



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104080473 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 01

(21) 申请号 201280068260. 1

C07H 21/04 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 11. 28

(30) 优先权数据

61/563, 985 2011. 11. 28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 07. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/066795 2012. 11. 28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/082116 EN 2013. 06. 06

(71) 申请人 费斯生物制药公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 J. 乔维特 C. 伍兹

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 刘国军

(51) Int. Cl.

A61K 38/28 (2006. 01)

A61K 38/00 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书18页

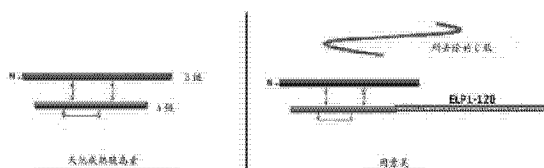
序列表33页 附图15页

(54) 发明名称

包含胰岛素氨基酸序列的治疗剂

(57) 摘要

本发明部分地涉及提供从注射部位缓慢吸收的药剂。在一些实施方案中, 药物组合物包含胰岛素氨基酸序列和提供从注射部位缓慢吸收的氨基酸序列, 例如像具有脯氨酸残基的基本上重复模式的氨基酸序列。



1. 一种用于提供持续血糖控制的药物组合物,所述药物组合物包含:有效量的蛋白质,所述蛋白质包含胰岛素氨基酸序列和提供从注射部位持续释放的氨基酸序列;以及药物赋形剂,以实现持续释放。

2. 如权利要求1所述的药物组合物,其中所述胰岛素氨基酸序列包含A链和B链氨基酸序列,其中所述A链和B链具有氨基酸序列SEQ ID NO:13,任选地具有总共1至8处氨基酸插入、缺失或取代。

3. 如权利要求2所述的药物组合物,其中所述提供从所述注射部位缓慢吸收的氨基酸序列与所述胰岛素A链共价结合。

4. 如权利要求2或3所述的药物组合物,其中所述A链与所述B链通过一个或多个二硫键结合。

5. 如权利要求2或3所述的药物组合物,其中所述A链与所述B链经由肽或化学接头连接。

6. 如权利要求1所述的药物组合物,其中所述提供持续释放的氨基酸序列具有脯氨酸残基的基本上重复模式。

7. 如权利要求6所述的药物组合物,其中所述提供持续释放的氨基酸序列是弹性蛋白样肽(ELP)氨基酸序列。

8. 如权利要求7所述的药物组合物,其中所述ELP包含VPGXG(SEQ ID NO:3)的重复序列,其中每个X独立地选自丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸以及缬氨酸残基。

9. 如权利要求8所述的药物组合物,其中X是缬氨酸。

10. 如权利要求9所述的药物组合物,其中所述ELP的氨基酸序列包含AVGVP(SEQ ID NO:4)、IPGVG(SEQ ID NO:6)或LPGVG(SEQ ID NO:8)的重复序列。

11. 如权利要求10中任一项所述的药物组合物,其中所述ELP包含ELP氨基酸单元的至少15个重复序列。

12. 如权利要求10所述的药物组合物,其中所述ELP包含ELP单元的至少30个重复序列。

13. 如权利要求10所述的药物组合物,其中所述ELP包含ELP单元的至少60个重复序列。

14. 如权利要求10所述的药物组合物,其中所述ELP包含ELP单元的至少90个重复序列。

15. 如权利要求10所述的药物组合物,其中所述ELP包含ELP单元的至少120个重复序列。

16. 如权利要求10所述的药物组合物,其中所述ELP包含ELP单元的至少180个重复序列。

17. 如权利要求1所述的药物组合物,其中所述药物组合物包含SEQ ID NO:14。

18. 如权利要求7所述的药物组合物,其中所述ELP在生理盐水中具有略低于37℃的转变温度。

19. 如权利要求1所述的药物组合物,其中所述提供持续释放的氨基酸序列形成无规

卷曲或非球状延伸结构或非结构化的生物聚合物,包括如由仇-法斯门算法所确定,其中至少 50%的氨基酸缺乏二级结构的生物聚合物。

20. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中所述氨基酸序列是具有延伸的非球状结构或无规卷曲结构的蛋白质。

21. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中所述药物组合物是融合蛋白。

22. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中所述药物组合物包含约 110mM 的氯化钠和约 20mM 的组氨酸。

23. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中所述药物组合物经过配制以用于约每周施用一次。

24. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中所述药物组合物经过配制以用于每天施用一次。

25. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中所述药物组合物经过配制以用于以约 0.5mg/mL 至约 200mg/mL 的剂量施用。

26. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中所述药物组合物经过配制以用于以约 10mg/mL 至约 50mg/mL 的剂量施用。

27. 一种治疗糖尿病的方法,所述方法包括施用提供持续血糖控制的药物组合物,所述药物组合物包含:有效量的蛋白质,所述蛋白质包含胰岛素氨基酸序列和提供从注射部位持续释放的氨基酸序列;以及药物赋形剂,以在有需要的患者体内实现持续释放。

28. 如权利要求 27 所述的方法,其中所述患者患有 1 型糖尿病。

29. 如权利要求 27 所述的方法,其中所述患者患有 2 型糖尿病。

30. 如权利要求 27 所述的方法,其中以每月 1 次至约 30 次的频率施用所述药物组合物。

31. 如权利要求 27 所述的方法,其中约每周施用所述药物组合物一次。

32. 如权利要求 27 所述的方法,其中每周施用所述药物组合物两次或三次。

33. 如权利要求 27 所述的方法,其中约每天施用所述药物组合物一次。

34. 如权利要求 27 所述的方法,其中皮下施用所述药物组合物。

包含胰岛素氨基酸序列的治疗剂

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求 2011 年 11 月 28 日提交的美国临时申请 No. 61/563, 985 的优先权, 该美国临时申请的内容以引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明部分地涉及具有持续生物作用的胰岛素形式及其衍生物。

[0004] 以电子方式递交的文本文件的描述

[0005] 随同以电子方式递交的以下文本文件的内容以引用的方式整体并入本文: 序列表的计算机可读格式的拷贝 (文件名: PHAS_025_01W0_SeqList_ST25.txt, 记录日期: 2012 年 11 月 28 日, 文件大小: 38 千字节)。

背景技术

[0006] 肽类药物和小分子药物的有效性经常因这些药物在循环中的半衰期以及难以获得基本上恒定的血浆水平而受到限制。举例来说, 肠促胰岛素 GLP-1 必须以相对高的剂量施用以应对它在循环中较短的半衰期, 并且这些高剂量尤其与恶心有关。Murphy 和 Bloom, Nonpeptidic glucagon-like peptide receptor agonists: A magic bullet for diabetes? PNAS 104(3):689-690 (2007)。此外, 肽类药剂血管活性肠肽 (VIP) 据一些估算值展现出短于一分钟的半衰期, 从而使得这种药剂对于药物使用来说不切实际。Domschke 等, Vasoactive intestinal peptide in man: pharmacokinetics, metabolic and circulatory effects, Gut 19:1049-1053 (1978); Henning 和 Sawmiller, Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects, Cardiovascular Research 49:27-37 (2001)。肽类药物的血浆半衰期较短经常是由于快速的肾清除率以及在全身循环期间的酶促降解。

[0007] 胰岛素或其衍生物也遭遇到类似的困难。胰岛素仅在它被酶 (例如胰岛素酶) 降解之前短暂的时间内具有活性, 并且因此仅具有约 6 分钟的半衰期。而且, 胰岛素可以被受试者所吸收, 并且因此所述受试者可能需要每天两次或更多次的胰岛素注射, 其中基于对血糖水平进行自我监测来对剂量加以调整。此外, 胰岛素水平出现高峰和低谷会使得受试者产生显著的并发症。仍需要如下的胰岛素疗法, 所述胰岛素疗法显示出向循环中的缓慢吸收作用并且提供长时间的稳态水平的葡萄糖控制作用。

发明内容

[0008] 本发明提供了用于持续释放的基于胰岛素的药物制剂, 以及用于递送使用所述持续释放制剂进行的治疗方案的方法。本发明从而为基于胰岛素的药物制剂提供了改进的药物代谢动力学。

[0009] 在一个方面, 本发明提供了一种用于提供持续血糖控制的药物组合物, 所述药物组合物包含: 有效量的蛋白质, 所述蛋白质包含胰岛素氨基酸序列和提供从注射部位持续

释放的氨基酸序列；以及药物赋形剂，以实现持续释放。

[0010] 在另一个方面，本发明提供了治疗糖尿病的方法，所述方法包括施用用于提供持续血糖控制的药物组合物。所述组合物包含：有效量的蛋白质，所述蛋白质包含胰岛素氨基酸序列和提供从注射部位持续释放的氨基酸序列；以及药物赋形剂，以在有需要的患者体内实现持续释放。在一些实施方案中，所述患者患有 1 型糖尿病或 2 型糖尿病。在一些实施方案中，所述方法包括以每月 1 至约 30 次，或约每周一次，或每周约两次或三次，或约每天一次的频率施用所述药物组合物。在一些实施方案中，所述方法包括皮下施用所述药物组合物。

[0011] 附图简述

[0012] 图 1A 示出了人胰岛素原序列 (SEQ ID NO:13)。胰岛素原序列由通过 C 肽连接的 B 链和 A 链组成。在两个邻近的双碱性氨基酸位点（以加下划线的斜体字指示）处进行酶促切割后，C 肽被去除以形成成熟的胰岛素。

[0013] 图 1B 示出了被称作 PE0139 或因素美 (INSUMERA) 或胰岛素-ELP1-120 的构造的简图，所述构造具有融合至 A 链的 C 端上的 120 个 ELP 单元。

[0014] 图 2 示出了 pPE0139 质粒的图谱。

[0015] 图 3 示出了胰岛素原 ELP1-120 融合蛋白的氨基酸序列 (SEQ ID NO:14)。胰岛素原序列（加下划线）与 ELP1-120 序列融合。所述氨基酸序列任选地在 N 端上包括起始甲硫氨酸残基。

[0016] 图 4 示出了非还原性 SDS-PAGE 实验。非还原性 SDS-PAGE 示出了在酶促加工后因 C 肽被切除所引起的融合蛋白分子量出现预期降低。泳道 1: **SEEBLUE®** Plus2 预染标准品 (INVITROGEN)；泳道 2: ELP1-120；泳道 3: 胰岛素原 ELP1-120；泳道 4: 胰岛素 ELP-120, 3 μ g；泳道 5: 胰岛素 ELP1-120, 6 μ g；泳道 6: **SEEBLUE®** Plus2 预染标准品 (INVITROGEN)。

[0017] 图 5 示出了抗胰岛素 B 链蛋白质印迹。进行抗胰岛素 B 链蛋白质印迹以确定与 ELP 融合的 A 链和 B 链两者的存在。数据显示 B 链在非还原性条件下存在，指示 A 链与 B 链之间形成二硫键。将融合蛋白和二硫键还原会使得 B 链从融合体中被去除。泳道 1: 经过还原的胰岛素 ELP 融合体，示出了不存在 B 链；泳道 2: 未经过还原的胰岛素 ELP 融合体，示出了 B 链的存在；泳道 3: ELP1-120；泳道 4: 胰岛素原 ELP 融合体，示出了 B 链的存在。

[0018] 图 6 示出了未经过加工的胰岛素-ELP1-120 的 ESI-MS 数据。电喷雾电离质谱分析确定未经过加工的胰岛素原 ELP 融合体的质量是 57008.5Da (SGS Mscan 代码 104531 和 104532)。存在另外的盐加合物。

[0019] 图 7 示出了经过加工的 pPE0139 的 ESI-MS 数据。电喷雾电离质谱分析确定在酶促去除 C 肽后成熟胰岛素 ELP 融合体的质量 (SGS M-scan 代码 107610)。胰岛素 ELP 的 ESI-MS 显示具有约 53298Da 的分子质量的主产物峰，所述主产物峰指示在 C 肽被切除后的成熟胰岛素 ELP。次峰有可能归属于部分降解的融合体或盐加合物。

[0020] 图 8 示出了与甘精胰岛素 (insulin glargine) 相比，使用胰岛素-ELP1-120 融合体使得正常小鼠的血糖下降。

[0021] 图 9 示出了使用因素美 (PE0139) 对 1 型糖尿病 (diabetes mellitus type1/typeldiabetes, T1DM) 小鼠模型进行给药。确切地说，示出了单次给药的数据。结果表明

与给予等摩尔浓度的来得时 (LANTUS) (甘精胰岛素, SANOFI-AVENTIS) 相比, 因素美的葡萄糖降低作用的持续时间更长。STZ 是链脲菌素 (streptozotocin); 未处理组指的是正常的未患糖尿病的动物; 每组 $N = 8$ 。

[0022] 图 10 示出了使用因素美 (PE0139) 对 1 型糖尿病 (T1DM) 小鼠模型进行给药。确切地说, 示出了每天一次给药的数据。结果表明与来得时 (甘精胰岛素, SANOFI-AVENTIS) 相比, 因素美在活性和半衰期方面具有优越性。STZ 是链脲菌素; 未处理组指的是正常的未患糖尿病的动物; 在第 6 小时的时间点, 25mg/kg 组和 50mg/kg 组的 $N = 5$; 在第 8 小时的时间点, 25mg/kg 组的 $N = 3$ 而 50mg/kg 组的 $n = 2$; 在第 24 小时的时间点, 25mg/kg 组的 $N = 1$ 而 5mg/kg 组的 $N = 7$ 。

[0023] 图 11A 示出了与来得时 (甘精胰岛素, SANOFI-AVENTIS) 相比, 因素美 (PE0139) 在 1 型糖尿病 (T1DM) 小鼠模型中的低剂量滴定。确切地说, 图 11A 示出了单次皮下给药。STZ 是链脲菌素; 未处理组指的是正常的未患糖尿病的动物; 来得时组、1mg/kg PE0139 组和未处理组的 $N = 8$; 3.33mg/kg PE0139 组的 $N = 7$ 。

[0024] 图 11B 示出了与来得时 (甘精胰岛素, SANOFI-AVENTIS) 相比, 因素美 (PE0139) 在 1 型糖尿病 (T1DM) 小鼠模型中的低剂量滴定。确切地说, 图 11B 示出了持续 14 天的每天一次皮下给药。STZ 是链脲菌素; 未处理组指的是正常的未患糖尿病的动物; 来得时组、1mg/kg PE0139 组和未处理组的 $N = 8$; 3.33mg/kg PE0139 组的 $N = 7$ 。

[0025] 图 12A 示出了相对于来得时 (甘精胰岛素, SANOFI-AVENTIS), 因素美 (PE0139) 具有显著增强的血糖控制。在第 1 天、第 3 天、第 7 天以及第 14 天, 观测到相对于来得时, 血糖曲线下面积 (AUC) 减少 27% -39%。确切地说, 图 12A 示出了化合物施用的第 1 天以及 0-24 小时的血糖 AUC。

[0026] 图 12B 示出了相对于来得时 (甘精胰岛素, SANOFI-AVENTIS), 因素美 (PE0139) 具有显著增强的血糖控制。在第 1 天、第 3 天、第 7 天以及第 14 天, 观测到相对于来得时, 血糖曲线下面积 (AUC) 减少 27% -39%。确切地说, 图 12B 示出了化合物施用的第 14 天以及 0-24 小时的血糖 AUC。

[0027] 图 13A 示出了因素美 (PE0139) 在皮下注射后实现了长半衰期和较小的峰谷比。确切地说, 图 13A 示出了在对患有糖尿病的猪进行单次皮下注射后的药物代谢动力学 (PK) 药物水平。

[0028] 图 13B 示出了因素美 (PE0139) 在每天一次皮下注射后实现了稳态峰 / 谷药物代谢动力学 (PK) 水平。确切地说, 图 13B 示出了每天对患有糖尿病的猪进行皮下注射一次, 持续 2 周; 在给药之前测量 PK 水平。

[0029] 发明详述

[0030] 本发明提供了展现出持续生物作用的基于胰岛素的药物组合物。还提供了使用本发明的组合物治疗包括高血糖症和糖尿病在内的疾病的方法。

[0031] 在一个方面, 本发明提供了一种用于提供持续血糖控制的药物组合物, 该药物组合物包含: 有效量的蛋白质, 所述蛋白质包含胰岛素氨基酸序列和提供从注射部位持续释放的氨基酸序列; 以及药物赋形剂, 以实现持续释放。

[0032] 在一些实施方案中, 胰岛素氨基酸序列包含 A 链和 B 链氨基酸序列, 并且 A 链和 B 链具有氨基酸序列 SEQ ID NO:13 (图 1), 任选地具有总共 1 至 8 处氨基酸插入、缺失或取

代。在一些实施方案中,提供从注射部位缓慢吸收的氨基酸序列与胰岛素 A 链共价结合。在另一个实施方案中, A 链与 B 链通过一个或多个二硫键结合或经由肽或化学接头连接。

[0033] 在另一个实施方案中,提供持续释放的氨基酸序列具有脯氨酸残基的基本上重复模式。所述基本上重复模式可以形成一系列 β 转角或 β 转角的模式。在其它实施方案中,提供持续释放的氨基酸序列是弹性蛋白样肽 (ELP) 氨基酸序列。在另一个实施方案中,ELP 包含 VPGXG (SEQ ID NO:3) 的重复序列,其中每个 X 独立地选自丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸以及缬氨酸残基。在另一个实施方案中,ELP 氨基酸序列包含 AVGVP (SEQ ID NO:4)、IPGVG (SEQ ID NO:6) 或 LPGVG (SEQ ID NO:8) 的重复序列。在各种实施方案中,ELP 包含 ELP 氨基酸单元的至少 15 个,或至少 30 个,或至少 60 个,或至少 90 个,或至少 120 个,或至少 180 个重复序列。在另一个实施方案中,ELP 氨基酸序列在生理盐水中具有略低于 37°C 的转变温度。

[0034] 在另一个实施方案中,药物组合物是融合蛋白。在另一个实施方案中,药物组合物包含 SEQ ID NO:14 (图 3)。

[0035] 在又一个实施方案中,提供持续释放的氨基酸序列形成无规卷曲或非球状延伸结构或非结构化的生物聚合物,包括如由仇-法斯门算法 (Chou-Fasman algorithm) 所确定,其中至少 50% 的氨基酸缺乏二级结构的生物聚合物。在又一个实施方案中,提供持续释放的氨基酸序列是具有延伸的非球状结构或无规卷曲结构的蛋白质。

[0036] 在另一个方面,本发明提供了治疗糖尿病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用本文所述的药物组合物。在一些实施方案中,所述患者患有高血糖症、1 型糖尿病或 2 型糖尿病,或者肥胖症。在一些实施方案中,所述方法包括以每月 1 至约 30 次,或约每周一次,或每周约两次或三次,或约每天一次的频率施用所述药物组合物。在一些实施方案中,所述方法包括皮下施用所述药物组合物。

[0037] 胰岛素氨基酸序列

[0038] 胰岛素注射液,例如人胰岛素的注射液可以用于治疗糖尿病。体内的胰岛素产生细胞被称作 β -细胞,并且它们存在于胰腺中。这些细胞聚集在一起以形成“郎格罕氏岛 (islet of Langerhans)”,所述郎格罕氏岛是以对它们进行描述的德国医学生的名字命名的。

[0039] 胰岛素的合成从胰岛素基因的翻译开始,所述胰岛素基因存在于染色体 11 上。在翻译期间,两个内含子从 mRNA 产物中被剪接掉,所述 mRNA 产物编码长度为 110 个氨基酸的蛋白质。这种初级翻译产物被称作前胰岛素原并且无活性。它含有长度为 24 个氨基酸的信号肽,所述信号肽是为蛋白质穿过细胞膜所需要的。人胰岛素原由通过具有 31 个氨基酸的 C 肽连接在一起的 A 链和 B 链组成 (图 1)。

[0040] 在前胰岛素原到达内质网后,蛋白酶将信号肽切除,从而产生胰岛素原。确切地说,在 A 链与 B 链之间形成二硫键后,通过胰蛋白酶/羧肽酶 B 样系统将 C 肽去除而将胰岛素原在体内转化为成熟胰岛素。胰岛素原由以下三个结构域组成:氨基端 B 链、羧基端 A 链、以及处于中间的被称作 C 肽的连接肽。胰岛素由通过两个二硫桥键连接在一起的被命名为链 A (21 个氨基酸, GIVEQCCASVCSLYQLENYCN) (SEQ ID NO:15) 和链 B (30 个氨基酸, FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKA) (SEQ ID NO:16) 的两条氨基酸链构成。在 A 链内存在

第三个二硫桥键,所述二硫桥键将 A 链的第 6 个残基与第 11 个残基连接在一起。在大多数的物种中,链 A 和链 B 的长度和氨基酸组成是相似的,并且这三个二硫键的位置是高度保守的。出于这个原因,猪胰岛素可以补充糖尿病患者体内不足的人胰岛素水平。现今,猪胰岛素已经基本上被利用细菌大批量生产的人胰岛素原(重组胰岛素)所取代。

[0041] 胰岛素分子在溶液中倾向于形成二聚体,并且在锌离子存在下,胰岛素二聚体缔合成六聚体。虽然胰岛素的单体容易通过血液扩散并且具有快速的作用,但是六聚体缓慢扩散并且具有延迟的起始作用时间。在设计重组胰岛素时,可以通过降低胰岛素分子形成二聚体和六聚体的倾向,但不干扰与胰岛素受体的结合作用方式对胰岛素的结构进行修饰。以这种方式,制成了从短效到长效不等的一系列制备物。

[0042] 在内质网内,胰岛素原暴露于多种特异性肽酶,所述肽酶将 C 肽去除并且产生成熟的并且具有活性的形式的胰岛素。在高尔基体中,胰岛素和游离的 C 肽被包装到分泌颗粒中,这些分泌颗粒在 β -细胞的细胞质中积聚。这些颗粒的胞外分泌由葡萄糖进入到 β 细胞中所触发。胰岛素的分泌对代谢有广泛的影响。

[0043] 响应于葡萄糖升高,胰岛素的释放存在两个阶段。第一个阶段是胰岛素立即释放。这可归因于储存在分泌颗粒中的预先形成的胰岛素释放。在短暂的延迟之后,再出现新合成的胰岛素更长时间的释放。

[0044] 在释放后,胰岛素仅在它被酶降解之前短暂的时间内具有活性。肝脏和肾脏中存在的胰岛素酶分解血浆中循环的胰岛素,并且因此,胰岛素仅具有约 6 分钟的半衰期。这种短暂的作用持续时间会使得胰岛素的循环水平发生快速的变化。

[0045] 已经研发出具有改进的治疗特性的胰岛素类似物(Owens 等, 2001, Lancet 358:739-46; Vajo 等, 2001, Endocr Rev 22:706-17),并且这些类似物可以与本发明结合使用。使用包括延长胰岛素 B 链的 COOH- 末端以及对针对白蛋白具有相当大的亲和力的经脂肪酸酰化了的胰岛素进行工程化在内的不同的策略来产生更长效的胰岛素类似物。然而,使用可获得的更长效胰岛素化合物进行的体内治疗仍会导致低血糖和高血糖波动频繁出现以及 HbA1c 适度降低。因此,研发真正长效并且稳定的人胰岛素类似物仍然是一项重要的任务。

[0046] 可以根据本发明使用的胰岛素的功能类似物包括速效类似物,如赖脯胰岛素(lispro)、门冬胰岛素(aspart)以及赖谷胰岛素(glulisine),这些速效类似物在皮下注射之后被快速吸收(<30 分钟),在一小时内达到峰值,并且具有相对短的作用持续时间(3 至 4 小时)。另外,已经研发出两种长效胰岛素类似物:甘精胰岛素和地特胰岛素(detemir),并且这两种长效胰岛素类似物可以与本发明结合使用。这些长效胰岛素类似物具有约两小时的起始作用时间并且在 4 至 6 小时内达到生物作用的稳定水平,并且可以持续长达 24 小时。

[0047] 因此,在一个实施方案中,胰岛素氨基酸序列可以含有赖脯胰岛素(也被称为优泌乐(HUMALOG),Eli Lilly)的 A 链和/或 B 链。赖脯胰岛素与人胰岛素的不同之处在于在胰岛素 B 链的位置 28 上脯氨酸被赖氨酸取代以及在胰岛素 B 链的位置 29 上赖氨酸被脯氨酸取代。虽然这些修饰不改变受体结合作用,但它们有助于阻止胰岛素二聚体和六聚体形成,从而允许更大量的活性单体胰岛素可供餐后注射使用。

[0048] 在另一个实施方案中,胰岛素氨基酸序列可以含有门冬胰岛素(也被称为诺和锐

(NOVOLOG), Novo Nordisk) 的 A 链和 / 或 B 链。门冬胰岛素经过设计而存在单处置换, 所述单处置换是人胰岛素 B 链的位置 28 上氨基酸脯氨酸被天冬氨酸所置换。这一修饰有助于阻止胰岛素六聚体形成, 从而产生更快速起效的胰岛素。

[0049] 在又一个实施方案中, 胰岛素氨基酸序列可以含有赖谷胰岛素 (也被称为艾倍得 (APIDRA), Sanofi-Aventis) 的 A 链和 / 或 B 链。赖谷胰岛素是短效类似物, 通过人胰岛素 B 链中位置 3 上的天冬酰胺被赖氨酸取代并且位置 29 上的赖氨酸被谷氨酰胺取代而产生。赖谷胰岛素与常规人胰岛素相比具有更快速的起始作用时间以及更短的作用持续时间。

[0050] 在另一个实施方案中, 胰岛素氨基酸序列可以含有甘精胰岛素 (也被称为来得时, Sanofi-Aventis) 的 A 链和 / 或 B 链。来得时具有延迟的吸收作用, 这是因为它具有酸性 pH 值, 所述酸性 pH 值在中性生理性 pH 值的存在下会引起胰岛素晶体的微沉淀物形成。甘精胰岛素与人胰岛素的不同之处在于 A 链的位置 21 上的氨基酸天冬酰胺被甘氨酸置换并且在 B 链的 C 端上添加了两个精氨酸。与睡前服用的中性鱼精蛋白哈格多恩 (neutral protamine Hagedorn, NPH) 胰岛素 (一种中效胰岛素) 相比较, 甘精胰岛素与患有 2 型糖尿病的患者更少发生夜间低血糖有关。

[0051] 在又一个实施方案中, 胰岛素氨基酸序列可以含有地特胰岛素 (也被称为诺和平 (LEVEMIR), Novo Nordisk) 的 A 链和 / 或 B 链。地特胰岛素是一种可溶性 (在中性 pH 值下) 长效胰岛素类似物, 其中 B30 上的氨基酸苏氨酸被去除并且 14- 碳肉豆蔻酰基脂肪酸被乙酰化至 LysB29 的 ϵ - 氨基上。在皮下注射之后, 地特胰岛素解离, 从而暴露出提供与白蛋白分子进行可逆性结合的游离脂肪酸。因此在稳态时, 游离的未结合的胰岛素的浓度大幅降低, 从而产生稳定的血浆葡萄糖水平。

[0052] 在一些实施方案中, 胰岛素氨基酸序列可以是单链胰岛素类似物 (SIA) (例如, 如美国专利 6, 630, 438 和 WO2008/019368 中所述, 这两项专利特此以引用的方式整体并入本文)。单链胰岛素类似物包括一组结构上相关的蛋白质, 其中 A 链与 B 链由多肽接头共价连接。多肽接头使 B 链的 C 端与 A 链的 N 端连接。接头可以具有任何长度, 只要该接头提供为 SIA 具有葡萄糖摄取和胰岛素受体结合作用所需的结构构象即可。在一些实施方案中, 接头的长度是约 5-18 个氨基酸。在其它实施方案中, 接头的长度是约 9-15 个氨基酸。在某些实施方案中, 接头的长度是约 12 个氨基酸。在某些示例性实施方案中, 接头具有序列 KDDNPNLPRLVR (SEQ ID NO. :17) 或 GAGSSSRAPQT (SEQ ID NO. :18)。然而, 应当了解的是, 有可能如在长度 (添加和缺失) 以及氨基酸的取代方面使这个序列发生许多变化, 而基本上不损害所产生的 SIA 在葡萄糖摄取和胰岛素受体结合活性方面的有效性。举例来说, 可以从任一端添加或去除若干个不同的氨基酸残基而基本上不降低所产生的 SIA 的活性。

[0053] 当前正处于临床研发中的示例性单链胰岛素类似物是艾布林 (albulin) (Duttaroy 等, 2005, Diabetes54:251-8)。艾布林可以在酵母中或在哺乳动物细胞中产生。它由通过十二肽接头连接在一起并且融合至天然人血清白蛋白的 NH2 端的人胰岛素 (与天然人胰岛素具有 100% 同一性) 的 B 链和 A 链组成。对于艾布林的表达和纯化, Duttaroy 等使用四种重叠引物以及 PCR 扩增建构了编码单链胰岛素的合成基因构建体, 所述单链胰岛素含有由十二肽接头连接在一起的成熟人胰岛素的 B 链和 A 链。将所得的 PCR 产物在框内连接于用于在酵母中表达的 pSAC35 载体内所含的人血清白蛋白 (HSA) 的信号肽与成熟 HSA 的 NH2 端之间。根据本发明, 可以将艾布林的 HSA 组分置换为如本文所述的提供持续释

放的氨基酸序列。

[0054] 因此,在一个方面,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含包括例如弹性蛋白样肽(ELP)在内的提供持续释放的氨基酸序列以及胰岛素氨基酸序列。举例来说,在某些实施方案中,该胰岛素是哺乳动物胰岛素,如人胰岛素或猪胰岛素。根据本发明,提供持续释放组分的氨基酸序列可以与胰岛素A链或B链或这两者偶联(例如经由重组融合或化学缀合)。在一些实施方案中,提供从注射部位缓慢吸收的氨基酸序列与胰岛素A链共价结合。胰岛素可以包含链A、链B以及链C中的每一个(SEQ ID NO:19和20),或可以含有经过加工的形式,该形式仅含有链A和链B。在一些实施方案中,链A和链B由短连接肽连接,从而产生单链胰岛素。胰岛素可以是人胰岛素的功能类似物,包括在N端和/或C端(链A和链B中的任一者或两者的N端和/或C端)上截短了1至10个氨基酸(包括截短了1个、2个、3个或约5个氨基酸)的功能性片段。功能类似物相对于天然序列(例如SEQ ID NO:15和16)可以含有1至10处氨基酸插入、缺失和/或取代(总共),并且在每种情况下,同时均保留肽的活性。举例来说,功能类似物相对于天然序列(其可以含有链A和链B,或含有链A、链B以及链C)可以具有1处、2处、3处、4处或5处氨基酸插入、缺失和/或取代(总共)。所述活性可以使用任何可供使用的测定(包括本文所述的那些)来确定或测定。在这些或其它实施方案中,胰岛素组分与链A和链B(SEQ ID NO:15和16)的天然序列中的每一个具有至少约75%、80%、85%、90%、95%或98%同一性。可以使用任何比对工具(包括Tatusova等,Blast2sequences—a new tool for comparing protein and nucleotide sequences,FEMS Microbiol Lett.174:247–250(1999))对两个序列之间(例如天然序列与功能类似物之间)的序列同一性进行测定。胰岛素组分可以含有本领域已知的另外的化学修饰。

[0055] 为了对胰岛素类似物或含有提供持续释放的氨基酸序列的胰岛素类似物的体外结合特性进行表征,可以在表达胰岛素受体的不同的细胞系中进行竞争结合测定(Jehle等,1996,Diabetologia39:421–432)。举例来说,可以使用利用过表达人胰岛素受体的CHO细胞进行的竞争结合测定。胰岛素还可以与IGF-1受体结合,与IGF-1受体结合的亲和力低于与胰岛素受体结合的亲和力。为了对含有提供持续释放的氨基酸序列的胰岛素类似物的结合亲和力进行测定,可以在L6细胞中使用¹²⁵I标记的IGF-1进行竞争结合测定。

[0056] 胰岛素的活性包括刺激外周葡萄糖利用以及抑制肝脏葡萄糖产生。可以在体外使用已知的方法对含有提供持续释放的氨基酸序列的胰岛素类似物介导这些生物活性的能力进行测定。举例来说,可以测量含有提供持续释放的氨基酸序列的类似物对3T3-L1脂肪细胞中的葡萄糖摄取的作用并且与胰岛素的作用相比较。使用生物活性类似物对细胞进行预处理一般会使得2-脱氧葡萄糖的摄取出现剂量依赖性增加。可以在多种细胞类型,例如H4IIE肝细胞瘤细胞中对含有提供持续释放的氨基酸序列的胰岛素类似物调节葡萄糖产生的能力进行测量。在这一测定中,使用生物活性类似物进行预处理一般会对所释放的葡萄糖的量产生剂量依赖性抑制作用。

[0057] 提供持续释放的氨基酸序列

[0058] 在一些实施方案中,提供持续释放的氨基酸序列包含经由蛋白质主链基团和/或侧链基团形成氢键并且可以促成疏水性相互作用以形成基质的结构单元。在一些实施方案中,氨基酸侧链不含氢键供体基团,氢键基本上经由蛋白质主链形成。示例性氨基酸包括脯

氨酸、丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸和异亮氨酸以及类似的氨基酸。在一些实施方案中,所述结构单元是基本上重复的结构单元,以便产生基本上重复的结构基序和基本上重复的氢键键合能力。在这些和其它实施方案中,所述氨基酸序列包含至少 10%、至少 20%、至少 40%或至少 50%的脯氨酸,所述脯氨酸可以基本上重复模式定位。脯氨酸的这种基本上重复模式可以产生重复的 β -转角结构。在此上下文中,基本上重复模式意指氨基酸序列的至少 50%或至少 75%的脯氨酸残基是可界定的结构单元的一部分。在另外的其它实施方案中,所述氨基酸序列包含具有氢键供体侧链的氨基酸,如丝氨酸、苏氨酸和 / 或酪氨酸。在一些实施方案中,重复序列可以含有一个至约四个脯氨酸残基,而其余残基独立地选自非极性残基,如甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸以及缬氨酸。非极性或疏水性残基可以促成疏水性相互作用以便形成基质。

[0059] 所述氨基酸序列在注射后在高于储存温度的温度下可以形成“凝胶样”状态。示例性序列具有重复肽单元,和 / 或可以在较低的温度下相对非结构化,并且在较高的温度下实现氢键键合的结构化的状态。

[0060] 在一些实施方案中,能够在体温下形成基质的氨基酸序列是具有含四个至十个氨基酸的重复单元的肽。所述重复单元可以在形成基质时形成一个、两个或三个氢键。在某些实施方案中,能够在体温下形成基质的氨基酸序列是蚕丝、弹性蛋白、胶原蛋白或角蛋白的氨基酸序列或其模拟物,或美国专利 6,355,776 中所公开的氨基酸序列,该美国专利特此以引用的方式并入。

[0061] 在某些实施方案中,所述氨基酸序列是弹性蛋白样蛋白 (ELP) 序列。所述 ELP 序列包含结构肽单元或序列或由其组成,所述结构肽单元或序列与弹性蛋白有关或为弹性蛋白的模拟物。所述 ELP 序列是由具有三个至约二十个氨基酸,或在一些实施方案中,具有四个至十个氨基酸,如四个、五个或六个氨基酸的结构单元构成的。单个结构单元的长度可以不同或可以是均一的。示例性结构单元包括由 SEQ ID NO:1-12(下文)所定义的单元,所述单元可以重复结构单元(包括串联重复单元)形式使用,或可以某种组合形式使用。因此,ELP 可以包含选自如下文所定义的 SEQ ID NO:1-12 的一种或多种结构单元或主要由其组成。

[0062] 在包括结构单元是 ELP 单元的实施方案在内的一些实施方案中,所述氨基酸序列包含约 10 至约 500 个结构单元或主要由其组成,或在某些实施方案中,约 50 至约 200 个结构单元,或在某些实施方案中,约 80 至约 200 个结构单元,或约 80 至约 150 个结构单元,如由 SEQ ID NO:1-12 所定义的单元中的一种或组合。因此,这些结构单元总共可以具有约 50 至约 2000 个氨基酸残基,或约 100 至约 800 个氨基酸残基,或约 200 至约 700 个氨基酸残基,或约 400 至约 600 个氨基酸残基的长度。

[0063] 所述氨基酸序列可以随所选的制剂展现出明显的并且可逆的逆相转变。即,所述氨基酸序列在低于转变温度 (T_t) 的制剂中可以是结构无序的并且高度可溶的,但在所述制剂的温度升高至 T_t 以上时,展现出急剧的 (2°C - 3°C 范围) 从无序到有序的相转变。除了温度之外,氨基酸聚合物的长度、氨基酸组成、离子强度、pH 值、压力、温度、所选溶剂、有机溶质的存在以及蛋白质浓度也可能影响转变特性,并且可以在配制中针对所需的吸收曲线对这些进行调整。吸收曲线可以容易地通过测定胰岛素氨基酸序列随时间推移的血浆浓度或活性来加以测试。

[0064] 在某些实施方案中,一种或多种 ELP 组分可以由包括但不限于以下的结构单元形成:

[0065] (a) 四肽 Val-Pro-Gly-Gly 或 VPGG (SEQ ID NO:1);

[0066] (b) 四肽 Ile-Pro-Gly-Gly 或 IPGG (SEQ ID NO:2);

[0067] (c) 五肽 Val-Pro-Gly-X-Gly (SEQ ID NO:3) 或 VPGXG, 其中 X 是任何天然的或非天然的氨基酸残基, 并且其中 X 任选地在聚合或低聚的重复序列之间不同;

[0068] (d) 五肽 Ala-Val-Gly-Val-Pro 或 AVGVP (SEQ ID NO:4);

[0069] (e) 五肽 Ile-Pro-Gly-X-Gly 或 IPGXG (SEQ ID NO:5), 其中 X 是任何天然的或非天然的氨基酸残基, 并且其中 X 任选地在聚合或低聚的重复序列之间不同;

[0070] (f) 五肽 Ile-Pro-Gly-Val-Gly 或 IPGVG (SEQ ID NO:6);

[0071] (g) 五肽 Leu-Pro-Gly-X-Gly 或 LPGXG (SEQ ID NO:7), 其中 X 是任何天然的或非天然的氨基酸残基, 并且其中 X 任选地在聚合或低聚的重复序列之间不同;

[0072] (h) 五肽 Leu-Pro-Gly-Val-Gly 或 LPGVG (SEQ ID NO:8);

[0073] (i) 六肽 Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly 或 VAPGVG (SEQ ID NO:9);

[0074] (j) 八肽 Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Val-Gly 或 GVGVPGVG (SEQ ID NO:10);

[0075] (k) 九肽 Val-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Gly-Ala-Gly 或 VPGFGVGAG (SEQ ID NO:11); 以及

[0076] (l) 九肽 Val-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Gly 或 VPGVGVPGG (SEQ ID NO:12)。

[0077] 这些由 SEQ ID NO:1-12 所定义的结构单元可以形成结构重复单元, 或可以组合用于形成 ELP。在一些实施方案中, ELP 组分完全 (或几乎完全) 由选自 SEQ ID NO:1-12 的结构单元中的一种或组合 (例如 2 种、3 种或 4 种结构单元) 形成。在其它实施方案中, ELP 组分中的至少 75%, 或至少 80%, 或至少 90% 由选自 SEQ ID NO:1-12 的结构单元中的一种或组合形成, 并且所述结构单元可以重复单元的形式存在。

[0078] 在某些实施方案中, ELP 包含 Val-Pro-Gly-X-Gly (SEQ ID NO:3) 的重复单元, 包括串联的重复单元, 其中 X 如上文所定义, 并且其中相对于整个 ELP 组分 (其可以包含除 VPGXG (SEQ ID NO:3) 以外的结构单元), 所采用的 Val-Pro-Gly-X-Gly (SEQ ID NO:3) 单元的百分比是占 ELP 的大于约 50%, 或大于约 75%, 或大于约 85%, 或大于约 95%。ELP 可以含有具有 5 至 15 个 SEQ ID NO:3 的结构单元 (例如约 10 个结构单元) 的基序, 其中客体残基 (guest residue) X 在所述基序中的至少 2 个或至少 3 个单元之间不同。所述客体残基可以独立地诸如选自非极性或非极性疏水性残基, 如氨基酸 V、I、L、A、G 以及 W (并且可以对所述客体残基进行选择以便保持所需的逆相转变特性)。

[0079] 在一些实施方案中, ELP 可以形成 β -转角结构。适于产生 β -转角结构的示例性肽序列描述于国际专利申请 PCT/US96/05186 中, 所述国际专利申请特此以引用的方式整体并入。举例来说, 可以改变序列 VPGXG (SEQ ID NO:3) 中的第四个残基 (X) 而不消除 β -转角的形成。

[0080] 示例性 ELP 的结构可以使用符号 $ELPk[X_iY_j-n]$ 来描述, 其中 k 表示具体的 ELP 重复单元, 加括号的大写字母是单字母氨基酸代码并且它们的相应下标表示结构单元中每一种客体残基 X 的相对比率 (在适当时), 并且 n 描述了以结构重复序列的数目计的 ELP 的总长度。举例来说, $ELP1[V5A2G3-10]$ 表示含有 10 个五肽 VPGXG (SEQ ID NO:3) 的

重复单元的 ELP 组分,其中 X 是缬氨酸、丙氨酸以及甘氨酸,它们的相对比率为约 5:2:3;ELP1[K1V2F1-4]表示含有 4 个五肽 VPGXG(SEQ ID NO:3)的重复单元的 ELP 组分,其中 X 是赖氨酸、缬氨酸以及苯丙氨酸,它们的相对比率为约 1:2:1;ELP1[K1V7F1-9]表示含有 9 个五肽 VPGXG(SEQ ID NO:3)的重复单元的多肽,其中 X 是赖氨酸、缬氨酸以及苯丙氨酸,它们的相对比率为约 1:7:1;ELP1[V-5]表示含有 5 个五肽 VPGXG(SEQ ID NO:3)的重复单元的多肽,其中 X 是缬氨酸;ELP1[V-20]表示含有 20 个五肽 VPGXG(SEQ ID NO:3)的重复单元的多肽,其中 X 是缬氨酸;ELP2[5]表示含有 5 个五肽 AVGVP(SEQ ID NO:4)的重复单元的多肽;ELP3[V-5]表示含有 5 个五肽 IPGXG(SEQ ID NO:5)的重复单元的多肽,其中 X 是缬氨酸;ELP4[V-5]表示含有 5 个五肽 LPGXG(SEQ ID NO:7)的重复单元的多肽,其中 X 是缬氨酸。

[0081] 对于 ELP, T_t 随客体残基的疏水性而变。因此,通过改变一个或多个客体残基的身份以及它们的摩尔分数,可以合成在广泛的范围内展现出逆转变的 ELP。因此,在给定的 ELP 长度下,可以通过将更大比例的疏水性客体残基并入到 ELP 序列中来降低 T_t 。合适的疏水性客体残基的实例包括缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸以及甲硫氨酸。还可以使用具有中等疏水性的酪氨酸。相反,可以通过并入诸如选自以下的那些残基之类的残基来提高 T_t :谷氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、苏氨酸、甘氨酸、精氨酸以及谷氨酰胺。

[0082] 对于分子量 >100,000 的多肽, PCT/US96/05186 (其特此以引用的方式整体并入)中所公开的疏水性标度提供了一种用于对具体 ELP 序列的近似 T_t 进行预测的手段。对于分子量 <100,000 的多肽,可以通过以下二次函数对 T_t 进行预测或确定: $T_t = M_0 + M_1X + M_2X^2$, 其中 X 是融合蛋白的 MW, 并且 $M_0 = 116.21$; $M_1 = -1.7499$; $M_2 = 0.010349$ 。

[0083] 在一些实施方案中, ELP 经过选择或设计以在配制条件下提供在约 10°C 至约 37°C, 如约 20°C 至约 37°C, 或约 25°C 至约 37°C 范围内的 T_t 。在一些实施方案中, 在生理条件下 (例如 0.9% 盐水) 的转变温度是约 34°C 至 36°C, 以顾及略微较低的外周温度。

[0084] 在某些实施方案中, 能够在体温下形成氢键键合的基质的氨基酸序列包含 $[VPGXG]_{90}$ (SEQ ID NO:31), 其中每个 X 选自 V、G 以及 A, 并且其中 V:G:A 的比率可以是约 5:3:2。举例来说, 能够在体温下形成氢键键合的基质的氨基酸序列可以包含 $[VPGXG]_{120}$ (SEQ ID NO:32), 其中每个 X 选自 V、G 以及 A, 并且其中 V:G:A 的比率可以是约 5:3:2。如本文所示, 这种 ELP 中的 120 个结构单元可以在存在约 5 至 15mg/ml (例如, 约 10mg/ml) 的蛋白质的情况下提供约 37°C 的转变温度。在约 40 至约 100mg/mL 的浓度下, 相转变温度是约 35°C (略低于体温), 这种相转变温度允许外周体温略低于 37°C。

[0085] 或者, 能够在体温下形成基质的氨基酸序列包含 $[VPGVG]_{90}$ (SEQ ID NO:31) 或 $[VPGVG]_{120}$ (SEQ ID NO:32)。如本文所示, 这种 ELP 中的 120 个结构单元可以在存在约 0.005 至约 0.05mg/ml (例如, 约 0.01mg/ml) 的蛋白质的情况下提供约 37°C 的转变温度。

[0086] 弹性蛋白样肽 (ELP) 蛋白质聚合物和重组融合蛋白可以如美国专利公布 No. 2010/0022455 中所述来制备, 所述美国专利公布特此以引用的方式并入。

[0087] 在其它实施方案中, 能够在体温下形成基质的氨基酸序列可以包括无规卷曲或非球状延伸结构。举例来说, 能够在体温下形成基质的氨基酸序列可以包括以下专利公布中所公开的氨基酸序列: 美国专利公布 No. 2008/0286808、WIPO 专利公布 No. 2008/155134 以

及美国专利公布 No. 2011/0123487, 所述专利公布中的每一者特此以引用的方式并入。在一些实施方案中, 能够在体温下形成基质的氨基酸序列可以主要由脯氨酸连同丝氨酸、丙氨酸和甘氨酸残基中的一种或多种构成。在一些实施方案中, 能够在体温下形成基质的氨基酸序列具有 50%、或 60%、或 70%、或 75%、或 80%、或 90% 的脯氨酸、丝氨酸、丙氨酸以及甘氨酸残基 (总共)。

[0088] 举例来说, 在一些实施方案中, 所述氨基酸序列包含具有至少 40 个氨基酸的非结构化重组聚合物。举例来说, 可以对所述非结构化聚合物进行限定, 其中所述非结构化聚合物中所含的甘氨酸 (G)、天冬氨酸 (D)、丙氨酸 (A)、丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T)、谷氨酸 (E) 以及脯氨酸 (P) 残基的总和占总氨基酸的多于约 80%。在一些实施方案中, 如通过仇 - 法斯门算法所确定, 至少 50% 的氨基酸缺乏二级结构。非结构化聚合物可以包含多于约 100 个、150 个、200 个或更多个连续氨基酸。在一些实施方案中, 所述氨基酸序列形成无规卷曲结构域。具体来说, 具有或形成“无规卷曲构象”的多肽或氨基酸聚合物基本上缺乏确定的二级结构和三级结构。

[0089] 在各种实施方案中, 预期的受试者是人, 并且体温是约 37°C, 并且因此, 药物组合物被设计成在这一温度下提供持续释放作用。虽然体温保持恒定, 但是通过使氢键键合和 / 或疏水性相互作用逆转所引起的向循环中的缓慢释放由因产品在注射部位处扩散而引起的浓度下降所驱动。在其它实施方案中, 受试者是非人哺乳动物, 并且药物组合物被设计成在所述哺乳动物的体温下展现出持续释放作用, 所述体温可以是约 30°C 至约 40°C, 在一些实施方案中, 如某些驯养宠物 (例如狗或猫) 或家畜 (例如母牛、马、绵羊或猪) 的体温。一般来说, Tt 高于制剂的储存条件 (其可以是 10°C 至约 25°C, 或 15°C 至 22°C), 从而使得药物组合物保持在供注射用溶液中。

[0090] 在一些实施方案中, 通过施用本发明的药物组合物的冷制剂 (例如 2°C -15°C, 或 2°C -10°C, 或 2°C -5°C) 来实现缓慢释放。因此, 在一些实施方案中, 提供了冷制剂。可以在约 2°C 至约 3°C、约 2°C 至约 4°C、约 2°C 至约 5°C、约 2°C 至约 6°C、约 2°C 至约 7°C、约 2°C 至约 8°C、约 2°C 至约 10°C、约 2°C 至约 12°C、约 2°C 至约 14°C、约 2°C 至约 15°C、约 2°C 至约 16°C、约 2°C 至约 20°C、约 10°C 至约 25°C 或 15°C 至 22°C 下施用冷制剂。

[0091] 所述药物组合物一般用于“全身递送”, 意思是所述药剂不局部递送至病理部位或作用部位。相反, 所述药剂从注射部位被吸收到血流中, 其中所述药剂在全身起作用或经由循环被输送到作用部位。

[0092] 持续释放

[0093] 在一个方面, 本发明提供了一种持续释放药物制剂。所述制剂包含用于全身施用的药物组合物, 其中所述药物组合物包含胰岛素氨基酸序列以及如本文所述的能够在受试者的体温下形成可逆性基质的氨基酸序列 (即, 提供持续释放的氨基酸序列)。所述可逆性基质由氢键 (例如分子内和 / 或分子间氢键) 以及疏水性作用形成。所述制剂进一步包含一种或多种在施用后诱导基质形成的药学上可接受的赋形剂和 / 或稀释剂。所述基质提供从注射部位缓慢吸收到循环中。从注射部位的持续释放或缓慢吸收是由于随着浓度在注射部位不断消散基质发生缓慢逆转。在产品移动进入循环之后, 所述制剂赋予了长半衰期和提高了的稳定性。因此, 实现了缓慢吸收和长半衰期的独特组合, 从而产生所期望的 PK 曲线, 所述 PK 曲线具有较低的峰谷比和 / 或长的 Tmax。

[0094] 确切地说,本发明使得如胰岛素氨基酸序列的肽类药物的药物代谢动力学得到改进,包括相对平坦的 PK 曲线,所述 PK 曲线具有低的峰谷比和 / 或长的 T_{max}。可以通过相对不频繁的施用时间表,如在一些实施方案中,每月注射一次至八次来维持所述 PK 曲线。

[0095] 在一个方面,本发明提供了一种持续释放药物制剂。所述制剂包含用于全身施用的药物组合物,其中所述药物组合物包含胰岛素氨基酸序列以及能够在受试者的体温下形成基质的氨基酸序列。所述可逆性基质由氢键(例如分子内和 / 或分子间氢键)以及疏水性作用形成。所述制剂进一步包含一种或多种在施用后诱导基质形成的药学上可接受的赋形剂和 / 或稀释剂。该基质提供从注射部位缓慢吸收到循环中,并且不受理论所束缚,这种缓慢的吸收是由于随着蛋白质浓度在注射部位处不断降低引起基质发生缓慢的逆转。这种缓慢的吸收曲线提供了平坦的 PK 曲线以及方便并且舒适的施用方案。举例来说,在各种实施方案中,在几天(例如 2 天至约 60 天,或约 4 天至约 30 天)的时间内,胰岛素氨基酸序列的血浆浓度不会改变超过 10 倍,或超过约 5 倍,或超过约 3 倍。一般来说,在多次(基本上均匀间隔)施用,如至少 2 次、至少约 5 次或至少约 10 次施用该制剂期间观测到这种平坦的 PK 曲线。在一些实施方案中,该缓慢的吸收表现为大于约 5 小时、大于约 10 小时、大于约 20 小时、大于约 30 小时或大于约 50 小时的 T_{max}(达到最高血浆浓度的时间)。

[0096] 从注射部位的持续释放或缓慢吸收是由能够在受试者的体温下形成氢键键合的基质的氨基酸序列以及该制剂的组分控制的。

[0097] 该制剂包含一种或多种在施用后诱导基质形成的药学上可接受的赋形剂和 / 或稀释剂。举例来说,这些赋形剂包括盐以及可以发挥使氢键键合稳定的作用的其它赋形剂。示例性盐包括碱土金属盐,如钠盐、钾盐以及钙盐。平衡离子包括氯离子和磷酸根。示例性盐包括氯化钠、氯化钾、氯化镁、氯化钙以及磷酸钾。

[0098] 制剂中的蛋白质浓度经过调整以连同赋形剂一起驱使基质在施用的温度下形成。举例来说,更高的蛋白质浓度有助于驱使基质形成,并且实现这个目的所需的蛋白质浓度根据所用的 ELP 系列而改变。举例来说,在使用 ELP1-120 或具有可比较的转变温度的氨基酸序列的实施方案中,存在处于约 1mg/mL 至约 200mg/mL 范围内的蛋白质,或存在处于约 5mg/mL 至约 125mg/mL 范围内的蛋白质。可以存在处于约 10mg/mL 至约 50mg/mL,或约 15mg/mL 至约 30mg/mL 范围内的药物组合物。在使用 ELP4-120 或具有可比较的转变温度的氨基酸序列的实施方案中,存在处于约 0.005mg/mL 至约 50mg/mL 范围内的蛋白质,或存在处于约 0.01mg/mL 至约 20mg/mL 范围内的蛋白质。

[0099] 在一定的 pH 值、离子强度下以及一般使用赋形剂配制药组合物以足以驱使基质在体温(例如,37°C,或在一些实施方案中,是 34°C 至 36°C)下形成。药物组合物一般经过制备而使得它不会在储存条件下形成基质。储存条件一般低于制剂的转变温度,如低于约 32°C,或低于约 30°C,或低于约 27°C,或低于约 25°C,或低于约 20°C,或低于约 15°C。举例来说,该制剂可以与血液等渗或具有模拟生理条件的离子强度。举例来说,该制剂可以具有如下的离子强度:至少 25mM 氯化钠的离子强度,或至少 30mM 氯化钠的离子强度,或至少 40mM 氯化钠的离子强度,或至少 50mM 氯化钠的离子强度,或至少 75mM 氯化钠的离子强度,或至少 100mM 氯化钠的离子强度,或至少 150mM 氯化钠的离子强度。在某些实施方案中,该制剂具有低于约 0.9% 盐水的离子强度的离子强度。在一些实施方案中,该制剂包含氯化钙、氯化镁、氯化钾、磷酸二氢钾、氯化钠以及磷酸氢二钠中的两种或更多种。

[0100] 在某些实施方案中,该制剂可以包含约 50mM 的组氨酸,或约 40mM 的组氨酸,或约 30mM 的组氨酸,或约 25mM 的组氨酸,或约 20mM 的组氨酸,或约 15mM 的组氨酸。

[0101] 液体制剂可以包含约 100mM 的氯化钠和约 20mM 的组氨酸并且可以冷藏或在室温下储存。可以改变盐浓度以在注射部位提供等渗性。

[0102] 该制剂可以被包装成预先计量的笔或注射器的形式以每周施用一次、每周施用两次,或每月施用一次至八次,或可选地被填充于常规的小瓶等当中。

[0103] 在示例性实施方案中,本发明提供了一种持续释放药物制剂,所述药物制剂包含治疗剂,该治疗剂(例如肽或蛋白质治疗剂)包含胰岛素氨基酸序列和包含 [VPGXG]₉₀(SEQ ID NO:31) 或 [VPGXG]₁₂₀(SEQ ID NO:32) 的氨基酸序列,其中每个 X 选自 V、G 以及 A。V、G 以及 A 可以约 5:3:2 的比率存在。或者,该氨基酸序列包含 [VPGVG]₉₀(SEQ ID NO:31) 或 [VPGVG]₁₂₀(SEQ ID NO:32)。该制剂进一步包含一种或多种药学上可接受的赋形剂和/或稀释剂以在向人受试者施用后从水性形式形成可逆性基质。胰岛素及其衍生物描述于本文和美国临时申请 No. 61/563,985 中,该美国临时申请特此以引用的方式并入。

[0104] 在这些实施方案中,可以存在处于约 0.5mg/mL 至约 200mg/mL 范围内的胰岛素氨基酸序列,或存在处于约 5mg/mL 至约 125mg/mL 范围内的胰岛素氨基酸序列。存在处于约 10mg/mL 至约 50mg/mL 范围内,或约 15mg/mL 至约 30mg/mL 范围内的胰岛素氨基酸序列。该制剂可以具有如下的离子强度:至少 25mM 氯化钠的离子强度,或至少 30mM 氯化钠的离子强度,或至少 40mM 氯化钠的离子强度,或至少 50mM 氯化钠的离子强度,或至少 75mM 氯化钠的离子强度,或至少 100mM 氯化钠的离子强度。该制剂可以具有低于约 0.9% 盐水的离子强度的离子强度。该制剂包含氯化钙、氯化镁、氯化钾、磷酸二氢钾、氯化钠以及磷酸氢二钠中的两种或更多种。

[0105] 还可以使用例如用于实现所需的稳定性的其它制剂组分。这些组分包括一种或多种氨基酸或糖醇(例如甘露醇)、防腐剂以及缓冲剂,并且这些成分是本领域熟知的。

[0106] 在另一个方面,本发明提供了一种用于递送胰岛素氨基酸序列的持续释放方案的方法。该方法包括向有需要的受试者施用本文所述的制剂,其中每月施用该制剂约 1 至约 8 次。

[0107] 在一些实施方案中,该制剂约每周施用一次,并且可以皮下或肌肉内施用。在一些实施方案中,施用部位不是病理部位,例如不是预期的作用部位。

[0108] 在各种实施方案中,在多次施用,如至少 2 次、至少约 5 次或至少约 10 次施用制剂的过程期间,胰岛素氨基酸序列的血浆浓度不会改变超过 10 倍,或约 5 倍,或约 3 倍。所述施用是基本上均匀间隔的,例如像约每天一次,或约每周一次,或每月一次至约五次。

[0109] 在某些实施方案中,受试者是人,但在其它实施方案中,可以是非人哺乳动物,如驯养宠物(例如狗或猫)或者家畜或农畜(例如马、母牛、绵羊或猪)。

[0110] 缀合与偶联

[0111] 根据本发明的某些实施方案,重组产生的融合蛋白包括通过基因融合而彼此缔合的提供持续释放的氨基酸序列(例如 ELP)和胰岛素氨基酸序列。举例来说,该融合蛋白可以通过对编码与提供持续释放组分的氨基酸序列在框内克隆的胰岛素氨基酸序列的多核苷酸进行翻译而产生。

[0112] 在某些实施方案中,提供持续释放组分的氨基酸序列与胰岛素氨基酸序列可以使

用具有不同长度的接头肽融合以便提供更大的物理分隔作用并且允许所融合的部分之间更大的空间活动性,并且因此使得胰岛素氨基酸序列在与它的受体结合方面的可及性达到最大。接头肽可以由柔性或较具刚性的氨基酸组成。举例来说,柔性接头可以包括具有相对小的侧链并且可以具亲水性的氨基酸。在不受限制的情况下,柔性接头可以包含甘氨酸和/或丝氨酸残基。较具刚性的接头可以含有例如具有较大空间位阻的氨基酸侧链,如(而但不限于)酪氨酸或组氨酸。接头可以具有少于约50个、40个、30个、20个、10个或5个氨基酸残基。接头可以例如经由重组融合而共价连接至胰岛素氨基酸序列和提供持续释放组分的氨基酸序列并且介于这两者之间。

[0113] 接头或肽间隔基可以是蛋白酶可切割的或不可切割的。举例来说,可切割的肽间隔基包括而但不限于由不同类型的蛋白酶(体外或体内)识别的肽序列,所述蛋白酶如Tev、凝血酶、因子Xa、纤溶酶(血液蛋白酶)、金属蛋白酶、组织蛋白酶(例如GFLG、SEQ ID NO:21等)以及在其它身体区室中存在的蛋白酶。在使用可切割的接头的一些实施方案中,融合蛋白在呈融合体形式时可以是无活性的、活性较低或效力较低的,所述融合体接着在间隔基在体内被切割后活化。或者,在胰岛素氨基酸序列在呈融合体的形式时具有足够活性的情况下,可以使用不可切割的间隔基。不可切割的间隔基可以是任何合适的类型,包括例如具有式[(Gly)_n-Ser]_m(SEQ ID NO:34)的不可切割的间隔部分,其中n是1至4(包括1和4在内),并且m是1至4(包括1和4在内)。或者,可以使用不同于主链ELP的短ELP序列而非接头或间隔基,同时实现所需的作用。

[0114] 在另外的其它实施方案中,药物组合物是重组融合体,所述重组融合体具有在每一端上由提供持续释放组分的氨基酸序列侧接的胰岛素氨基酸序列。这些提供持续释放组分的氨基酸序列中的至少一个可以经由可切割的间隔基连接,从而使得胰岛素氨基酸序列无活性,但在体内通过蛋白水解去除单个ELP组分而活化。所得的具有单个提供持续释放的氨基酸序列的融合体具有活性,并且在体内具有延长的半衰期(或增强的本文所述的其它特性)。

[0115] 在其它实施方案中,本发明提供了胰岛素氨基酸序列与提供持续释放组分的氨基酸序列的化学缀合物。这些缀合物可以通过本领域熟知的多种方法将提供持续释放组分的氨基酸序列与胰岛素氨基酸序列化学偶联来制得(参见例如Nilsson等,2005,Ann Rev Biophys Bio Structure 34:91-118)。在一些实施方案中,化学缀合物可以通过使胰岛素氨基酸序列与提供持续释放组分的氨基酸序列直接或经由短或长接头部分、经由治疗性蛋白质组分上的一个或多个官能团(例如胺、羧基、苯基、硫醇基或羟基)共价连接以形成共价缀合物而形成。可以使用各种常规的接头,例如二异氰酸酯、二异硫氰酸酯、碳化二亚胺、双(羟基丁二酰亚胺)酯、顺丁烯二酰亚胺-羟基丁二酰亚胺酯、戊二醛等。

[0116] 非肽化学间隔基可以另外是任何合适的类型,包括例如Bioconjugate Techniques, Greg T. Hermanson, 由Academic Press, Inc. 出版,1995中所述的官能接头,以及Cross-Linking Reagents Technical Handbook(可获自Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, Illinois))中所说明的那些,所述文献的公开内容特此以引用的方式以它们各自的整体并入。说明性化学间隔基包括可以连接至Lys的胺基的同双官能接头,以及可以在一端连接至Cys而在另一端连接至Lys的异双官能接头。

[0117] 在某些实施方案中,将在室温(或人体温度,例如Tt>37℃)下不会转变的相对小

的 ELP 组分（例如小于约 30kDa、25kDa、20kDa、15kDa 或 10kDa 的 ELP 组分）化学偶联或交联。举例来说，可以将具有相同或不同特性的两个相对小的 ELP 组分化学偶联。在一些实施方案中，这种偶联可以在体内，通过在 ELP 的 C 端上或周围添加单个半胱氨酸残基来进行。这些 ELP 组分可以各自与一个或多个胰岛素氨基酸序列融合，以便提高对靶标的活性或亲合力。

[0118] 治疗疾病的方法

[0119] 在各种实施方案中，如本文所述的本发明的药物组合物用于对患有如糖尿病或高血糖症的病变或胰岛素施用所适用的任何其它病状的患者进行护理和护理以便对抗或缓解包括各种代谢病症在内的那些病状的症状和并发症。治疗包括施用本发明的制剂以防止这些症状或并发症发作、缓解这些症状或并发症，或消除所述疾病、病状或病症。本发明的方法包括治疗 1 型糖尿病，即身体不产生胰岛素并且因此不能控制血液中糖的量的病状；以及 2 型糖尿病，即身体不能正常地利用胰岛素并且因此不能控制血液中糖的量的病状。

[0120] 在各种实施方案中，持续释放提供了持续的血糖控制。血糖控制指的是患有糖尿病的人体内典型的血糖（葡萄糖）水平。糖尿病的许多长期并发症（包括微血管并发症）由多年的高血糖症所引起。良好的血糖控制是糖尿病护理的一个重要的目标。由于血糖水平在全天期间会发生波动并且葡萄糖记录是这些变化的不完善的指标，所以在对患有糖尿病的人进行的研究试验和临床护理中使用糖化血红蛋白的百分比作为长期血糖控制的替代性量度。在这项检查中，血红蛋白 A1c 或糖化血红蛋白反映了在前 2-3 个月期间的平均葡萄糖值。

[0121] 在具有正常葡萄糖代谢的未患糖尿病的人中，通过大部分常见的方法所测定的糖化血红蛋白的水平通常是约 4% -6%（正常范围可能根据方法而变化）。“理想的血糖控制”表示葡萄糖水平始终正常（例如约 70-130mg/dl，或约 3.9-7.2mmol/L）并且与未患糖尿病的人没有区别。实际上，由于治疗措施的不完善，所以即使是“良好的血糖控制”也描述了在大部分时间平均略高于正常水平的血糖水平。应指出的是，被认为是“良好的血糖控制”的情况根据患者的年龄以及对低血糖的敏感性而不同。美国糖尿病协会（American Diabetes Association）倡导患者和医师应争取使得平均葡萄糖和血红蛋白 A1c 值低于 200mg/dl (11mmol/l) 和 8%。“不良的血糖控制”指的是在严重并发症出现之前的数月 and 数年内血糖水平和糖化血红蛋白水平持续升高，可能在例如约 200-500mg/dl (约 11-28mmol/L) 和约 9% -15% 或更高的范围内。

[0122] 在各种实施方案中，本发明提供了包含本文所述的药物组合物和有效治疗诸如上述那些疾病之类的疾病的其它药剂的组合疗法和 / 或共同制剂。

[0123] 在一个实施方案中，本发明提供了与以下物质的组合或共同制剂：胰高血糖素样受体 (GLP)-1 受体激动剂，如 GLP-1 (SEQ ID NO:22)、毒蜥外泌肽 -4(exendin-4) (SEQ ID NO:23)，或其如美国专利 8,178,495 中所公开的功能类似物和 / 或衍生物，所述美国专利特此以引用的方式并入。在一些实施方案中，GLP-1 是 GLP-1(A-B)，其中 A 是 1 至 7 的整数并且 B 是 38 至 45 的整数。在一些实施方案中，GLP-1 是 GLP-1(7-36) (SEQ ID NO:24) 或其功能类似物，或者 GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:25) 或其功能类似物。

[0124] 在另一个实施方案中，本发明提供了与 GLP-2 (SEQ ID NO:26)、GIP (SEQ ID NO:27)、胰高血糖素 (SEQ ID NO:28) 以及胃酸分泌调节素 (SEQ ID NO:29) 或其功能类似物

和 / 或衍生物的组合或共同制剂。功能类似物相对于天然序列可以含有 1 至 10 处氨基酸插入、缺失和 / 或取代 (总共)。

[0125] 在各种实施方案中,组合疗法和 / 或共同制剂包含具有例如本文所述的 ELP 或基质形成组分的融合蛋白。在一些实施方案中,ELP 包含至少 60 个 VPGXG 单元 (SEQ ID NO:30) 或 90 个 VPGXG 单元 (SEQ ID NO:31) 或 120 个 VPGXG 单元 (SEQ ID NO:32) 或 180 个 VPGXG 单元 (SEQ ID NO:33),其中 X 是独立选择的氨基酸。在各种实施方案中, X 是 V、G 或 A,它们的比率是 5:3:2 ;或 K、V 或 F,它们的比率是 1:2:1 ;或 K、V 或 F,它们的比率是 1:7:1 ;或 V。

[0126] 在另一个实施方案中,本发明提供了与如本文所述的各种形式的胰岛素的组合或共同制剂。在一个实施方案中,所述胰岛素是快速起效或速效胰岛素。

实施例

[0127] 将人胰岛素原与 ELP1-120 生物聚合物进行基因融合并且在大肠杆菌 (Ecoli.) 的可溶性部分中表达。在将胰岛素原部分纯化酶促加工为成熟胰岛素之后,在正常的小鼠模型中测试融合蛋白的葡萄糖降低作用并且与单独的胰岛素相比较。胰岛素 ELP 融合体显示出类似于胰岛素的葡萄糖降低作用。另外,据显示,融合蛋白的降低作用在模型中所延续的持续时间长于胰岛素。

[0128] 胰岛素融合体建构

[0129] 人胰岛素原由通过具有 31 个氨基酸的 C 肽连接在一起的 B 链和 A 链组成 (图 1A 和 1B)。在 B 链与 A 链之间形成二硫键后,通过胰蛋白酶 / 羧肽酶 B 样系统将 C 肽去除而将胰岛素原在体内转化为成熟胰岛素。这种肽加工在体外可以使用重组胰蛋白酶和羧肽酶 B 来复制。由于使融合体在大肠杆菌的可溶性部分中表达,所以不需要重新折叠步骤。

[0130] 合成胰岛素原核苷酸序列并且将所述胰岛素原核苷酸序列亚克隆到基于 pET 的载体 pPB1031 中,所述载体 pPB1031 将它定位在 ELP1-120 序列的 N 端上,从而产生质粒 pPE0139 (图 2)。

[0131] 图 3 示出了胰岛素原 ELP1-120 融合蛋白的氨基酸序列 (SEQ ID NO:14)。胰岛素原序列 (加下划线) 与 ELP1-120 序列融合。所述氨基酸序列任选地在 N 端上包括起始甲硫氨酸残基。

[0132] 发酵

[0133] 以分批补料发酵方法使胰岛素 ELP 融合体质粒 pPE0139 在 T7 启动子的控制下在大肠杆菌的细胞内部分中表达。使用两级摇瓶种子罐 (seed train) 在含有作为主要碳源的甘油和作为主要氮源的酵母提取物的半合成无动物成分培养基 (ECPM+ 脯氨酸) 中对甘油细胞储液进行扩增。在种子罐中达到足够的细胞密度之后,将培养物转移至与种子罐容纳相同的培养基的发酵罐中。经由 PID 控制将过程参数 (pH 值、温度、溶解氧) 维持在设定点。对培养物进行培养直到它达到静止期为止,此时开始甘油 / 酵母提取物 / 硫酸镁进料。在限制碳的情况下维持培养物并且使用 IPTG 对启动子进行诱导。在发酵结束时,将培养物离心以从用过的培养基中分离含有胰岛素 ELP 融合体的生物质。将细胞糊状物储存在 -70℃ 下直到后续纯化为止。

[0134] 纯化

[0135] 将冷冻的细胞糊状物重悬于含有 2M 脲（用于使胰岛素 ELP 解离）的溶解缓冲液中并且混合直到均质为止。使用微射流均质机 (microfluidizer) 实现溶解以破坏细胞膜。使用两级切向流过滤 (TFF) 系统将产物澄清并且浓缩。使胰岛素 ELP 融合体穿过 HIC 柱作为捕获步骤，并且将宿主细胞污染物洗去。使用对任何产物相关杂质（降解的物质）进行分级分离的梯度来对产物进行洗脱。对所选的级分进行 TFF 缓冲液交换以去除残留的盐，之后使用两个阴离子交换柱以去除残留的 DNA、内毒素以及宿主细胞蛋白质。使用最终的 TFF 浓缩和缓冲液交换来配制产物。使用 0.2 μ M 过滤进行灭菌。将产物储存在 4°C 下直到进行酶消化为止。

[0136] 胰岛素原 ELP 融合体 (PE0083) 的酶促加工

[0137] 在配制缓冲液中将经过纯化的胰岛素原 ELP1-120 稀释至 1mg/mL。如下制备用于将胰岛素原 ELP 加工为成熟的胰岛素 ELP 的 2X 酶溶液：50mM 碳酸氢钠、2 μ g/mL 胰蛋白酶以及 20 μ g/mL 羧肽酶 B。将 2X 酶溶液添加至等体积的 1mg/mL PE0083 中并且在 37°C 下孵育 1-2 小时。利用 ELP 的相转变特性停止酶促反应。将氯化钠添加至反应物中以诱导融合体发生相转变。成熟的胰岛素 ELP 形成凝聚层并且经由离心使其沉淀。将残留的酶洗去并且将沉淀的融合体重新溶解于低盐缓冲液中。进行两次相转变纯化。

[0138] 非还原性 SDS-PAGE (图 4) 示出了在酶促加工后因 C 肽被切除所引起的融合蛋白分子量出现预期降低。

[0139] 进行抗胰岛素 B 链蛋白质印迹 (图 5) 以确定与 ELP 融合的 A 链和 B 链两者的存在。数据显示 B 链在非还原性条件下存在，指示 A 链与 B 链之间形成二硫键。将融合蛋白和二硫键还原会使得 B 链从融合体中被去除。

[0140] 电喷雾电离质谱分析确定胰岛素原 ELP 融合体的质量 (图 6) 以及在酶促去除 C 肽后成熟胰岛素 ELP 融合体的质量 (图 7)。另外的盐加合物存在于两种样品中。使用埃尔曼试剂测定法 (Ellman's reagent assay) 确定二硫键的存在。不存在游离硫醇指示形成二硫键。

[0141] 体内葡萄糖降低作用

[0142] 将正常的小鼠禁食过夜并且使用盐水（阴性对照）、13nmol/kg 甘精胰岛素（阳性对照）或 35nmol/kg 胰岛素 ELP 融合体（因素美）进行皮下注射。在给药之前获得血糖读数并且在给药后 8 小时期间每过 1 小时之后以及在给药后 24 小时获得血糖读数。在给药后 1 小时使得食物可被获得。图 8 示出了血糖数据（平均值 $\pm$ SE）。相比于盐水对照组，胰岛素 ELP 融合体显示出显著的血糖降低作用。另外，胰岛素 ELP 融合体所显示的血糖降低作用的延续时间（7 小时）长于甘精胰岛素对照（2 小时）。

[0143] 在 1 型糖尿病模型中的体内作用

[0144] 使用 ELP-胰岛素融合体因素美 (PE0139) 对 1 型糖尿病 (T1DM) 小鼠模型进行给药。确切地说，单次给药的数据示于图 9 中。结果表明与给予等摩尔浓度的来得时（甘精胰岛素，SANOFI-AVENTIS）相比，因素美的葡萄糖降低作用的持续时间更长。当按每天一次方案给予所述化合物时（图 10），结果表明因素美与来得时（甘精胰岛素，SANOFI-AVENTIS）相比在活性和半衰期方面具有优越性。

[0145] 图 11A 和 11B 示出了与来得时（甘精胰岛素，SANOFI-AVENTIS）相比，因素美 (PE0139) 在 1 型糖尿病 (T1DM) 小鼠模型中的低剂量滴定。图 11A 示出了单次皮下给药，而

图 11B 示出了持续 14 天的每天一次皮下给药。在两种情况下,均显示出因素美具有更加显著和持续的血糖降低作用。

[0146] 还进行研究以确定因素美的血糖控制程度,所述血糖控制程度是患者典型的血糖水平的量度。图 12A 和 11B 示出了相对于来得时(甘精胰岛素, SANOFI-AVENTIS),因素美(PE0139)具有显著增强的血糖控制。观测到血糖曲线下面积(AUC)减少了 27% -39%。图 12A 示出了化合物施用的第 1 天以及 0-24 小时的血糖 AUC。图 12B 示出了化合物施用的第 14 天以及 0-24 小时的血糖 AUC。在两种给药方案中,因素美比来得时更有效地使血糖 AUC 减少。

[0147] 还进行研究来评价因素美治疗的药物代谢动力学(PK)。在患有糖尿病的猪中,遵循单次皮下注射(图 13A)或每天一次皮下注射,持续 2 周(图 13B)的方案。结果显示因素美在皮下注射后实现了长的半衰期和小的峰谷比。

[0148] 等同方案

[0149] 本领域技术人员仅仅使用常规的实验就将认识到或能够探悉本文明确描述的具体实施方案的许多等同方案。这些等同方案意图涵盖于以下权利要求书的范围内。

[0001]

序列表

<110> PhaseBio Pharmaceuticals, Inc.
Jowett, James
Woods, Christopher

<120> 包含胰岛素氨基酸序列的治疗剂

<130> PHAS-025/01W0 309646-2127

<150> US 61/563,985

<151> 2011-11-28

<160> 34

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ELP 组分序列

<400> 1

Val Pro Gly Gly

1

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ELP 组分序列

<400> 2

Ile Pro Gly Gly

1

[0002]

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ELP 组分序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa 可以是任何天然存在的或非天然的氨基酸

<400> 3

Val Pro Gly Xaa Gly
1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ELP 组分序列

<400> 4

Ala Val Gly Val Pro
1 5

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ELP 组分序列

[0003]

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa 可以是任何天然存在的或非天然的氨基酸

<400> 5

Ile Pro Gly Xaa Gly

1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ELP 组分序列

<400> 6

Ile Pro Gly Val Gly

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ELP 组分序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa 可以是任何天然存在的或非天然的氨基酸

<400> 7

Leu Pro Gly Xaa Gly

1 5

[0004]

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ELP 组分序列

<400> 8

Leu Pro Gly Val Gly

1 5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ELP 组分序列

<400> 9

Val Ala Pro Gly Val Gly

1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ELP 组分序列

<400> 10

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly

1 5

<210> 11

[0005]

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ELP 组分序列

<400> 11

Val Pro Gly Phe Gly Val Gly Ala Gly
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ELP 组分序列

<400> 12

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
1 5

<210> 13
<211> 86
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

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 Arg Arg
20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
35 40 45

[0006]

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
50 55 60

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85

<210> 14

<211> 691

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ELP-1-120 融合蛋白

<400> 14

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 Arg Arg
20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
50 55 60

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
65 70 75 80

[0007]

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
85 90 95

Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val
100 105 110

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro
115 120 125

Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
130 135 140

Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val
145 150 155 160

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly
165 170 175

Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val
180 185 190

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro
195 200 205

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
210 215 220

Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val
225 230 235 240

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly
245 250 255

[0008]

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
260 265 270

Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro
275 280 285

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly
290 295 300

Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
305 310 315 320

Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly
325 330 335

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val
340 345 350

Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
355 360 365

Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly
370 375 380

Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
385 390 395 400

Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
405 410 415

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val
420 425 430

[0009]

Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
435 440 445

Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
450 455 460

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala
465 470 475 480

Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
485 490 495

Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val
500 505 510

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro
515 520 525

Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
530 535 540

Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val
545 550 555 560

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly
565 570 575

Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val
580 585 590

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro
595 600 605

[0010]

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
610 615 620

Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val
625 630 635 640

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly
645 650 655

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
660 665 670

Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro
675 680 685

Gly Trp Pro
690

<210> 15
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Ala Ser Val Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 16
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

[0011]

<400> 16

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 Ala
20 25 30

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头肽

<400> 17

Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg
1 5 10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头肽

<400> 18

Gly Ala Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr
1 5 10

<210> 19

<211> 261

<212> DNA

<213> 智人

<400> 19

[0012]

atgtttgtga accaacacct gtgcggctca cacctggtgg aagctctcta cctagtgtgc 60
ggggaacgag gcttcttcta cacaccaag acctgcggg aggcagagga cctgcaggtg 120
gggcaggtgg agctgggcgg gggccctggt gcaggcagcc tgcagccctt ggcctggag 180
gggtccctgc agaagcgtgg cattgtggaa caatgtgta ccagcatctg ctccctctac 240
cagctggaga actactgcaa c 261

<210> 20

<211> 87

<212> PRT

<213> 智人

<400> 20

Met Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
1 5 10 15

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

Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln
50 55 60

Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Gln Leu Gln Asn Tyr Cys Asn
85

<210> 21

<211> 4

[0013]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头肽

<400> 21

Gly Phe Leu Gly
1

<210> 22
<211> 37
<212> PRT
<213> 智人

<400> 22

His Asp Glu Phe Glu Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val
1 5 10 15

Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu
20 25 30

Val Lys Gly Arg Gly
35

<210> 23
<211> 87
<212> PRT
<213> 毒蜥

<400> 23

Met Lys Ile Ile Leu Trp Leu Cys Val Phe Gly Leu Phe Leu Ala Thr
1 5 10 15

Leu Phe Pro Ile Ser Trp Gln Met Pro Val Glu Ser Gly Leu Ser Ser
20 25 30

[0014]

Glu Asp Ser Ala Ser Ser Glu Ser Phe Ala Ser Lys Ile Lys Arg His
35 40 45

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu
50 55 60

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser
65 70 75 80

Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly
85

<210> 24
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 25
<211> 31
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

[0015]

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 26
<211> 33
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

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

Asp

<210> 27
<211> 153
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27

Met Val Ala Thr Lys Thr Phe Ala Leu Leu Leu Leu Ser Leu Phe Leu
1 5 10 15

Ala Val Gly Leu Gly Glu Lys Lys Glu Gly His Phe Ser Ala Leu Pro
20 25 30

Ser Leu Pro Val Gly Ser His Ala Lys Val Ser Ser Pro Gln Pro Arg
35 40 45

Gly Pro Arg Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala
50 55 60

[0016]

Met Asp Lys Ile His Gln Gln Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln
65 70 75 80

Lys Gly Lys Lys Asn Asp Trp Lys His Asn Ile Thr Gln Arg Glu Ala
85 90 95

Arg Ala Leu Glu Leu Ala Ser Gln Ala Asn Arg Lys Glu Glu Glu Ala
100 105 110

Val Glu Pro Gln Ser Ser Pro Ala Lys Asn Pro Ser Asp Glu Asp Leu
115 120 125

Leu Arg Asp Leu Leu Ile Gln Glu Leu Leu Ala Cys Leu Leu Asp Gln
130 135 140

Thr Asn Leu Cys Arg Leu Arg Ser Arg
145 150

<210> 28
<211> 180
<212> PRT
<213> 智人

<400> 28

Met Lys Ser Ile Tyr Phe Val Ala Gly Leu Phe Val Met Leu Val Gln
1 5 10 15

Gly Ser Trp Gln Arg Ser Leu Gln Asp Thr Glu Glu Lys Ser Arg Ser
20 25 30

Phe Ser Ala Ser Gln Ala Asp Pro Leu Ser Asp Pro Asp Gln Met Asn
35 40 45

[0017]

Glu Asp Lys Arg His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys
50 55 60

Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn
65 70 75 80

Thr Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala Lys Arg His Asp Glu Phe Glu
85 90 95

Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu
100 105 110

Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
115 120 125

Arg Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly Arg
130 135 140

Arg His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp
145 150 155 160

Asn Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile
165 170 175

Thr Asp Arg Lys
180

<210> 29

<211> 37

<212> PRT

<213> 智人

<400> 29

[0018]

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> 30

<211> 300

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ELP 生物聚合物序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(300)

<223> Xaa 可以是任何天然的或非天然的氨基酸残基

<400> 30

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
1 5 10 15

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
20 25 30

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
35 40 45

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
50 55 60

[0019]

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
65 70 75 80

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
85 90 95

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
100 105 110

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
115 120 125

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
130 135 140

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
145 150 155 160

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
165 170 175

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
180 185 190

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
195 200 205

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
210 215 220

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
225 230 235 240

[0020]

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
245 250 255

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
260 265 270

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
275 280 285

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
290 295 300

<210> 31
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ELP 生物聚合物序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(450)
<223> Xaa 可以是任何天然的或非天然的氨基酸残基

<400> 31

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
1 5 10 15

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
20 25 30

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
35 40 45

[0021]

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
50 55 60

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
65 70 75 80

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
85 90 95

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
100 105 110

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
115 120 125

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
130 135 140

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
145 150 155 160

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
165 170 175

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
180 185 190

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
195 200 205

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
210 215 220

[0022]

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
225 230 235 240

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
245 250 255

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
260 265 270

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
275 280 285

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
290 295 300

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
305 310 315 320

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
325 330 335

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
340 345 350

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
355 360 365

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
370 375 380

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
385 390 395 400

[0023]

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
405 410 415

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
420 425 430

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
435 440 445

Xaa Gly
450

<210> 32
<211> 600
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ELP 生物聚合物序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(600)
<223> Xaa 可以是任何天然的或非天然的氨基酸残基

<400> 32

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
1 5 10 15

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
20 25 30

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
35 40 45

[0024]

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
50 55 60

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
65 70 75 80

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
85 90 95

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
100 105 110

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
115 120 125

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
130 135 140

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
145 150 155 160

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
165 170 175

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
180 185 190

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
195 200 205

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
210 215 220

[0025]

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
225 230 235 240

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
245 250 255

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
260 265 270

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
275 280 285

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
290 295 300

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
305 310 315 320

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
325 330 335

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
340 345 350

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
355 360 365

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
370 375 380

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
385 390 395 400

[0026]

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
405 410 415

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
420 425 430

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
435 440 445

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
450 455 460

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
465 470 475 480

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
485 490 495

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
500 505 510

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
515 520 525

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
530 535 540

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
545 550 555 560

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
565 570 575

[0027]

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
580 585 590

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
595 600

<210> 33
<211> 900
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ELP 生物聚合物序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(900)
<223> Xaa 可以是任何天然的或非天然的氨基酸残基

<400> 33

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
1 5 10 15

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
20 25 30

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
35 40 45

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
50 55 60

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
65 70 75 80

[0028]

Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val
85					90					95					
Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro
100					105					110					
Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly
115					120					125					
Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa
130					135					140					
Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly
145					150					155					160
Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val
165					170					175					
Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro
180					185					190					
Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly
195					200					205					
Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa
210					215					220					
Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly
225					230					235					240
Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val	Pro	Gly	Xaa	Gly	Val
245					250					255					

[0029]

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
260 265 270

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
275 280 285

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
290 295 300

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
305 310 315 320

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
325 330 335

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
340 345 350

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
355 360 365

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
370 375 380

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
385 390 395 400

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
405 410 415

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
420 425 430

[0030]

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
435 440 445

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
450 455 460

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
465 470 475 480

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
485 490 495

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
500 505 510

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
515 520 525

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
530 535 540

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
545 550 555 560

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
565 570 575

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
580 585 590

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
595 600 605

[0031]

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
610 615 620

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
625 630 635 640

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
645 650 655

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
660 665 670

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
675 680 685

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
690 695 700

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
705 710 715 720

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
725 730 735

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
740 745 750

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
755 760 765

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
770 775 780

[0032]

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
785 790 795 800

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
805 810 815

Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro
820 825 830

Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly
835 840 845

Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa
850 855 860

Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly
865 870 875 880

Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val Pro Gly Xaa Gly Val
885 890 895

Pro Gly Xaa Gly
900

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 不可切割的间隔肽

<220>

<221> 重复

<222> (1)..(20)

[0033]

<223> Gy Gly Gly Gly Ser 子序列中的 Gly 残基可以重复 1 至 4 次

<220>

<221> 重复

<222> (1)..(20)

<223> Gy Gly Gly Gly Ser 子序列可以重复 1 至 4 次

<400> 34

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

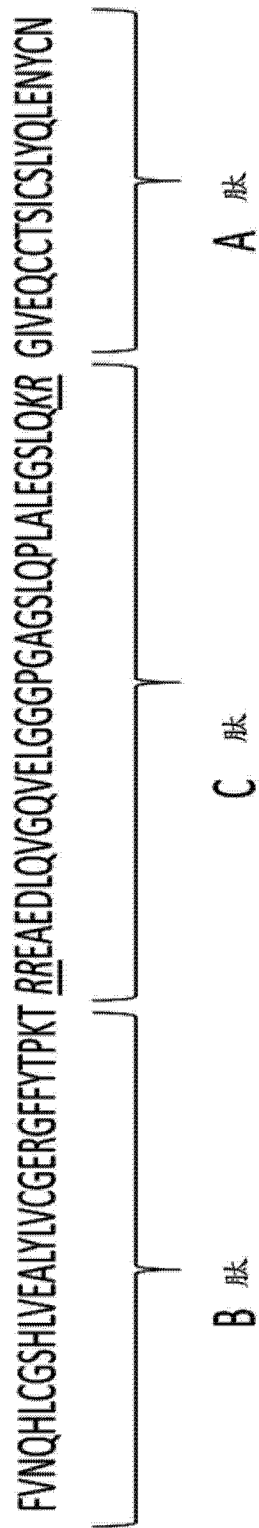


图 1A

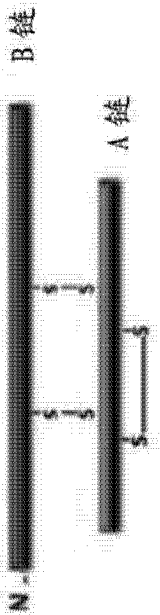
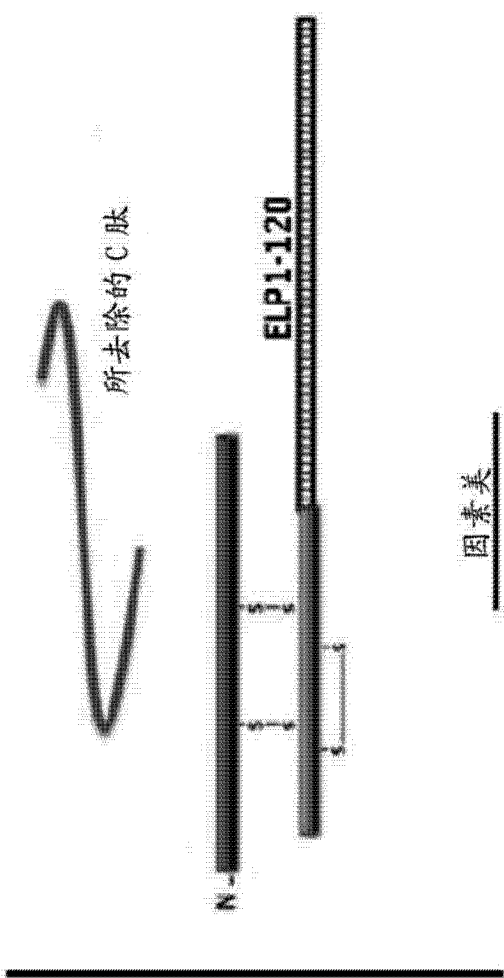


图 1B

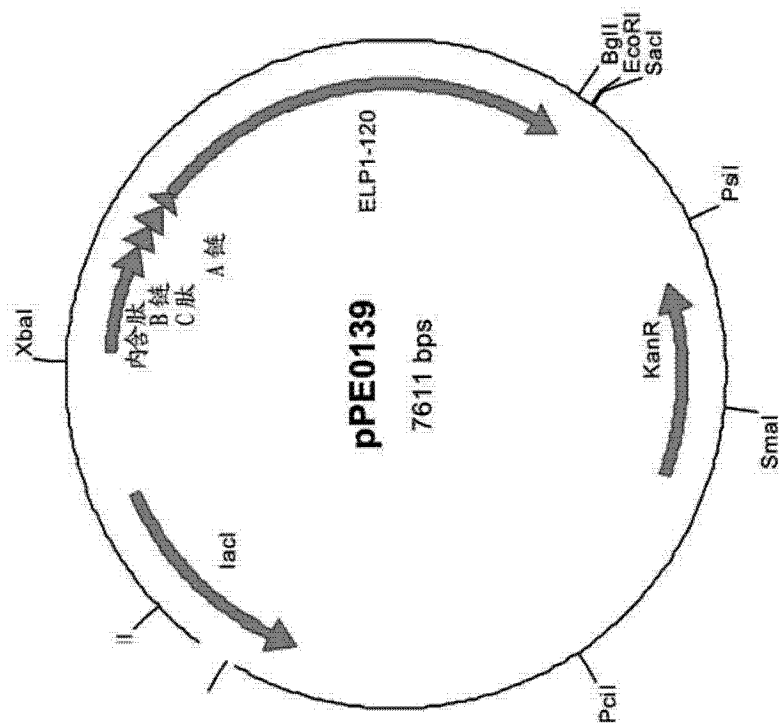


图 2

FVNOHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSI^{CSLYQ}LENY
CNVPGVGVPGGGVPAGAGVPGVPGVPGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVP
VGVPGVPGGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGVPGVPGGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVP
VGVPGGGVPAGAGVPGVPGVPGVPGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVP
GGVPGAGVPGGGVPGVPGVPGGGGVPAGAGVPGVPGVPGGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVP
AGVPGVGVPGVPGVPGGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGVPGVPGGGGVPAGAGVPGVPGVPGGGGVPAGAGVPAGAGVP
GGVPGVGVPGVPGGGGVPAGAGVPGVPGVPGGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVP
VGVPGVPGGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGVPGVPGGGGVPAGAGVPGVPGVPGGGGVPAGAGVPGVPGVPGGGGVPAGAGVP
VGVPGGGVPAGAGVPGVPGVPGGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVPGGGVPAGAGVP

图 3

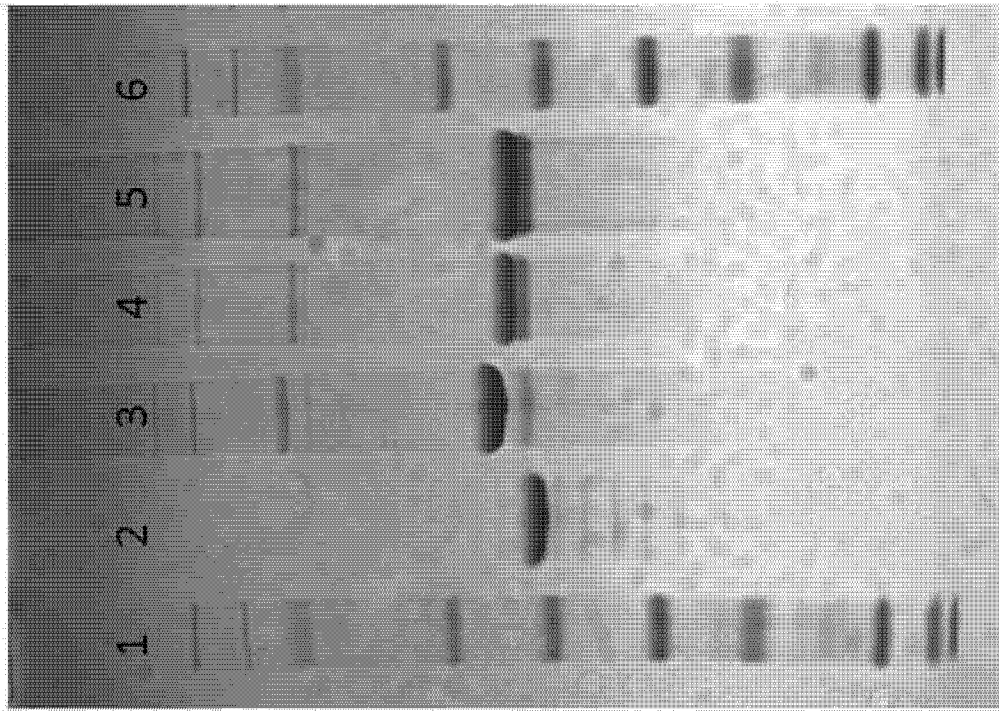


图 4

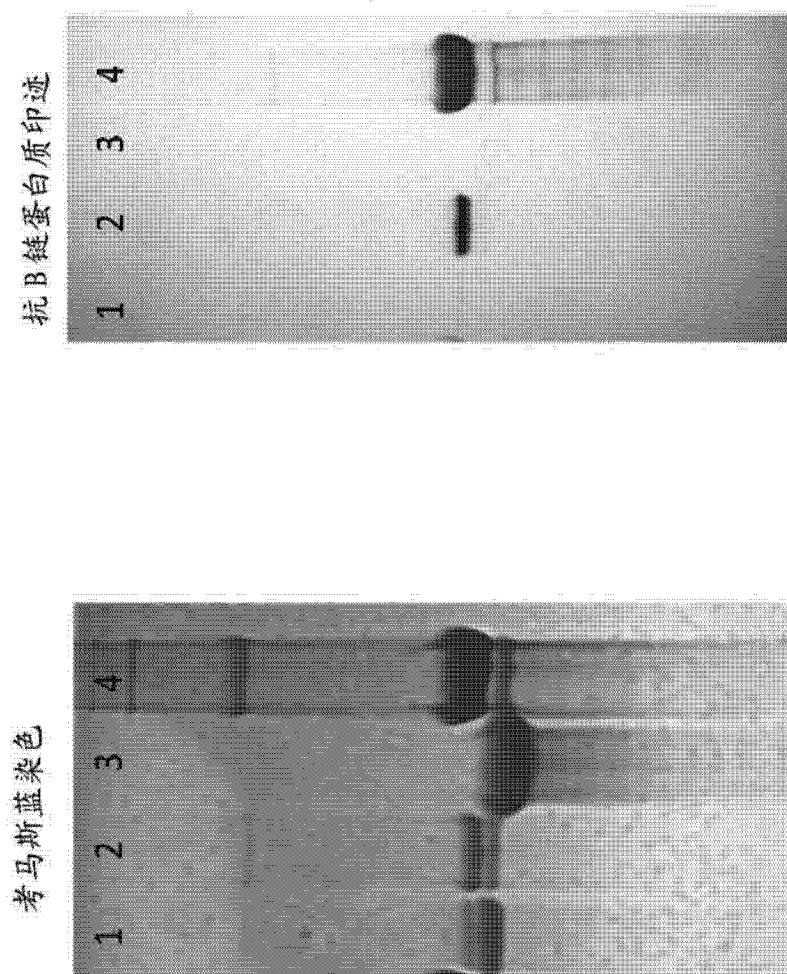


图 5

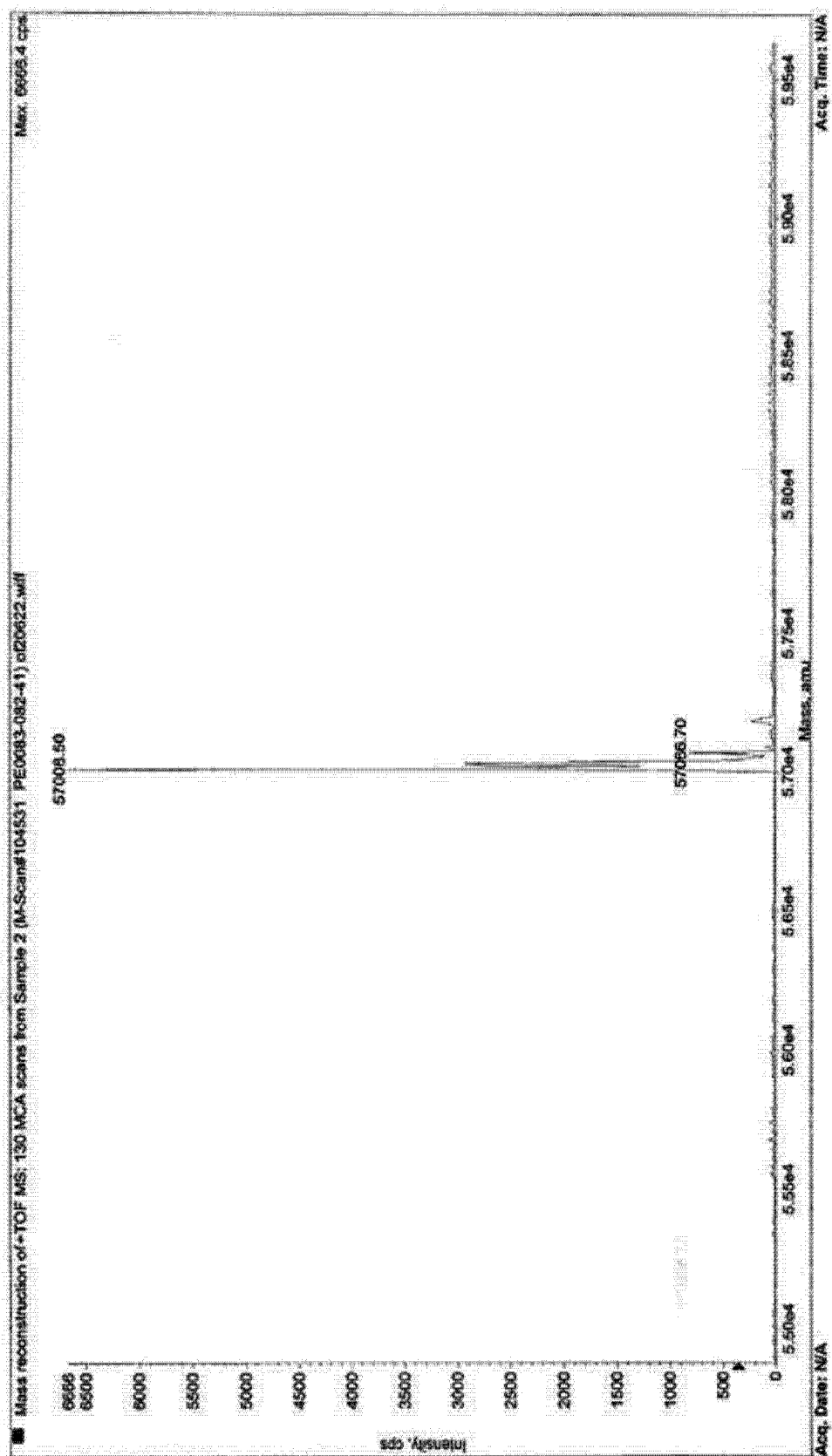


图 6

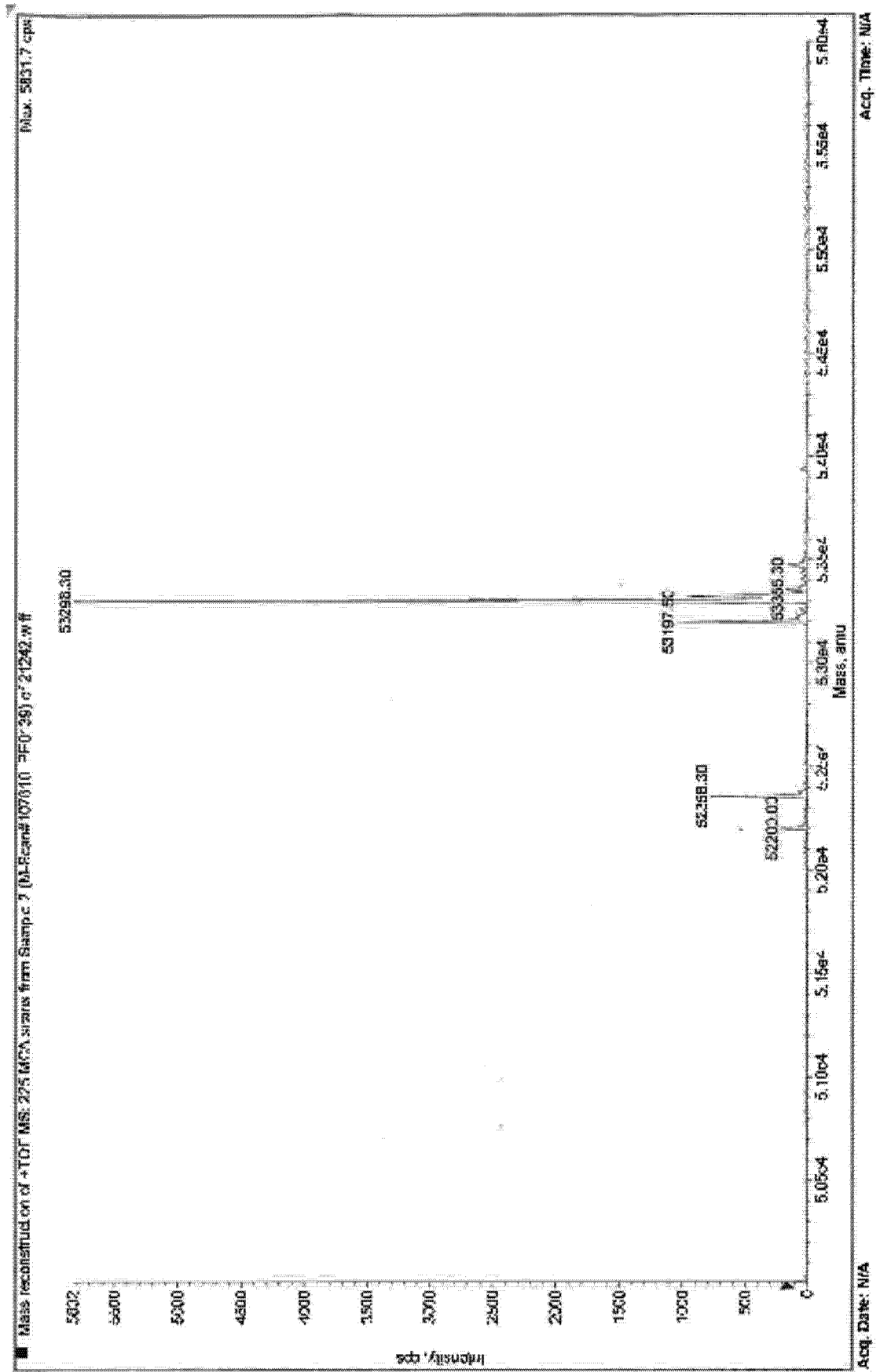


图 7

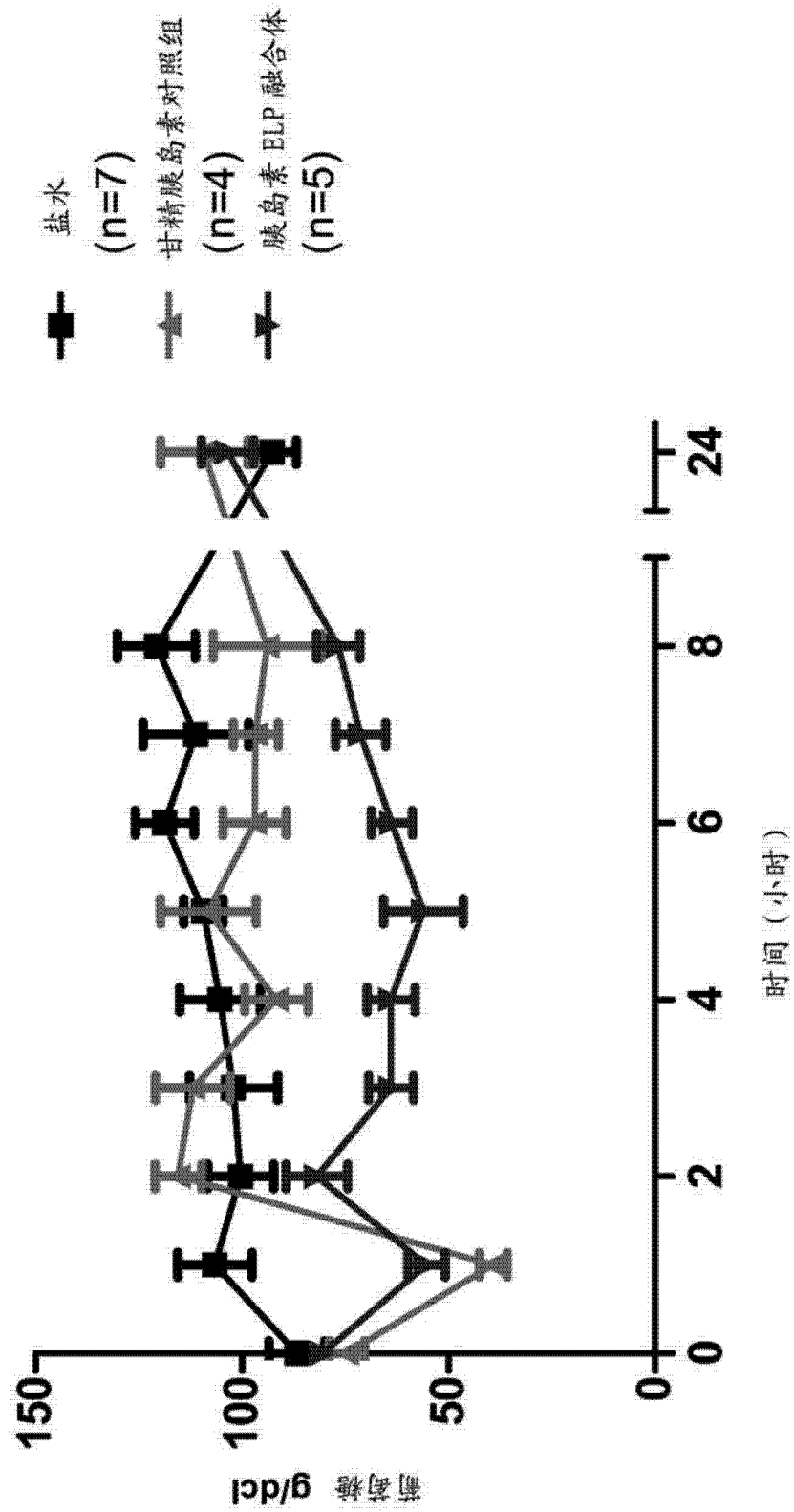


图 8

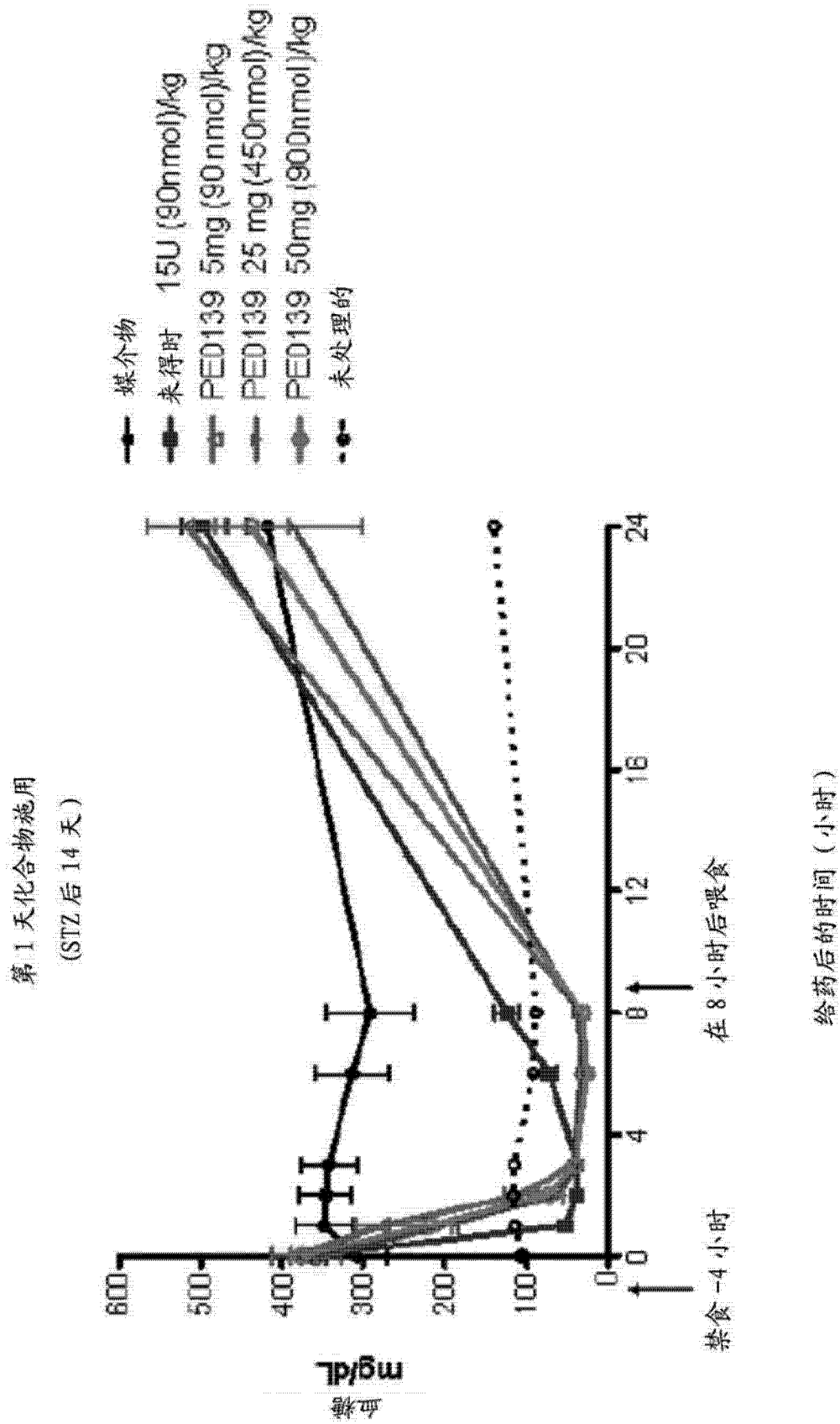


图 9

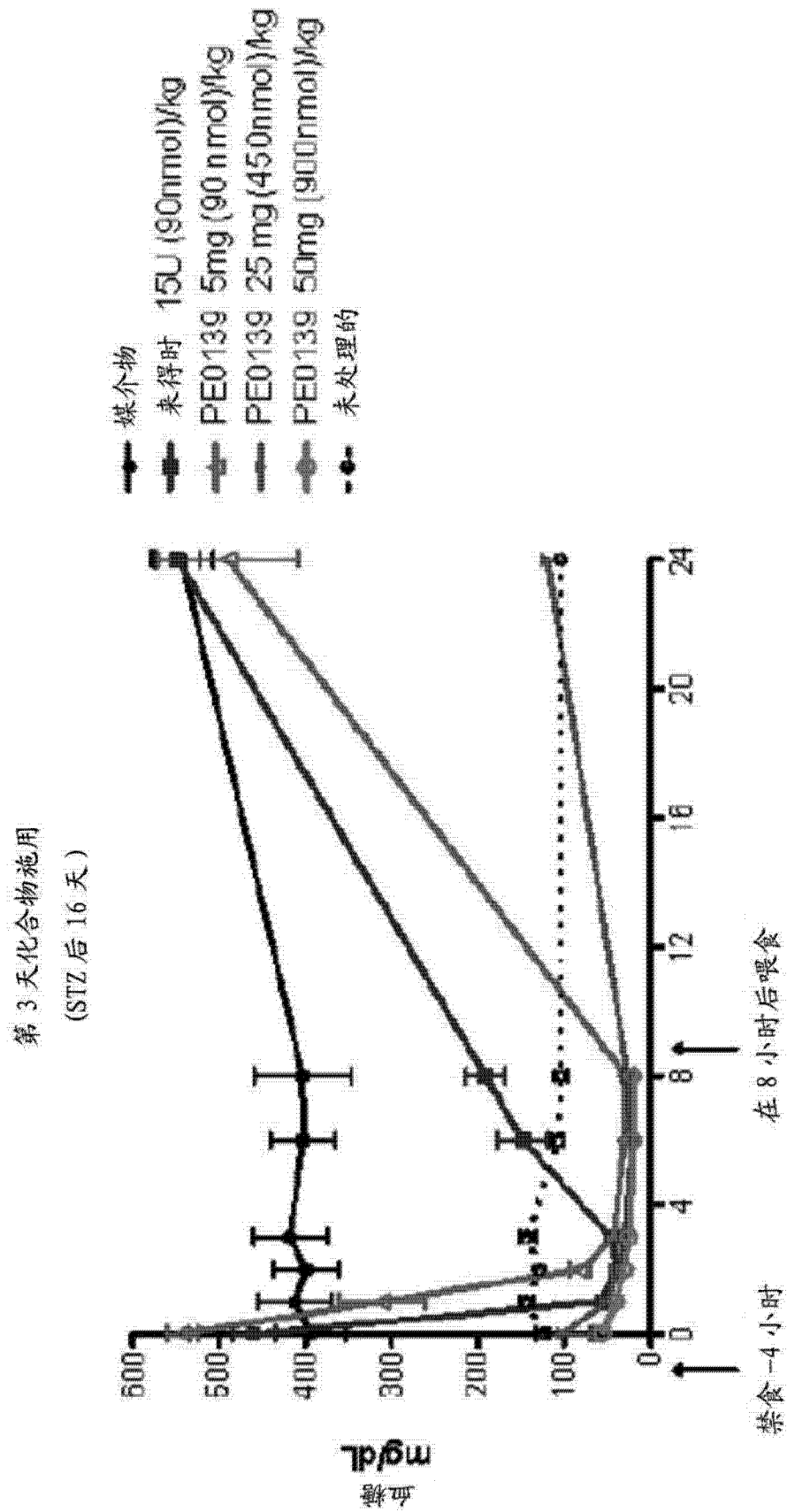


图 10

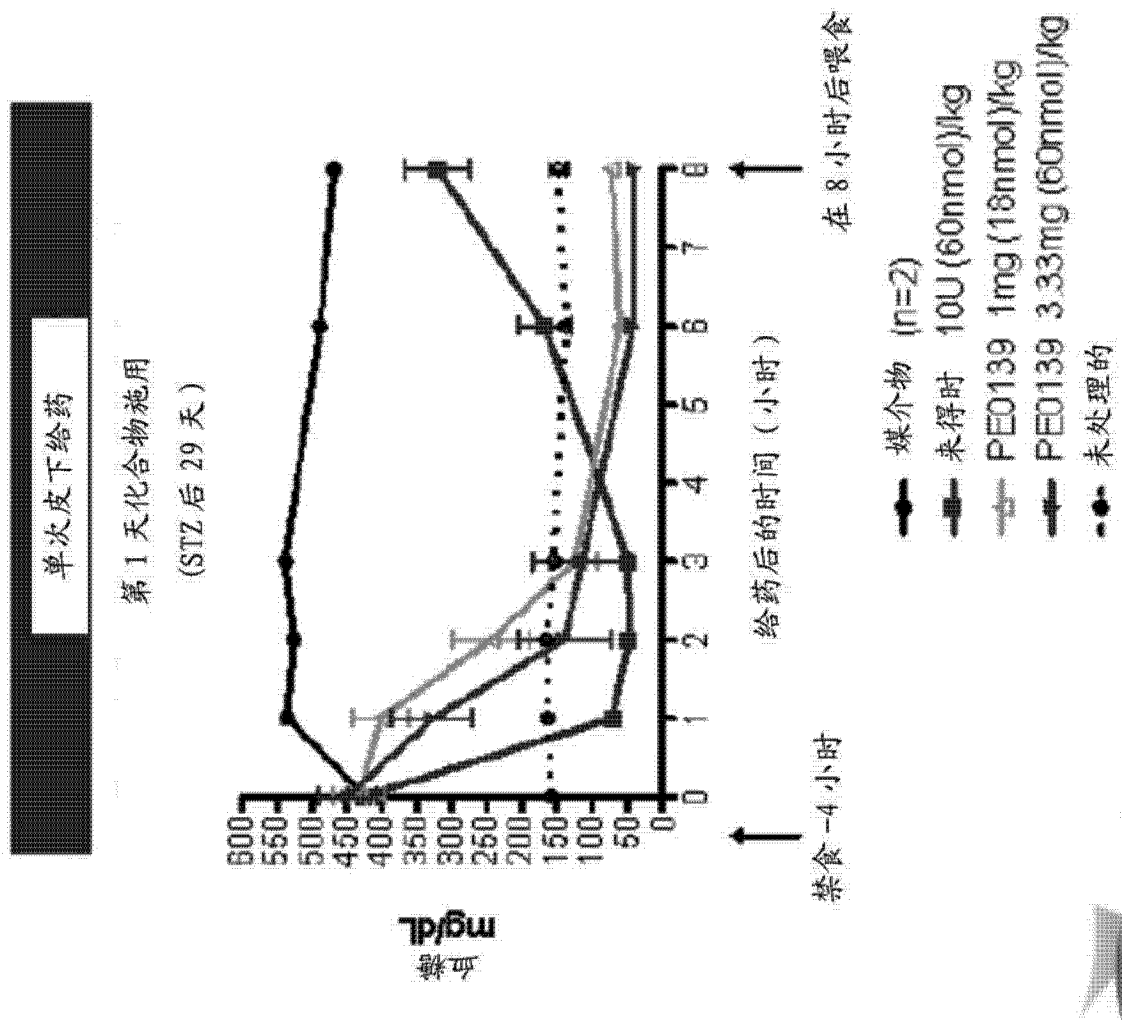


图 11A

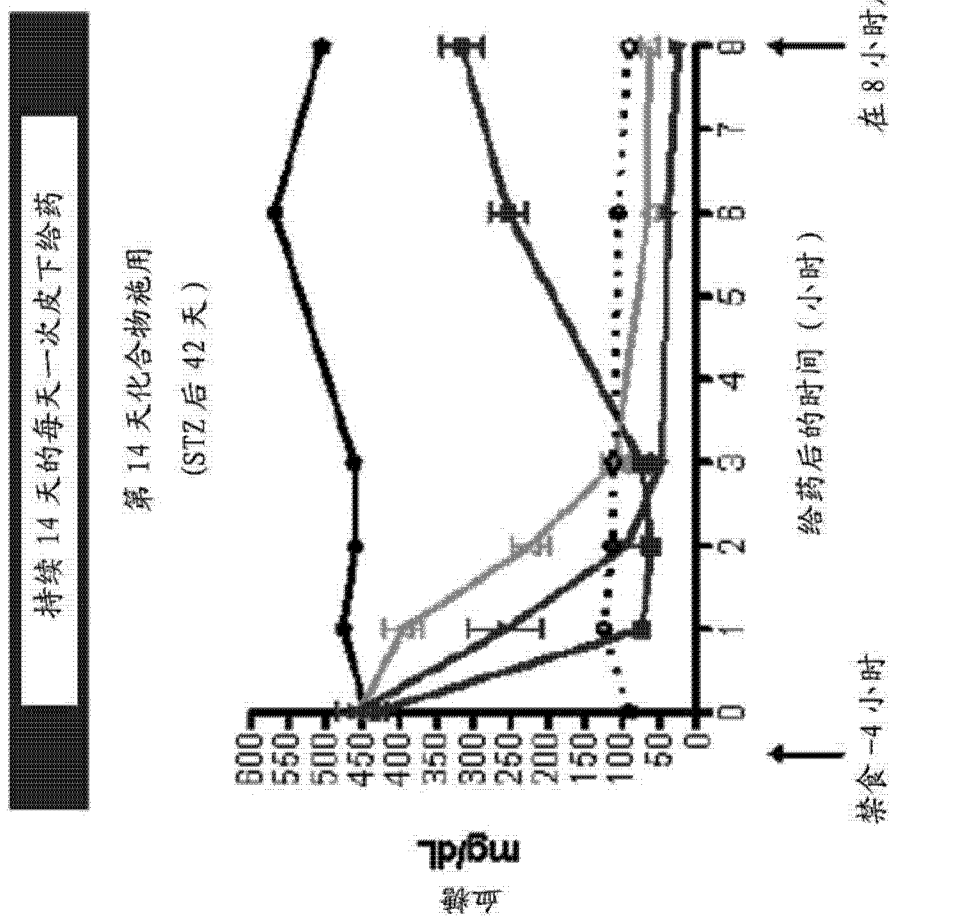


图 11B

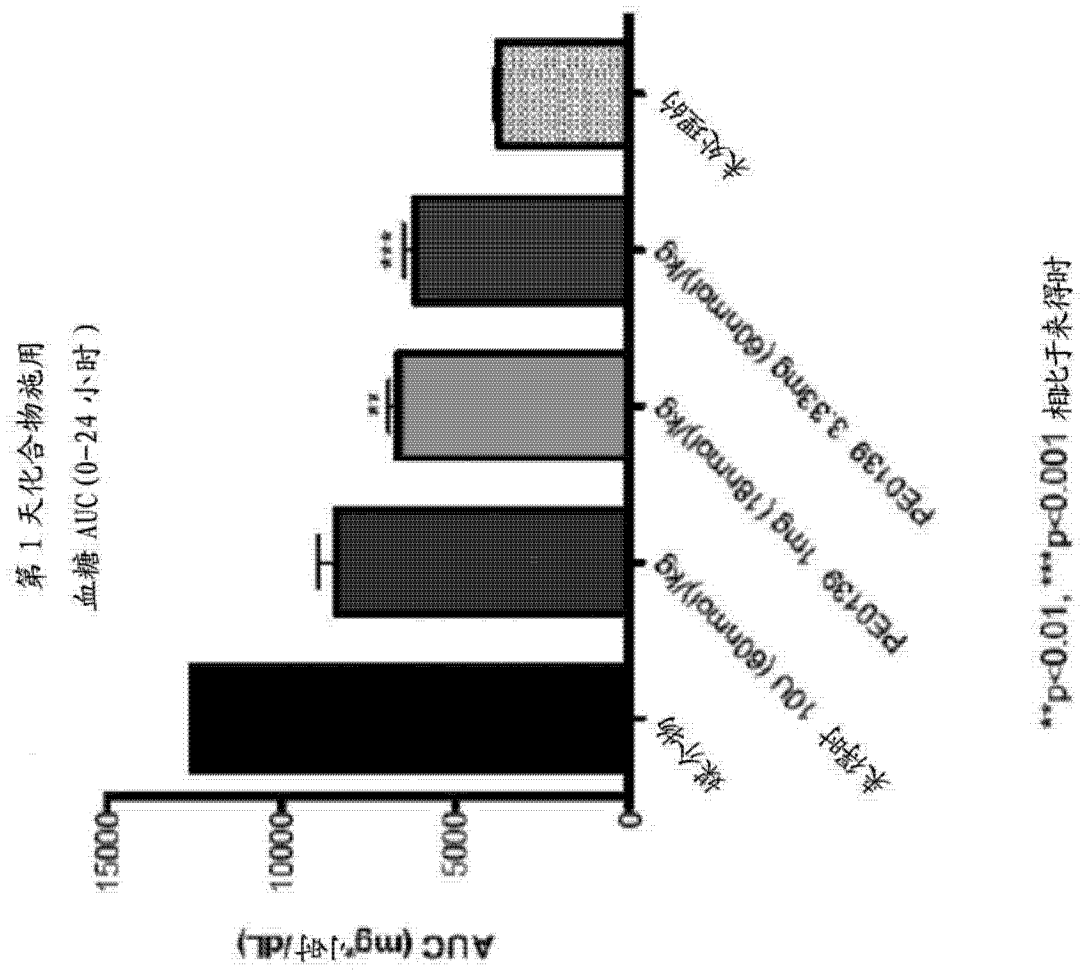


图 12A

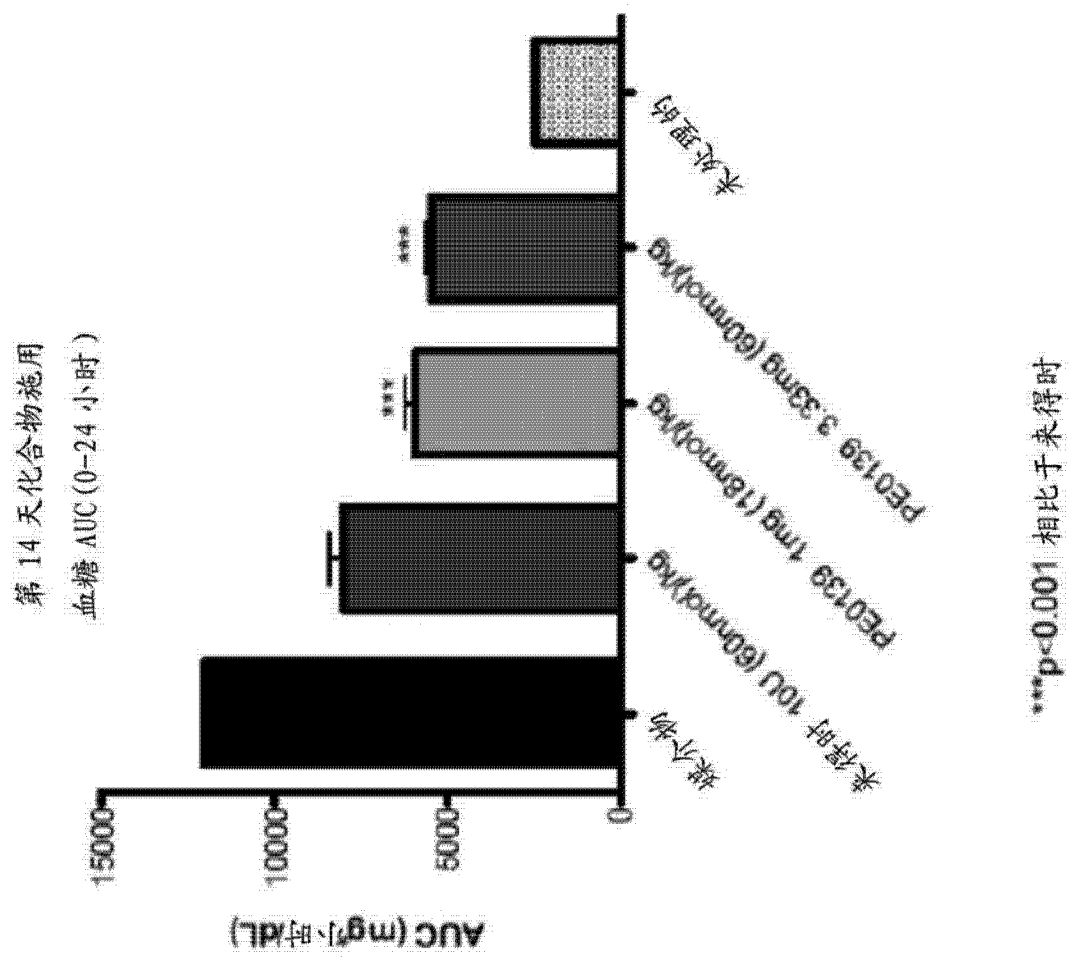


图 12B

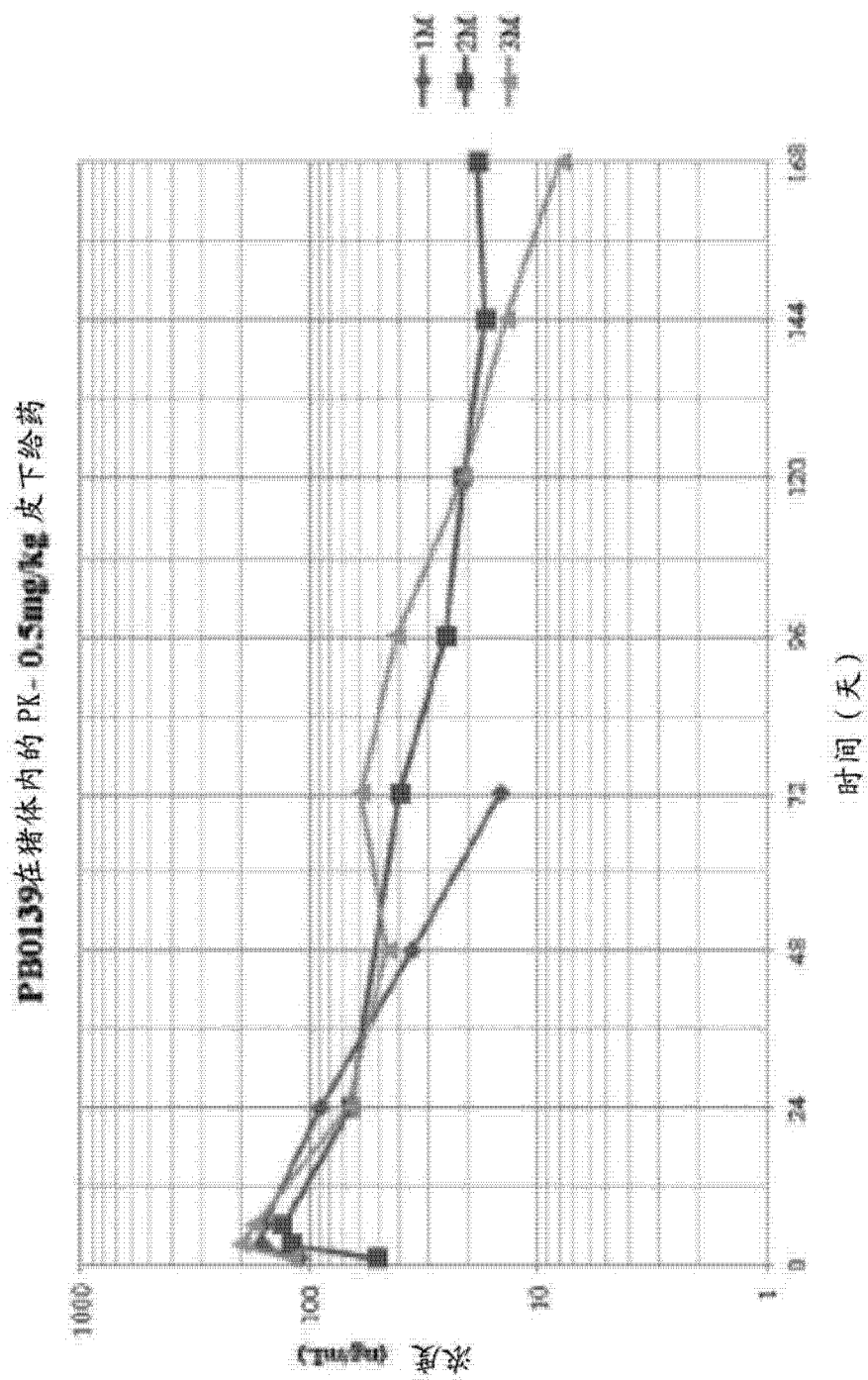


图 13A

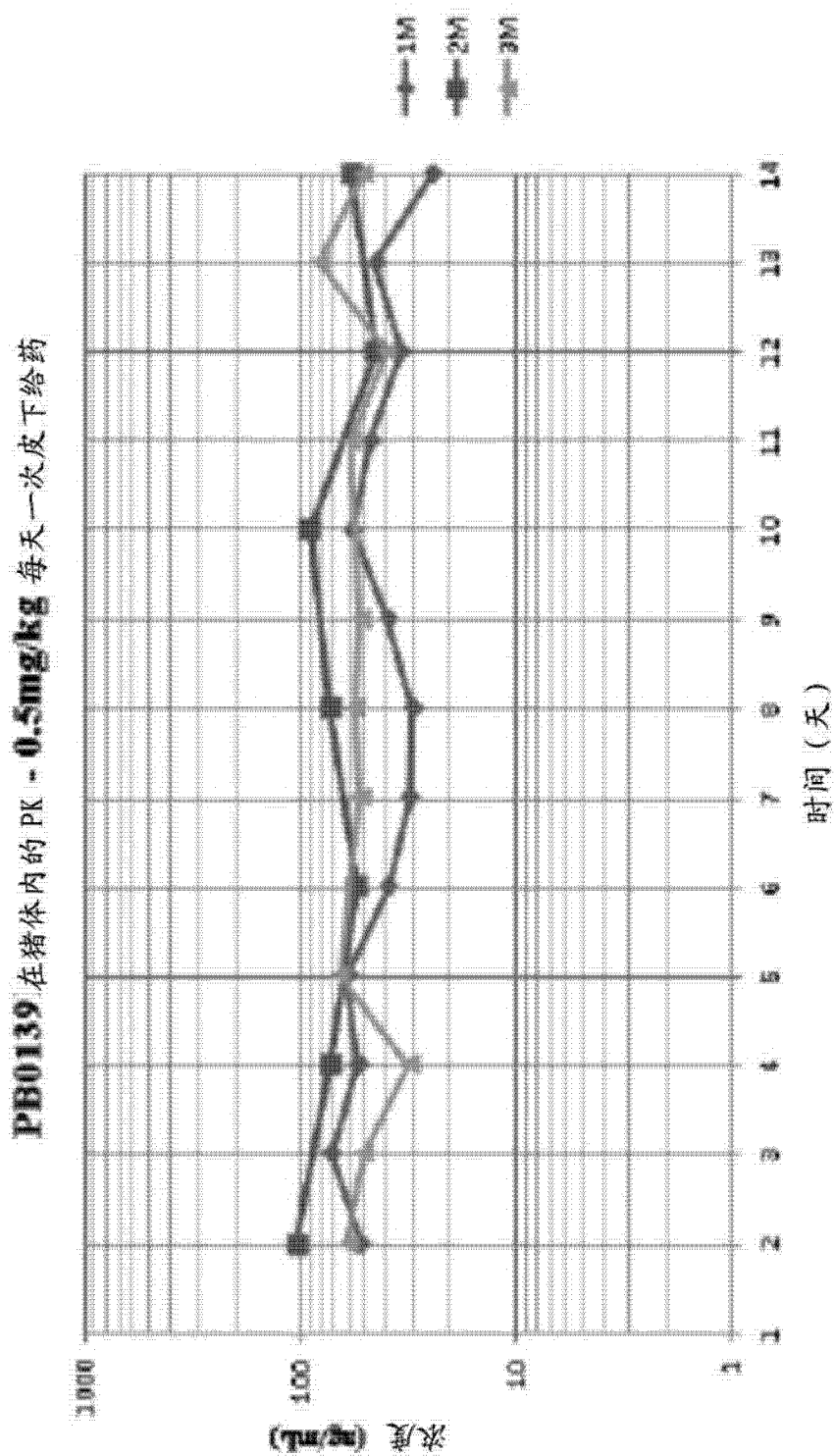


图 13B