(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113260373 B
(45)授权公告日 2025.04.22

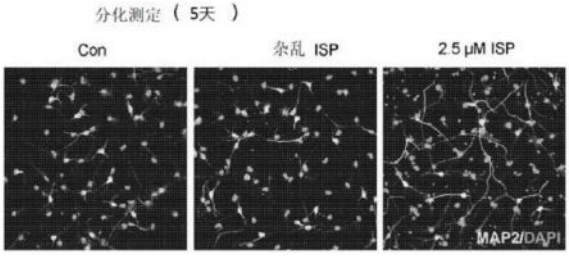
(21)申请号 201980058427.8
(22)申请日 2019.08.29
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113260373 A
(43)申请公布日 2021.08.13
(30)优先权数据
62/727,420 2018.09.05 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.03.05
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/048698 2019.08.29
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/051051 EN 2020.03.12
(73)专利权人 卡斯西部储备大学
地址 美国俄亥俄州
(72)发明人 J·西尔弗 Y·罗 F·罗
(74)专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理事务所(普通合伙) 11436
专利代理师 程淼
(51)Int.Cl.
A61K 38/10(2006.01)
A61K 38/46(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
(56)对比文件
US 2015366949 A1,2015.12.24
David L Kirkham等.Neural stem cells from protein tyrosine phosphatase sigma knockout mice generate an altered neuronal phenotype in culture.BMC Neuroscience.第第7卷卷文章号:50.
审查员 刘俊
权利要求书1页 说明书26页
序列表21页
序列表（电子公布） 附图22页

(54)发明名称

用于诱导神经可塑性的方法和组合物

(57)摘要

一种促进神经损伤后幸免的神经细胞的代偿性可塑性的方法,包括使幸免的神经细胞与有效量的治疗剂接触,所述治疗剂包含治疗性肽,其中所述治疗性肽包含与SEQ ID NO:32具有至少70%一致性的氨基酸序列。



CN 113260373 B

1.组合物在制造用于通过在神经损伤后促进幸免的神经细胞的代偿性可塑性而治疗该神经损伤的药物中的用途,所述组合物包括:

治疗剂,其包含:治疗性肽,其中所述治疗性肽具有选自由SEQ ID NO:1-25和32组成的组的氨基酸序列,和连接到所述治疗性肽并促进所述治疗性肽被细胞摄取的转运部分,

其中所述神经损伤位于脑部中并且归因于脑局灶性缺血、脑全面性缺血、恶性卒中、急性缺血性卒中、慢性卒中疾病、血栓或栓塞,且所述治疗性肽诱导所述脑部中的所述幸免的神经细胞的代偿性神经突生长。

2.根据权利要求1所述的用途,其中所述幸免的神经细胞是神经干细胞。

3.根据权利要求1所述的用途,其中所述幸免的神经细胞包括少突胶质细胞祖细胞(OPC)和/或胶质前体细胞(GPC)。

4.根据权利要求1所述的用途,其中所述幸免的神经细胞是神经元。

5.根据权利要求1所述的用途,其中所述神经突生长包括所述幸免的神经细胞的轴突出芽。

6.根据权利要求1所述的用途,其中所述神经突生长包括所述幸免的神经细胞的树突出芽或分叉。

7.根据权利要求1所述的用途,其中所述肽诱导幸免的神经细胞朝向所述神经损伤代偿性迁移。

8.根据权利要求1所述的用途,其中所述转运部分是HIV Tat转运部分。

9.根据权利要求1或8所述的用途,其中所述转运部分由肽接头连接到所述治疗性肽。

10.根据权利要求1-7中的任一项所述的用途,其中所述治疗剂包含选自由SEQ ID NO:35-61组成的组中的氨基酸序列。

11.根据权利要求1-7中的任一项所述的用途,其中在损伤后7天内使所述幸免的神经细胞与所述治疗剂接触。

用于诱导神经可塑性的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年9月5日提交的美国临时申请62/727420号的权益,该美国临时申请的公开内容通过援引而整体并入本文中。

[0003] 关于序列表的说明

[0004] 与本申请相关联的序列表以文本格式替代纸质副本提供,并且通过援引而并入本说明书中。包含该序列表的文本文件的名称CWR026868WOORD.txt。该文本文件是24KB;创建于2019年8月28日;并且与本说明书的提交一起经由EFS-Web递交。

背景技术

[0005] 神经损伤导致神经组织的功能障碍或死亡,显现出各种症状和效应。损伤可能归因于外部事件,例如创伤性脑损伤或缺血状况,内部事件,例如卒中、动脉瘤、脑出血、血栓或栓塞,或者更多种慢性神经变性疾病,例如多发性硬化。

[0006] 作为解释性示例,卒中发生在流向大脑的血流存在中断时,导致神经组织的死亡和局灶性神经功能缺损。征兆和症状可能随着卒中的位置和程度而不同。在美国每年有几乎800,000次所有类型的卒中,并且缺血性卒中占这些卒中的大约80%。Roger等人(2011)Circulation 123(4):e18-e209。在欧洲,估计的每年卒中事件超过1.1百万,这些中有相似的大约80%百分比是缺血性卒中。Heuschmann等人(2009)Stroke 40(5):1557-1563。

[0007] 评估和治疗急性卒中患者的指导原则集中于再灌注疗法以及可能加重卒中或复杂化临床过程的因素。对急性缺血性卒中的诊断是通过与局灶性缺血和所致的神经功能缺损一致的病史和体检的结合进行。计算机断层扫描法(CT)或磁共振成像(MRI)法脑成像用于排除出血及其他局灶性病理并且记录缺血的早期征兆。

[0008] 卒中也可以被视为慢性疾病。慢性卒中疾病的表现包括认知功能缺陷、吞咽困难和步态障碍,其急性恶化可能呈吞咽或步态代偿失调或谵妄的形式。如同所有慢性疾病,慢性卒中疾病的患者进一步急性卒中的风险较高,复发卒中的风险是相同年龄和性别的一般群体中首次卒中的风险的约6倍。

[0009] 对神经损伤的许多治疗方法采取修复的策略以恢复受损神经元的功能。然而,在完全丧失功能和/或神经元死亡之前介入的时间窗口短。因此,尽管在本领域中在解决许多神经损伤方面有所进展,但是仍然需要有效且灵活的治疗来在神经损伤之后恢复功能和/或减轻负面影响。本公开解决这些及相关需求。

发明内容

[0010] 提供了本发明内容以便以简化的形式介绍一系列构思,其在以下具体实施方式中进一步描述。本发明内容并非意在鉴别要求保护的主题的关键特征,也非意在用作辅助来确定要求保护的主题的范围。

[0011] 本公开概括地涉及治疗有此需要的受试者中的神经损伤的药剂、化合物和方法,例如,因创伤性脑损伤(TBI)、缺血、卒中(例如缺血性卒中和/或慢性卒中疾病)、动脉瘤、脑

出血、血栓、栓塞、多发性硬化(MS)或阿尔茨海默病所致的神经损伤,还涉及治疗与受试者的神经系统中的胶质瘢痕形成和/或硫酸软骨素蛋白聚糖(CSPG)相关联的疾病或病症的方法。

[0012] 在一个方面,本公开提供一种在神经损伤之后促进幸免的(spared)神经细胞的代偿性可塑性的方法。该方法包括使幸免的神经细胞与有效量的治疗剂接触,所述治疗剂抑制幸免的神经细胞中PTPσ的一种或更多种催化活性、信号传导或功能。在一些实施方案中,所述治疗剂包括治疗性肽,其中所述治疗性肽包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:32具有至少70%一致性,或者与SEQ ID NO:33具有至少70%一致性。

[0013] 在另一方面中,本公开提供一种治疗受试者中的神经损伤的方法。所述方法包括通过向受试者给药有效量的治疗剂而在神经损伤之后促进幸免的神经细胞的代偿性可塑性,所述治疗剂包含治疗性肽,其中所述治疗性肽包含与SEQ ID NO:32具有至少70%一致性或者与SEQ ID NO:33具有至少70%一致性的氨基酸序列。

[0014] 在这些方面的各种实施方案中,幸免的神经细胞可以是神经干细胞,可以包括少突胶质细胞祖细胞(OPC)和/或胶质前体细胞(GPC),或者可以是神经元。在一些实施方案中,代偿性可塑性可以表现在幸免的神经细胞的神经突生长,例如轴突出芽(sprouting)或树突出芽或分叉(branching)。在一些实施方案中,代偿性可塑性可以表现在幸免的神经细胞朝向神经损伤代偿性迁移。在一些实施方案中,神经损伤位于中枢神经系统,例如脑。在一些实施方案中,神经损伤归因于创伤性脑损伤(TBI)、多发性硬化(MS)、阿尔茨海默病、缺血、卒中、动脉瘤、脑出血、血栓或栓塞。

[0015] 在一些实施方案中,所述治疗剂进一步包含连接到治疗性肽的转运部分并且促进所述治疗性肽被细胞摄取。在一些实施方案中,所述转运部分是HIV Tat转运部分。在一些实施方案中,将所述治疗剂向受试者进行全身、鞘内或玻璃体内给药。

附图说明

[0016] 通过参考以下详细描述,结合附图,本发明的上述方面及随之而来的许多优点将变得更易于理解和变得更好理解,其中:

[0017] 图1示意性示出了在动物模型中实现PTPσ的细胞特异性缺失的方法的实施例。

[0018] 图2A-2C:图2A示出了T2-加权MRI扫描图像,图2B示出了显示载体和ISP治疗组的图,它们在卒中后18小时具有相同的梗死尺寸,卒中由暂时性近端大脑中动脉阻塞(tMCAO)手术诱导,治疗开始于卒中后24小时。图2C图示了相比于载体治疗卒中动物随着时间的存活率(44.828%),卒中后连续ISP治疗随着时间增高卒中动物的存活率(67.742%)。

[0019] 图3A-3C图示了计算机自动化运动空场分析的结果,显示卒中后连续ISP治疗的小鼠在卒中后2周至4周分别在总距离、水平活动和竖直活动的参数方面增强的运动活性。n=7-12,*<p<0.05,**p<0.01,ANOVA。

[0020] 图4图示了根据粘附去除试验测量卒中后ISP治疗改善受卒中影响的肢体的感觉运动功能。

[0021] 图5A-5B图示了根据在巴恩斯迷宫中找到目标孔的时间(图5A)和试错的数量(图5B)衡量,卒中后ISP治疗改善卒中小鼠的认知功能。

[0022] 图6A-6C图示了计算机自动化运动空场分析,显示了在卒中后4周分别在总距离

(图6A)、水平活动(图6B)和竖直活动(图6C)的参数方面卒中后延迟(卒中后第7天)ISP治疗的小鼠的增强的运动活性。n＝7每组,*,p＜0.05,并且**,p＜0.01,ANOVA。

[0023] 图7A-7F示出了ISP治疗增强成神经细胞形成和皮质脊髓束轴突出芽。图7A-7C是显示卒中后ISP治疗在卒中后小鼠中在侧脑室和邻近纹状体组织附近增强DCX+成神经细胞的图像和图。*p＜0.05,n＝4。比例尺＝100μm。图7D-7F分别是卡通示意图、图像和图,显示了卒中后ISP治疗增强来自皮质脊髓对侧束的轴突出芽。在颈部脊髓(箭头)处交叉的CST纤维通过对侧皮质BDA示踪来标记。(p＜0.01,学生t检验,每组n＝3)。

[0024] 图8A-8F示出了在条件(可诱导的)KO小鼠中PTPσ基因的NSC-特异性缺失和tomato报告物的同时标记的产生和表征。图8A示意性示出了制备PTPσ基因的可诱导的/条件KO(cKO)与同时标记的程序。图8B和8C示出了电泳图像,证实了在有或无诱导的情况下条件和重组的等位基因。PTPσ基因重组仅在成年NSC+巢(图8B)和富集的初级成年NSC神经球(图8C)中观察到。图8D-8F是图像,其示出了在纹状体(图8D)和DG(图8E)中SVZ或SGZ起源的成体新生tomato+细胞,及它们突起至海马中的CA3区域(图8F)。比例尺＝100mm。

[0025] 图9A-9H示出了评估神经修复的轴突出芽机制上的PTPσ缺失的策略。图9A示意性示出了在条件PTPσ小鼠中产生PTPσ基因的AAV介导的成年神经元特异性缺失并且同时标记tomato报告物的程序。图9B是示例性电泳分析的图像,证实了在受试小鼠的组织中条件和重组的等位基因。图9C是由tomato报告物标记的诱导的PTPσ缺失的图像,显示皮质神经元(标记为d;在图9D中放大)的tomato报告物标记及它们突起到纹状体(标记为e;在图9E中放大),跨越胼胝体(标记为f;在图9F中放大)到对侧皮质(标记为g;在图9G中放大)。图9H示出了皮质脊髓束(CST)和显示tomato报告物还成功地标记了皮质脊髓束(CST)图像。比例尺＝50mm。

[0026] 图10A-10E示出了成年神经干细胞培养物的形成和表征。图10A示意性示出了来自wt或cKO小鼠的成年神经干细胞(NSC)培养物的形成。图10B和10C是证实了成年NSC产生CSPG(图10B)并且是神经上皮干细胞蛋白阳性(图10C)的图像。图10D是来自梯度斑点(gradient spot)试验的图像,其中wt NSC(神经上皮干细胞蛋白阳性;箭头)无法穿透由CS56免疫染色(绿色)显像的CSPG外边缘。相反,图10E是显示cKO NSC可以穿透CSPG边缘的图像,表明它们中PTPσ功能的丧失。比例尺＝100um。

[0027] 图11A-11E示出了聚集蛋白聚糖基底涂层导致成年NSC的迁移下降,以及cKO NSC细胞中PTPσ基因的缺失(与wt相比)导致在基础水平(无聚集蛋白聚糖涂层)和具有聚集蛋白聚糖涂层情况下增强的迁移。图11A是在没有聚集蛋白聚糖基底涂层的情况下野生型NSC的代表性图像。图11B是在没有聚集蛋白聚糖基底涂层的情况下cKO NSC的代表性图像。鉴于NSC本身产生CSPG,它解释了为何在没有聚集蛋白聚糖基底涂层的情况下PTPσ的缺失或抑制增强NSC迁移。在缺血性脑部中,因为反应性星形细胞胶质在损伤周围在基底内产生额外的CSPG,所以还测试了在额外的聚集蛋白聚糖基底涂层存在下NSC的迁移。图11C是在聚集蛋白聚糖基底涂层的情况下代表性野生型NSC的图像,显示额外的聚集蛋白聚糖涂层抑制WT NSC的迁移,并且即使在额外的聚集蛋白聚糖涂层情况下cKO细胞中PTPσ的缺失也能够增强cKO细胞的迁移。图11D是在聚集蛋白聚糖基底涂层的情况下代表性cKO NSC的图像。比例尺＝50um。迁移的量化示于(E)中。**和***表示与wt细胞相比p＜0.01和p＜0.001,#和###表示与无聚集蛋白聚糖涂层条件相比p＜0.05和p＜0.001(双因素方差分析,Tukey验

后比较)。

[0028] 图12A和12B示出了ISP对CSPG-PTPσ途径的药理学抑制,显示出与遗传性PTPσ缺失相似的结果。图12A是一系列图像,显示出在有或无聚集蛋白聚糖涂层的情况下培养的对照细胞和ISP治疗的细胞的迁移。如所示,聚集蛋白聚糖涂层导致成年NSC的迁移减少,并且ISP治疗减轻CSPG对NSC迁移的抑制。图12B图示了在图12A中所示的各种条件下细胞的归一化的迁移指数。双因素方差分析,**和***表示与对照治疗的NSC相比$p<0.01$和$p<0.001$,#表示与无聚集蛋白聚糖涂布的条件相比$p<0.05$。比例尺=100um。

[0029] 图13A-13C示出了在聚集蛋白聚糖基底上与野生型NSC相比初级PTPσ cKO成年NSC具有增高的神经突生长。图13A和13B分别是体外分化5天的野生型和cKO NSC中MAP2免疫染色的代表性图像。比例尺=50um。图13C图示了通过无偏成像而对神经突长度的量化,以及对50个分化的神经元细胞的量化。**表示$p<0.01$,学生t检验。

[0030] 图14A和14B示生了在WT初级NSC细胞中ISP治疗增强神经突生长。图14是在体外分化5天的野生型NSC中MAP2免疫染色的一系列代表性图像。对神经突长度的量化是通过无偏成像进行,并且在每种条件下对50个分化的神经元细胞进行量化。图14B图示了对于对照、杂乱肽治疗的细胞和ISP肽治疗的细胞观察到的神经突长度。在对照和杂乱肽治疗的细胞之间没有显著差异,并且与对照或杂乱肽治疗的细胞相比,**表示在ISP治疗的细胞中$p<0.01$。单因素方差分析。

具体实施方式

[0031] 本公开概括地涉及治疗有此需要的受试者中的神经损伤的药剂、化合物和方法,例如,因创伤性脑损伤(TBI)、缺血、卒中(例如缺血性卒中和/或慢性卒中疾病)、动脉瘤、脑出血、血栓、栓塞、多发性硬化(MS)或阿尔茨海默病所致的神经损伤,还涉及治疗与受试者的神经系统中的胶质瘢痕形成和/或硫酸软骨素蛋白聚糖(CSPG)相关联的疾病或病症的方法。在一些实施方案中,本公开涉及在神经损伤之后促进幸免的神经细胞的代偿性可塑性。

[0032] 本公开部分地基于发明人发现在动物和人类卒中患者中在整个慢性阶段中硫酸软骨素蛋白聚糖(CSPG)可以在梗死周围区域中在胶质瘢痕中累积或调节。在卒中的慢性阶段期间CSPG在梗死周围区域处的这种累积已经与卒中后神经元可塑性重构(其包括形成新的局部回路、大脑半球间连接和皮质脊髓束轴突出芽)的抑制密切关联,潜在地导致卒中动物和人类患者的恢复受限。如下文更详细描述的,本发明人发现了一种全身性肽治疗(例如细胞内σ肽(intracellular sigma peptide,ISP)治疗),其抑制或调制神经细胞中的PTPσ催化活性、信号传导和/或功能,克服CSPG屏障而显著地改善鼠科动物卒中模型中的功能性恢复的多个方面,其中包括一般运动功能、特定的上肢感觉运动功能,以及认知功能。在研究恢复机制期间,确定了在神经细胞中对PTPσ信号传导的ISP调制(modulation)通过诱导幸免于损伤的神经细胞(例如未受损的神经元)的迁移和出芽活性以允许功能性代偿受损神经元的存在,从而促成若干方面的恢复。这最终允许即使在神经损伤后ISP治疗延迟时也诱导改善性效果。此外,该全身性肽治疗抑制或调制了PTPσ催化活性、信号传导和/或功能,导致卒中后脑慢性萎缩减少。因此,这证实了促进在神经损伤近端和远端的幸免(例如未受损)的神经细胞的可塑性的能力与损伤(例如恶性卒中)发生后促进恢复和存活的疗法高度相关。

[0033] 根据上述内容,在一个方面,本公开提供了一种促进神经损伤后幸免的神经细胞的代偿性可塑性的方法。所述方法包括使幸免的神经细胞与有效量的治疗剂接触,所述治疗剂在幸免的神经细胞中抑制或调制PTPσ的一种或更多种催化活性、信号传导或功能。该方法可适用于治疗受试者中的神经损伤的其他方法,所述其他方法是通过向受试者给药有效量的本公开的治疗剂或组合物而促进神经损伤后幸免的神经细胞的代偿性可塑性,这也被本公开涵盖。在一些实施方案中,所述治疗剂包含治疗性肽。所述治疗性肽可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:32具有至少70%一致性,或者与SEQ ID NO:33具有至少70%一致性。

[0034] 本文中使用的术语“治疗”表示对受试者(例如人类或非人类哺乳动物,例如另一种灵长类动物、马、狗、猪、小鼠、大鼠、豚鼠、兔等)的疾病、病症或病况(例如神经损伤)的医疗管理。治疗可以涵盖对疾病或病况(例如神经损伤)的治疗或改善成功的任何指标,包括任何参数例如症状的消除、缓解、减轻或者使疾病或病况令患者更可耐受,减缓变性或衰退的速率,或使变性较低地致弱。对症状的治疗或改善可以基于主观或客观的参数,包括医生检查的结果。例如,在本文中提及的“NIHSS量表”是衡量由卒中所致的损伤水平的常用量表(Kasner S E.Lancet Neurol.2006;7:603-12)。因此,术语“治疗”包括给药本公开的组合物以缓解或阻止或抑制与疾病或病况(例如神经损伤)相关联的症状或病况的发展。另外,此术语包括:保守性治疗,即,为了减轻症状而非治愈疾病、病理学状况或病症而设计的治疗;预防性治疗,即,旨在最小化或部分地或完全地抑制相关疾病、病理学状况或病症的发展的治疗;和支持性治疗,即,用于补充另一种特定的旨在改善相关疾病、病理学状况或病症的疗法的治疗。

[0035] 术语“治疗效果”表示在受试者中整体改善、减轻或消除疾病或病症、疾病或病症的症状,或疾病或病症的副作用。

[0036] 术语“治疗有效的”表示可以容易地确定的产生治疗效果(例如诱导幸免的神经元的代偿性可塑性和/或提高运动功能、感觉运动功能或认知)的组合物的量。本文中界定的药物的有效量可以根据因素而改变,例如受试者的疾病状态、年龄和重量,以及该药物在受试者中引发期望的响应的能力。给药方案可以被调整以提供最佳的治疗性响应。有效量也是其中活性化合物的治疗性有益效果超过其任何毒性或有害效果的量。

[0037] 术语“代偿性可塑性(compensatory plasticity)”表示诱导健康神经细胞的有助于神经功能的表型变化,其补偿受损神经细胞的损失或变性。健康神经细胞被称为“幸免的”神经细胞,表示它们在本方法解决的神经损伤中未直接受损。

[0038] 在一些实施方案中,幸免的神经细胞是神经干细胞。神经干细胞是多能未分化的神经细胞,其可以最终分化成神经系统的神经元和胶质。在其他实施方案中,幸免的神经细胞可以包括少突胶质细胞祖细胞(OPC)和/或胶质前体细胞(GPC)。在其他实施方案中,幸免的神经细胞是神经元。神经元或神经细胞是在神经组织内的细胞,其通过将神经递质释放入分隔开细胞的小突触间隙而将电脉冲沿着其主体的部分(例如沿着轴突)传递以实现与其他细胞通信。神经元,如本公开所涵盖的,通过表达某些细胞标志物而可区别于神经干细胞。具体地,神经元典型地是神经上皮干细胞蛋白-(nestin-)和DCX+(对于未成熟神经元),或者神经上皮干细胞蛋白-和NeuN+或apt2+(对于成熟神经元)。相反,神经干细胞典型地是神经上皮干细胞蛋白+和DCX-。

[0039] 如下文更详细描述的,确定了对PTPσ的催化活性、信号传导和/或功能的抑制诱导神经损伤(例如卒中)后幸免的神经细胞中的神经突生长(neurite outgrowth)。因此,在一些实施方案中,治疗剂/肽诱导幸免的神经细胞的代偿性神经突生长。神经突生长可以表现在幸免的神经细胞中的轴突出芽。轴突出芽是轴突(即,神经纤维)从细胞体延伸发育或以其他方式生长。轴突典型的功能是从神经细胞体朝向另一细胞传导电脉冲。在其他实施方案中,神经突生长可以表现在幸免的神经细胞中的树突出芽。树突是神经细胞的分支原生质性延伸,其将从其他神经细胞接收的电化学刺激传播到细胞体。在两种中的任一实施方案中,神经突出芽,无论轴突出芽或树突出芽或分叉,都导致与邻近、周围或甚至远处的神经细胞增加的突触接触。不限于特定的理论,增加的突触接触补偿因其他细胞的损伤而损失的突触接触。布通过神经突出芽而增加代偿性突触的情况下,可以建立可替代的或旁路连接,由此使信号传导途径改变路线,从而可以在受损的神经细胞损失或变性之后用来恢复功能。

[0040] 在一些实施方案中,本文中所述的神经突生长可以发生在幸免的神经细胞中,所述幸免的神经细胞在神经损伤位点的近端或在损伤位点的远端。术语“近端”或“远端”是表示相对距离并且可以取决于背景而表示不同的距离。在一些情形中,在神经损伤位点的近端的幸免的神经细胞是在损伤位点附近或以其他方式接近的细胞,其例如直接接触受损的神经细胞或者在受损细胞的可以细胞长度或宽度来衡量的距离内。相反,在神经损伤位点的远端的幸免的神经细胞可以远在例如脑的不同组织或区域中,或甚至在中枢神经系统的其他区域中,例如在脊髓中。例如,在一些实施方案中,治疗剂/肽在神经损伤位点的远端(例如在皮质脊髓对侧束中的位置)的幸存的神经元中诱导神经突生长。

[0041] 在其他实施方案中,治疗剂/肽诱导幸免的神经细胞朝向神经损伤代偿性迁移。在一些实施方案中,表现出代偿性迁移的幸免的神经细胞是神经干细胞。在其他实施方案中,表现出代偿性迁移的幸免的神经细胞是少突胶质细胞祖细胞(OPC)和/或胶质前体细胞(GPC)。在一些实施方案中,治疗剂/肽诱导在神经损伤位点近端的幸免的神经细胞的代偿性迁移。虽然本公开涵盖其中幸免的神经细胞的代偿性迁移导致幸免的神经细胞进入神经损伤位点的实施方案,但是本公开并不如此受限制。本公开还涵盖其中幸免的神经细胞的代偿性迁移导致与给药治疗剂/肽之前其所在相比幸免的神经细胞更接近神经损伤位点的实施方案。在一些实施方案中,迁移的幸免的神经细胞跨过CSPG环。

[0042] 本公开的方法解决中枢神经系统中发生的神经损伤。在一些实施方案中,神经损伤位于脑部。如下文更详细描述的,卒中模型用于确定神经损伤后幸免的神经细胞的诱导的可塑性。鉴于在幸免的神经细胞(包括在损伤位点远端的神经细胞)中发生增强的可塑性效果,本领域普通技术人员将理解本公开不限于卒中的情形,而且还涵盖其他形式的神经损伤。因此,神经损伤可能归因于:创伤性脑损伤(TBI),例如震荡;神经变性疾病,例如多发性硬化(MS);阿尔茨海默病、缺血(例如局灶性缺血或全面性缺血);卒中(例如缺血性卒中和/或慢性卒中疾病);动脉瘤、脑出血、血栓、栓塞;以及诸如其中神经细胞受损的此类。

[0043] 术语“缺血”在本文中还称为“大脑缺血”、“脑缺血”或“脑血管缺血”,是其中流向脑部的血流不足以满足代谢需求的状况。这导致不良氧供给或大脑低氧,由此导致脑组织的死亡或大脑梗死,也称为“缺血性卒中”。“缺血性卒中”是卒中的子类型,并且通常是由于阻塞脑动脉而中断对脑部的血液供给的结果。术语“大脑缺血”和“缺血性卒中”可以在本文

中可耳换地使用。

[0044] 存在两种类型的大脑缺血:“局灶性缺血”,其限于脑部的特定区域;和“全面性缺血”,其涵盖脑组织的宽大区域。典型地,脑缺血特征在于患者表现出以下症状中的一种或更多种:难以谈话和理解、面部、臂或腿的瘫痪或麻木、一只或两只限难以看见、头痛和难以走路。为了确定卒中的类型和最适当的治疗,急救队需要评价卒中的类型和脑部受卒中影响的区域。急救队还需要排除症状的其他可能起因,例如脑瘤或药物反应。存在着一般用于确定卒中类型的若干检验:体检、血液测试(葡萄糖水平、血细胞计数、血清电解质例如钠、钾或钙、胆固醇、总脂质、HDL、LDL或凝血因子例如抗凝血酶III、蛋白C、蛋白S;因子VIII;激活的蛋白C抗性;特别相关的是凝血因子和血小板测定)、计算机断层(CT)扫描、磁共振成像(MRI)、颈动脉超声、脑血管造影和超声心动图。关于缺血性卒中的诊断的评论,参见Am Fam Physician.,2015,91(8):528-36。缺血性卒中的急性阶段在本文中被称为“急性缺血性卒中”并且被定义为在发作的4小时内。卒中或缺血性卒中的慢性阶段在本文中被称为慢性卒中疾病并且在缺血性卒中的急性阶段之后发生。

[0045] 现在将描述在幸免的神经细胞中对PTPσ的一种或更多种催化活性、信号传导或功能的抑制,以及用于此目的的治疗剂。

[0046] PTPσ的活性、信号传导和/或功能可以以包括以下的若干方式被阻抑、抑制和/或阻滞:直接抑制PTPσ的细胞内结构域的活性(例如通过使用小分子、肽模拟物、抗体、细胞内抗体或显性负性多肽);激活(例如通过增大基因和/或蛋白的表达或活性)基因和/或蛋白(该基因和/或蛋白抑制PTPσ的细胞内结构域的一种或更多种活性、信号传导和/或功能);抑制作为PTPσ的下游介质的基因和/或蛋白(例如通过阻滞介质基因和/或蛋白的表达和/或活性);引入(例如通过使用重组基因表达载体、重组病毒载体或重组多肽)基因和/或蛋白(该基因和/或蛋白负调控PTPσ的一种或更多种活性、信号传导和/或功能);或者用例如PTPσ的亚效(hypomorphic)突变体基因置换(例如通过同源重组、使用重组基因表达或病毒载体的过度表达,或诱变)。

[0047] 抑制或降低PTPσ的一种或更多种活性、信号传导和/或功能的治疗剂可以包括降低和/或阻抑PTPσ的活性、信号传导和/或功能的药剂。这种药剂可以被细胞内递送并且一旦细胞内递送就增强受试者的运动功能、感觉运动功能或认知中的至少一种。

[0048] 在一些实施方案中,抑制或降低PTPσ的一种或更多种活性、信号传导和/或功能的治疗剂包含治疗性肽或小分子,其与PTPσ的细胞内结构域(具体地细胞内楔形结构域)结合和/或复合而抑制PTPσ的活性、信号传导和/或功能。因此,与幸免的神经细胞(例如神经干细胞、OPC、GPC、神经元和/或胶质细胞)的PTPσ的细胞内结构域结合和/或复合的治疗性肽或小分子可以用于促进代偿性细胞生长、运动性(例如迁移)、神经突生长、存活,或者促进这些细胞的代偿性可塑性的其他特征。

[0049] 在一些实施方案中,治疗剂可以是PTPσ的细胞内催化结构域的楔形结构域(即,楔结构域)的肽模拟物,诸如WO 2013/155103A1中所述,具通过援引而以其整体并入本文中。PTPσ的楔形结构域的肽模拟物当在细胞(例如神经元和/或胶质细胞)中表达或者缀合至细胞内转运部分时可以与在幸存的神经细胞中表达的楔形结构域结合和/或嵌合(camera),导致在幸免的神经细胞中消除PTPσ信号传导,从而促进细胞生长、运动性和存活。例如,这些治疗性肽与PTPσ完整楔形结构域结合可以:(i)妨碍PTPσ与目标蛋白(例如磷酸酶目标)

相互作用的能力;(ii)妨碍促进PTPσ和PTPσ中包含的另一结构域(例如催化失活的第二磷酸酶结构域D2)之间的分子间相互作用的活性;(iii)防止蛋白接近活性磷酸酶位点;(iv)竞争超过楔形结构域的正常相互作用物;和/或(v)空间上抑制磷酸酶活性。

[0050] 如上所述,在一些实施方案中,治疗剂可以包含治疗性肽、基本上由治疗性肽组成,和/或由治疗性肽组成,所述治疗性肽包含约10至约20个氨基酸的氨基酸序列,所述氨基酸序列与PTPσ的楔形结构域的氨基酸序列的约10至约20个连续氨基酸部分具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或100%一致性。在一些实施方案中,该约10至约20个连续氨基酸部分包括楔形结构域的N-末端α螺旋和4氨基酸转角的连续氨基酸。在一些实施方案中,PTPσ的参考楔形结构域是人类PTPσ序列。在一些实施方案中,治疗性肽包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:32具有至少约70%、至少约78%、至少约85%、至少约92%或100%一致性。在其他实施方案中,治疗性肽包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:33具有至少约70%、至少约78%、至少约85%、至少约92%或100%一致性。

[0051] 如下文公开的,具有细胞溶质运载体(carrier)的与PTPσ的楔形结构域对应或基本上一致的肽(例如治疗性肽)能够缓解对卒中后神经元可塑性重构的CSPG-介导的抑制,增强运动功能、感觉运动功能或认知中的至少一种。有利地,治疗性肽可以被全身性给药。

[0052] 如表1中所示,PTPσ的楔形结构域序列在较高等哺乳动物中是高度保守的,在人类至小鼠和大鼠中仅单个氨基酸改变(在位置6苏氨酸变为蛋氨酸),防止100%同源性。

[0053]

表 1：楔形结构域蛋白序列的比对

残基/位置																							来源生物	SEQ ID NO:
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
D	L	A	E	H	T	E	H	L	K	A	N	D	N	L	K		S	Q	E	Y	E	S		非洲爪蟾	1
D	H	T	E	H				L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	绿色安乐蜥	2
E	L	A	E	H	T	E	L	L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	斑马鱼	3
E	L	A	E	H	T	E	L	L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	罗非鱼 (Talapia)	4
E	L	A	E	H	T	E	H	L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	鸡	5
E	L	A	E	H	T	E	H	L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	雀科鸟	6
E	L	A	E	H	T	D	H	L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	鸭嘴兽	7
E	M	A	E	H	T	E	H	L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	袋獾	8
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	雪貂	9
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	丛猴	10
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	狨猴	11
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	大鼠	12
D	M	A	E	H	M	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	小鼠	13
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	狗	14
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	猪	15
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	牛	16
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	绵羊	17
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	虎鲸	18
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	松鼠猴	19
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	狒狒	20
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	大猩猩	21
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	长臂猿	22

[0054]

D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	猕猴	23
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	黑猩猩	24
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	人类	25
D	L	A	D	N	I	E	R	L	K	A	N	D	G	L	K	F	S	Q	E	Y	E	S	I	LAR(Lar 家族)	26
E	L	A	D	H	I	E	R	L	K	A	N	D	N	L	K	F	S	Q	E	Y	E	S	I	δ(Lar 家族)	27
K	L	E	E	E	I	N	R	R	M	A	D	D	N	K	I	F	R	E	E	F	N	A	L	ptp α	28

[0055] 如表1中所示,PTPσ的楔形结构域的第一α螺旋包含氨基酸1-10,转角区包含氨基酸11-14,以及第二α螺旋包含氨基酸15-24。例如,人类PTPσ的楔形结构域(SEQ ID NO:25)

的第一α螺旋具有DMAEHTERLK(SEQ ID NO:29)的氨基酸序列,转角具有ANDS(SEQ ID NO:30)的氨基酸序列,第二α螺旋具有LKLSQEYESI(SEQ ID NO:31)的氨基酸序列。

[0056] 楔形结构域还与LAR家族的其他成员、LAR和PTPδ共有序列同源性。这些氨基酸可能是楔形结构域的整体结构所需的。保守的氨基酸包括在位置13处丙氨酸,其标志第一α螺旋的结束和转角的开始,使其可能是整体楔形尺寸和结构所需的。

[0057] 因为楔形结构域的一般二级和三级结构在大多数受体PTPσ中保持一致,所以可以对靶向PTPσ楔形结构域的治疗性肽进行若干保守性替换以获得相似的结果。保守性替换的示例包括:一个非极性(疏水性)残基(例如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或蛋氨酸)替换另一个,一个极性(亲水性)残基替换另一个,例如精氨酸和赖氨酸之间的替换、谷氨酰胺和天冬酰胺之间的替换、甘氨酸和丝氨酸之间的替换,一个碱性残基(例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)替换另一个,和/或一个酸性残基(例如天冬氨酸或谷氨酸)替换另一个。

[0058] 这些保守性替换可以发生在非唯一性结构域中在α螺旋或转角中,具体地在第一α螺旋中的位置1-3和7-10;转角中的位置12和13;和第二α螺旋中的位置15、16、18-24。这些氨基酸可能是楔形结构域的整体结构所需的,但并非楔形特异性结合至PTPσ所需的。

[0059] PTPσ的唯一性氨基酸,特别是相比于LAR在PTPσ中差异性表达的氨基酸,被发现是楔形结构域的特异性结合所需的。这些包含第一α螺旋中位置4和5的EH结构域,后续在位置6处的苏氨酸或蛋氨酸(大鼠和小鼠替换)。在所有较高等哺乳动物中,在转角中,在位置14处存在唯一性丝氨酸。最后,在第二α螺旋中在位置17处存在唯一性亮氨酸。这些唯一性氨基酸的潜在作用将在下文讨论。

[0060] 在转角中在位置14处的丝氨酸残基由于其在楔形结构域中的位置而特别受关注。此氨基酸,位于α螺旋之间的转角中,从PTPσ的一般二级结构和三级结构稍微延伸,使其可用于结合相耳作用。另外,丝氨酸,由于其羟基和其包含的极性,已知促进若干同种亲和性和异种亲和性结合事件,例如邻近丝氨酸之间的氢键。还已知丝氨酸经过各种修饰,例如磷酸化,使得其为特异性所必需的可能性变高。集中于楔形结构域中的转角并且包含保守性丝氨酸的较小肽可能可以在相似功能的情况下提供更高的稳定性。这种肽可以被合成为环,其中以在两端上的半胱氨酸产生二硫键。

[0061] 第一α螺旋中的唯一性氨基酸包括在位置4处的谷氨酸、在位置5处的组氨酸和在位置6处的苏氨酸或蛋氨酸。虽然组氨酸参与在共有楔形结构域中,但是它不存在于LAR、PTPδ、PTPμ或CD45中。因为所有这三个氨基酸或是带电荷的,或是极性的,所以此序列或其组分之一是PTPσ楔形特异性所需的。

[0062] 另外,第二α螺旋包含在位置17处的唯一性亮氨酸。亮氨酸已经被表明为亮氨酸拉链的三维结构的关键粘附性分子。在这些分子中,其在结构上相似于楔形结构域,相对的α螺旋的位于大约7个间隔处的亮氨酸与相对α螺旋的疏水性区域相互作用。因为在第一α螺旋中位于位置9处还存在亮氨酸,所以此唯一性亮氨酸被认为是PTPσ楔形的整体三维结构完整性所需的。

[0063] 因此,在一些实施方案中,治疗性肽可以包含约14至约20个氨基酸,基本上由约14至约20个氨基酸组成,或由约14至约20个氨基酸组成,并且包含氨基酸序列EHX1ERLKANDSLKL(SEQ ID NO:32),其中X_1是T或M。包含SEQ ID NO:32的治疗性肽可以包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个保守性替换,从而该治疗性肽具有氨

基酸序列,该氨基酸序列与SEQ ID NO:32具有至少约70%、至少约78%、至少约85%、至少约92%或100%一致性。

[0064] 在一些实施方案中,保守性替换可以具有SEQ ID NO:32的氨基酸残基4E、5R、6L、7K、9N、10D、12L或13K。作为非限制性示例,氨基酸残基4E可以被替换为D或Q,氨基酸残基5R可以被替换为H、L或K,氨基酸残基6L可以被替换为I、V或M,氨基酸残基7K可以被替换为R或H,氨基酸残基9N可以被替换为E或D,氨基酸残基10D可以被替换为E或N,氨基酸残基12L可以被替换为I、V或M,和/或氨基酸残基13K可以被替换为R或H。所述替换中的任何一个或更多个可以以任何组合实施,只要所得的序列达到相同的上述参数。

[0065] 对治疗性肽的许多方面的描述概括地陈述在本文中在SEQ ID NO:32的上下文中,本公开还涵盖实施方案,其中治疗性肽包含如SEQ ID NO:33所示的楔形结构域的变体。应理解,本文中所述的治疗性肽的所有其他方面和特征也适用于此变体实施方案,除非另有明确说明。因此,在其他实施方案中,治疗性肽可以包含约14至约20个氨基酸,基本上由约14至约20个氨基酸组成,或由约14至约20个氨基酸组成,并且包含氨基酸序列$DMAEHX_1ERLKANDS$(SEQ ID NO:33),其中X_1是T或M。包含SEQ ID NO:33的治疗性肽可以包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个保守性替换,从而该治疗性肽具有氨基酸序列,该氨基酸序列与SEQ ID NO:33具有至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%一致性。

[0066] 在一些实施方案中,保守性替换可以具有SEQ ID NO:33的氨基酸残基7E、8R、9L、10K、12N或13D。作为示例,氨基酸残基7E可以被替换为D或Q,氨基酸残基8R可以被替换为H、L或K,氨基酸残基9L可以被替换为I、V或M,氨基酸残基10K可以被替换为R或H,氨基酸残基12N可以被替换为E或D,以及氨基酸残基13D可以被替换为E或N。

[0067] 在一些实施方案中,治疗性肽包含选自由SEQ ID NO:1-25、32和33组成的组中的氨基酸序列。

[0068] 本文所述的治疗性肽可以进行其他各种改变、替换、插入和缺失,其中这种改变在其用途方面提供某些优点。就此而言,与PTPσ的楔形结构域结合和/或复合的治疗性肽可以与所述多肽的序列对应或基本上但不完全一致,在所述多肽中作生一个或更多个改变,并且它保留抑制或降低PTPσ的一种或更多种活性、信号传导和/或功能的能力。

[0069] 治疗性肽可以是多肽衍生物的各种形式中的任一种,包括酰胺、与蛋白的缀合物、环化多肽、聚合的多肽、类似物、片段、化学修饰的多肽等衍生物。

[0070] 将理解,保守性替换还可以包括使用化学衍生化的残基替换非衍生化的残基,条件是这种肽显示出必要的结合活性。

[0071] 本文中使用的术语“化学衍生物”或其语法变型表示具有通过功能性侧基的反应而化学衍生的一个或更多个残基的主题多肽。这种衍生化的分子包括,例如,那些分子,其中游离氨基已经被衍生化而形成盐酸胺、对甲苯磺酰基、苄氧羰基、叔丁氧基羰基、氯乙酰基或甲酰基。游离的羧基可以被衍生化而形成盐、甲酯和乙酯或其他类型的酯或肼类。游离的羟基可以被衍生化而形成O-酰基或O-烷基衍生物。组氨酸的咪唑氮可以被衍生化而形成N-im-苄基组氨酸。化学衍生物还包括那些多肽,其包含20种标准氨基酸的一种或更多种天然存在的氨基酸衍生物。例如:4-羟脯氨酸可以替换脯氨酸;5-羟基赖氨酸可以替换赖氨酸;3-甲基组氨酸可以替换组氨酸;高丝氨酸可以替换丝氨酸;以及鸟氨酸可以替换赖氨

酸。本文所述的多肽还可以包括相对于本文中示出序列的多肽的序列具有一个或更多个添加和/或缺失或残基的任何多肽,只要必要的活性得以保持。

[0072] 本文所述的治疗性肽中的一种或更多种肽还可以通过天然过程(例如翻译后加工)和/或通过本领域已知的化学修饰技术进行修饰。修饰可以发生在肽中,包括发生在肽骨架、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。将理解,相同类型的修饰可以以相同或不同的程度存在于给定肽的若干位点处。修饰包括,例如,而不限于,乙酰化、酰化、添加乙酰氨基甲基(Acm)、ADP-核糖基化、酰胺化、共价附接到fiavin、共价附接到血红素(heme)部分、共价附接核苷酸或核苷酸衍生物、共价附接脂质或脂质衍生物、共价附接磷脂酰肌醇、交联、环化、二硫键形成、脱甲基化、形成共价交联、形成胱氨酸、形成焦谷氨酸、甲酰化、γ-羧基化、糖基化、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋、硒化、硫酸化、转移RNA介导的氨基酸添加到蛋白例如精氨酰化和泛素化(文献参见,Protein-structureandmolecularproperties,第2版,T.E.Creighton,W.H.Freeman and Company,New-York,1993)。

[0073] 本文所述的肽和/或蛋白还可以包括,例如,生物活性突变体、变体、片段、嵌合体和类似物;包含截短一个或更多个氨基酸的氨基酸序列的片段,其中所述截短可以起始于蛋白的氨基末端(N-末端)、羧基末端(C-末端)或内部。本发明的类似物包括插入或替换一个或更多个氨基酸。变体、突变体、片段、嵌合体和类似物可以充当LAR家族磷酸酶的抑制剂(而不限于本示例)。

[0074] 本文所述的治疗性多肽可以通过本领域技术人员已知的方法进行制备。肽和/或蛋白可以利用重组DNA来制备。例如,一种制备可以包括在允许在细胞内表达肽和/或蛋白的条件下培养宿主细胞(细菌或真核生物)。

[0075] 多肽的纯化可以通过亲和性方法、离子交换色谱法、尺寸排阻色谱法、疏水性或典型地用于蛋白纯化的其他纯化技术进行。纯化步骤可以在非变性条件下进行。在另一方面,若需要变性步骤,则可以利用本领域已知的技术使蛋白恢复活性。

[0076] 在一些实施方案中,本文所述的治疗性肽可以包含附加的残基,其可以被添加在多肽的任一末端处以便提供“接头”,通过该接头,所述多肽可以方便地连接到和/或附接到其他多肽、蛋白、可检测性部分、标记、固体基质或运载体。

[0077] 氨基酸残基接头通常是至少一个残基,并且可以是40或更多个残基,更经常地1至10个残基。用于连接的典型的氨基酸残基是甘氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、谷氨酸和天冬氨酸或诸如此类。另外,主题多肽可以通过末端-NH_2酰化(例如乙酰化或巯基乙酸酰胺化)、末端-甲酰胺化(例如用氨、甲胺)和相似的末端修饰来修饰序列而不同。如已公知的,末端修饰可用于降低对蛋白酶消化的敏感性,并因此用于延长多肽在溶液(特别是可能存在蛋白酶的生物流体)中的半衰期。就此而言,因为通过环化而形成的稳定结构并且鉴于本文所述的环形肽所示的生物活性,所以多肽环化也是有效的末端修饰,并且还是特别优选的。

[0078] 在一些实施方案中,接头可以是柔性肽接头,其将治疗性肽多肽连接到其他多肽、蛋白、和/或分子例如可检测性部分、标记、固体基质或运载体。柔性肽接头可以是约20个或较少的氨基酸长度。例如,肽接头可以包含约12个或更少的氨基酸残基,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12个。在一些情况中,肽接头包含任何组合的两个或更多个以下氨基酸:甘

氨酸、丝氨酸、丙氨酸和苏氨酸。在一些实施方案中,肽接头不包含半胱氨酸残基。

[0079] 在一些实施方案中,包含本文所述的治疗性肽的治疗剂可以以缀合蛋白或药物递送构建体的形式提供,其包含与治疗性肽连接的至少一个转运亚结构域或部分(即,转运部分)。该转运部分可以促进治疗性多肽被摄入哺乳动物(即,人类或动物)组织或细胞(例如神经细胞)中。该转运部分可以共价连接到治疗性肽。共价连接可以包括肽键或不稳定的键(例如在内部靶细胞环境中易裂解的或化学变化的键)。此外,转运部分可以(例如化学交联、UV交联)交联到治疗性多肽。转运部分还可以用本文所述的连接多肽来连接到治疗性多肽。

[0080] 转运部分可以在治疗剂中重复多于一次。转运部分的重复可以影响(例如增高)肽和/或蛋白被期望的细胞摄取。转运部分还可以位于治疗性肽的氨基末端区域处或在其羧基末端区域处或在此二区域处。

[0081] 在一些实施方案中,转运部分可以包含至少一个转运肽序列,其允许治疗性多肽一旦连接到该转运部分就通过受体非依赖性机制而穿入细胞中。本公开涵盖的Tat序列的示例如SEQ ID NO:34中所示。例如,在解释性非限制实施方案中,转运肽是合成的融合肽,其包含至少一个Tat-介导的蛋白递送序列以及与SEQ ID NO:1-25、32和33之一具有至少70%一致性的序列。在具体的解释性实施方案中,其中Tat-介导的蛋白递送序列以一个残基的肽接头而与SEQ ID NO:1-25、32和33之一的楔形结构域序列连接,融合肽可以分别具有SEQ ID NO:35-61的氨基酸序列。SEQ ID NO:35-59中的每一个所示的Xaa(和SEQ ID NO:60和61中的每一个所示的第一Xaa)可以是任何氨基酸残基,例如甘氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、谷氨酸和天冬氨酸或诸如此类。在一些实施方案中,所示的接头氨基酸(以Xaa表示)是甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸或苏氨酸。在一些实施方案中,所示的接头氨基酸(以Xaa表示)不是半胱氨酸。虽然SEQ ID NO:35-61公开的序列各自具有单个接头氨基酸残基,但是应理解,具有较长(包含两个或更多个氨基酸残基的)肽接头的其他实施方案也被本公开涵盖。较长肽接头在上文描述。

[0082] 本公开涵盖的已知转运部分、亚结构域及诸如此类的其他示例描述在例如,加拿大专利文件2,301,157号(conjugates containing homeodomain of antennapedia)以及美国专利号5,652,122、5,670,617、5,674,980、5,747,641和5,804,604中,全部所述专利通过援引而整体并入本文中。这种示例包括缀合物,其包含Tat HIV蛋白的氨基酸;单纯疱疹病毒-1DNA结合蛋白VP22、长度范围4至30个组氨酸重复的组氨酸标签,或者其能够促进活性货物部分通过受体非依赖性过程而被摄取的变体衍生物或同源物。

[0083] 触角足同源结构域的第三α-螺旋的16个氨基酸区域也已表现出能够使得蛋白(制备为融合蛋白)穿过细胞膜(PCT国际公布号WO 99/11809和加拿大中请号2,301,157。相似地,HIVTat蛋白表现出能够穿过细胞膜。

[0084] 另外,(多个)转运部分可以包含多肽,其具有与活性剂部分(例如包含细胞内结构域的片段抑制剂肽)共价连接的碱性氨基酸富集区。本文中使用的术语“碱性氨基酸富集区”涉及蛋白的具有高含量碱性氨基酸(例如精氨酸、组氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸)的区域。“碱性氨基酸富集区”可以具有例如,15%或更多的碱性氨基酸。在一些情形中,“碱性氨基酸富集区”可以具有小于15%的碱性氨基酸并且仍然用作转运剂区。在其他情形中,碱性氨基酸区将具有30%或更多的碱性氨基酸。

[0085] (多个)转运部分可以进一步包含脯氨酸富集区。本文中使用的术语脯氨酸富集区表示多肽在其序列中具有5％或更多(高达100％)的脯氨酸的区域。在一些情形中,脯氨酸富集区可以具有5％至15％之间的脯氨酸。此外,脯氨酸富集区表示,与在天然存在的蛋白(例如由人类基因组编码的蛋白)通常观察到脯氨酸相比,多肽的包含更多脯氨酸的区域。脯氨酸富集区的这种应用可以充当转运剂区。

[0086] 在一个实施方案中,本文所述的治疗性肽可以非共价地连接到转导剂。非共价连接的多肽转导剂的示例是Chariot蛋白递送系统(参见美国专利6,841,535号;J Biol Chem 274(35):24941-24946;和Nature Biotec.19:1173-1176,全部通过援引而整体并入本文中)。

[0087] 本文所述的治疗剂可以被修饰(例如化学修饰)。这种修饰可以被设计成促进对分子的控制或纯化、提高分子的溶解性、促进靶向期望的位置给药、增大或减小半衰期。许多这种修饰是本领域已知的,并且可以由技术人员应用。

[0088] 在本文公开的治疗方法实施方案中,将治疗有效量的治疗剂向患有与慢性卒中疾病相关的慢性功能的受试者给药。包含治疗剂的制剂可以在从例如卒中的检测或发作的时间至卒中的检测或发作后数天、数周、数月和/或数年的期间一次或更多次地向受试者给药。

[0089] 治疗剂可以通过任何适合的路径而被递送到受试者,包括例如,局部和/或全身性给药。全身性给药可以包括,例如,肠胃外给药。短语“肠胃外给药”表示除了肠给药和局部给药以外的给药模式,以注射为典型,并且非限制地包括:静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、室内、囊内、眶内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、subarachnoid、脊柱内和胸骨内注射和输注。在一些实施方案中,全身性给药包括:肌肉内、静脉内、关节内、动脉内、鞘内、玻璃体内、皮下或腹膜内给药。治疗剂还可以通过口腔、透皮、局部、通过吸入(例如支气管内、鼻内、经口吸入或鼻内滴剂)或通过直肠进行给药。在一些实施方案中,治疗剂可以通过利用输注泵经由静脉内给药而向受试者给药,从而每天或每周地递送治疗剂的剂量。

[0090] 局部给药的适宜特征可以包括达到治疗剂的有效局部浓度,以及避免治疗剂的全身性给药带来的潜在不良副作用。在一个实施方案中,治疗剂可以被直接引入受试者的脑部中。

[0091] 治疗剂的药学上可接受的制剂可以混悬在水性载体中并且通过常规的皮下注射针或利用输注泵而被引入。

[0092] 对于注射,治疗剂可以被配制在液体溶液中,典型地在生理上可相容的缓冲剂例如汉克溶液或林格溶液中。另外,治疗剂可以被配制成固体形式并且在使用之前即刻被重新溶解或混悬。还提供了冻干形式。注射可以是,例如,一次剂量注射或连续输注(例如利用输注泵)治疗剂的形式。

[0093] 应理解,向任何动物或人类受试者给药的治疗剂的量、体积、浓度和/或剂取决于许多因素,包括受试者的尺寸、身体表面积、年龄、要给药的具体组合物、性别、给药的时间和路径、一般健康状况,以及同时给药的其他药物。治疗剂的上述量、体积、浓度和/或剂量的具体变化可以容易地由本领域技术人员利用下述试验方法进行确定。

[0094] 在一些实施方案中,治疗剂,例如本文所述的治疗性肽,可以向有此需要的受试者

局部地和/或全身性地给药,给药的剂量或量是约0.1μmol、约1μmol、约5μmol、约10μmol或更多;或者约0.0001mg/kg、约0.001mg/kg、约0.01mg/kg、约0.1mg/kg或约1mg/kg至约5mg/kg或10mg/kg正被治疗的受试者。治疗剂可以每天、每周、每两周、每月或频次较少地进行给药,直至达到运动、感觉运动和/或认知缺陷的最大恢复。

[0095] 治疗剂可以以1-1000mg IV之间(例如100-600mg之间IV、例如200和400mg之间IV、例如约300mg IV)的固定单位剂量进行给药。当皮下给药时,治疗剂通常以1mg-100mg SC(例如75mg)之间的剂量进行给药。治疗剂还可以以1和10mg/kg之间(例如约6.0、4.0、3.0、2.0、1.0mg/kg)的剂量进行推注给药。在一些情况中,可以例如经由皮下泵进行连续给药。

[0096] 在一些实施方案中,幸免的神经细胞在损伤后7天内例如在发生神经损伤后约1、约2、约3、约4、约5、约6和约7天内与治疗剂接触。

[0097] 在治疗受试者的实施方案中,在损伤后7天内例如在发生神经损伤后约1、约2、约3、约4、约5、约6和约7天内,向受试者给药治疗剂。例如,在一些实施方案中,在神经损伤例如卒中发作后12小时或更多小时,例如13、14、15、16、17、18、19、10、21、22、23或24小时或更多小时,将治疗剂,例如治疗性肽,向受试者给药。例如,治疗剂可以在急性卒中后或在卒中发作后约12小时或更多小时被给药。

[0098] 在另一实施方案中,通常在神经损伤例如卒中发生后约24小时、约48小时、约100小时或约200小时或更多小时,可以将治疗剂向受试者通过静脉注射来全身性给药,或者在损伤位点局部地给药。

[0099] 在其他实施方案中,用于给药(多种)治疗剂的药学上可接受的制剂还可以被配制成向受试者提供活性化合物的持续递送。例如,该制剂可以在向受试者初始给药之后在至少一周、两周、三周或四周(包含)期间递送活性化合物。例如,根据本文所述的方法治疗的受试者可以(通过重复给药或通过使用持续递送系统或二者)用治疗剂在至少30天期间进行治疗。

[0100] 持续递送的方法包括使用聚合物胶囊、递送制剂的微型泵、生物可降解的植入物或植入的转基因自体细胞(参见美国专利6,214,622号)。可植入的输注泵系统(例如INFUSAID泵(Towanda,PA));参见Zierski等人,1988;Kanoff,1994)和渗透泵(Alza Corporation销售)是可商购获得的或以其他方式是本领域已知的。另一种给药模式是通过可植入的外部可编程的输注泵。输注泵系统和贮库系统也描述于例如美国专利5,368,562号和4,731,058号中。

[0101] 药物组合物可以向任何受试者进行给药,所述受试者可能体验到代偿性神经可塑性的有益效果,例如可塑性表现在增强的运动功能、感觉运动功能和/或认知。在这些动物中,最重要的是人类,但是本文所述的实施方案意在不限于如此。

[0102] 如所述,所述治疗剂可以用于治疗受试者中的神经损伤的方法中。该方法可以包括向有此需要的受试者给药治疗有效量的本文所述的治疗剂。治疗有效量可以包括增强幸免的神经细胞的代偿性可塑性的有效量(剂量),例如,可塑性可以表现在受试者中的运动功能、感觉运动功能或认知的至少一种。

[0103] 在一些实施方案中,可以用有效量的本文所述的治疗剂给药,以增强受试者的中枢神经系统中的神经细胞例如NSC、神经元和/或胶质细胞的生成,与未给药治疗剂的受试者中的神经细胞例如NSC、神经元和/或胶质细胞的量相比,产生神经元和/或胶质细胞的量

增长至少5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%或1000%。

[0104] 在一些实施方案中,通过本文所述的方法治疗的受试者已经患有急性大脑中动脉(MCA)缺血性事件或卒中,例如缺血性卒中。由于因血栓形成(例如静脉血栓形成)、栓塞或全身性低灌注所致的缺血(缺少葡萄糖和氧供给)而干扰对脑部的血液供给,所以缺血性卒中是脑功能的快速进展的损失。因此,脑部的受影响区域无法发挥功能,导致不能移动身体一侧的一个或更多个肢部,不能理解或表达言语或不能看见一侧的视野。

[0105] 急性大脑中动脉(MCA)缺血性事件或缺血性卒中的症状包括,例如偏瘫、面部减少的感觉和肌肉衰弱、麻木、感觉或振动知觉减小、改变的嗅觉、味觉、听觉或视觉(总体或部分)、眼睑下垂(下垂)和眼肌衰弱、降低的反射、平衡问题和眼球震颤、改变的呼吸和心率、胸锁乳突肌衰弱而不能头转向一侧、舌头衰弱(不能伸出和/或不能从一侧移动向一侧)、失语症、失用症、视野缺损、记忆缺陷、半边忽视、思维混乱、困惑、性欲过度姿态、病感失认、步行困难、改变的运动协调和眩晕和/或不平衡。

[0106] 缺血性事件或卒中例如缺血性卒中发作时间可以通过任何可用的方法进行确定。例如,受试者可以由例如医生就卒中(如本文中所述)的各种症状进行询问,以确定卒中发作的大约时间。在一些情况中,例如当受试者随着卒中清醒时或者如果症状的开始以其他方式不可检测,卒中发作时间难以确定。在这种情况中,卒中发作可以通过确定受试者最近得知为健康例如最近得知为正常(LKN)的时间来确定。在一些情况中,脑部的MRI可以用于确定受试者的发作时间和/或卒中持续时间(参见,例如Petkova等人;Radiology(2010)MR imaging helps predict time from symptom onset in patients with acute stroke: implications for patients with unknown onset time,257(3):782-92,通过援引以其整体并入本文中)。

[0107] 在一些实施方案中,如本文所述,治疗有此需要的受试者中的神经损伤的方法,进一步包括施用对神经损伤的附加疗法。另有陈述,本公开的治疗方法可以是解决神经损伤的联合疗法的部分。例如,治疗卒中的附加疗法还可以包括,例如溶栓(例如组织纤溶酶原激活剂(tPA))、血栓切除术、血管成形术和支架、治疗性低温和药物(例如阿司匹林、氯吡格雷和双嘧达莫)。在一些实施方案中,附加的疗法是例如溶栓药、神经保护剂、抗炎药、甾体、细胞因子或生长因子。使用的溶栓药可以是组织纤溶酶原激活剂或尿激酶。使用的神经保护剂可以是受体的激动剂,所述受体选自由以下组成的组:N-甲基-D天冬氨酸受体(NMDA)、α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸受体(AMPA)、甘氨酸受体、钙通道受体、缓激肽B2受体和钠通道受体,或选自由以下组成的组:缓激肽B1受体、α-氨基丁酸(GABA)受体和腺苷A1受体。使用的抗炎药可以是白介素-1和肿瘤坏死因子家族成员。

[0108] 用于神经恢复的标准测试(例如National Institute of Health Stroke Scale(NIHSS)、Barthel指标、修正的Rankin量表(mRS)、Glasgow Outcome量表、Montreal Cognative Assessment(MoCA)、卒中影响量表(SIS-16))可以由本领域技术人员用来确定功效。基于受试者的回答问题和执行与意识水平、语言、视野损失、眼外肌运动、运动强度、共济失调、构音困难、感觉损失和消除和不注意相关的活动的能力,NIHSS对卒中严重性进

行分类。有15条项目,并且每个项目的等级是用3至5级来评分,其中对于所有项目,0为正常,42为最大严重性评分。NIHSS的1-4表示轻微卒中;5-15的评分表示中等卒中,16-20的评分表示中等至严重卒中:以及21-42的评分表示严重卒中。

[0109] 一般定义

[0110] 除非本文中明确地定义,本文中使用的科学和技术术语将具有本领域技术人员通常理解的含义。为了本领域的定义和术语,技术人员具体地参考Ausubel,F.M.,等人(编),Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York(2010);Coligan,J.E.,等人(编.),Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons,New York(2010);Mirzaei,H.and Carrasco,M.(编.),Modem Proteomics-Sample Preparation,Analysis and Practical Applications in Advances in Experimental Medicine and Biology,Springer International Publishing,(2016);Comai,L,等人(编.),Proteomic:Methods and Protocols in Methods in Molecular Biology,Springer International Publishing,(2017);Alberts,B.,等人MolecularBiology ofthe Cell,W.W.Norton&Company;第6版(2014);和Kandel,E.R.,等人Principles of Neural Science,McGraw-Hill Education/Medical;第5版(2012)。

[0111] 为了方便,在此提供了本文中、说明书、实施例和权利要求中使用的某些术语。提供了定义以帮助描述具体的实施方案,并非意在限制要求保护的发明,因为本发明的范围仅由权利要求限定。

[0112] 除非上下文另有要求,单数术语将包括复数,并且复数术语将包括单数。词语“a”和“an”在与词语“包含”一起用于权利要求或说明书中时表示一个或更多个,除非明确说明。术语"或"在权利要求中用于表示"和/或",除非明确地说明仅表示可替代方案或者可替代方案是相互排除的,尽管本公开支持仅为可替代方案以及"和/或"的定义。

[0113] 除非上下文明确地另有要求,在整个本说明书和权利要求中,词语“包含”、“包括”及诸如此类应被解释为与排他或穷举的含义相反的包含含义,其应表示"包括但不限于"的含义。使用单数或复数的词语也分别包含复数和单数。术语"基本上由……组成"表示所提及的组合物可以包含额外的元件、变化和/或序列,但是所述额外的元件、变化和/或序列对所述组合物的功能性没有显著贡献。

[0114] 词语“约”表示在比所述参考数(例如表示数量、水平、值、数、频率、百分比、量度、尺寸、量、重量或长度)高或低最小差异的范围内的数。例如,"约"可以表示在比所示参考数高或低10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的范围内的数。

[0115] 本文中使用的术语"多肽"或"蛋白"表示其中单体是氨基酸残基的聚合物,氨基酸残基通过酰胺键而连接在一起。当氨基酸是α-氨基酸时,可以使用L-光学异构体或D-光学异构体,其中L-异构体是优选的。本文使用的术语多肽或蛋白还涵盖任何氨基酸序列并且包含修饰的序列例如糖蛋白。术语多肽明确地意在覆盖天然存在的蛋白,以及重组或合成制备的那些蛋白。术语"肽"简单地表示相对短的多肽聚合物,例如,长度高达约20、约30、约40、约50、约60、约70、约80或约90个氨基酸。术语"嵌合"或"融合"在蛋白或肽的替景中表示编码多肽的第一氨基酸序列与界定结构域(例如多肽部分)的第二氨基酸序列融合,该结构域相对于第一多肽的结构域是外源的并且基本上不同源的。嵌合蛋白可以呈现外源结构域,其存在于也表达第一蛋白的生物体中(但是在不同的蛋白中),或它可以是由不同种类

的生物体表达的蛋白结构的"种间"、"基因间"等的融合蛋白。

[0116] 技术人员将认识到,对肽、多肽或蛋白序列的各个替换、缺失或添加(其在序列中改变、添加或缺失单个氨基酸或氨基酸百分比)是"保守修饰的变体",其中该改变导致氨基酸替换为化学上相似的氨基酸。保守性氨基酸替换表提供功能上相似的氨基酸,是本领域技术人员公知的。以下六组是被视为相互保守性替换的氨基酸的示例:

[0117] (1)丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T),

[0118] (2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E),

[0119] (3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q),

[0120] (4)精氨酸(R)、赖氨酸(K),

[0121] (5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、蛋氨酸(M)、缬氨酸(V),和

[0122] (6)苯丙氨酸(L)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

[0123] 序列一致性是指两个聚合物序列例如蛋白序列的相似程度。序列一致性的确定可以由本领域普通技术人员利用接受的算法和/或技术容易地完成。序列一致性典型地通过将两个最佳比对的序列在比较窗上进行比较来确定,其中肽或多核苷酸序列在比较窗中的部分,与用于两个序列的最佳比对的参考序列(其不包含添加或缺失)相比,可以包含添加或缺失(即,缺口)。百分比的计算是通过确定在两个序列中一致的氨基酸残基或核酸碱基所在位置个数而得到匹配的位置数,将匹配的位置数除以比较窗口中的总位置数,以及将该结果乘以100而得到序列一致性百分比。各种软件驱动的算法可容易得到,例如BLAST N或BLAST P来执行这种比较。

[0124] 术语"野生型"(或"wt")分别表示天然存在的编码蛋白或其部分的多核苷酸序列,或蛋白序列或其部分,如同其正常存在于体内。

[0125] 在本文所述的方法中使用的药物、化合物、组合物等被视为在使用它们之前经过纯化和/或分离的。纯化的材料通常是"基本上纯的",表示核酸、多肽或其片段或其他分子已经从天然伴随其的组分分离。通常,多肽是基本上纯的,当按重量计其至少60%、70%、80%、90%、95%或甚至99%不含与其天然相关的蛋白和其他有机分子。例如,基本上纯的多肽可以通过从天然来源提取,通过在正常地不表达该蛋白的细胞中重组核酸的表达,或通过化学合成来获得。"分离的材料"已经从其天然位置和环境被移走。在分离的或纯化的结构域或蛋白片段的情况中,结构域或片段基本上不含有这样的氨基酸序列,该氨基酸序列在天然存在的序列中的蛋白旁侧。

[0126] 当提及多肽时,术语"部分"、"片段"、"变体"、"衍生物"和"类似物"包括保留本文所述的生物活性(例如抑制相互作用例如结合)的至少部分的任何多肽。本文所述的多肽可以非限制地包括部分、片段、变体或衍生物分子,只要该多肽仍然发挥其功能。本发明的多肽或其部分可以包括蛋白水解的片段、缺失片段,具体而言,或当被递送到动物时更易于达到作用位点的片段。

[0127] 公开了材料、组合物和组分,其可以用于本公开的方法和组合物、可以联合本公开的方法和组合物使用、可以用于制备本公开组合物,或者是本公开的方法的产物和组合物。应理解,当公开了这些材料的组合、子集、相互作用、组等时,即使没有明确地公开(具体提及)这些化合物的每种单独的组合和排列,各种单独的和共同的组合中的每种组合也都被具体地设想到。此概念适用于本公开的所有方面,包括但不限于所述方法的步骤。因此,任

何上述实施方案的特定元件可以组合或替换其他实施方案中的元件。例如,如果存在各种可执行的附加步骤,则应理解,这些附加步骤中的每步可以与本公开的方法的任何特定的方法步骤或方法步骤的组合一起执行,并且每种这样的组合或组合的子集都被具体地设想到,并且应视为已被公开。此外,应理解,本文所述的实施方案可以利用任何合适的材料例如本文其他部分所述的那些材料或本领域已知的合适材料来实施。

[0128] 本文中引用的公布物以及引用其所涉及的主题明确地通过援引而整体并入本文中。

[0129] 下文描述了具体的解释性实施方案,其中发明人证实了细胞内σ肽(ISP)治疗促进神经损伤模型中的恢复。具体而言,已显示,例如通过ISP治疗,抑制CSPG诱导的PTPσ信号传导,克服了CSPG屏障而改善鼠科动物卒中模型中功能性恢复的多个方面,包括一般运动功能、特定的上肢感觉运动功能以及认知功能。还检验了恢复机制。对PTPσ信号传导的ISP调制通过诱导幸免于损伤的神经细胞(即,未受损的神经元)中的迁移和出芽活性以允许功能性代偿存在的受损神经元,从而促成恢复的若干方面。这最终允许即使在神经损伤后ISP治疗延迟时也诱导了改善效果。

[0130] 首先,利用近端大脑中动脉阻塞(pMCAO)模型测试了在C57BL/6小鼠中卒中后ISP治疗的功效。对三个组群的小鼠(n=59)进行MCAO手术以便在纹状体和皮质组织中诱导大卒中,模拟往往在人类中致死的人类“恶性”卒中。对卒中小鼠进行T2加权MRI扫描以确定卒中损伤的尺寸,并且盲法分组为两个同等分布的组,在卒中发作6周后,从24小时开始,这两组或是每天接受载体(5%DMSO),或是每天接受ISP(20mg/小鼠/天或30mg/小鼠/天皮下注射)治疗。

[0131] 在卒中后24小时开始治疗之前,通过MRI对小鼠进行表征。数据表明,根据MRI扫描这两组动物在缺血性损伤的范围方面没有差异(参见,例如图2A和2B)。起始于卒中后24小时的ISP治疗(相比于仅FDA批准的卒中治疗的从卒中发作起4.5hr的rtPA治疗窗口)能够显著地改善卒中动物的存活率(参见,例如图2C)。这可能是由于抗-CSPG的效果,其最终抵消在卒中的急性阶段期间脑部的炎性和肿胀反应。

[0132] 在所有存活的小鼠中,通过利用计算机监测的自动化空场分析,我们观察到,在卒中后2-4周,卒中后ISP治疗在卒中小鼠中在多个参数方面(即,行进的总距离、总水平活动和总竖直活动;分别参见图3A、3B、3C)显著地提高运动功能。

[0133] 考虑到卒中后最普遍的功能缺陷是对侧上肢的运动病损,并且大于90%的人类卒中幸存者遭受感觉缺陷,还检验了在感觉运动行为测试(即,胶带去除测试)中卒中后ISP治疗对卒中小鼠的表现的影响。在此测试中,小鼠需要去除粘附到其受影响的和未影响的前爪的胶带。数据表明了,ISP治疗显著地改进小鼠能够将受影响的肢部上的胶带去除的速度(对未影响的肢部没有任何明显的效果)。这证实了ISP治疗的结果明确地与卒中诱导的感觉和运动功能缺陷相关(图4)。

[0134] 认知衰退也是卒中幸存者残疾的主要起因。因此,还检验了ISP治疗对卒中小鼠的认知功能的效果。巴恩斯迷宫测试用于评价小鼠的学习/记忆功能。数据表明,ISP治疗的小鼠在卒中后4周使用显著较少的时间以及较少的试错来找到巴恩斯迷宫中的逃逸洞(参见图5A)。

[0135] 这些数据证实了全身性ISP治疗在卒中小鼠中改善了功能恢复的多个方面,包括

一般运动功能、特定的上肢感觉运动功能以及认知功能。这些数据还表明,ISP治疗降低卒中后脑部的慢性萎缩(参见图5B)。急性阶段存活率和存活的小鼠中慢性功能的改善表明至少两种可能的机制可以潜在地有益于神经损伤患者,因此其提供值得关注且可靶向的途径来提高损伤例如恶性卒中后存活率并且改进损伤幸存者中的长期功能恢复。

[0136] 为了测试相对于损伤的时间而给药ISP的时机以及对恢复的对应效果,对成年C57b1/6J雌性和雄性小鼠进行暂时性近端MCAO手术(35min),如上所述。在卒中前和在卒中后7天,对动物进行基线行为测试以确保在开始治疗之前两组动物之间不存在差异。在SVZ和SGZ NSC被激活的时间点,测试了起始于卒中后7天ISP的延迟卒中后治疗的功效。在3连续周期间,小鼠每天接受ISP或载体注射(1mg/kg/天)。在卒中后每周进行空场运动测试和胶带去除测试直至4周。图6A-6C示出了延迟的ISP治疗方式在空场运动测试中经过4周在改善多个参数(即,分别是总距离、水平活动和竖直活动)表现方面提供了显著的效果。这具有显著的临床转化影响,因为如此所证实的,与目前FDA-批准的tPA治疗窗口相比,卒中后7天提供显著更宽的治疗窗口。

[0137] 利用小鼠卒中模型,还表明,ISP治疗在损伤的远端位置处增强成神经细胞形成和皮质脊髓束轴突出芽。参见图7A-7F。如所示,这些测定表明,卒中后ISP治疗在卒中后小鼠中在侧脑室和邻近的straddle组织附近增强DCX+成神经细胞。卒中后ISP治疗增强轴突从对侧皮质脊髓束区域出芽。这是第一次证实卒中后ISP治疗提高从对侧皮质的皮质脊髓束突起,显示出诱导的可塑性和幸免的神经细胞的机制。

[0138] 为了进一步研究如上所述这种显著的功能恢复的潜在机制,从神经损伤,由ISP治疗诱导,创建了可诱导的条件PTPσ敲除模型。图1示意性示出了实施PTPσ的细胞特异性缺失的方法。产生了PTPσfloxed小鼠、神经上皮干细胞蛋白-CreERT2-PTPσ条件敲除小鼠(神经干细胞-特异性cKO)和皮质神经元特异性cKO(使用AAV-hSyn-cre病毒注射在PTPσ floxed小鼠中)。在三代杂交后,获得了神经上皮干细胞蛋白-CreERT2-PTPσ条件敲除小鼠(cKO)。cKO小鼠允许在期望的时间在成年NSC中PTPσ的条件缺失。此外,在这些条件KO小鼠中,AAV-hSynl-cre注射入对侧或梗死周围位点中将允许我们特定地使PTPσ基因在成熟出芽神经元中在对侧或梗死周围位点。

[0139] 条件KO小鼠以预期的孟德尔比率出生,证实了floxed等位基因没有影响cKO小鼠的正常发育和存活而没有诱导基因重组。皮质神经元PTPσ小鼠是通过将AAV-hSyn-cre病毒注射入PTPσ floxed小鼠的运动和躯体感觉皮质中而产生。floxed等位基因的成功靶向和等位基因的重组在cKO小鼠中在NSC-特异性cKO中在包含成年NSC的脑区域中并在AAV-hSyn-cre注射的小鼠中在皮质特异性重组中被证实(参见图1、8A-8F和9A-9H)。

[0140] 图8A-8F示出了条件敲除小鼠允许研究CSPG-PTPσ途径在神经发生中的作用,以及其对神经元损伤例如卒中后功能恢复的贡献。图9A-9H示出了,通过将AAV-hSyn-cre注射入梗死周围区域以及对侧皮质区域中而使基因在预期的时间在存在的成熟神经元中缺失,使得条件敲除小鼠允许研究PTPσ调制对轴突出芽机制的效果。在此模型中,梗死周围注射和对侧皮质注射允许区别近端突起(梗死周围神经元出芽)和任何远端突起(对侧皮质神经元出芽)的贡献。

[0141] 因为初始结果表明,ISP治疗提高了朝向梗死区迁移的DCX+细胞的数量(参见图7A-7F,如上述),检测了SVZ NSC从野生型或cKO PTPσ小鼠的迁移。从成年野生型和NSC-cKO

小鼠SVZ,制备了成年神经干细胞(NSC)神经球培养物(图10A)。迁移测定表明,神经上皮干细胞蛋白(+)NSC产生CSPG(图10B和10C)。在CSPG斑点测定中,表明了野生型NSC无法跨过CSPG环边缘(图10D),与先前的研究一致。在鲜明对比下,cKO NSC能够跨过CSPG环的外边缘,表明在cKO NSC中成功地消除PTPσ功能(图10E)。

[0142] 另外,CSPG诱导的PTPσ信号传导首次被证实在成年NSC中在调节迁移和神经突生长方面是关键的。聚集蛋白聚糖基底涂层导致成年NSC的迁移减少,并且在cKO NSC细胞中PTPσ基因的缺失导致在基础水平(无聚集蛋白聚糖涂层)下和在聚集蛋白聚糖涂层情况下(参见图11A-11E)都增强迁移。ISP对CSPG-PTPσ途径的药理学抑制表现出与PTPσ基因缺失相似的结果(参见图12A和12B)。此外,在成年cKO NSC中PTPσ的基因缺失和ISP肽对PTPσ的药理学抑制二者一致地导致在分化的NSC中神经突生长的增加,而杂乱的ISP肽没有效果(参见图13A-13C、14A和14B)。

[0143] 总之,从PTPσ条件敲除小鼠获得的这些数据表明在神经损伤后幸免的神经细胞(包括成年NSC)的基础生物学中PTPσ的明确的功能重要性。观察到的功能包括神经元分化、神经突生长和迁移,其是在基础条件下以及在损伤例如卒中后可塑性方面参与神经发生的重要细胞机制。显著地,表明了,在卒中后甚至7天开始的ISP治疗仍然有效地增强功能恢复。此结果是极其重要的,因为超过卒中患者中的急性治疗窗口(在药理学上6小时和在手术上24小时)目前还没有可用的治疗性疗法。

[0144] 因为神经发生对于SCI中神经修复而言不是主要促成因素,所以CSPG-PTPσ途径的作用先前在脊髓损伤(SCI)模型中在受损的神经元中进行更多研究。然而,神经发生和DCX+成神经细胞的迁移已经表明对卒中后恢复作出功能性贡献。本公开的数据表明,在成年NSC中PTPσ的基因缺失以及ISP对PTPσ的药理学抑制一致地增强在新分化的成神经细胞中的神经突生长以及这些细胞的迁移。

[0145] 实施例

[0146] 为了示例性说明而非限制的目的,在本公开中提供以下实施例。

[0147] 实施例

[0148] 用于实施本公开的各种实施方案的材料和方法

[0149] 1.动物

[0150] C57BL/6小鼠购自Jackson Laboratory并安置在Case Western Reserve University的动物设施中。使小鼠维持在12-小时光/暗循环并且自由进食。所有动物操作方案获得Institutional Animal Care and Use Committee of Case Western Reserve University批准。在此研究中使用了10-12周龄的C57BL/6雄性小鼠。

[0151] 2.暂时性局灶性缺血的鼠科动物模型

[0152] 通过用硅橡胶涂布的单丝(Cat.602212PK10Re和602312PK10Re,Doccol Corporation)官腔内阻塞左MCA 45min在雄性C57BL/6小鼠(12周龄,25-30g)中诱导暂时性大脑中动脉阻塞(tMCAO)。简言之,将小鼠用异氟烷麻醉。对体温进行监测,并且通过恒温毯控制单元(Harvard apparatus)而维持在37±0.5℃。为了最小化动物的疼痛,对小鼠皮下注射丁丙诺啡。在覆盖颅顶的皮肤上作出中线切口,并且将皮肤侧向拉开以将柔性microtip固定在小鼠的左顶颅骨的表面上(前囟后0.5mm和侧3.5mm)。随后,作出中线颈部切口以分离小鼠的左颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)。将硅橡胶涂布的单

丝经由动脉切开术而导入在ECA中,并且根据Longa方法通过ICA朝向MCA的起点缓慢地推进。为了确保一致且成功地阻滞MCA,通过激光多普勒血流仪(PeriFlux系统5000,Perimed,Sweden)在所有卒中动物中监测区域大脑血流。在切口闭合后,对小鼠皮下给予1ml温盐水并且安置于加热的动物重症监护室中直至恢复。

[0153] 3.磁共振成像(MRI)

[0154] 在诱导脑缺血后23h,利用配有3-cm笼式线圈的水平biospec 9.4T扫描仪(Bruker Inc.,Billerica,MA)来测量梗死体积。在MRI扫描程序期间,将小鼠用1.5%异氟烷/氧气混合物麻醉并以俯卧位置于托架中。通过将暖空气吹入扫描仪中通过反馈控制系统(SA Instruments,Stony Brook,NY)而使小鼠的体温维持在33℃。在试验期间,还监测了呼吸速率。为了量化缺血性水肿体积,利用快速捕获和弛豫增强(RARE)序列在以下参数下获取多层T2-加权轴向图像:TE/TR,15/2000ms;RARE因子,8;NAV,4;矩阵尺寸,256x256;层厚度,1mm;层数,13;视场,2.4x2.4cm。图像重建和分析是利用内部开发的基于MATLAB的软件(Natick,MA,USA)进行。缺血性水肿体积和脑组织的ROI是从T2-加权的图像得出。因此,缺血性梗死体积的百分比按照以下公式进行计算:Σ(对侧面积-同侧非梗死面积)/Σ对侧面积X100%。

[0155] 4.肽制备

[0156] 肽购自CS-Bio(CA,USA),具有>98%纯度。将冻干的肽溶于无菌水中并储藏在-80℃直至使用。肽序列如下:

[0157] ISP:GRKKRRQRRRCDMAEHMERLKANDSLKLSQEYESI(SEQ ID NO:62)

[0158] 杂乱ISP(SISP):GRKKRRQRRRCIREDDSLMLYALAQEKKESNMHES

[0159] (SEQ ID NO:63)

[0160] 5.全身性肽治疗

[0161] 首先,针对每只小鼠,配制了10%DMSO(1.25ml DMSO在23.73ml无菌盐水中)载体溶液。然后,将适当的ISP肽添加到载体溶液,随后等分量到1.5ml Eppendorf管中(每份对应于单只小鼠的每日剂量)并且在-80℃冷冻。最终ISP肽浓度是0.3μg/μl。在MRI扫描后,根据卒中损伤的尺寸,将缺血性小鼠随机地分组为两个同等分布的组。在缺血后24h和其后在6周期间每个下午,对小鼠皮下注射ISP(30μg/天,100μl)或载体(5%DMSO/盐水,100 μl)。以盲法方式进行试验。

[0162] 6.量化卒中动物的脑萎缩

[0163] 将卒中后第6周脑切片(25μm)安装在PLL-涂布的玻片上。使切片在KH_2PO_4缓冲剂(pH 4.5)中复水10min,然后在预热的10%Giemsa溶液中在42℃染色30min。在用KH_2PO_4缓冲剂快速冲洗后,将切片在绝对乙醇中脱水,在二甲苯中透明,而后用Histoseal封装。通过Path Scan Enabler IV玻片扫描仪对一系列切片成像。利用ImageJ软件对对侧和同侧脑面积进行量化。萎缩率的计算公式如下:Σ(对侧脑面积一同侧脑面积)/Σ对侧脑面积X100%。

[0164] 7.对轴突出芽顺行性示踪和量化

[0165] 在tMCAO后4周,将小鼠用1.5%异氟烷/氧气混合物麻醉并在立体定位框中稳定化。将1.5μl生物素葡聚糖胺(BDA,MW10,000;10%PBS,invitrogen)注射在病灶对侧皮质中的三个位点(坐标:1.A/P 0.0mm,M/L-2mm,D/V-1mm;2.A/P 0.5mm,M/L-1.5mm,D/V-1mm;

3.A/P 0.5mm,M/L-2mm,D/V-1mm,)。两周后,在心脏灌注PBS而后灌注4％多聚甲醛后,采集脑部和颈部脊髓。在4％多聚甲醛中过夜固定并在20％和30％蔗糖中低温防护后,将冠状脑切片和脊髓横切片切成30μm厚度。为了BDA检测,将切片在0.1M PB中冲洗并在0.3％H_2O_2中孵育30min以灭活内源过氧化物酶,而后与Vectastain ®ABC试剂盒(Vector Laboratories,Burlingame,CA,USA)一起孵育2小时。用2,3'二氨基联苯胺四盐酸盐(0.1M PB中0.5mg/ml)对染色进行显像。跨过中线-BDA+纤维的数量和长度以盲法方式进行评估。用ImageJ软件分析切片。

[0166] 8.神经行为测定

[0167] 所有行为测试以盲法方式在光相(light phase)进行。为了减少应激,使小鼠在测试开始之前在行为测试室中适应1h。将所有装置用75％乙醇清洁以避免小鼠之间的本能气味。

[0168] 8.1运动功能

[0169] 如前所述,小鼠运动活性是利用Accuscan活性监测器(Columbus,OH,USA)在tMCAO之前一天和之后3、7、14、21、35和42天进行评估。在此监测器中有16个水平和8个竖直红外传感器(间隔2.5cm)。将每个小鼠置于42x42x31cm树脂玻璃开口箱中1小时,配有食物和水供给。为了避免观察者偏见,此运动测试是通过计算机和软件进行自动监测。运动活性是通过自动化Versamax软件(Accuscan,Columbus,OH,USA)来计算。测量了以下变量:(A)水平活动(在水平传感器中发生光束中断的总数);(B)行进的总距离(cm,动物行进的距离);(C)竖直活动(在竖直传感器中发生光束中断的总数)。

[0170] 8.2巴恩斯迷宫测试

[0171] 在tMCAO后28天利用巴恩斯迷宫(Stoelting Company,WoodDale,IL,USA)对缺血性小鼠的空间记忆进行检查。迷宫由91.5cm直径圆形平台组成,围绕周边具有20个洞。通过鼓风扇和平台上方的强光阻止小鼠无目的地在周围闲逛。

[0172] 在第0天,在除去启动室后,将小鼠温和地引导进入目标洞。

[0173] 在第1天,对小鼠进行2期4次训练以发现位于目标洞下的逃逸通道。一旦小鼠进入目标洞,该洞就被覆盖并且允许小鼠在其中停留2min。如果小鼠无法在5min内找到目标洞位置,则由观察者将小鼠引导进入目标洞。在第2天,进行一次试验,并且进行摄像直至小鼠进入目标洞或当小鼠无法找到目标洞位置时停止在5mins。找到逃逸洞花费的时间以及小鼠在寻找隐藏洞时错误的次数由观察者以盲法方式测量。

[0174] 8.3胶带去除测试

[0175] 为了检查感觉运动缺陷,在卒中后7、14、21、28、35和42天进行此测试。在1min适应期期间将每只小鼠置于透明圆筒(15cm直径)中。其后,将两种不同颜色的粘合标记(冲压制得2.5mm直径,Tough Spots)以相等压力施加在每只小鼠的前爪上。测量了去除粘合标记所需的时间,最大2min。为了达到最佳表现水平,在手术之前,小鼠应接受4天训练。

[0176] 9.神经干细胞培养

[0177] 初级干细胞从5周龄C57BL/6J小鼠获得。在安乐死后,将全脑立即采集并且在显微镜下切片以获得室管膜下区(SVZ)组织。在用穿刺刀进行机械分解之后,将组纵碎片利用胰蛋白酶进行处理,并且以10^4个细胞/cm^2密度作为单独的细胞重新悬浮在含义生长因子(表皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子)的neurobasal培养基中(NBM-GF)。细胞的后续传

代是每7天利用accutase®(innovative#AT-104,CA,USA)进行直至细胞建立可存活的细胞系,并且在每次传代后细胞碎片自然地减少。在每次传代的第4天,增殖的球体被供给NBM-GF。在此研究中我们使用在传代P3-P8的神经球。

[0178] 10.CSPG梯度交叉测定(gradient crossing assay)

[0179] 如前所述,在盖片上制备CSPG梯度。简言之,将24-孔玻璃盖片涂布有聚-L-赖氨酸和硝酸纤维素,并且将700ug/ml聚集蛋白聚糖(A1960)和10μg/ml层粘连蛋白(11243217001,Sigma)的混合物点加在有涂层的盖片上。在干燥后,将有涂层的盖片与层粘连蛋白一起在37℃孵育3小时。将转染的神经干细胞接种在10^4个细胞/盖片的密度,并且在NBM-GF培养基中培养。在7天后,将孔用4%聚甲醛在室温下固定15min并且储存在4℃下在磷酸盐缓冲的盐水中直至染色。

[0180] 11.在CSPG上神经干细胞的迁移

[0181] 为了在体外确定CSPG对神经干细胞迁移的效果,将平底48-孔板首先涂布聚-L-赖氨酸过夜,而后用水冲洗。将聚集蛋白聚糖(A1960,sigma)涂布到48-孔板上,以1μg/ml和10μg/ml的浓度稀释在无菌水中,过夜,而后用水冲洗。对照孔仅包含聚-L-赖氨酸。将具有相等尺寸的神经球接种在每个孔中在含有2.5μM ISP肽或杂乱肽的NBM-GF培养基中(n=7个神经球在7个孔中,每种条件),将板在37℃孵育21小时。其后,每个孔的图像是利用Leica DMi8宽视野显微镜来摄取。迁移活性被定义为神经球的总面积除以神经球的内面积。神经球的内面积和总面积通过ImageJ软件来测量。距离测量由观察者以盲法方式进行。

[0182] 12.神经干细胞分化测定

[0183] 简言之,将未处理24-孔板中玻璃盖片涂布聚鸟氨酸和层粘连蛋白。在传代期间分裂神经球之后,将各个细胞以10^4个细胞/cm^2密度接种在500μlNBM-GF中。每隔一天,将250μl培养基从每个孔除去,并且添加300μl新鲜NBM-GF。当附着的细胞达到大约70%融合(大约第5天)时,在每个孔内的全部NBM-GF被温和地除去并且立即被置换为neurobasal培养基(不含生长因子(NBM),含有ISP肽(2.5μM)或杂乱肽(2.5μM))。每个孔每天通过除去250μl培养基和添加300μl培养基(包含ISP或杂乱肽)进行补给。在完成NBM-GF的置换后在第5天,将孔用4%聚甲醛在室温下固定15min并且在4℃下储存在磷酸盐缓冲的盐水中,直至染色。

[0184] 13.免疫组织化学

[0185] 将小鼠用阿佛丁麻醉并且灌注PBS和4%聚甲醛(PFA)。将脑切片并在4℃下于4%PFA中后固定过夜,在20%蔗糖和30%蔗糖中平衡。将25μm厚切片在4%BSA/0.3%Triton-x100中孵育1小时。在封闭后,将切片与初级抗体一起在4℃下过夜孵育,而后与适当的二级抗体(缀合有Alexa荧光488或594)一起孵育。使用了以下初级抗体:5-HT(1:500,Immunostar,Hudson,WI)和CS56(1:500,C8035,Sigma)。对于每种染色,至少三个单独的动物/组被检测,并且图像用荧光显微镜来捕获。染色是用Image J软件来量化(US National Institutes of Health,USA)。

[0186] 14.免疫细胞化学

[0187] 将培养在盖片上的细胞在4%PFA中固定15min,在0.1%Triton-X100中通透化10min,然后在10%普通羊血清中孵育1小时。其后,将细胞在稀释的初级抗体中在4℃过夜孵育,而后在适当的二级抗体羊抗-小鼠或抗-兔IgM或IgG(缀合有Alexa Fluor 488或594)(1:1000,Invitrogen)中孵育。将玻璃盖片安装在显微镜载片上在Mowiol包含DAPI(Sigma,

St.Louis,USA)。使用了以下初级抗体:MAP2(1∶500,AB5622,Millipore)、神经上皮干细胞蛋白(1∶500,NB100-1604,Novus),和CS56(1∶500,C8035,Sigma)。每种条件下分析了三个盖片。随机地选取每个盖片中的视野,并且通过Stereo Investigator Software(MBF Bioscience,Williston,VT,USA)成像,定量的数据通过使用NIH ImageJ软件获得。

[0188] 15.统计分析

[0189] 所有研究是利用GraphPad Prism 6.00软件以盲法方式进行分析。数据表示为平均值±标准偏差。统计学显著性设置在$p<0.05$。统计分析是通过双尾非成对学生t检验、单因素或单因素方差分析和事后分析,通过Tukey多重比较检验、Dunnett多重比较检验或Sidak多重比较检验进行。没有统计学检验用于预定样本大小,但是我们的样本大小相似于本领域一般使用的。

[0190] 虽然已经示出和描述了示例性实施方案,但是将理解在不脱离本发明的精神和范围的情况下可以作出各种改变。

[0001] 序列表

[0002] <110> 卡斯西部储备大学

[0003] <120> 用于诱导神经可塑性的方法和组合物

[0004] <130> CWR-026868WO ORD

[0005] <160> 63

[0006] <170> PatentIn version 3.5

[0007] <210> 1

[0008] <211> 22

[0009] <212> PRT

[0010] <213> 非洲爪蟾 (Xenopus borealis)

[0011] <400> 1

[0012] Asp Leu Ala Glu His Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys

[0013] 1 5 10 15

[0014] Ser Gln Glu Tyr Glu Ser

[0015] 20

[0016] <210> 2

[0017] <211> 21

[0018] <212> PRT

[0019] <213> 安乐蜥 (Anolis carolinensis)

[0020] <400> 2

[0021] Asp His Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln

[0022] 1 5 10 15

[0023] Glu Tyr Glu Ser Ile

[0024] 20

[0025] <210> 3

[0026] <211> 24

[0027] <212> PRT

[0028] <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

[0029] <400> 3

[0030] Glu Leu Ala Glu His Thr Glu Leu Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys

[0031] 1 5 10 15

[0032] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0033] 20

[0034] <210> 4

[0035] <211> 24

[0036] <212> PRT

[0037] <213> 奥利亚罗非鱼 (Oreochromis aureus)

[0038] <400> 4

[0039] Glu Leu Ala Glu His Thr Glu Leu Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys
[0040] 1 5 10 15
[0041] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
[0042] 20
[0043] <210> 5
[0044] <211> 24
[0045] <212> PRT
[0046] <213> 原鸡 (Gallus gallus)
[0047] <400> 5
[0048] Glu Leu Ala Glu His Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys
[0049] 1 5 10 15
[0050] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
[0051] 20
[0052] <210> 6
[0053] <211> 24
[0054] <212> PRT
[0055] <213> 苍头燕雀 (Fringilla coelebs)
[0056] <400> 6
[0057] Glu Leu Ala Glu His Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys
[0058] 1 5 10 15
[0059] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
[0060] 20
[0061] <210> 7
[0062] <211> 24
[0063] <212> PRT
[0064] <213> 鸭嘴兽 (Ornithorhynchus anatinus)
[0065] <400> 7
[0066] Glu Leu Ala Glu His Thr Asp His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys
[0067] 1 5 10 15
[0068] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
[0069] 20
[0070] <210> 8
[0071] <211> 24
[0072] <212> PRT
[0073] <213> 袋獾 (Sarcophilus harrisii)
[0074] <400> 8
[0075] Glu Met Ala Glu His Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys
[0076] 1 5 10 15
[0077] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0078] 20

[0079] <210> 9

[0080] <211> 24

[0081] <212> PRT

[0082] <213> 雪貂 (Mustela putorius)

[0083] <400> 9

[0084] Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

[0085] 1 5 10 15

[0086] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0087] 20

[0088] <210> 10

[0089] <211> 24

[0090] <212> PRT

[0091] <213> 阿氏婴猴 (Galago alleni)

[0092] <400> 10

[0093] Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

[0094] 1 5 10 15

[0095] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0096] 20

[0097] <210> 11

[0098] <211> 24

[0099] <212> PRT

[0100] <213> 白羽狨 (Callithrix aurita)

[0101] <400> 11

[0102] Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

[0103] 1 5 10 15

[0104] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0105] 20

[0106] <210> 12

[0107] <211> 24

[0108] <212> PRT

[0109] <213> 黑鼠 (Rattus rattus)

[0110] <400> 12

[0111] Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

[0112] 1 5 10 15

[0113] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0114] 20

[0115] <210> 13

[0116] <211> 24

[0117] <212> PRT

[0118] <213> 小鼠 (Mus musculus)

[0119] <400> 13

[0120] Asp Met Ala Glu His Met Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

[0121] 1 5 10 15

[0122] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0123] 20

[0124] <210> 14

[0125] <211> 24

[0126] <212> PRT

[0127] <213> 狗 (Canis familiaris)

[0128] <400> 14

[0129] Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

[0130] 1 5 10 15

[0131] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0132] 20

[0133] <210> 15

[0134] <211> 24

[0135] <212> PRT

[0136] <213> 髯猪 (Sus barbatus)

[0137] <400> 15

[0138] Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

[0139] 1 5 10 15

[0140] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0141] 20

[0142] <210> 16

[0143] <211> 24

[0144] <212> PRT

[0145] <213> 原牛 (Bos primigenius)

[0146] <400> 16

[0147] Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

[0148] 1 5 10 15

[0149] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0150] 20

[0151] <210> 17

[0152] <211> 24

[0153] <212> PRT

[0154] <213> 绵羊 (Ovis aries)

[0155] <400> 17

[0156] Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

[0157] 1 5 10 15

[0158] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0159] 20

[0160] <210> 18

[0161] <211> 24

[0162] <212> PRT

[0163] <213> 虎鲸 (Orcinus orca)

[0164] <400> 18

[0165] Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

[0166] 1 5 10 15

[0167] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0168] 20

[0169] <210> 19

[0170] <211> 24

[0171] <212> PRT

[0172] <213> 松鼠猴 (Saimiri sciureus)

[0173] <400> 19

[0174] Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

[0175] 1 5 10 15

[0176] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0177] 20

[0178] <210> 20

[0179] <211> 24

[0180] <212> PRT

[0181] <213> 阿拉伯狒狒 (Papio hamadryas)

[0182] <400> 20

[0183] Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

[0184] 1 5 10 15

[0185] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0186] 20

[0187] <210> 21

[0188] <211> 24

[0189] <212> PRT

[0190] <213> 大猩猩 (Gorilla gorilla)

[0191] <400> 21

[0192] Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

[0193] 1 5 10 15

[0194] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0195] 20

[0196] <210> 22

[0197] <211> 24

[0198] <212> PRT

[0199] <213> 白掌长臂猿 (Hylobates lar)

[0200] <400> 22

[0201] Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

[0202] 1 5 10 15

[0203] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0204] 20

[0205] <210> 23

[0206] <211> 24

[0207] <212> PRT

[0208] <213> 冠毛猕猴 (Macaca radiata)

[0209] <400> 23

[0210] Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

[0211] 1 5 10 15

[0212] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0213] 20

[0214] <210> 24

[0215] <211> 24

[0216] <212> PRT

[0217] <213> 黑猩猩 (Pan troglodytes)

[0218] <400> 24

[0219] Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

[0220] 1 5 10 15

[0221] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0222] 20

[0223] <210> 25

[0224] <211> 24

[0225] <212> PRT

[0226] <213> 智人 (Homo sapiens)

[0227] <400> 25

[0228] Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys

[0229] 1 5 10 15

[0230] Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0231] 20

[0232] <210> 26

[0233] <211> 24

[0234] <212> PRT

[0235] <213> 黑鼠 (Rattus rattus)

[0236] <400> 26

[0237] Asp Leu Ala Asp Asn Ile Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Gly Leu Lys

[0238] 1 5 10 15

[0239] Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0240] 20

[0241] <210> 27

[0242] <211> 24

[0243] <212> PRT

[0244] <213> 黑鼠 (Rattus rattus)

[0245] <400> 27

[0246] Glu Leu Ala Asp His Ile Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys

[0247] 1 5 10 15

[0248] Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0249] 20

[0250] <210> 28

[0251] <211> 24

[0252] <212> PRT

[0253] <213> 黑鼠 (Rattus rattus)

[0254] <400> 28

[0255] Lys Leu Glu Glu Glu Ile Asn Arg Arg Met Ala Asp Asp Asn Lys Ile

[0256] 1 5 10 15

[0257] Phe Arg Glu Glu Phe Asn Ala Leu

[0258] 20

[0259] <210> 29

[0260] <211> 10

[0261] <212> PRT

[0262] <213> 智人 (Homo sapiens)

[0263] <400> 29

[0264] Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys

[0265] 1 5 10

[0266] <210> 30

[0267] <211> 4

[0268] <212> PRT

[0269] <213> 智人 (Homo sapiens)

[0270] <400> 30

[0271] Ala Asn Asp Ser

[0272] 1

[0273] <210> 31

[0274] <211> 10

[0275] <212> PRT

[0276] <213> 智人 (Homo sapiens)

[0277] <400> 31

[0278] Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0279] 1 5 10

[0280] <210> 32

[0281] <211> 14

[0282] <212> PRT

[0283] <213> 智人 (Homo sapiens)

[0284] <220>

[0285] <221> MOD_RES

[0286] <222> (3)..(3)

[0287] <223> Xaa is T or M

[0288] <400> 32

[0289] Glu His Xaa Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu

[0290] 1 5 10

[0291] <210> 33

[0292] <211> 14

[0293] <212> PRT

[0294] <213> 智人 (Homo sapiens)

[0295] <220>

[0296] <221> MOD_RES

[0297] <222> (6)..(6)

[0298] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0299] <400> 33

[0300] Asp Met Ala Glu His Xaa Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser

[0301] 1 5 10

[0302] <210> 34

[0303] <211> 10

[0304] <212> PRT

[0305] <213> 人工序列

[0306] <220>

[0307] <223> 合成构建体

[0308] <400> 34

[0309] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

[0310] 1 5 10

[0311] <210> 35

[0312] <211> 33

[0313] <212> PRT

[0314] <213> 人工序列

[0315] <220>

[0316] <223> 合成构建体

[0317] <220>

[0318] <221> MOD_RES

[0319] <222> (11)..(11)

[0320] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0321] <400> 35

[0322] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp Leu Ala Glu His

[0323] 1 5 10 15

[0324] Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Ser Gln Glu Tyr Glu

[0325] 20 25 30

[0326] Ser

[0327] <210> 36

[0328] <211> 32

[0329] <212> PRT

[0330] <213> 人工序列

[0331] <220>

[0332] <223> 合成构建体

[0333] <220>

[0334] <221> MOD_RES

[0335] <222> (11)..(11)

[0336] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0337] <400> 36

[0338] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp His Thr Glu His

[0339] 1 5 10 15

[0340] Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

[0341] 20 25 30

[0342] <210> 37

[0343] <211> 35

[0344] <212> PRT

[0345] <213> 人工序列

[0346] <220>

[0347] <223> 合成构建体

[0348] <220>

[0349] <221> MOD_RES

[0350] <222> (11)..(11)

[0351] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0352] <400> 37

[0353] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Glu Leu Ala Glu His

[0354] 1 5 10 15

[0355] Thr Glu Leu Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

[0356] 20 25 30

[0357] Glu Ser Ile

[0358] 35

[0359] <210> 38

[0360] <211> 35

[0361] <212> PRT

[0362] <213> 人工序列

[0363] <220>

[0364] <223> 合成构建体

[0365] <220>

[0366] <221> MOD_RES

[0367] <222> (11)..(11)

[0368] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0369] <400> 38

[0370] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Glu Leu Ala Glu His

[0371] 1 5 10 15

[0372] Thr Glu Leu Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

[0373] 20 25 30

[0374] Glu Ser Ile

[0375] 35

[0376] <210> 39

[0377] <211> 35

[0378] <212> PRT

[0379] <213> 人工序列

[0380] <220>

[0381] <223> 合成构建体

[0382] <220>

[0383] <221> MOD_RES

[0384] <222> (11)..(11)

[0385] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0386] <400> 39

[0387] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Glu Leu Ala Glu His

[0388] 1 5 10 15

[0389] Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

[0390] 20 25 30

[0391] Glu Ser Ile

[0392] 35

[0393] <210> 40

[0394] <211> 35

[0395] <212> PRT

[0396] <213> 人工序列

[0397] <220>

[0398] <223> 合成构建体

[0399] <220>

[0400] <221> MOD_RES

[0401] <222> (11)..(11)

[0402] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0403] <400> 40

[0404] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Glu Leu Ala Glu His

[0405] 1 5 10 15

[0406] Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

[0407] 20 25 30

[0408] Glu Ser Ile

[0409] 35

[0410] <210> 41

[0411] <211> 35

[0412] <212> PRT

[0413] <213> 人工序列

[0414] <220>

[0415] <223> 合成构建体

[0416] <220>

[0417] <221> MOD_RES

[0418] <222> (11)..(11)

[0419] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0420] <400> 41

[0421] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Glu Leu Ala Glu His

[0422] 1 5 10 15

[0423] Thr Asp His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

[0424] 20 25 30

[0425] Glu Ser Ile

[0426] 35

[0427] <210> 42

[0428] <211> 35

[0429] <212> PRT
[0430] <213> 人工序列
[0431] <220>
[0432] <223> 合成构建体
[0433] <220>
[0434] <221> MOD_RES
[0435] <222> (11)..(11)
[0436] <223> Xaa为任意氨基酸残基
[0437] <400> 42
[0438] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Glu Met Ala Glu His
[0439] 1 5 10 15
[0440] Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
[0441] 20 25 30
[0442] Glu Ser Ile
[0443] 35
[0444] <210> 43
[0445] <211> 35
[0446] <212> PRT
[0447] <213> 人工序列
[0448] <220>
[0449] <223> 合成构建体
[0450] <220>
[0451] <221> MOD_RES
[0452] <222> (11)..(11)
[0453] <223> Xaa为任意氨基酸残基
[0454] <400> 43
[0455] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp Met Ala Glu His
[0456] 1 5 10 15
[0457] Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
[0458] 20 25 30
[0459] Glu Ser Ile
[0460] 35
[0461] <210> 44
[0462] <211> 35
[0463] <212> PRT
[0464] <213> 人工序列
[0465] <220>
[0466] <223> 合成构建体
[0467] <220>

[0468] <221> MOD_RES
[0469] <222> (11)..(11)
[0470] <223> Xaa为任意氨基酸残基
[0471] <400> 44
[0472] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp Met Ala Glu His
[0473] 1 5 10 15
[0474] Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
[0475] 20 25 30
[0476] Glu Ser Ile
[0477] 35
[0478] <210> 45
[0479] <211> 35
[0480] <212> PRT
[0481] <213> 人工序列
[0482] <220>
[0483] <223> 合成构建体
[0484] <220>
[0485] <221> misc_feature
[0486] <222> (11)..(11)
[0487] <223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
[0488] <400> 45
[0489] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp Met Ala Glu His
[0490] 1 5 10 15
[0491] Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
[0492] 20 25 30
[0493] Glu Ser Ile
[0494] 35
[0495] <210> 46
[0496] <211> 35
[0497] <212> PRT
[0498] <213> 人工序列
[0499] <220>
[0500] <223> 合成构建体
[0501] <220>
[0502] <221> MOD_RES
[0503] <222> (11)..(11)
[0504] <223> Xaa为任意氨基酸残基
[0505] <400> 46
[0506] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp Met Ala Glu His

[0507] 1 5 10 15

[0508] Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

[0509] 20 25 30

[0510] Glu Ser Ile

[0511] 35

[0512] <210> 47

[0513] <211> 35

[0514] <212> PRT

[0515] <213> 人工序列

[0516] <220>

[0517] <223> 合成构建体

[0518] <220>

[0519] <221> MOD_RES

[0520] <222> (11)..(11)

[0521] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0522] <400> 47

[0523] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp Met Ala Glu His

[0524] 1 5 10 15

[0525] Met Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

[0526] 20 25 30

[0527] Glu Ser Ile

[0528] 35

[0529] <210> 48

[0530] <211> 35

[0531] <212> PRT

[0532] <213> 人工序列

[0533] <220>

[0534] <223> 合成构建体

[0535] <220>

[0536] <221> MOD_RES

[0537] <222> (11)..(11)

[0538] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0539] <400> 48

[0540] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp Met Ala Glu His

[0541] 1 5 10 15

[0542] Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

[0543] 20 25 30

[0544] Glu Ser Ile

[0545] 35

[0546] <210> 49
[0547] <211> 35
[0548] <212> PRT
[0549] <213> 人工序列
[0550] <220>
[0551] <223> 合成构建体
[0552] <220>
[0553] <221> MOD_RES
[0554] <222> (11)..(11)
[0555] <223> Xaa为任意氨基酸
[0556] <400> 49
[0557] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp Met Ala Glu His
[0558] 1 5 10 15
[0559] Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
[0560] 20 25 30
[0561] Glu Ser Ile
[0562] 35
[0563] <210> 50
[0564] <211> 35
[0565] <212> PRT
[0566] <213> 人工序列
[0567] <220>
[0568] <223> 合成构建体
[0569] <220>
[0570] <221> MOD_RES
[0571] <222> (11)..(11)
[0572] <223> Xaa为任意氨基酸残基
[0573] <400> 50
[0574] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp Met Ala Glu His
[0575] 1 5 10 15
[0576] Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
[0577] 20 25 30
[0578] Glu Ser Ile
[0579] 35
[0580] <210> 51
[0581] <211> 35
[0582] <212> PRT
[0583] <213> 人工序列
[0584] <220>

[0585] <223> 合成构建体

[0586] <220>

[0587] <221> misc_feature

[0588] <222> (11)..(11)

[0589] <223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸

[0590] <400> 51

[0591] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp Met Ala Glu His

[0592] 1 5 10 15

[0593] Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

[0594] 20 25 30

[0595] Glu Ser Ile

[0596] 35

[0597] <210> 52

[0598] <211> 35

[0599] <212> PRT

[0600] <213> 人工序列

[0601] <220>

[0602] <223> 合成构建体

[0603] <220>

[0604] <221> MOD_RES

[0605] <222> (11)..(11)

[0606] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0607] <400> 52

[0608] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp Met Ala Glu His

[0609] 1 5 10 15

[0610] Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

[0611] 20 25 30

[0612] Glu Ser Ile

[0613] 35

[0614] <210> 53

[0615] <211> 35

[0616] <212> PRT

[0617] <213> 人工序列

[0618] <220>

[0619] <223> 合成构建体

[0620] <220>

[0621] <221> MOD_RES

[0622] <222> (11)..(11)

[0623] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0624] <400> 53

[0625] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp Met Ala Glu His

[0626] 1 5 10 15

[0627] Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

[0628] 20 25 30

[0629] Glu Ser Ile

[0630] 35

[0631] <210> 54

[0632] <211> 35

[0633] <212> PRT

[0634] <213> 人工序列

[0635] <220>

[0636] <223> 合成构建体

[0637] <220>

[0638] <221> misc_feature

[0639] <222> (11)..(11)

[0640] <223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸

[0641] <400> 54

[0642] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp Met Ala Glu His

[0643] 1 5 10 15

[0644] Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

[0645] 20 25 30

[0646] Glu Ser Ile

[0647] 35

[0648] <210> 55

[0649] <211> 35

[0650] <212> PRT

[0651] <213> 人工序列

[0652] <220>

[0653] <223> 合成构建体

[0654] <220>

[0655] <221> MOD_RES

[0656] <222> (11)..(11)

[0657] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0658] <400> 55

[0659] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp Met Ala Glu His

[0660] 1 5 10 15

[0661] Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

[0662] 20 25 30

[0663] Glu Ser Ile

[0664] 35

[0665] <210> 56

[0666] <211> 35

[0667] <212> PRT

[0668] <213> 人工序列

[0669] <220>

[0670] <223> 合成构建体

[0671] <220>

[0672] <221> MOD_RES

[0673] <222> (11)..(11)

[0674] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0675] <400> 56

[0676] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp Met Ala Glu His

[0677] 1 5 10 15

[0678] Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

[0679] 20 25 30

[0680] Glu Ser Ile

[0681] 35

[0682] <210> 57

[0683] <211> 35

[0684] <212> PRT

[0685] <213> 人工序列

[0686] <220>

[0687] <223> 合成构建体

[0688] <220>

[0689] <221> MOD_RES

[0690] <222> (11)..(11)

[0691] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0692] <400> 57

[0693] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp Met Ala Glu His

[0694] 1 5 10 15

[0695] Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

[0696] 20 25 30

[0697] Glu Ser Ile

[0698] 35

[0699] <210> 58

[0700] <211> 35

[0701] <212> PRT

[0702] <213> 人工序列

[0703] <220>

[0704] <223> 合成构建体

[0705] <220>

[0706] <221> MOD_RES

[0707] <222> (11)..(11)

[0708] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0709] <400> 58

[0710] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp Met Ala Glu His

[0711] 1 5 10 15

[0712] Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

[0713] 20 25 30

[0714] Glu Ser Ile

[0715] 35

[0716] <210> 59

[0717] <211> 35

[0718] <212> PRT

[0719] <213> 人工序列

[0720] <220>

[0721] <223> 合成构建体

[0722] <220>

[0723] <221> MOD_RES

[0724] <222> (11)..(11)

[0725] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0726] <400> 59

[0727] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp Met Ala Glu His

[0728] 1 5 10 15

[0729] Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

[0730] 20 25 30

[0731] Glu Ser Ile

[0732] 35

[0733] <210> 60

[0734] <211> 25

[0735] <212> PRT

[0736] <213> 人工序列

[0737] <220>

[0738] <223> 合成构建体

[0739] <220>

[0740] <221> MOD_RES

[0741] <222> (11)..(11)

[0742] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0743] <220>

[0744] <221> MOD_RES

[0745] <222> (14)..(14)

[0746] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0747] <400> 60

[0748] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Glu His Xaa Glu Arg

[0749] 1 5 10 15

[0750] Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu

[0751] 20 25

[0752] <210> 61

[0753] <211> 25

[0754] <212> PRT

[0755] <213> 人工序列

[0756] <220>

[0757] <223> 合成构建体

[0758] <220>

[0759] <221> MOD_RES

[0760] <222> (11)..(11)

[0761] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0762] <220>

[0763] <221> MOD_RES

[0764] <222> (17)..(17)

[0765] <223> Xaa为任意氨基酸残基

[0766] <400> 61

[0767] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Xaa Asp Met Ala Glu His

[0768] 1 5 10 15

[0769] Xaa Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser

[0770] 20 25

[0771] <210> 62

[0772] <211> 35

[0773] <212> PRT

[0774] <213> 人工序列

[0775] <220>

[0776] <223> 合成构建体

[0777] <400> 62

[0778] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

[0779] 1 5 10 15

[0780] Met Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

[0781] 20 25 30

[0782] Glu Ser Ile

[0783] 35

[0784] <210> 63

[0785] <211> 35

[0786] <212> PRT

[0787] <213> 人工序列

[0788] <220>

[0789] <223> 合成构建体

[0790] <400> 63

[0791] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Ile Arg Glu Asp Asp

[0792] 1 5 10 15

[0793] Ser Leu Met Leu Tyr Ala Leu Ala Gln Glu Lys Lys Glu Ser Asn Met

[0794] 20 25 30

[0795] His Glu Ser

[0796] 35

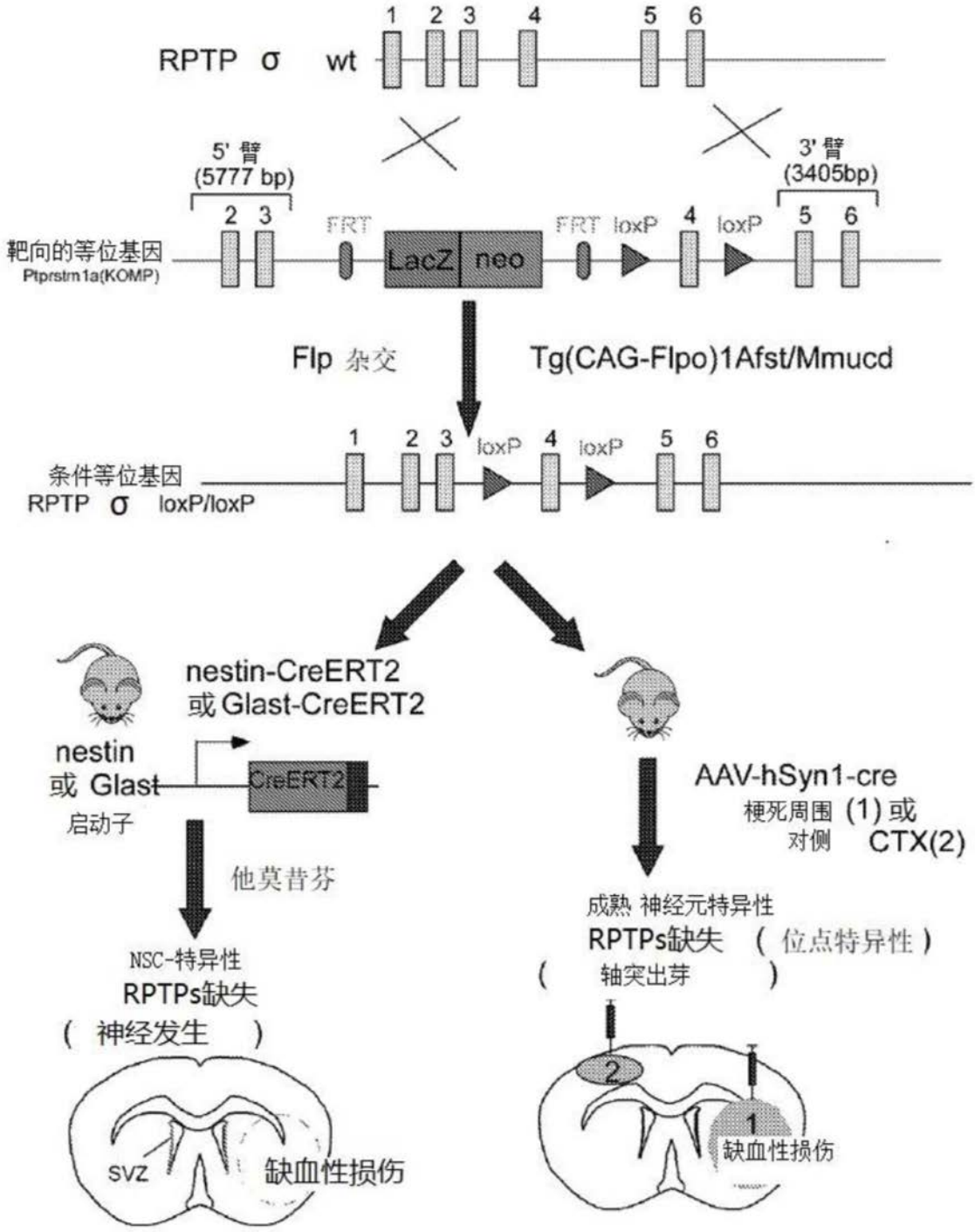

RPTP σ wt
1 2 3 4 5 6
5' 臂
(5777 bp)
3' 臂
(3405bp)
2 3
FRT
LacZ
neo
FRT
loxP
4
loxP
5 6
靶向的等位基因
Ptprstm1a(KOMP)
Flp 杂交
Tg(CAG-Flpo)1Afst/Mmucd
1 2 3 loxP 4 loxP 5 6
条件等位基因
RPTP σ loxP/loxP
nestin-CreERT2
或 Glast-CreERT2
nestin
或 Glast
启动子
CreERT2
他莫昔芬
NSC-特异性
RPTPs缺失
(神经发生)
SVZ
缺血性损伤
AAV-hSyn1-cre
梗死周围 (1) 或
对侧 CTX(2)
成熟 神经元特异性
RPTPs缺失 (位点特异性)
(轴突出芽)
2
1
缺血性损伤

图1

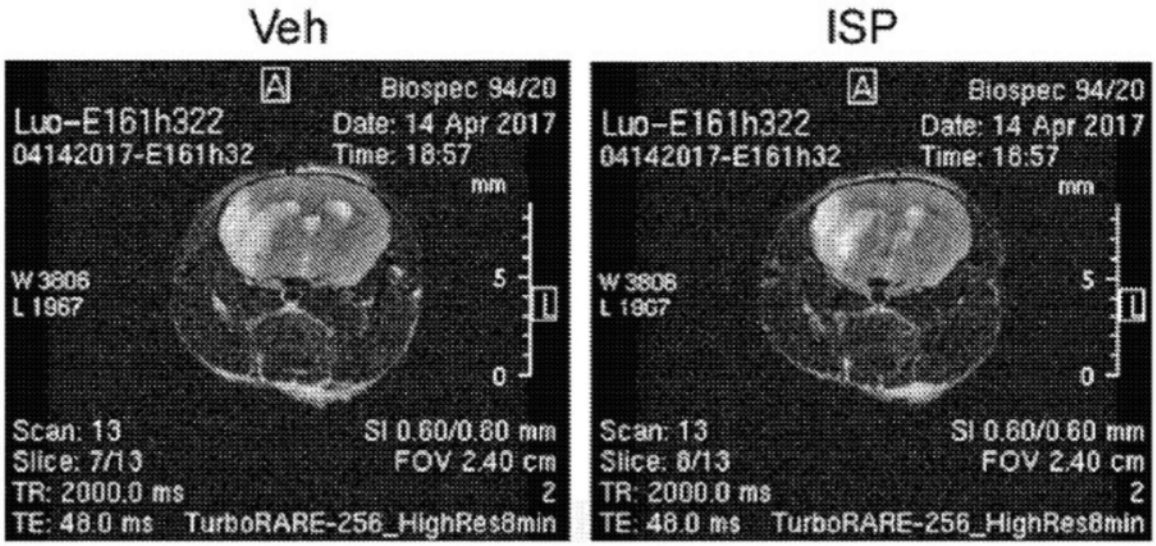

Veh
ISP
Biospec 94/20
Luo-E161h322
Date: 14 Apr 2017
04142017-E161h32
Time: 18:57
mm
W 3806
L 1967
5
0
Scan: 13
Slice: 7/13
TR: 2000.0 ms
TE: 48.0 ms
TurboRARE-256_HighRes8min
SI 0.60/0.60 mm
FOV 2.40 cm
2

图2A

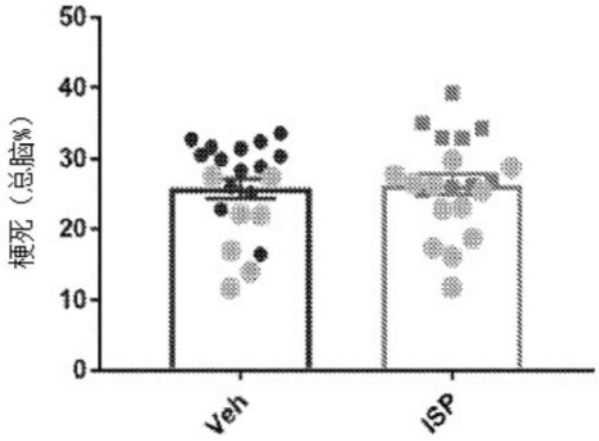

梗死（总脑%）
50
40
30
20
10
0
Veh
ISP

图2B

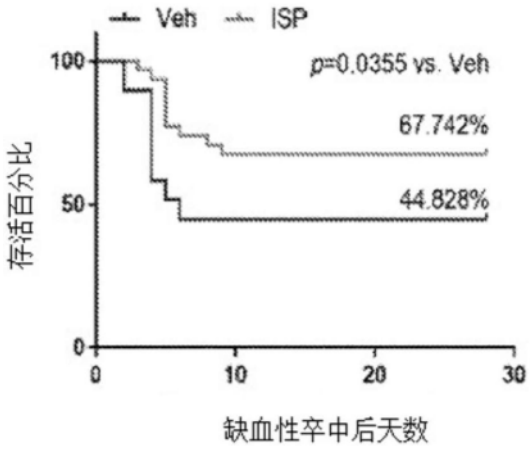

Veh
ISP
p=0.0355 vs. Veh
67.742%
44.828%
存活百分比
100
50
0
0
10
20
30
缺血性卒中后天数

图2C

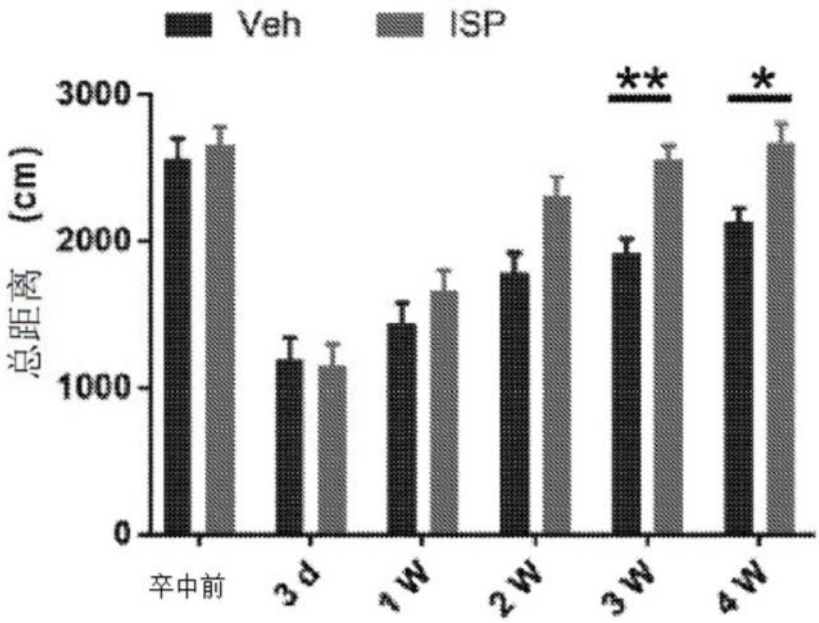

Veh
ISP
**
*
总距离 (cm)
3000
2000
1000
0
卒中前
3 d
1 W
2 W
3 W
4 W

图3A

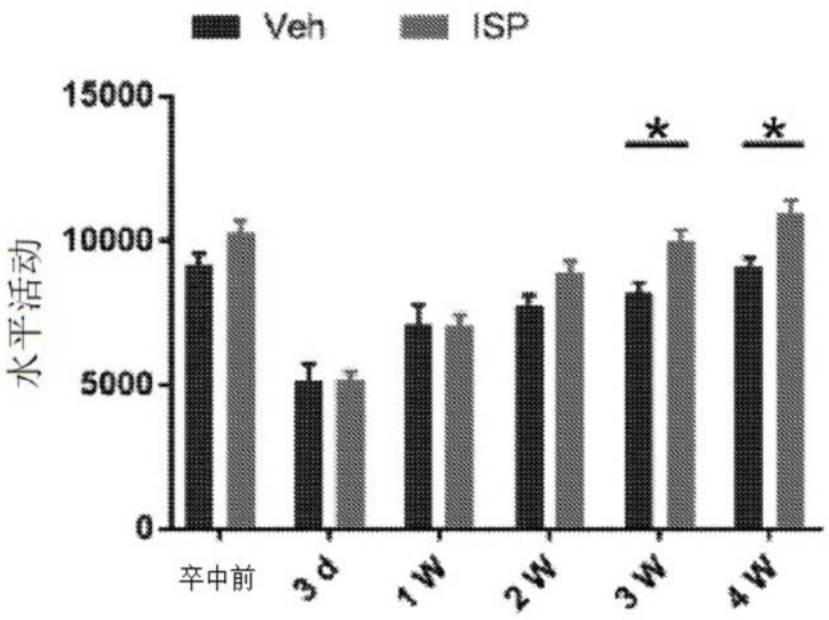

Veh
ISP
15000
10000
5000
0
水平活动
*
*
卒中前
3 d
1 W
2 W
3 W
4 W

图3B

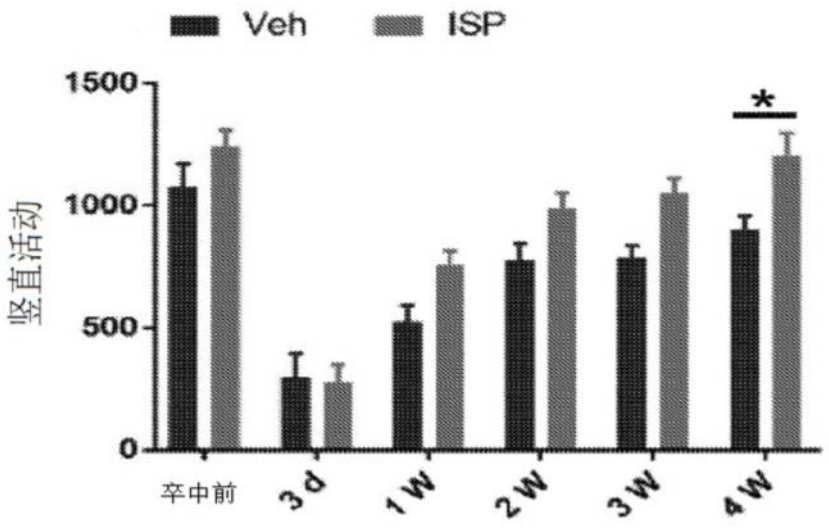

Veh
ISP
1500
1000
500
0
竖直活动
*
卒中前
3 d
1 W
2 W
3 W
4 W

图3C

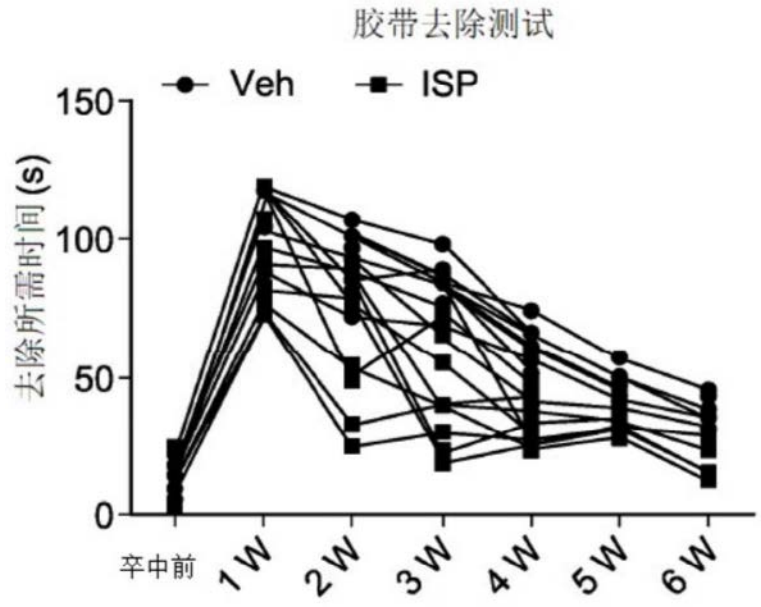

胶带去除测试
Veh
ISP
去除所需时间(s)
150
100
50
0
卒中前
1W
2W
3W
4W
5W
6W

图4

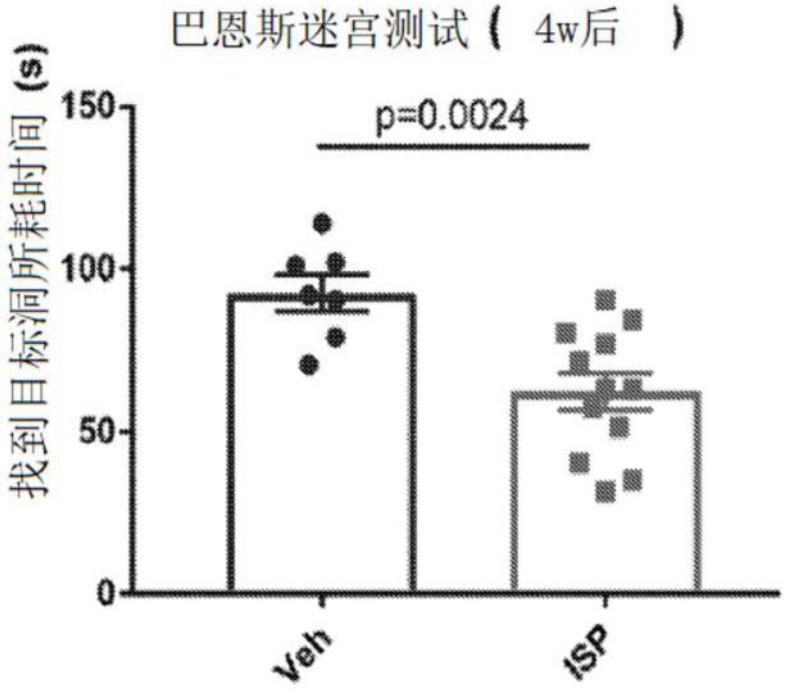

巴恩斯迷宫测试（ 4w后 ）
找到目标洞所耗时间 (s)
p=0.0024
150
100
50
0
Veh
ISP

图5A

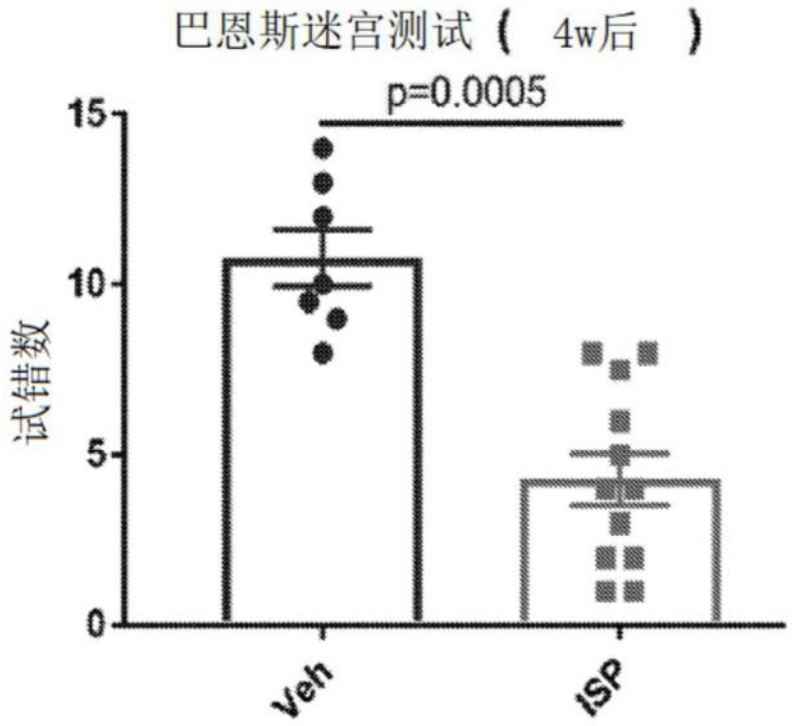

巴恩斯迷宫测试（ 4w后 ）
p=0.0005
试错数
15
10
5
0
Veh
ISP

图5B

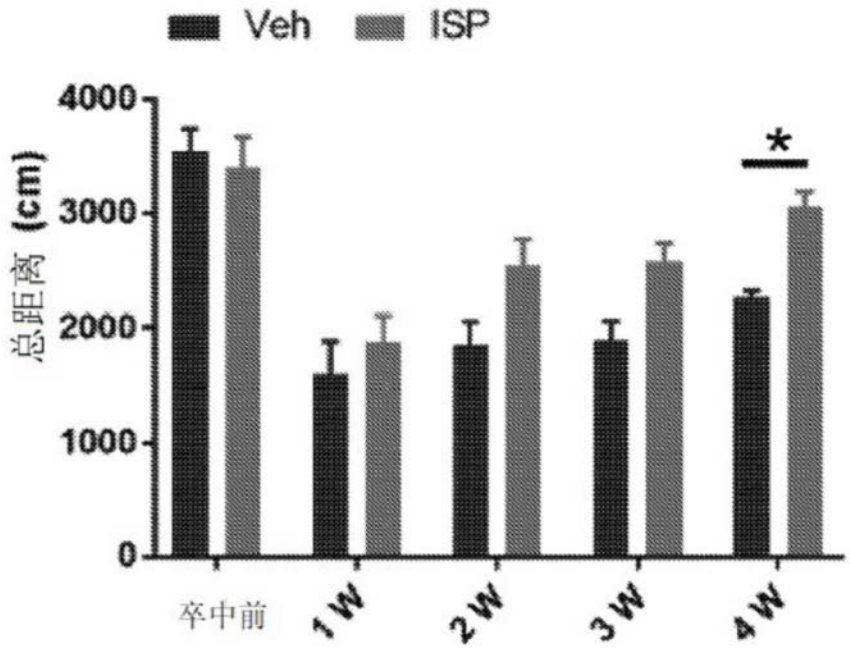

Veh
ISP
总距离 (cm)
4000
3000
2000
1000
0
*
卒中前
1W
2W
3W
4W

图6A

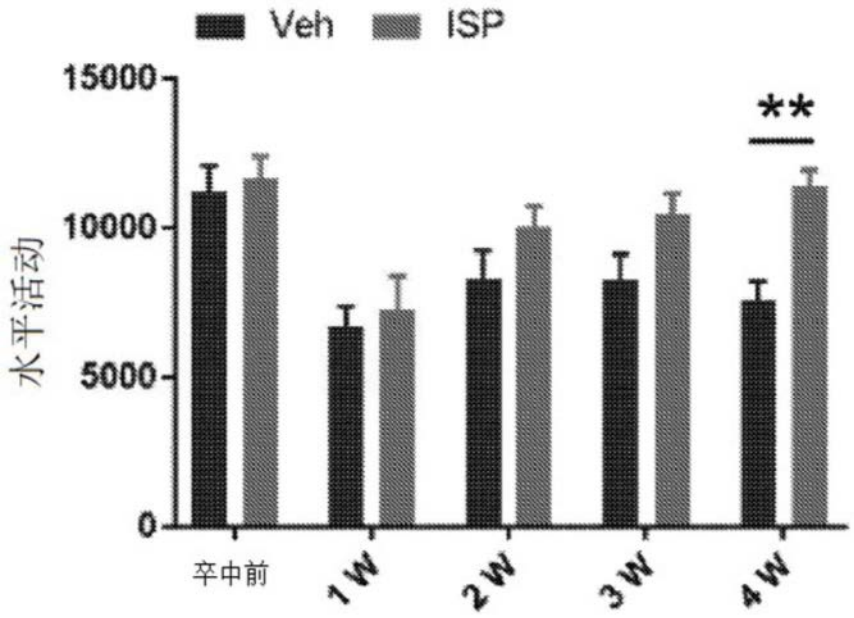

Veh
ISP
15000
10000
5000
0
水平活动
**
卒中前
1W
2W
3W
4W

图6B

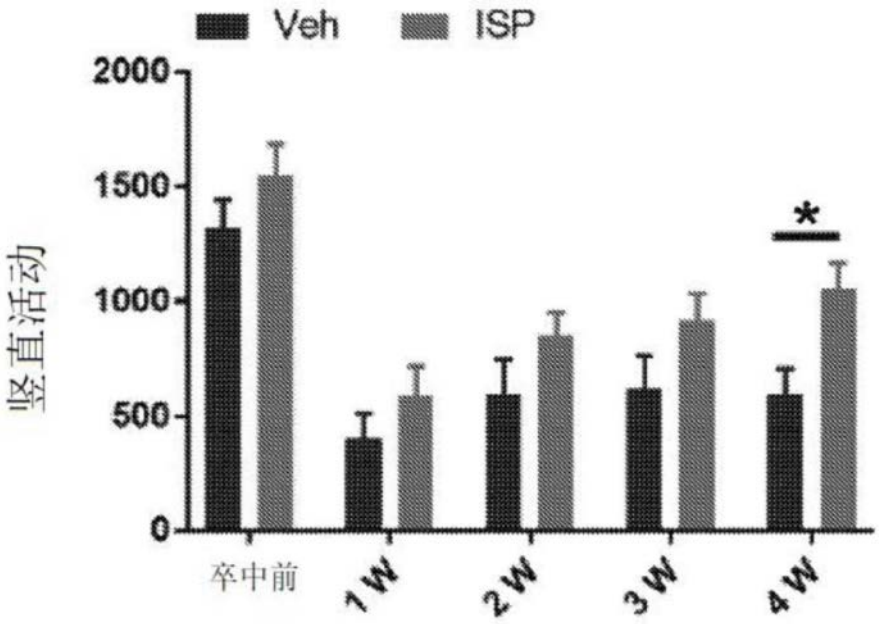

Veh
ISP
2000
1500
1000
500
0
竖直活动
*
卒中前
1W
2W
3W
4W

图6C

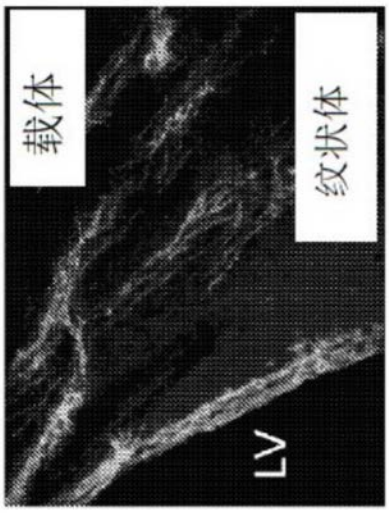


图7A

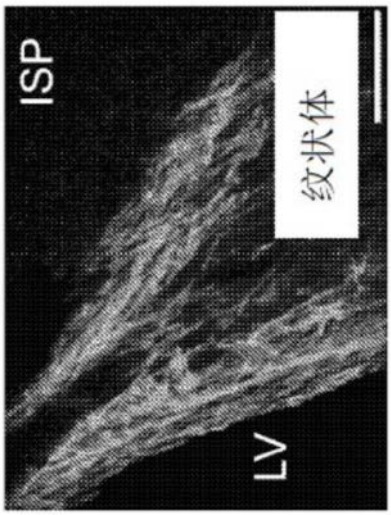


图7B

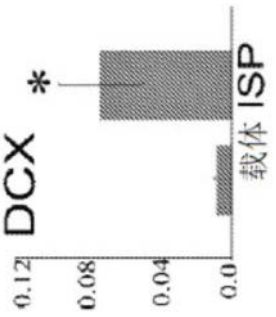


图7C

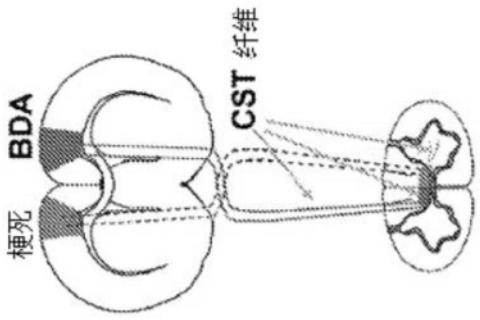

BDA
梗死
CST 纤维

图7D

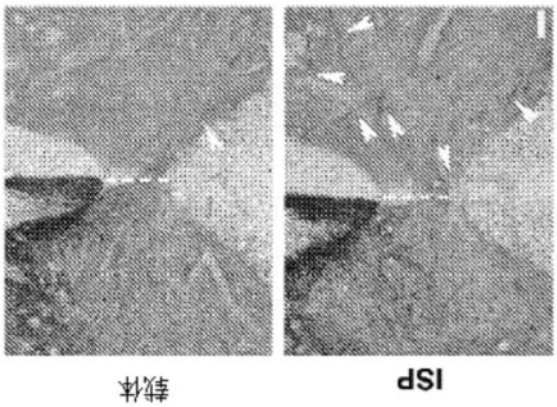

载体
ISP

图7E

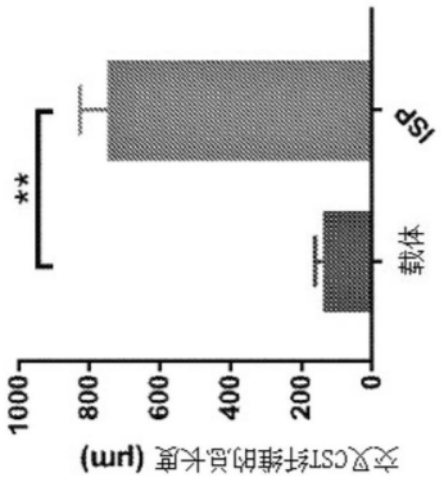

交叉CST纤维的总长度 (μm)
1000
800
600
400
200
0
**
载体
ISP

图7F

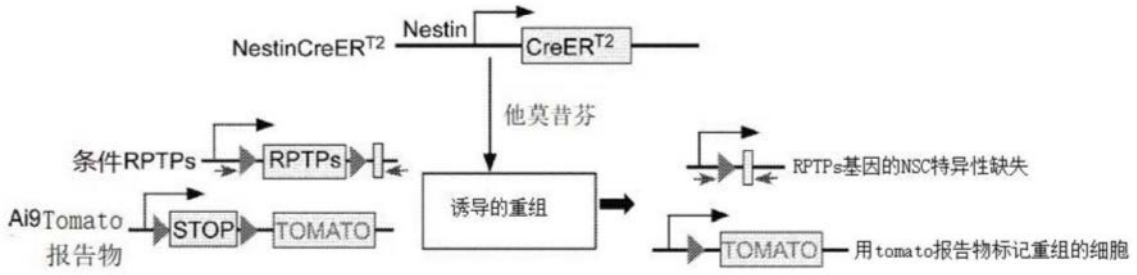

NestinCreER^{T2}
Nestin
CreER^{T2}
他莫昔芬
条件RPTPs
RPTPs
Ai9Tomato
报告物
STOP
TOMATO
诱导的重组
RPTPs基因的NSC特异性缺失
TOMATO
用tomato报告物标记重组的细胞

图8A

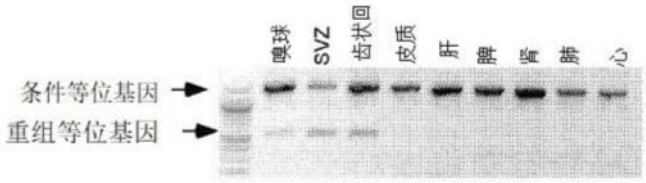

嗅球
SVZ
齿状回
皮质
肝
脾
肾
肺
心
条件等位基因
重组等位基因

图8B

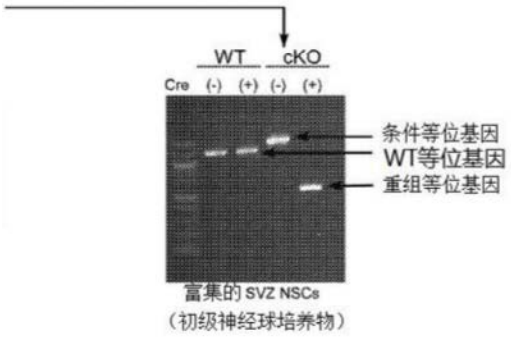

WT
cKO
Cre (-) (+) (-) (+)
条件等位基因
WT等位基因
重组等位基因
富集的 SVZ NSCs
（初级神经球培养物）

图8C

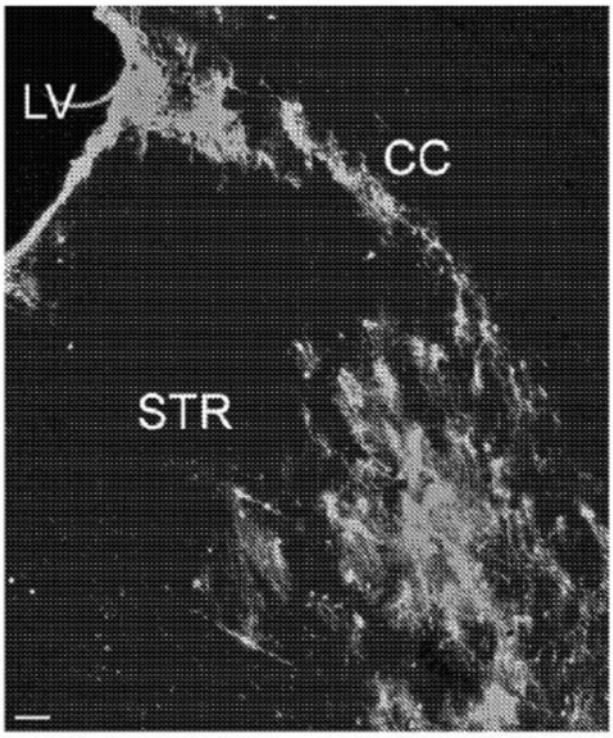


图8D

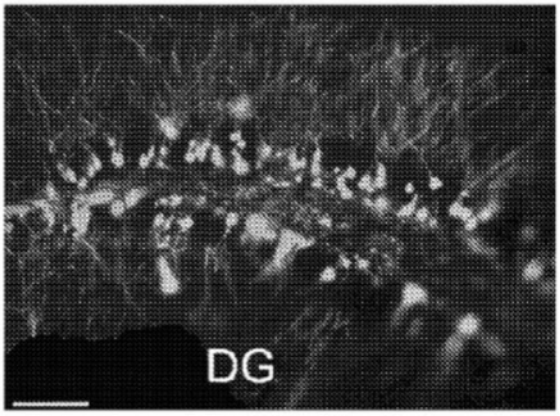


图8E

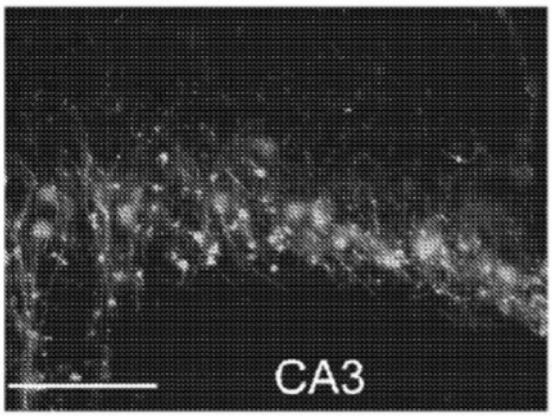


图8F

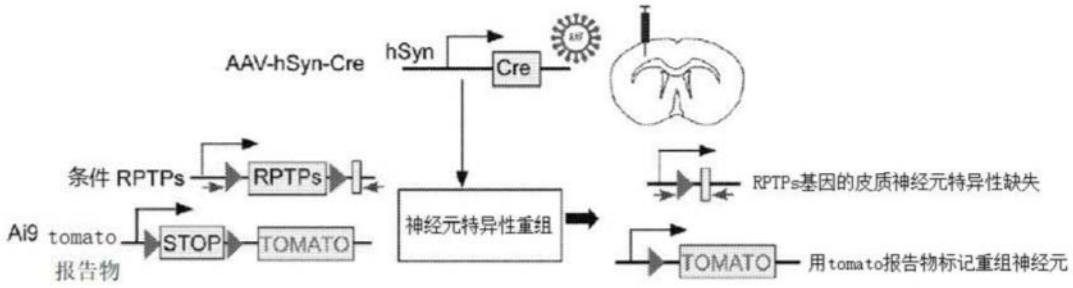


图9A

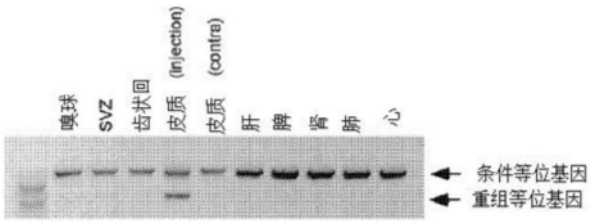


图9B

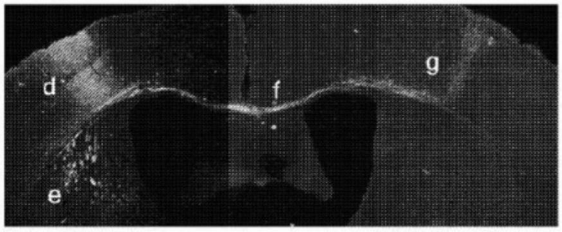


图9C

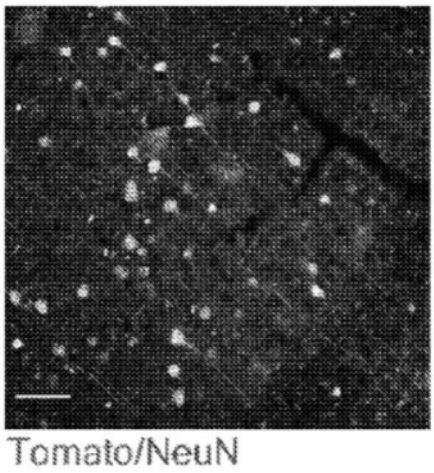


图9D



图9E

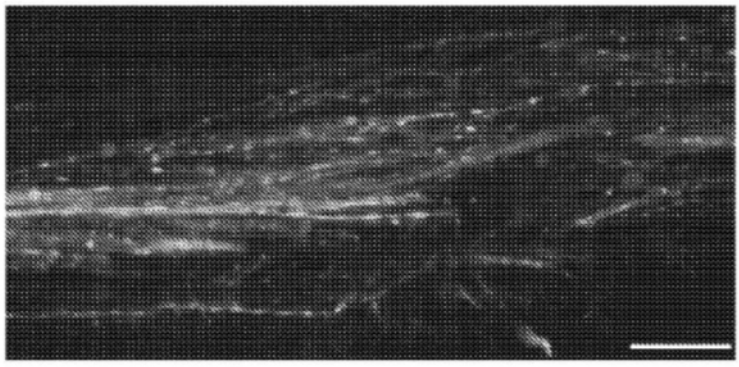


图9F

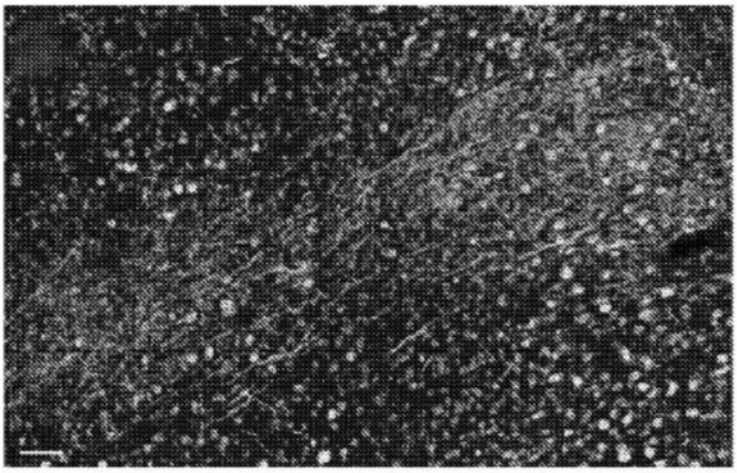


图9G

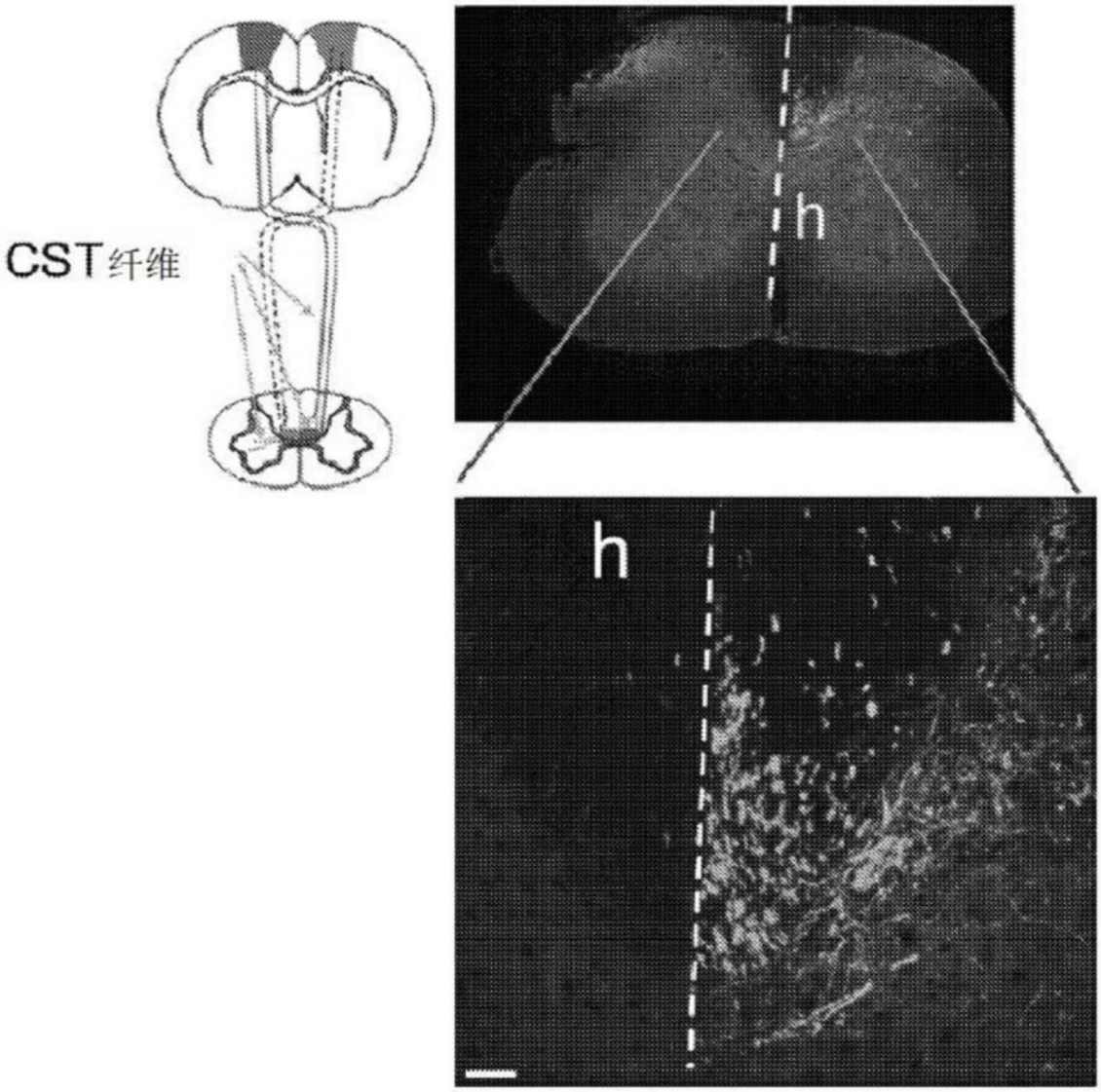


图9H

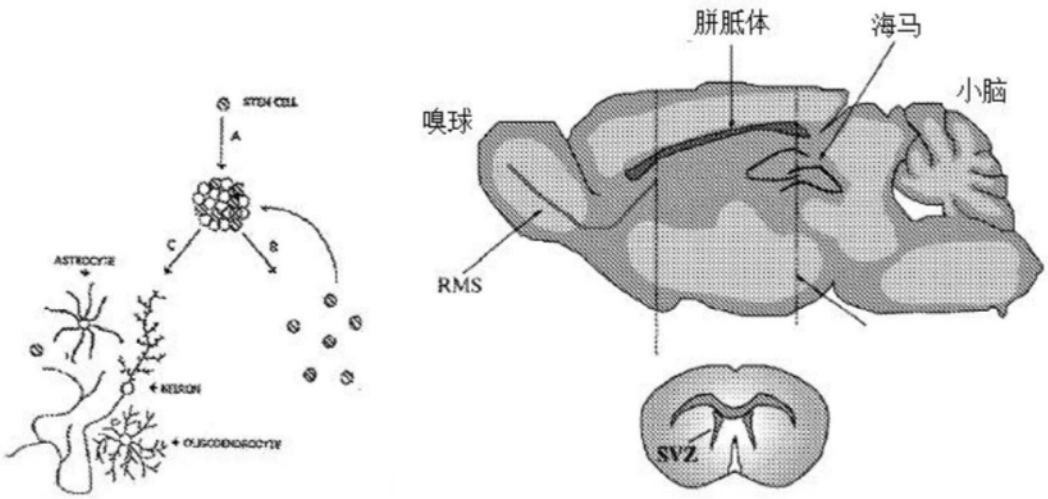


图10A

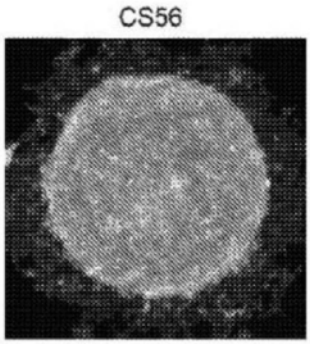


图10B

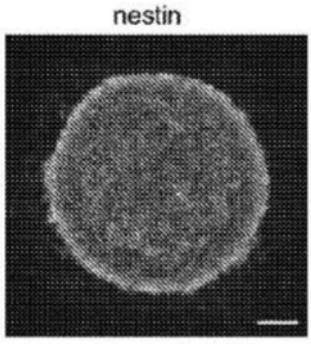


图10C



图10D



图10E

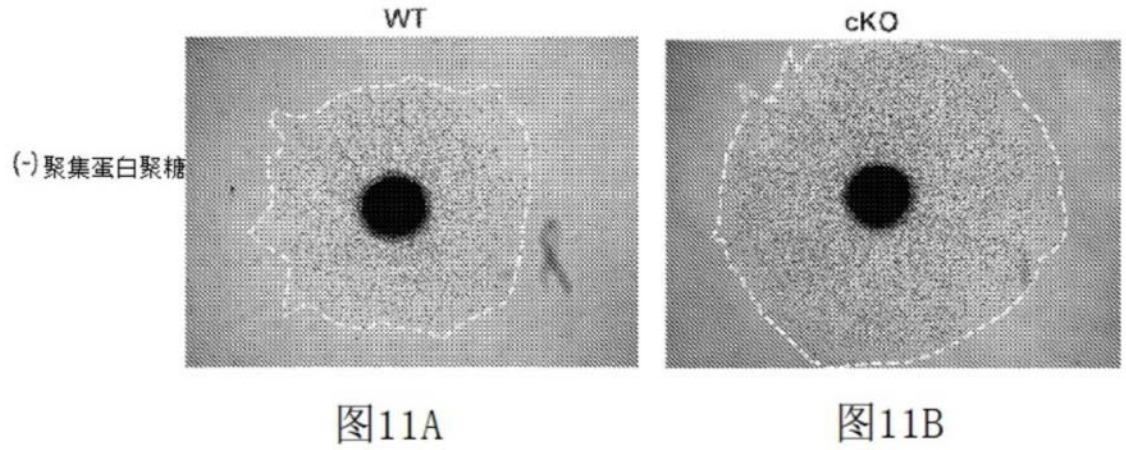


图11A 图11B

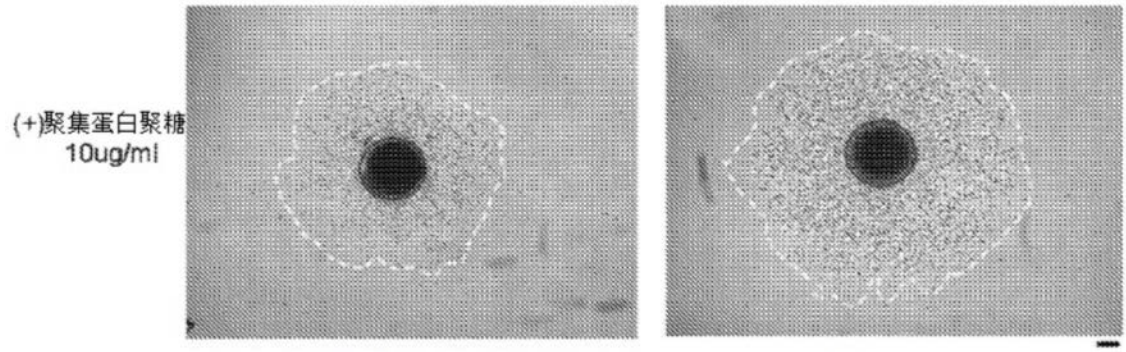


图11C 图11D

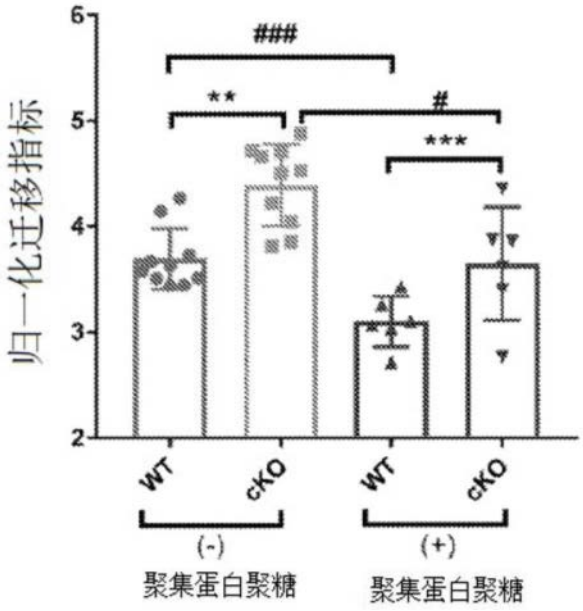


图11E

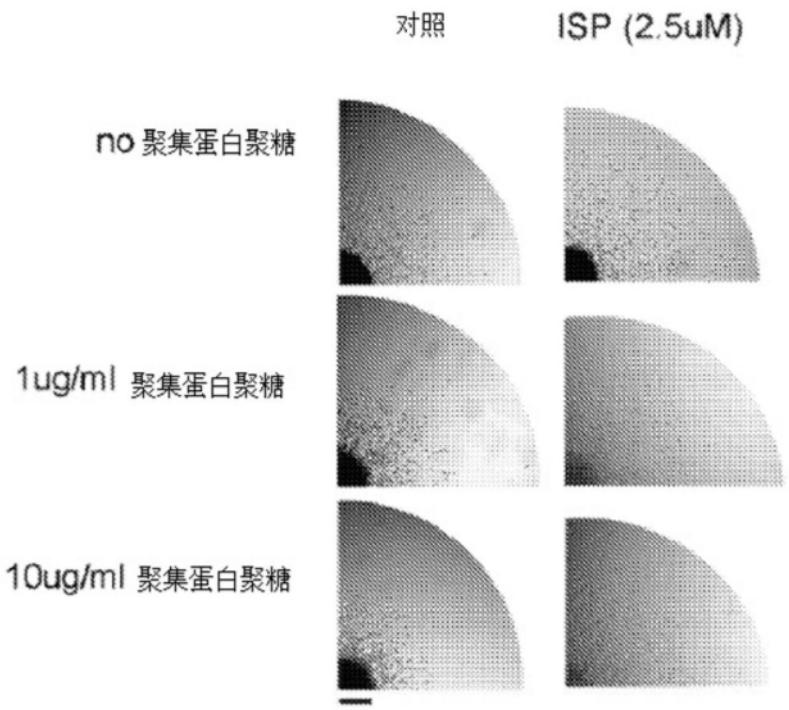

对照
ISP (2.5uM)
no 聚集蛋白聚糖
1ug/ml 聚集蛋白聚糖
10ug/ml 聚集蛋白聚糖

图12A

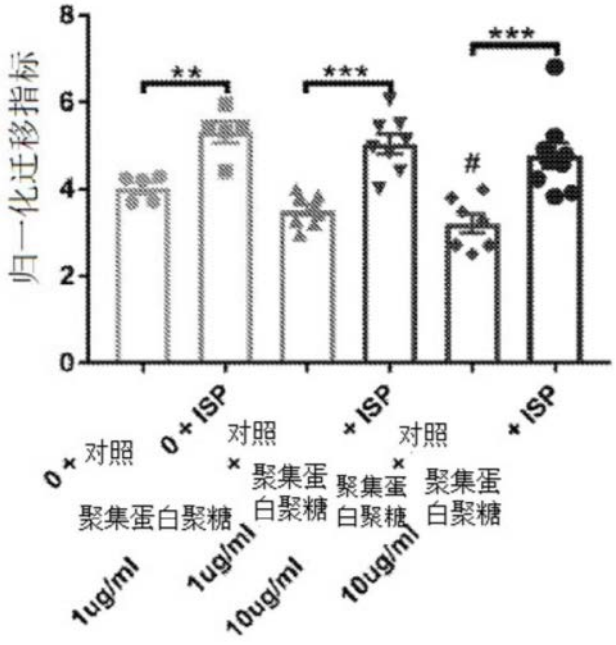

归一化迁移指标
8
6
4
2
0
**
***
***
#
0 × 对照
0 × ISP
对照
× ISP
对照
× ISP
聚集蛋白聚糖
聚集蛋白聚糖
聚集蛋白聚糖
1ug/ml
1ug/ml
10ug/ml
10ug/ml

图12B

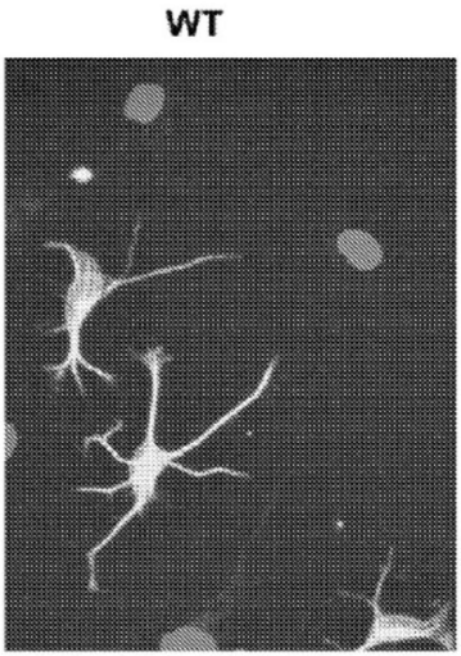


图13A

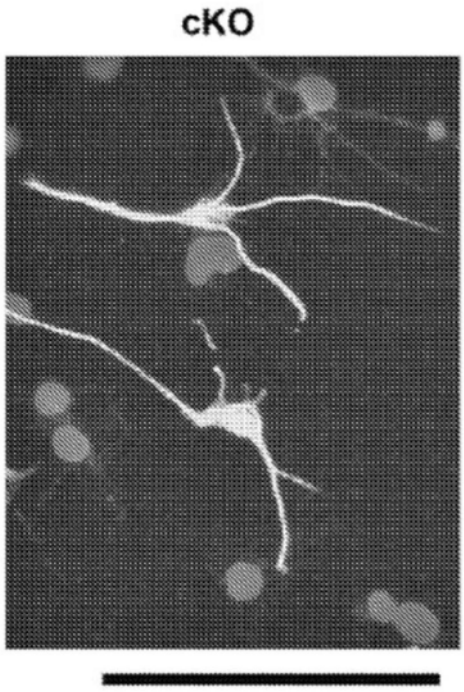


图13B

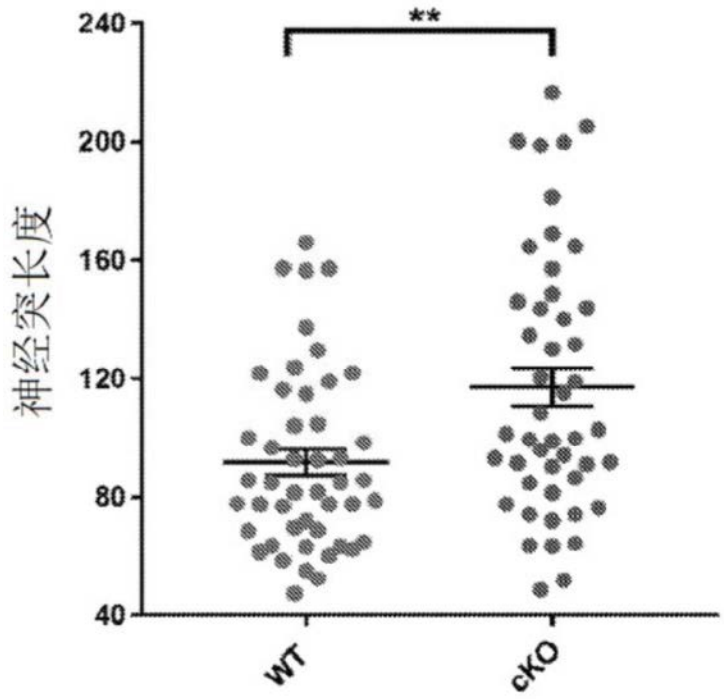

**
240
200
160
120
80
40
神经突长度
WT
cKO

图13C

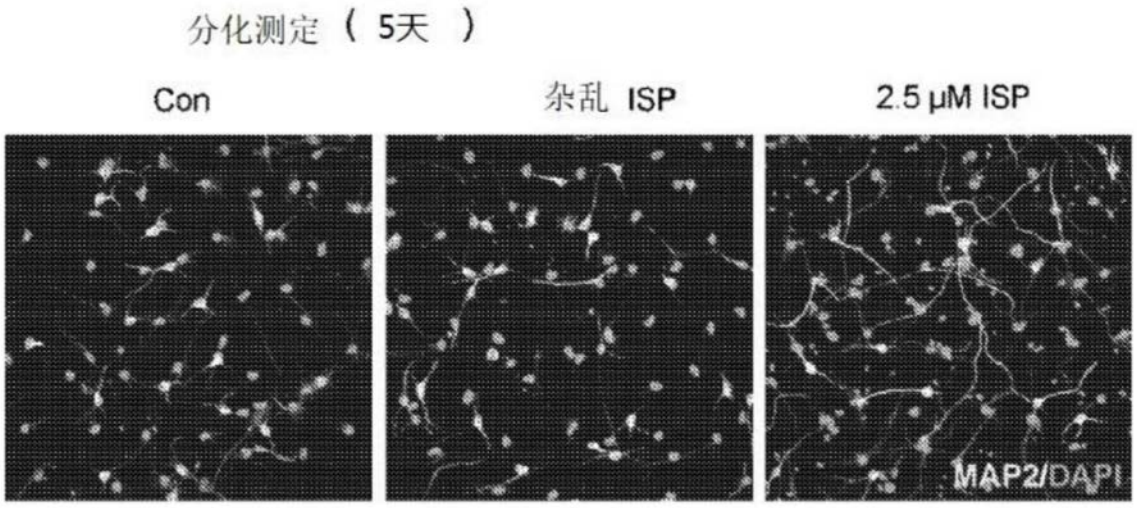

分化测定（ 5天 ）
Con
杂乱 ISP
2.5 μM ISP
MAP2/DAPI

图14A

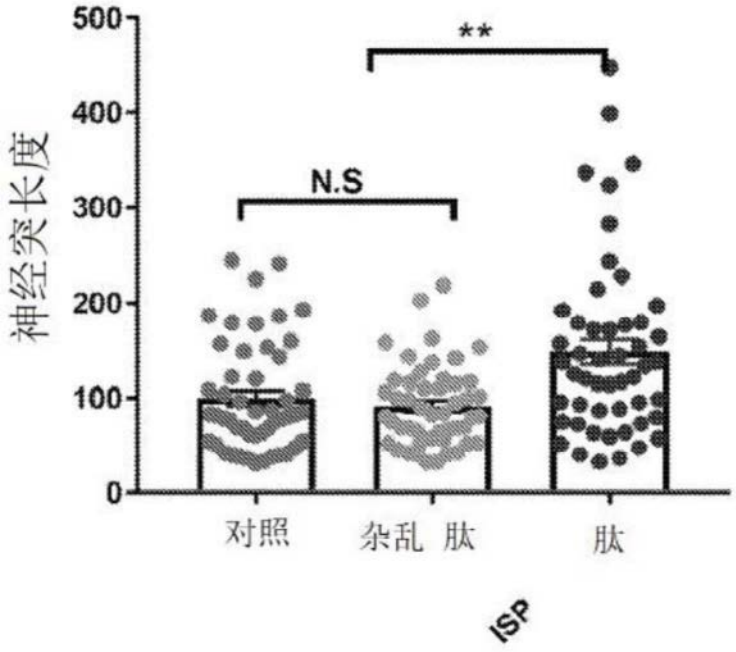


图14B