



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104254343 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 31

(21) 申请号 201380011868. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 02. 15

A61K 48/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/7105(2006. 01)

10-2012-0015177 2012. 02. 15 KR

A61K 31/7088(2006. 01)

10-2013-0016094 2013. 02. 15 KR

A61P 25/28(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 08. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2013/001179 2013. 02. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/122408 KO 2013. 08. 22

(71) 申请人 高丽大学校产学协力团

地址 韩国首尔

(72) 发明人 成在英 黄钟益 宣雄 赵恩纪

金源起

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理

有限公司 44224

代理人 黎艳 万志香

权利要求书1页 说明书21页 附图15页

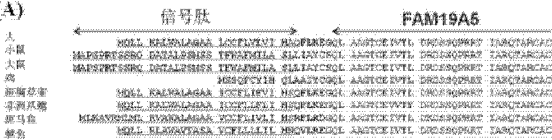
(54) 发明名称

参与调节胶质细胞生成的 FAM19A5 的医药用途

(57) 摘要

本发明涉及能够参与到调节胶质细胞生成的 FAM19A5 的药物用途,更具体地,涉及遍及脊椎动物的神经干细胞并调节胶质细胞生成的 FAM19A5 在预防、诊断或治疗中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病中的用途。

(A)



1. 一种用于调节干细胞增殖或分化的组合物,该组合物包括作为增殖或分化调节剂的FAM19A5(序列同源性19家族,成员A5)或其抑制剂。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述干细胞为胚胎神经干细胞或成体神经干细胞。

3. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述FAM19A5抑制剂为反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、miRNA或包含其的载体、或者抗体中的任一种。

4. 一种用于诊断中枢神经细胞损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的组合物,该组合物包含用于测量FAM19A5(序列同源性19家族,成员A5)基因的mRNA或其蛋白质水平的剂型。

5. 根据权利要求4所述的组合物,其特征在于,所述用于测量所述基因的mRNA的制剂包含寡核苷酸,该寡核苷酸具有与所述基因的mRNA互补的序列。

6. 根据权利要求4所述的组合物,其特征在于,所述用于测量蛋白质水平的制剂包含所述蛋白质的特异性抗体。

7. 根据权利要求4所述的组合物,其特征在于,所述中枢神经细胞损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病包括创伤性脑损伤、肌萎缩侧索硬化症、阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、帕金森氏病、中风或脑肿瘤。

8. 一种用于治疗早期创伤性脑损伤的组合物,该组合物包含FAM19A5(序列同源性19家族,成员A5)。

9. 根据权利要求8所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含选自天然或重组FAM19A5蛋白质、能够过度表达FAM19A5蛋白质的转基因神经干细胞和从所述神经干细胞中分化的星形胶质细胞中的至少一种。

10. 一种用于治疗退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的组合物,该组合物包含FAM19A5(序列同源性19家族,成员A5)抑制剂。

11. 根据权利要求10所述的组合物,其特征在于,所述FAM19A5抑制剂为反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、miRNA或包含其的载体、或者抗体中的任一种。

12. 根据权利要求10所述的组合物,其特征在于,所述组合物进一步包含胚胎神经干细胞或成体神经干细胞。

13. 一种用于脑部疾病或中枢神经系统疾病的预防性或治疗性药物的筛选方法,该方法包括:在体外使FAM19A5(序列同源性19家族,成员A5)基因与候选物质进行接触;以及测定所述候选物质能否促进或抑制所述基因的表达。

14. 一种用于脑部疾病或中枢神经系统疾病的预防性或治疗性药物的筛选方法,该方法包括:在体外使FAM19A5(序列同源性19家族,成员A5)蛋白质与候选物质进行接触;以及

测定所述候选物质能否提高或抑制所述蛋白质的功能或活性。

参与调节胶质细胞生成的 FAM19A5 的医药用途

技术领域

[0001] 本发明涉及能够调节脊椎动物中神经干细胞的增殖及分化的 FAM19A5 在诊断、预防或治疗中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病中的医药用途。

背景技术

[0002] 在发育初期,神经板形成神经管,然后经过发育过程,神经管内的腔室形成脑室。与脑室最近的细胞层为脑室区。通过神经形成过程,在脑室区之上形成额外的增殖细胞层,使之称为脑室下区。脑室区和脑室下区中的祖细胞具有神经干细胞的特性,而且通过复杂的控制系统迁移至皮质板 (cortical plate) 【Dehay and Kennedy, Nat Rev Neurosci 8:438-450, 2007; Molyneaux et al., Nat Rev Neurosci 8:427-437, 2007; Angevine and Sidman, Nature 192:766-768, 1961; Caviness and Takahashi, Brain Dev 17:159-163, 1995】。

[0003] 神经干细胞具有持续分裂的能力,即自我更新能力,其可被分化成中枢神经系统的神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。在胚胎期,主要经过分化成神经元的过程,而在出生后,会经过分化成胶质细胞的过程【Bayer et al., J Comp Neurol 307:499-516, 1991; Miller and Gauthier, Neuron 54:357-369, 2007】。

[0004] 从神经干细胞向神经元和胶质细胞的分化是在脑的发育过程和成体脑中能够持续观察到的现象。在成体脑中,神经发生产生于两处不同的脑区域,即侧脑室的脑室下区和海马齿状回。在脑室下区中,与脑室最近的室管膜细胞及随之分布的星形胶质细胞可作为神经干细胞,这两种细胞通过过渡放大细胞 (transient amplifying cell) 形成成神经细胞 (neuroblasts) 【Doetsch, Curr Opin Genet Dev 13:543-550, 2003; Doetsch et al., Cell 97:703-716, 1999; Lois and Alvarez-Buylla, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2074-2077, 1993; Palmer et al., Mol Cell Neurosci 8:389-404, 1997; Temple, Nature 414:112-117, 2001】。

[0005] 为了维持正常的大脑功能,神经元和胶质细胞的数值平衡是必要的。过去,在胶质细胞中占多数的星形胶质细胞被认为仅仅是神经元在执行功能时进行对其起到帮助的保护性细胞。然而,现在星形胶质细胞被认为除了作为结构性支持物,其还能影响神经元的周围环境。亦即,星形胶质细胞分泌生长因子,从而调节神经元的功能,进而帮助维持血管与脑之间的屏障。此外,已知星形胶质细胞可通过直接调节神经元之间的结构形成和突触功能来起更积极的作用。【Nedergaard et al., Trends Neurosci 26:523-530, 2003; Ullian et al., Science 291:657-661, 2001; Song et al., Nature 417:39-44, 2002; Temple and Davis, Development 120:999-1008, 1994; Seri et al., J Neurosci 21:7153-7160, 2001; Svendsen, Nature 417:29-32, 2002】在病理上通过大量研究已知晓星形胶质细胞的功能上的重要性。当脑受损伤时,星形胶质细胞会积极地增殖而变得反应化,而且观察到肥厚化。这种胶质细胞的积极增殖有利于促进组织在最初受损伤之后的尽快恢复并防止损伤的传播。然而,当这种现象重复时,神经元的再生会受到抑制,引起炎症反应,发

生损伤,可导致退行性脑部疾病【Myer et al.,Brain129:2761-2772,2006 ;Chen and Swanson,J Cereb Blood Flow Metab 23:137-149,2003 ;Cunningham et al.,Brain 128:1931-1942,2005 ;Faden,Curr Opin Neurol 15:707-712,2002 ;Katayama et al.,J Neurosurg 73:889-900,1990】。

[0006] 神经胶质增生 (Gliosis) 是一种在各种中枢神经系统的病理过程中通常发生的现象,是由神经元受损引起的星形胶质细胞的过度增殖和激活造成的。当中枢神经系统受损时,正常的星形胶质细胞变得肥大,并形成能够增加被称为胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 的中间丝蛋白的形成的反应性星形胶质细胞。受伤后,包括反应性星形胶质细胞的各种胶质细胞会过度增殖,从而形成叫作胶质瘢痕 (glial scar) 的坚硬的细胞层,其为治愈过程中的产物。这种神经胶质增生是在包括亨廷顿氏病、帕金森氏病和阿尔茨海默氏病的退行性脑部疾病、脑髓损伤以及如中风和脑肿瘤的中枢神经系统的各种病理现象中能够观察到的【Faideau et al.,Hum Mol Genet,2010 ;Chen et al.,Curr Drug Targets,2005 ;Rodriguez et al.,Cell Death Differ,2009 ;Robel et al.,J Neurosci,2011 ;Talbot et al.,Exp Neurol,2005 ;Shimada et al.,J Neurosci ;2012 ;Sofroniew and Vinters,Acta Neuropathol,2010】。

[0007] 通常,神经胶质增生会根据最初受伤时的情况或受到创伤后所经过的时间而具有各种影响。受创伤后,初始的反应性星形胶质细胞会分泌神经生长因子如 GDNF 来防止细胞程序化死亡,引起对谷氨酸的回收,从而保护神经元。此外,所述初始的反应性星形胶质细胞在如恢复血脑屏障、隔离发生损伤的部位以及防止健康组织的感染中发挥积极的作用。然而,当受损后经过一定时间时,通过过度增殖的反应性星形胶质细胞形成胶质瘢痕,其像网一样包住受伤部位,然后积累抑制细胞外基质。这种蛋白质的密集结构起到屏障的作用,而能够防止神经元在物理和化学上进行再生及重建连接。此外,会分泌能够诱发炎症的物质和如细胞毒性细胞因子的神经毒性物质来引发神经元的凋亡,抑制功能性的恢复以及恶化病理症状。在现有技术中,中枢神经系统疾病是通过病理组织学检查 (histopathological test)、电脑断层扫描 (CT) 或核磁共振成像 (MRI) 来进行检测。然而,使用这些方法的诊断仅在疾病发展到一定程度后才可以实现。因此,有必要研发出一种能够快速并准确地确认中枢神经系统疾病的进展的诊断标记。此外,在损伤前期能使神经元存活以及在后期能最大程度降低胶质瘢痕的生成并促进神经元的再生的治疗方法是最佳的方法。

发明内容

[0008] 技术内容

本发明涉及通过确认 FAM19A5 在调节胶质细胞生成的作用来提供 FAM19A5 在诊断、预防或治疗中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病中的医药用途。

[0009] 技术方案

为了达到上述目的,本发明提供作为增殖或分化的调节剂的包含 FAM19A5 (序列同源性 19 家族,成员 A5) 或其抑制剂的用于调节干细胞的增殖或分化的组合物。

[0010] 本发明还提供用于诊断中枢神经细胞损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的组合物,该组合物包含用于测量 FAM19A5 (序列同源性 19 家族,成员 A5) 基因的 mRNA 或

其蛋白质水平的剂型。

[0011] 本发明还提供包含 FAM19A5(序列同源性 19 家族,成员 A5)的用于治疗早期创伤性脑损伤的组合物。

[0012] 本发明还提供 FAM19A5 在制备用于治疗早期创伤性脑损伤的药物组合物中的用途。

[0013] 本发明还提供用于治疗动物的早期创伤性脑损伤的方法,该方法包括将包含药物有效剂量的 FAM19A5 的用于治疗早期创伤性脑损伤的组合物向受试者给药的步骤。

[0014] 本发明还提供包含 FAM19A5(序列同源性 19 家族,成员 A5)抑制剂的用于预防或治疗退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的组合物。

[0015] 本发明还提供所述 FAM19A5 抑制剂在制备用于预防或治疗退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的药物组合物中的用途。

[0016] 本发明还提供用于治疗动物的退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的方法,该方法包括向受试者给药用于治疗动物的退行性脑部疾病或中枢神经系统的组合物的步骤,该组合物包含药物有效剂量的 FAM19A5 抑制剂。

[0017] 本发明还提供用于脑部疾病或中枢神经系统疾病的预防性或治疗性药物的筛选方法,该方法包括:

在体外使 FAM19A5(序列同源性 19 家族,成员 A5)基因与候选物质进行接触;以及判断所述候选物质能否促进或抑制所述基因的表达。

[0018] 本发明还提供用于脑部疾病或中枢神经系统疾病的预防性或治疗性药物的筛选方法,该方法包括:

在体外使 FAM19A5(序列同源性 19 家族,成员 A5)蛋白质与候选物质进行接触;以及判断所述候选物质能否提高或抑制所述蛋白质的功能或活性。

[0019] 有益效果

本发明发现,一种由神经干细胞分泌的蛋白质 FAM19A5 能够调节神经干细胞的增殖或分化,在脑脊髓受损伤时,其会过度表达,从而促进星形胶质细胞的形成,进而恢复早期受损组织,而在已受损的组织中用 FAM19A5 特异性抗体中和 FAM19A5 时,会抑制星形胶质细胞的形成。因此, FAM19A5 可用于诊断、预防或治疗中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病。

附图说明

[0020] 图 1 展示了从各种脊椎动物的 FAM19A5 基因中表达的 FAM19A5 肽的氨基酸序列(A)和系统发育树(B)。

[0021] 图 2 展示了通过反转录聚合酶链反应(RT-PCR)的各种小鼠组织内的 FAM19A5 家族基因的 mRNA 表达模式(A)和每个发育阶段的 FAM19A5 家族基因的 mRNA 表达模型(B)。

[0022] 图 3 展示了通过使用原位杂交(in situ hybridization)在每个发育阶段从脑室区和大鼠脊髓中测定 FAM19A5mRNA 表达而获得的结果。

[0023] 图 4 展示了通过利用 Western 印迹法(A)和免疫细胞化学(B)来确定 FAM19A5 特异性抗体与 His-FAM19A5 蛋白质的结合特性的结果。

[0024] 图 5 展示了通过利用免疫组织化学来测定在每个发育阶段的小鼠的脑室区内

FAM19A5 肽的表达而获得的结果。

[0025] 图 6 展示了通过利用免疫组织化学来测定成年小鼠的脑室下区中神经干细胞和系统的损伤祖细胞内的 FAM19A5 肽的表达 (A) 和在经分化条件下 FAM19A5 肽的表达程度 (B) 的结果。

[0026] 图 7 展示了通过利用免疫细胞化学来测定小鼠的神经干细胞内所发育的神经球中的 FAM19A5 肽的表达而获得的结果。

[0027] 图 8 展示了通过测定神经球中 FAM19A5 的表达而获得的结果。(A) 展示了通过免疫细胞化学所获的结果, (B) 展示了通过 RT-PCR 所获的结果, 以及 (C) 展示了通过微阵列所获的结果。

[0028] 图 9 展示了通过利用免疫细胞化学 (A) 和 Western 印迹法 (B) 来测定由 FAM19A5 和其特异性抗体引起的神经干细胞的分化潜能的效果的结果。

[0029] 图 10 展示了通过测定由 FAM19A5 和特异性抗体引起的神经干细胞的分化潜能的效果的结果。

[0030] 图 11 展示了通过利用免疫组织化学 (I) 和 Western 印迹法 (II) (A)、以及放射免疫分析法 (B) 来测定小鼠的创伤性脑损伤模型的血液中 FAM19A5 蛋白质变化的结果。

[0031] 图 12 展示了创伤性脑损伤后通过测定随时间的 FAM19A5 蛋白质变化的结果。

[0032] 图 13 展示了通过利用免疫组织化学 (A)、Western 印迹法 (B) 和放射免疫分析法 (B) 来测定肌萎缩侧索硬化症模型中 FAM19A5 蛋白质变化的结果。

[0033] 图 14 展示了创伤性脑损伤后用 FAM19A5 特异性抗体处理时脑组织中的荧光信号。

[0034] 图 15 展示了创伤性脑损伤后用 FAM19A5 特异性抗体处理时随时间的细胞标记变化。

[0035] 图 16 展示了创伤性脑损伤后用 FAM19A5 特异性抗体处理时的神经元的变化。

[0036] 图 17 展示了通过测定经 FAM19A5 特异性抗体处理的小鼠的创伤性脑损伤模型中能够表达 FAM19A5 蛋白质的反应性星形胶质细胞的位置。

[0037] 图 18 展示了创伤性脑损伤后用 FAM19A5 特异性抗体处理时测定 NG2 少突胶质祖细胞 (A) 和少突胶质细胞 (B) 的变化的结果。

具体实施方式

[0038] 下面, 将详细地说明本发明的组成。

[0039] FAM19A5 (序列同源性 19 家族, 成员 A5) 为由五个能够编码小分泌蛋白质的高度同源的基因组成的 FAM19A 家族基因中的成员。这些蛋白质包含在固定位置上的保守的半胱氨酸残基, 而且与 CC-趋化因子基因家族中成员 MIP-1 α 有关联。已知, 这些蛋白质主要在脑部和脊髓中进行特异性表达, 而且在神经形成过程中由成体神经干细胞形成并分泌, 而用作用来促进星形胶质细胞的形成的分化调节因子。

[0040] 本发明人通过生物信息学分析方法 (bioinformatics approach) 利用原位杂交和免疫组织化学, 发现了体内 FAM19A5 的存在, 通过免疫细胞化学确认了 FAM19A5 在生成从神经干细胞中分化的细胞的过程中起的作用, 并且检测到其在脊椎动物中与神经元和胶质细胞生成有关的多种疾病的治疗用途, 从而完成本发明。

[0041] 因此, 本发明提供用于调节增殖或分化干细胞的组合物, 该组合物包含作为增殖

或分化调节剂的 FAM19A5 (序列同源性 19 家族, 成员 A5)。

[0042] 根据本发明的一个具体实施例, FAM19A5 在脊椎动物的脑中特异性表达, 其在脑室区和脊髓区域内分布最多, 处于生出生前的孕期中的胎儿的脑室区和脑室下区中高度表达, 然而分化有神经元的皮质板中弱表达。因此, 本发明首次证明了 FAM19A5 基因在已知具有神经干细胞群的中枢神经系统中的两个区域内强烈表达, 对完整的中枢神经系统的形成有重要作用, 并且参与组成中枢神经系统的神经元和胶质细胞的形成。

[0043] 基于这些结果, 观察了 FAM19A5 在从神经干细胞中生成的神经球内的表达。其结果可见, FAM19A5 在神经球内的分布要比 FAM19A5 家族基因的其他类型更多。这表明, 在成体和胚胎神经干细胞的功能中及在从所述干细胞生成的细胞向不同类型分化的过程中, FAM19A5 可能是一种重要的肽。

[0044] 通过这些结果, 可判断出, FAM19A5 是从神经干细胞中形成并分泌出来的, 而且影响细胞 (即神经元或星形胶质细胞) 的形成及其分化。由此可知, FAM19A5 能够促进星形胶质细胞的形成。

[0045] 因此, FAM19A5 可通过其数量上的量变来调节从神经干细胞分化的神经元或星形胶质细胞的数量。亦即, 由于可通过增加 FAM19A5 数量来增加已分化星形胶质细胞的数量, 而且可通过降低 FAM19A5 数量来增加已分化神经元的数量, 从而可知 FAM19A5 为分化调节因子。

[0046] 此外, 根据本发明的另一个具体实施例, 确定了可通过增加 FAM19A5 数量来降低神经干细胞的增殖, 并且可通过降低 FAM19A5 数量来增加神经干细胞的增殖。由此可知, FAM19A5 为干细胞的增殖调节因子。

[0047] 因此, FAM19A5 或其抑制剂可用作干细胞增殖或分化的调节剂。

[0048] 本发明的 FAM19A5 为从神经干细胞中分泌出来的分泌蛋白质, 其包含基因序列, 该基因序列编码作为向细胞外分泌的信号氨基酸末端的典型的信号肽, 随后具有成熟 FAM19A5 的氨基酸序列 (参照图 1)。

[0049] 本发明的用于调节干细胞的增殖或分化的组合物可包含天然或重组 FAM19A5、与之具有实质上等同的生理活性的 FAM19A5 蛋白质、过度表达所述天然或重组 FAM19A5 的转基因神经干细胞, 或 FAM19A5 抑制剂。所述具有实质上等同的生理活性的蛋白质包含天然 / 重组 FAM19A5、其功能性等同物和功能性衍生物。

[0050] 所述术语“功能性等同物”是指部分或全部的天然蛋白质的氨基酸被置换或部分氨基酸被删除或添加的氨基酸序列变异体, 而且与天然 FAM19A5 具有实质上等同的生物活性。

[0051] 所述术语“功能性衍生物”是指经修饰的蛋白质, 其能增强或降低所述 FAM19A5 蛋白质的物理和化学性质, 而且与天然 FAM19A5 具有实质上等同的生物活性。

[0052] 根据一个具体实施例, 本发明中所用的 FAM19A5 可从基因库编号 NM_134096、NM_001191991 等, 通过本领域的技术人员所熟知的遗传工程方法制备而成的。

[0053] 当通过基因重组方法制备蛋白质而获得天然 FAM19A5 时, 如果使用哺乳动物细胞而非大肠杆菌或昆虫细胞, 则认为其在所述蛋白质的活性或溶解程度上与所述天然类型更为类似。

[0054] 通过利用常用的柱层析法分离所述重组 FAM19A5 蛋白质。所述蛋白质的提纯程度

可通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)来检测。

[0055] 所述能够过度表达天然或重组 FAM19A5 的转基因神经干细胞是通过常规方法将能够表达天然或重组 FAM19A5 的载体导入神经干细胞内来制成的。

[0056] 所述 FAM19A5 抑制剂可以为反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、miRNA 或包含其的载体,或者抗体中的任一种。

[0057] 当体外培养神经干细胞时,可添加本发明的用于调节增殖或分化干细胞的组合物,作为增殖或分化调节因子。例如,在进行诱导增殖或分化的神经干细胞培养时,添加天然或重组 FAM19A5、或者其抑制剂,以通过天然或重组 FAM19A5、或者其抑制剂的数量变化来调节干细胞增殖的增加或降低,或者以调节神经元或星形胶质细胞的数量。

[0058] 此外,将神经干细胞和能够过度表达天然或重组 FAM19A5 的转基因神经干细胞一同培养来诱导分化时,由于从转基因和正常神经干细胞中所分泌的 FAM19A5 蛋白质的量在增加,因此星形胶质细胞的数量将会增加。

[0059] 除了 FAM19A5 外,本发明的用于调节干细胞增殖或分化的组合物可进一步包括已知的分化诱导因子,该分化诱导因子能够诱导神经干细胞的分化。例如,可使用睫状神经营养因子(CNTF)、骨形态发生蛋白(BMPs)、转化生长因子(TGF α)、或神经调节蛋白-1(NRG1)/神经胶质细胞生长因子-2(GGF2)。

[0060] 本发明还提供用于诊断中枢神经系统创伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的组合物,该组合物包含用于测量 FAM19A5(序列同源性 19 家族,成员 A5)基因的 mRNA 表达或蛋白质浓度的制剂。

[0061] 当脑部受到损伤,成熟的星形胶质细胞能够积极增殖,成为反应性星形胶质细胞,变肥大,诱导组织迅速恢复,而且预防损伤的蔓延。

[0062] 根据本发明的一个具体实施例,受损区域内的 FAM19A5 表达会显著提高,在受损区域内的放射状胶质细胞会表达作为标记的巢蛋白,同时能够表达 FAM19A5,而且与未受损的对照组相比数量有明显增加。此外,从脑室下区通过胼胝体迁移至脑损伤区域的成神经细胞几乎不表达 FAM19A5。除了所述受损区域外,在神经干细胞群所在的脑室下区的外围区域内,能够表达 FAM19A5 蛋白质的细胞的数量有增加,而且这些会同时表达作为星形胶质细胞的标记的 GFAP。

[0063] 此外,在脑创伤后血脑屏障受损时,FAM19A5 可渗进血液中。可通过血检确认 FAM19A5 的存在与否。待脑创伤之后,这种表达量会随着时间趋于持续增加。

[0064] 根据本发明的另一个具体实施例,在作为脊髓损伤疾病模型的肌萎缩侧索硬化症中测量 FAM19A5 蛋白质浓度的量变。结果,可确认所述表达量较普通模型有增加。

[0065] 因此,FAM19A5 可用作用来诊断中枢神经系统损伤的生物标记。

[0066] 此外,根据本发明的另一具体实施例,将 FAM19A5 特异性抗体用来治疗由创伤性脑损伤而生成的反应性星形胶质细胞时,可抑制那些星形胶质细胞的过度增殖,神经元会生存下来,因此可预期,从长远来看,会促进受损区域的神经元的再生。因此,FAM19A5 可用来客观并定量地诊断由中枢神经系统损伤引起的疾病的进展。

[0067] 因此,FAM19A5 可用作生物标记,用来诊断由中枢神经系统损伤引起的退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病。

[0068] 本说明书中使用的术语“中枢神经系统损伤”包括能够引起脑脊髓细胞的破坏或

退化的所有种类的中枢神经系统损伤。例如,外伤性脑损伤、肌萎缩侧索硬化症等,但所述损伤不限于此。

[0069] 所述术语“退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病”是指,由中枢神经系统损伤导致的神经胶质增生引起的退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病。这种疾病的例子包括阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、帕金森氏病、中风或脑肿瘤,但该疾病不限于任何具体的疾病种类。

[0070] 所述术语“诊断”是指,病理状态的确定。鉴于本发明的目的,所述诊断是指,测定 FAM19A5 表达作为中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的诊断标记,以确认中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病和中枢神经系统疾病的发病、进展及缓解。

[0071] 所述术语“诊断标记”是指,能够从普通细胞中分别诊断出中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的细胞的物质,其包括有机生物分子,如多肽或核酸(如 mRNA)、脂质、糖脂、糖蛋白以及糖(单糖、二糖、寡糖等),这些在中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的细胞中比起正常细胞有增加或减少。本发明所提供的用于中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的诊断标记可以为蛋白质,该蛋白质是由 FAM19A5 基因表达的,而且 FAM19A5 基因在中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的细胞中的表达较正常细胞有增加。

[0072] 本发明的用于诊断中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的组合物,包含用来测量 FAM19A5 基因的 mRNA 表达水平或其蛋白质表达量的制剂。这种制剂可包括,例如,具有与 FAM19A5mRNA 互补的序列的寡核苷酸,与 FAM19A5mRNA 特异性结合的引物或核酸探针,以及 FAM19A5 蛋白质特异性抗体。

[0073] 所述引物是指,在适当的温度和缓冲液中并在适当条件(即,不同的核苷三磷酸和聚合酶的四种类别)下可用作模板导向 DNA 合成的起始点的单链寡核苷酸。所述引物的合适长度可因各种因素,如温度和所述引物的用途,而有变化。此外,所述引物的序列不需要具有与所述模板序列完全互补的序列。在序列可杂交并所述引物可完成其功能的范畴内所述序列具有充分的互补性就足够了。因此,本发明的引物不需要具有与作为模板的基因的核苷酸序列完全互补的序列。在序列可杂交并所述引物可完成其功能的范畴内所述序列具有充分的互补性就足够了。此外,本发明的引物可优选地用于基因扩增反应。所述扩增反应是指,能够扩增核酸分子的反应。这种基因的扩增反应在本领域内已被广泛知晓,其可包括,如聚合酶链反应(PCR)、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、连接酶链反应(LCR)、转录介导的扩增(TMA)和基于核酸序列的扩增(NASBA)。

[0074] 所述核酸探针是指天然或变形的单体或线性连接的低聚物,包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸,其能够与靶核苷酸序列特异性杂交,而且会自然产生或被人工合成。本发明的探针可以为单链,优选为寡脱氧核苷酸(oligodeoxyribonucleotide)。本发明的探针可以包括天然 dNMP(即, dAMP、dGMP、dCMP 和 dTMP)、以及核苷酸类似物或衍生物。此外,本发明的探针可包括核糖核苷酸(ribonucleotide)。例如,其可包括:经骨架修饰的核苷酸,例如肽核酸(PNA)(M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993))、硫代磷酸酯 DNA、二硫代磷酸酯 DNA、磷酰胺酯 DNA、酰胺连接的 DNA、MMI 连接的 DNA、2'-O-甲基 RNA、 α -DNA 和甲基磷酸 DNA;经糖修饰的核苷酸,例如 2'-O-甲基 RNA、2'-氟 RNA、2'-氨基 RNA、2'-O-烷基 DNA、2'-O-烯丙基 DNA、2'-O-炔基 DNA、己糖 DNA、吡喃糖 RNA 和失水己糖醇 DNA;以及,具有碱基变异的核苷酸,例如 C-5 取代嘧啶(取代基包括氟代、溴代、氯代、碘代、甲基、乙基、乙烯基、

甲酰基、ethnyl-、丙炔基、炔基、噻唑基、咪唑基和吡啶基)、具有 C-7 取代基的 7-脱氮嘌呤(取代基包括氟代、溴代、氯代、碘代、甲基、乙基、乙烯基、甲酰基、炔基、烯基、噻唑基、咪唑基和吡啶基)、肌苷和二氨基嘌呤作为 FAM19A5 特异性抗体,可使用多克隆抗体、单克隆抗体、人抗体和人源化抗体。

[0075] 所述抗体片段的例子包括:Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段;双特异抗体(diabody);线性抗体(Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995));单链抗体分子;和从抗体片段中形成的多特异性抗体等。

[0076] 当用木瓜蛋白酶分解抗体时,形成两个相同的抗原结合片段,即具有单个抗原结合位点的“Fab”片段和余下的“Fc”片段。当用胃蛋白酶进行处理时,形成具有两个抗原结合位点且仍能与所述抗原交联的 F(ab')₂ 片段。Fv 为包括完整的抗原识别和结合区的小抗体片段。该区由一个重链与一个轻链可变区的二聚物组成,并紧紧地通过非共价键偶联。

[0077] 用于制备多克隆抗体的方法对本领域的技术人员来说是熟知的。多克隆抗体可通过向哺乳动物注射一次或多次免疫剂来制备的,而且根据需要,同时可注射免疫佐剂。通常,向哺乳动物的皮下或腹膜内注射多次免疫剂和 / 或免疫佐剂。所述免疫剂可以为本发明的蛋白质或其融合蛋白。当向哺乳动物一同注射已知有免疫原性的蛋白质和免疫剂来进行免疫化时,可能会有效。

[0078] 本发明的单克隆抗体可通过如文献(Kohler et al., Nature, 256:495(1975))中所记载的杂交方法进行制备,或通过重组 DNA 方法(如,参 zao 照美国专利号 4,816,576)进行制备。例如,所述单克隆抗体还可通过利用如文献(Clackson et al., Nature, 352:624-628(1991) and Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597(1991))中所述的技术从噬菌体抗体库中分离而出。

[0079] 只要能够展示期望的活性,本发明的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体,其中重链和 / 或轻链的部分与源自特定物种的相应抗体或属于特定抗体类或抗体亚类的相应抗体具有相同或同源的序列,而所述链的余下部分具有源自不同物种的抗体或属于不同抗体类或抗体亚类的抗体,或者与此抗体的片段相同或同源(Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。

[0080] 非人(如,鼠科(Murinae))抗体的“人源化”种类包括源自非人免疫球蛋白的具有最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如,Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或抗体的其他抗原结合序列)。在多数情况下,所述人源化抗体包括人免疫球蛋白(受体抗体),其中受体的互补决定区(CDR)的残基被具有期望的特异性、亲和度和能力的如大鼠、小鼠或兔的非人物种(供体抗体)的 CDR 残基所取代。在一些情况下,人免疫球蛋白的 Fv 框架残基被相应的非人残基所取代。此外,所述人源化抗体可包括受体抗体、或在导入有 CDR 或框架的序列中未被发现的残基。通常,所述人源化抗体实际上包括至少一种可变结构域,一般包括两种或以上的可变结构域。其中,所有的或实质上所有的 CDR 区相对应于所述非人免疫球蛋白的区域,而且所有的或实质上所有的 FR 区相对应于人免疫球蛋白序列的区域。此外,所述人源化抗体包括免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常包括人免疫球蛋白区的一部分(Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992))。

[0081] 本发明的用于诊断中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的组合物可以为包含于试剂盒的形式。

[0082] 所述试剂盒可包含用来测量 FAM19A5 基因的表达水平或蛋白质的量的所述引物、探针或抗体。对其的定义与如上所述的内容相同。

[0083] 当所述试剂盒应用于 PCR 扩增过程中时,PCR 扩增所必要的试剂可有选择地包括,如缓冲液、DNA 聚合酶(如,从 *Thermus aquaticus*(Taq)、*Thermus thermophiles*(Tth)、*Thermus filiformis*、*Thermis flavus*、*Thermococcus literalis* 或 *Pyrococcus furiosus*(PFU) 中获得的热稳定性 DNA 聚合酶)、DNA 聚合酶辅助因子和 dNTP。但所述试剂盒应用于免疫分析时,其可有选择性地包括二抗和做标记的底物。进一步,本发明的试剂盒可制成能够包含上述试剂化合物的多个单独的包裹或隔室(compartment)。

[0084] 此外,本发明的用于诊断中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的组合物可以为包含于微阵列的形式。

[0085] 此外,本发明的用于诊断中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的组合物可以为包含于微阵列的形式。

[0086] 在本发明的微阵列中,用于测量所述 FAM19A5 蛋白质或编码该蛋白质的基因的引物、探针或抗体用作可杂交的阵列要素并被固定于底物上。优选底物可包括适当的坚固性或非坚固性支撑物,如膜、过滤器、芯片、幻灯片、晶片、光纤、磁珠或非磁性珠、凝胶、管子、板、聚合物、微粒或毛细管。所述可杂交的阵列要素被排列并固定于所述底物上。这种固定可通过化学结合方法或利用 UV 的共价方法来进行。例如,所述可杂交的阵列要素可与被修饰而包含环氧化物或醛基的玻璃表面进行偶联,或可与利用 UV 的多聚赖氨酸涂层表面进行偶联。此外,所述可杂交的阵列要素可通过接头(如,乙二醇低聚物和二胺)与所述底物进行偶联。

[0087] 同时,当应用于本发明的微阵列的样品为核苷酸时,所述样品可被标记并于所述微阵列上的阵列要素进行杂交。杂交条件可多种多样,而且杂交程度的检测和分析可根据标记物质多样化地进行。

[0088] 此外,本发明提供用于诊断中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的方法,该方法利用了测量所述 FAM19A5 基因或蛋白质的表达水平的方法,更为具体地,所述方法包括:(a) 从疑似患有中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的患者的生物样品中测量 FAM19A5 基因的表达水平或所表达的蛋白质的量;及(b) 从正常对照组样品中测量基因的表达水平或所表达的蛋白质的量,并将其结果与(a) 测量结果进行对比。

[0089] 如上所述的用于测量基因的表达水平或所表达的蛋白质的量的方法可公知技术,其包括从生物样品中分离出 mRNA 或蛋白质的已知过程。

[0090] 所述生物样品是指,从中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的发病或进展程度与正常对照组进行对比时具有不同的基因或蛋白质表达水平的生物体中收集的样品。所述样品的例子可包括组织、细胞、血液、血清、血浆、唾液和尿,但不限于此。

[0091] 当测量所述基因的表达水平时,优选会测量 mRNA 的水平。作为测量 mRNA 的水平的方法可使用 RT-PCR、实时 RT-PCR、核糖核酸酶保护分析法、Northern 印迹法、DNA 芯片等,但不限于此。

[0092] 当测量所述蛋白质水平时,可使用抗体。此时,生物样品中的 FAM19A5 蛋白质和其

特异性抗体可形成结合物 (conjugate), 即抗原-抗体复合物。所形成的抗原-抗体复合物的量可通过由检测标记产生的信号的大小进行定量测定。此检测标记可选自酶、荧光物质、配体、发光物质、微粒、氧化还原分子或放射性同位素, 但不限于此。用于测定蛋白质水平的分析方法包括 Western 印迹法、ELISA、放射免疫分析法、放射免疫扩散法、Ouchterlony 免疫扩散法、火箭免疫电泳、组织免疫染色、免疫沉淀分析法、补体结合分析法、FACS、蛋白质芯片等, 但不限于此。

[0093] 因此, 通过利用所述检测方法, 本发明可确定对照组中表达的 mRNA 或蛋白质的量、以及疑似患有中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的患者中表达的 mRNA 或蛋白质的量。然后, 可互相对比所述结果, 以诊断中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的发病、进展程度等。

[0094] 此外, 在本发明的用于诊断中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的方法中, 当本发明的 FAM19A5 基因的表达水平或所表达的蛋白质的量与所述正常对照组样品相比有增加时, 可判断中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的存在。

[0095] 本发明还涉及用于治疗早期创伤性脑损伤的组合物, 该组合物包含 FAM19A5 (序列同源性 19 家族, 成员 A5)。

[0096] 本发明还涉及 FAM19A5 在制备用于治疗早期创伤性脑损伤的药物组合物中的用途。

[0097] 由于创伤性脑损伤而受伤后形成的初始的反应性星形胶质细胞会分泌能够防止细胞程序化死亡的神经生长因子, 如 GDNF, 并恢复对谷氨酸的收回来保护神经元。此外, 所述星形胶质细胞可通过恢复血脑屏障、隔离发生损伤的部位以及防止健康组织的感染来起到有益作用。

[0098] 由于从神经干细胞中形成的 FAM19A5 会参与到星形胶质细胞的形成, 而非神经元的形成, FAM19A5 可促进脑损伤区域中的星形胶质细胞的形成, 以治疗早期创伤性脑损伤并抑制脑损伤疾病的进展。

[0099] 因此, FAM19A5 可用作用来治疗早期创伤性脑损伤的制剂。

[0100] 本发明的用于治疗早期创伤性脑损伤的组合物可包含天然或重组 FAM19A5 蛋白质、与其具有事实上等等的生理活性的 FAM19A5 蛋白质、能够过度表达 FAM19A5 蛋白质的转基因神经干细胞或从所述神经干细胞中分化出的星形胶质细胞中的至少一种。对其的定义与如上所述的内容相同。所述天然或重组 FAM19A5 蛋白质或与其具有事实上等等的生理活性的 FAM19A5 蛋白质能够促进脑损伤区域中的星形胶质细胞的形成, 以治疗早期创伤性脑损伤。

[0101] 此外, 向脑组织直接注射所述能够过度表达 FAM19A5 蛋白质的转基因神经干细胞, 在脑损伤区域中分泌出 FAM19A5 蛋白质, 以促进星形胶质细胞的形成, 或者促进从转基因神经干细胞到星形胶质细胞的转化, 以治疗早期创伤性脑损伤。此时, 为了促进所述转基因神经干细胞的分化, 可并行给药分化诱导因子。分化诱导因子的种类与如上所述的内容相同。

[0102] 将从神经干细胞分化的星形胶质细胞直接注射到脑组织时, 在脑损伤区域中存在大量的星形胶质细胞, 从而可治疗早期创伤性脑损伤。

[0103] 此外,本发明提供用于治疗动物的早期创伤性脑损伤的方法,其包括:向受试者给药用于治疗早期创伤性脑损伤的组合物,该组合物包含药物有效剂量的 FAM19A5。

[0104] 下面将描述用于治疗早期创伤性脑损伤的药物组合物和在用于治疗早期创伤性脑损伤的方法中用到的给药方法,为了避免使本说明书过于复杂而省略多余的描述。

[0105] 可给药所述用于治疗早期创伤性脑损伤的药物组合物的受试者包括所有动物,如狗、猫和鼠。

[0106] 本发明还涉及用于预防或治疗退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的组合物,该组合物包含 FAM19A5(序列同源性 19 家族,成员 A5) 抑制剂。

[0107] 本发明还涉及 FAM19A5 抑制剂在制备用于预防或治疗退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的药物组合物中的用途。

[0108] 由于 FAM19A5 促进作为胶质细胞之一的星形胶质细胞的形成,在表达出大量胶质细胞的退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病中抑制 FAM19A5mRNA 或蛋白质的表达时,由于 FAM19A5 阻碍而使反应性星形胶质细胞的数量有减少,然而会促进能够表达 NG2(神经元-胶质抗原 2) 的祖细胞的增殖,脑损伤区域附近的神经元的轴突是有髓鞘的,从而 FAM19A5 抑制剂可用来治疗退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病。

[0109] 因此,本发明的用于预防或治疗退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的组合物可包含用来降低 FAM19A5 基因的 mRNA 表达或其蛋白质表达、或者功能或活性的制剂。

[0110] 所述 FAM19A5 蛋白质抑制剂可以为与 FAM19A5 蛋白质相结合并能够调节神经分化通路的信号的肽或化合物。此抑制剂可通过如蛋白质结构分析的以下示例性筛选方法来进行选取,而且可通过利用本领域的公知方法进行设计。

[0111] 此外,所述蛋白质抑制剂可使用相对 FAM19A5 蛋白质的多克隆抗体、单克隆抗体、人抗体和人源化抗体,而且所述抗体的定义与如上所述的内容相同。

[0112] 当通过利用抗体来调节细胞中受体的神经分化通路的信号转导时,可预防或治疗退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病。

[0113] 本发明的 FAM19A5 蛋白质的功能或活性抑制剂可通过脂质体、病毒、基因枪、聚合物、超声波或电击来进行转达,当该转达方法不限于此。

[0114] 所述 FAM19A5 基因可以为能够编码该基因的 DNA 或从其中转录得到的 mRNA。因此,所述基因的抑制剂可以为与所述基因本身相结合来阻止转录、或与从所述基因转录得到的 mRNA 相结合来防止所述 mRNA 的翻译的抑制剂。

[0115] 因此,所述 FAM19A5 基因的抑制剂包括能够抑制 FAM19A5 基因表达的所有抑制剂。例如,这种抑制剂可以为与所述基因相结合的肽、核酸、化合物等。所述抑制剂可通过如基于细胞的筛选的以下示例性筛选方法来进行选取,而且可通过利用本领域的公知方法进行设计。

[0116] 在一个具体实施例中,所述抑制剂可以为 FAM19A5 基因的反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、miRNA 或包含这些的载体。可利用本领域的公知方法来制备这种反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、miRNA 或包含这些的载体。

[0117] 在本发明中,术语“siRNA”是指通过切断靶基因的 mRNA 来诱导 RNA 干扰的双链 RNA 分子,其由与所述靶基因的 mRNA 具有相同序列的正义序列的 RNA 链及具有与其互补序列的反义序列的 RNA 链组成。

[0118] 所述 siRNA 可包含在体外合成的 siRNA 本身或通过其在表达载体中插入能够编码 siRNA 的序列来进行表达的形式。

[0119] 在本发明中,术语“载体”是指包含被插入到能够编码多肽的基因组中的外部 DNA 的基因构建。

[0120] 本发明所涉及的载体为在基因组中插入能够抑制所述基因的核酸序列的载体。例如,载体可包括 DNA 载体、质粒载体、粘粒载体、噬菌体载体、酵母载体或病毒载体。

[0121] 此外,所述反义链具有与所述 FAM19A5 基因、或从其片段中转录得到所有或部分 mRNA 序列互补的序列,并与所述 mRNA 相结合,而抑制所述 FAM19A5 基因或其片段的表达。

[0122] 此外,短发夹 RNAi (shRNAi) 是可利用普通方法通过靶向人或鼠的相同 shRNAi 序列区来制备而成的。

[0123] 此外,除了所述 FAM19A5 抑制剂之外,本发明的用于预防或治疗退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的组合物可进一步包含胚胎神经干细胞或成体神经干细胞。由于所述 FAM19A5 抑制剂能够调节同时使用的神经干细胞的增殖和分化,其可促进有助于组织恢复的神经元的形成,从而对退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的治疗进一步得到改善。

[0124] 本发明还提供用于治疗动物的退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的方法,该方法包括:向受试者给药用于预防或治疗退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的组合物,该组合物包含药物有效剂量的所述 FAM19A5 抑制剂。

[0125] 由于用于治疗早期创伤性脑损伤的药物组合物和在用于治疗退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的方法中用到的给药方法已在上面描述,为了避免使本说明书过于复杂而将省略多余的描述。

[0126] 同时,可给药所述用于预防或治疗退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的药物组合物的受试者可包括所有动物,例如非人的动物,如狗、猫和鼠。

[0127] 此外,本发明的医药组合物可进一步包含药学上可接受的载体 (carrier)。

[0128] 所述药学上可接受的载体 (carrier) 包含在医药领域中常用的载体或媒介物 (vehicle),具体地其包括离子交换树脂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白 (如,人血清白蛋白)、缓冲物质 (如,各种磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾和饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物)、水、盐类或电解质 (如,硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠和锌盐)、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素底物、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚芳酯、蜡、聚乙二醇、羊毛脂等,但不限于此。

[0129] 此外,除了上述化合物之外,本发明的组合物可进一步包含润滑剂、润湿剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂等。

[0130] 在一方面,本发明的组合物可使用用于肠胃外给药的水溶液来制成。优选地,可使用汉克氏溶液、林格氏溶液或如物理缓冲盐溶液的缓冲液。作为水注射悬浮液,可包括能够提高所述悬浮液粘度的底物,如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。

[0131] 本发明的组合物可全身或局部给药,而且可通过利用用于制剂的公知技术来制成适当的剂型。例如,当口服给药所述组合物时,所述组合物可与惰性稀释剂或可食用载体进行混合,并密封在硬的或软的明胶胶囊内,或压成片剂,然后进行给药。在口服给药中,所述活性化合物可与赋形剂进行混合,并以摄入型片剂、含片、锭剂、胶囊剂、酏剂、悬浮剂、糖浆、晶片等的形式进行使用。

[0132] 各种用于注射、胃肠外给药等的剂型可通过本领域中公知技术或常用技术进行制成。由于 FAM19A5 易溶于生理盐水或缓冲液,将 FAM19A5 保存在冷冻干燥状态下,然后在给药前立即将有效剂量的 FAM19A5 以静脉内注射、皮下注射、肌肉注射、腹腔内注射、经皮给药等适当的给药形式在生理盐水或缓冲液中进行制剂。

[0133] 本发明的医药组合物的活性成分的有效剂量是指,预防、抑制或缓解疾病所必要的量。

[0134] 因此,可根据各种因素,如疾病种类、疾病的严重程度、包含于所述组合物中的活性成分和其它组分的种类及含量、制剂种类、患者的年龄、体重、一般健康状况、性别、饮食、给药时间、给药途径、所述组合物的分泌速率、治疗期间以及同时被患者所使用的药品,来调节所述有效剂量。例如,当向成人一天给药一次或多次,而且本发明的抑制剂一天给药一次或多次时,可给药 0.1ng/kg ~ 10g/kg 的化合物、0.1ng/kg ~ 10g/kg 的多肽、蛋白质或抗体、以及 0.01ng/kg ~ 10g/kg 的反义寡核苷酸、siRNA、shRNAi 或 miRNA,但不限于此。

[0135] 本发明还提供用于脑部疾病或中枢神经系统疾病的预防性或治疗性药物的筛选方法,该方法包括:在体外使 FAM19A5(序列同源性 19 家族,成员 A5)基因与候选物质进行接触,并且判断所述候选物质能否促进或抑制所述基因的表达。

[0136] 本发明还提供用于脑部疾病或中枢神经系统疾病的预防性或治疗性药物的筛选方法,该方法包括:在体外使 FAM19A5(序列同源性 19 家族,成员 A5)蛋白质与候选物质进行接触,并且判断所述候选物质能否提高或抑制所述蛋白质的功能或活性。

[0137] 根据本发明的筛选方法,首先,将待分析的候选物质与包含所述基因或蛋白质的脑部疾病或中枢神经系统疾病的细胞进行接触。

[0138] 根据传统的选取方法,所述候选物质可包含,能够促进或抑制在 FAM19A5 基因序列中转录成 mRNA 和翻译成蛋白质的物质、被推测具有能够促进或抑制 FAM19A5 蛋白质的功能或活性的医学上应用的可能性的物质、或随机选取的单个的核酸、蛋白质、肽、其它提取物、天然产物、化合物等。

[0139] 然后,在处理候选物质的细胞中可测量基因表达的量、蛋白质的量或蛋白质的活性。在所测结果中,当测到基因表达的量、蛋白质的量或蛋白质的活性有增加或降低时,可判断所述候选物质为能够治疗或预防脑部疾病或中枢神经系统疾病的物质。

[0140] 在如上所述中,可通过各种本领域内公知的方法对所述基因表达的量、蛋白质的量或蛋白质的活性进行测量,如 RT-PCR、实时聚合酶链反应、Western 印迹法、Northern 印迹法、酶联免疫吸附试验(ELISA)、放射免疫分析(RIA)、放射免疫扩散法、免疫沉淀法等,但不限于此。

[0141] 通过本发明的筛选方法,可获得展示出能够促进基因表达或促进蛋白质功能的候选物质、以及反之展示出能够抑制基因表达或抑制蛋白质功能的候选物质。前者可以为用于早期创伤性脑损伤的治疗制剂。后者可以为用于退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的治疗制剂。

[0142] 用于退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的治疗制剂候选物质可在后期的用于退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的治疗制剂的研发过程中起到主导化合物的作用。当对所述主导化合物的结构进行变形和最优化以促进或抑制 FAM19A5 基因或从其中表达出的蛋白质的功能时,可研发出一种新型的用于退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的治疗

制剂。

[0143] 在本发明中,与基因工程技术有关的内容可从 Sambrook(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)) and Frederick(Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume1, 2, 3, John Wiley&Sons, Inc. (1994))一书所公开的内容中得到清晰的理解。

[0144] 实施例

本发明的优势和特点及达到这些的方法将根据具体说明的实施例而得到清晰的理解。然而,本发明不受以下所公开的实施例的限制,然而可以不同形式进行实现。所述实施例仅用来完整地公开本发明并向本领域的技术人员完整地告知本发明的范围,而且本发明由所附的权利要求所限定。

[0145] <实施例 1> 通过利用生物信息学发现的新型分泌性 FAM19A5 肽

通过生物信息学方法模型(bioinformatics approach model),进行FAM19A5基因筛选作业。本发明人从Ensembl(<http://www.ensembl.org/index.html>)和UniprotKB(<http://www.uniprot.org/uniprot>)上下载了约 50,000 种人基因组基因的开放阅读框架(open reading frames, ORFs)。为了识别其中是否存在具有可能为生理活性肽的基因,用 Signal P3.0 程序在约 2,000 种从细胞分泌出来的基因(分泌蛋白质组)中进行筛选。基于UniprotKB 信息,分析经筛选的 ORFs。其结果显示,约 600 种 ORFs 确认为能够编码肽的基因(peptidome)。其中,560 种基因的功能已被知晓,然而余下 40 种基因,还尚未发现其功能,而且其可编码新的肽。

[0146] 其中,在包括人在内的各种脊椎动物中发现了 FAM19A5 基因。FAM19A5 包含能够编码作为信号向细胞外分泌的具有氨基端的典型信号肽的基因序列,紧接着包含成熟 FAM19A5 的氨基酸序列。尤其,与其他种类相比, FAM19A5 蛋白质的氨基酸序列保存完好(图 1A)。上述比较基因组分析方法被认为是能够验证新发现的新型基因是否具有实质性功能的可信的实验模型【Robbins, J Comput Biol 3:465-478, 1996】。同时,根据现有技术文献的结果,在有一篇论文中确认了在患有老年痴呆症的脑组织中大量表达 CC 趋化因子基因并分析了作为 CC 趋化因子家族基因的 MIP-1 α 能够增殖胶质细胞并恶化退行性脑部基因的经验证的机制,然而系统发育树(图 1B)展示了, FAM19A 家族基因形成与所述 CC 趋化因子家族基因完全不同的分支【MengQi Dia et al., American Journal of Pathology, 1998】。

[0147] <实施例 2> 通过反转录聚合酶链反应(RT-PCR)验证各种组织中 FAM19A5 基因表达

从 Daehan Bio Link 株式会社(<http://www.dhbiolink.com>)购买 6 周龄黑色雄性小鼠(C57BL/6, 小鼠)。购买的小鼠在鼠笼里进行饲养,在该鼠笼内有供应适当的食物和水,温度维持在 20 ~ 24℃,湿度保持在 40 ~ 70%。此外,在 12/12 光暗周期(上午八点开灯,下午八点关灯)内保管这些野生型的小鼠。所有实验被设计成均使用最少数量的小鼠,根据动物实验伦理,实施了麻醉方法,以最大程度降低实验中所用的小鼠的痛苦,而且此项已被高丽大学的动物管理和使用委员会所核准(KUIACUC-08)。

[0148] 从小鼠中提取每个对应组织中所有 RNA,然后通过使用逆转录酶和随机六聚体来

制备互补 DNA (cDNA)。随后,通过利用相应的引物进行聚合酶链反应 (PCR),并观察小鼠组织的 mRNA 分布。将 PCR 中所用的引物的信息列在表 1 中。

[0149] 如图 2 所示,除了 FAM19A3 基因外,所有类型的 FAM19A 家族基因均进行脑特异性表达。此外,甚至在早期发育阶段也观察到 FAM19A 家族基因的表达。

[0150] 【表 1】

靶基因	引物序列	PCR 产物 大小 (bps)	位点	编号
FAM19A1	up: ATG GCA ATG GTC TCT GCA down: TTA GGT TCT TGG GTG AAT	402	437-838	NM 182808
FAM19A2	up: ATG ATC ACC AAG ATG AAT down: TTA ATG GGT TAC CCT AGT TG	408	1668- 2075	NM 182807
FAM19A3	up: ATG CAG AGG CCC ACC AGC down: TTA CCG TGT GAC CTT GGT G	399	590-988	NM 183224
FAM19A4	up: ATG AGA GTC TGT GCT AAG T down: CTA CCG GGT CAC CTT GGT	408	423-830	NM 177233
FAM19A5	up: ATG CAG CTC CTG AAG CCG CT down: TCA GGA GAC GGT GGT GGT CT	378	167-544	NM 134096

< 实施例 3> 通过原位杂交的每个发育阶段验证 FAM19A5 基因表达

为了确定在发育过程中大脑皮层中的 FAM19A 家族基因的表达模式,利用原位杂交来对比 mRNA 的量。用与上述方法相同的方式管理 Wistar 大鼠。处死 (断头) 了出生前胚胎期 14 (E14)、出生后过 21 天的大鼠而从其颅骨中取得脑。由于出生前的大鼠比起作为其他类型实验大鼠的小鼠具有更大体型,在所述实验中所述大鼠便于处理而被用来对比每个发育阶段的 FAM19A5 基因表达。

[0151] 提取的脑移至并冷冻在干冰上的异戊烷溶液中。将冷冻脑组织以 12 μ m 进行切片,贴 (解冻放置) 于涂有 TESPA (Sigma-Aldrich Co., Llc., St. Louis, MO, USA) 的载玻片上,然后在包含 4% 多聚甲醛的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中进行固定。然后,通过使用包含 0.25% 乙酸酐的 0.1M 的三乙醇胺 / 0.9% NaCl (pH 8.0) 中进行乙酰化反应。然后,使用乙醇和氯仿溶液来进行脱水和脱脂过程,随后在空气中干燥。同时,在 55℃ 下利用 35S 标记的探针对切片组织进行杂交,而后在常温下用 2×SSC 溶液清洗。用 RNA 降解酶 (RNA 酶) 处理所述片,然后在常温下依次用包含 1mM 二硫苏糖醇的 2×SSC、1×SSC、0.5×SSC、0.1×SSC 溶液清洗所述片,各清洗十分钟。最后,将所述组织切片进行脱水并在空气中干燥,然后将包含脑组织切片的载玻片暴露于 X 射线片 (Biomax MR, Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA)。

[0152] 同时,为了生成探针,从成年大鼠的大脑皮层中提取所有 RNA,通过利用逆转录酶和随机六聚体引物来制备 cDNA,然后进行 T 载体 (Promega Corp., Madison, WI, USA) 的克隆。将 PCR 中所用的引物的信息列在表 2 中。将克隆 T 载体用作模板,用 [35S] UTP (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA) 执行体外转录体系 (Promega Corp., Madison, WI, USA),然后纯化生成放射性标记的反义核糖核酸探针,用于

本杂交反应中。

[0153] 【表 2】

靶基因	引物序列	PCR 产物大小 (bps)	位点	编号
FAM19A5	up: ATG CAG CTC CTG AAG GCCdown: TCA GGA GAC CGT GGT CGT	399	13-411	NM 001191991

从嗅球所在的嘴侧至小脑所在尾侧,沿整体冠状面和矢状面,来扫描所述小鼠脑的解剖平面。

[0154] 如图 3 所示,在 FAM19A 家族基因的 mRNA 表达中,只有 FAM19A5mRNA 强分布于脑室区和脊髓中。在出生前胚胎期第 14 天 (E14) 和 16 天 (E16) 时, FAM19A5 仅仅强分布于脑室区中。在胚胎期第 18 天 (E18) 时,脑室区和脑室下区中的 FAM19A5 的表达仍高,而在包含分化的神经元的皮质板中 FAM19A5 的表达则低得多。

[0155] FAM19A5 在已知有神经干细胞群分布的中枢神经系统中的两个区域内强表达。这表明, FAM19A5 蛋白质对完整的中枢神经系统的形成起重要作用,而且能够首次证明, FAM19A5 蛋白质可参与组成中枢神经系统的神经元和胶质细胞的形成当中。

[0156] < 实施例 4>FAM19A5 特异性抗体的制备

为了制备能够特异性地识别 FAM19A5 蛋白的抗体,将短的合成 FAM19A5 接种于兔子上以获得多克隆抗体。在 HEK293T 细胞中过度表达的 FAM19A 家族基因中,所述抗体只能特异性地识别 FAM19A5 (图 4A)。此外,当用 N-糖苷酶 F 处理后,作为 FAM19A5 的成熟蛋白质的 20kDa 带会消失掉,由此确认其为 N-糖基化形式 (图 4B)。此外,通过利用免疫细胞化学来观察,每个抗体可特异性地识别能够表达 FAM19A5 (His 标记) 的 HEK293T 细胞 (图 4C)。

[0157] < 实施例 5> 通过免疫组织化学的发育过程测量 FAM19A5 蛋白质表达

这里使用免疫组织化学法,以确认翻译后的 FAM19A5 蛋白质表达模式是否类似。用与上述方法相同的方式管理小鼠。处死出生前胚胎期为第 12 天 (E12) ~ 第 18 天 (E18) 的小鼠而从其颅骨中取得脑。在含有 4% 多聚甲醛的磷酸盐缓冲液中固定 (后固定) 24 ~ 48 小时,然后用含有 30% 蔗糖的磷酸盐缓冲液处理 24 小时。然后,将所述脑置于用于脑组织的模具中,其中加入含有 30% 糖溶液的 OCT 复合物并在干冰上进行冷冻,使用前在 -80℃ 下进行保存。

[0158] 为了通过免疫组织化学确认小鼠脑中的 FAM19A5 蛋白质表达的区域和强度,使用了实施例 4 中所制备的多克隆抗体作为可与所述 FAM19A5 蛋白质反应的抗体,即 anti-FAM19A5。使用恒冷超薄切片机将小鼠的冷冻脑组织切片成 40 μm 厚度。用 PBS 溶液清洗脑组织切片 30 分钟,然后用含有 10% 血清氯化物的 PBS-T 溶液 (在磷酸盐缓冲液中含有 10% TritonX-100 的溶液) 进行封闭一个小时。如最终的荧光图像所示,为了避免邻近的非特异性抗原-抗体反应并准确区分 FAM19A5 特异性表达区域,将 FAM19A5 抗体与封闭溶液之比设成 1:500。FAM19A5 抗体与抗原在 4℃ 下过夜反应或在常温 (25℃) 下反应约 3 小时。待一抗-抗原反应结束后,用磷酸盐缓冲液清洗所述脑组织切片 3 次,每次 10 分钟。然后,以 1:500 比例稀释作为二抗的与 FITC 结合的兔抗 IgG (Invitrogen, USA) 后进行使用。待完成二抗-抗原反应后,用磷酸盐缓冲液清洗所述脑组织切片 3 次,每次 10 分钟,

而后将所述组织平整地放置在载玻片上。在常温下干燥所述组织 5 分钟,将 crystal/mount 溶液 (Biomeda Corp., USA) 涂在所述组织上,而后用盖玻片盖住来制备标本。通过利用共聚焦显微镜 (Zeiss LSM 510confocal microscopy) 来观察所制备标本的荧光图像。

[0159] 神经干细胞或神经祖细胞具有称为巢蛋白的中间丝蛋白,则将巢蛋白用作标记【Lendahl et al., Cell 60:585-595, 1990】。在早期发育阶段,观察到在神经管形成前,巢蛋白已在神经板中进行过表达【Woodbury et al., J Neurosci Res 61:364-370, 2000】。由于成神经细胞具有微管相关蛋白双皮质素 (DCX),将 DCX 用作标记。巢蛋白和 DCX 使用了经 1:500 比例稀释的、有结合 CY3 的抗小鼠和山羊 IgG (Invitrogen, USA) 作为二抗。

[0160] 如图 5 所示,有趣的是,如同使用原位杂交的实验结果,即使在蛋白质水平上, FAM19A5 蛋白质在脑室区内的表达也强。胚胎期第 12 天 (E12) 为正处于分裂的祖细胞主要分布于脑室区的期间,在该期间内, FAM19A5 肽主要地在整个脑室区内进行表达,而且在胚胎期第 14 天 (E14) 和第 18 天 (E18) 内仍进行高表达。在皮质板内的表达量与使用原位杂交的实验结果相比更低。在包含巢蛋白的祖细胞中, FAM19A5 蛋白质展示出点状形态。在包含 DCX 的成神经细胞成神经细胞中,展示出弱表达。在一些基因中,由于转录或翻译后的制备步骤,蛋白质表达与 mRNA 表达的水平可不相同【Wellington et al., Lab Invest 82:273-283, 2002】,然而在本发明中展示出相同的表达模式。

[0161] 除了实施例 3 的结果外,实施例 5 的结果说明在发育过程中脑组织中的 FAM19A5 蛋白质的鉴定、表达位点、表达水平或表达强度。认为, FAM19A5 会在组成中枢神经系统的神经干细胞内进行表达,而且会参与到神经元和胶质细胞的表达中。

[0162] < 实施例 6> 通过免疫组织化学的成体神经干细胞测量 FAM19A5 蛋白质表达

与出生前小鼠类似,通过免疫组织化学确认在成年小鼠的脑中 FAM19A5 蛋白质表达的区域和强度。

[0163] 因此,向以上述方法管理的 4 周龄雄性小鼠腹腔注射 0.5cc/100g 聚氨酯来进行麻醉,切割胸部,将 Ringer 针插进左边心室,用 0.9% 食盐水 (200mL) 排气,然后用含有 4% 多聚甲醛的 0.9% 食盐水 (200mL) 对所述心室进行灌流,并固定。提取所固定的小鼠脑,用含有 4% 多聚甲醛的磷酸盐缓冲液固定 24 ~ 48 小时,然后用含有 30% 糖的磷酸盐缓冲液处理约 24 小时。然后,将所述脑置于用于脑组织的模具中,其中加入含有 30% 糖溶液的 OCT 复合物,并在干冰上进行冷冻,使用前在 -80℃ 下进行保存。与出生前小鼠类似,为了确认通过免疫组织化学的成年小鼠的脑中 FAM19A5 蛋白质表达的区域和强度,使用 FAM19A5 抗体。此外,由于成体神经干细胞 (室管膜细胞和星形胶质细胞) 具有叫作胶质纤维酸性蛋白 (GFAP, Invitrogen, USA) 的中间丝蛋白,将 GFAP 用作标记。

[0164] 如图 6A 所述,与发育阶段的实验结果类似,在已知分布有成体神经干细胞群的脑室下区 (SVZ) 中, FAM19A5 的表达程度高。

[0165] 因此,结论为,比起成神经细胞,在神经干细胞中的 FAM19A5 表达更高。

[0166] 由此可测定 FAM19A5 的蛋白质量在分化条件下是否会下降。为此,针对 SVZ-RMS-OB 带进行实验。

[0167] 脑室下区 (SVZ) 中的成神经细胞通过嘴侧迁移流 (RMS) 迁移至嗅球 (OB),然后最终分化成成熟的中间神经元。由于 SVZ-RMS 中的 FAM19A5 表达高于 OB 中的 FAM19A5 表达,可认为蛋白质的量在分化过程中降低 (图 6B)。

[0168] < 实施例 7> 从成体神经干细胞中发育的神经球中对 FAM19A5 表达的测量

由于神经干细胞连续增殖技术的提高,因此可以形成从神经干细胞发育而成的称为神经球的细胞团。在各种实验中会用到此项技术,而且被当作是能反向追踪神经干细胞特性的有用的实验模型【Reynolds and Weiss, Science 255:1707-1710, 1992; Reynolds and Weiss, Dev Biol 275:1-13, 1996】。

[0169] 为了获得成体神经干细胞,从 3 周~8 周龄雄性小鼠中取出脑。可使用脑模具 (brain matrices),以分离出已知具有成体神经干细胞群的脑室下区。通过使用如分散酶 (Invitrogen, USA) 和木瓜蛋白酶 (Worthington Biochemical Corp., USA) 的蛋白酶来使组织解离成单个细胞。在培养液中添加如表皮生长因子 (EGF, Invitrogen) 和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF, Invitrogen) 的生长因子,从而有选择地增殖细胞而形成神经球。除了成体神经干细胞,从胚胎期为 12 (E12) 的出生前小鼠脑中分离出大脑皮层,并以相同方法有选择地培养胚胎神经干细胞来获得神经球。

[0170] 通过使用层粘连蛋白 (Invitrogen, USA) 为细胞粘附蛋白,将由成体神经干细胞组成的神经球和由胚胎神经干细胞组成的神经球固定在培养平板上,然后以免疫细胞化学法来测定 FAM19A5 蛋白质是否表达。在含有 4% 多聚甲醛的磷酸盐缓冲液中固定所获物 15 分钟,然后用 PBS-T 溶液 (在磷酸盐缓冲液中包含 0.5% TritonX-100 的溶液) 进行透化处理 5 分钟。待封闭处理 30 分钟后,进行抗原-抗体反应,然后使用 dapi 染色来观察细胞核。

[0171] FAM19A5 蛋白质在大多数的神经球中表达。由于所述蛋白质为分泌性蛋白质,在细胞质中所述蛋白质被染成点状形态 (图 7)。

[0172] 此外,为了知道表达 FAM19A5 蛋白质的细胞的特性,用各种神经干细胞标记同时对神经球进行染色。

[0173] 由此,表达 FAM19A5 蛋白质的细胞可同时表达出巢蛋白 (图 8A)。这表明,从神经干细胞中获得的神经球可用作研究 FAM19A5 的良好实验模型。

[0174] 此外,为了验证神经球中的 FAM19A5 基因表达是否强过相同家族的其他类型的基因表达,从成体神经干细胞中发育的神经球中提取所有的 RNA。然后,通过使用逆转录酶和随机六聚体来制备 cDNA。通过利用相应的引物进行 PCR,并观察神经球中 FAM19A5 mRNA 的分布。将 PCR 中所用的引物的信息列在表 1 中。

[0175] 如图 8B 所示, FAM19A 家族基因中的 FAM19A5 mRNA 较其他类型分布得显著更多。

[0176] 除了 RT-PCR, 利用微阵列对比 FAM19A 家族基因的表达程度。根据 Affymetrix, Inc. (www.affymetrix.com) 提供的基础实验方案进行制备 cDNA 和标记 cRNA 及与 Affymetrix MOE430v2.0 GeneChip (46k probe-sets) 的杂交反应。为了便于分析,在 cDNA 合成中使用了荧光标记,而且为了对表达量进行统计学分析,使用了 ChipInspector 软件 (Genomatix Software GmbH)。

[0177] 如图 8C 所示,与 RT-PCR 中的结果类似, FAM19A5 基因的表达量较其他类型基因的表达量显著更高。此外,正态化之后的水平为 4~14。考虑到水平 10 或以上的基因分布甚少,该结果表明 FAM19A5 为一种在神经球内具有强表达的基因。

[0178] 实施例 6 和实施例 7 的结果强烈暗示, FAM19A5 可以是在成体神经干细胞和胚胎神经干细胞的功能中或所述细胞向其他类型细胞分化的过程中起重要作用的物质。

[0179] <实施例 8> 抗体针对 FAM19A5 的中和作用后根据分析神经元和胶质细胞的特异性标记的所生成的星形胶质细胞的数值变化

为了确认从神经干细胞形成并分泌的 FAM19A5 蛋白质是否会影响从其中分化出的细胞的形成,使用了 FAM19A5 特异性抗体。

[0180] 为了进行分化测试,通过利用 Accutase(Innovative Cell Technologies Inc.,USA) 将神经球解离成单个细胞。在 24 孔板中每孔加入 50,000 个细胞并在含有生长因子的培养液中放置一天以使之稳定。第二天,将所述溶液更换成含有能够促进分化的因子的分化培养溶液。诱导分化 6 天,同时每天添加 FAM19A5 抗体 (500ng/mL) 来进行处理。通过使用三种类型的神经系统细胞(神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞)的标记,来进行免疫印迹法(Western blotting)和免疫细胞化学法。

[0181] 如图 9 所示,有趣的是,在使用相应的能够诱导 FAM19A5 蛋白质的中和作用的抗体的实验组中,Tuj1 标记的神经元的数量较用正常 Rb IgG 处理的对照组提高了约两倍,而标有 GFAP 的星形胶质细胞的数量相应减少。

[0182] 由此可认为,在从干细胞到其他类型细胞的分化过程中 FAM19A5 蛋白质可作为功能性分子,尤其是,可参与促进星形胶质细胞的形成。

[0183] <实施例 9>FAM19A5 肽和特异性抗体对神经干细胞增殖的影响

为了确认从神经干细胞形成并分泌的 FAM19A5 蛋白质是否影响增殖,使用了 FAM19A5 的肽和特异性抗体。为了进行增殖实验,将神经球解离成单个细胞。在 24 孔板中每孔加入 50,000 个细胞,并用肽或抗体来处理含有生长因子的培养液。用所述生长因子诱导增殖 6 天,同时每天以 500ng/mL 的 FAM19A5 肽和特异性抗体来进行处理。在最后一天,将形成的神经球解离成单个细胞,并测量细胞数。

[0184] 如图 10 所示,可发现,由于 FAM19A5 肽的存在,神经干细胞的增殖较对照组明显下降,而且当添加所述特异性抗体来进行处理时,增殖有增加。

[0185] <实施例 10> 创伤性脑损伤(TBI)小鼠模型中 FAM19A5 蛋白质的量变

为了确认在脑损伤后 FAM19A5 蛋白质的量是否变化,这里使用了创伤性脑损伤模型。固定 8 周龄小鼠的头部,然后将经液氮充分冷却的铁棒置于颅骨右侧一分钟。通过手术将小鼠的皮肤缝合,然后以与正常小鼠相同的方式管理所述小鼠 7 天【Moon et al., Neuro report22:304-308】。

[0186] 待 7 天后,腹腔麻醉所述小鼠,切开胸部,将 Ringer 氏针插进左边心室,用 0.9% 食盐水(200mL) 排水,然后用含有 4%多聚甲醛的 0.9%食盐水(200mL) 对所述心室进行灌流,并固定该心室。提取被固定小鼠的脑,用含有 4%多聚甲醛的磷酸盐缓冲液固定 24 ~ 48 小时,然后用含有 30%糖的磷酸盐缓冲液处理约 24 小时。然后,将所述脑置于用于脑组织的模具上,在干冰上以含有 30%糖溶液的 OCT 复合物进行冷冻,在 -80℃ 下进行保存直至使用。使用恒冷超薄切片机,将小鼠的冷冻脑组织切成 40 μ m 厚度切片,然后进行免疫组织化学分析。

[0187] 当受到外部伤害时,成熟星形胶质细胞通过逆分化过程成为放射状胶质细胞。这些种类的细胞能够表达出被叫作巢蛋白的祖细胞标记,而且在其位点上能够形成胶质细胞。

[0188] 如图 11A 所示,可观察到在受损区域(半暗带)内表达 FAM19A5 的细胞数量有明

显上升。所述受损区域内的放射状胶质细胞能够表达作为标记的巢蛋白,而且同时能够表达 FAM19A5,而且蛋白质的量较未受损的对照组有明显增加。

[0189] 此外,虽比例非常低,从脑室下区通过胼胝体(CC)迁移至脑部受损区域的成神经细胞没有表达 FAM19A5 肽。除了所述受损区域外,在神经干细胞群所在的脑室下区的周边地区中,表达 FAM19A5 蛋白质的细胞数量有增加,而且这些还同时表达作为星形胶质细胞标记的 GFAP。由此认为,与神经元的形成相比,从神经干细胞中形成的 FAM19A5 肽会更有可能参与到星形胶质细胞的形成当中。

[0190] 同时,当脑部受伤后血脑屏障受损时,作为分泌性因子的 FAM19A5 有可能会渗进血液中。此时,通过测定有无表达或表达程度,可研发出能够测定脑部受损疾病或脑部疾病的发病、进展和缓解的诊断标记。为了知道其可能性,从正常小鼠和脑部受伤 7 天后被认为 FAM19A5 表达最高的小鼠中获取血液并使之凝结。然后,仅分离血清并进行放射免疫分析。

[0191] 利用标准曲线测量血清中蛋白质量。结果,令人惊讶的是,在脑部受损 7 天后小鼠的血清内检测到的 FAM19A5 蛋白质是正常细胞的 7 倍或以上(图 11B)。

[0192] <实施例 11> 创伤性脑损伤(TBI)后 FAM19A5 蛋白质随时间的量变

仅在能够表达 GFAP 的反应性星形胶质细胞中,观察到创伤性脑损伤(TBI)后 FAM19A5 蛋白质随时间的量变。

[0193] 如图 12 所示,经测定,受伤 3 天后,用 GFAP 标记的星形胶质细胞中的 FAM19A5 表达较弱,5 天后表达开始增长,而且持续增长 7 天。

[0194] <实施例 12> 测量肌萎缩侧索硬化症(ALS)中展示出的 FAM19A5 蛋白质的数量增长

在 ALS 模型动物 mSOD1G93A Tg 小鼠中,对处于表现 ALS 症状的期间的组织进行免疫组化分析。如图 13A 所示,结果展示了,与同龄小鼠相比,在 mSOD1G93A 小鼠的脊髓中,FAM19A5 表达增长至很高水平。在腹角中强烈观察到这种表达增长,而在腹角中由于 ALS 的分布而尤为使运动神经元退化死亡。在此期间,在 mSOD1G93A 小鼠的脊髓中可观察到胶质细胞的增殖。这种病理改性过程通过 GFAP 双染也可发现。底部的放大照片为 mSOD1G93A 小鼠的腹角的高倍率图像。

[0195] 可以知道,大多数用 GFAP 标记的胶质细胞展示出高水平的 FAM19A5 表达。同时,认为分布在照片中央的细胞(箭头指示)是退行性运动神经元,因为这些细胞具有圆形细胞核且未被 GFAP 染色。甚至此时,还能观察到较强的 FAM19A5 表达。通过 Hoechst 染色,用蓝色荧光对细胞核进行反标(counter-label)。

[0196] 此外,通过免疫印迹法观察表达的变化。结果显示,与野生型(WT)小鼠相比,ALS 模型小鼠(TG)脊髓中的 FAM19A5 表达增长至很高水平(图 13B)。

[0197] 以与实施例 10 相同的方式进行放射免疫分析。结果显示,ALS 模型小鼠的血清中的 FAM19A5 蛋白质的量是普通小鼠的 3 倍或以上(图 13C)。

[0198] 在包括创伤性脑损伤的脑损伤模型和包括肌萎缩侧索硬化症的脊髓损伤疾病模型中检测到 FAM19A5,因此可以研发 FAM19A5 成为中枢神经系统损伤的标记物质。

[0199] <实施例 13> 创伤性脑损伤(TBI)后经 FAM19A5 抗体处理的反应性星形细胞增生的延迟效果

为了确认在诱导脑损伤后表达增加的 FAM19A5 蛋白质的功能,诱导损伤的第二天向小

鼠尾部的静脉中注射 FAM19A5 抗体。可认为,当发生创伤性脑损伤时,会破坏受损区域周边的血脑屏障,从而抗体可能进入周围脑组织。

[0200] 只有当注射 FAM19A5 抗体,才能观察到由二抗引起的荧光信号(图 14)。

[0201] 受伤后第二天注射抗体。从诱导损伤的那天起经过 3、5 和 7 天后,通过利用各种细胞标记来观察各种变化。

[0202] 如图 15 所示,经过 3 天后,与注射了正常兔 IgG 的对照组相比,在注射了 FAM19A5 抗体的小鼠模型中,受损组织附近表达 GFAP 的反应性星形胶质细胞的形成受到了抑制。这种现象在经过 5 天之后更加明显,甚至经过 7 天后还能微弱维持。因此,可认为,通过抗体抑制分泌 FAM19A5 会影响周围细胞,尤其是延迟受损后出现的反应性星形细胞增生。

[0203] 同时,受损后形成的反应性星形胶质细胞会分泌能够防止细胞程序性死亡的生长因子,如 GDNF,同时起到吸收谷氨酸的作用,因此,对减少神经元周围的有毒环境起到积极作用。因此,进行 TUNEL 染色根据 FAM19A5 抗体来测定反应性星形细胞增生的延迟是否会对保护神经元的功能产生负面影响。

[0204] 如图 16 所示,经测定,表达作为神经元标记的 NeuN 的细胞没有同时被 TUNEL 染色,从反应性星形胶质细胞的损失没有杀死神经元。

[0205] 根据实施例 10,创伤性脑损伤后从受损区域形成的反应性星形胶质细胞强烈地表达 FAM19A5 蛋白质。基于该结果,在创伤性脑损伤后经 FAM19A5 抗体处理的小鼠模型中,测定了表达 FAM19A5 蛋白质的反应性星形胶质细胞的位置。

[0206] 如预测的那样,可观察到,在注射了 FAM19A5 抗体的受损模型中,表达 FAM19A5 蛋白质的星形胶质细胞所处的位置较对照组与所述受损区域相对分离。

[0207] <实施例 14> 创伤性脑损伤(TBI)后由 FAM19A5 抗体处理所知的少突胶质祖细胞的数值下降。

[0208] 通过利用上述相同的实验方法,用各种类型的胶质细胞标记进行染色,以确认 FAM19A5 抗体是否影响各种类型的胶质细胞的形成。

[0209] 脑损伤后经过 5 天时,在受损区域中表达神经元-胶质细胞抗原 2(NG2)的少突胶质祖细胞的数量下降(图 18A)。

[0210] 同时,由于已知在受损脑组织中分裂的 NG2 细胞可成为能够形成成熟髓鞘的少突胶质细胞,用髓鞘碱性蛋白(MBP)标记的成熟少突胶质细胞进行观察,发现其数量也有下降(图 18B)。

[0211] 因此,脑损伤后出现的 FAM19A5 的活化能够促进 NG2 祖细胞的增殖,而且认为可其参与周围神经元轴突的髓鞘化。

[0212] 工业应用性

本发明的 FAM19A5 或其抑制剂可用作干细胞增殖或分化的调节剂、以及用于中枢神经系统损伤、退行性脑部疾病或中枢神经系统疾病的诊断试剂盒、芯片或将治疗剂。

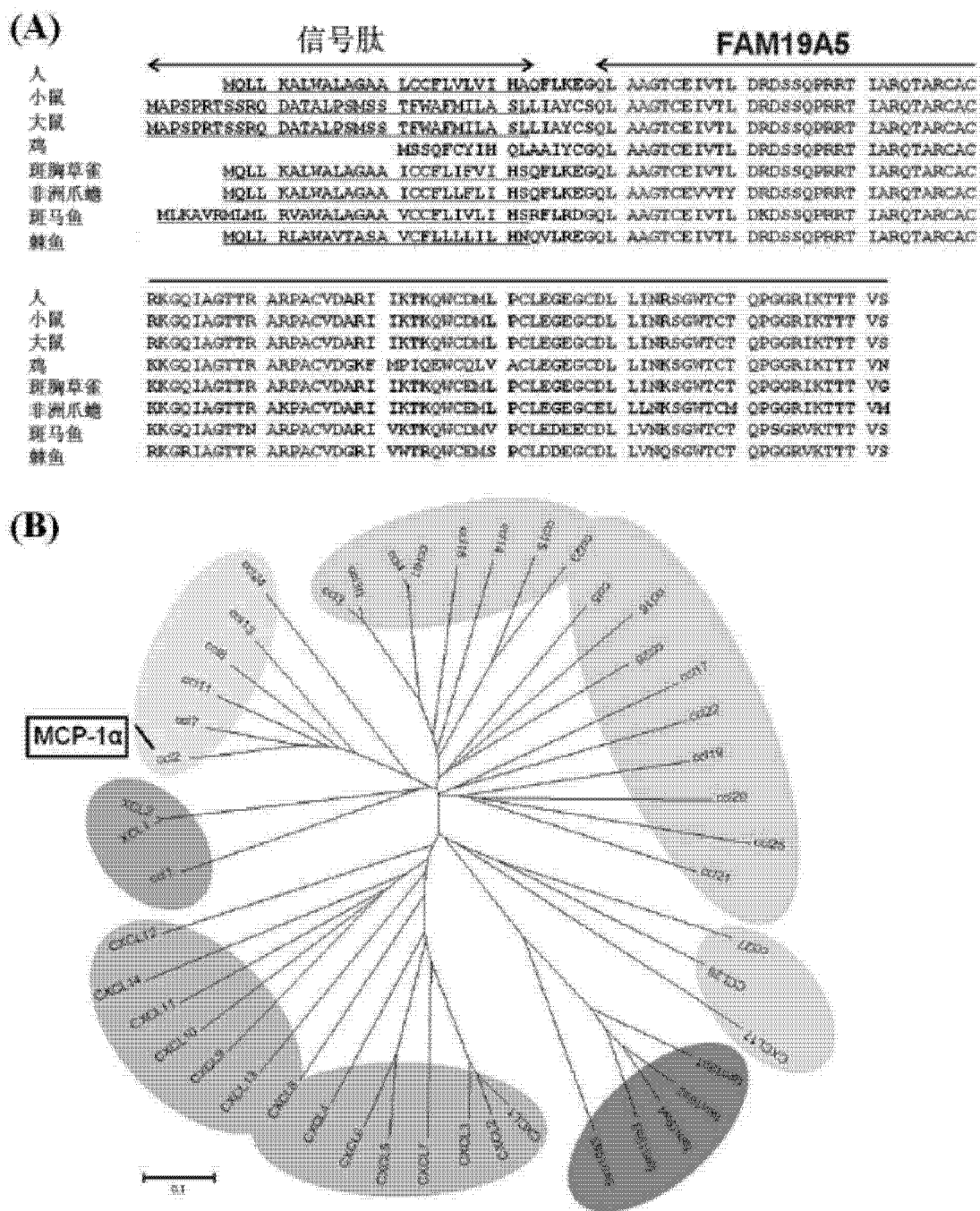


图 1

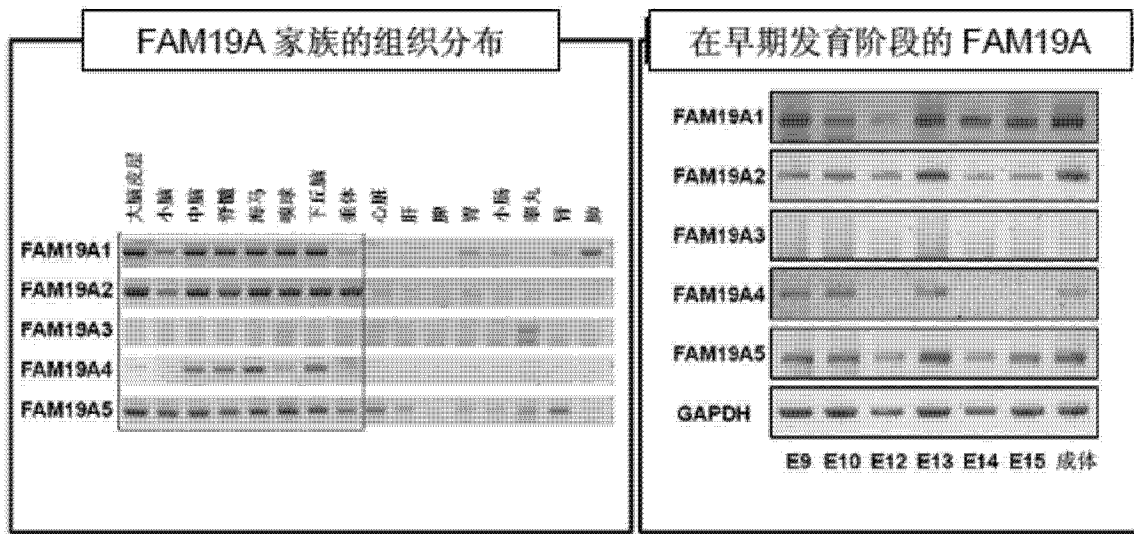


图 2

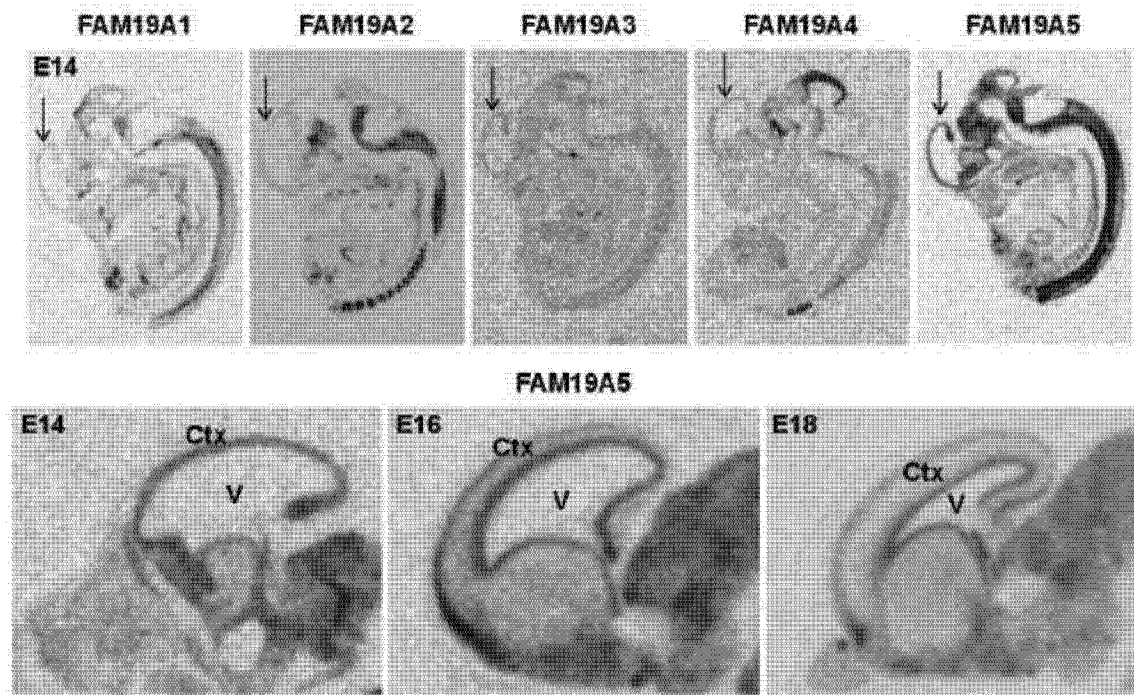
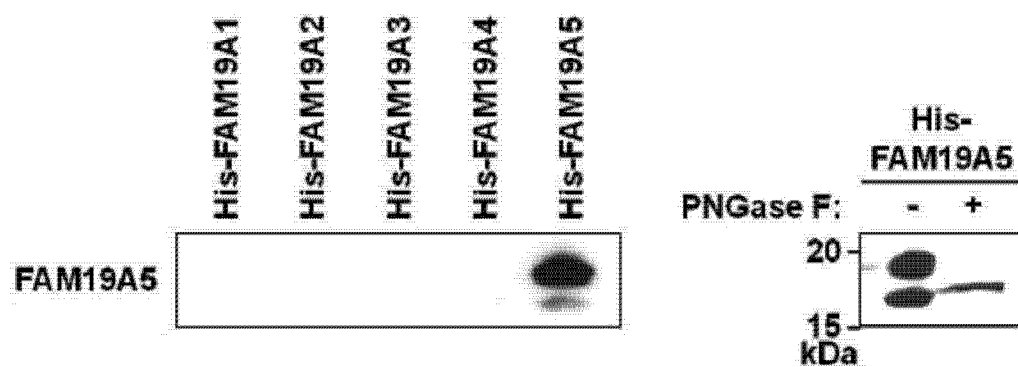


图 3

(A) Western 印迹



(B) 免疫细胞化学

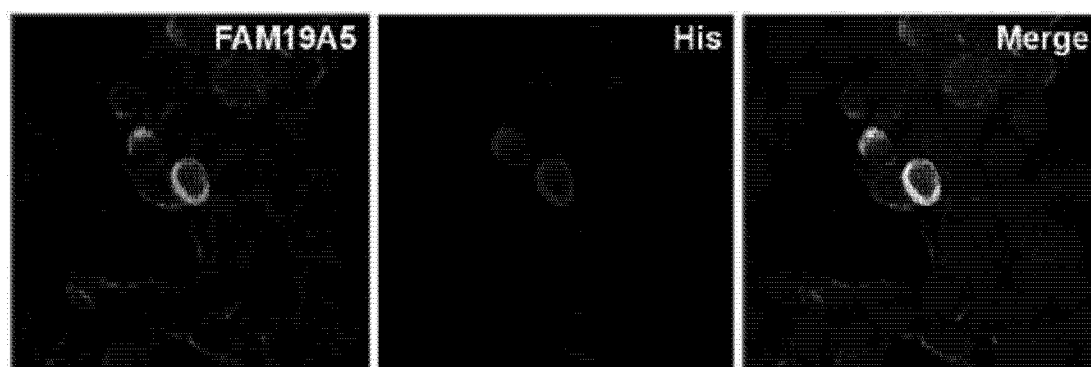


图 4

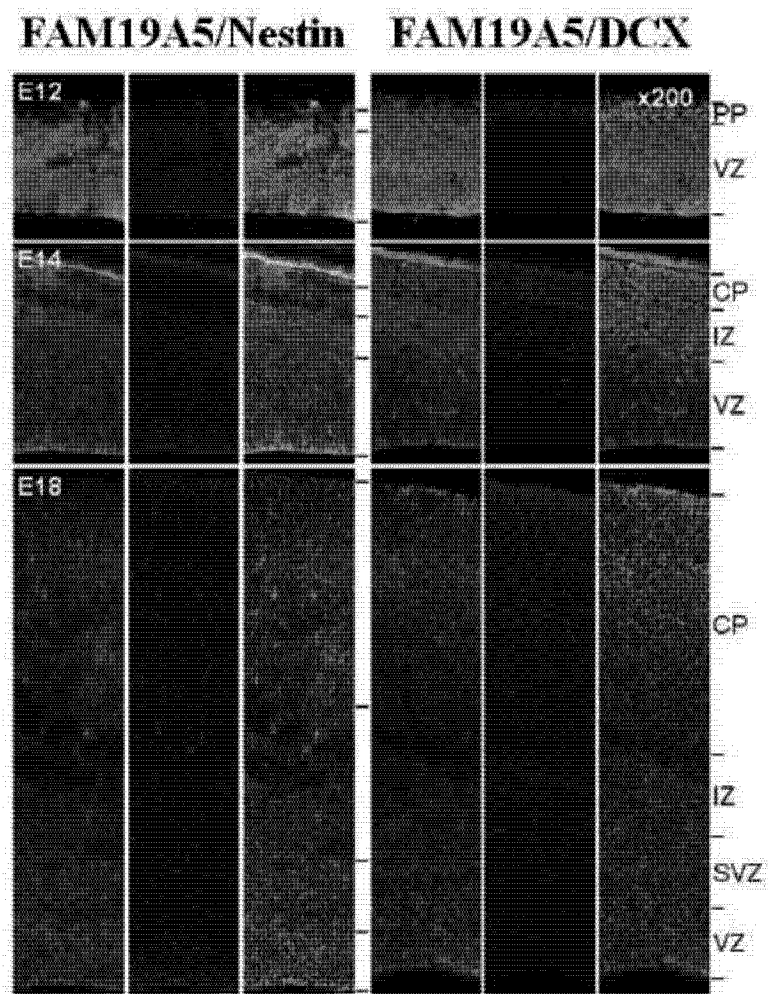


图 5

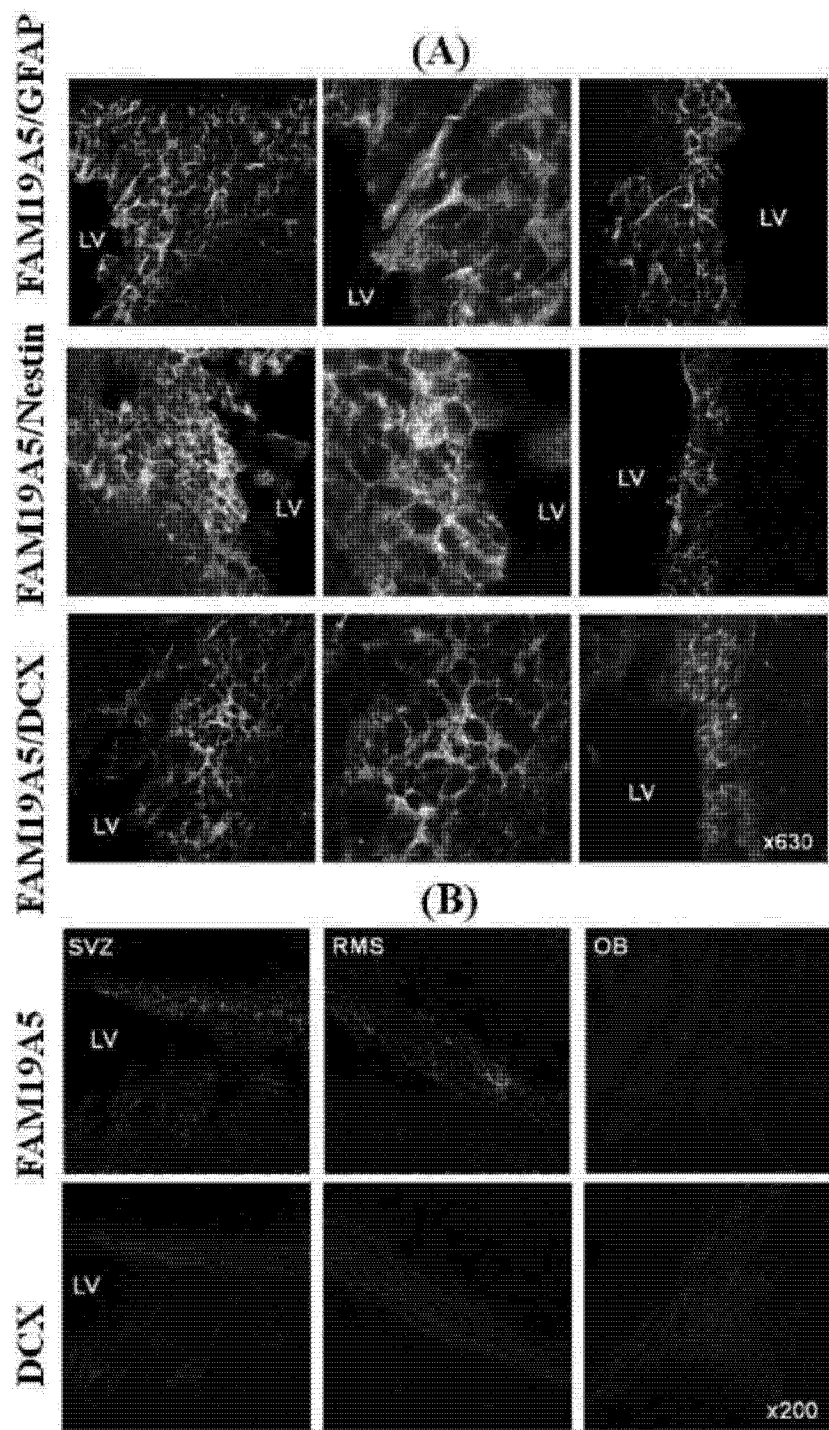


图 6

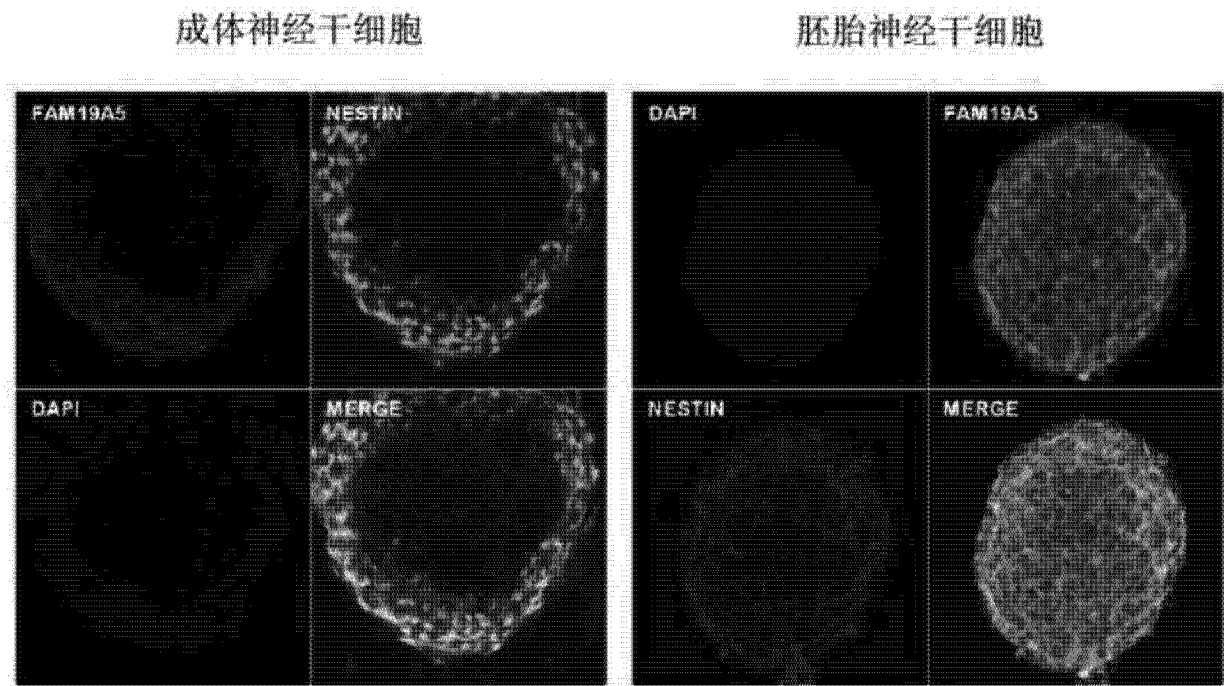
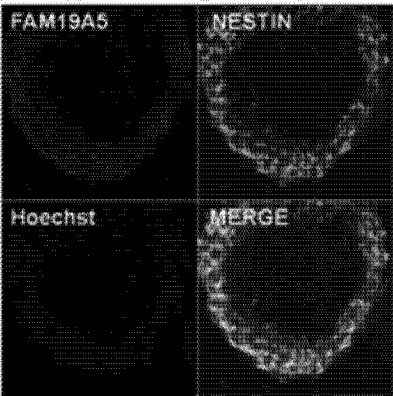
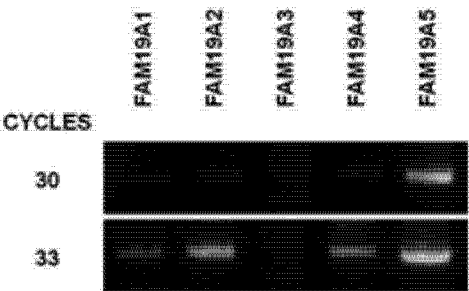


图 7

(A) 免疫细胞化学



(B) RT-PCR



(C) 微阵列

成年小鼠的 SVZ 区中 FAM19A5 家族基因

基因符号	基因名称	编号	原始	正常
FAM19A1	family with sequence similarity 19, member A1	BC132179	61.69188	5.9299307
FAM19A2	family with sequence similarity 19, member A2	BC027082	196.82034	7.6002617
FAM19A3	family with sequence similarity 19, member A3	BC118531	74.83356	6.2145233
FAM19A4	family with sequence similarity 19, member A4	BC089490	94.96983	6.5479784
FAM19A5	family with sequence similarity 19, member A5	BC015306	1155.4615	10.16699

图 8

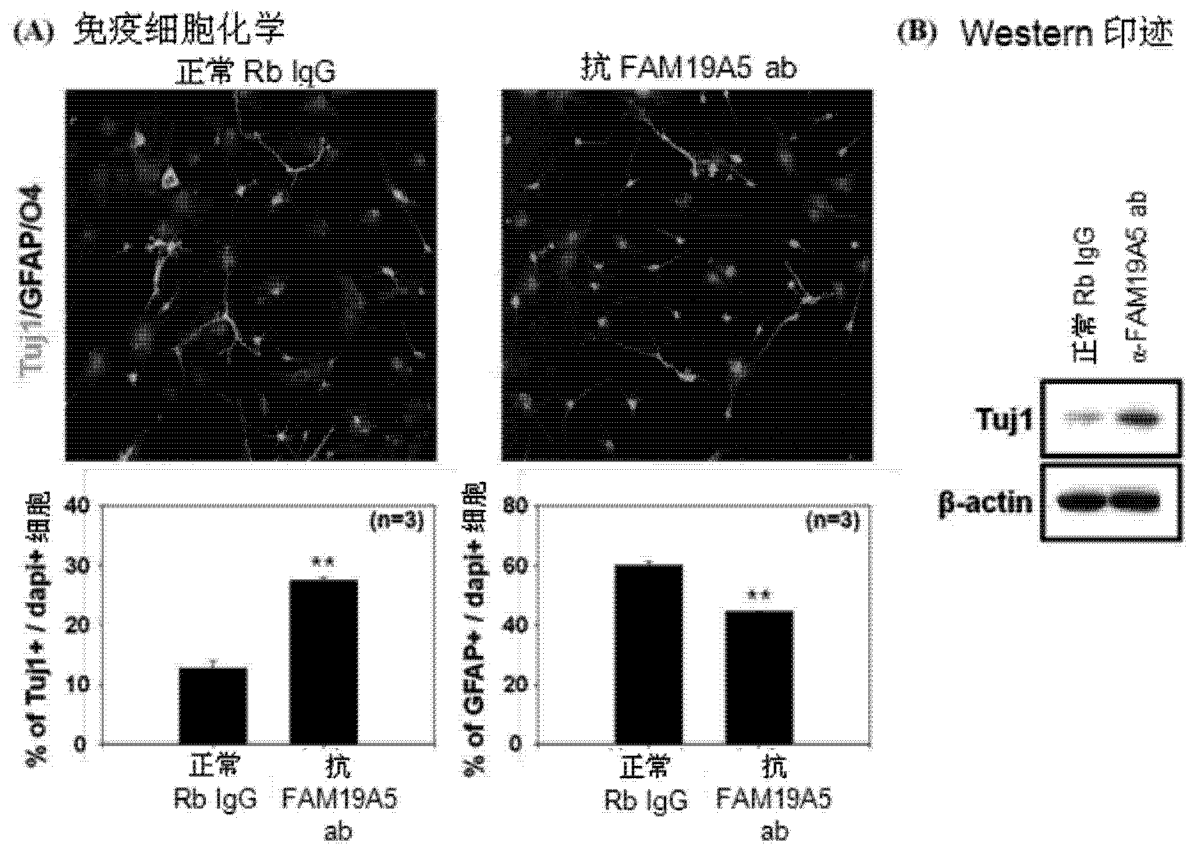


图 9

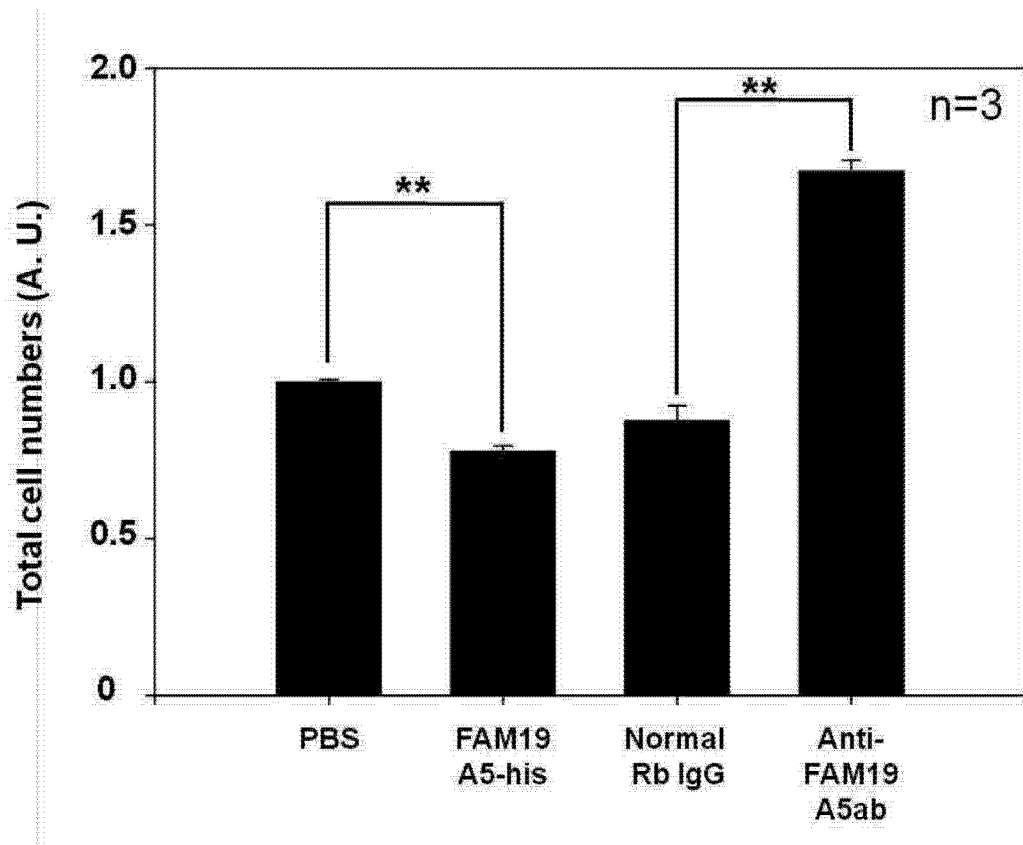


图 10

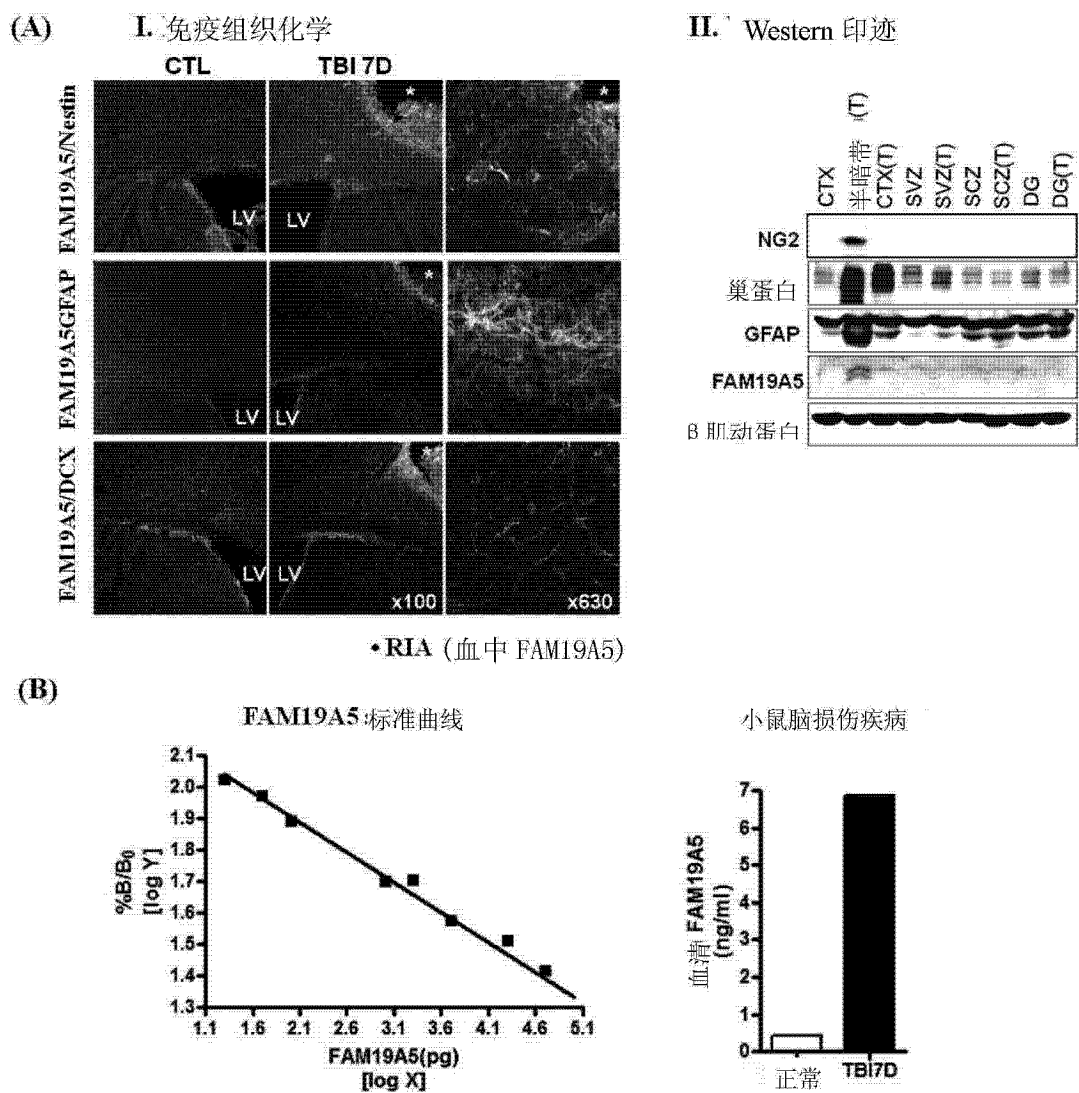


图 11

FAM19A5/GFAP/Hoechst

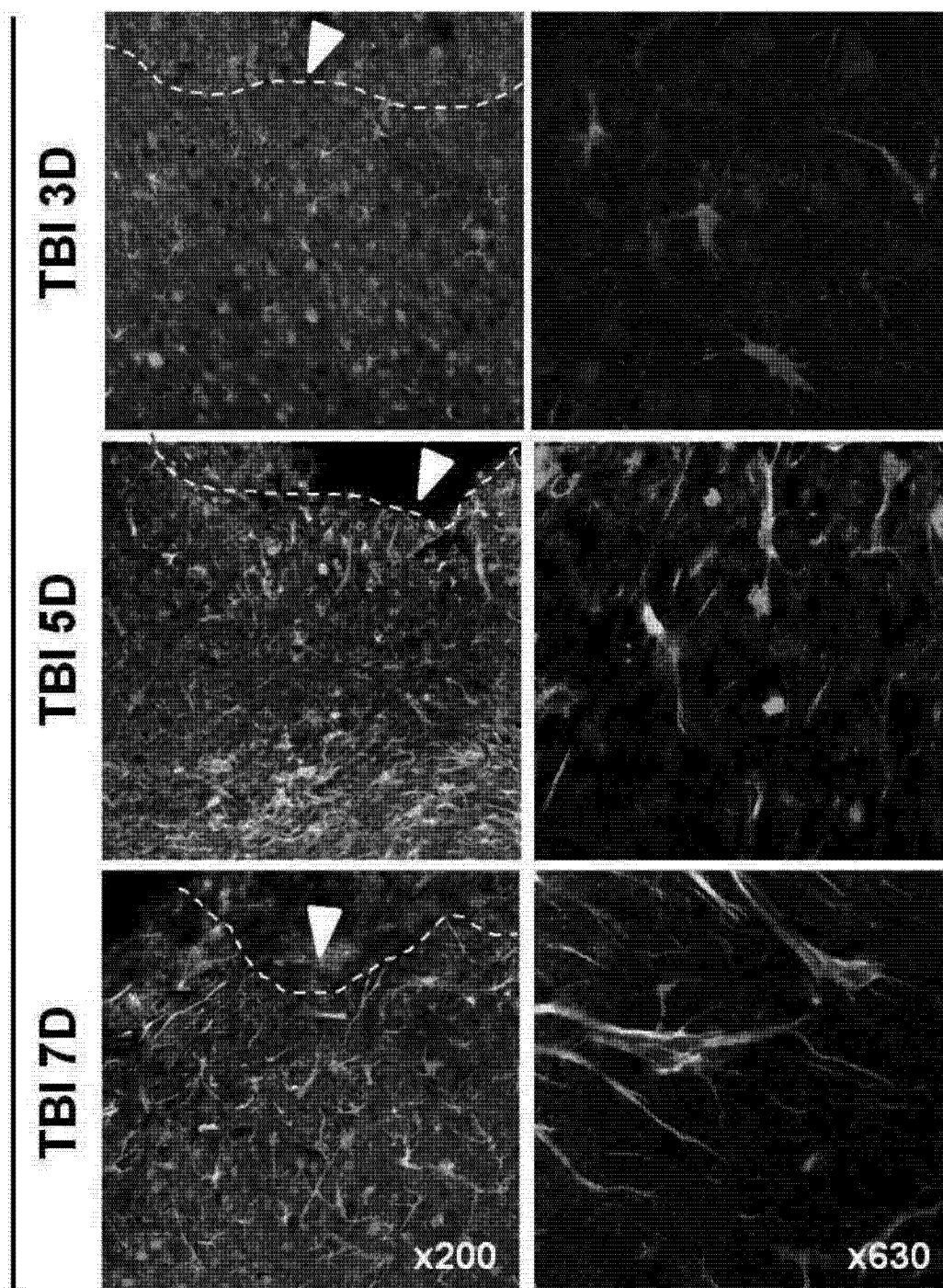


图 12

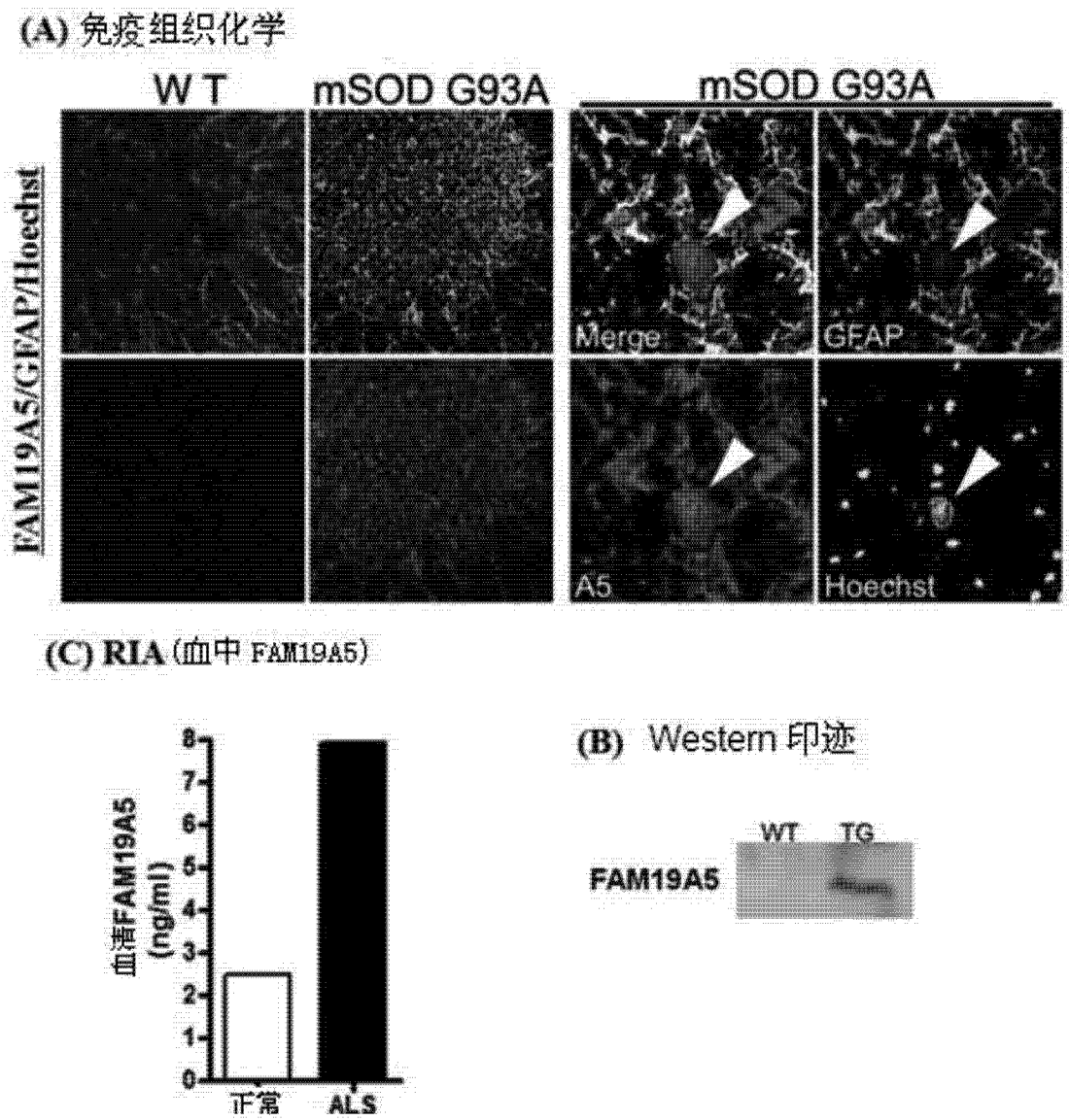


图 13

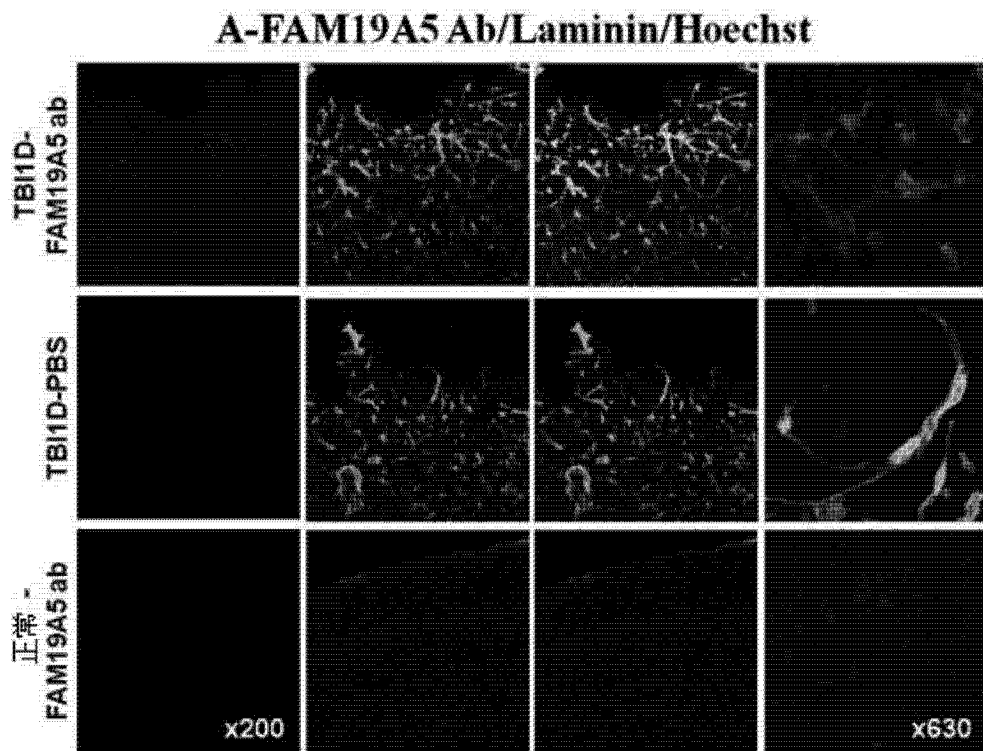
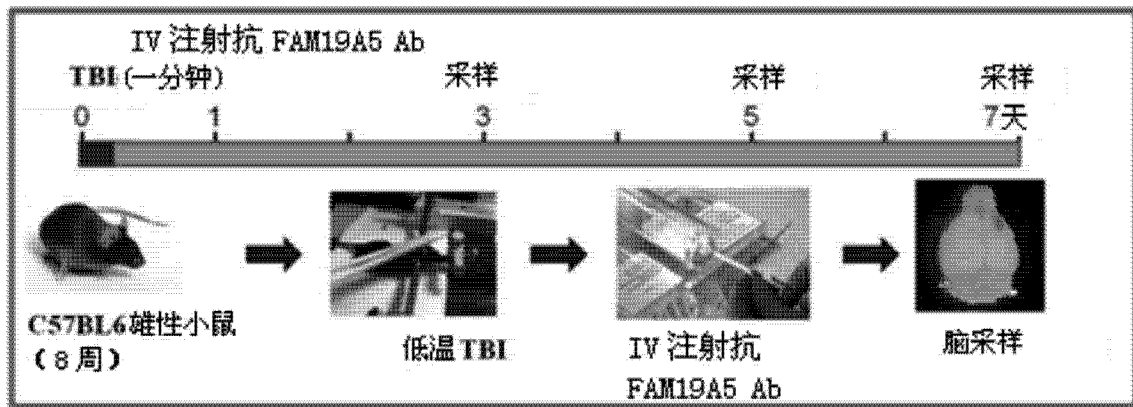


图 14

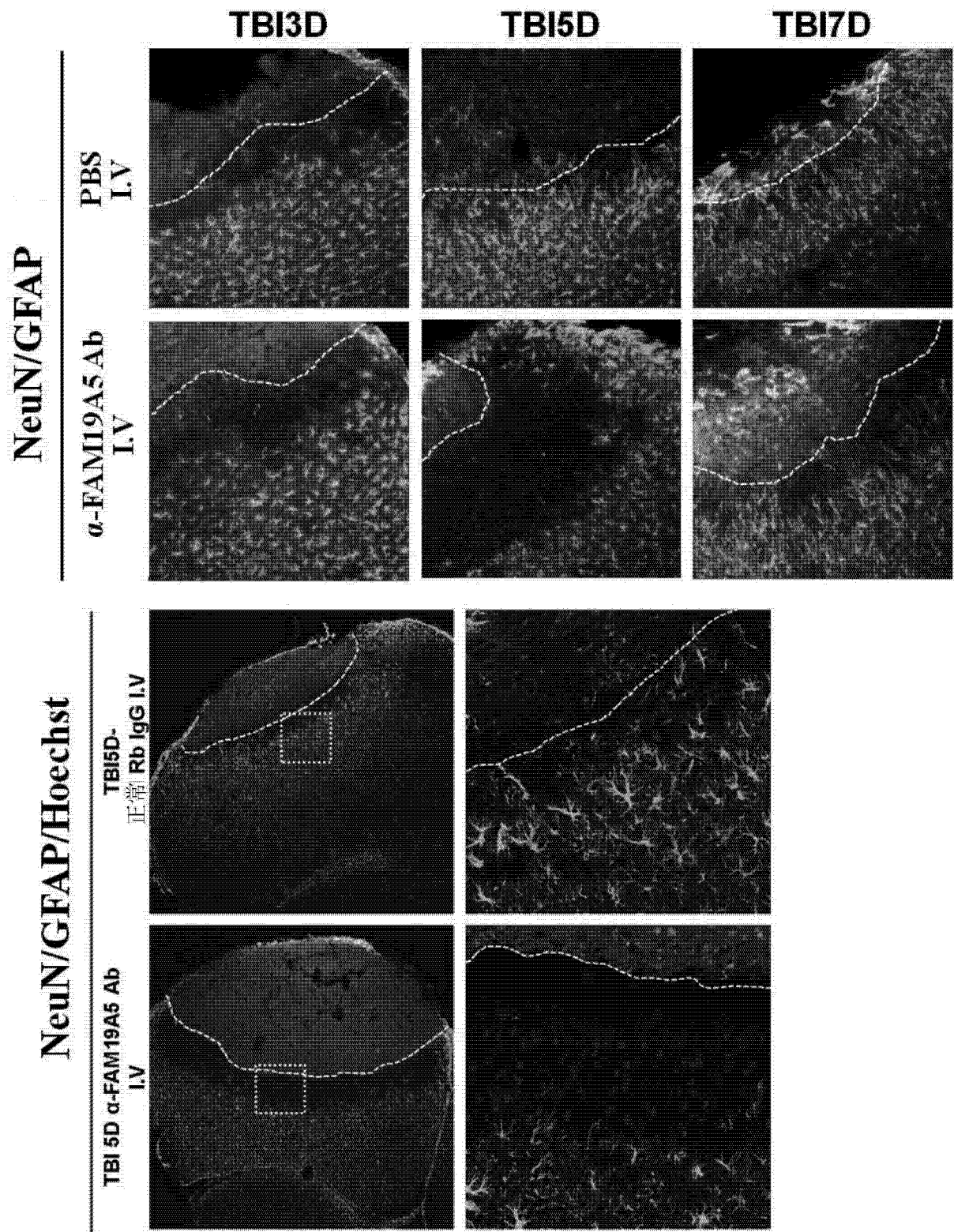


图 15

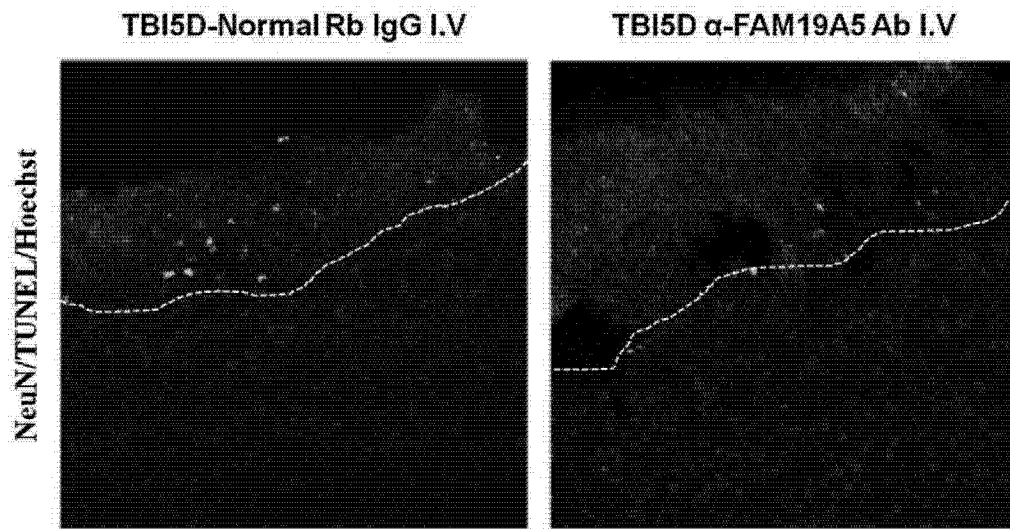


图 16

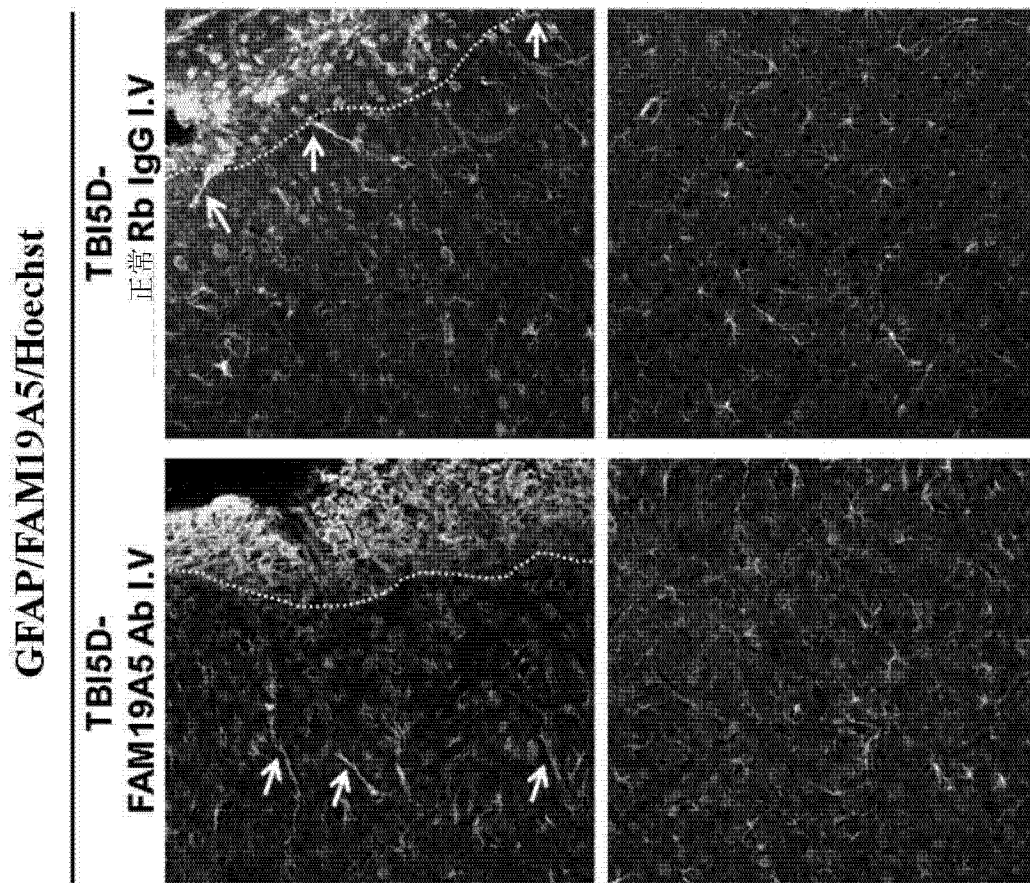


图 17

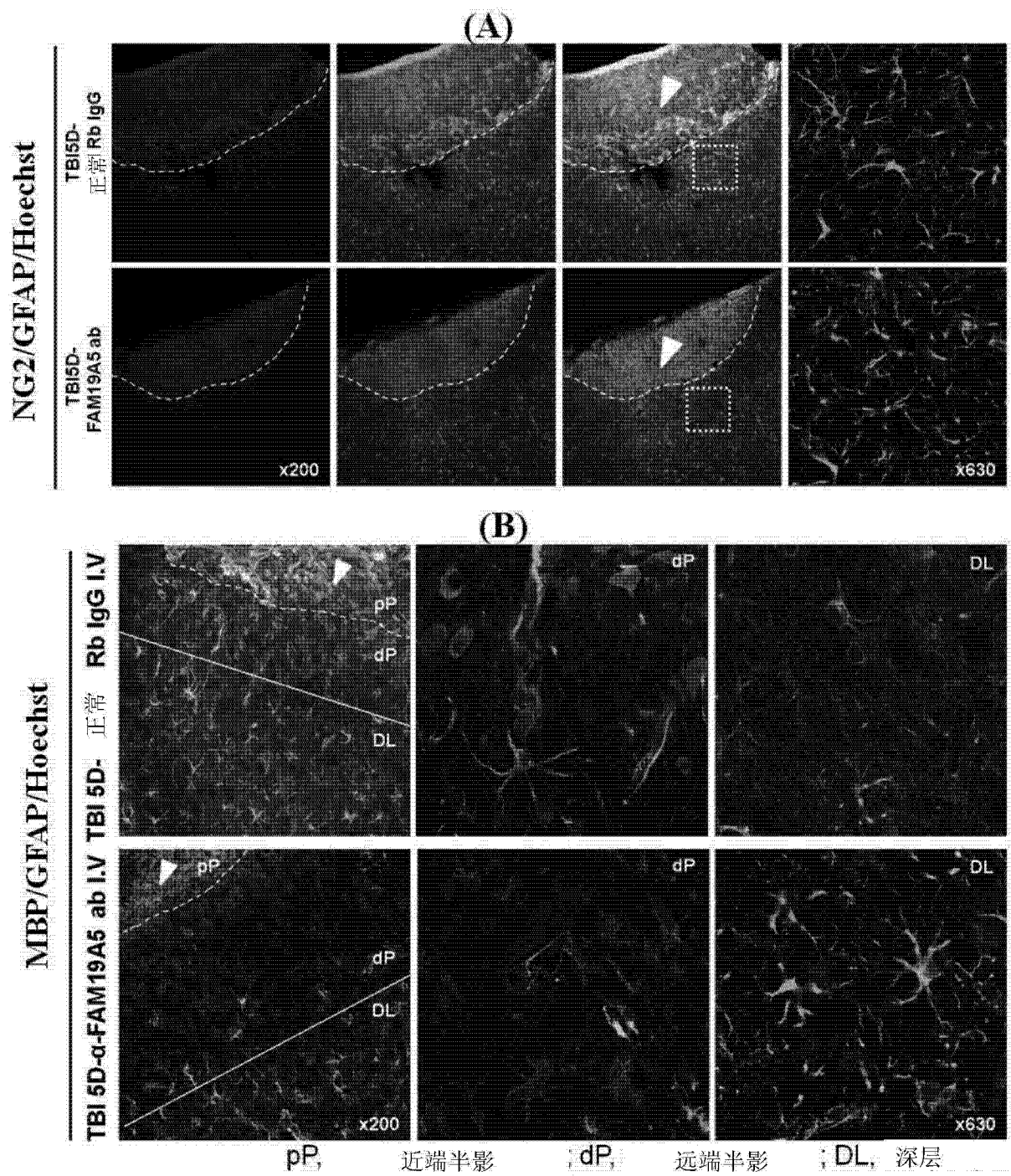


图 18