冻干ALX-0081制剂的加速和长期稳定性测试。

[0446] 作为对实施例7.12的补充,使用不同批次的相同制剂的ALX-0081[pH 6.5的20mM柠檬酸盐缓冲液,7%蔗糖(w/v)和0.01%吐温-80(v/v)]进行独立的稳定性实验。

[0447] 在不同的温度测试了冻干和液体制剂的稳定性:

[0448] -在pH 6.5的20mM柠檬酸盐缓冲液,7%蔗糖(w/v)和0.01%吐温-80(v/v)中的13.8mg/mL ALX-0081的液体制剂储存于 $\leq -60^\circ\text{C}$ 和 $+5^\circ\text{C} (\pm 3^\circ\text{C})$,并在不同的时间点,即初始、9个月、12个月、18个月和24个月测试其稳定性。

[0449] -在pH 6.5的20mM柠檬酸盐缓冲液,7%蔗糖(w/v)和0.01%吐温-80(v/v)中的12.7mg/mL ALX-0081的冻干制剂储存于 $+5^\circ\text{C} (\pm 3^\circ\text{C})$, $+25^\circ\text{C} (\pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\% \text{RH})$ 和 $+40^\circ\text{C} (\pm 2^\circ\text{C}/75 \pm 5\% \text{RH})$ 。与液体制剂类似,在0,9,12,18和24个月测定冻干制剂的稳定性。

[0450] 在每一个时间点,使用多种分析技术,包括cIEF、RP-HPLC、SE-HPLC、视觉外观、pH和紫外吸收来监视样品的化学和物理稳定性。

[0451] 通过库伦滴定法测定冻干粉末的水分含量。在Biacore中测量液体和冻干样品的相对效力,所述效力是相对于内部ALX-0081参考标准。

[0452] 在表25-26和表27-29中分别提供了液体和冻干制剂的详细样品特性数据,符合标准的样品被认为是在产品规范之内的,所述标准在上述提及的表格的每一个的第2列中列出。

[0453] 获得的数据证明所发明的制剂在至少24个月内是高度稳定的。在+5℃或+25℃储存24个月对冻干的ALX-0081的物理化学特性以及生物活性没有显著影响。当在+40℃使ALX-0081受胁迫24个月时,观察到后峰2的升高,这对应于在9、12、18和24个月之后焦谷氨酸盐变体的形成从起始材料中的1.1%分别提高到2.8%、3.2%、4.2%和6.2%。

[0454] 液体ALX-0081制剂在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的温度或在+5℃储存至少24个月,对于其物理化学稳定性没有显著影响:含量值是稳定的,样品保持澄清,初始材料的cIEF、RP-HPLC和SE-HPLC图谱与稳定性样品的图谱相当。

[0455] 在储存于+40℃的冻干样品中所报道的变化可能是由于胁迫性的储存条件造成的,并且这为较温和条件下的长期储存稳定性提供了良好的指示。

[0456] 长期稳定性预测

[0457] 目前的药品标准写明允许的焦谷氨酸盐百分含量是 $\leq 4\%$ 。根据该标准和目前的稳定性数据,使用阿伦尼乌斯方程(Arrhenius equation)预测冻干药品在+5℃和+25℃的保存期。阿伦尼乌斯方程是描述反应速率的温度依赖性的精确公式,其在制药工业中是常用的。如图10和11所示,预期冻干药品储存于+5℃时在至少500个月内仍然在规范范围内,当储存于+25℃时在至少60个月内仍然在规范范围内。

[0458] 7.15一般结论

[0459] 本文描述的vWF结合剂,特别是ALX-0081的重新配方发明提出了一种新的基于柠檬酸盐/蔗糖的制剂,其具有提高的溶解性(达80mg/mL)和显著提高的液体储存稳定性(例如与其原始制剂相比氧化较少)。而且,当它是冻干形式时,在+40℃储存12个月或甚至是24个月之后,基本上检测不到氧化或asp-异构化。对柠檬酸盐和蔗糖浓度的进一步优化导致冻干产品的水分含量降低,由此使焦谷氨酸盐形成的速率减至最小。已表明vWF结合剂的每一个物理化学特性受到制剂的不同物理和化学成分的不同影响,例如缓冲液选择、pH、浓度、赋形剂等。本文提供了各种制剂,所述制剂被优化以用于对不同的化学和/或物理胁迫进行补救或预防。

[0460] 设计了一种满足大部分关键标准的制剂:pH 6.5的20mM柠檬酸盐+7.0%蔗糖(w/v)+0.01%吐温-80(v/v)。使用这种制剂,ALX-0081显示在-20℃,+5℃,+25℃和+40℃至少12个月或者甚至24个月内是稳定的。这些数据清楚地表明比目前的液体制剂在5℃具有大大延长的保存期。

[0461] 此外,发明人已经详尽地显示:迄今已在临床研究中使用的同期ALX-0081制剂与本文提出的新优化的冻干ALX-0081制剂在体外生物活性和靶结合上是相当的。

[0462] 表A-1:vWF结合剂的实例

名称	SEQ ID NO	序列
12A02H1-3a- 12A02H1 (ALX-0081)	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNLSRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKRELVA AISRTGGSTYYPDSVE GRFTISRDNARMVYLQMNLSRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSSE YTFWGQGTQVTVSS
12A02-3a-12A02	2	QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNLSRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQAGG ALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA AISRTGGSTYYPDSVE GRFTISRDNARMVYLQMNLSRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSSE YTFWGQGTQVTVSS
12A02-GS9-12A02	3	QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNLSRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA AISRTGGSTY YPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNLSRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRV RTLPSSEYTFWGQGTQVTVSS
12A02-GS30- 12A02	4	QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNLSRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG SGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFR QAPGKERDLVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNARMVYLQMNLS RAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSSEYTFWGQGTQVTVSS
12A05-3a-12A05	5	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCYAN LKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CLASGRIFSIGAMGYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISR DPKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTV SS
12A05-GS9-12A05	6	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCYAN LKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCLASGRIFSIGAMGYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVKGR FTISRDPKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYWGQ GTQVTVSS
12A05-GS30- 12A05	7	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCYAN LKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGG GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGYRQAPGKQ RELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISRDPKNTVYLQMNLSRAEDTAVY YCYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS
12B06-3a-12B06	8	QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNARMVYLQMNLSRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQAGG ALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA AISRTGGSTYYARSVE GRFTISRDNARMVYLQMNLSRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSSE YTFWGQGTQVTVSS
12B06-GS9-12B06	9	QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNARMVYLQMNLSRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA AISRTGGSTY YARSVEGRFTISRDNARMVYLQMNLSRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRV RTLPSSEYTFWGQGTQVTVSS

[0463]

[0464]

12B06-GS30- 12B06	10	QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVA AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNALKPEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFR QAPGKERDVVAISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNALK PEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS
12A02H4-3a- 12A02H4	11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAISRTGGSTYYPDSVE GRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSE YTFWGQGTQVTVSS
12B06H2-3a- 12B06H2	12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVA AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVAISRTGGSTYYARSVE GRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSE YNFWGQGTQVTVSS
12A02H1-GS9- 12A02H1	13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAISRTGGSTY YPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRV RTLPSYTFWGQGTQVTVSS
12A02H4-GS9- 12A02H4	14	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAISRTGGSTY YPDSVEGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRV RTLPSYTFWGQGTQVTVSS
12B06H2-GS9- 12B06H2	15	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVA AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVAISRTGGSTY YARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRV RTLPSYTFWGQGTQVTVSS
12A02H1-GS30- 12A02H1	16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFR QAPGKGRELVAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLR AEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12A02H4-GS30- 12A02H4	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFR QAPGKGRELVAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLR AEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12B06H2-GS30- 12B06H2	18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVA AISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFR QAPGKGREVAISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLR AEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS
12A02H1	19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS

[0465] 表A-2

[0466]

名称	SEQ ID NO	序列
人 vWF	20	MIPARFAGVLLALALILPGLTCAEGTRGRSSTARCSLFGSDFVNTFDGSMYSFAG YCSYLLAGGCQKRSFSIIGDFQNGKRVSLSVYLGEFFDIHLFVNGTQDQORVS MPYASKGLYLETEAGYYKLSGEAYGFVARIDGSGNFQVLLSDRYFNKTCGLCGNF NIFAEDDFMTQEGTLTSDPYDFANSWALSSGEQWCERASPPSSSCNISSGEMQKG LWEQCQLLKSTSVFARCHPLVDPEPFVALCEKTLCECAGGLECACPALLEYARTC AQEGMVLYGWTDHSAACSPVCPAGMEYRQCVSPCARTCQSLHINEMCQERCVDGCS CPEGQLLDEGLCEVESTPCVHSGKRYPPGTSLSRDCNTCICRNSQWICSNEECF GECLVGTQSHFKSFDNRYFTFSGICQYLLARDCQDHSFSIVIETVQCADDRDAVC TRSVTVRLPGLHNSLVKLKHGAGVAMDGQDIQLPLLKGDLRIQHTVTASVRLSYG EDLQMDWDGRGRLLVKLSPVYAGKTCGLCGNYNGNQDGFLLTPSGLAEPRVEDFG NAWKLHGDCQDLQKQHS DPCALNPRMTRFSEEACAVLTSPTFEACHRAVSPLPYL RNCRYDVCSCSDGRECLCGALASYAAACAGRGVRVAWREPGRCELNCPKGQVYLQ CGTPCNLTCSRSLSPDEECNEACLEGCFPCPGLYMDERGDCVPKAQCPCYDGEI FQPEDIFSDHHTMCYCEDGFMHCTMSGVPGSLLPDAVLSSPLSHRSKRSLSRCPF MVKLVCPADNLRAEGLECTKTQNYDLECMSMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALE RCPCFHQGEKEYAPGETVKIGCNTCVCRDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDG LKYLFPGEQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGCSHPSVKCKKRVTLILVEGGEIE LFDGEVNVKRPMDETHFEVVESEGRYIILLGKALS VVWRHLSISVVLKQTYQE KVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDGNSWKVSSQCADTRKVPDSSPAT CHNNIMKQTMVDSSCRILTSDVFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACF CDTIAAYAHVCAQHKGKVVTRTATLCPQSCSEERNLRENGYECEWRYNSCAPACQV TCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPFGKILDELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGK KVTLNPSDPEHCQICHCDVVNLTCEACQEPGGVLVPPPTDAPVSPPTLYVEDISEP PLHDFYCSRLDLVFLLDGSSRLSEAEFEVLKAFVVDMMERLRISQKWVRVAVVE YHDGSHAYIGLKDRKRPELRRIASQVKYAGSQVASTSEVLKYTLFQIFSKIDRP EASRIALLMASQEPQMSRNFVRYVQGLKKKVIVIPVGIGPHANLKQIRLIEK QAPENKAFVLSSVDELEQQRDEIVSYLCDLAPEAPPPTLPPHMAQVTVGPGLRNS MVLDAFVLEGS DKG EADFNRSKEFMEEVIQRMVDVGQDSIHVTVLQYSYMTVE YPPSEAQSKGDILQVRREIRYQGGNRTNTGLALRYLSDHSFLVSGQDREQAPNLV YMTGPNPASDEIKRLPGDIQVVPIGVGPANVQELERIGWENAPILIQDFETLPR EAPDLVLQRCCSGEGLQIPTLSPAPDCSQPLDVILLLDGSSSFASYPDEMKSFA KAFISKANIGPRLTQVSVLQYGSITTDV PWNV VPEKAHLLSLVDVMQREGGPSQ IGDALGFAVRYLTSEMHGARGASKAVVILVTDVSVDSVDAADAARSNRVTVPF IGIGDRYDAAQLRILAGPAGDSNVVKLQRIEDLPTMVTLGNSFLHKLCSGFVRIC MDEDGNEKRP GDVWTL PDQCHTVTCQPDGQTL LKSHRVNCDRGLRSPCNSQSPV KVEETCGCRWTCPCVCTGSSSTRHIVTFDGNFKLITGSCSYVL FQNKEDLEVILH NGACSPGARQGC MKSIEVKHSALSVELHSDMEVTVNGRLVSVVPYVGGNMEVNVYG AIMHEVRFNHLGHIFTFTPNNEFQLQLSPKTFASKTYGLCGICDENGANDFMLR DGTVTDDWKTLLVQEWTVQRPQTCPILEEQCLVPDSSHQVLLPLFAECHKVL APATFYAICQQDSCHQEQVCEVIASVAHLCRTNGVCVDWRTPDFCAMS CPPSLVY NHCEHGCPRHCDGNVSSCGDHPSEGCFPCPPDKVMEGSCVPEEACTQCIGEDGVQ HQFLEAWVPDHQPCQICTCLSGRKVNCTTQPCPTAKAPT CGLCEVARLRQADQC CPEYECVCDPVSCDLPPVPHCERGLQPTLTNPGECPNFTCACRKEECKRVSPPS CPPHRLPTLRKTQCCDEYECACNCVNSTVSCPLGYLASTATND CGCTTTTCLPDK VCVHRSTIYPVGQFWEEGCDVCTCTDMEDAVMGLRVAQCSQKPCEDSCRS GFTYV LHEGECCGRCLPSACEVVTGSPRGDSQSSWKS VGSQWASPENPCLINECVRVKEE VFIQQRNVSCPQLEVPCPSGFQLSCKTSACCPSCR CERMEACMLNGTVIGPGKT VMIDVCTTCRCMVQGVVISGFKLECRKTT CNPCPLGYKEENNTGECCGRCLPTAC TIQLRGGQIMTLKRDETLQDGC DTHFCKVNERGEYFWEKRV TGCP PFDEHKCLAE GGKIMKIPGTCCDTCEEPECNDITARLQYVKVGSCKSEVEVDIHYCQGGKASKAM YSIDINDVQDQSCCS SPTREPMQVALHCTNGSVVYHEVLNAMECKCSPRKCSK

[0467] 表1.由设计专家程序(Design Expert program)预测的产生ALX-0081的最高熔解温度的50种不同的缓冲液/赋形剂组合的综述。根据T_m值对缓冲液/赋形剂组合进行排序。不同的缓冲液类型用不同的灰色阴影显示。

[0468]

运行	缓冲液		赋形剂 1		甘氨酸	NaCl	Tm
	名称	浓度 (mM)	名称	浓度 (mM)	浓度 (mM)	浓度 (mM)	°C
1	磷酸盐 pH 6.92	17.24	海藻糖	239.25	0.00	0.00	77.2772
2	磷酸盐 pH 6.98	16.29	海藻糖	242.04	0.00	0.00	77.2742
3	磷酸盐 pH 6.95	9.47	海藻糖	262.12	0.00	0.00	77.2641
4	磷酸盐 pH 7.50	9.47	甘露醇	0.00	273.04	0.00	77.2096
5	磷酸盐 pH 7.50	25.19	甘露醇	0.00	224.82	0.00	77.1483
6	磷酸盐 pH 7.50	9.47	蔗糖	0.00	273.04	0.00	77.1399
7	磷酸盐 pH 7.50	28.79	甘露醇	0.00	213.78	0.00	77.1262
8	磷酸盐 pH 7.50	30.88	甘露醇	0.00	207.39	0.00	77.1117
9	磷酸盐 pH 7.50	32.96	甘露醇	0.00	201.00	0.00	77.0953
10	柠檬酸盐 pH 6.23	48.16	海藻糖	162.85	0.00	0.00	77.0307
11	柠檬酸盐 pH 6.22	48.38	海藻糖	162.29	0.00	0.00	77.0307
12	磷酸盐 pH 6.87	19.89	甘露醇	231.44	0.00	0.00	76.9832
13	磷酸盐 pH 7.50	9.47	海藻糖	0.00	273.04	0.00	76.9483
14	柠檬酸盐 pH 7.00	60.84	蔗糖	129.38	0.00	0.00	76.9338
15	柠檬酸盐 pH 7.00	57.67	蔗糖	137.75	0.00	0.00	76.9312
16	磷酸盐 pH 7.50	50.01	甘露醇	0.00	148.72	0.00	76.9295
17	柠檬酸盐 pH 7.00	84.92	蔗糖	65.25	0.00	0.00	76.7979
18	磷酸盐 pH 7.06	36.18	蔗糖	183.48	0.00	0.00	76.7972
19	柠檬酸盐 pH 6.44	10.56	海藻糖	262.12	0.00	0.00	76.7449
20	柠檬酸盐 pH 7.00	77.11	甘露醇	0.00	90.04	0.00	76.7297
21	柠檬酸盐 pH 7.00	75.42	甘露醇	0.00	94.69	0.00	76.7291
22	柠檬酸盐 pH 7.00	79.01	甘露醇	81.42	0.00	0.00	76.6192
23	柠檬酸盐 pH 6.17	53.45	甘露醇	146.67	2.90	0.00	76.5956
24	柠檬酸盐 pH 6.18	53.23	甘露醇	149.46	0.00	0.00	76.5955
25	柠檬酸盐 pH 6.18	53.23	甘露醇	149.46	0.00	0.00	76.5955
26	柠檬酸盐 pH 6.16	53.66	甘露醇	148.35	0.00	0.00	76.5955
27	Tris pH 7.77	17.13	海藻糖	134.96	0.00	69.29	76.1017
28	Tris pH 8.00	89.75	甘露醇	0.00	15.10	70.51	76.0374
29	Tris pH 8.00	92.83	甘露醇	0.00	16.27	67.17	76.0343
30	Tris pH 8.00	93.86	甘露醇	0.00	0.00	74.76	76.0322
31	Tris pH 7.83	17.13	蔗糖	142.77	0.00	65.04	76.0321
32	Tris pH 7.82	17.13	蔗糖	142.21	0.00	65.34	76.0321
33	Tris pH 8.00	82.56	甘露醇	0.00	31.37	68.38	76.0298
34	Tris pH 8.00	97.63	甘露醇	0.00	0.00	71.42	76.0285
35	Tris pH 8.00	95.23	蔗糖	0.00	0.00	73.55	75.9714
36	Tris pH 8.00	97.63	蔗糖	0.00	0.00	71.42	75.97

[0469]

运行	缓冲液		赋形剂 1		甘氨酸	NaCl	Tm
	名称	浓度 (mM)	名称	浓度 (mM)	浓度 (mM)	浓度 (mM)	°C
37	Tris pH 7.77	17.13	甘露醇	121.58	0.00	76.59	75.5801
38	Tris pH 8.00	61.32	海藻糖	0.00	53.45	75.37	75.3047
39	Tris pH 8.00	67.14	海藻糖	0.00	47.06	73.85	75.3027
40	Tris pH 7.81	17.13	海藻糖	0.00	140.00	69.60	75.2196
41	组氨酸 pH 6.50	20.03	蔗糖	0.00	142.33	68.38	74.9111
42	组氨酸 pH 6.50	20.03	蔗糖	0.00	136.52	71.42	74.91
43	组氨酸 pH 6.50	20.03	蔗糖	0.00	124.90	77.50	74.9012
44	组氨酸 pH 6.50	20.03	甘露醇	0.00	127.22	76.28	74.8582
45	组氨酸 pH 6.50	20.03	甘露醇	0.00	131.29	74.16	74.8576
46	组氨酸 pH 6.50	20.03	甘露醇	0.00	118.51	80.84	74.8558
47	组氨酸 pH 6.50	20.03	甘露醇	0.00	136.52	71.42	74.8553
48	组氨酸 pH 6.50	20.83	甘露醇	0.00	109.21	85.10	74.8397
49	组氨酸 pH 6.49	20.03	甘露醇	0.00	146.98	65.95	74.8281
50	组氨酸 pH 6.50	20.03	海藻糖	0.00	144.07	67.47	74.4053

[0470] 表2.ALX-0081在不同制剂缓冲液中的溶解度测试

[0471]

制剂	pH	目测	测量的浓度 (mg/mL)	回收率 (%)
D-PBS + 200 mM 甘氨酸	7.4	浑浊 + 小颗粒	8.1	88.6
10 mM 磷酸盐+ 200 mM 甘氨酸	7.4	浑浊 + 小颗粒	8.7	88.3
20 mM 磷酸盐	7.4	浑浊 + 颗粒	4.9	96.4
20 mM 组氨酸	6.5	浑浊 + 颗粒	<3.4	N.D.
20 mM 柠檬酸盐	7.0	澄清	55.9	97.6

[0472] N.D. = 未测定

[0473] 表3.在储存和FT稳定性实验中评价的液体ALX-0081制剂,和测量的pH和摩尔渗透压浓度值的概况。

[0474]

制剂编号	浓度 (mg/mL)	缓冲液		赋形剂		吐温-80 (v/v)	测量的 pH	摩尔渗透 压浓度 mOsm/kg
		类型	pH	强度	类型			
1	20	50 mM 柠檬酸盐	6.0	75 mM	NaCl	0.01%	5.9	281
2				2.0%	甘露醇		6.0	253
3				4.0%	蔗糖		6.0	272
4				140 mM	甘氨酸		6.0	273
5			6.5	75 mM	NaCl		6.5	288
6				2.0%	甘露醇		6.5	266
7				4.0%	蔗糖		6.6	280
8				140 mM	甘氨酸		6.6	280
9			7.0	75 mM	NaCl		6.9	279
10				2.0%	甘露醇		7.0	259
11				4.0%	蔗糖		7.1	271
12				140 mM	甘氨酸		7.0	278
13	5			75 mM	NaCl		6.9	274
14				2.0%	甘露醇		7.0	254
15				4.0%	蔗糖		7.0	267
16				140 mM	甘氨酸		7.0	274
17		D-PBS	7.1	137/200 mM	NaCl/甘氨酸	7.2	470	

[0475] 表4.不同ALX-0081制剂的储存稳定性研究概况。其中给出了时间点、储存温度和方法。

[0476]

时间点	温度		制剂编号, 如表 3 所指出的	方法		
	-70°C	+40°C		RP-HPLC	cIEF	SE-HPLC
1 周	X	X	1-17	X		
2 周	X	X	1-17	X		
1 个月	X	X	1-17	X	X	X

[0477] 表5.不同液体ALX-0081制剂的储存稳定性数据。显示了在+40°C储存1个月后最相关的RP-HPLC峰的相对表面面积。Pyro=焦谷氨酸盐, 主峰(main)=主峰(main peak) (包括肩峰, 如果存在的话), 氧化=全体前峰。颜色码表示相对样品纯度: 最高纯度为白色, 中等纯度为灰色, 最低纯度为黑色。所有样品的回收率都是±100%。

[0478]

制剂编号	浓度 (mg/mL)	缓冲液		赋形剂		吐温-80 (v/v)	RP-HPLC 的峰面积%		
		类型	pH	强度	类型		氧化	主峰	pyro
1	20	50 mM 柠檬酸 盐	6.0	75 mM	NaCl	0.01%	1.5	88.6	3.7
2				2.0%	甘露醇		1.7	88.1	4.3
3				4.0%	蔗糖		1.7	88.1	4.6
4				140 mM	甘氨酸		2.2	88.3	3.9
5			6.5	75 mM	NaCl		2.5	88.5	3.6
6				2.0%	甘露醇		2.7	87.5	4.5
7				4.0%	蔗糖		2.3	88.0	4.2
8				140 mM	甘氨酸		4.6	85.2	4.3
9			7.0	75 mM	NaCl		2.4	86.8	5.2
10				2.0%	甘露醇		2.6	86.0	5.9
11				4.0%	蔗糖		2.8	85.9	6.1
12				140 mM	甘氨酸		4.7	82.8	6.2
13	5			75 mM	NaCl		2.3	86.8	5.2
14				2.0%	甘露醇		2.4	86.5	5.8
15				4.0%	蔗糖		2.1	87.7	5.2
16				140 mM	甘氨酸		5.0	83.1	6.4
17		D-PBS	7.1	137/200 mM	NaCl/ 甘氨酸		9.0	75.2	6.4

[0479] 表6. 在储存稳定性实验中评价的冻干/液体ALX-0081制剂的概况。

[0480]

制剂编号	浓度 (mg/mL)	缓冲液		赋形剂		吐温-80 (v/v)
		类型	pH	强度	类型	
3	20	50 mM 柠檬酸盐	6.0	4.0% (w/v)	蔗糖	0.01%
7			6.5	4.0% (w/v)	蔗糖	
17	5	D-PBS	7.1	137/200 mM	NaCl/甘氨酸	

[0481] 表7. 基于RP-HPLC和SE-HPLC报告的总面积, 在冻干和重构之后不同制剂中ALX-0081的回收率。

[0482]

冻干/重构之后的回收率 (%)	柠檬酸盐 pH 6.0 + 蔗糖 (制剂 3)	柠檬酸盐 pH 6.5 + 蔗 糖 (制剂 7)	D-PBS + 甘氨酸 (制剂 17)
RP-HPLC	104.3	105.4	103.2
SE-HPLC	101.3	99.6	102.8

[0483] 表8. 不同冻干ALX-0081制剂的储存稳定性数据的概况 (在-20℃, +5℃, +25℃和+40℃储存1.5个月)。颜色码代表样品稳定性的定性评估, 从白色 (稳定性最高) 经不同程度的灰色至黑色 (稳定性最低)。

[0484] N.T. = 未测试。(*与保持在-70℃的液体对照样品进行比较)

[0485]

储存 1.5 个月		柠檬酸盐 pH 6.0 + 蔗糖 (制剂 3)				柠檬酸盐 pH 6.5 + 蔗糖 (制剂 7)				D-PBS + 甘氨酸 (制剂 17)			
		-20°C	+5°C	+25°C	+40°C	-20°C	+5°C	+25°C	+40°C	-20°C	+5°C	+25°C	+40°C
目测		饼不受储存的影响 + 在所有样品中用 Milli-Q 水重构成澄清的溶液											
含量	浓度 (mg/mL)	N.T.	N.T.	N.T.	21.1	N.T.	N.T.	N.T.	21.2	N.T.	N.T.	N.T.	4.89
	回收率* (%)	N.T.	N.T.	N.T.	106	N.T.	N.T.	N.T.	105	N.T.	N.T.	N.T.	101
pH		N.T.	N.T.	N.T.	6.1	N.T.	N.T.	N.T.	6.6	N.T.	N.T.	N.T.	7.0
摩尔渗透压浓度 (mOsm/kg)		N.T.	N.T.	N.T.	289	N.T.	N.T.	N.T.	295	N.T.	N.T.	N.T.	487
RP-HPLC	主峰面积%	92.9	92.9	92.3	89.7	93.0	92.9	92.8	91.4	92.3	92.1	88.9	65.8
	前峰面积%	2.4	2.2	2.2	2.5	2.3	2.3	2.2	2.4	2.8	3.0	4.3	16.1
	pyro 面积%	0.9	1.0	1.6	3.9	0.8	0.9	1.2	2.2	1.0	1.1	2.8	12.6
	回收率* (%)	104	102	113	100	105	102	103	102	103	105	112	96.5

[0486]

eIEF	pyro 面积%	N.T.	N.T.	N.T.	3.6	N.T.	N.T.	N.T.	1.1	N.T.	N.T.	N.T.	12.7
SE-HPLC	主峰面积%	99.9	99.9	99.9	99.8	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	100	99.9	95.8
	前峰面积% (HMWs)	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	4.2
	回收率* (%)	101	98.4	108	100	99.7	95.0	96.2	99.0	103	98.1	101	89.6

[0487] 表9. 在储存稳定性实验中评价的ALX-0081制剂的概况。

[0488]

浓度 (mg/mL)	冻干循环时间 (小时)	柠檬酸盐缓冲液		蔗糖	吐温-80 (v/v)
		强度 (mM)	pH		
20	±65	50	6.5	4.0%	0.01%
		32		5.5%	
		15		7.0%	
	±37	50		4.0%	
		32		5.5%	
		15		7.0%	

[0489] 表10. 在+40°C储存4周后,冻干ALX-0081样品的水分含量和在RP-HPLC上检测的焦谷氨酸盐相对量。

[0490]

浓度 (mg/mL)	冻干循环时 间(小时)	柠檬酸盐缓冲液		蔗糖	吐温-80 (v/v)	水分含量	RP-HPLC
		强度 (mM)	pH				pyro
20	±65	50	6.5	4.0%	0.01%	4.87%	1.7%
		32		5.5%		2.32%	1.4%
		15		7.0%		1.27%	1.2%
	±37	50		4.0%		4.40%	1.6%
		32		5.5%		不能获得	1.3%
		15		7.0%		2.43%	1.1%

[0491] 表11. 在+5℃和+25℃储存过程中ALX-0081制剂的目测检查的结果。

[0492] “+”=澄清,“+/-”=轻微浑浊,“-”=浑浊“h”=小时,“d”=天。

[0493]

制剂				储存于+5℃					储存于+25℃				
浓度 (mg/mL)	柠檬酸 盐 pH 6.5 (mM)	蔗糖 w/v (%)	吐温-80 v/v (%)	1h	2h	19h	24h	4d	1h	2h	19h	24h	4d
28	15	----	----	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	20	----	----	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
	25	----	----	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
	30	----	----	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
	40	----	----	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
	50	----	----	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	15	5.0	----	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
	15	6.0	----	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	15	7.0	----	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	15	5.0	0.01	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
	15	6.0	0.01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	15	7.0	0.01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

[0494] 表12. 在-20℃进行连续5次FT循环后ALX-0081制剂的目测检查结果、含量和SE-HPLC分析(*与保持在≤-70℃的液体对照样品进行比较)。

[0495]

制剂				在-20℃进行 5 次 FT 循环			
浓度 (mg/mL)	柠檬酸盐 pH 6.5 (mM)	蔗糖 w/v (%)	吐温-80 (v/v) (%)	目测	含量	SE-HPLC	
					回收率 (%)*	图谱	回收率 (%)*
16	20	5.0	0.01	澄清	100	没有效果	105.3
		6.0			102		99.4
		7.0			99.0		103.4
	25	5.0			101		103.9
		6.0			102		98.5
		7.0			100		98.4
	30	5.0			97.2		98.8
		6.0			103		99.3
		7.0			97.5		102.8

[0496] 表13. 在-20℃进行连续5次FT循环后或在1次FT循环+储存24h+1次FT循环后, ALX-0081制剂的目测检查、回收率和摩尔渗透压浓度测量值的结果 (*与保持在≤-70℃的液体对照样品进行比较)。

[0497]

制剂				在-20℃进行 5 次 FT 循环			1 次 FT 循环 + 25℃ 24h + 1 次 FT 循环		
浓度 (mg/mL)	柠檬 酸盐 pH 6.5 (mM)	蔗糖 w/v (%)	吐温-80 (v/v) (%)	目测	回收 率 (%)*	摩尔渗透压 浓度 (mOsm/kg)	目测	回收 率 (%)	摩尔渗透压 浓度 (mOsm/kg)
20	20	5.0	0.01	澄清	103	236	澄清	101	236
		6.0			104	273		101	271
		7.0			103	304		99.4	306

[0498] 表14. 冻干参数。

[0499]

步骤编 号	描述	温度 (°C)	压力	时间 (hh:mm)
1	加载	20	大气压	N.A
2	冷冻	20 → -50	大气压	02:00
3	冷冻	-50	大气压	02:00
4	抽真空	-50	0.130 毫巴	00:10
5	初次干燥	-50 → -20	0.130 毫巴	1:00
6	初次干燥	-20	0.130 毫巴	19:00
7	初次干燥	-20 → 5	0.130 毫巴	00:50
8	初次干燥	5	0.130 毫巴	05:00
7	初次干燥	5 → 25	0.130 毫巴	03:00
7	二次干燥	25	0.130 毫巴	33:00
9	用氮气预充气	15	0.8 巴	N.A.
10	用塞子塞住	15	0.8 巴	N.A.
11	用氮气充气	15	大气压	N.A.
总时长(不包括用塞子塞住)				66:00

[0500] 表15. ALX-0081制剂的RP-HPLC分析主峰 (纯度) [12.5mg/mL API, 0.01%吐温-80 (v/v) 和7%蔗糖 (w/v), 在pH 6.5的20mM柠檬酸盐缓冲液中]。

[0501]

时间点 (个月)	储存条件	平均纯度 (主峰面积%)
初始	-	93.3
1	-20°C	93.0
	+5°C	93.0
	+25°C/60%RH	93.0
	+40°C/75%RH	92.7
3	-20°C	93.3
	+5°C	93.3
	+25°C/60%RH	93.1
	+40°C/75%RH	92.6
6	-20°C	93.2
	+5°C	93.3
	+25°C/60%RH	93.0
	+40°C/75%RH	92.4
9	-20°C	93.4
	+5°C	93.3
	+25°C/60%RH	93.1
	+40°C/75%RH	91.8
12	-20°C	93.2
	+5°C	93.1
	+25°C/60%RH	92.8
	+40°C/75%RH	91.3

[0502] 表16.ALX-0081制剂的RPC前峰和后峰分析[12.5mg/mL API, 0.01%吐温-80 (v/v) 和7%蔗糖 (w/v), 在pH 6.5的20mM柠檬酸盐缓冲液中]。

[0503]

时间点 (月)	储存条件	重复	前峰 (面积%)				后峰 (面积%)				
			3	2	1	1+2+3 的平均	1 的平 均	2 的平 均	3 的平 均	4 的平 均	3+4 的 平均
初始	-	01	0.07	0.47	1.86	2.34	3.54	0.70	0.09	0.19	0.19
		02	0.08	0.47	1.88						
1	-20°C	01	0.09	0.58	1.78	2.37	3.67	0.85	0.11	0.21	0.11
		02	0.09	0.60	1.77						
	+5°C	01	0.09	0.60	1.79	2.39	3.64	0.84	0.11	0.22	0.11
		02	0.09	0.59	1.80						
	+25°C/60%RH	01	0.09	0.60	1.77	2.40	3.66	0.91	0.11	0.22	0.11
		02	0.08	0.60	1.83						
	+40°C/75%RH	01	0.09	0.56	1.88	2.45	3.68	1.11	0.11	0.23	0.11
		02	0.09	0.63	1.83						
3	-20°C	01	0.09	0.51	1.91	2.37	3.45	0.72	0.09	0.26	0.26
		02	0.09	0.49	1.82						
	+5°C	01	0.09	0.51	1.83	2.35	3.41	0.73	0.09	0.28	0.28
		02	0.09	0.50	1.85						
	+25°C/60%RH	01	0.09	0.49	1.86	2.38	3.47	0.84	0.09	0.27	0.27
		02	0.09	0.53	1.87						
	+40°C/75%RH	01	0.09	0.53	1.89	2.41	3.44	1.32	0.09	0.31	0.31
		02	0.09	0.51	1.88						
6	-20°C	01	0.07	0.52	1.85	2.40	3.49	0.71	0.08	0.21	0.21
		02	0.07	0.54	1.89						
	+5°C	01	0.06	0.53	1.79	2.33	3.47	0.72	0.09	0.22	0.22
		02	0.07	0.54	1.80						
	+25°C/60%RH	01	0.07	0.54	1.82	2.40	3.50	0.93	0.09	0.22	0.22
		02	0.06	0.53	1.91						
	+40°C/75%RH	01	0.07	0.54	1.84	2.43	3.47	1.62	0.11	0.21	0.32
		02	0.07	0.55	1.92						
9	-20°C	01	0.07	0.47	1.83	2.30	3.43	0.70	0.09	0.22	0.22
		02	0.07	0.47	1.83						
	+5°C	01	0.07	0.45	1.87	2.31	3.45	0.69	0.09	0.22	0.22
		02	0.07	0.47	1.83						
	+25°C/60%RH	01	0.08	0.50	1.89	2.44	3.42	0.73	0.11	0.21	0.32
		02	0.07	0.51	1.97						
	+40°C/75%RH	01	0.07	0.49	1.84	2.32	3.46	2.07	0.13	0.24	0.37
		02	0.08	0.47	1.84						
12	-20°C	01	0.07	0.50	1.66	2.16	3.64	0.70	0.10	0.25	0.35
		02	0.07	0.49	1.66						
	+5°C	01	0.08	0.47	1.69	2.19	3.64	0.74	0.11	0.25	0.36
		02	0.06	0.49	1.72						
	+25°C/60%RH	01	0.08	0.48	1.74	2.21	3.55	1.07	0.12	0.26	0.38
		02	0.09	0.47	1.73						
	+40°C/75%RH	01	0.09	0.46	1.78	2.26	3.63	2.37	0.16	0.29	0.44
		02	0.09	0.48	1.79						

[0504] 表17.通过紫外测定的ALX-0081制剂的蛋白质浓度结果[12.5mg/mL API, 0.01%吐温-80 (v/v) 和7%蔗糖 (w/v), 在pH 6.5的20mM柠檬酸盐缓冲液中]。

[0505]

时间点 (月)	储存条件	稀释样品的平均浓度 (mg/mL)	用稀释因子校正的平均浓度 (mg/瓶)
初始	-	0.534	13.4
1	-20°C	0.532	13.3
	+5°C	0.530	13.3
	+25°C/60%RH	0.525	13.1
	+40°C/75%RH	0.516	12.9
3	-20°C	0.501	12.5
	+5°C	0.524	13.1
	+25°C/60%RH	0.530	13.3
	+40°C/75%RH	0.534	13.4
6	-20°C	0.530	13.3
	+5°C	0.528	13.2
	+25°C/60%RH	0.531	13.3
	+40°C/75%RH	0.523	13.1
9	-20°C	0.505	12.6
	+5°C	0.504	12.6
	+25°C/60%RH	0.511	12.8
	+40°C/75%RH	0.519	13.0
12	-20°C	0.504	12.6
	+5°C	0.505	12.6
	+25°C/60%RH	0.497	12.4
	+40°C/75%RH	0.510	12.7

[0506] 表18.ALX-0081制剂的SE-HPLC分析[12.5mg/mL API, 0.01%吐温-80 (v/v) 和7%蔗糖 (w/v), 在pH 6.5的20mM柠檬酸盐缓冲液中]。

[0507]

时间点 (月)	储存条件	平均前峰 (面积%)	平均主峰 (面积%)
初始	-	0.55	99.5
1	-20°C	0.51	99.5
	+5°C	0.53	99.5
	+25°C/60%RH	0.55	99.4
	+40°C/75%RH	0.56	99.5
3	-20°C	0.47	99.6
	+5°C	0.47	99.5
	+25°C/60%RH	0.47	99.5
	+40°C/75%RH	0.48	99.5
6	-20°C	0.60	99.4
	+5°C	0.63	99.4
	+25°C/60%RH	0.65	99.4
	+40°C/75%RH	0.68	99.3
12	-20°C	0.66	99.4
	+5°C	0.68	99.3
	+25°C/60%RH	0.67	99.3
	+40°C/75%RH	0.71	99.3

[0508] 表19. 在-20°C储存的冻干ALX-0081上进行的物理测试结果[12.5mg/mL API, 0.01%吐温-80 (v/v) 和7%蔗糖 (w/v), 在pH 6.5的20mM柠檬酸盐缓冲液中]。

[0509]

测试	单位	初始	1M	3M	6M	9M	12M
冻干物的外观	-	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物
重构溶液的外观	-	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物
重构时间 (用1 mL WFI 重构)	秒	50	60	50	48	41	41
摩尔渗透压浓度	mOsm/kg	298	298	297	280	-	296
重构溶液的 pH	-	6.8	6.6	6.8	6.7	-	6.6
水分含量	% w/w	0.65	0.72	0.83	0.74	0.62	0.63
通过 HIAC 检测到的显微镜下可见的颗粒	颗粒/mL	105 颗粒/mL $\phi \geq 10\mu\text{m}$;	73 颗粒/mL $\phi \geq 10\mu\text{m}$;	79 颗粒/mL $\phi \geq 10\mu\text{m}$;	50 颗粒/mL $\phi \geq 10\mu\text{m}$;	-	-
	颗粒/mL	3 颗粒/mL $\phi \geq 25\mu\text{m}$	3 颗粒/mL $\phi \geq 25\mu\text{m}$	7 颗粒/mL $\phi \geq 25\mu\text{m}$	4 颗粒/mL $\phi \geq 25\mu\text{m}$	-	-

[0510] 表20. 在+5℃储存的冻干ALX-0081上进行的物理测试结果[12.5mg/mL API, 0.01%吐温-80 (v/v) 和7%蔗糖 (w/v), 在pH 6.5的20mM柠檬酸盐缓冲液中]。

[0511]

测试	单位	初始	1M	3M	6M	9M	12M
冻干物的外观	-	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物
重构溶液的外观	-	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物
重构时间 (用1 mL WFI 重构)	秒	50	60	55	50	43	43
摩尔渗透压浓度	mOsm/kg	298	298	294	279	-	293
重构溶液的 pH	-	6.8	6.6	6.8	6.7	-	6.6
水分含量	% w/w	0.65	0.76	0.72	0.72	0.80	0.68
通过 HIAC 检测到的显微镜下可见的颗粒	颗粒/mL	105 颗粒/mL $\phi \geq 10\mu\text{m}$;	88 颗粒/mL $\phi \geq 10\mu\text{m}$;	49 颗粒/mL $\phi \geq 10\mu\text{m}$;	109 颗粒/mL $\phi \geq 10\mu\text{m}$;	-	-
	颗粒/mL	3 颗粒/mL $\phi \geq 25\mu\text{m}$	5 颗粒/mL $\phi \geq 25\mu\text{m}$	4 颗粒/mL $\phi \geq 25\mu\text{m}$	7 颗粒/mL $\phi \geq 25\mu\text{m}$	-	-

[0512] 表21. 在+25℃/60%RH储存的冻干ALX-0081上进行的物理测试结果[12.5mg/mL API, 0.01%吐温-80 (v/v) 和7%蔗糖 (w/v), 在pH 6.5的20mM柠檬酸盐缓冲液中]。

[0513]

测试	单位	初始	1M	3M	6M	9M	12M
冻干物的外观	-	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物
重构溶液的外观	-	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物
重构时间 (用1 mL WFI 重构)	秒	50	70	52	50	40	40
摩尔渗透压浓度	mOsm/kg	298	300	299	280	-	302
重构溶液的 pH	-	6.8	6.6	6.8	6.7	-	6.6
水分含量	% w/w	0.65	0.83	0.68	0.93	0.99	0.89*
通过 HIAC 检测到的显微镜下可见的颗粒	颗粒/mL	105 颗粒/mL $\phi \geq 10\mu\text{m}$;	58 颗粒/mL $\phi \geq 10\mu\text{m}$;	34 颗粒/mL $\phi \geq 10\mu\text{m}$;	45 颗粒/mL $\phi \geq 10\mu\text{m}$;	-	-
	颗粒/mL	3 颗粒/mL $\phi \geq 25\mu\text{m}$	3 颗粒/mL $\phi \geq 25\mu\text{m}$	4 颗粒/mL $\phi \geq 25\mu\text{m}$	0 颗粒/mL $\phi \geq 25\mu\text{m}$	-	-

[0514] 注意:*是2次独立测量而不是3次独立测量的平均值

[0515] 表22. 在+40℃/75%RH储存的冻干ALX-0081上进行的物理测试结果[12.5mg/mL API, 0.01%吐温-80 (v/v) 和7%蔗糖 (w/v), 在pH 6.5的20mM柠檬酸盐缓冲液中]。

[0516]

测试	单位	初始	1M	3M	6M	9M	12M
冻干物的外观	-	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 没有黑色颗粒物
重构溶液的外观	-	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物	澄清无色溶液, 不含可见颗粒物
重构时间 (用1 mL WFI 重构)	秒	50	70	50	52	44	43
摩尔渗透压浓度	mOsm/kg	298	300	299	279	-	292
重构溶液的 pH	-	6.8	6.7	6.8	6.7	-	6.6
水分含量	% w/w	0.65	0.83	1.13	1.48	1.83	2.09*
通过 HIAC 检测到的显微镜下可见的颗粒	颗粒/mL	105 颗粒/mL $\phi \geq 10\mu\text{m}$;	35 颗粒/mL $\phi \geq 10\mu\text{m}$;	94 颗粒/mL $\phi \geq 10\mu\text{m}$;	52 颗粒/mL $\phi \geq 10\mu\text{m}$;	-	-
	颗粒/mL	3 颗粒/mL $\phi \geq 25\mu\text{m}$	3 颗粒/mL $\phi \geq 25\mu\text{m}$	20 颗粒/mL $\phi \geq 25\mu\text{m}$	2 颗粒/mL $\phi \geq 25\mu\text{m}$	-	-

[0517] 注意:*是2次独立测量而不是3次独立测量的平均值

[0518] 表23. ALX-0081制剂的效力结果[12.5mg/mL API, 0.01%吐温-80 (v/v) 和7%蔗糖 (w/v), 在pH 6.5的20mM柠檬酸盐缓冲液中]。

[0519]

时间点 (月)	储存条件	效力结果 (%)*	下限 (%)**	上限 (%)***	通过/失败	接受标准
初始	-	91.4	88.1	94.8	通过	80% -120% (与参考相比)
1	-20°C	94.8	91.5	98.2	通过	
	+5°±3°C	94.5	90.3	98.8		
	+25°C/60%RH	97.4	94.2	100.7		
	+40°C/75%RH	97.7	94.0	101.6		
3	-20°C	105.5	101.7	109.5	通过	
	+5°±3°C	99.3	95.3	103.4		
	+25°C/60%RH	97.0	93.1	101.1		
	+40°C/75%RH	97.8	94.4	101.3		
6	-20°C	93.2	90.2	96.2	通过	
	+5°±3°C	93.1	90.0	96.2		
	+25°C/60%RH	97.5	94.1	101.0		
	+40°C/75%RH	100.2	96.9	103.6		
9	-20°C	101.0	95.2	107.2	通过	
	+5°±3°C	101.1	94.8	107.7		
	+25°C/60%RH	101.6	96.2	107.3		
	+40°C/75%RH	98.7	93.8	103.9		
12	-20°C	101.3	98.7	103.9	通过	
	+5°±3°C	101.2	98.3	104.2		
	+25°C/60%RH	105.7	103.0	108.5		
	+40°C/75%RH	100.4	95.5	105.5		

[0520] 表24.caplacizumab的体外可比性结果。

[0521]

研究类型	方法	可比性的标准	同时配制的 ALX-0081	冻干的 ALX-0081
生物活性 (效力)	表面等离子 体共振 (Biacore)	80 – 120%的相对效力 (与主参考标准相比)	102.8%	102.9%
生物活性 (效力)	vWF 中和 ELISA	80 – 120%的相对效力 (与主参考标准相比)	99.4%	109.5%
生物活性 (生物标志 物)	RICO	完全阻断 RICO(< 20%)所需的两种制剂 的浓度相差不大于 5 倍	0.4 µg/mL	0.4 µg/mL
亲和力	Gyrolab	两种制剂的 K _D 值在统 计学上没有差异(通过 K _D 估计值的 95% CI)	6.84 pM (2.74 – 10.95)	4.46 pM (-0.18 – 9.10)

[0522]

表 25. 储存于≤-60°C 的液体 ALX-0081 的稳定性结果[13.8 mg/mL API, 0.01% 吐温-80 (v/v)和 7% 蔗糖 (w/v), 在 pH 6.5 的 20 mM 柠檬酸盐缓冲液中]。

测试	接受标准	初始	9M	12M	18M	24M
含量	12.5 ± 2.5 mg/mL	13.8 mg/mL	13.4 mg/mL	13.8 mg/mL	13.4 mg/mL	14.1 mg/mL
纯度 cIEF	≥ 90% 主峰	97% 主峰	98% 主峰	98% 主峰	98% 主峰	98% 主峰
纯度 RP-HPLC	≥ 85% 主峰 ≤ 10% 前峰 1+2+3 ≤ 6% 后峰 1 ≤ 4% 后峰 2	91% 主峰 2% 前峰 1+2+3 6% 后峰 1 1% 后峰 2	91.2% 主峰 2.1% 前峰 1+2+3 (1.2% 前峰 1) 5.4% 后峰 1 1.0% 后峰 2	91.4% 主峰 1.8% 前峰 1+2+3 (1.2% 前峰 1) 5.5% 后峰 1 1.0% 后峰 2	90.8% 主峰 2.4% 前峰 1+2+3 (1.6% 前峰 1) 5.3% 后峰 1 1.1% 后峰 2	91.2% 主峰 2.2% 前峰 1+2+3 (1.4% 前峰 1) 5.4% 后峰 1 1.1% 后峰 2
纯度 (单体) SE-HPLC	≥ 95 % 主峰	99% 主峰	99.8% 主峰	99.7% 主峰	99.6% 主峰	99.6% 主峰
pH	6.5 ± 0.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
外观	澄清, 与参考 I 相比更不显乳色或与之相当, 无色	澄清, 与参考 I 相比更不显乳色或与之相当, 无色	澄清, 与参考 I 为同一样乳色, 无色	澄清, 与参考 I 相比更不显乳色, 无色	澄清, 与参考 I 相比更不显乳色, 无色	澄清, 与参考 I 相比更不显乳色或与之相当, 无色
效力 (Biacore) [CI:95%]	80 x 10 ³ – 120 x 10 ³ U/mg	93 x 10 ³ U/mg	96 x 10 ³ U/mg [91x10 ³ - 101 x10 ³ U/mg]	100 x 10 ³ U/mg [97 x 10 ³ – 104x10 ³ U/mg]	99 x 10 ³ U/mg [97 x 10 ³ -101x10 ³ U/mg]	94x10 ³ U/mg [93x10 ³ -95x10 ³ U/mg]

[0523]

表 26. 储存于+5°C ±3°C 的液体 ALX-0081 的稳定性结果[13.8 mg/mL API, 0.01% 吐温-80 (v/v)和 7% 蔗糖 (w/v), 在 pH 6.5 的 20 mM 柠檬酸盐缓冲液中]。

测试	接受标准	初始	9M	12M	18M	24M
含量	12.5 ± 2.5 mg/mL	13.8 mg/mL	13.5 mg/mL	13.9 mg/mL	13.6 mg/mL	13.1 mg/mL
纯度 cIEF	≥ 90% 主峰	97% 主峰	98% 主峰	98% 主峰	98% 主峰	97% 主峰
纯度 RP-HPLC	≥ 85% 主峰	91% 主峰	90.5% 主峰	90.7% 主峰	90.2% 主峰	90.2% 主峰
	≤ 10% 前峰 1+2+3	2% 前峰 1+2+3	2.6% 前峰 1+2+3	2.5% 前峰 1+2+3	2.9% 前峰 1+2+3	2.8% 前峰 1+2+3
	≤ 6% 后峰 1	6% 后峰 1	(1.7% 前峰 1) 5.3% 后峰 1	(1.8% 前峰 1) 5.4% 后峰 1	(2.1% 前峰 1) 5.2% 后峰 1	(2.1% 前峰 1) 5.2% 后峰 1
纯度 (单体) SE-HPLC	≤ 4% 后峰 2	1% 后峰 2	1.4% 后峰 2	1.3% 后峰 2	1.5% 后峰 2	1.5% 后峰 2
pH	≥ 95 % 主峰	99% 主峰	99.8% 主峰	99.8% 主峰	99.6% 主峰	99.7% 主峰
外观	6.5 ± 0.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
	澄清,与参考 I 相比更不 显乳色或与之相当,无 色	澄清,与参考 I 相比 更不显乳色或与之相 当,无色	澄清,与参考 I 为同 样乳色,无色	澄清,与参考 I 相比更 不显乳色,无色	澄清,与参考 I 相比 更不显乳色,无色	澄清,与参考 I 相比更 不显乳色或与之相当, 无色
效力 (BI(Acore) [CI:95%]	80 x 10 ³ – 120 x 10 ³ U/mg	93 x10 ³ U/mg	100 x10 ³ U/mg [95 x10 ³ - 105 x10 ³ U/mg]	96 x10 ³ U/mg [93 x10 ³ - 100 x10 ³ U/mg]	100 x10 ³ U/mg [97 x10 ³ -103 x10 ³ U/mg]	100x10 ³ U/mg [98x10 ³ -102x10 ³ U/mg]

[0524]

表 27. 储存于+5°C ±3°C 的冻干 ALX-0081 的稳定性结果[12.7 mg/mL API, 0.01% 吐温-80 (v/v)和 7% 蔗糖 (w/v), 在 pH 6.5 的 20 mM 柠檬酸盐缓冲液中]。

测试	接受标准	初始	9M	12M	18M	24M
冻干物外观	白色饼, 基本不含杂质	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 基本不含杂质	白色饼, 基本不含杂质	白色饼, 基本不含杂质	白色饼, 基本不含杂质
重构溶液外观	澄清, 与参考 I 相比更不显乳色或与之相当, 无色, 并且不含可见颗粒	澄清, 与参考 I 相比更不显乳色或与之相当, 无色, 并且不含可见颗粒	澄清, 与参考 I 为同样的乳色, 无色, 并且不含可见颗粒	澄清, 比参考 I 更不显乳色, 无色, 并且不含可见颗粒	澄清, 比参考 I 更不显乳色, 无色, 并且不含可见颗粒	澄清, 与参考 I 相比更不显乳色或与之相当, 无色, 并且不含可见颗粒
含量	12.5 ± 2.5 mg/瓶	12.7 mg/瓶	12.7 mg/瓶	12.6 mg/瓶	12.4 mg/瓶	12.7 mg/瓶
纯度 cIEF	≥ 90% 主峰	96% 主峰	97% 主峰	98% 主峰	98% 主峰	97% 主峰
纯度 RP-HPLC	≥ 85% 主峰 ≤ 10% 前峰 1+2+3 ≤ 6% 后峰 1 ≤ 4% 后峰 2	90.8% 主峰 2.3% 前峰 1+2+3 5.5% 后峰 1 1.1% 后峰 2	91.0% 主峰 2.2% 前峰 1+2+3 (1.4% 前峰 1) 5.2% 后峰 1 1.2% 后峰 2	91.3% 主峰 2.1% 前峰 1+2+3 (1.4% 前峰 1) 5.3% 后峰 1 1.1% 后峰 2	91.0% 主峰 2.3% 前峰 1+2+3 (1.5% 前峰 1) 5.3% 后峰 1 1.2% 后峰 2	91.1% 主峰 2.3% 前峰 1+2+3 (1.5% 前峰 1) 5.2% 后峰 1 1.2% 后峰 2
纯度 (单体) SE-HPLC	≥ 95 % 主峰	99.6% 主峰	99.8% 主峰	99.8% 主峰	99.6% 主峰	99.6% 主峰
pH	6.5 ± 0.5	6.6	6.5	6.5	6.5	6.5
残余水分		0.9%	0.69%	0.74%	0.76%	0.85%
PAMAS 检测 的亚可见颗粒	颗粒 ≥ 10 µm: ≤ 6000/瓶 颗粒 ≥ 25 µm: ≤ 600/瓶	14 ≥ 10 µm 0 ≥ 25 µm		359 ≥ 10 µm 13 ≥ 25 µm		6 ≥ 10 µm 0 ≥ 25 µm

[0525]

测试	接受标准	初始	9M	12M	18M	24M
效力 (BIAcore) [CI:95%]	80 x10 ³ – 120 x10 ³ U/mg	96 x10 ³ U/mg	100 x10 ³ U/mg [95 x10 ³ -105 x10 ³ U/mg]	107 x10 ³ U/mg [104 x10 ³ -110 x10 ³ U/mg]	101 x10 ³ U/mg [100 x10 ³ -103 x10 ³ U/mg]	96x10 ³ U/mg [93x10 ³ -99x10 ³ U/mg]

表 28. 储存于+25°C (±2°C/60±5% RH)的冻干 ALX-0081 的稳定性结果[12.7 mg/mL API, 0.01% 吐温-80 (v/v)和 7% 蔗糖 (w/v), 在 pH 6.5 的 20 mM 柠檬酸盐缓冲液中]。

测试	接受标准	初始	9M	12M	18M	24M
冻干物外观	白色饼，基本不含杂质	白色饼，没有黑色颗粒物	白色饼，基本不含杂质	白色饼，基本不含杂质	白色饼，基本不含杂质	白色饼，基本不含杂质
重构溶液外观	澄清，与参考 I 相比更不显乳色或与之相当，无色，并且不含可见颗粒	澄清，与参考 I 相比更不显乳色或与之相当，无色，并且不含可见颗粒	澄清，与参考 I 为同样的乳色，无色，并且不含可见颗粒	澄清，比参考 I 更不显乳色，无色，并且不含可见颗粒	澄清，比参考 I 更不显乳色，无色，并且不含可见颗粒	澄清，与参考 I 相比更不显乳色或与之相当，无色，并且不含可见颗粒
含量	12.5 ± 2.5 mg/瓶	12.7 mg/瓶	12.6 mg/瓶	12.6 mg/瓶	12.3 mg/瓶	13.1 mg/瓶
纯度 cIEF	≥ 90% 主峰	96% 主峰	97% 主峰	98% 主峰	97% 主峰	97% 主峰
纯度 RP-HPLC	≥ 85% 主峰 ≤ 10% 前峰 1+2+3 ≤ 6% 后峰 1 ≤ 4% 后峰 2	90.8% 主峰 2.3% 前峰 1+2+3 5.5% 后峰 1 1.1% 后峰 2	90.7% 主峰 2.3% 前峰 1+2+3 (1.5% 前峰 1) 5.2% 后峰 1 1.5% 后峰 2	90.8% 主峰 2.1% 前峰 1+2+3 (1.4% 前峰 1) 5.2% 后峰 1 1.6% 后峰 2	90.5% 主峰 2.4% 前峰 1+2+3 (1.6% 前峰 1) 5.2% 后峰 1 1.8% 后峰 2	90.4% 主峰 2.4% 前峰 1+2+3 (1.6% 前峰 1) 5.2% 后峰 1 1.7% 后峰 2
纯度 (单体) SE-HPLC	≥ 95 % 主峰	99.6% 主峰	99.8% 主峰	99.8% 主峰	99.7% 主峰	99.7% 主峰

[0526]

测试	接受标准	初始	9M	12M	18M	24M
pH	6.5 ± 0.5	6.6	6.5	6.5	6.5	6.5
残余水分		0.9%	0.86%	1.04%	1.03%	1.30%
PAMAS 检测的亚可见颗粒	颗粒 ≥ 10 μm: ≤ 6000/瓶 颗粒 ≥ 25 μm: ≤ 600/瓶	14 ≥ 10 μm 0 ≥ 25 μm		389 ≥ 10 μm 12 ≥ 25 μm		13 ≥ 10 μm 1 ≥ 25 μm
效力 (BIAcore) [CI:95%]	80 x10 ³ – 120 x10 ³ U/mg	96 x10 ³ U/mg	100 x10 ³ U/mg [95 x10 ³ -106 x10 ³ U/mg]	102 x10 ³ U/mg [99 x10 ³ -105 x10 ³ U/mg]	103 x10 ³ U/mg [101 x10 ³ -104 x10 ³ U/mg]	90x10 ³ U/mg [87x10 ³ -94x10 ³ U/mg]

表 29. 储存于+40°C (±2°C/75±5% RH)的冻干 ALX-0081 的稳定性结果[12.7 mg/mL API, 0.01% 吐温-80 (v/v)和 7% 蔗糖 (w/v), 在 pH 6.5 的 20 mM 柠檬酸盐缓冲液中]。

测试	接受标准	初始	9M	12M	18M	24M
冻干物外观	白色饼, 基本不含杂质	白色饼, 没有黑色颗粒物	白色饼, 基本不含杂质	白色饼, 基本不含杂质	白色饼, 基本不含杂质	白色饼, 基本不含杂质
重构溶液外观	澄清, 与参考 I 相比更不显乳色或与之相当, 无可见颗粒	澄清, 与参考 I 相比更不显乳色或与之相当, 无可见颗粒	澄清, 与参考 I 为同样的乳色, 无色, 并且不含可见颗粒	澄清, 比参考 I 更不显乳色, 无色, 并且不含可见颗粒	澄清, 比参考 I 更不显乳色, 无色, 并且不含可见颗粒	澄清, 与参考 I 相比更不显乳色或与之相当, 无色, 并且不含可见颗粒
含量	12.5 ± 2.5 mg/瓶	12.7 mg/瓶	12.5 mg/瓶	13.1 mg/瓶	12.1 mg/瓶	13.0 mg/瓶
纯度 cIEF	≥ 90% 主峰	96% 主峰	94% 主峰	96% 主峰	93% 主峰	93% 主峰

[0527]

测试	接受标准	初始	9M	12M	18M	24M
纯度 RP-HPLC	≥ 85% 主峰 ≤ 10% 前峰 1+2+3 ≤ 6% 后峰 1 ≤ 4% 后峰 2	90.8% 主峰 2.3% 前峰 1+2+3 5.5% 后峰 1 1.1% 后峰 2	89.2% 主峰 2.3% 前峰 1+2+3 (1.4% 前峰 1) 5.2% 后峰 1 2.8% 后峰 2	89.1% 主峰 2.2% 前峰 1+2+3 (1.4% 前峰 1) 5.2% 后峰 1 3.2% 后峰 2	87.8% 主峰 2.4% 前峰 1+2+3 (1.6% 前峰 1) 5.2% 后峰 1 4.2% 后峰 2	85.5% 主峰 2.4% 前峰 1+2+3 (1.7% 前峰 1) 5.3% 后峰 1 6.2% 后峰 2
纯度 (单体) SE-HPLC	≥ 95 % 主峰	99.6% 主峰	99.8% 主峰	99.8% 主峰	99.6% 主峰	99.7% 主峰
pH	6.5 ± 0.5	6.6	6.5	6.5	6.5	6.5
残余水分		0.9%	1.59%	2.09%	2.56%	3.34%
PAMAS 检测的 亚可见颗粒	颗粒 ≥ 10 μm: ≤ 6000/瓶 颗粒 ≥ 25 μm: ≤ 600/瓶	14 ≥ 10 μm 0 ≥ 25 μm		873 ≥ 10 μm 18 ≥ 25 μm		4 ≥ 10 μm 0 ≥ 25 μm
效力 (BIAcore) [CI:95%]	80 x10 ³ – 120 x10 ³ U/mg	96 x10 ³ U/mg	100 x10 ³ U/mg [96 x10 ³ -104 x10 ³ U/mg]	97 x10 ³ U/mg [94 x10 ³ -101 x10 ³ U/mg]	108 x10 ³ U/mg [106 x10 ³ -111 x10 ³ U/mg]	93x10 ³ U/mg [91x10 ³ -95x10 ³ U/mg]

[0528] 等同方式

[0529] 认为前述书面说明足以使本领域技术人员实施本发明。本发明不限于实施例提供

的范围,因此实施例是对本发明的一个方面的一个举例,其它功能上等同的实施方案在本发明的范围之内。根据前面的描述,除了本文所显示的和描述的修改之外,对本发明的各种修改对于本领域技术人员来说将是显而易见的,并且落在附随的权利要求的范围内。本发明的每一个实施方案不一定包括本发明的多个优点和多个目的。

[0530] 本申请全文中引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容通过引用将其全文合并入本文,特别是本文所引用的用途或主题。

序列表

<110> 埃博灵克斯股份有限公司
 <120> 免疫球蛋白单可变结构域的稳定制剂及其应用
 <130> P13-001-PCT-1
 <140> NL 1040254
 <141> 2013-06-14
 <150> US61/824523
 <151> 2013-05-17
 <160> 20
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
 20 25 30
 Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
 100 105 110
 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
 145 150 155 160
 Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
 165 170 175
 Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro
 180 185 190
 Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg

[0001]

	195	200	205
	Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val 210 215 220		
	Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg 225 230 235 240		
	Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr 245 250 255		
	Val Ser Ser		
	<210> 2 <211> 259 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 纳米抗体序列		
	<400> 2		
	Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly 1 5 10 15		
	Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn 20 25 30		
[0002]	Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val 35 40 45		
	Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val 50 55 60		
	Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr 65 70 75 80		
	Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		
	Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro 100 105 110		
	Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser 115 120 125		
	Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln 130 135 140		
	Ala Gly Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe 145 150 155 160		
	Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg 165 170 175		
	Asp Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro 180 185 190		

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

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

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

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

Val Ser Ser

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

<220>
 <223> 纳米抗体序列

<400> 3

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

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

[0003]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 195 200 205
 Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys
 210 215 220
 Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala
 225 230 235 240
 Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly
 245 250 255
 Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 260 265
 <210> 4
 <211> 286
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 4
 Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
 20 25 30
 [0004] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
 100 105 110
 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
 145 150 155 160
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu
 165 170 175
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met
 180 185 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val Ala Ala
 195 200 205
 Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly
 210 215 220
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Gly Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
 245 250 255
 Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
 260 265 270
 Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 275 280 285
 <210> 5
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 5
 Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly
 20 25 30
 Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr
 85 90 95
 Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Val Gln
 115 120 125
 Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 130 135 140
 Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly Ala Met Gly
 145 150 155 160
 Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile

[0005]

	165	170	175
Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly Arg Phe	180	185	190
Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn	195	200	205
Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala Asn Leu	210	215	220
Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	225	230	235
Thr Gln Val Thr Val Ser Ser	245		

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

<220>
 <223> 纳米抗体序列

<400> 6

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

[0006]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly	20	25	30
Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val	35	40	45
Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys	50	55	60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu	65	70	75
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr	85	90	95
Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp	100	105	110
Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly	115	120	125
Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	130	135	140
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe	145	150	155
Ser Ile Gly Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg	165	170	175

Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp
180 185 190

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

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

Tyr Cys Tyr Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn
225 230 235 240

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 7
<211> 274
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

<400> 7

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

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

[0007]

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala
165 170 175

Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala
180 185 190

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

Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 210 215 220

Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
 225 230 235 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr
 245 250 255

Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
 260 265 270

Ser Ser

<210> 8
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 纳米抗体序列

<400> 8

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

[0008]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser

<210> 9
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 纳米抗体序列

<400> 9

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

[0009]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

	165	170	175
	Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly 180 185 190		
	Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser 195 200 205		
	Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys 210 215 220		
	Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala 225 230 235 240		
	Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly 245 250 255		
	Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser 260 265		
<210>	10		
<211>	286		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	纳米抗体序列		
<400>	10		
[0010]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly 1 5 10 15		
	Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn 20 25 30		
	Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val 35 40 45		
	Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val 50 55 60		
	Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr 65 70 75 80		
	Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		
	Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro 100 105 110		
	Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser 115 120 125		
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 130 135 140		
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val 145 150 155 160		

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu
 165 170 175
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met
 180 185 190
 Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val Ala Ala
 195 200 205
 Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly
 210 215 220
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
 245 250 255
 Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
 260 265 270
 Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 275 280 285
 <210> 11
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 [0011] <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 11
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
 20 25 30
 Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
 100 105 110
 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser

<210> 12
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0012]

<220>
 <223> 纳米抗体序列

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser

<210> 13
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0013]

<220>
 <223> 纳米抗体序列

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser

	130	135	140
	Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala 145 150 155 160		
	Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln 165 170 175		
	Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly 180 185 190		
	Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser 195 200 205		
	Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg 210 215 220		
	Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala 225 230 235 240		
	Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly 245 250 255		
	Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser 260 265		
[0014]	<210> 14		
	<211> 265		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 纳米抗体序列		
	<400> 14		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn 20 25 30		
	Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val 35 40 45		
	Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val 50 55 60		
	Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr 65 70 75 80		
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		
	Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro 100 105 110		
	Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser 115 120 125		

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
 145 150 155 160
 Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln
 165 170 175
 Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly
 180 185 190
 Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 195 200 205
 Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 210 215 220
 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala
 225 230 235 240
 Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly
 245 250 255
 Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 260 265

[0015]

<210> 15
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 纳米抗体序列

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
 20 25 30
 Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
 100 105 110
 Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
 145 150 155 160
 Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln
 165 170 175
 Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly
 180 185 190
 Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 195 200 205
 Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 210 215 220
 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala
 225 230 235 240
 Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly
 245 250 255
 Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 260 265

[0016]

<210> 16
 <211> 286
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 纳米抗体序列

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
 20 25 30
 Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
 100 105 110
 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
245 250 255

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

[0017] Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280 285

<210> 17
<211> 286
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列

<400> 17

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro

[0018]

100	105	110
Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser 115 120 125		
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 130 135 140		
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val 145 150 155 160		
Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu 165 170 175		
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met 180 185 190		
Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala 195 200 205		
Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly 210 215 220		
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln 225 230 235 240		
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala 245 250 255		
Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu 260 265 270		
Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser 275 280 285		
<210> 18		
<211> 286		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 纳米抗体序列		
<400> 18		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn 20 25 30		
Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val 35 40 45		
Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val 50 55 60		
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr 65 70 75 80		

[0019]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
 100 105 110
 Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
 145 150 155 160
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
 165 170 175
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met
 180 185 190
 Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val Ala Ala
 195 200 205
 Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly
 210 215 220
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
 245 250 255
 Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu
 260 265 270
 Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 275 280 285
 <210> 19
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 19
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
 20 25 30
 Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
 100 105 110
 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 20
 <211> 2804
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 20
 Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
 1 5 10 15
 Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
 20 25 30
 Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
 35 40 45
 Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
 50 55 60
 Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
 65 70 75 80
 Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
 85 90 95
 Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
 100 105 110
 Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
 115 120 125
 Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
 130 135 140
 Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
 145 150 155 160
 Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
 165 170 175
 Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala
 180 185 190
 Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser
 195 200 205
 Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln

[0020]

210	215	220
Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu 225 230 235 240		
Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu 245 250 255		
Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala 260 265 270		
Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His 275 280 285		
Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys 290 295 300		
Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met 305 310 315 320		
Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu 325 330 335		
Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His 340 345 350		
Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn 355 360 365		
Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys 370 375 380		
Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp 385 390 395 400		
Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg 405 410 415		
Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys 420 425 430		
Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu 435 440 445		
Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val 450 455 460		
Ala Met Asp Gly Gln Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu 465 470 475 480		
Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu 485 490 495		
Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu 500 505 510		
Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn 515 520 525		

[0021]

	Gly	Asn	Gln	Gly	Asp	Asp	Phe	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly	Leu	Ala	Glu	Pro	
	530						535					540					
	Arg	Val	Glu	Asp	Phe	Gly	Asn	Ala	Trp	Lys	Leu	His	Gly	Asp	Cys	Gln	
	545					550					555					560	
	Asp	Leu	Gln	Lys	Gln	His	Ser	Asp	Pro	Cys	Ala	Leu	Asn	Pro	Arg	Met	
					565					570					575		
	Thr	Arg	Phe	Ser	Glu	Glu	Ala	Cys	Ala	Val	Leu	Thr	Ser	Pro	Thr	Phe	
				580					585					590			
	Glu	Ala	Cys	His	Arg	Ala	Val	Ser	Pro	Leu	Pro	Tyr	Leu	Arg	Asn	Cys	
		595						600					605				
	Arg	Tyr	Asp	Val	Cys	Ser	Cys	Ser	Asp	Gly	Arg	Glu	Cys	Leu	Cys	Gly	
	610						615					620					
	Ala	Leu	Ala	Ser	Tyr	Ala	Ala	Ala	Cys	Ala	Gly	Arg	Gly	Val	Arg	Val	
	625					630					635					640	
	Ala	Trp	Arg	Glu	Pro	Gly	Arg	Cys	Glu	Leu	Asn	Cys	Pro	Lys	Gly	Gln	
					645					650					655		
	Val	Tyr	Leu	Gln	Cys	Gly	Thr	Pro	Cys	Asn	Leu	Thr	Cys	Arg	Ser	Leu	
				660					665					670			
[0022]	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Glu	Cys	Asn	Glu	Ala	Cys	Leu	Glu	Gly	Cys	Phe	
			675					680					685				
	Cys	Pro	Pro	Gly	Leu	Tyr	Met	Asp	Glu	Arg	Gly	Asp	Cys	Val	Pro	Lys	
		690					695					700					
	Ala	Gln	Cys	Pro	Cys	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Glu	Ile	Phe	Gln	Pro	Glu	Asp	
	705					710					715					720	
	Ile	Phe	Ser	Asp	His	His	Thr	Met	Cys	Tyr	Cys	Glu	Asp	Gly	Phe	Met	
					725					730					735		
	His	Cys	Thr	Met	Ser	Gly	Val	Pro	Gly	Ser	Leu	Leu	Pro	Asp	Ala	Val	
				740					745					750			
	Leu	Ser	Ser	Pro	Leu	Ser	His	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Leu	Ser	Cys	Arg	
			755					760					765				
	Pro	Pro	Met	Val	Lys	Leu	Val	Cys	Pro	Ala	Asp	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	
			770				775					780					
	Gly	Leu	Glu	Cys	Thr	Lys	Thr	Cys	Gln	Asn	Tyr	Asp	Leu	Glu	Cys	Met	
	785					790					795					800	
	Ser	Met	Gly	Cys	Val	Ser	Gly	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro	Gly	Met	Val	Arg	
				805						810					815		
	His	Glu	Asn	Arg	Cys	Val	Ala	Leu	Glu	Arg	Cys	Pro	Cys	Phe	His	Gln	
				820					825					830			

Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr
 835 840 845
 Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp
 850 855 860
 Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly
 865 870 875 880
 Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp
 885 890 895
 Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys
 900 905 910
 Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu
 915 920 925
 Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys
 930 935 940
 Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg
 945 950 955 960
 Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg
 965 970 975
 [0023] His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val
 980 985 990
 Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr
 995 1000 1005
 Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn
 1010 1015 1020
 Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro
 1025 1030 1035
 Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln
 1040 1045 1050
 Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe
 1055 1060 1065
 Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val
 1070 1075 1080
 Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala
 1085 1090 1095
 Cys Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln
 1100 1105 1110
 His Gly Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln
 1115 1120 1125

[0024]

Ser Cys	Glu Glu Arg Asn	Leu	Arg Glu Asn Gly	Tyr	Glu Cys Glu
1130		1135		1140	
Trp Arg	Tyr Asn Ser Cys	Ala	Pro Ala Cys Gln	Val	Thr Cys Gln
1145		1150		1155	
His Pro	Glu Pro Leu Ala	Cys	Pro Val Gln Cys	Val	Glu Gly Cys
1160		1165		1170	
His Ala	His Cys Pro Pro	Gly	Lys Ile Leu Asp	Glu	Leu Leu Gln
1175		1180		1185	
Thr Cys	Val Asp Pro Glu	Asp	Cys Pro Val Cys	Glu	Val Ala Gly
1190		1195		1200	
Arg Arg	Phe Ala Ser Gly	Lys	Lys Val Thr Leu	Asn	Pro Ser Asp
1205		1210		1215	
Pro Glu	His Cys Gln Ile	Cys	His Cys Asp Val	Val	Asn Leu Thr
1220		1225		1230	
Cys Glu	Ala Cys Gln Glu	Pro	Gly Gly Leu Val	Val	Pro Pro Thr
1235		1240		1245	
Asp Ala	Pro Val Ser Pro	Thr	Thr Leu Tyr Val	Glu	Asp Ile Ser
1250		1255		1260	
Glu Pro	Pro Leu His Asp	Phe	Tyr Cys Ser Arg	Leu	Leu Asp Leu
1265		1270		1275	
Val Phe	Leu Leu Asp Gly	Ser	Ser Arg Leu Ser	Glu	Ala Glu Phe
1280		1285		1290	
Glu Val	Leu Lys Ala Phe	Val	Val Asp Met Met	Glu	Arg Leu Arg
1295		1300		1305	
Ile Ser	Gln Lys Trp Val	Arg	Val Ala Val Val	Glu	Tyr His Asp
1310		1315		1320	
Gly Ser	His Ala Tyr Ile	Gly	Leu Lys Asp Arg	Lys	Arg Pro Ser
1325		1330		1335	
Glu Leu	Arg Arg Ile Ala	Ser	Gln Val Lys Tyr	Ala	Gly Ser Gln
1340		1345		1350	
Val Ala	Ser Thr Ser Glu	Val	Leu Lys Tyr Thr	Leu	Phe Gln Ile
1355		1360		1365	
Phe Ser	Lys Ile Asp Arg	Pro	Glu Ala Ser Arg	Ile	Ala Leu Leu
1370		1375		1380	
Leu Met	Ala Ser Gln Glu	Pro	Gln Arg Met Ser	Arg	Asn Phe Val
1385		1390		1395	
Arg Tyr	Val Gln Gly Leu	Lys	Lys Lys Lys Val	Ile	Val Ile Pro
1400		1405		1410	
Val Gly	Ile Gly Pro His	Ala	Asn Leu Lys Gln	Ile	Arg Leu Ile

1415	1420	1425
Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val 1430 1435 1440		
Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys 1445 1450 1455		
Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro His Met 1460 1465 1470		
Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Arg Asn Ser Met Val Leu 1475 1480 1485		
Asp Val Ala Phe Val Leu Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala 1490 1495 1500		
Asp Phe Asn Arg Ser Lys Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg 1505 1510 1515		
Met Asp Val Gly Gln Asp Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr 1520 1525 1530		
Ser Tyr Met Val Thr Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser 1535 1540 1545		
Lys Gly Asp Ile Leu Gln Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly 1550 1555 1560		
Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp 1565 1570 1575		
His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn 1580 1585 1590		
Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys 1595 1600 1605		
Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro 1610 1615 1620		
Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala 1625 1630 1635		
Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro 1640 1645 1650		
Asp Leu Val Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile 1655 1660 1665		
Pro Thr Leu Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val 1670 1675 1680		
Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe 1685 1690 1695		
Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn 1700 1705 1710		

[0025]

	Ile Gly 1715	Pro Arg Leu Thr Gln 1720	Val Ser Val Leu Gln 1725	Tyr Gly Ser
	Ile Thr 1730	Thr Ile Asp Val Pro 1735	Trp Asn Val Val Pro 1740	Glu Lys Ala
	His Leu 1745	Leu Ser Leu Val Asp 1750	Val Met Gln Arg Glu 1755	Gly Gly Pro
	Ser Gln 1760	Ile Gly Asp Ala Leu 1765	Gly Phe Ala Val Arg 1770	Tyr Leu Thr
	Ser Glu 1775	Met His Gly Ala Arg 1780	Pro Gly Ala Ser Lys 1785	Ala Val Val
	Ile Leu 1790	Val Thr Asp Val Ser 1795	Val Asp Ser Val Asp 1800	Ala Ala Ala
	Asp Ala 1805	Ala Arg Ser Asn Arg 1810	Val Thr Val Phe Pro 1815	Ile Gly Ile
	Gly Asp 1820	Arg Tyr Asp Ala Ala 1825	Gln Leu Arg Ile Leu 1830	Ala Gly Pro
	Ala Gly 1835	Asp Ser Asn Val Val 1840	Lys Leu Gln Arg Ile 1845	Glu Asp Leu
[0026]	Pro Thr 1850	Met Val Thr Leu Gly 1855	Asn Ser Phe Leu His 1860	Lys Leu Cys
	Ser Gly 1865	Phe Val Arg Ile Cys 1870	Met Asp Glu Asp Gly 1875	Asn Glu Lys
	Arg Pro 1880	Gly Asp Val Trp Thr 1885	Leu Pro Asp Gln Cys 1890	His Thr Val
	Thr Cys 1895	Gln Pro Asp Gly Gln 1900	Thr Leu Leu Lys Ser 1905	His Arg Val
	Asn Cys 1910	Asp Arg Gly Leu Arg 1915	Pro Ser Cys Pro Asn 1920	Ser Gln Ser
	Pro Val 1925	Lys Val Glu Glu Thr 1930	Cys Gly Cys Arg Trp 1935	Thr Cys Pro
	Cys Val 1940	Cys Thr Gly Ser Ser 1945	Thr Arg His Ile Val 1950	Thr Phe Asp
	Gly Gln 1955	Asn Phe Lys Leu Thr 1960	Gly Ser Cys Ser Tyr 1965	Val Leu Phe
	Gln Asn 1970	Lys Glu Gln Asp Leu 1975	Glu Val Ile Leu His 1980	Asn Gly Ala
	Cys Ser 1985	Pro Gly Ala Arg Gln 1990	Gly Cys Met Lys Ser 1995	Ile Glu Val

	Lys	His	Ser	Ala	Leu	Ser	Val	Glu	Leu	His	Ser	Asp	Met	Glu	Val
	2000						2005					2010			
	Thr	Val	Asn	Gly	Arg	Leu	Val	Ser	Val	Pro	Tyr	Val	Gly	Gly	Asn
	2015						2020					2025			
	Met	Glu	Val	Asn	Val	Tyr	Gly	Ala	Ile	Met	His	Glu	Val	Arg	Phe
	2030						2035					2040			
	Asn	His	Leu	Gly	His	Ile	Phe	Thr	Phe	Thr	Pro	Gln	Asn	Asn	Glu
	2045						2050					2055			
	Phe	Gln	Leu	Gln	Leu	Ser	Pro	Lys	Thr	Phe	Ala	Ser	Lys	Thr	Tyr
	2060						2065					2070			
	Gly	Leu	Cys	Gly	Ile	Cys	Asp	Glu	Asn	Gly	Ala	Asn	Asp	Phe	Met
	2075						2080					2085			
	Leu	Arg	Asp	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	Asp	Trp	Lys	Thr	Leu	Val	Gln
	2090						2095					2100			
	Glu	Trp	Thr	Val	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Thr	Cys	Gln	Pro	Ile	Leu
	2105						2110					2115			
	Glu	Glu	Gln	Cys	Leu	Val	Pro	Asp	Ser	Ser	His	Cys	Gln	Val	Leu
	2120						2125					2130			
[0027]	Leu	Leu	Pro	Leu	Phe	Ala	Glu	Cys	His	Lys	Val	Leu	Ala	Pro	Ala
	2135						2140					2145			
	Thr	Phe	Tyr	Ala	Ile	Cys	Gln	Gln	Asp	Ser	Cys	His	Gln	Glu	Gln
	2150						2155					2160			
	Val	Cys	Glu	Val	Ile	Ala	Ser	Tyr	Ala	His	Leu	Cys	Arg	Thr	Asn
	2165						2170					2175			
	Gly	Val	Cys	Val	Asp	Trp	Arg	Thr	Pro	Asp	Phe	Cys	Ala	Met	Ser
	2180						2185					2190			
	Cys	Pro	Pro	Ser	Leu	Val	Tyr	Asn	His	Cys	Glu	His	Gly	Cys	Pro
	2195						2200					2205			
	Arg	His	Cys	Asp	Gly	Asn	Val	Ser	Ser	Cys	Gly	Asp	His	Pro	Ser
	2210						2215					2220			
	Glu	Gly	Cys	Phe	Cys	Pro	Pro	Asp	Lys	Val	Met	Leu	Glu	Gly	Ser
	2225						2230					2235			
	Cys	Val	Pro	Glu	Glu	Ala	Cys	Thr	Gln	Cys	Ile	Gly	Glu	Asp	Gly
	2240						2245					2250			
	Val	Gln	His	Gln	Phe	Leu	Glu	Ala	Trp	Val	Pro	Asp	His	Gln	Pro
	2255						2260					2265			
	Cys	Gln	Ile	Cys	Thr	Cys	Leu	Ser	Gly	Arg	Lys	Val	Asn	Cys	Thr
	2270						2275					2280			

[0028]

Thr Gln	Pro Cys	Pro Thr	Ala	Lys Ala	Pro Thr	Cys	Gly Leu	Cys	
2285			2290			2295			
Glu Val	Ala Arg	Leu Arg	Gln	Asn Ala	Asp Gln	Cys	Cys Pro	Glu	
2300			2305			2310			
Tyr Glu	Cys Val	Cys Asp	Pro	Val Ser	Cys Asp	Leu	Pro Pro	Val	
2315			2320			2325			
Pro His	Cys Glu	Arg Gly	Leu	Gln Pro	Thr Leu	Thr	Asn Pro	Gly	
2330			2335			2340			
Glu Cys	Arg Pro	Asn Phe	Thr	Cys Ala	Cys Arg	Lys	Glu Glu	Cys	
2345			2350			2355			
Lys Arg	Val Ser	Pro Pro	Ser	Cys Pro	Pro His	Arg	Leu Pro	Thr	
2360			2365			2370			
Leu Arg	Lys Thr	Gln Cys	Cys	Asp Glu	Tyr Glu	Cys	Ala Cys	Asn	
2375			2380			2385			
Cys Val	Asn Ser	Thr Val	Ser	Cys Pro	Leu Gly	Tyr	Leu Ala	Ser	
2390			2395			2400			
Thr Ala	Thr Asn	Asp Cys	Gly	Cys Thr	Thr Thr	Thr	Cys Leu	Pro	
2405			2410			2415			
Asp Lys	Val Cys	Val His	Arg	Ser Thr	Ile Tyr	Pro	Val Gly	Gln	
2420			2425			2430			
Phe Trp	Glu Glu	Gly Cys	Asp	Val Cys	Thr Cys	Thr	Asp Met	Glu	
2435			2440			2445			
Asp Ala	Val Met	Gly Leu	Arg	Val Ala	Gln Cys	Ser	Gln Lys	Pro	
2450			2455			2460			
Cys Glu	Asp Ser	Cys Arg	Ser	Gly Phe	Thr Tyr	Val	Leu His	Glu	
2465			2470			2475			
Gly Glu	Cys Cys	Gly Arg	Cys	Leu Pro	Ser Ala	Cys	Glu Val	Val	
2480			2485			2490			
Thr Gly	Ser Pro	Arg Gly	Asp	Ser Gln	Ser Ser	Trp	Lys Ser	Val	
2495			2500			2505			
Gly Ser	Gln Trp	Ala Ser	Pro	Glu Asn	Pro Cys	Leu	Ile Asn	Glu	
2510			2515			2520			
Cys Val	Arg Val	Lys Glu	Glu	Val Phe	Ile Gln	Gln	Arg Asn	Val	
2525			2530			2535			
Ser Cys	Pro Gln	Leu Glu	Val	Pro Val	Cys Pro	Ser	Gly Phe	Gln	
2540			2545			2550			
Leu Ser	Cys Lys	Thr Ser	Ala	Cys Cys	Pro Ser	Cys	Arg Cys	Glu	
2555			2560			2565			
Arg Met	Glu Ala	Cys Met	Leu	Asn Gly	Thr Val	Ile	Gly Pro	Gly	

[0029]

2570	2575	2580
Lys Thr Val Met Ile Asp	Val Cys Thr Thr Cys Arg	Cys Met Val
2585	2590	2595
Gln Val Gly Val Ile Ser	Gly Phe Lys Leu Glu Cys	Arg Lys Thr
2600	2605	2610
Thr Cys Asn Pro Cys Pro	Leu Gly Tyr Lys Glu Glu	Asn Asn Thr
2615	2620	2625
Gly Glu Cys Cys Gly Arg	Cys Leu Pro Thr Ala Cys	Thr Ile Gln
2630	2635	2640
Leu Arg Gly Gly Gln Ile	Met Thr Leu Lys Arg Asp	Glu Thr Leu
2645	2650	2655
Gln Asp Gly Cys Asp Thr	His Phe Cys Lys Val Asn	Glu Arg Gly
2660	2665	2670
Glu Tyr Phe Trp Glu Lys	Arg Val Thr Gly Cys Pro	Pro Phe Asp
2675	2680	2685
Glu His Lys Cys Leu Ala	Glu Gly Gly Lys Ile Met	Lys Ile Pro
2690	2695	2700
Gly Thr Cys Cys Asp Thr	Cys Glu Glu Pro Glu Cys	Asn Asp Ile
2705	2710	2715
Thr Ala Arg Leu Gln Tyr	Val Lys Val Gly Ser Cys	Lys Ser Glu
2720	2725	2730
Val Glu Val Asp Ile His	Tyr Cys Gln Gly Lys Cys	Ala Ser Lys
2735	2740	2745
Ala Met Tyr Ser Ile Asp	Ile Asn Asp Val Gln Asp	Gln Cys Ser
2750	2755	2760
Cys Cys Ser Pro Thr Arg	Thr Glu Pro Met Gln Val	Ala Leu His
2765	2770	2775
Cys Thr Asn Gly Ser Val	Val Tyr His Glu Val Leu	Asn Ala Met
2780	2785	2790
Glu Cys Lys Cys Ser Pro	Arg Lys Cys Ser Lys	
2795	2800	

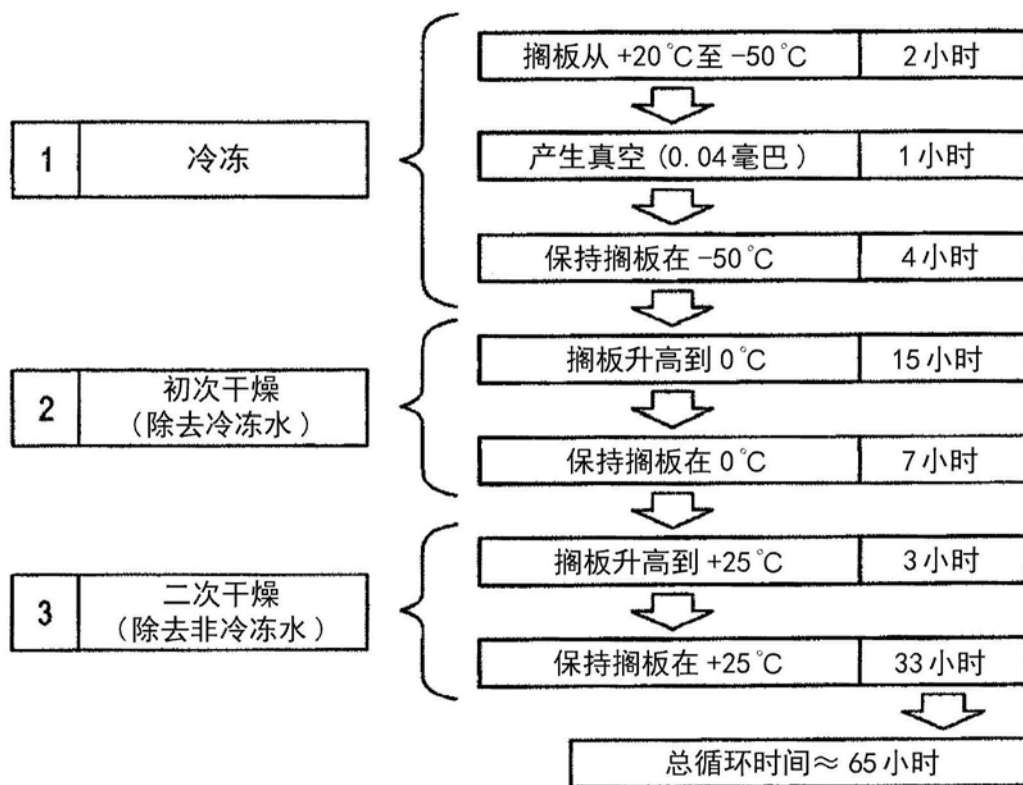


图1

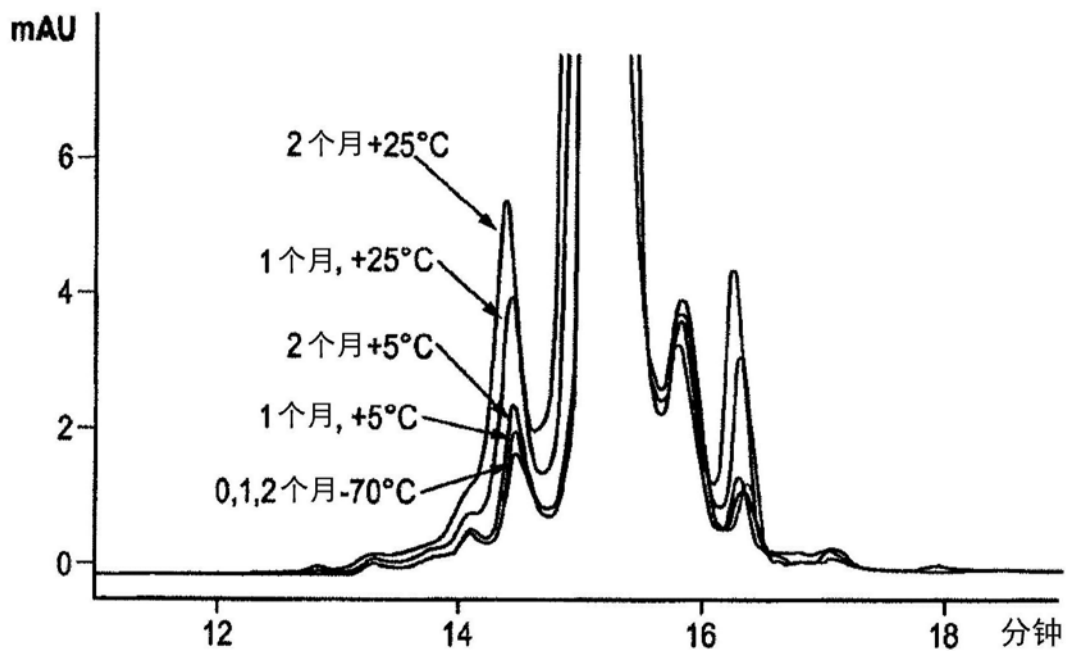


图2A

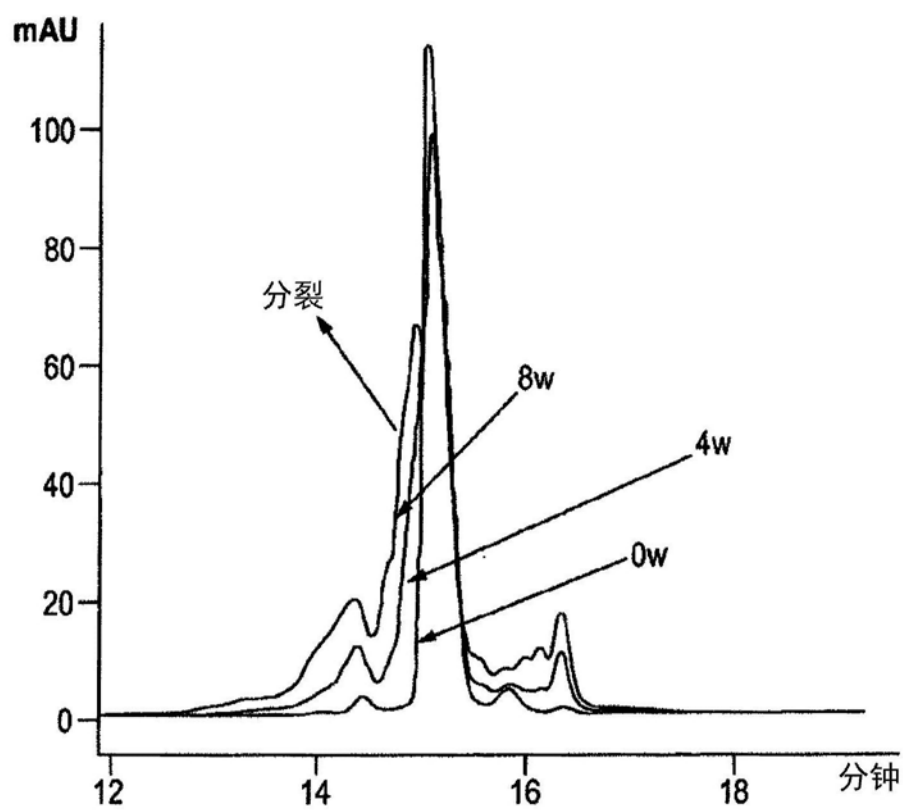


图2B

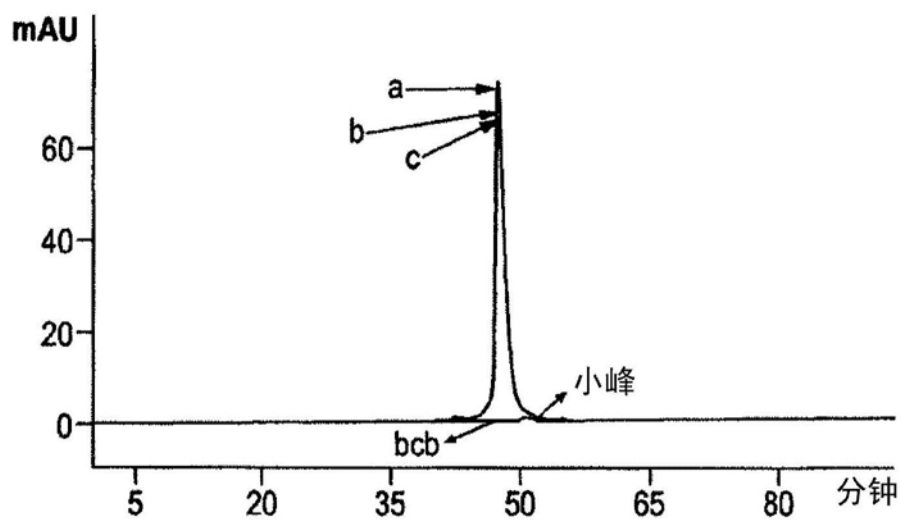


图3A

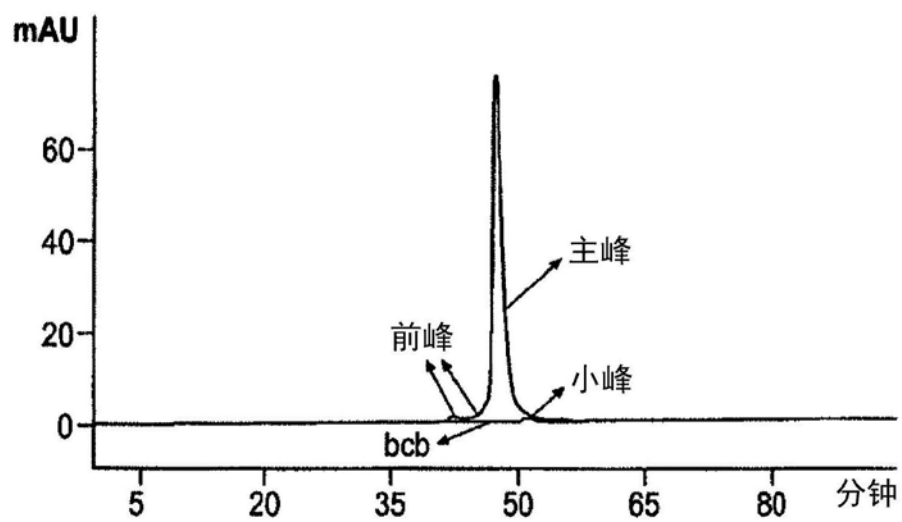


图3B

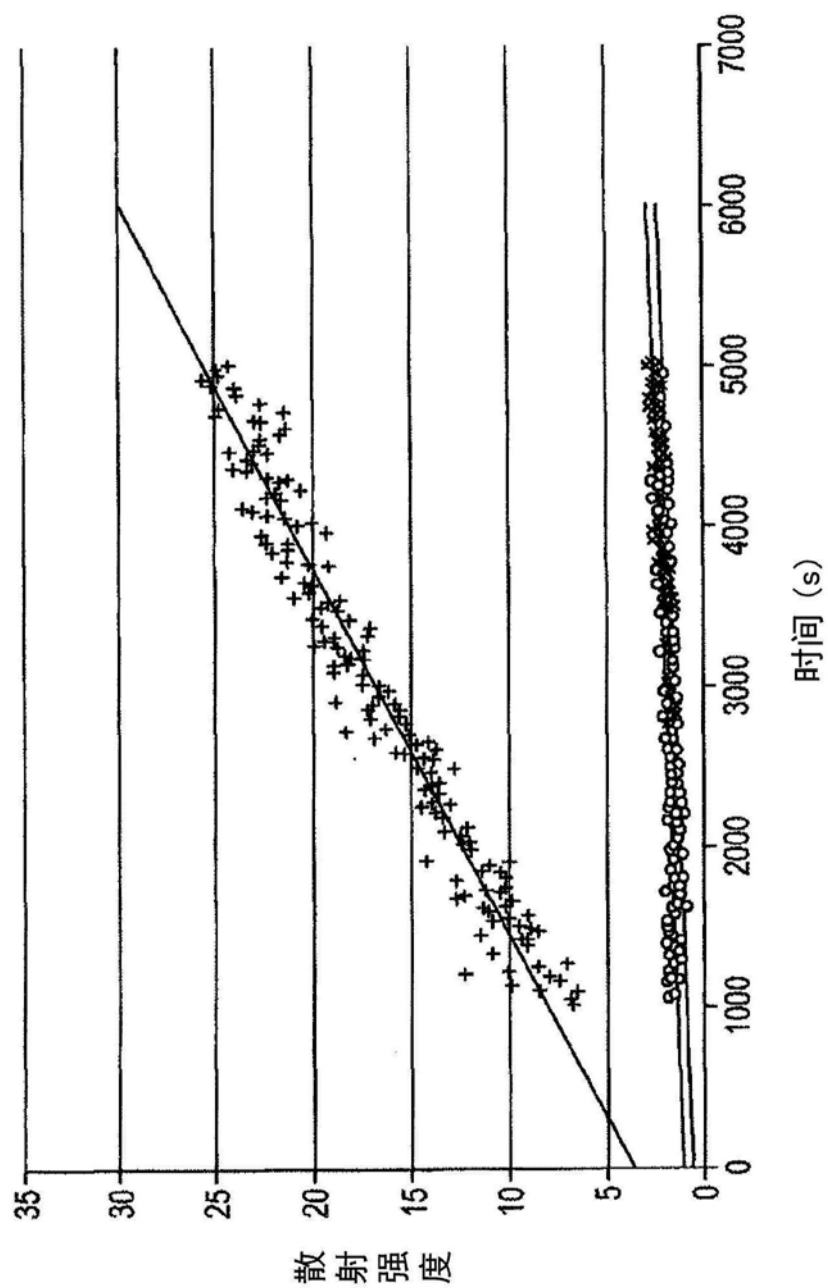


图4A

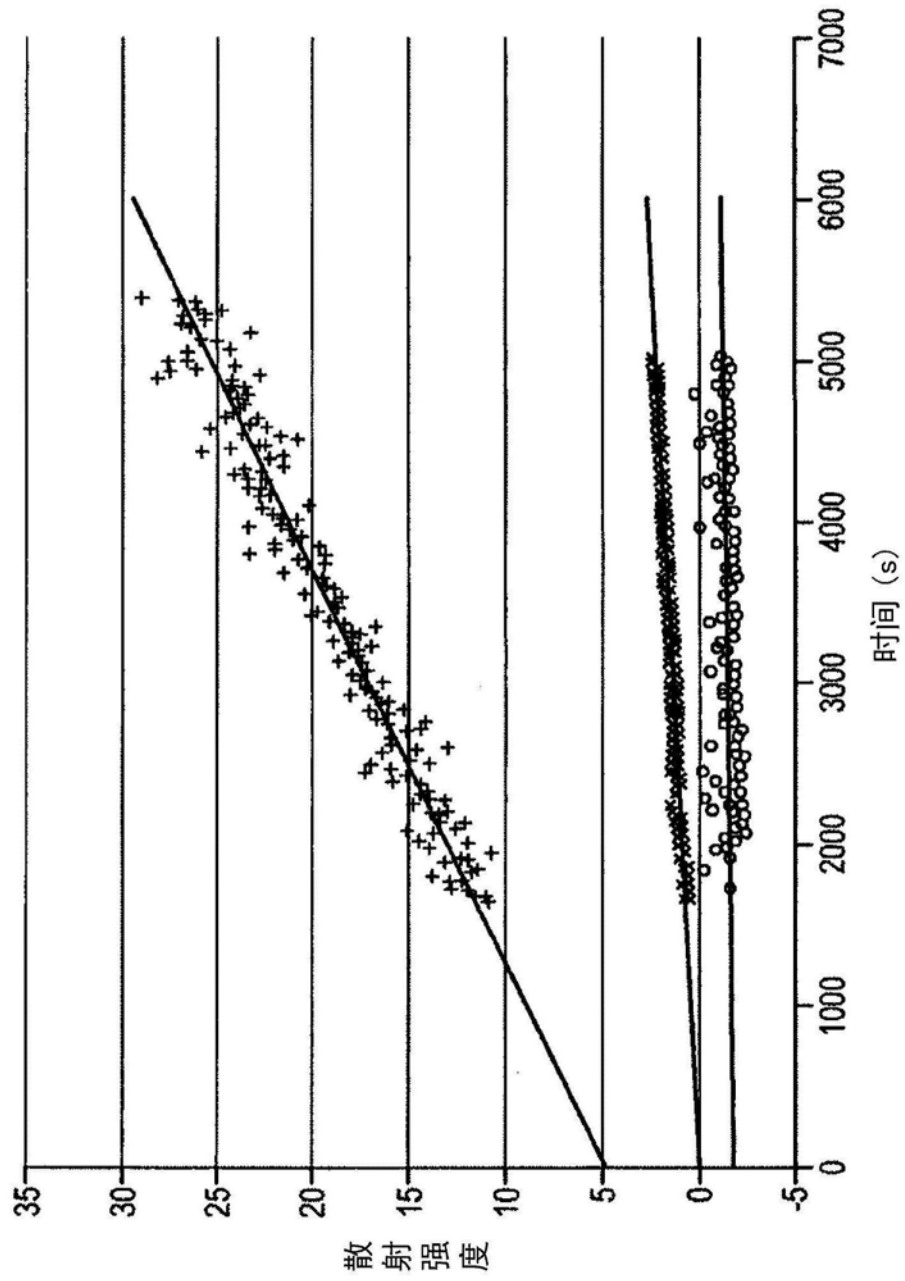


图4B

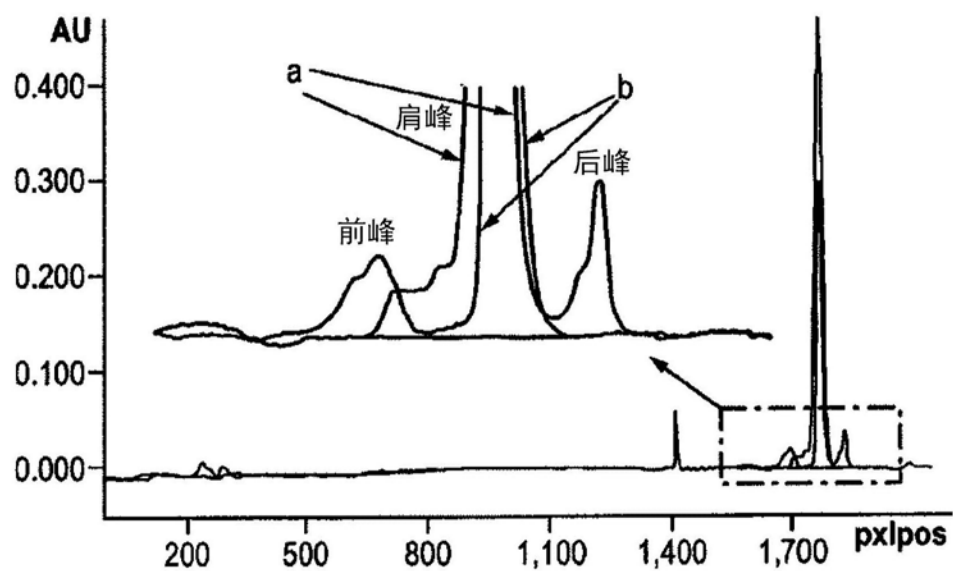


图5

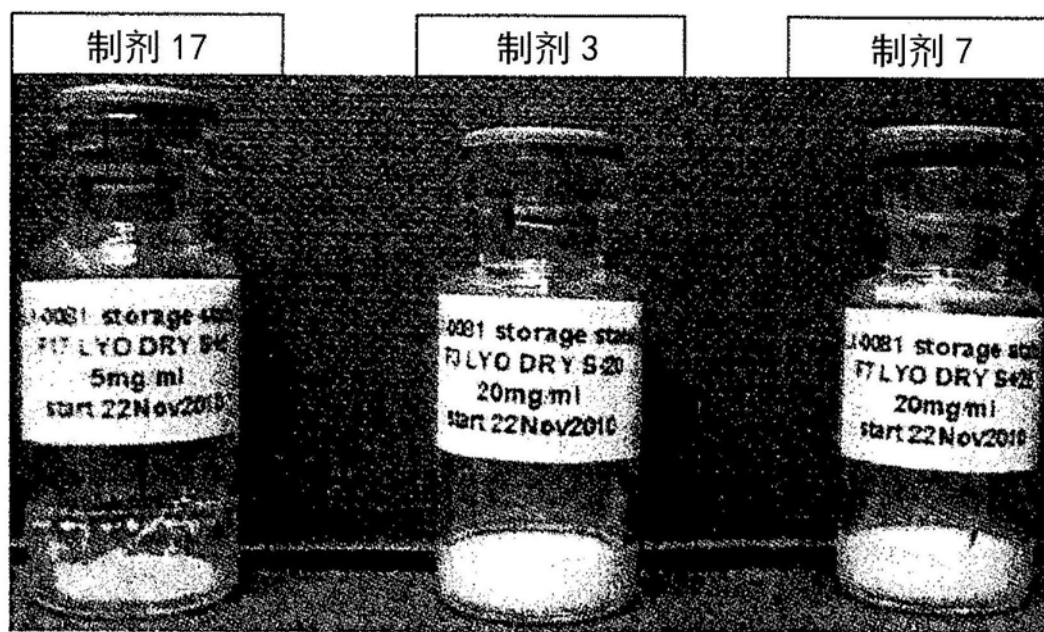


图6A

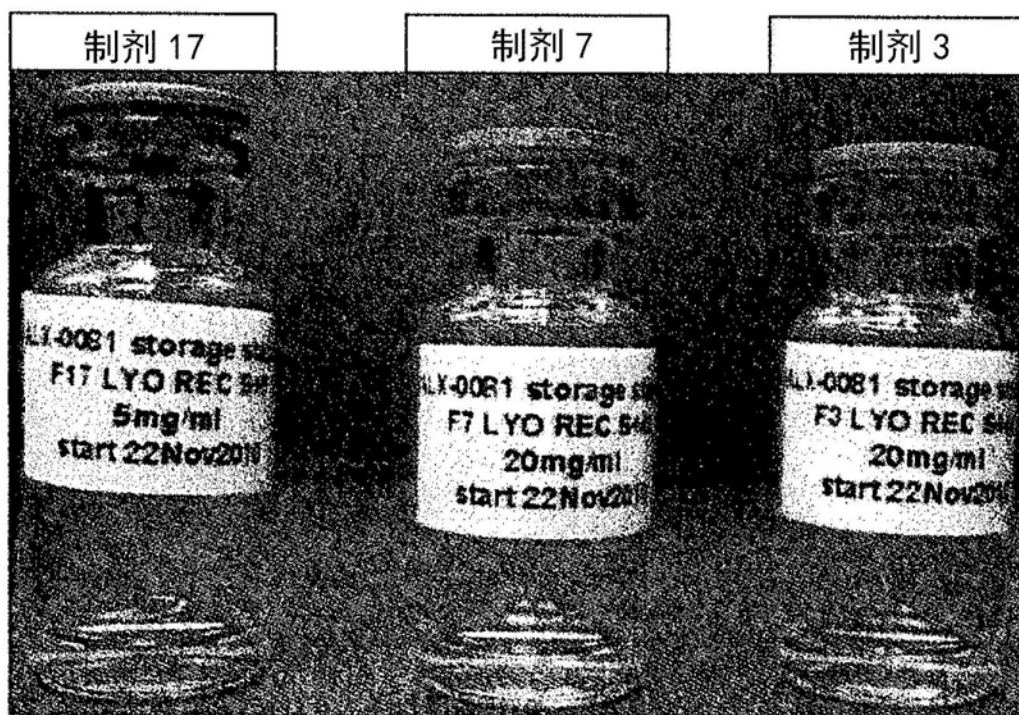


图6B

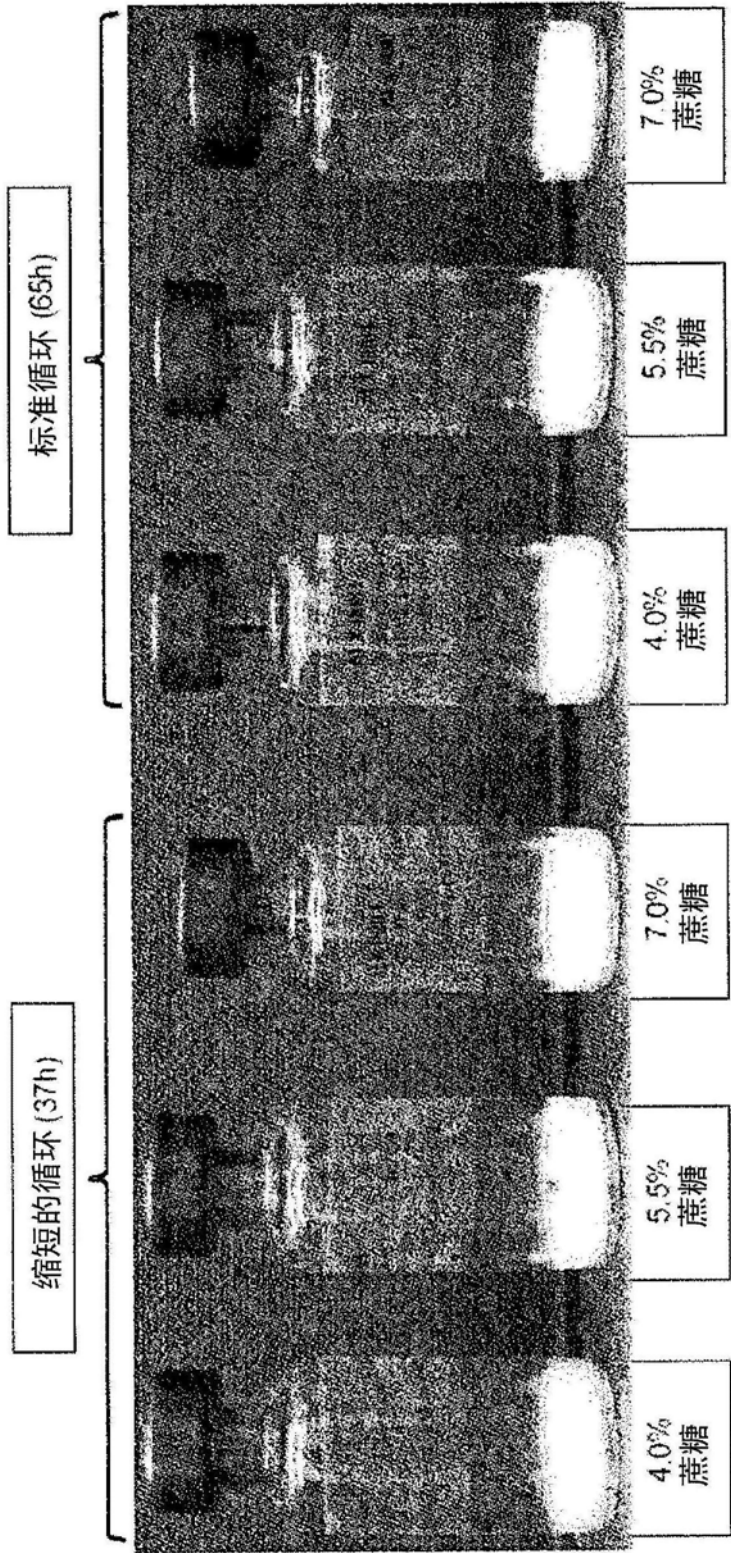


图7



图8A

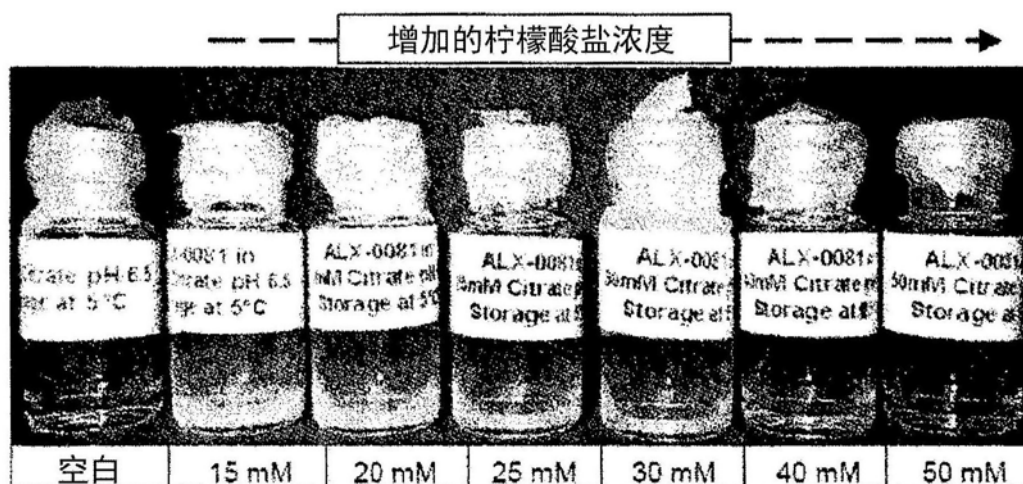


图8B

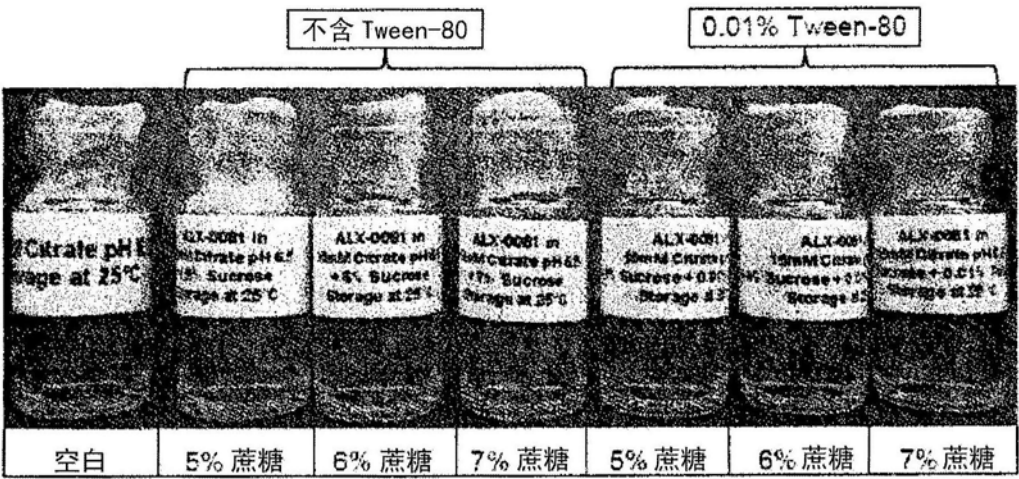


图9A

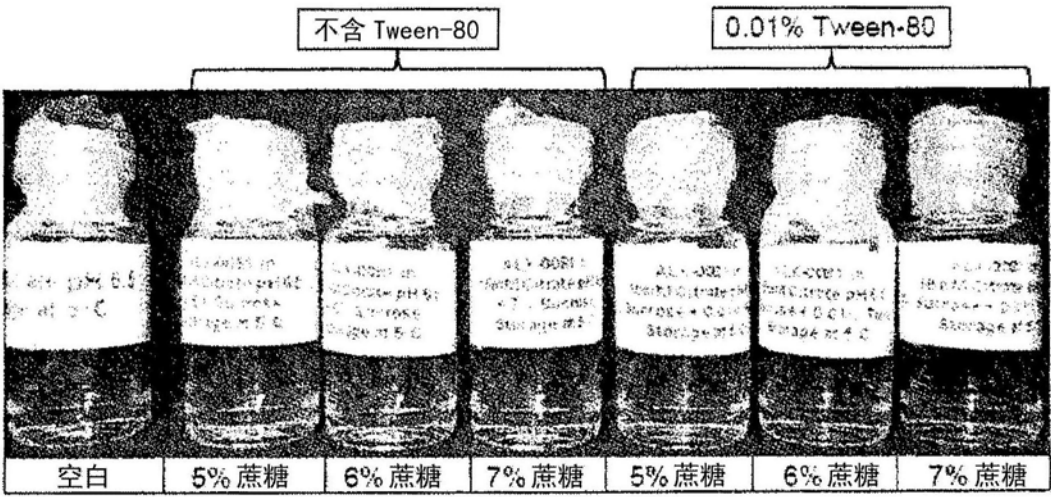


图9B

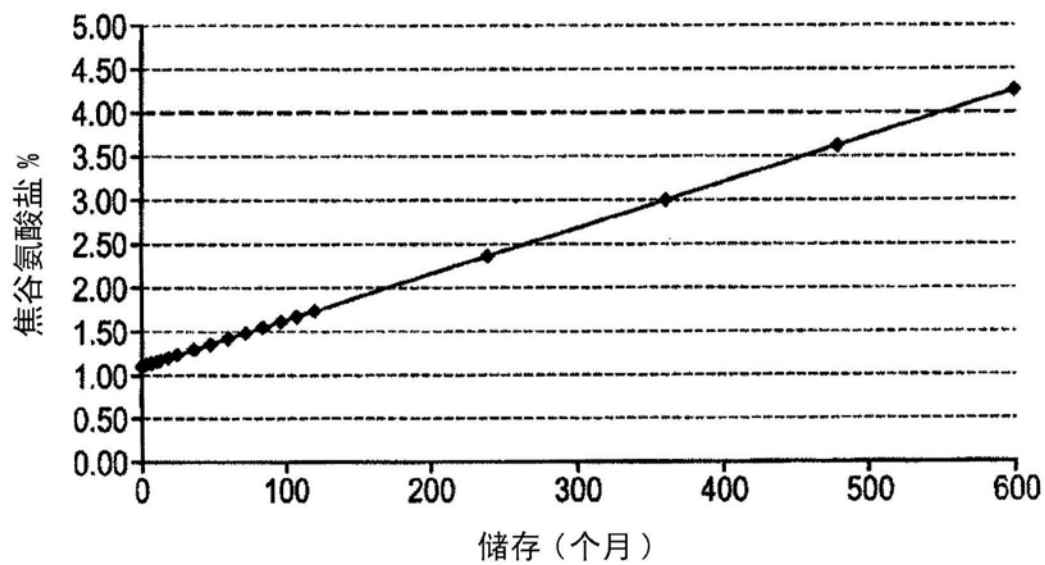


图10

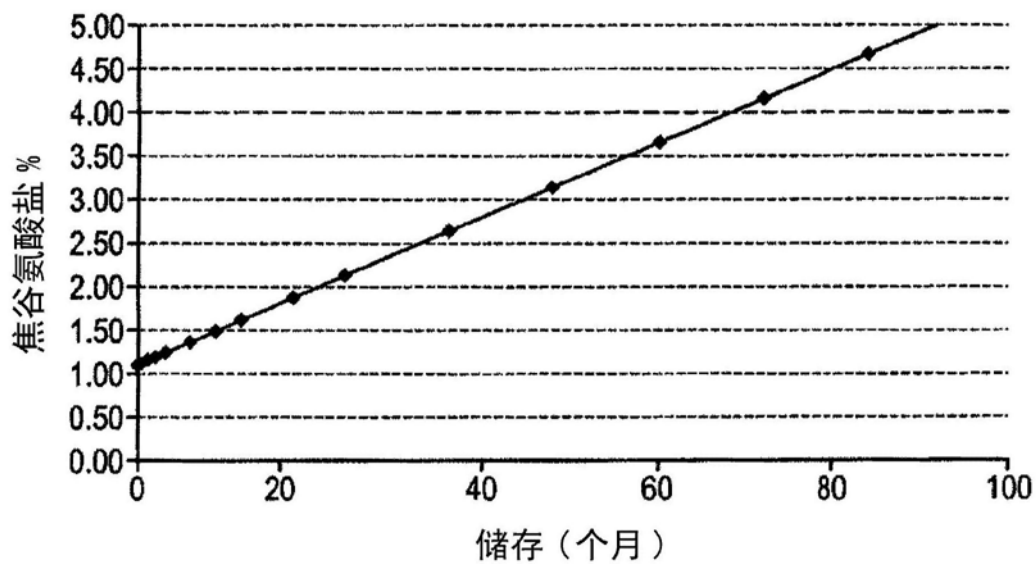


图11