



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103582724 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 12

(21) 申请号 201280025770. 0

A61K 39/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 04. 06

(30) 优先权数据

61/473, 123 2011. 04. 07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 11. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/032464 2012. 04. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/141978 EN 2012. 10. 18

(71) 申请人 葛兰素史密斯克莱有限责任公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 M. A. 蒙克 M. Y. 王 K. 张

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张平元

(51) Int. Cl.

C40B 30/06 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书11页

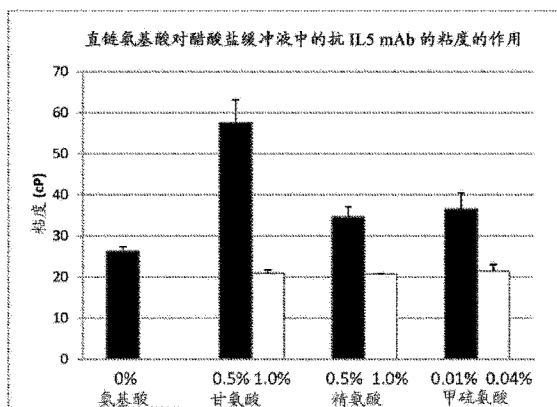
序列表4页 附图3页

(54) 发明名称

粘度降低的制剂

(57) 摘要

本发明涉及一种降低包含醋酸盐和治疗性蛋白的制剂的粘度的方法以及使用请求保护的方法制得的制剂。本发明还涉及通过任意本发明方法制备的稳定制剂。本发明还涉及包含容器的制品，该容器包含本发明的制剂。



1. 一种降低包含醋酸盐和治疗性多肽的制剂的粘度的方法,该方法包括:(a) 提供包含醋酸盐的制剂;以及(b) 将甘氨酸和/或精氨酸添加至该制剂中至约 1.0%w/v 的浓度,其中具有甘氨酸和/或精氨酸的制剂的粘度比不具有甘氨酸和/或精氨酸的相同制剂的粘度小。

2. 权利要求 1 的方法,其中具有甘氨酸和/或精氨酸的制剂的粘度比不具有甘氨酸和/或精氨酸的制剂的粘度降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25% 或至少约 30%。

3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中具有甘氨酸和/或精氨酸的制剂的粘度小于约 25cP 或小于约 20cP。

4. 一种降低包含醋酸盐和治疗性多肽的制剂的粘度的方法,该方法包括:(a) 提供包含醋酸盐的制剂;以及(b) 将甲硫氨酸添加至该制剂中至约 0.04%w/v 的浓度,其中具有甲硫氨酸的制剂的粘度比不具有甲硫氨酸的相同制剂的粘度小。

5. 权利要求 4 的方法,其中具有甲硫氨酸的制剂的粘度比不具有甲硫氨酸的制剂的粘度降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25% 或至少约 30%。

6. 权利要求 4 或 5 的方法,其中具有甲硫氨酸的制剂的粘度小于约 25cP 或小于约 20cP。

7. 一种降低包含醋酸盐和治疗性多肽的制剂的粘度的方法,该方法包括:(a) 提供包含醋酸盐的制剂;以及(b) 将苯丙氨酸添加至该制剂中至约 0.8%w/v 的浓度,其中具有苯丙氨酸的制剂的粘度比不具有苯丙氨酸的相同制剂的粘度小。

8. 权利要求 7 的方法,其中具有苯丙氨酸的制剂的粘度比不具有苯丙氨酸的制剂的粘度降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 40% 或至少约 50%。

9. 权利要求 7 或 8 的方法,其中具有苯丙氨酸的制剂的粘度小于约 20cP 或小于约 15cP。

10. 一种降低包含醋酸盐和治疗性多肽的制剂的粘度的方法,该方法包括:(a) 提供包含醋酸盐的制剂;以及(b) 将色氨酸添加至该制剂中至约 0.2%w/v 的浓度,其中具有色氨酸的制剂的粘度比不具有色氨酸的相同制剂的粘度小。

11. 权利要求 10 的方法,其中具有色氨酸的制剂的粘度比不具有色氨酸的制剂的粘度降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 40% 或至少约 50%。

12. 权利要求 10 或 11 的方法,其中具有色氨酸的制剂的粘度小于约 20cP 或小于约 15cP。

13. 一种降低包含醋酸盐和治疗性多肽的制剂的粘度的方法,该方法包括:(a) 提供包含醋酸盐的制剂;以及(b) 将脯氨酸添加至该制剂中至约 4.0%w/v 的浓度,其中具有脯氨酸的制剂的粘度比不具有脯氨酸的相同制剂的粘度小。

14. 权利要求 13 的方法,其中具有脯氨酸的制剂的粘度比不具有脯氨酸的制剂的粘度降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25% 或至少约 30%。

15. 权利要求 13 或 14 的方法,其中具有脯氨酸的制剂的粘度小于约 25cP 或小于约 20cP。

16. 前述权利要求任一项的方法,其中该方法进一步包括测定蛋白制剂的稳定性。
17. 前述权利要求任一项的方法,其中该制剂进一步包含蔗糖。
18. 权利要求 17 的方法,其中该制剂进一步包含浓度为约 234mM 的蔗糖。
19. 前述权利要求任一项的方法,其中该制剂配制为 pH 约 5.5。
20. 前述权利要求任一项的方法,其中该制剂进一步包含聚山梨酯-80。
21. 前述权利要求任一项的方法,其中该治疗性蛋白是抗原结合多肽。
22. 前述权利要求任一项的方法,其中该抗原结合多肽是抗体。
23. 前述权利要求任一项的方法,其中该抗原结合多肽是免疫球蛋白单一可变域。
24. 权利要求 21 的方法,其中该抗原结合多肽结合至白介素 5 (IL5)。
25. 权利要求 24 的方法,其中该抗原结合多肽是抗 IL5 抗体。
26. 权利要求 25 的方法,其中该抗 IL5 抗体包括包含 SEQ ID NO:1 的重链以及包含 SEQ ID NO:2 的轻链。
27. 前述权利要求任一项的方法,其中该治疗性蛋白的存在浓度为至少约 150mg/ml、至少约 175mg/ml、至少约 200mg/ml、至少约 225mg/ml、至少约 250mg/ml、至少约 275mg/ml 或至少约 300mg/ml。
28. 前述权利要求任一项的方法,其中该治疗性蛋白的存在浓度为至少约 150mg/ml 至约 300mg/ml。
29. 前述权利要求任一项的方法,其中该制剂是重构制剂。
30. 前述权利要求任一项的方法,其中该制剂是液体药物制剂。
31. 前述权利要求任一项的方法,其中该制剂适于肠胃外给药。
32. 前述权利要求任一项的方法,其中该制剂包含约 25mM 至约 75mM 醋酸盐。
33. 权利要求 32 的方法,其中该制剂包含约 55mM 醋酸盐。
34. 通过前述权利要求任一项的方法制备的稳定制剂。
35. 包含容器的制品,该容器包含权利要求 38 的制剂。
36. 权利要求 35 的制品,其进一步包含用于给药该制剂的说明书。

粘度降低的制剂

发明领域

[0001] 本发明涉及治疗性蛋白的制剂领域。更具体地,本发明涉及粘度降低的制剂以及制备其的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 许多包含蛋白的药品需要高治疗剂量以实现有效的患者响应。由于治疗性蛋白(包括单克隆抗体)体积大以及易于蛋白分解,为了达到血流中的治疗浓度,需要将其经静脉内或皮下注射给药。在这两种给药途径中,皮下注射对患者更为便利,因为可在家给予靶向皮下给药途径的药品。存在多种在预填充注射器中的已经重新或作为产品线延伸而开发的单克隆抗体药品,用于皮下给药途径。通常,由于皮下空间对给药剂量的体积限制,通过预填充注射器单次推注给药(bolus administration)的方式可给药不超过1mL药品溶液。然而,给药总体积和持续时间由给药溶液中单克隆抗体的浓度控制。为在更小体积内实现输注或推注给药更高剂量,需要溶液中高浓度的单克隆抗体。

[0004] 多种浓度范围超过100mg/mL的单克隆抗体以及大多数浓度为更高的200mg/mL的单克隆抗体具有相对高粘度,导致处置单克隆抗体药品溶液的问题。诸如用于浓缩抗体至高水平的切向流动过滤以及无菌过滤的制备工艺是困难的并导致高粘度溶液的产量损失。当必须达到超过约20牛的力以使用预填充注射器递送药品的皮下剂量时,还可出现患者或医疗专业人员药品处理和注射能力的问题。显然需要降低粘度的制剂方法,且在制剂开发期间使用降低粘度的赋形剂是一可行的方法。

发明内容

[0005] 本发明涉及一种降低包含醋酸盐和治疗性蛋白的制剂的粘度的方法。

[0006] 在一项实施方案中,该方法包括(a)提供包含醋酸盐的制剂;以及(b)将甘氨酸和/或精氨酸添加至该制剂中至约1.0%w/v的浓度,其中具有甘氨酸和/或精氨酸的制剂的粘度比不具有甘氨酸和/或精氨酸的相同制剂的粘度小。在一项实施方案中,具有甘氨酸和/或精氨酸的制剂的粘度比不具有甘氨酸和/或精氨酸的制剂的粘度降低至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%或至少约30%。在一项实施方案中,具有甘氨酸和/或精氨酸的制剂的粘度小于约25cP或小于约20cP。

[0007] 在另一项实施方案中,该方法包括(a)提供包含醋酸盐的制剂;以及(b)将甲硫氨酸添加至该制剂中至约0.04%w/v的浓度,其中具有甲硫氨酸的制剂的粘度比不具有甲硫氨酸的相同制剂的粘度小。在一项实施方案中,具有甲硫氨酸的制剂的粘度比不具有甲硫氨酸的制剂的粘度降低至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%或至少约30%。在一项实施方案中,具有甲硫氨酸的制剂的粘度小于约25cP或小于约20cP。

[0008] 在另一项实施方案中,该方法包括(a)提供包含醋酸盐的制剂;以及(b)将苯丙氨酸添加至该制剂中至约0.8%w/v的浓度,其中具有苯丙氨酸的制剂的粘度比不具有苯丙氨酸的相同制剂的粘度小。在一项实施方案中,具有苯丙氨酸的制剂的粘度比不具有苯丙氨酸的制剂的粘度降低至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约

30%、至少约 40% 或至少约 50%。在一项实施方案中,具有苯丙氨酸的制剂的粘度小于约 20cP 或小于约 15cP。

[0009] 在另一项实施方案中,该方法包括 (a) 提供包含醋酸盐的制剂;以及 (b) 将色氨酸添加至该制剂中至约 0.2%w/v 的浓度,其中具有色氨酸的制剂的粘度比不具有色氨酸的相同制剂的粘度小。在一项实施方案中,具有色氨酸的制剂的粘度比不具有色氨酸的制剂的粘度降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 40% 或至少约 50%。在一项实施方案中,具有色氨酸的制剂的粘度小于约 20cP 或小于约 15cP。

[0010] 在另一项实施方案中,该方法包括 (a) 提供包含醋酸盐的制剂;以及 (b) 将脯氨酸添加至该制剂中至约 4.0%w/v 的浓度,其中具有脯氨酸的制剂的粘度比不具有脯氨酸的相同制剂的粘度小。在一项实施方案中,具有脯氨酸的制剂的粘度比不具有脯氨酸的制剂的粘度降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25% 或至少约 30%。在一项实施方案中,具有脯氨酸的制剂的粘度小于约 25cP 或小于约 20cP。

[0011] 本发明还涉及通过本发明任一方法制备的稳定制剂。

[0012] 本发明还涉及包含容器的制品,该容器包含本发明制剂。

[0013] 附图简述

[0014] 图 1. 醋酸盐缓冲液:在低浓度的直链氨基酸 (0.5%w/v 甘氨酸,0.5%w/v 精氨酸,0.01%w/v 甲硫氨酸),抗 IL5mAb 样品的粘度高于不含氨基酸的样品的粘度;但在高浓度的直链氨基酸 (1.0%w/v 甘氨酸,1%w/v 精氨酸以及 0.04% 甲硫氨酸),该样品的粘度低于不含氨基酸的样品的粘度。

[0015] 图 2. 醋酸盐缓冲液:苯丙氨酸、色氨酸和脯氨酸降低了抗 IL5mAb 制剂的粘度而酪氨酸增加了抗 IL5mAb 制剂的粘度。

[0016] 图 3. 醋酸盐缓冲液:所有测试的氨基酸降低了抗 ELR mAb 制剂的粘度。脯氨酸实现了最大的粘度降低,然后是色氨酸、苯丙氨酸和甘氨酸。

[0017] 发明详述

[0018] 应当理解,本发明不限于具体的方法、试剂、化合物、组合物或生物系统,其当然可以变化。还应当理解,本文所用的术语仅为描述具体的实施方案,而不是为了限制。如本说明书及所附权利要求书中使用的,除非内容明确另有所指,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括所指事物的复数形式。因此,例如,提及“多肽”包括两种或多种多肽的组合等。

[0019] 当涉及可测量值如量、持续时间等时,本文所用的“约”是指涵盖从特定数值的 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 的变体 (包括 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 和 $\pm 0.1\%$),这样的变体适于施行所公开的方法。

[0020] 除非另有所指,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员通常所理解的相同的含义。尽管任何与本文所述的方法和材料相似或相当的方法和材料可用于本发明测试的实践中,但优选的材料和方法如本文所述。在描述和请求本发明中,将用到以下术语。

[0021] 本发明涉及一种降低包含醋酸盐和治疗性蛋白的制剂的粘度的方法。

[0022] 在本发明的示例性实施方案中,所生产的液体多肽组合物表现出理想的特性,如理想的粘度和表面张力特性。

[0023] 术语“表面张力”是指表面下的分子对表面 / 空气界面的分子施加的吸引力,是由

于液体的高分子浓度相对气体的低分子浓度而引起。具有低表面张力值的液体,如非极性液体,比水更容易流动。通常,表面张力值以牛/米或达因/厘米表示。

[0024] 本文涉及的“动态表面张力”是指表面/空气界面和对表面/表面界面的动态界面张力。有多种可选的方法测量动态表面张力,例如,捕泡表面张力计(captive bubble surface tensionometry)或搏动气泡表面张力计(pulsating bubble surface tensionometry)。

[0025] 术语“粘度”指的是流体在规定温度表现的对流动的内部阻力;是切应力与剪切速率之比。如果1达因/平方厘米的力导致两个面积为1平方厘米且相距1厘米的平行液体表面以1cm/s的速度相对运动,则液体具有1泊的粘度。1泊=100厘泊。

[0026] 当涉及表观粘度,应当理解粘度值取决于进行测量的条件,如所采用的温度、剪切速率和切应力。表观粘度定义为切应力与应用的剪切速率之比。有多种可选的方法测量表观粘度。例如,粘度可通过合适的锥和板、平行板或其它类型的粘度计或流变仪测试。

[0027] 在一些实施方案中,粘度降低的制剂具有小于约50cP、小于约45cP、小于约40cP、小于约35cP、小于约30cP、小于约25cP、小于约20cP或小于约15cP的粘度。

[0028] 本文替换使用的“多肽”、“肽”和“蛋白”是指氨基酸残基的聚合物。多肽可以是天然(组织衍生的)起源的、重组的或由原核或真核细胞制品天然表达的,或者是经由合成方法化学生产的。该术语适用于氨基酸聚合物(其中一个或多个氨基酸残基为相应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物),也适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般的化学结构不同的结构,但作用的方式与天然存在的氨基酸类似的化学化合物。科学和专利文献充分地描述了非天然残基。一些示例性的用作天然氨基酸残基模拟物的非天然组合和指导如下所述。芳香族氨基酸的模拟物可通过由以下替代而生成:例如D-或L-萘基丙氨酸(naphylalanine);D-或L-苯基甘氨酸;D-或L-2噻吩基丙氨酸(thienylalanine);D-或L-1,-2,3-,或4-芘基丙氨酸(pyrenylalanine);D-或L-3噻吩基丙氨酸(thienylalanine);D-或L-(2-吡啶基)-丙氨酸;D-或L-(3-吡啶基)-丙氨酸;D-或L-(2-吡嗪基)-丙氨酸;D-或L-(4-异丙基)-苯基甘氨酸;D-(三氟甲基)-苯基甘氨酸;D-(三氟甲基)-苯丙氨酸;D-对-氟-苯丙氨酸;D-或L-对-联苯基苯丙氨酸;K-或L-对-甲氧基-联苯基苯丙氨酸;D-或L-2-咪唑(烷基)丙氨酸;和D-或L-烷基丙氨酸,其中烷基可以为取代或未取代的甲基、乙基、丙基、己基、丁基、戊基、异丙基、异丁基、sec-isotyl、异戊基,或非酸性氨基酸。非天然氨基酸的芳香族环包括,例如噻唑基、噻吩基(thiophenyl)、吡啶基、苯并咪唑基、萘基、呋喃基、吡咯基,和吡啶基芳香族环。

[0029] 本文所用的“肽”包括作为本文具体举例说明的那些肽的保守变体的肽。本文所用的“保守变体”表示使用另一生物学上相似的残基替代氨基酸残基。保守变体的实例包括但不限于,一个疏水性残基如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、酪氨酸、正亮氨酸或甲硫氨酸取代另一个疏水残基,或一个极性残基取代另一个极性残基,如精氨酸取代赖氨酸、谷氨酸取代天冬氨酸或谷氨酰胺取代天冬酰胺等。可互相取代的中性亲水性氨基酸包括天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸和苏氨酸。“保守变体”还包括使用取代的氨基酸代替未取代的母体氨基酸,条件是取代的多肽的抗体也与未取代的多肽起免疫反应。这样的保守取代在本发明的肽的种类的定义之内。本文所用的

“阳离子的”是指在 pH7.4 时具有净正电荷的任何肽。肽的生物活性可通过本领域技术人员已知的和本文所述的标准方法测定。

[0030] 当关于蛋白使用“重组”时,表示该蛋白已通过引入异源核酸或蛋白或者改变天然核酸或蛋白进行修饰。

[0031] 本文所用的“治疗性蛋白”指的是(例如)研究者或临床医生所寻找的、可向哺乳动物给药以引出组织、系统、动物或人类的生物学或医学应答的任何蛋白和/或多肽。治疗性蛋白可引出多于一种生物学或医学应答。而术语“治疗有效量”是指与未接受该量的相应的受试者相比,导致(但不限于)疾病、病症或副作用痊愈、预防或减轻,或者疾病或病症进展速率降低的任何量。该术语在其范围内还包括有效增强正常生理功能的量以及在患者中有效地引起增强或有助于第二种药物的治疗作用的生理功能的量。

[0032] 本文所鉴定的所有“氨基酸”残基为天然的 L- 构型。与标准多肽命名一致,氨基酸残基的缩写如下表所示。

[0033] 表 1. 氨基酸缩写。

[0034]

1 个字母	3 个字母	氨基酸
Y	Tyr	L- 酪氨酸
G	Gly	L- 甘氨酸
F	Phe	L- 苯丙氨酸

[0035]

M	Met	L- 甲硫氨酸
A	Ala	L- 丙氨酸
S	Ser	L- 丝氨酸
I	Ile	L- 异亮氨酸
L	Leu	亮氨酸
T	Thr	L- 苏氨酸
V	Val	L- 缬氨酸
P	Pro	L- 脯氨酸
K	Lys	L- 赖氨酸
H	His	L- 组氨酸
Q	Gln	L- 谷氨酰胺

E	Glu	L- 谷氨酸
W	Trp	L- 色氨酸
R	Arg	L- 精氨酸
D	Asp	L- 天冬氨酸
N	Asn	L- 天冬酰胺
C	Cys	L- 半胱氨酸

[0036] 应当注意所有的氨基酸残基序列在本文通过从左至右的方向为从氨基端至羧基端的常规方向的式子表示。

[0037] 在另一项实施方案中,该多肽为抗原结合多肽。在一项实施方案中,该抗原结合多肽选自可溶性受体、抗体、抗体片段、免疫球蛋白单一可变域、Fab、F(ab')₂、Fv、二硫键(disulphide)连接的Fv、scFv、闭合构象的多特异性抗体、二硫键连接的scFv或双特异抗体。

[0038] 本文所用的术语“抗原结合多肽”指的是能够结合至抗原的抗体、抗体片段和其它蛋白构造。

[0039] 术语Fv、Fc、Fd、Fab,或F(ab)₂使用其标准含义(参见,例如Harlow等人,Antibodies A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,(1988))。

[0040] “嵌合抗体”指的是一种基因工程抗体,其含有来自供体抗体的天然存在的可变区(轻链和重链)以及来自受体抗体的轻链和重链恒定区。

[0041] “人源化抗体”指的是一种基因工程抗体,其CDR源自非人供体免疫球蛋白,而该分子的剩余的源自免疫球蛋白的部分来自一种(或多种)人免疫球蛋白。此外,可改变框架支持残基(framework support residues)以保持结合亲和力(参见,例如Queen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:10029-10032(1989),Hodgson等人,Bio/Technology,9:421(1991))。合适的人受体抗体可以通过与供体抗体的核苷酸和氨基酸序列的同源而选自常规数据库,例如KABAT.RTM.数据库、Los Alamos数据库和Swiss Protein数据库。特征在于与供体抗体的框架区的同源(在氨基酸基础上)的人抗体可能适于为供体CDR的插入提供重链恒定区和/或重链可变框架区。能够提供轻链恒定或可变框架区的合适的受体抗体可以类似的方式选择。应当注意,受体抗体的重链和轻链不要求源自同一受体抗体。现有技术描述了生产这样的人源化抗体的若干种方法--见例如EP-A-0239400和EP-A-054951。

[0042] 术语“供体抗体”指的是一种抗体(单克隆和/或重组的),将其可变区、CDR或其它功能片段或其类似物的氨基酸序列贡献给第一免疫球蛋白配偶体,从而提供改变的免疫球蛋白编码区并生成表达的改变的抗体,该抗体具有抗原特异性和该供体抗体的中和活性特征。

[0043] 术语“受体抗体”指的是与该供体抗体异源的抗体(单克隆和/或重组的),将其编码其重链和/或轻链框架区和/或其重链和/或轻链恒定区的全部(或任何部分,但在

一些实施方案中全部)氨基酸序列贡献给第一免疫球蛋白配偶体。在一些实施方案中,人抗体为受体抗体。

[0044] “CDR”定义为抗体的互补决定区的氨基酸序列,其为免疫球蛋白重链和轻链的高变区。参见,例如 Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)。在免疫球蛋白的可变部分有三个重链和三个轻链 CDR(或 CDR 区)。因此,本文所用的“CDR”指的是所有三个重链 CDR 或所有三个轻链 CDR(或如果适宜,所有的重链和所有的轻链 CDR 二者)。抗体的结构和蛋白折叠可能意味着其它残基被认为是抗原结合区的部分,且这可被技术人员理解。参见,例如 Chothia 等人, (1989) *Conformations of immunoglobulin hypervariable regions*; *Nature* 342, p877-883。

[0045] 本文所用的术语“域”指的是一种折叠的蛋白结构,其具有独立于该蛋白其它部分的三级结构。通常,域是蛋白离散功能特性形成的原因,且在很多情况中,域可以被添加、除去或转移至其它蛋白而不会失去该蛋白剩余部分和/或域的功能。“抗体单一可变域”是折叠的多肽域,其包含抗体可变域的序列特征。因此,它包括完全的抗体可变域和修饰的可变域,例如,其中一个或多个环被以下所代替:不是抗体可变域特征的序列,或已被平截的抗体可变域或者包含 N-端或 C-端延伸的抗体可变域,以及保留至少全长域的结合活性和特异性的可变域的折叠的片段。

[0046] 短语“免疫球蛋白单一可变域”指的是不依赖不同的 V 区或域而特异结合抗原或表位的抗体可变域 (V_H , V_{HH} , V_L)。免疫球蛋白单一可变域可与其它不同的可变区或可变域以一种形式(例如同型多体或异型多体)存在,其中其它区或域不是该单一免疫球蛋白可变域抗原结合所必需的(例如,其中该免疫球蛋白单一可变域结合抗原不依赖于另外的可变域)。本文所用的术语“域抗体”或“dAb”与能够结合至抗原的“免疫球蛋白单一可变域”是相同的。免疫球蛋白单一可变域可以是人抗体可变域,但也包括来自其它物种如啮齿动物(例如, W000/29004 所公开的)、铰口鲨和骆驼科的 V_{HH} dAb(纳米体)的单一抗体可变域。骆驼科 V_{HH} 是来自包括普通骆驼、美洲驼、羊驼、单峰骆驼和原驼物种的免疫球蛋白单一可变域多肽,其产生天然缺乏轻链的重链抗体。这样的 V_{HH} 域可根据本领域可用的标准技术人源化,而且根据本发明这样的域仍被认为是“域抗体”。本文所用的“ V_H ”包括骆驼科 V_{HH} 域。NARV 是另一种类型的免疫球蛋白单一可变域,其在包括铰口鲨的软骨鱼中被鉴定。这些域也被称为新型抗原受体可变区(通常简写成 V(NAR) 或 NARV)。更多详情参见 *Mol. Immunol.* 44, 656-665 (2006) 和 US20050043519A。

[0047] 术语“表位结合域”指的是不依赖于不同的 V 区或域特异地结合抗原或表位的域,这可以是域抗体(dAb),例如人、骆驼科或鲨鱼免疫球蛋白单一可变域。

[0048] 如本文所用,术语“抗原结合位点”指的是能够特异地结合至抗原的蛋白上的位点,这可以是单一域,例如表位结合域,或者它可以是可在标准抗体上找到的成对的 V_H/V_L 域。在本发明的一些方面中,单链 Fv(ScFv) 域可提供抗原结合位点。

[0049] 本文所用的术语“mAbdAb”和“dAbmAb”指的是本发明的抗原结合蛋白。这两个术语可替换使用,并具有本文所用的相同含义。

[0050] 在一项实施方案中,该方法包括 (a) 提供包含醋酸盐的制剂;以及 (b) 将一种或多种氨基酸添加至该制剂中,其中具有氨基酸的制剂的粘度比不具有相同氨基酸的相同制剂

的粘度小。在一些实施方案中,该氨基酸是直链氨基酸。在其它实施方案中,该氨基酸包含环状部分。在一项实施方案中,该氨基酸是色氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、丝氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苏氨酸、缬氨酸、脯氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、半胱氨酸。

[0051] 在一项实施方案中,该方法包括 (a) 提供包含醋酸盐的制剂;以及 (b) 将甘氨酸和/或精氨酸添加至该制剂中至约 1.0%w/v 的浓度,其中具有甘氨酸和/或精氨酸的制剂的粘度比不具有甘氨酸和/或精氨酸的相同制剂的粘度小。在一项实施方案中,具有甘氨酸和/或精氨酸的制剂的粘度比不具有甘氨酸和/或精氨酸的制剂的粘度降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25% 或至少约 30%。在一项实施方案中,具有甘氨酸和/或精氨酸的制剂的粘度小于约 25cP 或小于约 20cP。

[0052] 在另一项实施方案中,该方法包括 (a) 提供包含醋酸盐的制剂;以及 (b) 将甲硫氨酸添加至该制剂中至约 0.04%w/v 的浓度,其中具有甲硫氨酸的制剂的粘度比不具有甲硫氨酸的相同制剂的粘度小。在一项实施方案中,具有甲硫氨酸的制剂的粘度比不具有甲硫氨酸的制剂的粘度降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25% 或至少约 30%。在一项实施方案中,具有甲硫氨酸的制剂的粘度小于约 25cP 或小于约 20cP。

[0053] 在另一项实施方案中,该方法包括 (a) 提供包含醋酸盐的制剂;以及 (b) 将苯丙氨酸添加至该制剂中至约 0.8%w/v 的浓度,其中具有苯丙氨酸的制剂的粘度比不具有苯丙氨酸的相同制剂的粘度小。在一项实施方案中,具有苯丙氨酸的制剂的粘度比不具有苯丙氨酸的制剂的粘度降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 40% 或至少约 50%。在一项实施方案中,具有苯丙氨酸的制剂的粘度小于约 20cP 或小于约 15cP。

[0054] 在另一项实施方案中,该方法包括 (a) 提供包含醋酸盐的制剂;以及 (b) 将色氨酸添加至该制剂中至约 0.2%w/v 的浓度,其中具有色氨酸的制剂的粘度比不具有色氨酸的相同制剂的粘度小。在一项实施方案中,具有色氨酸的制剂的粘度比不具有色氨酸的制剂的粘度降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 40% 或至少约 50%。在一项实施方案中,具有色氨酸的制剂的粘度小于约 20cP 或小于约 15cP。

[0055] 在另一项实施方案中,该方法包括 (a) 提供包含醋酸盐的制剂;以及 (b) 将脯氨酸添加至该制剂中至约 4.0%w/v 的浓度,其中具有脯氨酸的制剂的粘度比不具有脯氨酸的相同制剂的粘度小。在一项实施方案中,具有脯氨酸的制剂的粘度比不具有脯氨酸的制剂的粘度降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25% 或至少约 30%。在一项实施方案中,具有脯氨酸的制剂的粘度小于约 25cP 或小于约 20cP。

[0056] 在另一项实施方案中,该方法进一步包括测定蛋白制剂的稳定性。

[0057] 在另一项实施方案中,该制剂进一步包含附加赋形剂。“赋形剂”包括但不限于,稳定剂,例如,人血清白蛋白 (hsa)、牛血清白蛋白 (bsa)、 α -酪蛋白、球蛋白、 α -乳白蛋白、LDH、溶菌酶、肌红蛋白、卵白蛋白、核糖核酸酶 A;缓冲剂,例如,柠檬酸、HEPES、组氨酸、乙酸钾、柠檬酸钾、磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)、乙酸钠、碳酸氢钠、柠檬酸钠、磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4)、Tris 碱和 Tris-HCl;氨基酸/代谢产物,例如甘氨酸、丙氨酸 (α -丙氨酸、 β -丙氨酸)、精氨酸、甜菜碱、亮氨酸、赖氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、组氨酸、脯氨酸、4-羟基脯氨酸、肌氨酸、

γ -氨基丁酸 (GABA)、冠瘿氨基酸 (opines) (丙氨亚氨基酸 (alanopine)、章鱼碱、N-羟甲基-L-丙氨酸 (strombine)), 和三甲基胺 N-氧化物 (TMAO); 表面活性剂, 例如聚山梨酯 20 和聚山梨酯 80, 以及泊洛沙姆 407; 脂质分子, 例如磷脂酰胆碱、乙醇胺和乙酰基色氨酸酯 (acetyltryptophanate); 聚合物, 例如聚乙二醇 (PEG) 和聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 10、24、40; 低分子量赋形剂, 例如阿拉伯糖、纤维二糖、乙二醇、果糖、岩藻糖、半乳糖、甘油 / 丙三醇、葡萄糖、肌醇、乳糖、甘露醇、麦芽糖、麦芽三糖、甘露糖、蜜二糖、2-甲基-2,4-戊二醇、辛酮糖、丙二醇、棉子糖、核糖、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖、木糖醇和木糖; 和高分子量赋形剂, 例如纤维素、 β -环糊精、右旋糖酐 (10kd)、右旋糖酐 (40kd)、右旋糖酐 (70kd)、聚蔗糖、明胶、羟丙基甲基纤维素、羟乙基淀粉、麦芽糊精、甲基纤维素、PEG (6kd)、聚葡萄糖、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) k15 (10kd)、PVP (40kd)、PVP k30 (40kd)、PVP k90 (1000kd)、葡聚糖凝胶 G200 和淀粉; 抗氧化剂, 例如, 抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫代甘油、巯基乙酸、硫代山梨糖醇和谷胱甘肽; 还原剂, 例如盐酸半胱氨酸、二硫苏糖醇和其它硫醇或噻吩 (thiophene); 螯合剂, 例如 EDTA、EGTA、谷氨酸和天冬氨酸; 无机盐 / 金属, 例如 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Na_2SO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 MgSO_4 和 NaF ; 有机盐, 例如乙酸钠、聚乙烯酸钠、辛酸钠 (Na caprylate 或 Na octanoate)、丙酸盐 (propionate)、乳酸盐、琥珀酸盐和柠檬酸盐; 有机溶剂, 例如乙腈、二甲基亚砷 (DMSO) 和乙醇。

[0058] 在一项实施方案中, 该制剂进一步包含蔗糖。在一项实施方案中, 该制剂包含浓度约 150 至约 300mM 的蔗糖。在一项实施方案中, 该制剂包含浓度约 200 至约 250mM 的蔗糖。在一项实施方案中, 该制剂包含浓度约 234mM 的蔗糖。

[0059] 在一项实施方案中, 该制剂配制为 pH 约 4.5 至约 7.5。在一项实施方案中, 该制剂配制为 pH 约 5.5。在一项实施方案中, 该制剂包含约 25mM 至约 75mM 醋酸盐。在一项实施方案中, 该制剂包含约 55mM 醋酸盐。

[0060] 在另一项实施方案中, 该制剂进一步包含聚山梨酯 -80。在另一项实施方案中, 该制剂进一步包含聚山梨酯 -80。在一项实施方案中, 该制剂进一步包含浓度至多 0.05%w/v 的聚山梨酯 -80。

[0061] 在另一项实施方案中, 该治疗性蛋白是抗原结合多肽。在一项实施方案中, 该抗原结合多肽是抗体。在一项实施方案中, 该抗原结合多肽是免疫球蛋白单一可变域。在一项实施方案中, 该抗原结合多肽结合至白介素 5 (IL5)。在一项实施方案中, 该抗原结合多肽是抗 IL5 抗体。在一项实施方案中, 该抗 IL5 抗体包括包含 SEQ ID NO:1 的重链以及包含 SEQ ID NO:2 的轻链。在一项实施方案中, 该抗原结合多肽结合至 ELR。在一项实施方案中, 该抗原结合多肽是抗 ELR 抗体。在一项实施方案中, 该抗 ELR 抗体包括包含 SEQ ID NO:3 的重链以及包含 SEQ ID NO:4 的轻链。

[0062] 在另一项实施方案中, 该治疗性蛋白的存在浓度为至少约 150mg/ml、至少约 175mg/ml、至少约 200mg/ml、至少约 225mg/ml、至少约 250mg/ml、至少约 275mg/ml 或至少约 300mg/ml。在另一项实施方案中, 该治疗性蛋白的存在浓度为至少约 150mg/ml 至约 300mg/ml。在一项实施方案中, 该治疗性蛋白的存在浓度为约 200mg/ml。

[0063] 在一项实施方案中, 冻干或喷雾干燥该制剂, 然后在测定粘度前重构。在一些实施方案中, 冻干或喷雾干燥粘度降低的制剂并之后用分散剂重构。在一项实施方案中, 该分散剂为无菌水或“注射用水” (WFI)。该液体多肽可进一步用等渗盐水或其它赋形剂稀释以在

给药前产生所需的浓度。在一项实施方案中,该制剂是重构制剂。在另一项实施方案中,该制剂是液体药物制剂。

[0064] 用于降低粘度的试剂可在配制方法的任意阶段加入。例如,在醋酸盐、治疗性蛋白或任意赋形剂之前、之后或与其同时。

[0065] 本发明制剂可以以任何适当给药途径给药,包括全身用药。全身用药包括口服给药、肠胃外给药、经皮给药、直肠给药,以及吸入给药。肠胃外给药是指除肠内、经皮或吸入外的给药途径,且通常通过注射或输注。肠胃外给药包括静脉内、肌肉内和皮下注射或输注。吸入是指给药入患者肺中,无论是经口或经鼻道吸入。

[0066] 本发明还涉及通过本发明任意方法制备的稳定制剂。

[0067] 在一项实施方案中,该制剂包含醋酸盐、治疗性蛋白和一种或多种氨基酸,其中具有氨基酸的制剂的粘度比不具有相同氨基酸的相同制剂的粘度小。在一些实施方案中,该氨基酸是直链氨基酸。在其它实施方案中,该氨基酸包含环状部分。在一项实施方案中,该氨基酸是色氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、丝氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苏氨酸、缬氨酸、脯氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、半胱氨酸。

[0068] 在一项实施方案中,该制剂包含醋酸盐、治疗性蛋白和甘氨酸和/或精氨酸。在一项实施方案中,甘氨酸和/或精氨酸的浓度为约 1.0%w/v,其中具有甘氨酸和/或精氨酸的制剂的粘度比不具有甘氨酸和/或精氨酸的相同制剂的粘度小。在一项实施方案中,具有甘氨酸和/或精氨酸的制剂的粘度比不具有甘氨酸和/或精氨酸的制剂的粘度降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25% 或至少约 30%。在一项实施方案中,具有甘氨酸和/或精氨酸的制剂的粘度小于约 25cP 或小于约 20cP。

[0069] 在一项实施方案中,该制剂包含醋酸盐、治疗性蛋白和甲硫氨酸。在一项实施方案中,甲硫氨酸的浓度为约 0.04%w/v,其中具有甲硫氨酸的制剂的粘度比不具有甲硫氨酸的相同制剂的粘度小。在一项实施方案中,具有甲硫氨酸的制剂的粘度比不具有甲硫氨酸的制剂的粘度降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25% 或至少约 30%。在一项实施方案中,具有甲硫氨酸的制剂的粘度小于约 25cP 或小于约 20cP。

[0070] 在一项实施方案中,该制剂包含醋酸盐、治疗性蛋白和苯丙氨酸。在一项实施方案中,苯丙氨酸的浓度为约 0.6%w/v 至约 1.0%w/v,其中具有苯丙氨酸的制剂的粘度比不具有苯丙氨酸的相同制剂的粘度小。在一项实施方案中,具有苯丙氨酸的制剂的粘度比不具有苯丙氨酸的制剂的粘度降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 40% 或至少约 50%。在一项实施方案中,具有苯丙氨酸的制剂的粘度小于约 20cP 或小于约 15cP。

[0071] 在一项实施方案中,该制剂包含醋酸盐、治疗性蛋白和色氨酸。在一项实施方案中,色氨酸的浓度为约 0.1%w/v 至约 0.3%w/v,其中具有色氨酸的制剂的粘度比不具有色氨酸的相同制剂的粘度小。在一项实施方案中,色氨酸的浓度为约 0.2%w/v。在一项实施方案中,具有色氨酸的制剂的粘度比不具有色氨酸的制剂的粘度降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 40% 或至少约 50%。在一项实施方案中,具有色氨酸的制剂的粘度小于约 20cP 或小于约 15cP。

[0072] 在一项实施方案中,该制剂包含醋酸盐、治疗性蛋白和脯氨酸。在一项实施方案

中,脯氨酸的浓度为约 4.0%w/v,其中具有脯氨酸的制剂的粘度比不具有脯氨酸的相同制剂的粘度小。在一项实施方案中,具有脯氨酸的制剂的粘度比不具有脯氨酸的制剂的粘度降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25% 或至少约 30%。在一项实施方案中,具有脯氨酸的制剂的粘度小于约 25cP 或小于约 20cP。

[0073] 在一项实施方案中,该制剂进一步包含蔗糖。在一项实施方案中,该制剂包含浓度约 150 至约 300mM 的蔗糖。在一项实施方案中,该制剂包含浓度约 200 至约 250mM 的蔗糖。在一项实施方案中,该制剂包含浓度约 234mM 的蔗糖。

[0074] 在一项实施方案中,该制剂配制为 pH 约 4.5 至约 7.5。在一项实施方案中,该制剂配制为 pH 约 5.5。在一项实施方案中,该制剂包含约 25mM 至约 75mM 醋酸盐。在一项实施方案中,该制剂包含约 55mM 醋酸盐。

[0075] 在另一项实施方案中,该制剂进一步包含聚山梨酯-80。在另一项实施方案中,该制剂进一步包含聚山梨酯-80。在一项实施方案中,该制剂进一步包含浓度至多 0.05%w/v 的聚山梨酯-80。

[0076] 本发明还涉及包含容器的制品,该容器包含本发明的制剂。在一项实施方案中,该制品进一步包含用于给药该制剂的说明书。

实施例

[0077] 甘氨酸、酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸和脯氨酸获自 Sigma-Aldrich。精氨酸获自 MP-Biomedicals 且甲硫氨酸获自 JT Baker。所有氨基酸为实验室级。抗 IL5mAb 储备溶液 (220mg/mL) 为自制且用 234mM 蔗糖的醋酸盐缓冲液 (pH5.5) 配制。

[0078] 调节抗 IL5mAb 溶液的浓度至 200mg/mL 以用于下述粘度测量。对于甘氨酸、精氨酸、甲硫氨酸和酪氨酸,在醋酸盐缓冲液中制备储备溶液 (表 2) 并将其加入各缓冲液的 220mg/mL 抗 IL5mAb 储备溶液中 (表 3)。

[0079] 对于色氨酸和苯丙氨酸,将氨基酸直接溶入抗 IL5mAb 溶液中以获得表 3 中的目标氨基酸浓度。由于它们的低水溶性,通过制备储备溶液可能无法获得该浓度。

[0080] 表 2:氨基酸储备溶液的浓度。

[0081]

氨基酸名称	醋酸盐缓冲液中储备溶液的浓度 (%w/v)
甘氨酸	10.90
精氨酸	10.90
甲硫氨酸	0.80
酪氨酸	0.04
脯氨酸	直接将粉末溶入溶液中

[0082] 表 3:为获得具有所述氨基酸浓度的 200mg/mL 抗 IL5mAb 的氨基酸的稀释方案。

[0083]

	在最终 200mg/mL 抗 IL5 mAb 溶液中的氨基酸浓度(% w/v)	220mg/mL 抗 IL5 mAb 储备溶液的体积(μ L)	氨基酸储备溶液的体积(μ L)	醋酸盐缓冲液的体积(μ L)	氨基酸的重量(g)
甘氨酸	0.5	1818	91	91	NA
甘氨酸	1.0	1818	182	0	NA
精氨酸	0.5	1818	91	91	NA
精氨酸	1.0	1818	182	0	NA
甲硫氨酸	0.01	1818	25	157	NA
甲硫氨酸	0.04	1818	100	82	NA
色氨酸	0.2	9090	NA	910	0.05
苯丙氨酸	0.83	5454	NA	546	0.02
酪氨酸	0.004	1818	182	0	NA
脯氨酸	4.0	9090	NA	900	0.4

[0084]

	在最终 100mg/mL 抗 ELR 溶液中的氨基酸浓度(% w/v)	100mg/mL 抗 ELR 储备溶液的体积(μ L) (A)	醋酸盐缓冲液的体积(μ L) (D)	氨基酸的重量(g) (B)
甘氨酸	1.00	2000	10	0.0200
色氨酸	0.20	2000	10	0.0040
苯丙氨酸	0.83	2000	10	0.0166
脯氨酸	4.00	2000	10	0.0800

[0085] 样品稀释后,采用 Brookfield LVDVUltra III C/P 流变仪在 25°C 测量样品的粘度。所用轴为 CP-40 且各次测量装载 500 μ L 样品。由所获不随转矩 % 增加而改变的粘度值计算平均粘度值。

[0001]

序列表

<110> MONCK, Myrna A.
WONG, Man Yi
ZHANG, Kai

<120> 粘度降低的制剂

<130> PU64607

<150> 61/473,123
<151> 2011-04-07

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 IL5 的成熟(无信号序列)重链的氨基酸序列

<400> 1
Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30
Ser Val His Trp Val Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Val Ile Trp Ala Ser Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val Val Leu
65 70 75 80
Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asp Pro Pro Ser Ser Leu Leu Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Arg Gly
100 105 110
Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

[0002]

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 2
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗 IL5 mAb 的成熟(无信号序列)轻链的氨基酸序列

<400> 2
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 Val His Ser Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 3
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗 ELR mAb 的重链的氨基酸序列

<400> 3
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asn Tyr Trp Ile Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

[0003]

Glu Trp Met Gly Asp Leu Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Thr Phe Tyr Ser
 65 70 75 80
 Glu Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Asp Arg Thr Trp Phe Ala His Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130 135 140
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 145 150 155 160
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 210 215 220
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 225 230 235 240
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 245 250 255
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 305 310 315 320
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340 345 350
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460
 Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 4
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗ELR mAb的轻链的氨基酸序列

<400> 4
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 20 25 30
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile
 35 40 45
 Glu Ser Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 50 55 60
 Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg

[0004]

65					70					75					80
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser
				85					90						95
Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	His	Gly	Glu
			100					105							110
Ser	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr
			115				120						125		
Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu
			130			135						140			
Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro
			145			150					155				160
Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly
			165					170							175
Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr
			180					185							190
Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His
			195				200					205			
Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val
		210				215					220				
Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							
225						230									

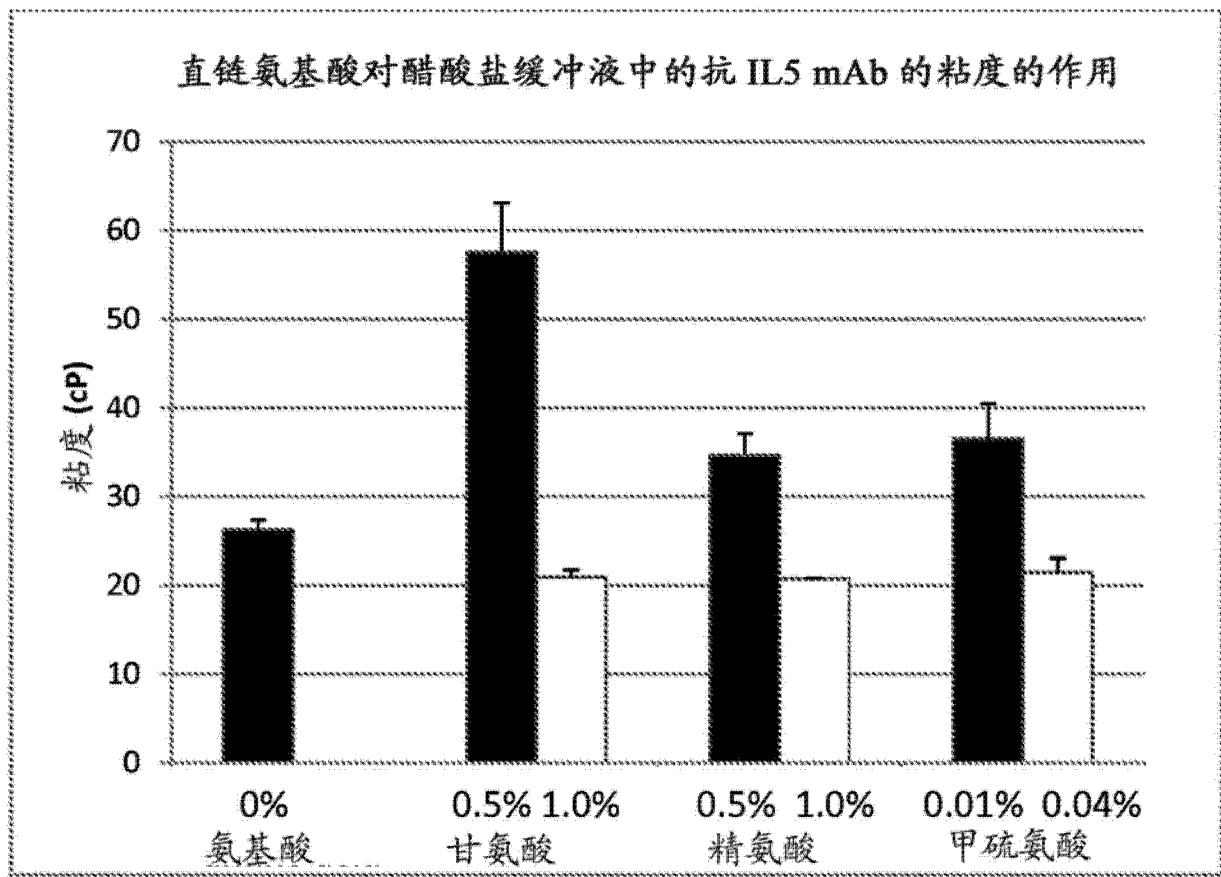


图 1

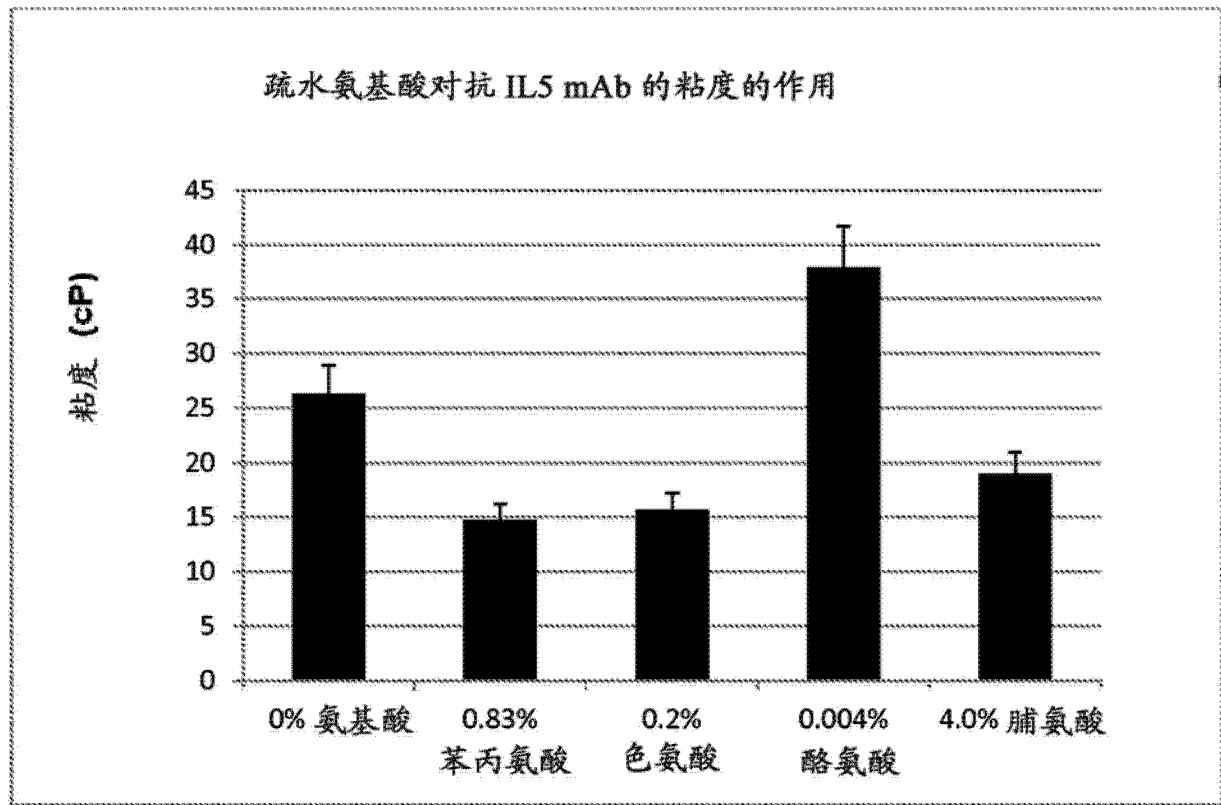


图 2

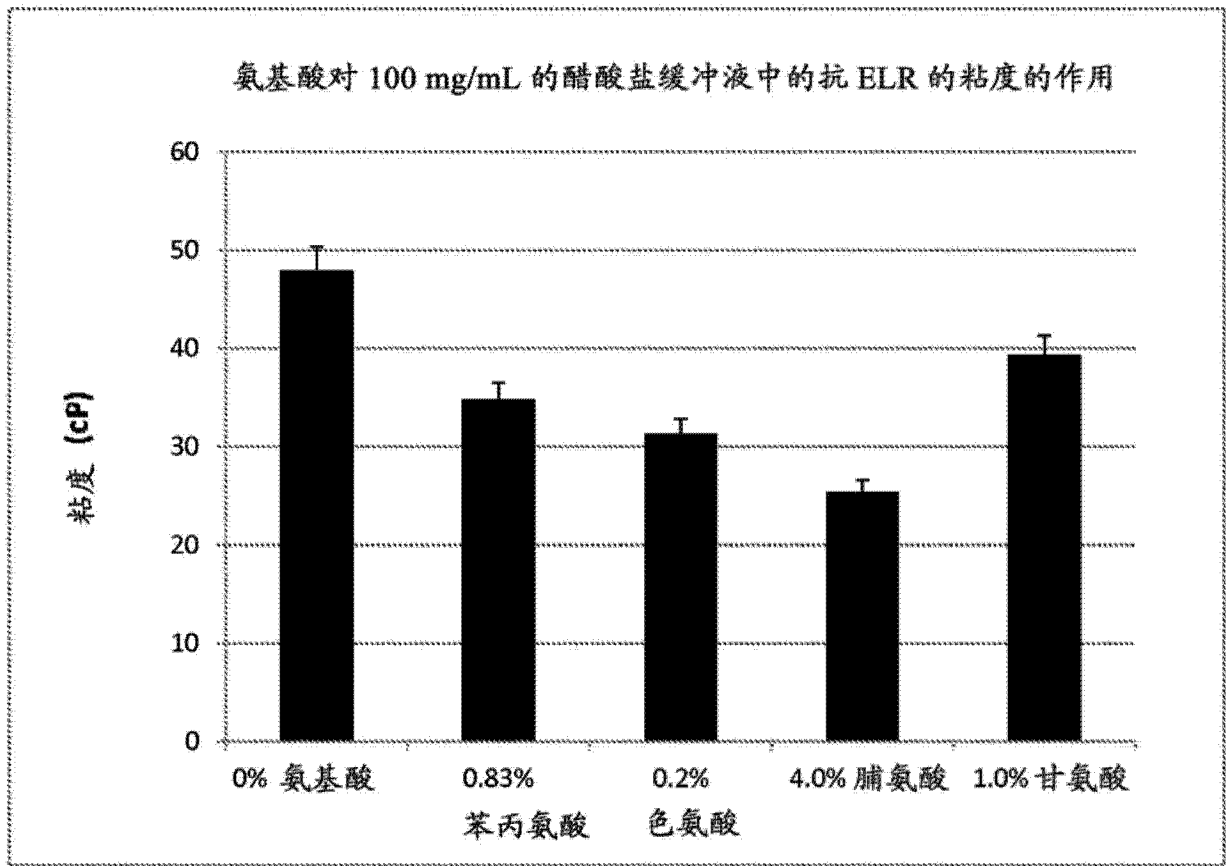


图 3