



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110461880 A

(43)申请公布日 2019.11.15

(21)申请号 201780082828.8

(22)申请日 2017.11.09

(30)优先权数据

62/420480 2016.11.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.07.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/060953 2017.11.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/089702 EN 2018.05.17

(71)申请人 科莱斯疗法公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 J.S.西拉 J.拉基

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 甘霖 黄希贵

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

A61P 25/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

权利要求书3页 说明书20页

序列表24页 附图7页

(54)发明名称

GDNF融合多肽及其使用方法

(57)摘要

本发明涉及GDNF融合多肽的组合物和方法,其中所述GDNF融合多肽包括直接或通过接头与GDNF变体连接的Fc结构域、白蛋白结合肽、纤连蛋白结构域或人血清白蛋白。GDNF融合多肽可以用于治疗代谢疾病,例如肥胖以及1型和2型糖尿病,以及神经性疾病,例如肌萎缩侧索硬化症(ALS)和帕金森氏病。

1. 一种神经胶质衍生的神经营养因子(GDNF)融合多肽,其包含式A-L-B,其中
A包含Fc结构域;
L是接头;和
B包含与参考GDNF序列具有80%序列同一性的GDNF变体,所述参考GDNF序列包含SEQ ID NO:1的氨基酸118-211。
2. 权利要求1的GDNF融合多肽,其进一步包含与所述Fc结构域的N末端连接的白蛋白结合肽。
3. 权利要求1的GDNF融合多肽,其进一步包含与所述Fc结构域的N末端连接的纤连蛋白结构域。
4. 权利要求1的GDNF融合多肽,其进一步包含与所述Fc结构域的N末端连接的人血清白蛋白。
5. 一种GDNF融合多肽,其包含式A-L-B,其中
A包含白蛋白结合肽;
L是接头;和
B包含与参考GDNF序列具有80%序列同一性的GDNF变体,所述参考GDNF序列包含SEQ ID NO:1的氨基酸118-211。
6. 一种GDNF融合多肽,其包含式A-L-B,其中
A包含纤连蛋白结构域;
L是接头;和
B包含与参考GDNF序列具有80%序列同一性的GDNF变体,所述参考GDNF序列包含SEQ ID NO:1的氨基酸118-211。
7. 一种GDNF融合多肽,其包含式A-L-B,其中
A包含人血清白蛋白;
L是接头;和
B包含与参考GDNF序列具有80%序列同一性的GDNF变体,所述参考GDNF序列包含SEQ ID NO:1的氨基酸118-211。
8. 权利要求1-7中任一项的GDNF融合多肽,其中所述GDNF变体由SEQ ID NO:1的氨基酸92-211或其片段组成。
9. 权利要求1-7中任一项的GDNF融合多肽,其中所述参考GDNF序列包含SEQ ID NO:1的氨基酸117-211。
10. 权利要求9的GDNF融合多肽,其中所述参考GDNF序列包含SEQ ID NO:1的氨基酸110-211。
11. 权利要求10的GDNF融合多肽,其中所述参考GDNF序列包含SEQ ID NO:1的氨基酸92-211。
12. 权利要求11的GDNF融合多肽,其中所述参考GDNF序列包含SEQ ID NO:1的氨基酸78-211。
13. 权利要求10-12中任一项的GDNF融合多肽,其中所述GDNF变体包含相对于野生型人GDNF的氨基酸取代,其减少在氨基酸残基85和120之间的蛋白酶水解作用。
14. 权利要求13的GDNF融合多肽,其中所述GDNF变体包含相对于野生型人GDNF的下述

残基中的一个或多个的氨基酸取代:对于非碱性氨基酸,相对于SEQ ID NO:1的序列的R88、R89、R91、R93、R104、K106、R108、R109、R112、K114和R116。

15. 权利要求2或5的GDNF融合多肽,其中所述白蛋白结合肽包含SEQ ID NO:2的序列。

16. 权利要求1-3和9-15中任一项的GDNF融合多肽,其中所述Fc结构域不形成二聚体。

17. 权利要求1-3和9-16中任一项的GDNF融合多肽,其中所述Fc结构域不包含铰链结构域。

18. 权利要求16的GDNF融合多肽,其中所述Fc结构域包含相对于人IgG1的序列的下述氨基酸取代中的一个或多个:T366W、T366Y、T394W、F405W、Y349T、Y349E、Y349V、L351T、L351H、L351N、L352K、P353S、S354D、D356K、D356R、D356S、E357K、E357R、E357Q、S364A、T366E、L368T、L368Y、L368E、K370E、K370D、K370Q、K392E、K392D、T394N、P395N、P396T、V397T、V397Q、L398T、D399K、D399R、D399N、F405T、F405H、F405R、Y407T、Y407H、Y407I、K409E、K409D、K409T和K409I。

19. 权利要求1-18中任一项的GDNF融合多肽,其中所述GDNF融合多肽中的所述接头是键。

20. 权利要求1-18中任一项的GDNF融合多肽,其中所述GDNF融合多肽中的所述接头是间隔物。

21. 权利要求20的GDNF融合多肽,其中所述间隔物包含SEQ ID NO:4-29中任何一个的序列。

22. 权利要求21的GDNF融合多肽,其中所述序列由SEQ ID NO:4或29组成。

23. 权利要求1-22中任一项的GDNF融合多肽,其中所述GDNF融合多肽具有3至60天的血清半衰期。

24. 权利要求1-23中任一项的GDNF融合多肽,其中所述GDNF融合多肽以20至20,000 pM的K_D结合人GDNF家族受体α1 (GFRα1)。

25. 权利要求1-24中任一项的GDNF融合多肽,其中所述GDNF融合多肽由单个开放读码框编码。

26. 权利要求1-7和9-12中任一项的GDNF融合多肽,其中所述GDNF变体与所述参考GDNF序列具有85%的序列同一性。

27. 权利要求26的GDNF融合多肽,其中所述GDNF变体与所述参考GDNF序列具有90%的序列同一性。

28. 权利要求27的GDNF融合多肽,其中所述GDNF变体与所述参考GDNF序列具有95%的序列同一性。

29. 权利要求28的GDNF融合多肽,其中所述GDNF变体与所述参考GDNF序列具有97%的序列同一性。

30. 权利要求1-29中任一项的GDNF融合多肽,其中所述GDNF变体由SEQ ID NO:1的氨基酸118-211、117-211、110-211、92-211或78-211组成。

31. 一种核酸分子,其编码权利要求1-30中任一项的GDNF融合多肽。

32. 一种载体,其包含权利要求31的核酸分子。

33. 一种宿主细胞,其表达权利要求1-30中任一项的GDNF融合多肽、权利要求31的核酸分子或权利要求32的载体。

34. 权利要求33的宿主细胞,其中所述宿主细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。
35. 一种制备权利要求1-30中任一项的GDNF融合多肽的方法,其中所述方法包括:
- a) 提供包含权利要求31的核酸分子或权利要求32的载体的宿主细胞,和
 - b) 在允许所述GDNF融合多肽形成的条件下,在所述宿主细胞中表达所述核酸分子或载体。
36. 权利要求35的方法,其中所述宿主细胞是CHO细胞。
37. 一种药物组合物,其包含权利要求1-30中任一项的GDNF融合多肽、权利要求31的核酸分子或权利要求32的载体,以及一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂。
38. 权利要求37的药物组合物,其中所述GDNF融合多肽为治疗有效量。
39. 一种治疗和/或预防受试者中的代谢疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用权利要求1-30中任一项的GDNF融合多肽、权利要求31的核酸分子、权利要求32的载体或者权利要求37或38的药物组合物。
40. 权利要求39的方法,其中所述代谢疾病选自肥胖、1型糖尿病和2型糖尿病。
41. 权利要求40的方法,其中所述代谢疾病是肥胖。
42. 权利要求40的方法,其中所述代谢疾病是1型糖尿病。
43. 权利要求40的方法,其中所述代谢疾病是2型糖尿病。
44. 权利要求39-43中任一项的方法,其中所述方法减少所述受试者的体重和/或体重增加百分比。
45. 权利要求39-44中任一项的方法,其中所述方法不影响所述受试者对食物摄入的食欲。
46. 权利要求39-45中任一项的方法,其中所述方法减少所述受试者的肥胖。
47. 权利要求39-46中任一项的方法,其中所述方法减少所述受试者的附睾和肾周脂肪垫的重量。
48. 权利要求39-47中任一项的方法,其中所述方法降低所述受试者的空腹胰岛素水平。
49. 权利要求39-48中任一项的方法,其中所述方法增加所述受试者的葡萄糖清除速率。
50. 权利要求39-49中任一项的方法,其中所述方法改善所述受试者的血清脂质概况。
51. 一种治疗和/或预防受试者中的神经性疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用权利要求1-30中任一项的GDNF融合多肽、权利要求31的核酸分子、权利要求32的载体或权利要求37或38的药物组合物。
52. 权利要求51的方法,其中所述神经性疾病选自精神分裂症、癫痫、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、焦虑、中风、脑肿瘤和脑转移。

GDNF融合多肽及其使用方法

[0001] 发明背景

在美国,肥胖是日益严重的问题,具有大约人口的25%的流行率。内脏和皮下脂肪增加引起各种器官功能障碍。过多的体重是任何系列并发症的风险因素,包括肥胖、糖尿病(例如,1型和2型糖尿病)、心血管疾病和几种形式的癌症。

[0002] 当外周组织需要升高量的胰岛素并且与肥胖相关时,发生胰岛素抵抗。一旦胰腺 β 细胞不能再产生足够的胰岛素以满足需求,就发生高血糖症并且发展2型糖尿病。在肥胖中增加的脂肪细胞被认为在该过程中起作用。治疗肥胖及其相关疾病和状况包括代谢疾病(尤其是1型和2型糖尿病)和胰岛素抵抗的努力已采取了从手术到药物的不同方法。

[0003] 尽管肥胖和代谢疾病如糖尿病(例如,1型和2型糖尿病)的普遍存在,但很少的治疗选项是可用的。存在用于这些代谢疾病的新型治疗的需要。

[0004] 发明概述

本发明的特征在于神经胶质衍生的神经营养因子(GDNF)融合多肽,其包括直接或通过接头与GDNF变体的N末端连接的Fc结构域、白蛋白结合肽、纤连蛋白结构域或人血清白蛋白。本发明的GDNF融合多肽与人GDNF家族受体 $\alpha 1$ (GFR $\alpha 1$)结合,并且期望地具有长血清半衰期。本发明的特征还在于药物组合物和使用这些GDNF融合多肽治疗和/或预防代谢疾病(例如肥胖以及1型和2型糖尿病)和神经性疾病(例如精神分裂症、癫痫、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、焦虑、中风、脑肿瘤和脑转移)的方法。

[0005] 在一个方面,本发明的特征在于具有式A-L-B的GDNF融合多肽,其中A包括Fc结构域;L是接头;并且B包括与参考GDNF序列具有至少80%序列同一性(例如,至少85%、90%、95%、97%或100%序列同一性)的GDNF变体,所述参考GDNF序列包括SEQ ID NO:1的氨基酸118-211。

[0006] 在一些实施方案中,GDNF融合多肽进一步包括与Fc结构域的N末端连接的白蛋白结合肽。

[0007] 在其它实施方案中,GDNF融合多肽进一步包括与Fc结构域的N末端连接的纤连蛋白结构域。

[0008] 在另外其它实施方案中,GDNF融合多肽进一步包括与Fc结构域的N末端连接的人血清白蛋白。

[0009] 在另一个方面,本发明的特征在于具有式A-L-B的GDNF融合多肽,其中A包括白蛋白结合肽;L是接头;并且B包括与参考GDNF序列具有至少80%序列同一性(例如,至少85%、90%、95%、97%或100%序列同一性)的GDNF变体,所述参考GDNF序列包括SEQ ID NO:1的氨基酸118-211。

[0010] 在另一个方面,本发明的特征在于具有式A-L-B的GDNF融合多肽,其中A包括纤连蛋白结构域;L是接头;并且B包括与参考GDNF序列具有至少80%序列同一性(例如,至少85%、90%、95%、97%或100%序列同一性)的GDNF变体,所述参考GDNF序列包括SEQ ID NO:1的氨基酸118-211。

[0011] 在另一个方面,本发明的特征在于具有式A-L-B的GDNF融合多肽,其中A包括人血

清白蛋白；L是接头；并且B包括与参考GDNF序列具有至少80%序列同一性（例如，至少85%、90%、95%、97%或100%序列同一性）的GDNF变体，所述参考GDNF序列包括SEQ ID NO:1的氨基酸118-211。

[0012] 在任何上述方面的某些实施方案中，GDNF变体由SEQ ID NO:1的氨基酸92-211或其片段组成。

[0013] 在任何上述方面的一些实施方案中，参考GDNF序列包括SEQ ID NO:1的氨基酸117-211、氨基酸110-211、氨基酸92-211或氨基酸78-211。

[0014] 在一些实施方案中，GDNF变体包括相对于野生型人GDNF的氨基酸取代，其减少SEQ ID NO:1的氨基酸残基85和120之间的蛋白酶水解作用。在某些实施方案中，GDNF变体包括相对于野生型人GDNF的下述残基中的一个或多个的氨基酸取代：对于非碱性氨基酸，相对于SEQ ID NO:1的序列的R88、R89、R91、R93、R104、K106、R108、R109、R112、K114和R116。

[0015] 在一些实施方案中，白蛋白结合肽包括SEQ ID NO:2的序列。

[0016] 在其它实施方案中，Fc结构域不形成二聚体。在另外其它实施方案中，Fc结构域不包括铰链结构域。

[0017] 在一些实施方案中，Fc结构域包括相对于人IgG1的序列的下述氨基酸取代中的一个或多个：T366W、T366Y、T394W、F405W、Y349T、Y349E、Y349V、L351T、L351H、L351N、L352K、P353S、S354D、D356K、D356R、D356S、E357K、E357R、E357Q、S364A、T366E、L368T、L368Y、L368E、K370E、K370D、K370Q、K392E、K392D、T394N、P395N、P396T、V397T、V397Q、L398T、D399K、D399R、D399N、F405T、F405H、F405R、Y407T、Y407H、Y407I、K409E、K409D、K409T和K409I。野生型Fc结构域的序列显示于SEQ ID NO:3中。

[0018] 在一些实施方案中，GDNF融合多肽中的接头是键。在其它实施方案中，GDNF融合多肽中的接头是间隔物。在特定实施方案中，间隔物包括SEQ ID NO:4-29中任何一个的序列。

[0019] 在一些实施方案中，GDNF融合多肽中的纤连蛋白结构域是具有UniProt ID NO:P02751序列的氨基酸610-702的纤连蛋白III型结构域（SEQ ID NO:30）。在其它实施方案中，纤连蛋白结构域是adnectin蛋白。

[0020] 在一些实施方案中，GDNF融合多肽中的人血清白蛋白具有UniProt ID NO:P02768（SEQ ID NO:31）的序列。

[0021] 在一些实施方案中，本文所述的本发明的GDNF融合多肽具有3至60天的血清半衰期。

[0022] 在其它实施方案中，GDNF融合多肽以20至20,000 pM的K_d结合人GDNF家族受体α1（GFRα1）。

[0023] 在一些实施方案中，GDNF融合多肽由单个开放读码框编码。

[0024] 在另一个方面，本发明的特征在于编码本文所述GDNF融合多肽的核酸分子。

[0025] 在还另一个方面，本发明的特征在于含有编码本文所述GDNF融合多肽的核酸分子的载体。

[0026] 在再另一个方面，本发明的特征在于表达本文所述GDNF融合多肽的宿主细胞、编码本文所述GDNF融合多肽的核酸分子或含有此类核酸分子的载体。

[0027] 在某些实施方案中，宿主细胞是哺乳动物细胞（例如，中国仓鼠卵巢（CHO）细胞）。在其它实施方案中，宿主细胞是人胚肾（HEK）（例如，HEK293、HEK 293F）、HeLa、

COS、PC3、Vero、MC3T3、NS0、Sp2/0、VERY、BHK、MDCK、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、T47D、NS0(并不内源性产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030或HsS78Bst细胞。

[0028] 在另外其它实施方案中,宿主细胞是细菌细胞(例如,大肠杆菌(*E. coli*)细胞)。大肠杆菌菌株的实例包括但不限于大肠杆菌294(ATCC[®] 31,446)、大肠杆菌λ1776(ATCC[®] 31,537、大肠杆菌BL21(DE3)(ATCC[®] BAA-1025)和大肠杆菌RV308(ATCC[®] 31,608)。

[0029] 在另一个方面,本发明的特征在于制备本发明的GDNF融合多肽的方法。该方法包括以下步骤:a)提供宿主细胞,其包括编码本文所述的GDNF融合多肽的核酸分子或含有此类核酸分子的载体,和b)在允许GDNF融合多肽产生的条件下,在宿主细胞中表达核酸分子或载体。

[0030] 在一些实施方案中,在制备本发明的任何GDNF融合多肽的方法中使用的宿主细胞是CHO细胞。在其它实施方案中,该方法中使用的宿主细胞是人胚肾(HEK)(例如,HEK293、HEK 293F)、HeLa、COS、PC3、Vero、MC3T3、NS0、Sp2/0、VERY、BHK、MDCK、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、T47D、NS0(并不内源性产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030或HsS78Bst细胞。

[0031] 在另外其它实施方案中,该方法中使用的宿主细胞是细菌细胞(例如,大肠杆菌细胞)。大肠杆菌菌株的实例包括但不限于大肠杆菌294(ATCC[®] 31,446)、大肠杆菌λ1776(ATCC[®] 31,537、大肠杆菌BL21(DE3)(ATCC[®] BAA-1025)和大肠杆菌RV308(ATCC[®] 31,608)。

[0032] 在另一个方面,本发明的特征在于药物组合物,其包括本发明的GDNF融合多肽、编码本发明的GDNF融合多肽的核酸分子或含有编码本发明的GDNF融合多肽的核酸分子的载体,以及一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂,其中所述GDNF融合多肽为治疗有效量。

[0033] 在还另一个方面,本发明的特征在于治疗和/或预防受试者中的代谢疾病的方法。该方法包括向受试者施用本文所述的GDNF融合多肽、核酸分子、载体或药物组合物的步骤。

[0034] 在一些实施方案中,代谢疾病选自肥胖、1型糖尿病和2型糖尿病。

[0035] 在一些实施方案中,代谢疾病是肥胖。在其它实施方案中,代谢疾病是1型糖尿病。在另外其它实施方案中,代谢疾病是2型糖尿病。

[0036] 在其它实施方案中,治疗和/或预防受试者中的代谢疾病的方法减少受试者的体重和/或体重增加的百分比。

[0037] 在一些实施方案中,该方法不影响受试者对食物摄入的食欲。在其它实施方案中,该方法减少受试者的肥胖。在其它实施方案中,该方法减少受试者的肥胖而不影响瘦体重。在另外其它实施方案中,该方法减少受试者的附睾和肾周脂肪垫的重量。在其它实施方案中,该方法降低受试者的空腹胰岛素水平、增加受试者的葡萄糖清除速率和/或改善受试者的血清脂质概况。

[0038] 在再另一个方面,本发明的特征在于治疗和/或预防受试者中的神经性疾病的方法。该方法包括向受试者施用本文所述的GDNF融合多肽,核酸分子,载体或药物组合物的步骤。

[0039] 在一些实施方案中,神经性疾病选自精神分裂症、癫痫、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、焦虑、中风、脑肿瘤和脑转移。

[0040] 定义

如本文使用的,术语“GDNF变体”指含有野生型人GDNF(本文进一步定义)的突变体或片

段的多肽,其具有比野生型人GDNF更长的血清半衰期。在一些实施方案中,GDNF变体与具有SEQ ID NO:1的氨基酸118-211、117-211、110-211、92-211或78-211的参考GDNF序列(在本文中进一步定义)具有至少80%的序列同一性(例如,80%、85%、90%、95%、97%或100%的序列同一性)。在一些实施方案中,GDNF变体含有相对于野生型人GDNF的氨基酸取代,其减少SEQ ID NO:1的氨基酸残基85和120之间的蛋白酶水解作用。此类氨基酸取代在本文中进一步详细描述。

[0041] 如本文使用的,术语“野生型人GDNF”指具有SEQ ID NO:1的序列的人神经胶质衍生的神经营养因子(GDNF)的天然形式。

[0042] 如本文使用的,术语“Fc结构域”指与人Fc结构域具有至少80%序列同一性(例如,至少85%、90%、95%、97%或100%序列同一性)的蛋白质,所述人Fc结构域至少包括C_H2结构域和C_H3结构域。任选地,Fc结构域含有减少或抑制Fc结构域二聚化的一个或多个氨基酸取代。任选地,Fc结构域含有铰链结构域。Fc结构域可以是免疫球蛋白抗体同种型IgG、IgE、IgM、IgA或IgD。另外,Fc结构域可以是IgG亚型(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3或IgG4)。Fc结构域也可以是非天然存在的Fc结构域,例如重组Fc结构域。

[0043] 如本文使用的,术语“白蛋白结合肽”指12至16个氨基酸的氨基酸序列,其对于血清白蛋白具有亲和力且作用于结合血清白蛋白。白蛋白结合肽可以具有不同起源,例如人、小鼠或大鼠。在一些实施方案中,白蛋白结合肽具有序列DICLPWGLW(SEQ ID NO:2)。

[0044] 如本文使用的,术语“纤连蛋白结构域”指细胞外基质或其片段的高分子量糖蛋白,其结合例如跨膜受体蛋白如整联蛋白和细胞外基质组分如胶原蛋白和纤维蛋白。在一些实施方案中,纤连蛋白结构域是具有UniProt ID NO:P02751的序列的氨基酸610-702的纤连蛋白III型结构域(SEQ ID NO:30)。在其它实施方案中,纤连蛋白结构域是adnectin蛋白。

[0045] 如本文使用的,术语“人血清白蛋白”指存在于人血浆中的白蛋白。人血清白蛋白是血液中最丰富的蛋白质。它占血液血清蛋白质的约一半。在一些实施方案中,人血清白蛋白具有UniProt ID NO:P02768(SEQ ID NO:31)的序列。

[0046] 如本文使用的,术语“接头”指两种元件(例如蛋白质结构域)之间的连接。接头可以是共价键或间隔物。术语“键”指化学键,例如酰胺键或二硫键,或者由化学反应例如化学缀合产生的任何种类的键。术语“间隔物”指在两个多肽或多肽结构域之间存在的部分(例如,聚乙二醇(PEG)聚合物)或氨基酸序列(例如,3-200个氨基酸序列),以提供两个多肽或多肽结构域之间的空间和/或灵活性。氨基酸间隔物可以是多肽的一级序列的部分(例如,经由多肽主链与间隔开的多肽或多肽结构域连接)。

[0047] 如本文使用的,术语“连接”用于描述两种或更多种元件、组分或蛋白质结构域(例如多肽)通过手段包括化学缀合、重组手段和化学键例如二硫键和酰胺键的组合或附着。例如,可以通过化学缀合、化学键、肽接头或任何其它共价连接手段,将两个单个多肽连接以形成一个连续的蛋白质结构。在一些实施方案中,Fc结构域通过肽接头与GDNF变体连接,其中所述肽接头的N末端通过化学键(例如肽键)与Fc结构域的C末端连接,并且所述肽接头的C末端通过化学键(例如肽键)与GDNF变体的N末端连接。在其它实施方案中,白蛋白结合肽的C末端以与上文所述相同的方式通过接头与GDNF变体的N末端连接。

[0048] 如本文使用的,术语“人GDNF家族受体α1(GFRα1)”指糖基磷脂酰肌醇(GPI)连接的

细胞表面蛋白,其属于由至少四个成员组成的GDNF-家族受体 α 亚型:GFR α 1、GFR α 2、GFR α 3和GFR α 4。

[0049] 如本文使用的,术语“结合亲和力”指两种分子之间的结合相互作用的强度。一般地,结合亲和力指分子及其结合配偶体(例如本发明的GDNF融合多肽)与其靶受体(例如人GDNF家族受体 α 1(GFR α 1))之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,否则结合亲和力指内在结合亲和力,其反映结合对的成员之间的1:1相互作用。两种分子之间的结合亲和力通常通过解离常数(K_D)或亲和常数(K_A)来描述。对于彼此具有低结合亲和力的两种分子一般缓慢结合,趋于容易解离,并且显示出大的 K_D 。对于彼此具有高亲和力的两种分子一般容易结合,趋于保持结合更久,并且显示出小的 K_D 。可以使用本领域众所周知的方法和技术,例如表面等离子共振,确定两种相互作用分子的 K_D 。 K_D 计算为 k_{off}/k_{on} 的比率。本文进一步描述了具体的说明性实施方案(参见例如实施例2)。在一些实施方案中,如本文所述的GDNF融合多肽以例如20至20,000 pM的 K_D 结合人GDNF家族受体 α 1(GFR α 1)。

[0050] 如本文使用的,在向受试者施用治疗性蛋白质的情况下,术语“血清半衰期”指受试者中蛋白质的血浆浓度减少一半所需的时间。蛋白质可以重新分布或从血流中清除,或降解,即通过蛋白酶水解作用。例如,具有去除的蛋白酶水解切割位点(即,SEQ ID NO:1的氨基酸85-120)或含有在蛋白酶水解切割位点内的氨基酸取代、包括GDNF变体的本发明的GDNF融合多肽,具有比野生型人GDNF更长的血清半衰期。蛋白质的血清半衰期可以使用本领域众所周知的技术测量,所述技术例如酶联免疫吸附测定(ELISA)(参见例如实施例4和图2)、蛋白质印迹、显微镜检查和质谱法。在一些实施方案中,如本文所述的GDNF融合多肽具有例如3至60天的血清半衰期。

[0051] 如本文使用的,术语“蛋白酶水解作用”指通过肽主链的水解将蛋白质分解成较小的多肽或氨基酸的过程。野生型人GDNF包括在SEQ ID NO:1的氨基酸残基85和120之间的潜在蛋白酶水解切割位点,并且因此具有短的血清半衰期。本发明的GDNF融合多肽包括具有缺失的蛋白酶水解切割位点或在蛋白酶水解切割位点内的氨基酸取代的GDNF变体,使得与野生型人GDNF相比,GDNF融合多肽具有减少的蛋白酶解和增加的血清半衰期。在一些实施方案中,GDNF融合多肽中的GDNF变体具有在蛋白酶水解切割位点内缺失或改变的蛋白酶水解切割位点(即,SEQ ID NO:1的氨基酸残基85和120)。

[0052] 如本文使用的,术语“非碱性氨基酸”指其侧链在例如生理学pH(例如pH 7.4)下不具有正电荷的氨基酸。非碱性氨基酸是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、脯氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。

[0053] 如本文使用的,术语“单个开放读码框”指单链中的核酸(即DNA)残基的排列,其可以通过宿主细胞内的分子机器翻译且表达成单一多肽。单个开放读码框中的核酸残基可以编码一系列序贯排列的一个或多个基因。

[0054] 如本文使用的,术语“核酸分子”指任何长度的核苷酸聚合物,并且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和/或其类似物,或者可以通过DNA或RNA聚合酶或通过合成反应掺入聚合物内的任何底物。核酸分子可以含有修饰的核苷酸,例如甲基化核苷酸及其类似物。如果存在的话,则可以在聚合物组装之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。核酸分子可以在合成

后例如通过与标记缀合进一步修饰。其它类型的修饰包括例如,用类似的核苷酸间修饰取代一个或多个天然存在的核苷酸,所述类似的核苷酸间修饰例如具有非荷电连接(例如,甲基磷酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等)和具有荷电连接(例如,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的那些、含有悬垂部分例如蛋白质(例如,核酸酶、毒素、抗体、信号肽、ply-L-赖氨酸等)的那些、具有嵌合剂(例如,吡啶、补骨脂素等)的那些、含有螯合剂(例如,金属、放射性金属、硼、氧化金属等)的那些、含有烷基化剂的那些、具有修饰连接(例如, α 异头核糖等)的那些、以及核酸分子的未修饰形式。此外,通常存在于糖中的任何羟基可以例如被替换为磷酸酯基团、磷酸基团,被标准保护基团保护,或被活化以制备与另外核苷酸的另外连接,或可以缀合至固体或半固体载体。5'和3'末端OH可以被磷酸化或者被胺或1-20个碳原子的有机封端基团部分取代。其它羟基也可以衍生为标准保护基团。核酸分子还可以含有本领域一般已知的类似形式的核糖或脱氧核糖,包括例如2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基-、2'-氟-或2'-叠氮-核糖、碳环糖类似物、 α -异头糖、差向异构糖如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、无环类似物和碱性核苷类似物如甲基核糖苷。一个或多个磷酸二酯连接可以替换为替代的连接基团。这些替代的连接基团包括但不限于其中磷酸盐被替换为P(O)S(“硫酯(thioate)”)、P(S)S(“二硫酯”)、(O)NR₂(“酰胺化物”)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂(“甲缩醛”)取代的实施方案,其中每个R或R'独立地为H或者任选含有醚(-O-)连接、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基(araldyl)的取代或未取代的烷基(1-20 C)。并非核酸分子中的所有连接都必须是相同的。前述描述适用于本文提及的所有核酸分子,包括DNA和RNA。

[0055] 如本文使用的,术语“多肽”描述单一聚合物,其中单体是通过酰胺键连接在一起的氨基酸残基。多肽预期涵盖天然存在的、重组的或合成产生的任何氨基酸序列。

[0056] 如本文使用的,术语“治疗和/或预防”指使用本发明的方法和组合物治疗和/或预防疾病,例如代谢疾病(例如,肥胖、1型和2型糖尿病)或神经性疾病(例如,ALS和帕金森氏病)。一般地,治疗代谢疾病或神经性疾病在受试者已发展代谢疾病或神经性疾病和/或已经诊断有代谢疾病或神经性疾病之后发生。预防代谢疾病或神经性疾病指当受试者处于发展代谢疾病或神经性疾病的风险时采取的步骤或程序。受试者可以显示由医生判断为发展代谢疾病或神经性疾病的指示或危险因素的体征或轻度症状,但尚未发展疾病。

[0057] 如本文使用的,术语“代谢疾病”指与受试者的代谢相关的疾病、病症或综合征,例如分解食物中的碳水化合物、蛋白质和脂肪以释放能量,以及将化学物质转换成其它物质且在细胞内转运它们用于能量利用和/或贮存。代谢疾病的一些症状包括高血清甘油三酯、高低密度胆固醇(LDL)、低高密度胆固醇(HDL)和/或高空腹胰岛素水平、升高的空腹血糖、腹部(中心)肥胖和升高的血压。代谢疾病增加发展其它疾病例如心血管疾病的风险。在本发明中,代谢疾病包括但不限于肥胖、1型糖尿病和2型糖尿病。

[0058] 如本文使用的,术语“体重增加的百分比”指与在先前时间的受试者的先前体重相比获得的体重的百分比。体重增加的百分比可以如下计算:

$$100 \times [(\text{在以后时间的体重} - \text{在先前时间的体重}) / (\text{在先前时间的体重})]。$$

[0059] 在本发明中,向受试者施用GDNF融合多肽、编码GDNF融合多肽的核酸分子或含有此类核酸分子的载体减少受试者的体重增加的百分比(参见例如实施例5和图3)。

[0060] 如本文使用的,术语“对食物摄入的食欲”指受试者对于食物的自然欲望或需要。

可以通过测量施用GDNF融合多肽后消耗的食物量来监测受试者对食物摄入的食欲(参见例如实施例6和图4)。在本发明中,向受试者施用GDNF融合多肽、编码GDNF融合多肽的核酸分子或含有此类核酸分子的载体不影响受试者对食物摄入的食欲。

[0061] 如本文使用的,术语“肥胖”指贮存于受试者的脂肪组织中的脂肪。在本发明中,向受试者施用GDNF融合多肽、编码GDNF融合多肽的核酸分子或含有此类核酸分子的载体减少受试者的肥胖而不影响瘦体重。

[0062] 如本文使用的,术语“瘦体重”指身体组成的组分,其包括例如瘦体重、体脂和体液。通常通过从总体重中减去体脂和体液的重量来计算瘦体重(参见例如实施例7和图5)。通常,受试者的瘦体重在总体重的60%至90%之间。在本发明中,向受试者施用GDNF融合多肽、编码GDNF融合多肽的核酸分子或含有此类核酸分子的载体减少受试者的肥胖(即脂肪)而不影响瘦体重。

[0063] 如本文使用的,术语“附睾和肾周脂肪垫”指附睾中和肾周围中紧密堆积的脂肪细胞。在本发明中,向受试者施用GDNF融合多肽、编码GDNF融合多肽的核酸分子或含有此类核酸分子的载体减少受试者的附睾和肾周脂肪垫的重量。

[0064] 如本文使用的,术语“空腹胰岛素”指在受试者对于一段时间(即12-24小时)没有任何食物摄入的同时,受试者的胰岛素水平。空腹胰岛素水平用于诊断代谢疾病。空腹胰岛素水平也用于指示受试者是否处于发展代谢疾病的风险中。通常,在患有1型糖尿病的受试者中,受试者的空腹胰岛素水平与健康受试者的那种相比很低。在患有胰岛素抗性(即,2型糖尿病)的受试者中,受试者的空腹胰岛素水平与健康受试者的那种相比很高。在本发明中,向受试者施用GDNF融合多肽、编码GDNF融合多肽的核酸分子或含有此类核酸分子的载体降低受试者的空腹胰岛素水平。

[0065] 如本文使用的,术语“葡萄糖清除速率”指葡萄糖从血液中清除的速率。葡萄糖清除速率可以在葡萄糖耐量测试(GTT)中测量(参见例如实施例8和图6)。在GTT中,受试者给予一定量的葡萄糖,之后获取血样以确定它如何快速地从血液中清除。葡萄糖清除速率可以用作诊断和/或确定发展代谢疾病(例如肥胖、糖尿病和胰岛素抗性)的风险的参数。

[0066] 如本文使用的,术语“血清脂质概况”指受试者的血清中不同类型的脂质和脂蛋白的分布测量。此类测量可以通过一组血液测试来完成。受试者的血清中的脂质和脂蛋白的类型包括但不限于胆固醇(例如,高密度脂蛋白(HDL)和低密度脂蛋白(LDL))、甘油三酯和游离脂肪酸(FFA)。不同类型的脂质和脂蛋白的分布可以用作诊断和/或确定发展代谢疾病(例如肥胖、糖尿病和胰岛素抗性)的风险的参数。高水平的胆固醇,尤其是低密度脂蛋白,一般被认为是关于发展某些代谢疾病,或者在一些严重的医学病例中,心血管疾病的指示或风险因素。在本发明中,向受试者施用GDNF融合多肽、编码GDNF融合多肽的核酸分子或含有此类核酸分子的载体改善受试者的血清脂质概况,使得胆固醇(尤其是低密度脂蛋白)和甘油三酯的水平降低。

[0067] 如本文使用的,术语“流体动力学注射”指体内基因递送方法,其中以大流体体积的含有编码目标蛋白质(例如,本发明的GDNF融合多肽)的核酸分子的改造质粒(例如,病毒质粒)快速静脉内注射到受试者内。流体动力学注射使用静脉中的受控流体动力学压力来增强细胞渗透性,使得来自大流体体积的快速注射的升高压力导致流体和质粒从静脉外渗。一般地,核酸分子在改造质粒中处于强启动子的控制下。核酸分子的表达主要由肝驱

动。在小鼠中,经常通过将质粒注射到尾静脉内来执行流体动力学注射。

[0068] 如本文所用,术语“百分比(%)序列同一性”是指在比对序列和引入空位(如果必要)以实现最大序列百分比同一性(即,可以在候选和参考序列中的一者或两者中引入空位用于最佳比对,并且为了比较的目的,可以忽略非同源序列)之后,候选序列(例如,GDNF变体的序列)的氨基酸(或核酸)残基与参考序列(例如,野生型人GDNF)的氨基酸(或核酸)残基相同的百分比。为了确定百分比同一性的目的的比对可以以本领域技术内的各种方式,例如,使用公开获得的计算机软件诸如BLAST、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件来实现。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括实现待比较序列全长内的最大比对所需的任何算法。在一些实施方案中,给定候选序列对、与或针对给定参考序列的百分比氨基酸(或核酸)序列同一性(其可以替代地表达为对、与或针对给定参考序列具有或包括特定百分比氨基酸(或核酸)序列同一性的给定候选序列)如下计算:

$$100 \times (A/B \text{ 的分数})$$

其中A是在候选序列和参考序列的比对中评分为相同的氨基酸(或核酸)残基的数目,并且其中B是参考序列中氨基酸(或核酸)残基的总数。在其中候选序列的长度不等于参考序列的长度的一些实施方案中,候选序列与参考序列的百分比氨基酸(或核酸)序列同一性不等于参考序列与候选序列的百分比氨基酸(或核酸)序列同一性。

[0069] 在具体实施方案中,比对用于与候选序列比较的参考序列可以显示候选序列在候选序列的全长或候选序列的连续氨基酸(或核酸)残基的选择部分上表现出50%至100%同一性。为了比较目的而比对的候选序列的长度为参考序列的长度的至少30%,例如,至少40%,例如,至少50%、60%、70%、80%、90%或100%。当候选序列中的位置被与参考序列中的相应位置相同的氨基酸(或核酸)残基占据时,则分子在该位置是相同的。

[0070] 如本文使用的,术语“参考GDNF序列”指这样的基础序列,其可以与其它序列(即GDNF变体的序列)进行比较,以便计算例如GDNF变体的序列与参考GDNF序列的百分比序列同一性。参考GDNF序列中的氨基酸(或核酸)残基的总数目通常用于此类比较中。在上式中,计算候选序列(例如GDNF变体的序列)与参考序列(例如参考GDNF序列)的百分比序列同一性的 $100 \times (A/B \text{ 的分数})$,A是GDNF变体的序列中与参考GDNF序列中相应位置中的残基相同的氨基酸(或核酸)残基的数目,并且B是参考GDNF序列中的氨基酸(或核酸)残基的总数目。

[0071] 如本文使用的,术语“宿主细胞”指包括从其相应的核酸表达蛋白质所需的必需细胞组分(例如细胞器)的媒介物。核酸通常包括在核酸载体中,所述核酸载体可以通过本领域已知的常规技术(例如,转化、转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、直接显微注射等)引入宿主细胞内。宿主细胞可以是原核细胞,例如细菌细胞,或真核细胞,例如哺乳动物细胞(例如CHO细胞)。如本文所述,宿主细胞用于表达编码本发明的GDNF融合多肽的核酸分子。

[0072] 如本文使用的,术语“载体”指能够转运它已与之连接的另一种核酸分子的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,其指另外的DNA区段其中可以连接到其内的环状双链DNA环。另一种类型的载体是噬菌体载体。另一种类型的载体是病毒载体,其中另外的DNA区段可以连接到病毒基因组内。某些载体能够在它们引入其内的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其它载体(例如,非附加型哺乳动物载体)可以在引入宿主细胞内之后整合到宿主细胞的基因组内,并且从而连同宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导它们与之可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中称为

“重组表达载体”（或简称为“重组载体”）。一般而言，在重组DNA技术中有用的表达载体经常是质粒的形式。在一些实施方案中，载体可以包括允许多重GDNF融合多肽表达的核糖体进入位点（IRES）。在本发明的一些实施方案中，病毒载体用于编码本发明的GDNF融合多肽的核酸分子的体内基因递送和表达。用于基因递送的病毒载体包括但不限于逆转录病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体（例如牛痘病毒载体，例如改良的牛痘Ankara (MVA)）、腺相关病毒载体和甲病毒载体。

[0073] 如本文使用的，术语“受试者”指哺乳动物，例如优选人。哺乳动物包括但不限于人以及驯养动物和农场动物，例如猴（例如食蟹猴）、小鼠、狗、猫、马和牛等。

[0074] 如本文使用的，术语“药物组合物”指医学制剂或药物制剂，其含有活性成分以及赋形剂和稀释剂，以致使活性成分适合于施用方法。本发明的药物组合物包括与GDNF融合多肽、编码GDNF融合多肽的核酸分子或含有此类核酸分子的载体相容的药学上可接受的组分。药物组合物可以是用于静脉内或皮下施用的含水形式，或者是用于经口施用的片剂或胶囊形式。

[0075] 如本文使用的，术语“药学上可接受的载体”指药物组合物中的赋形剂或稀释剂。药学上可接受的载体必须与制剂的其它成分相容并且对接受者无害。在本发明中，药学上可接受的载体必须对GDNF融合多肽、编码GDNF融合多肽的核酸分子或含有此类核酸分子的载体提供足够的药物稳定性。载体的性质因施用模式而异。例如，对于静脉内施用，一般使用水溶液载体；对于经口施用，优选固体载体。

[0076] 如本文使用的，术语“治疗有效量”指有效诱导受试者或患者中的所需生物效应或者治疗和/或预防患者患有本文所述的状况或疾病的量，例如药物剂量。本文还应理解，“治疗有效量”可以解释为以一个剂量或任何剂量或途径服用、单独或与其它治疗剂组合服用给予所需疗效的量。

[0077] 附图简述

图1A是蛋白质印迹，其显示了本发明的各种GDNF融合多肽（融合多肽1-5，参见实施例1）的表达。

[0078] 图1B是三个十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）凝胶的图示，其分别显示了在还原或非还原条件下融合多肽2、3和4的表达。

[0079] 图2是显示了小鼠中GDNF融合多肽的血清浓度的四个曲线图的图示。

[0080] 图3是显示了GDNF融合多肽6对体重的作用的两个曲线图的图示。

[0081] 图4是显示了GDNF融合多肽6对食物摄入的作用的柱状图。

[0082] 图5包括显示了GDNF融合多肽6对身体组成的作用的两个图。

[0083] 图6是显示了GDNF融合多肽6对葡萄糖清除速率的作用的曲线图。

[0084] 发明详述

本发明的特征在于制备作为治疗性蛋白质的胶质衍生的神经营养因子（GDNF）融合多肽的组合物和方法。本发明的GDNF融合多肽与人GDNF家族受体 $\alpha 1$ （GFR $\alpha 1$ ）结合，并且具有长血清半衰期。本发明的特征还在于药物组合物和使用这些GDNF融合多肽治疗和/或预防代谢疾病（例如肥胖以及1型和2型糖尿病）和神经性疾病（例如精神分裂症、癫痫、肌萎缩侧索硬化症（ALS）、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、焦虑、中风、脑肿瘤和脑转移）的方法。

[0085] I. GDNF融合多肽

一般而言,本发明的特征在于具有式A-L-B的GDNF融合多肽,其中A包括直接或通过接头与GDNF变体的N末端连接的Fc结构域、白蛋白结合肽、纤连蛋白结构域或人血清白蛋白。在优选的实施方案中,GDNF融合多肽由单个开放读码框编码。在一些实施方案中,当A包括Fc结构域时,本发明的GDNF融合多肽进一步包括直接或通过接头与Fc结构域的N末端连接的白蛋白结合肽、纤连蛋白结构域或人血清白蛋白。

[0086] 在某些实施方案中,本发明的GDNF融合多肽具有3至60天的血清半衰期。在其它实施方案中,GDNF融合多肽以20至20,000 pM的 K_D 结合人GDNF家族受体 $\alpha 1$ (GFR $\alpha 1$)。

[0087] II. GDNF变体

GDNF变体是含有野生型人GDNF (SEQ ID NO:1) 的突变体或片段的多肽。在一些实施方案中,GDNF变体与参考GDNF序列具有至少80%的序列同一性(例如,至少85%、90%、95%、97%或100%的序列同一性),所述参考GDNF序列包括SEQ ID NO:1的氨基酸118-211、117-211、110-211、92-211或78-211。野生型人GDNF的氨基酸序列显示于下文。

[0088] SEQ ID NO: 1: 野生型人GDNF

```
1 MKLWDVVAVC LVLLHTASAF PLPAGKRPPE APAEDRSLGR RRAPFALSSD SNMPEDYPDQ
61 FDDVMDFIQA TIKRLKRSPD QQMAVLPRRE RNRQAAAAANP ENSRGKGRRG QRGKNGRCVL
121 TAIHLNVTDL GLGYETKEEL IFRYCSGSCD AAETTYDKIL KNLSRNRRLV SDKVQGACCR
181 PIAFDDDLSE LDDNLVYHIL RKHSKRKRCG I
```

[0089] 人GDNF的氨基酸78-211构成GDNF功能结构域。在某些实施方案中,GDNF变体由SEQ ID NO:1的氨基酸92-211或其片段组成。在一些实施方案中,GDNF变体由SEQ ID NO:1的氨基酸118-211、氨基酸117-211、氨基酸110-211、氨基酸92-211或氨基酸78-211组成。

[0090] 野生型人GDNF含有潜在的蛋白酶水解切割位点,其大约在SEQ ID NO:1的氨基酸85和120之间。该GDNF位点使蛋白质易于蛋白酶水解作用和降解。因此,野生型人GDNF经常显示出例如小于10分钟的短血清半衰期(参见例如Boado等人,*Drug Metab Dispos.* 37: 2299-304, 2009的图4)。

[0091] 为了改善蛋白质的血清半衰期,GDNF变体可以具有缺失的蛋白酶水解切割位点。在其它实施方案中,GDNF变体含有相对于野生型人GDNF的氨基酸取代,其减少潜在蛋白酶水解位点(即,SEQ ID NO:1的氨基酸残基85和120之间)内的蛋白酶水解作用。此类氨基酸取代包括在蛋白酶水解切割位点中的荷电氨基酸例如精氨酸和赖氨酸取代非碱性氨基酸。可以取代非碱性氨基酸的氨基酸85和120之间的荷电氨基酸例如精氨酸和赖氨酸,包括R88、R89、R91、R93、R104、K106、R108、R109、R112、K114和R116。这些氨基酸残基可以取代非碱性氨基酸,如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、脯氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。

[0092] 包括上述GDNF变体的GDNF融合多肽展示例如3至60天的长血清半衰期,并且维持对于GFR $\alpha 1$ 的所需结合亲和力,例如具有20至20,000 pM的 K_D 。

[0093] III. Fc结构域

在本发明中,“Fc结构域”指与人Fc结构域具有至少80%序列同一性(例如,至少85%、90%、95%、97%或100%序列同一性)的蛋白质,所述人Fc结构域至少包括 C_{H2} 结构域和 C_{H3} 结构域。任选地,Fc结构域含有减少或抑制Fc结构域二聚化的一个或多个氨基酸取代。任选地,

Fc结构域含有铰链结构域。Fc结构域可以是免疫球蛋白抗体同种型IgG、IgE、IgM、IgA或IgD。另外，Fc结构域可以是IgG亚型(例如、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3或IgG4)。Fc结构域也可以是非天然存在的Fc结构域，例如重组Fc结构域。

[0094] 改造具有减少二聚化的Fc结构域的方法是本领域已知的。在一些实施方案中，可以将具有大侧链的一种或多种氨基酸(例如酪氨酸或色氨酸)引入 C_H3-C_H3 二聚体界面，以由于空间碰撞而阻碍二聚体形成。在其它实施方案中，可以将具有小侧链的一种或多种氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸或苏氨酸)引入 C_H3-C_H3 二聚体界面，以去除有利的相互作用。在 C_H3 结构域中引入具有大或小侧链的氨基酸的方法描述于例如Ying等人(*J Biol Chem.* 287:19399-19408,2012)、美国专利公开号2006/0074225、美国专利号8,216,805和5,731,168、Ridgway等人(*Protein Eng.* 9:617-612,1996)、Atwell等人(*J Mol Biol.* 270:26-35,1997)和Merchant等人(*Nat Biotechnol.* 16:677-681,1998)，所有这些参考文献都通过引用整体并入本文。

[0095] 在另外其它实施方案中，构成两个Fc结构域之间的 C_H3-C_H3 界面的 C_H3 结构域中的一个或多个氨基酸残基被替换为带正电荷的氨基酸残基(例如，赖氨酸、精氨酸或组氨酸)或带负电荷的氨基酸残基(例如，天冬氨酸或谷氨酸)，使得取决于引入的特定荷电氨基酸，相互作用变得静电上不利。在 C_H3 结构域中引入荷电氨基酸以不利于或阻止二聚体形成的方法描述于例如Ying等人(*J Biol Chem.* 287:19399-19408,2012)，美国专利公开号2006/0074225、2012/0244578和2014/0024111，所有这些参考文献都通过引用整体并入本文。

[0096] 在本发明的一些实施方案中，Fc结构域包括相对于人IgG1的序列的下述氨基酸取代中的一个或多个：T366W、T366Y、T394W、F405W、Y349T、Y349E、Y349V、L351T、L351H、L351N、L352K、P353S、S354D、D356K、D356R、D356S、E357K、E357R、E357Q、S364A、T366E、L368T、L368Y、L368E、K370E、K370D、K370Q、K392E、K392D、T394N、P395N、P396T、V397T、V397Q、L398T、D399K、D399R、D399N、F405T、F405H、F405R、Y407T、Y407H、Y407I、K409E、K409D、K409T和K409I。在一个特定实施方案中，相对于人IgG1的序列，Fc结构域包括氨基酸取代T366W。野生型Fc结构域的序列显示于SEQ ID NO:3中。

[0097] IV. 白蛋白结合肽

与血清蛋白质肽的结合可以改善蛋白质药物的药代动力学，并且特别地此处所述的GDNF融合多肽可以与血清蛋白质结合肽连接。

[0098] 作为一个实例，可以用于本文所述的方法和组合物中的白蛋白结合肽一般是本领域已知的。在一个实施方案中，白蛋白结合肽包括序列DICLPRWGCLW(SEQ ID NO:2)。

[0099] 在本发明中，白蛋白结合肽可以连接到本发明的GDNF融合多肽中的Fc结构域的N末端，以增加GDNF融合多肽的血清半衰期。白蛋白结合肽可以直接或通过接头连接到Fc结构域的N末端。在其它实施方案中，白蛋白结合肽直接或通过接头连接到GDNF变体的N末端。

[0100] 白蛋白结合肽可以与GDNF融合多肽遗传融合，或通过化学方法例如化学缀合与GDNF融合多肽连接。如果需要，则可以在GDNF融合多肽和白蛋白结合肽之间插入间隔物。不受理论束缚，预期在本发明的GDNF融合多肽中包括白蛋白结合肽可以通过其与血清蛋白的结合而导致治疗性蛋白质的延长保留。

[0101] V. 纤连蛋白结构域

与纤连蛋白结构域的结合可以改善蛋白质药物的药代动力学，并且特别地此处所述的

GDNF融合多肽可以与纤连蛋白结构域连接。

[0102] 纤连蛋白结构域是细胞外基质或其片段的高分子量糖蛋白,其结合例如跨膜受体蛋白如整联蛋白以及细胞外基质组分如胶原蛋白和纤维蛋白。在本发明的一些实施方案中,纤连蛋白结构域连接到本发明的GDNF融合多肽中的Fc结构域的N末端,以增加GDNF融合多肽的血清半衰期。纤连蛋白结构域可以直接或通过接头连接到Fc结构域的N末端。在其它实施方案中,纤连蛋白结构域直接或通过接头连接到GDNF变体的N末端。

[0103] 作为一个实例,可以用于此处所述的方法和组合物中的纤连蛋白结构域一般是本领域已知的。在一个实施方案中,纤连蛋白结构域是具有UniProt ID NO:P02751的序列的氨基酸610-702的纤连蛋白III型结构域(SEQ ID NO:30)。在另一个实施方案中,纤连蛋白结构域是adnectin蛋白。

[0104] 纤连蛋白结构域可以与GDNF融合多肽遗传融合,或通过化学方法例如化学缀合与GDNF融合多肽连接。如果需要,则可以在GDNF融合多肽和纤连蛋白结构域之间插入间隔物。不受理论束缚,预期在本发明的GDNF融合多肽中包括纤连蛋白结构域可以通过其与整联蛋白以及细胞外基质组分如胶原蛋白和纤维蛋白的结合而导致治疗性蛋白质的延长保留。

[0105] VI. 血清白蛋白

与血清白蛋白的结合可以改善蛋白质药物的药代动力学,并且特别地此处所述的GDNF融合多肽可以与血清白蛋白连接。

[0106] 血清白蛋白是球状蛋白质,其是哺乳动物中最丰富的血液蛋白质。血清白蛋白在肝中产生,且占血液血清蛋白质的约一半。它是单体的并且可溶于血液中。血清白蛋白的一些最关键的功能包括在体内转运激素、脂肪酸和其它蛋白质,缓冲pH,并且维持关于体液在血管和身体组织之间的正确分布所需的渗透压。在优选的实施方案中,血清白蛋白是人血清白蛋白。在本发明的一些实施方案中,人血清白蛋白连接到本发明的GDNF融合多肽中的Fc结构域的N末端,以增加GDNF融合多肽的血清半衰期。人血清白蛋白可以直接或通过接头连接到Fc结构域的N末端。在其它实施方案中,人血清白蛋白直接或通过接头连接到GDNF变体的N末端。

[0107] 作为一个实例,可以用于本文所述的方法和组合物中的血清白蛋白一般是本领域已知的。在一个实施方案中,血清白蛋白包括UniProt ID NO:P02768(SEQ ID NO:31)的序列。

[0108] 血清白蛋白可以与GDNF融合多肽遗传融合,或通过化学方法例如化学缀合与GDNF融合多肽连接。如果需要,则可以在GDNF融合多肽和人血清白蛋白之间插入间隔物。不受理论束缚,预期在本发明的GDNF融合多肽中包括人血清白蛋白可以导致治疗性蛋白质的延长保留。

[0109] VII. 接头

在本发明中,接头用于描述多肽或蛋白质结构域和/或相关的非蛋白质部分之间的连接或结合。在一些实施方案中,接头是Fc结构域、白蛋白结合肽、纤连蛋白结构域或人血清白蛋白与GDNF变体之间的连接或结合,对于其接头将Fc结构域、白蛋白结合肽、纤连蛋白结构域或人血清白蛋白的C末端连接到GDNF变体的N末端,使得两种多肽以串联系列彼此连接。

[0110] 接头可以是简单的共价键例如肽键,合成聚合物例如聚乙二醇(PEG)聚合物,或由

化学反应例如化学缀合产生的任何种类的键。在接头是肽键的情况下,在一个蛋白质结构域的C末端处的羧酸基团可以在缩合反应中与在另一个蛋白质结构域的N末端处的氨基基团反应,以形成肽键。具体地,肽键可以通过本领域众所周知的常规有机化学反应由合成手段形成,或通过来自宿主细胞的天然产生而形成,其中编码以串联系列的两种蛋白质例如Fc结构域和GDNF变体的DNA序列的核酸分子,可以通过宿主细胞中必需的分子机器(例如DNA聚合酶和核糖体)直接转录并且翻译成编码两种蛋白质的邻接多肽。

[0111] 在接头是合成聚合物例如PEG聚合物的情况下,聚合物可以在每个末端处用反应性化学官能团官能化,以与在两种蛋白质的连接末端处的末端氨基酸反应。

[0112] 在接头(除了上述肽键之外)由化学反应制备的情况下,化学官能团,例如胺、羧酸、酯、叠氮化物或本领域常用的其它官能团,可以分别地合成附着到一种蛋白质的C末端和另一种蛋白质的N末端。然后,两种官能团可以通过合成化学手段反应形成化学键,从而将两种蛋白质连接在一起。此类化学缀合程序对于本领域技术人员是常规的。

[0113] 间隔物

在本发明中,Fc结构域、白蛋白结合肽、纤连蛋白结构域或人血清白蛋白与GDNF变体之间的接头可以是包括3-200个氨基酸的氨基酸间隔物。合适的肽间隔物是本领域已知的,并且包括例如含有柔性氨基酸残基例如甘氨酸和丝氨酸的肽接头。在某些实施方案中,间隔物可以含有基序,例如GS、GGS、GGG (SEQ ID NO: 4)、GGGGS (SEQ ID NO: 5)、GGSG (SEQ ID NO: 6)或SGGG (SEQ ID NO: 7)的多重或重复基序。在某些实施方案中,间隔物可以含有2至12个氨基酸,包括GS的基序,例如GS、GSGS (SEQ ID NO: 8)、GSGSGS (SEQ ID NO: 9)、GSGSGSGS (SEQ ID NO: 10)、GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 11)或GSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 12)。在某些其它实施方案中,间隔物可以含有3至12个氨基酸,包括GGS的基序,例如GGS、GGS GGS (SEQ ID NO: 13)、GGS GGS GGS (SEQ ID NO: 14)和GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO: 15)。在另外其它实施方案中,间隔物可以含有4至12个氨基酸,包括GGSG (SEQ ID NO: 16)的基序,例如GGSG (SEQ ID NO: 17)、GGSG GSG (SEQ ID NO: 18)或GGSG GSG GSG (SEQ ID NO: 19)。在其它实施方案中,间隔物可以含有GGGGS (SEQ ID NO: 20)的基序,例如GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 21)。在其它实施方案中,间隔物还可以含有除甘氨酸和丝氨酸外的氨基酸,例如GGGGAGGGG (SEQ ID NO: 22)、GENLYFQSGG (SEQ ID NO: 23)、SACYCELS (SEQ ID NO: 24)、RSIAT (SEQ ID NO: 25)、RPACKIPNDLKQKVMNH (SEQ ID NO: 26)、GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG (SEQ ID NO: 27)、AAANSSIDLISVPVDSR (SEQ ID NO: 28)或GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 29)。在本发明的某些实施方案中,3或9氨基酸的肽间隔物用于以串联系列连接Fc结构域、白蛋白结合肽、纤连蛋白结构域或人血清白蛋白与GDNF变体。3或9氨基酸的肽间隔物分别由序列GGG (SEQ ID NO: 4)和GGGGAGGGG (SEQ ID NO: 22)组成。根据所涉及的两个蛋白质结构域和最终蛋白质融合多肽中所需的灵活性程度,可以调节肽间隔物的长度和所使用的氨基酸。可以调节间隔物的长度,以确保适当的蛋白质折叠且避免聚集体形成。例如,小的GDNF变体(例如,具有SEQ ID NO: 1的氨基酸117-211或118-211的GDNF变体)可以连接到更长的间隔物(例如,序列GGGGAGGGG (SEQ ID NO: 22)的间隔物)而不是较短的间隔物(例如,GGG (SEQ ID NO: 4))。

[0114] VIII. 载体、宿主细胞和蛋白质产生

本发明的GDNF融合多肽可以由宿主细胞产生。宿主细胞指包括从其相应的核酸表达本

文所述的多肽和融合多肽所需的必需细胞组分(例如细胞器)的媒介物。核酸可以包括在核酸载体中,所述核酸载体可以通过本领域已知的常规技术(例如,转化、转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、直接显微注射、感染等)引入宿主细胞内。核酸载体的选择部分取决于待使用的宿主细胞。一般地,优选的宿主细胞具有原核(例如细菌)或真核(例如哺乳动物)起源。

[0115] 核酸载体构建和宿主细胞

编码本发明的GDNF融合多肽的氨基酸序列的核酸序列可以通过本领域已知的各种方法制备。这些方法包括但不限于寡核苷酸介导的(或定点)诱变和PCR诱变。编码本发明的GDNF融合多肽的核酸分子可以使用标准技术例如基因合成获得。可替代地,可以使用本领域的标准技术,例如QuikChange™诱变,使编码野生型人GDNF的核酸分子截短和/或突变,以含有特定的氨基酸取代。可以使用核苷酸合成仪或PCR技术合成核酸分子。

[0116] 可以将编码本发明的GDNF融合多肽的核酸序列插入能够在原核或真核宿主细胞中复制且表达核酸分子的载体内。本领域可获得许多载体,并且可以用于本发明的目的。每个载体可以含有可以对于与特定宿主细胞的相容性进行调整且优化的各种组分。例如,载体组分可以包括但不限于复制起点,选择标记物基因、启动子、核糖体结合位点、信号序列、编码目标蛋白质的核酸序列和转录终止序列。

[0117] 在一些实施方案中,哺乳动物细胞用作本发明的宿主细胞。哺乳动物细胞类型的实例包括但不限于人胚肾(HEK)(例如,HEK293、HEK 293F)、中国仓鼠卵巢(CHO)、HeLa、COS、PC3、Vero、MC3T3、NS0、Sp2/0、VERY、BHK、MDCK、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、T47D、NS0(不内源性产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030和HsS78Bst细胞。在其它实施方案中,大肠杆菌细胞用作本发明的宿主细胞。大肠杆菌菌株的实例包括但不限于大肠杆菌294(ATCC® 31,446)、大肠杆菌λ1776(ATCC® 31,537)、大肠杆菌BL21(DE3)(ATCC® BAA-1025)和大肠杆菌RV308(ATCC® 31,608)。不同的宿主细胞具有用于蛋白质产物的转录后加工和修饰的特征和特定机制。可以选择适当的细胞系或宿主系统,以确保所表达的GDNF融合多肽的正确修饰和加工。可以使用本领域的常规技术将上述表达载体引入适当的宿主细胞内,所述技术例如转化、转染、电穿孔、磷酸钙沉淀和直接显微注射。一旦将载体引入宿主细胞内用于蛋白质生产,宿主细胞就在常规营养培养基中培养,所述营养培养基适当修饰用于诱导启动子,选择转化子或扩增编码所需序列的基因。用于表达治疗性蛋白质的方法是本领域已知的,参见例如Paulina Balbas, Argelia Lorence(编辑)*Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press; 第2版2004, 以及Vladimir Voynov和Justin A. Caravella(编辑)*Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)* Humana Press; 第2版2012。

[0118] 蛋白质产生、回收和纯化

用于产生本发明的GDNF融合多肽的宿主细胞可以在本领域已知且适合于培养所选宿主细胞的培养基中生长。用于哺乳动物宿主细胞的合适培养基的实例包括最小必需培养基(MEM)、达尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM)、Expi293™表达培养基、具有补充的胎牛血清(FBS)的DMEM和RPMI-1640。用于细菌宿主细胞的合适培养基的实例包括Luria肉汤(LB)加上必需的补充剂,例如选择剂,例如氨苄青霉素。宿主细胞在合适的温度例如约20℃至约39℃,例如25℃至约37℃,优选37℃,以及例如5至10%(优选8%)的CO₂水平下培养。培养基的pH

一般为约6.8至7.4,例如7.0,主要取决于宿主生物。如果在本发明的表达载体中使用诱导型启动子,则在适合于激活启动子的条件下诱导蛋白质表达。

[0119] 蛋白质回收通常涉及破坏宿主细胞,一般通过此类手段如渗透压休克、超声处理或裂解。一旦细胞被破坏,就可以通过离心或过滤去除细胞碎片。可以进一步纯化蛋白质。GDNF融合多肽可以通过蛋白质纯化领域中已知的任何方法纯化,例如通过色谱法(例如离子交换、亲和力和尺寸排阻柱色谱)、离心、差异溶解度或通过用于纯化蛋白质的任何其它标准技术。例如,可以通过适当选择且组合亲和柱例如蛋白A柱(例如,POROS蛋白A色谱))与色谱柱(例如,POROS HS-50阳离子交换色谱)、过滤、超滤、盐析和透析程序来分离且纯化蛋白质。在一些情况下,GDNF融合多肽可以与标记物序列例如肽缀合,以促进纯化。标记物氨基酸序列的实例是六组氨酸肽(His-标签),其以微摩尔亲和力与镍官能化的琼脂糖亲和柱结合。可用于纯化的其它肽标签包括但不限于血凝素“HA”标签,其对应于衍生自流感血凝素蛋白的表位(Wilson等人,Cell 37:767,1984)。

[0120] 可替代地,GDNF融合多肽可以由受试者(例如人)的细胞产生,例如,在基因治疗的背景下,通过施用含有编码本发明的GDNF融合多肽的核酸分子的载体(例如病毒载体(例如逆转录病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体(例如牛痘病毒载体,例如改良的牛痘Ankara(MVA))、腺相关病毒载体和甲病毒载体))。一旦进入受试者的细胞内(例如,通过转化、转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、直接显微注射、感染等),载体就促进GDNF融合多肽的表达,所述GDNF融合多肽然后由细胞分泌。如果疾病或病症的治疗是期望的结果,则可能不需要进一步的行动。如果需要收集蛋白质,则可以从受试者中收集血液,并且通过本领域已知的方法从血液中纯化蛋白质。

[0121] IX. 药物组合物和制剂

本发明的特征在于包括一种或多种本文所述的GDNF融合多肽的药物组合物。在一些实施方案中,本发明的药物组合物含有本发明的一种或多种GDNF融合多肽作为治疗性蛋白质。在其它实施方案中,含有一种或多种GDNF融合多肽的本发明的药物组合物可以与治疗中的其它试剂(例如治疗性生物制剂和/或小分子)或组合物组合使用。除了治疗有效量的GDNF融合多肽外,药物组合物还可以含有一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂,其可以通过本领域技术人员已知的方法配制。在其它实施方案中,本发明的药物组合物含有编码本发明的一种或多种GDNF融合多肽的核酸分子(DNA或RNA,例如mRNA)或含有此类核酸分子的载体。

[0122] 药物组合物中可接受的载体和赋形剂在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒。可接受的载体和赋形剂可以包括缓冲剂例如磷酸盐、柠檬酸盐、HEPES和TAE,抗氧化剂例如抗坏血酸和甲硫氨酸,防腐剂例如氯化六甲基铵、十八烷基二甲基苄基氯化铵、间苯二酚和苯扎氯铵,蛋白质例如人血清白蛋白、明胶、葡聚糖和免疫球蛋白,亲水性聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮,氨基酸例如甘氨酸、谷氨酰胺、组氨酸和赖氨酸,以及碳水化合物例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖和山梨糖醇。本发明的药物组合物可以以可注射制剂的形式肠胃外施用。可以使用无菌溶液或任何药学上可接受的液体作为媒介物配制用于注射的药物组合物。药学上可接受的媒介物包括但不限于无菌水、生理盐水和细胞培养基(例如达尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM)、 α 改良伊格尔培养基(α -MEM)、F-12培养基)。配制方法是本领域已知的,参见例如Banga(编辑) *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing and*

Delivery Systems (第2版) Taylor & Francis Group, CRC Press (2006)。

[0123] 本发明的药物组合物可以在微胶囊、诸如羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊中制备。本发明的药物组合物还可以在其他药物递送系统、诸如脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊中制备。此类技术描述于Remington: The Science and Practice of Pharmacy 第22版 (2012)。待用于体内施用的药物组合物必须是无菌的。这可以通过无菌过滤膜过滤而容易地完成。

[0124] 本发明的药物组合物也可以制备为持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有本发明的GDNF融合多肽的固体疏水聚合物的半透性基质。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶、聚丙烯酯((美国专利号3,773,919))、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸的共聚物,不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯,可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如LUPRON DEPOT™和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。一些持续释放制剂使得能够经几个月、例如一至六个月释放分子,而其他制剂释放本发明的药物组合物较短时间段,例如数天至数周。。

[0125] 药物组合物可以根据需要以单位剂型形成。药物制备物中包括的活性成分(例如,本发明的一种或多种GDNF融合多肽)的量是使得提供指定范围内的合适剂量(例如,0.01-100 mg/kg体重范围内的剂量)。

[0126] 用于基因疗法的药物组合物可以在可接受的稀释剂中,或者可以包含其中嵌入基因递送载体的缓释基质。如果使用流体动力学注射作为递送方法,则含有编码GDNF融合多肽的核酸分子或含有所述核酸分子的载体(例如,病毒载体)的药物组合物以大流体体积静脉内快速递送。可用作体内基因递送媒介物的载体包括但不限于逆转录病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体(例如,牛痘病毒载体,诸如修饰的牛痘病毒Ankara)、腺相关病毒载体和甲病毒载体。

[0127] X. 途径、剂量和施用

含有本发明的一种或多种GDNF融合多肽作为治疗性蛋白质的药物组合物可以配制用于静脉内施用、肠胃外施用、皮下施用、肌肉内施用、动脉内施用、鞘内施用或腹膜内施用。药物组合物还可以配制用于以下或经由以下施用:经口、鼻腔、喷雾、气溶胶、直肠或阴道施用。对于可注射制剂,本领域已知各种有效的药物载体。参见例如Pharmaceutics and Pharmacy Practice, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, Pa., Banker和Chalmers, 编辑,第238-250页(1982),以及ASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 第4版,第622-630页(1986)。

[0128] 在一些实施方案中,含有编码本发明的一种或多种GDNF融合多肽的核酸分子或含有此类核酸分子的载体的药物组合物可以通过基因递送施用。基因递送方法是本领域技术人员众所周知的。可以用于体内基因递送和表达的载体包括但不限于逆转录病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体(例如牛痘病毒载体,例如改良的牛痘Ankara (MVA))、腺相关病毒载体和甲病毒载体。在一些实施方案中,载体可以包括允许多重GDNF融合多肽表达的内部核糖体进入位点(IRES)。在某些实施方案中,编码一种或多种GDNF融合多肽的mRNA分子可以直接施用于受试者。

[0129] 在本发明的一些实施方案中,可以使用流体动力学注射平台施用编码一种或多种GDNF融合多肽的核酸分子或含有此类核酸分子的载体。在流体动力学注射方法中,将编码GDNF融合多肽的核酸分子置于改造质粒(例如,病毒质粒)中的强启动子的控制下。质粒经

常在大流体体积中静脉内快速地递送。流体动力学注射使用静脉中的受控流体动力学压力来增强细胞渗透性,使得来自大流体体积的快速注射的升高压力导致流体和质粒从静脉外渗。核酸分子的表达主要由肝驱动。在小鼠中,经常通过将质粒注射到尾静脉内来执行流体动力学注射。在某些实施方案中,可以使用流体动力学注射施用编码一种或多种GDNF融合多肽的mRNA分子。

[0130] 本发明药物组合物的剂量取决于因素,包括施用途径、待治疗的疾病和受试者的身体特征,例如年龄、体重、一般健康。通常,在单个剂量内包含的本发明GDNF融合多肽的量可以是有效预防、延迟或治疗疾病而不引起显著毒性的量。本发明的药物组合物可以包括范围为0.01至500 mg/kg(例如,0.01、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、150、200、250、300、350、400、450或500 mg/kg)的本发明GDNF融合多肽的剂量,并且在更具体的实施方案中,约0.1至约30 mg/kg,并且在更具体的实施方案中,约1至约30 mg/kg。剂量可以由医生根据常规因素加以调整,所述因素例如疾病的程度和受试者的不同参数。

[0131] 药物组合物以与剂量制剂相容的方式施用,并且以治疗有效的量施用,以导致症状的改善或补救。药物组合物以各种剂型施用,例如静脉内剂型、皮下剂型和经口剂型(例如可摄入的溶液、药物释放胶囊)。一般地,治疗性蛋白质以0.1-100 mg/kg,例如1-50 mg/kg给药。含有本发明的GDNF融合多肽的药物组合物可以施用于有此需要的受试者,例如,每天、每周、每月、每半年、每年一次或多次(例如,1-10次或更多次),或根据医学需要。剂量可以以单个剂量或多重剂量方案提供。施用之间的时机可以随着医疗状况的改善而减少,或随着患者的健康下降而增加。

[0132] XI. 适应症

本发明的药物组合物和方法可用于治疗和/或预防医学状况,例如代谢疾病,例如肥胖和糖尿病(1型和2型糖尿病)和神经性疾病。

[0133] 在一些实施方案中,含有本发明的GDNF融合多肽的药物组合物可以用于预防肥胖的发展和/或治疗已经诊断有肥胖的患者。例如,向受试者施用本发明的GDNF融合多肽可以通过减少脂肪量,同时维持瘦体重的量,来帮助减少受试者的体重(参见例如实施例5和7)。

[0134] 在一些实施方案中,含有本发明的GDNF融合多肽的药物组合物可以用于预防糖尿病(例如,1型和2型糖尿病)的发展和/或治疗已经诊断有糖尿病的患者。可能发展糖尿病的患者,例如具有遗传倾向、糖尿病家族史、与其它自身免疫疾病或其它代谢疾病相关的个体,可以预防性地施用本发明的GDNF融合多肽,以使得GDNF融合多肽可以维持 β 细胞的正常功能和健康,并且预防或延迟对 β 细胞的自身免疫炎症损伤。在其它实施方案中,含有本发明的GDNF融合多肽的药物组合物可以在他们被诊断有糖尿病(例如,1型和2型糖尿病)或者发展糖尿病的临床症状(例如高血糖水平、高空腹胰岛素水平、胰岛素抵抗、多尿、多饮和多食)之前施用于个体。在一些实施方案中,可以在患者需要胰岛素之前将GDNF融合多肽施用于患者。在另外其它实施方案中,GDNF融合多肽的施用可以延迟或推迟关于糖尿病患者中的胰岛素治疗的需要。例如,向受试者施用本发明的GDNF融合多肽可以帮助增加从血液中的葡萄糖清除速率(参见例如实施例8)。

[0135] 本发明的药物组合物和方法还可以用于治疗神经性疾病,包括但不限于精神分裂症、癫痫、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、焦虑、中风、

脑肿瘤和脑转移。

实施例

[0136] 实施例1 - GDNF融合多肽的表达

为了表达GDNF融合多肽,通过电穿孔将含有编码GDNF融合多肽的核酸分子的载体转染到中国仓鼠卵巢(CHO)细胞内。在蛋白质表达后,通过基于蛋白A的亲和柱色谱法,从细胞培养上清液中纯化表达的融合多肽。使用抗GDNF抗体通过蛋白质印迹分析纯化的GDNF融合多肽。图1A显示了五种GDNF融合多肽的表达:

融合多肽1:Fc-hGDNF₇₈₋₂₁₁ (SEQ ID NO:32)

融合多肽2:Fc-GGG-hGDNF₉₂₋₂₁₁ (SEQ ID NO:33)

融合多肽3:Fc-GGG-hGDNF₁₁₀₋₂₁₁ (SEQ ID NO:34)

融合多肽4:Fc-GGG-hGDNF₁₁₇₋₂₁₁ (SEQ ID NO:35)

融合多肽5:Fc-GGGGAGGGG-hGDNF₁₁₇₋₂₁₁ (SEQ ID NO:36)。

[0137] 上述每种融合多肽由单个开放读码框编码。在第2天和第6天时分析五种融合多肽中的每一种。如图1A中所示,包括潜在的蛋白酶水解切割位点(即SEQ ID NO:1的氨基酸85-120)的融合多肽1,看起来到第6天生成降解产物。

[0138] 还在还原或非还原条件下分析融合多肽2、3和4中的每一种(图1B)。

[0139] 实施例2 - 结合亲和力

表面等离子共振(SPR)用于确定GDNF融合多肽与GFR α 1的结合亲和力。该实施例中的GDNF融合多肽包括如实施例1中所述的融合多肽2-4,以及Fc(T366W)-GGG-hGDNF₁₁₇₋₂₁₁ (SEQ ID NO:37) (融合多肽6),其具有通过GGG接头与具有SEQ ID NO:1的氨基酸117-211的GDNF变体的N末端连接、具有氨基酸取代T366W(相对于人IgG1的序列)的Fc结构域。SPR测定被配置为使用His-标签捕获试剂盒(GE Healthcare),将人GFR α 1、GFR α 2和GFR α 3 Fc嵌合体(R&D Systems)捕获到CM5芯片表面上至用于动力学分析的适当水平。使GDNF融合多肽流过固定的GFR,以测量GDNF融合多肽和GFR结合和解离的动力学。在HBS-EP缓冲液(GE Healthcare)中以30 μ L/分钟的流速测量各种浓度的GDNF融合多肽的结合。使用Scrubber2软件拟合结合曲线,以获得表观结合亲和力和动力学常数。

[0140] 表1显示了本发明的GDNF融合多肽(范围为870 pM(融合多肽2)至3.8 nM(融合多肽4))对于结合在其C末端处与Fc结构域连接的人GDNF家族受体 α 1(GFR α 1)的平衡解离常数 K_D 。

[0141] 表1. GDNF融合多肽与GFR α 1的结合亲和力

	GFR α 1-hFc $K_{D,app}$
R&D hGDNF	~900 pM
融合多肽2 (Fc-GGG-hGDNF ₉₂₋₂₁₁)	160 pM
融合多肽3 (Fc-GGG-hGDNF ₁₁₀₋₂₁₁)	870 pM
融合多肽4 (Fc-GGG-hGDNF ₁₁₇₋₂₁₁)	3.8 nM
融合多肽6 (Fc(T366W)-GGG-hGDNF ₁₁₇₋₂₁₁)	4.9 nM

[0142] 实施例3 - GFR α 1报告基因测定

将HEK293T细胞以在含有10% FBS和抗生素的DMEM中20,000细胞/孔的密度接种在96孔

胶原包被的平板中。6小时后,根据制造商的说明书,使用Fugene 6,用pFR-Luc (62.5 ng)、pFA-ELK1 (7.5 ng)、hRet (10.5 ng)和GFR α 1 (4.5 ng)质粒转染细胞。第二天,细胞用PBS洗涤一次,并且置于含有1% FBS的新鲜DMEM中6-8小时。然后用以指定浓度的GDNF融合多肽处理细胞16小时。使用萤光素作为底物测定萤光素酶活性(Bright-Glo, Promega)。

[0143] 实施例4 - 体内血清浓度

为了测量本发明的GDNF融合多肽2-4(在实施例1中描述)和6(在实施例2中描述)的体内血清浓度,通过流体动力学注射的方式,用10 μ g编码GDNF融合多肽的核酸分子注射转基因小鼠品系C57BL/6NTa的小鼠。使用取自小鼠的血样,在注射后的不同时间点,使用酶联免疫吸附测定(ELISA)测量GDNF融合多肽的血清浓度。图2中所示的结果指示半衰期在小鼠中大于48小时。

[0144] 实施例5 - 融合多肽6对体重的作用

为了测量融合多肽6(在实施例2中描述)对体重的作用,在第0天时,转基因小鼠品系C57BL/6NTa的三只小鼠用0.3、3.0或10.0 mg/kg融合多肽6或者磷酸盐缓冲盐水(PBS)进行腹膜内注射。每两天或三天记录三只小鼠的平均体重。还计算并记录百分比体重变化。图3显示了用融合多肽6的处理以剂量依赖性方式减少体重。

[0145] 实施例6 - 融合多肽6对食物摄入的作用

使用与实施例5中所述相同的方案,监测用不同剂量的融合多肽6或PBS注射的小鼠的食物摄入量(即,高脂肪饮食(HFD))。从第0天开始每两天或三天测量并记录平均每日食物摄入量。图4显示了用融合多肽6的处理对小鼠对食物摄入的食欲没有显著作用。

[0146] 实施例7 - 融合多肽6对身体组成的作用

使用与实施例5中所述相同的方案,在注射后第18天时测量用不同剂量的融合多肽6或PBS注射的小鼠的脂肪、瘦体重和流体量中的变化。

从基线的变化 = (脂肪、瘦体重或流体的最终重量) - (脂肪、瘦体重或流体的初始重量)

从基线的百分比变化 = $100 \times [(\text{最终重量} - \text{初始重量}) / (\text{初始重量})]$ 。

[0147] 如图5中所示,用融合多肽6的处理显著降低脂肪的量而不影响体内的瘦体重,指示小鼠的体重减轻完全归于肥胖的减少。

[0148] 实施例8 - 融合多肽6对葡萄糖清除速率的作用

使用与实施例5中所述相同的方案,用不同剂量的融合多肽6或PBS注射的小鼠经受葡萄糖耐量测试(GTT)。在5小时禁食后,测量并记录小鼠的空腹血糖水平。小鼠用D-葡萄糖以2 g/kg体重的剂量进行腹膜内注射。在葡萄糖注射后15、30、60、90和120分钟进行血糖测量。所有样品都取自尾静脉出血并且用血糖仪测量。

[0149] 如图6中所示,用融合多肽6的处理显著改善葡萄糖清除速率。用10 mg/kg融合多肽6注射的小鼠中的血清葡萄糖水平在2小时后回到GTT之前的血清葡萄糖的初始水平。

[0150] 其他实施方案

尽管已经结合本发明的具体实施方案描述了本发明,但应该理解,其能够进行进一步的修改,并且本申请旨在覆盖本发明的任何变型、用途或调整,其遵循一般而言本发明的原理且包括属于本发明所属领域内的已知或惯常实践的与本公开的此类偏离,并且可以应用于上文所述的基本特征。

[0151] 所有出版物、专利和专利申请均通过引用以其整体并入本文,其程度如同每个单

独的出版物、专利或专利申请被具体和单独地指出通过引用以其整体并入。

[0152] 其他实施方案在以下权利要求内。

序列表

<110> Keros Therapeutics, Inc.

<120> GDNF融合多肽及其使用方法

<130> 51184-003W02

<150> US 62/420,480

<151> 2016-11-10

<160> 37

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 211

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Lys Leu Trp Asp Val Val Ala Val Cys Leu Val Leu Leu His Thr
1 5 10 15

[0001] Ala Ser Ala Phe Pro Leu Pro Ala Gly Lys Arg Pro Pro Glu Ala Pro
20 25 30

Ala Glu Asp Arg Ser Leu Gly Arg Arg Arg Ala Pro Phe Ala Leu Ser
35 40 45

Ser Asp Ser Asn Met Pro Glu Asp Tyr Pro Asp Gln Phe Asp Asp Val
50 55 60

Met Asp Phe Ile Gln Ala Thr Ile Lys Arg Leu Lys Arg Ser Pro Asp
65 70 75 80

Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala
85 90 95

Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg
100 105 110

Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr
115 120 125

Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr
130 135 140

Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr Asp Lys Ile Leu
145 150 155 160

Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys Val Gly Gln
165 170 175

Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp
180 185 190

Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys
195 200 205

Gly Cys Ile
210

<210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

[0002] <220>
<223> 合成构建体

<400> 2

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10

<210> 3
<211> 246
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25 30

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
35 40 45

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

	50	55	60	
	Val Ser His Glu Asp	Pro Glu Val Lys Phe	Asn Trp Tyr Val Asp Gly	65 70 75 80
	Val Glu Val His	Asn Ala Lys Thr Lys	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn	85 90 95
	Ser Thr Tyr Arg	Val Val Ser Val	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp	100 105 110
	Leu Asn Gly Lys	Glu Tyr Lys Cys Lys	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro	115 120 125
	Ala Pro Ile Glu Lys Thr	Ile Ser Lys Ala Lys	Gly Gln Pro Arg Glu	130 135 140
	Pro Gln Val Tyr Thr	Leu Pro Pro Ser Arg	Asp Glu Leu Thr Lys Asn	145 150 155 160
[0003]	Gln Val Ser Leu Thr	Cys Leu Val Lys	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile	165 170 175
	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		180 185 190
	Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		195 200 205
	Leu Thr Val Asp Lys Ser	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		210 215 220
	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		225 230 235 240
	Ser Leu Ser Pro Gly Lys			245
<210>	4			
<211>	3			
<212>	PRT			
<213>	人工序列			

[0004]

<220>
<223> 合成构建体

<400> 4

Gly Gly Gly
1

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 6

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 7

Ser Gly Gly Gly
1

<210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

[0005]

<220>
<223> 合成构建体

<400> 8

Gly Ser Gly Ser
1

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 9

Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 10

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 11

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

[0006]

<220>
<223> 合成构建体

<400> 12

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 13

Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 14

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 15

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 16
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

[0007]

<220>
<223> 合成构建体

<400> 16

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 17
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 17

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 18

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 19
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 19

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10

<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

[0008]

<220>
<223> 合成构建体

<400> 20

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 21

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 22

Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 23

Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 24

Ser Ala Cys Tyr Cys Glu Leu Ser
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 25

Arg Ser Ile Ala Thr
1 5

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

[0009]

<220>
<223> 合成构建体

<400> 26

Arg Pro Ala Cys Lys Ile Pro Asn Asp Leu Lys Gln Lys Val Met Asn
1 5 10 15

His

<210> 27
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 27

Gly Gly Ser Ala Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser
1 5 10 15

Gly Ala Ser Gly Thr Gly Thr Ala Gly Gly Thr Gly Ser Gly Ser Gly

	20	25	30
	Thr Gly Ser Gly 35		
	<210> 28		
	<211> 17		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成构建体		
	<400> 28		
	Ala Ala Ala Asn Ser Ser Ile Asp Leu Ile Ser Val Pro Val Asp Ser 1 5 10 15		
	Arg		
	<210> 29		
	<211> 36		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成构建体		
	<400> 29		
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly 1 5 10 15		
	Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser 20 25 30		
	Gly Gly Gly Ser 35		
	<210> 30		
	<211> 93		
	<212> PRT		
	<213> 智人		
	<400> 30		
	Gly Pro Val Glu Val Phe Ile Thr Glu Thr Pro Ser Gln Pro Asn Ser 1 5 10 15		

[0010]

His Pro Ile Gln Trp Asn Ala Pro Gln Pro Ser His Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Ile Leu Arg Trp Arg Pro Lys Asn Ser Val Gly Arg Trp Lys Glu Ala
35 40 45

Thr Ile Pro Gly His Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Lys Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Val Tyr Glu Gly Gln Leu Ile Ser Ile Gln Gln Tyr Gly His
65 70 75 80

Gln Glu Val Thr Arg Phe Asp Phe Thr Thr Thr Ser Thr
85 90

<210> 31
<211> 609
<212> PRT
<213> 智人

<400> 31

[0011]

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
145 150 155 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
165 170 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
180 185 190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
195 200 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
210 215 220

[0012]

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
225 230 235 240

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
245 250 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
305 310 315 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

[0013]

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu

<210> 32
<211> 380
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 32

[0014] Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25 30

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
35 40 45

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
50 55 60

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
65 70 75 80

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
85 90 95

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
100 105 110

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro

	115	120	125	
	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu 130 135 140			
	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn 145 150 155 160			
	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile 165 170 175			
	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr 180 185 190			
	Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys 195 200 205			
	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys 210 215 220			
[0015]	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu 225 230 235 240			
	Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Pro Asp Lys Gln Met Ala Val Leu Pro 245 250 255			
	Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser 260 265 270			
	Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val 275 280 285			
	Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu 290 295 300			
	Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala 305 310 315 320			
	Ala Glu Thr Thr Tyr Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg 325 330 335			
	Arg Leu Val Ser Asp Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala			

	340	345	350
	Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe	Leu Asp Asp Asn Leu	Val Tyr His Ile
	355	360	365
	Leu Arg Lys His Ser Ala Lys	Arg Cys Gly Cys	Ile
	370	375	380
<210>	33		
<211>	369		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成构建体		
<400>	33		
	Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly		
	1	5	10
	Val His Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu		
	20	25	30
[0016]			
	Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
	35	40	45
	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
	50	55	60
	Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
	65	70	75
	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
	85	90	95
	Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
	100	105	110
	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro		
	115	120	125
	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
	130	135	140

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
145 150 155 160

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
165 170 175

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
180 185 190

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
195 200 205

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
210 215 220

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
225 230 235 240

Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Asn Arg Gln Ala Ala Ala Ala
245 250 255

[0017]

Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys
260 265 270

Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr Asp Leu
275 280 285

Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser
290 295 300

Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr Asp Lys Ile Leu Lys Asn
305 310 315 320

Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys Val Gly Gln Ala Cys
325 330 335

Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn
340 345 350

Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys
355 360 365

Ile

<210> 34
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 34

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25 30

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
35 40 45

[0018] Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
50 55 60

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
65 70 75 80

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
85 90 95

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
100 105 110

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
115 120 125

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
130 135 140

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
145 150 155 160

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

	165	170	175
	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr 180 185 190		
	Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys 195 200 205		
	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys 210 215 220		
	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu 225 230 235 240		
	Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg 245 250 255		
	Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu 260 265 270		
[0019]	Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser 275 280 285		
	Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser 290 295 300		
	Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg 305 310 315 320		
	Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val 325 330 335		
	Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile 340 345 350		
	<210> 35		
	<211> 344		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成构建体		
	<400> 35		

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25 30

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
35 40 45

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
50 55 60

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
65 70 75 80

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
85 90 95

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
100 105 110

[0020]

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
115 120 125

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
130 135 140

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
145 150 155 160

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
165 170 175

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
180 185 190

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
195 200 205

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
210 215 220

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
225 230 235 240

Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile
245 250 255

His Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu
260 265 270

Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr
275 280 285

Tyr Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser
290 295 300

Asp Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp
305 310 315 320

Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His
325 330 335

[0021]

Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
340

<210> 36
<211> 350
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 36

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25 30

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
35 40 45

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

	50		55		60														
	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly			
	65					70					75					80			
	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn			
					85					90					95				
	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp			
				100					105					110					
	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro			
			115					120					125						
	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu			
		130					135					140							
	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn			
	145					150				155						160			
[0022]	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile			
					165					170					175				
	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr			
				180					185					190					
	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys			
			195					200					205						
	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys			
		210					215					220							
	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu			
	225					230					235					240			
	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly			
					245					250					255				
	Cys	Val	Leu	Thr	Ala	Ile	His	Leu	Asn	Val	Thr	Asp	Leu	Gly	Leu	Gly			
				260					265					270					
	Tyr	Glu	Thr	Lys	Glu	Glu	Leu	Ile	Phe	Arg	Tyr	Cys	Ser	Gly	Ser	Cys			

	275	280	285
	Asp Ala Ala Glu Thr Thr 290	Tyr Asp Lys Ile Leu 295	Lys Asn Leu Ser Arg 300
	Asn Arg Arg Leu Val 305	Ser Asp Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro 310 315 320	
	Ile Ala Phe Asp 325	Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr 330 335	
	His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile 340 345 350		
	<210> 37 <211> 334 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 合成构建体		
[0023]	<400> 37		
	Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly 1 5 10 15		
	Val His Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe 20 25 30		
	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val 35 40 45		
	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe 50 55 60		
	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro 65 70 75 80		
	Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr 85 90 95		
	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val 100 105 110		

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
115 120 125

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
130 135 140

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
165 170 175

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
180 185 190

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
195 200 205

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
210 215 220

[0024]

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly
225 230 235 240

Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly
245 250 255

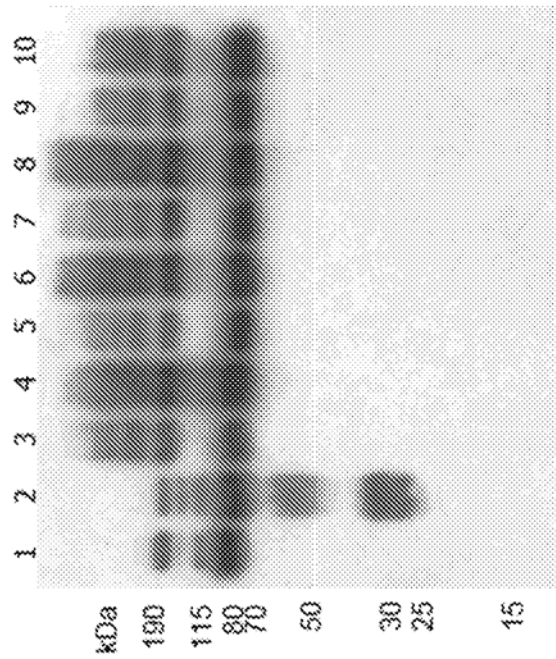
Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys
260 265 270

Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg
275 280 285

Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro
290 295 300

Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr
305 310 315 320

His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
325 330



泳道	样品	体积 (uL)
1	融合多肽 1 (Fc-hGDNF ₇₈₋₂₁₁) 第2天	5
2	融合多肽 1 (Fc-hGDNF ₇₈₋₂₁₁) 第6天	5
3	融合多肽 2 (Fc-GGG-hGDNF ₉₂₋₂₁₁) 第2天	5
4	融合多肽 2 (Fc-GGG-hGDNF ₉₂₋₂₁₁) 第6天	5
5	融合多肽 3 (Fc-GGG-hGDNF ₁₁₃₋₂₁₁) 第2天	5
6	融合多肽 3 (Fc-GGG-hGDNF ₁₁₃₋₂₁₁) 第6天	5
7	融合多肽 4 (Fc-GGG-hGDNF ₁₁₀₋₂₁₁) 第2天	5
8	融合多肽 4 (Fc-GGG-hGDNF ₁₁₇₋₂₁₁) 第2天	5
9	融合多肽 5 (Fc-GGGAGGGG-hGDNF ₁₁₇₋₂₁₁) 第2天	5
10	融合多肽 5 (Fc-GGGAGGGG-hGDNF ₁₁₇₋₂₁₁) 第6天	5

图 1A

泳道:
1. 非还原条件
2. 还原条件

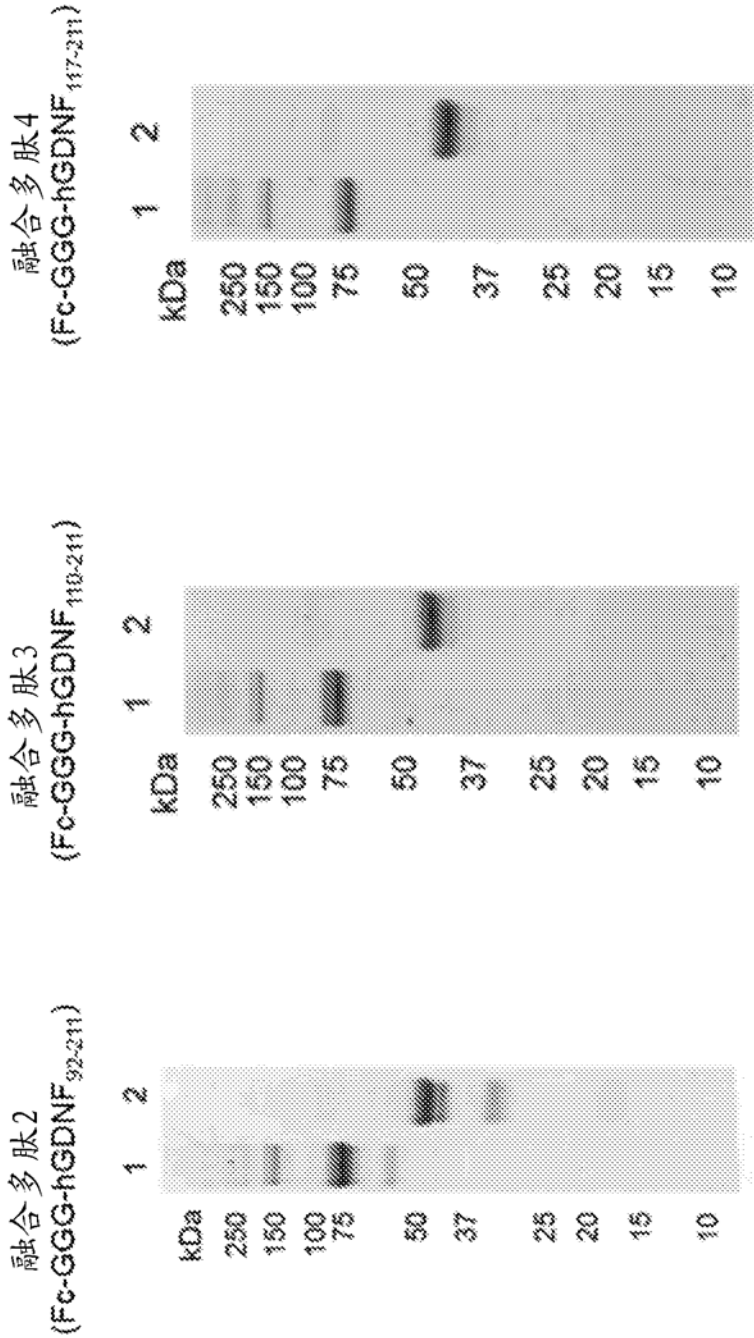


图 1B

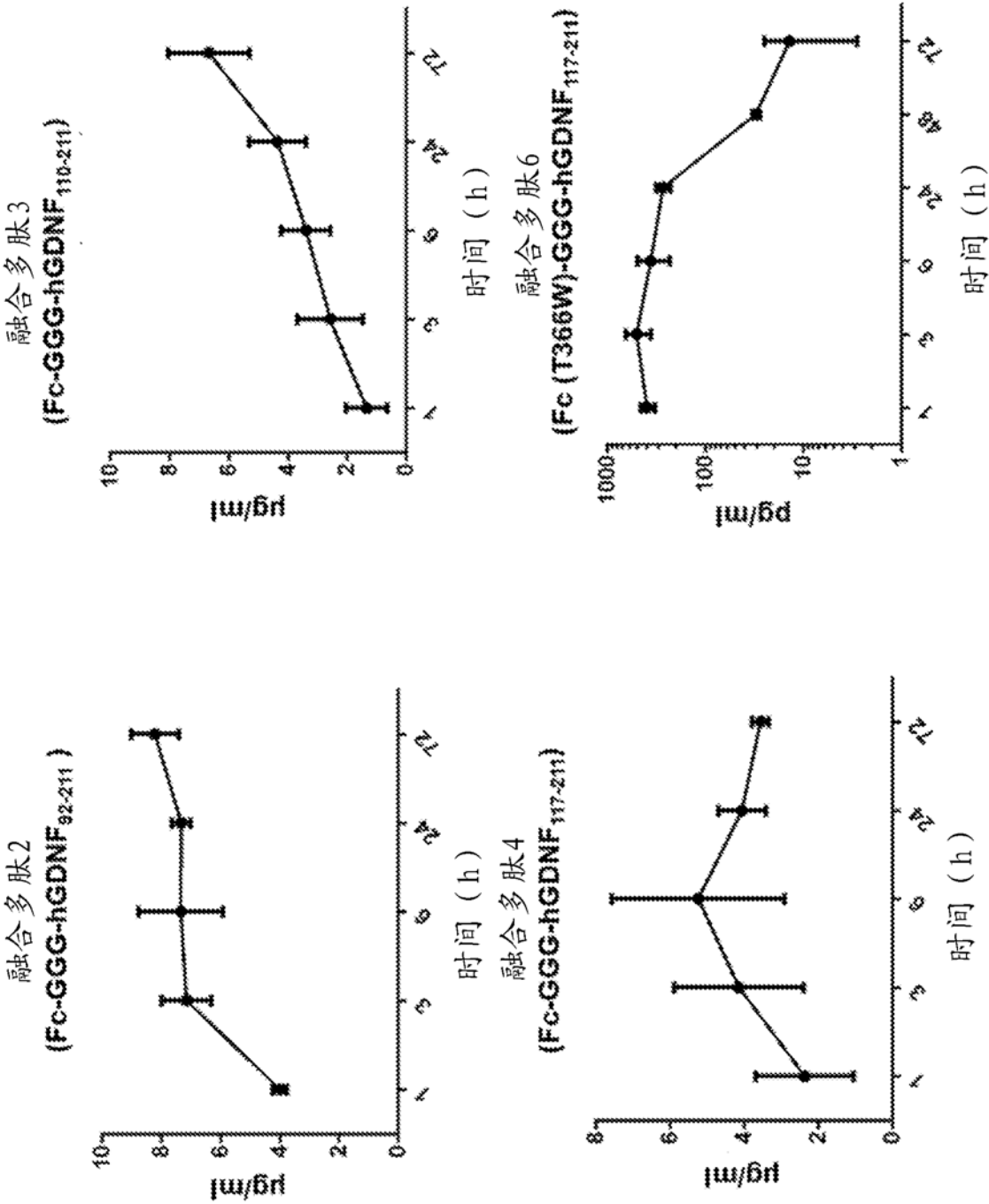


图 2

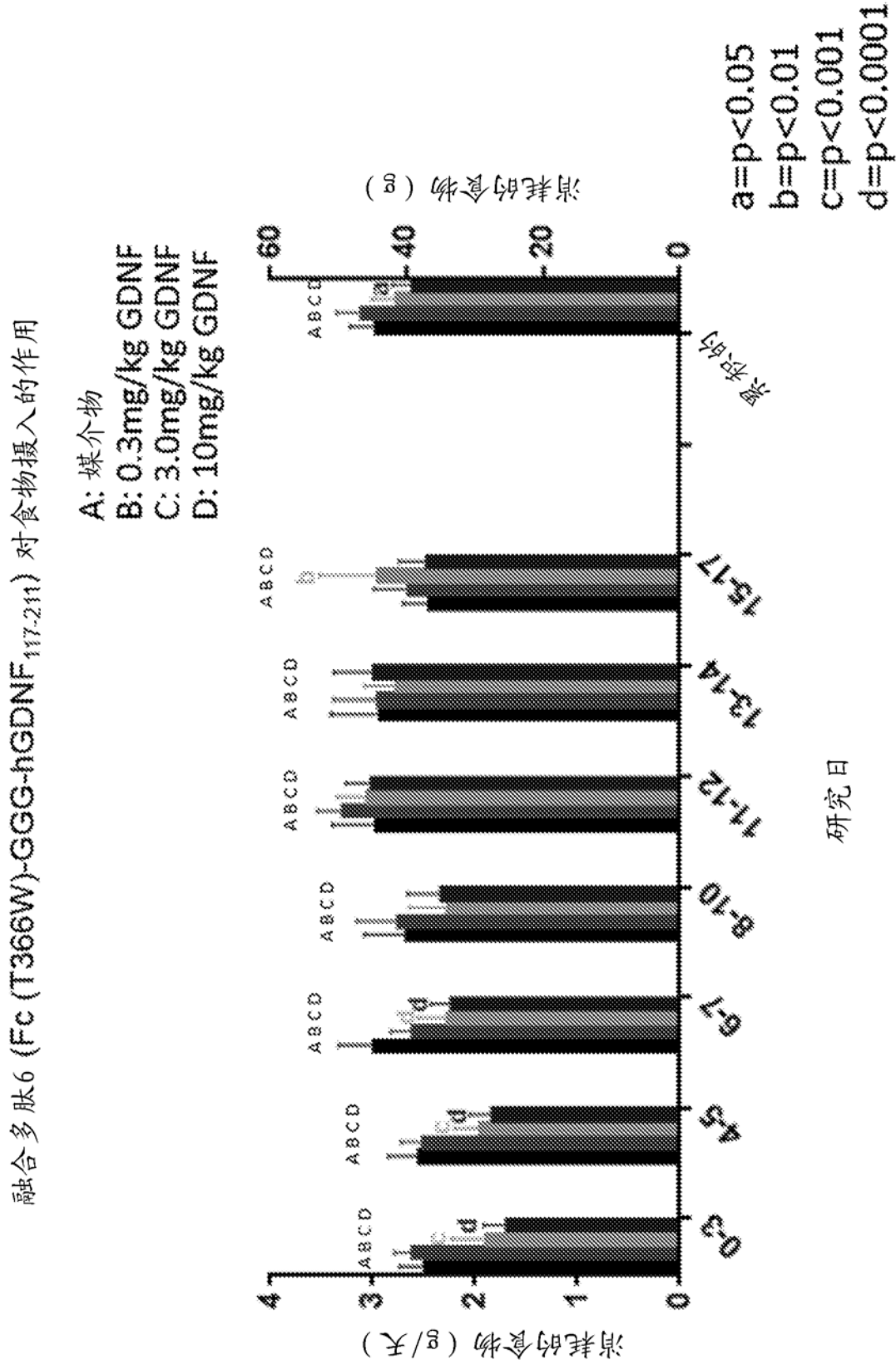


图 4

融合多肽6 (Fc (T366W)-GGG-hGDNF₁₁₇₋₂₁₁) 对身体组成的作用

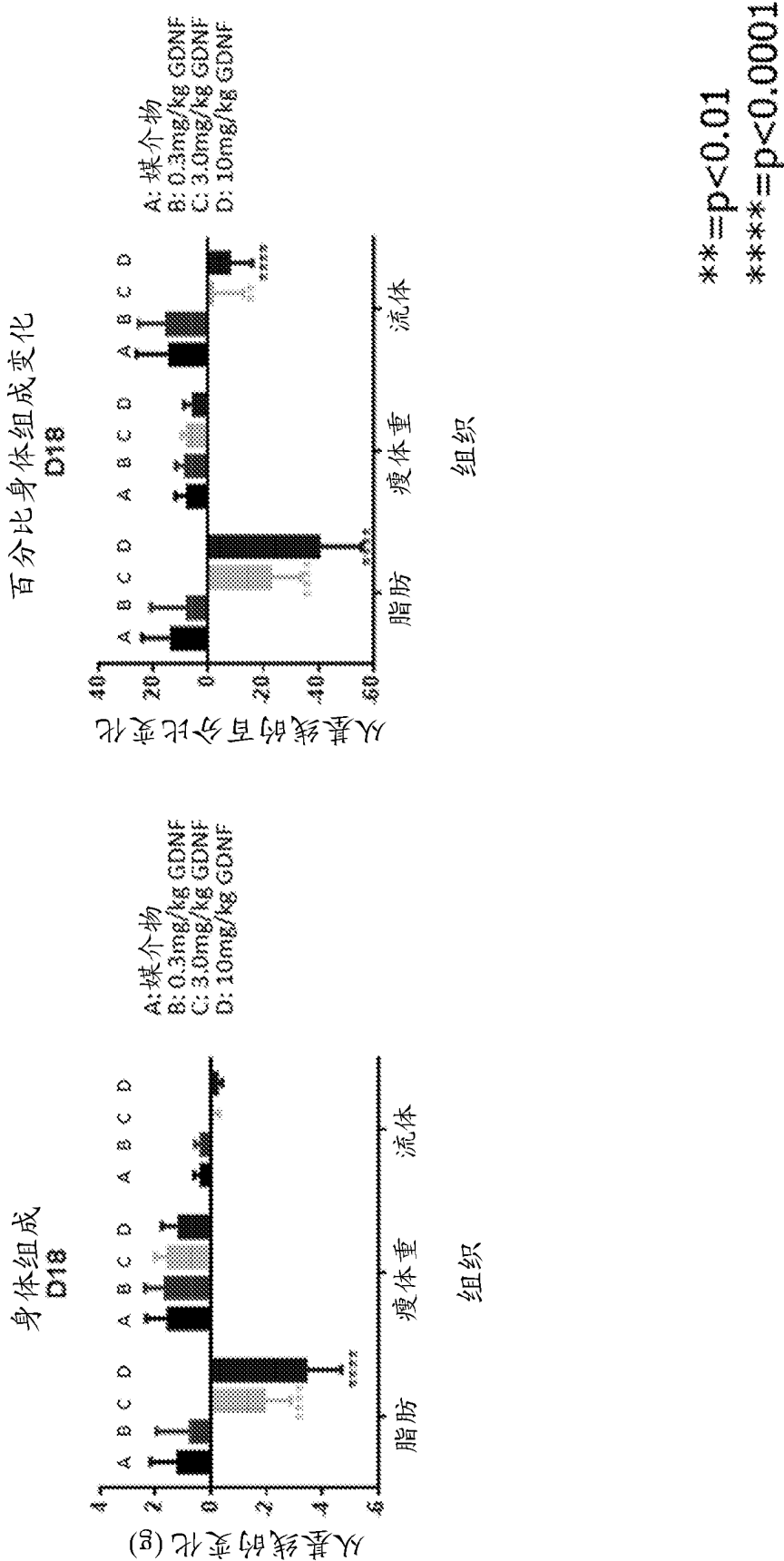
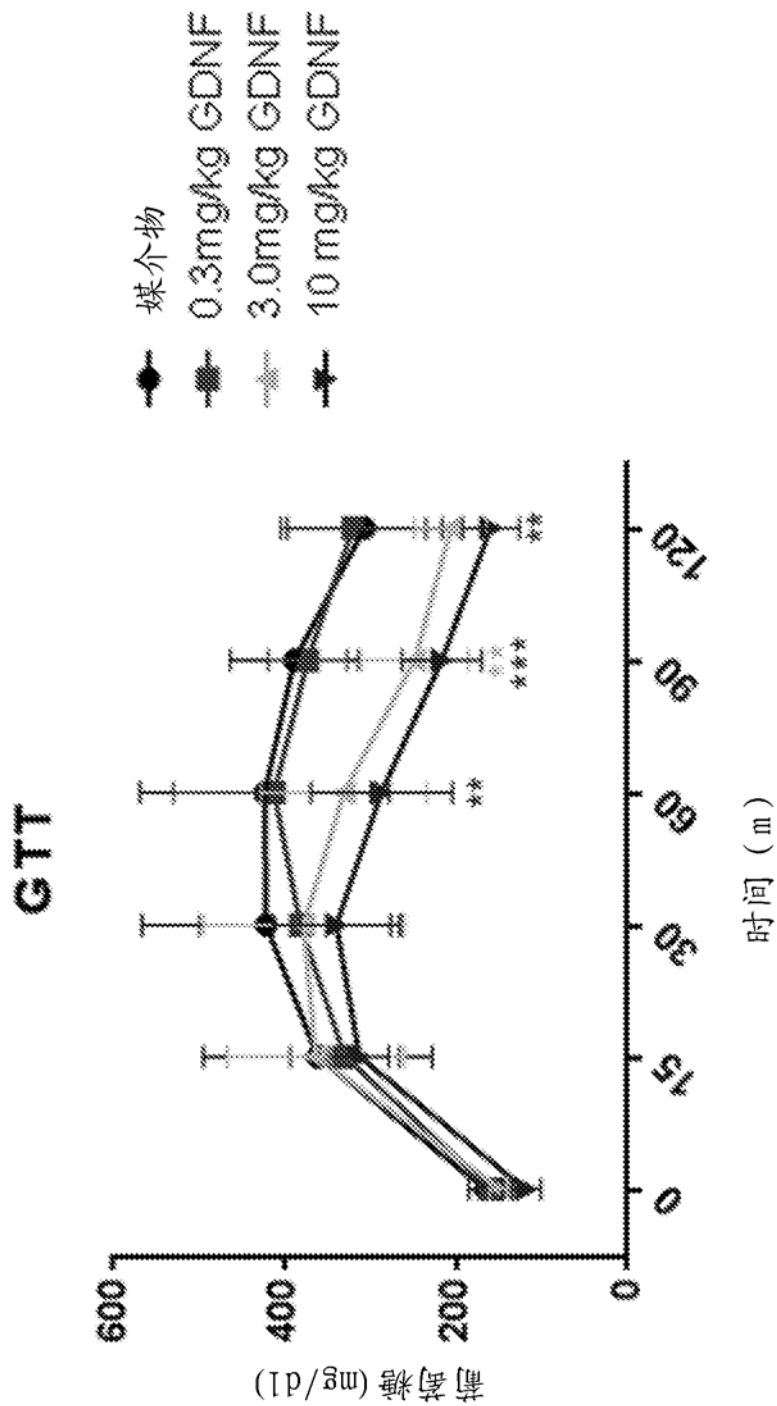


图 5

融合多肽6 (Fc (T366W)-GGG-hGDNF₁₁₇₋₂₁₁) 对葡萄糖清除速率的作用



**=p<0.01
***=p<0.001

图 6