(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106488933 A
(43)申请公布日 2017.03.08

(21)申请号 201580028749.X

(22)申请日 2015.03.31

(30)优先权数据
10-2014-0038032 2014.03.31 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.11.29

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2015/003195 2015.03.31

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/152618 KO 2015.10.08

(71)申请人 韩美药品株式会社
地址 韩国京畿道

(72)发明人 林亨奎 李钟守 金大振 裴城敏 郑圣烨 权世昌

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 张全信 董志勇

(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)
C07K 1/02(2006.01)

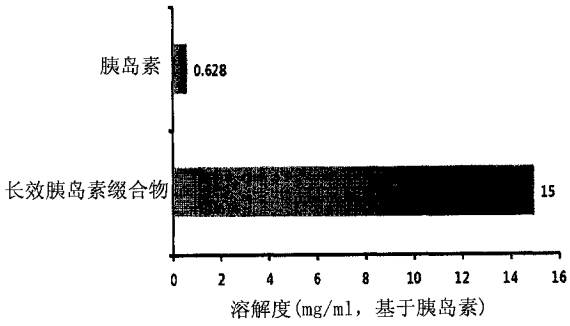
权利要求书1页 说明书19页
序列表21页 附图4页

(54)发明名称

通过使用免疫球蛋白Fc片段连接改善蛋白质和肽的溶解度的方法

(57)摘要

本发明涉及:与不连接至免疫球蛋白Fc片段的生理活性蛋白或肽相比,改善生理活性蛋白或肽的溶解度的方法,其包括将生理活性蛋白或肽连接至免疫球蛋白Fc片段的步骤;和用于改善生理活性蛋白或肽的溶解度的组合物,其包含免疫球蛋白Fc片段并且与不含免疫球蛋白Fc片段的组合物的溶解度相比,展示了改善的溶解度。



CN 106488933 A

1.与不缀合至免疫球蛋白Fc片段的生理活性蛋白或肽的溶解度相比改善所述生理活性蛋白或肽的溶解度的方法，其中所述方法包括将所述生理活性蛋白或肽缀合至免疫球蛋白Fc片段。

2.权利要求1所述的方法，其中所述免疫球蛋白Fc片段是源自IgG、IgA、IgD、IgE或IgM的Fc片段。

3.权利要求2所述的方法，其中所述免疫球蛋白Fc片段是结构域的混合物，其中每个结构域具有源自选自以下的免疫球蛋白的不同起源：IgG、IgA、IgD、IgE和IgM。

4.权利要求2所述的方法，其中所述免疫球蛋白Fc片段是由相同起源的单链免疫球蛋白组成的二聚体或多聚体。

5.权利要求4所述的方法，其中所述免疫球蛋白Fc片段是人无糖基化的IgG4 Fc片段。

6.权利要求1所述的方法，其中所述缀合是经由非肽基聚合物将生理活性蛋白或肽连接至免疫球蛋白Fc片段。

7.权利要求1所述的方法，其中与所述免疫球蛋白Fc片段缀合的所述生理活性蛋白或肽是融合蛋白的形式。

8.权利要求6所述的方法，其中所述非肽基聚合物是聚乙二醇。

9.权利要求6所述的方法，其中所述非肽基聚合物选自聚丙二醇、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚氧乙烯化多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯乙醚、生物可降解聚合物比如聚乳酸(PLA)和聚乳酸-乙醇酸(PLGA)、脂质聚合物、几丁质、透明质酸和其组合。

10.权利要求1所述的方法，其中所述方法用于改善生理活性蛋白或肽在水溶液中的溶解度。

11.权利要求10所述的方法，其中所述水溶液包括柠檬酸或醋酸缓冲液、作为非离子型表面活性剂的聚山梨醇酯、作为糖醇的甘露醇和作为等渗剂的氯化钠或甲硫氨酸。

12.权利要求10所述的方法，其中所述水溶液具有5.0到7.0的pH。

13.权利要求1所述的方法，其中所述生理活性蛋白或肽是毒蜥外泌肽-4、胰高血糖素、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)、胰高血糖素样肽-2(GLP-2)、甲状旁腺激素(PTH)、降钙素、胰岛素或泌酸调节肽。

14.一种用于改善生理活性蛋白或肽的溶解度的组合物，其包含免疫球蛋白Fc片段，其中与不包含免疫球蛋白Fc片段的组合物相比，所述组合物改善溶解度。

15.权利要求14所述的组合物，其中所述组合物包括生理活性蛋白或肽和免疫球蛋白Fc片段的缀合物，其中生理活性蛋白或肽作为活性成分经由肽基连接体或非肽基连接体连接至免疫球蛋白Fc片段。

通过使用免疫球蛋白Fc片段连接改善蛋白质和肽的溶解度的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及与不缀合至免疫球蛋白Fc片段的生理活性蛋白或肽的溶解度相比，改善生理活性蛋白或肽的溶解度的方法，该方法包括将生理活性蛋白或肽缀合至免疫球蛋白Fc片段的步骤，并且涉及用于改善生理活性蛋白或肽的溶解度的组合物，其包含免疫球蛋白Fc片段，其中与不含免疫球蛋白Fc片段的组合物相比，该组合物改善溶解度。

背景技术

[0002] 只有当药物被溶解时，它们才展现药理作用，因而药物的溶解度与效力密切相关。水溶性药物容易被制备为可注射制剂，并且当作为片剂被摄入时在胃肠道中溶解。但是，当在不增溶的情况下摄入时，水溶性差的药物作为聚集体比如沉淀物(pellet)存在于胃肠道中，并且它们不溶解为单个分子并且难以被吸收。进一步，当水溶性差的药物在不增溶的情况下被用作可注射制剂时，血管阻塞造成血液凝结。因此，水溶性差的药物不能被用作可注射制剂。药物溶解度是药物制剂中的主要挑战。

[0003] 已知的药物增溶方法中的一种是使用表面活性剂作为增溶剂。表面活性剂在每个分子中具有疏水和亲水基团二者。在水中，疏水烃链被隔绝在内部并且亲水基团暴露于水以形成球形胶团。药物可以通过封装在胶团中溶解。但是，当在该方法中使用高浓度的表面活性剂时，药物可能不适合于静脉内施用。进一步，将微乳液稀释低于表面活性剂的临界胶团浓度可能引起药物在胶团中的沉淀(Journal of Advanced Pharmacy Education& Research2(1)32-67(2012)ISSN 2249-3379)。因此，对于不管制剂的浓度如何不使用表面活性剂持续增加药物溶解度的方法存在需要。

[0004] 公开内容

[0005] 技术问题

[0006] 在这种背景下，本发明人已经进行了许多努力来研发能够改善药物比如生理活性蛋白或肽的溶解度的方法。结果，他们发现了当免疫球蛋白Fc片段缀合至生理活性蛋白或肽时，生理活性蛋白或肽的溶解度有效地增加从而容易地制备包含药学上有效浓度的生理活性蛋白或肽的制剂，从而完成本发明。

[0007] 技术方案

[0008] 本发明的目标是提供与不缀合至免疫球蛋白Fc片段的生理活性蛋白或肽的溶解度相比，改善生理活性蛋白或肽的溶解度的方法，其中该方法包括将生理活性蛋白或肽缀合至免疫球蛋白Fc片段。

[0009] 本发明的另一个目标是提供用于改善生理活性蛋白或肽的溶解度的组合物，其包含免疫球蛋白Fc片段，其中与不含免疫球蛋白Fc片段的组合物相比，该组合物改善溶解度。

[0010] 有益效果

[0011] 当根据本发明生理活性蛋白或肽与免疫球蛋白Fc片段缀合时，生理活性蛋白或肽的溶解度可以被有效地改善，并且因而在各种药物的制剂中是有效的。

[0012] 附图描述

[0013] 图1示出了胰岛素和长效胰岛素缀合物的标准校准曲线。

[0014] 图2示出了检查根据表1的组合物的胰岛素和长效胰岛素缀合物的溶解度的结果，其中胰岛素示出了0.628mg/mL的溶解度，并且长效胰岛素缀合物以胰岛素为基础示出了15mg/mL的溶解度。

[0015] 图3示出了SEQ ID NO:27的泌酸调节肽衍生物和泌酸调节肽衍生物-PEG-免疫球蛋白Fc片段缀合物的标准校准曲线。

[0016] 图4示出了检查根据表4的组合物的SEQ ID NO:27的泌酸调节肽衍生物和泌酸调节肽衍生物-PEG-免疫球蛋白Fc片段缀合物的溶解度的结果，其中泌酸调节肽衍生物示出了0.188mg/mL的溶解度，并且缀合物以泌酸调节肽为基础示出了11mg/mL的溶解度。

[0017] 最佳方式

[0018] 本发明的方面提供了与不缀合至免疫球蛋白Fc片段的生理活性蛋白或肽的溶解度相比，改善生理活性蛋白或肽的溶解度的方法，其中该方法包括将生理活性蛋白或肽缀合至免疫球蛋白Fc片段。

[0019] 在具体实施方式中，应用于根据本发明的方法的免疫球蛋白Fc片段是源自IgG、IgA、IgD、IgE或IgM的Fc片段。

[0020] 在另一个具体实施方式中，应用于根据本发明的方法的免疫球蛋白Fc片段是结构域的混合物(hybrid)，其中每个结构域具有源自免疫球蛋白的不同起源，该免疫球蛋白选自IgG、IgA、IgD、IgE和IgM。

[0021] 在仍另一个具体实施方式中，应用于根据本发明的方法的免疫球蛋白Fc片段是由相同起源的单链免疫球蛋白组成的二聚体或多聚体。

[0022] 在仍另一个具体实施方式中，应用于根据本发明的方法的免疫球蛋白Fc片段是人无糖基化的(aglycosylated)IgG4Fc片段。

[0023] 在仍另一个具体实施方式中，根据本发明的缀合步骤包括经由非肽基聚合物将生理活性蛋白或肽连接至免疫球蛋白Fc片段。

[0024] 在仍另一个具体实施方式中，通过根据本发明的方法制备的与免疫球蛋白Fc片段缀合的生理活性蛋白或肽是融合蛋白的形式。

[0025] 在仍另一个具体实施方式中，应用于根据本发明的方法的非肽基聚合物是聚乙二醇。

[0026] 在仍另一个具体实施方式中，应用于根据本发明的方法的非肽基聚合物选自聚丙二醇、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚氧乙烯化多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯乙醚、生物可降解聚合物比如聚乳酸(PLA)和聚乳酸-乙醇酸(PLGA)、脂质聚合物、几丁质、透明质酸和其组合。

[0027] 在仍另一个具体实施方式中，根据本发明的方法是为了改善生理活性蛋白或肽在水溶液中的溶解度。

[0028] 在仍另一个具体实施方式中，应用于根据本发明的方法的水溶液包括柠檬酸或醋酸缓冲液、作为非离子型表面活性剂的聚山梨醇酯、作为糖醇的甘露醇和作为等渗剂的氯化钠或甲硫氨酸。

[0029] 在仍另一个具体实施方式中，应用于根据本发明的方法的水溶液具有从5.0到7.0

的pH。

[0030] 在仍另一个具体实施方式中，根据本发明的方法中的生理活性蛋白或肽是毒蜥外泌肽-4(exendin-4)、胰高血糖素、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)、胰高血糖素样肽-2(GLP-2)、甲状旁腺激素(PTH)、降钙素、胰岛素或泌酸调节肽。

[0031] 在仍另一个具体实施方式中，应用于根据本发明的方法的水溶液进一步包含表面活性剂。

[0032] 另一个方面提供了用于改善生理活性蛋白或肽的溶解度的组合物，其包含免疫球蛋白Fc片段，其中与不包含免疫球蛋白Fc片段的组合物相比，该组合物改善溶解度。

[0033] 在具体实施方式中，该组合物包括生理活性蛋白或肽和免疫球蛋白Fc片段的缀合物，其中生理活性蛋白或肽作为活性成分经由肽基连接体或非肽基连接体连接至免疫球蛋白Fc片段。

[0034] 发明的方式

[0035] 本发明提供了与不缀合至免疫球蛋白Fc片段的生理活性蛋白或肽的溶解度相比，改善生理活性蛋白或肽的溶解度的方法，其中该方法包括将生理活性蛋白或肽缀合至免疫球蛋白Fc片段。甚至在不添加表面活性剂至溶剂的情况下，本发明的方法展示了改善生理活性蛋白或肽的溶解度的效果。在生理活性蛋白或肽——具体而言，胰岛素、泌酸调节肽等——是已知蛋白药物的成分的情况下，其展示了在从5到7的pH范围中的低溶解度，该pH范围是用于身体施用的制剂的一般pH范围。因此，困难在于将生理活性蛋白或肽制备成期望浓度的制剂。问题还在于其可注射制剂可能引起在身体中的沉淀以产生意外的副作用。出人意料地，本发明确认了当生理活性蛋白或肽与免疫球蛋白Fc片段缀合时，其显示了在上述pH范围中的增加的溶解度。即，本发明的方法具有改善在5到7的弱酸性pH范围中显示低溶解度的肽或蛋白质——比如胰岛素或泌酸调节肽——的溶解度的效果。

[0036] 如本文所使用，术语“溶解度(solubility)”指的是生理活性蛋白或肽在适合于人体施用的溶剂中溶解的程度。具体而言，其指的是在具体温度下溶质在给定溶剂中的饱和程度。溶解度可以通过测定饱和点处的溶质浓度来测量。例如，在将过量的溶质加入到溶剂，然后搅拌并过滤溶液之后，可以使用UV分光光度计或HPLC测量浓度，但不限于此。为了将生理活性蛋白或肽用于治疗，重要的是在溶剂中溶解其药学上有效量，其为在测定重构之后的冻干制剂的浓度或液体制剂的活性成分的浓度中应当被考虑的重要因素。

[0037] 已经确认了当生理活性蛋白或肽与免疫球蛋白Fc片段缀合时，与不连接片段的生理活性蛋白或肽相比，其溶解度显著地增加。以此为基础，本发明的特征在于生理活性蛋白或肽在水溶液中的溶解度得以改善。

[0038] 根据本发明的实施方式，当胰岛素或泌酸调节肽被用作代表性的生理活性肽并且免疫球蛋白Fc缀合至其时，胰岛素或泌酸调节肽的溶解度显著增加(图2和4)。

[0039] 如本文所使用，术语“水溶液”指的是意图溶解生理活性蛋白或肽的溶液。水溶液是适合于将生理活性蛋白或肽施用至人体的溶液。在本发明的具体实施方式中，水溶液可以具有中性或弱酸性pH，例如，5.0到7.0的pH。应用于本发明的方法的水溶液不限于特定类型，但是其可以具有柠檬酸或醋酸缓冲液——其包含作为非离子型表面活性剂的聚山梨醇酯、作为糖醇的甘露醇和作为等渗剂的氯化钠或甲硫氨酸。

[0040] 在根据本发明的方法中，免疫球蛋白Fc片段可以经由非肽基聚合物连接至生理活

性蛋白或肽。具体而言，免疫球蛋白Fc片段可以连接至与生理活性蛋白或肽连接的非肽基聚合物，或者免疫球蛋白Fc片段-非肽基聚合物可以连接至生理活性蛋白或肽。

[0041] 如本文所使用，术语“非肽基聚合物”指的是生物相容性聚合物，其包含通过除了肽键之外的共价键彼此连接的一个或多个重复单位。

[0042] 可以在本发明中使用的非肽基聚合物可以选自聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚氧乙烯化多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯乙醚、生物可降解聚合物比如PLA(聚乳酸)和PLGA(聚乳酸-乙醇酸)、脂质聚合物、几丁质、透明质酸和其组合，并且优选地，聚乙二醇，但不限于此。而且，在本领域中熟知的和在本领域的技能内容易制备的其衍生物包含在本发明的范围内。

[0043] 可以非限制地使用任何非肽基聚合物，只要其是如此聚合物：该聚合物对体内蛋白水解酶具有抗性，并且因而不容易被蛋白水解酶切割从而使得免疫球蛋白Fc片段起载体的功能。该非肽基聚合物的分子量在1kDa到100kDa，并且具体地1kDa到20kDa的范围内。而且，连接至免疫球蛋白Fc片段的本发明的非肽基聚合物可以是一种聚合物或者不同类型的聚合物的组合。

[0044] 该非肽基聚合物可以具有能够结合至免疫球蛋白Fc片段和蛋白质或肽药物的反应基团，并且因而起连接体的功能以将免疫球蛋白Fc片段与蛋白质或肽连接。

[0045] 使用非肽基聚合物作为连接体将生理活性蛋白或肽与免疫球蛋白Fc片段连接可以通过顺序地执行以下步骤实现：(1)使非肽基聚合物与生理活性蛋白或肽和免疫球蛋白Fc片段中的任一种反应；和(2)使步骤(1)的反应产物与生理活性蛋白或肽和免疫球蛋白Fc片段中的另一种反应。

[0046] 但是，如果在步骤(1)中，免疫球蛋白Fc片段连接至在两端具有反应基团的非肽基聚合物，则步骤(1)的部分产物可以是桥接(bridge)的形式，其中免疫球蛋白Fc片段的两个N末端在特定的反应条件下连接至非肽基聚合物的两端。桥接形式的步骤(1)的产物可能阻止将生理活性蛋白或肽连接至其的二次耦联反应或者可能大大地降低耦联产率。因此，在实施方式中，为了阻止免疫球蛋白Fc片段和免疫球蛋白Fc片段之间的桥接形成，顺序地，可以首先将非肽基聚合物和生理活性蛋白或肽反应，然后可以将非肽基聚合物连接的生理活性蛋白或肽与免疫球蛋白Fc片段反应。但是，没有必要以该顺序执行本发明的改善溶解度的方法。

[0047] 在步骤(1)中，用于将非肽基聚合物连接至生理活性蛋白或肽或免疫球蛋白Fc片段的化学反应可以通过已知方法执行。例如，在两端具有反应基团的非肽基聚合物可以在0℃至25℃下与生理活性蛋白或肽或免疫球蛋白Fc片段反应1小时至16小时。通过该反应，生理活性蛋白或肽或免疫球蛋白Fc片段可以经由反应基团共价地连接至一个非肽基聚合物。

[0048] 在步骤(1)中将生理活性蛋白或肽连接至非肽基聚合物的反应可以在包含有机溶剂的反应溶液中执行。就此而言，有机溶剂可以是本领域中通常使用的任何有机溶剂，具体地伯醇、仲醇或叔醇、和具有1到10个碳原子的醇，但是不限于此。更具体地，醇可以是异丙醇、乙醇或甲醇。有机溶剂可以自由地选自适合于生理活性蛋白或肽的类型的有机溶剂。进一步，有机溶剂可以用于生理活性蛋白或肽和非肽基聚合物之间的连接，基于反应溶液的总量，具体地以10％到60％的量，更具体地以30％到55％的量，并且更具体地以45％到55％的量包含有机溶剂，但是不限于此。进一步，反应溶液的pH可以是，具体地4.5到7.0，并且更

具体地5.0到6.5，但不限于此。

[0049] 进一步，根据参与反应的反应基团的类型，可以进一步包括还原剂来执行上述步骤。

[0050] 具体地，本发明的还原剂指的是本领域中已知的任何还原剂，其功能是还原由非肽基聚合物的醛基和多肽(生理活性蛋白或肽、免疫球蛋白Fc片段)的胺基之间的结合产生的可逆的亚胺双键以形成共价键。关于本发明的目标，为了使得非肽基聚合物与生理活性蛋白或肽或免疫球蛋白Fc片段之间共价结合，还原剂可以包含在反应溶液中。本发明的还原剂可以是本领域中已知的任何还原剂，优选地氰基硼氰化钠、硼烷吡啶复合物、硼氢化钠、硼烷二甲胺复合物、硼烷三甲胺复合物或三乙酰氧基硼氢化钠，但不限于此。根据生理活性多肽或免疫球蛋白恒定区和反应溶剂的种类，可以选择适当的还原剂。

[0051] 进一步，可以包含1mM到20mM的终浓度的还原剂，用于生理活性蛋白或肽与非肽基聚合物，或免疫球蛋白Fc片段与非肽基聚合物之间的连接反应(步骤(1)的反应)；和1mM到100mM的终浓度的还原剂，用于耦联反应(步骤(2)的反应)。

[0052] 同时，非肽基聚合物可以在两端具有反应基团，每个反应基团能够结合至免疫球蛋白Fc片段和生理活性蛋白或肽，具体地，每个反应基团能够结合至生理活性蛋白或肽的N末端或赖氨酸的胺基，或半胱氨酸的巯基；或结合至免疫球蛋白Fc片段。在两端的反应基团具体地选自反应醛基、丙醛基团、丁醛基团、马来酰亚胺基团和琥珀酰亚胺衍生物。就此而言，琥珀酰亚胺衍生物可以是琥珀酰亚胺基羧甲基(succinimidyl carboxymethyl)、戊酸琥珀酰亚胺酯、甲基丁酸琥珀酰亚胺酯、甲基丙酸琥珀酰亚胺酯、丁酸琥珀酰亚胺酯、丙酸琥珀酰亚胺酯、N-羟基琥珀酰亚胺或碳酸琥珀酰亚胺酯，但不限于此。可以非限制性地使用任何反应基团，只要其结合至免疫球蛋白Fc片段和生理活性蛋白或肽的氨基酸残基的胺基或巯基。

[0053] 具体而言，当非肽基聚合物在两端具有反应醛基时，在两端以最小的非特异性反应将生理活性蛋白或肽与免疫球蛋白连接是有效的。通过醛键的还原烷基化生成的最终产物比通过酰胺键连接时更稳定得多。醛反应基团在低pH下选择性地结合至N末端，并且可以在高pH下——例如，在9.0的pH下——结合至赖氨酸残基(Lys)以形成共价键。

[0054] 作为非肽基聚合物的连接体的两端的反应基团可以彼此相同或不同。例如，连接体可以在一端具有马来酰亚胺基团，并且在另一端具有醛基、丙醛基团或丁醛基团。当在其两端具有反应羟基的聚乙二醇被用作非肽基聚合物时，羟基可以通过已知的化学反应被活化为不同的反应基团，或者具有修饰的反应基团的商业可得的聚乙二醇可以被用于制备本发明的长效蛋白缀合物。

[0055] 进一步，非肽基聚合物的反应基团可以分别结合至生理活性蛋白或肽和免疫球蛋白Fc片段的N末端胺基或赖氨酸残基的侧链胺基，但是不具体地限于此。就此而言，生理活性蛋白或肽和免疫球蛋白Fc片段上的赖氨酸残基不限于具体的位置，并且该赖氨酸残基的非限制性实例还包括非天然氨基酸和Lys衍生物——只要它们具有能够结合至非肽基聚合物的反应基团的胺基——以及天然赖氨酸。

[0056] 同时，当在步骤(1)中首先生理活性蛋白或肽与非肽基聚合物反应时，生理活性蛋白或肽和非肽基聚合物以1:1到1:20的摩尔比反应，并且在步骤(2)中，为步骤(1)的产物的生理活性蛋白或肽和非肽基聚合物的缀合物与免疫球蛋白Fc片段以1:0.5到1:10的摩尔比

反应，但不限于此。

[0057] 此外，本发明的方法可以包括在步骤(1)之后在步骤(2)之前分离和纯化为步骤(1)的产物的生理活性多肽-非肽基聚合物缀合物或免疫球蛋白Fc片段-非肽基聚合物缀合物的过程。该过程可以使用本领域中已知的各种分离方法执行，比如色谱法。

[0058] 在步骤(2)中，当生理活性多肽-非肽基聚合物缀合物与免疫球蛋白Fc片段反应时，pH条件为4.0到9.0的pH，但是不具体地限于此。

[0059] 同时，生理活性蛋白或肽和免疫球蛋白Fc片段可以以融合蛋白的形式彼此缀合。

[0060] 如本文所使用，术语“融合蛋白”指的是通过最初编码单独蛋白的两个或更多个基因的接合产生的蛋白质。融合蛋白可以通过重组DNA技术人工地制备。进一步，融合蛋白可以是如此形式：其中生理活性蛋白或肽和免疫球蛋白Fc片段不经由连接体或经由肽基连接体彼此连接。

[0061] 在本文中，肽基连接体指的是连接组成融合蛋白的两种蛋白质的肽。可以包含肽基连接体以便于独立地折叠组成融合蛋白的两种蛋白质或者维持甚至处于融合蛋白形式的两种蛋白质的每种功能，但不限于此。

[0062] 如本文所使用，术语“免疫球蛋白Fc片段”指的是免疫球蛋白的重链恒定区2(CH2)和重链恒定区3(CH3)，不包括重链和轻链的可变区、免疫球蛋白的重链恒定区1(CH1)和轻链恒定区1(CL1)，并且其可以包括在重链恒定区处的铰链区。进一步，本发明的免疫球蛋白Fc片段可以是扩展的免疫球蛋白Fc片段，其包括重链恒定区1(CH1)和/或轻链恒定区1(CL1)的部分或全部，不包括免疫球蛋白的重链和轻链的可变区，只要其具有与天然蛋白相比基本上相似的或更好的效果。而且，其可以是在CH2和/或CH3的氨基酸序列的相对长的部分中具有缺失的区域。即，本发明的免疫球蛋白Fc片段可以包括(1)CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域和CH4结构域，(2)CH1结构域和CH2结构域，(3)CH1结构域和CH3结构域，(4)CH2结构域和CH3结构域，(5)恒定区的一个或多个结构域和免疫球蛋白铰链区(或铰链区的一部分)的组合，和(6)重链恒定区和轻链恒定区的每个结构域的二聚体。

[0063] 关于本发明的目标，免疫球蛋白Fc片段指的是具有增加结合至其的药物——即，生理活性蛋白或肽——的溶解度的效果的物质，并且其还可以指药物载体。

[0064] 如本文所使用，术语“载体”指的是与药物结合在一起的物质。一般而言，载体结合至药物以增加或消除药物的生理学活性。但是，关于本发明的目标，本发明的载体指的是如此物质：其通过在皮下施用之后延迟药物从施用位点到血液的递送，使药物的生理学活性的降低最小化并且增加药物的体内稳定性和效力的持续时间，并且同时还改善蛋白质或肽的溶解度。作为药物载体，已经研究了多种物质，比如脂质、聚合物等，但是本发明提供了免疫球蛋白Fc片段作为载体，用于改善与载体连接的药物的体内持续时间，使体内活性的降低最小化，并且还使溶解度最大化。进一步，免疫球蛋白Fc片段是在体内可以代谢的生物可降解的多肽，所以其可以安全地被用作药物载体。由于该特性，在其中免疫球蛋白Fc片段连接至生理活性蛋白或肽的缀合物可以被指定为本发明的长效缀合物。

[0065] 进一步，本发明中用于改善生理活性蛋白或肽的溶解度的免疫球蛋白Fc片段可以经由连接体或直接地连接至生理活性蛋白或肽。就此而言，生理活性蛋白或肽与免疫球蛋白Fc片段连接的位点没有被具体地限制，并且在蛋白质或肽内或在N末端或C末端处的任何位点是可能的。但是，为了使得当施用给人体时由本发明的方法制备的生理活性蛋白或肽

和免疫球蛋白Fc片段的缀合物展示生理学活性，根据待被应用的生理活性蛋白或肽的类型优选地选择不抑制生理学活性的位点，但是不限于此。

[0066] 此外，在缀合物的产生、纯化和产率方面，与整个免疫球蛋白分子相比，由于免疫球蛋白Fc片段相对低的分子量，其是更有优势的。进一步，由于其不含Fab——Fab由于一种抗体与另一种在氨基酸序列的差别展示高的非同质性(non-homogeneity)，其被预期为显著地增强同质性并且降低诱导血液抗原性的可能性。

[0067] 进一步，本发明的免疫球蛋白Fc片段不仅包括天然氨基酸序列而且包括其序列衍生物。氨基酸序列衍生物意思是其具有与野生型氨基酸序列不同的一个或多个氨基酸残基，并且其可以天然发生或者可以人工地生成。免疫球蛋白Fc片段包括由于缺失、插入、保守或非保守置换、或其组合导致的衍生物。插入通常通过大约1到20个氨基酸的连续氨基酸序列的添加进行，或者可以利用更长的序列进行。缺失通常在大约1到30个氨基酸残基的范围内。制备免疫球蛋白Fc片段的序列衍生物的技术在国际专利公布号WO97/34631和WO 96/32478中公开，其通过引用并入本文。通常不改变分子的活性的蛋白质和肽中的氨基酸交换在本领域中是已知的(H.Neurath,R.L.Hill,The Proteins,Academic Press,New York,1979)。最经常发生的交换是双向的Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Thy/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu和Asp/Gly交换。此外，如果需要，免疫球蛋白Fc片段可以通过磷酸化、硫酸化、丙烯酰化(acrylation)、糖基化、甲基化、法尼基化、乙酰化、酰胺化等进行修饰。

[0068] 上述的免疫球蛋白Fc衍生物可以是如此衍生物：其与本发明的免疫球蛋白Fc片段具有相等的生物学活性，但是针对热、pH等具有增加的免疫球蛋白Fc片段的结构稳定性。

[0069] 进一步，免疫球蛋白Fc片段可以从分离自人或动物——比如，牛、山羊、家猪、小鼠、兔子、仓鼠、大鼠、豚鼠等——的天然类型获得，或者可以是从转化的动物细胞或微生物获得的重组体或其衍生物。在本文中，它们可以通过利用蛋白水解酶从人或动物有机体或其处理物(treatment)分离整个免疫球蛋白由天然免疫球蛋白获得。木瓜蛋白酶将天然免疫球蛋白消化为Fab和Fc区域，并且胃蛋白酶处理导致产生pF'c和$F(ab)_2$片段。例如，这些片段可以经历尺寸排阻色谱法以分离Fc或pF'c。具体地，根据本发明的免疫球蛋白Fc片段可以是从微生物获得的重组的人源免疫球蛋白Fc片段。

[0070] 此外，本发明的免疫球蛋白Fc区域可以是具有天然糖链、与天然形式相比增加的糖链或与天然相比减少的糖链的形式，或者可以是去糖基化形式。免疫球蛋白Fc的增加的或减少的糖基化或去糖基化可以通过通常的方法实现，例如通过使用化学方法、酶法或使用微生物的基因工程方法。在本文中，当去糖基化时，结合至免疫球蛋白Fc片段的补体(C1q)显著减少并且抗体依赖性细胞毒性或补体依赖性细胞毒性降低或去除，从而在体内不诱导不必要的免疫应答。在该背景下，去糖基化的或无糖基化的免疫球蛋白Fc片段与药物载体的目的更加一致。

[0071] 如本文所使用，术语“去糖基化”指的是从免疫球蛋白Fc片段酶去除糖部分，并且术语“无糖基化”意思是免疫球蛋白Fc片段通过原核生物——具体地大肠杆菌(E.coli)——以未糖基化的形式产生。

[0072] 同时，免疫球蛋白Fc片段可以源自人或其它动物，包括牛、山羊、猪、小鼠、兔子、仓鼠、大鼠和豚鼠，并且优选地是人。此外，免疫球蛋白Fc片段可以是源自IgG、IgA、IgD、IgE和

IgM的Fc片段，或者可以是由其组合或其混合物制造的Fc片段。具体地，其源自IgG或IgM——其是人血液中最丰富的蛋白质，和最具体地源自IgG——其已知增强配体结合蛋白的半衰期。

[0073] 同时，如本文所使用，术语“组合”意思是编码相同起源的单链免疫球蛋白Fc片段的多肽连接至不同起源的单链多肽以形成二聚体或多聚体。即，二聚体或多聚体可以由选自以下的两个或更多个片段形成：IgG Fc、IgA Fc、IgM Fc、IgD Fc和IgE Fc片段。

[0074] 如本文所使用，术语“混合物”意思是编码不同起源的两个或更多个免疫球蛋白Fc片段的序列以单链免疫球蛋白Fc片段存在。在本发明中，各种类型的混合物是可能的。即，结构域混合物可以由选自IgG Fc、IgA Fc、IgM Fc、IgD Fc和IgE Fc的CH1、CH2、CH3和CH4的1到4个结构域组成，并且可以包括铰链区。

[0075] 同时，IgG被分为IgG1、IgG2、IgG3和IgG4亚类，并且本发明包括其组合和混合物。优选的是IgG2和IgG4亚类，并且最优选的是很少具有效应子功能比如补体依赖性细胞毒性(CDC)的IgG4的Fc片段。

[0076] 本发明的免疫球蛋白Fc片段可以是重组体形式，其中铰链区连接至其N末端。在这种情况下，表达为聚集体的免疫球蛋白Fc片段不引起活性的损失。而且，这些是不具有由起始密码子编码的起始甲硫氨酸残基的活性二聚体或单体形式的Fc片段，并且因此，存在增溶和重折叠的优势。

[0077] 本发明中的适合的免疫球蛋白Fc片段在韩国专利号755315、775343和824505中详细描述，这些专利通过引用并入本文。

[0078] 即，根据本发明被用作具有胰岛素和泌酸调节肽的融合蛋白的药物载体的最优选的免疫球蛋白Fc片段是人IgG4源非糖基化Fc区域。人源Fc片段与非人源Fc片段相比是更优选的，非人源Fc片段可以担当人体内的抗原并且引起不期望的免疫应答，比如产生针对抗原的新抗体。

[0079] 如本文所使用，术语“生理活性蛋白或肽”指的是调节基因表达或生理功能的蛋白质或肽。关于本发明的目标，可以非限制性地包含任何生理活性蛋白或肽，只要它增加溶解度。

[0080] 同时，根据IUPAC-IUB的命名法规则，本文提及的氨基酸采用如下缩写：

[0081] 丙氨酸：Ala或A 精氨酸：Arg或R

[0082] 天冬酰胺：Asn或N 天冬氨酸：Asp或D

[0083] 半胱氨酸：Cys或C 谷氨酸：Glu或E

[0084] 谷氨酰胺：Gin或Q 甘氨酸：Gly或G

[0085] 组氨酸：His或H 异亮氨酸：Ile或I

[0086] 亮氨酸：Leu或L 赖氨酸：Lys或K

[0087] 甲硫氨酸：Met或M 苯丙氨酸：Phe或F

[0088] 脯氨酸：Pro或P 丝氨酸：Ser或S

[0089] 苏氨酸：Thr或T 色氨酸：Trp或W

[0090] 酪氨酸：Tyr或Y 缬氨酸：Val或V

[0091] 进一步，贯穿本说明书，单字母密码和三字母密码可以被用于氨基酸。

[0092] 进一步，生理活性蛋白或肽是除了天然生理活性蛋白或肽之外还包含所有其衍生

物、变体和片段的概念。

[0093] 如本文所使用，术语“衍生物”指的是在天然生理活性蛋白或肽的氨基酸序列中具有氨基酸残基的一些基团的化学置换(例如，α-甲基化、α-羟基化)、缺失(例如，脱氨基)或修饰(例如，N-甲基化)的肽。衍生物可以包括保留天然生理活性肽的活性而与天然生理活性肽不具有序列同源性的肽模拟物。

[0094] 如本文所使用，术语“肽模拟物(peptide mimetic)”指的是被设计为模拟肽的蛋白样链。肽模拟物可以由包含D-氨基酸的D-肽模拟物示例，但是不限于此。肽模拟物可以容易地通过使用本领域中已知的制备肽模拟物的技术制备。

[0095] 如本文所使用，术语“变体”指的是具有与天然蛋白质或肽的氨基酸序列不同的一个或多个氨基酸序列的蛋白质或肽，并且指的是保留天然蛋白活性的肽。变体可以通过天然蛋白质或肽的氨基酸序列的一部分的置换、添加、缺失和修饰中的任一种制备，或者通过其组合制备。在本文中，添加的氨基酸可以是非天然存在的氨基酸(例如，D型氨基酸)。

[0096] 如本文所使用，术语“片段”指的是在天然蛋白质或肽的N末端或C末端处具有一个或多个氨基酸缺失的片段，并且优选地具有天然蛋白质的活性的片段。

[0097] 生理活性蛋白或肽可以通过源自天然或重组起源的任何方法制备，并且例如，其可以是通过使用原核细胞比如大肠杆菌作为宿主细胞制备的重组蛋白，但不限于此。

[0098] 同时，生理活性蛋白或肽可以是泌酸调节肽、毒蜥外泌肽-4、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)、GLP-2、促胰岛素释放肽比如糖依赖性胰岛素释放肽(GIP)、胰岛素、胰高血糖素、甲状旁腺激素(PTH)或降钙素，但不限于此。如上所述，生理活性蛋白或肽是除了天然生理活性蛋白或肽之外还包含所有其衍生物、变体和片段的概念。

[0099] 如本文所使用，术语“胰岛素”指的是如此肽，其响应于血液中升高的葡萄糖水平由胰腺分泌以处理(take up)肝脏、肌肉或脂肪组织中的葡萄糖并将其转化为糖原，并且停止脂肪作为能量来源，从而控制血糖水平。这种肽包括天然胰岛素、基础胰岛素、胰岛素激动剂、其前体、其衍生物、其片段和其变体。

[0100] 如本文所使用，术语“天然胰岛素”指的是如此激素，其由胰腺分泌以促进葡萄糖吸收并抑制脂肪分解，并且因而起到控制血糖水平的功能。胰岛素由不具有调节血糖水平功能的前体——称为胰岛素原——通过加工形成。胰岛素的氨基酸序列如下：

[0101] A链：

[0102] Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn(SEQ ID NO:1)

[0103] B链：

[0104] Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr(SEQ ID NO:2)

[0105] 如本文所使用，术语“基础胰岛素(basal insulin)”指的是管理正常日常血糖水平的肽，比如，地特胰岛素(levemir)、甘精胰岛素(lantus)、德谷胰岛素(deglude)等。

[0106] 如本文所使用，术语“胰岛素激动剂”指的是如此化合物：其结合至胰岛素受体以显示与胰岛素相等的生物活性，其与胰岛素的结构不相关。

[0107] 术语“胰岛素变体”指的是如此肽：其具有与天然胰岛素的氨基酸序列不同的一个或多个氨基酸序列，并且保留了控制体内血糖水平的功能。

[0108] 术语“胰岛素衍生物”指的是与天然胰岛素具有至少80％氨基酸序列同源性的肽，其可以使得在氨基酸残基上的一些基团被化学地置换、缺失或修饰，并且具有调节体内血糖水平的功能。“胰岛素片段”指的是如此片段：其在胰岛素的N末端或C末端具有一个或多个氨基酸缺失并且具有调节体内血糖水平的功能。

[0109] 胰岛素的激动剂、衍生物、片段和变体的每种制备方法可以单独或组合使用。例如，本发明包括如此肽：其具有与天然肽的氨基酸不同的一个或多个氨基酸并且N末端氨基酸残基进行脱氨基，并且具有调节体内血糖水平的功能。本发明中使用的胰岛素可以通过重组技术产生，并且还可以使用固相合成方法来合成。

[0110] 进一步，本发明中使用的胰岛素可以连接至非肽基聚合物。该非肽基聚合物可以被用作本发明的连接体。非肽基聚合物被用作连接体以连接免疫球蛋白Fc片段，从而维持胰岛素的活性并且改善溶解度，而且还改善稳定性。使用基因重组技术的肽连接体的应用是可能的。

[0111] 进一步。本发明的特征在于生理活性蛋白或肽与免疫球蛋白Fc片段缀合以改善蛋白质或肽的溶解度。在结合位点方面没有具体限制。但是，对胰岛素A链的修饰可以降低活性和稳定性，并且因而免疫球蛋白Fc片段可以经由连接体或不经由连接体连接至B链。具体而言，免疫球蛋白Fc片段可以经由非肽基连接体或不经由非肽基连接体连接至胰岛素B链的N末端，但是不具体地限于此。

[0112] 如本文所使用，术语“泌酸调节肽”指的是如此肽：其源自胰高血糖素前体——前胰高血糖素(pre-glucagon)，并且包括天然泌酸调节肽、其前体、其衍生物、其片段和其变体。

[0113] 具体地，泌酸调节肽具有如下氨基酸序列：HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA(SEQ ID NO:3)。

[0114] 泌酸调节肽衍生物包括肽、肽衍生物或肽模拟物，其通过泌酸调节肽序列的氨基酸的一部分的添加、缺失或置换制备，从而与天然泌酸调节肽相比以高水平活化GLP-1受体和胰高血糖素受体二者。在本发明中，泌酸调节肽衍生物可以具有SEQ ID NO:4到36中任一个氨基酸序列。

[0115] 进一步，泌酸调节肽片段保留控制体内血糖水平的功能。

[0116] 进一步，泌酸调节肽变体是如此肽：其具有与天然泌酸调节肽的氨基酸序列的氨基酸残基不同的一个或多个氨基酸残基并且具有活化GLP-1和胰高血糖素受体的功能。制备泌酸调节肽变体、衍生物和片段的方法可以单独或组合使用。例如，本发明包括如此肽：其具有与天然肽的氨基酸不同的一个或多个氨基酸并且N末端氨基酸残基进行脱氨基，并且具有活化GLP-1受体和胰高血糖素受体二者的功能。

[0117] 在本发明中，泌酸调节肽衍生物包含通过SEQ ID NO:3的氨基酸序列的置换、添加、缺失或翻译后修饰(例如，甲基化、酰化、泛素化、分子内共价结合)而制备从而活化胰高血糖素和GLP-1受体二者的任何肽。对于氨基酸的置换或添加，可以使用通常在人蛋白质中发现的20种氨基酸中的任一种以及非典型的或非天然存在的氨基酸。非典型的氨基酸的商业来源包括Sigma-Aldrich、ChemPep Inc.和Genzyme Pharmaceuticals。包含这些氨基酸和非典型的肽序列的肽可以合成和从供应商购买，例如，American Peptide Company(USA)、Bachem(USA)或Anygen(韩国)。

[0118] 在具体实施方式中，本发明的泌酸调节肽衍生物是包含下面式1的氨基酸序列的新型肽：

[0119] R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-Xg-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2 (式1)

[0120] 其中R1是组氨酸、脱氨基-组氨酰基、二甲基-组氨酰基(N-二甲基-组氨酰基)、β-羟基咪唑丙酰基、4-咪唑乙酰基、β-羧基咪唑丙酰基或酪氨酸。

[0121] X1是AIB(氨基异丁酸)、D-丙氨酸、甘氨酸、Sar(N-甲基甘氨酸)、丝氨酸或D-丝氨酸；

[0122] X2是谷氨酸或谷氨酰胺；

[0123] X3是亮氨酸或酪氨酸；

[0124] X4是丝氨酸或丙氨酸；

[0125] X5是赖氨酸或精氨酸；

[0126] X6是谷氨酰胺或酪氨酸；

[0127] X7是亮氨酸或甲硫氨酸；

[0128] X8是天冬氨酸或谷氨酸；

[0129] X9是谷氨酸、丝氨酸、α-甲基-谷氨酸或缺失；

[0130] X10是谷氨酰胺、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、丝氨酸或缺失；

[0131] X11是丙氨酸、精氨酸、缬氨酸或缺失；

[0132] X12是丙氨酸、精氨酸、丝氨酸、缬氨酸或缺失；

[0133] X13是赖氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、α-甲基-谷氨酸或缺失；

[0134] X14是天冬氨酸、谷氨酸、亮氨酸或缺失；

[0135] X15是苯丙氨酸或缺失；

[0136] X16是异亮氨酸、缬氨酸或缺失；

[0137] X17是丙氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、α-甲基-谷氨酸或缺失；

[0138] X18是色氨酸或缺失；

[0139] X19是丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丝氨酸、缬氨酸或缺失；

[0140] X20是丙氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、谷氨酰胺、精氨酸或缺失；

[0141] X21是天冬酰胺或缺失；

[0142] X22是丙氨酸、甘氨酸、苏氨酸或缺失；

[0143] X23是半胱氨酸、赖氨酸或缺失；

[0144] X24是具有由丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸的组合组成的2到10个氨基酸的肽，或缺失；和

[0145] R2是KRNRNNIA(SEQ ID NO:37)、GPSSGAPPPS(SEQ ID NO:38)、GPSSGAPPPSK(SEQ ID NO:39)、HSQGTFTSDYSKYLD(SEQ ID NO:40)、HSQGTFTSDYSRYLDK(SEQ ID NO:41)、HGEGTFTSDLSKQMEEEAVK(SEQ ID NO:42)或缺失(排除式1的氨基酸序列等同于SEQ ID NO:3的氨基酸序列的情况)。

[0146] 为了加强野生型泌酸调节肽对胰高血糖素受体和GLP-1受体的活性，本发明的泌酸调节肽衍生物可以用4-咪唑乙酰基、脱氨基-组氨酰基、二甲基-组氨酰基(N-二甲基-组氨酰基)、β-羟基咪唑丙酰基或β-羧基咪唑丙酰基置换，在4-咪唑乙酰基的情况中由SEQ ID

NO:3表示的氨基酸序列的1位处的组氨酸的α-C缺失,在脱氨基-组氨酰基的情况中N末端氨基缺失,在二甲基-组氨酰基(N-二甲基-组氨酰基)的情况中N末端氨基用两个甲基修饰,在β-羟基咪唑丙酰基的情况中N末端氨基用羟基置换,在β-羧基咪唑丙酰基的情况中N末端氨基用羧基置换。此外,GLP-1受体结合区域可以用加强疏水键和离子键或其组合的氨基酸置换。泌酸调节肽序列的部分可以用GLP-1或毒蜥外泌肽-4的氨基酸序列置换以加强对GLP-1受体的活性。

[0147] 进一步,泌酸调节肽序列的部分可以用稳定α螺旋的序列置换。例如,在式1的氨基酸序列的10、14、16、20、24和28位处的氨基酸可以用由已知稳定α螺旋的Tyr(4-Me)、Phe、Phe(4-Me)、Phe(4-Cl)、Phe(4-CN)、Phe(4-NO_2)、Phe(4-NH_2)、Phg、Pal、Nal、Ala(2-噻吩基)和Ala(苯并噻吩基)组成的氨基酸或氨基酸衍生物置换。

[0148] 在本文中,Tyr(4-Me)是酪氨酸衍生物,其中酪氨酸的羟基中的氢用甲基置换;Phe(4-Me)是苯丙氨酸衍生物,其中苯丙氨酸的对位用甲基置换;Phe(4-Cl)是苯丙氨酸衍生物,其中苯基的对位用氯置换;Phe(4-CN)是苯丙氨酸衍生物,其中苯基的对位用氰基置换;Phe(4-NO_2)是苯丙氨酸衍生物,其中苯基的对位用硝基置换;和Phe(4-NH_2)是苯丙氨酸衍生物,其中苯基的对位用胺基置换。

[0149] 进一步,Phg表示苯基甘氨酸;Pal是丙氨酸衍生物,其中丙氨酸的β-甲基用吡啶基置换;Nal是丙氨酸衍生物,其中丙氨酸的β-甲基用萘基置换;Ala(2-噻吩基)是丙氨酸衍生物,其中丙氨酸的β-甲基用2-噻吩基置换;和Ala(苯并噻吩基)是丙氨酸衍生物,其中丙氨酸的β-甲基用苯丙噻吩基置换。

[0150] 待被插入的α螺旋-稳定氨基酸或氨基酸衍生物的类型和数目方面没有限制。在具体实施方式中,分子内的环可以在氨基酸残基之间形成。例如,分子内的环可以在10和14、12和16、16和20、20和24以及24和28位处形成,并且在这种情况下,相应位置可以被谷氨酸和赖氨酸对取代。在溶解度可以通过本发明的方法改善的泌酸调节肽衍生物中形成的分子内的环的数目方面没有特别限制。

[0151] 在实施方式中,泌酸调节肽——其溶解度通过本发明的方法改善——或其衍生物可以是具有选自以下式2到6的氨基酸序列的泌酸调节肽衍生物。在具体实施方式中,本发明的泌酸调节肽衍生物是具有以下式2的氨基酸序列的肽,其中泌酸调节肽的氨基酸序列用毒蜥外泌肽或GLP-1的序列置换:

[0152] R1-A'-R3 (式2)

[0153] 在另一个具体实施方式中,本发明的泌酸调节肽衍生物是具有以下式3的氨基酸序列的肽,其中泌酸调节肽的氨基酸序列的部分使用适合的氨基酸连接体与毒蜥外泌肽或GLP-1的序列连接:

[0154] R1-B'-C'-R4 (式3)

[0155] 在仍另一个具体实施方式中,本发明的泌酸调节肽衍生物是如此肽:其中泌酸调节肽的氨基酸序列的部分用能够加强对GLP-1受体的结合亲和力的氨基酸置换。例如,26位处的Leu——其通过疏水作用与GLP-1受体结合——用疏水残基Ile或Val置换,从而加强对GLP-1受体的结合亲和力。更具体地,以下式4是包含具有改善的受体结合亲和力的泌酸调节肽的肽(D6置换的):

[0156] R1-SQGTFTSDYSKYLD-D1-D2-D3-D4-D5-LFVQW-D6-D7-N-D8-R3 (式4)

[0157] 在仍另一个具体实施方式中，本发明的泌酸调节肽衍生物是包含以下式5的肽，在该肽中氨基酸序列的一部分缺失、添加或者用另一个氨基酸置换，以便加强天然泌酸调节肽对GLP-1受体和胰高血糖素受体的活性：

[0158] R1-E1-QGTFTSDYSKYLD-E2-E3-RA-E4-E5-Fv-E6-WLMNT-E7-R5 (式5)

[0159] 在式2到5中，R1与式1中描述的相同；

[0160] A’选自SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT(SEQ ID NO:43)、SQGTFTSDYSKYLDEEAVRLFIEWLMNT(SEQ ID NO:44)、SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT(SEQ ID NO:45)、GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG(SEQ ID NO:46)、GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG(SEQ ID NO:47)、GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA(SEQ ID NO:48)和SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG(SEQ ID NO:49)；

[0161] B’选自SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT(SEQ ID NO:43)、SQGTFTSDYSKYLDEEAVRLFIEWLMNT(SEQ ID NO:44)、SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT(SEQ ID NO:45)、GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG(SEQ ID NO:46)、GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG(SEQ ID NO:47)、GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEW/AA(SEQ ID NO:48)、SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG(SEQ ID NO:49)、GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEW(SEQ ID NO:50)和SQGTFTSDYSRYLD(SEQ ID NO:51)；

[0162] C’是具有由丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸的组合组成的2到10个氨基酸的肽；

[0163] D1是丝氨酸、谷氨酸或精氨酸；

[0164] D2是精氨酸、谷氨酸或丝氨酸；

[0165] D3是精氨酸、丙氨酸或缬氨酸；

[0166] D4是精氨酸、缬氨酸或丝氨酸；

[0167] D5是谷氨酰胺、精氨酸或赖氨酸；

[0168] D6是异亮氨酸、缬氨酸或丝氨酸；

[0169] D7是甲硫氨酸、精氨酸或谷氨酰胺；

[0170] D8是苏氨酸、甘氨酸或丙氨酸；

[0171] E1是丝氨酸、AIB、Sar、D-丙氨酸或D-丝氨酸；

[0172] E2是丝氨酸或谷氨酸；

[0173] E3是精氨酸或赖氨酸；

[0174] E4是谷氨酰胺或赖氨酸；

[0175] E5是天冬氨酸或谷氨酸；

[0176] E6是谷氨酰胺、半胱氨酸或赖氨酸；

[0177] E7是半胱氨酸、赖氨酸或缺失；

[0178] R3是KRNRNNIA(SEQ ID NO:37)、GPSSGAPPPS(SEQ ID NO:38)或GPSSGAPPPSK(SEQ ID NO:39)；

[0179] R4是HSQGTFTSDYSKYLD(SEQ ID NO:40)、HSQGTFTSDYSRYLDK(SEQ ID NO:41)或HGEGTFTSDLSKQMEEEAVK(SEQ ID NO:42)；和

[0180] R5是KRNRNNIA(SEQ ID NO:37)、GPSSGAPPPS(SEQ ID NO:38)、GPSSGAPPPSK(SEQ ID NO:39)或缺失(排除式2到5的氨基酸序列等同于SEQ ID NO:3的氨基酸序列时的情况)。

[0181] 具体地，本发明的泌酸调节肽衍生物可以是以下式6的肽：

[0182] R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2 (式6)

[0183] 其中R1是组氨酸、脱氨基-组氨酰基、4-咪唑乙酰基或酪氨酸；

[0184] X1是AIB(氨基异丁酸)、甘氨酸、丝氨酸或D-丝氨酸；

[0185] X2是谷氨酸或谷氨酰胺；

[0186] X3是亮氨酸或酪氨酸；

[0187] X4是丝氨酸或丙氨酸；

[0188] X5是赖氨酸或精氨酸；

[0189] X6是谷氨酰胺或酪氨酸；

[0190] X7是亮氨酸或甲硫氨酸；

[0191] X8是天冬氨酸或谷氨酸；

[0192] X9是谷氨酸、α-甲基-谷氨酸或缺失；

[0193] X10是谷氨酰胺、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸或缺失；

[0194] X11是丙氨酸、精氨酸或缺失；

[0195] X12是丙氨酸、缬氨酸或缺失；

[0196] X13是赖氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、α-甲基-谷氨酸或缺失；

[0197] X14是天冬氨酸、谷氨酸、亮氨酸或缺失；

[0198] X15是苯丙氨酸或缺失；

[0199] X16是异亮氨酸、缬氨酸或缺失；

[0200] X17是丙氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、α-甲基-谷氨酸或缺失；

[0201] X18是色氨酸或缺失；

[0202] X19是丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸或缺失；

[0203] X20是丙氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、精氨酸或缺失；

[0204] X21是天冬酰胺或缺失；

[0205] X22是苏氨酸或缺失；

[0206] X23是半胱氨酸、赖氨酸或缺失；

[0207] X24是具有由甘氨酸组成的2到10个氨基酸的肽或者缺失；并且R2是KRNRNNIA(SEQ ID NO:37)、GPSSGAPPPS(SEQ ID NO:38)、GPSSGAPPPSK(SEQ ID NO:39)、HSQGTFTSDYSKYLD(SEQ ID NO:40)、HSQGTFTSDYSRYLDK(SEQ ID NO:41)、HGEGTFTSDLSKQMEEEAVK(SEQ ID NO:42)或缺失(排除式6的氨基酸序列等同于SEQ ID NO:3的氨基酸序列时的情况)。

[0208] 更具体地，本发明的泌酸调节肽衍生物可以选自SEQ ID NO:4到36的肽。

[0209] 泌酸调节肽具有两种肽——GLP-1和胰高血糖素——的活性。GLP-1降低血糖，减少食物摄取并抑制胃排空，而胰高血糖素升高血糖，促进脂解作用，并通过增加能量代谢降低体重。如果具有不同生物效应的两种肽存在于一个肽中并且这两种肽中的一种与另一种相比展示更强的显性效应，则可以产生不期望的作用。如果胰高血糖素与GLP-1相比展示更强的显性效应，则可以升高血糖。如果GLP-1与胰高血糖素相比展示更强的显性效应，则可以引起副作用比如恶心和呕吐。整体效力可以根据两种肽的活性比而改变。

[0210] 如本文所使用，术语“促胰岛素释放肽”指的是具有促胰岛素功能的肽，并且促胰岛素释放肽促进胰腺β细胞中胰岛素的合成和表达。促胰岛素释放肽的例子可以是胰高血

糖素样肽-1(GLP-1)、胰高血糖素样肽-2(GLP-2)、毒蜥外泌肽-3、毒蜥外泌肽-4、咪唑乙酰基(CA)毒蜥外泌肽-4或葡萄糖依赖性促胰岛素释放肽(GIP),但是不限于此——只要它具有促胰岛素功能。在本发明中使用的促胰岛素释放肽除了天然促胰岛素释放肽之外还包括所有其衍生物、变体和片段。其一般描述与上面的描述相同。

[0211] GLP-1、毒蜥外泌肽-3或毒蜥外泌肽-4、和其衍生物的描述包含在关于泌酸调节肽衍生物的韩国专利公布号10-2012-0137271(或WO2012-169798)和关于促胰岛素释放肽衍生物的韩国专利公布号10-2009-0008151(或WO2009-011544)中,其通过引用并入本文,但是不限于此。

[0212] 如本文所使用,术语"胰高血糖素"指的是升高血糖水平的肽激素。胰高血糖素的功能是在肝脏中将糖原降解为葡萄糖以升高血糖水平。

[0213] 同时,天然胰高血糖素可以具有如下序列。

[0214] His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(SEQ ID NO:52)

[0215] 进一步,在本发明中使用的胰高血糖素除了天然胰高血糖素之外还包括所有其衍生物、变体和片段。其一般描述与上面的描述相同。

[0216] 如本文所使用,术语"甲状旁腺激素(PTH)"指的是由甲状旁腺释放的激素,并且作用是增加血液中的钙浓度。关于甲状旁腺激素的氨基酸序列的信息可以从已知的数据库,比如美国国立卫生研究所的基因库(GenBank of the US National Institute of Health)获得。甲状旁腺激素除了天然甲状旁腺激素之外还包括所有其衍生物、变体和片段。

[0217] 如本文所使用,术语"降钙素"是调节血液中的钙浓度的甲状腺激素,并且其功能是降低血液中的钙浓度。关于降钙素的氨基酸序列的信息可以从已知的数据库,比如美国国立卫生研究所的基因库获得。降钙素除了天然降钙素之外还包括其所有衍生物、变体和片段。

[0218] 本发明的方法用于在不使用表面活性剂的情况下有效地增加生理活性蛋白或肽的溶解度。但是,为了进一步增加溶解度,可以使用表面活性剂。

[0219] 即,将表面活性剂加入到水溶液,并将生理活性蛋白或肽和免疫球蛋白Fc片段的长效缀合物封装在胶团中,从而进一步增加缀合物的溶解度。

[0220] 进一步,本发明的另一个方面涉及用于改善生理活性蛋白或肽的溶解度的组合物,其中该组合物包括免疫球蛋白Fc片段并因而与不包含免疫球蛋白Fc片段的组合物的溶解度相比展示改善的溶解度。

[0221] 在本文中,组合物包括生理活性蛋白或肽和免疫球蛋白Fc片段的缀合物,其中生理活性蛋白或肽作为活性成分经由肽连接体或非肽基连接体连接至免疫球蛋白Fc片段。

[0222] 在本发明的实施方式中,检查了通过将代表性的生理活性肽、胰岛素或泌酸调节肽与免疫球蛋白Fc缀合,在弱酸性pH下是否增加胰岛素或泌酸调节肽的溶解度。结果,与非缀合的形式相比,免疫球蛋白Fc片段缀合的形式显著地增加了胰岛素或泌酸调节肽的溶解度(表2和3、图2;以及表5和6、图4)。该结果建议,本发明的方法可以被用于改善肽或蛋白质的溶解度,并且具体而言,被用于显著地改善如此肽或蛋白质的溶解度:该肽或蛋白质在中性或弱酸性条件下具有非常低的溶解度并且因而包含其药学上有效浓度的制剂是困难的。

[0223] 在下文中，将参照下面的实施例更加详细地描述本发明。但是，这些实施例仅出于说明的目的，并且本发明不意欲由这些实施例限制。

[0224] 实施例1：胰岛素和长效胰岛素缀合物的溶解度的评估

[0225] (1)长效胰岛素缀合物的制备

[0226] 将胰岛素粉末溶于10mM HCl，然后与3.4K3-戊酮(propion)-ALD$_2$PEG(具有两个丙醛基团的PEG，NOF，日本)在4℃下以1:2的胰岛素:PEG的摩尔比和5mg/mL的胰岛素浓度反应大约2小时以PEG化(PEGlate)胰岛素B链的N末端。该反应在50mM柠檬酸钠(pH 5.0)和45％异丙醇中进行，并且将2mM至20mM的氰基硼氰化钠作为还原剂加入至反应中。反应溶液用SP HP(GE Healthcare)柱使用包含柠檬酸钠(pH 3.0)的缓冲液和KCl浓度梯度进行纯化。为了制备胰岛素-PEG-免疫球蛋白Fc片段缀合物，以大约1:1.2的摩尔比——具有20mg/mL的总蛋白浓度——在室温下使单-PEG化胰岛素和免疫球蛋白Fc片段反应大约13小时。就此而言，反应溶液为pH8.2的100mM HEPES和22mM磷酸钾，并且将20mM氰基硼氰化钠作为还原剂加入到反应中。

[0227] 在反应完成之后，将反应溶液首先穿过使用Tris-HCl(pH 7.5)缓冲液和NaCl浓度梯度的Q琼脂糖HP(GE Healthcare)柱，然后穿过使用Tris-HCl(pH 7.5)缓冲液和硫酸铵浓度梯度的Source 15ISO(GE Healthcare)柱，从而最终纯化胰岛素-PEG-免疫球蛋白Fc缀合物。

[0228] (2)胰岛素和长效胰岛素缀合物的溶解度的测试

[0229] 为了检查胰岛素和长效胰岛素缀合物的溶解度，根据下面表1中的组合物分别制备胰岛素和长效胰岛素缀合物的标准和测试材料。

[0230] 胰岛素和长效胰岛素缀合物的测试材料具有pH 6.0的醋酸缓冲溶液、作为非离子型表面活性剂的聚山梨醇酯、作为糖醇的甘露醇和作为等渗剂的氯化钠的组合物。根据表2和3中的定量值，在室温下溶解测试材料，将不完全溶解的胰岛素测试材料离心，并且仅上清液被收集并被用于溶解度测试。

[0231] 就此而言，作为胰岛素测试材料的理论定量值中的最大定量值，大约10mg/mL被测定，其是通过将100mg/mL的长效胰岛素缀合物转化为胰岛素获得的定量值。以最大定量值溶解的胰岛素测试材料被连续地稀释，并且胰岛素被完全溶解而无杂质或沉淀物的点(0.008mg/mL)被测定为最小定量值。

[0232] 胰岛素和长效胰岛素缀合物的各自的校准标准曲线首先通过反相高效液相色谱法(RP-HPLC)确认，如图1所示。通过将由反向色谱法确认的胰岛素和长效胰岛素缀合物测试材料的峰面积分别放入校准标准曲线来计算胰岛素和长效胰岛素缀合物的定量值。结果在表2和3以及图2中给出。

[0233] [表1]

[0234]

材料	溶解条件
胰岛素标准	溶解在HCl中，然后调节至pH 5.0
胰岛素测试材料	pH 6.0
长效胰岛素缀合物的标准和测试材料	pH 6.0

[0235] [表2]

[0236]

胰岛素	
理论定量值(mg/mL)	测量值(通过标准校准曲线计算的定量值)(mg/mL)
0.008	0.000
0.04	0.000
0.2	0.005
1	0.047
5	0.253
10	0.628

[0237] [表3]

[0238]

长效胰岛素缀合物(基于胰岛素)	
理论定量值(mg/mL)	测量值(通过标准校准曲线计算的定量值)(mg/mL)

[0239]

61.1	61.2
89	86.7
110	103.4
146	133.5

[0240] 如表2和3中所示，溶于长效胰岛素缀合物制剂缓冲液的长效胰岛素缀合物测试材料的定量值在理论值和测量值之间展示了微小差别，而溶于长效胰岛素缀合物制剂缓冲液的胰岛素测试材料的定量值在理论值和测量值之间展示了大的差别(多达大约16倍)。进一步，当胰岛素测试材料溶于长效胰岛素缀合物制剂缓冲液时，在除了0.008mg/mL之外的所有情况下，在离心后观察到了沉淀物。

[0241] 如结果中所示，通过被用作长效胰岛素缀合物的载体的免疫球蛋白Fc片段改善了溶解度。

[0242] 实施例2:泌酸调节肽和长效泌酸调节肽缀合物的溶解度的评估

[0243] (1)长效泌酸调节肽衍生物缀合物的制备

[0244] 将泌酸调节肽衍生物与MAL-10K-ALD PEG(NOF，日本)在4℃下以1:1的摩尔比和3mg/mL的泌酸调节肽衍生物浓度反应大约1小时以在SEQ ID NO:27——其是泌酸调节肽衍生物的氨基酸序列——的30位的半胱氨酸残基处PEG化MAL-10K-ALD PEG。该反应在50mM Tris(pH 7.5)和60％异丙醇中进行。在反应完成之后，将反应溶液施加至使用柠檬酸钠(pH 3.0)缓冲液和KCl浓度梯度的SP HP(GE healthcare，瑞典)柱以纯化在半胱氨酸处单-PEG化的泌酸调节肽衍生物。

[0245] 然后，将如此纯化的单-PEG化的泌酸调节肽衍生物和免疫球蛋白Fc以1:4的摩尔比——具有20mg/mL的总蛋白水平——在4℃下反应大约16小时。就此而言，反应溶液为pH 6.0的100mM磷酸钾，并且将20mM SCB钠作为还原剂加入到反应溶液。在反应完成之后，首先

将反应溶液穿过使用Bis-Tris缓冲液和NaCl浓度梯度的丁基琼脂糖FF(GE Healthcare,瑞典)柱,然后穿过使用柠檬酸钠缓冲液和硫酸铵浓度梯度的Source ISO(GE Healthcare,瑞典)柱,从而最终纯化泌酸调节肽衍生物-PEG-免疫球蛋白Fc缀合物。

[0246] (2)泌酸调节肽和长效泌酸调节肽缀合物的溶解度的测试

[0247] 为了检查SEQ ID NO:27的泌酸调节肽衍生物和长效泌酸调节肽衍生物缀合物的溶解度,根据下面表4中的组合物分别制备泌酸调节肽衍生物和长效泌酸调节肽衍生物缀合物的标准和测试材料。

[0248] 泌酸调节肽衍生物和长效泌酸调节肽衍生物缀合物的测试材料具有pH 5.6的柠檬酸盐缓冲溶液、作为非离子型表面活性剂的聚山梨醇酯、作为糖醇的甘露醇和甲硫氨酸的组合物。根据表5和6中的定量值,在室温下溶解测试材料,将不完全溶解的泌酸调节肽衍生物测试材料离心,并且仅上清液被收集并被用于溶解度测试。

[0249] 就此而言,作为泌酸调节肽衍生物测试材料的理论定量值中的最大定量值,大约5mg/mL被测定,其是通过将80mg/mL的长效泌酸调节肽衍生物缀合物转化为泌酸调节肽衍生物获得的定量值。以最大定量值溶解的泌酸调节肽衍生物测试材料被连续地稀释,并且胰岛素被完全溶解而无杂质或沉淀物的点(0.008mg/mL)被测定为最小定量值。

[0250] 泌酸调节肽衍生物和长效泌酸调节肽衍生物缀合物的各自的校准标准曲线首先通过反相色谱法确认,如图3所示。通过将由反向色谱法确认的泌酸调节肽衍生物和长效泌酸调节肽衍生物缀合物测试材料的峰面积分别放入校准标准曲线来计算泌酸调节肽衍生物和长效泌酸调节肽衍生物缀合物的定量值。

[0251] [表4]

[0252]

材料	溶解条件
泌酸调节肽衍生物标准	pH 7.5,60%异丙醇
泌酸调节肽衍生物测试材料	pH 5.6
长效泌酸调节肽衍生物缀合物的标准和测试材料	pH 5.6

[0253] [表5]

[0254]

泌酸调节肽衍生物	
理论定量值(mg/mL)	测量值(通过标准校准曲线计算的定量值)(mg/mL)
0.008	0.000
0.04	0.000
0.2	0.002
1	0.014
5	0.188

[0255] [表6]

[0256]

长效泌酸调节肽衍生物缀合物	
理论定量值(mg/mL)	测量值(通过标准校准曲线计算的定量值)(mg/mL)
10	9.6
40	40.5
90	88.0
160	145.8

[0257] 如表5和6以及图4中所示，溶于长效泌酸调节肽缀合物制剂缓冲液的长效泌酸调节肽衍生物缀合物测试材料的定量值在理论值和测量值之间展示了微小差别，而溶于长效泌酸调节肽缀合物制剂缓冲液的泌酸调节肽衍生物测试材料的定量值在理论值和测量值之间展示了大的差别(多达大约27倍)。进一步，当泌酸调节肽衍生物测试材料溶于长效泌酸调节肽缀合物制剂缓冲液时，在除了0.008mg/mL之外的所有情况下，在离心后观察到了沉淀物。如结果中所示，通过被用作长效泌酸调节肽衍生物缀合物的载体的免疫球蛋白Fc片段改善了泌酸调节肽衍生物的溶解度。

[0258] 这些结果表明被用作本发明的生理活性蛋白或肽的载体的免疫球蛋白Fc片段能够有效地改善蛋白质或肽的溶解度。

[0259] 基于上述描述，本领域技术人员将理解，本发明可以以不同的具体形式实施而不改变其技术精神或本质特征。因此，应当理解，上述实施方式在所有方面都不是限制性的，而是说明性的。本发明的范围由所附权利要求书限定而不是由说明书限定，并且因此落入权利要求书的边界和界限，或这些边界或界限的等价物内的所有改变或修改意欲由权利要求书包括。

<110> 韩美药品株式会社

<120> 通过使用免疫球蛋白Fc片段连接改善蛋白质和肽的溶解度的方法

<130> OPA15058

<150> KR 10-2014-0038032
<151> 2014-03-31

<160> 52

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 胰岛素α链

<400> 1
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15

[0001] Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 2
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 胰岛素β链

<400> 2
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
20 25 30

<210> 3
<211> 37
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽

<400> 3

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 4
<211> 37
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<400> 4
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

[0002] Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 5
<211> 39
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<400> 5
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Ala Trp Leu Lys Asn Thr Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 6
<211> 39
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<400> 6
Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 7
<211> 39
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

[0003]

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<400> 7
Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 8
<211> 42
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)

<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<400> 8
Xaa Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala His Ser Gln Gly Thr
20 25 30

Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp
35 40

<210> 9
<211> 30
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<400> 9
[0004] Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys
20 25 30

<210> 10
<211> 29
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<400> 10
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Lys
20 25

<210> 11

<211> 37
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<220>
<221> 变体
<222> (20)
<223> Xaa = α-甲基-谷氨酸

<400> 11
Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

[0005]

<210> 12
<211> 40
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<400> 12
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
35 40

<210> 13
<211> 43
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<400> 13
Xaa Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala His Ser Gln Gly Thr
20 25 30

Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Lys
35 40

<210> 14
<211> 38
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

[0006]

<400> 14
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Gly
1 5 10 15

Gly Gly His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met
20 25 30

Glu Glu Glu Ala Val Lys
35

<210> 15
<211> 30
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<220>
<221> 变体

<222> (16)
<223> Xaa = α-甲基-谷氨酸

<220>
<221> 变体
<222> (20)
<223> Xaa = α-甲基-谷氨酸

<400> 15
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Xaa
1 5 10 15

Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys
20 25 30

<210> 16
<211> 37
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
[0007] <223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<220>
<221> 变体
<222> (20)
<223> Xaa = α-甲基-谷氨酸

<220>
<221> 变体
<222> (24)
<223> Xaa = α-甲基-谷氨酸

<400> 16
Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Xaa Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 17

<211> 37
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<220>
<221> 变体
<222> (24)
<223> Xaa = α-甲基-谷氨酸

<400> 17
Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Xaa Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

[0008]

<210> 18
<211> 34
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<400> 18
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gly Gly His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu
20 25 30

Glu Lys

<210> 19
<211> 37
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<400> 19
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 20
<211> 40
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

[0009]

<400> 20
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
35 40

<210> 21
<211> 37
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<400> 21
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 22
<211> 40
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<400> 22
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Gly Gly Pro Ser
[0010] 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
35 40

<210> 23
<211> 37
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<400> 23
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Val Arg Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 24
<211> 30
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是脱氨基-组氨酰基

<400> 24
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys
20 25 30

<210> 25
<211> 29
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
[0011] <222> (2)
<223> Xaa = 氨基异丁酸

<400> 25
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 26
<211> 30
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (2)
<223> Xaa = 氨基异丁酸

<400> 26
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
20 25 30

<210> 27
<211> 30
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (2)
<223> Xaa = 氨基异丁酸

<400> 27
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
20 25 30

<210> 28
<211> 30
<212> PRT
[0012] <213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (2)
<223> Xaa = 氨基异丁酸

<400> 28
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
20 25 30

<210> 29
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体

<223> Xaa = 氨基异丁酸

<400> 29
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Cys Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 30
<211> 29
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (2)
<223> Xaa = 氨基异丁酸

<400> 30
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
[0013] 1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 31
<211> 37
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (2)
<223> Xaa是d-丝氨酸。

<400> 31
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 32
<211> 37
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<400> 32
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 33
<211> 37
<212> PRT
<213> 泌酸调节肽衍生物

[0014]

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<220>
<221> 变体
<222> (2)
<223> Xaa是d-丝氨酸。

<400> 33
Xaa Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 34
<211> 30
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (1)
<223> Xaa是4-咪唑乙酰基。

<220>
<221> 变体
<222> (2)
<223> Xaa = 氨基异丁酸

<400> 34
Xaa Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
20 25 30

[0015] <210> 35
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (2)
<223> Xaa = 氨基异丁酸

<400> 35
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
20 25 30

<210> 36
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 泌酸调节肽衍生物

<220>
<221> 变体
<222> (2)
<223> Xaa = 氨基异丁酸

<400> 36
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
20 25 30

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> R2组

[0016]

<400> 37
Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala
1 5

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> R2组

<400> 38
Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10

<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> R2组

<400> 39
Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
1 5 10

<210> 40
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> R2组

<400> 40
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 41
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

[0017]

<220>
<223> R2组

<400> 41
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Lys
1 5 10 15

<210> 42
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> R2组

<400> 42
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Lys
20

<210> 43
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A或B组

<400> 43
Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg
1 5 10 15

Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 44
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A或B组

[0018]

<400> 44
Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Glu
1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 45
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A或B组

<400> 45
Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg
1 5 10 15

Arg Ala Gln Asp Phe Val Ala Trp Leu Lys Asn Thr
20 25

<210> 46
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A或B组

<400> 46
Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Glu Glu Glu
1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly
20 25

<210> 47
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A或B组

<400> 47
[0019] Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu
1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly
20 25

<210> 48
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A或B组

<400> 48
Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu
1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala
20 25

<210> 49
<211> 28
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> A或B组

<400> 49
Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu
1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Gly
20 25

<210> 50
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> B组

<400> 50
Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu
1 5 10 15

[0020]

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp
20

<210> 51
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> B组

<400> 51
Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp
1 5 10

<210> 52
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

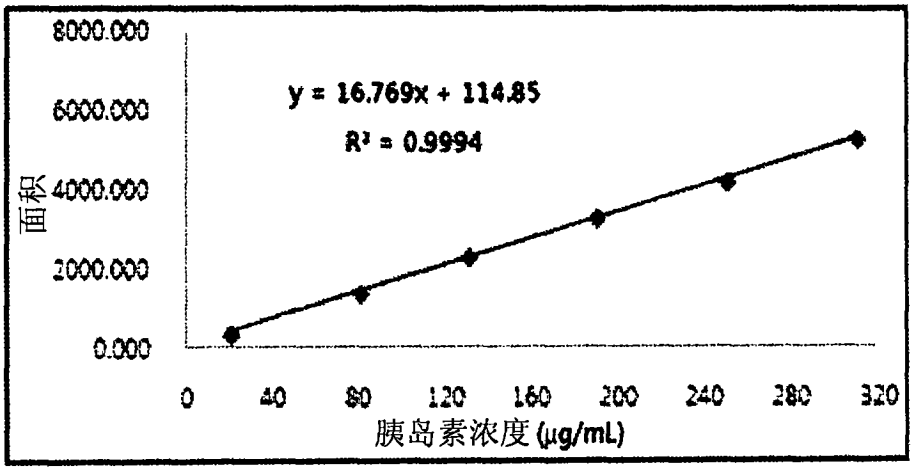
<220>
<223> 胰高血糖素

[0021]

<400> 52
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

胰岛素的标准校准曲线



长效胰岛素缀合物的标准校准曲线

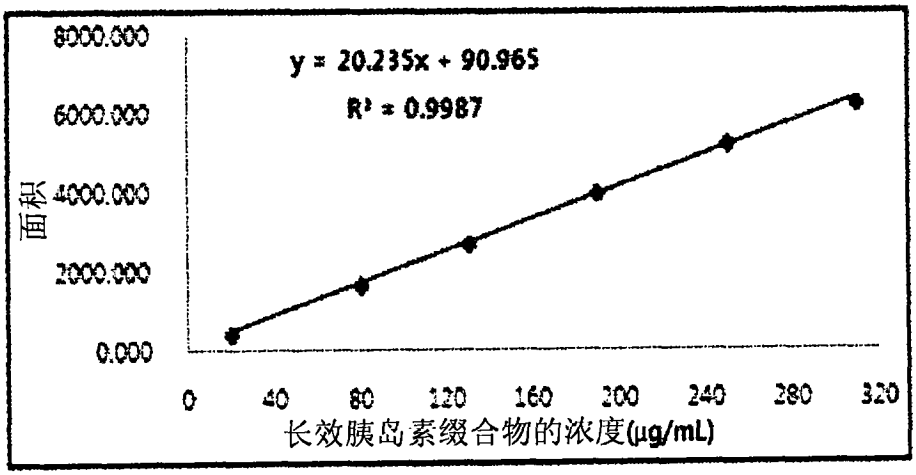


图1

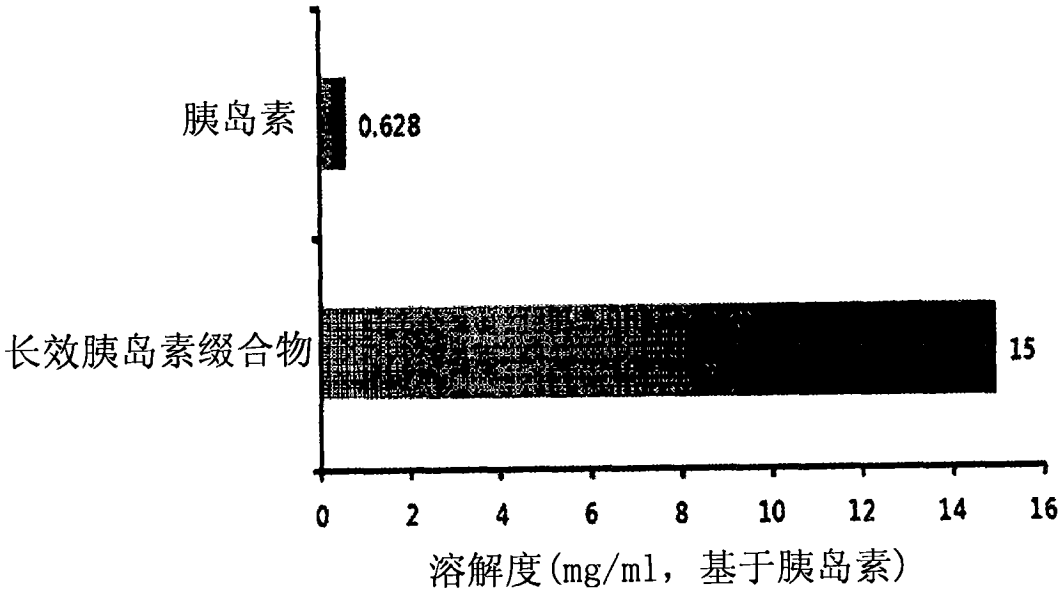
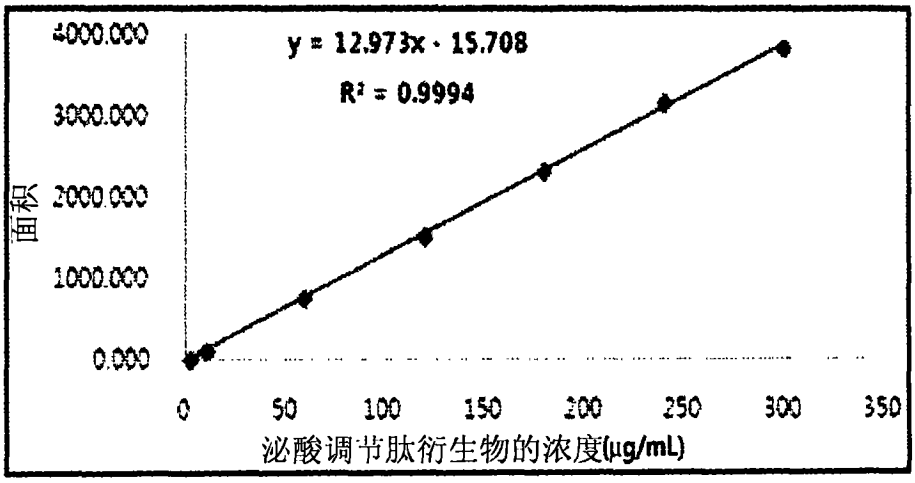


图2

泌酸调节肽衍生物的标准校准曲线



长效泌酸调节肽衍生物缀合物的标准校准曲线

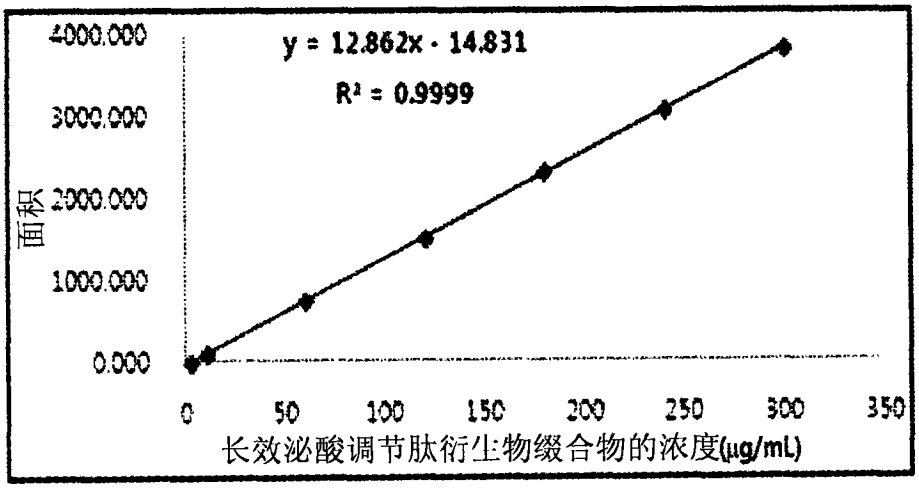


图3

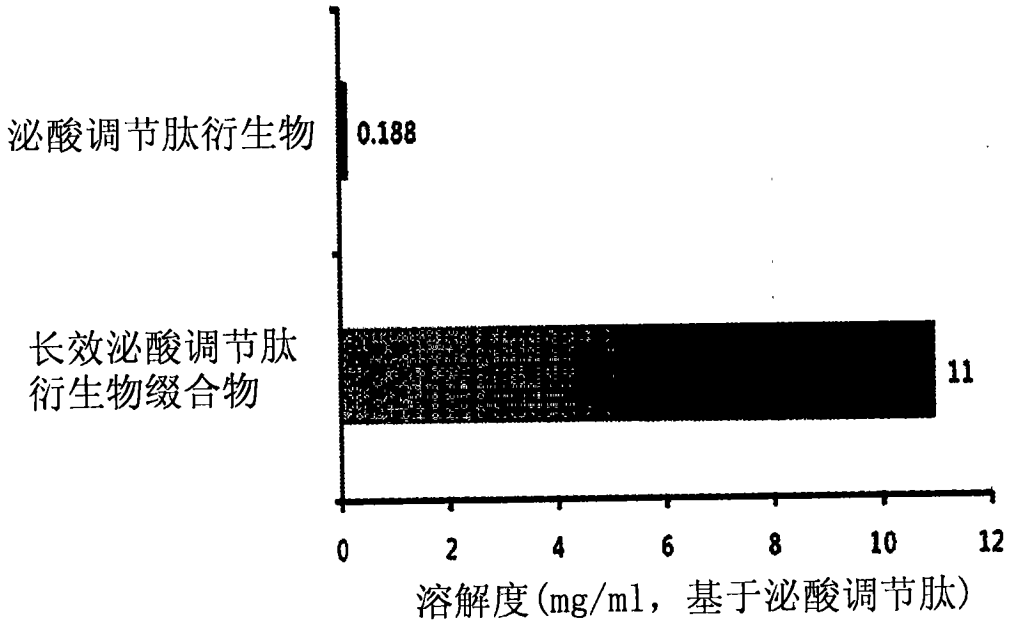

泌酸调节肽衍生物
0.188
长效泌酸调节肽
衍生物缀合物
11
0
2
4
6
8
10
12
溶解度(mg/ml，基于泌酸调节肽)

图4