(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101952314 B
(45)授权公告日 2016.04.20

(21)申请号 200880127378.0
(22)申请日 2008.12.17
(30)优先权数据
12/002972 2007.12.19 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2010.08.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2008/067774 2008.12.17
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2009/077569 EN 2009.06.25
(73)专利权人 通用电气公司
地址 美国纽约州
(72)发明人 C·伦德尔 E·贡内里乌松
M·林德博里 B·D-L·李
J·W·卡斯特尔 F·A·休德
M·E·马里诺
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 张萍 郭文洁
(51)Int.Cl.
C07K 16/24(2006.01)
C07K 16/00(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/32(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
G01N 33/00(2006.01)
(56)对比文件
US 20020052488 A1,2002.05.02,
EP 0329185 A2,1989.02.17,
US 20020052488 A1,2002.05.02,
Burczynski F. J. et al..Hepatocyte [3H]-palmitate uptake: effect of albumin surface charge modification.《Can. J. Physiol. Pharmacol.》.2001,第79卷第869-871页.
Burczynski F. J. et al..Hepatocyte [3H]-palmitate uptake: effect of albumin surface charge modification.《Can. J. Physiol. Pharmacol.》.2001,第79卷第869-871页.
审查员 钟辉

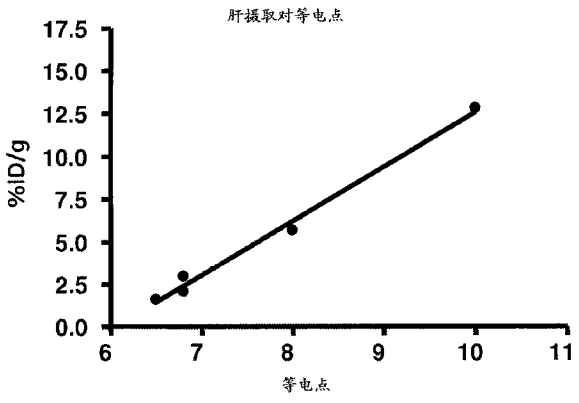
权利要求书1页 说明书13页
序列表4页 附图6页

(54)发明名称

快速清除多肽的生物动力学

(57)摘要

本发明提供了减少特异性结合目标的多肽体内肝摄取的方法,其包含:(a)提供一种特异性结合目标的多肽;以及(b)用酸性氨基酸残基替换步骤(a)中天然多肽的至少一个碱性或至少一个中性氨基酸残基以产生一种修饰多肽,其中所述修饰多肽的等电点低于天然多肽的等电点至少0.05-0.1pH点。还提供了使用所述创新方法生产的多肽,以及使用所述方法和制剂的成像技术。



CN 101952314 B

1. 一种制备特异性结合血小板衍生生长因子受体 -β (PDGF-Rβ) 并且具有减少的体内肝摄取的多肽的方法，其包含：

(a) 提供一种特异性结合 PDGF-Rβ 的 SEQ ID NO. 5 的多肽；以及

(b) 用酸性氨基酸残基替换步骤(a)中天然多肽的 R20、L21、K22、A25、A29、K36、S44 和 R47 残基以产生 SEQ ID NO. 2 的修饰多肽，

其中所述修饰多肽的等电点低于步骤(a)中所述天然多肽的等电点至少 0.05-0.1 pH 点；

其中所述修饰多肽进一步包含信号发生源；

且其中所述修饰多肽以天然多肽的至少 50%、75%、或 90% 的特异性结合所述目标。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述修饰多肽进一步包含靶向部分。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述信号发生源选自放射性、磁性、射线不透性、冷光、同位素或超声不透性信号发生源。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述信号发生源选自荧光或磷光信号发生源。

5. 根据权利要求 3 所述的方法，其中所述信号发生源包含 ^{99m}Tc 或 ^{18}F。

6. 一种诊断成像剂，所述诊断成像剂包含如权利要求 1 到 5 中任一权利要求所定义的带有信号发生源的修饰多肽。

7. 根据权利要求 6 所述的诊断成像剂，其作为药用组合物提供。

8. 根据权利要求 6 或权利要求 7 所述的诊断成像剂在制备用于目标在哺乳动物对象体内成像的药物中的用途。

快速清除多肽的生物动力学

发明领域

[0001] 总体上本发明的领域涉及能与目标结合的多肽。更具体地，本发明的领域涉及显示有利生物动力学的低分子量结合剂，以及使用此类快速清除结合剂的成像方法。

背景技术

[0002] 可使用多种结合剂，例如抗体、亲和体 (affibody)、anticalin、适配体，实现与样品中目标的特异性结合。高分子量结合剂例如抗体不适合某些体内应用（例如成像应用），因为其花费很长时间迁移到目标位点，组织穿透性不佳，在对象体内停留很长时间，且主要通过肝清除，与较小结合剂相比更有可能产生免疫应答。因此，对于某些体内应用，低分子量、快速清除的结合剂是优选的，因为其快速迁移到目标位点、组织穿透性、以及从体内快速清除。

[0003] 一种快速清除的结合剂为亲和体，其为一种基于蛋白 A 的 z 结构域的 7kDa 多肽。亲和体均共享一种共同的 3 螺旋蛋白折叠。使用噬菌体或酵母展示技术将 IgG 结合表面的 13 个氨基酸残基随机化产生抗新目标的亲和体。亲和力成熟的蛋白产生为单个 7kDa 结构域（单价亲和体）或者两个串联 7kDa 结构域（二价亲和体）。

[0004] 因为组织穿透性和低抗原性而特别适合某些体内应用的快速清除结合剂仍然可能以干扰所需应用的方式从体内清除。例如，通过肝清除可干扰基于肝的成像应用；通过肾清除放射性同位素标记的结合剂可导致对肾不可接受的放射剂量；或者从血液快速清除可能需要减速以实现难进入组织的穿透。

[0005] 因此，需要改变快速清除结合剂的生物动力学的方法。此外，需要快速清除的生物动力学调整的结合剂用于体内成像，其可用于临床前或诊断成像的多种成像模式。

发明内容

[0006] 本文提供了减少特异性结合目标的快速清除多肽肝摄取的方法，其包 含：提供一种特异性结合目标的多肽；以及用酸性氨基酸残基替换至少一个碱性或至少一个中性氨基酸残基以产生一种修饰多肽，其中所述修饰多肽的等电点低于天然多肽的等电点至少 0.05-0.1pH 点。

[0007] 在某些实施方案中，所述修饰多肽的血液半衰期与天然多肽的血液半衰期基本相同，而所述修饰多肽肝摄取与天然多肽相比大大减少。

[0008] 在某些实施方案中，所述多肽主要由包含 α 螺旋折叠的约 60 个氨基酸残基或包含成对 α 螺旋折叠片段的约 120 个氨基酸残基组成。替代性地，所述多肽可主要由包含 β 桶型折叠的约 160 个氨基酸残基组成。

[0009] 在所有实施方案中，所述修饰多肽保持对其天然目标的结合亲和力，因此，以未修饰多肽的至少 50％、75％、90％的特异性结合所述目标。

[0010] 在某些实施方案中，所述碱性氨基酸残基选自组氨酸、赖氨酸和精氨酸，所述酸性氨基酸残基选自天冬氨酸或谷氨酸。所述中性氨基酸残基可选自除组氨酸、赖氨酸、精氨

酸、天冬氨酸或谷氨酸之外的任何氨基酸残基，所述酸性氨基酸残基选自天冬氨酸或谷氨酸，及其衍生物。

[0011] 所述修饰多肽可附加信号发生源，例如放射性、荧光、磁性、射线不透性（^{99m}Tc 或 ^{18}F）、冷光、磷光、同位素、或超声不透性信号发生源。可选地或另外地，所述修饰多肽附加靶向部分。

[0012] 本文还提供了根据所公开的方法生产的多肽，包括主要由 SEQ ID 号码 1-9 的氨基酸残基组成的分离的多肽。还提供了包含本发明的修饰多肽的药用组合物。

[0013] 本文还提供了包含所述修饰多肽和信号发生源的体内成像制剂。

[0014] 本文还提供了在使用结合目标的多肽进行体内成像程序期间降低肝背景噪声的方法。

附图说明

[0015] 图 1 显示了根据本文教导修饰的 5 种单体亲和体的血液清除。保留在血液（在循环中）中的亲和体总注射量百分比显示于 y 轴。注射后时间显示于 x 轴。数据显示尽管序列变异，所述亲和体显示出相似的清除特性。

[0016] 图 2 显示了 5 种单体亲和体的肾和肝清除。肝（组 2A）和肾（组 2B）的保留在每克组织中的亲和体总注射量百分比对注射后耗用的时间作图显示。数据显示大范围的保留值，显示在所述亲和体组中的序列可变性足以将其导向肝或肾清除。

[0017] 图 3 显示了肝和肾介导的亲和体清除的相关性。两者反向相关，显示所 述亲和体由肝和肾从血流中去除，在所述亲和体组中的序列变异足以将所述清除以这样或那样的方式转变。

[0018] 图 4 显示了肝摄取与等电点的相关性。等电点和注射后 2 小时观察到的肝保留作图，并拟合线性回归。所述相关性的 r 平方值大于 0.98。

[0019] 图 5 显示了 2 种二聚体亲和体的血液清除。保留在血液（在循环中）中的亲和体总注射量百分比显示于 y 轴。注射后时间显示于 x 轴。数据显示尽管序列不同，所述亲和体显示出相似的清除特性。

[0020] 图 6 显示了二聚体亲和体的肾和肝清除。肝（左）和肾（右）的保留在每克组织中的亲和体总注射量百分比对注射后耗用时间作图显示。数据显示大范围的保留值，显示在所述亲和体组中的序列可变性足以将其导向肝或肾清除。

[0021] 图 7 显示了肝摄取与等电点的相关性。等电点和注射后 2 小时观察到的肝保留证实使用等电点导向从特定器官的清除是有效的，还可用于指导候选制剂选择或淘汰目的。

[0022] 详细说明

[0023] 在第一方面，本发明提供了一种减少特异性结合目标的多肽体内肝摄取的方法，其包含：

[0024] (a) 提供特异性结合目标的多肽；以及

[0025] (b) 用酸性氨基酸残基替换步骤 (a) 中天然多肽的至少一个碱性氨基酸残基或至少一个中性氨基酸残基以产生修饰多肽，

[0026] 其中所述修饰多肽的等电点低于步骤 (a) 中天然多肽的等电点至少 0.05-0.1pH 点。

[0027] 术语“氨基酸”系指天然存在和合成的氨基酸，以及与天然存在的氨基酸以相似方式作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸为遗传密码编码的氨基酸，以及后来修饰的氨基酸，例如羟脯氨酸、γ－羧基谷氨酸、O- 磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸和磷酸酪氨酸。本文定义的氨基酸类别并不互相排斥。因此，具有侧链显示两种或更多种物理一化学性质的氨基酸可包括在多个类别中。例如，具有芳香基团的氨基酸侧链进一步被极性取代基取代，例如 Tyr(Y)，可同时表现出芳香疏水性和极性或亲水性，因此可包括在芳香和极性两个类别中。根据本文提供的详细公开，任何氨基酸的适当分类对本领域技术人员是显而易见的。“酸性氨基酸”系指具有侧链 pK 值低于 7 的亲水氨基酸。碱性氨基酸在生理 pH 由于酸根的电离通常具有带负 电荷的侧链。“碱性氨基酸”系指具有侧链 pK 值高于 7 的亲水氨基酸。碱性氨基酸在生理 pH 由于与水合氢离子结合通常具有带正电荷的侧链。遗传编码的碱性氨基酸包括 His(H)、Arg(R) 和 Lys(K)。“中性氨基酸”系指非碱性或非酸性的氨基酸，并因此在生理条件下实际上是非电离的。酸性、碱性和中性氨基酸的具体示例详见表 2（下面）。

[0028] “结合目标”系指可被结合物结合的任何制剂。结合目标可包括一种或多种多肽、蛋白质（例如抗体）、核酸（例如多核苷酸、DNA、RNA、或适配体）；多糖（例如凝集素或糖）、脂、酶、酶底物、配体、受体、抗原或半抗原。所述目标可包括分离的化学基团或三维结构组分（例如由肽折叠形成的 3D 结构）。

[0029] “结合”系指结合剂优先结合目标的能力，其亲和力比结合除预定目标或密切相关目标以外的非特异性目标（例如 BSA 或酪蛋白）的亲和力高至少两倍。本文提供的结合剂结合其各自目标的亲和力 KD 值低于约 $1\times10^{6}M^{1}$，更优选地低于约 $1\times10^{7}M^{1}$，最优选地低于约 $1\times10^{8}M^{1}$。类似地，“特异性结合”系指结合剂结合预定抗原的属性，其亲和力 KD 值低于约 $1\times10^{7}M^{1}$。

[0030] 当用于本文时，短语“血液半衰期”系指当消除为一级或准一级时，一种制剂的血浆浓度降低一半所需的时间。对于多个衰减阶段，术语“血液半衰期”系指表观半衰期（如果不同阶段的衰减半衰期相似），或者显性半衰期（表明总清除），如果不同半衰期不相似。

[0031] 当用于本文时，术语“荧光团”系指一种化学化合物，其暴露于特定波长的光被激发时发光（在不同波长）。荧光团可以其发光性质或“颜色”描述。绿色荧光团（例如 Cy3、FITC 和俄勒冈绿）的特征在于其发光波长通常在 515-540 纳米范围内。红色荧光团（例如德州红、Cy5、和 4 甲基罗丹明）的特征在于其发光波长通常在 590-690 纳米范围内。荧光团的示例包括：4- 乙酰氨基 4′ －异硫氰酸根合芪 -2,2′ d 二磺酸，吖啶；吖啶和吖啶异硫氰酸酯的衍生物；5-(2′ －氨基乙基）氨基萘 -1- 磺酸 (EDANS)；4- 氨基 -N-[3- 乙烯基磺酰基）苯基］萘二酰亚胺 -3,5 二磺酸酯（荧光黄 VS）；N-(4- 苯胺基 1- 萘基）马来酰亚胺；邻氨基苯甲酰胺；亮黄；香豆素；香豆素衍生物；7- 氨基 -4- 甲基香豆素 (AMC，香豆素 120)；7- 氨基 - 三氟甲基香豆素（香豆素 151)；焰红染料；4′，6-diaminidino-2- 苯基吲哚 (DAPI)、5′，5″ －二溴连苯三酚 - 磺酞（溴邻苯三酚红）；7- 二乙基氨基 -3-(4′ －异硫氰酸根合苯基）4- 甲基香豆素； 4,4′ －二异硫氰酸根合二氢 - 芪 -2,2′ －二磺酸、4,4′ －二异硫氰酸根合芪 -2,2′ －二磺酸、5-［二甲基氨基］萘 1- 磺酰氯 (DNS，丹酰氯）；曙红；曙红衍生物例如曙红异硫氰酸酯；赤藓红；赤藓红衍生物例如赤藓红 B 和赤藓红异硫氰酸酯；乙啡啶；荧光素及衍生物例如 5- 羧基荧光素 (FAM)；5-(4,6- 二氯三嗪 2- 基）氨

基荧光素 (DTAF)；2′，7′－二甲氧基-4′ 5′－二氯-6-羧基荧光素 (JOE)、荧光素异硫氰酸酯 (FITC)；QFITC(XRITC)；荧光胺衍生物（与胺反应时放荧光）；IR144；IR1446；孔雀石绿异硫氰酸酯；4-甲基伞形酮；正甲酚酞；硝基酪氨酸；碱性副品红；酚红、B-藻红蛋白；o-邻苯二甲醛衍生物（与胺反应时发荧光）；芘及衍生物例如芘、丁酸芘、和琥珀酰亚胺基1-丁酸芘；活性红4(Cibacron.RTM. 亮红3B-A)、罗丹明及衍生物例如6-羧基-X-罗丹明(ROX)、6-羧基罗丹明(R6G)、丽丝胺罗丹明B磺酰氯、罗丹明(Rhod)、罗丹明B、罗丹明123、罗丹明X异硫氰酸酯、磺基罗丹明B、磺基罗丹明101和磺基罗丹明101的磺酰氯衍生物（德州红）；N，N，N′，N′－四甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA)；4甲基罗丹明、4甲基罗丹明异硫氰酸酯(TRITC)；核黄素；玫红酸和镧系元素螯合物的衍生物、量子原子团、花青和方酸(squaraines)。

[0032] 当用于本文时，术语“等电点”系指分子不携带净电荷时的pH。等电点可通过实验确定，或者对于多肽可基于一级序列计算。

[0033] 术语“天然多肽”意为以未修饰形式特异性结合目标的多肽。

[0034] 当用于本文时，术语“顺磁性金属离子”、“顺磁性离子”或“金属离子”系指对磁场平行或反平行磁化至与该磁场成一定程度的比例的金属离子。通常，这些是具有不成对电子的金属离子。合适的顺磁性金属离子的示例包括，但不限于，钆III[Gd^{3+}或Gd(III)]、铁III[Fe^{3+}或Fe(III)]、锰II[Mn^{2+}或Mn(II)]、钇III[Yt^{3+}或Yt(III)]、镝[Dy^{3+}或Dy(III)]、和铬[Cr(III)或Cr^{3+}]。在某些实施方案中，所述顺磁性离子为镧系元素原子Gd(III)，因其高磁矩(u2 = 63BM2)、对称性电子基态(S8)、以及目前许可其用于哺乳动物诊断。

[0035] “序列一致性百分比”意为通过在比较窗中比较两个最佳排列序列所确定的值，其中对于所述两个序列的最佳排列，所述多核苷酸或多肽序列在比较窗中的部分与参考序列（其不包含添加、替换或缺失）相比，可包含添加、替换或缺失（即缺口）。所述百分比计算方法为，确定相同核酸碱基或氨基酸残基在两个序列中都出现的位点数量以产生匹配位点的数量，匹配位点数 量除以比较窗中位点总数，所得结果乘以100以产生序列一致性百分比。

[0036] 术语“蛋白质”、“肽”和“多肽”用于本文时描述任何氨基酸链，无论其长度或翻译后修饰（例如糖基化或磷酸化）。因此，所述术语在本文可互换使用以指代氨基酸残基的聚合物。所述术语还适用于氨基酸聚合物，其中一个或多个氨基酸残基为相应天然氨基酸的人工化学模拟物。因此，术语“多肽”包括全长、天然蛋白质，以及重组或合成产生的多肽，其对应于全长天然蛋白质或天然蛋白质的特定结构域或部分。所述术语还包括成熟蛋白质，其具有一个添加的氨基末端甲硫氨酸以促进在原核细胞中的表达。本发明的多肽可为化学合成或通过重组DNA方法合成；或者可按照标准生物化学纯化方法从其天然表达的组织中纯化。

[0037] 当用于本文时，术语“生理条件”系指哺乳动物体内通常出现的条件。因此，生理条件意为pH约6.5到约7.5，以及温度在约25℃到约37℃的范围内。

[0038] 当用于本文时，术语“放射性核素”通常系指引入对象之后可被放射性检测追踪的任何原子。代表性的放射性原子包括：氟-18、锕-225、铋-212、砷-72、铟-110、铟-111、铟-113m、镓-67、镓-68、锶-83、锆-89、钌-95、钌-97、钌-103、钌-105、汞-107、汞-203、铼-186、铼-188、碲-121m、碲-122m、碲-125m、铥-165、铥-167、铥-168、镅-94m、镅-99m、

银 -111、铂 -197、钯 -109、铜 -62、铜 -64、铜 -67、钇 -86、钇 -90、钪 -47、钐 -153、镥 -177、铑 -105、镨 -142、镨 -143、铽 -161、钬 -166、金 -199、钴 -57、钴 -58、铬 -51、铁 -59、硒 -75、铊 -201、或镱 -169。

[0039] 术语“anticalin 骨架”系指多肽的氨基酸残基，其提供由一个或多个环连接的 8 个反平行 β 链组成的圆柱形 β 桶的三维结构，以足够容纳具有目标结合环的桶型一端，因此可结合目标。

[0040] 术语“亲和体骨架”通常系指多肽的氨基酸残基，其提供足够容纳所述多肽的结合界面氨基酸残基的三维结构，因此可结合目标。以相同拓扑结构（z- 域 3 螺旋折叠）维持结合位点和结合活性的任何序列都基于所述亲和体骨架。

[0041] 术语“基本一致”或“同源”的多种语法形式在肽的语境下表明包含具有所需一致性序列的肽，例如在特定比较窗中与参考序列有至少 80％、85％、90％、或 95％的序列一致性。

[0042] 当用于本文时，术语“信号发生源”系指使用一种或多种检测技术（例 如光谱测定、量热法、光谱法或肉眼检查）能提供可检测信号的分子。可检测信号的合适示例可包括光信号、和电信号或放射性信号。用于所述创新方法的信号发生源的示例包括，例如，生色团、荧光团、Raman 活性标签、放射性标记、酶、酶底物、或上述各项的组合。合适的放射性同位素包括：^{11}C、^{18}F、^{32}P、^{35}S、^{123}I、^{124}I、^{125}I、^{131}I、^{51}Cr、^{36}CI、^{57}Co、^{59}Fe、^{75}Se、和 ^{152}Eu。卤素（例如氯、氟、溴和碘）同位素以及包括镓、钇、铼和铟的金属也是有用的标记。可用作信号发生源的优选射电金属包括：^{99m}Tc、^{111}In、^{97}Ru、^{67}Cu、^{67}Ga、^{68}Ga、^{72}As、^{89}Zr 和 $^{201}T1$。可用作信号发生源的优选放射卤素包括：^{123}I 和 ^{131}I。用于通过正电子成像术（“PET”）体内诊断成像的放射性同位素包括 ^{11}C、^{18}F 和 ^{124}I。顺磁性标记可为以金属复合物或金属氧化物颗粒形式存在的金属离子。合适的顺磁性同位素可包括 ^{157}Gd、^{55}Mn、^{162}Dy、^{52}Cr 和 ^{56}Fe。

[0043] 当用于本文时，术语“靶向基团”系指在蛋白质 - 蛋白质复合物中识别并特异性结合一种或多种蛋白质的化学种类（即，有机分子或生物分子）。在一些实施方案中，所述靶向基团能结合靠近或邻近短暂反应（例如仅反应数秒或数分钟）部分的蛋白质片段。

[0044] 实施方案

[0045] 本文提供了通过改变等电点调整蛋白质序列的生物动力学以增加或减少体内肝和 / 或肾新陈代谢的方法。还提供了已使用本方法改变以表现改善生物动力学的多肽。进一步提供了使用本文提供的多肽在体内成像的方法（例如临床前成像或诊断成像）。

[0046] 总体上，本文提供的方法使本领域普通技术人员可通过改变多肽的等电点调整多肽的生物动力学。可用于氨基酸替换的方法包括通过本领域技术人员已知的多种方法诱变编码所述多肽的 cDNA，所述诱变方法包括随机诱变、定点诱变、以及使用易错 PCR 诱变。一种向结合界面位点引入随机替换的方法为在所需替换的密码子处使用包含简并引物的 DNA。替代性地，可使用标准合成肽合成技术产生所述多肽。

[0047] 表 1（下面）提供了在多种类型的快速清除结合剂中替换类型的通常指导。变化列表明对于对应类型的替换等电点转变的方向。

[0048]

初始	替换	变化	影响
碱性	酸性	负	高

[0049]

中性	酸性	负	中
酸性	碱性	正	高
中性	碱性	正	中

[0050] 表 1

[0051] 下面表 2 提供了代表性氨基酸的 pH 特性。

[0052]

氨基酸	电荷
丙氨酸 (A)	中性
苯丙氨酸 (F)	中性
甘氨酸 (G)	中性
异亮氨酸 (I)	中性
亮氨酸 (L)	中性
甲硫氨酸 (M)	中性
天冬酰胺 (N)	中性
脯氨酸 (P)	中性
谷氨酰胺 (Q)	中性
丝氨酸 (S)	中性
硒代半胱氨酸 (U)	中性
缬氨酸 (V)	中性
色氨酸 (W)	中性
酪氨酸 (Y)	中性
半胱氨酸 (C)	酸性
天冬氨酸 (D)	酸性
谷氨酸 (E)	酸性
赖氨酸 (K)	碱性
精氨酸 (R)	碱性
苏氨酸 (T)	弱酸性
组氨酸 (H)	弱碱性

[0053] 表 2

[0054] 虽然所述多肽的骨架部分优选地不改变以保持三级结构，但也可能存在不导致结合损失的在骨架氨基酸残基中的保守和非保守突变。

[0055] 本文涉及的多肽序列在下面表 3 中列出。标记为 SEQ. ID. NO. :1-8 的 多肽都靶向 PDGF-Rβ :

[0056]

SEQ. ID. No	序列	标识符	残基
1	GSSHHHHHHLQVDNKFNKERQVAAAEI DALPNLNRGQWNAFIASLVDDPSQSANL LAEAKKLNDAQAPKVD	Z1977	71
2	GSSHHHHHHLQVDNKFNKELSDAAQEI DSLPNLNRSQWNAFIKSLIDDPSQSANLL AEAKKLNDAQAPKVD	Z1978	71
3	GSSHHHHHHLQVDNKFNKERREAAKEI DSLPNLNRTQWNAFIRSLADDPSQSANL LAEAKKLNDAQAPKVD	Z1980	71
4	GSSHHHHHHLQVDNKFNKELVRAAQEI DELPNLNRGQWNAFIKSLVDDPSQSANL LAEAKKLNDAQAPKVD	Z1982	71
5	GSSHHHHHHLQVDNKFNKERLKAAAEI DALPNLNRKQWNAFISSLRDDPSQSANL LAEAKKLNDAQAPKVD	Z1995	71
6	GSHHHHHHLQVDNKFNKELIEAAAEIDA LPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLA EAKKLNDAQAPKVDC	Z2465	71
7	GSHHHHHHLQVDNKFNKELIAAAAEIDR LPNLNRVQWNAFIKSLVDDPSQSANLLA EAKKLNDAQAPKVDC	Z2477	71
8	GSHHHHHHLQVDNKFNKELVKAAAEID ALPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLL AEAKKLNDAQAPKVDC	Z2483	71

[0057] 表 3

[0058] 表现特性

[0059] 表 4 提供了单体亲和体的血液清除分析结果，对应图 1 所示的作图，定量说明了 5 种未修饰亲和体虽然序列不同但显示出相似的血液特性。

[0060]

亲和体	t1/2 (分钟)	AUC (0-120)	R^2 (t1/2 符合)
Z1980	1.4570	542.7	0.9998
Z1978	1.4040	476.3	0.9997

[0061]

Z1995	1.4620	495.5	0.9998
Z1977	1.6460	560.9	0.9996
Z1982	1.7720	548.3	0.9987

[0062] 表 4

[0063] 表 5 提供了二聚体亲和体的血液清除分析结果，对应图 5 所示的作图，定量说明了两种二聚体亲和体虽然序列不同但显示出相似的血液特性。

[0064]

亲和体	t1/2(分钟)	AUC (0-120)	R^2 (t1/2 符合)
zHer2	1.706	725	0.9995
ZTNF	1.767	618	0.9968

[0065] 表 5

[0066] 总体上，本文提供的快速清除结合剂可用于进行其它结合剂（例如抗体）用于执行的功能。因此，所述快速清除结合剂可用作，例如体内诊断的成像剂，如第二方面（下面）所述。当用于体内时，所述快速清除结合剂可使用合适的信号发生源（例如用于 PET 成像的 ^{18}F 或用于 SPECT 成像的 ^{99m}Tc）修饰以用于所选的成像模式。

[0067] 所公开的方法提供了相对于其它方法的关于控制清除与代谢的多个优点。典型的翻译后修饰（例如聚乙二醇修饰或糖基化）依赖于蛋白生产后进行的化学修饰。翻译后修饰可引起蛋白质凝聚或解折叠，并因此丧失活性。另外，翻译后修饰经常产生蛋白质的异质混合物，其为可注射制剂的不需要的特性。使用本文公开方法生产的蛋白质主要同质混合物可引入对象而无需另外耗费时间且昂贵的富集步骤，所述富集步骤是使用翻译后修饰技术生产的异质蛋白质混合物所必需的。

[0068] 另外的序列可添加到末端以赋予所选功能。因此，另外的序列可添加到一个或两个末端以促进结合剂自身或与结合目标偶联的纯化或分离（例如通过向所述多肽添加组氨酸标签）。信号发生源可在末端位点或在中间位点加入至所述多肽。信号发生源的合适示例可包括生色团、荧光团、Raman 活性标签、放射性标记、酶、酶底物、或上述各项的组合。可检测信号的合适示例可包括光信号、电信号或放射性信号。

[0069] 在第二方面，本发明提供了第一方面所述的修饰多肽。在第三方面，所述修饰多肽以药用组合物（如下所述）提供。第二和第三方面的修饰多肽和信号发生源的优选方面如第一方面（上面）所述。

[0070] 本发明的药用组合物可不经肠胃施用于人和其它动物。当用于本文时，术语“不经肠胃”施用系指施用方式，包括静脉、肌肉、腹膜内、胸骨内、皮下、和关节内注射和输注。不

经肠胃注射的本发明的药用组合物包含药用无菌水或非水溶液、分散液、悬浮液、或乳剂，以及使用之前复原到无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。合适的水和非水载体、稀释剂、溶剂、或溶媒的示例包括水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等等）、及其混合物、植物油（例如橄榄油）、以及可注射的有机酯例如油酸乙酯。例如，通过使用包被材料例如卵磷脂，对于分散液通过保持所需的粒度，以及通过使用表面活性剂，可保持适当的流动性。

[0071] 所述组合物还可包含佐剂，例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。通过包括多种抗细菌和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、山梨酸酚等等，可确保预防微生物作用。可能还需要包括等渗剂，例如糖、氯化钠等等。通过包括延缓吸收的制剂，例如单硬脂酸铝和明胶，可使所述可注射药用形式延长吸收。

[0072] 在第四方面，本发明提供了一种诊断成像剂，其包含第一方面所述的修饰多肽，具有连接其上的信号发生源。所述修饰多肽和信号发生源的优选方面如第一方面所述。优选地，所述成像剂以如上所述的药用组合物提供。

[0073] 在第五方面，本发明提供了一种目标体内成像的方法，所述方法包含：

[0074] (a) 作为一种成像程序的部分，将第四方面所述的诊断成像剂引入哺乳动物对象；以及

[0075] (c) 使所述对象成像。

[0076] 为评估所述目标水平，向对象输送一种标记的成像剂。通常，所述对象为哺乳动物且优选地为人。通过医学上合适的方法向对象输送所述标记的成像剂。经过根据所选标记的清除时间之后，使用成像模式测量所发出的信号以确定结合目标的成像剂的量。所得图像的视觉和定量分析提供了所述对象体内目标的全局和局部水平的精确评估。

[0077] 所述成像方法用于非侵入性评估目标水平以诊断与特定生物标记关联的疾病的方法，例如使用 c-met 成像癌症或者使用 PDGF-RB 成像肝和心血管疾病。所公开的生物动力学调整方法增强了定性和定量确定体内目标水 平，并可用于确定用于特定疾病的相关疗法的功效。

实施例

[0078] 从本文呈现的用于说明的下列实施例可更完全地了解本发明的实践。本发明提供了一种方法，通过该方法可通过改变蛋白质序列以产生等电点变化将从血液中的结合剂快速清除导向不同器官。下述实施例说明了 4 种不同情况，其中多肽结合剂的等电点有变化并显示出将血液清除导向所需器官。

[0079] 材料和方法

[0080] 对于下述实验，使用了 3 种类型的蛋白质：7kDa 单价亲和体、14kDa 二价亲和体。所有三种蛋白质为对特定目标具有亲和力的工程改造蛋白。在本研究中使用了多组二级和三级蛋白质结构非常相似但序列不同的亲和体。所述蛋白为重组生产并纯化。使用了 8 种不同序列的 7kDa 亲和体和 2 种不同序列的 14kDa 亲和体。

[0081] 序列变异使用噬菌体展示（例如，G.P.Smith 报道于“Filamentous Fusion Phage:Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface”, Science, 228, Pp1315-1317, 1985）改变本文所述的蛋白质序列。重组生产的亲

和体序列也可使用多种其它技术改变，包括定点诱变、简并 PCR、多点诱变、截短、以及其它用于产生现有蛋白质的突变体、变异体或替换的微生物技术。所做替换的性质取决于蛋白质性质的所需改变。还可合成生产（例如在肽合成仪上）蛋白质，多种用于替换氨基酸的化学技术（例如合成时直接加入替换或修饰的氨基酸）适合此情况。如果需要，非天然氨基酸最容易在合成仪上生产时替换进入蛋白质。

[0082] 残基选择亲和体骨架上的大多数氨基酸可改变。亲和体中 14 个氨基酸位点经常改变且改变时不影响亲和体的结构。这些氨基酸残基使用上述技术改变用于此处所述的研究。蛋白质的表面暴露氨基酸残基（部分或全部溶剂暴露）也可经常变化而对蛋白质的二级或三级结构没有任何实质影响（对于结合剂，此类替换通常对其结合其目标的能力没有影响）。亲和体的表面氨基酸残基已知，并也是序列变异的可能目标。所述蛋白质的疏水核心也已知，并不太可能是变异的目标，虽然存在某些示例，其中蛋白质的核心氨基酸残基改变而不影响蛋白质的结构或功能。残基选择可进一步基于母分子性质的所需改变。表 1 分类了替换的通常类型及其对等电点的影响。

[0083] 螯合物和生物缀合在某些情况下，生产的蛋白质带有“6-his”标签，其用于如下所述直接缀合射电金属。在其它情况下，射电金属的螯合剂在蛋白质生产后与蛋白质缀合。^{99m}Tc 的 HYNIC 螯合剂与蛋白质缀合，其使用 NHS 化学以共价连接到所述蛋白质的伯胺，或者顺丁烯酰亚胺化学以共价连接到游离半胱氨酸。此方法的技术描述于文献，很多经销商出售此类翻译后修饰的带有螯合剂的试剂盒或试剂。缀合螯合剂到蛋白质或功能化蛋白质的其它技术也适用于此情况。

[0084] 通过 6-his标签标记 使用以前发表的方法 (Waibel 等人，Nat. Biotechnol. 1999，17，897.) 的修改完成用 fac-$[^{99m}Tc(CO)_3]^+$核心标记蛋白质。简单而言，生理盐水 (4mCi，2mL) 中的 $Na[^{99m}TcO_4]$ 加入到 Isolink® boranocarbonate 试剂盒 (Mallinckrodt 赠与，参见 Alberto 等人，J. Am. Chem. Soc. 2001，123，3135.)。所得溶液加热到 95℃ 15-20 分钟以提供 fac-$[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$。移除一部分 (2mCi，1mL) 溶液并用 1N HCl 中和到 pH ～ 7。移除 325-μL 等分量并加入到 His_6- 蛋白质溶液。所得溶液在 35-37℃水浴中加热 40 分钟。典型的放射化学产量在 80-95％范围内（通过 ITLC-SG，Biodex，0.9％ NaCl 测定）。所述粗反应产物在 NAP-5 柱 (GE Healthcare，10mM PBS，其中 PBS ＝磷酸缓冲盐溶液）上层析以提供＞ 99％放射化学纯度的产物。典型的获得的比活度为 3-4 μCi/μg。然后用 10mMPBS 稀释所得溶液以提供合适的浓度用于随后的生物分布研究。

[0085] 通过 HYNIC螯合剂标记：根据已发表方法完成 $^{99m}Tc(tricine)_2$(HYNIC-Affi) 的合成。简单地说，200 μL tricine(Fluka；90mg/mL) 的 10mM PBS 溶液、100 μL 二水氯化亚锡 (Sigma-Ald rich；250 μg/mL 在 0.1N HCl 中）溶液、和 60 μL0.1N NaOH 混合以提供 pH6-7 的溶液。向此加入 200 μL 在生理盐水中的 $Na[^{99m}TcO4]$(Cardinal Health；2mCi/mL)。室温 15 分钟之后，所述溶液通过 ITLC(Biodex；0.9％ NaCl) 检测 ^{99m}Tc- 胶体。胶体一直＜ 5％。对于 14kDa HYNIC- 亲和体，20 μL(30 μg) 加入到所得 ^{99m}Tc-tricine 溶液中。该溶液在室温孵育 25 分钟。对于 7kDa HYNIC- 亲和体，移除 100 μCi ^{99m}Tc-tricine 并加入到 17 μg HYNIC- 蛋白质的溶液中。该溶液在室温孵育 25 分钟。进行 NAP-5 纯化以去除未反应起始原料，提供＞ 99％放射化学纯度、比活度 μCi/μg(21Ci/mmol) 的所需化合物。对纯化的放射性标记物进行 HPLC(Grace-Vydac 肽 / 蛋白质 C4 柱）。

[0086] 动物和动物模型：在年龄范围 8-15 周的正常雌性 C57/B16 小鼠 (Charles River Labs，Hopkinton，MA) 中进行生物分布研究。在进行生物分布实验之 前小鼠至少圈养 48 小时。某些其它生物分布实验在来自相同经销商的相同年龄范围和性别的初次接受试验或具有肿瘤的 CD-1 裸鼠中进行。来自不同小鼠类型的生物分布数据的统计比较表明，品系和肿瘤状态并不影响所有比较的器官（主要清除器官 - 血液、肝、肾、膀胱 / 尿）中的生物分布参数 ($p < 0.05$)。

[0087] 生物分布：小鼠尾部静脉注射～ 1ug ^{99m}Tc 标记的蛋白质（～ 3uCi/1ug)。小鼠置于内衬滤纸的笼子中直至安乐死。在每个时间点 (5、30、120、和 240 分钟）对 3 个小鼠进行安乐死，切除目标组织并在 Perkin Elmer1480Gamma Counter 上计数。对血液、肾、肝、脾、和注射位点（尾部）采集数据。汇集笼子中的尿与膀胱并也计数。剩余组织计数，每个动物的所有组织总和加上尿相加以提供总注射剂量。每个器官的注射剂量百分比基于所述总和确定，称量器官以确定每克的注射剂量百分比 (% ID/g)。对所述时间点的所有 3 个小鼠以平均值报告数据，误差棒代表该组的标准偏差。

[0088] 血液清除参数：通过将血液中 % ID/g 转换到血流中总 % ID 确定半衰期。假设在时间零点血液中 % ID 为 100%。使用最小二乘法分析 (Prism，GraphPad Software，WWW.graphpad.com) 用单指数曲线拟合数据。以分钟表示的半衰期开方为 (is extracted as) 拟合参数。R 平方值通常超过 0.97。通过数值整合上述产生的曲线获得 AUC（曲线下面积）。

[0089] 等电点测定：使用 Bjellqvist B，Hughes GJ，Pasquali C，Paquet N，Ravier F，Sanchez JC，Frutiger S， 和 Hochstrasser D. 在“The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences.”Electrophoresis. 19930ct ;14(10) :1023-31 中所述的方法基于一级序列（参见表 2) 计算等电点。

[0090] 实施例 1-一组 5种单体亲和体

[0091] 本研究的目标为设计低肝摄取的亲和体。为本研究选择了大范围等电点的 5 种单体亲和体。如上述计算，等电点的范围在 6.5 到 10.0。所述亲和体以其开发代号命名为“Z1977”、“Z1978”、“Z1980”、“Z1982”和“Z1995”。

[0092] 所述亲和体通过其 6-his 标签标记（如上所述）。所有 5 种亲和体纯化后放射化学纯度超过 99%。

[0093] 如上所述进行生物分布实验。观察到所述 5 种亲和体具有相似的血液清除谱（图 1)。血液数据进行单指数衰减曲线的最小二乘法拟合以确定血清半衰期。整合所得曲线以产生曲线下面积 (AUC) 值。这些数据和分析显示亲和体的总体体内特性很大程度上未因序列变异而改变（表 3)。

[0094] 虽然血液清除非常相似，但观察到所述 5 种亲和体具有显著不同的肝和肾保留水平（图 2)。发现肾和肝摄取值反向相关（图 3)。此数据显示肝和肾影响从血 - 液中去除亲和体，虽然清除率相同，但两者之间的分布不同。该差异非常重要性，因为将所述分子从肝中导出和导入肾或相反的能力在开发用于临床用途的亲和体中有价值。如果不改变所述分子的其它特性而能做到这点则尤其有价值。

[0095] 所述亲和体的序列用于评估序列对清除机制影响的程度。表 2 显示了本文报道的研究中使用的亲和体的序列。在不同亲和体之间对已知不影响所述分子结构的少数氨基酸

残基进行改变。如上所述分析所述序列以确定其等电点。

[0096] 从所述序列确定的等电点对注射后 2 小时观察到的肝保留值作图。观察到肝和等电点之间的相关性 - 该相关性显示 :不影响亲和体结构或大小的替换可用于通过改变其天然电荷状态控制其代谢。对于所述单体亲和体,斜率明显非零,p 值 < 0.01,线性回归 r 平方值 0.983(图 4)。

[0097] Z1978 亲和体显示出最低肝摄取。通过等电点降低将所述低摄取工程改造进入所述蛋白质。为进一步降低摄取,可使用上述方法进一步降低等电点。

[0098] 肝保留水平最高的亲和体为 Z1995。Z1995 和 Z1978 的序列比较表明某些替换可改变 (在本例中降低) 蛋白质的等电点。Z1995 中的下列替换将其转换为 Z1978 :R20 突变为 L,L21 突变为 S,K22 突变为 D,A25 突变为 Q,A29 突变为 S,K36 突变为 S,S44 突变为 K,以及 R47 突变为 I。总计,所述转换涉及净减少 2 个碱性氨基酸和净增加 1 个酸性氨基酸。此类序列操作 (增加酸性氨基酸残基数量并减少碱性氨基酸残基数量,或相反),有效改变等电点。在肽合成或其它生产蛋白质的技术背景下还可通过用合成碱性或酸性氨基酸替换改变等电点。

[0099] 实施例 2-一组二聚体亲和体

[0100] 本研究的目标为将本发明应用到多价亲和体以确定是否其体内特性以与所述单价亲和体相同的方式操作。多价亲和体在某些临床情况中具有优势,而控制其清除的能力有价值。

[0101] 为本研究选择了两种二价亲和体,每种包含一个单独的多肽链,其由两个相同的单价亲和体序列和一个小中间接头组成。以其开发名称称为“zTNF”和“zHer2”。基于其完全区别的等电点 -zHer2 为 9.0 和 zTNF 为 5.1- 从可选二聚体亲和体中选择出这二者。

[0102] 如上所述,使用顺丁烯酰亚胺化学通过末端半胱氨酸氨基酸残基将两种亲和体缀合到所述 hynic 螯合剂。通过质谱确认缀合,通过 HPLC 评估所述蛋白质完整。如上所述,两种亲和体使用 ^{99m}Tc 放射性标记。测定两者的放射化学纯度为 > 95%。

[0103] 两种二价亲和体的生物分布结果与观察到的所述单价亲和体的生物分布结果相似。血液清除曲线 (图 5) 和参数 (表 4) 与所述单价亲和体类似。清除器官表现出与观察到的所述单价亲和体相同的宽范围 (图 6)。

[0104] 如上所述,使用所述二价亲和体的一级序列 (表 2) 计算等电点。当与肝保留值比较时,观察到相同的相关性 (图 6)。该数据显示本发明可使用多价亲和体和单价亲和体实践,等电点的有效范围至少低至 5.1。

[0105] 实施例 3-一组 7种亲和体 :

[0106] 本研究的目标为开发一种低非特异性肝保留的靶向造影剂。在此例中,分析了对选择的成像目标具有高亲和力的亲和体序列并测定了等电点。观察到范围在 6.3 到 8.0 之间。

[0107] 选择最低等电点的亲和体 (以其开发代号称为“z2465”) 用于起始实验。基于上述数据,该分子应具有最低的非特异性肝保留。如上所述所选亲和体通过其 6-his 标签放射性标记并进行生物分布实验。所述分子以与其它亲和体相同的参数清除,并且如预期一样,观察到肝摄取低。

[0108] 为探索和确认基于目前的技术所作的预测,从所述 8 个的组中选择另外 2 种不同

等电点的亲和体（以其开发代号称为“z2477”和“z2483”），并进行一次单时间点生物分布实验。根据上述实施例，选择用于起始实验的 z2465 亲和体因其低等电点，在分析的 3 种亲和体中应具有最低的肝摄取。在注射后 2 小时，当进行比较时，仍观察到肝保留与等电点之间的相关性（图 7）。所述确认实验表明本发明的适当功能 - 使用等电点的方法允许快速选择用于开发的合适的亲和体，并将允许进一步减少肝保留。

[0109] z2483 中，将其转化为 z2465 并赋予其低肝保留的特定替换为 V20 到 I 和 K21 到 E。所述替换导致净增加一个酸性氨基酸残基和净减少一个碱性氨基酸残基 - 将等电点降至 6.3（从 7.2）的变化。

[0001]

1061898x1

225237-2序列表
序列表
<110> M. E. 马里诺
J. W. 卡斯特尔
F. A. 休德
B. D-L. 李

<120> 快速清除多肽的生物动力学

<130> 225237-2

<140>
<141>

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1
<211> 71
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 1
Gly Ser Ser His His His His His His Leu Gln Val Asp Asn Lys Phe
1 5 10 15
Asn Lys Glu Arg Gln Val Ala Ala Ala Glu Ile Asp Ala Leu Pro Asn
20 25 30
Leu Asn Arg Gly Gln Trp Asn Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp Asp
35 40 45
Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp
50 55 60
Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp
65 70

<210> 2
<211> 71
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 2
Gly Ser Ser His His His His His His Leu Gln Val Asp Asn Lys Phe
1 5 10 15
Asn Lys Glu Leu Ser Asp Ala Ala Gln Glu Ile Asp Ser Leu Pro Asn
20 25 30
Leu Asn Arg Ser Gln Trp Asn Ala Phe Ile Lys Ser Leu Ile Asp Asp
35 40 45
Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp
50 55 60
Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp

[0002]

1061898x1

65 70

<210> 3
<211> 71
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 3
Gly Ser Ser His His His His His His Leu Gln Val Asp Asn Lys Phe
1 5 10 15
Asn Lys Glu Arg Arg Glu Ala Ala Lys Glu Ile Asp Ser Leu Pro Asn
20 25 30
Leu Asn Arg Thr Gln Trp Asn Ala Phe Ile Arg Ser Leu Ala Asp Asp
35 40 45
Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp
50 55 60
Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp
65 70

<210> 4
<211> 71
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 4
Gly Ser Ser His His His His His His Leu Gln Val Asp Asn Lys Phe
1 5 10 15
Asn Lys Glu Leu Val Arg Ala Ala Gln Glu Ile Asp Glu Leu Pro Asn
20 25 30
Leu Asn Arg Gly Gln Trp Asn Ala Phe Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp
35 40 45
Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp
50 55 60
Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp
65 70

<210> 5
<211> 71
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 5
Gly Ser Ser His His His His His His Leu Gln Val Asp Asn Lys Phe
1 5 10 15
Asn Lys Glu Arg Leu Lys Ala Ala Ala Glu Ile Asp Ala Leu Pro Asn
20 25 30
Leu Asn Arg Lys Gln Trp Asn Ala Phe Ile Ser Ser Leu Arg Asp Asp
35 40 45
Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp

[0003]

1061898x1

50 55 60
Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp
65 70

<210> 6
<211> 71
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 6
Gly Ser His His His His His His Leu Gln Val Asp Asn Lys Phe Asn
1 5 10 15
Lys Glu Leu Ile Glu Ala Ala Ala Glu Ile Asp Ala Leu Pro Asn Leu
20 25 30
Asn Arg Arg Gln Trp Asn Ala Phe Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp Pro
35 40 45
Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
50 55 60
Gln Ala Pro Lys Val Asp Cys
65 70

<210> 7
<211> 71
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 7
Gly Ser His His His His His His Leu Gln Val Asp Asn Lys Phe Asn
1 5 10 15
Lys Glu Leu Ile Ala Ala Ala Ala Glu Ile Asp Arg Leu Pro Asn Leu
20 25 30
Asn Arg Val Gln Trp Asn Ala Phe Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp Pro
35 40 45
Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
50 55 60
Gln Ala Pro Lys Val Asp Cys
65 70

<210> 8
<211> 71
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 8
Gly Ser His His His His His His Leu Gln Val Asp Asn Lys Phe Asn
1 5 10 15
Lys Glu Leu Val Lys Ala Ala Ala Glu Ile Asp Ala Leu Pro Asn Leu
20 25 30

[0004]

1061898x1

Asn Arg Arg Gln Trp Asn Ala Phe Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp Pro
35 40 45
Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
50 55 60
Gln Ala Pro Lys Val Asp Cys
65 70

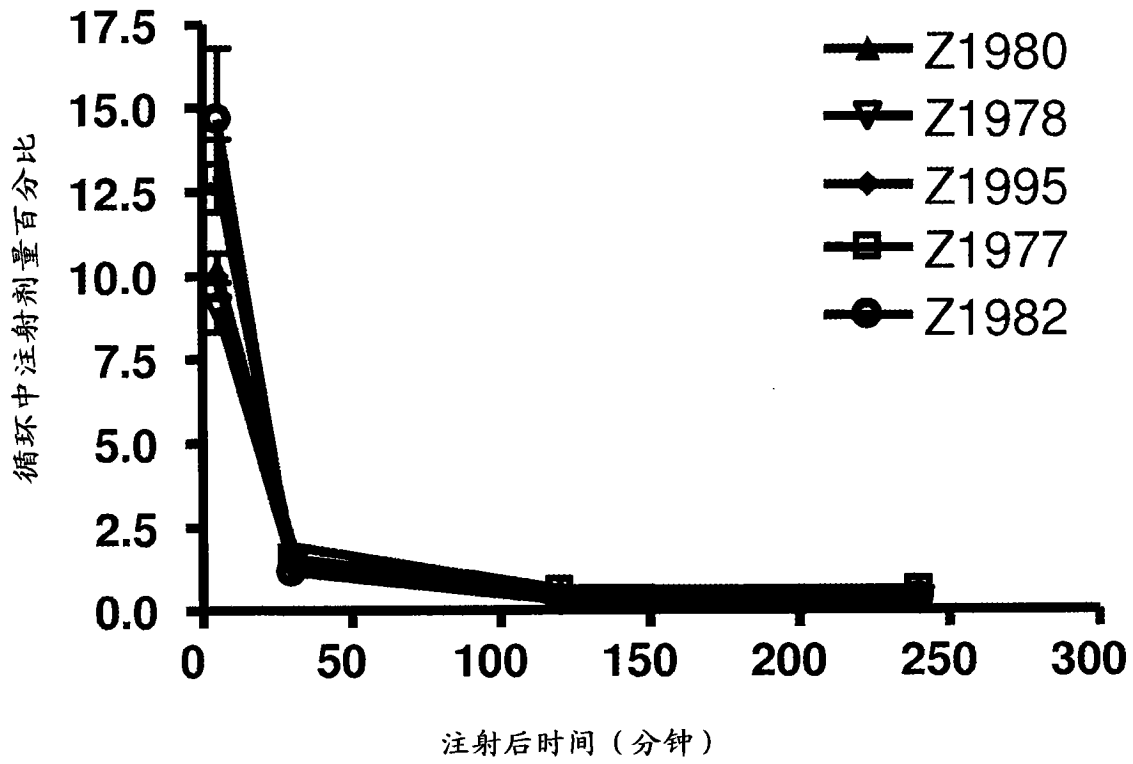

17.5
15.0
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
0
50
100
150
200
250
300
循环中注射剂量百分比
注射后时间（分钟）
Z1980
Z1978
Z1995
Z1977
Z1982

图 1

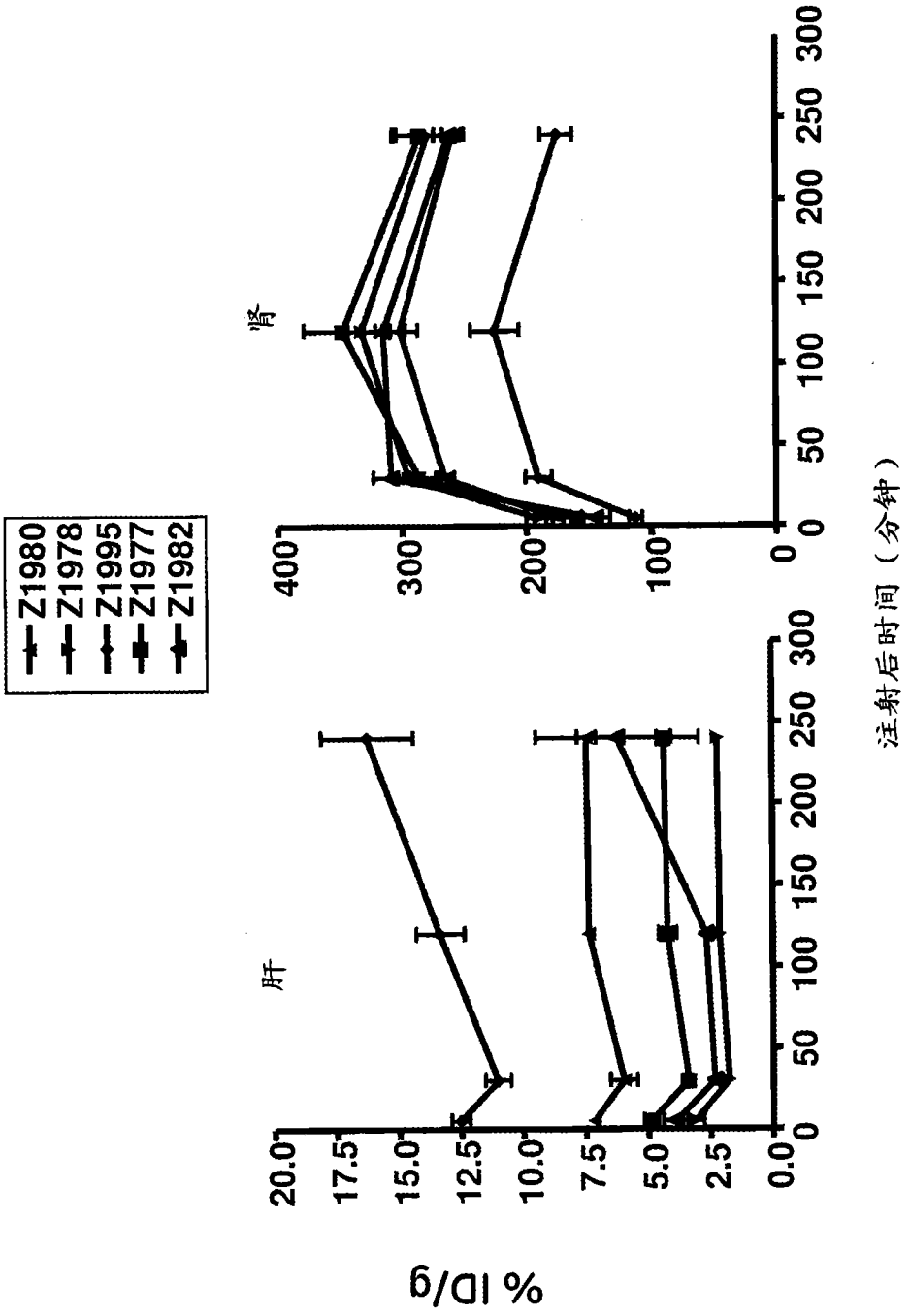

Z1980
Z1978
Z1995
Z1977
Z1982
肾
肝
%ID/g
注射后时间（分钟）
0
50
100
150
200
250
300
100
200
300
400
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
17.5
20.0

图 2B

图 2A

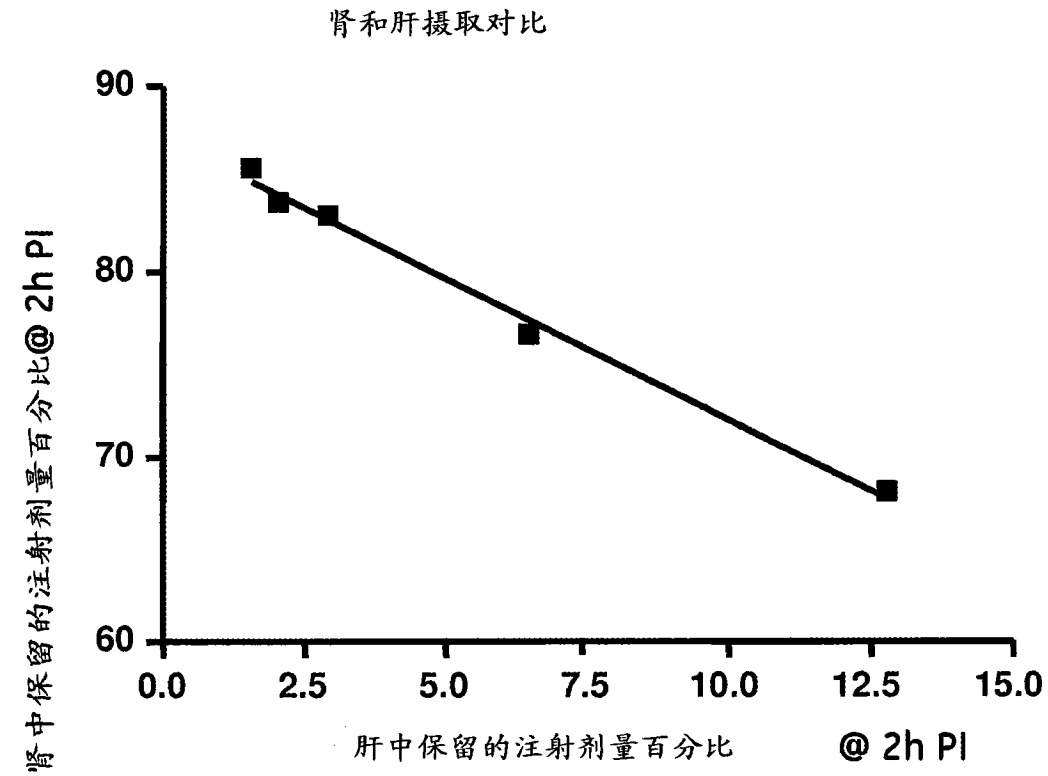

肾和肝摄取对比
90
80
70
60
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
肾中保留的注射剂量百分比@ 2h PI
肝中保留的注射剂量百分比 @ 2h PI

图 3

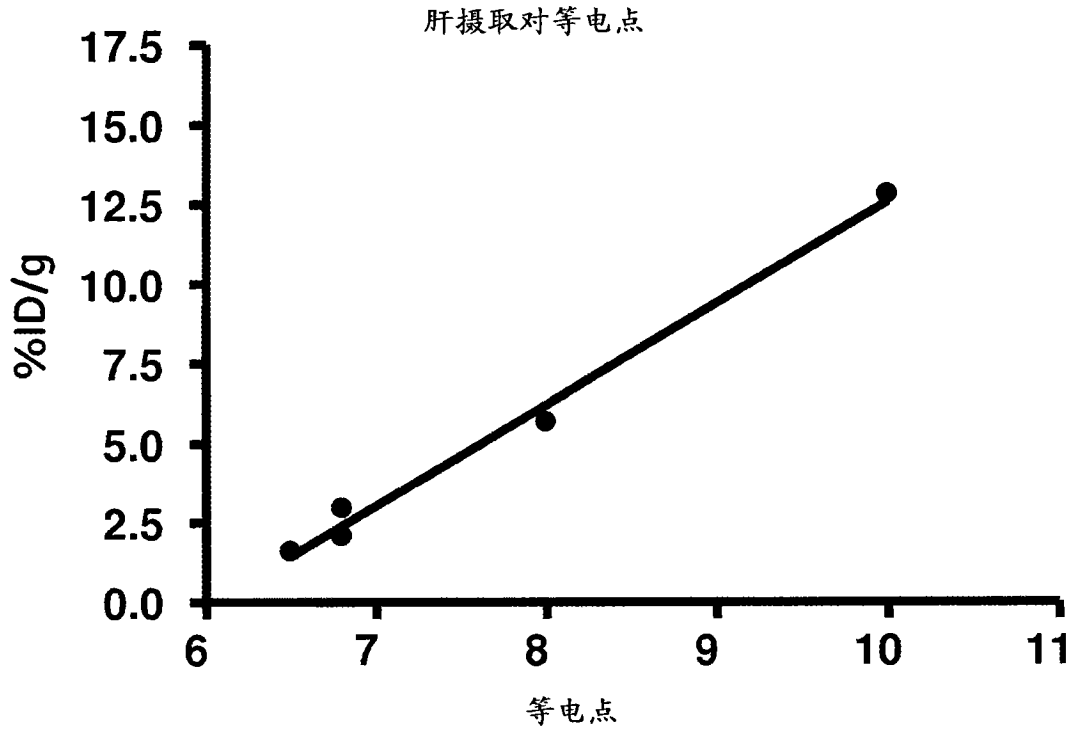

肝摄取对等电点
17.5
15.0
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
%ID/g
6
7
8
9
10
11
等电点

图 4

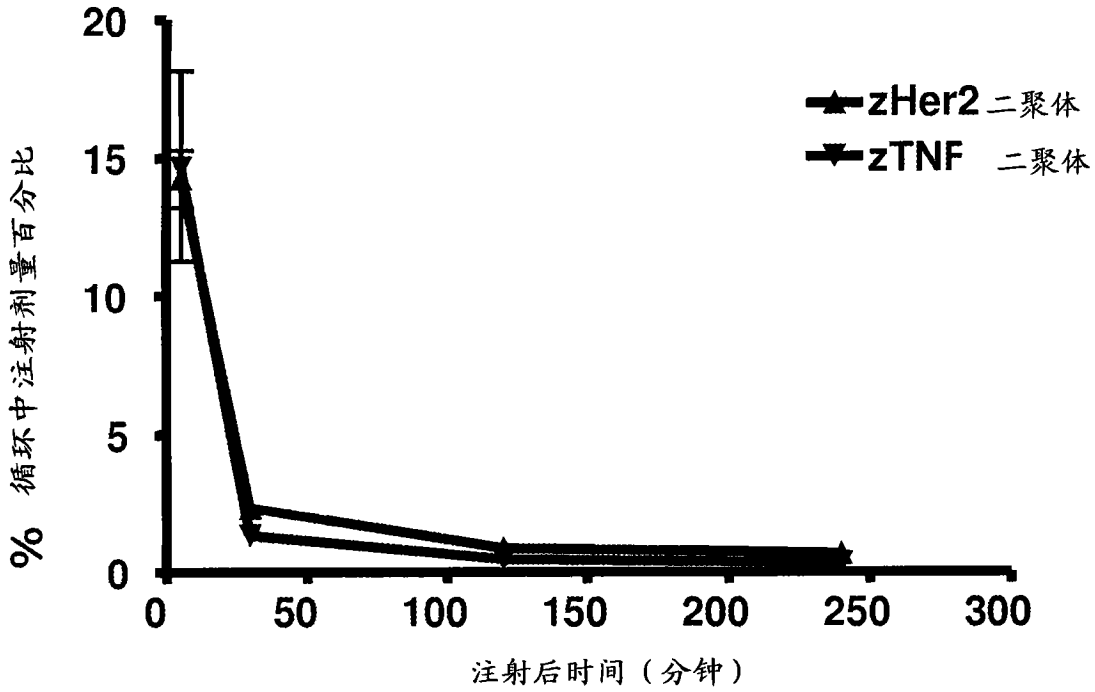

20
15
10
5
0
% 循环中注射剂量百分比
0
50
100
150
200
250
300
注射后时间（分钟）
zHer2 二聚体
zTNF 二聚体

图 5

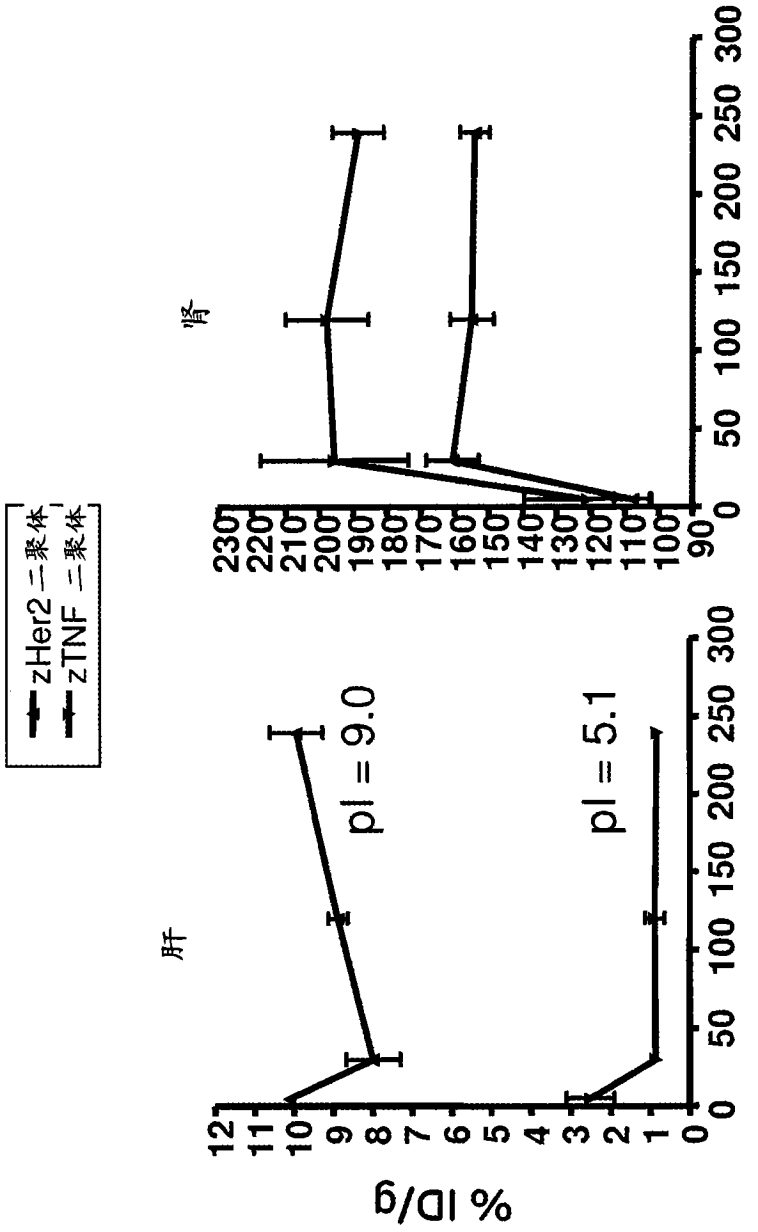

zHer2二聚体
zTNF二聚体
肝
肾
pI = 9.0
pI = 5.1
%ID/g
0
50
100
150
200
250
300
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230

图 6A

图 6B

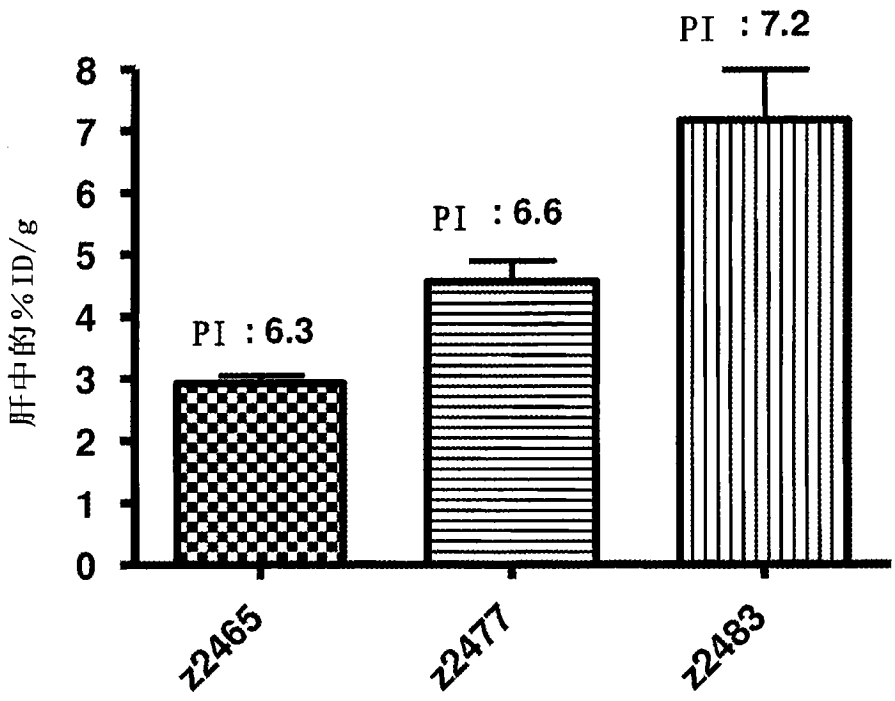


图 7