



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201438763 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：103123730

(22)申請日：中華民國 97 (2008) 年 12 月 23 日

(51)Int. Cl. : A61K9/08 (2006.01) A61K38/36 (2006.01)

(30)優先權：2007/12/28 美國 61/017,418

2007/12/31 美國 61/017,881

(71)申請人：巴克斯特國際公司 (美國) BAXTER INTERNATIONAL INC. (US)

美國

巴克斯特保健公司 (瑞士) BAXTER HEALTHCARE S.A. (CH)

瑞士

(72)發明人：麥西艾森 彼得 MATTHIESSEN, PETER (DE)；杜瑞柴克 彼得 TURECEK, PETER (AT)；史瓦茲 漢斯 彼得 SCHWARZ, HANS-PETER (AT)；史耐克 克特 SCHNECKER, KURT (AT)

(74)代理人：桂齊恆；閻啟泰

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：9 共 76 頁

(54)名稱

重組 VWF 調配物

RECOMBINANT VWF FORMULATIONS

(57)摘要

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

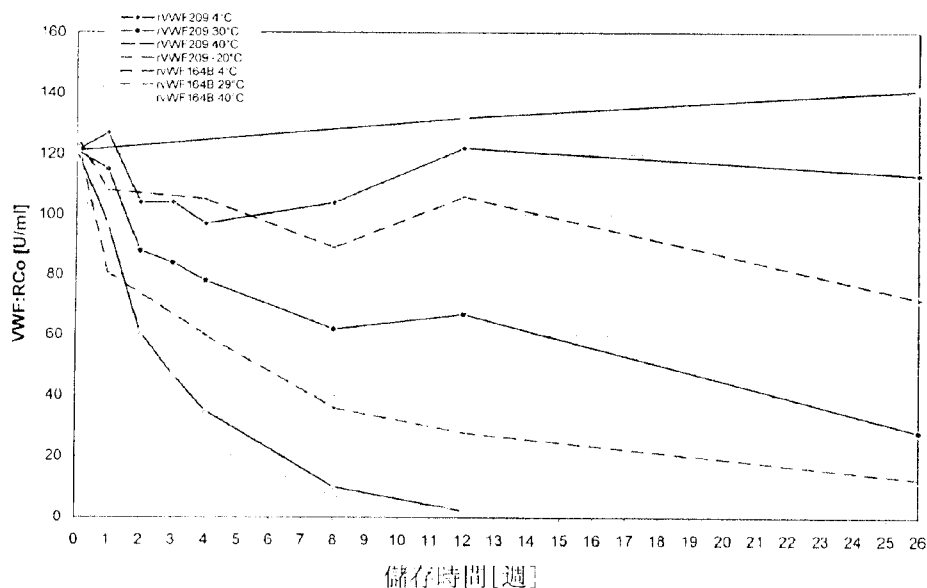


圖3



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201438763 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：103123730

(22)申請日：中華民國 97 (2008) 年 12 月 23 日

(51)Int. Cl. : *A61K9/08 (2006.01)* *A61K38/36 (2006.01)*

(30)優先權：2007/12/28 美國 61/017,418

2007/12/31 美國 61/017,881

(71)申請人：巴克斯特國際公司 (美國) BAXTER INTERNATIONAL INC. (US)

美國

巴克斯特保健公司 (瑞士) BAXTER HEALTHCARE S.A. (CH)

瑞士

(72)發明人：麥西艾森 彼得 MATTHIESSEN, PETER (DE)；杜瑞柴克 彼得 TURECEK, PETER (AT)；史瓦茲 漢斯 彼得 SCHWARZ, HANS-PETER (AT)；史耐克 克特 SCHNECKER, KURT (AT)

(74)代理人：桂齊恆；閻啟泰

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：9 共 76 頁

(54)名稱

重組 VWF 調配物

RECOMBINANT VWF FORMULATIONS

(57)摘要

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

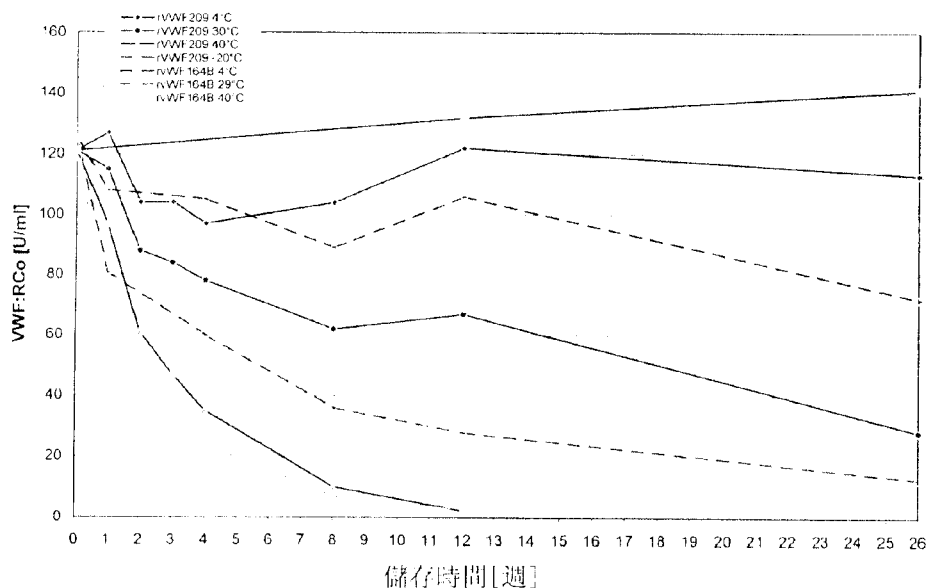


圖3

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

重組 VWF 調配物

RECOMBINANT VWF FORMULATIONS

【中文】

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

【英文】

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

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（3）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)

重組 VWF 調配物

RECOMBINANT VWF FORMULATIONS

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

【技術領域】

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

【先前技術】

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

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

於游離末端之間之二硫連接。繼組裝為多聚體後，蛋白水解移除前肽序列 (Leyte 等人, Biochem. J. 274 (1991), 257-261)。

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

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

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

因此，於技術領域中對開發包含重組 VWF 之穩定醫藥調配物存在需求。

【發明內容】

本發明提供適用於包含重組 VWF 之組合物的調配物，其產生高度穩定之醫藥組合物。該穩定醫藥組合物適用作治療患有可受益於重組 VWF 投藥

之病症或病狀的個體之治療劑。

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

在另一具體態樣中，提供上述調配物，其中 rVWF 包含 SEQ ID NO: 3 中所示之胺基酸序列。在另一具體態樣中，提供上述調配物，其中緩衝劑係選自由檸檬酸鈉、甘胺酸、組胺酸、Tris 及此等藥劑之組合所組成之群組。在又一具體態樣中，提供上述調配物，其中緩衝劑為檸檬酸鹽。在本發明之又一具體態樣中，提供上述調配物，其中 pH 在 6.0-8.0 或 6.5-7.3 之範圍內。在一相關具體態樣中，提供上述調配物，其中 pH 為 7.0。在另一具體態樣中，提供上述調配物，其中緩衝劑為檸檬酸鹽且 pH 為 7.0。

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

其中鹽為濃度為 10 mM 之氯化鈣。

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

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

在本發明之又一具體態樣中，提供上述調配物，其中穩定劑係選自由以下者所組成之群組：甘露糖醇、乳糖、山梨糖醇、木糖醇、蔗糖、海藻糖、甘露糖、麥芽糖、乳糖、葡萄糖、棉子糖、纖維二糖、龍膽二糖、異麥芽糖、阿拉伯糖、葡糖胺、果糖及此等穩定劑之組合。在另一具體態樣中，提供上述調配物，其中穩定劑為濃度為 7.8 mM 之海藻糖及濃度為 58.6 mM 之甘露糖醇。

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

在本發明之一具體態樣中，提供上述調配物，其中 rVWF 包含 SEQ ID

NO: 3 中所示之胺基酸序列；其中緩衝劑為濃度為 3.3 mM 之組胺酸及濃度為 3.3 mM 之 Tris (pH 7.0)；其中第一鹽為濃度為 30 mM 之氯化鈉且第二鹽為濃度為 0.56 mM 之氯化鈣；其中穩定劑為濃度為 7.8 mM 之海藻糖及濃度為 58.6 mM 之甘露糖醇；且其中界面活性劑為 0.03 g/L 之 TWEEN-80。

【圖式簡單說明】

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

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

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

圖 4 展示在 Advate 緩衝液中在 26 週期間 rVWF 濃度穩定。

圖 5 展示在 Advate 1:3 緩衝液中 rVWF 濃度隨時間穩定。

圖 6 展示在基於檸檬酸鹽之緩衝液中 rVWF 濃度隨時間穩定。

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

圖 8 展示 10 mM CaCl₂ 使 rVWF 之展開溫度增加約 8°C 至約 67°C。

圖 9 展示 CaCl₂ 之作用在 pH 7.3 及 pH 6.5 下類似。

【實施方式】

術語之定義

除非另外定義，否則本文所使用之所有技術及科學術語具有與本發明所屬技術領域內之一般熟習此項技術者通常所理解相同的含義。以下參考案對熟習技能者提供本發明中所使用之許多術語的通用定義：Singleton 等人，DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (第 2

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

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

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

如本文中所使用, 除非另外規定, 否則以下術語具有歸於其之含義。

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

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

如本文中所使用, 術語「表現 (express/expressing/ expression)」意謂允許或使基因或 DNA 序列中之資訊變得顯現, 例如藉由活化轉錄及轉譯相應基因或 DNA 序列所涉及之細胞功能來產生蛋白質。DNA 序列表現於細胞中或藉由細胞表現以形成諸如蛋白質之「表現產物 (expression product)」。

現產物自身（例如所得蛋白質）亦可稱為「經表現（expressed）」。表現產物之特徵可為細胞內、細胞外或分泌型產物。術語「細胞內（intracellular）」意謂在細胞內。術語「細胞外（extracellular）」意謂在細胞外，諸如跨膜蛋白。若物質在很大程度上自細胞上或細胞內之某處出現在細胞外，則其由細胞「分泌（secreted）」。

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

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

如本文中所使用，「類似物（analog）」係指結構實質上類似且具有相同生物活性、但可具有不同程度之活性之兩種或兩種以上多肽中的任一者，完整分子，或其片段。基於涉及一或多個胺基酸取代其他胺基酸之一或多個突變，類似物在其胺基酸序列之組成方面不同。基於經置換之胺基酸及置換其之胺基酸的物理化學或功能相關性，取代可為保守或非保守的。

如本文中所使用，「變異體（variant）」係指經修飾以包含通常不為分子之一部分之其他化學部分的多肽、蛋白質或其類似物。該等部分可調節分子之可溶性、吸收、生物半衰期等。或者，該等部分可降低分子之毒性且消除或減少分子之不良副作用等。能夠介導該等作用之部分揭示於 Remington's Pharmaceutical Sciences (1980)中。用於使該等部分偶合於分子之程序為技術領域中所熟知。舉例而言，變異體可為具有賦予蛋白質較長活

體內半衰期之化學修飾的凝血因子。在各種態樣中，多肽藉由糖基化、聚乙二醇化及/或聚唾液酸化來修飾。

重組 VWF

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

一種形式之適用 rVWF 至少具有活體內穩定（例如結合）至少一種因子 VIII (FVIII) 分子及視情況的具有藥理學上可接受之糖基化模式的特性。其特定實例包括無 A2 域、因此抗蛋白水解之 VWF (Lankhof 等人, *Thromb. Haemost.* 77: 1008-1013, 1997)，及包括醣蛋白 1b 結合域及對膠原蛋白及肝素之結合位點的 Val 449 至 Asn 730 之 VWF 片段 (Pietu 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 1339-1347, 1989)。對 VWF 穩定至少一種 FVIII 分子之能力的測定可根據現有技術中已知之方法在 VWF 缺陷型哺乳動物中進行。

本發明之 rVWF 可藉由技術領域中已知之任何方法來產生。一特定實例揭示於 1986 年 10 月 23 日公開之 WO86/06096 及 1990 年 7 月 23 日申請之美國專利申請案第 07/559,509 號中，該等案關於產生重組 VWF 之方法以引用的方式併入本文中。因此，用於下述之方法為技術領域中所已知：(i) 藉由遺傳工程化產生重組 DNA，例如經由 RNA 之逆轉錄及/或 DNA 之擴增；(ii) 藉由轉染將重組 DNA 引入原核或真核細胞，例如經由電穿孔或顯微注射；(iii) 培養該等經轉形之細胞，例如以連續或分批方式；(iv) 表現

VWF，例如原構性表現或在誘導之後表現；及 (v) 分離該 VWF，例如自培養基或藉由收穫經轉形之細胞；以便 (vi) 獲得經純化之 rVWF，例如經由陰離子交換層析法或親和力層析法。重組 VWF 可在經轉形之宿主細胞中使用技術領域中熟知之重組 DNA 技術來產生。舉例而言，可使用合適限制酶自 DNA 切離編碼多肽之序列。

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

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

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

隨後，培養及純化經轉形之宿主。可在習知醱酵條件下培養宿主細胞

以使所需化合物得以表現。該等醱酵條件為技術領域中所熟知。最後，藉由技術領域中熟知之方法自培養物中純化多肽。

視用於表現本發明之化合物的宿主細胞而定，碳水化合物（寡醣）基團可便利地連接於已知為蛋白質中之糖基化位點的位點。一般而言，當其為序列 Asn-X-Ser/Thr 之一部分時，其中 X 可為除脯胺酸外之任何胺基酸，O-連接的寡醣連接於絲胺酸（Ser）或蘇胺酸（Thr）殘基，而 N-連接的寡醣連接於天冬醯胺（Asn）殘基。X 較佳為不包括脯胺酸之 19 種天然存在胺基酸中之一者。各類型中存在之 N-連接的及 O-連接的寡醣之結構及糖殘基不同。通常在兩者上均存在之一種類型之糖為 N-乙醯神經胺酸（稱為唾液酸）。唾液酸通常為 N-連接的與 O-連接的寡醣之末端殘基且藉助於其負電荷可賦予糖基化化合物酸性特性。可將該（該等）位點併入本發明之化合物的連接子中且較佳在重組產生多肽化合物期間藉由細胞糖基化（例如在諸如 CHO、BHK、COS 之哺乳動物細胞中）。然而，該等位點可進一步藉由技術領域中已知之合成或半合成程序來糖基化。

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

VWF 之片段、變異體及類似物

用於製備多肽片段、變異體或類似物之方法為技術領域中所熟知。

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

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

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

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

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

製備聚乙二醇化多肽類似物通常將包含以下步驟：(a) 在使結合構築體多肽連接於一或多個 PEG 基團的條件下使多肽與聚乙二醇（諸如 PEG 之反應性酯或醛衍生物）反應；及 (b) 獲得反應產物。一般而言，醯化反應之最佳反應條件將根據已知參數及所需結果來確定。舉例而言，PEG:蛋白質之比率愈大，聚聚乙二醇化產物之百分比愈大。在一些具體態樣中，結合構築體將於 N-末端處具有單一 PEG 部分。聚乙二醇（polyethylene glycol，PEG）可連接於凝血因子以提供較長活體內半衰期。PEG 基團可具有任何適宜分子量且可為線性或分枝基團。PEG 之平均分子量在約 2 千道爾頓（kiloDalton，「kD」）至約 100 kDa、約 5 kDa 至約 50 kDa 或約 5 kDa 至約 10 kDa 之範圍內。藉由經由 PEG 部分上之天然或工程化反應性基團（例如醛、胺基、硫醇或酯基）與凝血因子上之反應性基團（例如醛、胺基或酯基）醯化或還原烷基化或藉由技術領域中已知之任何其他技術使 PEG 基團連接

於凝血因子。

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

進一步預期本發明之多肽可為與第二藥劑之融合蛋白，該第二藥劑為多肽。在一具體態樣中，為多肽之第二藥劑為 (但不限於) 酶、生長因子、抗體、細胞激素、趨化因子、細胞表面受體、細胞表面受體之胞外域、細胞黏著分子或上述蛋白質之片段或活性域。在一相關具體態樣中，第二藥劑為凝血因子，諸如因子 VIII、因子 VII、因子 IX。所預期之融合蛋白藉由技術領域中熟知之化學或重組技術來製備。

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

編碼片段、變異體及類似物之聚核苷酸可易於藉由熟習技術者產生以編碼天然存在分子之具有與天然存在分子相同或類似之生物活性的生物活性片段、變異體或類似物。此等聚核苷酸可使用 PCR 技術、DNA 編碼分子之消化/連接及其類似技術來製備。因此，熟習此項技術者將能夠使用技術領域中已知之任何方法（包括，但不限於位點特異性突變誘發）產生 DNA 股之單一鹼基改變以產生經改造密碼子及錯義突變。如本文中所使用，片語「中等嚴格雜交條件 (moderately stringent hybridization conditions)」意謂（例如）於 42°C 下在 50% 甲醯胺中雜交及於 60°C 下在 0.1×SSC、0.1% SDS 中洗滌。熟習此項技術者應瞭解，基於欲雜交之序列的長度及 GC 核苷酸鹼基含量進行此等條件之變化。技術領域中之配方標準適於確定確切雜交條件。參見 Sambrook 等人，9.47-9.51，於 *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) 中。

通用調配物及賦形劑

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

開發用於治療性蛋白質之調配物的主要挑戰在於使產品相對於製造、運輸及儲存之壓力穩定。調配物賦形劑之作用在於提供相對於此等壓力之穩定化作用。亦可利用賦形劑以降低高濃度蛋白質調配物之黏度以便使其能夠傳遞且增強患者便利性。一般而言，賦形劑可基於其使蛋白質相對於

各種化學及物理壓力穩定之機制加以分類。一些賦形劑用於減輕特定壓力之作用或調節特定蛋白質之特定敏感性。其他賦形劑對蛋白質之物理及共價穩定性具有更普遍作用。本文所述之賦形劑藉由其化學類型或其於調配物中之功能作用來編組。當論述各賦形劑類型時，提供對穩定化方式之簡短描述。

鑒於本文提供之教示內容及指導，熟習此項技術者將瞭解何量或何範圍之賦形劑可包括於任何特定調配物中以得到促進保留生物藥物（例如多肽）之穩定性的本發明之生物醫藥調配物。舉例而言，欲包括於本發明之生物醫藥調配物中之鹽的量及類型可根據最終溶液之所需滲透壓度（亦即等滲、低滲或高滲）以及欲包括於調配物中之其他組份的量及滲透壓度來選擇。類似地，藉由參考包括於調配物中之多元醇或糖的類型來例示，該賦形劑之量將視其滲透壓度而定。

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

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

當然，一般熟習此項技術者將認識到本文所述之賦形劑的濃度在特定調配物中具有互依性。舉例而言，當例如存在高多肽濃度時或當例如存在高穩定劑濃度時，可降低膨化劑之濃度。另外，一般熟習此項技術者將認識到為維持不存在膨化劑之特定調配物的等滲性，將相應地調節穩定劑之濃度（亦即，將使用「滲透（tonicifying）」量之穩定劑）。常見賦形劑為技術領域中所已知且可見於 Powell 等人，*Compendium of Excipients for Parenteral Formulations* (1998), *PDA J. Pharm. Sci. Technology*, 52:238-311 中。

緩衝液及緩衝劑

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

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

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

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

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

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

用於緩衝本文所述之調配物的例示性 pH 緩衝劑包括 (但不限於) 甘胺酸、組胺酸、麩胺酸鹽、丁二酸鹽、磷酸鹽、乙酸鹽、檸檬酸鹽、Tris 及胺

基酸或胺基酸之混合物，包括（但不限於）天冬胺酸、組胺酸及甘胺酸。

鹽

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

穩定劑及膨化劑

在本發明之醫藥調配物中，可添加穩定劑（或穩定劑之組合）以防止或減少儲存誘發之凝集及化學降解。重構後之混濁或渾濁溶液表示蛋白質已沈澱或至少凝集。術語「穩定劑（stabilizer）」意謂能夠防止在水溶液狀態下凝集或其他物理降解以及化學降解（例如自溶、脫醯胺、氧化等）之賦形劑。習用於醫藥組合物中之穩定劑包括（但不限於）蔗糖、海藻糖、甘露糖、麥芽糖、乳糖、葡萄糖、棉子糖、纖維二糖、龍膽二糖、異麥芽糖、阿拉伯糖、葡糖胺、果糖、甘露糖醇、山梨糖醇、甘胺酸、精胺酸 HCl、多羥基化合物（包括多醣，諸如葡聚糖、澱粉、羥乙基澱粉、環糊精、N-甲基吡咯啉酮、纖維素及玻糖醛酸）、氯化鈉[Carpenter 等人，Develop. Biol. Standard 74:225, (1991)]。在本發明之調配物中，穩定劑係以約 0.1 mM、0.5

mM、0.7 mM、0.8 mM、0.9 mM、1.0 mM、1.2 mM、1.5 mM、1.7 mM、2 mM、3 mM、4 mM、5 mM、6 mM、7 mM、8 mM、9 mM、10 mM、11 mM、12 mM、13 mM、14 mM、15 mM、16 mM、17 mM、18 mM、19 mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM、100 mM、200 mM、500 mM、700 mM、900 mM 或 1000 mM 之濃度併入。

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

界面活性劑

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

界面活性劑常用於蛋白質調配物中以防止表面誘發之降解。界面活性劑為具有與蛋白質競爭界面位置之能力的兩性分子。界面活性劑分子之疏

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

清潔劑亦可影響蛋白質之熱力學構形穩定性。在此處同樣，特定清潔劑賦形劑之作用將具有蛋白質特異性。舉例而言，已展示聚山梨醇酯降低一些蛋白質之穩定性且增加其他蛋白質之穩定性。蛋白質之清潔劑去穩定可根據清潔劑分子之可參與與部分或完全展開之蛋白質狀態之特異性結合的疏水性尾來合理化。此等類型之相互作用會引起構形平衡移向更膨脹之蛋白質狀態（亦即增加蛋白質分子之疏水性部分暴露，此與結合聚山梨醇酯相反）。或者，若蛋白質天然狀態展現一些疏水性表面，則清潔劑與天然狀態之結合可使該構形穩定。

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

作用之化學計量有關 (Randolph T.W.等人, *Pharm Biotechnol.*, 13:159-75 (2002))。

亦可添加適量之界面活性劑以防止冷凍及乾燥期間之表面相關凝集現象[Chang, B, J. Pharm. Sci. 85:1325, (1996)]。例示性界面活性劑包括陰離子、陽離子、非離子、兩性離子及兩性界面活性劑，包括衍生自天然存在胺基酸之界面活性劑。陰離子界面活性劑包括(但不限於)月桂基硫酸鈉、二辛基磺基丁二酸鈉及二辛基磺酸鈉、鵝去氧膽酸、N-月桂醯基肌胺酸鈉鹽、十二烷基硫酸鈣、1-辛烷磺酸鈉鹽、水合膽酸鈉、去氧膽酸鈉及甘去氧膽酸鈉鹽。陽離子界面活性劑包括(但不限於)氯苄烷銨或苄索氯銨、單水合氯化十六烷基吡啶及溴化十六烷基三甲基銨。兩性離子表面活性劑包括(但不限於)CHAPS、CHAPSO、SB3-10及SB3-12。非離子界面活性劑包括(但不限於)毛地黃皂苷、Triton X-100、Triton X-114、TWEEN-20及TWEEN-80。界面活性劑亦包括(但不限於)聚桂醇 400，聚癸氧 40 硬脂酸酯，聚氧乙炔氫化蓖麻油 10、40、50 及 60，單硬脂酸甘油酯，聚山梨醇酯 40、60、65 及 80，大豆卵磷脂及其他磷脂，諸如二油基磷脂醯膽鹼 (dioleoyl phosphatidyl choline, DOPC)、二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油 (dimyristoylphosphatidyl glycerol, DMPG)、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼 (dimyristoylphosphatidyl choline, DMPC) 及二油基磷脂醯甘油 (dioleoyl phosphatidyl glycerol, DOPG); 蔗糖脂肪酸酯、甲基纖維素及羧甲基纖維素。因此進一步提供包含個別或呈不同比率之混合物形式的此等界面活性劑之組合物。在本發明之調配物中，界面活性劑係以約 0.01 g/L 至約 0.5 g/L 之濃度併入。

其他常見賦形劑組份

胺基酸

已發現胺基酸在蛋白質調配物中作為緩衝劑、膨化劑、穩定劑及抗氧化劑之多種用途。使用組胺酸及麩胺酸分別在 5.5-6.5 及 4.0-5.5 之 pH 範圍內緩衝蛋白質調配物。組胺酸之咪唑基具有 $pK_a = 6.0$ 且麩胺酸側鏈之羧基具有 4.3 之 pK_a ，其使此等胺基酸適合於在其各自 pH 範圍內緩衝。麩胺酸尤其適用於該等情況（例如 Stemgen®）。組胺酸通常見於市售蛋白質調配物（例如 Xolair®、Herceptin®、Recombinate®）中，且此胺基酸提供檸檬酸鹽（已知在注射後刺痛之緩衝劑）之替代物。有趣地，亦已報導相對於在液體與凍乾呈現中以高濃度使用時之凝集，如在具有 ABX-IL8（IgG2 抗體）之調配物中所觀察到，組胺酸具有穩定作用（Chen B 等人，*Pharm Res.*, 20(12): 1952-60 (2003)）。亦觀察到組胺酸（至多 60 mM）降低此抗體之高濃度調配物的黏度。然而，在相同研究中，作者觀察到在不鏽鋼容器中之抗體的凍融研究期間含有組胺酸之調配物的凝集增加及褪色。作者將此歸因於自鋼容器腐蝕浸出之鐵離子的作用。關於組胺酸之另一注意在於其在金屬離子存在下經歷光氧化（Tomita M 等人，*Biochemistry*, 8(12): 5149-60 (1969)）。在調配物中使用甲硫胺酸作為抗氧化劑顯現前景；已觀察到其有效抵抗多種氧化壓力（Lam XM 等人，*J Pharm Sci.*, 86(11): 1250-5 (1997)）。

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

對競爭凝集反應之抑制。

抗氧化劑

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

除各種賦形劑防止蛋白質氧化之有效性外，抗氧化劑本身誘導蛋白質之其他共價或物理變化的可能性受到關注。舉例而言，還原劑會引起分子內二硫鍵斷裂，此會導致雙硫改組。在過渡金屬離子存在下，已證明抗壞血酸及 EDTA 促進多種蛋白質及肽中之甲硫胺酸氧化（Akers MJ, 及 Defelippis MR. Peptides and Proteins as Parenteral Solutions. 於: Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins 中. Sven Frokjaer, Lars Hovgaard 編 Pharmaceutical Science. Taylor and Francis, UK (1999)；Fransson J.R., *J. Pharm. Sci.* 86(9): 4046-1050 (1997)；Yin J 等人, *Pharm Res.*, 21(12): 2377-83 (2004)）。已報導硫代硫酸鈉降低 rhuMab HER2 中光及溫度誘發之甲硫胺酸氧化的程度；然而，在此研究中亦報導硫代硫酸鹽-蛋白質加合物之形成（Lam XM, Yang JY 等人, *J Pharm Sci.* 86(11): 1250-5 (1997)）。根據蛋白質之特定壓力及

敏感性進行對適當抗氧化劑之選擇。

金屬離子

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

金屬離子賦予蛋白質穩定性或增強之活性的兩個實例為人類脫氧核糖核酸酶（rhDNase，Pulmozyme®）及因子 VIII。在 rhDNase 之情況下，Ca⁺² 離子（至多 100 mM）經由特異性結合位點增強酶之穩定性（Chen B 等人，*J Pharm Sci.*, 88(4): 477-82 (1999)）。事實上，自具有 EGTA 之溶液移除鈣離子使得脫醯胺及凝集增加。然而，僅在 Ca⁺² 離子情況下觀察到此作用；觀察到其他二價陽離子 Mg⁺²、Mn⁺² 及 Zn⁺² 使 rhDNase 不穩定。在因子 VIII 中觀察到類似作用。Ca⁺² 及 Sr⁺² 離子使蛋白質穩定，而如 Mg⁺²、Mn⁺² 及 Zn⁺²、Cu⁺² 及 Fe⁺² 之其他離子使酶不穩定（Fatouros, A.等人，*Int. J. Pharm.*, 155, 121-131 (1997)）。在關於因子 VIII 之獨立研究中，在 Al⁺³ 離子存在下觀察到凝集速率之顯著增加（Derrick TS 等人，*J. Pharm. Sci.*, 93(10): 2549-57 (2004)）。作者注意到如緩衝鹽之其他賦形劑通常受 Al⁺³ 離子污染，且說明需要在經調配產物中使用具有適當品質之賦形劑。

防腐劑

當開發包括一種以上來自相同容器之萃取物的多用途非經腸調配物

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

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

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

一些防腐劑會引起注射部位反應，其為需要在選擇防腐劑時加以考慮

之另一因素。在致力於評估 Norditropin 中之防腐劑及緩衝劑的臨床試驗中，觀察到疼痛感覺在含有苯酚及苄醇之調配物中與含有間甲酚之調配物相比較低（Kappelgaard A.M., *Horm Res.* 62 Suppl 3:98-103 (2004)）。有趣地，在常用防腐劑中，苄醇具有麻醉特性（Minogue SC 及 Sun DA., *Anesth Analg.*, 100(3): 683-6 (2005)）。

凍乾

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

在一態樣中，凍乾循環包含三個步驟：冷凍、第一乾燥及第二乾燥[A.P. Mackenzie, *Phil Trans R Soc London, Ser B, Biol* 278:167 (1977)]。在冷凍步驟中，冷卻溶液以引發結冰。此外，此步驟誘發膨化劑之結晶。冰在第一乾燥階段中昇華，其係藉由使用真空及引入熱量以促進昇華而使腔室壓力降低至冰之蒸氣壓以下來進行。最後，在第二乾燥階段中在降低之腔室壓力下及於升高之儲存溫度下移除吸附或結合之水。該過程產生稱為凍乾餅之物質。此後，該餅可用無菌水或適於注射之稀釋劑來重構。

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

在乾燥狀態下，玻璃轉移溫度提供關於最終產物之儲存溫度之資訊。

製備方法

本發明進一步涵蓋製備醫藥調配物之方法。例如無菌注射用水、用於多劑量用途之具有防腐劑的水或具有適量界面活性劑(例如聚山梨醇酯-20)之水、0.4%生理食鹽水、0.3%甘胺酸或水性懸浮液之各種水性載劑可含有活性化合物與適合於製造水性懸浮液之賦形劑的混合物。在各種態樣中，該等賦形劑為懸浮劑，例如羧甲基纖維素鈉、甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、海藻酸鈉、聚乙烯基吡咯啉酮、黃耆膠及阿拉伯膠；分散劑或濕潤劑可為天然存在之磷脂(例如卵磷脂)，或氧化烯與脂肪酸之縮合產物(例如聚氧乙烯硬脂酸酯)，或氧化乙烯與長鏈脂族醇之縮合產物(例如十七伸乙基氧基十六醇)，或氧化乙烯與衍生自脂肪酸及己糖醇之偏酯的縮合產物(諸如聚氧乙烯山梨糖醇單油酸酯)，或氧化乙烯與衍生自脂肪酸及己糖醇酸酐之偏酯的縮合產物(例如聚乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯)。水性懸浮液亦可含有一或多種防腐劑，例如對羥基苯甲酸乙酯或對羥基苯甲酸正丙酯。

投藥

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

包括上文所揭示之彼等藥劑。

醫藥調配物可經口、局部、經皮、非經腸、藉由吸入噴霧、經陰道、經直腸或藉由顱內注射來投予。如本文中所使用，術語非經腸包括皮下注射、靜脈內、肌肉內、腦池內注射或輸液技術。亦涵蓋藉由靜脈內、皮內、肌肉內、乳房內、腹膜內、鞘內、眼球後、肺內注射進行投藥及/或於特定部位處進行手術植入。通常，組合物基本上無熱原質，以及會對受體有害之其他雜質。

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

套組

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

調配物之裝置。較佳地，套組含有描述醫藥調配物之用途的標籤。

劑量

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

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

以下實施例不欲具有限制性，而僅例示本發明之特定具體態樣。

實施例 1

震盪實驗

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

於室溫 (RT) 下使於 Advate 緩衝液 (90 mM NaCl、1.68 mM CaCl₂、10 mM L-組胺酸、10 mM tris、0.26 mM 麩胱甘肽、23.4 mM 海藻糖、175.7 mM 甘露糖醇及 0.1 g/L TWEEN-80, pH 7.0) 或 Advate 1:3 緩衝液 (於水中稀釋 3 倍之 Advate 緩衝液) 中之 rVWF 於震盪器上經受劇烈震盪歷時 0 min、1 min、2.5 小時或 4 天，且相對於震盪之前的起始物質質量測 rVWF 之回收百分比。如表 1 中所示，在 Advate 緩衝液中觀察到約 40-80% 之損失，而在 Advate 1:3 緩衝液中觀察到約 20-30% 之損失。VWF 抗原 VWF:Ag 對應於可在 VWF 特异性 ELISA 中使用多株抗-VWF 抗體偵測之 VWF 的量，而 VWF:RC₀ 對應於在瑞斯托菌素 (ristocetin) 存在下引起穩定血小板之凝集之 VWF 的量。在兩種情況下，使用相對於實際 WHO 標準校準之人類參考血漿作為標準 (1 ml 參考血漿通常含有 1U VWF)。

表 1. 劇烈震盪時間對 rVWF 回收率之影響

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

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

表 2.

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

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

總而言之，劇烈震盪導致在 Advate 緩衝液或 Advate 1:3 緩衝液中 rVWF 損失至少 30%，其中 Advate 緩衝液展示回收率損失與 Advate 1:3 緩衝液相比較高。有趣地，當將 rVWF 儲存且在汽車中運輸約 5000 km（代表在運輸期間之預期震盪）時，未觀察到劇烈震盪實驗中所觀察到之相同沈澱。rVWF 之沈澱可藉由儲存於無頂空之注射器中來消除。

實施例 2

重組 VWF 之穩定性

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

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

如圖 3 中所示，基於檸檬酸鹽之調配物（15 mM 檸檬酸鈉、10 mM CaCl₂、100 mM NaCl，pH 7.0）的穩定性好於含有 0.1 M 麩胱甘肽之 Advate 1:3 緩衝液調配物。

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

實施例 4

定液體調配物之特徵

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

DSC 為將增加樣品及參考物之溫度所需之熱量之量的差以溫度函數形式量測之熱分析技術。DSC 實驗之結果為熱通量對比溫度或對比時間之曲線。

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

表 3.在各種緩衝液中之展開溫度

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

緩衝液組份及濃度：

A) Advate :	5.26 g/l NaCl 0.248 g/l CaCl ₂ 32 g/l D-甘露糖醇 8 g/l 海藻糖 1.56g/l L-組胺酸 1.2 g/l Tris 0.08 g/l 還原型麩胱甘肽	pH=7.0
B) Immunate :	5.25 g/l 甘胺酸 2.2 g/l NaCl 5.25 g/l NaCit ₃ 5.25 g/l 離胺酸-HCl 0.62 g/l CaCl ₂	pH=6.8
C) 檸檬酸鹽 :	3 g/l 甘胺酸 2.92 g/l NaCl 2.5 g/l NaCit ₃ 30g/l D-甘露糖醇 10g/l 海藻糖	pH=6.8
D) NovoSeven :	0.75 g/l 甘胺酸 2.92 g/l NaCl 1.47 g/l CaCl ₂ 30 g/l D-甘露糖醇	pH=6.8

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

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

表 4.

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

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

表 5.

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

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

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

根據以上實施例，與未經稀釋之 Advate 緩衝液相比，Advate 1:3 緩衝液提供關於凍乾後冷凍/解凍及回收率之優勢。此外，Advate 1:3 緩衝液可在於 40°C 下培養期間比 Advate 緩衝液更好地穩定（例如，維持生物活性）rVWF 活性。在 Advate 1:3 緩衝液中之 rVWF 對於於 4°C 下培養 4 週為穩定的。最後，DSC 已證明 pH 7.0 對於防止 rVWF 降解為最佳的（亦即，展示最高展開溫度）。

因此，鑒於本文所提供之資料，對於 rVWF 推薦藉由 NaCl 調整至所需滲透壓度之包括 15 mM 檸檬酸鹽（或甘胺酸或組胺酸）、10 mM CaCl₂（pH 6.5-7.3）的調配物。舉例而言，在一具體態樣中，基於檸檬酸鹽之配方為 15 mM 檸檬酸鈉、10 mM CaCl₂、100 mM NaCl，pH 7.0。

或者，亦涵蓋無麩胱甘肽之 Advate 或 Advate 1:3 緩衝液：Advate：90 mM NaCl、1.68 mM CaCl₂、10 mM L-組胺酸、10mM Tris、0.26 mM 麩胱甘肽、23.4 mM 海藻糖、175.7 mM 甘露糖醇及 0.1 g/L TWEEN-80，pH 7.0；Advate 1:3：30 mM NaCl、0.56 mM CaCl₂、3.3 mM L-組胺酸、3.3 mM tris、7.8 mM 海藻糖、58.6 mM 甘露糖醇及 0.03 g/L TWEEN-80，ph 7.0。

【符號說明】

無

序列表

- <110> 麥西艾森等人
- <120> 重組VWF調配物
- <130> TW097150160
- <150> 61/017,881
- <151> 2007-12-31
- <160> 3
- <170> PatentIn 3.5版
- <210> 1
- <211> 8833
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成的聚核苷酸

- <220>
- <221> misc_特徵
- <223> 前原vWF

```

<400> 1
agctcacagc tattgtggtg ggaaaggag ggtggttggg ggaatgcaca gcttgggctt      60
tatctcccc agcagtgagg actccacagc ccctgggcta cataacagca agacagtccg      120
gagctgtagc agacctgatt gagccittgc agcagctgag agcatggcct agggtagggcg      180
gcaccattgt ccagcagctg agtttccag ggaccttggg gatagccgca gccctcattt      240
gcaggggaag atgattcctg ccagatttgc cggggtgctg ctgtctctgg ccctcatttt      300
gccagggacc ctttgtgcag aaggaactgc cggcaggtca tccacggccc gatgcagcct      360
tttcggaagt gacttcgtca acaccttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg      420
cagttacctc ctggcagggg gcgccagaa acgctccttc tcgattattg gggacttcca      480
gaatggcaag agagtgagcc tctccgtgta tcttggggaa tttttgaca tccatttgtt      540
tgtcaatggt accgtgacac agggggacca aagagctcct atgccctatg cctccaaagg      600
gctgtatcta gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggcttltg      660
ggccaggatc gatggcagcg gcaacttca agtctctgtg tcagacagat acticaaaa      720
gacctgcggg ctgtgtggca actttaacat ctttctgtaa gatgacttta tgaccaaga      780
agggaccttg acctcggacc ctlatgactt tgccaactca tgggclctga gcagtggaga      840
acagtgggtg gaacgggcat ctctcccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat      900
gcagaagggc ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcgggtg ttgcccgtg      960
ccaccctcig gtaggacccc agccttttgt ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagtg      1020
tgctgggggg ctggagtgcg cctgccctgc cctcctggag tacgcccgga cctgtgcca      1080
ggagggaatg gtgtgttacg gctggaccga ccacagcgcg tgcagcccag tgtgccctgc      1140
tggtatggag tataggcagt gtgtgtcccc ttgcgccagg acctgccaga gcctgcacat      1200
caatgaaatg tgcaggagc gatgcgtgga tggctgcagc tgccttgagg gacagctcct      1260
ggatgaaggc ctctgcgtgg agagcaccga gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgcta      1320
ccctcccggc acctccctct ctcgagactg caacacctgc atttgccgaa acagccagtg      1380
gatctgcagc aatgaagaat gtccagggga gtgccttgtc acaggtcaat cacacttcaa      1440

```

gagctttgac aacagatact tcaccttcag tgggatctgc cagtacctgc tggcccggga 1500
ttgccaggac cactccttct ccatigtcat tgagactgtc cagtgtgctg atgaccgcga 1560
cgctgtgtgc acccgctccg tcaccgtccg gctgccctggc ctgcacaaca gccttgtgaa 1620
actgaagcat ggggcaggag ttgccatgga tggccaggac gtccagctcc ccttcctgaa 1680
aggtgacctc cgcatccagc atacagtac gccctccgtg cgcctcagct acggggagga 1740
cctgcagatg gactgggatg gccgcgggag gctgctggtg aagctgtccc ccgtctatgc 1800
cgggaagacc tgcggcctgt gtgggaatla caatggcaac cagggcgacg acttccttac 1860
ccccctggg ctggcgggag cccgggtgga ggacttcggg aacgccigga agctgcacgg 1920
ggactgccag gacctgcaga agcagcacag cgatccctgc gccctcaacc cgcgcatgac 1980
caggttctcc gaggaggcgt gcgcggctct gacgtcccc acattcgagg cctgccatcg 2040
tgccgtcagc ccgtgccct acctgcggaa ctgccctac gacgtgtgct cctgctcgga 2100
cggccgcgag tccctgtgct gcgccctggc cagctatgcc gcggcctgctg cggggagagg 2160
cgtgcgctc gcgtggcgcg agccaggccg ctgtgagctg aactgccca aaggccaggt 2220
gtacctcag tgcgggacc cctgcaacct gacctgccg tcctctctt acccgatga 2280
ggaatgcaat gaggcctgcc tggaggcctg ctctgcccc ccaggcctct acatggatga 2340
gaggggggac tgcgtgcccc agggccagtg cccctgttac talgacggtg agatcttcca 2400
gccagaagac atcttctcag accatcacac catgtgctac tgtgaggatg gcttcatgca 2460
ctgtaccatg agtggagctc ccggaagcct gctgccctgac gctgtcctca gcagtcacct 2520
gtctcatcgc agcaaaagga gcctatccig tccggcccc atggtaagc tggigtgtcc 2580
cgctgacaac ctgcgggctg aagggtcga gigtacaaa acgtgccaga actatgacct 2640
ggagtcatg agcatgggtt gttctcttgg ctgccctgct cccccggca tggtcggca 2700
tgagaacaga tgtgtggccc tggaaagggt tccctgcttc calcagggca aggagatgct 2760
ccctggagaa acagtgaaga ttggctgcaa cacttgtgtc tgtcgggacc ggaagtggaa 2820
ctgcacagac catgtgtgtg atgccacgtg ctccacgatc ggcatggccc actacctcac 2880
cttcgacggg ctcaaalacc tgttccccgg ggagtgccag tacgttctgg tgcaggatla 2940
ctgcggcagt aaccttggga cctttcggat cctagtgggg aalaaggat gcagccacc 3000
ctcagtgaat tgcaagaaac gggctacat cctgggtggag ggaggagaga ttgagctgtt 3060
tgacggggag gtgaatgiga agaggccat gaaggatgag actcacctt aggtgggtgga 3120
gtctggccgg tacatcattc tctgtctggg caaagccctc tccgtggtct gggaccgcca 3180
cctgagcacc tccgtggctc tgaagcagac ataccaggag aaagtgtgtg gcctgtgtgg 3240
gaattttgat ggcatccaga acaatgacct caccagcagc aacctccaag tggaggaaga 3300
cccigtggac ttgggaact cctggaaagt gagctcgag tltgctgaca ccagaaaagt 3360
gcctctggac tcatccccig ccacctgcca taacaacatc atgaagcaga cgalggtgga 3420
ttcctcctgt agaatcctta ccagtgacgt ctccaggac tgcaacaagc tggiggacc 3480
cgagccatat ctggatgctt gcatttacga cacctgctcc tigtgagcca ttggggactg 3540
cgcctgcttc tgcgacacca ttgctgccta tggccacgtg tigtcccagc atggcaaggt 3600
ggtgacctgg aggacggcca cattgtgccc ccagagctgc gaggagagga atctccggga 3660
gaacgggtat gagtgtgagt ggcgctataa cagctgtgca cctgcctgtc aagtcacgtg 3720

tcagcacctt gagccactgg cctgccctgt gcagtggtg gagggctgcc atgccactg	3780
ccctccaggg aaaatcctgg atgagctttt gcagacctgc gttgacctg aagactgtcc	3840
agltgtgtag gtggctggcc ggcgttttgc ctcaggaaag aaagtcacct tgaatcccag	3900
tgacctgag cacigccaga ttggccactg tgatgtttgc aaccicacct gtgaagcctg	3960
ccaggagccg ggaggcctgg tggtgctcc cacagatgcc ccggtgagcc ccaccactct	4020
glatgtggag gacatctcgg aaccgctgtt gcacgatttc tactgcagca ggctactgga	4080
cctggctctc ctgctggatg gctcctccag gctgtccgag gctgagttt aagtgtgaa	4140
ggcctttgtg gtggacatga tggagcggct gcgcatctcc cagaagtggg tccgctggc	4200
ctgtggggag taccacgacg gctcccacgc ctacatcggg ctcaaggacc ggaagcgacc	4260
gtcagagctg cggcgcattg ccagccaggt gaaglatgcg ggcagccagg tggcctccac	4320
cagcgaggtc ttgaaataca cactgttcca aatcttcagc aagatcgacc gccctgaagc	4380
ctcccgcac accctgtctc tgatggccag ccaggagccc caacggatgt cccggaactt	4440
gttccgtac gtccagggcc tgaagaagaa gaaggctatt gtgatcccgg tgggcatagg	4500
gccccatgcc aacctcaagc agatccgctt catcgagaag caggcccctg agaacaaggc	4560
cttctgtctg agcagtgtag atgagctgga gcagcaaaag gacgagatcg ttagctacct	4620
ctgtgacctt gccccgaag cccctcctcc taccctgccc cccgacatgg cacaagtac	4680
tgtgggcccc gggctcttgg gggtttcgac cctggggccc aagaggaact ccatggttct	4740
ggatgtggcg ttctgtctgg aaggatcgga caaaattggt gaagccgact tcaacaggag	4800
caaggagttc atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggcagggaca gcatccactg	4860
cacgggtctg cagtactcct acatggtagc tgtggagtac ccttcagcg aggcacagtc	4920
caaaggggac atcctgcagc gggtagcaga gatccgtac cagggcggca acaggaccaa	4980
cactgggctg gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc agggtgaccg	5040
ggagcagggc cccaacctgg tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa	5100
gaggctccct ggagacatcc aggtggigcc cattggagtg ggcctaatag ccaacgtgca	5160
ggagctggag aggatggct ggcccaatgc ccctatcctc atccaggact ttgagacgt	5220
ccccgagag gctcctgacc tggtagctga gaggtgctgc tccggagagg ggctgcagat	5280
ccccaccctc tccccgac ctgactgcag ccagcccctg gacgtgatcc ttctctgga	5340
tggctctcc agtttcccag ctcttattt tgatgaaatg aagagtctcg ccaaggcttt	5400
catttcaaaa gccaatatag ggcctctgt cactcaggtg tcagtgtgc agtatggaag	5460
catcaccacc attgacgtgc catggaactg ggtcccggag aaagccatt tgctgacct	5520
tgtggacgtc atgcagcggg agggagggcc cagccaaatc ggggatgctt tgggctttgc	5580
tgtgcgatac ttgacttcag aatgcatgg tgccaggccc ggagcctcaa aggcggtagt	5640
caacctggtc acggacgtct ctgtggattc agtggatgca gcagctgatg ccgccaggic	5700
caacagagtg acagtgttcc ctattggaat tggagatcgc tacgatgcag cccagctacg	5760
gatcttggca ggcccagcag gcgactccaa cgtggtaga ctcagcgaa tcgaagacct	5820
ccctaccatg gtcacctgg gcaattcctt cctccacaaa ctgtgctctg gatttgttag	5880
gatttgcag gatgaggatg ggaatgagaa gagggcccgg gacgtctgga ccttgcaga	5940
ccagtgccac accgtgactt gccagccaga tggccagacc ttgctgaaga gtcacgggt	6000

caactgtgac cgggggctga ggccctcgtg ccclaacagc cagtccccctg ttaaagtgga	6060
agagacctgt ggctgccgt ggacctgccc ctgcgtgtgc acaggcagct ccactcggca	6120
catcgtgacc ttgatgggc agaatttcaa gctgactggc agctgttctt atgtcctatt	6180
tcaaaacaag gaggcaggacc tggaggatgat tctccataat ggtgcctgca gccctggagc	6240
aaggcagggc tgcatgaaat ccatcgaggt gaagcacagt gccctciccg tcgagctgca	6300
cagtgcacatg gaggtgacgg tgaatgggag actggctctt gttccttacg tgggtgggaa	6360
catggaagtc aacgtttatg gtgcatcat gcatgaggtc agattcaatc acctgggca	6420
catcttcaca ttacttccac aaaacaatga gtccaactg cagctcagcc ccaagacttt	6480
tgcttcaaag acgtatggtc tgtgtgggat ctgtgatgag aacggagcca atgacttcat	6540
gctgagggat ggcacagica ccacagactg gaaaacactt gttcaggaat ggactgtgca	6600
gcggccaggg cagacgtgcc agcccatcct ggaggagcag tgccttgctc cgcacagctc	6660
ccactgccag gtctcctct taccactgtt tgcctgaatgc cacaaggctc tggctccagc	6720
cacattctat gccatctgcc agcaggacag ttgccaccag gagcaaggtg gtgaggatgat	6780
cgctcttat gccaccctct gtcggaccaa cggggctctg gttgactgga ggacacctga	6840
ttctgtgct atgcatgcc caccatctct ggctacaac cactgtgagc atggctgtcc	6900
ccggcactgt gatggcaac tgagctcctg tggggacat cctccgaag gctgtttctg	6960
ccctccagat aaagtcaigt tggaaaggcag ctgtgtccct gaagaggcct gcactcagtg	7020
catgtgtgag gatggagctc agcaccagtt cctggaagcc tgggtcccgg accaccagcc	7080
ctgtcagatc tgcacatgcc tcagcggcgc gaaggtaac tgcacaacgc agccctgccc	7140
cacggccaaa gctcccactg gtggcctgtg tgaagtagcc cgctccgcc agaatgcaga	7200
ccagtgtgc cccgaglatg agtgtgtgtg tgaccagtg agctgtgacc tgccccagt	7260
gcctcactgt gaacgtggcc tccagcccac actgaccaac cctggcgagt gcagaccaa	7320
cttcacctgc gccctgcagga aggaggagtg caaaagagt tccccacct cctgcccccc	7380
gcaccgttg cccaccctc ggaagacca gtgctgtgat gagtatgagt gtgcttcaa	7440
ctgtgtcaac tccacagtga gctgtccct tgggtacttg gcctcaactg ccaccaatga	7500
ctgtggctgt accacaacca cctgcttcc cgacaagggt tgtgtccacc gaagcaccat	7560
ctacctgtg ggccagttct gggaggaggg ctgcgatgtg tgcacctgca ccgacatgga	7620
ggatgccgtg atgggcctcc gcgtggcca gtgctcccag aagccctgtg aggacagctg	7680
tcggtcgggc ttacttiacg ttctgcatga aggcgagtg tgtggaaggt gcctgccatc	7740
tgctgtgag gtgtgactg gctcaccgc gggggactcc cagtcttctt ggaagagtg	7800
cgctcccag tggccctccc cggagaacct ctgccatc aatgagtg tccgagtga	7860
ggaggaggtc ttatataac aaaggaact ctccctgccc cagctggagg tccctgtctg	7920
cccctcgggc tticagctga gctgtaagac ctacagctgc tgcccaagct gtcgtgtga	7980
gcgatggag gccctgatgc tcaatggcac lgtcattggg cccgggaaga ctgtgatgat	8040
cgatgtgtgc acgacctgcc gctgcatggt cgagggtggg gtcattctg gattcaagct	8100
ggagtgcagg aagaccact gcaaccctg cccctgggt tacaaggaag aaaatacac	8160
aggtgaatgt tgtgggagat gtttgcctac ggcttgacc attcagctaa gaggaggaca	8220
gatcatgaca ctgaagcgtg atgagacgt ccaggatggc tgtgatactc acttctgcaa	8280

ggccaatgag agaggagagt acttctggga gaagagggtc acaggctgcc caccctttga 8340
 lgaacacaag tgtctggctg agggaggtaa aattatgaaa attccaggca cctgctgtga 8400
 cacatgtgag gagcctgagt gcaacgacat cactgccagg ctgcagtatg tcaagggtgg 8460
 aagctgtaag tctgaagiag aggtggatat ccontactctgc cagggcaaat gtgccagcaa 8520
 agccaatgtac tccattgaca tcaacgatgt gcaggaccag tgctcctgct gctctccgac 8580
 acggacggag cccatgcagg tggccctgca ctgcaccaat ggctctgttg tgtacatga 8640
 ggttctcaat gccatggagt gcaaatgctc cccaggaag tgcagcaagt gaggctgctg 8700
 cagctgcatg ggtgcctgct gctgcctgcc ttggcctgat ggccaggcca gagtgctgcc 8760
 agtcctctgc atgttctgct ctgtgtccct tctgagccca caataaaggc tgagctctta 8820
 tcttgcaaaa ggc 8833

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

<220>
 <223> 合成的多肽

<220>
 <221> MISC_特徴
 <223> 前原vWF

<400> 2

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Leu Ile Leu Pro Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr Ala Arg Cys
 20 25 30
 Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly Ser Met Tyr
 35 40 45
 Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly Cys Gln Lys
 50 55 60
 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> 人工序列

<220>
<223> 合成的多肽

<220>
<221> MISC_特徵
<223> 成熟vWF

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ala 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

2/11

申請專利範圍

1. 一種重組溫韋伯氏因子 (recombinant von Willebrand Factor, rVWF) 之穩定液體醫藥調配物，其包含：(a) rVWF；(b) 緩衝劑；(c) 一或多種鹽；(d) 視情況的穩定劑；及 (e) 視情況的界面活性劑；

其中該 rVWF 包含選自由以下者所組成之群組的多肽：

a) SEQ ID NO: 3 中所示之胺基酸序列；

b) a) 之生物活性類似物、片段或變異體；

c) 由 SEQ ID NO: 1 中所示之聚核苷酸編碼的多肽；

d) c) 之生物活性類似物、片段或變異體；及

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

其中該緩衝液包含約 0.1 mM 至約 500 mM 範圍內之 pH 緩衝劑且其中 pH 在約 2.0 至約 12.0 之範圍內；

其中該鹽濃度為約 1 mM 至 500 mM；

其中該穩定劑濃度為約 0.1 mM 至 1000 mM；且

其中該界面活性劑濃度為約 0.01 g/L 至 0.5 g/L。

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

3. 如申請專利範圍第 1 項之調配物，其中該緩衝劑係選自由檸檬酸鈉、甘胺酸、組胺酸、Tris 及此等藥劑之組合所組成之群組。

4. 如申請專利範圍第 3 項之調配物，其中該緩衝劑為濃度為 15 mM 之檸檬酸鈉。

5. 如申請專利範圍第 1 項之調配物，其中 pH 在 6.0-8.0 之範圍內。
6. 如申請專利範圍第 5 項之調配物，其中 pH 在 6.5-7.3 之範圍內。
7. 如申請專利範圍第 4 項之調配物，其中 pH 為 7.0。
8. 如申請專利範圍第 1 項之調配物，其中該緩衝劑為檸檬酸鹽且該 pH 為 7.0。
9. 如申請專利範圍第 1 項之調配物，其中該鹽係選自由氯化鈣、氯化鈉及氯化鎂所組成之群組。
10. 如申請專利範圍第 9 項之調配物，其中該鹽濃度在 0.5 mM 至 300 mM 之範圍內。
11. 如申請專利範圍第 10 項之調配物，其中該鹽為濃度為 10 mM 之氯化鈣。
12. 如申請專利範圍第 1 項之調配物，其中該 rVWF 包含 SEQ ID NO: 3 中所示之胺基酸序列；其中該緩衝劑為檸檬酸鹽且該 pH 為 7.0；且其中該鹽為濃度為 10 mM 之氯化鈣。
13. 如申請專利範圍第 1 項之調配物，其中該 rVWF 包含 SEQ ID NO: 3 中所示之胺基酸序列；其中該緩衝劑為濃度為 15 mM 之檸檬酸鈉且該 pH 為 7.0；且其中該鹽為濃度為 10 mM 之氯化鈣及濃度為 100 mM 之 NaCl。
14. 如申請專利範圍第 3 項之調配物，其中該一或多種緩衝劑為濃度各自為 3.3 mM 之組胺酸及 Tris。
15. 如申請專利範圍第 3 項之調配物，其中該 pH 為 7.0。
16. 如申請專利範圍第 9 項之調配物，其中該一或多種鹽為濃度為 30 mM 之氯化鈉及濃度為 0.56 mM 之氯化鈣。

17. 如申請專利範圍第 1 項之調配物，其中該穩定劑係選自由以下者所組成之群組：甘露糖醇、乳糖、山梨糖醇、木糖醇、蔗糖、海藻糖、甘露糖、麥芽糖、乳糖、葡萄糖、棉子糖、纖維二糖、龍膽二糖、異麥芽糖、阿拉伯糖、葡糖胺、果糖及此等穩定劑之組合。

18. 如申請專利範圍第 17 項之調配物，其中該等穩定劑為濃度為 7.8 mM 之海藻糖及濃度為 58.6 mM 之甘露糖醇。

19. 如申請專利範圍第 1 項之調配物，其中該界面活性劑係選自由毛地黃皂苷 (digitonin)、Triton X-100、Triton X-114、TWEEN-20、TWEEN-80 及此等界面活性劑之組合所組成之群組。

20. 如申請專利範圍第 1 項之調配物，其中該界面活性劑為 0.03 g/L 之 TWEEN-80。

21. 如申請專利範圍第 1 項之調配物，其中該 rVWF 包含 SEQ ID NO: 3 中所示之胺基酸序列；其中該等緩衝劑為濃度為 3.3 mM 之組胺酸及濃度為 3.3 mM 之 Tris, pH 7.0；其中該等鹽為濃度為 30 mM 之氯化鈉及濃度為 0.56 mM 之氯化鈣；其中該等穩定劑為濃度為 7.8 mM 之海藻糖及濃度為 58.6 mM 之甘露糖醇；且其中該界面活性劑為 0.03 g/L 之 TWEEN-80。

圖式

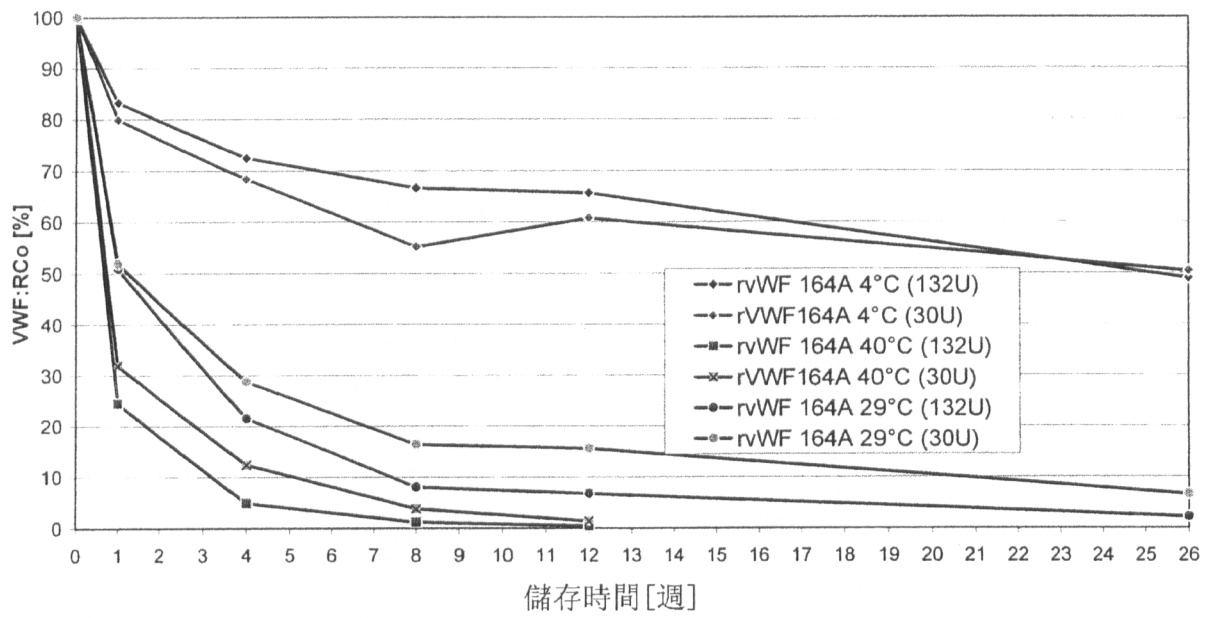


圖1

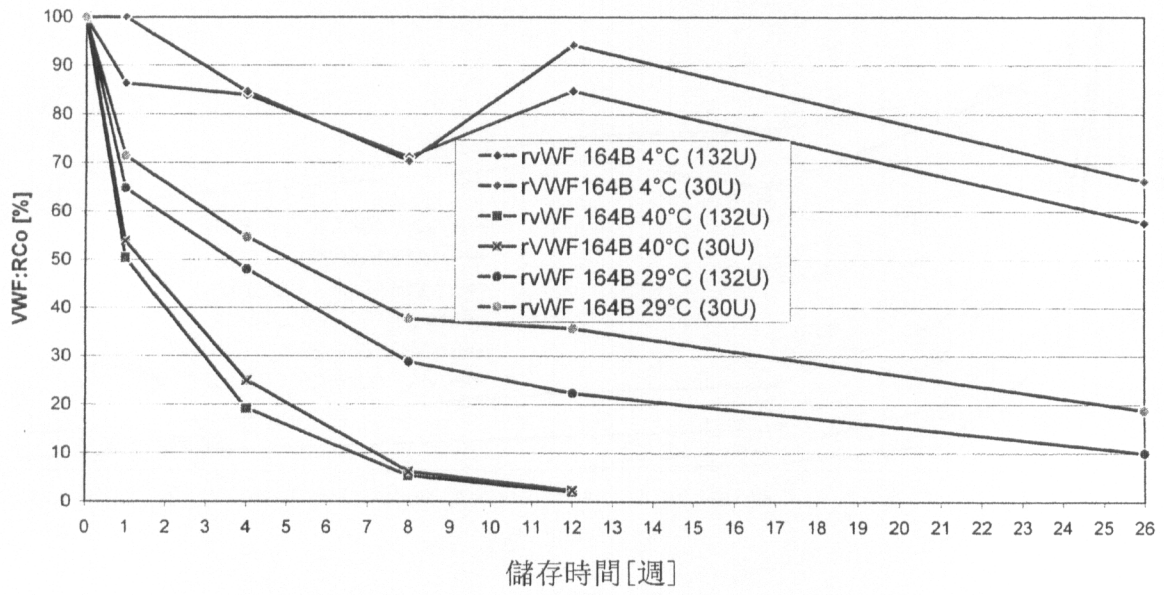


圖2

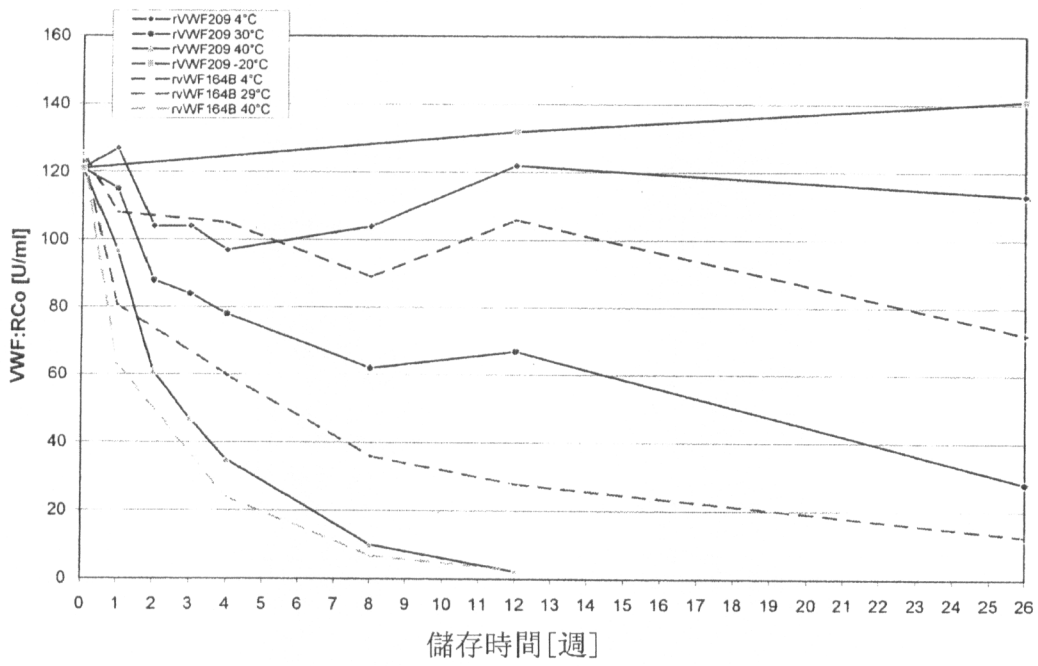


圖3

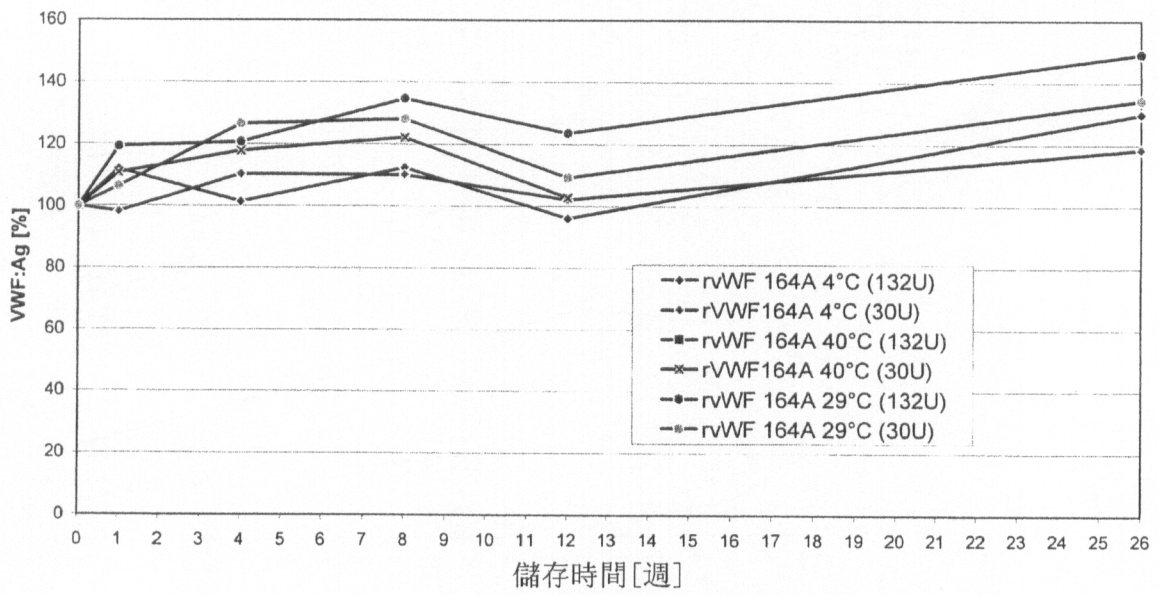


圖4

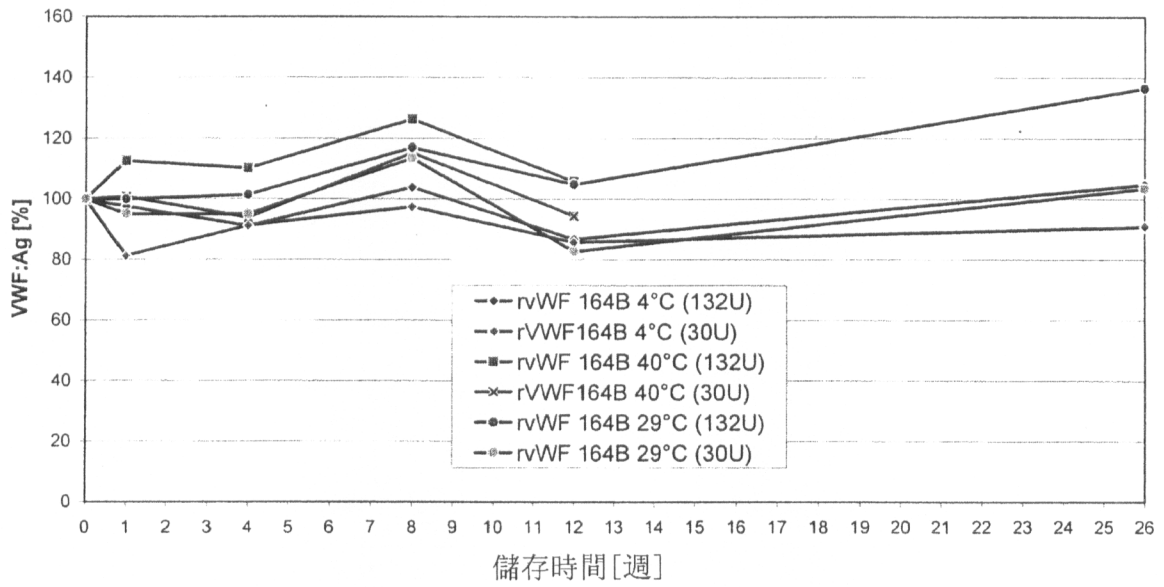


圖5

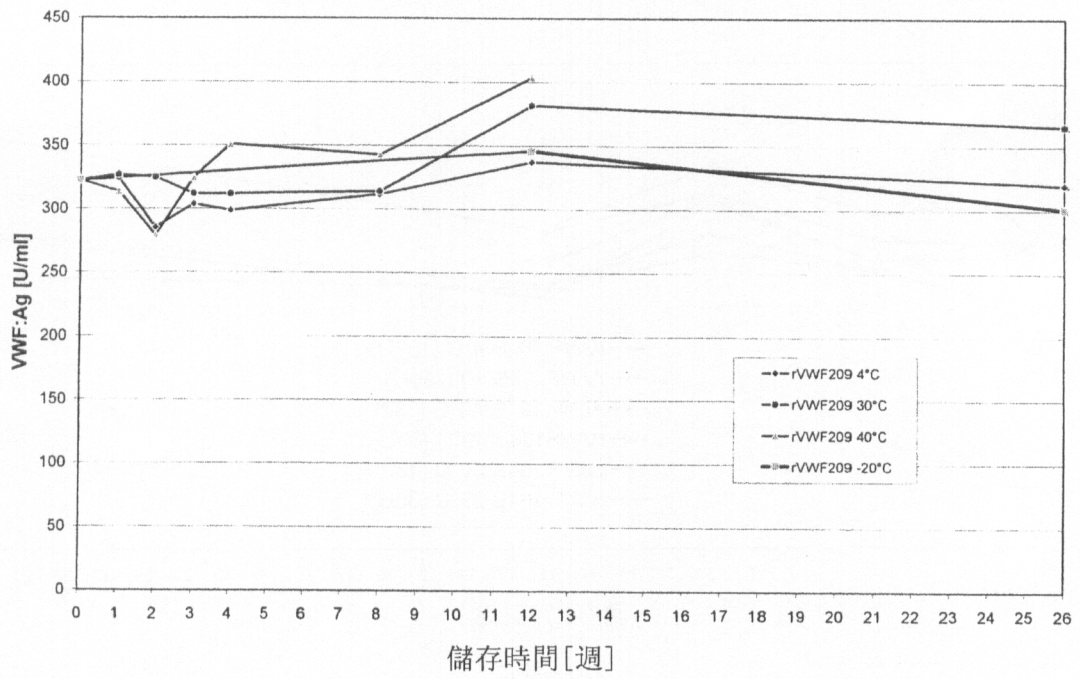


圖6

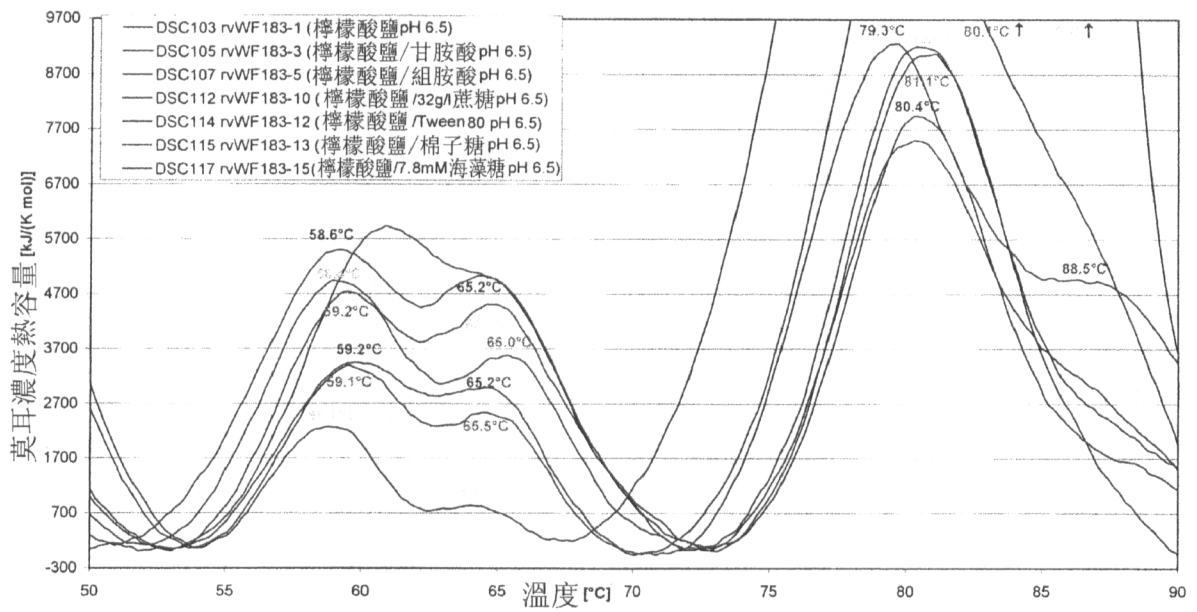


圖7

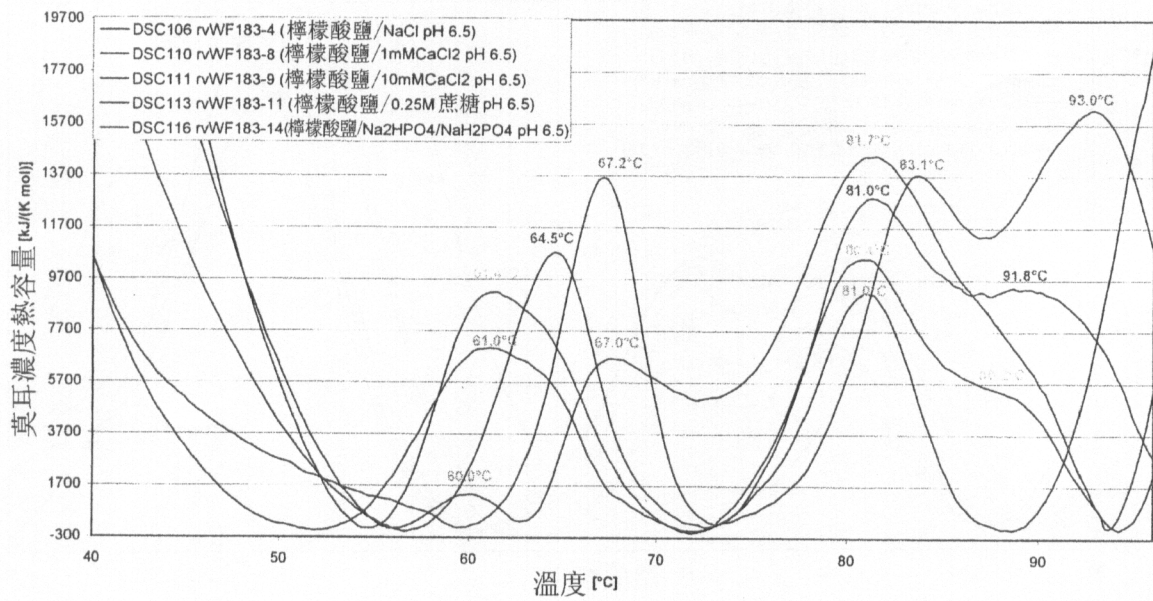


圖8

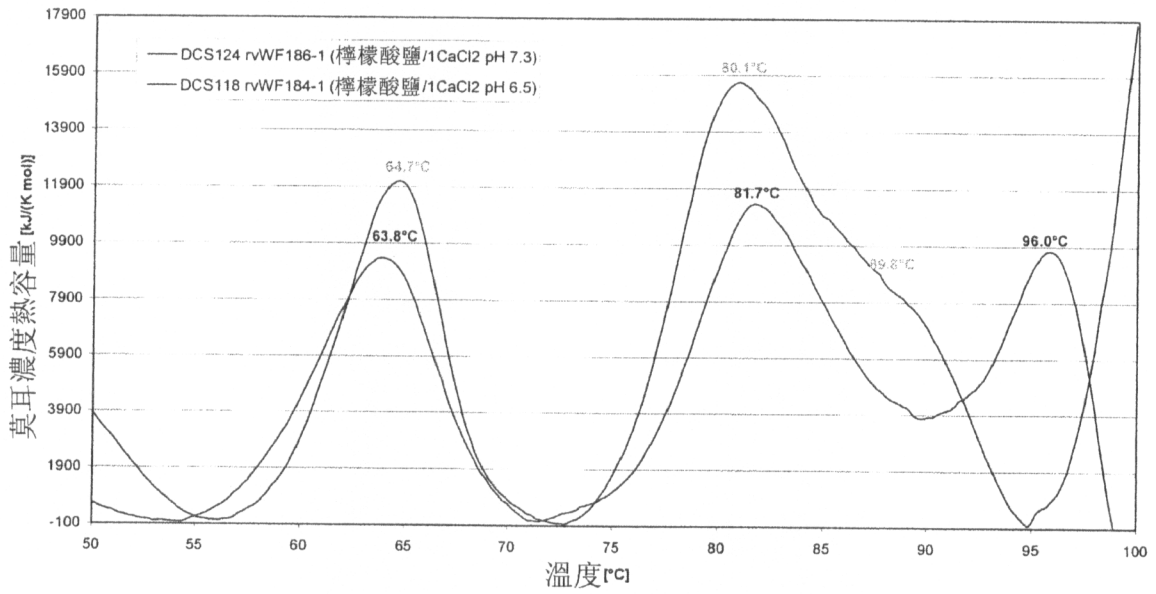


圖9