



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108472281 B

(45) 授权公告日 2023.09.08

(21) 申请号 201680073746.2

A · A · 蒂斯比里图 J · D · 泽姆劳

(22) 申请日 2016.12.16

(74) 专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11382

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108472281 A

专利代理人 曹津燕 张伟

(43) 申请公布日 2018.08.31

(51) Int.CI.

A61K 31/30 (2006.01)

(30) 优先权数据  
15201070.8 2015.12.18 EP  
92979 2016.02.19 LU

A61K 38/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 31/315 (2006.01)

2018.06.14

A61K 31/4166 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 1/16 (2006.01)

PCT/EP2016/081407 2016.12.16

(56) 对比文件

US 8735538 B1, 2014.05.27

(87) PCT国际申请的公布数据

WO 2004056849 A2, 2004.07.08

W02017/103094 EN 2017.06.22

Summer, K. H. et al. "The biogenic  
methanobactin is an effective chelator  
for copper in a rat model for Wilson  
disease".《Journal of Trace Elements in  
Medicine and Biology》.2010, 第25卷(第1期),  
36-41.

(73) 专利权人 德国亥姆霍兹慕尼黑中心健康与  
环境研究中心(有限公司)

审查员 刘桂英

地址 德国纽伦堡

权利要求书2页 说明书29页

专利权人 密歇根大学董事会  
爱荷华州立大学研究基金会股份  
有限公司

序列表6页 附图15页

(72) 发明人 H · 齐施卡 J · 利奇曼奈格尔

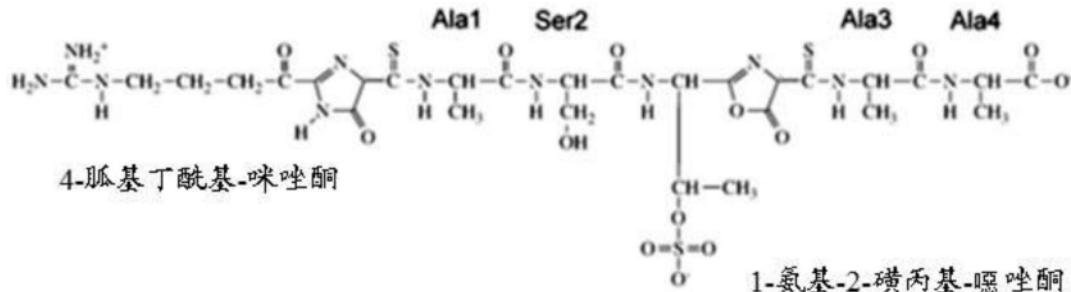
(54) 发明名称

用于治疗铜相关疾病的手段和方法

(57) 摘要

本发明涉及(生物)医学领域,并且更具体地  
涉及铜相关疾病的治疗。本发明提供了用于从器  
官和/或循环中耗竭(过量)铜的新手段和方法。  
本发明提供了具有高铜结合亲和力的试剂及其  
稳定化形式,以及新的治疗方案。本发明的手段  
和方法对威尔逊病的治疗特别有用,但也用于其  
他病症的治疗。

1. 甲基孢囊菌 (*Methylocystis*) 菌株SB2甲烷氧化菌素 (mb-SB2) 在制备用于在受试者中治疗威尔逊病的药物中的应用, 其特征在于, 所述治疗包括至少一个以下的治疗周期:(a) 甲烷氧化菌素施用的第一阶段, 之后是(b) 非治疗的第二阶段, 其中所述第二阶段超过所述第一阶段, 并且其中所述甲烷氧化菌素以稳定化形式提供; 并且所述mb-SB2具有式(V):



(V) .

2.根据权利要求1所述的应用，其特征在于，所述第一阶段持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多持续天的时间段。

3.根据权利要求1所述的应用，其特征在于，所述甲烷氧化菌素以单剂量每天一次、每天两次、每天三次、每天四次、每隔一天或连续地施用。

4.根据权利要求1所述的应用，其特征在于，所述第二阶段持续至少1周、2周、3周、4周、5周或更多的时间段。

5.根据权利要求1所述的应用，其特征在于，所述治疗周期的第二阶段之后是至少一个另外的治疗周期。

6. 根据权利要求1所述的应用，其特征在于，所述治疗方法包括反复的治疗周期。

7. 根据权利要求1所述的应用，其特征在于，所述威尔逊病包括急性期威尔逊病。

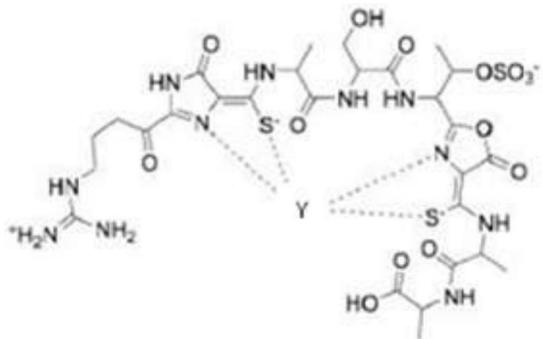
8.根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述急性期威尔逊病的特征是急性肝衰竭。

9. 根据权利要求1所述的应用，其特征在于，所述甲烷氧化菌素以至少1mg/kg体重的剂量施用给所述受试者。

10. 根据权利要求1所述的应用，其特征在于，所述甲烷氧化菌素以 $10^{-15}$ 或更小的 $K_d$ 结合 $C_{11}(I)$ 。

11. 根据权利要求1所述的应用，其特征在于，所述治疗包括：至少一个包括施用以 $10^{-15}$ 或更小的 $K_d$ 结合Cu(I)的甲烷氧化菌素的治疗周期，和至少一个包括施用以 $10^{-15}$ 或更大的 $K_d$ 结合Cu(I)的甲烷氧化菌素的治疗周期。

12. 根据权利要求1所述的应用，其特征在于，当复合锌或铜时，所述mb-SB2具有以下结构(VII)：



( VII )

其中Y选自Zn(I)、Zn(II)、Cu(I)和Cu(II)。

13. 根据权利要求1所述的应用，其特征在于，所述甲烷氧化菌素复合Zn(I)和/或Zn(II)，和/或以pH $\geqslant 9$ 提供。

14. 根据权利要求1所述的应用，其特征在于，所述治疗减少以下中的至少一个：(i) 全肝铜水平，(ii) 总肝细胞铜水平，和/或(iii) 肝细胞线粒体铜水平。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的应用，其特征在于，所述治疗导致铜经由胆汁排泄。

## 用于治疗铜相关疾病的手段和方法

[0001] 本发明是在由美国能源部授予的资助DE-SC0006630的政府支持下完成的。政府对本发明享有某些权利。

### 背景技术

[0002] 铜是对于真核生物和大多数原核生物来说必不可少的微量元素,它在关键的生物学功能如酶活性、氧气转运和细胞信号传导中起着重要作用。但是,由于其高的氧化还原活性和催化自由基生成的能力,铜可能对脂质、蛋白质、DNA和其他生物分子具有不利影响。特别是,线粒体被认为是铜毒性导致的氧化损伤的主要目标。此外,铜可能干扰蛋白质,并可能从金属蛋白中置换其他金属如锌,由此抑制其活性。为了防止铜发挥其潜在的毒性效应,它通常不以游离形式存在,而只是作为一种复合物。在人体中,血浆中约95%的铜与蛋白质如铜蓝蛋白(一种由肝细胞合成并分泌的多铜铁氧化酶)结合。据估计,每个细胞中存在的游离铜原子少于1个。

[0003] 由于其在代谢中的矛盾作用,铜生物利用中的任何不平衡必然导致缺乏或毒性,并且所有生物体已经进化出调节其吸收、排泄和生物利用的机制。在哺乳动物中,铜吸收通过肠上皮细胞摄取而发生在小肠中,随后通过铜转运蛋白ATP7A转移到血液中。肝在铜代谢中起着关键作用,作为铜储存的场所并且调节其向血清和组织的分布和过量的铜向胆汁中的排泄。特别是,肝细胞通过专门化的转运蛋白ATP7B转运和调节生理铜。

[0004] ATP7A和ATP7B在结构和功能上密切相关,具有约60%的氨基酸序列同一性。它们经历ATP依赖性磷酸化和去磷酸化的循环以催化铜穿过细胞膜的移位,用于金属化许多必需的含铜酶(cuproenzyme),以及用于除去过量的细胞铜以防止毒性。

[0005] ATP7B突变导致对肝细胞在细胞和系统水平维持铜稳态的能力的主要损害,从而导致胆铜排泄受损和肝中持续的铜蓄积,这是一种被称为威尔逊病(WD)的病症。这可能导致——很可能是由于肝铜的溢出(Bandmann等人,The Lancet.Neurology 14,103-113(2015))——对大脑有害的影响,并在许多情况下导致慢性肝病,还导致爆发性肝衰竭(Gitlin,Gastroenterology 125,1868-1877(2003))。

[0006] 未经治疗的威尔逊病普遍致命,大多数患者死于肝病。为了恢复体内铜稳态,每日施用临幊上使用的铜螯合剂D-青霉胺(D-PA)和曲恩汀(TETA)或候选药物四硫代钼酸盐(TTM)(Gitlin JD,Gastroenterology.2003 Dec;125(6):1868-77)。这种终身治疗只有在晚期肝或神经系统疾病发作之前开始才有效(Roberts等人,Am J Clin Nutr 88,851S-854S(2008))。锌盐也是如此,其主要用于WD的轻度病例以减少通过胃肠道的铜吸收,或作为螯合剂治疗的WD患者的铜维持疗法(Gitlin JD,上述引文)。然而,在急性肝衰竭(由延迟诊断、治疗失败或迅速发展的暴发性肝炎引起)的情况下,除非进行肝移植,否则死亡几乎是确定的(Gitlin JD,上述引文)。目前FDA/EMA批准的所有铜螯合剂都具有严重的副作用,包括骨髓毒性、肾毒性、肝毒性、贫血和引发自身免疫性疾病(Gitlin JD,上述引文)。由于D-PA的毒性,几乎三分之一的WD患者需要停止治疗(Weiss&Stremmel,Current gastroenterology reports 14,1-7(2012))。

[0007] 目前批准的药物治疗通常不能恢复急性WD中的铜稳态,因此使肝移植成为唯一可行的治疗选择。鉴于这些问题,用于WD和其他铜相关疾病的替代和创新治疗的医疗需求明显未得到满足。本申请背后的技术问题是符合未被满足的医疗需求,以用于对铜相关疾病例如WD、特别是急性WD的替代和创新治疗。

## 发明内容

[0008] 基于甲烷氧化菌素(铜载体)从肝细胞和肝细胞线粒体中大量耗竭铜的意想不到的能力,本发明人首次提出:(1)新的治疗方案,其涉及铜耗竭阶段,随后是非治疗阶段,(2)(以前难以治疗或无法治疗的)急性期威尔逊病的新治疗,和(3)稳定化形式的甲烷氧化菌素,其保留了不稳定的甲烷氧化菌素的优异能力(并因此适用于根据上文所述的治疗方案和医疗指示使用),但提供了在体温下稳定性增加的益处。

[0009] 甲烷氧化菌素是由许多嗜甲烷菌产生的低分子量铜结合分子,并且已被证明介导从环境中获取铜(Semrau等人,2010.FEMS Microbiol Rev34:496-531)。本发明人首次证明,甲烷氧化菌素对于治疗各种铜相关疾病和病症具有相当大的潜力,并且由于其优异的铜结合亲和力(Choi等人,2006.Biochemistry 45:1442-1453)和体内耐受性,是有潜力的用于在有此需要的患者中大量且快速消耗过量铜水平的新制剂。由于它们的有益特性,甲烷氧化菌素被认为对威尔逊病患者中的急性脱铜治疗特别有用。

[0010] 因此,第一方面,本发明涉及用于在受试者中治疗威尔逊病的方法中应用的铜结合甲烷氧化菌素,其中所述治疗包括以下的治疗周期:(a)甲烷氧化菌素施用的第一阶段,之后是(b)非治疗的第二阶段,其中所述第二阶段超过第一阶段。所述第一阶段可以持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多持续天的时间段,并且可涉及以单剂量每天一次、每天两次、每天三次、每天四次、每隔一天或连续地施用甲烷氧化菌素。所述第二阶段可持续至少1周、2周、3周、4周、5周或更长。在治疗周期的非治疗的第二阶段之后可以是至少一个另外的治疗周期。特别地,根据本发明的方法的所述治疗可以包括连续的治疗周期。

[0011] 另一方面,本发明还涉及用于在受试者中治疗急性期威尔逊病的方法中应用的铜结合甲烷氧化菌素。

[0012] 在任何情况下,用于本发明的应用的甲烷氧化菌素可以包含以下通式(I)或由以下通式(I)组成:

[0013]  $R^1 - (X)_{2-5} - R^2$  (I)

[0014] 其中,

[0015]  $R^1$ 和 $R^2$ 各自为包含N并与烯硫醇物(enethiolate)连接的5元杂环;

[0016] 并且每个X独立地选自任何氨基酸。

[0017] 进一步设想的是,甲烷氧化菌素可以来源于细菌,包括嗜甲烷菌和非嗜甲烷菌,例如甲基孢囊菌属(*Methylocystis* spec.)、甲基弯菌属(*Methylosinus* spec.)、甲基微菌属(*Methylomicrobium* spec.)和甲基球菌属(*Methylococcus* spec.)。例如,甲烷氧化菌素可以选自(a)发孢甲基弯菌(*Methylosinus trichosporium*)OB3b甲烷氧化菌素(mb-OB3b)、(b)甲基孢囊菌(*Methylocystis*)菌株SB2甲烷氧化菌素(mb-SB2)、(c)荚膜甲基球菌(*Methylococcus capsulatus*)Bath甲烷氧化菌素(mb-Bath)、(d)白色甲基微菌(*Methylomicrobium album*)BG8甲烷氧化菌素(mb-BG8)、(e)甲基孢囊菌(*Methylocystis*)

菌株M甲烷氧化菌素、(f)毛甲基胞囊菌(*Methylocystis hirsuta*)CSC1甲烷氧化菌素和(g)玫瑰甲基孢囊菌(*Methylocystis rosea*)甲烷氧化菌素(mb-rosea)、(h)甲基孢囊菌属(*Methylosinus* sp.)菌株LW3甲烷氧化菌素(mb-LW3)、(i)甲基孢囊菌属(*Methylosinus* sp.)菌株LW4甲烷氧化菌素(mb-LW4)、(j)甲基孢囊菌属(*Methylosinus* sp.)菌株LW5(mb-LW5)、(k)甲基弯菌属(*Methylosinus* sp.)菌株PW1甲烷氧化菌素(mb-PW1)、(l)小甲基孢囊菌(*Methylocystis parvus*)OBBP甲烷氧化菌素(mb-OBBP)、(m)巴西贪铜菌(*Cupriavidus basiliensis*)B-8甲烷氧化菌素(mb-B-8)、(n)适冷假单胞菌(*Pseudomonas extremaustralis*)14-3甲烷氧化菌素(mb-14-3)、(o)固氮螺菌属(*Azospirillum* sp.)菌株B510甲烷氧化菌素(mb-B510)、(p)运动替斯崔纳菌(*Tistrella mobilis*)KA081020-065(mb-mobilis)甲烷氧化菌素和(q)堆肥从毛单胞菌(*Comamonas composti*)DSM 21721甲烷氧化菌素(mb-21721)。

[0018] 用于本发明的应用的甲烷氧化菌素被设想以 $10^{-15}$ 或更小的 $K_d$ 结合铜,特别是Cu(I)。

[0019] 所述甲烷氧化菌素可以复合Zn(I)和/或Zn(II)。

[0020] 另一方面,本发明提供了一种包含稳定化甲烷氧化菌素的药物组合物。所述药物组合物可以在37°C下稳定至少20小时或更长。稳定化可以通过以下方式实现:a)提供pH $\geq 9$ 的药物组合物和/或以与Zn(I)和/或Zn(II)的复合物形式提供甲烷氧化菌素。所述锌:甲烷氧化菌素复合物可以通过使一定量的Zn(I)和/或Zn(II)与一定量的甲烷氧化菌素在水性溶液(aqueous solution)中以1:1的比率接触来制备。本发明的药物组合物被设想可用于治疗多种疾病,包括威尔逊病、癌症、神经退行性疾病、糖尿病、细菌感染、炎性疾病、纤维化、肝硬化、家族性肌萎缩性侧索硬化症、铅和/或汞中毒。

## 附图说明

[0021] 图1:LPP大鼠中的肝疾病反映了毁灭性的线粒体铜超负荷引起的WD患者中的急性肝衰竭。

[0022] (A)患病LPP<sup>-/-</sup>大鼠(上图)和具有急性肝衰竭的未经治疗的WD患者(下图)中肝损伤的组织病理学比较(HE染色)。可检测到组织坏死伴有再吸收性炎症以及修复(纤维化)(黑色箭头头部),并标记胆管增生(圆圈)、各向异性(黑色箭头)和几种炎性浸润(白色箭头)。插入块显示细胞凋亡(白色星号)和具有气球状肝细胞的结节(黑色星号)。比例尺:100 μm。

[0023] (B)患病LPP<sup>-/-</sup>大鼠(左侧两图)和具有急性肝衰竭的未经治疗的WD肝(右侧两图)中的线粒体结构损伤。可以识别各种大小(星号)的透明液泡、嵴扩张(箭头)、电子密度的显著差异以及分离的内膜和外膜(箭头头部)。比例尺:500nm。

[0024] (C)来自LPP<sup>-/-</sup>大鼠和具有急性肝衰竭的未经治疗的WD患者的全肝匀浆和纯化的肝线粒体中可比较的铜负担。对照杂合LPP<sup>-/-</sup>(N=17);受影响的LPP<sup>-/-</sup>,其铜强烈升高,但AST<200U/L、胆红素<0.5mg/dl(N=13);疾病发作的LPP<sup>-/-</sup>,其AST>200U/L、胆红素<0.5mg/dl(N=8);患病的LPP<sup>-/-</sup>,其AST>200U/L、胆红素>0.5mg/dl(N=10)。<sup>\*</sup>相对于对照组显著,<sup>#</sup>相对于受影响组显著,<sup>†</sup>相对于疾病发作组显著,<sup>\*</sup>p<0.05,<sup>\*\*</sup>p<0.01,<sup>\*\*\*</sup>p<0.001。

- [0025] 图2:铜负荷增加严重攻击线粒体膜的完整性。
- [0026] (A) LPP<sup>-/-</sup>大鼠中的进行性疾病状态与正常结构的线粒体(类型1和2)中的减少和结构改变的线粒体(类型3和4)中的增加相并行。比例尺:500nm。对照LPP<sup>+/+</sup> 82-89 d,N=4,n=766;受影响的LPP<sup>-/-</sup> 82-93 d,N=6,n=886;疾病发作的LPP<sup>-/-</sup> 81-93 d,N=4,n=784;患病的LPP<sup>-/-</sup> 104-107 d,N=5,n=939。N=大鼠数量,n=分析的线粒体的数量。<sup>\*</sup>相对于对照组显著,<sup>†</sup>相对于疾病发作组显著,<sup>\*</sup>p<0.05,<sup>\*\*</sup>p<0.01。
- [0027] (B) 荧光偏振显示在LPP<sup>-/-</sup>线粒体相对于对照线粒体中,在蛋白质-脂质界面(TMA-DPH)、而不在膜内脂质相(DPH)处的线粒体膜性质中的物理改变。N=大鼠数量,n=测量次数。<sup>\*</sup>相对于对照组显著,<sup>\*</sup>p<0.05,<sup>\*\*</sup>p<0.01,<sup>\*\*\*</sup>p<0.001。
- [0028] (C) 经钙或铜诱导的MPT,分离的LPP<sup>+/+</sup>线粒体经历大幅度肿胀,这在来自患病和疾病发作的大鼠的LPP<sup>-/-</sup>线粒体中显著降低。(N=2-3,n=4-6)。<sup>\*</sup>相对于对照组显著,<sup>#</sup>相对于受影响组显著,<sup>†</sup>相对于疾病发作组显著,<sup>\*</sup>p<0.05,<sup>\*\*</sup>p<0.01,<sup>\*\*\*</sup>p<0.001。
- [0029] (D) 钙诱导的(100μM)MPT可以被Cys-A(5μM)有效抑制。这种阻断效应在来自患病和疾病发作的LPP<sup>-/-</sup>大鼠的线粒体中严重受损。表(左)显示平均值和标准偏差,而曲线(右)描绘一个示例性测量。<sup>\*</sup>相对于对照组显著,<sup>#</sup>相对于受影响组显著,<sup>†</sup>相对于疾病发作组显著,<sup>\*</sup>p<0.05,<sup>\*\*</sup>p<0.01。
- [0030] (E) 与对照线粒体相比,LPP<sup>-/-</sup>线粒体在更早的时间点失去它们的膜电位。表(左)显示平均值和标准偏差,而曲线(右)描绘一个示例性测量。<sup>\*</sup>相对于对照组显著,<sup>#</sup>相对于受影响组显著,<sup>†</sup>相对于疾病发作组显著,<sup>\*</sup>p<0.05,<sup>\*\*</sup>p<0.01,<sup>\*\*\*</sup>p<0.001。
- [0031] 图3:甲烷氧化菌素(MB)驱动肝线粒体、肝细胞和全肝的铜耗竭。
- [0032] (A) 从新鲜分离的铜负担的LPP<sup>-/-</sup>线粒体的MB驱动的铜提取相对于通过铜螯合剂D-PA、TETA和TTM(各2mM,孵育30分钟,Co=缓冲液处理的对照,N=3)的铜提取。<sup>\*</sup>相对于对照组显著,<sup>\*\*</sup>p<0.01。
- [0033] (B) MB对铜依赖性线粒体呼吸复合物IV活性的毒性,相对于用TTM观察到的毒性(MB:N=3,n=9;TTM:N=1,n=3)。<sup>\*</sup>相对于缓冲液对照组显著,<sup>#</sup>相对于MB的相应浓度显著,<sup>\*</sup>p<0.05,<sup>\*\*</sup>p<0.01,<sup>\*\*\*</sup>p<0.001。
- [0034] (C) 来自预先负荷铜的HepG2(N=3)和WD患者的肝细胞样(HLC)细胞(两个独立实验中的一个)通过MB((+)24h经MB治疗的,(-)未经治疗的对照)被高效地脱铜。相对于未经治疗的对照组显著,<sup>\*\*\*</sup>p<0.001。
- [0035] (D) 在2和24小时(N=3)时,到HepG2细胞中的剂量依赖性细胞内MB摄取(以μg MB/mg细胞蛋白给出)。
- [0036] (E) 与TTM相比,MB的细胞(HepG2)毒性(N=3,n=9)。ΔΨ消散质子载体(protonophor)CCCP用作阳性对照。<sup>\*</sup>相对于缓冲液对照组显著,<sup>#</sup>相对于MB的相应浓度显著,<sup>\*\*</sup>p<0.01,<sup>\*\*\*</sup>p<0.001。箭头指示具有低ΔΨ的细胞。
- [0037] (F) 经MB(500μM)治疗的HepG2细胞仅显示线粒体膜电位损失的中间阶段(250μM CCCP,N=2)。染色指示核(蓝色)、有ΔΨ的线粒体(橙红色)和没有ΔΨ的线粒体(绿色)。比例尺:50μm。
- [0038] (G) 经两小时LPP<sup>-/-</sup>肝灌注,累积的铜排泄到胆汁中。与TTM(0.8μM)相比,MB(0.7μM)迫使10倍更高的铜量进入胆汁中(请注意MB(右侧,蓝色轴)和D-PA、TETA和TTM(左侧,黑

色轴)的比例不同)。D-PA (2.2 $\mu$ M) 和TETA (1.8 $\mu$ M) 未使铜进入胆汁中 (N=3, Co=Krebs-Ringer缓冲液对照)。

[0039] (H) 两小时LPP<sup>-/-</sup>肝灌注期间灌注液中的铜浓度。除TTM外,所有螯合剂都将铜输送到灌注液中(浓度如同G中,N=2)。

[0040] (I) 两小时LPP<sup>-/-</sup>肝灌注。与D-PA、TETA、TTM和Krebs-Ringer缓冲液灌注对照形成对照,MB显著降低肝铜含量(螯合剂浓度如同G中,N=3)。\*相对于对照组显著,\*p<0.05。

[0041] 图4:采用甲烷氧化菌素(MB)短期体内治疗有效避免急性肝衰竭。

[0042] (A) 在通过MB治疗3或5天的LPP<sup>-/-</sup>肝中发现明显肝损伤的组织病理学特征减少,但未在经4天D-PA或TETA治疗中发现(比例尺:100 $\mu$ m,HE染色,符号说明如同图1、图6中)。日剂量为150mg (130 $\mu$ mol) MB/kg bw, 100mg (540 $\mu$ mol) D-PA/kg bw或480mg (2190 $\mu$ mol) TETA/kg bw。

[0043] (B) 与未经治疗的LPP<sup>-/-</sup>对照(U,N=6) 和经D-PA(8号、9号)或TETA(10号、11号)治疗的LPP<sup>-/-</sup>大鼠形成对照,经短期MB治疗的LPP<sup>-/-</sup>动物(1-7号)呈现明显降低的AST水平,恢复正常。

[0044] (C) 经腹腔注射(i.p.),MB仅可在血清中检测到半小时,指示系统停留时间非常短(n=2)。

[0045] (D) 与未经治疗的LPP<sup>-/-</sup>对照(N=4) 和经D-PA或TETA(N=2,每个)治疗的LPP<sup>-/-</sup>大鼠形成对照,经短期MB治疗的LPP<sup>-/-</sup>大鼠(N=3,每个)在全肝铜水平上呈现渐进但轻微的降低,但在线粒体铜水平上呈现显著降低.\*相对于未经治疗的对照组显著,\*p<0.05。

[0046] (E) 与从未治疗的LPP<sup>-/-</sup>对照(图2A) 和经D-PA或TETA治疗的LPP<sup>-/-</sup>大鼠中分离的线粒体形成对照,从经短期MB治疗的LPP<sup>-/-</sup>大鼠中分离出的结构严重受损的线粒体(类型4)的数量大量减少。(N=2,每个,在图9A中量化,比例尺:1 $\mu$ m)。

[0047] 图5:甲烷氧化菌素对抗急性肝衰竭的保护持续数周。

[0048] (A) 经短期MB治疗的LPP<sup>-/-</sup>大鼠保持健康至少两周,此后血清AST和胆红素(未显示)水平再次升高。在分析时,一只动物(1号)仍然健康,两只动物(2号和3号)患病。

[0049] (B,C,D) 按此顺序(大鼠1-3),线粒体铜含量而非全肝铜含量(B)增加,明显肝损伤的典型组织学特征的频率增加(C),和线粒体结构损伤的严重程度增加(D)。比例尺:在(C)中为100 $\mu$ m,在(D)中为500nm。

[0050] 图6:

[0051] (A) Masson三色染色显示患病LPP<sup>-/-</sup>大鼠肝(左图)中有纤维化的迹象(染成蓝色),但外植的WD患者肝中有明显的纤维化(右图)。比例尺:100 $\mu$ m。

[0052] (B) LPP大鼠肝在不同疾病状态下的组织病理学分析(HE染色)显示疾病进展期间的改变增加(比例尺:100 $\mu$ m;白色星号:(不同阶段的)凋亡,黑色箭头:各向异性,黑色星号:气球状的肝细胞,白色箭头:炎性浸润;白色箭头头部:细胞质凝结)。

[0053] (C) LPP大鼠肝线粒体的原位电子显微照片,与如B中的疾病状态对应(比例尺:500nm)。分离的内膜和外膜用箭头指示。

[0054] (D) D-PA治疗失败的WD患者的外植肝中的肝损伤。左图:HE染色显示肝损伤和大量纤维化的组织病理学特征(黑色箭头头部,比例尺:100 $\mu$ m)。中间图:一些区域呈现相对完整的线粒体(I),另一些表现出严重的结构损伤(II,III,参见图1B,比例尺:500nm)。右图:与

具有急性肝衰竭的未经治疗的WD患者(参见图1C)相比,在来自D-PA治疗失败的WD患者的肝的组织匀浆和分离的线粒体中测定到总铜含量较低。

[0055] 图7:

[0056] (A) 分离的对照线粒体( $LPP^{+/+}$ )的铜负荷量。将线粒体(4mg/ml)与DTT(1mM)一起预孵育,加入浓缩的(20mM)或稀释的(2mM)铜储备溶液,随后通过密度梯度离心再次纯化,并测定其铜负荷量(N=4)。

[0057] (B) 将来自(A)的铜预负载的 $LPP^{+/+}$ 线粒体与铜螯合剂(2mM)一起孵育30分钟,随后通过密度梯度离心再次纯化。(N=5,\*相对于对照组显著, $*p<0.05$ ,\*\* $p<0.01$ )。

[0058] (C) 对于 $LPP^{+/+}$ 对照线粒体相对于 $LPP^{-/-}$ 线粒体,MB对铜依赖性线粒体呼吸复合物IV活性的作用的比较( $LPP^{+/+}$ :N=3,n=9, $LPP^{-/-}$ :N=2,n=6,\*相对于缓冲液对照组显著,#相对于 $LPP^{+/+}$ 的相应浓度显著, $*p<0.05$ ,\*\* $p<0.01$ ,\*\*\* $p<0.001$ )。

[0059] (D) MB治疗引起具有基础(basic)铜负荷的HepG2细胞中铜减少50% (N=3,(+) 24h经MB治疗的,(-)未经治疗的对照,\*相对于未经治疗的对照组显著, $*p<0.05$ ) ,

[0060] (E) 组氨酸结合铜对HepG2细胞的剂量依赖性毒性(中性红)(N=5;\*相对于对照组显著,\* $p<0.05$ )。

[0061] 图8:

[0062] (A) 两小时 $LPP^{-/-}$ 肝灌注期间的胆汁流量。显示为三个独立实验的平均值。

[0063] (B) 两小时 $LPP^{-/-}$ 肝灌注期间通过MB的累积胆铜排泄(N=3)。

[0064] (C) 两小时 $LPP^{-/-}$ 肝灌注期间到灌注液中的平行的LDH和铜释放。

[0065] 图9:

[0066] (A) 对图4E定量。与从未经治疗的和经D-PA或TETA治疗的 $LPP^{-/-}$ 动物中分离的线粒体形成对照,从经短期MB治疗的 $LPP^{-/-}$ 动物中分离出的结构严重受损的线粒体(类型4)的数量大量减少(N=大鼠数量,n=线粒体数量;受影响的(A):N=6,n=886;疾病发作(Do):N=4,n=784;3d MB:N=2,n=324;5d MB:N=2,n=527;D-PA:N=2,n=252;TETA:N=2,n=366)。

[0067] (B) 在MB药物假期后来自图5中经MB治疗的 $LPP^{-/-}$ 大鼠的线粒体的呼吸分析。在分析时,来自仍然健康的动物(1号)的线粒体与对照线粒体(以琥珀酸盐作为底物的呼吸对照比,RCR<sub>S</sub>)一样完整,而来自两个患病动物(2号、3号)的线粒体受损。

[0068] (C) 无金属MB和负荷Zn的MB的稳定性分析,之后是在37°C下其两个亚稳态噁唑酮环(在394nm处的0xaA/ZnA和在340nm处的0xAB/ZnB)<sup>57</sup>的吸光度测量。与无金属甲烷氧化菌素形成对照,Zn-MB在37°C下具有时间稳定性。

[0069] (D) 未经治疗的(左)和经MB治疗的(右)垂死 $LPP^{-/-}$ 大鼠的组织病理学分析。在两种组织中都存在肝损伤,然而在经MB治疗的动物中较不严重,指示肝再生(比例尺:100μm,HE染色,符号说明如同图1、图6中)。

[0070] (E) 来自在D中描述的动物的线粒体,已分离的(左)或原位的(右)。与未经治疗的动物形成对照,在经MB治疗的 $LPP^{-/-}$ 大鼠中仅观察到轻微的结构改变(比例尺:500nm)。

[0071] (F) 在不同疾病状态下从 $LPP^{-/-}$ 大鼠分离的线粒体的ATP的产生逐渐受损。短期MB治疗扭转了这种损伤。

[0072] 图10:

[0073] 不同的应用途径或治疗方案可以进一步增强MB诱导的线粒体脱铜。

[0074] 通过5x MB腹腔注射(i.p.)、5x MB静脉注射(i.v.)，以及特别是16x MB腹腔注射(i.p.) (一周,每天两次)的一周短期治疗大大减少线粒体铜负荷。

[0075] 图11:

[0076] 来自发孢甲基弯菌(*M. trichosporium*)OB3b(A)(144、155)、甲基孢囊菌菌株(*Methylocystis* strain sp.)M(B)(136)、毛甲基孢囊菌(*M. hirsuta*)CSC1(C)(136)、玫瑰甲基孢囊菌(*M. rosea*)(D)(136)和甲基孢囊菌菌株(*Methylocystis* strain sp.)SB2(E)(135)的全长mb的化学结构。

[0077] 图12: Mb前体肽。

[0078] 在来自具有结构表征的mb的嗜甲烷菌的已知基因组序列的细菌中检测到的序列以红色显示，在来自嗜甲烷菌的已知基因组序列的细菌中检测到的序列以蓝色显示，以及在来自非嗜甲烷菌的已知基因组序列的细菌中检测到的序列以绿色显示。氨基酸上方的条表示这样的氨基酸对，所述氨基酸对经翻译后修饰成或者建议经翻译后修饰成噁唑酮、咪唑啉酮或吡嗪二酮基团。缩写：来自发孢甲基弯菌(*Methylosinus trichosporium*)OB3b(mb-OB3b)、甲基弯菌属(*Methylosinus* sp.)菌株LW3(mb-LW3)、LW4(mb-LW4)、PW1(mb-PW1)、小甲基孢囊菌(*Methylocystis parvus*)OBPP(mb-OBPP)、玫瑰甲基孢囊菌(*Methylocystis rosea*)(mb-rosea)、甲基孢囊菌(*Methylocystis*)菌株SB2(mb-SB2)、SC2(mb-SC2)和LW5(mb-LW5)、巴西贪铜菌(*Cupriavidus basiliensis*)B-8(mb-B-8)、适冷假单胞菌(*Pseudomonas extremozustralis*)14-3(mb-14-3)、固氮螺菌属(*Azospirillum* sp.)菌株B510(mb-B510)、运动替斯崔纳菌(*Tistrella mobilis*)KA081020-065(mb-mobilis)和堆肥丛毛单胞菌(*Comamonas composti*)DSM 21721(mb-21721)的甲烷氧化菌素。

[0079] 图13: Mb基因簇。

[0080] 嗜甲烷菌发孢甲基弯菌(*M. trichosporium*)OB3b、甲基孢囊菌属(*Methylocystis* sp.)SB2和玫瑰甲基孢囊菌(*Methylocystis.rosea*)的完整基因组的基因簇。

[0081] 图14:具有反复的脱铜阶段的重复治疗方案。

[0082] 使LPP<sup>-/-</sup>大鼠经受由每日三次MB注射(i.p.)五天组成的第一治疗周期，之后是非治疗阶段。与未经治疗的动物相比，反复的治疗周期导致线粒体和肝铜负荷的显著降低以及疾病发作前的时间加倍。

[0083] 图15:在结构上和化学上不同的甲烷氧化菌素(MB)肽，例如来自甲基孢囊菌(*Methylocystis*)菌株SB2的mb-SB2，在从肝细胞线粒体中耗竭铜方面表现出类似的治疗潜力。

[0084] 与现有的临床批准的铜螯合剂如D-PA相比，来自甲基孢囊菌(*Methylocystis*)菌株SB2的MB-SB2作为有前景的铜螯合剂在来自三只不同LPP<sup>-/-</sup>大鼠的新鲜分离的线粒体上起作用(1mM的D-PA、OB3b, SB2, 孵育30min, 对照=经缓冲液处理的对照, N=3)。来自甲基孢囊菌(*Methylocystis*)菌株SB2的MB肽mb-SB2在结构上和化学上偏离其他MB肽(例如偏离来自发孢甲基弯菌(*Methylosinus trichosporium*)OB3b的mb-OB3b)。

## 具体实施方式

[0085] 威尔逊病(WD)，一种常染色体隐性遗传性铜超负荷紊乱，是一种尚不可治愈的疾

病,若不治疗会致命。整体治疗方法是通过药物治疗或肝移植恢复和维持正常的铜稳态。铜螯合剂(例如D-青霉胺、曲恩汀和四硫代钼酸盐)和/或锌盐目前代表了WD治疗的金标准。无论选择何种具体方法,治疗必须持续贯穿患者的一生,因为异常的铜累积不能通过低铜饮食来控制。重要的是,不依从药物治疗或停止药物治疗与难治性肝或神经系统恶化的风险相关。

[0086] 不幸的是,目前可用的治疗选择在减少铜水平方面的效果有限;而且不能通过胆汁恢复生理铜的排泄。伴随着严重的副作用,对于高剂量和重复给药(通常每天几次)的需求,导致生活质量严重受损以及整体不良的患者依从性。

[0087] 此外,一旦WD表现为晚期肝衰竭,例如由于延迟诊断、不良依从性或快速暴发性肝炎,常用处方的WD治疗剂无法恢复肝功能。在这种情况下,具有所有其固有风险和不利因素的肝移植目前仍然是唯一可行的选择。虽然肝移植有效恢复正常胆铜排泄(由此预防疾病复发)并促进从肝外部位的铜的去除,但是,鉴于合适供体器官的长期短缺以及与手术相关的实质发病率和死亡率,只有在危及生命的情况下它才被视为治疗选择。

[0088] 因此迫切需要用于WD治疗的新手段和方法。本发明所基于的令人惊讶的发现表明,甲烷氧化菌素,一种来自嗜甲烷菌的chalkophore,是令人惊讶地有效且耐受性良好的脱铜剂。出乎意料的是,本发明人发现,由于它们优异的铜结合亲和力,甲烷氧化菌素(与效率低得多的其他铜螯合剂形成对照)可有利地用于长期效应的大量的(过量)铜耗竭,由此获得一种预期显著提高患者依从性并因此提高总体治疗成功的新的治疗方案。此外,本发明人发现甲烷氧化菌素甚至能够去除累积的线粒体铜,这最近被认为是导致许多疾病中组织和器官损伤的氧化应激的关键致病因素。因此,甲烷氧化菌素不仅是治疗WD的有希望的试剂,而且还用于治疗许多无关疾病,所述疾病已与血液、全细胞和/或线粒体内的铜含量增加有关。

#### [0089] 威尔逊病

[0090] 威尔逊病(WD)是一种遗传性疾病,与铜运输ATP酶ATP7B中的突变有关,该突变导致ATP7B蛋白活性受损或无功能。ATP7B中的超过500个突变已被识别,其中大部分是低丰度突变。

[0091] WD的典型特征是胆铜排泄受到严重损害(甚至完全缺失),从而导致肝铜超负荷,并最终导致铜溢流进入循环和/或中枢神经系统。

[0092] 受影响的患者中可能会出现各种反映由于铜过量的细胞损伤的体征和症状。威尔逊病患者可能会患有许多类型的肝疾病,并且肝疾病的表现症状的可能有很大变化,从无症状、仅有生化异常到明显的肝硬化。如本文他处所述,威尔逊病也可以表现为急性肝衰竭。其他表现包括抗Coombs阳性溶血性贫血、心肌病和内分泌功能障碍。在生命的第二或第三个十年中更常见的神经系统症状是可变的,最常包括震颤、共济失调和肌张力障碍,与基底神经节参与的神经病理学结果一致。最常见的精神疾病特征是异常行为(通常为烦躁或去抑制增加)、性格改变、焦虑和抑郁。

[0093] WD的诊断通常需要测试的组合,这些测试由在第八届国际WD(莱比锡2001)会议上工作组提出的诊断评分反映出来(Ferenci等人Liver Int.2003;23(3):139-42),并且WD的诊断现在已纳入欧洲肝研究协会(EASL)威尔逊病临床实践指南(EASL Clinical Practice Guidelines:Wilson's disease,J Hepatol.2012 Mar;56(3):671-85)。通常,凯-费氏

(Kayser-Fleischer) 环和低铜蓝蛋白(减少正常低值的50%,通常为0.1g/L或更低)的组合足以确定诊断。凯-费氏(Kayser-Fleischer)环是由角膜后弹力膜(**Deszemet's membrane**)中铜的沉积造成的,可通过裂隙灯检查进行评估。ATP7B功能缺失,随之在铜蓝蛋白生物合成期间未能掺入铜,导致缺乏酶活性并迅速降解的载脂蛋白的分泌,造成具酶促活性的铜蓝蛋白的低血清浓度,并因此造成在WD患者中通常见到的铜的成比例地低总血清浓度,严重肝损伤或急性肝衰竭的情况下除外,在此非铜蓝蛋白结合的铜由于其突然从肝释放而具有高血清浓度。

[0094] 根据EASL临床实践指南(上述引文),其他重要的诊断参数包括尿铜排泄增加(>1.6 $\mu\text{mol}/24\text{h}$ 或在儿童中>0.64 $\mu\text{mol}/24\text{h}$ )、非铜蓝蛋白结合的铜(“游离铜”)水平>1.6 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 以及肝实质铜含量>4 $\mu\text{mol}/\text{g}$ 干重。ATP7B突变的直接基因检测也越来越多地用于确认临床WD的诊断。

[0095] 值得注意的是,根据本发明的甲烷氧化菌素治疗通常被设想用于上述迹象和症状中任意者表现的WD。由于其优异的铜结合亲和力,甲烷氧化菌素被认为可用于任何形式的WD。除非另有说明,否则术语“威尔逊病”或“WD”包括急性和非急性WD形式,其表现为肝和/或神经学缺陷、婴儿早发性WD和成人晚发性WD、以前治疗过和未经治疗的WD。有利的是,甲烷氧化菌素(特别是根据本文提供的治疗方案施用的甲烷氧化菌素)被认为对于否则就要进行肝移植的情况是有效的,包括以急性肝衰竭作为首次疾病表现的WD患者、常规铜螯合剂治疗无应答者、出现终末期肝疾病(ESLD)和严重肝功能不全的患者以及如Schilsky ML, Ann NY Acad Sci. 2014 May;1315:45-9所综述的无肝衰竭的神经学WD患者。该术语还涵盖非人类哺乳动物受试者(包括犬)中的相关铜超负荷疾病。术语WD还包括WD的动物模型,例如携带ATP7B突变的完全消除了其肝铜转运活性的LPP<sup>-/-</sup>大鼠。

[0096] 一般而言,呈现上文中所述表现形式中任意者的患者预计会从甲烷氧化菌素治疗中受益。特别地,作为根据本文所述治疗方案施用甲烷氧化菌素的结果,大量铜耗竭的反复的(recurring)治疗周期被认为是一种有效的、耐受性良好且患者依从的用于呈现出上述迹象和症状中任意者的WD的治疗选择。

#### [0097] 治疗方案

[0098] 因此,第一方面,本发明提供了一种铜结合甲烷氧化菌素,其用于在受试者中治疗威尔逊病的方法中应用,其中所述治疗包括至少一个以下的治疗周期:(a)甲烷氧化菌素施用的第一阶段,之后是(b)非治疗的第二阶段,其中所述第二阶段超过第一阶段。“非治疗”是指期间不施用甲烷氧化菌素的一段时间。任选且有利地,“非治疗”可包括不施用其他WD治疗剂(特别是铜螯合剂)。令人惊奇地,事实证明如本文所述的甲烷氧化菌素是非常有效且耐受性良好的脱铜剂,其允许具有长期效应的大量铜耗竭的反复的(recurrent)治疗阶段。即,本发明人发现,当使用甲烷氧化菌素用于WD治疗时,不必需要稳定给药(如采用本领域已知的铜螯合剂那样的),但是患者相当能够经受甲烷氧化菌素治疗的反复的(recurrent)阶段以除去过量的铜,之后是优选根本不需要施用WD治疗剂的阶段。与目前已知的通常需要终生、高剂量稳定施用的WD治疗剂相比,这是一个显著的优势。因此根据本发明的治疗方案预期显著改善WD患者的生活质量,并由此显著改善患者依从性和总体治疗成功。

[0099] 特别地,本发明治疗方案的第一阶段设想持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多持续

天的时间段。在治疗的第一阶段(“脱铜阶段”)期间,可以如本文其它地方所述的以单剂量每天一次、每天两次、每天三次、每天四次、每隔一天或连续地施用甲烷氧化菌素。施用甲烷氧化菌素的第一阶段之后是非治疗的第二阶段。有利地,所述第二阶段甚至被认为超过如在所附实施例中所证明的甲烷氧化菌素施用的第一阶段,并且因此设想其持续至少1、2、3、4或5或甚至更长。熟练的从业人员很容易认识到,第二阶段的持续时间取决于几个因素,例如,营养铜摄入量、体质、WD的严重程度等。无论如何,在甲烷氧化菌素施用的第一阶段之后,本文设想非治疗的最短时间为至少1周。

[0100] 容易理解的是,设想了反复的(recurrent)治疗周期,即如前所述的几个治疗周期可以彼此相继。具体而言,可以在非治疗的阶段之后进行治疗阶段(脱铜阶段),随后的非治疗的阶段之后可以进行另一个脱铜阶段,等等。治疗周期可以间隔经几周、几个月、几年、甚至终生重复进行。本发明的治疗方案提供定期预防性的铜耗竭(即在发生WD的迹象和症状之前)和/或在必要时用于急性和任选的反复的脱铜治疗。熟练的从业者能够容易地评估何时进行根据本发明的甲烷氧化菌素治疗。

[0101] 急性WD

[0102] 如先前所解释的,本发明提供了一种新颖且有效的治疗方案,其允许在WD患者中进行(可选地重复的)铜耗竭。本发明所基于的另一个令人惊讶的见解是这一事实,即甲烷氧化菌素对治疗表现为急性肝衰竭(ALF)的急性WD(到目前为止,除非进行肝移植,否则这一病症将一定是致命的)是有效的。

[0103] 急性WD在本文中定义为呈现为急性肝衰竭(ALF)的WD,其可以是WD的初始表现或可以在WD治疗停止时发生。迄今为止,目前用于WD治疗的已知的铜螯合剂不能够结合并去除足够的过量铜以补救在患有ALF的WD患者中可见的肝功能的快速恶化。相反,令人惊讶地发现,本文所述的甲烷氧化菌素能够如此有效地耗竭铜,使得甚至设想可以有效治疗呈现急性WD(呈现为ALF)的WD患者,而不需要紧急肝移植。

[0104] 急性肝衰竭被定义为肝细胞功能障碍的快速发展(即在距首次肝症状发作不足26周内),可选地患者中伴随有凝血病和肝性脑病。肝性脑病可表现为较高的脑功能(例如情绪,I级中的浓度)缺陷至深度昏迷(IV级)。凝血病通常表现为凝血酶原时间延长(通常为国际标准化比值(INR)≥1.5)和进行性血小板减少症(可在全血计数中检测到)。

[0105] ALF的诊断基于体检、实验室检查结果和患者病史。在实验室测试中,可通过评估天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、γ谷氨酰转肽酶(GGT)、总胆红素和/或白蛋白水平来评估肝功能。具有由WD导致的ALF的患者常有非免疫性(Coombs阴性)溶血性贫血,该溶血性贫血可发生于肝衰竭之前或与肝损伤同时发生。肝细胞衰退可能导致大量储存的铜释放到循环中,由此增加“游离”(非铜蓝蛋白结合的)铜的水平。由于碱性磷酸酶(ALP)相对降低和胆红素增加(由溶血和肝功能障碍引起),碱性磷酸酶(ALP)与胆红素比率的增加小于4:1,天冬氨酸转氨酶(AST)与丙氨酸转氨酶(ALT)的比率大于2.2:1,血清铜增加(通常在200μg/dL以上)提示由急性WD导致的ALF。至于如何识别这类患者的指导除其他方面外(i.a.)由Schilsky ML, Ann NY Acad Sci. 2014 May; 1315: 45-9和Bermann等人Gastroenterology. 1991 Apr; 100(4): 1129-34提供。特别是,如果碱性磷酸酶(ALP)与胆红素比率大于4:1并且同时AST与ALT的比率在2.2以上,则可以推定由WD导致的ALF。

[0106] 诊断可通过评价其他表明威尔逊病的迹象和症状来确认,包括临床症状(例如深度黄疸)和常规WD诊断参数(如本文他处所述的铜蓝蛋白、血清或尿铜)。诊断必须通过如前所述的肝活组织检查和/或突变分析确定肝铜含量来确定。

[0107] 急性WD的临床表现通常从肝到肾衰竭迅速发展,除非进行紧急肝移植,否则未经治疗导致几乎95%的死亡率。本发明人是认识到甲烷氧化菌素可用作急性WD严重临床表现的有效补救方法的第一人。预期的是,通过施用甲烷氧化菌素的铜耗竭甚至可以使在急性WD患者中的肝移植过时。可以根据本文他处所述的治疗方案或者根据熟练的从业人员认为合适的任何其他治疗方案来进行急性WD的甲烷氧化菌素治疗。通常,急性WD治疗将涉及通过施用足量的甲烷氧化菌素的大量铜耗竭的阶段,一旦急性WD的迹象和症状减弱和/或化验结果改善,该阶段可结束。随后,可以按照本发明的方案进行治疗。

#### [0108] 甲烷氧化菌素

[0109] 如本文他处所述,本发明人是认识到根据新的治疗方案甲烷氧化菌素作为用于WD治疗的安全有效的铜耗竭剂以及用于治疗迄今被认为药物治疗不可逆转的急性WD的治疗潜力的第一人。如本文所用的术语“甲烷氧化菌素”或“mb”通常指来自细菌、特别是嗜甲烷菌的铜结合(和Cu(II)还原性)肽。除非另有说明,否则本文使用“铜”来指代Cu(I)和Cu(II)两者。天然存在的甲烷氧化菌素被认为分泌到细胞外介质,在那里它们通过与Cu(II)或Cu(I)结合并将铜运载到细胞中而起到chalkophore的作用。

[0110] 本文使用的术语“甲烷氧化菌素”特别包括其特征在于存在一个噁唑酮环和一个第二噁唑酮、咪唑啉酮或吡嗪二酮环的经修饰的肽。所述两个环被2-5个氨基酸残基隔开。每个环都有相邻的硫代酰胺基团。在结构上,可以将mb分成两组,这两组都设想用于根据本发明的应用(图11、图12)。一种类型(组I)以来自发孢甲基弯菌(*Methylosinus trichosporium*)OB3b的mb代表。基于序列相似性和比对,来自甲基弯菌属(*Methylosinus* sp.)菌株LW3(mb-LW3)、甲基弯菌属(*Methylosinus* sp.)菌株LW4(mb-LW4)、甲基弯菌属(*Methylosinus* sp.)菌株PW1(mb-PW1)、甲基孢囊菌(*Methylocystis*)菌株LW5(mb-LW5)的推定mb和来自小甲基孢囊菌(*Methylocystis parvus*)OBPP的两个mb(mb-OBPP(2))中的一个也将落入该组(图12)。在该组中,环被4或5个氨基酸隔开,并且mb含有2个或更多个不参与成环的Cys。

[0111] 第二组(组II)以来自甲基孢囊菌(*Methylocystis*)菌株SB2、rosea和SC2的结构表征的mb(图11、12)代表。由于不存在mb-OB3b中发现的二硫键,该mb组在核心肽中缺乏Cys,较小且可能较不刚性。在这个组中,环被两个氨基酸隔开。与II组mb的其他成员形成对照,mb-B-8、mb-14-3、mb-B510和mb-21721中含有4个Cys。然而,基于Cys的位置,我们预测所有4个Cys均被修饰成杂环。来自该组中结构表征的成员的mb含有硫酸根基团,其可通过与Ser2的骨架酰胺形成氢键而有助于形成紧密弯曲。硫酸根基团也增加Cu<sup>2+</sup>/1+亲和力(E1 Ghazouani等人,2012.*Proc.Nat.Acad.Sc.*109:8400)。与C端环相邻的保守的T/S表明该组的其他成员也含有硫酸根基团。

[0112] 发现,在发孢甲基弯菌(*M. trichosporium*)OB3b中推定的mb前体匹配序列的基因组区域具有许多独特和显著的特征(图13)。这些特征包括(a)前体肽翻译修饰的肽;(b)前导肽和核心肽之间潜在的切割位点,暗示分泌;(c)mb基因簇上游和下游的基因,其编码与mb前体序列成熟、运输和mb生物合成调节中的可能作用相容的蛋白质序列。对该初始搜索

的详细描述揭示了一系列含有基因簇的基因组,该基因簇的特征与发孢甲基弯菌(*M. trichosporium*)OB3b mb基因簇的特征相匹配,例如,在小甲基孢囊菌(*Methylocystis parvus*)OBPP、甲基弯菌属(*Methylosinus* sp.)LW3以及非嗜甲烷菌固氮螺菌属(*Azospirillum* sp.)B510、固氮螺菌属(*Azospirillum* sp.)B506、适冷假单胞菌(*Pseudomonas extremaustralis*)、适冷假单胞菌(*Pseudomonas extremaustralis*)亚系*laumondii* TT01、运动替斯崔纳菌(*Tistrella mobilis*)、葡萄糖醋酸杆菌属(*Gluconacetobacter* sp.)SXCC、木葡萄糖醋酸杆菌(*Gluconacetobacter oboediens*)、甲基杆菌属(*Methyllobacterium* sp.)B34、巴西贪铜菌(*Cupriavidus basilensis*)B-8、发光杆菌(*Photorhabdus luminescens*)和*Vibrio caribbeanicus* BAA-2122。

[0113] 目前,具有已知功能的发孢甲基弯菌(*Methylosinus trichosporium*)OB3b mb基因簇中的唯一基因是负责Cu<sup>+</sup>-mb-OB3b摄取的mb-OB3b、MbnA和TonB-转运蛋白(MbnT)的结构基因(Semrau等人,未发表的结果)。细胞色素c过氧化物酶MbnH和FAD<sup>+</sup>依赖性氧化还原酶(代替MbnH或有时除了MbnH之外在嗜甲烷菌基因簇MbnF中存在)是参与环形成所需的氧化步骤的可能的候选物。另外,在mb-OB3b中发现的转氨酶MbnN,而不是mb-SB2基因簇,可能参与N-端酮基异丙基的形成,以及在mb-SB2和mb-rosea中发现的碘基转移酶MbnS,而不是mb-OB3b基因簇,可能催化苏氨酸的碘化。另一种基因产物,多药及毒性化合物外排(MATE)蛋白被提出参与成熟mb的分泌。

[0114] 一般而言,本发明包括由mb基因编码的甲烷氧化菌素,所述mb基因优选发孢甲基弯菌(*Methylosinus trichosporium*)OB3b mb基因或其变体或直系同源物。关于核酸序列的术语“变体”是指多态性,即分别与变体所来自的“亲本”核酸序列相比,一个或多个核苷酸的交换、缺失或插入。“直系同源物”,或直系同源基因,是在不同物种中通过物种形成从共同的始祖基因进化而来的基因。如本文所用,变体或直系同源物编码铜结合甲烷氧化菌素,其优选表现出与所附实施例中评估的mb相同的有利性质。设想mb-OB3b基因的变体或直系同源物包含这样的核酸序列或由这样的核酸序列组成,所述核酸序列与mb基因具有至少约60%,例如至少约65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%的序列同一性。

[0115] 设想mb OB3b基因、其变体或直系同源物编码mb前体肽,该mb前体肽包含这样的氨基酸序列或由这样的氨基酸序列组成,所述氨基酸序列与已知mb-OB3b前体肽的氨基酸序列具有至少约60%,例如至少约65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%的序列同一性,所述已知mb-OB3b前体肽的氨基酸序列的UniProt登录号为E3YBA4(2015年6月24日登录版本号为15),如SEQ ID No.1所示(图12)。特别是,如下文更详细描述的,mb OB3b基因被发现编码包括被潜在切割位点隔开的前导肽和核心肽的前体肽。对于整个前体肽的优选的序列同一性百分比如上所述。此外,编码的(即非翻译修饰的)甲烷氧化菌素(即核心肽)设想包含这样的氨基酸序列或由这样的氨基酸序列组成,所述氨基酸序列与如SEQ ID No.1所示(图12)的已知mb-OB3b核心前体肽的氨基酸序列具有至少约60%,例如至少约65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%的序列同一性。

[0116] 通常,术语“序列同一性”指示两个(核苷酸或氨基酸)序列在比对的相同位置处具有相同残基的程度,并且通常以百分比表示。优选地,在被比较的序列的全长上确定同一性。因此,完全相同序列的两个拷贝具有100%的同一性,但是不高度保守并且具有缺失、添加或替换的序列可以具有较低的同一性程度。本领域技术人员将认识到,有几种算法可用

于使用标准参数确定序列同一性,例如Blast (Altschul等人(1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)、Blast2 (Altschul等人(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)、Smith-Waterman (Smith等人(1981) J. Mol. Biol. 147:195-197) 和ClustalW。因此,例如,SEQ ID No:1的氨基酸序列可以充当“主题序列”或“参考序列”,而与其不同的多肽或多核苷酸的氨基酸序列或核酸序列可以充当“查询序列”。

[0117] 对铜的高亲和力是甲烷氧化菌素的共同特征。因此,本发明的甲烷氧化菌素设想以高结合亲和力结合铜(特别是Cu(I))。术语“亲和力”或“结合亲和力”是指配体结合的强度,例如甲烷氧化菌素与Cu(I)结合的强度。通常通过测量结合速率常数( $k_{on}$ )和解离速率常数( $k_{off}$ )并计算 $k_{off}/k_{on}$ 的商以获得平衡解离常数 $K_d$ ( $K_d = k_{off}/k_{on}$ )来确定给定配体与其靶标的结合的亲和力,所述平衡解离常数 $K_d$ 与结合亲和力成反比,即 $K_d$ 值越低,结合亲和力越高。本发明优选的甲烷氧化菌素以在纳摩尔范围即 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 内,在皮摩尔范围即 $10^{-10}$ 、 $10^{-11}$ 、 $10^{-12}$ 内,或在飞摩尔范围即 $10^{-13}$ 、 $10^{-14}$ 、 $10^{-15}$ 内的平衡解离常数或 $K_d$ 结合Cu(I)。优选地,本发明的甲烷氧化菌素以飞摩尔范围内的 $K_d$ 结合Cu(I),并且特别设想以 $10^{-15}$ 或更小的 $K_d$ 结合Cu(I)。许多不同的方法已被用来确定mb的金属结合亲和力常数。所有的测量方法都显示Cu(II)/(I)和Cu(I)的亲和力为 $\sim 10^{21} M^{-1}$ 或更大,并且是生物系统中已知的最高值之一。关于这一提议,mb-OB3b在体外和体内实验中均显示从金属硫蛋白中除去Cu。已显示Mb在厌氧条件下溶解并结合不溶形式的Cu(I),并且从铜矿物、腐殖质材料中提取铜,并且例如可以根据Banci等人的ESI-MS方法测量玻璃铜(Cu(I))结合亲和力(Nature. 2010 Jun 3; 465 (7298): 645-8),这依赖于同时监测在竞争配体即二硫苏糖醇(DTT)或二硫代氨基甲酸二乙酯(DETC)浓度增加时金属化/非金属化Cu(I)结合配体比率的变化。或者,Cu(I)结合亲和力可以例如通过与发色铜螯合剂浴铜灵二磺酸盐(BCS)竞争滴定来确定,如El Ghazoiani A等人,Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 May 29; 109 (22): 8400-4所述。使用该方法测量Cu(I)结合亲和力,本发明所包括的甲烷氧化菌素也将表现出 $10^{-15}$ 或更小,例如 $10^{-16}$ 、 $10^{-17}$ 、 $10^{-18}$ 、 $10^{-19}$ 、 $10^{-20}$ 、 $10^{-21}$ 或更小的 $K_d$ 。

[0118] 如前所述,设想表现出高铜结合亲和力的甲烷氧化菌素(以及以 $10^{-15}$ 或更低的 $K_d$ 结合Cu(I),“高亲和力mb”)特别适用于根据本发明的应用,并且尤其是用于在(急性)WD治疗中的大量铜耗竭。然而,具有较高 $K_d$ (即以较低亲和力结合Cu(I))的甲烷氧化菌素也可成功用于治疗各种疾病。例如,在需要不太广泛的和/或快速的铜耗竭的情况下,可以使用对Cu(I)具有较低结合亲和力的甲烷氧化菌素(“低亲和力mb”)。也考虑将具有不同Cu(I)结合亲和力的甲烷氧化菌素组合用于治疗。例如,一个或多个使用高亲和力mb用于从患者大范围脱铜的治疗周期之后可以是一个或多个使用低亲和力mb用于维持治疗的治疗周期,以便保持铜的低水平而不会过度耗竭铜。反之亦然,治疗也可以以低亲和力mb开始,并且在一个或多个治疗周期后,任选地逐渐继续使用具有较高Cu(I)结合亲和力的mb。

[0119] 术语“甲烷氧化菌素”包括天然存在的甲烷氧化菌素及其保留复合铜(即Cu(I)和Cu(II))能力、并优选以与天然存在的甲烷氧化菌素相当或甚至更高的结合亲和力结合Cu(I)的功能性变体、片段和衍生物。

[0120] 如前所述,本发明的甲烷氧化菌素可以来源于图12中列出的细菌,包括甲基孢囊菌属(Methylocystis spec.)、甲基弯菌属(Methylosinus spec.)、甲基微菌属(Methylomicrobium spec.)和甲基球菌属(Methylococcus spec.)。特别是,甲烷氧化菌素

可以选自(a)发孢甲基弯菌(*Methylosinus trichosporium*)0B3b甲烷氧化菌素(mb-0B3b)、(b)甲基孢囊菌(*Methylocystis*)菌株SB2甲烷氧化菌素(mb-SB2)、(c)荚膜甲基球菌(*Methylococcus capsulatus*)Bath甲烷氧化菌素(mb-Bath)、(d)白色甲基微菌(*Methylomicrobium album*)BG8甲烷氧化菌素(mb-BG8)、(e)甲基孢囊菌(*Methylocystis*)菌株M甲烷氧化菌素、(f)毛甲基孢囊菌(*Methylocystis hirsuta*)CSC1甲烷氧化菌素和(g)玫瑰甲基孢囊菌(*Methylocystis rosea*)甲烷氧化菌素(mb-rosea)、(h)甲基孢囊菌属(*Methylosinus* sp.)菌株LW3甲烷氧化菌素(mb-LW3)、(i)甲基孢囊菌属(*Methylosinus* sp.)菌株LW4甲烷氧化菌素(mb-LW4)、(j)甲基孢囊菌属(*Methylosinus* sp.)菌株LW5(mb-LW5)、(k)甲基弯菌属(*Methylosinus* sp.)菌株PW1甲烷氧化菌素(mb-PW1)、(l)小甲基孢囊菌(*Methylocystis parvus*)0BBP甲烷氧化菌素(mb-0BBP)、(m)巴西贪铜菌(*Cupriavidus basiliensis*)B-8甲烷氧化菌素(mb-B-8)、(n)适冷假单胞菌(*Pseudomonas extremaustralis*)14-3甲烷氧化菌素(mb-14-3)、(o)固氮螺菌属(*Azospirillum* sp.)菌株B510甲烷氧化菌素(mb-B510)、(p)运动替斯崔纳菌(*Tistrella mobilis*)KA081020-065(mb-mobilis)甲烷氧化菌素和(q)堆肥从毛单胞菌(*Comamonas composti*)DSM 21721甲烷氧化菌素(mb-21721)。

[0121] 对于根据本发明的应用选择的甲烷氧化菌素优选具有与在所附实施例中评价的mb和/或如本文他处所述的mb相同的有利性质。

[0122] 通常,本发明的甲烷氧化菌素可包含以下通式(I)或由以下通式(I)组成:

[0123]  $R^1 - (X)_{2-5} - R^2 \quad (I)$

[0124] 其中,

[0125]  $R^1$ 和 $R^2$ 各自为包含N并与烯硫醇物(enethiolate)连接的5元杂环;

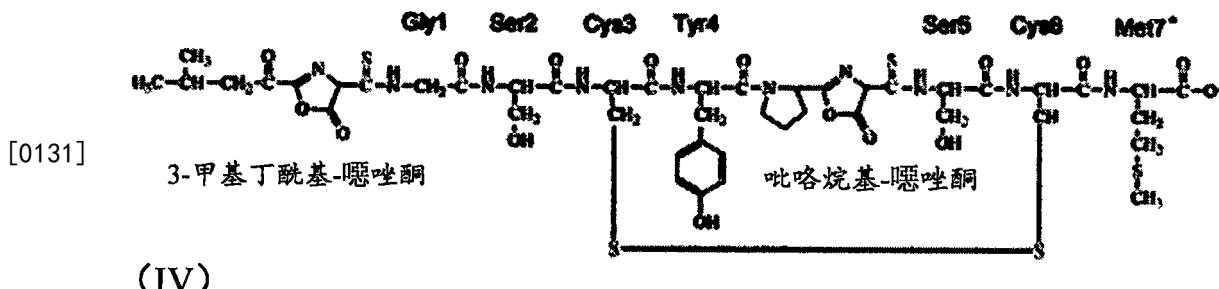
[0126] 并且每个X独立地选自任何氨基酸。

[0127] 术语“氨基酸”或“氨基酸残基”通常是指具有其公认定义的氨基酸,例如选自下列的氨基酸:丙氨酸(Ala或A)、精氨酸(Arg或R)、天冬酰胺(Asn或N)、天冬氨酸(Asp或D)、半胱氨酸(Cys或C)、谷氨酰胺(Gln或Q)、谷氨酸(Glu或E)、甘氨酸(Gly或G)、组氨酸(His或H)、异亮氨酸(Ile或I)、亮氨酸(Leu或L)、赖氨酸(Lys或K)、甲硫氨酸(Met或M)、苯丙氨酸(Phe或F)、脯氨酸(Pro或P)、丝氨酸(Ser或S)、苏氨酸(Thr或T)、色氨酸(Trp或W)、酪氨酸(Tyr或Y)、和缬氨酸(Val或V),但是可以根据需要使用修饰的、合成的或稀有的氨基酸。通常,氨基酸可以被分组为具有非极性侧链(例如,Ala、Ile、Leu、Met、Gly、Phe、Pro、Val)、带负电的侧链(例如Asp、Glu)、带正电的侧链(例如,Arg、His、Lys)或不带电的极性侧链(例如,Asn、Cys、Gln、Ser、Thr、Trp和Tyr)。该术语包括天然存在的和合成的氨基酸,以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸,以及后来被修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 $\gamma$ -羧基谷氨酸和0-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即与氢、羧基、氨基和R基团结合的碳,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砜、甲硫氨酸甲基锍。此类类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽主链,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指其结构与氨基酸的一般化学结构不同、但以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的化合物。

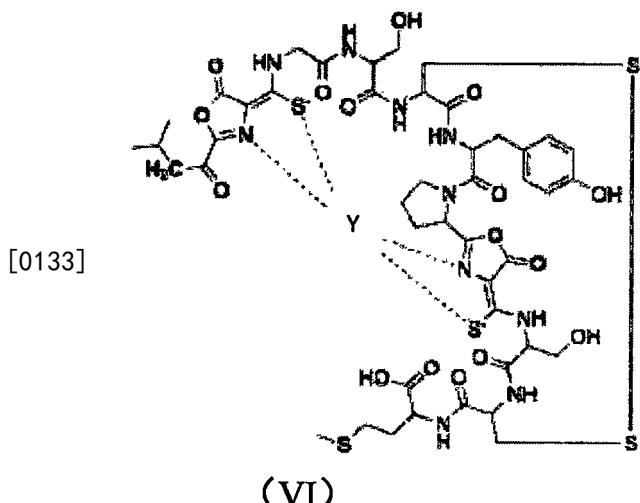
[0128] 特别地,当甲烷氧化菌素是mb-0B3b时,预期其包含式(II)或由式(II)组成

[0129]  $R^1GSCyR^2SCM$  (II) ,

[0130] 其中 $R^1$ 选自(N-2-异丙基酯- (4-亚硫酰基-5-羟基-咪唑) 和N-2-异丙基酯- (4-硫代羰基-5-羟基-咪唑酯) ,并且 $R^2$ 选自吡咯烷- (4-羟基-5-亚硫酰基-咪唑) 和吡咯烷- (4-羟基-5-硫代羰基-咪唑酯) 。所述mb-0B3b可尤其包含式(IV)或由式(IV)组成:



[0132] 当复合锌或铜时,所述mb-0B3b被设想具有以下结构(VI)



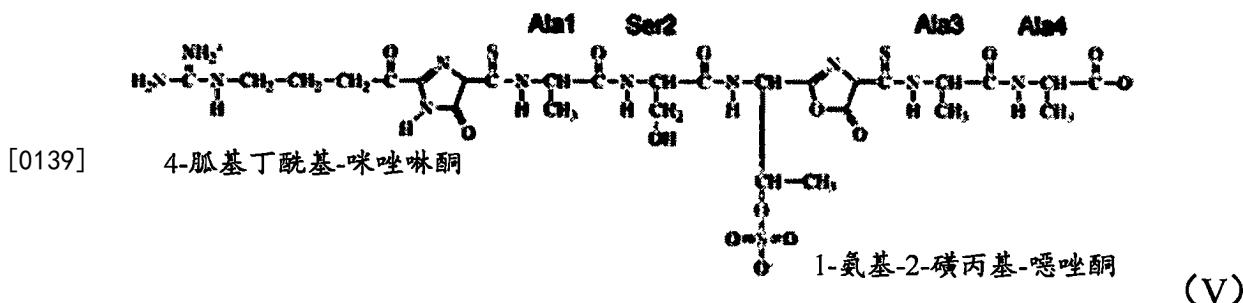
[0134] 其中Y选自铜(Cu(I)或Cu(II))或锌(Zn(I)或Zn(II))。

[0135] 其中,当甲烷氧化菌素是mb-SB2时,设想其具有式(III) :

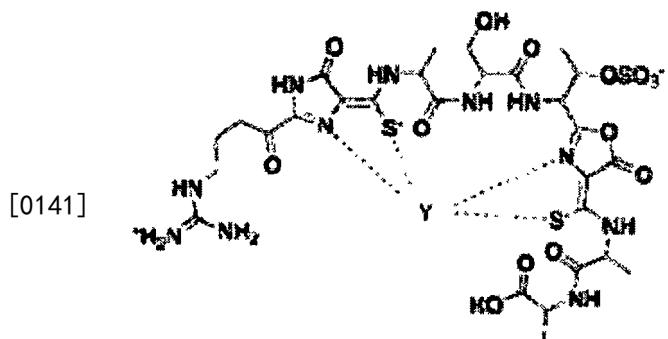
[0136]  $R^1ASR^2AA$  (III)

[0137] 其中 $R^1$ 是4-胍基丁酰基-咪唑,并且 $R^2$ 是1-氨基-2-羟基-噁唑酮。

[0138] 所述mb-SB2可以特别具有式(V) :



[0140] 当复合锌或铜时,所述mb-SB2被设想具有以下结构(VII) :



## (VII)

[0142] 其中Y选自铜(Cu(I)或Cu(II))或锌(Zn(I)或Zn(II))。

[0143] 与现有临床批准的铜螯合剂例如D-PA相比,来自甲基孢囊菌(*Methylocystis*)菌株SB2的这种特异性MB肽mb-SB2作为有前途的铜螯合剂最有效起作用。如上所述,mb-SB2在耗竭铜上甚至至少与来自发孢甲基弯菌(*Methylosinus trichosporium*)OB3b的另一种MB肽mb-OB3b一样有效。

[0144] 来自甲基孢囊菌(*Methylocystis*)菌株SB2的MB肽mb-SB2在结构上和化学上偏离其他MB肽,尤其是偏离来自发孢甲基弯菌(*Methylosinus trichosporium*)OB3b的mb-OB3b。然而,MB-家族中结构不同且重量较轻的肽表现出与铜螯合剂类似的治疗潜力。

[0145] 当在本文中使用时,术语“复合”和“结合”可互换使用,即例如甲烷氧化菌素“结合”铜被理解为甲烷氧化菌素“复合”铜,反之亦然。术语“复合”通常意味着形成复合物,所述复合物由中心离子和周围排列的分子组成,所述分子被称为配体或复合剂。对于本发明,中心离子将是铜(即Cu(I)或Cu(II))或锌(即Zn(I)或Zn(II)),配体将是甲烷氧化菌素。一个甲烷氧化菌素通常会复合一个铜或锌离子,分别形成甲烷氧化菌素-铜复合物或甲烷氧化菌素-锌复合物。本领域技术人员将容易理解,甲烷氧化菌素-铜复合物通常会在给受试者施用甲烷氧化菌素之后,当甲烷氧化菌素复合并由此耗竭受试者体内的(过量)铜时形成。甲烷氧化菌素-锌复合物在本文中被认为是如下所述的甲烷氧化菌素的稳定化形式。

[0146] 如本文他处所述,甲烷氧化菌素片段、变体和衍生物也可预见用于本文所述的应用。

[0147] “甲烷氧化菌素片段”是“功能性”或“铜结合”肽,其保留了它们所来自的“亲本”甲烷氧化菌素的铜结合区。例如,设想提供特别小的能够穿过血脑屏障的甲烷氧化菌素片段,以便有效治疗与CNS中的铜超负荷相关的神经学WD或其他病症。

[0148] 术语“甲烷氧化菌素变体”是指具有“亲本”甲烷氧化菌素的甲烷氧化菌素通式的甲烷氧化菌素(图12),但与亲本甲烷氧化菌素相比含有至少一个氨基酸取代、缺失或插入,条件是该变体保留本文所述的期望的铜结合亲和力和/或生物学活性。

[0149] “甲烷氧化菌素衍生物”是化学修饰的甲烷氧化菌素。通常,只要它们不消除甲烷氧化菌素的有益作用,所有类型的改变都包含在本发明中。也就是说,甲烷氧化菌素衍生物优选保留它们所来自的甲烷氧化菌素的铜结合亲和力和/或生物学活性。甲烷氧化菌素衍生物还包括如下所述的稳定化甲烷氧化菌素。

[0150] 在本发明的上下文中可能的化学修饰包括氨基酸残基的酰化、乙酰化或酰胺化。其他合适的修饰包括例如用不同长度的聚合物链来延伸氨基(例如XTEN技术或

**PASylation®**)、N-糖基化、O-糖基化和碳水化合物如羟乙基淀粉(例如**HESylation®**)或聚唾液酸(如**PolyXen®**技术)的化学缀合。诸如烷基化(例如甲基化、丙基化、丁基化)、芳基化和醚化之类的化学修饰可以是可能的并且也是设想的。本文设想的其他化学修饰是泛素化、与治疗剂或诊断剂的缀合、标记(例如用放射性核素或各种酶)以及通过化学合成的非天然氨基酸的插入或取代。

[0151] 其他可能的修饰可以涉及用更稳定的咪唑啉酮或吡嗪二酮基团替代噁唑酮基团。从第II组甲烷氧化菌素到第I组的操纵子的基因的基因添加或缺失,反之亦然,应导致可能导致环的类型变化的改变。用咪唑啉酮或吡嗪二酮基团替代噁唑酮基团应该将甲烷氧化菌素的稳定性提高至可以口服给药的程度。

[0152] 为了本发明的目的,如上定义的甲烷氧化菌素还包括其药学上可接受的盐。如本文所用,短语“药学上可接受的盐”是指对治疗安全和有效的那些甲烷氧化菌素的盐。药学上可接受的盐包括与阴离子如来自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸、胆碱等的那些阴离子形成的那些盐,以及与阳离子例如来自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的那些阳离子形成的那些盐。

[0153] 如前所述,甲烷氧化菌素片段、变体和衍生物优选保留在所附实施例中评估的甲烷氧化菌素的有利能力。

#### [0154] 生物学效应

[0155] 如先前所解释的,根据本发明的甲烷氧化菌素设想引起如本文所述的期望的生物学效应,即它们优选能够以高结合亲和力结合铜,并且能够使其从系统中耗竭,优选其经由胆汁排泄。不希望受到具体理论的束缚,本发明人已经证实,由于铜负荷增加导致的线粒体损伤随着来自WD模型LPP<sup>-/-</sup>大鼠的肝中的疾病状态而逐渐增加。如所附实施例所示,甲烷氧化菌素能够快速耗竭线粒体和肝细胞铜。设想如本文所述的甲烷氧化菌素优选表现出相同的有利特征。

[0156] 因此,设想甲烷氧化菌素用于治疗威尔逊病的应用,其中治疗减少(i)全肝铜水平,(ii)总肝细胞铜水平,和/或(iii)肝细胞线粒体铜水平。此外,甲烷氧化菌素优选引起通过胆汁的(过量)铜的排泄。

#### [0157] 治疗效果

[0158] 预期对有此需要的受试者(特别是WD患者)施用甲烷氧化菌素会引起治疗效果。如本文所用的术语“治疗效果”通常是指治疗的期望的或有益的影响,例如,改善或缓解疾病表现。术语疾病的“表现”在本文中用于描述其可察觉的表达,并且包括临床表现,其在下文中定义为可以在体检期间检测到的和/或可由患者察觉的疾病的指征(即,症状),和病理表现,意指疾病在细胞和分子水平上的表达。WD表现的改善或缓解可以通过使用与诊断WD所述的相同的测试来评估。另外地或替代地,还可以评估各个患者的一般状态(例如,健康、幸福感),这也将帮助熟练的从业人员评估是否已经引发了治疗效果。本领域技术人员知道许多其他适用于观察本发明化合物的治疗效果的方式。

#### [0159] 稳定化甲烷氧化菌素

[0160] 另一方面,本发明人已经发现了提供稳定化形式的甲烷氧化菌素的方法。

[0161] 不希望受到具体理论的束缚,发现mb-OB3b易受时间和/或温度依赖性衰减的影响。因此,为了在治疗期间(和之后)使患者体内甲烷氧化菌素的生物半衰期和/或血浆浓度

增加，并且因此优选改善治疗效果并提供甲烷氧化菌素治疗的长期效果，设想提供甲烷氧化菌素的稳定化形式。一般而言，任何形式的能够稳定化甲烷氧化菌素的化学修饰都是可以想到的（也参见甲烷氧化菌素衍生物）。具体而言，本发明提供了复合锌即Zn(I)和/或Zn(II)的甲烷氧化菌素的稳定化形式。除非另有说明，否则术语“锌”通常是指Zn(I)和/或Zn(II)。此外，本发明人发现，当以pH≥9被提供时，甲烷氧化菌素可以稳定化。因此，用于本发明的应用和方法，设想提供稳定化形式的甲烷氧化菌素，即复合Zn(I)或Zn(II)的甲烷氧化菌素和/或以pH为9、10或11被提供的甲烷氧化菌素。特别地，根据本文他处所述的治疗方案，这些稳定化形式的甲烷氧化菌素可用于治疗WD，和/或治疗急性期WD。如本文所述的甲烷氧化菌素的稳定化形式在此前并未作为药物使用。因此，本发明还包括含有稳定化甲烷氧化菌素的药物组合物，其中所述甲烷氧化菌素复合Zn(I)和/或Zn(II)和/或以pH≥9被提供。熟练的从业人员将容易理解，当由于稳定化原因而提供pH≥9的甲烷氧化菌素时，包含甲烷氧化菌素（任选地复合锌）的药物组合物也需要具有pH≥9。

[0162] 含有复合Zn(I)或Zn(II)的甲烷氧化菌素的药物组合物可以通过使一定量的Zn(I)和/或Zn(II)与一定量的甲烷氧化菌素以1:1的比率在水性溶液中接触而提供。为了避免药物组合物中的游离锌离子过量，使用等摩尔量的锌和甲烷氧化菌素可能是有益的。

[0163] 药物组合物

[0164] 如前所述，本文还设想了包含甲烷氧化菌素，特别是包含甲烷氧化菌素的稳定化形式的药物组合物。特别地，所述药物组合物设想用于治疗威尔逊病的应用，其中所述治疗减少(i)全肝铜水平，(ii)总肝细胞铜水平，和/或(iii)肝细胞线粒体铜水平。即，所述药物组合物优选包含复合Zn(I)或Zn(II)的甲烷氧化菌素和/或以pH≥9提供的甲烷氧化菌素。所述组合物可以在37℃下稳定至少20、50、75、100、125、150小时或更长。因此，本发明的其它方面包括药物组合物，其包含如本文所述的（特别是稳定化）甲烷氧化菌素，以及所述（稳定化）甲烷氧化菌素用于制备药物组合物的用途。术语“药物组合物”特别是指适合施用于人的组合物。然而，本文也设想了适合施用于非人类动物的组合物。

[0165] 药物组合物及其组分（即活性成分和任选的赋形剂或载体）优选是药学上可接受的，即能够引发期望的治疗效果而不会在接受者中引起任何不希望的局部或全身作用。本发明的药学上可接受的组合物可以特别是无菌的和/或药学上惰性的。具体而言，术语“药学上可接受的”可以意指由监管机构或其他公认的药典批准用于动物、尤其用于人的。

[0166] 本文所述的（稳定化）甲烷氧化菌素优选以治疗有效量存在于药物组合物中。“治疗有效量”是指引发所需治疗效果的甲烷氧化菌素的量。确切的剂量将取决于治疗的目的，并且将可由本领域技术人员使用已知技术来确定。治疗功效和毒性可以通过在细胞培养物或实验动物中的标准药物程序例如ED<sub>50</sub>（对50%群体治疗有效的剂量）和LD<sub>50</sub>（对50%群体致死的剂量）来确定。治疗效果和毒性作用之间的剂量比是治疗指数，它可以表示为ED<sub>50</sub>/LD<sub>50</sub>的比率。显示出大的治疗指数的药物组合物通常是优选的。

[0167] 设想药物组合物包含如本文所述的甲烷氧化菌素，特别是以稳定化形式，优选以治疗有效量，与任选地与一种或多种载体、赋形剂和/或其他活性剂一起。

[0168] “赋形剂”包括填充剂、粘合剂、崩解剂、包衣、吸附剂、抗粘剂、助流剂、防腐剂、抗氧化剂、调味剂、着色剂、甜味剂、溶剂、助溶剂、缓冲剂、螯合剂、粘度赋予剂、表面活性剂、稀释剂、保湿剂、载体、稀释剂、防腐剂、乳化剂、稳定剂和张力调节剂。用于在本发明药物组

合物中应用的示例性适合的载体包括盐水、缓冲盐水、右旋糖和水。

[0169] 其他活性剂

[0170] 药物组合物还可以包含对治疗有关的特定疾病有效的其他活性剂。举例来说，目前用于治疗WD的活性剂包括铜螯合剂d-青霉胺(D-PA)、曲恩汀(TETA)和四硫代钼酸盐(TTM)以及锌盐。为了治疗癌症，有用的其他活性剂包括已知的化学治疗剂，包括烷化剂、抗代谢物、抗微管剂、拓扑异构酶抑制剂；细胞毒性抗生素和单克隆抗体。用于治疗神经退行性疾病症的活性剂包括但不限于左旋多巴及其衍生物、多巴胺激动剂、MAO-B抑制剂、儿茶酚-O-甲基转移酶(COMT)抑制剂、抗胆碱能药、金刚烷胺、胆碱酯酶抑制剂、美金刚和利鲁唑。选择合适的其他药剂用于治疗特定疾病在技术人员的知识范围内。

[0171] 制剂

[0172] 本发明的药物组合物可以以各种形式配制，例如，以固体、液体、气体或冻干形式，并且尤其可以以软膏、乳膏、透皮贴剂、凝胶、粉末、片剂、溶液、气雾剂、颗粒剂、丸剂、混悬剂、乳剂、胶囊剂、糖浆剂、液体剂、酏剂、浸膏剂、酊剂或流浸膏剂的形式或特别适用于所需给药方法的形式。本身已知用于生产药物的方法在Forth,Henschler,Rummel(1996) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie,Urban&Fischer中指出。

[0173] 给药

[0174] 根据本发明可想到用于施用甲烷氧化菌素和药物组合物的多种途径。通常情况下，在胃肠外完成给药，但也设想口服给药。肠胃外递送的方法包括局部、动脉内、肌内、皮下、髓内、鞘内、心室内、静脉内、腹膜内、子宫内、阴道内、舌下或鼻内给药。

[0175] 癌症治疗

[0176] 本文公开的甲烷氧化菌素和药物组合物也被设想用于治疗各种癌症。许多癌症类型表现出肿瘤内铜增加和/或全身铜分布改变。已认识到铜作为肿瘤进展的多方面，包括生长、血管生成和转移的限制因素。因而本文所述的甲烷氧化菌素和药物组合物是抑制这些过程的有前景的工具。

[0177] 正如Denoyer等人,Metallomics.2015 Nov 4;7(11):1459-76所综述的，据报道高血清铜浓度与多种癌症相关，所述癌症包括淋巴瘤、网状细胞肉瘤、支气管和喉鳞状细胞癌、宫颈癌、乳腺癌、胃癌和肺癌，并且已发现血清铜升高与结直肠癌和乳腺癌以及恶性血液病包括慢性淋巴细胞性白血病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤和霍奇金淋巴瘤中的疾病阶段及其进展相关。在恶性组织中铜的升高也已在一系列癌症类型中确认，所述癌症包括乳腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、肺癌、胃癌和白血病。铜在癌症发展和进展中的作用仍有待阐明。氧化还原活性铜的含量升高可能导致氧化应激和慢性炎症，这与细胞的恶性转化有内在联系。因此，已提出，组织或血清中的铜升高可能是致癌的风险因素。本文所述的甲烷氧化菌素和药物组合物可以用于降低总体铜水平并由此使发生癌症的风险最小化。

[0178] 据报道铜还影响诱导促血管生成应答的各种分子途径。铜能够直接与血管生长因子结合，并通过激活NF $\kappa$ B影响其分泌和表达。此外，铜被发现直接影响癌性细胞侵袭和转移的能力。

[0179] Papa等人,Genes Cancer.2014 Apr;5(1-2):15-21进一步报道铜依赖性歧化酶SOD1在许多癌症中过表达以应对由线粒体基质的抗氧化机制的失调引起的活性氧(ROS)水平升高。铜的耗竭被预想降低整体SOD1活性，由此减少肿瘤细胞增殖和存活。与此相一致，

本文所述的甲烷氧化菌素和药物组合物也被设想用于治疗过表达SOD1的癌症。

[0180] 已知的铜螯合剂(例如D-PA)控制血管生成的能力已被研究,并由此推断其能损害癌症生长和转移。然而,本文所述的甲烷氧化菌素和药物组合物此前尚未阐明被用于癌症治疗。因此,本文进一步提供了本文所述的甲烷氧化菌素和药物组合物用于治疗多种癌症的应用,所述癌症包括但不限于网状细胞肉瘤、支气管和喉鳞状细胞癌、宫颈癌、乳腺癌、结直肠癌、胃癌、肺癌、肝癌、前列腺癌、脑癌、慢性淋巴样白血病、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤和霍奇金氏淋巴瘤。

[0181] 神经退行性疾病

[0182] 蛋白质聚集是各种神经退行性疾病的显著特征,所述神经退行性疾病包括帕金森病、阿尔茨海默病、包括克雅氏病(CJD)、致命性家族性失眠症(FFI)和吉斯特曼斯综合症(GSS)的朊病毒病、家族性肌萎缩侧索硬化症(fALS)等等。越来越多的研究表明,过渡金属能够加速在病理性沉积物中发现的几种蛋白质的聚集过程,特别是铜产生最显著的聚集加速。因此,预期通过甲烷氧化菌素治疗耗竭铜以减少蛋白质聚集,由此减轻或甚至恢复疾病的迹象和症状。

[0183] 因此,进一步设想使用本文所述的甲烷氧化菌素和药物组合物来治疗神经退行性疾病,包括帕金森病、阿尔茨海默病、朊病毒病、亨廷顿病和fALS。

[0184] 糖尿病

[0185] 此外,有缺陷的铜调控已被认为是糖尿病中器官损伤的致病机制,其已归因于抗氧化防御机制受损和氧化应激。惊人地,TETA治疗显示出其对在糖尿病患者中发挥能量代谢作用的线粒体蛋白起作用,并导致心脏结构和功能的恢复(Jüllig等人,Proteomics Clin Appl.2007 Apr;1(4):387-99)。如本申请的实施例3所示,甲烷氧化菌素令人惊讶地能够有效去除累积的线粒体铜,并因此也是用于新型糖尿病疗法的有前途的试剂,所述疗法基于过量铜水平的耗竭、特别是从线粒体中的过量铜水平的耗竭,由此减少总体氧化应激和组织损伤。与先前的研究相一致,甲烷氧化菌素特别设想来改善糖尿病患者中的糖尿病性心肌病和动脉和/或肾脏结构/功能并改善左心室(LV)肥大(参见Zhang等人Cardiovasc Diabetol.2014 Jun 14;13:100)。

[0186] 其他疾病

[0187] 适合用本文所述的甲烷氧化菌素和药物组合物治疗的其他疾病和病症包括细菌感染、炎性疾病、纤维化、肝硬化、铅和/或汞中毒。

[0188] 特别地,在细菌感染期间,巨噬细胞释放铜以试图通过铜毒性杀死侵入的微生物。这导致了侵入微生物中的铜应激反应的诱导(Gleason等人,PNAS 2014 Apr;vol.111,no.16:5866-5871)。根据Gleason等人(2014),这种高水平的宿主铜有利于白色念珠菌(C.albicans)的SOD5的活化。白色念珠菌(C.albicans)是最普遍的人类真菌病原体(酵母真菌),它能够通过其表达的超氧化物歧化酶5(SOD5,一种单体的仅铜SOD)与宿主的免疫反应(例如巨噬细胞)作斗争。因此铜的耗竭更重要的是降低总体SOD5活性,从而在细菌感染期间减少人类真菌病原体。相应地,本文所述的甲烷氧化菌素和药物组合物也被设想用于在细菌感染期间人类真菌病原体(例如过表达SOD5的白色念珠菌(C.albicans))的治疗。

[0189] 因此,本发明包括一种药物组合物,其中细菌感染对人类真菌病原体有利,优选所述人类真菌病原体为白色念珠菌(Candida.albicans)。

[0190] 治疗/处理

[0191] 术语“治疗(处理)”以其所有语法形式,包括治疗性治疗或预防性治疗本文所述的疾病,特别是WD。“治疗或预防性治疗”包括旨在完全预防临床和/或病理表现的预防性治疗或旨在改善或缓解临床和/或病理表现的治疗性治疗。因此术语“治疗”还包括改善或预防本文所述的疾病,特别是WD。

[0192] 术语“受试者”或“个体”或“动物”或“患者”在本文中可互换使用,是指期望接受治疗的任何受试者,特别是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括人类、非人类灵长类动物、犬、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛等,其中特别设想人类受试者用于根据本发明的治疗。

[0193] 剂量

[0194] 甲烷氧化菌素的确切剂量可以取决于治疗目的(例如,预防性或维持性治疗相对于急性WD的治疗),并且可由本领域技术人员使用已知技术来确定。对于施用途径、年龄、体重、一般健康状况、性别、饮食、施用时间、药物相互作用和病症严重程度的调整可以是必要的,并且可由本领域技术人员用常规实验来确定。一般而言,1mg/kg体重(bw)的剂量可以能够引发本文他处所述的期望的治疗效果。可用于本发明应用和方法中的示例性剂量包括1mg/kg bw和1000mg/kg bw之间的剂量,例如1mg/kg bw和100mg/kg bw之间,特别是1mg/kg bw和50mg/kg bw之间,例如1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、45或50mg/kg bw。

[0195] 试剂盒

[0196] 本文所述的甲烷氧化菌素,特别是以稳定化形式,和药物组合物被设想能够作为试剂盒的一部分被提供。因此,另一方面,本发明还涉及包含甲烷氧化菌素(特别是以稳定化形式)或包含其的药物组合物用于治疗威尔逊病的应用的试剂盒,其中,所述治疗减少(i)全肝铜水平,(ii)总肝细胞铜水平,和/或(iii)肝细胞线粒体铜水平。

[0197] 试剂盒可以是两个或更多个部分的试剂盒,并且包含前述甲烷氧化菌素,或包含其的药物组合物,以及其他活性剂和/或药物赋形剂。例如,所述试剂盒可包含可用于治疗WD的一种或多种活性剂或包含其的药物组合物,所述活性剂例如d-青霉胺(D-PA)、曲恩汀(TETA)和四硫代钼酸盐(TTM)和/或锌盐。试剂盒组分可以被包含在一个容器中或小瓶中。就甲烷氧化菌素或包含其的药物组合物的施用而言,设想试剂盒组分同时或依次施用,或分开施用。本发明进一步包括通过不同的施用途径应用试剂盒组分。例如,常规铜螯合剂可以口服给药,而甲烷氧化菌素可以使用肠胃外给药途径。

[0198] 必须注意的是,如本文所用,除非上下文另有明确指示,否则单数形式“一(a)”、“一个(an)”和“该(the)”包括复数形式。因此,例如,提及“一种试剂”,其包括一种或多种这样的不同试剂,并且提及“该方法”,其包括参考本领域普通技术人员已知的可以修改或替代本文所述方法的等同步骤和方法。

[0199] 除非另外指明,否则在一系列元素之前的术语“至少”应理解为指代该系列中的每个元素。本领域技术人员将认识到或仅仅使用常规实验就能够确定本文描述的本发明的具体实施方式的许多等价物。这样的等价物意欲包含在本发明中。

[0200] 本文使用的术语“和/或”包括“和”、“或”和“由所述术语连接的元素的全部或任何其他组合”的含义。

[0201] 如本文所用,术语“大约”或“约”是指在给定值或范围的20%内,优选在10%内,并且更优选在5%内。然而,它也包括具体数字,例如约20包括20。

[0202] 术语“小于”或“大于”包括具体数字。例如，小于20表示小于或等于20。类似地，多于或大于意为分别多于或等于，或者大于或等于。

[0203] 在整个说明书和随后的权利要求书中，除非上下文另有要求，否则词语“包括 (comprise)”以及诸如“包括 (comprises)”和“包括 (comprising)”的变形将被理解为暗示包含所述整体或步骤或者整体或步骤的组，但不排除任何其他的整体或步骤或者整体或步骤的组。当在本文中使用时，术语“包括 (comprising)”可以用术语“含有 (containing)”或“包含 (including)”来代替，或者有时在本文中用术语“具有 (having)”来代替。

[0204] 当在本文中使用时，“由…组成 (consisting of)”排除权利要求要素中未指定的任何要素、步骤或成分。当在本文中使用时，“基本上由……组成 (consisting essentially of)”不排除不会实质上影响权利要求的基本和新颖特征的材料或步骤。

[0205] 在本文的每种情况下，术语“包括 (comprising)”、“基本上由……组成 (consisting essentially of)”和“由……组成 (consisting of)”中的任何一个可以用另外两个术语中的任一个来代替。

[0206] 应该理解的是，本发明不限于本文所述的具体方法学、方案、材料、试剂和物质等，并且可据此变化。本文使用的术语仅用于描述特定实施例的目的，而不旨在限制完全由权利要求限定的本发明的范围。

[0207] 本说明书全文中引用的所有出版物和专利(包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商说明书、指导说明书等)，无论是上文还是下文，均通过引用整体并入本文。本文中的任何内容都不应被解释为承认由于在先发明，而使本发明无权先于这样的公开。如果通过引用并入的材料与本说明书相矛盾或不一致，说明书将取代任何此类材料。

[0208] 实施例

[0209] 材料和方法

[0210] 来源于患者的样本

[0211] 本研究纳入了来自4例在海德堡大学医院进行移植以治疗威尔逊病的具有肝衰竭的WD患者的肝。2例患者(1号和2号)未接受过在先铜螯合治疗，而2例患者(3号和4号)在D-PA治疗后出现肝衰竭。患者表示知情同意，研究得到了德国海德堡医科大学伦理委员会的批准。外植后，将WD患者肝在LN2中休克冷冻并储存于-80°C下。解冻的样品立即固定用于组织学和电子显微镜分析。

[0212] 动物

[0213] LPP大鼠品系由美国安娜堡密歇根大学的Jimo Borjigin提供(ahmed等人，上述引文)。大鼠自由采食Altromin 1314饲料(Altromin Spezialfutter GmbH, 德国)和自来水。饲料中的铜含量是13mg/kg。所有动物都按照亥姆霍兹慕尼黑中心(Helmholtz Center Munich)实验室动物护理和使用指南进行治疗。LPP-/-大鼠被提供有ATP7b突变，因此为ATP7b-/-。在本研究中，杂合LPP+/-大鼠作为对照。

[0214] 动物治疗

[0215] 动物实验由德国慕尼黑上拜恩行政区(Regierung von Oberbayern)当局批准。

[0216] 体内治疗

[0217] LPP大鼠分别以150mg/kg bw的剂量用MB或通过每日i.p.注射3或5个持续天或每日两次i.p.注射8个持续天进行治疗，或者以100mg/kg bw/d的剂量用D-PA或以480 mg/kg

bw/d用TETA通过饮用水4天进行治疗(Togashi等人,Hepatology 15,82-87(1992))。基于在开始治疗的年龄时Atp7b-/-大鼠肝中的平均铜含量为250 $\mu\text{g/g}$  w.w. (Zischka等人,上述引文),8g w.w.的LPP-/-大鼠肝含有约31.5 $\mu\text{mol}$ 铜。选择与该铜量等摩尔的单MB剂量。在D-PA的情况下,据报道给药剂量和选择的施用途径在长期应用中成功地预防了LEC大鼠中肝炎的发作(Togashi等人,上述引文)。大鼠中的亚慢性毒性研究已显示,通过饮用水,以3000ppm剂量的TETA没有毒性(Greenman等人,Fundam Appl Toxicol 29,185-193(1996))。假定体重为250g的大鼠每天摄入40ml水,这转化为480mg/kg bw/d的剂量。关于85天龄的LPP-/-大鼠中的平均肝铜含量,所应用螯合剂的摩尔比分别为MB 1:D-PA 4.3:TETA 17.4。对于静脉注射MB的应用(150mg/kgbw),将与PinPort<sup>TM</sup>(Instech Laboratories, Inc., USA)连接的导管插入大鼠的股静脉中,用不可吸收的缝合线固定,在皮下穿过并通过在肩膀之间形成的皮肤切口外置。

[0218] 肝灌注

[0219] LPP-/-肝(动物年龄为79-83天)用含有5mM葡萄糖的Krebs-Ringer碳酸氢盐溶液一次性灌注(Beuers等人,J Biol Chem 278,17810-17818(2003))。介质用95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>充气并保持在37°C下。大鼠肝通过门静脉灌注(Beuers等人,上述引文),右侧肝叶结扎,并以其铜含量作为灌注前的对照(Beuers等人,Hepatology 33,1206-1216(2001))。胆管插管后,在将铜螯合剂连续添加至灌注介质之前,收集20分钟的胆汁样品。如别处所述,以10分钟间隔收集胆汁和流出的灌注液(Beuers等人,上述引文)。将D-PA\*HCl(20mg/108 $\mu\text{mol}$ )、TETA\*2HCl(20mg/91 $\mu\text{mol}$ )、TTM\*2NH4(10mg/38 $\mu\text{mol}$ )和MB(40mg/35 $\mu\text{mol}$ )分别溶解于50ml 0.9%的NaCl中,并在2小时内通过灌注泵(Perfusor,Braun,Melsungen)连续添加到灌注介质中。所应用螯合剂的摩尔比为MB 1:D-PA 3.1:TETA 2.6:TTM 1.1。如所描述的,每十分钟测量流出的灌注液中的LDH(Beuers等人,上述引文)。对照灌注仅用Krebs-Ringer碳酸氢盐溶液进行。

[0220] 组织学检查、血浆/血清AST和胆红素

[0221] 将福尔马林固定的石蜡包埋的肝样品切成4 $\mu\text{m}$ 厚的切片,并用苏木精和曙红染色进行标准分析或用Masson三色法分析纤维化的组织。用Reflotron系统(Roche)测量动物血浆或血清中的AST活性和胆红素浓度。

[0222] 线粒体分析

[0223] 如前所述,线粒体来源于WD患者的冷冻外植肝或新鲜制备的大鼠肝匀浆(Zischka等人,Anal Chem 80,5051-5058(2008))。具体而言,使用Percoll®或Nycodenz®通过差异和密度梯度离心纯化线粒体。新鲜的大鼠肝线粒体用于呼吸测量、螯合剂治疗、肿胀分析(MPT)、跨膜电位( $\Delta \psi_m$ )、极化实验、ATP合成,并用戊二醛固定用于随后的电子显微镜分析。储存的冷冻线粒体用于呼吸复合物IV活性和金属分析。

[0224] 分离的线粒体的功能完整性通过在Clark型氧电极(Oxygraph,Hansatech Instruments)中的标准呼吸测量来评估(Zischka等人,上述引文)。使用基于试剂盒的测定来分析ATP合成(ATP生物发光测定试剂盒,Roche)(Zischka等人,上述引文)。用吸光度读数器在540nm处以96孔板格式通过光散射来测量线粒体肿胀(Schulz等人,Biochimica et biophysica acta 1828,2121-2133(2013))。在96孔板读数器(BioTek)中评估 $\Delta \psi_m$ ,随后进行Rh123荧光淬灭(Schulz等人,上述引文)。在DPH和TMA-DPH-染色的线粒体中测量极化

(Prendergast等人,上述引文)。简而言之,将线粒体(3mg/ml)在37℃下用DPH或TMA-DPH(分别为50μM和20μM)孵育30分钟。在ex:366nm和em:425nm处重复评估平行和垂直荧光。使用如下公式以mP0l计算极化(Grebowski等人,Biochim Biophys Acta 1828,241-248(2013)):

[0225]  $P = (I_{||} - G * I_{\perp}) / (I_{||} + G * I_{\perp}) ; G = 0.89。$

[0226] 用螯合剂体外处理分离的线粒体

[0227] 铜升高的新鲜分离的密度梯度纯化的LPP-/-线粒体经受用2mM D-PA、TETA、TTM或MB的螯合剂处理30分钟,随后通过Nycodenz®梯度进行再次纯化,以将溶液中的铜与并入线粒体的铜相分离。在验证实验中,将来自对照大鼠(LPP+/-)的线粒体与1mM DTT在室温下孵育5分钟,然后加入Cu2+(终浓度为200-600μM)再孵育20分钟。然后通过Nycodenz®梯度离心重新纯化负荷了铜的线粒体,并随后如上所述用螯合剂处理。

[0228] 细胞培养

[0229] 将HepG2细胞保持在含有2%FCS的MEM中。我们发现与无金属甲烷氧化菌素形成对照,Zn-MB在37℃下是时间稳定的(图9C)。因此,在细胞培养实验中使用通过制备20mM MB溶液并在pH控制下添加等摩尔浓度的Zn溶液而产生的Zn-MB。

[0230] 如别处所述进行中性红细胞毒性测定(Repetto等人,Nat Protoc 3,1125-1131(2008))。简而言之,将 $2 \times 10^4$ 个细胞与单独的培养基(含有2%FCS,阴性对照)、0.05至1mM 锌-MB或0.25mM CCCP(作为线粒体毒性阳性对照)孵育24小时,随后通过中性红进行分析。

[0231] 对于免疫荧光染色,将 $2 \times 10^4$ 个细胞与单独的培养基、500μM MB或250μM CCCP在具有透明玻璃底部的黑色96-孔板中孵育。在37℃下通过1.6μM Hoechst 33342(ex 360-400nm,em 410-480nm)、300nMMitoTracker®红(ex 620-640nm,em 650-760nm)和1μM壬基吖啶橙(NAO,ex 460-490nm,em 500-550nm)染色40分钟。洗涤步骤后,分析荧光。

[0232] 为了确定MB的细胞脱铜效率,将细胞用含2%FCS的培养基或15μM铜-组氨酸预处理24小时,随后经受用500μM MB的24小时处理。之后,将细胞洗涤两次并计数。在用65%硝酸对样品进行湿灰化后,通过ICP-OES测定 $2.5 \times 10^6$ 个细胞中的铜。

[0233] 通过使用单克隆抗MB抗体的竞争性ELISA,从与不同浓度的MB孵育了2或24h的细胞裂解物测定细胞MB摄取。

[0234] 威尔逊病患者的HLC的产生

[0235] 从新捐献的中段尿液中以 $400 \times g$ 离心10分钟使尿道上皮细胞沉淀(Zhou等人,J Am Soc Nephrol 22,1221-1228(2011))。将细胞培养在由补充有10%胎牛血清(FBS,PAA)、0.1mM非必需氨基酸(NEAA,Sigma)、0.1mM β-巯基乙醇、1mM GlutaMAX(Life Technologies)和SingleQuot Kit CC-4127 REG(Lonza)的杜氏改良Eagle培养基/Ham's F-12培养基(DMEM/F12,Lonza)组成的尿细胞培养基(UCM)中。使用Amaxa基础核转染试剂盒(Lonza,VPI-1005)通过附加型表达载体pCXLE-hOCT3/4-shp53-F,pCXLE-hSK和pCXLE-hUL(Addgene)的核转染重新编程尿道上皮细胞。在mTeSR细胞培养基中,将iPS细胞(iPSC)维持在基质胶包被的平板上,并用1U/ml分散酶(Stem Cell Technologies)分离成小簇,并且每5至7天进行传代培养。通过对先前报道的方法的修改,将WD iPSC分化成肝细胞样细胞(HLC)(Basma等人,Gastroenterology 136,990-999(2009))。将 $5 \times 10^4$ 个iPSC以单个细胞铺板到预先涂有基质胶的6孔板上。第二天,将培养基更换为富含100ng/ml重组活化素A(Peprotech)、100ng/ml成纤维细胞生长因子-2(FGF2,Peprotech)和50ng/ml重组人类

Wnt3a (R&D Systems) 的DMEM/F12。随后,根据标准方案更换培养基直至第14天(Basma等人,上述引文)。通过流式细胞术和通过qRT-PCR分析来表征细胞以评估肝细胞谱系的典型标志物。

[0236] HLC在第14天用Cu-组氨酸(15 $\mu$ M)在6孔板中孵育24小时。第二天,取出培养基并更换为含有MB(300 $\mu$ M)的OptiMEM。孵育24小时后,收集洗涤的细胞,计数并评估其铜含量。

[0237] 甲烷氧化菌素(MB)抗体的产生和竞争性ELISA

[0238] 使用偶联到卵清蛋白(50 $\mu$ g)(Squarix, Marl, 德国)的MB、5nmolCPG寡核苷酸(Tib Molbiol, 柏林)、500 $\mu$ l PBS和500 $\mu$ l不完全弗氏佐剂的混合物皮下和腹膜内免疫Lou/c大鼠。初次注射后6周给予无佐剂的加强注射。使用标准程序进行融合。组织培养上清液(TCS)在固相免疫测定中用偶联至BSA的MB或以4 $\mu$ g/ml的浓度偶联至BSA涂布的ELISA板的无关肽进行测试。用缀合HRP的针对大鼠IgG同种型(TIB173 IgG2a、TIB174 IgG2b、全部来自ATCC的TIB170 IgG1、自制的R-2c IgG2c)的mAb检测来自TCS的结合至MB的抗体(mAb),从而避免IgM类的mAb。准备使用TMB(1-StepTM Ultra TMB-ELISA, Thermo)使HRP可视化。将与MB特异性反应的86个杂交瘤冷冻,并将含有TCS的抗体用于进一步分析。

[0239] 竞争ELISA。所有86个TCS用缓冲液(PBS, 5% FCS, 0.01% sodium azide)以1:10稀释。将50 $\mu$ l的每个TCS与50 $\mu$ l MB溶液(1000ng/ml, 在缓冲液中)或缓冲液过夜预孵育。实验重复进行。将50 $\mu$ l预孵育的样品加入以用于筛选的MB涂布的ELISA平板中。10分钟后,洗涤平板,用缀合HRP的对抗大鼠IgG同种型的mAb检测对抗MB的结合的抗体,并用TMB显现HRP。在连续的MB稀释液(1000ng/ml至2ng/ml)中进一步分析识别游离MB(当与MB预孵育时无信号,在缓冲液对照中呈阳性信号)的mAb。最佳识别游离MB的四种mAb被建立(10B10、12D9、18H7、21G5, 全部为大鼠IgG2a亚类)。为了增加测试系统的灵敏度,将所建立的杂交瘤的TCS在涂有MB的ELISA平板上滴定。10B10(1:1260)的效价比12D9(1:320)、18H7(1:10)和21G5(1:320)要好得多。

[0240] 对于测试系统,10B10以1:500的稀释度使用并且预孵育时间缩短至1小时。

[0241] 金属含量测定

[0242] 在用65%硝酸对样品进行湿灰化后,通过ICP-OES(Ciros Vision, SPECTRO Analytical Instruments GmbH)分析在肝匀浆、细胞裂解物和线粒体制备物中的铜(Zischka等人,上述引文)。

[0243] 其他

[0244] 肝组织和线粒体的电子显微镜检查按如前所述32进行。对于分离的线粒体的结构分析,它们被归类为1型:“浓缩”型的正常结构的线粒体(Hackenbrock, J Cell Biol 37, 345-369 (1968)),2型:具有微小改变比如嵴略微增加的线粒体,类型3:具有大量增加的嵴的线粒体,以及类型4:具有大量基质浓缩物、基质空泡化、内边界膜剥离和严重嵴变形的线粒体。甲烷氧化菌素是从孢子甲基弯菌(Methylosinus trichosporium)OB3b的用过的培养基中分离出来的,如前所述(Bandow等人, Methods Enzymol 495, 259-269 (2011))。通过动力显色法(Charles River, Ecully, 法国)检测甲烷氧化菌素中的内毒素,其平均为4.5IU/mg。蛋白定量通过Bradford测定完成(Bradford, Anal Biochem 72, 248-254 (1976))。按他处所述的方法测定分离的线粒体中的细胞色素C氧化酶活性(Kiebish等人, J Neurochem 106, 299-312 (2008))。

[0245] 铜螯合剂和化学品

[0246] D-青霉胺\*HCl(D-PA)由Hey1制药公司(柏林)提供,曲恩汀\*2HCl(TETA)来自Sigma(Taufkirchen,德国),四硫代钼酸盐\*2 NH4(纯度98%) (TTM)由KT.Suzuki(日本千叶大学)提供.CCCP来自Sigma.DPH和TMA-DPH从Life Technologies获得。

[0247] 统计

[0248] 在整个研究过程中,N等于分析的动物的数量,n等于测量的技术性重复的次数。数据以平均值和SD表示。对于学生t检验,除了图3I中所示的那些(未配对单尾检验)外,数据进行了未配对双尾检验。当p值小于0.05时,差异被认为具有统计显著性。P值表示:\*p<0.05,\*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001。

[0249] 实施例1:线粒体损伤是WD患者中肝衰竭和LPP-/-大鼠中肝损伤的特殊病征。

[0250] 导致ATP7B完全功能丧失的突变导致人类严重的WD表型(Das&Ray,Nat Clin Pract Neurol 2,482-493(2006))。LPP-/-大鼠携带完全消除其肝铜转运活性的Atp7b突变(Burkhead等人.Biometals 24,455-466(2011))。这些动物迅速从铜负担的肝发展到肝衰竭和死亡(Zischka,上述引文)。将来自具有WD急性发作的未经治疗的患者(已经历肝移植)的患病肝与来自具有进展性疾病状态的LPP-/-大鼠的肝进行比较(图1)。此外,本研究纳入了在移植前已接受过不成功的D-PA治疗的WD患者的肝(图6D)。

[0251] 为了比较肝损伤的临床阶段,将在80-100天龄的大鼠在肝损伤变得明显时分为三组:(1)受肝铜升高影响的大鼠,其血清AST<200U/L,胆红素<0.5mg/dl,(2)显示“疾病发作”的大鼠AST>200U/L,其胆红素<0.5mg/dl,(3)“患病”大鼠,其AST>200U/L,胆红素>0.5mg/dl(图10A)。

[0252] 在未经治疗的WD患者和患病的LPP-/-肝中观察到相同的组织损伤特征(图1A)。在所有WD患者肝中观察到纤维化,并且在来自患病的LPP-/-大鼠的肝中发现纤维化开始(图6A)。这些特征在杂合LPP+/-对照肝中不存在,但在LPP-/-大鼠中稳步进展(图6B)。

[0253] LPP-/-大鼠和WD患者的肝之间的另一个引人注目的类似之处是线粒体的结构性损伤(图1B和图6C、D)。观察到不同大小的透明液泡,其含有无定形但电子致密材料、分离的内膜和外膜,在电子密度和嵴扩张方面有明显的差异(图1B和图6C、D),描绘了典型的WD线粒体表型20。重要的是,在从患病的LPP-/-大鼠和未经治疗的WD患者肝获得的肝匀浆和线粒体中发现了高度可比的水平的铜(图1C)。相比之下,在来自D-PA预治疗的WD患者的外植肝和分离的线粒体的组织匀浆中存在较低的铜含量。这与线粒体结构的更异质性的损伤相符(图6D),这可能是由源于这些肝内的大量纤维化的区带异质性引起的(图6D)。

[0254] 实施例2:铜负荷的增加损害线粒体膜的完整性和功能。

[0255] 线粒体铜含量随着来自LPP-/-大鼠的肝中的疾病状态逐渐增加(图1C、图10A)。这与日益严重的膜缺陷并行,如直接在新鲜分离的线粒体的水平上所证明的(图2) :

[0256] 观察到,相对于对照,在LPP-/-中结构正常的大鼠肝线粒体(类型1和2)急剧下降,并且结构改变的细胞器的数量相应增加(类型3和4,图2A)。

[0257] 用荧光团DPH和TMA-DPH进行膜偏振测量(Prendergast等人.Biochemistry 20,7333-7338(1981))揭示线粒体膜“流动性”的改变在膜脂质-水界面(TMA-DPH)的极性头部基团处,而不在膜内脂质相(DPH)处(图2B)。

[0258] 经通过钙或铜诱导线粒体通透性转换(MPT),对照线粒体经历大幅度肿胀

(Zischka, 上述引文), 这在来自患病和疾病发作的LPP-/-大鼠的线粒体中显著降低(图2C)。

[0259] 相对于对照线粒体,Cys-A阻断钙诱导的MPT的能力在LPP-/-中显著受损(图2D)。

[0260] 与对照线粒体相比,内线粒体跨膜电位( $\Delta \Psi$ )的时间稳定性受到损害,并且LPP-/-线粒体在较早时间点时丧失了其膜电位(图2E)。

[0261] 发现LPP-/-线粒体具有受损的产生ATP的能力(图9F)。

[0262] 实施例3:细菌肽甲烷氧化菌素迅速耗竭累积的线粒体铜。

[0263] 比较甲烷氧化菌素(MB)与现有临床批准的铜螯合剂D-PA、TETA和候选药物TTM从新鲜分离的LPP-/-线粒体中去除铜的能力。MB肽具有非常高的铜亲和力,并且在贫铜环境中生长时由甲烷氧化细菌产生(Kim等人, *Science* 305, 1612-1615 (2004))。与D-PA和TETA形成对照,MB和TTM均快速降低与LPP-/-线粒体连接的铜(图3A)。使用来自野生型大鼠的人工预负荷铜的线粒体获得了类似的结果(图7A、B)。此外,当评估重要的铜依赖性线粒体呼吸复合物IV的损伤时,MB被发现毒性明显低于TTM(图3B、图7C)。

[0264] 与现有临床批准的铜螯合剂如D-PA相比,即使是特定的MB肽,如来自甲基孢囊菌(*Methylocystis*)菌株SB2的mb-SB2,其在结构上和化学上偏离其他MB肽(例如偏离来自发孢甲基弯菌(*Methylosinus trichosporium*)OB3b的mb-OB3b),也可以作为有前景的铜螯合剂。在三种不同的LPP-/-大鼠中,将新鲜分离的线粒体(ATP7B-/-)与1mM铜螯合剂D-PA、mb-OB3b和mb-SB2孵育30分钟,并且与缓冲液处理的对照相比,研究它们的螯合效能。在所有三种LPP-/-大鼠线粒体中,MB肽mb-SB2减少得至少与来自发孢甲基弯菌(*Methylosinus trichosporium*)OB3b的MB肽mb-OB3b一样有效。

[0265] 实施例4:甲烷氧化菌素有效地使肝细胞脱铜,并具有低细胞毒性。

[0266] 在细胞水平上,过夜MB处理在具有基础铜(图7D)或者预负荷了仅表现出轻微毒性的铜(图3C、7E)的HepG2细胞中使得铜减少50%。此外,为了测试MB对WD患者样品的功效,将来自这些患者的尿道上皮细胞重编程为诱导的多能干细胞(iPSC)并分化成肝细胞样细胞(HLC, 图7F-I)。经MB处理后,在铜预负荷的HepG2和HLC中发现了可比较的铜耗竭(图3C)。

[0267] 使用对MB特异性的单克隆抗体,发现MB通过HepG2细胞以剂量依赖性方式吸收(图3D)。MB的毫无根据的细胞毒性效应仅在毫摩尔MB浓度下观察到(图3E)。在线粒体水平,无毒MB浓度(500 $\mu$ M)仅部分降低线粒体膜电位(图3F)。因此,MB有效使肝细胞脱铜而没有大的毒副作用。

[0268] 实施例5:甲烷氧化菌素将肝铜导入胆汁。

[0269] MB的铜去除效率在整个器官水平被进一步验证(图3G-I)。在LPP-/-肝的两小时灌注期间,与TTM相比,在存在MB的情况下,十倍更高的铜量被释放到胆汁中,而胆汁是铜的主要生理排泄途径(Ferenci, *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 3, 726-733 (2005)) (图3G、图8A、B)。D-PA和TETA未引起任何可检测到的铜释放到胆汁中(图3G)。然而,除了TTM以外,所有的螯合剂都导致灌注液中铜的存在增加(图3H),这可能与TTM使铜细胞内沉淀的能力有关(Ogra等人, *Toxicology* 106, 75-83 (1996))。由于肝损伤标记物LDH与铜释放曲线并行(图8C),铜向灌注液中的释放部分取决于肝疾病状态。值得注意的是,只有MB在两小时灌注内显著降低了LPP-/-肝的铜含量(图3I)。

[0270] 实施例6:短期甲烷氧化菌素应用逆转体内肝损伤。

[0271] 在LPP-/-大鼠中在肝疾病发作年龄(85-90天)评估短期MB治疗方案的效率。动物接受MB(i.p.)3或5天,或接受临床使用的铜螯合剂D-PA或TETA,口服给药4天。

[0272] 与使用D-PA或TETA治疗形成对照,MB应用导致LPP-/-肝中组织病理学肝损伤标志物的强烈减少(图4A)。后两种螯合剂无法避免血清AST水平的升高(表明进行性肝损伤,图4B),这意味着短期D-PA或TETA治疗没有治疗效果。相比之下,在MB处理的七只LPP-/-大鼠中的六只中,AST水平显著降低(图4B)并且动物恢复了体重(图10B)。重要的是,5天的MB治疗后,两只具有疾病发作的LPP-/-动物和一只患病LPP-/-大鼠从肝功能障碍中获救(AST<200U/L,图10B)。

[0273] 关于药物安全性,用MB治疗的对照LPP+/-大鼠没有表现出任何毒性迹象,并且体重、肝铜浓度、血清AST和胆红素值保持在生理范围内(N=4,数据未显示)。此外,MB在血清中仅可检测到30分钟(图4C)。

[0274] MB导致总肝铜的逐渐减少,这在线粒体隔室中甚至更为明显(图4D)。经D-PA或TETA处理后,在整个肝和纯化的线粒体中均未发现铜还原(图4D)。MB的线粒体脱铜效果通过超结构检查得到证实(图4E)。在来自MB治疗的LPP-/-动物的分离物中几乎不存在严重受损的线粒体(类型4,图2A),但在来自D-PA或TETA治疗的动物的分离物中则存在(图4E,图9A中定量)。

[0275] 短期MB治疗能延迟急性肝衰竭的发作多久?为了解决这个问题,三只LPP-/-大鼠用MB治疗五天,之后进入MB药物假期。从MB治疗开始,给予富含锌的食物(1000ppm)(Halestrap, Biochem Soc Trans 38, 841-860 (2010)),因为在WD中锌是临床相关的铜维持疗法12。所有经MB治疗的动物显示恢复了正常血清AST,持续至少两周,此后AST水平再次升高(图5A)。在分析时,一只动物仍然健康,两只动物表现出不同的肝疾病阶段(图5A,C)。肝损伤程度与线粒体(而不是全肝)铜水平(图5B)以及线粒体中结构(图5D)和功能缺陷(图9B)相关。

[0276] 腹膜内(i.p.)或静脉内(i.v.)MB的应用路径可替代地使用(图10B和C)。对于i.v.注射,三只LPP-/-大鼠是导管插入股静脉。在三天的恢复期后,动物持续五天接受每日MB剂量。所有动物都恢复了体重,并且在AST或胆红素升高的情况下,水平恢复正常(图10C)。此外,在全肝和纯化的线粒体水平上,发现铜含量显著降低(图10C)。

[0277] 实施例7:甲烷氧化菌素用于治疗急性肝衰竭。

[0278] 通过由每日两次MB注射一周(即,总共16次i.p.注射,图10D)组成的“急性救援方案”评估MB拯救患病的LPP-/-大鼠的能力。对4只具有强烈升高的AST水平的LPP-/-大鼠进行治疗(图10D)。所有动物在治疗方案结束时存活,体重恢复并且呈现正常的血清AST和胆红素以及特别低的铜值(图10D)。3号动物的情况最好地例证了这种强大的治疗效果(图10D)。呈现进行性体重减轻和胆红素水平大于8mg/dl(图10A)的患病LPP-/-大鼠必须被视为垂死,因为这样的动物通常会在几天内死亡。与此相反,在“急性救援方案”之后,与大量结构和功能线粒体恢复有关,3号动物体重恢复了29%,表现出AST和胆红素水平的急剧下降并降至正常,肝铜耗竭(图10D、图9D-F)。

[0279] 实施例8:重复mb治疗

[0280] 由于短期MB治疗的效率,我们进行了第一次测试,旨在用由较长观察周期中断的

重复治疗周期组成的方案替代每日螯合疗法(图14)。包括5只LPP-/-大鼠以及5只年龄和性别匹配的LPP+/-对照。一对大鼠分别在实验第1、8、29、36和85天处死。在实验第一天,所有动物都是健康的,与其LPP+/-对照相比,被处死的LPP-/-大鼠表现出显著的肝和线粒体铜负荷和线粒体功能轻微受损(87%的ATP生产能力)(第1对)。对剩下的4只LPP-/-大鼠进行第一个治疗周期,其由每日三次MB注射(i.p.)五天组成。所有动物保持健康,这导致在实验第8天铜负荷减少40%(第2对),再经三周的观察后,铜负荷回到起始水平(第29天,第3对)。在第二次治疗周期后,铜负荷再次下降,但现在下降到起始值的25%,导致LPP-/-线粒体中的铜负荷空前得低(第36天,第4对)。这种75%的脱铜效率与随后的7周观察期相关,在该期间剩余的LPP-/-大鼠保持健康。在实验第85天,与其LPP+/-对照相比,肝和线粒体铜负荷已升高回到在治疗开始之前的值(第1天),这与线粒体功能受损有关(65%的ATP生产能力)(第5对)。这对应于未经治疗的LPP-/-大鼠患病时的年龄的加倍。

## 序列表

<110> 德国亥姆霍兹慕尼黑中心健康与环境研究中心（有限公司）  
密歇根大学董事会  
爱荷华州立大学研究基金会股份有限公司

<120> 用于治疗铜相关疾病的手段和方法

<130> LC18310004P

<150> EP 15 201 070.8

<151> 2015-12-18

<150> LU 92979

<151> 2016-02-19

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> 甲基弯菌属

[0001]

<400> 1

Met Thr Val Lys Ile Ala Gln Lys Lys Val Leu Pro Val Ile Gly Arg  
1 5 10 15

Ala Ala Ala Leu Cys Gly Ser Cys Tyr Pro Cys Ser Cys Met  
20 25 30

<210> 2

<211> 34

<212> PRT

<213> 甲基弯菌属

<400> 2 .

Met Ala Ile Lys Ile Ala Lys Lys Glu Val Leu Pro Val Val Gly Arg  
1 5 10 15

Leu Gly Ala Met Cys Ser Ser Cys Pro Met Cys His Cys Gly Pro Leu  
20 25 30

Cys Pro

<210> 3  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 甲基孢囊菌属

<400> 3

Met Ala Ile Lys Ile Ser Lys Lys Glu Val Leu Pro Val Val Gly Arg  
 1 5 10 15

Leu Gly Ala Met Cys Ser Ser Cys Pro Met Cys Gly Pro Leu Cys Pro  
 20 25 30

<210> 4  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 甲基弯菌属

[0002]

<400> 4

Met Ala Ile Lys Ile Ala Lys Lys Glu Val Leu Pro Val Val Gly Arg  
 1 5 10 15

Leu Gly Ala Met Cys Ser Ser Cys Pro Met Cys Gly Pro Leu Cys Pro  
 20 25 30

<210> 5  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 甲基弯菌属

<400> 5

Met Thr Ile Lys Val Val Lys Lys Glu Ile Leu Pro Val Ile Gly Arg  
 1 5 10 15

Val Gln Ala Met Cys Ala Cys Asn Pro Pro Trp Cys Gly Thr Cys  
 20 25 30

<210> 6  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> 甲基孢囊菌属

<400> 6

Met Ala Ile Lys Ile Val Lys Lys Glu Ile Leu Pro Val Ile Gly Arg  
 1 5 10 15

Val Gln Ala Phe Cys Ser Ser Asp Ser Gly Gly Gly Gln Ile Gly Cys  
 20 25 30

Gly Pro Ala  
 35

<210> 7  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 甲基孢囊菌属

[0003]

<400> 7

Met Thr Ile Arg Ile Ala Lys Arg Ile Thr Leu Asn Val Ile Gly Arg  
 1 5 10 15

Ala Ser Ala Arg Cys Ala Ser Thr Cys Ala Ala Thr Asn Gly  
 20 25 30

<210> 8  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 甲基孢囊菌属

<400> 8

Met Thr Ile Arg Ile Ala Lys Arg Ile Thr Leu Asn Val Ile Gly Arg  
 1 5 10 15

Ala Ser Ala Arg Cys Ala Ser Thr Cys Ala Ala Thr Asn Gly  
 20 25 30

<210> 9  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> 甲基孢囊菌属

<400> 9

Met Thr Ile Arg Ile Ala Lys Arg Ile Thr Leu Asn Val Ile Gly Arg  
1 5 10 15

Ala Ser Ala Met Cys Ala Ser Thr Cys Ala Ala Thr Asn Gly  
20 25 30

<210> 10  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> 甲基孢囊菌属

<400> 10

Met Thr Ile Lys Ile Val Lys Arg Thr Ala Leu Ala Val Asn Gly Arg  
[0004] 1 5 10 15

Ala Gly Ala Asp Cys Gly Thr Ala Cys Trp Ala  
20 25

<210> 11  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> 甲基孢囊菌属

<400> 11

Met Ala Ile Asn Ile Val Lys Arg Thr Thr Leu Val Val Asn Gly Arg  
1 5 10 15

Thr Gly Ala Asp Cys Gly Thr Ala Cys Trp Gly  
20 25

<210> 12  
<211> 27  
<212> PRT

<213> 甲基弯菌属

<400> 12

Met Ala Ile Asn Ile Val Lys Arg Thr Thr Leu Val Val Asn Gly Arg  
 1                       5                       10                       15

Ser Gly Ala Asp Cys Gly Thr Ala Cys Trp Gly  
 20                       25

<210> 13

<211> 29

<212> PRT

<213> 运动替斯崔纳菌

<400> 13

Met Ser Ile Lys Ile Ser Ala Arg Lys Ala Leu Gln Ile Ala Gly Arg  
 1                       5                       10                       15

[0005] Ala Gly Ala Arg Cys Ala Thr Ile Cys Ala Val Ala Gly  
 20                       25

<210> 14

<211> 30

<212> PRT

<213> 巴西贪铜菌

<400> 14

Met Thr Ile Lys Ile Ser Lys Lys Glu Ala Ile Glu Val Arg Gly Arg  
 1                       5                       10                       15

Ser Gly Ala Cys Cys Gly Ser Cys Cys Ala Ala Ile Gly Ala  
 20                       25                       30

<210> 15

<211> 31

<212> PRT

<213> 适冷假单胞菌

<400> 15

Met Ser Ile Lys Ile Ala Lys Lys His Thr Leu Gln Ile Ala Gly Arg  
 1                   5                   10                   15

Ala Gly Ala Cys Cys Ala Ser Cys Cys Ala Pro Leu Gly Val Asn  
 20                   25                   30

<210> 16  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 固氮螺菌属

<400> 16

Met Thr Ile Lys Ile Ala Lys Lys Gln Thr Leu Ser Val Ala Gly Arg  
 1                   5                   10                   15

[0006]

Ala Gly Ala Cys Cys Gly Ser Cys Cys Ala Pro Val Gly Val Asn  
 20                   25                   30

<210> 17  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 堆肥丛毛单胞菌

<400> 17

Met Lys Ile Lys Val Thr Lys Lys Thr Thr Met Thr Val Ala Gly Arg  
 1                   5                   10                   15

Ala Gly Ala Cys Cys Ala Ser Cys Cys Ala Pro Val Gly Val Asn  
 20                   25                   30

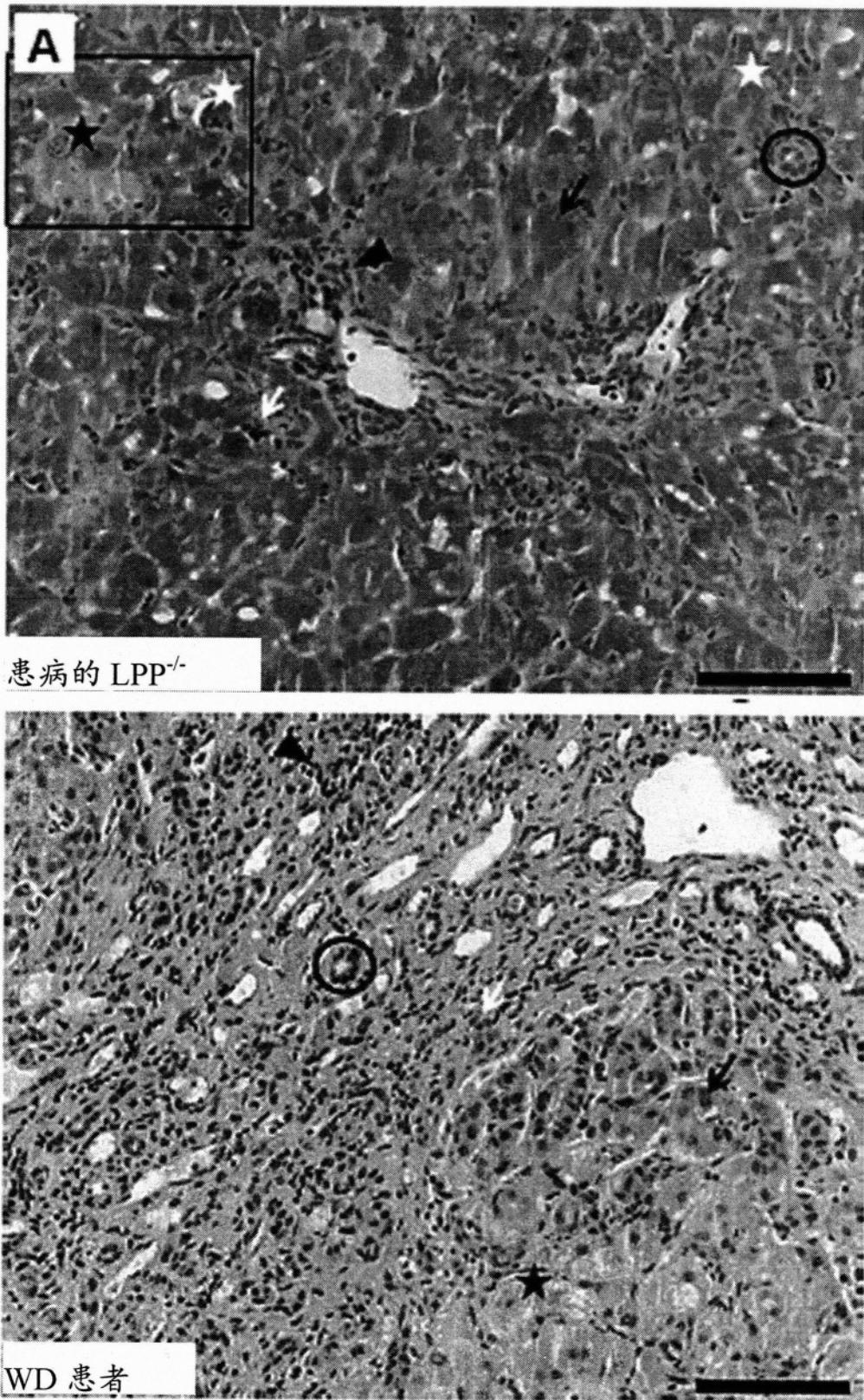


图1

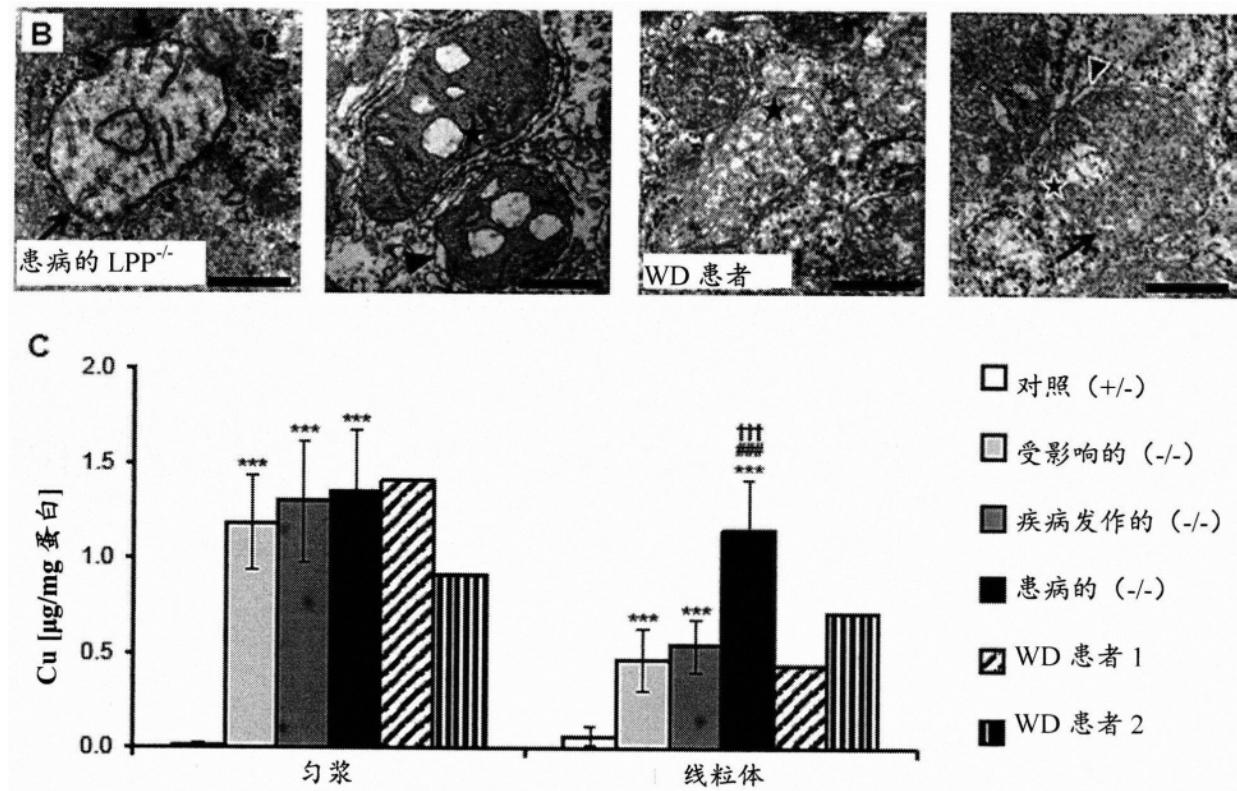


图1(续)

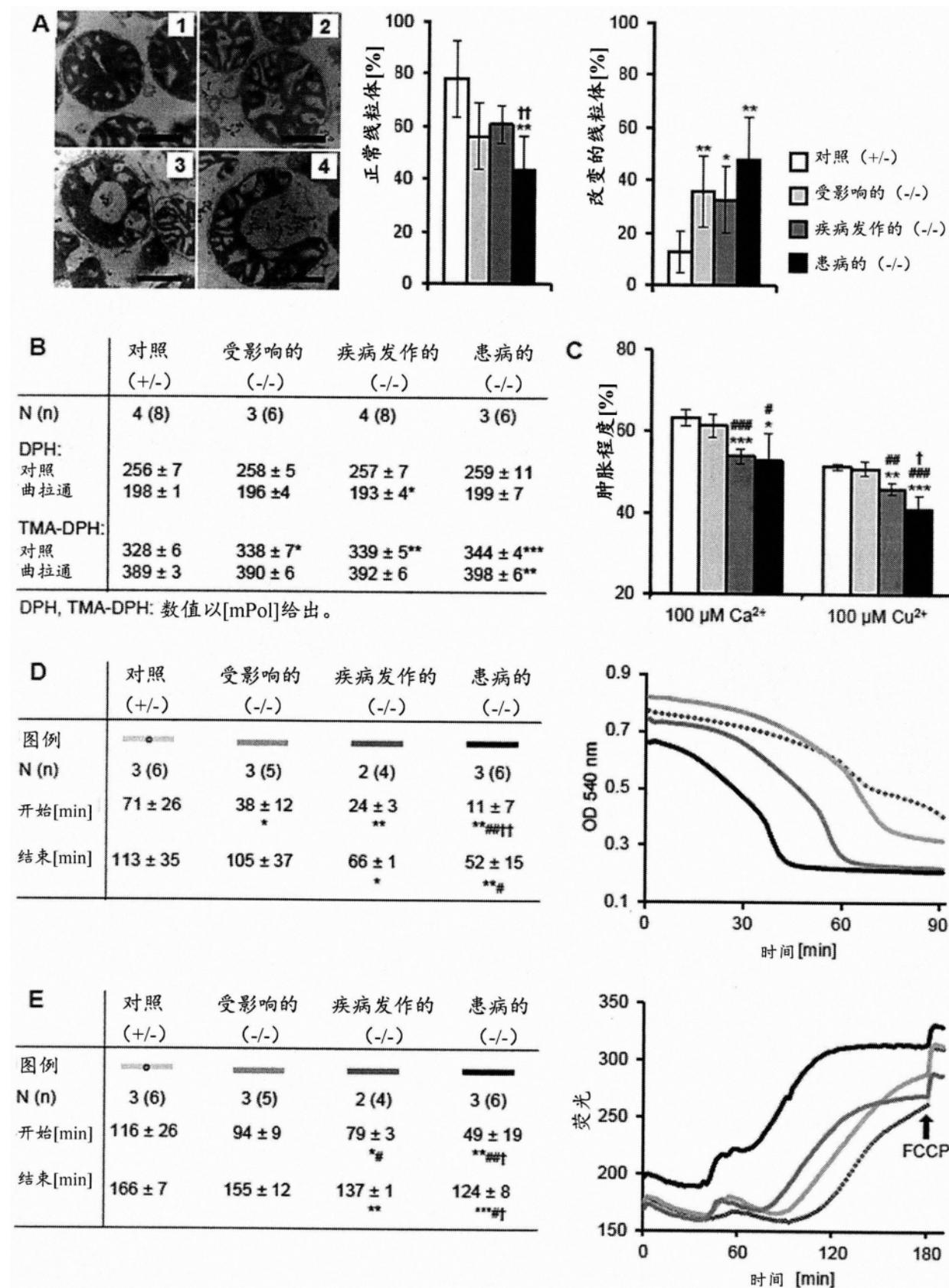


图2

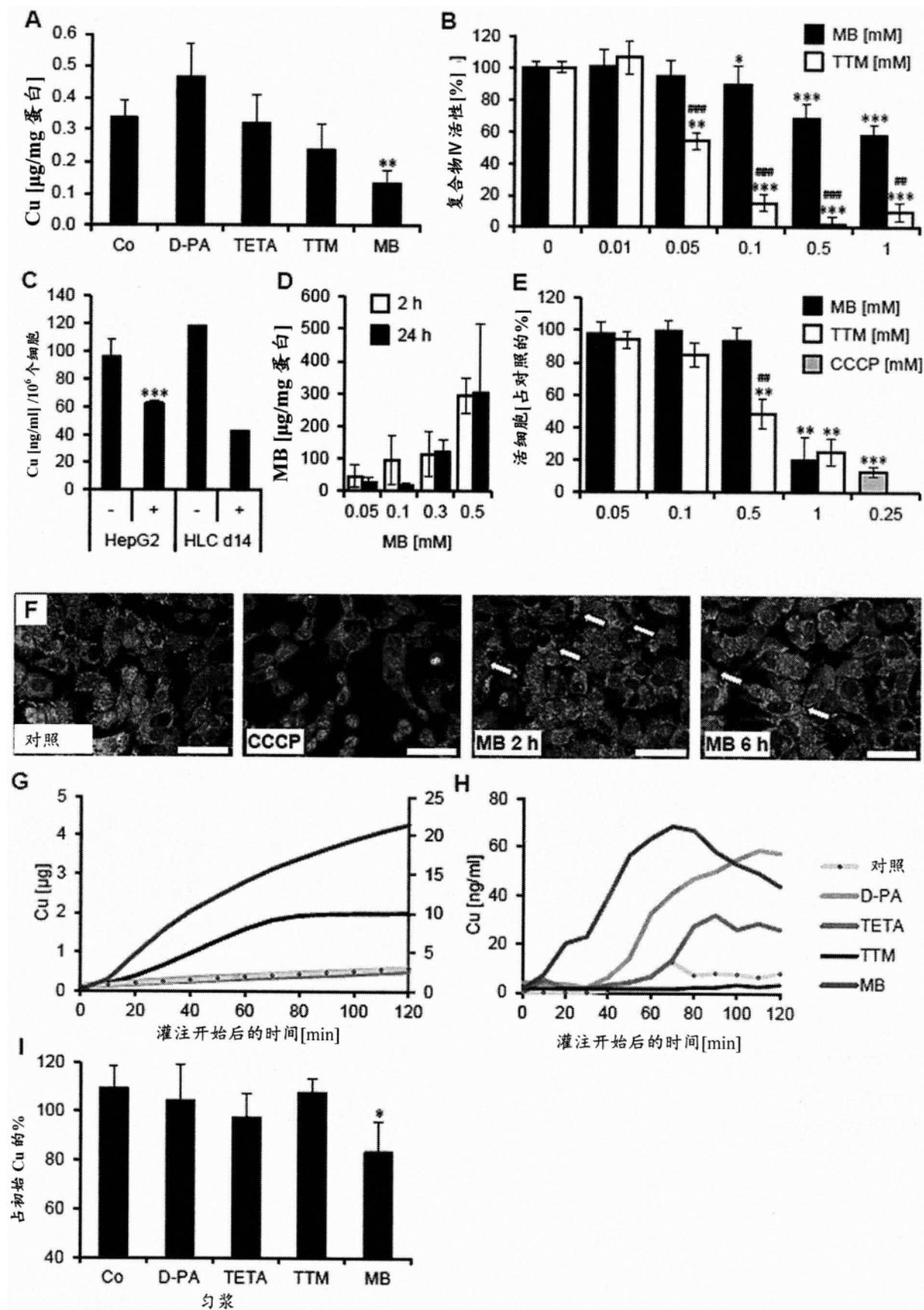
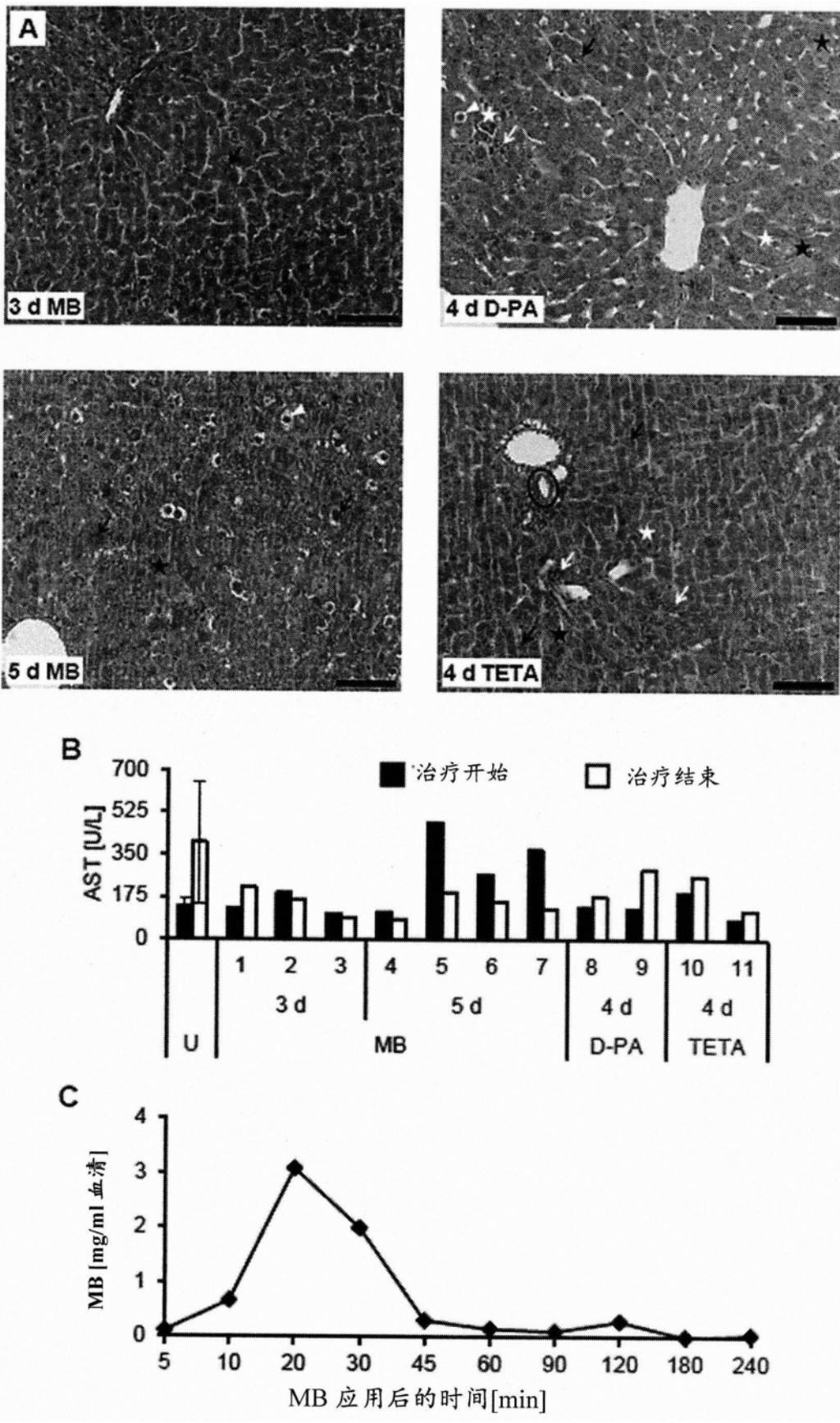


图3



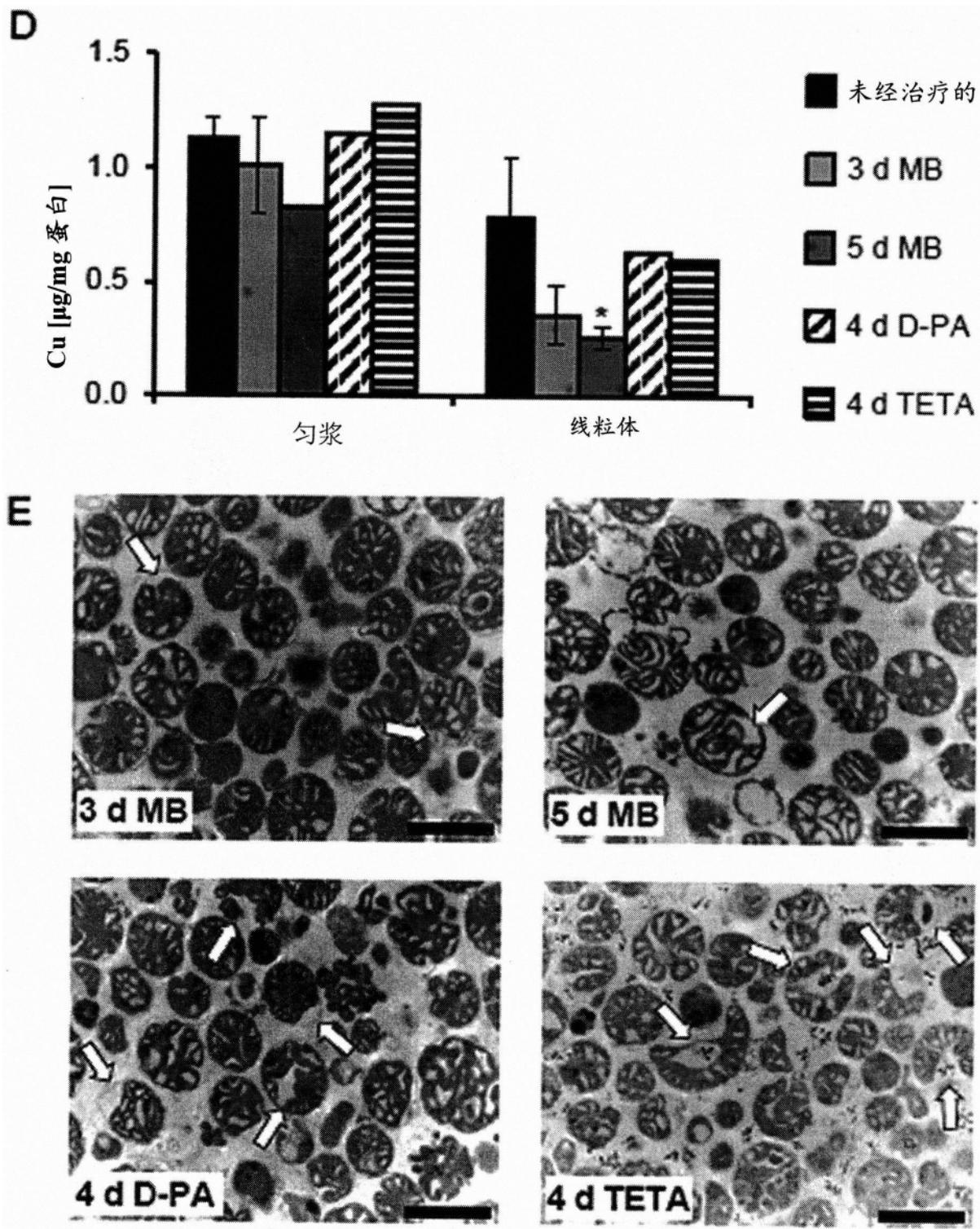


图4

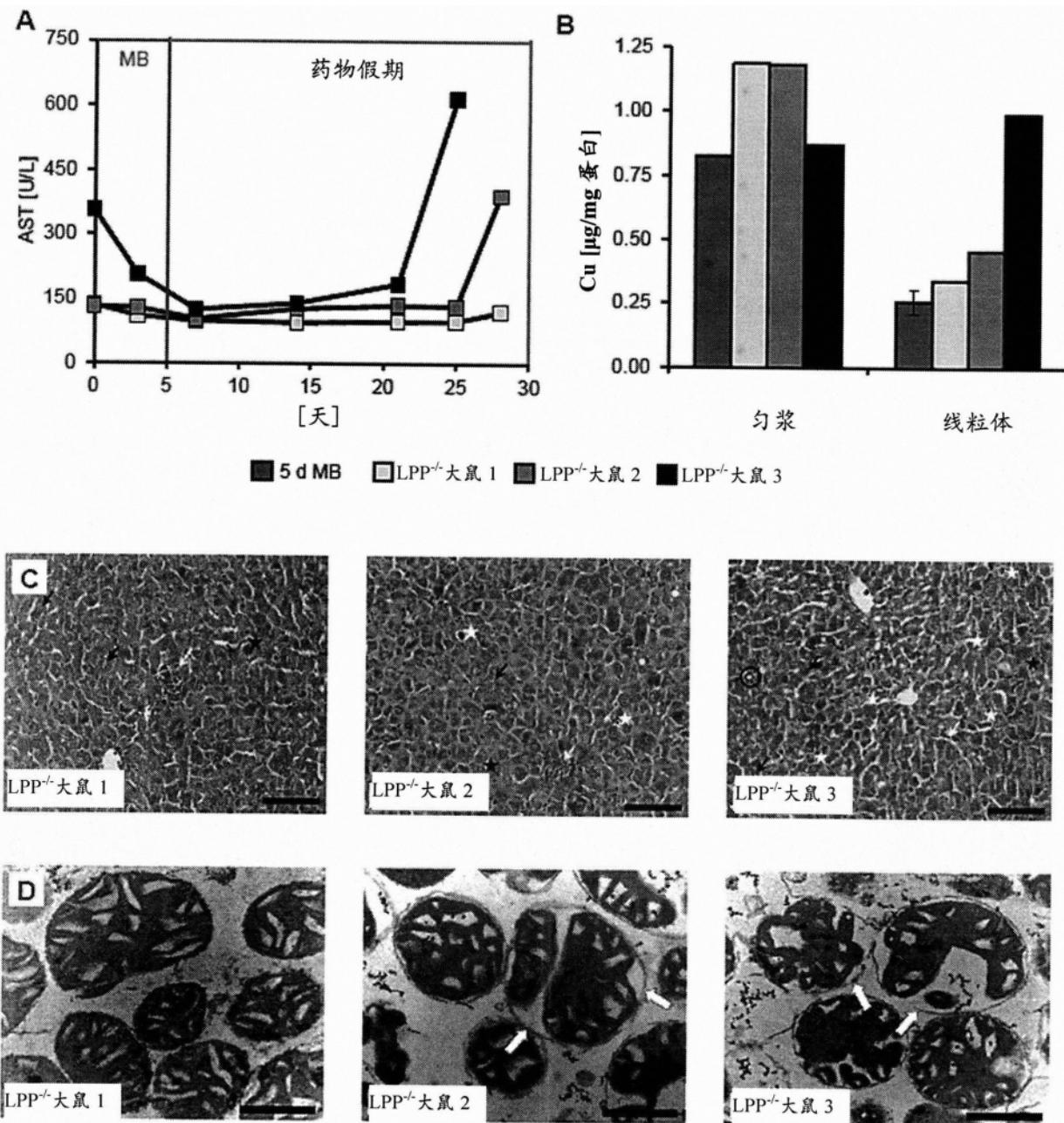


图5

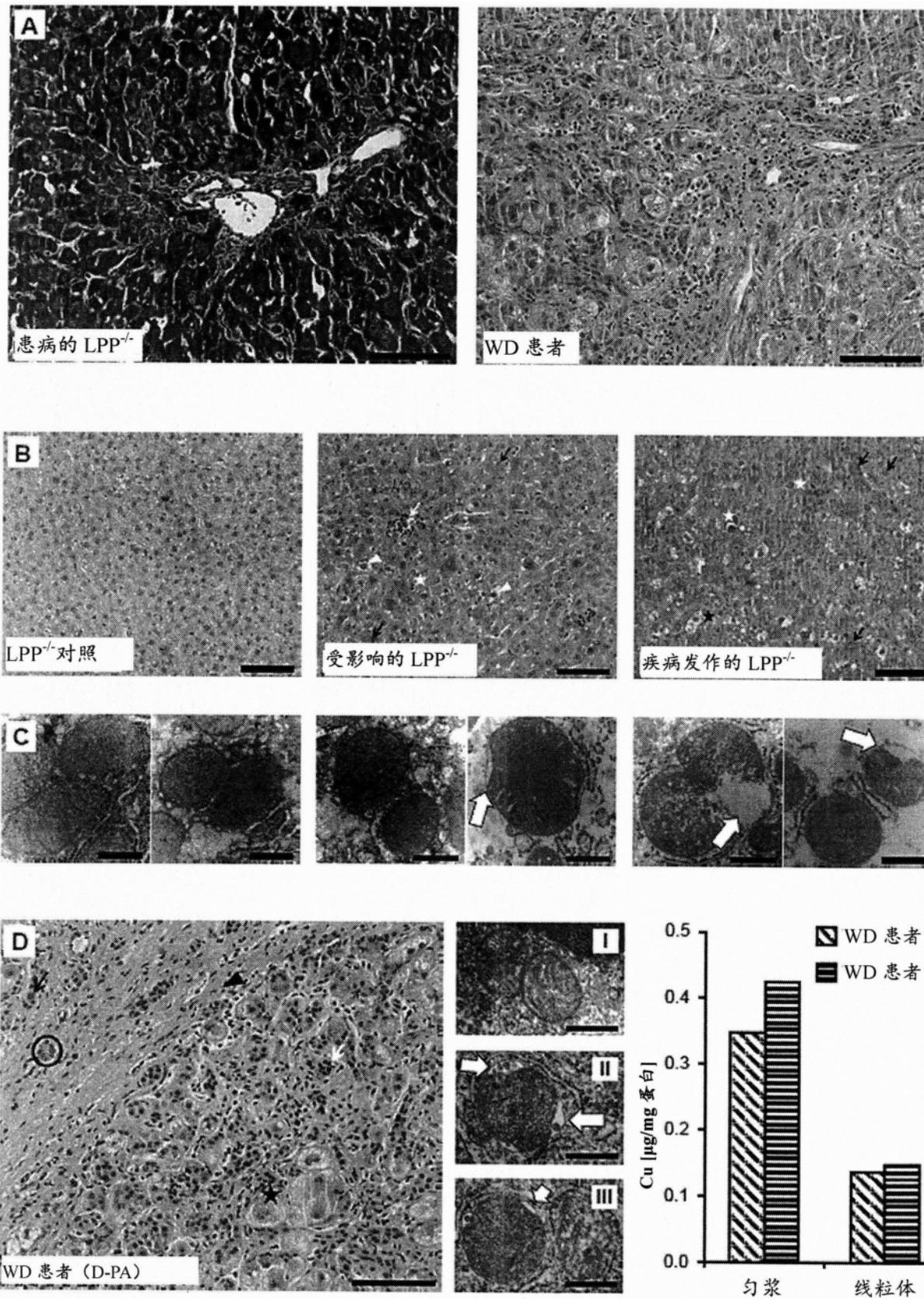


图6

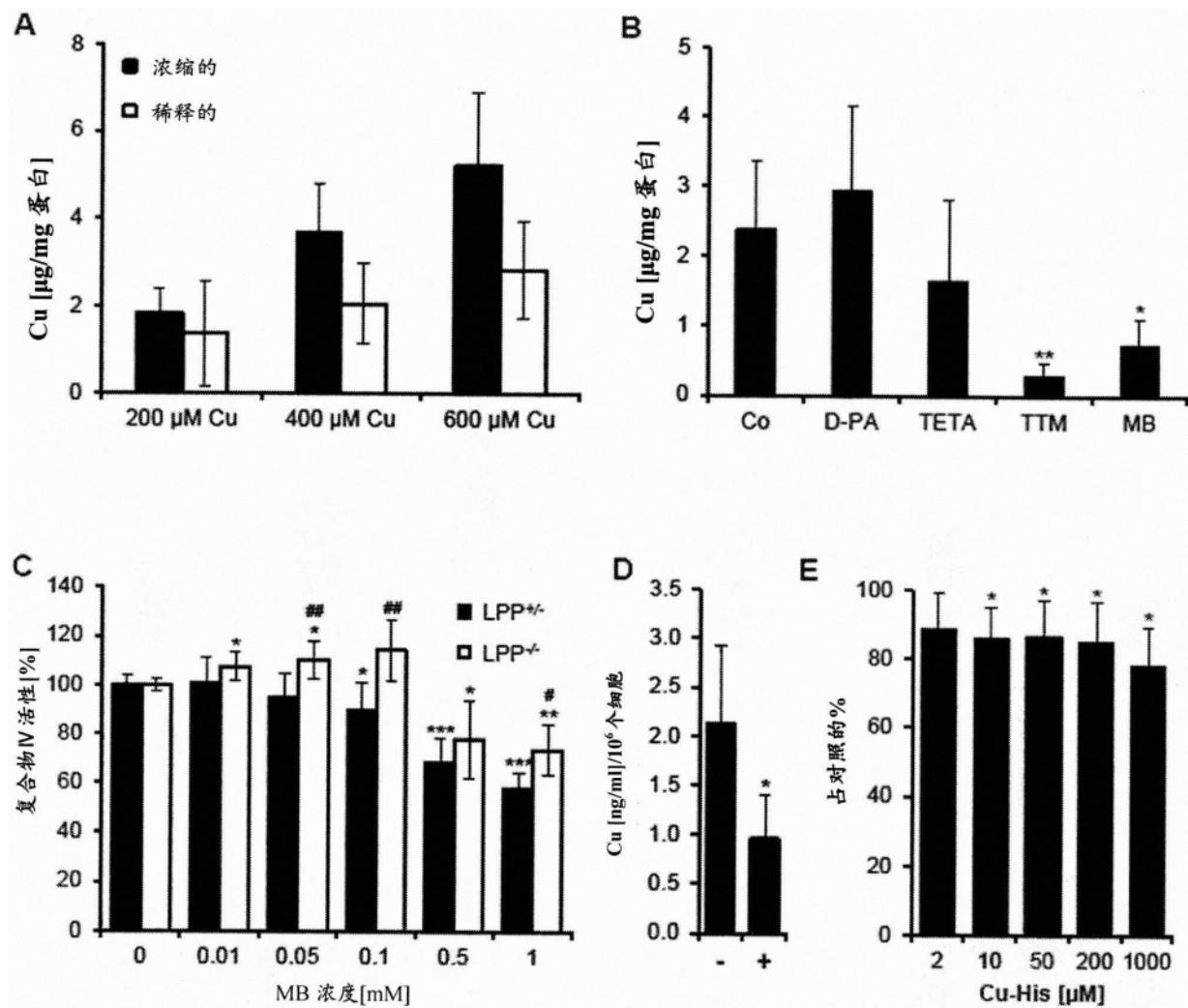


图7

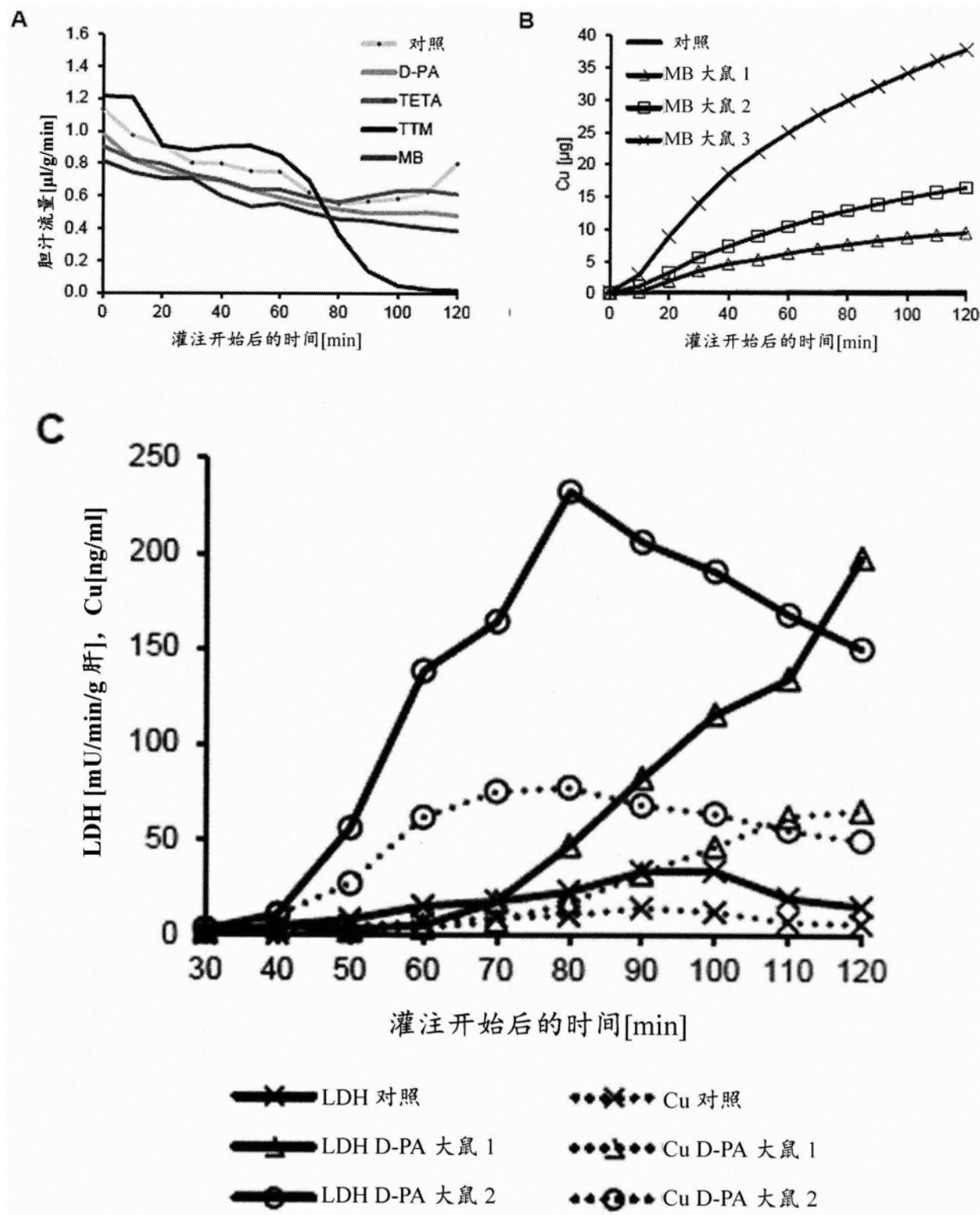


图8

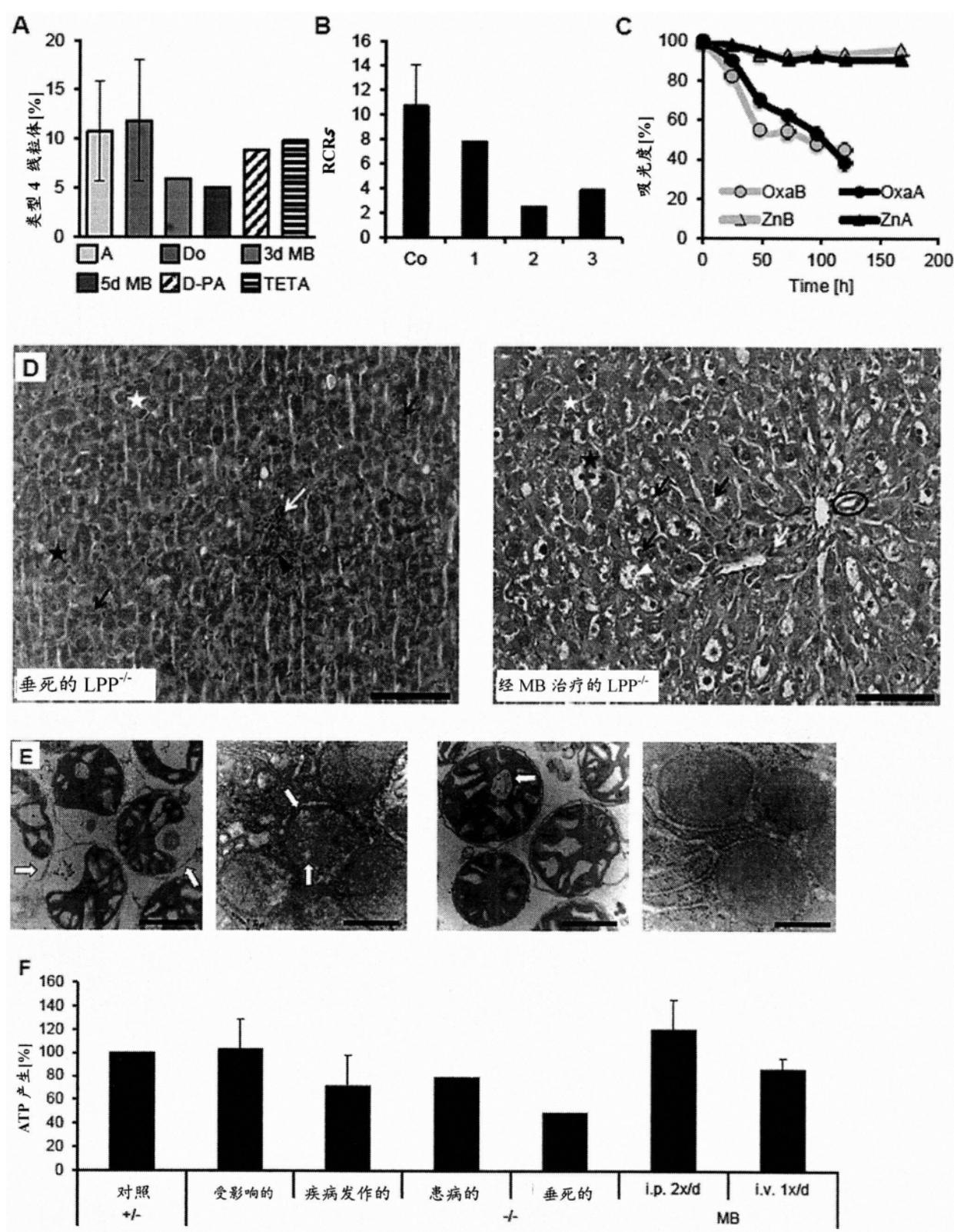


图9

组别 性别, 大鼠	鼠龄 [d]	体重 [g]		AST [U/L]		胆红素 [mg/dl]		铜 [ng/mg 蛋白质]		线粒体 铜耗竭 <sup>a</sup> [%]
		开始	结束	开始	结束	开始	结束	匀浆	线粒体	
<b>A</b>										
对照 (+/-)										
f, N=15	83-146	-	170±13	-	115±28	-	<0.5	14±2	27±2	-
m, N=11	75-95	-	274±36	-	123±35	-	<0.5	17±4	53±16	-
受影响的 (-/-)										
f, N=4	85-92	-	165±16	-	138±37	-	<0.5	1353±137	415±84	-
m, N=11	66-93	-	253±25	-	151±33	-	<0.5	1188±196	464±248	-
疾病发作的 (-/-)										
f, N=5	83-93	-	146±10	-	315±53	-	<0.5	1477±211	566±35	-
m, N=6	80-107	-	275±45	-	244±44	-	<0.5	1337±155	476±159	-
患病的 (-/-)										
f, N=1	84	-	162	-	590	-	0.5	1389	670	-
m, N=4	91-107	-	274±20	-	412±124	-	1.3±1.1	1389±79	1129±328	-
垂死的 (-/-)										
f, N=3	97-106	-	140±5	-	454±96	-	14.2±5.5	1667±478	1398±301	-
m, N=1	95	-	255	-	570	-	8.0	1261	1602	-
<b>B</b>										
MB 5x i.p. (-)										
f, 大鼠 1 (A)	91	157	154	116	87	<0.5	<0.5	-	205	50.7
m, 大鼠 2 (Do) <sup>b</sup>	90	197	205	480	194	<0.5	<0.5	806	321	32.4
m, 大鼠 3 (Do)	90	231	242	270	160	<0.5	<0.5	851	251	47.2
f, 大鼠 4 (D)	95	160	164	369	127	0.6	<0.5	915	432	35.6
<b>C</b>										
MB 5x i.v. (-)										
f, 大鼠 1 (D)	92	135	143	295	155	1.5	<0.5	928	532	20.6
f, 大鼠 2 (Do)	92	150	161	70	107	1.2	<0.5	1265	391	31.0
m, 大鼠 3 (Do)	81	234	240	97	98	1.6	<0.5	721	173	63.7
<b>D</b>										
MB 16x i.p. (-)										
f, 大鼠 1 (D)	89	148	155	365	182	1.0	<0.5	455	241	64.0
f, 大鼠 2 (D)	89	144	160	570	178	0.9	<0.5	315	218	67.4
f, 大鼠 3 (M)	90	120	155	610	122	15.5	<0.5	220	203	85.5
f, 大鼠 4 (Do)	90	143	163	273	131	<0.5	<0.5	513	206	63.6

a: 相对于相应未经治疗的组计算

b: 缩写为 A: 受影响的, Do: 疾病发作的, D: 患病的, M: 垂死的

图10

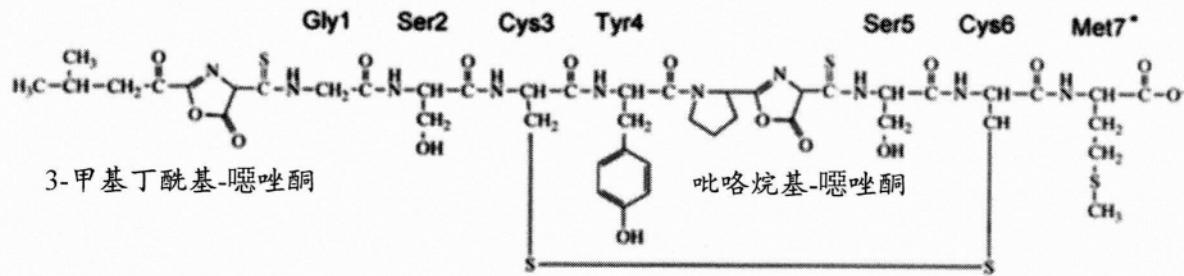
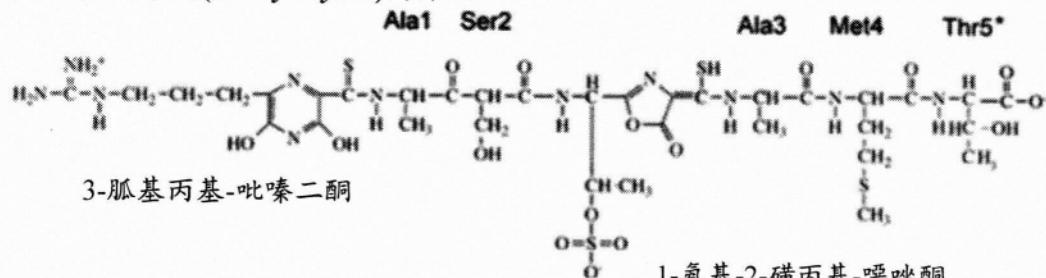
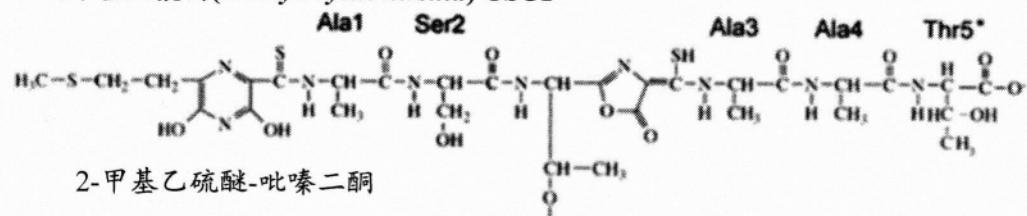
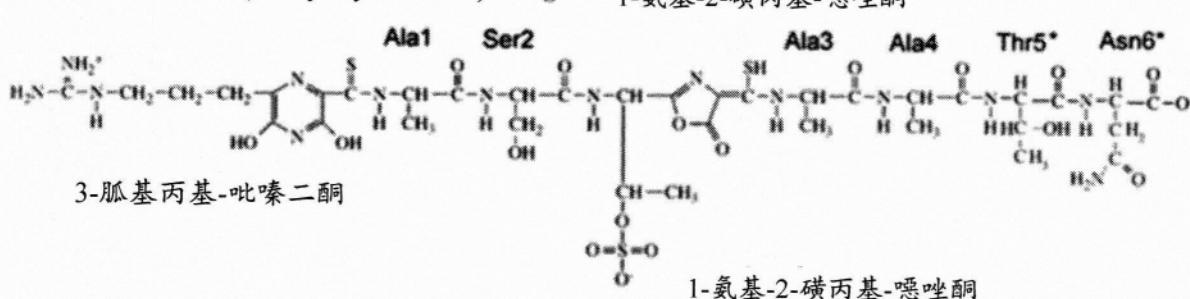
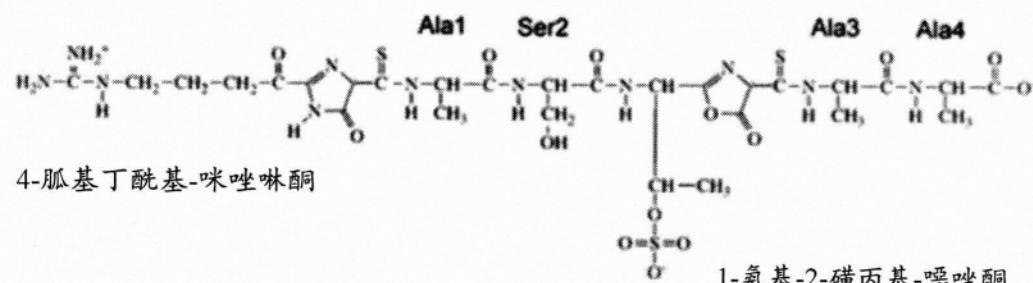
**A: 发孢甲基弯菌(*Methylosinus trichosporium*) OB3b****B: 甲基孢囊菌(*Methylocystis*)菌株 M****C: 毛甲基孢囊菌(*Methylocystis hirsuta*) CSC1****D: 玫瑰甲基孢囊菌(*Methylocystis rosea*)****E: 甲基孢囊菌(*Methylocystis*)菌株 SB2**

图11

SEQ ID No.

	前导肽	核心肽
<b>I</b>		
mb-OB3b:	<b>MTVKIAQKKVLPVIGRAAALCGSCYPCSCM</b>	
mb-LW3 v1:	<b>MAIKIAKKEVLPVVGRLGAMCSSCPMCGPLCP</b>	
mb-LW5 v1:	<b>MAIKISKKEVLPVVGRLGAMCSSCPMCGPLCP</b>	
mb-PW1:	<b>MAIKIAKKEVLPVVGRLGAMCSSCPMCGPLCP</b>	
mb-LW4:	<b>MTIKVVKKEILPVIGRVQAMCACNPPWCGTG</b>	
mb-OBBP v1:	<b>MAIKIVKKEILPVIGRVQAFCSSCSGGGQCGCGPA</b>	
<b>II</b>		
mb-SB2:	<b>MTIRIAKRITLNVIGRASARCASTCAATNG</b>	
mb-rosea:	<b>MTIRIAKRITLNVIGRASARCASTCAATNG</b>	
mb-SC2:	<b>MTIRIAKRITLNVIGRASAMCASTCAATNG</b>	
mb-OBBP v2:	<b>MTIKIVKRTALAVNGRAGADCGTACWA</b>	
mb-LW5 v2:	<b>MAINIVKRTTLVNVNGRTGADCGTACWG</b>	
mb-LW3 v2:	<b>MAINIVKRTTLVNVNGRSGADCGTACWG</b>	
mb-mobilis:	<b>MSIKISARKALQIAGRAGARCATICAVAG</b>	
mb-B-8:	<b>MTIKISKKEAIEVRGRSGACCGSCCAAIGA</b>	
mb-14-3:	<b>MSIKIAKKHTLQIAGRAGACCASCCAPLVGN</b>	
mb-B510:	<b>MTIKIAKKQTLSVAGRAGACCGSCCAPVGVN</b>	
mb-21721:	<b>MKIKVTKKTTMTVAGRAGACCASCCAPVGVN</b>	

图12

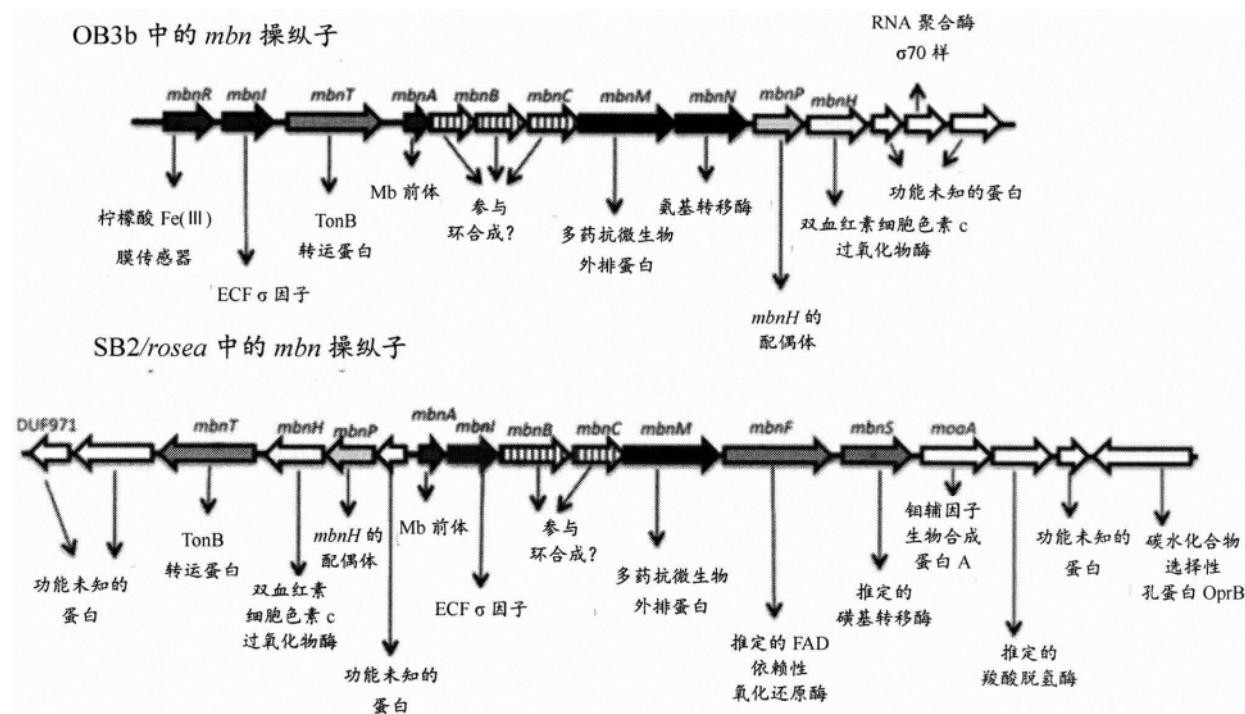


图13

实验天数 治疗	1 3x MB/d	5 3x MB/d	8 3x MB/d	观察		观察		85
大鼠对	1	2	3	4				5
大鼠对			1	2	3	4	5	
LPP 基因型	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-	-/-
年龄[d]	82	82	89	89	109	109	117	116
性别	F	F	F	F	F	F	M	M
铜蓝蛋白[U/L]	234	8	227	1	194	1	163	0
AST [U/L]开始	-	-	-	88	-	110	-	94
AST [U/L]结束	118	113	93	88	78	86	90	83
体重[g]开始	-	-	-	156	-	151	-	258
体重[g]结束	170	179	163	155	186	177	349	291
Cu [ $\mu$ g/mg 蛋白]	0.013	0.917	0.014	0.593	0.012	1.001	0.013	0.226
匀浆	0.028	0.296	0.027	0.167	0.027	0.267	0.028	0.067
线粒体							0.023	0.266

图14

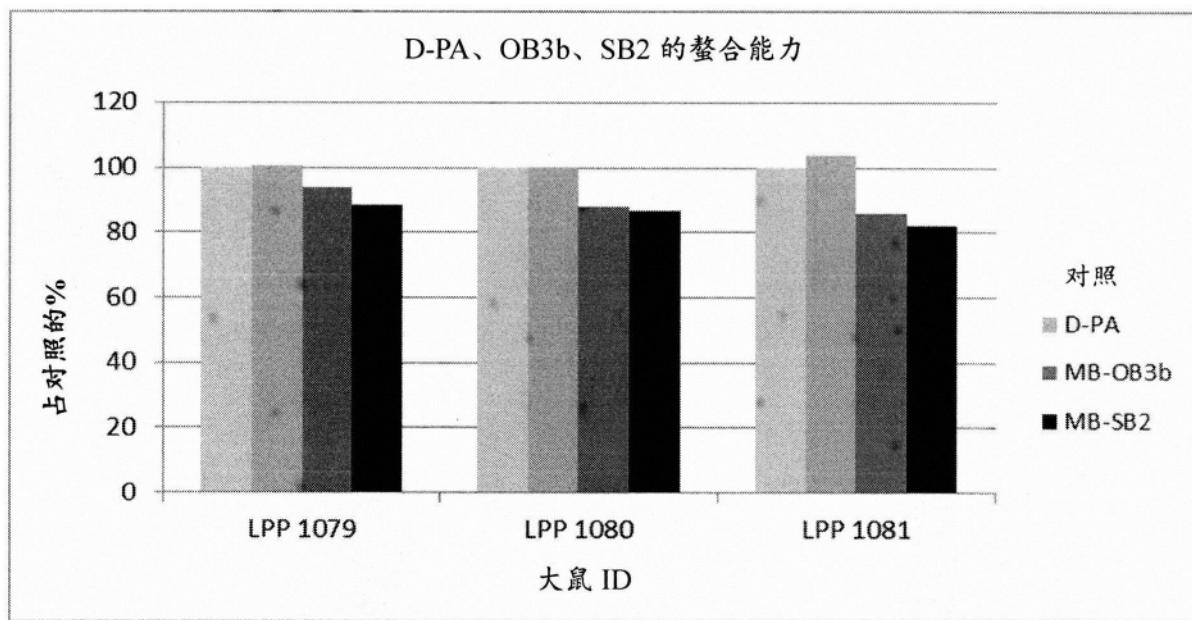


图15