



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104645315 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201410709391. 4

(22) 申请日 2009. 03. 02

(30) 优先权数据

61/067, 589 2008. 02. 29 US

(62) 分案原申请数据

200980114836. 1 2009. 03. 02

(71) 申请人 阿索尔达治疗公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 H·金 A·O·卡加诺

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 韩威威

(51) Int. Cl.

A61K 38/18(2006. 01)

A61K 45/06(2006. 01)

A61P 25/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书18页

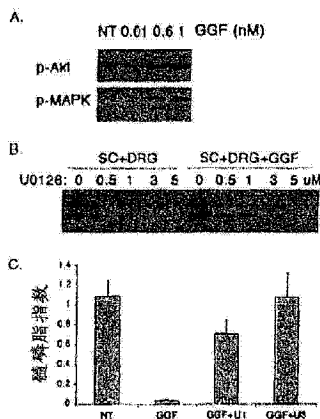
序列表6页 附图14页

(54) 发明名称

达到所需胶质生长因子 2 血浆水平的方法

(57) 摘要

本发明涉及达到所需胶质生长因子 2 血浆水平的方法。具体而言,本发明涉及将胶质生长因子 2(GGF2) 给予需要的患者以达到在所需治疗窗口内的 GGF2 血清水平,该治疗窗口是基于折磨患者的疾病或障碍确定的。在特定的实施方案中,患者患有与髓鞘形成水平降低相关的疾病或障碍,并且给予 GGF2 以促进患者的髓鞘形成。



1. GGF2(胶质生长因子 2) 在制备用于通过以下方法避免在受治疗者中给予 GGF2 后施旺细胞髓鞘形成抑制的组合物中的用途,所述方法包括:

提供需要神经元髓鞘形成的受治疗者;  
提供在药物学上可接受的载体中的 GGF2;  
将 GGF2 给予受治疗者;和,  
确定 GGF2 的量低于抑制施旺细胞髓鞘形成的量。

2. GGF2 在制备用于通过以下方法促进患有与髓鞘形成水平降低相关疾病或障碍的患者的髓鞘形成的组合物中的用途,所述方法包括:

选择患有与髓鞘形成水平降低相关疾病或障碍的患者;  
将用量为约 500ng GGF2/kg 体重量给予患者;  
由此促进髓鞘形成。

3. GGF2 在制备用于通过以下方法促进患有与髓鞘形成水平降低相关疾病或障碍的患者的髓鞘形成的组合物中的用途,所述方法包括:

选择患有与髓鞘形成水平降低相关疾病或障碍的患者;  
将达到约 0.01nM GGF2 血浆水平量的 GGF2 给予患者。

4. GGF2 和 Mek1/Erk 途径抑制剂在制备用于通过以下方法当将 GGF2 用于促进髓鞘形成时扩大 GGF2 治疗剂量范围的组合物中的用途,所述方法包括:

选择患有与髓鞘形成水平降低相关疾病或障碍的患者;  
将 GGF2 和 Mek1/Erk 途径抑制剂给予患者,和,  
由此在比不存在给予 Mek1/Erk 途径抑制剂情况下发生的更高剂量的 GGF2 下发生 GGF2 介导的髓鞘形成。

5. 用于测量患者中的 c-Jun 蛋白质水平的试剂在制备通过以下方法确定 GGF2 的量是否用于促进髓鞘形成的治疗有效量的药剂中的用途,所述方法包括:

提供接受 GGF2 治疗的患者;和  
测量患者中的 c-Jun 蛋白质水平,由此相对于基线 c-Jun 水平的 c-Jun 的增加表明 GGF2 的量接近用于促进髓鞘形成的治疗功效的最大阈值。

6. 一种药物组合物,包含 GGF2 或 EGFL 结构域和 Mek1/Erk 途径抑制剂。

## 达到所需胶质生长因子 2 血浆水平的方法

[0001] 本申请是申请日为 2009 年 3 月 2 日、申请号为 200980114836.1、发明名称为“达到所需胶质生长因子 2 血浆水平的方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请依据 35USC § 119(e) 要求 2008 年 2 月 29 日提交的美国临时申请系列号 61/067,589 的优先权,在此特意将该申请全部引入作为参考。

[0004] 导致本发明的研究由 NIH 专用拨款号 R01-NS45939-01 部分资助。美国政府在本发明中具有某些权利。

### 发明领域

[0005] 本发明涉及将胶质生长因子 2(GGF2) 给予需要的患者,以达到在基于折磨患者的疾病或障碍确定的所需治疗窗口内的 GGF2 血清水平。

[0006] 背景

[0007] 神经调节蛋白 (NRG) 和 NRG 受体包括生长因子 - 受体酪氨酸激酶系统,该系统用于神经、肌肉、上皮和其他组织的器官形成中所涉及的细胞 - 细胞信号传导 (Lemke, *Mol. Cell. Neurosci.* 7:247-262, 1996 ;Burden 等, *Neuron* 18:847-855, 1997)。NRG 家族由三个基因组成,这三个基因编码包含上皮细胞生长因子 (EGF) 样、免疫球蛋白 (Ig) 和其他可识别结构域的许多配体。许多分泌的和膜相连的同种型在该信号传导系统中起着配体的作用。NRG 的受体是人体中 EGF 受体 (EGFR) 家族的所有成员,包括 EGFR(或 ErbB1)、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4,也分别称为 HER1 至 HER4(Meyer 等, *Development* 124:3575-3586, 1997 ; Orr-Urtreger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1867-71, 1993 ;Marchionni 等, *Nature* 362:312-8, 1993 ;Chen 等, *J. Comp. Neurol.* 349:389-400, 1994 ;Corfas 等, *Neuron* 14:103-115, 1995 ;Meyer 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1064-1068, 1994 ; 和 Pinkas-Kramarski 等, *Oncogene* 15:2803-2815, 1997)。

[0008] 对这三个 NRG 基因, Nrg-1、Nrg-2 和 Nrg-3, 作图至不同的染色体基因座 (Pinkas-Kramarski 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9387-91, 1994 ;Carraway 等, *Nature* 387:512-516, 1997 ;Chang 等, *Nature* 387:509-511, 1997 和 Zhang 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:9562-9567, 1997), 并共同编码不同的 NRG 蛋白质阵列。迄今为止研究最彻底的是 Nrg-1 的基因产物,其包括一组大约 15 个不同的结构相关的同种型 (Lemke, *Mol. Cell. Neurosci.* 7:247-262, 1996, 以及 Peles 和 Yarden, *BioEssays* 15:815-824, 1993)。最先鉴定的 NRG-1 的同种型包括 Neu 分化因子 (NDF ;Peles 等, *Cell* 69, 205-216, 1992 和 Wen 等, *Cell* 69, 559-572, 1992)、神经生长因子 (HRG ;Holmes 等, *Science* 256:1205-1210, 1992)、乙酰胆碱受体诱导活性 (ARIA ;Falls 等, *Cell* 72:801-815, 1993) 以及胶质生长因子 GGF1、GGF2 和 GGF3 (Marchionni 等, *Nature* 362:312-8, 1993)。

[0009] 通过同源性克隆 (Chang 等, *Nature* 387:509-512, 1997 ;Carraway 等, *Nature* 387:512-516, 1997 和 Higashiyama 等, *J. Biochem.* 122:675-680, 1997) 和基因组方法 (Busfield 等, *Mol. Cell. Biol.* 17:4007-4014, 1997) 鉴定出 Nrg-2 基因。NRG-2cDNA 也称

为神经 - 和胸腺 - 衍生的 ErbB 激酶激活剂 (NTAK ;Genbank Accession No. AB005060)、神经调节蛋白的分支 (Don-1) 和小脑衍生的生长因子 (CDGF ;PCT 申请 WO 97/09425)。实验证据表明表达 ErbB4 或 ErbB2/ErbB4 组合的细胞很可能显示出对 NRG-2 特别强烈的应答 (Pinkas-Kramarski 等, Mol. Cell. Biol. 18:6090-6101, 1998)。还知道 Nrg-3 基因产物 (Zhang 等, 上文) 结合并激活 ErbB4 受体 (Hijazi 等, Int. J. Oncol. 13:1061-1067, 1998)。

[0010] EGF 样结构域存在于所有形式的 NRG 的核心, 并且是结合并激活 ErbB 受体所需的。这三个基因编码的 EGF 样结构域的推断的氨基酸序列大约 30-40% 相同 (逐对比较)。此外, 在 NRG-1 和 NRG-2 中似乎存在至少两个亚形式的 EGF 样结构域, 这可以赋予不同的生物活性和组织特异性效能。

[0011] 通过上皮生长因子受体家族的 NRG 受体酪氨酸激酶 EGFR、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 介导对 NRG 的细胞应答 (Busfield 等, 1997, Mol Cell Biol. 17:4007-14 ;Carraway 等, 1997, Nature 387:512-6 ;Chang 等, 1997, Nature 387:509-12)。所有 NRG 的高亲和性结合主要是通过 ErbB3 或 ErbB4 介导的 (Ferguson 等, 2000, EMBO J. 19:4632-43)。NRG 配体的结合导致与其他 ErbB 亚基的二聚作用和通过特定酪氨酸残基磷酸化的反式激活 (Honegger 等, 1990, Mol Cell Biol. 10:4035-44 ;Lemmon and Schless inger, 1994, Trends Biochem Sci. 19:459-63 ;Heldin, 1995, Cell. 80:213-23 ;Hubbard 等, 1998, J Biol Chem. 273:11987-90)。在某些实验情况中, 几乎所有 ErbB 受体组合在应答 NRG-1 同种型结合时似乎能够形成二聚体。然而, ErbB2 似乎是优选的二聚化伴侣, 其在稳定配体 - 受体复合物中可能起着重要作用。

[0012] 已经显示出 GGF2 能促进施旺细胞的增殖、分化和保护 (Goodearl 等, 1993, J Biol Chem. 268:18095-102 ;Minghetti 等, 1996 J Neurosci Res. 43:684-93)。NRG-1、ErbB2 和 ErbB4 的表达也是小鼠发育过程中心室心肌的小梁形成所需的 (Meyer 和 Birchmeier, 1995, Nature 378:386-90 ;Gassmann 等, 1995, Nature 378:390-4 ;Kramer 等, 1996, Proc Natl Acad Sci USA 93:4833-8)。GGF2 也显示出能促进心肌细胞的增殖和保护 (Zhao 等, 1998, J Biol Chem 273:10261-10269)。在中风的动物模型中还证明了 GGF2- 介导的神经保护作用, 尽管关于给药的参数仍然不明确。

[0013] 本发明通过提供关于优化治疗益处同时限制不利作用的 GGF2 给药方法的指导增进了 GGF2 关于治疗应用的使用。本发明限定了针对特别的疾病状况规定的 GGF2 血清浓度水平的靶治疗窗口。

[0014] 概述

[0015] 本发明涉及将 GGF2 给予需要的患者, 以达到在靶治疗窗口内的 GGF2 血清血浆水平, 确定了该水平在疾病或障碍的治疗中是有效的。根据本发明, 可以在药物组合物中给予 GGF2。

[0016] 根据本发明, 提供了避免在受治疗者中给予胶质生长因子 2 (GGF2) 后施旺细胞髓鞘形成抑制的方法, 所述方法包括 : 提供需要神经元髓鞘形成的受治疗者 ; 在药物学上可接受的载体中提供 GGF2 ; 将 GGF2 给予受治疗者 ; 和确定 GGF2 的量低于抑制施旺细胞髓鞘形成的量。

[0017] 在另一个实施方案中, 本发明涉及促进患有与髓鞘形成水平降低相关疾病或障碍的患者中髓鞘形成的方法, 该方法包括 : 选择患有与髓鞘形成水平降低相关疾病或障碍的

患者；将用量为约 500ng GGF2/kg 体重的胶质生长因子 2 (GGF2) 给予患者；由此促进髓鞘形成。

[0018] 在另一个实施方案中，本发明涉及促进患有与髓鞘形成水平降低相关疾病或障碍的患者中髓鞘形成的方法，该方法包括：选择患有与髓鞘形成水平降低相关疾病或障碍的患者；和，将达到约 0.01nM GGF2 血浆水平量的胶质生长因子 2 (GGF2) 给予患者。

[0019] 在进一步的实施方案中，本发明涉及当将 GGF2 用于促进髓鞘形成时拓宽 GGF2 治疗剂量范围的方法，该方法包括：

[0020] 选择患有与髓鞘形成水平降低相关疾病或障碍的患者；

[0021] 将 GGF2 和 Mek1/Erk 途径抑制剂给予患者，和，由此在比不存在给予 Mek1/Erk 途径抑制剂时发生的更高剂量的 GGF2 下发生 GGF2 介导的髓鞘形成。

[0022] 在另一个实施方案中，本发明涉及确定 GGF2 的量是否是促进髓鞘形成的治疗有效量的方法，该方法包括：

[0023] 提供接受 GGF2 治疗的患者；和测量患者中的 c-Jun 蛋白质水平，由此 c-Jun 相对于基线 c-Jun 水平的增加表示 GGF2 的量接近用于促进髓鞘形成的治疗功效的最大阈值。

[0024] 在本发明的特定实施方案中，使用针对达到得血浆 GGF2 浓度的狭窄靶治疗窗口的给药方案，将 GGF2 给予哺乳动物。

[0025] 如在此所示的，已知 GGF2 能够促进施旺细胞的增殖、分化和保护。GGF2 还显示出在多发性硬化（包括实验性自体免疫脑脊髓炎）的动物模型中能促进髓鞘重新形成和减轻症状。然而，在一些情况下（例如，在高浓度的 GGF2 下），GGF2 可以防止与施旺细胞共同培养的神经元的髓鞘形成。

[0026] 在此提供的数据证明 GGF2 实际上能够促进外周神经的髓鞘形成，但教导了给予需要的哺乳动物的 GGF2 的精确剂量是获得所需的 GGF2 介导的促进的外周神经的髓鞘形成需要的。如在此所教导的，为了促进髓鞘形成，给予 GGF2，使得在血浆 GGF2 浓度的治疗窗口内。在缺乏在此所示结果的情况下，不存在促进需要的哺乳动物中髓鞘形成所需的血浆 GGF2 浓度的狭窄治疗窗口的评价。

[0027] 在此所示的数据还证明了 GGF2 足以促进髓鞘形成并拯救 CRD-Nrg1- 缺乏轴突上的髓鞘形成缺陷。然而，在高浓度下，GGF2 以 Erk- 依赖性方式抑制髓鞘形成。本发明的结果证明了 GGF2 既可以促进也可以抑制髓鞘形成，这取决于提供给施旺细胞的浓度。

[0028] 因此，本发明涉及以下令人惊讶的发现：在 GGF2- 介导的 PI3- 激酶途径激活和髓鞘形成促进之间存在迄今为止未实现的正相关，在 GGF2- 介导的 Mek1/Erk 途径激活和髓鞘形成促进之间存在负相关。换句话说，本发明人发现了通过测定这些途径的激活水平，GGF2 的给药可以精细地调节以促进髓鞘形成。根据本发明，关于促进患者髓鞘形成的 GGF2 的靶治疗窗口是在不存在可检测的 Mek1/Erk 途径激活（例如，通过检测磷酸化的 Erk 来测定）情况下促进 PI3- 激酶途径激活（例如，通过检测磷酸化的 Akt 来测定）的 GGF2 的量。

[0029] 本发明的制剂和组合物呈现出特定的、所需的释放特征，其最大化治疗效果同时最小化不利副作用。可以根据药物或活性剂的最大血浆浓度 ( $C_{max}$ ) 和在特定给药间隔药物或活性剂的血浆浓度 ( $C_{tau}$ ) 来描述所需的释放特征。可以从观察到的  $C_{max}$  和  $C_{tau}$  计算  $C_{max}$  与  $C_{tau}$  的比例 ( $C_{max}:C_{tau}$ )。给药间隔 ( $t_{au}$ ) 是从最后一次给予药物或活性剂起的时间。在本发明的应用中，给药间隔 ( $t_{au}$ ) 可以是，例如，十二 (12) 小时，在该情况下， $C_{tau}$  是在最后

一次给药后十二 (12) 小时时药物或活性剂的浓度。

[0030] 此外,本发明的制剂和组合物呈现出所需的释放特征,其可以根据在稳定状态下的药物或活性剂的最大血浆浓度 ( $C_{\max SS}$ ) 和在稳定状态下的药物或活性剂的最小血浆浓度 ( $C_{\min SS}$ ) 来描述。当给药速率 (吸收) 等于药物或活性剂的清除速率时,观察到稳定状态。可以从观察到的  $C_{\max SS}$  和  $C_{\min SS}$  来计算  $C_{\max SS}$  与  $C_{\min SS}$  的比例 ( $C_{\max SS}:C_{\min SS}$ )。此外,本发明的制剂和组合物呈现出所需的释放特征,其可以根据在稳定状态下药物或活性剂的平均最大血浆浓度 ( $C_{av SS}$ ) 来描述。

[0031] 在涉及需要髓鞘重新形成的患者的本发明的实施方案中,GGF2 的目标峰血清水平为约 0.01nM。

[0032] 在涉及需要髓鞘重新形成的患者的本发明的实施方案中,GGF2 的目标峰血清水平为或约为以下的任一个值,或以下值之间的范围:约 0.001 至 0.01ng/ml ;0.01 至 0.1ng/ml ;0.1 至 1.0ng/ml ;1.0 至 10ng/ml ;10 至 100ng/ml ;或 100 至 1000ng/ml。在特定的实施方案中,目标峰血清水平为约 1.0ng/ml。

[0033] 在涉及患有中风的患者的本发明的实施方案中,GGF2 的目标峰血清水平为或约为以下的任一个值,或以下值之间的范围:约 0.00001 至 0.0001ng/ml ;0.0001 至 0.001ng/ml ;0.001 至 0.01ng/ml ;0.001 至 0.01ng/ml ;0.01 至 0.1ng/ml ;0.1 至 1.0ng/ml ;1.0 至 10ng/ml ;10 至 100ng/ml ;100 至 1000ng/ml ;1000 至 10000ng/ml ;或 10000 至 100000ng/ml。在特定的实施方案中,目标峰血清水平为约 0.2 微克 /ml。

[0034] 在涉及患有神经病患者的本发明的实施方案中,GGF2 的目标峰血清水平为或约为以下的任一个值,或以下值之间的范围:约 0.001 至 0.01ng/ml ;0.01 至 0.1ng/ml ;0.1 至 1.0ng/ml ;1.0 至 10ng/ml ;10 至 100ng/ml ;或 100 至 1000ng/ml。在特定的实施方案中,目标峰血清水平为约 6.25ng/ml。

[0035] 在涉及患有心力衰竭的患者的本发明的实施方案中,GGF2 的目标峰血清水平为或约为以下的任一个值,或以下值之间的范围:约 0.001 至 0.01ng/ml ;0.01 至 0.1ng/ml ;0.1 至 1.0ng/ml ;1.0 至 10ng/ml ;10 至 100ng/ml ;或 100 至 1000ng/ml。在特定的实施方案中,目标峰血清水平为约 6.8 微克 /ml。

[0036] 根据本发明,可以通过本领域技术人员已知的不同途径来给予含有 GGF2 的药物组合物。可以使用任何合适的给药途径,例如,静脉内、非肠道、皮下、肌内、颅内、眼窝内、眼部、心室内、囊内、脊柱内、脑池内、腹膜内、鼻内、气溶胶、口服或局部 (例如,通过使用带有能够穿过真皮并进入血流的制剂的粘性贴剂) 给药。设想了口服给药包括含有 GGF2 的持续释放口服剂型。如在此所述的 GGF2 药物组合物可以用于治疗患有神经障碍的个体,其中所述药物组合物使治疗效果最大化,同时使不利的副作用最小化。

[0037] 在本发明的第一个实施方案中,将 GGF2 给予患有与脱髓鞘相关的神经障碍的哺乳动物,其中以获得和维持血浆 GGF2 浓度的狭窄靶治疗窗口的给药方案来给予 GGF2。如在此所教导的,给予精确剂量的 GGF2 是必需的,以便达到就诱导需要的受试者中髓鞘形成而言的治疗功效所需要的 GGF2 的血清血浆水平。为了获得治疗功效需要给予合适剂量 GGF2 的脱髓鞘障碍的实例包括 Guillain-Barre 综合症,慢性炎性脱髓鞘多发性神经病,多发性神经病,由于创伤引起的外周性脱髓鞘,多发性硬化,视神经炎,由于创伤引起的中枢脱髓鞘,横贯性脊髓炎,进行性多病灶脑白质病,Devic's 病 (德维克氏病),急性弥漫性脑脊髓

炎,肾上腺脑白质萎缩症和肾上腺脊髓神经病。

[0038] 在本发明的第二个实施方案中,将 GGF2 给予患有心肌障碍的哺乳动物,所述心肌障碍如充血性心力衰竭,心肌梗塞,再灌注损伤,化学性、病毒性或突发性心脏中毒,心律不齐,其中以获得血浆 GGF2 浓度的靶治疗窗口的给药方案来给予 GGF2。

[0039] 在本发明的第三个实施方案中,将 GGF2 给予患有中风、脊髓损伤或创伤性脑损伤的哺乳动物,其中以获得血浆 GGF2 浓度的靶治疗窗口的给药方案来给予 GGF2。

[0040] 将认识到,对于在此详述的任何应用,可以以任何合适的形式,或作为药物组合物中的成分,并且通过任何方式来给予 GGF2,所有这些都本文中有描述和 / 或是本领域已知的。

[0041] 因此,本发明涉及就治疗有效血浆水平的 GGF2 靶而言治疗窗口的鉴定。该靶治疗窗口根据折磨患者的疾病或障碍和通过达到适当的治疗有效的 GGF2 血浆水平赋予的所需活性而改变。

[0042] 在此也包括基于症状的表现来选择个体的方法。在此还包括基于对达到治疗有效的 GGF2 血浆水平的响应性来选择个体的方法,如对于每种应用所示的。

[0043] 除了以上所示的治疗方法,本发明延伸至本发明的任一种化合物的用途,用于制备药物或作为可以给予用于这些治疗的药物,以及延伸至用于所公开的和限定的治疗的这些化合物。

[0044] 本发明还包括药物组合物,其含有 GGF2 或 EGFL 结构域和 Mek1/Erk 途径抑制剂,以及该组合物在患有与髓鞘形成水平降低相关的疾病或障碍的患者治疗中的用途。

[0045] 附图简述

[0046] 图 1A-C 显示 (A) 施旺细胞 -DRG 神经元共培养物中 GGF2- 诱导的 Akt 和 MAPK 激活。在髓鞘形成条件下施旺细胞 -DRG 共培养物是处理过的 GGF (0.6  $\mu$ M), 并且 20 分钟后,通过蛋白质印迹分析来测定 Akt 和 MAPK 激活水平。(B) 通过 U0125 抑制 GGF2- 诱导的 MAPK 激活。用递增剂量的 U0125 将共培养物预处理 30 分钟,然后用 GGF2 进行刺激。对照培养物是留下未处理的。20 分钟后测定 MAPK 激活。(C) 通过 U0125 (1 和 3  $\mu$ M) 抑制 GGF2- 诱导的 MAPK 激活逆转了 GGF2 对髓鞘形成的抑制作用。在髓鞘形成条件下,用 GGF2 和 U0125 (1 和 3  $\mu$ M) 将共培养物进行共同处理。十至十二天后,将培养物固定并对 MBP 进行免疫染色,来测定髓鞘形成的水平。

[0047] 图 2 显示了 GGF2 在低浓度下促进了髓鞘形成。在髓鞘形成条件下用 0.5 至 1000pM (0.0005 至 1nM) 浓度范围的 GGF2 处理共培养物。十至十二天后,通过 MBP 免疫染色来测定髓鞘形成。更特别地,从左到右的 GGF2 浓度分别为 :NT, 0.5pM, 1pM, 3pM, 10pM, 30pM, 300pM, 600pM 和 1,000pM。十至十二天后,通过 MBP 免疫染色来测定髓鞘形成。

[0048] 图 3A-F 显示了通过 Mek1/Erk 激活介导了 GGF 对髓鞘形成的抑制作用。(A) 用 GGF (0.01, 0.6 和 1nM) 处理施旺细胞 DRG 共培养物,并且 45 分钟后,制备细胞裂解物,并通过蛋白质印迹分析确定活性 Erk (p-Erk) 和 Akt (p-Akt) 的水平。在 1nM (框内), GGF 诱导了 Erk 和 Akt 的激活。(B) 在共培养物中 GGF- 诱导的 Erk 激活的抑制。用 U0126 预处理施旺细胞 -DRG 共培养物 30 分钟,然后在 U0126 连续存在下加入 GGF (0.6nM)。在 45 分钟后,制备细胞裂解物,并测定 p-Erk 和 p-Akt 的水平。用 U0126 的处理抑制了内源性和 GGF- 诱导的 Erk 激活,而没有影响 Akt 激活。(C) 用 GGF 或 GGF+U0126 (1nM) 处理的共培养物中形成的

MBP<sup>+</sup>髓磷脂部分的图像。用 U0126 处理消除了 GGF 的抑制作用并诱导了髓鞘形成。没有任何处理维持了对照培养物 (NT)。刻度棒 :100 μm。结果的量化显示于 (D) 中。(E) 共培养物中内源性 Erk 活性的抑制促进了髓鞘形成。在髓鞘形成条件下,用递增浓度的 U0126 (0.5、1 和 3nM) 处理共培养物,并且 11 天后,如上分析髓鞘形成。在用 U0126 处理的培养物中观察到了髓鞘形成的明显增加。误差棒表示 ±SE (p<0.001)。(F) 通过 c-Jun 降低和 Krox20 表达增加来实现 GGF 诱导的 Erk 激活的抑制。在 GGF 或 GGF+U0126 (0.5、1 和 3nM) 的存在下在髓鞘形成条件下维持共培养物 11 天,分析细胞裂解物的 MBP、c-Jun 和 Krox 20 表达。肌动蛋白水平作为装载对照。随着用 U0126 的处理,GGF- 诱导的 c-Jun 表达得到下调。在用 U0126 处理的培养物中的 Krox 20 蛋白质的水平显示出增加。

[0049] 图 4A-C 显示了 GGF 在低浓度下促进髓鞘形成。(A) 用 0.0003 至 10nM 范围中的不同浓度的 GGF 处理施旺细胞,并且 20 分钟后,制备细胞裂解物,并通过蛋白质印迹 (上) 和密度分析 (下) 来分析 Erk 和 Akt 激活的水平。与 Erk 激活相比, Akt 激活显示出在更低浓度范围下 (框内) 增加。(B) 在髓鞘形成条件下用不同浓度 (0.0005, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.3, 0.6 和 1nM) 的 GGF 将共培养物处理 11 天,然后固定并对 MBP 和 DAPI 进行免疫染色。与结果的量化 (右侧) 一起显示了对照和用 0.01nM GGF 处理过的培养物的图像。显示了明显的 GGF 的双相作用:在低浓度 (0.0005 至 0.01nM) 下促进髓鞘形成,而在较高 (0.3nM 及以上) 浓度下抑制该过程。(C) 低浓度 (0.01nM) 的 GGF 显著增加了 CRD-Nrg1<sup>+/-</sup> 神经元的髓鞘形成 (p = 0.003)。误差棒显示 ±SEM。通过一尾 ANOVA (\*:p<0.001) 来分析数据。(D) 显示随着浓度进一步提高, GGF2 开始抑制髓鞘形成,与 Erk 激活的出现相符。在 CRD-Nrg1<sup>+/-</sup> 共培养物中也证明了 GGF2 的促进髓鞘细胞形成作用,其中低剂量的 GGF2 拯救了对突变轴突的髓鞘形成作用。

[0050] 图 5A-D 显示了全长 GGF2 的核酸和氨基酸序列。

[0051] 图 6-11 显示了表皮生长因子样 (EGFL) 结构域 1-6 的核酸和氨基酸序列。

[0052] 图 12 显示了关于神经调节蛋白命名的表。

[0053] 发明详述

[0054] 在此呈现的数据证明了为了促进外周神经的髓鞘形成,必须使用涉及达到例如血浆 GGF2 浓度或 GGF2 剂量的治疗窗口的给药方案来给予 GGF2。

[0055] 定义

[0056] 在此所用的术语具有本领域技术人员所识和所知的意思,然而,为了方便和完整性,以下列出了特定的术语和它们的意思。

[0057] 如在此所用的“约”意思是所述的值加上或减去另一个量;由此确定一个值的范围。在某些优选实施方案中,“约”表示相对于基础 (或核心或参照) 值或量加上或减去高达 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, .75%, .5%, .25% 或 .1% 的范围。

[0058] “表皮生长因子样结构域”或“EGF 样结构域”意思是由 NRG-1、NRG-2 或 NRG-3 基因编码的多肽基序,其结合并激活 ErbB2、ErbB3、ErbB4 或其组合,并具有与 EGF 受体结合结构域的结构相似性,如如下文献中所公开的:Holmes 等, Science 256:1205-1210, 1992; 美国专利号 5,530,109; 美国专利号 5,716,930; 美国系列号 08/461,097; Hijazi 等, Int. J. Oncol. 13:1061-1067, 1998; Chang 等, Nature 387:509-512, 1997; Carraway 等, Nature



387:512-516,1997 ;Higashiyama 等, J Biochem. 122:675-680,1997 和 WO 97/09425。对于表皮生长因子样 (EGFL) 结构域 1-6 的核酸和氨基酸序列,参见图 10-15。

[0059] “神经调节蛋白”或“NRG”意思是由 NRG-1、NRG-2 或 NRG-3 基因或核酸(例如, cDNA) 编码的多肽,其结合并激活 ErbB2、ErbB3、ErbB4 受体,或其组合。

[0060] “神经调节蛋白-1”、“NRG-1”、“神经生长因子”、“GGF2”或“p185erbB2 配体”意思是直接结合或反式激活 ErbB2 受体并由美国专利号 5, 530, 109 ;美国专利号 5, 716, 930 和美国专利号 7, 037, 888 中所述的 p185erbB2 配体基因编码的多肽,在此将每篇专利的内容引入作为参考。对于全长 GGF2 的核酸和氨基酸序列,参见图 9A-D。对于涉及神经调节蛋白命名的表格,参见图 12。

[0061] 由 NRG-1、NRG-2 和 NRG-3 基因编码的多肽具有 EGF 样结构域,这使其结合并激活 ErbB 受体。Holmes 等 (Science 256:1205-1210,1992) 已经表明单独的 EGF 样结构域足以结合并激活 p185erbB2 受体。因此,由 NRG-1、NRG-2 或 NRG-3 基因编码的任何蛋白质产品,例如,具有由神经调节蛋白基因或 cDNA 编码的 EGF 样结构域的多肽(例如,EGF 样结构域,如美国专利号 5, 530, 109 ;美国专利号 5, 716, 930 ;美国专利号 7, 037, 888, 美国专利号 7, 135, 456 和美国专利号 7, 319, 019 中所述的 ;或如 W097/09425 中公开的 EGF 样结构域),可以用于本发明的方法中,以获得其中获得了有效血清血浆 GGF2 水平的治疗窗口。

[0062] 还必须注意到如在此和所附权利要求中使用的,单数形式“a”,“an”和“the”包括复数指代物,除非文中另外清楚地指出。

[0063] 除非另外限定,在此所用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常理解的意思。尽管与在此所述那些相似或相等的任何方法和材料可以用于本发明实施方案的实践或测试中,但现在将描述特定的方法、装置和材料。

[0064] “局部给药”意思是通过非全身性途径在患病或障碍部位或附近的直接给药。

[0065] 如在此所用的术语“患者”和“受治疗者”指的是所有动物,包括哺乳动物。患者或受治疗者的实例包括人、牛、狗、猫、山羊、绵羊和猪。

[0066] 如在此所用的“药物学上可接受的盐、酯、酰胺和前药”指的是本发明化合物的那些羧酸盐、氨基酸加成盐、酯、酰胺和前药,这在合理的医学判断范围内,适用于接触患者的组织,而没有不当的毒性、刺激、过敏性反应等,与合理的益处 / 风险比例匹配,并且对预期的用途是有效的,以及在可能的情况中,还指本发明化合物的两性离子形式。

[0067] 术语“前药”指的是在体内快速转化以产生上式的母体化合物的化合物,例如,通过血液中的水解。T. Higuchi 和 V. Stella,“Pro-drugs as Novel Delivery Systems”(作为新传送系统的前药), A. C. S. Symposium 系列的 Vol. 14, 和 Bioreversible Carriers in Drug Design (药物设计中的生物可逆载体), 编辑 Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987 中提供了彻底的讨论,在此将这两篇文献引入作为参考。

[0068] 术语“盐”指的是本发明化合物的相对无毒的、无机和有机酸加成盐。可以在化合物的最终分离和纯化过程中在现场制备这些盐,或通过分开地将游离碱基形式的纯化化合物与合适的有机或无机酸反应并分离由此形成的盐来制备这些盐。代表性的盐包括溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、硝酸盐、醋酸盐、草酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、硼酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、

延胡索酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘二甲酸盐、甲磺酸盐、葡萄糖酸盐、乳糖酸盐和月桂酰磺酸盐等。这些可以包括基于碱和碱土金属的阳离子,如钠、锂、钾、钙、镁等,以及无毒的铵、四甲铵、四甲铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。(参见,例如, S. M. Barge 等, “Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci., 1977, 66:1-19, 在此将其引入作为参考)。

[0069] “治疗有效量”是足以减轻与医学病症或虚弱相关的症状、正常化 导致特定身体功能削弱的疾病或障碍中的身体功能或提供一种或多种临床测量的疾病参数的改善的量。优选,与脱髓鞘疾病相关疾病的症状的改善,例如,包括,步行速度、较低的末端肌紧张性、较低的末端肌力或痉挛状态。如与本申请相关的,治疗有效量是足以减轻与待治疗的神经障碍相关的疼痛或痉挛的量,或足以导致患有损害神经功能的或阻碍正常性欲、膀胱或肠功能的神经障碍的患者性欲、膀胱或肠功能改善的量。

[0070] “治疗”指的是对于患者给予药物或进行医疗程序,以缓解患者的临床病症,包括降低的疾病持续时间和疾病严重程度,或患者生活质量的主观改善或患者延长的存活。

[0071] 如在此所用的,术语“靶治疗窗口”指的是达到所需治疗结果的剂量范围或血清浓度范围。对于 GGF2,在特定的实施方案中,靶治疗窗口指的是足以诱导患者中施旺细胞髓鞘形成的 GGF2 的量,该量低于足以抑制患者中髓鞘形成的含量。在一个令人惊讶的发现中,本发明人通过确定 PI3- 激酶途径激活和 Mek1/Erk 途径激活的相对水平鉴定出 GGF2 对于其促进髓鞘形成能力的靶治疗窗口。更特别地,本发明人发现了在 GGF2- 介导的 PI 3- 激酶途径激活和髓鞘形成促进之间存在迄今为止未实现的正相关,在 GGF2- 介导的 Mek1/Erk 途径激活和髓鞘形成促进之间存在负相关。换句话说,本发明人发现了通过测定这些途径的激活水平,GGF2 的给药可以精细地调节以促进髓鞘形成。就促进受治疗者髓鞘形成而言 GGF2 的靶治疗窗口被定义为在不存在可检测的 Mek1/Erk 途径激活(例如,通过检测磷酸化的 Erk 来测定)情况下促进 PI3- 激酶途径激活(例如,通过检测磷酸化的 Akt 来测定)的 GGF2 的量。可以使用本领域已知的标准试验来获得磷酸化 Akt 和磷酸化 Erk 的检测,这些试验包括 ELISA、蛋白质(免疫)印迹、免疫细胞化学、体外激酶试验、LC/MS(液相色谱/质谱)、MaldiTOF/MS(基质辅助激光解离/离子化-飞行时间质谱)或其他本领域已知的蛋白系统,如 Luminex。

[0072] 本领域技术人员将认识到 PI3- 激酶途径激活和 Mek1/Erk 途径激活的其他细胞内标记是已知的并且根据本发明来使用。根据本发明,PI3- 激酶途径激活和 Mek1/Erk 途径激活的其他指示剂可以用于确定其中 GGF2 促进髓鞘形成的治疗窗口。

[0073] 此外,本发明的化合物可以以未溶解以及溶解形式存在,用药物学上可接受的溶剂,如水、乙醇等溶解。通常,对于本发明的目的,认为溶解形式等同于未溶解形式。

[0074] “MAP 激酶抑制剂”

[0075] 可以用于本发明中的 MAP 激酶抑制剂的非限制性列表包括:牛蒡子甙元,其在体外有效地抑制 MKK1 的活性,具有 1nM 的 IC<sub>50</sub> 值,并因此抑制 MAP 激酶 ERK1/2、p38 激酶和 JNK 的磷酸化和激活及其在用 LPS 处理的 Raw264.7 细胞中的活性;PD 98059,其是 MAP 激酶-激酶(也称为 MAPK/ERK 激酶或 MEK)有效的、选择性的和细胞渗透性的抑制剂,通过 MAP 激酶-激酶抑制 MAP 激酶的磷酸化但不抑制 MAP 激酶自身。PD98059- 诱导作用的 IC<sub>50</sub> 值对于许多试验在 1-20 μM 范围中;SB202190,其是 p38MAP 高选择性的、有效的和细胞渗透性的抑制剂,在活性激酶的 ATP 袋内结合,如在重组人 p38 中测量的,具有 38nM 的 K<sub>d</sub>,并

选择性地抑制 p38  $\alpha$  和  $\beta$  同种型 (对于 p38  $\alpha$  /SAPK2  $\alpha$  和 p38  $\beta$  2/SAPK2  $\beta$  的 IC50 值分别为 50 和 100nM);SB203580, 其是 p38 有丝分裂素激活的蛋白激酶的高选择性和细胞渗透性抑制剂, 对于 p38/SAPK2a 和 p38/SAPK2b 分别具有 50 和 500nM 的 IC50 值, 并且还在高 10 倍的浓度下 (IC50  $\sim$  3-5  $\mu$ M) 抑制磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (PKK1) (显示出超过 Lck, GSK3b 和 Akt/PKB 100-500 倍的选择性);SL 327, 其是 MEK1 和 MEK2 的选择性抑制剂, 分别具有 180 和 220nM 的 IC50 值。其在体外阻断海马趾 LTP 并且是体内的脑渗透剂, 全身给药后, 阻断大鼠中的恐惧条件作用和学习, 并且在小鼠中产生神经保护;SP600125, 其是 c-Jun N-末端激酶 (JNK) 的选择性抑制剂。其竞争性地和可逆地抑制 JNK1、2 和 3 (IC50 = 40-90nM) 并已经显示出对 ERK2、p38b 和各种其他激酶具有较低的抑制力, 并且已知在体内是活性的;和 U0126, 其是有丝分裂素激活的蛋白激酶、MEK-1 和 MEK-2 的选择性抑制剂, 具有高于 PD98059100 倍的功效, 并且是 PKC、Raf、ERK、JNK、MEKK、MKK-3、MKK-4/SEK、MKK-6、Ab1、Cdk2 和 Cdk4 的弱抑制剂, 并在基于细胞的受体试验中抑制 AP-1 反式激活。

[0076] 目前在 FDA 期试验中的其他抑制剂包括法呢基转移酶抑制剂 (FTI)。例如, **Zarnestra®** (R115777, tipifarnib) 是开发中最向前的 FTI。患有之前治疗过的转移性乳癌的患者 II 期试验测试了两个不同的给药方案: 连续的和间歇的。这 2 组中的客观反应率为 10% 和 14%, 另外 15% 和 9% 具有至少 6 个月的稳定疾病。观察到的主要副作用是骨髓抑制和神经病, 两者在间歇给药组中都低于连续的。已经与细胞毒性化疗结合进行了 zarnestra 和其他 FTI 的几个 I 期研究, 并且证明了这些组合方案的安全性。乳癌中的 II 期试验正在进行中, 包括与芳香酶抑制剂联合使用 zarnestra。FDA 对在急性骨髓性白血病 (AML) 中使用 zarnestra 的批准是未决的 III 期数据, 因为基于来自单臂 II 期试验的数据, FDA 委员会投票反对加快对 zarnestra 的批准。

[0077] 关于 **Zarnestra®**, 对于 I 期临床试验, 每日口服两次 400mg 的 **Zarnestra®**, 持续两周; 对于 II 期临床试验, 每日口服两次 300mg 的 **Zarnestra®**, 在每 28 天的循环中持续头 21 天; 对于 I II 期临床试验, 每日口服两次 600mg 的 **Zarnestra®**, 在每 28 天的循环中持续头 21 天。

[0078] Raf 抑制剂包括另一种类型的目前处于 FDA 期试验的抑制剂。例如, 索拉非尼 (BAY 43-9006) 是第一种不仅靶向 Raf/MEK/Erk 信号途径而且靶向 VEGFR 和 PDGFR 途径的化合物。在 2004 年 3 月, 索拉非尼以捷径状态得到 FDA 批准用于转移性肾细胞癌。在 2005 年 4 月, 接受索拉非尼进入 Pilot 1 计划, 其是设计用于已经通过 FDA 快速追踪状态批准的治疗, 并且具有提供明显优于现有标准治疗益处的潜能。还存在几个在患有晚期原发性肾癌和肝癌以及转移性黑素瘤患者中进行中的大的、国际性的、多机构的索拉非尼 III 期临床研究。

[0079] 关于索拉非尼, I 期临床试验测试了两个剂量水平: 剂量水平 1: 每日口服两次 200mg 的索拉非尼, 持续 3 周的循环, 或剂量水平 2: 每日口服两次 400mg 的索拉非尼, 持续 3 周的循环。

[0080] 最近提出了患有晚期肾癌患者中进行的 III 期试验的计划中期分析的结果 (Escudier 等, J Natl Cancer Inst. 2008, 100:1454-63; 在此将其内容全部引入作为参考)。在 769 名分析的患者中, 与使用安慰剂的 12 周相比, 用索拉非尼使无进展存活 (PFS)

加倍至 24 周的中值。在所有患者亚组中观察到来自索拉非尼的益处,与年龄、疾病持续时间或之前的治疗无关。在接受索拉非尼的 80% 患者中获得疾病控制:78% 具有稳定的疾病(与安慰剂臂中的 55% 相比)和 2% 具有部分反应(与安慰剂臂中的无相比)。索拉非尼的 12 周无进展率为 79% (相对于安慰剂的 50%)。此外,在 768 名患者中,索拉非尼耐受非常好,并且最常见的副作用是高血压、疲劳、腹泻和皮疹,包括手脚上的皮疹(手脚综合症)。

[0081] II 期功效试验是研究索拉非尼在晚期肺、乳房和其他癌症中作为单种药剂。I/II 期临床试验是研究索拉非尼结合各种标准化疗和其他抗癌剂。

[0082] ISIS 5132 是另一种 raf 抑制剂,已经在 I 期研究中显示出可接受的毒性。II 期研究目前正在各种癌症类型中进行。

[0083] 目前在 FDA 期试验中的其他抑制剂包括 MEK 抑制剂。例如,CI-1040 是 MEK1-2 的口服、选择性的小分子抑制剂。动物和培养物研究已经表明这种药剂在乳癌细胞系中的活性。I 期研究已经发现了轻度的胃肠道和皮肤副作用。不幸地,在 4 种不同肿瘤类型(晚期结直肠癌、NSCLC、乳癌和胰腺癌)的 67 名患者的 II 期研究发现没有应答,尽管 CI-1040 治疗是耐受性良好的。

[0084] PD0325901, 第二代 MEK 抑制剂,最近已经进入了临床进展,与 CI-1040 相比,显示出明显更好的药理特性,这些研究者希望可以转化成更好的抗癌功效。已经在黑素瘤患者中显示出一些部分的应答。

[0085] 对于 PD 0325901, I 期和 II 期临床试验测试了多剂量水平。一天口服给药一次或两次;评价了几个给药时间表;目前的给药时间表为在 28 天的循环中,5 天给药,2 天停药,持续 3 周。评价的剂量范围为一天一次 1mg 至每日两次 30mg。由于安全性考虑,尤其是在一天两次 10mg 和更高剂量下呈现的眼部和神经毒性,过早地停止了临床试验。

[0086] 理解本发明不限于所述的特定分子、组合物、方法或方案,因为这些可以改变。还应当理解说明书中所用的术语只是出于描述特定实施方案的目的,而不是打算来限制本发明的范围,本发明只受所附权利要求的限制。

[0087] 给药:可以将神经调节蛋白基因编码的神经调节蛋白和含有 EGF 样结构域的多肽与药物学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂一起以单位剂型给予患者或实验动物。可以使用常规的药物实践来提供合适的制剂或组合物,以将这样的组合物给予患者或实验动物。可以使用任何合适的给药途径,例如,静脉内、非肠道、皮下、肌内、颅内、眶内、眼部、心室内、囊内、脊柱内、脑池内、腹膜内、鼻内、气溶胶、口服或局部(例如,通过使用带有能够穿过真皮并进入血流的制剂的粘性贴剂)给药。治疗制剂可以是液体溶液或悬浮液的形式;对于口服给药,制剂可以是片剂或胶囊的形式;对于鼻内制剂,是粉末、鼻滴液或气溶胶的形式。以上任一种制剂都可以是持续释放制剂。

[0088] 本领域公知的用于制备制剂的方法可以在例如“Remington's Pharmaceutical Sciences”中找到,在此将其全部引入作为参考。对于非肠道给药的制剂可以例如含有赋形剂、无菌水或盐水、聚烷撑二醇(如聚乙二醇)、植物来源的油或氢化萘。可以使用持续释放的、生物相容的、生物可降解的丙交酯聚合物,丙交酯/乙交酯共聚物,或聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物,来控制化合物的释放。对于给药本发明分子,其他有用的非肠道传送系统包括乙烯-醋酸乙烯酯共聚物颗粒、渗透泵、可植入灌输系统和脂质体。用于吸入的制剂可以含有

赋形剂,例如,乳糖,或可以是水溶液,其含有,例如,聚氧乙烯-9-月桂酯、甘胆酸盐和脱氧胆酸盐,或可以是油性溶液,用于以鼻滴液的形式或作为凝胶来给药。

[0089] 因此,并且如之前所述的,本发明在其范围内包括并延伸至所述的治疗方法和这些化合物用于制备药物的用途,这些药物可用于这些方法。

[0090] 脱髓鞘疾病:髓鞘覆盖中枢和外周神经系统中的许多神经纤维。完整髓鞘的存在加速了神经脉冲的轴突传送。影响髓磷脂的障碍中断了神经传递,并且疾病症状可以反应出神经系统任何部分中的缺陷。

[0091] 通过中枢神经系统(CNS)中的少突神经胶质形成的髓磷脂在化学上和免疫学上不同于外周通过施旺细胞形成的。因此,一些髓磷脂障碍(例如,Guillain-Barré综合症,慢性炎性脱髓鞘多神经病和其他外周性神经多神经病)倾向于主要影响外周神经,而其他髓磷脂障碍主要影响CNS。CNS中最常受到影响的区域是大脑、脊髓和视神经。

[0092] 脱髓鞘通常是感染性、缺血性、代谢性或遗传性障碍继发性的。在主要的脱髓鞘障碍中,同时诱因是未知的,怀疑自体免疫机制,因为障碍有时候跟随病毒性感染或病毒疫苗接种。

[0093] 脱髓鞘倾向于是片段性的或不调和的,同时或按序影响多个区域。然而,髓鞘重新形成可以伴随神经功能的修复、再生和完全恢复而发生。然而,大范围的髓磷脂丧失通常接着轴突变性,并且通常跟随着细胞体变性。

[0094] 多发性硬化(MS)的特征在于大脑和脊髓中脱髓鞘的分散碎片。常见的症状包括视觉和眼球运动异常、感觉异常、虚弱、痉挛、排尿障碍和轻度认知障碍。通常,神经缺陷是多重的,好转和恶化逐渐导致失去能力。诊断是通过好转和恶化的病史加上临床病征、测试结果、核磁共振成像(MRI)看到的损伤或其他标准(取决于症状),以客观地证明 $\geq 2$ 分开的神经异常。治疗通常包括用于急性恶化的皮质类固醇、防止恶化的免疫调节药物和支持性方法。

[0095] 在MS中,产生局部区域的脱髓鞘(斑),伴随少突神经胶质的破坏、血管周围的炎症以及斑中和周围的髓磷脂的脂质和蛋白质成分的化学变化。轴突损伤是可能的,但细胞体和轴突倾向于相对得到较好的保护。在斑中产生纤维性神经胶质增殖,其分散在整个CNS中,主要在白质中,特别是在侧柱和后柱(尤其是在颈部)、视神经和室周区域。中脑、脑桥和小脑中的纤维束也受到影响。大脑和脊髓中的灰质可能受到影响,但程度要低得多。

[0096] 心脏疾病

[0097] 心脏疾病是对各种影响心脏的不同疾病的统称。它是许多工业化国家(包括美国)中的主要死亡原因。通过介绍呈现了以下宽泛种类的心脏疾病。外源性心肌病是其中主要病状位于心肌外的一种心肌病。大部分心肌病是外源性的,因为心肌病最常见的诱因是缺血。内源性心肌病源自心肌的虚弱,而不是由于可识别的外部诱因。另一方面,心血管疾病指的是各种影响心脏自身和/或血管系统的特定疾病,尤其是流入和流出心脏的静脉和动脉。对疾病二态性的研究表明患有心血管疾病的女性通常患有影响血管的形式,而男性通常患有影响心肌自身的形式。心血管疾病已知的或相关的诱因包括糖尿病、高血压、高同型半胱氨酸血症和高胆固醇血症。缺血性心脏病是另一种类型的心脏自身的疾病,特征在于供应给器官的血液减少。

[0098] 高血压性心脏病是用于表示由高血压(尤其是局部高血压)引起的心脏病的术

语。炎性心脏病涉及心肌和 / 或其周围组织的发炎。瓣膜性心脏病是涉及心脏的一个或多个瓣膜的任何疾病过程。心脏右侧的瓣膜是三尖瓣,肺瓣膜和心脏左侧的瓣膜是二尖瓣和动脉瓣膜。

[0099] 充血性心力衰竭,是工业化国家死亡的主要诱因之一,由心脏增加的工作负荷及其泵动能力逐渐降低引起。其可以由损害心脏填充或泵出足量通过身体血液的能力的任何结构或功能性的心脏障碍引起。最初,由高血压或收缩组织损失引起的提高的工作负荷诱发补偿性心肌细胞肥大和左心室壁增厚,由此增强收缩力和维持心脏功能。然而,随着时间推移,左心室扩大,心脏收缩泵功能恶化,心肌细胞经受细胞死亡,并且心肌功能逐渐恶化。

[0100] 成为充血性心力衰竭基础的因素包括血压、缺血性心脏疾病、暴露于心脏中毒化合物(如蒽环类抗生素)和已知能提高心力衰竭风险的遗传缺陷。

[0101] “充血性心力衰竭”意思是受损的心脏功能,其使得心脏不能维持休息或锻炼时的正常血液输出,或不能维持正常心脏充盈压情况中的正常心脏输出。约 40% 或更低的左心室射血分数表示充血性心力衰竭(通过比较,约 60% 的射血分数是正常的)。充血性心力衰竭患者显示出公知的临床症状和体征,如呼吸急促、胸腔积液、休息或锻炼时疲劳、收缩功能障碍和水肿。可以通过公知的方法容易地诊断出充血性心力衰竭(参见,例如,“Consensus recommendations for the management of chronic heart failure”(慢性心力衰竭控制的一致推荐), *Am. J. Cardiol.*, 83(2A):1A-38-A, 1999)。

[0102] 使用公知的方法(如,身体检查、超声心动图显象、放射性核素成像、入侵性血液动力学监控、核磁共振血管造影术和结合耗氧量研究的踏车锻炼测试)来测定相对严重性和疾病进展。

[0103] “缺血性心脏病”意思是由心脏对氧的需求和足够的氧供应之间的不平衡引起的任何障碍。大部分缺血性心脏疾病的病例是由冠状动脉狭窄引起的,如在动脉粥样硬化或其他血管疾病中产生。

[0104] “心肌梗塞”意思是通过其缺血性疾病导致一部分心肌由疤痕组织替代的过程。

[0105] “心脏中毒”意思是通过直接或间接损害或杀灭心肌细胞降低心脏功能的化合物。

[0106] “高血压”意思是医学专业人士(例如,医生或护士)认为高于正常和携带提高的产生充血性心力衰竭风险的血压。

[0107] “治疗”意思是相对于在治疗不存在下产生的疾病进展,治疗过程中神经调节蛋白或神经调节蛋白样多肽的给药以统计学显著的方式减缓或抑制了充血性心力衰竭的进展。公知的标志,如左心室射血分数、锻炼表现和其他临床测试,以及存活率和住院治疗可以用于测定疾病进展。可以通过本领域公知的方法(参见,例如, *SOLVD Investigators*, *N. Engl. J. Med.* 327:685-691, 1992 和 *Cohn* 等, *N. Engl. J. Med.* 339:1810-1816, 1998) 来测定治疗是否以统计学差异方式减缓或抑制了疾病进展。

[0108] “降低心肌变薄进展”意思是维持心室心肌细胞的肥大,使得心肌壁的厚度得到维持或提高。

[0109] “抑制心肌凋亡”意思是与未治疗的心肌细胞相比,神经调节蛋白治疗抑制至少 10% 的心肌细胞死亡,更优选至少 15%,再更优选至少 25%,更优选至少 50%,再更优选至少 75%,最优选至少 90%。

[0110] 中风

[0111] 中风或脑血管意外 (CVA) 是用于表示由于将血液供应给大脑的血管障碍引起的大脑功能快速产生丧失的术语。当大脑部分的血液供应突然中断时或大脑中的血管爆裂,将血液泄露进大脑细胞周围的空间中时,发生了中风。当大脑细胞不再从血液接受氧和营养物质时,或进入大脑或大脑周围存在突然出血时,大脑细胞死亡。中风的症状包括突然失去知觉或软弱无力,尤其是身体的一侧;突然混乱或失语或说话不能理解,或失去平衡或方向感;或突然不知原因的严重头疼。存在两种形式的中风:缺血性的,其是由于供应大脑的血管的阻塞(例如,由血栓症或栓塞引起的);和出血,其是进入大脑或大脑周围的出血引起的。

[0112] 治疗窗口指数

[0113] 对于在此所述的每种疾病应用,建立了 GGF2 血清血浆水平的靶治疗窗口。根据在此呈现的实验结果,将 GGF2 给予患有脱髓鞘相关神经障碍的哺乳动物,必须以定量方案来给予 GGF2,以获得和维持狭窄的血浆 GGF2 浓度的靶治疗窗口。如在此所教导的,需要精确的 GGF2 定量给药,以便获得对于就在需要的患者中诱导髓鞘形成而言治疗功效所需要的 GGF2 血清血浆水平。

[0114] 在涉及需要重新形成髓鞘患者的本发明的实施方案中,GGF2 的目标血清血浆水平为约 0.01nM。

[0115] 在另一个涉及需要重新形成髓鞘的患者的本发明实施方案中,给予用量为约 500ng/kg 患者体重的 GGF2。

[0116] 本发明的组合物可以用于患者病症的治疗中,包括在需要的患者中建立 GGF2 的治疗有效浓度。该组合物可以用于建立一个水平和或维持患者中 GGF2 的治疗有效浓度。在理想的情况下,本发明的组合物可以配制以避免 GGF2 最初释放中的大峰。本发明的组合物当给予需要的患者时可提供上述疾病的治疗。优选地,给予组合物,使得达到在患者中维持至少 6 小时,优选至少 8 小时,更优选至少约 10-12 小时时间段的 GGF2 治疗有效的血浆水平。

## 实施例

[0117] 材料和方法

[0118] 抗体

[0119] 对于免疫荧光分析,使用 1:500 稀释度的髓磷脂碱性蛋白 (MBP) 的单克隆抗体 (SM194) (Sternberger monoclonals)。对于蛋白质印迹分析,用于激活 erbB2(p-Neu/Tyr 1248)、erbB2 和 erbB3 的多克隆抗体全部获自 Santa Cruz 并以 1:1000 稀释度来使用。磷酸化 Akt 的单克隆抗体和磷酸化 MAPK 的多克隆抗体购自 Cell Signaling,并分别以 1:1000 和 1:500 的稀释度来使用。Akt 和 MAPK 的多克隆抗体 (Promega) 分别以 1:1000 和 1:5000 的稀释度来使用。

[0120] II 型和 III 型神经调节蛋白 -1

[0121] 重组人胶质生长因子 -II(rhGGF-II, II-型 Nrg1) 获自 Acorda Therapeutics, Inc。重组人感觉和运动神经元衍生因子 (rhSMDF, III-型 Nrg1) 购自 R&D Systems。在本发明的研究中,rhGGF-II 和 rhSMDF 各自简单地称为 GGF(或 GGF2) 和 SMDF。GGF 是含有 EGF 结构域和 Ig 样结构域的 N-末端 419 个氨基酸残基。因此,GGF 是缺乏跨膜

和细胞质结构域的可溶性蛋白。

[0122] 初级大鼠施旺细胞培养物

[0123] 按照之前所述的 (Brookes 等, Brain Res. 1979 ;165:105-118) 从新生大鼠 (1-2 天大) 的坐骨神经制备施旺细胞。对于常规培养, 使施旺细胞在含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 Dulbecco' s 改良 Eagle' s 培养基 (DMEM) 中生长, 该培养基补充了 EGF- 结构域神经调节蛋白 -1 (R&D Systems) (10ng/ml) 和福司柯林 (2  $\mu$  M)。在文中描述的所有实验中都使用了传代 2-4 之间的细胞。

[0124] 背根神经节 (DRG) 神经元 - 施旺细胞共培养物

[0125] 按照之前所述的 (Eldridge 等, J Cell Biol. 1987 ; 105(2):1023-34) 从 14.5 天大的大鼠胚胎制备分离的 DRG, 并以 1.25DRG/ 盖玻片的密度涂布于胶原蛋白 (1 型大鼠尾巴胶原蛋白) 覆盖的 12mm 玻璃盖玻片上。五至六小时后, 用补充了 B27 (GIBCO), 20% 葡萄糖, NGF (50ng/ml) 和 5- 氟脱氧尿苷 (FUdR, 10  $\mu$  M) 的神经基础培养基 (Cellgro) 注满培养物, 并将培养物再维持 2-3 天, 以除去增殖中的非神经细胞。然后将培养物转入不含 FUdR 的新鲜培养基中, 并维持直至 DRG 轴突达到盖玻片的外周。在轴突网络建立后, 将施旺细胞以 100,000 细胞 / 盖玻片的密度置于神经元上。四至五天后, 将培养物转入形成髓鞘的培养基中: 最小必需培养基 (MEM), 该培养基补充 10% 热灭活 FBS, 20% 葡萄糖, NGF (50ng/ml) 和抗坏血酸 (50  $\mu$  g/ml)。十至十一天后, 通过 MBP 的免疫染色来测定髓鞘形成。

[0126] 上颈部神经节 (SCG) 神经元 - 施旺细胞共培养物

[0127] 按照之前所述的从出生后 1-2 天的大鼠制备分离的 SCG, 并以 0.8SCG/ 盖玻片的密度涂布于胶原覆盖的 12mm 玻璃盖玻片。第二天, 用补充 B27 (GIBCO), 20% 葡萄糖, NGF (50ng/ml) 和 5- 氟脱氧尿苷 (FUdR, 10  $\mu$  M) 的神经基础培养基注满培养物, 并将培养物在培养基中再维持 2-3 天, 以除去增殖中的非神经细胞。将培养物转回不含 FUdR 的新鲜培养基, 并维持, 直至轴突延伸出盖玻片的外周。将施旺细胞置于神经元上, 并在含补充剂的神经基础培养基中偶那个维持, 直至施旺细胞移植于轴突上 (约 7-10 天)。按照对 DRG- 施旺细胞共培养物所述的, 通过将培养物置于髓鞘形成培养基中来启动髓鞘形成。四十天后, 通过 MBP 免疫染色来测定髓鞘形成。

[0128] 免疫沉淀和蛋白质印迹分析

[0129] 为了制备细胞裂解物, 将 60mm 平板或共培养物上 90-95% 汇合的大鼠施旺细胞在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中洗涤两次, 在 300  $\mu$  l 冰冷裂解缓冲液 (50mM Tris HCl pH7.4, 1% NP-40, 0.25% 脱氧胆酸钠, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 10  $\mu$  g/ml 亮肽素, 2  $\mu$  g/ml 抑肽酶, 1mM PMSF 和 0.5mM 原钒酸盐) 裂解。通过在冷的 14,000rpm 下离心 15min 来澄清裂解物, 并根据制造商说明来测定上清液的蛋白质浓度 (Bio-Rad:Hercules, CA)。对于蛋白质印迹分析, 在 10% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶上将 50-70  $\mu$  g 施旺细胞裂解物进行大小分级, 并转移至 PVDF 膜上。在 5% 奶中阻断后, 用在阻断溶液中制备的合适一抗来孵育膜。用辣根过氧化物酶缀合的二抗孵育后, 通过增强的化学发光来观察蛋白质条带。对于免疫沉淀, 用 0.6  $\mu$  g 一抗在 4 $^{\circ}$ C 下将 500  $\mu$  g 施旺细胞裂解物培养 3 小时, 然后用 50  $\mu$  l Sepharose A 珠粒孵育 1 小时。将珠粒在裂解缓冲液中洗涤 5 次, 并在 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶上将结合珠粒的蛋白质分级, 并接受蛋白质印迹分析。

[0130] MBP 的免疫荧光染色



[0131] 在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中冲洗 DRG- 施旺细胞或 SCG- 施旺细胞培养物, 然后在 4% 多聚甲醛中固定 20 分钟。用 PBS 洗涤后, 在冰冷甲醇中将样品渗透 25 分钟, 然后在阻断溶液 (5% 正常山羊 - 血清 +0.3% 曲通 X) 中在室温下孵育 1 小时。这以后用在阻断溶液中制备的一抗孵育过夜。用 PBS 洗涤后, 用 Alexa-488 缀合的山羊抗鼠二抗将样品孵育 45 分钟。通过用 DAPI 染色来观察细胞的核。

[0132] 实时定量 PCR

[0133] 统计学分析

[0134] 使用 SAS 编程软件进行单向 ANOVA, 具有 95% 的显著性水平。

[0135] 结果

[0136] 通过 MAPK 激活介导 GGF2 对髓鞘形成的抑制功能。早先的研究已经表明 II 型 Nrg1 (GGF2), 加入施旺细胞 - 神经元共培养物中时, 抑制了髓鞘形成。还报道了 Ras/Raf/MAPK 途径的激活抑制了施旺细胞中髓磷脂相关的基因表达, 而 PI3- 激酶途径的激活促进了髓鞘形成, 形成了施旺细胞的髓鞘形成状态是由 PI3- 激酶和 Ras/Raf/MAPK 途径之间的平衡来决定的主张 (Ogata 等, J Neurosci 2004 ;24:6724-32)。本发明人预测到如果 GGF2 通过 MAPK 激活将逆转对髓鞘形成的抑制作用。为了测定 GGF2 对髓鞘形成的抑制作用可能是由于其诱导施旺细胞中强烈的 MAPK 激活的能力引起的可能性, 本发明人使用了公认的体外髓鞘形成培养系统, 其中将施旺细胞与背根神经节 (DRG) 神经元共同培养, 并通过将抗坏血酸加入到培养基中来诱导相关轴突形成髓鞘。首先为了测定 GGF2 对共培养物中 MAPK 激活的作用, 将初级施旺细胞置于 DRG 神经元上, 并使轴突增殖。一旦培养物停止增殖, 用 0.6nM 的 GGF2 刺激共培养物。二十分钟后, 制备细胞裂解物, 并通过蛋白质印迹分析测定 MAPK 激活。在对照共培养物中, 存在低水平的活性 MAPK。如图 1 中所示的, 用 GGF2 处理进一步提高了 MAPK 激活的水平。为了测定 GGF2 诱导的 MAPK 激活是否可以通过用 U0126 (MAPK 激酶的药物抑制剂) 处理来阻断, 在 GGF2 刺激之前, 用递增浓度 (0.5、1、3 和 10  $\mu$ M) 的 U0126 将共培养物预处理 30 分钟, 并且在培养基中维持这些浓度。在 GGF2 处理不存在下用抑制剂处理对照培养物。在对照和实验培养物中, U0126 介导的 MAPK 抑制都是浓度依赖性的, 如通过磷 -MAPK 水平的逐渐降低所示的。在用 GGF2 和 1  $\mu$ M 浓度的 U0126 处理的培养物中, 激活的水平降至基础水平, 而在 10  $\mu$ M U0126 下, 共培养物中的 MAPK 激活完全被消除。U0126 对 GGF2 诱导的 PI3 激酶激活没有作用。

[0137] 为了评价 MAPK 抑制对髓鞘形成的作用, 在启动髓鞘形成时, 在 U0126 存在或不存在下, 用 GGF2 处理共培养物, 并在所述的髓鞘形成条件下, 维持相同的条件。在所述的髓鞘形成条件下对照培养物不进行处理。十至十一天后, 将培养物固定并将髓磷脂碱性蛋白 (MBP) 进行免疫染色, 以观察髓磷脂部分。在用 GGF2 处理的培养物中, 如之前所示的, 髓磷脂部分的数量存在明显的降低, 表明 GGF2 对髓鞘形成的抑制作用。然而, 在用 U0126 共同处理的培养物中, 髓鞘形成存在剂量依赖性增加, 表明阻断 MAPK 激活逆转了 GGF2 的抑制作用。

[0138] GGF2在低浓度下促进髓鞘形成: 尽管在用递增浓度的 GGF2 处理的施旺细胞中, MAPK 激活的水平稳定提高, 但本发明人观察到在低于 0.01  $\mu$ M 的低浓度下, 同时 Akt 激活水平明显增加超过基础水平, 则不存在可检测水平的 MAPK 激活。如果通过 Akt 和 MAPK 激活之间的平衡来测定施旺细胞的髓鞘形成状态, 本发明人设法评价在这些浓度下在 MAPK 活性

不存在下的 Akt 激活提高是否与对髓鞘形成的积极作用相关。为了研究这种可能性,在启动髓鞘形成时用 0.0005 至 0.03nM 浓度范围的 GGF2 处理共培养物。之后将培养物固定并对 MBP 进行免疫染色。如基于即时的发现所预测的,与未处理的对照培养物相比,用 0.0005 至 0.01nM 范围的低剂量 GGF2 处理的培养物中,存在髓鞘形成水平的提高。当量化时,结果证明了髓磷脂部分的数量存在剂量依赖性增加(图 2):在 0.0005、0.001 和 0.01nM GGF2 下,相对于对照水平,髓鞘形成各自增加 1.9-、2.7- 和 3.5- 倍。在 0.03nM 下,髓鞘形成水平存在剧烈下降,降至接近或略低于对照培养物的水平。随后 GGF2 量的增加导致髓鞘形成进一步降低。在 0.6nM GGF2 下,对 GGF2 的髓鞘形成应答得到完全抑制。图 1 中显示了对应于共培养物中活性 MAPK 出现的该浓度。这些结果表明 GGF2 在髓鞘形成中起着双重作用:一个是促进髓鞘形成,而另一个是抑制髓鞘形成,并且通过呈现给施旺细胞的 GGF2 剂量来决定这两个相对的功能。

[0139] GGF2 的相对功能通过 Mek/Erk 激活来介导。为了进一步研究 GGF2 的相对功能,进行了其他的实验。之前的研究已经表明了 Ras/Raf/Erk 和 PI-3 激酶分别作为髓鞘形成的负向和正向调节剂,表明两者之间的平衡与施旺细胞的髓鞘形成状态相关。为了进一步描述通过 GGF2 诱导的途径的激活状态,用 1nM 的可溶性 GGF2 蛋白处理共培养物。本发明人确定了在该浓度下,GGF2 有效地抑制了髓鞘形成。GGF2 处理后 30 分钟制备细胞裂解物,并且通过蛋白质印迹分析测定磷酸化蛋白的存在(图 3A)。在 1nM 下(图 3A,框内泳道),GGF2 将 Akt 激活提高超过基础水平。在该浓度下 GGF2 处理的培养物中,也观察到了 Erk 激活的增加。显示出低如 0.6nM 的 GGF2 浓度对于 GGF2 处理的培养物中的 Erk 激活足够了。

[0140] 为了确证以上的结果,并进一步研究 Erk 激活和 GGF2 对髓鞘形成的抑制作用之间的关联,进行了其他的实验。因此,用 GGF2 和递增浓度的 U0126(上述的 Mek1/Erk 途径的特定抑制剂)一起处理共培养物。图 3B 中呈现的蛋白质印迹分析显示出 U0126 以剂量依赖性方式抑制了 GGF2 诱导的 Erk 激活,同时对 Akt 激活没有作用。用药物处理也降低了在共培养物系统中正常观察到的低水平的内源性 Erk 活性。

[0141] 本发明人进一步确定了 Mek1/Erk 对髓鞘形成的抑制作用。如图 3C 和 3D 中所示的,高浓度 GGF2 的添加几乎完全抑制了共培养物中的髓鞘形成。然而,在 U0126 共同处理的培养物中,逆转了 GGF2 的抑制作用,如通过髓鞘形成水平剂量依赖性增加所示的(图 3C 和 3D)。该结果提供了 GGF2 对髓鞘形成的抑制作用是通过 Erk 激活来介导的直接证据。令人感兴趣地,在 GGF2 不存在下,共培养物中的 U0126 处理也导致了髓鞘形成水平的提高(图 3E),这表明内源性 Mek1/Erk 活性起着固有的髓鞘形成负向调节剂的作用。

[0142] 对从共培养物制得的裂解物的蛋白质印迹分析也表明 GGF2 处理提高了 c-Jun 蛋白(施旺细胞分化和髓鞘形成的负向调节剂)的表达。随后 GGF2- 诱导的 Mek1/Erk 活性的抑制下调了 c-Jun 水平,这随后伴随着髓磷脂蛋白表达的提高。与对 c-Jun 作用的不同,U0126 处理导致了共培养物中 Krox20 表达的提高。这与最近的报道相一致,该报道表明了 c-Jun 和 Krox20 在调节髓鞘形成中的交叉对抗关系(Parkinson 等,2008,Journal of Cell Biology 181:625-637)。

[0143] GGF2 促进施旺细胞髓鞘形成:为了确证和延伸在此所呈现的结果,并进一步评价 GGF2 的相对作用,本发明人测定了 GGF2 对施旺细胞中 Ras/Raf/Erk 和 PI3- 激酶激活的浓度依赖性作用。用 0.0003 至 10nM 范围的不同浓度的 GGF2 处理细胞,并通过蛋白质印迹分

析测定 Erk 和 Akt 激活的水平。图 4A 和 4B 中呈现了激活水平的图像和相对提高。在最低测试剂量开始,活性 Akt 的水平稳定提高,而 Erk 激活需要更高浓度的 GGF2。作为结果,低浓度下两个途径的不同激活产生了狭窄的剂量窗口 (0.003 至 0.01nM,在图 4B 中带框),其中 Akt 是应答 GGF2 中激活的主要途径。接着,在共培养系统中测定各种剂量的 GGF2 对髓鞘形成的作用。在低浓度窗口下,GGF2 引发了剂量依赖性促进髓鞘细胞形成作用:与对照培养物相比,在 0.0005、0.001、0.003 和 0.01nM GGF2 下,髓鞘形成分别增加了 1.5-、2.3-、2.2- 和 2.8- 倍(图 4C)。随着浓度进一步提高,GGF2 开始抑制髓鞘形成,与 Erk 激活的出现相符。在 CRD-Nrg1<sup>+/-</sup>共培养物中也证明了 GGF2 的促进髓鞘细胞形成作用,其中低剂量的 GGF2 拯救了对突变轴突的髓鞘形成作用(图 4D)。

[0144] 可溶性 Nrg1 同时促进和抑制了髓鞘形成:通过浓度来决定双重选择:在外周神经系统中(PNS),将 GGF2 认为是与施旺细胞损伤应答相关的 Nrg1 同种型。髓鞘形成中的施旺细胞中 GGF-β3 的异常体内表达刺激了细胞增殖并诱导脱髓鞘(Huijbregts 等, J Neurosci 2003 ;23:7269-80)。此外,显示出将高浓度 GGF2(例如,超过 0.25nM GGF2 的那些)加入施旺细胞-DRG 神经元共培养物中将刺激髓鞘形成(Zanazzi 等, J Cell Biol 2001 ;152:1289-99)。因此,本发明研究的一个出人意料的结果是以下的发现:在低浓度下,GGF2 呈现出髓鞘形成促进作用。然而,这种促进髓鞘形成的作用限于低浓度范围,并且如之前所述的,从该范围开始,GGF2 浓度的提高导致髓鞘形成的抑制。这是令人感兴趣的发现,因为其证明了可溶性 GGF2 在相同的细胞背景中只是基于呈现给细胞的含量就能引发两种相对的生物功能。还表明了 GGF2 的阈水平决定了髓鞘形成过程中的促进髓鞘形成和抑制功能。如本发明中第一次证明的,这可以通过受体下游信号效应物的浓度依赖性差异激活来解释。更具体地,本发明的数据表明在优选激活 Akt 的浓度下观察到 GGF2 的促进髓鞘形成功能,而在与 Erk 激活出现相符的较高浓度下转变成抑制作用,尽管水平的持续提高活化 Akt。该结果也支持之前的观点:PI3- 激酶和 Ras/Raf/Erk 激活之间的平衡在决定施旺细胞的髓鞘形成状态中是关键(Ogata 等, J Neurosci 2004 ;24:6724-32)。然而,本发明的发现提供了直接的证据:Ras/Raf/Erk 途径的激活起着髓鞘形成的负向调节剂的作用。

[0145] Nrg1 对髓鞘形成的抑制功能是通过 Erk/Mek1 激活来介导的: Ras/Raf/Erk 途径对髓鞘形成的抑制作用之前已经通过研究进行了表明,在这些研究中,施旺细胞中组成型活性 Mek1 的表达阻断福司柯林诱导的髓磷脂基因表达,而结构域-阴性 Ras 阻断由 Nrg1 诱导的髓磷脂基因下调。然而,在本发明的结果之前,没有说明它对髓鞘形成的直接作用。如在此所证明的,GGF2,在超过极限浓度使用时,抑制了共培养物中的髓鞘形成。本发明人在此显示了 Mek1/Erk1 激活的抑制恢复了 GGF2 处理过的共培养物中的髓鞘形成,证明了 GGF2 的抑制作用是通过其 Ras/Raf/Erk1 激活来介导的。通过 Mek1/Erk 激活抑制髓鞘形成的机制是不清楚的。可能的机制包括之前所述的髓磷脂基因表达的抑制。作为这种意见的支持,本发明数据揭示了 U0126 处理过的培养物中髓鞘形成的提高伴随着 P0 表达的提高。还可能的是 Mek1/Erk 途径可能调节涉及髓鞘形成或施旺细胞分化的转录因子。最近表明了施旺细胞中 c-Jun 的异常表达抑制了髓鞘形成,由此表明 c-Jun 起着髓磷脂程序的负向调节剂的作用。本发明的发现与该结论相一致,因为本发明人确定了抑制髓鞘形成的 GGF2 处理伴随 c-Jun 诱导,此外,Nrg1- 诱导的 Mek1/Erk1 活性的抑制阻断了 c-Jun 表达。该结

果表明 Mek1/Erk1 对髓鞘形成的抑制作用部分是通过 c-Jun 的诱导来介导的。

[0146] 本发明研究的另一个令人感兴趣的发现是共培养物中作为髓鞘形成负向调节剂的内在 Mek1/Erk- 依赖性信号的存在。在用 U0126 处理的正常髓鞘形成共培养物促进了髓鞘形成的实验中显示了这一情况。在髓鞘形成过程中引起 Mek1/Erk1 活性的信号性质目前是未知的, 尽管很可能起源是轴突性的, 与轴突 CRD-Nrg1 无关。可能的候选物是由 PNS 神经元表达并随后通过蛋白水解分裂从轴突膜释放出来的 I 型和 II 型 Ig-Nrg1。另一种可能的 Mek1/Erk 激活剂是 FGF-2, 其在 PNS 神经元中表达, 并且其受体在施旺细胞上表达。用 FGF-2 的处理下调了髓磷脂基因表达并在体外抑制髓鞘形成。FGF-2 表达的丧失导致坐骨神经再生过程中形成髓鞘的轴突的数量增加。外周神经元也表达 PDGF 和 IGF, 相应的受体酪氨酸激酶在相关的施旺细胞上表达。非常关心的是测定这些生长因子在 PNS 的髓鞘形成过程中的调节作用。

[0147] GGF2 的治疗用途: 实验移植已经给通过髓鞘形成胶质细胞的移植修复损伤神经的潜能提供了压倒性的证明。施旺细胞对于这样的治疗是良好的候选物, 因为它们容易在培养物中扩大, 并给予自体移植的可能性, 以促进在脱髓鞘损伤处 (不仅在 PNS 中, 而且在 CNS 中) 的髓鞘重新形成和神经调节的恢复。然而, 通过施旺细胞对成年再生轴突的髓鞘重新形成通常不完全, 与正常神经相比, 导致形成较薄的髓鞘和较短的节间。因此, 本发明的 GGF2 的促进髓鞘形成功能的证明和由于 GGF2 剂量水平避免疏忽的髓鞘形成障碍的能力是意义重大的, 因为这提供了用于治疗脱髓鞘疾病以及用于神经损伤后重建髓磷脂的治疗策略。

[0148] 其他实施方案: 本说明书中提及的所有出版物和专利申请在此引入作为参考, 至特意和单独指明每篇单独的出版物或专利申请引入作为参考相同的程度。

[0149] 尽管已经结合其特定的实施方案描述了本发明, 但应当理解它能够进一步改进, 并且本申请旨在覆盖通常按照本发明的原理本发明的任何改变、用途或改进而且包括这样的与本发明公开内容的偏离, 其在本发明所属领域内已知的或通常的实践内, 可以应用于上文中所述的必要特征, 并且在所附权利要求的范围中。

[0001]

序列表

<110> Kim, Haesun  
Caggiano, Anthony

<120> 达到所需胶质因子 2 血浆水平的方法

<130> ACOR. P0038W0

<140> PCT/US2009/001356

<141> 2009-03-02

<150> 61/067,589

<151> 2008-02-29

<160> 14

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2003

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

```

ggaatteett tttttttttt ttttttttett rrtttttttt tgecettata cetettegce 60
tttctgtggt tccatccact tcttcccct cctctcecca taaacaacte tctaccct 120
gcaccccaa iaataaata aaaggaggag ggcaaggggg gaggaggagg agtgggtgtg 180
cgagggggaag gaaaaggag gcagcgcgag aagagccggg cagagtcga accgacagcc 240
agaagcccgc acgcaccteg caccatgaga tggcgacgcg ccccgcgcg ctccggcgt 300
cccgcceccc gggcccagc ccccgctec gccgcccgc ctctccgcg gctgccgtg 360
ctgccactac tctctctgt ggggaccgcg gccctggcgc cgggggcggc ggccggcaac 420
gaggcggctc ccgcccgggc ctctgtgtgc tactctcc cgeccagcgt gggatcgggt 480
caggagctag ctccagcgc cgcggtggtc atcaggggaa aggtgcacc gcagcggcgg 540
cagcaggggg cactcgacag gaaggcggcg gcggcggcgg gcgaggcagg ggcgtggggc 600
ggcgatcgcg agcccaccg cgcgggccc cgggcgctgg ggccgcccgc cgaggagccg 660
ctctctccgc ccaacgggac cgtgcccctc tggcccacc ccccgtgccc cagcgcggc 720
gagcccgggg agggaggeec ctatctgtgt aaggtgcacc aggtgtgggc ggtgaaagcc 780
ggggccttga agaaggactc cctctctacc gtgcgctgg ggacctgggg ccaccccgc 840
ttcccctct cgcggaggct caaggaggac agcaggtaca tcttcttcat ggagcccgc 900
gecaacagca ccagcccgc gccgcgcgc ttcgagcct ctttcccctc tetggagacg 960
ggcccgaacc tcaagaagg ggtcagcccg gtgctgtgca ageggtgccc ctgcccctcc 1020
caattgaaag agatgaaaag ccaggaatcg gctgcaggtt ccaaaactagt cctctggtg 1080
gaaaccagtt ctgaatactc ctctctcaga ttcaagtgtt tcaagaatgg gaatgaattg 1140
aatcgnaaaa acaaacaca aaatatcang atcaaaaaa agccagggaa gtcagaactt 1200
cgcattaaca aagcatcaet ggctgattet ggagagtata tgtcaaaagt gatcagcaaa 1260
ttaggaaatg acagtgctc tgcctatct accatcgtgg aatcaaacgc tacatctaca 1320
tcaccactg ggacaagcca tcttgtaaaa tgtgcggaga aggagaaaac tttctgtgtg 1380
aatggagggg agtgcctcat ggtgaaagac ctttcaaac cctcagata ctgtgcaag 1440
tgcctaaaag agtttactgg tgcctctgc caaaactacg taalgcccag ctctctactg 1500
acgtcactc cctttctgtc tctgctgaa taggagcag ctccagttgt gctgctttct 1560
tgttctgca tctcccctca gattccact agagctagat gtgtcttacc agatctata 1620
ttactgctc ctgctgtct catgagaaca ttaacaaaag caattgtatt acttctctg 1680
ttcgcgacta gttgctctg agatactaat aggtgtgtga ggetccggat gttctggaa 1740
ttgatattga atgatgtgat acaaatgat agtcaatctc aagcagtgaa atatgataat 1800
aaagcattt caaagtctca cttttattga taaaaaaaa atcattctac tgaacagtc 1860

```

[0002]

atcttcttta tacaatgacc acatcctgaa aagggtgttg ctaagctgta accgatatgc 1920  
 acttgaatg atggtaagtt aatittgatt cagaatgtgt tatttgcac aaataaacat 1980  
 aataaaagga aaaaaaaaaa aaa 2003

<210> 2

<211> 422

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg  
 1 5 10 15  
 Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu  
 20 25 30  
 Leu Pro Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala  
 35 40 45  
 Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser  
 50 55 60  
 Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala  
 85 90 95  
 Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly  
 100 105 110  
 Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro  
 115 120 125  
 Ala Glu Glu Pro Leu Leu Ala Ala Asn Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro  
 130 135 140  
 Thr Ala Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr  
 145 150 155 160  
 Leu Val Lys Val His Gln Val Trp Ala Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys  
 165 170 175  
 Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Thr Trp Gly His Pro Ala  
 180 185 190  
 Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe  
 195 200 205  
 Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg  
 210 215 220  
 Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val  
 225 230 235 240  
 Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys Ala Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu  
 245 250 255  
 Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys  
 260 265 270  
 Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn  
 275 280 285  
 Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln  
 290 295 300  
 Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala  
 305 310 315 320  
 Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp  
 325 330 335  
 Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr  
 340 345 350  
 Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys  
 355 360 365  
 Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser  
 370 375 380

[0003]

Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp  
 385 390 395 400  
 Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro  
 405 410 415  
 Phe Leu Ser Leu Pro Glu  
 420

<210> 3  
 <211> 198  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 3  
 agccatcttg tcaagtgtgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtc 60  
 ttcattggtga aagaccttcc aaatccctca agatacttct gcaagtgcc aaatgagttt 120  
 actgggtgac gctgccaaaa ctactgaatg gccagcttct acagtaagtc caatcccttt 180  
 ctgtctctgc ctgaatag 198

<210> 4  
 <211> 65  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 4  
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr  
 20 25 30  
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr  
 35 40 45  
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro  
 50 55 60  
 Glu  
 65

<210> 5  
 <211> 192  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 5  
 agccatcttg tcaagtgtgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtc 60  
 ttcattggtga aagaccttcc aaatccctca agatacttct gcaagtgcc acctggatcc 120  
 actggagcga gatgtactga gaatgtgcc atgaaagtc aaaccaaga aaaagcggag 180  
 gagctctact aa 192

<210> 6  
 <211> 63  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 6  
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr  
 20 25 30

[0004]

Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn  
           35                                  40                                  45  
 Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr  
           50                                  55                                  60

<210> 7  
 <211> 183  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 7  
 agccatcttg tcaagtgatgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtgc 60  
 ttcattggga aagaccttc aaatccctca agatacttgt gcaagtgcc aaatgagttt 120  
 actggatgc gctgccaaaa ctacgtaatg gccagcttct acaaagcgga ggagctctac 180  
 taa 183

<210> 8  
 <211> 60  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 8  
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
   1                  5                                  10                                  15  
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr  
           20                                  25                                  30  
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr  
           35                                  40                                  45  
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr  
           50                                  55                                  60

<210> 9  
 <211> 210  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 9  
 agccatcttg tcaagtgatgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtgc 60  
 ttcattggga aagaccttc aaatccctca agatacttgt gcaagtgcc aaatgagttt 120  
 actggatgc gctgccaaaa ctacgtaatg gccagcttct acaagcatct tgggattgaa 180  
 ttatggaga aagcggagga gctctactaa 210

<210> 10  
 <211> 69  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 10  
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
   1                  5                                  10                                  15  
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr  
           20                                  25                                  30  
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr  
           35                                  40                                  45  
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Lys  
           50                                  55                                  60

[0005]



Ala Glu Glu Leu Tyr  
65

<210> 11  
<211> 267  
<212> DNA  
<213> 智人

<400> 11  
agccatcttg tcaagtgtgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtg 60  
ttcatgggta aagaccttcc aaatccctca agatacttgt gcaagtgcc aactggattc 120  
actggagcga gatgtactga gaatgtgcc atgaaagtcc aaaccaaga aaagtgccca 180  
aatgagttta ctggtgatcg ctgccaaaac tacgtaatgg ccagettota cagtacgtcc 240  
actcccttcc tgcctctgcc tgaatag 267

<210> 12  
<211> 88  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 12  
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
1 5 10 15  
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr  
20 25 30  
Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn  
35 40 45  
Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr  
50 55 60  
Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser  
65 70 75 80  
Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu  
85

<210> 13  
<211> 252  
<212> DNA  
<213> 智人

<400> 13  
agccatcttg tcaagtgtgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtg 60  
ttcatgggta aagaccttcc aaatccctca agatacttgt gcaagtgcc aactggattc 120  
actggagcga gatgtactga gaatgtgcc atgaaagtcc aaaccaaga aaagtgccca 180  
aatgagttta ctggtgatcg ctgccaaaac tacgtaatgg ccagettota caaagcggag 240  
gagctctact aa 252

<210> 14  
<211> 83  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 14  
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
1 5 10 15  
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr  
20 25 30

[0006]



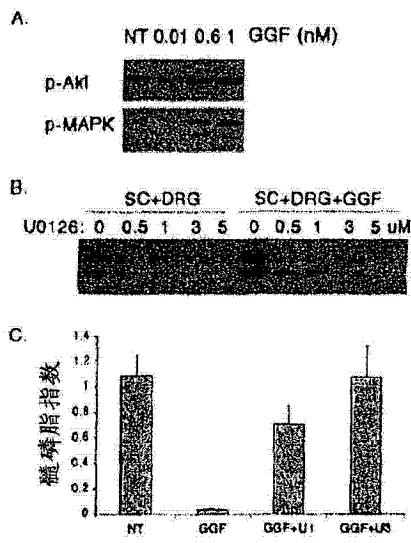


图 1

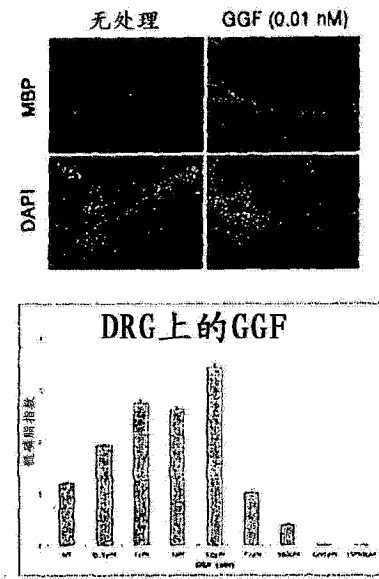


图 2

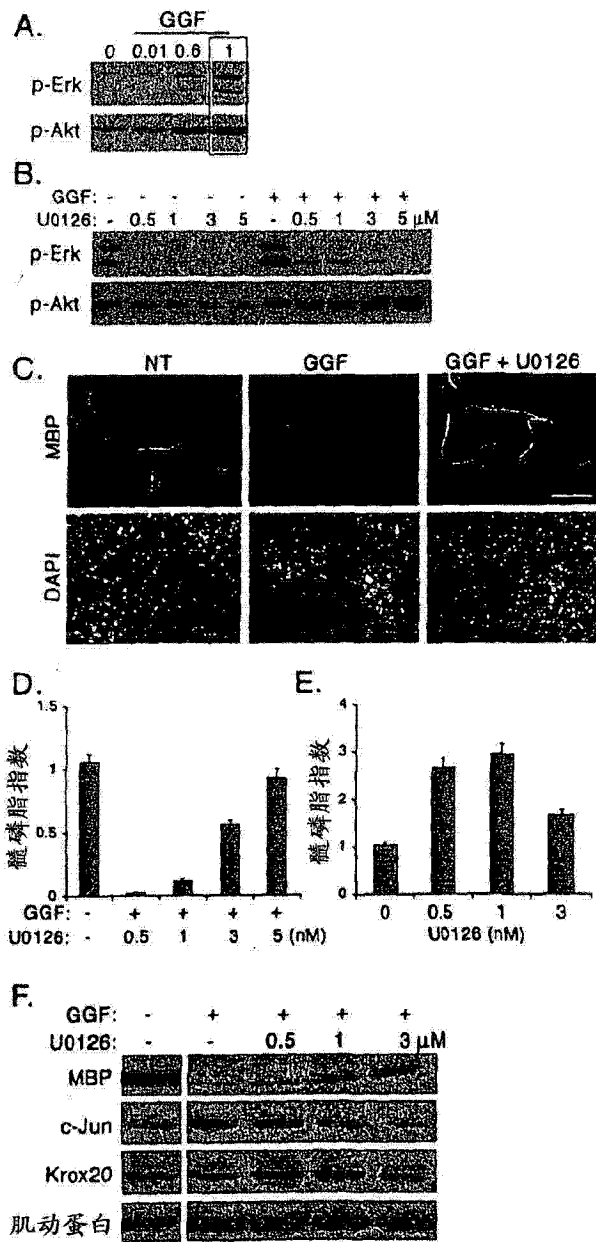


图 3

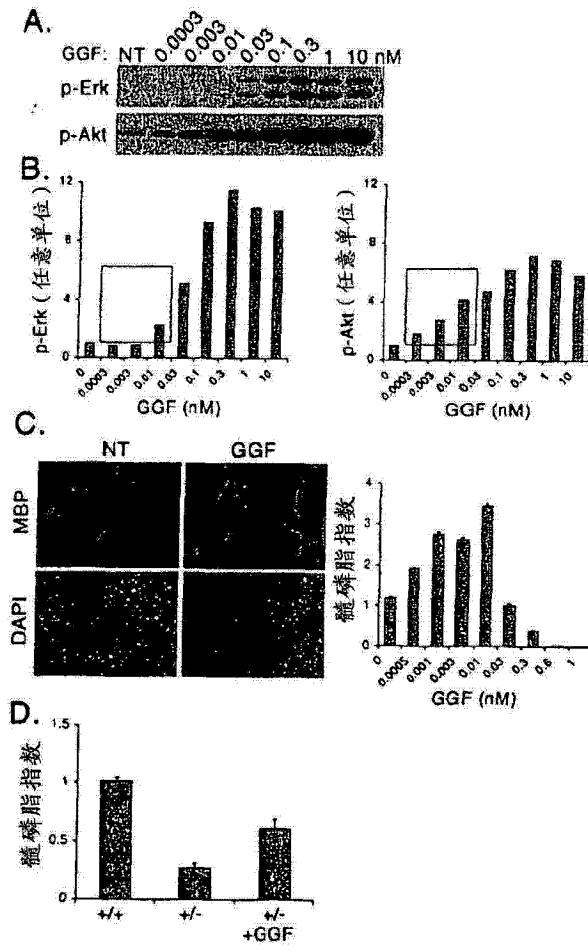


图 4

GGF2HBSS5的核苷酸序列&推断的酸序列

GGAAATCCCTT TTTTTTTTTT TTTTTTTCTT MNTTTTTTTTT TGCCCTTATA CCTCTTCGCC	60
TTTCTGTGGT TCCATCCACT TCTTCCCCCT CCTCCCTCCA TAAACAACATC TCCTACCCCT	120
GCACCCCCAA TAAATAAATA AAAGGAGGAG GGCACAGGGG GAGGAGGAG AGTGTGCTG	180
CGAGGGGAAG GAAAGGGAG GCAGCGCGAG AAGAGCCGGG CAGAGTCCGA ACCGACAGCC	240
AGAAGCCCGC ACGCACCTCG CACC ATG AGA TGG CGA CGC GCC CGC CGC CGC	291
Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg	
TCC GGG CGT CCC GGC CCC CGG GCC CAG CGC CCC GGC TCC GCC GCC CGC	339
Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg	
TCG TCG CCG CCG CTG CCG CTG CCA CTA CTG CTG CTG CTG GGG ACC	387
Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Thr	
Val Cys Leu Leu Thr Val GGF-II 09	
GCG GCC CTG GCG CCG GGG GCG GCG GCC AAC GAG GCG GCT CCC GCG	435
Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala	
Ala Ala Leu Pro Pro	
GGG GCC TCG GTG TGC TAC TCG TCC CCG CCC AGC GTG GGA TCG GTG CAG	483
Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser Ser Pro Ser Val Gly Ser Val Gln	
Ala Ser Pro Val Ser Val Gly Ser Val Gln GGF-II 08	
GAG CTA GCT CAG CGC GCC GTG ATC GAG GGA AAG GTG CAC CCG	531
Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro	
Glu Leu Val Gln Arg Trp Phe Val Val Ile Glu Gly Lys GGF-II 04	

图 5A

GGF2HBS5的核苷酸序列&推断的酸序列

<p>CAG CGG CCG CAG CAG GGG GCA CTC GAC AGG AAG GCG GCG GCG GCG GCG Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala Ala</p>	<p>579</p>
<p>GGC GAG GCA GGG GCG TGG GGC GGC GAT CGC GAG CCG CCA GCC CCG GGC Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly</p>	<p>627</p>
<p>CCA CGG CCG CTG GGG CCG CCC GCC GAG GAG CCG CTG CTC GCC GCC AAC Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro Ala Glu Glu Pro Leu Ala Ala Asn</p>	<p>675</p>
<p>GGG ACC GTG CCC TCT TGG CCC ACC GCC CCG GTG CCC AGC GCC GGC GAG Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro Thr Ala Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu</p>	<p>723</p>
<p>CCC GGG GAG GAG GCG CCC TAT CTG GTG AAG GTG CAC CAG GTG TGG GCG Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr Leu Val Lys Val His Gln Val Trp Ala Lys Val His Glu Val Trp Ala GGF-II 01 &amp; GGF-II 11</p>	<p>771</p>
<p>GTG AAA GCC GGG GGC TTG AAG AAC GAC TCG CTG ACC GTG CCG CTG Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Ala Lys Asp Leu Leu Leu Xaa Val GGF-II 10</p>	<p>819</p>
<p>GGG ACC TGG GGC CAC CCC GCC TTC CCC TCC TGC GGG AGG CTC AAG GAG Gly Thr Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Gly Ala Trp Gly Pro Pro Ala Phe Pro Val Xaa Tyr GGF-II 03</p>	<p>867</p>
<p>GAC AGC AGG TAC ATC TTC TTC ATG GAG CCC GAC GCC AAC AGC ACC AGC Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Gla Ala Xaa Ser Ser Gly GGF-II 02</p>	<p>915</p>

图 5B

GGF2HBS5的核苷酸序列&推断的酸序列

CGC GCG CCG GCC TTC CGA GCC TCT TTC CCC CCT CTG GAG ACG GGC Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly	963
CGG AAC CTC AAG AAG GAG GTC AGC CGG GTG CTG TGC AAG CGG TGC GCC Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys Ala	1011
TTG CCT CCC CAA TTG AAA GAG ATG AAA AGC CAG GAA TCG GCT GCA GGT Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly	1059
TCC AAA CTA GTC CTT CGG TGT GAA ACC AGT TCT GAA TAC TCC TCT CTC Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Leu Val Leu Arg GGF-II 06	1107
AGA TTC AAG TGG TTC AAG AAT GGG AAT GAA TTG AAT CGA AAA AAC AAA Arg Phe Lys Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys	1155
CCA CAA AAT ATC AAG ATA CAA AAA AAG CCA GGG AAG TCA GAA CTT CGC Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg	1203
ATT AAC AAA GCA TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAG TAT ATG TGC AAA GTG Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Xaa Lys GGF-II 12	1251
ATC AGC AAA TTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAT ATC ACC ATC GTG Ile Ser Lys Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val	1299
GAA TCA AAC GCT ACA TCT ACA TCC ACC ACT GGG ACA AGC CAT CTT GTA Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val	1347

图 5C



## GGF2HBS5的核苷酸序列&amp;推断的酸序列

AAA TGT GCG GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT GGA GGG GAG TGC Lys Cys Ala Glu Lys Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys	1395
TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAC CCC TCG AGA TAC TTG TGC AAG TGC Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys	1443
CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser	1491
TTC TAC AGT ACG TCC ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT GAA Phe Tyr Ser Thr Ser Thr pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu	1530
TAGGAGCATG CTCAGTTGGT GCTGCTTTCT TGTGTGTCGCA TCTCCCCCTCA GATTCCACCT	1590
AGAGCTAGAT GTGTCTTACC AGATCTAATA TTGACTGCCT CTGCCCTGTCG CATGAGAACA	1650
TTAACAAAAG CAATTGTATT ACTTCCCTCTG TTCCGGACTA GTTGGCTCTG AGATACTAAT	1710
AGGTGTGTGA GGCTCCGGAT GTTTCTGGAA TTGATATTGA ATGATGTGAT ACAAATTGAT	1770
AGTCAATATC AAGCAGTGAA ATATGATAAT AAAGGCATTT CAAAGTCTCA CTTTTATTGA	1830
TAAAATAAAA ATCATTTCTAC TGAACAGTCC ATCTTCTTTA TACAATGACC ACATCCTGAA	1890
AAGGGTGTG CTAAGCTGTA ACCGATATGC ACTTGAAATG ATGGTAAGTT AATTTTGATT	1950
CAGAAATGTGT TATTTGTTCAC AAATAAACAT AATAAAGGA AAAAAA AAA	2003

图 5D

## EGFL1

AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT	48
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn	
GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC	96
GLY GLY Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr	
TTG TGC AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC	144
Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr	
GTA ATG GCC AGC TTC TAC AGT ACG TCC ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT	192
Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro	
GAA TAG	198
Glu	

图 6

## EGFL2

AGC	CAT	CTT	GTC	AAG	TGT	CCA	GAG	AAG	GAG	AAA	ACT	TTC	TGT	GTG	AAT	48
Ser	His	Leu	Val	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn	
GGA	GGC	GAG	TGC	TTC	ATG	GTG	AAA	GAC	CTT	TCA	AAT	CCC	TCA	AGA	TAC	96
Gly	Gly	Glu	Cys	Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr	
TTG	TGC	AAG	TGC	CAA	CCT	GGA	TTC	ACT	GGA	GCG	AGA	TGT	ACT	GAG	AAT	144
Leu	Cys	Lys	Cys	Gln	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Ala	Arg	Cys	Thr	Glu	Asn	
GTG	CCC	ATG	AAA	GTC	CAA	ACC	CAA	GAA	AAA	GCG	GAG	GAG	CTC	TAC	TAA	192
Val	Pro	Met	Lys	Val	Gln	Thr	Gln	Glu	Lys	Ala	Glu	Glu	Leu	Tyr		

图 7

## EGFL3

AGC	CAT	CTT	GTC	AAG	TGT	GCA	GAG	AAG	GAG	AAA	ACT	TTC	TGT	GTC	AAT	48
Ser	His	Leu	Val	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn	
GGA	GGC	GAG	TGC	TTC	ATG	GTG	AAA	GAC	CTT	TCA	AAT	CCC	TCA	AGA	TAC	96
Gly	Gly	Glu	Cys	Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr	
TTG	TGC	AAG	TGC	CCA	AAT	GAG	TTT	ACT	GGT	GAT	CGC	TGC	CAA	AAC	TAC	144
Leu	Cys	Lys	Cys	Pro	Asn	Glu	Phe	Thr	Gly	Asp	Arg	Cys	Gln	Asn	Tyr	
GTA	ATG	GCC	AGC	TTC	TAC	AAA	GCG	GAG	GAG	CTC	TAC	TAA				183
Val	Met	Ala	Ser	Phe	Tyr	Lys	Ala	Glu	Glu	Leu	Tyr					

图 8

## EGFL4

AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT	48
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn	
GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC	96
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr	
TTG TGC AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC	144
Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr	
GTA ATG GCC AGC TTC TAC AAG CAT CTT GGG ATT GAA TTT ATG GAG AAA	192
Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Lys	
GCG GAG GAG CTC TAC TAA	210
Ala Glu Glu Leu Tyr	

图9

## EGFL5

AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT	48
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn	
GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC	96
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr	
TTG TGC AAG TGC CAA CCT GGA TTC ACT GGA GCG AGA TGT ACT GAG AAT	144
Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn	
GTG CCC ATG AAA GTC CAA ACC CAA GAA AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT	192
Val Pro Met Lys Val Gln Thr Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr	
GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC TTC TAC AGT ACG TCC	240
Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser	
ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT GAA TAG	267
Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu	

图 10

## EGFL6

AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT 48  
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
 GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC 96  
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr  
 TTG TGC AAG TGC CAA CCT GGA TTC ACT GGA GCG AGA TGT ACT GAG AAT 144  
 Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn  
 GTG CCC ATG AAA GTC CAA ACC CAA AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT 192  
 Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr  
 GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC TTC TAC AAA GCG GAG 240  
 Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu  
 GAG CTC TAC TAA 252  
 Glu Leu Tyr

图 11

RNA							
大小	2224bp						
转录物	转录物的数量	9	类型	信使			
内容	其他可替换的形式						
鉴定	主要的	类型	bp	kDa	AA	在以下位置中表达的产物	作者
HRG- $\gamma$ , 1型 NRG1	-	剪接	1651	-	211	-	Holmes
GGF2, 2型 NRG1	-	剪接	1986	-	422	神经系统, 骨骼肌	Marchionni, Holmes
	可溶形式						
SMDF, 3型 NRG1	-	剪接	1860	31.6	296	神经系统、脊髓、运动神经元、胎儿的肺、肝脏、肾脏	Holmes, Michailov
	C-末端EGF样结构域和独特的N-末端序列, 其缺乏Ig样结构域, 富含半胱氨酸的结构域 (CRD)						
HRG- $\alpha$ , 1型 NRG1	是	剪接	2224	70.2	640	乳房、卵巢、睾丸、前列腺、心脏、肌肉	Holmes, Michailov
	-						
HRG- $\beta$ 1, 1型 NRG1	-	剪接	2199	-	645	神经元	Holmes
	-						
HRG- $\beta$ 2, 1型 NRG1	-	剪接	2490	-	637	-	Holmes
	-						
HRG- $\beta$ 3, 1型 NRG1	-	剪接	1715	-	241	脑脊髓	Marchionni, Holmes
	可能是核异构体						
HRG-ND F43, 1型 NRG1	-	剪接	1793	-	462	-	Wen, Holmes
GGF, 2型 NRG1	-	剪接	1199	-	241	神经系统, 骨骼肌	Marchionni, Holmes
	免疫球蛋白样和 EGF 样结构域和 kringle 样序列						

图 12