



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119562965 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 04

(21) 申请号 202380034373.8

(22) 申请日 2023.03.01

(30) 优先权数据

63/315,296 2022.03.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/063510 2023.03.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/168288 EN 2023.09.07

(71) 申请人 斯科特生物公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 S·J·布斯菲尔德 M·J·威尔逊

(74) 专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205

专利代理师 马爽 刘芳

(51) Int.Cl.

C07K 14/62 (2006.01)

A61K 47/64 (2006.01)

权利要求书2页 说明书16页

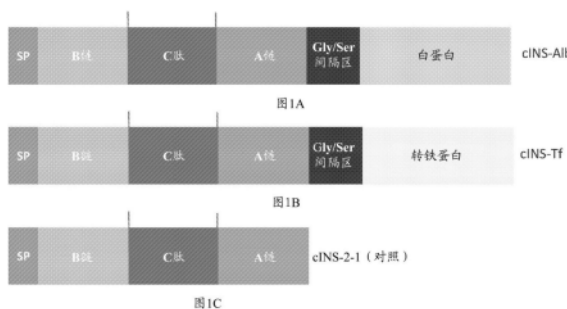
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

胰岛素融合蛋白

(57) 摘要

本公开提供了用于治疗犬或猫的糖尿病的组合物和方法。将犬或猫胰岛素-血清白蛋白融合蛋白施用于受试者。



1. 一种用于治疗伴侣动物的融合蛋白,所述融合蛋白包含胰岛素原和血清白蛋白,其中所述胰岛素原是犬胰岛素原或猫胰岛素原。
2. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中胰岛素原是犬胰岛素原。
3. 根据权利要求2所述的融合蛋白,其中犬胰岛素原序列与SEQ ID NO:12共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性。
4. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中胰岛素原是猫胰岛素原。
5. 根据权利要求4所述的融合蛋白,其中猫胰岛素原序列与SEQ ID NO:15共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性。
6. 根据权利要求1或权利要求2所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含与SEQ ID NO:1共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的多肽。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含N末端信号肽。
8. 根据权利要求7所述的融合蛋白,其中所述信号肽是犬胰岛素信号肽。
9. 根据权利要求7或权利要求8所述的融合蛋白,其中所述信号肽包含与MALWMRLPLLALLALWAPAPTRA (SEQ ID NO:7) 共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列。
10. 根据权利要求1至3或6至9中任一项所述的融合蛋白,其中所述犬胰岛素原是与SEQ ID NO:10中所示的参考多肽序列相比在一个或多个裂解位点处具有突变的犬胰岛素原变体。
11. 根据权利要求1至3或6至10中任一项所述的融合蛋白,其中与SEQ ID NO:10中所示的参考多肽序列相比,所述犬胰岛素原包含K53R、R55K和L86R突变。
12. 根据权利要求1至3或6至11中任一项所述的融合蛋白,其中所述犬胰岛素原-血清白蛋白融合蛋白包含与SEQ ID NO:8共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的接头。
13. 根据权利要求1至12中任一项所述的融合蛋白,其中编码所述融合蛋白的多核苷酸操作性地连接至启动子。
14. 根据权利要求13所述的融合蛋白,其中所述启动子是巨细胞病毒增强子/鸡b-肌动蛋白启动子。
15. 一种适于在治疗犬或猫的代谢疾病中使用的药物组合物,其包含根据权利要求1至14中任一项所述的融合蛋白。
16. 根据权利要求1至14中任一项所述的融合蛋白或根据权利要求15所述的药物组合物,其在用于治疗患有代谢疾病,任选地糖尿病的犬或猫受试者的方法中使用。
17. 根据权利要求1至14中任一项所述的融合蛋白或根据权利要求15所述的药物组合物在制造用于治疗患有代谢疾病,任选地糖尿病的犬或猫受试者的药物中的用途。
18. 根据权利要求1至14中任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白经配制为以所述融合蛋白的至少约0.01mg/kg、至少约0.05mg/kg、至少约0.1mg/kg、至少约1mg/kg、至少约2mg/kg、至少约5mg/kg、至少约10mg/kg或至少约15mg/kg的浓度施用,并且/或者其中所述融合蛋白经静脉内施用。
19. 根据权利要求1至14中任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白以至少约0.01mg、至少约0.05mg、至少约0.1mg、至少约1mg、至少约2mg、至少约5mg、至少约10mg或至

少约15mg的剂量施用。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白经静脉内施用于所述犬或猫受试者。

21. 一种治疗患有代谢疾病的犬或猫受试者的方法,所述方法包括向所述犬或猫受试者施用有效量的根据权利要求1至14中任一项所述的融合蛋白或根据权利要求15所述的药物组合物。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述代谢疾病是糖尿病。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述糖尿病是1型糖尿病。

24. 根据权利要求22所述的方法,其中所述糖尿病是2型糖尿病。

25. 根据权利要求21至24中任一项所述的方法,其中治疗有效量经静脉内施用。

26. 根据权利要求21至24中任一项所述的方法,其中治疗有效量在0.01mg/kg至15mg/kg的所述融合蛋白之间。

27. 根据权利要求21至26中任一项所述的方法,其中所述治疗有效量在1mg/kg至15mg/kg的所述融合蛋白之间。

28. 根据权利要求21至27中任一项所述的方法,其中所述方法使所述受试者的空腹血糖降低约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%或约50%。

29. 一种编码用于治疗伴侣动物的融合蛋白的多核苷酸,所述融合蛋白包含胰岛素原和血清白蛋白,其中所述胰岛素原是犬胰岛素原或猫胰岛素原。

30. 根据权利要求29所述的多核苷酸,其中犬胰岛素原-血清白蛋白融合多核苷酸与SEQ ID NO:2共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性。

31. 根据权利要求29所述的多核苷酸,其中猫胰岛素原-血清白蛋白融合多核苷酸与SEQ ID NO:19共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性。

胰岛素融合蛋白

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年3月1日提交的美国临时专利申请第63/315,296号的优先权权益,其公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 与本申请相关联的序列表XML以XML文件格式提供,并通过引用并入本说明书。包含序列表XML的XML文件的名称是SCTB_017_01WO_ST26.xml。XML文件为40,960字节,创建于2023年2月27日,并经由USPTO专利中心以电子方式提交。

技术领域

[0005] 本公开总体上涉及用于治疗糖尿病的组合物和方法。

背景技术

[0006] 糖尿病是与由于胰腺 β 细胞的胰岛素分泌损失或功能障碍、组织中的胰岛素敏感性降低或两者引起的长期高血糖症相关联的综合征。在狗中, β 细胞损失往往是快速和进行性的,并且通常是由于免疫介导的破坏、空泡变性或胰腺炎。在猫中, β 细胞的损失或功能障碍是胰岛素抗性、胰岛淀粉样变性或慢性淋巴浆细胞性胰腺炎的结果。在人中, β 细胞损失是由1型糖尿病中的自体免疫应答和2型糖尿病中的胰岛素敏感性降低引起的。

[0007] 胰岛素是由胰岛的 β 细胞产生的内源性肽激素,并且其被认为是身体的主要合成代谢激素。胰岛素是治疗哺乳动物的糖尿病的主要手段。当前的护理标准是每日两次胰岛素注射以及频繁的医疗就诊和一次性诊断,这是昂贵、耗时且不方便的。

[0008] 本公开提供了与胰岛素融合蛋白相关的组合物和方法,以提供持续的胰岛素半衰期。

发明内容

[0009] 本公开提供了一种用于治疗伴侣动物的融合蛋白,该融合蛋白包含胰岛素原和血清白蛋白,其中胰岛素原是犬胰岛素原或猫胰岛素原。

[0010] 在一些实施方案中,胰岛素原是犬胰岛素原。

[0011] 在一些实施方案中,犬胰岛素原序列与SEQ ID NO:12共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性。

[0012] 在一些实施方案中,胰岛素原是猫胰岛素原。

[0013] 在一些实施方案中,猫胰岛素原序列与SEQ ID NO:15共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性。

[0014] 在一些实施方案中,融合蛋白包含与SEQ ID NO:1共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的多肽。

[0015] 在一些实施方案中,融合蛋白包含N末端信号肽。

[0016] 在一些实施方案中,信号肽是犬胰岛素信号肽。

- [0017] 在一些实施方案中,信号肽包含与MALWMRLLPLLALLLWAPAPTRA (SEQ ID NO:7) 共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列。
- [0018] 在一些实施方案中,犬胰岛素原是与其SEQ ID NO:10中所示的参考多肽序列相比在一个或多个裂解位点处具有突变的犬胰岛素原变体。
- [0019] 在一些实施方案中,与SEQ ID NO:10中所示的参考多肽序列相比,犬胰岛素原包含K53R、R55K和L86R突变。
- [0020] 在一些实施方案中,犬胰岛素原-血清白蛋白融合蛋白包含与SEQ ID NO:8共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的接头。
- [0021] 在一些实施方案中,编码融合蛋白的多核苷酸操作性地连接至启动子。
- [0022] 在一些实施方案中,启动子是巨细胞病毒增强子/鸡b-肌动蛋白启动子。
- [0023] 本公开提供了适于在治疗犬或猫的代谢疾病中使用的药物组合物,其包含本公开的实施方案的融合蛋白
- [0024] 在一些实施方案中,本公开的融合蛋白和/或药物组合物在用于治疗患有代谢疾病,任选地糖尿病的犬或猫受试者的方法中使用。
- [0025] 在一些实施方案中,本公开的融合蛋白和/或药物组合物用于制造用于治疗患有代谢疾病,任选地糖尿病的犬或猫受试者的药物。
- [0026] 在一些实施方案中,以融合蛋白的至少约0.01mg/kg、至少约0.05mg/kg、至少约0.1mg/kg、至少约1mg/kg、至少约2mg/kg、至少约5mg/kg、至少约10mg/kg或至少约15mg/kg的浓度配制融合蛋白,并且/或者其中融合蛋白经静脉内施用。
- [0027] 在一些实施方案中,融合蛋白以至少约0.01mg、至少约0.05mg、至少约0.1mg、至少约1mg、至少约2mg、至少约5mg、至少约10mg或至少约15mg的剂量施用。
- [0028] 在一些实施方案中,融合蛋白经静脉内施用于犬或猫受试者。
- [0029] 本公开提供了一种治疗患有代谢疾病的犬或猫受试者的方法,该方法包括向犬或猫受试者施用有效量的本公开的融合蛋白和/或本公开的药物组合物。
- [0030] 在一些实施方案中,代谢疾病是糖尿病。
- [0031] 在一些实施方案中,糖尿病是1型糖尿病。
- [0032] 在一些实施方案中,糖尿病是2型糖尿病。
- [0033] 在一些实施方案中,治疗有效量经静脉内施用。
- [0034] 在一些实施方案中,治疗有效量在0.01mg/kg至15mg/kg的融合蛋白之间。
- [0035] 在一些实施方案中,治疗有效量在1mg/kg至15mg/kg的融合蛋白之间。
- [0036] 在一些实施方案中,该方法使受试者的空腹血糖降低约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%或约50%。
- [0037] 本公开提供了一种编码用于治疗伴侣动物的融合蛋白的多核苷酸,该融合蛋白包含胰岛素原和血清白蛋白,其中胰岛素原是犬胰岛素原或猫胰岛素原。
- [0038] 在一些实施方案中,犬胰岛素原-血清白蛋白融合多核苷酸与SEQ ID NO:2共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性。
- [0039] 在一些实施方案中,猫胰岛素原-血清白蛋白融合多核苷酸与SEQ ID NO:19共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性。

附图说明

[0040] 图1A至图1C显示本公开的例示性犬胰岛素蛋白的示意图。所有三种蛋白质均包含天然信号肽(SP)和经修饰的弗林蛋白酶位点。图1A显示例示性犬前胰岛素原-血清白蛋白融合蛋白(cINS-A1b)的示意图。caINS-A1b蛋白具有将胰岛素的A链与犬血清白蛋白连接的甘氨酸/丝氨酸接头。图1B显示例示性犬前胰岛素原-转铁蛋白融合蛋白(cINS-Tf)的示意图。caINS-Tf蛋白具有将胰岛素的A链与犬转铁蛋白连接的甘氨酸/丝氨酸接头。图1C显示含有弗林蛋白酶位点修饰的例示性犬前胰岛素原蛋白的示意图,并用作对照(cINS-2-1)。

[0041] 图2显示了与对照胰岛素标准品相比,caINS-A1b和caINS-Tf的体外胰岛素生物活性。 EC_{50} 值列于图下方的表中。配体诱导的胰岛素受体活化响应于纯化的cINS-A1b和cINS-Tf的浓度增加。参考胰岛素标准品用作对照。相对效力表示为相对光单位。

具体实施方式

[0042] 如本文其它地方所述,本公开至少部分基于发明人的令人惊讶的发现,即胰岛素融合蛋白在犬和猫中实现胰岛素的持续生物活性。提供了制备和使用融合蛋白的方法。

[0043] 通过与具有较长半衰期的蛋白质(例如,血清白蛋白)融合而工程化以克服天然激素的短半衰期的胰岛素融合蛋白是用于治疗糖尿病的治疗进步。已经开发了使用于犬科动物和猫科动物的长效胰岛素融合蛋白表达构建体。表达构建体包含分泌信号肽,以及旨在延长所得融合蛋白的循环时间的融合结构域。

[0044] 将表达构建体施用于有需要的受试者。还提供了在治疗兽医受试者的1型糖尿病(T1DM)、2型糖尿病(T2DM)或代谢综合征的方案中使用这些融合蛋白并增加受试者的胰岛素半衰期的方法。

[0045] 本公开涵盖胰岛素-白蛋白融合蛋白,其包含具有胰岛素活性的治疗性蛋白质。本公开还涵盖多核苷酸,其包含编码与白蛋白或白蛋白的片段(部分)或变体融合的具有胰岛素活性的治疗性蛋白质的核酸分子,或者替代性地由其组成。白蛋白可以与具有胰岛素活性的治疗性蛋白质的N末端、C末端或两个末端融合。在一些实施方案中,白蛋白与胰岛素原的C末端融合。本公开还涵盖多核苷酸,其包含编码蛋白质的核酸分子,该蛋白质包含与足以延长其体内活性的白蛋白或白蛋白的片段(部分)或变体融合的具有胰岛素活性的治疗性蛋白质。

[0046] 前导序列

[0047] 在一个实施方案中,胰岛素蛋白包含前导序列,其可包含分泌信号肽。如本文所用,术语“前导序列”是指多肽的任何N末端序列。在一个实施方案中,本文所述的犬或猫胰岛素蛋白包含前导序列或信号序列和胰岛素原。在一个实施方案中,前导序列是天然序列(犬或猫胰岛素)前导区。在另一个实施方案中,前导序列是异源序列,即衍生自除犬或猫胰岛素以外的另一种蛋白质。

[0048] 在一个实施方案中,前导区是犬IL-2序列。在一个实施方案中,IL-2前导区包含与SEQ ID NO:21共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列。

[0049] SEQ ID NO:21:MYKMQLLSICIALTLVLVANS

[0050] 在另一个实施方案中,前导区是天然犬胰岛素序列。在一个实施方案中,犬前导区

包含与SEQ ID NO:7共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列。

[0051] SEQ ID NO:7:MALWMRLLPLLALLLWAPAPTRA

[0052] 在一个实施方案中,前导序列是猫IL-2序列。在一个实施方案中,IL-2前导区包含与SEQ ID NO:13共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列。

[0053] SEQ ID NO:13:MYKIQLLSICIALTLILVTNS

[0054] 在另一个实施方案中,前导区是天然猫胰岛素序列。在一个实施方案中,犬前导区包含与SEQ ID NO:9共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列。

[0055] SEQ ID NO:9:MAPWTRLLPLLALLSLWIPAPTRA

[0056] 前导序列可以衍生自最终旨在施用的相同物种,即犬科动物或猫科动物。如本文所用,术语“衍生的”或“衍生自”意指序列或蛋白质来源于特定受试物种或与来源于特定受试物种的蛋白质或序列共有相同的序列。例如,“衍生自”犬或猫的前导序列与在犬或猫中表达的相同前导序列共有相同的序列(或其变体,如本文所定义)。然而,指定的核酸或氨基酸实际上不必来源于犬或猫。本领域已知能够产生所需序列的多种技术,包括类似蛋白质(例如,同源物)的诱变或核酸或氨基酸序列的人工产生。“衍生的”核酸或氨基酸在其“衍生”的物种中保留相同核酸或氨基酸的功能,而不管衍生序列的实际来源。

[0057] 胰岛素

[0058] 胰岛素参与体内葡萄糖利用的调控。身体不能合成胰岛素或对胰岛素有抗性的细胞导致以慢性高血糖症为特征的糖尿病。前胰岛素原被转录为110个氨基酸的链。从其N末端去除信号肽产生胰岛素原。在A链与B链组分之间形成二硫键,并去除中间的C链,产生包含51个氨基酸的生物活性胰岛素分子,其大小小于原始翻译产物的一半。

[0059] 如本文所用的术语“胰岛素”是指胰岛素或其功能片段,包括胰岛素原和前胰岛素原,以及胰岛素或其功能片段的氨基酸序列变体。本公开提供了包含犬胰岛素或猫胰岛素的蛋白质,以及编码此类蛋白质的多核苷酸和表达载体。在一些实施方案中,胰岛素蛋白包含编码多肽的多核苷酸序列,该多肽包含(a)分泌信号肽和(b)胰岛素原多肽。在一个实施方案中,蛋白质包含犬IL2信号肽和犬胰岛素原。在另一个实施方案中,蛋白质包含犬胰岛素信号肽和犬胰岛素原。天然犬胰岛素原的氨基酸序列示于SEQ ID NO:10中。

[0060] 在一个实施方案中,蛋白质包含猫IL2信号肽和猫胰岛素原。在另一个实施方案中,蛋白质包含猫胰岛素信号肽和猫胰岛素原。天然猫胰岛素原的氨基酸序列示于SEQ ID NO:11中。

[0061] 在一些实施方案中,犬或猫胰岛素包括变体,其可以包括与本文所述或本领域已知的胰岛素核酸或氨基酸序列的至多约10%的变异,其保留野生型序列的功能。如本文所用,“保留功能”意指核酸或氨基酸以与野生型序列相同的方式起作用,尽管不一定处于相同的表达或活性水平。例如,在一个实施方案中,与野生型序列相比,功能性变体具有增加的表达或活性。在另一个实施方案中,与野生型序列相比,功能性变体具有降低的表达或活性。在一个实施方案中,与野生型序列(SEQ ID NO:11)相比,功能性变体在表达或活性方面具有10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大的增加或降低。

[0062] 在一个实施方案中,与天然序列相比,犬胰岛素原序列含有一个或多个突变。在一些实施方案中,这些突变位于B/C链与C/A链之间的裂解位点。在一个实施方案中,一个或多个裂解位点被突变以在现有蛋白酶裂解位点处掺入至少一个弗林蛋白酶裂解位点。在一个实施方案中,胰岛素原序列具有K53R突变。在另一个实施方案中,胰岛素原序列具有R55K突变。在另一个实施方案中,胰岛素原序列具有L86R突变。在另一个实施方案中,胰岛素原序列具有K53R和R55K突变两者。在另一个实施方案中,胰岛素原序列具有K53R和L86R突变两者。在另一个实施方案中,胰岛素原序列具有R55K和L86R突变两者。在另一个实施方案中,胰岛素原序列具有K53R、R55K和L86R突变。

[0063] 在一个实施方案中,犬胰岛素原序列是与SEQ ID NO:12共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列。

[0064] 在一个实施方案中,猫胰岛素原序列是与SEQ ID NO:15共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列。

[0065] 当需要胰岛素原序列的变体或片段时,可以使用野生型核酸序列的定点诱变产生这些肽的编码序列。替代性地或另外地,基于网络的或商业上可获得的计算机程序以及基于服务的公司可以用于将氨基酸序列反翻译成核酸编码序列,包括RNA和/或cDNA两者。参见,例如EMBOSS的backtranseq:Gene Infinity;和/或Expasy。在一个实施方案中,设计RNA和/或cDNA编码序列以在最终预期施用的受试物种,即,犬或猫中最佳表达。

[0066] 融合结构域

[0067] 本公开提供了包含融合结构域的融合蛋白。通过将胰岛素与具有较长半衰期的融合结构域融合,胰岛素融合蛋白克服了天然激素的短半衰期。在一些实施方案中,融合结构域包含(i)犬血清白蛋白或其功能性变体,(ii)犬IgG Fc或其功能性变体,或(iii)犬转铁蛋白或其功能性变体。在一些实施方案中,融合结构域包含犬血清白蛋白。

[0068] 在一些实施方案中,融合结构域包含(i)猫血清白蛋白或其功能性变体,(ii)猫IgG Fc或其功能性变体,或(iii)猫转铁蛋白或其功能性变体。在一些实施方案中,融合结构域包含猫血清白蛋白。

[0069] 在一些实施方案中,融合结构域是犬血清白蛋白,其包含与SEQ ID NO:16共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列。

[0070] 在一些实施方案中,融合结构域是犬转铁蛋白,其包含与SEQ ID NO:17共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列。

[0071] 在一些实施方案中,融合结构域是猫血清白蛋白,其包含与SEQ ID NO:18共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列。

[0072] 胰岛素融合蛋白

[0073] 本公开提供了包含一个或多个拷贝的胰岛素原的融合蛋白,以及编码此类融合蛋白的多核苷酸和表达载体。在一些实施方案中,融合蛋白包含编码融合蛋白的多核苷酸序列,该融合蛋白包含(a)包含分泌信号肽的前导序列,(b)胰岛素原,以及(c)包含(i)IgG Fc或其功能性变体,(ii)白蛋白或其功能性变体,或(iii)转铁蛋白或其功能性变体的融合结构域。在一个实施方案中,融合蛋白包含凝血酶前导序列、胰岛素原和IgG Fc或其功能性变体。在另一个实施方案中,融合蛋白包含凝血酶前导序列、胰岛素原和白蛋白或其功能性变体。

[0074] 在一些实施方案中,融合蛋白包含犬胰岛素前导序列、犬胰岛素原(K53R、R55K和L86R)、甘氨酸/丝氨酸接头和犬血清白蛋白。在实施方案中,融合蛋白包含与SEQ ID NO:1共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列。

[0075] 在一些实施方案中,融合蛋白包含犬胰岛素前导序列、犬胰岛素原(K53R、R55K和L86R)、甘氨酸/丝氨酸接头和犬转铁蛋白。在实施方案中,融合蛋白包含与SEQ ID NO:3共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列。

[0076] 在一些实施方案中,融合蛋白包含犬胰岛素前导序列和犬胰岛素原(K53R、R55K和L86R)。在实施方案中,融合蛋白包含与SEQ ID NO:5共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列。

[0077] 在一些实施方案中,融合蛋白包含猫胰岛素前导序列、猫胰岛素原(K53R、R55K和L86R)、甘氨酸/丝氨酸接头和猫血清白蛋白。在实施方案中,融合蛋白包含与SEQ ID NO:6共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列。

[0078] 在一个实施方案中,融合蛋白包含胰岛素前导序列、胰岛素原和白蛋白或其功能性变体。在一个实施方案中,融合蛋白包含胰岛素前导序列、胰岛素原和转铁蛋白或其功能性变体。

[0079] 在一个实施方案中,融合蛋白包含IL2前导序列、胰岛素原和白蛋白或其功能性变体。在一个实施方案中,融合蛋白包含IL2前导序列、胰岛素原和转铁蛋白或其功能性变体。

[0080] 除了本文提供的前导序列、胰岛素原和胰岛素多肽之外,还提供编码这些多肽的核酸序列(可与“多核苷酸”互换使用)。在一个实施方案中,提供了编码本文所述的胰岛素原-血清白蛋白融合多肽的核酸序列。在一些实施方案中,编码犬胰岛素原-血清白蛋白融合体的核酸序列包含与SEQ ID NO:2共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列。

[0081] 在一些实施方案中,编码犬胰岛素原-转铁蛋白融合体的核酸序列包含与SEQ ID NO:4共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列。

[0082] 在一些实施方案中,编码猫胰岛素原-血清白蛋白融合体的核酸序列包含与SEQ ID NO:19共有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列。

[0083] 本公开的融合蛋白的体内功能和稳定性可通过添加小肽接头来优化,例如,以防止潜在不期望的结构域相互作用或出于其它原因。此外,富含甘氨酸的接头可提供一些结构灵活性,使得胰岛素原部分可有效地与靶细胞上的胰岛素受体相互作用。因此,在一个实施方案中,融合蛋白的胰岛素原的C末端和融合结构域的N末端经由接头融合。在一些实施方案中,接头包括1、2、3或n个重复的具有序列(GGGGS)_n的富含G的肽接头。在一个实施方案中,接头包括1、1.5或2个重复的具有序列GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO:14)的富含G的肽接头。在一个实施方案中,接头包括具有序列GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO:8)的富含G的肽接头的重复。在一个实施方案中,接头包括具有序列GGGGS GGGGS (SEQ ID NO:20)的富含G的肽接头的重复。

[0084] 在一些实施方案中,本公开的融合蛋白在5'至3'中包含:

[0085] (a) 犬胰岛素信号肽;

[0086] (b) 犬胰岛素原(K53R、R55K和L86R);

[0087] (c) Gly/Ser接头;和

[0088] (d) 犬血清白蛋白。

[0089] 在一些实施方案中,表达盒包含与SEQ ID NO:2共有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的核酸序列。

[0090] 在一些实施方案中,本公开的融合蛋白在5'至3'中包含:

[0091] (a) 猫胰岛素信号肽;

[0092] (b) 猫胰岛素原(K53R、R55K和L86R);

[0093] (c) Gly/Ser接头;和

[0094] (d) 猫血清白蛋白

[0095] 在一些实施方案中,表达盒包含与SEQ ID NO:19共有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的核酸序列。

[0096] 表达盒

[0097] 在一些实施方案中,表达盒是指包含胰岛素原融合构建体编码序列、启动子的核酸分子,并且可包括其其它调控序列。可将表达盒工程化到遗传元件(例如,质粒)中,用于递送到细胞中并纯化用于治疗性施用的融合蛋白。

[0098] 表达盒通常含有启动子序列作为表达控制序列的一部分。在一个实施方案中,使用组成型启动子。在本文所述的质粒和表达载体中,可以使用CB7启动子。CB7是带有巨细胞病毒增强子元件的鸡 β -肌动蛋白启动子。在本文所述的表达载体中可使用可利用其它启动子,诸如病毒启动子、组成型启动子、可调控启动子(参见,例如,WO 2011/126808和WO 2013/04943)或响应于生理信号的启动子。

[0099] 在本文所述的质粒和表达载体的一些实施方案中,可以使用CMV增强子、鸡 β -肌动蛋白启动子和兔 β -球蛋白剪接受体位点(CAG)启动子。在本文所述的质粒和表达载体的一些实施方案中,可以使用延伸因子-1 α (EF1a)启动子。

[0100] 除启动子外,表达盒和/或表达载体还可含有其它合适的转录起始、终止、增强子序列、有效的RNA加工信号,诸如剪接和聚腺苷酸化(polyA)信号;稳定细胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(即,Kozak共有序列);增强蛋白质稳定性的序列;以及当需要时,增强编码产物分泌的序列。合适的polyA序列的例示性示例包括例如兔 β 球蛋白、SV40、牛生长激素(bGH)和TK polyA。

[0101] 合适的增强子的例示性示例包括例如 α 胎蛋白增强子、TTR最小启动子/增强子、LSP(TH结合球蛋白启动子/ α 1-微球蛋白/双库尼茨抑制剂(bikunin)增强子)等。在一个实施方案中,polyA是兔球蛋白polyA。

[0102] 这些控制序列与胰岛素原融合构建体序列“可操作地连接”。如本文所用,术语“可操作地连接”是指与目的基因邻接的表达控制序列和以反式或以一定距离起作用以控制目的基因的表达控制序列两者。

[0103] 在一个实施方案中,提供了一种表达盒,其包括CB7启动子、嵌合内含子、由SEQ ID NO:2编码的蛋白质的编码序列和兔 β 球蛋白聚A。

[0104] 在一个实施方案中,提供了一种表达盒,其包括CB7启动子、嵌合内含子、由SEQ ID NO:4编码的蛋白质的编码序列和兔 β 球蛋白聚A。

[0105] 在一个实施方案中,提供了一种表达盒,其包括CB7启动子、嵌合内含子、由SEQ ID NO:19编码的蛋白质的编码序列和兔 β 球蛋白聚A。

[0106] 用于构建本公开的任何实施方案的方法是核酸操作领域技术人员已知的,并且包括遗传工程、重组工程和合成技术。

[0107] 在一些实施方案中,本公开的融合蛋白包含表达盒,该表达盒在5'至3'中包含:

[0108] (a) 巨细胞病毒(CMV)增强子/鸡b-肌动蛋白(CAG)启动子;

[0109] (b) 犬胰岛素信号肽;

[0110] (c) 犬胰岛素原(K53R、R55K和L86R);

[0111] (d) Gly/Ser接头;和

[0112] (e) 犬血清白蛋白。

[0113] 在一些实施方案中,表达盒包含与SEQ ID NO:2共有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的核酸序列。

[0114] 在一些实施方案中,本公开的融合蛋白包含表达盒,该表达盒在5'至3'中包含:

[0115] (a) 巨细胞病毒(CMV)增强子/鸡b-肌动蛋白(CAG)启动子;

[0116] (b) 猫胰岛素信号肽;

[0117] (c) 猫胰岛素原(K53R、R55K和L86R);

[0118] (d) Gly/Ser接头;和

[0119] (e) 猫血清白蛋白

[0120] 在一些实施方案中,表达盒包含与SEQ ID NO:19共有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的核酸序列。

[0121] 在一个实施方案中,将编码本文所述的胰岛素原融合构建体的核酸序列工程化到任何合适的遗传元件中,例如裸DNA、噬菌体、转座子、粘粒、RNA分子(例如,mRNA)、附加体、重组AAV等,遗传元件将其上携带的胰岛素原融合序列转移至宿主细胞,例如用于在包装宿主细胞中产生携带DNA或RNA的纳米颗粒、病毒体和/或用于递送至受试者的宿主细胞。在一个实施方案中,遗传元件是质粒。可以通过任何合适的方法递送所选择的遗传元件,包括转染、电穿孔、脂质体递送、膜融合技术、高速DNA包被的团块、病毒感染和原生质体融合。用于制备此类构建体的方法是核酸操作领域技术人员已知的,并且包括遗传工程、重组工程和合成技术。参见,例如,Green和Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY(2012)。

[0122] 在一些实施方案中,本文所述的胰岛素原融合构建体可经由病毒体递送,病毒体包括但不限于重组AAV(rAAV)。此类其它病毒体可包括可使用的适于基因疗法的任何病毒,包括但不限于腺病毒;疱疹病毒;慢病毒;逆转录病毒;等等。适当地,当产生这些其它病毒体中的一种时,其作为复制缺陷型病毒体产生。

[0123] 细胞培养

[0124] 动物细胞、哺乳动物细胞、培养的细胞、动物或哺乳动物宿主细胞、宿主细胞、重组细胞、重组宿主细胞、制造细胞系等都是可在细胞培养基中维持的细胞的术语。此类细胞通常是从哺乳动物获得或衍生的细胞系,并且当置于含有适当营养物和/或生长因子的培养基中的单层培养物或悬浮培养物中时能够生长和存活。对于特定细胞培养物的生长和维持所必需的生长因子和营养物能够由相关领域的技术人员根据经验容易地确定,诸如Barnes和Sato,(1980,Cell,22:649);于Mammalian Cell Culture,编辑J.P.Mather,Plenum Press,N Y,1984;以及美国专利第5,721,121号中所述。

[0125] 此外,通常采用细胞培养条件并且已知用于细胞的分批、补料分批或连续培养,除了温度之外,还注意pH例如约6.5至约7.5、溶解氧(O₂)、例如约5%至90%的空气饱和度和二氧化碳(CO₂)、搅拌和湿度。

[0126] 细胞系细胞通常是动物或哺乳动物细胞,其可表达和分泌,或可被分子工程化以表达和分泌大量特定蛋白质至培养基中。应当理解,由宿主细胞产生的目的蛋白质可以是宿主细胞内源的或同源的。在一个实施方案中,目的蛋白质由中国仓鼠卵巢(CHO)宿主细胞产生和分泌。在一些实施方案中,目的蛋白质是胰岛素原-血清白蛋白融合蛋白。

[0127] 适于携带、表达和产生用于随后分离和/或纯化的蛋白质的动物或哺乳动物宿主细胞的非限制性示例包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO)。

[0128] 适于在本公开的方法中培养的细胞可含有例如经由转化、转染、感染或注射引入的表达载体(构建体),诸如质粒等,其带有编码用于在培养过程中表达和生产的蛋白质的编码序列或其部分。此类表达载体含有插入编码序列的转录和翻译所必需的元件。

[0129] 在本公开所涵盖的培养方法中,通常使用本领域已知和实践的分离和纯化方法在总细胞培养期结束时根据需要收集、回收、分离和/或纯化或基本上纯化由细胞产生的蛋白质。在一些实施方案中,目的蛋白质从培养的细胞中分泌并从培养基或上清液中分离。在一些实施方案中,还可以使用本领域已知和实践的方法从宿主细胞(例如,细胞裂解物)回收蛋白质。

[0130] 用所公开的组合物治疗受试者的方法

[0131] 还提供了包含本文所述的融合蛋白的组合物。本文所述的药物组合物被设计用于通过任何合适的途径或不同途径的组合递送至有需要的犬或猫受试者。直接递送至肝脏(任选地经由静脉内、经由肝动脉或通过移植)、直接递送至胰腺、口服、吸入、鼻内、气管内、动脉内、眼内、静脉内、肌内、皮下、皮内以及其它肠胃外施用途径。本文所述的融合蛋白可在单一组合物或多种组合物中递送。

[0132] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物被设计用于通过肌内施用递送至有需要的犬或猫受试者。

[0133] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物被设计用于通过静脉内施用递送至有需要的犬或猫受试者。

[0134] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物被设计用于通过皮下施用递送至有需要的犬或猫受试者。

[0135] 在一些实施方案中,治疗过程可包括重复施用相同的融合蛋白。还可使用本文所述的融合蛋白选择其它组合。在一些实施方案中,本文所述的组合物可在涉及其它糖尿病药物或基于蛋白质的疗法(包括例如胰岛素类似物、胰岛素、口服抗高血糖药物、磺酰脲类、双胍类、噻唑烷二酮类和 α -葡萄糖苷酶抑制剂)的方案中组合。在一些实施方案中,本文所述的组合物可在涉及生活方式改变的方案(包括饮食和锻炼方案)中组合。

[0136] 如本文所用的术语“胰岛素原构建体”、“胰岛素原表达构建体”和同义词包括如本文所述的胰岛素原序列与前导区(无论是天然的还是异源的)的组合。术语“胰岛素原构建体”、“胰岛素原表达构建体”和同义词可用于指编码胰岛素原融合蛋白或其表达产物的核酸序列。

[0137] 在一个方面,本公开涉及一种治疗有需要的受试者的疾病或病症的方法,该方法

包括施用有效量的胰岛素原融合蛋白,从而改善和/或治疗I型糖尿病、II型糖尿病或代谢综合征的症状中的一种或多种症状。

[0138] 在一些实施方案中,该方法包括施用至少约0.01mg/kg、至少约0.05mg/kg、至少约0.1mg/kg、至少约1mg/kg、至少约2mg/kg、至少约5mg/kg、至少约10mg/kg或至少约15mg/kg的融合蛋白。

[0139] 在一些实施方案中,单位剂量的胰岛素原融合蛋白包含至少约0.01mg、至少约0.05mg、至少约0.1mg、至少约1mg、至少约2mg、至少约5mg、至少约10mg或至少约15mg。

[0140] 在一些实施方案中,融合蛋白经静脉内施用。在一些实施方案中,融合蛋白经肌肉施用。在一些实施方案中,融合蛋白经皮下施用。在一些实施方案中,治疗有效量的胰岛素原融合蛋白以至少约0.01mg/kg、至少约0.05mg/kg、至少约0.1mg/kg、至少约1mg/kg、至少约2mg/kg、至少约5mg/kg、至少约10mg/kg或至少约15mg/kg的剂量施用。

[0141] 在一些实施方案中,治疗有效量的胰岛素原融合蛋白以至少约0.01mg、至少约0.05mg、至少约0.1mg、至少约1mg、至少约2mg、至少约5mg、至少约10mg或至少约15mg的单位剂量施用。

[0142] 在一些实施方案中,治疗有效量的胰岛素原融合蛋白以至多约100mg、至多约90mg、至多约80mg、至多约70mg、至多约60mg、至多约50mg、至多约40mg、至多约30mg、至多约20mg或至多约10mg的单位剂量施用。

[0143] 在一些实施方案中,该方法包括每天一次、每2天一次、每3天一次、每4天一次、每7天一次、每14天一次、每21天一次或每28天一次施用该剂量的胰岛素原融合蛋白。

[0144] 在一些实施方案中,该方法包括施用该剂量的胰岛素原融合蛋白方案至少一周、两周或四周。

[0145] 在一些实施方案中,该方法包括施用该剂量的胰岛素原融合蛋白方案至少一个月、两个月、四个月、六个月、八个月、十个月、12个月、14个月、16个月或18个月。

[0146] 在一些实施方案中,施用治疗有效量的胰岛素原融合蛋白方案至少一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月、一年、十八个月、两年、三年、四年、五年、六年、七年、八年、九年或十年。

[0147] 在一些实施方案中,该方法包括长期施用该剂量的胰岛素原融合蛋白方案。

[0148] 可将融合蛋白组合物配制成含有在约0.1mg至约15mg的范围内的量的融合蛋白的剂量单位。

[0149] 在另一个方面,提供了一种在犬或猫受试者中维持胰岛素原融合蛋白的生物活性的方法。该方法包括将如本文所述的组合物施用于有需要的受试者。在一个实施方案中,如本文所述,组合物包含含有胰岛素原-血清白蛋白融合蛋白的融合蛋白。在一些实施方案中,与天然肽相比,本文所述的胰岛素原融合蛋白导致胰岛素的半衰期延长。在一些实施方案中,本文提供的融合蛋白导致胰岛素原融合蛋白在受试者中的半衰期为至少5小时、至少7小时、至少10小时、至少15小时、至少20小时、至少25小时、至少30小时、至少35小时或至少40小时。在一个实施方案中,对于兽医受试者,可将融合蛋白以1 μ L至约100mL的体积递送。参见,例如,Diehl等人,J.Applied Toxicology,21:15-23(2001)关于向各种兽医动物施用物质的良好实践的讨论。该文献通过引用并入本文。如本文所用,术语“剂量”可指在治疗过程中递送至受试者的总剂量,或在单次(多次)施用中递送的量。

[0150] 在一个实施方案中,组合物与有效量的胰岛素组合施用。各种市售胰岛素产品是本领域已知的,包括但不限于鱼精蛋白锌重组人胰岛素(ProZinc®)、猪胰岛素锌悬浮液(Vetsulin®)和甘精胰岛素(Lantus®)。在一些实施方案中,与用融合蛋白治疗之前相比,本文所述的融合蛋白与胰岛素的组合降低了受试者中的胰岛素剂量需求。此类剂量要求可降低10%或更多、20%或更多、30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、或90%或更多。治疗医师可以确定受试者所需的胰岛素的正确剂量。例如,可使用胰岛素或其它疗法治疗受试者,治疗医师可以在施用融合蛋白后继续进行该治疗。这种胰岛素或其它联合疗法可以随后根据需要进行、减少或中断。

[0151] 在一个实施方案中,向受试者递送治疗有效量的本文所述的组合物。如本文所用,“治疗有效量”是指在靶细胞中递送足以达到治疗目标的量的胰岛素原-血清白蛋白的融合蛋白的量。在某些实施方案中,治疗目标是改善或治疗I型糖尿病、II型糖尿病或代谢综合征的症状中的一种或多种症状。治疗有效量可以基于动物模型而不是犬或猫受试者来确定。在另一个实施方案中,治疗目标是缓解受试者中的代谢疾病。

[0152] 上述融合蛋白可根据已公开的方法递送至宿主细胞。融合蛋白,优选地悬浮在生理学相容的载剂中,可施用于包括犬在内的所需受试者。考虑到转移病毒所针对的适应症,本领域技术人员可以容易地选择合适的载剂。例如,一种合适的载剂包括盐水,其可以用多种缓冲溶液(例如,磷酸盐缓冲盐水)配制。其它示例性载剂包括无菌盐水、乳糖、蔗糖、磷酸钙、明胶、葡聚糖、琼脂、果胶、花生油、芝麻油和水。载剂的选择不是对本公开的限制。

[0153] 在一些实施方案中,除了融合蛋白和/或变体和载剂之外,本公开的组合物还可含有其它常规药物成分,诸如防腐剂或化学稳定剂。例示性防腐剂包括氯丁醇、山梨酸钾、山梨酸、二氧化硫、没食子酸丙酯、对羟基苯甲酸酯、乙基香草醛、甘油、苯酚和对氯苯酚。例示性化学稳定剂包括明胶和白蛋白。

[0154] 在一些实施方案中,本公开的融合蛋白被配制为长效注射剂。长效注射制剂以可调节的、预定的速率在治疗范围内递送融合蛋白(例如,胰岛素原-血清白蛋白融合蛋白)持续指定的时间段。释放可直接发生在局部治疗的作用部位或全身水平,从而将融合蛋白的不良副作用降低到最低。

[0155] 在一些实施方案中,本公开的胰岛素原-血清白蛋白融合蛋白被配制为长效注射剂。

[0156] 本文所述的重组融合蛋白可用于制备药物,该药物用于将胰岛素原融合蛋白递送至有需要的受试者,向受试者提供具有增加的半衰期的胰岛素,和/或用于治疗受试者的I型糖尿病、II型糖尿病或代谢综合征。

[0157] 在一个方面,提供了一种治疗糖尿病的方法。该方法包括将如本文所述的组合物施用于有需要的犬或猫受试者。在一个实施方案中,组合物包含如本文所述的胰岛素原融合蛋白。

[0158] 在另一个实施方案中,提供了一种用于治疗犬或猫的2型糖尿病的方法。该方法包括施用如本文所述的胰岛素原融合蛋白。

[0159] 在另一个实施方案中,提供了一种用于治疗犬或猫的1型糖尿病的方法。该方法包括施用如本文所述的胰岛素原融合蛋白。

[0160] 在另一个方面,提供了一种治疗犬或猫的代谢疾病的方法。该方法包括将如本文

所述的组合物施用于有需要的犬或猫受试者。在一个实施方案中,组合物包含如本文所述的胰岛素原融合蛋白。在一个实施方案中,代谢疾病是I型糖尿病。在一个实施方案中,代谢疾病是II型糖尿病。在一个实施方案中,代谢疾病是代谢综合征。

[0161] 在另一个实施方案中,提供了一种用于治疗犬或猫的糖尿病的方法。该方法包括施用如本文所述的胰岛素原-血清白蛋白融合蛋白,其中融合蛋白在受试者中施用胰岛素之后施用。

[0162] 在另一个实施方案中,提供了一种用于预防糖尿病犬或猫的白内障形成的方法。该方法包括施用如本文所述的胰岛素原-血清白蛋白融合蛋白。

[0163] 在另一个实施方案中,提供了一种用于降低糖尿病犬或猫的血糖浓度的方法。该方法包括施用如本文所述的胰岛素原-血清白蛋白融合蛋白。

[0164] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”被定义为涵盖出于改善I型糖尿病、II型糖尿病(T2DM)或代谢综合征的一种或多种症状的目的,向受试者施用本文所述的一种或多种化合物或组合物。因此,“治疗”可包括在给定受试者中减少I型糖尿病、II型糖尿病或代谢综合征的进展、降低症状的严重程度、消除疾病症状、延缓疾病的进展或增加疗法的功效中的一者或多者。

[0165] 如本文所用,术语“缓解”是指当猫或狗不再表现糖尿病的临床体征并且具有正常血糖水平时停止胰岛素治疗的能力。

[0166] 在另一个实施方案中,提供了一种用于治疗猫或犬的T2DM的方法。该方法包括施用如本文所述的融合蛋白。

[0167] 在另一个方面,提供了一种治疗猫或犬的代谢疾病的方法。该方法包括将如本文所述的组合物施用于有需要的猫或犬受试者。在一个实施方案中,组合物包含如本文所述的胰岛素原融合蛋白。

[0168] 在另一个方面,提供了一种降低犬或猫受试者的空腹血糖的方法。该方法包括将如本文所述的组合物施用于有需要的受试者。在一个实施方案中,组合物包含如本文所述的胰岛素原-血清白蛋白融合蛋白。在一些实施方案中,本文提供的方法使受试者的空腹血糖降低至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%或至少约50%。在一些实施方案中,本文提供的方法使受试者的空腹血糖降低约20%。在一些实施方案中,本文提供的方法使受试者的空腹血糖降低约30%。在一些实施方案中,本文提供的方法使受试者的空腹血糖降低约40%。

[0169] 定义

[0170] 除非另有定义,否则本文使用的术语(包括技术和科学术语)具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。还应当理解,诸如在常用词典中定义的那些术语应当被解释为具有与它们在本申请和相关领域的上下文中的含义一致的含义,并且不应当以理想化或过于正式的意义来解释,除非在本文中明确地如此定义。本说明书中使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并不旨在进行限制。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献通过引用以其整体并入本文。在术语冲突的情况下,以本说明书为准。

[0171] 在描述实施方案时对“一个实施方案”或“另一个实施方案”的引用并不意味着所引用的实施方案与另一实施方案(例如,在所引用的实施方案之前描述的实施方案)相互排

斥,除非另外明确指定。

[0172] 在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“相同的”或百分比“同一性”是指两个或更多个序列或亚序列相同或具有指定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸,即当在比较窗口或指定区域上进行比较和比对以获得最大对应性时,在指定区域上与参考序列共有至少约80%同一性,例如至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性,如使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和视觉检查测量的。此类序列被称为“基本上相同”。该定义还指测试序列的互补序列。在一些实施方案中,同一性存在于长度为至少约25个氨基酸或核苷酸的区域上,例如,存在于长度为50、100、200、300、400个氨基酸或核苷酸的区域上,或存在于参考序列的全长上。

[0173] 对于序列比较,通常一个序列充当参考序列,将测试序列与其进行比较。当使用序列比较算法时,将测试和参考序列输入计算机中,如果需要,指定亚序列坐标,并指定序列算法程序参数。可使用默认程序参数,或可指定替代参数。然后基于程序参数,序列比较算法计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。在一些实施方案中,使用BLAST和BLAST 2.0算法以及默认参数。

[0174] 在氨基酸序列的上下文中,术语“百分比(%)同一性”、“序列同一性”、“百分比序列同一性”或“百分比相同”是指当比对对应性时两个序列中相同的残基。可以容易地确定蛋白质、多肽、约70个氨基酸至约100个氨基酸的全长上的氨基酸序列或其肽片段或相应的核酸序列编码序列的同一性百分比。合适的氨基酸片段的长度可以是至少约8个氨基酸,并且可以高达约150个氨基酸。通常,当提到两个不同序列之间的“同一性”、“同源性”或“相似性”时,“同一性”、“同源性”或“相似性”是参照“比对的”序列来确定的。

[0175] “比对的”序列或“比对”是指多个核酸序列或蛋白质(氨基酸)序列,通常含有对缺失或额外碱基或氨基酸的校正。使用多种公开的或可商购的多序列比对程序中的任一种进行比对。序列比对程序可用于氨基酸序列,例如“Clustal X”、“MAP”、“PIMA”、“MSA”、“BLOCKMAKER”、“MEME”和“Match-Box”程序。通常,在默认设置下使用这些程序中的任何一者,尽管本领域技术人员可以根据需要改变这些设置。替代性地,本领域技术人员可利用另一种算法或计算机程序,其提供至少如所引用的算法和程序所提供的同一性或比对水平。

[0176] 术语“氨基酸取代”及其同义词旨在涵盖通过用另一取代氨基酸替换氨基酸来修饰氨基酸序列。取代可以是保守取代。它也可以是非保守取代。在提及两个氨基酸时,术语保守旨在意指这些氨基酸具有本领域技术人员公认的共同性质。例如,具有疏水性非酸性侧链的氨基酸、具有疏水性酸性侧链的氨基酸、具有亲水性非酸性侧链的氨基酸、具有亲水性酸性侧链的氨基酸和具有亲水性碱性侧链的氨基酸。共同性质还可以是具有疏水性侧链的氨基酸、具有脂肪族疏水性侧链的氨基酸、具有芳香族疏水性侧链的氨基酸、具有极性中性侧链的氨基酸、具有带电荷侧链的氨基酸、具有带电荷酸性侧链的氨基酸和具有带电荷碱性侧链的氨基酸。天然存在的和非天然存在的氨基酸均是本领域已知的,并且可以在实施方案中用作取代氨基酸。用于替换氨基酸的方法是本领域技术人员熟知的,并且包括但不限于编码氨基酸序列的核苷酸序列的突变。本文中提及的“一个或多个”旨在涵盖例如1、2、3、4、5、6个或更多个单独的实施方案。

[0177] 可以使用密码子优化来设计编码序列以用于最佳表达。密码子优化的编码区可通过各种不同的方法设计。该优化可以使用在线获得的方法、公开的方法或提供密码子优化

服务的公司来进行。一种密码子优化方法描述于例如国际专利申请公开号W0 2015/012924,其通过引用并入本文。简言之,用同义密码子序列修饰编码产物的核酸序列。适当地,修饰产物的开放阅读框(ORF)的整个长度。然而,在一些实施方案中,可以仅改变ORF的片段。通过使用这些方法之一,可以将频率应用于任何给定的多肽序列,并产生编码该多肽的密码子优化的编码区的核酸片段。

[0178] 在实施方案中,胰岛素-血清白蛋白融合体是人源化的、犬源化的、猫源化的或马源化的。

[0179] “人源化”意指融合蛋白包含与人相容的氨基酸序列,使得该氨基酸序列不太可能被人受试者的免疫系统视为外来的。

[0180] “犬源化”意指融合蛋白包含与犬相容的氨基酸序列,使得该氨基酸序列不太可能被犬受试者的免疫系统视为外来的。在本公开中,前缀为“犬(ca)”的多肽的术语是指人多肽的变体,其中人融合结构域被该融合结构域的犬同源物替换,并且当胰岛素原是人蛋白质的片段或变体时,胰岛素原被该片段或变体的犬同源物替换。

[0181] “猫源化”意指融合蛋白包含与猫相容的氨基酸序列,使得该氨基酸序列不太可能被猫受试者的免疫系统视为外来的。在本公开中,前缀为“猫(fe)”的多肽的术语是指人多肽的变体,其中人融合结构域被该融合结构域的猫同源物替换,并且当胰岛素原是人蛋白质的片段或变体时,胰岛素原被该片段或变体的猫同源物替换。

[0182] “马源化”意指融合蛋白包含与马相容的氨基酸序列,使得该氨基酸序列不太可能被马受试者的免疫系统视为外来的。

[0183] 如本文别处所述,本公开延伸至与除人、犬、猫和马之外的物种相容的融合蛋白。在这种情况下,融合蛋白可被称为“物种源化的(speciesized)”,是指将施用该分子的目标物种。

[0184] 在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法旨在用于猫科动物。术语猫(猫科)是指37种猫物种中的任一种,其中包括猎豹、美洲狮、美洲虎、美洲豹、狮子、猞猁、老虎和家猫。在实施方案中,受试者是家猫。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法旨在用于犬科动物。术语犬是指在犬科中发现的任何物种,其中包括家犬、狼和狐狸。在实施方案中,受试者是家犬(domestic dog,也称为Canis lupus familiaris或Canis familiaris)。

[0185] 如在本公开和所附权利要求的描述中所使用的,单数形式“一”、“一个”和“该”旨在也包括复数形式,除非上下文另有明确指示。

[0186] 同样如本文所用,“和/或”是指并涵盖一个或多个相关列出项目的任何和所有可能的组合,以及当在替代方案(或)中解释时缺乏组合。

[0187] 如本文所用,短语“基本上由……组成”是指在方法或组合物中列举的活性药剂的属或种,并且还可包括其本身对于列举的适应症或目的不具有实质活性的其它药剂。

[0188] 词语“包含(comprise/comprises/comprising)”被解释为包含性的而不是排他性的。词语“组成(consist/consisting)”及其变体应被排他性地解释,而不是包含性地解释。尽管说明书中的各种实施方案使用“包含”语言来呈现,但在其它情况下,相关实施方案也旨在使用“由……组成”或“基本上由……组成”语言来解释和描述。

[0189] 如本文所用,除非另有指明,否则术语“约”意指与所给出的参考的10%的可变性。

[0190] 如本文所用的术语“调控”或其变化形式是指组合物抑制生物途径的一种或多种

组分的能力。

[0191] 如本文所用,“疾病”、“病症”和“病况”可互换使用,以指示受试者中的异常状态。

[0192] 术语“受试者”、“个体”和“患者”可互换地指哺乳动物、人或非人灵长类动物、家养哺乳动物(例如,犬或猫)、实验室哺乳动物和农业哺乳动物。在各种实施方案中,受试者可以是人(例如,成年男性、成年女性、青春期男性、青春期女性、男童、女童)。在各种实施方案中,受试者是伴侣动物。例示性的伴侣动物包括但不限于狗、猫、马、兔、雪貂、鸟和豚鼠。在各种实施方案中,受试者是犬。在各种实施方案中,受试者是猫。在各种实施方案中,受试者是哺乳动物。

[0193] 如本文所用,术语“靶细胞”是指其中期望表达蛋白质的任何靶细胞。在某些实施方案中,靶细胞是肝细胞。在一些实施方案中,靶细胞是肌细胞。

[0194] 如本文所用,“表达盒”是指包含生物学上有用的核酸序列(例如,编码蛋白质、酶或其它有用基因产物、mRNA等的基因cDNA)和与其可操作地连接的指导或调节核酸序列及其基因产物的转录、翻译和/或表达的调控序列的核酸分子。如本文所用,“可操作地连接的”序列包括与核酸序列连续或不连续的调控序列(也称为元件)和以反式或顺式核酸序列起作用的调控序列两者。此类调控序列通常包括例如启动子、增强子、转录因子、转录终止子、内含子、增强翻译效力的序列(即,Kozak共有序列)、有效的RNA加工信号诸如切片和聚腺苷酸化序列、稳定细胞质mRNA的序列(例如土拨鼠肝炎病毒(WHP)翻译后调控元件(WPRE))和TATA信号中的一者或多者。表达盒可含有基因序列上游(5')的调控序列,例如,启动子、增强子、内含子等中的一者或多者,和增强子中的一者或多者,或基因序列下游(3')的调控序列,例如,包括聚腺苷酸化位点的3'非翻译区(3'UTR),以及其它元件。在某些实施方案中,调控序列与基因产物的核酸序列可操作地连接,其中调控序列通过间插核酸序列,即,5'-非翻译区(5'UTR)与基因产物的核酸序列分开。在某些实施方案中,表达盒包含一种或多种基因产物的核酸序列。在一些实施方案中,表达盒可以是单顺反子或双顺反子表达盒。

[0195] 如本文所用,“施用”是指局部和全身施用,例如,包括肠内、肠胃外、肺部和局部/经皮施用。可用于本文所述方法中的药物成分的施用途径包括例如口服(经口(P.O.))施用、经鼻或吸入施用、作为栓剂施用、局部接触、经皮递送(例如,经由经皮贴剂)、鞘内(IT)施用、静脉内(“iv”)施用、腹膜内(“ip”)施用、肌肉内(“im”)施用、病灶内施用或皮下(“sc”)施用,或植入缓释装置(例如,微型渗透泵、长效制剂等)至受试者。肠胃外施用包括例如静脉内、肌肉内、动脉内、肾内、尿道内、心内、冠状动脉内、心肌内、皮内、硬脑膜外、皮下、腹膜内、心室内、离子导入和颅内。

[0196] 术语“全身施用”和“经全身施用的”是指将药物成分或组合物施用于哺乳动物使得药物成分或组合物经由循环系统递送至体内部位(包括药物作用的靶向部位)的方法。全身施用包括但不限于口服、鼻内、直肠和肠胃外(例如,除通过消化道之外,诸如肌肉内、静脉内、动脉内、经皮和皮下)施用。

[0197] 术语“有效量”或“药物有效量”是指产生期望结果所必需的一种或多种药物成分(例如,融合蛋白)的量和/或剂量和/或剂量方案。

[0198] 如本文所用,术语“治疗(treating/treatment)”是指延迟该术语所适用的疾病或病况或此疾病或病况的一种或多种症状的发作、延缓或逆转其进展、降低其严重程度、或缓

解或预防该术语所适用的疾病或病况或此疾病或病况的一种或多种症状。术语“治疗”还包括预防、减轻、改善、减少、抑制、消除和/或逆转疾病或病况的一种或多种症状。

[0199] 术语“减轻”是指该病理或疾病的一种或多种症状的减少或消除,和/或该病理或疾病的一种或多种症状的发作或严重程度的速率或延迟的降低,和/或该病理或疾病的预防。在一些实施方案中,病理或疾病的一种或多种症状的减少或消除可包括例如空腹血糖的可测量和持续降低。

[0200] ****

[0201] 本文提及的所有出版物和专利通过引用以其整体并入本文,如同每个单独的出版物或专利被具体地和单独地指明通过引用并入本文。在冲突的情况下,以本申请(包括本文的任何定义)为准。然而,对本文所引用的任何参考文献、文章、出版物、专利、专利出版物和专利申请的提及不是并且也不应被视为承认或以任何形式暗示它们构成有效的现有技术或形成世界上任何国家的公知常识的一部分。

[0202] 本文所用的章节标题仅用于组织目的,并且不应被解释为限制所描述的主题。

[0203] 虽然已经说明和描述了例示性实施方案,但是应当理解,在不脱离本公开的精神和范围的情况下,可以在其中进行各种改变。

[0204] 实施例

[0205] 提出以下实施例是为了向本领域普通技术人员提供如何使用、制备和评估本文所述的组合物和方法的描述,并且旨在纯粹作为本公开的示例,并不旨在限制本公开的范围。

[0206] 实施例1:半衰期延长的犬胰岛素-血清白蛋白融合体的产生和犬胰岛素融合蛋白的体外效力的评估

[0207] 已经开发了犬胰岛素-血清白蛋白融合蛋白用于控制狗的高血糖症和与高血糖症相关联的糖尿病临床症状。

[0208] 通过构建含有以下元件的融合多肽来产生犬前胰岛素原-血清白蛋白融合蛋白(cINS-A1b)(图1A)(SEQ ID NO:1):

[0209] • 天然犬胰岛素信号肽(SP)

[0210] • 犬胰岛素原,其中天然序列已在3个氨基酸位置(K53R、R55K和L86R)处进行了修饰以在现有蛋白酶裂解位点(B链、C肽、A链)处掺入2个弗林蛋白酶裂解位点

[0211] • 包含序列GGGGSGGGSGGG(SAQ ID NO:8)的Gly/Ser接头

[0212] • 犬血清白蛋白

[0213] 用与上述相同的元件制备犬前胰岛素原融合蛋白,不同在于用犬转铁蛋白(cINS-Tf)(图1B)(SEQ ID NO:3)替换犬血清白蛋白序列。还产生具有3个氨基酸修饰(K53R、R55K和L86R)的对照犬前胰岛素原序列作为对照(cINS-2-1)(图1C)(SEQ ID NO:5)。

[0214] 进行一项研究以评估两种融合蛋白(cINS-A1b和cINS-Tf)的体外效力,在含有编码相应蛋白质的cDNA的表达质粒瞬时转染后,在哺乳动物细胞中产生每种蛋白质的C末端组氨酸标记形式。经由镍亲和层析从细胞上清液中纯化蛋白质,并使用PathHunter[®]™胰岛素生物测定试剂盒(Eurofins[™] DiscoverX Products, LLC)按照试剂盒说明书测定胰岛素生物活性。试剂盒中提供的标准胰岛素用作参考对照。cINS-A1b和cINS-Tf两者在该测定中均表现出生物活性(图2)。对两种融合蛋白中的胰岛素分子进行的修饰导致效力的少量损失,如EC₅₀值的变化所指示的。



图1A

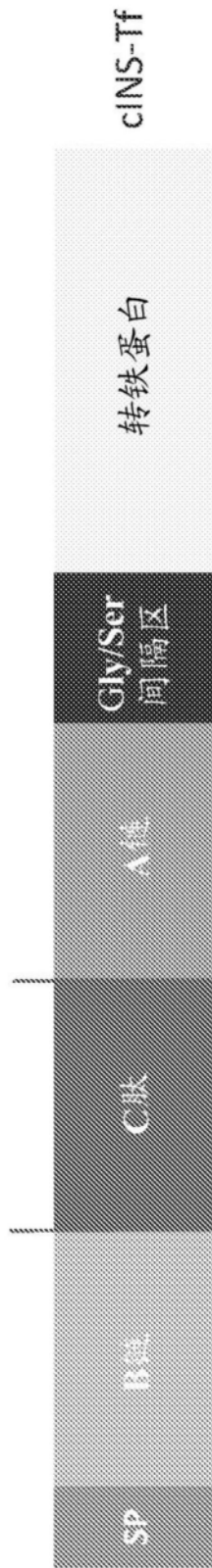


图1B

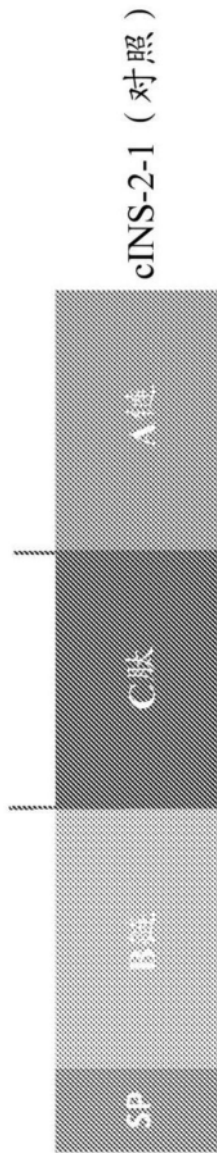


图1C

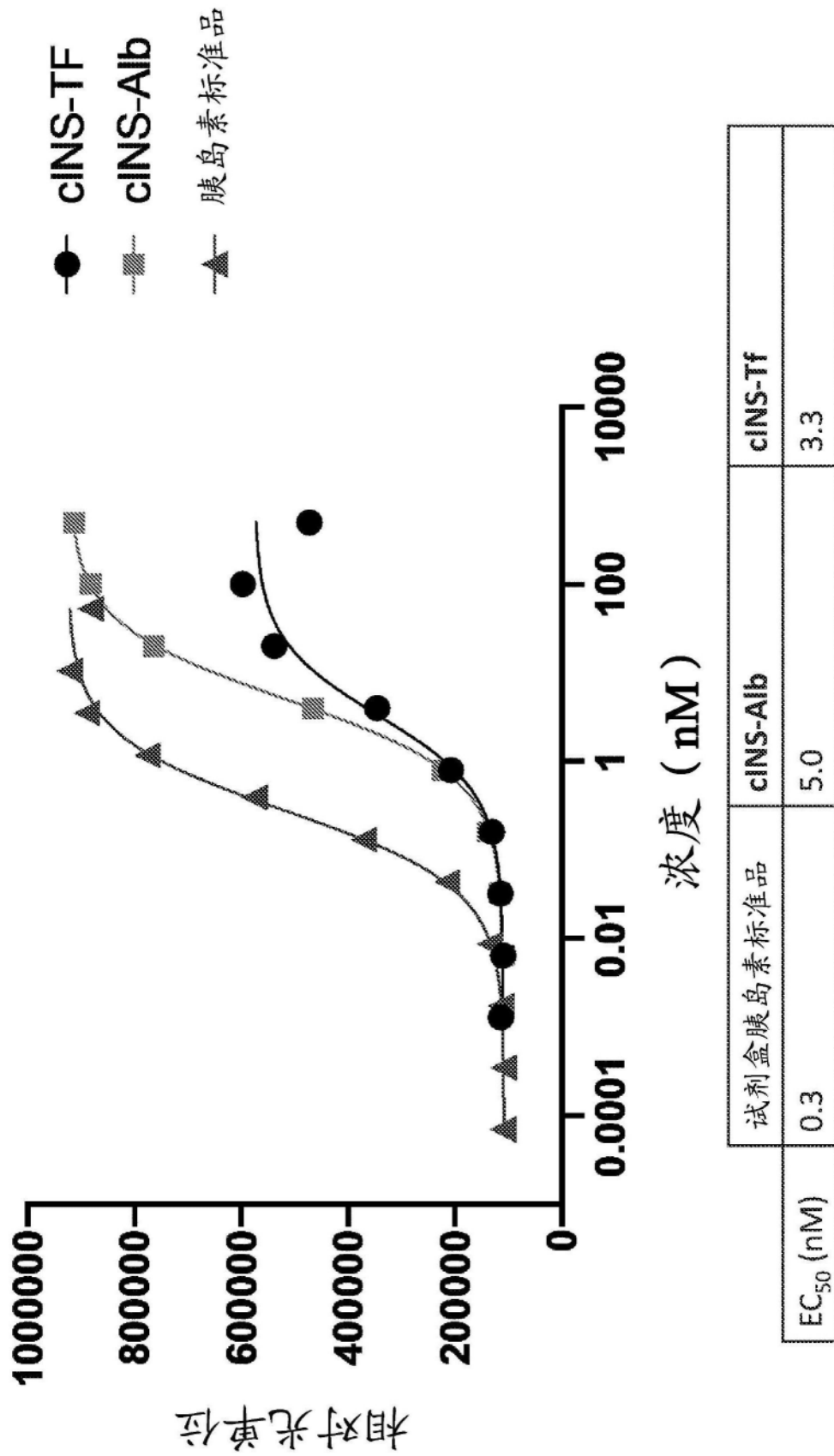


图2