



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109862880 A

(43)申请公布日 2019.06.07

(21)申请号 201780059493.8

(22)申请日 2017.09.26

(30)优先权数据

16190957.7 2016.09.27 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/074413 2017.09.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/060210 EN 2018.04.05

(71)申请人 德国费森尤斯卡比有限公司

地址 德国巴特洪堡

(72)发明人 阿莱桑德拉·德尔·里奥

卡梅拉·萨比娜

(74)专利代理机构 北京骥驰知识产权代理有限公司 11422

代理人 唐晓峰

(51)Int.Cl.

A61K 9/00(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

A61K 9/08(2006.01)

A61P 19/02(2006.01)

A61K 47/18(2006.01)

A61K 47/26(2006.01)

权利要求书1页 说明书27页

序列表5页 附图4页

(54)发明名称

液体药物组合物

(57)摘要

本发明涉及新型蛋白质制剂。特别地,本发明涉及针对白细胞介素-6受体的抗体的液体药物组合物,制备该组合物的方法,包含该组合物的试剂盒,包含该组合物的包,和使用该组合物和/或包的治疗方法。

1. 一种液体药物组合物, 包含:
 - (a) 抗IL-6受体 (抗IL-6R) 抗体;
 - (b) 组氨酸缓冲液;
 - (c) 多元醇;
 - (d) 游离氨基酸;
 - (e) 表面活性剂;
 - (f) 注射用水; 和
 - (g) 任选的盐,其中组合物的pH在5.5和7.5之间。
2. 根据权利要求1所述的液体药物, 其中所述组合物的pH在6.0和6.5之间。
3. 根据前述权利要求中任一项所述的液体药物组合物, 其中所述多元醇为甘露糖醇。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的液体药物组合物, 其中所述游离氨基酸为甲硫氨酸。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的液体药物组合物, 其中所述表面活性剂为聚山梨醇酯。
6. 根据权利要求5所述的液体药物组合物, 其中所述聚山梨醇酯为聚山梨醇酯80。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的液体药物组合物, 其中所述任选的盐为氯化钠。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的液体药物组合物, 其中所述抗IL6R抗体选自托珠单抗、萨皮利珠单抗、弗巴利珠单抗或萨里单抗。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的液体药物组合物, 其中所述组合物包含:
 - 15-200mg/ml的抗IL-6R;
 - 10和25mM的组氨酸 (或组氨酸缓冲系统);
 - 190-210mM的甘露糖醇;
 - 0.4-0.6mM的甲硫氨酸;
 - 0.4-0.9mM的聚山梨醇酯80;
 - 水 (注射用);
 - 75-125mM的氯化钠。
10. 一种药物递送装置, 包括如前述任一项权利要求所述的液体药物组合物。
11. 如权利要求1-9中任一项所述的液体药物组合物, 用于治疗类风湿性关节炎、幼年型特发性关节炎、巨细胞动脉炎或系统性硬化症。

液体药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及新型蛋白质制剂。特别地,本发明涉及针对白细胞介素-6受体的抗体的液体药物组合物、制备该组合物的方法、包含该组合物的试剂盒、包含该组合物的包、以及使用该组合物和/或包的治疗方法。

[0002] 发明背景

[0003] 自90年代以来,已经批准了几种生物制剂用于治疗自身免疫性疾病,例如类风湿性关节炎、幼年型关节炎和其他自身免疫性疾病。其中,有针对肿瘤坏死因子- α 的药物(例如依那西普(Etanercept)(市售为**Enbrel**[®])、阿达木单抗(Adalimumab)(市售为**Humira**[®])或英夫利昔单抗(Infliximab)(市售为**Remicade**[®])以及白细胞介素-6受体(IL-6R)(例如托珠单抗(tocilizumab)(市售为**ROACTEMRA**[®]或**Actemra**[®]))。其他针对IL-6R用于治疗这些疾病的药物正在开发中或已在卫生当局的预注册中,如萨皮利珠单抗(sapelizumab)、弗巴利珠单抗(vobarilizumab)、或萨里单抗(sarilumab)。

[0004] 例如,托珠单抗通常通过静脉或皮下注射递送给患者,并且以液体形式提供,通常在包中,所述包例如小瓶、预填充注射器或预填充“笔装置”。目前托珠单抗的市售制剂包含以下成分:

[0005]

静脉注射制剂的成分	皮下注射制剂的成分
托珠单抗 (20mg/mL)	托珠单抗 (180mg/mL)
十二水合磷酸二钠	聚山梨醇酯80
脱水磷酸二氢钠	L-组氨酸和L-组氨酸单盐酸盐
聚山梨醇酯80	L-精氨酸和L-精氨酸盐酸盐
蔗糖	L-甲硫氨酸
注射用水	注射用水
pH约为6.5	pH约为6.0

[0006] 这些制剂已分别在PCT申请W003068260和W02009084659中公开。已经公开了针对抗IL-6R抗体的其他制剂,例如W00213860、W02011085158或W02013063510中的那些。

[0007] 当制备包含生物活性蛋白质(例如抗体)的药物组合物时,所述组合物必须以这样的方式配制,即蛋白质的活性保持适当的一段时间。蛋白质的活性/稳定性的丧失可能由蛋白质的化学或物理不稳定性引起,特别是由于变性、聚集或氧化。因此,所得产物可能是药学上不可接受的,尤其是在长期储存后。尽管已知使用赋形剂可增加给定蛋白质的稳定性,但这些赋形剂的稳定作用高度依赖于赋形剂的性质和生物活性蛋白质本身的性质。

[0008] 如用托珠单抗强调的那样,当抗体以不同浓度(例如20mg/mL与180mg/mL)或以不同呈现方式(静脉与皮下注射)出售时,其通常用不同的赋形剂配制。

[0009] 仍然需要含有抗IL-6R抗体(例如托珠单抗、萨皮利珠单抗、弗巴利珠单抗或萨里单抗)作为活性成分的其他制剂,其中该制剂在适当的时间段内稳定并且适合用于注射,优选适合用于任何类型的注射。该制剂可用于治疗自身免疫疾病(例如类风湿性关节炎和幼

年型特发性关节炎)中的给药。即使不能超过市售制剂的总体性能,但是,具有相当性能但无论抗体浓度如何或其呈现方式如何都有用的替代制剂仍然是市售制剂的非常理想的替代品。理想地,可解决现有技术的问题,同时降低制剂的复杂性。

[0010] 发明概述

[0011] 根据本发明的第一方面,提供了液体药物组合物,其包含针对白细胞介素-6受体(IL-6R)的抗体(例如托珠单抗、萨皮利珠单抗、弗巴利珠单抗或萨里单抗)、组氨酸缓冲液和多元醇(例如糖醇)。该组合物进一步包含游离氨基酸、表面活性剂和任选地盐。该组合物(基本上或完全)不含精氨酸(合适为L-精氨酸)。

[0012] 根据本发明的第二方面,提供了制备液体药物组合物的方法,该方法包含将抗IL-6R的抗体(例如托珠单抗、萨皮利珠单抗、弗巴利珠单抗或萨里单抗)、组氨酸缓冲液、多元醇(例如糖醇)、游离氨基酸、表面活性剂、和任选地盐混合在一起。还提供通过如本文所定义的制备液体药物组合物的方法可得到、得到、或直接得到的液体药物组合物。

[0013] 根据本发明的第三方面,提供了药物递送装置(例如预填充注射器或笔、或静脉袋),其包含如本文所定义的液体药物组合物。

[0014] 根据本发明的第四方面,提供了部件试剂盒(kit of parts),其包含药物递送装置、如本文所定义的液体药物组合物(任选地包含在包或容器中)、以及任选地一套关于液体药物组合物的给药(例如静脉或皮下给药)的说明。

[0015] 根据本发明的第五方面,提供了包(例如预填充注射器、笔、静脉注射袋、或含有任何上述的包/容器),其包含如本文所定义的液体药物组合物。

[0016] 根据本发明的第六方面,提供了制造包或药物递送装置的方法,该方法包含将如本文所定义的液体药物组合物装入包或药物递送装置中。还提供了通过如本文所定义的制造包或药物递送装置的方法可得到、得到、或直接得到的包或药物递送装置。

[0017] 根据本发明的第七方面,提供了用于治疗的如本文所定义的液体药物组合物。

附图说明

[0018] 图1:缓冲液选择步骤。A) 光压力,高分子量(HMW)%,SEC数据;B) 光压力,DLS(单体半径);C) 50°C的热压力,聚集体半径;D) 50°C的热压力,HMW%,SEC数据。

[0019] 图2:缓冲液选择步骤。A) 氧化压力,单体%,SEC数据;B) 氧化压力,高分子量%,SEC数据;C) 机械压力,高分子量%,SEC数据。

[0020] 图3:制剂在热压力下的行为-主峰变化的结果(CE-SDS)。

[0021] 图4:制剂在光压力下的行为-主峰变化的结果(CE-SDS)。

[0022] 定义

[0023] 与本发明的任何特定方面有关的任何特征(包括可选的、合适的、和优选的特征)也可为本发明的任何其他方面的特征(包括可选的、合适的、和优选的特征)。

[0024] 除非另有说明,否则说明书和权利要求书中使用的下列术语具有以下含义。

[0025] 如本文所用,术语“抗体”及其复数形式的“抗体”尤其包括多克隆抗体、亲和纯化的多克隆抗体、单克隆抗体、和抗原结合片段,例如纳米抗体、F(ab')₂、Fab蛋白水解片段、和单链可变区片段(scFvs)。其是指单臂(单价)或双臂(二价)抗体。

[0026] 术语“重组抗体”旨在包括使用重组方法制备、表达、产生或分离的抗体。

[0027] 术语“抗IL-6R抗体”是指针对白细胞介素-6受体(即IL-6R)的抗体。优选地,它是这样的抗体,其不仅结合其靶标(即IL-6R),而且还中和它(或者抑制它或者拮抗它)。

[0028] 术语“托珠单抗”包括如W09219759(特别是其中的hPM-1)和本领域其他地方所定义的药物物质(可商购),以及其生物仿制药。托珠单抗具有包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)和包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)。其分子量约为145kDa。

[0029] 术语“萨皮利珠单抗”是指目前正在开发的抗IL6R抗体,也称为SA-237,以及其生物仿制药。萨皮利珠单抗具有包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)和包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)。

[0030] 术语“弗巴利珠单抗”是指目前正在开发的与抗人血清白蛋白纳米抗体关联的抗IL6R纳米抗体(也称为ALX-0061),以及其生物仿制药。弗巴利珠单抗包含如SEQ ID NO:5中所定义的氨基酸序列。其分子量约为257kDa。

[0031] 术语“萨里单抗”是指目前在卫生当局的预注册中的抗IL6R抗体,也称为REGN-88或SAR-153191,以及其生物仿制药。萨里单抗具有包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)。其分子量约为144kDa。

[0032] 术语“生物仿制药”是指与市场上的(即经卫生当局批准的)任何一种药物物质具有全蛋白质序列同一性的药物物质。应注意,生物仿制药可具有(略微)不同的糖基化谱。在将“生物仿制药”在市场上销售之前,这种“生物仿制药”需要被正式批准作为营销的“生物仿制药”。

[0033] 本文中,术语“缓冲液”或“缓冲溶液”是指化合物的溶液,已知它们在药物或兽医用途的制剂中是安全的并且具有维持或控制制剂的pH在制剂所需的pH范围内的效果。用于控制pH在中等酸性pH至中等碱性pH的可接受缓冲液包括但不限于磷酸盐、乙酸盐、乳酸盐、柠檬酸盐、精氨酸、TRIS、和组氨酸、其盐和/或酸性形式、和/或其任何组合。“TRIS”是指2-氨基-2-羟甲基-1,3-丙二醇,及其任何药理学上可接受的盐。制备缓冲液的化合物也称为“缓冲剂”。根据本发明,优选的缓冲液为组氨酸缓冲液。由于“缓冲剂”赋予的“缓冲作用”,添加少量强酸或强碱后,“缓冲溶液”的pH仅会轻微变化。应注意,给定浓度的组氨酸缓冲液通常涉及组氨酸与组氨酸的咪唑鎓形式(或质子化组氨酸盐)的组合浓度。然而,在组氨酸的情况下,通过参考组氨酸或其盐的输入量,通常可以直接计算此浓度。组合物的总pH通常反映了每种相关缓冲物种的平衡浓度(即缓冲剂与其酸/碱共轭物的平衡)。

[0034] 本文中,术语“缓冲剂”是指缓冲液或缓冲溶液的酸或碱组分(通常为弱酸或弱碱)。缓冲剂有助于将给定溶液的pH维持在或接近预定值,并且通常选择缓冲剂以补足预定值。缓冲剂合适为单一化合物,其产生所需的缓冲效果,特别是当该缓冲剂与适量(取决于所需的预定pH)的其相应“酸/碱共轭物”混合(并且适当地能够与其进行质子交换)时,或者如果原位形成所需量的其相应“酸/碱共轭物”-这可以通过添加强酸或强碱直至达到所需的pH来实现。

[0035] 除非另有说明,否则本文提及“氨基酸”或“氨基酸类”,无论是特定的(例如精氨酸、组氨酸)还是一般的(例如任何氨基酸),在其存在的情况下或是在组合物(特别是本发明的药物液体组合物)中,都涉及相应的游离氨基酸(无论它的/它们的质子化状态和/或盐形式,尽管为了一致性起见,参考游离氨基酸本身适当地计算各个量)。这可适当地包括天

然和/或人造氨基酸。除非有相反的说明,否则这些参考文献并不旨在涉及作为较大化合物(与包含多种化合物的组合物相对)的一部分共价掺入的氨基酸残基,所述较大化合物例如肽或蛋白质(其中此类氨基酸残基通过肽键连接)。因此,例如尽管作为蛋白质的托珠单抗含有氨基酸残基,但不认为其包含任何“游离氨基酸”。举例来说,定义为“不含精氨酸”的组合物不含任何游离精氨酸,但它仍可包含一种或多种本身确实包含精氨酸残基的蛋白质(例如托珠单抗)。除非另有说明,否则本文提及的任何一种或多种“氨基酸”,无论是特定的还是一般的,合适地涉及其L-立体异构体或其外消旋体,最合适为L-氨基酸。

[0036] 当与组合物的给定组分相关使用时(例如“基本上不含精氨酸的液体药物组合物”),用语“基本上不含”是指基本上没有向其中加入该组分的组合物。如上所述,此提及与蛋白质结构中氨基酸残基的存在无关。当组合物“基本上不含”给定组分时,该组合物合适地包含不超过0.001wt.%的该组分,合适为不超过0.0001wt.%的该组分,合适为不超过0.00001wt.%,合适为不超过0.000001wt.%,合适为不超过0.0000001wt.%,最合适为不超过0.0001ppb(按重量计)。

[0037] 当与组合物的给定组分相关使用时(例如“基本上不含精氨酸的液体药物组合物”),用语“完全不含”是指不含所述组分的组合物。如上所述,此提及与蛋白质结构中氨基酸残基的存在无关。

[0038] 如本文所用,术语“稳定性”是指托珠单抗在本发明制剂中的物理、化学和构象稳定性(并且包括维持生物效价)。蛋白质制剂的不稳定性可由蛋白质分子的化学降解或聚集引起,以形成更高级聚合物、去糖基化、糖基化修饰、氧化或任何其它降低本发明抗体的至少一种生物活性的结构修饰。

[0039] 如本文所用,术语“稳定的”溶液或制剂是其中蛋白质的降解、修饰、聚集、生物活性丧失等的程度可接受地受控制且随着时间的推移不会不可接受地增加的一种溶液或制剂。因此,其通常是指在保存/储存期间组分(通常为活性物质或其组合物)的物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物稳定性。

[0040] 优选地,制剂在室温和/或较低温度(例如2-8℃)下在至少12个月的时间内保留至少大于80%的抗体活性。当在室温下和/或在较低温度(例如2-8℃)下储存时,本发明的稳定化抗体制剂优选具有至少约12个月,18个月,更优选至少20个月,甚至更优选约24个月的货架期。用于监测本发明的抗体制剂的稳定性的方法为本领域可获得的,并且包括本文公开的实施例中描述的方法。

[0041] 如本文所用,术语“稳定剂”是生理学上被耐受并赋予制剂合适稳定性/张度的化合物。其显著阻止水通过与制剂接触的细胞膜的净流动。诸如甘油的化合物通常用于此类目的。其他合适的稳定性剂包括但不限于氨基酸或蛋白质(例如甘氨酸或白蛋白)、盐(例如氯化钠)、和糖(例如葡萄糖、甘露糖醇、蔗糖和乳糖)。根据本发明,优选的稳定剂为多元醇,甚至更优选为糖醇如甘露糖醇。

[0042] 如本文所用,术语“表面活性剂”是指可显著增加疏水性油性物质的水溶性或者增加两种疏水性不同的物质的混溶性的可溶性化合物。因此,这些聚合物通常用于工业应用、化妆品和药物。其还用作药物递送应用的模型系统,尤其是为了改变药物的吸收或其向靶组织的递送。众所周知的表面活性剂包括聚山梨醇酯(聚氧乙烯衍生物;吐温)以及泊洛沙姆(即基于环氧乙烷和环氧丙烷的共聚物,也称为Pluronic®)。根据本发明,优选的表面活

性剂为聚山梨醇酯表面活性剂,且甚至更优选聚山梨醇酯80。

[0043] 如本文所用,术语“等渗剂”或“张度剂”为生理上被耐受并赋予制剂合适张度的化合物。其显著阻止水通过与制剂接触的细胞膜的净流动。诸如甘油的化合物通常用于此类目的。根据本发明,优选的等渗剂为盐,甚至更优选NaCl。

[0044] 本文中,对组合物的给定组分(特别是缓冲剂)的具体量的提及,适当地涉及相关组分的纯无水形式的量(或通过使用该量的纯无水形式形成的组合物),即使当形成组合物时,这种组分可以以非无水形式使用。任何相应的非无水形式(例如一水合物、二水合物等)的量可通过简单地使用适当的倍率法计算。例如,除非另有说明(根据实施例,其中量与组氨酸有关),与组氨酸有关的规定量是指组氨酸的无水形式,其具有约155g/mol的分子量。本领域技术人员将容易理解如何根据所用组分的形式合理地调节稀释剂/水的量,以得到目标浓度。

[0045] 应理解,提及“治疗”包括预防以及缓解已确定的病症症状。因此,状态、疾病或病症的“治疗”包括:(1)预防或延迟在可能受到或易患该状态、疾病或病症但尚未经历或显示临床或亚临床症状的人中发展的该状态、疾病或病症的临床症状的出现,(2)抑制状态、疾病或病症,即阻止、减少或延迟疾病的发展或其复发(在维持治疗的情况下)或其至少一种临床或亚临床症状,或(3)缓解或减轻疾病,即导致状态、疾病或病症或至少一种其临床或亚临床症状的消退。

[0046] 当组合物包含多种成分(任选地以特定量的浓度或在特定浓度范围内)时,该组合物可任选地包括除特别提及的那些成分之外的其他成分。

[0047] 发明详述

[0048] 本发明的主要目的为包含抗IL-6R抗体的液体药物组合物,该抗体能够中和(或抑制或拮抗)IL-6R活性。优选地,液体药物组合物包含抗IL-6R抗体,例如托珠单抗、萨皮利珠单抗、弗巴利珠单抗、或萨里单抗,包括其任何生物仿制药。该组合物优选包含组氨酸缓冲液(其将pH保持在5.5-7.5的范围内)和多元醇。该组合物优选(基本上或完全)不含精氨酸。此外,该组合物还可包括本文中关于液体药物组合物所定义的任何一种或多种其他组分(例如包括张度剂、表面活性剂等),任选以本文所规定的任何量、浓度或形式;并且其中组合物任选具有本文中关于液体药物组合物给出的任何一种或多种参数或性质(例如pH、重量摩尔渗透压浓度)。优选地,本发明的液体药物组合物包含抗IL6-R抗体、组氨酸缓冲液(其将pH保持在5.5-7.5的范围内)、多元醇、聚山梨醇酯表面活性剂、游离氨基酸、和任选地盐。

[0049] 根据本发明,作为一个整体,液体药物组合物(基本上或完全)不含精氨酸(如L-精氨酸)。

[0050] 根据本发明的液体药物组合物整体包含浓度从或从约10至或至约250mg/ml,优选从或从约15至或至约200mg/mL的抗IL-6R抗体。例如,抗IL-6R抗体在制剂中存在的浓度可以为或约为15、20、30、40、50、60、80、100、120、140、160、180、或200mg/ml。抗IL-6R抗体可为任何已知抗IL6R抗体,例如托珠单抗、萨皮利珠单抗、弗巴利珠单抗、或萨里单抗(如本文所定义)。

[0051] 优选地,本发明的制剂在配制和/或包装时在至少12个月的时间内(第一次使用前)保留至少80%的抗IL-6R生物活性。可通过任何已知方法测量抗IL-6R活性。

[0052] 本发明的液体药物组合物整体的pH范围从或从约5.5至或至约7.5。优选地,液体药物组合物的pH范围从或从约6.0至或至约7.0。合适地,液体药物组合物的pH为或约为6.0或6.5。

[0053] 本发明的缓冲液为组氨酸缓冲液,且其浓度从或从约2至或至约50mM。在一个实施方案中,组氨酸缓冲液存在的浓度从或从约5至或至约30mM,优选浓度从或从约10至或至约25mM,甚至优选浓度为或约为20mM。

[0054] 或者,液体药物组合物包含浓度从或从约0.1至或至约10mg/mL的缓冲物种(合适为组氨酸缓冲物质-例如组氨酸本身)。在一个实施方案中,缓冲物种存在的浓度从或从约0.5至或至约5mg/mL,更优选从或从约2至或至约4mg/mL。例如,缓冲物种在制剂中存在的浓度可以为或约为2.0、2.25、2.5、2.75、3.0、3.25、3.5、3.75或4.0mg/mL。在一个实施方案中,缓冲系统/缓冲剂存在的浓度为或约为3.10mg/mL。

[0055] 或者,液体药物组合物包含缓冲液与抗IL6R抗体的摩尔比为约5:1-约200:1的缓冲液,并且将主要取决于制剂中抗体的浓度。例如,当抗IL6R抗体为20mg/mL的托珠单抗或萨里单抗时,摩尔比最合适为约145:1,当抗IL6R抗体为180mg/mL的托珠单抗或萨里单抗时,摩尔比最合适为约16:1。

[0056] 本发明的液体药物组合物整体包含稳定剂,最优选为多元醇。合适地,此组分有助于维持生物药物的结构完整性,特别是在冷冻和/或冷冻干燥(如果需要)和/或储存期间。液体药物组合物可包含一种或多种多元醇。优选地,多元醇为糖多元醇,例如糖醇。甚至优选地,糖醇选自甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、阿拉伯糖醇、赤藓糖醇、乳糖醇、麦芽糖醇、或肌醇。更优选地,多元醇(例如糖醇)为甘露糖醇。本发明人确实将甘露糖醇确认为特别有利的多元醇稳定剂,其与组氨酸缓冲液一起用于液体抗IL-6R抗体制剂中。

[0057] 液体药物组合物包含浓度从或从约50至或至约400mM,优选从或从约100至或至约300mM,更优选从或从约150至或至约250mM的多元醇(例如甘露糖醇)。在一个实施方案中,多元醇存在的浓度在190和210mM之间,最优选为或约为200mM。在一个具体实施方案中,多元醇为甘露糖醇,并且在液体药物组合物中存在的浓度为或约为200mM。

[0058] 或者,液体药物组合物包含多元醇(例如甘露糖醇),其浓度从或从约1mg/mL至或至约100mg/mL,更优选从或从约10mg/mL至或至约75mg/mL,甚至更优选从或从约25mg/mL至或至约50mg/mL。在一个实施方案中,多元醇存在的浓度在30mg/mL和40mg/mL之间,最合适为约36mg/mL。例如,多元醇(例如甘露糖醇)在制剂中存在的浓度可以为或约为25、27.5、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、42.5、45、47.5、或50mg/mL。在一个具体实施方案中,多元醇为甘露糖醇,并且在液体药物组合物中存在的浓度为或约为36mg/mL。

[0059] 或者,液体药物组合物包含多元醇(例如甘露糖醇),其中糖稳定剂与抗IL-6R抗体的摩尔比为约100:1-约1500:1,并且将主要取决于制剂中抗体的浓度。例如,当抗IL6R抗体为20mg/mL的托珠单抗或萨里单抗时,摩尔比最合适为约1450:1,当抗IL6R抗体为180mg/mL的托珠单抗或萨里单抗时,摩尔比最合适为约161:1。

[0060] 本发明的液体药物组合物整体包含至少一种除组氨酸和精氨酸之外的游离氨基酸。优选地,所述游离氨基酸含有硫元素,例如半胱氨酸或甲硫氨酸。甚至优选地,游离氨基酸为甲硫氨酸。已显示所述组分是良好的抗氧化剂。

[0061] 液体药物组合物包含至少一种游离氨基酸(例如甲硫氨酸),其浓度从或从约0.1

至5mM,优选从或从约0.2至或至约2mM,更优选从或从约0.4至或至约0.6mM。例如,游离氨基酸存在的浓度为或约为0.400、0.425、0.450、0.475、0.500、0.550、0.575、或0.600mM。在一个具体实施方案中,该至少一种游离氨基酸为甲硫氨酸,并且在液体药物组合物中存在的浓度为或约为0.5mM。

[0062] 或者,液体药物组合物包含所述至少一种游离氨基酸(例如甲硫氨酸),其浓度从或从约0.01mg/mL至或至约1mg/mL,优选从或从约0.025mg/mL至或至约0.5mg/mL,更优选从或从约0.05mg/mL至或至约0.2mg/mL,甚至优选从或从约0.06mg/mL至或至约0.1mg/mL。例如,所述至少一种游离氨基酸存在的浓度为或约为0.050、0.055、0.060、0.065、0.070、0.075、0.080、0.085、0.090、0.095、或0.1mg/mL。在一个具体实施方案中,该至少一种游离氨基酸为甲硫氨酸,并且在液体药物组合物中存在的浓度为或约为0.075mg/mL。

[0063] 或者,液体药物组合物包含所述至少一种氨基酸(例如甲硫氨酸),其中糖稳定剂与抗IL-6R抗体的摩尔比为约1:5-约5:1,并且将主要取决于制剂中抗体的浓度。例如,当抗IL6R抗体为20mg/mL的托珠单抗或萨里单抗时,摩尔比优选为约36:10,当抗IL6R抗体为180mg/mL的托珠单抗或萨里单抗时,摩尔比最合适为约2:5。

[0064] 本发明的液体药物组合物整体含有表面活性剂。优选的表面活性剂为聚山梨醇酯,例如聚山梨醇酯20(别称:聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单月桂酸酯)、聚山梨醇酯40(别称:聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单棕榈酸酯)、聚山梨醇酯60(别称:聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单硬脂酸酯)、或聚山梨醇酯80(别称:聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯)。优选地,表面活性剂为聚山梨醇酯80。

[0065] 液体药物组合物包含表面活性剂,例如聚山梨醇酯80,其浓度从或从约0.1至或至约5mM,优选从或从约0.2至或至约2mM,更优选从或从约0.4至或至约0.9mM。例如,表面活性剂存在的浓度为或约为0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70、0.75、0.80、0.85、或0.90mM。在一个具体实施方案中,表面活性剂为聚山梨醇酯80,并且在液体药物组合物中存在的浓度为或约为0.75或0.80mM。

[0066] 或者,液体药物组合物包含表面活性剂,例如聚山梨醇酯80,其浓度从或从约0.1至或至约10mg/mL,优选从或从约0.25至或至5mg/mL,更优选从或从约0.5至或至约2mg/mL。例如,表面活性剂存在的浓度为或约为0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.75、或2mg/mL。在一个具体实施方案中,表面活性剂为聚山梨醇酯80,并且在液体药物组合物中存在的浓度为或约为1.0mg/mL。

[0067] 或者,液体药物组合物包含表面活性剂(如聚山梨醇酯80),其中表面活性剂与抗IL-6R抗体的摩尔比为约1:2-约60:1,并且将主要取决于制剂中抗体的浓度。例如,当抗IL6R抗体为20mg/mL的托珠单抗或萨里单抗时,摩尔比优选为约56:10,当抗IL6R抗体为180mg/mL的托珠单抗或萨里单抗时,摩尔比最合适为约6:10。

[0068] 本发明的液体药物组合物可包括任何一种或多种药学上可接受的稀释剂,或其混合物。然而,最合适的是,液体药物组合物为水性药物组合物。最合适的是,稀释剂为水,且合适仅为水。水合适为注射用水(WFI)。稀释剂可构成任何液体药物组合物中成分的余量,例如使得重量百分比总计为100%。本文关于液体药物组合物的任何组分给出的任何浓度表示该组分在(并且适当地溶解在)与任何其他组分的混合物中稀释剂中的浓度。

[0069] 本发明的液体药物组合物合适为溶液,且适合为(基本上或完全)不含颗粒或沉淀

物。

[0070] 本发明的液体药物组合物整体可进一步包含一种或多种赋形剂,例如盐。在一个具体实施方案中,存在至少一种另外的赋形剂,其是张度剂。优选地,若存在,则张度剂是或包含氯化钠(NaCl)。氯化钠为一种特别有利的稳定剂,其与组氨酸缓冲液一起用于液体抗IL-6R抗体制剂。

[0071] 合适地,液体药物组合物包含盐(例如氯化钠),其浓度从或从约20至或至约200mM,优选从或从约50至或至约150mM,更优选从或从约75至或至约125mM。在一个实施方案中,盐存在的浓度为或约为100mM。在一个具体实施方案中,盐为氯化钠,并且存在的浓度为或约为100mM。或者,液体药物组合物包含盐(例如NaCl),其浓度从或从约0.5mg/mL至或至约25mg/mL,优选从或从约1.0mg/mL至或至约10mg/mL,更合适从或从约3mg/mL至或至约7mg/mL。在一个实施方案中,盐存在的浓度在5mg/mL和6mg/mL之间,最合适为约5.84mg/mL。在一个具体实施方案中,盐为氯化钠,并且存在的浓度为约5.84mg/mL。

[0072] 或者,液体药物组合物包含盐(例如NaCl),其中盐与抗IL-6R抗体的摩尔比为约50:1-约800:1,并且将主要取决于制剂中抗体的浓度。例如,当抗IL6R抗体为20mg/mL的托珠单抗或萨里单抗时,摩尔比优选为约725:1,当抗IL6R抗体为180mg/mL的托珠单抗或萨里单抗时,摩尔比最合适为约80:1。

[0073] 在另一方面,本发明还提供稳定液体抗IL-6R抗体组合物的方法,包括将抗IL-6R抗体与形成如本文所定义的液体药物组合物所需的任何相关组分混合。因此,本文提供了制备液体药物组合物的方法,该方法包括将针对IL-6R的抗体(例如托珠单抗)、组氨酸缓冲液、多元醇(例如糖醇)、和任选地任何一种或多种本文中关于液体药物组合物所定义的其他组分,任选地以规定的任何量、浓度或形式混合在一起;和任选地调节本文中关于液体药物组合物给出的任何一个或多个参数(例如pH、重量摩尔渗透压浓度)。其他相关组分可包括至少一种游离氨基酸(例如甲硫氨酸)、表面活性剂(例如聚山梨醇酯80)、和任选地盐(例如NaCl)。这些化合物(即抗IL-6R抗体、组氨酸缓冲液、多元醇、表面活性剂、至少一种游离氨基酸、和/或盐)中每一种可根据本文描述的浓度、pH和/或比例使用。如果需要,本领域技术人员可以参考实施例或本领域众所周知的用于形成液体药物组合物(尤其是用于借助注射器注射的那些液体药物组合物)的技术。

[0074] 在一个实施方案中,该方法包括将相关各组分在稀释剂(例如水)中混合在一起,使得所有组分(基本上或完全)溶解在稀释剂中。

[0075] 还提供了通过如本文所定义的制备液体药物组合物的方法可得到、得到、或直接得到的液体药物组合物。

[0076] 合适地,本发明的液体药物组合物具有至少6个月,合适为至少12个月,合适为至少18个月,更合适为至少24个月的货架期。合适地,本发明的液体药物组合物在2-8℃的温度下具有至少6个月,合适为至少12个月,合适为至少18个月,更合适为至少24个月的货架期。

[0077] 在某些实施方案中,将缓冲剂和/或缓冲液预先形成成为单独的混合物,并且借助于缓冲液交换(例如使用渗滤直至达到相关浓度或重量摩尔渗透压浓度)将缓冲液转移至液体药物组合物的前体(包含除缓冲液之外的一些或所有组分)。如果需要,此后可添加另外的赋形剂以制备最终液体药物组合物。一旦存在所有组分或者在存在所有组分之前,可以

调节pH。

[0078] 可过滤最终的液体药物组合物,以适当地除去颗粒物质。合适地,过滤是通过尺寸分级为 $1\mu\text{m}$ 或更小,合适为 $0.22\mu\text{m}$ 的滤器。例如,过滤是通过 $0.22\mu\text{m}$ 的PES滤器或PVDF滤器进行的模式。

[0079] 在第三个方面,本发明提供药物递送装置,其包含如本文所定义的液体药物组合物。优选地,药物递送装置包含药物组合物位于其中的腔室。更优选地,药物递送装置为无菌的。

[0080] 药物递送装置可为小瓶、安瓿、注射器、注射笔(例如基本上包含注射器)或静脉袋。当药物递送装置为注射器时,其优选为注射笔。注射器合适为玻璃注射器。

[0081] 在第四个方面,本发明提供了部件试剂盒,其包含药物递送装置(其中不含液体药物组合物)、如本文所定义的液体药物组合物(任选地包含在单独的包或容器中)、以及任选地一套关于液体药物组合物的给药(例如皮下或静脉给药)的使用说明。然后,使用者可在给药前用液体药物组合物(其可提供在小瓶或安瓿等中)填充药物递送装置。

[0082] 作为第五个方面,还描述了包含如本文定义的液体药物组合物的包。合适地,该包包含如本文所定义的药物递送装置,合适为多个药物递送装置。该包可包含用于容纳一个或多个药物递送装置的任何合适的容器。

[0083] 在第六个方面,本发明提供了制造药物递送装置的方法,合适地如本文所定义,该方法包括将如本文所定义的液体药物组合物装入药物递送装置中。这种制造通常涉及将如本文所定义的液体药物组合物装入注射器,合适为借助于接到其上的针。针可之后被移除、更换或保留。还公开了通过本文定义的制造方法可得到、得到、或直接得到的药物递送装置。

[0084] 还描述了制造包的方法,该方法包括将如本文所定义的液体药物组合物装入包中。合适地,这通过将所述液体药物组合物装入一个或多个药物递送装置中,然后将一个或多个预填充药物递送装置并入包内存在的容器来实现。此外,本发明还提供通过本文定义的制造方法可得到、得到、或直接得到的包。

[0085] 本文定义的液体药物组合物可用于治疗任何一种或多种上述疾病或医学病症。在一个具体实施方案中,液体药物组合物用于治疗类风湿性关节炎和幼年型特发性关节炎。或者,液体药物组合物用于治疗其他疾病,例如巨细胞动脉炎或系统性硬化症。

[0086] 液体药物组合物适合通过静脉注射或通过皮下注射来非消化道给药。

具体实施方案

[0087] 在一个实施方案中,液体药物组合物包含:

[0088] -抗IL-6R抗体(如托珠单抗、萨皮利珠单抗、弗巴利珠单抗、或萨里单抗);

[0089] -组氨酸缓冲液,其将pH保持在约5.5-7.5之间;

[0090] -多元醇(例如甘露糖醇);

[0091] -游离氨基酸(例如甲硫氨酸);

[0092] -表面活性剂(例如聚山梨醇酯80);

[0093] -注射用水;和

[0094] -任选地盐(例如NaCl)。

- [0095] 在一个实施方案中,液体药物组合物包含:
- [0096] -抗IL-6R抗体(如托珠单抗、萨皮利珠单抗、弗巴利珠单抗、或萨里单抗),其中抗体的浓度为10-250mg/mL;
- [0097] -组氨酸缓冲液,其将pH保持在约5.5-7.5之间;
- [0098] -多元醇(例如甘露糖醇);
- [0099] -游离氨基酸(例如甲硫氨酸);
- [0100] -表面活性剂(例如聚山梨醇酯80);
- [0101] -注射用水;和
- [0102] -任选地盐(例如NaCl)。
- [0103] 在一个实施方案中,液体药物组合物包含:
- [0104] -抗IL-6R抗体(如托珠单抗、萨皮利珠单抗、弗巴利珠单抗、或萨里单抗);
- [0105] -组氨酸缓冲液,其将pH保持在约5.5-7.5之间,其中缓冲液的浓度为2-50mM,或者浓度为0.1-10mg/mL,或者缓冲液与抗体的摩尔比为5:1-200:1;
- [0106] -多元醇(例如甘露糖醇);
- [0107] -游离氨基酸(例如甲硫氨酸);
- [0108] -表面活性剂(例如聚山梨醇酯80);
- [0109] -注射用水;和
- [0110] -任选地盐(例如NaCl)。
- [0111] 在一个实施方案中,液体药物组合物包含:
- [0112] -抗IL-6R抗体(例如托珠单抗、萨皮利珠单抗、弗巴利珠单抗、或萨里单抗);
- [0113] -组氨酸缓冲液,其将pH保持在约5.5-7.5之间;
- [0114] -多元醇(例如甘露糖醇),其中多元醇的浓度为50-400mM,或者浓度为1-100mg/mL,或者多元醇与抗体的摩尔比为100:1-1500:1;
- [0115] -游离氨基酸(例如甲硫氨酸);
- [0116] -表面活性剂(例如聚山梨醇酯80);
- [0117] -注射用水;和
- [0118] -任选地盐(例如NaCl)。
- [0119] 在一个实施方案中,液体药物组合物包含:
- [0120] -抗IL-6R抗体(例如托珠单抗、萨皮利珠单抗、弗巴利珠单抗、-或萨里
- [0121] 单抗);
- [0122] -组氨酸缓冲液,其将pH保持在约5.5-7.5之间;
- [0123] -多元醇(例如甘露糖醇);
- [0124] -游离氨基酸(例如甲硫氨酸),其中游离氨基酸的浓度为0.1-5mM,或者浓度为0.01-1mg/mL,或者游离氨基酸与抗体的摩尔比为1:5-5:1;
- [0125] -表面活性剂(例如聚山梨醇酯80);
- [0126] -注射用水;和
- [0127] -任选地盐(例如NaCl)。
- [0128] 在一个实施方案中,液体药物组合物包含:
- [0129] -抗IL-6R抗体(例如托珠单抗、萨皮利珠单抗、弗巴利珠单抗、或萨里单抗);

- [0130] -组氨酸缓冲液, 其将pH保持在约5.5-7.5之间;
- [0131] -多元醇(例如甘露糖醇);
- [0132] -游离氨基酸(例如甲硫氨酸);
- [0133] -表面活性剂(例如聚山梨醇酯80), 其中游离氨基酸的浓度为0.1-5mM, 或者浓度为0.1-10mg/mL, 或者表面活性剂与抗体的摩尔比为1:2-60:1;
- [0134] -注射用水; 和
- [0135] -任选地盐(例如NaCl)。
- [0136] 在一个实施方案中, 液体药物组合物包含:
- [0137] -抗IL-6R抗体(如托珠单抗、萨皮利珠单抗、弗巴利珠单抗、或萨里单抗);
- [0138] -组氨酸缓冲液, 其将pH保持在约5.5-7.5之间;
- [0139] -多元醇(例如甘露糖醇);
- [0140] -游离氨基酸(例如甲硫氨酸);
- [0141] -表面活性剂(例如聚山梨醇酯80);
- [0142] -注射用水; 和
- [0143] -任选地盐(例如NaCl), 其中游离氨基酸的浓度为20-200mM, 或者浓度为0.5-25mg/mL, 或者盐与抗体的摩尔比为50:1-800:1。
- [0144] 在一个实施方案中, 液体药物组合物包含:
- [0145] -抗IL-6R抗体(如托珠单抗、萨皮利珠单抗、弗巴利珠单抗、或萨里单抗), 其中抗体的浓度为10-250mg/mL;
- [0146] -组氨酸缓冲液, 其将pH保持在约5.5-7.5之间, 其中缓冲液的浓度为2-50mM, 或者浓度为0.1-10mg/mL, 或者缓冲液与抗体的摩尔比为5:1-200:1;
- [0147] -多元醇(例如甘露糖醇), 其中多元醇的浓度为50-400mM, 或者浓度为1-100mg/mL, 或者多元醇与抗体的摩尔比为100:1-1500:1;
- [0148] -游离氨基酸(例如甲硫氨酸), 其中游离氨基酸的浓度为0.1-5mM, 或者浓度为0.01-1mg/mL, 或者游离氨基酸与抗体的摩尔比为1:5-5:1;
- [0149] -表面活性剂(例如聚山梨醇酯80), 其中游离氨基酸的浓度为0.1-5mM, 或者浓度为0.1-10mg/mL, 或者表面活性剂与抗体的摩尔比为1:2-60:1;
- [0150] -注射用水; 和
- [0151] -任选地盐(例如NaCl), 其中游离氨基酸的浓度为20-200mM, 或者浓度为0.5-25mg/mL, 或者盐与抗体的摩尔比为50:1-800:1。
- [0152] 实施例
- [0153] 材料和设备
- [0154] 以下材料用于制备随后实施例中描述的制剂:

[0155]

成分	供应商/参考
托珠单抗	Toci-052-UF-DS (内部)
谷胱甘肽-L 还原型	G4251
组氨酸氯化物	104354 (Merck)
盐酸 (Hydrochloridric acid) 1 N	109057 (Merck)
Kollidon 12 PF	50348141 (BASF)
Kolliphor ELP	50259800 (BASF)
L-精氨酸	101587 (Merck)
L-精氨酸单盐酸盐	101544 (Merck)
L-组氨酸	1.04352 (Merck)
L-组氨酸单盐酸盐	1.04354 (Merck)
L-甲硫氨酸	95811601 CM (Evonik Rexim)
甘露糖醇	1.05303 (Merck)
聚山梨醇酯 80	8.17061 (Merck)
氯化钠	1.16224 (Merck)
柠檬酸钠	1613859 (Merck)

[0156]

氢氧化钠	106498 (Merck)
磷酸氢二钠	106576 (Merck)
硫代甘油-1 (Thioglycerol-1)	56454 (Sigma)
三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐	108219 (Merck)
WFI	3033965 (Eurospital)

[0157] 以下一次性设备和材料用于随后的实施例和筛选实验。

[0158]

项目	代码	供应商
Eppendorf 管 (0.5 mL, 1.5 mL, 2.0 mL)	NA	Eppendorf
Falcon (聚丙烯管)	352096 (15 mL), 352070 (50 mL)	Becton Dickinson
PES 膜(0.22 μ m)滤器装置	MillexGP Express PES membrane REF SLGP033RS	Millipore
PETG 瓶	3420-1000, 3420-0500, 2019-0259, 3420-0125, 3420-0060, 2019-0030	Nalgene
DIN2R I 型玻璃小瓶	NA	Schott
溴丁基橡胶塞	4023/50 gray FluroTec	West Pharmaceuticals

[0159] 以下设备用于随后的实施例和筛选实验。

[0160]

项目	型号	制造商
HPLC 系统	Alliance	Waters
DLS/SLS	Z-sizer Nano	Alfatech
UV 分光光度计	Lambda 35	Perkin Elmer
分析天平 (Analytical scales)	AX204	Mettler Toledo
pH 计	Seven Multi	Mettler Toledo
密度计	DE45 Delta Range	Mettler Toledo
DSF	AB 7500 RT Fast	Applied Biosystem
荧光计	Fluoromax 3	Horiba
流变仪	Discover HR3	TA instrument
渗透压计	Osmomat 030-D	Gonotec
校准移液管	P100, P200, P1000	Gilson
96 孔 PCR 板	Micro AMP plate	AB

[0161] 分析技术和方案

[0162] 在随后的实施例和筛选实验中,出于下表所述的原因,采用以下方案的分析方法:

[0163]

分析方法	测试范围
OD	蛋白质含量
SE-HPLC	聚集
CEX-HPLC	异形体 (isoforms) 分布
电位分析法	pH
流变测定法	粘度
渗透压测定法	重量摩尔渗透压浓度
动态光散射 (DLS)	聚集
差示扫描荧光分析法 (DSF)	熔解温度
CE-SDS (非还原条件)	碎裂

[0164] 下面依次介绍上述每种分析方法的各个方案,并在实施例和筛选实验中引用的任何此类分析方法都使用这些方案。

[0165] 1. 热压力

[0166] 在50℃下保温每个样品;在每个时间点,取出所需量的样品,并立即分析或在测试前在-80℃储存。

[0167] 2. 机械压力

[0168] 将每个体积为5ml的样品放入10ml的Nalgene正方形瓶中,并进行轨道振荡(150rpm;室温)直至14天。在每个时间点,取出相关容器,立即进行测试或在测试前在-80℃储存。

[0169] 3. 光压力

[0170] 在765Wh/m²进行曝光。将暴露于照射的样品与所需量的对照样品(保存在同一个试验箱中,但不进行照射)一起放置。暴露后,在每个时间点,取出所需量的样品,立即进行

测试或在测试前在-80℃储存。

[0171] 4.氧化压力

[0172] 向每个样品(100μL)中加入100μL的2%v/v的H₂O₂,得到1%的最终浓度。将溶液在25℃下保温。如果溶液变得浑浊,则在RT℃下以10000g将板旋转25分钟。

[0173] 5.其他方法

[0174] 标准方法用于:

[0175] -可见颗粒,

[0176] -蛋白质含量,

[0177] -SE-HPLC,

[0178] -CE-SDS,

[0179] -CEX-HPLC

[0180] -pH,

[0181] -重量摩尔渗透压浓度(仅限时间0)。

[0182] 本研究旨在开发一种新的抗IL-6R抗体的液体制剂,用于皮下和/或静脉应用。制剂开发由以下阶段组成:

[0183] 1.缓冲液选择(DS DoE)。

[0184] 2.赋形剂选择(DP DoE)。

[0185] 正式稳定性研究如下(表1):

[0186]

	温度(°C)	残余湿度(%)
DS	-80±10	N/A
	-20±5	
	5±3	
DP	40±2	75±5
	25±2	60±5
	5±3	N/A

[0187] 实施例1-筛选缓冲液

[0188] 使用DoE方法进行DS缓冲液筛选。从初始的大量缓冲液中,通过热力学和动力学参数的组合方法,选择最终缓冲液,以及一种备用缓冲液。本实施例中使用的抗IL-6R抗体为托珠单抗。纯化后,通过离心用4种不同的缓冲液来交换抗体:

[0189] o磷酸盐缓冲液pKa=7.2,

[0190] o磷酸盐柠檬酸盐缓冲液pKa=6.40,

[0191] o TRIS缓冲液pKa=8.1,

[0192] o组氨酸pKa=6.0。

[0193] DS仅由mAb和缓冲液组成,该步骤的目的为评估两种组分的单一相互作用。实验基质如下(见下表2):

[0194]

缓冲系统	样品 n°	浓度	pH
磷酸盐	1	10	6.2
	2	10	8.2
	3	20	7.2
	4	30	6.2
	5	30	8.2
磷酸盐柠檬酸盐	6	10	5.4
	7	10	7.4
	8	20	6.4
	9	30	5.4
	10	30	7.4
TRIS	11	10	7.1
	12	10	9.1
	13	20	8.1
	14	30	7.1
	15	30	8.1
组氨酸	16	20	6.0

[0195] 浓度交换和浓度在本领域技术人员知识范围内,因此在此不详述。抗体靶浓度高于210mg/mL。采用差示扫描荧光分析法(DSF)技术(High throughput thermostability screening of monoclonal antibody formulations.J Pharm Sci.2010Apr;99(4):1707-20)以SyproOrange染料预选缓冲液。根据DSF,压力测试阶段以具有较高Th和较低聚集百分比的缓冲液进行:

[0196] -组氨酸20mM,pH 6.0,

[0197] -TRIS 20mM pH 6.2,

[0198] -磷酸盐20mM pH 6.2,

[0199] -磷酸盐20mM pH 7.2。

[0200] 使用的压力试验为:

[0201] -热压力,

[0202] -机械压力,

[0203] -光压力

[0204] -氧化。

[0205] 光压力:图1A和1B分别显示高分子量物种(HMW)和单体半径的结果。组氨酸缓冲液20mM pH 6.0和磷酸盐缓冲液20mM pH 6.2显示最低的HMW%增加,以及最低的单体半径增加。值得注意的是,与磷酸盐缓冲液相比,TRIS缓冲液对光压力的保护作用稍强。

[0206] 热压力:图1C和1B分别显示聚集体半径和高分子量物种(HMW)的结果。除pH 7.2的磷酸盐外,对所有样品都观察到很低的聚集体半径增加。组氨酸缓冲液20mM pH 6.0和磷酸盐缓冲液20mM pH 6.2显示出最低的HMW增加。大多数聚集的样品为采用pH 7.2的磷酸盐缓冲液的那些。

[0207] 氧化压力:图2A和2B分别显示单体%和高分子量物种(HMW)的结果。对于所有样

品,观察到很低的聚集体半径的HMW增加。

[0208] 机械压力:图2C显示高分子量物种 (HMW) 的结果。对于pH 6.2的磷酸盐缓冲液和pH 6.0的组氨酸缓冲液,观察到最低的HMW%增加。

[0209] 粘度:数据强调了磷酸盐缓冲液的粘度高于组氨酸或TRIS缓冲液(见下表3)

[0210]

测试样品	粘度(mPa.S)		
	5°C	20°C	25°C
Phos pH 7.2	256	89	80
Phos pH 6.2	226	66	35
TRIS pH 7.1	73	28	24
His pH 6.0	72	31	29

[0211] 结论:根据缓冲液筛选结果,所选择的缓冲液为:组氨酸缓冲液20mM pH 6.0(作为前导缓冲液)和TRIS缓冲液20mM pH 7.1(作为备用)。

[0212] 实施例2-筛选赋形剂

[0213] 其目的为开发由五种成分组成的制剂:缓冲液、抗氧化剂、表面活性剂、张度剂、和稳定剂。将用于选择缓冲液的方法用来筛选赋形剂:1)通过SE-HPLC的高通量赋形剂筛选(约40种不同制剂),2)对所选制剂进行的压力测试,3)选择一种前导制剂和一种(或两种)备用制剂。然后对制剂稳定性进行几个月的测试。关于DoE的实验基质如表4所示:

[0214] 用等渗剂调节重量摩尔渗透压浓度(用氯化钠调节重量摩尔渗透压浓度至300mOsm/Kg)。

[0215] 以与选择缓冲液所述相同的条件对所选制剂进行压力。从压力测试中,选择得到的1个前导制剂(TOM 4),并将其在最终一级容器中稳定放置数月。

[0216] 热压力:图3显示主峰变化(CE-SDS)的结果。与RoActemra相比,制剂TOM 4、TOM 11、TOM 17、TOM 29、TOM 34和TOM 35显示最低的变化。它们均在20mM的组氨酸中配制。

[0217] 光压力:图4显示主峰变化(CE-SDS)的结果。与RoActemra相比,制剂TOM 4、TOM 26、TOM 27、TOM 29、TOM 34、TOM 35显示最低的变化。它们均在20mM的组氨酸中配制。

[0218]

制剂 编号	填充 剂	填充 剂 (mM)	NaCl 浓度 (mM)	表面 活性 剂	表面 活性 剂 (mg/ ml)	抗氧 化剂	抗氧 化剂 浓度 (mg/ ml)	缓冲 液	计 算 的 重 摩 量 尔 渗 透 压 浓 度 (mOs m/Kg)
TOM 1	甘 露 糖醇	200	25	Kolli phor ELP	0.1	L- 甲 硫 氨 酸	0.75	TRIS	290
TOM 2	甘 露 糖醇	50	100	吐 温 80	0.1	L- 甲 硫 氨 酸	0.75	TRIS	290
TOM 3	甘 露 糖醇	200	25	Kolli phor ELP	1	L- 甲 硫 氨 酸	0.075	TRIS	290
TOM 4	甘 露 糖醇	200	100	吐 温 80	1	L- 甲 硫 氨 酸	0.075	组 氨 酸	420
TOM 5	甘 露 糖醇	200	100	吐 温 80	1	L- 甲 硫 氨 酸	0.75	TRIS	440
TOM 6	精 氨 酸	50	25	Kolli phor ELP	0.1	L- 甲 硫 氨 酸	0.075	TRIS	190
TOM 7	甘 露 糖醇	200	100	Kolli don 12PF	0.1	L- 甲 硫 氨 酸	0.075	TRIS	440
TOM 8	甘 露 糖醇	50	100	Kolli don 12PF	0.1	L- 甲 硫 氨 酸	0.75	TRIS	290
TOM 9	甘 露 糖醇	200	100	吐 温 80	0.1	L- 甲 硫 氨 酸	0.75	TRIS	440
TOM 10	甘 露 糖醇	50	100	Kolli don 12PF	0.1	L- 甲 硫 氨 酸	0.075	TRIS	290
TOM 11	甘 露 糖醇	50	100	Kolli phor ELP	1	硫 代 甘油	0.075	组 氨 酸	270

[0219]

TOM 12	甘 露 糖醇	50	25	吐 温 80	0.1	硫 代 甘油	0.075	TRIS	140
TOM 13	精 氨 酸	200	25	吐 温 80	0.1	硫 代 甘油	0.75	组 氨 酸	470
TOM 14	精 氨 酸	50	25	吐 温 80	0.1	硫 代 甘油	0.75	TRIS	190
TOM 15	甘 露 糖醇	50	25	Kolli don 12PF	0.1	硫 代 甘油	0.75	组 氨 酸	120
TOM 16	精 氨 酸	200	100	Kolli don 12PF	1	硫 代 甘油	0.075	组 氨 酸	620
TOM 17	甘 露 糖醇	200	100	Kolli phor ELP	0.1	硫 代 甘油	0.75	组 氨 酸	420
TOM 18	精 氨 酸	50	25	吐 温 80	1	硫 代 甘油	0.075	组 氨 酸	170
TOM 19	精 氨 酸	200	100	吐 温 80	0.1	硫 代 甘油	0.075	TRIS	640
TOM 21	精 氨 酸	50	100	Kolli phor ELP	1	硫 代 甘油	0.075	TRIS	340
TOM 22	精 氨 酸	200	100	Kolli don 12PF	0.1	硫 代 甘油	0.75	TRIS	640
TOM 23	精 氨 酸	50	100	Kolli don 12PF	1	硫 代 甘油	0.75	组 氨 酸	320
TOM 24	精 氨 酸	200	25	Kolli phor ELP	0.1	硫 代 甘油	0.075	TRIS	490
TOM 25	甘 露 糖醇	200	25	Kolli don 12PF	1	硫 代 甘油	0.075	TRIS	290
TOM 26	甘 露 糖醇	200	25	Kolli phor ELP	1	谷 胱 甘肽	0.75	组 氨 酸	270
TOM 27	甘 露 糖醇	200	25	Kolli phor ELP	0.1	谷 胱 甘肽	0.075	组 氨 酸	270
TOM 28	精 氨 酸	200	25	吐 温 80	1	谷 胱 甘肽	0.075	TRIS	490
TOM 29	精 氨 酸	200	25	Kolli don	1	谷 胱 甘肽	0.75	组 氨 酸	470

[0220]

				12PF					
TOM 30	精氨酸	200	25	Kolli phor ELP	0.1	谷胱甘肽	0.75	组氨酸	470
TOM 31	精氨酸	50	100	Kolli phor ELP	0.1	谷胱甘肽	0.75	TRIS	340
TOM 33	甘露糖醇	50	25	Kolli don 12PF	0.1	谷胱甘肽	0.075	TRIS	140
TOM 34	精氨酸	50	25	Kolli phor ELP	1	谷胱甘肽	0.075	组氨酸	170
TOM 35	甘露糖醇	50	25	吐温 80	1	谷胱甘肽	0.75	组氨酸	120
TOM 36	精氨酸	200	100	吐温 80	1	谷胱甘肽	0.75	组氨酸	620
TOM 37	精氨酸	50	25	吐温 80	0.1	谷胱甘肽	0.075	组氨酸	170

[0221] 表4:关于实施例2的DoE的实验基质。当在该表中提及精氨酸作为填充剂时,其应理解为精氨酸一水合物;在缓冲液栏中,TRIS是指TRIS 20mM pH 7.1,而在缓冲液栏中,组氨酸是指组氨酸20mM pH 6.0。

[0222] 实施例3-1年稳定性

[0223] 对前导制剂的1年稳定性进行评估。已经监测了各种标准,包括pH、蛋白质含量(以光密度评估)、HMW物种(以SE-HPLC评估)、和主峰(以IEX-HPLC评估)。结果如下表5所示,证实前导制剂至少一年的稳定性。

[0224]

	T0	4 wk	8 wk	13 wk	26 wk	39 wk	52 wk
pH	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
蛋白质含量 (mg/mL)	181.7	181.5	183.0	184.2	184.0	180.0	179.5
HMW (%)	1.0	0.8	0.6	0.7	0.8	1.0	1.0
主峰 (%)	55.5	54.1	55.0	56.9	57.3	-	-

[0225] 表5:1年稳定性数据。Wk=周数

[0226] 缩写

[0227] DoE 实验设计

[0228] DP 药品

[0229] DS 药物

[0230] DSF 差示扫描荧光分析法

[0231] OD 光密度

[0232] PES 聚醚砜

[0233] rpm 每分钟转数

- [0234] RT 室温
- [0235] SE-HPLC 尺寸排阻高效液相色谱法
- [0236] HMW 高分子量
- [0237] 参考文献
- [0238] 1) W003/068260
- [0239] 2) W02009/084659。
- [0240] 3) W00213860
- [0241] 4) W02011085158
- [0242] 5) W02013063510。
- [0243] 6) High throughput thermostability screening of monoclonal antibody formulations. J Pharm Sci. 2010Apr; 99(4):1707-20

序列表

<110> 德国费森尤斯卡比有限公司

<120> 液体药物组合物

<130>

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

[0244]

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 2

Xaa Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp

[0245]

35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80
[0246] Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
100 105

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

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 Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val 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 Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

[0247] <210> 5
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 5

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 Ser Val Phe Lys Ile Asn
 20 25 30
 Val Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Phe Ile Thr Thr Glu Ser Asp Tyr Asp Leu Gly Arg Arg Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125
Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
130 135 140
Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
145 150 155 160
Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
165 170 175
Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp
180 185 190
[0248] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr
195 200 205
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
210 215 220
Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu
225 230 235 240
Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 6

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

[0249]

<210> 7
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 7

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

[illegible]

序列表

<110> 德国费森尤斯卡比有限公司(FRESENIUS KABI DEUTSCHLAND GMBH)

<120> 液体药物组合物

<150> 16190957.7

<151> 2009-09-27

<160> 7

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

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

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

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

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

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

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

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val 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 Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

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 Ser Val Phe Lys Ile Asn
 20 25 30
 Val Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Phe Ile Thr Thr Glu Ser Asp Tyr Asp Leu Gly Arg Arg Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 130 135 140
 Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 145 150 155 160
 Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 165 170 175
 Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp
 180 185 190

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr
 195 200 205
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

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

<210> 7

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 7

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

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

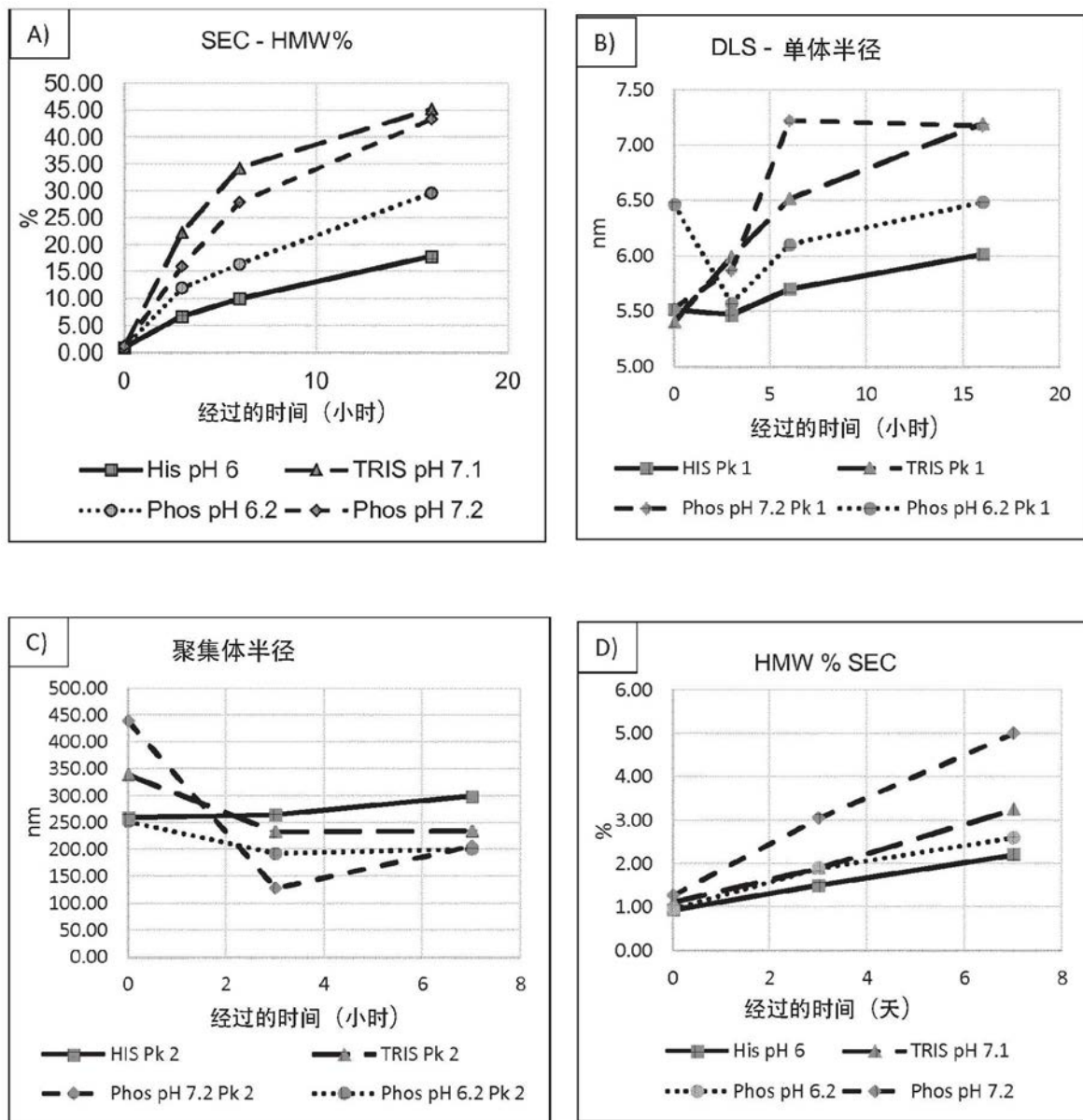


图1

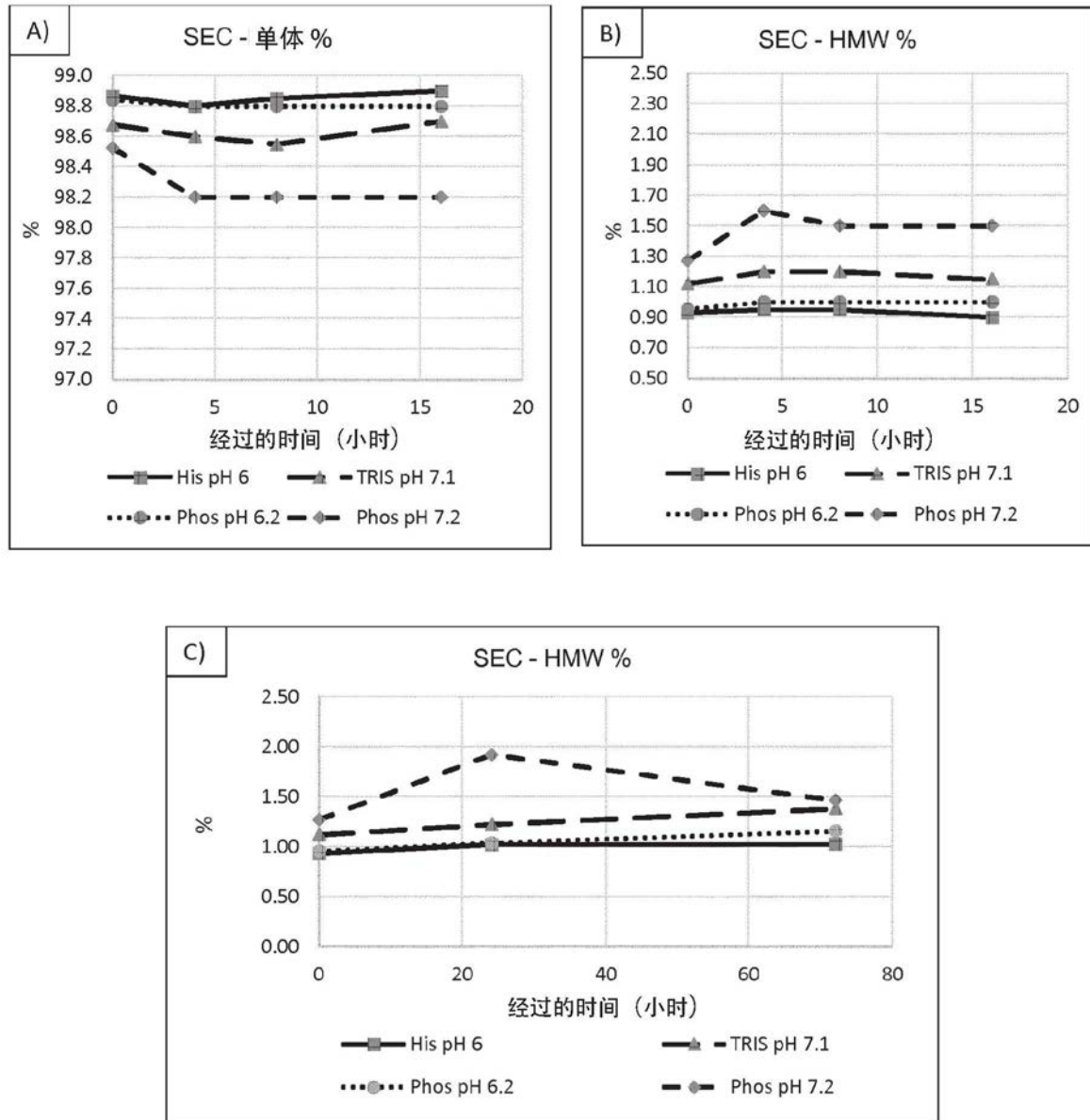


图2

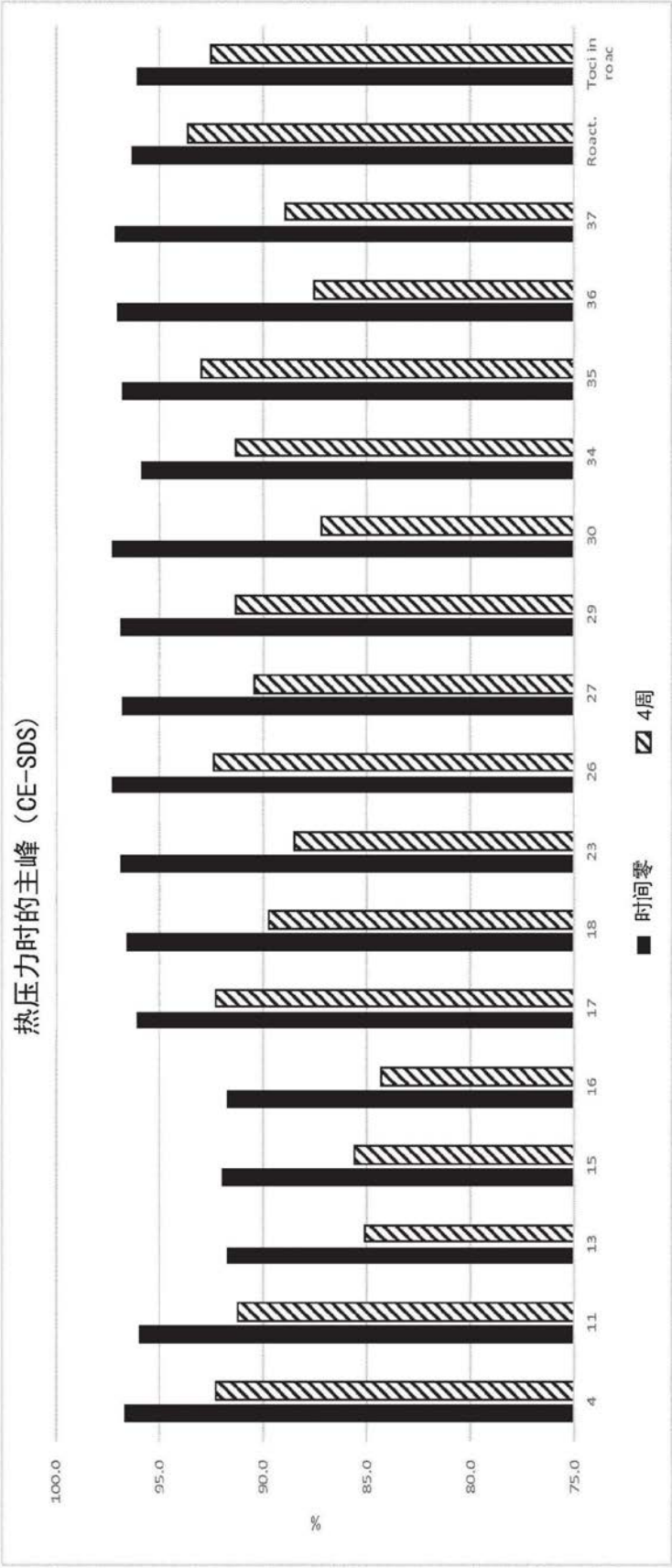


图3

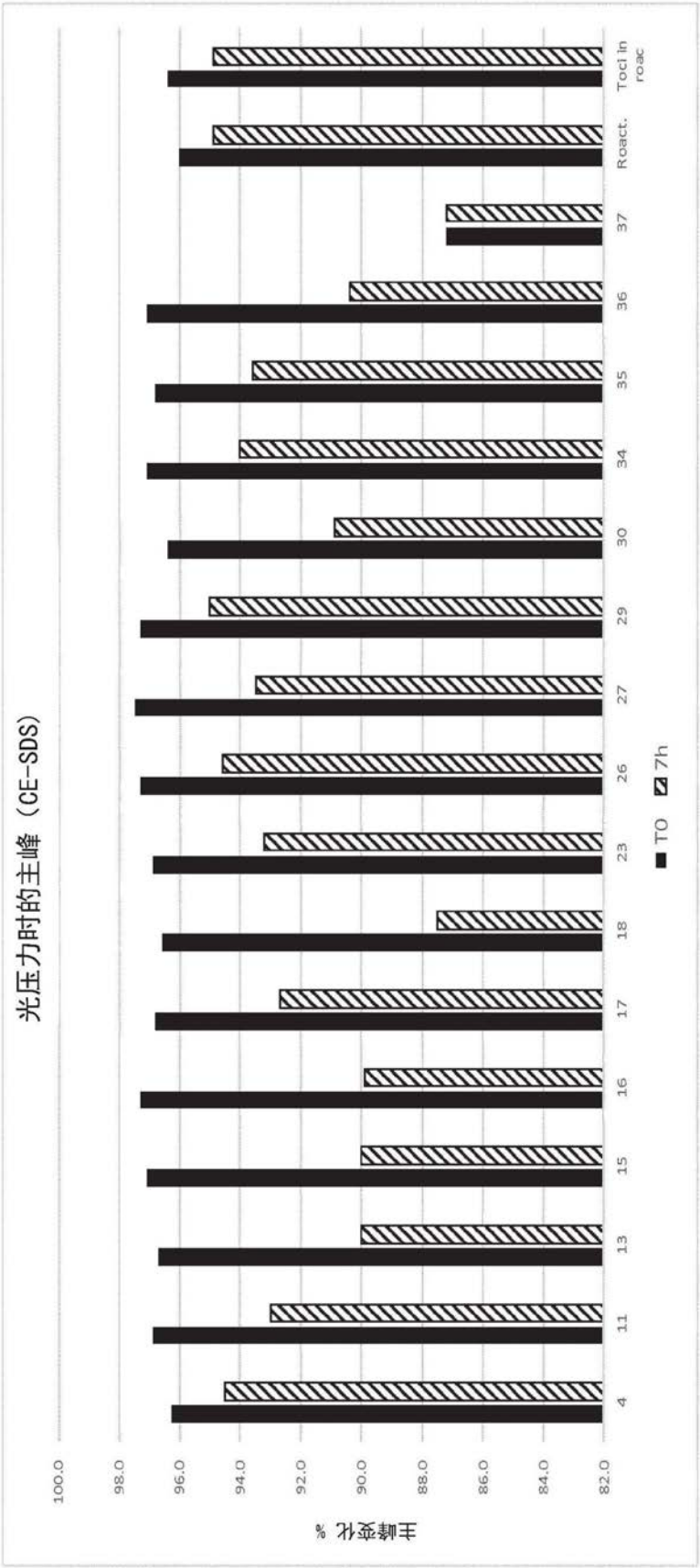


图4