



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104288775 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201410282849. 2

A61P 1/18(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 11. 05

(30) 优先权数据

07021493. 7 2007. 11. 05 EP

(62) 分案原申请数据

200880114325. 5 2008. 11. 05

(71) 申请人 伊沃泰克国际有限公司

地址 德国汉堡

(72) 发明人 M·奥斯滕 M·格泽 R·穆斯曼

F·哈德 T·西格蒙德 M·施奈德

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李程达

(51) Int. Cl.

A61K 47/48(2006. 01)

A61K 38/18(2006. 01)

C07K 14/475(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

A61P 25/28(2006. 01)

权利要求书2页 说明书15页

序列表1页 附图8页

(54) 发明名称

用于药物用途的 neurturin 缀合物

(57) 摘要

本发明涉及缀合到多元醇的 neurturin 蛋白质产物且涉及具有提高的生物利用度的药物组合物,其包含作为活性成分的 neurturin 缀合物,优选 PEG 化的 neurturin 缀合物或其变异体。

1. Neurturin 缀合物,其包含连接到 neurturin 变体的氨基酸上的多元醇部分,其中所述氨基酸在成熟人 neurturin 的氨基酸 47-69 的区域内。

2. 权利要求 1 的缀合物,其中所述氨基酸在成熟人 neurturin 的氨基酸 51-65 的区域内。

3. 权利要求 1 或 2 的缀合物,其中所述氨基酸是赖氨酸。

4. 权利要求 1-3 任一项的缀合物,其中所述 neurturin 变体包含选自下列的一个或多个置换:R51K、R52K、R54K、R56K、R57K、R58K、R60K、R61K、R63K 和 R65K。

5. 人 neurturin 蛋白的变体,其中 neurturin 变体选自 (a), (b) 和 (c):

(a)neurturin 变体,其相对于野生型人 neurturin 具有 1、2、3 或 4 个氨基酸变化,并且其中 neurturin 变体相对于人 neurturin 在氨基酸位置 47-69 的区域内具有至少一个氨基酸变化;

(b)neurturin 变体,其相对于人 neurturin 具有至少一个氨基酸变化,其中所述氨基酸变化位于选自成熟人 neurturin 的氨基酸位置 51、52、54、56、57、58、60 或 65 的至少一个氨基酸位置;和

(c)neurturin 变体,其具有 R63K 置换。

6. 权利要求 5 的 neurturin 变体,其中引入了至少一个赖氨酸残基。

7. 权利要求 6 的 neurturin 变体,其中在成熟人 neurturin 的编码序列内引入了至少一个下列突变:R51K、R52K、R54K、R56K、R57K、R58K、R60K、R61K、R63K 或 R65K。

8. 权利要求 5-7 任一项的 neurturin 变体,其是包含共价连接于其的多元醇部分的缀合物。

9. 权利要求 8 的缀合物,其中所述多元醇部分是聚亚烷基二醇部分,优选聚乙二醇部分。

10. 权利要求 8 或 9 的缀合物,其中所述多元醇部分是线性或分支多元醇部分。

11. 权利要求 8-10 任一项的缀合物,其中聚乙二醇分子连接于其置换的赖氨酸残基和/或 N 末端氨基酸。

12. 权利要求 9-11 任一项的缀合物,其中所述聚乙二醇分子具有 4-40kDa、优选 20-40kDa 的平均分子量。

13. 权利要求 9-12 任一项的缀合物,其中所述聚乙二醇分子通过酰基或烷基连接于所述 neurturin 蛋白,和/或其中所述聚乙二醇分子是甲氧基-PEG-OH。

14. 药物组合物,其包含作为活性成分的根据权利要求 8-13 任一项的至少一种 neurturin 缀合物,和药学上可接受的载体、稀释剂和/或佐剂。

15. 权利要求 14 的组合物,其相对于含有未经修饰的对照 neurturin 蛋白产品的组合物而言具有活性成分的增加的生物可利用性,其中修饰的 neurturin 蛋白以这样的量存在:所述量提供活性成分的生物可利用性的至少 2 倍、优选至少 5 倍、更优选至少 10 倍的增加。

16. 权利要求 14-15 任一项的组合物,其用于注射或输液,特别是用于皮下或静脉内注射。

17. 权利要求 14-15 任一项的组合物,其用于预防或治疗胰腺或神经退行性病症,特别是用于预防或治疗 I 型糖尿病、成人隐匿性自身免疫性糖尿病和 II 型糖尿病。

18. 权利要求 14-17 任一项的组合物,其施用于哺乳动物、特别是人。

用于药物用途的 neurturin 缀合物

[0001] 本申请是申请号为 200880114325.5、申请日为 2008 年 11 月 5 日的中国发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及修饰人 neurturin 以提高其血清半衰期和药物代谢动力学特征。尤其,本发明涉及新型 neurturin 缀合物,其包含共价连接至多元醇部分,优选聚乙二醇的 neurturin 或其生物活性片段。本发明还涉及具有提高的生物利用度的药物组合物,其包含作为活性剂的新型 neurturin 缀合物以用于糖尿病和神经退行性疾病的治疗、处理、预防和 / 或诊断。

背景技术

[0003] 胰腺 β 细胞分泌胰岛素以应答升高的血糖水平。与其他激素相比,胰岛素在能量代谢的调控中起关键作用。胰岛素导致了糖原和甘油三酯的贮存及蛋白质的合成。胰岛素刺激葡萄糖进入到肌肉和脂肪细胞。在患有 I 型糖尿病或 LADA (成年阴性自身免疫性糖尿病 (latent autoimmune diabetes in adults), Pozzilli & Di Mario, 2001, Diabetes Care. 8:1460-1467) 的患者中,由于自身免疫攻击, β -细胞被破坏。由剩余的胰岛细胞产生的胰岛素量太少导致了血糖水平的升高 (高血糖症)。在 II 型糖尿病患者中肝脏和肌肉细胞失去了应答正常的血液胰岛素水平的能力 (胰岛素抵抗)。高血糖水平 (也和高血脂水平) 依次导致了 β -细胞功能的损伤和 β -细胞死亡的增加。有趣的是,在 II 型糖尿病患者中 β -细胞再生过程 (如新生和复制) 似乎没有弥补 β -细胞量的损失,从而导致总 β -细胞量随着时间减少。最终,在 II 型糖尿病患者中外源胰岛素的应用为必需的以用于血糖水平的充分控制。

[0004] 在 I 型糖尿病患者中,当 β -细胞被自身免疫攻击破坏时,已设计了调节免疫系统的治疗并能停止或显著降低胰岛的破坏 (Raz et al., 2001, Lancet 358:1749-1753; Chatenoud et al., 2003, Nat Rev Immunol. 3:123-132; Homann et al., Immunity. 2002, 3:403-415)。然而,由于人 β 细胞再生相对缓慢,如果所述治疗与可刺激 β 细胞再生的治疗相结合,可更成功进行所述治疗。

[0005] 因为现今的普通抗糖尿病药物无法足够好的控制血糖水平以完全预防高血糖水平和低血糖水平的发生,糖尿病成为非常致残的疾病。血糖水平的频繁升高是有毒性的且可导致长期并发症,例如肾病、视网膜病变、神经病变及外周血管疾病。 β 细胞的大量损失也导致了由胰腺 α 细胞分泌的胰高血糖素的下调,其有助于危险的低血糖发病期的风险增加。还有大量的相关病情,如肥胖、高血压、心脏病和高血脂,因此糖尿病患者处于很大的危险中。

[0006] 除了患者的生活质量受到损害,糖尿病的治疗和长期并发症导致了呈不断上升趋势的医疗保健系统的巨大财政负担。因此,在本领域中对于 I 型糖尿病和 LADA 的治疗,并且对于晚期 II 型糖尿病的治疗有鉴定诱导胰腺胰岛素产生 β -细胞再生的因子的强烈需

要。一旦胰腺功能受损,所述因子可恢复正常的胰腺内分泌功能或甚至可预防 I 型糖尿病、LADA 或 II 型糖尿病的出现或进展。

[0007] Neurturin 为在胚胎胰腺中表达的分泌蛋白。已显示重组的 Neurturin 可刺激小鼠胚胎干细胞分化成胰岛素产生细胞。此外,胰腺 neurturin 水平升高的转基因小鼠具有实质性增加的胰腺 β -细胞量。基于这些发现,已提出将 neurturin 用于糖尿病之类的胰腺疾病的治疗(见例如 WO 03/99318 和 WO 2005/051415,其公开内容以引用的形式并入本文)。

[0008] Neurturin 为由胶质细胞系源性神经营养因子(GDNF)、Neurturin、Artemin 和 Persephin 组成的 GDNF 配体家族(GFL)的一员。成熟的 neurturin 为 102 个氨基酸单体组成的大小为 23.6kDa 的同型二聚体。每个单体含有 3 个链内二硫键以形成一个胱氨酸结。另外一个二硫键连接所述单体。

[0009] 以前已提出将 Neurturin 用于神经退行性疾病(如帕金森病、阿尔茨海默病和亨廷顿氏症、运动神经元病、脊髓损伤或听觉障碍)的治疗(WO 97/08196, WO 99/06064; Akerud et al. J Neurochem. 1999;73(1):70-78; Koeberle & Ball Neuroscience. 2002; 110(3):555-567; Bilak et al. Mol Cell Neurosci. 1999;13(5):326-336; Perez-Navarro et al. Neuroscience. 2000;98(1):89-96; Rosenblad et al, Eur J Neurosci. 1999; 11(5):1554-1566, 其公开内容以引用的形式并入本文)。

[0010] 然而,发现 neurturin 和相关的 GDNF 因子通过对流增强递送(CED)进入大鼠脑中,其分布容积被限制(Hamilton et al., Exp Neurol. 2001;168(1):155-161)。通常必需通过注射施用蛋白。注射后大部分蛋白质从体内快速清除,从而迫使了频繁的注射。在我们自己的研究中,我们发现在哺乳动物中皮下和静脉注射 neurturin 后其生物利用度低。只有大约 10%皮下注射的 neurturin 进入循环。因此,在患者中难以达到对治疗有用的血液蛋白质水平。

[0011] 因此,有强烈的必要来研制有增强的可利用性的 neurturin 变异体并研发与之相关的方法来延长在体内的蛋白疗法的循环半衰期(生物利用度)从而不需要频繁的注射作为活性剂的 neurturin 以满足患者的“用户友好”蛋白疗法的需要。

[0012] 因此,本发明的根本问题是提供提高其生物利用度的新的 neurturin 变异体和制剂。

[0013] 通过提供权利要求中所述的实施方式解决所述问题。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明涉及新型的 neurturin 缀合物,其包含共价连接到人 neurturin 蛋白产物的多元醇部分。

[0016] 本发明还涉及药物组合物,其包含缀合至少一个聚乙二醇分子的至少一种 neurturin 蛋白产物和/或其生物活性片段作为活性成分,及药物可接受的载体、稀释剂和/或佐剂。

[0017] 在一进一步的实施方式中,本发明涉及对有需要的受试者施用药物组合物的方法,所述药物组合物包含药物活性量的:缀合至少一个聚乙二醇分子的至少一种经修饰的 neurturin 蛋白产物或其生物活性片段作为活性成分,及药物可接受的载体、稀释剂和/或佐剂。

[0018] 本发明还提供对有需要的受试者施用药物组合物的方法,所述组合物包含药物活性量的:缀合至少一个聚乙二醇分子的至少一种经修饰的 neurturin 蛋白产物或其生物活性片段作为活性成分、及低分子量物质、及药物可接受的载体、稀释剂和 / 或佐剂。

[0019] 本发明的组合物适于预防或治疗胰腺疾病或神经退行性疾病,尤其胰腺自身免疫性疾病,例如 I 型糖尿病或 LADA 及 II 型糖尿病之类的自身免疫性糖尿病。

[0020] 发明详述

[0021] 本发明提供包含共价连接的多元醇部分(如聚乙二醇(PEG))的 neurturin 缀合物,及包含所述 neurturin 缀合物,及其变体、衍生物或生物活性片段的药物组合物。

[0022] 除非提供了特殊的定义,本文所使用的相关术语及实验室方案、技术和方法已被其所述领域所熟知。标准的化学符号和缩写可与所述符号所代表的全名互换使用。标准的技术可用于化学合成、化学分析、药物制剂、组合物、递送和患者的治疗。标准的技术可用于 DNA 重组法、寡核苷酸合成、组织培养等。例如可使用试剂盒根据产品说明进行如本领域通常所实现或如本文所述的反应或纯化技术。通常可依据本领域所熟知的常规方法和如各种经本说明书引用和讨论的一般或更具体的参考文献所述进行上述技术和方案。

[0023] 所述术语“类似物”指结构上与 neurturin 类似且具有相似功能的多肽。

[0024] 本文所用术语“生物活性的”或“生物活性”指所述 neurturin 产物诱导和 / 或刺激祖细胞(例如干细胞)分化成胰岛素产生细胞,及和 / 或促进胰岛素产生细胞(例如体内或体外的 β 细胞)的保护、生存或再生。使用 WO 93/06116 和美国专利申请 No. 08/535,681 所述的或本文实施例所述的公开的用于测定 GDNF 活性的标准体外测定可轻易确定本文所公开的经修饰的 neurturin 蛋白产物的生物活性。

[0025] 本文所用的 neurturin 的“片段”指 neurturin 的一部分,其通过包括但不限于 neurturin 的酶消化和化学裂解(例如 CNBr)及所述多肽的物理剪切的任何方法生成。Neurturin 的片段也可通过例如重组 DNA 技术和氨基酸合成生成。

[0026] 当所述片段或前体显示出相同的 neurturin 生物活性时,本发明所用的 neurturin 的“活性片段”或“生物活性片段”指单独或与连接到其上的相关分子或残基(例如糖或磷酸盐残基,或所述多肽分子的聚集体)结合的所述 neurturin 多肽链的任何片段或前体。所述术语“生物活性片段”也指 neurturin 产物的片段,其诱导和 / 或刺激祖细胞(例如干细胞)分化成胰岛素产生细胞,及和 / 或促进胰岛素产生细胞(例如体内或体外的 β 细胞)的保护、生存或再生。使用 WO 93/06116 和美国专利申请 No. 08/535,681 所述的或本文实施例所述的公开的用于测定 GDNF 活性的标准体外测定可轻易确定本文所公开的经修饰的 neurturin 蛋白产物片段的生物活性。

[0027] 本文所用术语“同源物”指来自共同祖先蛋白序列的后代的涉及 neurturin 的多肽。术语“同源”适用于通过遗传复制事件而分离的蛋白质间的关系。

[0028] 所述术语“低分子量物质”指平均分子量在 100Da ~ 12000Da 之间,优选在 200Da ~ 8000Da 之间,最优选在约 500Da ~ 7000Da 之间的物质。

[0029] 所述低分子量物质可为阴离子聚合物,其可为天然或合成的且其含有多种阴离子基团(如羧酸和 / 或硫酸基团)。例如,所述阴离子聚合物可选自低分子量硫酸化糖、硫酸化环糊精或硫酸化合成聚合物(如丙烯酸聚合物、芳香族聚合物和 / 或多元醇)。更具体的说,所述阴离子聚合物选自低分子量肝素或肝素衍生物、类肝素硫酸盐、硫酸软骨素、葡聚糖硫

酸盐、经化学修饰的肝素衍生寡糖 (list from Wang et al. (2002), supra)、类肝素寡糖、葡聚糖硫酸盐、硫酸化低分子糖胺聚糖、糊精-2-硫酸盐、纤维素硫酸盐和羧磺酸聚合物 (例如 PRO2000)、PAVAS (丙烯酸与乙烯醇硫酸的共聚物)、磺化聚合物 PAMPS [聚 (2-丙烯醛基-氨基-2-甲基-1-丙磺酸)] (M_w 约为 7000 ~ 12000)、硫酸软骨素、硫酸化环糊精、昆布多糖硫酸 (Alban, S. in Carbohydrates in Drug Design (Ed. Z. J. Witczak, K. A. Nieforth) Dekker, New York, 1997, pp209)、聚甘油硫酸盐 (Türk, H., Haag, R., Alban, S. Bioconjugate Chem. 2004, 15, 162 ;)、戊聚糖聚硫酸盐 (PPS) 及它们的衍生物 (如乳糖修饰的戊聚糖硫酸盐、分馏 PPS/ 低分子量 PPS, 墨角藻聚糖或衍生物或它们的组合)。

[0030] 低分子量肝素 (LMWH) 类似物 (例如依诺肝素、达肝素或法安明) 是适宜聚合物的优选例。其可通过肝素的分馏和 / 或限制性酶消化或化学消化获得, 且其具有优选的约 3000 ~ 约 7000 道尔顿的平均分子量 (Weitz1997supra)。

[0031] 本文所用术语“经修饰的 neurturin 蛋白产物”指包含共价连接的多元醇部分的经化学修饰的 neurturin 蛋白缀合物及由细胞表达的缀合物。

[0032] 本领域技术人员可通过本文公开方法的或通过本领域已知的任何方法制备经化学修饰的 neurturin 缀合物。

[0033] 本发明的 neurturin 缀合物的所述多元醇部分可为具有直链或支链的任何水性单或双功能聚 (亚烷基氧化物)。通常, 所述多元醇为聚 (亚烷基乙二醇), 如聚 (乙二醇) (PEG)。然而, 本领域的技术人员会认识到可适当的使用其他的多元醇, 如聚 (丙二醇) 及聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物。可通过缀合 neurturin 到水性聚合物来制备其他 neurturin 缀合物。所述聚合物的非限制性名单包括其他的聚环氧乙烷均聚物, 如聚丙二醇、聚氧乙烯化的多元醇、它们的共聚物和它们的嵌段共聚物。可使用有效的非抗原性材料 (如葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚乙烯醇、基于碳水化合物的聚合物等) 作为基于聚环氧乙烷的聚合物的替代物。

[0034] 所述蛋白缀合物也可在本领域熟知的原核或真核细胞中表达。

[0035] 所述术语“neurturin 缀合物”指包含共价连接到 neurturin 氨基酸的多元醇部分 (如聚乙二醇) 的 neurturin 蛋白产物。所述氨基酸在 N- 末端氨基酸或其他的任何氨基酸处可为位点特异性的。PEG 缀合物可包含共价连接到所述 neurturin 蛋白产物的任何适合位点的一个或多个 PEG 分子。

[0036] 本文互换使用的术语“neurturin 蛋白产物”、“neurturin 产物”、“neurturin 蛋白”或“neurturin”指与可导致有公布的 GenBank 登录号 NP_004549 (SEQ ID NO:1, 图 3) 的氨基酸序列的 neurturin 前体裂解的生物活性人 neurturin 产物或人 neurturin 前体本身有超过 70% 的、优选超过 80%、更优选超过 90% 和最优选超过 95% 的同一性的蛋白或肽、其变异体或衍生物。所述小鼠和人蛋白之间的同一性为约 91%, 且希望优选的哺乳动物 neurturin 蛋白有相似的高同一性。可依据标准方案 (例如, 通过使用 BLAST 算法) 确定 neurturin 产物与人 neurturin 蛋白或前体间的同一性百分比。当在长度为 100 个氨基酸中引入四个空位以协助所述比对, 优选在比较的序列中以相同氨基酸残基排列的较小的两个序列中发现的氨基酸残基百分比来计算同一性百分比。

[0037] 所用术语“直系同源物”指通过特化从共同的祖先基因进化而来的不同物种中的多肽。直系同源物在进化的过程中保留相同的功能。

[0038] 所述术语“聚乙二醇”或“PEG”指 PEG 本身和其衍生物。通常以甲氧基-PEG-OH(m-PEG) 使用所述聚合物 PEG, 其中一个末端为相对惰性的甲氧基基团, 而另一个末端为经化学修饰的羟基基团。支链的 PEG 也常用。分支臂 (m) 的数可在 3 ~ 100 或更多的范围内。羟基基团还经过化学修饰。如 PCT 专利申请 W096/21469 所述的另一个分支形式具有经化学修饰的单个末端。还有另一个分支形式具有沿着 PEG 骨架而非在 PEG 链末端的反应基团 (如羧基)。除了所述的 PEG 形式, 也可用骨架中的薄弱连接或可降解连接制备所述聚合物。例如, 在通过引用整体并入本文的美国专利申请 Ser. No. 06/026, 716 中 Harris 已说明可用经水解的聚合物骨架中的酯连接制备 PEG。所述水解可导致聚合物裂解成低分子量片段。所述环氧乙烷和环氧丙烷的共聚物在化学上与 PEG 密切相关, 且在它的许多应用中可使用其代替 PEG。

[0039] 所述术语“PEG 化”包含聚乙二醇分子共价附着到可为蛋白的基质上。蛋白的 PEG 化广为本领域所知且已由例如 Veronese, F. M., *Biomaterials* 22(2001)405-417 进行了综述。可使用不同的官能团和不同分子量的聚乙二醇、线性和分支 PEG 及不同的连接基团连接 PEG (也见 Francis, G. E., et al., *Int. J. Hematol.* 68(1998)1-18; Delgado, C., et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems* 9(1992)249-304)。

[0040] 可在水溶液中用如例如, 在 WO 00/44785 中所述的 PEG 化试剂, 优选使用分子量在 5 ~ 40kDa 之间的 NHS 激活的线性或分支 PEG 分子进行 PEG 化。也可依据 Lu, Y. et al., *Reactive Polymers* 22(1994)221-229 在固相中进行 PEG 化。

[0041] 依据 Felix, A. M., et al., *ACS Symp. Ser.* 680 (Poly(ethylene glycol)) (1997)218-238 可在 N-末端氨基酸处进行选择性的 PEG 化。在固相合成期间通过偶联 N-PEG 化氨基酸衍生物到所述肽链的 N-末端氨基酸可完成选择性的 N-末端 PEG 化。在固相合成期间通过偶联 N-PEG 化氨基酸衍生物到所述增长链可完成侧链的 PEG 化。可在如上所述的固相合成中或通过将活化的 PEG 试剂使用于氨基脱保护肽的液相合成来组合处理 N-末端 PEG 化和侧链 PEG 化。

[0042] 适合的 PEG 衍生物为具有优选的平均分子量为约 5 ~ 约 40kDa, 更优选为约 20 ~ 约 40kDa, 和最优选为约 30kDa 的活化的 PEG 分子。所述 PEG 衍生物可为线性或分支的 PEG。

[0043] 活化的 PEG 衍生物为本领域已知及在例如 Morpurgo, M., et al., *J. Bioconj. Chem.* 7(1996)363-368 中所述的 PEG-乙烯砜。直链和支链 PEG 类型适合于 PEG 化片段的制备。活性 PEG 试剂的例子为碘-乙酰-甲氧基-PEG 和甲氧基-PEG-乙烯砜。(m 优选从约 450 到约 900 的整数, 且 R 为线性或分支的、具有 1 ~ 6 个碳原子的低级烷基, 例如甲基、乙基、异丙基等, 其中优选甲基。

[0044] 本文所用术语“PEG”或“PEG 部分”旨在包括但不限于线性和分支的 PEG、甲氧基 PEG、水解或酶解的 PEG、悬挂式 PEG (pendant PEG)、树枝状 PEG、PEG 和一个或多个多元醇的共聚物、及 PEG 和 PLGA (聚(乳酸/乙醇酸)) 的共聚物。

[0045] 所述术语“PEG 化的 neurturin”或“通过“PEG 化”修饰的 neurturin”或“包含聚乙二醇部分的 neurturin 缀合物”指通过共价连接 PEG 部分形成所述 PEG 化蛋白的方法制备的 neurturin 蛋白产物。

[0046] 所述术语“药物可接受的载体、稀释剂和 / 或佐剂”指一种或多种药物和生理可接受的化合物 (例如赋形剂和辅助物), 其辅助将活性成分加工成可用于药物的制剂。可在

Remington's Pharmaceutical (Maack Publishing Co., Easton, Pa.) 的最新版中发现详细的情况。

[0047] 所述术语“未修饰的对照 neurturin 蛋白产物”指与相关的经修饰的 neurturin 蛋白产物来源相同的、作为对照使用的 neurturin 蛋白产物。

[0048] 本文所用术语“变异体”指相对于天然多肽,如下文进一步所述的含有一个或多个取代、添加、删除和 / 或插入的多核苷酸变异体。所述术语“变异体”也包含异种来源的同源多肽。通常而言, neurturin 变异体保留完全的、或其绝大比例的、或至少一部分的生物活性(例如,可使用如下所述的具体测定确定)。本文所用术语“变异体”也包含本领域熟知的、提供功能等效分子的 neurturin,其可通过取代、添加或删除改变蛋白序列来修饰。后者包括改变的序列,其中通过在序列内的残基取代功能等效的氨基酸残基导致了生物学沉默的交流。

[0049] 通过在编码多肽的 DNA 中引入适当的核苷酸变化或通过所需多肽的体外化学合成制备 neurturin 变异体。本领域技术人员应了解可使用删除、插入和取代获得显示 neurturin 生物活性的蛋白产物变异体。

[0050] 本领域技术人员熟知一个或多个选定氨基酸残基的所述删除、插入或突变的诱变技术(例如,美国专利 No. 4518584,其公开内容以引用的形式并入本文)。

[0051] 在一优选的实施方式中,在成熟的人 neurturin 中的氨基酸 47 ~ 69 之间,优选 51 ~ 65 之间(如图 3 所示的氨基酸 141 ~ 164 之间,优选 147 ~ 160 之间)的区域引入氨基酸的变化。所述氨基酸变化包含所述区域中至少一个精氨酸残基的删除或取代,例如精氨酸残基 51、52、54、56、57、58、60、61 和 / 或 65。优选精氨酸被中性或酸性氨基酸取代,例如甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸、天冬氨酸或谷氨酸。特别优选被谷氨酸取代,例如 R51E、R52E、R54E、R56E、R57E、R58E、R60E、R61E 和 R65E 或包含至少 2 个所述取代的 neurturin 变异体。

[0052] 另外和 / 或还可使用赖氨酸取代例如上文指定区域中的氨基酸残基,尤其是精氨酸残基以便于偶联多元醇部分。因为在成熟的人 neurturin 中没有赖氨酸,所述改变允许用多元醇部分进行位点特异性修饰。特别优选在上文指定区域中被赖氨酸取代,例如 R51K、R52K、R54K、R56K、R57K、R58K、R60K、R61K 和 R65K 或包含至少 2 个所述取代的 neurturin 变异体。

[0053] Neurturin 取代变异体具有移除人或小鼠 neurturin 氨基酸序列的至少一个氨基酸残基及在其位点中插入的不同残基。所述取代变异体包括等位基因变异体,其特征之处在于,可导致或不导致氨基酸变化的种群中自然发生的核苷酸序列变化。

[0054] 出人意料的是,本发明研究者发现,与包含无缀合 neurturin 的药物组合物相比,所公开的药物组合物具有其活性成分—所述缀合的 neurturin 和 / 或其生物活性片段的提高的生物利用度。本发明证明, neurturin 蛋白缀合多元醇(如 PEG)显著提高 neurturin 产物的血清半衰期和生物利用度。如果采用皮下注射, neurturin 产物的生物利用度的提高可反过来降低注射位点处所述制剂的积累或加工,且以这种方式提高局部的耐受性。

[0055] 本发明提供了用与未修饰的对照 neurturin 相比低许多的剂量对患者使用本发明的 neurturin 缀合物的方法以具有治疗效果。这与“用户友好蛋白疗法”的需要相符,且也可导致生产活性剂和 / 或药物组合物的较低成本。

[0056] 与未修饰的 neurturin 相比,本发明的 neurturin 缀合物在水溶液中也有更高的

溶解性,这可导致活性剂配制的简化。

[0057] 作为进一步的优势,缀合多元醇(如 PEG)到 neurturin 可降低对于 neurturin 的免疫原性,及因此形成的中和抗体或抗活性剂的过敏反应。

[0058] 优选,本发明的 neurturin 蛋白产物为人 neurturin 或其生物活性片段。优选经重组技术制备 neurturin 蛋白产物,因为所述方法能达到高纯度蛋白的高产量且不限于在细菌、植物、哺乳动物或昆虫细胞系统中表达的产品。

[0059] 重组 neurturin 蛋白产物包括蛋白的糖基化形式和非糖基化形式。一般而言,重组技术包括分离编码 neurturin 蛋白产物的基因、在合适的载体和/或细胞类型中克隆所述基因、根据需要修饰所述基因以编码所需的变异体,并表达所述基因以制备 neurturin 蛋白产物。

[0060] 另外,编码所需 neurturin 产物的核苷酸序列可为化学合成的。希望可使用由遗传密码变性或等位基因的变异或改变所致的在密码子使用上不同的核苷酸序列表达 neurturin 产物,以便于用选定细胞制备所述蛋白产物。

[0061] Kotzbauer et al., Nature 384:467-470 描述了小鼠 neurturin 蛋白的 cDNA 和氨基酸序列及人 neurturin 蛋白的 cDNA 和氨基酸序列,在本文中以 SEQ ID NO:1 识别。

[0062] 可通过各种方法分离或制备依据本发明的 neurturin 产物。在专利申请 W097/08196 中描述了用于制备 neurturin 产物的例示方法,其以引用的形式并入本文。在此也描述了用于 neurturin 蛋白表达的各种载体、宿主细胞和培养物生长条件及合成 neurturin 蛋白产物变异体的方法。在专利 No. EP 0 423 980 公开了适于在大肠杆菌中表达 neurturin 蛋白的其他载体,其公开内容以引用的形式并入本文。

[0063] 蛋白 neurturin 的生物活性形式为二硫键连接的二聚体,其可通过纯化的 neurturin 的分子量确定。在细菌系统中表达后提取的物质实质上无生物活性,并以单体的形式存在。重折叠是必需的以制备有生物活性的二硫键连接的二聚体。用于细菌系统中表达的 neurturin 的重折叠和成熟的适当方法与在 W0 93/06116 中所述的基本相似。用于测定 neurturin 活性的标准体外测定与在 W0 93/06116 和美国专利申请 No. 08/535,681 中所述的测定 GDNF 活性的测定也基本相似,且其以引用的形式并入本文。

[0064] 将惰性、无毒、高降解性的聚合物—聚乙二醇(PEG)(也称作聚氧化乙烯(PEO))共价连接到 neurturin 在生物技术和医药上有重要的应用。Neurturin 的 PEG 化导致了导致持久的持续时间的改良的药物代谢动力学,提高了安全性(例如较低的毒性、免疫原性和抗原性)、提高疗效、降低用药次数、提高药物溶解度和稳定性、降低蛋白分解作用、及便于控制药物释放。

[0065] 本发明涉及经酰基或烷基连接连接到至少一个聚乙二醇分子的 neurturin 蛋白产物(例如原核表达 neurturin 的衍生物)或其变异体的使用,及连接到一个或多个的聚乙二醇分子的 neurturin 或其变异体的使用。可通过本领域已知的任何 PEG 化反应进行 PEG 化。见,例如 Focus on Growth Factors, 3(2):4-10, 1992; EP 0 154 316, 其公开内容以引用的形式并入本文; EP 0 401 384; 和本文引用的与 PEG 化相关的其他刊物。

[0066] 与不含有 PEG 化的 neurturin 的药物组合物相比,本发明的药物组合物在哺乳动物中(例如在人中)具有提高的活性成分的生物利用度(见图 2)。所述 PEG 化的 neurturin 优选以在活性成分的生物利用度上提供至少 2 倍的,优选至少 5 倍的并更优选至少 10 倍的

提高的量存在。

[0067] 可通过本申请的实施例所示确定生物利用度的提高。更具体而言,将含有指定量或剂量的活性成分的组合与含有相同剂量但未 PEG 化的活性成分的药物组合物进行比较。在皮下施用给实验动物(例如,小鼠)后可从血浆浓度确定两种组合物的生物利用度。优选,经至少 120 分钟,优选 240 分钟且最优选 24 小时的时间段后测量所述血浆浓度(见图 2)。

[0068] 可使本发明的药物组合物适应于通过任何有效途径的施用,例如通过口腔、鼻腔、直肠、肺、局部、透皮或肠外途径的施用。因此,所述组合物可为固体或液体组合物,例如片剂、胶囊、粉末、乳膏、凝胶剂、软膏、溶液、乳液、悬浮液、冷冻干燥物等。但优选通过注射或输液施用所述组合物,更优选通过注射,例如通过皮下或静脉注射。所述药物组合物优选水溶液。

[0069] 除所述活性成分和可选择低分子量物质(如阴离子聚合物)之外,所述药物组合物可包含药物可接受的载体、稀释剂和/或佐剂,例如缓冲液、张力调节剂、稳定剂、填充剂、崩解剂、增稠剂等。

[0070] 所述药物组合物包含治疗有效量或剂量的活性成分。所述治疗有效剂量依赖于活性成分的类型、待治疗疾病的类型和种类及施用的类型。对于含有 neurturin 作为活性成分的肠外组合物来说,所述治疗有效剂量优选在约 0.001mg/天~500mg/天的范围内,更优选从约 0.05mg/天~约 100mg/天,最优选从约 0.01mg/天~约 5mg/天。

[0071] 优选将所述组合物施用给哺乳动物,尤其是人。因此,所述组合物适合于人用和兽用药品。所述组合物尤其适合于神经退行性疾病或胰腺疾病的预防和/或治疗,尤其是胰腺自身免疫性疾病(如 I 型糖尿病和 LADA、或 II 型糖尿病)。

[0072] 可通过本领域技术人员已知的任何适当方法,优选肠内或肠外或局部直接给胰腺施用本文所述的 neurturin 缀合物。可依据体重、体表面积或器官大小的因素计算具体的剂量。本领域技术人员常规进行确定涉及上述各组合物的用于治疗的适当剂量所需的计算的进一步优化,且其在常规进行的任务的范围内。可通过将建立确定所利用剂量的测定与适当的剂量响应性数据结合使用来确定适当的剂量。将由主治医师考虑改变药物作用的各种因素(例如患者的年龄、健康状况、体重、性别和饮食,任意感染的严重性,施用时间及其他临床因素)确定涉及用于治疗上述适应症的方法的最终给药方案。随着研究的进行,与治疗各种疾病的适当剂量水平有关的进一步信息将出现。

[0073] 预见本文所述的 neurturin 缀合物的连续施用或持续给药对特定的治疗而言是有优势的。虽然经机械手段(例如用输液泵)可完成连续的施用,希望也可实施其他连续或几乎连续施用的方式。例如,化学衍生或包裹导致了蛋白的缓释形式,其具有以基于确定的给药方案的预计量持续存在的效果。因此,neurturin 蛋白产物包括衍生的或以另外方式制备的蛋白以完成所述连续施用。

[0074] 在一进一步优选的实施方式中,可将 neurturin 缀合物直接递送给祖细胞(例如干细胞)以在体外或在体内刺激胰岛素产生细胞的分化。在本发明的实施方式中,可优选以 0.1ng/ml~500ng/ml 之间,更优选 1ng/ml~100ng/ml 之间,甚至更优选 20~80ng/ml 之间且最优选 50ng/ml 的浓度添加 neurturin 缀合物。

[0075] 可以单独治疗或与其他药物制剂的联合治疗使用本文所公开的 neurturin 缀合

物。例如,可与适合用于治疗或预防胰腺疾病和 / 或肥胖症和 / 或代谢综合征的其他药物制剂一起,尤其可与适合用于刺激和 / 或诱导祖细胞分化为胰岛素产生细胞的其他药物制剂一起施用。另外,可与具有免疫抑制活性的药物制剂一起使用,例如,在 W02005/51415 中公布的抗体、多肽和 / 或肽或非肽低分子量物质。

[0076] 与野生型人 neurturin 相比,本发明的另一实施方式为包含至少一个氨基酸(例如 1、2、3 或 4 个氨基酸)变化的人 neurturin 变异体。如上详述,相对于天然的人 neurturin,人 neurturin 变异体可包含一个或多个取代、添加、删除和 / 或插入。可如上所述制备 neurturin 变异体。

[0077] 在一优选的实施方式中,在成熟的人 neurturin 的氨基酸 47 ~ 69 之间,优选 51 ~ 65 之间(如图 3 所示的氨基酸 141 ~ 164 之间,优选 147 ~ 160 之间)的区域出现氨基酸的变化。所述氨基酸变化包含所述区域中至少一个精氨酸残基的删除或取代,例如精氨酸残基 51、52、54、56、57、58、60、61 和 / 或 65。优选精氨酸被中性或酸性氨基酸取代,例如甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸、天冬氨酸或谷氨酸。特别优选被谷氨酸取代,例如 R51E、R52E、R54E、R56E、R57E、R58E、R60E、R61E 和 R65E 或包含至少 2 个所述取代的 neurturin 变异体。

[0078] 也优选人 neurturin 的变异体,其中另外和 / 或还可用赖氨酸取代上文指定区域中的氨基酸残基,尤其是精氨酸残基,从而便于所述 neurturin 变异体位点特异性缀合到多元醇基团。特别优选在上文指定区域中被赖氨酸取代,例如 R51K、R52K、R54K、R56K、R57K、R58K、R60K、R61K 和 R65K 或包含至少 2 个所述取代的 neurturin 变异体。

[0079] 本发明的 Neurturin 取代变异体移除人 neurturin 氨基酸序列的至少一个氨基酸残基,及在其位点中插入的不同残基。所述取代变异体包括等位基因变异体,其特征在于是,可导致或不导致氨基酸变化的种群中自然发生的核苷酸序列变化。

[0080] 本发明进一步提供了对有需要的受试者施用药物组合物的方法,其中所述组合物包含药物活性量或剂量的:缀合至少一个多元醇(如 PEG)的至少一种 neurturin 蛋白产物或所述缀合的 neurturin 的生物活性片段作为活性成分,及药物可接受的载体、稀释剂和 / 或佐剂。

[0081] 本发明甚至进一步提供了对有需要的受试者施用药物组合物的方法,其中所述组合物包含药物活性量或剂量的:至少一种经修饰的 neurturin 蛋白产物或其生物活性片段作为活性成分,及低分子量物质,及药物可接受的载体、稀释剂和 / 或佐剂。

[0082] 附图简述

[0083] 下列附图和实施例说明本发明且其为如下述要求保护的本发明的非限制性实施方式。基于下列附图说明的因素本发明的许多其他方面和优势对本领域技术人员而言是显而易见的。

[0084] 图 1:细胞培养物中的 PEG 化的 neurturin 的生物活性

[0085] 所述报告细胞系经受了递增浓度的 neurturin 或用 PEG 缀合的 neurturin(PEG 化的 neurturin)。针对所测试制剂的最终浓度(在 x 轴上以 ng/ml 表示,图 1A 和 1B)标绘所得的报告基因活性(在 y 轴上以相对光单位(RLU)表示)。使用两组单独制备的未修饰的 neurturin 作为实验对照(PeproTech;Lot0805112 和 Lot0106112),并将它们的相对活性与三种 PEG 化缀合物(单-mPEG-NHS-neurturin、单-mPEG-CHO-neurturin 和单-CES0310-neurturin)相比较。给定的值为至少 3 个孔的平均值 $\pm$ S.D。所述不

同测试计算出的 EC_{50} 为 :Neurturin(Lot0805112, 未修饰的蛋白) : $EC_{50} = 2.2\text{ng/ml}$, neurturin(Lot0106112, 未修饰的蛋白) : $EC_{50} = 1.2\text{ng/ml}$, 单 -CES0310-neurturin : $EC_{50} = 12\text{ng/ml}$ (图 1A), 及 neurturin(Lot0106112, 未修饰的蛋白) : $EC_{50} = 3.8\text{ng/ml}$, 单 -mPEG-NHS-neurturin : $EC_{50} = 9.7\text{ng/ml}$, 和 单 -mPEG-CHO-neurturin : $EC_{50} = 7.4\text{ng/ml}$ (图 1B)。

[0086] 图 2 :在小鼠中皮下施用测试制剂后的药物代谢动力学 (PK) 研究

[0087] 图 2A 和 2B 示在给小鼠施用 0.050mg/kg BW (图 2A) 或 0.50mg/kg BW (图 2B) 的 neurturin 或 PEG 化的 neurturin 后在不同时间点以 ng/ml 表示的 neurturin 血浆浓度。通过 neurturin ELISA 测定确定所得的血浆水平。时间点 0 显示用 ELISA 测定的小鼠血清中 neurturin 的平均背景信号。由从未处理小鼠的 12 份血清 (图 2A) 或 11 份血清 (图 2B) 单独测量的值计算背景值。其他的示值为从三个动物测量的血清水平的平均值 $\pm S.D.$ 。图 2A 示源于两个单独实验 (单 -NHS-neurturin_Exp. 1 和 -_Exp. 2) 的 neurturin 缀合物单 -NHS-neurturin 的 PK 数据。图 2B 示源自另一个实验的数据, 其中用 0.50mg/kg BW 单 -NHS-neurturin 处理小鼠。

[0088] 就覆盖全部所测时间点的曲线下面积 (AUC) 分析而言, 设置所述基准为 0.6ng/ml (在时间点 0 处的平均背景值) :Neurturin 未修饰的蛋白 : $18.8\text{ng}\cdot\text{min/ml}$, 单 -mPEG-NHS-neurturin_Exp1 : $409\text{ng}\cdot\text{min/ml}$, 单 -mPEG-NHS-neurturin_Exp2 : $918\text{ng}\cdot\text{min/ml}$, 单 -CES0310-neurturin : $EC_{50} = 142\text{ng}\cdot\text{min/ml}$ (图 2A), 及 neurturin 未修饰的蛋白 : $324\text{ng}\cdot\text{min/ml}$, 单 -mPEG-NHS-neurturin : $1157\text{ng}\cdot\text{min/ml}$, 和 单 -mPEG-CHO-neurturin : $845\text{ng}\cdot\text{min/ml}$ (图 2B)。

[0089] 就 neurturin 血清水平的曲线下面积 (AUC) 分析 (图 2A 和 2B) 而言, 设置所述基准为 0.6ng/ml neurturin, 其对应在未处理小鼠血清中确定的平均背景水平。

[0090] 图 3

[0091] 由美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 公布了人 neurturin 前体的蛋白序列 (登录号 :NP_004549)。用粗体标出了对应于生物及药物活性形式的成熟蛋白的序列。

[0092] 图 4

[0093] 图 4A :人 neurturin 和突变的 neurturin 变异体的表达。对浓缩的表达 neurturin 和 neurturin 变异体的 HEK-293 细胞的上清液进行 Native-PAGE/Western-blot (依据成熟人 neurturin 的序列进行位置的编号, R :精氨酸, E :谷氨酸)。

[0094] 图 4B Neurturin ELISA :使用由大肠杆菌表达的人重组 neurturin 的代表性的标准曲线。

[0095] 图 5 :Neurturin 的生物活性的定量

[0096] 图 5A 细胞的 neurturin 生物活性测定 :由大肠杆菌中递增浓度的外源性人重组 neurturin 组合递增血清浓度刺激的酪氨酸羟化酶报告基因活性。

[0097] 图 5B Neurturin 变异体的生物活性 (n. d. :未检测)

[0098] 图 6 :不同脊椎动物物种的 neurturin 序列的比对

[0099] 示成熟人 neurturin 的氨基酸 47 ~ 69 (依据成熟人 neurturin 肽的序列进行位置的编号, genbank 登录号 NP_004549, 成熟肽氨基酸 96 ~ 197)。不同于人 neurturin 的氨基酸变异以粗体和下划线标出 (GenBank 登录号在括号内)。

[0100] 图 7:neurturin 表达构建体的 DNA 序列:Kr-G3-H6-G3-Xa-rhneurturin(wt)

[0101] 将 Kr-G3-H6-G3-Xa-rhneurturin(wt) 克隆进 pMA 载体。将限制性内切酶位点和所得的编码区的氨基酸序列与正义链和反义链的 DNA 序列一起显示。

[0102] 图 8:抗 neurturin 抗体 ELISA

[0103] 抗 neurturin 抗体 ELISA:左侧:使用抗 neurturin IgG 的标准曲线,右侧:使用抗 neurturin IgG/IgM 的标准曲线。

[0104] 应注意讨论了本发明的一个或多个方面的所有优选的实施方式也涉及所有其他的方面。

[0105] 说明了本发明的多用途,但其不限于下列实施例。

实施例

[0106] 实施例 1:neurturin 的 PEG 化

[0107] 通过称为 PEG 化的方法将聚乙二醇基团 (PEG) 缀合到 neurturin 上。所述技术广泛用于治疗蛋白的修饰且对任何本领域的技术人员而言所述方案是熟悉的。在本发明中,通过连接单个 PEG 分子到同型二聚体两个亚基中的一个的 N-末端氨基酸上来制备单 PEG 化的 neurturin 缀合物。制备了两个不同的单 PEG 化的 neurturin 缀合物,其在所连接 PEG 的大小和结构及缀合所述 PEG 到所述蛋白的制备方法上不同。使用约 5kDa 的线性 PEG 试剂 (mPEG-succinimidyl succinat;NOF, Japan) 制备本文以“单-mPEG-NHS-neurturin”公开的缀合物。所谓“NHS 法”为可溶性蛋白 PEG 化的最常用方法。另外,使用 5kDa 的线性聚乙二醇丁醛 (Nektar, 082M0H01) 以生成以“单-mPEG-CHO-neurturin”公开的缀合物。在特定的实验条件下,NHS 酯或 NHS 醛与蛋白和肽的游离氨基基团有效地反应。在以“单-CES0310-neurturin”公开的另一个缀合物中,使用现有技术已知的 PEG 化方法将 neurturin 同型二聚体的一条链上的 N-末端氨基酸缀合到约 5kDa 的有六分支臂的 PEG 上(见,例如但不限于 DE 2005 100 04157.0、EP 1 631 545 A2;WO 04/108634;WO 07/025763;CA2528667)。Neurturin 不含有赖氨酸残基,因此希望上述的 PEG 化反应主要导致了经 neurturin 同型二聚体的 N-末端氨基酸的反应氨基基团的 N-末端 PEG 化。使用本领域任何技术人员已知的标准生物化学方法确认 PEG 化产品的质量(大小和纯度)。

[0108] 实施例 2:PEG 化的 neurturin 缀合物或其变异体的生物活性

[0109] 使用基于细胞的报告物测定评估了所述 neurturin 缀合物的生物活性。确定 neurturin 缀合物或其 PEG 化缀合物能多强地激活在表面表达 neurturin 受体的细胞系中的报告基因构建体。在测定中发现相对于未修饰的 neurturin,两种 PEG 化的 neurturin 缀合物的活性降低了 3~10 倍(图 1A 和 1B)。

[0110] 用 neurturin 报告基因构建体稳定转染在细胞表面表达 neurturin 受体的人成神经细胞瘤细胞系 TGW(JCRB0618)。所述报告基因构建体包含荧光素酶基因,其在其他的调控元件之间且受重复的血清应答元件(SRE)的转录控制。在所述细胞中,应答 MAPK 通路的激活(例如通过 neurturin 结合到其表面受体)以刺激荧光素酶的表达。在 96 孔板中进行所述测定。通过添加荧光素底物到孔中,并在分析读数器上(Molecular Devices)以发光模式运行以进行读取来测量荧光素酶活性。

[0111] 实施例 3:PEG 化的 neurturin 缀合物或其变异体的提高的生物利用度

[0112] 利用在小鼠中的 PK 研究评估 PEG 化的 neurturin 缀合物的相对生物利用度 (图 2A 和 2B)。在所述实验中,皮下注射所述蛋白到小鼠的颈部区域。随后,在递送所述蛋白后在规定的时点使用特定的 neurturin ELISA 测定确定 neurturin 的血清浓度 (图 2A 和 2B)。如使用未经 neurturin 处理的小鼠的血清进行检测 (0 值点),在小鼠血清存在下所述 neurturin ELISA 测定的灵敏性为相对的高背景信号所限。在进行 0.050mg/kg 体重 (BW) 的未修饰的 neurturin 的注射后,在任何时间点都未发现 neurturin 血清水平显著超过所述背景水平。相反,当使用相同量的 PEG 化的 neurturin 时,无关 PEG 修饰的种类,都可检测到注射蛋白血清水平的显著提高 (图 2A)。当将未修饰的 neurturin 的注射量提高 10 倍 (0.5mg/kg BW) 时可在时间点 60、90、120 和 180 分钟时在血清中明显检测出所述蛋白 (图 2B)。使用 T 检验及计算的 p 值 < 0.05 确认观察的显著性。另外,以 0.5mg/kg BW 剂量给定的 PEG 化的 neurturin 衍生物的血清水平比未修饰的蛋白高几倍 (图 2A 和 2B)。

[0113] 相对于未修饰的 neurturin,本文所示的 neurturin 缀合物始终体现出较高的血清水平。总之,neurturin 的 PEG 化显著提高了 neurturin 的生物利用度。

[0114] 实施例 4:Neurturin 变异体

[0115] 通过基于 PCR 的定点诱变用酸性的谷氨酸残基取代位于 neurturin 的碱性插入区 (patch) 内 (成熟蛋白的氨基酸 51 ~ 65) 的碱性精氨酸残基。简言之,通过基于 PCR 的诱变并使用不匹配的引物引入所需突变:R51E、R52E、R54E、R56E、R57E、R58E、R60E、R61E、R63E 或 R65E (依据成熟人 neurturin 肽的序列进行位置的编号,GenBank 登录号 NP_004549,成熟肽氨基酸 96 ~ 197,在图 3 中也显示所述序列,R:精氨酸,E:谷氨酸) 以修饰具有额外的 N-末端真核分泌信号肽的成熟人 neurturin 的编码序列。

[0116] 纯化所得质粒,并通过测序检查编码序列的正确性。经侧翼的 HindIII 和 XhoI 克隆位点将所述编码序列克隆进 pCDNA3.1+ 质粒 (Invitrogen Cat.No. V790 ~ 20) 以用于真核表达。

[0117] 在每一个 175cm² 组织培养皿上的用 25ml 培养基培养的 HEK-293 细胞中瞬时转染所述载体及作为转染对照的空对照载体和 GFP 表达载体以用于真核表达。在转染后 48 小时进行每一个培养基的收集,并通过使用超滤柱浓缩培养基上清液至约 0.4ml。

[0118] 使用用于检测的 neurturin 特异性抗体通过 native-PAGE/Western-blot 首次控制了 wt 人 neurturin 和突变的变异体的表达 (见图 4)。使用在大肠杆菌中表达的人重组 neurturin 作为对照。

[0119] 图 4A 示人野生型 neurturin (wt) 及除 R63E 外的所有经修饰的 neurturin 变异体以相似量表达。与 wt neurturin 相似,所述 neurturin 变异体的表观质量在 20 ~ 25kDa 之间的范围内。

[0120] 通过 neurturin 特异性 ELISA 确定表达的 neurturin 的产量。简言之,在微孔上包被兔抗 neurturin 抗体以用于从含有 neurturin 的浓缩培养基上清捕获 neurturin。在洗涤后,使用缀合生物素的羊抗 neurturin 抗体,再使用缀合过氧化物酶的链霉亲和素,通过发光读出器定量捕获的 neurturin。使用在大肠杆菌中表达的人重组 neurturin 建立标准曲线 (见图 4B)。

[0121] 此外,用特定的细胞测定定量表达的 neurturin 变异体的生物活性。所述测定原理基于 Tanaka et al., 2002, 2003 的实验 (Tanaka M, Xiao H, Kiuchi K. Heparin

facilitates glial cell line-derived neurotrophic factor signal transduction. *Neuroreport*. 2002 Oct 28;13(15):1913-6; Tanaka M, Xiao H, Hirata Y, Kiuchi K. A rapid assay for glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin based on transfection of cells with tyrosine hydroxylase promoter-luciferase construct. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2003 May;11(2):119-22.), 显示了通过 neurturin 在人 TGW 成神经细胞瘤细胞系中稳定表达对酪氨酸羟化酶 (TH) 报告基因构建体进行的诱导。简言之,用含有 neurturin 的样品处理过表达酪氨酸羟化酶 (TH) 报告基因构建体的 TGW 细胞导致了由 neurturin 信号转导 MAPK 通路的诱导。所述报告基因构建体包含受重复的血清应答元件 (SRE) 控制的荧光素酶基因。荧光素酶的表达依赖于 MAPK 通路的激活。在 96 孔板中进行所述测定。通过荧光素的添加并用发光读出器分析来测量 neurturin 介导的荧光素酶的表达。

[0122] 显示使用在大肠杆菌中表达的人重组 neurturin 作为标准并与递增的血清浓度组合定量 neurturin 的生物活性的代表性实验示于图 5A。

[0123] 图 5B 示野生型重组人 neurturin 及除 R63E 外的所有 neurturin 变异体以相似量表达,导致了 1.2 ~ 1.7g/l 之间的所述蛋白浓度,且与具有 0.32 ~ 0.89ng/ml 之间的 EC_{50} 的野生型重组人 neurturin 相比,所有表达的变异体在体外显示了相似的生物活性 (见图 5B)。用于比较的大肠杆菌中的人重组 neurturin 显示了可能由样品中一部分未正确折叠的 neurturin 的导致的 EC_{50} 为 2.20ng/ml 的较弱的效力 (见图 5B)。

[0124] 因此,图 5 显示了在 neurturin “踵”(heel) 区的修饰 (例如将带负电荷的酸性氨基酸引入到碱性插入区中) 通常不损害 neurturin 的生物活性。出人意料的是现有技术显示在“踵”(heel) 区的从碱性氨基酸到酸性氨基酸的修饰干扰 neurturin 的生物活性 (见如上所述的与其他的 GFL 的序列和结构比较)。

[0125] 表达 neurturin 变异体 R63E 的失败显示在所述位置从精氨酸到谷氨酸的变化是不容许的。然而,不导致氨基酸电荷完全改变的其他修饰是功能性的。已知的 neurturin 同源物的序列比较显示 R63E 变异体存在于鸭嘴兽 (*Ornithorhynchus anatinus*)、短尾獭 (*Monodelphis domestica*) 和原鸡 (*Gallus gallus*) 的人 neurturin 同源物中。在位置 52、57、58 和 61 处的精氨酸残基的天然变异体也存在于不同的 neurturin 同源物中 (见图 6)。

[0126] 研究者用赖氨酸取代在“踵”(heel) 区的碱性精氨酸以建立具有提高的生物利用度的生物活性 neurturin 变异体。因为精氨酸和赖氨酸在结构上是相关的,预计所述交换仅最小限度的影响 neurturin 分子的结构。所述改变能经所示蛋白的区域中的赖氨酸侧链的伯胺进行 neurturin 的位点特异性的定向 PEG 化以容许氨基酸实质上改变,因此其对生物活性不重要。因为在成熟的天然人 neurturin 序列中不存在赖氨酸,所述反应为高特异性的。通过优化反应条件 (例如 pH、温度和反应时间) 使活化的 PEG 与其他胺的反应最小化。通过在“踵”(heel) 区的碱性插入区内安排 PEG 修饰达到了两个目的:(i) 在最小化对蛋白活性的影响的同时,可获得蛋白 PEG 化的益处 (经降低的肾清除、降低的免疫原性、提高的蛋白稳定性而提高的生物利用度)。(ii) 预计所述区域的 PEG 化可通过防止与带有负电荷的细胞表面蛋白聚糖的相互作用来保护碱性插入区,也预计其可提高蛋白的生物利用度。

[0127] 在第一步中,可通过基于 PCR 的定点诱变修饰成熟人 neurturin 的编码序列,优化

了所述序列的人密码子的使用（具有用于真核分泌的额外的 N-末端信号肽）和额外的纯化标签（具有因子 Xa 裂解所述纯化标签的额外位点的六个重复的组氨酸残基）。在此，将在精氨酸残基 51、52、54、56、57、58、60、61、63 或 65 处的密码子与赖氨酸残基的密码子互换。

[0128] 在本发明所得的称为 Kr-G3-H6-G3-Xa-rhneurturin 的表达构建体包括下列特征：

[0129] ● Kr：小鼠的含有 kringle 的跨膜蛋白 2 的 DNA 序列、氨基酸 1～26、以人密码子使用（氨基酸序列：MGTPHLQGFLLLFPLLLRLHGASAGS；SEQ ID NO：2）优化的用于细胞质分泌的信号肽（GenBank 登录号 NP_082692）。

[0130] ● G3：以人密码子使用（氨基酸序列：GGG；SEQ ID NO：3）优化的甘氨酸间隔区的 DNA 序列。

[0131] ● H6：以人密码子使用（氨基酸序列：HHHHHH；SEQ ID NO：4）优化的用于纯化目的的 6 个组氨酸标签的 DNA 序列。

[0132] ● Xa：以人密码子使用（氨基酸序列：IEGR；SEQ ID NO：5）优化的因子 Xa 蛋白酶识别位点的 DNA 序列。因子 Xa 蛋白酶切割精氨酸后的 C-末端。

[0133] ● rhneurturin：以人密码子使用（氨基酸序列：ARLGARPCGLRELEVRVSELGLGYAS DETVLFYRCAGACEAAARVYDLGLRRLRQRRRLRRERVRAQPCCRPTAYEDEVSFLDAHSRYHTVHEL SARECACV；SEQ ID NO：6）优化的成熟的重组人 neurturin 的 DNA 序列。在各自的 neurturin 变异体表达构建体中通过赖氨酸密码子 AAG 取代在位置 51、52、54、56、57、58、60、61、63 或 65 处的单个精氨酸密码子。

[0134] 在图 7 中示克隆进 pMA 载体的 Kr-G3-H6-G3-Xa-rhneurturin(wt) 的完整 DNA 序列；SEQ ID NO：7。

[0135] 实施例 5：neurturin 变异体的 PEG 化

[0136] 将所得构建体克隆进原核表达载体 pcDNA3.1+ 中，将其转染进 HEK-293 细胞以用于如上所述经修饰的 neurturin 变异体的表达。

[0137] 通过引入纯化标签的方法由超滤和由亲和层析纯化表达的 neurturin 变异体。

[0138] 通过如上所述的 native-PAGE/Western-blot 和 neurturin 活性测定检查所得的 neurturin 变异体制剂的结构、纯度和生物活性。

[0139] 将以足够产量表达和以可接受的纯度纯化的生物活性 neurturin 变异体用于用不同的单分散 PEG 的共价修饰。所述 PEG 优选 2.5～30kDa 的大小，为线性或分支的，且用 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）酯激活。N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）酯自发地与伯胺发生反应提供了蛋白的有效 PEG 化。其他的 PEG 衍生物例如但不限于不同大小的分子、非单分散分子，或具有不同的分支样式的分子，且也可使用缀合化学。

[0140] 在反应后，在引入的蛋白酶位点通过因子 Xa 裂解纯化标签，并通过大小排除和/或亲和层析纯化 PEG-neurturin 变异体。

[0141] 本领域熟知大量其他的纯化标签和蛋白酶位点/重组蛋白酶组合，并可替换所述 His 标签和/或因子 Xa 位点/因子 Xa 裂解点。另外，可从无纯化标签的真核表达系统的上清或者过表达细菌的上清或裂解物通过色谱法纯化含有引入的 PEG 化位点的所述 neurturin 蛋白。

[0142] 通过如上所述的 SDS-PAGE/Western-blot、native-PAGE/Western-blot 和 neurturin 活性测定检查所得的 neurturin 变异体制剂的结构、纯度和生物活性。

[0143] 在皮下施用 $50 \mu\text{mol/kg}$ s.c 给小鼠或大鼠后,体内测定了在体外显示足够生物活性的纯化的 PEG-neurturin 变异体的药物代谢动力学表现。在施用后的基准处及 0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6 和 8 小时处通过 neurturin ELISA 确定血浆 neurturin 浓度。

[0144] 通过 6 天的、每天一次皮下施用 $50 \mu\text{mol/kg}$ 给 neo STZ 大鼠,测试了相比 wt neurturin 显示提高的生物利用度的选定 PEG-neurturin 变异体的体内效力。与媒质对照和 wt neurturin 组相比,每天测定血糖并在 6 天的处理后测定胰腺胰岛素含量以测定 β -细胞功能。

[0145] 实施例 6:PEG 化的 neurturin 的免疫原性潜力

[0146] 人重组 wt neurturin 具有免疫原性潜能,其通过在施用给成年小鼠超过 2 周后抗 neurturin 抗体的出现证明。用特定的测定检测抗 neurturin 抗体。简言之,在微平板上包被重组人 neurturin 以捕获血清抗体。在洗涤后,使用缀合生物素的山羊抗 IgG 抗体或山羊抗 IgG/IgM 抗体,再使用缀合过氧化物酶的链霉亲和素通过发光读出器定量捕获的抗 neurturin 抗体。使用在血清中稀释的抗 neurturin IgG 和抗 neurturin IgM 以建立标准曲线(见图 8)。

[0147] 因药理活性蛋白的 PEG 化降低了它们的免疫原性潜力,通过 28 天的、每天一次皮下施用 $50 \mu\text{mol/kg}$ 给成年小鼠,测试了具有提高的生物利用度和持续效力的选定 PEG-neurturin 变异体的免疫原性潜力。与媒质对照和 wt neurturin 组相比,每周通过抗 neurturin 抗体 ELISA 确定抗 neurturin 抗体的出现。

[0001]

序列表

<110> DeveloGen AG

<120> 用于药物用途的neurturin缀合物

<130> 41112P EP

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 197

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> 肽

<222> (1).. (197)

<223> 人neurturin前体

<400> 1

Met	Gln	Arg	Trp	Lys	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Ser	Val	Leu	Cys	Ser	Ser
1				5				10					15		

Val	Leu	Ser	Ile	Trp	Met	Cys	Arg	Glu	Gly	Leu	Leu	Leu	Ser	His	Arg
			20					25					30		

Leu	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Pro	Leu	His	Arg	Leu	Pro	Arg	Thr	Leu	Asp
		35					40					45			

Ala	Arg	Ile	Ala	Arg	Leu	Ala	Gln	Tyr	Arg	Ala	Leu	Leu	Gln	Gly	Ala
		50				55					60				

Pro	Asp	Ala	Met	Glu	Leu	Arg	Glu	Leu	Thr	Pro	Trp	Ala	Gly	Arg	Pro
65					70					75				80	

Pro	Gly	Pro	Arg	Arg	Arg	Ala	Gly	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Ala	Arg	Ala
				85					90					95	

Arg	Leu	Gly	Ala	Arg	Pro	Cys	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Glu	Val	Arg	Val
			100					105						110	

Ser	Glu	Leu	Gly	Leu	Gly	Tyr	Ala	Ser	Asp	Glu	Thr	Val	Leu	Phe	Arg
		115					120						125		

Tyr	Cys	Ala	Gly	Ala	Cys	Glu	Ala	Ala	Ala	Arg	Val	Tyr	Asp	Leu	Gly
		130					135						140		

Leu	Arg	Arg	Leu	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg	Leu	Arg	Arg	Glu	Arg	Val	Arg
					150					155					160

Ala	Gln	Pro	Cys	Cys	Arg	Pro	Thr	Ala	Tyr	Glu	Asp	Glu	Val	Ser	Phe
			165						170					175	

Leu	Asp	Ala	His	Ser	Arg	Tyr	His	Thr	Val	His	Glu	Leu	Ser	Ala	Arg
				180					185					190	

Glu	Cys	Ala	Cys	Val
				195

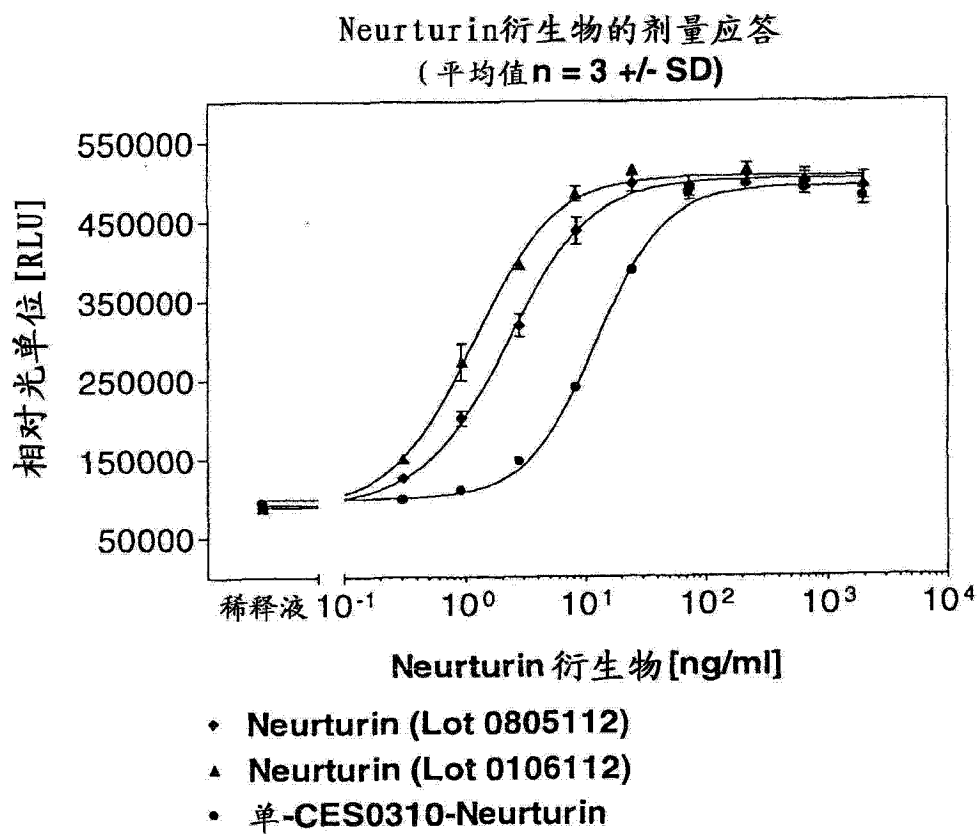


图 1A

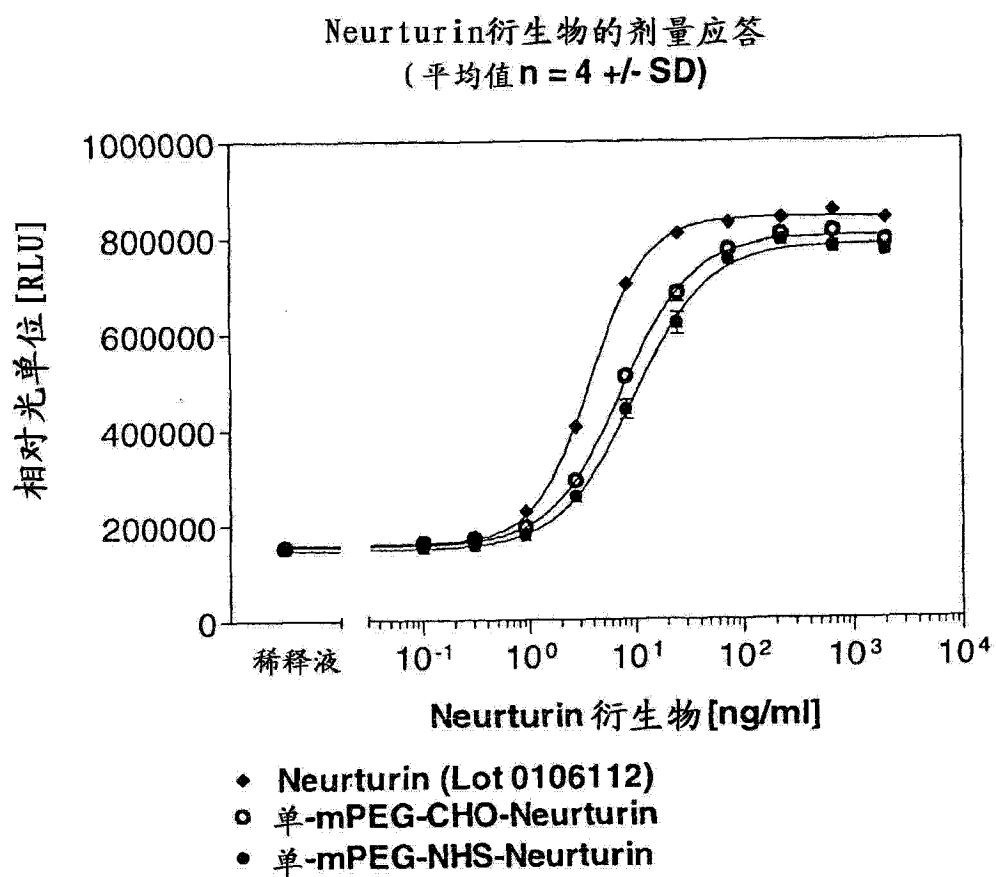


图 1B

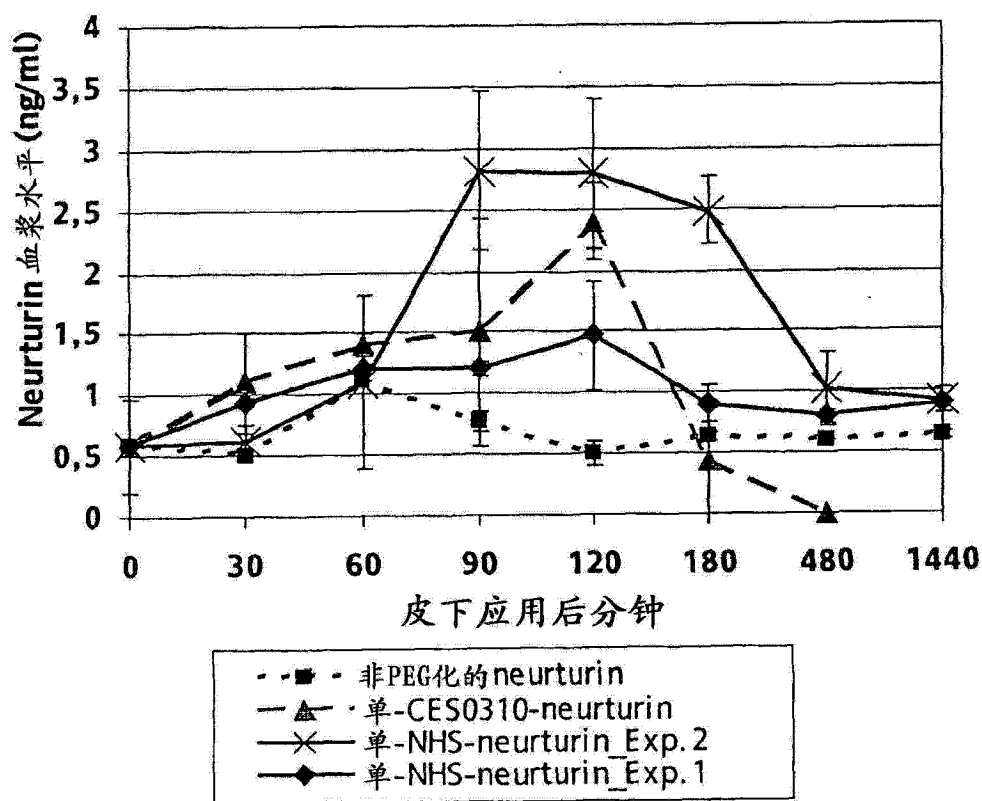


图 2A

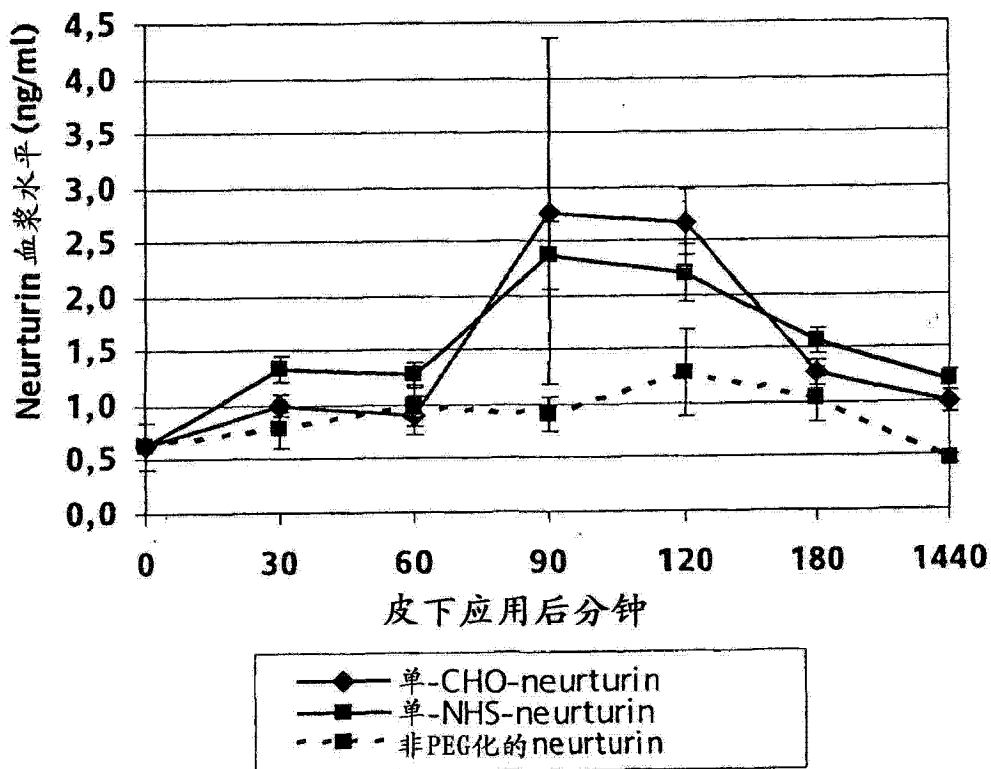


图 2B

MQRWKAAALA SVLCSSVLSI WMCREGLLLS HRLGPALVPL HRLPRTLDA
 IARLAQYRAL LQGAPDAMEL RELTPWAGRP PGPRRRAGPR RRRARARLGA
 RPCGLRELEV RVSELGLGYA SDETVLFRYC AGACEAAARV YDLGLRRLRQ
 RRRLRRERVR AQPCCRPTAY EDEVSFLDAH SRYHTVHEL S ARECACV

图 3

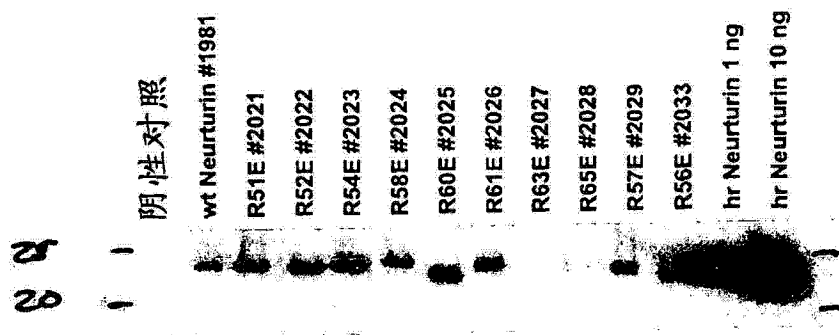


图 4A

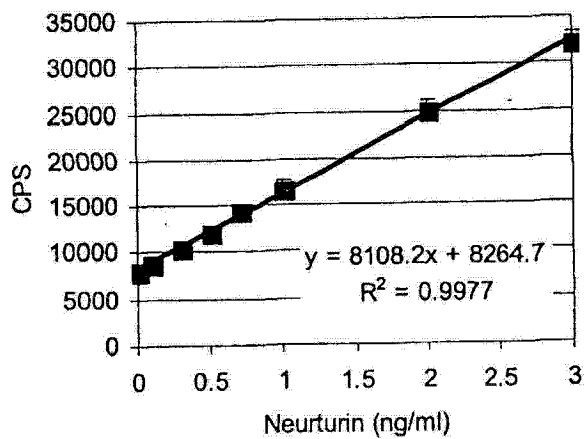


图 4B

图 4

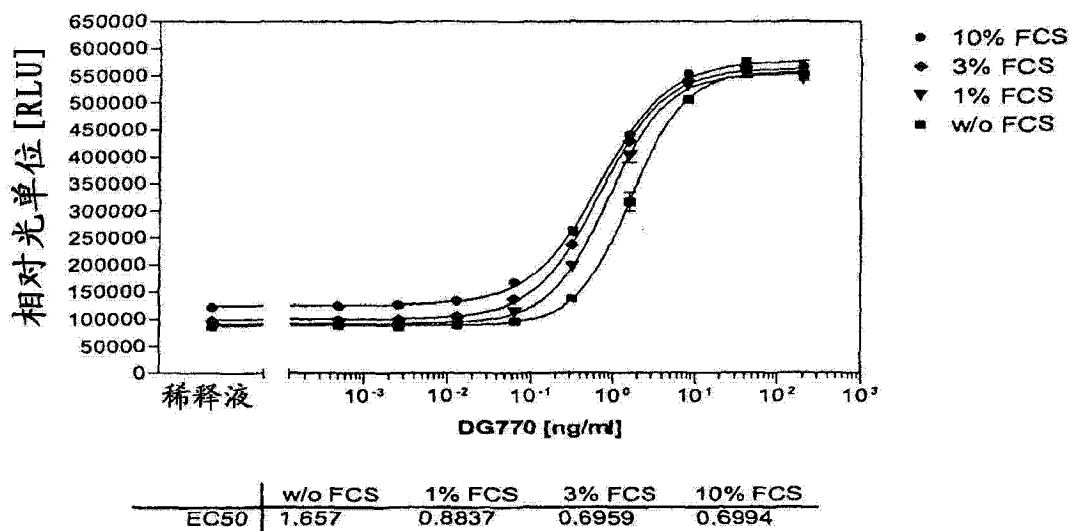


图 5A

突变氨基酸位置 (人成熟 Neurturin)	通过Neurturin ELISA测定的Neurturin 浓度[ng/ml]	由细胞酪氨酸羟化酶报告 基因测定的 Neurturin 活性的 EC ₅₀ [ng/ml]
对照	n.d.	n.d.
wt	1500	0.71
R51E	1600	0.58
R52E	1500	0.32
R54E	1700	0.41
R56E	1600	0.48
R57E	1300	0.58
R58E	1200	0.89
R60E	1600	0.47
R61E	1600	0.48
R63E	n.d.	n.d.
R65E	1500	0.37
wt(大肠杆菌)	1500	2.20

图 5B

图 5

智人(<i>Homo sapiens</i>) (NP_004549)	DLGLRRLRQRRRLRRERVRAQPC	SEQ ID NO: 8
恒河猴(<i>Macaca mulatta</i>) (XP_001085705.1)	DLGLRRLRQRRRLRRERVRAQPC	SEQ ID NO: 9
欧洲牛(<i>Bos taurus</i>) (XP_603915.2)	DLGLRRLRQRRRVRRERVRAQPC	SEQ ID NO: 10
家犬(<i>Canis familiaris</i>) (XP_854570)	DLGLRRLRQRRRVRRERVRAQPC	SEQ ID NO: 11
小家鼠(<i>Mus musculus</i>) (NP_032764.1)	DLGLRRLRQRRRVRRERARAHP	SEQ ID NO: 12
褐家鼠(<i>Rattus norvegicus</i>) (NP_445851.1)	DLGLRRLRQRRRVRKERVRAHP	SEQ ID NO: 13
鸭嘴兽(<i>Ornithorhynchus anatinus</i>) (XP_001509015.1)	DLGLRRLRQRRRVRKVKVRAQPC	SEQ ID NO: 14
短尾猴(<i>Monodelphis domestica</i>) (XP_001369475.1)	DLGLRRLRQRRRVRKVKIRARPC	SEQ ID NO: 15
原鸡(<i>Gallus gallus</i>) (NP_001074973.1)	DL <u>SLKSVRS</u> <u>SKKIR</u> <u>KEKVR</u> APC	SEQ ID NO: 16

图 6

图 7

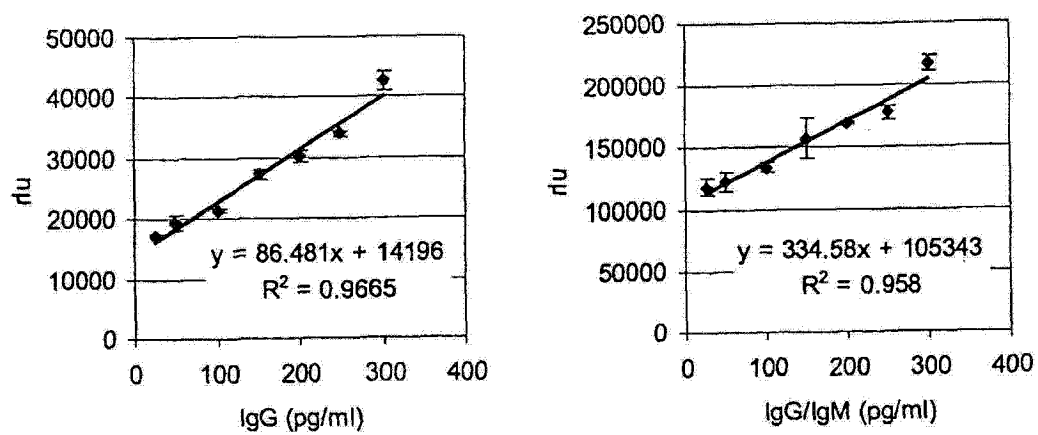


图 8