



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105816858 A

(43)申请公布日 2016.08.03

(21)申请号 201610221805.8

(22)申请日 2008.12.23

(30)优先权数据

61/017,418 2007.12.28 US

61/017,881 2007.12.31 US

(62)分案原申请数据

200880127339.0 2008.12.23

(71)申请人 巴克斯特国际公司

地址 美国伊利诺伊州

申请人 巴克斯特保健股份有限公司

(72)发明人 皮特·马特提森 皮特·图雷切克

汉斯-皮特·施瓦茨

库尔特·施尼科

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 杨青 缙正煜

(51)Int.Cl.

A61K 38/36(2006.01)

A61K 9/08(2006.01)

A61K 47/12(2006.01)

A61K 47/02(2006.01)

A61K 47/26(2006.01)

A61K 47/36(2006.01)

A61P 7/04(2006.01)

权利要求书2页 说明书20页

序列表26页 附图9页

(54)发明名称

重组VWF配方

(57)摘要

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

1. 一种重组冯维勒布兰特因子(rVWF)的稳定液态药物配方,其包含:(a)rVWF;(b)缓冲剂;(c)一种以上盐;(d)可任选的稳定剂;以及(e)可任选的表面活性剂;

其中,所述rVWF包含选自下组的多肽:

a)SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;

b)a)的生物学活性类似物、片段或变体;

c)被SEQ ID NO:1所示的多核苷酸编码的多肽;

d)c)的生物学活性类似物、片段或变体;以及

e)被一种多聚核苷酸所编码的多肽,所述多聚核苷酸可在适度严格的杂交条件下杂交至SEQ ID NO:1所示多聚核苷酸;

其中所述缓冲液由在约0.1mM至约500mM范围内、且其中pH在约2.0至约12.0范围内的pH缓冲剂组成;

其中所述盐的浓度为约1至500mM;

其中所述稳定剂的浓度为约0.1至1000mM;并且

其中所述表面活性剂的浓度为约0.01g/L至0.5g/L。

2. 如权利要求1所述的配方,其特征在于,所述rVWF包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的配方,其特征在于,所述缓冲剂选自下组:柠檬酸钠、甘氨酸、组氨酸、Tris以及这些试剂的组合。

4. 如权利要求3所述的配方,其特征在于,所述缓冲剂是浓度为15mM的柠檬酸钠。

5. 如权利要求1所述的配方,其特征在于,pH范围为6.0-8.0。

6. 如权利要求5所述的配方,其特征在于,pH范围为6.5-7.3。

7. 如权利要求4所述的配方,其特征在于,pH为7.0。

8. 如权利要求1所述的配方,其特征在于,所述缓冲剂是柠檬酸盐,且pH是7.0。

9. 如权利要求1所述的配方,其特征在于,所述盐选自由氯化钙、氯化钠和氯化镁所构成的组。

10. 如权利要求9所述的配方,其特征在于,所述盐的浓度范围是0.5至300mM。

11. 如权利要求10所述的配方,其特征在于,所述盐是浓度为10mM的氯化钙。

12. 如权利要求1所述的配方,其特征在于,所述rVWF包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;其中,所述缓冲剂是柠檬酸盐且pH是7.0;并且其中,所述盐是浓度为10mM的氯化钙。

13. 如权利要求1所述的配方,其特征在于,所述rVWF包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;其中,所述缓冲剂是浓度为15mM的柠檬酸钠且pH是7.0;并且其中,所述盐是浓度为10mM的氯化钙和浓度为100mM的NaCl。

14. 如权利要求3所述的配方,其特征在于,所述一种以上缓冲剂是浓度各自是3.3mM的组氨酸和Tris。

15. 如权利要求3所述的配方,其特征在于,pH是7.0。

16. 如权利要求9所述的配方,其特征在于,所述一种以上盐是浓度为30mM的氯化钠和浓度为0.56mM的氯化钙。

17. 如权利要求1所述的配方,其特征在于,所述稳定剂选自下组:甘露醇、乳糖、山梨糖醇、木糖醇、蔗糖、海藻糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖、棉籽糖、纤维二糖、龙胆二糖、异麦

芽糖、阿拉伯糖、葡糖胺、果糖以及这些稳定剂的组合。

18. 如权利要求17所述的配方,其特征在于,所述稳定剂是浓度为7.8mM的海藻糖和浓度为58.6mM的甘露醇。

19. 如权利要求1所述的配方,其特征在于,所述表面活性剂选自下组:毛地黄皂苷、TRITON X-100、TRITON X-114、吐温-20、吐温-80以及这些表面活性剂的组合。

20. 如权利要求1所述的配方,其特征在于,所述表面活性剂是浓度为0.03g/L的吐温-80。

21. 如权利要求1所述的配方,其特征在于,所述rVWF包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;其中,所述缓冲剂是浓度为3.3mM的组氨酸和浓度为3.3mM的Tris,且pH为7.0;其中,所述盐是浓度为30mM的氯化钠和浓度为0.56mM的氯化钙;其中,所述稳定剂是浓度为7.8mM的海藻糖和浓度为58.6mM的甘露醇;并且其中所述表面活性剂是浓度为0.03g/L的吐温-80。

重组VWF配方

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

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

技术领域

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

背景技术

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

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

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

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

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

[0009] 因此,存在开发稳定的包含重组VWF的药物配方的需要。

发明内容

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

80。

附图说明

[0019] 图1显示,由于谷胱甘肽的存在,rVWF在Advate缓冲液中26周后是不稳定的。

[0020] 图2显示,rVWF在Advate 1:3缓冲液中在4℃下直到12周仍是稳定的。

[0021] 图3显示,基于柠檬酸盐的配方的稳定性比含有0.1M谷胱甘肽的Advate 1:3缓冲液配方要好。

[0022] 图4显示,在Advate缓冲液中在整个26周期间rVWF浓度是稳定的。

[0023] 图5显示,在Advate 1:3缓冲液中随时间过去rVWF浓度是稳定的。图6显示,在基于柠檬酸盐的缓冲液中随时间过去rVWF浓度是稳定的。

[0024] 图7显示,大多数赋形剂使rVWF的解叠温度(unfolding temperature)提高约1或2℃。

[0025] 图8显示,10mM CaCl₂使rVWF的解叠温度提高约8℃至约67℃。

[0026] 图9显示,在pH 7.3下和在pH 6.5下CaCl₂的效果是类似的。

具体实施方式

[0027] 术语的定义

[0028] 除非另外定义,在此使用的所有技术术语和科学术语的意义与本发明所属领域普通技术人员通常知道的意义相同。下述参考文献为本领域技术人员提供了在本发明中使用的许多术语的一般定义:Singleton等,《微生物学和分子生物学词典》(第2版,1994);《剑桥科学技术词典》(Walker编,1988);《遗传学词汇》(第5版),R Rieger等(编著),Springer Verlag(1991)以及Hale和Marham,《HARPER COLLINS生物学词典》(1991)。

[0029] 在此引用的每个公开、专利申请、专利、以及其他参考文献通过参考方式将其全部内容并入本文,该合并达到与本发明公开可以不一致的程度。

[0030] 需注意的是,当在本说明书和权利要求中使用,单数形式“一”、“一种”和“该”包括复数引用,除非上下文另外清楚地指定。

[0031] 在此使用时,除非特别说明,下述术语具有它们被给予的意义。

[0032] 术语“包含”,就肽化合物而言,是指化合物可以在给定序列的氨基和羧基末端之一或两者处包括额外的氨基酸。当然,这些附加的氨基酸将不会显著地干涉该化合物的活性。就本发明的组合物而言,术语“包含”是指组合物可以包括附加成分。这些附加成分将不会显著地干涉组合物的活性。

[0033] 术语“药学活性的”是指,描述的物质被确定具有影响医疗参数(例如,但不限于,血压、血细胞数、胆固醇含量)或疾病状态(例如,但不限于,癌症、自身免疫紊乱)的活性。

[0034] 在此使用的术语“表达”是指,允许或者引起在基因或者DNA序列中的信息变得被表现出来,例如,通过活化细胞的功能而产生蛋白质,该功能涉及对应的基因或DNA序列的转录和翻译。DNA序列在细胞中或者被细胞表达从而形成“表达产物”比如蛋白质。该表达产物本身,例如,得到的蛋白质,还可以被说成是被“表达的”产物。表达产物能够作为胞内的、胞外的或分泌的产物而被表征。术语“胞内”是指在细胞里面。术语“胞外”是指在细胞外面,比如横跨膜的蛋白质。如果物质由细胞上某处或者里面大量地出现在细胞外侧,其就是被

细胞“分泌”。

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

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

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

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

[0039] 重组VWF

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

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

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

多肽的序列。

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

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

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

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

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

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

[0049] VWF的片段、变体和类似物

[0050] 用于制备多肽片段、变体或类似物的方法是本技术领域众所周知的。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0061] 一般配方和赋形剂

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

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

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

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

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

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

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

[0068] 缓冲液和缓冲剂

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

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

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

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

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

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

[0075] 盐

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

[0077] 稳定剂和填充剂

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

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

[0080] 表面活性剂

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

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

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

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

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

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

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

[0086] 其他普通的赋形剂成分

[0087] 氨基酸

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

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

[0090] 抗氧化剂

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

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

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

[0093] 金属离子

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

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

[0096] 防腐剂

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

[0098] 在开发防腐剂量形式的配方期间需要考虑几个方面。必须优化在药物产品中有效的防腐剂浓度。这要求测试剂量形式中给定的防腐剂,其浓度范围可在不损害蛋白质稳定性的情况下赋予抗微生物效果。例如,在开发用于白介素-1受体(I型)液体配方的过程中,

通过使用差示扫描量热法(DSC),成功地筛选出三种防腐剂。基于它们在市售产品中常用浓度下对稳定性的影响,这些防腐剂分等级次序(Remmele RL Jr., et al., Pharm. Res., 15 (2):200-8(1998))。

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

[0100] 冻干

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

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

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

[0104] 制备方法

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

[0106] 给药

[0107] 为了将组合物给药于人类或试验用动物,在一个方面,组合物包含一种以上药学

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

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

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

[0110] 试剂盒

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

[0112] 剂量

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

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

以确定适当的剂量。最终的剂量摄入将被主治医师确定,该主治医师会考虑到改变药物作用的各种因素,例如药物比活力、损伤严重程度和病人的应答、年龄、状况、体重、性别和病人的饮食、任何感染的严重程度、给药时间及其他临床因素。随着研究进行,关于适当剂量水平以及各种疾病和状况的治疗持续时间的进一步信息将会被披露。

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

[0116] 实施例1

[0117] 摇动实验

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

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

[0120] 表1. 剧烈摇动时间对rVWF回收率的影响

[0121]

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

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

[0123] 表2。

[0124]

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

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

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

[0127] 实施例2

[0128] 重组VWF的稳定性

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

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

[0131] 如图3所示,基于柠檬酸盐的配方(15mM柠檬酸钠、10mM CaCl₂、100mM NaCl,pH 7.0)的稳定性比含有0.1M谷胱甘肽的Advate1:3缓冲液配方要好。

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

[0133] 实施例4

[0134] 液体配方的表征

[0135] 差示扫描量热法(DSC)被用于评估蛋白质(rVWF)在各种缓冲液中解叠的程度。如表3所示,Advate缓冲液pH 7.0对于稳定化是最佳的。

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

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

[0138] 表3.在各种缓冲液中的解叠温度

[0139]

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

[0140] 缓冲剂成分和浓度:

- [0141] A)Advate: 5.26g/L NaCl
- [0142] 0.248g/L CaCl₂
- [0143] 32g/L D-甘露醇
- [0144] 8g/L海藻糖
- [0145] 1.56g/L L-组氨酸
- [0146] 1.2g/L Tris
- [0147] 0.08g/L谷胱甘肽红 pH=7.0
- [0148] B)Immunate: 5.25g/L甘氨酸
- [0149] 2.2g/L NaCl
- [0150] 5.25g/L NaCit3
- [0151] 5.25g/L赖氨酸盐酸盐
- [0152] 0.62g/L CaCl₂ pH=6.8
- [0153] C)柠檬酸盐: 3g/L甘氨酸
- [0154] 2.92g/L NaCl
- [0155] 2.5g/L NaCit3

[0156]		30g/L D-甘露醇	
[0157]		10g/L海藻糖	pH=6.8
[0158]	D)NovoSeven:	0.75g/L甘氨酸	
[0159]		2.92g/L NaCl	
[0160]		1.47g/L CaCl ₂	
[0161]		30g/L D-甘露醇	pH=6.8
[0162]	rVWF 158:	20mM Hepes	
[0163]		150mM NaCl	
[0164]		5g/L蔗糖	pH=7.4

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

[0166] 表4

[0167]

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

[0168]

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

[0169] 除不同的缓冲液之外,DSC被用于估定在Advate缓冲液中在不同的pH值下rVWF的解叠温度。结果如下述表5所示。对于rVWF的稳定化,Advate缓冲液pH 7.0是最佳的(即,最高的解叠温度;峰1)。

[0170] 表5。

[0171]

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

[0172] 在不同温度下储存不同的持续时间之后,评估了在Advate缓冲液中和在Advate 1:3缓冲液中的rVWF荧光光谱。在Advate缓冲液或Advate 1:3缓冲液中于40°C下储存0到28天之后,没有观察到(或者仅略微观察到)荧光光谱的变化。在其他温度下没有观察到差异。

[0173] 同样地,使用胶滤(Superose 6)评估rVWF的降解。在Advate缓冲液中于4°C下26周之后,观察到一些降解,而在Advate 1:3缓冲液中于4°C下26周之后则几乎没有观察到rVWF的降解。在40°C下,谷胱甘肽随时间过去提高了降解量(虽然在Advate 1:3缓冲液中提高程度较慢)。

[0174] 基于以上所述实施例,就冷冻/解冻和冻干后回收率而言,Advate 1:3缓冲液与未稀释的Advate缓冲液相比较具有优势。另外,在40°C下孵育期间Advate 1:3缓冲液能够稳

定化rVWF活性(例如,维持生物活性),比Advate缓冲液更好。在Advate 1:3缓冲液中的rVWF在4°C下孵育4周是稳定的。最后,DSC已经表明,pH 7.0是抑制rVWF降解的最佳值(即,显示出最高的解叠温度)。

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

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

序列表

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

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

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

[0001]

```

agctcacagc tatttggtg gaaaggag ggtggttgg ggaigtaca gcttgggett      60
tatctceccc agcagtgggg actccacagc cctgggcta cataacagca agacagtccg      120
gagctgtagc agaactgatt gageccttgc agcagctgag agcatggcct aggggtggcg      180
gcaccattgt ccagcagctg agtttccag ggaccttga gatagccga gcectcattt      240
gcaggggaag atgattcctg ccagattgc cgggtgctg cttgctctgg ceetcatitt      300
gcccaggacc ctttgtcag aaggaactcg cggcaggtea tccacggccc gatgcagcct      360
ttcgggaagt gacttcgca acaccttga tggagcatg tacagcttg cgggatactg      420
cagttacctc ctggcaggg gctgccagaa acgtccttc tgattattg gggacttcca      480
gaatggcaag agagtgagc tctcctgta tcttgggaa tttttgaca tccattggt      540
tgcaatggt acegtgacac agggggacca aagagctctc atgccctatg cctccaaagg      600
gctgtatcta gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggctttgt      660
ggccaggatc gatggeagc gcaacttca agtctctctg tcagacagat acttcaacaa      720
gaectgcggg ctgtgtggca actttaacat ctttctgaa gatgacttta tgaccaaga      780
aggaccttg acctcggacc cttatgactt tgccaactca tggctctga gcagtggaga      840
acagtgggtg gaacgggcat ctctcctcag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat      900
gcagaagggc ctgtgggagc agtgcagct tetgaagagc acctcgggtg ttgccectg      960
ccacctctg gtggaccecg agccttttgt ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagtg     1020
tgctgggggg ctggagtgcg cctgcctgce cctctggag taccccga cctgtgcca     1080
ggaggaatg gtgtgttacg gctggaccga ccacagcgcg tgcagcccag tgtgcctgc     1140
tggtatggag tataggcagt gtgtgtcccc ttgcgccagg acctgcaga gcctgeacat     1200
caatgaaatg tctcaggagc gatgcgtgga tgctgcagc tgcctgagg gacagctcct     1260
ggatgaaggc ctctcgtgg agagcaccga gtgtcctgce gtgcattccg gaaagccta     1320
ccctcccgcc acctcctct ctcgagactg caaacctgc atttgcgaa acagccagtg     1380
    
```


gatctgcagc	aatgaagaat	gtccagggga	gtgccttgtc	acaggtcaat	cacacttcaa	1440
gagctttgac	aacagatact	tcacettcag	tgggatctgc	cagtacctgc	tggccccgga	1500
ttgccaggac	cactccttct	ccattgtcat	tgagactgtc	cagtgtgctg	atgaccgcga	1560
cgetgtgtgc	acccgetccg	tcaccgtccg	getgcectgc	ctgcacaaca	gccttgtgaa	1620
actgaagcat	ggggcaggag	tigccatgga	tggccaggac	gtccagctcc	ccctccgtaa	1680
agglgacctc	cgcaiccage	atacagtgac	ggcctccgtg	cgccctcagc	acggggagga	1740
cttcagatg	gactgggatg	gcccggggag	gctgctgggtg	aagctgtccc	ccgtctatgc	1800
cggaagacc	tgcggcctgt	gtgggaatta	caatggcaac	cagggcgacg	acttccttac	1860
ccctctggg	ctggcggagc	cccgggtgga	ggactteggg	aacgcctgga	agctgcacgg	1920
ggactgccag	gacctgcaga	agcagcacag	cgatccctgc	gccctcaacc	cgcgcatgac	1980
caggttctcc	gaggaggcgt	gcgcggtcct	gacgtccccc	acattcgagg	cctgccatcg	2040
tgcgctcage	ccgetgcctt	acctgcggaa	ctgccgctac	gacgtgtgct	cctgctcgga	2100
cggccgcgag	tgcctgtgcg	gcgcccctggc	cagctatgcc	gcccctgctg	cggggagagg	2160
cgtgcgcgtc	gcgtggcgcg	agccaggccg	ctgtgagctg	aactgcccga	aaggccaggt	2220
gtacctgcag	tgcgggaccc	ccgtcaacct	gacctgccgc	tctctctctt	acccggatga	2280
ggaatgcaat	gaggectgce	tggagggetg	cttctgcccc	ccagggtctt	acatggatga	2340
gaggggggac	lgcglgcccc	aggcccaglg	cccclgtllc	latgacgglg	agalclicca	2400
gccagaagac	atcttctcag	accatecacac	catgtgetac	tgtgaggatg	gcttcatgca	2460
ctgtaccatg	agtggagtec	ccggaagctt	getgcctgac	getgtectca	gcagteccct	2520
gtctcatcgc	agcaaaagga	gcctatcctg	tcggccccc	atggtcaagc	tgggtgtgcc	2580
cgetgacaac	ctgcgggctg	aagggctcga	gtgtacaaa	acgtgccaga	actatgacct	2640
ggagtgcattg	agcatgggct	gtgtctctgg	ctgectctgc	cccccgggca	tggteggca	2700
tgagaacaga	tgtgtggccc	tggaaagggtg	tcctgtcttc	catcagggca	aggagtatgc	2760
ccctggagaa	acagtgaaga	ttggctgcaa	cacttgtgtc	tgtcgggacc	ggaagtggaa	2820
ctgcacagac	catgtgtgtg	atgccacgtg	ctccacgac	ggcatggccc	actaectcac	2880
cttcgacggg	ctcaaatacc	tgttcccggg	ggagtgccag	tacgttctgg	tgcaggatta	2940
ctgcggcagt	aacctggga	cccttcggat	cttagtgggg	aataagggat	gcagccaccc	3000
ctcagtguaa	tgcagaanaac	gggtcaccat	ccctggggag	ggaggagaga	ttgagctgtt	3060
tgcgggggag	gtgaatgtga	agaggeccat	gaaggatgag	actcactttg	aggtggtgga	3120
gtctggccgg	tacatcattc	tgetgtctgg	caaagccctc	tcctgtgtct	gggaccgcca	3180
cttgagcattc	tcctgtgtcc	tgaagcagac	ataccaggag	aaagtgtgtg	gcctgtgtgg	3240
gaattttgat	ggcatccaga	acaatgacct	caccagcagc	aacctccaag	tggaggaaga	3300
ccctgtggac	tttgggaact	ccctggaaagt	gagctcgcag	tgtgctgaca	ccagaaaagt	3360
gcctctggac	tcctccctg	ccacctgcca	taacaacatc	atgaagcaga	cgatggtgga	3420
ttctctctgt	agaatcctta	ccagtgcagt	ctccaggac	tgcaacaagc	tgggtggacce	3480
cgagccatat	ctggatgtct	gcatttacga	cacctgctcc	tgtgagtcca	ttggggactg	3540
cgcctgcttc	tgcgacacea	ttgctgccta	tgccacgtg	tgtgcccagc	atggcaaggt	3600
ggtagcttgg	aggacggcca	catlgtgccc	ccagagctgc	gaggagagga	atctccggga	3660
gaacgggtat	gagtgtgagt	ggcgciataa	cagctgtgca	ccctgctgtc	aagtcacgtg	3720
tcagcaccct	gagccactgg	ccctgccctgt	gcagtgtgtg	gagggtctgc	atgcccactg	3780
ccctccaggg	aaaatctcgg	atgagctttt	gcagacctgc	gctgacctgc	aagactgtcc	3840
agtggtgtgag	gtggctggcc	ggcgttttgc	ctcaggaag	aaagtcacct	tgaatccag	3900
tgacctgag	cactgccaga	tttgccactg	tgatgtgtc	aacctcactt	gtgaagcctg	3960
ccaggagccg	ggaggcctgg	tgggtgctcc	cacagatgcc	ccggtgagcc	ccaccactct	4020

[0002]

gtatgtggag	gacatctcgg	aaccgcccgtt	gcacgatttc	tactgcagca	ggctactgga	4080
ccctggctctc	ctgctggatg	gctcctccag	gctgtccgag	gctgagtttg	aagtgetgaa	4140
ggccttttg	gtggacatga	tggagcggct	gcgatctcc	cagaagtggg	tccgcgtggc	4200
cggtgggag	taccacgaoc	gctcccacgc	ctacatggg	ctcaaggacc	ggaagcgacc	4260
gtcagagctg	cggcgcattg	ccagccaggt	gaagtatgcg	ggcagccagg	tggccicccac	4320
cagcgaggtc	ttgaaataca	cactglcca	aalcttcagc	aagatcgacc	gccccgaagc	4380
ctcccgcate	accctgctcc	tgatggccag	ccaggagccc	caacggatgt	cccggaaactt	4440
tgctcgetac	gtccagggcc	tgaagaagaa	gaaggtcatt	gtgateccgg	tgggcattgg	4500
gccccatgcc	aaccicaagc	agatcccct	catcgagaag	caggcccctg	agaacaaggc	4560
cttcgtgctg	agcagtgtgg	atgagctgga	gcagcaaagg	gacgagatcg	ttagctacct	4620
ctgtgacctt	gccccgaag	cccctctcc	tactctgccc	cccgacatgg	cacaagtcac	4680
tggtggcccc	gggctcttgg	gggtttcgac	cctggggccc	aagaggaact	ccatggttct	4740
ggatgtggcg	ttcgtcctgg	aaggatcgga	caaaattggt	gaagccgact	tcaacaggag	4800
caaggagttc	atggaggagg	tgattcagcg	gatggatgfg	ggccaggaca	gcattccact	4860
caoggtgctg	cagtactcct	acatggtgac	tgtggagtac	cccctcagcg	aggeacagtc	4920
caaaggggac	atcctgcage	gggtgcgaga	gatccgctac	caggcggca	acaggacca	4980
cactgggctg	gccccggtt	accctctlga	ccacagcttc	ttggcagcc	agggctgaccg	5040
ggagcaggcg	cccaacctgg	tctacatggt	caaccgaaat	cctgcctctg	atgagatcaa	5100
gaggctgect	ggagacatcc	aggtggtgcc	cattggagtg	ggcctaattg	ccaactgca	5160
ggagctggag	aggattgget	ggcccaatgc	ccctatctc	atccaggact	ttgagacgct	5220
ccccgagag	gctcctgacc	tggctctgca	gaggtctgic	tccggagagg	ggctgcagat	5280
ccccaccctc	tcccctgcac	ctgactgcag	ccagcccctg	gactgatacc	ttctctgga	5340
tgctcctcc	agtttccag	citcttattt	tgatgaaatg	aagagtttcg	ccaaggcttt	5400
catttcaaaa	gccaatatag	ggcctctct	cactcaggtg	tcagtctctc	agtatggaag	5460
catcaccacc	attgacgtgc	catggaacgt	ggtcccggag	aaagcccatt	tgctgagcct	5520
tgtggacgtc	atgcagcggg	agggaggccc	cagccaaatc	ggggatgect	tgggctttgc	5580
tgtgcgatac	ttgacttcag	aaatgcatgg	tcccaggccg	ggagcctcaa	agggcggtgt	5640
calcctggtc	acggacgict	cigtggalle	aglggatgca	gcagctgatg	ccgccaggtc	5700
caacagagtg	acagtgttcc	ctattggaat	tggagatcgc	tacgatgcag	cccagctacg	5760
gatcttggea	ggcccagcag	gegactccaa	cgtggtgaag	ctccagcga	tcaagacct	5820
ccctaccatg	gtaccttgg	gcaattcctt	ctcccacaaa	ctgtgctctg	gatttgttag	5880
gatttgcattg	gatgaggatg	ggaatgagaa	gaggcccggg	gactcttgga	ccttgccaga	5940
ccagtgccac	accgtgaact	gccagccaga	tggccagacc	ttgetgaaga	gtcctgggt	6000
caactgtgac	cggggctga	ggccttctgt	ccctaacagc	cagtcacctg	ttaaagtgga	6060
agagacctgt	ggctgccget	ggacctgccc	ctgcgtgtgc	acagccagct	ccacteggea	6120
catcgtgacc	tttgatgggc	agaatttcaa	gctgactggc	agctgttctt	atgtctatt	6180
tcaaaacaag	gagcaggacc	tggaggtgat	tctccataat	ggtgcttgea	gcccctggagc	6240
aaggcagggc	tgcattgaaat	ccatcgaggt	gaagcacagt	gcccctctccg	togagctgca	6300
cagtgcattg	gaggtgacgg	tgaatgggag	actggtctct	gttccttacg	tgggtgggaa	6360
catggaagtc	aacgtttatg	gtgccatcat	gcattgaggtc	agattcaatc	accttggctca	6420
catcttcaca	ttcactccac	aaaacaatga	gttccaactg	cagctcagcc	ccaagacttt	6480
tgettcaaaag	acgtatggtc	tgtgtgggat	ctgtgatgag	aacggagcca	atgacttcat	6540
gctgagggat	ggcacagtca	ccacagactg	gaaaacactt	gttcaggaat	ggactgtgca	6600
gcggccaggg	cagacgtgcc	agcccactct	ggaggagcag	tgtctgttcc	ccgacagctc	6660

[0003]

	ccaatgccag gtcctcctct taccactgtt tgctgaatgc cacaaggtcc tggtccagc	6720
	caattctat gccatctgcc agcaggacag ttgccaccag gageaagtgt gtgaggtgat	6780
	cgctcttat gccacctct gtcggaccaa cggggtctgc gttgactgga ggacacctga	6840
	ttctgtget atgtcatgcc caccatctct ggctacaac cactgtgagc atggctgtcc	6900
	ccggcactgt gatggcaacg tgagctctctg tggggaccat cctccgaag gctgtttctg	6960
	ccctccagat aaagtcatgt tgaaggcag ctgtgtccct gaagaggcct gcactcagtg	7020
	cattggtgag gatggagtc agcaccagtt cctggaagcc tgggtcccgg accaccagcc	7080
	ctgtcagatc tgcacatgcc tcagcggcg gaaggtcaac tgcacaacgc agccctgcc	7140
	cacggcctaa gctcccacgt gtggcctgtg tgaagtagcc cgcctccgc agaatgcaga	7200
	ccagtgtgc cccgagtatg agtgtgtgtg tgaccagtg agctgtgacc tgccccagt	7260
	gcctcactgt gaacgtgccc tccagccac actgaccaac cctggcgagt gcagaeccaa	7320
	ctcacctgc gctgcagga aggaggagt caaaagagt tccccacct cctgcccccc	7380
	gcaccgtttg cccacccttc ggaagaccca gtgtgtgat gagtatgagt gtgctgcaa	7440
	ctgtgtcaac tccacagtga gctgtccct tgggtacttg gctcaactg ccaccaatga	7500
	ctgtggtgt accacaacca cctgcttcc cgacaagggt tgtgtccacc gaagcaccat	7560
	ctaccctgtg ggccagttct gggaggagg ctgcgatgtg tgcacctgca ccgacatgga	7620
	ggatgccgtg atgggctcc gcgtggccca gctgtcccag aagccctgtg aggacagctg	7680
	tcggtcgggc ttcacttac ttctgatga aggcgagtgc tgtggaaggt gctgcccac	7740
	tgctgtgag gtggtgactg gctcacccg ggggactcc cagtcttctt ggaagagtgt	7800
	cgctcccag tgggctccc cggagaacc ctgcctcacc aatgagtgtg tccgagtga	7860
	ggaggaggtc ttatataaac aaaggaacgt ctctgcccc cagctggagg tccctgtctg	7920
	cccctcgggc tttcagctga gctgtaagac ctccagctgc tgcctaacgt gctgctgga	7980
[0004]	gcgatggag gctgcactgc tcaatggcac tgcattggg cccgggaaga ctgtgatgat	8040
	cgatgtgtgc acgacctgcc gctgcactgt gcaggtggg gtcactctct gattcaagct	8100
	ggagtgcagg aagaccacct gcaaccctg cccctgggt tacaaggaag aaaataaac	8160
	aggtgaatgt tgtgggagat gtttgcctac gcttgcacc attcagctaa gaggaggaca	8220
	gatcatgaca ctgaagcgtg atgagacgt ccaggatggt tgtgatactc acttctgcaa	8280
	ggtcaatgag agaggagagt acttctggga gaagagggtc acaggctgcc cacccttga	8340
	tgaacacaag tgtctggtg agggaggtaa aattatgaaa attccaggea cctgctgga	8400
	caatgtgag gacctgagt gcaacgacat cactgccagg ctgcagtatg tcaaggtggg	8460
	aagctgtaag tctgaagtag aggtggatat cactactgc cagggeaat gtgccagcaa	8520
	agccatgtac tccattgaca tcaacgatgt gcaggaccag tgcctctgct gctctccgac	8580
	acggacggag cccatgcagg tggcctgca ctgcaccaat ggtctgtttg tgtaccatga	8640
	ggttctcaat gccatggagt gcaaatgctc cccaggaag tgcagcaagt gaggctgctg	8700
	cagctgcactg ggtgctgct gctgctgcc ttggcctgat ggccaggcca gactgctgcc	8760
	agctctctgc atgttctgct ctgtgtccct tctgagccca caataaagge tgagctctta	8820
	tcttcaaaa ggc	8833

<210> 2

<211> 2783

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Polypeptide

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> prepro-vWF
 <400> 2
 Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu 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

[0005]

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

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

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

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

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

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

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

[0006] Glu Gly Gln Leu Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys
 325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0007] Asn Pro Arg Met Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr
 565 570 575

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0008] 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

[0009] Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu
 1040 1045 1050

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

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

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

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

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

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

Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro

	1145	1150	1155
	Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu		
	1160	1165	1170
	Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly		
	1175	1180	1185
	Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile		
	1190	1195	1200
	Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu		
	1205	1210	1215
	Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser Pro		
	1220	1225	1230
	Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His Asp		
	1235	1240	1245
[0010]	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		
[0011]	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				
[0012]	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
[0013]	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
[0014]	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
[0015]	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
[0016]	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

[0017]

<210> 3
 <211> 2050
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Polypeptide

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> mature vWF
 <400> 3
 Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp
 1 5 10 15

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

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

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

 Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys

65	70	75	80	
Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr	85	90	95	
Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr	100	105	110	
Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr	115	120	125	
Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile	130	135	140	
Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys	145	150	155	160
Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly	165	170	175	
[0018] 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

[0019] 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

[0020] Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn
 660 665 670

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

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

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

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

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

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

Gln Asp Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr

	770	775	780	
	Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln			
	785	790	795	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
[0021]	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
[0022]	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
[0023]	Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val	1340	1345	1350
	Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys	1355	1360	1365
	Leu Val Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu	1370	1375	1380
	Phe Ala Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala	1385	1390	1395
	Ile Cys Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val	1400	1405	1410
	Ile Ala Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val	1415	1420	1425
	Asp Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser	1430	1435	1440
	Leu Val Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp			

	1445		1450		1455
	Gly Asn Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe				
	1460		1465		1470
	Cys Pro Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu				
	1475		1480		1485
	Glu Ala Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln				
	1490		1495		1500
	Phe Leu Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys				
	1505		1510		1515
	Thr Cys Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys				
	1520		1525		1530
	Pro Thr Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg				
	1535		1540		1545
[0024]	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		
[0025]	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
[0026]	Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp	
	1970	1975 1980
	Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser	
	1985	1990 1995
	Ile Asp Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro	
	2000	2005 2010
	Thr Arg Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly	
	2015	2020 2025
	Ser Val Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys	
	2030	2035 2040
	Ser Pro Arg Lys Cys Ser Lys	
	2045	2050

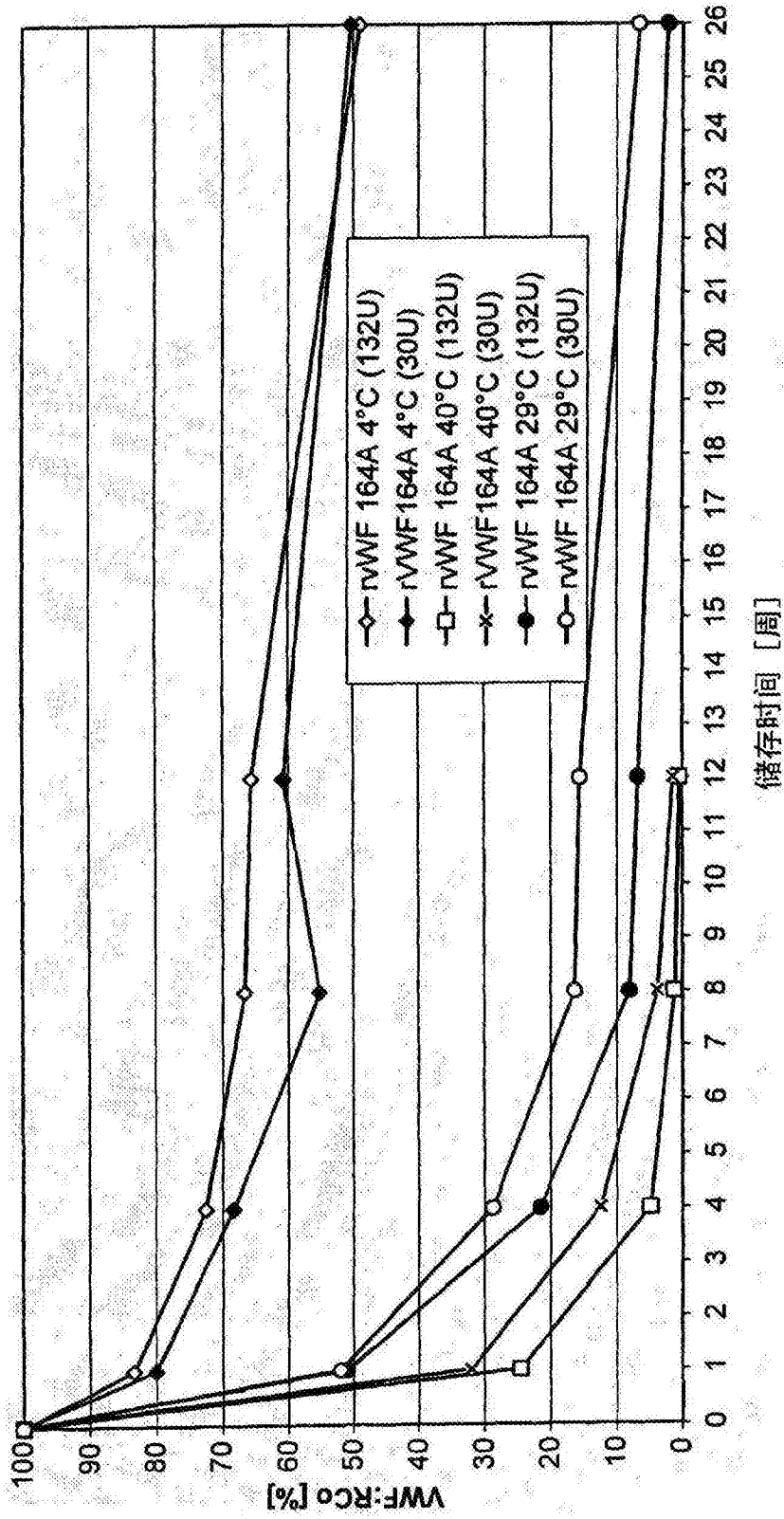


图1

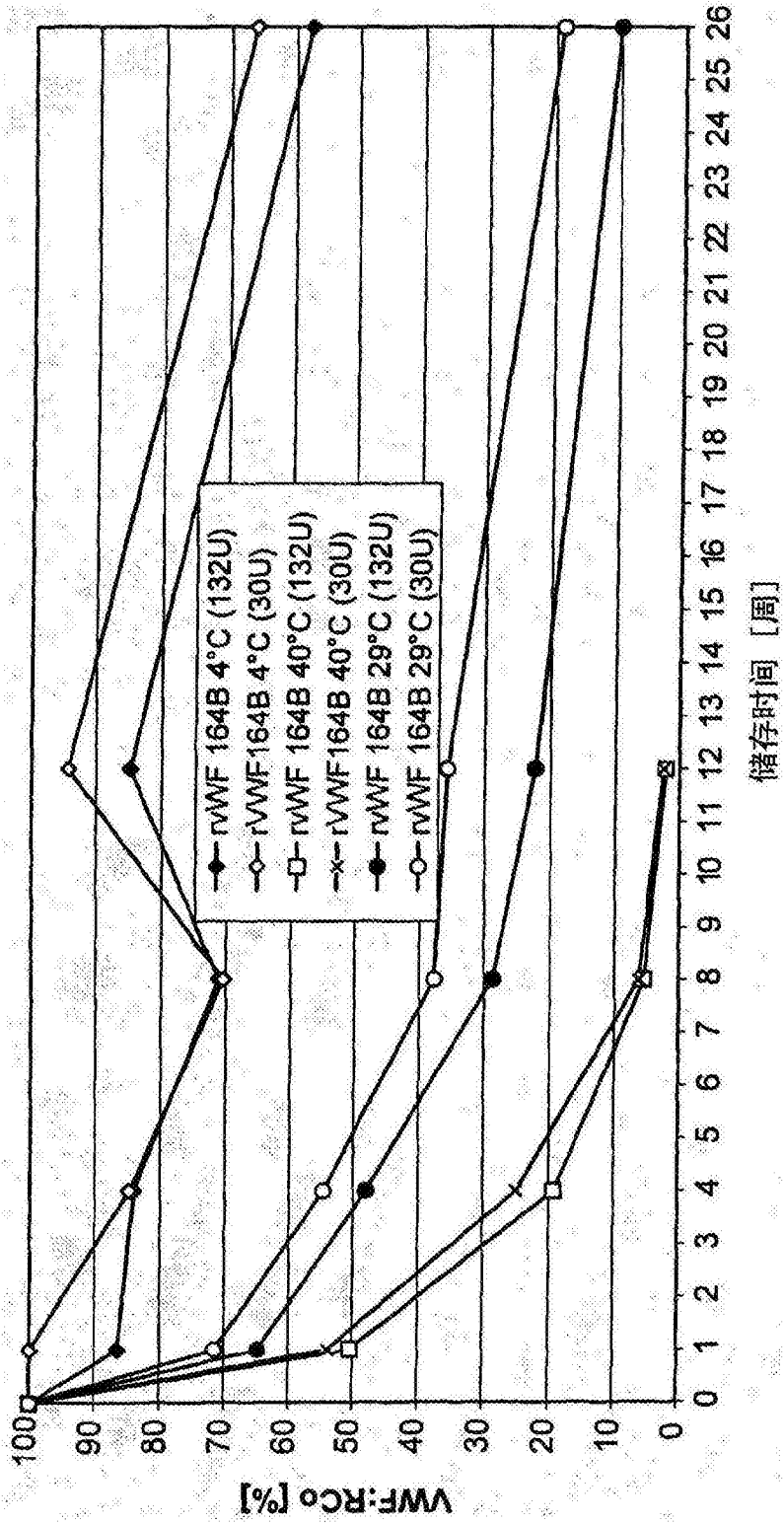


图2

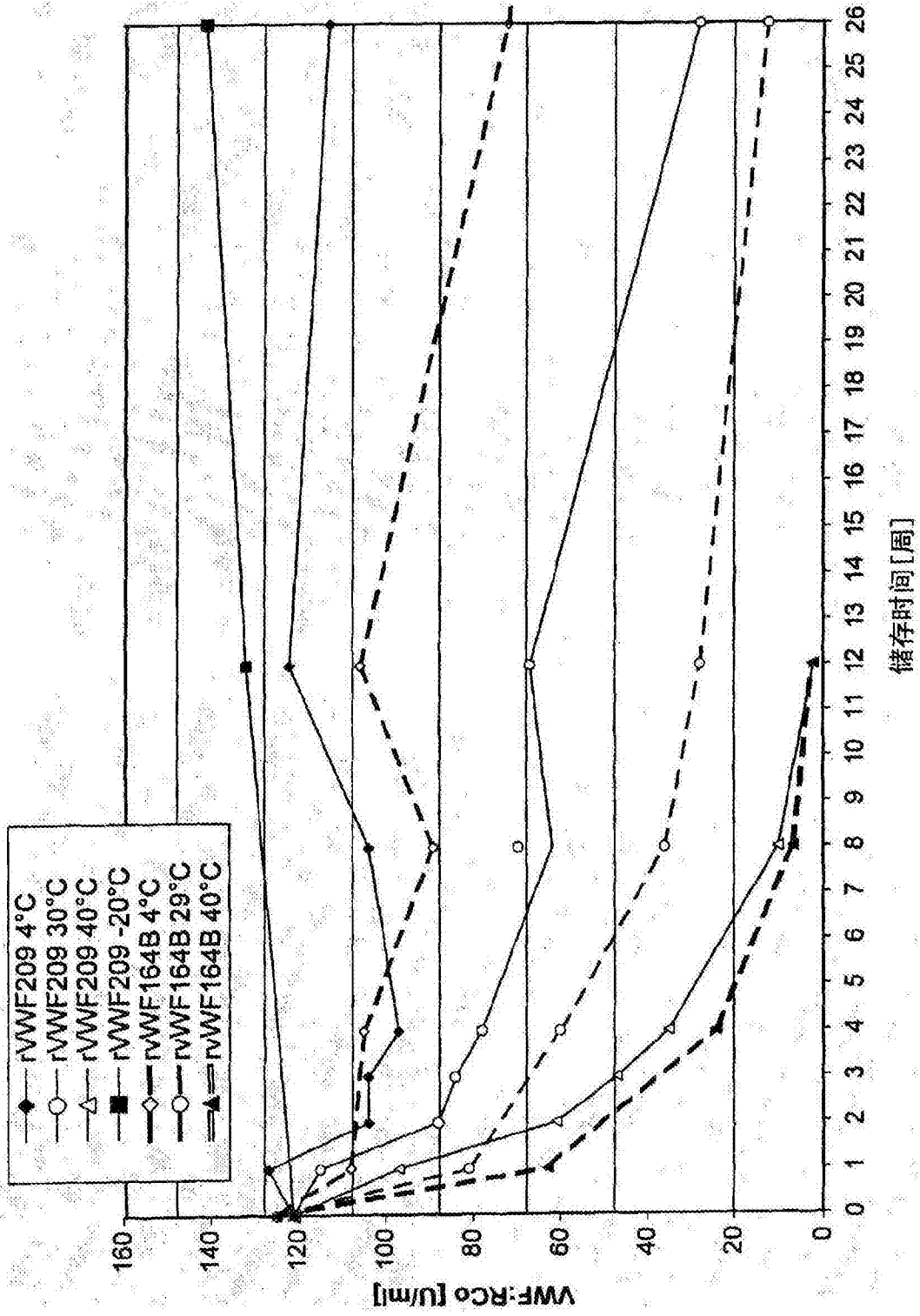


图3

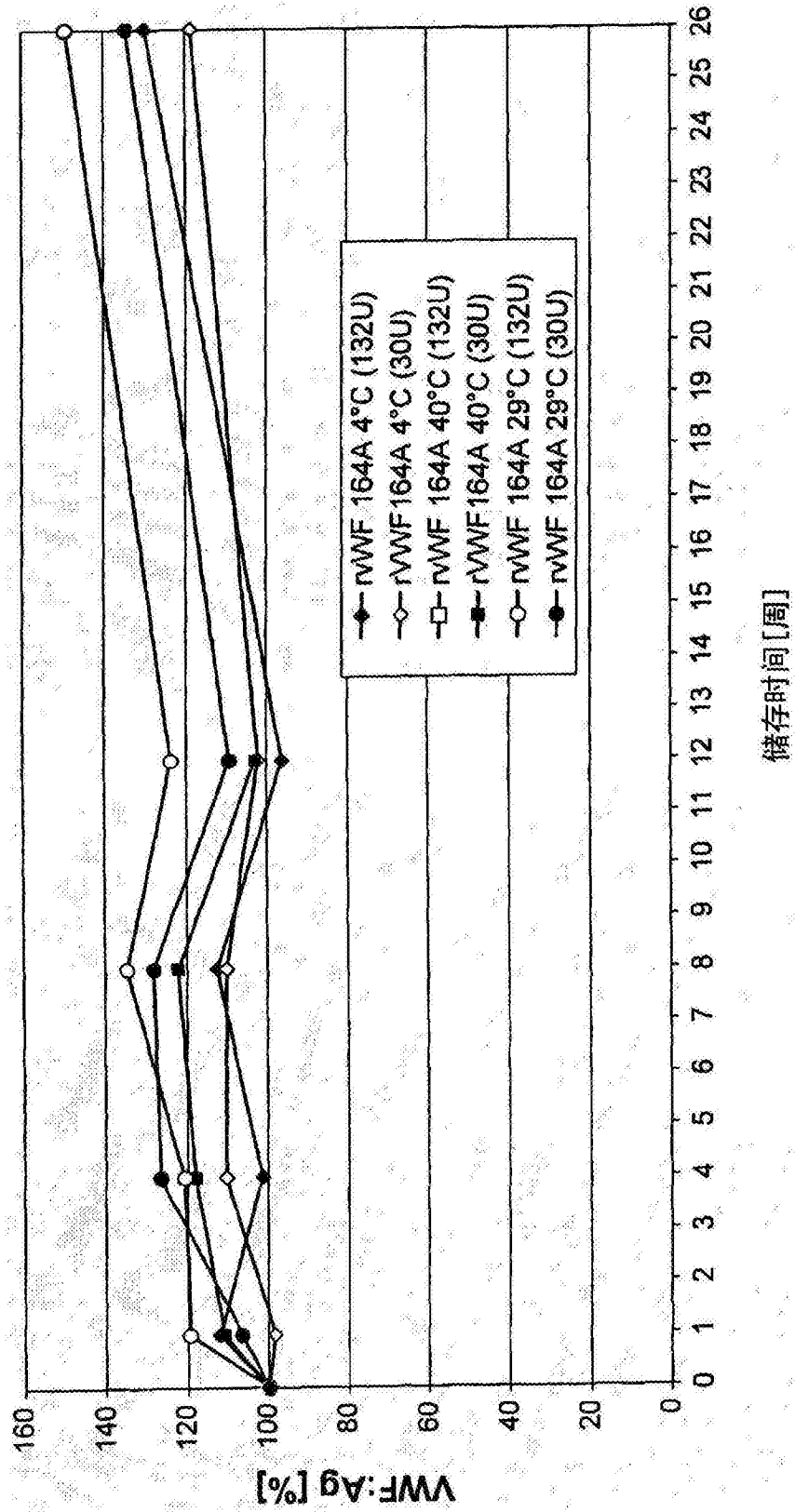


图4

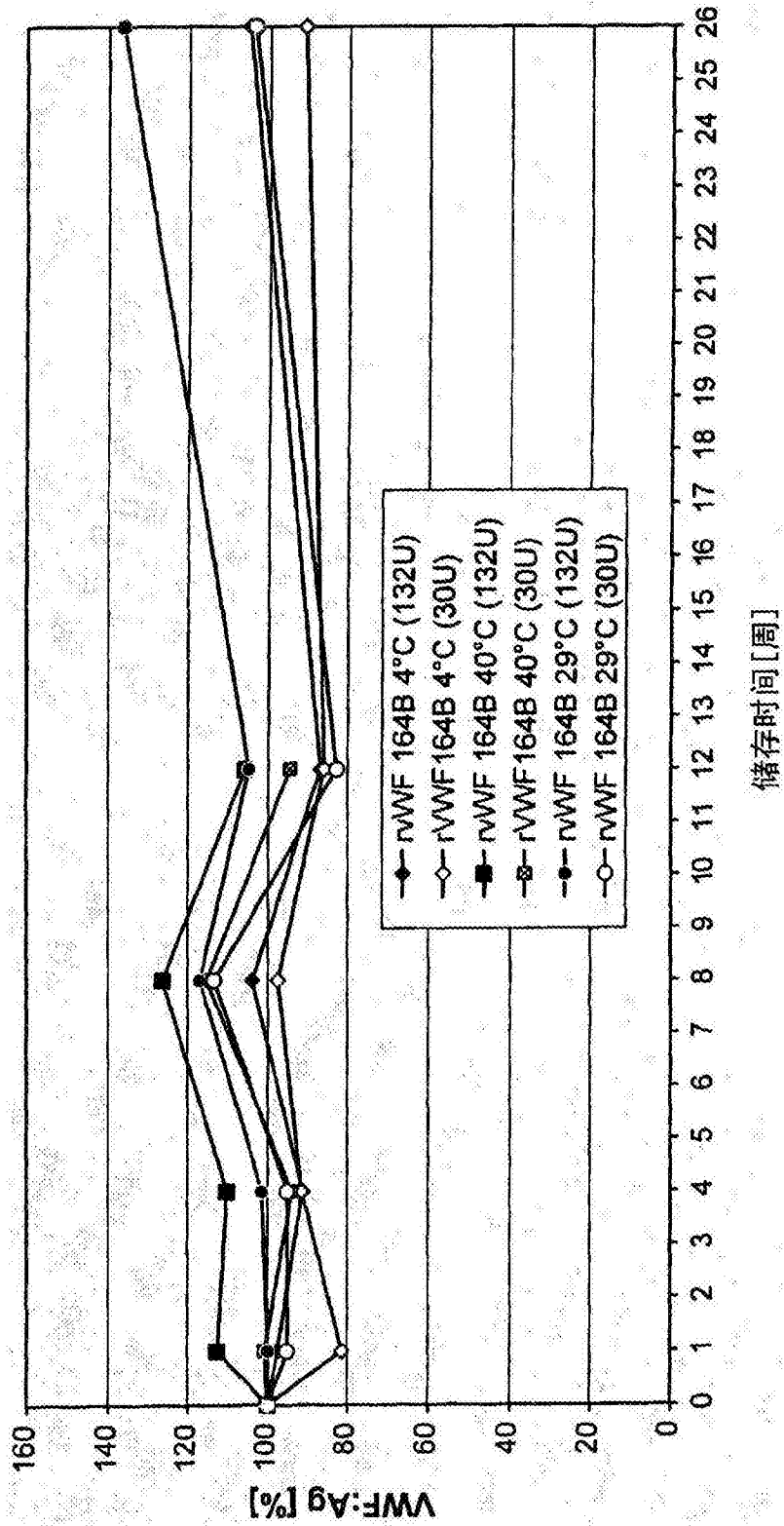


图5

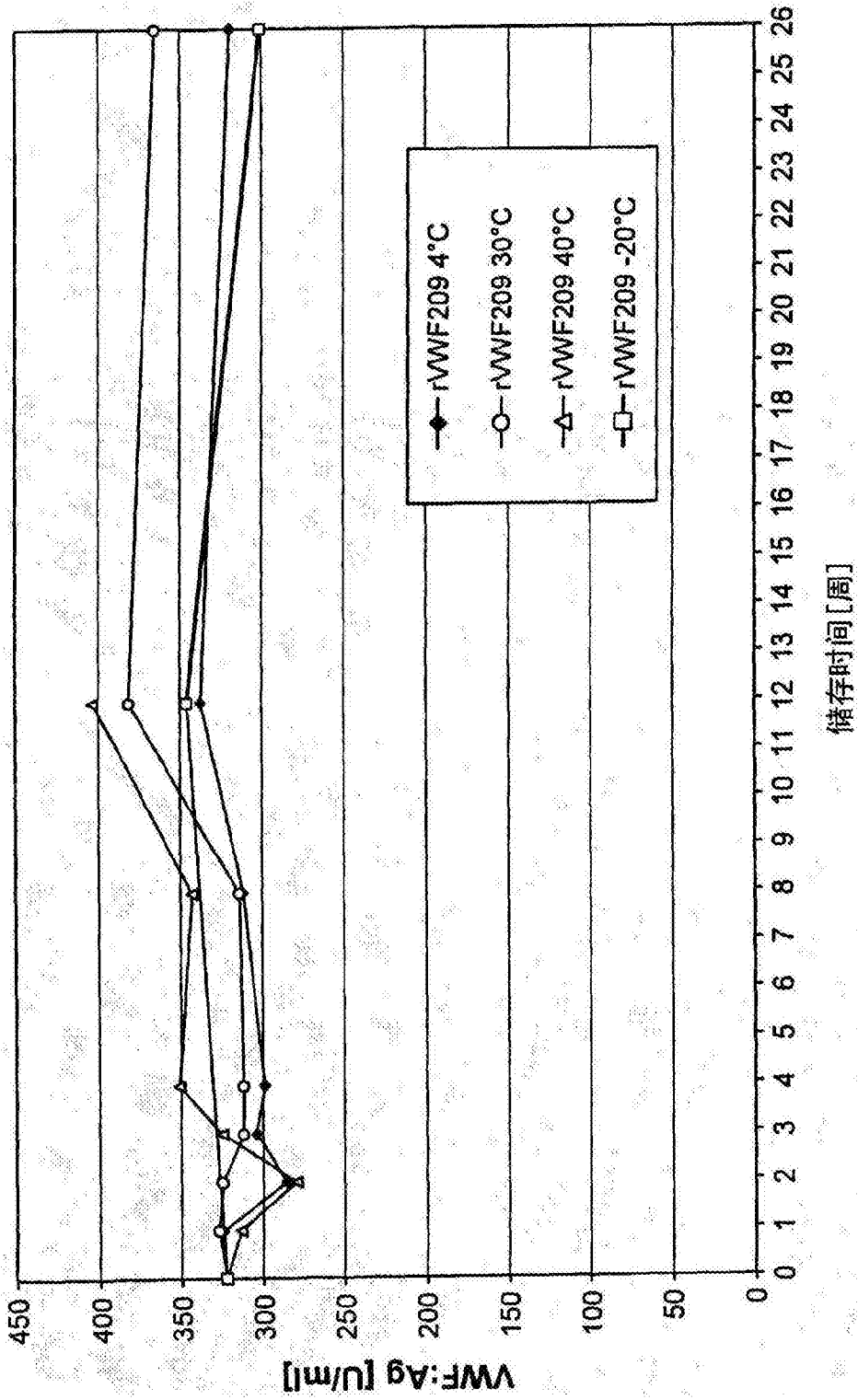


图6

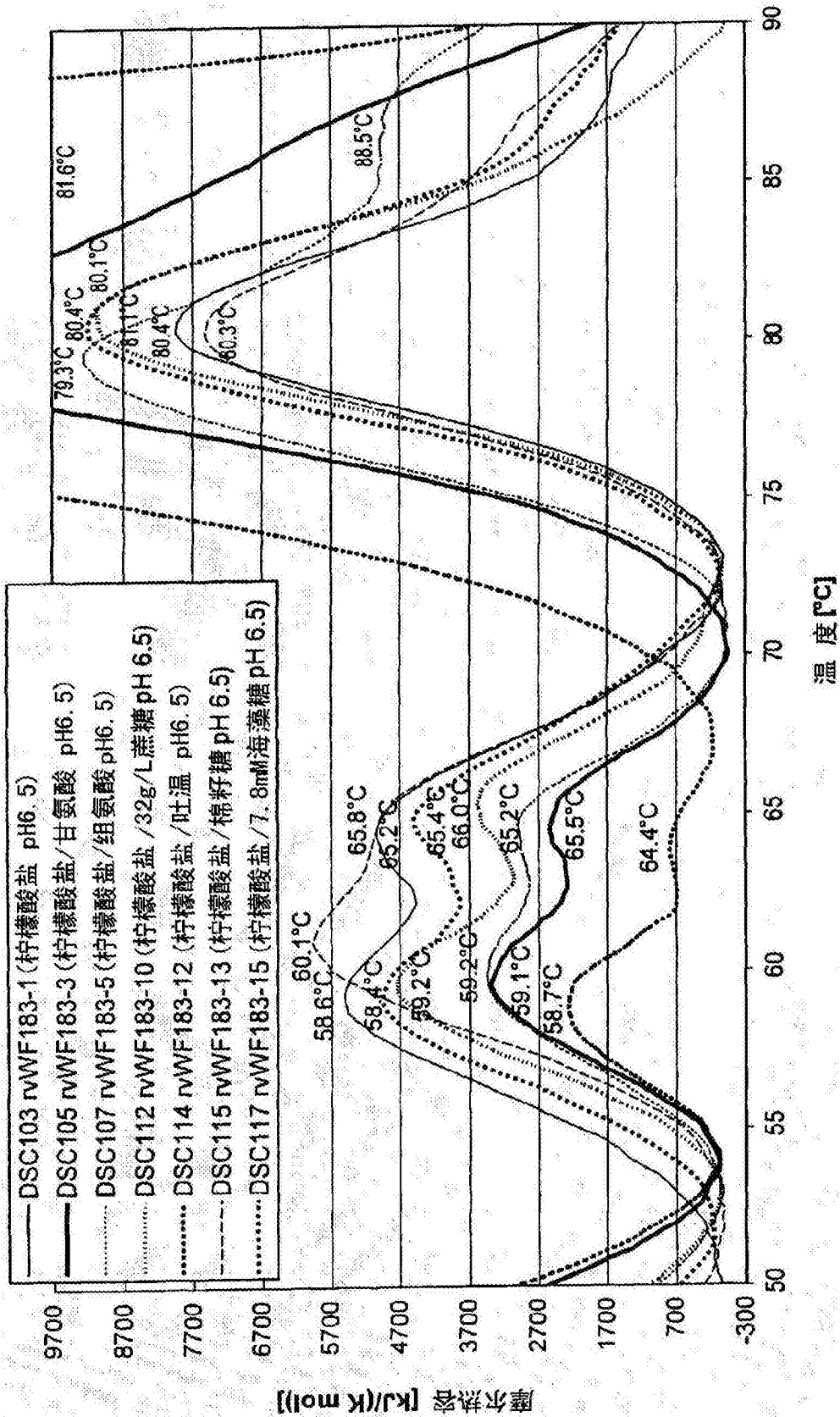


图7

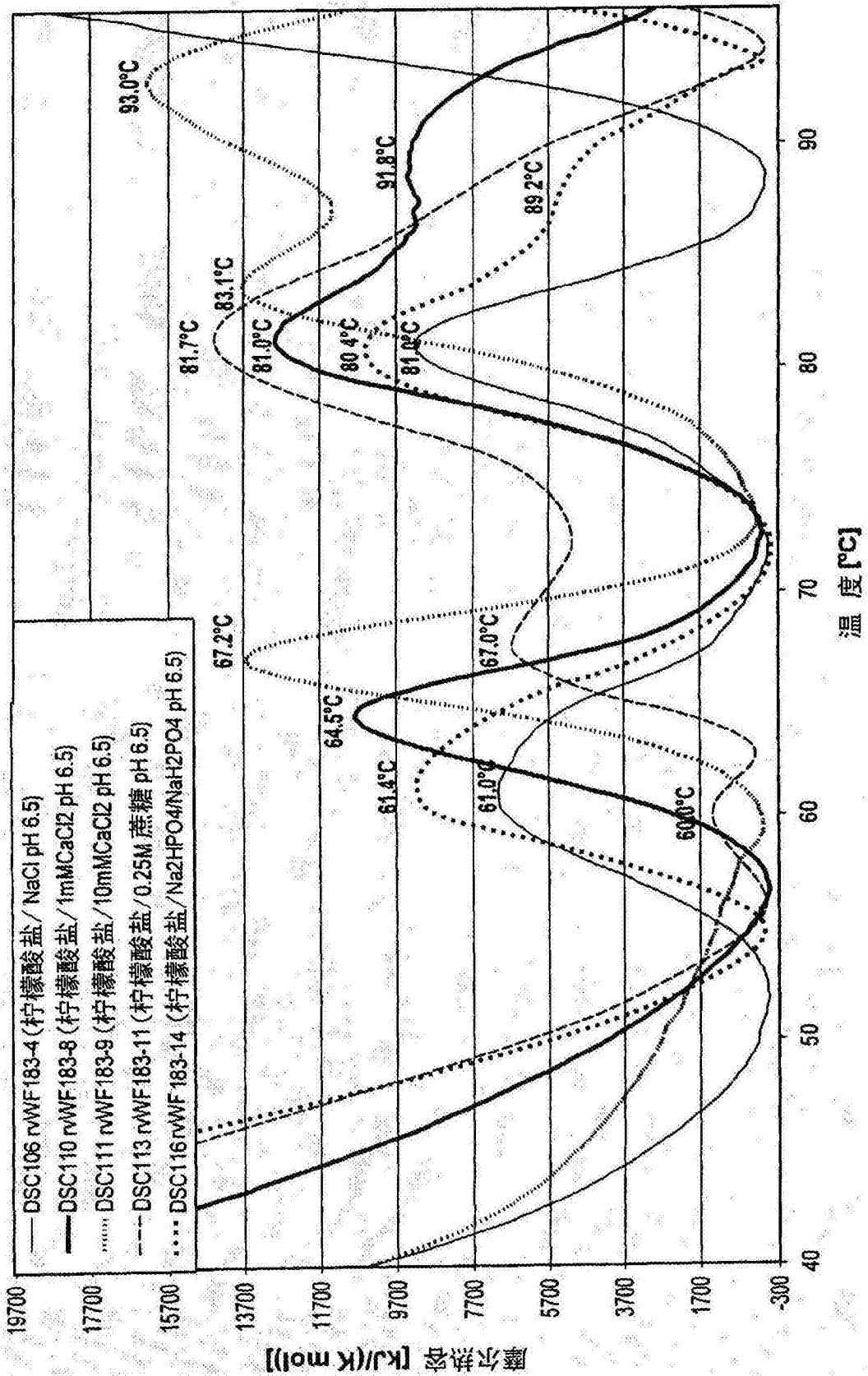


图8

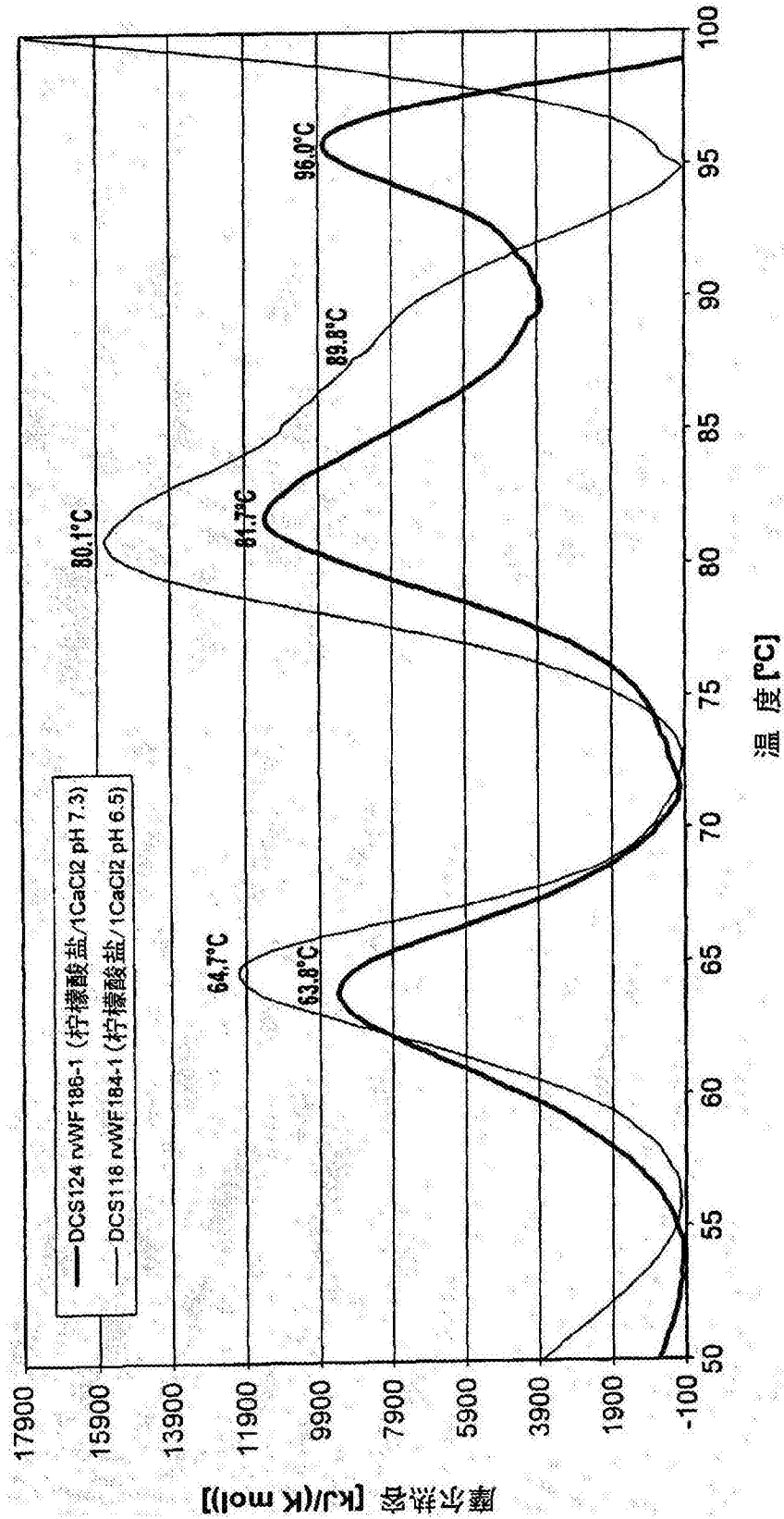


图9