



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 116997352 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 03

(21) 申请号 202280022149.2

(22) 申请日 2022.03.23

(30) 优先权数据

2021-049485 2021.03.24 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.09.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/013755 2022.03.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/202947 JA 2022.09.29

(71) 申请人 JCR制药股份有限公司

地址 日本兵库县

(72) 发明人 安川秀仁 村濑浩晃 山口裕加

冈部真二

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

专利代理师 盛曼 金龙河

(51) Int.Cl.

A61K 38/43 (2006.01)

权利要求书3页 说明书41页

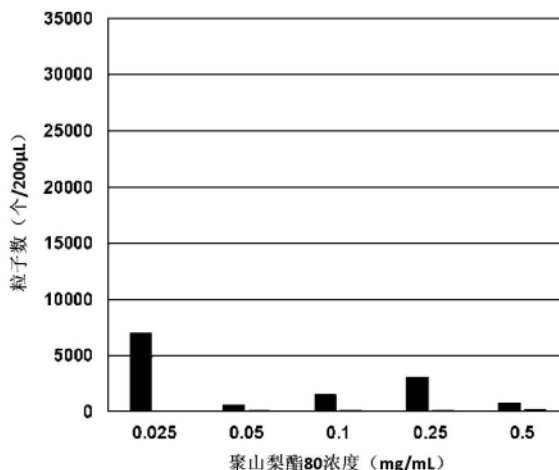
序列表25页 附图4页

(54) 发明名称

稳定的水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物

(57) 摘要

本发明公开了含有蛋白质作为有效成分的稳定的水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物。该药物组合物含有具有生理活性的蛋白质和两种非离子型表面活性剂,例如,该非离子型表面活性剂为聚山梨酯80和聚氧乙烯(160)聚氧丙烯(30)二醇,作为任选成分,含有作为中性盐的氯化钠、作为二糖类的蔗糖、和作为缓冲剂的柠檬酸缓冲剂。



1. 一种水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物,其含有具有生理活性的蛋白质和两种非离子型表面活性剂。

2. 根据权利要求1所述的水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物,其中,还含有中性盐、二糖类和缓冲剂中的至少一种。

3. 根据权利要求1或2所述的水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物,其中,作为该非离子型表面活性剂,含有聚山梨酯和泊洛沙姆。

4. 根据权利要求3所述的水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物,其中,

该聚山梨酯为聚山梨酯20或聚山梨酯80,

该泊洛沙姆选自聚氧乙烯(42)聚氧丙烯(67)二醇、聚氧乙烯(54)聚氧丙烯(39)二醇、聚氧乙烯(196)聚氧丙烯(67)二醇、聚氧乙烯(42)聚氧丙烯(67)二醇、聚氧乙烯(3)聚氧丙烯(17)二醇、聚氧乙烯(20)聚氧丙烯(20)二醇和聚氧乙烯(120)聚氧丙烯(40)二醇组成的组。

5. 根据权利要求3所述的水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物,其中,该聚山梨酯为聚山梨酯80,该泊洛沙姆为聚氧乙烯(160)聚氧丙烯(30)二醇。

6. 根据权利要求3至5中任一项所述的水性药物组合物,其中,该聚山梨酯的浓度为0.005~1.5mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.05~0.6mg/mL。

7. 根据权利要求3至5中任一项所述的水性药物组合物,其中,该聚山梨酯的浓度为0.025~1.0mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.1~0.5mg/mL。

8. 根据权利要求3至5中任一项所述的水性药物组合物,其中,该聚山梨酯的浓度为0.05~0.15mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.15~0.45mg/mL。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的水性药物组合物,其中,该中性盐为氯化钠。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的水性药物组合物,其中,该二糖类选自海藻糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖和这些中的两种以上的组合组成的组。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的水性药物组合物,其中,该缓冲剂选自柠檬酸缓冲剂、磷酸缓冲剂、甘氨酸缓冲剂、组氨酸缓冲剂、碳酸缓冲剂、乙酸缓冲剂和这些中的两种以上的组合组成的组。

12. 根据权利要求3至5中任一项所述的水性药物组合物,其中,该中性盐的浓度为0.3~1.2mg/mL,该二糖类的浓度为50~100mg/mL,该缓冲剂的浓度为10~30mM,该聚山梨酯的浓度为0.005~1.5mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.1~0.6mg/mL。

13. 根据权利要求3至5中任一项所述的水性药物组合物,其中,该中性盐的浓度为0.5~1.0mg/mL,该二糖类的浓度为55~95mg/mL,该缓冲剂的浓度为15~25mM,该聚山梨酯的浓度为0.05~1.0mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.25~0.45mg/mL。

14. 根据权利要求3至5中任一项所述的水性药物组合物,其中,该中性盐的浓度为0.7~0.9mg/mL,该二糖类的浓度为60~90mg/mL,该缓冲剂的浓度为15~25mM,该聚山梨酯的浓度为0.05~0.15mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.25~0.45mg/mL。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的水性药物组合物,其pH为4.5~6.5。

16. 根据权利要求1至14中任一项所述的水性药物组合物,其pH为5.0~6.0。

17. 根据权利要求1至14中任一项所述的水性药物组合物,其pH为5.2~5.8。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的水性药物组合物,其中,该具有生理活性的蛋

白质为抗体与溶酶体酶的融合蛋白。

19. 根据权利要求18所述的水性药物组合物,其中,该融合蛋白中,该溶酶体酶通过肽键结合在该抗体的轻链或重链中的任一者的C末端侧或N末端侧中的任一侧。

20. 根据权利要求18所述的水性药物组合物,其中,该融合蛋白中,该溶酶体酶通过肽键结合在该抗体的重链的C末端侧。

21. 根据权利要求18所述的水性药物组合物,其中,该融合蛋白中,该溶酶体酶借助由至少1个氨基酸构成的接头结合在该抗体的轻链或重链中的任一者的C末端侧或N末端侧中的任一侧。

22. 根据权利要求18所述的水性药物组合物,其中,该融合蛋白中,该溶酶体酶借助由至少1个氨基酸构成的接头结合在该抗体的重链的C末端侧。

23. 根据权利要求21或22所述的水性药物组合物,其中,该接头具有选自由Gly-Ser、Gly-Gly-Ser、序列号1、序列号2、序列号3、序列号4和2~10个这些氨基酸序列连接而成的氨基酸序列组成的组中的氨基酸序列。

24. 根据权利要求18至23中任一项所述的水性药物组合物,其中,该溶酶体酶为人溶酶体酶。

25. 根据权利要求18至24中任一项所述的水性药物组合物,其中,该溶酶体酶选自由 α -L-艾杜糖醛酸酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、葡糖脑苷脂酶、 β -半乳糖苷酶、GM2激活蛋白、 β -氨基己糖苷酶A、 β -氨基己糖苷酶B、N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸转移酶、 α -甘露糖苷酶、 β -甘露糖苷酶、半乳糖神经酰胺酶、鞘脂激活蛋白C、芳基硫酸酯酶A、 α -L-岩藻糖苷酶、天冬氨酰氨基葡萄糖苷酶、 α -N-乙酰氨基半乳糖苷酶、酸性鞘磷脂酶、 α -半乳糖苷酶、 β -葡糖醛酸糖苷酶、乙酰肝素N-硫酸酯酶、 α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、乙酰CoA- α -氨基葡萄糖苷N-乙酰基转移酶、N-乙酰葡萄糖胺-6-硫酸酯酶、酸性神经酰胺酶、淀粉-1-6-葡萄糖苷酶、唾液酸酶、天冬氨酰氨基葡萄糖苷酶、棕榈酰蛋白硫酸酯酶-1、三肽基肽酶-1、透明质酸酶-1、CLN1和CLN2组成的组。

26. 根据权利要求24所述的水性药物组合物,其中,该人溶酶体酶为 α -L-艾杜糖醛酸酶。

27. 根据权利要求18至26中任一项所述的水性药物组合物,其中,该抗体为人抗体或人源化抗体。

28. 根据权利要求18至27中任一项所述的水性药物组合物,其中,该抗体为Fab抗体、F(ab')₂抗体或F(ab')₂抗体。

29. 根据权利要求18至28中任一项所述的水性药物组合物,其中,该抗体识别存在于血管内皮细胞的表面的分子作为抗原。

30. 根据权利要求29所述的水性药物组合物,其中,该血管内皮细胞为人的血管内皮细胞。

31. 根据权利要求29或30所述的水性药物组合物,其中,该血管内皮细胞为脑血管内皮细胞。

32. 根据权利要求31所述的水性药物组合物,其中,该存在于脑血管内皮细胞的表面的分子选自由转铁蛋白受体(TfR)、胰岛素受体、瘦素受体、脂蛋白受体、IGF受体、OATP-F、有机阴离子转运体和单羧酸转运体组成的组。

33. 根据权利要求28所述的水性药物组合物,其中,该抗体为人源化抗人转铁蛋白受体

(hTfR) 抗体。

34. 根据权利要求28所述的水性药物组合物, 其中, 该抗体是作为Fab抗体的人源化抗人转铁蛋白受体 (hTfR) 抗体, 该人溶酶体酶为人 α -L- 艾杜糖醛酸酶, 该融合蛋白为该抗体与该人 α -L- 艾杜糖醛酸酶的融合蛋白, 在该融合蛋白中,

该抗体的轻链含有序列号22的氨基酸序列, 并且

该抗体的重链在其C末端侧借助序列号4所示的氨基酸序列与人 α -L- 艾杜糖醛酸酶结合, 由此形成序列号27所示的氨基酸序列。

35. 根据权利要求28所述的水性药物组合物, 其中, 该抗体是作为Fab抗体的人源化抗人转铁蛋白受体 (hTfR) 抗体, 该人溶酶体酶为人 α -L- 艾杜糖醛酸酶, 该融合蛋白为该抗体与该人 α -L- 艾杜糖醛酸酶的融合蛋白, 在该融合蛋白中,

该抗体的轻链含有序列号22所示的氨基酸序列, 并且

该抗体的重链含有序列号23所示的氨基酸序列, 该重链在其C末端侧借助序列号4所示的氨基酸序列与具有序列号5或序列号6所示的氨基酸序列的人 α -L- 艾杜糖醛酸酶结合。

36. 根据权利要求1至35中任一项所述的水性药物组合物, 其被封入到由硼硅酸玻璃或疏水性树脂形成的容器中。

37. 根据权利要求36所述的水性药物组合物, 其中, 该容器是使用环烯烃共聚物、环烯烃类开环聚合物或对环烯烃类开环聚合物进行氢化而得到的物质形成的容器。

38. 一种冷冻干燥药物组合物, 其为将权利要求6至35中任一项所述的水性药物组合物冷冻干燥而得到的冷冻干燥药物组合物。

39. 根据权利要求38所述的冷冻干燥药物组合物, 其被封入到材质包含硼硅酸玻璃或疏水性树脂的容器中。

40. 根据上述39所述的冷冻干燥药物组合物, 其中, 该容器的材质包含环烯烃共聚物、环烯烃类开环聚合物或对环烯烃类开环聚合物进行氢化而得到的物质。

41. 根据上述1~40的水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物, 其在2~8℃的温度下且在暗处保存36个月后的聚合物的含有比率为0.5%以下。

42. 根据上述1~37的水性药物组合物, 其在2~8℃的温度下且在暗处保存36个月后的聚合物的含有比率和分解物的含有比率分别为0.5%以下和1%以下。

43. 根据上述39~41的冷冻干燥药物组合物, 其在2~8℃的温度下且在暗处保存36个月后的聚合物的含有比率和分解物的含有比率分别为0.5%以下和0.1%以下。

稳定的水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及含有具有生理活性的蛋白质和两种或两种以上非离子型表面活性剂的水性药物组合物,例如,涉及含有作为具有生理活性的蛋白质的使抗体与溶酶体酶结合而成的融合蛋白、以及作为非离子型表面活性剂的聚山梨酯80和聚氧乙烯(160)聚氧丙烯(30)二醇的水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物。

背景技术

[0002] 以往,考虑到蛋白质的储藏稳定性,含有蛋白质作为有效成分的药物通常制成冷冻干燥制剂(冷冻干燥药物组合物)来供给。目前,含有艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、 α -半乳糖苷酶A、葡糖脑苷脂酶、 α -L-艾杜糖醛酸酶-N-乙酰基半乳糖胺-4-硫酸酯酶等溶酶体酶、抗人IL-6受体抗体、抗人PD-1抗体等抗体、促红细胞生成素、达贝泊汀、生长激素等蛋白质作为主剂的药物大多以水性药物组合物的形态制造、销售。水性药物组合物由于不需要使用时的药剂的溶解操作,因此与冷冻干燥药物组合物相比便利性高。但是,即使是含有蛋白质作为主剂的药物,也存在以冷冻干燥药物组合物形态供给的药物。

[0003] 水性药物组合物中,为了提高作为主剂的蛋白质的稳定性或为了防止该蛋白质向容器的吸附,大多会添加非离子型表面活性剂。作为所述非离子型表面活性剂,有聚山梨酯80等。例如,对于含有达贝泊汀或阿加糖酶作为有效成分的水性药物组合物而言,存在添加了聚山梨酯80作为非离子型表面活性剂的水性药物组合物(非专利文献1、2)。另外,对于生长激素而言,存在添加了聚氧乙烯(160)聚氧丙烯(30)二醇作为非离子型表面活性剂的水性药物组合物(非专利文献3)。

[0004] 现有技术文献

[0005] 非专利文献

[0006] 非专利文献1:ダルベポエチンアルファBS注5 μ gシリンジ(达贝泊汀 α BS注5 μ g注射器)“JCR”(2010)

[0007] 非专利文献2:アガルシダーゼベータBS点滴静注5mg(阿加糖酶BBS点滴静注5mg)“JCR”(2018)

[0008] 非专利文献3:グロウジェクト(Growject)皮下注6mg/グロウジェクト皮下注12mg 附带的说明书(2017)

发明内容

[0009] 发明所要解决的问题

[0010] 本发明的目的在于,提供含有两种或两种以上非离子型表面活性剂作为表面活性剂、稳定至能够在市场上流通的程度的含有具有生理活性的蛋白质作为有效成分的水性药物组合物。

[0011] 用于解决问题的方法

[0012] 在面向上述目的的研究中,本发明人发现,通过将具有生理活性的蛋白质制成含

有蔗糖和两种非离子型表面活性剂作为赋形剂的水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物的形态,能够稳定地保存,从而完成了本发明。即,本发明提供以下内容。

[0013] 1. 一种水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物,其含有具有生理活性的蛋白质和两种非离子型表面活性剂。

[0014] 2. 根据上述1所述的水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物,其中,还含有中性盐、二糖类和缓冲剂中的至少一种。

[0015] 3. 根据上述1或2所述的水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物,其中,作为该非离子型表面活性剂,含有聚山梨酯和泊洛沙姆。

[0016] 4. 根据上述3所述的水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物,其中,

[0017] 该聚山梨酯为聚山梨酯20或聚山梨酯80,

[0018] 该泊洛沙姆选自自由聚氧乙烯(42)聚氧丙烯(67)二醇、聚氧乙烯(54)聚氧丙烯(39)二醇、聚氧乙烯(196)聚氧丙烯(67)二醇、聚氧乙烯(42)聚氧丙烯(67)二醇、聚氧乙烯(3)聚氧丙烯(17)二醇、聚氧乙烯(20)聚氧丙烯(20)二醇和聚氧乙烯(120)聚氧丙烯(40)二醇组成的组。

[0019] 5. 根据上述3所述的水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物,其中,该聚山梨酯为聚山梨酯80,该泊洛沙姆为聚氧乙烯(160)聚氧丙烯(30)二醇。

[0020] 6. 根据上述3至5中任一项所述的水性药物组合物,其中,该聚山梨酯的浓度为0.005~1.5mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.1~0.6mg/mL,或者该聚山梨酯的浓度为0.005~1.5mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.05~0.6mg/mL。

[0021] 7. 根据上述3至5中任一项所述的水性药物组合物,其中,该聚山梨酯的浓度为0.025~1.0mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.2~0.5mg/mL,或者该聚山梨酯的浓度为0.025~1.0mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.1~0.5mg/mL。

[0022] 8. 根据上述3至5中任一项所述的水性药物组合物,其中,该聚山梨酯的浓度为0.05~0.15mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.25~0.45mg/mL,或者该聚山梨酯的浓度为0.05~0.15mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.15~0.45mg/mL。

[0023] 9. 根据上述1至8中任一项所述的水性药物组合物,其中,该中性盐为氯化钠。

[0024] 10. 根据上述1至9中任一项所述的水性药物组合物,其中,该二糖类选自海藻糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖和这些中的两种以上的组合组成的组。

[0025] 11. 根据上述1至10中任一项所述的水性药物组合物,其中,该缓冲剂选自柠檬酸缓冲剂、磷酸缓冲剂、甘氨酸缓冲剂、组氨酸缓冲剂、碳酸缓冲剂、乙酸缓冲剂和这些中的两种以上的组合组成的组。

[0026] 12. 根据上述3至5中任一项所述的水性药物组合物,其中,该中性盐的浓度为0.3~1.2mg/mL,该二糖类的浓度为50~100mg/mL,该缓冲剂的浓度为10~30mM,该聚山梨酯的浓度为0.005~1.5mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.1~0.6mg/mL。

[0027] 13. 根据上述3至5中任一项所述的水性药物组合物,其中,该中性盐的浓度为0.5~1.0mg/mL,该二糖类的浓度为55~95mg/mL,该缓冲剂的浓度为15~25mM,该聚山梨酯的浓度为0.05~1.0mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.25~0.45mg/mL。

[0028] 14. 根据上述3至5中任一项所述的水性药物组合物,其中,该中性盐的浓度为0.7~0.9mg/mL,该二糖类的浓度为60~90mg/mL,该缓冲剂的浓度为15~25mM,该聚山梨酯的

浓度为0.05~0.15mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.25~0.45mg/mL。

[0029] 15.根据上述1至14中任一项所述的水性药物组合物,其pH为4.5~6.5。

[0030] 16.根据上述1至14中任一项所述的水性药物组合物,其pH为5.0~6.0。

[0031] 17.根据上述1至14中任一项所述的水性药物组合物,其pH为5.2~5.8。

[0032] 18.根据上述1至17中任一项所述的水性药物组合物,其中,该具有生理活性的蛋白质为抗体与溶酶体酶的融合蛋白。

[0033] 19.根据上述18所述的水性药物组合物,其中,该融合蛋白中,该溶酶体酶通过肽键结合在该抗体的轻链或重链中的任一者的C末端侧或N末端侧中的任一侧。

[0034] 20.根据上述18所述的水性药物组合物,其中,该融合蛋白中,该溶酶体酶通过肽键结合在该抗体的重链的C末端侧。

[0035] 21.根据上述18所述的水性药物组合物,其中,该融合蛋白中,该溶酶体酶借助由至少1个氨基酸构成的接头结合在该抗体的轻链或重链中的任一者的C末端侧或N末端侧中的任一侧。

[0036] 22.根据上述18所述的水性药物组合物,其中,该融合蛋白中,该溶酶体酶借助由至少1个氨基酸构成的接头结合在该抗体的重链的C末端侧。

[0037] 23.根据上述21或22所述的水性药物组合物,其中,该接头具有选自由Gly-Ser、Gly-Gly-Ser、序列号1、序列号2、序列号3、序列号4和1~10个这些氨基酸序列连接而成的氨基酸序列组成的组中的氨基酸序列。

[0038] 24.根据上述18至23中任一项所述的水性药物组合物,其中,该溶酶体酶为人溶酶体酶。

[0039] 25.根据上述18至24中任一项所述的水性药物组合物,其中,该溶酶体酶选自由 α -L-艾杜糖醛酸酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、葡糖脑苷脂酶、 β -半乳糖苷酶、GM2激活蛋白、 β -氨基己糖苷酶A、 β -氨基己糖苷酶B-N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸转移酶、 α -甘露糖苷酶、 β -甘露糖苷酶、半乳糖神经酰胺酶、鞘脂激活蛋白C、芳基硫酸酯酶A、 α -L-岩藻糖苷酶、天冬氨酰氨基葡萄糖苷酶、 α -N-乙酰氨基半乳糖苷酶、酸性鞘磷脂酶、 α -半乳糖苷酶、 β -葡糖醛酸糖苷酶、乙酰肝素N-硫酸酯酶、 α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、乙酰CoA-氨基葡萄糖苷N-乙酰基转移酶-N-乙酰葡萄糖胺-6-硫酸酯酶、酸性神经酰胺酶、淀粉-1-6-葡萄糖苷酶、唾液酸酶、天冬氨酰氨基葡萄糖苷酶、棕榈酰蛋白硫酯酶-1、三肽基肽酶-1、透明质酸酶-1、CLN1和CLN2组成的组。

[0040] 26.根据上述24所述的水性药物组合物,其中,该人溶酶体酶为 α -L-艾杜糖醛酸酶。

[0041] 27.根据上述18至26中任一项所述的水性药物组合物,其中,该抗体为人抗体或人源化抗体。

[0042] 28.根据上述18至27中任一项所述的水性药物组合物,其中,该抗体为Fab抗体、F(ab')₂抗体或F(ab')₂抗体。

[0043] 29.根据上述18至28中任一项所述的水性药物组合物,其中,该抗体识别存在于血管内皮细胞的表面的分子作为抗原。

[0044] 30.根据上述29所述的水性药物组合物,其中,该血管内皮细胞为人的血管内皮细胞。

[0045] 31.根据上述29或30所述的水性药物组合物,其中,该血管内皮细胞为脑血管内皮

细胞。

[0046] 32. 根据上述31所述的水性药物组合物,其中,该存在于脑血管内皮细胞的表面的分子选自由转铁蛋白受体 (TfR)、胰岛素受体、瘦素受体、脂蛋白受体、IGF受体、OATP-F、有机阴离子转运体和单羧酸转运体组成的组。

[0047] 33. 根据上述28所述的水性药物组合物,其中,该抗体为人源化抗人转铁蛋白受体 (hTfR) 抗体。

[0048] 34. 根据上述28所述的水性药物组合物,其中,该抗体是作为Fab抗体的人源化抗人转铁蛋白受体 (hTfR) 抗体,该人溶酶体酶为人 α -L-艾杜糖醛酸酶,该融合蛋白为该抗体与该人 α -L-艾杜糖醛酸酶的融合蛋白,在该融合蛋白中,

[0049] (1) 该抗体的轻链含有序列号22的氨基酸序列,并且

[0050] (2) 该抗体的重链在其C末端侧借助序列号4所示的氨基酸序列与人 α -L-艾杜糖醛酸酶结合,由此形成序列号27所示的氨基酸序列。

[0051] 35. 根据上述28所述的水性药物组合物,其中,该抗体是作为Fab抗体的人源化抗人转铁蛋白受体 (hTfR) 抗体,该人溶酶体酶为人 α -L-艾杜糖醛酸酶,该融合蛋白为该抗体与该人 α -L-艾杜糖醛酸酶的融合蛋白,在该融合蛋白中,

[0052] (1) 该抗体的轻链含有序列号22所示的氨基酸序列,并且

[0053] (2) 该抗体的重链含有序列号23所示的氨基酸序列,该重链在其C末端侧借助序列号4所示的氨基酸序列与具有序列号5或序列号6所示的氨基酸序列的人 α -L-艾杜糖醛酸酶结合。

[0054] 36. 根据上述1至35中任一项所述的水性药物组合物,其被封入到由硼硅酸玻璃或疏水性树脂形成的容器中。

[0055] 37. 根据上述36所述的水性药物组合物,其中,该容器是使用环烯烃共聚物、环烯烃类开环聚合物或对环烯烃类开环聚合物进行氢化而得到的物质形成的容器。

[0056] 38. 一种药物组合物,其含有对上述1至35中任一项所述的水性药物组合物进行冷冻干燥而得到的物质。

[0057] 39. 根据上述38所述的冷冻干燥药物组合物,其被封入到材质包含硼硅酸玻璃或疏水性树脂的容器中。

[0058] 40. 根据上述39所述的冷冻干燥药物组合物,其中,该容器的材质包含环烯烃共聚物、环烯烃类开环聚合物或对环烯烃类开环聚合物进行氢化而得到的物质。

[0059] 41. 根据上述1~40的水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物,其在2~8℃的温度下且在暗处保存36个月后的聚合物的含有比率为0.5%以下。

[0060] 42. 根据上述1~37的水性药物组合物,其在2~8℃的温度下且在暗处保存36个月后的聚合物的含有比率和分解物的含有比率分别为0.5%以下和1%以下。

[0061] 42. 根据上述39~41的冷冻干燥药物组合物,其在2~8℃的温度下且在暗处保存36个月后的聚合物的含有比率和分解物的含有比率分别为0.5%以下和0.1%以下。

[0062] 发明效果

[0063] 根据本发明,可以提供含有具有生理活性的蛋白质作为有效成分、稳定至能够在市场上流通的程度的水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物。

附图说明

[0064] 图1为示出振荡24小时后的水性药物组合物(配方A~C)中所包含的每单位液量(200 μ L)的粒子数的测定值的图。黑棒表示粒径小于10 μ m的粒子数,白棒表示粒径为10 μ m以上的粒子数。纵轴表示粒子数(个/200 μ L),横轴表示泊洛沙姆188的浓度(mg/mL)。

[0065] 图2为示出振荡24小时后的水性药物组合物(配方A~C)中的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的含有率的图。纵轴表示聚合物的含有率(%),横轴表示泊洛沙姆188的浓度(mg/mL)。

[0066] 图3为示出振荡24小时后的水性药物组合物(配方A~C)中的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的分解物的含有率的图。纵轴表示聚合物的含有率(%),横轴表示泊洛沙姆188的浓度(mg/mL)。

[0067] 图4为示出振荡24小时后的水性药物组合物(配方D~I)中所包含的每单位液量(200 μ L)的粒子数的测定值的图。黑棒表示粒径小于10 μ m的粒子数,白棒表示粒径为10 μ m以上的粒子数。纵轴表示粒子数(个/200 μ L),横轴表示聚山梨酯80的浓度(mg/mL)。

[0068] 图5为示出振荡24小时后的水性药物组合物(配方D~I)中的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的含有率的图。纵轴表示聚合物的含有率(%),横轴表示聚山梨酯80的浓度(mg/mL)。

[0069] 图6为示出振荡24小时后的水性药物组合物(配方D~I)中的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的分解物的含有率的图。纵轴表示聚合物的含有率(%),横轴表示聚山梨酯80的浓度(mg/mL)。

[0070] 图7为示出振荡24小时后的水性药物组合物(配方J~N)中所包含的每单位液量(200 μ L)的粒子数的测定值的图。黑棒表示粒径小于10 μ m的粒子数,白棒表示粒径为10 μ m以上的粒子数。纵轴表示粒子数(个/200 μ L),横轴表示聚山梨酯80的浓度(mg/mL)。

[0071] 图8为示出振荡24小时后的水性药物组合物(配方J~N)中的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的含有率的图。纵轴表示聚合物的含有率(%),横轴表示聚山梨酯80的浓度(mg/mL)。

[0072] 图9为示出振荡24小时后的水性药物组合物(配方J~N)中的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的分解物的含有率的图。纵轴表示聚合物的含有率(%),横轴表示聚山梨酯80的浓度(mg/mL)。

具体实施方式

[0073] 本发明涉及以具有生理活性的蛋白质作为有效成分的药物在溶液状态或冷冻干燥状态下储藏稳定的药物组合物。在此,具有生理活性的蛋白质包括使抗体与生理活性物质结合而成的蛋白质。此时,与生理活性物质结合的抗体只要具有与抗原特异性结合的性质,则抗体的动物种属等没有特别限制,尤其是人抗体或人源化抗体。例如,抗体可以为人以外的哺乳动物的抗体,另外也可以为人抗体与人以外的其它哺乳动物的抗体的嵌合抗体。

[0074] 人抗体是指其整体为人来源的基因所编码的抗体。但是,为了提高基因的表达效率等而向原本的人基因中加入了突变的基因所编码的抗体也为人抗体。另外,将编码人抗体的2个以上基因组合而将某一个人抗体的一部分置换为其它人抗体的一部分而成的抗体

也为人抗体。人抗体具有免疫球蛋白轻链的3个互补决定区(CDR)和免疫球蛋白重链的3个互补决定区(CDR)。免疫球蛋白轻链的3个CDR从位于N末端侧者起依次称为CDR1、CDR2和CDR3。免疫球蛋白重链的3个CDR从位于N末端侧者起依次称为CDR1、CDR2和CDR3。通过将某一个人抗体的CDR置换为其它人抗体的CDR而改变了人抗体的抗原特异性、亲和性等的抗体也为人抗体。

[0075] 本发明的一个实施方式中,通过对原本的人抗体的基因进行改造而对原抗体的氨基酸序列加入了置换、缺失、添加等突变的抗体也称为人抗体。将原抗体的氨基酸序列中的氨基酸置换为其它氨基酸时,所置换的氨基酸的个数优选为1~20个,更优选为1~10个,进一步优选为1~5个,进而更优选为1~3个。使原抗体的氨基酸序列中的氨基酸缺失时,缺失的氨基酸的个数优选为1~20个,更优选为1~10个,进一步优选为1~5个,进而更优选为1~3个。另外,加入了组合有这些氨基酸的置换和缺失的突变的抗体也为人抗体。添加氨基酸时,在原抗体的氨基酸序列中或N末端侧或C末端侧添加优选1~20个、更优选1~10个、进一步优选1~5个、进而更优选1~3个氨基酸。加入了组合有这些氨基酸的添加、置换和缺失的突变的抗体也为人抗体。加入了突变的抗体的氨基酸序列与原抗体的氨基酸序列优选显示80%以上的一致性,更优选显示85%以上的一致性,进一步优选显示90%以上的一致性,进而更优选显示95%以上的一致性,还进一步优选显示98%以上的一致性。即,本发明中称为“人来源的基因”时,除了人来源的原基因以外,还包含对人来源的原基因加以改造而得到的基因。

[0076] 本发明中,“人源化抗体”这一术语是指:可变区的一部分(例如,特别是CDR的全部或一部分)氨基酸序列来自人以外的哺乳动物、其以外的区域来自人的抗体。例如,作为人源化抗体,可列举通过将构成人抗体的免疫球蛋白轻链的3个互补决定区(CDR)和免疫球蛋白重链的3个互补决定区(CDR)用其它哺乳动物的CDR置换而制作的抗体。移植到人抗体的合适位置的CDR所来源的其它哺乳动物的生物种属只要为人以外的哺乳动物就没有特别限定,优选为小鼠、大鼠、兔子、马、或人以外的灵长类,更优选为小鼠和大鼠,例如为小鼠。

[0077] 以下对本发明中抗体为人抗体或人源化抗体的情况进行详述。人抗体和人源化抗体的轻链有 λ 链和 κ 链。构成抗体的轻链可以为 λ 链和 κ 链中的任一者。另外,人抗体和人源化抗体的重链有 γ 链、 μ 链、 α 链、 σ 链和 ϵ 链,分别对应于IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。构成抗体的重链可以为 γ 链、 μ 链、 α 链、 σ 链和 ϵ 链中的任一者,优选为 γ 链。进而,抗体的重链的 γ 链有 $\gamma 1$ 链、 $\gamma 2$ 链、 $\gamma 3$ 链和 $\gamma 4$ 链,分别对应于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。构成抗体的重链为 γ 链时,其 γ 链可以为 $\gamma 1$ 链、 $\gamma 2$ 链、 $\gamma 3$ 链和 $\gamma 4$ 链中的任一者,优选为 $\gamma 1$ 链或 $\gamma 4$ 链。抗体为人源化抗体或人抗体且为IgG时,该抗体的轻链可以为 λ 链和 κ 链中的任一者,该抗体的重链可以为 $\gamma 1$ 链、 $\gamma 2$ 链、 $\gamma 3$ 链和 $\gamma 4$ 链中的任一者,优选为 $\gamma 1$ 链或 $\gamma 4$ 链。例如,作为优选抗体的一个方式,可列举轻链为 κ 链且重链为 $\gamma 1$ 链的抗体、轻链为 λ 链且重链为 $\gamma 1$ 链的抗体。

[0078] 本发明中,“嵌合抗体”这一术语是指:来自2个以上不同种属的、2个以上不同抗体的片段连接而成的抗体。

[0079] 人抗体与其它哺乳动物的抗体的嵌合抗体是指:人抗体的一部分被人以外的哺乳动物的抗体的一部分置换的抗体。抗体由以下说明的Fc区、Fab区和铰链区构成。作为这样的嵌合抗体的具体例,可列举Fc区来自人抗体、而Fab区来自其它哺乳动物的抗体的嵌合抗体。铰链区来自人抗体或其它哺乳动物的抗体中的任一者。相反地,可列举Fc区来自其它哺

乳动物、而Fab区来自人抗体的嵌合抗体。铰链区可以来自人抗体或其它哺乳动物的抗体中的任一者。关于人源化抗体,可以说也同样。

[0080] 另外,抗体也可以说是由可变区和恒定区构成。作为嵌合抗体的其它具体例,还可列举:重链的恒定区(C_H)和轻链的恒定区(C_L)来自人抗体、而重链的可变区(V_H)和轻链的可变区(V_L)来自其它哺乳动物的抗体的抗体;相反地,重链的恒定区(C_H)和轻链的恒定区(C_L)来自其它哺乳动物的抗体、而重链的可变区(V_H)和轻链的可变区(V_L)来自人抗体的抗体。在此,其它哺乳动物的生物种属只要是人以外的哺乳动物则没有特别限定,优选为小鼠、大鼠、兔子、马、或人以外的灵长类,更优选为小鼠。关于人源化抗体,可以说也同样。

[0081] 人抗体与小鼠抗体的嵌合抗体特别称为“人/小鼠嵌合抗体”。作为人/小鼠嵌合抗体,可列举:Fc区来自人抗体、而Fab区来自小鼠抗体的嵌合抗体;相反地,Fc区来自小鼠抗体、而Fab区来自人抗体的嵌合抗体。铰链区来自人抗体或小鼠抗体中的任一者。作为人/小鼠嵌合抗体的其它具体例,也可列举:重链的恒定区(C_H)和轻链的恒定区(C_L)来自人抗体、而重链的可变区(V_H)和轻链的可变区(V_L)来自小鼠抗体的抗体;相反地,重链的恒定区(C_H)和轻链的恒定区(C_L)来自小鼠抗体、而重链的可变区(V_H)和轻链的可变区(V_L)来自人抗体的抗体。关于人源化抗体,可以说也同样。

[0082] 抗体本来具有由2条免疫球蛋白轻链和2条免疫球蛋白重链总计4条多肽链构成的基本结构。但是,本发明中称为“抗体”时,除了具有该基本结构的抗体以外,还包括:

[0083] (1)由1条免疫球蛋白轻链和1条免疫球蛋白重链总计2条多肽链构成的抗体;以及,以下所详述那样的,

[0084] (2)在免疫球蛋白轻链的C末端侧结合接头、并且进一步在其C末端侧结合免疫球蛋白重链而成的单链抗体、

[0085] (3)在免疫球蛋白重链的C末端侧结合接头、并且进一步在其C末端侧结合免疫球蛋白轻链而成的单链抗体、

[0086] (4)在免疫球蛋白重链的可变区的C末端侧结合接头、并且进一步在其C末端侧结合免疫球蛋白轻链的可变区而成的单链抗体(scFv)、和

[0087] (5)在免疫球蛋白轻链的可变区的C末端侧结合接头、并且进一步在其C末端侧结合免疫球蛋白重链的可变区而成的单链抗体(scFv)。

[0088] 另外,(6)从本来意义的抗体的基本结构中缺失了Fc区的、由Fab区构成的物质和由Fab区和铰链区的全部或一部分构成的物质(包括Fab、 $F(ab')$ 和 $F(ab')_2$)、和

[0089] (7)单域抗体也包括在本发明的“抗体”中。进而,使轻链的可变区和重链的可变区借助接头结合而形成了单链抗体的scFv也包括在本发明的抗体中。

[0090] 需要说明的是,本发明中称为“接头”时,例如是指由两个以上氨基酸通过肽键结合而成的肽链构成的接头。所述由肽链构成的接头也可以称为“肽接头”。“接头”在本说明书的上下文中也可以改称为“接头序列”。该接头的N末端与其它蛋白质的C末端通过肽键而结合,在该接头的C末端进一步结合其它蛋白质的N末端,由此2个蛋白质借助接头而形成结合体。

[0091] 具有由2条轻链和2条重链总计4条多肽链构成的基本结构的抗体具有位于轻链的可变区(V_L)的3个互补决定区(CDR)和位于重链的可变区(V_H)的3个互补决定区(CDR)。轻链的3个CDR从位于N末端侧者起依次称为CDR1、CDR2和CDR3。重链的3个CDR也从位于N末端侧

者起依次称为CDR1、CDR2和CDR3。但是,即使这些CDR的一部分或全部不完整、或不存在,只要具有与特定抗原特异性结合的性质则也包含在抗体中。轻链和重链的可变区(V_L 和 V_H)的CDR以外的区域称为框架区(FR)。FR从位于N末端侧者起依次称为FR1、FR2、FR3和FR4。通常,CDR和FR从N末端侧起依次按照FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4的顺序存在。关于仅由重链构成的重链抗体,可以说也同样。

[0092] 本发明的一个实施方式中,Fab是指:含有可变区和 C_L 区(轻链的恒定区)的1条轻链与含有可变区和 C_{H1} 区(重链的恒定区的部分1)的1条重链以各自中存在的半胱氨酸残基彼此通过二硫键结合而成的分子。Fab中,重链除了含有可变区和 C_{H1} 区(重链的恒定区的部分1)以外,可以还含有铰链区的一部分,但此时的铰链区缺少存在于铰链区且使抗体的重链彼此结合的半胱氨酸残基。Fab中,轻链和重链通过在存在于轻链的恒定区(C_L 区)的半胱氨酸残基与存在于重链的恒定区(C_{H1} 区)或铰链区的半胱氨酸残基之间形成的二硫键而结合。将形成Fab的重链称为Fab重链。Fab中缺少存在于铰链区且使抗体的重链彼此结合的半胱氨酸残基,因此由1条轻链和1条重链构成。构成Fab的轻链含有可变区和 C_L 区。构成Fab的重链可以由可变区和 C_{H1} 区构成,也可以除了可变区、 C_{H1} 区以外还含有铰链区的一部分。但是,此时为了避免以铰链区在2条重链间形成二硫键,以不含使重链之间结合的半胱氨酸残基的方式来选择铰链区。 $F(ab')$ 中,其重链除了含有可变区和 C_{H1} 区以外,还包含含有使重链彼此结合的半胱氨酸残基的铰链区的全部或一部分。 $F(ab')_2$ 是指:2个 $F(ab')$ 以彼此的铰链区中存在的半胱氨酸残基彼此通过二硫键结合而成的分子。将形成 $F(ab')$ 或 $F(ab')_2$ 的重链称为Fab'重链。另外,两种以上的抗体直接或借助接头结合而成的二聚体、三聚体等聚合物也为抗体。进而,不限于这些,含有免疫球蛋白分子的一部分且具有与抗原特异性结合的性质抗体均包括在本发明所述的“抗体”中。即,本发明中称为免疫球蛋白轻链时,包括来自免疫球蛋白轻链、具有其可变区的全部或部分氨基酸序列的序列。另外,称为免疫球蛋白重链时,包括来自免疫球蛋白重链、具有其可变区的全部或部分氨基酸序列的序列。因此,只要具有可变区的全部或部分氨基酸序列,则例如缺失了Fc区的序列也为免疫球蛋白重链。

[0093] 另外,在此,Fc或Fc区是指:含有由抗体分子中的 C_{H2} 区(重链的恒定区的部分2)和CH3区(重链的恒定区的部分3)构成的片段的区域。

[0094] 进而,本发明的一个实施方式的抗体还包括:

[0095] (8)借助接头序列使构成上述(6)所示的Fab、 $F(ab')$ 或 $F(ab')_2$ 的轻链和重链结合而分别形成了单链抗体的scFab、sc $F(ab')$ 和sc $F(ab')_2$ 。在此,scFab、sc $F(ab')$ 和sc $F(ab')_2$ 可以为在轻链的C末端侧结合接头序列、并且进一步在其C末端侧结合重链而成的序列,另外可以为在重链的C末端侧结合接头、并且进一步在其C末端侧结合轻链而成的序列。进而,将轻链的可变区和重链的可变区借助接头结合而形成了单链抗体的scFv也包括在本发明中的抗体中。scFv可以为在轻链的可变区的C末端侧结合接头序列、并且进一步在其C末端侧结合重链的可变区而成的序列,另外可以为在重链的可变区的C末端侧结合接头序列、并且进一步在其C末端侧结合轻链的可变区而成的序列。

[0096] 进而,本说明书中所述的“抗体”是除了全长抗体、上述(1)~(8)所示的抗体以外,还包括作为比包含(1)~(8)更广的概念的、全长抗体的一部分发生缺损而成的抗原结合性片段(抗体片段)中的任一形态。抗原结合性片段还包括重链抗体、轻链抗体、VHH、VNAR和这

些中的一部分缺损而形成的物质。

[0097] “抗原结合性片段”这一术语是指：与抗原的特异性结合活性的至少一部分得以保持的、抗体的片段。作为结合性片段的例子，例如，除了上述(4)和(5)所示的例子以外，还包括Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、可变区(Fv)、将重链的可变区(V_H)和轻链的可变区(V_L)以合适的接头连接而成的单链抗体(scFv)、作为含有重链的可变区(V_H)和轻链的可变区(V_L)的多肽的二聚体的双特异性抗体、scFv的重链(H链)上结合有恒定区的一部分(C_H3)的作为二聚体的迷你抗体、其它的低分子化抗体等。但是，只要具有与抗原的结合能力，则不限于这些分子。另外，这些结合性片段还包括将抗体用适当的酶处理而得到的结合性片段、使用经基因工程学改造而得到的抗体基因在适当的宿主细胞中产生的蛋白质。

[0098] 本发明的一个实施方式中称为“单链抗体”时是指：在含有免疫球蛋白轻链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列的C末端侧结合接头、进一步在其C末端侧结合含有免疫球蛋白重链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列而成、能够与特定抗原特异性结合的蛋白质。另外，在含有免疫球蛋白重链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列的C末端侧结合接头、进一步在其C末端侧结合含有免疫球蛋白轻链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列而成、能够与特定抗原特异性结合的蛋白质也为本发明中的“单链抗体”。例如，上述(2)和(3)所示的抗体包括在单链抗体中。在免疫球蛋白重链的C末端侧借助接头结合免疫球蛋白轻链而成的单链抗体中，通常免疫球蛋白重链缺失了Fc区。免疫球蛋白轻链的可变区具有3个与抗体的抗原特异性有关的互补决定区(CDR)。同样，免疫球蛋白重链的可变区也具有3个CDR。这些CDR是决定抗体的抗原特异性的主要区域。因此，单链抗体优选含有免疫球蛋白重链的全部3个CDR和免疫球蛋白轻链的全部3个CDR。但是，只要抗体的抗原特异性的亲和性得到维持，则也可以为1个或2个以上CDR缺失的单链抗体。

[0099] 单链抗体中，配置在免疫球蛋白的轻链与重链之间的接头为优选由2~50个、更优选8~50个、进一步优选10~30个、进而更优选30~30个或30~30个、例如30个或30个氨基酸残基构成的肽链。这样的接头只要利用其连接两条链而成的抗hTfR抗体保持对hTfR的亲合性，则其氨基酸序列没有限定，优选仅由甘氨酸构成或由甘氨酸和丝氨酸构成，例如，具有氨基酸序列Gly-Ser、氨基酸序列Gly-Gly-Ser、氨基酸序列Gly-Gly-Gly、序列号1所示的氨基酸序列、序列号2所示的氨基酸序列、序列号3所示的氨基酸序列、序列号4所示的氨基酸序列或这些氨基酸序列重复2~10次或2~5次而成的序列。例如，在由免疫球蛋白重链的可变区的整个区域构成的氨基酸序列的C末端侧借助接头结合免疫球蛋白轻链的可变区而形成ScFv时，优选使用具有序列号4所示的氨基酸序列的接头。

[0100] 本发明的一个实施方式中的抗体为骆驼科动物(包括羊驼)来源的抗体。骆驼科动物的抗体具有由以二硫键连接的2条重链构成的抗体。将该由2条重链构成的抗体称为重链抗体。VHH为含有构成重链抗体的重链的可变区的由1条重链构成的抗体、或者构成重链抗体的恒定区(CH)缺失的由1条重链构成的抗体。VHH也为本发明的实施方式的抗体之一。为了降低将骆驼科动物来源的抗体(包括VHH)给药于人时的抗原性而在骆驼科动物的抗体的氨基酸序列中加入了突变的抗体也为本发明的一个实施方式的抗体。向骆驼科动物的抗体的氨基酸中加入突变时，可以加入与能够加入到本说明书中记载的抗体中的突变同样的突变。此外，由通过二硫键连接的2条轻链构成的抗体也为本发明的实施方式的抗体之一。将该由2条轻链构成的抗体称为轻链抗体。

[0101] 本发明的一个实施方式的抗体为鲨鱼来源的抗体。鲨鱼的抗体由以二硫键连接的2条重链构成。将该由2条重链构成的抗体称为重链抗体。VNAR为含有构成重链抗体的重链的可变区的由1条重链构成的抗体、或构成重链抗体的恒定区(CH)缺失的由1条重链构成的抗体。VNAR也为本发明的实施方式的抗体之一。为了降低将鲨鱼来源的抗体(包括VNAR)给药于人时的抗原性而在鲨鱼的抗体的氨基酸序列中加入了突变的抗体也为本发明的一个实施方式的抗体。向鲨鱼抗体的氨基酸中加入突变时,可以加入与能够加入到本说明书中记载的抗体中的突变同样的突变。使鲨鱼的抗体人源化而形成的抗体也为本发明的实施方式的抗体之一。

[0102] 本发明的一个实施方式中,单域抗体是指以单个可变区就具有与抗原特异性结合的性质的抗体。单域抗体包括可变区仅由重链的可变区构成的抗体(重链单域抗体)、可变区仅由轻链的可变区构成的抗体(轻链单域抗体)。VHH、VNAR为单域抗体的一种。

[0103] 本发明中,作为抗体特异性识别的抗原,例如为存在于血管内皮细胞的表面的分子(表面抗原)。作为所述表面抗原,可列举转铁蛋白受体(TfR)、胰岛素受体、瘦素受体、脂蛋白受体、IGF受体、OATP-F等有机阴离子转运体、单羧酸转运体、Fc受体,但是不限于这些。单羧酸转运体(MCT)可以为14种亚型(MCT1~MCT14)中的任一亚型,特别优选MCT1、MCT2、MCT4或MCT8,例如为MCT8。抗原优选为存在于人血管内皮细胞的表面的这些分子(表面抗原)。

[0104] 在上述表面抗原中,转铁蛋白受体(TfR)、胰岛素受体、瘦素受体、脂蛋白受体、IGF受体、OATP-F等有机阴离子转运体、MCT-8等单羧酸转运体存在于形成血脑屏障(Blood Brain Barrier)的脑毛细血管内皮细胞(脑血管内皮细胞)的表面。能够识别这些抗原的抗体可以借助抗原与脑毛细血管内皮细胞结合。另外,结合于脑毛细血管内皮细胞的抗体可以通过血脑屏障并到达中枢神经系统。因此,通过使目标蛋白与这样的抗体结合,可以到达至中枢神经系统。作为目标蛋白,可列举具有要在中枢神经系统中发挥药效的功能的蛋白质。例如,作为目标蛋白,可列举在伴有中枢神经障碍的溶酶体病患者中缺损或功能不全的溶酶体酶。所述溶酶体酶以原状无法到达中枢神经系统,对患者的中枢神经障碍不显示药效,但通过使其与这些抗体结合而能够通过血脑屏障,因此能够改善在溶酶体病患者中可见的中枢神经障碍。

[0105] 本发明中,“人转铁蛋白受体”或“hTfR”这一术语是指具有序列号5所示的氨基酸序列的膜蛋白。本发明的抗hTfR抗体在其一个实施方式中为对序列号5所示的氨基酸序列中N末端侧起第89位的半胱氨酸残基至C末端的苯丙氨酸为止的部分(hTfR的细胞外区域)特异性结合的抗体,但是不限于此。

[0106] 以下以针对hTfR的抗体为例来说明抗体的制作方法。作为针对hTfR的抗体的制作方法,通常为下述方法:使用导入了整合有hTfR基因的表达载体的细胞制作重组人转铁蛋白受体(rhTfR),使用该rhTfR免疫小鼠等动物而得到。从免疫后的动物取出产生针对hTfR的抗体的细胞,使其与骨髓瘤细胞融合,可以制作具有产生针对hTfR的抗体的能力的杂交瘤细胞。

[0107] 另外,通过利用体外免疫法用rhTfR来免疫由小鼠等动物得到的免疫系统细胞,也可以获得产生针对hTfR的抗体的细胞。在利用体外免疫法进行免疫的情况下,该免疫系统细胞所来源的动物种属没有特别限定,优选为小鼠、大鼠、兔子、豚鼠、狗、猫、马和包括人在

内的灵长类,更优选为小鼠、大鼠和人,进一步优选为小鼠和人。作为小鼠的免疫系统细胞,可以使用例如由小鼠的脾脏制备的脾细胞。作为人的免疫系统细胞,可以使用由人的外周血、骨髓、脾脏等制备的细胞。在利用体外免疫法对人的免疫系统细胞进行免疫的情况下,可以得到针对hTfR的人抗体。

[0108] 本发明中,要与抗体结合的人溶酶体酶没有特别限定,可列举 α -L-艾杜糖醛酸酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、葡糖脑苷脂酶、 β -半乳糖苷酶、GM2激活蛋白、 β -氨基己糖苷酶A、 β -氨基己糖苷酶B-N-乙酰葡糖胺-1-磷酸转移酶、 α -甘露糖苷酶、 β -甘露糖苷酶、半乳糖神经酰胺酶、鞘脂激活蛋白C、芳基硫酸酯酶A、 α -L-岩藻糖苷酶、天冬氨酰氨基葡萄糖苷酶、 α -N-乙酰氨基半乳糖苷酶、酸性鞘磷脂酶、 α -半乳糖苷酶A、 β -葡糖醛酸糖苷酶、乙酰肝素N-硫酸酯酶、 α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、乙酰CoA α -氨基葡萄糖苷N-乙酰基转移酶-N-乙酰葡糖胺-6-硫酸酯酶、酸性神经酰胺酶、淀粉-1-6-葡糖苷酶、唾液酸酶、天冬氨酰氨基葡萄糖苷酶、棕榈酰蛋白硫酯酶-1 (PPT-1)、三肽基肽酶-1 (TPP-1)、透明质酸酶-1、CLN1、CLN2、CLN3、CLN6、和CLN8等溶酶体酶。

[0109] 在抗体为特异性识别存在于血管内皮细胞的表面的分子(表面抗原)的抗体的情况下,与抗体结合的人溶酶体酶为 α -L-艾杜糖醛酸酶则可以作为胡尔勒综合征、胡尔勒-沙伊综合征和沙伊综合征的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶则可以作为亨特氏综合征的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为葡糖脑苷脂酶则可以作为戈谢病的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为 β -半乳糖苷酶则可以作为GM1-神经节苷脂贮积症1~3型的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为GM2激活蛋白则可以作为GM2-神经节苷脂贮积症AB变异型的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为 β -氨基己糖苷酶A则可以作为桑德霍夫病和泰萨二氏病的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为 β -氨基己糖苷酶B则可以作为桑德霍夫病的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为N-乙酰葡糖胺-1-磷酸转移酶则可以作为I-细胞病的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为 α -甘露糖苷酶则可以作为 α -甘露糖苷贮积症的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为 β -甘露糖苷酶则可以作为 β -甘露糖苷贮积症的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为半乳糖神经酰胺酶则可以作为克拉伯病的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为鞘脂激活蛋白C则可以作为戈谢病样贮积症的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为芳基硫酸酯酶A则可以作为异染性脑白质变性症(异染性脑白质营养不良)的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为 α -L-岩藻糖苷酶则可以作为岩藻糖苷贮积症的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为天冬氨酰氨基葡萄糖苷酶则可以作为天冬氨酰葡糖胺尿症的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为 α -N-乙酰氨基半乳糖苷酶则可以作为辛德勒病和川崎病的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为酸性鞘磷脂酶则可以作为尼曼-皮克病的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为 α -半乳糖苷酶A则可以作为法布里病的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为 β -葡糖醛酸糖苷酶则可以作为斯莱综合征的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为乙酰肝素N-硫酸酯酶、 α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、乙酰CoA α -氨基葡萄糖苷N-乙酰基转移酶和N-乙酰葡糖胺-6-硫酸硫酸酯酶则可以作为圣菲利波综合征的中枢神经障碍治疗

剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为酸性神经酰胺酶则可以作为法伯病的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为淀粉-1,6-葡萄糖苷酶则可以作为柯里氏病(Forbes-Cori病)的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为唾液酸酶则可以作为唾液酸酶缺损症的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为天冬氨酰氨基葡萄糖苷酶则可以作为天冬氨酰葡萄糖胺尿症的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为棕榈酰蛋白硫酯酶-1(PPT-1)则可以作为神经元蜡样脂褐质沉积症或Santavuori-Haltia病的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为三肽基肽酶-1(TPP-1)则可以作为神经元蜡样脂褐质沉积症或Jansky-Bielschowsky病的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为透明质酸酶-1则可以作为透明质酸酶缺损症的中枢神经障碍治疗剂使用,与抗体结合的人溶酶体酶为CLN1、CLN2、CLN3、CLN6和CLN8则可以作为巴藤病的中枢神经障碍治疗剂使用。

[0110] 在抗体为特异性识别存在于血管内皮细胞的表面的分子(表面抗原)的抗体的情况下,就作为要与抗体结合的溶酶体酶的优选例,可列举人 α -L-艾杜糖醛酸酶(hIDUA)。hIDUA为具有水解存在于硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素之类的糖胺聚糖(GAG)分子内的艾杜糖醛酸键的活性的溶酶体酶之一。粘多糖症I型为由编码该酶的基因的突变导致的基因疾病。粘多糖症I型可分为胡尔勒综合征、胡尔勒-沙伊综合征和沙伊综合征,胡尔勒综合征为重症型,胡尔勒-沙伊综合征为中等型,沙伊综合征为轻症型。这些患者中,硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素在组织内蓄积,结果显示角膜浑浊、精神发育滞后等各种症状。但是,轻症型的情况下,也有时观察不到精神发育滞后。该抗体与hIDUA的融合蛋白能够通过BBB并分解蓄积在脑组织内的GAG,因此能够通过给药于显示精神发育滞后的胡尔勒综合征患者而作为中枢神经障碍治疗剂使用。

[0111] 本发明中,术语“人 α -L-艾杜糖醛酸酶”或“hIDUA”尤其是指与野生型的hIDUA具有相同氨基酸序列的hIDUA。野生型的hIDUA具有由序列号6所示的628个氨基酸构成的氨基酸序列。具有由序列号7所示的626个氨基酸构成的氨基酸序列的hIDUA的变体也为hIDUA。但是不限于这些,只要具有IDUA活性,则在野生型的hIDUA的氨基酸序列中加入了置换、缺失、添加等突变的序列也包括在hIDUA中。在将hIDUA的氨基酸序列中的氨基酸置换为其它氨基酸时,所置换的氨基酸的个数优选为1~10个,更优选为1~5个,进一步优选为1~3个,进而更优选为1~2个。使hIDUA的氨基酸序列中的氨基酸缺失时,缺失的氨基酸的个数优选为1~10个,更优选为1~5个,进一步优选为1~3个,进而更优选为1~2个。另外,也可以加入组合有这些氨基酸的置换和缺失的突变。向hIDUA中添加氨基酸时,在hIDUA的氨基酸序列中或者N末端侧或C末端侧添加优选1~10个、更优选1~5个、进一步优选1~3个、进而更优选1~2个氨基酸。也可以加入组合有这些氨基酸的添加、置换和缺失的突变。加入了突变的hIDUA的氨基酸序列与原hIDUA的氨基酸序列优选显示80%以上的一致性,更优选显示85%以上的一致性,进一步优选显示90%以上的一致性,进而更优选显示95%以上的一致性,进而更优选显示99%以上的一致性。

[0112] 需要说明的是,本发明中,原蛋白质(包括抗体)的氨基酸序列与加入了突变的蛋白质的氨基酸序列的一致性可以使用周知的一致性计算算法容易地进行计算。例如,作为这样的算法,有BLAST(Altschul SF.J Mol.Biol.215.403-10、(1990))、Pearson和Lipman的类似性检索法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA.85.2444(1988))、Smith和Waterman的局部一

致性算法(Adv. Appl. Math. 2.482-9(1981))等。

[0113] 另外, 原蛋白质(包括抗体)的氨基酸序列中的氨基酸向其它氨基酸的置换例如在氨基酸的那些侧链和化学性质上有关联性的氨基酸家族内发生。作为所述氨基酸家族, 可列举以下的氨基酸家族:

[0114] (1) 作为酸性氨基酸的天冬氨酸和谷氨酸;

[0115] (2) 作为碱性氨基酸的组氨酸、赖氨酸和精氨酸;

[0116] (3) 作为芳香族胺酸的苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸;

[0117] (4) 作为羟基氨基酸的丝氨酸和苏氨酸;

[0118] (5) 作为疏水性氨基酸的甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;

[0119] (6) 作为中性的亲水性氨基酸的半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺;

[0120] (7) 作为影响肽链的取向的氨基酸的甘氨酸和脯氨酸;

[0121] (8) 作为酰胺型氨基酸的天冬酰胺和谷氨酰胺;

[0122] (9) 作为侧链小的氨基酸的丙氨酸和甘氨酸。

[0123] 本发明中, hIDUA具有IDUA活性时是指: 在将hIDUA与抗体融合而形成融合蛋白时, 相对于天然型的hIDUA本来具有的活性具有3%以上的活性。其中, 该活性相对于天然型的hIDUA本来具有的活性优选为10%以上, 更优选为20%以上, 进一步优选为50%以上, 进一步更优选为80%以上。与抗体融合的hIDUA为加入了突变的hIDUA时也相同。抗体例如为抗hTfR抗体。

[0124] 本发明中称为“融合蛋白”时, 是指使抗体和人溶酶体酶借助非肽接头或肽接头结合或者直接结合而形成的物质。使抗体与人溶酶体酶结合的方法将在以下详细说明。

[0125] 作为使抗体与人溶酶体酶结合的方法, 有借助非肽接头或肽接头结合的方法。作为非肽接头, 可以使用聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇与丙二醇的共聚物、聚氧乙基化多元醇、聚乙烯醇、多糖类、葡聚糖、聚乙烯基醚、生物降解性高分子、脂质聚合物、几丁质类和透明质酸、或者这些的衍生物、或者将这些组合而成的物质。肽接头为由形成了肽键的1~50个氨基酸构成的肽链或其衍生物, 通过其N末端和C末端分别与抗体或人溶酶体酶中的任一者形成共价键而使抗体与人溶酶体酶结合。

[0126] 使用生物素-链霉亲和素作为非肽接头时, 可以是抗体结合有生物素、人溶酶体酶结合有链霉亲和素、且借助该生物素与链霉亲和素的结合而使抗体与人溶酶体酶结合, 也可以是相反地抗体结合有链霉亲和素、人溶酶体酶结合有生物素、且借助该生物素与链霉亲和素的结合而使抗体与人溶酶体酶结合。

[0127] 使用PEG作为非肽接头使本发明的抗体与人溶酶体酶结合而成的物质被特别称为抗体-PEG-人溶酶体酶。抗体-PEG-人溶酶体酶可以通过使抗体与PEG结合而制作抗体-PEG、接着使抗体-PEG与人溶酶体酶结合而制造。或者, 抗体-PEG-人溶酶体酶也可以通过使人溶酶体酶与PEG结合而制作人溶酶体酶-PEG、接着使人溶酶体酶-PEG与抗体结合而制造。使PEG与抗体和人溶酶体酶结合时, 可使用被碳酸酯、羰基咪唑、羧酸的活性酯、吡内酯、环状亚胺硫酮、异氰酸酯、异硫氰酸酯、亚氨酸酯或醛等官能团修饰的PEG。这些PEG中所导入的官能团主要与抗体和人溶酶体酶分子内的氨基反应, 从而PEG与抗体和人溶酶体酶共价键合。此时使用的PEG的分子量和形状没有特别限定, 其平均分子量(MW) 优选为MW=300~60000, 更优选为MW=500~20000。例如, 平均分子量为约300、约500、约1000、约2000、约

4000、约10000、约20000等的PEG可以优选作为非肽接头使用。

[0128] 例如,抗体-PEG可以如下得到:将抗体和具有醛基作为官能团的聚乙二醇(ALD-PEG-ALD)以ALD-PEG-ALD相对于该抗体的摩尔比为1:11、1:12.5、1:15、1:110、1:120等的方式混合,向其中添加 NaCNBH_3 等还原剂而进行反应,从而得到。接着,使抗体-PEG在 NaCNBH_3 等还原剂存在下与人溶酶体酶反应,由此得到抗体-PEG-人溶酶体酶。也可以相反地先使人溶酶体酶与ALD-PEG-ALD结合而制作人溶酶体酶-PEG,接着使人溶酶体酶-PEG与抗体结合,由此得到抗体-PEG-人溶酶体酶。

[0129] 抗体和人溶酶体酶也可以通过在抗体的重链或轻链的C末端侧或N末端侧借助接头或直接通过肽键分别结合人溶酶体酶的N末端或C末端。如此使抗体与人溶酶体酶结合而成的融合蛋白可以如下得到:将在编码抗体的重链或轻链的cDNA的3'末端侧或5'末端侧直接或夹着编码接头的DNA片段地以框内方式配置有编码人溶酶体酶的cDNA的DNA片段整合于哺乳动物细胞、酵母等真核生物用的表达载体,培养导入了该表达载体的哺乳动物细胞,由此而得到。在该哺乳动物细胞中编码人溶酶体酶的DNA片段与重链结合的情况下,将整合有编码抗体的轻链的cDNA片段的哺乳动物细胞用的表达载体也导入到同一宿主细胞中,另外,在编码人溶酶体酶的DNA片段与轻链结合的情况下,将整合有编码抗体的重链的cDNA片段的哺乳动物细胞用的表达载体也导入到同一宿主细胞中。在抗体为单链抗体的情况下,使抗体与人溶酶体酶结合而成的融合蛋白可以如下得到:将在编码人溶酶体酶的cDNA的5'末端侧或3'末端侧直接或夹着编码接头的DNA片段地连接有编码单链抗体的cDNA的DNA片段整合于哺乳动物细胞、酵母等真核生物用的表达载体,使其在导入了该表达载体的这些细胞中表达,由此而得到。

[0130] 在抗体的轻链的C末端侧结合有人溶酶体酶的类型融合蛋白中,抗体包含含有轻链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列和含有重链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列,人溶酶体酶结合在该抗体的轻链的C末端侧。在此,抗体的轻链与人溶酶体酶可以直接结合,也可以借助接头而结合。

[0131] 在抗体的重链的C末端侧结合有人溶酶体酶的类型融合蛋白中,抗体包含含有轻链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列和含有重链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列,人溶酶体酶结合在该抗体的重链的C末端侧。在此,抗体的重链与人溶酶体酶可以直接结合,也可以借助接头而结合。

[0132] 在抗体的轻链的N末端侧结合有人溶酶体酶的类型融合蛋白中,抗体包含含有轻链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列和含有重链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列,人溶酶体酶结合在该抗体的轻链的N末端侧。在此,抗体的轻链与人溶酶体酶可以直接结合,也可以借助接头而结合。

[0133] 在抗体的重链的N末端侧结合有人溶酶体酶的类型融合蛋白中,抗体包含含有轻链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列和含有重链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列,人溶酶体酶结合在该抗体的重链的N末端侧。在此,抗体的重链与人溶酶体酶可以直接结合,也可以借助接头而结合。

[0134] 此时在抗体与人溶酶体酶之间配置接头的情况下,其序列由优选1~50个、更优选1~17个、进一步优选1~10个、进而更优选1~5个氨基酸构成,但根据要与抗体结合的人溶酶体酶,构成接头的氨基酸的个数可以适宜地调整为1个、2个、3个、1~17个、1~10个、10~

40个、20~34个、23~31个、25~29个等。这样的接头只要利用其连接而成的抗体保持与hTfR的亲性和、且利用该接头连接的人溶酶体酶在生理条件下可以发挥该蛋白质的生理活性,则其氨基酸序列没有限定,优选由甘氨酸和丝氨酸构成,例如,具有由甘氨酸或丝氨酸中的任意1个氨基酸构成的序列、氨基酸序列Gly-Ser、氨基酸序列Gly-Gly-Ser、序列号1所示的氨基酸序列、序列号2所示的氨基酸序列、序列号3所示的氨基酸序列、序列号4所示的氨基酸序列、或者由1~10个或2~5个这些氨基酸序列连接而成的1~50个氨基酸构成的序列、由2~17个、2~10个、10~40个、20~34个、23~31个、25~29个氨基酸构成的序列等。例如,可以优选使用由氨基酸序列Gly-Ser构成的序列、具有序列号4所示的氨基酸序列的序列作为接头。抗体为单链抗体时也同样。

[0135] 需要说明的是,在该融合蛋白中一个肽链中含有两个以上接头时,为了方便而将各接头从N末端侧起依次命名为第一接头、第二接头。

[0136] 作为在抗体为抗人转铁蛋白受体抗体时的、抗体的优选的一个实施方式,可以例示如下抗体:

[0137] 在轻链的可变区中,

[0138] (a) CDR1含有序列号8或9所示的氨基酸序列,

[0139] (b) CDR2含有序列号10或11所示的氨基酸序列,且

[0140] (c) CDR3含有序列号12所示的氨基酸序列;

[0141] 在重链的可变区中,

[0142] (d) CDR1含有序列号13或14所示的氨基酸序列,

[0143] (e) CDR2含有序列号15或16所示的氨基酸序列,且

[0144] (f) CDR3含有序列号17或18所示的氨基酸序列。在此,抗体优选为人抗体或人源化抗体。

[0145] 上述(a)~(f)所示的各CDR的氨基酸序列的组合可以为任意组合,例如,可列举表1所示的组合。

[0146] [表1]

[0147] (表1)轻链和重链的CDR的氨基酸序列的组合作为例1

[0148]

	轻链			重链		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
序列号	8	10	12	13	15	17
	8	10	12	14	16	18
	9	11	12	13	15	17
	9	11	12	14	16	18

[0149] 作为在抗体为抗人转铁蛋白受体抗体时的、抗体的进一步优选的一个实施方式,可以例示:(x)轻链的可变区具有序列号20所示的氨基酸序列、重链的可变区含有序列号21所示的氨基酸序列的抗体。在此,抗体优选为人抗体或人源化抗体。

[0150] 在此,序列号20所示的轻链的可变区的氨基酸序列中,含有序列号8和序列号9所示的氨基酸序列作为CDR1,含有序列号10和序列号11所示的氨基酸序列作为CDR2,含有序

列号12所示的氨基酸序列作为CDR3。另外,序列号21所示的重链的可变区的氨基酸序列中,含有序列号13和序列号14所示的氨基酸序列作为CDR1,含有序列号15和序列号16所示的氨基酸序列作为CDR2,含有序列号17和序列号18所示的氨基酸序列作为CDR3。进而,作为重链框架区3,含有序列号19所示的氨基酸序列。

[0151] 但是,在抗体为人源化抗体且为抗人转铁蛋白受体抗体时的、抗体的优选实施方式不限于上述(x)。例如,轻链的可变区的氨基酸序列与上述(x)中的轻链的可变区的氨基酸序列具有80%以上的一致性、重链的可变区的氨基酸序列与上述(x)中的重链的可变区的氨基酸序列具有80%以上的一致性的抗体只要对hTfR具有亲和性,则也可以用于本发明中。

[0152] 进而,轻链的可变区的氨基酸序列与上述(x)中的轻链的可变区的氨基酸序列具有85%以上的一致性且重链的可变区的氨基酸序列与上述(x)中的重链的可变区的氨基酸序列具有85%以上的一致性的抗体、

[0153] 轻链的可变区的氨基酸序列与上述(x)中的轻链的可变区的氨基酸序列具有90%以上的一致性且重链的可变区的氨基酸序列与上述(x)中的重链的可变区的氨基酸序列具有90%以上的一致性的抗体、和

[0154] 轻链的可变区的氨基酸序列与上述(x)中的轻链的可变区的氨基酸序列具有95%以上的一致性且重链的可变区的氨基酸序列与上述(x)中的重链的可变区的氨基酸序列具有95%以上的一致性的抗体,只要对hTfR具有亲和性则也可以用于本发明中。

[0155] 作为轻链的可变区的氨基酸序列与上述(x)中的轻链的可变区的氨基酸序列具有一致性且重链的可变区的氨基酸序列与上述(x)中的重链的可变区的氨基酸序列具有一致性的抗体,可列举:

[0156] (x-a)轻链的可变区含有与序列号20所示的氨基酸序列具有80%以上的序列一致性的氨基酸序列,并且含有序列号8或9的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号10或11的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号12的氨基酸序列作为CDR3,重链的可变区含有与序列号21所示的氨基酸序列具有80%以上的序列一致性的氨基酸序列,并且含有序列号13或14的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号15或16的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号17或18的氨基酸序列作为CDR3的抗体;

[0157] (x-b)轻链的可变区含有与序列号20所示的氨基酸序列具有85%以上的序列一致性的氨基酸序列,并且含有序列号8或9的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号10或11的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号12的氨基酸序列作为CDR3,重链的可变区含有与序列号21所示的氨基酸序列具有85%以上的序列一致性的氨基酸序列,并且含有序列号13或14的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号15或16的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号17或18的氨基酸序列作为CDR3的抗体;

[0158] (x-c)轻链的可变区含有与序列号20所示的氨基酸序列具有90%以上的序列一致性的氨基酸序列,并且含有序列号8或9的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号10或11的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号12的氨基酸序列作为CDR3,重链的可变区含有与序列号21所示的氨基酸序列具有90%以上的序列一致性的氨基酸序列,并且含有序列号13或14的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号15或16的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号17或18的氨基酸序列作为CDR3的抗体;

[0159] (x-d)轻链的可变区含有与序列号20所示的氨基酸序列具有95%以上的序列一致性的氨基酸序列,并且含有序列号8或9的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号10或11的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号12的氨基酸序列作为CDR3,重链的可变区含有与序列号21所示的氨基酸序列具有95%以上的序列一致性的氨基酸序列,并且含有序列号13或14的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号15或16的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号17或18的氨基酸序列作为CDR3的抗体。

[0160] 进而,作为在抗体且为抗人转铁蛋白受体抗体时的、抗体的优选实施方式,

[0161] 在上述(x)中的轻链的可变区的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1~5个氨基酸发生了置换、缺失或添加,并且在上述(x)中的重链的可变区的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1~5个氨基酸发生了置换、缺失或添加的抗体;

[0162] 在上述(x)中的轻链的可变区的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1~3个氨基酸发生了置换、缺失或添加,并且在上述(x)中的重链的可变区的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1~3个氨基酸发生了置换、缺失或添加的抗体;和

[0163] 在上述(x)中的轻链的可变区的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1或2个氨基酸发生了置换、缺失或添加,并且在上述(x)中的重链的可变区的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1或2个氨基酸发生了置换、缺失或添加的抗体,只要对hTfR具有亲和性则也可以用于本发明中。在此,抗体优选为人抗体或人源化抗体。

[0164] 作为抗体的轻链的可变区的氨基酸序列为在上述(x)中的轻链的可变区的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中的氨基酸发生了置换、缺失或添加的氨基酸序列、并且在上述(x)中的重链的可变区的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中的氨基酸发生了置换、缺失或添加的抗体,可列举:

[0165] (x-e)

[0166] 在轻链的可变区的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1~5个氨基酸发生了置换、缺失或添加,并且含有序列号8或9的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号10或11的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号12的氨基酸序列作为CDR3,在重链的可变区的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1~5个氨基酸发生了置换、缺失或添加,并且含有序列号13或14的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号15或16的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号17或18的氨基酸序列作为CDR3的抗体;

[0167] (x-f)

[0168] 在轻链的可变区的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1~3个氨基酸发生了置换、缺失或添加,并且含有序列号8或9的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号10或11的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号12的氨基酸序列作为CDR3,在重链的可变区的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1~3个氨基酸发生了置换、缺失或添加,并且含有序列号13或14的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号15或16的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号17或18的氨基酸序列作为CDR3的抗体;

[0169] (x-g)

[0170] 在轻链的可变区的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1或2个氨基酸发生了置换、缺失或添加,并且含有序列号8或9的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号10或11的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号12的氨基酸序列作为CDR3,在重链的可变区的氨基酸序列中构

成其的氨基酸序列中1或2个氨基酸发生了置换、缺失或添加,并且含有序列号13或14的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号15或16的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号17或18的氨基酸序列作为CDR3的抗体。

[0171] 在上述(x-a)~(x-g)中,各CDR的氨基酸序列的组合可以为任意组合,例如,可列举表2所示的组合。下述的(y-a)~(y-g)中也同样。

[0172] [表2]

[0173] (表2)轻链和重链的CDR的氨基酸序列的组合作例2

	轻链			重链		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
[0174] 序列号	8	10	12	13	15	17
	8	10	12	14	16	18
	9	11	12	13	15	17
	9	11	12	14	16	18

[0175] 本发明中,作为抗体为人源化抗体且为作为抗人转铁蛋白受体抗体的Fab时的、优选的一个实施方式,可以例示出:

[0176] (y)轻链含有序列号22所示的氨基酸序列、重链含有序列号23所示的氨基酸序列的作为Fab的抗体。在此,轻链含有序列号20所示的氨基酸序列作为可变区,重链含有序列号21所示的氨基酸序列作为可变区。本发明中,将构成Fab的重链称为Fab重链。即,由序列号23所示的氨基酸序列构成的重链为Fab重链。

[0177] 作为抗体为人源化抗体且为抗人转铁蛋白受体抗体时的、抗体的优选的实施方式,不限于上述(y)。例如,轻链的氨基酸序列与上述(y)中的轻链的氨基酸序列具有80%以上的一致性、重链的氨基酸序列与上述(y)中的重链的氨基酸序列具有80%以上的一致性的抗体只要对hTfR具有亲和性,则也可以用于本发明中。

[0178] 进而,轻链的氨基酸序列与上述(y)中的轻链的氨基酸序列具有85%以上的一致性、重链的氨基酸序列与上述(y)中的重链的氨基酸序列具有85%以上的一致性的抗体;

[0179] 轻链的氨基酸序列与上述(y)中的轻链的氨基酸序列具有90%以上的一致性、重链的氨基酸序列与上述(y)中的重链的氨基酸序列具有90%以上的一致性的抗体;和

[0180] 轻链的氨基酸序列与上述(y)中的轻链的氨基酸序列具有95%以上的一致性、重链的氨基酸序列与上述(y)中的重链的氨基酸序列具有95%以上的一致性的抗体只要对hTfR具有亲和性,则也可以用于本发明中。

[0181] 作为轻链的氨基酸序列与上述(y)中的轻链的氨基酸序列具有一致性、重链的氨基酸序列与上述(y)中的重链的氨基酸序列具有一致性的抗体,可列举:

[0182] (y-a)轻链含有与序列号22所示的氨基酸序列具有80%以上的序列一致性的氨基酸序列,并且含有序列号8或9的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号10或11的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号12的氨基酸序列作为CDR3,重链含有与序列号23所示的氨基酸序列具有80%以上的序列一致性的氨基酸序列,并且含有序列号13或14的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号15或16的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号17或18的氨基酸序列作为CDR3的

抗体;

[0183] (y-b)轻链含有与序列号22所示的氨基酸序列具有85%以上的序列一致性的氨基酸序列,并且含有序列号8或9的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号10或11的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号12的氨基酸序列作为CDR3,重链含有与序列号23所示的氨基酸序列具有85%以上的序列一致性的氨基酸序列,并且含有序列号13或14的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号15或16的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号17或18的氨基酸序列作为CDR3的抗体;

[0184] (y-c)轻链含有与序列号22所示的氨基酸序列具有90%以上的序列一致性的氨基酸序列,并且含有序列号8或9的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号10或11的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号12的氨基酸序列作为CDR3,重链含有与序列号23所示的氨基酸序列具有90%以上的序列一致性的氨基酸序列,并且含有序列号13或14的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号15或16的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号17或18的氨基酸序列作为CDR3的抗体;

[0185] (y-d)轻链含有与序列号22所示的氨基酸序列具有95%以上的序列一致性的氨基酸序列,并且含有序列号8或9的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号10或11的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号12的氨基酸序列作为CDR3,重链含有与序列号23所示的氨基酸序列具有95%以上的序列一致性的氨基酸序列,并且含有序列号13或14的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号15或16的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号17或18的氨基酸序列作为CDR3的抗体。

[0186] 进而,作为抗体为人源化抗体且为作为抗人转铁蛋白受体抗体的Fab时的、抗体的优选的实施方式,抗体的氨基酸序列为:

[0187] 在上述(y)中的轻链的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1~5个氨基酸发生了置换、缺失或添加,在上述(y)中的重链的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1~5个氨基酸发生了置换、缺失或添加的氨基酸序列;

[0188] 在上述(y)中的轻链的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1~3个氨基酸发生了置换、缺失或添加,在上述(y)中的重链的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1~3个氨基酸发生了置换、缺失或添加的氨基酸序列;和

[0189] 在上述(y)中的轻链的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1或2个氨基酸发生了置换、缺失或添加,在上述(y)中的重链的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1或2个氨基酸发生了置换、缺失或添加的氨基酸序列的抗体只要对hTfR具有亲和性,则也可以用于本发明中。

[0190] 作为轻链的氨基酸序列为在上述(y)中的轻链的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中的氨基酸发生了置换、缺失或添加的氨基酸序列、上述(y)中的重链的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中的氨基酸发生了置换、缺失或添加的抗体,可列举:

[0191] (y-e)

[0192] 在轻链的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1~5个氨基酸发生了置换、缺失或添加,并且含有序列号8或9的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号10或11的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号12的氨基酸序列作为CDR3,在重链的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1~5个氨基酸发生了置换、缺失或添加,并且含有序列号13或14的氨基酸序列作为CDR1、

含有序列号15或16的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号17或18的氨基酸序列作为CDR3的抗体；

[0193] (y-f)

[0194] 在轻链的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1~3个氨基酸发生了置换、缺失或添加,并且含有序列号8或9的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号10或11的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号12的氨基酸序列作为CDR3,在重链的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1~3个氨基酸发生了置换、缺失或添加,并且含有序列号13或14的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号15或16的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号17或18的氨基酸序列作为CDR3的抗体；

[0195] (y-g)

[0196] 在轻链的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1或2个氨基酸发生了置换、缺失或添加,并且含有序列号8或9的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号10或11的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号12的氨基酸序列作为CDR3,在重链的氨基酸序列中构成其的氨基酸序列中1或2个氨基酸发生了置换、缺失或添加,并且含有序列号13或14的氨基酸序列作为CDR1、含有序列号15或16的氨基酸序列作为CDR2且含有序列号17或18的氨基酸序列作为CDR3的抗体。

[0197] 作为抗体为人源化抗人转铁蛋白受体抗体、人溶酶体酶为人 α -L-艾杜糖醛酸酶(hIDUA)时的融合蛋白的优选方式,可列举以下融合蛋白。即,由具有序列号22所示的氨基酸序列的人源化抗hTfR抗体的轻链、以及在具有序列号23所示的氨基酸序列的人源化抗hTfR抗体的Fab重链的C末端侧借助序列号4所示的接头结合有序列号6所示的人 α -L-艾杜糖醛酸酶而形成的氨基酸序列构成的融合蛋白。

[0198] 另外,作为抗体为人源化抗人转铁蛋白受体抗体、人溶酶体酶为人 α -L-艾杜糖醛酸酶(hIDUA)时的融合蛋白的优选方式,可列举以下的融合蛋白。即,如下融合蛋白:该人源化抗hTfR抗体的轻链具有序列号22所示的氨基酸序列,该人源化抗hTfR抗体的Fab重链在其C末端侧借助具有序列号4所示的氨基酸序列的接头与序列号6所示的人 α -L-艾杜糖醛酸酶结合,整体上具有序列号27所示的氨基酸序列。

[0199] 本发明中,具有生理活性的蛋白质例如可以通过培养下述哺乳动物细胞而产生,所述哺乳动物细胞为以通过使编码该蛋白质的基因表达或强表达而产生该蛋白质的方式施加了人工操作的哺乳动物细胞。此时在产生蛋白质的哺乳动物细胞内强表达的该基因通常是通过用整合有该基因的表达载体进行转化而导入到该哺乳动物细胞中的。另外,对于此时使用的哺乳动物细胞没有特别限定,优选来自人、小鼠、中华仓鼠的细胞,特别优选来自中华仓鼠卵巢细胞的CHO细胞。本发明中,称为蛋白质时,尤其是指培养这样的产生蛋白质的哺乳动物细胞时分泌到培养基中的蛋白质。

[0200] 本发明的一个实施方式中的水性药物组合物含有作为有效成分的具有生理活性的蛋白质和两种或两种以上非离子型表面活性剂。该水性药物组合物可以还含有中性盐、二糖类和缓冲剂中的至少一种。

[0201] 作为水性药物组合物中所包含的两种或两种以上非离子型表面活性剂,只要是药剂学上可接受的非离子型表面活性剂则没有特别限定,作为所述非离子型表面活性剂,优选聚山梨酯和泊洛沙姆。在此,作为聚山梨酯,可例示聚山梨酯20、聚山梨酯80。另外,作为

泊洛沙姆,可例示聚氧乙烯(42)聚氧丙烯(67)二醇、聚氧乙烯(54)聚氧丙烯(39)二醇、聚氧乙烯(196)聚氧丙烯(67)二醇、聚氧乙烯(42)聚氧丙烯(67)二醇、聚氧乙烯(3)聚氧丙烯(17)二醇、聚氧乙烯(20)聚氧丙烯(20)二醇、聚氧乙烯(120)聚氧丙烯(40)二醇,特别优选聚氧乙烯(160)聚氧丙烯(30)二醇。聚氧乙烯(160)聚氧丙烯(30)二醇与泊洛沙姆188含义相同。

[0202] 作为水性药物组合物含有两种非离子型表面活性剂时的、优选的非离子型表面活性剂的组合,一者为聚山梨酯且另一者为泊洛沙姆。例如,优选聚山梨酯20与泊洛沙姆188、聚山梨酯80与泊洛沙姆188的组合,特别优选聚山梨酯80与泊洛沙姆188的组合。也可以在这些组合中进一步组合其它种类的聚山梨酯、泊洛沙姆等。

[0203] 水性药物组合物中的两种或两种以上非离子型表面活性剂中,两种的浓度优选分别为0.105~0.6mg/mL和0.005~1.5mg/mL,更优选分别为0.1~0.5mg/mL和0.025~1.0mg/mL,进一步优选分别为0.15~0.45mg/mL和0.05~1.0mg/mL,进一步更优选分别为0.25~0.45mg/mL和0.05~0.15mg/mL,例如分别为0.325mg/mL和0.075mg/mL。另外,例如分别为0.162mg/mL和0.075mg/mL,分别为0.130mg/mL和0.075mg/mL,分别为0.108mg/mL和0.075mg/mL,分别为0.08mg/mL和0.075mg/mL。

[0204] 水性药物组合物含有聚山梨酯和泊洛沙姆作为两种非离子型表面活性剂时,聚山梨酯的浓度优选为0.005~1.5mg/mL,更优选为0.025~1.0mg/mL,进一步优选为0.05~1.0mg/mL,进一步更优选为0.05~0.15mg/mL,例如为0.075mg/mL。另外,此时的泊洛沙姆的浓度优选为0.105~0.6mg/mL,更优选为0.1~0.5mg/mL,进一步优选为0.15~0.45mg/mL,例如为0.325mg/mL。另外,例如为0.162mg/mL、0.130mg/mL、0.108mg/mL、0.08mg/mL。

[0205] 水性药物组合物含有聚山梨酯80和泊洛沙姆188作为两种非离子型表面活性剂时,聚山梨酯80的浓度优选为0.005~0.15mg/mL,更优选为0.025~1.0mg/mL,进一步优选为0.05~1.0mg/mL,例如为0.075mg/mL。另外,此时的泊洛沙姆188的浓度优选为0.105~0.6mg/mL,更优选为0.1~0.5mg/mL,进一步优选为0.15~0.45mg/mL,例如为0.325mg/mL,另外例如为0.162mg/mL、0.130mg/mL、0.108mg/mL、0.08mg/mL。例如,聚山梨酯80的浓度为0.05~1.0mg/mL且泊洛沙姆188的浓度为0.15~0.45mg/mL。进而,例如,聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL且泊洛沙姆188的浓度为0.325mg/mL。另外,例如聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL且泊洛沙姆188的浓度为0.162mg/mL,例如聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL且泊洛沙姆188的浓度为0.130mg/mL,例如聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL且泊洛沙姆188的浓度为0.108mg/mL,例如聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL且泊洛沙姆188的浓度为0.08mg/mL。

[0206] 作为水性药物组合物中所包含的中性盐,只要是药剂学上可接受的中性盐则没有特别限定,作为所述中性盐,优选氯化钠、氯化镁,特别优选氯化钠。

[0207] 水性药物组合物中的中性盐的浓度优选为0.3~1.2mg/mL,更优选为0.5~1.0mg/mL,进一步优选为0.7~0.9mg/mL,例如为0.8mg/mL。

[0208] 作为水性药物组合物中所包含的二糖类,只要是药剂学上可接受的二糖类则没有特别限定,作为所述二糖类,优选海藻糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖或这些的组合,特别优选蔗糖。

[0209] 水性药物组合物中的二糖类的浓度优选为50~100mg/mL,更优选为55~95mg/mL,进一步优选为60~90mg/mL,例如为75mg/mL。

[0210] 作为水性药物组合物中所包含的缓冲剂,只要是药剂学上可接受的缓冲剂则没有特别限定,优选柠檬酸缓冲剂、磷酸缓冲剂、甘氨酸缓冲剂、组氨酸缓冲剂、碳酸缓冲剂、乙酸缓冲剂、或将这些组合而成的缓冲剂。水性药物组合物中所包含的缓冲剂的浓度优选为3~30mM,更优选为10~30mM,进一步优选为15~25mM,例如为20mM。另外,利用缓冲剂调整的水性药物组合物的pH优选为4.5~7.0,更优选为4.5~6.5,进一步优选为5.0~6.0,进一步更优选为5.2~5.8,例如为5.5。使用柠檬酸缓冲剂作为缓冲剂时,水性药物组合物中所包含的柠檬酸缓冲剂的浓度优选为3~30mM,更优选为10~30mM,进一步优选为15~25mM,例如为20mM。另外,利用柠檬酸缓冲剂调整的水性药物组合物的pH优选为4.5~7.0,更优选为4.5~6.5,进一步优选为5.0~6.0,进一步更优选为5.2~5.8,例如为5.5。

[0211] 作为本发明的水性药物组合物的优选组成,可列举:

[0212] (A) 具有生理活性的蛋白质的浓度为0.5~20mg/mL,中性盐的浓度为0.3~1.2mg/mL,二糖类的浓度为50~100mg/mL,两种或两种以上非离子型表面活性剂中的两种非离子型表面活性剂的浓度分别为0.105~0.6mg/mL和0.005~1.5mg/mL,缓冲剂的浓度为3~30mM且pH为4.5~6.5的组成;

[0213] (B) 具有生理活性的蛋白质的浓度为1.0~10mg/mL,中性盐的浓度为0.5~1.0mg/mL,二糖类的浓度为55~95mg/mL,两种或两种以上非离子型表面活性剂中的两种非离子型表面活性剂的浓度分别为0.1~0.5mg/mL和0.025~1.0mg/mL,缓冲剂的浓度为10~30mM且pH为5.0~6.0的组成;

[0214] (C) 具有生理活性的蛋白质的浓度为2.0~10mg/mL,中性盐的浓度为0.7~0.9mg/mL,二糖类的浓度为60~90mg/mL,两种或两种以上非离子型表面活性剂中的两种非离子型表面活性剂的浓度分别为0.15~0.45mg/mL和0.05~0.15mg/mL,缓冲剂的浓度为15~25mM且pH为5.2~5.8的组成。

[0215] 在上述(A)~(C)所示的水性药物组合物中,具有生理活性的蛋白质例如为人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白。作为所述人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的优选方式,可列举以下方式。即,由具有序列号22所示的氨基酸序列的人源化抗hTfR抗体的轻链、以及在具有序列号23所示的氨基酸序列的人源化抗hTfR抗体的Fab重链的C末端侧借助序列号4所示的接头结合有序列号6所示的人 α -L-艾杜糖醛酸酶而形成的氨基酸序列构成的融合蛋白。

[0216] 另外,上述(A)~(C)所示的水性药物组合物中具有生理活性的蛋白质为人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白时,作为该融合蛋白的进一步优选的方式,可列举以下方式。即,如下融合蛋白:该人源化抗hTfR抗体的轻链具有序列号22所示的氨基酸序列,该人源化抗hTfR抗体的Fab重链在其C末端侧借助具有序列号4所示的氨基酸序列的接头与序列号6所示的人 α -L-艾杜糖醛酸酶结合,整体上具有序列号27所示的氨基酸序列。

[0217] 上述(A)~(C)所示的水性药物组合物中,人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的优选浓度为0.5~20mg/mL、1.0~10mg/mL、2.0~10mg/mL或2.0~6.0mg/mL,可适宜调整为2.5mg/mL、5.0mg/mL等。

[0218] 上述(A)~(C)所示的水性药物组合物中,作为中性盐,只要是药剂学上可接受的中性盐则没有特别限定,优选氯化钠。使用氯化钠作为中性盐时,其浓度优选为0.3~1.2mg/mL,更优选为0.5~1.0mg/mL,进一步优选为0.7~0.9mg/mL,例如为0.8mg/mL。

[0219] 上述(A)~(C)所示的水性药物组合物中,作为二糖类,只要是药剂学上可接受的二糖类则没有特别限定,优选蔗糖。使用蔗糖作为二糖类时,其浓度优选为50~100mg/mL,更优选为55~95mg/mL,进一步优选为60~90mg/mL,例如为75mg/mL。

[0220] 上述(A)~(C)所示的水性药物组合物中,作为两种或两种以上非离子型表面活性剂,只要是药剂学上可接受的非离子型表面活性剂则没有特别限定,作为所述非离子型表面活性剂,优选聚山梨酯和泊洛沙姆。在此,作为聚山梨酯,可例示聚山梨酯20、聚山梨酯80。另外,作为泊洛沙姆,可例示聚氧乙烯(42)聚氧丙烯(67)二醇、聚氧乙烯(54)聚氧丙烯(39)二醇、聚氧乙烯(196)聚氧丙烯(67)二醇、聚氧乙烯(42)聚氧丙烯(67)二醇、聚氧乙烯(3)聚氧丙烯(17)二醇、聚氧乙烯(20)聚氧丙烯(20)二醇、聚氧乙烯(120)聚氧丙烯(40)二醇,特别优选聚氧乙烯(160)聚氧丙烯(30)二醇。作为该水性药物组合物含有两种非离子型表面活性剂时优选的非离子型表面活性剂的组合,一者为聚山梨酯且另一者为泊洛沙姆。例如,优选聚山梨酯20与泊洛沙姆188、聚山梨酯80与泊洛沙姆188的组合,特别优选聚山梨酯80与泊洛沙姆188的组合。也可以向这些组合中进一步组合其它种类的聚山梨酯、泊洛沙姆等。该水性药物组合物中的两种或两种以上非离子型表面活性剂的浓度优选分别为0.105~0.6mg/mL和0.005~1.5mg/mL,更优选分别为0.1~0.5mg/mL和0.025~1.0mg/mL,进一步优选分别为0.15~0.45mg/mL和0.05~1.0mg/mL,进一步更优选分别为0.25~0.45mg/mL和0.05~0.15mg/mL,例如分别为0.325mg/mL和0.075mg/mL。另外,例如分别为0.162mg/mL和0.075mg/mL,分别为0.130mg/mL和0.075mg/mL,分别为0.108mg/mL和0.075mg/mL,分别为0.08mg/mL和0.075mg/mL。该水性药物组合物含有聚山梨酯和泊洛沙姆作为两种非离子型表面活性剂时,聚山梨酯的浓度为0.005~1.5mg/mL,更优选为0.025~1.0mg/mL,进一步优选为0.05~1.0mg/mL,进一步更优选为0.05~0.15mg/mL,例如为0.075mg/mL。另外,此时的泊洛沙姆的浓度优选为0.105~0.6mg/mL,更优选为0.1~0.5mg/mL,进一步优选为0.15~0.45mg/mL,例如为0.325mg/mL。另外,例如为0.162mg/mL、0.130mg/mL、0.108mg/mL、0.08mg/mL。

[0221] 上述(A)~(C)所示的水性药物组合物中使用的缓冲剂只要是药剂学上可接受的缓冲剂则没有特别限定,优选柠檬酸缓冲剂。使用柠檬酸缓冲剂作为缓冲剂时,其浓度优选为3~30mM,更优选为10~30mM,进一步优选为15~25mM,例如为20mM。另外,利用缓冲剂调节的水性药物组合物的pH优选为4.5~6.5,更优选为5.0~6.0,进一步优选为5.2~5.8,例如为5.5。

[0222] 作为具有生理活性的蛋白质为抗体与人溶酶体酶的融合蛋白时的、水性药物组合物的优选组成的一例,可列举如下组成:该融合蛋白为人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白,其浓度为1~10mg/mL,中性盐(特别是氯化钠)的浓度为0.3~1.2mg/mL,二糖类(特别是蔗糖)的浓度为50~100mg/mL,聚山梨酯(特别是聚山梨酯80)的浓度为0.025~1.0mg/mL,泊洛沙姆(特别是泊洛沙姆188)的浓度为0.1~0.5mg/mL,柠檬酸缓冲剂的浓度为10~30mM。更具体而言,可列举如下组成:人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的浓度为1~10mg/mL,氯化钠的浓度为0.5~1.0mg/mL,蔗糖的浓度为55~95mg/mL,聚山梨酯(特别是聚山梨酯80)的浓度为0.05~1.0mg/mL,泊洛沙姆(特别是泊洛沙姆188)的浓度为0.15~0.45mg/mL,柠檬酸缓冲剂的浓度为15~25mM。进一步具体而言,可列举如下组成:人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的浓度为1~10mg/mL,氯化钠的浓度为0.7~0.9mg/mL,蔗糖

的浓度为60~90mg/mL,聚山梨酯(特别是聚山梨酯80)的浓度为0.05~0.15mg/mL,泊洛沙姆(特别是泊洛沙姆188)的浓度为0.15~0.45mg/mL,柠檬酸缓冲剂的浓度为15~25mM。进一步更具体而言,可列举如下组成:人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的浓度为5mg/mL,氯化钠的浓度为0.8mg/mL,蔗糖的浓度为75mg/mL,聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL,泊洛沙姆188的浓度为0.325mg/mL,柠檬酸缓冲剂的浓度为20mM。另外,具体而言可列举如下组成:人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的浓度为5mg/mL,氯化钠的浓度为0.8mg/mL,蔗糖的浓度为75mg/mL,聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL,泊洛沙姆188的浓度为0.162mg/mL,柠檬酸缓冲剂的浓度为20mM。另外,具体而言可列举如下组成:人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的浓度为5mg/mL,氯化钠的浓度为0.8mg/mL,蔗糖的浓度为75mg/mL,聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL,泊洛沙姆188的浓度为0.130mg/mL,柠檬酸缓冲剂的浓度为20mM。另外,具体而言可列举如下组成:人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的浓度为5mg/mL,氯化钠的浓度为0.8mg/mL,蔗糖的浓度为75mg/mL,聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL,泊洛沙姆188的浓度为0.108mg/mL,柠檬酸缓冲剂的浓度为20mM。另外,具体而言可列举如下组成:人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的浓度为5mg/mL,氯化钠的浓度为0.8mg/mL,蔗糖的浓度为75mg/mL,聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL,泊洛沙姆188的浓度为0.08mg/mL,柠檬酸缓冲剂的浓度为20mM。

[0223] 以具有生理活性的蛋白质作为有效成分的本发明的水性药物组合物在温度2~8℃的暗处可以稳定保存优选3个月、更优选1年、进一步优选2年、更进一步优选3年或3年以上的期间,例如4年、5年、6年等期间。另外,本发明的水性药物组合物在温度22~28℃的暗处可以稳定保存优选3个月、更优选6个月。

[0224] 以具有生理活性的蛋白质作为有效成分的本发明的水性药物组合物可以作为注射剂给药于静脉内、肌肉内、腹腔内或皮下。本发明的水性药物组合物可以制成填充于管形瓶的形态来供给,也可以制成预先填充于注射器的形态、即预充型制剂来供给。对用于填充水性药物组合物的注射器、管形瓶等容器的材质没有特别限定,优选为硼硅酸玻璃制的容器,此外,也优选作为环状烯烃与烯烃的共聚物的环烯烃共聚物、环烯烃类开环聚合物或对环烯烃类开环聚合物进行氢化而得到的物质等疏水性树脂制的容器。

[0225] 本发明的一个实施方式中的冷冻干燥药物组合物是含有作为有效成分的具有生理活性的蛋白质和两种或两种以上非离子型表面活性剂的组合物。该冷冻干燥药物组合物可以还含有中性盐、二糖类和缓冲剂中的至少一种。

[0226] 作为冷冻干燥药物组合物中所包含的两种或两种以上非离子型表面活性剂,只要是药剂学上可接受的非离子型表面活性剂则没有特别限定,作为所述非离子型表面活性剂,优选聚山梨酯和泊洛沙姆。在此,作为聚山梨酯,可例示聚山梨酯20、聚山梨酯80。另外,作为泊洛沙姆,可例示聚氧乙烯(42)聚氧丙烯(67)二醇、聚氧乙烯(54)聚氧丙烯(39)二醇、聚氧乙烯(196)聚氧丙烯(67)二醇、聚氧乙烯(42)聚氧丙烯(67)二醇、聚氧乙烯(3)聚氧丙烯(17)二醇、聚氧乙烯(20)聚氧丙烯(20)二醇、聚氧乙烯(120)聚氧丙烯(40)二醇,特别优选聚氧乙烯(160)聚氧丙烯(30)二醇。聚氧乙烯(160)聚氧丙烯(30)二醇与泊洛沙姆188含义相同。

[0227] 冷冻干燥药物组合物含有两种非离子型表面活性剂时,作为优选的非离子型表面活性剂的组合,一者为聚山梨酯且另一者为泊洛沙姆。例如,优选聚山梨酯20与泊洛沙姆

188、聚山梨酯80与泊洛沙姆188的组合,特别优选聚山梨酯80与泊洛沙姆188的组合。也可以在这些组合中进一步组合其它种类的聚山梨酯、泊洛沙姆等。

[0228] 本发明的一个实施方式中,冷冻干燥药物组合物溶解于水性溶剂后使用。作为此时使用的水性溶剂的优选例,可列举纯水、生理盐水,但是不限于这些。将冷冻干燥药物组合物溶解于水性溶剂时,有时会产生经冷冻干燥的成分的一部分不溶解的问题,但是该冷冻干燥药物组合物不会产生该问题。将冷冻干燥药物组合物用水性溶剂溶解而得到的物质也为本发明的水性药物组合物。此时的水性药物组合物在温度2~8℃的暗处可以稳定保存优选1天、更优选1周。该冷冻干燥药物组合物可以以冷冻干燥药物组合物的状态在温度2~8℃的暗处稳定保存优选3个月、更优选1年、进一步优选2年、更进一步优选3年或3年以上的期间,例如4年、5年、6年等的期间。另外,该冷冻干燥药物组合物可以在温度22~28℃的暗处稳定保存优选3个月、更优选6个月。

[0229] 将冷冻干燥药物组合物溶解而得到的水性药物组合物中的两种或两种以上非离子型表面活性剂中,两种的浓度优选分别为0.105~0.6mg/mL和0.005~1.5mg/mL,更优选分别为0.1~0.5mg/mL和0.025~1.0mg/mL,进一步优选分别为0.15~0.45mg/mL和0.05~1.0mg/mL,进一步更优选分别为0.15~0.45mg/mL和0.05~0.15mg/mL,例如分别为0.325mg/mL和0.075mg/mL。另外,例如分别为0.162mg/mL和0.075mg/mL,分别为0.130mg/mL和0.075mg/mL,分别为0.108mg/mL和0.075mg/mL,分别为0.08mg/mL和0.075mg/mL。

[0230] 冷冻干燥药物组合物含有聚山梨酯和泊洛沙姆作为两种非离子型表面活性剂时,将其溶解而得到的水性药物组合物的聚山梨酯的浓度优选为0.005~1.5mg/mL,更优选为0.025~1.0mg/mL,进一步优选为0.05~1.0mg/mL,进一步更优选为0.05~0.15mg/mL,例如为0.075mg/mL。另外,此时的泊洛沙姆的浓度优选为0.105~0.6mg/mL,更优选为0.1~0.5mg/mL,进一步优选为0.15~0.45mg/mL,例如为0.325mg/mL。另外,例如为0.162mg/mL、0.130mg/mL、0.108mg/mL、0.08mg/mL。

[0231] 冷冻干燥药物组合物含有聚山梨酯80和泊洛沙姆188作为两种非离子型表面活性剂时,将其溶解而得到的水性药物组合物的聚山梨酯80的浓度优选为0.005~0.15mg/mL,更优选为0.025~1.0mg/mL,进一步优选为0.05~1.0mg/mL,例如为0.075mg/mL。另外,此时的泊洛沙姆188的浓度优选为0.105~0.6mg/mL,更优选为0.1~0.5mg/mL,进一步优选为0.15~0.45mg/mL,例如为0.325mg/mL。另外,例如为0.162mg/mL、0.130mg/mL、0.108mg/mL、0.08mg/mL。例如,聚山梨酯80的浓度为0.05~1.0mg/mL且泊洛沙姆188的浓度为0.15~0.45mg/mL。进而,例如,聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL且泊洛沙姆188的浓度为0.325mg/mL。另外,例如聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL且泊洛沙姆188的浓度为0.162mg/mL,例如聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL且泊洛沙姆188的浓度为0.130mg/mL,例如聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL且泊洛沙姆188的浓度为0.108mg/mL,例如聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL且泊洛沙姆188的浓度为0.08mg/mL。

[0232] 作为冷冻干燥药物组合物中所包含的中性盐,只要是药剂学上可接受的中性盐则没有特别限定,作为所述中性盐,优选氯化钠、氯化镁,特别优选氯化钠。

[0233] 冷冻干燥药物组合物含有中性盐时,将其溶解而得到的水性药物组合物的中性盐的浓度优选为0.3~1.2mg/mL,更优选为0.5~1.0mg/mL,进一步优选为0.7~0.9mg/mL,例如为0.8mg/mL。

[0234] 作为冷冻干燥药物组合物中所包含的二糖类,只要是药剂学上可接受的二糖类则没有特别限定,作为所述二糖类,优选海藻糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖或这些的组合,特别优选蔗糖。

[0235] 冷冻干燥药物组合物含有二糖类时,将其溶解而得到的水性药物组合物的二糖类的浓度优选为50~100mg/mL,更优选为55~95mg/mL,进一步优选为60~90mg/mL,例如为75mg/mL。

[0236] 作为冷冻干燥药物组合物中所包含的缓冲剂,只要是药剂学上可接受的缓冲剂则没有特别限定,优选柠檬酸缓冲剂、磷酸缓冲剂、甘氨酸缓冲剂、组氨酸缓冲剂、碳酸缓冲剂、乙酸缓冲剂、或将这些组合而成的缓冲剂。冷冻干燥药物组合物含有缓冲剂时,将其溶解而得到的水性药物组合物的缓冲剂的浓度优选为3~30mM,更优选为10~30mM,进一步优选为15~25mM,例如为20mM。另外,利用缓冲剂调整的该水性药物组合物的pH优选为4.5~7.0,更优选为4.5~6.5,进一步优选为5.0~6.0,进一步更优选为5.2~5.8,例如为5.5。使用柠檬酸缓冲剂作为缓冲剂时,该水性药物组合物中所包含的柠檬酸缓冲剂的浓度优选为3~30mM,更优选为10~30mM,进一步优选为15~25mM,例如为20mM。另外,利用柠檬酸缓冲剂调整的该水性药物组合物的pH优选为4.5~7.0,更优选为4.5~6.5,进一步优选为5.0~6.0,进一步更优选为5.2~5.8,例如为5.5。

[0237] 作为本发明的冷冻干燥药物组合物的优选例,将其溶解而得到的水性药物组合物的组成可列举:

[0238] (D)具有生理活性的蛋白质的浓度为0.5~20mg/mL,中性盐的浓度为0.3~1.2mg/mL,二糖类的浓度为50~100mg/mL,两种或两种以上非离子型表面活性剂中的两种非离子型表面活性剂的浓度分别为0.105~0.6mg/mL和0.005~1.5mg/mL,缓冲剂的浓度为3~30mM且pH为4.5~6.5的组成;

[0239] (E)具有生理活性的蛋白质的浓度为1.0~10mg/mL,中性盐的浓度为0.5~1.0mg/mL,二糖类的浓度为55~95mg/mL,两种或两种以上非离子型表面活性剂中的两种非离子型表面活性剂的浓度分别为0.1~0.5mg/mL和0.025~1.0mg/mL,缓冲剂的浓度为10~30mM且pH为5.0~6.0的组成;

[0240] (F)具有生理活性的蛋白质的浓度为2.0~10mg/mL,中性盐的浓度为0.7~0.9mg/mL,二糖类的浓度为60~90mg/mL,两种或两种以上非离子型表面活性剂中的两种非离子型表面活性剂的浓度分别为0.15~0.45mg/mL和0.05~0.15mg/mL,缓冲剂的浓度为15~25mM且pH为5.2~5.8的组成。

[0241] 在上述(D)~(F)中,具有生理活性的蛋白质例如为人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白。作为所述人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的优选方式,可列举以下方式。即,由具有序列号22所示的氨基酸序列的人源化抗hTfR抗体的轻链、以及在具有序列号23所示的氨基酸序列的人源化抗hTfR抗体的Fab重链的C末端侧借助序列号4所示的接头结合有序列号6所示的人 α -L-艾杜糖醛酸酶而形成的氨基酸序列构成的融合蛋白。

[0242] 另外,上述(D)~(F)中具有生理活性的蛋白质为人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白时,作为该融合蛋白的进一步优选的方式,可列举以下方式。即,如下融合蛋白:该人源化抗hTfR抗体的轻链具有序列号22所示的氨基酸序列,该人源化抗hTfR抗体的Fab重链在其C末端侧借助具有序列号4所示的氨基酸序列的接头与序列号6所示的人 α -L-艾杜糖醛

酸酶结合,整体上具有序列号27所示的氨基酸序列。

[0243] 在上述(D)~(F)中,人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的优选浓度为0.5~20mg/mL、1.0~10mg/mL、2.0~10mg/mL或2.0~6.0mg/mL,可适宜调整为2.5mg/mL、5.0mg/mL等。

[0244] 上述(D)~(F)中,作为中性盐,只要是药剂学上可接受的中性盐则没有特别限定,优选氯化钠。使用氯化钠作为中性盐时,其浓度优选为0.3~1.2mg/mL,更优选为0.5~1.0mg/mL,进一步优选为0.7~0.9mg/mL,例如为0.8mg/mL。

[0245] 上述(D)~(F)中,作为二糖类,只要是药剂学上可接受的二糖类则没有特别限定,优选蔗糖。使用蔗糖作为二糖类时,其浓度优选为50~100mg/mL,更优选为55~95mg/mL,进一步优选为60~90mg/mL,例如为75mg/mL。

[0246] 上述(D)~(F)中,作为两种或两种以上非离子型表面活性剂,只要是药剂学上可接受的非离子型表面活性剂则没有特别限定,作为所述非离子型表面活性剂,优选聚山梨酯和泊洛沙姆。在此,作为聚山梨酯,可例示聚山梨酯20、聚山梨酯80。另外,作为泊洛沙姆,可例示聚氧乙烯(42)聚氧丙烯(67)二醇、聚氧乙烯(54)聚氧丙烯(39)二醇、聚氧乙烯(196)聚氧丙烯(67)二醇、聚氧乙烯(42)聚氧丙烯(67)二醇、聚氧乙烯(3)聚氧丙烯(17)二醇、聚氧乙烯(20)聚氧丙烯(20)二醇、聚氧乙烯(120)聚氧丙烯(40)二醇,特别优选聚氧乙烯(160)聚氧丙烯(30)二醇。作为上述(D)~(F)含有两种非离子型表面活性剂时优选的非离子型表面活性剂的组合,一者为聚山梨酯且另一者为泊洛沙姆。例如,优选聚山梨酯20与泊洛沙姆188、聚山梨酯80与泊洛沙姆188的组合,特别优选聚山梨酯80与泊洛沙姆188的组合。也可以向这些组合中进一步组合其它种类的聚山梨酯、泊洛沙姆等。上述(D)~(F)中的两种或两种以上非离子型表面活性剂中,两种的浓度优选分别为0.105~0.6mg/mL和0.005~1.5mg/mL,更优选分别为0.1~0.5mg/mL和0.025~1.0mg/mL,进一步优选分别为0.15~0.45mg/mL和0.05~1.0mg/mL,进一步更优选分别为0.15~0.45mg/mL和0.05~0.15mg/mL,例如分别为0.325mg/mL和0.075mg/mL。另外,例如分别为0.162mg/mL和0.075mg/mL,分别为0.130mg/mL和0.075mg/mL,分别为0.108mg/mL和0.075mg/mL,分别为0.08mg/mL和0.075mg/mL。上述(D)~(F)含有聚山梨酯和泊洛沙姆作为两种非离子型表面活性剂时,聚山梨酯的浓度为0.005~1.5mg/mL,更优选为0.025~1.0mg/mL,进一步优选为0.05~1.0mg/mL,进一步更优选为0.05~0.15mg/mL,例如为0.075mg/mL。另外,此时的泊洛沙姆的浓度优选为0.105~0.6mg/mL,更优选为0.1~0.5mg/mL,进一步优选为0.15~0.45mg/mL,例如为0.325mg/mL。另外,例如为0.162mg/mL、0.130mg/mL、0.108mg/mL、0.08mg/mL。

[0247] 上述(D)~(F)中使用的缓冲剂只要是药剂学上可接受的缓冲剂则没有特别限定,优选柠檬酸缓冲剂。使用柠檬酸缓冲剂作为缓冲剂时,其浓度优选为3~30mM,更优选为10~30mM,进一步优选为15~25mM,例如为20mM。另外,利用缓冲剂调节的水性药物组合物的pH优选为4.5~6.5,更优选为5.0~6.0,进一步优选为5.2~5.8,例如为5.5。

[0248] 作为具有生理活性的蛋白质为抗体与人溶酶体酶的融合蛋白时的、冷冻干燥药物组合物的优选组成的一例,可列举如下组成:该融合蛋白为人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白,将冷冻干燥药物组合物溶解而得到的水性药物组合物中的该融合蛋白的浓度为1~10mg/mL,中性盐(特别是氯化钠)的浓度为0.3~1.2mg/mL,二糖类(特别是蔗糖)的浓度为50~100mg/mL,聚山梨酯(特别是聚山梨酯80)的浓度为0.025~1.0mg/mL,泊洛沙姆(特

别是泊洛沙姆188)的浓度为0.1~0.5mg/mL,柠檬酸缓冲剂的浓度为10~30mM。更具体而言,可列举如下组成:人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的浓度为1~10mg/mL,氯化钠的浓度为0.5~1.0mg/mL,蔗糖的浓度为55~95mg/mL,聚山梨酯(特别是聚山梨酯80)的浓度为0.05~1.0mg/mL,泊洛沙姆(特别是泊洛沙姆188)的浓度为0.15~0.45mg/mL,柠檬酸缓冲剂的浓度为15~25mM。进一步具体而言,可列举如下组成:人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的浓度为1~10mg/mL,氯化钠的浓度为0.7~0.9mg/mL,蔗糖的浓度为60~90mg/mL,聚山梨酯(特别是聚山梨酯80)的浓度为0.05~0.15mg/mL,泊洛沙姆(特别是泊洛沙姆188)的浓度为0.15~0.45mg/mL,柠檬酸缓冲剂的浓度为15~25mM。进一步更具体而言,可列举如下组成:人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的浓度为5mg/mL,氯化钠的浓度为0.8mg/mL,蔗糖的浓度为75mg/mL,聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL,泊洛沙姆188的浓度为0.325mg/mL,柠檬酸缓冲剂的浓度为20mM。另外,具体而言可列举如下组成:人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的浓度为5mg/mL,氯化钠的浓度为0.8mg/mL,蔗糖的浓度为75mg/mL,聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL,泊洛沙姆188的浓度为0.162mg/mL,柠檬酸缓冲剂的浓度为20mM。另外,具体而言可列举如下组成:人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的浓度为5mg/mL,氯化钠的浓度为0.8mg/mL,蔗糖的浓度为75mg/mL,聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL,泊洛沙姆188的浓度为0.130mg/mL,柠檬酸缓冲剂的浓度为20mM。另外,具体而言可列举如下组成:人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的浓度为5mg/mL,氯化钠的浓度为0.8mg/mL,蔗糖的浓度为75mg/mL,聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL,泊洛沙姆188的浓度为0.108mg/mL,柠檬酸缓冲剂的浓度为20mM。另外,具体而言可列举如下组成:人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的浓度为5mg/mL,氯化钠的浓度为0.8mg/mL,蔗糖的浓度为75mg/mL,聚山梨酯80的浓度为0.075mg/mL,泊洛沙姆188的浓度为0.08mg/mL,柠檬酸缓冲剂的浓度为20mM。

[0249] 本发明的冷冻干燥制剂可以与用于溶解其的专用溶液一起以试剂盒形式供给。冷冻干燥制剂例如在使用前用专用溶液、纯水等溶解后给药于患者的静脉内、肌肉内、腹腔内或皮下等。对用于将冷冻干燥制剂封入、填充等的注射器和管形瓶等容器的材质没有特别限定,优选为硼硅酸玻璃制的容器,此外,也优选作为环状烯烃与烯烃的共聚物的环烯烃共聚物、环烯烃类开环聚合物或对环烯烃类开环聚合物进行氢化而得到的物质等疏水性树脂制的容器。

[0250] 本发明的一个实施方式中的水性药物组合物在温度2~8℃下且在暗处保存36个月后的聚合物的含有比率优选为0.5%以下,更优选为0.4%以下,进一步优选为0.3%以下。另外,本发明的一个实施方式中的水性药物组合物在温度2~8℃下且在暗处保存36个月后的聚合物的含有比率和分解物的含有比率分别优选为0.5%以下和1%以下,更优选为0.4%以下和0.8%以下,进一步优选为0.3%以下和0.6%以下。

[0251] 本发明的一个实施方式中的水性药物组合物在制造后可以在2~8℃的温度下在暗处保存优选24个月、更优选36个月、进一步优选48个月、更进一步优选72个月。即,可以在订货方的医疗机构以水性药物组合物形式以能够给药于患者的状态长期保存。

[0252] 本发明的一个实施方式中的冷冻干燥药物组合物在温度2~8℃下且在暗处保存36个月后的聚合物的含有比率优选为0.5%以下,更优选为0.4%以下,进一步优选为0.3%以下。另外,本发明的一个实施方式中的水性药物组合物在温度2~8℃下且在暗处保存36

个月后的聚合物的含有比率和分解物的含有比率分别优选为0.5%以下和0.1%以下,更优选为0.4%以下和0.07%以下,进一步优选为0.3%以下和0.05%。

[0253] 本发明的一个实施方式中的冷冻干燥药物组合物在制造后可以在温度2~8℃下在暗处保存优选24个月、更优选36个月、进一步优选48个月、更进一步优选72个月。即,可以在订货方的医疗机构以冷冻干燥药物组合物形式以能够给药于患者的状态长期保存。

[0254] 实施例

[0255] 以下参照实施例进一步详细地说明本发明,但是并非意图将本发明限定于实施例。

[0256] [实施例1]人源化抗hTfR抗体-hIDUA融合蛋白表达用载体的构建

[0257] 使用编码具有序列号22所示的氨基酸序列的轻链和具有序列号23所示的氨基酸序列的重链的Fab区域的基因来构建人源化抗hTfR抗体-hIDUA融合蛋白表达用载体。

[0258] [pE-neo载体和pE-hygr载体的构建]

[0259] 将pEF/myc/nuc载体(インビトロジェン公司)用KpnI和NcoI消化,切出含有EF-1启动子和其第一内含子的区域,将其用T4 DNA聚合酶进行平滑末端化处理。另外将pCI-neo(インビトロジェン公司)用BglIII和EcoRI消化,切除含有CMV的增强子/启动子和内含子的区域后,用T4DNA聚合酶进行平滑末端化处理。向其中插入上述含有EF-1 α 启动子和其第一内含子的区域(平滑末端化处理后的产物),构建pE-neo载体。将pE-neo载体用SfiI和BstXI消化,切除含有新霉素抗性基因的约1kbp的区域。以pcDNA3-1/Hygro(+)(インビトロジェン公司)为模板,使用引物Hyg-Sfi5'(序列号13)和引物Hyg-BstX3'(序列号14),通过PCR反应扩增潮霉素基因。将扩增出的潮霉素基因用SfiI和BstXI消化,插入到上述pE-neo载体中,构建pE-hygr载体。需要说明的是,pE-neo载体和pE-hygr载体的构建参考专利文献(日本专利第6279466号)而进行。

[0260] [pE-IRES-GS-puro的构建]

[0261] 将表达载体pPGKIH(Miyahara M.et.al.,J.Biol.Chem.275,613-618(2000))用限制酶(XhoI和BamHI)消化,切出含有来自小鼠脑心肌炎病毒(EMCV)的内部核糖体结合位点(IRES)、潮霉素抗性基因(Hyg^r基因)和小鼠磷酸甘油酸激酶(mPGK)的多聚腺苷酸化区域(mPGKpA)的DNA片段。将该DNA片段插入到pBluescript SK(-)(Stratagene公司)的XhoI与BamHI位点间,将其作为pBSK(IRES-Hygr-mPGKpA)。

[0262] 以pBSK(IRES-Hygr-mPGKpA)为模板,使用引物IRES5'(序列号29)和引物IRES3'(序列号30),通过PCR扩增含有EMCV的IRES的一部分的DNA片段。将该DNA片段用限制酶(XhoI和HindIII)消化,插入到pBSK(IRES-Hygr-mPGKpA)的XhoI与HindIII位点间,将其作为pBSK(NotI-IRES-Hygr-mPGKpA)。将pBSK(NotI-IRES-Hygr-mPGKpA)用限制酶(NotI和BamHI)消化,插入到pE-hygr载体的NotI与BamHI位点间,将其作为质粒pE-IRES-Hygr。

[0263] 将表达载体pPGKIH用EcoRI消化,切出由含有mPGK的启动子区域(mPGKp)的碱基序列构成的DNA片段。将该DNA片段插入到pBluescript SK(-)(Stratagene公司)的EcoRI位点,将其作为mPGK promoter/pBS(-)。以mPGK promoter/pBS(-)为模板,使用引物mPGKP5'(序列号31)和引物mPGKP3'(序列号32),通过PCR扩增含有mPGK的启动子区域(mPGKp)的DNA片段。将该DNA片段用限制酶(BglIII和EcoRI)消化,插入到pCI-neo(Promega公司)的BglIII与EcoRI位点间,将其作为pPGK-neo。将pE-IRES-Hygr用限制酶(NotI和BamHI)消化,切出

DNA片段(IRES-Hygr),插入到pPGK-neo的NotI与BamHI位点间,将其作为pPGK-IRES-Hygr。

[0264] 由CHO-K1细胞制备cDNA,将其作为模板,使用引物GS5' (序列号33)和引物GS3' (序列号34),通过PCR扩增含有GS基因的DNA片段。将该DNA片段用限制酶(BalI和BamHI)消化,插入到pPGK-IRES-Hygr的BalI与BamHI位点间,将其作为pPGK-IRES-GS-ΔpolyA。

[0265] 以pCAGIPuro(Miyahara M.et.al.,J.Biol.Chem.275,613-618(2000))为模板,使用引物puro5' (序列号35)和引物puro3' (序列号36),通过PCR扩增含有嘌呤霉素抗性基因(puro^r基因)的DNA片段。将该DNA片段插入到pT7Blue T-Vector(Novagen公司)中,将其作为pT7-puro。

[0266] 将pT7-puro用限制酶(AflIII和BstXI)消化,插入到表达载体pE-neo的AflIII和BstXI位点间,将其作为pE-puro。

[0267] 以pE-puro为模板,使用引物SV40polyA5' (序列号37)和引物SV40polyA3' (序列号38),通过PCR扩增含有SV40晚期多聚腺苷酸化区域的DNA片段。将该DNA片段用限制酶(NotI和HpaI)消化,插入到表达载体pE-puro的NotI与HpaI位点间,将其作为pE-puro(XhoI)。将pPGK-IRES-GS-ΔpolyA用限制酶(NotI和XhoI)消化,切出含有IRES-GS区域的DNA片段,将其插入到表达载体pE-puro(XhoI)的NotI与XhoI位点间,将其作为pE-IRES-GS-puro。需要说明的是,pE-IRES-GS-puro的构建参考专利文献(日本专利第6279466号)而进行。

[0268] [pE-mIRES-GS-puro(ΔE)的构建]

[0269] 以表达载体pE-IRES-GS-puro为模板,使用引物mIRES-GS5' (序列号39)和引物mIRES-GS3' (序列号40),通过PCR扩增EMCV的IRES至GS的区域,扩增在位于EMCV的IRES的5'侧起第2位的起始密码子(ATG)加入突变而进行了破坏的DNA片段。以表达载体pE-IRES-GS-puro为模板,使用该DNA片段和上述引物IRES5'通过PCR扩增含有IRES至GS的上述区域的DNA片段。将该DNA片段用限制酶(NotI和PstI)消化,将切出的DNA片段插入到pBluescript SK(-)(Stratagene公司)的NotI与PstI位点间,将其作为mIRES/pBlueScript SK(-)。

[0270] 将表达载体pE-IRES-GS-puro用SphI消化,切除SV40增强子区域。使剩余的DNA片段自连接,将其作为pE-IRES-GS-puro(ΔE)。将mIRES/pBlueScript SK(-)用NotI和PstI消化,切出含有改造型IRES(mIRES)和GS基因的一部分的区域。另外将pE-IRES-GS-puro(ΔE)用NotI和PstI消化,插入上述含有mIRES和GS基因的一部分的区域,构建pE-mIRES-GS-puro(ΔE)。

[0271] [pEM-hygr(LC3)和pE-mIRES-GSp-Fab-IDUA的构建]

[0272] 人工合成含有β-Globin MAR(Matrix Attachment Region)、CMV增强子、人EF-1α启动子、MluI和BamHI切割位点、干扰素βMar的DNA片段(CMVE-EF-1αp-IFNβMAR)(序列号41)。向该DNA片段的5'侧导入HindIII序列,向3'侧导入EcoRI序列。将该DNA片段用HindIII和EcoRI消化,插入到pUC57载体的HindIII与EcoRI位点间,将其作为JCR69 in pUC57。人工合成含有MluI和BamHI切割位点、IRES、潮霉素抗性基因和mPGK多聚腺苷酸化信号的DNA片段(IRES-HygroR-mPGKpA)(序列号42)。将DNA该DNA片段插入到JCR69 in pUC57的MluI和BamHI位点,将其作为pEM hygro。

[0273] 人工合成含有编码具有序列号22所示的氨基酸序列的人源化抗hTfR抗体的轻链全长的基因的DNA片段(序列号26),插入到pUC57-Amp,将其作为JCR131 in pUC57-Amp。向该DNA片段的5'侧导入MluI序列,向3'侧导入NotI序列。将该质粒DNA用MluI和NotI消化,使

其整合于表达载体pEM hygro的MluI-NotI间。将得到的载体作为人源化抗hTfR抗体的轻链表达用载体pEM-hygr (LC3)。

[0274] 人工合成含有编码如下蛋白质的基因的具有序列号28所示的碱基序列的DNA片段,所述蛋白质为在具有序列号23所示的氨基酸序列的人源化抗hTfR抗体的重链的Fab区域的C末端侧借助序列号4所示的接头序列结合有具有序列号6所示的氨基酸序列的人IDUA的、整体上具有序列号27所示的氨基酸序列的蛋白质。向该DNA片段的5'侧导入MluI序列,向3'侧导入NotI序列。将该DNA片段用MluI和NotI消化,使其整合于pE-mIRES-GS-puro(Δ E)的MluI与NotI之间。将得到的载体作为在人源化抗hTfR抗体的Fab重链的C末端侧结合有hIDUA的蛋白质的表达用载体pE-mIRES-GSp-Fab-IDUA。

[0275] [实施例2]人源化抗hTfR抗体-hIDUA融合蛋白的高表达细胞株的制作

[0276] 对于CHO细胞(CHO-K1:由美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)获得),通过下述方法使用NEPA21(NEPAGENE公司)转化实施例1中构建的pEM-hygr(LC3)和pE-mIRES-GSp-Fab-IDUA。

[0277] 细胞的转化大体上通过以下方法进行。以 2×10^7 个细胞/mL的密度用CD OPTI-CHOTM培养基(Thermo Fisher Scientific公司)与PBS的1:1混合液将CHO-K1细胞悬浮。采集50 μ L的细胞悬浮液,向其中添加50 μ L用CD OPTI-CHOTM培养基与PBS的1:1混合液稀释成200 μ g/mL的pEM-hygr(LC3)质粒DNA溶液。使用NEPA21(NEPAGENE公司)实施电穿孔,将pEM-hygr(LC3)质粒DNA导入到细胞中。在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的条件下培养一晚后,将细胞用添加了0.5mg/mL的潮霉素的CD OPTI-CHOTM培养基进行选择培养。向得到的细胞中通过相同方法导入pE-mIRES-GSp-Fab-IDUA质粒DNA(用AhdI消化而线性化的产物)。在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的条件下培养一晚后,将细胞用添加了0.5mg/mL的潮霉素和10 μ g/mL的嘌呤霉素0.8mg/mL的CD OPTI-CHOTM培养基进行选择培养。在选择培养时,阶段性地提高MSX的浓度,最终使MSX浓度为300 μ M,选择性地增殖显示抗药性的细胞。

[0278] 接着,播种通过有限稀释法以每1孔中为1个以下的细胞增殖的方式在96孔板上通过选择培养而选择出的细胞,培养约2周以使各细胞形成单克隆集落。采集形成了单克隆集落的孔的培养上清,通过ELISA法调查人源化抗体含量,选择人源化抗hTfR抗体-hIDUA融合蛋白的高表达细胞株。

[0279] 此时的ELISA法大体上通过以下方法实施。向96孔微滴定板(Nunc公司)的各孔中,以各100 μ L加入将鸡抗IDUA多克隆抗体溶液用0.05M碳酸氢盐缓冲液稀释至5 μ g/mL而成的溶液,在室温或4 $^{\circ}$ C下静置至少1小时,使抗体吸附于板。接着用在Tris缓冲生理盐水(pH 8.0)中加入有0.05%Tween20的溶液(TBS-T)将各孔清洗3次后,将在Tris缓冲生理盐水(pH 8.0)中添加有1%BSA的溶液向各孔中分别添加300 μ L,将板在室温下静置1小时。接着将各孔用TBS-T清洗3次后,将用在Tris缓冲生理盐水(pH 8.0)中添加有0.1%BSA和0.05%Tween20的溶液(TBS-BT)稀释成适当浓度的培养上清或人源化抗hTfR抗体-hIDUA融合蛋白纯化品向各孔中分别添加100 μ L,将板在室温下静置1小时。接着将板用TBS-T清洗3次后,将用TBS-BT稀释的HRP标记抗人IgG多克隆抗体溶液向各孔中分别添加50 μ L,将板在室温下静置1小时。用TBS-T将各孔清洗3次后,使用ELISA POD底物TMB试剂盒(Nakalai Tesque公司)使其显色。接着向各孔中分别加入50 μ L的1mol/L硫酸而使反应停止,使用96孔酶标仪对各孔测定450nm下的吸光度。选择出显示出高测定值的孔所对应的细胞,作为人源化抗hTfR抗

体-hIDUA融合蛋白的高表达细胞株。将由此得到的人源化抗hTfR抗体-hIDUA融合蛋白的高表达细胞株作为人源化抗hTfR抗体-hIDUA表达株。将该细胞株所表达的人源化抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白作为人源化抗hTfR抗体-hIDUA融合蛋白(人源化抗hTfR抗体-hIDUA)。

[0280] 将得到的人源化抗hTfR抗体-hIDUA表达株悬浮于含有10mg/L胰岛素、16 μ mol/L胸苷、100 μ mol/L次黄嘌呤、500 μ g/mL潮霉素B、10 μ g/mL嘌呤霉素、300 μ mol/L MSX和10% (v/v) DMSO的CD OPTI-CHOTM培养基后,分注于冻存管中,作为种细胞保存在液氮中。

[0281] [实施例3]人源化抗hTfR抗体-hIDUA表达株的培养

[0282] 为了获得人源化抗hTfR抗体-hIDUA,通过以下方法培养人源化抗hTfR抗体-hIDUA表达株。将实施例2中得到的人源化抗hTfR抗体-hIDUA表达株以细胞密度为约 3×10^5 个/mL的方式悬浮于含有10mg/L胰岛素、16 μ mol/L胸苷、100 μ mol/L次黄嘌呤的调节为pH6.9的约170L的无血清培养基(CD OPTI-CHOTM培养基,ThermoFisher SCIENTIFIC公司)。将该细胞悬浮液170L转移到培养槽中。将培养基用叶轮以约80~100rpm的速度搅拌而使培养基的溶解氧饱和度保持在约30%,在34~37 $^{\circ}$ C的温度范围将细胞培养约10天。在培养期间内监控细胞密度、细胞的生存率、培养基的葡萄糖浓度和乳酸浓度。在培养基的葡萄糖浓度为3.0g/L以下时立即向培养基中添加葡萄糖溶液以使葡萄糖浓度达到3.5g/L。在培养期间内,向培养基中适当添加补料液(EFFICIENTFEED A+TM,ThermoFisher SCIENTIFIC公司)。培养结束后回收培养基。将回收的培养基用MILLISTAK+HCTM Pod Filter grade D0HC(Merck公司)过滤,进一步用MILLISTAK+TM HCgrade X0HC(Merck公司)过滤,得到含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的培养上清。将该培养上清用PELLICONTM 3Cassette w/Ultracel PLCK膜(孔径:30kDa、膜面积:1.14m²、Merck公司)进行超滤,浓缩到液量达到约14分之一为止。接着,将该浓缩液用OPTICAPTM XL600(0.22 μ m,Merck公司)过滤。将得到的液体作为浓缩培养上清。

[0283] [实施例4]人源化抗hTfR抗体-hIDUA的纯化

[0284] 向实施例3中得到的浓缩培养上清中添加0.25倍容量的2M精氨酸溶液(pH 7.0)。将该溶液以100cm/小时的固定流速上样到用柱体积的4倍容量的含有400mM精氨酸的25mM MES缓冲液(pH6.5)进行了平衡化的CAPTURE SELECTTM CH1-XL柱(柱体积:约3.1L、柱床高度:约20cm、Thermo Fisher Scientific公司)中,使人源化抗hTfR抗体-hIDUA吸附于柱。CAPTURE SELECTTM CH1-XL柱为在载体上固定化有具有与IgG抗体的CH1结构域特异性结合的性质的配体的亲和柱。

[0285] 接着,以相同流速供给柱体积的5倍容量的相同缓冲液而清洗柱。接着以相同流速供给柱体积的3倍容量的25mM MES缓冲液(pH 6.5)进一步清洗柱。接着,用柱体积的5倍容量的10mM乙酸钠-HCl缓冲液(pH 3.5)洗脱吸附于柱的人源化抗hTfR抗体-hIDUA。洗脱液用预先加入了250mM MES缓冲液(pH 6.0)的容器接收并立即中和。

[0286] 向来自上述亲和柱的洗脱液中添加250mM MES缓冲液(pH 6.5),将洗脱液的pH调节为6.0。接着,将该洗脱液用OPTICAPTM XL600(孔径:0.22 μ m,Merck公司)过滤。将该过滤后的溶液以300cm/小时的固定流速上样到用柱体积的5倍容量的含有15mM NaCl的50mM MES缓冲液(pH 6.0)进行了平衡化的作为多模式阴离子交换柱的CAPTOTM adhere柱(柱体积:约1.5L、柱床高度:约10cm、GE Healthcare公司)中。回收含有该人源化抗hTfR抗体-hIDUA的上样液。CAPTOTM adhere以N-苄基-N-甲基乙醇胺为配体,因此是具有基于静电相互作用、氢键、疏水性相互作用等的选择性的强阴离子交换体。

[0287] 接着,以相同流速供给柱体积的5倍容量的相同缓冲液而清洗柱,回收该清洗液。

[0288] 将上述上样液和清洗液以200cm/小时的固定流速上样到用柱体积的4倍容量的含有300mM NaCl的25mM MES缓冲液(pH 6.5)进行了平衡化的作为多模式弱阳离子交换柱的CAPTOTM MMC柱(柱体积:约3.1L、柱床高度:约20cm、GE Healthcare公司)。CAPTOTM MMC为具有基于疏水性相互作用、氢键形成等的选择性的弱阳离子交换体。

[0289] 接着,以相同流速供给柱体积的5倍容量的相同缓冲液而清洗柱。接着,用柱体积的10倍容量的含有1M NaCl的25mM MES缓冲液(pH6.5)洗脱吸附于弱阳离子交换柱的人源化抗hTfR抗体-hIDUA。

[0290] 向来自上述弱阳离子交换柱的洗脱液中加入0.5倍容量的含有0.8mg/mL NaCl和75mg/mL蔗糖的20mM柠檬酸缓冲液(pH 5.5),将pH调节到5.8。接着,用PELLICONTM 3Cassette w/Ultracel PLCTK膜(孔径:30kDa、膜面积:0.57m²、Merck公司)进行超滤,浓缩至溶液中的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的浓度达到约30mg/mL为止。接着,将该浓缩液用OPTICAPTM XL600(0.22μm、Merck公司)过滤。

[0291] 将上述浓缩液以40cm/小时的固定流速上样到用柱体积的1.5倍容量的含有0.8mg/mL NaCl和75mg/mL蔗糖的20mM柠檬酸缓冲液(pH 5.5)进行了平衡化的作为尺寸排阻柱的BioSEC柱(柱体积:约9.4L、柱床高度:30cm、Merck公司)中,进而以相同流速供给相同缓冲液。此时,在来自尺寸排阻柱的洗脱液的流路中配置用于连续测定洗脱液的吸光度的吸光光度计,监测280nm的吸光度,回收在280nm下显示吸收峰的级分,作为含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的级分,将其作为人源化抗hTfR抗体-hIDUA纯化品。

[0292] [实施例5]含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的水性药物组合物的稳定性的研究1

[0293] 水性药物组合物中,为了提高作为主剂的蛋白质的稳定性或为了防止该蛋白质向容器的吸附,大多会添加非离子型表面活性剂,例如,生长激素的情况下,有添加了泊洛沙姆188作为非离子型表面活性剂的水性药物组合物。因此,为了对含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的水性药物组合物调查通过添加泊洛沙姆188而对蛋白质的稳定性带来的影响,实施了以下研究。

[0294] 使用实施例4中得到的人源化抗hTfR抗体-hIDUA纯化品制备含有氯化钠、柠檬酸缓冲剂、蔗糖、泊洛沙姆188和人源化抗hTfR抗体-hIDUA且仅泊洛沙姆188的浓度不同的表3所示的3种水性药物组合物。将这3种水性药物组合物(配方A~C)分别以2mL填充于玻璃管形瓶中,密封,用振荡机(SR-2S,タイテック公司)在室温下连续振荡24小时(振荡速度:240次往返/分钟,振幅:40mm)。利用实施例8中记载的方法测定振荡后的水性药物组合物中所包含的每单位液量(200μL)的粒子数(粒径:1~100μm)。另外,利用实施例9中记载的方法测定振荡后的水性药物组合物中所包含的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的含有率。进而,利用实施例10中记载的方法测定各水性药物组合物中所包含的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的分解物的含有率。

[0295] [表3]

[0296] 表3含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的水性药物组合物的组成

[0297]

成分	配方 A	配方 B	配方 C
人源化抗hTfR抗体-hIDUA	5	5	5
氯化钠	0.8	0.8	0.8
柠檬酸水合物	1.05	1.05	1.05
柠檬酸钠水合物	4.41	4.41	4.41
蔗糖	75	75	75
泊洛沙姆 188	0.25	0.5	0.8
pH	5.5	5.5	5.5

[0298] (以mg/mL来表示各添加物的浓度。)

[0299] 将水性药物组合物中所包含的粒子数的测定结果示于图1。获知：与泊洛沙姆188的浓度无关，振荡后的水性药物组合物中均含有大量粒径小于10 μ m的粒子。

[0300] 接着，考察水性药物组合物中所包含的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的含有率的测定结果。将其测定结果示于图2。与泊洛沙姆188的浓度无关，振荡后的水性药物组合物中均几乎不含聚合物。

[0301] 接着，考察水性药物组合物中所包含的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的分解物的含有率的测定结果。将其测定结果示于图3。与泊洛沙姆188的浓度无关，振荡后的水性药物组合物中均几乎不含分解物。

[0302] [实施例6]含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的水性药物组合物的稳定性的研究2

[0303] 另外，作为添加了非离子型表面活性剂的水性药物组合物，例如，达贝泊汀和阿加糖酶的情况下，有添加了聚山梨酯80作为非离子型表面活性剂的水性药物组合物。因此，为了对含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的水性药物组合物调查通过添加聚山梨酯80而对蛋白质的稳定性带来的影响，实施了以下研究。

[0304] 使用实施例4中得到的人源化抗hTfR抗体-hIDUA纯化品制备含有氯化钠、柠檬酸缓冲剂、蔗糖、聚山梨酯80和人源化抗hTfR抗体-hIDUA且仅聚山梨酯80的浓度不同的表4所示的6种水性药物组合物。将这6种水性药物组合物(配方D~I)分别以2mL填充于玻璃管形瓶，密封，用振荡机(SR-2S，タイテック公司)在室温下连续振荡24小时(振荡速度：240次往返/分钟，振幅：40mm)。利用实施例8中记载的方法测定振荡后的水性药物组合物中所包含的每单位液量(200 μ L)的粒子数(粒径：1~100 μ m)。另外，利用实施例9中记载的方法测定振荡后的水性药物组合物中所包含的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的含有率。进而，利用实施例10中记载的方法测定各水性药物组合物中所包含的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的分解物的含有率。

[0305] [表4]

[0306] 表4含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的水性药物组合物的组成

[0307]

成分	配方 D	配方 E	配方 F	配方 G	配方 H	配方 I
人源化抗hTfR抗体-hIDUA	5	5	5	5	5	5
氯化钠	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
柠檬酸水合物	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05
柠檬酸钠水合物	4.41	4.41	4.41	4.41	4.41	4.41
蔗糖	75	75	75	75	75	75
聚山梨酯80	0.025	0.05	0.1	0.25	0.5	0.8
pH	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5

[0308] (以mg/mL来表示各添加物的浓度。)

[0309] 将水性药物组合物中所包含的粒子数的测定结果示于图4。获知：将聚山梨酯80的浓度设为0.25mg/mL以上时，与将聚山梨酯80的浓度设为0.1mg/mL以下时相比，振荡后的水性药物组合物中所包含的粒径小于10 μ m的粒子数显著少。

[0310] 接着，考察水性药物组合物中所包含的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的含有率的测定结果。其测定结果示于图5。聚山梨酯80的浓度越高则振荡后的水性药物组合物中的聚合物量越少，将聚山梨酯80的浓度设为0.5mg/mL以上时，水性药物组合物中几乎确认不到聚合物。

[0311] 接着，考察水性药物组合物中所包含的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的分解物的含有率的测定结果。将其测定结果示于图6。与聚山梨酯80的浓度无关，振荡后的水性药物组合物中均几乎确认不到分解物。

[0312] 由实施例5和上述的结果可认为，为了抑制水性药物组合物中的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的产生，添加泊洛沙姆188是有效的，为了抑制粒径小于10 μ m的微粒的增加，添加聚山梨酯80是有效的，即，对于水性药物组合物的稳定性，各表面活性剂具有不同的效果。

[0313] [实施例7]含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的水性药物组合物的稳定性的研究3

[0314] 使用实施例4中得到的人源化抗hTfR抗体-hIDUA纯化品制备含有氯化钠、柠檬酸缓冲剂、蔗糖、泊洛沙姆188、聚山梨酯80和人源化抗hTfR抗体-hIDUA且仅聚山梨酯80的浓度不同的表5所示的5种水性药物组合物。将这5种水性药物组合物(配方J~N)分别以2mL填充于玻璃管形瓶中，密封，用振荡机(SR-2S, タイテック公司)在室温下连续振荡24小时(振荡速度：240次往返/分钟，振幅：40mm)。利用实施例8中记载的方法测定振荡后的水性药物组合物中所包含的每单位液量(200 μ L)的粒子数(粒径：1~100 μ m)。另外，利用实施例9中记载的方法测定振荡后的水性药物组合物中所包含的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的含有率。进而，利用实施例10中记载的方法测定各水性药物组合物中所包含的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的分解物的含有率。

[0315] [表5]

[0316] 表5含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的水性药物组合物的组成

[0317]

成分	配方 J	配方 K	配方 L	配方 M	配方 N
人源化抗hTfR抗体-hIDUA	5	5	5	5	5
氯化钠	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
柠檬酸水合物	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05
柠檬酸钠水合物	4.41	4.41	4.41	4.41	4.41
蔗糖	75	75	75	75	75
泊洛沙姆 188	0.325	0.325	0.325	0.325	0.325
聚山梨酯80	0.025	0.05	0.1	0.25	0.5
pH	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5

[0318] (以mg/mL来表示各添加物的浓度。)

[0319] 将水性药物组合物中所包含的粒子数的测定结果示于图7。获知:将聚山梨酯80的浓度设为0.05mg/mL以上时,与将聚山梨酯80的浓度设为0.025mg/mL时相比,振荡后的水性药物组合物中所包含的粒径小于10 μ m的粒子数少。

[0320] 接着,考察水性药物组合物中所包含的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的含有率的测定结果。将其测定结果示于图8。与聚山梨酯80的浓度无关,水性药物组合物中几乎确认不到聚合物。

[0321] 接着,考察水性药物组合物中所包含的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的分解物的含有率的测定结果。将其测定结果示于图9。与聚山梨酯80的浓度无关,振荡后的水性药物组合物中均几乎确认不到分解物。

[0322] 根据上述结果判明,为了同时抑制水性药物组合物中的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的产生和粒径小于10 μ m的微粒的增加,添加泊洛沙姆188和聚山梨酯80这两者是有有效的,为了抑制粒径小于10 μ m的微粒的增加,添加聚山梨酯80是有有效的。但是,水性药物组合物要作为药剂给药于人,因此泊洛沙姆188和聚山梨酯80的浓度优选设定得较低。例如,可以通过将水性药物组合物中的泊洛沙姆188和聚山梨酯80的浓度分别设在0.15~0.5mg/mL和0.025~0.125mg/mL的范围来制成稳定的水性药物组合物。

[0323] [实施例8]水性药物组合物中所包含的粒子数(粒径:1~100 μ m)的测定

[0324] 水性药物组合物中所包含的粒子数的测定使用流式成像颗粒分析装置FLOWCAM™(フルイド・イメージング・テクノロジーズ公司)来进行。流式成像颗粒分析装置是如下装置:将样品溶液通过注射泵引入与光学系统正交的流动池中,对从流动池中通过的粒子进行实时拍摄,从而能够测定样品溶液中所包含的粒子数。测定中,将要检测的粒子尺寸设为1~100 μ m来进行。

[0325] [实施例9]水性药物组合物中所包含的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的含有率的测定

[0326] 在岛津HPLC系统LC-20A(岛津制作所)中设置作为尺寸排阻色谱柱的TSKgel G3000SW_{XL} 5 μ m柱(7.8mm直径×30cm长,TOSOH公司)。另外,在柱的下游设置吸光光度计,以能够连续测定来自柱的流出液的吸光度(测定波长215nm)。用0.2M磷酸钠缓冲水溶液将柱平衡化后,将含有10 μ g人源化抗hTfR抗体-hIDUA的样品溶液上样到柱中,进而以0.6mL/分

钟的流速通入0.2M磷酸钠缓冲水溶液。在此期间,通过测定来自柱的流出液的吸光度(测定波长215nm)而得到洗脱曲线。根据得到的洗脱曲线求出人源化抗hTfR抗体-hIDUA的单体的峰面积(单体峰面积)和比该单体峰先出现的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的峰面积(聚合物峰面积)、比该单体峰晚出现的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的分解物的峰面积(分解物峰面积)。通过下式求出聚合物的含有率(%)。

[0327] 聚合物的含有率(%) = {聚合物峰面积/(单体峰面积+聚合物峰面积+分解物峰面积)} × 100

[0328] [实施例10]水性药物组合物中所包含的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的分解物的含有率的测定

[0329] 在岛津HPLC系统LC-20A(岛津制作所)中设置作为尺寸排阻色谱柱的TSKgel G3000SW_{XL} 5μm柱(7.8mm直径×30cm长,TOSO公司)。另外,在柱的下游设置吸光光度计,以能够连续测定来自柱的流出液的吸光度(测定波长215nm)。用0.2M磷酸钠缓冲水溶液将柱平衡化后,将含有10μg人源化抗hTfR抗体-hIDUA的样品溶液上样到柱中,进而以0.6mL/分钟的流速通入0.2M磷酸钠缓冲水溶液。在此期间,通过测定来自柱的流出液的吸光度(测定波长215nm)而得到洗脱曲线。根据得到的洗脱曲线求出人源化抗hTfR抗体-hIDUA的单体的峰面积(单体峰面积)和比该单体峰先出现的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的峰面积(聚合物峰面积)、比该单体峰晚出现的人源化抗hTfR抗体-hIDUA的分解物的峰面积(分解物峰面积)。通过下式求出分解物的含有率(%)。

[0330] 分解物的含有率(%) = {分解物峰面积/(单体峰面积+聚合物峰面积+分解物峰面积)} × 100

[0331] [实施例11]水性药物组合物的制剂设计

[0332] 基于上述实施例5~7中所示的研究结果,作为含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的水性药物组合物的制剂实施例,设计了具有表6所示的组成的水性药物组合物(配方0)。将该水性药物组合物以1~10mL的液量填充、封入到玻璃制或塑料制的管形瓶、安瓶或注射器中,在低温(例如4℃)下储藏。将其填充、封入到注射器而成的制剂为预充注射器型制剂。

[0333] [表6]

[0334] 表6含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的水性药物组合物的组成

[0335]

成分	配方 O
人源化抗hTfR抗体-hIDUA	5
氯化钠	0.8
柠檬酸水合物	1.05
柠檬酸钠水合物	4.41
蔗糖	75
泊洛沙姆 188	0.325
聚山梨酯80	0.075
pH	5.5

[0336] (以mg/mL来表示各添加物的农度。)

[0337] [实施例12]水性药物组合物的长期保存试验

[0338] 作为含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的水性药物组合物,将配方O以2mL填充于玻璃管形瓶中,在2~8℃的温度下在暗处保存。在保存期内,连续地测定溶液的pH、每单位液量(200μL)的粒子数(粒径:1~100μm)、人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的含有率和人源化抗hTfR抗体-hIDUA的分解物的含有率。粒子数的测定通过实施例8中记载的方法来进行测定,人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的含有率通过实施例9中记载的方法来进行测定,人源化抗hTfR抗体-hIDUA的分解物的含有率通过实施例10中记载的方法来进行测定。

[0339] 表7示出含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的水性药物组合物配方O的长期保存试验的结果。在保存开始时、保存开始1个月后、2个月后、3个月后、6个月后、9个月后、12个月后、18个月后、24个月后和36个月后测定溶液的pH、每单位液量(200μL)的粒子数(粒径:1~100μm)、人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的含有率和人源化抗hTfR抗体-hIDUA的分解物的含有率。在长期保存试验的保存期内,pH、粒子数、聚合物(%)和分解物(%)几乎未发生变化。这些结果表明,含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的水性药物组合物配方O在2~8℃的温度下在暗处至少36个月内是稳定的,另外,预测在保存开始72个月后就稳定。

[0340] [表7]

[0341] 表7含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的水性药物组合物配方O的长期保存试验的结果

[0342]

经过时刻	pH	粒子数 (粒径<10 μm)	粒子数 (粒径≥10 μm)	聚合物 (%)	分解物 (%)
保存开始时	5.51	859	69	0.16	0.11
1个月	5.50	137	11	0.20	0.12
2个月	5.50	736	6	0.25	0.14
3个月	5.50	257	6	0.23	0.15
6个月	5.50	1877	40	0.19	0.20
9个月	5.51	20720	287	0.19	0.27
12个月	5.50	7667	97	0.17	0.26
18个月	5.48	509	0	0.21	0.37
24个月	5.48	3564	58	0.17	0.43
36个月	5.50	1785	53	0.24	0.56

[0343] [实施例13]冷冻干燥药物组合物的制造

[0344] 将含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的水性药物组合物配方0以2.4mL填充于玻璃管形瓶中,用橡胶塞(氯丁橡胶制)半塞并冷冻干燥。在冷冻干燥工序中,将管形瓶内的气相置换为氮气后用橡胶塞全塞,从而将管形瓶密封。得到的冷冻干燥品在管形瓶中形成白色的块。得到的冷冻干燥品可以通过向管形瓶中加入纯水并振荡而形成2.4mL的溶液,从而复原成原来的水性药物组合物。

[0345] [实施例14]冷冻干燥药物组合物的长期保存试验

[0346] 将实施例13中得到的含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的冷冻干燥药物组合物配方0在2~8℃的温度下在暗处保存。在保存期内,连续地测定通过将冷冻干燥药物组合物溶解于纯水而得到的溶液的pH、每单位液量(200μL)的粒子数(粒径:1~100μm)、人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的含有率和人源化抗hTfR抗体-hIDUA的分解物的含有率。粒子数的测定通过实施例8中记载的方法来进行测定,人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的含有率通过实施例9中记载的方法来进行测定,人源化抗hTfR抗体-hIDUA的分解物的含有率通过实施例10中记载的方法来进行测定。

[0347] 表8示出含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的配方0的冷冻干燥药物组合物的长期保存试验的结果。在保存开始时、保存开始1个月、2个月、3个月、6个月、9个月、12个月、18个月、24个月和36个月后测定溶液的pH、每单位液量(200μL)的粒子数(粒径:1~100μm)、人源化抗hTfR抗体-hIDUA的聚合物的含有率和人源化抗hTfR抗体-hIDUA的分解物的含有率。在长期保存试验的保存期内,pH、粒子数、聚合物(%)和分解物(%)几乎未发生变化。这些结果表明,含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的冷冻干燥药物组合物配方0在2~8℃的温度下在暗处至少36个月内是稳定的,另外,预测在保存开始72个月也稳定。

[0348] [表8]

[0349] 表8含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的冷冻干燥药物组合物配方0的长期保存试验的结果

[0350]

经过时刻	pH	粒子数 (粒径<10 μm)	粒子数 (粒径≥10 μm)	聚合物 (%)	分解物 (%)
保存开始时	5.51	561	6	0.16	0.10
1个月	5.51	166	0	0.20	0.10
2个月	5.51	1280	34	0.24	0.11
3个月	5.50	355	0	0.20	0.10
6个月	5.50	1923	40	0.17	0.11
9个月	5.51	6553	80	0.18	0.15
12个月	5.50	755	11	0.15	0.09
18个月	5.49	316	18	0.16	0.06
24个月	5.48	807	6	0.16	0.05
36个月	5.41	533	0	0.22	0.03

[0351] 产业上的可利用性

[0352] 根据本发明,可以向市场供给含有具有生理活性的蛋白质作为有效成分的水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物。

[0353] 序列表自由文本

[0354] 序列号1:接头例1的氨基酸序列

[0355] 序列号2:接头例2的氨基酸序列

[0356] 序列号3:接头例3的氨基酸序列

[0357] 序列号4:接头例4的氨基酸序列

[0358] 序列号5:人转铁蛋白受体的氨基酸序列

[0359] 序列号6:人IDUA的氨基酸序列1

[0360] 序列号7:人IDUA的氨基酸序列2

[0361] 序列号8:抗hTfR抗体的轻链CDR1的氨基酸序列1

[0362] 序列号9:抗hTfR抗体的轻链CDR1的氨基酸序列2

[0363] 序列号10:抗hTfR抗体的轻链CDR2的氨基酸序列1

[0364] 序列号11:抗hTfR抗体的轻链CDR2的氨基酸序列2

[0365] 序列号12:抗hTfR抗体的轻链CDR3的氨基酸序列1

[0366] 序列号13:抗hTfR抗体的重链CDR1的氨基酸序列1

[0367] 序列号14:抗hTfR抗体的重链CDR1的氨基酸序列2

[0368] 序列号15:抗hTfR抗体的重链CDR2的氨基酸序列1

[0369] 序列号16:抗hTfR抗体的重链CDR2的氨基酸序列2

[0370] 序列号17:抗hTfR抗体的重链CDR3的氨基酸序列1

[0371] 序列号18:抗hTfR抗体的重链CDR3的氨基酸序列2

[0372] 序列号19:抗hTfR抗体的重链框架区3的氨基酸序列

[0373] 序列号20:抗hTfR抗体的轻链的可变区的氨基酸序列

[0374] 序列号21:抗hTfR抗体的重链的可变区的氨基酸序列

[0375] 序列号22:抗hTfR抗体的轻链的氨基酸序列

[0376] 序列号23:抗hTfR抗体的Fab重链的氨基酸序列

[0377] 序列号24:引物Hyg-Sfi5',合成序列

[0378] 序列号25:引物Hyg-BstX3',合成序列

- [0379] 序列号26:编码抗hTfR抗体的轻链的氨基酸序列的碱基序列,合成序列
- [0380] 序列号27:人源化抗hTfR抗体的Fab重链与人IDUA的融合蛋白的氨基酸序列
- [0381] 序列号28:含有编码人源化抗hTfR抗体的Fab重链与人IDUA的融合蛋白的氨基酸序列的基因的碱基序列,合成序列
- [0382] 序列号29:引物IRES5',合成序列
- [0383] 序列号30:引物IRES3',合成序列
- [0384] 序列号31:引物mPGKP5',合成序列
- [0385] 序列号32:引物mPGKP3',合成序列
- [0386] 序列号33:引物GS5',合成序列
- [0387] 序列号34:引物GS3',合成序列
- [0388] 序列号35:引物puro5',合成序列
- [0389] 序列号36:引物puro3',合成序列
- [0390] 序列号37:引物SV40polyA5',合成序列
- [0391] 序列号38:引物SV40polyA3',合成序列
- [0392] 序列号39:引物mIRES-GS5',合成序列
- [0393] 序列号40:引物mIRES-GS3',合成序列
- [0394] 序列号41:CMVE-EF-1 α p-IFN β MAR,合成序列
- [0395] 序列号42:IRES-HygroR-mPGKpA,合成序列

序列表

<110>

JCR制药股份有限公司(JCR Pharmaceuticals Co., Ltd.)

<120> 稳定的水性药物组合物或冷冻干燥药物组合物(Stable liquid pharmaceutical composition and lyophilized pharmaceutical composition)

<130> 1230JP

<150> JP 2021-049485

<151> 2021-03-24

<160> 42

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of an exemplified linker 1

<400> 1

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of an exemplified linker 2

<400> 2

Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of an exemplified linker 3

<400> 3

Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of an exemplified linker 4

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 5

<211> 760

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu

1 5 10 15

Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp

20 25 30

Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Val Asp Glu Glu Glu Asn Ala

35 40 45

Asp Asn Asn Thr Lys Ala Asn Val Thr Lys Pro Lys Arg Cys Ser Gly

50 55 60

Ser Ile Cys Tyr Gly Thr Ile Ala Val Ile Val Phe Phe Leu Ile Gly

65 70 75 80

Phe Met Ile Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr

85 90 95

Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro

100 105 110

Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys

115 120 125

Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile

130 135 140

Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln

145 150 155 160

Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe

165 170 175

Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val

180 185 190

Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg

195 200 205

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

515	520	525
Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe		
530	535	540
Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp		
545	550	555
Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu		
565	570	575
Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu		
580	585	590
Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn		
595	600	605
Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp		
610	615	620
Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln		
625	630	635
Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu		
645	650	655
Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys		
660	665	670
Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro		
675	680	685
Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser		
690	695	700
Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys		
705	710	715
Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala		
725	730	735
Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp		
740	745	750
Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe		
755	760	
<210> 6		
<211> 628		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 6		
Ala Glu Ala Pro His Leu Val His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp		
1	5	10
Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro		

20	25	30
His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn		
35	40	45
Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg		
50	55	60
Thr His Trp Leu Leu Glu Leu Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg		
65	70	75
Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu		
85	90	95
Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser		
100	105	110
Gly His Phe Thr Asp Phe Glu Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys		
115	120	125
Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu		
130	135	140
Ala His Val Ser Lys Trp Asn Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His		
145	150	155
His Asp Phe Asp Asn Val Ser Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr		
165	170	175
Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg		
180	185	190
Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu		
195	200	205
Ser Trp Gly Leu Leu Arg His Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr		
210	215	220
Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly		
225	230	235
Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln		
245	250	255
Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn		
260	265	270
Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg		
275	280	285
Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His		
290	295	300
Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu		
305	310	315
Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala		
325	330	335

Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro		
340	345	350
His Val Gln Leu Leu Arg Lys Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu		
355	360	365
Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly		
370	375	380
Thr Val Leu Asp Ser Asn His Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His		
385	390	395
Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr		
405	410	415
Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr		
420	425	430
Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr		
435	440	445
Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg		
450	455	460
Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg		
465	470	475
Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly		
485	490	495
Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu		
500	505	510
Val His Val Cys Ala Arg Pro Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg		
515	520	525
Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser		
530	535	540
Asp Glu His Val Gly Ser Lys Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe		
545	550	555
Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr		
565	570	575
Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser		
580	585	590
Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser		
595	600	605
Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser		
610	615	620
Pro Gly Asn Pro		
625		
<210>	7	

<211> 626
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 Ala Pro His Leu Val His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu
 1 5 10 15
 Arg Arg Phe Trp Arg Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser
 20 25 30
 Gln Ala Asp Gln Tyr Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala
 35 40 45
 Tyr Val Gly Ala Val Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His
 50 55 60
 Trp Leu Leu Glu Leu Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu
 65 70 75 80
 Ser Tyr Asn Phe Thr His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu
 85 90 95
 Asn Gln Leu Leu Pro Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His
 100 105 110
 Phe Thr Asp Phe Glu Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu
 115 120 125
 Val Ser Ser Leu Ala Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His
 130 135 140
 Val Ser Lys Trp Asn Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp
 145 150 155 160
 Phe Asp Asn Val Ser Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp
 165 170 175
 Ala Cys Ser Glu Gly Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly
 180 185 190
 Gly Pro Gly Asp Ser Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp
 195 200 205
 Gly Leu Leu Arg His Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu
 210 215 220
 Ala Gly Val Arg Leu Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg
 225 230 235 240
 Ser Ser Ile Ser Ile Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile
 245 250 255
 Arg Gln Leu Phe Pro Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu
 260 265 270
 Ala Asp Pro Leu Val Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp

275	280	285
Val Thr Tyr Ala Ala Met	Val Val Lys Val Ile Ala	Gln His Gln Asn
290	295	300
Leu Leu Leu Ala Asn Thr	Thr Ser Ala Phe Pro Tyr	Ala Leu Leu Ser
305	310	315
Asn Asp Asn Ala Phe Leu	Ser Tyr His Pro His	Pro Phe Ala Gln Arg
325	330	335
Thr Leu Thr Ala Arg Phe	Gln Val Asn Asn Thr	Arg Pro Pro His Val
340	345	350
Gln Leu Leu Arg Lys Pro	Val Leu Thr Ala Met Gly	Leu Leu Ala Leu
355	360	365
Leu Asp Glu Glu Gln Leu	Trp Ala Glu Val Ser Gln	Ala Gly Thr Val
370	375	380
Leu Asp Ser Asn His Thr	Val Gly Val Leu Ala Ser	Ala His Arg Pro
385	390	395
Gln Gly Pro Ala Asp Ala	Trp Arg Ala Ala Val	Leu Ile Tyr Ala Ser
405	410	415
Asp Asp Thr Arg Ala His	Pro Asn Arg Ser Val	Ala Val Thr Leu Arg
420	425	430
Leu Arg Gly Val Pro Pro	Gly Pro Gly Leu Val Tyr	Val Thr Arg Tyr
435	440	445
Leu Asp Asn Gly Leu Cys	Ser Pro Asp Gly Glu Trp	Arg Arg Leu Gly
450	455	460
Arg Pro Val Phe Pro Thr	Ala Glu Gln Phe Arg Arg	Met Arg Ala Ala
465	470	475
Glu Asp Pro Val Ala Ala	Ala Pro Arg Pro Leu Pro	Ala Gly Gly Arg
485	490	495
Leu Thr Leu Arg Pro Ala	Leu Arg Leu Pro Ser Leu	Leu Leu Val His
500	505	510
Val Cys Ala Arg Pro Glu	Lys Pro Pro Gly Gln Val	Thr Arg Leu Arg
515	520	525
Ala Leu Pro Leu Thr Gln	Gly Gln Leu Val Leu Val	Trp Ser Asp Glu
530	535	540
His Val Gly Ser Lys Cys	Leu Trp Thr Tyr Glu Ile	Gln Phe Ser Gln
545	550	555
Asp Gly Lys Ala Tyr Thr	Pro Val Ser Arg Lys Pro	Ser Thr Phe Asn
565	570	575
Leu Phe Val Phe Ser Pro	Asp Thr Gly Ala Val Ser	Gly Ser Tyr Arg
580	585	590

Val Arg Ala Leu Asp Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro
595 600 605

Val Pro Tyr Leu Glu Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly
610 615 620

Asn Pro
625

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence 1 of CDR 1 in the light chain of anti-hTfR
antibody

<400> 8

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence 2 of CDR 1 in the light chain of anti-hTfR
antibody

<400> 9

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence 1 of CDR 2 in the light chain of anti-hTfR
antibody

<400> 10

Lys Val Ser Asn Arg Phe
1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Amino acid sequence 2 of CDR 2 in the light chain of anti-hTfR antibody
<400> 11
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Amino acid sequence of CDR 3 in the light chain of anti-hTfR antibody
<400> 12
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5
<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Amino acid sequence 1 of CDR1 in the heavy chain of anti-hTfR antibody
<400> 13
Gly Tyr Ser Phe Met Asn Tyr Trp
1 5
<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Amino acid sequence 2 of CDR1 in the heavy chain of anti-hTfR antibody
<400> 14
Gly Tyr Ser Phe Met Asn Tyr Trp Leu Gly
1 5 10
<210> 15
<211> 8

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Amino acid sequence 1 of CDR 2 in the heavy chain of anti-hTfR antibody
<400> 15
Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Pro
1 5
<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Amino acid sequence 2 of CDR 2 in the heavy chain of anti-hTfR antibody
<400> 16
Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Pro Thr Tyr Ser Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Val
<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Amino acid sequence 1 of CDR 3 in the heavy chain of anti-hTfR antibody
<400> 17
Ser Gly Asn Tyr Asp Glu Val Ala Tyr
1 5
<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Amino acid sequence 2 of CDR 3 in the heavy chain of anti-hTfR antibody
<400> 18
Ala Arg Ser Gly Asn Tyr Asp Glu Val Ala Tyr
1 5 10

<210> 19
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Amino acid sequence of framework region 3 in the heavy chain of anti-hTfR antibody
 <400> 19
 Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 <210> 20
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Amino acid sequence of the variable region of the light chain of anti-hTfR antibody
 <400> 20
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 21
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Amino acid sequence of the variable region of the heavy chain of anti-hTfR antibody

<400> 21

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

<210> 22

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of the light chain of anti-hTfR antibody

<400> 22

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

	100		105		110
Arg Thr Val	Ala Ala Pro Ser	Val Phe Ile Phe	Pro Pro Ser	Asp Glu	
115		120		125	
Gln Leu Lys	Ser Gly Thr Ala	Ser Val Val Cys	Leu Leu Asn	Asn Phe	
130		135		140	
Tyr Pro Arg	Glu Ala Lys Val	Gln Trp Lys Val	Asp Asn Ala	Leu Gln	
145		150		155	
Ser Gly Asn	Ser Gln Glu Ser	Val Thr Glu Gln	Asp Ser Lys	Asp Ser	
	165		170		175
Thr Tyr Ser	Leu Ser Ser Thr	Leu Thr Leu Ser	Lys Ala Asp	Tyr Glu	
	180		185		190
Lys His Lys	Val Tyr Ala Cys	Glu Val Thr His	Gln Gly Leu	Ser Ser	
195		200		205	
Pro Val Thr	Lys Ser Phe Asn	Arg Gly Glu Cys			
210		215			
<210>	23				
<211>	226				
<212>	PRT				
<213>	Artificial Sequence				
<220>					
<223>	Amino acid sequence of Fab-heavy chain of anti-hTfR antibody				
<400>	23				
Glu Val Gln	Leu Val Gln Ser	Gly Ala Glu Val	Lys Lys Pro	Gly Glu	
1	5	10	15		
Ser Leu Lys	Ile Ser Cys Lys	Gly Ser Gly Tyr	Ser Phe Met	Asn Tyr	
	20	25	30		
Trp Leu Gly	Trp Val Arg Gln	Met Pro Gly Lys	Gly Leu Glu	Trp Met	
	35	40	45		
Gly Asp Ile	Tyr Pro Gly Gly	Asp Tyr Pro Thr	Tyr Ser Glu	Lys Phe	
50	55	60			
Lys Val Gln	Val Thr Ile Ser	Ala Asp Lys Ser	Ile Ser Thr	Ala Tyr	
65	70	75	80		
Leu Gln Leu	Ser Ser Leu Lys	Ala Ser Asp Thr	Ala Met Tyr	Tyr Cys	
	85	90	95		
Ala Arg Ser	Gly Asn Tyr Asp	Glu Val Ala Tyr	Trp Gly Gln	Gly Thr	
	100	105	110		
Leu Val Thr	Val Ser Ser Ala	Ser Thr Lys Gly	Pro Ser Val	Phe Pro	
	115	120	125		
Leu Ala Pro	Ser Ser Lys Ser	Thr Ser Gly Gly	Thr Ala Ala	Leu Gly	

130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
210	215	220
His Thr		
225		
<210> 24		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Primer Hyg-Sfi5', synthetic sequence		
<400> 24		
gaggccgcct cggcctctga		20
<210> 25		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Primer Hyg-BstX3', synthetic sequence		
<400> 25		
aaccatcgtg atgggtgcta ttcctttgc		29
<210> 26		
<211> 740		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Nucleotide sequence encoding the amino acid sequence of the light chain of anti-hTfR antibody, synthetic sequence		
<400> 26		
acgcgtgccg ccaccatggg ctggagctgg attctgctgt tcctcctgag cgtgacagca		60
ggagtgcaca gcgacatcgt gatgaccag actcccctga gcctgagcgt gacacctggc		120

cagcctgcca gcatcagctg cagaagctct cagagcctgg tgcacagcaa cggcaacacc 180
 tacctgcact ggtatctgca gaagcccggc cagagccctc agctgctgat ctacaaggtg 240
 tccaacagat tcagcggcgt gcccacaga ttctccggca gcggctctgg caccgacttc 300
 accctgaaga tttccagagt ggaagccgag gacgtgggcg tgtactactg cagccagagc 360
 acccacgtgc cctggacatt cggccagggc accaaggtgg aaatcaagag aaccgtggcc 420
 gctcccagcg tgttcatctt cccacctagc gacgagcagc tgaagtccgg cacagcctct 480
 gtcgtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac 540
 aacgccctgc agagcggcaa cagccaggaa agcgtgaccg agcaggactc caaggacagc 600
 acctacagcc tgagcagcac cctgacctg agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg 660
 tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg tctagccccg tgaccaagag cttcaacaga 720
 ggcgagtgt aagcggccgc 740

<210> 27

<211> 869

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of fusion protein of the Fab-heavy chain of anti-hTfR antibody and hIDUA

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Met Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Leu Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Pro Thr Tyr Ser Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Val Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Asn Tyr Asp Glu Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
210	215	220
His Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
225	230	235
Ser Ala Glu Ala Pro His Leu Val His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu		
245	250	255
Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu		
260	265	270
Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu		
275	280	285
Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val		
290	295	300
Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly		
305	310	315
Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu		
325	330	335
Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala		
340	345	350
Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp		
355	360	365
Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly		
370	375	380
Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp		
385	390	395
His His Asp Phe Asp Asn Val Ser Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn		
405	410	415
Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu		
420	425	430
Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro		
435	440	445
Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe		
450	455	460
Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys		

465	470	475	480
Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala			
	485	490	495
Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr			
500	505	510	
Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp			
515	520	525	
Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln			
530	535	540	
His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala			
545	550	555	560
Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe			
565	570	575	
Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro			
580	585	590	
Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu			
595	600	605	
Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala			
610	615	620	
Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala			
625	630	635	640
His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile			
645	650	655	
Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val			
660	665	670	
Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val			
675	680	685	
Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg			
690	695	700	
Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met			
705	710	715	720
Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala			
725	730	735	
Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu			
740	745	750	
Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr			
755	760	765	
Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp			
770	775	780	

Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln
 785 790 795 800
 Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser
 805 810 815
 Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly
 820 825 830
 Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe
 835 840 845
 Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro
 850 855 860

Ser Pro Gly Asn Pro
 865

<210> 28

<211> 2688

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleotide seuquence encoding the amino acid sequence of fusion
 protein of the Fab-heavy chain of anti-hTfR antibody and hIDUA,
 synthetic sequence

<400> 28

acgcgtcgcc accatgggtt ggagcctcat cttgctcttc cttgtcgctg ttgctacgcg	60
agtcggcagc gaggtgcaac tagtgagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc	120
tctgaagatt tcctgtaagg gttctggata cagctttatg aactactggc tgggatgggt	180
gcgccagatg cccgggaaag gcctggagtg gatgggggac atctaccccg gcggagacta	240
ccctacatac agcgagaagt tcaaggtcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag	300
caccgcctac ctgcagttga gcagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc	360
gagatcaggc aattacgacg aagtggccta ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtctc	420
ctcagctagc accaagggcc catcggtctt ccccttgga cctcctcca agagcacctc	480
tgggggcaca gcggccctgg gctgcttgg caaggactac ttccccgaac cggtagcggg	540
gtcgtggaac tcaggcggcc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc	600
ctcaggactc tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca	660
gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga	720
gccgaagagc tgtgataaga cgcatacggg tggcggaggg tctggaggtg gcggatcagg	780
cggaggtgga tctgccgagg ccccgccact ggtgcacgtg gacgcggccc gcgcgctgtg	840
gccccgcgg cgcttctgga ggagcacagg cttctgcccc ccgctgccac acagccaggc	900
tgaccagtac gtcctcagct gggaccagca gctcaacctc gcctatgtgg gcgccgtccc	960
tcaccgcggc atcaagcagg tccggaccca ctggctgctg gagcttgtca ccaccagggg	1020
gtccactgga cggggcctga gctacaactt caccacactg gacgggtact tggaccttct	1080

cagggagaac cagctcctcc cagggtttga gctgatgggc agcgccctcg gccacttcac	1140
tgactttgag gacaagcagc aggtgtttga gtggaaggac ttggtctcca gcctggccag	1200
gagatacatc ggtaggtacg gactggcgca tgtttccaag tggaacttcg agacgtggaa	1260
ttagccagac caccacgact ttgacaacgt ctccatgacc atgcaaggct tcctgaacta	1320
ctacgatgcc tgctcggagg gtctgcgcgc cgccagcccc gccctgcggc tgggaggccc	1380
cggcgactcc ttccacaccc caccgcgac cccgctgagc tggggcctcc tgcgccactg	1440
ccacgacggt accaacttct tcaactgggga ggcgggcgtg cggctggact acatctccct	1500
ccacaggaag ggtgcgcgca gctccatctc catcctggag caggagaagg tcgtcgcgca	1560
gcagatccgg cagctcttcc ccaagtctgc ggacaccccc atttacaacg acgaggcgga	1620
cccgtggtg ggctggtccc tgccacagcc gtggaggggc gacgtgacct acgcggccat	1680
ggtggtgaag gtcatcgcgc agcatcagaa cctgctactg gccaacacca cctccgcctt	1740
cccctacgcg ctccctgagca acgacaatgc ctccctgagc taccaccgc accccttcgc	1800
gcagcgacg ctccaccgcgc gcttccaggt caacaacacc cgcccgccgc acgtgcagct	1860
gttgcgcaag ccggtgctca cggccatggg gctgctggcg ctgctggatg aggagcagct	1920
ctggggccgaa gtgtcgcagg ccgggaccgt cctggacagc aaccacacgg tgggcgtcct	1980
ggccagcgcc caccgcccc agggccccgc cgacgcctgg cgcgcccgcg tgctgatcta	2040
cgcgagcgac gacacccgcg cccaccccaa ccgcagcgtc gcggtgacct tgcggctgcg	2100
cgggggtgccc cccggccccg gcctggtcta cgtcacgcgc tacctggaca acgggctctg	2160
cagccccgac ggcgagtggc ggcgccctgg ccggcccgtc ttccccacgg cagagcagtt	2220
ccggcgcatg cgcgcggtg aggacccggt ggccgcggcg ccccgccccct taccgcgcg	2280
tggccgcctg accctgcgcc ccgcgctgcg gctgccgtcg cttttgctgg tgcacgtgtg	2340
tgcgcgcccc gagaagccgc ccgggcaggt cacgcggctc cgcgccctgc ccctgaccca	2400
agggcagctg gttctggtct ggtcggatga acacgtgggc tccaagtgcc tgtggacata	2460
cgagatccag ttctctcagg acggttaagg gtacaccccg gtcagcagga agccatcgac	2520
cttcaacctc tttgtgttca gccagacac aggtgctgtc tctggctcct accgagttcg	2580
agccctggac tactgggccc gaccaggccc cttctcggac cctgtgccgt acctggaggt	2640
ccctgtgcca agagggcccc catccccggg caatccataa gcggccgc	2688
<210> 29	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer IRES5', synthetic sequence	
<400> 29	
caactcgagc ggccgcccc cccccctctc cctccccccc ccctaacgtt act	53
<210> 30	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220>	
<223> Primer IRES3', synthetic sequence	
<400> 30	
caagaagctt ccagaggaac tg	22
<210> 31	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer mPGKP5', synthetic sequence	
<400> 31	
gcgagatctt accgggtagg ggaggcgctt	30
<210> 32	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer mPGKP3', synthetic sequence	
<400> 32	
gaggaattcg atgatcggtc gaaaggcccc	30
<210> 33	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer GS5', synthetic sequence	
<400> 33	
aatatggcca caaccatggc gacctcagca agttcc	36
<210> 34	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer GS3', synthetic sequence	
<400> 34	
ggaggatccc tcgagttagt tttgtattg gaagggt	38
<210> 35	
<211> 28	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer puro5', synthetic sequence	
<400> 35	
gcttaagatg accgagtaca agcccacg	28
<210> 36	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer puro3', synthetic sequence	
<400> 36	
cccatacgtga tggtcaggca ccgggcttgc	30
<210> 37	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer SV40polyA5', synthetic sequence	
<400> 37	
caacaagcgg ccgccctcga gttcccttta gtgagggtta atgc	44
<210> 38	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer SV40polyA3', synthetic sequence	
<400> 38	
cccctgaacc tgaaacataa aatg	24
<210> 39	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer mIRES-GS5', synthetic sequence	
<400> 39	
acacgatgat aagcttgcca caacc	25
<210> 40	
<211> 21	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primer mIRES-GS3', synthetic sequence	
<400>	40	
	ctccacgata tccctgccat a	21
<210>	41	
<211>	2076	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	CMVE-EF-1 alpha p-IFN beta MAR, synthetic sequence	
<400>	41	
	aagcttaaat tatctctaag gcatgtgaac tggctgtctt ggTTTTcatc tgtacttcat	60
	ctgctacctc tgtgacctga aacatattta taattccatt aagctgtgca tatgatagat	120
	ttatcatatg tatTTTcctt aaaggatttt tgtaagaact aattgaattg atacctgtaa	180
	agtctttatc aactaccca ataaataata aatctctttg ttcagctctc tgTTTctata	240
	aatatgtacc agTTTTattg TTTTtagtgg tagtgatttt attctctttc tatatatata	300
	cacacacatg tgtgcattca taaatatata caTTTTtTat gaataaaaaa ttattagcaa	360
	tcaatattga aaaccactga TTTTgttta tgtgagcaaa cagcagatta aaagaaattc	420
	ctgcaggagt caatgggaaa aaccatttgg agccaagtaC actgactcaa tagggacttt	480
	ccattgggtt ttgccagta cataaggtca ataggggggtg agtcaacagg aaagtcccat	540
	tggagccaag tacattgagt caatagggaC tttccaatgg gTTTTgcca gtacataagg	600
	tcaatgggag gtaagccaat gggTTTTtcc cactactgac atgtatactg agtcattagg	660
	gactttccaa tgggtTTTgc ccagtacata aggtcaatag gggTgaatca acaggaaagt	720
	cccattggag ccaagtacac tgagtcaata gggactttcc attgggtttt gcccagtaca	780
	aaaggtcaat agggggtgag tcaatgggtt tttccatta ttggcacata cataaggtca	840
	ataggggtga ctagtggaC agagcatgct tgagggtga gtgcccctca gtgggcagag	900
	agcacatggc ccacagtccc tgagaagttg gggggagggg tgggcaattg aactggtgcc	960
	tagagaaggt ggggcttggg taaactggga aagtgatgtg gtgtactggc tccacctttt	1020
	tccccagggt gggggagaac catatataag tgcagtagtc tctgtgaaca ttcaaggttc	1080
	tgctttctcc ctctgtgag tttggtaagt cactgactgt ctatgcctgg gaaagggtgg	1140
	gcaggagggtg gggcagtgaC ggaaaagtgg cactgtgaac cctgcagccc tagacaattg	1200
	tactaacctt cttctctttc ctctcctgac aggttggtgt acagtagctt ccaacgcgta	1260
	taatggatcc agtcaatatg ttcaccccaa aaaagctgtt tgTTaacttg ccaacctcat	1320
	tctaaaatgt atatagaagc ccaaaagaca ataacaaaaa tattcttgta gaacaaaatg	1380
	ggaaagaatg ttccactaaa tatcaagatt tagagcaaag catgagatgt gtggggatag	1440
	acagtgaggc tgataaaaata gagtagagct cagaaacaga ccattgata tatgtaagtg	1500
	acctatgaaa aaaatatggc attttacaat gggaaaatga tggTctTTTT cTTTTttaga	1560

aaaacaggga aatatattta tatgtaaaa ataaaaggga acccatatgt cataccatac	1620
acacaaaaaa attccagtga attataagtc taaatggaga aggcaaaact ttaaattcttt	1680
tagaaaataa tatagaagca tgccatcaag acttcagtgt agagaaaaat ttcttatcac	1740
tcaaagtcct aaccacaaag aaaagattgt taattagatt gcatgaatat taagacttat	1800
ttttaaaatt aaaaaacat taagaaaagt caggccatag aatgacagaa aatatttgca	1860
acaccccagt aaagagaatt gtaatatgca gattataaaa agaagtctta caaatcagta	1920
aaaaataaaa ctagacaaaa atttgaacag atgaaagaga aactctaaat aatcattaca	1980
catgagaaac tcaatctcag aaatcagaga actatcattg catatacact aaattagaga	2040
aatattaaaa ggctaagtaa catctgtggc gaattc	2076
<210> 42	
<211> 2130	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> IRES-HygroR-mPGKpA, synthetic sequence	
<400> 42	
acgcgtggta cctctagagt cgacccgggc ggccgcccc cccccctctc cctccccccc	60
ccctaacgtt actggccgaa gccgcttgga ataaggccgg tgtgcgtttg tctatatgtt	120
attttccacc atattgccgt cttttggcaa tgtgagggcc cgaaacctg gccctgtctt	180
cttgacgagc attcctaggg gtctttcccc tctcgccaaa ggaatgcaag gtctgttgaa	240
tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc ttcttgaaga caaacaacgt ctgtagcgac	300
cctttgcagg cagcggaaac cccacactgg cgacaggtgc ctctgcggcc aaaagccacg	360
tgtataagat acacctgcaa aggcggcaca accccagtgc cacgttgtga gttggatagt	420
tgtggaaaga gtcaaatggc tctcctcaag cgtattcaac aaggggctga aggatgcccc	480
gaaggtaccc cattgtatgg gatctgatct ggggcctcgg tgcacatgct ttacatgtgt	540
ttagtcgagg ttaaaaaaac gtctaggccc cccgaaccac ggggacgtgg ttttcctttg	600
aaaaacacga tgataatatg gccacaacca tgaaaaagcc tgaactcacc gcgacgtctg	660
tcgagaagtt tctgatcgaa aagttcgaca gcgtctccga cctgatgcag ctctcggagg	720
gcgaagaatc tcgtgctttc agcttcgatg taggagggcg tggatatgtc ctgcgggtaa	780
atagctgcgc cgatggtttc tacaaagatc gttatgttca tcggcacttt gcatcggccg	840
cgctcccgat tccggaagtg cttgacattg gggaattcag cgagagcctg acctattgca	900
tctcccgccg tgcacagggt gtcacgttgc aagacctgcc tgaaaccgaa ctgcccgtg	960
ttctgcagcc ggtcgcggag gccatggatg cgatcgctgc ggccgatctt agccagacga	1020
gcgggttcgg ccatttcgga ccgcaaggaa tcggtcaata cactacgtgg cgtgatttca	1080
tatgcgcgat tgctgatccc catgtgtatc actggcaaac tgtgatggac gacaccgtca	1140
gtgcgtccgt cgcgcaggct ctcgatgagc tgatgctttg ggccgaggac tgccccgaag	1200
tccggcacct cgtgcacgcg gatttcggct ccaacaatgt cctgacggac aatggccgca	1260
taacagcggc cattgactgg agcgaggcga tgttcgggga ttcccaatac gaggtcgcca	1320
acatcttctt ctggaggccg tggttggctt gtatggagca gcagacgcgc tacttcgagc	1380

ggaggcatcc ggagcttgca ggatcgccgc ggctccgggc gtatatgctc cgcattggtc	1440
ttgaccaact ctatcagagc ttggttgacg gcaatttcga tgatgcagct tgggcgcagg	1500
gtcgatgcga cgcaatcgtc cgatccggag ccgggactgt cgggcgtaca caaatcgccc	1560
gcagaagcgc ggccgtctgg accgatggct gtgtagaagt actcgccgat agtggaacc	1620
gacgccccag cactcgtccg agggcaaagg aatagtcgag aaattgatga tctattaagc	1680
aataaagacg tccactaaaa tggaagtttt tcctgtcata ctttgtaag aagggtgaga	1740
acagagtacc tacattttga atggaaggat tggagctacg ggggtggggg tgggtggga	1800
ttagataaat gcctgctctt tactgaaggc tctttactat tgctttatga taatgtttca	1860
tagttggata tcataattta aacaagcaaa accaaattaa gggccagctc attcctccac	1920
tcacgatcta tagatccact agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa	1980
attgttatcc gtcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct	2040
ggggtgccta atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgtcactg cccgctttcc	2100
agtcgggaaa cctgtcgtgc cagcgatcc	2130

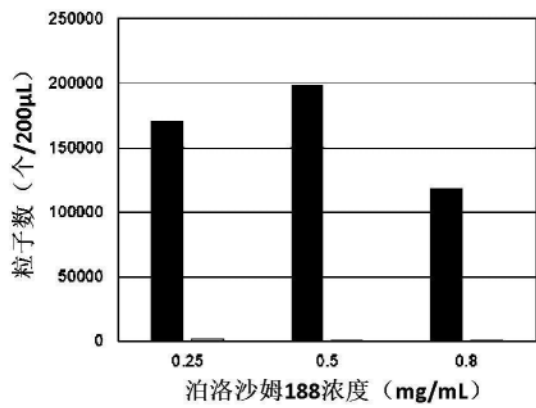


图1

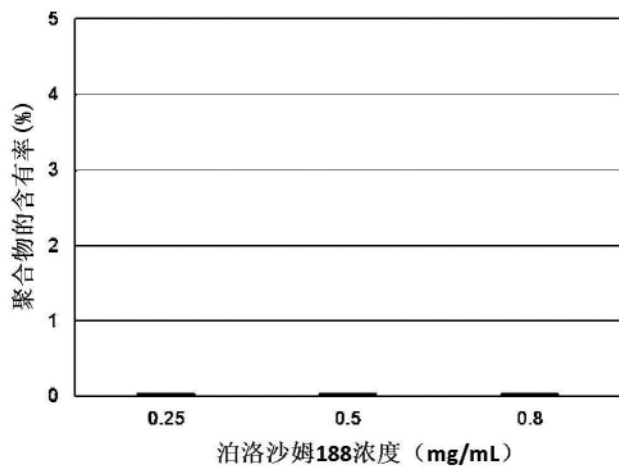


图2

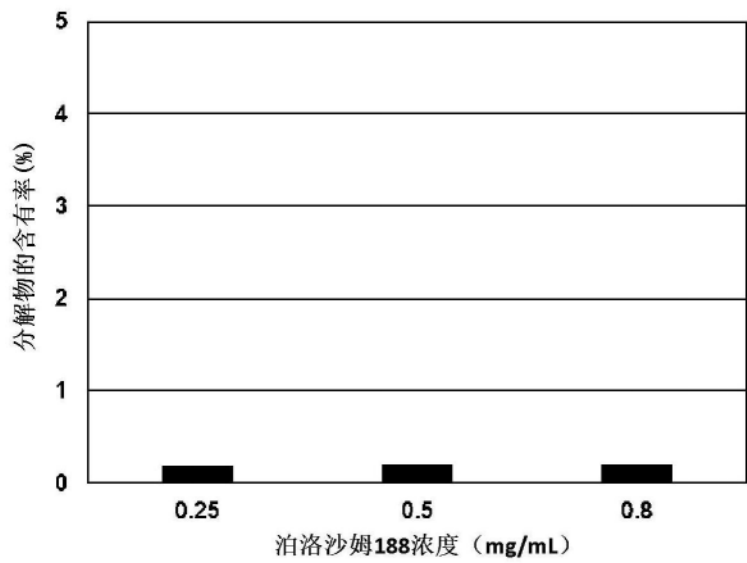


图3

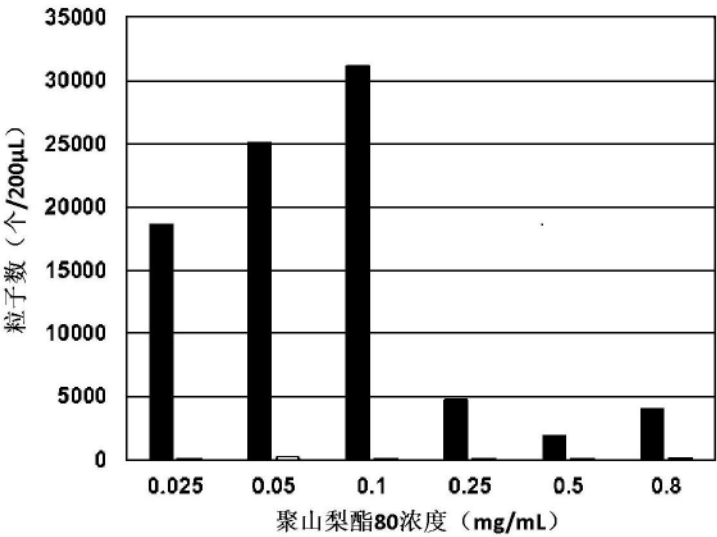


图4

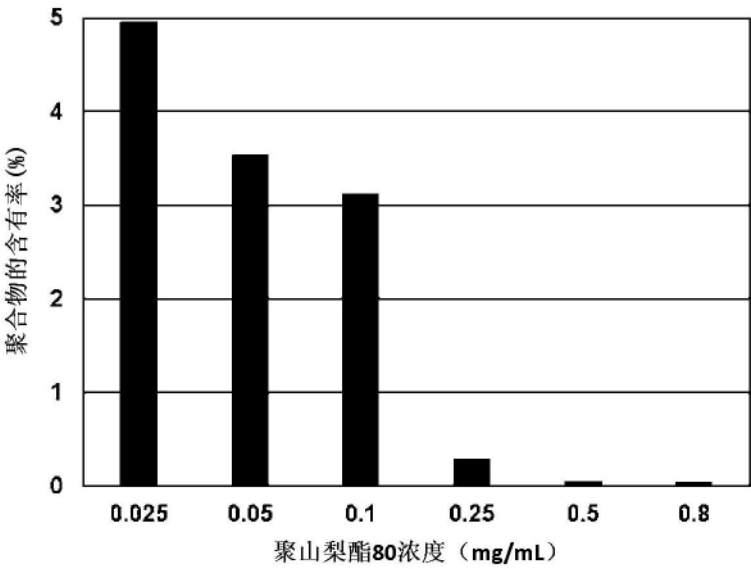


图5

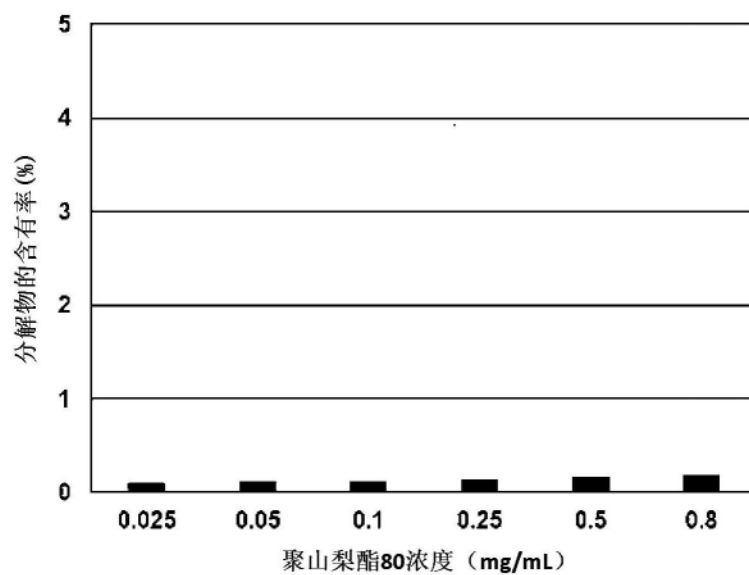


图6

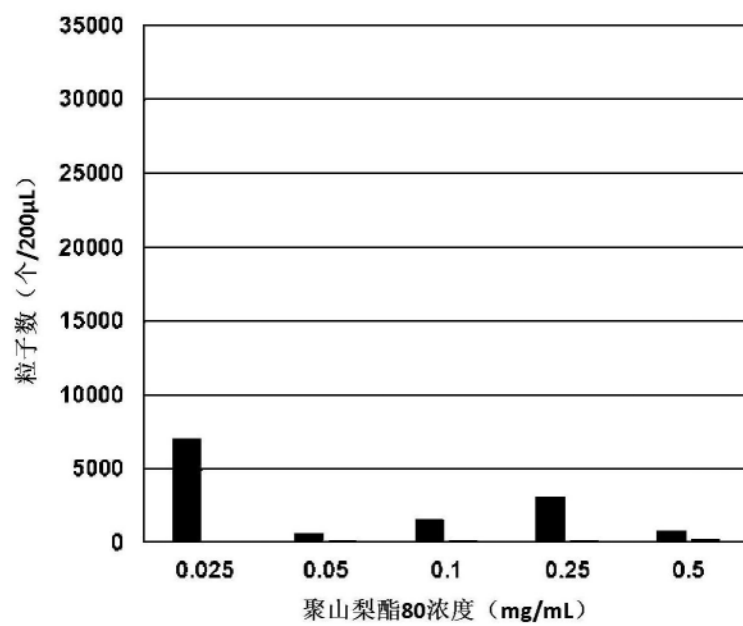


图7

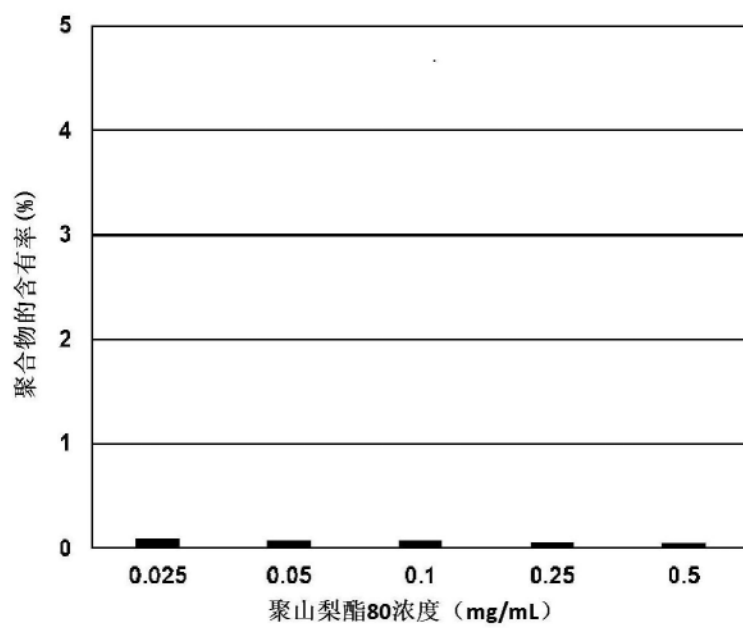


图8

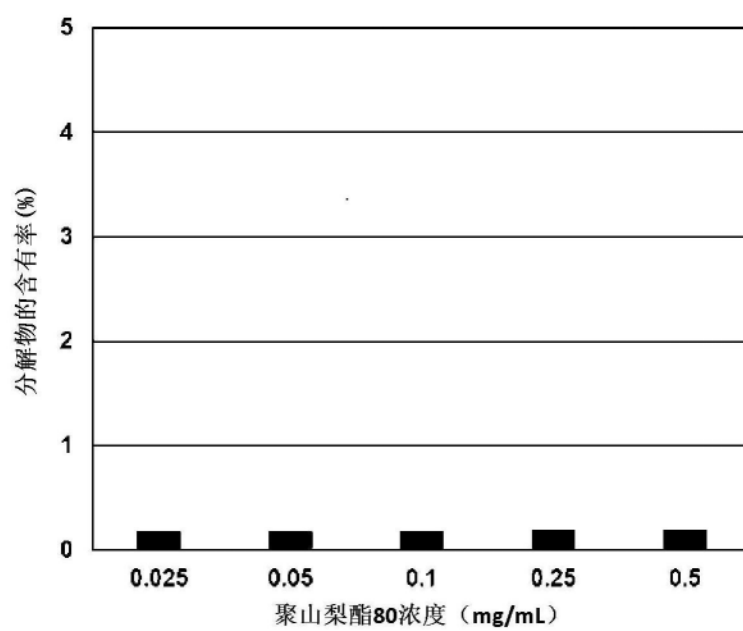


图9