(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103339149 B
(45)授权公告日 2016.02.03

(21)申请号 201180039105.2

(22)申请日 2011.06.14

(30)优先权数据
PA201000522 2010.06.14 DK

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.02.07

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/DK2011/050214 2011.06.14

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2011/157275 EN 2011.12.22

(73)专利权人 H. 隆德贝克有限公司
地址 丹麦瓦尔拜

(72)发明人 A·尼克杰 S·格勒鲁普
P·S·马德森 C·M·佩德森
D·奥尔森

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司 72003
代理人 吴小瑛 张福根

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 38/18(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)

(56)对比文件

WO 2009/155932 A2,2009.12.30, 摘要,第5页第2段至第6页第2段,第67页最后一段,第68页第4段,第88页倒数第2段.

US 2007/0264195 A1,2007.11.15, 权利要求1-2,11,15-16,19,33-36,40,42,说明书第第0145,0184段,序列表.

Olav M. Andersen,et al..Molecular dissection of the interaction between amyloid precursor protein and its neuronal trafficking receptor SorLA/LR11.《Biochemistry》.2006, 第45卷第2618-2628页.

Minae Niwa,et al..The roles of glial cell line-derived neurotrophic factor, tumor necrosis factor-α,and an inducer of these factors in drug dependence.《J. Pharmacol. Sci.》.2007, 第104卷第116-121页.

审查员 张秀丽

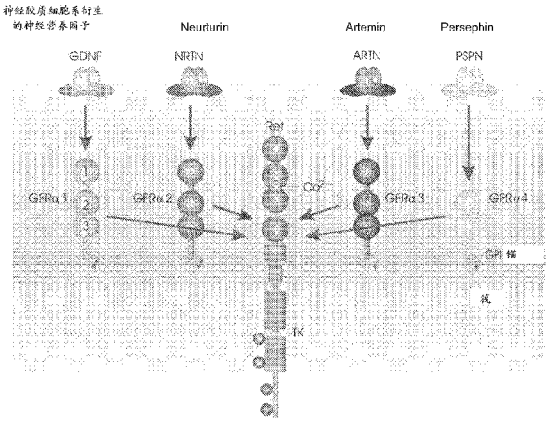
权利要求书1页 说明书33页
序列表41页 附图18页

(54)发明名称

SorLA 和 GDNF- 家族配体受体之间的相互作用的调节

(57)摘要

本发明涉及通过调节 SorLA 与 GDNF- 家族配体受体之间的相互作用来提高神经元存活的方法。用于调节 SorLA 与 GDNF- 家族配体受体之间的相互作用的试剂选自蛋白质、肽、抗体或小有机化合物。本发明还涉及包含这些试剂的药物组合物以及所述试剂或药物组合物用于治疗与神经元损失相关和 / 或需要神经元存活的疾病的用途。



CN 103339149 B

1. 针对 SorLA 或 GFRα1 的抗体在制备用于通过调节或抑制 SorLA 与 GFRα1 之间的相互作用来提高需要其的患者脑中的 GDNF 的细胞外水平的方法中的药物的用途，其中所述患者患有选自以下的疾病：慢性疼痛、神经性疼痛、精神分裂症、注意力缺陷和多动症 (ADHD)、药物滥用、焦虑障碍和 / 或双相障碍（躁郁症）。

2. 根据权利要求 1 的用途，其中抑制 GDNF 的内化和 / 或退化。

3. 根据权利要求 1 的用途，其中所述方法用于通过调节 SorLA 与 GFRα1 之间的相互作用来提高神经元的存活。

4. 根据权利要求 1 的用途，其中所述方法用于通过调节 SorLA 与 GFRα1 之间的相互作用来提高多巴胺能神经元的存活。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项的用途，其中所述抗体结合 SorLA 或 GFRα1 的胞外域上的一个或多个结合位点。

6. 根据权利要求 5 的用途，其中所述结合位点包括 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 和 / 或 SEQ ID NO:7。

7. 根据权利要求 1-4 中任一项的用途，其中所述抗体是多克隆或单克隆的。

8. 根据权利要求 1-4 中任一项的用途，其中所述抗体是分离的或重组的。

9. 根据权利要求 1-4 中任一项的用途，其中所述抗体是人源化、嵌合或单链抗体。

10. 包含针对 SorLA 或 GFRα1 的抗体和载体的药物组合物，其中所述抗体结合 SorLA 或 GFRα1 的胞外域上的一个或多个结合位点，

其中所述结合位点包括 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 和 / 或 SEQ ID NO:7；和

其中所述药物组合物用于治疗选自以下的疾病：慢性疼痛、神经性疼痛、精神分裂症、注意力缺陷和多动症 (ADHD)、药物滥用、焦虑障碍和 / 或双相障碍（躁郁症）。

SorLA 和 GDNF- 家族配体受体之间的相互作用的调节

发明领域

[0001] 本发明涉及 Vps10p- 结构域受体 SorLA 及其与 GDNF- 家族配体受体的相互作用的调节。能够调节或抑制这种相互作用的试剂在神经、精神和行为障碍的治疗中具有潜力。本发明提供能够作为经 SorLA 的信号传递（包括但不限于逆向运输和 GDNF 的分选）的调节剂的这类配体。该试剂因此根据神经、精神和行为障碍的具体类型选自拮抗剂 / 抑制剂和激动剂。

[0002] 本发明还涉及用于识别可调节 SorLA 和 GDNF- 家族配体受体之间的相互作用的新型试剂的检测法。

[0003] 发明背景

[0004] 神经系统疾病，特别是精神和行为障碍属于残疾的主因，其在全球 15 岁及以上的成年人中占有残疾的生命中的年数的大于 37％，并且是可能在未来造成越来越严重的健康、社交和经济问题的疾病 (Lopez 和 Murray 1998)。

[0005] 在例如来自世界卫生组织的 ICD10, 第 VI 章，Blocks G00-G99(Diseases of the nervous system) 中定义了神经系统疾病，并包括例如神经变性疾病，如帕金森氏病。

[0006] 在例如来自世界卫生组织的 ICD10, 第 V 章，Blocks F00-F99(Mental and behavioral disorders) 中定义了精神和行为障碍，并包括例如重度抑郁症、精神分裂症、注意力缺陷和多动症 (ADHD)、药物滥用、焦虑障碍和双相障碍（躁郁症）。

[0007] 这些障碍是常见、严重、慢性和通常威胁生命的疾病。自杀估计是多达 15％的重度抑郁症和双相障碍之类障碍的患者的死因，并已经识别出许多其它有害的健康相关效应 (Michelson, Stratakis 等人 1996 ; Musselman, Evans 等人 1998 ; Ciechanowski, Katon 等人 2000 ; Schulz, Beach 等人 2000 ; Kupfer 2005)。越来越认识到，这些障碍中的一些是对多个器官系统具有有害作用的全身疾病。

[0008] 突触可塑性和传递中的改变的神经元活性、存活，特别是受损被认为构成神经元疾病的病理生理学。神经递质多巴胺特别涉及几种常见的脑功能障碍，尤其是帕金森氏病、精神分裂症、注意力缺陷和多动症以及药物依赖和某些内分泌紊乱。临床上用于治疗这些病症的许多药物通过影响传递来发挥作用。有三种主要的多巴胺能通路。在这种通路的多巴胺能神经元的运动控制和选择性变性中重要的黑质纹状体通路是帕金森氏病的标志。中脑边缘 / 中脑皮层通路从中脑中的细胞组行进至边缘系统的一部分，尤其是伏核，和行进至皮层 ; 它们涉及在情绪和药物诱发的回馈系统中。最后，从下丘脑行进至垂体腺的结节垂体束通路，它们调节其分泌。

[0009] 神经营养因子是神经元“存活 (stay alive)”信号的有力介质并对突触传递和可塑性具有显著作用。神经胶质细胞衍生的神经营养因子 (GDNF) 是一组相关的同源二聚体神经营养因子之一，其还包括 neuturin(NRTN)、persephin(PSPN) 和 artemin(ARTN)。这些一起被称作 GDNF 家族配体 (GFL)。GDNF 遍布发育的神经系统表达，但在成人大脑中其在纹状体、丘脑、皮层和海马体的神经元中特别高度表达。由于逆向运输，在黑质中还发现显著量的源于纹状体的 GDNF。表达在星形细胞和雪旺细胞中以及在非神经元组织，如肾、睾丸和

骨骼肌中也是明确的。

[0010] GDNF 在功能上与帕金森氏病相关 (Lin 等人，1993)。帕金森氏病的特征在于黑质的多巴胺能神经元的进行性损失和纹状体的多巴胺能神经元支配的随后损失。这一通路是自主运动行为所必需的。随着黑质纹状体多巴胺能通路选择性退化，基底核中的多巴胺复发。在神经元损失超过 50-60％以上时，其表现出基本运动症状，即震颤、运动不能、僵直、姿势不稳定和运动徐缓。这些运动症状大部分可通过多巴胺替代几乎完全逆转 (Sian 等人，1999)。在死后的人帕金森氏病大脑的黑质中的神经营养因子分布的研究中，NGF、NT-3 和 NT-4 几乎或完全没有表现出改变，而 GDNF、BDNF 和 CNTF 在帕金森氏病大脑中与年龄相当的对照组相比显著减少；同时 GDNF 消耗明显更多 (Chauhan 等人，2001)。该研究集中于神经纤维网（即在由交织轴突、树突和神经胶质细胞构成的灰质中的神经元之间的致密间隙）中的神经元水平和浓度。明显地，GDNF 在这两个区域中都极大减少，但在神经纤维网中相对较多。没有充分理解帕金森氏病的分子病因学，但似乎涉及 GDNF。

[0011] GDNF 信号传递通过其与两种受体的相互作用介导。活性二聚体首先结合其主要受体 GFRα1，其用于使该配体富集在细胞膜上，所得四聚 (2:2) 复合物随后与同源二聚体受体酪氨酸激酶 RET 相互作用以诱发 RET 磷酸化和形成信号传递复合物。Neuturin、persephin 和 artemin 使用类似的信号转导机制，但这三者各自在靶向 Ret 受体之前结合单独类型 (2-4) 的 GFRα。GFRα 受体通过糖基化磷脂酰肌醇 (GPI) 锚连接到质膜上，但可通过未知的磷脂酶或蛋白酶从细胞表面释放。可溶 GFRα1 也可刺激 RET 磷酸化，但由 GDNF 与膜结合或可溶的 GFRα1 一起引发的下游信号通路不同。

[0012] GDNF 与其相关物一起在运动神经元的存活中、在交感和感觉神经元的发育中和在海马突触发生中起到重要作用。其促进成人脑损伤后的多巴胺能神经元的存活和再生长并且是成人多巴胺神经元的维持和存活所必需的。因此，GDNF 是用于治疗帕金森氏病的有吸引力的靶标。但是，在胚胎发生过程中多巴胺能系统的发育不需要 GDNF、GFRα1 和 Ret。相反，GDNF 或受体的遗传破坏在老年小鼠中造成黑质纹状体系统的加速变性。在帕金森氏病与 GDNF 系统之间没有得出遗传相关性，而几个报告已表明 GDNF 信号传导与注意力缺陷和多动症 (ADHD)(Syed 等人 2007 Am J Med Genet) 和精神分裂症 (Souza 等人 2010 J Psychiatr Res)(Williams 等人 2007 Schizophr Res) 的发展之间的遗传连锁。令人感兴趣的是，腹侧被盖区和伏核中的 GDNF 信号传导增强降低了啮齿动物对精神兴奋药如可卡因的响应和敏感性，表明 GDNF 在对药物滥用的行为响应中起到关键作用。尽管 Ret 是公认的 GDNF 信号传导受体，但许多表达 GFRα1 的细胞不表达 Ret，表明存在另外的 GDNF/GFRα1 受体。

[0013] RET、GFRα1 和 GDNF 敲除小鼠据报道共享明显类似的表型，可能是这三种蛋白质参与相同信号级联的后果。实际上，缺乏 GDNF(Moore 等人，1996)、GFRα1(Cacalano 等人，1998；Enomoto 等人，1998；Tomac 等人，2000) 或 Ret(Durbec 等人，1996；Schuchardt 等人，1994) 的小鼠由于肾发育不全和若干副交感神经元以及整个肠神经系统的缺乏而在出生后死亡。令人惊讶地，除 GFRα1 敲除小鼠的 PNS 和 CNS 中的许多其它神经元集群外的中脑多巴胺能神经元在出生时没有或几乎没有表现出异常 (Tomac 等人，2000)。根据这些敲除报告，尽管衍生自神经元脊 (crest) 的神经元谱系，例如大多数肠神经系统和颈上神经节的正常发育依赖于功能 Ret，但 GDNF、GFRα1 和 RET 看起来没有参与一般而言的神经

元发育，因为据报道在敲除胚胎和新生小鼠中不存在这些神经元 (Durbec 等人，1996)。由于敲除小鼠在出生后不久死亡，未评估耗损后的 CNS 长期后果。采用其它方法研究在婴幼期和成年期的后果。杂合 GFRα1+/- 小鼠存活至成年期并与野生型同窝出生仔畜相比表现出降低的 GDNF- 介导的神经保护，表现为诱发脑缺血。由此表明可达的 GFRα1 水平是 GDNF 效率中的限制因素 (Tomac 等人，2000)。对 GFRα1+/- 杂合子小鼠的研究揭示纹状体中的多巴胺的减少和与运动活性下降相伴的黑质的多巴胺能神经元的年龄相关减少 (Zaman 等人，2008)。区域选择性的 RET 切除造成特别在衰老小鼠的黑质中的巴胺能神经元的进行性损失 (Kramer 等人，2007)。黑质纹状体神经支配的损失间接影响多巴胺能纹状体神经元，以造成纹状体中的神经末梢的显著年龄相关性退化和降低的诱发多巴胺释放水平。RET 因此对维持黑质纹状体多巴胺系统而言是关键的 (Kramer 等人，2007)。同样地，在具有 GDNF 无效突变的中脑多巴胺能神经元的连续出生后发育的研究中使用在中脑中植入了胚胎神经 GDNF-/- 组织的成年野生型小鼠 (Granholm 等人，2000)。GDNF-/- 组织植入造成多巴胺能神经元数量减少和神经突增生，该研究表明，GDNF 对中脑多巴胺能神经元的长期存活而言是关键的 (Granholm 等人，2000)。黑质纹状体多巴胺能系统功能的年龄相关性下降是 GDNF 信号传导通路受损的小鼠共有的，这种表型类似于与帕金森氏病的早期相关的改变。

[0014] GFL-GFRα-RET 内聚性 (cohesiveness) 的指示是成年小鼠的 CNS 中的补充表达模式。在此，表达 RET 的 GDNF 和 NRTN 响应脑区共同表达 GFRα1 或 GFRα2。反之亦然，接收来自表达 GFRα1 或 GFRα2 的神经元的投射的几个区域具有内源性 GDNF 和 NRTN(Golden 等人，1998)。该配对是特异性的，因为 GFL 和相应的 GFRα 敲除小鼠表现出非常类似的表型 (Airaksinen 等人，1999)。但是，关于颈上交感神经节的神经元，GDNF-/-、GFRα1-/- 和 RET-/- 小鼠的表型相冲突。在 RET 敲除小鼠中完全没有这些神经元 (Durbec 等人，1996)；它们在 GDNF-/- 新生小鼠中仅在较低程度上受影响（神经元数量减少 35％）(Moore 等人，1996)，而它们在 GFRα1 敲除小鼠中看起来正常和不受影响 (Enomoto 等人，1998)。这可通过这些神经元中的 GFLs 和 GFRαs 之间的过剩性解释，因为颈上交感神经节神经元取决于对形成、迁移和出生后存活的 ARTN-GFRα3 信号传导 (Nishino 等人，1999)。因此，GFRα3-/- 小鼠能活能育，但表现出眼睑下垂的明显表型。尽管在多种多样的神经节中广泛表达 GFRα3，但 GFRα3- 介导的信号传导在其它 PNS 神经节中不是决定性的 (Nishino 等人，1999)。GFRα2 是几种神经节后副交感神经元发育中的基本因子，且 GFRα2 去除由于失效的胆碱能纤维神经支配而造成泪腺和唾液腺功能障碍以及小肠肌丛（即控制胃肠道运动性的肠神经系统的一部分）缺陷 (Rossi 等人，1999)。GFRα2-/- 小鼠像 GFRα3 敲除小鼠一样可活 (Rossi 等人，1999)，并且没有表现出 CNA 缺陷，尽管在成年 CNS 中遍布表达 NRTN 和 GFRα2(Golden 等人，1998)。在 GFL 或 GFRα 敲除小鼠的 CNS 中仅观察到次要表型的事实可归因于中枢神经元的营养过剩。

[0015] 总之，GDNF、neuturin、artemin 或 persephin 诱发的信号传递故障在功能上或基因上与许多病症，尤其是运动神经元病、感觉再生和神经性疼痛、缺血、癫痫、帕金森氏病、药物滥用和精神分裂症相关联。

[0016] SorLA

[0017] 分选蛋白相关受体，缩写为 SorLA(Swiss prot ID no Q92673)，也被称作 LR11，是 250-kDa 的 1 型膜蛋白和在 Vps10p- 结构域受体家族中确定的第二个成员。这一家

族中的所有受体共有如下结构特征：大约 600- 氨基酸 N- 末端结构域，与构成酵母分选受体 Vps10p 的腔部分的两个结构域的每一个具有强相似性 (Marcusson, Horazdovsky 等人 1994)。在配体中尤其结合神经营养因子和神经肽的 Vps10p- 结构域 (Vps10p-D) (Mazella, Zsurger 等人 1998 ; Munck Petersen, Nielsen 等人 1999 ; Nykjaer, Lee 等人 2004 ; Westergaard, Sorensen 等人 2004 ; Teng, Teng 等人 2005) 构成最初确定的成员 Sortilin 的整个腔部分并通过酶促前肽裂解活化以供配体结合 (Mazella, Zsurger 等人 1998 ; Munck Petersen, Nielsen 等人 1999)。其腔结构域仅由 Vps10p 结构域构成的 SorLA，类似于选蛋白，作为前受体 (proreceptor) 合成，其在晚期高尔基体隔室中被弗林蛋白酶裂解。已经证实，前肽裂解决定了用于神经肽和受体相关蛋白的前肽可抑制结合的 Vps10p 结构域。在 SEQ ID NO 3 中给出 SorLA vps10-p 结构域的序列。已经证实 (Jacobsen, Madsen 等人 2001)，在位于其它腔结构域中的位点发生未受前肽抑制的受体 - 相关蛋白、载脂蛋白 E 和脂蛋白脂肪酶的积极结合。在转染细胞中，在能够介导胞吞作用的细胞表面上表达大约 10％的全长 SorLA。在晚期高尔基体隔室中发现主要受体库并已经表明与新合成的配体的相互作用。在发育过程中和在成年生物中都在遍布神经系统的不同细胞类型中高度表达 SorLA(Kanaki, Bujo 等人 1998 ; Motoi, Aizawa 等人 1999 ; Offe, Dodson 等人 2006)。有趣地是，在散发形式的阿尔茨海默氏症中 SorLA 水平降低 (Scherzer, Offe 等人 2004 ; Dodson, Gearing 等人 2006 ; Sager, Wuu 等人 2007)，且 SorLA 基因中的遗传突变在基因上与迟发性阿尔茨海默氏症相关联 (Rogaeva, Meng 等人 2007)。重要地，SorLA 已显示介导淀粉样前体蛋白的高亲和力结合和分选并提供防止 Aβ 生成 (Andersen, Reiche 等人 2005 ; Offe, Dodson 等人 2006 ; Spoelgen, von Arnim 等人 2006 ; Rogaeva, Meng 等人 2007)。

[0018] 尽管许多药物已可用于治疗神经、精神和行为障碍，但都具有复杂的间接作用机制并旨在减轻症状而非治疗基础病因。相反，通常相信，应开发靶向调节突触可塑性或神经元存活的信号通路的药物作为神经、精神和行为障碍的长期治疗 (Manji, Drevets 等人 2001)。大量实验和临床数据表明 GDNF 信号传导在精神和行为障碍中，笼统而言在神经系统障碍中的中心功能。例如，GDNF 或 GFRα1-3 基因中的多态性与精神分裂症相关，且 GDNF 多态性与注意力缺陷和多动症相关。此外，改变的 GDNF 血清水平与双相障碍相关。

[0019] 帕金森氏病是以归因于所选神经元，主要是致密部和黑质内的中脑多巴胺能神经元的进行性死亡的运动和认知功能受损为特征的神经变性疾病。这造成降低的多巴胺水平 (Davie 2008 中综述)。当前帕金森氏病疗法仅是症状疗法，因为基础的神经元变性仍在继续。这种姑息疗法包括与多巴胺代谢的各种抑制剂联合施用多巴胺激动剂和 LDOPA。GDNF 已显示对多巴胺能神经元具有神经保护和神经再生作用 (Beck 等人 1995 ; Kearns 等人 1995 ; Lin 等人 1993 ; Sauer 等人 1995)，其已被视为对帕金森氏病的一种疗法。在帕金森氏病的 MPTP- 和 6-OHDA- 损伤动物模型中已表现出 GDNF 的积极作用，其中 GDNF 据显示促进中脑多巴胺能神经元的存活 (Gash 等人 1998 ; Tomac 等人 1995)。脑内 GDNF 注入帕金森病猕猴的实验揭示帕金森氏病的三种主要症状，即运动徐缓、僵直和姿势不稳的显著缓解 (Gash 等人，1996)。GDNF 接受者具有中脑多巴胺能神经元的显著增强的多巴胺水平、纤维密度和细胞尺寸，且明显地，黑质中的多巴胺能神经元数量提高。GDNF 疗法的问题是递送，因为 GDNF 难以渗透血脑屏障。在帕金森氏病啮齿动物和猴子中尝试基因疗法，具有积极结果 (Zurn 等人，2001)。通过包囊的基因工程细胞系递送的 GDNF 导致持续释放低水平

GDNF 和随后保护黑质多巴胺能神经元和行为复原。此外，通过慢病毒载体体系递送 GDNF 表明黑质的神经元的再生，以致帕金森氏病的功能缺陷逆转。但是，作为帕金森氏病疗法测试 GDNF 的临床试验结果具有不同结果。脑室内输注 GDNF 没有在帕金森氏病患者中产生症状益处并与许多不良副作用，包括恶心、幻觉和抑郁相关联 (Nutt 等人 2003)。而将 GDNF 施用到纹状体中与显著的临床益处相关联 (Gill 等人 2003)，但是，在双盲的安慰剂对照试验中不能证实这些结果 (Lang 等人 2006)。尽管临床试验由于获得不同结果而是非结论性的，但 GDNF 仍被视为帕金森氏病的潜在疗法，但必须克服几个障碍。这些包括 GDNF 的递送 ：其需要穿透血脑屏障，GDNF 需要扩散到适当的靶并且必须使非靶递送的效应最小化以降低不良副作用。

[0020] 发明概述

[0021] 本发明涉及通过调节 SorLA 与 GDNF- 家族配体受体，如 GFRα1、2、3 和 / 或 4 受体之间的相互作用来提高神经元，如多巴胺能神经元的存活的方法。根据一个实施方案，可通过调节或抑制 SorLA 与 GFRα1 之间的相互作用来提高需要其的患者脑中的 GDNF 细胞外水平，或抑制 GDNF 的内化和 / 或退化。

[0022] 本发明特别涉及一种方法，其中用于调节 SorLA 与 GDNF- 家族配体受体之间的相互作用的试剂选自蛋白质、肽、抗体或小有机化合物。

[0023] 本发明还涉及包含与一种或多种可药用载体或稀释剂结合或与佐剂结合的这样的试剂的药物组合物。

[0024] 另外，本发明涉及这样的试剂或药物组合物用于提高特别是在包括如下疾病中的神经元，例如多巴胺能神经元的存活的用途 ：损伤诱导的神经细胞死亡、脊髓损伤、周围神经损伤、脑缺血、运动神经元病、肌萎缩性侧索硬化、慢性疼痛、神经性疼痛、癫痫、癌症、帕金森氏病、重度抑郁症、精神分裂症、注意力缺陷和多动症 (ADHD)、药物滥用、焦虑障碍、和 / 或双相障碍 (躁郁症)。

[0025] 最后，本发明涉及用于确定能够抑制 SorLA 与 GDNF- 家族配体受体之间的相互作用的试剂的各种检测法。

[0026] 附图简述

[0027] 图 1. GDNF 家族配体信号传导

[0028] 图 2. Vps10p- 结构域受体的域结构

[0029] 图 3. SorLA 选择性结合 GDNF 而非其它 GDNF- 家族配体

[0030] (A) 描绘 SorLA 的域结构。(B)GDNF 以如 SPR 所示的浓度依赖性方式结合到固定化 SorLA 上。计算出的 KD 为 3-8nM。(C)SorLA 选择性结合到 GDNF 而非其它 GDNF 家族配体 artemin、neuturin 和 persephin 上。所用神经营养因子浓度为 20nM。(D) 由 GDNF 的成熟部分而非 GDNF 前肽 (GDNFpro) 介导该相互作用。显示 100nM 配体浓度的感应图。(E) 过量 SorLA 前肽 (SorLApro, 10μM) 部分抑制 GDNF 结合 (100nM)。(F) 过量神经降压素 (NT, 20μM) 完全抑制 GDNF 的结合 (50nM)。(G-H) 通过 293 细胞或稳定表达 SorLA 的 293 细胞内化 50nM GDNF。内化的 GDNF(绿色) 通过免疫荧光法直观化。(I) 通过过量神经降压素 (NT, 20μM) 抑制 GDNF 内化。

[0031] 图 4. SorLA 和 GFRα1 协同吸收 GDNF

[0032] (A) 通过免疫荧光法目测 SorLA 在 45 分钟期间内化的 GDNF(50nM)。但是，使用

10nM GDNF 无法检测出内化。GDNF(50nM) 没有被表达 GFRα1 的细胞内化，而是保持结合在表面上。(B) 表达 SorLA 和 GFRα1 的细胞将 GDNF 内化至很大程度。(C)SorLA 和 GFRα1 从表面内化 GDNF(10nM) 的过程的时间进程。

[0033] 图 5.SorLA 和 GFRα1 形成细胞表面 GDNF 受体复合物

[0034] (A) 如 SorLA 与来自表达这两种受体的细胞的 GFRα1 的共免疫沉淀所示，SorLA 直接与细胞中的 GFRα1 相互作用。(B) 使用抗胞外域的抗体和荧光标记第二抗体，非透化固定细胞中的SorLA(接受体)与GFRα1(供体)之间的细胞表面相互作用的荧光共振能量转移 (FRET) 分析。显示出代表性细胞。(C) 细胞表面 SorLA/GFRα1 复合物形成是高度特异性的。在所有 FRET 通道图中在尺寸为 5x5 像素的感兴趣区域 (ROI) 内计算平均 E_{app}% 值并作为 ROIs 的相应平均接受体信号的函数绘图。E_{app}% 对接受体信号的接近恒定的依赖性表明特异性相互作用。(D) 显示 E_{app}% 值的正态分布的直方图，SorLA/GFRα1 相互作用的平均值为 16%（黑色直方图）。为了比较，在稳定转染的细胞中测量 SorLA 和 Ret 的 E_{app}% 值（灰色直方图）。平均 E_{app}% 值为 6%，表明潜在的 SorLA/Ret 相互作用不是特异性的。(E) GFRα1 以浓度依赖性方式结合到固定化 SorLA 胞外域上，KD 为大约 6nM。(F)GFRα1 而非 Ret 胞外域（各 200nM) 与 SorLA 的特异性相互作用。(G) 与 SorLA/GDNF 相互作用不同，过量神经降压素 (NT,20μM) 没有抑制通过 SorLA 结合 GFRα1(200nM)。(H) 过量 SorLA 前肽 (5μM) 抑制 GFRα1(200nM) 结合到 SorLA 上。

[0035] 图 6. 通过 SorLA 逆行分选 GFRα1/GDNF

[0036] (A)GFRα1(绿色) 在 SorLA 存在下随时间经过从细胞表面内化。(B)GDNF 的存在看起来增强该内化。(C) 单独的 GFRα1 在实验过程中没有内化。(D)SorLA/GFRα1 相互作用在低 pH 下稳定，表明该复合物在内体 pH 下存留。(E) 如 50nM GDNF 和 50nM GFRα1 与固定化 SorLA 的结合的 SPR 分析所示，SorLA/GDNF 和 SorLA/GFRα1 不是竞争性相互作用。

[0037] 图 7.SorLA 调节 GFRα1 亚细胞定位

[0038] (A)SorLA 的存在造成 GFRα1 在稳定转染的细胞中的更多囊泡状定位。(B) 表面生物素化实验，其显示表面局域化的 GFRα1 在表达 SorLA 的细胞中的减少。(C) 如通过蔗糖梯度离心评估，SorLA 降低含有 flotilin(脂质筏标记物) 的级分中的 GFRα1 的相对量。

[0039] 图 8.SorLA 破坏 Ret 表面群集

[0040] (A) 如平衡梯度离心所示，SorLA 的过量表达改变内源性 Ret 在 SY5Y 成神经细胞瘤细胞中的亚细胞定位。(B) 非透化的分化 SY5Y 细胞的 Ret 染色，表明在野生型 SorLA 过量表达时，而非通过 SorLA deltatail 的过量表达，表面局域化的 Ret 簇的存在消失。(C) 表达内源性 Ret 和一些 SorLA、过量表达野生型 SorLA 或缺乏胞质尾区的 C- 末端截断的 SorLA 变体 (SorLA deltatail) 的分化成神经细胞瘤 (SY5Y) 细胞的免疫荧光染色。在非转染细胞中，在强染色的分散簇中观察到内源性 Ret。但是，SorLA 过量表达完全破坏 Ret 群集。SorLA 胞质尾区的截断恢复 Ret 群集。

[0041] 图 9.SorLA 调节 Ret 信号传导和下游功能

[0042] (A) 用 6nM GDNF+/-6nM 可溶 GFRα1 刺激 SY5Y 成神经细胞瘤细胞 0、15 和 45 分钟。Ret 使用抗 -Ret 抗体免疫沉淀并通过使用抗 - 磷酸酪氨酸抗体的免疫印迹法分析。(B) 使用过量表达 SorLA 的成神经细胞瘤细胞的类似实验。(C) 在实验过程中通过 10μg/ml 抗 -SorLA 抗体的存在恢复 Ret 磷酸化的 SorLAs 抑制。(D) 通过过量前肽 (SorLApro)

的存在抑制内源性 SorLA 提高了成神经细胞瘤细胞的存活，而过量表达 (SorLA) 造成降低的存活。(E) 通过过量前肽抑制 SorLA 提高了成神经细胞瘤细胞的增殖。(F)SorLA 的过量表达抑制了 GDNF 诱导的而非视黄酸 (RA) 诱导的神经突增生。

[0043] 图 10.SorLA 调节脑中各处的 GFRα1 和 Ret 亚细胞定位

[0044] (A) 免疫印迹法显示，SorLA 在年轻和年老小鼠的整个中枢神经系统中表达。(B) 显示在围绕皮层各处的神经元胞体的囊泡中的 SorLA 存在的免疫组织化学。(C) 通过来自野生型或 SorLA-/- 小鼠的脑匀浆的蔗糖梯度离心评估的 SorLA-/- 脑中的 GFRα1 的改变的亚细胞定位。(D) 显示 SorLA-/- 脑中的 Ret 的改变的亚细胞定位的类似实验。

[0045] 图 11.SorLA 是 GFRα 的一般分选受体

[0046] (A) 用 GFRα1-4 如所示短暂转染稳定表达 SorLA 的细胞，其随后分别使用抗 -GFRα1、-2、-3 和 -4 免疫沉淀，接着使用抗 -SorLA 进行免疫印迹法。(B)GFRα2(绿色) 在 SorLA 存在下的逆行分选。(C) 使用蔗糖梯度离心评估的 SorLA-/- 脑中的 GFRα2 的改变的亚细胞定位。

[0047] 图 12.SorLA 抑制提高 GDNF- 诱导的多巴胺能神经元存活

[0048] (A) 对黑质的免疫组织化学，其显示 SorLA(绿色) 在多巴胺能神经元 (红色) 中的存在。(B) 在神经胶质细胞层上生长的多巴胺能神经元 (红色) 的原代培养物。在神经胶质和神经元中都表达 SorLA。(C)SorLA 和 GDNF 在原代多巴胺能神经元的神经元和神经胶质中的共定位。(D)SorLA 和 GFRα1 在原代多巴胺能神经元的神经元和神经胶质中的共定位。(E) 原代多巴胺能神经元的存活需要 GDNF 并受抗 -SorLA 抗体促进。

[0049] 图 13.SorLA-/- 小鼠表现出机能亢进和对安非他明的不敏感性

[0050] (A) 在旷场测试时 SorLA-/- 小鼠过度活跃。年龄逆转过度活跃。(B) 年轻和年老 SorLA-/- 小鼠在旷场中在 20 分钟过程中的轨迹图。(C)SorLA-/- 小鼠对 10mg/kg 安非他明不敏感。(D) 在注射盐水或安非他明后幼年 (小于 8 周大) 野生型和 SorLA-/- 小鼠在旷场中在 40 分钟过程中的轨迹图。(E) 在注射盐水或安非他明后成年 (大于 12 周大) 野生型和 SorLA-/- 小鼠在旷场中在 40 分钟过程中的轨迹图。

[0051] 图 14.SorLA-/- 小鼠表现出提高的冒险行为和注意力缺陷

[0052] (A) 在高架十字迷宫中测试时 SorLA-/- 小鼠过度活跃。(B)SorLA-/- 小鼠在高架十字迷宫中的臂之间进行更多离开次数。(C) 与在臂之间的总离开次数相比，SorLA-/- 小鼠增加开臂中的进入次数。(D)SorLA-/- 小鼠在开臂中度过的时间百分比提高。(E) 野生型 (n = 23) 和 SorLA-/-(n = 12) 小鼠从高架十字迷宫上的跌落次数。(F) 在高架十字迷宫中测试 10 分钟的野生型和 SorLA-/- 小鼠的轨迹图。

[0053] 图 15. 描述通过 SorLA 逆行分选 GDNF 受体的假想模型

[0054] 图 16.GFRα1 结构域 1 的截断导致对 SorLA 降低的亲和力。

[0055] (A) 可溶全长 GFRα1(sGF Rα1 FL) 以浓度依赖性方式结合到 SorLA 上，估计的 Kd = 12nM。(B)GFRα1 由三个同源结构域构成。缺乏与结构域 1 对应的序列拉伸的 N- 末端截断的可溶 GFRα1 变体 (s GFRα1Δ 结构域 1) 结合固定化 SorLA，Kd = 120nM。

[0056] 图 17. 成熟 GDNF 的 N- 末端 38 氨基酸结合到 SorLA 上

[0057] (A)GST 与 GDNF 前肽 (GDNFpropep)、成熟 GDNF 的 N- 末端 38 氨基酸 (GDNFN-term) 或成熟 GDNF 的前 38 个氨基酸之前的 GDNF 前肽 (GDNFN-term propep) 之间的融合蛋白结

合到固定化 SorLA 上。包括单独的 GST 作为阴性对照。(B) 包含成熟 GDNF 的前 38 个氨基酸的肽以浓度依赖性方式结合到 SorLA 上。

[0058] 图 18. SorLA 是 CNS 中的 GDNF 内化受体

[0059] (A) 皮质神经胶质细胞的原代培养物表达高水平的 SorLA。(B)GDNF(10nM,15min) 被来自野生型而非 Sorl1-/- 小鼠的神经胶质细胞内化。

[0060] 图 19. GDNF,而非 GFRα1 被分类为是造成退化的溶酶体

[0061] (A) 溶酶体退化的抑制提高表达 SorLA 和 GFRα1 的细胞中的内化 GDNF 水平。(B-C) 如通过代谢标记和接着脉冲追踪分析评估的在不存在或存在 SorLA 的情况下的 GFRα1 的逆转 (Turnover)。

[0062] 图 20. SorLA 敲除小鼠中的提高的 GDNF 水平

[0063] 在来自野生型和 Sorl1 敲除小鼠的组织中通过 ELISA 测得的 GDNF 水平。GDNF 在敲除动物的 VTA 和纹状体中增加 ($P = 0.01$, $n = 3$;各自包含三个动物的库)。

[0064] 图 21. 通过 SorLA 功能阻断抗体抑制 GDNF 内化和退化。(A) 表达 GFRa1 和 SorLA 的 293 细胞用非特异性兔 IgG(10ug/ml) 预培养 2 小时,随后用 GDNF(10nM) 和兔 IgG 培养 15 分钟。细胞随后使用 GDNF 抗体和荧光标记的第二抗体固定和染色。(B) 使用针对 SorLA 胞外域产生的兔多克隆抗体的类似实验。抗 -SorLA IgG 的存在提高表面 GDNF 免疫荧光。

[0065] 发明详述

[0066] 定义

[0067] 佐剂 :其与施用的免疫原决定簇 / 抗原的混合物提高或改变对所述决定簇的免疫响应的任何物质。

[0068] 亲和力 :配体与其结合位点的相互作用可以以结合亲和力表征。通常,高亲和力配体结合源于配体与其受体之间的较大分子间力,而低亲和力配体结合涉及配体与其受体之间的较小分子间力。通常,高亲和力结合涉及比低亲和力结合的情况中配体在其受体结合位点的较长停留时间。当一些结合能可用于造成受体中的构象变化时,配体与受体的高亲和力结合通常在生理学上重要,以致相关离子通道或酶的行为改变。可结合到受体上、改变受体的功能并引发生理学响应的配体被称作该受体的激动剂。可以就可引发多少生理学响应和产生该生理学响应所需的激动剂浓度表征激动剂与受体的结合。高亲和力配体结合意味着相对较低的配体浓度足以最大占据配体结合位点和引发生理学响应。低亲和力结合意味着在最大占据结合位点并实现对配体的最大生理学响应之前需要相对较高的配体浓度。常常就占据一半受体结合位点时的配体浓度 (被称作离解常数 (kd)) 表征配体结合。亲和力也是受体与它们的配体之间,例如抗体与其抗原之间的结合强度。

[0069] 激动剂 :激动剂是能够提高或实现受体活性的化合物。

[0070] 拮抗剂 :拮抗剂在这种情况下与抑制剂同义。拮抗剂是能够降低效应物,如受体的活性的化合物。

[0071] 具体而言,对 SorLA 或 GDNF- 家族配体受体 (GFRα1-4) 的激动剂或拮抗剂可结合至它们的胞外域,例如介导 SorLA 与 GDNF- 家族配体受体 (例如如 SEQ ID NO 5 或 7 中给出) 之间的特异性结合的结构域。能够调节 SorLA 与 GDNF- 家族配体受体之间的相互作用的试剂可包括 SorLA 或 GDNF- 家族配体受体的可溶片段、针对各受体的抗体、天然结合伴侣,如 GDNF 或神经降压素、或合成小有机化合物。

[0072] 抗体：本文所述的术语“抗体”包括全抗体和任何抗原结合片段（即“抗原结合部分”）或其单链。

[0073] “全抗体”是指包含通过双硫键互连的至少两个重（H）链和两个轻（L）链的糖蛋白，或其抗原结合部分。各重链由重链可变区（在本文中缩写为V_H）和重链恒定区（在本文中缩写为C_H）构成。各轻链由轻链可变区（在本文中缩写为VL）和轻链恒定区（在本文中缩写为C_L）构成。V_H和V_L区可进一步细分成高变区，被称作互补决定区（CDR），散布着较保守的区域，被称作构架区（FR）。各V_H和V_L由以下列次序从氨基末端到羧基末端排列的三个CDR和四个FR构成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白结合至宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞（例如效应细胞）和经典补体系统的第一成分（C1q）。

[0074] 本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”是指保留了特异性结合抗原的能力的一个或多个抗体片段。已经显示，可通过全长抗体的片段实施抗体的抗原结合功能。术语抗体的“抗原结合部分”中包含的结合片段的实例包括（i）Fab片段——由V_L、V_H、C_L和C_{H1}结构域构成的一价片段；（ii）F（ab’）2片段——包含通过铰链区处的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段；（iii）由V_H和C_{H1}结构域构成的Fd片段；（iv）由抗体的单臂的V_L和V_H结构域构成的Fv片段；（v）由V_H结构域构成的dAb片段（Ward等人.，（1989）Nature 341:544-546）；（vi）分离的互补决定区（CDR），和（vii）可任选通过合成接头连接的两个或更多个分离的CDR的组合。此外，尽管Fv片段的两个结构域V_L和V_H通过分开的基因编码，但它们可使用重组法通过能使它们形成单蛋白质链的合成接头连接，其中V_L和V_H区成对形成一价分子（被称作单链Fv（scFv）；参见例如Bird等人（1988）Science 242:423-426；和Huston等人（1988）Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883）。这样的单链抗体也意在包含在术语抗体的“抗原结合部分”中。

[0075] 抗原结合结构域的另一实例是免疫球蛋白融合蛋白，其包含（i）融合到免疫球蛋白铰链区多肽上的结合结构域多肽，（ii）融合到铰链区上的免疫球蛋白重链CH2恒定区，和（iii）融合到CH2恒定区上的免疫球蛋白重链CH3恒定区。该结合结构域多肽可以是重链可变区或轻链可变区。在US 2003/0118592和US 2003/0133939（它们全文经此引用并入本文）中进一步公开了这样的结合结构域免疫球蛋白融合蛋白。

[0076] 使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段，并筛选片段以与完整抗体相同的方式使用。

[0077] 术语“表位”是指能特异性结合抗体的蛋白质决定簇。表位通常由如氨基酸或糖侧链之类的分子的化学活性表面组构成，并通常具有特定的三维结构特性以及特定的电荷特性。构象和非构象表位的区别在于，在变性溶剂存在下损失与前者而非后者的结合。

[0078] 本文所用的术语“人抗体”意在包括具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可包括不是通过人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如在体外通过随机或位点专一诱变或在体内通过体细胞突变引入的突变）。但是，本文所用的术语“人抗体”无意包括其中衍生自另一哺乳动物物种（如小鼠）的种系的CDR序列已接枝到人构架序列上的抗体。

[0079] 本文所用的术语“重组人抗体”包括通过重组手段制备、表达、创建或分离的所有人抗体，如（a）从针对人免疫球蛋白基因转基因或转染色体动物（例如小鼠）或由其制备

的杂交瘤中分离出的抗体，(b) 从转化表达抗体的宿主细胞中，例如从转染瘤中分离出的抗体，(c) 从重组、组合人抗体库中分离出的抗体，和 (d) 通过涉及人免疫球蛋白基因序列剪接成其它 DNA 序列的任何其它手段制备、表达、创建或分离的抗体。这样的重组人抗体具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区。但是，在某些实施方案中，可以对这样的重组人抗体施以体外诱变（或在使用针对人 Ig 序列转基因的动物时，体内体细胞诱变），也称作亲和力成熟，因此重组抗体的 V_H 和 V_L 区的氨基酸序列是尽管衍生自人种系 V_H 和 V_L 序列并与人种系 V_H 和 V_L 序列相关但可能并非在体内天然存在于人抗体种系清单 (germline repertoire) 中的序列。

[0080] 本文所用的“特异性结合”是指抗体结合至预定抗原 / 表位。通常，在 FACS 中基于 IC_{50} 值作为表观亲和力测量时，抗体以相当于大约 10^{-7}M 或更小，如大约 10^{-8}M 或更小，如大约 10^{-9}M 或更小、大约 10^{-10}M 或更小、或大约 10^{-11}M 或甚至更小的 K_D 的亲和力结合，并以相当于比其与除预定抗原或密切相关抗原以外的非特异性抗原（例如 BSA，酪蛋白）的结合亲和力低至少 10 倍，如至少 100 倍的 K_D 的亲和力结合至预定抗原。

[0081] 抗体种类：根据它们的重链的恒定域的氨基酸序列，可以将免疫球蛋白归为不同种类。免疫球蛋白有至少五个主类：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，其中几种可进一步分成亚类（同种型），例如 IgG-1、IgG-2、IgG-3 和 IgG-4；IgA-1 和 IgA-2。与不同种类的免疫球蛋白对应的重链恒定域分别被称作 alpha(a)、delta(d)、epsilon(e)、gamma(g) 和 mu(μ)。可以根据它们的恒定域的氨基序列将抗体的轻链归为两个明显不同的类型之一，被称作 kappa(k) 和 lambda(l)。不同种类的免疫球蛋白的亚单位结构和三维构象是公知的。

[0082] 嵌合抗体：其中可变区来自一种动物物种且恒定区来自另一动物物种的抗体。例如，嵌合抗体可以是具有衍生自小鼠单克隆抗体的可变区和人恒定区的抗体。

[0083] 互补决定区或 CDR：抗体的 V- 结构域中的区域，它们一起形成抗体识别和结合结构域。

[0084] 恒定区或恒定域或 C- 域：恒定区是包含给定同种型内的其中可含有保守置换的氨基酸残基序列的抗体分子的那些结构部分。示例性的重链免疫球蛋白恒定区是本领域中被称作 CH1、CH2、CH3、CH4 和 CH5 的那些免疫球蛋白分子部分。示例性的轻链免疫球蛋白恒定区是本领域中被称作 CL 的免疫球蛋白分子部分。

[0085] 人抗体构架：具有衍生自人免疫球蛋白的抗原结合位点和该分子的基本所有其余免疫球蛋白衍生部分的分子。

[0086] 人源化抗体构架：具有衍生自来自非人物种的免疫球蛋白的抗原结合位点的分子，而该分子的一些或所有其余免疫球蛋白衍生部分衍生自人免疫球蛋白。抗原结合位点可包含：融合到一个或多个人恒定域上的来自非人免疫球蛋白的完整可变域；或接枝到可变域中的适当的人构架区上的一个或多个互补决定区 (CDR)。在人源化抗体中，CDR 可来自小鼠单克隆抗体，且该抗体的其它区域来自人。

[0087] 免疫球蛋白：血清抗体，包括 IgG、IgM、IgA、IgE 和 IgD。

[0088] 免疫球蛋白同种型：对具有不同 H 链的 Ig 的命名，名称是 IgG(IgG1,2,3,4)、IgM、IgA(IgA1,2)、sIgA、IgE、IgD。

[0089] 免疫学不同 (Immunologically distinct)：术语免疫学不同是指能够在两种多肽之间区分抗体特异性结合多肽之一且不特异性结合另一多肽的能力。

[0090] 单克隆抗体：各种语法形式的短语单克隆抗体是指仅含一种能与特定抗原免疫反应的抗体结合位点的抗体分子群。单克隆抗体因此通常对与其免疫反应的任何抗原表现出单一结合亲和力。单克隆抗体可含有具有多个抗体结合位点（各自对不同抗原有免疫特异性）的抗体分子，例如双特异性单克隆抗体。

[0091] 多克隆抗体：多克隆抗体是识别特异性的给定抗原的抗体分子的混合物，因此多克隆抗体可识别所述抗原内的不同表位。

[0092] 结合：术语“结合”或“与 ... 缔合”是指化学体或化合物或其部分之间的邻近状况。该缔合可以是非共价的，其中通过氢键合或范德华或静电相互作用积极促进该并置，或其可以是共价的。

[0093] 结合位点：本文所用的术语“结合位点”或“结合袋 (binding pocket)”是指由于其形状而有利地与另一分子、分子复合物、化学体或化合物缔合的分子或分子复合物的区域。本文所用的袋包括至少深腔，和任选浅腔。

[0094] 片段：本发明的多肽片段，包括其任何功能等同物，在一个实施方案中可包含少于 30 个氨基酸残基，例如少于 25 个氨基酸、少于 15 个氨基酸或甚至少于 10 个氨基酸。因此，片段被认为可例如分别包含大约 2 至大约 30 个氨基酸，或大约 2 至大约 25、大约 15 或大约 10 个氨基酸。

[0095] GDNF- 家族配体受体旨在包括名为 GFR α 1、2、3 和 / 或 4 的受体。该定义还包括其同种型，和如果规定，如例如 SEQ ID NO 4 至 12 中规定的其片段或结构域。

[0096] SorLA旨在包括如例如 SEQ ID NO 1 至 3 中规定的 SorLA 受体或其片段或结构域。

[0097] 同源性：可以使用公知的评分矩阵，如 BLOSUM 30、BLOSUM 40、BLOSUM 45、BLOSUM 50、BLOSUM 55、BLOSUM 60、BLOSUM 62、BLOSUM 65、BLOSUM 70、BLOSUM 75、BLOSUM 80、BLOSUM 85 和 BLOSUM 90 中的任一种计算氨基酸序列之间的同源性。

[0098] 配体：能与（第二）生物分子结合和形成复合物以发挥生物用途的物质、化合物或生物分子，如包括受体的蛋白质。在较窄义上，其是通过分子间力，如离子键、氢键和范德华力结合到靶蛋白上的位点上的信号触发分子。该对接（缔合）通常可逆（离解）。配体与其靶分子之间的实际不可逆共价结合在生物系统中罕见。与金属有机和无机化学中的含义不同，配体是否结合在金属位置是无关的，因为这是血红蛋白中的情况。配体与受体的结合可改变化学构象，即受体蛋白的三维形状。受体蛋白的构象状态决定受体的功能状态。结合的倾向或强度被称作亲和力。配体包括底物、抑制剂、活化剂、非自体受体、共受体和神经递质。放射性配体是放射性同位素标记的化合物并体内用作 PET 研究中的示踪剂和用于体外结合研究。

[0099] 药剂：术语“药剂”或“药物”或“药品”或“试剂”是指可用于治疗（包括预防、诊断、减轻或治愈）患者的病状、病痛、病症、疾病或损伤的任何治疗或预防剂。在术语药剂或药物的含义内可包括治疗有用的遗传决定子、肽、多肽和多核苷酸。如本文中定义，“治疗剂”、“药剂”或“药物”或“药品”或“试剂”是一种类型的生物活性剂。

[0100] 药物组合物：或组合物是指在适当施用于患者时能够引发所需治疗效果的任何化学或生物材料、化合物或组合物。

[0101] 多肽：本文所用的术语“多肽”是指包含至少两个氨基酸的分子。该氨基酸可以是天然或合成的。

[0102] 术语“多肽”也旨在包括蛋白质，即包含至少一个多肽的功能生物分子；在包含至少两个多肽时，这些可形成复合物、共价连接或非共价连接。

[0103] 序列同一性：在一个实施方案中使用包含至少 25 个连续氨基酸并具有与所涉蛋白质的氨基酸序列至少 80％，如 85％，例如 90％，如 95％，例如 99％相同的氨基酸序列的片段测定序列同一性，其中在 Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0 中使用默认缺口权重 (default gap weights) 用算法 GAP、BESTFIT 或 FASTA 测定同一性百分比。

[0104] 本发明提供了 SorLA- 独立于 GDNF- 以明显高的亲和力结合 GFRα1 且这两者从转染细胞中有效共沉淀的证据（图 6）。在细胞中共表达时，SorLA 传达 GFRα1 的内化和下调，并介导其逆向运输至核周 (Golgi-) 隔室，由此避免溶酶体退化（图 6）。明显地，使用 GFRα2、3 和 -4 的类似结果表明，SorLA 可以与所有 GFRα 类型相互作用，且下述功能含义实际上不仅可涉及 GDNF，还涉及 neuturin、persephin 和 artemin。此外，SorLA 的表达显著影响 Ret 信号传导的 GDNF 诱导，即在响应提高的 GDNF 浓度的 Ret 和 GFRα1 阳性细胞中，SorLA 的过量表达显著抑制 Ret 磷酸化（图 9）。在成神经细胞瘤细胞和培养的神经元上进行的功能研究与这些结果一致。因此，SorLA 的存在阻碍 GDNF 诱导的成神经细胞瘤细胞的存活、增殖和分化（图 9），并且当 SorLA 在功能上被抗 -SorLA 抗体阻断时，GDNF 诱导的原代多巴胺能神经元存活显著增强（图 12）。

[0105] 本发明人因此提出 SorLA 与 GDNF- 家族配体受体，如 GFRα1 之间的相互作用是 GDNF 信号传导中的关键调节要素，以及靶向 GDNF- 家族配体受体和 / 或 SorLA 中的负责结合位点的药物（肽、蛋白质、合成、小有机化合物）可用于通过消除 GDNF- 家族配体受体与 SorLA 的结合来促进或阻碍 GDNF 功能。本发明因此涉及阻碍或减少成神经细胞瘤细胞的存活、增殖和分化并在另一实施方案中提高神经元，例如多巴胺能神经元的存活的方法。

[0106] 设想可以使用能够调节 SorLA 与 GDNF- 家族配体受体之间的相互作用的这些试剂或药物治疗各种疾病，且其中逆转或减少神经元损失，例如多巴胺能神经元的损失，和 / 或其中减少成神经细胞瘤细胞的分化、增殖和 / 或存活。这些疾病和损伤包括神经细胞死亡、脊髓损伤、周围神经损伤、脑缺血、运动神经元病、肌萎缩性侧索硬化、慢性疼痛、神经性疼痛、癫痫、癌症、帕金森氏病、重度抑郁症、精神分裂症、注意力缺陷和多动症 (ADHD)、药物滥用、焦虑障碍和 / 或双相障碍（躁郁症）。

[0107] 本发明人表明，GFRα：SorLA 复合物的靶向作用代表用于体内治疗 GFL- 表型（包括行为表型，如 ADHD 和帕金森氏病）的全新方法。这样的策略与上述进行中的临床和临床前试验相比具有许多优点。例如，代替直接递送～ 36kDa GDNF 家族配体二聚体，本发明人提议生成穿透血脑屏障并特异性调节 SorLA 与 GFRα 受体之间的相互作用的小分子激动剂或拮抗剂，由此提高内源性 GDNF 家族配体的生物活性。

[0108] 不同试剂可被认为对 SorLA 与 GDNF- 家族配体受体相互作用具有这些调节剂作用。具体而言，用于调节 SorLA 与 GDNF- 家族配体受体之间的相互作用的试剂选自蛋白质、肽、抗体或小有机化合物。

[0109] 该试剂可包含 SorLA 的胞外域 (SEQ ID No 1)、其同种型或其片段。通过将这种多肽施用于对象，会发生在成神经细胞瘤细胞或神经元，例如多巴胺能神经元上发现的 GDNF- 家族配体受体之间的竞争，由此抑制相互作用。可以考虑与 GDNF- 家族配体受体具有亲和力的若干片段，特别是具有大约 600 个氨基酸的 SorLa 的 N- 末端，其包含 SorLA 的

N- 末端 Vps10p- 结构域 (SEQ ID NO 3)。本发明的发明人另外展示，SorLA 前肽 (SEQ ID NO 2) 有效抑制这种相互作用。

[0110] 可以在不阻碍与 GDNF- 家族配体受体的结合的情况下对 SorLA 的胞外域做出各种修改。因此具有与 SEQ ID NO 1、2 或 3 至少 80％序列同一性，如与 SEQ ID NO 1、2 或 3 至少 85％、90％、95％或 98％序列同一性的多肽被认为能对该相互作用产生类似或相关的影响。

[0111] 该试剂或药物当然也可选自 GDNF- 家族配体受体的胞外域，包括 GFRα1-4 受体、其同种型或其片段。具体而言，如 SEQ ID 4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 中定义的序列或其片段。SEQ ID NO 7 是与 SorLA 的结合位点，包含这种序列的肽特别优选。

[0112] 具有与 SEQ ID 4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 至少 80％序列同一性，如与 SEQ ID 4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 至少 85％、90％、95％或 98％序列同一性的序列被认为对该相互作用产生类似或相关的影响。

[0113] 还已经表明，神经降压素也能抑制这种相互作用。因此根据一个实施方案，可以使用神经降压素 (SEQ ID 13) 或如 SEQ ID 14 或 15 中定义的其片段。

[0114] 根据本发明的另一实施方案，该蛋白质是 GDNF，其是与 GDNF- 家族配体受体 GFRα1 的天然结合伴侣。因此本发明还涉及 GDNF、其片段或其同种型。该 GDNF 蛋白可包含序列 SEQ ID NO 16 或 18。根据另一实施方案，该蛋白质具有与 SEQ ID NO 16 或 18 至少 80％序列同一性，如与 SEQ ID NO 16 或 18 至少 85％、90％、95％或 98％序列同一性。

[0115] 还已经表明，该前肽能调节 SorLA 与 GDNF- 家族配体受体，特别是 GFRα1 之间的相互作用。因此根据一个实施方案，该蛋白质包含如 SEQ ID NO 17 中定义的 GDNF 的前肽或具有与 SEQ ID NO 17 至少 80％序列同一性，如与 SEQ ID NO 17 至少 85％、90％、95％或 98％序列同一性的蛋白质。

[0116] 本发明人进一步发现，SorLA-/- 转基因小鼠表现出以注意力缺陷和过度活跃为特征的行为表型 (图 14)，表明改变的多巴胺能活性和类似 ADHD 的表型。使用 wt 和转基因小鼠的安非他明治疗的初步实验支持这一假说，因为 SorLA-/- 小鼠看起来对安非他明不敏感。

[0117] 根据一个具体实施方案，本发明涉及通过调节或抑制 SorLA 与 GFRα1 之间的相互作用，例如通过抑制 GDNF 的内化和 / 或退化来提高需要其的患者脑中的 GDNF 的细胞外水平的方法。

[0118] 这种方法被认为可通过调节 SorLA 与 GFRα1 之间的相互作用来提高神经元，如多巴胺能神经元的存活，因此适合治疗疾病，如损伤诱导的神经细胞死亡、脊髓损伤、周围神经损伤、脑缺血、运动神经元病、肌萎缩性侧索硬化、慢性疼痛、神经性疼痛、癫痫、癌症、帕金森氏病、重度抑郁症、精神分裂症、注意力缺陷和多动症 (ADHD)、药物滥用、焦虑障碍和 / 或双相障碍 (躁郁症)。

[0119] 适合调节或抑制 SorLA 与 GFRα1 之间的相互作用的试剂是针对 SorLA 或 GFRα1 的抗体。这种抗体优选结合包含例如结合位点，如SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:7 的 GFRα1 和 / 或 SorLA 的胞外域。

[0120] 该抗体可以是多克隆或单克隆的，如人源化、嵌合或单链抗体。

[0121] 抗体

[0122] 可以使用含有感兴趣的小肽作为免疫抗原的完整多肽或片段制备本发明的结合相同受体靶，如 SorLA 或 GDNF- 家族配体受体，如 GFRα1-4 的抗体。用于使动物免疫的多肽可通过重组 DNA 技术或通过化学合成获得并可任选与载体蛋白缀合。

[0123] 多克隆和单克隆抗体的制备是本领域中公知的。

[0124] 多克隆抗体特别可以如例如 Green 等人：“Production of Polyclonal Antisera”，in Immunochemical 5 Protocols(Manson 编辑）；Humana Press，1992，第 1-5 页；Coligan 等人：“Production of Polyclonal Antisera in Rabbits，Rats，Mice and Hamsters”，Current Protocols in Immunology，1992，第 2.4.1 部分以及 Ed Harlow 和 David Lane（编辑）在“Antibodies；A laboratory manual”Cold Spring Harbor Lab.Press 1988 中所述获得。单克隆抗体特别可以如例如 Kohler&Milstein，Nature，1975，256：495；Coligan 等人在 Current Protocols in Immunology，1992，第 2.5.1-2.6.7 部分中；和 Harlow 等人在 Antibodies：A Laboratory Manual；Cold Spring Harbor，Pub.，1988，第 726 页（都全文经此引用并入本文）中所述获得。

[0125] 简言之，可通过用包含抗原的组合物注射例如小鼠、取出血清样品以验证抗体生成的存在、取出脾以获得 B 淋巴细胞、融合 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞以产生杂交瘤、克隆杂交瘤、选择产生对该抗原的抗体的阳性克隆并从杂交瘤培养物中分离抗体来获得单克隆抗体。

[0126] 可以通过各种公认技术从杂交瘤培养物中分离和纯化单克隆抗体，包括使用蛋白质 A 琼脂糖的亲和色谱法、尺寸排阻色谱法和离子交换色谱法，参见例如 Coligan 等人，Current Protocols in Immunology，1992，第 2.7.1-2.7.12 部分和第 2.9.1-2.9.3 部分；和 Barnes 等人：“Purification of Immunoglobulin 25G(IgG)”，Methods in Molecular Biology；Humana Press，1992，第 10 卷，第 79-104 页（都全文经此引用并入本文）。多克隆或单克隆抗体可任选例如通过结合到结合了针对其产生抗体的多肽的基质上和从基质洗脱来进一步纯化。

[0127] 抗 GFRα1-4 的抗体可购自例如 R&D Systems，如人 GDNF MAb(Clone 27106)、小鼠 IgG1 人 GFR alpha-4 MAb(Clone 215725)、小鼠 IgG1 人 GFR alpha-2 MAb(Clone 129030)、小鼠 IgG2B 人 GFR alpha-3 MAb(Clone 111004)、小鼠 IgG1 人 GFR alpha-1 MAb(Clone 260714)、小鼠 IgG1 人 / 大鼠 GDNF 亲和纯化多克隆 Ab、山羊 IgG 人 GFR alpha-4 亲和纯化多克隆 Ab、山羊 IgG 人 GFR alpha-1 亲和纯化多克隆 Ab、山羊 IgG 人 GFR alpha-2 亲和纯化多克隆 Ab、山羊 IgG 人 GFR alpha-3 亲和纯化多克隆 Ab、山羊 IgG。

[0128] 此外，本发明人已制成针对人 SorLA 的整个胞外域产生的兔多克隆抗体。在 CHO 细胞中表达 SorLA 胞外域并使用亲和色谱法从培养上清液中纯化。

[0129] 这些抗体可以如图 9 和 12 中所示充当 SorLA 拮抗剂。

[0130] 本发明人已经以类似方式制成针对人 SorLA 的整个胞外域产生的一系列小鼠单克隆抗体。这些可根据它们充当 SorLA 激动剂或拮抗剂的能力选择。然后克隆所选抗体的互补位并可生成人源性抗体。

[0131] 一方面，本发明涉及能特异性结合 GFRα1、2、3 或 4 的胞外域上的表位的抗体的用途，具体而言，SEQ ID NO 4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 或具有与 SEQ ID 4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 至少 80％序列同一性，如与 SEQ ID 4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 至少 85％、90％、95％

或98％序列同一性的序列被认为对该相互作用产生类似或相关的影响。SEQ ID NO 7是与SorLA的结合位点，包含这种序列的肽特别优选。

[0132] 根据另一实施方案，本发明涉及具有在SorLA的胞外域上的表位的抗体，具体而言，包含N-末端Vpsp10p-结构域(SEQ ID NO 3)、SEQ ID No 1或2或与SEQ ID NO 1、2或3至少80％序列同一性，如与SEQ ID NO 1、2或3至少85％、90％、95％或98％序列同一性的序列能对该相互作用产生类似或相关的影响。

[0133] 在一个实施方案中，如上定义的抗体选自：多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、单链抗体、重组抗体、嵌合抗体或仅是它们的抗原部分。

[0134] 药物组合物和给药形式

[0135] 在治疗方法中的主要给药途径是静脉内、经口和局部。也考虑有效地将药物输送至靶部位或将药物引入血流的其它给药方法，如皮下注射或吸入。

[0136] 由于本发明的大部分化合物是蛋白质，最常见的给药方式是静脉内、肌肉内或皮下给药，尽管在文献中也充分描述了鼻内给药。

[0137] 可以通过常规技术制备适用于这样的给药的剂型。

[0138] 本发明的化合物可作为单一活性剂或与至少一种其它活性剂一起给药。

[0139] 制剂

[0140] 尽管本发明的化合物有可能作为原料化学品给药，它们优选以药物制剂形式存在。

[0141] 因此，本发明进一步提供医用药物制剂，其包含本发明的化合物和可药用载体或稀释剂。

[0142] 在本发明的一些实施方案中以抗体形式提供。药物制剂包括这种抗体和佐剂。

[0143] 合适的佐剂的非限制性实例选自免疫靶向佐剂；免疫调节佐剂，如毒素、细胞因子和分枝杆菌衍生物；油制剂；聚合物；胶束形成佐剂；皂草苷；免疫刺激复合基质(ISCOM基质)；粒子；DDA；铝佐剂；DNA佐剂；y-菊粉；和包囊佐剂。

[0144] 佐剂的应用包括使用如氢氧化铝或磷酸盐(明矾)之类的试剂的应用。

[0145] 根据本发明，DDA(二甲基双十八烷基溴化铵)像DNA和y-菊粉一样也是候选佐剂，弗氏完全和不完全佐剂以及皂树皂甙如QuilA和QS21像RIBI一样可用。其它可能性是单磷酰脂质A(MPL)、上述C3和C3d和mu-ramyl二肽(MDP)。

[0146] 脂质体制剂也已知提供佐剂作用，因此根据本发明脂质体佐剂是优选的。

[0147] 也可根据本发明使用免疫刺激复合基质类型(ISCOMO基质)佐剂。

[0148] 关于免疫刺激复合物的组成和用途的细节可例如见于Morein B等人，1995,Clin.Immunother.3:461-475以及Barr IG和Mitchell GF,1996,Immunol.and Cell Biol.74:8-25(两者都全文经此引用并入本文)。

[0149] 本发明的化合物可配制成肠胃外给药(例如通过注射，例如快速浓注或连续输注)并可以与添加的防腐剂一起以单位剂型存在于安瓿、预装注射器、小体积输注或多剂容器中。该组合物可呈现如在油性或水性赋形剂中的悬浮液、溶液或乳剂之类的形式，例如在含水聚乙二醇中的溶液。油性或非水载体、稀释剂、溶剂或赋形剂的实例包括丙二醇、聚乙二醇、植物油(例如橄榄油)和可注射有机酯(例如油酸乙酯)并可含有配制剂，如防腐、润湿、乳化或悬浮、稳定和/或分散剂。

[0150] 或者，活性成分可以是通过无菌固体的无菌离析或通过由溶液冻干获得的粉末形式，以在使用前用合适的赋形剂，例如无菌无热原水构造。

[0151] 肠胃外制剂中可用的油包括石油、动物油、植物油或合成油。此类制剂中可用的油的具体实例包括花生油、35 大豆油、芝麻油、棉籽油、玉米油、橄榄油、矿脂和矿物油。用于肠胃外制剂的合适脂肪酸包括油酸、硬脂酸和异硬脂酸。油酸乙酯和肉豆蔻酸异丙酯是合适的脂肪酸酯的实例。

[0152] 适用于肠胃外制剂的皂包括脂肪碱金属、铵和三乙醇胺盐，合适的洗涤剂包括 (a) 阳离子洗涤剂，例如二甲基二烷基卤化铵和烷基卤化吡啶鎓；(b) 阴离子洗涤剂，例如烷基、芳基和烯烃磺酸盐、烷基、烯烃、醚和甘油单酯硫酸盐和磺基丁二酸盐，(c) 非离子洗涤剂，例如脂肪胺氧化物、脂肪酸链烷醇酰胺和聚氧乙烯聚丙烯共聚物，(d) 两性洗涤剂，例如烷基 -. β .- 氨基丙烯酸和 2- 烷基咪唑啉季铵盐，和 (e) 它们的混合物。

[0153] 该肠胃外制剂通常在溶液中按重量计含有大约 0.5 至大约 25％的活性成分。可以使用防腐剂和缓冲剂。为了尽可能减小或消除注射位置的刺激，这样的组合物可含有一种或多种具有大约 12 至大约 17 的亲水 - 亲脂平衡 (HLB) 的非离子表面活性剂。这种制剂中的表面活性剂的量按重量计通常为大约 5 至大约 15％。合适的表面活性剂包括聚乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯，如失水山梨糖醇单油酸酯，和环氧乙烷与通过环氧丙烷和丙二醇的缩合形成的疏水基料的高分子量加合物。该肠胃外制剂可存在于单位剂量或多剂量密封容器，如安瓿和小瓶中，并可储存在冻干条件下，只需要在临使用前添加无菌液体赋形剂，例如水，以供注射。可以由之前描述的种类的无菌粉剂、颗粒剂和片剂制备临时注射液和悬浮液。

[0154] 经皮给药

[0155] 本文所述的药剂 - 化学改性剂复合物可经皮给药。经皮给药通常涉及为使药物经皮肤通道进入患者体循环的药剂递送。皮肤位置包括用于经皮给药的解剖区域并包括前臂、腹、胸、背、臀、乳突区等。

[0156] 通过使该复合物来源与患者皮肤长时间接触，实现经皮给药。透皮贴剂具有为身体提供药剂 - 化学改性剂复合物的受控递送的附加优点。参见 Transdermal Drug Delivery:Developmental Issues and Research Initiatives,Hadgraft 和 Guy(编辑),Marcel Dekker,Inc.,(1989) ;Controlled Drug Delivery:Fundamentals and Applications,Robinson 和 Lee(编辑),Marcel Dekker Inc.,(1987) ; 和 Transdermal Delivery of Drugs, 第 1-3 卷 ,Kydonieus 和 Berner(编辑),CRC Press,(1987)(都全文经此引用并入本文)。可以通过在适当的介质，如弹性体基质材料中溶解、分散或以其它方式掺入药剂 - 化学改性剂复合物来制造这样的剂型。吸收增强剂也可用于提高该化合物的透皮通量。可通过提供速率控制膜或将该化合物分散在聚合物基质或凝胶中来控制这样的通量速率。

[0157] 被动经皮给药

[0158] 各种类型的经皮贴剂可用于本文所述的方法。例如，可以由背衬材料和丙烯酸酯粘合剂制备简单粘性贴剂。将药剂 - 化学改性剂复合物和任何增强剂配制成粘性浇注溶液并使其充分混合。将该溶液直接浇注到背衬材料上并在烤箱中蒸发浇注溶剂，留下粘性膜。可以粘贴剥离型衬层以完成该系统。

[0159] 或者，可以使用聚氨酯基质贴剂递送该药剂－化学改性剂复合物。这一贴剂的层包含背衬、聚氨酯药物／增强剂基质、膜、粘合剂和剥离型衬层。使用室温固化的聚氨酯预聚物制备该聚氨酯基质。将水、醇和复合物添加到该预聚物中以致形成粘性紧实弹性体，其可直接仅浇注在背衬材料上。

[0160] 本发明的另一实施方案利用水凝胶基质贴剂。通常，水凝胶基质包含醇、水、药物和几种亲水聚合物。这种水凝胶基质可以在背衬与粘合层之间并入经皮贴剂中。

[0161] 贮液贴剂也可用于本文所述的方法。这种贴剂包含不透或半透的热封背衬材料、热封膜、丙烯酸酯基压敏皮肤粘合剂和硅化剥离型衬层。将背衬热封到膜上以形成贮器，可随后向其中填充该复合物、增强剂、胶凝剂和其它赋形剂的溶液。

[0162] 泡沫基质贴剂在设计和组成上类似于贮液系统，只是将胶凝药剂－化学改性剂溶液封在薄泡沫层，通常聚氨酯中。这种泡沫层位于背衬和已在贴剂外周热封的膜之间。

[0163] 对被动给药系统而言，通常通过位于该贮器与皮肤之间的膜、通过从整体式装置(monolithic device)扩散或通过在该递送系统中充当速率控制屏障的皮肤本身控制释放速率。参见美国专利Nos.4,816,258；4,927,408；4,904,475；4,588,580、4,788,062；等等(都全文经此引用并入本文)。药物递送速率部分取决于膜的性质。例如，在体内的透膜药物递送速率通常高于穿透皮肤屏障。使用位于贮器与皮肤之间的限速膜最有利地控制从该装置向膜递送该复合物的速率。假设皮肤可足以被该复合物渗透(即经皮吸收大于穿透该膜的速率)，该膜用于控制患者经受的剂量速率。

[0164] 可根据所需渗透程度、该复合物的性质和与构造该装置相关的机械考量选择合适的可透膜材料。示例性的可透膜材料包括各种天然和合成聚合物，如聚二甲基硅氧烷(有机硅橡胶)、乙烯乙酸乙烯酯共聚物(EVA)、聚氨酯、聚氨酯－聚醚共聚物、聚乙烯、聚酰胺、聚氯乙烯(PVC)、聚丙烯、聚碳酸酯、聚四氟乙烯(PTFE)、纤维素材料，例如三乙酸纤维素和硝酸／乙酸纤维素，和水凝胶，例如甲基丙烯酸2-羟乙酯(HEMA)。

[0165] 根据所需装置特征，在该装置中可含有其它项，如治疗产品的其它常规组分。例如，本发明的组合物还可包括一种或多种防腐剂或抑菌剂，例如羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、氯甲酚、苯扎氯铵等。这些药物组合物还可含有其它活性成分，如抗菌剂，特别是抗生素、麻醉剂、止痛剂和止痒剂。

[0166] 本发明的化合物可配制成作为栓剂给药。首先熔化低熔点蜡，如脂肪酸甘油酯或可可脂的混合物并例如通过搅拌均匀分散活性组分。然后将熔融的均匀混合物倒入尺寸方便的模具中，冷却并固化。

[0167] 可以将该活性化合物配制成包含置于聚乙二醇(PEG)载体(例如PEG 1000[96％]和PEG 4000[4％])中的例如大约0.5％至大约50％本发明的化合物的栓剂。例如本发明的化合物可配制成阴道给药。除活性成分外还含有这样的载体的子宫托、卫生棉塞、霜、凝胶、膏、泡沫或喷剂在本领域中已知合适。

[0168] 本发明的化合物可配制成鼻内给药。

[0169] 将该溶液或悬浮液通过常规手段，例如用滴管、移液管或喷雾器直接施加到鼻腔中。该制剂可以以单剂或多剂形式提供。在滴管或移液管的后一情况下，这可通过患者施加适当的预定体积的溶液或悬浮液实现。在喷雾器的情况下，这可例如借助计量雾化喷雾泵实现。

[0170] 本发明的化合物可配制成气雾剂给药，特别用于呼吸道，包括鼻内给药。该化合物通常具有例如大约 5 微米或更小的小粒度。可通过本领域中已知的手段，例如通过微粉化获得这样的粒度。在带有合适的推进剂的加压包装中提供活性成分，所述合适的推进剂如氯氟烃 (CFC)，例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷或二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适的气体。该气雾剂可方便地还含有表面活性剂，如卵磷脂。通过计量阀控制药物剂量。或者，可以以干粉，例如该化合物在合适粉末基质，如乳糖、淀粉、淀粉衍生物如羟丙基甲基纤维素和聚乙烯基吡咯烷 (PVP) 中的粉末混合物的形式提供活性成分。该粉末载体将在鼻腔中形成凝胶。该粉末组合物可以以单位剂型存在，例如在如明胶壳或泡沫包装的胶囊或药筒中，可借助吸入器从中施用粉末。如果需要，可以用适合活性成分的缓释或控释给药的肠溶包衣制备制剂。该药物制剂优选在单位剂型中。在这样的形式中，将该制剂细分成含有适当量的活性组分的单位剂量。该单位剂型可以是包装制品，该包装含有离散量的制剂，如成包片剂、胶囊和在小瓶或安瓿中的粉剂。单位剂型 5 也可以是胶囊、片剂、扁囊剂或锭剂本身，或其可以是包装形式的适当数量的任何这些。

[0171] 注射是静脉内、肌肉内、脊柱内、腹膜内、皮下、快速浓注或连续给药。

[0172] 在一个实施方案中，本发明的药物组合物以 30 分钟至 24 小时的时间间隔给药。

[0173] 在另一实施方案中，本发明的药物组合物以 1 至 6 小时的时间间隔给药。

[0174] 在另一实施方案中，本发明的药物组合物以 6 至 72 小时的时间间隔给药。

[0175] 在另一实施方案中，该药物组合物以 10 微克至 500 毫克 / 公斤体重的剂量给药。

[0176] 本发明的多肽和抗体可以以医学上可接受的任何方式给药。这包括肠胃外 10 途径注射，如静脉内、血管内、动脉内、皮下、肌肉内、瘤内、腹膜内、心室内、硬膜内、气管内、鞘内、脑室内、脑间、肺内等，以及鼻内、眼内、直肠或局部。在本发明中还具体包括通过如贮存注射或可蚀植入物之类的手段缓释给药。

[0177] 口服也可行，只要防止蛋白质在胃中退化。

[0178] 给药可以通过定期注射快速浓注制剂进行，或可通过从体外（例如 IV 袋）或体内（例如生物可蚀性植入物、生物人造器官、生物相容胶囊）储器静脉或腹膜内给药而更连续进行。参见例如美国专利 4,407,957、5,798,113, 和 5,800,828，各自经此引用并入本文。例如在美国专利 5,654,007、5,780,014, 和 5,814,607 中描述了肺内递送方法和装置，各自经此引用并入本文。除全身递送外，也考虑直接递送至血 - 脑或血 - 视网膜屏障后的 CNS。局部递送可以通过如经导管递送至一个或多个动脉，如通往 CNS 的大脑动脉之类的方式。在 US 6,042,579(Medtronic)（全文经此引用并入本文）中描述了蛋白质制剂局部用泵递送至 CNS 的方法。

[0179] 术语“可药用载体”是指一种或多种天然或合成的有机或无机成分，多肽或抗体与其结合以利于施用。合适的载体包括无菌盐水，尽管已知可药用的其它水性和非水等渗无菌溶液和无菌悬浮液是本领域普通技术人员已知的。

[0180] “有效量”是指能够改善或延迟患病、退行性或受损状况的进程的量。可以根据个体确定有效量，并部分基于要治疗的症状和寻求的结果。本领域普通技术人员利用此类因素并仅用常规实验法就可确定有效量。

[0181] 脂质体系统可以是各种单层囊泡、多层囊泡或稳定的多层囊泡，并可根据本领域技术人员公知的方法，例如根据美国专利 5,169,637、4,762,915、5,000,958 或

5,185,154(都全文经此引用并入本文)的教导制备和施用。此外,可能希望表达本发明的新型多肽以及其它所选多肽,如脂蛋白,以增强它们与脂质体的结合。

[0182] 设想了用于全身给药的各种剂量方案。在一个实施方案中,向对象施用包含抗体或多肽的制剂的方法包括施用每剂 1 μg/kg 至 30,000 μg/kg 对象体重的所述剂量。

[0183] 在另一实施方案中,该剂量为每剂 10 μg/kg 至 30,000 μg/kg 对象体重。在另一实施方案中,该剂量为每剂 1030 μg/kg 至 10,000 μg/kg 对象体重。在一个不同的实施方案中,该剂量为每剂 5 μg/kg 至 10,000 μg/kg 对象体重。在又一实施方案中,该剂量为每剂 25 μg/kg 至 3,000 μg/kg 对象体重。在最优选的实施方案中,该剂量为每剂 50 μg/kg 至 3,000 μg/kg 对象体重。在文献中提供了关于特定剂量和递送方法的指导;参见例如美国专利 Nos. 4,657,760 ;5,206,344 ;或 5,225,212(都全文经此引用并入本文)。预计不同的制剂对不同的治疗化合物和不同的疾病有效,靶向一个器官或组织给药例如可能需要以与另一器官或组织不同 5 的方式递送。

[0184] 检测法

[0185] 本发明还包括用于识别能够调节 SorLA 与 GDNF- 家族配体受体,如 GFRα1、2、3 或 4 之间的相互作用的新型结合伴侣的体外和 / 或体内检测法,包括 SorLA 和 GDNF- 家族配体受体。这些检测法可以例如是基于细胞的,包含表达受体 SorLA 或 GFRα1、2、3 或 4 或两者的细胞并测量响应。或者,可以进行体外检测法,由此测量该新型结合伴侣抑制该相互作用的能力。下面描述本发明的各种实施方案。

[0186] 基于细胞检测法

[0187] 本发明还涉及可识别能够调节 SorLa 与 GDNF- 家族配体受体复合物,特别是 GFRα1 之间的相互作用的试剂的各种检测法。

[0188] 可以在细胞系统中测定通过 Vps10p 结构域受体家族的成员结合、内化或信号传导(实施例 6)。用候选试剂(抑制剂 / 拮抗剂)化合物孵育例如用分别编码所有三种受体的质粒转染后的表达 SorLA 和 GFRα1 和 GDNF 的细胞。所述试剂可例如代表针对受体 SorLA 和 GFRα1 任一的抗体,结合配体,如 SorLA 前肽或各受体的片段。在孵育后,可以洗涤细胞,蛋白质复合物与例如二硫代双[琥珀酰亚氨基丙酸酯](DSP, Pierce)交联,随后细胞溶解。由此获得的细胞溶解产物可随后用结合在例如琼脂糖珠上的 SorLA 或 GFRα1 或两者的抗体孵育。然后从洗过的珠粒上洗脱沉淀的复合物并通过免疫印迹法分析。

[0189] 因此在一个实施方案中,本发明涉及用于识别可结合 SorLa 和 GDNF- 家族配体受体复合物的试剂的基于细胞的筛选检测法,包括步骤

[0190] a) 用表达 SorLA 受体、GDNF 和 / 或 GDNF- 家族配体受体的细胞孵育感兴趣的试剂

[0191] b) 溶解细胞并用 SorLA 或 GDNF- 家族配体受体的特异性抗体孵育细胞,和

[0192] c) 通过免疫印迹法分析复合物形成。

[0193] 在另一实施方案中,本发明涉及用于识别能够抑制 SorLA 的试剂的基于细胞的筛选法。

[0194] 针对 SorLA:GFRα1:GDNF 受体复合体实体的拮抗剂可充当这整个复合物的抑制剂。因此其与筛选能够结合例如 Vps10p- 结构域受体实体的试剂相关。在实施例 8 中描述了这种方法。可以在细胞系统中测定通过 Vps10p 结构域受体家族的成员结合、内化或信号传导。可以在分别不存在和存在候选抑制剂 / 拮抗剂化合物的情况下用放射性标记的配体

孵育内源性地或例如用含有该受体的cDNA的质粒转染后表达受体之一的细胞。在孵育后，可以洗涤细胞以除去非特异性结合，随后收获。使用本领域技术人员公知的常规放射性配体检测法测定候选拮抗剂/抑制剂与受体的结合程度。参见例如Bylund和Toews(1993)Am J Physiol.265(5Pt 1):L421-9，名为“Radioligand binding methods:practical guide and tips”。也可以如Nykjær等人(1992)FEBS 300:13-和Nielsen等人(2001)EMBO J(两者都全文经此引用并入本文）中所述测定胞吞作用/内化。

[0195] 因此根据另一实施方案，本发明涉及用于识别能够抑制SorLA的试剂的基于细胞的筛选法，包括步骤

[0196] a)用放射性标记的试剂孵育表达SorLA受体、GDNF和/或GDNF-家族配体受体的细胞，

[0197] b)洗涤细胞以除去非特异性结合，

[0198] c)收获细胞，

[0199] d)测量结合量。

[0200] 在另一实施方案中，设想了识别能够调节通过SorLA逆行分选GFRα受体的试剂的基于细胞的筛选法，其中可以在表达SorLA和GFRα受体的细胞中通过荧光标签或荧光抗体标记表面局域化的GFRα受体，并随后用SorLA激动剂/拮抗剂孵育例如大约20至大约30分钟。随后可以如图6和图11中所示使用共焦显微术评估内化的GFRα受体量。

[0201] 因此根据另一实施方案，本发明涉及用于识别能够调节通过SorLA逆行分选GFRα受体的试剂的基于细胞的筛选法，包括步骤

[0202] a)在表达SorLA和GFRα受体的细胞中通过荧光标签或荧光抗体标记该试剂

[0203] b)随后用SorLA激动剂/拮抗剂孵育所述细胞一段时间

[0204] c)分析内化GFRα受体的量。

[0205] 在另一实施方案中，设想了用于识别能够提高Ret磷酸化的试剂的基于细胞的筛选法。

[0206] 可以在不存在或存在SorLA拮抗剂或激动剂的情况下用浓度递增的GDNF刺激成神经细胞瘤细胞（例如SY5Y细胞）一段指定时间。然后可溶解细胞并用结合到Gammabind珠粒(GE Healthcare)上的抗Ret抗体(R&D Systems)孵育该细胞溶解产物。然后可从洗过的珠粒中洗脱沉淀的蛋白质（酸性缓冲液，随后中和）并可使用抗-磷酸酪氨酸(Milipore)通过免疫印迹法目测任何磷酸化Ret(如图9中所示)。

[0207] 因此本发明还涉及用于识别能够提高Ret磷酸化的试剂的基于细胞的筛选法，包括步骤

[0208] a)在存在或不存在SorLA结合剂的情况下以递增浓度的GDNF孵育成神经细胞瘤细胞一段指定时间

[0209] b)溶解细胞，

[0210] c)使用抗-磷酸酪氨酸抗体免疫沉淀磷酸化Ret，和

[0211] d)目测磷酸化。

[0212] 在另一实施方案中，本发明涉及用于识别能够提高细胞存活的试剂的基于细胞的筛选法。

[0213] 可以从细胞培养物中收获成神经细胞瘤细胞（例如SY5Y）并再悬浮在生长培养

基，如含有 1％ glutamax 和 1％ P/S（青霉素和链霉素）的无酚红 (LONZA) 的 DMEM 中。随后将细胞在 96 孔板中铺板。第二天，在不存在或存在 SorLA 拮抗剂或激动剂的情况下用浓度递增的 GDNF 刺激细胞，并在它们的正常孵育器中孵育一段时间，例如 72 小时。在孵育后，可以制备 MultiTox-Fluor Multiplex 细胞毒性检测试剂 (Promega) 并如制造商的技术支持文件所示添加到细胞中，并孵育。此后用例如 Wallac VICTOR3TM 1420 Multilabel Counter(Perkin ElmerTM Lifesciences) 测量荧光，其中信号与存活成正比。

[0214] 因此本发明还涉及用于识别能够提高细胞存活的试剂的基于细胞的筛选法，包括步骤

[0215] a) 在不存在或存在 SorLA 拮抗剂或激动剂的情况下用浓度递增的 GDNF 孵育成神经细胞瘤细胞并培养一段时间

[0216] b) 使用细胞毒性检测法测定细胞存活。

[0217] 在另一实施方案中，为了测试存活，在盖玻片而非 96 孔板上培养细胞。在孵育后，然后例如在 PBS 中的 4％低聚甲醛 (PFA) 中固定细胞一段时间（如在室温下 30 分钟）并封固到载玻片上。然后如图 9D 中所示在荧光显微镜中直接计数细胞。

[0218] 因此本发明还涉及用于识别能够提高细胞存活的试剂的基于细胞的筛选法，包括步骤

[0219] a) 在不存在或存在 SorLA 拮抗剂或激动剂的情况下用浓度递增的 GDNF 孵育成神经细胞瘤细胞并孵育一段时间

[0220] b) 固定细胞

[0221] c) 细胞计数。

[0222] 体外检测法

[0223] 用于识别破坏 GFRα1 和 / 或 GDNF 与 SorLA 的相互作用的试剂的体外检测法

[0224] 可以通过例如表面等离子体共振分析 (Biacore, Sweden) 使用例如 CaHBS 作为标准运行缓冲液 (10mM HEPES, pH 7.4, 140mM NaCl、2mM CaCl2、1mM EGTA 和 0.005％ Tween-20) 进行试剂，如小有机分子、肽或可溶受体（包括但不限于 SorLA、GFRα1 和 GDNF）直接结合到固定的蛋白质上的测定。这种试剂可衍生自成熟 GDNF 的 N- 末端（图 17）或 GFRα1 结构域 1（图 16）。

[0225] 使用 NHS/EDC 方法如供应商所述活化来自 Biacore 的生物传感器芯片 (CM5, 目录号 BR-1000-14)，接着用 SorLA 包被。可以采用几种不同的方法：可以通过将结合信号（响应单位）与用受体之一固定的芯片进行比较和将这一信号与空流细胞 (empty flow cell) 进行比较来识别候选试剂。在另一方法中，可以在不存在或存在推定抑制剂的情况下监测已确定的试剂的抑制。信号差描绘拮抗剂的抑制潜力。可以通过使用 Biaevaluation 3.1 版程序就亲和力评估和抑制潜力拟合传感图来分析收集的数据。表面等离子体共振检测法容易转化成其它检测法，其中将 Vps10p- 结构域受体、该试剂或推定抑制剂固定在固相上。例如，可以通过孵育一定时间（例如在 50mM NaHCO3, pH 9.6 中在 4℃下 16 小时）来将受体固定在例如来自 Nunc 的 Maxisorp 微滴定孔（目录号 439454）中。在室温下使用 5％牛血清白蛋白 (Sigma, 目录号 A9647) 封闭 2 小时后，该孔可以用 MB 缓冲液 (10mM HEPES, pH 7.4、140mM NaCl、2 20mM CaCl2 和 1mM MgCl2) 洗涤 3 次，然后在不存在或存在各种浓度的候选抑制剂的情况下用标记的配体（例如碘化的）孵育。在孵育（例如在 4℃下整夜）和用

MB 缓冲液洗涤后，通过添加 10％ SDS 释放结合的放射性。可以测定示踪剂与仅用牛血清白蛋白包被的孔的非特异性结合并从在结合实验中测得的值中减去。可以使用来自 GraphPad 的 Prism 软件，版本 4 将结合数据点拟合为结合方程式。同样地，可以标记拮抗剂并直接测量与固定的受体的结合。在另一设置中，可以将受体、配体或拮抗剂固定在闪烁珠上并在邻近闪烁分析法中测量结合，其中已使用放射性标记受体结合分子。

[0226] 因此本发明还涉及用于识别破坏 GFRα1 和 / 或 GDNF 与 SorLA 的相互作用的试剂的体外检测法，包括步骤

[0227] a) 将 GFRα1 和 / 或 SorLA 固定在生物传感器芯片中

[0228] b) 施加试剂，和

[0229] c) 将这种信号与标准进行比较

[0230] 或

[0231] a) 将该试剂、GFRα1、GDNF 或 SorLA 固定在固相上，

[0232] b) 在不存在或存在各种浓度的所述试剂的情况下用标记的配对物（例如碘化的试剂、GFRα1、GDNF 和 / 或 SorLA）孵育这些物质，和

[0233] c) 计数或测量该结合。

[0234] 进一步实施方案

[0235] 1. 通过调节 SorLA 与 GDNF- 家族配体受体之间的相互作用来提高神经元，如多巴胺能神经元的存活的方法。

[0236] 2. 根据实施方案 2 的方法，其中所述 GDNF- 家族配体受体选自 GFRα1、2、3、和 / 或 4。

[0237] 3. 根据实施方案 1 或 2 的方法，其中用于调节 SorLA 与 GDNF- 家族配体受体之间的相互作用的试剂选自蛋白质、肽、抗体或小有机化合物。

[0238] 4. 根据实施方案 3 的方法，其中所述试剂是 SorLA 的胞外域 (SEQ ID NO 1)、其同种型或其片段。

[0239] 5. 根据实施方案 4 的方法，其中所述片段包含或是来自 SorLA 的 N- 末端 Vps10p- 结构域的片段 (SEQ ID NO 3)。

[0240] 6. 根据实施方案 3 的方法，其中所述试剂是 SorLA 前肽 (SEQ ID NO 2) 或其片段。

[0241] 7. 根据实施方案 2 至 5 任一项的方法，其具有与 SEQ ID NO 1、2 或 3 至少 80％序列同一性，如与 SEQ ID NO 1、2 或 3 至少 85％、90％、95％或 98％序列同一性。

[0242] 8. 根据实施方案 3 的方法，其中所述试剂选自 GFRα1-4 受体的胞外域、其同种型或其片段。

[0243] 9. 根据实施方案 8 的方法，其中所述 GFRα 受体包含如 SEQ ID 4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 中定义的序列或其片段。

[0244] 10. 根据实施方案 8 的方法，其具有与 SEQ ID 4、5、6、7、7、8、9、10、11 或 12 至少 80％序列同一性，如与 SEQ ID 4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 的至少 85％、90％、95％或 98％序列同一性。

[0245] 11. 根据实施方案 3 的方法，其中所述蛋白质包含神经降压素 (SEQ ID 13) 或例如如 SEQ ID 14 或 15 中定义的其片段，或由神经降压素 (SEQ ID 13) 或例如如 SEQ ID 14 或 15 中定义的其片段构成。

[0246] 12. 根据实施方案 3 的方法，其中所述蛋白质是 GDNF、其片段或其同种型。

[0247] 13. 根据实施方案 12 的方法，其中所述 GDNF 包含序列 SEQ ID NO 16 或 18，或由序列 SEQ ID NO 16 或 18 构成。

[0248] 14. 根据实施方案 13 的方法，其具有与 SEQ ID NO 16 或 18 至少 80％序列同一性，如与 SEQ ID NO 16 或 18 至少 85％、90％、95％或 98％序列同一性。

[0249] 15. 根据实施方案 3 的方法，其中所述蛋白质包含或由如 SEQ ID NO 17 中定义的 GDNF 的前肽构成。

[0250] 16. 根据实施方案 15 的方法，其具有与 SEQ ID NO 17 至少 80％序列同一性，如与 SEQ ID NO 17 至少 85％、90％、95％或 98％序列同一性。

[0251] 17. 根据实施方案 3 的方法，其中所述抗体具有在 GFRα1、2、3 或 4 的胞外域上的表位。

[0252] 18. 根据实施方案 17 的抗体，其是单克隆或多克隆的并具有在如实施方案 8、9 或 10 任一项中定义的任何序列内的表位。

[0253] 19. 根据实施方案 3 的方法，其中所述抗体具有在 SorLA 的胞外域上的表位。

[0254] 20. 根据实施方案 19 的方法，其是单克隆或多克隆的并具有在如实施方案 4、5、6 或 7 任一项中定义的任何序列内的表位。

[0255] 21. 包含如实施方案 1-16 任一项中定义的试剂以及一种或多种可药用载体或稀释剂的药物组合物。

[0256] 22. 包含如实施方案 17-20 任一项中定义的抗体和佐剂的药物组合物。

[0257] 23. 如实施方案 1 至 20 任一项中定义的试剂或根据实施方案 21 和 22 任一项的药物组合物用于提高神经元，如多巴胺能神经元的存活的用途。

[0258] 24. 如实施方案 1 至 20 任一项中定义的试剂或根据实施方案 21 和 22 任一项的药物组合物用于治疗与神经元，如多巴胺能神经元的损失相关和 / 或需要神经元，如多巴胺能神经元的存活的疾病。

[0259] 25. 根据实施方案 24 的用途，其中所述疾病选自损伤诱导的神经细胞死亡、脊髓损伤、周围神经损伤、脑缺血、运动神经元病、肌萎缩性侧索硬化、慢性疼痛、神经性疼痛、癫痫、癌症、帕金森氏病、重度抑郁症、精神分裂症、注意力缺陷和多动症 (ADHD)、药物滥用、焦虑障碍和 / 或双相障碍（躁郁症）。

[0260] 26. 通过施用有效量的如实施方案 1 至 20 任一项中定义的试剂或根据实施方案 21 或 22 任一项的药物组合物来治疗与神经元，如多巴胺能神经元的损失相关和 / 或需要神经元，如多巴胺能神经元的存活的疾病的方法。

[0261] 27. 根据实施方案 26 的方法，其用于治疗根据实施方案 25 的疾病。

[0262] 28. 根据实施方案 1 至 20 任一项的化合物或根据实施方案 21 和 22 任一项的药物组合物用于制备根据实施方案 24 或 25 任一项的疾病响应的治疗药剂的用途。

[0263] 29. 用于识别能够调节 SorLA 与 GDNF- 家族配体受体，如 GFRα1、2、3 或 4 之间的相互作用的结合伴侣的体外或体内检测法，其包含 SorLA 和 / 或 GDNF- 家族配体受体。

[0264] 参考资料

[0265] Andersen, O. M., J. Reiche 等人 (2005)." 神经分选蛋白相关受体 sorLA/LR11 调节淀粉状蛋白前体蛋白的加工 (Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11

regulates processing of the amyloid precursor protein)."Proc Natl Acad Sci U S A 102(38):13461-6。

[0266] Beck,K.D.,J.Valverde 等人 (1995)."在成人闹钟中脑多巴胺能神经元受 GNDF 的保护免于 axotomy 诱导的变性 (Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain)."Nature 373(6512):339-41。

[0267] Cacalano G,Farinas I,Wang LC,Hagler K,Forgie A,Moore M,Armanini M,Phillips H,Ryan AM,Reichardt LF,Hynes M,Davies A,Rosenthal A(1998) 在发育中的神经系统和肾中 GFRalpha1 是 GDNF 的基本受体成分 (GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney).Neuron 21(1):53-62。

[0268] Chauhan NB,Siegel GJ,Lee JM(2001) 帕金森氏病脑的黑质神经元中缺乏神经胶质细胞系衍生的神经营养因子 (Depletion of glial cell line-derived neurotrophic factor in substantia nigra neurons of Parkinson's disease brain).J Chem Neuroanat 21(4):277-288 Ciechanowski,P.S.,W.J.Katon 等人 (2000)."抑郁和糖尿病:抑郁症状对附着、功能和成本的影响 (Depression and diabetes:impact of depressive symptoms on adherence,function,and costs)."Arch Intern Med 160(21):3278-85。

[0269] Davie,C.A.(2008)."帕金森氏病综述 (A review of Parkinson's disease)."Br Med Bull 86:109-27。

[0270] Dodson,S.E.,M.Gearing 等人 (2006)."在散发阿尔茨海默病而不是家族阿尔茨海默病中 LR11/SorLA 表达减少 (LR11/SorLA expression is reduced in sporadic Alzheimer disease but not in familial Alzheimer disease)."J Neuropathol Exp Neurol 65(9):866-72。

[0271] Durbec PL,Larsson-Blomberg LB,Schuchardt A,Costantini F,Pachnis V(1996) 肠和交感成神经细胞亚群的 c-ret 的常见来源和发育相关因素 (Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts).Development 122(1):349-358。

[0272] Enomoto H,Araki T,Jackman A,Heuckeroth RO,Snider WD,Johnson EM,Jr.,Milbrandt J(1998) 缺乏 GFR alpha 1 的小鼠在肠神经系统和肾脏有缺陷 (GFR alpha1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys).Neuron 21(2):317-324。

[0273] Gash,D.M.,G.A.Gerhardt 等人 (1998)."神经胶质细胞系衍生的神经营养因子对啮齿动物和非人灵长类动物的黑质纹状体多巴胺系统的影响 (Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on the nigrostriatal dopamine system in rodents and nonhuman primates)."Adv Pharmacol 42:911-5。

[0274] Gill,S.S.,N.K.Patel 等人 (2003)."在帕金森氏病中直接脑输注神经胶质细胞系衍生的神经营养因子 (Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease)."Nat Med 9(5):589-95。

[0275] Golden JP,Baloh RH,Kotzbauer PT,Lampe PA,Osborne PA,Milbrandt

J,Johnson EM,Jr.(1998)neurturin、GDNF 以及它们的受体在成年小鼠中的表达(Expression of neurturin,GDNF,and their receptors in the adult mouse)CNS.J Comp Neurol 398(1):139-150。

[0276] Granholm AC,Reyland M,Albeck D,Sanders L,Gerhardt G,Hoernig G,Shen L,Westphal H,Hoffer B(2000)神经胶质细胞系衍生的神经营养因子对于中脑多巴胺神经元出生后存活很重要(Glial cell line-derived neurotrophic factor is essential for postnatal survival of midbrain dopamine neurons).J Neurosci 20(9):3182-3190。

[0277] Jacobsen L,Madsen P,Nielsen MS,Geraerts WP,Gliemann J,Smit AB,Petersen CM(2002)sorLA 胞质结构域与 GGA1 和 -2 相互作用并限定 GGA 结合的最低要求(The sorLA cytoplasmic domain interacts with GGA1 and-2 and defines minimum requirements for GGA binding).FEBS Lett 511(1-3):155-158。

[0278] Kanaki,T.,H.Bujo等人(1998)."鼠科动物脑中LR11的发育调节(Developmental regulation of LR11 expression in murine brain)."DNA Cell Biol 17(8):647-57。

[0279] Kearns,C.M.and D.M.Gash(1995)."体内 GNDF 保护黑质多巴胺神经元抗 6 一羟基多巴胺(GDNF protects nigral dopamine neurons against 6-hydroxydopamine in vivo)."Brain Res 672(1-2):104-11。

[0280] Kramer ER,Aron L,Ramakers GM,Seitz S,Zhuang X,Beyer K,Smidt MP,Klein R(2007)小鼠缺乏Ret信号传导引起黑质纹状体系统的进行性和迟发变性(Absence of Ret signaling in mice causes progressive and late degeneration of the nigrostriatal system).PLoS Biol 5(3):e39。

[0281] Kupfer,D.J.(2005)."双相障碍中增加的医学负担(The increasing medical burden in bipolar disorder)."Jama 293(20):2528-30。

[0282] Lang,A.E.,S.Gill等人(2006)."在帕金森氏病中核内神经胶质细胞系衍生的神经营养因子输注随机化控制的试验(Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease)."Ann Neurol 59(3):459-66。

[0283] Lin,L.F.(1993)et al.GDNF:中脑多巴胺能神经元的神经胶质细胞系衍生的神经营养因子(GDNF:a glial cell-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons).Science May 21:1130-2。

[0284] Manji,H.K.,W.C.Drevets等人(2001)."抑郁的细胞神经学(The cellular neurobiology of depression)."Nat Med 7(5):541-7。

[0285] Marcusson,E.G.,B.F.Horazdovsky等人(1994)."VPS10基因编码酵母空泡羧肽酶Y的分选受体(The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene)."Cell 77(4):579-86。

[0286] Mazella,J.,N.Zsurger等人(1998)."100Kda神经降压素受体是gp95/sortilin,一种非G蛋白偶联的受体(The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin,a non-G-protein-coupled receptor)."J Biol Chem 273(41):26273-6。

[0287] Michelson,D.,C.Stratakis等人(1996)."患有抑郁症的妇女的骨矿物质密度

(Bone mineral density in women with depression)."N Engl J Med 335(16):1176-81。

[0288] Moore MW,Klein RD,Farinas I,Sauer H,Armanini M,Phillips H,Reichardt LF,Ryan AM,Carver-Moore K,Rosenthal A(1996)缺乏GDNF的小鼠的肾和神经元异常(Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF).Nature 382(6586):76-79

Motoi,Y.,T.Aizawa等人(1999)."在大鼠和人脑中的新型嵌合载脂蛋白E受体LR11(Neuronal localization of a novel mosaic apolipoprotein E receptor,LR11,in rat and human brain)."Brain Res 833(2):209-15。

[0289] Munck Petersen,C.,M.S.Nielsen等人(1999)."用于配体结合的前肽裂解条件选蛋白/神经降压素受体-3(Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding)."Embo J 18(3):595-604。

[0290] Musselman,D.L.,D.L.Evans等人(1998)."抑郁与心血管疾病的关系:流行病学、生物学和治疗(The relationship of depression to cardiovascular disease:epidemiology,biology,and treatment)."Arch Gen Psychiatry 55(7):580-92。

[0291] Nishino J,Mochida K,Ohfuji Y,Shimazaki T,Meno C,Ohishi S,Matsuda Y,Fujii H,Saijoh Y,Hamada H(1999)颈上神经节的迁移和存活需要GFR alpha3,一种artemin受体组分(GFR alpha3,a component of the artemin receptor,is required for migration and survival of the superior cervical ganglion).Neuron 23(4):725-736。

[0292] Nutt,J.G.,K.J.Burchiel等人(2003)."PD中神经胶质细胞系衍生的神经营养因子(GDNF)的随机化双盲试验(Randomized,double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF)in PD)."Neurology 60(1):69-73。

[0293] Nykjaer,A.,R.Lee等人(2004)."选蛋白对于proNGF诱导的神经元细胞死亡很重要(Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death)."Nature 427(6977):843-8。

[0294] Offe,K.,S.E.Dodson等人(2006)."脂蛋白受体LR11调节淀粉状beta产生和淀粉状前体蛋白在内体小室中的运输(The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments)."J Neurosci 26(5):1596-603。

[0295] Rogaeva,E.,Y.Meng等人(2007)."神经元选蛋白相关受体SORL1与阿尔茨海默病遗传相关(The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease)."Nat Genet 39(2):168-77。

[0296] Rossi J,Luukko K,Poteryaev D,Laurikainen A,Sun YF,Laakso T,Eerikainen S,Tuominen R,Lakso M,Rauvala H,Arumae U,Pasternack M,Saarma M,Airaksinen MS(1999)在缺乏GFRalpha2,一种功能neurturin受体的小鼠中的肠和副交感神经系统的延迟生长和缺陷(Retarded growth and deficits in the enteric and parasympathetic nervous system in mice lacking GFR alpha2,a functional neurturin receptor).Neuron 22(2):243-252。

[0297] Sager,K.L.,J.Wuu等人(2007)."在轻度认知损伤中神经元LR11/sorLA表达降低(Neuronal LR11/sorLA expression is reduced in mild cognitive impairment)."Ann

Neurol 62(6):640-7。

[0298] Sauer,H.,C.Rosenblad 等人 (1995)."神经胶质细胞系衍生的神经营养因子而不是转化生长因子 beta 3 防止黑质多巴胺能神经元在纹状体 6- 羟基多巴胺损伤后的延迟变性 (Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion)."Proc Natl Acad Sci U S A 92(19):8935-9。

[0299] Scherzer,C.R.,K.Offe 等人 (2004)."阿尔茨海默病中的载脂蛋白 E 受体 LR11 损失 (Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease)."Arch Neurol 61(8):1200-5。

[0300] Schulz,R.,S.R.Beach 等人 (2000)."老年人中的抑郁与死亡率之间的关联 :心血管健康研究 (Association between depression and mortality in older adults:the Cardiovascular Health Study)."Arch Intern Med 160(12):1761-8。

[0301] Sian J,Gerlach M,Youdim MB,Riederer P(1999) 帕金森氏病 :一种主要的动力学低的基底神经节疾病 (Parkinson's disease:a major hypokinetic basal ganglia disorder).J Neural Transm 106(5-6):443-476。

[0302] Souza 等人 .(2010).J Psychiatr Res。

[0303] Spoelgen,R.,C.A.von Arnim 等人 (2006)."sorLA/LR11 胞质体结构域与淀粉状前体蛋白 (APP) 和 beta- 分泌酶 beta 位点 APP 裂解酶之间的相互作用 (Interaction of the cytosolic domains of sorLA/LR11 with the amyloid precursor protein(APP)and beta-secretase beta-site APP-cleaving enzyme)."J Neurosci 26(2):418-28。

[0304] Syed Z,Dudbridge F,Kent L(2007) 神经营养因子基因 GDNF、NGF 和 NT3 在对 ADHD 易感性中的研究 (An investigation of the neurotrophic factor genes GDNF,NGF,and NT3 in susceptibility to ADHD).Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 144B(3):375-378。

[0305] Teng,H.K.,K.K.Teng 等人 (2005)."ProBDNF 通过激活 p75NTR 和选蛋白的受体复合物诱导神经元凋亡 (ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin)."J Neurosci 25(22):5455-63。

[0306] Tomac AC,Grinberg A,Huang SP,Nosrat C,Wang Y,Borlongan C,Lin SZ,Chiang YH,Olson L,Westphal H,Hoffer BJ(2000) 神经胶质细胞系衍生的神经营养因子受体 alpha1 有效性调节神经胶质细胞系衍生的神经营养因子信号传导 :来自小鼠携带一个或两个突变等位基因的证据 (Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha1 availability regulates glial cell line-derived neurotrophic factor signaling:evidence from mice carrying one or two mutated alleles).Neuroscience 95(4):1011-1023。

[0307] Tomac,A.,E.Lindqvist 等人 (1995)."体内通过 GDNF 黑质纹状体多巴胺能系统的保护和修复 (Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo)."Nature 373(6512):335-9。

[0308] Westergaard,U.B.,E.S.Sorensen 等人 (2004)."选蛋白 Vps10p 结构域的功能

性组织(Functional organization of the sortilin Vps10p domain)."J Biol Chem 279(48):50221-9。

[0309] Williams等人.(2007).Schizophr Res。

[0310] Zaman V,Boger HA,Granholm AC,Rohrer B,Moore A,Buhusi M,Gerhardt GA,Hoffer BJ,Middaugh LD(2008)老年GFRalpha-1杂合小鼠的黑质纹状体多巴胺系统:神经化学、形态学和行为(The nigrostriatal dopamine system of aging GFRalpha-1 heterozygous mice:neurochemistry,morphology and behavior).Eur J Neurosci 28(8):1557-1568。

[0311] Zurn AD,Widmer HR,Aebischer P(2001)GDNF的持续递送:通往帕金森氏病治疗(Sustained delivery of GDNF:towards a treatment for Parkinson's disease).Brain Res Brain Res Rev 36(2-3):222-229。

实施例

[0312] 实施例1:SorLA:GFRα1复合物的证实

[0313] 用编码SorLA和GFRα1的质粒稳定转染的HEK293细胞与DSP(Pierce)交联,随后细胞溶解。用结合到Gammabind珠粒(GE Healthcare)上的SorLA或GFRα1的抗体(R&D Systems)孵育细胞溶解产物。用SDS上样缓冲液从洗过的珠粒中洗脱沉淀的复合物。免疫印迹分析表明存在SorLA:GFRα1复合物(图5A)。也使用表面等离子体共振(Biacore,Sweden)使用CaHBS作为标准运行缓冲液(10mM HEPES,pH 7.4,140mM NaCl,2mM $CaCl_2$,1mM EGTA,0.005% Tween-20)证实SorLA的胞外域与GFRα1的直接相互作用。使用NHS/EDC方法如供应商所述活化来自Biacore的生物传感器芯片(CM5,目录号BR-1000-14),接着用SorLA包被(图5C)。

[0314] 实施例2:SorLA:GFRα2复合物的证实

[0315] 用编码SorLA和GFRα2的质粒稳定转染的HEK293细胞与DSP(Pierce)交联,随后细胞溶解。用结合到Gammabind珠粒(GE Healthcare)上的GFRα2的抗体(R&D Systems)孵育细胞溶解产物。用SDS上样缓冲液从洗过的珠粒中洗脱沉淀的复合物。免疫印迹分析表明存在SorLA:GFRα2复合物(图11A)。也使用表面等离子体共振(Biacore,Sweden)使用CaHBS作为标准运行缓冲液(10mM HEPES,pH 7.4,140mM NaCl,2mM $CaCl_2$,1mM EGTA,0.005% Tween-20)证实SorLA的胞外域与GFRα2的直接相互作用。使用NHS/EDC方法如供应商所述活化来自Biacore的生物传感器芯片(CM5,目录号BR-1000-14),接着用SorLA包被。

[0316] 实施例3:SorLA:GFRα3复合物的证实

[0317] 用编码SorLA和GFRα3的质粒稳定转染的HEK293细胞与DSP(Pierce)交联,随后细胞溶解。用结合到Gammabind珠粒(GE Healthcare)上的GFRα3的抗体(R&D Systems)孵育细胞溶解产物。用SDS上样缓冲液从洗过的珠粒中洗脱沉淀的复合物。免疫印迹分析表明存在SorLA:GFRα3复合物(图11A)。也使用表面等离子体共振(Biacore,Sweden)使用CaHBS作为标准运行缓冲液(10mM HEPES,pH 7.4,140mM NaCl,2mM $CaCl_2$,1mM EGTA,0.005% Tween-20)证实SorLA的胞外域与GFRα3的直接相互作用。使用NHS/EDC方法如供应商所述活化来自Biacore的生物传感器芯片(CM5,目录号BR-1000-14),接着用SorLA

包被。

[0318] 实施例 4:SorLA:GFRα4 复合物的证实

[0319] 用编码 SorLA 和 GFRα4 的质粒稳定转染的 HEK293 细胞与 DSP(Pierce) 交联,随后细胞溶解。用结合到 Gammabind 珠粒 (GE Healthcare) 上的 GFRα4 的抗体 (R&D Systems) 孵育细胞溶解产物。用 SDS 上样缓冲液从洗过的珠粒中洗脱沉淀的复合物。免疫印迹分析表明存在 SorLA:GFRα4 复合物 (图 11A)。也使用表面等离子体共振 (Biacore, Sweden) 使用 CaHBS 作为标准运行缓冲液 (10mM HEPES, pH 7.4, 140mM NaCl, 2mM $CaCl_2$, 1mM EGTA, 0.005% Tween-20) 证实 SorLA 的胞外域与 GFRα4 的直接相互作用。使用 NHS/EDC 方法如供应商所述活化来自 Biacore 的生物传感器芯片 (CM5, 目录号 BR-1000-14),接着用 SorLA 包被。

[0320] 实施例 5:SorLA:GDNF 复合物的证实

[0321] 使用表面等离子体共振 (Biacore, Sweden) 使用 CaHBS 作为标准运行缓冲液 (10mM HEPES, pH 7.4, 140mM NaCl, 2mM $CaCl_2$, 1mM EGTA, 0.005% Tween-20) 证实 SorLA 的胞外域与 GDNF 的直接相互作用。使用 NHS/EDC 方法如供应商所述活化来自 Biacore 的生物传感器芯片 (CM5, 目录号 BR-1000-14),接着用 SorLA 包被 (图 3)。

[0322] 实施例 6: 调节包含 SorLA 和 GFRα1 的复合物的用于识别受体拮抗剂 / 激动剂的基于细胞的筛选法

[0323] 可以在细胞系统中测定通过 Vps10p 结构域受体家族的成员结合、内化或信号传导。用候选试剂 (抑制剂 / 拮抗剂) 化合物孵育例如用分别编码所有三种受体的质粒转染后的表达 SorLA 和 GFRα1 和 GDNF 的细胞。所述试剂可例如代表受体 SorLA 和 GFRα1 任一的抗体,结合配体,如 SorLA 前肽或各受体的片段。在孵育后,洗涤细胞,蛋白质复合物与二硫代双 [琥珀酰亚氨基丙酸酯](DSP, Pierce) 交联,随后在含有蛋白酶抑制剂 (完全, Roche Applied Science, Switzerland) 的 TNE 缓冲液 (10mM Tris-HCl、150mM NaCl、1mM EDTA、1% nonides P-40, pH.8) 中细胞溶解。用结合在琼脂糖珠 (GE Healthcare) 上的 SorLA 或 GFRα1 的抗体 (R&D Systems) 孵育该细胞溶解产物。从洗过的珠粒上洗脱沉淀的复合物 (酸性缓冲液和随后中和)。洗脱液中的 SorLA 和 GFRα1 的免疫印迹分析揭示候选化合物是否能够抑制 SorLA:GFRα1 复合物形成。

[0324] 实施例 7: 用于识别破坏 GFRα1 和 / 或 GDNF 与 SorLA 的相互作用的试剂的体外检测法

[0325] 可以通过例如表面等离子体共振分析 (Biacore, Sweden) 使用例如 CaHBS 作为标准运行缓冲液 (10mM HEPES, pH 7.4, 140mM NaCl、2mM $CaCl_2$、1mM EGTA 和 0.005% Tween-20) 进行配体,如小有机分子、肽或可溶受体 (包括但不限于 SorLA、GFRα1 和 GDNF) 直接结合到固定的蛋白质上的测定。这种试剂可衍生自成熟 GDNF 的 N- 末端 (图 17) 或 GFRα1 结构域 1(图 16)。使用 NHS/EDC 方法如供应商所述活化来自 Biacore 的生物传感器芯片 (CM5, 目录号 BR-1000-14),接着用 SorLA 包被。可以采用几种不同的方法 :可以通过将结合信号 (响应单位) 与用受体之一固定化的芯片进行比较和将这一信号与空流细胞进行比较来识别候选试剂。在另一方法中,可以在不存在或存在推定抑制剂的情况下监测已确定的配体的抑制。信号差描绘拮抗剂的抑制潜力。通过使用 Biaevaluation 3.1 版程序就亲和力评估和抑制潜力拟合传感图来分析收集的数据。表面等离子体共振检测法容易

转化成其它检测法，其中将 Vps10p- 结构域受体、该配体或推定抑制剂固定在固相上。例如，通过在 50mM $NaHCO_3$，pH 9.6 中在 4℃下孵育 16 小时来将受体固定在例如来自 Nunc 的 Maxisorp 微滴定孔（目录号 439454）中。在室温下使用 5％牛血清白蛋白 (Sigma, 目录号 A9647) 封闭 2 小时后，该孔用 MB 缓冲液 (10mM HEPES, pH 7.4、140mM NaCl、2 20mM $CaCl_2$ 和 1mM $MgCl_2$) 洗涤 3 次，然后在不存在或存在各种浓度的候选抑制剂的情况下用标记的配体（例如碘化的）孵育。在孵育（例如在 4℃下整夜）和用 MB 缓冲液洗涤后，通过添加 10％ SDS 释放结合的放射性。测定示踪剂与仅用牛血清白蛋白包被的孔的非特异性结合并从在结合实验中测得的值中减去。可以使用来自 GraphPad 的 Prism 软件，版本 4 将结合数据点拟合为结合方程式。同样地，可以标记拮抗剂并直接测量与固定的受体的结合。在另一设置中，可以将受体、配体或拮抗剂固定在闪烁珠上并在邻近闪烁分析法中测量结合，其中已使用放射性标记受体结合分子。

[0326] 实施例 8: 用于识别能够抑制 SorLA 的试剂的基于细胞的筛选法

[0327] 针对 SorLA:GFRα1:GDNF 受体复合体实体的拮抗剂可充当该整个复合物的抑制剂。因此其与筛选能够结合例如 Vps10p- 结构域受体实体的试剂相关。在本实施例中描述了这种方法。可以在细胞系统中测定通过 Vps10p 结构域受体家族的成员结合、内化或信号传导。在分别不存在和存在候选抑制剂 / 拮抗剂化合物的情况下用放射性标记的配体孵育内源性地或例如用含有该受体的 cDNA 的质粒转染后表达受体之一的细胞。在孵育后，洗涤细胞以除去非特异性结合，随后收获。使用本领域技术人员公知的常规放射性配体检测法测定候选拮抗剂 / 抑制剂与受体的结合程度。参见例如 Bylund 和 Toews(1993)Am J Physiol.265(5 Pt 1):L421-9，名为“Radioligand binding methods:practical guide and tips”。也可以如 Nykjær 等人 (1992)FEBS 300:13- 和 Nielsen 等人 (2001)EMBO J 中所述测定胞吞作用 / 内化。

[0328] 实施例 9: 用于识别能够调节通过 SorLA 逆行分选 GFRα 受体的试剂的基于细胞的筛选法

[0329] 在表达 SorLA 和 GFRα 受体的细胞中通过荧光标签或荧光抗体标记表面局域化的 GFRα 受体，并用 SorLA 激动剂 / 拮抗剂孵育 30 分钟。随后如图 6 和图 11 中所示使用共焦显微术评估内化的 GFRα 受体量。

[0330] 实施例 10: 用于识别能够提高 Ret 磷酸化的试剂的基于细胞的筛选法

[0331] 在不存在或存在 SorLA 拮抗剂或激动剂的情况下用浓度递增的 GDNF 刺激 SY5Y 成神经细胞瘤细胞一段指定时间。溶解细胞并用结合到 Gammabind 珠粒 (GE Healthcare) 上的抗 Ret 抗体 (R&D Systems) 孵育该细胞溶解产物。从洗过的珠粒中洗脱沉淀的蛋白质（酸性缓冲液，随后中和）并使用抗 - 磷酸酪氨酸 (Milipore) 通过免疫印迹法目测磷酸化 Ret（如图 9 中所示）。

[0332] 实施例 11: 用于识别能够提高细胞存活的试剂的基于细胞的筛选法

[0333] 通过胰蛋白酶 -EDTA 处理收获 SY5Y 成神经细胞瘤细胞，此后再悬浮在含有 1％ glutamax 和 1％ P/S（青霉素和链霉素）的无酚红 (LONZA) 的 DMEM 中。随后将细胞铺板：在 96 孔板中，20.000 细胞 / 孔，最终体积 50 微升。第二天，在不存在或存在 SorLA 拮抗剂或激动剂的情况下用浓度递增的 GDNF 刺激细胞。添加 GDNF 等后的最终体积为 100 微升。每种样品一式四份制造。细胞在它们的正常孵育器中孵育 72 小时。在 72 小时后，制

备 MultiTox-Fluor Multiplex 细胞毒性检测试剂 (Promega) 并如制造商的技术支持文件所示添加到细胞中。简言之,对各样品而言,混合 100 微升测定缓冲液、0.1 微升 GF-AFC 底物和 0.1 微升 bis-AAF-R110 底物并添加到孔中。在定轨振荡器 (Ika® KS 260 Basic) 上以 240rpm 混合 1 分钟后,该板在 37℃下孵育 30 分钟。此后用 Wallac VICTOR3TM 1420 多重标记计数器 (Perkin ElmerTM Lifesciences) 测量荧光。在 400nmEx/505nmEm 下测量存活力。信号与存活成正比。

[0334] 测试存活的另一方式是在盖玻片而非 96 孔板上孵育细胞。在 72 小时后,可以在室温下在 PBS 中的 4%低聚甲醛 (PFA) 中固定细胞 30 分钟并使用含有 DAPI 的封片剂封固到载玻片上。可以在荧光显微镜中直接计数 DAPI 染色的细胞。

[0335] (如图 9D 中所示)。

[0336] 实施例 12: 通过 SorLA 拮抗剂 / 激动剂调节原代神经元细胞培养物中的 GDNF 家族配体活性

[0337] 由野生型小鼠大脑制备原代神经元培养物。

[0338] 在出生后 0-2 天,切出大脑,离解细胞并在例如 10ng/ml GDNF 存在下和在存在或不存在 SorLA 拮抗剂或激动剂的情况下铺板。在培养物体外成熟 1-2 周后,计数存活的神经元数。

[0339] 实施例 13: 通过 SorLA 拮抗剂 / 激动剂调节原代多巴胺能神经元中的 GDNF 活性

[0340] 由 P0-P2 大鼠的腹侧被盖区制备原代多巴胺能神经元。将大鼠幼畜断头,分离大脑并置于冷 PBS 中。大脑腹侧向下放置。最初刀口穿过整个大脑尾部至中脑曲,第二刀位于该曲喙突端,将切片平放。切片的腹侧缘沿下丘脑的顶部切割,下一刀是切片的腹侧缘与脑室孔之间的大致中间处。将组织切成更小的片段并置于冷 L15 培养基 (Gibco, Invitrogen) 中。组织用温木瓜酶溶液 (L15 培养基,2mM EDTA, 20 单位 / 毫升木瓜酶 (TMWorthington, Medinova), 0.5mM 犬尿喹啉酸和 NaOH(以将 pH 调节至大约 7) 在 37℃下孵育 30 分钟。除去培养基,在神经元培养基 (NeurobasalTM 培养基,无 L- 谷氨酰胺 (Gibco, Invitrogen)、FBS、B-27(Invitrogen)、glutamax(Invitrogen)、primocin(Amaxa)、5- 氟脱氧尿苷 (Sigma) 和尿苷 (Sigma)) 中通过温和研磨分解组织。将神经元旋转沉淀 (800rpm, 5min),在神经元培养基中稀释该小粒,并在 10ng/ml GDNF 存在下和在存在或不存在 SorLA 拮抗剂或激动剂的情况下在皮质神经胶质细胞层上铺板。神经元在 37℃下体外孵育 1 周,此后它们在室温下用在 PBS 中的 4%低聚甲醛 (PFA) 固定 30 分钟。此后它们在含有 0.1% Triton X-100 的 PBS 中洗涤两次 15 分钟,接着用在 PBS 中的 10% FBS 孵育 20 分钟。此后在 4℃下用抗 - 酪氨酸羟化酶抗体 (Pel freeze, 1:1000) 在 PBS 中的 10% FBS 中孵育盖玻片整夜。第二天,盖玻片在含有 0.1% Triton X-100 的 PBS 中洗涤三次,并在 4℃下用 Alexa-fluor® 488 羊抗兔 IgG(Invitrogen, 1:1000) 在 PBS 中的 10% FBS 中孵育整夜。盖玻片此后在 PBS 中的 0.1% Triton X-100 中洗涤 2x15min、在 PBS 中洗涤 1x15min 和在水中洗涤 1x15min。该盖玻片用 Dako 荧光封片剂 (Dako, Denmark) 封固到载玻片上。通过计数酪氨酸羟化酶阳性神经元的数量来将存活神经元数计分 (如图 12 中所示)。

[0341] 实施例 14:SorLA 拮抗剂 / 激动剂对安非他明诱发的过度活跃的作用

[0342] 小鼠用 SorLA 拮抗剂或激动剂预处理 1-30 天,并在由 (40x40x35cm) 透明 Plexiglas 台构成的旷场试验中测试安非他明诱发的过度活跃。将该台安装在连接至计

算机的摄像机下的在 Any-maze 跟踪系统控制下的昏暗房间中。将小鼠置于该台子的角落中，并如图 13 中所示在 40 分钟期间内记录它们的活动。腹腔内或静脉给予安非他明 (0.1-10mg/kg)。

[0343] 实施例 15:SorLA 拮抗剂 / 激动剂对焦虑相关行为的作用

[0344] 在高架十字迷宫中测试野生型和 SorLA 转基因小鼠的焦虑相关行为。使用高架十字迷宫作为抑郁、躁狂和焦虑相关行为的实验模型。用抗抑郁或抗焦虑药处理小鼠通常提高游走距离、线路交叉数和进入数和在开臂中度过的时间。高架十字迷宫升至地板上方 40 厘米，并由两个具有 15 厘米高的不透明壁的相反封闭臂和两个相同尺寸的相反开臂 (35x5cm) 构成。将该高架十字迷宫安装在 Any-maze 跟踪系统控制下连接至计算机的摄像机下的暗光房间中。对各小鼠进行 10 分钟测试期并如图 14 中所述测量进入数和在开臂中度过的时间。进行类似实验，其中小鼠用 SorLA 拮抗剂或激动剂预处理 1-30 天。

[0345] 实施例 16:SorLA 拮抗剂 / 激动剂对安非他明诱发的敏感的作用

[0346] 成年小鼠用 4mg/kg 安非他明或盐水预处理，每隔一天一次，5 天，同时也用 SorLA 拮抗剂或激动剂处理，并在旷场中测试自主活动。在最后一次安非他明预处理后继续用 SorLA 拮抗剂 / 激动剂处理 1 周。在第 16 天，进行敏感试验，其中所有小鼠接受安非他明 (2mg/kg) 的致敏注射并在旷场中测试自主活动。

[0347] 实施例 17:SorLA 拮抗剂 / 激动剂对小鼠中的 MPTP- 诱发的神经毒性的保护作用

[0348] 用 20mg/kg MPTP(1- 甲基 -4- 苯基 -1,2,3,6- 四氢吡啶，对多巴胺能神经元有选择性毒性的试剂）每天注射成年小鼠，持续 4 天，含或不含 SorLA 拮抗剂 / 激动剂。在注射前 1 天和在停止注射后 2 天，在由 (40x40x35cm) 透明 Plexiglas 台构成的旷场试验中记录运动活动。将该台安装在 Any-maze 跟踪系统控制下的连接至计算机的摄像机下的昏暗房间中。将小鼠置于该台子的角落中，并在 60 分钟期间内记录它们的活动。最后，用 4％低聚甲醛灌注小鼠以使用免疫组织化学评估各种形态标记，如酪氨酸羟化酶和多巴胺转运体。

[0349] 实施例 18: 用于识别能够提高细胞分化的试剂的基于细胞的筛选法

[0350] 用胰蛋白酶 -EDTA 处理收获成神经细胞瘤细胞。将细胞再悬浮在含有 10％ FBS 和 1％ P/S（青霉素和链霉素）的 DMEM-F12 培养基中并接种在 6 孔板中。第二天，除去培养基并用新鲜培养基和浓度递增的 GDNF 在不存在或存在 SorLA 拮抗剂或激动剂的情况下孵育细胞。细胞在它们的正常孵育器中孵育 72 小时，此后用连接至照相机的立体显微镜 (Leica DC300) 目测细胞。通过将神经突定义为是细胞直径的两倍长的突起，对神经突增生计分。

[0351] 实施例 19: 处理方法

[0352] 将具有肽 / 多肽性质的所得开发出的活性剂（可能基于抗体）冻干以在使用前溶解或作为即用型溶液，以使其可用于肠胃外给药途径（例如静脉 (I.V.)、肌肉内 (I.M.) 或皮下 (S.C.)。固体剂型的粘膜施用也代表这种情况中的一种可能性。如果所得开发出的活性剂具有化学性质，制备用于口服以及潜在途径，例如用于 S.C. 或 I.M. 用途的制剂。开发出的药剂用于预防用途或慢性给药以用于长期治疗。在这种情况下，活性剂干扰并由此阻碍会造成精神和行为障碍的症状的分子事件的进程发生。如果此时开发基因试验以诊断倾向于产生精神和行为障碍的个体，应使用可能与这种诊断学相关的药剂。如果已经产生精神和行为障碍 ;用该药剂进行慢性治疗代表另一可能性。该原理始终能抑制造成该疾病的症状的分子事件。最后，可以与用于神经或精神和行为障碍的常规疗法，例如与抗精神病

药、抗抑郁药或锂一起共同给予该药剂。

[0353] 实施例 20：用于识别能够通过 SorLA 调节 GDNF 家族配体 (GFL) 内化和退化的试剂的基于细胞的筛选法

[0354] GDNF 或另一 GFL 在存在或不存在 SorLA 激动剂 / 拮抗剂（例如抗体）的情况下与表达 SorLA 和 GFRα 受体的细胞孵育 2-120 分钟。通过荧光标签或荧光抗体标记 GDNF 或其它 GFL。随后如图 6 和图 11 和图 21 中所示使用共焦显微术评估内化的 GDNF 或 GFL 的量。

[0001]

序列表

<110> Lundbeck A/S

<120> SorLA 和 GDNF-家族配体受体之间的相互作用的调节

<130> 0760

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 2214
<212> PRT
<213> 人

<400> 1

Met Ala Thr Arg Ser Ser Arg Arg Glu Ser Arg Leu Pro Phe Leu Phe
1 5 10 15

Thr Leu Val Ala Leu Leu Pro Pro Gly Ala Leu Cys Glu Val Trp Thr
20 25 30

Gln Arg Leu His Gly Gly Ser Ala Pro Leu Pro Gln Asp Arg Gly Phe
35 40 45

Leu Val Val Gln Gly Asp Pro Arg Glu Leu Arg Leu Trp Ala Arg Gly
50 55 60

Asp Ala Arg Gly Ala Ser Arg Ala Asp Glu Lys Pro Leu Arg Arg Lys
65 70 75 80

Arg Ser Ala Ala Leu Gln Pro Glu Pro Ile Lys Val Tyr Gly Gln Val
85 90 95

Ser Leu Asn Asp Ser His Asn Gln Met Val Val His Trp Ala Gly Glu

[0002]

100 105 110

Lys Ser Asn Val Ile Val Ala Leu Ala Arg Asp Ser Leu Ala Leu Ala
115 120 125

Arg Pro Lys Ser Ser Asp Val Tyr Val Ser Tyr Asp Tyr Gly Lys Ser
130 135 140

Phe Lys Lys Ile Ser Asp Lys Leu Asn Phe Gly Leu Gly Asn Arg Ser
145 150 155 160

Glu Ala Val Ile Ala Gln Phe Tyr His Ser Pro Ala Asp Asn Lys Arg
165 170 175

Tyr Ile Phe Ala Asp Ala Tyr Ala Gln Tyr Leu Trp Ile Thr Phe Asp
180 185 190

Phe Cys Asn Thr Leu Gln Gly Phe Ser Ile Pro Phe Arg Ala Ala Asp
195 200 205

Leu Leu Leu His Ser Lys Ala Ser Asn Leu Leu Leu Gly Phe Asp Arg
210 215 220

Ser His Pro Asn Lys Gln Leu Trp Lys Ser Asp Asp Phe Gly Gln Thr
225 230 235 240

Trp Ile Met Ile Gln Glu His Val Lys Ser Phe Ser Trp Gly Ile Asp
245 250 255

Pro Tyr Asp Lys Pro Asn Thr Ile Tyr Ile Glu Arg His Glu Pro Ser
260 265 270

Gly Tyr Ser Thr Val Phe Arg Ser Thr Asp Phe Phe Gln Ser Arg Glu

[0003]

275 280 285

Asn Gln Glu Val Ile Leu Glu Glu Val Arg Asp Phe Gln Leu Arg Asp
290 295 300

Lys Tyr Met Phe Ala Thr Lys Val Val His Leu Leu Gly Ser Glu Gln
305 310 315 320

Gln Ser Ser Val Gln Leu Trp Val Ser Phe Gly Arg Lys Pro Met Arg
325 330 335

Ala Ala Gln Phe Val Thr Arg His Pro Ile Asn Glu Tyr Tyr Ile Ala
340 345 350

Asp Ala Ser Glu Asp Gln Val Phe Val Cys Val Ser His Ser Asn Asn
355 360 365

Arg Thr Asn Leu Tyr Ile Ser Glu Ala Glu Gly Leu Lys Phe Ser Leu
370 375 380

Ser Leu Glu Asn Val Leu Tyr Tyr Ser Pro Gly Gly Ala Gly Ser Asp
385 390 395 400

Thr Leu Val Arg Tyr Phe Ala Asn Glu Pro Phe Ala Asp Phe His Arg
405 410 415

Val Glu Gly Leu Gln Gly Val Tyr Ile Ala Thr Leu Ile Asn Gly Ser
420 425 430

Met Asn Glu Glu Asn Met Arg Ser Val Ile Thr Phe Asp Lys Gly Gly
435 440 445

Thr Trp Glu Phe Leu Gln Ala Pro Ala Phe Thr Gly Tyr Gly Glu Lys

[0004]

450 455 460

Ile Asn Cys Glu Leu Ser Gln Gly Cys Ser Leu His Leu Ala Gln Arg
465 470 475 480

Leu Ser Gln Leu Leu Asn Leu Gln Leu Arg Arg Met Pro Ile Leu Ser
485 490 495

Lys Glu Ser Ala Pro Gly Leu Ile Ile Ala Thr Gly Ser Val Gly Lys
500 505 510

Asn Leu Ala Ser Lys Thr Asn Val Tyr Ile Ser Ser Ser Ala Gly Ala
515 520 525

Arg Trp Arg Glu Ala Leu Pro Gly Pro His Tyr Tyr Thr Trp Gly Asp
530 535 540

His Gly Gly Ile Ile Thr Ala Ile Ala Gln Gly Met Glu Thr Asn Glu
545 550 555 560

Leu Lys Tyr Ser Thr Asn Glu Gly Glu Thr Trp Lys Thr Phe Ile Phe
565 570 575

Ser Glu Lys Pro Val Phe Val Tyr Gly Leu Leu Thr Glu Pro Gly Glu
580 585 590

Lys Ser Thr Val Phe Thr Ile Phe Gly Ser Asn Lys Glu Asn Val His
595 600 605

Ser Trp Leu Ile Leu Gln Val Asn Ala Thr Asp Ala Leu Gly Val Pro
610 615 620

Cys Thr Glu Asn Asp Tyr Lys Leu Trp Ser Pro Ser Asp Glu Arg Gly

[0005]

625 630 635 640

Asn Glu Cys Leu Leu Gly His Lys Thr Val Phe Lys Arg Arg Thr Pro
645 650 655

His Ala Thr Cys Phe Asn Gly Glu Asp Phe Asp Arg Pro Val Val Val
660 665 670

Ser Asn Cys Ser Cys Thr Arg Glu Asp Tyr Glu Cys Asp Phe Gly Phe
675 680 685

Lys Met Ser Glu Asp Leu Ser Leu Glu Val Cys Val Pro Asp Pro Glu
690 695 700

Phe Ser Gly Lys Ser Tyr Ser Pro Pro Val Pro Cys Pro Val Gly Ser
705 710 715 720

Thr Tyr Arg Arg Thr Arg Gly Tyr Arg Lys Ile Ser Gly Asp Thr Cys
725 730 735

Ser Gly Gly Asp Val Glu Ala Arg Leu Glu Gly Glu Leu Val Pro Cys
740 745 750

Pro Leu Ala Glu Glu Asn Glu Phe Ile Leu Tyr Ala Val Arg Lys Ser
755 760 765

Ile Tyr Arg Tyr Asp Leu Ala Ser Gly Ala Thr Glu Gln Leu Pro Leu
770 775 780

Thr Gly Leu Arg Ala Ala Val Ala Leu Asp Phe Asp Tyr Glu His Asn
785 790 795 800

Cys Leu Tyr Trp Ser Asp Leu Ala Leu Asp Val Ile Gln Arg Leu Cys

[0006]

805 810 815

Leu Asn Gly Ser Thr Gly Gln Glu Val Ile Ile Asn Ser Gly Leu Glu
820 825 830

Thr Val Glu Ala Leu Ala Phe Glu Pro Leu Ser Gln Leu Leu Tyr Trp
835 840 845

Val Asp Ala Gly Phe Lys Lys Ile Glu Val Ala Asn Pro Asp Gly Asp
850 855 860

Phe Arg Leu Thr Ile Val Asn Ser Ser Val Leu Asp Arg Pro Arg Ala
865 870 875 880

Leu Val Leu Val Pro Gln Glu Gly Val Met Phe Trp Thr Asp Trp Gly
885 890 895

Asp Leu Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Ser Asn Met Asp Gly Ser Ala Ala
900 905 910

Tyr His Leu Val Ser Glu Asp Val Lys Trp Pro Asn Gly Ile Ser Val
915 920 925

Asp Asp Gln Trp Ile Tyr Trp Thr Asp Ala Tyr Leu Glu Cys Ile Glu
930 935 940

Arg Ile Thr Phe Ser Gly Gln Gln Arg Ser Val Ile Leu Asp Asn Leu
945 950 955 960

Pro His Pro Tyr Ala Ile Ala Val Phe Lys Asn Glu Ile Tyr Trp Asp
965 970 975

Asp Trp Ser Gln Leu Ser Ile Phe Arg Ala Ser Lys Tyr Ser Gly Ser

[0007]

980 985 990

Gln Met Glu Ile Leu Ala Asn Gln Leu Thr Gly Leu Met Asp Met Lys
995 1000 1005

Ile Phe Tyr Lys Gly Lys Asn Thr Gly Ser Asn Ala Cys Val Pro
1010 1015 1020

Arg Pro Cys Ser Leu Leu Cys Leu Pro Lys Ala Asn Asn Ser Arg
1025 1030 1035

Ser Cys Arg Cys Pro Glu Asp Val Ser Ser Ser Val Leu Pro Ser
1040 1045 1050

Gly Asp Leu Met Cys Asp Cys Pro Gln Gly Tyr Gln Leu Lys Asn
1055 1060 1065

Asn Thr Cys Val Lys Gln Glu Asn Thr Cys Leu Arg Asn Gln Tyr
1070 1075 1080

Arg Cys Ser Asn Gly Asn Cys Ile Asn Ser Ile Trp Trp Cys Asp
1085 1090 1095

Phe Asp Asn Asp Cys Gly Asp Met Ser Asp Glu Arg Asn Cys Pro
1100 1105 1110

Thr Thr Ile Cys Asp Leu Asp Thr Gln Phe Arg Cys Gln Glu Ser
1115 1120 1125

Gly Thr Cys Ile Pro Leu Ser Tyr Lys Cys Asp Leu Glu Asp Asp
1130 1135 1140

Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Ser His Cys Glu Met His Gln Cys

[0008]

1145 1150 1155

Arg Ser Asp Glu Tyr Asn Cys Ser Ser Gly Met Cys Ile Arg Ser
1160 1165 1170

Ser Trp Val Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Arg Asp Trp Ser Asp
1175 1180 1185

Glu Ala Asn Cys Thr Ala Ile Tyr His Thr Cys Glu Ala Ser Asn
1190 1195 1200

Phe Gln Cys Arg Asn Gly His Cys Ile Pro Gln Arg Trp Ala Cys
1205 1210 1215

Asp Gly Asp Thr Asp Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu Asp Pro Val
1220 1225 1230

Asn Cys Glu Lys Lys Cys Asn Gly Phe Arg Cys Pro Asn Gly Thr
1235 1240 1245

Cys Ile Pro Ser Ser Lys His Cys Asp Gly Leu Arg Asp Cys Ser
1250 1255 1260

Asp Gly Ser Asp Glu Gln His Cys Glu Pro Leu Cys Thr His Phe
1265 1270 1275

Met Asp Phe Val Cys Lys Asn Arg Gln Gln Cys Leu Phe His Ser
1280 1285 1290

Met Val Cys Asp Gly Ile Ile Gln Cys Arg Asp Gly Ser Asp Glu
1295 1300 1305

Asp Ala Ala Phe Ala Gly Cys Ser Gln Asp Pro Glu Phe His Lys

[0009]

1310 1315 1320

Val Cys Asp Glu Phe Gly Phe Gln Cys Gln Asn Gly Val Cys Ile
1325 1330 1335

Ser Leu Ile Trp Lys Cys Asp Gly Met Asp Asp Cys Gly Asp Tyr
1340 1345 1350

Ser Asp Glu Ala Asn Cys Glu Asn Pro Thr Glu Ala Pro Asn Cys
1355 1360 1365

Ser Arg Tyr Phe Gln Phe Arg Cys Glu Asn Gly His Cys Ile Pro
1370 1375 1380

Asn Arg Trp Lys Cys Asp Arg Glu Asn Asp Cys Gly Asp Trp Ser
1385 1390 1395

Asp Glu Lys Asp Cys Gly Asp Ser His Ile Leu Pro Phe Ser Thr
1400 1405 1410

Pro Gly Pro Ser Thr Cys Leu Pro Asn Tyr Tyr Arg Cys Ser Ser
1415 1420 1425

Gly Thr Cys Val Met Asp Thr Trp Val Cys Asp Gly Tyr Arg Asp
1430 1435 1440

Cys Ala Asp Gly Ser Asp Glu Glu Ala Cys Pro Leu Leu Ala Asn
1445 1450 1455

Val Thr Ala Ala Ser Thr Pro Thr Gln Leu Gly Arg Cys Asp Arg
1460 1465 1470

Phe Glu Phe Glu Cys His Gln Pro Lys Thr Cys Ile Pro Asn Trp

[0010]

1475 1480 1485

Lys Arg Cys Asp Gly His Gln Asp Cys Gln Asp Gly Arg Asp Glu
1490 1495 1500

Ala Asn Cys Pro Thr His Ser Thr Leu Thr Cys Met Ser Arg Glu
1505 1510 1515

Phe Gln Cys Glu Asp Gly Glu Ala Cys Ile Val Leu Ser Glu Arg
1520 1525 1530

Cys Asp Gly Phe Leu Asp Cys Ser Asp Glu Ser Asp Glu Lys Ala
1535 1540 1545

Cys Ser Asp Glu Leu Thr Val Tyr Lys Val Gln Asn Leu Gln Trp
1550 1555 1560

Thr Ala Asp Phe Ser Gly Asp Val Thr Leu Thr Trp Met Arg Pro
1565 1570 1575

Lys Lys Met Pro Ser Ala Ser Cys Val Tyr Asn Val Tyr Tyr Arg
1580 1585 1590

Val Val Gly Glu Ser Ile Trp Lys Thr Leu Glu Thr His Ser Asn
1595 1600 1605

Lys Thr Asn Thr Val Leu Lys Val Leu Lys Pro Asp Thr Thr Tyr
1610 1615 1620

Gln Val Lys Val Gln Val Gln Cys Leu Ser Lys Ala His Asn Thr
1625 1630 1635

Asn Asp Phe Val Thr Leu Arg Thr Pro Glu Gly Leu Pro Asp Ala

[0011]

1640 1645 1650

Pro Arg Asn Leu Gln Leu Ser Leu Pro Arg Glu Ala Glu Gly Val
1655 1660 1665

Ile Val Gly His Trp Ala Pro Pro Ile His Thr His Gly Leu Ile
1670 1675 1680

Arg Glu Tyr Ile Val Glu Tyr Ser Arg Ser Gly Ser Lys Met Trp
1685 1690 1695

Ala Ser Gln Arg Ala Ala Ser Asn Phe Thr Glu Ile Lys Asn Leu
1700 1705 1710

Leu Val Asn Thr Leu Tyr Thr Val Arg Val Ala Ala Val Thr Ser
1715 1720 1725

Arg Gly Ile Gly Asn Trp Ser Asp Ser Lys Ser Ile Thr Thr Ile
1730 1735 1740

Lys Gly Lys Val Ile Pro Pro Pro Asp Ile His Ile Asp Ser Tyr
1745 1750 1755

Gly Glu Asn Tyr Leu Ser Phe Thr Leu Thr Met Glu Ser Asp Ile
1760 1765 1770

Lys Val Asn Gly Tyr Val Val Asn Leu Phe Trp Ala Phe Asp Thr
1775 1780 1785

His Lys Gln Glu Arg Arg Thr Leu Asn Phe Arg Gly Ser Ile Leu
1790 1795 1800

Ser His Lys Val Gly Asn Leu Thr Ala His Thr Ser Tyr Glu Ile

[0012]

1805 1810 1815

Ser Ala Trp Ala Lys Thr Asp Leu Gly Asp Ser Pro Leu Ala Phe
1820 1825 1830

Glu His Val Met Thr Arg Gly Val Arg Pro Pro Ala Pro Ser Leu
1835 1840 1845

Lys Ala Lys Ala Ile Asn Gln Thr Ala Val Glu Cys Thr Trp Thr
1850 1855 1860

Gly Pro Arg Asn Val Val Tyr Gly Ile Phe Tyr Ala Thr Ser Phe
1865 1870 1875

Leu Asp Leu Tyr Arg Asn Pro Lys Ser Leu Thr Thr Ser Leu His
1880 1885 1890

Asn Lys Thr Val Ile Val Ser Lys Asp Glu Gln Tyr Leu Phe Leu
1895 1900 1905

Val Arg Val Val Val Pro Tyr Gln Gly Pro Ser Ser Asp Tyr Val
1910 1915 1920

Val Val Lys Met Ile Pro Asp Ser Arg Leu Pro Pro Arg His Leu
1925 1930 1935

His Val Val His Thr Gly Lys Thr Ser Val Val Ile Lys Trp Glu
1940 1945 1950

Ser Pro Tyr Asp Ser Pro Asp Gln Asp Leu Leu Tyr Ala Val Ala
1955 1960 1965

Val Lys Asp Leu Ile Arg Lys Thr Asp Arg Ser Tyr Lys Val Lys

[0013]

1970 1975 1980

Ser Arg Asn Ser Thr Val Glu Tyr Thr Leu Asn Lys Leu Glu Pro
1985 1990 1995

Gly Gly Lys Tyr His Ile Ile Val Gln Leu Gly Asn Met Ser Lys
2000 2005 2010

Asp Ser Ser Ile Lys Ile Thr Thr Val Ser Leu Ser Ala Pro Asp
2015 2020 2025

Ala Leu Lys Ile Ile Thr Glu Asn Asp His Val Leu Leu Phe Trp
2030 2035 2040

Lys Ser Leu Ala Leu Lys Glu Lys His Phe Asn Glu Ser Arg Gly
2045 2050 2055

Tyr Glu Ile His Met Phe Asp Ser Ala Met Asn Ile Thr Ala Tyr
2060 2065 2070

Leu Gly Asn Thr Thr Asp Asn Phe Phe Lys Ile Ser Asn Leu Lys
2075 2080 2085

Met Gly His Asn Tyr Thr Phe Thr Val Gln Ala Arg Cys Leu Phe
2090 2095 2100

Gly Asn Gln Ile Cys Gly Glu Pro Ala Ile Leu Leu Tyr Asp Glu
2105 2110 2115

Leu Gly Ser Gly Ala Asp Ala Ser Ala Thr Gln Ala Ala Arg Ser
2120 2125 2130

Thr Asp Val Ala Ala Val Val Val Pro Ile Leu Phe Leu Ile Leu

[0014]

2135 2140 2145

Leu Ser Leu Gly Val Gly Phe Ala Ile Leu Tyr Thr Lys His Arg
2150 2155 2160

Arg Leu Gln Ser Ser Phe Thr Ala Phe Ala Asn Ser His Tyr Ser
2165 2170 2175

Ser Arg Leu Gly Ser Ala Ile Phe Ser Ser Gly Asp Asp Leu Gly
2180 2185 2190

Glu Asp Asp Glu Asp Ala Pro Met Ile Thr Gly Phe Ser Asp Asp
2195 2200 2205

Val Pro Met Val Ile Ala
2210

<210> 2
<211> 53
<212> PRT
<213> 人

<400> 2

Glu Val Trp Thr Gln Arg Leu His Gly Gly Ser Ala Pro Leu Pro Gln
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Leu Val Val Gln Gly Asp Pro Arg Glu Leu Arg Leu
20 25 30

Trp Ala Arg Gly Asp Ala Arg Gly Ala Ser Arg Ala Asp Glu Lys Pro
35 40 45

Leu Arg Arg Lys Arg
50

[0015]

<210> 3
<211> 676
<212> PRT
<213> 人

<400> 3

Ser Ala Ala Leu Gln Pro Glu Pro Ile Lys Val Tyr Gly Gln Val Ser
1 5 10 15

Leu Asn Asp Ser His Asn Gln Met Val Val His Trp Ala Gly Glu Lys
20 25 30

Ser Asn Val Ile Val Ala Leu Ala Arg Asp Ser Leu Ala Leu Ala Arg
35 40 45

Pro Lys Ser Ser Asp Val Tyr Val Ser Tyr Asp Tyr Gly Lys Ser Phe
50 55 60

Lys Lys Ile Ser Asp Lys Leu Asn Phe Gly Leu Gly Asn Arg Ser Glu
65 70 75 80

Ala Val Ile Ala Gln Phe Tyr His Ser Pro Ala Asp Asn Lys Arg Tyr
85 90 95

Ile Phe Ala Asp Ala Tyr Ala Gln Tyr Leu Trp Ile Thr Phe Asp Phe
100 105 110

Cys Asn Thr Leu Gln Gly Phe Ser Ile Pro Phe Arg Ala Ala Asp Leu
115 120 125

Leu Leu His Ser Lys Ala Ser Asn Leu Leu Leu Gly Phe Asp Arg Ser
130 135 140

[0016]

His Pro Asn Lys Gln Leu Trp Lys Ser Asp Asp Phe Gly Gln Thr Trp
145 150 155 160

Ile Met Ile Gln Glu His Val Lys Ser Phe Ser Trp Gly Ile Asp Pro
165 170 175

Tyr Asp Lys Pro Asn Thr Ile Tyr Ile Glu Arg His Glu Pro Ser Gly
180 185 190

Tyr Ser Thr Val Phe Arg Ser Thr Asp Phe Phe Gln Ser Arg Glu Asn
195 200 205

Gln Glu Val Ile Leu Glu Glu Val Arg Asp Phe Gln Leu Arg Asp Lys
210 215 220

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

Ser Ser Val Gln Leu Trp Val Ser Phe Gly Arg Lys Pro Met Arg Ala
245 250 255

Ala Gln Phe Val Thr Arg His Pro Ile Asn Glu Tyr Tyr Ile Ala Asp
260 265 270

Ala Ser Glu Asp Gln Val Phe Val Cys Val Ser His Ser Asn Asn Arg
275 280 285

Thr Asn Leu Tyr Ile Ser Glu Ala Glu Gly Leu Lys Phe Ser Leu Ser
290 295 300

Leu Glu Asn Val Leu Tyr Tyr Ser Pro Gly Gly Ala Gly Ser Asp Thr
305 310 315 320

[0017]

Leu Val Arg Tyr Phe Ala Asn Glu Pro Phe Ala Asp Phe His Arg Val
325 330 335

Glu Gly Leu Gln Gly Val Tyr Ile Ala Thr Leu Ile Asn Gly Ser Met
340 345 350

Asn Glu Glu Asn Met Arg Ser Val Ile Thr Phe Asp Lys Gly Gly Thr
355 360 365

Trp Glu Phe Leu Gln Ala Pro Ala Phe Thr Gly Tyr Gly Glu Lys Ile
370 375 380

Asn Cys Glu Leu Ser Gln Gly Cys Ser Leu His Leu Ala Gln Arg Leu
385 390 395 400

Ser Gln Leu Leu Asn Leu Gln Leu Arg Arg Met Pro Ile Leu Ser Lys
405 410 415

Glu Ser Ala Pro Gly Leu Ile Ile Ala Thr Gly Ser Val Gly Lys Asn
420 425 430

Leu Ala Ser Lys Thr Asn Val Tyr Ile Ser Ser Ser Ala Gly Ala Arg
435 440 445

Trp Arg Glu Ala Leu Pro Gly Pro His Tyr Tyr Thr Trp Gly Asp His
450 455 460

Gly Gly Ile Ile Thr Ala Ile Ala Gln Gly Met Glu Thr Asn Glu Leu
465 470 475 480

Lys Tyr Ser Thr Asn Glu Gly Glu Thr Trp Lys Thr Phe Ile Phe Ser
485 490 495

[0018]

Glu Lys Pro Val Phe Val Tyr Gly Leu Leu Thr Glu Pro Gly Glu Lys
500 505 510

Ser Thr Val Phe Thr Ile Phe Gly Ser Asn Lys Glu Asn Val His Ser
515 520 525

Trp Leu Ile Leu Gln Val Asn Ala Thr Asp Ala Leu Gly Val Pro Cys
530 535 540

Thr Glu Asn Asp Tyr Lys Leu Trp Ser Pro Ser Asp Glu Arg Gly Asn
545 550 555 560

Glu Cys Leu Leu Gly His Lys Thr Val Phe Lys Arg Arg Thr Pro His
565 570 575

Ala Thr Cys Phe Asn Gly Glu Asp Phe Asp Arg Pro Val Val Val Ser
580 585 590

Asn Cys Ser Cys Thr Arg Glu Asp Tyr Glu Cys Asp Phe Gly Phe Lys
595 600 605

Met Ser Glu Asp Leu Ser Leu Glu Val Cys Val Pro Asp Pro Glu Phe
610 615 620

Ser Gly Lys Ser Tyr Ser Pro Pro Val Pro Cys Pro Val Gly Ser Thr
625 630 635 640

Tyr Arg Arg Thr Arg Gly Tyr Arg Lys Ile Ser Gly Asp Thr Cys Ser
645 650 655

Gly Gly Asp Val Glu Ala Arg Leu Glu Gly Glu Leu Val Pro Cys Pro
660 665 670

[0019]

Leu Ala Glu Glu
675

<210> 4
<211> 465
<212> PRT
<213> 人

<400> 4

Met Phe Leu Ala Thr Leu Tyr Phe Ala Leu Pro Leu Leu Asp Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ser Ala Glu Val Ser Gly Gly Asp Arg Leu Asp Cys Val Lys Ala
20 25 30

Ser Asp Gln Cys Leu Lys Glu Gln Ser Cys Ser Thr Lys Tyr Arg Thr
35 40 45

Leu Arg Gln Cys Val Ala Gly Lys Glu Thr Asn Phe Ser Leu Ala Ser
50 55 60

Gly Leu Glu Ala Lys Asp Glu Cys Arg Ser Ala Met Glu Ala Leu Lys
65 70 75 80

Gln Lys Ser Leu Tyr Asn Cys Arg Cys Lys Arg Gly Met Lys Lys Glu
85 90 95

Lys Asn Cys Leu Arg Ile Tyr Trp Ser Met Tyr Gln Ser Leu Gln Gly
100 105 110

Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ser Pro Tyr Glu Pro Val Asn Ser Arg Leu
115 120 125

[0020]

Ser Asp Ile Phe Arg Val Val Pro Phe Ile Ser Asp Val Phe Gln Gln
130 135 140

Val Glu His Ile Pro Lys Gly Asn Asn Cys Leu Asp Ala Ala Lys Ala
145 150 155 160

Cys Asn Leu Asp Asp Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser Ala Tyr Ile Thr
165 170 175

Pro Cys Thr Thr Ser Val Ser Asn Asp Val Cys Asn Arg Arg Lys Cys
180 185 190

His Lys Ala Leu Arg Gln Phe Phe Asp Lys Val Pro Ala Lys His Ser
195 200 205

Tyr Gly Met Leu Phe Cys Ser Cys Arg Asp Ile Ala Cys Thr Glu Arg
210 215 220

Arg Arg Gln Thr Ile Val Pro Val Cys Ser Tyr Glu Glu Arg Glu Lys
225 230 235 240

Pro Asn Cys Leu Asn Leu Gln Asp Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile Cys
245 250 255

Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu Ser Arg
260 265 270

Ser Val Ser Ser Cys Leu Lys Glu Asn Tyr Ala Asp Cys Leu Leu Ala
275 280 285

Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr Val Met Thr Pro Asn Tyr Ile Asp Ser
290 295 300

[0021]

Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly Asn
305 310 315 320

Asp Leu Glu Glu Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn Thr
325 330 335

Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr
340 345 350

Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro Val Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr
355 360 365

Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu
370 375 380

Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala
385 390 395 400

Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Asn Thr His Leu Cys Ile Ser
405 410 415

Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ser His Ile Thr
420 425 430

Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Gly Leu Ser Pro Leu Leu
435 440 445

Val Leu Val Val Thr Ala Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr Glu Thr
450 455 460

Ser
465

[0022]

<210> 5
<211> 120
<212> PRT
<213> 人

<400> 5

Asp Arg Leu Asp Cys Val Lys Ala Ser Asp Gln Cys Leu Lys Glu Gln
1 5 10 15

Ser Cys Ser Thr Lys Tyr Arg Thr Leu Arg Gln Cys Val Ala Gly Lys
20 25 30

Glu Thr Asn Phe Ser Leu Ala Ser Gly Leu Glu Ala Lys Asp Glu Cys
35 40 45

Arg Ser Ala Met Glu Ala Leu Lys Gln Lys Ser Leu Tyr Asn Cys Arg
50 55 60

Cys Lys Arg Gly Met Lys Lys Glu Lys Asn Cys Leu Arg Ile Tyr Trp
65 70 75 80

Ser Met Tyr Gln Ser Leu Gln Gly Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ser Pro
85 90 95

Tyr Glu Pro Val Asn Ser Arg Leu Ser Asp Ile Phe Arg Val Val Pro
100 105 110

Phe Ile Ser Asp Val Phe Gln Gln
115 120

<210> 6
<211> 460
<212> PRT
<213> 人

[0023]

<400> 6

Met Phe Leu Ala Thr Leu Tyr Phe Ala Leu Pro Leu Leu Asp Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ser Ala Glu Val Ser Gly Gly Asp Arg Leu Asp Cys Val Lys Ala
20 25 30

Ser Asp Gln Cys Leu Lys Glu Gln Ser Cys Ser Thr Lys Tyr Arg Thr
35 40 45

Leu Arg Gln Cys Val Ala Gly Lys Glu Thr Asn Phe Ser Leu Ala Ser
50 55 60

Gly Leu Glu Ala Lys Asp Glu Cys Arg Ser Ala Met Glu Ala Leu Lys
65 70 75 80

Gln Lys Ser Leu Tyr Asn Cys Arg Cys Lys Arg Gly Met Lys Lys Glu
85 90 95

Lys Asn Cys Leu Arg Ile Tyr Trp Ser Met Tyr Gln Ser Leu Gln Gly
100 105 110

Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ser Pro Tyr Glu Pro Val Asn Ser Arg Leu
115 120 125

Ser Asp Ile Phe Arg Val Val Pro Phe Ile Ser Val Glu His Ile Pro
130 135 140

Lys Gly Asn Asn Cys Leu Asp Ala Ala Lys Ala Cys Asn Leu Asp Asp
145 150 155 160

Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser Ala Tyr Ile Thr Pro Cys Thr Thr Ser
165 170 175

[0024]

Val Ser Asn Asp Val Cys Asn Arg Arg Lys Cys His Lys Ala Leu Arg
180 185 190

Gln Phe Phe Asp Lys Val Pro Ala Lys His Ser Tyr Gly Met Leu Phe
195 200 205

Cys Ser Cys Arg Asp Ile Ala Cys Thr Glu Arg Arg Arg Gln Thr Ile
210 215 220

Val Pro Val Cys Ser Tyr Glu Glu Arg Glu Lys Pro Asn Cys Leu Asn
225 230 235 240

Leu Gln Asp Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile Cys Arg Ser Arg Leu Ala
245 250 255

Asp Phe Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu Ser Arg Ser Val Ser Ser Cys
260 265 270

Leu Lys Glu Asn Tyr Ala Asp Cys Leu Leu Ala Tyr Ser Gly Leu Ile
275 280 285

Gly Thr Val Met Thr Pro Asn Tyr Ile Asp Ser Ser Ser Leu Ser Val
290 295 300

Ala Pro Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly Asn Asp Leu Glu Glu Cys
305 310 315 320

Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn Thr Cys Leu Lys Asn Ala
325 330 335

Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr Val Trp Gln Pro Ala
340 345 350

[0025]

Phe Pro Val Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Ala Leu Arg Val
355 360 365

Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu Asn Glu Ile Pro Thr
370 375 380

His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala Gln Lys Leu Lys Ser
385 390 395 400

Asn Val Ser Gly Asn Thr His Leu Cys Ile Ser Asn Gly Asn Tyr Glu
405 410 415

Lys Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ser His Ile Thr Thr Lys Ser Met Ala
420 425 430

Ala Pro Pro Ser Cys Gly Leu Ser Pro Leu Leu Val Leu Val Val Thr
435 440 445

Ala Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr Glu Thr Ser
450 455 460

<210> 7
<211> 115
<212> PRT
<213> 人

<400> 7

Asp Arg Leu Asp Cys Val Lys Ala Ser Asp Gln Cys Leu Lys Glu Gln
1 5 10 15

Ser Cys Ser Thr Lys Tyr Arg Thr Leu Arg Gln Cys Val Ala Gly Lys
20 25 30

[0026]

Glu Thr Asn Phe Ser Leu Ala Ser Gly Leu Glu Ala Lys Asp Glu Cys
35 40 45

Arg Ser Ala Met Glu Ala Leu Lys Gln Lys Ser Leu Tyr Asn Cys Arg
50 55 60

Cys Lys Arg Gly Met Lys Lys Glu Lys Asn Cys Leu Arg Ile Tyr Trp
65 70 75 80

Ser Met Tyr Gln Ser Leu Gln Gly Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ser Pro
85 90 95

Tyr Glu Pro Val Asn Ser Arg Leu Ser Asp Ile Phe Arg Val Val Pro
100 105 110

Phe Ile Ser
115

<210> 8
<211> 464
<212> PRT
<213> 人

<400> 8

Met Ile Leu Ala Asn Val Phe Cys Leu Phe Phe Phe Leu Asp Glu Thr
1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Ala Ser Pro Ser Ser Leu Gln Gly Pro Glu Leu His
20 25 30

Gly Trp Arg Pro Pro Val Asp Cys Val Arg Ala Asn Glu Leu Cys Ala
35 40 45

[0027]

Ala Glu Ser Asn Cys Ser Ser Arg Tyr Arg Thr Leu Arg Gln Cys Leu
50 55 60

Ala Gly Arg Asp Arg Asn Thr Met Leu Ala Asn Lys Glu Cys Gln Ala
65 70 75 80

Ala Leu Glu Val Leu Gln Glu Ser Pro Leu Tyr Asp Cys Arg Cys Lys
85 90 95

Arg Gly Met Lys Lys Glu Leu Gln Cys Leu Gln Ile Tyr Trp Ser Ile
100 105 110

His Leu Gly Leu Thr Glu Gly Glu Glu Phe Tyr Glu Ala Ser Pro Tyr
115 120 125

Glu Pro Val Thr Ser Arg Leu Ser Asp Ile Phe Arg Leu Ala Ser Ile
130 135 140

Phe Ser Gly Thr Gly Ala Asp Pro Val Val Ser Ala Lys Ser Asn His
145 150 155 160

Cys Leu Asp Ala Ala Lys Ala Cys Asn Leu Asn Asp Asn Cys Lys Lys
165 170 175

Leu Arg Ser Ser Tyr Ile Ser Ile Cys Asn Arg Glu Ile Ser Pro Thr
180 185 190

Glu Arg Cys Asn Arg Arg Lys Cys His Lys Ala Leu Arg Gln Phe Phe
195 200 205

Asp Arg Val Pro Ser Glu Tyr Thr Tyr Arg Met Leu Phe Cys Ser Cys
210 215 220

[0028]

Gln Asp Gln Ala Cys Ala Glu Arg Arg Arg Gln Thr Ile Leu Pro Ser
225 230 235 240

Cys Ser Tyr Glu Asp Lys Glu Lys Pro Asn Cys Leu Asp Leu Arg Gly
245 250 255

Val Cys Arg Thr Asp His Leu Cys Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe His
260 265 270

Ala Asn Cys Arg Ala Ser Tyr Gln Thr Val Thr Ser Cys Pro Ala Asp
275 280 285

Asn Tyr Gln Ala Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Gly Met Ile Gly Phe Asp
290 295 300

Met Thr Pro Asn Tyr Val Asp Ser Ser Pro Thr Gly Ile Val Val Ser
305 310 315 320

Pro Trp Cys Ser Cys Arg Gly Ser Gly Asn Met Glu Glu Glu Cys Glu
325 330 335

Lys Phe Leu Arg Asp Phe Thr Glu Asn Pro Cys Leu Arg Asn Ala Ile
340 345 350

Gln Ala Phe Gly Asn Gly Thr Asp Val Asn Val Ser Pro Lys Gly Pro
355 360 365

Ser Phe Gln Ala Thr Gln Ala Pro Arg Val Glu Lys Thr Pro Ser Leu
370 375 380

Pro Asp Asp Leu Ser Asp Ser Thr Ser Leu Gly Thr Ser Val Ile Thr
385 390 395 400

[0029]

Thr Cys Thr Ser Val Gln Glu Gln Gly Leu Lys Ala Asn Asn Ser Lys
405 410 415

Glu Leu Ser Met Cys Phe Thr Glu Leu Thr Thr Asn Ile Ile Pro Gly
420 425 430

Ser Asn Lys Val Ile Lys Pro Asn Ser Gly Pro Ser Arg Ala Arg Pro
435 440 445

Ser Ala Ala Leu Thr Val Leu Ser Val Leu Met Leu Lys Leu Ala Leu
450 455 460

<210> 9
<211> 331
<212> PRT
<213> 人

<400> 9

Met Ile Leu Ala Asn Val Phe Cys Leu Phe Phe Phe Leu Gly Thr Gly
1 5 10 15

Ala Asp Pro Val Val Ser Ala Lys Ser Asn His Cys Leu Asp Ala Ala
20 25 30

Lys Ala Cys Asn Leu Asn Asp Asn Cys Lys Lys Leu Arg Ser Ser Tyr
35 40 45

Ile Ser Ile Cys Asn Arg Glu Ile Ser Pro Thr Glu Arg Cys Asn Arg
50 55 60

Arg Lys Cys His Lys Ala Leu Arg Gln Phe Phe Asp Arg Val Pro Ser
65 70 75 80

Glu Tyr Thr Tyr Arg Met Leu Phe Cys Ser Cys Gln Asp Gln Ala Cys

[0030]

85 90 95

Ala Glu Arg Arg Arg Gln Thr Ile Leu Pro Ser Cys Ser Tyr Glu Asp
100 105 110

Lys Glu Lys Pro Asn Cys Leu Asp Leu Arg Gly Val Cys Arg Thr Asp
115 120 125

His Leu Cys Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe His Ala Asn Cys Arg Ala
130 135 140

Ser Tyr Gln Thr Val Thr Ser Cys Pro Ala Asp Asn Tyr Gln Ala Cys
145 150 155 160

Leu Gly Ser Tyr Ala Gly Met Ile Gly Phe Asp Met Thr Pro Asn Tyr
165 170 175

Val Asp Ser Ser Pro Thr Gly Ile Val Val Ser Pro Trp Cys Ser Cys
180 185 190

Arg Gly Ser Gly Asn Met Glu Glu Glu Cys Glu Lys Phe Leu Arg Asp
195 200 205

Phe Thr Glu Asn Pro Cys Leu Arg Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn
210 215 220

Gly Thr Asp Val Asn Val Ser Pro Lys Gly Pro Ser Phe Gln Ala Thr
225 230 235 240

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

Asp Ser Thr Ser Leu Gly Thr Ser Val Ile Thr Thr Cys Thr Ser Val

[0031]

260 265 270

Gln Glu Gln Gly Leu Lys Ala Asn Asn Ser Lys Glu Leu Ser Met Cys
275 280 285

Phe Thr Glu Leu Thr Thr Asn Ile Ile Pro Gly Ser Asn Lys Val Ile
290 295 300

Lys Pro Asn Ser Gly Pro Ser Arg Ala Arg Pro Ser Ala Ala Leu Thr
305 310 315 320

Val Leu Ser Val Leu Met Leu Lys Leu Ala Leu
325 330

<210> 10
<211> 400
<212> PRT
<213> 人

<400> 10

Met Val Arg Pro Leu Asn Pro Arg Pro Leu Pro Pro Val Val Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Pro Pro Ser Pro Leu Pro Leu Ala Ala Gly Asp
20 25 30

Pro Leu Pro Thr Glu Ser Arg Leu Met Asn Ser Cys Leu Gln Ala Arg
35 40 45

Arg Lys Cys Gln Ala Asp Pro Thr Cys Ser Ala Ala Tyr His His Leu
50 55 60

Asp Ser Cys Thr Ser Ser Ile Ser Thr Pro Leu Pro Ser Glu Glu Pro
65 70 75 80

[0032]

Ser Val Pro Ala Asp Cys Leu Glu Ala Ala Gln Gln Leu Arg Asn Ser
85 90 95

Ser Leu Ile Gly Cys Met Cys His Arg Arg Met Lys Asn Gln Val Ala
100 105 110

Cys Leu Asp Ile Tyr Trp Thr Val His Arg Ala Arg Ser Leu Gly Asn
115 120 125

Tyr Glu Leu Asp Val Ser Pro Tyr Glu Asp Thr Val Thr Ser Lys Pro
130 135 140

Trp Lys Met Asn Leu Ser Lys Leu Asn Met Leu Lys Pro Asp Ser Asp
145 150 155 160

Leu Cys Leu Lys Phe Ala Met Leu Cys Thr Leu Asn Asp Lys Cys Asp
165 170 175

Arg Leu Arg Lys Ala Tyr Gly Glu Ala Cys Ser Gly Pro His Cys Gln
180 185 190

Arg His Val Cys Leu Arg Gln Leu Leu Thr Phe Phe Glu Lys Ala Ala
195 200 205

Glu Pro His Ala Gln Gly Leu Leu Leu Cys Pro Cys Ala Pro Asn Asp
210 215 220

Arg Gly Cys Gly Glu Arg Arg Arg Asn Thr Ile Ala Pro Asn Cys Ala
225 230 235 240

Leu Pro Pro Val Ala Pro Asn Cys Leu Glu Leu Arg Arg Leu Cys Phe
245 250 255

[0033]

Ser Asp Pro Leu Cys Arg Ser Arg Leu Val Asp Phe Gln Thr His Cys
260 265 270

His Pro Met Asp Ile Leu Gly Thr Cys Ala Thr Glu Gln Ser Arg Cys
275 280 285

Leu Arg Ala Tyr Leu Gly Leu Ile Gly Thr Ala Met Thr Pro Asn Phe
290 295 300

Val Ser Asn Val Asn Thr Ser Val Ala Leu Ser Cys Thr Cys Arg Gly
305 310 315 320

Ser Gly Asn Leu Gln Glu Glu Cys Glu Met Leu Glu Gly Phe Phe Ser
325 330 335

His Asn Pro Cys Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ala Lys Met Arg Phe His
340 345 350

Ser Gln Leu Phe Ser Gln Asp Trp Pro His Pro Thr Phe Ala Val Met
355 360 365

Ala His Gln Asn Glu Asn Pro Ala Val Arg Pro Gln Pro Trp Val Pro
370 375 380

Ser Leu Phe Ser Cys Thr Leu Pro Leu Ile Leu Leu Leu Ser Leu Trp
385 390 395 400

<210> 11
<211> 369
<212> PRT
<213> 人

<400> 11

[0034]

Met Val Arg Pro Leu Asn Pro Arg Pro Leu Pro Pro Val Val Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Pro Pro Ser Pro Leu Pro Leu Ala Ala Gly Asp
20 25 30

Pro Leu Pro Thr Glu Ser Arg Leu Met Asn Ser Cys Leu Gln Ala Arg
35 40 45

Arg Lys Cys Gln Ala Asp Pro Thr Cys Ser Ala Ala Tyr His His Leu
50 55 60

Asp Ser Cys Thr Ser Ser Ile Ser Thr Pro Leu Pro Ser Glu Glu Pro
65 70 75 80

Ser Val Pro Ala Asp Cys Leu Glu Ala Ala Gln Gln Leu Arg Asn Ser
85 90 95

Ser Leu Ile Gly Cys Met Cys His Arg Arg Met Lys Asn Gln Val Ala
100 105 110

Cys Leu Asp Ile Tyr Trp Thr Val His Arg Ala Arg Ser Leu Asp Ser
115 120 125

Asp Leu Cys Leu Lys Phe Ala Met Leu Cys Thr Leu Asn Asp Lys Cys
130 135 140

Asp Arg Leu Arg Lys Ala Tyr Gly Glu Ala Cys Ser Gly Pro His Cys
145 150 155 160

Gln Arg His Val Cys Leu Arg Gln Leu Leu Thr Phe Phe Glu Lys Ala
165 170 175

[0035]

Ala Glu Pro His Ala Gln Gly Leu Leu Leu Cys Pro Cys Ala Pro Asn
180 185 190

Asp Arg Gly Cys Gly Glu Arg Arg Arg Asn Thr Ile Ala Pro Asn Cys
195 200 205

Ala Leu Pro Pro Val Ala Pro Asn Cys Leu Glu Leu Arg Arg Leu Cys
210 215 220

Phe Ser Asp Pro Leu Cys Arg Ser Arg Leu Val Asp Phe Gln Thr His
225 230 235 240

Cys His Pro Met Asp Ile Leu Gly Thr Cys Ala Thr Glu Gln Ser Arg
245 250 255

Cys Leu Arg Ala Tyr Leu Gly Leu Ile Gly Thr Ala Met Thr Pro Asn
260 265 270

Phe Val Ser Asn Val Asn Thr Ser Val Ala Leu Ser Cys Thr Cys Arg
275 280 285

Gly Ser Gly Asn Leu Gln Glu Glu Cys Glu Met Leu Glu Gly Phe Phe
290 295 300

Ser His Asn Pro Cys Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ala Lys Met Arg Phe
305 310 315 320

His Ser Gln Leu Phe Ser Gln Asp Trp Pro His Pro Thr Phe Ala Val
325 330 335

Met Ala His Gln Asn Glu Asn Pro Ala Val Arg Pro Gln Pro Trp Val
340 345 350

[0036]

Pro Ser Leu Phe Ser Cys Thr Leu Pro Leu Ile Leu Leu Leu Ser Leu
355 360 365

Trp

<210> 12
<211> 299
<212> PRT
<213> 人

<400> 12

Met Val Arg Cys Leu Gly Pro Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Ser Ala Ser Ser Val Gly Gly Asn Arg Cys Val Asp Ala Ala Glu Ala
20 25 30

Cys Thr Ala Asp Ala Arg Cys Gln Arg Leu Arg Ser Glu Tyr Val Ala
35 40 45

Gln Cys Leu Gly Arg Ala Ala Gln Gly Gly Cys Pro Arg Ala Arg Cys
50 55 60

Arg Arg Ala Leu Arg Arg Phe Phe Ala Arg Gly Pro Pro Ala Leu Thr
65 70 75 80

His Ala Leu Leu Phe Cys Pro Cys Ala Gly Pro Ala Cys Ala Glu Arg
85 90 95

Arg Arg Gln Thr Phe Val Pro Ser Cys Ala Phe Ser Gly Pro Gly Pro
100 105 110

[0037]

Ala Pro Pro Ser Cys Leu Glu Pro Leu Asn Phe Cys Glu Arg Ser Arg
115 120 125

Val Cys Arg Cys Ala Arg Ala Ala Ala Gly Pro Trp Arg Gly Trp Gly
130 135 140

Arg Gly Leu Ser Pro Ala His Arg Pro Pro Ala Ala Gln Ala Ser Pro
145 150 155 160

Pro Gly Leu Ser Gly Leu Val His Pro Ser Ala Gln Arg Pro Arg Arg
165 170 175

Leu Pro Ala Gly Pro Gly Arg Pro Leu Pro Ala Arg Leu Arg Gly Pro
180 185 190

Arg Gly Val Pro Ala Gly Thr Ala Val Thr Pro Asn Tyr Val Asp Asn
195 200 205

Val Ser Ala Arg Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys Gly Ala Ser Gly Asn
210 215 220

Arg Arg Glu Asp Cys Glu Ala Phe Arg Gly Leu Phe Thr Arg Asn Arg
225 230 235 240

Cys Leu Asp Gly Ala Ile Gln Ala Phe Ala Ser Gly Trp Pro Pro Val
245 250 255

Leu Leu Asp Gln Leu Asn Pro Gln Gly Asp Pro Glu His Ser Leu Leu
260 265 270

Gln Val Ser Ser Thr Gly Arg Ala Leu Glu Arg Arg Ser Leu Leu Ser
275 280 285

[0038]

Ile Leu Pro Val Leu Ala Leu Pro Ala Leu Leu
290 295

<210> 13
<211> 13
<212> PRT
<213> 人

<400> 13

Gln Leu Tyr Glu Asn Lys Pro Arg Arg Pro Tyr Ile Leu
1 5 10

<210> 14
<211> 3
<212> PRT
<213> 人

<400> 14

Tyr Ile Leu
1

<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> 人

<400> 15

Pro Tyr Ile Leu
1

<210> 16
<211> 211
<212> PRT
<213> 人

<400> 16

[0039]

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

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
```

[0040]

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> 17
<211> 58
<212> PRT
<213> 人

<400> 17

Phe Pro Leu Pro Ala Gly Lys Arg Pro Pro Glu Ala Pro Ala Glu Asp
1 5 10 15

Arg Ser Leu Gly Arg Arg Arg Ala Pro Phe Ala Leu Ser Ser Asp Ser
20 25 30

Asn Met Pro Glu Asp Tyr Pro Asp Gln Phe Asp Asp Val Met Asp Phe
35 40 45

Ile Gln Ala Thr Ile Lys Arg Leu Lys Arg
50 55

<210> 18
<211> 38
<212> PRT
<213> 人

<400> 18

Ser Pro Asp Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg
1 5 10 15

[0041]

Gln Ala Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg
20 25 30

Gly Gln Arg Gly Lys Asn
35

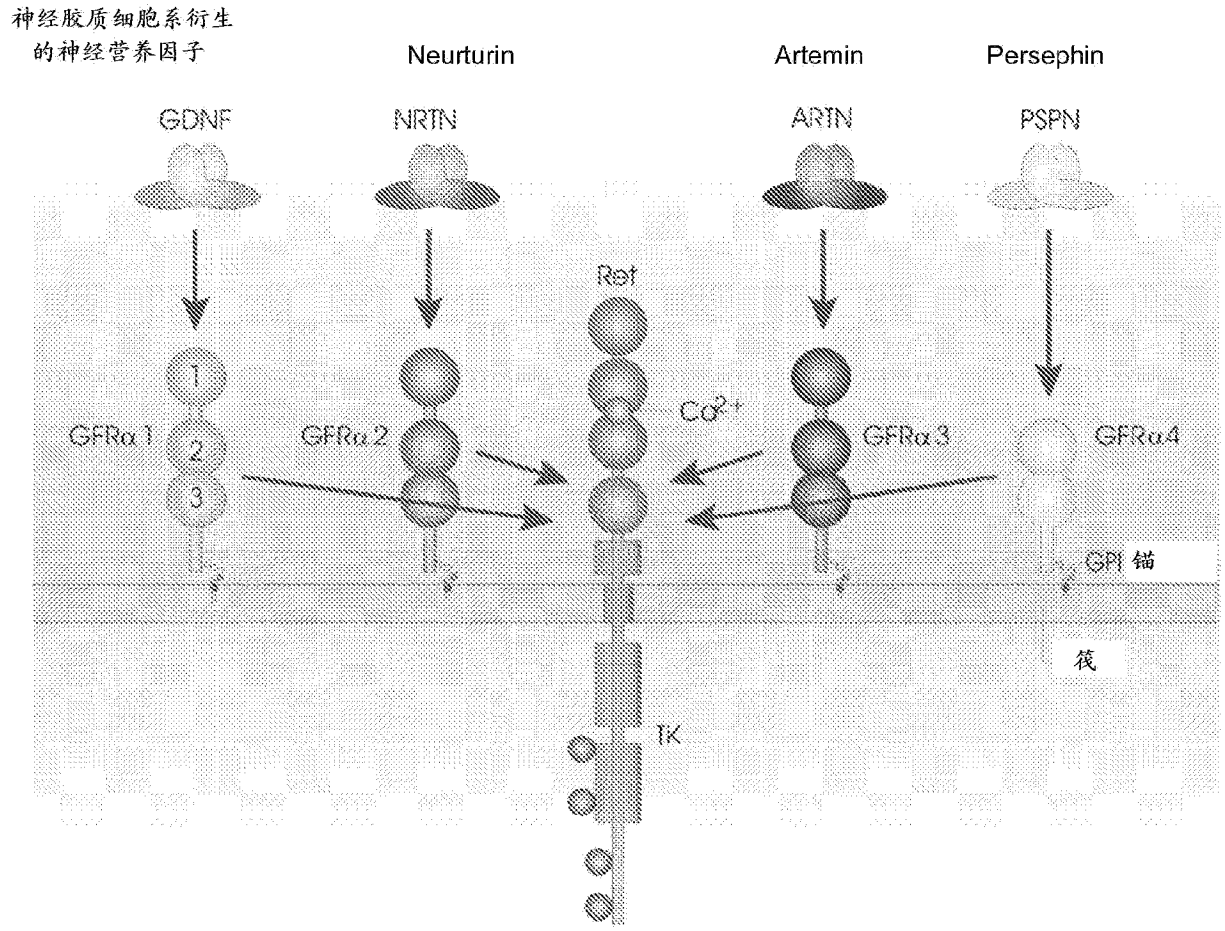

神经胶质细胞系衍生的神经营养因子
Neurturin
Artemin
Persephin
GDNF
NRTN
ARTN
PSPN
Ret
GFRα1
GFRα2
GFRα3
GFRα4
Ca2+
GPI 锚
筏
TK

图 1

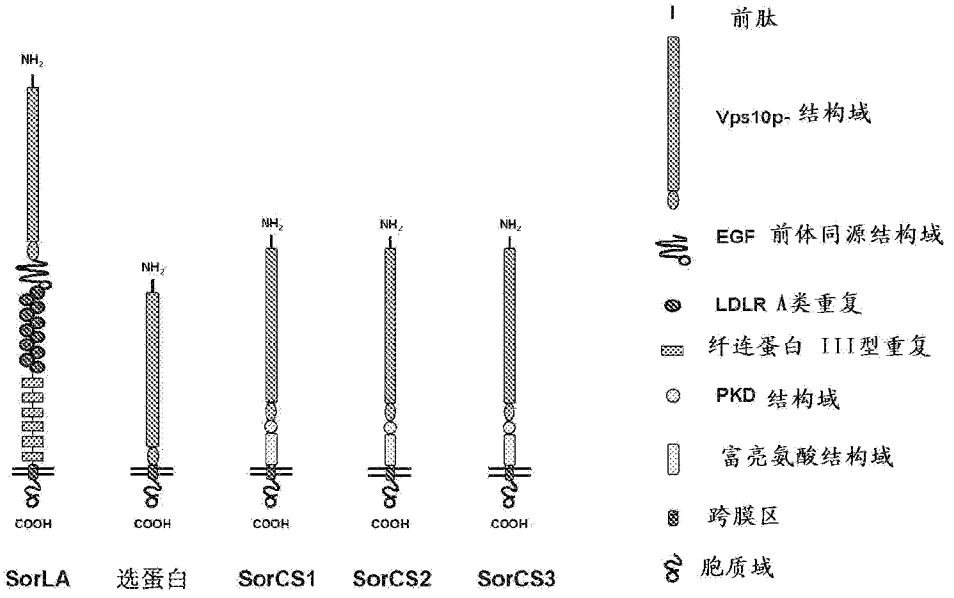

NH2
COOH
SorLA
选蛋白
SorCS1
SorCS2
SorCS3
前肽
Vps10p- 结构域
EGF 前体同源结构域
LDLR A类重复
纤连蛋白 III型重复
PKD 结构域
富亮氨酸结构域
跨膜区
胞质域

图 2

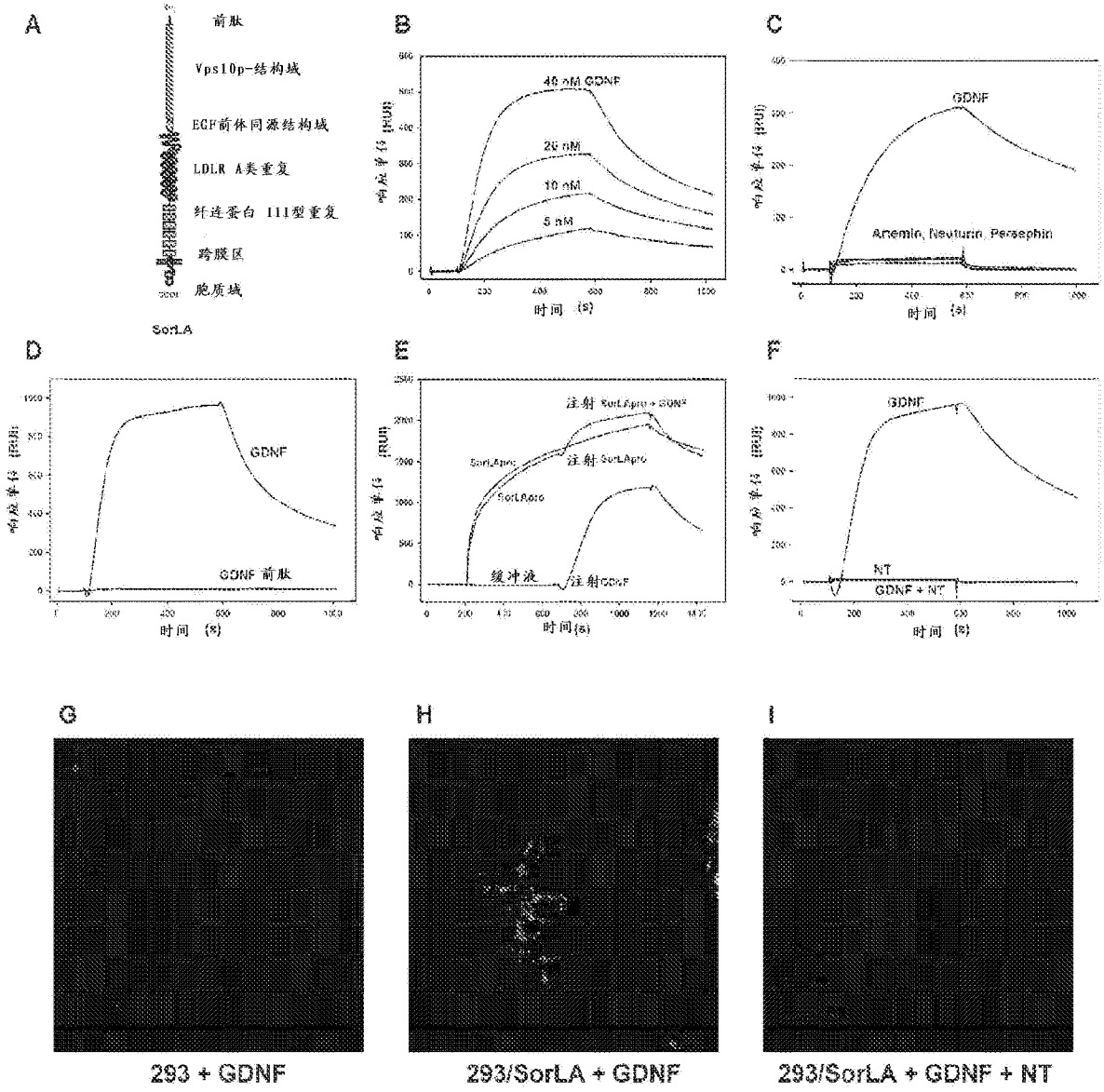

A
前肽
Vps10p-结构域
ECF前体同源结构域
LDLR A类重复
纤连蛋白 III型重复
跨膜区
胞质域
SorLA
B
40 nM GDNF
20 nM
10 nM
5 nM
时间 (s)
C
GDNF
Artemin, Neurturin, Persephin
时间 (s)
D
GDNF
GDNF 前肽
时间 (s)
E
注射 SorLApro + GDNF
注射 SorLApro
SorLApro
缓冲液
注射GDNF
时间(s)
F
GDNF
NT
GDNF + NT
时间 (s)
G
H
I
293 + GDNF
293/SorLA + GDNF
293/SorLA + GDNF + NT

图 3

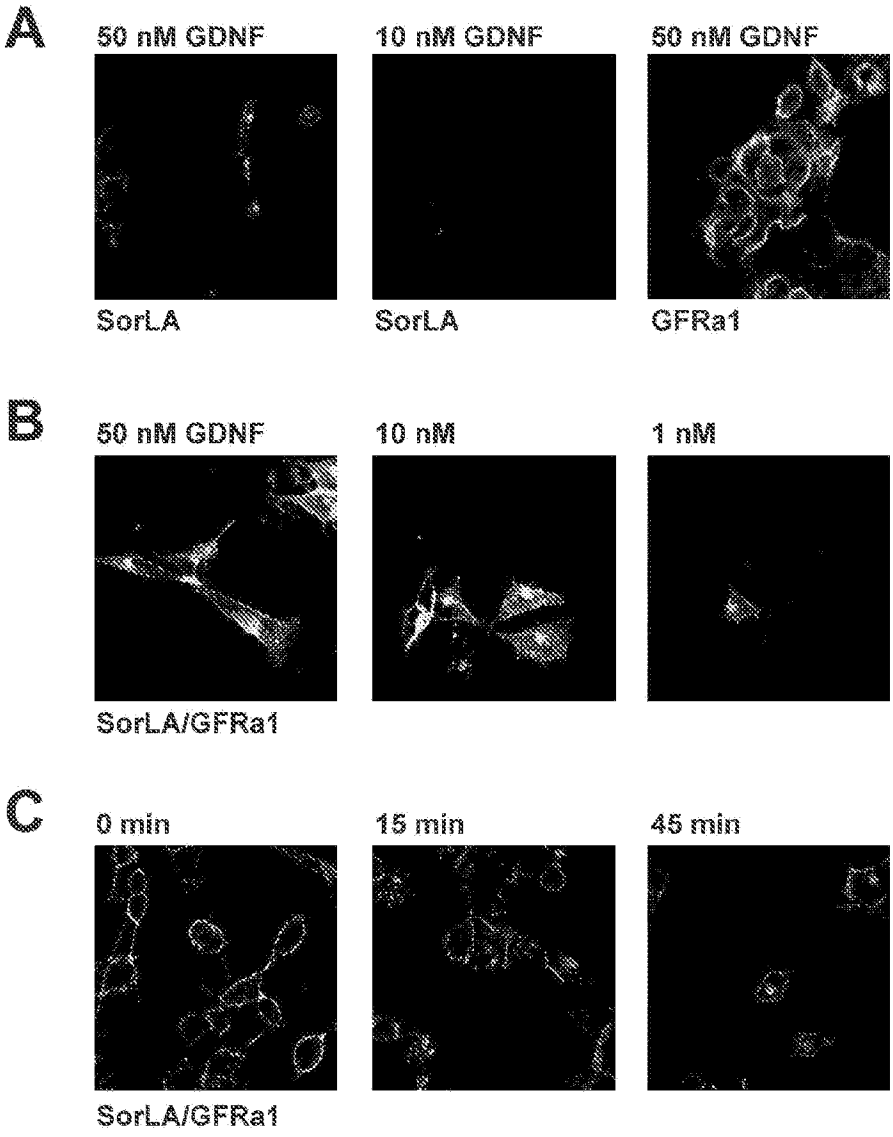

A
50 nM GDNF
10 nM GDNF
50 nM GDNF
SorLA
SorLA
GFRa1
B
50 nM GDNF
10 nM
1 nM
SorLA/GFRa1
C
0 min
15 min
45 min
SorLA/GFRa1

图 4

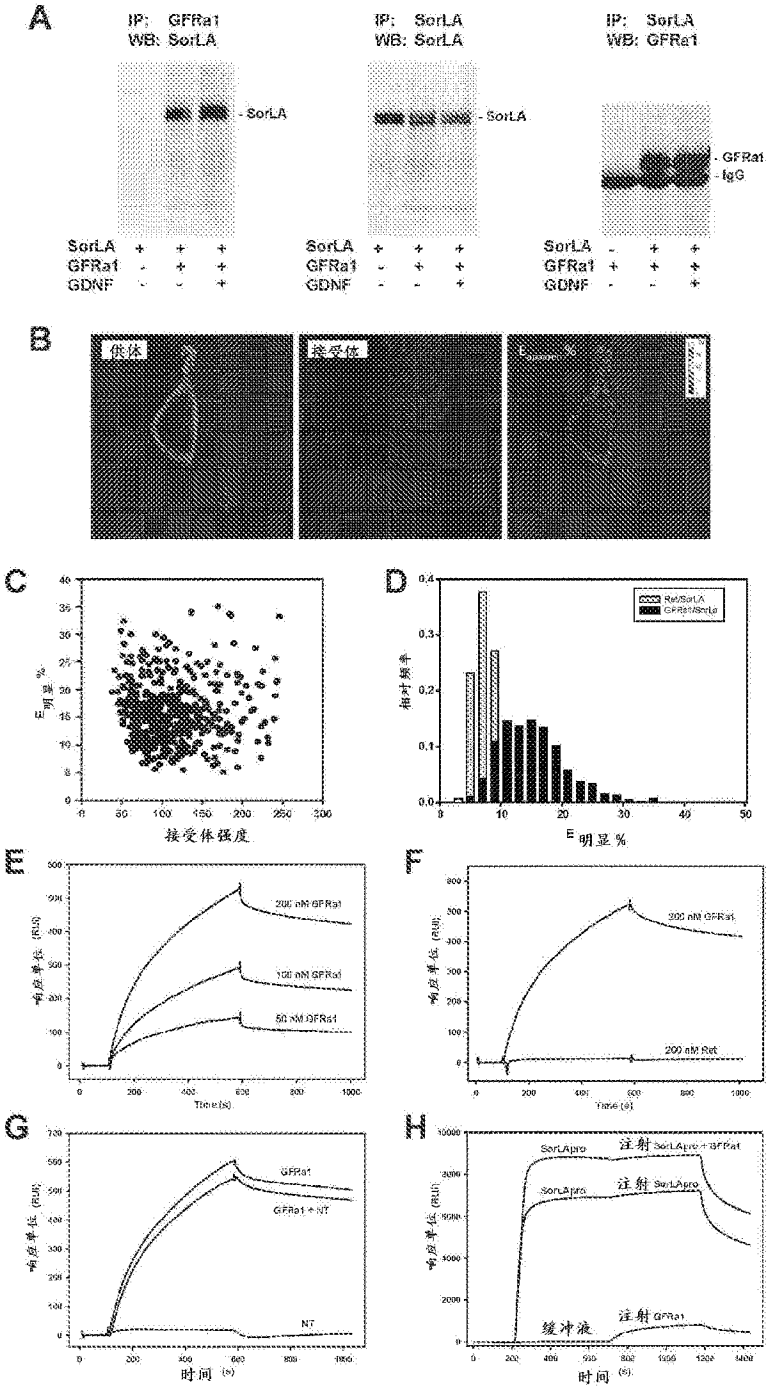

A
IP: GFRa1
WB: SorLA
IP: SorLA
WB: SorLA
IP: SorLA
WB: GFRa1
SorLA
GFRa1
IgG
SorLA + + +
GFRa1 - + +
GDNF - - +
B
供体
接受体
C
接受体强度
D
相对频率
E明显%
E
200 nM GFRa1
100 nM GFRa1
50 nM GFRa1
响应单位 (RU)
F
200 nM GFRa1
200 nM Ret
G
GFRa1
GFRa1 + NT
NT
时间 (s)
H
SorLApro
注射 SorLApro+GFRa1
注射 SorLApro
缓冲液
注射 GFRa1
时间 (s)

图 5

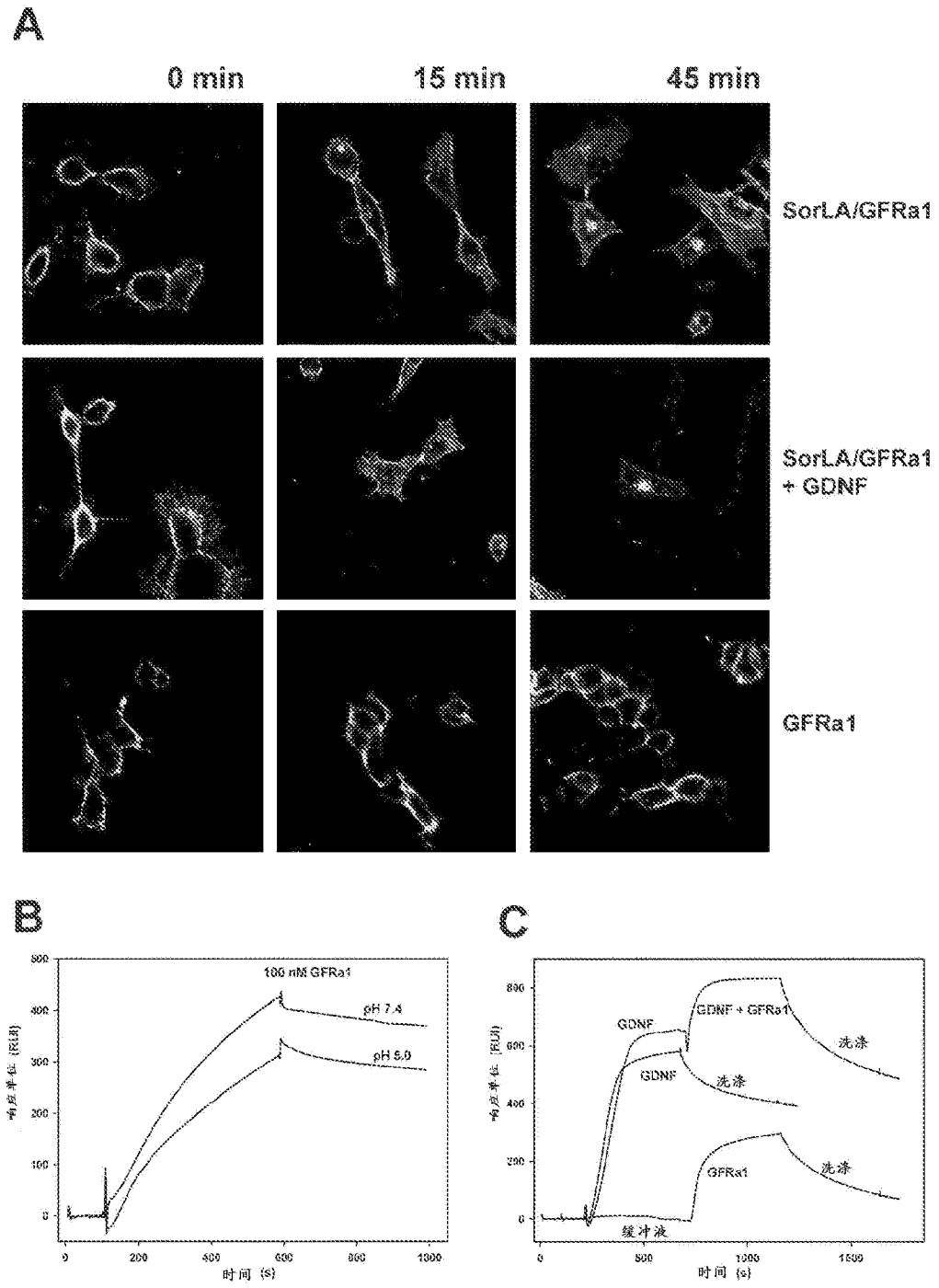

A
0 min
15 min
45 min
SorLA/GFRa1
SorLA/GFRa1
+ GDNF
GFRa1
B
100 nM GFRa1
pH 7.4
pH 5.0
时间 (s)
C
GDNF
GDNF + GFRa1
洗涤
GDNF
洗涤
GFRa1
洗涤
缓冲液
时间 (s)

图 6

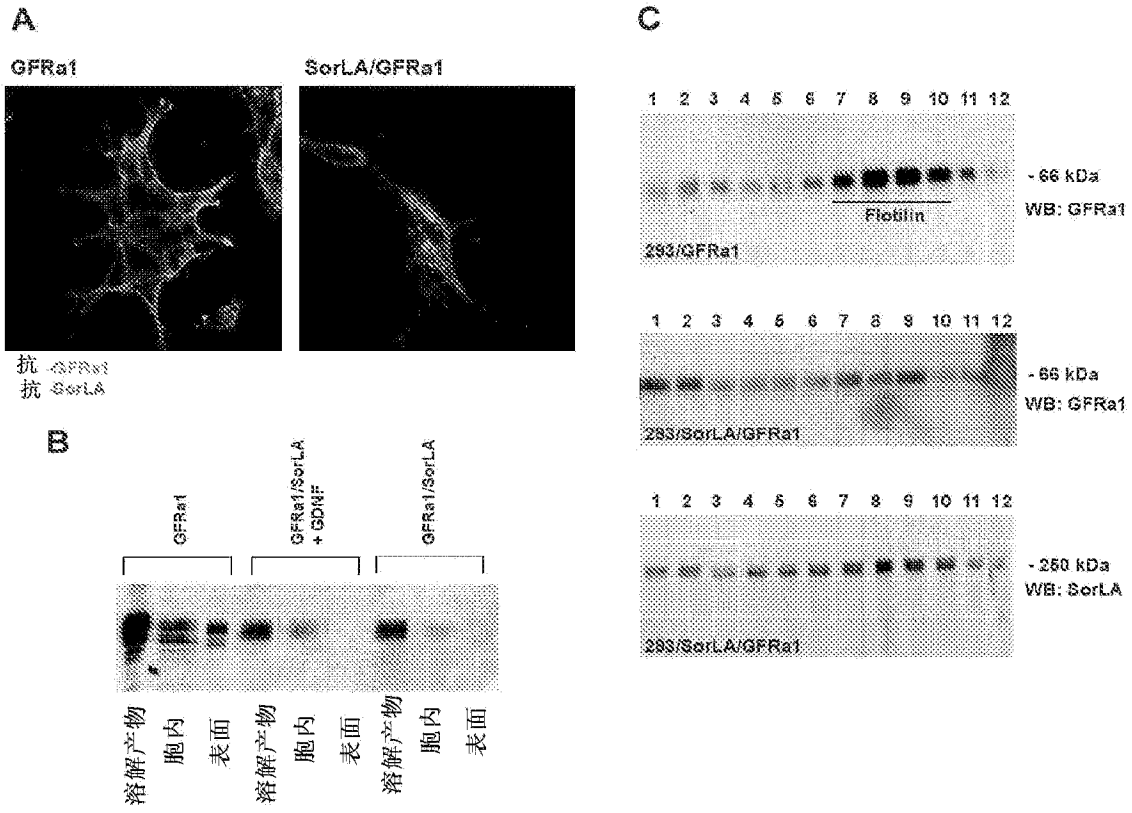
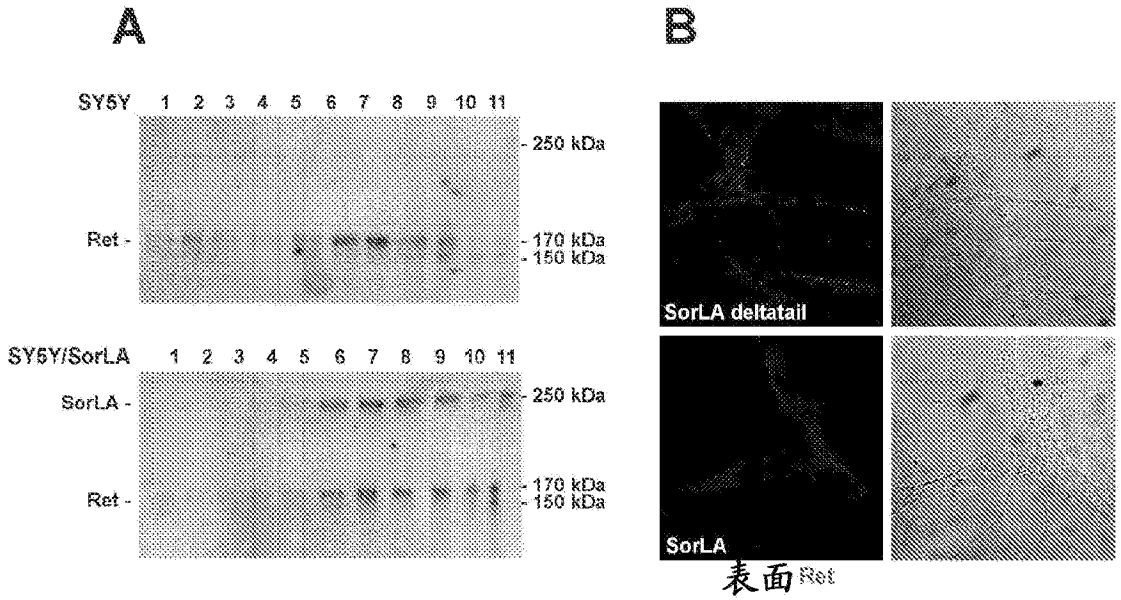

A
GFRa1
SorLA/GFRa1
抗 GFRa1
抗 SorLA
B
GFRa1
GFRa1/SorLA + GDNF
GFRa1/SorLA
溶解产物
胞内
表面
溶解产物
胞内
表面
溶解产物
胞内
表面
C
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
~66 kDa
WB: GFRa1
Flotilin
293/GFRa1
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
~66 kDa
WB: GFRa1
293/SorLA/GFRa1
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
~250 kDa
WB: SorLA
293/SorLA/GFRa1

图 7


A
SY5Y 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
250 kDa
Ret -
170 kDa
150 kDa
SY5Y/SorLA 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
SorLA -
250 kDa
Ret -
170 kDa
150 kDa
B
SorLA deltatail
SorLA
表面Ret

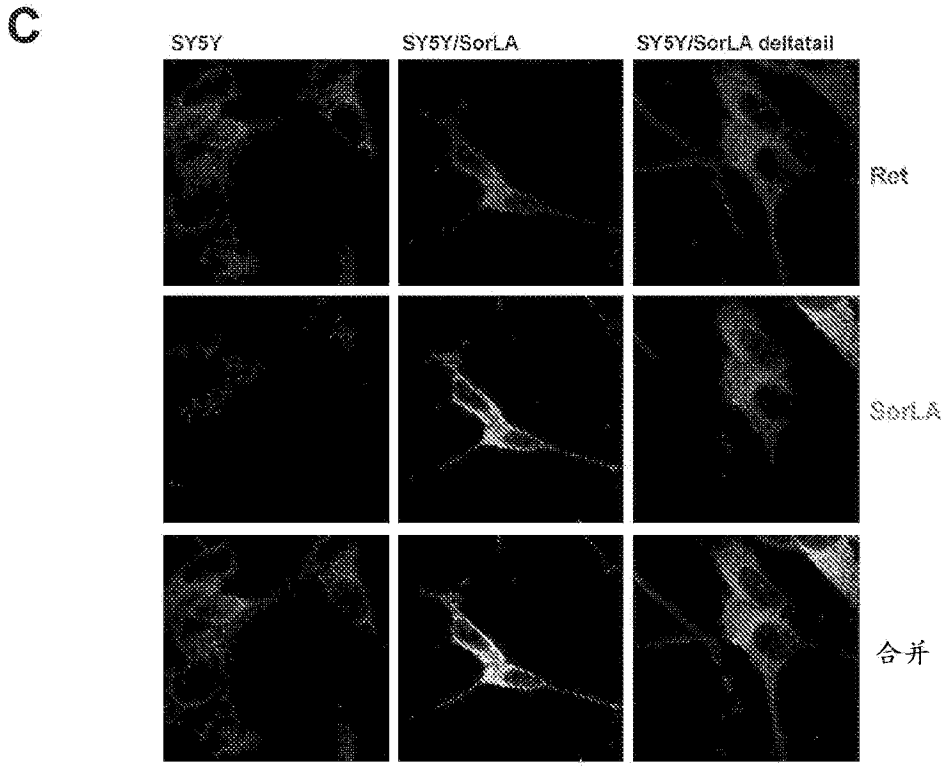

C
SY5Y
SY5Y/SorLA
SY5Y/SorLA deltatail
Ret
SorLA
合并

图 8

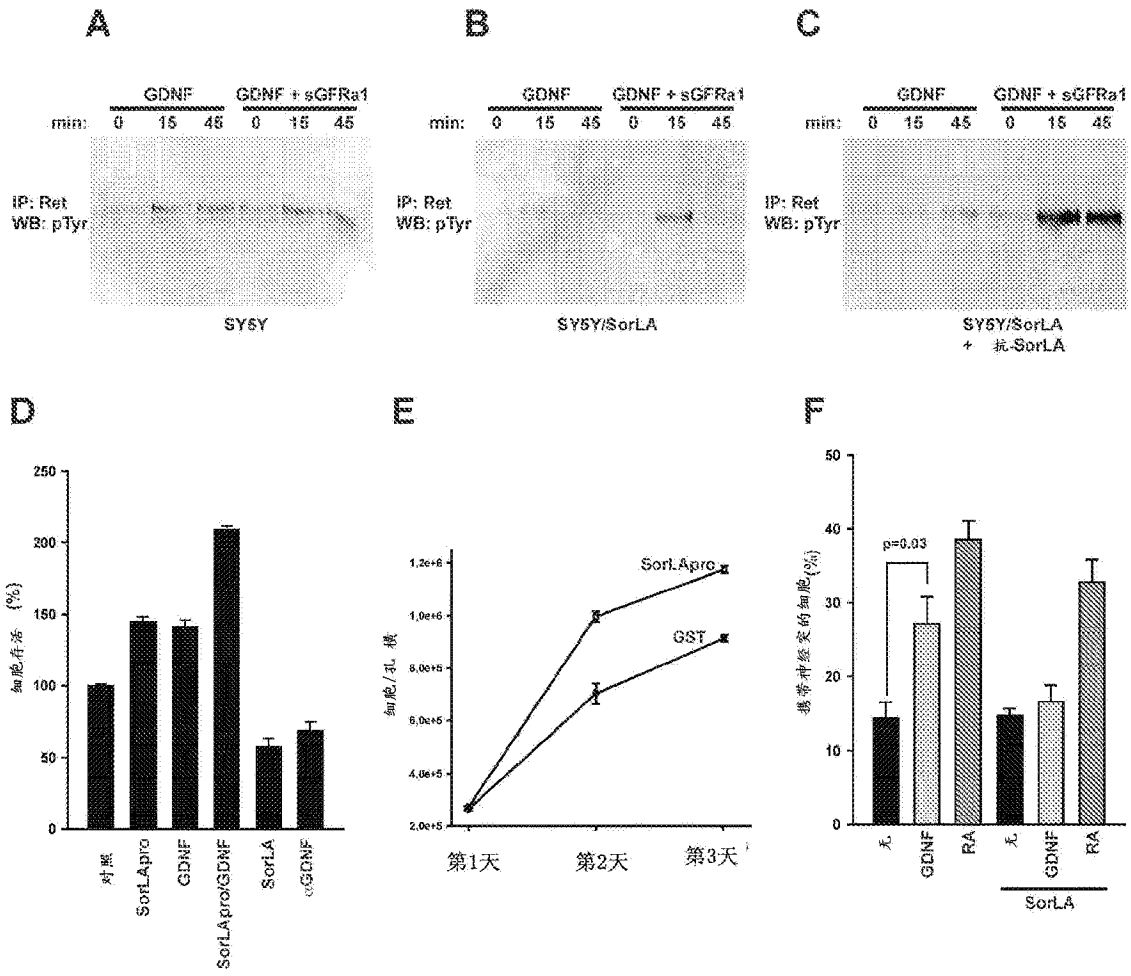

A
B
C
GDNF
GDNF + sGFRa1
min: 0 15 45 0 15 45
IP: Ret
WB: pTyr
SY5Y
SY5Y/SorLA
SY5Y/SorLA
+ 抗-SorLA
D
E
F
细胞存活 (%)
250
200
150
100
50
0
对照
SorLApro
GDNF
SorLApro/GDNF
SorLA
GDNF
细胞/孔 数
1,2e+6
1,0e+6
8,0e+5
6,0e+5
4,0e+5
2,0e+5
SorLApro
GST
第1天
第2天
第3天
携带神经突的细胞(%)
50
40
30
20
10
0
p=0.03
无
GDNF
RA
无
GDNF
RA
SorLA

图 9

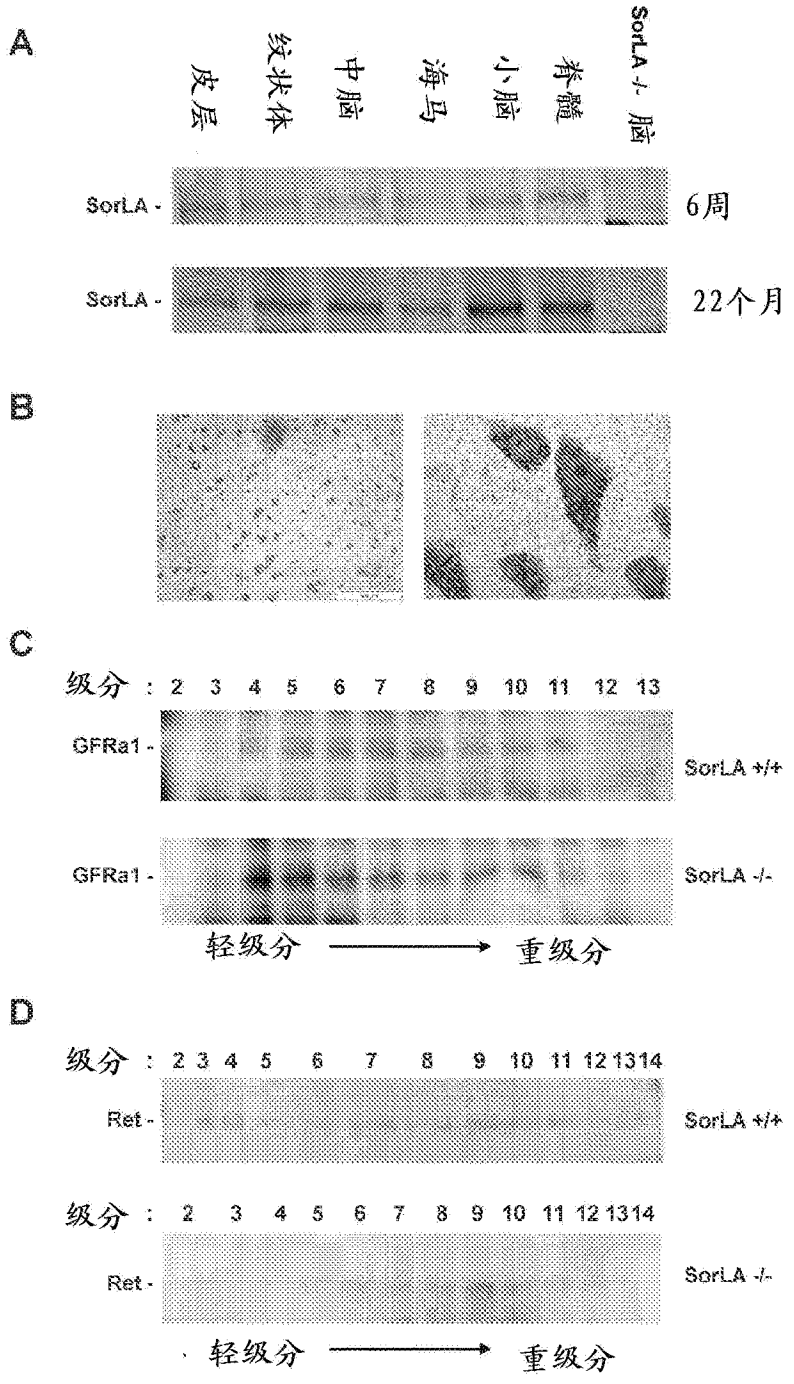

A
皮层
纹状体
中脑
海马
小脑
脊髓
SorLA -/- 脑
SorLA -
6周
SorLA -
22个月
B
C
级分 : 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
GFRa1 -
SorLA +/+
GFRa1 -
SorLA -/-
轻级分
重级分
D
级分 : 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Ret -
SorLA +/+
级分 : 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Ret -
SorLA -/-
轻级分
重级分

图 10

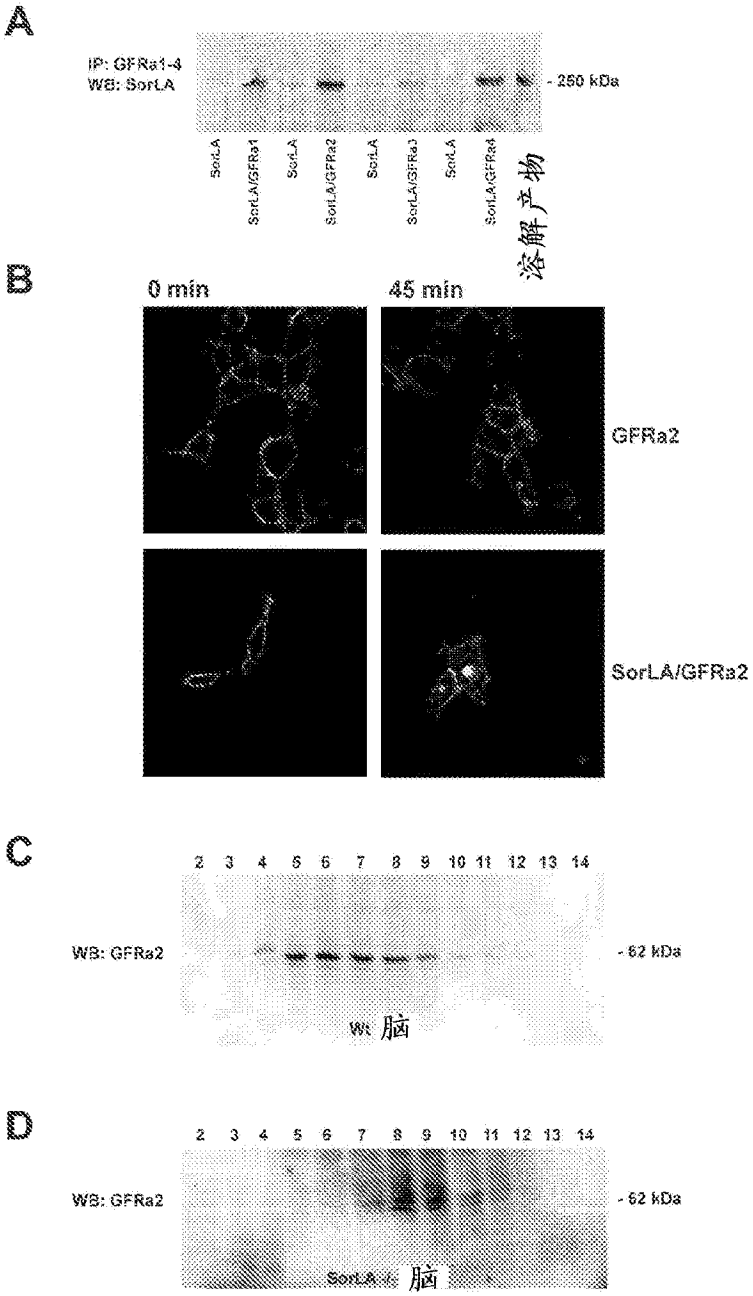

A
IP: GFRa1-4
WB: SorLA
- 250 kDa
SorLA
SorLA/GFRa1
SorLA
SorLA/GFRa2
SorLA
SorLA/GFRa3
SorLA
SorLA/GFRa4
溶解产物
B
0 min
45 min
GFRa2
SorLA/GFRa2
C
2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
WB: GFRa2
- 62 kDa
Wt 脑
D
2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
WB: GFRa2
- 62 kDa
SorLA -/- 脑

图 11

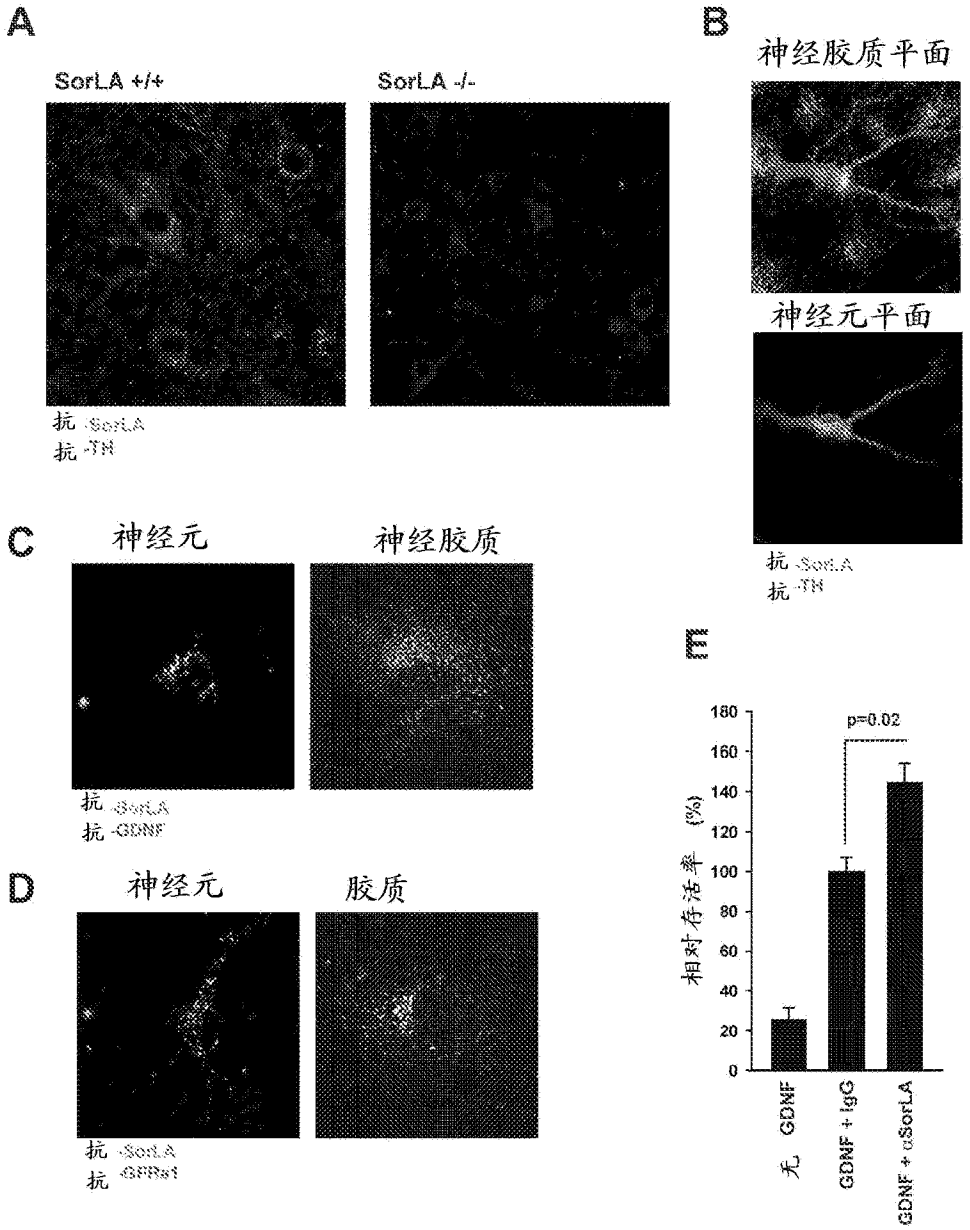

A
SorLA +/+
SorLA -/-
抗 -SorLA
抗 -TN
B
神经胶质平面
神经元平面
抗 -SorLA
抗 -TN
C
神经元
神经胶质
抗 -SorLA
抗 -GDNF
D
神经元
胶质
抗 -SorLA
抗 -GFRα1
E
p=0.02
相对存活率 (%)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
无 GDNF
GDNF + IgG
GDNF + αSorLA

图 12

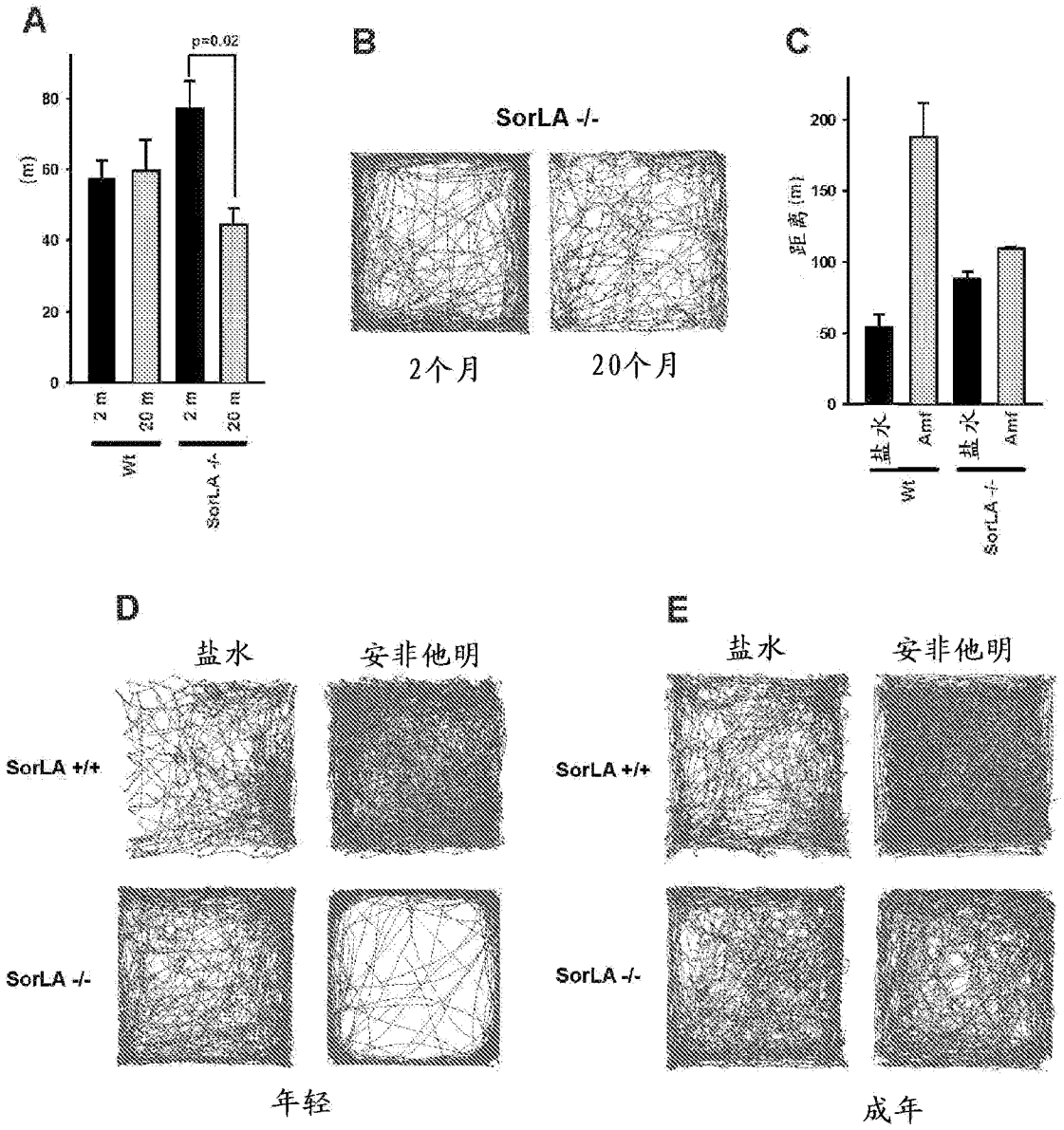

A
p=0.02
80
60
40
20
0
(m)
2 m
20 m
2 m
20 m
Wt
SorLA -/-
B
SorLA -/-
2个月
20个月
C
200
150
100
50
0
距离(m)
盐水
Amf
盐水
Amf
Wt
SorLA -/-
D
盐水
安非他明
SorLA +/+
SorLA -/-
年轻
E
盐水
安非他明
SorLA +/+
SorLA -/-
成年

图 13

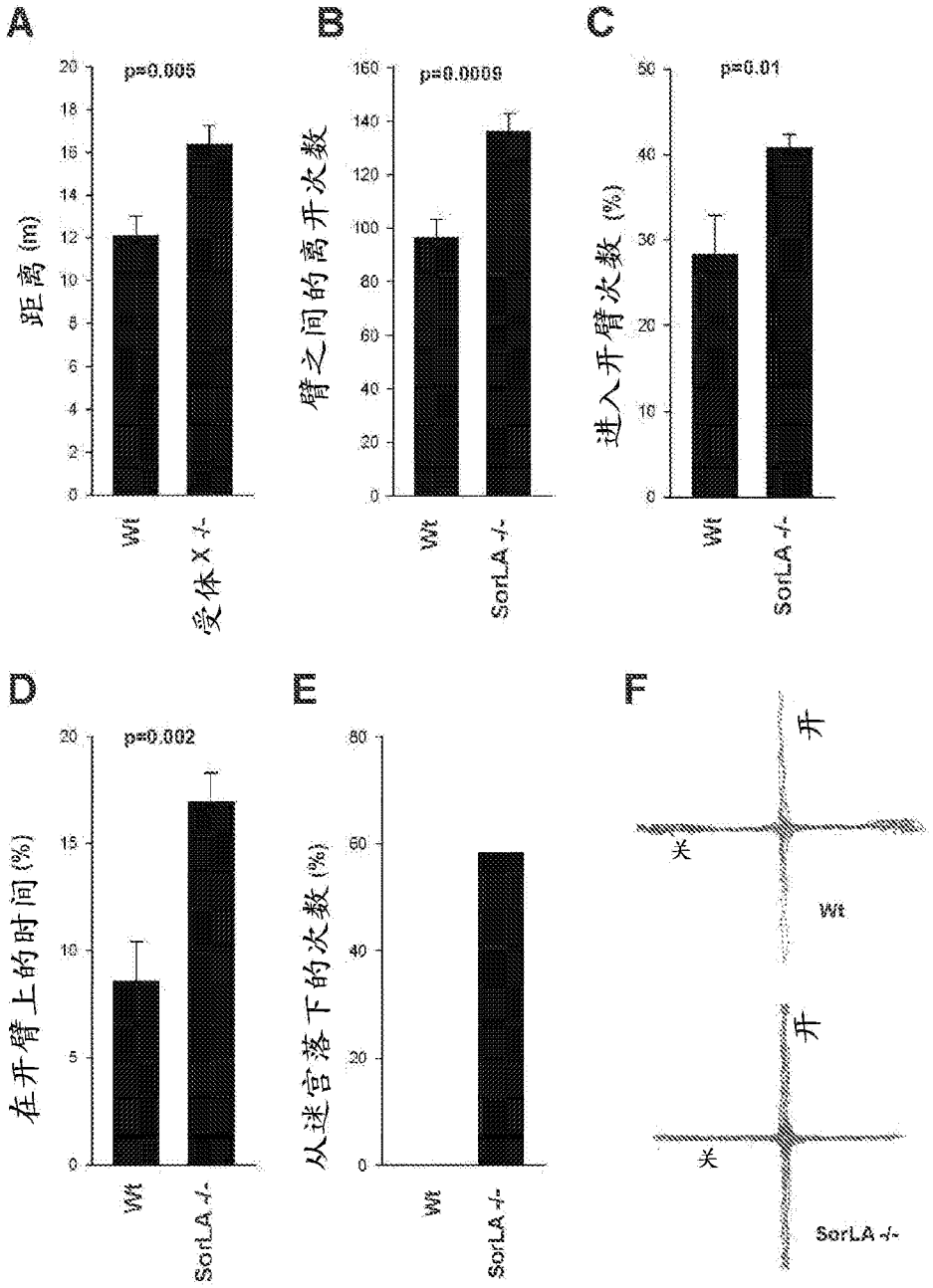

A
p=0.005
距离 (m)
Wt
受体X -/-
B
p=0.0009
臂之间的离开次数
Wt
SorLA -/-
C
p=0.01
进入开臂次数 (%)
Wt
SorLA -/-
D
p=0.002
在开臂上的时间 (%)
Wt
SorLA -/-
E
从迷宫落下的次数 (%)
Wt
SorLA -/-
F
开
关
Wt
开
关
SorLA -/-

图 14

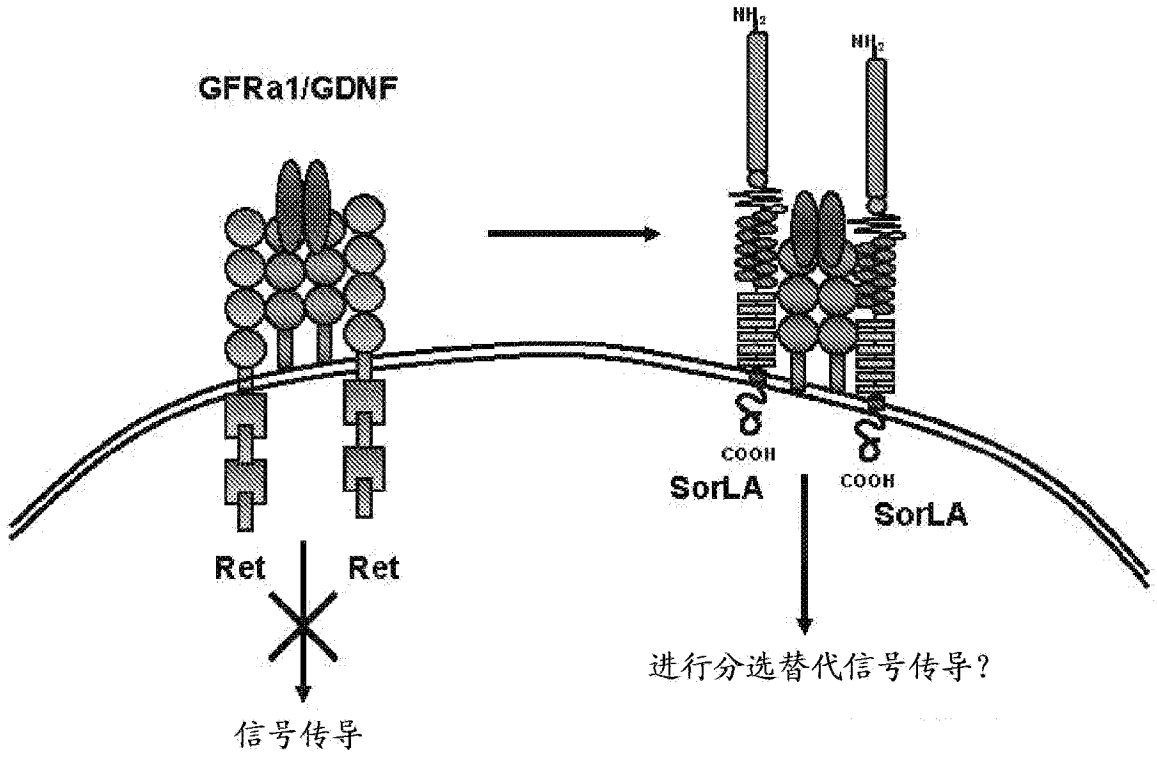

GFRa1/GDNF
NH2
NH2
COOH
SorLA
COOH
SorLA
Ret
Ret
信号传导
进行分选替代信号传导?

图 15

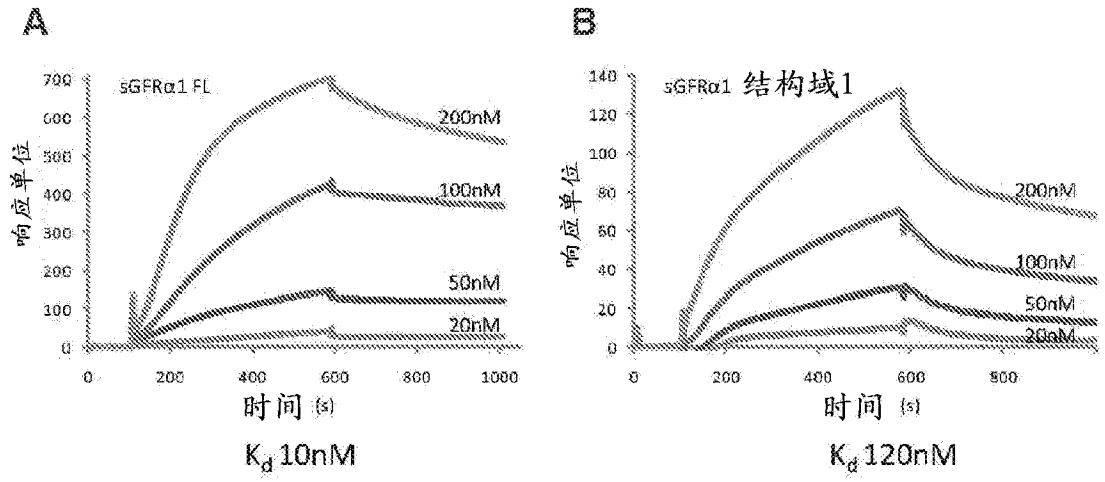

A
sGFRα1 FL
响应单位
200nM
100nM
50nM
20nM
时间 (s)
Kd 10nM
B
sGFRα1 结构域1
响应单位
200nM
100nM
50nM
20nM
时间 (s)
Kd 120nM

图 16

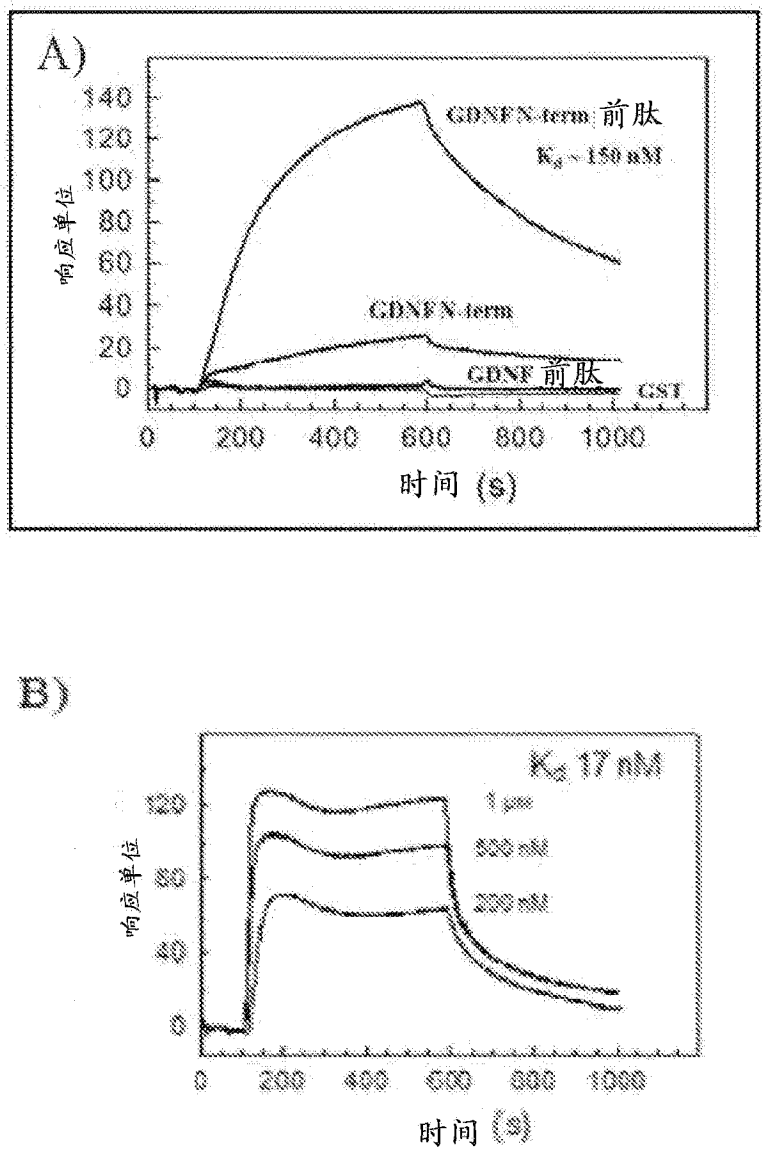

A)
响应单位
140
120
100
80
60
40
20
0
CDNFN-term 前肽
K_d ~ 150 nM
CDNFN-term
CDNF 前肽
CST
0
200
400
600
800
1000
时间 (s)
B)
K_d 17 nM
响应单位
120
80
40
0
0
200
400
600
800
1000
时间 (s)

图 17

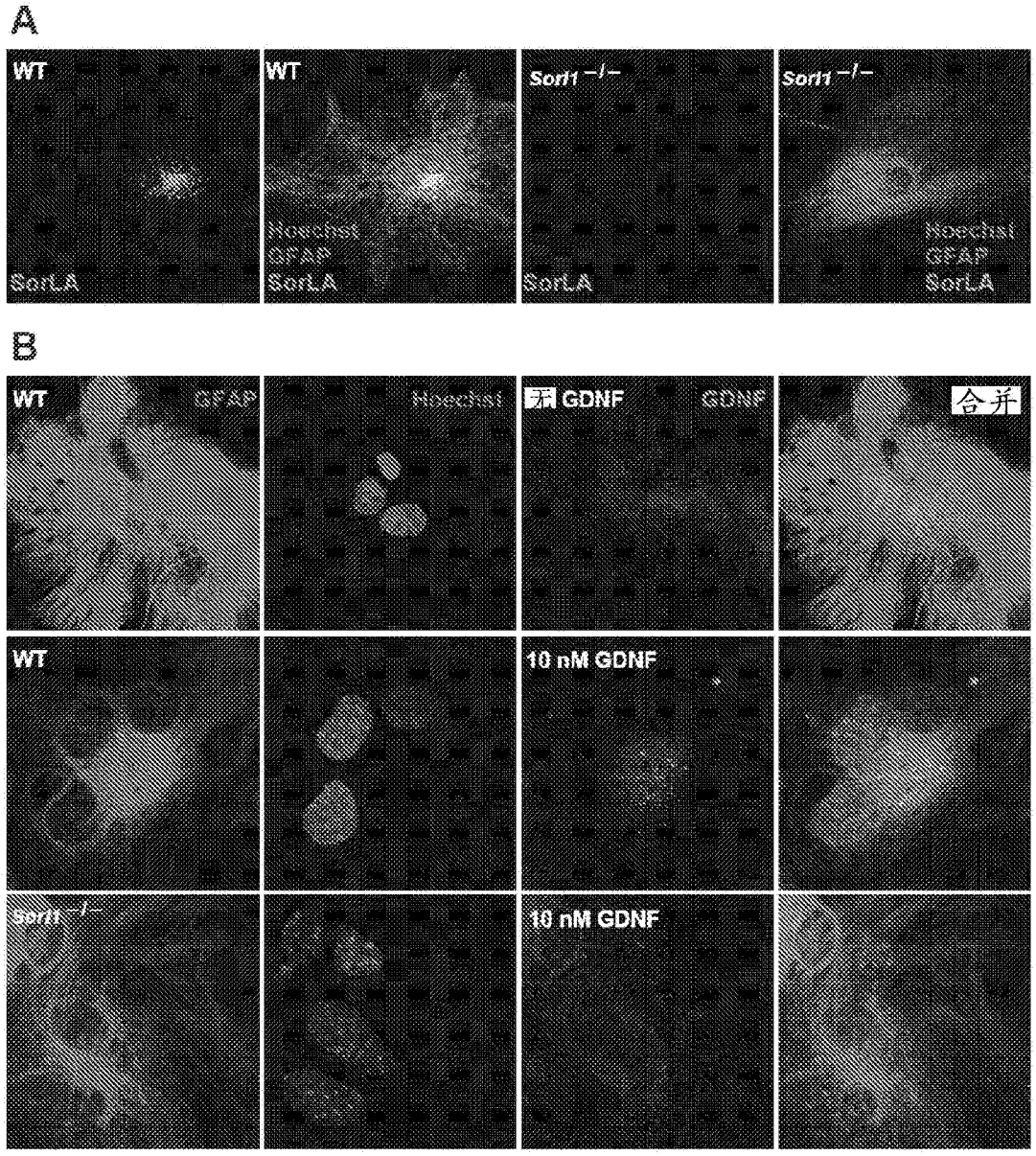

A
WT
SorLA
WT
Hoechst
GFAP
SorLA
Sorl1 −/−
SorLA
Sorl1 −/−
Hoechst
GFAP
SorLA
B
WT
GFAP
Hoechst
GDNF
GDNF
合并
WT
10 nM GDNF
Sorl1 −/−
10 nM GDNF

图 18

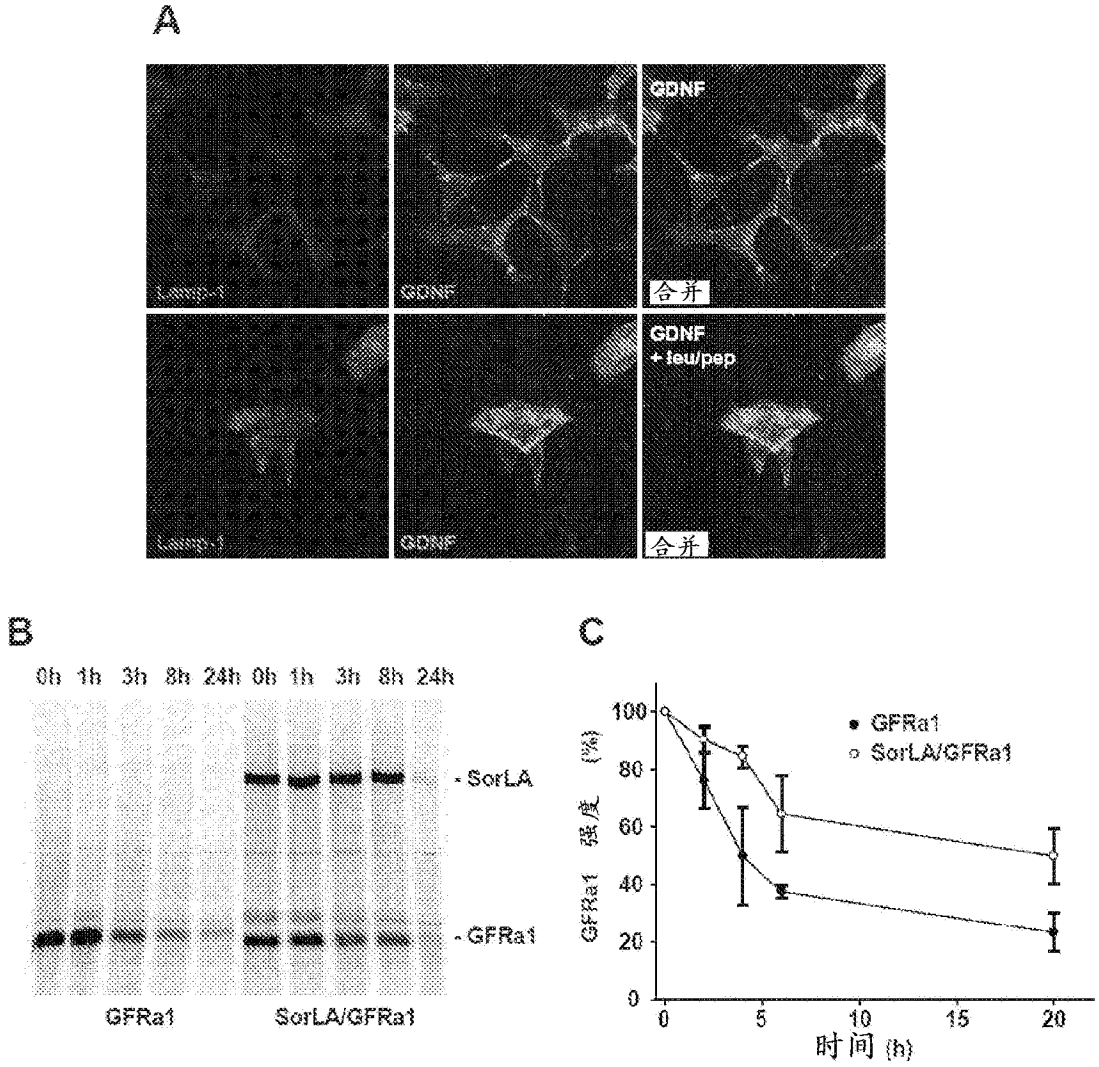

A
GDNF
合并
GDNF
+ leu/pep
合并
B
0h 1h 3h 8h 24h 0h 1h 3h 8h 24h
SorLA
GFRa1
GFRa1
SorLA/GFRa1
C
GFRa1
SorLA/GFRa1
GFRa1 强度 (%)
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
时间 (h)

图 19

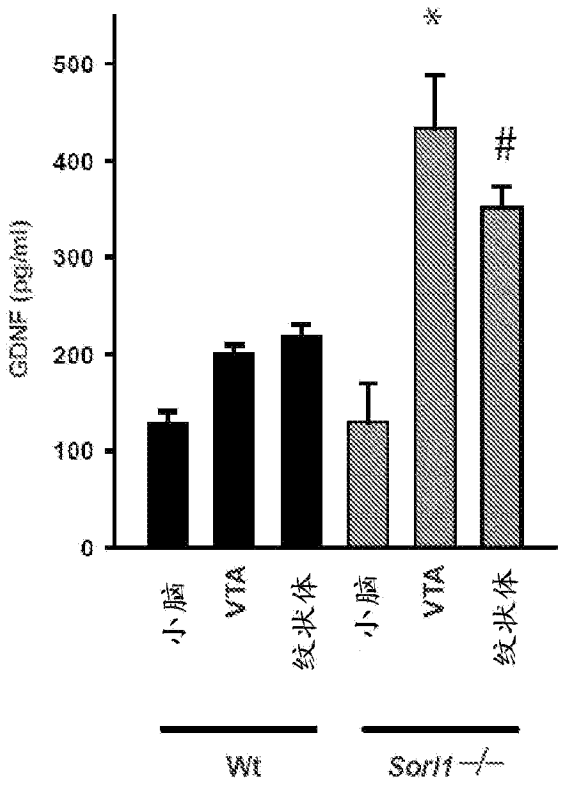

GDNF (pg/ml)
500
400
300
200
100
0
*
#
小脑
VTA
纹状体
小脑
VTA
纹状体
Wt
Sorl1 -/-

图 20

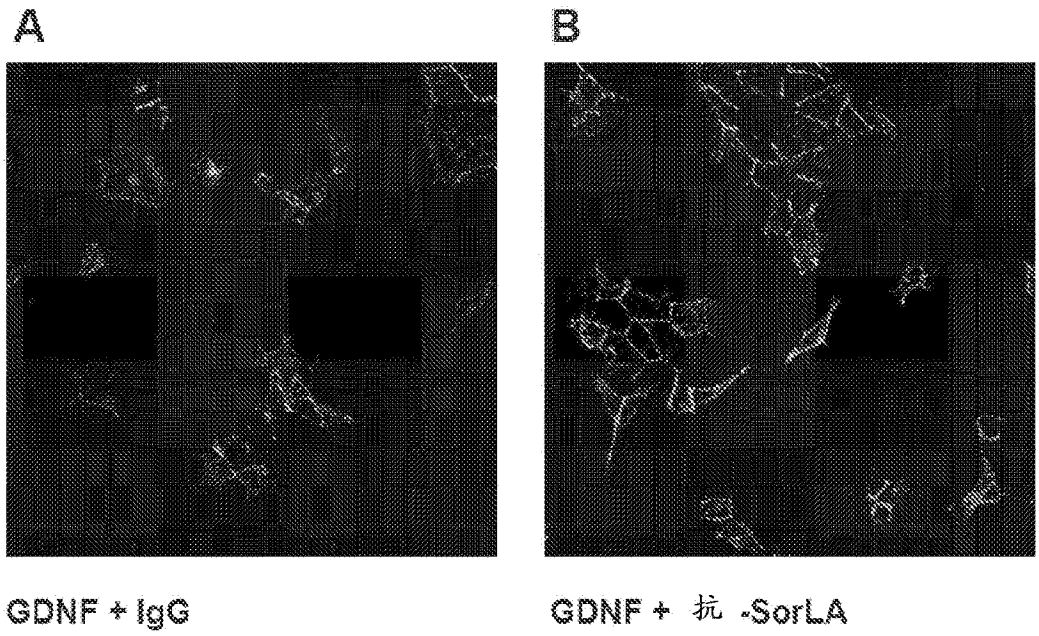

A
B
GDNF + IgG
GDNF + 抗 -SorLA

图 21