



(10) 申请公布号 CN 117279665 A

(43) 申请公布日 2023.12.22

(21) 申请号 202280033472.X

(22) 申请日 2022.05.11

(30) 优先权数据

2021-080729 2021.05.12 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.11.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/020001 2022.05.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/239817 JA 2022.11.17

(71) 申请人 JCR制药股份有限公司

地址 日本兵库县

(72) 发明人 森本秀人 木田祥穗 曾彩玲

川岛聪

(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 鲁雯雯 金龙河

(51) Int.Cl.

A61K 47/68 (2006.01)

权利要求书4页 说明书30页

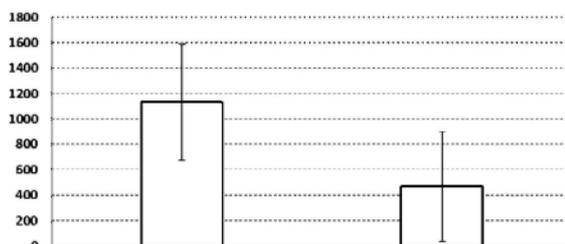
序列表29页 附图10页

(54) 发明名称

黏多糖贮积症I型的治疗用药物组合物

(57) 摘要

本发明提供一种黏多糖贮积症I型患者的治疗用的药物组合物。其中,患者特别是在中枢神经系统具有障碍。以0.1~10mg/kg体重的剂量,通过静脉滴注将含有抗人转铁蛋白受体抗体与人 α -L-艾杜糖醛酸酶的融合蛋白作为有效成分的药物组合物给药于黏多糖贮积症I型的患者。给药以5天~21天的间隔,持续进行至少3个月。由此,蓄积于患者的组织内特别是中枢神经系统的硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素被分解。



1. 一种药物组合物,所述药物组合物含有抗人转铁蛋白受体抗体与人 α -L-艾杜糖醛酸酶的融合蛋白作为有效成分,所述融合蛋白以0.1~10mg/kg体重的剂量,通过静脉输液给药于黏多糖贮积症I型的患者。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中,所述融合蛋白以0.1~8mg/kg体重的剂量进行给药。

3. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中,所述融合蛋白以1~6mg/kg体重的剂量进行给药。

4. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中,所述融合蛋白以2mg/kg体重或4mg/kg体重的剂量进行给药。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的药物组合物,其中,所述融合蛋白以0.33mg/小时~200mg/小时的速度进行给药。

6. 根据权利要求1~4中任一项所述的药物组合物,其中,所述融合蛋白历时3小时进行给药。

7. 根据权利要求1~6中任一项所述的药物组合物,其中,所述融合蛋白通过静脉滴注进行给药。

8. 根据权利要求1~7中任一项所述的药物组合物,其中,所述给药以5天~21天的间隔,持续进行至少3个月。

9. 根据权利要求1~7中任一项所述的药物组合物,其中,所述给药以7天的间隔,持续进行至少1个月。

10. 根据权利要求8或9所述的药物组合物,其中,所述融合蛋白在初次给药时以0.1~2mg/kg体重的剂量进行给药,在第二次以后的给药时增加剂量进行给药。

11. 根据权利要求8或9所述的药物组合物,其中,所述融合蛋白在初次给药时以0.1~2mg/kg体重的剂量进行给药,之后,以2~6mg/kg体重的维持剂量进行给药。

12. 根据权利要求8或10所述的药物组合物,其中,以2mg/kg体重或4mg/kg体重的维持剂量进行给药。

13. 根据权利要求1~12中任一项所述的药物组合物,其中,所述抗人转铁蛋白受体抗体为Fab。

14. 根据权利要求1~13中任一项所述的药物组合物,其中,所述人 α -L-艾杜糖醛酸酶直接或经由连接子结合于所述抗人转铁蛋白受体抗体的轻链的C末端侧或N末端侧,或所述抗人转铁蛋白受体抗体的重链的C末端侧或N末端侧。

15. 根据权利要求1~13中任一项所述的药物组合物,其中,所述人 α -L-艾杜糖醛酸酶经由连接子结合于所述抗人转铁蛋白受体抗体的重链的C末端侧。

16. 根据权利要求14或15所述的药物组合物,其中,所述连接子为包含1~150个氨基酸残基的肽。

17. 根据权利要求16所述的药物组合物,其中,所述连接子为包含选自由1个甘氨酸、1个丝氨酸、氨基酸序列Gly-Ser、氨基酸序列Gly-Gly-Ser、序列号1的氨基酸序列、序列号2的氨基酸序列、序列号3的氨基酸序列以及这些氨基酸序列1~10个连续而成的氨基酸序列构成的组中的氨基酸序列而成的肽。

18. 根据权利要求16所述的药物组合物,其中,所述连接子为包含序列号3的氨基酸序

列的肽。

19. 根据权利要求1~18中任一项所述的药物组合物,其中,所述抗人转铁蛋白受体抗体在轻链的可变区分别包含序列号4或序列号5的氨基酸序列作为CDR1、包含序列号6或序列号7的氨基酸序列或氨基酸序列Lys-Val-Ser作为CDR2、以及包含序列号8的氨基酸序列作为CDR3,在重链的可变区分别包含序列号9或10的氨基酸序列作为CDR1、包含序列号11或12的氨基酸序列作为CDR2、以及包含序列号13或14的氨基酸序列作为CDR3,

所述人 α -L-艾杜糖醛酸酶结合于所述抗人转铁蛋白受体抗体的轻链的C末端侧或N末端侧,或所述抗人转铁蛋白受体抗体的重链的C末端侧或N末端侧。

20. 根据权利要求19所述的药物组合物,其中,所述重链的可变区包含序列号16的氨基酸序列。

21. 根据权利要求20所述的药物组合物,其中,所述重链为Fab重链,所述Fab重链包含序列号19的氨基酸序列。

22. 根据权利要求19~21中任一项所述的药物组合物,其中,所述轻链的可变区包含序列号17的氨基酸序列。

23. 根据权利要求22所述的药物组合物,其中,所述轻链包含序列号18的氨基酸序列。

24. 根据权利要求1~23中任一项所述的药物组合物,其中,所述人 α -L-艾杜糖醛酸酶包含与序列号20的氨基酸序列或序列号21的氨基酸序列具有至少85%的一致性的氨基酸序列。

25. 根据权利要求1~23中任一项所述的药物组合物,其中,所述人 α -L-艾杜糖醛酸酶包含序列号20的氨基酸序列或序列号21的氨基酸序列。

26. 根据权利要求19所述的药物组合物,其中,所述抗人转铁蛋白受体抗体的轻链包含序列号18的氨基酸序列,所述抗人转铁蛋白受体抗体的重链包含序列号19的氨基酸序列,所述重链在其C末端侧经由序列号3的氨基酸序列的连接子与具有序列号20或序列号21的氨基酸序列的人 α -L-艾杜糖醛酸酶结合。

27. 根据权利要求19所述的药物组合物,其中,所述抗人转铁蛋白受体抗体的轻链包含序列号18的氨基酸序列,所述抗人转铁蛋白受体抗体的重链包含序列号19的氨基酸序列,所述重链通过在其C末端侧经由序列号3的氨基酸序列的连接子与具有序列号20的氨基酸序列的人 α -L-艾杜糖醛酸酶结合而形成序列号24的氨基酸序列。

28. 根据权利要求1~27中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物为冻干剂或水性液剂。

29. 根据权利要求28所述的药物组合物,其中,所述药物组合物还含有中性盐、二糖类、非离子性表面活性剂以及缓冲剂中的至少一种。

30. 根据权利要求28或29所述的药物组合物,其中,所述药物组合物包含聚山梨醇酯和/或泊洛沙姆作为所述非离子性表面活性剂。

31. 根据权利要求30所述的药物组合物,其中,所述聚山梨醇酯为聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80,

所述泊洛沙姆选自自由聚氧乙烯(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)二醇以及聚氧乙烯(120)聚氧丙烯(40)二醇构成的组中。

32. 根据权利要求30所述的药物组合物,其中,所述聚山梨醇酯为聚山梨醇酯80,所述泊洛沙姆为聚氧乙烯(160)聚氧丙烯(30)二醇。

33. 根据权利要求30~32中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物为水性液剂,所述聚山梨醇酯的浓度为0.005mg/mL~1.5mg/mL,所述泊洛沙姆的浓度为0.1mg/mL~0.6mg/mL。

34. 根据权利要求30~32中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物为水性液剂,所述聚山梨醇酯的浓度为0.025mg/mL~1.0mg/mL,所述泊洛沙姆的浓度为0.2mg/mL~0.5mg/mL。

35. 根据权利要求30~32中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物为水性液剂,所述聚山梨醇酯的浓度为0.05mg/mL~0.15mg/mL,所述泊洛沙姆的浓度为0.25mg/mL~0.45mg/mL。

36. 根据权利要求29~35中任一项所述的药物组合物,其中,所述中性盐为氯化钠。

37. 根据权利要求29~36中任一项所述的药物组合物,其中,所述二糖类选自由海藻糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖以及它们中的两种以上的组合构成的组中。

38. 根据权利要求29~37中任一项所述的药物组合物,其中,所述缓冲剂选自由柠檬酸缓冲剂、磷酸缓冲剂、甘氨酸缓冲剂、组氨酸缓冲剂、碳酸缓冲剂、醋酸缓冲剂以及它们中的两种以上的组合构成的组中。

39. 根据权利要求30或31所述的药物组合物,其中,所述药物组合物为选自由以下的(1)~(3)构成的组中的水性液剂:

(1) 所述融合蛋白的浓度为1mg/mL~10mg/mL,所述中性盐的浓度为0.3mg/mL~1.2mg/mL,所述二糖类的浓度为50mg/mL~100mg/mL,所述缓冲剂的浓度为10mM~30mM,所述聚山梨醇酯的浓度为0.005mg/mL~1.5mg/mL,以及所述泊洛沙姆的浓度为0.1mg/mL~0.6mg/mL;

(2) 所述融合蛋白的浓度为2mg/mL~8mg/mL,所述中性盐的浓度为0.5mg/mL~1.0mg/mL,所述二糖类的浓度为55mg/mL~95mg/mL,所述缓冲剂的浓度为15mM~25mM,所述聚山梨醇酯的浓度为0.05mg/mL~1.0mg/mL,以及所述泊洛沙姆的浓度为0.25mg/mL~0.45mg/mL; 以及

(3) 所述融合蛋白的浓度为4mg/mL~6mg/mL,所述中性盐的浓度为0.7mg/mL~0.9mg/mL,所述二糖类的浓度为60mg/mL~90mg/mL,所述缓冲剂的浓度为15mM~25mM,所述聚山梨醇酯的浓度为0.05mg/mL~0.15mg/mL,以及所述泊洛沙姆的浓度为0.25mg/mL~0.45mg/mL。

40. 根据权利要求28~41中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物是pH为4.5~6.5、5.0~6.0、或5.2~5.8的水性液剂。

41. 根据权利要求30~32中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物为选自由以下的(1)~(3)构成的组中的冻干剂:

(1) 用纯水溶解时,所述融合蛋白的浓度为1mg/mL~10mg/mL,所述中性盐的浓度为0.3mg/mL~1.2mg/mL,所述二糖类的浓度为50mg/mL~100mg/mL,所述缓冲剂的浓度为10mM~30mM,所述聚山梨醇酯的浓度为0.005mg/mL~1.5mg/mL,以及所述泊洛沙姆的浓度为0.1mg/mL~0.6mg/mL;

(2) 用纯水溶解时,所述融合蛋白的浓度为2mg/mL ~ 8mg/mL,所述中性盐的浓度为0.5mg/mL ~ 1.0mg/mL,所述二糖类的浓度为55mg/mL ~ 95mg/mL,所述缓冲剂的浓度为15mM ~ 25mM,所述聚山梨醇酯的浓度为0.05mg/mL ~ 1.0mg/mL,所述泊洛沙姆的浓度为0.25mg/mL ~ 0.45mg/mL;以及

(3) 用纯水溶解时,所述融合蛋白的浓度为4mg/mL ~ 6mg/mL,所述中性盐的浓度为0.7mg/mL ~ 0.9mg/mL,所述二糖类的浓度为60mg/mL ~ 90mg/mL,所述缓冲剂的浓度为15mM ~ 25mM,所述聚山梨醇酯的浓度为0.05mg/mL ~ 0.15mg/mL,所述泊洛沙姆的浓度为0.25mg/mL ~ 0.45mg/mL。

42. 根据权利要求28 ~ 32、36 ~ 38以及41中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物为用纯水溶解时的pH为4.5 ~ 6.5、5.0 ~ 6.0、或5.2 ~ 5.8的冻干剂。

43. 根据权利要求1 ~ 42中任一项所述的药物组合物,其中,所述患者在中枢神经系统具有障碍。

44. 根据权利要求1 ~ 43中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物具有使脑脊液、血清以及尿中所含的硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素的浓度减少的作用。

45. 根据权利要求1 ~ 44中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物用于黏多糖贮积症I型的患者的酶替代疗法。

46. 根据权利要求1 ~ 45中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物与免疫抑制剂并用。

47. 一种黏多糖贮积症I型的患者的酶替代疗法,所述酶替代疗法使用根据权利要求1 ~ 46中任一项所述的药物组合物。

48. 根据权利要求47所述的酶替代疗法,其中,所述患者在中枢神经系统具有障碍。

黏多糖贮积症I型的治疗用药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及含有抗人转铁蛋白受体抗体与人 α -L-艾杜糖醛酸酶(hIDUA)的融合蛋白作为有效成分的黏多糖贮积症I型的治疗用药物组合物,详细而言,涉及一种特征在于通过向黏多糖贮积症I型的患者非肠道给药该药物组合物,使蓄积于包括脑的脏器中的硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素分解的黏多糖贮积症I型的治疗用药物组合物。

背景技术

[0002] α -L-艾杜糖醛酸酶(IDUA)是具有将存在于硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素这样的糖胺聚糖(GAG)的分子内的非硫酸化 α -L-艾杜糖苷(iduronosidic)键水解的活性的溶酶体酶之一。黏多糖贮积症I型的患者遗传性地缺损一部分或全部 α -L-艾杜糖醛酸酶活性。该酶的缺损引起硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的代谢异常,其接着引起硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的分子的片段在肝脏、肾脏这样的组织中的蓄积,进一步引起硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素向尿中的排泄。其结果是,由于这些异常,会引起包括骨骼的变形和重度的智障的、黏多糖贮积症I型的患者的各种症状。黏多糖贮积症I型被分类为重症型的Hurler综合征(MPS IH)、中间型的Hurler-Scheie综合征(MPS IH-S)以及轻症型的Scheie综合征(MPS IS)。

[0003] 黏多糖贮积症I型的患者仅表现出微少的IDUA活性这一事实在1970年代就已经知道,预测IDUA基因的异常是该疾病的原因。1991年,编码hIDUA的人基因得到单离,被确认是对于该疾病的致病基因(非专利文献1)。编码hIDUA的基因的单离使下述成为可能:使用重组技术大量生产重组hIDUA(rhIDUA),将该酶作为治疗药用于黏多糖贮积症I型的酶替代疗法(专利文献1)。

[0004] 但是,rhIDUA无法通过血脑屏障(BBB),因此存在无法有效地改善黏多糖贮积症I型患者的中枢神经系统的障碍的问题。为了解决关于使用所述rhIDUA的黏多糖贮积症I型的酶替代疗法的技术问题,开发出抗人转铁蛋白受体抗体与人 α -L-艾杜糖醛酸酶的融合蛋白(专利文献2、3)。该融合蛋白利用抗人转铁蛋白受体抗体与存在于构成BBB的脑内的微血管内皮细胞上的人转铁蛋白受体结合,由此能穿过BBB。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:US6149909

[0008] 专利文献2:US20180171012

[0009] 专利文献3:US20190338043

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献1:Scott HS.et.al.,Proc Natl Acad Sci USA 88:9695-9(1991)

发明内容

[0012] 发明要解决的问题

[0013] 本发明的目的在于提供一种特征在于通过向黏多糖贮积症I型的患者非肠道给药

含有抗人转铁蛋白受体抗体与人 α -L-艾杜糖醛酸酶的融合蛋白作为有效成分的药物组合物,至少使蓄积于脑的糖胺聚糖分解的黏多糖贮积症I型的患者的处置方法。

[0014] 用于解决问题的方法

[0015] 在面向上述目的的研究中,本发明人等发现了如下内容,从而完成了本发明,即,通过向黏多糖贮积症I型的患者静脉注射含有抗人转铁蛋白受体抗体与人 α -L-艾杜糖醛酸酶的融合蛋白作为有效成分的药物组合物,能将蓄积于患者的脑的糖胺聚糖分解。即,本发明包括以下内容。

[0016] 1.一种药物组合物,该药物组合物含有抗人转铁蛋白受体抗体与人 α -L-艾杜糖醛酸酶的融合蛋白作为有效成分,该融合蛋白以0.1~10mg/kg体重的剂量,通过静脉输液给药于黏多糖贮积症I型的患者。

[0017] 2.根据上述1所述的药物组合物,其中,该融合蛋白以0.1~8mg/kg体重的剂量进行给药。

[0018] 3.根据上述1所述的药物组合物,其中,该融合蛋白以1~6mg/kg体重的剂量进行给药。

[0019] 4.根据上述1所述的药物组合物,其中,该融合蛋白以2mg/kg体重或4mg/kg体重的剂量进行给药。

[0020] 5.根据上述1~4中任一项所述的药物组合物,其中,该融合蛋白以0.33mg/小时~200mg/小时的速度进行给药。

[0021] 6.根据上述1~4中任一项所述的药物组合物,其中,该融合蛋白历时至少1小时进行给药。

[0022] 7.根据上述1~6中任一项所述的药物组合物,其中,该融合蛋白通过静脉滴注进行给药。

[0023] 8.根据上述1~7中任一项所述的药物组合物,其中,该给药以5天~21天的间隔,持续进行至少3个月。

[0024] 9.根据上述1~7中任一项所述的药物组合物,其中,该给药以7天的间隔,持续进行至少1个月。

[0025] 10.根据上述8或9所述的药物组合物,其中,该融合蛋白在初次给药时以0.1~2mg/kg体重的剂量进行给药,在第二次以后的给药时增加剂量进行给药。

[0026] 11.根据上述8或9所述的药物组合物,其中,该融合蛋白在初次给药时以0.1~2mg/kg体重的剂量进行给药,之后,以2~6mg/kg体重的维持剂量进行给药。

[0027] 12.根据上述8或10所述的药物组合物,其中,以2mg/kg体重或4mg/kg体重的维持剂量进行给药。

[0028] 13.根据上述1~12中任一项所述的药物组合物,其中,该抗人转铁蛋白受体抗体为Fab。

[0029] 14.根据上述1~13中任一项所述的药物组合物,其中,该 α -L-艾杜糖醛酸酶经由连接子结合于该抗人转铁蛋白受体抗体的轻链的C末端侧或N末端侧,或该抗人转铁蛋白受体抗体的重链的C末端侧或N末端侧。

[0030] 15.根据上述1~13中任一项所述的药物组合物,其中,该 α -L-艾杜糖醛酸酶经由连接子结合于该抗人转铁蛋白受体抗体的重链的C末端侧。

[0031] 16. 根据上述14或15所述的药物组合物,其中,该连接子为包含1~150个氨基酸残基的肽。

[0032] 17. 根据上述16所述的药物组合物,其中,该连接子为包含选自1个甘氨酸、1个丝氨酸、氨基酸序列Gly-Ser、氨基酸序列Gly-Gly-Ser、序列号1的氨基酸序列、序列号2的氨基酸序列、序列号3的氨基酸序列以及这些氨基酸序列1~10个连续而成的氨基酸序列构成的组中的氨基酸序列的肽。

[0033] 18. 根据上述16所述的药物组合物,其中,该连接子为包含序列号3的氨基酸序列的肽。

[0034] 19. 根据上述1~18中任一项所述的药物组合物,其中,该抗人转铁蛋白受体抗体在轻链的可变区分别包含序列号4或序列号5的氨基酸序列作为CDR1、包含序列号6或序列号7的氨基酸序列或氨基酸序列Lys-Val-Ser作为CDR2、以及包含序列号8的氨基酸序列作为CDR3,在重链的可变区分别包含序列号9或10的氨基酸序列作为CDR1、包含序列号11或12的氨基酸序列作为CDR2、以及包含序列号13或14的氨基酸序列作为CDR3,

[0035] 该 α -L-艾杜糖醛酸酶结合于该抗人转铁蛋白受体抗体的轻链的C末端侧或N末端侧,或该抗人转铁蛋白受体抗体的重链的C末端侧或N末端侧。

[0036] 20. 根据上述19所述的药物组合物,其中,该重链的可变区包含序列号16的氨基酸序列。

[0037] 21. 根据上述20所述的药物组合物,其中,该重链为Fab重链,该Fab重链包含序列号19的氨基酸序列。

[0038] 22. 根据上述19~21中任一项所述的药物组合物,其中,该轻链的可变区包含序列号17的氨基酸序列。

[0039] 23. 根据上述22所述的药物组合物,其中,该轻链包含序列号18的氨基酸序列。

[0040] 24. 根据上述1~23中任一项所述的药物组合物,其中,该人 α -L-艾杜糖醛酸酶包含与序列号20的氨基酸序列或序列号21的氨基酸序列具有至少85%的一致性的氨基酸序列。

[0041] 25. 根据上述1~23中任一项所述的药物组合物,其中,该人 α -L-艾杜糖醛酸酶包含序列号20的氨基酸序列或序列号21的氨基酸序列。

[0042] 26. 根据上述1所述的药物组合物,其中,该抗人转铁蛋白受体抗体的轻链包含序列号18的氨基酸序列,该抗人转铁蛋白受体抗体的重链包含序列号19的氨基酸序列,该重链在其C末端侧经由序列号3的氨基酸序列的连接子与具有序列号20或序列号21的氨基酸序列的人 α -L-艾杜糖醛酸酶结合。

[0043] 27. 根据上述19所述的药物组合物,其中,该抗人转铁蛋白受体抗体的轻链包含序列号18的氨基酸序列,该抗人转铁蛋白受体抗体的重链包含序列号19的氨基酸序列,该重链通过在其C末端侧经由序列号3的氨基酸序列的连接子与具有序列号20的氨基酸序列的人 α -L-艾杜糖醛酸酶结合而形成序列号24的氨基酸序列。

[0044] 28. 根据上述1~27中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物为冻干剂或水性液剂。

[0045] 29. 根据上述28所述的药物组合物,其中,所述药物组合物还含有中性盐、二糖类、非离子性表面活性剂以及缓冲剂中的至少一种。

[0046] 30. 根据上述28或29所述的药物组合物,其中,所述药物组合物包含聚山梨醇酯和/或泊洛沙姆作为该非离子性表面活性剂。

[0047] 31. 根据上述30所述的药物组合物,其中,该聚山梨醇酯为聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80,

[0048] 该泊洛沙姆选自由聚氧乙烯(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)二醇以及聚氧乙烯(120)聚氧丙烯(40)二醇构成的组中。

[0049] 32. 根据上述30所述的药物组合物,其中,该聚山梨醇酯为聚山梨醇酯80,该泊洛沙姆为聚氧乙烯(160)聚氧丙烯(30)二醇。

[0050] 33. 根据上述30~32中任一项所述的作为水性液剂的药物组合物,其中,该聚山梨醇酯的浓度为0.005mg/mL~1.5mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.1mg/mL~0.6mg/mL。

[0051] 34. 根据上述30~32中任一项所述的作为水性液剂的药物组合物,其中,该聚山梨醇酯的浓度为0.025mg/mL~1.0mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.2mg/mL~0.5mg/mL。

[0052] 35. 根据上述30~32中任一项所述的作为水性液剂的药物组合物,其中,该聚山梨醇酯的浓度为0.05mg/mL~0.15mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.25mg/mL~0.45mg/mL。

[0053] 36. 根据上述29~35中任一项所述的药物组合物,其中,该中性盐为氯化钠。

[0054] 37. 根据上述29~36中任一项所述的药物组合物,其中,该二糖类选自由海藻糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖以及它们中的两种以上的组合构成的组中。

[0055] 38. 根据上述29~37中任一项所述的药物组合物,其中,该缓冲剂选自由柠檬酸缓冲剂、磷酸缓冲剂、甘氨酸缓冲剂、组氨酸缓冲剂、碳酸缓冲剂、醋酸缓冲剂以及它们中的两种以上的组合构成的组中。

[0056] 39. 根据上述30~32中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物为选自由以下的(1)~(3)构成的组中的水性液剂:

[0057] (1) 该融合蛋白的浓度为1mg/mL~10mg/mL,该中性盐的浓度为0.3mg/mL~1.2mg/mL,该二糖类的浓度为50mg/mL~100mg/mL,该缓冲剂的浓度为10mM~30mM,该聚山梨醇酯的浓度为0.005mg/mL~1.5mg/mL,以及该泊洛沙姆的浓度为0.1mg/mL~0.6mg/mL;

[0058] (2) 该融合蛋白的浓度为2mg/mL~8mg/mL,该中性盐的浓度为0.5mg/mL~1.0mg/mL,该二糖类的浓度为55mg/mL~95mg/mL,该缓冲剂的浓度为15mM~25mM,该聚山梨醇酯的浓度为0.05mg/mL~1.0mg/mL,以及该泊洛沙姆的浓度为0.25mg/mL~0.45mg/mL;以及

[0059] (3) 该融合蛋白的浓度为4mg/mL~6mg/mL,该中性盐的浓度为0.7mg/mL~0.9mg/mL,该二糖类的浓度为60mg/mL~90mg/mL,该缓冲剂的浓度为15mM~25mM,该聚山梨醇酯的浓度为0.05mg/mL~0.15mg/mL,以及该泊洛沙姆的浓度为0.25mg/mL~0.45mg/mL。

[0060] 40. 根据上述28~41中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物是pH为4.5~6.5、5.0~6.0、或5.2~5.8的水性液剂。

[0061] 41. 根据上述30~32中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物为选自由以下的(1)~(3)构成的组中的冻干剂:

[0062] (1) 用纯水溶解时,该融合蛋白的浓度为1mg/mL~10mg/mL,该中性盐的浓度为0.3mg/mL~1.2mg/mL,该二糖类的浓度为50mg/mL~100mg/mL,该缓冲剂的浓度为10mM~30mM,该聚山梨醇酯的浓度为0.005mg/mL~1.5mg/mL,以及该泊洛沙姆的浓度为0.1mg/mL

~ 0.6mg/mL;

[0063] (2) 用纯水溶解时,该融合蛋白的浓度为2mg/mL ~ 8mg/mL,该中性盐的浓度为0.5mg/mL ~ 1.0mg/mL,该二糖类的浓度为55mg/mL ~ 95mg/mL,该缓冲剂的浓度为15mM ~ 25mM,该聚山梨醇酯的浓度为0.05mg/mL ~ 1.0mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.25mg/mL ~ 0.45mg/mL;以及

[0064] (3) 用纯水溶解时,该融合蛋白的浓度为4mg/mL ~ 6mg/mL,该中性盐的浓度为0.7mg/mL ~ 0.9mg/mL,该二糖类的浓度为60mg/mL ~ 90mg/mL,该缓冲剂的浓度为15mM ~ 25mM,该聚山梨醇酯的浓度为0.05mg/mL ~ 0.15mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.25mg/mL ~ 0.45mg/mL。

[0065] 42. 根据上述28 ~ 32、36 ~ 38以及41中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物为用纯水溶解时的pH为4.5 ~ 6.5、5.0 ~ 6.0、或5.2 ~ 5.8的冻干剂。

[0066] 43. 根据上述1 ~ 42中任一项所述的药物组合物,其中,该患者在中枢神经系统具有障碍。

[0067] 44. 根据上述1 ~ 43中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物具有使脑脊液、血清以及尿中所含的硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素的浓度减少的作用。

[0068] 45. 根据上述1 ~ 44中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物用于黏多糖贮积症I型的患者的酶替代疗法。

[0069] 46. 根据上述1 ~ 45的药物组合物,其中,所述药物组合物与免疫抑制剂并用。

[0070] 47. 一种黏多糖贮积症I型的患者的酶替代疗法,该酶替代疗法使用根据上述1 ~ 46中任一项所述的药物组合物。

[0071] 48. 根据上述47所述的酶替代疗法,其中,该患者在中枢神经系统具有障碍。

[0072] 49. 一种药物组合物,该药物组合物为上述1 ~ 46中任一项所述的药物组合物,向黏多糖贮积症I型的患者给药该药物组合物时,给药后采集自该患者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度与最初给药该药物组合物前的采集自患者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度相比为2/3以下、1/2以下或1/3以下。

[0073] 50. 一种药物组合物,该药物组合物为上述1 ~ 46中任一项所述的药物组合物,向黏多糖贮积症I型的患者给药该药物组合物时,给药后采集自该患者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度为2000ng/mL以下、1800ng/mL以下、1600ng/mL以下、1500ng/mL以下或1400ng/mL以下。

[0074] 50. 一种药物组合物,该药物组合物为上述1 ~ 46中任一项所述的药物组合物,向黏多糖贮积症I型的患者给药该药物组合物时,与最初给药该药物组合物前相比,使该患者产生以下示出的至少一种功能改善:

[0075] (1) 能进行更长时间的对话;

[0076] (2) 能进行更多的文字书写;

[0077] (3) 减轻腰、膝等的关节痛;

[0078] (4) 减轻伴随步行的疼痛、肌肉和关节的僵硬;

[0079] (5) 能更容易地进行开罐等指尖的运动、篮球等全身运动;

[0080] (6) 提高语言能力。

[0081] 发明效果

[0082] 根据本发明,例如,能使蓄积于黏多糖贮积症I型的患者的包括脑的脏器的硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素分解,特别能使蓄积于包括脑的中枢神经系统的硫酸乙酰肝素分解,因此能抑制所述患者的脏器、特别是包括脑的中枢神经系统的功能障碍的恶化。

附图说明

[0083] 图1是表示临床试验(第I期)中的由受试制剂的给药引起的黏多糖贮积症I型的患者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度的变化的图。左侧示出受试制剂给药前的值,右侧示出受试制剂给药后的值。纵轴表示硫酸乙酰肝素的浓度(ng/mL),图表上的纵线表示SD误差条。

[0084] 图2是表示临床试验(第I期)中的由受试制剂的给药引起的黏多糖贮积症I型的患者的脑脊液中所含的硫酸皮肤素的浓度的变化的图。左侧示出受试制剂给药前的值,右侧示出受试制剂给药后的值。纵轴表示硫酸皮肤素的浓度(ng/mL),图表上的纵线表示SD误差条。

[0085] 图3是表示临床试验(第I期)中的由受试制剂的给药引起的黏多糖贮积症I型的患者的血清中所含的硫酸乙酰肝素的浓度的变化的图。左侧示出受试制剂给药前的值,右侧示出受试制剂给药后的值。纵轴表示硫酸乙酰肝素的浓度(ng/mL),图表上的纵线表示SD误差条。

[0086] 图4是表示临床试验(第I期)中的由受试制剂的给药引起的黏多糖贮积症I型的患者的血清中所含的硫酸皮肤素的浓度的变化的图。左侧示出受试制剂给药前的值,右侧示出受试制剂给药后的值。纵轴表示硫酸皮肤素的浓度(ng/mL),图表上的纵线表示SD误差条。

[0087] 图5是表示临床试验(第I期)中的由受试制剂的给药引起的黏多糖贮积症I型的患者的尿中所含的硫酸乙酰肝素的浓度的变化的图。左侧示出受试制剂给药前的值,右侧示出受试制剂给药后的值。纵轴表示硫酸乙酰肝素的量($\mu\text{g}/\text{mg}$ 肌酸酐),图表上的纵线表示SD误差条。

[0088] 图6是表示临床试验(第I期)中的由受试制剂的给药引起的黏多糖贮积症I型的患者的尿中所含的硫酸皮肤素的浓度的变化的图。图表示出受试制剂给药前的值,右侧示出受试制剂给药后的值。纵轴表示硫酸皮肤素的量($\mu\text{g}/\text{mg}$ 肌酸酐),图表上的纵线表示SD误差条。

[0089] 图7是表示临床试验(第II期)第一试验中的由受试制剂的给药引起的黏多糖贮积症I型的患者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度的变化的图。 \times 和 \diamond 表示各患者的硫酸乙酰肝素的浓度。纵轴表示硫酸乙酰肝素的浓度(ng/mL),虚线表示非黏多糖贮积症I型患者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度的平均值。

[0090] 图8是表示临床试验(第II期)第一试验中的由受试制剂的给药引起的黏多糖贮积症I型的患者的脑脊液中所含的硫酸皮肤素的浓度的变化的图。 \times 和 \diamond 表示各患者的硫酸皮肤素的浓度。纵轴表示硫酸皮肤素的浓度(ng/mL)。

[0091] 图9是表示临床试验(第II期)第二试验中的由受试制剂的给药引起的黏多糖贮积症I型的患者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度的变化的图。涂白的 \circ 、 Δ 以及 \square 表示2.0mg/kg体重给药组中的各患者的硫酸乙酰肝素的浓度,涂黑的 \bullet 、 \blacktriangle 以及 \blacksquare 表示4.0mg/

kg体重给药组中的各患者的硫酸乙酰肝素的浓度。纵轴表示硫酸乙酰肝素的浓度(ng/mL),虚线表示非黏多糖贮积症I型患者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度的平均值。

[0092] 图10是表示临床试验(第II期)第二试验中的由受试制剂的给药引起的黏多糖贮积症I型的患者的脑脊液中所含的硫酸皮肤素的浓度的变化的图。涂白的○、△以及□表示2.0mg/kg体重给药组中的各患者的硫酸皮肤素的浓度,涂黑的●、▲以及■表示4.0mg/kg体重给药组中的各患者的硫酸皮肤素的浓度。纵轴表示硫酸皮肤素的浓度(ng/mL)。

[0093] 图11是表示临床试验(第II期)第一试验中的由受试制剂的给药引起的黏多糖贮积症I型的患者的血清中所含的硫酸乙酰肝素的浓度的变化的图。×和◇表示各患者的硫酸乙酰肝素的浓度。纵轴表示硫酸乙酰肝素的浓度(ng/mL)。

[0094] 图12是表示临床试验(第II期)第一试验中的由受试制剂的给药引起的黏多糖贮积症I型的患者的血清中所含的硫酸皮肤素的浓度的变化的图。×和◇表示各患者的硫酸皮肤素的浓度。纵轴表示硫酸皮肤素的浓度(ng/mL)。

[0095] 图13是表示临床试验(第II期)第二试验中的由受试制剂的给药引起的黏多糖贮积症I型的患者的血清中所含的硫酸乙酰肝素的浓度的变化的图。涂白的○、△以及□表示2.0mg/kg体重给药组中的各患者的硫酸乙酰肝素的浓度,涂黑的●、▲以及■表示4.0mg/kg体重给药组中的各患者的硫酸乙酰肝素的浓度。纵轴表示硫酸乙酰肝素的浓度(ng/mL)。

[0096] 图14是表示临床试验(第II期)第二试验中的由受试制剂的给药引起的黏多糖贮积症I型的患者的血清中所含的硫酸皮肤素的浓度的变化的图。涂白的○、△以及□表示2.0mg/kg体重给药组中的各患者的硫酸皮肤素的浓度,涂黑的●、▲以及■表示4.0mg/kg体重给药组中的各患者的硫酸皮肤素的浓度。纵轴表示硫酸皮肤素的浓度(ng/mL)。

具体实施方式

[0097] 在形成人的血脑屏障(Blood Brain Barrier)的脑微血管内皮细胞(脑血管内皮细胞)的表面存在转铁蛋白受体(hTfR)。能将转铁蛋白受体识别为抗原的抗体(抗hTfR抗体)能与hTfR结合。并且,与脑微血管内皮细胞表面的hTfR结合的抗体能通过经由hTfR的胞吞转运(transcytosis)穿过血脑屏障到达中枢神经系统。因此,通过使人 α -L-艾杜糖醛酸酶(hIDUA)与该抗体结合,能使hIDUA到达中枢神经系统。

[0098] 在本发明中,抗hTfR抗体优选为Fab。在此,Fab是指包含可变区和C_L区(轻链的恒定区)的一条轻链以及包含可变区和C_{H1}区(重链的恒定区的部分1)的一条重链由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。在Fab中,重链除了可变区和C_{H1}区(重链的恒定区的部分1)以外,还可以包含铰链区的一部分,但该情况下的铰链区缺少了存在于铰链区且将抗体的重链彼此结合的半胱氨酸残基。在Fab中,轻链与重链通过二硫键结合,所述二硫键形成于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。将形成Fab的重链称为Fab重链。Fab缺少了存在于铰链区且将抗体的重链彼此结合的半胱氨酸残基,因此Fab包含一条轻链和一条重链。构成Fab的轻链包含可变区和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}区以外还包含铰链区的一部分。但在该情况下,铰链区以不包含使重链之间结合的半胱氨酸残基的方式进行选择,以防止通过铰链区在两条重链之间形成二硫键。

[0099] 在本发明中,抗hTfR抗体优选为人抗体或人源化抗体。人抗体是指其整体由源自

人的基因编码的抗体。其中,出于提高基因的表达效率等目的而对原始的人的基因施加变异的基因所编码的抗体也是人抗体。此外,将编码人抗体的两个以上的基因组合,将某一个人抗体的一部分置换为另一个人抗体的一部分而得到的抗体也是人抗体。人抗体具有免疫球蛋白轻链的三处互补决定区(CDR)和免疫球蛋白重链的三处互补决定区(CDR)。免疫球蛋白轻链的三处CDR从位于N末端侧的CDR起依次称为CDR1、CDR2以及CDR3。免疫球蛋白重链的三处CDR从位于N末端侧的CDR起依次称为CDR1、CDR2以及CDR3。通过将某一个人抗体的CDR置换为另一个人抗体的CDR来改变人抗体的抗原特异性、亲和性等而得到的抗体也是人抗体。

[0100] 在本发明中,“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)的氨基酸序列源自人以外的哺乳动物、除此以外的区域源自人的抗体。例如,作为人源化抗体,可列举出通过利用其他哺乳动物的CDR将构成人抗体的免疫球蛋白轻链的三处互补决定区(CDR)和免疫球蛋白重链的三处互补决定区(CDR)置换而制作的抗体。作为被移植到人抗体的适当位置的CDR的来源的其他哺乳动物的生物种只要为人以外的哺乳动物就没有特别限定,优选小鼠、大鼠、兔、马或人以外的灵长类,更优选小鼠和大鼠,例如小鼠。

[0101] 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 链中的任一方。此外,人抗体和人源化抗体的重链有 γ 链、 μ 链、 α 链、 σ 链以及 ϵ 链,分别对应于IgG、IgM、IgA、IgD以及IgE。构成抗体的重链可以为 γ 链、 μ 链、 α 链、 σ 链以及 ϵ 链中的任一方,优选为 γ 链。而且,抗体的重链的 γ 链有 γ 1链、 γ 2链、 γ 3链以及 γ 4链,分别对应于IgG1、IgG2、IgG3以及IgG4。在构成抗体的重链为 γ 链的情况下,该 γ 链可以为 γ 1链、 γ 2链、 γ 3链以及 γ 4链中的任一方,优选为 γ 1链或 γ 4链。在抗体为人源化抗体或人抗体,且为IgG的情况下,该抗体的轻链可以为 λ 链和 κ 链中的任一方,该抗体的重链可以为 γ 1链、 γ 2链、 γ 3链或 γ 4链中的任一方,优选为 γ 1链或 γ 4链。例如,作为优选的抗体的一个方案,可列举出轻链为 κ 链且重链为 γ 1链的抗体、轻链为 λ 链且重链为 γ 1链的抗体。

[0102] 在本发明的一个方案中,抗hTfR抗体在轻链的可变区分别包含序列号4或序列号5的氨基酸序列作为CDR1、包含序列号6或序列号7的氨基酸序列或氨基酸序列Lys-Val-Ser作为CDR2、以及包含序列号8的氨基酸序列作为CDR3,在重链的可变区分别包含序列号9或10的氨基酸序列作为CDR1、包含序列号11或12的氨基酸序列作为CDR2、以及包含序列号13或14的氨基酸序列作为CDR3。而且,抗人转铁蛋白受体抗体例如在重链的框架区3包含序列号15的氨基酸序列。

[0103] 在本发明的一个方案中,抗hTfR抗体在重链的可变区包含序列号16的氨基酸序列,并且在轻链的可变区包含序列号17的氨基酸序列。

[0104] 在本发明的优选的一个方案中,抗hTfR抗体为Fab,其为轻链包含序列号18的氨基酸序列、重链包含序列号19的氨基酸序列的Fab重链。

[0105] 在本发明的一个方案中,只要各CDR的氨基酸序列是保守的,只要保持对hTfR的亲合性,抗hTfR抗体就可以在可变区或包括可变区的其他部分的氨基酸序列施加置换、缺失、添加等变异。在将抗hTfR抗体的可变区的氨基酸序列的氨基酸置换为其他氨基酸的情况下,被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,进一步更优选为1~2个。在使抗hTfR抗体的可变区的氨基酸序列中的氨基酸缺失的情况下,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,进一步更优选为1~2个。而且,可以施加将这些氨基酸的置换和缺失组合的变异。在对抗hTfR抗体的可变区添加氨基酸的情况下,在抗hTfR抗体的可变区的氨基酸序列中或N末端侧或C末端侧添加优选为1~10个、更优选为1~5个、进一步优选为1~3个、进一步更优选为1~2个氨基酸。也可以施加将这些氨基酸的添加、置换以及缺失组合的变异。施加了变异的抗hTfR抗体的可变区的氨基酸序列与原始的抗hTfR抗体的可变区的氨基酸序列优选具有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,进一步更优选显示95%以上的一致性,进一步更优选显示99%以上的一致性。对包括可变区的其他部分的氨基酸序列施加变异的情况也是同样的。而且,施加了变异的抗hTfR抗体相对于hTfR的Kd值与原始的抗hTfR抗体相对于hTfR的Kd值相比,为50倍以下的值是理想的,例如优选为10倍以下的值。

[0106] 在本发明的一个方案中,抗hTfR抗体对hTfR的胞外区和猴TfR的胞外区两者均具有亲和性。该情况下的抗hTfR抗体与hTfR的胞外区的解离常数优选为 1×10^{-10} M以下,与猴TfR的胞外区的解离常数优选为 5×10^{-9} M以下。

[0107] 在本发明的一个方案中,“人 α -L-艾杜糖醛酸酶”或“hIDUA”术语特别是指具有与野生型的hIDUA相同的氨基酸序列的hIDUA。野生型的hIDUA具有由序列号20所示的628个氨基酸构成的氨基酸序列。具有由序列号21所示的626个氨基酸构成的氨基酸序列的hIDUA的变体也是hIDUA。但是,并不限于于此,只要具有IDUA活性,对野生型的hIDUA的氨基酸序列施加置换、缺失、添加等变异而得到的变体也包括在hIDUA中。在将hIDUA的氨基酸序列的氨基酸置换为其他氨基酸的情况下,被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,进一步更优选为1~2个。在使hIDUA的氨基酸序列中的氨基酸缺失的情况下,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,进一步更优选为1~2个。而且,可以施加将这些氨基酸的置换和缺失组合的变异。在对抗hIDUA添加氨基酸的情况下,在hIDUA的氨基酸序列中或N末端侧或C末端侧添加优选为1~10个、更优选为1~5个、进一步优选为1~3个、进一步更优选为1~2个氨基酸。也可以施加将这些氨基酸的添加、置换以及缺失组合的变异。施加了变异的hIDUA的氨基酸序列与原始的hIDUA的氨基酸序列优选具有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,进一步更优选显示95%以上的一致性,进一步更优选显示99%以上的一致性。

[0108] 在本发明中,称hIDUA具有IDUA活性时,是指在使hIDUA与抗体融合而制成融合蛋白时,相对于天然型的hIDUA本来所具有的活性具有3%以上的活性。但是,该活性相对于天然型的hIDUA本来所具有的活性,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。在与抗体融合的hIDUA施加了变异的情况下也是同样的。抗体例如为抗hTfR抗体。

[0109] 需要说明的是,在本发明中,原始的蛋白质(包括抗体)的氨基酸序列与施加了变异的蛋白质的氨基酸序列的一致性可以使用公知的一致性计算算法容易地计算出。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。

[0110] 此外,原始的蛋白质(包括抗体)的氨基酸序列中的氨基酸用其他氨基酸进行的置换,例如发生在氨基酸的侧链和化学性质方面相关的氨基酸家族内。预测这样的氨基酸家族内的置换不会给原始的蛋白质的功能带来大的变化(即,为保守的氨基酸置换)。所述氨基酸家族例如如下所述:

- [0111] (1) 作为酸性氨基酸的天冬氨酸和谷氨酸;
- [0112] (2) 作为碱性氨基酸的组氨酸、赖氨酸以及精氨酸;
- [0113] (3) 作为芳香族氨基酸的苯丙氨酸、酪氨酸以及色氨酸;
- [0114] (4) 作为具有羟基的氨基酸(羟基氨基酸)的丝氨酸和苏氨酸;
- [0115] (5) 作为疏水性氨基酸的蛋氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸以及异亮氨酸;
- [0116] (6) 作为中性的亲水性氨基酸的半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺以及谷氨酰胺;
- [0117] (7) 作为影响肽链的取向的氨基酸的甘氨酸和脯氨酸;
- [0118] (8) 作为酰胺型氨基酸(极性氨基酸)的天冬酰胺和谷氨酰胺;
- [0119] (9) 作为脂肪族氨基酸的丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸以及缬氨酸;
- [0120] (10) 作为侧链小的氨基酸的丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸以及苏氨酸;
- [0121] (11) 作为侧链特别小的氨基酸的丙氨酸和甘氨酸;以及
- [0122] (12) 作为具有支链的氨基酸的缬氨酸、亮氨酸以及异亮氨酸。

[0123] 在本发明的一个方案中,所谓的抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白是指使抗hTfR抗体与hIDUA经由肽连接子或直接结合而成的物质。例如,抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白是使hIDUA的N末端或C末端通过肽键经由连接子或直接分别结合于抗体的重链或轻链的C末端或N末端而成的物质。

[0124] 就使hIDUA结合于hTfR抗体的轻链的C末端的类型的融合蛋白而言,抗体包含包括轻链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列和包括重链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列(例如Fab重链),hIDUA结合于该抗体的轻链的C末端。其中,抗体的轻链与hIDUA可以直接结合,也可以经由连接子而结合。

[0125] 就使hIDUA结合于hTfR抗体的重链的C末端的类型的融合蛋白而言,抗体包含包括轻链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列和包括重链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列(例如Fab重链),hIDUA结合于该抗体的重链的C末端。其中,抗体的重链与hIDUA可以直接结合,也可以经由连接子而结合。

[0126] 就使hIDUA结合于hTfR抗体的轻链的N末端的类型的融合蛋白而言,抗体包含包括轻链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列和包括重链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列(例如Fab重链),hIDUA结合于该抗体的轻链的N末端。其中,抗体的轻链与hIDUA可以直接结合,也可以经由连接子而结合。

[0127] 就使hIDUA结合于hTfR抗体的重链的N末端的类型的融合蛋白而言,抗体包含包括轻链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列和包括重链的可变区的全部或一部分的氨基酸序列(例如Fab重链),hIDUA结合于该抗体的重链的N末端。其中,抗体的重链与hIDUA可以直接结合,也可以经由连接子而结合。

[0128] 此时,在hTfR抗体与hIDUA之间配置连接子的情况下,连接子的序列由优选为1~50个、更优选为1~20个、进一步优选为10~17个、进一步更优选为13~17个、例如由15个氨

氨基酸构成。就这样的连接子而言,只要借助其连结的抗体能保持与hTfR的亲合性,且通过所述连接子连结的hIDUA能在生理条件下发挥所述蛋白质的生理活性,就对其氨基酸序列没有限定,优选由甘氨酸和丝氨酸构成,例如,由甘氨酸或丝氨酸中的任一个氨基酸构成,具有氨基酸序列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、或这些氨基酸序列连续1~10个或者2~5个而成的由1~150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,由氨基酸序列Gly-Ser构成连接子、具有序列号3所示的氨基酸序列的连接子可以适合用作连接子。

[0129] 作为本发明中的抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的优选例子,可列举出如下融合蛋白:抗hTfR抗体的轻链包含序列号18的氨基酸序列,抗hTfR抗体的重链包含序列号19的氨基酸序列,该重链在其C末端经由序列号3的氨基酸序列的连接子与具有序列号20或序列号21的氨基酸序列的人 α -L-艾杜糖醛酸酶结合。

[0130] 作为本发明中的抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的更优选例子,可列举出如下融合蛋白:抗hTfR抗体的轻链包含序列号18的氨基酸序列,抗hTfR抗体的重链包含序列号19的氨基酸序列,该重链在其C末端经由序列号3的氨基酸序列的连接子与具有序列号20的氨基酸序列的人 α -L-艾杜糖醛酸酶结合,由此形成序列号24的氨基酸序列。

[0131] 作为本发明中的抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白的更优选例子,可列举出如下融合蛋白:抗hTfR抗体的轻链由序列号18的氨基酸序列构成,抗hTfR抗体的重链包含序列号19的氨基酸序列,该重链在其C末端侧经由序列号3的氨基酸序列的连接子与具有序列号20或序列号21的氨基酸序列的人 α -L-艾杜糖醛酸酶结合。

[0132] 本发明中的药物组合物包含作为有效成分的抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白。所述药物组合物可以为冻干剂也可以为水性液剂。

[0133] 本发明的一个实施方式中的药物组合物包含中性盐、二糖类、非离子性表面活性剂以及缓冲剂中的至少一种。所述医药品可以进一步包含聚山梨醇酯和/或泊洛沙姆作为非离子性表面活性剂。

[0134] 药物组合物中所含的非离子性表面活性剂只要是药剂学上可允许的就没有特别限定,作为所述非离子性表面活性剂,优选聚山梨醇酯和泊洛沙姆。在此,作为聚山梨醇酯,可举例示出聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80。此外,作为泊洛沙姆,可举例示出: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同义。

[0135] 药物组合物可以包含两种非离子性表面活性剂。作为药物组合物含有两种非离子性表面活性剂时的优选的非离子性表面活性剂的组合,一方为聚山梨醇酯且另一方为泊洛沙姆。例如,优选聚山梨醇酯20与泊洛沙姆188、聚山梨醇酯80与泊洛沙姆188的组合,特别优选聚山梨醇酯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他种类的聚山梨醇酯、泊洛沙姆等。

[0136] 在药物组合物为水性液剂的情况下,所述水性液剂含有作为两种非离子性表面活性剂的聚山梨醇酯和泊洛沙姆的情况下的聚山梨醇酯的浓度,优选为0.005mg/mL~1.5mg/

mL,更优选为0.025mg/mL~1.0mg/mL,进一步优选为0.05mg/mL~1.0mg/mL,进一步更优选为0.05mg/mL~0.15mg/mL,例如为0.075mg/mL。此外,此时的泊洛沙姆的浓度优选为0.1mg/mL~0.6mg/mL,更优选为0.2mg/mL~0.5mg/mL,进一步优选为0.25mg/mL~0.45mg/mL,例如为0.325mg/mL。

[0137] 在药物组合物为水性液剂的情况下,所述水性液剂含有作为两种非离子性表面活性剂的聚山梨醇酯80和泊洛沙姆188的情况下的聚山梨醇酯80的浓度,优选为0.005mg/mL~1.5mg/mL,更优选为0.025mg/mL~1.0mg/mL,进一步更优选为0.05mg/mL~1.0mg/mL,例如为0.075mg/mL。此外,此时的泊洛沙姆188的浓度优选为0.1mg/mL~0.6mg/mL,更优选为0.2mg/mL~0.5mg/mL,进一步优选为0.25mg/mL~0.45mg/mL,例如为0.325mg/mL。例如,聚山梨醇酯80的浓度为0.05mg/mL~1.0mg/mL,泊洛沙姆188的浓度为0.25mg/mL~0.45mg/mL。进一步例如,聚山梨醇酯80的浓度为0.075mg/mL,泊洛沙姆188的浓度为0.325mg/mL。

[0138] 药物组合物中所含的中性盐只要是药剂学上可允许的就没有特别限定,作为所述中性盐,优选氯化钠、氯化镁,特别优选氯化钠。

[0139] 药物组合物中所含的二糖类只要是药剂学上可允许的就没有特别限定,作为所述二糖类,优选海藻糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖或它们的组合,特别优选蔗糖。

[0140] 药物组合物为水性液剂的情况下的所述水性液剂中的二糖类的浓度优选为50mg/mL~100mg/mL,更优选为55mg/mL~95mg/mL,进一步优选为60mg/mL~90mg/mL,例如为75mg/mL。

[0141] 药物组合物中所含的缓冲剂只要是药剂学上可允许的就没有特别限定,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、醋酸缓冲剂或它们的组合。药物组合物为水性液剂的情况下的所述水性液剂中所含的缓冲剂的浓度优选为3mM~30mM,更优选为10mM~30mM,进一步优选为15mM~25mM,例如为20mM。在水性液剂中使用柠檬酸缓冲剂作为缓冲剂的情况下,水性液剂中所含的柠檬酸缓冲剂的浓度优选为3mM~30mM,更优选为10mM~30mM,进一步优选为15mM~25mM,例如为20mM。此外,利用缓冲剂调整的水性液剂的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。此外,利用柠檬酸缓冲剂调整的水性液剂的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。

[0142] 作为水性液剂的药物组合物的优选的组成,可列举出以下的(1)~(3):

[0143] (1) 该融合蛋白的浓度为1mg/mL~10mg/mL,该中性盐的浓度为0.3mg/mL~1.2mg/mL,该二糖类的浓度为50mg/mL~100mg/mL,该缓冲剂的浓度为10mM~30mM,该聚山梨醇酯的浓度为0.005mg/mL~1.5mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.1mg/mL~0.6mg/mL的水性液剂;

[0144] (2) 该融合蛋白的浓度为2mg/mL~8mg/mL,该中性盐的浓度为0.5mg/mL~1.0mg/mL,该二糖类的浓度为55mg/mL~95mg/mL,该缓冲剂的浓度为15mM~25mM,该聚山梨醇酯的浓度为0.05mg/mL~1.0mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.25mg/mL~0.45mg/mL的水性液剂;以及

[0145] (3) 该融合蛋白的浓度为4mg/mL~6mg/mL,该中性盐的浓度为0.7mg/mL~0.9mg/mL,该二糖类的浓度为60mg/mL~90mg/mL,该缓冲剂的浓度为15mM~25mM,该聚山梨醇酯的浓度为0.05mg/mL~0.15mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.25mg/mL~0.45mg/mL的水性液剂。

[0146] 需要说明的是,上述(1)~(3)的水性液剂的pH例如调整至4.5~6.5、5.0~6.0或

5.2~5.8。

[0147] 作为冻干剂的药物组合物的优选的组成,可列举出以下的(1)~(3):

[0148] (1)用纯水溶解时,该融合蛋白的浓度为1mg/mL~10mg/mL,该中性盐的浓度为0.3mg/mL~1.2mg/mL,该二糖类的浓度为50mg/mL~100mg/mL,该缓冲剂的浓度为10mM~30mM,该聚山梨醇酯的浓度为0.005mg/mL~1.5mg/mL,以及该泊洛沙姆的浓度为0.1mg/mL~0.6mg/mL的冻干剂;

[0149] (2)用纯水溶解时,该融合蛋白的浓度为2mg/mL~8mg/mL,该中性盐的浓度为0.5mg/mL~1.0mg/mL,该二糖类的浓度为55mg/mL~95mg/mL,该缓冲剂的浓度为15mM~25mM,该聚山梨醇酯的浓度为0.05mg/mL~1.0mg/mL,以及该泊洛沙姆的浓度为0.25mg/mL~0.45mg/mL的冻干剂;以及

[0150] (3)用纯水溶解时,该中性盐的该融合蛋白的浓度为4mg/mL~6mg/mL,浓度为0.7mg/mL~0.9mg/mL,该二糖类的浓度为60mg/mL~90mg/mL,该缓冲剂的浓度为15mM~25mM,该聚山梨醇酯的浓度为0.05mg/mL~0.15mg/mL,该泊洛沙姆的浓度为0.25mg/mL~0.45mg/mL的冻干剂。

[0151] 需要说明的是,用纯水溶解上述(1)~(3)的冻干剂时的pH例如为4.5~6.5、5.0~6.0或5.2~5.8。

[0152] 作为水性液剂的药物组合物,可以采用填充于小瓶的形态,也可以以预先填充于注射器的预填充型制剂的方式供给。对于填充水性药物组合物的注射器、小瓶等容器的材质没有特别限定,优选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环烯烃类开环聚合物加氢得到的物质等疏水性树脂制的容器。

[0153] 作为冻干剂的药物组合物也可以与用于将其溶解的专用溶液一起以试剂盒(kit)的方式供给。冻干剂例如在使用前用专用溶液、纯水等溶解来使用。对于将冻干制剂封入、填充等的注射器和小瓶等容器的材质没有特别限定,优选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环烯烃类开环聚合物加氢得到的物质等疏水性树脂制的容器。

[0154] 药物组合物无论为水性液剂或冻干剂中的哪种形态,通常将药物组合物添加至装有生理盐水等的透析袋中进行稀释,注入给患者。

[0155] 在本发明的一个实施方式中,药物组合物用作黏多糖贮积症I型的治疗剂。黏多糖贮积症I型被分类为重症型的Hurler综合征(MPS IH)、中间型的Hurler-Scheie综合征(MPS IH-S)以及轻症型的Scheie综合征(MPS IS),所述药物组合物能用于任何类型的黏多糖贮积症I型。

[0156] 黏多糖贮积症I型的原因在于:具有将存在于硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素这样的糖胺聚糖(GAG)的分子内的非硫酸化 α -L-艾杜糖苷(iduronosidic)键水解的活性的hIDUA遗传性地缺损一部分或全部。患者由于黏多糖贮积症I型的hIDUA的缺损,导致硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素异常地蓄积于包括脑的全身的组织中,表现出骨骼变形、重症的智障等各种症状。

[0157] 作为药物组合物的有效成分的抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白穿过BBB在脑组织内发挥IDUA活性,能分解硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素,因此所述药物组合物特别作为用于在

中枢神经系统具有障碍的黏多糖贮积症I型的患者的酶替代疗法的治疗药是有效的。

[0158] 在本发明的一个实施方式中,通过非肠道途径例如静脉输液向黏多糖贮积症I型的患者给药,例如通过点滴进行静脉输液。

[0159] 所述药物组合物以0.1~10mg/kg体重的剂量,例如1~10mg/kg体重、1~6mg/kg体重、2~6mg/kg体重、2mg/kg体重、4mg/kg体重、6mg/kg体重、或8mg/kg体重的剂量,通过静脉输液向黏多糖贮积症I型的患者给药。在将所述药物组合物通过点滴进行静脉输液的情况下,给药速度调整为使融合蛋白以每1小时0.33mg~200mg的量被注入。通常,给药所需要的时间为30分钟~4小时,例如为3小时。

[0160] 黏多糖贮积症I型是遗传病,给药是对症疗法,因此需要持续地给药所述药物组合物。所述药物组合物优选隔3~21天、更优选隔5~14天的间隔进行给药,例如隔7天、14天等间隔进行给药。所述药物组合物的给药持续时间没有特别限制,优选为至少1个月,更优选为至少3个月。可以设想所述药物组合物将终生进行给药。

[0161] 就所述药物组合物的给药量而言,可以是初次的给药停留在少量,之后逐渐增加。作为有效成分的抗hTfR抗体与hIDUA的融合蛋白对患者来说是异物,因此存在产生免疫反应等副反应的可能性。通过采用逐渐增加给药量的方法,能降低患者产生急剧的副反应的可能性。

[0162] 作为采用逐渐增加给药量的方法的情况的给药进度,例如可列举出以下的(1)~(8)。

[0163] (1) 初次以0.1~2mg/kg体重的剂量给药,之后,与初次剂量相比,增加剂量。

[0164] (2) 初次以0.1~2mg/kg体重的剂量给药,之后,增加剂量至2mg/kg体重、4mg/kg体重、或6mg/kg体重。

[0165] (3) 初次以0.1~0.5mg/kg体重的剂量给药,第二次和第三次以1~2mg/kg体重的剂量给药,第四次以后以维持剂量4mg/kg体重给药。

[0166] (4) 初次以0.1~0.2mg/kg体重的剂量给药,第二次以2mg/kg体重的剂量给药,第三次以后以4mg/kg体重的剂量(维持剂量)给药。

[0167] (5) 初次以0.1mg/kg体重的剂量给药,第二次以后以2mg/kg体重的剂量(维持剂量)给药。

[0168] (6) 初次以0.1mg/kg体重的剂量给药,第二次以1mg/kg体重,第三次以2mg/kg体重的剂量给药,第四次以后以4mg/kg体重的剂量(维持剂量)给药。

[0169] (7) 初次以0.1mg/kg体重的剂量给药,第二次以2mg/kg体重的剂量给药,第四次以后以4mg/kg体重的剂量(维持剂量)给药。

[0170] (8) 初次以1.0mg/kg体重的剂量给药,第二次以2mg/kg体重的剂量给药,第四次以后以4mg/kg体重的剂量(维持剂量)给药。

[0171] 作为所述药物组合物的优选的用法剂量,隔7天的间隔,至少1个月内,以4mg/kg体重的剂量,经过至少1或2小时例如3小时,通过点滴来静脉输液给患者。

[0172] 当以上述的用法剂量对患者给药时,所述药物组合物不会给患者造成严重不良事件。但是,为了抑制免疫反应,药物组合物也可以与免疫抑制剂并用。可以并用的免疫抑制剂没有特别限定,例如可以使用环磷酰胺等烷基化剂;硫唑嘌呤、霉酚酸酯、甲氨蝶呤、咪唑立宾等代谢拮抗剂;环孢菌素、他克莫司等细胞内信号传导抑制剂。

[0173] 在将所述药物组合物作用于黏多糖贮积症I型的患者的酶替代疗法的治疗药的情况下,所述药物组合物的给药效果例如可以通过在给药前后采集患者的脑脊液(CSF)、血清和/或尿,测定它们中的硫酸乙酰肝素和/或硫酸皮肤素的浓度来进行评价。据认为硫酸乙酰肝素在中枢神经系统中的蓄积成为中枢神经系统的功能障碍的原因,因此可预测由于脑脊液中的硫酸乙酰肝素的浓度的减少,患者的中枢神经系统的功能有所改善。硫酸乙酰肝素和/或硫酸皮肤素的浓度的测定可以通过实施例记载的方法进行。

[0174] 当向黏多糖贮积症I型的患者给药该药物组合物时,给药后采集自该患者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度与最初给药该药物组合物前的采集自患者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度相比减少。给药后的硫酸乙酰肝素的浓度与给药前的硫酸乙酰肝素的浓度相比,优选为2/3以下、1/2以下、或1/3以下。

[0175] 例如,所述药物组合物可以通过如下给药方案来减少患者的脑脊液(CSF)、血清和/或尿中的硫酸乙酰肝素和/或硫酸皮肤素的浓度,所述给药方案为:向黏多糖贮积症I型的患者以2mg/kg体重或4mg/kg体重的剂量给药该药物组合物,或者初次以1.0mg/kg体重的剂量给药,第二次以2mg/kg体重的剂量给药,第四次以后以4mg/kg体重的剂量(维持剂量)逐渐增加给药量,隔7天的间隔,历时3个月(12周)进行给药。在以所述用法剂量给药所述药物组合物的情况下,给药后采集自该患者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度与最初给药该药物组合物前的采集自患者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度相比,优选为2/3以下,更优选为1/2以下,进一步优选为1/3以下。或者,给药后采集自该患者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度优选为2000ng/mL以下,更优选为1800ng/mL以下,进一步优选为1600ng/mL以下,进一步优选为1500ng/mL以下,进一步优选为1400ng/mL以下。

[0176] 当向黏多糖贮积症I型的患者给药该药物组合物时,可以期待黏多糖贮积症I型的患者的功能障碍的改善。作为可以期待的功能障碍的改善,可列举出:能进行更长时间的对话、能进行更多的文字书写、活力增加、减轻腰、膝等的关节痛、减轻伴随步行的疼痛、肌肉和关节的僵硬、能更容易地进行开罐等指尖的运动、篮球等全身运动、提高语言能力,但并不限于此。

[0177] 实施例

[0178] 以下,参照实施例来对本发明进一步详细地进行说明,但没有意图将本发明限定于实施例。

[0179] (实施例1)人源化抗hTfR抗体-hIDUA融合蛋白表达用载体的构建

[0180] 人源化抗hTfR抗体-hIDUA融合蛋白表达用载体使用编码作为抗体部分的具有序列号18所示的氨基酸序列的轻链和具有序列号19所示的氨基酸序列的重链的Fab区的基因来构建。

[0181] (pE-neo载体和pE-hygr载体的构建)

[0182] 用KpnI和NcoI消化pEF/myc/nuc载体(Invitrogen公司),切出包含EF-1启动子及其第一内含子的区域,然后使用T4 DNA聚合酶对其进行末端平滑化处理。另外,用BglIII和EcoRI消化pCI-neo(Invitrogen公司),切除包含CMV的增强子/启动子以及内含子的区域,然后使用T4 DNA聚合酶进行末端平滑化处理。在其中插入上述的包含EF-1 α 启动子及其第一内含子的区域(末端平滑化处理后),构建pE-neo载体。用SfiI和BstXI消化pE-neo载体,切除包含新霉素抗性基因的约1kbp的区域。以pcDNA3.1/Hygro(+)(Invitrogen公司)为模

板,使用引物Hyg-Sfi5' (序列号22)和引物Hyg-BstX3' (序列号23),通过PCR反应扩增潮霉素基因。用SfiI和BstXI消化扩增的潮霉素基因,插入至上述的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(日本特许第6279466号)进行。

[0183] (pE-IRES-GS-puro的构建)

[0184] 用限制酶(XhoI和BamHI)消化表达载体pPGKIH(Miyahara M.et.al., J.Biol.Chem.275,613-618(2000)),切出包含源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)以及小鼠磷酸甘油酸激酶(mPGK)的多腺苷酸化区(mPGKpA)的DNA片段。将该DNA片段插入至pBluescript SK(-)(Stratagene公司)的XhoI位点和BamHI位点之间,将其作为pBSK(IRES-Hygr-mPGKpA)。

[0185] 以pBSK(IRES-Hygr-mPGKpA)为模板,使用引物IRES5' (序列号24)和引物IRES3' (序列号25),通过PCR扩增包含EMCV的IRES的一部分的DNA片段。用限制酶(XhoI和HindIII)消化该DNA片段,插入至pBSK(IRES-Hygr-mPGKpA)的XhoI位点和HindIII位点之间,将其作为pBSK(NotI-IRES-Hygr-mPGKpA)。用限制酶(NotI和BamHI)消化pBSK(NotI-IRES-Hygr-mPGKpA),插入至pE-hygr载体的NotI位点和BamHI位点之间,将其作为质粒pE-IRES-Hygr。

[0186] 用EcoRI消化表达载体pPGKIH,切出由包含mPGK的启动子区(mPGKp)的碱基序列构成的DNA片段。将该DNA片段插入至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26)和引物mPGKP3' (序列号27),通过PCR扩增包含mPGK的启动子区(mPGKp)的DNA片段。用限制酶(BglII和EcoRI)消化该DNA片段,插入至pCI-neo(Promega公司)的BglII位点和EcoRI位点之间,将其作为pPGK-neo。用限制酶(NotI和BamHI)消化pE-IRES-Hygr来切出DNA片段(IRES-Hygr),插入至pPGK-neo的NotI位点和BamHI位点之间,将其作为pPGK-IRES-Hygr。

[0187] 由CHO-K1细胞制备cDNA,以此为模板,使用引物GS5' (序列号28)和引物GS3' (序列号29),通过PCR扩增包含GS基因的DNA片段。用限制酶(BalI和BamHI)消化该DNA片段,插入至pPGK-IRES-Hygr的BalI位点和BamHI位点之间,将其作为pPGK-IRES-GS-ΔpolyA。

[0188] 以pCAGIPuro(Miyahara M.et.al., J.Biol.Chem.275,613-618(2000))为模板,使用引物puro5' (序列号30)和引物puro3' (序列号31),通过PCR扩增包含嘌呤霉素抗性基因(puro^r基因)的DNA片段。将该DNA片段插入至pT7Blue T-Vector(Novagen公司),将其作为pT7-puro。

[0189] 用限制酶(AflIII和BstXI)消化pT7-puro,插入至表达载体pE-neo的AflIII位点和BstXI位点之间,将其作为pE-puro。

[0190] 以pE-puro为模板,使用引物SV40polyA5' (序列号32)和引物SV40polyA3' (序列号33),通过PCR扩增包含SV40后期多聚腺苷酸化区的DNA片段。用限制酶(NotI和HpaI)消化该DNA片段,插入至表达载体pE-puro的NotI位点和HpaI位点之间,将其作为pE-puro(XhoI)。用限制酶(NotI和XhoI)消化pPGK-IRES-GS-ΔpolyA,切出包含IRES-GS区的DNA片段,将其插入至表达载体pE-puro(XhoI)的NotI位点和XhoI位点之间,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(日本特许第6279466号)进行。

[0191] (pE-mIRES-GS-puro(ΔE)的构建)

[0192] 以表达载体pE-IRES-GS-puro为模板,使用引物mIRES-GS5' (序列号34)和引物mIRES-GS3' (序列号35),通过PCR,扩增EMCV的从IRES起到GS的区域,扩增对位于EMCV的IRES的5'侧起第二位的起始密码子(ATG)施加变异而破坏的DNA片段。以表达载体pE-IRES-GS-puro为模板,使用该DNA片段和上述的引物IRES5',通过PCR扩增包括从IRES起到GS的上述区域的DNA片段。用限制酶(NotI以及PstI)消化该DNA片段,将切出的DNA片段插入至pBluescript SK(-)(Stratagene公司)的NotI位点和PstI位点之间,将其作为mIRES/pBlueScript SK(-)。

[0193] 用SphI消化表达载体pE-IRES-GS-puro,切除SV40增强子区。使残留的DNA片段自身连接(self ligation),将其作为pE-IRES-GS-puro(Δ E)。用NotI和PstI消化mIRES/pBlueScript SK(-),切出包含修饰型IRES(mIRES)和GS基因的一部分的区域。另外,用NotI和PstI消化pE-IRES-GS-puro(Δ E),插入至上述的包含mIRES和GS基因的一部分的区域,构建pE-mIRES-GS-puro(Δ E)。

[0194] (pEM-hygr(LC3)和pE-mIRES-GSp-Fab-IDUA的构建)

[0195] 人工合成了包含 β -Globin MAR(Matrix Attachment Region:核基质结合区)、CMV增强子、人EF-1 α 启动子、MluI和BamHI切割位点以及干扰素 β Mar的DNA片段(CMVE-EF-1 α p-IFN β MAR)(序列号36)。在该DNA片段的5'侧导入HindIII序列,在3'侧导入EcoRI序列。用HindIII和EcoRI消化该DNA片段,插入至pUC57载体的HindIII位点和EcoRI位点之间,将其作为JCR69 in pUC57。人工合成了包含MluI和BamHI切割位点、IRES、潮霉素抗性基因以及mPGK多聚腺苷酸化信号的DNA片段(IRES-HygroR-mPGKpA)(序列号40)。将该DNA片段插入至JCR69 in pUC57的MluI和BamHI位点,将其作为pEM hygro。

[0196] 人工合成包含编码具有序列号14所示的氨基酸序列的人源化抗hTfR抗体的轻链的全长的基因的DNA片段(序列号37)并插入至pUC57-Amp,将其作为JCR131 in pUC57-Amp。在该DNA片段的5'侧导入MluI序列,在3'侧导入NotI序列。用MluI和NotI消化该质粒DNA,嵌入在表达载体pEM hygro的MluI-NotI之间。将所得到的载体设为作为人源化抗hTfR抗体的轻链的表达用载体的pEM-hygr(LC3)。

[0197] 人工合成整体上具有包含编码具有序列号38所示的氨基酸序列的蛋白质的基因的序列号39所示的碱基序列的DNA片段,其在具有序列号19所示的氨基酸序列的人源化抗hTfR抗体的Fab重链的C末端侧经由序列号3所示的连接子序列结合有具有序列号20所示的氨基酸序列的人IDUA。在该DNA片段的5'侧导入MluI序列,在3'侧导入NotI序列。用MluI和NotI消化该DNA片段,嵌入在pE-mIRES-GS-puro(Δ E)的MluI和NotI之间。将所得到的载体设为作为使hIDUA结合于人源化抗hTfR抗体的Fab重链的C末端侧而得到的蛋白质的表达用载体的pE-mIRES-GSp-Fab-IDUA。

[0198] (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

[0199] 利用下述的方法,使用NEPA21(NEPAGENE公司),通过实施例1中构建的pEM-hygr(LC3)和pE-mIRES-GSp-Fab-IDUA转化CHO细胞(CHO-K1:从American Type Culture Collection获取)。

[0200] 细胞的转化大致通过以下的方法进行。将CHO-K1细胞以成为 2×10^7 细胞/mL的密度的方式用CD OptiCHO™培养基(Thermo Fisher Scientific公司)和PBS的1:1混合液进行悬浮。采集50 μ L的细胞悬浮液,向其中添加50 μ L用CD OptiCHO™培养基和PBS的1:1混合液稀

释至200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的pEM-hygr (LC3) 质粒DNA溶液。使用NEPA21 (NEPAGE公司) 实施电穿孔,将pEM-hygr (LC3) 质粒DNA导入至细胞中。在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的条件下培养一夜,然后用添加有0.5mg/mL的潮霉素的CD OptiCHOTM培养基选择培养细胞。利用同样的方法,将pE-mIRES-GSp-Fab-IDUA质粒DNA (用AhdI消化,经线性化) 导入至所得到的细胞中。在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的条件下培养一夜,然后用添加有0.5mg/mL的潮霉素和10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素的CD OptiCHOTM培养基选择培养细胞。选择培养时,阶段性地提高MSX的浓度,最终使MSX浓度成为300 μM ,选择性地增殖表现出抗药性的细胞。

[0201] 接着,通过有限稀释法,在96孔板上接种通过选择培养选择出的细胞,以使每个孔增殖1个以下的细胞,培养约2周以使各细胞形成单克隆集落。采集形成有单克隆集落的孔的培养上清液,利用ELISA法定量人源化抗体含量,选择人源化抗hTfR抗体-hIDUA融合蛋白的高表达细胞株。

[0202] 此时的ELISA法大致按照以下的方法实施。在96孔微量滴定板 (Nunc公司) 的各孔中,分别加入100 μL 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的稀释液,在室温或4 $^{\circ}\text{C}$ 下静置至少1小时,使抗体吸附在板上。接着,使用在Tris缓冲生理盐水 (pH8.0) 中添加有0.05% Tween20的缓冲液 (TBS-T) 清洗各孔三次,然后在各孔中分别加入300 μL 在Tris缓冲生理盐水 (pH8.0) 中添加有1% BSA的缓冲液,将板在室温下静置1小时。接着,用TBS-T清洗各孔三次,然后在各孔中分别加入100 μL 用在Tris缓冲生理盐水 (pH8.0) 中添加有0.1% BSA和0.05% Tween20的缓冲液 (TBS-BT) 稀释至适当浓度的培养上清液或人源化抗hTfR抗体-hIDUA融合蛋白纯化物,将板在室温下静置1小时。接着,用TBS-T清洗板三次,然后在各孔中分别加入50 μL 用TBS-BT稀释的HRP标记抗人IgG多克隆抗体溶液,将板在室温下静置1小时。用TBS-T清洗各孔三次,然后使用ELISA POD基质TMB试剂盒 (Nakalai Tesque公司) 进行显色。接着,在各孔中分别加入50 μL 的1mol/L硫酸使反应停止,使用96孔板读板仪,测定各孔在450nm下的吸光度。选择与显示出高测定值的孔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。将这样得到的人源化抗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)。

[0203] 使所得到的的人源化抗hTfR抗体-hIDUA表达株在含有10mg/L胰岛素、16 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 胸苷、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 次黄嘌呤、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素B、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素、300 $\mu\text{mol}/\text{L}$ MSX以及10% (v/v) DMSO的CD OptiCHOTM培养基悬浮后分注到冻存管中,作为种子细胞保存在液氮中。

[0204] (实施例3)人源化抗hTfR抗体-hIDUA表达株的培养

[0205] 为了获得人源化抗hTfR抗体-hIDUA,通过以下的方法培养人源化抗hTfR抗体-hIDUA表达株。使实施例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的方式悬浮在含有10mg/L胰岛素、16 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 胸苷、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 次黄嘌呤的、调整至pH6.9的约170L的无血清培养基 (CD OptiCHOTM培养基, ThermoFisher SCIENTIFIC公司) 中。将170L该细胞悬浮液移到培养槽中。用叶轮以大致100rpm的速度搅拌培养基,将培养基的溶解氧饱和度保持在约30%,在34~37 $^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内培养细胞约10天。在培养期间,监测细胞密度、细胞活性、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以下的情况下,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,

将进料(feed)液(EFFICIENTFEED A+™, ThermoFisher SCIENTIFIC公司)适当添加至培养基中。培养结束后回收培养基。用Millistak+HC Pod Filter grade DOHC(Merck公司)过滤回收的培养基,再用Millistak+HCgrade X0HC(Merck公司)进行过滤,得到了包含人源化抗hTfR抗体-hIDUA的培养上清液。使用Pellicon™3Cassette w/Ultracel PLCTK膜(孔径:30kDa,膜面积:1.14m²,Merck公司)对该培养上清液进行超滤,浓缩至液量为约1/14。接着,使用Opticap XL600(0.22μm,Merck公司)过滤该浓缩液。将所得到的液体作为浓缩培养上清液。

[0206] (实施例4)人源化抗hTfR抗体-hIDUA的纯化

[0207] 向实施例3中得到的浓缩培养上清液中添加0.25倍容量的2M精氨酸溶液(pH7.0)。将该溶液以100cm/小时的恒定流速加载到用柱体积的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 Select™CH1-XL柱(柱体积:约3.1L,柱床高度:约20cm,Thermo Fisher Scientific公司)上,使人源化抗hTfR抗体-hIDUA吸附在柱上。Capture Select™CH1-XL柱是由具有与IgG抗体的CH1结构域特异性结合的性质的配体固定在载体上的亲和柱。

[0208] 接着,以相同流速供给柱体积的5倍容量的相同缓冲液来清洗柱。接着,以相同流速供给柱体积的3倍容量的25mM MES缓冲液(pH6.5)来进一步清洗柱。接着,用柱体积的5倍容量的10mM醋酸钠-HCl缓冲液(pH3.5),洗脱吸附在柱上的人源化抗hTfR抗体-hIDUA。洗脱液由预先加入了250mM MES缓冲液(pH6.0)的容器承接,立即进行中和。

[0209] 在上述的来自亲和柱的洗脱液中添加250mM MES缓冲液(pH6.5),将洗脱液的pH调整至6.0。接着,用Opticap XL600(孔径:0.22μm,Merck公司)过滤该洗脱液。将该过滤后的溶液以300cm/小时的恒定流速加载到用柱体积的5倍容量的含有15mM NaCl的50mM MES缓冲液(pH6.0)进行了平衡化的、作为多模式阴离子交换柱的Capto adhere柱(柱体积:约1.5L,柱床高度:约10cm,GE Healthcare公司)上。回收包含该人源化抗hTfR抗体-hIDUA的加载液。Capto adhere是以N-苄基-N-甲基乙醇胺为配体,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。

[0210] 接着,以相同流速供给柱体积的5倍容量的相同缓冲液来清洗柱,回收该清洗液。

[0211] 将上述加载液和清洗液以200cm/小时的恒定流速加载到用柱体积的4倍容量的含有300mM NaCl的25mM MES缓冲液(pH6.5)进行了平衡化的、作为多模式弱阳离子交换柱的Capto MMC柱(柱体积:约3.1L,柱床高度:约20cm,GE Healthcare公司)上。Capto MMC是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。

[0212] 接着,以相同流速供给柱体积的5倍容量的相同缓冲液来清洗柱。接着,用柱体积的10倍容量的含有1M NaCl的25mM MES缓冲液(pH6.5),洗脱吸附在弱阳离子交换柱上的人源化抗hTfR抗体-hIDUA。

[0213] 在上述的来自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(pH5.5),将pH调整至5.8。接着,使用Pellicon™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的浓度为约30mg/mL。接着,使用Opticap XL600(0.22μm,Merck公司)过滤该浓缩液。

[0214] 将上述的浓缩液以40cm/小时的恒定流速加载到用柱体积的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 (pH5.5) 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) 上,进一步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上配置用于连续测定洗脱液的吸光度的吸光度计,监测280nm的吸光度,回收在280nm显示出吸收峰的级分作为包含人源化抗hTfR抗体-hIDUA的级分,将其作为人源化抗hTfR抗体-hIDUA纯化品。

[0215] (实施例5)水性药物组合物的制备

[0216] 使用实施例4中得到的人源化抗hTfR抗体-hIDUA融合蛋白纯化品,制备具有表1中示出的组成的水性药物组合物。该水性药物组合物以1mL~10mL的液量被填充、封入到玻璃制或塑料制的小瓶、安瓿、或注射器中,在低温(例如4℃)下储藏。将水性药物组合物填充、封入到注射器中得到的制剂为预充式注射器型的制剂。

[0217] [表1]

[0218] 表1含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA的水性液剂的组成

[0219]

成分	组成
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
聚山梨醇酯80	0.075
pH	5.5

[0220] (各添加物的浓度以mg/mL为单位示出。)

[0221] (实施例6)临床试验(第I期)

[0222] 为了确认实施例5中制备的含有人源化抗hTfR抗体-hIDUA融合蛋白的水性药物组合物(以下,称为“受试制剂”)的安全性和对黏多糖贮积症I型的有效性,实施临床试验(第I期)。

[0223] 在临床试验(第I期)中,将满足至少表2所示的选择标准的黏多糖贮积症I型(MPS I)患者作为受试者。受试者人数设为4名。需要说明的是,全部受试者在参加所述试验前均已接受了通常的黏多糖贮积症I型的酶替代疗法。

[0224] [表2]

[0225] 表2受试者的选择标准

	选择标准
	年龄为 18 岁以上。
[0226]	符合以下的 (1) ~ (3) 中任意项, 被诊断为 MPSI 的人: (1) 白血球或培养皮肤成纤维细胞的 IDUA 酶活性小于基准值下限的 10%, 并且确认到伴随增龄的尿中糖胺聚糖 (GAG: glycosaminoglycan) 浓度的增加 (酶替代疗法前)。 (2) 白血球或培养皮肤成纤维细胞的 IDUA 酶活性小于基准值下限的 10%, 并且同源染色体的任何 IDUA 基因都存在对酶活性产生影响的变异。 (3) 确认到伴随增龄的尿中 GAG 浓度的增加 (酶替代疗法前), 并且同源染色体的任何 IDUA 基因都存在对酶活性产生影响的变异。

[0227] 以表3所示的给药量和给药法将受试制剂给药于患者。即,初次以0.1mg/kg体重的剂量给药,第二次以1.0mg/kg体重的剂量,第三次以2.0mg/kg体重的剂量,以及第四次以4.0mg/kg体重的剂量,共计四次将受试制剂给药于各受试者。各次给药隔1周的间隔进行。此外,各给药一边观察受试者的状态一边历时约3小时通过点滴静脉注射来进行。此外,临床试验结束后,患者接受通常的黏多糖贮积症I型的酶替代疗法。此外,在给药受试制剂前和第四次给药后5小时以内,从各受试者采集脑脊液。此外,在给药受试制剂前和第四次给药1周后接受通常的黏多糖贮积症I型的酶替代疗法前,从各受试者采集血清和尿。

[0228] [表3]

[0229] 表3受试制剂的给药量和给药方法

	给药量和给药方法
[0230]	以相对于每 1kg 体重 0.1mg 的剂量通过点滴静脉注射初次给药受试制剂。以第二次为 1.0mg/kg, 第三次为 2.0mg/kg, 第四次为 4.0mg/kg 逐渐增加剂量的方式给药受试制剂。给药间隔设为 1 周。历时约 3 小时给药点滴总量。

[0231] 受试制剂对黏多糖贮积症I型的有效性通过检查表4所示的项目进行评价。需要说明的是,表4示出临床试验方案中记载的一部分有效性的评价项目。

[0232] [表4]

[0233] 表4受试制剂的有效性的评价项目 (摘录)

[0234]	有效性的评价项目
	脑脊液中的硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的浓度
	血清中的硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的浓度

尿中的硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的浓度
脑脊液中药物浓度
与神经认知和行动的变化相关的其他临床表现

[0235] 受试制剂的黏多糖贮积症I型的安全性通过检查表5所示的项目进行评价。需要说明的是,表5示出临床试验方案中记载的一部分安全性的评价项目。

[0236] [表5]

[0237] 表5受试制剂的安全性的评价项目(摘录)

[0238]	安全性评价项目
	不良事件
	临床检查(血液学检查、血液生化学检查、铁相关检查、尿检查)
	生命体征(脉搏数、体温、血压)
	12导联心电图
	抗体检查(抗IDUA抗体、抗人源化抗体的抗体)
	给药相关反应(IAR: 输液相关反应)

[0239] (实施例7)临床试验(第I期)的有效性评价

[0240] (脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的浓度)

[0241] 将实施例6中从各受试者采集的在受试制剂的给药前和在第四次给药后5小时以内从各受试者采集的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的浓度的测定结果分别示于图1和图2。着眼于硫酸乙酰肝素,在受试制剂的给药前,受试者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度的平均值为1132ng/mL,给药后的所述浓度的平均值大幅减少为467ng/mL(图1)。非黏多糖贮积症患者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度的平均值大约为360ng/mL,由此预测出通过进一步持续受试制剂的给药,能使脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度减少至非黏多糖贮积症患者水平。需要说明的是,硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的浓度通过实施例12~14中记载的方法进行测定。

[0242] 着眼于硫酸皮肤素,在受试制剂的给药前,受试者的脑脊液中所含的硫酸皮肤素的浓度的平均值为264ng/mL,给药后的所述浓度的平均值大幅减少为213ng/mL(图2)。关于硫酸皮肤素也与硫酸乙酰肝素同样,预测出通过进一步持续受试制剂的给药,能使脑脊液中所含的硫酸皮肤素的浓度减少至非黏多糖贮积症患者水平。

[0243] 这些结果表明:通过点滴静脉注射给药于患者的受试制剂穿过BBB到达中枢神经系统,将蓄积于此的糖胺聚糖分解去除,受试制剂对黏多糖贮积症I型的中枢神经系统的异常也有药效。此外,根据这些结果可预测,受试制剂通过以1~6mg/kg体重、或1~8mg/kg体重的剂量1周给药1次,来发挥其药效。

[0244] (血清和尿中所含的硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的浓度)

[0245] 将实施例6中从各受试者采集的在受试制剂的给药前和在第四次给药1周后且接受通常的黏多糖贮积症I型的酶替代疗法前分别从各受试者采集的血清中所含的硫酸乙酰

肝素和硫酸皮肤素的浓度的测定结果分别示于图3和图4。着眼于硫酸乙酰肝素,在受试制剂的给药前,受试者的血清中所含的硫酸乙酰肝素的浓度的平均值为359ng/mL,给药后的所述浓度的平均值大幅减少为217ng/mL(图3)。着眼于硫酸皮肤素,在受试制剂的给药前,受试者的血清中所含的硫酸皮肤素的浓度的平均值为965ng/mL,给药后的所述浓度的平均值大幅减少为867ng/mL(图4)。

[0246] 将实施例6中从各受试者采集的在受试制剂的给药前和在第四次给药1周后且接受通常的黏多糖贮积症I型的酶替代疗法前分别从各受试者采集的尿中所含的硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的浓度的测定结果分别示于图5和图6。着眼于硫酸乙酰肝素,在受试制剂的给药前,受试者的尿中所含的硫酸乙酰肝素的浓度的平均值为31.0 μ g/mg肌酸酐,给药后的所述浓度的平均值大幅减少为16.0 μ g/mg肌酸酐(图5)。着眼于硫酸皮肤素,在受试制剂的给药前,受试者的尿中所含的硫酸皮肤素的浓度的平均值为22.7 μ g/mg肌酸酐,给药后的所述浓度的平均值大幅减少为17.1 μ g/mg肌酸酐(图6)。这些结果表明:通过点滴静脉注射给药于患者的受试制剂不仅将蓄积于中枢神经系统的糖胺聚糖分解去除,还将蓄积于全身的组织糖胺聚糖分解去除,受试制剂对黏多糖贮积症I型的中枢神经系统及其他组织的异常也有药效。并且,对蓄积于中枢神经系统及其他组织的糖胺聚糖被分解去除后的患者可以期待能进行更长时间的对话、能进行更多的文字书写、活力增加、减轻腰、膝等的关节痛、减轻伴随步行的疼痛、肌肉和关节的僵硬、能更容易地进行开罐等指尖的运动、篮球等全身运动、提高语言能力等功能障碍的改善。

[0247] (实施例8)临床试验(第I期)的安全性评价

[0248] 在受试制剂的给药期间,在全部受试者中未确认到严重不良事件。即,表明受试制剂可以安全地以0.1~4mg/kg体重的剂量1周给药1次。

[0249] (实施例9)临床试验(第II期)

[0250] 临床试验(第II期)是为了确认给药受试制剂3个月时的安全性和对黏多糖贮积症I型的有效性。

[0251] 在临床试验(第II期)中,将满足至少表2所示的选择标准的黏多糖贮积症I型(MPS I)患者作为受试者。需要说明的是,全部受试者在参加所述试验前均已接受了通常的黏多糖贮积症I型的酶替代疗法。

[0252] 临床试验(第II期)包括两个试验。在临床试验(第II期)第一试验中,以表6所示的给药量和给药法将受试制剂给药于患者。即,初次以1.0mg/kg体重的剂量给药,第二次以2.0mg/kg体重的剂量,从第三次到第十二次这十次以4.0mg/kg体重的剂量将受试制剂给药于各受试者。各次给药隔1周的间隔进行。此外,各给药一边观察受试者的状态一边历时约3小时通过点滴静脉注射来进行。受试者设为两人。

[0253] [表6]

[0254] 表6受试制剂的给药量和给药方法(临床试验(第II期)第一试验)

	给药量和给药方法
--	----------

[0255]

	以相对于每 1kg 体重 1.0mg 的剂量通过点滴静脉注射初次给药受试制剂。第二次为 2.0mg/kg 的剂量，之后从第三次到第十二次共计十次为 4.0mg/kg 的剂量，通过点滴静脉注射给药受试制剂。给药间隔设为 1 周。历时约 3 小时给药点滴总量。
--	--

[0256] 在临床试验(第II期)第二试验中,以表7所示的给药量和给药法将受试制剂给药于患者。即,将受试者分为两组,对一组以2.0mg/kg体重的剂量给药受试制剂(2.0mg/kg体重给药组),对另一组以4.0mg/kg体重的剂量给药受试制剂(4.0mg/kg体重给药组)。各组均隔1周的间隔给药受试制剂十二次。此外,各给药一边观察受试者的状态一边历时约3小时通过点滴静脉注射来进行。进行非盲法试验,受试者人数设为十五人。

[0257] [表7]

[0258] 表7受试制剂的给药量和给药方法(临床试验(第II期)第二试验)

	给药量和给药方法
--	----------

[0259]

	将受试者分为两组,对一组以 2.0mg/kg 体重的剂量给药受试制剂(2.0mg/kg 体重给药组),对另一组以 4.0mg/kg 体重的剂量给药受试制剂(4.0mg/kg 体重给药组)。
--	--

[0260] 临床试验(第II期)第一试验和第二试验均在给药受试制剂前和在第十二次给药后5小时以内从各受试者采集脑脊液。此外,在给药受试制剂前和第十二次给药1周后且接受通常的黏多糖贮积症I型的酶替代疗法前,从各受试者采集血清和尿。关于第二试验,仅从预定受试者人数十五人中完成给药的六人中采集他们的脑脊液、血清以及尿。

[0261] 受试制剂对黏多糖贮积症I型的有效性通过检查表4所示的项目进行评价,除此之外,还通过对受试者进行修订版简易视觉空间记忆测试(BVMT-R)、修订版霍普金斯语言学习测试(HVLT-R)、注意力变量试验(TOVA)来进行评价。

[0262] 受试制剂的黏多糖贮积症I型的安全性通过检查表5所示的项目进行评价。需要说明的是,表5示出临床试验方案中记载的一部分安全性的评价项目。

[0263] (实施例10)临床试验(第II期)的有效性评价

[0264] (脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的浓度)

[0265] 将实施例9中从第一试验的各受试者采集的在受试制剂的给药前和在第十二次给药后5小时以内分别从各受试者采集的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的浓度的测定结果分别示于图7和图8。着眼于硫酸乙酰肝素,关于全部受试者,受试者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度与受试制剂的给药前相比,在给药后减少至1/3以下(图7)。并且,关于全部受试者,受试者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度为1400ng/mL以下,此外,低于非黏多糖贮积症患者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度的平均值即约360ng/mL。根据这些结果可预测,通过进一步持续受试制剂的给药,能使脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度减少至非黏多糖贮积症患者水平,并且维持该水平。

[0266] 着眼于硫酸皮肤素,关于全部受试者,受试者的脑脊液中所含的硫酸皮肤素的浓

度与受试制剂的给药前相比,在给药后减少(图8)。需要说明的是,非黏多糖贮积症患者的脑脊液中所含的硫酸皮肤素的浓度的平均值为约220ng/mL。关于硫酸皮肤素也与硫酸乙酰肝素同样,预测出通过进一步持续受试制剂的给药,能使脑脊液中所含的硫酸皮肤素的浓度减少至非黏多糖贮积症患者水平,并且维持该水平。

[0267] 将实施例9中从第二试验的各受试者采集的在受试制剂的给药前和在第十二次给药后5小时以内分别从各受试者采集的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的浓度的测定结果分别示于图9和图10。着眼于硫酸乙酰肝素,关于全部受试者,受试者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度与受试制剂的给药前相比,在给药后减少至1/3以下(图9)。并且,关于全部受试者,受试者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度为1400ng/mL以下,此外,接近或低于非黏多糖贮积症患者的脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度的平均值即约360ng/mL。预测出通过进一步持续受试制剂的给药,能使脑脊液中所含的硫酸乙酰肝素的浓度减少至非黏多糖贮积症患者水平,并且维持该水平。

[0268] 着眼于硫酸皮肤素,关于全部受试者,受试者的脑脊液中所含的硫酸皮肤素的浓度与受试制剂的给药前相比,在给药后减少(图10)。需要说明的是,非黏多糖贮积症患者的脑脊液中所含的硫酸皮肤素的浓度的平均值为约220ng/mL。关于硫酸皮肤素也与硫酸乙酰肝素同样,预测出通过进一步持续受试制剂的给药,能使脑脊液中所含的硫酸皮肤素的浓度减少至非黏多糖贮积症患者水平,并且维持该水平。需要说明的是,硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的浓度通过实施例12~14中记载的方法进行测定。

[0269] 这些结果表明:通过点滴静脉注射给药于患者的受试制剂穿过BBB到达中枢神经系统,将蓄积于此的糖胺聚糖分解去除,受试制剂对黏多糖贮积症I型的中枢神经系统的异常也有药效。此外,根据这些结果预测出,受试制剂通过以1~6mg/kg体重、或1~8mg/kg体重的剂量1周给药1次,来发挥其药效。

[0270] (血清中所含的硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的浓度)

[0271] 将实施例9中从第一试验的各受试者采集的在受试制剂的给药前和在第十二次给药1周后且接受通常的黏多糖贮积症I型的酶替代疗法前分别从各受试者采集的血清中所含的硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的浓度的测定结果分别示于图11和图12。确认了硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素与受试制剂的给药前相比,给药后的浓度均大致减少的倾向(图11、图12)。

[0272] 将实施例9中从第二试验的各受试者采集的在受试制剂的给药前和在第十二次给药1周后且接受通常的黏多糖贮积症I型的酶替代疗法前分别从各受试者采集的血清中所含的硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的浓度的测定结果分别示于图13和图14。确认了硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素与受试制剂的给药前相比,给药后的浓度均大致减少的倾向(图13、图14)。

[0273] 以上结果表明:通过点滴静脉注射给药于患者的受试制剂不仅将蓄积于中枢神经系统的糖胺聚糖分解去除,还将蓄积于全身的组织糖胺聚糖分解去除,受试制剂对黏多糖贮积症I型的中枢神经系统和其他组织的异常也有药效。并且,对蓄积于中枢神经系统及其他组织的糖胺聚糖被分解去除后的患者可以期待由于中枢神经系统的功能障碍得到改善,得到能进行更长时间的对话、能进行更多的文字书写、活力增加、减轻腰、膝等的关节痛、减轻伴随步行的疼痛、肌肉和关节的僵硬、能更容易地进行开罐等指尖的运动、篮球等

全身运动、提高语言能力等效果。

[0274] (实施例11)临床试验(第II期)的安全性评价

[0275] 在受试制剂的给药期间,在全部受试者中未确认到严重不良事件。即,表明受试制剂可以安全地以0.1mg/kg~4mg/kg体重的剂量1周给药一次。

[0276] (实施例12:硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的测定法(各种溶液的制备))

[0277] 按以下步骤制备试验中使用的(a)~(k)溶液。

[0278] (a) MeCN/水:

[0279] 将0.5mL的注射用水和4.5mL的乙腈混合,将其作为MeCN/水。本溶液现用现配。

[0280] (b) 氘标记溶剂:

[0281] 在冰浴下,对1.5mL的甲醇-d₄(Sigma-Aldrich公司)滴加240μL的乙酰氯,将其作为氘标记溶剂。本溶液现用现配。

[0282] (c) PBS/柠檬酸溶液:

[0283] 将柠檬酸溶解于纯水中而制作10mM浓度的柠檬酸溶液。进一步,将柠檬酸三钠二水合物溶解于纯水中而制作10mM浓度的柠檬酸钠溶液。对柠檬酸溶液滴加柠檬酸钠溶液而调整至pH3.0。将该溶液作为10mM柠檬酸缓冲液(pH3.0)。此外,将在18mL的10mM柠檬酸缓冲液(pH3.0)中加入2mL的PBS而得到的溶液作为PBS/柠檬酸溶液。

[0284] (d) 流动相A:

[0285] 将在247.5mL的纯水中添加2.5mL的1M甲酸铵水溶液和400μL的氢氧化铵水溶液(25%NH₄OH)并混合而得到的溶液作为流动相A。本溶液现用现配。

[0286] (e) 流动相B:

[0287] 将在45mL的纯水中混合5mL的1M甲酸铵水溶液、450mL的乙腈以及800μL的氢氧化铵水溶液(25%NH₄OH)而得到的溶液作为流动相B。本溶液现用现配。

[0288] (f) 硫酸乙酰肝素工作母液(HS工作母液):

[0289] 在1.5mL微量离心管中称量硫酸乙酰肝素(Iduron公司),加入注射用水进行溶解,制备5.0mg/mL浓度的溶液。将所制备的溶液在0.5mL螺帽管中各分注15μL,冷冻(-15℃以下)保存直到使用时为止。将该溶液作为HS工作母液。

[0290] (g) 硫酸皮肤素工作母液(DS工作母液):

[0291] 在1.5mL微量离心管中称量来自猪小肠粘膜的硫酸软骨素B钠盐(Sigma-Aldrich公司),加入注射用水进行溶解,制备5.0mg/mL浓度的溶液。将所制备的溶液在0.5mL螺帽管中各分注15μL,冷冻(-15℃以下)保存直到使用时为止。将该溶液作为DS工作母液。

[0292] (h) 硫酸皮肤素内标溶液(DS内标溶液):

[0293] 在硼硅酸螺口试管中量取40μL的DS工作母液,在氮气流下蒸馏除去溶剂。对于固体物添加400μL的氘标记溶剂,进行搅拌,然后在65℃下反应75分钟,进行氘化甲醇分解(deuteriomethanolysis)。反应后,在氮气流下蒸馏除去溶剂。对于固体物添加500μL的MeCN/水,进行30分钟超声波处理。将所制备的溶液在0.5mL螺帽管中各分注20μL,冷冻(-15℃以下)保存。将该溶液作为硫酸皮肤素内标溶液(DS内标溶液)。

[0294] (i) 硫酸乙酰肝素内标溶液(HS内标溶液):

[0295] 在硼硅酸螺口试管中量取40μL的HS工作母液,在氮气流下蒸馏除去溶剂。对于固体物添加400μL的氘标记溶剂,进行搅拌,然后在65℃下反应75分钟,进行氘化甲醇分解

(deuteriomethanolysis)。反应后,在氮气流下蒸馏除去溶剂。对于干固体添加500 μ L的MeCN/水,进行30分钟超声波处理。将所制备的溶液在0.5mL螺帽管中各分注20 μ L,冷冻(-15 $^{\circ}$ C以下)保存。将该溶液作为硫酸乙酰肝素内标溶液(HS内标溶液)。

[0296] (j) 样品溶解用溶液:

[0297] 对5mL的MeCN/水添加1 μ L的HS内标溶液和1 μ L的DS内标溶液并搅拌,然后进行30分钟超声波处理。将该溶液作为样品溶解用溶液。本溶液现用现配。

[0298] (k) 校准曲线制作用溶液:

[0299] 量取480 μ L的PBS/柠檬酸溶液,对其分别添加各10 μ L的HS工作母液和DS工作母液,制备分别各含有100 μ g/mL的硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素的溶液。用PBS/柠檬酸溶液稀释该溶液,制备分别各含有2500ng/mL的硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素的溶液。用PBS/柠檬酸溶液2梯度稀释该溶液,制备分别以25~2500ng/mL的浓度含有硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素的溶液。将该溶液作为校准曲线制作用溶液。

[0300] (实施例13:硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的测定法(甲醇分解反应))

[0301] 分别量取20 μ L的上述实施例12中制备的校准曲线制作用溶液,单独地分取在硼硅酸螺口试管中。此外,作为空白对照,将PBS/柠檬酸溶液分取在硼硅酸螺口试管中。在氮气流下蒸馏除去试管中的溶剂(N=1)。对于干固体添加20 μ L的2,2-二甲氧基丙烷和200 μ L的盐酸的浓度为3N的盐酸甲醇并搅拌,然后使用恒温水槽在70 $^{\circ}$ C进行甲醇分解反应90分钟。反应后,在氮气流下蒸馏除去溶剂。对于干固体添加50 μ L的样品溶解用溶液而溶解,然后离心(15000rpm、10分钟、室温),将上清液采集至小瓶中。

[0302] 此外,用PBS/柠檬酸溶液稀释上述实施例12中制备的硫酸皮肤素工作母液和硫酸乙酰肝素工作母液,制备均以25.0ng、50.0ng/mL、500ng/mL以及2000ng/mL的浓度含有硫酸皮肤素工作母液和硫酸乙酰肝素工作母液的四种质控试样(QC试样),分别设为QC-LL、QC-L、QC-M以及QC-H。将它们分别量取20 μ L,单独地分取在硼硅酸螺口试管中,在氮气流下蒸馏除去试管中的溶剂。对于干固体添加20 μ L的2,2-二甲氧基丙烷和200 μ L的盐酸的浓度为3N的盐酸甲醇并搅拌,然后使用恒温水槽在70 $^{\circ}$ C进行甲醇分解反应90分钟。反应后,在氮气流下蒸馏除去溶剂。对于干固体添加50 μ L的样品溶解用溶液而溶解,然后离心(15000rpm、10分钟、室温),将上清液采集至小瓶中。

[0303] 此外,将实施例6或9中采集的脑脊液、血清以及尿分别分取在硼硅酸螺口试管中,在氮气流下蒸馏除去试管中的溶剂。对于干固体添加20 μ L的2,2-二甲氧基丙烷和200 μ L的盐酸的浓度为3N的盐酸甲醇并搅拌,然后使用恒温水槽在70 $^{\circ}$ C进行甲醇分解反应90分钟。反应后,在氮气流下蒸馏除去溶剂。对于干固体添加50 μ L的样品溶解用溶液而溶解,然后离心(15000rpm、10分钟、室温),将上清液采集至小瓶中。

[0304] (实施例14:硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素的测定法(LC/MS/MS分析))

[0305] LC/MS/MS分析使用将亲水性相互作用超高效液相色谱和串联四极杆质谱仪组合而成的装置实施。使用QTRAP5500(AB Sciex公司)作为质谱仪(MS/MS装置),对其安装Nexera X2(岛津制作所)作为HPLC装置。此外,使用Acquity UPLC™BEH Amid 1.7 μ m(2.1 \times 50mm,Waters公司)作为LC柱。使用实施例12中制备的流动相A和流动相B作为流动相。此外,柱温设定为50 $^{\circ}$ C。

[0306] 用由6%(v/v)的流动相A和94%(v/v)的流动相B构成的混合液将柱平衡化,然后

注入10 μ L的试样,以表8所示的流动相的梯度条件实施层析。需要说明的是,流动相的流速设为0.4mL/分钟。

[0307] [表8]

[0308] 表8液相色谱的条件

试样注入后的经过时间 (分钟)	流动相 A (% (v/v))	流动相 B (% (v/v))
0	6	94
1	6	94
4	30	70
4.01	6	94
6	6	94

[0310] 按照QTRAP5500 (AB Sciex公司)的使用说明书如表9所示地设定MS/MS装置的离子源参数。

[0311] [表9]

[0312] 表9 MS/MS装置的离子源的各种参数的设定

离子源	ESI (TurboV)
极性	正
扫描方式	MRM
离子喷雾电压	5500V
加热器气体温度	500 $^{\circ}$ C
气帘气 (CUR)	30.0psi
碰撞气 (CAD)	8psi
离子源气1 (GS1)	70.0psi
离子源气2 (GS2)	70.0psi
入口电压	10.0V
持续时间	4.00min

[0314] 通过校准曲线制作用溶液和QC试样的测定,求出在源自各校准曲线制作用溶液中所含的硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素的产物离子的色谱图上检测到的峰(检测峰)的面积。此外,求出源自DS内标溶液和HS内标溶液的产物离子的检测峰的面积。校准曲线制作用溶液以N=1进行测定,QC试样(QC-LL、QC-L、QC-M以及QC-H)以N=3进行测定。

[0315] 需要说明的是,DS内标溶液和HS内标溶液中所含的硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素经氘标记。因此,源自硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素的前体离子的质荷比(m/z)分别为432和390,与非标记物相比为较大的值。源自非标记的硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素的前体离子的质荷比(m/z)分别为426和384。因此,这些前体离子在四极杆(Q1)基于离子的质荷比(m/z)被分离,因此能单独地检测。将前体离子和产物离子的(m/z)整合示于表10。

[0316] [表10]

[0317] 表10前体离子与产物离子的(m/z)

	前体离子 (m/z)	产物离子 (m/z)
[0318] 硫酸皮肤素	426	236
硫酸皮肤素 (氘标记)	432	239
硫酸乙酰肝素	384	162
硫酸乙酰肝素 (氘标记)	390	162

[0319] 求出源自DS内标溶液的检测峰(DS-IS检测峰面积)相对于源自各校准曲线制作用溶液中所含的硫酸皮肤素的检测峰的面积(DS检测峰面积)的面积比(DS检测峰面积/DS-IS检测峰面积)。将该值设为纵轴,将各校准曲线制作用溶液的硫酸皮肤素的浓度设为横轴,使用二次规划法计算出回归方程而制作校准曲线。

[0320] 此外,求出源自HS内标溶液的检测峰(HS-IS检测峰面积)相对于源自各校准曲线制作用溶液中所含的硫酸乙酰肝素的检测峰的面积(HS检测峰面积)的面积比(HS检测峰面积/HS-IS检测峰面积)。将该值设为纵轴,将各校准曲线制作用溶液的硫酸乙酰肝素的浓度设为横轴,使用二次规划法计算出回归方程而制作校准曲线。

[0321] 将各受试者的脑脊液、血清以及尿的测定值内插于上述的校准曲线,求出各试样中所含的DS和HS的浓度。需要说明的是,对尿中的DS和HS的测定值进行肌酸酐校正,计算出包含1mg的肌酸酐的尿中所含的量($\mu\text{g}/\text{mg}$ 肌酸酐)。

[0322] 工业上的可利用性

[0323] 根据本发明,能提供一种新型药剂,所述药剂例如能用于对黏多糖贮积症I型患者的酶替代疗法。

[0324] 序列列表自由文本

[0325] 序列号1:连接子例1的氨基酸序列

[0326] 序列号2:连接子例2的氨基酸序列
 序列号3:连接子例3的氨基酸序列
 序列号4:轻链CDR1的氨基酸序列
 序列号5:轻链CDR1的氨基酸序列2
 序列号6:轻链CDR2的氨基酸序列
 序列号7:轻链CDR2的氨基酸序列2
 序列号8:轻链CDR3的氨基酸序列
 序列号9:重链CDR1的氨基酸序列
 序列号10:重链CDR1的氨基酸序列2
 序列号11:重链CDR2的氨基酸序列
 序列号12:重链CDR2的氨基酸序列2
 序列号13:重链CDR3的氨基酸序列
 序列号14:重链CDR3的氨基酸序列2
 序列号15:重链框架区3的氨基酸序列
 序列号16:重链的可变区的氨基酸序列
 序列号17:轻链的可变区的氨基酸序列
 序列号18:轻链的氨基酸序列
 序列号19:Fab重链的氨基酸序列
 序列号20:人IDUA的氨基酸序列
 序列号21:人IDUA的氨基酸序列2
 序列号22:引物Hyg-Sfi5',合成序列
 序列号23:引物Hyg-BstX3',合成序列
 序列号24:引物IRES5',合成序列
 序列号25:引物IRES3',合成序列
 序列号26:引物mPGKP5',合成序列
 序列号27:引物mPGKP3',合成序列
 序列号28:引物GS5',合成序列
 序列号29:引物GS3',合成序列
 序列号30:引物puro5',合成序列
 序列号31:引物puro3',合成序列
 序列号32:引物SV40polyA5',合成序列

[0327] 序列号33:引物SV40polyA3',合成序列

[0328] 序列号34:引物mIRES-GS5',合成序列

[0329] 序列号35:引物mIRES-GS3',合成序列

- [0330] 序列号36:CMVE-EF-1 α p-IFN β MAR,合成序列
- [0331] 序列号37:编码轻链的氨基酸序列的碱基序列,合成序列
- [0332] 序列号38:Fab重链与人IDUA的融合蛋白的氨基酸序列
- [0333] 序列号39:包含编码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
- [0334] 序列号40:IRES-HygroR-mPGKpA,合成序列。

<400> 8

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链的CDR1的氨基酸序列1

<400> 9

Gly Tyr Ser Phe Met Asn Tyr Trp

1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链的CDR1的氨基酸序列2

<400> 10

Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp

1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链的CDR2的氨基酸序列1

<400> 11

Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Pro

1 5

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链的CDR2的氨基酸序列2

<400> 12

Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Pro Thr Tyr Ser Glu Lys Phe Lys

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> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链的可变区的氨基酸序列

<400> 17

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> 18

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链的氨基酸序列

<400> 18

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			160	
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> 19

<211> 226

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fab重链的氨基酸序列

<400> 19

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
 225
 <210> 20
 <211> 628
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 20
 Ala Glu Ala Pro His Leu Val His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp
 1 5 10 15
 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
 385 390 395 400
 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
 465 470 475 480
 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
 545 550 555 560
 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> 21
 <211> 626
 <212> PRT

<213> 智人
 <400> 21
 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
Thr Leu Thr Ala Arg Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val		
	340	345
Gln Leu Leu Arg Lys Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu		
	355	360
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
Asp Asp Thr Arg Ala His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg		
	420	425
Leu Arg Gly Val Pro Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr		
	435	440
Leu Asp Asn Gly Leu Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly		
	450	455
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
Leu Thr Leu Arg Pro Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His		
	500	505
Val Cys Ala Arg Pro Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg		
	515	520
Ala Leu Pro Leu Thr Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu		
	530	535
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
Leu Phe Val Phe Ser Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg		
	580	585
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> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物Hyg-Sfi5',合成序列	
<400> 22	
gaggccgcct cggcctctga	20
<210> 23	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物Hyg-BstX3',合成序列	
<400> 23	
aaccatcgtg atgggtgcta ttcctttgc	29
<210> 24	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物IRES5',合成序列	
<400> 24	
caactcgagc ggccgcccc cccccctetc cctcccccc ccctaacgtt act	53
<210> 25	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物IRES3',合成序列	
<400> 25	
caagaagctt ccagaggaac tg	22
<210> 26	
<211> 30	
<212> DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物mPGKP5',合成序列	
<400> 26	
gcgagatcctt accgggtagg ggaggcgctt	30
<210> 27	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物mPGKP3',合成序列	
<400> 27	
gaggaattcg atgatcggtc gaaaggccccg	30
<210> 28	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物GS5',合成序列	
<400> 28	
aatatggcca caacatggc gacctcagca agttcc	36
<210> 29	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物GS3',合成序列	
<400> 29	
ggaggatccc tcgagttagt ttttgattg gaaggct	38
<210> 30	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物puro5',合成序列	
<400> 30	
gcttaagatg accgagtaca agcccacg	28
<210> 31	
<211> 30	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物puro3',合成序列	
<400> 31	
cccatcgtga tggtcaggca ccgggcttgc	30
<210> 32	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物SV40polyA5',合成序列	
<400> 32	
caacaagcgg ccgccctcga gttcccttta gtgagggtta atgc	44
<210> 33	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物SV40polyA3',合成序列	
<400> 33	
cccctgaacc tgaacataa aatg	24
<210> 34	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物mIRES-GS5',合成序列	
<400> 34	
acacgatgat aagcttgcca caacc	25
<210> 35	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物mIRES-GS3',合成序列	
<400> 35	
ctccacgata tccctgccat a	21
<210> 36	

<211>	2076					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	CMVE-EF-1 α -IFN β MAR,合成序列					
<400>	36					
aagcttaaat	tatctctaag	gcatgtgaac	tgctgtctt	ggttttcatc	tgtacttcat	60
ctgctacctc	tgtgacctga	aacatattta	taattccatt	aagctgtgca	tatgatagat	120
ttatcatatg	tattttcctt	aaaggatttt	tgtaagaact	aattgaattg	atacctgtaa	180
agtctttatc	acactacceca	ataaataata	aatctctttg	ttcagctctc	tgtttctata	240
aatatgtacc	agttttattg	tttttagtgg	tagtgatttt	attctctttc	tatatatata	300
cacacacatg	tgtgcattca	taaatatata	caatttttat	gaataaaaaa	ttattagcaa	360
tcaatattga	aaaccactga	tttttgttta	tgtgagcaaa	cagcagatta	aaagaaattc	420
ctgcaggagt	caatgggaaa	aaccattgg	agccaagtac	actgactcaa	tagggacttt	480
ccattgggtt	ttgccagta	cataaggtca	atagggggtg	agtcaacagg	aaagtcccat	540
tgagaccaag	tacattgagt	caataggac	ttccaatgg	gttttgcca	gtacataagg	600
tcaatgggag	gtaagccaat	gggtttttcc	cattactgac	atgtatactg	agtcattagg	660
gactttccaa	tggtttttgc	ccagtacata	aggtcaatag	gggtgaatca	acaggaaagt	720
cccattggag	ccaagtacac	tgagtcaata	gggactttcc	attgggtttt	gcccagtaca	780
aaaggtcaat	agggggtgag	tcaatgggtt	ttcccatta	ttggcacata	cataaggtca	840
ataggggtga	ctagtggaga	agagcatgct	tgagggtgca	gtgccctca	gtgggcagag	900
agcacatggc	ccacagtccc	tgagaagttg	gggggagggg	tgggcaattg	aactggtgcc	960
tagagaaggt	ggggcttggg	taaactggga	aagtgatgtg	gtgtactggc	tccacctttt	1020
tccccagggt	gggggagaac	catatataag	tgcagtagtc	tctgtgaaca	ttcaaggttc	1080
tgcttctcc	ctcctgtgag	tttggttaagt	cactgactgt	ctatgcctgg	gaaagggtgg	1140
gcaggagggtg	gggcagtgca	ggaaaagtgg	cactgtgaac	cctgcagccc	tagacaattg	1200
tactaacctt	cttctctttc	ctctcctgac	aggttggtgt	acagtagctt	ccaacgcgta	1260
taatggatcc	agtcaatatg	ttcaccccaa	aaaagctggt	tgtaacttg	ccaacctcat	1320
tctaaaatgt	atatagaagc	ccaaaagaca	atacaaaaa	tattcttgta	gaacaaaatg	1380
ggaaaagaatg	ttccactaaa	tatcaagatt	tagagcaag	catgagatgt	gtggggatag	1440
acagtgaggc	tgataaaaata	gagtagagct	cagaaacaga	cccattgata	tatgtaagtg	1500
acctatgaaa	aaaatatggc	attttacaat	gggaaatga	tggctttttt	cttttttaga	1560
aaaacagga	aatatattta	tatgtaaaaa	ataaaagga	accatatgt	cataccatac	1620
acacaaaaaa	attccagtga	attataagtc	taaatggaga	aggcaaaact	ttaaactttt	1680
tagaaaataa	tatagaagca	tgccatcaag	acttcagtgt	agagaaaaat	ttcttatcac	1740
tcaaagtcc	aaccacaaag	aaaagattgt	taattagatt	gcatgaatat	taagacttat	1800
ttttaaaatt	aaaaaacctt	taagaaaagt	caggccatag	aatgacagaa	aatatttgca	1860
acaccccagt	aaagagaatt	gtaatatgca	gattataaaa	agaagtctta	caaatcagta	1920
aaaaataaaa	ctagacaaaa	atttgaacag	atgaaagaga	aactctaat	aatcattaca	1980

385	390	395	400
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	

65	70	75	80
Thr Ala Gly Thr Gly Cys Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Ala Gly Cys			
	85	90	95
Ala Gly Ala Gly Gly Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Cys Cys Cys			
	100	105	110
Gly Gly Gly Gly Ala Gly Thr Cys Thr Cys Thr Gly Ala Ala Gly Ala			
	115	120	125
Thr Thr Thr Cys Cys Thr Gly Thr Ala Ala Gly Gly Gly Thr Thr Cys			
	130	135	140
Thr Gly Gly Ala Thr Ala Cys Ala Gly Cys Thr Thr Thr Ala Thr Gly			
145	150	155	160
Ala Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly Gly Gly Ala Thr			
	165	170	175
Gly Gly Gly Thr Gly Cys Gly Cys Cys Ala Gly Ala Thr Gly Cys Cys			
	180	185	190
Cys Gly Gly Gly Ala Ala Ala Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly			
	195	200	205
Thr Gly Gly Ala Thr Gly Gly Gly Gly Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr			
	210	215	220
Ala Cys Cys Cys Cys Gly Gly Cys Gly Gly Ala Gly Ala Cys Thr Ala			
225	230	235	240
Cys Cys Cys Thr Ala Cys Ala Thr Ala Cys Ala Gly Cys Gly Ala Gly			
	245	250	255
Ala Ala Gly Thr Thr Cys Ala Ala Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Gly			
	260	265	270
Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Thr Cys Ala Gly Cys Cys Gly Ala			
	275	280	285
Cys Ala Ala Gly Thr Cys Cys Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Cys Cys			
	290	295	300
Gly Cys Cys Thr Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Thr Thr Gly Ala			
305	310	315	320
Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala Gly Gly Cys Cys Thr Cys			
	325	330	335
Gly Gly Ala Cys Ala Cys Cys Gly Cys Cys Ala Thr Gly Thr Ala Thr			
	340	345	350
Thr Ala Cys Thr Gly Thr Gly Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala Gly			
	355	360	365
Gly Cys Ala Ala Thr Thr Ala Cys Gly Ala Cys Gly Ala Ala Gly Thr			
	370	375	380

Gly Gly Cys Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Ala																	
385					390						395						400
Gly Gly Ala Ala Cys Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly																	
					405						410						415
Thr Cys Thr Cys Cys Thr Cys Ala Gly Cys Thr Ala Gly Cys Ala Cys																	
					420						425						430
Cys Ala Ala Gly Gly Gly Cys Cys Cys Ala Thr Cys Gly Gly Thr Cys																	
					435						440						445
Thr Thr Cys Cys Cys Cys Cys Thr Gly Gly Cys Ala Cys Cys Cys Thr																	
					450												460
Cys Cys Thr Cys Cys Ala Ala Gly Ala Gly Cys Ala Cys Cys Thr Cys																	
					465												480
Thr Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Cys																	
					485						490						495
Cys Thr Gly Gly Gly Cys Thr Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala																	
					500						505						510
Ala Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Thr Cys Cys Cys Cys Gly Ala																	
					515												525
Ala Cys Cys Gly Gly Thr Gly Ala Cys Gly Gly Thr Gly Thr Cys Gly																	
					530						535						540
Thr Gly Gly Ala Ala Cys Thr Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Cys Cys																	
					545												560
Thr Gly Ala Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Gly Thr Gly Cys Ala																	
					565						570						575
Cys Ala Cys Cys Thr Thr Cys Cys Cys Gly Gly Cys Thr Gly Thr Cys																	
					580						585						590
Cys Thr Ala Cys Ala Gly Thr Cys Cys Thr Cys Ala Gly Gly Ala Cys																	
					595						600						605
Thr Cys Thr Ala Cys Thr Cys Cys Cys Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly																	
					610												620
Cys Gly Thr Gly Gly Thr Gly Ala Cys Cys Gly Thr Gly Cys Cys Cys																	
					625						635						640
Thr Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Thr Thr Gly Gly Gly Cys Ala																	
					645						650						655
Cys Cys Cys Ala Gly Ala Cys Cys Thr Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly																	
					660						665						670
Cys Ala Ala Cys Gly Thr Gly Ala Ala Thr Cys Ala Cys Ala Ala Gly																	
					675												685
Cys Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Cys Ala Cys Cys Ala Ala Gly Gly																	

690	695	700
Thr Gly Gly Ala Cys	Ala Ala Gly Ala Ala	Ala Gly Thr Thr Gly Ala
705	710	715
Gly Cys Cys Gly Ala	Ala Gly Ala Gly Cys	Thr Gly Thr Gly Ala Thr
	725	730
Ala Ala Gly Ala Cys	Gly Cys Ala Thr	Ala Cys Gly Gly Gly Thr Gly
	740	745
Gly Cys Gly Gly Ala	Gly Gly Gly Thr	Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly
	755	760
Thr Gly Gly Cys Gly	Gly Ala Thr	Cys Ala Gly Gly Cys Gly Gly Ala
	770	780
Gly Gly Thr Gly Gly	Ala Thr Cys	Thr Gly Cys Cys Gly Ala Gly Gly
	785	790
Cys Cys Cys Cys Gly	Cys Ala Cys	Cys Thr Gly Gly Thr Gly Cys Ala
	805	810
Cys Gly Thr Gly Gly	Ala Cys Gly	Cys Gly Cys Cys Cys Gly Cys
	820	825
Gly Cys Gly Cys Thr	Gly Thr Gly	Gly Cys Cys Cys Cys Thr Gly Cys
	835	840
Gly Gly Cys Gly Cys	Thr Thr Cys	Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly
	850	855
Cys Ala Cys Ala Gly	Gly Cys Thr	Thr Cys Thr Gly Cys Cys Cys Cys
	865	870
Cys Cys Gly Cys Thr	Gly Cys Cys	Ala Cys Ala Cys Ala Gly Cys Cys
	885	890
Ala Gly Gly Cys Thr	Gly Ala Cys	Cys Ala Gly Thr Ala Cys Gly Thr
	900	905
Cys Cys Thr Cys Ala	Gly Cys Thr	Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala Gly
	915	920
Cys Ala Gly Cys Thr	Cys Ala Ala	Cys Cys Thr Cys Gly Cys Cys Thr
	930	935
Ala Thr Gly Thr Gly	Gly Gly Gly Cys	Gly Cys Cys Gly Thr Cys Cys Cys
	945	950
Thr Cys Ala Cys Cys	Gly Cys Gly	Gly Cys Ala Thr Cys Ala Ala Gly
	965	970
Cys Ala Gly Gly Thr	Cys Cys Gly	Gly Gly Ala Cys Cys Cys Ala Cys Thr
	980	985
Gly Gly Cys Thr Gly	Cys Thr Gly	Gly Ala Gly Cys Thr Thr Gly Thr
	995	1000
		1005

Cys Ala	Cys Cys Ala Cys Cys	Ala Gly Gly Gly Gly	Gly Thr Cys
1010		1015	1020
Cys Ala	Cys Thr Gly Gly Ala	Cys Gly Gly Gly Gly	Cys Cys Thr
1025		1030	1035
Gly Ala	Gly Cys Thr Ala Cys	Ala Ala Cys Thr Thr	Cys Ala Cys
1040		1045	1050
Cys Cys	Ala Cys Cys Thr Gly	Gly Ala Cys Gly Gly	Gly Thr Ala
1055		1060	1065
Cys Thr	Thr Gly Gly Ala Cys	Cys Thr Thr Cys Thr	Cys Ala Gly
1070		1075	1080
Gly Gly	Ala Gly Ala Ala Cys	Cys Ala Gly Cys Thr	Cys Cys Thr
1085		1090	1095
Cys Cys	Cys Ala Gly Gly Gly	Thr Thr Thr Gly Ala	Gly Cys Thr
1100		1105	1110
Gly Ala	Thr Gly Gly Gly Cys	Ala Gly Cys Gly Cys	Cys Thr Cys
1115		1120	1125
Gly Gly	Gly Cys Cys Ala Cys	Thr Thr Cys Ala Cys	Thr Gly Ala
1130		1135	1140
Cys Thr	Thr Thr Gly Ala Gly	Gly Ala Cys Ala Ala	Gly Cys Ala
1145		1150	1155
Gly Cys	Ala Gly Gly Thr Gly	Thr Thr Thr Gly Ala	Gly Thr Gly
1160		1165	1170
Gly Ala	Ala Gly Gly Ala Cys	Thr Thr Gly Gly Thr	Cys Thr Cys
1175		1180	1185
Cys Ala	Gly Cys Cys Thr Gly	Gly Cys Cys Ala Gly	Gly Ala Gly
1190		1195	1200
Ala Thr	Ala Cys Ala Thr Cys	Gly Gly Thr Ala Gly	Gly Thr Ala
1205		1210	1215
Cys Gly	Gly Ala Cys Thr Gly	Gly Cys Gly Cys Ala	Thr Gly Thr
1220		1225	1230
Thr Thr	Cys Cys Ala Ala Gly	Thr Gly Gly Ala Ala	Cys Thr Thr
1235		1240	1245
Cys Gly	Ala Gly Ala Cys Gly	Thr Gly Gly Ala Ala	Thr Gly Ala
1250		1255	1260
Gly Cys	Cys Ala Gly Ala Cys	Cys Ala Cys Cys Ala	Cys Gly Ala
1265		1270	1275
Cys Thr	Thr Thr Gly Ala Cys	Ala Ala Cys Gly Thr	Cys Thr Cys
1280		1285	1290
Cys Ala	Thr Gly Ala Cys Cys	Ala Thr Gly Cys Ala	Ala Gly Gly

1295	1300	1305
Cys Thr Thr Cys Cys Thr Gly Ala Ala Cys Thr Ala Cys Thr Ala		
1310	1315	1320
Cys Gly Ala Thr Gly Cys Cys Thr Gly Cys Thr Cys Gly Gly Ala		
1325	1330	1335
Gly Gly Gly Thr Cys Thr Gly Cys Gly Cys Gly Cys Cys Gly Cys		
1340	1345	1350
Cys Ala Gly Cys Cys Cys Cys Gly Cys Cys Cys Thr Gly Cys Gly		
1355	1360	1365
Gly Cys Thr Gly Gly Gly Ala Gly Gly Cys Cys Cys Cys Gly Gly		
1370	1375	1380
Cys Gly Ala Cys Thr Cys Cys Thr Thr Cys Cys Ala Cys Ala Cys		
1385	1390	1395
Cys Cys Cys Ala Cys Cys Gly Cys Gly Ala Thr Cys Cys Cys Cys		
1400	1405	1410
Gly Cys Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Thr		
1415	1420	1425
Cys Cys Thr Gly Cys Gly Cys Cys Ala Cys Thr Gly Cys Cys Ala		
1430	1435	1440
Cys Gly Ala Cys Gly Gly Thr Ala Cys Cys Ala Ala Cys Thr Thr		
1445	1450	1455
Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Cys		
1460	1465	1470
Gly Gly Gly Cys Gly Thr Gly Cys Gly Gly Cys Thr Gly Gly Ala		
1475	1480	1485
Cys Thr Ala Cys Ala Thr Cys Thr Cys Cys Cys Thr Cys Cys Ala		
1490	1495	1500
Cys Ala Gly Gly Ala Ala Gly Gly Gly Thr Gly Cys Gly Cys Gly		
1505	1510	1515
Cys Ala Gly Cys Thr Cys Cys Ala Thr Cys Thr Cys Cys Ala Thr		
1520	1525	1530
Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Gly Ala Gly Ala Ala		
1535	1540	1545
Gly Gly Thr Cys Gly Thr Cys Gly Cys Gly Cys Ala Gly Cys Ala		
1550	1555	1560
Gly Ala Thr Cys Cys Gly Gly Cys Ala Gly Cys Thr Cys Thr Thr		
1565	1570	1575
Cys Cys Cys Cys Ala Ala Gly Thr Thr Cys Gly Cys Gly Gly Ala		
1580	1585	1590

Cys Ala	Cys Cys Cys Cys Cys	Cys Ala Thr Thr Thr	Ala Cys Ala Ala
1595		1600	1605
Cys Gly	Ala Cys Gly Ala Gly	Gly Cys Gly Gly	Ala Cys Cys Cys
1610		1615	1620
Gly Cys	Thr Gly Gly Thr Gly	Gly Gly Cys Thr	Gly Gly Thr Cys
1625		1630	1635
Cys Cys	Thr Gly Cys Cys Ala	Cys Ala Gly Cys Cys	Gly Thr Gly
1640		1645	1650
Gly Ala	Gly Gly Gly Cys Gly	Gly Ala Cys Gly Thr	Gly Ala Cys
1655		1660	1665
Cys Thr	Ala Cys Gly Cys Gly	Gly Cys Cys Ala Thr	Gly Gly Thr
1670		1675	1680
Gly Gly	Thr Gly Ala Ala Gly	Gly Thr Cys Ala Thr	Cys Gly Cys
1685		1690	1695
Gly Cys	Ala Gly Cys Ala Thr	Cys Ala Gly Ala Ala	Cys Cys Thr
1700		1705	1710
Gly Cys	Thr Ala Cys Thr Gly	Gly Cys Cys Ala Ala	Cys Ala Cys
1715		1720	1725
Cys Ala	Cys Cys Thr Cys Cys	Gly Cys Cys Thr Thr	Cys Cys Cys
1730		1735	1740
Cys Thr	Ala Cys Gly Cys Gly	Cys Thr Cys Cys Thr	Gly Ala Gly
1745		1750	1755
Cys Ala	Ala Cys Gly Ala Cys	Ala Ala Thr Gly Cys	Cys Thr Thr
1760		1765	1770
Cys Cys	Thr Gly Ala Gly Cys	Thr Ala Cys Cys Ala	Cys Cys Cys
1775		1780	1785
Gly Cys	Ala Cys Cys Cys Cys	Thr Thr Cys Gly Cys	Gly Cys Ala
1790		1795	1800
Gly Cys	Gly Cys Ala Cys Gly	Cys Thr Cys Ala Cys	Cys Gly Cys
1805		1810	1815
Gly Cys	Gly Cys Thr Thr Cys	Cys Ala Gly Gly Thr	Cys Ala Ala
1820		1825	1830
Cys Ala	Ala Cys Ala Cys Cys	Cys Gly Cys Cys Cys	Gly Cys Cys
1835		1840	1845
Gly Cys	Ala Cys Gly Thr Gly	Cys Ala Gly Cys Thr	Gly Thr Thr
1850		1855	1860
Gly Cys	Gly Cys Ala Ala Gly	Cys Cys Gly Gly Thr	Gly Cys Thr
1865		1870	1875
Cys Ala	Cys Gly Gly Cys Cys	Ala Thr Gly Gly Gly	Gly Cys Thr

1880	1885	1890
Gly Cys Thr Gly Gly Cys	Gly Cys Thr Gly Cys	Thr Gly Gly Ala
1895	1900	1905
Thr Gly Ala Gly Gly Ala	Gly Cys Ala Gly Cys	Thr Cys Thr Gly
1910	1915	1920
Gly Gly Cys Cys Gly Ala	Ala Gly Thr Gly Thr	Cys Gly Cys Ala
1925	1930	1935
Gly Gly Cys Cys Gly Gly	Gly Ala Cys Cys Gly	Thr Cys Cys Thr
1940	1945	1950
Gly Gly Ala Cys Ala Gly	Cys Ala Ala Cys Cys	Ala Cys Ala Cys
1955	1960	1965
Gly Gly Thr Gly Gly Gly	Cys Gly Thr Cys Cys	Thr Gly Gly Cys
1970	1975	1980
Cys Ala Gly Cys Gly Cys	Cys Cys Ala Cys Cys	Gly Cys Cys Cys
1985	1990	1995
Cys Cys Ala Gly Gly Gly	Cys Cys Gly Gly	Cys Cys Gly Ala
2000	2005	2010
Cys Gly Cys Cys Thr Gly	Gly Cys Gly Cys Gly	Cys Cys Gly Cys
2015	2020	2025
Gly Gly Thr Gly Cys Thr	Gly Ala Thr Cys Thr	Ala Cys Gly Cys
2030	2035	2040
Gly Ala Gly Cys Gly Ala	Cys Gly Ala Cys Ala	Cys Cys Gly
2045	2050	2055
Cys Gly Cys Cys Cys Ala	Cys Cys Cys Ala	Ala Cys Cys Gly
2060	2065	2070
Cys Ala Gly Cys Gly Thr	Cys Gly Cys Gly Gly	Thr Gly Ala Cys
2075	2080	2085
Cys Cys Thr Gly Cys Gly	Gly Cys Thr Gly Cys	Gly Cys Gly Gly
2090	2095	2100
Gly Gly Thr Gly Cys Cys	Cys Cys Cys Gly Gly	Cys Cys Cys
2105	2110	2115
Gly Gly Gly Cys Cys Thr	Gly Gly Thr Cys Thr	Ala Cys Gly Thr
2120	2125	2130
Cys Ala Cys Gly Cys Gly	Cys Thr Ala Cys Cys	Thr Gly Gly Ala
2135	2140	2145
Cys Ala Ala Cys Gly Gly	Gly Cys Thr Cys Thr	Gly Cys Ala Gly
2150	2155	2160
Cys Cys Cys Cys Gly Ala	Cys Gly Gly Cys Gly	Ala Gly Thr Gly
2165	2170	2175

Gly Cys Gly Gly Cys Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly Cys Cys Gly	2180	2185	2190
Gly Cys Cys Cys Gly Thr Cys Thr Thr Cys Cys Cys Cys Ala Cys	2195	2200	2205
Gly Gly Cys Ala Gly Ala Gly Cys Ala Gly Thr Thr Cys Cys Gly	2210	2215	2220
Gly Cys Gly Cys Ala Thr Gly Cys Gly Cys Gly Cys Gly Gly Cys	2225	2230	2235
Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Cys Cys Gly Gly Thr Gly Gly Cys	2240	2245	2250
Cys Gly Cys Gly Gly Cys Gly Cys Cys Cys Cys Gly Cys Cys Cys	2255	2260	2265
Cys Thr Thr Ala Cys Cys Cys Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Gly	2270	2275	2280
Cys Cys Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Cys Thr Gly Cys Gly	2285	2290	2295
Cys Cys Cys Cys Gly Cys Gly Cys Thr Gly Cys Gly Gly Cys Thr	2300	2305	2310
Gly Cys Cys Gly Thr Cys Gly Cys Thr Thr Thr Thr Gly Cys Thr	2315	2320	2325
Gly Gly Thr Gly Cys Ala Cys Gly Thr Gly Thr Gly Thr Gly Cys	2330	2335	2340
Gly Cys Gly Cys Cys Cys Cys Gly Ala Gly Ala Ala Gly Cys Cys	2345	2350	2355
Gly Cys Cys Cys Gly Gly Gly Cys Ala Gly Gly Thr Cys Ala Cys	2360	2365	2370
Gly Cys Gly Gly Cys Thr Cys Cys Gly Cys Gly Cys Cys Cys Thr	2375	2380	2385
Gly Cys Cys Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Cys Ala Ala Gly Gly	2390	2395	2400
Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr	2405	2410	2415
Cys Thr Gly Gly Thr Cys Gly Gly Ala Thr Gly Ala Ala Cys Ala	2420	2425	2430
Cys Gly Thr Gly Gly Gly Cys Thr Cys Cys Ala Ala Gly Thr Gly	2435	2440	2445
Cys Cys Thr Gly Thr Gly Gly Ala Cys Ala Thr Ala Cys Gly Ala	2450	2455	2460
Gly Ala Thr Cys Cys Ala Gly Thr Thr Cys Thr Cys Thr Cys Ala			

2465	2470	2475	
Gly Gly Ala Cys Gly Gly Thr Ala Ala Gly Gly Cys Gly Thr Ala			
2480	2485	2490	
Cys Ala Cys Cys Cys Cys Gly Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly			
2495	2500	2505	
Gly Ala Ala Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Ala Cys Cys Thr Thr			
2510	2515	2520	
Cys Ala Ala Cys Cys Thr Cys Thr Thr Thr Gly Thr Gly Thr Thr			
2525	2530	2535	
Cys Ala Gly Cys Cys Cys Ala Gly Ala Cys Ala Cys Ala Gly Gly			
2540	2545	2550	
Thr Gly Cys Thr Gly Thr Cys Thr Cys Thr Gly Gly Cys Thr Cys			
2555	2560	2565	
Cys Thr Ala Cys Cys Gly Ala Gly Thr Thr Cys Gly Ala Gly Cys			
2570	2575	2580	
Cys Cys Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Cys			
2585	2590	2595	
Cys Cys Gly Ala Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Cys Thr Thr			
2600	2605	2610	
Cys Thr Cys Gly Gly Ala Cys Cys Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys			
2615	2620	2625	
Gly Thr Ala Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Thr Cys Cys Cys			
2630	2635	2640	
Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala Ala Gly Ala Gly Gly Gly Cys Cys			
2645	2650	2655	
Cys Cys Cys Ala Thr Cys Cys Cys Cys Gly Gly Gly Cys Ala Ala			
2660	2665	2670	
Thr Cys Cys Ala Thr Ala Ala Gly Cys Gly Gly Cys Cys Gly Cys			
2675	2680	2685	
<210> 40			
<211> 2130			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> IRES-HygroR-mPGKpA, 合成序列			
<400> 40			
acgcgtggta cctctagagt cgacccgggc ggccgcccc cccccctetc ctecccccc			60
ccctaacgtt actggccgaa gccgcttga ataaggccgg tgtgcgtttg tctatatgtt			120
atittccacc atattgccgt cttttggcaa tgtgagggcc cggaaacctg gcctgtctt			180

cttgacgagc attcctaggg gtctttcccc tctcgccaaa ggaatgcaag gtctgttgaa	240
tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc ttcttgaaga caaacaacgt ctgtagcgac	300
cctttgcagg cagcgggaacc ccccacctgg 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 tgataaatatg gccacaacca tgaaaaagcc tgaactcacc gcgacgtctg	660
tcgagaagtt tctgatcgaa aagttcgaca gcgtctccga cctgatgcag ctctcggagg	720
gcgaagaatc tcgtgctttc agcttcgatg taggagggcg tggatatgtc ctgcgggtaa	780
atagctgcgc cgatggtttc tacaagatc gttatgttea tcggcacttt gcateggccc	840
cgctcccgat tccggaagtg cttgacattg gggaattcag cgagagcctg acctattgca	900
tctcccgcg tgacacaggt gtcacgttgc aagacctgcc tgaaacgaa ctgcccgtg	960
ttctgcagcc ggtcgcggag gccatggatg cgatcgctgc ggccgatctt agccagacga	1020
gcgggttcgg cccattcgga ccgcaaggaa tcggtcaata cactacgtgg cgtgatttea	1080
tatgcgcgat tgctgatccc catgtgtatc actggcaaac tgtgatggac gacaccgtca	1140
gtgcgtccgt cgcgcaggt ctctgatgagc tgatgctttg ggccgaggac tgccccgaag	1200
tccggcacct cgtgcacgcg gatttcggct ccaacaatgt cctgacggac aatggccgca	1260
taacagcggc cattgactgg agcgaggcga tgttcgggga ttccaatac gaggtcgcca	1320
acatcttctt ctggaggccg tggttgctt gtatggagca gcagacgcgc tacttcgagc	1380
ggaggcatcc ggagcttgca ggatcgccgc ggctccgggc gtatatgtc 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 tctgtcata ctttgtaag aagggtgaga	1740
acagagtacc tacattttga atggaaggat tggagctac 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 gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct	2040
ggggtgccta atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc	2100
agtcgggaaa cctgtcgtgc cagcggatcc	2130

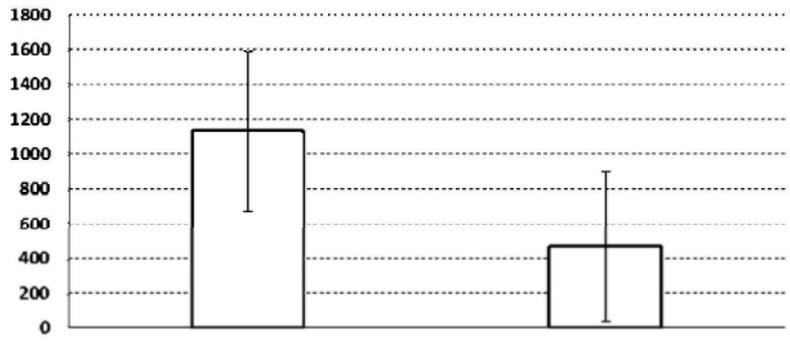


图1

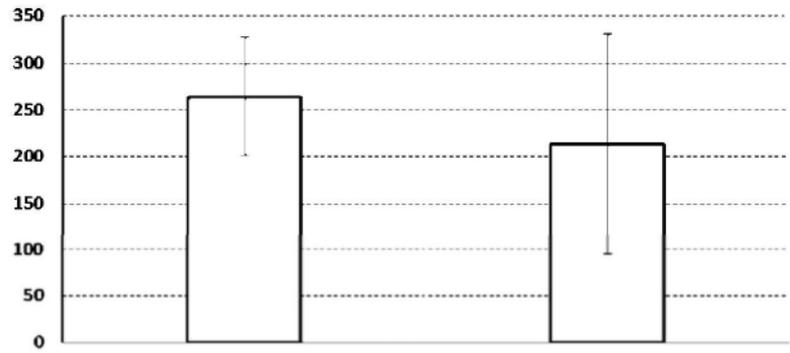


图2

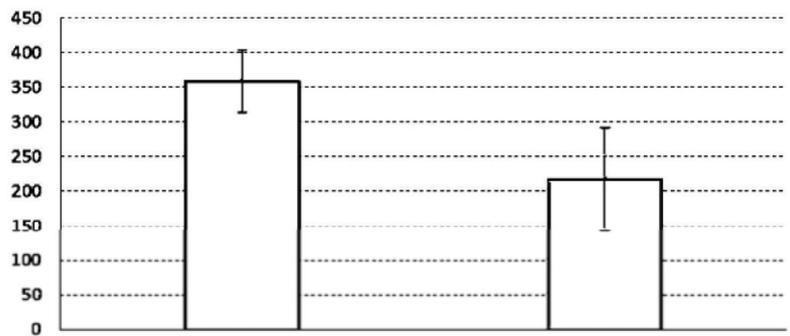


图3

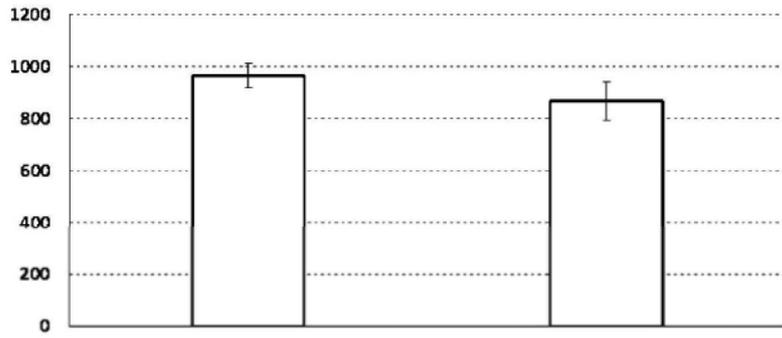


图4

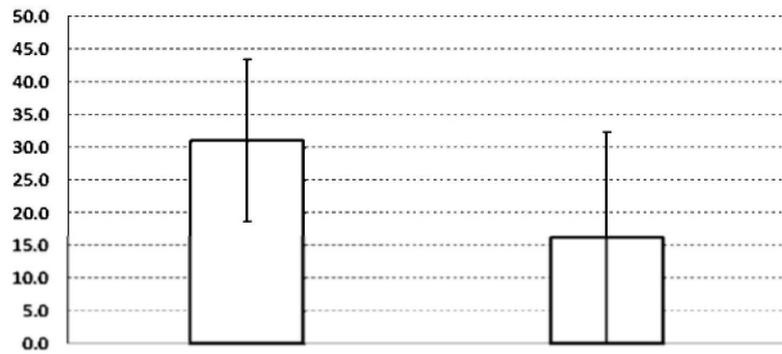


图5

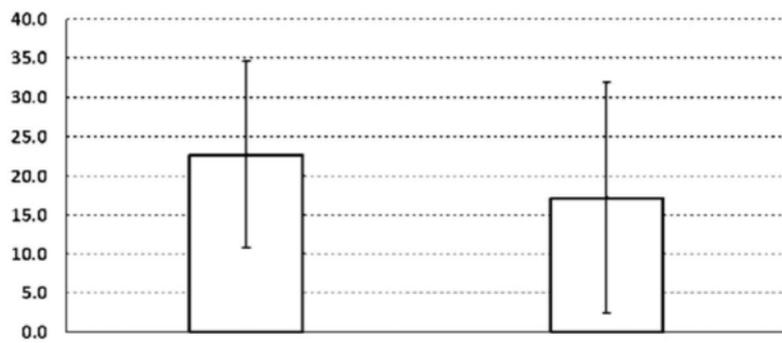


图6

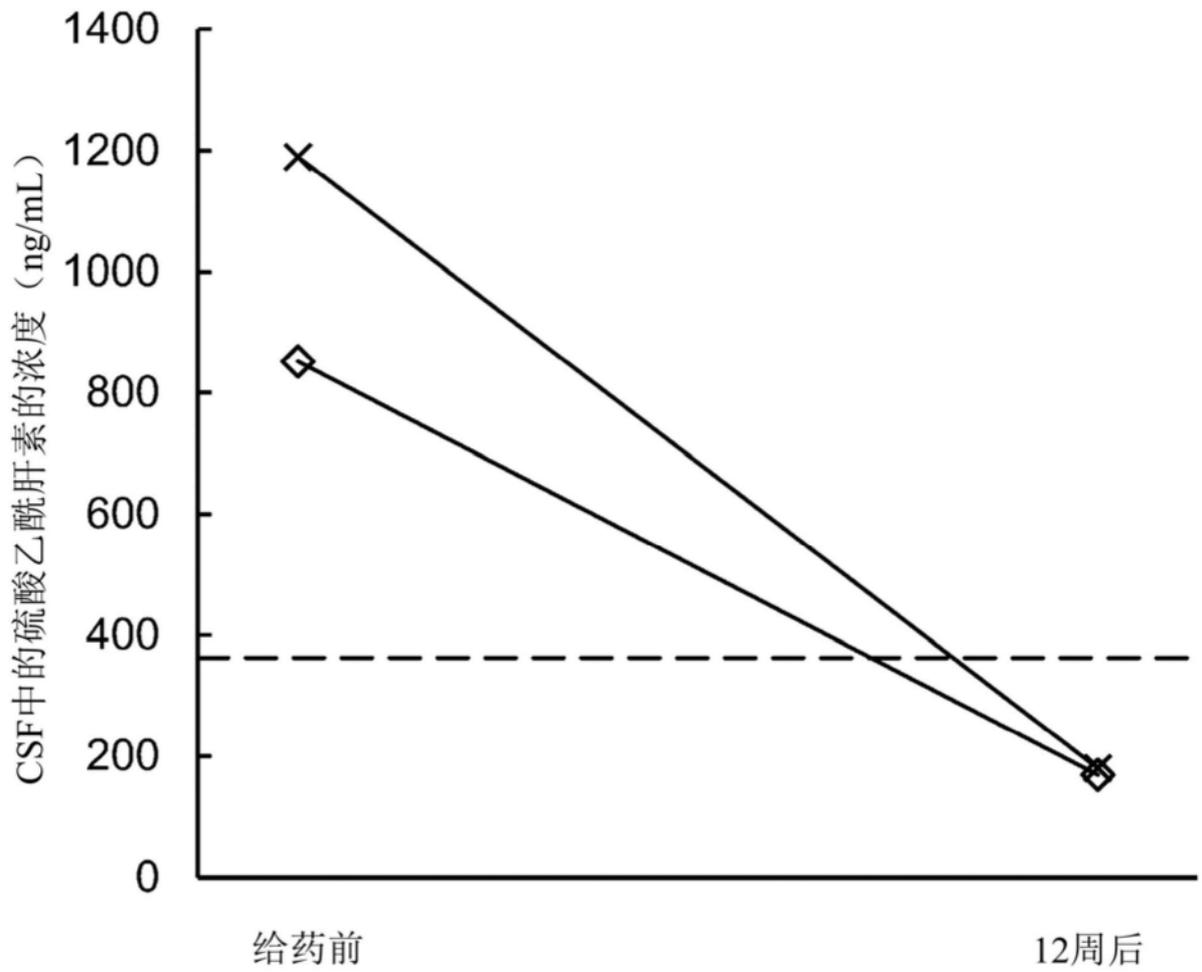


图7

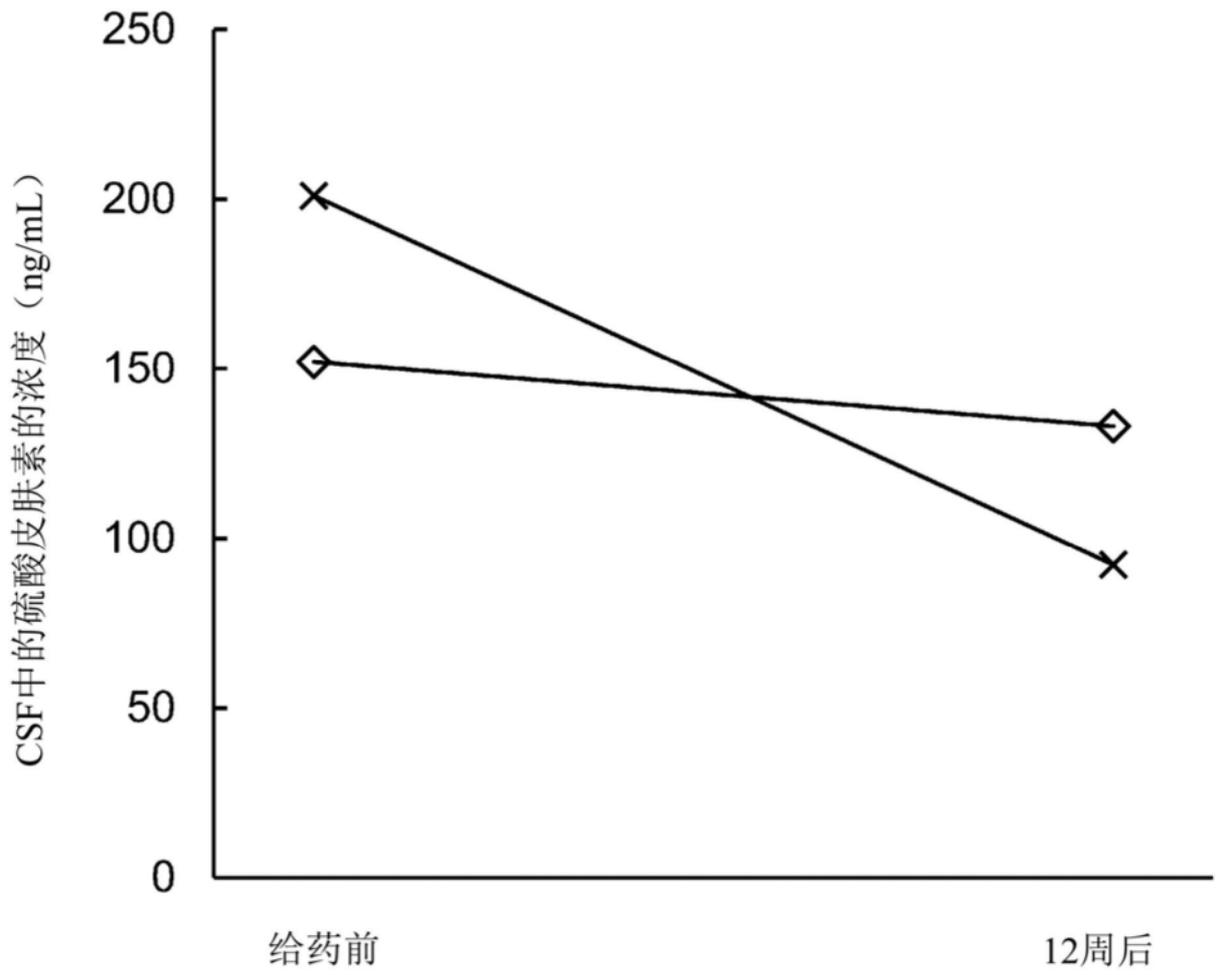


图8

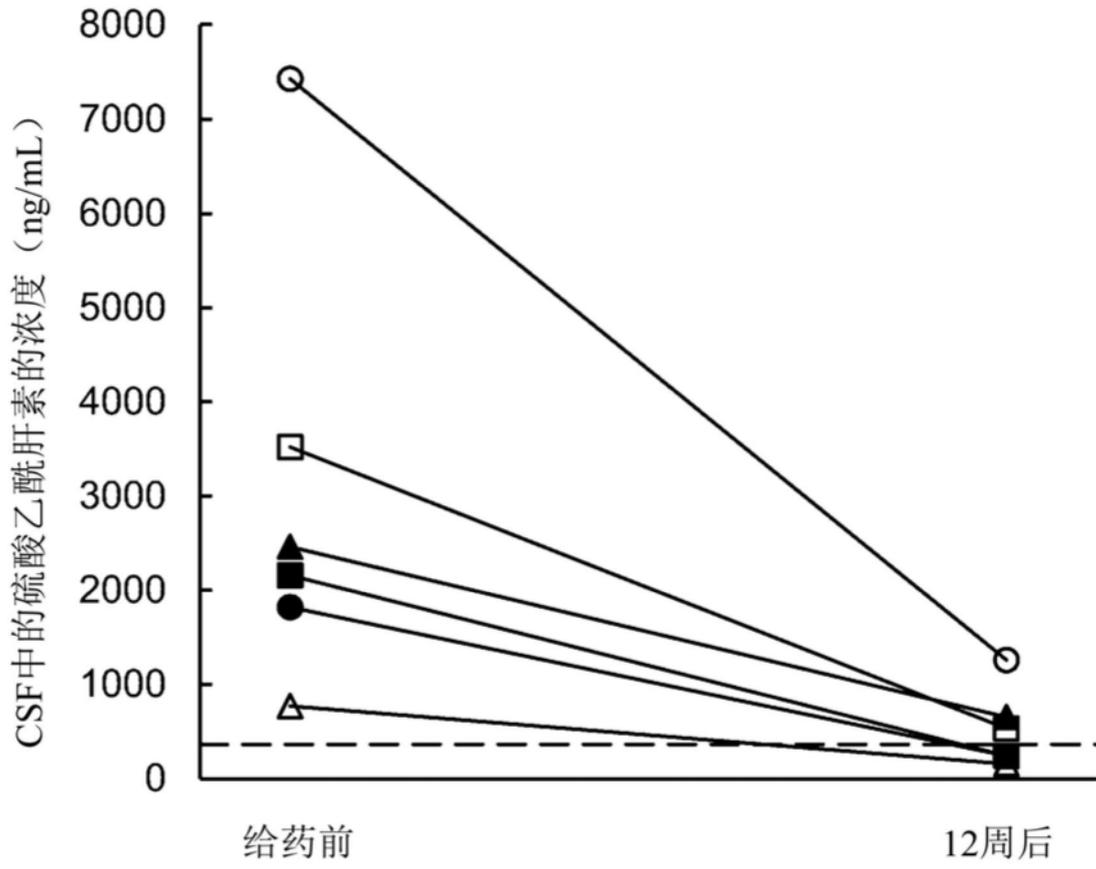


图9

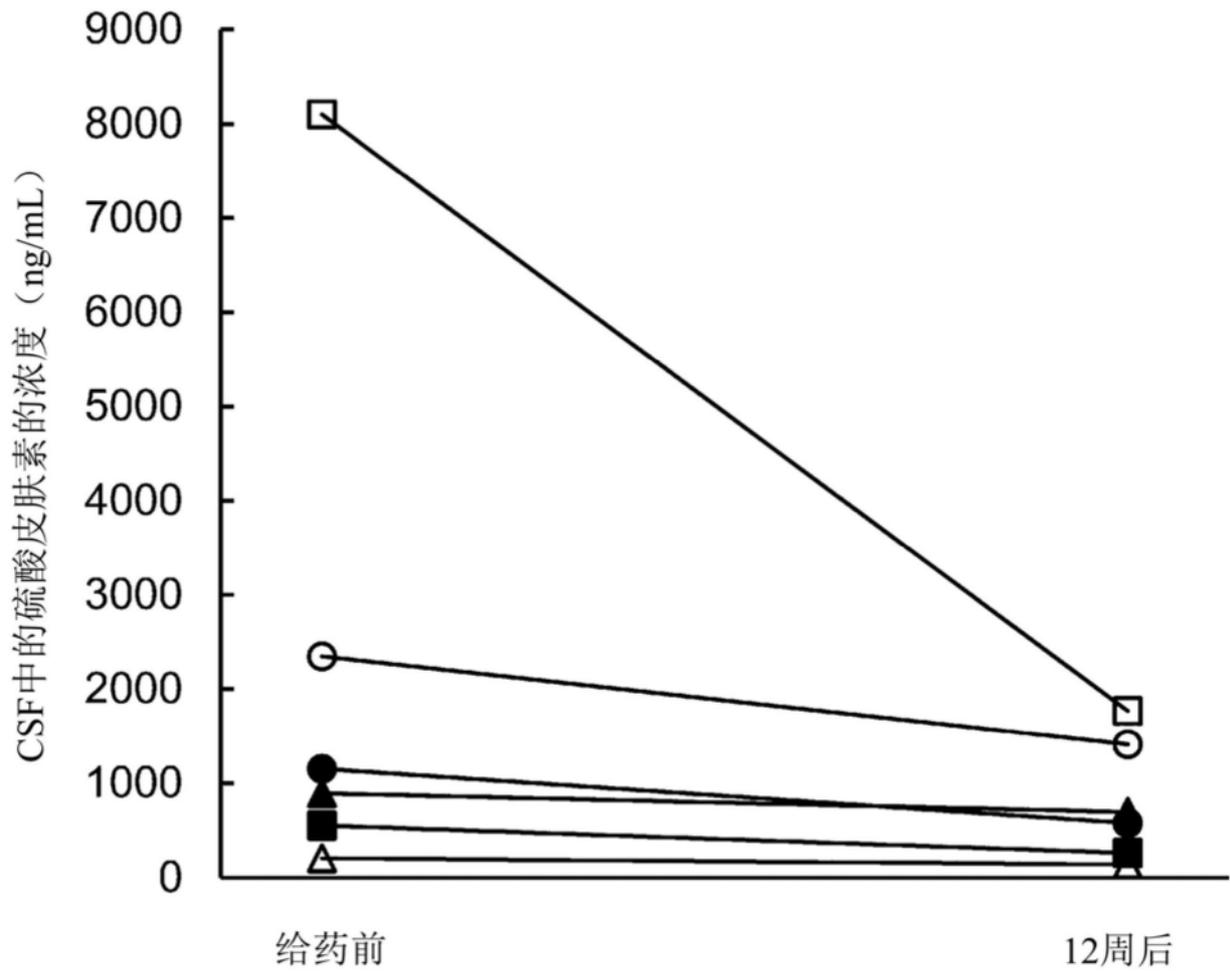


图10

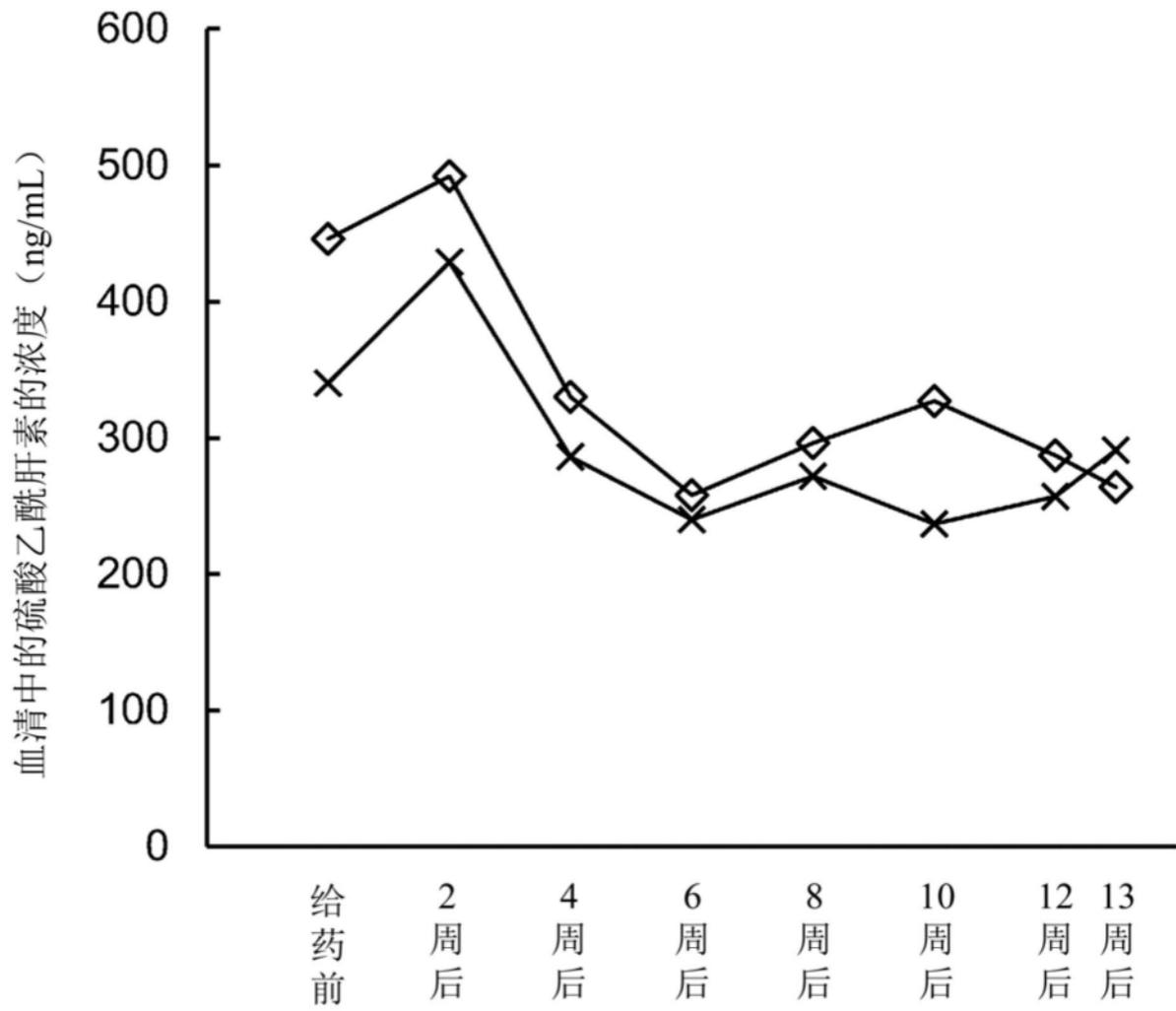


图11

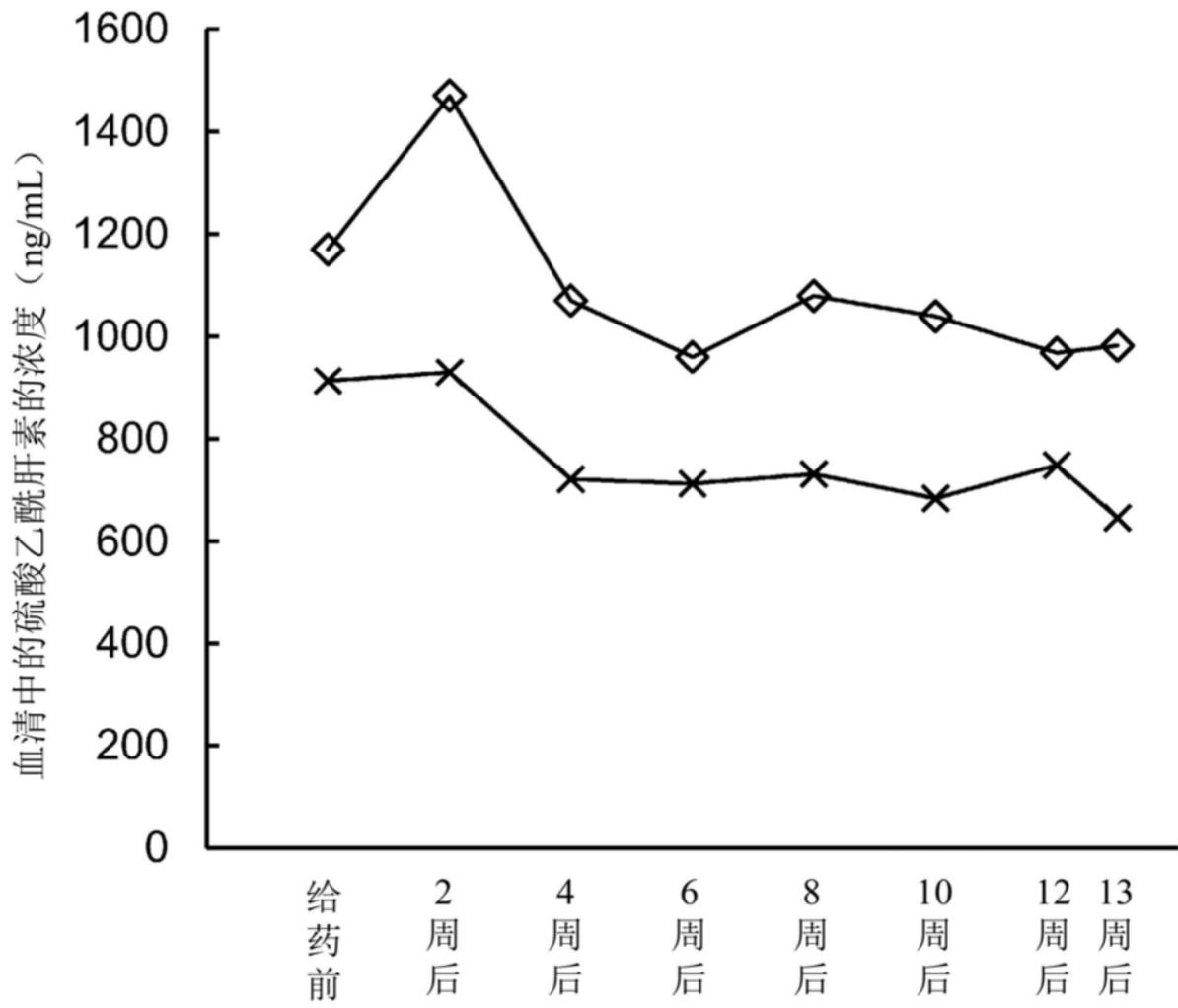


图12

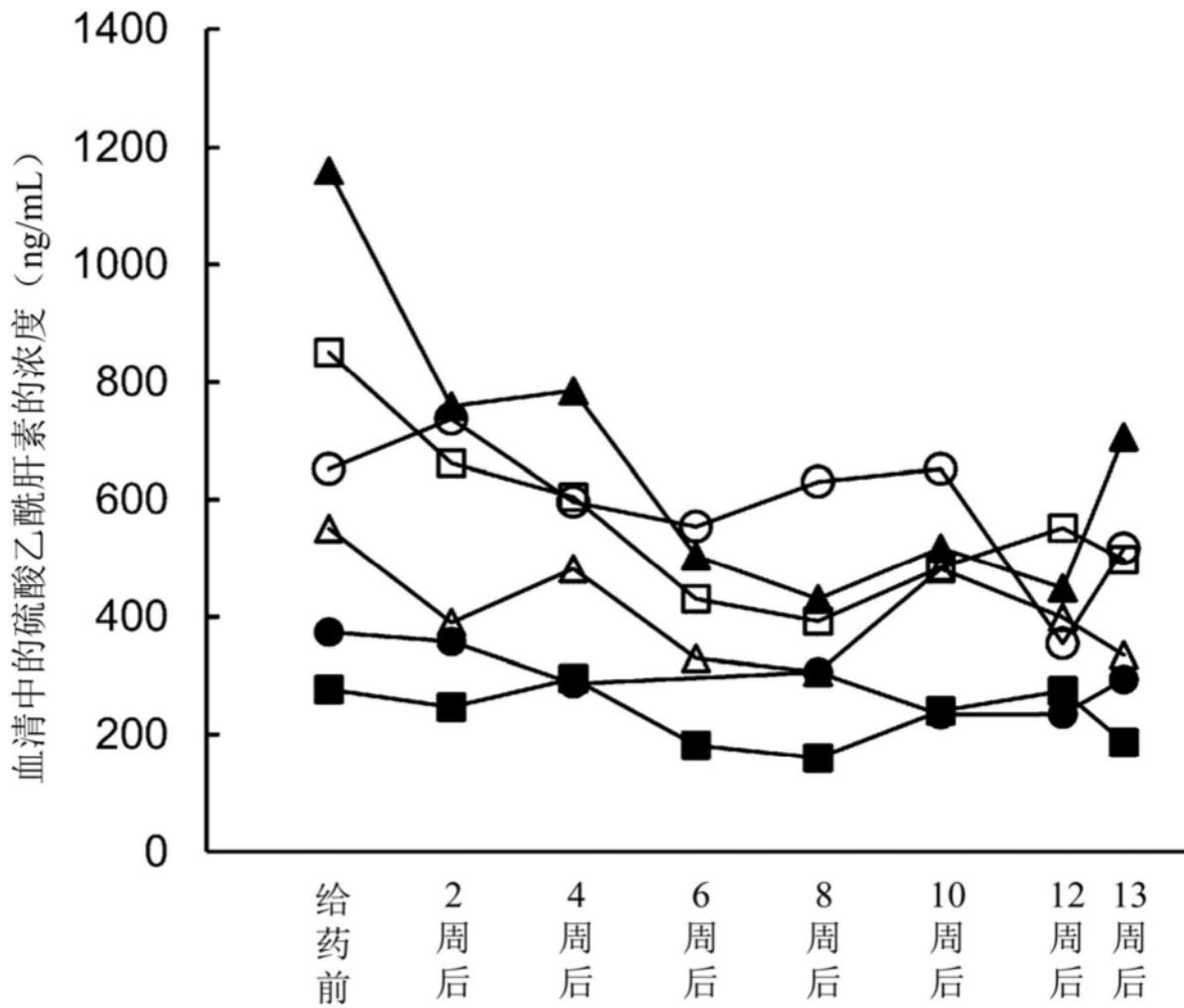


图13

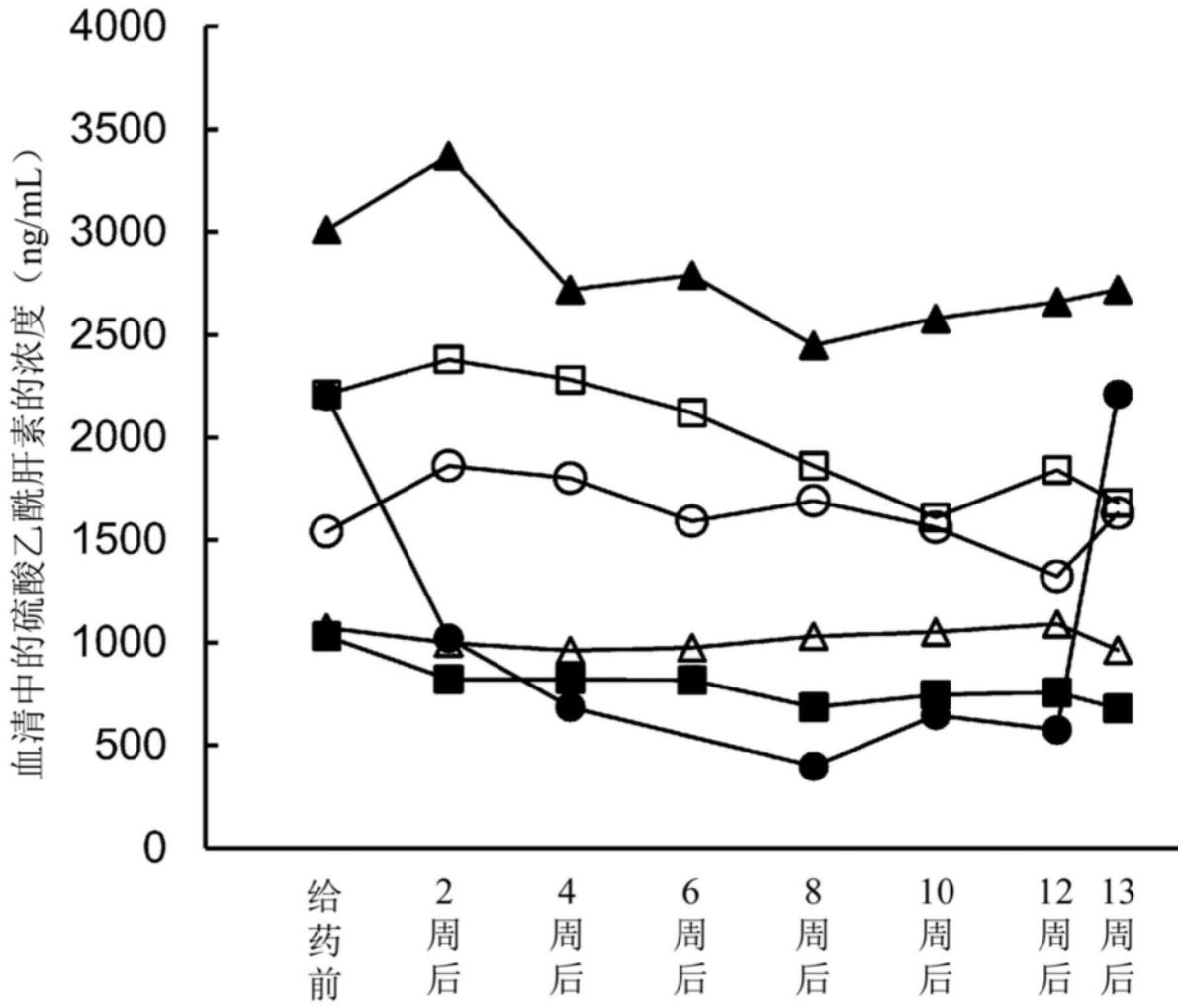


图14