



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103819564 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 28

(21) 申请号 201410030902. X

A61K 38/16 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 06. 11

A61P 25/28 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 25/24 (2006. 01)

61/186, 246 2009. 06. 11 US

A61P 25/18 (2006. 01)

(62) 分案原申请数据

201080031759. 6 2010. 06. 11

(71) 申请人 安吉奥开米公司

地址 加拿大魁北克

(72) 发明人 米歇尔·德默勒 多米尼克·波依温

让-保罗·卡斯泰恩

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 余刚 张英

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006. 01)

C12N 15/62 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书26页 附图19页

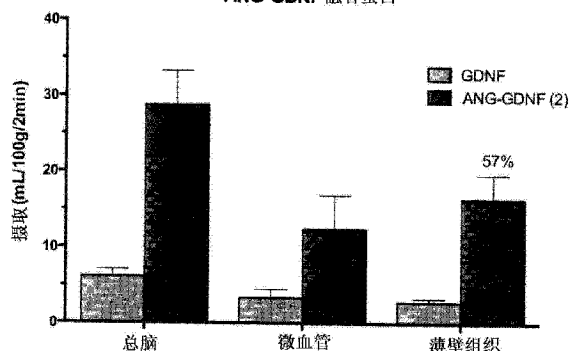
(54) 发明名称

用于将 GDNF 和 BDNF 递送至中枢神经系统的融合蛋白

(57) 摘要

本发明涉及一种用于将 GDNF 和 BDNF 递送至中枢神经系统的融合蛋白,其包括充当穿过血脑屏障的载体的肽载体如 angiopep-2,连接于胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、或相关分子,如它们的类似物或片段。本发明的化合物可以用来治疗其中期望增加神经元存活或生长的任何疾病,例如神经变性疾病如帕金森病或肌萎缩侧索硬化。能够利用所述化合物进行治疗的其他疾病包括精神分裂症和抑郁症。

ANG-GDNF 融合蛋白



1. 一种包含下式的化合物：

A-X-B

其中,A包括与选自由Angiopep-2(SEQ ID NO:97)、反向Angiopep-2(SEQ ID NO:117)、Angiopep-1 (SEQ ID NO:67)、cys-Angiopep-2 (SEQ ID NO:113)和Angiopep-2-cys (SEQ ID NO:114)组成的组中的序列至少 70% 相同的氨基酸序列 ;B 是与以下基本相同的多肽：

GDNF、其具有至少一种 GDNF 活性的片段、或 GDNF 类似物；

以及

X 是将 A 结合于 B 的连接物。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中,所述化合物能够穿过血脑屏障。

3. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中,所述 B 包括 GDNF 的成熟形式。

4. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中,所述序列同一性为至少 90%。

5. 根据权利要求 4 所述的化合物,其中, A 包括选自由 Angiopep-2 (SEQ ID NO:97)、反向 Angiopep-2 (SEQ ID NO:117)、Angiopep-1 (SEQ ID NO:67)、cys-Angiopep-2 (SEQ ID NO:113) 和 Angiopep-2-cys (SEQ ID NO:114) 组成的组中的氨基酸序列。

6. 根据权利要求 5 所述的化合物,其中, A 由选自由 Angiopep-2 (SEQ ID NO:97)、反向 Angiopep-2 (SEQ ID NO:117)、Angiopep-1 (SEQ ID NO:67)、cys-Angiopep-2 (SEQ ID NO:113) 和 Angiopep-2-cys (SEQ ID NO:114) 组成的组中的氨基酸序列构成。

7. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中, X 是肽键。

8. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中, X 是至少一个氨基酸 ;并且 A 和 B 各自通过肽键共价键接于 X。

9. 根据权利要求 8 所述的化合物,其中, X 选自由以下构成的组 : (GGGS)_n, 其中 n 为 1、2 或 3 ; PAPAP ; (PT)_pP, 其中 p 为 2、3、4、5、6 或 7 ; 以及 A(EAAAK)_qA, 其中 q 为 1、2、3、4 或 5。

10. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中, A 是 Angiopep-2 (SEQ ID NO:97); X 是肽键 ; 以及 B 是 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹ ; 其中 A 通过 X 结合于 B 的 N- 端。

11. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中, A 是 Angiopep-2 (SEQ ID NO:97); X 是肽键 ; 以及 B 是 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹ ; 其中 A 通过 X 结合于 B 的 C- 端。

12. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中, A 是反向 Angiopep-2 (SEQ ID NO:117); X 是肽键 ; 以及 B 是 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹ ; 其中 A 通过 X 结合于 B 的 N- 端。

13. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中, A 是 Angiopep-2 (SEQ ID NO:97); X 是 (GGGS)₂ ; 以及 B 是 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹ ; 其中 A 通过 X 结合于 B 的 N- 端。

14. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中, A 是 Angiopep-2 (SEQ ID NO:97); X 是 PAPAP ; 以及 B 是 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹ ; 其中 A 通过 X 结合于 B 的 N- 端。

15. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中, A 是 Angiopep-2 (SEQ ID NO:97); X 是 A(EAAAK)₂A ; 以及 B 是 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹ ; 其中 A 通过 X 结合于 B 的 N- 端。

16. 一种编码根据权利要求 7-15 中任一项所述的化合物的核酸分子。

17. 一种载体,包括根据权利要求 16 所述的核酸分子,其中,所述核酸可操作地连接于启动子。

18. 一种制备根据权利要求 7 或 8 所述的化合物的方法,所述方法包括在细胞中表达由根据权利要求 17 所述的载体编码的多肽,以及纯化所述多肽。

19. 一种制备根据权利要求7或8所述的化合物的方法,所述方法包括在固体载体上合成所述化合物。

20. 根据权利要求1-15中任一项所述的化合物在制备用于治疗具有神经变性疾病的对象的药物中的用途。

21. 根据权利要求20所述的用途,其中,所述神经变性疾病选自以下组成的组:多聚谷氨酰胺序列延长病、脆性X染色体综合征、脆性XE精神发育迟缓、弗里德赖希共济失调症、营养不良性肌强直、8型脊髓小脑性共济失调、和12型脊髓小脑性共济失调、亚历山大病、阿耳珀病、阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、运动失调性毛细血管扩张症、Batten病(SVSB四氏病)、卡纳万病、Cockayne综合征、皮质基底节变性、克雅二氏病、缺血性中风、克拉伯病、Lewy体痴呆、多发性硬化、多系统萎缩、帕金森病、佩-梅二氏病、匹克病、原发性侧索硬化、植烷酸贮积症、Sandhoff病、谢耳德病、脊髓损伤、脊髓性肌萎缩、SRO三氏病以及脊髓痨。

22. 根据权利要求21所述的用途,其中,所述多聚谷氨酰胺复发病是亨廷顿氏病(HD)、齿状核红核苍白球丘脑下核萎缩、肯尼迪病(也称为脊髓延髓肌萎缩),或选自1型、2型、3型(马-约病)、6型、7型和17型组成的组中的脊髓小脑性共济失调。

23. 根据权利要求20所述的用途,其中,所述对象是人。

24. 根据权利要求1-15中任一项所述的化合物在制备用于治疗具有神经元损伤的对象的药物中的用途。

25. 根据权利要求24所述的用途,其中,所述神经元损伤是由缺血性中风、出血性中风或脊髓受损引起的。

26. 根据权利要求24所述的用途,其中,所述对象是人。

27. 根据权利要求1-15中任一项所述的化合物在制备用于治疗具有抑郁症的对象的药物中的用途。

28. 根据权利要求27所述的用途,其中,所述对象是人。

29. 根据权利要求1-15中任一项所述的化合物在制备用于治疗具有精神分裂症的对象的药物中的用途。

30. 根据权利要求29所述的用途,其中,所述对象是人。

用于将 GDNF 和 BDNF 递送至中枢神经系统的融合蛋白

[0001] 本申请是申请日为 2010 年 6 月 11 日的题为“用于将 GDNF 和 BDNF 递送至中枢神经系统的融合蛋白”的中国专利申请号 201080031759.6 的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种包括肽载体和胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)或脑源性神经营养因子(BDNF)的轭合物(结合物或共轭物, conjugate), 及其用途。

背景技术

[0003] 与神经元损失或损伤相关的疾病是严重病症并且在世界范围内影响数百万人。尽管疗法如 GDNF 在治疗神经变性病如帕金森病中具有前景, 但是在本发明之前, 这样的疗法至脑的递送由于活性剂不能穿过(跨越或越过, cross)血脑屏障而是复杂的。事实上, 涉及用于帕金森病的 GDNF 疗法的先前临床试验要求使用将药剂直接注入脑中, 并且用于治疗肌萎缩侧索硬化的 BDNF 试验涉及药剂的胸内注射。这些方法是繁琐且困难的。

[0004] 由于对于其中增加神经元存活或生长是有益的各种各样的疾病的治疗性治疗存在需要, 所以期望具有穿过血脑屏障的能力的基于 GDNF 和 BDNF 的治疗剂。

发明内容

[0005] 现在本发明的发明人开发了这样的化合物, 其包括轭合至 GDNF、BDNF、或相关分子的肽载体(peptide vector)。这些化合物可以例举包括 GDNF 或 BDNF 序列和 Angiopep-2 序列的融合蛋白。在某些实施方式中, 这些化合物能够穿过血脑屏障, 并因此可以用作治疗具有神经变性疾病或神经元受损的对象(个体, subject)的治疗剂。

[0006] 因此, 在第一方面, 本发明的特征在于一种包括下式的化合物

[0007] A-X-B

[0008] 其中 A 是肽载体; B 是与以下基本上相同(具有统一性的, identical)的多肽: (i) GDNF、其具有至少一种 GDNF 活性的片段、或 GDNF 类似物(例如本文中描述的任一种); 或 (ii) BDNF、其具有至少一种 BDNF 活性的片段、或 BDNF 类似物(例如本文中描述的任一种); 以及 X 是结合 A 与 B 的连接物(接头, linker)(例如本文中描述的任一种)。该化合物可以能够(例如有效地)穿过血脑屏障。该化合物可以包括 GDNF 的成熟形式(例如亚型 1 的氨基酸 118-211)或 BDNF 的成熟形式(例如亚型 A 的氨基酸 129-247)。GDNF 片段可以包括或可以是亚型 1 的氨基酸 78-211。该化合物可以进一步包括标签(tag)如 His 标签, 或切割位点如凝血酶切割位点。在某些实施方式中, 该化合物具有图 2 或图 14 所示的结构。在某些实施方式中, X 是肽键或 X 是至少一个氨基酸, 其中 A 和 B 各自通过肽键共价地链接于 X。在某些实施方式中, 连接物是柔性连接物(例如 (GGGGS)_n, 其中 n 为 1、2 或 3)、刚性连接物(例如 PAPAP 和 (PT)_nP, 其中 n 为 2、3、4、5、6 或 7), 或者 α -螺旋连接物(例如 A(EAAAK)_nA, 其中 n 为 1、2、3、4 或 5)。肽载体可以存在于 GDNF、BDNF 或相关分子的 N- 或 C- 端。本发明的特征还在于一种编码该化合物的核酸分子, 其中 X 是肽键、氨基酸或肽连接物。该核

酸可以是载体的一部分,并且该核酸可以可操作地(operably)连接于启动子。本发明的特征还在于一种通过在细胞中表达由所述载体编码的多肽,并纯化该多肽而制备一种化合物的方法。本发明的特征还在于一种通过在固体支撑物(固体载体, solid support)上合成所述化合物而制备该化合物的方法。

[0009] 在另一方面,本发明的特征在于一种治疗(例如预防地)具有神经变性病或神经元受损或损伤的对象(例如人)的方法,通过给予该对象有效量的本发明的化合物。神经变性病可以选自多聚谷氨酰胺序列延长病(多聚谷氨酰胺扩张紊乱, polyglutamine expansion disorder)、脆性 X 染色体综合征、脆性 XE 精神发育迟缓、弗里德赖希共济失调症(Friedreich's ataxia)、营养不良性肌强直(myotonic dystrophy)、8 型脊髓小脑性共济失调(spino cerebellar ataxia type 8)和 12 型脊髓小脑性共济失调、亚历山大病(Alexander disease)、阿耳珀病(Alper's disease)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、运动失调性毛细血管扩张症(ataxia telangiectasia)、Batten 病(Batten disease, SVSB 四氏病(Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten disease))、卡纳万病(Canavan disease)、Cockayne 综合征(Cockayne syndrome)、皮质基底节变性(Corticobasal degeneration)、克雅二氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)、缺血性中风(ischemia stroke)、克拉伯病(Krabbe disease)、Lewy 体痴呆(Lewy body dementia)、多发性硬化、多系统萎缩(multiple system atrophy)、帕金森病、佩-梅二氏病(Pelizaeus-Merzbacher disease)、匹克病(Pick's disease)、原发性侧索硬化(primary lateral sclerosis)、植烷酸贮积症(Refsum's disease)、Sandhoff 病(Sandhoff disease)、谢耳德病(Schilder's disease)、脊髓损伤(spinal cord injury)、脊髓性肌萎缩(spinal muscular atrophy)、SRO 三氏病(Steele-Richardson-Olszewski disease)、以及脊髓痨(Tabes dorsalis)组成的组。多聚谷氨酰胺复发病(polyglutamine repeat disease)可以是亨廷顿氏病(HD)、齿状核红核苍白球丘脑下核萎缩(dentatorubropallidolusian atrophy)、肯尼迪病(Kennedy's disease)(也称为脊髓延髓肌萎缩(spino bulbular muscular atrophy)),或选自 1 型、2 型、3 型(马-约病(Machado-Joseph disease))、6 型、7 型、和 17 型组成的组中的脊髓小脑性共济失调(spino cerebellar ataxia)。神经元损伤可以由缺血性中风、出血性中风(hemorrhagic stroke)、或脊髓受损引起。能够利用本发明的化合物治疗的其他疾病包括抑郁症和精神分裂症(schizophrenia)。

[0010] 在以上这些方面的特定实施方式中, A 是 Angiopep-2 (SEQ ID NO:97), X 是肽键, 而 B 是 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹, 其中 A 通过 X 结合于 B 的 N-端; A 是 Angiopep-2 (SEQ ID NO:97), X 是肽键, 而 B 是 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹, 其中 A 通过 X 连接于 B 的 C-端; A 是反向 Angiopep-2 (reversed Angiopep-2)(SEQ ID NO:117), X 是肽键, 而 B 是 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹, 其中 A 通过 X 连接于 B 的 N-端; A 是 Angiopep-2 (SEQ ID NO:97), X 是 (GGGGS)₂, 而 B 是 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹, 其中 A 通过 X 连接于 B 的 N-端; A 是 Angiopep-2 (SEQ ID NO:97), X 是 PAPAP, 而 B 是 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹, 其中 A 通过 X 连接于 B 的 N-端; 或 A 是 Angiopep-2 (SEQ ID NO:97), X 是 A(EAAAK)₂A, 而 B 是 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹, 其中 A 通过 X 连接于 B 的 N-端。

[0011] 在以上方面的任一个中, 肽载体可以是与表 1 列出的序列中的任一个基本相同的多肽、或其片段。在某些实施方式中, 肽载体具有 Angiopep-1 (SEQ ID NO:67)、

Angiopep-2 (SEQ ID NO:97)、Angiopep-3 (SEQ ID NO:107)、Angiopep-4a (SEQ ID NO:108)、Angiopep-4b (SEQ ID NO:109)、Angiopep-5 (SEQ ID NO:110)、Angiopep-6 (SEQ ID NO:111)、Angiopep-7 (SEQ ID NO:112)、或反向 Angiopep-2 (SEQ ID NO:117) 的序列。本发明的肽载体或化合物可以被有效地输送到特定细胞型(例如,肝、肺、肾、脾和肌肉中的任一种、两种、三种、四种或五种),或可以有效地穿过哺乳动物 BBB (例如 Angiopep-1、-2、-3、-4a、-4b、-5、以及 -6)。在另一实施方式中,肽载体或化合物能够进入特定细胞型(例如,肝、肺、肾、脾和肌肉中的任一种、两种、三种、四种或五种),但不会有效地穿过 BBB (例如包括 Angiopep-7 的轭合物)。肽载体可以为任意长度,例如至少 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、25、35、50、75、100、200、或 500 个氨基酸,或者是这些数值之间的任意范围。在某些实施方式中,肽载体的长度为 10 ~ 50 个氨基酸。多肽可以通过重组遗传技术或化学合成生产。

[0012] 表 1 :示例性肽载体

[0013]

**SEQ ID
NO:**

1	T	F	V	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	S	A	E	D
2	T	F	Q	Y	G	G	C	M	G	N	G	N	N	F	V	T	E	K	E
3	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	R	N	N	F	D	T	E	E	Y
4	S	F	Y	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	Y	L	R	E	E	E
5	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
6	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
7	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	K	N	N	Y	K	R	A	K	Y
8	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y
9	T	F	Q	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y

[0014]

10	T	F	Q	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y
11	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
12	T	F	F	Y	G	G	S	L	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
13	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y
14	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	G	N	N	Y	K	R	A	K	Y
15	P	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	L	R	A	K	Y
16	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	R	E	K	Y
17	P	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	K	N	N	F	K	R	A	K	E
18	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	D
19	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	D	R	A	K	Y
20	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	K	R	A	E	Y
21	P	F	F	Y	G	G	C	G	A	N	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
22	T	F	F	Y	G	G	C	G	G	K	K	N	N	F	K	T	A	K	Y
23	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	R	N	N	F	L	R	A	K	Y
24	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	R	N	N	F	K	T	A	K	Y
25	T	F	F	Y	G	G	S	R	G	N	R	N	N	F	K	T	A	K	Y
26	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	G	N	N	F	K	R	A	K	Y
27	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	L	R	A	K	Y
28	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	K	T	A	K	Y
29	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	G	N	N	F	K	S	A	K	Y
30	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	D	R	E	K	Y
31	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	L	R	E	K	E
32	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	G	N	N	F	D	R	A	K	Y
33	T	F	F	Y	G	G	S	R	G	K	G	N	N	F	D	R	A	K	Y
34	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	G	N	N	F	V	T	A	K	Y
35	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	K	G	N	N	Y	V	T	A	K	Y
36	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	K	G	N	N	F	L	T	A	K	Y
37	S	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	F	L	T	A	K	Y
38	T	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	K	N	N	F	V	R	E	K	Y
39	T	F	F	Y	G	G	C	M	G	N	K	N	N	F	V	R	E	K	Y
40	T	F	F	Y	G	G	S	M	G	N	K	N	N	F	V	R	E	K	Y
41	P	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	Y	V	R	E	K	Y
42	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	V	R	E	K	Y
43	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	Y	V	R	E	K	Y
44	T	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	G	N	N	F	L	T	A	K	Y
45	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	R	N	N	F	L	T	A	E	Y
46	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	G	N	N	F	K	S	A	E	Y
47	P	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	F	K	T	A	E	Y
48	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	R	N	N	F	K	T	E	E	Y
49	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	D
50	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	G	N	N	F	V	R	E	K	Y
51	S	F	F	Y	G	G	C	M	G	N	G	N	N	F	V	R	E	K	Y
52	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	G	N	N	F	L	R	E	K	Y
53	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	G	N	N	F	V	R	E	K	Y
54	S	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	G	N	N	Y	L	R	E	K	Y
55	T	F	F	Y	G	G	S	L	G	N	G	N	N	F	V	R	E	K	Y
56	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	G	N	N	F	V	T	A	E	Y
57	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	K	G	N	N	F	V	S	A	E	Y
58	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	D	R	A	E	Y
59	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	L	R	E	E	Y

[0015]

60 T F F Y G G C L G N K N N Y L R E E Y
61 P F F Y G G C G G N R N N Y L R E E Y
62 P F F Y G G S G G N R N N Y L R E E Y
63 M R P D F C L E P P Y T G P C V A R I
64 A R I I R Y F Y N A K A G L C Q T F V Y G
65 Y G G C R A K R N N Y K S A E D C M R T C G
66 P D F C L E P P Y T G P C V A R I I R Y F Y
67 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y
68 K F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y
69 T F Y Y G G C R G K R N N Y K T E E Y
70 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
71 C T F F Y G C C R G K R N N F K T E E Y
72 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y C
73 C T F F Y G S C R G K R N N F K T E E Y
74 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y C
75 P F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y
76 T F F Y G G C R G K R N N F K T K E Y
77 T F F Y G G K R G K R N N F K T E E Y
78 T F F Y G G C R G K R N N F K T K R Y
79 T F F Y G G K R G K R N N F K T A E Y
80 T F F Y G G K R G K R N N F K T A G Y
81 T F F Y G G K R G K R N N F K R E K Y
82 T F F Y G G K R G K R N N F K R A K Y
83 T F F Y G G C L G N R N N F K T E E Y
84 T F F Y G C G R G K R N N F K T E E Y
85 T F F Y G G R C G K R N N F K T E E Y
86 T F F Y G G C L G N G N N F D T E E E
87 T F Q Y G G C R G K R N N F K T E E Y
88 Y N K E F G T F N T K G C E R G Y R F
89 R F K Y G G C L G N M N N F E T L E E
90 R F K Y G G C L G N K N N F L R L K Y
91 R F K Y G G C L G N K N N Y L R L K Y
92 K T K R K R K K Q R V K I A Y E E I F K N Y
93 K T K R K R K K Q R V K I A Y
94 R G G R L S Y S R R F S T S T G R
95 R R L S Y S R R R F
96 R Q I K I W F Q N R R M K W K K
97 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
98 M R P D F C L E P P Y T G P C V A R I
I R Y F Y N A K A G L C Q T F V Y G G
C R A K R N N F K S A E D C M R T C G G A

99 T F F Y G G C R G K R N N F K T K E Y
100 R F K Y G G C L G N K N N Y L R L K Y
101 T F F Y G G C R A K R N N F K R A K Y
102 N A K A G L C Q T F V Y G G C L A K R N N F
E S A E D C M R T C G G A

103 Y G G C R A K R N N F K S A E D C M R T C G

[0016]

G A

```

104 G L C Q T F V Y G G C R A K R N N F K S A E
105 L C Q T F V Y G G C E A K R N N F K S A
107 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
108 R F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
109 R F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
110 R F F Y G G S R G K R N N F R T E E Y
111 T F F Y G G S R G K R N N F R T E E Y
112 T F F Y G G S R G R R N N F R T E E Y
113 C T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
114 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y C
115 C T F F Y G G S R G R R N N F R T E E Y
116 T F F Y G G S R G R R N N F R T E E Y C
117 Y E E T K F N N R K G R S G G Y F F T

```

[0017] 编号 5、67、76 和 91 的多肽分别包括 SEQ ID No:5、67、76 和 91,并且在 C- 端处被酰胺化。

[0018] 编号 107、109 和 110 的多肽分别包括 SEQ ID No:97、109 和 110,并且在 N- 端处被乙酰化。

[0019] 在以上方面的任一个中,肽载体可以包括具有下式的氨基酸序列:X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19,其中 X1-X19 (例如 X1-X6、X8、X9、X11-X14 和 X16-X19) 各自独立地是任意氨基酸(例如,天然氨基酸如 Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr 和 Val)或缺少(缺乏或不存在,absent),并且 X1、X10 和 X15 中的至少一个(例如 2 个或 3 个)是精氨酸。在一些实施方式中,X7 是 Ser 或 Cys;或 X10 和 X15 各自独立地是 Arg 或 Lys。在一些实施方式中,X1 至 X19 (包括端值)残基与 SEQ ID NO:1-105 和 107-116 中的任一个的氨基酸序列中的任一个(例如 Angiopep-1、Angiopep-2、Angiopep-3、Angiopep-4a、Angiopep-4b、Angiopep-5、Angiopep-6、和 Angiopep-7)基本上相同。在一些实施方式中,氨基酸 X1-X19 中的至少一个(例如 2、3、4、或 5 个)是 Arg。在一些实施方式中,所述多肽在该多肽的 N- 端、该多肽的 C- 端、或这两个末端处具有一个或多个另外的半胱氨酸残基。

[0020] 在以上方面的任一个的某些实施方式中,肽载体或 GDNF、BDNF、或相关分子被修饰(例如,如本文中描述的)。所述肽或多肽可以被酰胺化、乙酰化、或这二者。这样的修饰可以在多肽的氨基或羧基末端处。所述肽或多肽也可以包括本文中描述的多肽中的任一个的拟肽(peptidomimetics)(例如,本文中描述的那些)。所述肽或多肽可以为多聚体形式(multimeric form),例如二聚体形式(例如,通过半胱氨酸残基的二硫键接形成的)。

[0021] 在某些实施方式中,肽载体或 GDNF、BDNF、或相关分子具有带有至少一个氨基酸取代(例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个取代)、插入、或缺失的本文中描述的氨基酸序列,或与本文中描述的氨基酸序列基本相同。所述肽或多肽可以包含例如 1 至 12 个、1 至 10 个、1 至 5 个、或 1 至 3 个氨基酸取代,例如,1 至 10 个(例如至 9、8、7、6、5、4、3、2 个)氨基酸取代。氨基酸取代可以是保守的或非保守的。例如,肽载体可以在对应于 SEQ ID NO:1、Angiopep-1、Angiopep-2、Angiopep-3、Angiopep-4a、Angiopep-4b、Angiopep-5、Angiopep-6 和 Angiopep-7 中的任一个的氨基酸序列的位置 1、10 和 15 的位置中的一个、两

个或三个处具有精氨酸。在某些实施方式中, BDNF、GDNF、或相关分子可以在任意位置处具有半胱氨酸或赖氨酸取代或插入(例如在 N- 或 C- 端位置处的赖氨酸取代)。

[0022] 在以上方面的任一个中, 所述化合物可以具体地排除包括 SEQ ID NO:1-105 和 107-116 中的任一个的多肽或由 SEQ ID NO:1-105 和 107-116 中的任一个构成的多肽(例如, Angiopep-1、Angiopep-2、Angiopep-3、Angiopep-4a、Angiopep-4b、Angiopep-5、Angiopep-6 和 Angiopep-7)。在一些实施方式中, 本发明的多肽和化合物排除(或不包括) SEQ ID NO:102、103、104 和 105 的多肽。

[0023] “片段”是指全长氨基酸或核酸序列(例如 BDNF 或 GDNF)的一部分。片段可以包括该全长序列的至少 4、5、8、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、175、200 或 250 个氨基酸或核酸。片段可以保持全长蛋白质的生物学活性中的至少一种。

[0024] “基本相同(基本同一, substantially identical)”是指表现出与参考氨基酸或核酸序列的至少 35%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、或甚至 99% 同一性的多肽或核酸。对于多肽, 比较序列(comparison sequence)的长度通常为至少 4 个(例如, 至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、50、或 100 个)氨基酸。对于核酸, 比较序列的长度通常为至少 60 个核苷酸, 优选至少 90 个核苷酸, 并且更优选至少 120 个核苷酸, 或全长。在本文中应当理解, 在与初始多肽的氨基酸相同或类似的序列的氨基酸之间可以存在间隙(gap)。这些间隙可以不包括氨基酸、包括一个或多个与初始多肽不相同或类似的氨基酸。百分比同一性可以例如利用缺省间隙重量(default gap weight), 用 Wisconsin Genetics Package Release 7.0 (软件包释放 7.0) 中的 n 算法 GAP、BESTFIT 或 FASTA 加以确定。

[0025] “肽载体”是指能够被输送到特定细胞型(例如肝、肺、肾、脾或肌肉)中或穿过 BBB 的化合物或分子如多肽或拟肽。该载体可以连接(共价地或非共价地)或耦合至一种试剂(药剂, agent)并由此可以能够将该试剂输送到特定细胞型中或穿过 BBB。在某些实施方式中, 该载体可以结合至癌细胞或脑内皮细胞上存在的受体, 并由此通过转胞吞作用(transcytosis)被输送到该癌细胞中或穿过 BBB。该载体可以是可以获得高水平的跨内皮输送同时不影响该细胞或 BBB 完整性的分子。该载体可以是多肽或拟肽, 并且可以是天然的或通过化学合成或重组遗传技术生产的。

[0026] “治疗”对象的疾病、紊乱或病症是指通过将治疗剂给予该对象而减少所述疾病、紊乱或病症的至少一种症状。

[0027] “预防地治疗”对象的疾病、紊乱或病症是指在出现一种疾病症状或多种症状之前, 通过向该对象给予治疗剂而降低(例如防止)所述疾病、紊乱或病症的发作频率或严重程度。

[0028] 在一个实例中, 对特定病症进行治疗的对象是已被医务人员诊断为患有该病症的对象。诊断可以通过任何合适方式(如本文中描述的那些)进行。进行预防地治疗该病症的形成的对象可以接受这样的诊断或者可以没有接受这样的诊断。本领域技术人员将理解, 本发明的对象可以已经过标准测试或可以已被鉴定(没有检查)为由于存在一种或多种风险因素而处于高风险的对象。

[0029] “对象”是指人或非人动物(例如哺乳动物)。

[0030] “等价剂量”是指相比于未轭合的分子,对于在本发明化合物中实现 GDNF、BDNF 或相关分子的相同摩尔量所需的本发明化合物的量。

[0031] 被“有效输送穿过 BBB”的多肽是指至少能够如 Angiopep-6 那样有效地穿过 BBB 的多肽(即,高于在 2007 年 5 月 29 日提交的美国专利申请 No. 11/807,597 中描述的原位脑灌注测定中的 Angiopep-1 (250nM)的 38.5%,将其结合于此供参考)。因此,“没有有效地输送穿过 BBB”的多肽以较低水平输送至脑(例如,比 Angiopep-6 更低效地被输送)。

[0032] “有效地输送至特定细胞型”的多肽或化合物是指,该多肽或化合物能够比对照物质或在轭合物情况下相比于未轭合试剂,在该细胞型中积累的水平至少大 10% (例如 25%、50%、100%、200%、500%、1000%、5000%、或 10000%) (例如,由于增大到细胞中的输送、降低的从细胞的流出、或它们的组合)。这样的活性在国际申请公开 No. W02007/009229 中更详细地进行了描述,将其结合于此供参考。

[0033] 本发明的其他特征和优点根据以下详细的描述、附图和权利要求将会更明显。

附图说明

[0034] 图 1 示出了人 GDNF 和 BDNF 的序列。

[0035] 图 2 是含有通过肽键、柔性连接物、刚性连接物或 α -螺旋连接物连接的 His₆ 标签、凝血酶切割位点、Angiopep-2 肽和 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹ 的 Angiopep2-GDNF 构建体的示意图。

[0036] 图 3 示出了图 2 中描述的构建体的序列。

[0037] 图 4-7 示出了用于产生 GDNF 构建体的克隆策略。

[0038] 图 8-12 示出了 GDNF 构建体的序列。

[0039] 图 13 是示出了结合于 GDNF 家族受体 α -1 (GR α -1) 的 Angiopep2/GDNF 的结构示意图。

[0040] 图 14 是示出了包括(a)Angiopep-2 或反向 Angiopep-2 以及(b)GDNF(hGDNF⁷⁸⁻²¹¹)的插入融合蛋白(addition fusion protein)的示意图。具体构建体包括 An2-hGDNF (融合至 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹ 的 N-端 Angiopep-2);hGDNF-An2 (融合至 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹ 的 C-端 Angiopep-2); An2NT-hGDNF (融合至 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹ 的 N-端反向序列 Angiopep-2);An2-Flex-hGDNF (通过柔性((GGGGS)₂)连接物融合至 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹ 的 N-端 Angiopep-2);An2-Rig-hGDNF (通过刚性(PAPAP)连接物融合至 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹ 的 N-端 Angiopep-2);An2-Hel-hGDNF (通过螺旋(A(EAAAK)₂A)连接物融合至 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹ 的 N-端 Angiopep-2)。

[0041] 图 15 是示出了用于确定轭合物是否能够结合 GFR α 1 受体的酶联免疫吸附测定(ELISA)的示意图。

[0042] 图 16 是一组曲线图,示出了来自对于图 14 的各个轭合物实施的在图 15 中描述的结合实验的结果。

[0043] 图 17 是示出了 GDNF 和 Angiopep-GDNF 融合蛋白同质二聚体的形成的示意图。

[0044] 图 18 是考马斯染色聚丙烯酰胺凝胶(Coomassie-stained polyacrylimide gel)的照片,示出了在 GDNF 和 An2-GDNF 多肽二者中的二聚体的形成。当该二聚体用二巯苏糖醇(DTT)处理时形成单体。

[0045] 图 19 是示出了 GDNF 信号转导级联(signaling cascade)的示意图。

[0046] 图 20 是一组蛋白质印迹的照片,示出了 GDNF 和 An2-GDNF 二者能够增大 GDNF 信

号转导级联的成分的活化(磷酸化)。

[0047] 图 21 是示出了来自利用 GDNF 或 Angiopep-2/GDNF 融合蛋白的原位脑灌注测定的结果的曲线图。

具体实施方式

[0048] 本发明的发明人已经开发了包括 GDNF、BDNF、其类似物或功能片段的化合物,其连接于能够穿过血脑屏障(BBB)的肽载体。这些化合物能够穿过 BBB 并因此比没有连接于该肽载体的 GDNF、BDNF、相关分子远远更有效地被输送到脑中。这种增大的输送能够导致更大的效力、更低的副作用、或这二者的组合。在其中效力增大的情况下,相比于没有连接于该肽载体时的 GDNF、BDNF、或相关分子,可以给予该化合物的更低有效量。在其他情况下,在副作用减少的情况下,可以有可能地以更高的剂量给予。本发明的化合物可以用于治疗其中期望增大神经元生长或减少神经元死亡的疾病。这样的疾病包括神经变性疾病如帕金森病(PD)、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、以及本文中描述的其他疾病和病症。

[0049] GDNF 和 GDNF 类似物

[0050] 在某些实施方式中,肽载体连接于 GDNF、GDNF 类似物、GDNF 片段、或其修饰形式。在某些实施方式中,GDNF 类似物是与 GDNF、GDNF 类似物、或其片段基本相同(例如,至少 60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99% 相同)的序列。

[0051] GDNF 作为二硫连接的同型二聚体(homodimer)被分泌,并且能够支持多巴胺能神经元、浦肯野细胞(Purkinje cell)、运动神经元(motoneuron)和交感神经元(sympathetic neuron)的存活。具有这些活性中的一种或多种的 GDNF 类似物或片段可以在本发明中使用,并且这样的类似物和片段的活性能够利用本领域中已知的任何方式进行测试。

[0052] 人 GDNF 表示为 211 个氨基酸蛋白(亚型 1;SEQ ID NO:117)、185 个氨基酸蛋白(亚型 2;SEQ ID NO:118)、以及 133 个氨基酸蛋白。成熟 GDNF 是包括亚型 1 的氨基酸 78-211 或 118-211、亚型 2 的氨基酸 92-185 的 134 个氨基酸序列。亚型 3 包括来自氨基酸 40-133 的转化生长因子样结构域(transforming growth factor like domain)。

[0053] 在某些实施方式中,GDNF 类似物是 GDNF 的剪接变体(splice variant)。这样的蛋白描述在 PCT 公开 No. W02009/053536 中,并且包括 pre-(α)pro-GDNF、pre-(β)pro-GDNF、和 pre-(γ)pro-GDNF 剪接变体,以及缺乏 pre-pro 区的变体:(α)pro-GDNF、(β)pro-GDNF 和 pre-(γ)pro-GDNF。

[0054] GDNF 类似物也描述在美国专利公开 No. 2009/0069230 中,其包括具有以下序列的 GDNF 类似物:

[0055] Xaa₁-Pro-Xaa₃-Pro-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈ (I)

[0056] 其中,Xaa₁ 是 Phe、Trp 或 Tyr;Xaa₃ 是 Leu、Ala、Ile 或 Val;Xaa₅ 是 Ala、Leu、Ile 或 Val;Xaa₆ 是 Gly,为 D 构象的任意氨基酸残基或为缺少(没有,absent);Xaa₇ 是 Lys、Arg 或 His 或为缺少;而 Xaa₈ 是 Arg、Lys 或 His 或为缺少。Xaa 代表氨基酸,我们也可以称其为氨基酸残基。下标(这里,下标 1-8)代表肽序列中每个氨基酸的位置。因此,Xaa₁ 代表 GDNF 前体蛋白的片段中的第一个氨基酸残基。

[0057] 在具体实施方式中,GDNF 前体蛋白的片段可以具有由以下表示的序列:(1) Phe-Pro-Xaa₃-Pro-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈, (例如, Phe-Pro-Leu-Pro-Ala-Gly-Lys-Arg);(2) Xaa₁-

Pro-Leu-Pro-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈; (3) Phe-Pro-Leu-Pro-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈; (4) Xaa₁-Pro-Xaa₃-Pro-Ala-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈; (5) Phe-Pro-Xaa₃-Pro-Ala-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈; (6) Phe-Pro-Leu-Pro-Ala-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈; (7) Xaa₁-Pro-Xaa₃-Pro-Xaa₅-Gly-Xaa₇-Xaa₈; (8) Phe-Pro-Xaa₃-Pro-Xaa₅-Gly-Xaa₇-Xaa₈; (9) Phe-Pro-Leu-Pro-Xaa₅-Gly-Xaa₇-Xaa₈; (10) Phe-Pro-Leu-Pro-Ala-Gly-Xaa₇-Xaa₈; (11) Xaa₁-Pro-Xaa₃-Pro-Xaa₅-Xaa₆-Lys-Xaa₈; (12) Phe-Pro-Xaa₃-Pro-Xaa₅-Xaa₆-Lys-Xaa₈; (13) Phe-Pro-Leu-Pro-Xaa₅-Xaa₆-Lys-Xaa₈; (14) Phe-Pro-Leu-Pro-Ala-Xaa₆-Lys-Xaa₈; (15) Phe-Pro-Leu-Pro-Ala-Gly-Lys-Xaa₈; (16) Xaa₁-Pro-Xaa₃-Pro-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Arg; (17) Phe-Pro-Xaa₃-Pro-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Arg; (18) Phe-Pro-Leu-Pro-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Arg; (19) Phe-Pro-Leu-Pro-Ala-Xaa₆-Xaa₇-Arg; 以及 (20) Phe-Pro-Leu-Pro-Ala-Gly-Xaa₇-Arg。

[0058] 在另一个实施方式中, GDNF 前体蛋白的片段可以是与式 I 一致的 GDNF 前体蛋白的片段或部分, 其中 Xaa₁ 是 Phe, Xaa₃ 是 Leu, Xaa₅ 是 Ala, Xaa₆ 是 Gly, Xaa₇ 是 Lys, 并且 Xaa₈ 是 Arg (即, Phe-Pro-Leu-Pro-Ala-Gly-Lys-Arg)。由式 I 表示的氨基酸残基中的至少一个 (例如, 一个、两个、或三个) 可以为缺少。例如, Xaa₆、Xaa₇ 和 / 或 Xaa₈ 可以为缺少。

[0059] 在另一个实施方式中, GDNF 前体蛋白的片段或生物学活性变体可以具有、或可以包括与下式 II 的氨基酸序列一致的氨基酸残基的序列:

[0060] Pro-Pro-Xaa₃-Xaa₄-Pro-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Xaa₁₃-Xaa₁₄ (II)

[0061] 其中 Xaa₃ 是 Glu 或 Asp; Xaa₄ 是 Ala、Gly、Ile、Leu、Met 或 Val; Xaa₆ 是 Ala、Gly、Ile、Leu、Met 或 Val; Xaa₇ 是 Glu 或 Asp; Xaa₈ 是 Asp 或 Glu; Xaa₉ 是 Arg、His 或 Lys; Xaa₁₀ 是 Ser、Asn、Gln 或 Thr; Xaa₁₁ 是 Leu、Ala、Gly、Ile、Leu、Met 或 Val; Xaa₁₂ 是 Gly, 为 D- 构型的任意氨基酸残基, 或为不存在; Xaa₁₃ 是 Arg、His 或 Lys, 或为不存在; Xaa₁₄ 是 Arg、His 或 Lys, 或者为不存在。与式 II 一致的示例性肽可以具有序列 Pro-Pro-Glu-Ala-Pro-Ala-Glu-Asp-Arg-Ser-Leu-Gly-Arg-Arg (SEQ ID NO:2)。

[0062] 在另一个实施方式中, GDNF 前体蛋白的片段或生物学活性变体可以具有、或可以包括与下式 III 的氨基酸序列一致的氨基酸残基的序列:

[0063] Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Xaa₁₃-Xaa₁₄-Xaa₁₅-Xaa₁₆-Xaa₁₇-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Xaa₂₁-Xaa₂₂ (III)。

[0064] 其中 Xaa₁ 和 Xaa₂ 独立地是 Arg、Lys、或 H, 或者为缺少; Xaa₃ 是 Glu 或 Asp; Xaa₄ 是 Arg、Lys 或 His; Xaa₅ 是 Asn、Gln、Ser、或 Thr; Xaa₆ 是 Arg、Lys 或 His; Xaa₇ 是 Gln、Asn、Ser 或 Thr; Xaa₈、Xaa₉、Xaa₁₀ 和 Xaa₁₁ 独立地是 Ala、Gly、Ile、Leu、Met、或 Val; Xaa₁₂ 是 Asn、Gln、Ser、或 Thr; Xaa₁₃ 是 Pro 或 Ser; Xaa₁₄ 是 Glu 或 Asp; Xaa₁₅ 是 Asn、Gln、Ser、或 Thr; Xaa₁₆ 是 Ser、Asn、Gln 或 Thr; Xaa₁₇ 是 Lys、Arg、或 His; Xaa₁₈ 是 Gly、Ala、Ile、Leu、Met、或 Val; Xaa₁₉ 是 Lys、Arg 或 His; Xaa₂₀ 是 Gly, 为 D- 构型的任意氨基酸残基, 或为不存在; 以及 Xaa₂₁ 和 Xaa₂₂ 独立地是 Arg、Lys、His、或为不存在。与式 III 一致的示例性肽可以具有序列 Arg-Arg-Glu-Arg-Asn-Arg-Gln-Ala-Ala-Ala-Asn-Pro-Glu-Asn-Ser-Arg-Gly-Lys-Gly-Arg-Arg。

[0065] 其他 GDNF 类似物描述在 PCT 公开 No. W02008/069876 中。这些类似物包括 ERNRQAAAAANPENS RGK- 酰胺; FPLPA- 酰胺; 以及 PPEAPAEDRSL- 酰胺。

[0066] 还有的其他 GDNF 类似物描述在 PCT 公开 No. W02007/019860 中。这些类似物包括

具有下式的那些：

[0067] $X_a-(x)-X_b-X_c-X_d-X_f$

[0068] 其中 X_a 为 D、E、A 或 G, (x) 为 2-3 个氨基酸残基的序列或选自氨基酸残基 A、D、E、G、I、K、L、P、Q、S、T 和 V 组成的组中的单个氨基酸残基, X_b 是氨基酸残基 Y 或 H, 或疏水性氨基酸残基, 并且 X_c 、 X_d 或 X_f 中的至少一个为带电荷或疏水性氨基酸残基。该类似物的长度可以为 6-22 个氨基酸。

[0069] 其他 GDNF 类似物描述在美国专利申请公开 No. 2006/0258576 中。这些类似物包括 FPLPA- 酰胺、PPEAPAEDRSL- 酰胺、LLEAPAEDHSL- 酰胺, SPDKQMAVLP、SPDKQAAALP、SPDKQTPIFS、ERNRQAAAAANPENS RGK- 酰胺、ERNRQAAAA SPENS RGK- 酰胺、和 ERNRQSAATNVENS SKK- 酰胺。

[0070] 另外的 GDNF 类似物可以包括功能性片段(例如, 本文中描述的任何片段)、具有本文中描述的任何修饰的肽、或其拟肽。这样的类似物和片段的活性可以利用本领域已知的任何方式进行测试。

[0071] BDNF

[0072] BDNF 是蛋白的神经生长因子家族的糖蛋白。该蛋白编码为 247 个氨基酸多肽(亚型 A)、255 个氨基酸多肽(亚型 B)、262 个氨基酸多肽(亚型 C)、276 个氨基酸多肽(亚型 D)、329 个氨基酸多肽(亚型 E)。成熟的 119 个氨基酸糖蛋白从更大的前体加工而产生促进神经元细胞群存活的营养因子。该成熟蛋白包括亚型 A 前蛋白(preprotein)的氨基酸 129-247、亚型 B 前蛋白的氨基酸 137-255、亚型 C 前蛋白的氨基酸 144-162、亚型 D 前蛋白的氨基酸 158-276、或亚型 E 前蛋白的氨基酸 211 (或 212)-329。BDNF 作用于 TrkB 受体和低亲和性神经生长因子受体(LNGFR 或 p75)。BDNF 能够支持已有神经元的神经元存活并且还能够促进新神经元的生长和分化。本发明的 BDNF 片段或类似物可以具有任何前述活性。这样的类似物和片段的活性可以利用本领域已知的任何方式进行测试。

[0073] BDNF 类似物描述在美国专利申请公开 No. 2004/0072291 中, 其包括在选自由 10、16、20、29、31、36、38、39、42、44、49、52、53、54、61、63、71、76、86、87、90、92、98、100、102、103 和 105 组成的组中的一个或多个位置处的 A、C、D、E、G、H、K、N P、Q R、S 或 T 的替代的那些。另外的替代描述在下表 2 中。

[0074] 表 2

[0075]

残基#	WT 残基	可能的替代
9	E	A C F G I L M P V W Y
10	L	I M F V W Y
11	S	A C F G I L M P V W Y
13	C	D E F H I K N P Q R S T V Y
14	D	A C F G I L M P V W Y
15	S	D F H I L N P Q W Y
16	I	W M Y
17	S	A C G P
18	E	T F H I P Q S
19	W	A C D E G H K N P Q R S T
20	V	W Y
21	T	D F H I L P W Y
22	A	D E H K N P Q R S T
23	A	H T
24	D	H P T
28	A	H T
31	M	W Y
32	S	A C G P
34	G	T D E H K N P Q R S
35	T	A C G P
36	V	F I L M W Y
38	V	W Y F I M
39	L	F I M V W Y
41	K	A C G H P S
42	V	I
44	V	F L M W Y
45	S	A C F P V Y

[0076]

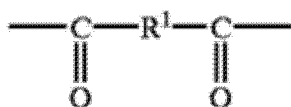
46	K	A C G P Q S T
47	G	D E H N P Q R S T
48	Q	A C G P
49	L	F I M V W Y
50	K	I P T
51	Q	A C G P
52	Y	I M V W
53	F	M W Y
55	E	A C G H N P Q S T
56	T	A C G P
57	K	A C G H P Q S T
58	C	D E G H K N P Q R S T
59	N	A C G P T
60	P	T
61	M	I V W Y
87	V	F I M W Y
88	R	A C G P
89	A	D E H K N Q R T
90	L	F I M V W Y
91	T	A C P G P
92	H	I W Y
93	D	P T
94	S	A C G P
95	K	H P
96	K	P
97	R	A C G P
98	I	H W
101	R	P T
102	F	I M V W Y
103	I	F M W Y
104	R	A C G P T
105	I	M W
106	D	A C G H I M P T
107	T	A C D E G H K N P Q S
108	S	A C D G H P
109	C	D E H K N P Q R S T
110	V	T
111	C	D E F H I K N P Q R S T V W Y
112	T	A C F G I L H P V W Y
113	L	任何氨基酸

[0077] BDNF 类似物还描述在美国专利 No. 6800607 中,其描述了用 1- 酰基 - 甘油修饰的 BDNF。这些类似物包括那些 A 修饰的 BDNF,其是式(1)的化合物:

[0078] $A(X-B)_n$

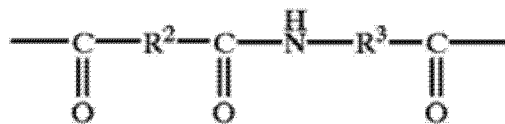
[0079] 其中 A 是脑源性神经营养因子的残基, B 是在甘油部分的 2- 位置处具有羟基的 1- 酰基 - 甘油衍生物的残基,其是通过从羟基除去氢原子制得的, X 是化学交键 (cross-linkage), 并且 m 是引入的平均数并且不小于约 0.5 ; (3) 根据以上(2)的 A 修饰的 BDNF, 其中 X 为下式(2)的基团:

[0080]



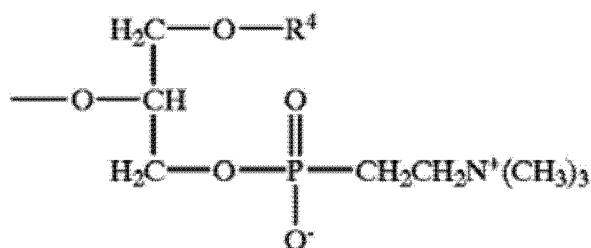
[0081] 其中 R^1 是亚烷基,或下式(3)的基团:

[0082]



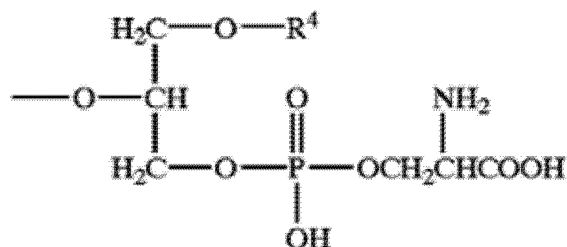
[0083] 其中 R^2 和 R^3 独立地是亚烷基;(4)根据以上(2)的A修饰的BDNF,其中1-酰基-甘油衍生物是1-酰基-甘油-3-磷酸胆碱、1-酰基-甘油-3-磷酸丝氨酸、或1-酰基-甘油-3-磷酸乙胺;(5)根据以上(2)的A修饰的BDNF,其中B是下式(4)的1-酰基-甘油-3-磷酸胆碱残基:

[0084]



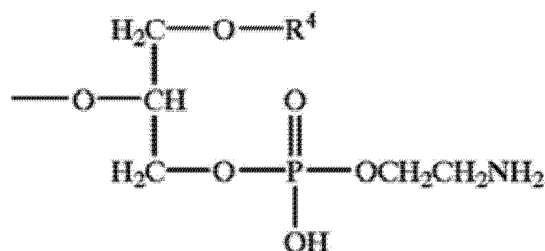
[0085] 其中 R^4 是酰基,下式(5)的1-酰基-甘油-3-磷酸丝氨酸残基:

[0086]



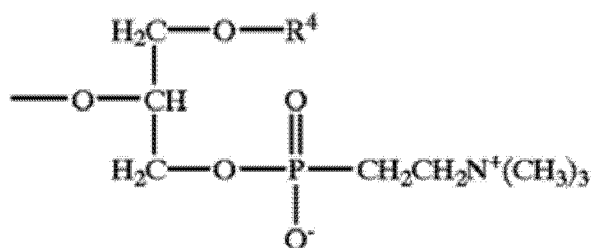
[0087] 其中 R^4 是酰基,或下式(6)的1-酰基-甘油-磷酸乙胺残基:

[0088]



[0089] 其中 R^4 是酰基;(6)根据以上(2)或(3)的A修饰的BDNF,其中B是下式(4)的基团:

[0090]



[0091] 其中 R^4 是酰基；(7)根据以上(2)、(3)、(4)、(5)和(6)中任一个的 A 修饰的 BDNF，其中酰基是具有 8 至 30 个碳原子的烷酰基；(8)根据以上(2)、(3)、(4)、(5)、(6)和(7)中任一个的 A 修饰的 BDNF，其中酰基是棕榈酰基；(9)根据以上(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)和(8)中任一个的 A 修饰的 BDNF，其中 m 为在约 1 至约 6 的范围；(11)根据以上(10)的 A 修饰的 BDNF，其中 R^1 是具有 2 至 10 个碳原子的直链亚烷基；(12)根据以上(10)的 A 修饰的 BDNF，其中 R^1 是三亚甲基。

[0092] 其他 BDNF 类似物包括在 PCT 公开 No. W096/15146 中描述的那些，其描述了 BDNF 与水溶性聚合物如聚乙二醇的轭合物。另外的 BDNF 类似物可以包括功能性片段(例如，本文中描述的任何片段)、具有本文中描述的任何修饰的肽、或其拟肽。这样的类似物的活性能够利用本领域已知的任何方法进行测试。

[0093] 肽载体

[0094] 本发明的化合物可以以本文中描述的任何多肽为特征，例如，表 1 中描述的任何肽(例如，Angiopep-1 或 Angiopep-2)，或其片段或类似物。在某些实施方式中，该多肽可以与本文中描述的多肽具有至少 35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、或甚至 100% 的同一性。该多肽相对于本文中描述的序列之一具有一个或多个(例如，2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个)替代。其他修饰在下面更详细地描述。

[0095] 本发明还以这些多肽的片段(例如，功能性片段)为特征。在某些实施方式中，这些片段能够被有效地输送至特定细胞型(例如，肝、眼、肺、肾、或脾)或在其中积累，或被有效地输送穿过 BBB。多肽的截短形式可以为来自该多肽的 N-端、该多肽的 C-端、或其组合的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 个或更多个氨基酸。其他片段包括其中该多肽的内部部分缺失的序列。

[0096] 另外的多肽可以通过利用本文中描述的测定或方法之一进行鉴定。例如，候选多肽可以通过传统肽合成进行生产，用紫杉醇(paclitaxel)轭合并给予实验室动物。生物学活性多肽轭合物可以如下鉴定，例如基于其增高用肿瘤细胞注射且用该轭合物进行治疗的动物的存活的能力(相比于没有用轭合物进行治疗(例如用未轭合的药剂进行治疗)的对照)。例如，生物学活性多肽可以基于其在原位脑灌注测定中在薄壁组织中的位置进行鉴定。

[0097] 也可以进行用来确定在其他组织中的积累的测定。多肽的标记轭合物可以给予动物，并且可以测量在不同器官中的积累。例如，轭合至可检测标记(例如，近-IR 荧光光谱标记如 Cy5.5)的多肽允许在体内可视化中活着。这样的多肽可以给予动物，并且可以检测器官中的该多肽的存在，由此允许确定在期望器官中该多肽积累的速率和量。在其他实施方式中，该多肽可以用放射活性同位素(例如 ^{125}I)进行标记。该多肽然后给予动物。在一个时间期之后，牺牲该动物并提取器官。然后可以利用本领域已知的任何方式测量在各个器

官中放射性同位素的量。通过比较在特定器官中标记的候选多肽的量与标记的对照多肽的量,能够确定该候选多肽进入特定组织中并积累的能力。恰当的阴性对照包括已知的不被有效地输送到特定细胞中的任何肽或多肽(例如,不穿过BBB的与Angiopep相关的肽,或任何其他肽)。

[0098] 另外的序列描述在美国专利No. 5807980(例如本文中的SEQ ID NO:102)、5780265(例如SEQ ID NO:103)、5118668(例如SEQ ID NO:105)。编码抑肽酶(aprotinin)类似物的一种示例性核苷酸序列 atgagaccag atttctgcct cgagccgccg tacactgggc cctgcaaagc tcgtatcatc cgttacttct acaatgcaaa ggcaggcctg tgtcagacct tcgtatacgg cggctgcaga gctaagcgta acaacttcaa atccgcggaa gactgcatgc gtacttgcgg tgggtgcttag;SEQ ID NO:6; Genbank 登录号为 X04666。抑肽酶类似物的其他实例可以通过利用国际申请No. PCT/CA2004/000011 中披露的合成抑肽酶序列(或其部分)进行蛋白质 BLAST (Genbank:www/ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 而找到。示例性抑肽酶类似物也可以以登录号 CAA37967 (GI:58005) 和 1405218C (GI:3604747) 找到。

[0099] 修饰的多肽

[0100] 在本发明中使用的肽载体和 GDNF、BDNF、或相关分子可以具有修饰的氨基酸序列。在某些实施方式中,修饰不会显著地破坏期望的生物学活性(例如穿过 BBB 的能力或神经展长激动剂活性)。该修饰可以降低(例如至少 5%、10%、20%、25%、35%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、或 95%)、可以不具有影响、或可以增加(例如至少 5%、10%、25%、50%、100%、200%、500% 或 1000%)初始多肽的生物学活性。修饰的肽或多肽可以具有或可以优化多肽的特性,如体内稳定性、生物利用度、毒性、免疫学活性、免疫学同一性、或轭合性能。

[0101] 修饰包括通过天然过程如翻译后加工、或通过本领域已知的化学修饰技术产生的那些。修饰可以发生在多肽中的任何地方,包括多肽骨架、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。相同类型的修饰可以以相同或不同程度存在于给定多肽的若干位点,并且多肽可以包含超过一种类型的修饰。多肽可以作为泛化的结果而被支化,并且它们可以为环状,具有或没有发生支化。环状的、支化的、和支化的环状多肽可以来自翻译后天然过程或者可以合成地形成。其他修饰包括乙二醇化、乙酰化、酰基化、插入乙酰氨基甲基(Acm)基团、ADP-核糖基化、烷基化、酰胺化、生物素化、甲酰化、羧乙基化、酯化、共价连接于核黄素、共价连接于血红素部分、共价连接于核苷酸或核苷酸衍生物、药物的共价连接、标记物(例如荧光或放射活性)的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联、环化、二硫键形成、脱甲基化、形成共价交联、形成半胱氨酸、形成焦谷氨酸、甲酰化、 γ -羧酸化、糖基化、GPI 锚形成、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒化、硫酸化、转运 tRNA 介导的氨基酸插入蛋白如精氨酸化和泛化。

[0102] 修饰的多肽也可以包括多肽序列中的氨基酸插入、缺失、或替代,是保守的或非保守的(例如, D-氨基酸, desamino acid)(例如,在这样的变化不实质性地改变该多肽的生物学活性的情况下)。尤其是,一个或多个半胱氨酸残基插入本发明的任何多肽的氨基或羧基末端能够有利于这些多肽的轭合,例如通过二硫键链接。例如,Angiopep-1 (SEQ ID NO:67)、Angiopep-2 (SEQ ID NO:97)、或 Angiopep-7 (SEQ ID NO:112)能够被修饰以包括在氨基末端处的单个半胱氨酸残基(分别是(SED ID NO:71、113 和 115),或在羧基末端处的单个半胱氨酸残基(分别是 SEQ ID NO:72、114 和 116)。氨基酸替代可以是保守的(即,其中

残基被另一个相同大致类型或基团替换)或非保守的(即,其中残基被另一种类型的氨基酸替换)。另外,非天然氨基酸可以替代天然氨基酸(即,非天然保守氨基酸替代或非天然的非保守氨基酸替代)。

[0103] 合成地形成的多肽可以包括由 DNA 非天然编码的氨基酸(例如,非天然或非自然的氨基酸)的替代。非天然氨基酸的实例包括 D-氨基酸、具有连接于半胱氨酸的硫原子的乙酰氨基基团的氨基酸、乙二醇化氨基酸、式 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (其中 n 为 2-6)的 ω 氨基酸、中性非极性氨基酸如肌氨酸、叔丁基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、和正亮氨酸。苯基甘氨酸可以替代 Trp、Tyr 或 Phe;瓜氨酸和蛋氨酸亚砷是中性非极性的,磺基丙氨酸是酸性的,而鸟氨酸是碱性的。脯氨酸可以用羟基脯氨酸替代并且保留赋予性能的构象。

[0104] 类似物可以通过替代突变(substitutional mutagenesis)产生并保留初始多肽的生物学活性。鉴定为“保守替代”的替代的实例在表 3 中示出。如果这样的替代导致不期望的变化,则引入其他类型的替代(在表 3 中称为“示例性替代”,或如参考氨基酸种类在本文中进一步描述的),并且筛选产物。

[0105] 功能或免疫学同一性的替代修饰通过以下实现,即选择对保持(a)替代区域中的多肽骨架的结构,例如,作为片或螺旋构象、(b)在靶位点处的分子的电荷或疏水性、或(c)侧链的体积,的影响显著不同的替代。天然残基基于共有侧链性能分成几类:

[0106] (1) 疏水性的:正亮氨酸、蛋氨酸(Met)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、组氨酸(His)、色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe);

[0107] (2) 中性亲水性的:半胱氨酸(Cys)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr);

[0108] (3) 酸性/带负电荷的:天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu);

[0109] (4) 碱性的:天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln)、组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg);

[0110] (5) 影响链取向的残基:甘氨酸(Gly)、脯氨酸(Pro);

[0111] (6) 芳香族的:色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)、组氨酸(His);

[0112] (7) 极性的:Ser、Thr、Asn、Gln;

[0113] (8) 碱性带正电荷的:Arg、Lys、His;以及

[0114] (9) 带电荷的:Asp、Glu、Arg、Lys、His。

[0115] 其他氨基酸替代列于表 3 中。

[0116] 表 3:氨基酸替代

[0117]

初始残基	示例性替代	保守替代
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, 正亮氨酸	Leu

[0118] 多肽衍生物和拟肽

[0119] 除了由天然氨基酸组成的多肽之外,拟肽或多肽类似物也被本发明涵盖并且能够形成本发明化合物中使用的肽载体或 GDNF、BDNF、或相关分子。多肽类似物作为具有与模板多肽类似的性能的非肽药物而用于制药工业。该非肽化合物称为“肽模拟物(peptide mimetics)”或拟肽(Fauchere et al., Infect. Immun. 54: 283-287, 1986; Evans et al., J. Med. Chem. 30:1229-1239, 1987)。与治疗有用的肽或多肽结构相关的肽模拟物可以用来产生等效或增强的治疗或预防效果。通常,拟肽结构上类似于示例多肽(即,具有生物学或药理学活性的多肽)如天然受体结合多肽,但具有通过本领域已知的方法,可选地被键接如 $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ (顺和反式)、 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 、 $-\text{COCH}_2-$ 等替代的一个或多个肽键接(Spatola, Peptide Backbone Modifications, Vega Data, 1:267, 1983; Spatola et al., Life Sci. 38:1243-1249, 1986; Hudson et al., Int. J. Pept. Res. 14:177-185, 1979; 以及 Weinstein, 1983, Chemistry and Biochemistry, of Amino Acids, Peptides and Proteins, Weinstein eds, Marcel Dekker, New York)。这样的多肽模拟物相对于天然多肽可以具有显著的优点,包括更经济的生产、更大的化学稳定性、增强的药理学性能(例如半衰期、吸收、潜力、效力)、降低的抗原性等等。

[0120] 尽管本文中描述的肽载体可以有效地穿过 BBB 或靶特定细胞型(例如本文中描述的那些),但是它们的有效性可能由于存在蛋白酶而降低。同样地,本发明中使用的 GDNF、BDNF、或相关分子的有效性可能类似地降低。血清蛋白酶具有特异底物要求,包括 L-氨基

酸和用于切割的肽键。此外,外肽酶(其代表血清中蛋白酶活性的最主要成分)通常作用于该多肽的第一肽键并且需要游离 N-端(Powell et al., Pharm. Res. 10:1268-1273, 1993)。据此,使用多肽的修饰形式经常是有利的。修饰的多肽保留初始 L-氨基酸多肽的结构特性,但有利地是不易于对通过蛋白酶和 / 或外肽酶的切割敏感。

[0121] 具有相同类型的 D-氨基酸(例如,对映异构体;代替 L-赖氨酸的 D-赖氨酸)的共有序列的一个或多个氨基酸的系统性替代可以用来产生更稳定的多肽。因此,如本文描述的多肽衍生物或拟肽可以都是 L-、都是 D-、或混合的 D、L 多肽。N-端或 C-端 D-氨基酸的存在增加多肽的体内稳定性,因为肽酶不能利用 D-氨基酸作为底物(Powell et al., Pharm. Res. 10:1268-1273, 1993)。反向 -D 多肽是包含 D-氨基酸的多肽,以相对于包含 L-氨基酸的多肽的反向序列排列。因此, L-氨基酸多肽的 C-端残基变为 D-氨基酸多肽的 N-端等。反向 D-多肽保留相同的三级构象并因此保留与 L-氨基酸多肽相同的活性,但对于体外和体内的酶促降解更稳定,因而具有比初始多肽更大的治疗效力(Brady and Dodson, Nature368:692-693, 1994 和 Jameson et al., Nature368:744-746, 1994)。除了反向 -D 多肽外,包含共有序列或基本相同的共有序列变化的限制多肽(constrained polypeptide)可以通过本领域熟知的方法产生(Rizo et al., Ann. Rev. Biochem. 61:387-418, 1992)。例如,限制多肽可以通过插入能够形成二硫键桥的半胱氨酸残基并由此导致产生环状多肽而生成。环状多肽不具有游离的 N-或 C-端。因此,它们不易感于由外肽酶的蛋白水解,尽管它们当然地易感于内肽酶,其不切割多肽末端。具有 N-端或 C-端 D-氨基酸的多肽以及环状多肽的氨基酸序列通常与它们的对应多肽的序列相同,除了分别存在 N-端或 C-端 D-氨基酸残基,或它们的环状结构。

[0122] 包含分子内二硫键的环状衍生物可以通过常规固相合成同时在选择用于环化的位置如氨基和羧基末端处并入合适 S-保护半胱氨酸或高半胱氨酸残基而制得(Sah et al., J. Pharm. Pharmacol. 48:197, 1996)。在完成链组装之后,环化可以如下进行:(1)通过选择性除去 S-保护基团,结果是相应的两个游离 SH-官能团的载体上氧化(on-support oxidation),从而形成 S-S 键,接着常规从该载体移出产物以及恰当的纯化程序,或(2)通过从载体除去多肽以及完全侧链去保护,接着在高度稀释水溶液中氧化游离 SH-官能团。

[0123] 包含分子内酰胺键的环状衍生物可以通过常规固相合成同时在选择用于环化的位置处并入合适氨基和羧基侧链保护的氨基衍生物而制得。包含分子内 -S-烷基键的环状衍生物可以通过常规固相化学同时在选择用于环化的位置处并入具有合适氨基保护的侧链、和合适 S-保护的半胱氨酸或高半胱氨酸残基的氨基酸残基而制得。

[0124] 对作用于多肽的 N-端或 C-端残基的肽酶赋予抗性的另一种有效途径是在肽末端处插入化学基团,以使修饰的多肽不再是用于该肽酶的底物。一种这样的修饰是在一个或两个末端处进行的多肽糖基化。某些化学修饰,尤其是 N-端糖基化,已被证实增大人血清中的多肽的稳定性(Powell et al., Pharm Res. 10:1268-1273, 1993)。增强血清稳定性的其他化学修饰包括但不限于插入 N-端烷基,由低级烷基或 1 至 20 个碳原子构成,如乙酰基,和 / 或插入 C-端酰胺或取代酰胺基团。尤其是,本发明包括由带有 N-端乙酰基和 / 或 C-端酰胺基的多肽构成的修饰多肽。

[0125] 本发明还包括其他类型的包含另外的化学部分(不是多肽的常见部分)的多肽衍生物,假定该衍生物保持期望的多肽功能活性。这样的衍生物的实例包括(1)氨基末端或另

一游离氨基的 N- 酰基衍生物, 其中该酰基可以是烷酰基(例如乙酰基, 己酰基, 辛酰基)、芳酰基(例如苯甲酰基) 或封端基团(保护基团, blocking group) 如 F-moc (苄氧羰基 -O-CO-); (2) 羧基末端或另一个游离羧基或羟基的酯; (3) 通过与氨或与合适胺的反应产生的羧基末端或另一游离羧基的酰胺; (4) 磷酸化衍生物; (5) 耦合至抗体或其他生物学配体的衍生物以及其他类型的衍生物。

[0126] 通过向本文中描述的多肽插入另外的氨基酸残基而得到的更长多肽序列也涵盖在本发明中。能够预期这样的更长多肽序列与以上描述的多肽具有相同生物学活性和特异性(例如细胞向性)。虽然不排除具有大量另外的氨基酸的多肽, 但是应理解, 一些大的多肽可以呈现掩盖该有效序列的构型, 由此阻止结合于靶(例如, LRP 受体家族的成员如 LRP 或 LRP2)。这些衍生物可以充当竞争性拮抗剂。因此, 尽管本发明涵盖多肽或具有延伸的本文描述的多肽的衍生物, 但是理想地该延伸不破坏这些多肽或其衍生物的细胞靶向活性。

[0127] 包括在本发明中的其他衍生物是由直接或通过间隔物(spacer), 如通过丙氨酸的短伸展或通过用于蛋白水解的公认位点(例如, 通过组织蛋白酶, 参见例如美国专利 No. 5126249 和欧洲专利 No. 495049) 而彼此共价连接的两个相同或两个不同多肽(如本文描述的) 构成的双多肽(dual polypeptide)。本文中描述的多肽的多聚体由来自相同或不同多肽或其衍生物形成的分子的聚合物构成。

[0128] 本发明还涵盖作为包含本文描述的多肽的嵌合或融合蛋白的多肽衍生物, 或其片段, 在其氨基-或羧基末端处、或这二者处连接至不同蛋白的氨基酸序列。这样的嵌合或融合蛋白可以通过编码该蛋白的核酸的重组表达产生。例如, 嵌合蛋白或融合蛋白可以包含与所述多肽之一共享的至少 6 个氨基酸(理想地导致具有等效或更大功能活性的嵌合或融合蛋白)。

[0129] 鉴定拟肽的测定分析

[0130] 如上所述, 产生以复制本文中描述的多肽的骨架结构和药效团显示(拟肽) 的非肽基化合物经常具有更大的代谢稳定性、更高的潜力、更长的作用持续时间、以及更好的生物利用度的属性。

[0131] 拟肽化合物可以利用本领域已知的组合文库方法中的大量途径中的任一种获得, 包括生物学文库, 空间可寻址平行固相或溶液相文库、需要去卷积(deconvolution) 的合成文库方法、“一珠一化合物(one-bead onecompound)” 文库方法、以及利用亲和性色谱选择的合成文库方法。生物学文库途径限于肽文库, 尽管其他四种途径可应用于肽、非肽寡聚物、或化合物的小分子文库(Lam, Anticancer Drug Des. 12:145, 1997)。用于合成分子文库的方法的实例可以在本领域中找到, 例如, 在: DeWitt et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:6909, 1993); Erb et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA91:11422, 1994); Zuckermann et al. (J. Med. Chem. 37:2678, 1994); Cho et al. (Science261:1303, 1993); Carell et al. (Angew. Chem, Int. Ed. Engl. 33:2059, 1994 and ibid2061); 以及在 Gallop et al. (Med. Chem. 37:1233, 1994) 中。化合物的文库可以存在于溶液中(例如, Houghton, Biotechniques13:412-421, 1992) 或珠子(Lam, Nature354:82-84, 1991)、芯片(Fodor, Nature364:555-556, 1993)、细菌或孢子(美国专利 No. 5223409)、质粒(Cull et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA89:1865-1869, 1992) 或噬菌体(Scott and Smith, Science249:386-390, 1990) 上、或荧光酶, 以及通过确定合适底物至产物的转化而

检测到的酶促标记。

[0132] 一旦鉴定了本文中描述的多肽,则可以通过任意的标准方法,包括但不限于差异溶解度(例如(沉淀)、离心、层析(例如亲和性、离子交换和尺寸排除)、或通过用于纯化肽、拟肽或蛋白质的任何其他标准技术进行分离和纯化。鉴定的感兴趣的多肽的功能性质可以利用本领域已知的任何功能测定分析进行评价。期望地,使用用于评价分子内信号转导中的下游受体功能(例如细胞增生)的测定分析。

[0133] 例如,本发明的拟肽化合物可以利用以下三阶段方法获得:(1)扫描本文描述的多肽以鉴定对于靶向本文描述的特定细胞型所需的二级结构的区;(2)利用构象受限二肽代用品来精制骨架几何结构并提供对应于这些代用品的有机平台;以及(3)利用最好的有机平台来显示设计用于模拟天然多肽的期望活性的候选物文库中的有机药效团。更详细地,该三阶段为如下。在第1阶段中,扫描主要(主导,lead)候选多肽并将它们的结构精简以鉴定对于它们的活性的要求。合成初始的一系列多肽类似物。在第2阶段中,最佳多肽类似物利用构象受限二肽代用品进行考察。吡啶啉-2-酮、吡啶啉-9-酮和喹啉酮氨基酸(分别为 I²aa、I⁹aa 和 Qaa)用作用于研究最佳肽候选物的骨架结构的平台。这些和相关的平台(在 Halab et al., Biopolymers 55:101-122, 2000 和 Hanseeian et al., Tetrahedron 53:12789-12854, 1997 中进行了综述)可以在多肽的特异区处引入从而在不同方向使药效团定向。这些类似物的生物学评价鉴定模拟对于活性的几何结构要求的改进的主要多肽。在第3阶段,来自最大活性的主要多肽的平台用于显示负责天然肽活性的药效团的有机代用品(organic surrogate)。药效团和支架以平行合成格式进行组合。多肽的衍生化以及以上的阶段可以利用本领域已知的方法通过其他方式完成。

[0134] 从本文中描述的多肽、多肽衍生物、拟肽或其他小分子确定的结构功能关系可以用来精制和制备具有类似或更好性能的类似分子结构。因此,本发明的化合物还包括共享本文描述的多肽的结构、极性、电荷特性和侧链性能分子。

[0135] 总之,基于本文的公开内容,本领域技术人员可以开发肽和拟肽筛选测定分析,其可用于鉴定用来将试剂靶向特定细胞型(例如本文中描述的那些)的化合物。这个发明的测定分析可以开发用于低通量、高通量、或超高通量筛选格式。本发明的测定分析包括适于自动化的测定分析。

[0136] 连接物

[0137] GDNF、BDNF 或相关分子可以直接地(例如,通过共价键如肽键)结合于肽载体或者可以通过连接物结合。连接物包括化学连接剂(例如可切割连接物)和肽。

[0138] 在一些实施方式中,连接物是化学连接剂。GDNF、BDNF 或相关分子和肽载体可以通过巯基、氨基(胺)、和/或糖类(碳水化合物, carbohydrate)或任何恰当反应基团进行偶合。同型双官能和异型双官能交联剂(偶合试剂)可从许多商业来源获得。可用于交联的区可以在本发明的多肽上找到。交联剂可以包括柔性臂,例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个碳原子。示例性交联剂包括 BS3([双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯];BS3 是靶向可访问伯胺的同型双官能 N-羟基琥珀酰亚胺酯)、NHS/EDS(N-羟基琥珀酰亚胺和 N-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二酰亚胺);NHS/EDC 允许伯胺基团与羧基偶合)、磺基-EMCS([N-ε-马来酰亚胺己酸]酰肼;磺基-EMCS 是对巯基和氨基反应性的异型双官能反应基团(马来酰亚胺和 NHS-酯)、酰肼(大多数蛋白质包含暴露的糖类并且酰肼是用于将羧基连接

至伯胺的试剂)、以及 SATA (N- 琥珀酰亚胺基 -S- 乙酰基硫代乙酸酯 ;SATA 是对胺反应性的并添加保护的巯基)。

[0139] 为了形成共价键,可以用作化学反应性基团的是各种各样的活性羧基(例如酯),其中羟基部分在修饰肽所需的水平是生理上可接受的。特定试剂包括 N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS)、N- 羟基 - 磺基琥珀酰亚胺(磺基 -NHS)、马来酰亚胺 - 苯甲酰基 - 琥珀酰亚胺(MBS)、 γ - 马来酰亚胺基 - 丁酰氧琥珀酰亚胺酯(GMBS)、马来酰亚胺基丙酸(MPA)、马来酰亚胺基己酸(MHA)、以及马来酰亚胺基十一酸(MUA)。

[0140] 伯胺是 NHS 酯的主要靶。存在于蛋白质的 N- 端上的可访问的 α - 胺基和赖氨酸的 ϵ - 胺与 NHS 酯发生反应。酰胺键在 NHS 酯耦合反应与伯胺发生反应释放 N- 羟基琥珀酰亚胺时形成。这些包含反应性基团的琥珀酰亚胺在本文中称为琥珀酰亚胺基。在本发明的某些实施方式中,蛋白质上的官能团将是硫醇基并且化学反应性基团将是含马来酰亚胺基的基团如 γ - 马来酰亚胺 - 丁酰胺(GMBA 或 MPA)。这样的含马来酰亚胺的基团在本文中称为马来酰基。

[0141] 马来酰亚胺基在反应混合物的 pH 为 6.5-7.4 时对于肽上的巯基是最大选择性的。在 pH7.0, 马来酰亚胺基与巯基(例如蛋白质如血清白蛋白或 IgG 上的硫醇基)的反应速率比与胺的反应速率快 1000 倍。因此,能够形成马来酰亚胺基和巯基之间的稳定硫醚键。

[0142] 在其他实施方式中,连接物包括至少一个氨基酸(例如,至少 2、3、4、5、6、7、10、15、20、25、40 或 50 个氨基酸的肽)。在某些实施方式中,连接物是单个氨基酸(例如,任意天然氨基酸如 Cys)。在其他实施方式中,使用富甘氨酸的肽如具有序列 [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n 的肽,其中 n 为 1、2、3、4、5 或 6,如在美国专利 No. 7271149 中描述的。在其他实施方式中,使用富丝氨酸的肽,如在美国专利 No. 5525491 中描述的。富丝氨酸的肽连接物包括式 [X-X-X-X-Gly]_y 的那些,其中至多两个 X 是 Thr,并且剩余的 X 为 Ser,而 y 为 1 至 5(例如, Ser-Ser-Ser-Ser-Gly, 其中 y 大于 1)。在一些情况下,连接物是单个氨基酸(例如任意氨基酸,如 Gly 或 Cys)。其他连接物包括刚性连接物(例如, PAPAP 和 (PT)_nP, 其中 n 为 2、3、4、5、6 或 7)以及 α - 螺旋连接物(例如, A(EAAAK)_nA, 其中 n 为 1、2、3、4 或 5)。

[0143] 合适连接物的实例是琥珀酸、Lys、Glu 和 Asp,或二肽如 Gly-Lys。当连接物是琥珀酸时,其一个羧基可以与氨基酸残基的氨基形成酰胺键,而其另一个羧基可以例如与肽或取代基(substituent)的氨基形成酰胺基。当连接物是 Lys、Glu 或 Asp,其羧基可以与氨基酸残基的氨基形成酰胺键,并且其氨基可以例如与取代基的羧基形成酰胺基。当 Lys 用作连接物,另外的连接物可以插入在 Lys 的 ϵ - 氨基和取代基之间。在一个特定实施方式中,另外的连接物是琥珀酸,其例如与 Lys 的 ϵ - 氨基或与取代基中存在的氨基形成酰胺键。在一个实施方式中,另外的连接物是 Glu 或 Asp (例如,其与 Lys 的 ϵ - 氨基形成酰胺键以及与取代基中存在的羧基形成另一个酰胺键),即,取代基是 N^ε - 酰基化赖氨酸残基。

[0144] 疾病

[0145] 其中增强神经元存活(例如降低神经元死亡速率)或增大神经元形成速率是有益的任何疾病或病症可以利用本发明的化合物进行治疗。这样的病症包括神经变性病,例如选自自由多聚谷氨酰胺序列延长病(例如亨廷顿氏病(HD)、齿状核红核苍白球丘脑下核萎缩(dentatorubropallidoluysian atrophy)、肯尼迪病(也称为脊髓延髓肌萎缩))以及脊髓小脑性共济失调(spinocerebellar ataxia)(例如 1 型、2 型、3 型(也称为马 - 约病)、6 型、7

型和 17 型)、另一三核苷酸重复扩增疾病(例如,脆性 X 染色体综合征,脆性 XE 脆性 XE 精神发育迟缓、弗里德赖希共济失调症(Friedreich's ataxia)、营养不良性肌强直(myotonic dystrophy)、8 型脊髓小脑性共济失调、和 12 型脊髓小脑性共济失调)、亚历山大病、阿耳珀病、阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、运动失调性毛细血管扩张症(ataxia telangiectasia)、Batten 病(也称为 SVSB 四氏病(Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten disease))、卡纳万病(Canavan disease)、Cockayne 综合征、皮质基底节变性、克雅二氏病、缺血性中风、克拉伯病、Lewy 体痴呆、多发性硬化、多系统萎缩、帕金森病、佩-梅二氏病、匹克病、原发性侧索硬化、植烷酸贮积症(Refsum's disease)、Sandhoff 病、谢耳德病(Schilder's disease)、脊髓损伤、脊髓性肌萎缩、SRO 三氏病(Steele Richardson Olszewski disease)、以及脊髓痨(Tabes dorsalis)。其他病症包括损伤(例如脊髓损伤)、脑震荡(concussion)、缺血性中风、以及出血性中风(hemorrhagic stroke)。

[0146] 给药和剂量

[0147] 本发明的特征还在于药物组合物,其包含治疗有效量的本发明的化合物。该组合物可以配制用于各种各样的药物递送系统。一种或多种生理可接受的赋形剂或载体也可以包括在该组合物中用于合适制剂。用于本发明中的合适制剂在 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed., 1985 中找到。对于用于药物递送的方法的简要综述,参见例如 Langer (Science 249:1527-1533, 1990)。

[0148] 药物组合物用于肠胃外、鼻内、局部、口腔、或外部给药,如通过经皮方式,用于预防和/或治疗性治疗。药物组合物可以肠胃外给药(例如,通过静脉内、肌内、或皮下注射),或通过口腔摄入,或通过受血管病或癌症影响的区域处的局部施加或动脉内注射。另外的给药途径包括血管内、动脉内、瘤内、腹膜内、心室内、硬膜内、以及鼻部、眼部、巩膜内、眶内、直肠、局部或喷雾给药。缓释给药也特别包括在本发明中,通过这样的方式作为储存注射液(depot injection)或可侵蚀植入物或组件。因此,本发明提供用于肠胃外给药的组合物,其包括溶解或悬浮在可接受载体,优选含水载体,例如水、缓冲水、盐水、PBS 等中的上述试剂。这些组合物可以包含药学上可接受的辅助物质,如恰当生理条件所需的,如 pH 调节和缓冲剂、毒性调节剂、润湿剂、清洁剂等。本发明还提供用于口腔递送的组合物,其可以包含惰性成分如用于药片、胶囊的制剂的粘结剂或填料等。此外,本发明提供用于外部给药(局部给药, local administration)的组合物,其可以包含惰性成分如用于霜剂、软膏剂的制剂的溶剂或乳化剂等。

[0149] 这些组合物可以通过传统灭菌技术进行灭菌,或者可以进行无菌过滤。所得含水溶液可以直接包装应用,或冻干,该冻干的制剂在给药之前与无菌含水载体组合。制剂的 pH 典型地为在 3 和 11 之间,更优选在 5 和 9 之间或在 6 和 8 之间,并且最优选在 7 和 8 之间,如 7 至 7.5。所得固体形式的组合物可以包装为多个单剂量单位,其每一个包含固定量的前述试剂或多个试剂,如在药片或胶囊的密封包装中。固体形式的组合物也可以包装在用于灵活量的容器中,如在设计用于局部可施加霜剂或软膏剂的可挤压管中。

[0150] 包含有效量的组合物可以给药以用于预防性或治疗性治疗。在预防性应用中,在对于神经学或神经变性病临床确定的诱因或增大的易感性的情况下,可以将组合物给予对象。本发明的组合物可以以足以延迟、降低、或优选地防止临床疾病发作的量给予对象(例

如,人)。在治疗性应用中,以足以治愈或至少部分地阻止病症的症状及其并发症的量将组合物给予已患有疾病(例如,神经学或神经变性病)的对象(例如人)。足以实现这个目的的量定义为“治疗有效量”,一个足以显著地改善与疾病或医学病症相关的一些症状的化合物的量。例如,在神经变性病(例如,本文中描述的那些)的治疗中,降低、防止、延迟、抑制或阻止疾病或病症的任何症状的试剂或化合物将是治疗有效的。试剂或化合物的治疗有效量不要求治愈疾病或病症,但将提供对于该疾病或病症的治疗以使该疾病或病症的发作被延迟、阻碍、或防止,或该疾病或病症症状被缓解,或者疾病或病症的期间被改变,或例如为较不严重或在个体中加速恢复。

[0151] 有效用于这种用途的量可以依赖于疾病或病症的严重程度以及对象的体重和总体状态,但通常的范围为每个对象每个剂量约 $0.05\ \mu\text{g}$ 至约 $1000\ \mu\text{g}$ (例如, $0.5\text{--}100\ \mu\text{g}$) 等效量的 GDNF、BDNF 或相关分子。用于初步给药和加强给药的合适方案典型地是通过初步给药,随后通过后续给药以每小时、每天、每周、或每月间隔一次或多次重复剂量。本发明组合物中存在的试剂的总有效量可以在相对较短时间期内作为单个剂量、或者作为推注或通过灌注给予哺乳动物,或者可以利用分段治疗协议给药,其中多个剂量在更长时期内给药(例如,每 4–6、8–12、14–16 或 18–24 小时,或每 2–4 天、1–2 周、一月一次的剂量)。可替换地,考虑足以在血液中维持治疗有效浓度的连续静脉内灌注。

[0152] 本发明组合物这存在以及应用于哺乳动物(例如人)的本发明的方法中使用的一种或多种试剂的治疗有效量可以在考虑该哺乳动物的年龄、体重、和病况的个体差异的情况下由普通医务人员确定。由于本发明的某些化合物表现出增强的穿过 BBB 的能力,所以本发明化合物的剂量可以低于对于未联合激动剂的治疗效果所需的等剂量(例如,低于或等于其的约 90%、75%、50%、40%、30%、20%、15%、12%、10%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、或 0.1%)。本发明的试剂以有效量给予对象(例如哺乳动物,如人),该量为在治疗的对象中产生期望结果(例如保持神经元、新神经元生长)的量。治疗有效量也可以由本领域技术人员依据经验确定。

[0153] 相比于每周 0.1 至 2500 (例如 2000 、 1500 、 1000 、 500 、 100 、 10 、 1 、 0.5 或 0.1) μg , 每周一次或多次(例如每周 2、3、4、5、6 或 7 次或更多次)的每个剂量的 GDNF、BDNF 或相关分子,对象也可以接受在约 0.05 至 $1000\ \mu\text{g}$ 范围内的等效剂量的试剂。对象也可以接受每两周或三周一的每个剂量在 0.1 至 $3000\ \mu\text{g}$ 范围内的组合物的试剂。

[0154] 包括有效量的本发明的组合物的单次或多次给药可以由治疗医师所选的剂量水平和方式进行。剂量和给药时间安排可以基于对象的疾病或病症严重程度加以确定和调整,其可以根据临床医务人员通常采用的方法或本文描述的那些方法在整个治疗期间进行监控。

[0155] 本发明的化合物可以联合传统治疗方法或疗法一起使用或者可以与传统治疗方法或疗法分开使用。

[0156] 当本发明的化合物联合利用其他试剂的疗法进行给药时,它们可以顺序给药或同时给予个体。可替换地,根据本发明的药物组合物可以由本发明的化合物连同药学可接受赋形剂(如本文中描述的那些)以及本领域已知的另一种治疗性或预防性试剂的组合构成。

[0157] 实施例 1

[0158] Angiopep-2/GDNF 构建体

[0159] 生成包括 Angiopep-2 和 hGDNF 序列 (hGDNF⁷⁸⁻²¹¹) 的构建体。这些构建体包括 N-端 (His)₆ 标签、凝血酶切割位点、Angiopep-2 序列以及 GDNF 序列。还生成对照肽, 其没有 Angiopep-2 序列 (图 2)。这些序列的 N-端部分的氨基酸序列示于图 3。用于克隆这些构建体的策略描述在图 4-7 中。相似的策略可以用于生成 BDNF 构建体。这些构建体的序列示于图 8-12 中。显示结合于 GFR α 1 的 Angiopep-2-GDNF 化合物的示意图示于图 13 中。

[0160] 生成另外的 GDNF 构建体, 如图 14 中所示。这些包括其中 Angiopep-2 附着在其 N-端的 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹ (An2-hGDNF); 其中 Angiopep-2 附着在其 C-端的 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹ (hGDN F-An2); 其中反向 Angiopep-2 附着在其 N-端的 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹ (An2NT-hGDNF); 其中 Angiopep-2 通过柔性 ((GGGS)₂) 连接物附着在其 N-端的 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹ (An2-Flex-hGDNF); 其中 Angiopep-2 通过刚性 (PAPAP) 连接物附着在其 N-端的 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹ (An2-Rig-hGDNF); 以及其中 Angiopep-2 通过螺旋 (A(EAAAK)₂A) 连接物附着在其 N-端的 hGDNF⁷⁸⁻²¹¹ (An2-Hel-hGDNF)。

[0161] 实施例 2

[0162] GDNF 构建体轭合物的受体结合

[0163] 为了检测 GDNF 轭合物的受体结合, 使用双夹心 Elisa。简言之, 将小鼠抗-人 IgG 抗体结合至一个板 (图 15)。添加 GFR α 1 受体 /IgG Fc 融合体, 其结合至这些抗体。为了检测配体结合, 将 GDNF、GDNF 轭合物、或 Angiopep-2 各自添加至这些板。然后将这些板依次用羊抗-GDNF 抗体和碱性磷酸酶-轭合的兔抗-羊 IgG 抗体处理。然后将这些样品用对硝基苯基磷酸酯 (p-NPP) (一种在 AP 处理后从无色变化至黄色的碱性磷酸酶 (AP) 底物) 处理。蛋白质的结合基于这种颜色变化进行检测。

[0164] 在这种测定分析中, 所有测试的融合蛋白能够在类似于 GDNF 本身的水平上结合 GDNF 受体 (图 16)。没有观察到 Angiopep-2 (一种阴性对照) 结合该受体。对每种蛋白计算各自的结合常数, 如下表中所示。如可以看到的, 所有融合蛋白能够有效地结合 GDNF 受体。

	Kd (nM)	Bmax (A₄₀₅/min) x 10⁻³
GDNF	0.24	155
An2-GDNF	0.68	146
GDNF-An2	0.53	155
An2NT-GDNF	0.31	161
An2-Flex-GDNF	0.16	161
An2-Rig-GDNF	0.82	202
An2-Hel-GDNF	0.27	142
An2	ND	ND

[0166] 实施例 3

[0167] 同型二聚体的形成

[0168] 如上所述, 已知 GDNF 通过二硫键形成同型二聚体 (图 17)。利用 An2-GDNF 蛋白也观察到这样的二聚体的形成 (图 18)。通过用还原试剂如二硫苏糖醇 (DTT) 处理, 这些二硫键可以被还原。

[0169] 实施例 4

[0170] GDNF 信号转导级联的激活

[0171] 如以上解释的, GDNF 结合至 GFR $\alpha 1$ 受体。该配体 - 受体复合物然后结合至酪氨酸激酶受体 RET。这种受体然后可以激活两个路径, 通过磷脂酰肌醇 3- 激酶 (PI3K) 的 Akt 路径和通过 Ras 的 Erk 路径。这些路径各自的激活导致增加的细胞存活和增生 (图 19)。

[0172] 为了测试融合蛋白是否能够激活这些路径, 将细胞用 GDNF、An2-GDNF 处理十分钟, 或未处理。根据这些实验, 利用 GDNF 和 An2-GDNF 二者观察磷酸化 RET、磷酸化 Erk、以及磷酸化 Akt。这些结果表明, 与 GDNF 一样, An2-GDNF 能够激活 GDNF 路径。

[0173] 实施例 5

[0174] 原位脑灌注

[0175] 为了确定 GDNF 融合蛋白是否能够穿过血脑屏障, 实施原位灌注测定分析。这样的测定分析例如描述在 PCT 公开 W02006/086870 中。根据这些结果, 观察到 Angiopep-2-GDNF 轭合物比未轭合的 GDNF 远远有效地穿过 BBB (图 21)。

[0176] 其他实施方式

[0177] 在本说明书中提及的所有专利、专利申请 (包括美国临时申请 No. 61/186, 246, 于 2009 年 7 月 1 日提交) 以及出版物, 以如同各个独立的专利、专利申请、或出版物特别地和单个地指出通过引用而被结合的程度, 将它们并入本文供参考。

GDNF 序列**亚型 1**

```

1 mklwdvvavc lvlhtasaf plpagkrppe apaedrsigr rrapfalssd snmpedypdq
61 fddvmdfiqa tikrlkrspd kqnavlprre rnrqaaaanp ensrgkgrrg qrgknrgcvl
121 taihlntvdl glgyetkeel ifrycsgscd aaettydkil knlsrnrrii sdkvgqaccr
181 piafdddlf lddnlvyhil rkhsakrcgc i

```

亚型 2

```

1 mklwdvvavc lvlhtasaf plpaanmped ypdqfddvmd fiqatikrlk rspdkqnavl
61 prrernrqaa aanpensrgk grggrgknr gcvtaihin vtdlglgyet keelifrycs
121 gscdaaetty dkilknlsrn rrlvsdkvgg accrpiafdd dlsfiddnlv yhihrkhsak
181 rcgci

```

亚型 3

```

1 mgcrgclpga aphrvrlpaa npensrgkgr rggrgknrgc vitaihlntv dglgyetke
61 elifrycsgs cdaaettydk ilknlsrnrr lvskvggac crpiafddd sfiddnlvyh
121 ilrkhsakrc gci

```

BDNF 序列**亚型 A**

```

1 mtifltmvi syfgcmkaap mkeanirgqg glaypgvrth gtlesvngpk agsrgltsia
61 dtfehviele ldedqkvrpn eenkdadly tsrvmlssqv plepplflle eeyknyldaa
121 nmsmrvrhrs dparrgelsv cdsisewvta adkktavdms ggtvtvlekv pvskgqlkqy
181 fyetkcnpmg ytkegcrgid krhwnsqcrt tgsyvraltm dskkrigwrf iridtsvcvt
241 ltikrgr

```

亚型 B

```

1 mfhqvrrvmt ilfltmvisy fgcmkaapmk eanirgqgg l aypgvrthgt lesvngpkag
61 srgltsladt fehvieell edqkvrpnee nnkdadyts rvmllssqvp leppllflle
121 yknyldaanm smrvrrhsdp arrgelsvcd sisewvtaad kktavdmsgg tvvtvlekvvp
181 skgqlkqyfy etkcnpmgyt kegcrgidkr hwnsqcrttq syvraltmds kkrigwrfir
241 idtsvcvtit ikrgr

```

亚型 C

```

1 mgsreeewfh qvrrvmtlf ltmvisyfgc mkaapmkean irgqggglayp gvrthgtles
61 srgltslads ltsladdfeh vieelldedq kvrpneennk dadlytsrvml lssqvplepp
121 llflleeykn ylmaanmsmr vrrhsdparr gelsvcdsis ewvtaadkkt avdmsggtvt
181 vlekvpvskg qlkqyfyetk cnpmgytkeg crgidkrhwn sqcrttqsyv raltmdskkr
241 igwrfiridtsvcvtltikr gr

```

亚型 D

```

1 mlcaislcar vrklrsagrc gkfhqvrrvm tilfltmvis yfgcmkaapm keanirgqgg
61 laypgvrthg tlesvngpka gsrgltslad tfehvielel dedqkvrpne ennkdadlyt
121 srvmllssqv leppllflle eyknyldaan msrmvrrhsd parrgelsvc dsisewvtaa
181 dkktavdmsg gtvvtvlekv vskgqlkqyf yetkcnpmgy tkegcrgidk rhwnsqcrtt
241 qsyvraltmd skkrigwrfi ridtsvcvtl tikrgr

```

亚型 E

```

1 mogatsflhe ctrlilvttq naeflqkqlq vhtcfgyvph asvwhdcasq kkgcavylhv
61 svefnklipe ngfikfhqvr rvmtilfltm visyfgcmka apmkeanirg qgglaypgvr
121 thgtlesvng pkagsrglts ladtfehvie elldedqkvr pneennkdad lytsrvmlss
181 qvpleppllf lleeyknyld aanmsmrvrr hsdparrgel svcdsisewv taadkktavd
241 msggtvtvle kvpvskgqik qyfyetkcnp mgytkegcrg idkrhwnsqc rttqsyvral
301 tmdskkrigw rfiridtscv cttikrgr

```

图 1

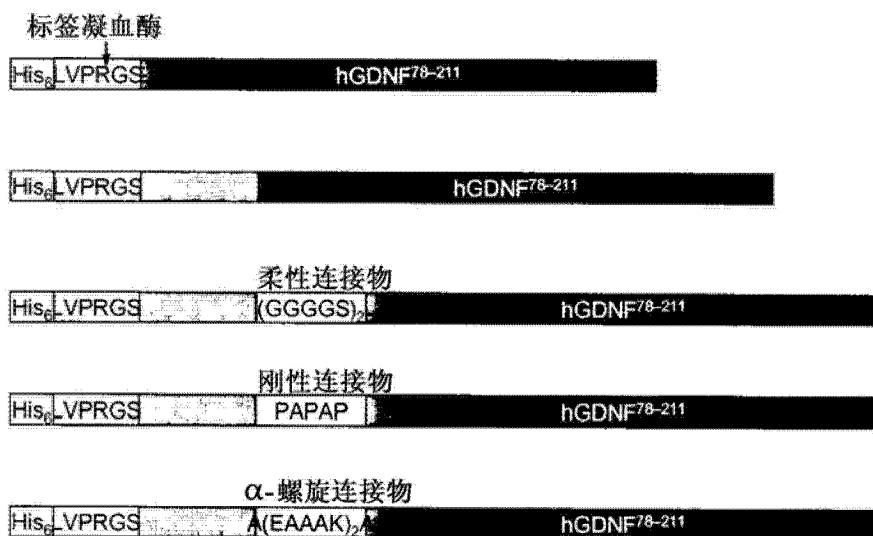


图 2

1) 柔性连接物

- (GGGGS)₁₋₃

His6-An2-(GGGGS)₂-hGDNF:

MGSSHHHHHHSSGLVPR^LGSHTFFYGGSRGKRNNFKTEEYGGGGSGGGGS-(hGDNF)

2) 刚性连接物

- PAPAP
- (PT)₂₋₇P

His6-An2-(PAPAP)-hGDNF:

MGSSHHHHHHSSGLVPR^LGSHTFFYGGSRGKRNNFKTEEY-PAPAP-(hGDNF)

3) 螺旋形成连接物

- A(EAAAK)₂₋₅A

图 3

His₆-An2-hGDNF 的构建

Angiopep-2

NdeI

His Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys

CAT ACC TTT TTC TAT GGC GGC AGC CGT GGC AAA
 GTA TGG AAA AAG ATA CCG CCG TCG GCA CCG TTT

Arg Asn Asn Phe Lys Thr Glu Glu Tyr Met Ser (人 GDNF⁷⁸⁻²¹¹)

CGC AAC AAT TTC AAG ACC GAG GAG TAT ATG TCT
 GCG TTG TTA AAG TTC TGG CTC CTC ATA TAC AGA

BseRI

Angiopep-2 (NdeI)

5'-TACCTTTTCTATGGCGGCAGCCGTGGCAAACGCAACAATTTCAAGACCGAGGAGTA-3'
 3'-GGAAAAAGATACCGCCGTCGGCACCCTTTCGCTTGTAAAGTTCTGGCTCCTCATAT-5'

1. 退火寡核苷酸
2. 用 T4 聚核苷酸激酶的磷酸化结束
3. 用 NdeI 消化的 pET28a-hGDNF 中的连接和去磷酸化
4. 通过用 BseRI (An2 中仅有的) 消化来验证正确取向

Oligo1: 5'-TACCTTTTCTATGGCGGCAGCCGTGGCAAACGCAACAATTTCAAGACCGAGGAGTA-3'

Oligo2: 5'-TATACTCCTCGGTCTTGAAATTGTTGCGTTTGCCACGGCTGCCGCCATAGAAAAAGG-3'

图 4

His₆-An2-(GGGGS)₂-hGDNF 的构建

Angiopep-2

His Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr Glu Glu Tyr

CAT ACC TTT TTC TAT GGC GGC AGC CGT GGC AAA CGC AAC AAT TTC AAG ACC GAG GAG TAT
GTA TGG AAA AAG ATA CCG CCG TCG GCA CCG TTT GCG TTG TTA AAG TTC TGG CTC CTC ATA

NdeI BseRI

连接物(GGGGS)₂

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ser (人GDNF⁷⁸⁻²¹¹)

GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT GGT GGG TCT ATG TCT
CCA CCG CCA CCG AGC CCG CCA CCA CCC AGA TAC AGA

An2-(GGGGS)₂ (NdeI)

5' -TACCTTTTCTATGGCGGCAGCCGTGGCAAACGCAACAATTTCAAGACCGAGGAGTATGGTGG
3' - GGAAAAAGATACCGCCGTCGGCACC GTTGGCGTTGTTAAAGTTCTGGCTCCTCATACCACC

CGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTC-3'
GCCACCGAGCCCGCCACCACCCAGAT-5'

1. 退火寡核苷酸
2. 用 T4 聚核苷酸激酶的磷酸化结束
3. 用 NdeI 消化的 pET28a-hGDNF 中的连接和去磷酸化
4. 通过用 BseRI (An2 中仅有的) 消化来验证正确取向

Oligo1 (An2FlexFor)

5' -TACCTTTTCTATGGCGGCAGCCGTGGCAAACGCAACAATTTCAAGACCGAGGAGTATGGTGG
CGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTC-3'

Oligo2 (An2FlexRev)

5' -TAGACCCACCACCGCCCGAGCCACCGCCACCATACTCCTCGGTCTTGAAATTGTTGCGTTTGC
CACGGCTGCCGCCATAGAAAAAGG-3'

图 5

His₆-An2-(PAPAP)-hGDNF的构建

Angiopep-2

His Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr Glu Glu Tyr

CAT ACC TTT TTC TAT GGC GGC AGC CGT GGC AAA CGC AAC AAT TTC AAG ACC GAG GAG TAT
 GTA TGG AAA AAG ATA CCG CCG TCG GCA CCG TTT GCG TTG TTA AAG TTC TGG CTC CTC ATA

NdeI 连接物(PAPAP) BseRI

Pro Ala Pro Ala Pro Met Ser (人GDNF⁷⁸⁻²¹¹)

CCA GCT CCA GCT CCT ATG TCT

GGT CGA GGT CGA GGA TAC AGA

An2-(PAPAP) (NdeI)

5' -TACCTTTTTTCTATGGCGGCAGCCGTGGCAAACGCAACAATT

3' - GGAAAAAGATACCGCCGTCGGCACCGTTTGC GTTGTAA

CAAGACCGAGGAGTATCCAGCTCCAGCTCC-3'

IGTTCTGGCTCCTCATAGGTCGAGGTCGAGGAT-5'

1. 退火寡核苷酸
2. 用 T4 聚核苷酸激酶的磷酸化结束
3. 用 NdeI 消化的 pET28a-hGDNF 中的连接和去磷酸化
4. 通过用 BseRI (An2 中仅有的) 消化来验证正确取向

Oligo1 (An2RigFor)

5' - TACCTTTTTTCTATGGCGGCAGCCGTGGCAAACGCAACAATTT

CAAGACCGAGGAGTATCCAGCTCCAGCTCC-3'

Oligo2 (An2RigRev)

5' - TAGGAGCTGGAGCTGGATACTCCTCGGTCTTGAAATTGTTGCG

TTTGCCACGGCTGCCGCCATAGAAAAAGG-3'

图 6

His₆-An2-A(EAAAK)₂A-hGDNF的构建

Angiopep-2

His Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr Glu Glu Tyr

CAT ACC TTT TTC TAT GGC GGC AGC CGT GGC AAA CGC AAC AAT TTC AAG ACC GAG GAG TAT
GTA TGG AAA AAG ATA CCG CCG TCG GCA CCG TTT GCG TTG TTA AAG TTC TGG CTC CTC ATA
NdeI BseRI

连接物A(EAAAK)₂A

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Met Ser (人GDNF⁷⁸⁻²¹¹)
GCT GAA GCT GCG GCA AAA GAA GCA GCG GCT AAA GCT ATG TCT
CGA CTT CGA CGC CGT TTT CTT CGT CGC CGA TTT CGA TAC AGA

An2-A(EAAAK)₂A (NdeI)

5'-TACCTTTTCTATGGCGGCAGCCGTGGCAAACGCAACAATTTCAAGACCGAGGAGTATGCTGAAG
3'- GGAAAAAGATACCGCCGTCGGCACCGTTTGCCTTGTTAAAGTTCTGGCTCCTCATACGACTTC

CTGCGGCAAAAGAAGCAGCGGCTAAAGC-3'
GACGCCGTTTCTTCGTCGCCGATTTTCGAT-5'

1. 退火寡核苷酸
2. 用 T4 聚核苷酸激酶的磷酸化结束
3. 用 NdeI 消化的 pET28a-hGDNF 中的连接和去磷酸化
4. 通过用 BseRI (An2 中仅有的) 消化来验证正确取向

Oligo1 (An2HELFor)

5'-TACCTTTTCTATGGCGGCAGCCGTGGCAAACGCAACAATTTCAAGACCGAGGAGTATGCTGAAG

CTGCGGCAAAAGAAGCAGCGGCTAAAGC-3'

Oligo2 (An2HELRev)

5'-TAGCTTTAGCCGCTGCTTCTTTTGCCGCAGCTTCAGCATACCTCGGTCTTGAAATTGTTGCGT

TTGCCACGGCTGCCGCCATAGAAAAGG-3'

图 7

His₆-hGDNF

_____ His- 标签 _____ 凝血酶 _____

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAT
M G S S H H H H H S S G L V P R G S H
ATGTCTCCTGATAAACAAATGGCTGTCCTGCCACGCCGCGAACGCAATCGTCAGGCGGCG
M S P D K Q M A V L P R R E R N R Q A A
GCAGCGAATCCTGAAAAATCCCGTGGCAAAGGTCGCCGTGGTCAACGTGGCAAGAATCGT
A A N P E N S R G K G R R G Q R G K N R
GGTTGCGTACTGACTGCAATCCATCTGAATGTTACCGACCTGGGTCTGGGTTACGAGACG
G C V L T A I H L N V T D L G L G Y E T
AAAGAGGAGCTGATCTTCCGTTATTGCTCCGGTTCCTGCGACGCTGCGGAGACTACCTAT
K E E L I F R Y C S G S C D A A E T T Y
GACAAAATTCTGAAGAACCTGTCTCGTAATCGTCGTCTGGTCAGCGACAAAGTTGGCCAG
D K I L K N L S R N R R L V S D K V G Q
GCGTGCTGCCGCCCCGATTGCTTTTGACGACGATCTGTCCTTTCTGGACGATAACCTGGTG
A C C R P I A F D D D L S F L D D N L V
TACCATATTCTGCGTAAACACAGCGCCAAGCGTTGTGGTTGCATCTAG
Y H I L R K H S A K R C G C I *

图 8

His₆-An2-hGDNF

His- 标签 凝血酶

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAT
M G S S H H H H H S S G L V P R G S H

Angiopep-2

ACCTTTTCTATGGCGGCAGCCGTGGCAAACGCAACAATTTCAAGACCGAGGAGTAT
T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
ATGTCTCCTGATAAACAAATGGCTGTCCTGCCACGCCGCGAACGCAATCGTCAGGCGGCG
M S P D K Q M A V L P R R E R N R Q A A
GCAGCGAATCCTGAAAATTCCCGTGGCAAAGGTGCGCGTGGTCAACGTGGCAAGAATCGT
A A N P E N S R G K G R R G Q R G K N R
GGTTGCGTACTGACTGCAATCCATCTGAATGTTACCGACCTGGGTCTGGGTTACGAGACG
G C V L T A I H L N V T D L G L G Y E T
AAAGAGGAGCTGATCTTCCGTTATTGCTCCGGTTCCTGCGACGCTGCGGAGACTACCTAT
K E E L I F R Y C S G S C D A A E T T Y
GACAAAATTCTGAAGAACCTGTCTCGTAATCGTCGTCTGGTCAGCGACAAAGTTGGCCAG
D K I L K N L S R N R R L V S D K V G Q
GCGTGCTGCCGCCCGATTGCTTTTGACGACGATCTGTCCTTTCTGGACGATAACCTGGTG
A C C R P I A F D D D L S F L D D N L V
TACCATATTCTGCGTAAACACAGCGCCAAGCGTTGTGGTTGCATCTAG
Y H I L R K H S A K R C G C I *

图 9

His₆-An2-(GGGGS)₂-hGDNF

His- 标签 凝血酶

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAT
M G S S H H H H S S G L V P R G S H

Angiopep-2

ACCTTTTCTATGGCGGCAGCCGTGGCAAACGCAACAATTTCAAGACCGAGGAGTAT
T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y

柔性连接物

GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCTATGTCTCCTGATAAACAAATGGCTGTCCTG
G G G G S G G G G S M S P D K Q M A V L
CCACGCCGCGAACGCAATCGTCAGGCGGCGGCAGCGAATCCTGAAAATTCCTGGCAAA
P R R E R N R Q A A A A N P E N S R G K
GGTCGCCGTGGTCAACGTGGCAAGAATCGTGGTTGCGTACTGACTGCAATCCATCTGAAT
G R R G Q R G K N R G C V L T A I H L N
GTTACCGACCTGGGTCTGGGTACGAGACGAAAGAGGAGCTGATCTTCCGTTATTGCTCC
V T D L G L G Y E T K E E L I F R Y C S
GGTTCCTGCGACGCTGCGGAGACTACCTATGACAAAATTCTGAAGAACCTGTCTCGTAAT
G S C D A A E T T Y D K I L K N L S R N
CGTCGTCTGGTCAGCGACAAAGTTGGCCAGGCGTGCTGCCGCCGATTGCTTTTGACGAC
R R L V S D K V G Q A C C R P I A F D D
GATCTGTCTTTCTGGACGATAACCTGGTGTACCATATTCTGCGTAAACACAGCGCCAAG
D L S F L D D N L V Y H I L R K H S A K
CGTTGTGGTTGCATCTAG
R C G C I *

图 10

His₆-An2-(PAPAP)-hGDNF

_____ His- 标签 _____ 凝血酶 _____
 ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAT
 M G S S H H H H H S S G L V P R G S H
 _____ Angiopep-2 _____
 ACCTTTTCTATGGCGGCAGCCGTGGCAAACGCAACAATTTCAAGACCGAGGAGTAT
 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
 _____ 刚性连接物 _____
 CCAGCTCCAGCTCCTATGTCTCCTGATAAACAAATGGCTGTCTCCTGCCACGCCGCGAACGC
 P A P A P M S P D K Q M A V L P R R E R
 AATCGTCAGGCGGCGGCAGCGAATCCTGAAAATTCCTGGCAAAGGTCGCCGTGGTCAA
 N R Q A A A A N P E N S R G K G R R G Q
 CGTGGCAAGAATCGTGTTGCGTACTGACTGCAATCCATCTGAATGTTACCGACCTGGGT
 R G K N R G C V L T A I H L N V T D L G
 CTGGGTTACGAGACGAAAGAGGAGCTGATCTTCCGTTATTGCTCCGGTTCCTGCGACGCT
 L G Y E T K E E L I F R Y C S G S C D A
 GCGGAGACTACCTATGACAAAATTCTGAAGAACCTGTCTCGTAATCGTCGTCTGGTCAGC
 A E T T Y D K I L K N L S R N R R L V S
 GACAAAGTTGGCCAGGCGTGCTGCCGCCGATTGCTTTTGACGACGATCTGTCCTTTCTG
 D K V G Q A C C R P I A F D D D L S F L
 GACGATAACCTGGTGTACCATATTCTGCGTAAACACAGCGCCAAGCGTTGTGGTTGCATC
 D D N L V Y H I L R K H S A K R C G C I
 TAG
 *

图 11

His- 标签 凝血酶

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAT
M G S S H H H H H S S G L V P R G S H

Angiopep-2

ACCTTTTTCTATGGCGGCAGCCGTGGCAAACGCAACAATTTCAAGACCGAGGAGTAT
T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y

α -螺旋连接物

GCTGAAGCTGCGGC AAAAGAAGCAGCGGCTAAAGCTATGTCTCCTGATAAACAAATGGCT
A E A A A K E A A A K A M S P D K Q M A
GTCCTGCCACGCCGCGAACGCAATCGTCAGGCGGCGGCAGCGAATCCTGAAAATTC CCGT
V L P R R E R N R Q A A A A N P E N S R
GGCAAAGGTGCGCGTGGTCAACGTGGCAAGAATCGTGGTTGCGTACTGACTGCAATCCAT
G K G R R G Q R G K N R G C V L T A I H
CTGAATGTTACCGACCTGGGTCTGGGTACGAGACGAAAGAGGAGCTGATCTTCCGTTAT
L N V T D L G L G Y E T K E E L I F R Y
TGCTCCGGTTCCTGCGACGCTGCGGAGACTACCTATGACAAAATTCTGAAGAACCTGTCT
C S G S C D A A E T T Y D K I L K N L S
CGTAATCGTCGTCTGGTCAGCGACAAAGTTGGCCAGGCGTGCTGCCGCCCCGATTGCTTTT
R N R R L V S D K V G Q A C C R P I A F
GACGACGATCTGTCTTTCTGGACGATAACCTGGTGTACCATATTCTGCGTAAACACAGC
D D D L S F L D D N L V Y H I L R K H S
GCCAAGCGTTGTGGTTGCATCTAG
A K R C G C I *

40

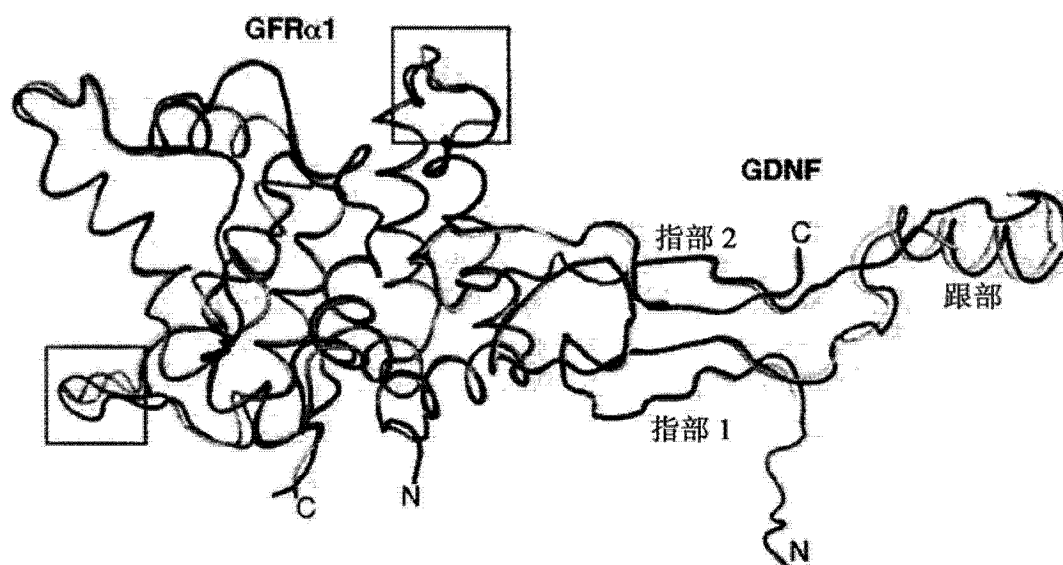
结合至 GFR α 1 的 GDNF 的结构

图 13

1- hGDNF**2- An2-hGDNF****3- hGDNF-An2****4- An2NT-hGDNF (An2 的反向序列)****5- An2-Flex-hGDNF****6- An2-Rig-hGDNF****7- An2-Hel-hGDNF**

图 14

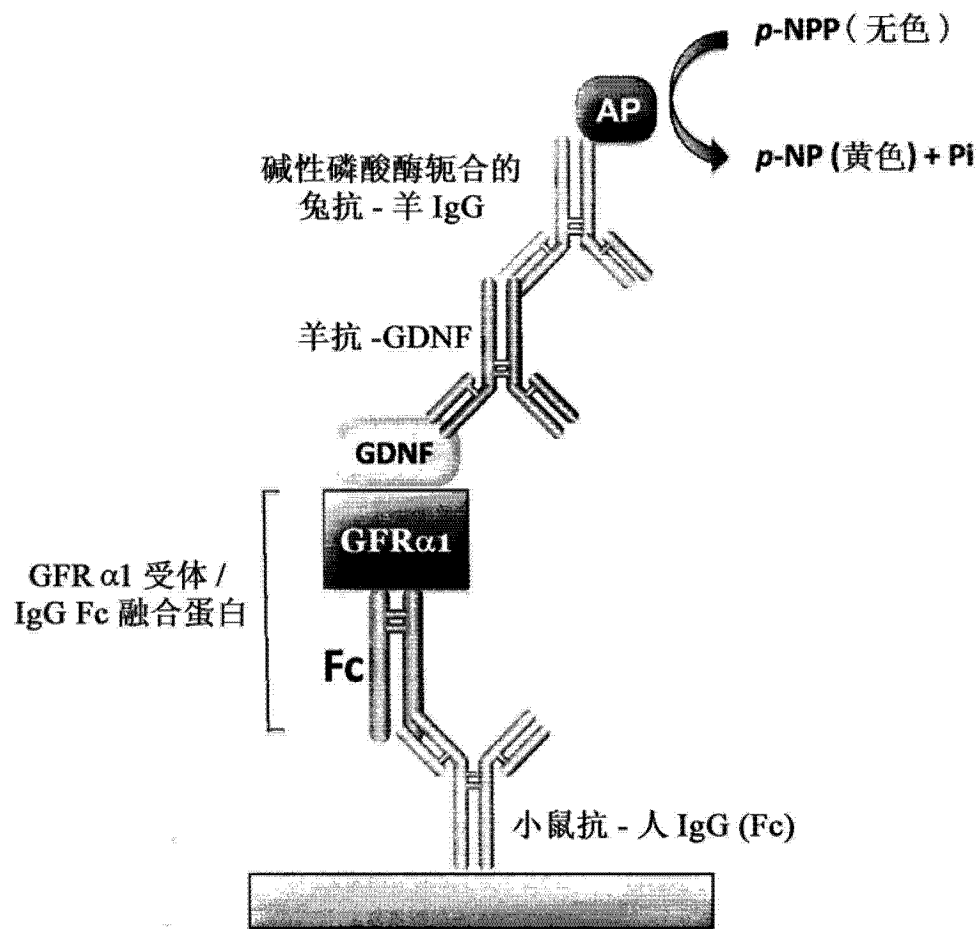


图 15

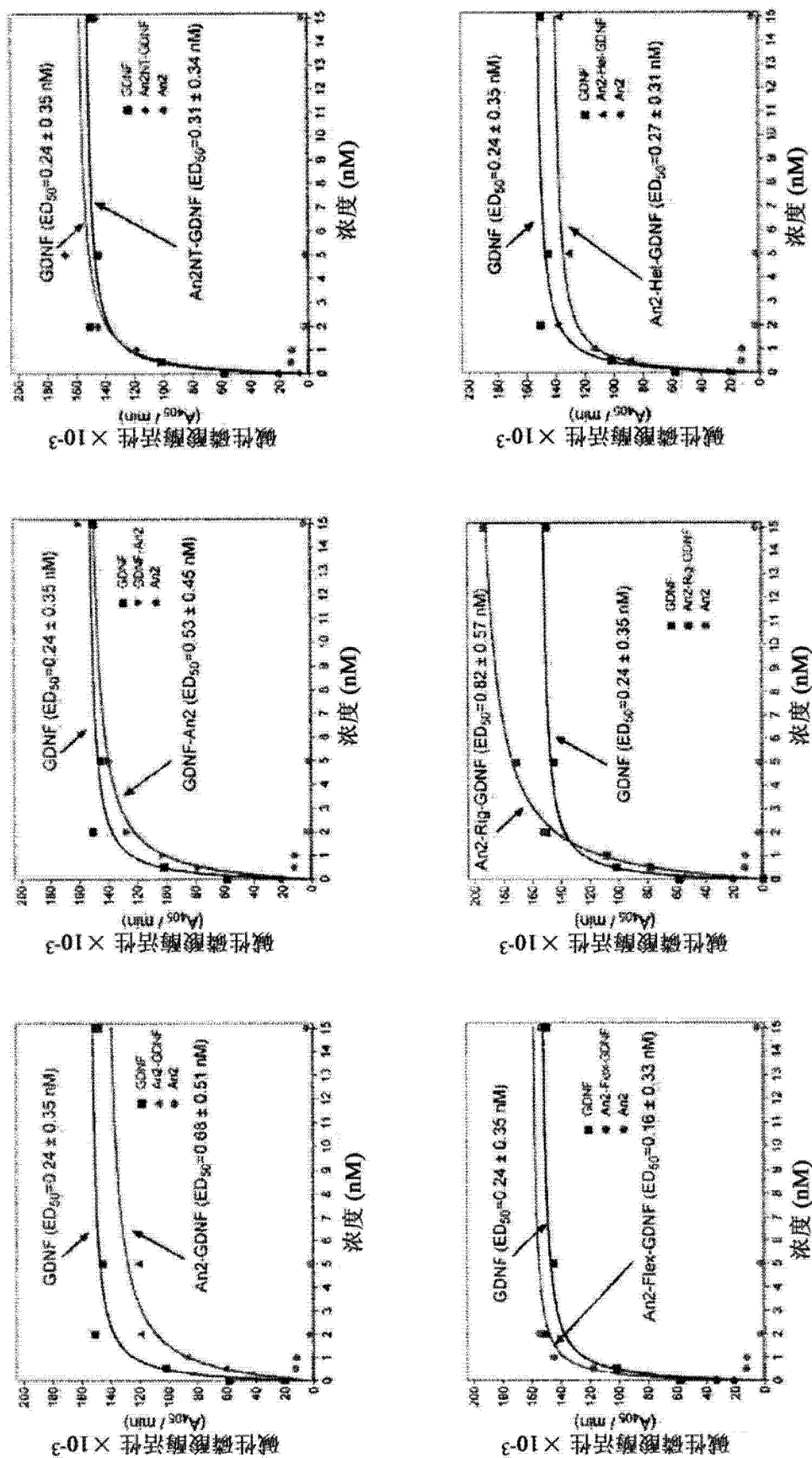


图 16

GDNF (同型二聚体): 31 kDa



ANG-GDNF (同型二聚体): 36 kDa

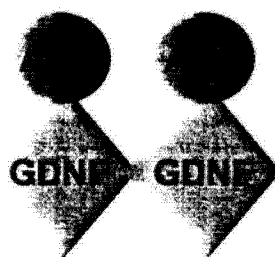


图 17

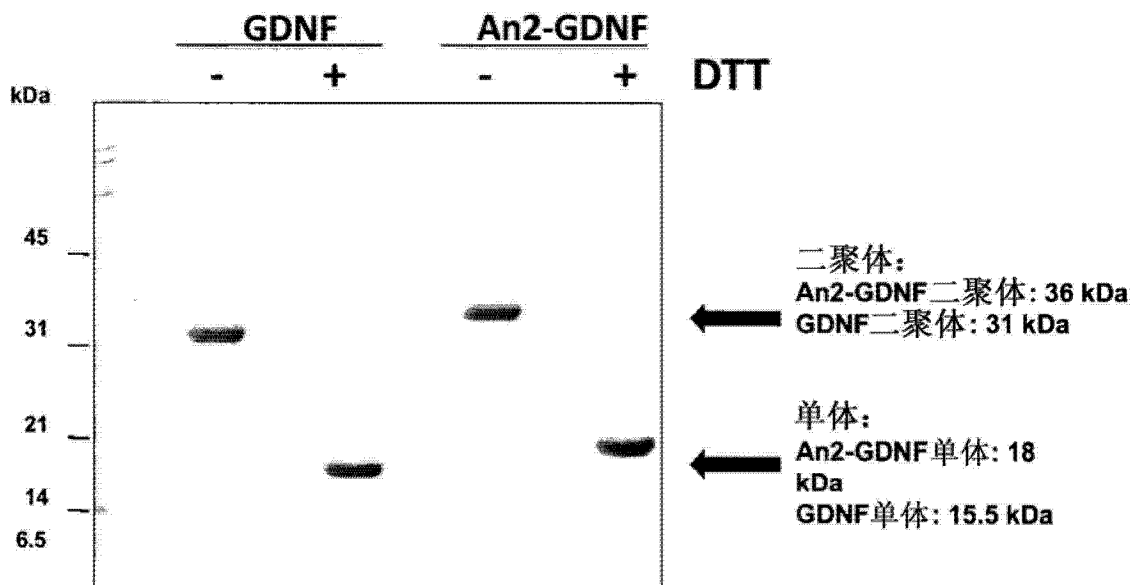


图 18

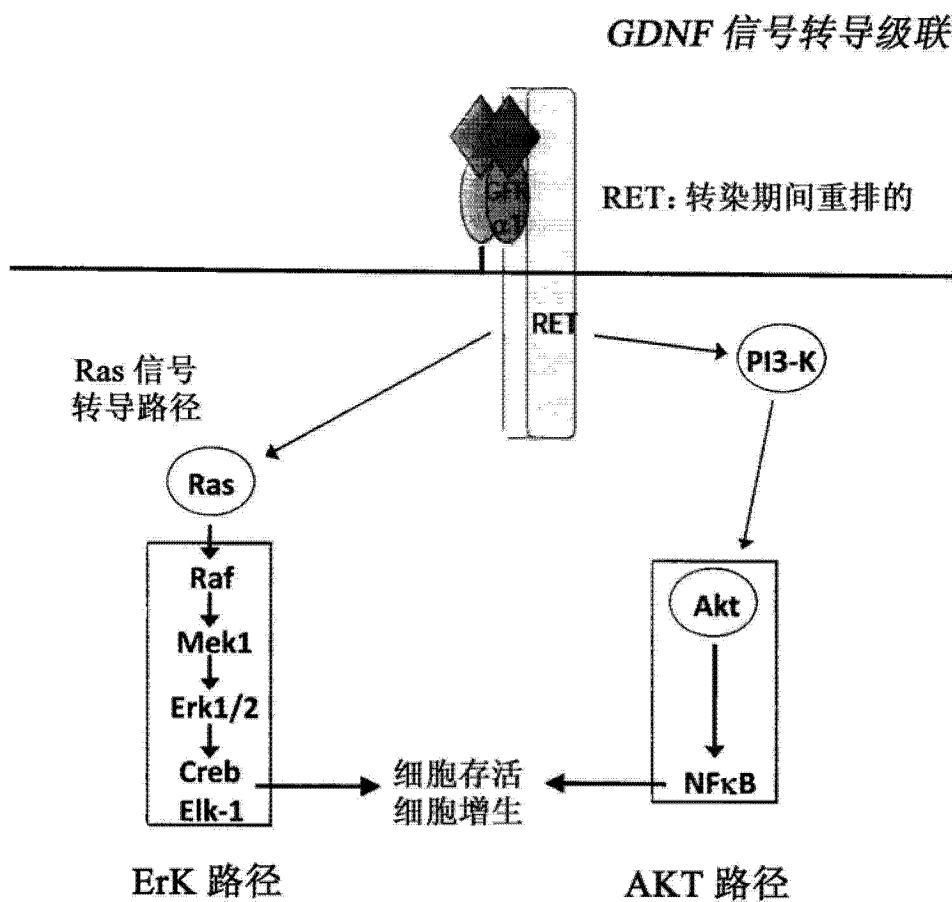


图 19

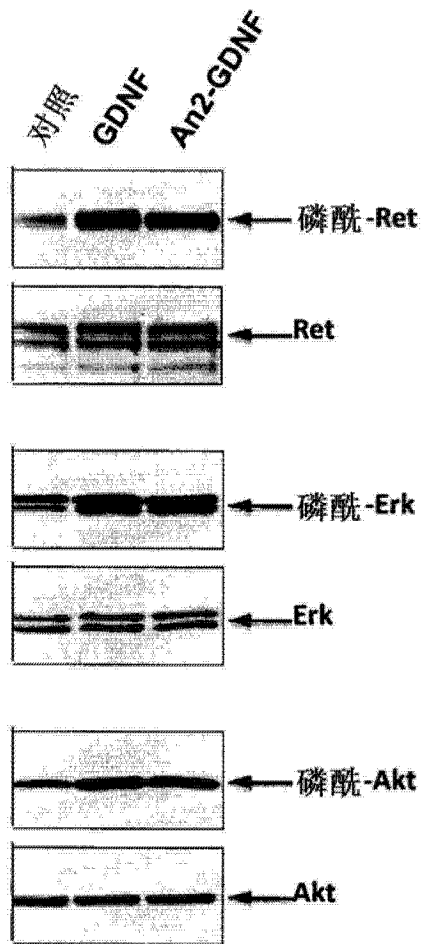


图 20

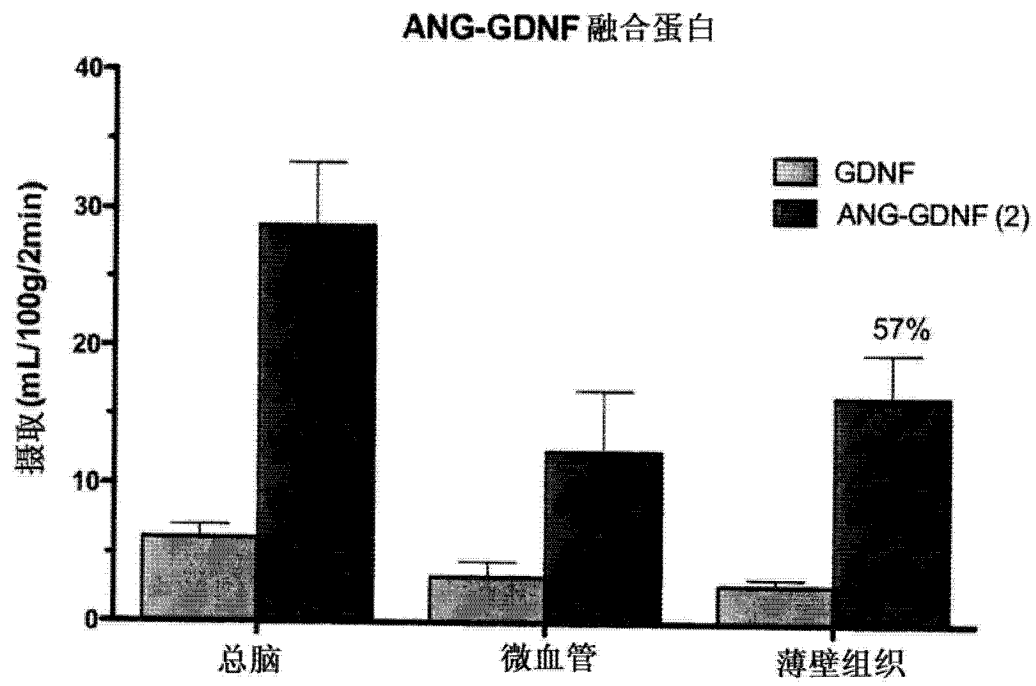


图 21