



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102596225 B

(45) 授权公告日 2015.06.24

(21) 申请号 201080046238.8

(22) 申请日 2010.10.14

(30) 优先权数据

61/251,583 2009.10.14 US

61/252,161 2009.10.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.04.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/052715 2010.10.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/047183 EN 2011.04.21

(73) 专利权人 阿寇达医疗有限公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 A·O·卡贾诺 A·J·贝拉

J·F·亚奇

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 过晓东

(51) Int. Cl.

A61K 38/18(2006.01)

A61P 25/02(2006.01)

(56) 对比文件

Mark A. Marchionni et al. Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. 《nature》. 1993, 第 362 卷 313-314 页.

Mark A. Marchionni et al. AAB59622. 《NCBI Genbank》. 1996,

审查员 张起

权利要求书1页 说明书16页

序列表3页 附图5页

(54) 发明名称

神经调节蛋白在治疗外周神经损伤中的应用

(57) 摘要

本发明的实施方案指的是使用神经调节蛋白预防或者治疗外周神经损伤,从而减少、缓解、或者避免外周神经功能损失。

1. GGF2 多肽在制备用于为患有外周神经创伤的主体或者具有患上外周神经损伤风险的主体进行预防或者治疗外周神经创伤的药物中的应用,所述外周神经损伤来自医疗过程或者外科手术过程。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,其中,所述药物被配置用于在医疗过程或者外科手术过程之前进行给药。

3. 根据权利要求 1 所述的应用,其中,所述外科手术是一种肿瘤切除外科手术。

4. 根据权利要求 3 所述的应用,其中,所述肿瘤切除外科手术是一种前列腺切除术。

5. 根据权利要求 1 所述的应用,其中,所述医疗过程为婴儿的分娩。

6. 根据权利要求 5 所述的应用,其中,所述药物被配置用于在分娩之前进行给药。

7. 根据权利要求 6 所述的应用,其中,所述药物被配置用于在分娩前 24-48 个小时时进行给药。

8. 根据权利要求 3 所述的应用,其中,所述肿瘤切除外科手术是乳房完全切除术或者乳房部分切除术。

9. 根据权利要求 8 所述的应用,其中,所述药物被配置用于在乳房完全切除术或者乳房部分切除术之前进行给药。

10. 根据权利要求 9 所述的应用,其中,所述药物被配置用于在乳房完全切除术或者乳房部分切除术之前 24-48 个小时时进行给药。

11. 根据权利要求 1 所述的应用,其中,所述外科手术过程是盆腔、腹腔、或结肠外科手术。

12. 根据权利要求 11 所述的应用,其中,所述药物被配置用于在外科手术过程之前进行给药。

13. 根据权利要求 12 所述的应用,其中,所述药物被配置用于在外科手术过程之前 24-48 个小时时进行给药。

14. 根据权利要求 3 所述的应用,其中肿瘤切除外科手术是针对前列腺癌、膀胱癌、或者直肠癌。

15. 根据权利要求 1-4 或 14 任意其中一项所述的应用,其中,所述药物被配置用于在医疗过程或者外科手术过程之前 24-48 个小时时进行给药。

16. 根据权利要求 1-4、14 或 15 任意其中一项所述的应用,其中,所述药物被配置用于以每千克体重 0.1 毫克 GGF2 至每千克体重 10 毫克 GGF2 进行给药。

17. 根据权利要求 16 所述的应用,其中,所述药物被配置用于以每千克体重 0.5 毫克至每千克体重 5 毫克进行给药。

18. 根据权利要求 1 所述的应用,其中所述外周神经创伤引起勃起功能失调。

## 神经调节蛋白在治疗外周神经损伤中的应用

[0001] 本申请要求 2009 年 10 月 14 日递交的美国临时申请序列号 61/251, 583 的优先权和 2009 年 10 月 16 日递交的美国临时申请序列号 61/252, 161 的优先权, 这里提到的每个申请的全部内容通过引证在此全部并入本文。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及神经外伤或者伤害。更具体的, 本发明涉及神经调节蛋白或者其功能性片段在预防、治疗或者改善外周神经损伤方面的应用。

### 背景技术

[0003] 外周神经通常由于外伤受损, 所述外伤包括车祸、摩托车事故、外科手术、刀和发射物创口和生育对孩子和母亲的创伤。神经创伤常见的外科手术原因包括前列腺切除术和乳房切除术。在外科手术过程中其他常见的损伤是长期的肢体位置或者不可避免的神经压缩或者偶然发生的神经挤压的结果。神经损伤之后, 由受损伤的神经支配身体区域会丧失感觉和 / 或功能。例如, 在前列腺切除术中收到神经创伤之后, 通常会导致勃起功能失调。在乳房切除术之后, 常常会发生上肢和 / 或肩胛骨的正常功能损失。此外, 在分娩创伤或者其他会破坏臂丛的外伤产生之后, 同侧肢体会发生功能失调。

[0004] 在一种神经创伤发生之后, 任意可以预防或者限制功能失调程度的治疗会显著的影响现有的用于治疗外周神经创伤的治疗策略。这里对其他的外周神经创伤治疗法和治疗剂存在需要。

### 发明内容

[0005] 在多种多样的中枢神经系统疾病和中枢神经系统创伤的动物模型中, 神经调节蛋白已经显示出具有神经保护作用 and 神经恢复作用。然而, 在本发明之前, 神经调节蛋白从来没有被认为能够预防和 / 或治疗外周神经损伤。因此, 本发明的某些实施方案涉及通过对患有外周神经损伤或者有患有外周神经损伤风险的主体给药神经调节蛋白 (例如, GGF2) 或者它的一种功能性片段来治疗或者改善外周神经损伤的方法。

[0006] 本发明表明, 使用神经调节蛋白治疗外周神经损伤能够减少外周神经功能的损伤, 当在收到神经损伤之前或者之后给药神经调节蛋白能够改善或者减少外周神经功能损伤, 并且在某些情况下修复外周神经功能。在某些实施方案中, 外周神经损伤被避免。在某些实施方案中, 一种存在的外周神经损伤被消除。在某些实施方案中, 外周神经损伤不能完全避免。在某些实施方案中, 一种已经存在的外周神经损伤不能被完全消除。

[0007] 使用大鼠勃起功能失调模型作为活体内系统, 用于表明神经调节蛋白在治疗外周神经损伤中的有效性。在某些方面, 本发明涉及治疗由外周神经损伤引起的勃起功能失调, 但是, 本发明不只局限于勃起功能失调。神经调节蛋白可以有效作为单一治疗剂用于治疗任意一种外周神经损伤, 并且不需要与天然神经管或者人造神经管共同使用进行治疗, 也不需要与其他细胞治疗剂 (例如, 雪旺氏 (Schwann) 细胞) 共同使用治疗。

[0008] 某些实施方案涉及治疗外周神经损伤的方法,本方法包括对患有外周神经损伤的主体或者对具有患上外周神经损伤风险的主体给药有效量的神经调节蛋白。某些实施方案涉及 prophylaxing 或者预防外周神经损伤的方法,本方法包括对患有外周神经损伤的主体给药有效量的神经调节蛋白。术语主体包括哺乳动物,并且尤其是人类主体。

[0009] 在某些实施方案中,外周神经通常由于外伤受损的结果,所述外伤包括但是不局限于车祸、摩托车事故、外科手术、刀和发射物创口和分娩创伤。在某些实施方案中,一种外周神经损伤是外科手术的结果,比如一种前列腺切除术,乳房切除术等等。在基本上任意一种外科手术中,外周神经损伤可能是组织切割作用的直接结果、组织切除术的直接结果和/或四肢位置或者四肢挤压的副作用。在一种具体的实施方案中,神经调节蛋白被用来治疗或者预防那些会导致勃起功能失调的外周神经损伤。

[0010] 进一步的实施方案涉及勃起功能失调的治疗,所述勃起功能失调是由于外科手术对与勃起功能有关的外周神经(例如,海绵体神经和/或阴茎神经)创伤引起的。海绵体神经创伤常常作为前列腺癌症切除术的结果;这种创伤会产生勃起功能失调(ED)。

[0011] 目前的药物干预能够治疗创伤之后造成的功能性缺陷,所述创伤是由于向海绵体增加血液流动促进阴茎勃起而导致的创伤。目前存在的医疗器械干预能够治疗由创伤引起的功能性缺陷,所述创伤是由于增加阴茎体积导致一种类似于正常阴茎勃起的状态而引起的。目前存在的用于治疗勃起功能失调(ED)的所有干预都是由缺陷的。

[0012] 本发明主要在创伤发生的时候保护神经,和/或通过减少任意功能性缺陷的严重程度增加病人机能性恢复。

[0013] 通过在大鼠中进行双边粉碎模型检验神经调节蛋白1肽(GGF2),大鼠中的双边粉碎模型是一种广泛接受的海绵体神经创伤模型;这种模型已经被用于检验西地那非(sildenafil)及其他勃起功能失调(ED)药物。如这里所阐述的,在创伤之后5周对神经进行电刺激得到GGF2改善的功能性结果,并且测定睾丸内压力(ICP)。

[0014] 某些实施方案是指使用神经调节蛋白治疗乳房切除术之后的神经创伤。长胸廓创伤、肋间臂神经创伤和胸背神经创伤在乳房切除术中是常见的,尽管其他神经也可以被损伤,并且,神经调节蛋白可以被用于预防或者治疗这种创伤。可以在乳房切除术之前和/或之后递送神经调节蛋白,从而保护并修复神经功能。这里存在很多常用的上肢功能的测定方法,包括力量、感觉、关节活动范围和反应能力-所有测定方法或者任意一种测定方法都适合于确定神经功能保护作用或者恢复能力。本发明同样可以应用于任一医疗过程或者手术过程中的任意神经损害。

[0015] 进一步实施方案包括在臂丛外伤之后使用神经调节蛋白对神经创伤进行的治疗。臂丛创伤是钝力外伤、分娩外伤、交通事故和运动损伤后导致受损伤的肢体发力不足和感觉缺陷的常见结果。神经调节蛋白可以向患有臂丛损伤的人给药,从而减少肢体功能的损伤并修复肢体功能。在可以预见的位置,例如,分娩时,本发明的组合物可以预防性的被给药。肢体功能还可以通过许多被广泛承认的神经学测量方法来测定运动机能、力量、感觉、关节活动范围和/或反应能力。

[0016] 根据使用的具体神经调节蛋白的性质和药物环境,本领域普通技术人员可以理解本发明的某些方面包括给药大约1微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,2微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,3微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,4微克或者

毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,5 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,6 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,7 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,8 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,9 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,10 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,1-10 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,1-20 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,10-20 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,1-30 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,1-40 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,1-50 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,10-20 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,10-30 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,10 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,15 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,20 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,25 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,30 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,35 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,40 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,50 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,15-25 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,15-40 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,15-35 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,15-50 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,20-50 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,20-40 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,20-40 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,25-35 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,30-50 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,30-60 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,50-75 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,50-100 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,100 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,1-100 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,100-150 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,150-200 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,200 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽,1-200 微克或者毫克的神经调节蛋白多肽或者肽 本发明的某些方面包括在外科手术之前和 / 或之后给药神经调节蛋白。

[0017] 在某些方面,神经调节蛋白可以是 NRG1、2、3 或者 4 基因编码的任意全长神经调节蛋白。在一种进一步的方面,神经调节蛋白可以是神经调节蛋白多肽的任一功能性片段。在某些实施方案中,神经调节蛋白的功能性片段含有 EGF- 样区域。在某些实施方案中,神经调节蛋白可以是任一来自 NRG1、2、3 或者 4 基因的肽,这种肽能够结合并活化 erbB 受体。在某些实施方案中,神经调节蛋白可以是任何一种由 NRG1、2、3 或者 4 基因编码的野生型肽修饰所得的肽,所述修饰所得的肽结合并活化 erbB 受体。

[0018] 神经调节蛋白和含有神经调节蛋白 EGF- 样区域的多肽可以与一种药学上可接受的稀释剂、载体、或者赋形剂一起,以单位剂量形式对主体给药。常用的药物习惯可以被利用从而提供适当的制剂或者组合物,并对病人或者试验动物给药这种组合物。静脉内给药是优选的,尽管如此,也可以使用其他任何适当的给药途径,例如,非肠道给药、皮下给药、肌肉注射给药、颅内给药、眶内给药、眼药、心室内给药、中央囊内给药、脊柱内给药、脑池内给药、腹膜内给药、产期内给药、烟雾剂、口服给药或者透皮给药或者局部给药(例如,通过使用一种装置或者粘性贴片,其中携带能够穿过真皮进入血流的制剂)。治疗性制剂可以处于液体溶液或者悬浮液的形式;为了进行口服,制剂可以处于片剂或者胶囊剂的形式;并且对于经鼻给药制剂,可以处于粉末、滴鼻剂或者烟雾剂的形式。

[0019] “神经调节蛋白-1”、“NRG-1”、“heregulin”指的是一种多肽,这种多肽能够结合

ErbB 受体 1、ErbB 受体 3 或者 ErbB 受体 4, 并且通过受体配对作用 (二聚作用) 还结合 ErbB 受体 2。在一个实施方案中, 通过美国专利第 5, 530, 109 号、美国专利第 5, 716, 930 号、和美国专利第 7, 037, 888 号中提到的 p185erbB2 配位体基因编码神经调节蛋白, 这里提到的每个申请的全部内容通过引证在此全部并入本文。在一个实施方案中, 所述神经调节蛋白是 GGF2 或者其任何一种子序列、或者任何一种分子, 包括 GGF2 整个序列或者 GGF2 序列的活性部分。

[0020] 术语“治疗有效量”或者“有效量”指的是能够引起组织、系统、动物或者人类发生科研工作者、兽医、医生或者其他临床医师寻找的生物反应或者医药反应的神经调节蛋白的量。

[0021] 治疗性改变是指在测量的生物化学特性或者生理特性方面向着减轻疾病 (例如, 外周神经损伤) 或者解决问题的方向发生的改变。更为具体的, “有效量”是足够减少与医学条件或者虚弱有关的症状的量, 从而使在疾病或者紊乱中导致某些身体功能损伤的身体功能正常化, 或者从而改善疾病或者病况的一种或者一种以上的临床测量参数。

[0022] 除非明确表明其指的是其他选项, 或者当选项是相互排斥的时, 在权利要求书中使用术语“或者”指的是“和 / 或”。还可以预计的是, 任意列出的使用术语“或”的地方还可以专门与所阐述的其他选项相独立。

[0023] 在本申请上下文中使用的术语“大约”指的是所使用的装置或者方法产生的数值与确定的数值相比在 85%、90%、95% > 或者误差标准偏差范围内。

[0024] 按照长期存在的专利法, 在权利要求书或者说明书中使用的单词“一种 (a)”和“一种 (an)”表示一种或者一种以上, 除非另有明确指出。

[0025] 在某些实施方案中, 根据本发明, 预防性的使用神经调节蛋白从而预防或者减轻潜在的损伤。在某些实施方案中, 根据本发明, 预后应用神经调节蛋白, 从而表明主体的未来状态。在某些实施方案中, 根据本发明, 诊断性的应用神经调节蛋白, 从而确定一种情况或者状态的存在或者可能存在。在某些实施方案中, 根据本发明, 治疗性的应用神经调节蛋白, 从而以某些减少或者除去被治疗的病况或者疾病的症状或者病征的方式影响一种病况。

[0026] 通过下面的详细描述, 本发明的其他目标、特点和优点会变得显而易见。然而, 本领域普通技术人员应该理解, 下面的详细说明和具体的实施例尽管表明了本发明具体的实施方案, 但只是以起到示意的作用而给出, 本领域普通技术人员通过这里的详细说明可以理解, 在本发明的精神和范围内, 各种各样的改变和变化会变得显而易见。

## 附图说明

[0027] 下面的附图形成了本发明说明书的一部分, 并且被包括用于说明本发明所公开的某些必然方面。通过这些附图中的一个与这里所描述的具体实施方案的详细说明, 本发明可以被更好的理解。

[0028] 图 1 : 睾丸内压力 (ICP) 平均改变数据。

[0029] 图 2 : 动脉血压正常化数据。

[0030] 图 3 : 来自每个治疗组 ((组 A) 正常的、(组 B) 压碎的、(组 C) 压碎 +GGF2) 的 3 个动物的代表性的荧光金标记的主盆神经节 (MPG)。将被注入到阴茎组织中的荧光金向后

运输穿过整个神经,到主盆神经节 (MPG) 的细胞体。组 A :正常动物显示了不存在神经损伤的情况下观察到的退行性标记的数值。组 B :压碎的动物显示,损伤后完整神经纤维的急剧减少,由于荧光金标记物不能被输送到主盆神经节 (MPG)。组 C :压碎 +GGF2 动物显示了增加的荧光金标记主盆神经节 (MPG) 细胞数目的增加,这表明在创伤后,作为 GGF2 的治疗结果存在保存的更好的神经纤维。

[0031] 图 4 :在主盆神经节 (MPG) 中定量荧光金标记物。结果显示正常动物具有大量的细胞体标记在主盆神经节 (MPG) 中。在挤压损伤之后,标记的细胞的数量急剧减少,在神经纤维被损害之后,所得结果不能将标记物向后传递回主盆神经节 (MPG)。然而,GGF2 治疗改善了能够以后退方式将荧光金从阴道组织运输到主盆神经节 (MPG) 的完整的神经纤维的数目,导致大量的被标记的细胞。

[0032] 图 5 :代表性的 nNos 着色水平。海绵体 nNOS 是一种大家公认的海绵体神经维持标记物。这些工作的结果包括正常的组织染色 (组 A)。通过比较,在海绵体神经挤压损伤之后 (组 B) 存在显著的 nNOS 着色损失。在阴道体中,海绵体神经末梢保藏的 nNOS 着色显示使用 GGF2 治疗挤压损伤之后,海绵体神经的存活率增加。着色密度表明了使用 GGF2 治疗之后 nNOS 着色的保存。

[0033] 图 6 :代表性的酪氨酸羟化酶 (TH) 着色水平。本图的结果显示在组 A 中有正常的组织染色,在组 B 中,海绵体神经挤压损伤之后存在显著减少的酪氨酸羟化酶 (TH) 着色。组 C 显示了阴道体中的海绵体神经末梢保藏的酪氨酸羟化酶 (TH) 着色;这一发现与挤压损伤之后接受 GGF2 治疗产生的阴道神经分布的一般保藏或者重建相符合。因此,着色密度表明了使用 GGF2 治疗之后酪氨酸羟化酶 (TH) 着色的保存。

[0034] 图 7 :代表性的泡状乙酰胆碱转运蛋白 (VaChT) 着色。结果显示正常的组织着色 (组 A),和海绵体神经挤压损伤之后泡状乙酰胆碱转运蛋白 (VaChT) 着色的显著损失 (组 B)。相反,在阴道体中,海绵体神经末梢保藏的泡状乙酰胆碱转运蛋白 (VaChT) 着色显示使用 GGF2 治疗 (C) 挤压损伤之后,海绵体神经的存活率增加 (组 C)。

[0035] 着色密度显示使用 GGF2 治疗之后泡状乙酰胆碱转运蛋白 (VaChT) 着色的保存倾向。

## 具体实施方式

[0036] 外周神经创伤是许多不同情况、挤压、挫伤、相互碰撞、压扁或者挫伤的常见结果,例如,由外伤、事故或者外科手术产生的。尽管外部因素导致的神经创伤是变化的,但是在神经水平上的表现具有共同的特征 (参见,例如, Lee and Wolfe, J Am Acad Orthop Surg, 8(4), p. 243, 2008)。在各个病理学中,外伤性损伤常常造成髓鞘形成损伤、神经外膜损伤、神经束膜损伤、神经内膜损伤和轴损伤。在最温和的病例中,损伤主要是针对髓鞘质和神经外膜,然后在几天或者几周之后自然完全恢复。

[0037] 然而,许多神经创伤会导致神经内膜破坏和轴破坏,并因此导致不能完全恢复或者需要持续很长一段时间才能恢复的机能破坏。

[0038] 此外,在包括轴突损伤的外周神经损伤中,在损伤后几个小时时间内,轴突发生局部退化。在随后几天的时间内,最接近的神经元细胞体和轴突经历一种过程,这种过程叫做华勒氏变性。在轴突退化之后,髓鞘质产生的雪旺氏 (Schwann) 细胞死亡,留下碎片并发

炎。雪旺氏 (Schwann) 细胞的细胞死亡和相关发炎加重神经损伤。

[0039] 与中枢神经系统不同,在外周神经中可以发生显著数量的再生。轴突沿着神经束膜管生长并重新刺激末梢的靶分子,并且雪旺氏 (Schwann) 细胞 remyelinate 轴突。虽然外周神经可以再生,但不幸的是,这一步骤并不理想;许多经历了退化的神经元不在重新生成或者不能识别它们原有的靶分子并造成永久的机能失调的结果。这些机能失调可以包括运动机能损失、感觉功能损失、瘫痪、反应能力损失、僵硬、挛缩或者关节活动范围减少。。

[0040] 在一种神经创伤发生之后,任意可以限制功能失调程度的治疗会显著的影响现有的用于治疗外周神经创伤的治疗策略。

[0041] 大量文献显示,神经调节蛋白能够增加神经元通过人造管再生的能力,并且可以增加其作为细胞治疗剂(例如雪旺氏 (Schwann) 细胞移植体)的附属治疗法的作用。在本发明之前,人们并不知道神经调节蛋白可以单独被使用,例如,用于保护和/或修复外周神经创伤功能。

[0042] 在这些研究中使用的模型(大鼠勃起功能失调模型)是一种标准的、广泛承认的并很好公布的外周神经创伤模型。在这种特异性方法中,通过钳子挤压使海绵体神经受损。在其他周围神经的模型中,也可以使用相同的挤压或者碰撞损伤。在海绵体神经伤害模型中,功能性缺陷发生在勃起功能上。由于外伤性神经损伤病理生理学的常见性和一致性,这种海绵体神经伤害是一种优秀的前列腺切除术-导致的伤害模型,并且,是所有外伤性周围神经损伤的一种一般模式。

[0043] 对周围神经的损伤会导致位于脊神经后根神经节(DRG)中的感觉神经元细胞体内部的改变;这些改变能够促进存活和轴突再生。在适宜条件下,举例来说,在挤压损伤之后,绝大多数的神经纤维成功的再生。然而,在许多临床上相应环境中,外伤导致的神经损伤或者疾病导致的神经损伤结果往往不好,只有有限的功能恢复,并且通常被延误。在此情况下,会产生神经性疼痛或者慢性疼痛。

[0044] 疼痛通常与感觉神经损伤或者感觉神经损害有关,并使受影响的地方收到重视和固定。因此,伤害感受(神经元信号支撑疼痛的感觉)是促进愈合机制的伴随物,虽然这回引发令人不愉快的感觉和感情经验。然而,在许多病理情况下,感受伤害的入侵可以导致功能性变化,所述功能性变化会对肌体产生伤害。

[0045] 神经损伤会导致原始传入神经元的性质以及它们同脊髓的中枢关联性发生多种变化,产生异常性疼痛(allodynia)(受到正常无害刺激时的疼痛感觉)、痛觉过敏(一种对给定的疼痛刺激的夸大反应)和感受领域(即,使用刺激物时感觉“疼痛”的范围)的扩张。大多数慢性疼痛的病况都是中枢神经组织或者外周神经组织收到破坏的结果。

[0046] 勃起功能失调

[0047] 阳痿,此外还可以被称为勃起功能失调(ED),是一种常见的问题,仅在美国,就有2千万的男性面临这一问题。阴茎勃起是一种神经血管现象,这种神经血管现象取决于神经完整性和功能性血管的完整性。在收到性刺激之后,海绵体神经末梢和内皮细胞释放神经传递素(尤其是一氧化氮)。动脉平滑肌和小动脉的平滑肌的松弛增加动脉流动。海绵体内部获得的血液使阴茎处于勃起状态。

[0048] 在盆腔根治手术(例如,为了前列腺癌、膀胱癌或者直肠癌进行的手术)中损伤的海绵体神经是本国因医生的治疗而引起的勃起功能失调(ED)的最为常见的原因之一



种。勃起功能失调 (ED) 是根治性前列腺切除术之后的主要病态来源。例如,即使引入神经-从外科手术技术,在使用两面海绵体神经丛治疗患有器官-限制性前列腺癌的患者之后,手术后效力在 30%到 80%范围内 (Wang, J Sex Med, 4 :1085-97, 2007)。

[0049] 到目前为止,已经调查了多种不同的神经调节策略;然而,目前没有可使用的既能够在损伤发生之前对海绵体神经进行神经保护,又能够在损伤发生之后刺激神经再生的疗法 (Michl et al., J Urol 176 :227-31, 2006 ;Burnett and Lue, J Urol 176 :882-7, 2006)。即使同时对骨盆恶性肿瘤的外科手术治疗和放射治疗进行神经丛改良,这里仍然需要一种新型的在治疗后能够保持并恢复勃起功能的方法。

[0050] 可以观察到定义明确的末梢到损害位点的细胞改变模型,从轴突和髓鞘退化开始,巨噬细胞侵入、细胞吞噬作用、和雪旺氏 (Schwann) 细胞反分化作用,最后形成邦氏带。这会改变受损伤的神经环境和其使轴突再生的能力。当轴突从“传播”模式变化为生长模式时,营养因子、表达蛋白质 (GAP-43、微管蛋白、肌动蛋白)、新型的神经肽和细胞因子会促进神经元的存活。由于末梢神经肢体支撑能力和再生的神经元能力是不确定的 (Fu and Gordon, Mol Neurobiol. 14 :67-116, 1997),因此需要新的能够增强生长能力的方法。

[0051] 神经调节蛋白

[0052] “神经调节蛋白”、“神经调节蛋白-1”、“NRG-1”、“heregulin”指的是一种多肽,这种多肽能够结合 ErbB1 受体、ErbB3 受体或者 ErbB 4 受体,并且通过配对 (二聚作用) 作用结合 ErbB2 受体。例如,如美国专利第 5,530,109 号、美国专利第 5,716,930 号、和美国专利第 7,037,888 号所描述的,神经调节蛋白可以由 p185erbB2 配位体基因编码,这里提到的每个申请的全部内容通过引证在此全部并入本文;神经调节蛋白还可以由 NRG-2 基因、NRG-3 基因和 NRG-4 基因编码。神经调节蛋白可以是 GGF2 或者其任何一种活性片段;神经调节蛋白还可能是 GGF2 的一种保守变体,或者包括 GGF2 的分子。在本技术的一些用法中,术语“神经调节蛋白”是用来表明全神经调节蛋白分子的 EGF-样区域;这也被叫做“神经调节蛋白-样”蛋白质、肽或者多肽。

[0053] “神经调节蛋白-样”蛋白质、肽或者多肽指的是具有 EGF-样区域的多肽,这种多肽是由一种神经调节蛋白基因编码的。在一个实施方案中,“神经调节蛋白-样”蛋白质、肽或者多肽对患有外周神经创伤的主体或者有风险患有外周神经创伤的主体 (例如,预约外科手术的病人或者即将分娩的病人,都有发生相关外周神经创伤的风险) 有治疗作用。

[0054] GGF2 氨基酸序列 (在包括 EGF-样区域的部分加了下划线) 是:

[0055] MRWRRAPRRSGRPGPRAQRPGSAARSSPPLPLLLGTAALAPGAAAGNEAAPAGASVCYSSPPSV  
GSVQELAQRAAVVIEGKVPQRQQGALDRKAAAAAGEAGAWGGREPPAAGPRALGPPAEEPLLAANGTVPSWPTA  
PVPSAGEPGEEAPYLKVVHQVWAVKAGGLKKDSSLTVRLGTWGHPAFPSCGRLKEDSRVIFFMEDANSTSRAPAA  
FRASFPPLETGRNLKKEVSRVLCRRCALPPQLKEMKSQESAAGSKLVLRCEVSSEYSSLRFKWFKNGNELNRKNKP  
QNIKIQQKPGKSELRINKASLADSGEYMCKVSKLGNDSASANITIVESNATSTSTTGTSHLVKCAEKEKTFCVNG  
GECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRQNYVMASFYSTSTPFLSLPE (SEQ ID NO :1) (GenBank 编录号  
AAB59622,通过引证在此全部并入本文)。在本发明的某些方面,神经调节蛋白多肽或者其  
部分与 GGF2 的氨基酸序列具有 75,80,85,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或者 100%的  
一致性或者与 GGF2 的氨基酸序列相同。在本发明的某些方面,神经调节蛋白-样多肽与  
GGF2 的 EGF-样区域的氨基酸序列具有 75,80,85,86,97,88,89,90,91,92,93,94,95,96,

97,98,99,或者100%的一致性或者与GGF2的EGF-样区域的氨基酸序列相同。

[0056] 如这里所使用的,“蛋白质”或者“多肽”指的是包括至少十个氨基酸残基的分子。在某些实施方案中,所述蛋白质包括GGF2多肽的全部或者GGF2多肽的一部分。在一些实施方案中,使用野生型的蛋白质或者多肽治疗外周神经创伤,但是,在本发明的一些实施方案中,使用修饰的蛋白质或者多肽治疗外周神经创伤。在这里,术语“肽”、“蛋白质”或者“多肽”可以互换使用。为了方便起见,这里使用的术语肽指的是任意长度的氨基酸序列。

[0057] “修饰的肽”指的是一种肽,这种肽的化学结构,尤其是它的氨基酸序列是可以根据其各自的野生型肽发生变化的。在一些实施方案中,一种修饰的肽具有至少一个修饰的氨基酸。在一些实施方案中,一种修饰的肽具有至少一个d-氨基酸。在一些实施方案中,一种修饰的肽具有至少一个非天然存在地氨基酸。

[0058] 不作为任何限制,在某些实施方案中,肽(野生型肽或者修饰的肽)的大小可以包括5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,110,120,130,140,150,160,170,180,190,200,210,220,230,240,250,275,300,325,350,375,400,422个或者更多的氨基分子,或者由其衍生的任意范围的相应氨基序列或者这里涉及的序列;在一个实施方案中,这些蛋白质、多肽或者大小范围以GGF2为准。可以预计,通过在氨基末端或者羧基末端截断使这些多肽比它们相应的野生型形式更短,进行多肽突变,而且还可以通过使多肽与具有特定功能的异源蛋白质(例如,用于靶定或者定位,用于纯化,等到)融合或者共轭,进行多肽突变。

[0059] 如这里所使用的,一种“氨基酸分子”指的是任意一种氨基酸、氨基酸衍生物、或者本领域内已知的氨基酸模拟物。在某些实施方案中,所述肽分子的残基是连续的,在氨基酸分子残基中不存在任意氨基酸分子间断。在其他的实施方案中,本序列可以包括一种或一种以上非氨基酸分子基团。在具体的实施方案中,所述肽分子的残基序列可以被一种或者一种以上非氨基酸分子基团所间断。

[0060] 因此,术语“肽”组合物包括氨基酸序列;这些氨基酸可以是任意具有20个共有氨基酸的天然合成的蛋白质或者任意修饰的氨基酸或者罕见的氨基酸。

[0061] 使用本领域普通技术人员已知的任意一种技术制备肽组合物,包括(i)通过标准分子生物技术进行肽表达,(2)从天然来源中分离肽化合物,或者(iii)化学合成。之前以及公开了某些神经调节蛋白基因的核苷酸以及肽序列,并且这些神经调节蛋白基因的核苷酸以及肽序列可以在受到认可的计算机数据库中发现。这种数据库之一是国家生物技术信息中心的Genbank和GenPept数据库(在世界宽带网的ncbi.nlm.nih.gov上)。使用这里公开的技术或者本领域普通技术人员已知的技术可以放大和/或表达这些基因的编码区域。

[0062] 修饰的肽可以包括取代的变体、插入的变体或者缺失变体。缺失变体一般缺失天然分子或者野生型分子中的一种或者一种以上的残基。可以除去单独的残基,也可以除去一定数量的连续的氨基酸。可以向编码核苷酸序列中引入(通过取代作用或者插入作用)终止密码子,从而产生一种平截蛋白质。插入性变体一般包括在肽的非末端位置加入材料。

这可以包括插入一种或者一种以上的残基。还可以产生末端添加,通常叫做融合蛋白质或者融合肽。取代性变体通常包括肽内部的一个或者一个以上位点上一个氨基酸与另一个氨基酸的交换,并且可能被设计从而调节肽的一种或者一种以上的性质,同时发生或者不发生其他功能或者性质损失,所述功能或者性质例如,结合神经调节蛋白受体和神经调节蛋白受体的活化作用。取代作用可以是保守性的,也就是说,一个氨基酸被另一个具有相似形状和电荷的氨基酸替换。做为选择,取代作用可以是非保守性的,因此,肽的功能或者活性也受到影。非保守性改变一般包括使用化学性质不同的残基取代一种残基,例如,使用一种非极性的氨基酸或者不带电的氨基酸取代极性氨基酸或者带电荷的氨基酸,反之亦然。

[0063] 本领域内已知的“保存性取代作用”包括,但是不局限于,例如,如下改变:丙氨酸被丝氨酸所取代;精氨酸被赖氨酸所取代;天门冬酰胺被谷氨酰胺或者组氨酸所取代;天冬氨酸被谷氨酸所取代;半胱氨酸被丝氨酸所取代;谷氨酰胺被天门冬酰胺所取代;谷氨酸被天冬氨酸所取代;甘氨酸被脯氨酸所取代;组氨酸被天门冬酰胺或者谷氨酰胺所取代;异亮氨酸被亮氨酸或者缬氨酸所取代;亮氨酸被缬氨酸或者异亮氨酸所取代;赖氨酸被精氨酸所取代;甲硫氨酸被亮氨酸或者异亮氨酸所取代;苯基丙氨酸被酪氨酸或者亮氨酸或者甲硫氨酸所取代;丝氨酸被苏氨酸所取代;苏氨酸被丝氨酸所取代;色氨酸被酪氨酸所取代;酪氨酸被色氨酸或者苯基丙氨酸所取代;以及缬氨酸被异亮氨酸或者亮氨酸所取代。

[0064] 应该理解的是,氨基酸序列和核苷酸序列可以分别包括其他的残基,例如其他的N-末端氨基酸或者C-末端氨基酸、或者5'序列或者3'序列,前提是这些序列能够满足这里所阐述的功能性标准,例如,维持生物活性。末端序列的加成作用尤其适合于某些氨基酸序列,例如,在编码区域的5'部分或者3'部分包括不同的非编码序列侧链的氨基酸序列。

#### [0065] 药物制剂

[0066] 本发明的药物制剂包括有效量的肽,这种肽溶化在或者分散在一种药学上可接受的载体中。短语“药学上可接受的或者药理学上可接受的”指的是当对主体给药时,例如,当对人给药时,通常不会产生不利反应、过敏反应或者其他不良反应的组合物。根据本发明的公开,以及雷鸣氏药物科学(第18版,Mack印刷公司,1990,通过引证在此全部并入本文)的例证,本发明所属技术领域普通技术人员已知这种药物组合物的制备方法。此外,为了实现对人类给药的目的,应该理解的是,这些制备方法应该满足一些规定的无菌、致热反应、普遍安全性和纯度标准,例如,美国食品药物管理局生物标准所规定的。

[0067] 此外,如这里所使用的“药学上可接受的载体”包括一些材料,例如,溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如,抗细菌剂、抗真菌剂)、等渗试剂、吸收延迟试剂、盐类、防腐剂、药物、药物稳定剂、凝胶剂、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、着色剂、这些类似的材料及其结合,如本发明所述领域普通技术人员参照本发明的公开所知。除去与活性成分不相容的常用载体之外,载体在治疗组合物或者药物组合物中的应用是可以预计的。

[0068] 根据是否需要以固体、液体或者烟雾剂的形式给药,以及是否需要被灭菌某种给药途径(例如,注射),本发明的药物可以包括不同类型的载体。本发明可以被静脉内给药、皮内给药、动脉内给药、腹膜内给药、病灶内给药、颅内给药、关节腔内给药、前列腺内

(intraprostatically) 给药、胸膜内给药、气管内给药、经鼻给药、玻璃体内给药、阴道内给药、直肠内给药、肿瘤内给药、肌肉内给药、皮下给药、结膜下给药、气囊内给药、粘膜给药、心包内给药、脐内给药、intraocularly 给药、口服给药、局部给药、部分给药、吸入给药（例如，通过烟雾剂）。此外，本发明还可以通过注射给药、输液给药、连续输液给药、直接局部灌注靶细胞给药、通过导管给药、通过洗胃给药、或者通过其他方法或者前述的结合给药，如本发明所属领域普通技术人员所熟知的。

[0069] 本发明组合物向主体给药的剂量可以通过物理因素和生理因素来确定，例如，体重、疾病的严重程度、被治疗的疾病类型、之前发生的治疗性干预或者并发性治疗性干预、病人的并发症以及给药途径。在任意情况下，负责给药的医生可以确定活性成分在组合物中的浓度和对单独的个体给药的适当剂量。

[0070] 在某些实施方案中，药物组合物可以包括，例如，至少大约 0.1% 的活性化合物。在其他的实施方案中，一种活性化合物可以以大约 2% 到大约 75% 的重量单位被包括，或者在大约 25% 到大约 60% 的范围内被包括，例如，在其中的任意范围内。在其他非限制性的实施例中，一种剂量还可能包括每次给药从大约 1 微克 / 千克 / 体重、大约 5 微克 / 千克 / 体重、大约 10 微克 / 千克 / 体重、大约 50 微克 / 千克 / 体重、大约 100 微克 / 千克 / 体重、大约 200 微克 / 千克 / 体重、大约 350 微克 / 千克 / 体重、大约 500 微克 / 千克 / 体重、大约 1 毫克 / 千克 / 体重、大约 5 毫克 / 千克 / 体重、大约 10 毫克 / 千克 / 体重、大约 50 毫克 / 千克 / 体重、大约 100 毫克 / 千克 / 体重、大约 200 毫克 / 千克 / 体重、大约 350 毫克 / 千克 / 体重、大约 500 毫克 / 千克 / 体重、到大约 1000 毫克 / 千克 / 体重或更多，以及其中任意一种范围。衍生自上述范围的一种非限制性实施例中，根据上面所述的数量，可以给药大约 5 毫克 / 千克 / 体重到大约 100 毫克 / 千克 / 体重、大约 5 微克 / 千克 / 体重到大约 500 毫克 / 千克 / 体重、等等。

[0071] 在任意情况下，本发明组合物可以包括不同的抗氧化剂从而延迟一种或者一种以上组分的氧化过程。另外，通过添加防腐剂可以预防微生物的作用，所述防腐剂例如，不同的抗菌剂和抗真菌剂，包括，但是不局限于对羟基苯甲酸（例如，对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯）、氯代丁醇、石炭酸、山梨酸、乙基汞硫代水杨酸钠或者他们的混合物。

[0072] 该药物可以被配制成一种组合物，以游离碱形式、中性形式或者盐的形式存在。药学上可接受的盐包括酸加成盐，例如，与肽组合物的游离氨基基团形成的那些酸加成盐，或者与无机酸形成的酸加成盐，所述无机酸例如，盐酸、磷酸，或者与有机酸（例如，醋酸、草酸、酒石酸或者苯乙醇酸）形成的酸加成盐。与自由羧基基团形成的盐类还可以来源于无机碱，例如，比方说，钠、钾、铵、钙或者氢氧化铁；或者来源于有机碱，例如，异丙胺、三甲胺、组氨酸或者普鲁卡因。

[0073] 在组合物处于液体形式的实施方案中，载体可以是一种溶剂或者分散介质，包括，但是不局限于，水、醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇、液态的聚乙二醇，等等）、脂类（例如，甘油三酯、植物油、脂质体）和这些的组合。例如，通过使用包衣，例如卵磷脂，可以保持合适的流动性；或者通过保持分散在载体中的必须的颗粒尺寸，也可以保持合适的流动性，这里所述的载体例如，比方说，液态的多元醇或者脂类；通过使用表明活性剂，例如羟基丙基纤维素也可以保持合适的流动性，或者这些方法的结合。在许多情况下，优选地包括等渗剂，例如，比方说，糖、氯化钠或者其组合。

[0074] 在某些实施方案中，制备所述组合物用于口服给药。在这些实施方案中，所述固体

组合物可以包括,例如,溶液、悬浮液、乳化液、片剂、丸剂、胶囊剂(例如,硬壳明胶胶囊或者软壳明胶胶囊)、持续释放的试剂、口腔组合物、锭剂、酞剂、悬浮液、糖浆、圆片或者这些的结合。口服组合物可以直接被整合到日常饮食的食品中。优选的用于口服给药的载体包括惰性稀释剂,可吸收的食用载体或者这些的组合。在本发明的其他方面,所述口服的组合物可以被制备成一种糖浆或者酞剂。糖浆或者酞剂可以包括,例如,至少一种活性成分、一种甜味剂、一种防腐剂、一种调味剂、一种着色剂、一种防腐剂或者这些的组合。

[0075] 在某些优选的实施方案中,一种口服组合物可以包括一种或一种以上的粘合剂、赋形剂、崩解试剂、润滑剂、调味剂和这些的组合。在某些实施方案中,组合物可以包括一种或者一种以上的下列物质:一种粘合剂,例如,举例来说,黄芪胶、阿拉伯树胶、玉米淀粉、明胶或者这些的组合;一种赋形剂,例如,举例来说,磷酸氢钙、甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁或者这些的组合;一种崩解剂,例如,举例来说,玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸或者这些的组合;一种润滑剂,例如,举例来说,硬脂酸镁;一种甜味剂,例如,举例来说,蔗糖、乳糖、糖精或者这些的组合;一种调味剂,例如,举例来说,薄荷香精、水杨酸甲酯、樱桃香料、橙子香料,等等;或者上述这些的组合。当所述剂量单位形式是一种胶囊剂时,她可以含有除了上述类型的材料之外的其他载体,例如,一种液态载体。各种各样的其他材料可以当作包衣存在,或者用于修饰所述剂量单元的外观形态。举例来说,片剂,丸剂,或者胶囊剂可以包覆有虫胶、糖或者两个都有。

[0076] 通过将必需量的本发明的活性化合物混合在适当的溶剂中,以及选择性与其他另外一种上面列举的成分相混合,随后进行过滤灭菌,就可以制备无菌的可注射溶液。通常,通过将各种灭菌活性成分与含有基本分散介质和/或其他成分的无菌媒介物相混合来制备分散体系。对于用于制备无菌可注射溶液、悬浮液或者乳化液的无菌粉末来说,优选的制备方法是真空干燥或者冷冻干燥技术,这些技术产生活性成分加上任何一种其他的理想成分的粉末,所述其他的理想成分选自之前的无菌过滤后的液体介质。如果需要的话,应该将液体介质进行适当的缓冲,并且在与足够的盐水或者葡萄糖一起注射之前,首先将液体稀释剂变得等渗。本发明还包括能够用于直接注射的高盐度组合物的制备,其中,可以预见,使用二甲亚砜作为溶剂会产生非常快的穿透力,在小面积内传递高浓度的活性试剂。

[0077] 优选的,本发明组合物在标准制造和存储条件下是稳定的,并且,被保藏免受微生物(例如,细菌和真菌)污染。应当理解,内毒素污染应该被保持在安全水平的最低限度,例如,少于0.5纳克/毫克蛋白质。

[0078] 在具体的实施方案中,通过加入含有延迟吸收试剂的本发明组合物的方法会延长可注射组合物的吸收,所述延迟吸收试剂例如,举例来说,单硬脂酸铝、明胶或者这些的组合。

## 实施例

### [0079] 实施例 1:海绵体神经损伤的大鼠模型

[0080] 海绵体神经损伤的大鼠模型通常使用下列工艺。使用异氟烷麻醉大鼠。将动物放置于加热地毯上,维持动物体温在37°C。将腹部刮干净并使用防腐的Clinidin溶液(聚乙烯吡酮碘)擦净。隔开腹膜腔的中下腹部,使海绵体神经和主要的盆神经节(MPGs)暴露出来。通过使用止血剂压破海绵体神经两分钟,导致海绵体神经损伤。在与神经调节蛋白有

关的研究中,在损伤发生之前,对两个神经调节蛋白组进行 48 小时的治疗。

[0081] 大鼠压破模型提供了一种简单的、可再生的并且非常稳妥的勃起功能减小。本技术被广泛的应用并且已经有一些使用这些技术的研究被公布。在挤压损伤之后,不需要检查勃起功能,勃起功能的减小是可以预计的,并且通常,在挤压损伤大约 5 周之后进行功能性测试。

[0082] 在对海绵体神经进行损伤之后,通过 2-3 间断缝合术,将腹腔与腹肌的 reapproximation 和筋膜分两层缝合在一起(吸收性缝线)。使用一种皮下(包埋)连续缝合术缝合皮肤,将皮肤与非油绳(PDS 或者包覆的 vicryl)缝合材料缝合起来。先给药丁丙诺啡止痛剂(在过程完成之前 10 分钟),并在手术后 48 小时内每 6-12 小时给药来控制疼痛。

[0083] 手术后大约 5 周后,使用氯胺酮(100 毫克/千克腹内给药)和甲苯噻嗪(5 毫克/千克)麻痹大鼠。通过相同的切割法切开阴茎脚,使用 23G 针插入右边的脚然后与一种软件程序相连进行功能性研究,所述软件程序专门被设计用于测定阴茎海绵体内压力。在进行测量之前,用一种电极在 1.5 毫安下刺激海绵体神经。测定过程的时间大约是 15 分钟。在麻醉恢复之前,对心肌内注射治安乐死试剂使大鼠安乐死,并收集组织(海绵体神经、MPG、阴茎、前列腺)进行光学显微镜检查法,同时评价分子和组织。

[0084] 如图 1 中显示的存在于阴茎海绵体内压力(ICP)内的数据,在损伤后 5 周对海绵体神经的电刺激法显示,在神经调节蛋白-治疗组中,神经和末端器官功能都被明显的保存,这一结果在更高的剂量条件下更为明显。首先通过非重复的二因素方差分析测定法进行数据分析,其 Bonferroni t- 测验和显著性假定为  $p < 0.05$ 。所有的结果以平均数 ± 标准差来表示。如图 2 所示,当主动血压正常化时,这个改变还会被显著改善。

[0085] 从组织学观点来看,根据在 MPG 中使用荧光金向后运输标记物获得的数据表明,NRG 治疗增加了完整神经纤维的数目,并改善了神经元一氧化氮合成酶和来自阴茎神经和平滑肌组织的泡状乙酰胆碱转运蛋白(VaChT)的改善的保存能力,这个现象说明这里存在着神经保护和/或神经再生作用机制。与没有受到任何一种神经调节蛋白的挤压损伤动物相比,平滑肌凋亡被减少。

[0086] 实施例 2:荧光金组织学方法

[0087] 为了进行这个方案,肋内注射 4% 的荧光金,并在一周之后收获主要的盆神经节(MPG)组织,并固定在 4% 的多聚甲醛、0.1M 磷酸盐缓冲液中,固定整夜,然后被放置于 20% 的蔗糖中。低温切割机的厚度为 20 微米。使用超位数照相机和成像系统摄像,随后分析荧光金增强的细胞计数。其后,随机选择主要的盆神经节(MPG)样本幻灯片(每种动物选择 10 个)并进行细胞计数,从而确定完整的神经元的数目。(参见,例如, Dail, W. G., Trujillo, D., de la Rosa, D. and Walton, G.: Autonomic innervation of reproductive organs: analysis of the neurons whose axons project in the main penile nerve in the pelvic plexus of the rat(生殖器官的自发神经分布:大鼠骨盆丛中主要阴茎神经上的轴突计划的神经元分析). Anat Rec, 224:94, 1989; Laurikainen A, Hiltunen JO, Vanhatalo S, Klinge E, Saarma M: Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed in penis of adult rat and retrogradely transported in penile parasympathetic and sensory nerves(胶质细胞系衍生的神经营养性因子在成年大鼠的

阴茎中的表达和在阴茎副交感神经和感觉神经中胶质细胞系衍生的神经营养性因子的向后运输). (Cell Tissue Res 2000(细胞组织研究,2000),302 :321-9.)

[0088] 因此,这是使用荧光金的一种退行性的痕量方案。这些方案产生的结果提供的信息表明,神经调节蛋白治疗法帮助海绵体神经再生并再投影到其靶分子(阴茎的海绵体)上和/或海绵体神经的神经保护。

[0089] 因此,将荧光金注射到靶器官中,在本发明情况下,注射到阴茎体中。其后,被末端器官神经末梢吸收。这种吸收表明神经纤维被保存和/或再生进入注射区域。一旦荧光金被吸收,荧光金以一种退行性方式被运输到神经轴突中,并且,该标记物被累积入主要的盆神经节(MPG)的原始神经元中。

[0090] 图3显示了来自每个治疗组((组A)正常组、(组B)挤压组、(组C)挤压+GGF2)的三种动物的代表性的主要的盆神经节(MPG)荧光金标记物。正常的动物(组A)表示在不存在神经损伤的情况下观察到的退行性标记数值。挤压动物(组B)说明损伤后的完整神经纤维急剧减少,因此,荧光金标记物不能被运输回到主要的盆神经节(MPG)。挤压+GGF2动物(组C)显示荧光金标记的主要的盆神经节(MPG)细胞的增加,这说明在损伤之后,作为GGF2治疗的结果,神经纤维存在更好的保藏。

[0091] 图4提供了在所述主要的盆神经节(MPG)中的荧光金标记物的量。正常动物在主要的盆神经节(MPG)中具有大量标记的细胞体。在挤压损伤之后,标记的细胞数目急剧减少,由于神经纤维损害,标记物不能向后运输回到主要的盆神经节(MPG)。GGF2治疗法改良的完整的神经纤维数目使荧光剂能够从阴茎组织以一种推行性方式运输到主要的盆神经节(MPG),导致更大数目的标记细胞。

#### [0092] 实施例3:免疫组织化学

[0093] 对阴茎体的最接近纵向低温切割面进行nNos、泡状乙酰胆碱转运蛋白(VaChT)染色。使用含有1% triton-X的三羟甲基氨基甲烷缓冲液进行洗涤。使用5%的正常山羊血清阻断组织1小时,然后在4摄氏度条件下培养整夜:

[0094] a) nNos(Sigma ;1/1000) 或者

[0095] b) VaChT(Abeam ;1/150) 或者

[0096] c) TH(Millipore ;1/5000)。

[0097] 在冲洗几次之后,在山羊-抗-兔子HRP和驴抗山羊(1/1000)中培养片段1小时,然后在含有0.2%的硫酸镍铵和0.03%过氧化氢的DAB溶液中培养10分钟。在最后洗涤之后,对片段进行脱水,在二甲苯中纯化,并装在Permount(Fisher科学技术公司)上。

[0098] nNos着色:

[0099] 在阴茎海绵体内的海绵体神经轴突端板中释放一氧化氮(NO),这种一氧化氮与内皮一氧化碳一起造成平滑肌的松弛,引发阴茎勃起的血液动力学改变,同时促进肿大维持。目前普遍的理解是,海绵体神经在损伤之后的效力恢复依赖于,或者至少部分地依赖于轴突在维持神经组织中的再生以及末端器官的成功的功能性神经再分布。在海绵体神经损害后的阴茎动物模型研究中,可以观察到明确定义的病理学改变。这些病理学改变可以在神经失用到致命的轴突损害范围内变化,并且会包括平滑肌凋亡、内皮凋亡、一氧化氮合成酶(NOS)神经密度的减少、纤维增值性细胞因子(例如,转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ )的上调节、平滑肌纤维症或者损失、或者病理学信号反应(例如改变的音猬因子蛋白质)。

[0100] 另外,由海绵体神经的神经失用次生出勃起的慢性丧失。

[0101] 在延长的恢复期间,由于正常睾丸不能正常的在松弛和勃起状态之间转换,这一状态被认为加重了睾丸平滑肌进一步结构损坏的效力 (Bella AJ, Lin G, Fandel TM, Hickling DR, Morash C, Lue TF. Nerve growth factor modulation of the cavernous nerve response to injury (海绵体神经对损伤的反应的神经生长因子调节). *J Sex Med* 6 Suppl 3 :347-352, 2009.)。

[0102] 海绵状的 nNOS 是一种大家公认的海绵体神经保藏标记物。(参见,例如, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1464-410X.2010.09364.x/full>) 这一方案的结果显示了根据实施例 1 的方案产生的大鼠海绵体神经两面损伤之后的神经保护和 / 或神经再生作用。

[0103] 密度着色结果 (代表性的邻近躯干部分, 5 个随机选择的幻灯片, 观察着未知 - 每个实验组 5 个动物) 表明对使用神经调节蛋白治疗的主体进行的 nNOS 着色保藏。

[0104] 图 5 提供了 nNos 水平代表性的染色水平。染色密度表明 nNOS 的存在。这些工作的结果包括正常组织染色 (组 A)。比较起来, 在海绵体神经挤压损伤 (组 B) 之后, 存在显著的 nNOS 着色损失。阴茎体中海绵体神经末梢的保藏的 nNOS 着色表明, 在使用 GGF2 治疗挤压损伤之后 (组 C), 海绵体神经存活和 / 或再生速率增加。着色密度表明使用 GGF2 治疗后 nNOS 着色的保藏作用。

[0105] 泡状乙酰胆碱转运蛋白 (VaChT) 着色 :

[0106] 盆神经节神经元刺激阴茎表达 nNOS 和胆碱能标记物, 并且刺激阴茎的交感去甲肾上腺素激活的神经分布, 这种盆神经节神经元通过交感神经干大量增多, 并不截断阴茎神经或者盆神经节。这些方案产生的结果提供的信息表明, 根据泡状乙酰胆碱转运蛋白 (VaChT) 的肋内着色, 神经调节蛋白治疗法帮助海绵体神经再生并再投影到其靶分子 (阴茎的海绵体) 上和 / 或海绵体神经的神经保护。虽然外科手术勃后勃起功能失调 (ED) 的原始病因是神经原性的, 在啮齿动物中进行的研究揭示了在阴茎神经损伤之后, 勃起组织内部也存在形态学变化和功能性变化。(参见, 例如, Keast JR. Plasticity of pelvic autonomic ganglia and urogenital innervation (骨盆自主神经节的柔软性和泌尿生殖器的神经分布). *Int Rev Cytol* 2006 ;248 :141-208 ;Andersson KE, Hedlund P, Aim P. Sympathetic pathways and adrenergic innervation of the penis (阴茎肾上腺素神经分布和合成途径). *Int J Impot Res* 2000 ;12 :S5-12 ;Mulhall JM, Bella AJ, Briganti A, McCullough A, Brock G. Erectile Function Rehabilitation in the Radical Prostatectomy Patient (根治性前列腺切除术病人中的勃起功能康复治疗). *J Sex Med* 7(4), 1687-1698, 2010)。

[0107] 密度着色结果 (代表性的邻近躯干部分, 5 个随机选择的幻灯片, 观察着未知 - 每个实验组 5 个动物) 表明对使用 GGF2 治疗的主体进行的泡状乙酰胆碱转运蛋白 (VaChT) 着色保藏。

[0108] 图 7 提供了代表性的泡状乙酰胆碱转运蛋白 (VaChT) 的免疫组织化学着色。着色密度表明泡状乙酰胆碱转运蛋白 (VaChT) 的存在。结果包括正常组织染色 (组 A)、以及海绵体神经挤压损伤 (组 B) 之后泡状乙酰胆碱转运蛋白 (VaChT) 着色的明显减少。相反, 组 C 中显示的阴茎体中海绵体神经末梢的保藏的泡状乙酰胆碱转运蛋白 (VaChT) 着色说明,



在使用 GGF2 治疗挤压损伤之后 (组 C), 海绵体神经存活和 / 或再生速率增加。着色密度表明使用 GGF2 治疗后泡状乙酰胆碱转运蛋白 (VaChT) 着色的保藏作用。

[0109] TH 着色:

[0110] TH 是一种肾上腺素能纤维的标记物, 并且可以被用于支持神经在睾丸体中的保藏。睾丸体的临近部分被纵向低温切割, 并使用一元抗体染色, 所述一元抗体是由邻苯二酚胺合成的标记物, 酪氨酸羟化酶产生的 (在大鼠阴茎神经损伤之后被损坏的海绵体神经移植术, 具有新陈代谢综合症的特点, Matthew R. Nangle, BSc, PhD, Joseph Proietto, MBBS, PhD, ? and Janet R. Keast, BSc, PhD J Sex Med 2009 ;6 :3032-3044)。

[0111] 着色密度结果表明 TH 的存在。实际上实现的着色密度结果 (代表性的邻近躯干部分, 5 个随机选择的幻灯片, 观察着未知 - 每个实验组 5 个动物) 表明对使用 ggf2 治疗的动物进行的 TH 着色保藏。图 6 提供了代表性的酪氨酸羟化酶 (TH) 着色水平。结果包括正常组织染色 (组 A)、以及海绵体神经挤压损伤 (组 B) 之后酪氨酸羟化酶 (TH) 着色的明显减少。组 C 显示了, 相对于使用 GGF2 治疗挤压损伤之后 (组 C) 阴茎神经分布保藏的一般性增加, 阴茎体中海绵体神经末梢的保藏的酪氨酸羟化酶 (TH) 着色更好。着色密度显示使用 GGF2 治疗后酪氨酸羟化酶 (TH) 着色的保藏作用。

[0112] 图 6 提供了代表性的酪氨酸羟化酶 (TH) 着色水平。结果包括正常组织染色 (组 A)、以及海绵体神经挤压损伤 (组 B) 之后酪氨酸羟化酶 (TH) 着色的明显减少。组 C 显示了, 相对于使用 GGF2 治疗挤压损伤之后 (组 C) 阴茎神经分布保藏的一般性增加, 阴茎体中海绵体神经末梢的保藏的酪氨酸羟化酶 (TH) 着色更好。着色密度显示使用 GGF2 治疗后酪氨酸羟化酶 (TH) 着色的保藏作用。

[0113] 实施例 4: 作为替换的实施方案

[0114] 在任何一种外科手术过程中几乎都会发生外周神经创伤。神经损伤的可能性与外科手术中组织解剖的位置和程度有关。例如, 外科乳房切除术常常发生由外周神经创伤引起的并发症, 包括腋窝和手臂的麻痹 (例如, 损伤到肋间臂神经)、翼状肩胛的麻痹的 (损伤到胸长神经)、背阔肌的麻痹 (损伤到胸背神经)。

[0115] (参见, Watt-Boolsen et al., 1988 ;Aitken and Minton, 1983)。

[0116] 因此, 无论在乳房切除术之前使用神经调节蛋白、在乳房切除术之后使用神经调节蛋白还是在乳房切除术之前和之后都使用神经调节蛋白, 都会限制神经损伤和 / 或增强周围神经功能的恢复。在手术之前 24 小时, 对计划进行乳房切除术的病人进行适当量的神经调节蛋白治疗。选择性地, 在手术之后, 病人也可以继续治疗长达 6 周的时间, 从而加速神经恢复。在作为选择的实施方案中, 病人只在手术之前或者只在手术之后被治疗。如这里提到的, 进行肿瘤外科切除术 (前列腺切除术、乳房切除术、甲状腺切除术, 等等) 之后使用神经调节蛋白预防神经损伤。应当注意到, 神经调节蛋白已经被用作启动子并且可以作用抑制因子, 抑制肿瘤细胞形成和生长 (Atlas et al., 2003 ;Chua et al., 2009)。神经调节蛋白治疗可以或者不可以对患有某些肿瘤的病人使用。只有当足够安全时才使用神经调节蛋白治疗患有 erbB 阳性肿瘤的病人, 研究表明神经调节蛋白不会增加肿瘤的生长。

[0117] 而且, 外科造成的神经损伤的治疗不局限于乳房切除术和前列腺切除术。神经损伤常常发生在包括明显的解剖和 / 或切除术的外科手术中。这些外科手术包括, 但是不局限于, 上肢科手术、手部外科手术、膝外科手术 / 置换、臀部外科手术 / 替换、肘外科手术 /

替换、颈部动脉和静脉外科手术解剖、甲状腺外科手术、扁桃体切除术、手脚外科手术。外周神经创伤常见于骨盆外科手术、腹部外科手术和结肠直肠外科手术。神经损伤也发生在口部和脸部的外科手术中。

[0118] 除了外科手术中的解剖和切除对神经的直接损伤之外，神经损伤还常常由于外科手术过程中给病人移位、挤压接触点或者挤压或者拉伸神经造成、由于褶皱、限制、剪、绞或者其他任意一种会挤压组织的行为造成。这是外科手术不可避免的结果或者不适当手术的结果。无论外周神经创伤的起因或者病理如何，神经调节蛋白都能够预防和 / 或治疗这种损伤。

[0119] 对于人类而言，临床试验显示了 NRG 预防并且治疗外周神经创伤的效果，在所述临床试验中，评价使用神经调节蛋白治疗的病人与使用安慰剂治疗病人的常见受影响的神经区域中感觉功能和 / 或运动机能的数据。举例来说，通过标准神经病学感觉功能方法可以检查腋窝麻痹程度，所述方法包括异常性疼痛 (allodynia) 检验、痛觉过敏检验、感觉阈检验或者敏锐度检验 (二点辨别觉)。这些方法在本发明所属技术领域内是标准的。手术后，对病人进行一段时间的治疗，并对使用神经调节蛋白治疗的病人和使用参照物治疗的病人之间进行统计学比较。根据这些试验，在外科手术之前和 / 或之后进行 NRG 治疗可以预防和 / 或治疗外周神经创伤。

[0120] 类似于上述试验的方法也可以被用于与相似的方式评价驱动力量、活动范围和协调性。依照这些试验，在手术之前或者之后进行 NRG 治疗以及被发现能够预防和 / 或治疗外周神经创伤 (所述外周神经创伤会导致发力、关节活动范围或者协调性中一种或者一种以上的损伤)。

[0001]

## 序列表

<110> A·O·卡贾诺  
A·J·贝拉  
J·F·亚奇

<120> 神经调节蛋白在治疗外周神经损伤中的应用

<130> ACOR.P0207W0

<140> 未知的

<141> 2010-10-14

<150> 61/251, 583

<151> 2009-10-14

<150> 61/252, 161

<151> 2009-10-16

<160> 1

<170> PatentIn 第 3.5 版

<210> 1

<211> 422

<212> PRT

<213> 现代人

<400> 1

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

[0002]

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 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

[0003]

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

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

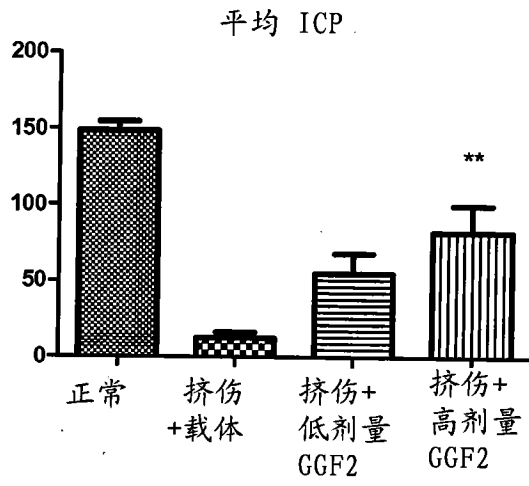


图 1

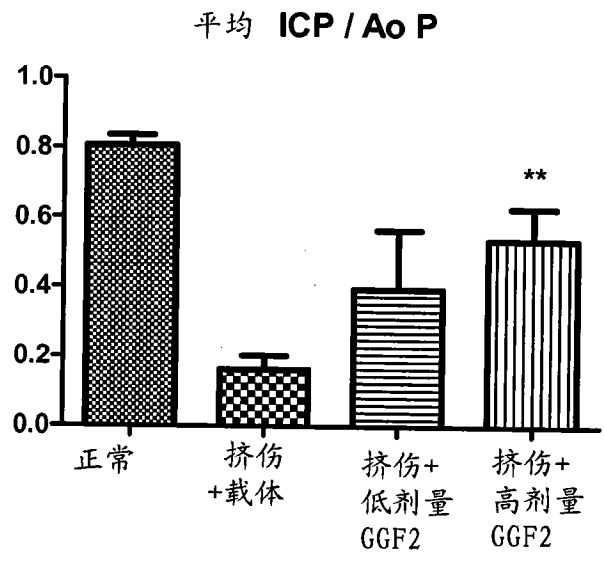


图 2

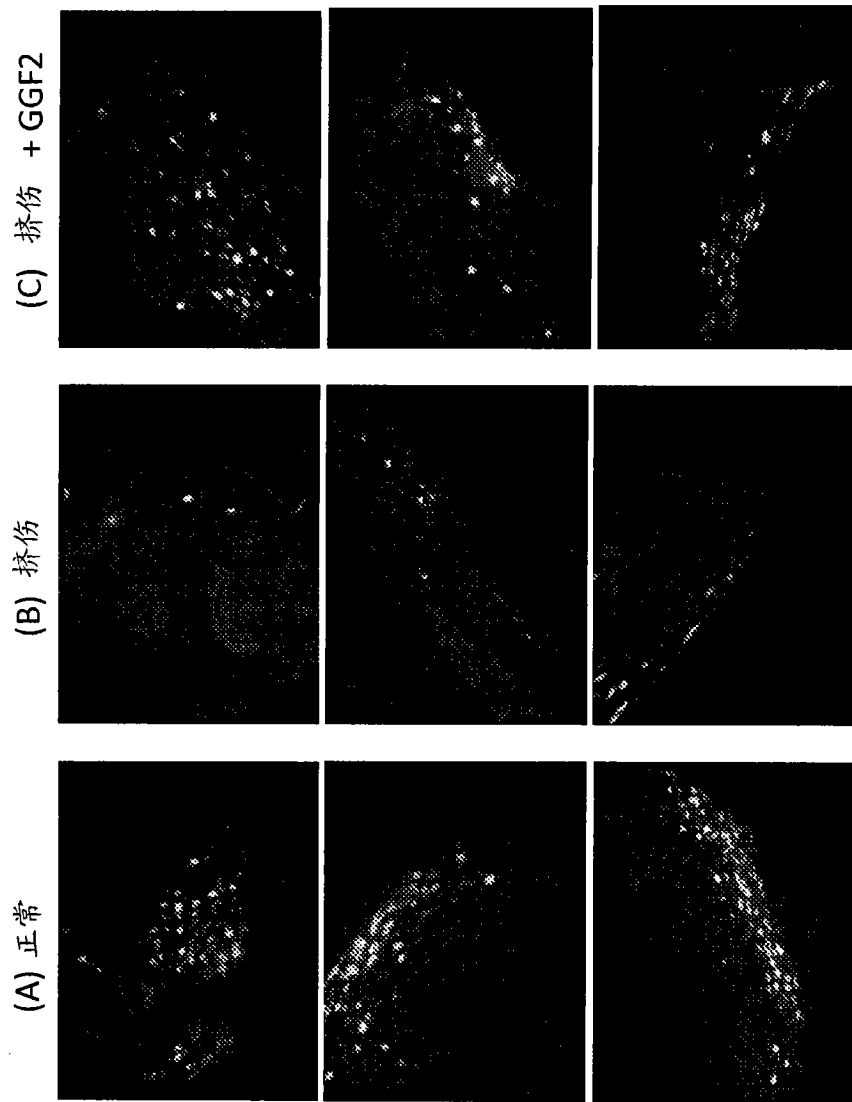


图 3

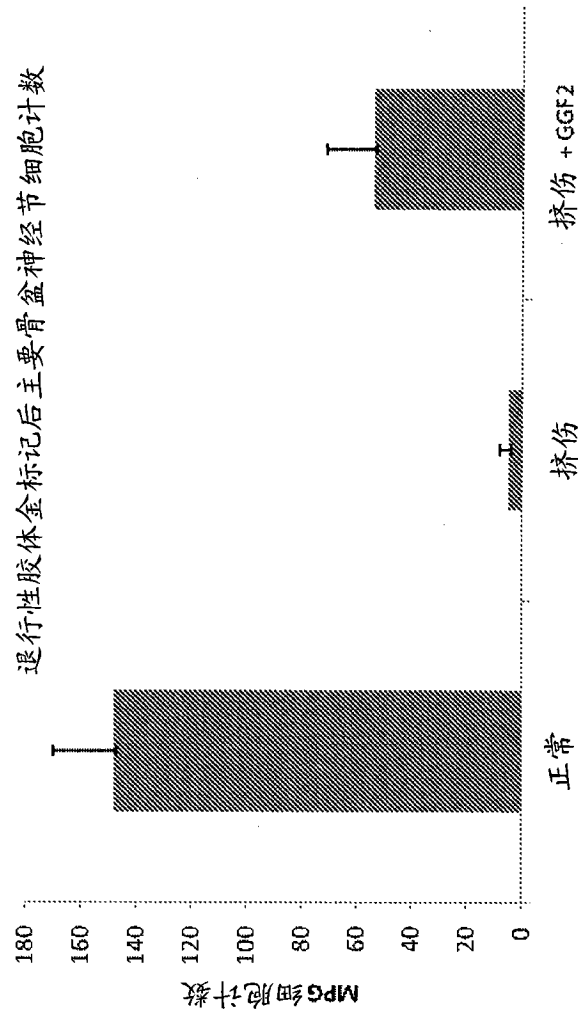


图 4



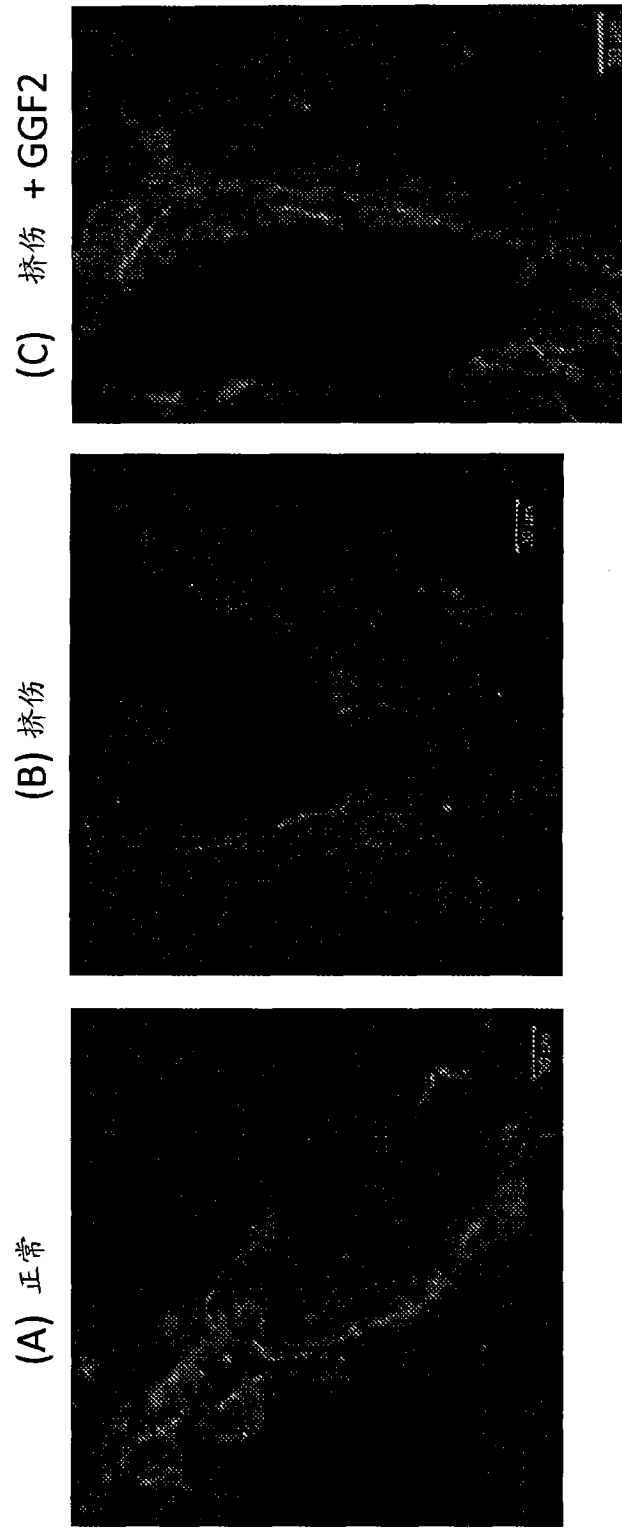


图 5

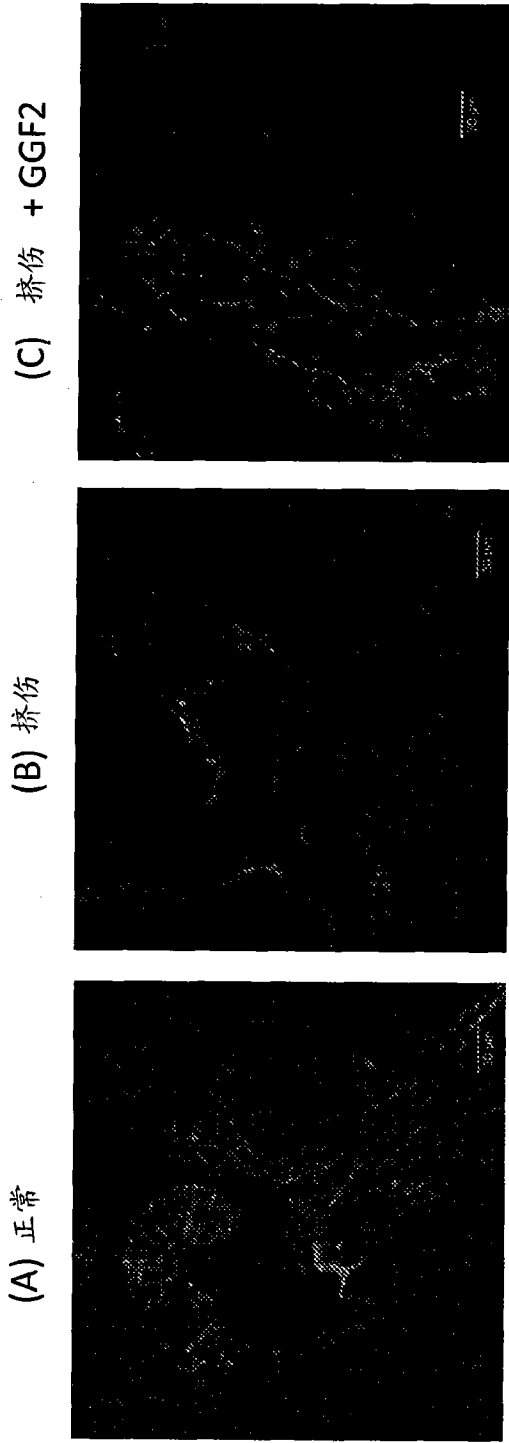


图 6

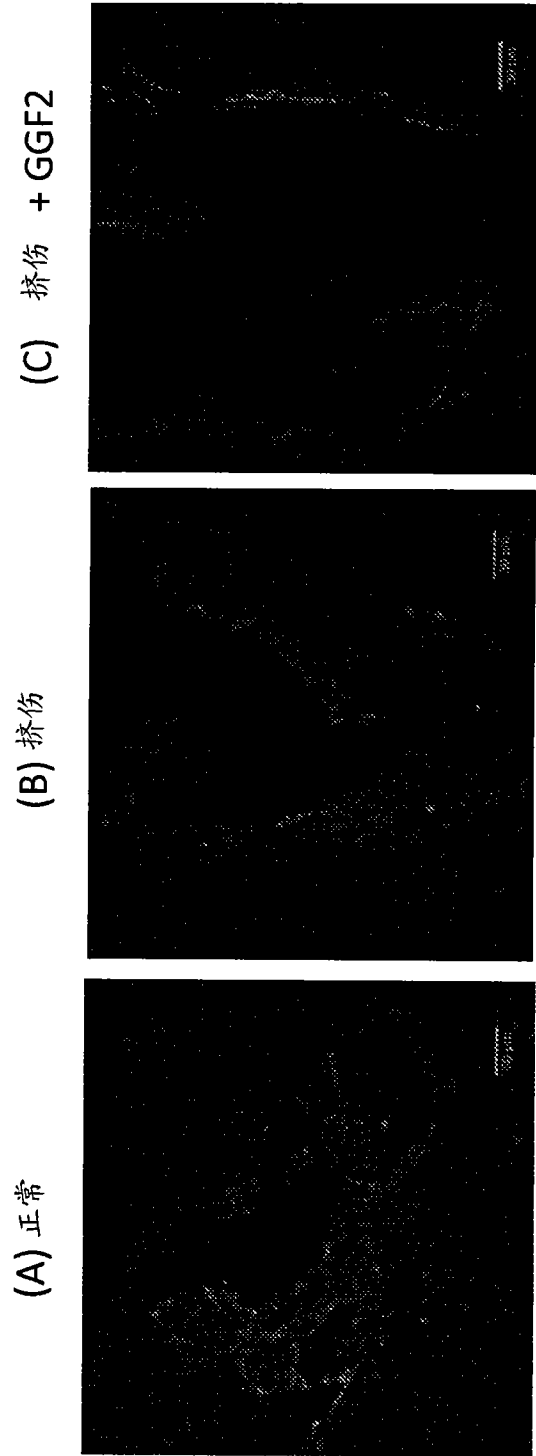


图 7