(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101123991 B
(45)授权公告日 2011.03.16

(21)申请号 200580048506.9

(22)申请日 2005.12.21

(30)优先权数据
04030415.6 2004.12.22 EP

(85)PCT申请进入国家阶段日
2007.08.21

(86)PCT申请的申请数据
PCT/EP2005/013756 2005.12.21

(87)PCT申请的公布数据
WO2006/066891 EN 2006.06.29

(73)专利权人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司
地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 B·阿姆雷因 S·福瑟尔 K·朗 F·梅茨格 J·雷古拉 A·肖布马尔 F·赫西 K-P·金克勒 M·兰岑多费尔

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
代理人 黄革生 隗永良

(51)Int.Cl.
A61K 47/48(2006.01)

(56)对比文件
WO 95/32003 A1,1995.11.30, 权利要求 1-21.

US 2004/0014652 A1,2004.01.22, 权利要求 1-23.

WO 94/12219 A2,1994.06.09, 权利要求 1-25.

Tae Hyong Kim et.al.Pegylated recombinant human epidermal growth factor(rhEGF) for sustained release from biodegradable PLGAmicrospheres.Biomaterials23.2002,232311-2317.

R.B. Greenwald.PEG drugs: an overview.Journal of Controlled Release74.2001,74159-171.

E.Carro et.al.Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-β level. Nature Medicine8 12.2002,8(12),1390-1397.

Haeshin Lee and Tae Gwan Park. Preparation and Characterization of Mono-PEGylatedEpidermal Growth Factor:Evaluation of in Vitro BiologicActivity.Pharmaceutical Research196.2002,19(6),845-851.

审查员 李林

权利要求书 2 页 说明书 21 页 序列表 1 页
附图 11 页

(54)发明名称

胰岛素样生长因子-1(IGF-I)和聚乙二醇的缀合物

(57)摘要

公开了由胰岛素样生长因子-1(IGF-I)变体和一个或两个聚乙二醇基组成的缀合物,其特征在于所述的IGF-I变体具有野生型IGF-I氨基酸序列27、37、65、68位的至多三个氨基酸位置上的氨基酸改变,使得所述的氨基酸中的一个或两个为赖氨酸且第27位氨基酸为极性氨基酸,但不是赖氨酸,所述的IGF-I变体通过所述的赖氨酸的伯氨基缀合并且所述的聚乙二醇基具有20-100kDa的总分子量。该缀合物用于治疗神经变性病症,如阿尔茨海默病。

CN 101123991 B

1. 由胰岛素样生长因子 -I 变体和聚乙二醇组成的缀合物，其特征在于所述的胰岛素样生长因子 -I 变体为第 27、37、65 位氨基酸为精氨酸，第 68 位氨基酸为赖氨酸的 RRRK，或第 27、37、68 位氨基酸为精氨酸，第 65 位氨基酸为赖氨酸的 RRKR，并且所述的聚乙二醇与所述 RRKR 通过 65 位赖氨酸的伯氨基共价结合，或所述的聚乙二醇与所述 RRRK 通过 68 位赖氨酸和 / 或 N- 末端氨基酸的伯氨基共价结合。

2. 权利要求 1 的缀合物，其特征在于所述的聚乙二醇具有 20-100kDa 的总分子量。

3. 权利要求 1 的缀合物，其特征在于在胰岛素样生长因子 -I 变体中至多三个 N- 末端氨基酸被截去。

4. 权利要求 1 的缀合物，其特征在于聚乙二醇为支化聚乙二醇。

5. 权利要求 4 的缀合物，其特征在于聚乙二醇具有 20kDa-100kDa 的总分子量。

6. 胰岛素样生长因子 -I 变体，其为第 27、37、65 位氨基酸为精氨酸，第 68 位氨基酸为赖氨酸的 RRRK，或第 27、37、68 位氨基酸为精氨酸，第 65 位氨基酸为赖氨酸的 RRKR。

7. 权利要求 6 的胰岛素样生长因子 -I 变体作为生产权利要求 1 中的聚乙二醇化胰岛素样生长因子 -I 变体的中间体的用途。

8. 制备包含胰岛素样生长因子 -I 变体和一个聚乙二醇的缀合物的方法，所述的聚乙二醇具有约 20 至约 100kDa 的总分子量，该方法包括使权利要求 6 的胰岛素样生长因子 -I 中间体与活化的聚乙二醇在一定条件下反应，所述的条件使得所述聚乙二醇通过化学方式与所述 RRKR 通过 65 位赖氨酸的伯氨基共价结合，或所述的聚乙二醇与所述 RRRK 通过 68 位的赖氨酸伯氨基共价结合。

9. 权利要求 8 的方法，其特征在于所述聚乙二醇另外通过化学方式与所述的 RRRK 经 RRRK 的 N- 末端氨基共价结合。

10. 药物组合物，其包含权利要求 1-5 中任一项的缀合物和可药用载体。

11. 权利要求 1-5 中任一项的缀合物在制备治疗阿尔茨海默病的药物中的用途。

12. 赖氨酸 - 聚乙二醇化胰岛素样生长因子 -I 变体与 N- 末端聚乙二醇化胰岛素样生长因子 -I 变体的组合物，所述的聚乙二醇化胰岛素样生长因子 -I 变体为第 27、37、65 位氨基酸为精氨酸，第 68 位氨基酸为赖氨酸的 RRRK，或第 27、37、68 位氨基酸为精氨酸，第 65 位氨基酸为赖氨酸的 RRKR，并且所述的聚乙二醇与所述 RRKR 通过 65 位赖氨酸的伯氨基共价结合，或所述的聚乙二醇与所述 RRRK 通过 68 位的赖氨酸和 / 或 N- 末端氨基酸的伯氨基共价结合。

13. 药物组合物，其包含赖氨酸 - 聚乙二醇化胰岛素样生长因子 -I 变体、N- 末端聚乙二醇化胰岛素样生长因子 -I 变体和可药用载体，所述的聚乙二醇化胰岛素样生长因子 -I 变体为第 27、37、65 位氨基酸为精氨酸，第 68 位氨基酸为赖氨酸的 RRRK，或第 27、37、68 位氨基酸为精氨酸，第 65 位氨基酸为赖氨酸的 RRKR，并且所述的聚乙二醇与所述 RRKR 通过 65 位赖氨酸的伯氨基共价结合，或所述的聚乙二醇与所述 RRRK 通过 68 位赖氨酸和 / 或 N- 末端氨基酸的伯氨基共价结合。

14. 赖氨酸 - 聚乙二醇化胰岛素样生长因子 -I 变体与 N- 末端聚乙二醇化胰岛素样生长因子 -I 变体的组合物在制备治疗阿尔茨海默病的药物中的用途，所述的聚乙二醇化胰岛素样生长因子 -I 变体为第 27、37、65 位氨基酸为精氨酸，第 68 位氨基酸为赖氨酸的 RRRK，或第 27、37、68 位氨基酸为精氨酸，第 65 位氨基酸为赖氨酸的 RRKR，并且所述的聚乙

二醇与所述 RRKR 通过 65 位赖氨酸的伯氨基共价结合，或所述的聚乙二醇与所述 RRRK 通过 68 位赖氨酸和 / 或 N- 末端氨基酸的伯氨基共价结合。

胰岛素样生长因子 -1(IGF-1) 和聚乙二醇的缀合物

[0001] 本发明涉及胰岛素样生长因子 -I(IGF-I) 与聚乙二醇 (PEG) 的缀合物,包含这类缀合物的药物组合物和生产和使用这类缀合物的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 阿尔茨海默病 (AD) 为日益增加的神经变性的普遍形式,其在 65 岁以上年龄的全部痴呆病例中约占 50% -60%。据估计它目前影响全世界 1500 万人,并且由于在人群中老龄化人口的相对增加,所以其患病率可能在接下来的 20 年到 30 年内增加。AD 是一种进行性病症,其中从临床症状发作到死亡之间的平均期限约有 8.5 年。与高级精神功能相关的大脑区域中的锥体神经元死亡和神经元突触丧失产生了典型症状,其特征在于认知功能的严重和进行性受损 (Francis, P.T. 等人, J.Neurol.Neurosurg:Psychiatry66(1999)137-147)。AD 在世界中为老年性和早老性痴呆的最常见形式并且在临床上被视为残酷的进行性痴呆,与之共同存在的情况是记忆、智力功能丧失和语言障碍增加 (Merritt, A Textbook of Neurology, 第 6 版, Lea&Febiger, 费城, 第 484-489 页, 1979)。从神经病理学上讲, AD 的主要标志在于存在两种特征性损害 :淀粉状老年蛋白斑和神经纤维缠结 (NFT)。尽管所述的斑沉积在神经元外,但是在死亡后的大脑中的神经元内部观察到了缠结。淀粉状蛋白斑核心中的主要成分之一为病理性沉积的小淀粉状蛋白 -β- 肽 (Aβ),其被来自淀粉状蛋白前体蛋白 (APP) 的分泌酶裂解 (Selkoe, D.J., Physiol.Rev.81(2001)741-766 ;Hardy, J., 和 Selkoe, D.J., Science297(2002)353-356 ; Bush, A.I., 和 Tanzi, R.E., Proc.Natl.Acad.Sci.USA99(2002)7317-7319)。39-43 个残基的自聚集肽 Aβ (MW ～ 4kDa) 作为较大 APP(110-120kDa) 的一部分合成。APP 为具有大的 N- 末端胞外结构域、单一跨膜结构域和短胞质尾的 I 型膜整合糖蛋白。Aβ 区跨 APP 的胞外和跨膜结构域部分。APP 参与 AD 中神经元细胞死亡的最常见推断为淀粉状蛋白假说。这一假说推断淀粉状蛋白沉积或部分聚集的可溶性 Aβ 引起神经毒性级联,由此产生与 AD 病理学相似的神经变性 (Selkoe, D.J., Physiol.Rev.81(2001)741-766 ;Hardy, J., 和 Selkoe, D.J., Science 297(2002)353-356)。

[0004] 胰岛素样生长因子 I(IGF-I) 为在结构上与胰岛素相关的循环激素。传统上认为 IGF-I 是生长激素对外周组织起作用的主要介体。IGF-I 由 70 个氨基酸组成并且也称作生长调节素 C 且定义为 SwissProt No.P01343。用途、活性和产生在下列文献中提及 :例如, le Bouc, Y. 等人, FEBS Lett.196(1986)108-112 ;de Pagter-Holthuizen, P. 等 人, FEBS Lett.195(1986)179-184 ;Sandberg Nordqvist, A.C. 等 人, Brain Res.Mol.Brain Res.12(1992)275-277 ;Steenbergh, P.H. 等人, Biochem.Biophys.Res.Commun.175(1991)507-514 ;Tanner, J.M. 等 人, Acta Endocrinol.(Copenh.)84(1977)681-696 ;Uthne, K. 等 人, J.Clin.Endocrinol.Metab.39(1974)548-554 ;EP0 123 228 ;EP 0 128 733 ;US 5,861,373 ;US 5,714,460 ;EP 0 597 033 ;WO02/32449 ;WO 93/02695。

[0005] IGF-I 功能的调节是十分复杂的。在循环中,仅 0.2% 的 IGF-I 以游离形式存在,而大部分与 IGF- 结合蛋白 (IGFBP) 结合,它们对 IGF 具有极高的亲和力并且调节 IGF-I 功

能。该因子可以通过释放 IGF-I 的机制，诸如蛋白酶对 IGFBP 的蛋白水解局部释放。

[0006] IGF-I 在发育和成熟大脑中起旁分泌作用 (Werther，G.A. 等人，Mol. Endocrinol.4(1990)773-778)。体外研究表明 IGF-I 为 CNS 中几种类型神经元的有效的非选择性营养剂 (Knusel，B. 等人，J.Neurosci.10(1990)558-570 ;Svrzic，D.，和 Schubert，D.，Biochem.Biophys.Res.Commun.172(1990)54-60)，包括多巴胺能神经元 (Knusel，B. 等人，J.Neurosci.10(1990)558-570) 和少突胶质细胞 (McMorris，F.A.，和 Dubois-Dalcq，M.，J.Neurosci.Res.21(1988)199-209 ;McMorris，F.A. 等 人，Proc. Natl.Acad.Sci.USA 83(1986)822-826 ;Mozell，R.L.， 和 McMorris，F.A.，J.Neurosci. Res.30(1991)382-390))。US 5,093,317 中提及了胆碱能神经元细胞的存活通过施用 IGF-I 得到提高。进一步已知 IGF-I 刺激外周神经再生 (Kanje，M. 等人，Brain Res.486(1989)396-398) 并且提高鸟氨酸脱羧酶活性 (US5,093,317)。US 5,861,373 和 WO 93/02695 中提及了治疗中枢神经系统损伤或疾病的方法，这主要通过增加 IGF-I 和 / 或其类似物在患者中枢神经系统中的活性浓度来影响神经胶质和 / 或非胆碱能神经元细胞。WO0232449 涉及减轻或预防哺乳动物中枢神经系统中局部缺血性损伤的方法，这通过向哺乳动物鼻腔施用包含治疗有效量的 IGF-I 或其生物活性变体的药物组合物来进行。有效减轻或预防与局部缺血事件相关局部缺血性损伤的量的 IGF-I 或其变体通过哺乳动物的鼻腔吸收并且被转运入中枢神经系统。EP0874641 请求保护 IGF-I 或 IGF-II 在制备用于治疗或预防中枢神经系统中的神经元损伤的药物中的用途，所述的神经元损伤是因为 AIDS- 相关痴呆、AD、帕金森病、皮克病、亨廷顿舞蹈病、肝性脑病、皮质 - 基底神经节综合征、进行性痴呆、具有痉挛性截瘫的家族性痴呆、进行性核上麻痹、多发性硬化、Schilder 脑硬化或急性坏死性出血性脑脊髓炎引起的，其中所述的药物为用于在血脑屏障或血 - 脊髓屏障外部以有效量肠胃外施用所述 IGF 的形式。

[0007] 游离 IGF-I 的脑和血清水平的下降与 AD 的散发和家族形式的发病机制相关。此外，IGF-I 防止神经元受到 Aβ- 诱导的神经毒性的影响 (Niikura，T. 等人，J.Neurosci.21(2001)1902-1910 ;Dore，S. 等 人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94(1997)4772-4777 ;Dore，S. 等 人，Ann.NY Acad.Sci.890(1999)356-364)。 近来，经证实外周施用 IGF-I 能够降低大鼠和小鼠脑 Aβ 水平 (Carro，E. 等人，Nat. Med.8(2002)1390-1397)。此外，研究证实在转基因 AD 小鼠模型中，延长的 IGF-I 治疗显著减少了脑淀粉状蛋白斑的堆积。这些数据强烈支持了 IGF-I 能够通过从大脑中清除 Aβ 降低脑 Aβ 水平和减轻与斑相关的脑痴呆的观点。

[0008] 蛋白质与聚乙二醇 (PEG) 的共价修饰证实是延长蛋白质的体内循环半衰期的有用方法 (Hershfield，M.S. 等人，N.Engl.J.Med.316(1987) 589-596 ;Meyers，F.J. 等人，Clin.Pharmacol.Ther.49(1991)307-313 ;Delgado，C 等人，Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst.9(1992)249-304 ;Katre，Advanced Drug Delivery Systems 10(1993)91 ;EP-A 0 400 472 ;Monfardini，C 等 人，Bioconjugate Chem.6(1995)62-69 ;Satake-Ishikawa，R. 等 人，CellStruct.Funct.17(1992)157-160 ;Katre，N.V. 等 人，Proc.Natl.Acad. Sci.USA 84(1987)1487-1491 ;Tsutsumi，Y. 等 人，Jpn.J.Cancer Res.85(1994)9-12 ; Inoue，H. 等人，J.Lab.Clin.Med.124(1994)529-536 ;Chamow，S.M. 等人，Bioconjugate Chem.5(1994)133-140)。

[0009] 聚乙二醇化的其它优点在于溶解度增加和蛋白质免疫原性下降 (Katre, N.V., J.Immunol.144(1990)209-213)。用于蛋白质聚乙二醇化的常用方法为使用氨基反应性试剂如N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化的聚乙二醇。使用这类试剂使聚乙二醇与蛋白质在游离伯氨基,诸如N-末端 α-氨基和赖氨酸残基的 ε-氨基上连接。然而,这种手段的主要局限在于蛋白质一般包含大量的赖氨酸残基且由此聚乙二醇基以非特异性方式与蛋白质在所有游离 ε-氨基上连接,从而产生随机聚乙二醇化蛋白质的异源产物混合物。因此,许多NHS-聚乙二醇化蛋白质因低特异性活性而不适合于商业化应用。失活是因生物活性所需的一个或多个赖氨酸残基或N-末端氨基残基的共价修饰或蛋白质活性位点附近或位点上的聚乙二醇残基的共价连接所致。例如,发现使用NHS-聚乙二醇化试剂修饰人生长激素将蛋白质的活性降低了10-倍以上 (Clark,R. 等人,J.Biol.Chem.271(1996)21969-21977)。人生长激素包含9个赖氨酸与N-末端氨基酸。这些赖氨酸中的某些位于已知对受体结合而言关键的蛋白质区内 (Cunningham,B.C. 等人,Science 254(1991)821-825)。此外,通过使用氨基反应性聚乙二醇试剂修饰红细胞生成素也导致生物活性接近完全丧失 (Wojchowski, D.M. 等人,Biochim.Biophys.Acta 910(1987)224-232)。使用氨基反应性聚乙二醇化试剂共价修饰干扰素-α2 导致生物活性丧失40-75% (美国专利US 5,382,657)。对G-CSF的类似修饰导致活性丧失60%以上 (Tanaka, H. 等人, Cancer Res.51(1991)3710-3714) 且对白细胞介素-2的类似修饰导致生物活性丧失90%以上 (Goodson,R.J.,和Katre,N.V., BioTechnology 8(1990)343-346)。

[0010] WO 94/12219和WO 95/32003中请求保护包含PEG和IGF或半胱氨酸突变的IGF的聚乙二醇缀合物,所述的PEG与所述的突变蛋白在突变蛋白的N-末端区的游离半胱氨酸上连接。WO 2004/60300中描述了N-末端聚乙二醇化的IGF-I。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明包含IGF-I变体,其特征在于在野生型IGF-I氨基酸序列的27,37,65和/或68位氨基酸上具有氨基酸改变,使得37、65、68位氨基酸中的一个或多个为赖氨酸 (K) 且第27位氨基酸为极性氨基酸,但不是赖氨酸。

[0013] 优选第27位氨基酸为精氨酸。

[0014] 这类IGF-I变体用作生产赖氨酸-聚乙二醇化IGF-I的中间体 (IGF-I中间体)。

[0015] 令人意外地发现赖氨酸-聚乙二醇化IGF-I变体 (氨基反应性聚乙二醇化IGF-I变体),优选20kDa-100kDa的聚乙二醇化IGF-I变体且尤其优选单聚乙二醇化IGF-I变体在治疗应用方面具有优良特性。

[0016] 本发明的另一个实施方案为本发明赖氨酸-聚乙二醇化IGF-I变体和N-末端聚乙二醇化的IGF-I变体组合物。优选分子比为9 : 1-1 : 9。另外优选一种组合物,其中该摩尔比至少为1 : 1(每一份N-末端聚乙二醇化IGF-I变体中有至少1份赖氨酸-聚乙二醇化IGF-I变体),优选至少6 : 4(每4份N-末端聚乙二醇化IGF-I变体中有至少6份赖氨酸-聚乙二醇化IGF-I变体)。优选赖氨酸-聚乙二醇化IGF-I变体和N-末端聚乙二醇化IGF-I变体均为单聚乙二醇化的。优选在该组合物中,在赖氨酸-聚乙二醇化IGF-I变体和N-末端聚乙二醇化IGF-I变体中所述变体是相同的。变体优选地选自RRKK、RRKR、RRRK、RKRR。PEG优选具有的平均分子量为30-45kDa,尤其是30kDa或40kDa。赖氨酸-聚乙二醇化IGF-I变体和N-末端聚乙二醇化IGF-I变体在IGF结合蛋白 (例如BP4和BP5)

的结合方面表现出相差无几的亲和力，但在 IGF-IR 磷酸化方面表现出活性不同。

[0017] 本发明提供了由 IGF-I 变体（IGF-I 缀合物或缀合物）和聚乙二醇基组成的缀合物，其特征在于所述的 IGF-I 变体在野生型 IGF-I 氨基酸序列的 27、37、65 和 / 或 68 位氨基酸上具有氨基酸改变，使得 37、65、68 位氨基酸中的一个或多为赖氨酸 (K)，第 27 位氨基酸为极性氨基酸，但不是赖氨酸，并且所述的 PEG 与所述的 IGF-I 变体通过伯氨基，优选通过赖氨酸的伯氨基缀合。

[0018] 优选聚乙二醇基具有的总分子量至少为 20kDa，更优选约 20-100kDa 并且尤其优选 20-80kDa。

[0019] 聚乙二醇基与 IGF-I 变体通过赖氨酸的伯氨基在 37、65、68 位氨基酸中的一个或多个氨基酸上缀合（氨基反应性聚乙二醇化）并且任选在 N- 末端氨基酸上聚乙二醇化。缀合物优选在 37、65、68 位氨基酸的一个或多个赖氨酸残基上单聚乙二醇化或二聚乙二醇化并且任选在 N- 末端氨基酸上聚乙二醇化。进一步优选所述的缀合物在 K65、K68 或 K37 上单聚乙二醇化或在 K65 和 K68 上二聚乙二醇化并且任选在 N- 末端氨基酸上聚乙二醇化。优选不超过 20％的聚乙二醇化 IGF-I 变体另外在 N- 末端聚乙二醇化。

[0020] 如下命名 IGF-I 变体 :K65 意指第 65 位氨基酸为赖氨酸，R27 意指第 27 位氨基酸为精氨酸等。带有氨基酸 R27、K37、K65、K68 的 IGF-I 变体命名为 RKKK。IGF-I 野生型命名为 KRKK。

[0021] 尤其优选的 IGF-I 变体和缀合物中的变体为 :RRKK、RRKR、RRRK、RKRR。

[0022] 另外优选本发明的（聚乙二醇化）IGF-I 变体为这样的一种变体，其中在 N- 末端上的至多三个（优选所有三个）氨基酸被截去。相应的野生型突变体称作 Des(1-3)-IGF-I 并且缺乏来自 N- 末端的氨基酸残基 gly、pro 和 glu(Kummer,A. 等人，Int. J. Exp. Diabesity Res. 4(2003)45-57)。

[0023] 聚乙二醇基为线性或支化的。

[0024] 本发明进一步包含使用 IGF-I 中间体制备本发明缀合物的方法。该方法包括制备包含 IGF-I 变体和一个或两个聚乙二醇基的缀合物，所述的聚乙二醇基优选具有的总分子量至少为 20kDa，更优选约 20-100kDa 并且 尤其优选 20-80kDa，该方法通过使 IGF-I 中间体与活化的聚乙二醇在一定条件下反应来进行，所述的条件使得所述聚乙二醇通过化学方式与所述的 IGF-I 中间体经 IGF-I 变体的赖氨酸伯氨基结合。

[0025] 本发明进一步包含药物组合物，其包含本发明的缀合物，优选包含本发明的缀合物与可药用载体。

[0026] 本发明进一步包含生产包含本发明缀合物的药物组合物的方法。

[0027] 本发明进一步包含本发明缀合物在制备用于治疗 AD 的药物中的用途。

[0028] 本发明进一步包含治疗 AD 的方法，其特征在于向有这类治疗需要的患者施用药物有效量的氨基反应性聚乙二醇化 IGF-I 变体，优选每周施用 1-2 次。

[0029] 发明详述

[0030] 本文所用的" 聚乙二醇化 IGF-I 变体" 或" 氨基反应性聚乙二醇化" 意指 IGF-I 变体与一个或两个聚乙二醇基通过 IGF-I 变体分子的一个或两个赖氨酸发生氨基反应性偶联而共价结合。PEG 基连接在 IGF-I 变体分子的赖氨酸侧链的伯 ε - 氨基位点上。另外可能的情况是，聚乙二醇化还发生在 N- 末端 α - 氨基上。因合成方法和所用的变体，聚乙

二醇化 IGF-I 变体可以由具有或不具有 N- 末端聚乙二醇化的、在 K65、K68 和 / 或 K37 上聚乙二醇化 IGF-I 变体的混合物组成，由此聚乙二醇化位点在不同分子上可以不同或在每个分子的聚乙二醇侧链的量和 / 或分子的聚乙二醇化位点方面基本上为均一的。优选 IGF-I 变体为单聚乙二醇化和 / 或二聚乙二醇化的并且尤其是从 N- 末端聚乙二醇化 IGF-I 变体纯化的。

[0031] 本文所用的氨基反应性聚乙二醇化指的是通过使用反应性（活化的）聚乙二醇，优选使用 N- 羟基琥珀酰亚胺基酯类，优选甲氧基聚乙二醇使聚乙二醇链与 IGF-I 变体的赖氨酸伯氨基随机连接的方法。该偶联反应使聚乙二醇与 IGF-I 的赖氨酸残基的反应性伯 ε - 氨基和任选的 IGF-I 的 N- 末端氨基酸的 α - 氨基连接。PEG 与蛋白质的这类氨基缀合为本领域众所周知的。 例如，这类方法的综述由 Veronese，F.M.，Biomaterials 22(2001)405-417 提供。按照 Veronese 所述，可以通过使用对伯氨基进行烷基化的活化的 PEG 进行 PEG 与蛋白质伯氨基的缀合。为了进行这类反应，可以使用活化烷基化 PEG，例如 PEG 醛，PEG- 三氟代乙烷磺酰氯或 PEG 环氧化物。另外有用的试剂为酰化 PEG，诸如羧化 PEG 的羟基琥珀酰亚胺基酯类或末端羟基被氯甲酸酯类或羰基咪唑活化的 PEG。另外有用的 PEG 试剂为具有氨基酸臂的 PEG。这类试剂可以包含所谓的支化 PEG，由此至少 2 个相同或不同的 PEG 分子通过肽间隔基（优选赖氨酸）彼此连接，并且例如与作为赖氨酸间隔基的活化羧酸酯的 IGF-I 变体结合。单 -N- 末端偶联还描述于 Kinstler，O. 等的 Adv.Drug Deliv.Rev.54(2002)477-485 中。

[0032] 本文所用的" PEG 或聚乙二醇 " 意指商购或可以按照本领域众所周知的方法通过对乙二醇进行开环聚合制备的水溶性聚合物 (Kodera，Y. 等人，Progress in Polymer Science 23(1998)1233-1271 ;Francis，G.E. 等人，Int.J.Hematol.68(1998)1-18)。术语 " PEG" 广泛用于包括任意的聚乙二醇分子，其中乙二醇单元的数量至少为 460，优选 460-2300 且尤其优选 460-1840(230 个 PEG 单元折合分子量约为 10kDa)。PEG 单元的上限值仅受缀合物的溶解度限制。通常不使用大于包含 2300 个单元的 PEG 的 PEG。优选本发明中所用的 PEG 一端为羟基或甲氧基（甲氧基 PEG，mPEG）并且在另一端上通过醚氧键与接头部分共价连接。聚合物为线性或支化的。支化 PEG 例如描述于 Veronese，F.M. 等人，Journal of Bioactive 和 Compatible Polymers12(1997)196-207 中。有用的 PEG 试剂例如购自 NektarTherapeutics(www.nektar.com)。

[0033] 可以实际需要任意分子量的 PEG，例如，约 20 千道尔顿 (Da)-100kDa(n 为 460-2300)。对以道尔顿描述的分子量而言，在 PEG 中重复单元的数量 " n" 为近似的。例如，如果两个 PEG 分子与接头连接，其中每个 PEG 分子具有 10kDa(n 各自约为 230) 的相同分子量，那么接头上 PEG 的总分子量约为 20kDa。与接头连接的 PEG 的分子量也可以不同，例如，在接头上的两个分子中，一个 PEG 分子可以为 5kDa 并且一个 PEG 分子可以为 15kDa。分子量始终意指平均分子量。

[0034] 在下文的实施例中，描述了用于生产氨基反应性聚乙二醇化 IGF-I 变体的某些优选试剂。应理解，例如基于 Veronese,F.M.,Biomaterials22(2001)405417 所述方法的修饰可以在操作步骤中进行，只要该方法可以产生本发明的缀合物即可。

[0035] 在靶蛋白中存在至多三个可能的反应性伯氨基（至多两个赖氨酸和一个末端氨基酸）产生了一系列聚乙二醇化 IGF-I 变体异构体，它们在聚乙二醇链的连接点上不同。

[0036] 本发明提供了具有改进的特性的 IGF-I 变体的聚乙二醇化形式。这类聚乙二醇化 IGF-I 变体缀合物包含与之随机连接的线性或支化的一个或两个 PEG 基，由此缀合物中所有 PEG 基团的总分子量优选约 20-80kDa。本领域技术人员显而易见来自这一分子量范围的小的衍生形式是可能的，只要该聚乙二醇化 IGF-I 变体在降低大脑中 Aβ 肽水平方面表现出活性即可。此外，使用具有大于 80kDa 的分子量的 PEG 使 IGF-I 变体聚乙二醇化产生了较高的生物利用度。然而，预计这类活性随分子量的增加而降低，这是因 IGF-I 受体活化和血脑屏障转运减少所致。因此，必须将 20-100kDa 的 PEG 分子量范围理解为用于有效治疗 AD 患者的 PEG 和 IGF-I 变体的缀合物的最佳范围。

[0037] 本文所用的" 分子量" 意指 PEG 的平均分子量。

[0038] 下列 IGF-I 变体的聚乙二醇化形式为考虑的本发明缀合物的实施方案：

[0039] -单聚乙二醇化 IGF-I 变体，其中 PEG 基具有 20-80kDa 的分子量 (460-1840 个 PEG 单元）；

[0040] -二聚乙二醇化 IGF-I 变体，其中每一 PEG 基具有约 10-50kDa 的分子量 (230-1150 个 PEG 单元）；

[0041] 及其混合物。

[0042] 尤其优选选自 RRKK、RRKR、RRRK 和 RKRR 的单聚乙二醇化 IGF-I，其中支化 PEG 基具有 30-45，优选 40-45kDa 的分子量（约 920 个 PEG 单元）。例如，基于 PEG 的 44kDa 的平均分子量和 IGF-I 的 7.6kDa 的分子量，这类单 PEG-IGF-I 的计算平均分子量约为 51.6kDa。另外优选单聚乙二醇化 IGF-I，其选自 RRKK、RRKR、RRRK 和 RKRR，其中 PEG 具有 30 或 40kDa 的平均分子量。

[0043] 本发明的" PEG 或 PEG 基" 意指包含聚乙二醇作为必需部分的残基。这类 PEG 可以包含对结合反应而言必不可少的额外化学基团；其因分子的化学合成而产生；或为用于分子部分彼此之间最佳间隔的间隔基。此外，这类 PEG 可以由一个或多个彼此连接的 PEG 侧链组成。带有一个以上 PEG 链的 PEG 基称作多臂或支化 PEG。例如，可以通过将聚环氧乙烷添加到各种多元醇，包括甘油、季戊四醇和山梨醇上而制备支化 PEG。例如，可以由季戊四醇和环氧乙烷制备四臂支化 PEG。支化 PEG 通常带有 2-8 个臂并且描述于例如 EP-A 0 473 084 和美国专利 US 5,932,462 中。尤其优选带有两个通过赖氨酸伯氨基连接的 PEG 侧链 (PEG2) 的 PEG(Monfardini，C 等人，Bioconjugate Chem.6(1995)62-69)。

[0044] 本文所用的" 基本上均一的" 意指产生、包含或使用的聚乙二醇化 IGF-I 变体分子仅为那些带有一个或两个所连接 PEG 基的分子。该制品可以包含少量未反应的（即缺乏 PEG 基）蛋白质。正如根据肽作图和 N- 末端测序确定的，下文的一个实例提供了至少 90％ PEG-IGF-I 变体缀合物和至多 5％未反应蛋白质的制品。可以通过常用的纯化方法，优选大小排阻色谱法对聚乙二醇化 IGF-I 变体的这类均一制品进行分离和纯化。

[0045] 本文所用的" 单聚乙二醇化" 意指 IGF-I 变体为每个 IGF-I 变体分子仅在一个赖氨酸上聚乙二醇化，由此仅一个 PEG 基在该位点上共价联机。这类单聚乙二醇化 IGF-I 可以在一定程度上在 N- 末端上额外聚乙二醇化。纯的单聚乙二醇化 IGF-I 变体（没有 N- 末端聚乙二醇化）占制品的至少 80％，优选 90％，并且最优选单聚乙二醇化 IGF-I 变体占制品的 92％或 92％以上，剩余部分为例如未反应的（未聚乙二醇化）IGF-I 和 / 或 N- 末端聚乙二醇化 IGF-I 变体。因此，本发明的单聚乙二醇化 IGF-I 变体制品的均一性足以展示出

均一性制品的优点，例如，在药物应用中。这同样应用于二聚乙二醇化分子。

[0046] ″活化的 PEG 或活化的 PEG 试剂″为本领域当前水平众所周知的。优选使用亲电子活化的 PEG，诸如聚乙二醇的烷氧基丁酸琥珀酰亚胺基酯类（″低级烷氧基 -PEG-SBA″）或聚乙二醇的烷氧基丙酸琥珀酰亚胺基酯类（″低级烷氧基 -PEG-SPA″）或 N- 羟基琥珀酰亚胺活化的 PEG。可以使用使活化的酯与胺反应而形成酰胺的任意常规方法。在活化的 PEG 与 IGF-I 的反应中，典型的琥珀酰亚胺基酯为导致酰胺形成的离去基。琥珀酰亚胺基酯类在生产带有蛋白质的缀合物中的用途公开在美国专利 US 5,672,662 中。

[0047] 所用的反应条件对不同聚乙二醇化 IGF-I 变体的相对量具有影响。通过控制反应条件（例如试剂之比、pH、温度、蛋白质浓度、反应时间等），不同聚乙二醇化分子的相对量可以改变。优选反应在 pH 8-10 的包含 5-15％ (v/v) 乙醇和 0.5-4％ (v/v) 乙二醇的缓冲水溶液中进行。如果产生单聚乙二醇化变体，则蛋白质：PEG 之比优选为 1 ：0.5-1 ：2，并且如果产生二聚乙二醇化变体，则蛋白质：PEG 之比优选为 1 ：2.2-1 ：5。可以根据本领域技术人员的知识改变反应温度和反应时间，由此高温和长反应时间导致聚乙二醇化增加。如果产生单聚乙二醇化变体，那么由此优选在 4℃下进行至多 30 分钟。当将聚乙二醇化试剂与 IGF-I 变体在由 50mM 硼酸钠、10％乙醇和 1％二（乙二醇）(DEG) 组成 pH 约 9.0 的反应缓冲液中以 1 ：1.5 的蛋白质：PEG 之比混合时，并且反应温度从 4℃开始，产生单聚乙二醇化分子、二聚乙二醇化分子和微量三聚乙二醇化分子的混合物。当蛋白质：PEG 之比约为 1 ：3 时，主要产生二聚乙二醇化和寡聚乙二醇化分子。

[0048] 本发明的 IGF-I 变体缀合物如下制备：通过使 IGF-I 变体的赖氨酸伯氨基与双官能试剂共价反应而形成带有酰胺键的中间体并且使含有酰胺键的该中间体与活化的聚乙二醇衍生物共价反应而形成 IGF-I 变体缀合物。在上述方法中，所述的双官能试剂优选为 N- 琥珀酰亚胺基 -S- 乙酰基硫代丙酸酯或 N- 琥珀酰亚胺基 -S- 乙酰基硫代乙酸酯，并且活化的聚乙二醇衍生物优选地选自碘 - 乙酰基 - 甲氧基 -PEG、甲氧基 -PEG- 乙烯基砜和甲氧基 -PEG- 马来酰亚胺。

[0049] 尤其优选使用分子量为 40kDa 的 N- 羟基琥珀酰亚胺基活化的支化 PEG 酯 (mPEG2-NHS)(Monfardini，C 等人，Bioconjugate Chem.6(1995)62-69；Veronese，F.M. 等人，J.Bioactive Compatible Polymers 12(1997)197-207；美国专利 US 5,932,462)。

[0050] 可以通过巯基与 IGF-I 变体进行氨基反应性共价连接（″活化″）并且使所得到的活化的 IGF-I 变体与聚乙二醇 (PEG) 衍生物偶联制备 IGF-I 变体缀合物。第一步包含通过 IGF-I 变体赖氨酸 NH_2- 基共价连接的巯基。使用携带被保护的巯基和额外的反应基的双官能试剂对 IGF-I 变体进行这种活化，分别诸如活性酯类（例如琥珀酰亚胺基酯）、酸酐类、磺酸酯类、羧酸和磺酸卤化物。用本领域公知的基团，例如乙酰基保护巯基。这些双官能试剂能够通过形成酰胺键与赖氨酸的 ε - 氨基反应。所述双官能试剂的制备为本领域公知的。双官能 NHS 酯类的前体描述于 DE 39 24 705 中，而对乙酰巯基化合物的衍生描述于 March，J.，Advanced OrganicChemistry(1977)375-376 中。双官能试剂 SATA 为商购的 (MolecularProbes，Eugene，OR，USA 和 Pierce，Rockford，IL) 并且描述于 Duncan，R.J.，Anal.Biochem.132(1983)68-73 中。

[0051] 例如，反应在 pH 6.5-8.0 的缓冲水溶液，例如，在 10mM 磷酸钾，300mM NaCl，pH 7.3 中进行。可以将双官能试剂加入到 DMSO 中。在反应完成后，优选在 30 分钟后，

通过添加赖氨酸终止反应。可以通过本领域公知的方法，例如通过透析或柱过滤分离过量的双官能试剂。可以通过例如 Grasetti，D.R，. 和 Murray，J.F.，Arch.Biochem. Biophys.119(1967)41-49 中所述的光度测定法测定加入到 IGF-I 变体上的巯基的平均数量。上述反应后共价偶联活化的聚乙二醇 (PEG) 衍生物。

[0052] 活化的 PEG 衍生物为本领域公知的并且就 PEG- 乙烯基砜而言描述于例如 Morpurgo，M. 等人，J.Bioconjugate Chem.7(1996)363-368 中。直链和支化 PEG 分子均适合于制备式 I 的化合物。反应性 PEG 试剂的实例为碘 - 乙酰基 - 甲氧基 -PEG 和甲氧基 -PEG- 乙烯基砜。这些碘活化的物质的用途为本领域中公知的并且描述于例如 Hermanson，G.T.，BioconjugateTechniques，Academic Press，San Diego(1996)pp.147-148 中。

[0053] 本发明化合物的进一步纯化，包括单聚乙二醇化和 / 或二聚乙二醇化 IGF-I 变体的分离且优选从 N- 末端聚乙二醇化形式中的分离可以通过本领域公知的方法进行，例如，柱色谱法，优选离子交换色谱法，尤其是阳离子交换色谱法。

[0054] 单 PEG 缀合物的百分比以及单 PEG 和二 PEG 分子之比可以通过混合洗脱峰周围的较宽范的级分而减少组合物中单 PEG 的百分比或混合较窄的级分而增加组合物中单 PEG 百分比来控制。约 90％的单 PEG 缀合物在产率和活性间达良好平衡。有时，例如，至少 95％或至少 98％的缀合物为单 PEG 分子的组合物可能是理想的。在本发明的一个实施方案中，单聚乙二醇化缀合物的百分比为 90％ -98％。

[0055] 本文所用的" 极性氨基酸" 意指选自半胱氨酸 (C)、天冬氨酸 (D)、谷氨酸 (E)、组氨酸 (H)、天冬酰胺 (N)、谷氨酰胺 (Q)、精氨酸 (R)、丝氨酸 (S) 和苏氨酸 (T) 的氨基酸。赖氨酸也为极性氨基酸，但不包括在内，因为按照本发明赖氨酸被取代。精氨酸优选用作极性氨基酸。

[0056] 药物制剂

[0057] 本发明的聚乙二醇化 IGF-I 提供了改善的循环稳定性，从而能够在整个体内在低施用间隔持续接近 IGF-I 受体。

[0058] 可以将聚乙二醇化 IGF-I 变体作为混合物或作为离子交换色谱法或大小排阻色谱法分离的不同聚乙二醇化种类施用。可以按照用于制备本领域技术人员公知的药物组合物的方法配制本发明的化合物。为了生产这类组合物，可以将本发明的聚乙二醇化 IGF-I 变体与可药用载体混合，优选通过对含有药物组合物所需组分的水溶液透析来进行。例如，这类可接受的载体描述于 Remington′ s Pharmaceutical Sciences，18th edition，1990，Mack Publishing Company，Oslo 等编辑（例如 1435-1712 页）中。典型组合物包含有效量的本发明物质，例如约 0.1-100mg/ml，与适量的载体。可以通过肠胃外施用该组合物。优选通过腹膜内、皮下、静脉内或鼻内施用本发明的聚乙二醇化 IGF-I。

[0059] 可以按照本领域公知的方法制备本发明的药物制剂。通常将聚乙二醇化 IGF-I 变体的溶液对指定用于药物组合物的缓冲液透析并且通过浓缩或稀释调整所需的最终蛋白质浓度。

[0060] 这类药物组合物可以用于注射或输注施用，优选通过腹膜内、皮下、静脉内或鼻内施用，并且包含有效量的聚乙二醇化 IGF-I 变体与可药用稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和 / 或载体。这类组合物包括各种缓冲内含物的稀释剂（例如精氨酸、乙酸盐、磷酸盐）；pH 和离子强度剂；添加剂，诸如去污剂和增溶剂（例如 Tween™ 80/ 聚山梨醇酯、

pluronic™ F68）；抗氧化剂（例如抗坏血酸、偏亚硫酸氢钠）；防腐剂（Timersol™、苄醇）和填充物质（例如蔗糖、甘露糖醇）；将所述物质掺入聚合物化合物，诸如聚乳酸、聚乙醇酸等微粒制品或掺入脂质体。这类组合物可以影响本发明单聚乙二醇化 IGF-I 释放和清除的物理状态稳定率。

[0061] 剂量和药物浓度

[0062] 一般而言，在标准治疗方案中，在一定时间期限内使用 0.001-3mg、优选 0.01-3mg 聚乙二醇化 IGF-I 变体 /kg/ 天范围的剂量治疗患者，持续 1 天至约 30 天乃至 30 天以上。将药物作为单一每日皮下或静脉内或腹膜内快速弹丸注射或输注包含 0.1-100mg 聚乙二醇化 IGF-I/ml 的药物制剂施用。将这种治疗方法与任意标准（例如化疗）治疗联用，通过在所述的标准治疗之前、治疗过程中或治疗之后施用聚乙二醇化 IGF-I 来进行。这导致与单一标准治疗相比效果改善。

[0063] 发现每周仅施用 1 或 2 次本发明的聚乙二醇化 IGF-I 可以进行成功治疗。本发明的另一个实施方案由此为治疗阿尔茨海默病的方法，包括向有此需要的患者施用治疗有效量的本发明聚乙二醇化 IGF-I，一次剂量范围为每 kg 和每 3-8 天、优选每 7 天 0.001-3mg、优选 0.01-3mg 的聚乙二醇化 IGF-I 变体。当使用聚乙二醇化 IGF-I 时，优选地，单聚乙二醇化 IGF-I 优选作为本发明赖氨酸 - 聚乙二醇化 IGF-I 变体与 N- 末端聚乙二醇化 IGF-I 变体（其中摩尔比至少为 1 ： 1）的组合物使用。

[0064] 本发明的另一个实施方案为本发明的聚乙二醇化 IGF-I 在制备治疗阿尔茨海默病的药物中的用途，所述治疗为向有此需要的患者施用治疗有效量的和 1 或 2 个剂量，其范围为每 kg 和每 6-8 天、优选每 7 天 0.001-3mg、优选 0.01-3mg 的聚乙二醇化 IGF-I 变体。当使用聚乙二醇化 IGF-I 时，优选地，单聚乙二醇化 IGF-I 优选作为本发明赖氨酸 - 聚乙二醇化 IGF-I 变体与 N- 末端聚乙二醇化 IGF-I 变体（其中摩尔比至少为 1 ： 1）的组合物使用。

[0065] 提供下列实施例、参考文献和附图有助于理解本发明，其确切的范围如后附权利要求中所述。应理解可以在不脱离本发明精神的情况下对所述操作步骤进行修改。

[0066] 序列表

[0067] SEQ ID NO：1 为人 IGF-I 的氨基酸序列（SwissProt P01343，氨基酸 1-70：IGF-I；氨基酸 71-105：前肽）。

[0068] 附图简述

[0069] 图 1：PEG-IGF 的 IEC-HPLC。使用制备型强阳离子交换柱（TOSOH-BIOSEP，SP-5PW）从聚乙二醇化混合物中分离纯的位置异构体。分离 5 个不同的峰级分（编号 0-4）并且处理以便进一步分析。

[0070] 图 2：单 PEG-IGF-I 峰的 SDS-PAGE 分析。通过 4-12％ Tris- 甘氨酸 SDS-PAGE 在非还原（A）和还原（B）条件下对 5 个纯化的峰级分（编号 0-4）进行电泳并且使用考马斯蓝对凝胶中的蛋白质染色。MW，分子量标记。

[0071] 图 3：单聚乙二醇化 IGF-I 峰 1，2 和 3 的肽分析。使用 Asp-N 消化纯化的单聚乙二醇化峰 1，2 和 3 并且通过 HPLC 分离肽级分。通过如所述的 Edman N- 末端肽降解获得聚乙二醇化片段的肽序列。A：HPLC 分析在 30-45 分钟保留时间时产生 rhIGF-I 肽的 6 个不同片段并且聚乙二醇化峰的主要片段 7（和最小的片段 7′）在～ 70 分钟保留时间时达到峰

值。箭头表示与 rhIGF-I 相比不同峰中肽片段的主要相对改变。B :获自 rhIGF-I 的 Asp-N 裂解的 6 个片段的肽序列。用黑体字标记赖氨酸 (K) 并且在片段 3 和 4 中出 现。片段 5 例示了 N- 末端肽。C :Edman 降解后聚乙二醇化肽片段 7 的肽序列。半胱氨酸和聚乙二醇化赖氨酸残基递送该肽序列中的片段。

[0072] 图 4 :来自 IGF-I 和单聚乙二醇化异构体的不同总体表达谱的 AD 的分级簇类分析。IGF-I 和聚乙二醇化变体的孵育时间为 24 小时 ;使用小鼠细胞系 NIH-3T3。数据分析条件描述于文中。(A) 下调的基因簇。(B) 上调的基因簇。

[0073] 图 5 :IGF-IR 通过 rhIGF-I 和单 PEG-IGF-I 的磷酸化。使人 IGF-IR 稳定转染的 NIH3T3 细胞血清饥饿过夜并且与增加剂量 (0.01-10 μ g/ml) 的 rhIGF-I 或单 PEG-IGF-I 异构体 (峰 1、2、3、峰混合物、Des(1-3) 峰 3) 一起孵育 30 分钟。随后处理细胞以便进行方法中所述的蛋白质印迹或细胞中的分析。得到分别使用 rhIGF-I(A)、峰 1(B)、峰 2(C)、峰 3(D)、峰混合物 (E) 和 Des(1-3) 峰 3(F) 的剂量响应曲线。将磷酸化信号对各孔中的 IGF-IR 水平归一化。数据点表示来自 3 次独立培养的 6 个测定值的平均值 ±SEM。

[0074] 图 6 :NIH-3T3 细胞中 IGF-IR 磷酸化的定量分析。使用单点结合动力学拟合获自实施例 7 中实验的剂量响应曲线,以便获得特异性结合 (B_{Max})、半数最大结合浓度 (EC_{50}) 和希尔系数 (n_H)。数据表示来自 3 次独立培养的 6 个测定值的平均值 ±SEM。

[0075] 图 7 :rhIGF-I 体内降低 PS2APP 小鼠中脑 Aβ 。用 rhIGF-I(50 μ g/kg 腹腔注射) 将 2-3 月龄的双重转基因 PS2AAP 小鼠 (n = 10) 处理 2 小时。制备皮质提取物并且如方法中所述评价 APP、C99、Aβ 和对照蛋白质 (清蛋白) 水平。从对清蛋白归一化的值计算 C99/APP、Aβ /APP 和 C99/Aβ 比值并且表示为占未处理对照的 % 并且表示为平均值 ±SEM。A :2 月龄皮质提取物的代表性蛋白质印迹。注意通过 rhIGF-I 处理 Aβ 水平明显下降,而其它水平未改变。B :来自 PS2APP 小鼠皮质提取物的定量分析 (**,与未处理对照相比 $p < 0.01$)。

[0076] 图 8 :rhlGF-I 体内降低 PS2APP 小鼠中 Aβ 的时程。用 rhIGF-I(50 μ g/kg 腹腔注射) 将 2 月龄小鼠处理 2、6 或 24 小时。随后评估 Aβ /APP 和 C99/Aβ 水平并且如所述计算比例。将数据表示为占未处理对照的 % 并 且表示为平均值 ±SEM。(n = 10-13)。A :注射后 2、6 和 24 小时时 Aβ /APP 比值 ;B :注射后 2、6 和 24 小时时 C99/Aβ 比值 (**,与未处理对照相比 $p < 0.01$)。

[0077] 图 9 :峰 1-3 体内降低 AAP 和 PS2APP 小鼠中 Aβ 。在单一转基因 APP 和双重转基因 PS2APP 小鼠的混合群体中进行实验。峰 1、2 和 3 的 Aβ /APP 和 C99/Aβ 比值共同显示了其对 Aβ 降低和清除的相对作用的直接比较 (n = 8-10)。A :Aβ /APP 比值表示峰 1-3 对脑 Aβ 积累的作用。B :峰 1-3 的 C99/Aβ 比值表示 Aβ 从脑中的清除 (*, $p < 0.05$;**, $p < 0.01$;***, $p < 0.001$,与未处理对照相比)。

[0078] 图 10 :峰 3 体内降低 AAP 和 PS2APP 小鼠中 Aβ 的时程。用峰 3(50 μ g/kg 腹腔注射) 将 2 月龄 APP 和 PS2APP 小鼠的混合群体处理 2、6、24、48 或 72 小时。随后评估 APP, C99,Aβ 和肌动蛋白水平并且如所述计算比例。将数据表示为占未处理对照的 % 并且表示为平均值 ±SEM。(n = 10-15)。A :注射后 6、24 和 48 小时时 Aβ /APP ;B :注射后 6、24 和 48 小时时 C99/Aβ 比值 (*, $p < 0.05$;**, $p < 0.01$;***, $p < 0.001$,均与未处理对照相比)。

[0079] 图 11 :峰 1-3 体内降低 PS2APP 小鼠中的 Aβ 。峰 1、2 和 3 的 Aβ /APP 比值共同

显示了其对 Aβ 降低和清除的相对作用的直接比较 (n = 3-13) ;*,与未处理对照相比 p < 0.05)。

[0080] 图 12 :峰 3 体内降低 PS2APP 小鼠中 Aβ 的时程。用峰 3 的单一注射 (50μg/kg 腹腔注射) 将 2 月龄 PS2APP 小鼠处理 2、6、24、48 或 72 小时。随后如所述计算 Aβ /APP 比值。将数据表示为占未处理对照的 % 并且表示为平均值 ±SEM(n = 4-13 ;*,p < 0.05 ;**, p < 0.01,与未处理对照相比)。

[0081] 实施例

[0082] 材料和方法

[0083] 重组人胰岛素样生长因子 (rhIGF-I) 通过 Cell Concepts(Umkirch, Germany) 购自 PeproTech(Rocky Hill, NJ, USA) 并且 Des(1-3)-IGF-I 获自 GroPep(Adelaide, Australia)。聚乙二醇 (PEG) 试剂来自 Nektar Ltd.(SanCarlos,CA,USA)。用于本研究的所有其它化学品和溶剂具有可获得的最高纯度。可以根据本领域当前水平通过重组方式生产 IGF-I 变体,例如通过使用位点定向诱变与优选例如在 US 6,509,443 或 US 6,403,764 中所述在大肠杆菌 (E.coli) 中的表达方法的组合。

[0084] IGF-I 的聚乙二醇化

[0085] 产生在单一位点上具有聚乙二醇化的 IGF-I(单 PEG-IGF-I)。通过使赖氨酸 ε - 氨基在 IGF-I 分子表面或 N- 末端上与 40kDa 分子量的活化支化 PEG 部分缀合制备单 PEG-IGF-I。聚乙二醇化反应混合物包含在 50mM 硼酸钠缓冲液 (10 % 乙醇和 1 % DEG), pH 9.0 中的 1 ∶ 1.5 摩尔比的 rhIGF-I 和 40kDa PEG-NHS。使该反应在 4℃下进行 30 分钟。基于所用 PEG 部分的 44kDa 平均分子量和 IGF-I 的 7.6kDa 分子量,预计计算的单 PEG-IGF-I 的平均分子量约为 51.6kDa。

[0086] 通过离子交换色谱法分离 PEG-IGF-I 位置异构体

[0087] 使用制备型强阳离子交换柱 (TOSOH-BIOSEP, SP-5PW,内径 30mm 和长 75mm) 的纯化方案制备纯的单 PEG-IGF-I 同种型。缓冲系统由调整至 pH 4.5 的 7.5mM 乙酸钠、10 % 乙醇和 1 % 二甘醇 (缓冲液 A) 和调整至 pH 6.5 的 20mM 磷酸钾、10 % 乙醇和 1 % 二甘醇 (缓冲液 B) 组成。

[0088] 用 25 % 缓冲液 B 将该柱预平衡。在加载 PEG-IGF-I 样品后,用 35 % 缓冲液 B 洗涤该柱,随后使线性梯度上升至 65 % 缓冲液 B 以便分离异构体。为了洗脱未聚乙二醇化 IGF-I, 将系统切换至具有 pH.8.0 的改变的缓冲液 B。流速为 8ml/ 分钟并且在 218nm 处进行检测。手工收集所得蛋白质样品并且等分储存在 -20℃下以便通过各种蛋白质化学和生物分析法进行分析 (参见下文)。

[0089] 使用分析型强阳离子交换柱 (TOSOH-BIOSEP, SP-NPR, 颗粒大小 2.5μm, 直径 4.6mm, 长 3.5cm) 研究分离的位置异构体的纯度。就这种 分析柱而言,我们使用了与制备型分析柱相同的流动相,但流速和运行时间下降。通过分光光度法,基于单 PEG-IGF-I 蛋白质部分的 280nm 吸收 ($E^{1mg/ml}_{280}$ = 0.584) 测定单 PEG-IGF-I 异构体的蛋白质浓度。

[0090] 单 PEG-IGF-I 纯度的分析

[0091] 通过 4-12 % Tris- 甘氨酸 SDS-PAGE 在非还原或还原条件下分析各单 PEG-IGF-I 异构体。固定蛋白质并且使用 Simple Blue SaveStain(Invitrogen,Basel,Switzerland) 染色。

[0092] 单 PEG-IGF-I 异构体的质谱鉴定

[0093] 使用 Asp-N 裂解纯化的单 PEG-IGF 异构体以便鉴定 N- 末端、K27、K65 或 K68 上 4 个可能的聚乙二醇化位点。裂解缓冲液由 100mM Tris/HClpH 8.0 与 0.04μg/μl Asp-N(Roche Diagnostics GmbH,DE) 组成。在裂解缓冲液中,将 20μg 单 PEG-IGF 在 37℃下与 1μg Asp-N 一起孵育 16 小时。16 小时后,通过添加 TCEP(10mM) 在 37℃下反应 1.5 小时还原该反应混合物。随后通过添加 1/20 体积的 10% TFA 使反应溶液终止以便完成裂解反应。通过联机 HPLC ESI 质谱、HPLC 直接分析获得的肽混合物或储存在 -80℃下。

[0094] 为了进行 ESI-LC-MS 分析,在配备有 Phenomenex Jupiter C18 反相柱 (1×250mm, 5μm, **300 Å**) 的 Agilent 1100 HPLC 系统上分离肽混合物,其中流速为 40μl/ 分钟。另外在 220nm 处读取 UV 信号。使 Q-ToF II 或 LCT 质谱仪 (Micromass) 与 HPLC 系统直接偶联。在 200-2000m/z 质量范围内以 1 次扫描 / 秒记录 ESI-ToF 光谱。评价 UV 和 TIC 光谱并且可以在色谱图中对每一肽指定一个单峰。

[0095] 为了进行 HPLC 分析,在配备有 Phenomenex Jupiter C18 反相柱 (1×250mm,5μm, **300 Å**) 的 Agilent 1100 HPLC 系统上分离肽混合物,其中流速为 40μl/ 分钟。另外在 220nm 处读取 UV 信号。在保留时间内 PEG 肽类向较高乙腈浓度移位并且手动收集它们且对其进行 N- 末端 Edman 降 解。

[0096] HPLC 试验条件 (溶剂 A :0.1%的水中的 TFA ;溶剂 B :0.1%的乙腈中的 TFA) 如表 1 中所示 :

[0097] 表 1. 梯度

[0098]

时间	% B
0	0
10	0
30	20
60	28
70	48
80	100
85	100
86	0
96	0

[0099] 在带有 procise 系统控制软件的 Applied Biosystems ProteinsequencerProcise 492 上并根据制造商的说明进行 N- 末端 Edman 降解测序。将自 HPLC 收集的 20μl 级分直接应用于 BioBrene Plus™ conditioned microTFA 滤器。在滤筒密封垫密封的氩气环境中将滤器干燥并且导入蛋白质测序仪。使用自动化标准程序对多肽进行序列降解。使用 Applied Biosystems 数据评估软件 610A 对来自每一降解循环的 HPLC 色谱图进行分析揭示出了每一氨基酸的位置。半胱氨酸以及修饰的氨基酸,如聚乙二醇化赖氨酸作为色谱图中的缺口出现。

[0100] 寡核苷酸阵列转录分析

[0101] 为了对不同单 PEG-IGF-I 异构体进行体外转录谱分析,使 IGF-IR 稳定转染的 NIH-3T3 细胞血清饥饿 2 小时并且在 24 小时内无血清存在下与 0.1 或 1μg/ml rhIGF 和

1μg/ml 相应单 PEG-IGF-I 异构体或所获得的未分 离异构体混合物一起孵育。随后收集培养的细胞并且用 RNA-BeeTM 提取总细胞 RNA。将每一样品中的 10μg RNA 逆转录、标记并且使用商品试剂盒并按照供应商的说明 (Invitrogen, Basel, Switzerland ;Ambion, Huntingdon,UK) 处理。用于碱性热片段化的方法和用于 MOE 430AGeneChip 阵列的杂交条件为制造商提供的标准操作步骤 (Affymetrix,US)。

[0102] 使用共焦激光扫描器记录阵列的荧光 (细胞强度) 并且使用 MAS 5.0 软件 (Affymetrix,US) 分析数据。将各基因的表达水平计算为与错配寡核苷酸杂交相比荧光强度的归一化的平均差 (表示为平均差 (AD))。每次实验均按照一式三份进行以便解释生物变异性。

[0103] 选择下面的两个标准用于选择差异表达的基因 :i) 处理细胞的 mRNA 水平值必须至少高于未处理的细胞 5 倍或低于其 5 倍 ;ii) 标准偏差必须显著小于平均差的绝对改变并且将计算的基因的置信水平设定在大于 97% (p < 0.03)。

[0104] IGF-IR 磷酸化测定

[0105] 将使用人 IGF-IR 稳定转染的第 2-4 代之间的 NIH-3T3 细胞用于这些实验。将细胞在未包被的 24- 孔或 96- 孔平板中培养并且使其生长至 70%汇合。随后将细胞血清饥饿过夜,然后与 rhIGF-I 或相应的 PEG-IGF-I 峰 (或峰混合物) 一起孵育 30 分钟。然后在 Laemmli 缓冲液中裂解细胞以便进行蛋白质印迹或用 4%多聚甲醛固定 30 分钟以便进行细胞内 IGF-IR 磷酸化分析。为了进行蛋白质印迹分析,通过 10% Bis-Tris SDS-PAGE 分离蛋白质提取物并且印迹在硝化纤维膜上。将印迹与小鼠抗磷酸酪氨酸 (4G10,1 : 1000 ; Upstate) 和兔抗 IGF-IR(C-20,1 : 1000 ;Santa Cruz) 一级抗体共孵育并且用抗小鼠 Alexa680(1 : 10000 ;Molecular Probes) 和抗兔 IRDye800 二级抗体 (1 : 10000 ; Jackson) 标记。为了进行细胞内分析,封闭固定的细胞并且用 2%山羊血清和 Triton X-100(0.1%) 透化处理且与相同的初级和二级抗体一起孵育。使用 Odyssey 成像系统 (Licor Biosciences) 对 蛋白质带进行荧光检测。从数字图像中对蛋白质带的像素强度进行定量并且使用 GraphPad Prism 软件分析剂量响应曲线。使用获自所关注的相同区的 IGF-IR 值归一化磷酸酪氨酸水平以便获得实时 IGF-IR 活化改变。一式两份进行实验并且重复 3 次以便获得每一剂量的 6 个独立研究结果。将数据表示为平均值 ±SEM。

[0106] 使用 rhIGF-I 和 PEG-IGF-I 异构体的体内实验

[0107] 将由单一转基因 AAP 和双重转基因 PS2AAP 小鼠组成的阿尔茨海默病小鼠模型 (Richards, J.G. 等人, J.Neurosci.23(2003)8989-9003) 用于研究 rhIGF-I(和单 PEG-IGF-I) 对大脑淀粉样变性病的作用,近期已经在其它小鼠和大鼠模型中证实了该大脑淀粉样变性病 (Carro, E. 等人, Nat.Med.8(2002)1390-1397)。已经证实在 2 个月时 PS2APP 小鼠模型发生具有可测定 Aβ 水平的淀粉样变性病并且在 8 月龄时斑块沉积发作 (Richards, J.G. 等人, J.Neurosci.23(2003)8989-9003)。单一转基因 APP 小鼠在其幼龄时表现出极为相似的 Aβ 水平且因此包括在该组中。我们分析了前斑块龄 (2-3 个月) 以便研究 rhIGF-I 和 PEG-IGF-I 异构体对可溶性大脑 Aβ 水平的作用。所有实验均按照 Swiss 动物保护权利进行并且将对动物的损害保持在最低水平。由在含有 10%甘油的 1mM HCl(rhIGF-I) 或 PBS 中的储备溶液 (单 PEG-IGF-I 异构体) 制备在溶剂低于 1%的 0.9% NaCl 中的注射溶液。给对照组注射 0.9% NaCl。注射在轻度异氟烷麻醉下腹腔注射进行。

在注射后不同时间点（2、6、24、48 或 72 小时）时在异氟烷麻醉下处死动物。将小鼠断头并且取出大脑用于分离端脑（包括海马的皮质）。在低渗裂解缓冲液中制备皮质蛋白质提取物，所述的缓冲液包含 4mM Tris pH 7.4 和 320mM 蔗糖（均来自 Fluka）与蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物（均来自 Sigma）。样品缓冲液为包含 8M 脲的 Laemmli(Fluka)。通过 4-12% Bis-TrisSDS-PAGE 分离蛋白质并且印迹在硝化纤维膜上。将印迹与检测 APP 的小鼠抗淀粉状前体蛋白 (APP) 抗体 (WO-2 克隆，1 ： 5000 ;The GeneticsCompany)、C99 片段和 Aβ 和山羊抗肌动蛋白抗体 (C-11，1 ： 5000 ;Santa Cruz) 一级抗体共孵育并且用抗小鼠 Alexa680(1 ： 10000 ;Molecular Probes) 和抗山羊 IRDye800 二级抗体 (1 ： 10000 ; Jackson) 标记。使用 Odyssey 成像系统 (Licor Biosciences) 对蛋白质带进行荧光检测。使用 GraphPad Prism 软件从数字图像中分析对蛋白质带的像素强度。将数据表示为平均值 ±SEM。

[0108] 将所有值对肌动蛋白（或清蛋白作为对照蛋白）归一化并且计算具体比值 (C99/APP、Aβ/APP、C99/Aβ)。C99/APP 比值给出了有关 β- 分泌酶和 γ- 分泌酶的活性状态的信息，因为 C99 为 β- 分泌酶的产物和 γ- 分泌酶的底物；在这一测定值中的改变可以指示着对这些不依赖于 Aβ 晚期命运的分泌酶之一的调节作用。由于在特定治疗后 C99/APP 水平恒定，所以 C99/Aβ 比值可以监测不依赖于其产生的 Aβ 的清除率，即随清除率增加而升高并且随其降低而降低。此外，将 Aβ 对 APP 归一化，因为其产生依赖于在个体小鼠之间改变的转基因 APP 表达。对每一个体动物进行比值计算。将所有获得的数据以占包括在每次实验中的未治疗的对照的%表示。将每种剂量 / 时间间隔使用 2-5 只动物的个体实验重复 2-4 次。根据平均值 ±SEM，通过未配对 t 检验评价统计学差异，其中将 $p < 0.05$ 视为具有统计学意义。

[0109] 实施例 1

[0110] 单 PEG-IGF-I 位置异构体的色谱分离

[0111] IGF-I 包含作为潜在聚乙二醇化位点的 4 个氨基并且预计有 4 种可能的单聚乙二醇化 IGF-I（单 PEG-IGF-I）异构体。根据反应条件的不同预计其它的衍生物被寡聚乙二醇化。研发强阳离子高压液相色谱法 (IEC-HPLC) 用于基于其局部电荷差异分离 PEG-IGF-I 或 Des(1-3)-IGF-I 异构体。5mgPEG-IGF-I 的制备型洗脱分布图如图 1 中所示。该方法的结果可分离成 5 个主要的峰，3 个峰具有基线分离并且 2 个峰具有部分分离。基线吸收降至色谱图的末端提示无在较高保留时间时洗脱的额外单聚乙二醇化 IGF-I 分子。因切换至具有不同 pH 的改进缓冲液 B 而在峰 3 与 4 之间出现额外 的峰。用分析型 IEC-HPLC 估计各异构体的纯度和 IEC 级分中其它位置异构体的污染。所有单聚乙二醇化峰具有的纯度＞ 99%。

[0112] 实施例 2

[0113] 单 PEG-IGF-I 异构体的 SDS-PAGE 分析

[0114] 在非还原和还原条件下进行 SDS-PAGE 以便评估不同 IGF-I 分子通过分子间二硫键的潜在的不必要的交联。两种条件均产生类似的结果，这表明无大量蛋白质异常交联（图 2）。SDS-PAGE 分析显示峰 0 具有的表观分子量＞ 100kDa 而主要检测带为在～ 70kDa 的峰 1-3；另外，在～ 70kDa 处检测到峰 4，这是预计的未聚乙二醇化 IGF-I 的大小（图 2）。我们根据 HPLC 中获得的这一运行分布图和保留时间推断峰 0 最可能由二 PEG-IGF-I 和寡

PEG-IGF-I 组成。相反，将峰 1-3 命名为 3 种不同的单 PEG-IGF-I 异构体。在对单 PEG-IGF-I 预计的分子量 (51.6kDa) 与～ 70kDa 的表观大小之间存在偏差 ；然而，观察到的较高表观分子量可以解释为因使 PEG-IGF-I 的电泳运动相当缓慢的水结合和表观分子量增加导致的较大的 PEG 流体力学体积 (Foser，S. 等人，Pharmacogenomic J.3(2003)319)。IEC-HPLC 和 SDS-PAGE 实验共同表明，可以认为 IEC 级分的纯度对进一步表征而言是足够纯的。

[0115] 与 rhIGF-I 相对比对单 PEG-Des(1-3)-IGF-I 进行聚乙二醇化和分离并且类似地产生 3 个主要的单 PEG-Des(1-3)-IGF-I 峰。

[0116] 实施例 3

[0117] 单 PEG-IGF-I 异构体的分析

[0118] 使用 HPLC 在 30-45 分钟保留时间分离 Asp-N 裂解 rhIGF-I 的 6 个独立肽片段 (图 3A，上组)。在裂解纯化的峰 1-3(图 3A，下组) 后，观察 6 个片段的不同分布和额外片段 (片段 7) 的出现，以便在～ 70 分钟的保留时间时洗脱。就峰 1 而言，特异性肽片段 4 随片段 7 的增加而减小。就峰 2 而言，我们观察到片段 3 明显减小和片段 5 轻度减小以及主要和次要 PEG 片段的 出现 (7 和 7′)。类似地，对峰 3 的 HPLC 分析产生了片段 3 和 5 的明显减小同时伴随着片段 7 和 7′ 的出现。图 11B 表示通过 rhIGF-I 的 Asp-N 裂解获得的相应片段的肽序列。我们使用 Edman N- 末端肽降解分析了使用聚乙二醇化峰 1、2 和 3 获得的主要片段 7 的肽序列。由此半胱氨酸和聚乙二醇化氨基酸递送该肽序列中的片段。使用这种分析可以将峰 1 清楚地对应于在 K27 聚乙二醇化的 rhIGF-I(图 3C)。就峰 2 而言，将主要片段 7(＞ 90％) 对应于在 K65 聚乙二醇化的 rhIGF-I，因为通过 Edman 降解证实 K68 为未修饰的赖氨酸 (K)。相反，峰 3 的级分为在 K68 处的聚乙二醇化 (序列中的缺口)，其中 K65 在 Edman 降解 HPLC 色谱图中产生信号 (图 3C)。无法通过 Edman 降解对次要峰 7′ 测序，表明 N- 末端不易于反应，最可能的是因聚乙二醇化所致。这些数据共同表明峰 1 由 K27 聚乙二醇化异构体组成，峰 2 为在 K65 处聚乙二醇化的 IGF-I 且峰 3 为在 K68 聚乙二醇化且大量 N- 末端聚乙二醇化的 IGF-I。

[0119] 实施例 4

[0120] rhIGF-I 和单 PEG-IGF-I 异构体的转录谱分析

[0121] 我们使用 DNA 微阵列测定了使用 rhIGF-I 或 PEG-IGF-I 异构体处理用人 IGF-IR 稳定转染的 NIH-3T3 细胞 24 小时的转录反应。因此，我们使用 0.1 和 1μg/ml 的 IGF-I 或 1μg/ml 的单 PEG-IGF-I 峰或获自聚乙二醇化反应的峰混合物刺激细胞。我们使用商品芯片类型 (MOE 430A ；Affymetrix Inc.) 比较了使用对照培养物刺激的细胞的总体转录活性，该芯片包含用于约 14,000 种小鼠基因，包括所有已知 IGF-I 应答基因的探针组。将 mRNA 丰度表示为正确匹配的寡核苷酸探针与在中心位置上具有错配的相应探针之间的平均差 (AD)。我们仅考虑在三个同样生物样品中具有改变大于 5 倍并 97％再现性的基因 (p 值＜ 0.03)。该分析产生了总计 162 个基因，86 个被所有 IGF-I 变体上调且 76 个被所有 IGF-I 变体下调。不同单 PEG-IGF-I 异构体的转录活性的一般相关概况解释为图 4 中上调和下调基因的分级簇的形式。检查 0.1μg/ml 和 1.0μg/ml IGF-I 对各基因的诱导水 平显示所选择的簇极为类似。峰 3 在相同浓度下产生了与未聚乙二醇化 IGF-I 类似的表达谱并且比 PEG-IGF 混合物和其它峰更有效。有意义的是，峰 2 引起了与 PEG-IGF 混合物类似的转录反应。与生物活性一致，峰 1 表现出了最弱的转录反应，这表明聚乙二醇化干扰了受

体相互作用。

[0122] 实施例 5 和 6

[0123] rhIGF-I 和单 PEG-IGF-I 导致的体外 IGF-IR 磷酸化

[0124] 为了对 IGF-IR 活化进行体外分析，使用稳定表达人 IGF-IR 的 NIH-3T3 细胞。在血清饥饿过夜后，使用增加剂量的 rhIGF-I 或相应 PEG-IGF-I 异构体 (0.003-10μg/ml) 处理细胞。按照上述进行磷酸化 IGF-IR 的蛋白质印迹分析并且使获得的剂量响应曲线用单点结合动力学拟合，包括希尔系数 (n_H)；结合曲线的定量数据如图 6 中的表中所示。从 rhIGF-I 的剂量响应曲线（图 5A）得到 EC_{50} 为 6.3nM 并且几乎以全或无方式出现，其中 n_H 为 2.27（图 6）。相反，单 PEG-IGF-I 的峰 1 表现出不饱和的明显剂量响应，n_H 为 0.34 且估计的 EC_{50} 为 91.5nM（图 5B，6）。峰 2 和 3（图 5C 和 5D）表现出类似的结合亲和力，其中 EC_{50} 值分别为 13.4 和 21.5nM（图 6）。在两种情况中，n_H 是有规律性的，分别为 1.27 和 1.19。峰混合物表现出类似的 IGF-IR 活化模式，其中亲和力轻度降低，EC_{50} 为 28.8nM 且规律性的 n_H 为 1.28（图 5E，7）。最后，PEG-Des(1-3)-IGF-I 峰 3 具有所有 PEG 异构体中最高的亲和力，其中 EC_{50} 为 10.8nM 且规律性的 n_H 为 1.08（图 5F，7）。该数据表明，除峰 1 外的所有峰均可特异性活化人 IGF-IR，其与 rhIGF-I 相比亲和力丧失 2-5 倍。

[0125] 实施例 7

[0126] rhIGF-I 对 2 月龄 PS2APP 小鼠的体内 Aβ 降低

[0127] 将双重转基因 PS2APP 小鼠用于分析 rhIGF-I 对大脑 Aβ 积累的短期作用。我们使用 50μg/kg rhIGF-I 腹腔注射处理这些小鼠并且在注射后 2 小时分析了皮质 Aβ。图 7A 表示来自 2 月龄小鼠的大脑提取物的蛋白质 印迹。而 APP、C99 和对照蛋白（清蛋白）水平显示未因 rhIGF-I 而改变，在 rhIGF-I 注射后 2 小时 Aβ 水平下降。进行定量分析并且计算相应的像素强度比以便获得有关 rhIGF-I 对 Aβ 产生的潜在作用的信息。这种分析揭示出 APP/ 对照蛋白（对照的 97.5±5.7%）和 C99/APP（对照的 87.2±9.8%）比值未改变，表明在使用 rhIGF-I 处理后 2 小时转基因 APP 表达和 APP 加工均未改变（图 7B）。相反，Aβ/APP 显著降至对照的 68.4±7.1% ($p < 0.01$) 并且 C99/Aβ 增加至对照的 157.9±16.6% ($p < 0.01$)，表明 rhIGF-I 降低了 Aβ。这些数据共同表明，用 rhIGF-I 处理幼小 PS2APP 小鼠 2 小时主要增加了 Aβ 从大脑中的清除率。

[0128] 实施例 8

[0129] rhIGF-I 对 PS2APP 小鼠的体内 Aβ 降低的时程

[0130] 为了评价这种 rhIGF-I 对可溶性大脑 Aβ 的短期作用的时程，通过腹腔注射 50μg/kg rhIGF-I 处理无大脑斑块的幼小的 PS2APP 小鼠（2 月龄）并且在此后 2、6 或 24 小时检测皮质 APP、C99、Aβ 和肌动蛋白水平。APP/ 清蛋白和 C99/APP 比值在任意研究的时间点处均未因 rhIGF-I 而显著改变。在注射后 2 小时观察到了 rhIGF-I 对 Aβ/APP 的降低，而在 6 和 24 小时后这种作用不存在（图 8A）。类似地，仅在 2 小时时可检测到通过 C99/Aβ 比值监测的 Aβ 减少的增加，并且在 6 和 24 小时时消失（图 8B）。这表明 rhIGF-I 对 Aβ 清除率的作用可能因在血流中分离的 IGF-I 的半衰期短而具有短的持续时间。

[0131] 实施例 9

[0132] 峰 1-3 在 2 月龄 APP 和 PS2APP 小鼠的体内 Aβ 清除效率中的对比分析

[0133] 在本实施例中，共同显示了 PEG-IGF-I 峰 1-3 的数据以便对 Aβ 降低和 Aβ 清除的

效率进行直接比较。与 rhIGF-I 类似，APP/ 肌动蛋白（本文将肌动蛋白用作对照蛋白）或 C99/APP 比值未因任何浓度的峰 1、2 或 3 而改变。峰 3 在腹腔注射后 6 小时时在降低 Aβ/APP 方面具有最高的效率（图 9A）。相反，峰 1 在整个测试浓度范围内均无活性并且峰 2 仅在所用的最高浓度（500μg/kg）下对降低 Aβ/APP 发挥了显著作用。类似地，正如图 9B 中所示，峰 3 仅在低剂量（15-50μg/kg）下为在增加 C99/Aβ 比值（作为增加的 Aβ 清除率的代表）方面具有活性的化合物。此外，在该评价中，峰 1 无活性并且峰 2 仅在 500μg/kg 下发挥出显著作用。这些数据共同表明，在该体内实验范例中峰 3 为最具有活性的单 PEG-IGF-I 异构体。图 11 表示了仅双重转基因 PS2APP 小鼠模型中的结果。

[0134] 实施例 10

[0135] 峰 3 对 PS2APP 小鼠的体内 Aβ 降低的时程

[0136] 在腹腔注射后 6 小时，50μg/kg 的峰 3 在降低大脑 Aβ 水平方面发挥显著作用。为了测试这种作用维持多长时间，我们分析了来自用 50μg/kg 峰 3 处理 2、6、24、48 和 72 小时的 PS2APP 小鼠的大脑提取物。在整个时间期限内均未观察到 APP/ 肌动蛋白或 C99/APP 比值的显著改变。相反，在腹腔注射后 6、24 和 48 小时时 Aβ/APP 水平显著下降（分别为 $p < 0.05$、$p < 0.001$ 和 $p < 0.01$），表明峰 3 在至少 48 小时内具有降低 Aβ 的作用（图 10A）。代表 Aβ 清除率不依赖于 Aβ 产生的 C99/Aβ 比值（因为 C99/APP 保持恒定）以极为类似的时程显著增加，在注射后至少 24 小时内得以充分维持（图 10B）。这些数据共同表明峰 3 能够降低 PS2APP 的大脑 Aβ。图 12 表示仅双重转基因 PS2APP 小鼠模型中的结果。

[0137] 实施例 11

[0138] 与 IGF 结合蛋白 IGFBP4(BP4) 和 IGFBP5(BP5) 的结合

[0139] 由 Shimasaki，S.，Mol.Endocrinol.4(1990)1451-1458 鉴定并且克隆了 IGFBP4(SwissProt 22692)。由 Kiefer，M.C.，Biochem.Biophys.Res.Commun.176(1991)219-225 鉴定并且克隆了 IGFBP5(SwissProt 24593)。两种结合蛋白均以重组方式在大肠杆菌中产生。

[0140] 为了对蛋白质相互作用进行表面等离振子共振 (SPR) 分析，使用 Biacore 3000 仪器。试验和反应缓冲液为在 25℃下的 HBS-P(10mMHEPES，150mM NaCl，0.005％聚表面活性剂，ph 7.4)。在 12℃下预冷却所有样品。在 5μg/ml 浓度下使 IGFBP4 和 IGFBP5 进行胺偶联。在 CM5 芯片上的偶联产生～ 700RUs 的负荷信号。以 1.23nM-100nM 间的 5 个浓度注射聚乙二醇化 IGF-I 样品（分析物）5 分钟（结合期）并且以 50μl/ 分钟的流速用 HBS-P 洗涤 5 分钟。通过一次注射 100mM HCl 1 分钟再生芯片表面。

[0141] 芯片、分析方式和注射的序列对应于表 2 中的描述。通过使用 1 ：1Langmuir 结合模型进行数据评价。

[0142] 表 2 ：

[0143]

芯片	配体	分析物	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
CM5	BP4	IGF-1	4.0×10^{6}	7.2×10^{-4}	1.8×10^{-10}
CM5	BP4	40kDa/NT-RRRK	5.4×10^{4}	1.5×10^{-3}	2.8×10^{-8}
CM5	BP4	40kDa/RRRK	7.1×10^{4}	6.8×10^{-4}	9.5×10^{-9}
CM5	BP4	组合物	6.9×10^{4}	5.3×10^{-4}	7.7×10^{-9}
CM5	BP5	IGF-1	9.6×10^{6}	1.6×10^{-3}	1.7×10^{-10}

CM5	BP5	40kDa/NT-RRRK	1.1×10^{5}	2.1×10^{-3}	2.0×10^{-8}
CM5	BP5	40kDa/RRRK	1.5×10^{5}	2.0×10^{-3}	1.3×10^{-8}
CM5	BP5	组合物	1.1×10^{5}	2.5×10^{-3}	2.3×10^{-8}

[0144] 缩写：

[0145] 40kDa：40kDa 支化 PEG

[0146] 40kDa/NT-RRRK：使用 40kDa PEG 在 N- 末端聚乙二醇化的 RRRK

[0147] 40kDa/RRRK：使用 40kDa PEG 在 K68 赖氨酸聚乙二醇化的 RRRK

[0148] 组合物：40kDa/NT-RRRK 和 40kDa/RRRK 的组合物（1 ： 1）

[0149] 这些结果表明所有聚乙二醇化 IGF 样品在类似范围内有效结合 IGFBP4 和 IGFBP5。所有聚乙二醇化样品与未聚乙二醇化 IGF 相比均表 现出显著下降的结合率常数。

[0150] 从样品曲线中扣除阴性对照数据（例如缓冲液曲线）以便校准系统内在基线漂移和信躁下降。

[0151] 实施例 12

[0152] 配体导致的 IGF-IR 自磷酸化

[0153] 为了测定本发明多肽活化 IGF-IR 并且诱导 IGF-IR 磷酸化的能力，用本发明的多肽刺激过表达 IGF-IR 的细胞且随后通过 ELISA 分析 IGF-IR 磷酸化状态。

[0154] 为了进行 ELISA，用 100μl 抗人 IGF-IRα（0.5mg/ml）的单克隆抗体（在含有 3% BSA 的 PBST 中以 1 ： 350 稀释）包被 96- 孔链霉抗生物素包被的聚苯乙烯平板（Nunc）。于室温下在平板振荡器上孵育 1 小时后，除去包被溶液并且用 200μl PBST/ 孔将平板洗涤三次。

[0155] 将 IGF-IR 转染的 NIH-3T3 细胞在补充了 2mM L- 谷氨酰胺（Gibco，目录号 25030-024）和 0.5％热灭活 FCS（PAA，目录号 A15-771）的高葡萄糖 MEM Dulbecco 培养基（DMEM）（PAA，目录号 E15-009）中铺板。为了测定 EC_{50} 值，在 37℃和 5％ CO_2 条件下将使用 1.3×10^{4} 个细胞 / 孔接种的 96 孔平板培养 2 天。

[0156] 在使用低血清培养基培养 48 小时后，谨慎除去培养基并且换成用 50μl 相应培养基稀释的不同浓度的本发明多肽。在 37℃和 5％ CO_2 条件下孵育 10 分钟后，通过抽吸谨慎除去培养基并且每孔添加 120μl 冷裂解缓冲液（50mM Tris pH 7.5，1mM EDTA，1mM EGTA，20％甘油，1％ Triton-X100，100mM NaF，1mM $NaVO_4$，Complete™ 蛋白酶抑制剂）。将平板与裂解缓冲液于 4℃下在平板振荡器上孵育 15 分钟并且此后将 100μl 的孔内含物转入用抗人 IGF-IRα 的单克隆抗体包被的 ELISA 平板上。于室温下在平板振荡器上将裂解物孵育 1 小时以使 IGF-IR 结合俘获抗体并且在此后谨慎抽吸。通过用每次 200μl PBST/ 孔洗涤三次除去未结合的物质。

[0157] 为了检测结合的磷酸化 IGF-IR，将 100μl 抗人 IGF-IRα 的多克隆 IgG 兔抗体（在 3% BSA/PBST 中以 1 ： 12650 稀释）加入到各孔中，随后于室温下在平板振荡器上再孵育 1 小时。再次谨慎除去孔内含物并且用 200μl PBST/ 孔将各孔洗涤三次。为了检测多克隆的兔抗体，将 100μl HRP（CellSignaling Technology Inc.USA）偶联的抗兔 IgG 多克隆抗体（在 3% BSA/PBST 中以 1 ： 6000 稀释）加入到各孔中。于室温下在振荡器上孵育 1 小时后，通过用 200μl PBST/ 孔将平板洗涤 6 次除去未结合的检测抗体。作为用于抗体偶联的 HRP 的底物，将 100μl 的 3,3′ -5,5′ - 四甲基联苯胺加入到各孔中，随后于室

温下在平板振荡器上再孵育 0.5 小时。

[0158] 在用 25μl/ 孔 1M H_2SO_4 反应终止后通过测定在 450nm 波长处的吸收进行定量。

[0159] 以 10nM IGF-I 作为 100％ (max) 并且无 IGF-I 作为 0％ (min) 对照，通过下列公式将获得的样品 OD450 值转化成活化百分比：活化百分比＝ (样品 -min)/(max-min)。将所得到的 EC_{50}(在 IGF-IR 半数最大活化下的多肽浓度) 值概括在表 3 中。

[0160] 表 3

[0161]

样品	EC50[nM]	“STDEV”
K68-RRRK 20kDa 线性	2.1	0.2
NT-RRRK 20kDa 线性	29.6	1.9
组合物 20kDa 线性	7.6	
K68-RRRK 30kDa 线性	4.7	0.9
NT-RRRK 30kDa 线性	44.5	5.0
组合物 30kDa 线性	9.2	1.1
组合物 40kDa 支化	16.4	0.7
K68-RRRK 20kDa 支化	1.5	1.1
组合物 20kDa 支化	5.1	0.5
NT-RRRK 40kDa 支化	19.9	1.1

[0162] 缩写参见实施例 11。

[0163] 参考文献

[0164] Bush, A. I., and Tanzi, R. E., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(2002)7317-7319

[0165] Carro, E., et al., Nat. Med. 8(2002)1390-1397

[0166] Chamow, S. M., et al., Bioconjugate Chem. 5(1994)133-140

[0167] Clark, R., et al., J. Biol. Chem. 271(1996)21969-21977

[0168] Cunningham, B. C., et al., Science 254(1991)821-825

[0169] de Pagter-Holthuizen, P., et al., FEBS Lett. 195(1986)179-184；

[0170] DE 39 24 705

[0171] Delgado, C., et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 9(1992)249-304

[0172] Dore, S., et al., Ann. NY Acad. Sci. 890(1999)356-364

[0173] Dore, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94(1997)4772-4777

[0174] Duncan, R. J., Anal. Biochem. 132(1983)68-73

[0175] EP 0 123 228

[0176] EP 0 128 733

[0177] EP 0 597 033

[0178] EP-A 0 400 472

[0179] EP-A 0 473 084

[0180] Foser, S., et al., Pharmacogenomic J. 3(2003)319

[0181] Francis, G. E., et al., Int. J. Hematol. 68(1998)1-18

[0182] Francis, P. T., et al., J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 66(1999)137-147

[0183] Goodson, R. J., and Katre, N. V., BioTechnology 8(1990)343-346

[0184] Grasetti, D. R,. and Murray, J. F., Arch. Biochem. Biophys. 119(1967)41-49

[0185] Hardy, J., and Selkoe, D. J., Science 297(2002)353-356

[0186] Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego(1996) pp. 147-148

[0187] Hershfield, M. S., et al., N. Engl. J. Med. 316(1987)589-596

[0188] Inoue, H., et al., J. Lab. Clin. Med. 124(1994)529-536

[0189] Kanje, M., et al., Brain Res. 486(1989)396-398

[0190] Katre, Advanced Drug Delivery Systems 10(1993)91

[0191] Katre, N. V., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(1987)1487-1491

[0192] Katre, N. V., J. Immunol. 144(1990)209-213

[0193] Kiefer, M. C., Biochem. Biophys. Res. Commun. 176(1991)219-225

[0194] Kinstler, O., et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 54(2002)477-485

[0195] Knusel, B., et al., J. Neurosci. 10(1990)558-570

[0196] Kodera, Y., et al., Progress in Polymer Science 23(1998)1233-1271

[0197] Kummer, A., et al., Int. J. Exp. Diabesity Res. 4(2003)45-57

[0198] le Bouc, Y., et al., FEBS Lett. 196(1986)108-112;

[0199] March, J., Advanced Organic Chemistry(1977)375-376

[0200] McMorris, F. A., and Dubois-Dalcq, M., J. Neurosci. Res. 21(1988)199-209

[0201] McMorris, F. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83(1986)822-826

[0202] Merritt, A Textbook of Neurology, 6th edition, Lea&Febiger, Philadelphia, pp. 484-489, 1979

[0203] Meyers, F. J., et al., Clin. Pharmacol. Ther. 49(1991)307-313

[0204] Monfardini, C., et al., Bioconjugate Chem. 6(1995)62-69

[0205] Morpurgo, M., et al., J. Bioconjugate Chem. 7(1996)363-368

[0206] Mozell, R. L., and McMorris, F. A., J. Neurosci. Res. 30(1991)382-390

[0207] Niikura, T., et al., J. Neurosci. 21(2001)1902-1910

[0208] Remington ' s Pharmaceutical Sciences, 18th edition, 1990, Mack PublishingCompany, edited by Oslo et al. (e. g. pp. 1435-1712

[0209] Richards, J. G., et al., J. Neurosci. 23(2003)8989-9003

[0210] Sandberg Nordqvist, A. C., et al., Brain Res. Mol. Brain Res. 12(1992)275-277

[0211] Satake-Ishikawa, R., et al., Cell Struct. Funct. 17(1992)157-160

[0212] Selkoe, D. J., Physiol. Rev. 81(2001)741-766

[0213] Shimasaki, S., Mol. Endocrinol. 4(1990)1451-1458

[0214] Steenbergh, P. H., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 175(1991)507-514;

[0215] Svrzic, D., and Schubert, D., Biochem. Biophys. Res. Commun. 172(1990)54-60

[0216] Tanaka, H., et al., Cancer Res. 51(1991)3710-3714

[0217] Tanner, J. M., et al., Acta Endocrinol. (Copenh.)84(1977)681-696

[0218] Tsutsumi, Y., et al., Jpn. J. Cancer Res. 85(1994)9-12

[0219] US 5,093,317

[0220] US 5,672,662

[0221] US 5,714,460

[0222] US 5,861,373

[0223] US 5,932,462

[0224] US 6,403,764

[0225] US 6,509,443

[0226] Uthne,K.,et al.,J.Clin.Endocrinol.Metab.39(1974)548-554

[0227] Veronese,F.M.,Biomaterials 22(2001)405-417

[0228] Veronese,F.M.,et al.,Journal of Bioactive and Compatible Polymers 12(1997)196-207

[0229] Werther,G.A.,et al.,Mol.Endocrinol.4(1990)773-778

[0230] WO 02/32449

[0231] WO 2004/60300

[0232] WO 93/02695

[0233] WO 94/12219

[0234] WO 95/32003

[0235] Wojchowski,D.M.,et al.,Biochim.Biophys.Acta 910(1987)224-232

[0001] 序列表

[0002] <110> 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司 (F.Hoffmann-La Roche AG)

[0003] <120> 胰岛素样生长因子-1(IGF-1)和聚乙二醇的缀合物

[0004] <130>22904

[0005] <150>EP 04030415

[0006] <151>2004-12-22

[0007] <160>1

[0008] <170>PatentIn 版本 3.2

[0009] <210>1

[0010] <211>105

[0011] <212>PRT

[0012] <213> 人 (Homo sapiens)

[0013] <400>1

[0014] Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe

[0015] 1 5 10 15

[0016] Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly

[0017] 20 25 30

[0018] Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys

[0019] 35 40 45

[0020] Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu

[0021] 50 55 60

[0022] Lys Pro Ala Lys Ser Ala Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp

[0023] 65 70 75 80

[0024] Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly

[0025] 85 90 95

[0026] Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg Met

[0027] 100 105

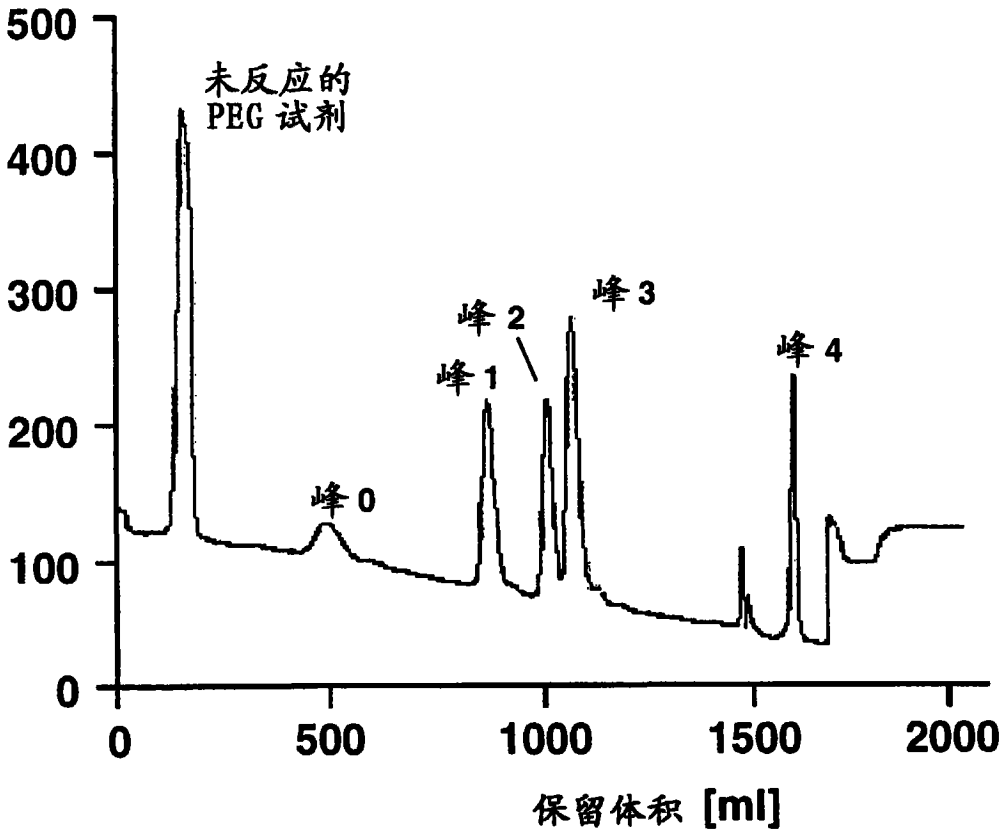

500
400
300
200
100
0
未反应的
PEG 试剂
峰 0
峰 1
峰 2
峰 3
峰 4
0
500
1000
1500
2000
保留体积 [ml]

图 1

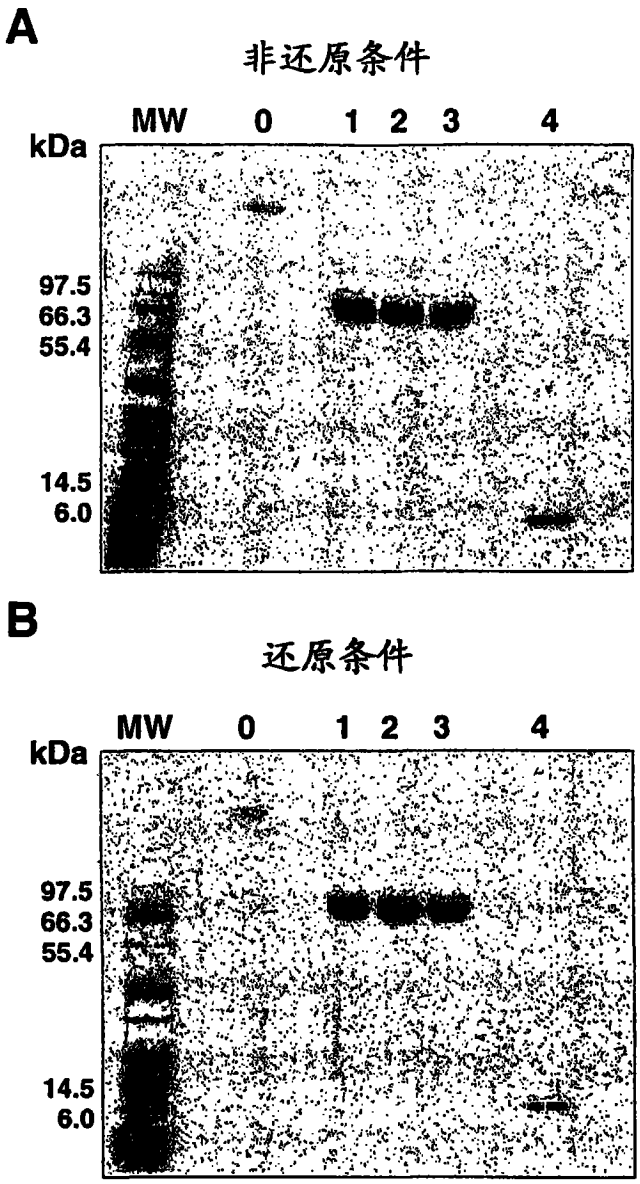
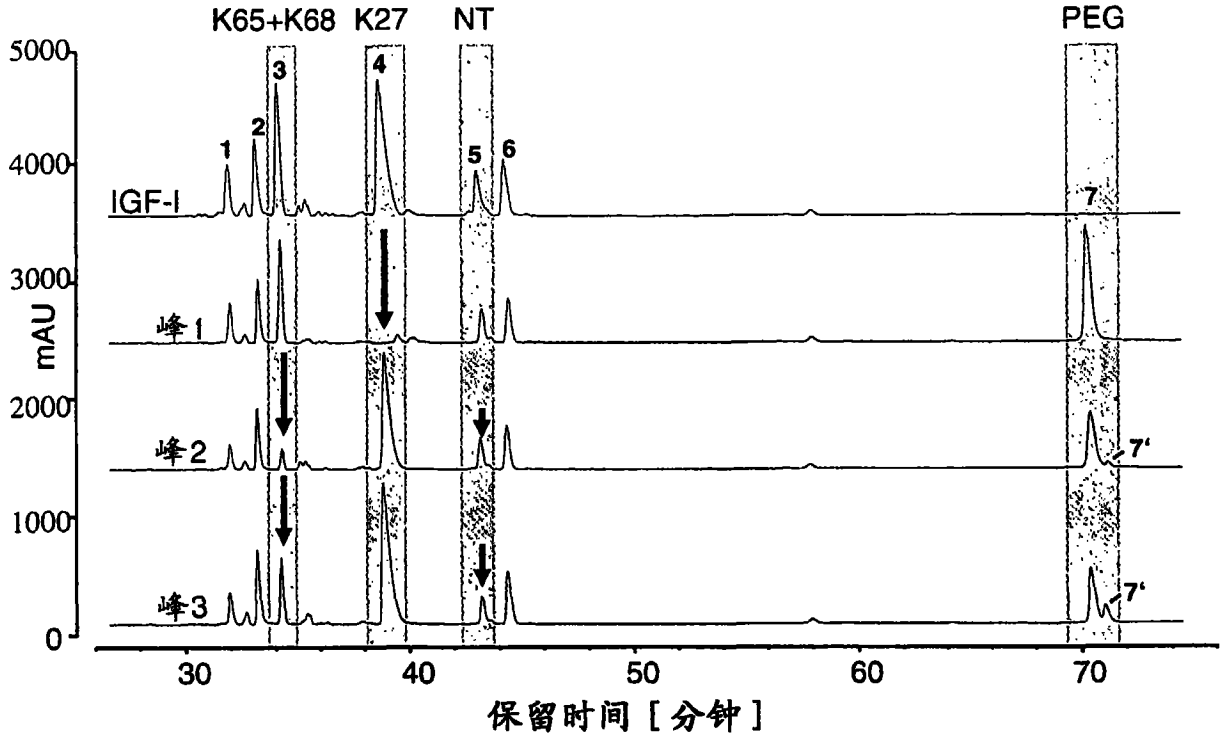

A
非还原条件
MW 0 1 2 3 4
kDa
97.5
66.3
55.4
14.5
6.0
B
还原条件
MW 0 1 2 3 4
kDa
97.5
66.3
55.4
14.5
6.0

图 2

Fig. 3

A



B

#	aa ID	序列
1	53-57	DLRRL
2	45-52	DECCFRSC
3	58-70	EMYCAPLKPAKSA
4	20-44	DRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIV
5	1-11	GPETLCGAELV
6	12-19	DALQFVCG

C

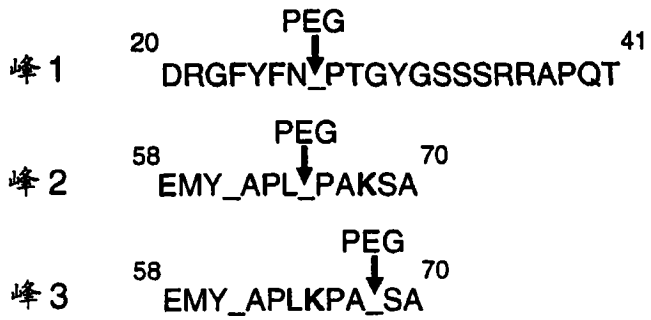


图 3

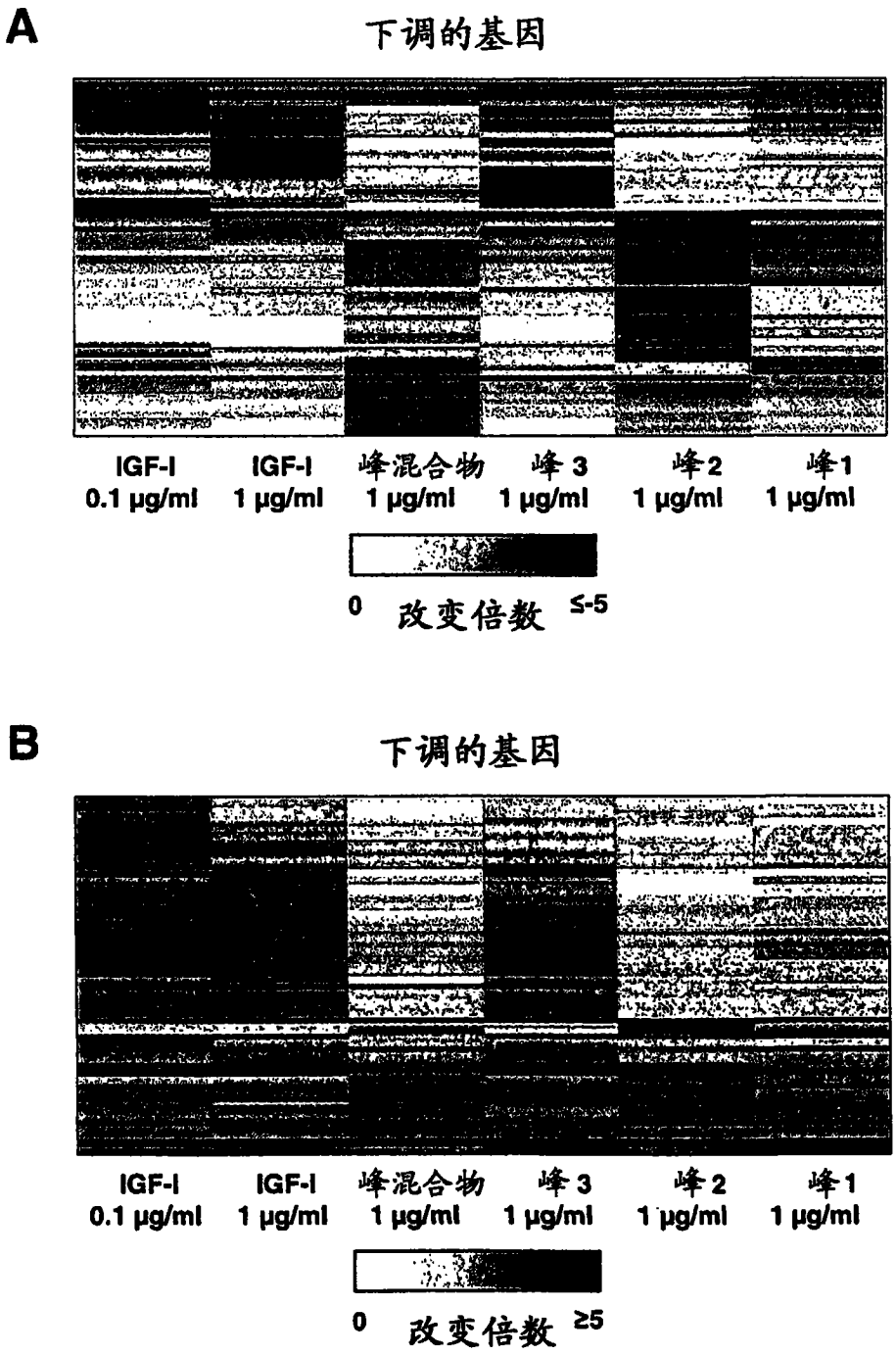

A
下调的基因
IGF-I 0.1 μg/ml
IGF-I 1 μg/ml
峰混合物 1 μg/ml
峰 3 1 μg/ml
峰2 1 μg/ml
峰1 1 μg/ml
0
改变倍数
≤-5
B
下调的基因
IGF-I 0.1 μg/ml
IGF-I 1 μg/ml
峰混合物 1 μg/ml
峰 3 1 μg/ml
峰2 1 μg/ml
峰1 1 μg/ml
0
改变倍数
≥5

图 4

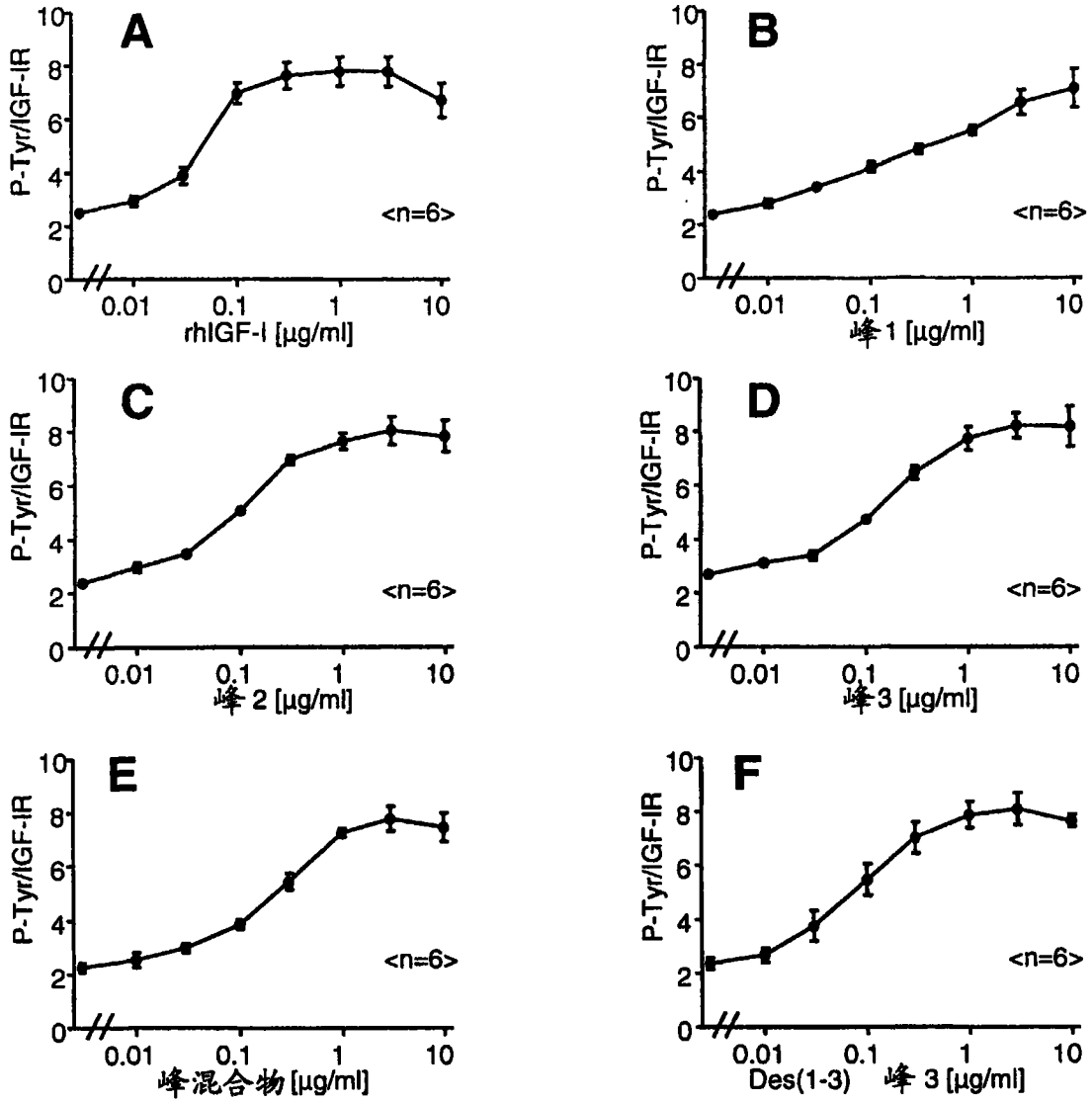


图 5

化合物	EC_{50} [nM]	B_{Max} [Ratio]	n_H
rhIGF-I	6.3 ± 1.1	5.1 ± 0.4	2.27 ± 0.65
峰1	91.5 ± 215.0	8.2 ± 6.6	0.34 ± 0.31
峰2	13.4 ± 2.7	5.5 ± 0.4	1.27 ± 0.30
峰3	21.5 ± 4.9	5.5 ± 0.5	1.19 ± 0.31
混合物	28.8 ± 5.5	5.3 ± 0.4	1.28 ± 0.29
Des(1-3) 3	10.8 ± 3.7	6.0 ± 1.0	1.08 ± 0.41

图 6

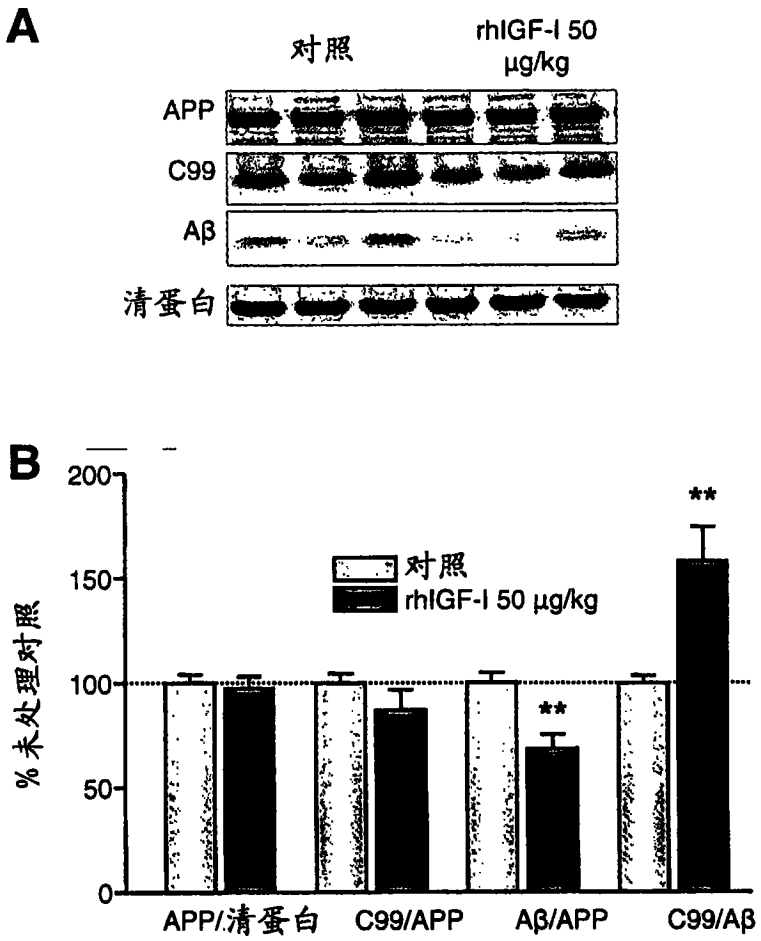

A
对照
rhIGF-I 50 μg/kg
APP
C99
Aβ
清蛋白
B
200
150
100
50
0
% 未处理对照
对照
rhIGF-I 50 μg/kg
**
**
APP/清蛋白
C99/APP
Aβ/APP
C99/Aβ

图 7

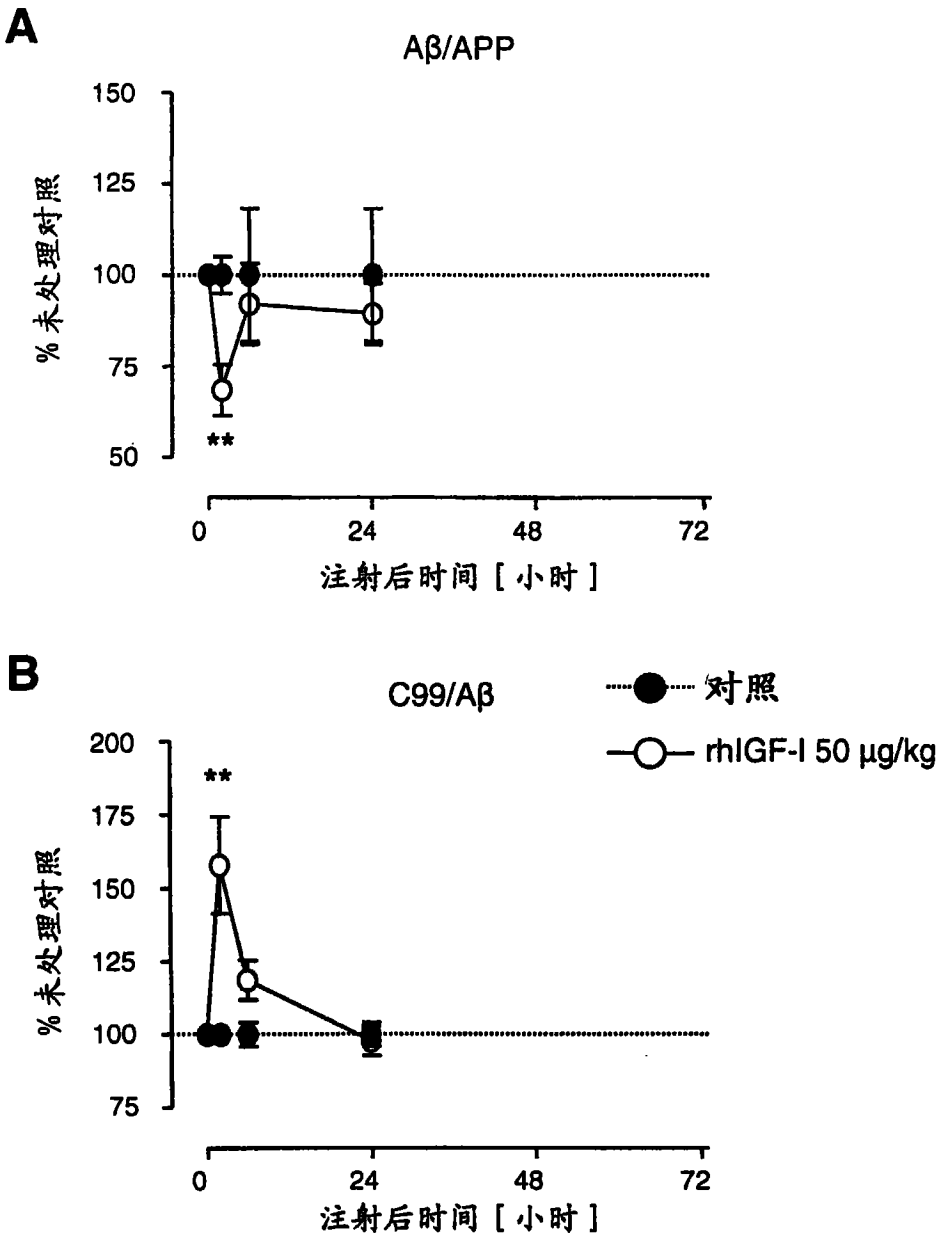

A
Aβ/APP
% 未处理对照
150
125
100
75
50
**
0
24
48
72
注射后时间 [小时]
B
C99/Aβ
对照
rhIGF-I 50 μg/kg
% 未处理对照
200
175
150
125
100
75
**
0
24
48
72
注射后时间 [小时]

图 8

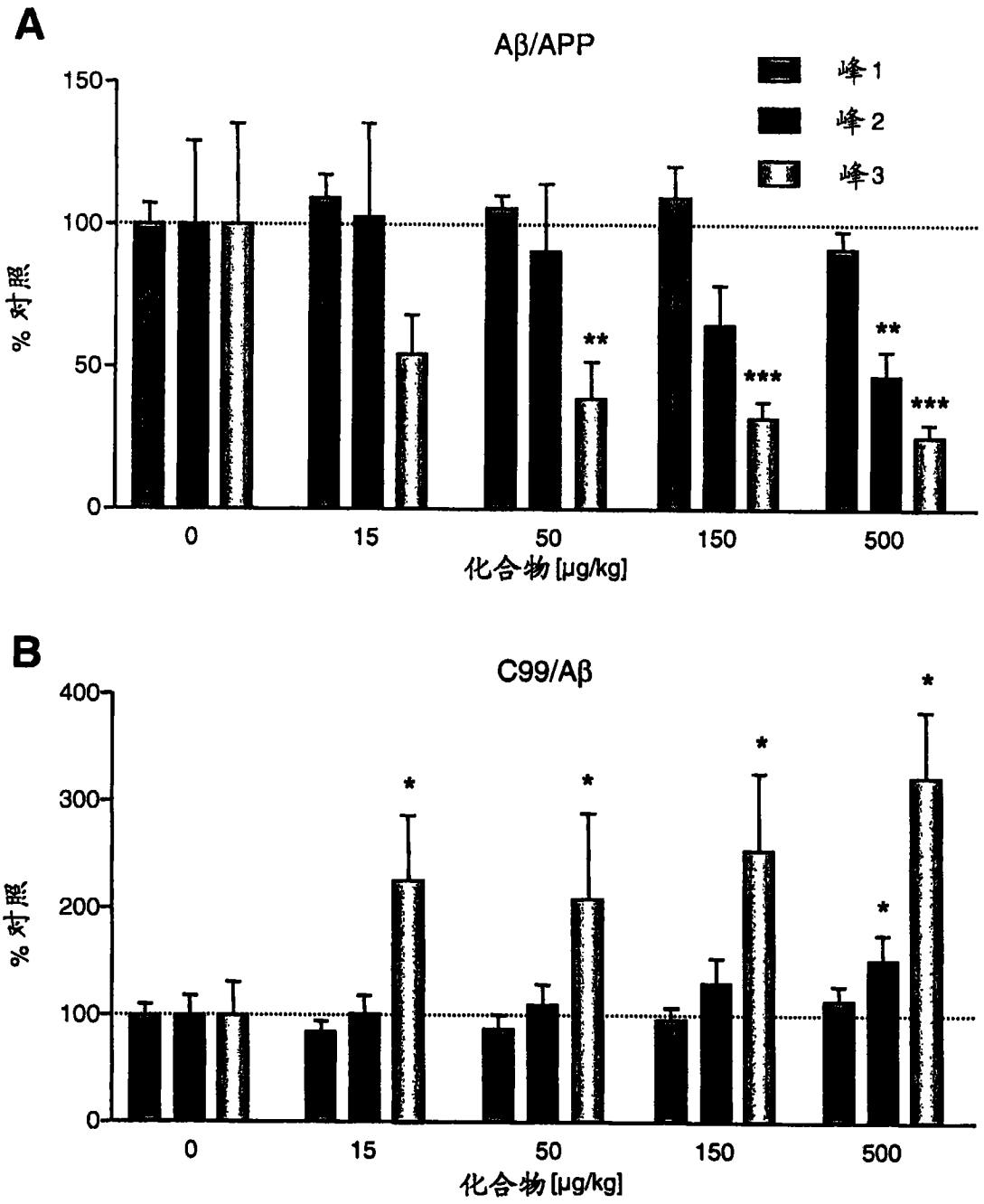

A
Aβ/APP
峰1
峰2
峰3
150
100
50
0
% 对照
**
***
**
***
0
15
50
150
500
化合物 [μg/kg]
B
C99/Aβ
400
300
200
100
0
% 对照
*
*
*
*
*
0
15
50
150
500
化合物 [μg/kg]

图 9

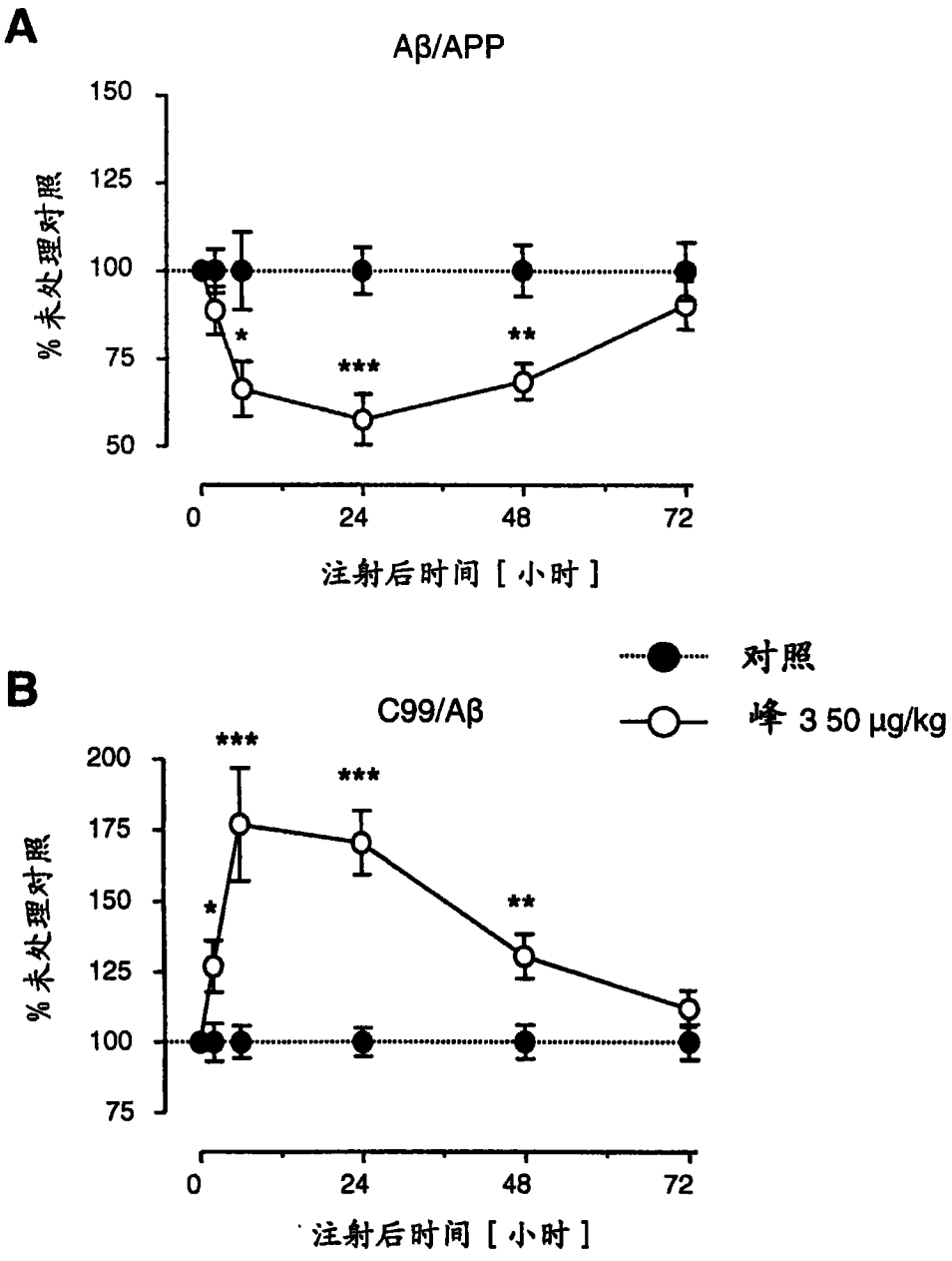

A
Aβ/APP
% 未处理对照
150
125
100
75
50
0
24
48
72
注射后时间 [小时]
*
***
**
B
C99/Aβ
对照
峰 3 50 μg/kg
% 未处理对照
200
175
150
125
100
75
0
24
48
72
注射后时间 [小时]
*
***
***
**

图 10

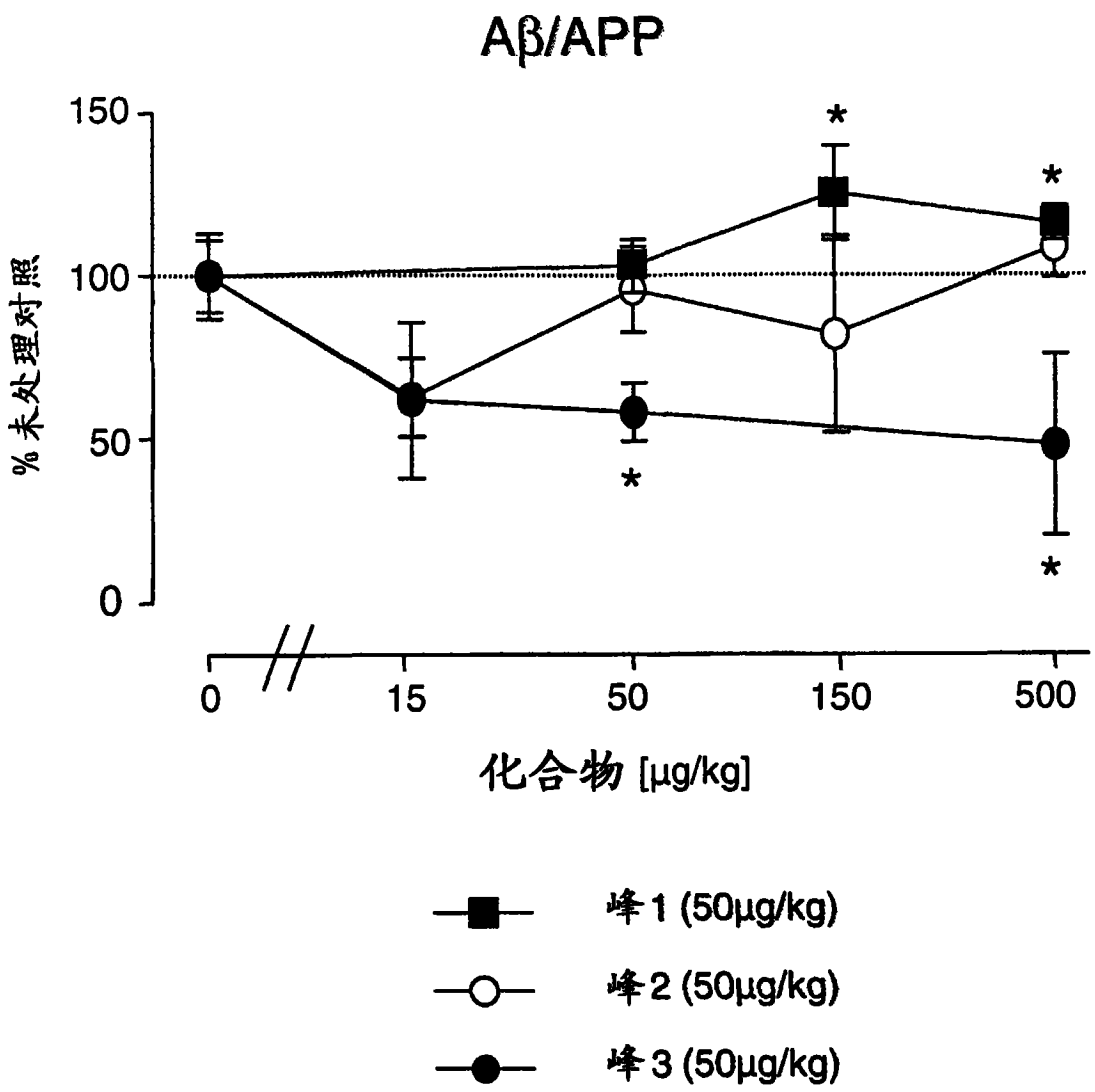

Aβ/APP
150
100
50
0
% 未处理对照
*
*
*
*
0
15
50
150
500
化合物 [µg/kg]
峰 1 (50µg/kg)
峰 2 (50µg/kg)
峰 3 (50µg/kg)

图 11

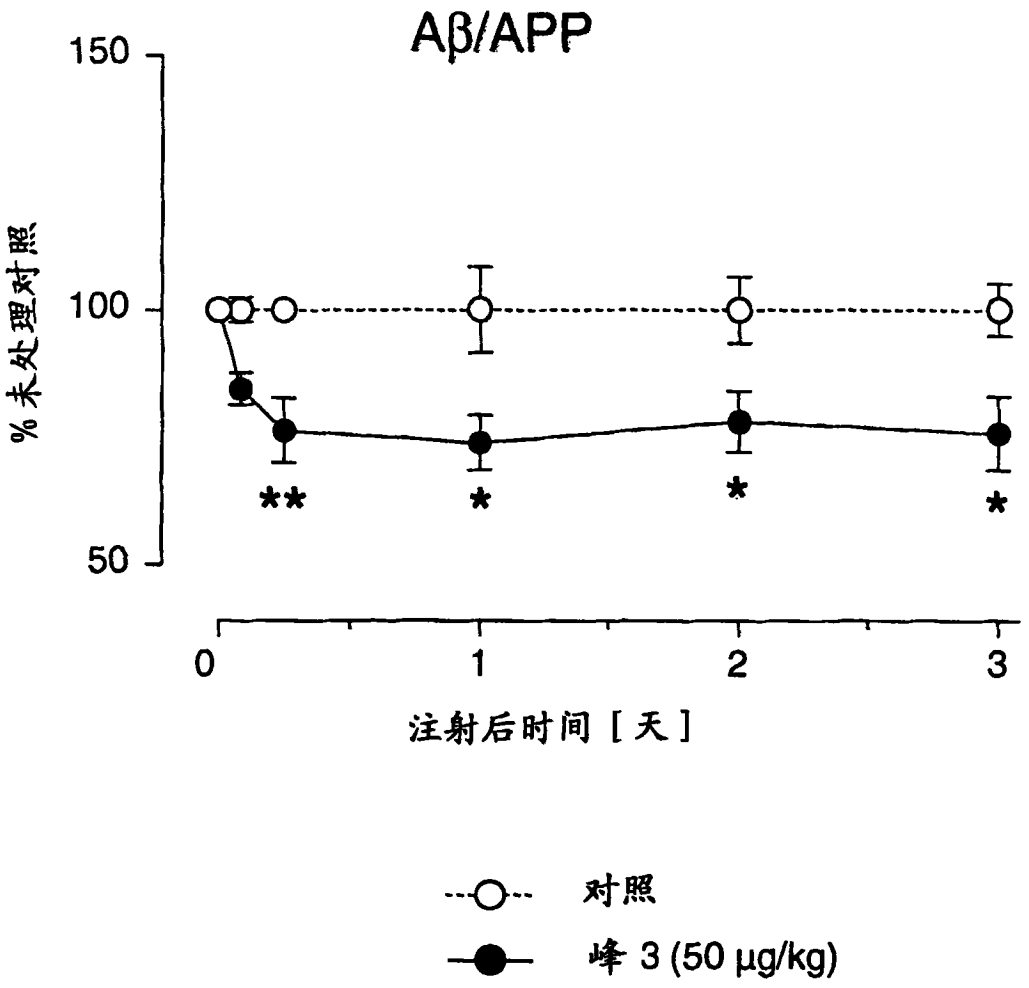


图 12