



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105854000 A

(43) 申请公布日 2016.08.17

(21) 申请号 201610077253.8

*A61K 47/18*(2006.01)

(22) 申请日 2016.02.03

*A61P 3/04*(2006.01)

(66) 本国优先权数据

*A61P 3/10*(2006.01)

201510071304.1 2015.02.11 CN

*A61P 1/00*(2006.01)

(71) 申请人 杭州鸿运华宁生物医药工程有限公  
司

地址 310052 浙江省杭州市滨江区秋溢路  
288号东冠高新科技园2号楼3楼302  
室

(72) 发明人 张成 章华 范克索 郭勇  
景书谦

(74) 专利代理机构 杭州杭诚专利事务所有限公  
司 33109

代理人 林宝堂 赵越剑

(51) Int. Cl.

*A61K 38/26*(2006.01)

*A61K 9/08*(2006.01)

*A61K 47/12*(2006.01)

*A61K 47/26*(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页  
序列表8页

(54) 发明名称

一种药用 GLP-1R 抗体融合蛋白的稳定溶液  
制剂

(57) 摘要

本发明公开了一种药用 GLP-1R 抗体融合蛋白的稳定溶液制剂,包括治疗有效剂量的 GLP-1R 抗体融合蛋白、氨基酸、表面活性剂及缓冲体系,所述氨基酸的终浓度为 1-500mM,表面活性剂的终浓度为 0.01%-0.5%,所述稳定溶液制剂的 pH 值为 5.0 至 8.0。本发明性能稳定,在体内半衰期较长,治疗效果好,可以用于糖尿病、肥胖症及其相关病症的治疗。

1. 一种药用GLP-1R抗体融合蛋白的稳定溶液制剂,其特征在于,包括治疗有效剂量的GLP-1R抗体融合蛋白、氨基酸、表面活性剂及缓冲体系,所述氨基酸的终浓度为1-500mM,表面活性剂的终浓度为0.01-0.5%,所述稳定溶液制剂的pH值为5.0至8.0。

2. 根据权利要求1所述的稳定溶液制剂,其特征在于:所述氨基酸的终浓度为80-200mM,表面活性剂的终浓度为0.01%-0.2%,所述缓冲体系为柠檬酸盐缓冲液,所述稳定溶液制剂的pH值为5.5至7.0。

3. 根据权利要求2所述的稳定溶液制剂,其特征在于:所述柠檬酸盐缓冲液的浓度为5-30mM。

4. 根据权利要求2所述的稳定溶液制剂,其特征在于:所述氨基酸为L-精氨酸,L-精氨酸的终浓度为100-180mM,所述表面活性剂为吐温-80,吐温-80的终浓度为0.05%-0.15%。

5. 根据权利要求1所述的稳定溶液制剂,其特征在于:所述治疗有效剂量的GLP-1R抗体融合蛋白的终浓度为0.1mg/mL-100mg/mL。

6. 根据权利要求5所述的稳定溶液制剂,其特征在于:所述治疗有效剂量的GLP-1R抗体融合蛋白的终浓度为5mg/mL-40mg/mL。

7. 根据权利要求1-6任意一项所述的稳定溶液制剂,其特征在于:所述GLP-1R抗体融合蛋白的轻链可变结构域的氨基酸序列选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6其中之一,重链可变结构域的氨基酸序列选自SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9其中之一。

8. 根据权利要求7所述的稳定溶液制剂,其特征在于:所述GLP-1R抗体融合蛋白的轻链恒定结构域的氨基酸序列为SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11,重链恒定结构域的氨基酸序列为SEQ ID NO:12。

9. 根据权利要求1所述的稳定溶液制剂,其特征在于:其应用于治疗糖尿病或肥胖症。

10. 根据权利要求1所述的稳定溶液制剂,其特征在于:其应用于治疗肠易激综合征以及通过降低血浆葡萄糖、抑制胃和/或肠运动、抑制胃和/或肠排空、或抑制食物摄入而受益的其它疾病。

## 一种药用GLP-1R抗体融合蛋白的稳定溶液制剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,特别涉及一种药用GLP-1R抗体融合蛋白的稳定溶液制剂。

### 背景技术

[0002] GLP-1类似物在临床试验中用于治疗II型糖尿病和肥胖症(Gallwitz B,European Endocrinol,2015;11:21-5)。GLP-1诱导多种生物学效应,例如刺激胰岛素分泌、抑制胰高血糖素分泌、抑制胃排空、抑制胃运动或肠运动,并且诱导体重减轻(Lund A et al,Eur J Intern Med 2014;25:407-14)。GLP-1的显著特征是其刺激胰岛素分泌而不伴有低血糖相关危险的能力,所述低血糖相关危险见于应用胰岛素治疗或通过促进胰岛素分泌起作用的某些类型的口服治疗时。天然存在的GLP-1在体内会被迅速清除,具有极短的体内半衰期这一事实限制了涉及GLP-1的多肽治疗的有效性。

[0003] 目前已经有多种途径可以在保持生物学活性的同时延长GLP-1及其类似物在体内的半衰期(Verspohl EJ,Pharmacol Rev,2012;64:A-AX),包括将GLP-1及其类似物与免疫球蛋白Fc部分或者人血清白蛋白(HSA)融合。我们选择的全新途径涉及将GLP-1与完整的GLP-1R抗体分子(IgG)进行融合。IgG具有延长融合分子体内循环半衰期的作用,其本身在人体内的半衰期是21天。在保留GLP-1分子生物学活性的同时,GLP-1R抗体融合蛋白具有由抗体分子提供的稳定性方面的优势。同时,GLP-1和GLP-1R的抗体形成的融合蛋白质具有由抗体分子提供的分子靶向性进而增加GLP-1与GLP-1R结合的几率。另外,抗体分子的免疫原性也低于其他的蛋白融合伙伴,对于一个需要长期甚至终身服用的药物,低免疫原性是一个必备的属性。

[0004] 这些融合蛋白质一般在哺乳动物细胞、例如CHO、SP2/0或NSO中生产。但是发明人观察到在CHO细胞中产生的GLP-1R抗体融合蛋白易于被内源蛋白酶或者在特定的细胞培养理化条件下降解,且其趋势在低pH的环境下更加显著和快速,同时发现在pH值7以上时,GLP-1R抗体融合蛋白更加易于聚合。另外,发明人还发现GLP-1R抗体融合蛋白在冷藏条件(2-8℃)下、在单一的缓冲溶液(例如柠檬酸盐缓冲液)中的溶解度低,无法满足药用的剂量要求。这些问题在本发明中通过对pH的控制、使用特定的制剂添加物的组合、以及使用特定的GLP-1R抗体融合蛋白浓度来予以克服。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种药用GLP-1R融合蛋白的稳定溶液制剂,性能稳定,在体内半衰期较长,治疗效果佳,可以被用于糖尿病、肥胖症及其相关病症的治疗。

[0006] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

[0007] 一种药用GLP-1R抗体融合蛋白的稳定溶液制剂,包括治疗有效剂量的GLP-1R抗体融合蛋白、氨基酸、表面活性剂及缓冲体系,所述氨基酸的终浓度为1-500mM,表面活性剂的终浓度为0.01%-0.5%,所述稳定溶液制剂的pH值为5.0至8.0。

[0008] 为了克服GLP-1R抗体融合蛋白的溶液制剂在低pH值下不稳定,高pH值下易聚合以及GLP-1R抗体融合蛋白在单一的缓冲溶液中溶解度不够高的一些问题,本发明研发了包含GLP-1R抗体融合蛋白的在物理和化学上稳定的溶液制剂,其进一步包含了缓冲体系、作为稳定剂和渗透压调节剂的氨基酸和表面活性剂。该稳定溶液制剂在25℃下的稳定保存为至少6个月。本发明进一步优选的稳定溶液制剂包含终浓度约0.1-100mg/mL的GLP-1R抗体融合蛋白、浓度为5-30mM的柠檬酸盐缓冲液、终浓度0.01%-0.2%的吐温-80和终浓度80-200mM的L-精氨酸,并且pH为5至8。该稳定溶液制剂提高了GLP-1R抗体融合蛋白的溶解度以及其在特殊环境下,尤其是高温下的稳定性。本发明还包括治疗糖尿病、肥胖症和相关病症的方法,该方法包括施用本发明所述的GLP-1R抗体融合蛋白制剂。

[0009] 作为优选,所述氨基酸的终浓度为80-200mM,表面活性剂的终浓度为0.01%-0.2%,所述缓冲体系为柠檬酸盐缓冲液,所述稳定溶液制剂的pH值为5.5至7.0。

[0010] 作为优选,所述柠檬酸盐缓冲液的浓度为5-30mM。

[0011] 作为优选,所述氨基酸为L-精氨酸,L-精氨酸的终浓度为100-180mM,所述表面活性剂为吐温-80,吐温-80的终浓度为0.05%-0.15%。

[0012] 作为优选,所述治疗有效剂量的GLP-1R抗体融合蛋白的终浓度为0.1mg/mL-100mg/mL。

[0013] 作为优选,所述治疗有效剂量的GLP-1R抗体融合蛋白的终浓度为5mg/mL-40mg/mL。

[0014] 作为优选,所述GLP-1R抗体融合蛋白的轻链可变结构域的氨基酸序列选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6其中之一,重链可变结构域的氨基酸序列选自SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9其中之一。

[0015] 作为优选,所述GLP-1R抗体融合蛋白的轻链恒定结构域的氨基酸序列为SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11,重链恒定结构域的氨基酸序列为SEQ ID NO:12。

[0016] 本发明所述的GLP-1R抗体融合蛋白包含GLP-1或其类似物,在其C端通过肽接头与GLP-1R抗体轻链的N端进行了融合。该抗体融合蛋白在生物学上相比GLP-1及其类似物具有类似或者更好的生物学活性和延长的半衰期。优选的GLP-1R抗体融合蛋白的轻链可变结构域序列包含全部或部分的SEQ ID NO:1、2、3、4、5或6,其轻链恒定结构域序列包含全部或部分的SEQ ID NO:10或11,其重链可变结构域序列包含全部或者部分的SEQ ID NO:7、8或9,其重链恒定结构域序列包含全部或者部分的SEQ ID NO:12。更优选的GLP-1R抗体融合蛋白的轻链可变结构域序列基本是SEQ ID NO:1、2、3、4、5或6,其轻链恒定结构域序列基本是SEQ ID NO:10或11,其重链可变结构域序列基本是SEQ ID NO:7、8或9,其重链恒定结构域序列基本是SEQ ID NO:12。最优选的GLP-1R抗体融合蛋白的轻链可变结构域序列完全是SEQ ID NO:1、2、3、4、5或6,其轻链恒定结构域序列完全是SEQ ID NO:10或11,其重链可变结构域序列完全是SEQ ID NO:7、8或9,其重链恒定结构域序列完全是SEQ ID NO:12。

[0017] 本发明的稳定溶液制剂应用于治疗糖尿病或肥胖症。

[0018] 本发明的稳定溶液制剂应用于治疗肠易激综合征以及通过降低血浆葡萄糖、抑制胃和/或肠运动、抑制胃和/或肠排空、或抑制食物摄入而受益的其它疾病。

[0019] 本发明的有益效果是:性能稳定,在体内半衰期较长,治疗效果佳,可以被用于糖尿病、肥胖症、肠易激综合征及其相关病症的治疗。

## 具体实施方式

[0020] 下面通过具体实施例,对本发明的技术方案作进一步的具体说明。

[0021] 本发明中,若非特指,所采用的原料和设备等均可从市场购得或是本领域常用的。下述实施例中的方法,如无特别说明,均为本领域的常规方法。

[0022] 本发明GLP-1R抗体融合蛋白的制备参见申请人在先申请的专利:CN104371019A, WO 2015/021871。

[0023] 生物学活性指的是GLP-1R抗体融合蛋白在体内与GLP-1R结合并活化GLP-1R而引发响应的能力。响应包括不限于促进胰岛素分泌、抑制胰高血糖素分泌、抑制食欲、减轻体重、诱导饱腹感、抑制胰腺β细胞凋亡和诱导胰腺β细胞增殖。

[0024] 药用GLP-1R抗体融合蛋白质的稳定溶液制剂包含了在缓冲液中的GLP-1R抗体融合蛋白,该缓冲液进一步含有作为稳定剂、渗透压调节剂的氨基酸和表面活性剂。该稳定溶液制剂在25℃下的稳定性能至少维持6个月,其更为精确的25℃下稳定性保持周期为6个月至8个月、6个月至12个月、6个月至18个月、6个月至24个月、8个月至12个月、8个月至18个月、8个月至24个月、12个月至18个月、12个月至24个月、18个月至24个月。

[0025] 本发明所用到的缓冲液体系由包括但不限于以下的一种或者数种有机或无机化合物组成:柠檬酸(citric acid),柠檬酸盐(salts of citric acid),抗坏血酸(ascorbic acid),抗坏血酸盐(salts of ascorbic acid),葡萄糖酸(gluconic acid),葡萄糖酸盐(salts of gluconic acid),碳酸(carbonic acid),碳酸盐(salts of carbonic acid),酒石酸(tartaric acid),酒石酸盐(salts of tartaric acid),琥珀酸(succinic acid),琥珀酸盐(salts of succinic acid),醋酸(acetic acid),醋酸盐(salts of acetic acid),酞酸(phthalic acid),酞酸盐(salt of phthalic acid),磷酸(phosphoric acid),磷酸盐(phosphate),盐酸(hydrochloric acid),三羟甲基氨基甲烷(Tris),氨丁三醇(Thomethamine)以及氨基酸(amino acid),包括但不限于组氨酸(Histidine),精氨酸(Arginine),甘氨酸(Glycine)。

[0026] 渗透压调节剂在本发明中定义为在被添加后能够增加制剂渗透压的一种物质。本发明所涉及的渗透压调节剂为自由氨基酸,包括但不限于以下:精氨酸(arginine)、组氨酸(histidine)、蛋氨酸(methionine)、赖氨酸(lysine)、鸟氨酸(ornithine)、亮氨酸(leucine)、异亮氨酸(isoleucine)、丙氨酸(alanine)、甘氨酸(glycine)、谷氨酸(glutamic acid)和天冬氨酸(aspartic acid)。碱性氨基酸优选精氨酸,组氨酸,赖氨酸或者其组合。氨基酸可以以氨基酸盐的形式添加,同时被添加的氨基酸可以是D构象氨基酸,比如D-精氨酸,或者L构象氨基酸,比如L-精氨酸。

[0027] 在本发明所述范围内,氨基酸的添加不仅限于作为渗透压调节剂,同时也作为稳定剂,其包括但不限于精氨酸(arginine)、组氨酸(histidine)、蛋氨酸(methionine)、赖氨酸(lysine)、鸟氨酸(ornithine)、亮氨酸(leucine)、异亮氨酸(isoleucine)、丙氨酸(alanine)、甘氨酸(glycine)、谷氨酰胺(glutamine)、谷氨酸(glutamic acid)、天冬酰胺(asparagine)、天冬氨酸(aspartic acid)、苯丙氨酸(phenylalanine)、酪氨酸(tyrosine)、丝氨酸(serine)、脯氨酸(proline)和色氨酸(tryptophan)。氨基酸作为稳定剂和渗透压调节剂在本发明中优选的浓度为1至500mM。

[0028] 表面活性剂在本发明里定义为具有两性结构的有机化合物,即他们含有具有不同可溶性质的基团,典型的情况是这种化合物同时含有可溶于油的碳氢基团和易溶于水的离子基团。本发明涉及的表面活性剂包括但不限于以下的一些:山梨醇酐脂肪酸酯(sorbitan fatty acid esters;比如,山梨糖单辛酸酯(sorbitan monocaprylate)、失水山梨醇单月桂酸酯(sorbitan monolaurate)、失水山梨醇棕榈酸酯(sorbitan monopalmitate));失水山梨醇三油酸酯(sorbitan trioleate);甘油脂肪酸酯(glycerine fatty acid esters;比如:单辛酸甘油酸酯(glycerine monocaprylate))、单十四烷酸甘油酸酯(glycerine monomyristate)、单硬脂酸甘油酯(glycerine monostearate);聚甘油脂肪酸酯(polyglycerine fatty acid esters;比如:十甘油单硬脂酸酯(decaglycerine monostearate))、十甘油二硬脂酸酯(decaglyceryl distearate)、十甘油单亚油酸酯(decaglyceryl monolinoleate));聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯(polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters;比如:聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯(polyoxyethylene sorbitan monolaurate)),其中聚氧乙烯(20)失水山梨醇单月桂酸酯(polyoxyethylene(20)sorbitan monolaurate)即为吐温-20(Tween-20)、聚氧乙烯失水山梨醇单棕榈酸酯(polyoxyethylene sorbitan monopalmitate),即吐温-40(Tween-40)、聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯(polyoxyethylene sorbitan monooleate),其中聚氧乙烯(80)失水山梨醇单油酸酯(polyoxyethylene(80)sorbitan monooleate)即为吐温-80(Tween-80)、聚氧乙烯失水山梨醇单硬脂酸酯(polyoxyethylene sorbitan monostearate),其中聚氧乙烯(60)失水山梨醇单硬脂酸酯(polyoxyethylene(60)sorbitan monostearate)即为吐温-60;聚氧乙烯失水山梨醇三油酸酯(polyoxyethylene sorbitan trioleate),即吐温-85(Tween-85),聚氧乙烯失水山梨醇三硬脂酸酯(polyoxyethylene sorbitan tristearate),即吐温-65(Tween-65);聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯(polyoxyethylene sorbitol fatty acid esters,比如:聚氧乙烯山梨糖醇四硬脂酸酯(polyoxyethylene sorbitol tetrastearate),聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯polyoxyethylene sorbitol tetraoleate));聚氧乙烯甘油脂肪酸酯(polyoxyethylene glycerine fatty acid esters,比如:聚氧乙烯甘油单硬脂酸酯(polyoxyethylene glyceryl monostearate)),聚氧乙烯聚乙二醇脂肪酸酯(polyoxyethylene glycol fatty acid esters;比如:聚氧乙烯聚乙二醇二硬脂酸酯(polyoxyethylene glycol distearate));聚氧乙烯烷基醚(polyoxyethylene alkyl ethers,比如:聚氧乙烯月桂醚polyoxyethylene lauryl ether));聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚(polyoxyethylene polyoxypropylene alkyl ethers,比如:聚氧乙烯聚氧丙烯二醇(polyoxyethylene polyoxypropylene glycol),聚氧乙烯聚氧丙烯醇胺醚(polyoxyethylene polyoxypropylene propyl ether),聚氧乙烯聚氧丙烯十六烷基醚(polyoxyethylene polyoxypropylene cetyl ether));聚氧乙烯烷基苯基醚(polyoxyethylene alkylphenyl ethers,比如:壬基酚聚氧乙烯醚(polyoxyethylene nonylphenyl ether));聚氧乙烯氢化蓖麻油油(polyoxyethylene hydrogenated castor oils,比如polyoxyethylene castor oil聚氧乙烯蓖麻油油));聚氧乙烯蜂蜡衍生物(polyoxyethylene beeswax derivatives,比如:聚氧乙烯山梨醇蜂蜡衍生物(polyoxyethylene sorbitol beeswax));聚氧乙烯羊毛脂衍生物(polyoxyethylene lanolin derivatives)和聚氧乙烯脂肪酸酰胺(polyoxyethylene fatty acid amides,比

如:聚氧乙烯硬脂酸酰胺(polyoxyethylene stearic acid amide));十碳-十八碳烷基硫酸盐(C10-C18alkyl sulfates,比如:十六烷基硫酸钠(sodium cetyl sulfate),硫酸月桂酸钠(sodium lauryl sulfate),硫酸油烯醇钠(sodium oleyl sulfate));添加有2到4个环氧乙烷基团的十碳-十六碳脂肪醇聚氧乙烯醚硫酸铵(polyoxyethylene C10-C16alkyl ether sulfate with an average of 2to 4moles of ethylene oxide units added,比如:聚环氧乙烷月桂基醚硫酸钠(sodium polyoxyethylene lauryl sulfate));一碳-十八碳烷基磺酸酯(C1-C18alkyl sulfosuccinate ester salts,比如:月桂酯磺酸钠(sodium lauryl sulfosuccinate ester));以及天然的表面活性剂,比如卵磷脂(lecithin)、甘油磷脂(glycerophospholipid)、磷酸鞘酯类(sphingophospholipids,比如神经鞘磷脂(sphingomyelin))、十二碳-十八碳蔗糖脂肪酸酯(sucrose esters of C12-C18fatty acids)。本发明使用的表面活性剂配方可能含有一个或者多个以上所述的表面活性剂成分。比较合适的表面活性剂是聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯类化合物,比如吐温-20、吐温-40、吐温-60和吐温-80。

[0029] 药用GLP-1R融合蛋白质的稳定溶液制剂包含终浓度约0.1至约100mg/mL GLP-1R抗体融合蛋白。优选的GLP-1R抗体融合蛋白的浓度(mg/mL)范围为约0.1至1、1至5、5至10、5至20、10至20、20至30、20至40、30至40、40至50、50至60、60至70、70至80、80至90、90至100mg/mL。特别优选的GLP-1R抗体融合蛋白的浓度(mg/mL)为约0.1、约0.25、约0.5、约1、约2、约3、约4、约5、约6.5、约8、约10、约12.5、约15、约17.5、约20、约22.5、约25、约27.5、约30、约32.5、约35、约37.5、约40、约45、约50、约55、约60、约65、约70、约75、约80、约85、约90、约95、约100mg/mL。

[0030] 优选的稳定溶液制剂的缓冲体系为柠檬酸盐,其浓度范围为约5至30mM。进一步优选的柠檬酸盐浓度(mM)范围为约5至25、5至20、5至15、5至12.5、5至10、7.5至30、7.5至25、7.5至20、7.5至15、7.5至12.5、7.5至10、8至30、8至25、8至20、8至15、8至12.5、8至11、8至10、9至30、9至25、9至20、9至15、9至12.5、10至30、10至25、10至20、10至17.5、10至15、10至12.5、12.5至30、12.5至25、12.5至20、12.5至15、15至30、15至25、15至20、17.5至30、17.5至25、17.5至22.5、17.5至20、20至30、20至27.5、20至25、20至22.5、22.5至30、22.5至27.5、22.5至25、25至30、25至27.5、27.5至30。更进一步优选的柠檬酸盐的浓度为约5至20mM。特别优选的柠檬酸盐的浓度为约10、10.0、20或20.0mM。

[0031] 本发明所述的药用GLP-1R融合蛋白质的稳定溶液制剂的pH调节范围为约5至8。该pH范围为制剂提供可接受的稳定性,以保持GLP-1R抗体融合蛋白的溶解度和促进胰岛素分泌的活性,并且是非肠道施用可以接受的。可以通过加入酸、例如HCl,或加入碱,例如NaOH,将pH调节至预期的pH或者可以加入柠檬酸盐缓冲液和柠檬酸的组合以获得预期的缓冲浓度和预期的pH。优选pH值的范围为5至7.75、5至7.5、5至7.25、5至7.0、5至6.75、5至6.5、5至6.25、5至6.0、5至5.75、5至5.5、5至5.25、5.25至8.0、5.25至7.75、5.25至7.5、5.25至7.25、5.25至7.0、5.25至6.75、5.25至6.5、5.25至6.25、5.25至6.0、5.25至5.75、5.25至5.5、5.5至8.0、5.5至7.75、5.5至7.5、5.5至7.25、5.5至7.0、5.5至6.75、5.5至6.5、5.5至6.25、5.5至6.0、5.5至5.75、5.75至8.0、5.75至7.75、5.75至7.5、5.75至7.25、5.75至7.0、5.75至6.75、5.75至6.5、5.75至6.25、5.75至6.0、6.0至8.0、6.0至7.75、6.0至7.5、6.0至7.25、6.0至7.0、6.0至6.75、6.0至6.5、6.0至6.25、6.25至8.0、6.25至7.75、6.25至7.5、6.25至7.25、

6.25至7、6.25至6.75、6.25至6.5、6.5至8.0、6.5至7.75、6.5至7.5、6.5至7.25、6.5至7、6.5至7、6.5至6.75、6.75至8、6.75至7.75、6.75至7.5、6.75至7.25、6.75至7.0、7至8.0、7至7.75、7至7.5、7至7.25、7.25至8.0、7.25至7.75、7.25至7.5、7.5至8.0、7.5至7.75、7.75至8.0。进一步优选的pH范围为6至7，特别优选的pH值为约6.5或6.50。

[0032] 本发明优选了L-精氨酸作为药用GLP-1R融合蛋白质的稳定溶液制剂的渗透压调节剂和稳定剂，其浓度范围为1至500mM，起到稳定GLP-1R抗体融合蛋白、增加其溶解度，并调整制剂的渗透压使其适用于非肠道施用等作用。优选的L-精氨酸的浓度范围为80至200mM。进一步优选浓度范围为80至190、80至180、80至170、80至160、80至150、80至140、80至130、80至120、80至110、80至100、80至90、90至200、90至190、90至180、90至170、90至160、90至150、90至140、90至130、90至120、90至110、90至100、100至200、100至190、100至180、100至170、100至160、100至150、100至140、100至130、100至120、100至110、110至200、110至190、110至180、110至170、110至160、110至150、110至140、110至130、110至120、120至200、120至190、120至180、120至170、120至160、120至150、120至140、120至130、130至200、130至190、130至180、130至170、130至160、130至150、130至140、140至200、140至190、140至180、140至170、140至160、140至150、150至200、150至190、150至180、150至170、150至160、160至200、160至190、160至180、160至170、170至200、170至190、170至180、180至190、190至200。更进一步优选的L-精氨酸浓度为100至180mM。特别优选为约138mM或约138.0mM。

[0033] 本发明优选了吐温-80作为药用GLP-1R融合蛋白质的稳定溶液制剂的表面活性剂，其浓度范围为0.01%至0.5%。优选的吐温-80的浓度范围为约0.01%至0.2%，优选的浓度范围是与GLP-1R抗体融合蛋白和精氨酸组合确定的，以便可溶聚集物和不可溶颗粒的形成最小化。进一步优选的吐温-80的浓度范围为约0.01%至0.2%、0.01%至0.15%、0.01%至0.1%、0.01%至0.05%、0.01%至0.025%、0.025%至0.2%、0.025%至0.15%、0.025%至0.1%、0.025%至0.075%、0.025%至0.05%、0.05%至0.2%、0.05%至0.15%、0.05%至0.1%、0.05%至0.075%、0.075%至0.2%、0.075%至0.15%、0.075%至0.1%、0.1%至0.2%、0.1%至0.15%、0.15%至0.2%。更进一步优选的吐温-80浓度范围为约0.05%至约0.15%。特别优选的吐温-80浓度为约0.1%。

[0034] 特别优选的药用GLP-1R融合蛋白质的稳定溶液制剂包含GLP-1R抗体融合蛋白，浓度范围为约5至约20mg/mL、柠檬酸盐缓冲液：浓度为约20mM、吐温-80：浓度为约0.1%、L-精氨酸：浓度为约138mM，并且pH为约6.5。另一个特别优选的药用GLP-1R融合蛋白质的稳定溶液制剂包含GLP-1R抗体融合蛋白，浓度范围为约20至约40mg/mL、柠檬酸盐缓冲液：浓度为约20mM、吐温-80：浓度为约0.1%、L-精氨酸：浓度为约138mM，并且pH为约6.5。另一个特别优选的稳定溶液制剂包含GLP-1R抗体融合蛋白，浓度范围为约5至约20mg/mL、柠檬酸盐缓冲液：浓度范围为约5至20mM，吐温-80：浓度范围为约0.05%至0.15%、L-精氨酸：浓度范围为约100至180mM，并且pH范围为约6.0至7。另一个特别优选的稳定溶液制剂包含GLP-1R抗体融合蛋白，浓度范围为约20至约40mg/mL、柠檬酸盐缓冲液：浓度范围为约5至20mM，吐温-80：浓度范围为约0.05%至0.15%、L-精氨酸：浓度范围为约100至180mM，并且pH范围为约6.0至7。

[0035] 稳定溶液制剂的施用可以通过具备了通常技术的医师所知的任何有效途径。外用非肠道施用是其中一种方法。非肠道施用在医学文献中通常被理解为通过灭菌注射器或某

些其它机械设备例如输注泵将剂型注射至体内。外用非肠道途径可以包括静脉内、肌内、皮下和腹膜内途径施用。皮下施用是优选的途径。

[0036] 本发明所述的稳定溶液制剂可以被用于治疗患有非胰岛素依赖性糖尿病或者处于发展成非胰岛素依赖性糖尿病危险中的个体、胰岛素依赖性糖尿病或肥胖症的个体。在上下文描述的稳定溶液制剂中GLP-1R抗体融合蛋白的有效量是当施用于需要GLP-1R刺激的个体时引起预期的治疗和/或预防效果而不引起不希望的副作用的量。

[0037] 优选的GLP-1R抗体融合蛋白每两周施用一次或者每周施用一次。取决于治疗的疾病,其可能需要更频繁施用GLP-1R抗体融合蛋白,例如每周施用二至三次。

[0038] 本发明将通过参考以下实施例以非限制性实施例的方式进行描述。

[0039] 检测方法的描述

[0040] 报告基因实验检测GLP-1R抗体融合蛋白在体外激活GLP-1R的功能。

[0041] 以每孔20000个接种共表达hGLP-1R-CRE-Luciferase的CHO-DHFR-细胞至96孔细胞培养板,37°C培养过夜。第二天除去培养基上清,用无血清培养基清洗细胞表面两次,吸去残液,再加入100 $\mu$ l用无血清培养基稀释GLP-1R抗体融合蛋白样品和对照,37°C孵育4小时。孵育结束后,加入100 $\mu$ l Promega的Bright Glo化学发光底物,最后将细胞裂解物转移至白色96孔板,在Molecular Devices的SpectraMax L酶标仪上读取相对荧光强度。用GraphPad处理数据得到对数浓度与应答强度的剂量-响应曲线和EC50值。

[0042] 体积排阻高效液相色谱法(SEC-HPLC)检测GLP-1R抗体融合蛋白的纯度。

[0043] SEC-HPLC用于检测GLP-1R抗体融合蛋白的聚合物(可溶聚集物)的形成和相应的单体损失。使用安捷伦1100系列HPLC,在25°C的柱温下,用含有200mM磷酸盐,pH6.8的流动相冲洗TSK-G3000SWx1高效液相体积排阻层析柱,直至UV吸收曲线维持在基线。进样50 $\mu$ l浓度为1至3mg/mL的药用GLP-1R融合蛋白质的稳定溶液制剂的稀释液(用流动相对原样进行稀释)。上样完成后,继续在流动相流速0.5mL/min下运行,记录UV280nm的吸收曲线。完成方法后对主峰(单体)、二聚和多聚体在UV280nm下的吸收峰进行积分,计算出主峰所占总面积的比例,此即为样品的纯度。

[0044] 实例一:pH对GLP-1R抗体融合蛋白稳定性的作用:

[0045] pH可以影响GLP-1R抗体融合蛋白的溶解度和稳定性,是制剂处方中最为关键的一个参数。我们通过实例一评估了pH值对GLP-1R抗体融合蛋白稳定性的影响,通过可溶聚合物(二聚体和多聚体)形成的多寡作为标准,选择了测定在45°C的高温下1周和3周后各样品中可溶聚合物生成的比例(聚合物%)来比较各pH值下GLP-1R抗体融合蛋白的稳定性。

[0046] 根据表1制备药用GLP-1R融合蛋白质的稳定溶液制剂:

[0047] 表1不同pH条件的GLP-1R抗体融合蛋白制剂

	GLP-1R抗体融合蛋白 4.5mg/mL	pH	缓冲液
[0048]	1	6.5	0.1M PBS
	2	7	0.1M PBS
	3	7.5	0.1M PBS
	4	8	0.1M PBS

[0049] 药用GLP-1R融合蛋白质的稳定溶液制剂是通过0.22 $\mu$ m聚偏1,1二氟乙烯(PVDF)膜

灭菌过滤的。将溶液在45℃下储存在2mL硼硅玻璃材质的西林瓶中直至分析或者最多3周。各样品中的可溶聚合物比例由SEC-HPLC来测定,表2结果显示特别优选的pH值6.5条件下,制剂的可溶性聚合体形成的比例为最低、制剂的稳定性最佳,且显示了随着pH的降低,稳定性有增加的趋势。

[0050] 表2不同pH条件下GLP-1R抗体融合蛋白制剂的可溶性聚合体形成的比例

GLP-1R抗体融合蛋白 4.5mg/mL	pH	单位	考察时间点(周)	
			1	3
1	6.5	%	0.52	4.51
2	7.0	%	0.65	4.80
3	7.5	%	1.12	8.16
4	8.0	%	1.39	14.79

[0051] 实例二:优选制剂处方的稳健性研究

[0052] 我们对优选制剂处方在GLP-1R抗体融合蛋白为10mg/mL的浓度下进行了稳健性研究,以考察处方中三个最重要的制剂成分或者因素(L-精氨酸,pH值和吐温-80)在实际生产过程中的偏差(±15%)是否会对药物质量和稳定性产生显著影响,并基于处方研究的一般规律及GLP-1R抗体融合蛋白的特性,选择了单体纯度(即主峰所占百分比)的变化作为评判标准。

[0053] 根据表3制备GLP-1R抗体融合蛋白制剂用于DOE实验:

[0054] 表3 DOE实验GLP-1R抗体融合蛋白制剂样品

处方	L-精氨酸 (mmol/L)	吐温-80 (%)	pH
DOE-1	110	0.05	7
DOE-2	110	0.15	6
DOE-3	166	0.05	6
DOE-4	166	0.15	7
优选处方(重复1)	138	0.1	6.5
优选处方(重复2)	138	0.1	6.5
DOE-5	110	0.15	7
DOE-6	110	0.05	6
DOE-7	166	0.15	6
DOE-8	166	0.05	7

[0055] 制备制剂处方并且通过0.22μm聚偏1,1二氟乙烯(PVDF)膜灭菌过滤。将制剂在40℃下贮存在2mL玻璃小瓶中直至分析或至多1个月。各处方的纯度值由SEC-HPLC来测定,表4结果显示:在pH6至7,L-精氨酸110至166mM和吐温-80浓度0.05%至0.15%的范围内,各制剂处方在纯度上的表现相当,没有出现显著性差异,表明本优选处方的稳健性良好,生产中若出现偏差对实际制剂的稳定性造成的影响不具有显著性。

[0056] 表4 DOE实验各GLP-1R抗体融合蛋白制剂样品的纯度检测结果

制剂处方	纯度 (%)	纯度 (%)	纯度 (%)
	0 天	15 天	1 月
DOE-1	99.76	96.18	95.94
DOE-2	99.77	95.59	95.34
DOE-3	99.75	96.42	96.20
DOE-4	99.75	94.43	94.10
优选处方 (重复 1)	99.75	95.35	94.58
优选处方 (重复 2)	99.75	95.84	94.88
DOE-5	99.74	96.38	95.91
DOE-6	99.74	95.60	95.23
DOE-7	99.75	96.44	96.33
DOE-8	99.75	94.43	93.77

[0061] 实例三:GLP-1R抗体融合蛋白浓度对制剂处方稳定性的影响

[0062] 我们比较了优选的制剂处方在两个不同的GLP-1R抗体融合蛋白浓度下的表现,考察优选制剂处方是否可以对更高浓度的GLP-1R抗体融合蛋白提供可接受的稳定性,以利于更高剂量GLP-1R抗体融合蛋白在实际中的施用。我们选择了10和20mg/mL的GLP-1R抗体融合蛋白进行了对比。

[0063] 根据表5制备GLP-1R抗体融合蛋白制剂用于实验:

[0064] 表5不同蛋白浓度的GLP-1R抗体融合蛋白制剂

[0065]

编号	GLP-1R 抗体融合蛋白浓度 (mg/mL)	柠檬酸盐浓度 (mM)	L-精氨酸 (mmol/L)	吐温-80 (%)	pH
5	10	20	138	0.1	6.5
6	20	20	138	0.1	6.5

[0066] 制备制剂处方并且通过0.22 $\mu$ m聚偏1,1二氟乙烯(PVDF)膜灭菌过滤。将制剂在37 $^{\circ}$ C下贮存在2mL玻璃小瓶中直至分析或最多1个月。各处方的纯度值由SEC-HPLC来测定,生物学活性由报告基因的方法来检测,表6结果显示:该优选制剂处方能够为20mg/mL浓度的GLP-1R抗体融合蛋白提供高稳定性,其纯度在37 $^{\circ}$ C下的变化与10mg/mL下表现类似,仅发生了非显著性的改变,同时两者在生物学活性上没有体现出显著性差异。

[0067] 表6不同蛋白浓度下的GLP-1R抗体融合蛋白制剂的纯度和生物学活性的检测结果

编号	纯度 (%)	纯度 (%)	纯度 (%)	纯度 (%)
	0 天	7 天	15 天	1 月
5	98.3	98.2	97.6	96.7
6	96.6	96.85	96.5	96.05
编号	活性 (EC50)	活性 (EC50)	活性 (EC50)	活性 (EC50)
	0 天	7 天	15 天	1 月
5	0.1 nM	0.08 nM	0.09 nM	0.11 nM
6	0.06 nM	0.07 nM	0.08 nM	0.08 nM

[0069] 实例四:优选制剂处方的震动稳定性研究

[0070] 我们对优选的制剂处方进行了震动条件下的稳定性研究,以考察优选制剂处方能否为GLP-1R抗体融合蛋白在震动的环境下提供稳定性,对样品运输和日常携带对其造成的影响做评估。

[0071] 根据表7制备GLP-1R抗体融合蛋白制剂用于实验:

[0072] 表7用于震动稳定性研究的GLP-1R抗体融合蛋白制剂

[0073]

编号	GLP-1R 抗体融合蛋白浓度 (mg/mL)	柠檬酸盐浓度 (mM)	L-精氨酸 (mmol/L)	吐温-80 (%)	pH
7	10	20	138	0.1	6.5

[0074] 制备制剂处方并且通过0.22 $\mu$ m聚偏1,1二氟乙烯(PVDF)膜灭菌过滤。将制剂在37 $^{\circ}$ C下贮存在2mL玻璃小瓶中,置于摇床上以70rpm的速度震荡直至分析或最多15天。各处方的纯度值由SEC-HPLC来测定,生物学活性由报告基因的方法来检测,表8结果显示:在这样的震动条件下,GLP-1R抗体融合蛋白的稳定性和生物学活性均保持稳定。

[0075] 表8震动稳定性研究的GLP-1R抗体融合蛋白制剂样品的纯度和生物学活性的检测结果

[0076]

编号	纯度 (%)	纯度 (%)	纯度 (%)	纯度 (%)	纯度 (%)
	0 天	1 天	5 天	10 天	15 天
7	98.8	99.5	99.5	99.5	99.6
编号	活性 (EC50)	活性 (EC50)	活性 (EC50)	活性 (EC50)	活性 (EC50)
	0 天	1 天	5 天	10 天	15 天
7	0.13 nM	0.13 nM	0.13 nM	0.14 nM	0.16 nM

[0077] 实例五:优选制剂处方的加速稳定性研究

[0078] 我们对优选的制剂处方进行了加速稳定性研究,以更为快速地考察在优选制剂处方下GLP-1R抗体融合蛋白的稳定性随着时间变化的趋势。

[0079] 根据表9制备GLP-1R抗体融合蛋白制剂用于实验:

[0080] 表9用于加速稳定性研究的GLP-1R抗体融合蛋白制剂

[0081]

编号	GLP-1R 抗体融合蛋白浓度 (mg/mL)	柠檬酸盐浓度 (mM)	L-精氨酸 (mmol/L)	吐温-80 (%)	pH
8	10	20	138	0.1	6.5

[0082] 制备制剂处方并且通过0.22 $\mu$ m聚偏1,1二氟乙烯(PVDF)膜灭菌过滤。将制剂在25 $^{\circ}$ C下贮存在2mL玻璃小瓶中直至分析或最多6个月。各处方的纯度值由SEC-HPLC来测定,生物学活性由报告基因的方法来检测,表10结果显示:GLP-1R抗体融合蛋白制剂可以承受在25 $^{\circ}$ C的储存温度下至少6个月的时间未发生在纯度和生物学活性上的显著性变化,其稳定性优越。

[0083] 表10加速稳定性研究GLP-1R抗体融合蛋白制剂样品的纯度和生物学活性的检测

结果

[0084]

编号	纯度 (%)	纯度 (%)	纯度 (%)	纯度 (%)	纯度 (%)	纯度 (%)
	0月	0.5月	1月	2月	4月	6月

[0085]

8	98.4%	98.6%	98.8%	99.4%	97.6%	96.9%
编号	活性 (EC50)	活性 (EC50)	活性 (EC50)	活性 (EC50)	活性 (EC50)	活性 (EC50)
	0月	0.5月	1月	2月	4月	6月
8	0.17 nM	N/A	0.09 nM	0.08 nM	0.1 nM	0.05 nM

[0086] N/A=未测试。

[0087] 以上所述的实施例只是本发明的一种较佳的方案,并非对本发明作任何形式上的限制,在不超出权利要求所记载的技术方案的前提下还有其它的变体及改型。

## SEQUENCE LISTING

<110> 杭州鸿运华宁生物医药工程有限公司  
 <120> 一种药用 GLP-1R 抗体融合蛋白的稳定溶液制剂  
 <130> 2016.2.2  
 <160> 12  
 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
 <211> 157  
 <212> PRT  
 <213> Artificial (人工的)  
 <400> 1

[0001]

```

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

```

<210> 2  
 <211> 164  
 <212> PRT  
 <213> Artificial (人工的)  
 <400> 2

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1           5           10           15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Ser Gly
           20           25           30
Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser

```

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

<210> 3

<211> 153

<212> PRT

[0002] <213> Artificial (人工的)

<400> 3

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

<210> 4  
 <211> 160  
 <212> PRT  
 <213> Artificial (人工的)  
 <400> 4  
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Ser Gly  
 20 25 30  
 Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser  
 35 40 45  
 Ala Thr Gly Ser Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser  
 50 55 60  
 Ala Ser Ile Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn  
 65 70 75 80  
 Ile Asn Asn Leu Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
 85 90 95  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Glu Val Pro Ser  
 100 105 110  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 115 120 125  
 [0003] Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Cys Cys Gln Gln Ala His  
 130 135 140  
 Arg Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Arg Arg  
 145 150 155 160

<210> 5  
 <211> 151  
 <212> PRT  
 <213> Artificial (人工的)  
 <400> 5  
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Gly  
 20 25 30  
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val  
 35 40 45  
 Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala  
 50 55 60  
 Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Ile His Trp Tyr  
 65 70 75 80  
 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Thr Ser  
 85 90 95

Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 100 105 110  
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala  
 115 120 125  
 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln  
 130 135 140  
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 145 150

<210> 6  
 <211> 158  
 <212> PRT  
 <213> Artificial (人工的)  
 <400> 6

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

[0004]

<210> 7  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Artificial (人工的)  
 <400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn  
 20 25 30

Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Phe Ile Ser Asn Leu Ser Tyr Arg Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Thr Met Ala Pro Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 8  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Artificial (人工的)  
 <400> 8

[0005]

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

<210> 9  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Artificial (人工的)  
 <400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr  
 20 25 30

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

<210> 10  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens (人)  
 <400> 10

[0006]

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

<210> 11  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens (人)  
 <400> 11

Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala  
 1 5 10 15  
 Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala  
 20 25 30  
 Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val  
 35 40 45  
 Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser



Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 275 280 285

[0008] Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325