



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101809032 A

(43) 申请公布日 2010.08.18

(21) 申请号 200880108349.X

C07K 5/093 (2006.01)

(22) 申请日 2008.08.25

(30) 优先权数据

60/957732 2007.08.24 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.03.23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/061082 2008.08.25

(87) PCT申请的公布数据

W02009/027369 EN 2009.03.05

(71) 申请人 诺沃 - 诺迪斯克有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 J·布查特 N·兰格兰约翰森

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 权陆军 付磊

(51) Int. Cl.

C07K 14/61 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 44 页 序列表 3 页
附图 2 页

(54) 发明名称

用于选择性修饰蛋白质的方法

(57) 摘要

总的来说,本发明涉及对蛋白质引入性质修饰基团的新方法。具体地,本发明涉及赖氨酸残基的衍生,以及具有改良的药理学性质的生长激素的新缀合物,和用于其制备和在治疗中使用的方法。

1. 一种用于蛋白质的位点选择性修饰的方法,所述方法包括:使所述蛋白质与辅助蛋白质和具有下式的性质修饰基团接触:R1-Gln-Gly-R2。

2. 根据权利要求1的方法,其中R1和R2是适合于进一步修饰的基团。

3. 根据权利要求2的方法,其中R1包含芳族或杂芳族基团。

4. 根据权利要求3的方法,其中R1是苯甲氧甲酰基($\text{PhCH}_2\text{OC}=\text{O}$)。

5. 根据权利要求4的方法,其中R2是适合于进一步修饰的基团。

6. 根据权利要求5的方法,其中R2是包含选自下述的官能团的基团: $-\text{CHO}$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $\text{Ar}-\text{NH}_2$ 、炔基、叠氮基、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{CHX}-\text{CH}_2\text{Y}$ 或 $-\text{CHY}-\text{CH}_2\text{X}$ (其中X是O或N和Y是O)、缩醛或不同潜在醛、 $-\text{SH}$ 、 $\text{Z}-\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ (其中Z是Cl、Br或I)。

7. 根据权利要求6的方法,其中R2是包含选自下述的官能团的基团: $-\text{CHO}$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $\text{Ar}-\text{NH}_2$ 、炔基、叠氮基、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{CHX}-\text{CH}_2\text{Y}$ 或 $-\text{CHY}-\text{CH}_2\text{X}$ (其中X是O或N和Y是O)、缩醛或不同潜在醛、 $-\text{SH}$ 、 $\text{Z}-\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ (其中Z是Cl、Br或I)。

8. 根据权利要求1-7中任一项的方法,其中所述蛋白质是细胞因子。

9. 根据权利要求1-7的方法,其中所述蛋白质属于4-螺旋束蛋白质种类。

10. 根据权利要求1-9中任一项的方法,其中所述蛋白质是hGH。

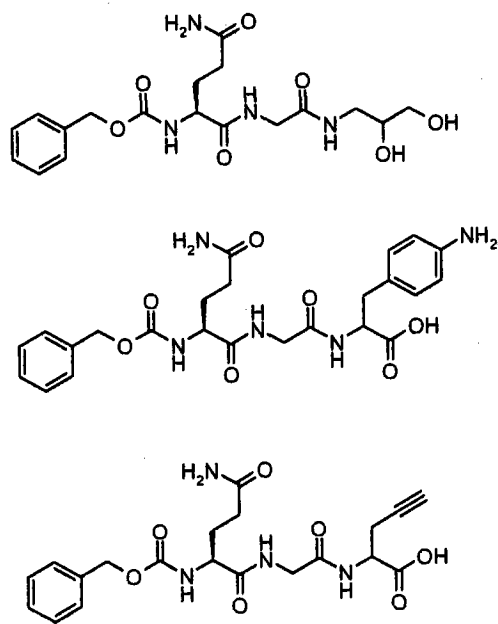
11. 根据权利要求1-10中任一项的方法,其中所述辅助蛋白质是修饰谷氨酰胺残基的酶。

12. 根据权利要求1-11中任一项的方法,其中所述辅助蛋白质是转谷氨酰胺酶。

13. 根据权利要求12的方法,其中所述转谷氨酰胺酶是来自茂原链霉菌的微生物转谷氨酰胺酶。

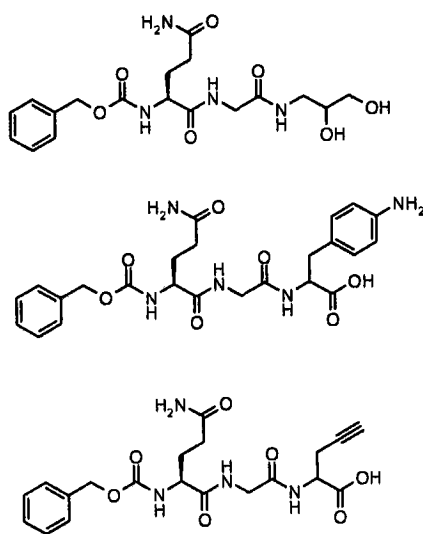
14. 根据权利要求13的方法,其中所述转谷氨酰胺酶是具有80%或更多序列同源性的来自茂原链霉菌的微生物转谷氨酰胺酶突变体。

15. 根据权利要求2的方法,其中所述性质修饰基团选自:



16. 一种用于生长激素的位点选择性修饰的方法,所述方法包括使所述蛋白质与辅助蛋白质和具有下式的性质修饰基团接触:R1-Gln-Gly-R2。

17. 根据权利要求 16 的方法, 其中 R1 和 R2 是适合于进一步修饰的基团。
18. 根据权利要求 17 的方法, 其中 R1 包含芳族或杂芳族基团。
19. 根据权利要求 18 的方法, 其中 R1 是苯甲氧甲酰基 (PhCH₂OC = O)。
20. 根据权利要求 19 的方法, 其中 R2 是适合于进一步修饰的基团。
21. 根据权利要求 20 的方法, 其中 R2 是包含选自下述的官能团的基团: -CHO、-ONH₂、Ar-NH₂、炔基、叠氮基、-NHNH₂、-CHX-CH₂Y 或 -CHY-CH₂X (其中 X 是 O 或 N 和 Y 是 O)、缩醛或不同潜在醛、-SH、Z-CH₂C = O (其中 Z 是 Cl、Br 或 I)。
23. 根据权利要求 22 的方法, 其中 R2 是包含选自下述的官能团的基团: -CHO、-ONH₂、Ar-NH₂、炔基、叠氮基、-NHNH₂、-CHX-CH₂Y 或 -CHY-CH₂X (其中 X 是 O 或 N 和 Y 是 O)、缩醛或不同潜在醛、-SH、Z-CH₂C = O (其中 Z 是 Cl、Br 或 I)。
24. 根据权利要求 16 的方法, 其中所述生长激素是人生长激素。
25. 根据权利要求 16 的方法, 其中所述辅助蛋白质是转谷氨酰胺酶。
26. 根据权利要求 25 的方法, 其中所述转谷氨酰胺酶是来自茂原链霉菌的微生物转谷氨酰胺酶。
27. 根据权利要求 26 的方法, 其中所述转谷氨酰胺酶是具有 80% 或更多序列同源性的来自茂原链霉菌的微生物转谷氨酰胺酶突变体。
28. 根据权利要求 16 的方法, 其中所述性质修饰基团选自:



29. 根据权利要求 16 的方法, 其中所述人生长激素在赖氨酸残基处进行修饰。
30. 根据权利要求 29 的方法, 其中所述人生长激素在赖氨酸 145 处进行修饰。
31. 根据权利要求 30 的方法, 其中所述人生长激素在赖氨酸 145 处进行修饰, 并且随后与和 hGH 相比较延长缀合物的体内半衰期的延长基团缀合。
32. 根据权利要求 15 的方法, 其中所述延长基团是亲水聚合物。
33. 根据权利要求 31 的方法, 其中所述延长基团是 PEG。
34. 根据权利要求 31 的方法, 其中所述延长基团包含与清蛋白可逆结合的部分。
35. 根据权利要求 31 的方法, 其中所述延长基团包含脂肪酸残基或脂肪二酸残基。

用于选择性修饰蛋白质的方法

发明领域

[0001] 总的来说,本发明涉及对蛋白质引入性质修饰基团的新方法。具体地,本发明涉及赖氨酸残基的衍生,以及具有改良的药理学性质的生长激素的新缀合物,和用于其制备和在治疗中使用的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 众所周知通过使基团与蛋白质缀合修饰蛋白质的性质和特征,以改变蛋白质的性质。事实上,超过 20 年前,美国专利号 4,179,337 教导了与聚乙二醇或聚丙二醇缀合的蛋白质。一般地,此种缀合一般需要蛋白质中的某一官能团以与缀合基团中的另一种官能团反应。一般地,氨基例如 N 末端氨基或在赖氨酸中的 ϵ -基团,已与合适的酰化试剂组合使用。经常希望或甚至需要能够控制缀合反应,即控制缀合化合物在何处附着且控制附着多少个缀合基团。这经常称为特异性或选择性。

[0004] 然而,选择性化学反应谱 (repertoire) 非常有限。替代方案是通过重组方法引入具有独特反应性的特定非天然氨基酸,并且随后在进一步的衍生中利用这种反应性。替代方案是使用识别待修饰蛋白质的结构和功能特征的酶。这个的例子是微生物转谷氨酰胺酶 (mTGase) 的使用,以选择性修饰生长激素中的 Gln 残基。具体地,转谷氨酰胺酶已在食品工业且特别在乳制品厂工业中用于交叉结合蛋白质。其他文件公开了转谷氨酰胺酶改变生理学活性蛋白质的性质的用途。参见例如 EP950665, EP 785276 和 Sato, Adv. Drug Delivery Rev., 54, 487-504 (2002), 其公开了在转谷氨酰胺酶的存在下在包括至少一个 Gln 的蛋白质和氨基官能化 PEG 或相似配体之间的直接反应;还参见 Wada 在 Biotech. Lett., 23, 1367-1372 (2001) 中,其公开了借助于转谷氨酰胺酶 β -乳球蛋白与脂肪酸的直接缀合。通过转谷氨酰胺酶催化的反应是其中谷氨酰胺残基的伯酰胺 (primary amide) 从反应混合物中存在的伯胺转化成仲酰胺的转酰胺基反应,如图 1 中所示。

[0005] 然而,蛋白质的选择性衍生是非常困难的任务;蛋白质中的赖氨酸通过酰化进行衍生是甚至更加固有的非选择性过程。因此,目前不存在用于赖氨酸残基选择性衍生的有效方法。因此,本领域中迫切需要用于选择性衍生蛋白质或目的多肽中的氨基酸残基例如赖氨酸的方法。

[0006] 附图简述

[0007] 图 1 描述了通过 TGase 催化的一般反应。

[0008] 图 2 描述了本发明的一般反应,也称为“反向 TGase”。

[0009] 图 3 描述了如实施例 1 中所述的人生长激素的修饰。

[0010] 图 4 详细描述了 TGase 介导的转酰胺基作用的机制。

[0011] 发明详述

[0012] 本发明通过提供这样的方法解决了这些需要,所述方法经由辅助蛋白质以更选择性的方式将性质修饰基团引入靶蛋白质中,同时使用常规化学方法。一般而言该方法可以如下描述:首先,形成辅助蛋白质和性质修饰基团之间的活化复合物;其次,以比通过常规方法可以达到的那种更加选择性的方式,将修饰基团从活化复合物转移到待修饰的蛋白

质,且从而导致“修饰的蛋白质”。同样,如本文所使用的,“修饰的蛋白质”指已通过本发明的方法选择性修饰的蛋白质或多肽。

[0013] 具体地,本发明涉及包括含至少 2 个赖氨酸的蛋白质与性质修饰基团的转谷氨酰胺酶催化的反应的方法。性质修饰基团是式 R1-Gln-Gly-R2 的含谷氨酰胺-甘氨酸的蛋白质。具体地,在这个方法中,通过使性质修饰基团中的谷氨酰胺残基与 TGase 反应形成活化酰基复合物,以附着性质修饰基团。在优选实施方案中,性质修饰基团通过酰化转移给靶蛋白质中的赖氨酸残基,如图 2 中所述。在一个实施方案中,R1 和 R2 都是所需取代基,其中至少一个包括适合于进一步修饰的化学基团。因此,本发明涉及“反向”TGase 反应,以选择性修饰在靶蛋白质内的赖氨酸残基。

[0014] 如本文所使用的,术语“多肽”指通过肽键连接的氨基酸残基聚合物,无论是天然还是合成产生的。小于约 10 个氨基酸残基的多肽通常称为“肽”。术语“肽”意指通过肽键连接的 2 个或更多氨基酸的序列,其中所述氨基酸可以是天然或非天然的。该术语包含术语多肽和蛋白质,这可以由通过共价相互作用或非共价相互作用结合在一起的 2 个或更多肽组成,所述共价相互作用例如半胱氨酸桥。“蛋白质”是包括一条或多条多肽链的大分子。蛋白质还可以包括非肽组分,例如碳水化合物基团。碳水化合物和其他非肽取代基通过其中产生蛋白质的细胞可以加入蛋白质中,并且将随着细胞类型而改变。蛋白质在本文中就其氨基酸主链结构而言进行定义;取代基例如碳水化合物基团一般并未指定,但仍可以存在。由非宿主 DNA 分子编码的蛋白质或多肽是“异源”蛋白质或多肽。“分离的多肽”是基本上不含在自然界中与多肽结合的污染细胞组分的多肽,所述污染细胞组分例如碳水化合物、脂质或其他蛋白质杂质。一般地,分离的多肽制剂包含高度纯化形式的多肽,即至少约 80%纯、至少约 90%纯、至少约 95%纯、超过 95%纯,例如 96%、97%或 98%或更高纯,或超过 99%纯。显示具体蛋白质制剂包含分离的多肽的一种方法是通过在蛋白质制剂的十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳和凝胶的考马斯亮蓝染色后单个条带的出现。然而,术语“分离的”不排除可选择的物理形式的相同多肽的存在,例如二聚体或可选择地糖基化或衍生形式。术语“氨基末端”和“羧基末端”在本文中用于指在多肽内的位置。当上下文允许时,这些术语关于多肽的特定序列或部分用于指接近或相对位置。例如,置于多肽内的参考序列羧基末端的特定序列定位接近于参考序列的羧基末端,但不一定在完整多肽的羧基末端处。

[0015] 本发明的辅助蛋白质

[0016] 本发明的一个方面涉及使用辅助蛋白质用于选择性修饰靶蛋白质的方法。在优选实施方案中,辅助蛋白质是酶例如转谷氨酰胺酶。转谷氨酰胺酶(在本文中也可互换地称为“TGase”)也称为蛋白质-谷氨酰胺- γ -谷氨酰转移酶,并且催化蛋白质或蛋白质链中的谷氨酰胺(Gln)残基的 γ -羧酰胺基(carboxyamido)和赖氨酸(Lys)残基的 ϵ -氨基或各种烷基胺之间的酰基转移反应,如图 1 中所示。TGase 在各种动物组织、血细胞、血浆等中以各种分子形式广泛发现。这种酶催化通过 ϵ -(γ -谷氨酰)赖氨酸-同工蛋白质键的交联反应,和在血液凝固的最后一个步骤中交联血纤蛋白分子,并且发现它涉及表皮细胞的角质化、精液凝固、创伤组织愈合等。因为转谷氨酰胺酶对 Gln 残基具有非常高的底物特异性,所以可能仅在蛋白质中的特定 Gln 残基可以用烷基胺修饰。例如,使用源于豚鼠肝脏的转谷氨酰胺酶(TGase),将具有末端糖单位的烷基胺引入 β -酪蛋白内的其一个或多个特

定 Gln 残基处 (Yan, S. C. B. 等人, (1984) *Biochemistry*, 23, 3759-3765)。此外, 使用血液凝固因子 XIII (因子 XIII)——在血浆中发现的转谷氨酰胺酶, 将更低分子量的精胺衍生物引入载脂蛋白 B 内的其一个或多个 Gln 残基处 (Cocuzzi, E. 等人, (1990), *Biochem. J.*, 265, 707-713)。

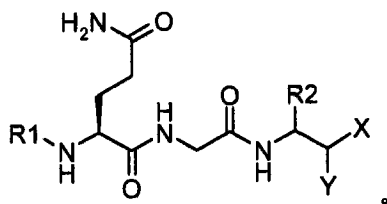
[0017] 在本发明的方法中使用的转谷氨酰胺酶可以得自各种来源, 无具体限制, 例如得自各种动物组织、血浆组分和微生物。有用的转谷氨酰胺酶的例子包括微生物转谷氨酰胺酶, 例如来自茂原链霉菌 (*Streptomyces mobaraense*)、肉桂链霉菌 (*Streptomyces cinnamomeus*) 和灰肉色链霉菌 (*Streptomyces griseocarneus*) (全部公开于引入本文作为参考的 US 5, 156, 956 中), 以及淡紫灰链霉菌 (*Streptomyces lavendulae*) (公开于引入本文作为参考的 US 5, 252, 469 中) 和拉达卡链霉菌 (*Streptomyces ladakanus*) (引入本文作为参考的 JP2003199569)。应当指出, 以前的链轮丝菌属 (*Streptovorticillium*) 成员目前包括在链霉菌属 (*Streptomyces*) 中 [Kaempfer, J. *Gen. Microbiol.*, 137, 1831-1892, 1991]。其他有用的微生物转谷氨酰胺酶已从枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) (公开于引入本文作为参考的 US 5, 731, 183 中) 和各种黏菌中分离。有用的微生物转谷氨酰胺酶的其他例子是公开于 WO 96/06931 (例如来自 *Bacillus lydicus* 的转谷氨酰胺酶) 和 WO 96/22366 中的那些, 所述 2 个专利申请都引入本文作为参考。有用的非微生物转谷氨酰胺酶包括豚鼠肝转谷氨酰胺酶和来自各种海洋来源的转谷氨酰胺酶, 所述海洋来源如比目鱼真鲷 (*Pagrus major*) (公开于引入本文作为参考的 EP-0555649 中) 和日本牡蛎太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) (公开于引入本文作为参考的 US 5, 736, 356 中)。

[0018] 因此, 在优选实施方案中, 在本发明的方法中使用的 TGase 是微生物转谷氨酰胺酶。在更优选的实施方案中, TGase 来自茂原链霉菌。在另一个实施方案中, TGase 是与天然 TGase 具有至少 80% 序列同源性的突变 TGase。

[0019] 性质修饰基团

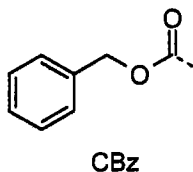
[0020] 本发明的性质修饰基团包含通式 R1-Gln-Gly-R2 的含谷氨酰胺蛋白质。在更优选的实施方案中, 性质修饰基团具有下式:

[0021]



[0022] 在优选实施方案中, R1 是

[0023]



[0024] 在另一个实施方案中, R1 是 CBz; R2 选自 H、炔丙基或 4-氨基苄基; Y 是 OH 或 = O; 和 X 是 CH₂OH 或 OH。

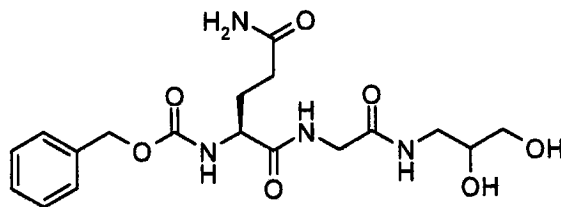
[0025] 在另外一个实施方案中, R1 是 CBz ;R2 是 H ;Y 是 OH ;和 X 是 CH₂OH。

[0026] 在另外一个实施方案中, R1 是 CBz ;R2 是 4- 氨基苄基 ;Y 是 = O ;和 X 是 OH。

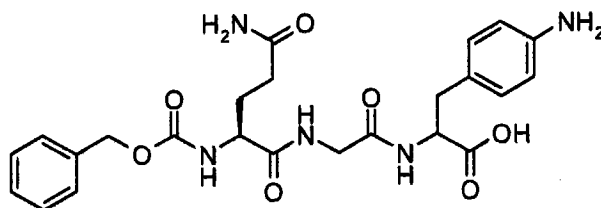
[0027] 在另一个实施方案中, R1 是 CBz ;R2 是炔丙基 ;Y 是 = O ;和 X 是 OH。

[0028] 因此,本发明的优选性质修饰基团 (或底物) 选自 :

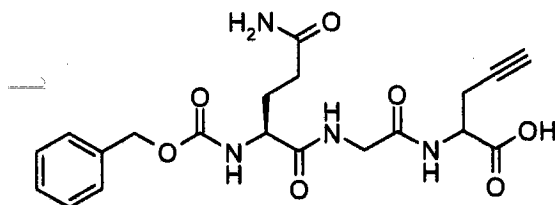
[0029]



[0030]



[0031]



[0032] 本发明的方法

[0033] 用于修饰本发明的靶蛋白质 (即目的蛋白质) 的需要可能由于许多原因而出现, 并且这也在可以根据本发明的方法选择性修饰的化合物种类中反映。

[0034] 总的来说,本发明的方法包括包含至少 2 个赖氨酸的蛋白质与式 R1-Gln-Gly-R2 的含谷氨酰胺和甘氨酸肽的转谷氨酰胺酶催化的反应。该方法由下述步骤组成 : (a) 通过肽合成制备式 R1-Gln-Gly-R2 的化合物, 并且如本领域已知的纯化 ; (b) 使过量的这种化合物 R1-Gln-Gly-R2 与包含至少一个赖氨酸且优选超过一个赖氨酸的靶蛋白质在任选包含有机溶剂、去污剂或其他改性剂的水缓冲液中混合 ; (c) 向这种混合物中加入催化量的转谷氨酰胺酶, 优选来自茂原链霉菌的微生物转谷氨酰胺酶 (允许反应进行所需时间量) ; (d) TGase 抑制剂可以任选加入混合物中 ; (e) 对混合物实施纯化过程, 一般包括单元操作例如超滤或渗滤和层析 (离子交换、尺寸排阻、疏水作用等)。以这种方式, 获得选择性修饰的蛋白质。蛋白质通过标准蛋白质分析法进行表征, 包括层析、电泳、肽作图和质谱分析法。任选地, 在步骤 (b) 或 (c) 后, 修饰的蛋白质可以经由 R1 或 R2 的官能团进行进一步修饰。

[0035] 具体地, 作为 TGase 介导的转酰胺基作用机制的部分, 通过 TGase 活性位点中的 Cys 和 Gln- 底物之间的反应形成分子间硫酯 (参见图 4)。术语“转酰胺基作用”意指在其中谷氨酰胺侧链中的氮与来自另一种化合物的氮, 特别是来自另一种含氮亲核体的氮交换的反应。这种中间体可以视为活化的 Gln 残基, 活性种类是 TGase- 硫酯, 其与胺例如蛋白质赖氨酸残基反应。反应的选择性是下述的结果 : 1) 在与具有 Lys 的蛋白质底物相互作用时, TGase- 硫酯的剪切立体体积, 和 2) 在 TGase- 硫酯和具有 Lys 的蛋白质底物之间更限

定的非共价相互作用。这个的直接结果是携带活化的酰基的蛋白质——酰基-X-蛋白质包括在本发明中,其中X是使酰基朝向通过蛋白质-赖氨酸胺的亲核攻击活化的原子或基团。

[0036] 因此,可能希望修饰蛋白质以改变蛋白质的物理化学性质,例如以增加(或减少)可溶性以修饰治疗蛋白质的生物利用率。在另一个实施方案中,可能希望通过使化合物与蛋白质缀合修饰在身体中的清除率,所述化合物与血浆蛋白质例如清蛋白结合,或增加蛋白质的大小以阻止或延迟通过肾的排出。缀合还可以改变且特别是减少蛋白质对水解例如在体内的蛋白酶解的易感性。在另一个实施方案中,可能希望缀合标记以促进蛋白质的分析。此种标记的例子包括放射性同位素、荧光标记和酶底物。在另外一个实施方案中,使化合物与蛋白质缀合,以促进蛋白质的分离。例如,对具体柱材料具有特定亲和力的化合物可以与蛋白质缀合。还可能希望修饰蛋白质的免疫原性,例如通过缀合蛋白质,以便隐藏、掩蔽或遮蔽在蛋白质上的一个或多个免疫原性表位。术语“缀合”作为名词意指修饰的肽,即具有与之结合以修饰所述肽性质的部分的肽。作为动词,该术语意指使部分与肽结合以修饰所述肽性质的过程。

[0037] 在一个实施方案中,本发明提供了改善靶化合物或蛋白质的药理学性质的方法。改善就相应未修饰的蛋白质而言。此种药理学性质的例子包括功能体内半衰期、免疫原性、肾过滤、蛋白酶保护和清蛋白结合。

[0038] 术语“功能体内半衰期”以其正常含义使用,即在其下蛋白质或修饰的蛋白质的50%生物活性仍存在于身体/靶器官中的时间,或在其下蛋白质或修饰的蛋白质活性是其起始值的50%的时间。作为测定功能体内半衰期的替代方案,可以测定“体内血浆半衰期”,即在其下在被清除前50%修饰的蛋白质在血浆或血流中循环的时间。血浆半衰期的测定通常比测定功能半衰期更简单,并且血浆半衰期的量级通常是功能体内半衰期量级的良好指示。血浆半衰期的替代术语包括血清半衰期、循环半衰期、循环的半衰期、血清清除、血浆清除和清除半衰期。

[0039] 与功能体内半衰期或血浆半衰期结合使用的术语“增加的”,用于指相对于未修饰的(亲本)蛋白质的那种,修饰的蛋白质的相关半衰期统计学上显著地增加,如在可比较条件下测定的。例如,相关半衰期可以增加至少约25%,例如至少约50%,例如至少约100%、150%、200%、250%或500%。在一个实施方案中,相对于亲本蛋白质的半衰期,本发明的化合物显示至少约5小时、优选至少约24小时、更优选至少约72小时且最优选至少约7天的半衰期中的增加。

[0040] 体内血浆半衰期的测量可以以如文献中描述的许多方法来进行。体内血浆半衰期中的增加可以定量为清除(CL)中的减少或平均滞留期(MRT)中的增加。如在合适测定中测定的,对于其CL减少至亲本蛋白质CL的小于70%、例如小于50%、例如小于20%、例如小于10%的本发明修饰的蛋白质被说成具有增加的体内血浆半衰期。在合适测定中对于其MRT增加至亲本蛋白质MRT的大于130%、例如大于150%、例如大于200%、例如大于500%的本发明修饰的蛋白质被说成具有增加的体内血浆半衰期。清除和平均滞留期可以在标准药物代谢动力学研究中使用合适的测试动物进行评估。选择对于给定蛋白质合适的测试动物在本领域技术人员的能力内。当然,在人中的测试代表最终测试。一般地并且作为例子,小鼠、大鼠、犬、猴或猪注射入目的化合物。注射的量依赖于测试动物。随后,如对于CL和MRT评估合适的,在1至5天的时间段内获取血样。通过ELISA技术方便地分析血样。

[0041] 术语化合物的“免疫原性”指化合物当施用于人时,引发有害免疫应答的能力,无论是体液、细胞还是两者。在任何人亚群中都可能存在显示对特定施用的蛋白质的敏感性的个体。使用本领域已知的常规方法,通过定量在敏感个体中生长激素抗体和/或生长激素应答性 T 细胞的存在可以测量免疫原性。在一个实施方案中,相对于敏感个体的亲本蛋白质的免疫原性,本发明的修饰的蛋白质显示在那个个体中免疫原性的至少约 10%、优选至少约 25%、更优选至少约 40% 且最优选至少约 50% 的减少。

[0042] 如本文所使用的,术语“蛋白酶保护”或“蛋白酶保护的”意指本发明修饰的蛋白质对血浆肽酶或蛋白酶比亲本蛋白质更有抵抗力。已知血浆中存在的蛋白酶和肽酶牵涉于循环蛋白质的降解。

[0043] 通过下述降解测定来测定蛋白质对通过例如二肽基氨肽酶 IV (DPPIV) 降解的抗性:在 100 μ L 0.1 M 三乙胺-HCl 缓冲液, pH 7.4 中,使等分试样的蛋白质 (5 nmol) 和与 5 mU 酶促活性对应的 1 μ L 纯化二肽基氨肽酶 IV 在 37°C 下温育 10-180 分钟。通过加入 5 μ L 10% 三氟乙酸终止酶促反应,并且分离蛋白质降解产物且使用 HPLC 分析进行定量。用于执行这种分析的一种方法是:根据 Siegel 等人, Regul. Pept. 1999 ;79 :93-102 和 Mentlein 等人 Eur. J. Biochem. 1993 ;214 :829-35, 将混合物应用到 Vydac C18 widepore (30 nm 孔, 5 μ m 颗粒) 250x4.6 mm 柱内, 并且以 1 ml/ 分钟的流速用溶于 0.1% 三氟乙酸的乙腈线性逐步梯度 (0% 乙腈 3 分钟、0-24% 乙腈 17 分钟、24-48% 乙腈 1 分钟) 洗脱。蛋白质及其降解产物可以通过其在 220 nm (蛋白质键) 或 280 nm (芳族氨基酸) 的吸光度进行监控, 并且通过与标准的那些相关的其峰面积积分进行定量。在导致小于 10% 的蛋白质被水解的温育时间下估计蛋白质通过二肽基氨肽酶 IV 的水解率。在一个实施方案中, 修饰的蛋白质的水解率是亲本蛋白质那种的小于 70%、例如小于 40%、例如小于 10%。

[0044] 哺乳动物物种的循环血液中最丰富的蛋白质组分是血清清蛋白, 其通常以约 3 至 4.5 克 /100 毫升全血的浓度存在。血清清蛋白是约 70,000 道尔顿的血液蛋白质, 其在循环系统中具有几种重要功能。它充当在血液中发现的多种有机分子的转运蛋白, 充当各种代谢物例如脂肪酸和胆红素通过血液的主要转运蛋白, 并且由于其丰度, 充当循环血液的渗透调节物。血清清蛋白具有超过一周的半衰期, 并且增加蛋白质血浆半衰期的一种方法是使蛋白质与和血清清蛋白结合的基团缀合。清蛋白结合性质可以如引入本文作为参考的 J. Med. Chem, 43, 2000, 1986-1992 中所述进行测定。

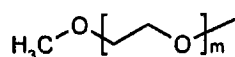
[0045] 在一个方面, 本发明修饰的蛋白质可以通过 R1 和或 R2 的进一步衍生进行进一步修饰。具体地, R1 和 / 或 R2 可以包括适合于进一步修饰的化学基团。此种修饰可以包括选自下述的化学基团的缀合: 树状聚体、聚环氧烷 (PAO)、聚亚烷基二醇 (PAG)、聚乙二醇 (PEG)、聚丙二醇 (PPG)、分支 PEGs、聚乙烯醇 (PVA)、聚羧酸酯、聚乙烯吡咯烷酮、乙烯-马来酸酐共聚物、苯乙烯-马来酸酐共聚物、葡聚糖、羧甲基-葡聚糖; 血清蛋白质结合配体, 例如与清蛋白结合的化合物, 例如脂肪酸、C5-C24 脂肪酸、脂族二酸 (例如 C5-C24)、抑制聚糖与受体 (例如脱唾液酸糖蛋白受体和甘露糖受体) 结合的结构 (例如唾液酸衍生物或模拟物)、包含在生理条件下改变电荷性质的部分的小有机分子, 例如羧酸或胺, 或阻止聚糖特异性识别的中性取代基例如较小的烷基取代基 (例如 C1-C5 烷基)、低分子量有机荷电原子团 (例如 C1-C25), 其可以包含一种或多种羧酸、胺磺酸 (amines sulfonic)、磷酸或其组合; 低分子中性亲水分子 (例如 C1-C25), 例如可以任选分支的环糊精或聚乙烯链; 具有

2-40kDa 平均分子量的聚乙二醇 ;定义明确的精确聚合物,例如具有 700 至 20,000Da、或更优选 700-10,000Da 之间的精确分子量的树状聚体 ;和基本上非免疫原性多肽例如清蛋白或抗体或任选包含 Fc 结构域的抗体部分。

[0046] 在一个实施方案中,本发明修饰的蛋白质是聚乙二醇化的 (PEGylated)。术语“PEG”意指分子量约 100 至约 1,000,000Da 的聚乙二醇,包括其类似物,其中例如末端 OH- 基团已由烷氧基例如甲氧基、乙氧基或丙氧基替代。具体地,其中末端 -OH 基团已由甲氧基替代的 PEG 称为 mPEG。

[0047] 术语“mPEG”(或更适当地“mPEG 基 (mPEGyl)”)指结构的多分散或单分散原子团:

[0048]



[0049] 其中 m 是大于 1 的整数。因此,其中 m 是 90 的 mPEG 具有 3991Da 的分子量,即约 4kDa。同样地,具有 20kDa 平均分子量的 mPEG 具有 454 的 m 平均值。由于用于产生 mPEG 的方法,这些分子经常具有分子量的分布。这种分布由多分散性指数描述。

[0050] 如本文所使用的,术语“多分散性指数”指重均分子量和数均分子量之间的比,如聚合物化学领域中已知的(参见例如,“Polymer Synthesis and Characterization”, J. A. Nairn, University of Utah, 2003)。多分散性指数是大于或等于 1 的数字,并且它可由凝胶渗透层析 (Gel Permeation Chromatographic) 数据进行估计。当多分散性指数是 1 时,产物是单分散的,并且因此由具有单一分子量的化合物组成。当多分散性指数大于 1 时,它是那种聚合物的多分散性的量度,即具有不同分子量的聚合物的分布如何广泛。

[0051] 在式、化合物名称或分子结构中例如“mPEG20000”的使用指示其中 mPEG 是多分散的并且具有约 20kDa 分子量的 mPEG 残基。

[0052] 多分散性指数一般随着 PEG 或 mPEG 分子量而增加。当参考 20kDa PEG 且特别是 20kDa mPEG 时,它意指具有低于 1.06 的多分散性指数的化合物(或事实上化合物的混合物),例如低于 1.05、例如低于 1.04、例如低于 1.03、例如在 1.02 和 1.03 之间。当参考 30kDa PEG 且特别是 30kDa mPEG 时,它意指具有低于 1.06 的多分散性指数的化合物(或事实上化合物的混合物),例如低于 1.05、例如低于 1.04、例如低于 1.03、例如在 1.02 和 1.03 之间。当参考 40kDa PEG 且特别是 40kDa mPEG 时,它意指具有低于 1.06 的多分散性指数的化合物(或事实上化合物的混合物),例如低于 1.05、例如低于 1.04、例如低于 1.03、例如在 1.02 和 1.03 之间。

[0053] 通过 R1 和 / 或 R2 基团的进一步衍生与修饰的蛋白质缀合的 PEG 或 mPEG 可以具有任何分子量。具体地,分子量可以在 500 和 1000,000Da 之间、例如在 500 和 500,000Da 之间、例如在 500 和 100,000Da 之间、例如在 500 和 60,000Da 之间、例如在 1000 和 40,000Da 之间、例如在 5000 和 40,000Da 之间。具体地,可以使用具有在 10,000Da 和 40,000Da 之间、例如在 20,000Da 和 40,000Da 之间、例如在 20,000 和 30,000Da 或在 30,000 和 40,000Da 之间的分子量的 PEG。特别提及具有 10,000、20,000、30,000 或 40,000Da 分子量的 PEG 或 mPEG。

[0054] 在一个实施方案中,R1 和 / 或 R2 包括已知与血浆蛋白质例如清蛋白结合的一种或多种部分。化合物与清蛋白结合的能力可以如引入本文作为参考的 J. Med. Chem, 43, 2000,

1986-1992 中所述进行测定。在本背景中,如果 Ru/Da 高于 0.05、例如高于 0.10、例如高于 0.12 或甚至高于 0.15,那么化合物定义为与清蛋白结合。

[0055] 在本发明的另一个实施方案中,清蛋白结合部分是蛋白质,例如包括小于 40 个氨基酸残基的蛋白质。其为清蛋白结合部分的许多小蛋白质公开于引入本文作为参考的 J. Biol. Chem. 277,38(2002)35035-35043 中。

[0056] 如上文讨论的,修饰性质基团的直接缀合是已知的(例如,通过使用 TGase 经由 Gln 残基与含 Gln 蛋白质缀合的胺官能化 PEG 或脂肪酸)。然而,当衍生靶化合物例如治疗蛋白质时,此种缀合有时可以缺乏所需特异性。此外,从例如 EP 950665, EP 785276, Sato, Adv. Drug Delivery Rev., 54, 459-476, 2002 和 Wada, Biotech. Lett., 23, 1367-1372, 2001 中公开的例子显而易见的是,需要显著过量(最高达 100-1000 倍)的待与蛋白质缀合的化合物用于反应进行。此种过量对反应在技术或大规模中的利用构成限制。例如,具有小多分散性指数的 mPEG 是非常昂贵的,并且关于大量过量的需求实际上是不容许的。此外,对于大的部分例如 PEG 10kDa 或 PEG 20k Da 的缀合,由于此种化合物的分子量,以 100-1000 倍级别的试剂过量是不可行的。还众所周知的是,大量 PEG 的存在可能使蛋白质即待修饰的蛋白质和转谷氨酰胺酶沉淀。与此形成对比的是,本方法提供下述优点:在酶促步骤中需要大量过量的反应物是即使以大量过量也容易处理的小分子。通过正确选择在第二个步骤中待形成的键,不需要大量过量,因为例如在几乎等摩尔量的胺和酮官能性(functionality)下发生脎形成。

[0057] 本发明的靶化合物

[0058] 本发明的靶化合物优选是蛋白质或蛋白质。具体地,根据本发明的方法,蛋白质必须是转谷氨酰胺酶的底物。在一个方面,靶化合物包含至少一个 Lys 残基且优选至少 2 个 Lys 残基。如果靶化合物本身不是转谷氨酰胺酶底物,那么可能在蛋白质中插入一个或多个 Gln 或 Lys 残基,并且特别是 Lys 残基,以使得蛋白质成为转谷氨酰胺酶的底物。原则上,此种 Gln 或 Lys 残基可以在序列中的任何位置处插入,然而,它优选在其中蛋白质的生理例如治疗活性不受影响至蛋白质例如在治疗干预中不再有用的程度的位置处插入。氨基酸残基在蛋白质中的插入可以通过本领域技术人员已知的标准技术来达到,例如翻译后化学修饰或转基因技术。

[0059] 其为转谷氨酰胺酶底物的任何靶化合物或蛋白质都可以通过本发明的方法进行修饰,例如酶、蛋白质激素、生长因子、抗体、细胞因子、受体、淋巴因子和疫苗抗原,并且特别提及治疗蛋白质,例如胰岛素、胰高血糖素样蛋白质 1 (GLP-1)、胰高血糖素样蛋白质 2 (GLP-2)、生长激素、细胞因子、三叶因子蛋白质 (TFF)、蛋白质黑皮质素受体改性剂和因子 VII 化合物。因此,本发明的靶化合物包括例如 hGH、促乳素或任何其他细胞因子;胰岛素、GLP1 或任何其他蛋白质激素;抗体或由其衍生的片段;活化因子 VII、活化因子 IX、因子 VIII、因子 XIII、或任何其他凝固因子。

[0060] 将获益于修饰基团的更选择性引入的一种此种蛋白质是生长激素。生长激素 (GH) 或促生长素 (STH) 是蛋白质激素,其在人和其他动物中刺激生长和细胞繁殖。它是 191-氨基酸、单链多肽激素,其通过在垂体前叶腺的侧翼内的促生长素细胞合成、贮存且分泌。具体地,关于人生长激素的基因位于染色体 17 的 q22-24 区域中,并且与人绒毛膜生长催乳激素 (hCS, 也称为胎盘催乳激素) 基因紧密相关。GH、人绒毛膜生长催乳激素 (hCS) 和促乳素

(PRL) 是具有生长促进和生乳活性的一组同源激素。

[0061] 如上所述,人生长激素的主要同工型是 191 个氨基酸 (SEQ ID NOs :1 和 2) 和约 22,000 道尔顿分子量的蛋白质。结构包括与 GH 受体的功能相互作用所必需的 4 个螺旋。GH 在结构和外观上与促乳素和绒毛膜生长催乳激素在进化上同源。尽管在来自不同物种的生长激素之间的显著结构相似性,但仅人和灵长类动物生长激素在人中具有显著作用。人 GH 的剪接变体显示于 SEQ ID NO :3 中。还参见, Boguszewski 等人, J. Clin. Endocrinol. Metab. 83(8) :2878-2885 (1998)。

[0062] 术语“生长激素化合物”意指人生长激素 (hGH), 其中一个或多个氨基酸残基已缺失和/或由其他氨基酸残基替代,天然或非天然的,和/或包括另外氨基酸残基的 hGH,天然或非天然的,和/或其中至少一个有机取代基与一个或多个有机取代基结合的 hGH。特别提及 191 天然氨基酸序列 (生长激素) 和 192 氨基酸 N 末端甲硫氨酸种类 (人长高激素)。

[0063] 在本发明中可应用的生长激素化合物的其他例子包括其中作为一组的氨基酸编号 172、174、176 和 178 由下述氨基酸组之一替代 (R、S、F、R) ; (R、A、Y、R) ; (K、T、Y、K) ; (R、S、Y、R) ; (K、A、Y、R) ; (R、F、F、R) ; (K、Q、Y、R) ; (R、T、Y、H) ; (Q、R、Y、R) ; (K、K、Y、K) ; (R、S、F、S) 或 (K、S、N、R), 如引入本文作为参考的 WO 92/09690 (Genentech) 中公开的。

[0064] 在本发明中可应用的生长激素化合物的其他例子包括具有下述置换的 hGH : G120R、G120K、G120Y、G120F 和 G120E, 如引入本文作为参考的 US 6,004,931 (Genentech) 中公开的。

[0065] 在本发明中可应用的生长激素化合物的其他例子包括具有下述置换组的 hGH : R167N、D171S、E174S、F176Y 和 I179T ; R176E、D171S、E174S 和 F176Y ; F10A、M14W、H18D 和 H21N ; F10A、M14W、H18D、H21N、R167N、D171S、E174S、F176Y、I179T ; F10A、M14W、H18D、H21N、R167N、D171A、E174S、F176Y、I179T ; F10H、M14G、H18N 和 H21N ; F10A、M14W、H18D、H21N、R167N、D171A、T175T 和 I179T ; 和 F10I、M14Q、H18E、R167N、D171S 和 I179T, 如引入本文作为参考的 US 6,143,523 (Genentech) 中公开的。

[0066] 在本发明中可应用的生长激素化合物的其他例子包括具有下述置换组的 hGH : H18A、Q22A、F25A、D26A、Q29A、E65A、K168A、E174A 和 G120K, 如引入本文作为参考的 US 6,136,536 (Genentech) 中公开的。

[0067] 在本发明中可应用的生长激素化合物的其他例子包括具有下述置换组的 hGH : H18D、H21N、R167N、K168A、D171S、K172R、E174S、I179T, 并且其中 G120 进一步由 R、K、W、Y、F 或 E 置换, 如引入本文作为参考的 US 6,057,292 (Genentech) 中公开的。

[0068] 在本发明中可应用的生长激素化合物的其他例子包括具有下述置换组的 hGH : H18D、H21N、R167N、K168A、D171S、K172R、E174S 和 I179T, 如引入本文作为参考的 US 5,849,535 (Genentech) 中公开的。

[0069] 在本发明中可应用的生长激素化合物的其他例子包括具有下述置换组的 hGH : H18D、H21D、R167N、K168A、D171S、K172R、E174S 和 I179T ; 以及 H18A、Q22A、F25A、D26A、Q29A、E65A、K168A 和 E174A, 如引入本文作为参考的 WO 97/11178 (Genentech) 中公开的。

[0070] 在本发明中可应用的生长激素化合物的其他例子包括具有下述置换组的 hGH : K168A 和 E174A ; R178N 和 I179M ; K172A 和 F176A ; 以及 H54F、S56E、L58I、E62S、D63N 和 Q66E, 如引入本文作为参考的 WO 90/04788 (Genentech) 中公开的。

[0071] 当本发明的方法对包括 hGH 的靶化合物执行时,反应导致选自下述的至少一个 Lys 的选择性修饰:Lys64、Lys67、Lys96、Lys141、Lys166、Lys171、Lys184、Lys194 和 Lys198。在优选实施方案中,主要修饰 SEQ ID NO:2 的一个单个赖氨酸 Lys171。在另一个实施方案中,修饰至少 2 个 Lys。

[0072] 在另外一个实施方案中,Lys171 用一个性质修饰基团进行修饰,并且第二个 Lys 用第二个、不同的性质修饰基团进行修饰,如本文公开的。

[0073] 将获益于本发明的方法的另一种蛋白质是胰岛素,并且具体地人胰岛素。在本背景中,术语“人胰岛素”指天然产生的胰岛素或重组产生的胰岛素。重组人胰岛素可以在任何合适的宿主细胞中产生,例如宿主细胞可以是细菌、真菌(包括酵母)、昆虫、动物或植物细胞。许多胰岛素化合物已公开于文献中,并且它们在本发明的方法中也特别有用。“胰岛素化合物”(和相关表达)指其中一个或多个氨基酸已缺失和/或由其他氨基酸残基包括非编码氨基酸替代的人胰岛素,和/或包括另外氨基酸即超过 51 个氨基酸的人胰岛素,和/或其中至少一个有机取代基与一个或多个氨基酸结合的人胰岛素。

[0074] 下述专利文件作为可在由本发明提供的方法中具体应用的胰岛素化合物的公开内容提及。

[0075] 引入本文作为参考的 WO 97/31022 (Novo Nordisk) 公开了具有延长的活性概况的胰岛素化合物,其中 B 链 N 末端氨基酸的氨基和/或 Lys^{B29} 的 ϵ -氨基具有包含亲脂取代基的羧酸。特别提及 N ^{ϵ B29}-(CO-(CH₂)₁₄-COOH) 人胰岛素;N ^{ϵ B29}-(CO-(CH₂)₁₆-COOH) 人胰岛素;N ^{ϵ B29}-(CO-(CH₂)₁₈-COOH) 人胰岛素;N ^{ϵ B29}-(CO-(CH₂)₂₀-COOH) 人胰岛素;N ^{ϵ B29}-(CO-(CH₂)₂₂-COOH) 人胰岛素;N ^{ϵ B29}-(CO-(CH₂)₁₄-COOH) Asp^{B28}-人胰岛素;N ^{ϵ B29}-(CO-(CH₂)₁₆-COOH) Asp^{B28}-人胰岛素;N ^{ϵ B29}-(CO-(CH₂)₁₈-COOH) Asp^{B28}-人胰岛素;N ^{ϵ B29}-(CO-(CH₂)₂₀-COOH) Asp^{B28}-人胰岛素;N ^{ϵ B29}-(CO-(CH₂)₂₂-COOH) Asp^{B28}-人胰岛素;N ^{ϵ B30}-(CO-(CH₂)₁₄-COOH) Thr^{B29}Lys^{B30}-人胰岛素;N ^{ϵ B30}-(CO-(CH₂)₁₆-COOH) Thr^{B29}Lys^{B30}-人胰岛素;N ^{ϵ B30}-(CO-(CH₂)₁₈-COOH) Thr^{B29}Lys^{B30}-人胰岛素;N ^{ϵ B30}-(CO-(CH₂)₂₀-COOH) Thr^{B29}Lys^{B30}-人胰岛素;N ^{ϵ B30}-(CO-(CH₂)₂₂-COOH) Thr^{B29}Lys^{B30}-人胰岛素;N ^{ϵ B28}-(CO-(CH₂)₁₄-COOH) Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素;N ^{ϵ B28}-(CO-(CH₂)₁₆-COOH) Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素;N ^{ϵ B28}-(CO-(CH₂)₁₈-COOH) Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素;N ^{ϵ B28}-(CO-(CH₂)₂₀-COOH) Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素;N ^{ϵ B28}-(CO-(CH₂)₂₂-COOH) Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素;N ^{ϵ B29}-(CO-(CH₂)₁₄-COOH) desB30 人胰岛素;N ^{ϵ B29}-(CO-(CH₂)₁₆-COOH) desB30 人胰岛素;N ^{ϵ B29}-(CO-(CH₂)₁₈-COOH) desB30 人胰岛素;N ^{ϵ B29}-(CO-(CH₂)₂₀-COOH) desB30 人胰岛素;和 N ^{ϵ B29}-(CO-(CH₂)₂₂-COOH) desB30 人胰岛素。

[0076] 引入本文作为参考的 WO 96/29344 (Novo Nordisk) 公开了具有延长的活性概况的胰岛素化合物,其中 B 链 N 末端氨基酸的氨基具有附着的包含 12-40 个碳原子的亲脂取代基,或其中 B 链 C 末端氨基酸的羧基具有附着的包含 12-40 个碳原子的亲脂取代基。

[0077] 引入本文作为参考的 WO 95/07931 (Novo Nordisk) 公开了具有延长的活性概况的胰岛素化合物,其中 Lys^{B29} 的 ϵ -氨基具有亲脂取代基。特别提及 N ^{ϵ B29}-十三酰 des(B30) 人胰岛素、N ^{ϵ B29}-十四酰 des(B30) 人胰岛素、N ^{ϵ B29}-癸酰 des(B30) 人胰岛素、N ^{ϵ B29}-十二酰 des(B30) 人胰岛素、N ^{ϵ B29}-十三酰 Gly^{A21}des(B30) 人胰岛素、N ^{ϵ B29}-十四酰 Gly^{A21}des(B30) 人胰岛素、N ^{ϵ B29}-癸酰 Gly^{A21}des(B30) 人胰岛素、N ^{ϵ B29}-十二酰 Gly^{A21}des(B30) 人胰岛素、N ^{ϵ B29}-十三酰 Gly^{A21}Gln^{B3}des(B30) 人胰岛素、N ^{ϵ B29}-十四酰 Gly^{A21}Gln^{B3}des(B30) 人胰岛素。

胰岛素、N^εB29- 癸酰 Gly^{A21}Gln^{B3}des(B30) 人胰岛素、N^εB29- 十二酰 Gly^{A21}Gln^{B3}des(B30) 人胰岛素、N^εB29- 十三酰 Ala^{A21}des(B30) 人胰岛素、N^εB29- 十四酰 Ala^{A21}des(B30) 人胰岛素、N^εB29- 癸酰 Ala^{A21}des(B30) 人胰岛素、N^εB29- 十二酰 Ala^{A21}des(B30) 人胰岛素、N^εB29- 十三酰 Ala^{A21}Gln^{B3}des(B30) 人胰岛素、N^εB29- 十四酰 Ala^{A21}Gln^{B3}des(B30) 人胰岛素、N^εB29- 癸酰 Ala^{A21}Gln^{B3}des(B30) 人胰岛素、N^εB29- 十二酰 Ala^{A21}Gln^{B3}des(B30) 人胰岛素、N^εB29- 十三酰 Gln^{B3}des(B30) 人胰岛素、N^εB29- 十四酰 Gln^{B3}des(B30) 人胰岛素、N^εB29- 癸酰 Gln^{B3}des(B30) 人胰岛素、N^εB29- 十二酰 Gln^{B3}des(B30) 人胰岛素、N^εB29- 十三酰 Gly^{A21}人胰岛素、N^εB29- 十四酰 Gly^{A21}人胰岛素、N^εB29- 癸酰 Gly^{A21}人胰岛素、N^εB29- 十二酰 Gly^{A21}人胰岛素、N^εB29- 十三酰 Gly^{A21}Gln^{B3}人胰岛素、N^εB29- 十四酰 Gly^{A21}Gln^{B3}人胰岛素、N^εB29- 癸酰 Gly^{A21}Gln^{B3}人胰岛素、N^εB29- 十二酰 Gly^{A21}Gln^{B3}人胰岛素、N^εB29- 十三酰 Ala^{A21}人胰岛素、N^εB29- 十四酰 Ala^{A21}人胰岛素、N^εB29- 癸酰 Ala^{A21}人胰岛素、N^εB29- 十二酰 Ala^{A21}人胰岛素、N^εB29- 十三酰 Ala^{A21}Gln^{B3}人胰岛素、N^εB29- 十四酰 Ala^{A21}Gln^{B3}人胰岛素、N^εB29- 癸酰 Ala^{A21}Gln^{B3}人胰岛素、N^εB29- 十二酰 Ala^{A21}Gln^{B3}人胰岛素、N^εB29- 十三酰 Gln^{B3}人胰岛素、N^εB29- 十四酰 Gln^{B3}人胰岛素、N^εB29- 癸酰 Gln^{B3}人胰岛素、N^εB29- 十二酰 Gln^{B3}人胰岛素、N^εB29- 十三酰 Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 十四酰 Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 癸酰 Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 十二酰 Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 十三酰 Gly^{A21}Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 十四酰 Gly^{A21}Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 癸酰 Gly^{A21}Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 十二酰 Gly^{A21}Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 十三酰 Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 十四酰 Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 癸酰 Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 十二酰 Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 十三酰 Ala^{A21}Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 十四酰 Ala^{A21}Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 癸酰 Ala^{A21}Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 十二酰 Ala^{A21}Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 十三酰 Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 十四酰 Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 癸酰 Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 十二酰 Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 十三酰 Gln^{B3}Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 十四酰 Gln^{B3}Glu^{B30}人胰岛素、N^εB29- 癸酰 Gln^{B3}Glu^{B30}人胰岛素和 N^εB29- 十二酰 Gln^{B3}Glu^{B30}人胰岛素。

[0078] 引入本文作为参考的 W0 97/02043(Novo Nordisk) 公开了在胰岛素预防中有用的激素失活的胰岛素化合物, 并且特别地人胰岛素的此种类似物选自 desA1 人胰岛素; des(A1-A2) 人胰岛素; des(A1-A3) 人胰岛素; desA21 人胰岛素; des(B1-B5) 人胰岛素; des(B1-B6) 人胰岛素; des(B23-B30) 人胰岛素; des(B24-B30) 人胰岛素; des(B25-B30) 人胰岛素; Gly^{A2} 人胰岛素; Ala^{A2} 人胰岛素; Nle^{A2} 人胰岛素; Thr^{A2} 人胰岛素; Pro^{A2} 人胰岛素; D-allo Ile^{A2} 人胰岛素; Nva^{A3} 人胰岛素; Nle^{A3} 人胰岛素; Leu^{A3} 人胰岛素; Val^{A2}, Ile^{A3} 人胰岛素; Abu^{A2}, Abu^{A3} 人胰岛素; Gly^{A2}, Gly^{A3} 人胰岛素; D-Cys^{A6} 人胰岛素; D-Cys^{A6}, D-Cys^{A11} 人胰岛素; Ser^{A6}, Ser^{A11}, des(A8-A10) 人胰岛素; D-Cys^{A7} 人胰岛素; D-Cys^{A11} 人胰岛素; Leu^{A19} 人胰岛素; Gly^{B6} 人胰岛素; Glu^{B12} 人胰岛素; Asn^{B12} 人胰岛素; Phe^{B12} 人胰岛素; D-Ala^{B12} 人胰岛素; 和 Asp^{B25} 人胰岛素, 可在本发明的方法中应用。

[0079] 引入本文作为参考的 W0 92/15611(Novo Nordisk) 公开了在胰岛素受体结合过程中具有快速结合速率常数的人胰岛素类似物, 并且特征在于在位置 A13 中包括酪氨酸和/或在位置 B17 中包括苯丙氨酸、色氨酸或酪氨酸。具体地, 此种类似物选自 Tyr^{A13} 人胰岛素、Phe^{B17} 人胰岛素、Trp^{B17} 人胰岛素、Tyr^{B17} 人胰岛素、Tyr^{A13}, Phe^{B17} 人胰岛素、Tyr^{A13}, Trp^{B17} 人胰岛素、Tyr^{A13}, Tyr^{B17} 人胰岛素、Phe^{A13}, Phe^{B17} 人胰岛素、Phe^{A13}, Trp^{B17} 人胰岛素、Phe^{A13},

Tyr^{B17} 人胰岛素、Trp^{A13}, Phe^{B17} 人胰岛素、Trp^{A13}, Trp^{B17} 人胰岛素和 Trp^{A13}, Tyr^{B17} 人胰岛素。

[0080] 引入本文作为参考的 W0 92/00322(Novo Nordisk) 公开了人胰岛素类似物, 其能够靶向特定组织, 并且特征在于在胰岛素分子的 A13 位置和 / 或 B17 位置中具有不同于亮氨酸的天然存在的氨基酸残基和 / 或在胰岛素分子的 B18 位置中具有不同于缬氨酸的天然存在的氨基酸残基。具体地, 此种类似物选自 Ala^{B17} 人胰岛素、Ala^{B18} 人胰岛素、Asn^{A13} 人胰岛素、Asn^{A13}, Ala^{B17} 人胰岛素、Asn^{A13}, Asp^{B17} 人胰岛素、Asn^{A13}, Glu^{B17} 人胰岛素、Asn^{B18} 人胰岛素、Asp^{A13} 人胰岛素、Asp^{A13}, Ala^{B17} 人胰岛素、Asp^{A13}, Asp^{B17} 人胰岛素、Asp^{A13}, Glu^{B17} 人胰岛素、Asp^{B18} 人胰岛素、Gln^{A13} 人胰岛素、Gln^{A13}, Ala^{B17} 人胰岛素、Gln^{A13}, Asp^{B17} 人胰岛素、Gln^{B18} 人胰岛素、Glu^{A13} 人胰岛素、Glu^{A13}, Ala^{B17} 人胰岛素、Glu^{A13}, Asp^{B17} 人胰岛素、Glu^{A13}, Glu^{B17} 人胰岛素、Glu^{B18} 人胰岛素、Gly^{A13} 人胰岛素、Gly^{A13}, Ala^{B17} 人胰岛素、Gly^{A13}, Asn^{B17} 人胰岛素、Gly^{A13}, Asp^{B17} 人胰岛素、Gly^{A13}, Glu^{B17} 人胰岛素、Gly^{B18} 人胰岛素、Ser^{A13} 人胰岛素、Ser^{A13}, Gln^{A17}, Glu^{B10}, Gln^{B17}-des(Thr^{B30}) 人胰岛素、Ser^{A13}, Ala^{B17} 人胰岛素、Ser^{A13}, Asn^{B17} 人胰岛素、Ser^{A13}, Asp^{B17} 人胰岛素、Ser^{A13}, Gln^{B17} 人胰岛素、Ser^{A13}, Glu^{B17} 人胰岛素、Ser^{A13}, Thr^{B17} 人胰岛素、Ser^{B14}, Asp^{B17} 人胰岛素、Ser^{B18} 人胰岛素、Thr^{A13} 人胰岛素或 Thr^{B18} 人胰岛素。

[0081] 引入本文作为参考的 W0 90/01038(Novo Nordisk) 公开了具有高生物活性的人胰岛素类似物, 并且特征在于具有由 His 或 Tyr 置换的 Phe^{B25}, 在位置 A4、A8、A17、A21、B9、B10、B12、B13、B21、B26、B27、B28 和 B30 中的一个或多个中具有置换, 以及在任选不存在的位置 B30 处具有氨基酸残基。具体地, 此种类似物选自 Tyr^{B25} 人胰岛素、Tyr^{B25}, Asp^{B28} 人胰岛素、His^{B25} 人胰岛素、His^{B25}, Asp^{B28} 人胰岛素、Tyr^{B25} 人胰岛素-B30-酰胺和 His^{B25} 人胰岛素-B30-酰胺。

[0082] 引入本文作为参考的 W0 86/05496(Novo Nordisk) 公开了具有延长的作用的人胰岛素类似物, 并且特征在于具有封闭的 B30 羧基, 以在位置 A4、A17、A21、B13 和 B21 处的氨基酸残基中具有 1 至 4 个封闭的羧基。具体地, 此种类似物选自胰岛素-B30-辛酯、胰岛素-B30-十二烷酰胺、胰岛素-B30-十六烷酰胺、胰岛素-(B21, B30)-二甲酯、胰岛素-(B17, B30)-二甲酯、胰岛素-(A4, B30) 二酰胺、胰岛素-A17 酰胺-B30-辛酯、胰岛素-(A4, B13)-二酰胺-B30-己酰胺、胰岛素-(A4, A17, B21, B30)-四酰胺、胰岛素-(A17, B30)-二酰胺、A4-Ala-胰岛素-B30-酰胺和 B30-Leu-胰岛素-(A4, B30)-二酰胺。

[0083] 引入本文作为参考的 W0 86/05497(Novo Nordisk) 公开了胰岛素化合物, 其中位置 A4、A17、B13 和 B21 中的 4 个氨基酸残基中的一个或多个包括不带电侧链。特别提及人胰岛素 A17-Gln、人胰岛素 A4-Gln、猪胰岛素 B21-Gln、人胰岛素 B13-Gln、人胰岛素 (A17, B21)-Gln、人胰岛素 A4-Ala、人胰岛素 B21-Thr、人胰岛素 B13-Val、人胰岛素-Thr-A17-Gln、人胰岛素 B21-甲酯和人胰岛素 A17-甲酯。

[0084] 引入本文作为参考的 W0 92/00321(Novo Nordisk) 公开了具有延长的活性的胰岛素化合物, 其中已引入在 B 链 N 末端中的正电荷。特别提及 Arg^{B5}, Ser^{A21}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Arg^{B5}, Pro^{B6}, Ser^{A21}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Arg^{B5}, Gly^{A21}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Arg^{B5}, Pro^{B6}, Gly^{A21}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Arg^{B2}, Ser^{A21}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Arg^{B2}, Pro^{B3}, Ser^{A21}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Arg^{B2}, Gly^{A21}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Arg^{B2}, Pro^{B3}, Gly^{A21}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Arg^{B2}, Arg^{B3}, Ser^{A21} 人胰岛素、Arg^{B4}, Pro^{B5}, Ser^{A21}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Arg^{B4}, Arg^{B5}, Pro^{B6}, Gly^{A21}, Thr^{B30} 人胰岛素、Arg^{B3}, Gly^{A21}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、

Arg^{B3}, Ser^{A21}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Arg^{B4}, Gly^{A21}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Arg^{B4}, Ser^{A21}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素和 Arg^{B1}, Pro^{B2}, Gly^{A21}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素。

[0085] 引入本文作为参考的 W0 90/07522 (Novo Nordisk) 公开了在溶液中显示低结合能力的胰岛素化合物, 其中在位置 B28 中存在带正电氨基酸残基, 即 Lys 或 Arg。特别提及 des[Phe^{B25}]-人胰岛素、des[Tyr^{B26}]-人胰岛素、des[Thr^{B27}]-人胰岛素、des[Pro^{B28}]-人胰岛素、des[Phe^{B25}]-猪胰岛素、des[Pro^{B28}]-猪胰岛素、des[Pro^{B28}]-兔胰岛素、des[Phe^{B25}], des[Thr^{B30}]-人胰岛素、des[Tyr^{B26}], des[Thr^{B30}]-人胰岛素、[Ser^{A21}]-des[Pro^{B28}]-人胰岛素、[Gly^{A21}]-des[Pro^{B28}]-人胰岛素、[Gly^{A21}]-des[Phe^{B25}]-人胰岛素、[Asp^{A21}]-des[Phe^{B25}]-人胰岛素、[His^{B25}]-des[Tyr^{B26}], des[Thr^{B30}]-人胰岛素、[Asn^{B25}]-des[Tyr^{B26}], des[Thr^{B30}]-人胰岛素、[Asp^{A21}]-des[Phe^{B25}], des[Thr^{B30}]-人胰岛素、[Asp^{B28}]-des[Phe^{B25}]-人胰岛素、[Asp^{B3}]-des[Phe^{B25}]-人胰岛素、[Lys^{B28}]-人胰岛素、[Lys^{B28}, Thr^{B29}]-人胰岛素和 [Arg^{B28}]-des[Lys^{B29}]-人胰岛素。

[0086] 引入本文作为参考的 W0 90/11290 (Novo Nordisk) 公开了具有延长的活性的胰岛素化合物。特别提及 [Arg^{A0}]-人胰岛素-(B30-酰胺)、[Arg^{A0}, Gln^{B13}]-人胰岛素-(B30-酰胺)、[Arg^{A0}, Gln^{A4}, Asp^{A21}]-人胰岛素-(B30-酰胺)、[Arg^{A0}, Ser^{A21}]-人胰岛素-(B30-酰胺) 和 [Arg^{A0}, Arg^{B27}]-des[Thr^{B30}]-人胰岛素。

[0087] 引入本文作为参考的 W0 90/10645 (Novo Nordisk) 公开了糖基化胰岛素。特别提及 Phe (B1) 葡萄糖人胰岛素、Phe (B1) 甘露糖人胰岛素、Gly (A1) 甘露糖人胰岛素、Lys (B29) 甘露糖人胰岛素、Phe (B1) 半乳糖人胰岛素、Gly (A1) 半乳糖人胰岛素、Lys (B29) 半乳糖人胰岛素、Phe (B1) 麦芽糖人胰岛素、Phe (B1) 乳糖人胰岛素、Gly (A1) 葡萄糖人胰岛素、Gly (A1) 麦芽糖人胰岛素、Gly (A1) 乳糖人胰岛素、Lys (B29) 葡萄糖人胰岛素、Lys (B29) 麦芽糖人胰岛素、Lys (B29) 乳糖人胰岛素、Gly (A1), Phe (B1) 二葡萄糖人胰岛素、Gly (A1), Lys (B29) 二葡萄糖人胰岛素、Phe (B1), Lys (B29) 二葡萄糖人胰岛素、Phe (B1) 异麦芽糖人胰岛素、Gly (A1) 异麦芽糖人胰岛素、Lys (B29) 异麦芽糖人胰岛素、Phe (B1) 麦芽三糖人胰岛素、Gly (A1) 麦芽三糖人胰岛素、Lys (B29) 麦芽三糖人胰岛素、Gly (A1), Phe (B1) 二麦芽糖人胰岛素、Gly (A1), Lys (B29) 二麦芽糖人胰岛素、Phe (B1), Lys (B29) 二麦芽糖人胰岛素、Gly (A1), Phe (B1) 二乳糖人胰岛素、Gly (A1), Lys (B29) 二乳糖人胰岛素、Phe (B1), Lys (B29) 二乳糖人胰岛素、Gly (A1), Phe (B1) 二麦芽三糖人胰岛素、Gly (A1), Lys (B29) 二麦芽三糖人胰岛素、Phe (B1), Gly (A1) 二甘露糖人胰岛素、Phe (B1), Lys (B29) 二甘露糖人胰岛素、Gly (A1), Lys (B29) 二甘露糖人胰岛素、Phe (B1), Gly (A1) 二半乳糖人胰岛素、Phe (B1), Lys (B29) 二半乳糖人胰岛素、Gly (A1), Lys (B29) 二半乳糖人胰岛素、Phe (B1), Gly (A1) 二异麦芽糖人胰岛素、Phe (B1), Lys (B29) 二异麦芽糖人胰岛素、Gly (A1), Lys (B29) 二异麦芽糖人胰岛素、Phe (B1) 葡萄糖 [Asp^{B10}] 人胰岛素和 Gly (A1), Phe (B1) 二葡萄糖 [Asp^{B10}] 人胰岛素。

[0088] 引入本文作为参考的 W0 88/065999 (Novo Nordisk) 公开了稳定的胰岛素化合物, 其中 Ans^{21A} 已由其他氨基酸残基置换。特别提及 Gly^{A21} 人胰岛素、Ala^{A21} 人胰岛素、Ser^{A21} 人胰岛素、Thr^{A21} 人胰岛素和 hSer^{A21} 人胰岛素。

[0089] 引入本文作为参考的 EP 254516 (Novo Nordisk) 公开了具有延长的作用的胰岛素化合物, 其中碱性氨基酸残基已由中性氨基酸残基置换。特别提及:

[0090] Gly^{A21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Ser^{A21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Thr^{A21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Ala^{B21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、His^{A21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Asp^{B21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gly^{A21}, Arg^{B21}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Ser^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Thr^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Ala^{B21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、His^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Asp^{B21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{B13}, Gly^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{B13}, Ser^{A21}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{B13}, Ser^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{B13}, Thr^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{B13}, Ala^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{B13}, His^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{B13}, Asp^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{B13}, Gly^{A21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{B13}, Ser^{A21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{B13}, Thr^{A21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{B13}, Ala^{A21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{B13}, His^{A21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{B13}, Asp^{A21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Asn^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素、Ser^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素、Thr^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素、Ala^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素、His^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素、Asp^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素、Gly^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素、Asn^{A21}, Arg^{B27} 人胰岛素、Ser^{A21}, Arg^{B27} 人胰岛素、Thr^{A21}, Arg^{B27} 人胰岛素、Ala^{A21}, Arg^{B27} 人胰岛素、His^{A21}, Arg^{B27} 人胰岛素、Asp^{A21}, Arg^{B27} 人胰岛素、Gly^{A21}, Arg^{B27} 人胰岛素、Gln^{A17}, Asn^{A21}, Arg^{B27} 人胰岛素、Gln^{A17}, Ser^{A21}, Arg^{B27} 人胰岛素、Gln^{A17}, Thr^{A21}, Arg^{B27} 人胰岛素、Gln^{A17}, Ala^{A21}, Arg^{B27} 人胰岛素、Gln^{A17}, His^{A21}, Arg^{B27} 人胰岛素、Gln^{A17}, Asp^{A21}, Arg^{B27} 人胰岛素、Gln^{A17}, Gly^{A21}, Arg^{B27} 人胰岛素、Gln^{A17}, Asn^{A21}, Gln^{B13} 人胰岛素、Gln^{A17}, Ser^{A21}, Gln^{B13} 人胰岛素、Gln^{A17}, Thr^{A21}, Gln^{B13} 人胰岛素、Gln^{A17}, Ala^{A21}, Gln^{B13} 人胰岛素、Gln^{A17}, His^{A21}, Gln^{B13} 人胰岛素、Gln^{A17}, Asp^{A21}, Gln^{B13} 人胰岛素、Gln^{A17}, Gly^{A21}, Gln^{B13} 人胰岛素、Arg^{A27}, Asn^{A21}, Gln^{B13} 人胰岛素、Arg^{A27}, Ser^{A21}, Gln^{B13} 人胰岛素、Arg^{A27}, Thr^{A21}, Gln^{B13} 人胰岛素、Arg^{A27}, Ala^{A21}, Gln^{B13} 人胰岛素、Arg^{A27}, His^{A21}, Gln^{B13} 人胰岛素、Arg^{A27}, Asp^{A21}, Gln^{B13} 人胰岛素、Arg^{A27}, Gly^{A21}, Gln^{B13} 人胰岛素、Gln^{A17}, Asn^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素、Gln^{A17}, Ser^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素、Gln^{A17}, Thr^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素、Gln^{A17}, Ala^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素、Gln^{A17}, His^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素、Gln^{A17}, Asp^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素、Gln^{A17}, Gly^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素、Gln^{B13}, Asn^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素、Gln^{B13}, Ser^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素、Gln^{B13}, Thr^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素、Gln^{B13}, Ala^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素、Gln^{B13}, His^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素、Gln^{B13}, Asp^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素和 Gln^{B13}, Gly^{A21}, Lys^{B27} 人胰岛素。

[0091] 引入本文作为参考的 EP 214826 (Novo Nordisk) 公开了速效胰岛素化合物。

[0092] 引入本文作为参考的 EP 194864 (Novo Nordisk) 公开了具有延长的作用的胰岛素化合物, 其中碱性氨基酸残基已由中性氨基酸残基置换。特别提及 Gln^{A17}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{A17}, Gln^{B13}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{A17}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{A17}, Lys^{B27}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{A17}, Gln^{A17}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{B13}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{B13}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{B13}, Lys^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Gln^{B13}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Arg^{B27}, Arg^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Arg^{B27}, Lys^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Lys^{B27}, Arg^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Lys^{B27}, Lys^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Lys^{B29}-NH₂, des-(B30) 人胰岛素, Thr^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Lys^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Lys^{B30} (Lau)-NH₂ 人胰岛素、Lys^{B30}, Arg^{B31}-NH₂ 人胰岛素、Lys^{B30}, Lys^{B31}-NH₂ 人胰岛素、Arg^{B30}-NH₂ 人胰岛素、Arg^{B30}, Arg^{B31}-NH₂ 人胰岛素和 Arg^{B30}, Lys^{B31}-NH₂ 人胰岛素。

[0093] 引入本文作为参考的美国专利号 3, 528, 960 (Eli Lilly) 公开了 N-羧基芳酰基胰

岛素化合物,其中胰岛素分子的 1、2 或 3 个伯胺基具有羧基芳酰基。

[0094] 引入本文作为参考的 GB 专利号 1.492.997 (Nat. Res. Dev. Corp.) 公开了具有改善的降血糖作用概况的在 N^εB²⁹ 处具有氨基甲酰置换的胰岛素化合物。

[0095] 引入本文作为参考的 JP 公开 (laid-open) 专利申请号 1-254699 (Kodama Co., Ltd.) 公开了胰岛素化合物,其中烷酰基与 Phe^{B1} 的氨基或与 Lys^{B29} 的 ε-氨基或这两者结合。

[0096] 引入本文作为参考的 JP 公开专利申请号 57-067548 (Shionogi) 公开了胰岛素化合物,其中 B30 位置具有含至少 5 个碳原子的氨基酸,所述氨基酸不一定由核苷酸三联体编码。

[0097] 引入本文作为参考的 WO 03/053339 (Eli Lilly) 公开了胰岛素化合物,其中 A 链在 N 末端中已延伸了 2 个氨基酸残基——A-1 和 A0,其中 B 链已在 N 末端处延伸了 2 个氨基酸残基——B-1 和 B0,其中在位置 B28、B29 和 B39 处的氨基酸残基可以置换,并且其中在位置 B28 或 B29 处的 Lys 的 ε-氨基与带正电的氨基酸的 α-羧基共价结合,以形成 Lys-Nε-氨基酸衍生物。特别提及所述类似物,其中 A-1 和 B-1 都不存在,并且其中 A0 代表 Arg 和 B0 代表 Arg 或不存在。

[0098] 选自下述的胰岛素化合物也可应用于本发明的方法:i) 其中位置 B28 是 Asp、Lys、Leu、Val 或 Ala 并且位置 B29 是 Lys 或 Pro 的类似物;和 ii) des (B28-B30)、des (B27) 或 des (B30) 人胰岛素,并且特别地其中位置 B28 是 Asp 或 Lys 并且位置 B29 是 Lys 或 Pro 的胰岛素化合物。

[0099] 其他可应用的胰岛素化合物选自 B29-N^ε-肉豆蔻酰-des (B30) 人胰岛素、B29-N^ε-棕榈酰-des (B30) 人胰岛素、B29-N^ε-肉豆蔻酰人胰岛素、B29-N^ε-棕榈酰人胰岛素、B28-N^ε-肉豆蔻酰 Lys^{B28}Pro^{B29} 人胰岛素、B28-N^ε-棕榈酰 Lys^{B28}Pro^{B29} 人胰岛素、B30-N^ε-肉豆蔻酰-Thr^{B29}Lys^{B30} 人胰岛素、B30-N^ε-棕榈酰-Thr^{B29}Lys^{B30} 人胰岛素、B29-N^ε-(N-棕榈酰-γ-谷氨酰)-des (B30) 人胰岛素、B29-N^ε-(N-石胆酰 (lithocholyl)-γ-谷氨酰)-des (B30) 人胰岛素、B29-N^ε-(ω-羧基十七烷酰)-des (B30) 人胰岛素、B29-N^ε-(ω-羧基十七烷酰) 人胰岛素和 B29-N^ε-肉豆蔻酰-des (B30) 人胰岛素。

[0100] 将获益于本发明的方法的另一种蛋白质是 GLP-1。在本发明的方法中可应用的 GLP-1 的例子包括人 GLP-1 和 GLP-1 化合物。人 GLP-1 是源于前胰高血糖素原的 37 氨基酸残基蛋白质,其尤其 (i. a.) 在远端回肠、胰和脑中在 L 细胞中合成。GLP-1 是在葡萄糖代谢以及胃肠道分泌和代谢中具有调节功能的重要胃肠激素。前胰高血糖素原加工以产生 GLP-1 (7-36)-酰胺、GLP-1 (7-37) 和 GLP-2 主要在 L 细胞中发生。片段 GLP-1 (7-36)-酰胺和 GLP-1 (7-37) 都是葡萄糖依赖性促胰岛素试剂。在过去数十年中,GLP-1 的许多结构类似物从希拉毒蜥蜴 (钝尾毒蜥 (Heloderma suspectum) 和珠毒蜥 (Heloderma horridum)) 毒液中分离。毒蜥外泌肽 -4 (Exendin-4) 是从珠毒蜥毒液中分离的 39 氨基酸残基蛋白质,并且这种蛋白质与 GLP-1 共享 52% 同源性。毒蜥外泌肽 -4 是有效的 GLP-1 受体激动剂,其在注射入犬内时已显示刺激胰岛素释放和确保血糖水平降低。GLP-1 (1-37) 和毒蜥外泌肽 -4 (1-39) 组及其特定片段、类似物和衍生物 (本文指定为 GLP-1 化合物) 是有效的促胰岛素试剂,并且它们在本发明的方法中都可应用。GLP-1 (1-37) 的促胰岛素片段是

促胰岛素蛋白质,关于其完整序列可以在 GLP-1(1-37) 的序列中发现,并且其中至少一个末端氨基酸已缺失。GLP-1(1-37) 的促胰岛素片段的例子是其中 GLP-1(1-37) 的位置 1-6 中的氨基酸残基已缺失的 GLP-1(7-37),和其中 GLP-1(1-37) 的位置 1-6 和 37 中的氨基酸残基已缺失的 GLP-1(7-36)。毒蜥外泌肽 -4(1-39) 的促胰岛素片段的例子是毒蜥外泌肽 -4(1-38) 和毒蜥外泌肽 -4(1-31)。化合物的促胰岛素性质可以通过本领域众所周知的体内或体外测定进行测定。例如,化合物可以施用于动物并且随着时间过去监控胰岛素浓度。GLP-1(1-37) 和毒蜥外泌肽 -4(1-39) 的促胰岛素类似物指其中一个或多个氨基酸残基已由其他氨基酸残基交换,和 / 或一个或多个氨基酸残基已从其缺失,和 / 或一个或多个氨基酸残基已从其加入的各自分子,前提是所述类似物是促胰岛素的或是促胰岛素化合物的前体药物。GLP-1(1-37) 的促胰岛素类似物的例子是例如,其中位置 8 中的丙氨酸已由甲硫氨酸替代并且位置 1 至 6 中的氨基酸残基已缺失的 Met⁸-GLP-1(7-37),和其中位置 34 中的缬氨酸已由精氨酸替代并且位置 1 至 6 中的氨基酸残基已缺失的 Arg³⁴-GLP-1(7-37)。毒蜥外泌肽 -4(1-39) 的促胰岛素类似物的例子是 Ser²Asp³- 毒蜥外泌肽 -4(1-39),其中位置 2 和 3 中的氨基酸残基已分别由丝氨酸和天冬氨酸替代(这个具体类似物在本领域中也称为毒蜥外泌肽 -3)。GLP-1(1-37)、毒蜥外泌肽 -4(1-39) 及其类似物的促胰岛素衍生物是本领域技术人员视为这些蛋白质的衍生物的那些,即具有亲本蛋白质分子中不存在的至少一个取代基,前提是所述衍生物是促胰岛素的或是促胰岛素化合物的前体药物。取代基的例子是酰胺、碳水化合物、烷基和亲脂取代基。GLP-1(1-37)、毒蜥外泌肽 -4(1-39) 及其类似物的促胰岛素衍生物的例子是 GLP-1(7-36)-酰胺、Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-十六烷酰))) -GLP-1(7-37) 和 Tyr³¹- 毒蜥外泌肽 -4(1-31)-酰胺。GLP-1(1-37)、毒蜥外泌肽 -4(1-39)、其促胰岛素片段、其促胰岛素类似物及其促胰岛素衍生物的进一步例子在 WO 98/08871、WO 99/43706、US 5424286 和 WO 00/09666 中描述,所述专利文件全部包含入本文作为参考。

[0101] 将获益于本发明的方法的另一种蛋白质是 GLP-2。GLP-2 和 GLP-2 化合物也可以通过本发明提供的方法进行修饰。在本背景中, GLP-2 化合物与 GLP-2 受体结合,优选具有低于 1 μM、例如低于 100nM 的亲和常数 (K_d) 或效力 (EC₅₀)。术语“GLP-2 化合物”意指人 GLP-2,其中一个或多个氨基酸残基已缺失和 / 或由另一个氨基酸残基替代,天然或非天然的,和 / 或包括另外氨基酸残基的人 GLP-2,和 / 或其中至少一个有机取代基与一个或多个氨基酸残基结合的人 GLP-2。具体地,考虑那些蛋白质,其氨基酸序列在 33 个连续氨基酸的任何序列处显示超过 60% 的人 GLP-2 氨基酸序列。同样,考虑那些蛋白质,当最高达 4 个氨基酸从氨基酸序列中缺失时,其氨基酸序列在 37 个连续氨基酸的任何序列处显示超过 60% 的人 GLP-2 氨基酸序列。同样,考虑那些蛋白质,当最高达 2 个氨基酸加入其氨基酸序列中时,其氨基酸序列在 31 个连续氨基酸的任何序列处显示超过 60% 的 GLP-2 氨基酸序列。术语“GLP 化合物”还包括可以从一个个体到另一个存在且发生的天然等位基因变异。同样,糖基化或其他翻译后修饰的程度和定位可以依赖于选择的宿主细胞和宿主细胞环境的性质而改变。

[0102] 可以根据本发明使用的候选 GLP-2 化合物包括 WO 96/32414、WO97/39031、WO 98/03547、WO 96/29342、WO 97/31943、WO 98/08872 中描述的 GLP-2 化合物,所述专利文件全部引入本文作为参考。

[0103] 具体地,下述 GLP-2 化合物可在本发明的方法中应用。

[0104] A2G-GLP-2(1-33);K30R-GLP-2(1-33);S5K-GLP-2(1-33);S7K-GLP-2(1-33);D8K-GLP-2(1-33);E9K-GLP-2(1-33);M10K-GLP-2(1-33);N11K-GLP-2(1-33);T12K-GLP-2(1-33);I13K-GLP-2(1-33);L14K-GLP-2(1-33);D15K-GLP-2(1-33);N16K-GLP-2(1-33);L17K-GLP-2(1-33);A18K-GLP-2(1-33);D21K-GLP-2(1-33);N24K-GLP-2(1-33);Q28K-GLP-2(1-33);S5K/K30R-GLP-2(1-33);s7K/K30R-GLP-2(1-33);D8K/K30R-GLP-2(1-33);E9K/K30R-GLP-2(1-33);M10K/K30R-GLP-2(1-33);N11K/K30R-GLP-2(1-33);T12K/K30R-GLP-2(1-33);I13K/K30R-GLP-2(1-33);L14K/K30R-GLP-2(1-33);D15K/K30R-GLP-2(1-33);N16K/K30R-GLP-2(1-33);L17K/K30R-GLP-2(1-33);A18K/K30R-GLP-2(1-33);D21K/K30R-GLP-2(1-33);N24K/K30R-GLP-2(1-33);Q28K/K30R-GLP-2(1-33);K30R/D33K-GLP-2(1-33);D3E/K30R/D33E-GLP-2(1-33);D3E/S5K/K30R/D33E-GLP-2(1-33);D3E/S7K/K30R/D33E-GLP-2(1-33);D3E/D8K/K30R/D33E-GLP-2(1-33);D3E/E9K/K30R/D33E-GLP-2(1-33);D3E/M10K/K30R/D33E-GLP-2(1-33);D3E/N11K/K30R/D33E-GLP-2(1-33);D3E/T12K/K30R/D33E-GLP-2(1-33);D3E/I13K/K30R/D33E-GLP-2(1-33);D3E/L14K/K30R/D33E-GLP-2(1-33);D3E/D15K/K30R/D33E-GLP-2(1-33);D3E/N16K/K30R/D33E-GLP-2(1-33);D3E/L17K/K30R/D33E-GLP-2(1-33);D3E/A18K/K30R/D33E-GLP-2(1-33);D3E/D21K/K30R/D33E-GLP-2(1-33);D3E/N24K/K30R/D33E-GLP-2(1-33);和 D3E/Q28K/K30R/D33E-GLP-2(1-33)。

[0105] 具有与 GLP-2 蛋白质附着的仅一个亲脂取代基的 GLP-2 衍生物也可本发明的方法中应用,例如其中亲脂取代基包括 4-40 个碳原子、例如 8-25 个碳原子、例如 12-20 个碳原子的 GLP-2 衍生物。

[0106] 下述列表包含可在本发明的方法中具体应用的 GLP-2 衍生物:

- [0107] S5K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33);
- [0108] S7K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33);
- [0109] D8K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33);
- [0110] E9K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33);
- [0111] M10K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33);
- [0112] N11K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33);
- [0113] T12K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33);
- [0114] I13K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33);
- [0115] L14K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33);
- [0116] D15K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33);
- [0117] N16K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33);
- [0118] L17K(3-(辛酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33);
- [0119] L17K(3-(壬酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33);
- [0120] L17K(3-(癸酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33);
- [0121] L17K(3-(十一烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33);
- [0122] L17K(3-(十二烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33);

- [0123] L17K(3-(十三烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0124] L17K(3-(十四烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0125] L17K(3-(十五烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0126] L17K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0127] L17K(3-(十七烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0128] L17K(3-(十八烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0129] L17K(3-(十九烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0130] L17K(3-(二十烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0131] L17K((S)-4-羧基-4-(辛酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0132] L17K((S)-4-羧基-4-(壬酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0133] L17K((S)-4-羧基-4-(癸酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0134] L17K((S)-4-羧基-4-(十一烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0135] L17K((S)-4-羧基-4-(十二烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0136] L17K((S)-4-羧基-4-(十三烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0137] L17K((S)-4-羧基-4-(十四烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0138] L17K((S)-4-羧基-4-(十五烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0139] L17K((S)-4-羧基-4-(十六烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0140] L17K((S)-4-羧基-4-(十七烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0141] L17K((S)-4-羧基-4-(十八烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0142] L17K((S)-4-羧基-4-(十九烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0143] L17K((S)-4-羧基-4-(二十烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0144] L17K(4-(辛酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0145] L17K(4-(壬酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0146] L17K(4-(癸酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0147] L17K(4-(十一烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0148] L17K(4-(十二烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0149] L17K(4-(十三烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0150] L17K(4-(十四烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0151] L17K(4-(十五烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0152] L17K(4-(十六烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0153] L17K(4-(十七烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0154] L17K(4-(十八烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0155] L17K(4-(十九烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0156] L17K(4-(二十烷酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0157] A18K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0158] D21K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0159] N24K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0160] Q28K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0161] S5K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;

- [0162] S7K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0163] D8K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0164] E9K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0165] M10K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0166] N11K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0167] T12K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0168] I13K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0169] L14K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0170] D15K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0171] N16K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0172] L17K(3-(辛酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0173] L17K(3-(壬酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0174] L17K(3-(癸酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0175] L17K(3-(十一烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0176] L17K(3-(十二烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0177] L17K(3-(十三烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0178] L17K(3-(十四烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0179] L17K(3-(十五烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0180] L17K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0181] L17K(3-(十七烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0182] L17K(3-(十八烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0183] L17K(3-(十九烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0184] L17K(3-(二十烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0185] L17K((S)-4-羧基-4-(辛酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0186] L17K((S)-4-羧基-4-(壬酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0187] L17K((S)-4-羧基-4-(癸酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0188] L17K((S)-4-羧基-4-(十一烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0189] L17K((S)-4-羧基-4-(十二烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0190] L17K((S)-4-羧基-4-(十三烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0191] L17K((S)-4-羧基-4-(十四烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0192] L17K((S)-4-羧基-4-(十五烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0193] L17K((S)-4-羧基-4-(十六烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0194] L17K((S)-4-羧基-4-(十七烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0195] L17K((S)-4-羧基-4-(十八烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0196] L17K((S)-4-羧基-4-(十九烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0197] L17K((S)-4-羧基-4-(二十烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0198] L17K(4-(辛酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0199] L17K(4-(壬酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33);
- [0200] L17K(4-(癸酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33);

- [0201] L17K(4-(十一烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0202] L17K(4-(十二烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0203] L17K(4-(十三烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0204] L17K(4-(十四烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0205] L17K(4-(十五烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0206] L17K(4-(十六烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0207] L17K(4-(十七烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0208] L17K(4-(十八烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0209] L17K(4-(十九烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0210] L17K(4-(二十烷酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0211] A18K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0212] D21K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0213] N24K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0214] Q28K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0215] D3E/S5K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0216] D3E/S7K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0217] D3E/D8K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0218] D3E/E9K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0219] D3E/M10K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0220] D3E/N11K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0221] D3E/T12K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0222] D3E/I13K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0223] D3E/L14K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0224] D3E/D15K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0225] D3E/N16K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0226] D3E/L17K(3-(辛酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0227] D3E/L17K(3-(壬酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0228] D3E/L17K(3-(癸酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0229] D3E/L17K(3-(十一烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0230] D3E/L17K(3-(十二烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0231] D3E/L17K(3-(十三烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0232] D3E/L17K(3-(十四烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0233] D3E/L17K(3-(十五烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0234] D3E/L17K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0235] D3E/L17K(3-(十七烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0236] D3E/L17K(3-(十八烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0237] D3E/L17K(3-(十九烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0238] D3E/L17K(3-(二十烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0239] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(辛酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

- [0240] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(壬酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0241] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(癸酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0242] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(十一烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0243] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(十二烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0244] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(十三烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0245] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(十四烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0246] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(十五烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0247] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(十六烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0248] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(十七烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0249] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(十八烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0250] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(十九烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0251] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(二十烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0252] D3E/L17K(4-(辛酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0253] D3E/L17K(4-(壬酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0254] D3E/L17K(4-(癸酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0255] D3E/L17K(4-(十一烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0256] D3E/L17K(4-(十二烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0257] D3E/L17K(4-(十三烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0258] D3E/L17K(4-(十四烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0259] D3E/L17K(4-(十五烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0260] D3E/L17K(4-(十六烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0261] D3E/L17K(4-(十七烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0262] D3E/L17K(4-(十八烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0263] D3E/L17K(4-(十九烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0264] D3E/L17K(4-(二十烷酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0265] D3E/A18K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0266] D3E/D21K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0267] D3E/N24K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;和
- [0268] D3E/Q28K(3-(十六烷酰氨基)丙酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33)。

[0269] 将获益于本发明的方法的另一种蛋白质是因子 VII。可在本发明的方法中应用的因子 VII 化合物包含野生型因子 VII (即, 具有在美国专利号 4, 784, 950 中公开的氨基酸序列的多肽), 以及相对于野生型因子 VII 显示基本上相同或改善的生物活性的因子 VII 变体、因子 VII 相关多肽以及因子 VII 衍生物和因子 VII 缀合物。术语“因子 VII 化合物”意欲包含其未切割 (酶原) 形式的因子 VII 多肽、以及已蛋白酶解加工以产生其各自生物活性形式的那些, 其可以指定为因子 VIIa。一般地, 因子 VII 在残基 152 和 153 之间切割以产生因子 VIIa。因子 VII 的此种变体可以显示相对于人因子 VII 的不同性质, 包括稳定性、磷脂结合、改变的比活性等。

[0270] 如本文所使用的, “因子 VII 相关多肽”包含多肽, 包括变体, 其中相对于野生型因子 VIIa 的活性, 因子 VIIa 生物活性已相当大地修饰或减少。这些多肽包括但不限于修饰

或破坏多肽生物活性的特定氨基酸序列改变已引入其内的因子 VII 或因子 VIIa。

[0271] 如本文所使用的,术语“因子 VII 衍生物”意指野生型因子 VII、相对于野生型因子 VII 显示基本上相同或改善的生物活性的因子 VII 变体和因子 VII 相关多肽,其中亲本蛋白质的一个或多个氨基酸已例如通过烷基化、聚乙二醇化、酰化、酯形成或酰胺形成等进行化学修饰。这包括但不限于聚乙二醇化的人因子 VIIa、半胱氨酸-聚乙二醇化的人因子 VIIa 及其变体。

[0272] 术语“聚乙二醇化的人因子 VIIa”意指具有修饰到人因子 VIIa 多肽的 PEG 分子的人因子 VIIa。应当理解,PEG 分子可以与因子 VIIa 多肽的任何部分附着,包括因子 VIIa 多肽的任何氨基酸残基或碳水化合物部分。术语“半胱氨酸-聚乙二醇化的人因子 VIIa”意指具有与人因子 VIIa 中引入的半胱氨酸巯基缀合的 PEG 分子的因子 VIIa。

[0273] 因子 VIIa 在血液凝固中的生物活性衍生自其 (i) 与组织因子 (TF) 结合和 (ii) 催化因子 IX 或因子 X 的蛋白酶剪切,以产生活化的因子 IX 或 X (分别为因子 IXa 或 Xa) 的能力。为了本发明的目的,因子 VIIa 生物活性可以通过测量制剂促进血液凝固的能力进行定量,其中使用因子 VII 缺陷血浆和促凝血酶原激酶,如例如美国专利号 5,997,864 中描述的。在这个测定中,生物活性表示为相对于对照样品凝固时间中的减少,并且通过与包含 1 单位 /ml 因子 VII 活性的合并人血清标准相比较转化成“因子 VII 单位”。可替代地,因子 VIIa 生物活性可以通过下述进行定量:(i) 测量因子 VIIa 在包括包埋在脂质膜中的 TF 和因子 X 的系统中产生因子 Xa 的能力。(Persson 等人, J. Biol. Chem. 272 :19919-19924, 1997);(ii) 测量在水系统中的因子 X 水解;(iii) 使用基于表面等离子共振的仪器测量其与 TF 的物理结合 (Persson, FEBS Letts. 413 :359-363, 1997) 和 (iv) 测量合成底物的水解。

[0274] 相对于野生型因子 VIIa,具有基本上相同或改善的生物活性的因子 VII 变体包含下述那些,当在如上所述的一种或多种凝固测定、蛋白酶解测定或 TF 结合测定中测试时,其显示已在相同细胞类型中产生的因子 VIIa 的特异性活性的至少约 25%、优选至少约 50%、更优选至少约 75% 且最优选至少约 90%。相对于野生型因子 VIIa,具有基本上减少的生物活性的因子 VII 变体是下述那些,当在如上所述的一种或多种凝固测定、蛋白酶解测定或 TF 结合测定中测试时,其显示已在相同细胞类型中产生的野生型因子 VIIa 的特异性活性的小于约 25%、优选小于约 10%、更优选小于约 5% 和最优选小于约 1%。相对于野生型因子 VII,具有相当大的修饰的生物活性的因子 VII 变体包括但不限于,显示 TF 不依赖性因子 X 蛋白酶解活性的因子 VII 变体和结合 TF 但不切割因子 X 的那些。

[0275] 相对于野生型因子 VII,显示与野生型因子 VII 基本上相同或更佳生物活性或可替代地显示相当大的修饰或减少的生物活性的因子 VII 变体包括但不限于,具有通过一个或多个氨基酸的插入、缺失或置换与野生型因子 VII 的序列不同的氨基酸序列的多肽。

[0276] 如本文所使用的,术语“变体”意指具有野生型因子 VII 的序列的因子 VII,其中亲本蛋白质的一个或多个氨基酸已由另一个氨基酸置换,和 / 或其中亲本蛋白质的一个或多个氨基酸已缺失,和 / 或其中一个或多个氨基酸已插入蛋白质中,和 / 或其中一个或多个氨基酸已加入亲本蛋白质中。此种添加可以在亲本蛋白质的 N 末端或 C 末端或两者处发生。在这个定义内的“变体”仍具有其活化形式的 FVII 活性。在一个实施方案中,变体与野生型因子 VII 的序列 70% 等同。在一个实施方案中,变体与野生型因子 VII 的序列 80% 等同。

在另一个实施方案中,变体与野生型因子 VII 的序列 90% 等同。在进一步的实施方案中,变体与野生型因子 VII 的序列 95% 等同。

[0277] 具有与野生型因子 VII 基本上相同生物活性的因子 VII 变体的非限制性例子包括 S52A-FVIIa, S60A-FVIIa(Lino 等人, Arch. Biochem. Biophys. 352 :182-192, 1998) ; 如美国专利号 5,580,560 中公开的显示增加的蛋白酶解稳定性的 FVIIa 变体;已在残基 290 和 291 之间或在残基 315 和 316 之间蛋白酶解切割的因子 VIIa(Mollerup 等人, Biotechnol. Bioeng. 48 :501-505, 1995) ;氧化形式的因子 VIIa(Kornfelt 等人, Arch. Biochem. Biophys. 363 :43-54, 1999) ;如 PCT/DK02/00189 中公开的 FVII 变体;和如 WO 02/38162(Scripps Research Institute) 中公开的显示增加的蛋白酶解稳定性的 FVII 变体;如 WO 99/20767(University of Minnesota) 中公开的具有修饰的 Gla-结构域且显示增强的膜结合的 FVII 变体;和如 WO 01/58935(Maxygen ApS) 中公开的 FVII 变体,所有所述专利文件引入本文作为参考。

[0278] 特别提及与野生型 FVIIa 相比较具有增加的生物活性的 FVII 变体,包括如 WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, PCT/DK02/00635, 丹麦专利申请 PA 2002 01423, 丹麦专利申请 PA 2001 01627 ;W002/38162(Scripps Research Institute) 中公开的 FVII 变体;和如 JP2001061479(Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.) 中公开的具有增强的活性的 FVIIa 变体,所有所述专利文件引入本文作为参考,所有所述专利文件引入本文作为参考。

[0279] 相对于野生型因子 VII, 具有相当大地减少或修饰的生物活性的因子 VII 变体的例子包括 R152E-FVIIa(Wildgoose 等人, Biochem 29 :3413-3420, 1990)、S344A-FVIIa(Kazama 等人, J. Biol. Chem. 270 :66-72, 1995)、FFR-FVIIa(Holst 等人, Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 15 :515-520, 1998) 和缺乏 Gla 结构域的因子 VIIa(Nicolaisen 等人, FEBS Letts. 317 :245-249, 1993), 所有所述专利文件引入本文作为参考。

[0280] 因子 VII 变体、因子 VII 或因子 VII 相关多肽的例子包括野生型因子 VII, L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, 和 S336G-FVII, L305V/K337A-FVII, L305V/V158D-FVII, L305V/E296V-FVII, L305V/M298Q-FVII, L305V/V158T-FVII, L305V/K337A/V158T-FVII, L305V/K337A/M298Q-FVII, L305V/K337A/E296V-FVII, L305V/K337A/V158D-FVII, L305V/V158D/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V-FVII, L305V/V158T/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V-FVII, L305V/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/K316H-FVII, S314E/K316Q-FVII, S314E/L305V-FVII, S314E/K337A-FVII, S314E/V158D-FVII, S314E/E296V-FVII, S314E/M298Q-FVII, S314E/V158T-FVII, K316H/L305V-FVII, K316H/K337A-FVII, K316H/V158D-FVII, K316H/E296V-FVII, K316H/M298Q-FVII, K316H/V158T-FVII, K316Q/L305V-FVII, K316Q/

K337A-FVII, K316Q/V158D-FVII, K316Q/E296V-FVII, K316Q/M298Q-FVII, K316Q/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D-FVII, S314E/L305V/E296V-FVII, S314E/L305V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/K337A/E296V-FVII, S314E/L305V/K337A/V158D-FVII, S314E/L305V/V158D/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V-FVII, S314E/L305V/V158T/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V-FVII, S314E/L305V/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D-FVII, K316H/L305V/E296V-FVII, K316H/L305V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/K337A/E296V-FVII, K316H/L305V/K337A/V158D-FVII, K316H/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V-FVII, K316H/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V-FVII, K316H/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D-FVII, K316Q/L305V/E296V-FVII, K316Q/L305V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/K337A/E296V-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158D-FVII, K316Q/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V-FVII, K316Q/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V-FVII, K316Q/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/K337A-FVII, F374Y/V158D-FVII, F374Y/E296V-FVII, F374Y/M298Q-FVII, F374Y/V158T-FVII, F374Y/S314E-FVII, F374Y/L305V-FVII, F374Y/L305V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D-FVII, F374Y/L305V/E296V-FVII, F374Y/L305V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T-FVII, F374Y/L305V/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-FVII, F374Y/K337A/M298Q-FVII, F374Y/K337A/E296V-FVII, F374Y/K337A/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q-FVII, F374Y/V158D/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q-FVII, F374Y/V158T/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E-FVII, F374Y/S314E/M298Q-FVII, F374Y/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158D-FVII, F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII, F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII, F374Y/L305V/V158D/

M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII, F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158T-FVII, F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII, F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158D-FVII, F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII, F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII, F374Y/K337A/E296V/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158D/M298Q/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, S52A- 因子 VII、S60A- 因子 VII ;R152E- 因子 VII、S344A- 因子 VII、缺乏 Gl_a 结构域的因子 VIIa ;和 P11Q/K33E-FVII、T106N-FVII、K143N/N145T-FVII、V253N-FVII、R290N/A292T-FVII、G291N-FVII、R315N/V317T-FVII、K143N/N145T/R315N/V317T-FVII ;和在从 233Thr 到 240Asn 的氨基酸序列中具有置换、添加或缺失的 FVII,在从 304Arg 到 329Cys 的氨基酸序列中具有置换、添加或缺失的 FVII。

[0281] 将获益于本发明的方法的另一种蛋白质是 IL-19。可在本发明的方法中应用的 IL-19 的具体例子包括 W0 98/08870 (Human Genome Science) 中公开的那些,所述专利文件引入本文作为参考。特别提及在 W098/08870 中作为 SEQ ID NO :2 公开的蛋白质。

[0282] 将获益于本发明的方法的另一种蛋白质是 IL-20。可应用的 IL-20 的具体例子包括 W0 99/27103 (ZymoGenetics) 中公开的那些,所述专利文件引入本文作为参考。在本背景中,IL-20 意指 IL-20 自身及其片段以及与 IL-20 或其片段至少 90% 等同的多肽。可在本

发明的方法中特别应用的蛋白质包括在 WO 99/27103 中作为下述公开的那些 :SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、SEQ ID NO :26、SEQ ID NO :27、SEQ ID NO :28、SEQ ID NO :29、SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33、SEQ ID NO :34 和 SEQ ID NO :35。

[0283] 将获益于本发明的方法的另外一种蛋白质是 IL-21。在本发明的方法中可应用的 IL-21 的例子包括 WO 00/53761 (ZymoGenetics) 中公开的那些,所述专利文件引入本文作为参考。特别提及在 WO 00/53761 中作为 SEQ ID NO :2 公开的蛋白质。

[0284] 将获益于本发明的方法的另外一种蛋白质是 TTF。TTF 蛋白质是主要与胃肠道相关发现的蛋白质家族。特别提及已知来自人、小鼠和大鼠的乳腺癌相关 pS2 蛋白质 (TTF-1),已知来自人、猪、大鼠和小鼠的解痉多肽 (TTF-2),以及已知来自人、大鼠和小鼠的肠三叶因子 (TTF-3)。

[0285] 来自可在本发明的方法中应用的 TTF 家族的其他蛋白质包括 W002/46226 (Novo Nordisk) 中公开的那些,所述专利文件包括在本文中作为参考。特别提及 TTF-2 蛋白质,其中具有在 WO 02/46226 的 SEQ ID NO :1 中公开的氨基酸的 TTF2 蛋白质包括在 Cys6-Cys104、Cys8-Cys35、Cys19-Cys34、Cys29-Cys46、Cys58-Cys84、Cys68-Cys83 和 Cys78-Cys95 之间的双硫键,并且其中独立地选自糖残基和寡糖的部分 X 与 Asn15 共价附着。

[0286] TTF 家族的其他蛋白质包括 TTF-1 和 TTF-3 二聚物,如引入本文作为参考的 WO 96/06861 (Novo Nordisk) 中公开的那些。

[0287] 几种黑皮质素 (melanocortin) 受体是已知的,并且可在本发明的方法中应用的蛋白质特别提及肽黑皮质素 -4 受体激动剂,其已知具有食欲抑制作用。特别提及在下述专利文件中公开的一种或多种蛋白质,所述专利文件全部引入本文作为参考 :US 6,054,556 (Hruby)、W000/05263 (William Harvey Research)、W0 00/35952 (Melacure)、W0 00/35952 (Melacure)、W0 00/58361 (Procter & Gamble)、W001/52880 (Merck)、W0 02/26774 (Procter & Gamble)、W003/06620 (Palatin)、W0 98/27113 (Rudolf Magnus Institute) 和 W099/21571 (Trega)。

[0288] 可在本发明的方法中应用的其他一种或多种蛋白质包括 ACTH、促肾上腺皮质激素释放因子、血管紧张素、降钙素、胰岛素及其片段和类似物、胰高血糖素、IGF-1、IGF-2、肠胃泌素、胃泌素、四肽胃泌素、五肽胃泌素、尿胃泌素 (urogastrin)、表皮生长因子、促胰液素、神经生长因子、促甲状腺素释放激素、生长抑素、生长激素释放激素、生长调节素、甲状旁腺激素、血小板生成素、促红细胞生成素、下丘脑释放因子、促乳素、促甲状腺激素、内啡肽、脑啡肽、加压素、催产素、阿片样物质 (opioids) 及其类似物、天冬酰胺酶、精氨酸酶、精氨酸脱氨酶、腺苷脱氨酶和核糖核酸酶。

[0289] 根据本发明的方法待修饰的蛋白质可以从天然来源 (例如,植物、动物或微生物,例如酵母、细菌、真菌或病毒) 中分离,或它们可以是合成的。来自天然来源的蛋白质也包括来自转基因来源的蛋白质,例如已进行基因修饰以表达或增加蛋白质表达的来源,其中所述蛋白质可以是在自然界中存在的意义上“天然的”或在仅由于人为干预存在的意义上

“非天然的”。从天然来源中分离的蛋白质也可以在本发明的缀合前实施合成修饰。

[0290] 药物组合物

[0291] 本发明还涉及包括通过本文公开的任何方法修饰的蛋白质的药物组合物。在一个方面,此种药物组合物包括修饰的蛋白质例如生长激素 (GH), 其以 10^{-15} mg/ml 至 200mg/ml、例如 10^{-10} mg/ml 至 5mg/ml 的浓度存在, 并且其中所述组合物具有 2.0 至 10.0 的 pH。组合物可以进一步包括缓冲系统、一种或多种防腐剂、一种或多种强壮剂、一种或多种螯合剂、稳定剂和表面活性剂。在本发明的一个实施方案中, 药物组合物是水组合物, 即包含水的组合物。此种组合物一般是溶液或悬浮液。在本发明的进一步的实施方案中, 药物组合物是水溶液。术语“水组合物”定义为包括至少 50% w/w 水的组合物。同样地, 术语“水溶液”定义为包括至少 50% w/w 水的溶液, 并且术语“水悬浮液”定义为包括至少 50% w/w 水的悬浮液。

[0292] 在另一个实施方案中, 药物组合物是冷冻干燥组合物, 在使用前医生或患者向其中加入溶剂和 / 或稀释剂。

[0293] 在另一个实施方案中, 药物组合物是无需任何先前溶解即可使用的干燥组合物 (例如, 冷冻干燥或喷雾干燥)。

[0294] 在进一步的方面, 本发明涉及包括修饰的蛋白质例如修饰的 GH 蛋白质和缓冲剂的水溶液的药物组合物, 其中所述修饰的蛋白质例如修饰的 GH 蛋白质以 0.1-100mg/ml 或更高的浓度存在, 并且其中所述组合物具有约 2.0 至约 10.0 的 pH。

[0295] 在本发明的另一个实施方案中, 组合物的 pH 选自 2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9 和 10.0。

[0296] 在本发明的进一步的实施方案中, 缓冲剂选自乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸、甘氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠和三 (羟甲基)-氨基甲烷、N-二 [羟乙基] 甘氨酸 (bicine)、N-[2-羟-1,1-二羟甲基乙基] 甘氨酸 (tricine)、苹果酸、琥珀酸盐、马来酸、延胡索酸、酒石酸、天冬氨酸或其混合物。这些特定缓冲剂中的每一种构成本发明的替代实施方案。

[0297] 在本发明的进一步的实施方案中, 组合物进一步包括药学上可接受的防腐剂。在本发明的进一步的实施方案中, 防腐剂选自苯酚、邻甲酚、间甲酚、对甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、2-苯氧基乙醇、对羟基苯甲酸丁酯、2-苯基乙醇、苯甲醇、氯代丁醇和硫柳汞、溴硝丙二醇、苯甲酸、咪唑烷基脲、氯己定、脱氢乙酸钠、氯甲酚、对羟基苯甲酸乙酯、氯化苄乙铵、氯苯甘油醚 (3p-氯苯氧基丙-1,2-二醇) 或其混合物。在本发明的进一步的实施方案中, 防腐剂以 0.1mg/ml 至 20mg/ml 的浓度存在。在本发明的进一步的实施方案中, 防腐剂以 0.1mg/ml 至 5mg/ml 的浓度存在。在本发明的进一步的实施方案中, 防腐剂以 5mg/ml 至 10mg/ml 的浓度存在。在本发明的进一步的实施方案中, 防腐剂以 10mg/ml 至 20mg/ml 的浓度存在。这些特定防腐剂中的每一种构成本发明的替代实施方案。防腐剂在药物组合物中的用途是本领域技术人员众所周知的。为了方便起见参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 20 版, 2000。

[0298] 在本发明的进一步的实施方案中,组合物进一步包括等渗剂。在本发明的进一步的实施方案中,等渗剂选自盐(例如氯化钠)、糖或糖醇、氨基酸(例如 L-甘氨酸、L-组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸)、糖醇(例如甘油(丙三醇)、1,2-丙二醇(丙二醇)、1,3-丙二醇、1,3-丁二醇)聚乙二醇(例如 PEG400)、或其混合物。可以使用任何糖例如单糖、二糖或多糖、或水溶性葡聚糖,包括例如果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、葡聚糖、支链淀粉、糊精、环糊精、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素-Na。在一个实施方案中,糖添加剂是蔗糖。糖醇定义为具有至少一个-OH 基团的 C4-C8 烃,并且包括例如甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、半乳糖醇、卫矛醇、木糖醇和阿拉伯糖醇。在一个实施方案中,糖醇添加剂是甘露糖醇。上文提及的糖或糖醇可以个别或组合使用。关于使用的量无固定限制,只要糖或糖醇在液体制剂中是可溶的,并且不会不利地影响使用本发明的方法获得的稳定作用。在一个实施方案中,糖或糖醇浓度是约 1mg/ml 至约 150mg/ml。在本发明的进一步的实施方案中,等渗剂以 1mg/ml 至 50mg/ml 的浓度存在。在本发明的进一步的实施方案中,等渗剂以 1mg/ml 至 7mg/ml 的浓度存在。在本发明的进一步的实施方案中,等渗剂以 8mg/ml 至 24mg/ml 的浓度存在。在本发明的进一步的实施方案中,等渗剂以 25mg/ml 至 50mg/ml 的浓度存在。这些具体等渗剂中的每一种构成本发明的替代实施方案。等渗剂在药物组合物中的用途是本领域技术人员众所周知的。为了方便起见参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 20 版, 2000。

[0299] 在本背景中,术语“药学上可接受的盐”意指对患者无害的盐。此种盐包括药学上可接受的酸加成盐、药学上可接受的金属盐、铵和烷基化铵盐。酸加成盐包括无机盐和有机酸的盐。合适无机酸的代表性例子包括盐酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸、硫酸、硝酸等。合适有机酸的代表性例子包括甲酸、乙酸、三氯乙酸、三氟乙酸、丙酸、苯甲酸、肉桂酸、柠檬酸、延胡索酸、乙醇酸、乳酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、草酸、苦味酸、丙酮酸、水杨酸、琥珀酸、甲磺酸、乙磺酸、酒石酸、抗坏血酸、扑酸、二亚甲基水杨酸、乙二磺酸、葡糖酸、柠檬酸、天冬氨酸、硬脂酸、棕榈酸、EDTA、乙醇酸、对氨基苯甲酸、谷氨酸、苯磺酸、对甲苯磺酸等。药学上可接受的无机或有机酸加成盐的进一步例子包括引入本文作为参考的 J. Pharm. Sci. 1977, 66, 2 中列出的药学上可接受的盐。金属盐的例子包括锂、钠、钾、镁盐等。铵和烷基化铵盐的例子包括铵、甲铵、二甲铵、三甲铵、乙铵、羟乙铵、二乙铵、丁铵、四甲铵等。

[0300] 在本发明的进一步的实施方案中,组合物进一步包括螯合剂。在本发明的进一步的实施方案中,螯合剂选自乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸和天冬氨酸的盐及其混合物。在本发明的进一步的实施方案中,螯合剂以 0.1mg/ml 至 5mg/ml 的浓度存在。在本发明的进一步的实施方案中,螯合剂以 0.1mg/ml 至 2mg/ml 的浓度存在。在本发明的进一步的实施方案中,螯合剂以 2mg/ml 至 5mg/ml 的浓度存在。这些具体螯合剂中的每一种构成本发明的替代实施方案。螯合剂在药物组合物中的用途是本领域技术人员众所周知的。为了方便起见参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 20 版, 2000。

[0301] 在本发明的进一步的实施方案中,组合物进一步包括稳定剂。稳定剂在药物组合物中的用途是本领域技术人员众所周知的。为了方便起见参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 20 版, 2000。

[0302] 更具体而言,本发明的组合物是稳定的液体药物组合物,其治疗活性组分包括在液体药物组合物中的贮存过程中可能显示聚集物形成的蛋白质。“聚集物形成”意指蛋白质

分子之间导致形成可以保持可溶的寡聚物或由溶液沉淀的大可见聚集物的物理相互作用。“在贮存过程中”意指液体药物组合物或组合物制备后,不立即施用于受试者。相反,在制备后,它包装用于贮存,以液体形式、冷冻状态或干燥形式,用于随后重构成液体形式或适合于施用于受试者的其他形式。“干燥形式”意指液体药物组合物或组合物通过冷冻干燥(即,冻干;参见例如 Williams 和 Polli(1984) *J. Parenteral Sci. Technol.* 38 :48-59)、喷雾干燥(参见 Masters(1991) 在 *Spray-Drying Handbook* 中(第 5 版;Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), 第 491-676 页;Broadhead 等人(1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18 :1169-1206;和 Mumenthaler 等人(1994) *Pharm. Res.* 11 :12-20)、或风干(Carpenter 和 Crowe(1988) *Cryobiology* 25 :459-470;和 Roser(1991) *Biopharm.* 4 :47-53)进行干燥。在液体药物组合物的贮存过程中通过蛋白质的聚集物形成可以不利地影响那种蛋白质的生物活性,从而导致药物组合物的治疗功效的丧失。此外,当含蛋白质的药物组合物使用输注系统进行施用,聚集物形成可能引起其他问题,例如管道系统、膜或泵堵塞。

[0303] 本发明的药物组合物可以进一步包括足以减少在组合物的贮存过程中通过蛋白质的聚集物形成的氨基酸碱量。“氨基酸碱”意指氨基酸或氨基酸组合,其中任何给定氨基酸以其游离碱形式或以其盐形式存在。当使用氨基酸组合时,所有氨基酸都可以以其游离碱形式存在,所有都可以以其盐形式存在,或一些可以以其游离碱形式存在,而其他的以其盐形式重组。在一个实施方案中,用于制备本发明的组合物的氨基酸是携带荷电侧链的那些,例如精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。特定氨基酸(甲硫氨酸、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸及其混合物)的任何立体异构体(即,L或D同分异构体或其混合物),或这些立体异构体的组合或甘氨酸或有机碱例如但不限于咪唑,可以在本发明的药物组合物中存在,只要特定氨基酸或有机碱以其游离碱形式或其盐形式存在。在一个实施方案中,使用氨基酸的L-立体异构体。在一个实施方案中,使用L-立体异构体。本发明的组合物也可以用这些氨基酸的类似物进行配制。“氨基酸类似物”意指天然存在的氨基酸的衍生物,其达到在本发明的液体药物组合物的贮存过程中减少通过蛋白质的聚集物形成的所需作用。合适的精氨酸类似物包括例如氨基胍、鸟氨酸和N-乙基L-精氨酸,合适的甲硫氨酸类似物包括乙硫氨酸和丁硫氨酸(buthionine),并且合适的半胱氨酸类似物包括S-甲基-L半胱氨酸。与其他氨基酸一样,氨基酸类似物以其游离碱形式或其盐形式掺入组合物内。在本发明的进一步的实施方案中,氨基酸或氨基酸类似物以足以阻止或延迟蛋白质聚集的浓度使用。

[0304] 在本发明的进一步的实施方案中,当充当治疗剂的蛋白质是包括对氧化易感的至少一个甲硫氨酸残基的蛋白质时,可以加入甲硫氨酸(或其他硫氨基酸或氨基酸类似物),以抑制甲硫氨酸残基至甲硫氨酸亚砷的氧化。“抑制”意指随着时间过去甲硫氨酸氧化种类的最小积累。抑制甲硫氨酸氧化导致蛋白质以其正确分子形式的更大保留。可以使用甲硫氨酸(L或D同分异构体)的任何立体异构体或其任何组合。待加入的量应是足以抑制甲硫氨酸残基氧化的量,从而使得甲硫氨酸亚砷的量对调节作用是可接受的。一般地,这意味着组合物包含不超过约10%至约30%的甲硫氨酸亚砷。一般地,这可以通过加入甲硫氨酸来获得,从而使得加入的甲硫氨酸与甲硫氨酸残基的比是约1:1至约1000:1,例如10:1至约100:1。

[0305] 在本发明的进一步的实施方案中,组合物进一步包括选自高分子量聚合物或低分子量化合物的稳定剂。在本发明的进一步的实施方案中,稳定剂选自聚乙二醇(例如PEG3350)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮、羧基-/羟基纤维素或其衍生物(例如,HPC、HPC-SL、HPC-L和HPMC)、环糊精、含硫物质例如一硫代甘油、巯基乙酸和2-甲巯基乙醇和不同盐(例如氯化钠)。这些具体稳定剂中的每一种构成本发明的替代实施方案。

[0306] 药物组合物还可以包括另外的稳定剂,其进一步增强其中的治疗活性蛋白质的稳定性。对本发明特别重要的稳定剂包括但不限于,保护蛋白质不受甲硫氨酸氧化的甲硫氨酸和EDTA,以及保护蛋白质不受与冻融或机械剪切相关的聚集的非离子型表面活性剂。

[0307] 在本发明的进一步的实施方案中,组合物进一步包括表面活性剂。在本发明的进一步的实施方案中,表面活性剂选自去污剂,乙氧基化蓖麻油,聚乙二醇化的甘油酯,乙酰化单酸甘油酯,失水山梨糖醇脂肪酸酯,聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段聚合物(例如泊洛沙姆,例如**Pluronic**[®] F68、泊洛沙姆 188 和 407、Triton X-100),聚氧乙烯失水山梨糖醇脂肪酸酯,聚氧乙烯和聚乙烯衍生物例如烷基化和烷氧基化衍生物(tweens,例如 Tween-20、Tween-40、Tween-80 和 Brij-35),单酸甘油酯或其乙氧基化衍生物,甘油二酯或其聚氧乙烯衍生物,醇,甘油,凝集素和磷脂(例如磷脂酰丝氨酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、双磷脂酰甘油和鞘磷脂),磷脂衍生物(例如二棕榈酰磷脂酸)和溶血磷脂(例如棕榈酰溶血磷脂酰-L-丝氨酸和乙醇胺、胆碱、丝氨酸或苏氨酸的1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酯)以及溶血磷脂酰和磷脂酰胆碱的烷基、烷氧基(烷基酯)、烷氧基(烷基醚)-衍生物,例如溶血磷脂胆碱的月桂酰和肉豆蔻酰衍生物,二棕榈酰磷脂酰胆碱,和极性首基的修饰,所述首基是胆碱、乙醇胺、磷脂酸、丝氨酸、苏氨酸、甘油、肌醇和带正电的DODAC、DOTMA、DCP、BISHOP、溶血磷脂酰丝氨酸和溶血磷脂酰苏氨酸,和甘油磷酸酯(例如脑磷脂),甘油糖脂(例如吡喃半乳糖苷(galactopyransoide)),鞘糖脂(例如神经酰胺,神经节苷脂),十二烷基磷酸胆碱,鸡蛋溶血卵磷脂,梭链孢酸衍生物-(例如牛磺二氢梭链孢酸钠等),长链脂肪酸及其C₆-C₁₂盐(例如油酸和辛酸),酰基肉碱和衍生物,赖氨酸、精氨酸或组氨酸的N^α-酰化衍生物,或赖氨酸或精氨酸的侧链酰化衍生物,包括赖氨酸、精氨酸或组氨酸和中性或酸性氨基酸的任何组合的二蛋白质(diprotein)的N^α-酰化衍生物,包括中性氨基酸和2个荷电氨基酸的任何组合的三蛋白质的N^α-酰化衍生物,DSS(多库酯钠,CAS登记号[577-11-7]),多库酯钙,CAS登记号[128-49-4]),多库酯钾,CAS登记号[7491-09-0]),SDS(十二烷基硫酸钠或月桂基硫酸钠),辛酸钠,胆酸或其衍生物,胆汁酸及其盐和甘氨酸或牛磺酸缀合物,熊去氧胆酸,胆酸钠,去氧胆酸钠,牛磺胆酸钠,甘胆酸钠,N-十六烷基-N,N-二甲基-3-铵基-1-丙磺酸盐,阴离子(烷基-芳基-磺酸盐)单价表面活性剂,两性离子表面活性剂(例如N-烷基-N,N-二甲基铵基-1-丙磺酸盐、3-胆酰胺(cholamido)-1-丙基二甲基铵基-1-丙磺酸盐,阳离子表面活性剂(季铵碱)(例如十六烷基三甲基溴化铵、十六烷基氯化吡啶鎓),非离子表面活性剂(例如十二烷基β-D-吡喃葡萄糖苷),衍生自环氧丙烷和环氧乙烷至乙二胺的顺次加成的四功能嵌段共聚物的poloxamines(例如Tetronic's),或表面活性剂可以选自咪唑啉衍生物,或其混合物。这些具体表面活性剂中的每一种构成本发明的替代实施方案。

[0308] 表面活性剂在药物组合物中的用途是本领域技术人员已知的。为了方便起见参考Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,2000。

[0309] 其他成分可以存在于本发明的药物组合物中是可能的。此种另外成分可以包括润湿剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、张力改性剂、螯合剂、金属离子、含油载体、蛋白质（例如人血清清蛋白、明胶或蛋白质）和两性离子（例如氨基酸例如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸）。当然，此种另外成分不应不利地影响本发明的药物组合物的总稳定性。

[0310] 根据本发明的包含修饰的蛋白质例如修饰的 GH 蛋白质的药物组合物可以在几个部位处施用于有此治疗需要的患者，例如在局部部位处，例如皮肤和粘膜部位，在绕过吸收的部位处，例如在动脉、静脉、心脏中的施用，和在涉及吸收的部位处，例如在皮肤中、在皮肤下、在肌肉中或在腹部中的施用。

[0311] 根据本发明的药物组合物的施用可以通过几种施用途至需要此种治疗的患者，所述施用途例如舌、舌下、口腔、在口中、口部、在胃和肠中、鼻、肺，例如通过细支气管和肺泡或其组合、表皮、皮的、经皮、阴道、直肠、眼例如通过结膜、输尿管和肠胃外。

[0312] 本发明的组合物可以以几种剂型施用，例如，作为溶液、悬浮液、乳剂、微乳剂、多层乳剂、泡沫、油膏剂、糊剂、药膏、软膏、片剂、包衣片、冲洗剂、胶囊如硬明胶胶囊和软明胶胶囊、栓剂、直肠用胶囊、滴剂、凝胶、喷雾剂、粉末、气溶胶、吸入剂、滴眼剂、眼用软膏、眼用冲洗剂、阴道栓、阴道环、阴道软膏、注射溶液、原位转化溶液例如原位胶凝作用、原位设置、原位沉淀、原位结晶、输注溶液和移植片。

[0313] 本发明的组合物可以进一步在药物载体、药物递送系统和先进的药物递送系统中配制，或例如通过共价、疏水和静电相互作用与药物载体、药物递送系统和先进的药物递送系统附着，以进一步增强修饰的 GH 蛋白质的稳定性、增加生物利用率、增加可溶性、减少不利反应、达到本领域技术人员众所周知的时间治疗、且增加患者顺应性或其任何组合。载体、药物递送系统和先进的药物递送系统的例子包括但不限于，聚合物例如纤维素和衍生物、多糖例如葡聚糖和衍生物、淀粉和衍生物、聚（乙烯醇）、丙烯酸和甲基丙烯酸聚合物、聚乳酸和聚乙醇酸及其嵌段共聚物、聚乙二醇、载体蛋白质例如清蛋白、凝胶例如热胶凝系统例如本领域技术人员众所周知的嵌段共聚系统、胶束、脂质体、微球体、纳米微粒（nanoparticulate）、液晶及其分散体、在脂质-水系统中的相行为领域中技术人员众所周知的 L2 相及其分散体、聚合胶束、多层乳剂、自乳化、自微乳化、环糊精及其衍生物、和树状聚体。

[0314] 本发明的组合物在固体、半固体、粉末和溶液的组合物中 useful，用于修饰的蛋白质例如修饰的 GH 蛋白质的肺施用，其中使用例如计量剂量吸入器、干粉吸入器和喷洒器，全都是本领域技术人员众所周知的设备。

[0315] 本发明的组合物在控释、持续释放、延长释放、延迟释放和缓慢释放药物递送系统的组合物中特别有用。更具体而言但不限于，组合物在肠胃外控释和持续释放系统的组合物中 useful（2 种系统都导致在施用次数中的多倍减少），本领域技术人员众所周知的。更加优选地是皮下施用的控释和持续释放系统。不限制本发明的范围，有用的控释系统和组合物的例子是水凝胶、含油凝胶、液晶、聚合胶束、微球体、纳米颗粒。

[0316] 产生用于本发明的组合物的控释系统的方法包括但不限于结晶、缩合、共结晶、沉淀、共沉淀、乳化、分散、高压匀浆、胶囊化、喷雾干燥、微囊化、凝聚、相分离、溶剂蒸发以产生微球体、挤出和超临界流体过程。一般参考 Handbook of Pharmaceutical

Controlled Release(Wise, D.L., 编辑 Marcel Dekker, New York, 2000) 和 Drug and the Pharmaceutical Sciences 第 99 卷:Protein Composition and Delivery(MacNally, E. J., 编辑 Marcel Dekker, New York, 2000)。

[0317] 肠胃外施用可以借助于注射器任选笔样注射器通过皮下、肌内、腹膜内或静脉内注射来执行。可替代地,肠胃外施用可以借助于输注泵来执行。进一步的选择是组合物,其可以是以鼻或肺喷雾剂形式的溶液或悬浮液,用于施用修饰的蛋白质例如修饰的 GH 蛋白质。作为再进一步的选择,包含本发明的修饰的蛋白质例如修饰的 GH 蛋白质的药物组合物也可以适合于经皮施用,例如通过无针注射或来自片(patch),任选离子电渗疗法片或跨粘膜例如口腔施用。

[0318] 术语“稳定化的组合物”指具有增加的物理稳定性、增加的化学稳定性或增加的物理和化学稳定性的组合物。如本文所使用的,术语蛋白质组合物的“物理稳定性”指由于蛋白质暴露于热机械应力和/或与失稳界面和表面例如疏水表面和界面的相互作用,蛋白质形成生物学上无活性和/或不可溶的蛋白质聚集物的趋势。在使合适容器(例如药液筒或小瓶)中填充的组合物在不同温度下暴露于机械/物理应力(例如搅拌)各个时间段后,水蛋白质组合物的物理稳定性借助于目测检查和/或浊度测量进行评估。组合物的目测检查在具有暗背景的锐聚焦光下执行。组合物浊度的特征在于例如在 0 至 3 的量表上排列浊度程度的目测得分(显示无浊度的组合物与目测得分 0 对应,并且在日光下显示可见浊度的组合物与目测得分 3 对应)。当它显示在日光中的可见浊度时,组合物就蛋白质聚集而言分类为物理不稳定的。可替代地,组合物浊度可以通过本领域技术人员众所周知的简单浊度测量进行评估。水蛋白质组合物的物理稳定性还可以通过使用蛋白质构象状态的光谱试剂或探针进行评估。探针优选是与蛋白质的非天然构象异构体优先结合的小分子。蛋白质结构的小分子光谱探针的一个例子是硫代黄素 T。硫代黄素 T 是已广泛用于淀粉状蛋白原纤维检测的荧光染料。在原纤维以及可能的其他蛋白质构型的存在下,当与原纤维蛋白质形式结合时,硫代黄素 T 产生在约 450nm 处的新激发最大值和在约 482nm 处的增强发射。未结合的硫代黄素 T 在波长处基本上是无荧光的。

[0319] 其他小分子可以用作蛋白质结构从天然到非天然状态中的改变的探针。例如,“疏水片”探针优先与蛋白质的暴露疏水片结合。疏水片一般以其天然状态包埋在蛋白质的三级结构内,但随着蛋白质开始解折叠或变性而变得暴露。这些小分子、光谱探针的例子是芳族的、疏水性染料,例如蒽(antrhacene)、吖啶、菲咯啉等。其他光谱探针是金属-氨基酸络合物,例如疏水氨基酸的钴金属络合物,所述疏水氨基酸例如苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸等。

[0320] 如本文所使用的,术语蛋白质组合物的“化学稳定性”指蛋白质结构中的化学共价改变,其导致与天然蛋白质结构相比较,具有潜在更少生物效力和/或潜在增加的免疫原性性质的化学降解产物的形成。依赖于天然蛋白质和蛋白质暴露于其的环境的类型和性质,可以形成各种化学降解产物。化学降解的消除最可能不可避免,并且渐增量的化学降解产物经常在蛋白质组合物的贮存和使用过程中可见,如本领域技术人员众所周知的。大多数蛋白质易于脱酰胺,其中谷氨酰胺酰基或天冬酰胺酰基残基中的侧链酰胺基团水解以形成游离羧酸的过程。其他降解途径涉及高分子量转化产物的形成,其中 2 种或更多种蛋白质分子通过转酰胺基作用和/或二硫化物相互作用彼此共价结合,从而导致共价结

合的二聚体、寡聚体和多聚体降解产物的形成 (Stability of ProteinPharmaceuticals, Ahern, T. J. & Manning M. C., Plenum Press, New York 1992)。可以提及氧化 (例如甲硫氨酸残基的) 作为化学降解的另一种变化。通过在暴露于不同环境条件后 (降解产物的形成经常可以通过例如增加温度得到加速) 在各个时间点时测量化学降解产物的量, 可以评估蛋白质组合物的化学稳定性。经常使用各种层析技术 (例如 SEC-HPLC 和 / 或 RP-HPLC), 通过依赖于分子大小和 / 或电荷分离降解产物来测定每个个别降解产物的量。

[0321] 因此, 如上文概述的, “稳定化的组合物” 指具有增加的物理稳定性、增加的化学稳定性或增加的物理和化学稳定性的组合物。一般而言, 组合物在使用和贮存过程中必须是稳定的 (顺应推荐的使用和贮存条件) 直至达到到期日。

[0322] 在本发明的一个实施方案中, 包括修饰的 GH 蛋白质的药物组合物对于超过 6 周的使用和超过 3 年的贮存是稳定的。

[0323] 在本发明的另一个实施方案中, 包括修饰的 GH 蛋白质的药物组合物对于超过 4 周的使用和超过 3 年的贮存是稳定的。

[0324] 在本发明的进一步的实施方案中, 包括修饰的 GH 蛋白质的药物组合物对于超过 4 周的使用和超过 2 年的贮存是稳定的。

[0325] 在本发明的更进一步的实施方案中, 包括修饰的 GH 蛋白质的药物组合物对于超过 2 周的使用和超过 2 年的贮存是稳定的。

[0326] 本发明修饰的蛋白质的治疗用途

[0327] 在修饰的蛋白质是治疗蛋白质的程度上, 本发明还涉及本发明修饰的蛋白质在治疗中的用途, 并且特别涉及包括所述修饰的蛋白质的药物组合物。

[0328] 因此, 如本文所使用的, 术语“治疗”意指患者的处理和护理, 用于对抗状况例如疾病或病症的目的。该术语意欲包括对于患者所患的给定状况的治疗完全范围, 例如活性化合物的施用, 以减轻症状或并发症, 以延迟疾病、病症或状况的进展, 以减轻或缓解症状和并发症, 和 / 或治愈或消除疾病、病症或状况以及预防状况, 其中预防应当理解为患者的处理和护理, 用于对抗疾病、状况或病症的目的, 并且包括活性化合物的施用, 以预防症状或并发症的发作。待治疗的患者优选是哺乳动物, 特别是人类, 但它还可以包括动物, 例如犬、猫、牛、羊和猪。然而, 应当认识到治疗方案和预防 (预防性) 方案代表本发明的分别方面。

[0329] 如本文所使用的, 本发明修饰的蛋白质的“治疗有效量”意指足以治愈、减轻或部分抑制给定疾病及其并发症的临床表现的量。足以实现这点的量定义为“治疗有效量”。用于每个目的的有效量将依赖于例如疾病或损伤的严重程度以及受试者的重量、性别、年龄和总体状态。应当理解测定合适剂量可以使用常规实验, 通过构建值的矩阵且测试在矩阵中的不同点来达到, 这完全在受过训练的医生或兽医的普通技术内。

[0330] 本发明因此提供了用于在治疗中使用的根据本发明的修饰的蛋白质。

[0331] 同样, 一般肠胃外剂量在 10^{-9} mg/kg 至约 100 mg/kg 体重 / 施用的范围中。一般施用剂量是约 0.0000001 至约 10 mg/kg 体重 / 施用。确切剂量将依赖于例如适应症, 药物, 施用频率和方式, 待治疗的受试者的性别、年龄和总体状况, 待治疗的疾病或状况的性质和严重程度, 所需治疗效果和对于本领域技术人员显而易见的其他因素。一般给药频率是每天 2 次、每天 1 次、每 2 天 1 次 (bi-daily)、每周 2 次、每周 1 次或具有甚至更长的给药时间间隔。由于与相应未缀合的生长激素相比较, 本发明的化合物延长的半衰期, 具有长给药时间

间隔例如每周 2 次、每周 1 次或具有甚至更长的给药时间间隔的给药方案是本发明的具体实施方案。如下文描述的,许多疾病在治疗中使用伴随施用或顺次施用的超过一种药物进行治疗。因此,在用于治疗下文描述的疾病之一的治疗方法中使用与正常用于治疗所述疾病的一种或多种其他治疗活性化合物组合的本发明修饰的蛋白质,在本发明的范围内。通过类比,在用于所述疾病的药物制造中使用与正常用于治疗上述疾病之一的其他治疗活性化合物组合的本发明修饰的蛋白质,也在本发明的范围内。

[0332] 胰岛素用于治疗或预防糖尿病,并且在一个实施方案中,本发明因此提供了治疗 1 型或 2 型糖尿病的方法,该方法包括给有此需要的受试者施用治疗有效量的根据本发明的胰岛素或胰岛素化合物缀合物。因此,在一个实施方案中,本发明提供了根据本发明修饰的胰岛素在用于 1 型或 2 型糖尿病治疗的药物制造中的用途。

[0333] GLP-1 可以在高血糖症、2 型糖尿病、葡萄糖耐受不良、1 型糖尿病、肥胖、高血压、X 综合征、血脂异常、 β -细胞凋亡、 β -细胞缺乏、炎性肠病综合征、消化不良、认知病症例如认知增强、神经保护 (neuroprotection)、动脉粥样硬化 (atherosclerosis)、冠心病和其他心血管病症。在一个实施方案中,本发明因此提供了治疗所述疾病的方法,该方法包括给有此需要的受试者施用治疗有效量的根据本发明的 GLP-1 或 GLP-1 化合物缀合物。因此,在另一个实施方案中,本发明提供了根据本发明的 GLP-1 或 GLP-1 化合物缀合物在用于上述疾病治疗的药物制造中的用途。

[0334] GLP-2 可以在肠衰竭治疗中使用,所述肠衰竭导致营养物在肠中的吸收不良,并且特别地 GLP-2 可以在下述疾病的治疗中使用:小肠综合征、炎性肠病综合征、Chron 氏病、结肠炎包括胶原结肠炎、放射性结肠炎、放射后萎缩、非热带(谷蛋白耐受不良)和热带口炎性腹泻、在血管阻塞或创伤后损伤的组织、旅行者腹泻、脱水、菌血症、脓毒症、神经性厌食、在化学疗法后损伤的组织、早产儿、硬皮病 (scleroderma)、胃炎包括萎缩性胃炎、窦切除术后的萎缩性胃炎和幽门螺杆菌胃炎、溃疡、肠炎、陷凹、淋巴阻塞、血管疾病和移植物抗宿主、在外科手术后的愈合、放射后萎缩和化学疗法、和骨质疏松症。因此,本发明的目的是提供治疗上述疾病的方法,该方法包括给有此需要的受试者施用治疗有效量的根据本发明的 GLP-2 或 GLP-2 化合物缀合物。因此,在另一个实施方案中,本发明提供了根据本发明的 GLP-2 或 GLP-2 化合物缀合物在用于上述疾病治疗的药物制造中的用途。

[0335] 本发明的化合物还发挥生长激素活性,并且同样可以用于治疗将获益于循环生长激素量中的增加的疾病或状态。此种疾病或状态包括生长激素缺乏 (GHD);Turner 综合征、Prader-Willi 综合征 (PWS);Noonan 综合征;Down 综合征;慢性肾脏疾病、青少年类风湿性关节炎;囊性纤维化、在接受 HAART 治疗的儿童中的 HIV- 感染 (HIV/HALS 儿童);小于胎龄出生的矮小儿童 (SGA);具有极低出生体重出生的儿童但不是 SGA 中的身材矮小症 (VLBW);骨骼发育不良;软骨发育不良;软骨发育不全;特发性身材矮小症 (ISS);成人中的 GHD;长骨中或长骨的骨折,例如胫骨、腓骨、股骨、肱骨、桡骨、尺骨、锁骨、掌骨 (metacarpal)、跖骨 (metatarsal) 和指;松质骨 (spongy bones) 中或松质骨的骨折,例如头骨 (skull)、手的底部和足的底部;在例如手、膝或肩中的腱或韧带外科手术后的患者;具有或经历牵引成骨 (distraction osteogenesis) 的患者;在髋关节或盆置换、弯月面修复、脊柱融合或假体固定后的患者,例如在膝、髋、肩、肘、腕或颞中;骨接合术材料例如钉子、螺丝钉和板已固定到其内的患者;具有骨折不愈合或愈合不良的患者;在从胫骨到第一趾的切骨术

(osteatomia) 后的患者 ; 在移植物植入后的患者 ; 在由创伤或关节炎引起的膝中的关节软骨变性 ; 在具有 Turner 综合征的患者中的骨质疏松症 ; 在男性中的骨质疏松症 ; 在长期透析中的成年患者 (APCD) ; APCD 中营养不良相关的心血管病 ; APCD 中的恶病质逆转 ; APCD 中的癌症 ; APCD 中的慢性抽出性肺疾病 ; APCD 中的 HIV ; 具有 APCD 的老人 ; APCD 中的慢性肝病、APCD 中的疲劳综合征 ; Chron 氏病 ; 肝功能受损 ; 具有 HIV 感染的男性 ; 短肠综合征 ; 向心性肥胖 ; HIV 相关的脂肪营养不良综合征 (HALS) ; 男性不育症 ; 在大选择性外科手术、酒精 / 药物解毒作用或神经学创伤后的患者 ; 衰老 ; 虚弱老人 ; 骨关节炎 ; 外伤性损害的软骨 ; 勃起功能障碍 ; 纤维肌痛 (fibromyalgia) ; 记忆障碍 ; 抑郁 ; 外伤性脑损伤 ; 蛛网膜下出血 ; 极低出生体重 ; 代谢综合征 ; 糖皮质激素肌病 ; 或在儿童中由于糖皮质激素治疗的身材矮小症。生长激素也已用于加速肌肉组织、神经组织或伤口愈合 ; 对损害组织的血流加速或改善 ; 或在损害组织中的感染率降低, 该方法包括给有此需要的患者施用有效量的治疗有效量的式 I 的化合物。本发明因此提供了用于治疗这些疾病或状态的方法, 该方法包括给有此需要的患者施用治疗有效量的根据本发明的生长激素或生长激素化合物缀合物。

[0336] 一般地, 施用的修饰的生长激素量在 10^{-7} – 10^{-3} g/kg 体重、例如 10^{-6} – 10^{-4} g/kg 体重、例如 10^{-5} – 10^{-4} g/kg 体重的范围中。

[0337] 在另一个实施方案中, 本发明提供了生长激素或生长激素化合物缀合物在用于上述疾病或状态治疗的药物制造中的用途。

[0338] 细胞因子和涉及免疫系统的许多疾病的病因学牵连。具体地, 提及 IL-20 可以与牛皮癣及其治疗有关, 并且 IL-21 与癌症有关并且可以构成对这种疾病的治疗。在一个实施方案中, 本发明提供了用于治疗牛皮癣的方法, 其包括施用治疗有效量的根据本发明的 IL-20 缀合物。在另一个实施方案中, 本发明涉及本发明的 IL-20 缀合物在用于牛皮癣治疗的药物制造中的用途。

[0339] 在另一个实施方案中, 本发明涉及治疗癌症的方法, 该方法包括给有此需要的受试者施用治疗有效量的本发明的 IL-21 缀合物。

[0340] 在另一个实施方案中, 本发明涉及本发明的 IL-21 缀合物在用于癌症治疗中的药物制造中的用途。

[0341] TTF 蛋白质可以用于增加受试者中的粘膜 (mucosa) 层粘性, 减少唾液分泌, 例如其中唾液分泌增加由照射治疗、用抗胆碱能药物治疗或 Sjögren 氏综合征引起, 治疗变应性鼻炎, 在创伤、休克、大手术、肾病或肝病、用 NSAID 例如阿司匹林、类固醇或酒精治疗后继发的应激诱导的胃溃疡。TTF 蛋白质还可以用于治疗 Chron 氏病、溃疡性结肠炎、角结膜炎、慢性膀胱感染、肠膀胱炎、乳头状瘤和膀胱癌。在一个实施方案中, 本发明因此涉及治疗上述疾病或状态的方法, 该方法包括给有此需要的受试者患者施用治疗有效量的根据本发明的 TTF 缀合物。

[0342] 在另一个实施方案中, 本发明涉及本发明的 TTF 缀合物在用于治疗上述疾病或状态的药物制造中的用途。

[0343] 黑皮质素受体改性剂且特别是黑皮质素 4 受体激动剂已和肥胖和相关疾病的治疗和预防牵连。在一个实施方案中, 本发明提供了用于预防或延迟葡萄糖耐受不良 (IGT) 至不需要胰岛素的 2 型糖尿病的进展, 用于预防或延迟不需要胰岛素的 2 型糖尿病至需要胰岛素的糖尿病的进展, 用于治疗肥胖和用于调节食欲的方法。糖皮质激素 4 受体激动剂

也已和选自下述的疾病治疗牵连：动脉粥样硬化、高血压、糖尿病、2 型糖尿病、葡萄糖耐受不良（IGT）、血脂异常、冠心病、胆囊疾病、胆石、骨关节炎、癌症、性功能障碍和早产儿死亡的危险。在一个实施方案中，本发明因此提供了治疗上述疾病或状态的方法，该方法包括给有此需要的受试者施用治疗有效量的本发明的黑皮质素 4 受体激动剂缀合物。

[0344] 在另外一个实施方案中，本发明涉及本发明的黑皮质素 4 受体激动剂缀合物在用于上述疾病或状态治疗的药物制造中的用途。

[0345] 因子 VII 化合物也已和与凝固相关的疾病治疗牵连，并且生物活性的因子 VII 化合物特别已和治疗血友病患者、具有针对因子 VIII 和 IX 的抑制剂的血友病患者、具有血小板减少症的患者、具有血小板病例如 Glanzmann 氏血小板机能不全（thrombasthenia）血小板释放缺陷和存储池缺陷的患者、具有 von Willebrand 氏病的患者、具有与创伤或外科手术相关的肝病和出血问题的患者牵连。生物学无活性的因子 VII 化合物已牵连于治疗处于凝固性过高的（hypercoagulable）状态中的患者，例如具有脓毒症、深部静脉血栓形成的患者，处于心肌感染或血栓形成中风、肺栓塞的危险中的患者，具有急性冠状动脉综合征的患者，经历冠心病、心脏事件的预防和关于接受血管成形术的患者的再狭窄的患者，具有周围血管疾病和急性呼吸窘迫综合征的患者。在一个实施方案中，本发明因此提供了用于治疗上述疾病或状态的方法，该方法包括给有此需要的受试者施用治疗有效量的根据本发明的因子 VII 化合物缀合物。

[0346] 在另一个实施方案中，本发明提供了根据本发明的因子 VII 化合物缀合物在用于上述疾病或状态治疗的药物制造中的用途。

[0347] 许多疾病在治疗中使用伴随施用或顺次施用的超过一种药物进行治疗。因此，在用于治疗上文描述的疾病之一的治疗方法中使用与正常用于治疗所述疾病的一种或多种其他治疗活性化合物组合的本发明修饰的蛋白质，在本发明的范围内。通过类比，在用于所述疾病的药物制造中使用与正常用于治疗上述疾病之一的其他治疗活性化合物组合的本发明修饰的蛋白质，也在本发明的范围内。

[0348] 如上所述，根据本发明的方法的治疗修饰的蛋白质可以在治疗中使用，并且这也是本发明的一个实施方案。

[0349] 在另一个实施方案中，本发明提供了本发明的修饰的蛋白质在诊断中的用途。

[0350] 本文引用的所有参考文献，包括出版物、专利申请和专利在此整体引入本文作为参考，并且其程度与每个参考文献个别且特别指出引入作为参考，并且在本文中整体阐述（至由法律允许的最大程度）相同。

[0351] 所有标题和小标题在本文中仅为了方便而使用，并且不应解释为以任何方式限制本发明。

[0352] 本文提供的任何和所有例子或示例性语言（例如，“例如”）的使用仅意欲更好地举例说明本发明，并且不对本发明的范围造成限制，除非另有说明。在说明书中的语言不应解释为指示如实践本发明所必需的任何非具体化的要素。

[0353] 本文专利文件的引用和引入仅为了方便而完成，并且不反映此种专利文件的任何有效性、专利性和 / 或可实施性观点。

[0354] 本发明包括如由可应用法律允许的在此附加的实施方案中引用的主题的所有修饰和等同方案。

[0355] 本发明通过下述非限制性例子进一步举例说明。

实施例

[0356] 实施例中使用的 TGase 是根据 US5156956 来自茂原链轮丝菌 (*Streptoverticillium mobaraense*) 的微生物转谷氨酰胺酶。

[0357] 实施例还包含下述一般方法：

[0358] 毛细管电泳

[0359] 毛细管电泳使用 Agilent Technologies 3DCE 系统 (Agilent Technologies) 来执行。数据采集和信号处理使用 Agilent Technologies 3DCE ChemStation 来执行。毛细管是来自 Agilent 的 64.5cm (56.0cm 有效长度) 50 μ m 内径 (i.d.) “Extended Light Path Capillary”。UV 检测在 200nm (16nm Bw, 参考 380nm 和 50nm Bw) 处执行。运行电解质是磷酸盐缓冲液 50mM pH7 (方法 A)。毛细管用 0.1M NaOH 3 分钟, 随后用 Milli-Q 水 2 分钟并且用电解质 3 分钟进行调整 (conditioned)。在每次运行后, 毛细管用 Milli-Q 水 2 分钟, 随后用磷酸 2 分钟并且用 Milli-Q 水 2 分钟进行冲洗。流体动力注射在 50mbar 下 4.0 秒完成。电压是 +25kV。毛细管温度是 30°C, 并且运行时间是 10.5 分钟。

[0360] Maldi-Tof 质谱分析法

[0361] 分子量使用 Autoflex Maldi-Tof 仪器 (Bruker) 进行测定。样品使用 α -氰基-4-羟基-肉桂酸作为基质进行制备。

[0362] RP-HPLC

[0363] RP-HPLC 分析在 Agilent 1100 系统上使用 Vydac 218TP54 4.6mm x 250mm 5 μ m C-18 硅柱 (silica column) (The Separations Group, Hesperia) 来执行。检测是通过 UV 在 214nm、254nm、280nm 和 301nm 处。柱用 0.1% 三氟乙酸 / H₂O 进行平衡, 并且样品通过 0 至 90% 乙腈的合适梯度针对 0.1% 三氟乙酸 / H₂O 进行洗脱。

[0364] LC-MS

[0365] LC-MS 分析在 PE-Sciex API 100 或 150 质谱仪上执行, 所述质谱仪配备 2 个 Perkin Elmer Series 200 微量泵 (Micropumps)、Perkin Elmer Series 200 自动进样器、Applied Biosystems 785A UV 检测器和 Sedex 75 Evaporative 光散射检测器。Waters Xterra 3.0mm x 50mm 5 μ m C-18 硅柱以 1.5ml/分钟在室温下进行洗脱。它用 5% 乙腈 / 0.1% 三氟乙酸 / H₂O 进行平衡, 并且用 5% 乙腈 / 0.1% 三氟乙酸 / H₂O 1.0 分钟, 并且随后用在 7 分钟内至 90% 乙腈 / 0.1% 三氟乙酸 / H₂O 的线性梯度进行洗脱。检测是通过在 214nm 处的 UV 检测和 Evaporative 光散射。将柱洗脱物的级分引入 PE-Sciex API 100 质谱仪的离子喷射界面内。在运行过程中每 2 秒扫描质量范围 300-2000amu。

[0366] 蛋白质定量

[0367] 蛋白质浓度通过使用 NanoDrop ND-1000 UV-分光光度计测量在 280nm 下的吸光度进行估计。

[0368] 用于测定一个或多个衍生位点的酶促肽作图

[0369] 肽作图使用还原和烷基化的蛋白质的 Asp-N 消化来执行。首先, 蛋白质根据标准程序用 DTT (二硫苏糖醇) 和碘乙酰胺进行处理。烷基化的产物使用 HPLC 进行纯化。随后, 烷基化的纯化产物用内切蛋白酶 Asp-N (Boehringer) 以 1 : 100 的酶 : 底物比消化过夜。

消化物使用 C-18 柱和标准三氟乙酸 / 乙腈缓冲系统进行 HPLC 分离。所得到的肽图与未衍生的 hGH 的那种进行比较, 并且收集具有不同保留时间的级分, 并且使用 Maldi-tof 质谱分析法进行进一步分析。

[0370] SDS page

[0371] SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳使用 NuPAGE 4% -12% Bis-Tris 凝胶 (Invitrogen NP0321BOX) 来执行。凝胶进行银染色 (Invitrogen LC6100) 或考马斯染色 (Invitrogen LC6065), 并且相关时还就 PEG 用碘化钡进行染色, 如由 M. M. Kurfurst 在 Anal. Biochem. 200 (2) :244-248, 1992 中所述。

[0372] 蛋白质层析

[0373] 蛋白质层析在来自 GE Health Care 的 Äkta Explorer 层析系统和柱上执行。阴离子交换使用 Q-Sepharose HP 26/10 柱完成。起始缓冲液是 20mM 三乙醇胺缓冲液 pH 8.5, 并且洗脱缓冲液是起始缓冲液 +0.2M NaCl。化合物一般用 0-75% 洗脱缓冲液梯度经过 15 柱体积进行洗脱。脱盐和缓冲液更换使用 HiPrep 26/10 柱来执行。

[0374] 实施例

[0375] 实施例中使用的 TGase 是根据美国专利号 5, 156, 956 来自茂原链轮丝菌的微生物转谷氨酰胺酶。

[0376] 实施例还包含下述一般方法:

[0377] 毛细管电泳

[0378] 毛细管电泳使用 Agilent Technologies 3DCE 系统 (Agilent Technologies) 来执行。数据采集和信号处理使用 Agilent Technologies 3DCE ChemStation 来执行。毛细管是来自 Agilent 的 64.5cm (56.0cm 有效长度) 50 μ m 内径 "Extended Light Path Capillary"。UV 检测在 200nm (16nm Bw, 参考 380nm 和 50nm Bw) 处执行。运行电解质是磷酸盐缓冲液 50mM pH7 (方法 A)。毛细管用 0.1M NaOH 3 分钟, 随后用 Milli-Q 水 2 分钟并且用电解质 3 分钟进行调整。在每次运行后, 毛细管用 Milli-Q 水 2 分钟, 随后用磷酸 2 分钟并且用 Milli-Q 水 2 分钟进行冲洗。流体动力注射在 50mbar 下 4.0 秒完成。电压是 +25kV。毛细管温度是 30°C, 并且运行时间是 10.5 分钟。

[0379] Maldi-Tof 质谱分析法

[0380] 分子量使用 Autoflex Maldi-Tof 仪器 (Bruker) 进行测定。样品使用 α -氰基-4-羟基-肉桂酸作为基质进行制备。

[0381] RP-HPLC

[0382] RP-HPLC 分析在 Agilent 1100 系统上使用 Vydac 218TP54 4.6mm x 250mm 5 μ m C-18 硅柱 (The Separations Group, Hesperia) 来执行。检测是通过 UV 在 214nm、254nm、280nm 和 301nm 处。柱用 0.1% 三氟乙酸 / H₂O 进行平衡, 并且样品通过 0 至 90% 乙腈的合适梯度针对 0.1% 三氟乙酸 / H₂O 进行洗脱。

[0383] LC-MS

[0384] LC-MS 分析在 PE-Sciex API 100 或 150 质谱仪上执行, 所述质谱仪配备 2 个 Perkin Elmer Series 200 微量泵、Perkin Elmer Series 200 自动进样器、Applied Biosystems 785A UV 检测器和 Sedex 75 Evaporative 光散射检测器。Waters Xterra 3.0mm x 50mm 5 μ m C-18 硅柱以 1.5ml/分钟在室温下进行洗脱。它用 5% 乙腈 / 0.1% 三氟

乙酸/H₂O 进行平衡,并且用 5%乙腈/0.1%三氟乙酸/H₂O 1.0 分钟,并且随后用在 7 分钟内至 90%乙腈/0.1%三氟乙酸/H₂O 的线性梯度进行洗脱。检测是通过在 214nm 处的 UV 检测和 Evaporative 光散射。将柱洗脱物的级分引入 PE-Sciex API 100 质谱仪的离子喷射界面内。在运行过程中每 2 秒扫描质量范围 300-2000amu。

[0385] 蛋白质定量

[0386] 蛋白质浓度通过使用 NanoDrop ND-1000 UV- 分光光度计测量在 280nm 下的吸光度进行估计。

[0387] 用于测定一个或多个衍生位点的酶促肽作图

[0388] 肽作图使用还原和烷基化的蛋白质的 Asp-N 消化来执行。首先,蛋白质根据标准程序用 DTT(二硫苏糖醇)和碘乙酰胺进行处理。烷基化的产物使用 HPLC 进行纯化。随后,烷基化的纯化产物用内切蛋白酶 Asp-N(Boehringer)以 1 : 100 的酶:底物比消化过夜。消化物使用 C-18 柱和标准三氟乙酸/乙腈缓冲系统进行 HPLC 分离。所得到的肽图与未衍生的 hGH 的那种进行比较,并且收集具有不同保留时间的级分,并且使用 Maldi-tof 质谱分析法进行进一步分析。

[0389] SDS page

[0390] SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳使用 NuPAGE 4% -12% Bis-Tris 凝胶 (Invitrogen NP0321BOX) 来执行。凝胶进行银染色 (Invitrogen LC6100) 或考马斯染色 (Invitrogen LC6065), 并且相关时还就 PEG 用碘化钡进行染色, 如由 M. M. Kurfurst 在 Anal. Biochem. 200 (2) :244-248, 1992 中所述。

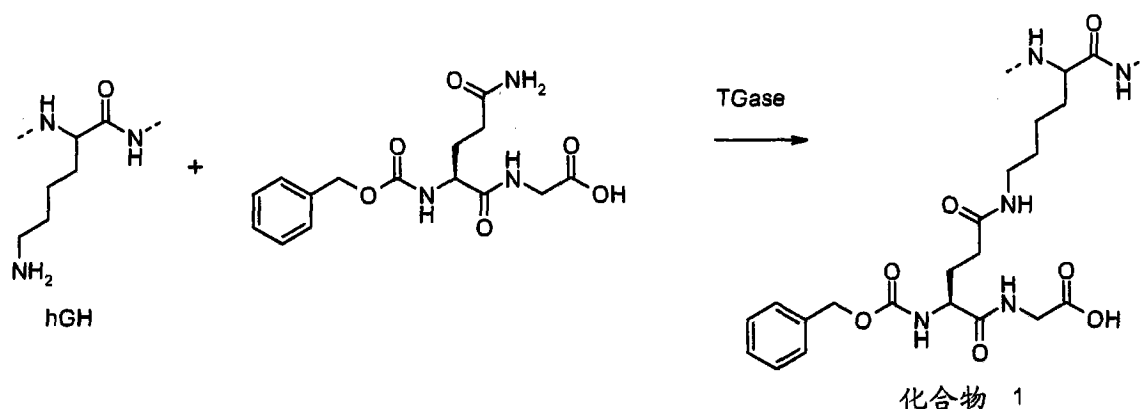
[0391] 蛋白质层析

[0392] 蛋白质层析在来自 GE Health Care 的 Äkta Explorer 层析系统和柱上执行。阴离子交换使用 Q-Sepharose HP 26/10 柱完成。起始缓冲液是 20mM 三乙醇胺缓冲液 pH 8.5, 并且洗脱缓冲液是起始缓冲液 +0.2MNaCl。化合物一般用 0-75%洗脱缓冲液梯度经过 15 柱体积进行洗脱。脱盐和缓冲液更换使用 HiPrep 26/10 柱来执行。

[0393] 实施例 1

[0394] 修饰的人生长激素 (化合物 1) 的制备

[0395]



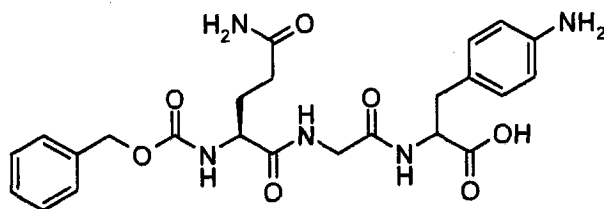
[0396] 如图 3 中所述,制备 20mM 三乙醇胺缓冲液, pH 8.5。(TEA- 缓冲液);(a) 使 20mg hGH 溶解于 TEA- 缓冲液 (0.5ml) 中,和 (b) 使 68mg Z-Gln-Gly-OH 溶解于 TEA- 缓冲液 (1ml) 中;和 (c) 使 200mgAktiva WM TGase 制剂 (包含 ~ 0.5% TGase 蛋白质) 溶解于 TEA- 缓

冲液 (1mL) 中。使 (A) 和 (B) 混合, 并且加入 10 μ l (C)。在室温下 19 小时后, 通过离子交换层析分离主要产物, 并且肽作图和序列分析显示产物在 Lys145 中选择性衍生化。

[0397] 实施例 2

[0398] N-碳酰氧苯甲基-谷氨酰胺酰-甘氨酸-(4-氨基-苯丙氨酸) [Z-Gln-Gly-(4-氨基-Phe)-OH], 化合物 2 的制备

[0399]



化合物 2

[0400] 第一个氨基酸与树脂的附着: 向 2-氯三苯甲基氯树脂 (Pepchem, 2g, 1.5mmol/g) 中加入溶解于 DCM(16ml) 和二异丙基乙胺 (780 μ l) 的混合物中的 Fmoc-(4-Boc-氨基-Phe)-OH(Fluka, 2.26g, 4.5mmol)。使浆搅拌 5 分钟, 随后加入二异丙基乙胺 (1540 μ l)。搅拌持续 1 小时的时间段, 这之后加入甲醇 (5ml), 并且继续搅拌另外 15 分钟。使树脂排出并且用二氯甲烷 (DCM) (6x30ml) 随后为 N-甲基吡咯烷酮 (NMP) (6x30ml) 进行洗涤。

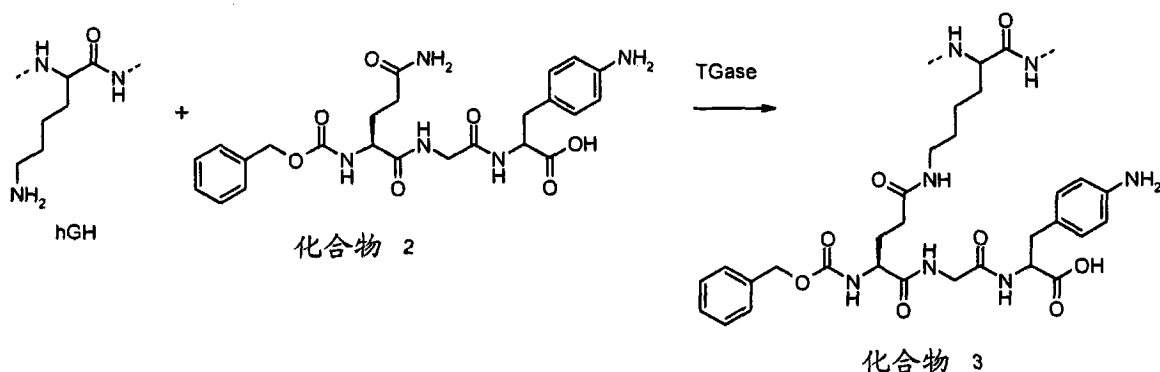
[0401] Fmoc 基团的去除: 向树脂中加入溶于 NMP (20ml) 中的 20% 哌啶并且使反应进行 15 分钟。使树脂排出, 并且再次用溶于 NMP (20ml) 中的 20% 哌啶处理 1 小时。使树脂排出, 并且用 NMP (6x30ml) 洗涤。偶联 Z-Gln-Gly-OH: 向树脂中加入溶于 NMP 中的 Z-Gln-Gly-OH(Bachem, 1.52g, 4.5mmol) 和羟基苯并三唑 (HOBt, 0.61g, 4.5mmol) 的溶液, 随后为二异丙基碳二亚胺 (DIC) (700 μ l, 4.5mmol)。在反应过夜后, 使树脂排出, 并且用 NMP (6x30ml) 随后用 DCM (6x30ml) 进行洗涤。

[0402] 从固体支持体切割: 使树脂排出, 以取出大量 DCM。它用三氟乙酸 (TFA) (12.6ml)、水 (0.6ml)、DCM (5.8ml) 和三异丙基硅烷 (0.8ml) 的混合物进行处理。在反应 1 小时后, 树脂在 15 分钟内缓慢过滤到二乙醚 (100ml) 内, 使之搅拌另外 30 分钟。所得到的沉淀通过离心进行回收, 并且用二乙醚洗涤 3 次。使固体在真空中干燥过夜。根据 $^1\text{H-NMR}$ 和 LC-MS, 产物是纯的且同质的。

[0403] 实施例 3

[0404] hGH 用 Z-Gln-Gly-(4-氨基-Phe)-OH(化合物 2) 转酰胺基化, 以获得 Z-Gln(hGH)-Gly-(4-氨基-Phe)-OH, 化合物 3

[0405]



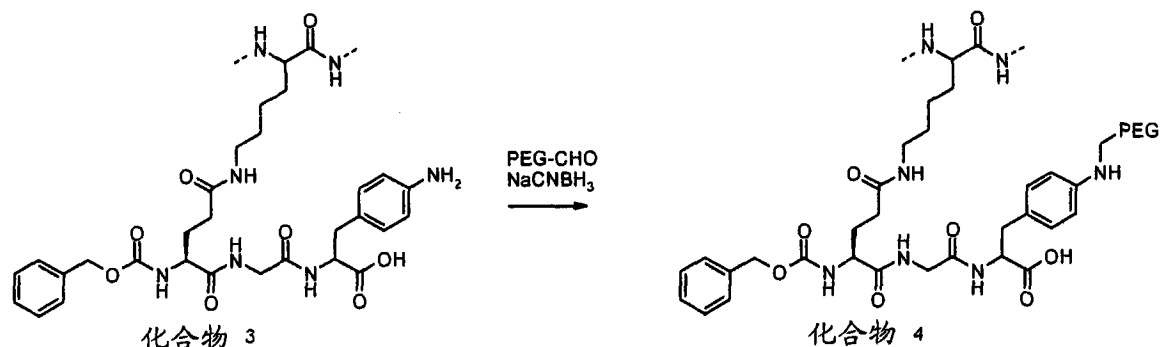
[0406] 制备 3 种溶液：1) 使 hGH(40mg, 1.8 μ mol) 溶解于 1ml 20mM 三乙醇胺缓冲液 pH 8.5 中；2) 使 Z-Gln-Gly-OH(202mg, 412 μ mol) 溶解于 2ml 20mM 三乙醇胺缓冲液 pH 8.5 中，pH 使用 10% 三乙醇胺溶液 (2.4ml) 调整至 8.15；3) 使转谷氨酰胺酶 Activa WM(Ajinomoto) (在具有麦芽糖糊精的固体混合物中 1%，36mg, 9nmol) 溶解于 1ml 20mM 三乙醇胺缓冲液 pH 8.5 中。

[0407] 使溶液 1 和 2 混合，并且将 111 μ l 溶液 3 加入这种混合物中；pH 是 8.2 并且体积是 5.5ml。反应通过 CE 监控。在室温 (r. t.) 下 5 小时反应后，通过的 CE 分析显示具有增加的迁移时间的新产物的存在，显示约 70% 转化至转酰胺基化产物。向反应混合物中加入 10mM 含水 N-乙基马来酰亚胺 (300 μ l)，并且将它贮存于 5℃ 过夜。将混合物装载到 15ml HiPrep 柱 (GE Healthcare)，并且使用三乙醇胺缓冲液 pH 8.5 洗脱，以取出低分子量物质和盐。合并相关级分，并且基于 UV 吸收测量，回收是 36.6mg 蛋白质。

[0408] 实施例 4

[0409] Z-Gln(hGH)-Gly-(4-氨基-Phe)-OH(化合物 3) 的聚乙二醇化，以获得化合物 4

[0410]



[0411] 向根据实施例 3 制备的转酰胺基化 hGH 溶液中加入冰乙酸 (1ml) 和水 (1ml) 的混合物。pH 测量为 2，并且随后使用 1M NaOH(1ml) 调整至 3.3。向这种溶液中加入溶解于三乙醇胺缓冲液 pH 8.5 (1.2ml) 和水 (1.2ml) 的混合物中的 PEG-醛 40kDa (120mg, 3 μ mol)。允许它反应 1 小时时间段，这之后加入溶于水 (1ml) 中的 70 μ l NaCNBH₃ (7.1mg, 8 μ mol) 溶液。反应持续过夜。通过还原 SDS-PAGE 的分析显示具有预期分子量的产物的存在。混合物在 HiPrep 柱上如实施例 3 那样进行脱盐，从而回收作为 20ml 的相关合并级分，用 20ml 水稀释所述相关合并级分。将这种混合物装载到 Q-Sepharose HP26/10 (GE Healthcare)。起始缓冲液是三乙醇胺缓冲液 pH 8.5。使用在 15 柱体积中在三乙醇胺缓冲液 pH 8.5 中的 0-75% 0.2M NaCl 梯度，随后在 5 柱体积中在三乙醇胺缓冲液 pH 8.5 中的 75-100% 0.2M

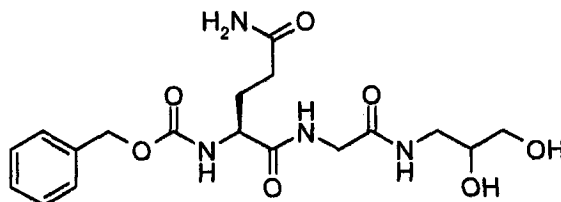
NaCl 洗脱产物。

[0412] 肽作图分析和序列分析证实化合物 4 是在位置 Lys145 中选择性修饰的 hGH。

[0413] 实施例 5

[0414] N- 碳酰氧苯甲基 - 谷氨酰胺酰 - 甘氨酸 -2,3- 二羟基丙 -1- 酰胺, 化合物 5 的制备

[0415]



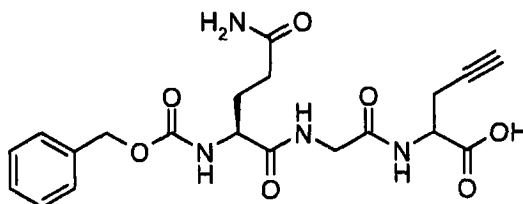
化合物 5

[0416] 在氮气氛下制备溶于具有三乙胺 (0.41ml) 的 DMF (20ml) 中的 Z-Gln-Gly-OH (Bachem, 1g, 2.96mmol) 溶液, 并且冷却至 $< 20^{\circ}\text{C}$ 。使溶解于 DMF (4ml) 中的氯甲酸异丁酯 (407 μl , 0.42g, 3.1mmol) 在 3 分钟时间段内逐滴加入搅拌的溶液中。搅拌在寒冷中继续另外 50 分钟, 这之后加入溶于具有三乙胺 (0.41ml) 的 DMF (2ml) 中的 (R)-3-氨基 1,2-丙二醇 (0.27g, 2.96mmol) 悬浮液。去除冷却浴, 从而允许溶液缓慢达到室温。继续搅拌另外 16 小时, 这之后使反应混合物在真空中浓缩至干燥, 从而留下粗产物 (1.9g), 其通过反相 HPLC 进行纯化。根据 $^1\text{H-NMR}$ 和 LC-MS, 产物是纯的且同质的。

[0417] 实施例 6

[0418] N- 碳酰氧苯甲基 - 谷氨酰胺酰 - 甘氨酸 - 炔丙基甘氨酸, 化合物 6 的制备

[0419]



化合物 6

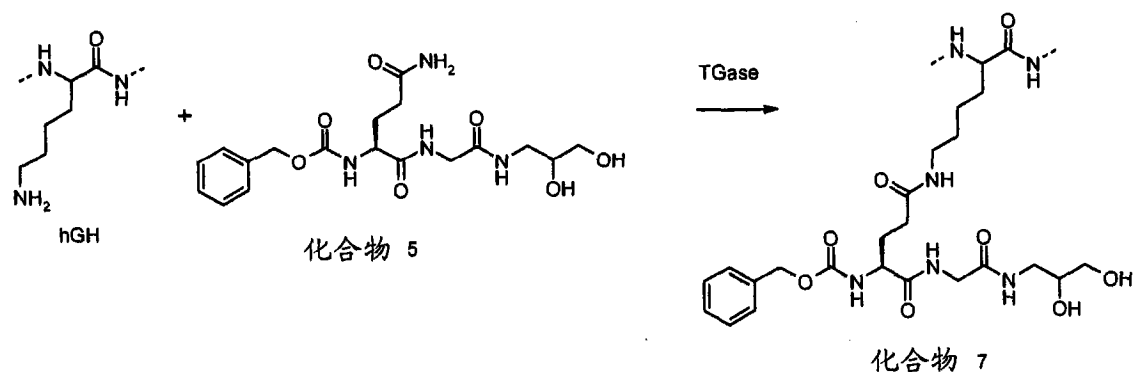
[0420] 这种化合物类似于化合物 2 (实施例 2) 进行制备, 其中使用 Fmoc- 炔丙基甘氨酸代替 Fmoc-(4-Boc-氨基 -Phe)-OH 作为待与树脂偶联的第一个氨基酸。

[0421] 虽然本发明的某些特征已在本文中举例说明且描述, 但许多修饰、置换、改变和等同方案目前对于本领域普通技术人员将是显而易见的。因此, 应当理解附加实施方案预期涵盖如落在本发明的真正精神内的所有此种修饰和改变。

[0422] 实施例 7

[0423] hGH 用 Z-Gln-Gly-2,3- 二羟基丙 -1- 酰胺 (化合物 5) 的转酰胺基化, 以获得 Z-Gln(hGH)-Gly-2,3- 二羟基丙 -1- 酰胺, 化合物 7

[0424]

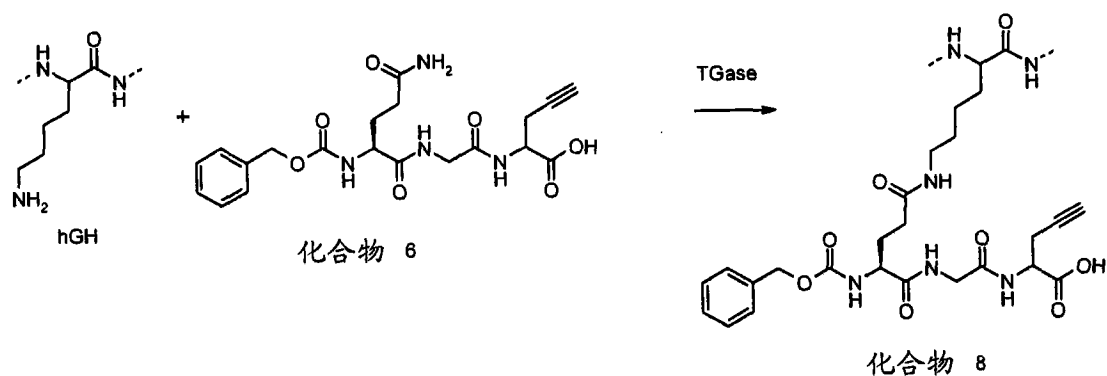


[0425] 程序等同于实施例 3 的那种。25 小时时间段后,将 65%原材料 (hGH) 转化成所需产物 7,如通过 CE 分析测定的。

[0426] 实施例 8

[0427] hGH 用 Z-Gln-Gly- 炔丙基甘氨酸 -OH (化合物 6) 的转酰胺基化,以获得 Z-Gln(hGH)-Gly- 炔丙基甘氨酸 -OH, 化合物 8

[0428]



[0429] 程序等同于实施例 3 的那种。22 小时时间段后,将 59%原材料 (hGH) 转化成所需产物 8,如通过 CE 分析测定的。

[0430] 序列

[0431] SEQ ID NO:1

[0432] 人生长激素多核苷酸

[0433] atggetacag gctcccggac gtccctgctc ctggcttttg gcctgctctg cctgccctgg

[0434] cttcaaagagg gcagtgcctt cccaaccatt cccttatcca ggcttttttga caacgctatg

[0435] ctccgcgccc atcgtctgca ccagctggcc tttagacacct accaggagtt tgaagaagcc

[0436] tatateccaa aggaacagaa gtattcattc ctgcagaacc cccagacctc cctctgtttc

[0437] tcagagteta ttccgacacc ctccaacagg gaggaacac aacagaaatc caacctagag

[0438] ctgctccgca tctccctgct gctcatccag tcgtggctgg agcccgtgca gttcctcagg

[0439] agtgtcttcg ccaacagcct ggtgtacggc gcctctgaca gcaacgtcta tgacctccta

[0440] aaggacctag aggaaggcat ccaaacgctg atggggaggc tggaagatgg cagcccccg

[0441] actgggcaga tcttcaagca gacctacagc aagttcgaca caaactcaca caacgatgac

[0442] gcactactca agaactacgg gctgctctac tgcttcagga aggacatgga caaggtcgag

[0443] acattcctgc gcatcgtgca gtgccgctct gtggagggca gctgtggctt ctag

[0444] SEQ ID NO:2

[0445] 人生长激素多肽

[0446] matgsrtsll lafgllclpw lqegsafpti plsrlfdnam lrahrlhqla fdtyqefeea

[0447] yipkeqkysf lqnpqtslcf sesiptpsnr eetqqksnle llrisllliq swlepqvflr

[0448] svfanslvyg asdsnvdydl kdleegiql mgrledgspr tgqifkqtys kfdtnshndd

[0449] allknyglly cfrkdmkve tflrivqcrs vegscgf

[0450] SEQ ID NO :3

[0451] MAAGSRTSLLAFGLLCLSWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRRRLYQLAYDTYQEFNPQ

[0452] TSLCFSESIPTPSNRVKTQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQLLRVVFANSLVYGASDSN

[0453] VYRHLKDLEEGIQTLMWRLDGSPTGQIFNQSYSKFDTKSHNDDALLKNYGLLYCFRKD

[0454] MDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF

<110>NOVO NORDISK A/S

<120> 用于选择性修饰蛋白质的方法

<130>7497. 204-WO

<160>3

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>654

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>1

atggctacag gctcccgga	gctccctgctc	ctggcttttg	gcctgctctg	cctgccctgg	60
cttcaagagg gcagtgcctt	cccaaccatt	cccttatcca	ggctttttga	caacgctatg	120
ctccgcgccc atcgtctgca	ccagctggcc	tttgacacct	accaggagtt	tgaagaagcc	180
tatatcccaa aggaacagaa	gtattcattc	ctgcagaacc	cccagacctc	cctctgtttc	240
tcagagtcta ttcgacacc	ctccaacagg	gaggaaacac	aacagaaatc	caacctagag	300
ctgctccgca tctccctgct	gtcctaccag	tcgtggctgg	agcccgtgca	gttcctcagg	360
agtgtcttcg ccaacagcct	gggtgtacgg	gcctctgaca	gcaacgtcta	tgacctccta	420
aaggacctag aggaaggcat	ccaaacgctg	atggggaggc	tggaagatgg	cagcccccg	480
actgggcaga tcttcaagca	gacctacagc	aagttcgaca	caaactcaca	caacgatgac	540
gcactactca agaactacgg	gtgctcttac	tgcttcagga	aggacatgga	caaggtcgag	600
acattcctgc gcatcgtgca	gtgccgctct	gtggagggca	gctgtggctt	ctag	654

<210>2

<211>217

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>2

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

35	40	45
Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys		
50	55	60
Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe		
65	70	75
Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys		
85	90	95
Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp		
100	105	110
Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val		
115	120	125
Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu		
130	135	140
Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg		
145	150	155
Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser		
165	170	175
His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe		
180	185	190
Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys		
195	200	205
Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe		
210	215	

<210>3

<211>202

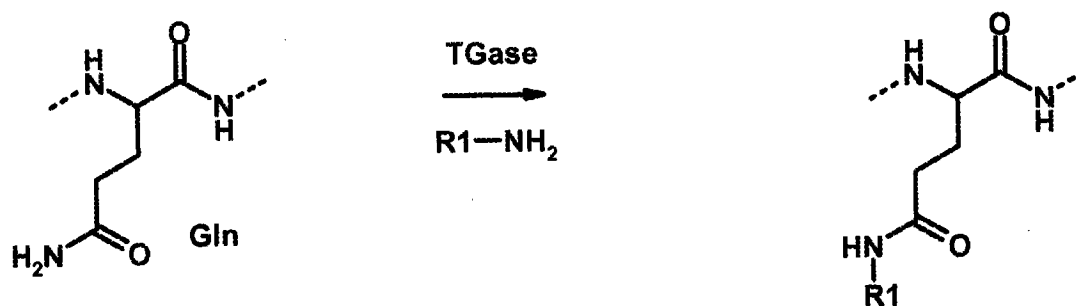
<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>3

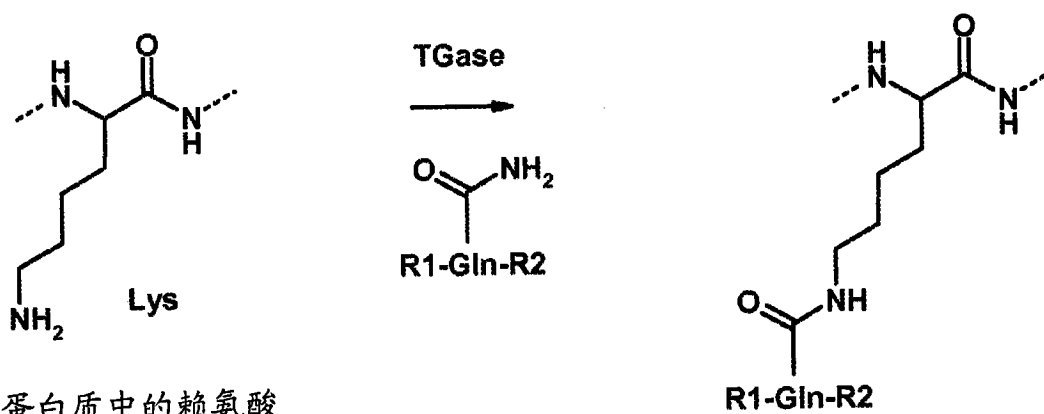
Met Ala Ala Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu		
1	5	10
Cys Leu Ser Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu		
20	25	30
Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala Arg Arg Leu Tyr Gln		
35	40	45
Leu Ala Tyr Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys		
50	55	60

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



蛋白质中的谷氨酰胺

图 1



蛋白质中的赖氨酸

图 2

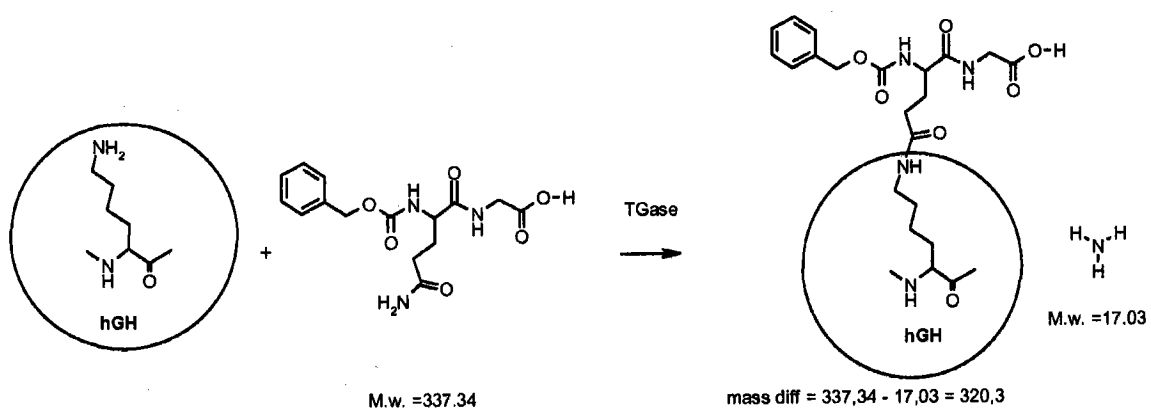


图 3

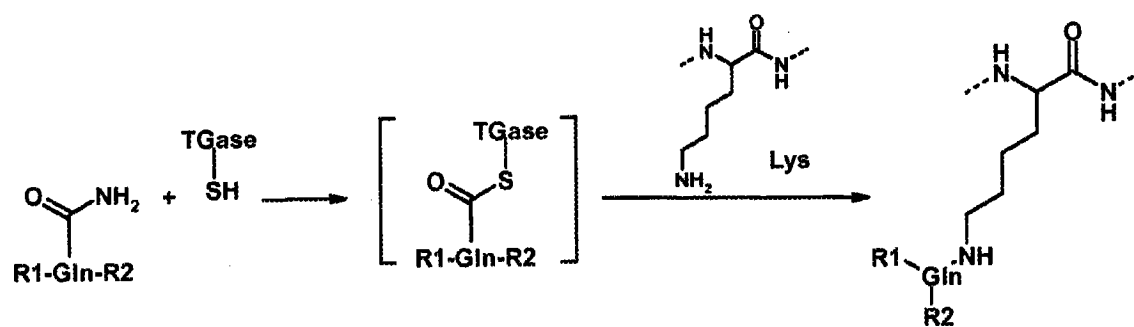


图 4