



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I593421 B

(45) 公告日：中華民國 106 (2017) 年 08 月 01 日

(21) 申請案號：103141771

(22) 申請日：中華民國 98 (2009) 年 10 月 21 日

(51) Int. Cl. : A61K38/16 (2006.01)

A61K9/19 (2006.01)

C12N15/11 (2006.01)

(30) 優先權：2008/10/21 美國

61/107,273

(71) 申請人：巴克斯歐塔公司 (美國) BAXALTA INCORPORATED (US)

美國

巴克斯歐塔有限公司 (瑞士) BAXALTA GMBH (CH)

瑞士

(72) 發明人：史耐克 克特 SCHNECKER, KURT (AT)；海德衛傑 伊娃 HAIDWEGER, EVA

(AT)；杜瑞柴克 彼得 TURECEK, PETER (AT)

(74) 代理人：閻啟泰；林景郁

(56) 參考文獻：

EP 1522312B1

US 6005077

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：3 共 77 頁

(54) 名稱

凍乾的重組 VWF 調配物

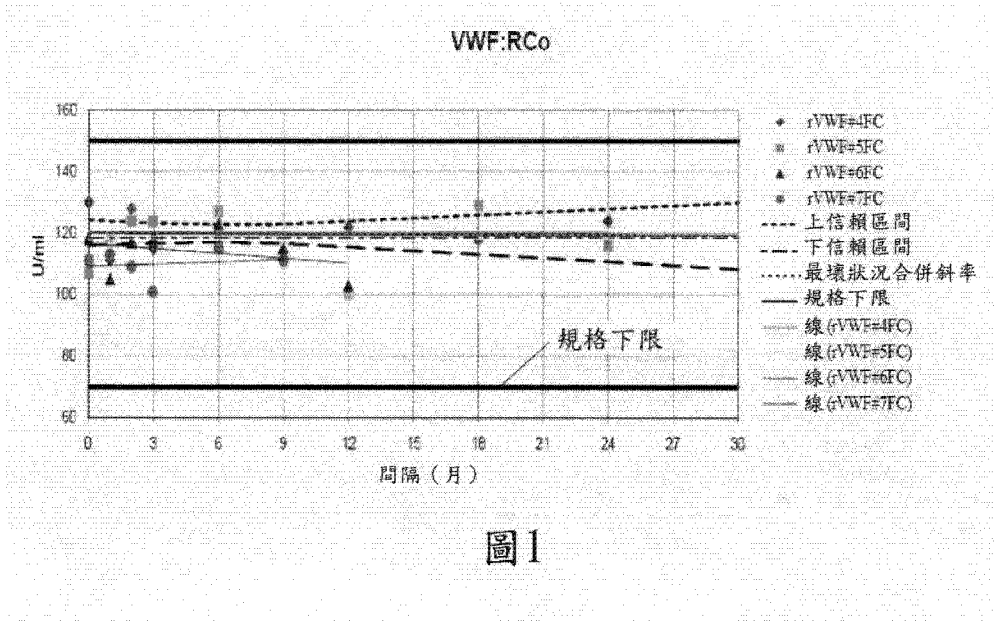
LYOPHILIZED RECOMBINANT VWF FORMULATIONS

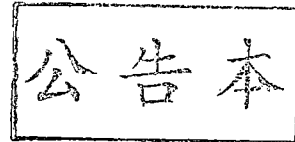
(57) 摘要

本發明提供凍乾的重組馮威里氏因子(recombinant von-Willebrand Factor；rVWF)之長期穩定醫藥調配物以及製造及投予該等調配物之方法。

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

指定代表圖：





## 發明摘要

※ 申請案號：103147716 (由 9813554 分割)

※ 申請日：98.10.21

※ IPC 分類：A61K 38116 (2006.01)

A61K 9119 (2006.01)

C12N 15111 (2006.01)

## 【發明名稱】(中文/英文)

凍乾的重組 VWF 調配物

LYOPHILIZED RECOMBINANT VWF FORMULATIONS

## 【中文】

本發明提供凍乾的重組馮威里氏因子 (recombinant von-Willebrand Factor ; rVWF) 之長期穩定醫藥調配物以及製造及投予該等調配物之方法。

## 【英文】

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

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第（ 1 ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

無

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：

無

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

凍乾的重組 VWF 調配物

LYOPHILIZED RECOMBINANT VWF FORMULATIONS

## 【技術領域】

一般而言，本發明係關於凍乾的重組 VWF 調配物及製造包含重組 VWF 之凍乾組成物的方法。

## 【先前技術】

馮威里氏因子 (Von Willebrand factor, VWF) 為在血漿中以大小介於約 500 至 20,000 kD 範圍內之一系列多聚體形式進行循環的糖蛋白。VWF 之多聚體形式由藉由二硫鍵連接在一起之 250 kD 多肽子單元構成。VWF 介導血小板與受損血管壁之內皮下組織的初期黏著。僅較大多聚體展現止血活性。假定內皮細胞分泌 VWF 之較大多聚形式，且具有低分子量之彼等 VWF 形式 (低分子量 VWF) 由蛋白質水解分裂產生。具有較大分子質量的多聚體儲存在內皮細胞之魏貝爾-帕拉德體 (Weibel-Pallade body) 中，且在受刺激之後即釋放。

VWF 係由內皮細胞及巨核細胞合成，呈基本上由重複結構域組成之前原 VWF (prepro-VWF) 形式。在信號肽分裂之後，原 VWF 即在其 C 末端區域藉由二硫鍵進行二聚。該等二聚體充當多聚作用之原體，多聚作用受自由末端之間之二硫鍵支配。組合成多聚體之後，蛋白質水解移除肽原序列 (Leyte 等人, Biochem. J. 274 (1991), 257-261)。

預計可得自 VWF 之選殖 cDNA 的主要轉譯產物為 2813 個殘基的前驅

體多肽（前原 VWF）。前原 VWF 由 22 個胺基酸信號肽及 741 個胺基酸肽原組成，而成熟 VWF 包含 2050 個胺基酸（Ruggeri Z.A.,及 Ware, J., FASEB J., 308-316 (1993)）。

VWF 缺陷導致馮威里氏病（VWD），該疾病特性在於在某種程度上已經斷定之出血性表型。3 型 VWD 為最嚴重之形式，其中 VWF 完全失去，而 1 型 VWD 與 VWF 之定量損失有關且其表型可能極其輕微。2 型 VWD 與 VWF 之定性缺陷有關，且可能與 3 型 VWD 同樣嚴重。2 型 VWD 具有許多亞型，其中有些與高分子量多聚體之損失或減少有關。2a 型馮威里氏症候群（VWS-2A）之特性在於中間及大型多聚體二者之損失。VWS-2B 之特性在於分子量最高之多聚體的損失。與 VWF 相關之其他疾病及病症在此項技術中眾所周知。

美國專利第 6,531,577 號、第 7,166,709 號及歐洲專利申請案第 04380188.5 號描述血漿來源之 VWF 調配物。然而，血漿來源之 VWF 除了具有數量及純度問題之外，亦存在血液攜帶病原體（例如病毒及變異型克亞二氏病（Creutzfeldt-Jakob disease；vCJD））之風險。此外，已知 VWF 在應力條件下會形成聚集體。

因而，此項技術中需要開發一種包含重組 VWF 之穩定醫藥調配物。

### **【發明內容】**

本發明提供適用於凍乾重組 VWF 以產生高度穩定之醫藥組成物的調配物。該穩定醫藥組成物適用作治療劑用於治療罹患可受益於投予重組 VWF 之病症或病狀的個人。

在一個具體實例中，提供重組馮威里氏因子（rVWF）之穩定凍乾醫藥

調配物，其包含：(a) rVWF；(b) 一或多種緩衝劑；(c) 一或多種胺基酸；(d) 一或多種穩定劑；及 (e) 一或多種界面活性劑；該 rVWF 包含選自由下列組成之群的多肽：a) 在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；b) a) 之生物學活性類似物、片段或變異體；c) 由在 SEQ ID NO: 1 中所列出之多核苷酸編碼的多肽；d) c) 之生物學活性類似物、片段或變異體；及 e) 由在中度嚴格雜交條件下與在 SEQ ID NO: 1 中所列出之多核苷酸雜交之多核苷酸編碼的多肽；該緩衝液包含在約 0.1 mM 至約 500 mM 範圍內的 pH 緩衝劑，且該 pH 值在約 2.0 至約 12.0 範圍內；該胺基酸之濃度為約 1 至約 500 mM；該穩定劑之濃度為約 0.1 至約 1000 mM；且該界面活性劑之濃度為約 0.01 g/L 至約 0.5 g/L。

在另一具體實例中，rVWF 包含在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列。在另一具體實例中，緩衝劑係選自由檸檬酸鹽、甘胺酸、組胺酸、HEPES、Tris 及此等緩衝劑之組合組成之群。在又一具體實例中，緩衝劑為檸檬酸鹽。在許多具體實例中，pH 值在約 6.0 至約 8.0、約 6.5 至約 7.5 範圍內或為約 7.3。在另一具體實例中，pH 值為約 7.3。

在另一具體實例中，上述胺基酸係選自由甘胺酸、組胺酸、脯胺酸、絲胺酸、丙胺酸及精胺酸組成之群。在另一具體實例中，胺基酸之濃度在約 0.5 mM 至約 300 mM 範圍內。在另一具體實例中，胺基酸為約 15 mM 濃度之甘胺酸。

在本發明之一個具體實例中，rVWF 包含在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；其中緩衝劑為檸檬酸鹽，且 pH 值為約 7.3；且其中胺基酸為約 15 mM 濃度之甘胺酸。

在本發明之另一具體實例中，上述一或多種穩定劑係選自由甘露醇、乳糖、山梨醇、木糖醇、蔗糖、海藻糖、甘露糖、麥芽糖、乳糖、葡萄糖、棉子糖、纖維二糖、龍膽二糖、異麥芽糖、阿拉伯糖 (arabinose)、葡糖胺、果糖及此等穩定劑之組合組成之群。在一個具體實例中，穩定劑為約 10 g/L 濃度之海藻糖及約 20 g/L 濃度之甘露醇。

在本發明之又一具體實例中，上述界面活性劑係選自由毛地黃皂苷、Triton X-100、Triton X-114、TWEEN-20、TWEEN-80 及此等界面活性劑之組合組成之群。在另一具體實例中，界面活性劑為約 0.01 g/L 之 TWEEN-80。

在本發明之另一具體實例中，rVWF 包含在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；其中緩衝劑為約 15 mM 濃度、約 pH 7.3 之檸檬酸鹽；其中胺基酸為約 15 mM 濃度之甘胺酸；其中穩定劑為約 10 g/L 濃度之海藻糖及約 20 g/L 濃度之甘露醇；且其中界面活性劑為約 0.1 g/L 之 TWEEN-80。

### 【圖式簡單說明】

圖 1 展示用於評估穩定性之批次（在  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$  儲存）的合併 VWF:RC<sub>0</sub> 活性之 ANCOVA 分析。

圖 2 展示在  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$  儲存之 rVWF FDP 中殘餘水分增加。

圖 3 展示在  $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  儲存之 rVWF FDP 中殘餘水分增加。

### 【實施方式】

#### 術語定義

除非另外定義，否則本文中所使用之所有技術及科學術語均與一般熟習本發明所屬技術領域者通常所理解之含義相同。以下參考文獻向熟習此項技術者提供用於本發明之許多術語的一般定義：Singleton, 等人，



DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (第 2 版, 1994); THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker 編, 1988); THE GLOSSARY OF GENETICS, 第 5 版, R. Rieger, 等人 (編), Springer Verlag (1991); 及 Hale 及 Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991)。

本文中所引用之各公開案、專利申請案、專利及其他參考文獻係以不與本發明不一致之程度以全文引用之方式併入本文中。

在此應注意，除非本內容中另外明確規定，否則如本說明書及隨附申請專利範圍中所使用之單數形式「一」及「該」包括複數個指代物。

如本文中所使用，除非另外規定，否則以下術語具有歸屬於其之含義：

術語「包含」對於肽化合物意謂化合物可能在指定序列之胺基及羧基末端中之一或二者處包括其他胺基酸。固然，此等其他胺基酸不應顯著干擾該化合物之活性。對於本發明之組成物，術語「包含」意謂組成物可能包括其他組份。此等其他組份不應顯著干擾該組成物之活性。

術語「藥理活性」意謂如此描述之物質經測定具有可影響醫學參數（例如（但不限於）血壓、血球計數、膽固醇含量）或疾病病況（例如（但不限於）癌症、自體免疫性病症）的活性。

如本文中所使用，術語「表現」意謂允許或導致基因或 DNA 序列中之資訊顯現，例如藉由活化涉及相應基因或 DNA 序列之轉錄及轉譯的細胞功能而產生蛋白質。DNA 序列在細胞中表現或由細胞表現，以便形成諸如蛋白質之「表現產物」。表現產物自身（例如所得蛋白質）亦可說成是「經表現」。表現產物可特性化為細胞內、細胞外或分泌產物。術語「細胞內」意

謂在細胞內部。術語「細胞外」意謂在細胞外部，諸如跨膜蛋白。若物質在很大程度上出現在細胞外部、自細胞上某處或在細胞內部，則其係由細胞「分泌」。

如本文中所使用，「多肽」係指由胺基酸殘基、結構變異體、相關天然存在之結構變異體及其非天然存在之合成類似物經由肽鍵連接所構成的聚合物。合成多肽係藉由例如使用自動化多肽合成器製備。術語「蛋白質」通常係指大多肽。術語「肽」通常係指短多肽。

如本文中所使用，多肽之「片段」意欲指小於全長多肽或蛋白質表現產物的任何多肽或蛋白質部分。

如本文中所使用，「類似物」係指在結構上實質上類似且具有相同生物活性，但可能對整個分子或其片段具有不同程度之活性的任何兩種或兩種以上多肽。類似物因一或多個突變（涉及一或多種胺基酸對於其他胺基酸之取代、缺失、插入及/或添加）而在其胺基酸序列組成方面不同。根據被置換之胺基酸與用於進行置換之胺基酸的物理化學或功能相關性，取代可為保守性或非保守性。

如本文中所使用，「變異體」係指經修飾以包含通常並非分子之一部分的其他化學部分的多肽、蛋白質或其類似物。該等部分可調節分子之溶解度、吸收、生物半衰期，等等。或者，該等部分可降低分子毒性，並消除或削弱該分子之任何不想要的副作用，等等。能夠介導該等作用之部分揭示於 Remington's Pharmaceutical Sciences (1980)中。將該等部分偶合至分子的程序在此項技術中眾所周知。例如（但不限於），在一個態樣中，變異體為具有可賦予蛋白質更長活體內半衰期之化學修飾的凝血因子。在多個態樣

中，多肽係藉由糖基化、聚乙二醇化及/或唾液酸化 (polysialylation) 來修飾。

### 重組 VWF

前原 VWF 之多核苷酸及胺基酸序列分別在 SEQ ID NO:1 及 SEQ ID NO:2 中列出，且分別可以基因庫 (GenBank) 登記號 NM\_000552 及 NP\_000543 獲得。對應成熟 VWF 蛋白質之胺基酸序列在 SEQ ID NO: 3 中列出 (對應於全長前原 VWF 胺基酸序列之胺基酸 764-2813)。

適用 rVWF 之一種形式至少具有在活體內穩定 (例如結合) 至少一種 VIII 因子 (FVIII) 分子且視情況具有藥理學上可接受之糖基化模式的性質。其特定實例包括無 A2 結構域因而可抗蛋白質水解之 VWF (Lankhof 等人, *Thromb. Haemost.* 77: 1008-1013, 1997); 及自 Val 449 至 Asn 730 之 VWF 片段, 包括糖蛋白 1b 結合域以及膠原蛋白及肝素之結合位點 (Pietu 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 1339-1347, 1989)。在一個態樣中, 測定 VWF 穩定至少一種 FVIII 分子之能力係在缺乏 VWF 之哺乳動物中根據此項技術現狀中已知的方法進行。

本發明之 rVWF 係藉由此項技術中已知之任何方法產生。一個特定實例揭示於在 1986 年 10 月 23 日公開之 WO86/06096 及 1990 年 7 月 23 日申請之美國專利申請案第 07/559,509 號中, 該等文獻之關於產生重組 VWF 的方法係以引用之方式併入本文中。因而, 在此項技術中已知進行下列之方法:

- (i) 藉由基因工程 (例如經由 RNA 逆轉錄及/或 DNA 擴增) 產生重組 DNA;
- (ii) 藉由轉染 (例如經由電穿孔或微量注射) 向原核或真核細胞中引入重組 DNA;
- (iii) 培養轉型細胞, 例如以連續或間歇方式;
- (iv) 表現 VWF, 例如組成性表現或在誘導之後表現; 及
- (v) 分離 VWF, 例如自培養基或藉

由收集轉型細胞，以便 (vi) 獲得純化 rVWF，例如經由陰離子交換層析或親和層析。在一個態樣中，重組 VWF 係在轉型宿主細胞中使用此項技術眾所周知的重組 DNA 技術製造。例如，可使用適合限制酶自 DNA 切除編碼多肽之序列。或者，在另一態樣中，DNA 分子係使用化學合成技術（諸如胺基磷酸酯法）合成。又，在另一態樣中，使用此等技術之組合。

本發明亦提供在適當宿主中編碼本發明多肽之載體。該載體包含編碼多肽之多核苷酸，其可操作地與適當表現控制序列連接。在多核苷酸插入載體中之前或之後實現此可操作連接的方法眾所周知。表現控制序列包括啓動子、活化子、強化子、操縱子、核糖體結合位點、起始信號、中止信號、加帽信號 (cap signal)、聚腺苷酸化信號，及涉及轉錄或轉譯控制的其他信號。所得載體（其中具有多核苷酸）係用於使適當宿主轉型。此轉型可使用此項技術眾所周知的方法進行。

許多可利用且眾所周知的宿主細胞中任一者均可用於實施本發明。特定宿主之選擇取決於此項技術中已公認的許多因素，包括例如與所選表現載體的相容性、DNA 分子所編碼之肽的毒性、轉型率、肽之易回收性、表現特性、生物安全性及成本。在理解並非所有宿主細胞對於表現特定 DNA 序列均具有相等效果的情況下，必須尋得此等因子之平衡。在此等一般準則內，適用微生物宿主細胞包括（但不限於）細菌、酵母及其他真菌、昆蟲、植物、培養中之哺乳動物（包括人類）細胞，或此項技術中已知之其他宿主。

轉型宿主細胞在習知醱酵條件下培養以便表現所要化合物。該等醱酵條件在此項技術中眾所周知。最終，藉由此項技術中眾所周知的方法自培

養基或宿主細胞自身純化多肽。

視用於表現本發明化合物之宿主細胞而定，糖（寡醣）基視情況與蛋白質中已知的待糖基化位點連接。一般而言，O 連接之寡醣與絲胺酸（Ser）或蘇胺酸（Thr）殘基連接，而當天冬醯胺酸（Asn）殘基為序列 Asn-X-Ser/Thr（其中 X 可為除脯胺酸以外的任何胺基酸）之一部分時，N 連接之寡醣與天冬醯胺酸（Asn）殘基連接。X 較佳為 19 個天然存在之胺基酸（不計脯胺酸）之一。N 連接寡醣及 O 連接寡醣之結構以及在各類型中發現之糖殘基均不同。通常在 N 連接寡醣及 O 連接寡醣上發現之一種糖為 N-乙醯基神經胺酸（稱為唾液酸）。唾液酸通常為 N 連接寡醣及 O 連接寡醣之末端殘基，且在一個態樣中，由於其負電荷而賦予糖基化化合物酸性。該（等）位點可併入本發明化合物之連接子中，且較佳在重組產生多肽化合物期間藉由細胞進行糖基化（例如，在哺乳動物細胞中，諸如 CHO、BHK、COS）。在其他態樣中，該等位點係藉由此項技術中已知的合成或半合成程序而糖基化。

或者，藉由合成方法使用例如固相合成技術製造化合物。適合之技術在此項技術中眾所周知，及包括下列文獻中所描述之彼等：Merrifield (1973), *Chem. Polypeptides*, 第 335-61 頁 (Katsoyannis 及 Panayotis 編); Merrifield (1963), *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149; Davis 等人 (1985), *Biochem. Intl.* 10: 394-414; Stewart 及 Young (1969), *Solid Phase Peptide Synthesis*; 美國專利第 3,941,763 號; Finn 等人 (1976), *The Proteins* (第 3 版) 2: 105-253; 及 Erickson 等人 (1976), *The Proteins* (第 3 版) 2: 257-527。固相合成為製造個別肽的較佳技術，此係由於其為製造小肽的最成本有效之方法。

## VWF 之片段、變異體及類似物

製備多肽片段、變異體或類似物之方法在此項技術中眾所周知。

多肽片段係使用（但不限於）酶分裂（例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶）以及使用重組法製備，以產生具有特定胺基酸序列之多肽片段。可產生包含具有特定活性之蛋白質區域（諸如多聚域）或此項技術中已知之任何其他可識別之 VWF 域的多肽片段。

製造多肽類似物之方法亦為眾所周知。多肽之胺基酸序列類似物可為取代、插入、添加或缺失類似物。缺失類似物（包括多肽片段）缺乏天然蛋白質之一或多個殘基，該等殘基對於功能或免疫原活性並非必需的。插入類似物包括在多肽中之非末端點添加例如胺基酸。此類似物可包括例如（但不限於）插入免疫活性抗原決定基或僅插入單個殘基。添加類似物（包括多肽片段）包括在蛋白質之一或兩個末端添加一或多個胺基酸，且包括例如融合蛋白質。亦涵蓋上述類似物之組合。

取代類似物通常在蛋白質內之一或多個位點用一種野生型胺基酸交換另一種，且可經設計以便在未完全損失其他功能或性質的情況下調節多肽之一或多種性質。在一個態樣中，取代為保守性取代。「保守性胺基酸取代」為以具有側鏈或類似化學特性的胺基酸取代胺基酸。用於進行保守性取代之類似胺基酸包括具有下列側鏈之胺基酸：酸性側鏈（麩胺酸、天門冬胺酸）；鹼性側鏈（精胺酸、離胺酸、組胺酸）；極性醯胺側鏈（麩醯胺酸、天冬醯胺酸）；疏水性脂族側鏈（白胺酸、異白胺酸、纈胺酸、丙胺酸、甘胺酸）；芳族側鏈（苯丙胺酸、色胺酸、酪胺酸）；小側鏈（甘胺酸、丙胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、甲硫胺酸）；或脂族羥基側鏈（絲胺酸、蘇胺酸）。

在一個態樣中，類似物實質上與重組 VWF 同源，或實質上與重組 VWF 相同，該等類似物係來源於重組 VWF。類似物包括保留野生型多肽之至少某些生物活性（例如凝血活性）的類似物。

所涵蓋之多肽變異體包括（但不限於）藉由諸如下列技術進行化學修飾的多肽：泛素化；糖基化，包括多唾液酸化（polysialation）；與治療劑或診斷劑結合；標記；共價聚合物連接，諸如聚乙二醇化（以聚乙二醇衍生）；引入不可水解之鍵；及藉由化學合成胺基酸（諸如鳥胺酸，其通常並不存在於人類蛋白質中）進行插入或取代。變異體保留未經修飾之本發明分子的相同或基本上相同之結合性質。該化學修飾可包括藥劑直接或間接（例如經由連接子）與 VWF 多肽連接。在間接連接情況下，涵蓋連接子可水解或不可水解。

在一個態樣中，製備聚乙二醇化多肽類似物將包含以下步驟：(a) 在結合構築體多肽與一或多個 PEG 基團連接的條件下，使多肽與聚乙二醇（諸如 PEG 之反應性酯或醛衍生物）反應；及 (b) 獲得反應產物。一般而言，醯化反應之最優反應條件係根據已知參數及所要結果確定。例如，PEG:蛋白質之比愈大，聚-聚乙二醇化產物（poly-pegylated product）之百分比愈大。在一些具體實例中，結合構築體在 N 末端具有單一 PEG 部分。聚乙二醇（PEG）可與凝血因子連接以例如獲得更長活體內半衰期。PEG 基團可能具有任何適宜分子量，且為直鏈或分支鏈。PEG 之平均分子量介於約 2 千道爾頓（kiloDalton, 「kD」）至約 100 kDa、約 5 kDa 至約 50 kDa，或約 5 kDa 至約 10 kDa 範圍內。在某些態樣中，PEG 基團係藉由 PEG 部分上之天然或工程反應性基團（例如醛基、胺基、硫醇基，或酯基）與凝血因子上之反

應性基團（例如醛基、胺基，或酯基）的醯化或還原性烷基化反應，或藉由此項技術中已知之任何其他技術而與凝血因子連接。

製備聚唾液酸化多肽之方法描述於美國專利公開案 20060160948，Fernandes et Gregoriadis；*Biochim. Biophys. Acta* 1341: 26-34, 1997，及 Saenko 等人, *Haemophilia* 12:42-51, 2006 中。簡言之，在室溫下於暗處攪拌含 0.1 M  $\text{NaIO}_4$  之多聚乙醯神經氨糖酸（CA）溶液以氧化 CA。活化之 CA 溶液在暗處相對於例如 0.05 M 磷酸鈉緩衝液（pH 7.2）進行透析，且此溶液添加至 rVWF 溶液中並在室溫下於暗處在溫和搖動下培育 18 小時。視情況藉由例如超濾/滲濾自 rVWF-唾液酸結合物分離自由試劑。rVWF 與唾液酸之結合物係使用戊二醛作為交聯試劑而獲得（Migneault 等人, *Biotechniques* 37: 790-796, 2004）。

在另一態樣中，進一步涵蓋本發明多肽為與第二藥劑（其為多肽）形成之融合蛋白質。在一個具體實例中，第二藥劑（其為多肽）為（但不限於）酶、生長因子、抗體、細胞激素、超化因子、細胞表面受體、細胞表面受體之細胞外域、細胞黏著分子，或上述蛋白質之片段或活性域。在相關具體實例中，第二藥劑為凝血因子，諸如因子 VIII、因子 VII、因子 IX。所涵蓋之融合蛋白質係藉由此項技術中眾所周知的化學或重組技術製造。

在另一態樣中，亦涵蓋前原 VWF 及原 VWF 多肽在本發明調配物中將提供治療效益。例如，美國專利第 7,005,502 號描述一種醫藥製劑，其包含大量的可在試管內誘導凝血酶產生之原 VWF。除天然存在之成熟 VWF 的重組生物學活性片段、變異體，或其他類似物之外，本發明亦涵蓋在本文所述之調配物中使用前原 VWF（在 SEQ ID NO:2 中列出）或原 VWF 多肽



(SEQ ID NO: 2 之胺基酸殘基 23 至 764) 的重組生物學活性片段、變異體，或類似物。

編碼片段、變異體及類似物之多核苷酸可由熟習編碼與天然存在之分子具備相同或相似之生物活性的天然存在分子之生物學活性片段、變異體或類似物的工作者容易地產生。在多個態樣中，此等多核苷酸係使用 PCR 技術、DNA 編碼分子之消化/接合及類似技術來製備。因而，熟習此項技術者將能夠使用此項技術中已知之任何方法（包括（但不限於）位點特異性突變誘發）在 DNA 股中產生單鹼基變化，以產生經改變之密碼子及錯義突變。如本文中所使用，片語「中度嚴格雜交條件」意謂例如在 42°C 下於 50% 甲醯胺中雜交，及在 60°C 下於 0.1×SSC、0.1% SDS 中洗滌。熟習此項技術者應理解，可根據待雜交序列之長度及 GC 核苷酸鹼基含量而改變此等條件。此項技術中之標準公式適用於確定準確雜交條件。參看 Sambrook 等人, 9.47-9.51, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)。

### 凍乾

在一個態樣中，包含本發明 VWF 多肽之調配物在投藥之前經凍乾。凍乾係使用此項技術中常見之技術進行，且應針對所開發之組成物進行優化 [Tang 等人, *Pharm Res.* 21:191-200, (2004) 及 Chang 等人, *Pharm Res.* 13:243-9 (1996)]。

在一個態樣中，凍乾週期由三個步驟構成：凍結、初步乾燥及二次乾燥 [A.P. Mackenzie, *Phil Trans R Soc London, Ser B, Biol* 278:167 (1977)]。在凍結步驟中，冷卻溶液以引發結冰。此外，此步驟誘發膨脹劑結晶。冰在初步

乾燥階段中昇華，此係藉由降低腔室壓力至低於冰之蒸氣壓、使用真空及引入熱以促進昇華來進行。最終，在二次乾燥階段，在低腔室壓力及高存放溫度（shelf temperature）下除去附著水或結合水。該處理產生稱為凍乾塊之物質。此後，該凍乾塊可用無菌水或適合稀釋劑復原供注射。

凍乾週期不僅決定賦形劑之最終物理狀態，而且亦影響其他參數，諸如復原時間、外觀、穩定性及最終含水量。呈凍結狀態之組成物結構經受在特定溫度下發生之若干轉移（例如玻璃轉移、濕化及結晶），且該結構可用於理解及優化凍乾處理。玻璃轉移溫度（ $T_g$  及/或  $T_g'$ ）可提供關於溶質之物理狀態的資訊，且可藉由差示掃描量熱術（DSC）測定。當設計凍乾週期時， $T_g$  及  $T_g'$  為必須考慮的重要參數。例如， $T_g'$  對於初步乾燥至關重要。此外，在乾燥狀態下，玻璃轉移溫度提供關於最終產物之儲存溫度的資訊。

### 一般調配物及賦形劑

賦形劑為賦予或增強藥品（例如蛋白質）之穩定性及遞送的添加劑。不管包含其之原因如何，賦形劑為調配物之必需組份，且因此必需安全且為患者良好耐受。對於蛋白質藥物，賦形劑之選擇尤其重要，此係由於其可影響藥物之效力及免疫原性。因此，需要開發具有適當選擇之賦形劑且提供適合穩定性、安全性及市場性的蛋白質調配物。

在一個態樣中，凍乾調配物至少包含一或多種緩衝液、膨脹劑，及穩定劑。在此態樣中，在聚集成為凍乾步驟期間或復原期間之間題的情況下，評估且選擇界面活性劑之效用。包括適當緩衝劑以在凍乾期間維持調配物在 pH 值穩定區內。涵蓋用於液體及凍乾蛋白質調配物之賦形劑組份的比較提供於表 A 中。

表 A：凍乾蛋白質調配物之賦形劑組份

賦形劑組份	在凍乾調配物中的功能
緩衝液	○在凍乾期間及復原之後維持調配物之 pH 值
張力劑/穩定劑	○穩定劑包括低溫保護劑及凍乾保護劑 ○實例包括多元醇、糖及聚合物 ○低溫保護劑保護蛋白質不受凍結應力損壞 ○凍乾保護劑在凍乾狀態下穩定蛋白質
膨脹劑	○用於增加產物精緻性且防噴 ○向凍乾塊提供結構強度 ○實例包括甘露醇及甘胺酸
界面活性劑	○若在凍乾處理期間存在聚集問題，則採用 ○可用於減少復原時間 ○實例包括聚山梨醇酯 20 及聚山梨醇酯 80
抗氧化劑	○通常不採用，可大幅延遲凍乾塊中之分子反應
金屬離子/螯合劑	○若僅作為輔助因子包括特定金屬離子，或若蛋白酶活性需要金屬，則可包括在內 ○在凍乾調配物中一般不需要螯合劑
防腐劑	○僅用於多劑量調配物 ○在調配物中防止微生物生長 ○通常包括在復原稀釋劑（例如 bWFI）中

在開發蛋白質調配物時，主要挑戰為針對製造、運輸及儲存之應力而穩定產物。調配物賦形劑之作用為提供針對此等應力之穩定作用。亦採用賦形劑來降低高濃度蛋白質調配物之黏度，以使其能夠遞送並增加患者便利性。一般而言，賦形劑可根據其針對各種化學及物理性應力而穩定蛋白質的機制進行分類。一些賦形劑係用於減輕特定應力之效應或用於調節特定蛋白質之特定感受性。其他賦形劑對蛋白質之物理及共價穩定性具有更一般之作用。本文所述之賦形劑係藉由其化學類型或其在調配物中之功能作用而組織。當論述各賦形劑類型時，提供穩定模式之簡要描述。

根據本文所提供之教示及導則，熟習此項技術者應瞭解在任何特定調配物中可包括多少量或範圍之賦形劑來獲得本發明之生物醫藥調配物，該賦形劑之量或範圍有助於該生物醫藥（例如蛋白質）穩定性之保持。例如，

包括在本發明生物醫藥調配物中之鹽的量及類型係根據最終溶液之所要滲透壓（亦即，等滲透壓、低滲透壓或高滲透壓）以及待要包括在該調配物中之其他組份的量及滲透壓進行選擇。

舉例而言，包括約 5%山梨醇可達成等滲透壓，而需要約 9%蔗糖賦形劑才能達成等滲透壓。可包括在本發明生物醫藥調配物內的一或多種賦形劑濃度之量或範圍的選擇已參考鹽、多元醇及糖而例示於上文。然而，熟習此項技術者應瞭解，本文所描述及參考特定賦形劑進一步例示之考慮因素同樣可用於賦形劑之所有類型及組合，例如包括鹽、胺基酸、其他張力劑、界面活性劑、穩定劑、膨脹劑、低溫保護劑、凍乾保護劑、抗氧化劑、金屬離子、螯合劑及/或防腐劑。

此外，若以莫耳濃度報導特定賦形劑，則熟習此項技術者應認可亦涵蓋溶液之當量百分率（%）w/v（例如，（溶液樣本中物質之公克數/溶液之毫升數） $\times 100\%$ ）。

固然，一般熟習此項技術者應認可，本文所述之賦形劑濃度在特定調配物內具有互依性。舉例而言，若例如蛋白質濃度較高，或若例如穩定劑濃度較高，則可降低膨脹劑之濃度。此外，一般熟習此項技術者應認可，爲了維持不含膨脹劑之特定調配物的等滲透壓性，因此要調節穩定劑之濃度（亦即，使用「張力調節（tonicifying）」量之穩定劑）。常用賦形劑在此項技術中眾所周知，且可在 Powell 等人，*Compendium of Excipients for Parenteral Formulations* (1998), *PDA J. Pharm. Sci. Technology*, 52:238-311 中找到。

### 緩衝液及緩衝劑

通常在較窄 pH 值範圍內觀察到藥理學活性蛋白質調配物之穩定性最大。此最優穩定性之 pH 值範圍需要在預調配研究早期確定。若干方法適用於此意圖，諸如加速穩定性研究及量熱篩檢研究 (Remmele R.L. Jr., 等人, *Biochemistry*, 38(16): 5241-7 (1999))。調配物一旦最終製成，即必須製造蛋白質且維持整個存放期。因此，在調配物中幾乎總是採用緩衝劑來控制 pH 值。

緩衝物質之緩衝能力在 pH 值等於 pKa 時最大，且隨 pH 值自此值增加或降低而降低。在其 pKa 之 1 個 pH 單位內，存在 90% 緩衝能力。緩衝能力亦隨緩衝液濃度增加而按比例增加。

當選擇緩衝液時，需要考慮若干因素。首先，需要根據緩衝液之 pKa 及所要調配物 pH 值來確定緩衝液種類及其濃度。保證緩衝液與蛋白質及其他調配物賦形劑相容，且不催化任何降解反應同樣重要。要考慮之第三重要態樣為投藥之後緩衝液可能誘發之刺痛感及刺激感。例如，已知檸檬酸鹽在注射之後會導致刺痛 (Laursen T, 等人, *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 98(2): 218-21 (2006))。對於經由皮下 (SC) 或肌肉內 (IM) 途徑投予之藥物，其中與藉由靜脈內 (IV) 途徑投藥 (調配物在投藥之後快速稀釋至血液中) 時相比，藥物溶液保持在注射位點之時段相對更長，刺痛及刺激之可能性更大。對於藉由直接 IV 輸注投藥之調配物，需要監控緩衝液 (及任何其他調配物組份) 之總量。不得不尤其留心以磷酸鉀緩衝液形式投予之鉀離子，其可能在患者中誘發心血管效應 (Hollander-Rodriguez JC, 等人, *Am. Fam. Physician.*, 73(2): 283-90 (2006))。

用於凍乾調配物之緩衝液需要額外考慮。一些緩衝液 (如磷酸鈉) 在凍結期間可能自蛋白質無定形相結晶析出，從而導致 pH 改變。其他常見緩

衝液（諸如乙酸酯及咪唑）在凍乾處理期間可能會昇華或蒸發，從而在凍乾期間或復原之後改變調配物之 pH 值。

組成物中所存在之緩衝系統應加以選擇使得生理學上相容且可維持醫藥調配物之所要 pH 值。在一個具體實例中，溶液之 pH 值介於 pH 2.0 與 pH 12.0 之間。例如，溶液之 pH 值可能為 2.0、2.3、2.5、2.7、3.0、3.3、3.5、3.7、4.0、4.3、4.5、4.7、5.0、5.3、5.5、5.7、6.0、6.3、6.5、6.7、7.0、7.3、7.5、7.7、8.0、8.3、8.5、8.7、9.0、9.3、9.5、9.7、10.0、10.3、10.5、10.7、11.0、11.3、11.5、11.7，或 12.0。

pH 緩衝化合物可以適合維持調配物之 pH 值處於預定水準的任何量存在。在一個具體實例中，pH 緩衝液濃度介於 0.1 mM 與 500 mM（1 M）之間。例如，涵蓋 pH 緩衝劑為至少 0.1、0.5、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、200，或 500 mM。

如本文中所陳述，用於緩衝調配物之例示性 pH 緩衝劑包括（但不限於）有機酸、甘胺酸、組胺酸、麩胺酸、丁二酸鹽、磷酸鹽、乙酸鹽、檸檬酸鹽、Tris、HEPES，及胺基酸或胺基酸混合物，包括（但不限於）天門冬胺酸、組胺酸及甘胺酸。在本發明之一個具體實例中，緩衝劑為檸檬酸鹽。

### 穩定劑及膨脹劑

在本發明醫藥調配物之一個態樣中，添加穩定劑（或穩定劑之組合）以防止或減少儲存導致之聚集及化學降解。復原後之混濁或不透明溶液表明蛋白質已沈澱或至少已聚集。術語「穩定劑」意謂在水溶液狀態下能夠防止聚集或物理降解（包括化學降解，例如自溶作用、脫醯胺作用、氧化

作用，等等)的賦形劑。所涵蓋之穩定劑包括(但不限於)蔗糖、海藻糖、甘露糖、麥芽糖、乳糖、葡萄糖、棉子糖、纖維二糖、龍膽二糖、異麥芽糖、阿拉伯糖、葡糖胺、果糖、甘露醇、山梨醇、甘胺酸、鹽酸精胺酸、多羥基化合物(包括多醣，諸如聚葡萄糖、澱粉、羥乙基澱粉、環糊精、N-甲基吡咯啉酮(pyrollidene)、纖維素及玻尿酸)、氯化鈉[Carpenter 等人, Develop. Biol. Standard 74:225, (1991)]。在本發明調配物中，穩定劑係以約0.1、0.5、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、700、900，或1000 mM之濃度併入。在本發明之一個具體實例中，甘露醇及海藻糖用作穩定劑。

必要時調配物亦包括適量膨脹劑及滲透壓調節劑。膨脹劑包括例如(但不限於)甘露醇、甘胺酸、蔗糖、諸如聚葡萄糖、聚乙烯吡咯啉酮之聚合物、羧甲基纖維素、乳糖、山梨醇、海藻糖，或木糖醇。在一個具體實例中，膨脹劑為甘露醇。膨脹劑係以約0.1、0.5、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、700、900，或1000 mM之濃度併入。

### 界面活性劑

蛋白質具有與表面相互作用的較高傾向，從而使其對於空氣-液體、小瓶-液體，及液體-液體(矽油)界面處之吸附及變性較為敏感。已觀察到此降解途徑視蛋白質濃度而可逆，且導致形成可溶性及不可溶性蛋白質聚集體，或因表面吸附而損失溶液中之蛋白質。除容器表面吸附之外，表面導

致之降解作用因物理攪動而加劇，這會在產品運輸及處理期間經歷。

界面活性劑通常用於蛋白質調配物中以防止表面導致之降解作用。界面活性劑為能夠在與蛋白質競爭界面位置時勝出的兩性分子。界面活性劑分子之疏水性部分佔據界面位置（例如空氣/液體），同時該分子之親水性部分仍定向主體溶劑。在充分濃度（通常約為清潔劑之臨界微胞濃度）下，界面活性劑分子之表層用於防止蛋白質分子吸附在界面處。從而將表面導致之降解作用減至最低。本文中所涵蓋之界面活性劑包括（但不限於）聚乙氧基化去水山梨醇之脂肪酸酯，亦即，聚山梨醇酯 20 及聚山梨醇酯 80。二者之不同僅在於賦予分子疏水性特性之脂肪鏈長度分別為 C-12 及 C-18。因此，與聚山梨醇酯-20 相比，聚山梨醇酯-80 更具表面活性，且具有更低臨界微胞濃度。

清潔劑亦可影響蛋白質之熱力學構形穩定性。再次說明，指定清潔賦形劑之作用應具蛋白質特異性。例如，聚山梨醇酯已顯示可降低一些蛋白質之穩定性並增加其他蛋白質之穩定性。清潔劑使蛋白質不穩定可以清潔劑分子之疏水性尾部（其可參加與部分或完全未摺疊蛋白質狀態的特異性結合）的觀點進行解釋。此等類型之相互作用可導致構形平衡變為更膨脹之蛋白質狀態（亦即，增加互補蛋白質分子之疏水性部分暴露至結合聚山梨醇酯）。或者，若蛋白質天然狀態展現一些疏水表面，則與天然狀態結合之清潔劑可穩定該構形。

聚山梨醇酯之另一態樣在於其固有地對氧化降解敏感。其（作為原料）往往含有足量過氧化物從而導致蛋白質殘基側鏈（尤其甲硫胺酸）氧化。由添加穩定劑所產生的氧化破壞之可能性著重表明，應在調配物中使用最



低有效濃度的賦形劑。對於界面活性劑，針對指定蛋白質的有效濃度將視穩定機制而定。

在凍結及乾燥期間，亦添加適量界面活性劑以防止與表面相關之聚集現象[Chang, B, J. Pharm. Sci. 85:1325, (1996)]。因而，例示性界面活性劑包括（但不限於）陰離子、陽離子、非離子、兩性離子，及兩性界面活性劑，包括來源於天然存在之胺基酸的界面活性劑。陰離子界面活性劑包括（但不限於）月桂基硫酸鈉、二辛基磺基丁二酸鈉及二辛基磺酸鈉、鵝去氧膽酸、N-月桂醯基肌胺酸鈉鹽、十二烷基硫酸鋰、1-辛烷磺酸鈉鹽、水合膽酸鈉、去氧膽酸鈉，及甘胺去氧膽酸鈉鹽。陽離子界面活性劑包括（但不限於）苯甲烷氯化銨或苯乙烷氯化銨、單水合十六烷基氯化吡啶鎊，及十六烷基三甲基溴化銨。兩性離子界面活性劑包括（但不限於）CHAPS、CHAPSO、SB3-10，及 SB3-12。非離子界面活性劑包括（但不限於）毛地黃皂苷、Triton X-100、Triton X-114、TWEEN-20，及 TWEEN-80。界面活性劑亦包括（但不限於）聚桂醇（lauromacrogol）400；硬脂酸聚乙二醇酯 40；聚氧化乙烯氫化蓖麻油 10、40、50 及 60；單硬脂酸甘油酯；聚山梨酸酯 40、60、65 及 80；大豆卵磷脂及其他磷脂，諸如二油基磷脂醯膽鹼（DOPC）、二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油（DMPG）、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼（DMPC）及二油基磷脂醯甘油（DOPG）；蔗糖脂肪酸酯；甲基纖維素；及羧甲基纖維素。因此，進一步提供以個別形式或不同比率之混合物形式包含此等界面活性劑之組成物。在本發明之一個具體實例中，界面活性劑為 TWEEN-80。在本發明調配物中，界面活性劑係以約 0.01 g/L 至約 0.5 g/L 之濃度併入。在所提供之調配物中，界面活性劑濃度為 0.005、0.01、0.02、0.03、0.05、

0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 或 1.0 g/L。

## 鹽

通常添加鹽以增加調配物之離子濃度，此舉對於蛋白質溶解度、物理穩定性及等滲透壓性可能較為重要。鹽可以各種方式影響蛋白質之物理穩定性。離子可藉由與蛋白質表面上之帶電殘基結合來穩定蛋白質之天然狀態。或者，鹽可藉由沿蛋白質骨架與肽基 (-CONH-) 結合來穩定變性狀態。鹽亦可藉由屏蔽蛋白質分子內殘基之間的靜電相互排斥作用來穩定蛋白質天然構形。蛋白質調配物中之鹽亦可屏蔽蛋白質分子之間的靜電相互吸引作用，該相互作用會導致蛋白質聚集且不溶解。在所提供之調配物中，鹽濃度介於 0.1、1、10、20、30、40、50、80、100、120、150、200、300，與 500 mM 之間。

## 其他常見賦形劑組份

### 胺基酸

胺基酸在蛋白質調配物中已尋得多種用途，如緩衝液、膨脹劑、穩定劑及抗氧化劑。因而，在一個態樣中，分別採用組胺酸及麩胺酸來緩衝 pH 值範圍為 5.5-6.5 及 4.0-5.5 的蛋白質調配物。組胺酸之咪唑基之  $pK_a=6.0$ ，且麩胺酸側鏈之羧基之  $pK_a$  為 4.3，此使得此等胺基酸適用於在其各別 pH 值範圍內進行緩衝。在該等情況下，麩胺酸尤其適用。組胺酸在市售蛋白質調配物中較為常見，且此胺基酸可替代檸檬酸，眾所周知，檸檬酸為注射後導致刺痛的緩衝液。有趣的是，亦已報導當以高濃度液體及凍乾形式使用時，組胺酸對聚集具有穩定效應 (Chen B, 等人, *Pharm Res.*, 20(12): 1952-60 (2003))。其他人亦觀察到組胺酸可降低高蛋白質濃度調配物之黏度。然而，

在同一研究中，在於不鏽鋼容器中進行抗體凍融研究期間，作者在含組胺酸調配物中觀察到聚集及變色增加。關於組胺酸之另一注意事項為其在金屬離子存在下會光氧化（Tomita M, 等人, *Biochemistry*, 8(12): 5149-60 (1969)）。甲硫胺酸在調配物中用作抗氧化劑看似有前景的；已觀察到其對許多氧化應力有效（Lam XM, 等人, *J Pharm Set*, 86(11): 1250-5 (1997)）。

在許多態樣中，提供包括一個或多種胺基酸之調配物，甘胺酸、脯胺酸、絲胺酸、精胺酸及丙胺酸已顯示可藉由優先排除機制穩定蛋白質。甘胺酸亦為凍乾調配物中之常用膨脹劑。已證明精胺酸為抑制聚集之有效藥劑，且其已用於液體及凍乾調配物中。

在所提供之調配物中，胺基酸濃度介於 0.1、1、10、20、30、40、50、80、100、120、150、200、300，與 500 mM 之間。在本發明之一個具體實例中，胺基酸為甘胺酸。

### 抗氧化劑

蛋白質殘基氧化由許多不同的原因引起。除了添加特定抗氧化劑以外，預防蛋白質氧化破壞包括在整個製造處理及產物儲存期間小心控制許多因素，諸如大氣氧、溫度、光曝露，及化學污染。因此，本發明涵蓋使用醫藥抗氧化劑，包括（但不限於）還原劑、氧/自由基捕捉劑，或螯合劑。在一個態樣中，蛋白質治療調配物中之抗氧化劑可溶於水，且在整個產品存放期仍具活性。還原劑及氧/自由基捕捉劑藉由除去溶液中之活性氧物質而起作用。螯合劑（諸如 EDTA）藉由結合可促進自由基形成之痕量金屬污染物而有效。例如，在酸性纖維母細胞生長因子之液體調配物中利用 EDTA 抑制半胱胺酸殘基之金屬離子催化氧化。

除各種賦形劑預防蛋白質氧化之效果以外，亦關心抗氧化劑自身導致蛋白質之其他共價或物理變化的可能性。例如，還原劑會導致分子內二硫鍵分裂，該分裂又會導致二硫化物改組。在過渡金屬離子存在下，抗壞血酸及 EDTA 已顯示可在許多蛋白質及肽中促進甲硫胺酸氧化 (Akers MJ, 及 Defelippis MR. *Peptides and Proteins as Parenteral Solutions*. *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*. Sven Frokjaer, Lars Hovgaard 編. *Pharmaceutical Science*. Taylor 及 Francis, UK (1999)); Fransson J.R., *J. Pharm. Sci.* 86(9): 4046-1050 (1997); Yin J, 等人, *Pharm Res.*, 21(12): 2377-83 (2004)。已報導硫代硫酸鈉可降低 rhuMab HER2 中光及溫度誘導之甲硫胺酸氧化的程度；然而，此研究中亦報導硫代硫酸鹽-蛋白質加合物之形成 (Lam XM, Yang JY, 等人, *J Pharm Sci.* 86(11): 1250-5 (1997))。選擇適當抗氧化劑係根據蛋白質之特定應力及敏感度進行。在某些態樣中，所涵蓋之抗氧化劑包括（但不限於）還原劑及氧/自由基捕捉劑、EDTA，及硫代硫酸鈉。

### 金屬離子

一般而言，在蛋白質調配物中不需要過渡金屬離子，此係由於其可催化蛋白質中之物理及化學降解反應。然而，當特定金屬離子為蛋白質輔因子時，其可包括在調配物中；且若其形成配位錯合物，則可包括在蛋白質之懸浮液調配物中（例如胰島素之鋅懸浮液）。最近，已建議使用鎂離子（10-120 mM）抑制天門冬胺酸異構化形成異天門冬胺酸 (WO 2004039337)。

金屬離子賦予蛋白質穩定性或增加蛋白質活性的兩個實例為人類脫氧核糖核酸酶 (rhDNase, Pulmozyme®) 及因子 VIII。在 rhDNase 情況下，Ca<sup>2+</sup> 離子（至多 100 mM）藉由特定結合位點增加酶之穩定性 (Chen B, 等人, *J*

*Pharm Sci.*, 88(4): 477-82 (1999))。實際上，用 EGTA 自溶液移除鈣離子會導致脫醯胺作用及聚集增加。然而，經觀察此作用僅與  $\text{Ca}^{+2}$  離子相關；經觀察，其他二價陽離子  $\text{Mg}^{+2}$ 、 $\text{Mn}^{+2}$  及  $\text{Zn}^{+2}$  使 rhDNase 不穩定。在因子 VIII 中觀察到類似效應。 $\text{Ca}^{+2}$  及  $\text{Sr}^{+2}$  離子穩定蛋白質；而其他如  $\text{Mg}^{+2}$ 、 $\text{Mn}^{+2}$  及  $\text{Zn}^{+2}$ 、 $\text{Cu}^{+2}$  及  $\text{Fe}^{+2}$  使酶不穩定 (Fatouros, A., 等人, *Int. J. Pharm.*, 155, 121-131 (1997))。在關於因子 VIII 之獨立研究中，在  $\text{Al}^{+3}$  離子存在下觀察到聚集率顯著增加 (Derrick TS, 等人, *J. Pharm. Sci.*, 93(10): 2549-57 (2004))。作者指出，其他賦形劑 (如緩衝鹽) 通常經  $\text{Al}^{+3}$  離子污染，且說明需要在調配產物中使用具適當品質之賦形劑。

### 防腐劑

當開發多次用量非經腸調配物 (其涉及自同一容器取出一次以上) 時，必需防腐劑。其主要功能為在整個存放期內或使用藥品時，抑制微生物生長且確保產品無菌。常用防腐劑包括 (但不限於) 苯甲醇、苯酚及間甲酚。雖然防腐劑具有較長使用歷史，但開發包括防腐劑之蛋白質調配物仍具挑戰性。防腐劑幾乎一向具有使蛋白質不穩定之效應 (聚集)，且此已變成限制其在多劑量蛋白質調配物中使用的主要因素 (Roy S, 等人, *J Pharm Sci.*, 94(2): 382-96 (2005))。

迄今為止，大部分蛋白質藥物已經調配僅供單次使用。然而，當多劑量調配物有可能存在時，其賦予患者便利之優勢將增加，且增加市場性。一個良好實例為人類生長激素 (hGH)，所開發之防腐調配物已將更便利、可多次使用之注射筆形式商業化。在市場上現可獲得至少 4 種含有 hGH 防腐調配物之該等筆器件。Norditropin® (液體，Novo Nordisk)、Nutropin AQ®

(液體，Genentech) & Genotropin (凍乾雙腔藥筒，Pharmacia & Upjohn) 含有苯酚，而 Somatropin® (Eli Lilly) 係以間甲酚調配。

在防腐劑型之調配物開發期間需要考慮若干態樣。在藥品中，有效防腐劑濃度必須經優化。此需要在具有賦予抗微生物效果而不損害蛋白質穩定性之濃度範圍的劑型中測試指定防腐劑。例如，在開發介白素-1 受體 (I 型) 之液體調配物時，藉由使用差示掃描量熱術 (DSC) 成功篩檢出三種防腐劑。根據防腐劑在通常用於市售產品中之濃度下對穩定性之影響將其按順序分級 (Remmele RL Jr., 等人, *Pharm Res.*, 15(2): 200-8 (1998))。

與凍乾調配物相比，開發含防腐劑之液體調配物更具挑戰性。凍乾產品可在無防腐劑的情況下凍乾，且在使用時用含防腐劑之稀釋劑復原。此顯著縮短防腐劑與蛋白質接觸之時間，從而將相關穩定性風險最小化。對於液體調配物，不得不在整個產品存放期內維持防腐效果及穩定性(約 18-24 個月)。一個重要注意點為，在含活性藥物及所有賦形劑組份之最終調配物中必須顯示防腐效果。

一些防腐劑可引起注射位點反應，此為選擇防腐劑時需要考慮的另一因素。在聚焦於評估 Norditropin 中之防腐劑及緩衝液的臨床試驗中，與含間甲酚之調配物相比，在含苯酚及苯甲醇之調配物中觀察到疼痛感降低 (Kappelgaard A.M., *Horm Res.* 62 Suppl 3:98-103 (2004))。有趣的是，在常用防腐劑中，苯甲醇具備麻醉性 (Minogue SC, 及 Sun DA., *Anesth Analg.*, 100(3): 683-6 (2005))。在多個態樣中，防腐劑之使用提供比任何副作用均重要的效益。

## 製備方法

本發明進一步涵蓋製備醫藥調配物之方法。

本發明方法進一步包含一個或多個以下步驟：在凍乾之前向該混合物中添加如本文所描述之穩定劑；在凍乾之前向該混合物中添加至少一種選自膨脹劑、等滲透壓調節劑及界面活性劑之藥劑，各藥劑均如本文所描述。

凍乾物質之標準復原實務為回添一定體積的注射用純水或無菌水(WFI)(通常等於在凍乾期間移除之體積)，雖然抗細菌劑之稀釋溶液有時用於產生供非經腸投藥之醫藥[Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, 18:1311-1354 (1992)]。因此，提供製備復原 rVWF 組成物之方法，該方法包含向本發明之凍乾 rVWF 組成物中添加稀釋劑的步驟。

凍乾物質可復原成水溶液。各種水性載劑，例如注射用無菌水、用於多劑量使用的具有防腐劑之水，或具有適量界面活性劑之水（例如，含有活性化合物與適用於製造水性懸浮液之賦形劑之混合物的水性懸浮液）。在許多態樣中，該等賦形劑為懸浮劑，例如（但不限於）羧甲基纖維素鈉、甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、海藻酸鈉、聚乙烯吡咯啉酮、黃耆膠(gum tragacanth)及阿拉伯膠(gum acacia)；分散劑或潤濕劑為天然存在之磷脂（例如（但不限於）卵磷脂），或環氧烷與脂肪酸之縮合產物（例如（但不限於）聚氧化乙烯硬脂酸酯），或環氧乙烷與長鏈脂族醇（例如（但不限於）十七伸乙基氧基十六醇）之縮合產物，或環氧乙烷與衍生自脂肪酸及己糖醇之偏酯的縮合產物（諸如聚氧化乙烯山梨醇單油酸酯），或環氧乙烷與衍生自脂肪酸及己糖醇酐之偏酯的縮合產物（例如（但不限於）聚乙烯脫水山梨醇單油酸酯）。在多個態樣中，水性懸浮液亦含有一或多種防腐劑，例如（但不限於）對羥基苯甲酸乙酯或對羥基苯甲酸正丙酯。

## 投藥

在一個態樣中，爲了向人類或試驗動物投予組成物，組成物包含一或多種醫藥學上可接受之載劑。片語「醫藥學上」或「藥理學上」可接受係指當使用此項技術中眾所周知的途徑投藥（如下文所描述）時，分子整體及組成物穩定、可抑制蛋白質降解（諸如聚集及分裂產物），且此外不產生過敏或其他有害反應。「醫藥學上可接受之載劑」包括任何及所有臨床上適用之溶劑、分散介質、包衣劑、抗細菌劑及抗真菌劑、等滲透壓及吸收延遲劑及類似物，包括上文所揭示之藥劑。

醫藥調配物係經口、局部、經皮、非經腸、藉由吸入噴霧、經陰道、經直腸或藉由顱內注射而投予。如本文中所使用之術語非經腸包括皮下注射、靜脈內注射、肌肉內注射、腦池內注射或輸注技術。亦涵蓋在特定部位藉由靜脈內、皮內、肌肉內、乳房內、腹膜內、鞘內、眼球後、肺內注射及/或外科植入進行投藥。一般而言，組成物基本上不含熱原以及可能對接受者有害的其他雜質。

組成物之單次或多次投藥係根據治療醫師所選擇之劑量濃度及模式來進行。出於預防或治療疾病之目的，適當劑量取決於待治療之疾病類型，如上文所定義；疾病之嚴重程度及進程；是出於預防還是出於治療目的投予藥物；先前療法；患者之臨床病史及對藥物之反應；及主治醫師之判斷。

## 套組

作爲附加態樣，本發明包括包含一或多種凍乾組成物之套組，該等組成物係以有助於其投予個體使用的方式包裝。在一個具體實例中，該套組包括本文所描述之醫藥調配物（例如包含治療蛋白質或肽的組成物），該調



配物包裝在諸如密封瓶或密封器皿之容器中，描述化合物或組成物在實施該方法中之用途的標籤係黏貼至容器或包括在該包裝中。在一個具體實例中，醫藥調配物係包裝在容器中，以致容器中之頂部空間量（例如，液體調配物與容器頂部之間的空氣量）極小。頂部空間量較佳可忽略（亦即，幾乎為零）。在一個具體實例中，套組含有具有治療蛋白質或肽組成物的第一容器及具有該組成物之生理學上可接受之復原溶液的第二容器。在一個態樣中，醫藥調配物係包裝在單位劑型中。套組可進一步包括適用於根據特定投藥途徑投予醫藥調配物的器件。套組較佳含有描述醫藥調配物之用途的標籤。

### 劑量

涉及治療本文所描述之病狀之方法的用藥方案將由主治醫師考慮可改變藥物作用的各種因素來確定，該等因素例如患者年齡、病狀、體重、性別及飲食、任何感染之嚴重程度、投藥時間及其他臨床因素。舉例而言，本發明之重組 VWF 的典型劑量為約 50 U/kg，等於 500  $\mu$ g/kg。

在一個態樣中，本發明調配物係藉由初始快速推注接著連續輸注來進行投藥，以維持藥品之治療循環濃度。作為另一實例施，本發明化合物係以一次劑量形式投藥。一般熟習此項技術者將容易地優化有效劑量及投藥方案，如根據良好醫學實務及個別患者之臨床病狀所確定。用藥頻率取決於藥劑之藥物動力學參數及投藥途徑。最優醫藥調配物係由熟習此項技術者視投藥途徑及所要劑量來確定。例如參看 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版 (1990, Mack Publishing 公司, Easton, PA 18042) 第 1435-1712 頁，該文獻之揭示內容以引用的方式併入本文中。該等調配物影響所投予

之藥劑的物理狀態、穩定性、活體內釋放速率，及活體內清除速率。視投藥途徑不同，適合劑量係根據體重、身體表面積或器官大小來計算。可藉由使用用於測定血液濃度劑量之既定檢定連同適當劑量反應資料來確定適當劑量。最終用藥方案係由主治醫師考慮可改變藥物作用的各種因素來確定，該等因素例如藥物之比活性、損傷之嚴重程度及患者之反應性、患者年齡、病狀、體重、性別及飲食、任何感染之嚴重程度、投藥時間及其他臨床因素。隨著研究進行，將出現關於各種疾病及病狀之適當劑量濃度及治療持續時間的其他資訊。

以下實施例不意欲具有限制意義，而是僅例示本發明之特定具體實例。

## 實施例 1

### 搖動實驗

爲了測定 rVWF 在各種調配物中之沈澱量，在各種條件下測試 rVWF 在紊亂搖動之後的聚集程度。

如下表 1 中所示，在 20 mM 檸檬酸鹽緩衝液 (pH 7.3) 中評定各種 rVWF 調配物。設計搖動實驗以模擬機械應力條件。1-2 ml 各調配物用實驗室搖動器以 1200 rpm 搖動 10 分鐘。

表 1

Lyo25	離胺酸	組胺酸	甘胺酸	絲胺酸	甘露醇	PEG 1500	Tween 80	蔗糖	海藻糖	棉子糖
18	30 mM				5 g/L					
19		30 mM			5 g/L					
20			30 mM		5 g/L					
21				30 mM	5 g/L					
22	30 mM					5 g/L				
23		30 mM				5 g/L				
24			30 mM			5 g/L				
25				30 mM		5 g/L				
26	30 mM						0.1 g/L			
27		30 mM					0.1 g/L			
28			30 mM				0.1 g/L			
29				30 mM			0.1 g/L			
30	30 mM				5 g/L	5 g/L				
31		30 mM			5 g/L	5 g/L				
32			30 mM		5 g/L	5 g/L				
33				30 mM	5 g/L	5 g/L				
34	30 mM				5 g/L		0.1 g/L			
35		30 mM			5 g/L		0.1 g/L			
36			30 mM		5 g/L		0.1 g/L			
37				30 mM	5 g/L		0.1 g/L			
38	30 mM				5 g/L	5 g/L	0.1 g/L			
39		30 mM			5 g/L	5 g/L	0.1 g/L			
40			30 mM		5 g/L	5 g/L	0.1 g/L			
41				30 mM	5 g/L	5 g/L	0.1 g/L			
42					5 g/L					
43								5 g/L		
44									5 g/L	
45										5 g/L
46					5 g/L	5 g/L				
47						5 g/L		5 g/L		
48						5 g/L			5 g/L	
49						5 g/L				5 g/L
50					5 g/L		0.1 g/L			
51							0.1 g/L	5 g/L		
52							0.1 g/L		5 g/L	
53							0.1 g/L			5 g/L

可見 VWF 聚集物之評定係根據以下所示之方案進行。在大部分情況下，「可見聚集物」為大小介於約 100 nm 至 1-2 cm 範圍內的凝膠纖維。

### 方案

顆粒	
A	無顆粒
B	若干顆粒，幾乎不可見（點）
B1	許多顆粒，幾乎不可見（點）
C	若干顆粒，易見（纖維）
D	許多顆粒，易見（纖維）
E	可見顆粒（>1 mm 纖維）
E1	絨毛狀白色沈澱物（浮游在表面上）
E2	膠狀

搖動實驗之結果示於下表 2 中。

表 2

Lyo25 樣本	離胺酸	組胺酸	甘胺酸	絲胺酸	甘露醇	PEG 1500	Tween 80	搖動 1-2 mL， 1200 rpm，30 min
18	30 mM				5 g/L			E1
19		30 mM			5 g/L			E1
20			30 mM		5 g/L			E1
21				30 mM	5 g/L			E1
22	30 mM					5 g/L		E1
23		30 mM				5 g/L		E1
24			30 mM			5 g/L		E1
25				30 mM		5 g/L		E1
26	30 mM						0.1 g/L	E2 大
27		30 mM					0.1 g/L	E2 大
28			30 mM				0.1 g/L	E2 約 6mm
29				30 mM			0.1 g/L	E2 約 3mm
30	30 mM				5 g/L	5 g/L		E1
31		30 mM			5 g/L	5 g/L		E1
32			30 mM		5 g/L	5 g/L		E1
33				30 mM	5 g/L	5 g/L		E1
34	30 mM				5 g/L		0.1 g/L	B1
35		30 mM			5 g/L		0.1 g/L	B
36			30 mM		5 g/L		0.1 g/L	E2 大
37				30 mM	5 g/L		0.1 g/L	E2 大

38	30 mM				5 g/L	5 g/L	0.1 g/L	D
39		30 mM			5 g/L	5 g/L	0.1 g/L	D
40			30 mM		5 g/L	5 g/L	0.1 g/L	B
41				30 mM	5 g/L	5 g/L	0.1 g/L	B

總之，上述搖動實驗表明，含有 Tween-80 及甘露醇之調配物提供最佳結果（亦即，聚集量最小）。

## 實施例 2

### 凍融實驗

設計凍融實驗以評定由重複凍結及解凍所導致之應力的影響。除了用於搖動實驗之上述調配物（表 1）以外，亦評定以下調配物（表 3 及表 4）：

表 3

Lyo25 樣本	甘露醇	PEG 1500	Tween 80	蔗糖	海藻糖	棉子糖
42	5 g/L					
43				5 g/L		
44					5 g/L	
45						5 g/L
46	5 g/L	5 g/L				
47		5 g/L				
48		5 g/L				
49		5 g/L				
50	5 g/L		0.1 g/L			
51			0.1 g/L	5 g/L		
52			0.1 g/L		5 g/L	
53			0.1 g/L			5 g/L

表 4

Lyo25 樣本	離胺酸	組胺酸	甘胺酸	絲胺酸	甘露醇	PEG 1500	Tween-80	蔗糖	海藻糖	棉子糖
76					20 g/L		0.2 g/L	20 g/L		
77					20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
78					20 g/L		0.2 g/L			10 g/L
79		15 mM			20 g/L		0.2 g/L	20 g/L		

80		15 mM			20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
81		15 mM			20 g/L		0.2 g/L			10 g/L
82		15 mM	15 mM		20 g/L		0.2 g/L	20 g/L		
83		15 mM	15 mM		20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
84		15 mM	15 mM		20 g/L		0.2 g/L			10 g/L
85		15 mM	15 mM		20 g/L	5 g/L	0.2 g/L			
86		15 mM	15 mM		20 g/L	5 g/L	0.2 g/L		10 g/L	
87		15 mM	15 mM		20 g/L	15 g/L	0.2 g/L		10 g/L	
88		15 mM	15 mM		20 g/L		0.2 g/L			5 g/L
89		15 mM	15 mM		20 g/L		0.2 g/L			15 g/L
90		15 mM			20 g/L		0.2 g/L			15 g/L
92		15 mM	15 mM		20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
93	30 mM				20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
94		30 mM			20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
95			30 mM		20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
96				30 mM	20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
97		15 mM			20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
98		15 mM	15 mM		20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
99		15 mM	15 mM		20 g/L		0.2 g/L		5 g/L	
100		15 mM			20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	
		15 mM			20 g/L		0.2 g/L		10 g/L	

所有調配物均在冰箱中於-20°C下凍結約 1 小時，且接著在室溫下解凍。結果示於下表 5 中。

表 5

Lyo25 樣本	離胺 酸	組胺 酸	甘胺 酸	絲胺 酸	甘 露 醇	PEG 1500	Tween-80	蔗糖	海 藻 糖	棉 子 糖	凍/融 (4 次)	凍/融 (約 10 次)
18	30 mM				5 g/L						E1	15
19		30 mM			5 g/L						E1	19
20			30 mM		5 g/L						C	20
21				30 mM	5 g/L						C	21
22	30 mM					5 g/L					C	22
23		30				5					C/B1	23

		mM				g/L					
24			30 mM			5 g/L				C	24
25				30 mM		5 g/L				C	25
26	30 mM						0.1 g/L			B	26
27		30 mM					0.1 g/L			B-B1	27
28			30 mM				0.1 g/L			B	28
29				30 mM			0.1 g/L			E	29
30	30 mM				5 g/L	5 g/L				E	30
31		30 mM			5 g/L	5 g/L				D	31
32			30 mM		5 g/L	5 g/L				B1-C	32
33				30 mM	5 g/L	5 g/L				C/D	33
34	30 mM				5 g/L		0.1 g/L			E2 (剩餘之 B)	34
35		30 mM			5 g/L		0.1 g/L			E	35
36			30 mM		5 g/L		0.1 g/L			E	36
37				30 mM	5 g/L		0.1 g/L			B	37
38	30 mM				5 g/L	5 g/L	0.1 g/L			B	38
39		30 mM			5 g/L	5 g/L	0.1 g/L			B	39
40			30 mM		5 g/L	5 g/L	0.1 g/L			B	40
41				30 mM	5 g/L	5 g/L	0.1 g/L			A	41
42					5 g/L					D	42
43								5		D	43

								g/L				
44								5 g/L		E1	44	
45									5 g/L	E1	45	
46					5 g/L	5 g/L				D	46	
47						5 g/L		5 g/L		D	47	
48						5 g/L			5 g/L	D-E	48	
49						5 g/L			5 g/L	E	49	
50					5 g/L		0.1 g/L			B1	50	
51							0.1 g/L	5 g/L		C-D	51	
52							0.1 g/L		5 g/L	B1	52	
53							0.1 g/L		5 g/L	B1	53	

如上所示，海藻糖提供最佳結果（亦即，聚集量最小）。

### 實施例 3

#### 凍乾實驗

設計凍乾實驗以評定各種調配物形成凍乾塊的能力，該凍乾塊在 10 分鐘內溶解且獲得澄清溶液。亦進行加速穩定性研究以證明生物活性無顯著損失。

下表 6 中所示之調配物係用氮氣凍乾器 TS20002 根據製造商說明書凍乾。凍乾總時間約為 72 小時。以下調配物亦各含有 20 g/L 甘露醇及 0.1 g/L Tween-80。



表 6

Lyo 26	檸檬酸鹽	HEPE S	甘氨酸	組胺酸	乙酸鹽	Tris	磷酸鹽	離胺酸	組胺酸	甘氨酸	海藻糖	棉子糖
1	15 mM										10 g/L	
2	15 mM							15 mM			10 g/L	
3	15 mM								15 mM		10 g/L	
4	15 mM									15 mM	10 g/L	
5	15 mM							15 mM		15 mM	10 g/L	
6	15 mM							30 mM			10 g/L	
7	15 mM											10 g/L
8	15 mM								15 mM			10 g/L
9		15 mM									10 g/L	
10		15 mM						15 mM			10 g/L	
11		15 mM							15 mM		10 g/L	
12		15 mM								15 mM	10 g/L	
13		15 mM						15 mM		15 mM	10 g/L	
14		15 mM						15 mM		15 mM		10 g/L
15			15 mM								10 g/L	
16			15 mM						15 mM		10 g/L	
17				15 mM							10 g/L	
18				15 mM				15 mM			10 g/L	
19					15 mM			15 mM		15 mM	10 g/L	
20						15 mM		15 mM		15 mM	10 g/L	
21							15 mM	15 mM		15 mM	10 g/L	

凍乾實驗之結果示於下表 7 中。

表 7

			緩衝液					--	賦形劑	--	--	--
Lyo 26	檸檬酸鹽	HEPES	甘氨酸	組氨酸	乙酸鹽	Tris	磷酸鹽	離氨酸	組氨酸	甘氨酸	海藻糖	棉子糖
1	15 mM										10 g/L	
2	15 mM							15 mM			10 g/L	
3	15 mM								15 mM		10 g/L	
4	15 mM									15 mM	10 g/L	
5	15 mM							15 mM			10 g/L	
6	15 mM							30 mM			10 g/L	
7	15 mM											10 g/L
8	15 mM								15 mM			10 g/L
9		15 mM									10 g/L	
10		15 mM						15 mM			10 g/L	
11		15 mM							15 mM		10 g/L	
12		15 mM								15 mM	10 g/L	
13		15 mM						15 mM		15 mM	10 g/L	
14		15 mM						15 mM		15 mM		10 g/L
15			15 mM								10 g/L	
16			15 mM						15 mM		10 g/L	
17				15 mM							10 g/L	
18				15 mM				15 mM			10 g/L	
19					15 mM			15 mM		15 mM	10 g/L	
20						15 mM		15 mM		15 mM	10 g/L	
21							15 mM	15 mM		15 mM	10 g/L	

如上所示，檸檬酸鹽或 HEPES 緩衝液與胺基酸組合獲得澄清溶液。

爲了評定經復原之凍乾 rVWF 的穩定性，進行 VWF:Ag 及 VWF:RCo 測試。VWF:Ag 對應可在 VWF 特異性 ELISA 中使用多株抗 VWF 抗體偵測到的 VWF 量；而 VWF:RCo 對應在瑞斯特黴素（ristocetin）存在下導致穩定之血小板凝集的 VWF 量。樣本在 40°C 下儲存。假定阿瑞尼氏方程式（Arrhenius equation）適用，則在 40°C 下一個月之穩定性約與在 4°C 下一年之穩定性相等。穩定性實驗之結果示於下表 8 及表 9 中。

表 8

rVWF:Ag 調 配物	週 (40°)			
	0	4	5	8
1	121.1	89.8	113.0	106.6
2	121.8	102.0	114.0	112.8
3	119.9	102.0	105.0	112.7
4	117.3	100.0	108.0	114.4
5	121.2	98.2	117.0	114.9
6	123.8	96.6	107.0	--
7	135.2	96.6	112.0	112.4
8	130.6	82.2	108.0	115.7
9	112.0	89.5	109.0	107.0
10	122.4	87.1	106.0	107.7
11	119.3	97.5	115.0	114.2
12	124.2	109.0	109.0	103.4
13	110.2	92.3	106.0	112.4
14	108.9	107.0	103.0	109.0

表 9

rVWF:RCo 調配物	週 (40°)			
	0	4	5	8
1	86	102	97.0	93.0
2	84	97	88.0	89.0
3	85	100	87.0	93.0
4		102	81.0	98.0
5	85	89	88.0	98.0
6	83	102	88.0	
7		92	97.0	95.0
8	88	94	90.0	104.0
9	93	91	97.0	100.0
10	95	87	87.0	87.0
11	86	93	89.0	99.0
12	84	91	89.0	95.0
13	88	87	96.0	89.0
14	90	91	86.0	92.0

ELISA 之標準偏差在 10%-20%範圍內。上述結果表明，所有測試調配物在 40°C 下經 8 週均具有良好穩定性。

若在調配物中使用不同的胺基酸（例如 15 mM 或 20 mM 之甘胺酸、離胺酸或組胺酸），且若改變檸檬酸鹽緩衝液（例如，15、20 或 25 mM），則又進行穩定性實驗。如上所述，使用 VWF:RCo 活性檢定監控 rVWF 之穩定性。即使在 13 個月之後，對於在 40°C 下儲存之 rVWF 穩定性樣本亦未觀察到 VWF:RCo 活性值顯著差異。量測值之顯著性用 t-檢驗進行檢驗。檢定之中間精密度係藉由計算變異數係數來確定。在所有系列穩定性資料中，CV 均小於 20%，且滿足  $CV < 20\%$  之驗證標準。基於以上所述，可得出以下結論：rVWF 在所測試之所有檸檬酸鹽緩衝系統中均穩定，而與緩衝液莫耳濃度及所添加之胺基酸無關。即使當在 40°C 下儲存至少 13 個月時，rVWF 仍穩定。

使用 VWF:RC<sub>0</sub> 活性檢定進行之效力測定在 CV 值小於 20%的情況下顯示良好中間精密度。

因而，鑒於本文中呈現之資料，建議包括 15 mM 檸檬酸鹽（二水合檸檬酸三鈉）、15 mM 甘胺酸、10 g/L 海藻糖、20 g/L 甘露醇、0.1 g/L Tween-80（pH 7.3）的 rVWF 調配物。

#### 實施例 4

##### 長期穩定性

##### 加速穩定性測試及長期穩定性測試

進行研究以評估在推薦儲存條件及高儲存條件下儲存之 rVWF 最終藥品 (FDP) 的穩定性。來自高儲存條件之資料保證溫度偏差將不會影響 rVWF FDP 之品質，且將在不存在即時、真實條件穩定性資料時用於外推該物質之可接受有效條件。

當前規格為 $\leq 3.0\%$ 殘餘水分（如使用卡爾·費歇爾法 (Karl Fischer Method) 所測定）。批次 rVWFF#4FC、rVWFF#5FC、rVWFF#6FC 及 rVWFF#7FC 分別釋放 1.2%、1.3%、1.2% 及 1.5% 之水分含量。基於過去對具有類似小瓶及塞子構造之其他產品的經驗，預計在建議存放期（亦即，在  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  之預定儲存溫度下 24 個月）末期，釋放約 1.3% 殘餘水分的任何 rVWF 批次均將符合  $\leq 3.0\%$  之規格界限。

使用已製成之 4 個 rVWF FDP 批次，在所推薦之儲存條件（亦即  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ）及高溫（亦即  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ）下進行長期穩定性研究。此等研究已提供充分資料，以便比較個別臨床批次之穩定性特性。

在表 10 中可獲得穩定性方案，包括穩定性指示檢定及穩定性接受標準

之描述，表 10 亦含有與穩定性研究中所評估之 rVWF FDP 批次相關的資訊。

表 10

儲存條件 (°C)	批號	完成 (及建議) 測試間隔
5°C±3°C	rVWF#1FC	0、1、2、3、6、9、12、18、24 個月
30°C	rVWF#1FC	0、1、3、6 個月
5°C±3°C	rVWF#2FC	0、1、2、3、6 個月
5°C±3°C	rVWF#3FC	0、1、2、3、6、9、12、18、24 個月
30°C	rVWF#3FC	0、0.5、1、2、3、6 個月
40°C	rVWF#3FC	0、0.5、1、2、3 個月
5°C±3°C	rVWF#4FC	0、1、2、3、6、9、12、18、24、(30) 個月
40°C	rVWF#4FC	0、1、2、3、6、9 個月
5°C±3°C	rVWF#5FC	0、1、2、3、6、9、12、18、(24、30) 個月
40°C	rVWF#5FC	0、1、2、3、6、9 個月
5°C±3°C	rVWF#6FC	0、1、2、3、6、9、12、(18、24、30) 個月
40°C	rVWF#6FC	0、1、2、3、6、9 個月
5°C±3°C	rVWF#7FC	0、1、2、3、6、9、12、(18、24、30) 個月
40°C	rVWF#7FC	0、1、2、3、6、9 個月

#### 總體穩定性 (24 個月) 之匯總及論述

所呈現之 rVWF FDP 穩定性資料包含下列：

1. 批次 rVWF#1FC 在 5°C±3°C (完成測試) 下之 24 個月長期研究資料及在 30°C±2°C (完成測試) 下之 6 個月中間資料；
2. 批次 rVWF#2FC 在 5°C±3°C (完成測試) 下之 6 個月資料；
3. 批次 rVWF#3FC 在 2-8°C (完成測試) 下之 24 個月長期研究資料，在 30°C±2°C 下之 6 個月資料，及在 40°C±2°C (完成測試) 下之 3 個月資料；
4. 批次 rVWF#4FC 在 5°C±3°C 下之 24 個月穩定性資料及在 40°C±2°C 下之 9 個月資料；
5. 批次 rVWF#5FC 在 5°C±3°C 下之 24 個月穩定性資料及在 40°C±2°C 下之 9 個月資料；

6. 批次 rVWFF#6FC 在  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$  下之 12 個月穩定性資料及在  $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  下之 9 個月資料；及

7. 批次 rVWFF#7FC 在  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$  下之 12 個月穩定性資料及在  $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  下之 9 個月資料。

在批次 rVWFF#4FC、rVWFF#5FC、rVWFF#6FC 及 rVWFF#7FC 之殘餘水分中所觀察到之變化仍遠低於接受標準  $\leq 3\%$ ，且不影響功能活性 (VWF:RC<sub>0</sub>)。對於適用於非臨床研究及臨床研究中的所製造批次，定性分析技術（亦即外觀、SDS-PAGE 分析，等等）之穩定性結果中不存在可觀察到的變化。類似地，對於總蛋白質分析、VWF:Ag 分析或在儲存期間所觀察之 VWF 多聚體數目，不存在穩定性降低之趨勢。

批次 rVWF#1FC、rVWF#2FC 及 rVWF#3FC 所呈現之 VWF:RC<sub>0</sub> 活性與 VWF:Ag 活性之比及 VWF:RC<sub>0</sub> 資料二者的變化可能為測試方法變化之結果，實際上，個別 VWF:RC<sub>0</sub> 穩定性測試結果由一個穩定性樣本之單次測定資料及/或來自不符合歐洲藥典 (non-Ph. Eur.-conforming) 法之檢定方法的資料組成。在將檢定方法變成符合歐洲藥典之檢定之後，使用原檢定方法及新檢定方法測試非臨床批次之所有測試時間點。

大規模製造出之 rVWF FDP 展現與實驗規模下製造出之 rVWF FDP 批次相似的穩定性特性。此等 rVWF FDP 批次在  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$  下儲存高達 24 個月仍維持 VWF:RC<sub>0</sub> 活性。當前，甚至在  $30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  下儲存 6 個月或在  $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  下儲存 9 個月之後，大規模批次樣本中 VWF 多聚體類型在穩定性方面亦無變化。表 11 展示在  $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  於應力條件下儲存之批次 rVWF#4FC、rVWF#5FC、rVWF#6FC 及 rVWF#7FC 之 VWF:RC<sub>0</sub>、VWF:Ag、VWF 多聚體類型的結果。

該等結果表明，在高溫儲存條件下穩定性為 9 個月可外推成在環境溫度下或甚至在冷藏條件下存放期為 3 年以上。

表 11

rVWF#4FC 在 40°C±2°C 下之穩定性資料							
屬性	規格	在各時間（月）之結果					
		0	1	2	3	6	9
VWF:RCo 活性[U/ml] <sup>1)</sup>	70-150	130	117	118	127	132	142
VWF:Ag ELISA (U/ml)	報導結果	86	87	79	81	79	86
VWF 多聚體分析	報導結果	21	20	20	20	21	18
rVWF#5FC 在 40°C±2°C 下之穩定性資料							
屬性	規格	在各時間（月）之結果					
		0	1	2	3	6	9
VWF:RCo 活性[U/ml] <sup>1)</sup>	70-150	107	119	120	116	132	134
VWF:Ag ELISA (U/ml)	報導結果	94	86	84	91	90	79
VWF 多聚體分析	報導結果	20	20	18	19	20	19
rVWF#6FC 在 40°C±2°C 下之穩定性資料							
屬性	規格	在各時間（月）之結果					
		0	1	2	3	6	9
VWF:RCo 活性[U/ml] <sup>1)</sup>	70-150	118	111	126	129	130	119
VWF:Ag ELISA (U/ml)	報導結果	85	95	86.3	73.5	80.8	70.3
VWF 多聚體分析	報導結果	20	19	20	20	20	n.t.
rVWF#7FC 在 40°C±2°C 下之穩定性結果							
屬性	規格	在各時間（月）之結果					
		0	1	2	3	6	9
VWF:RCo 活性[U/ml] <sup>1)</sup>	70-150	111	115	122	105	99	112
VWF:Ag ELISA (U/ml)	報導結果	87.3	85.3	77.5	68.8	75	73.8
VWF 多聚體分析	報導結果	21	20	20	19	19	19



協方差分析(ANCOVA 分析)顯示,回歸線之斜率差(批次 rVWFF#4FC、rVWFF#5FC、rVWFF#6FC 及 rVWFF#7FC, 在  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$  儲存)不顯著 ( $p=0.906$ ),從而可按照 ICH Q1A(R2)中所描述合併 VWF:RCo 活性資料。個別批次之趨勢線的高度差亦不顯著。如圖 1 所示,對所合併之最壞狀況斜率(worse case slope)進行外推,顯示信賴區間完全處於最少 24 個月之接受標準內。平均曲線之下信賴區間在 51 個月時降低至 80%初始活性(在歐洲藥典中,對於人類馮威里氏因子,80%亦為估計效力與所陳述效力之間的最大差異)。所合併之最壞狀況斜率顯示,VWF:RCo 每月降低 0.0344 U。此比較顯示,rVWF FDP 之穩定性特性,特別是 VWF:RCo 活性不會由於產生方法之變化而改變。上述外推支持當在推薦儲存溫度下儲存時,rVWF FDP 之臨時存放期可擴充至 24 個月。

水分自塞子向凍乾製品轉移取決於塞子材料,且受塞子在滅菌後的殘餘水分、儲存樣本時的濕度及塞子固有水分轉移速率影響。如圖 2 中所示,在  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$  儲存之批次 rVWFF#4FC、rVWFF#5FC、rVWFF#6FC 及 rVWFF#7FC 的殘餘水分類似(斜率比較之差異不顯著, $p=0.734$ )。在高溫條件  $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  下儲存之批次亦顯示,經 9 個月之殘餘水分增加類似(圖 3)。在此,ANCOVA 分析顯示,回歸線斜率之差異類似( $p=0.546$ )。圖 3 顯示最壞狀況合併斜率外推至多達 24 個月。

當在  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$  下儲存時,此等資料足以支持使用批次 rVWFF#6FC 及 rVWFF#7FC 持續所描述之 24 個月有效期。

### 建議儲存條件及存放期

rVWF FDP 之推薦儲存條件為  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 。因此，當在所推薦儲存條件下儲存時，建議 rVWF FDP 之臨時存放期為 24 個月。rVWF FDP 批次之存放期有可能根據其他資料進一步延長以獲得更長儲存期。

**【符號說明】**

無

## 序列表

&lt;110&gt; 史耐克等人

&lt;120&gt; 凍乾的重組VWF調配物

&lt;130&gt; TW098135542

&lt;150&gt; US-61/107,273

&lt;151&gt; 2008-10-21

&lt;160&gt; 3

&lt;170&gt; PatentIn 3.5 版

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 8833

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智慧人

&lt;400&gt; 1

```

agctcacage tattgtggtg ggaaaggag ggtggttggg ggatgtcaca gcttgggctt      60
tatlcccc agcagtgggg actccacage ccttgggcta cataacagca agacagtccg      120
gagclgtagc agacctgatt gagcctttgc agcagctgag agcatggcct aggggtggcg      180
gcaccattgt ccagcagctg agtttcccag ggaccttggg gatagccgca gccctcattt      240
gcaggggaag atgattcctg ccagatttgc cgggggtgctg cttgctctgg ccctcatttt      300
gccagggacc ctltgtgcag aaggaactcg cggcaggica tccacggccc gatgcagcct      360
tttcggaagt gacttcgca acaccttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg      420
cagtlacctc ctggcagggg gctgccagaa acgctccttc tcgattattg gggacttcca      480
gaatggcaag agagtgagcc tctccgtgta tcttggggaa tttttgaca tccatttgtt      540
tgtcaatggt accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgccctatg cctccaaagg      600
gctglatcfa gaaactgagg ctggglacla caagctgtcc ggtgaggcct atggcittgt      660
ggccaggalc gatggcagcg gcaactttca agtccctgctg tcagacagat acttcaaca      720
gacctgcggg ctgtgtggca actttaacat ctttgcctgaa gatgacttta tgaccaaga      780
agggaccttg acctcggacc cttatgactl tgccaactca tgggctctga gcagtggaga      840
acagtggtgt gaacgggcat ctccctccag cagctcatgc aacatctctt ctggggaaat      900
gcagaagggc ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcgggtg ttgcccgtg      960
ccacctctg gtggacccc agccttttgt ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagtg      1020
tgctgggggg ctggagtgcg cctgccctgc cctcctggag tacgcccgga cctgtgcca      1080
ggagggaaat gtgctglacg gctggaccga ccacagcgcg tgcagcccag tgtgccctgc      1140
tggataggag tataggcagt gtgtgtcccc ttgcgccagg acctgccaga gcctgcacat      1200
caatgaaatg tgcaggagc gatgcgtgga tggctgcagc tggcctgagg gacagctcct      1260
ggatgaaggc ctctgcgtgg agagcaccga gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgcta      1320
ccctcccggc acctccctct ctgcgagactg caacacctgc atttgccgaa acagccagtg      1380
gatctgcagc aatgaagaat gtccagggga gtgccctgtc acaggtcaat cacacttcaa      1440
gagctttgac aacagatact tcaccttcag tgggatctgc cagtacctgc tggcccggga      1500
ttgccaggac cactccttct ccattgtcat tgagactgtc cagtgtgctg atgaccgca      1560
cgctgtgtgc acccgctccg tcaccgtccg gctgcctggc ctgcacaaca gccttltgaa      1620
actgaagcat ggggcaggag ttgccatgga tggccaggac gtccagctcc cctcctgaa      1680

```

aggtgacctc cgcatccagc atacagtac ggcctccgtg cgcctcagct acggggagga 1740  
cctgcagatg gactgggatg gccgcgggag gctgctggtg aagctgtccc ccgtctatgc 1800  
cgggaagacc tgcggcctgt gtgggaatta caatggcaac cagggcgacg acttccttac 1860  
ccccctctggg ctggcggagc cccgggtgga ggacttcggg aacgcctgga agctgcacgg 1920  
ggactgccag gacctgcaga agcagcacag cgatccctgc gccctcaacc cgcgcatgac 1980  
caggttctcc gaggaggcgt gcgcggtcct gacgtcccc acattcgagg cctgccatcg 2040  
tgccgtcagc ccgtgccct acctgcggaa ctgccgctac gacgtgtgct cctgctcggg 2100  
cggcccgag tgcctgtgcg gcgccctggc cagctatgcc gcggcctgcg cggggagagg 2160  
cgtgcgcgtc gcgtggcgcg agccaggccc ctgtgagctg aactgcccga aaggccaggt 2220  
gtacctgcag tgcgggacct cctgcaacct gacctgccg tctctctctt acccgatga 2280  
ggaatgcaat gaggcctgcc tggaggcgtc cttctgcccc ccagggtctt acatggatga 2340  
gaggggggac tgcgtgccca aggccagtg cccctgttac tatgacggtg agatcttcca 2400  
gccagaagac atcttctcag accatcacac catgtgctac tgtgaggatg gcttcatgca 2460  
ctgtaccatg agtggagtcc ccggaagctt gctgcctgac gctgtcctca gcagtcccct 2520  
gtctcatcgc agcaaaagga gcctatcctg tcggccccc atggtcaagc tgggtgtgctc 2580  
cgctgacaac ctgcgggctg aagggtcga gtglaccaa acgtgccaga actatgacct 2640  
ggagtgcatt agcatgggct gtgtctctgg ctgcctctgc cccccggca tggtcgggca 2700  
tgagaacaga tgtgtggccc tggaaagggt tccctgcttc catcagggca aggagtatgc 2760  
ccctggagaa acagtgaaga ttggctgcaa cacttgtgtc tgtcgggacc ggaagtggaa 2820  
ctgcacagac catgtgtgtg atgccacgtg ctccacgac ggcatggccc actacctcac 2880  
cttcgacggg ctcaaatacc tgttccccgg ggagtgccag tacgttctgg tgcaggatta 2940  
ctgcggcagt aacctggga cctttcggat cctagtgggg aataagggat gcagccaccc 3000  
ctcagtgaaa tgcaagaaac gggtcacat cctgggtggag ggaggagaga ttgagctgtt 3060  
tgacggggag gtgaatgtga agaggccat gaaggatgag actcactttg aggtggtgga 3120  
gtctggccgg tacatcattc tctgtctggg caaagccctc tccgtggtct gggaccgcca 3180  
cctgagcacc tccgtgggcc tgaagcagac ataccaggag aaagtgtgtg gcctgtgtgg 3240  
gaattttgat ggcatccaga acaatgacct caccagcagc aacctccaag tggaggaaga 3300  
ccctgtggac tttgggaact cctggaaagt gagctcgag tgtgctgaca ccagaaaagt 3360  
gcctctggac tcatccccg ccacctgcca taacaacatc atgaagcaga cgatgggtgga 3420  
ttcctcctgt agaatcctta ccagtacgt cttccaggac tgcaacaagc tgggtggacc 3480  
cgagccatat ctggatgct gcatttacga cacctgcctc tgtgagacca ttggggactg 3540  
cgcctgcttc tgcgacacca ttgctgccta tgcccacgtg tgtgcccagc atggcaaggt 3600  
ggtgacctgg aggacggcca cattgtgccc ccagagctgc gaggagagga atctccggga 3660  
gaacgggtat gagtgtgagt ggcgctataa cagctgtgca cctgcctgtc aagtcacgtg 3720  
tcagcaccct gagccactgg cctgccctgt gcagtgtgtg gagggctgcc atgcccactg 3780  
ccctccaggg aaaatcctgg atgagcttt gcagacctgc gttgacctg aagactgtcc 3840  
agtgtgtgag gtggctggcc ggcgttttc ctcaggaaag aaagtcacct tgaatcccag 3900  
tgacctgag cactgccaga ttggccactg tgatgtgtc aacctcact gtgaagcctg 3960

ccaggagccg ggaggccctgg tgggtgcctcc cacagatgcc ccggtgagcc ccaccactct 4020  
 glatgiggag gacatctcgg aaccgcccgtt gcacgatttc tactgcagca ggctactgga 4080  
 cctggctctc ctgtcggatg gctcctccag gctgtccgag gctgagtttg aagtgcgtgaa 4140  
 ggccctttgtg gtggacatga tggagcggct gcgcatctcc cagaagtggg tccgcgtggc 4200  
 cgtggiggag taccacgacg gctcccacgc ctacatcggg ctcaaggacc ggaagcgacc 4260  
 gtcagagctg cggcgcattg ccagccaggt gaagtatcgc ggccagccagg tggcctccac 4320  
 cagcgaggtc ttgaaataca cactgttcca aatcttcagc aagatcgacc gccctgaagc 4380  
 ctcccgcate accctgctcc tgatggccag ccaggagccc caacggatgt cccggaactt 4440  
 tctccctac gtcacaggcc tgaagaagaa gaaggtcatt gtgatcccgg tgggcattgg 4500  
 gccccatgcc aacctcaagc agatccgct catcgagaag caggcccctg agaacaaggc 4560  
 ctctgtcgtg agcagtgtg atgagctgga gcagcaaagg gacgagatcg ttagctacct 4620  
 ctgtgacctt gccctgaag cccctcctcc tactctgccc cccgacatgg cacaagtcac 4680  
 tgtgggcccc gggctcttgg gggtttcgac cctggggccc aagaggaact ccatggttct 4740  
 ggatgtggcg ttctcctgg aaggatcga caaatlgtt gaagccgact tcaacaggag 4800  
 caaggagttc atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca gcatccacgt 4860  
 cacggigtct cagtlactct acatggtgac tgtggagtac cccctcagcg aggcacagtc 4920  
 caaaggggac atctcgcgc ggggtcgcgaga gatccgctac caggcggca acaggaccaa 4980  
 cactgggctg gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc agggtgaccg 5040  
 ggagcaggcg cccaacctgg tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa 5100  
 gaggctgcct ggagacatcc aggtggtgcc cattggagtg ggccctaatg ccaacgtgca 5160  
 ggagctggag aggatgtgct ggcccattgc cctatcctc atccaggact ttgagacgct 5220  
 cccccgagag gctcctgacc tgggtcgtgca gaggtgctgc tccggagagg ggctgcagat 5280  
 cccccctc tcccctgcac ctgactgcag ccagcccctg gacgtgatcc ttctcctgga 5340  
 tggctcctcc aglttcccag ctcttattt tgalgaaatg aagagtttcg ccaaggcttt 5400  
 catttcaaaa gccaatatag ggcctcgtct cactcagggt tcagtgctgc agtatggaag 5460  
 calcaccacc atlgacgigc calggaacgt ggtcccggag aaagccatt tgcctgagcct 5520  
 tgtggacgtc atgcagcggg agggaggccc cagccaaatc ggggatgcct tgggctttgc 5580  
 tgtgcgatac ttgacttcag aaatgcatgg tgccaggccg ggagcctcaa aggcgggtgt 5640  
 catcctggtc acggacgtct ctgtggattc agtggatgca gcagctgatg ccgccaggtc 5700  
 caacagagtg acagtgttcc ctattggaat tggagatcgc tacgatgcag cccagctacg 5760  
 gatcttggca ggcccagcag gcgactccaa cgtgggtgag ctccagcga tgaagacct 5820  
 ccctaccatg gtcacctigg gcaattcctt cctccacaaa ctgtgctctg gatttgttag 5880  
 gatttgcagt gatgaggatg ggaatgagaa gagggcccgg gacgtctgga ccttgccaga 5940  
 ccagtgccac accgtgactt gccagccaga tggccagacc ttgctgaaga gtcacgggt 6000  
 caactgtgac cgggggctga ggccttcgtg ccctaacagc cagtcccctg ttaaagtgga 6060  
 agagacctgt ggctgccgct ggacctgcc ctgctgtgac acaggcagct ccaactcggca 6120  
 categtgacc ttgatgggc agaatttcaa gctgactggc agctgttctt atgtcctatt 6180  
 tcaaaacaag gagcaggacc tggaggtgat tctccataat ggtgcctgca gccctggagc 6240

aaggcagggc tgcataaata ccatcgaggt gaagcacagt gccctctccg tcgagctgca	6300
cagtacatg gaggtgacgg tgaatgggag actggtctct gttccttacg tgggtgggaa	6360
catggaagtc aacgtttatg gtgccatcat gcatgaggtc agattcaatc accttggta	6420
catcttcaca ttactccac aaaacaatga gticcaactg cagctcagcc ccaagacttt	6480
tgcttcaaag acgtatggtc tgtgtgggat ctgtgatgag aacggagcca atgacttcat	6540
gctgagggat ggcacagica ccacagactg gaaaacactt gttcaggaat ggactgtgca	6600
gcggccaggg cagacgtgcc agcccatcct ggaggagcag tgtctgtcc ccgacagctc	6660
ccactgccag gtctctctct taccactgtt tgctgaatgc cacaaggtcc tggctccagc	6720
cacattctat gccatctgcc agcaggacag ttgccaccag gagcaagtgt gtgaggtgat	6780
cgctcttat gccaccctct gtcggaccaa cggggtctgc gttgactgga ggacacctga	6840
tttctgtgct atgtcatgcc caccatctct ggtctacaac cactgtgagc atggctgtcc	6900
ccggcactgt gaiggcaacg tgagctcctg tggggacat cctccgaag gctgtttctg	6960
ccctccagat aaagtcatgt tggaaaggcag ctgtgtccct gaagaggcct gcactcagt	7020
cattgggtgag gaiggagtc agcaccagt cctggaagcc tgggtcccgg accaccagcc	7080
ctgtcagatc tgcacatgcc tcagcgggagc gaaggtcaac tgcacaacgc agccctgcc	7140
cacggccaaa gctcccacgt gtggcctgtg tgaagttagc cgctccgcc agaatgcaga	7200
ccagtgtgct cccgagiatg agtgtgtgtg tgaccagtg agctgtgacc tgcctccagt	7260
gcctcactgt gaacgtggcc tccagccac actgaccaac cctggcgagt gcagacccaa	7320
cttacctgc gctgcagga aggaggagt caaaagagt tcccaccct cctgcccccc	7380
gcaccgtttg cccacccttc ggaagaccca gtgctgtgat gagtatgagt gtgcctgcaa	7440
ctgtgtcaac tccacagtga gctgtccct tgggtacttg gcctcaactg ccaccaatga	7500
ctgtggctgt accacaacca cctgcccttc cgacaagggt tgtgtccacc gaagcacat	7560
ctaccctgtg ggcagatct gggaggaggc ctgcgatgtg tgcacctgca ccgacatgga	7620
ggatgccgtg atgggctcc gcgtggccca gtgtctccag aagccctgtg aggacagctg	7680
tcggtcgggc ttacttacg ttctgcatga aggcgagtc tgtggaaggt gcctgccatc	7740
tgctgtgag gtggtgactg gctcaccgag gggggactcc cagctctctt ggaagagtgt	7800
cggtctccag tgggctccc cggagaacct ctgcctcacc aatgagtgtg tccgagtga	7860
ggaggaggtc ttataacaac aaaggaacct ctctgcccc cagctggagg tccctgtctg	7920
cccccgggc tticagctga gctgtaaagac ctcagcgtgc tgcccaagct gtgcctgtga	7980
gcgcatggag gctgcatgc tcaatggcac tgcattggg cccgggaaga ctgtgatgat	8040
cgatgtgtgc acgacctgcc gctgcatggt gcagggtggg gtcactctct gattcaagct	8100
ggagtgcagg aagaccacct gcaaccctg cccctgggt tacaaggaag aaaataaac	8160
aggtgaatgt tgtgggagat gtttgcctac ggcttgacc aticagctaa gaggaggaca	8220
gatcatgaca ctgaagcgtg algagacgct ccaggatggc tgtgatactc acttctgcaa	8280
ggtcaatgag agaggagagt acttctggga gaagagggtc acaggctgcc cacccttga	8340
tgaacacaag tictgtgctg agggaggtaa aattatgaaa attccaggca cctgtctgta	8400
cacatgtgag gagcctgagt gcaacgacat cactgccagg ctgcagtatg tcaaggtggg	8460
aagctgtaag tctgaagtag aggtggatat ccactactgc cagggcaat gtgccagcaa	8520

agccatgtac tccattgaca tcaacgatgt gcaggaccag tgctcctgct gctctccgac 8580  
 acggacggag cccatgcagg tggccctgca ctgcaccaat ggctctgttg tgtaccatga 8640  
 ggttctcaat gccatggagt gcaaatgctc ccccaggaag tgcagcaagt gaggctgctg 8700  
 cagctgcatg ggigcctgct gctgcctgcc ttggcctgat ggccaggcca gagtgtgctg 8760  
 agtcctctgc atgttctgct cttgtgccct tetgagccca caataaaggc tgagctctta 8820  
 tcttgcaaaa ggc 8833

<210> 2  
 <211> 2783  
 <212> PRT  
 <213> 智慧人  
 <400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Cys Val His Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser  
 340 345 350

Arg Asp Cys Asn Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser  
 355 360 365

Asn Glu Glu Cys Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe  
 370 375 380

Lys Ser Phe Asp Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr  
 385 390 395 400

Leu Leu Ala Arg Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu  
 405 410 415

Thr Val Gln Cys Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val  
 420 425 430

Thr Val Arg Leu Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His  
 435 440 445

Gly Ala Gly Val Ala Met Asp Gly Gln Asp Val Gln Leu Pro Leu Leu  
 450 455 460

Lys Gly Asp Leu Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu  
 465 470 475 480

Ser Tyr Gly Glu Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu  
 485 490 495

Leu Val Lys Leu Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys  
 500 505 510

Gly Asn Tyr Asn Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly  
 515 520 525



Leu Ala Glu Pro Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His  
530 535 540

Gly Asp Cys Gln Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu  
545 550 555 560

Asn Pro Arg Met Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr  
565 570 575

Ser Pro Thr Phe Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr  
580 585 590

Leu Arg Asn Cys Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu  
595 600 605

Cys Leu Cys Gly Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg  
610 615 620

Val Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly  
625 630 635 640

Gln Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser  
645 650 655

Leu Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys  
660 665 670

Phe Cys Pro Pro Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys Ala Gln  
675 680 685

Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp Ile Phe  
690 695 700

Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met His Cys  
705 710 715 720

Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val Leu Ser  
725 730 735

Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro  
740 745 750

Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu  
755 760 765

Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met Ser Met  
770 775 780

Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg His Glu  
785 790 795 800

Asn Arg Cys Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala  
805 810 815

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp  
820 825 830

Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr  
835 840 845

Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe  
850 855 860

Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn  
865 870 875 880

Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro  
885 890 895

Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu  
900 905 910

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile  
1190 1195 1200

Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu  
1205 1210 1215

Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser Pro  
1220 1225 1230

Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His Asp  
1235 1240 1245

Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly  
1250 1255 1260

Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala Phe  
1265 1270 1275

Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg Ile Ser Gln Lys Trp Val  
1280 1285 1290

Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp Gly Ser His Ala Tyr Ile  
1295 1300 1305

Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu Leu Arg Arg Ile Ala  
1310 1315 1320

Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala Ser Thr Ser Glu  
1325 1330 1335

Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys Ile Asp Arg  
1340 1345 1350

Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu Leu Met Ala Ser Gln Glu  
1355 1360 1365

Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly Leu  
1370 1375 1380

Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His  
1385 1390 1395

Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu  
1400 1405 1410

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

Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu Gln  
1700 1705 1710

Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro  
1715 1720 1725

Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu  
1730 1735 1740

Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg  
1745 1750 1755

Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys  
1760 1765 1770

Ala Val Val Ile Leu Val Thr Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp  
1775 1780 1785

Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro  
1790 1795 1800

Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu  
1805 1810 1815

Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile  
1820 1825 1830

Glu Asp Leu Pro Thr Met Val Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His  
1835 1840 1845

Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg Ile Cys Met Asp Glu Asp Gly  
1850 1855 1860

Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp Val Trp Thr Leu Pro Asp Gln Cys  
1865 1870 1875

His Thr Val Thr Cys Gln Pro Asp Gly Gln Thr Leu Leu Lys Ser  
1880 1885 1890

His Arg Val Asn Cys Asp Arg Gly Leu Arg Pro Ser Cys Pro Asn  
1895 1900 1905

Ser Gln Ser Pro Val Lys Val Glu Glu Thr Cys Gly Cys Arg Trp  
1910 1915 1920

Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr Gly Ser Ser Thr Arg His Ile Val  
1925 1930 1935

Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe Lys Leu Thr Gly Ser Cys Ser Tyr  
1940 1945 1950

Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu Gln Asp Leu Glu Val Ile Leu His  
1955 1960 1965

Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly Ala Arg Gln Gly Cys Met Lys Ser  
1970 1975 1980

Ile Glu Val Lys His Ser Ala Leu Ser Val Glu Leu His Ser Asp  
 1985 1990 1995  
 Met Glu Val Thr Val Asn Gly Arg Leu Val Ser Val Pro Tyr Val  
 2000 2005 2010  
 Gly Gly Asn Met Glu Val Asn Val Tyr Gly Ala Ile Met His Glu  
 2015 2020 2025  
 Val Arg Phe Asn His Leu Gly His Ile Phe Thr Phe Thr Pro Gln  
 2030 2035 2040  
 Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln Leu Ser Pro Lys Thr Phe Ala Ser  
 2045 2050 2055  
 Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly Ile Cys Asp Glu Asn Gly Ala Asn  
 2060 2065 2070  
 Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr  
 2075 2080 2085  
 Leu Val Gln Glu Trp Thr Val Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln  
 2090 2095 2100  
 Pro Glu Gln Cys Leu Val Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu  
 2105 2110 2115  
 Leu Leu Pro Leu Phe Ala Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala  
 2120 2125 2130  
 Thr Phe Tyr Ala Ile Cys Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln  
 2135 2140 2145  
 Val Cys Glu Val Ile Ala Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn  
 2150 2155 2160  
 Gly Val Cys Val Asp Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser  
 2165 2170 2175  
 Cys Pro Pro Ser Leu Val Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro  
 2180 2185 2190  
 Arg His Cys Asp Gly Asn Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser  
 2195 2200 2205  
 Glu Gly Cys Phe Cys Pro Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser  
 2210 2215 2220  
 Cys Val Pro Glu Glu Ala Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly  
 2225 2230 2235  
 Val Gln His Gln Phe Leu Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro  
 2240 2245 2250  
 Cys Gln Ile Cys Thr Cys Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr  
 2255 2260 2265

Thr Gln Pro Cys Pro Thr Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys  
2270 2275 2280

Glu Val Ala Arg Leu Arg Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu  
2285 2290 2295

Tyr Glu Cys Val Cys Asp Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val  
2300 2305 2310

Pro His Cys Glu Arg Gly Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly  
2315 2320 2325

Glu Cys Arg Pro Asn Phe Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys  
2330 2335 2340

Lys Arg Val Ser Pro Pro Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr  
2345 2350 2355

Leu Arg Lys Thr Gln Cys Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn  
2360 2365 2370

Cys Val Asn Ser Thr Val Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser  
2375 2380 2385

Thr Ala Thr Asn Asp Cys Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro  
2390 2395 2400

Asp Lys Val Cys Val His Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln  
2405 2410 2415

Phe Trp Glu Glu Gly Cys Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu  
2420 2425 2430

Asp Ala Val Met Gly Leu Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro  
2435 2440 2445

Cys Glu Asp Ser Cys Arg Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu  
2450 2455 2460

Gly Glu Cys Cys Gly Arg Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val  
2465 2470 2475

Thr Gly Ser Pro Arg Gly Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val  
2480 2485 2490

Gly Ser Gln Trp Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg  
2495 2500 2505

Val Lys Glu Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro  
2510 2515 2520

Gln Leu Glu Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys  
2525 2530 2535

Lys Thr Ser Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu  
2540 2545 2550

Ala Cys Met Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val  
2555 2560 2565

Met Ile Asp Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly  
2570 2575 2580

Val Ile Ser Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn  
2585 2590 2595

Pro Cys Pro Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys  
2600 2605 2610

Cys Gly Arg Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly  
2615 2620 2625

Gly Gln Ile Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly  
2630 2635 2640

Cys Asp Thr His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe  
2645 2650 2655

Trp Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys  
2660 2665 2670

Cys Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys  
2675 2680 2685

Cys Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg  
2690 2695 2700

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

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

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

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

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

Arg Lys Cys Ser Lys  
2780

<210> 3  
<211> 2050  
<212> PRT  
<213> 智慧人

<400> 3

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu  
 500 505 510

Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala  
 515 520 525

Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu  
 530 535 540

Arg Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp  
 545 550 555 560

Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu  
 565 570 575

Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala  
 580 585 590

Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys  
 595 600 605

Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu Leu Met Ala Ser  
 610 615 620

Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly  
625 630 635 640

Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His  
645 650 655

Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn  
660 665 670

Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp  
675 680 685

Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro  
690 695 700

Thr Leu Pro Pro Asp Met Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu  
705 710 715 720

Gly Val Ser Thr Leu Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val  
725 730 735

Ala Phe Val Leu Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn  
740 745 750

Arg Ser Lys Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly  
755 760 765

Gln Asp Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr  
770 775 780

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr  
 1055 1060 1065

Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser  
 1070 1075 1080

Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val  
 1085 1090 1095

Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val  
 1100 1105 1110

Arg Ile Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp  
 1115 1120 1125

Val Trp Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln Pro  
 1130 1135 1140

Asp Gly Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp Arg  
 1145 1150 1155

Gly Leu Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys Val  
 1160 1165 1170

Glu Glu Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr  
 1175 1180 1185

Gly Ser Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe  
 1190 1195 1200

Lys Leu Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu  
 1205 1210 1215

Gln Asp Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly  
1220 1225 1230

Ala Arg Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala  
1235 1240 1245

Leu Ser Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly  
1250 1255 1260

Arg Leu Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn  
1265 1270 1275

Val Tyr Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly  
1280 1285 1290

His Ile Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln  
1295 1300 1305

Leu Ser Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly  
1310 1315 1320

Ile Cys Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly  
1325 1330 1335

Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val  
1340 1345 1350

Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys  
1355 1360 1365

Leu Val Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu  
1370 1375 1380

Phe Ala Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala  
1385 1390 1395

Ile Cys Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val  
1400 1405 1410

Ile Ala Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val  
1415 1420 1425

Asp Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser  
1430 1435 1440

Leu Val Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp  
1445 1450 1455

Gly Asn Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe  
1460 1465 1470

Cys Pro Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu  
1475 1480 1485

Glu Ala Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln  
1490 1495 1500

Phe Leu Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys  
 1505 1510 1515  
 Thr Cys Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys  
 1520 1525 1530  
 Pro Thr Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg  
 1535 1540 1545  
 Leu Arg Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val  
 1550 1555 1560  
 Cys Asp Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu  
 1565 1570 1575  
 Arg Gly Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro  
 1580 1585 1590  
 Asn Phe Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser  
 1595 1600 1605  
 Pro Pro Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr  
 1610 1615 1620  
 Gln Cys Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser  
 1625 1630 1635  
 Thr Val Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn  
 1640 1645 1650  
 Asp Cys Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys  
 1655 1660 1665  
 Val His Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu  
 1670 1675 1680  
 Gly Cys Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met  
 1685 1690 1695  
 Gly Leu Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser  
 1700 1705 1710  
 Cys Arg Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys  
 1715 1720 1725  
 Gly Arg Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro  
 1730 1735 1740  
 Arg Gly Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp  
 1745 1750 1755  
 Ala Ser Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val  
 1760 1765 1770  
 Lys Glu Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln  
 1775 1780 1785

Leu Glu Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys  
 1790 1795 1800  
 Thr Ser Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala  
 1805 1810 1815  
 Cys Met Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met  
 1820 1825 1830  
 Ile Asp Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val  
 1835 1840 1845  
 Ile Ser Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro  
 1850 1855 1860  
 Cys Pro Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys Cys  
 1865 1870 1875  
 Gly Arg Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly Gly  
 1880 1885 1890  
 Gln Ile Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys  
 1895 1900 1905  
 Asp Thr His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp  
 1910 1915 1920  
 Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys  
 1925 1930 1935  
 Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys  
 1940 1945 1950  
 Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu  
 1955 1960 1965  
 Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp  
 1970 1975 1980  
 Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser  
 1985 1990 1995  
 Ile Asp Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro  
 2000 2005 2010  
 Thr Arg Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly  
 2015 2020 2025  
 Ser Val Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys  
 2030 2035 2040  
 Ser Pro Arg Lys Cys Ser Lys  
 2045 2050

## 申請專利範圍

1. 一種重組馮威里氏因子 (recombinant von Willebrand Factor ; rVWF) 之穩定凍乾醫藥調配物，其包含：(a) rVWF；(b) 一或多種緩衝劑；(c) 一或多種胺基酸；(d) 一或多種穩定劑；及 (e) 一或多種界面活性劑；

(a) 該 rVWF 包含選自由以下者所組成之群組之多肽：

1) 在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；及

2) 由在 SEQ ID NO: 1 中所列出之多核苷酸編碼的多肽；

(b) 其緩衝液包含選自由以下者所組成之群組的 pH 緩衝劑：15 mM 的檸檬酸鹽及 HEPES，且其 pH 在約 2.0 至約 12.0 的範圍內；

(c) 該胺基酸係選自由以下者所組成之群組：甘胺酸、離胺酸及組胺酸，濃度為約 1 mM 至約 500 mM；

(d) 該穩定劑之濃度為約 0.1 mM 至約 1000 mM；且

(e) 該界面活性劑之濃度為約 0.01 g/L 至約 0.5 g/L。

2. 根據請求項 1 的調配物，其中該 rVWF 包含在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列。

3. 根據請求項 2 的調配物，其中該緩衝劑為檸檬酸鹽。

4. 根據請求項 1 的調配物，其中 pH 是在約 6.0 至約 8.0 的範圍內。

5. 根據請求項 4 的調配物，其中 pH 是在約 6.5 至約 7.5 的範圍內。

6. 根據請求項 2 的調配物，其中該 pH 為約 7.3。

7. 根據請求項 1 的調配物，其中該緩衝劑為檸檬酸鹽，且該 pH 為約 7.3。

8. 根據請求項 1 的調配物，其中該胺基酸的濃度在約 1 mM 至約 300 mM 的範圍內。

9. 根據請求項 8 的調配物，其中該胺基酸是濃度為約 15 mM 的甘胺酸。

10. 根據請求項 1 的調配物，其中該 rVWF 包含在 SEQ ID NO: 3 中所列



出之胺基酸序列；其中該緩衝劑為檸檬酸鹽且該 pH 為約 7.3；且其中該胺基酸是濃度為約 15 mM 的甘胺酸。

11. 根據請求項 1 的調配物，其中該一或多種穩定劑係選自由以下者所組成的群組：甘露醇、乳糖、山梨醇、木糖醇、蔗糖、海藻糖、甘露糖、麥芽糖、葡萄糖、棉子糖、纖維二糖、龍膽二糖、異麥芽糖、阿拉伯糖 (arabinose)、葡糖胺、果糖及這些穩定劑之組合。

12. 根據請求項 11 的調配物，其中該穩定劑是濃度為約 10g/L 的海藻糖及濃度為約 20g/L 的甘露醇。

13. 根據請求項 1 的調配物，其中該界面活性劑係選自由以下者所組成的群組：毛地黃皂苷、Triton X-100、Triton X-114、TWEEN-20、TWEEN-80 及這些界面活性劑之組合。

14. 根據請求項 13 的調配物，其中該界面活性劑是約 0.01 g/L 的 TWEEN-80。

15. 根據請求項 1 的調配物，其中該 rVWF 包含在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；其中該緩衝劑是濃度為約 15 mM、pH 約 7.3 的檸檬酸鹽；其中該胺基酸是濃度為約 15 mM 的甘胺酸；其中該穩定劑是濃度為約 10g/L 的海藻糖及濃度為約 20g/L 的甘露醇；且其中該界面活性劑是約 0.1 g/L 的 TWEEN-80。

16. 一種重組馮威里氏因子 (rVWF) 之穩定凍乾醫藥調配物，其包含：  
(a) rVWF；(b) 一或多種緩衝劑；(c) 一或多種胺基酸；(d) 一或多種穩定劑；及 (e) 一或多種界面活性劑；其中該調配物係藉由將包含以下者之溶液凍乾來製備：

(a) 該 rVWF 包含選自由以下者所組成之群組的多肽：

1) 在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；及

2) 由在 SEQ ID NO: 1 中所列出之多核苷酸編碼的多肽；

(b) 其緩衝液包含在約 0.1 mM 至約 500 mM 的範圍內的 pH 緩衝劑且具有在約 2.0 至約 12.0 的範圍內的 pH；其中該緩衝劑為檸檬酸鹽；

(c) 該胺基酸之濃度為約 1 mM 至約 500 mM；其中該胺基酸為甘胺酸；

(d) 該穩定劑之濃度為約 0.1 mM 至約 1000 mM，其中該一或多種穩定劑為甘露醇及海藻糖；及

(e) 該界面活性劑之濃度為約 0.01 g/L 至約 0.5 g/L，其中該界面活性劑是 TWEEN-80。

17. 一種重組馮威里氏因子 (rVWF) 之穩定凍乾醫藥調配物，其包含：

(a) rVWF；(b) 一或多種緩衝劑；(c) 一或多種胺基酸；(d) 一或多種穩定劑；及 (e) 一或多種界面活性劑；其中該調配物係藉由將包含以下者之溶液凍乾來製備：

(a) 該 rVWF 包含選自由以下者所組成之群組的多肽：

1) 在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；及

2) 由在 SEQ ID NO: 1 中所列出之多核苷酸編碼的多肽；

(b) 其緩衝液包含在約 0.1 mM 至約 500 mM 的範圍內的 pH 緩衝劑且具有在約 6.5 至約 7.5 的範圍內的 pH；其中該緩衝劑為檸檬酸鹽；

(c) 該胺基酸之濃度為約 1 mM 至約 500 mM；其中該胺基酸為甘胺酸；

(d) 該穩定劑之濃度為約 0.1 mM 至約 1000 mM，其中該一或多種穩定劑為甘露醇及海藻糖；及

(e) 該界面活性劑之濃度為約 0.01 g/L 至約 0.5 g/L，其中該界面活性劑是 TWEEN-80。

18. 一種重組馮威里氏因子 (rVWF) 之穩定凍乾醫藥調配物，其包含：

(a) rVWF；(b) 一或多種緩衝劑；(c) 一或多種胺基酸；(d) 一或多種穩定劑；及 (e) 一或多種界面活性劑；其中該調配物係藉由將包含以下者之溶液凍乾來製備：

(a) 該 rVWF 包含選自由以下者所組成之群組的多肽：

- 1) 在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；及
- 2) 由在 SEQ ID NO: 1 中所列出之多核苷酸編碼的多肽；

(b) 該溶液中的緩衝劑是濃度為 15 mM 的檸檬酸鹽且 pH 為約 7.3；

(c) 該胺基酸是在溶液中濃度為約 15 mM 的甘胺酸；

(d) 該穩定劑是在溶液中濃度為約 10g/L 的海藻糖及在溶液中濃度為約 20g/L 的甘露醇；及

(e) 該界面活性劑為在溶液中約 0.1 g/L 之 TWEEN-80。

19. 一種重組馮威里氏因子 (rVWF) 之穩定凍乾醫藥調配物，其由以下者組成：(a) rVWF；(b) 一或多種緩衝劑；(c) 一或多種胺基酸；(d) 一或多種穩定劑；及 (e) 一或多種界面活性劑；其中該調配物係藉由將溶液凍乾來製備：

其中該 rVWF 包含在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；其中該緩衝劑是 pH 約 7.3、在溶液中濃度為約 15 mM 的檸檬酸鹽；其中該胺基酸是在溶液中濃度為約 15 mM 的甘胺酸；其中該穩定劑是在溶液中濃度為約 10g/L 的海藻糖及在溶液中濃度為約 20g/L 的甘露醇；且其中該界面活性劑是在溶液中約 0.1 g/L 的 TWEEN-80。

20. 一種重組馮威里氏因子 (rVWF) 之穩定凍乾醫藥調配物，其由以下者組成：(a) rVWF；(b) 一或多種緩衝劑；(c) 一或多種胺基酸；(d) 一或多種穩定劑；及 (e) 一或多種界面活性劑；其中該調配物係藉由將溶液凍乾來製備：

其中該 rVWF 包含在 SEQ ID NO: 3 中所列出之胺基酸序列；其中該緩衝劑是 pH 約 7.3、在溶液中濃度為約 15 mM 的檸檬酸鹽；其中該胺基酸是在溶液中濃度為約 15 mM 的甘胺酸；其中該穩定劑是在溶液中濃度為約 10g/L 的海藻糖及在溶液中濃度為約 20g/L 的甘露醇；且其中該界面活性劑

是在溶液中約 0.1 g/L 的 TWEEN-80，其係用於靜脈內投予。

圖式

VWF:RC0

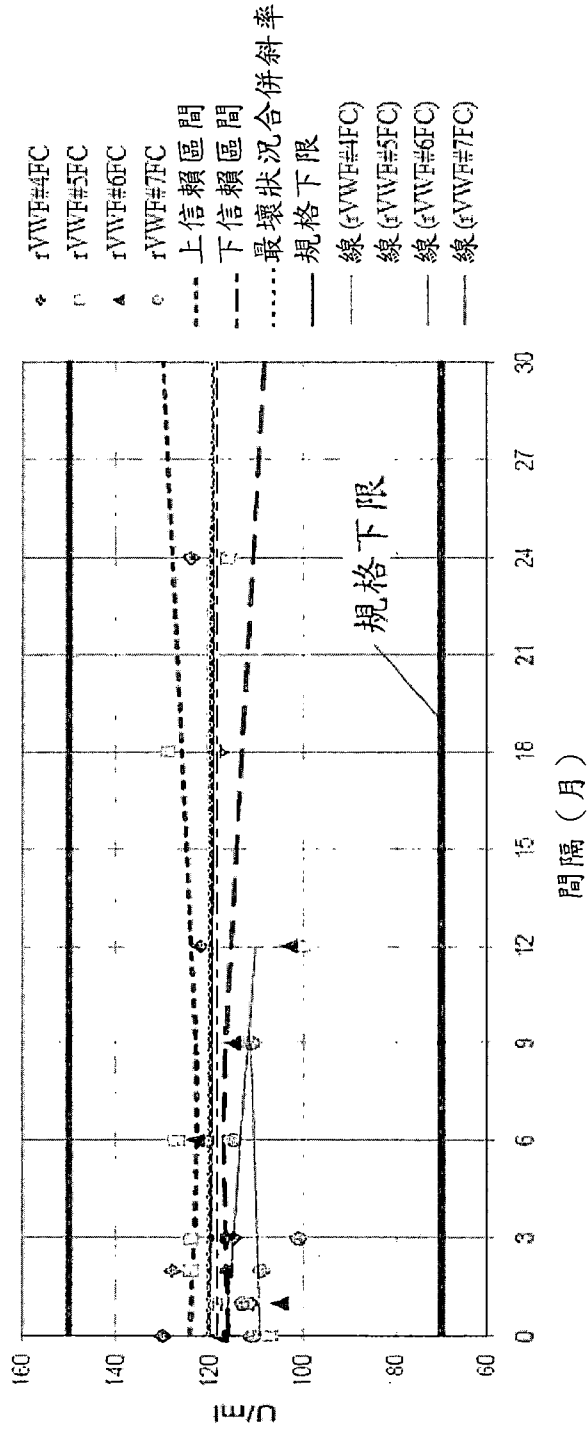


圖1

殘餘水分 2-8°C

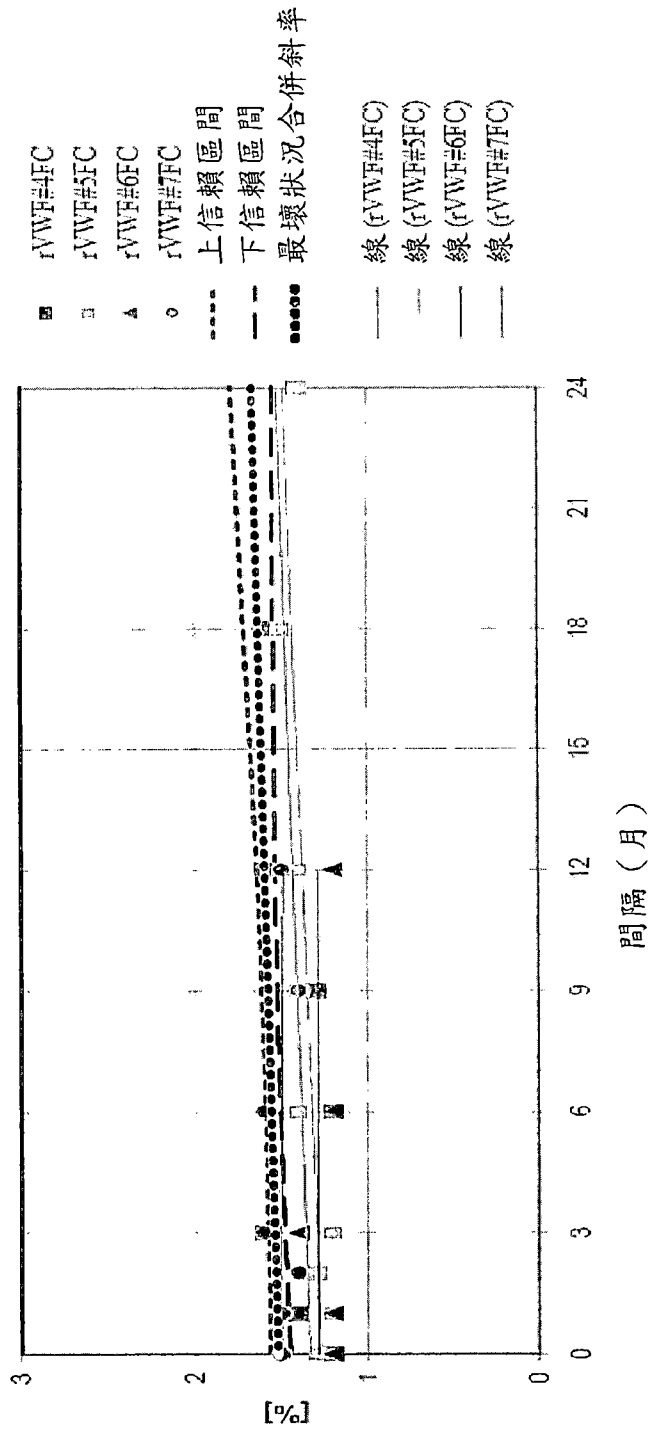


圖2

殘餘水分  $40 \pm 2^\circ\text{C}$

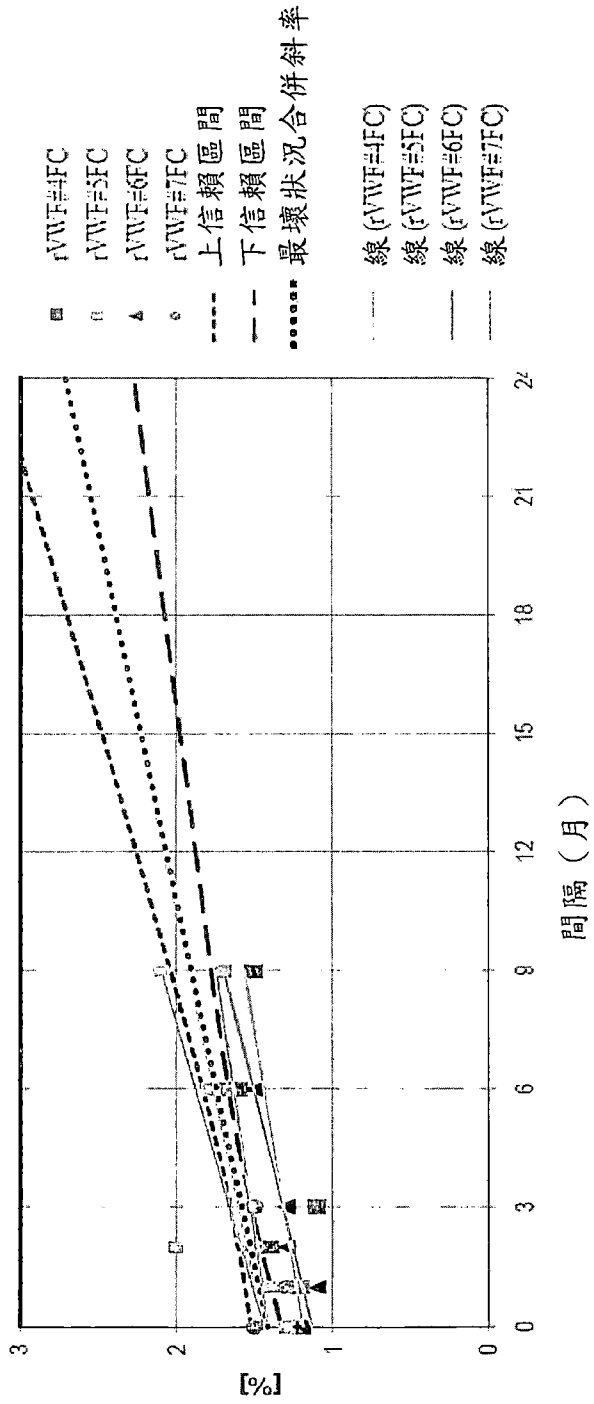


圖3