

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101043899 B

(45) 授权公告日 2011.03.30

- (21) 申请号 200580035828.X US 2004/0028613 A1, 2004.02.12, 摘要.  
CN 1500095 A, 2004.05.26, 摘要.  
CN 101166753 A, 2008.04.23, 说明书第  
52-53 页.  
Chiara Riganti et al. NITROARGININE  
METHYL ESTER AND CANAVANINELOWER  
INTRACELLULAR REDUCED GLUTATHIONE.  
Free Radical Biology and Medicine 35  
10.2003, 35(10), 1210-1216.
- (22) 申请日 2005.08.18
- (30) 优先权数据  
60/602,825 2004.08.19 US
- (85) PCT 申请进入国家阶段日  
2007.04.19
- (86) PCT 申请的申请数据  
PCT/US2005/029638 2005.08.18
- (87) PCT 申请的公布数据  
W02006/023782 EN 2006.03.02
- (73) 专利权人 比奥根艾迪克 MA 公司  
地址 美国马萨诸塞州
- (72) 发明人 安东尼·罗索曼多  
R·布莱克·佩平斯基 龚邦健
- (74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
11105  
代理人 封新琴 巫肖南
- (51) Int. Cl.  
A61K 38/00 (2006.01)
- (56) 对比文件  
US 2003/0186267 A1, 2003.10.02, 摘要.

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 1 页

(54) 发明名称

重折叠转化型生长因子 BETA 家族蛋白

(57) 摘要

用于折叠属于转化型生长因子 beta 超家族的蛋白的组合物和方法在本发明公开。所述组合物和方法允许所述蛋白在不产生适当折叠的生物活性产物的表达系统中产生时进行折叠。

1. 诱导变性的神经肽素蛋白折叠的方法,所述方法包括:

提供变性的神经肽素蛋白,其由 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 108-220 组成或由 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 108-220 的片段组成,所述片段含有 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 117-220;和

使该神经肽素蛋白与有效诱导该蛋白折叠的量的重折叠缓冲液接触,其中所述重折叠缓冲液由以下组成 (i) 浓度 50mM、pH7.8 的磷酸钾, (ii) 浓度 0.5M 的胍-HCl, (iii) 浓度 0.30M-0.5M 的 L-精氨酸, (iv) 浓度 0.1% -0.5% 的吐温-80, 和 (v) 浓度 1mM-2mM 的氧化型谷胱甘肽, 以及 (vi) 浓度 0.2mM 的还原型谷胱甘肽。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述重折叠缓冲液的 L-精氨酸浓度为 0.35M。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述重折叠缓冲液的吐温-80 浓度为 0.1%。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述重折叠缓冲液的氧化型谷胱甘肽浓度为 1mM。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述重折叠缓冲液由以下物质组成 (i) 浓度 50mM, pH7.8 的磷酸钾, (ii) 浓度 0.5M 的胍-HCl, (iii) 浓度 0.35M 的 L-精氨酸, (iv) 浓度 0.1% 的吐温-80, (v) 浓度 1mM 的氧化型谷胱甘肽, 和 (vi) 浓度 0.2mM 的还原型谷胱甘肽。

6. 权利要求 1 的方法,还包含在利用所述重折叠缓冲液诱导折叠之前在细菌中表达所述神经肽素蛋白。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述细菌是大肠杆菌。

8. 权利要求 6 的方法,其中所述神经肽素蛋白以不溶形式在细菌中表达,并且在利用重折叠缓冲液诱导折叠之前,使该不溶的神经肽素蛋白与使所述神经肽素蛋白变性的有效量的增溶缓冲液接触。

9. 组合物,由浓度为所述浓度的 1-10 倍的以下组分组成:(i) 浓度 50mM, pH 7.8 的磷酸钾;(ii) 浓度 0.5M 的胍-HCl;(iii) 浓度 0.3M-0.5M 的 L-精氨酸;(iv) 浓度 0.1% -0.5% 的吐温-80;和 (v) 浓度 1mM-2mM 的氧化型谷胱甘肽,和 (vi) 浓度 0.2mM 的还原型谷胱甘肽。

10. 权利要求 9 的组合物,其中 L-精氨酸浓度为 0.35M 的 1-10 倍。

11. 权利要求 9 的组合物,其中吐温-80 浓度为 0.1% 的 1-10 倍。

12. 权利要求 9 的组合物,其中氧化型谷胱甘肽浓度为 1mM 的 1-10 倍。

13. 权利要求 9 的组合物,由浓度为所述浓度的 1-10 倍的以下组分组成:(i) 浓度 50mM, pH7.8 的磷酸钾, (ii) 浓度 0.5M 的胍-HCl, (iii) 浓度 0.35M 的 L-精氨酸, (iv) 浓度 0.1% 的吐温-80, (v) 浓度 1mM 的氧化型谷胱甘肽, 和 (vi) 浓度 0.2mM 的还原型谷胱甘肽。

14. 权利要求 9 的组合物,由以下组分组成:(i) 浓度 50mM, pH7.8 的磷酸钾, (ii) 浓度 0.5M 的胍-HCl, (iii) 浓度 0.35M 的 L-精氨酸, (iv) 浓度 0.1% 的吐温-80, (v) 浓度 1mM 的氧化型谷胱甘肽, 和 (vi) 浓度 0.2mM 的还原型谷胱甘肽。

## 重折叠转化型生长因子 BETA 家族蛋白

[0001] 相关领域的交叉参考

[0002] 本申请要求 2004 年 8 月 19 日提交的临时申请 60/602,825 的优先权。该在先申请的全文内容包含在此作为参考。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及用于重折叠属于转化型生长因子 beta 超家族的蛋白的组合物和方法。

### 背景技术

[0004] 神经胚素 (neublastin) 也已知为 Artemin 和 Enovin, 其为 24-kDa 同源二聚体分泌型蛋白, 促进外周和中央神经系统神经元诸如多巴胺能神经元的存活 (Baudet et al., 2000, Development, 127 :4335 ;Rosenblad et al., 2000, Mol. Cell Neurosci., 15(2) :199 ; GenBank AF120274)。编码神经胚素的基因已经被克隆并测序 (Roseblad et al., 2000, Mol. Cell Neurosci., 15(2) :199 ;Baloh et al., Neuron, 21 :1291)。

[0005] 神经胚素是神经胶质细胞来源的神经细胞营养因子 (GDNF) 配体家族成员。在细胞水平, GDNF 成员活化受体酪氨酸激酶 RET。RET 结合共同受体 GDNF 家族受体 alpha (GFRalpha), 其为糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 连接型膜蛋白, 提供对 RET 的配体特异性。已知四种 GFRalpha (GFRalpha1-4)。神经胚素结合 GFRalpha3, 与 RET 一起形成三元信号复合体 (Baudet et al. 2000, Development, 127 :4335 ;Baloh et al., 1998, Neuron, 21 :1291), 其主要定位于痛觉感觉神经元上 (Orozco et al., 2001, Eur. J. Neurosci., 13(11) :2177)。这些神经元检测痛觉和损伤。因此, 神经胚素在临床上可用于神经病的一般治疗并更具体地用于治疗神经病性疼痛。

[0006] 神经胚素和其它 GDNF 家族成员是转化型生长因子 beta (TGF beta) 超家族成员, 并由此其特征在于存在 7 个具有相似间隔的保守的半胱氨酸残基, 其形成半胱氨酸结的结构 (Saarma, 1999, Microsc. Res. Tech., 45 :292)。每个单体含有这样的两个二硫键, 其形成封闭的环结构, 包绕第三个二硫键以形成紧实的结状结构。每个单体中所含的第七个半胱氨酸形成分子间二硫键, 其共价连接所述单体形成最终的二聚体产物 (Rattenholl et al 2000, J. Mol. Biol., 305 :523)。

[0007] TGF beta 家族成员作为前原蛋白合成, 所述蛋白在切割信号肽和原结构域以后最终作为成熟同源二聚体分泌 (见例如 Rattenholl, et al., 2000, J. Mol. Biol., 305 :523 ; Fairlie et al., 2001, J. Biol. Chem., 276(20) :16911)。信号肽和原结构域介导 TGF beta 家族成员的正确分泌 (Rattenholl et al., 2000, J. Mol. Biol., 305 :523 ;Rattenholl et al., 2001, Eur. J. Biochem., 268 :3296)。

### 发明内容

[0008] 本发明至少部分基于这样的发现, 即一些缓冲组合物对于诱导变性多肽的重折叠

特别有效。开发本发明具体描述的组合物和方法以诱导蛋白重折叠,从而产生这样的多肽,其具有正确的三维结构以及伴随的生物活性。

[0009] 一方面,本发明的特征在于诱导变性多肽的折叠的方法,其通过:(1) 提供变性多肽;和(2) 使该多肽与有效诱导该多肽折叠的量的重折叠缓冲液接触,其中所述重折叠缓冲液包含(i) 浓度 25mM-150mM、pH5.8-8.0 的磷酸钾或磷酸钠,(ii) 浓度 0.3M-2M 的胍-HCl,(iii) 浓度 0.25M-1M 的 L-精氨酸,(iv) 浓度 0.05%-1% 的吐温-80,和(v) 浓度 1mM-4mM 的氧化型谷胱甘肽以及浓度 0.05mM-0.8mM 的还原型谷胱甘肽,其中氧化型谷胱甘肽与还原型谷胱甘肽的比是 5:1-20:1。

[0010] 一些实施方案中,所述变性多肽是含有 TGF beta 超家族成员的多肽。

[0011] 本发明中的“TGF beta 超家族成员,”指这样的蛋白,其具有与 TGF beta 超家族的野生型成员相同的序列,保持野生型蛋白生物活性的截短物,或与野生型蛋白(全长或成熟蛋白)具有至少 70% 的序列同一性并保持野生型蛋白生物活性的变体。TGF beta 超家族的成员包括例如,TGF-beta,生长分化因子,骨形态发生蛋白,活化素(activin),抑制素(inhibin),和神经胶质细胞系来源的神经营养因子。一些实施方案中,变体与全长野生型蛋白具有至少 70%,80%,85%,90%,95%,或 98% 的序列同一性并保持野生型蛋白的生物活性。一些实施方案中,变体与成熟野生型蛋白具有至少 70%,80%,85%,90%,95%,或 98% 的序列同一性并保持野生型蛋白的生物活性。

[0012] 本发明所述方法中所用的“重折叠缓冲液”组分的浓度指存在与变性多肽的反应中的重折叠缓冲液组分的最终浓度(不是加入重折叠反应其它组分之前重折叠缓冲液母液中组分的浓度)。

[0013] 本文中“诱导多肽重折叠”指诱导多肽中的三级结构,以及获得相关生物活性,其对应野生型蛋白的生物活性。

[0014] TGF beta 超家族成员可为神经胶质细胞系来源的神经营养因子(GDNF)家族成员。本文中“GDNF 家族成员,”指具有与 GDNF 家族的野生型成员相同的序列的蛋白质,保持野生型蛋白生物活性的截短物,或与野生型蛋白(全长或成熟蛋白)具有至少 70% 的序列同一性并保持野生型蛋白生物活性的变体。GDNF 家族的成员包括 GDNF,neurturin,神经胚素,和 persephin。一些实施方案中,变体与全长野生型蛋白具有至少 70%,80%,85%,90%,95%,或 98% 的序列同一性并保持野生型蛋白的生物活性。一些实施方案中,变体与成熟野生型蛋白具有至少 70%,80%,85%,90%,95%,或 98% 的序列同一性并保持野生型蛋白的生物活性。

[0015] 一些实施方案中,GDNF 家族成员是神经胚素蛋白。“神经胚素蛋白”在本文指具有与 GDNF 家族的野生型成员相同的序列的蛋白质,保持野生型蛋白生物活性的截短物,或与野生型蛋白(全长或成熟蛋白)具有至少 70% 的序列同一性并保持野生型蛋白生物活性的变体。GDNF 家族的成员包括 GDNF,neurturin,神经胚素,和 persephin。一些实施方案中,变体与全长野生型蛋白具有至少 70%,80%,85%,90%,95%,或 98% 的序列同一性并保持野生型蛋白的生物活性。一些实施方案中,变体与成熟野生型蛋白(例如,SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 108-220)具有至少 70%,80%,85%,90%,95%,或 98% 的序列同一性并保持野生型蛋白的生物活性。神经胚素蛋白可例如包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 122-220,SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 117-220 或 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 108-220 或由其组成。

[0016] 所述方法还包括在利用重折叠缓冲液诱导折叠之前在细菌（例如大肠杆菌）中表达多肽的方法。一些实施方案中，在利用重折叠缓冲液诱导折叠之前，所述多肽以不溶形式在细菌中表达，所述不溶多肽与有效变性所述多肽的量的增溶缓冲液接触。

[0017] 一些实施方案中，重折叠缓冲液包含浓度 0.30M-0.5M 的 L-精氨酸。其他实施方案中，重折叠缓冲液包含浓度至少 0.30M 的 L-精氨酸。其他实施方案中，重折叠缓冲液包含浓度至少 0.35M 的 L-精氨酸。其他实施方案中，重折叠缓冲液包含浓度 0.35M 的 L-精氨酸。

[0018] 一些实施方案中，重折叠缓冲液包含浓度 0.1% -1% 的吐温 -80。其他实施方案中，重折叠缓冲液包含浓度 0.1% -0.5% 的吐温 -80。其他实施方案中，重折叠缓冲液包含浓度至少 0.1% 的吐温 -80。其他实施方案中，重折叠缓冲液包含浓度 0.1% 的吐温 -80。

[0019] 一些实施方案中，重折叠缓冲液包含的氧化型谷胱甘肽与还原型谷胱甘肽的比例为 5 : 1-10 : 1。其他实施方案中，重折叠缓冲液包含的氧化型谷胱甘肽与还原型谷胱甘肽的比例为 5 : 1。一些实施方案中，重折叠缓冲液包含浓度 1mM-2mM 的氧化型谷胱甘肽。其他实施方案中，重折叠缓冲液包含浓度 1mM 的氧化型谷胱甘肽。

[0020] 一些实施方案中，重折叠缓冲液包含浓度 0.5M-1.0M 的胍 -HCl。其他实施方案中，重折叠缓冲液包含浓度至少 0.5M 的胍 -HCl。其他实施方案中，重折叠缓冲液包含浓度 0.5M 的胍 -HCl。

[0021] 一些实施方案中，重折叠缓冲液包含磷酸钾浓度 25mM-100mM。其他实施方案中，重折叠缓冲液包含磷酸钾浓度 25mM-75mM。其他实施方案中，重折叠缓冲液包含磷酸钾浓度至少 50mM。其他实施方案中，重折叠缓冲液包含磷酸钾浓度 50mM。一些实施方案中，重折叠缓冲液包含磷酸钾 pH7.0-8.0。其他实施方案中，重折叠缓冲液包含磷酸钾 pH7.5-8.0。其他实施方案中，重折叠缓冲液包含磷酸钾 pH 约 7.8。

[0022] 所述重折叠缓冲液可选包含或由以下组分组成：(i) 浓度 50mM，pH7.8 的磷酸钾，(ii) 浓度 0.5M 的胍 -HCl，(iii) 浓度 0.35M 的 L-精氨酸，(iv) 浓度 0.1% 的吐温 -80，(v) 浓度 1mM 的氧化型谷胱甘肽，和 (vi) 浓度 0.2mM 的还原型谷胱甘肽。

[0023] 一些实施方案中，所述重折叠缓冲液不由以下组分组成：(i) 浓度 50mM，pH7.8 的磷酸钾，(ii) 浓度 0.5M 的胍 -HCl，(iii) 浓度 0.35M 的 L-精氨酸，(iv) 浓度 0.1% 的吐温 -80，(v) 浓度 1mM 的氧化型谷胱甘肽，和 (vi) 浓度 0.2mM 的还原型谷胱甘肽。

[0024] 一些实施方案中，所述重折叠缓冲液缺乏尿素和 / 或甘氨酸。

[0025] 另一方面，本发明的特征在于这样的组合物，其包含稀释 1-10 倍时有效诱导神经肽素多肽的折叠的量的重折叠缓冲液，其中所述重折叠缓冲液包含浓度为所述浓度的 1-10 倍的以下组分：(i) 浓度 25mM-150mM，pH5.8-8.0 的磷酸钾或磷酸钠；(ii) 浓度 0.3M-2M 的胍 -HCl；(iii) 浓度 0.25M-1M 的 L-精氨酸，(iv) 浓度 0.05% -1% 的吐温 -80，(v) 浓度 1mM-4mM 的氧化型谷胱甘肽，和浓度 0.05mM-0.8mM 的还原型谷胱甘肽，其中氧化型谷胱甘肽与还原型谷胱甘肽的比例是 5 : 1-20 : 1。所述组合物可选用作在开始折叠反应之前利用其它组分稀释的母液。

[0026] 一些实施方案中，重折叠缓冲液包含 L-精氨酸，其浓度为 0.30M-0.5M 的 1-10 倍。其他实施方案中，重折叠缓冲液包含 L-精氨酸，其浓度为至少 0.30M 的 1-10 倍。其他实施方案中，重折叠缓冲液包含 L-精氨酸，其浓度为至少 0.35M 的 1-10 倍。其他实施方案中，

重折叠缓冲液包含 L-精氨酸,其浓度为 0.35M 的 1-10 倍。

[0027] 一些实施方案中,重折叠缓冲液包含吐温-80,其浓度为 0.1%-1% 的 1-10 倍。其他实施方案中,重折叠缓冲液包含吐温-80,其浓度为 0.1%-0.5% 的 1-10 倍。其他实施方案中,重折叠缓冲液包含吐温-80,其浓度为至少 0.1% 的 1-10 倍。其他实施方案中,重折叠缓冲液包含吐温-80,其浓度为 0.1% 的 1-10 倍。

[0028] 一些实施方案中,重折叠缓冲液包含的氧化型谷胱甘肽与还原型谷胱甘肽的比例为 5:1-10:1。其他实施方案中,重折叠缓冲液包含的氧化型谷胱甘肽与还原型谷胱甘肽的比例为 5:1。一些实施方案中,重折叠缓冲液包含的氧化型谷胱甘肽的浓度为 1mM-2mM 的 1-10 倍。其他实施方案中,重折叠缓冲液包含的氧化型谷胱甘肽的浓度为 1mM 的 1-10 倍。

[0029] 一些实施方案中,重折叠缓冲液包含胍-HCl,其浓度为 0.5M-1.0M 的 1-10 倍。其他实施方案中,重折叠缓冲液包含胍-HCl,其浓度为至少 0.5M 的 1-10 倍。其他实施方案中,重折叠缓冲液包含胍-HCl,其浓度为 0.5M 的 1-10 倍。

[0030] 一些实施方案中,重折叠缓冲液包含磷酸钾,其浓度为 25mM-100mM 的 1-10 倍。其他实施方案中,重折叠缓冲液包含磷酸钾,其浓度为 25mM-75mM 的 1-10 倍。其他实施方案中,重折叠缓冲液包含磷酸钾,其浓度为至少 50mM 的 1-10 倍。其他实施方案中,重折叠缓冲液包含磷酸钾,其浓度为 50mM 的 1-10 倍。一些实施方案中,重折叠缓冲液包含 pH7.0-8.0 的磷酸钾。其他实施方案中,重折叠缓冲液包含 pH7.5-8.0 的磷酸钾。其他实施方案中,重折叠缓冲液包含 pH 约 7.8 的磷酸钾。

[0031] 所述重折叠缓冲液可选包含或由以下组分组成,所述组分的浓度为下述浓度的 1-10 倍:(i) 浓度 50mM, pH7.8 的磷酸钾;(ii) 浓度 0.5M 的胍-HCl;(iii) 浓度 0.35M 的 L-精氨酸;(iv) 浓度 0.1% 的吐温-80;(v) 浓度 1mM 的氧化型谷胱甘肽;和 (vi) 浓度 0.2mM 的还原型谷胱甘肽。

[0032] 一些实施方案中,所述重折叠缓冲液不由以下物质组成:(i) 浓度 50mM, pH7.8 的磷酸钾,(ii) 浓度 0.5M 的胍-HCl,(iii) 浓度 0.35M 的 L-精氨酸,(iv) 浓度 0.1% 的吐温-80,(v) 浓度 1mM 的氧化型谷胱甘肽,和 (vi) 浓度 0.2mM 的还原型谷胱甘肽。

[0033] 一些实施方案中,所述重折叠缓冲液缺乏尿素和/或甘氨酸。

[0034] 本文所述组合物和方法的优点在于它们允许大量正确折叠的 TGF beta 超家族蛋白诸如神经胚素在如下条件下的重折叠和纯化:其中所述蛋白在不能产生正确折叠的生物活性产物的宿主(例如细菌)中产生。

[0035] 除非另有说明,本文所用的所有技术和科学术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常的理解一样。但类似或等同于本文所述方法和材料的那些可用于本发明的实践和检测,示例性方法和材料在下文描述。所有公开出版物,专利公开,专利和本文所述的其他参考文献的全文包含在此作为参考。如有冲突,以本申请,包括定义为准。所述材料,方法和实例仅仅为了举例说明,并非意图限制。

[0036] 本发明的其他特征和优点从下面的详细描述以及权利要求明显可见。

[0037] 附图简述

[0038] 图 1 图示了神经胚素的人和老鼠 113 氨基酸以及 104 氨基酸形式的序列。

[0039] 图 2 图示了将溶解的神经胚素与表 1 中具体的重折叠缓冲液保温之后检测到的吸

光度（缓冲液 4，其含有浓度 1% 的吐温 -80，未显示）。

## 发明内容

[0040] 本发明提供用于诱导属于 TGF beta 超家族的变性多肽的折叠的组合物和方法。利用一些组合物诱导变性神经胚素（其为 TGF beta 超家族以及 GDNF 亚家族成员）的折叠，在所附工作实施例中描述。由于神经胚素具有 TGF beta 超家族和 GDNF 亚家族成员共同的半胱氨酸结状结构，预期本发明所述的重折叠缓冲液可有效诱导属于 TGF beta 超家族以及 GDNF 亚家族组的其它多肽的折叠。

[0041] 神经胚素

[0042] 天然人前原神经胚素多肽的长度为 220 个氨基酸，并具有以下序列：MELGLGGLSTLSHCPWPRRQPALWPTLAALALLSSVAEASLGSAPRSPAPREGPPPVLASPAHLPGGRTARWCSEGRARRPPPPQPSRPAPPPAPPSPALPRGGRAARAGGPGSRARAAGARGCRLRSQ LVPVRALGLGHRSEDELVRFRFCGSCRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATA CGCLG (SEQ ID NO :1)。

[0043] 人神经胚素信号肽起始于位置 1 的蛋氨酸（加下划线），终止于位置 39 的丙氨酸（加下划线）。人神经胚素的全长原结构域起始于位置 40 的丝氨酸（加下划线），终止于位置 107 的精氨酸（加下划线）。成熟人神经胚素多肽由羧基末端 113 个氨基酸组成，其起始于位置 108 的丙氨酸，结束于位置 220 的甘氨酸。本文所述的组合物和方法使得变性神经胚素蛋白能有效折叠，所述神经胚素蛋白包括全长神经胚素，成熟神经胚素（缺乏信号肽和原区），或成熟神经胚素的生物活性截短物或变体。

[0044] 根据本发明所述方法折叠的神经胚素蛋白的长度可变。尽管成熟人神经胚素多肽可由前原神经胚素的羧基末端 113 个氨基酸组成，并不需要所有 113 个氨基酸来获得有用的神经胚素生物活性。氨基末端截短是容许的。因此，神经胚素多肽可对应天然人神经胚素的羧基末端 99-113 个氨基酸（即其长度可为 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 或 113 个氨基酸）。由神经胚素的羧基末端 104 和 113 个氨基酸组成的神经胚素多肽在下文的工作实施例中举例说明。

[0045] 除了长度可变，神经胚素多肽的序列也可变。具体地，可将一些氨基酸取代导入神经胚素序列而不明显丧失本文所述的神经胚素生物活性。示例性实施方案中，多肽可与 SEQ ID NO :1 具有至少 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% or 99% 的同一性（或与 SEQ ID NO :1 的氨基酸 108-220 具有 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% or 99% 的同一性）。与 SEQ ID NO :1（或 SEQ ID NO :1 的氨基酸 108-220）中公开的不同的变体神经胚素多肽的序列，可包括一或多处保守氨基酸取代，一或多处非保守氨基酸取代，和 / 或一或多处缺失或插入。一些实施方案中，所述变体神经胚素多肽相对于 SEQ ID NO :1（或 SEQ ID NO :1 的氨基酸 108-220）包含至少一处氨基酸取代，其提供可偶联聚合物（例如聚亚烷基二醇部分诸如聚乙二醇部分）的内部聚合物偶联位点（示例性神经胚素变体描述于 WO 02/060929，其内容包含在此作为参考）。一些实施方案中，所述变体神经胚素多肽相对于 SEQ ID NO :1（或 SEQ ID NO :1 的氨基酸 108-220）包含至少一处氨基酸取代，其降低肝素结合（例如，R155E, R156E, R158E, 或 R155, 156E, 或位于成熟神经胚素多肽中相应位置的这些取代中的一或多个）。

[0046] 保守取代是用具有同一性质的一种氨基酸取代另一氨基酸。保守取代包括在下组

内进行的取代：缬氨酸，丙氨酸和甘氨酸；亮氨酸，缬氨酸和异亮氨酸；天冬氨酸和谷氨酸；天冬酰胺和谷氨酰胺；丝氨酸，半胱氨酸和苏氨酸；赖氨酸和精氨酸；以及苯丙氨酸和酪氨酸。非极性疏水氨基酸包括丙氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，缬氨酸，脯氨酸，苯丙氨酸，色氨酸和蛋氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸，丝氨酸，苏氨酸，半胱氨酸，酪氨酸，天冬酰胺和谷氨酰胺。阳性带电（碱性）氨基酸包括精氨酸，赖氨酸和组氨酸。带负电（酸性）氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。上述极性、碱性或酸性组中某一成员被相同组中其它成员的任意取代可认为是保守取代。

[0047] 除包含变体神经肽素多肽以外，多肽可选包含异源氨基酸序列。本文中“异源”用于氨基酸序列时，指这样的序列，其源自对于具体的宿主细胞而言异源的来源，或如果来自相同宿主细胞，为对其原始形式进行了修饰的。示例性异源序列包括异源信号序列（例如天然大鼠白蛋白信号序列，修饰的大鼠信号序列，或人生长激素信号序列）或用于纯化变体神经肽素多肽的序列（例如组氨酸标记）。

[0048] 神经肽素活性

[0049] 本文所述方法中所用神经肽素多肽显示天然神经肽素的至少一种生物活性。生物活性神经肽素多肽是这样的多肽，其二聚化时可与 GFR $\alpha$  3 一起结合 RET 并诱导 RET 二聚化以及自身磷酸化。（见例如 Sanicola et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94 :6238）。确定受体结合以及受体自身磷酸化的任何方法可用于评估神经肽素多肽的生物活性。例如，实施例 3 中描述的 KIRA 实验可用于评估神经肽素生物活性（也见，Sadick et al., 1996, Anal. Biochem., 235(2) :207）。

[0050] 重折叠缓冲液

[0051] 通常，本文所述方法中所用的重折叠缓冲液包括以下组分：(i) 浓度 25mM-150mM、pH5.8-8.0 的磷酸钾或磷酸钠，(ii) 浓度 0.3M-2M 的胍-HCl，(iii) 浓度 0.25M-1M 的 L-精氨酸，(iv) 浓度 0.05% -1% 的吐温 -80，和 (v) 浓度 1mM-4mM 的氧化型谷胱甘肽以及浓度 0.05mM-0.8mM 的还原型谷胱甘肽，其中氧化型谷胱甘肽与还原型谷胱甘肽的比是 5 : 1-20 : 1。

[0052] 一些实施方案中，可使用浓度 25mM-150mM 的磷酸钠取代磷酸钾。这些方法中所用的磷酸钠或磷酸钾的 pH 通常落在 5.8-8.0 的范围内。此外，一些实施方案中，可使用变性剂诸如吐温 -20 或 NP40 取代浓度 0.05% -1% 的吐温 -80。

[0053] 具体重折叠缓冲液对于诱导变性多肽的折叠的有效性可通过在将变性多肽在具体缓冲液中保温后测定吸光度 (OD<sub>320</sub>) 来评估（见实施例 1 和图 2）。在所述实验中检测到的吸光度指示沉淀的、不当折叠的蛋白的存在。如所附实施例 2 所示，低吸光度读数表示缓冲液对于诱导变性多肽的折叠有效。折叠的多肽的生物活性也可通过本文所述的体外和 / 或体内生物测定法来测定。

[0054] 以下是实施部分的实施例。其不应解释为从任何方面对本发明范围的限制。

[0055] 实施例

[0056] 实施例 1 : 鉴定神经肽素重折叠缓冲液

[0057] 重组神经肽素作为 10 组氨酸标记的融合蛋白（图 1）在大肠杆菌中在 T7 启动子的控制下表达。人和大鼠 113 和 104 氨基酸形式源自它们各自的构建体（图 1）并通过本发明所述的方法进行重折叠和纯化。113 个氨基酸以及 104 个氨基酸形式的起点在图 1 的

粗体文本中均加有下划线。

[0058] 在大肠杆菌中表达时,神经胚素作为不溶蛋白包含在包含体 (IB) 内。因此,神经胚素必需自 IB 分离并重折叠以获得可溶且具有生物活性的产物。因此,包含体通过利用 Gaulin press 在 PBS 中裂解表达神经胚素的大肠杆菌然后进行离心来获得。除非另有说明,所有离心 4°C 进行,而所有其它步骤在室温进行。为了获得最大可能产量的正确折叠的神经胚素,优选不含细胞碎片的 IB 沉淀物开始。为了实现该目的,对 IB 沉淀物进行称重并进一步在 IB 洗涤缓冲液 (20mM Tris pH 8.5 和 0.5M EDTA ;8ml 每克蛋白) 中洗涤。通过在 15,000xg 离心 20 分钟收集 IB 沉淀物,去除混浊的 (cloudy) 上清,在含有 2% Tri-n-X 100 的相同缓冲液 (8ml 每克蛋白) 中再次洗涤,以辅助去除污染性磷脂。利用不含洗涤剂的洗涤缓冲液 (8ml 每克蛋白) 进行最后的洗涤以去除吐温 -80,弃去上清。

[0059] 将新鲜制备的增溶缓冲液 (6M 胍 -HCl,0.05M 磷酸钾 pH 7.8,0.1M DTT,和 1.0mM EDTA) 加入沉淀并利用 polytron 混合器进行较好的混合。为了保证完全溶解,在室温搅拌混合物过夜。第二天,在 10,000rpm 离心 20 分钟使溶液澄清。将上清倾析入新的容器,称重余下的不溶沉淀以允许评估回收。并非所有蛋白可通过所述过程而溶解。在这一点,利用标准 Bradford 蛋白测定法利用增溶缓冲液中的 BSA 作为对照定量可溶蛋白。

[0060] 为确定具体的缓冲条件是否可产生高产量正确折叠的神经胚素,在 96 孔板中制备潜在的 (potential) 重折叠缓冲液的阵列 (见表 1)。

[0061] 表 1 :96- 孔板重折叠缓冲图谱

[0062]

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>
	<b>mM</b>	<b>mM</b>	<b>mM</b>	<b>mM</b>	<b>mM</b>	<b>mM</b>	<b>mM</b>	<b>mM</b>	<b>mM</b>
<b>1 Phos (pH7.8)</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>
<b>胍</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>
<b>精氨酸</b>	<b>150</b>	<b>250</b>	<b>350</b>	<b>150</b>	<b>250</b>	<b>350</b>	<b>150</b>	<b>250</b>	<b>350</b>
<b>还原型谷胱甘肽</b>	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>
<b>氧化型谷胱甘肽</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
<b>吐温-80</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

<b>2 Phos (pH7.8)</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<b>胍</b>	500	500	500	500	500	500	500	500	500
<b>精氨酸</b>	150	250	350	150	250	350	150	250	350
<b>还原型谷胱甘肽</b>	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
<b>氧化型谷胱甘肽</b>	1	2	4	1	2	4	1	2	4
<b>吐温-80</b>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
<b>3 Phos (pH7.8)</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<b>胍</b>	500	500	500	500	500	500	500	500	500
<b>精氨酸</b>	150	250	350	150	250	350	150	250	350
<b>还原型谷胱甘肽</b>	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
<b>氧化型谷胱甘肽</b>	1	2	4	1	2	4	1	2	4
<b>吐温-80</b>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
<b>4 Phos (pH7.8)</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<b>胍</b>	500	500	500	500	500	500	500	500	500
<b>精氨酸</b>	150	250	350	150	250	350	150	250	350
<b>还原型谷胱甘肽</b>	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
<b>氧化型谷胱甘肽</b>	1	2	4	1	2	4	1	2	4
<b>吐温-80</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1

[0063] 如表 1 所示,板中的所有胍 HCl (0.5M),还原型谷胱甘肽 (0.2mM),和磷酸钾 pH 7.8 (50mM) 都恒定,但 L-精氨酸,氧化型谷胱甘肽,以及吐温 -80 可变。L-精氨酸浓度为 0.15M-0.35M (加入达 0.8M L-精氨酸也可),而氧化型谷胱甘肽为 1-4mM。此外,吐温 -80 可为 0-1%。由于一些情况中的甘氨酸可在重折叠过程中取代 L-精氨酸,制备分离的板,其中保存的所有缓冲组分除 L-精氨酸以外相同,所述 L-精氨酸被 25-100mM 的甘氨酸取代。

[0064] 每个孔中的缓冲液的最最终体积是 280  $\mu$ l (还原型谷胱甘肽是从母液浓度新鲜添加的)。然后将 20 微升溶解的神经胚素加入每个孔,其终浓度为 0.1mg/ml。48 小时内监测吸光度。任何检出的吸光度表示沉淀的但并非正确折叠的蛋白的存在。

[0065] 在含有 0.15M L-精氨酸的孔中观察到最多量的沉淀出现,在含有 0.35M L-精氨酸的孔中观察到最小量的沉淀 (图 2)。在所有含有 0.35M L-精氨酸的孔中,在含有 0.1%

吐温-80 的孔中观察到最好的总体结果。当氧化型谷胱甘肽与还原型谷胱甘肽的比例为 20 : 1 时观察到最佳重折叠（但选择 5 : 1 的比例进行进一步的实验, 以降低重折叠缓冲液所需氧化型谷胱甘肽的量）。基于这些标准, 使用以下实施例中存在重折叠缓冲液系统并可提供产率高且正确折叠的神经胚素。在所有缓冲条件下, 用甘氨酸替换 L- 精氨酸导致神经胚素沉淀。

[0066] 实施例 2 : 神经胚素的重折叠和纯化

[0067] 应用实施例 1 中描述的缓冲液分析结果来制备以下重折叠缓冲液, 其用于本实施例以及后面的实施例 : 0.5M 胍-HCl, 0.35M L- 精氨酸, 50mM 磷酸钾 pH 7.8, 0.2mM 还原型谷胱甘肽, 1mM 氧化型谷胱甘肽, 和 0.1% 吐温-80。重折叠缓冲液是新鲜制备的。溶解的蛋白在重折叠缓冲液中快速稀释到终浓度 0.05-0.5mg/ml。平均而言使用 0.1mg/ml 溶解的神经胚素。该混合物在室温保温至少 48 小时。无需搅拌。

[0068] 利用 Ni-IMAC 层析去除宿主细胞污染物

[0069] 将 L- 精氨酸从 0.35M 稀释到 0.175M 以避免 Ni 从 IMAC 树脂滤出。这可利用以下任意方法进行。利用 0.5M 胍-HCl 将精氨酸直接稀释到适当浓度。由于如果不能保持胍浓度, 神经胚素可发生沉淀, 因此没有单独使用水（胍-HCl 应当保持在缓冲液中直到下文所述的阳离子层析步骤）, 造成产品回收的主要损失。由于直接稀释 L- 精氨酸将实质上增加工作体积并增加所需的胍的量, 利用 Millipore 切向流 (tangential flow) Pellicon 装置 (unit) 将蛋白浓缩到原始体积的二十分之一。浓缩后, 利用 0.5M 胍将 L- 精氨酸稀释到 0.175M。

[0070] 将稀释的 L- 精氨酸溶液加于 Ni-NTA IMAC 柱, 该柱事先在柱洗涤缓冲液 (40mM 咪唑和 0.5M 胍 HCl) 中以 50-100ml 每分钟的流速平衡。神经胚素经由组氨酸标记结合于 Ni-NTA 基质并且在流出物 (flow through) 中没有观察到产物。利用 5 个柱体积的洗涤缓冲液洗涤之后, 利用 0.5M 胍中的 0.2M 咪唑从树脂洗脱神经胚素。弃去柱洗涤缓冲液（其不含有神经胚素）。利用 Bradford 测定法监测蛋白回收。此外, 从该点开始监测宿主细胞污染物。

[0071] 通过蛋白酶消化从神经胚素分离组氨酸标记

[0072] 根据所需神经胚素长度 (113 个氨基酸或 104 个氨基酸), 采用两种可能的组氨酸标记去除法之一。

[0073] 为了产生野生型 113 个氨基酸的神经胚素产物, 用 Endo Lys C 去除标记中所含赖氨酸残基的标记 c 末端。将 5 个单位的 Endo Lys C (WAKO, catalogue#129-02541) 每克神经胚素加入 Ni-NTA 洗脱所得的物质。不需要缓冲液替代或 pH 调节（一些情况中采用利用 10mM HEPES pH 7.8 的缓冲液取代, 可有效工作）。神经胚素与蛋白酶在室温恒速搅拌下保温过夜。

[0074] 为了产生神经胚素的 104 个氨基酸的形式, 利用胰蛋白酶 (CooperBiomedical#3740) 处理组氨酸标记的产物, 其中所用胰蛋白酶与神经胚素的比例为 1 : 2000。再次, 无需缓冲液取代或 pH 调节。将混合物在室温保温过夜同时恒速搅拌。

[0075] 用洗涤缓冲液 (0.5M 胍-HCl 和 0.04M 咪唑) 平衡 Ni-NTA 树脂。利用 0.5M 胍-HCl 将神经胚素制备物中的咪唑浓度从 0.2M 调节到 0.04M 后, 将所述物质加载于 Ni-NTA 树脂, 流速为 50-100ml 每分钟。收集含有非标记的神经胚素的柱流出物并利用 Bradford 实验监

测神经胚素。为了再生成 Ni-NTA 树脂,利用 0.5M 胍 HCl 中的 0.2M 咪唑洗脱组氨酸。对该物质以及树脂流出物进行 SDS/PAGE 以确定蛋白酶消化的效率。

[0076] 通过加入 ddH<sub>2</sub>O 将前一步骤的 Ni-NTA 流出物中的胍-HCl 调节到 0.35M。较高浓度的胍可防止神经胚素结合阳离子基质。用 C-100 洗涤缓冲液 (5mM 磷酸钠 pH 6.5 和 0.35M NaCl) 平衡 C-100 过滤器结合型药筒 (Sar-rious, catalogue#C100X)。

[0077] 可用 SP-Sepharose (AmershamPharmacia) 取代 C-100 滤膜。但是,选择 C-100 是由于其与常规柱层析相比表面积增加。当在 SP-Sepharose 上纯化神经胚素时,可通过选择较大的柱直径和 / 或降低蛋白载量来防止神经胚素的局部聚集。这防止神经胚素的局部高浓度,其可导致四聚体形成以及产物沉淀,尤其是利用磷酸钠缓冲液的时候。

[0078] 将 0.35M 胍-HCl 中的神经胚素以流速 50-100ml 每分钟加入 C-100 过滤器,然后利用 C-100 洗涤缓冲液充分洗涤该过滤器。该步骤去除任何残留的组氨酸标记,内毒素,以及神经胚素单体。神经胚素二聚体通过利用 5mM 磷酸钠 pH6.5 和 1M 氯化钠将蛋白质从 C-100 基质洗脱来回收。洗脱通过 280nm 的 UV 吸收以及收集在一个容器中的神经胚素的峰来监测。

[0079] 神经胚素浓度以及缓冲液置换

[0080] 通过 Millipore Biomax-10 切向流过滤 (tangential flow filtration) 浓缩神经胚素,并以 5 个渗滤体积用相同装置渗滤至 5mM 磷酸钠 pH 6.5 和 0.15M 氯化钠。努力达到终蛋白浓度 1.0-1.5mg/ml,不允许浓度超过 2.0mg/ml,否则神经胚素开始在该配方中沉淀,造成大量蛋白丢失。一旦产物被浓缩到 1.0mg/ml 并配制在 5mM 磷酸钠 pH 6.5 和 0.15M 氯化钠中,可将神经胚素等分成方便的等份,保存在 -70°C 备用。

[0081] 实施例 3:神经胚素的分析定性

[0082] 对实施例 2 中所述纯化的神经胚素进行各种分析实验以确定纯度,一级氨基酸序列,生物活性,以及二硫键结构完整性。

[0083] 纯度和分子量的 SDS/PAGE 评估

[0084] 通过 4-20% 聚丙烯酰胺凝胶,在非还原条件下,对从神经胚素重折叠 / 纯化步骤获得的样品进行 SDS/PAGE 分析。终神经胚素产物作为可还原的 24,000Da 二聚体迁移,估计的纯度 > 98%。

[0085] 重折叠型大鼠神经胚素的质谱分析

[0086] 为了评估重折叠产物的纯度并测定其质量,在 ZMD 质谱仪上对神经胚素进行质谱分析。在 8M 尿素中变性神经胚素并在分析前用 DTT 处理以还原所有二硫键并将二聚体分子转化成单体。鉴定的主要信号表示大鼠神经胚素残基 10-113,提示制备物中的主要物种如预期那样。但是,鉴定了 10991Da 的主要信号并预期其对应亮氨酸缺失,预期 11076 的信号是小量精氨酸到赖氨酸取代。低水平的峰对应氧化,乙腈加合物以及 TFA 加合物。也鉴定了少量的神经胚素的 106 个氨基酸的形式。没有鉴定胰蛋白酶相关峰。

[0087] 通过 AspN 肽作图对大鼠 104 氨基酸神经胚素的表征

[0088] 对神经胚素进行 AspN 肽作图,所述神经胚素是通过胰蛋白酶消化去除组氨酸标记产生的。将该批次与数种其它神经胚素制备物包括野生型大鼠 113 氨基酸,野生型人 113 氨基酸,人 104 氨基酸形式进行比较。结果表明该批次如预期的那样,具有大约 8% Met92 氧化,5% Leu61 缺失,低水平 Arg 到 Lys 突变,以及低于 1% 的 Asn95 脱氨基作用。

**[0089] 大鼠氨基酸神经肽素二硫化物分析**

**[0090]** 对大鼠 104 氨基酸神经肽素进行二硫化物分析。对野生型大鼠 113 氨基酸神经肽素进行平行实验作为对照。使用大约 150  $\mu$  L 重折叠并纯化的神经肽素进行二硫化物作图。结果表明两个样品中的所有二硫连接是可比的,并且如预期的那样。神经肽素单体的图谱与对照的相似,但是紧邻主单体峰之前洗脱的低水平峰下的面积不同。预期这些较早洗脱的峰含有部分氧化的单体并且不包含在下游质量作图 (mass mapping) 中。收集含有二硫键连接的肽的级分并利用 DHB 作为基质通过 MALDI--F 质谱法分析。数据表明 AspN/胰蛋白酶消化后,大鼠 104 氨基酸神经肽素如预期的那样,并且没有混合的二硫化物连接 (connectivity) 的证据。

**[0091] 利用激酶受体活化 - 酶 - 连接的免疫吸附物测定神经肽素活性**

**[0092]** 神经肽素活性通过其刺激 NB41A3-mRL3 细胞中 c-Ret 磷酸化的能力来确定,所述细胞是表达 Ret 和 GFRa3 的粘性小鼠神经母细胞瘤细胞系。将 NB41A3-mRL3 细胞以  $2 \times 10^5$  细胞每孔铺于 24 孔板中含有补充了 10% FBS 的 DMEM 中,并在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养 18 小时。去除培养基并用 1ml PBS 每孔洗涤细胞后,在 37°C、5% CO<sub>2</sub>,用含有 113 氨基酸或 104 氨基酸神经肽素的 DMEM 刺激细胞 10 分钟。为终止神经肽素活性,去除培养基并在用 10mM Tris, pH 8.0, 0.5% NP40, 0.2% DOC, 50mM NaF, 0.1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 和 1mM PMSF 裂解之前即刻用 PBS 洗涤细胞。在 4°C 保温 1 小时之后,通过重复移液搅动裂解物并转移到包被有抗 -RET mAb (AA. GE7. 3) 的 96 孔 ELISA 板。在室温用封闭缓冲液 (含有 1% 正常小鼠血清的 TBST 和 3% BSA) 封闭所述孔 1 小时,然后利用单独的 TBST 洗涤 6 次。通过将捕获的受体与 HRP 偶联的磷酸酪氨酸抗体 (4G10 ;0.2Tg 每孔) 保温 (2 小时) 监测磷酸化的 RET。保温后,用 TBST 洗涤孔 6 次,通过比色实验监测 450nm 的 HRP 活性。测定用裂解物或单独的裂解缓冲液处理的孔的吸光度值,校正背景,数据作为活化混合物中存在的神经肽素浓度的函数作图。大鼠 104 氨基酸神经肽素在 KERA 中的活性与阳性 113 氨基酸神经肽素对照的一样,表明重折叠 / 纯化过程产生生物活性产物。

**[0093] 内毒素实验**

**[0094]** 利用 Limulus Amebocyte 裂解物测定法以及生产商推荐的条件 (Bio\*Whittaker),测定每个纯化步骤中的内毒素水平。大量内毒素在第一个 Ni-NTA 洗涤步骤中去除。添加胰蛋白酶后,观察到内毒素水平轻微升高,其很可能是由于所用胰蛋白酶制备物中的内毒素。利用大量洗涤缓冲液洗涤 C100 柱可去除残留的内毒素。终产物中的内毒素水平恰好位于最大可接受水平之下。

**[0095] 宿主细胞蛋白测定法**

**[0096]** 利用 Cygnus Technologies 的大肠杆菌宿主细胞蛋白测定试剂盒以及生产商推荐的条件,监测每个纯化步骤中的宿主细胞蛋白质污染。该试剂盒是基于 ELISA 测定法的试剂盒,其敏感度达 1ng/ml 宿主细胞蛋白。如上文所述的内毒素结果,大部分宿主蛋白清除出现在第一个 Ni-NTA 层析步骤以及 C100 洗涤过程中。确定宿主细胞蛋白占终产物的 0.0001% 以下。

**[0097] 胰蛋白酶清除实验**

**[0098]** 利用基于荧光素的测定法、用 N-T-BOC-GLN-ALA-ARG 7-AMIDO-4- 甲基香豆素 (Methylcoumarin)HCl 作为底物监测胰蛋白酶清除,其敏感度为低于 40ng/ml。大部分 (如

果不是全部)添加的胰蛋白酶通过 C100 流出洗涤去除。存留在终产物中的胰蛋白酶的量低于 0.004% (低于敏感度水平)。

[0099] 组氨酸标记检测 ELISA

[0100] 开发利用抗多组氨酸抗体的组氨酸标记 ELISA 来监测存留在终制备物中的组氨酸标记的神经胚素。如预期那样,在 Ni-NTA 之前的所述物质中发现大部分组氨酸标记,而在第一次 Ni-NTA 流出物中没有发现所述标记,表明大部分组氨酸标记的神经胚素结合 Ni-NTA 树脂。该物质用 0.2M 咪唑洗脱从树脂洗脱。该测定法的敏感度为大约  $0.3 \mu\text{g/ml}$ ,测定终产物中鉴定的组氨酸标记的神经胚素的最终量为总蛋白的 0.12% 或 0.88mg。

[0101] 宿主细胞 DNA 检测测定法

[0102] 宿主细胞 DNA 的清除利用采用在基于 ELISA 的夹心实验中偶联于链霉抗生物素的单链 DNA 结合蛋白的测定法来监测。该测定法显示敏感度为大约 200pg/ml 大肠杆菌 DNA。基于单链 DNA 结合测定法,确定终制备物具有少于 0.0001% 的污染性宿主细胞 DNA。与上文所述其它实验一样,第一 Ni-NTA 层析步骤和 C100 洗涤步骤对于去除起始物种中的 DNA 杂质是最为有效的。

[0103] 用 104 氨基酸神经胚素治疗的慢性收缩损伤 (CCI) 大鼠

[0104] 神经胚素治疗的 CCI 大鼠与载体治疗的对照相比显示减轻的触觉异常性疼痛。神经胚素治疗的大鼠能承受施加于身体同侧的足的较大的力。触觉异常性疼痛利用 von Frey Hairs 采用 up-down 法评估 (Chaplan et al., 1994)。在第 7, 10, 14, 17 和 21 天检测大鼠的改变的痛阈。Shams ( $n = 3$ ) 在检测过程中不显示不同的阈值 (克),而对于所用的 von Frey Hairs,所有 CCI 大鼠与它们的基线值相比具有较低的阈值。神经胚素  $-1041\text{mg/Kg}$  ( $n = 8$ ) 和  $3\text{mg/Kg}$  ( $n = 7$ ) 治疗的大鼠与载体治疗的对照相比能承受的阈值升高 ( $n = 8$ )。在 op CCI (post-op CCI) 之后 17 和 21 天,神经胚素治疗的动物承受的力具有统计学显著性 ( $p < .05$ )。热痛觉过敏在神经胚素治疗的 CCI 大鼠中减轻,在 op 后 21 天,剂量  $3\text{mg/Kg}$  显示高于剂量  $1\text{mg/Kg}$  的效力。热痛觉过敏利用 Hargreaves 装置测定以评估热撤退潜伏期 (thermal withdrawal latency)。在第 7, 10, 14, 17 和 21 天检测大鼠的爪撤退潜伏期 (paw withdrawal latency),发现其变短。检测过程中,Shams ( $n = 3$ ) 不显示改变的爪撤退潜伏期,而所有 CCI 大鼠与它们的基线值相比具有较短的爪撤退潜伏期。CCI 诱导后的 14, 16 和 21 天,神经胚素  $-1041\text{mg/Kg}$  ( $n = 8$ ) 和  $3\text{mg/Kg}$  ( $n = 7$ ) 治疗的大鼠与载体治疗的对照相比能承受施加时间更长的热刺激。在 op 后 21 天,虽然 104 氨基酸神经胚素  $3\text{mg/Kg}$  治疗的大鼠与 104 氨基酸神经胚素  $1\text{mg/Kg}$  治疗的大鼠相比显示明显更长的潜伏期,神经胚素治疗的动物的爪撤退潜伏期的时间在 op CCI 后第 14, 17 和 21 天具有统计学显著性 ( $p < .05$ )。

[0105] 神经胚素治疗的 CCI 大鼠能将更多的重量加于受影响的慢性收缩的后腿,所述情况如残疾度 (incapacitance) 检测所见。利用残疾度计测定残疾程度以评估每只足的重量分布。在基线,大鼠将等同的重量分布在它们的每只足,但损伤后它们将较小的重量施加于身体同侧的足。检测期间,Shams ( $n = 4$ ) 不显示足之间的重量分布改变,而与它们的基线值相比,所有 CCI 大鼠将较小的重量施加于受影响的足。与载体处理的对照相比,104 氨基酸神经胚素  $1\text{mg/Kg}$  ( $n = 8$ ) 和  $3\text{mg/Kg}$  ( $n = 7$ ) 治疗的大鼠将较多的重量施加于身体同侧的足 ( $n = 8$ )。神经胚素处理的动物中受影响足的残疾度在 op CCI 之后第 14, 17 和 21 天具有统计学显著性 ( $p < .05$ )。

[0106] 神经胚素和载体治疗的 CCI 大鼠的冷异常性疼痛实验 (cold allodynia test) 没有统计学明显的差异, 神经胚素治疗的大鼠倾向于在第 10 天具有较短的持续期。冷异常性疼痛利用在 4°C 冷却的冷铜板在 5 分钟受试期的内测定。在第 7, 10, 14, 17 和 21 天测定与其基线值相比大鼠的抬爪撤退期。在基线, 没有动物对冷有反应。与其基线值相比, Shams (n = 3) 在整个检测过程中不显示抬高的爪撤退持续期。与载体治疗的对照 (n = 8) 相比, 在 CCI 诱导后第 14, 17 和 21 天, 104 氨基酸神经胚素 1mg/Kg (n = 8) 和 3mg/Kg (n = 7) 治疗的小鼠抬高受影响爪的持续时间较短, 但是神经胚素治疗的动物的爪撤退持续时间 (duration of paw withdrawal) 不具有统计学上显著性。

[0107] 其它实施方案

[0108] 虽然本发明根据其详细的说明书进行了描述, 前述的说明意图说明而不是限制所附权利要求限定的本发明的范围。其它方面, 优点以及修饰在权利要求的范围内。

人神经胚素	(1)	MGHHHHHHHHSSGHI <del>DDDDK</del> AGGPGSRARA <del>A</del> GARGCRLRSQ <del>L</del> VPV <del>R</del> AL
大鼠神经胚素	(1)	MGHHHHHHHHSSGHI <del>DDDDK</del> AGTRSSRARAT <del>D</del> ARGCRLRSQ <del>L</del> VPV <del>S</del> AL
人神经胚素	(51)	GLGHRSE <del>L</del> VRF <del>R</del> FC <del>S</del> G <del>S</del> CRRARS <del>P</del> HD <del>L</del> SLASLLGAGALR <del>P</del> PPGSR <del>P</del> VSQ
大鼠神经胚素	(51)	GLGHSS <del>E</del> LIR <del>R</del> FR <del>F</del> C <del>S</del> G <del>S</del> CRRARS <del>P</del> HD <del>L</del> SLASLLGAGALR <del>S</del> PPGSR <del>P</del> ISQ
人神经胚素	(101)	PCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLS <del>A</del> TACGCLG (SEQ ID NO:2)
大鼠神经胚素	(101)	PCCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDHLS <del>A</del> TACGCLG (SEQ ID NO:3)

图 1

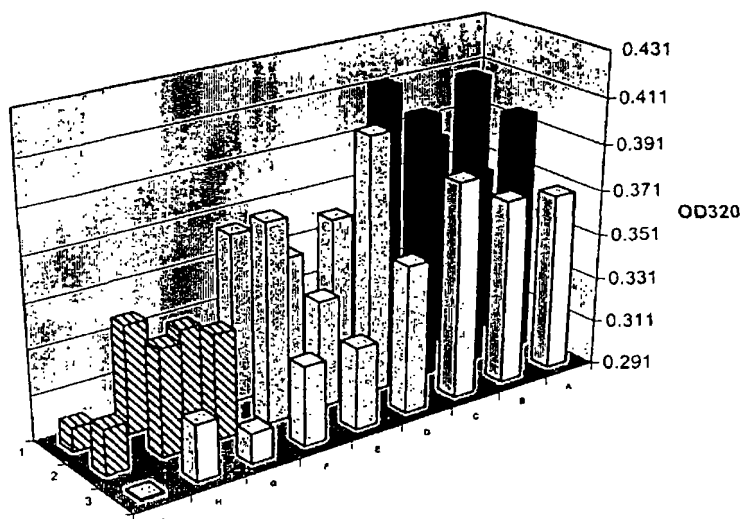


图 2