



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107019794 B

(45) 授权公告日 2021.03.12

(21) 申请号 201710109733.2

(22) 申请日 2009.07.17

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107019794 A

(43) 申请公布日 2017.08.08

(30) 优先权数据
61/135,171 2008.07.17 US

(62) 分案原申请数据
200980136079.8 2009.07.17

(73) 专利权人 阿索尔达治疗公司
地址 美国纽约

(72) 发明人 A·卡加诺 A·甘谷利 J·艾希
T·帕利

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

代理人 郑天松

(51) Int.Cl.
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 1138785 C, 2004.02.18
CN 1138785 C, 2004.02.18
苏丽军.Neuregulin治疗慢性心力衰竭的研究进展.《临床心血管》.2007,第803-805页.

审查员 朱晓冬

权利要求书1页 说明书27页
序列表17页 附图15页

(54) 发明名称

用于治疗或预防心力衰竭的神经调节蛋白
或其亚序列的治疗性施剂

(57) 摘要

本发明涉及治疗哺乳动物的心力衰竭。因此,本发明针对建立剂量方案,其维持和/或增强通过施用神经调节蛋白(例如神经胶质生长因子2(GGF2)或其亚序列)赋予的治疗性益处,而伴随地最小化任何潜在副作用。

1. 包括表皮生长因子-样 (EGF-样) 结构域的重组肽用于制备治疗或预防哺乳动物心力衰竭的无载质蛋白的组合物的用途, 其中所述组合物适合于至少每48小时施用一次。
2. 权利要求1的用途, 其中所述组合物适合于每48小时施用。
3. 权利要求1的用途, 其中所述组合物适合于每96小时施用。
4. 权利要求1的用途, 其中所述组合物适合于每5天施用一次、每6天施用一次、每周施用一次、每10天施用一次、每14天施用一次、每个月施用一次、每2个月施用一次、每3个月施用一次或每4个月施用一次。
5. 权利要求1的用途, 其中所述哺乳动物是人。
6. 权利要求1的用途, 其中所述EGF-样结构域是包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的神经胶质生长因子2 (GGF2) 的EGF结构域。
7. 权利要求1的用途, 其中所述EGF-样结构域是包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的GGF2的EGF结构域。
8. 权利要求1的用途, 其中所述肽包含重组人GGF2的片段。
9. 权利要求8的用途, 其中所述片段至少85个氨基酸长。
10. 权利要求8的用途, 其中所述组合物包含1mg/kg~10mg/kg的GGF2肽。
11. 前述权利要求之任一项的用途, 其中所述组合物包含0.01mg/kg~约1mg/kg的GGF2肽。
12. 前述权利要求之任一项的用途, 其中所述组合物包含0.1mg/kg~约1mg/kg的GGF2肽。
13. 前述权利要求之任一项的用途, 其中所述组合物包含3.25mg/kg的GGF2肽。
14. 前述权利要求之任一项的用途, 其中所述组合物包含0.625mg/kg的GGF2肽。

用于治疗或预防心力衰竭的神经调节蛋白或其亚序列的治疗性施剂

[0001] 本申请是2009年7月17日提交的200980136079.8号同名发明专利申请的分案申请。

【技术领域】

[0002] 发明领域涉及治疗心力衰竭。更特别是,本发明针对改善的剂量方案,其维持和/或增强施用神经调节蛋白(例如神经胶质生长因子2(GGF2)或其片段)的治疗性益处,而最小化任何潜在副作用。

【背景技术】

[0003] 与给有需要的患者施用药疗相关的根本性的挑战是耐受性与功效之间的关系。治疗指数是可施用于患者的物质的有效的剂量与检测到对患者的不期望的副作用的剂量之间的范围。一般而言,有效的剂量与副作用起始的剂量之间的差异越大,物质越是良性,及越可能被患者耐受。

[0004] 心力衰竭(特别是充血性心力衰竭(CHF))是工业化国家中死亡的主导原因之一。成为充血性心力衰竭的基础的因素包括:高血压,缺血性心脏病,暴露于心脏毒性化合物(例如蒽环类抗生素),辐射暴露,物理创伤及与增加的心力衰竭风险相关的遗传缺陷。由此,CHF常由由于高血压,来自慢性缺血,心肌梗塞,病毒疾病,化学毒性,辐射的对心肌的损伤及其他疾病(例如硬皮病)的对心脏的增加的工作负荷所致。这些病情导致心脏的抽泵能力的进行性降低。起初,由高血压或收缩性组织的损失所致的增加的工作负荷诱导补偿性心肌细胞肥大及左心室壁加厚,由此增强收缩性及维持心脏功能。经时,但是,左心室膨胀,心脏收缩泵功能恶化,心肌细胞经历凋亡性细胞死亡,及心肌功能进行性恶化。

[0005] 神经调节蛋白(NRGs)及NRG受体包括涉及神经,肌肉,上皮,及其他组织中器官发生及细胞发育的细胞间信号转导的生长因子-受体酪氨酸激酶系统(Lemke, Mol.Cell.Neurosci.7:247-262,1996and Burden et al.,Neuron 18:847-855,1997)。NRG家族由编码含表皮生长因子(EGF)-样,免疫球蛋白(Ig),及其他可识别结构域的多种配体的4种基因构成。多种分泌的及附接膜的异构体在此信号转导系统中发挥配体的作用。人中NRG配体的受体是EGF受体(EGFR)家族的全部成员,及分别包括EGFR(或ErbB1),ErbB2,ErbB3,及ErbB4,也被称为HER1~HER4(Meyer et al.,Development 124:3575-3586,1997; Orr-Urtreger et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:1867-71,1993;Marchionni et al.,Nature 362:312-8,1993;Chen et al.,J.Comp.Neurol.349:389-400,1994;Corfas et al.,Neuron 14:103-115,1995;Meyer et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:1064-1068,1994;and Pinkas-Kramarski et al.,Oncogene 15:2803-2815,1997)。

[0006] 4种NRG基因,NRG-1,NRG-2,NRG-3,及NRG-4,定位于不同染色体座位(Pinkas-Kramarski et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:9387-91,1994;Carraway et al.,Nature 387:512-516,1997;Chang et al.,Nature 387:509-511,1997;and Zhang et

al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:9562-9567, 1997), 及共同编码NRG蛋白的种种阵列。NRG-1的基因产物, 例如, 包括一组大致15种不同的结构上-相关的异构体 (Lemke, Mol. Cell. Neurosci. 7:247-262, 1996 and Peles and Yarden, BioEssays 15:815-824, 1993)。首先鉴定的NRG-1的亚型包括Neu分化因子 (NDF; Peles et al., Cell 69, 205-216, 1992 and Wen et al., Cell 69, 559-572, 1992), 神经生长因子 (HRG; Holmes et al., Science 256:1205-1210, 1992), 诱导活性的乙酰胆碱受体 (ARIA; Falls et al., Cell 72: 801-815, 1993), 及神经胶质生长因子GGF1, GGF2, 及GGF3 (Marchionni et al. Nature 362: 312-8, 1993)。

[0007] NRG-2基因通过同源性克隆 (Chang et al., Nature 387:509-512, 1997; Carraway et al., Nature 387:512-516, 1997; and Higashiyama et al., J. Biochem. 122:675-680, 1997) 及通过基因组方法 (Busfield et al., Mol. Cell. Biol. 17:4007-4014, 1997) 鉴定。NRG-2cDNA也已知为神经-及胸腺-来源的ErbB激酶活化子 (NTAK; Genbank登录号 No. AB005060), 神经调节蛋白趋异剂 (Don-1), 及小脑-来源的生长因子 (CDGF; PCT申请W0 97/09425)。实验证据显示, 表达ErbB4或ErbB2/ErbB4组合的细胞可能显示针对NRG-2的特别稳健的应答 (Pinkas-Kramarski et al., Mol. Cell. Biol. 18:6090-6101, 1998)。NRG-3基因产物 (Zhang等人, supra) 也已知结合及活化ErbB4受体 (Hijazi et al., Int. J. Oncol. 13: 1061-1067, 1998)。

[0008] EGF-样结构域存在于全部形式的NRG的核心, 及需要结合及活化ErbB受体。3种基因中编码的EGF-样结构域的推断的氨基酸序列大致是30~40%相同 (比对)。而且, NRG-1及NRG-2中似乎有至少2种亚型的EGF-样结构域, 其可赋予不同生物活性及组织-特异性潜力。

[0009] 对NRG的细胞应答通过表皮生长因子受体家族的NRG受体酪氨酸激酶EGFR, ErbB2, ErbB3, 及ErbB4介导。全部NRG的高-亲和力结合主要经或者ErbB3或ErbB4介导。NRG配体的结合导致与其他ErbB亚基的二聚化及通过对特异性酪氨酸残基的磷酸化反式激活。在某些实验环境中, ErbB受体的几乎全部组合似乎能响应NRG-1异构体的结合形成二聚体。但是, 看起来ErbB2是可在稳定配体-受体复合物中起重要的作用的优选的二聚化偶体。ErbB2不结合其自身上的配体, 但必需与其他受体亚型之一异源配对。ErbB3确实具有酪氨酸激酶活性, 但是其他受体的磷酸化的靶。NRG-1, ErbB2, 及ErbB4的表达已知必要于小鼠发育期间心室心肌的小梁形成。

[0010] 神经调节蛋白刺激补偿性肥大性生长及抑制经历生理应激的心肌细胞的凋亡。根据这些观察, 神经调节蛋白的施用对于防止, 最小化, 或翻转由作为基础的因素 (例如高血压, 缺血性心脏病, 及心脏毒性) 所致的充血性心脏病有用。见, 例如, 美国专利号 (USPN) 6, 635, 249, 将其整体并入本文。

[0011] 从一般人群中心力衰竭的高发病率来看, 仍有未满足的对阻止或最小化此疾病进展 (例如通过抑制心脏功能损失或通过改良性心脏功能) 的需求。

[0012] 【发明概述】

[0013] 本发明包括治疗或预防哺乳动物的心力衰竭的方法。方法基于惊人的发现, 包括表皮生长因子-样 (EGF-样) 结构域的肽的治疗性益处可通过不维持稳定-状态的神经调节蛋白施用 (例如通过用以或超过48, 72, 96或更多小时的施用间隔给哺乳动物施用治疗有效量的肽) 的剂量方案实现。因此, 本方法要求给哺乳动物含EGF-样结构域的肽的间歇的或不

连续的施用(每48~96小时,或甚至更长间隔),其中所述EGF-样结构域由神经调节蛋白基因编码,及其中肽的施用是以对于治疗或预防哺乳动物的心力衰竭有效的量。不维持稳定-状态浓度的神经调节蛋白施用的剂量方案与更频繁的剂量方案同样有效,然而无可产生自更频繁的施用的不便,成本或副作用。本文所用的术语,间歇的或不连续的施用包括以至少48小时,72小时,96小时,1天,2天,3天,4天,5天,6天,7天,8天,9天,10天,11天,12天,13天,14天、1周,2周,4周,1个月,2个月,3个月,4个月,或其任何组合或增量的间隔的施剂方案,只要间隔/方案至少为48小时,72小时,96小时,1天,2天,3天,4天,5天,6天,7天,8天,9天,10天,11天,12天,13天,14天、1周,2周,4周,1个月,2个月,3个月,4个月。本文所用的术语间歇的或不连续的施用包括以不小于48小时,72小时,96小时,1天,2天,3天,4天,5天,6天,7天,8天,9天,10天,11天,12天,13天,14天、1周,2周,4周,1个月,2个月,3个月,4个月,或其任何组合或增量的间隔的施剂方案,只要间隔/方案不小于48小时,72小时,96小时,1天,2天,3天,4天,5天,6天,7天,8天,9天,10天,11天,12天,13天,14天、1周,2周,4周,1个月,2个月,3个月,4个月。

[0014] 根据本发明,给哺乳动物的含EGF-样结构域的肽的间歇的或不连续的施用(其中所述EGF-样结构域由神经调节蛋白基因编码)针对达到不维持施用的肽的窄稳定-状态浓度的剂量方案,由此降低哺乳动物将经历可产生自经延长的持续时间维持施用的肽的生理学以上水平的不利的副作用的概率。例如,与外源地施用的NRG的生理学以上水平相关的副作用包括:神经鞘增生,乳腺增生,肾病,精子减少症,肝脏酶升高,心脏瓣膜变化及注射位点的皮肤变化。

[0015] 在优选实施方式中,本发明针对引起或允许包括由神经调节蛋白基因编码的EGF-样结构域的肽的血清水平波动的间歇的剂量方案,从而降低与更频繁的肽施用相关的不利的副作用的潜力。本发明的间歇的剂量方案由此赋予给哺乳动物的治疗性优势,但不维持稳定状态治疗性水平的包括由神经调节蛋白基因编码的EGF-样结构域的肽。如被本领域普通技术人员同意,有本发明的各种实施方式来获得间歇的施剂;这些实施方式的益处可以各种方式陈述,例如,所述施用不维持稳定状态治疗性水平的所述肽,施用降低与更频繁地施用NRG肽相关的不利的副作用的潜力,等。

[0016] 在本发明的特定实施方式中,神经调节蛋白可为包含NRG-1, NRG-2, NRG-3或NRG-4,或者基本上由其构成或由其构成的基因,基因产物或其相应亚序列或片段。在优选实施方式中,本发明的NRG亚序列或片段包括表皮生长因子-样(EGF-样)结构域或其同系物。如被本领域普通技术人员同意,与EGF-样结构域肽的肽同系物通过找结构同源性或如EGF-样肽在功能测定中一样由同系物肽进行(例如通过结合及活化ErbB受体)来测定。优选片段至少为40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85个氨基酸长。本发明的神经调节蛋白肽可,进而,由这些神经调节蛋白基因(或其亚序列)任之一编码。在更特定的实施方式中,方法中使用的肽是重组人GGF2或其片段或亚序列。见图8A~8D的全长人GGF2的氨基酸及核酸序列。

[0017] 在本发明的一个方面,适宜哺乳动物包括但不限于,小鼠,大鼠,兔,狗,猴或猪。在本发明的一个实施方式中,哺乳动物是人。

[0018] 在本发明的其他实施方式中,心力衰竭可产生自高血压,缺血性心脏病,暴露于心

脏毒性化合物(例如,可卡因,醇,抗-ErbB2抗体或抗-HER抗体,例如**赫赛汀®**,或蒽环类抗生素,例如多柔比星或道诺霉素),心肌炎,甲状腺疾病,病毒感染,牙龈炎,药物滥用,酒精滥用,心包炎,动脉粥样硬化,血管疾病,肥大性心肌病,急性心肌梗塞或之前心肌梗塞,左心室心脏收缩功能障碍,冠状动脉分流手术,饥饿,辐射暴露,进食障碍,或遗传缺陷。

[0019] 在本发明的另一实施方式中,在蒽环类抗生素施用之前,期间,或后,将抗-ErbB2或抗-HER2抗体,例如**赫赛汀®**,施用于哺乳动物。

[0020] 在本发明的其他实施方式中,在暴露于心脏毒性化合物之前,暴露于所述心脏毒性化合物期间,或暴露于所述心脏毒性化合物后施用肽;诊断所述哺乳动物的充血性心力衰竭之前或后施用肽。本发明的方法可在受试者哺乳动物已经历补偿性心脏肥大后进行;本发明的方法包括,方法的结果旨在维持左心室肥大或阻止心肌疏伐进展,或抑制心肌细胞凋亡。在本发明的方法中,肽可包括由神经调节蛋白基因编码的EGF-样结构域,或者基本上由其构成,或由其构成。本发明的肽在暴露于心脏毒性化合物之前,期间,或后施用。在另一实施方式中,含EGF-样结构域的肽在这些时期中的2个,或全部3个期间施用。根据本发明,由神经调节蛋白基因编码的含EGF-样结构域的肽以每48~96小时的间隔施用。在本发明的一个实施方式中,由神经调节蛋白基因编码的含EGF-样结构域的肽是GGF2。在本发明的再一实施方式中,在诊断哺乳动物的充血性心力衰竭之前或后施用肽。在本发明的又一实施方式中,将肽施用于已经历补偿性心脏肥大的哺乳动物。在本发明的其他特定实施方式中,肽的施用维持左心室肥大,阻止心肌疏伐进展,和/或抑制心肌细胞凋亡。

[0021] 本发明的实施方式包括以下:用于治疗哺乳动物的心力衰竭的方法,所述方法包括给所述哺乳动物外源施用包括表皮生长因子-样(EGF-样)结构域的肽,其中所述以所述间隔的施用降低所述哺乳动物中与所述外源肽的施用相关的不利的副作用。用于治疗哺乳动物的心力衰竭的方法,所述方法包括给所述哺乳动物外源施用包括表皮生长因子-样(EGF-样)结构域的肽,其中所述EGF-样结构域由神经调节蛋白(NRG)-1基因编码,及所述外源肽以对治疗所述哺乳动物的心力衰竭的治疗有效量、以至少48小时的间隔施用,其中所述以所述间隔的施用不在所述哺乳动物中维持稳定状态水平的所述外源肽。用于治疗哺乳动物的心力衰竭的方法,所述方法包括给所述哺乳动物外源施用包括表皮生长因子-样(EGF-样)结构域的肽或其同系物,及所述外源肽以对治疗所述哺乳动物的心力衰竭的治疗有效量、以至少或不小于48小时的间隔施用,其中所述以所述间隔的施用允许所述哺乳动物中所述外源肽相对基线或施用前水平的血清浓度的剂量内波动。

[0022] 本文中的术语不利的或有害的副作用指医学治疗的非故意的及不期望的结果。关于本发明,由外源肽的施用所致的不利的或有害的副作用可包括以下任何一种或多种:神经鞘增生,乳腺增生,肾病,及注射位点的皮肤变化。

[0023] 本文中的术语“所述哺乳动物中所述外源肽相对施用前水平的血清浓度的剂量内波动”指一剂量的外源肽施用之前的血清浓度水平之间的差异。

[0024] 本文中的术语“稳定状态水平”指足以实现施用及消除之间的平衡(在随后的剂量之间的波动范围内的)的外源试剂(例如,肽)的水平。“维持稳定状态治疗性水平”指将外源试剂浓度维持在足以给受试者或患者赋予治疗性益处的水平。

【附图说明】

[0025] 图1显示描绘如由射血分数及缩短分数变化例示的心脏功能的直方图。如所示,大鼠用0.625mg/kg的GGF2或等摩尔量的EGF-样片段(片段;EGF-id)每天(q天)静脉内(iv)处理。

[0026] 图2显示描绘如由射血分数及缩短分数的变化显示的心脏功能的线坐标图。如所示,大鼠用0.625mg/kg或3.25mg/kg的GGF2静脉内处理q天。

[0027] 图3显示描绘如由处理时期期间收缩末期容量的显著的改善显示的心脏功能的线坐标图。如所示,大鼠用0.625mg/kg或3.25mg/kg的GGF2静脉内处理q天。

[0028] 图4显示描绘如由射血分数及缩短分数变化显示的心脏功能的线坐标图。如所示,大鼠用3.25mg/kg的GGF2静脉内(iv)处理q24,48或96小时。

[0029] 图5显示描绘如由超声波心动图射血分数的变化显示的心脏功能的线坐标图。如所示,大鼠用媒质或3.25mg/kg的GGF2(有或无BSA)静脉内(iv)处理。

[0030] 图6显示描绘静脉内施用后重组人GGF2(rhGGF2)的半衰期的线坐标图。

[0031] 图7显示描绘皮下施用后重组人GGF2(rhGGF2)的半衰期的线坐标图。

[0032] 图8A~D显示全长GGF2的核酸及氨基酸序列。核酸序列指定SEQ ID NO:1及氨基酸序列指定SEQ ID NO:2。

[0033] 图9显示表皮生长因子-样(EGFL)结构域1的核酸及氨基酸序列。EGFL结构域1的核酸序列在本文中指定SEQ ID NO:3及EGFL结构域1的氨基酸序列在本文中指定SEQ ID NO:4。

[0034] 图10显示表皮生长因子-样(EGFL)结构域2的核酸及氨基酸序列。EGFL结构域2的核酸序列在本文中指定SEQ ID NO:5及EGFL结构域2的氨基酸序列在本文中指定SEQ ID NO:6。

[0035] 图11显示表皮生长因子-样(EGFL)结构域3的核酸及氨基酸序列。EGFL结构域3的核酸序列在本文中指定SEQ ID NO:7及EGFL结构域3的氨基酸序列在本文中指定SEQ ID NO:8。

[0036] 图12显示表皮生长因子-样(EGFL)结构域4的核酸及氨基酸序列。EGFL结构域4的核酸序列在本文中指定SEQ ID NO:9及EGFL结构域4的氨基酸序列在本文中指定SEQ ID NO:10。

[0037] 图13显示表皮生长因子-样(EGFL)结构域5的核酸及氨基酸序列。EGFL结构域5的核酸序列在本文中指定SEQ ID NO:11及EGFL结构域5的氨基酸序列在本文中指定SEQ ID NO:12。

[0038] 图14显示表皮生长因子-样(EGFL)结构域6的核酸及氨基酸序列。EGFL结构域6的核酸序列在本文中指定SEQ ID NO:13及EGFL结构域6的氨基酸序列在本文中指定SEQ ID NO:14。

[0039] 图15显示包括表皮生长因子-样(EGFL)结构域的多肽的氨基酸序列,其在本文中指定SEQ ID NO:21。

[0040] 图16显示pSV-AHSG载体及含人GGF2的编码序列的pCMGGF2载体的模式图。

[0041] 图17显示为增强转录,GGF2编码序列放置在EBV BMLF-1干扰序列(MIS)后的模式图。

[0042] 【发明详述】

[0043] 本发明人作出惊人的发现,以适当间隔的时间间隔的不连续的或间歇的神经调节蛋白施用将治疗有效量的神经调节蛋白递送给有需要的患者及所述治疗方案对于防止,预防,改善,最小化,治疗或逆转心脏病,例如充血性心力衰竭有用。

[0044] 尽管常规智慧及开发实践涉及设计剂量方案,以维持稳定状态浓度的最窄范围,本发明人在本文中展示,不维持窄稳定-状态浓度的用于神经调节蛋白施用的剂量方案与更频繁的剂量方案同样有效。的确,本发明人显示,神经调节蛋白以至少48小时,72小时,96小时,1天,2天,3天,4天,5天,6天,7天,8天,9天,10天,11天,12天,13天,14天,1周,2周,4周,1个月,2个月,3个月,4个月,或其任何组合或增量的施剂间隔治疗心力衰竭,只要间隔/方案至少为48小时与每天施剂同样有效。

[0045] 为了评估外源NRG的药代动力学,本发明人显示,作为神经调节蛋白的半衰期,当静脉内递送时是4~8小时,及当经皮下递送时是11~15小时。见,例如,表1和2及图6和7。以稀少如每第四天的方案的施剂将,因此,在剂量之间不维持任何可检测的水平至少3天。基于这些发现,本发明之前,将无法预测到所述峰/谷比例将与一致的治疗性益处相关。值得注意的是,有此量级的半衰期的化合物通常根据频繁的剂量方案施用(例如,每天一剂量或每天多个剂量)。的确,基于就GGF2可用的药物代谢动力学数据,传统开发将预测,最佳治疗将涉及每天皮下施剂。

[0046] 遵循常规智慧及开发实践中,其他对CHF的医学治疗一般以至少每天基础施用。所述方案的周期性被认为需要,因为CHF是通常由心脏的损伤的收缩和/或松弛所致的慢性疾病,而非急性病情。在导致损伤的松弛及CHF的弱心脏的人中,医学治疗包括阻断特异性神经激素的形成或作用的药物(例如血管紧张素转变酶抑制剂(ACE-抑制剂),血管紧张素受体拮抗剂(ARBs),醛甾酮拮抗剂及 β -肾上腺素能药物受体阻断剂)。这些及其他药疗现在是慢性CHF中的护理标准,因为它们已展示导致改善的症状,生命期望和/或减少住院治疗。在急性恶化或慢性症状的情况中,患者常用变力性剂(例如多巴酚丁胺,地高辛)处理以增强心脏收缩性,伴随血管扩张剂(例如硝酸酯,奈西立肽)和/或利尿药(例如呋塞米)以减少淤血。患高血压及充血性心力衰竭的患者用一或多种抗高血压药试剂(例如 β -阻断剂,ACE-抑制剂及ARBs,硝酸酯(硝酸异山梨酯),肼屈嗪,及钙通道阻断剂)处理。

[0047] 由此,尽管关于治疗CHF的典型的实践,本发明人已展示,新剂量方案导致有效治疗CHF,而避免不期望的副作用。尽管不愿意被理论束缚,可能是,所述神经调节蛋白处理通过刺激心肌细胞肥大,及通过抑制心肌细胞凋亡部分或完全抑制心脏的进一步恶化来加强心脏的抽泵能力。

[0048] 作为额外的背景,施剂的基本原理旨在测定有效循环浓度及设计剂量方案来维持那些水平。合并药物代谢动力学(PK)及药效学(PD)研究来预测将维持稳定-状态水平的特定药物的剂量方案。典型的计划旨在最小化C_{max}及C_{min}之间的差异,由此减少副作用。

[0049] 药物被它们的‘治疗指数’描述,其为毒性剂量或循环水平除以有效剂量或循环浓度的比。当治疗指数大时,有可不接近毒性水平而给予有效剂量的宽安全性范围。当以太接近于有效浓度的浓度得到不利的效应时,治疗指数描述为窄,及药物难以安全施用。

[0050] 当开发剂量方案时,将PK/PD数据与治疗指数的知识组合来设计施用的剂量及频率以至将患者(例如,人)中的化合物维持在一定浓度,以至其为有效浓度以上及毒性浓度

以下。如果不诱导不安全的效应不可维持药物的有效浓度,药物将在开发期间失败。涉及药物开发的额外的注释可见于各种参考文献,包括:药物开发中的药代动力学:临床研究设计及分析(2004,Peter Bonate及Danny Howard,eds。),将其整体并入本文。

[0051] 神经调节蛋白是与结合erbB受体的表皮生长因子相关的生长因子。它们已显示提高心力衰竭,心脏毒性及缺血的多个模型中的心脏功能。它们也已显示保护中风,脊髓伤害,神经试剂暴露,外周神经损伤及化学毒性的模型中的神经系统。

[0052] 但是,维持超常水平的外源地供给的神经调节蛋白已显示具有不利的效应,包括神经鞘增生,乳腺增生及肾病。每天皮下施用神经调节蛋白后观察这些效应。见,例如,表10。

[0053] 如本文所述,由于相比静脉内施用延长的半衰期,且原本相信维持恒定水平的配体将有利,从而探究皮下施用。开发剂量方案以降低这些效应将显著增强将用作治疗剂的神经调节蛋白的能力,及本发明也针对此。展示不维持恒定水平的欠频繁的施剂也能使此开发有效。

[0054] 神经调节蛋白:如上所述,由NRG-1,NRG-2,NRG-3及NRG-4基因编码的肽具有使它们结合及活化ErbB受体的EGF-样结构域。Holmes等人(Science 256:1205~1210,1992)显示,EGF-样结构域单独足以结合及活化p185erbB2受体。因此,由NRG-1,NRG-2,或NRG-3基因编码的任何肽产物,或任何神经调节蛋白-样肽,例如,具有由神经调节蛋白基因或cDNA编码的EGF-样结构域的肽(例如,含NRG-1肽亚结构域C-C/D或C-C/D'的EGF-样结构域,如USPN 5,530,109,USPN 5,716,930及USPN 7,037,888中所述;或如公开于WO 97/09425的EGF-样结构域)可用于本发明的方法来预防或治疗充血性心力衰竭。将各USPN 5,530,109;USPN 5,716,930;USPN 7,037,888;及WO 97/09425的内容均整体并入本文。

[0055] 危险因素:熟知增加个体的发展充血性心力衰竭的似然性的危险因素。这些包括,及不限于,吸烟,肥胖症,高血压,缺血性心脏病,血管疾病,冠状动脉分流手术,心肌梗塞,左心室心脏收缩功能障碍,暴露于心脏毒性化合物(醇,药物(例如可卡因),及蒽环类抗生素(例如多柔比星,及柔红霉素)),病毒感染,心包炎,心肌炎,牙龈炎,甲状腺疾病,辐射暴露,已知增加心力衰竭的风险的遗传缺陷(例如Bachinski and Roberts, Cardiol.Clin.16:603-610,1998;Siu et al.,Circulation 8:1022-1026,1999;and Arbustini et al.,Heart 80:548-558,1998中所述),饥饿,进食障碍(例如厌食症及贪食症),心力衰竭的家族历史,及心肌肥大。

[0056] 根据本发明,可间歇性地施用神经调节蛋白,以实现预防,例如通过防止或降低那些鉴定为濒临危险者中的充血性心脏病进展速度。例如,给患早期补偿性肥大的患者施用神经调节蛋白允许维持肥大性状态及阻止进展到心力衰竭。此外,可在发展补偿性肥大之前给予那些鉴定为濒临危险者心脏保护性神经调节蛋白治疗。

[0057] 在蒽环类抗生素化学治疗或蒽环类抗生素/抗-ErbB2(抗-HER2)抗体(例如,**赫赛汀®**)联合治疗之前及期间给癌患者施用神经调节蛋白可阻止患者的心肌细胞经历凋亡,由此保存心脏功能。已患心肌细胞损失的患者也受益于神经调节蛋白治疗,因为其余心肌组织通过展示肥大性生长及增加的收缩性响应神经调节蛋白暴露。

[0058] 治疗:可将神经调节蛋白及含由神经调节蛋白基因编码的EGF-样结构域的肽及药学-可接受的稀释剂,载质,或赋形剂施用于患者或实验动物。本发明的组合物可以单元剂

型提供。

[0059] 采用常规药学实践来提供适宜制剂或组合物,及将所述组合物施用给患者或实验动物。尽管优选静脉内施用,可采用任何适当的施用途径,例如,肠胃外,皮下,肌内,经皮,心内,腹膜内,鼻内,气雾剂,口服,或局部(例如,通过施加带能交叉真皮及进入血流的制剂的粘合贴剂)施用。

[0060] 治疗性制剂可取液体溶液或悬浮液形式;对于口服施用,制剂可取片剂或胶囊形式;及对于鼻内制剂,以粉末,鼻滴液,或气雾剂的形式。

[0061] 本领域中熟知的制备制剂的方法见于,例如,“Remington’s Pharmaceutical Sciences”。用于肠胃外施用的制剂可,例如,含赋形剂,无菌水,或盐水,聚烯基甘醇,例如聚乙二醇,蔬菜来源的油,或氢化萘。用于施用本发明的分子的其他潜在地有用的肠胃外递送系统包括乙烯-乙酸乙烯酯共聚物粒子,渗透泵,可植入的输注系统,及脂质体。用于吸入的制剂可含赋形剂,例如,乳糖,或可为含,例如,聚氧乙烯-9-月桂醚,甘胆酸盐及脱氧胆酸盐的水溶液,或可为以鼻滴液,或作为凝胶的形式施用的油性溶液。

[0062] 作为本发明的其他方面,提供了将本化合物用作药学,尤其是在治疗或预防前述病情及疾病。本文也提供的是本化合物在制备用于治疗或预防前述病情及疾病之一的药物中的用途。

[0063] 关于静脉内注射,剂量水平变动于约0.001mg/kg,0.01mg/kg~至少10mg/kg,以如本文所述从至少约每24,36,48小时~约每96小时及尤其是每48,72,或96小时或以上的规则的时间间隔。在特定实施方式中,静脉内注射剂量水平变动于约0.1mg/kg~约10mg/kg,以如本文所述从约每48小时~约每96小时及尤其是每48,72,或96小时或以上的规则的时间间隔。在另一特定实施方式中,静脉内注射剂量水平变动于约1mg/kg~约10mg/kg,以如本文所述从约每48小时~约每96小时及尤其是每48,72,或96小时或以上的规则的时间间隔。在再一特定实施方式中,静脉内注射剂量水平变动于约0.01mg/kg~约1mg/kg,以如本文所述从约每48小时~约每96小时及尤其是每48,72,或96小时或以上的规则的时间间隔。在再一特定实施方式中,静脉内注射剂量水平变动于约0.1mg/kg~约1mg/kg,以如本文所述从约每48小时~约每96小时及尤其是每48,72,或96小时或以上的规则的时间间隔。

[0064] 关于皮下注射,剂量水平变动于约0.01mg/kg~至少10mg/kg,以如本文所述从约每48小时~约每96小时及尤其是每48,72,或96小时或以上的规则的时间间隔。在特定实施方式中,注射剂量水平变动于约0.1mg/kg~约10mg/kg,以如本文所述从约每48小时~约每96小时或以上的规则的时间间隔,及尤其是每48,72,或96小时。在另一特定实施方式中,注射剂量水平变动于约1mg/kg~约10mg/kg,以如本文所述从约每48小时~约每96小时或以上的规则的时间间隔,及尤其是每48,72,或96小时。

[0065] 在再一特定实施方式中,注射剂量水平变动于约0.01mg/kg~约1mg/kg,以如本文所述从约每48小时~约每96小时或以上的规则的时间间隔,及尤其是每48,72,或96小时。在再一特定实施方式中,注射剂量水平变动于约0.1mg/kg~约1mg/kg,以如本文所述从约每48小时~约每96小时或以上的规则的时间间隔,及尤其是每48,72,或96小时。

[0066] 通常选择经皮剂量以提供相比使用注射剂量实现的类似或更低血水平。

[0067] 本发明的化合物可作为单独的活性剂施用,或它们可与其他试剂组合施用,包括展示相同或类似治疗性活性及对于所述组合的施用测定为安全的及有效的其他化合物。其

他用于治疗CHF的所述化合物包括：脑促尿钠排泄肽(BNP)，阻断特异性神经激素的形成或作用的药物(例如血管紧张素转变酶抑制剂(ACE-抑制剂)，血管紧张素受体拮抗剂(ARBs)，醛甾酮拮抗剂及 β -肾上腺素能药物受体阻断剂)，增强心脏收缩性的变力性剂(例如多巴酚丁胺，地高辛)，减少淤血的血管扩张剂(例如硝酸酯，奈西立肽)和/或利尿药(例如呋塞米)，及一或多种抗高血压药试剂(例如 β -阻断剂，ACE-抑制剂及ARBs)，硝酸酯(硝酸异山梨酯)，肼屈嗪，及钙通道阻断剂。

[0068] 如上所述，医学干扰涉及药物治疗要求选择适当的药物及其以足够的剂量方案递送。足够的剂量方案涉及治疗的足够的剂量，途径，频度，及持续时间。药物治疗的根本目标是在作用位点获取最佳药物浓度，以致使经治疗的患者克服使需要治疗的病理学过程。广义地说，药物处置的原理的基础知识辅助适当的剂量方案的选择。但是，可在这里使用治疗性药物监控(TDM)作为辅助主治医师确定用于个体患者的医学治疗的选定的药物的有效及安全的剂量方案的补充性工具。

[0069] 靶浓度及治疗性窗：最佳药物浓度的定义变化取决于特定药物的药效学特征。用于时间-依赖性抗生素(如青霉素)的最佳治疗，例如，与达到2~4的峰浓度和MIC(最小抑制性浓度)的比例及等于75%的剂量间隔的MIC以上的时间相关。浓度-依赖性抗生素(如庆大霉素)，例如，功效与获得约8~10的峰浓度和MIC比例相关。与特定药物的施用相关的细微差别无关地，药物治疗旨在在已于之前基于靶物种中药物的药物代谢动力学，药效学及毒性特征测定的“治疗性窗”的限制内达到靶血浆浓度(其常反映作用位点的浓度)。此窗的宽度就不同药物及物种而变化。当最小有效的浓度和最小毒性浓度之间的差异小(2~4倍)时，治疗性窗被称为窄。相反，当有效和毒性浓度之间有大的差异时，药物视为具有宽治疗性窗。有窄治疗性窗的药物之一例为地高辛，其中平均有效和毒性浓度之间的差异为2或3倍。另一方面，阿莫西林具有宽治疗性范围，及患者的过量施剂通常不与毒性问题相关。

[0070] 药物应答中的存活力：有相应药物应答的相同物种的健康受试者中的显著的存活力是共同的。而且，疾病状态具有影响器官系统及功能(例如，肾，肝脏，含水量)(可进而影响药物应答)的潜力。进而，此贡献于施用药物的患病个体中药物应答的增加的差异。然而另一相关问题涉及以其导致可导致对一或两种药物应答的改变的的药物代谢动力学相互作用的时间施用多于一种药物。总之，生理(例如，年龄)，病理(例如，疾病效应)，及药理学(例如，药物相互作用)因素可改变动物中的药物处置。随其发生的个体中增加的存活力可导致有窄治疗指数的药物的治疗性失败或毒性。

[0071] 将受益于本发明的治疗方案的患者群相当地多样，例如，患损伤的肾功能的患者是良好的候选，因为连续的水平蛋白治疗剂常相关于肾血管球沉着物。因此，如描述于本发明的不维持恒定血浆水平的治疗性方案的实用性将对于患既有的功能的任何减少可有害的缓和的肾功能的患者非常有益。类似地，如本文所述短暂的及间歇的暴露于治疗剂(例如GGF2)可有益于患响应用生长因子的慢性及连续的刺激的肿瘤类型的患者。其他可特异性地受益于如本文所述的间歇的治疗的患者是患许旺细胞瘤及其他外周神经病的患者。这是本发明的优势，即间歇的施剂可在不维持各组织的连续的副作用-相关的刺激中具有显著的优点。

[0072] 以确定血清药物水平，以及报告的水平的目的采血的恰当的时机要求考虑药物测量的药代动力学性质。将这些性质的讨论中使用的一些术语在以下段落定义。

[0073] 半衰期:间隔开始时存在的血清浓度降低50%需要的时间。知晓近似的半衰期必要于临床医师,由于其决定口服试剂的最佳施剂日程表,血清浓度的剂量内波动,及需要于达到稳定状态的时间。

[0074] 简言之,已对GGF2进行多个药物代谢动力学研究。GGF2的典型的半衰期就静脉内(iv)途径,在4和8小时之间,然而经皮下(皮下)施用的GGF2的半衰期在11和15小时之间。 C_{max} ,AUC, T_{max} 及 $T_{1/2}$ 显示于以下表1和2。当半衰期对于通过这些方法精确测定过长时,分几次代替一次。

[0075] 表1及表2

[0076] 附录7

[0077] 单个静脉内或皮下剂量的 ^{125}I -rhGGF2后雄性Sprague-Dawley大鼠血浆中 ^{125}I -rhGGF2-来源的放射性的平均药代动力学

| 参数 | 组 1 (n=2) | | 组 2 (n=1) | |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 总 | TCAPrecip | 总 | TCAPrecip |
| C_{max} (μg eq/g) | 0.3289 | 0.2953 | 0.0157 | 0.01 |
| AUC 0-t (μg eq-h/g) | 1.27 | 0.01 | 0.27 | 0.17 |
| AUC inf (μg eq-h/g) | 1.37 | 0.96 | 0.39 | 0.26 |
| T_{max} (h) | 0.08 | 0.08 | 6.0 | 6.0 |
| 半衰期 | 6.37 | 6.11 | 13.20 | 14.66 |
| | 组 1-静脉内 | | 组 2-皮下 | |

[0079] 单个静脉内或皮下剂量的 ^{125}I -rhGGF2后雄性Sprague-Dawley大鼠血浆中 ^{125}I -rhGGF2-来源的放射性的平均药代动力学

[0080] 附录9

| 参数 | 组 1 (n=2) | | 组 2 (n=1) | |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 总 | TCAPrecip | 总 | TCAPrecip |
| C_{max} (μg eq/g) | 0.2611 | 0.2291 | 0.0197 | 0.0034 |
| AUC 0-t (μg eq-h/g) | 1.488 | 0.567 | 0.335 | 0.064 |
| AUC inf (μg eq-h/g) | 1.667 | 0.62 | - | - |
| T_{max} (h) | 0.08 | 0.08 | 12.0 | 12.0 |
| 半衰期 | 7.75 | 7.96 | - | - |
| | 组 1-静脉内 | | 组 2-皮下 | |

[0082] 对于静脉内及皮下施用,施用后血浆浓度分别显示于图6和7。如图6和7中所示, C_{max} ,指最大血浆浓度(在施用后任何时间血浆中测量的最大浓度);AUCinf,指对时间无限大的浓度对比时间曲线下面积(该方法用于预期测定具有检测限制);AUC0-t,指血浆浓度下面积(从计时起点到最后可测量的浓度的时间曲线);通过任何方法的AUC指总暴露于动物的估计值;及 T_{max} ,指最大血浆浓度的中位时间。

[0083] 如由表及图证明,不可能通过以每第四天,每隔一天或每天施剂的施剂途径维持稳定状态治疗性水平。一天后及甚至之前久,水平不可测量,如由表11所示的数据反映。

表 11: 静脉内施用后 GGF2 的 PK 参数*

| 大鼠 | | | | | | | |
|---------------|--|--|---|---|----------------------|-------------------------|----------------------------|
| 剂量 (mg/kg) | AUC _{0-∞} ((小 时 •ng/mL) | AUC _{0-∞} ((小 时 •ng/mL) /剂量 (mg/kg) | AUC _{0-最后} ((小 时 •ng/mL) | AUC _{0-最后} ((小 时 •ng/mL) /剂量 (mg/kg) | CL (mL/分钟 /kg) | t _{1/2} (h) | V _{ss} (mL/kg) |
| 8 | 16100±20500 | 2010±2560 | 16800±22300 | 2100±2790 | 18.1±12.7 | 1.46±1.84 | 1050±331 |
| 16 | 39600±9440 | 2470±590 | 38300±10000 | 2390±625 | 7.00±1.33 | 1.69±0.430 | 532±145 |
| 猴 | | | | | | | |
| 8 | 15900±1690 | 1980±212 | 15100±1730 | 1890±217 | 8.48±0.910 | 2.02±0.358 | 1110±113 |

[0085] *由从通过ELISA所测的血浆GGF2浓度获得的数据获取。报告的数据是平均值±SD。

[0086] 稳定状态:稳定状态血清浓度是用各剂量回到的那些值及代表药物施用的量及以给定时间间隔消除的量之间的平衡的状态。用任何药物的长期剂量期间,其平均稳定状态血清浓度的2种主要决定因素是特定患者中药物施用的速度及药物的总清除率。

[0087] 峰血清浓度:血清浓度-对比-时间曲线上的最大浓度点。由于其代表输入及输出速度之间的复杂的关系,峰血清浓度的确切的时间难以预测。

[0088] 谷血清浓度:施剂间隔期间发现的最小血清浓度。谷浓度理论上存在于施用下一剂量立即之前的时期。

[0089] 吸收:药物进入身体的过程。血管内施用的药物总地吸收,但血管外施用产生吸收的变化的程度及速度。吸收速度和消除速度之间的关系是血流中药物浓度的主要决定子。

[0090] 分布:全身可用的药物从血管内空间到血管外流体及组织的扩散,从而到靶受体位点。

[0091] 治疗性范围:与高程度的功效及剂量-相关的毒性的低风险相关的血清药物浓度范围。治疗性范围是统计学概念:其是与大部分患者中的治疗性应答相关的浓度范围。结果,一些患者以范围下限以下的血清水平呈现治疗性应答,而其他要求超过对于治疗性益处上限的血清水平。

[0092] 样品收集的正确时机重要,由于药物治疗常基于血清浓度测定修正。吸收及分布期应完全,及在样品抽出之前达到稳定-状态浓度。稳定-状态浓度存在之前得到的水平可错误地低;基于所述结果的增加剂量可产生毒性浓度。此外,当进行比较性测量时,采样时间一致是重要的。

[0093] 与剂量相关的采血时机对于血清浓度结果的正确解释关键。与药物施用相关的样品抽出时间的选择应基于药物的药代动力学性质,其剂型及测定样品的临床原因(例如,功效评定或可能的药物-诱导的毒性的阐明)。对于有短半衰期的药物的常规血清水平监控,可收集稳定状态峰及谷样品,以表征血清浓度特征;对于有长半衰期的药物而言,稳定-状态谷样品单独通常足够。

[0094] “充血性心力衰竭”是指致使心脏在静止时或运动时不能维持正常血输出,或在正常心脏填充压力的情况中不能维持正常心脏输出的损伤的心脏功能。约40%或以下的左心室射血分数指示充血性心力衰竭(作为比较,约60%的射血分数是正常)。充血性心力衰竭的患者显示良好-已知的临床症状及迹象,例如呼吸急促,胸腔积液,静止时或运动时疲乏,收缩性功能障碍,及水肿。充血性心力衰竭通过熟知的方法容易诊断(见,例如,“Consensus

recommendations for the management of chronic heart failure."Am.J.Cardiol.,83 (2A):1A-38-A,1999)。

[0095] 相对严重性及疾病进展使用熟知的方法评定,例如物理检查,超声波心动图记术,放射性核素成像,侵袭性血液动力学监控,磁共振血管造影术,及与氧摄取研究偶联的锻炼踏车测试。

[0096] “缺血性心脏病”是指由心肌需要氧及适当的氧供给之间的不平衡所致的任何病症。缺血性心脏病的多数病例产生自如如动脉粥样硬化或其他血管病症中出现的冠状动脉缩小。

[0097] “心肌梗塞”是指缺血性疾病导致被瘢痕组织取代的心肌区的过程。

[0098] “心脏毒性”是指通过直接或间接损害或杀伤心肌细胞降低心脏功能的化合物。

[0099] “高血压”是指被医学专业者(例如,医师或护士)认为是高于正常及带了发展充血性心力衰竭的增加了的风险的血压。

[0100] “治疗”是指施用神经调节蛋白或神经调节蛋白-样肽在治疗期间,相对于将在无治疗的情况下发生的疾病进展,以统计学显著的方式减缓或抑制充血性心力衰竭进展。熟知的标志(例如左心室射血分数,锻炼表现,及其他上列临床测试),以及存活率及住院治疗速度可用于评定疾病进展。治疗是否以统计学显著的方式减缓或抑制疾病进展可通过本领域熟知的方法测定(见,例如,SOLVD Investigators,N.Engl.J.Med.327:685-691,1992and Cohn et al.,N.Engl.J Med.339:1810-1816,1998)。

[0101] “预防”是指最小化或部分或完全抑制处于发展充血性心力衰竭的风险的哺乳动物的充血性心力衰竭发展(如在“Consensus recommendations for the management of chronic heart failure."Am.J.Cardiol.,83 (2A):1A-38-A,1999中指定的)。确定是否通过施用通过已知的方法制备的神经调节蛋白或神经调节蛋白-样肽最小化或预防充血性心力衰竭,例如SOLVD Investigators,supra,及Cohn等人,supra中所述的那些。

[0102] 术语“治疗有效量”旨在表示引起由研究者,兽医,医学医生或其他临床医师观察的组织,系统,动物或人的生物或医学应答的药物或药理学试剂的量。治疗性变化是以期减轻疾病或解决病情的方向所测的生物化学特征性中的变化。更具体而言,“治疗有效量”是足以降低与医学病情或虚弱相关的症状,以标准化导致特异性身体功能损伤的疾病或病症中的身体功能,或提供一或多种临床上所测的疾病参数的改善的量。

[0103] 术语“预防性有效量”旨在表示将预防或降低被研究者,兽医,医学医生或其他临床医师观察到预防组织,系统,动物或人中的生物或医学事件的发生的风险的药理学药物的量。

[0104] 术语“治疗性窗”旨在表示实现任何治疗性变化的最小的量与导致对患者的毒性立即之前的应答的最大量之间的剂量范围。

[0105] “处于充血性心力衰竭的风险”是指个体who吸烟,肥胖(即,超过它们的理想重量20%或以上),已或将暴露于心脏毒性化合物(例如蒽环类抗生素),或患有(或患过)高血压,缺血性心脏病,心肌梗塞,已知增加心力衰竭风险的遗传缺陷,心力衰竭家族历史,心肌肥大,肥大性心肌病,左心室心脏收缩功能障碍,冠状动脉分流手术,血管疾病,动脉粥样硬化,酒精中度,心包炎,病毒感染,牙龈炎,或进食障碍(例如,神经性厌食症或贪食症),或是酒精或可卡因成瘾。

- [0106] “降低心肌疏伐进展”是指维持心室心肌细胞肥大以至于心室壁厚度维持或增加。
- [0107] “抑制心肌凋亡”是指神经调节蛋白处理相比未处理的心肌细胞,抑制心肌细胞死亡至少10%,更优选至少15%,再更优选为至少25%,甚至更优选至少50%,再更优选至少75%,及最优选至少90%。
- [0108] “神经调节蛋白”或“NRG”是指由NRG-1, NRG-2, 或NRG-3基因或核酸(例如, cDNA) 编码, 及结合及活化ErbB2, ErbB3, 或ErbB4受体, 或其组合的肽。
- [0109] “神经调节蛋白-1”, “NRG-1”, “神经生长因子”, “GGF2”, 或“p185erbB2配体”是指当与另一受体(ErbB1, ErbB3或ErbB4) 成对时结合ErbB2受体, 及由p185erbB2配体基因编码的肽, 描述于美国专利No. 5, 530, 109; 美国专利No. 5, 716, 930; 及美国专利No. 7, 037, 888, 将其各均通过引用整体并入本文。
- [0110] “神经调节蛋白-样肽”是指具有由神经调节蛋白基因编码的EGF-样结构域, 及结合及活化ErbB2, ErbB3, ErbB4, 或它们的组合的肽。
- [0111] “表皮生长因子-样结构域”或“EGF-样结构域”是指结合及活化ErbB2, ErbB3, ErbB4, 或其组合, 及与如公开于Holmes等人, Science 256:1205~1210, 1992年; 美国专利No. 5, 530, 109; 美国专利No. 5, 716, 930; 美国专利No. 7, 037, 888; Hijazi et al., Int. J. Oncol. 13:1061-1067, 1998; Chang et al., Nature 387:509-512, 1997; Carraway et al., Nature 387:512-516, 1997; Higashiyama et al., J Biochem. 122:675-680, 1997; 及WO 97/09425的EGF受体-结合结构域带有结构相似性的由NRG-1, NRG-2, 或NRG-3基因编码的肽基序。对于对应于由NRG-1基因编码的EGFL结构域1~6的核酸及氨基酸序列见图9~14。
- [0112] “抗-ErbB2抗体”或“抗-HER2抗体”是指特异性结合ErbB2 (在人中也被称为HER2) 受体的细胞外结构域及通过神经调节蛋白结合阻止ErbB2 (HER2)-依赖性信号转导起始的抗体。
- [0113] “转化的细胞”是指已利用重组DNA技术或已知的基因治疗技术导入编码神经调节蛋白或具有神经调节蛋白EGF-样结构域的肽的DNA分子的细胞(或细胞后代)。
- [0114] “启动子”是指足以指导转录的最小的序列。也包括在本发明的是足以致使启动子-依赖性基因表达基于细胞类型或生理状态(例如, 含氧量低的对比含氧量正常的条件) 可控制的, 或可被外部信号或试剂诱导的启动子元件; 所述元件可位于天然的基因的5' 或3' 或内部区中。
- [0115] “运作性连接的”是指编码肽的核酸(例如, cDNA) 及一或多个调控序列以当适当的分子(例如, 转录活化子蛋白) 结合到调控序列时以使基因表达的方式连接。
- [0116] “表达载体”是指源于, 例如, 噬菌体, 腺病毒, 反转录病毒, 痘病毒, 疱疹病毒, 或人工染色体的, 用于转移运作性连接到启动子的肽(例如, 神经调节蛋白) 编码序列到宿主细胞, 以至于编码的肽或肽在宿主细胞内表达的遗传加工的质粒或病毒。
- [0117] 除非另有定义, 本文所用的全部技术及科学术语与被本发明所属领域的普通技术人员通常理解的具有相同含义。
- [0118] 包括在此说明书中的文献, 法案, 材料, 装置, 物品的讨论等仅旨在提供本发明的背景。其不推荐或代表任何或全部这些形式部分基于现有技术形成的或是本申请的各权利要求的优先权日之前的与本发明相关领域中的共知常识。

[0119] 【其他实施方式】

[0120] 本发明已联系其特定实施方式描述,需知,其能进一步修饰,及本申请旨在覆盖任何变化,用途,或适应本发明,一般而言,遵循本发明的原理及包括所述从本公开内容脱离,在本发明所属领域中已知的或习惯的实践内,及可将其应用于前述必要的特征,及落入随附的权利要求的范围内。

[0121] 以下实施例将辅助本领域技术人员更佳了解本发明及其原理及优点。期望这些实施例为阐明本发明,及不限制其范围。

【实施例】

[0122] 如本文中以上所示,神经调节蛋白是结构上与表皮生长因子(EGF)相关的生长因子家族,及对于心脏正常发育必要。证据提示,神经调节蛋白是治疗心脏病(包括心力衰竭,心肌梗塞,化学治疗剂毒性及病毒心肌炎)的潜在治疗剂。

[0123] 本文所述的研究用于定义大鼠中充血性心力衰竭左前降支(LAD)动脉结扎模型中的施剂。多个神经调节蛋白剪接变体克隆及产生。将由来自之前报道(Liu等人,2006)的EGF-样结构域(EGF-1d)构成的神经调节蛋白片段与称为神经胶质生长因子2(GGF2)的全长神经调节蛋白及域有Ig结构域的EGF-样结构(EGF-Ig)比较。雄性及雌性Sprague-Dawley大鼠经历LAD动脉结扎。在结扎后7天,大鼠每天用神经调节蛋白静脉内(iv)处理。心脏功能通过超声波心动图记术监控。

[0124] 第一研究比较了用等摩尔量的EGF-1d或GGF2施剂10天(对于GGF2,此计算为0.0625和0.325mg/kg)。GGF2处理导致,相比施剂时期末的EGF-1d,射血分数(EF)及缩短分数(FS)的显著($p<0.05$)更大改善。第二研究比较了用EGF-1d及EGF-Ig以等摩尔浓度施20天GGF2。GGF2处理导致显著改善的EF,FS及LVESD($p<0.01$)。用EGF-1d或EGF-Ig心脏生理的改善不维持此时期。第三研究每天(q 24小时),每隔一天(q 48小时)及每第四天(q 96小时)比较用GGF2(3.25mg/kg)施剂20天。全部3种GGF2治疗方案导致显著的心脏生理的改善,包括EF,ESV及EDV,及效应维持终止施剂后10天。本文呈现的研究确认GGF2为主要神经调节蛋白化合物,及建立施用其的最佳剂量方案。

[0125] 如所示本文中,本研究建立相比公开的神经调节蛋白片段的GGF2的相对功效(Liu等人,2006),起始剂量范围及剂量频度研究,及测定是否如之前报道需要BSA赋形剂。

[0126] 【方法和材料】

[0127] **【GGF2 (EGF-Ig) 的IgEGF (Ig154Y) 结构域的克隆,表达及纯化】**

[0128] DNA:从既有的GGF2 cDNA扩增IgEGF结构域及使用Nde1及BamH1限制性位点克隆进pet 15b载体(Novagen cat#69661~3)中。得到的蛋白是21.89kda+~3kDa His标签(=~25kDa)

[0129] IgEgf pet 15克隆的DNA序列:有下划线的序列是用于扩增的引物。以粗体显示的序列是用于将序列插入pet载体的克隆位点(Nde1及BamH1)。

CATATGttgcctccccaattgaaagagatgaaaagccaggaatcggctgcaggttccaaa
 L P P Q L K E M K S Q E S A A G S K
 ctagtcccttcgggtgtgaaaccagttctgaatactcctctctcagattcaagtgggttcaag
 L V L R C E T S S E Y S S L R F K W F K
 aatgggaatgaattgaatcgaaaaaacaaccacaaaatatcaagatacaaaaaaagcca
 N G N E L N R K N K P Q N I K I Q K K P
 gggaagtcagaacttcgcattaacaaagcatcactgggtgattctggagagtatatgtgc
 G K S E L R I N K A S L A D S G E Y M C
 [0130] aaagtgatcagcaaattaggaatgacagtgcctctgccaatatcaccatcgtggaatca
 K V I S K L G N D S A S A N I T I V E S
 aacgctacatctacatccaccactgggacaagccatcttgtaaaatgtgcggagaaggag
 N A T S T S T T G T S H L V K C A E K E
 aaaactttctgtgtgaatggaggggagtgcctcatggtgaaagacctttcaaacccctcg
 K T F C V N G G E C F M V K D L S N P S
 agatacttgtgcaagtgcccaaataagtttactggatcgctgccaaaactacgtaatg
 R Y L C K C P N E F T G D R C Q N Y V M
 gccagcttctac**GGATCC** (SEQ ID NO: 15)
 A S F Y (SEQ ID NO: 16)

[0131] 最终从pet15b载体翻译的蛋白示于下。载体部分加了下划线。

M G G S H H H H H G M A S M T G G T A N G V
 G D L Y D D D D K V P G S L P P Q L K E M K S
 Q E S A A G S K L V L R C E T S S E Y S S L R
 [0132] F K W F K N G N E L N R K N K P Q N I K I Q K
 K P G K S E L R I N K A S L A D S G E Y M C K
 V I S K L E N D S A S A N I T I V E S N A T S
 T S T T G T S H L V K C A E K E K T F C V N G
 G E C F M V K D L S N P S R Y L C K C P N E F
 T G D R C Q N Y V M A S F Y (SEQ ID NO: 17)

[0133] 【蛋白表达】将克隆使用过夜表达自动诱导系统(Novagen)在LB培养基中于25℃转化进用于蛋白表达的B121细胞24小时。

[0134] 【蛋白再折叠】从Novagen蛋白再折叠试剂盒,70123-3适应。

[0135] 【蛋白纯化】His TRAP柱-根据生产商的使用说明

[0136] 【蛋白印迹】蛋白表达通过蛋白印迹评定。得到的有His标签的条带以约25kD运行。

[0137] 将4~20%标准凝胶(Biorad)用于蛋白分辨,然后是转移到Protran硝酸纤维素纸(来自Schliecher及Schull的0.1μm孔径)。印迹在TBS-T(0.1%)中5%乳中封闭。将在TBS-T中的5%乳中的第一抗体(来自R&D系统的抗EGF人NRG1-α/HRG1-α亲和力纯化的多克隆Ab Cat#AF-296-NA)的1:1000稀释液液于室温1小时(也于4℃工作过夜)。以在TBS-T中的5%乳中的1:10,000稀释液使用兔抗山羊HRP第二抗体于室温1小时。全部洗涤在TBS-T中进行。

[0138] 【Ig154Y的纯化流程】将培养物在来自Novagen的过夜表达自动诱导系统1(cat# 71300-4)中于25℃生长。将培养物离心沉降及将沉淀提取,溶解及再折叠,以在纯化可发生之前获取Ig154Y。

[0139] 【用于提取,增溶及再折叠的物质】

[0140] 10×洗涤缓冲液:200mM Tris-HCl,pH 7.5,100mM EDTA,10%Triton X-100

[0141] 10×增溶缓冲液:500mM CAPS,pH 11.0

[0142] 50×透析缓冲液:1M Tris-HCl,pH 8.5

[0143] 30%N-月桂基肌氨酸-添加as粉末(Sigma 61739-5G)

- [0144] 1M DTT
- [0145] 还原的谷胱甘肽 (Novagen 3541)
- [0146] 氧化的谷胱甘肽 (Novagen 3542)
- [0147] **【A. 细胞裂解及包含体的制备】**
- [0148] -将细胞沉淀解冻及重悬浮于30ml 1×洗涤缓冲液。
- [0149] -将蛋白酶抑制剂(25μl的10×/50ml), DNA酶(200μl的1mg/ml/50ml) 及MgCl₂(500 μl的1M/50ml) 加入悬浮液。
- [0150] -细胞通过伴随在冰上冷却超声处理来裂解。
- [0151] -超声处理后通过以10000×g离心12分钟来收集包含体。
- [0152] -除去上清, 及将沉淀充分重悬浮于30ml的1×洗涤缓冲液。
- [0153] -重复步骤4。
- [0154] -将沉淀充分重悬浮于30ml的1×洗涤缓冲液。
- [0155] -通过以10000×g离心10分钟来收集包含体。
- [0156] **【B. 增溶及再折叠】**
- [0157] -从待处理的包含体的湿重, 计算对于以10~15mg/ml的浓度重悬浮包含体必需的1×增溶缓冲液的量。如果计算的体积大于250ml, 使用250ml。
- [0158] -于室温, 制备计算的体积的补充了0.3%N-月桂基肌氨酸(如果在进一步优化中需要, 可使用达2%) (300mg/100mL缓冲液) 及1mMDTT的1×增溶缓冲液。
- [0159] -将来自步骤2的计算的量的1×增溶缓冲液添加到包含体, 及轻轻混合。可将大的碎片通过重复的移液打碎。
- [0160] -在冰箱摇床中于25℃, 以50~100rpm温育4~5小时(或更长, 如果在进一步优化中需要)。
- [0161] -通过于室温以10000×g离心10分钟来澄清。
- [0162] -将含可溶性蛋白的上清转移到清洁管。
- [0163] **【C. 用于蛋白再折叠的透析流程】**
- [0164] -制备所需的体积的缓冲液用于溶解的蛋白的透析。透析应用大于样品体积的50倍的至少2次缓冲液更换来进行。将50×透析缓冲液稀释到1×以期望的体积及补充0.1mM DTT。
- [0165] -于4℃透析至少4小时。更换缓冲液及持续。透析额外的4或以上小时。
- [0166] -制备如步骤1中测定的额外的透析缓冲液, 但省略DTT。
- [0167] -通过用缺少DTT的透析缓冲液2次额外的更换(各分钟4hr) 持续透析。
- [0168] **【D. 促进二硫键形成的氧化还原再折叠缓冲液】**
- [0169] -制备在1×透析缓冲液中含1mM还原的谷胱甘肽(1.2g/4L) 及0.2mM氧化的谷胱甘肽(0.48g/4L) 的透析缓冲液。体积应为25倍大于溶解的蛋白样品的体积。冷却至4℃。
- [0170] -将来自步骤1的再折叠的蛋白于4℃过夜透析。
- [0171] **【用于纯化的物质】**
- [0172] 全部过程于4℃进行。
- [0173] **【化学品】**
- [0174] 氨基丁三醇盐酸盐(Sigma T5941-500G)

- [0175] 氯化钠5M溶液(Sigma S6546-4L)
- [0176] 氢氧化钠10N(JT Baker 5674-02)
- [0177] 咪唑(JT Baker N811-06)
- [0178] **【A.在HISPrep FF 16/10柱-20ml(GE Healthcare)上的纯化】**
- [0179] 缓冲液A:20mM Tris-HCl+500mM NaCl pH 7.5
- [0180] 缓冲液B:缓冲液+500mM咪唑pH 7.5
- [0181] 柱平衡:缓冲液A-5CV,缓冲液B-5CV,缓冲液A-10CV
- [0182] 负荷20ml的样品每次以0.5ml/分钟在20ml柱上运行
- [0183] 用5CV的缓冲液A洗涤柱
- [0184] 用5CV的280mM咪唑洗脱柱。
- [0185] 用10CV的100%缓冲液B清洁。
- [0186] 用15CV的缓冲液A平衡
- [0187] 用SDS-PAGE银染色分析级分
- [0188] 用Ig154Y合并级分
- [0189] **【B.His-标签去除】**
- [0190] 去除His-标签用来自Novagen的凝血酶切割捕获试剂盒(Cat#69022~3)进行。基于之前测试,最佳条件是针对每10 μ g的Ig154Y蛋白,以0.005U的酶/ μ l用凝血酶室温4小时。温育4小时后,添加16 μ l的链霉亲和素琼脂糖浆/单元的凝血酶。于室温摇动样品30分钟。通过自旋-过滤或无菌过滤(取决于体积)回收Ig154Y。
- [0191] 全切割通过EGF及抗-His蛋白印迹确定。
- [0192] **【C.Ig154Y浓度】**
- [0193] 用Millipore Centriprep 3000MWC0 15ml浓缩机(Ultracel YM-3,4320)调节到期望的浓度
- [0194] **【D.最终缓冲液中的储存】**
- [0195] 存储在20mM Tris+500mM NaCl pH 7.5和1 \times PBS+0.2%BSA。
- [0196] **【156Q(EGF-Id) [NRG1b2 EGF结构域(156Q)]的克隆,表达及纯化】**
- [0197] DNA:将NRG1b2 egf结构域从人脑cDNA克隆及使用Nde1及BamH1限制性位点克隆进pet 15b载体(Novagen cat#69661~3)。得到的蛋白是6.92kda+~3kDa His标签(=9.35kDa)
- [0198] NRG1b2 egf pet 15克隆的DNA序列
- [0199] 有下划线的序列是克隆位点(Nde1及BamH1)
- CATATGAGCCA TCTTGTAATA TGTGCGGAGA AGGAGAAAAC TTTCTGTGTG AATGGAGGGG
- AGTGCTTCAT GGTGAAAGAC CTTTCAAACC CCTCGAGATA CTTGTGCAAG TGCCCAAATG
- [0200] AGTTTACTGG TGATCGCTGC CAAACTACG TAATGGCCAG CTTCTACAAG GCGGAGGAGC
- TGTACCAGTA AGGATCC (SEQ ID NO: 18)
- [0201] 从pet15b载体最终翻译的蛋白示于下。egf结构域以绿色亮显。

[0202] 10 20 30 40 50
 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MSHLVKCAEK EKTFCVNGGE CFMVKDLSNP
 60 70 80
 SRYLCKCPNE FTGDRCQNYV MASFYKAEEL YQ (SEQ ID NO: 19)

[0203] 计算的pI/Mw:7.69/9349.58

[0204] **【蛋白表达】**

[0205] 将克隆使用过夜表达自动诱导系统 (Novagen) 在LB培养基中于25℃转化进用于蛋白表达的B121细胞24小时。表达主要在不溶性包含体中。

[0206] **【蛋白再折叠】**从Novagen蛋白再折叠试剂盒,70123-3适应。

[0207] **【蛋白纯化】**将蛋白以2.5ml/分钟装在阴离子交换柱DEAE。EGF-Id片段留在流通中,然而混入物以更高盐结合及洗脱。装载及洗涤缓冲液是50mM Tris pH7.9及洗脱缓冲液是有1M NaCl的50mM Tris pH7.9。将流通合并及用来自Millipore的Centriprep YM-3浓缩。

[0208] **【蛋白印迹】**通过蛋白印迹评定蛋白表达。得到的条带以约10kD运行。

[0209] 将4~20%标准凝胶 (Biorad) 用于蛋白分辨,然后是转移到Protran硝酸纤维素纸(0.1μm孔径来自的Schliecher及Schull)。将印迹在TBS-T (0.1%) 中的5%乳中封闭。使在TBS-T中的5%乳中的第一抗体(来自R&D系统的抗EGF人NRG1-α/HRG1-α亲和力纯化的多克隆Ab Cat#AF-296-NA)的1:1000稀释液于室温1小时(也于4℃工作过夜)。以在TBS-T中的5%乳中的1:10,000稀释液使用兔抗山羊HRP第二抗体于室温1小时。全部洗涤在TBS-T中进行。

[0210] **【NRG-156Q的纯化流程】**

[0211] 在来自Novagen的过夜表达自动诱导系统1 (cat#71300-4) 中于25℃生长培养物。有非常少的可溶性NRG-156Q (EGF-Id) 存在。将培养物离心沉降及提取沉淀,溶解及再折叠,以在纯化可进行之前获取NRG-156Q。

[0212] **【用于提取,增溶及再折叠的物质】**

[0213] 10×洗涤缓冲液:200mM Tris-HCl,pH 7.5,100mM EDTA,10%Triton X-100

[0214] 10×增溶缓冲液:500mM CAPS,pH 11.0

[0215] 50×透析缓冲液:1M Tris-HCl,pH 8.5

[0216] 30%N-月桂基肌氨酸-作为粉末添加(Sigma 61739-5G)

[0217] 1M DTT

[0218] 还原的谷胱甘肽 (Novagen 3541)

[0219] 氧化的谷胱甘肽 (Novagen 3542)

[0220] **【A.细胞裂解及包含体的制备】**

[0221] -在30ml 1×洗涤缓冲液中解冻及重悬浮细胞沉淀。根据需要全部重悬浮。

[0222] -将蛋白酶抑制剂(25μl的10×/50ml),DNA酶(200μl的1mg/ml/50ml)及MgCl2(500μl的1M/50ml)添加到悬浮液。

[0223] -通过超声处理裂解细胞。

[0224] a.贯穿此步骤在冰上冷却细胞。

[0225] b.使用方形端,在水平6,10倍超声处理30秒钟,直到悬浮液粘度变轻。在各超声处

理之间使悬浮液在冰上冷却60秒钟。当超声处理时,在50ml圆锥形管中保持体积不高于40ml。

[0226] -当完成时,将各悬浮液转移到250ml曲颈离心机瓶,用于以F-16/250转子使用。

[0227] -通过以10,000×g离心12分钟来收集包含体。

[0228] -去除上清(保留用于可溶性蛋白分析的样品)及在30ml的1×洗涤缓冲液中充分重悬浮沉淀。

[0229] -如步骤4中重复离心及保留沉淀。

[0230] -再次,在30ml的1×洗涤缓冲液中充分重悬浮沉淀。

[0231] -通过以10,000×g离心10分钟来收集包含体。倒出上清,及通过在纸巾上敲打颠倒的管来去除最后痕量的液体。

[0232] **【B. 增溶及再折叠】**

[0233] -从待处理的包含体的湿重,计算对于以10~15mg/ml的浓度重悬浮包含体必需的1×增溶缓冲液的量。如果计算的体积大于250ml,使用250ml。

[0234] -于室温,制备计算的体积的补充了0.3%N-月桂基肌氨酸(可使用达2%,如果在进一步优化中需要)(300mg/100mL缓冲液)及1mM DTT的1×增溶缓冲液。

[0235] -将计算的量的来自步骤2的1×增溶缓冲液添加到包含体及轻轻混合。可将大的碎片通过重复的移液打碎。

[0236] -在冰箱摇床中于25℃,以50~100rpm温育4~5小时。

[0237] -通过于室温以10,000×g离心10分钟来澄清。

[0238] **【C. 用于蛋白再折叠的透析流程】**

[0239] -制备所需的体积的缓冲液用于溶解的蛋白的透析。透析应用大于样品的50倍体积的至少2次缓冲液更换来进行。

[0240] -将50×透析缓冲液以期望的体积稀释到1×,及补充0.1mM DTT。

[0241] -于4℃透析至少4小时。更换缓冲液及持续。透析额外的4或以上小时。

[0242] -制备额外的如步骤1中测定的透析缓冲液,但省略DTT。

[0243] -用缺少DTT的透析缓冲液,通过2次额外的更换(各分钟4小时)持续透析。

[0244] **【D. 促进二硫键形成的氧化还原再折叠缓冲液】**

[0245] -制备在1×透析缓冲液中含1mM还原的谷胱甘肽(1.2g/4L)及0.2mM氧化的谷胱甘肽(0.48g/4L)的透析缓冲液。体积应为25倍大于溶解的蛋白样品的体积。冷却至4℃。

[0246] -于4℃过夜透析来自步骤1的再折叠的蛋白。

[0247] **【用于纯化的物质】**

[0248] 全部过程于4℃进行。

[0249] **【化学品】**

[0250] 氨基丁三醇盐酸盐(Sigma T5941-500G)

[0251] 氯化钠5M溶液(Sigma S6546~4L)

[0252] 氢氧化钠10N(JT Baker 5674-02)

[0253] **【E. 在DEAE HiPrep 16/10阴离子柱-20ml(GE Healthcare)上的纯化】**

[0254] 缓冲液A:50mM Tris-HCl pH 8.0

[0255] 缓冲液B:50mM Tris-HCl,有1M NaCl pH 8.0

- [0256] 柱平衡:缓冲液A-5CV,缓冲液B-5CV,缓冲液A-10CV
- [0257] -以2.0ml/分钟 (NRG-156 (EGF-Id) 在流通中) 在20ml柱上每次运行负荷50ml的样品。
- [0258] -20ml柱用5CV的缓冲液A洗涤
- [0259] 20ml柱用有5CV的至100%B的梯度。这是为了洗脱下混入物。
- [0260] -用10CV的100%缓冲液B清洁。
- [0261] -用15CV的缓冲液A平衡
- [0262] -用SDS-PAGE银染色分析级分
- [0263] -用NRG-156Q (10kDa) 合并级分
- [0264] **【F.NRG-156 (EGF-Id) 的浓度】**
- [0265] -用Millipore Centriprep 3000MWC0 15ml浓缩机 (Ultracel YM-3,4320) 浓缩
- [0266] -使用修饰的Lowry蛋白测定来测定浓度。
- [0267] **【G.His-标签去除】**
- [0268] His-标签的去除用来自Novagen的凝血酶切割捕获试剂盒 (Cat#69022~3) 进行。基于之前测试,最佳条件是用凝血酶以0.005U的酶/ μ l对于每10 μ g的NRG-156Q (EGF-Id) 蛋白室温4小时。温育4小时后,添加16 μ l的链霉亲和素琼脂糖浆/单元的凝血酶。于室温摇动样品30分钟。通过自旋-过滤或无菌过滤 (取决于体积) 回收NRG-156Q。完全切割用EGF及抗-His蛋白印迹确定。
- [0269] **【H.最终缓冲液中的储存】**
- [0270] 于4℃储存在有0.2%BSA的1 \times PBS中。
- [0271] **【GGF2的表达及纯化】**
- [0272] 对于GGF2的克隆及背景信息,见USPN 5,530,109。细胞系描述于USPN 6,051,401。各USPN 5,530,109及USPN 6,051,401的整个内容均通过引用整体并入本文。
- [0273] **【CHO-(Alpha2HSG)-GGF细胞系】**设计此细胞系,以产生足够的量的胎球蛋白 (人alpha2HSG),以支持无血清条件中rhGGF2的高产生速度。
- [0274] Cho (dhfr-) 细胞用图16中显示的表达载体 (pSV-AHSG) 转染。稳定的细胞在氨苄西林选择下生长。指定细胞系 (dhfr-/ α 2HSGP)。dhfr-/ α 2HSGP细胞然后用图16中显示的含人GGF2的编码序列的pCMGGF2载体使用阳离子脂质DMRIE-C试剂 (生命Technologies#10459~014) 转染。
- [0275] 在标准流程下使用甲氨喋呤 (100nM,200nM,400nM,1 μ M) 以4~6周间隔衍生稳定的及高产生细胞系。使细胞从含血清的培养基逐渐脱离。克隆通过标准限制稀释方法分离。培养基要求之细节见于上述报道。
- [0276] 为增强转录,GGF2编码序列放置在EBV BMLF-1干扰序列 (MIS) 后。见图17的模式图。
- [0277] MIS序列 (SEQ ID NO:20)
- [0278] CGAT[AACTAGCAGCATTTCCTCCAACGAGGATCCCGCAG
- [0279] (GTAAGAAGCTACACCGGCCAGTGGCCGGGGCC
- [0280] CGATAACTAGCAGCATTTCCTCCAACGAGGATCCCGCAG (GTAAGAAGCTACACCGGCC
- [0281] AGTGGCCGGGGCC

[0282] GTGGAGCCGGGGGCATCCGGTGCCTGAGACAGAGGTGCTCAAGGCAGTCTCCACCTTTT

[0283] GTCTCCCCTCTGCAG) AGAGCCACATTCTGGAA]GT

[0284] GGF2编码序列 (SEQ ID NO:1)

301 ggccccccggg cccagcgccc cggtcccgcc gcccgcctgt cgccgcctgt gccgctgctg
361 ccactactgc tgctgctggg gaccgcggcc ctggcgccgg gggcgccggc cggcaacgag
421 gcggtcccg cgggggcctc ggtgtgtac tegtcccgcc ccagcgtggg atcgggtgag
481 gagctagctc agcgcgcgcg ggtggtgatc gagggaaagg tgcaccgcga gcggcgccag
541 cagggggcac tcgacaggaa ggcggcgccg gcggcgccgg aggcaggggc gtggggcgcc
601 gatcgcgagc cgccagccgc gggccacagg gcgctggggc cgcccgccga ggagccgctg
661 ctgcgcgcca acgggacgt gccctcttg gccaccgcc cggtgcccag cgccggcgag
721 cccggggagg aggcgcctc tctggtgaag gtgcaccagg tgtggcggt gaaagccggg
781 ggcttgaaga aggactcgt gctaccgtg cgctgggga cctggggcca cccgccttc
841 cctcctgctg ggaggtcaa ggaggacagc aggtacatct tcttcatgga gcccgacgcc
[0285] 901 aacagcacca gccgcgcgc gccgccttc cgagcctct tccccctct ggagacgggc
961 cggaacctca agaaggagg cagccgggtg ctgtgcaagc ggtgcgcctt gcctcccaa
1021 ttgaaagaga tgaaaagcca ggaatcggc gcaggttcca aactagtctt tcggtgtgaa
1081 accagttctg aatactcctc tctcagattc aagtggttca agaattggaa tgaattgaat
1141 cgaaaaaaca aaccacaaa tatcaagata caaaaaagc cagggaagtc agaacttcgc
1201 attaacaaag catcactggc tgattctgga gagtatatgt gcaaagtgt cagcaaatta
1261 ggaaatgaca gtgcctctgc caatatcacc atcgtggaat caaacgctac atctacatcc
1321 accactggga caagcatct tgtaaaatgt gcggagaagg agaaaacttt ctgtgtgaat
1381 ggaggggagt gcttcattgt gaaagacct tcaaaccct cgagatactt gtgcaagtgc
1441 ccaaagtgt ttactggtga tcgtgccaa aactacgtaa tggccagctt ctacagtacg
1501 tccactcctt ttctgtctct gcctgaatg

[0286] GGF2蛋白序列 (SEQ ID NO:2)

[0287] MRWRRAPRRSGRPGPRAQRPGSAARSSPPLPLPLLLLLGTAALAPGAAAGNEAAPAGASVCYSSPPSV
GSVQELAQRAAVVIEGKVHPQRRQQGALDRKAAAAAGEAGAWGGDREPPAAGPRALGPPAEELLAANGTVPSWPTA
PVPSAGEPGEEAPYLKVHVQVWAVKAGGLKKDSLLTVRLGTWGHFAFPSCGRLKEDSRYIFFMEPDANSTSRAPAAF
RASFPPLETGRNLKKEVSRVLCKRCALPPQLKEMKSQESAAGSKLVLCETSSEYSSLRFKWFKNELNRKNKPQN
IKIQKKPGKSELINKASLADSGEYMCKVISKLGNDASANITIVESNATSTSTGTSHLVKCAEKEKTFVNGGEC
FMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYSTSTPFLSLPE

[0288] GGF2产生: 将一瓶以 2.2×10^6 细胞/mL的GGF2解冻到100mL的Acorda培养基1 (见表3), 及扩展直到达到足够数到种子产生容器。细胞在21通气的滚瓶中以 1.0×10^5 细胞/mL接种于生产培养基Acorda培养基2 (见表4)。滚瓶维持于37℃5天, 然后降低到27℃26天。监控滚瓶的细胞计数及总体外观, 但它们不进料。一旦活力在10%以下, 将细胞旋转出, 及收获条件培养基, 及无菌过滤。

[0289] 表3: 培养基1

[0290]

| 项目 | 供应商 | 货号 | 终浓度 |
|-------------------------|------------|-----------|-----------------------------|
| CD-CHO | Invitrogen | 10743-029 | -去除50ml, 然后添加以下成分 |
| FeSO ₄ .EDTA | Sigma | F-0518 | 1 × (10ml/L) |
| L-谷氨酰胺 | Cellgro | 25-005-CI | 4mM (20ml/L) |
| 重组人胰岛素 | Sigma | I-9278 | 290U/L (1ml/L) |
| 非-必要的氨基酸 | Cellgro | 25-025-CI | 1 × (10ml/L) |
| 豚4型大豆-HySoy | Sigma | P0521 | 20 × CD-CHO (50ml/L) 中制成的粉末 |
| 庆大霉素 | Invitrogen | 15750-078 | 100μg (2ml/L) |

[0291] 表4: 培养基2

| | | | | |
|--------|-------------------------|------------|------------|----------------------------|
| [0292] | 项目 | 供应商 | 货号 | 终浓度 |
| | CD-CHO | Invitrogen | 10743-029 | 50% (-50ml 第一) |
| | HyQ SFX-CHO | HyClone | SH30187.02 | 50% (-50ml 第一) |
| | FeSO ₄ .EDTA | Sigma | F-0518 | 1× (10ml/L) |
| | L-谷氨酰胺 | Cellgro | 25-005-CI | 4mM (20ml/L) |
| | 重组人胰岛素 | Sigma | I-9278 | 290U/L (1ml/L) |
| | 非-必要的氨基酸 | Cellgro | 25-025-CI | 1× (10ml/L) |
| | 脲4型大豆-HySoy | Sigma | P0521 | 20× CD-CHO (50ml/L) 中制成的粉末 |
| | 庆大霉素 | Invitrogen | 15750-078 | 100μg (2ml/L) |

[0293] 【GGF2的纯化流程】

[0294] 全部过程于4℃进行。

[0295] 化学品：

[0296] 乙酸钠

[0297] 冰醋酸 (用于pH调节)

[0298] 10N NaOH (用于pH调节)

[0299] NaCl

[0300] 硫酸钠

[0301] L-精氨酸 (JT Baker cat#:2066-06)

[0302] 甘露糖醇 (JT Baker cat#:2553-01)

[0303] 原材料:条件培养基上清。调整pH到6.5。

[0304] 【步骤1】

[0305] 捕获-阳离子交换层析

[0306] HiPrep SP 16/10 (Amersham Biosciences)

[0307] 柱平衡:缓冲液A-5CV,缓冲液B-5CV,缓冲液15%B-5CV

[0308] 缓冲液A:20mM乙酸钠,pH 6.0

[0309] 缓冲液B:20mM乙酸钠,pH 6.0,1M NaCl

[0310] 以2ml/分钟用连续的负荷过夜 (如果可能) 来负荷样品。结合以连续的负荷更佳。

[0311] 起始样品的最大容量:5mg GGF2/ml培养基

[0312] 流速:3ml/分钟

[0313] 首次洗涤:15%B,10CV

[0314] 第二次洗涤:35%B,10CV

[0315] GGF2洗脱:60%B,8CV

[0316] 柱洗涤:100%B,8CV

| | | | | |
|--------|-------|-------------------------------|----------|----------------|
| [0317] | 缓冲液: | 组合物 | 导电性 | 使用 |
| | 15%B | 20mM 乙酸钠, pH 6.0, 150mM NaCl | | 预平衡 |
| | 35%B | 20mM 乙酸钠, pH 6.0, 350mM NaCl | | 首次洗涤 |
| | 60%B | 20mM 乙酸钠, pH 6.0, 600mM NaCl | | 第二次洗涤 |
| | 100%B | 20mM 乙酸钠, pH 6.0, 1000mM NaCl | 88 mS/cm | GGF2 洗脱 柱洗涤 |

[0318] 【步骤2】

- [0319] 精制-凝胶过滤层析
- [0320] 聚丙烯酰胺葡聚糖S200 26/60
- [0321] 洗脱缓冲液:20mM乙酸钠,100mM硫酸钠,1%甘露糖醇,10mM L-精氨酸,pH 6.5
- [0322] 缓冲液导电性:
- [0323] 样品:SP GGF2洗脱合并浓缩达~AU280 1.0
- [0324] 流速:1.3ml/分钟
- [0325] 峰洗脱:以从注射开始~0.36CV
- [0326] 【步骤3】
- [0327] DNA及内毒素去除-通过Intercept Q膜过滤。
- [0328] 预平衡缓冲液:20mM乙酸钠,100mM硫酸钠,1%甘露糖醇,10mM L-精氨酸,pH 6.5
- [0329] 收集流通
- [0330] 【步骤4】
- [0331] 最终制剂及样品制备
- [0332] 将额外的90mM L-精氨酸添加到样品
- [0333] 浓缩
- [0334] 无菌过滤
- [0335] 本文所用的媒质/对照物品是0.2%牛血清白蛋白(BSA),0.1M磷酸钠,pH 7.6。
- [0336] 本文中使用大鼠株 **CD[®]IGS** [Cr1: **CD[®]** (SD)/MYOINFARCT] 及幼稚的Sprague Dawley。这些株从Charles River实验室获得。测试动物在到达时大致是6~7周龄,及在手术过程时大致160~200g重。实际范围可变化及记录在数据中。
- [0337] 研究接受的全部幼稚的Sprague Dawley动物,及分配到组1。处理之前称重认为适宜于研究的动物。
- [0338] 将全部 **CD[®]IGS** [Cr1: **CD[®]** (SD)/MYOINFARCT] 接受的动物使用基于来自在Charles River实验室进行的手术过程后第7天进行的超声波心动图检查的计算的射血分数的简单随机化过程随机化到处理组(组2~5)。进行简单随机化以导致各处理组(组2~5)由可应用的数的动物构成,导致跨组2~5大致相等的组平均射血分数(±3%)。
- [0339] 根据实验室的标准运作过程使组2~6中的全部动物适应Charles River实验室的环境。随后将动物随机化到处理组。在它们的初次超声波心动图检查之前,使组1中全部幼稚的动物在接受后适应环境大致24小时。
- [0340] 动物在悬浮的,不锈钢,金属丝网类型笼中个别笼养,一般而言不使用实底笼,因为啮齿动物是食粪性的,及摄入含排泄的测试品及代谢产物的粪便,或摄入垫层本身,这可导致此毒性研究解释混淆。
- [0341] 经自动计时器提供荧光照明大致12小时/天。有时,由于研究-相关的活性间歇性地打断暗循环。监控温度及湿度,及每天记录及分别尽可能维持到64~79°F及30~70%之间。
- [0342] 基础摄食是经啮齿动物摄食#5002,PMI Nutrition International,Inc检验的块状实验室 **摄食[®]**。此摄食随意可用,除非另有指定。研究记录中鉴定使用的各批号。给全部动物经自动水系统随意供给自来水,除非另有说明。

[0343] 【研究设计】

[0344] 表5:GGF2对比EGF-1d片段 (Liu等人,2006)

[0345] LAD后第7天起始施剂10天

| 组 | 处理 | 生命持续时间 | 剂量 | 施剂间隔 † | ECHO 时间点 (手术后) |
|---------------------|---------|----------|--------------|-----------|-------------------|
| 1(n = 5 M; n = 5 F) | 对照 (媒质) | 手术后 17 天 | 仅媒质 | 24 小时 | 第 6, 17 天 |
| 2(n = 6 M; n = 6 F) | GGF2 | 后 17 天 | 0.0625 mg/kg | 24 小时 | 第 6, 17 天 |
| 3(n = 6 M; n = 6 F) | GGF2 | 后 17 天 | 0.625 mg/kg | 24 小时 | 第 6, 17 天 |
| 4(n = 6 M; n = 7 F) | EGF-1d | 后 17 天 | 等摩尔 | 24 小时 | 第 6, 17 天 |
| 5(n = 7 M; n = 6 F) | EGF-1d | 后 17 天 | 等摩尔 | 24 小时 | 第 6, 17 天 |

[0347] 表6:相比EGF-1d及EGF-Ig的GGF2更高剂量

[0348] LAD后第7天起始施剂20天。清洗10天。

| 组 | 处理 | 生命持续时间 | 剂量 | 施剂间隔 † | ECHO 时间点(手术后) |
|----------------------|-----------------|----------------|-------------|-----------|----------------------|
| 1 (n = 5 M; n = 5 F) | N/A: 年龄匹配的幼稚的对照 | 初次 ECHO 后 30 天 | NA | NA | ‡第 1, 12, 22, & 32 天 |
| 2 (n = 6 M; n = 6 F) | 对照 (媒质) | 手术后 38 天 | 仅媒质 | 24 小时 | *第 7, 18, 28, & 38 天 |
| 3 (n = 6 M; n = 6 F) | GGF-2 | 手术后 38 天 | 0.625 mg/kg | 24 小时 | *第 7, 18, 28, & 38 天 |
| 4 (n = 6 M; n = 7 F) | GGF-2 | 手术后 38 天 | 3.25 mg/kg | 24 小时 | *第 7, 18, 28, & 38 天 |
| 5 (n = 7 M; n = 6 F) | EGF-1d | 手术后 38 天 | 等摩尔 | 24 小时 | *第 7, 18, 28, & 38 天 |
| 6 (n = 7 M; n = 6 F) | EGF-Ig | 手术后 38 天 | 等摩尔 | 24 小时 | *第 7, 18, 28, & 38 天 |

[0350] 表7:GGF2剂量频度

| 组 | 处理 | 生命持续时间 | 剂量 | 施剂间隔 † | ECHO 时间点(手术后) |
|----------------------|-----------------|----------------|------------|-----------|----------------------|
| 1 (n = 5 M; n = 5 F) | N/A: 年龄匹配的幼稚的对照 | 初次 ECHO 后 30 天 | NA | NA | ‡第 1, 12, 22, & 32 天 |
| 2 (n = 6 M; n = 6 F) | 对照 (媒质) | 手术后 38 天 | 仅媒质 | 24 小时 | *第 7, 18, 28, & 38 天 |
| 3 (n = 6 M; n = 6 F) | GGF-2 | 手术后 38 天 | 3.25 mg/kg | 24 小时 | *第 7, 18, 28, & 38 天 |
| 4 (n = 6 M; n = 7 F) | GGF-2 | 手术后 38 天 | 3.25 mg/kg | 48 小时 | *第 7, 18, 28, & 38 天 |
| 5 (n = 7 M; n = 6 F) | GGF-2 | 手术后 38 天 | 3.25 mg/kg | 96 小时 | *第 7, 18, 28, & 38 天 |

[0352] TA 1-测试品1;M=雄性;F=雌性。

[0353] 表8:有及无BSA的GGF2

| 组 | 处理 | 生命持续时间 | 剂量 | 施 剂 间 隔 [†] | ECHO 时间点 (手术后) |
|-------------------------|-----------------|----------|------------|-------------------------|-------------------|
| 1 (n = 5 M; n = 5 F) | N/A: 年龄匹配的幼稚的对照 | 手术后 17 天 | NA | NA | 第 6 及 17 天 |
| 2 (n = 6 M; n = 6 F) | 对照 (煤质) | 后 17 天 | 仅煤质 | 24 小时 | 第 6 及 17 天 |
| 3 (n = 6 M; n = 6 F) | GGF-2+BSA | 后 17 天 | 3.25 mg/kg | 24 小时 | 第 6 及 17 天 |
| 4 (n = 6 M; n = 7 F) | GGF-2 无 BSA | 后 17 天 | 3.25 mg/kg | 24 小时 | 第 6 及 17 天 |

[0355] 【测试及对照物品施用】

[0356] 【施用途径】

[0357] 测试及对照品通过静脉内注射施用。分配到组1的动物未用煤质或测试品处理；这些动物作为未处理的年龄匹配的对照。施用频度，持续时间，及剂量如表5~8中所述。剂量体积大致是1ml/kg。

[0358] 【测试品施用】

[0359] 测试及对照品经尾静脉施用。个体剂量基于最新近体重。剂量通过推注施用，除非发起者另有说明。

[0360] 【测试系统的制备】

[0361] 【手术过程-左前降支动脉结扎】

[0362] 如Charles River实验室手术能力参照论文, Vol.13, No.1, 2005年中所述在Charles River实验室进行手术过程。简言之，在胸中，稍微到胸骨左，通过皮肤及胸部肌肉进行颅-尾切开。横断第三及第四肋骨，及钝器解剖肋间肌肉。快速进入胸腔，及完全打开心包。通过切取取出心脏。鉴定肺部锥及左心耳。用小弯针于使一块5~0丝缝线在左前降支冠状动脉下。系绷带，及心脏再放入胸部。轻轻挤压出胸腔中的空气而闭合胸壁及皮肤切口。使用正压通气及放入富氧环境使动物恢复意识。

[0363] 【手术后恢复】

[0364] 由Charles River实验室如Charles River实验室手术能力参照论文, Vol.13, No.1, 2005年中所述进行手术后短期监控及施用适当的镇痛药。

[0365] 进行手术后长期监控，以评定动物的疼痛或感染迹象。接受动物后每天观察切开位点持续7天。如需要施用补充性疼痛管理及抗微生物治疗。

[0366] 表9. 计划的药疗及剂量

| 药物 | 间隔，剂量，及途径 | | | | |
|------|----------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------------|
| | 手术后每天 | 第 1 /7 天 * ECHO | 第 12 /18 天* ECHO | 第 22 /28 天* ECHO | 第 3 2/38 天 * ECHO & 尸检 |
| 异氟烷 | - | 对效应，吸入 | 对效应，吸入 | 对效应，吸入 | 对效应，吸入 |
| 丁丙诺啡 | 0.01 mg/kg, I.M. (仅需要时) | - | - | - | - |

[0368] *—通过如下所示的动物组分配指定的ECHO过程天。

[0369] 【死前研究评估】

[0370] 【笼侧观察】

[0371] 全部动物一天至少两次观察病态,死亡率,伤害,及食品及水的利用度。鉴定任何健康差的动物用于进一步监控及可能的安乐死。

[0372] **【体重】**

[0373] 测量体重,及在随机化之前及研究期间每周记录至少一次。

[0374] **【食品消费】**

[0375] 不测量食品消费,但记录食欲不振。

[0376] **【超声波心动图检查】**

[0377] 在接受(第0天)后第1天,12,22及第32天对分配到组1的全部动物进行超声波心动图检查。在Charles River实验室进行的手术过程(第0天)后第7天,18,28及第38天对分配到组2~5的全部动物进行超声波心动图检查。

[0378] 对于超声波心动图检查,各动物根据表5麻醉及从其胸部剪毛。将耦合凝胶应用于超声波心动图变换器,及得到图像以测量多个水平的心脏功能。对各动物以短轴观得到图像(以中-乳头水平,或其他取决于通过超声波心动图记术观察的梗塞区位置)。

[0379] **【超声波心动图参数】**

[0380] 以中-乳头肌肉水平,或其他取决于通过超声波心动图记术观察的梗塞区位置采取左心室的ECHO图像。记录M-模式及2-D图像,及储存在CD和/或MOD。用ECHO得到的测量参数包括:心室内中隔壁厚度(心舒期);单元=cm;心室内中隔壁厚度(心缩期);单元=cm;左心室内部尺度(心舒期);单元=cm;左心室内部尺度(心缩期);单元=cm;左心室乳头壁厚度(心舒期);单元=cm;左心室乳头壁厚度(心缩期);单元=cm;端心脏舒张体积;单元=mL;收缩末期容量;单元=mL;射血分数;报道为百分率;中风体积;单元=ml;及%缩短分数;报道为百分率

[0381] **【安乐死】**

[0382] **【垂死性】**

[0383] 使如通过测试设备标准运作过程指定的任何垂死动物以人道的理由安乐死。使濒死或发现死亡的安乐死的全部动物经历常规尸检。

[0384] **【安乐死方法】**

[0385] 通过将饱和的氯化钾注射到大静脉,然后是获得批准的确保死亡的方法,例如驱血法进行安乐死。

[0386] **【最终处置】**

[0387] 使研究的全部存活的动物在它们的计划的尸检时安乐死或,如果必需,在濒死时安乐死。

[0388] 研究1-用GGF2以0.625mg/kg静脉内处理大鼠q天导致如在本文通过射血分数及缩短分数变化显示的心脏功能的显著的改善。EGF-1d片段未导致相同程度的改善。见表5。

[0389] 研究2-用GGF2以0.625和3.25mg/kg静脉内处理大鼠q天导致如在本文通过射血分数及缩短分数变化显示的心脏功能的显著的改善。显著的改善也见于处理期间收缩末期容量及舒张末期容量。见表6。

[0390] 研究3结果-用GGF以23.25mg/kg静脉内处理大鼠q24,48或96小时导致如在本文通过射血分数及缩短分数变化显示的心脏功能的显著的改善。显著的改善也见于处理期间收缩末期容量及舒张末期容量。见表7。

[0391] 之前报道 (Liu et al) 显示,为最佳神经调节蛋白稳定性及活性,需要载质蛋白 (例如BSA)。GGF2展示无需载质 (例如BSA) 的稳定性。设计此实验以测试是否GGF2稳定,及在无BSA的治疗性方案中活跃。处理10天后,含BSA及不含BSA的GGF2制剂导致相比媒质对照的射血分数改善类似于见于之前研究的那些。因此,从此研究明白,CHF处理用GGF2制剂不需要BSA或其他载质蛋白。见表8。

[0392] 表10:病理学发现

| 施剂 | 坐骨神经鞘增生 (NSH) | 乳腺NSH | 注射位点/皮肤变化 | 心脏效应 |
|-----------|---------------|-------|-----------|------|
| 每天皮下 | ++ | ++ | ++ | + |
| 每天静脉内 | + | + | + | +/- |
| 48小时间隔静脉内 | +/- | - | - | +/- |
| 96小时间隔静脉内 | - | - | - | - |

[0394] ++常存在;+存在;+/-偶尔观察的,-罕见的或未观察到

[0395] 如表10中所示,GGF2的间歇的施剂降低与超常水平的外源地施用的GGF2相关的副作用。本发明人发现,此发现与将GGF2静脉内或经皮下施用无关地真实。

[0396] 用每隔一天施剂有时观察到增生及心脏效应。我们用欠频繁的施剂未观察到。

[0397] 本申请中参考几个出版物及专利文献,以便更完全说明本发明涉及的现有技术。此说明书中提及的全部出版物及专利申请通过引用并入本文,如各独立性出版物或专利申请特异性地及个别通过引用并入一样。

[0398] 本说明书还包括以下内容:

[0399] 1. 治疗或预防哺乳动物心力衰竭的方法,所述方法包括:

[0400] 提供包括表皮生长因子-样 (EGF-样) 结构域的肽;

[0401] 以至少48小时的间隔给哺乳动物施用治疗有效量的所述肽,其中所述治疗有效量对于治疗或预防所述哺乳动物的心力衰竭有效。

[0402] 2. 实施方式1的方法,其中所述施用每48小时进行。

[0403] 3. 实施方式1的方法,其中所述施用每96小时进行。

[0404] 4. 实施方式1的方法,其中所述施用以选自下列的方案进行:每4天,每周,每10天,每14天,每个月,每2个月,每3个月或每4个月。

[0405] 5. 实施方式1的方法,其中所述哺乳动物是人。

[0406] 6. 实施方式1的方法,其中所述肽是重组人GGF2。

[0407] 7. 实施方式的方法,其中所述肽是:

[0408] SHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQ。

[0409] 8. 实施方式的方法,其中所述肽是:

[0410] SHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELY。

[0411] 9. 实施方式1的方法,其中所述肽由神经调节蛋白 (NRG)-1基因,神经调节蛋白 (NRG)-2基因,神经调节蛋白 (NRG)-3基因,或神经调节蛋白 (NRG)-4基因编码。

[0001] 序列表
 [0002] <110> CAGGIANO, ANTHONY
 [0003] IACI, JENNIFER
 [0004] GANGULY, ANINDITA
 [0005] PARRY, TOM
 [0006] <120> 用于治疗或预防心力衰竭的神经调节蛋白或其亚序列的治疗性施剂
 [0007] <130> ACOR.P0040W0
 [0008] <140> PCT/US2009/004130
 [0009] <141> 2009-07-17
 [0010] <150> 61/135,171
 [0011] <151> 2008-07-17
 [0012] <160> 33
 [0013] <170> PatentIn version 3.5
 [0014] <210> 1
 [0015] <211> 2003
 [0016] <212> DNA
 [0017] <213> 智人 (Homo sapiens)
 [0018] <220>
 [0019] <221> misc_feature
 [0020] <222> (31) .. (32)
 [0021] <223> n 是 a, c, g, 或 t
 [0022] <220>
 [0023] <221> CDS
 [0024] <222> (265) .. (1530)
 [0025] <400> 1
 [0026] ggaattcctt tttttttttt tttttttctt nttttttttt tgcccttata cctcttcgcc 60
 [0027] tttctgtggt tccatccact tcttccccct cctcctccca taaacaactc tcctaccctt 120
 [0028] gcacccccaa taaataaata aaaggaggag ggcaaggggg gaggaggagg agtggtgctg 180
 [0029] cgaggggaag gaaaaggag gcagcgcgag aagagccggg cagagtccga accgacagcc 240
 [0030] agaagccgcg acgcacctcg cacc atg aga tgg cga cgc gcc ccg cgc cgc 291
 [0031] Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg
 [0032] 1 5
 [0033] tcc ggg cgt ccc ggc ccc cgg gcc cag cgc ccc ggc tcc gcc gcc cgc 339
 [0034] Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg
 [0035] 10 15 20 25
 [0036] tcg tcg ccg ccg ctg ccg ctg ctg cca cta ctg ctg ctg ctg ggg acc 387
 [0037] Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Gly Thr
 [0038] 30 35 40
 [0039] gcg gcc ctg gcg ccg ggg gcg gcg gcc ggc aac gag gcg gct ccc gcg 435
 [0040] Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala
 [0041] 45 50 55

[0042] ggg gcc tcg gtg tgc tac tgc tcc ccg ccc agc gtg gga tcg gtg cag 483
 [0043] Gly Ala Ser Val Cys Tyr Cys Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln
 [0044] 60 65 70
 [0045] gag cta gct cag cgc gcc gcg gtg gtg atc gag gga aag gtg cac ccg 531
 [0046] Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro
 [0047] 75 80 85
 [0048] cag cgg cgg cag cag ggg gca ctc gac agg aag gcg gcg gcg gcg 579
 [0049] Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala
 [0050] 90 95 100 105
 [0051] ggc gag gca ggg gcg tgg ggc ggc gat cgc gag ccg cca gcc gcg ggc 627
 [0052] Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly
 [0053] 110 115 120
 [0054] cca cgg gcg ctg ggg ccg ccc gcc gag gag ccg ctg ctc gcc gcc aac 675
 [0055] Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro Ala Glu Glu Pro Leu Leu Ala Ala Asn
 [0056] 125 130 135
 [0057] ggg acc gtg ccc tct tgg ccc acc gcc ccg gtg ccc agc gcc ggc gag 723
 [0058] Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro Thr Ala Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu
 [0059] 140 145 150
 [0060] ccc ggg gag gag gcg ccc tat ctg gtg aag gtg cac cag gtg tgg gcg 771
 [0061] Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr Leu Val Lys Val His Gln Val Trp Ala
 [0062] 155 160 165
 [0063] gtg aaa gcc ggg ggc ttg aag aag gac tcg ctg ctc acc gtg cgc ctg 819
 [0064] Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu
 [0065] 170 175 180 185
 [0066] ggg acc tgg ggc cac ccc gcc ttc ccc tcc tgc ggg agg ctc aag gag 867
 [0067] Gly Thr Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu
 [0068] 190 195 200
 [0069] gac agc agg tac atc ttc ttc atg gag ccc gac gcc aac agc acc agc 915
 [0070] Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser
 [0071] 205 210 215
 [0072] cgc gcg ccg gcc gcc ttc cga gcc tct ttc ccc cct ctg gag acg ggc 963
 [0073] Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly
 [0074] 220 225 230
 [0075] cgg aac ctc aag aag gag gtc agc cgg gtg ctg tgc aag cgg tgc gcc 1011
 [0076] Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys Ala
 [0077] 235 240 245
 [0078] ttg cct ccc caa ttg aaa gag atg aaa agc cag gaa tcg gct gca ggt 1059
 [0079] Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly
 [0080] 250 255 260 265
 [0081] tcc aaa cta gtc ctt cgg tgt gaa acc agt tct gaa tac tcc tct ctc 1107
 [0082] Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu
 [0083] 270 275 280

[0084] aga ttc aag tgg ttc aag aat ggg aat gaa ttg aat cga aaa aac aaa 1155
 [0085] Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys
 [0086] 285 290 295
 [0087] cca caa aat atc aag ata caa aaa aag cca ggg aag tca gaa ctt cgc 1203
 [0088] Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg
 [0089] 300 305 310
 [0090] att aac aaa gca tca ctg gct gat tct gga gag tat atg tgc aaa gtg 1251
 [0091] Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val
 [0092] 315 320 325
 [0093] atc agc aaa tta gga aat gac agt gcc tct gcc aat atc acc atc gtg 1299
 [0094] Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val
 [0095] 330 335 340 345
 [0096] gaa tca aac gct aca tct aca tcc acc act ggg aca agc cat ctt gta 1347
 [0097] Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val
 [0098] 350 355 360
 [0099] aaa tgt gcg gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat gga ggg gag tgc 1395
 [0100] Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys
 [0101] 365 370 375
 [0102] ttc atg gtg aaa gac ctt tca aac ccc tcg aga tac ttg tgc aag tgc 1443
 [0103] Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys
 [0104] 380 385 390
 [0105] cca aat gag ttt act ggt gat cgc tgc caa aac tac gta atg gcc agc 1491
 [0106] Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser
 [0107] 395 400 405
 [0108] ttc tac agt acg tcc act ccc ttt ctg tct ctg cct gaa taggagcatg 1540
 [0109] Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu
 [0110] 410 415 420
 [0111] ctcagttggt gctgctttct tgttgtgca tctccctca gattccacct agagctagat 1600
 [0112] gtgtcttacc agatctaata ttgactgcct ctgcctgtcg catgagaaca ttaacaaaag 1660
 [0113] caattgtatt acttcctctg ttccgcacta gttggctctg agatactaata aggtgtgtga 1720
 [0114] ggctccggat gtttctggaa ttgatattga atgatgtgat acaaattgat agtcaatatc 1780
 [0115] aagcagtga atatgataat aaaggcattht caaagtctca cttttattga taaaataaaa 1840
 [0116] atcattctac tgaacagtcc atcttcttta tacaatgacc acatcctgaa aagggtgttg 1900
 [0117] ctaagctgta accgatatgc acttgaaatg atggttaagt aattttgatt cagaatgtgt 1960
 [0118] tatttgtcac aaataaacat aataaaagga aaaaaaaaaa aaa 2003
 [0119] <210> 2
 [0120] <211> 422
 [0121] <212> PRT
 [0122] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0123] <400> 2
 [0124] Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg
 [0125] 1 5 10 15

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| [0126] | Ala | Gln | Arg | Pro | Gly | Ser | Ala | Ala | Arg | Ser | Ser | Pro | Pro | Leu | Pro | Leu |
| [0127] | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| [0128] | Leu | Pro | Leu | Leu | Leu | Leu | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Ala | Pro | Gly | Ala | |
| [0129] | | | | 35 | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| [0130] | Ala | Ala | Gly | Asn | Glu | Ala | Ala | Pro | Ala | Gly | Ala | Ser | Val | Cys | Tyr | Cys |
| [0131] | | | | 50 | | | | 55 | | | | | 60 | | | |
| [0132] | Ser | Pro | Pro | Ser | Val | Gly | Ser | Val | Gln | Glu | Leu | Ala | Gln | Arg | Ala | Ala |
| [0133] | | | | 65 | | | | 70 | | | | | 75 | | | 80 |
| [0134] | Val | Val | Ile | Glu | Gly | Lys | Val | His | Pro | Gln | Arg | Arg | Gln | Gln | Gly | Ala |
| [0135] | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| [0136] | Leu | Asp | Arg | Lys | Ala | Ala | Ala | Ala | Ala | Gly | Glu | Ala | Gly | Ala | Trp | Gly |
| [0137] | | | | 100 | | | | | | 105 | | | | | 110 | |
| [0138] | Gly | Asp | Arg | Glu | Pro | Pro | Ala | Ala | Gly | Pro | Arg | Ala | Leu | Gly | Pro | Pro |
| [0139] | | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | |
| [0140] | Ala | Glu | Glu | Pro | Leu | Leu | Ala | Ala | Asn | Gly | Thr | Val | Pro | Ser | Trp | Pro |
| [0141] | | | | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | |
| [0142] | Thr | Ala | Pro | Val | Pro | Ser | Ala | Gly | Glu | Pro | Gly | Glu | Glu | Ala | Pro | Tyr |
| [0143] | | | | 145 | | | | | 150 | | | | 155 | | | 160 |
| [0144] | Leu | Val | Lys | Val | His | Gln | Val | Trp | Ala | Val | Lys | Ala | Gly | Gly | Leu | Lys |
| [0145] | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| [0146] | Lys | Asp | Ser | Leu | Leu | Thr | Val | Arg | Leu | Gly | Thr | Trp | Gly | His | Pro | Ala |
| [0147] | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | | 190 | |
| [0148] | Phe | Pro | Ser | Cys | Gly | Arg | Leu | Lys | Glu | Asp | Ser | Arg | Tyr | Ile | Phe | Phe |
| [0149] | | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | |
| [0150] | Met | Glu | Pro | Asp | Ala | Asn | Ser | Thr | Ser | Arg | Ala | Pro | Ala | Ala | Phe | Arg |
| [0151] | | | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | |
| [0152] | Ala | Ser | Phe | Pro | Pro | Leu | Glu | Thr | Gly | Arg | Asn | Leu | Lys | Lys | Glu | Val |
| [0153] | | | | 225 | | | | | 230 | | | | 235 | | | 240 |
| [0154] | Ser | Arg | Val | Leu | Cys | Lys | Arg | Cys | Ala | Leu | Pro | Pro | Gln | Leu | Lys | Glu |
| [0155] | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| [0156] | Met | Lys | Ser | Gln | Glu | Ser | Ala | Ala | Gly | Ser | Lys | Leu | Val | Leu | Arg | Cys |
| [0157] | | | | 260 | | | | | | 265 | | | | | 270 | |
| [0158] | Glu | Thr | Ser | Ser | Glu | Tyr | Ser | Ser | Leu | Arg | Phe | Lys | Trp | Phe | Lys | Asn |
| [0159] | | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | |
| [0160] | Gly | Asn | Glu | Leu | Asn | Arg | Lys | Asn | Lys | Pro | Gln | Asn | Ile | Lys | Ile | Gln |
| [0161] | | | | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | |
| [0162] | Lys | Lys | Pro | Gly | Lys | Ser | Glu | Leu | Arg | Ile | Asn | Lys | Ala | Ser | Leu | Ala |
| [0163] | | | | 305 | | | | | 310 | | | | 315 | | | 320 |
| [0164] | Asp | Ser | Gly | Glu | Tyr | Met | Cys | Lys | Val | Ile | Ser | Lys | Leu | Gly | Asn | Asp |
| [0165] | | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | |
| [0166] | Ser | Ala | Ser | Ala | Asn | Ile | Thr | Ile | Val | Glu | Ser | Asn | Ala | Thr | Ser | Thr |
| [0167] | | | | 340 | | | | | | 345 | | | | | 350 | |

[0168] Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys
 [0169] 355 360 365
 [0170] Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser
 [0171] 370 375 380
 [0172] Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp
 [0173] 385 390 395 400
 [0174] Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro
 [0175] 405 410 415
 [0176] Phe Leu Ser Leu Pro Glu
 [0177] 420
 [0178] <210> 3
 [0179] <211> 198
 [0180] <212> DNA
 [0181] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0182] <220>
 [0183] <221> CDS
 [0184] <222> (1) .. (195)
 [0185] <400> 3
 [0186] agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat 48
 [0187] Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 [0188] 1 5 10 15
 [0189] gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac 96
 [0190] Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 [0191] 20 25 30
 [0192] ttg tgc aag tgc cca aat gag ttt act ggt gat cgc tgc caa aac tac 144
 [0193] Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 [0194] 35 40 45
 [0195] gta atg gcc agc ttc tac agt acg tcc act ccc ttt ctg tct ctg cct 192
 [0196] Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro
 [0197] 50 55 60
 [0198] gaa tag 198
 [0199] Glu
 [0200] 65
 [0201] <210> 4
 [0202] <211> 65
 [0203] <212> PRT
 [0204] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0205] <400> 4
 [0206] Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 [0207] 1 5 10 15
 [0208] Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 [0209] 20 25 30

[0210] Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 [0211] 35 40 45
 [0212] Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro
 [0213] 50 55 60
 [0214] Glu
 [0215] 65
 [0216] <210> 5
 [0217] <211> 192
 [0218] <212> DNA
 [0219] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0220] <220>
 [0221] <221> CDS
 [0222] <222> (1) .. (192)
 [0223] <400> 5
 [0224] agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat 48
 [0225] Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 [0226] 1 5 10 15
 [0227] gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac 96
 [0228] Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 [0229] 20 25 30
 [0230] ttg tgc aag tgc caa cct gga ttc act gga gcg aga tgt act gag aat 144
 [0231] Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 [0232] 35 40 45
 [0233] gtg ccc atg aaa gtc caa acc caa gaa aaa gcg gag gag ctc tac taa 192
 [0234] Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr
 [0235] 50 55 60
 [0236] <210> 6
 [0237] <211> 63
 [0238] <212> PRT
 [0239] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0240] <400> 6
 [0241] Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 [0242] 1 5 10 15
 [0243] Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 [0244] 20 25 30
 [0245] Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 [0246] 35 40 45
 [0247] Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr
 [0248] 50 55 60
 [0249] <210> 7
 [0250] <211> 183
 [0251] <212> DNA

[0252] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0253] <220>
 [0254] <221> CDS
 [0255] <222> (1) .. (183)
 [0256] <400> 7
 [0257] agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat 48
 [0258] Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 [0259] 1 5 10 15
 [0260] gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac 96
 [0261] Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 [0262] 20 25 30
 [0263] ttg tgc aag tgc cca aat gag ttt act ggt gat cgc tgc caa aac tac 144
 [0264] Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 [0265] 35 40 45
 [0266] gta atg gcc agc ttc tac aaa gcg gag gag ctc tac taa 183
 [0267] Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr
 [0268] 50 55 60
 [0269] <210> 8
 [0270] <211> 60
 [0271] <212> PRT
 [0272] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0273] <400> 8
 [0274] Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 [0275] 1 5 10 15
 [0276] Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 [0277] 20 25 30
 [0278] Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 [0279] 35 40 45
 [0280] Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr
 [0281] 50 55 60
 [0282] <210> 9
 [0283] <211> 210
 [0284] <212> DNA
 [0285] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0286] <220>
 [0287] <221> CDS
 [0288] <222> (1) .. (210)
 [0289] <400> 9
 [0290] agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat 48
 [0291] Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 [0292] 1 5 10 15
 [0293] gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac 96

[0294] Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 [0295] 20 25 30
 [0296] ttg tgc aag tgc cca aat gag ttt act ggt gat cgc tgc caa aac tac 144
 [0297] Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 [0298] 35 40 45
 [0299] gta atg gcc agc ttc tac aag cat ctt ggg att gaa ttt atg gag aaa 192
 [0300] Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Lys
 [0301] 50 55 60
 [0302] gcg gag gag ctc tac taa 210
 [0303] Ala Glu Glu Leu Tyr
 [0304] 65
 [0305] <210> 10
 [0306] <211> 69
 [0307] <212> PRT
 [0308] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0309] <400> 10
 [0310] Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 [0311] 1 5 10 15
 [0312] Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 [0313] 20 25 30
 [0314] Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 [0315] 35 40 45
 [0316] Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Lys
 [0317] 50 55 60
 [0318] Ala Glu Glu Leu Tyr
 [0319] 65
 [0320] <210> 11
 [0321] <211> 267
 [0322] <212> DNA
 [0323] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0324] <220>
 [0325] <221> CDS
 [0326] <222> (1) .. (267)
 [0327] <400> 11
 [0328] agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat 48
 [0329] Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 [0330] 1 5 10 15
 [0331] gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac 96
 [0332] Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 [0333] 20 25 30
 [0334] ttg tgc aag tgc caa cct gga ttc act gga gcg aga tgt act gag aat 144
 [0335] Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn

| | | | |
|--------|---|----|-------|
| [0336] | 35 | 40 | 45 |
| [0337] | gtg ccc atg aaa gtc caa acc caa gaa aag tgc cca aat gag ttt act 192 | | |
| [0338] | Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr | | |
| [0339] | 50 | 55 | 60 |
| [0340] | ggg gat cgc tgc caa aac tac gta atg gcc agc ttc tac agt acg tcc 240 | | |
| [0341] | Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser | | |
| [0342] | 65 | 70 | 75 80 |
| [0343] | act ccc ttt ctg tct ctg cct gaa tag 267 | | |
| [0344] | Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu | | |
| [0345] | 85 | | |
| [0346] | <210> 12 | | |
| [0347] | <211> 88 | | |
| [0348] | <212> PRT | | |
| [0349] | <213> 智人(Homo sapiens) | | |
| [0350] | <400> 12 | | |
| [0351] | Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn | | |
| [0352] | 1 | 5 | 10 15 |
| [0353] | Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr | | |
| [0354] | 20 | 25 | 30 |
| [0355] | Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn | | |
| [0356] | 35 | 40 | 45 |
| [0357] | Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr | | |
| [0358] | 50 | 55 | 60 |
| [0359] | Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser | | |
| [0360] | 65 | 70 | 75 80 |
| [0361] | Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu | | |
| [0362] | 85 | | |
| [0363] | <210> 13 | | |
| [0364] | <211> 252 | | |
| [0365] | <212> DNA | | |
| [0366] | <213> 智人(Homo sapiens) | | |
| [0367] | <220> | | |
| [0368] | <221> CDS | | |
| [0369] | <222> (1) .. (252) | | |
| [0370] | <400> 13 | | |
| [0371] | agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat 48 | | |
| [0372] | Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn | | |
| [0373] | 1 | 5 | 10 15 |
| [0374] | gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac 96 | | |
| [0375] | Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr | | |
| [0376] | 20 | 25 | 30 |
| [0377] | ttg tgc aag tgc caa cct gga ttc act gga gcg aga tgt act gag aat 144 | | |

[0378] Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 [0379] 35 40 45
 [0380] gtg ccc atg aaa gtc caa acc caa gaa aag tgc cca aat gag ttt act 192
 [0381] Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr
 [0382] 50 55 60
 [0383] ggt gat cgc tgc caa aac tac gta atg gcc agc ttc tac aaa gcg gag 240
 [0384] Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu
 [0385] 65 70 75 80
 [0386] gag ctc tac taa 252
 [0387] Glu Leu Tyr
 [0388] <210> 14
 [0389] <211> 83
 [0390] <212> PRT
 [0391] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0392] <400> 14
 [0393] Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 [0394] 1 5 10 15
 [0395] Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 [0396] 20 25 30
 [0397] Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 [0398] 35 40 45
 [0399] Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr
 [0400] 50 55 60
 [0401] Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu
 [0402] 65 70 75 80
 [0403] Glu Leu Tyr
 [0404] <210> 15
 [0405] <211> 498
 [0406] <212> DNA
 [0407] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0408] <400> 15
 [0409] catatgttgc ctccccaatt gaaagagatg aaaagccagg aatcggtgc aggttccaaa 60
 [0410] ctatgccttc ggtgtgaaac cagttctgaa tactctctc tcagattcaa gtggttcaag 120
 [0411] aatgggaatg aattgaatcg aaaaaacaaa ccacaaaata tcaagataca aaaaaagcca 180
 [0412] gggaagtcag aacttcgcat taacaaagca tctactggtg attctggaga gtatatgtgc 240
 [0413] aaagtgatca gcaaatagg aaatgacagt gcctctgcca atatcaccat cgtggaatca 300
 [0414] aacgctacat ctacatccac cactgggaca agccatcttg taaaatgtgc ggagaaggag 360
 [0415] aaaactttct gtgtgaatgg aggggagtgc ttcattggtga aagaccttcc aaaccctcgc 420
 [0416] agatacttgt gcaagtgcgc aaatgagttt actggtgatc gctgccaaaa ctacgtaatg 480
 [0417] gccagcttct acggatcc 498
 [0418] <210> 16
 [0419] <211> 162

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| [0420] | <212> PRT | | | | | | | | | | | | | | | |
| [0421] | <213> 智人(Homo sapiens) | | | | | | | | | | | | | | | |
| [0422] | <400> 16 | | | | | | | | | | | | | | | |
| [0423] | Leu | Pro | Pro | Gln | Leu | Lys | Glu | Met | Lys | Ser | Gln | Glu | Ser | Ala | Ala | Gly |
| [0424] | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| [0425] | Ser | Lys | Leu | Val | Leu | Arg | Cys | Glu | Thr | Ser | Ser | Glu | Tyr | Ser | Ser | Leu |
| [0426] | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| [0427] | Arg | Phe | Lys | Trp | Phe | Lys | Asn | Gly | Asn | Glu | Leu | Asn | Arg | Lys | Asn | Lys |
| [0428] | | | | 35 | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| [0429] | Pro | Gln | Asn | Ile | Lys | Ile | Gln | Lys | Lys | Pro | Gly | Lys | Ser | Glu | Leu | Arg |
| [0430] | | 50 | | | | | 55 | | | | 60 | | | | | |
| [0431] | Ile | Asn | Lys | Ala | Ser | Leu | Ala | Asp | Ser | Gly | Glu | Tyr | Met | Cys | Lys | Val |
| [0432] | 65 | | | | | 70 | | | | 75 | | | | | 80 | |
| [0433] | Ile | Ser | Lys | Leu | Gly | Asn | Asp | Ser | Ala | Ser | Ala | Asn | Ile | Thr | Ile | Val |
| [0434] | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| [0435] | Glu | Ser | Asn | Ala | Thr | Ser | Thr | Ser | Thr | Thr | Gly | Thr | Ser | His | Leu | Val |
| [0436] | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| [0437] | Lys | Cys | Ala | Glu | Lys | Glu | Lys | Thr | Phe | Cys | Val | Asn | Gly | Gly | Glu | Cys |
| [0438] | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| [0439] | Phe | Met | Val | Lys | Asp | Leu | Ser | Asn | Pro | Ser | Arg | Tyr | Leu | Cys | Lys | Cys |
| [0440] | | 130 | | | | | 135 | | | | 140 | | | | | |
| [0441] | Pro | Asn | Glu | Phe | Thr | Gly | Asp | Arg | Cys | Gln | Asn | Tyr | Val | Met | Ala | Ser |
| [0442] | 145 | | | | | 150 | | | | 155 | | | | 160 | | |
| [0443] | Phe | Tyr | | | | | | | | | | | | | | |
| [0444] | <210> 17 | | | | | | | | | | | | | | | |
| [0445] | <211> 198 | | | | | | | | | | | | | | | |
| [0446] | <212> PRT | | | | | | | | | | | | | | | |
| [0447] | <213> 智人(Homo sapiens) | | | | | | | | | | | | | | | |
| [0448] | <400> 17 | | | | | | | | | | | | | | | |
| [0449] | Met | Gly | Gly | Ser | His | His | His | His | His | Gly | Met | Ala | Ser | Met | Thr | |
| [0450] | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| [0451] | Gly | Gly | Thr | Ala | Asn | Gly | Val | Gly | Asp | Leu | Tyr | Asp | Asp | Asp | Asp | Lys |
| [0452] | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| [0453] | Val | Pro | Gly | Ser | Leu | Pro | Pro | Gln | Leu | Lys | Glu | Met | Lys | Ser | Gln | Glu |
| [0454] | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| [0455] | Ser | Ala | Ala | Gly | Ser | Lys | Leu | Val | Leu | Arg | Cys | Glu | Thr | Ser | Ser | Glu |
| [0456] | | 50 | | | | | 55 | | | | 60 | | | | | |
| [0457] | Tyr | Ser | Ser | Leu | Arg | Phe | Lys | Trp | Phe | Lys | Asn | Gly | Asn | Glu | Leu | Asn |
| [0458] | 65 | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | | |
| [0459] | Arg | Lys | Asn | Lys | Pro | Gln | Asn | Ile | Lys | Ile | Gln | Lys | Lys | Pro | Gly | Lys |
| [0460] | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| [0461] | Ser | Glu | Leu | Arg | Ile | Asn | Lys | Ala | Ser | Leu | Ala | Asp | Ser | Gly | Glu | Tyr |

| | | | |
|--------|---|-----|-----|
| [0462] | 100 | 105 | 110 |
| [0463] | Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Glu Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn | | |
| [0464] | 115 | 120 | 125 |
| [0465] | Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr | | |
| [0466] | 130 | 135 | 140 |
| [0467] | Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn | | |
| [0468] | 145 | 150 | 155 |
| [0469] | Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr | | |
| [0470] | 165 | 170 | 175 |
| [0471] | Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr | | |
| [0472] | 180 | 185 | 190 |
| [0473] | Val Met Ala Ser Phe Tyr | | |
| [0474] | 195 | | |
| [0475] | <210> 18 | | |
| [0476] | <211> 198 | | |
| [0477] | <212> DNA | | |
| [0478] | <213> 智人(Homo sapiens) | | |
| [0479] | <400> 18 | | |
| [0480] | catatgagcc atcttgtaaa atgtgcggag aaggagaaaa ctttctgtgt gaatggaggg 60 | | |
| [0481] | gagtgttca tgggtgaaaga cctttcaaac ccctcgagat acttgtgcaa gtgcccaaat 120 | | |
| [0482] | gagtttactg gtgatcgtg ccaaaactac gtaatggcca gcttctacaa ggcggaggag 180 | | |
| [0483] | ctgtaccagt aaggatcc 198 | | |
| [0484] | <210> 19 | | |
| [0485] | <211> 82 | | |
| [0486] | <212> PRT | | |
| [0487] | <213> 智人(Homo sapiens) | | |
| [0488] | <400> 19 | | |
| [0489] | Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro | | |
| [0490] | 1 5 10 15 | | |
| [0491] | Arg Gly Ser His Met Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys | | |
| [0492] | 20 25 30 | | |
| [0493] | Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser | | |
| [0494] | 35 40 45 | | |
| [0495] | Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp | | |
| [0496] | 50 55 60 | | |
| [0497] | Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu | | |
| [0498] | 65 70 75 80 | | |
| [0499] | Tyr Gln | | |
| [0500] | <210> 20 | | |
| [0501] | <211> 236 | | |
| [0502] | <212> DNA | | |
| [0503] | <213> 智人(Homo sapiens) | | |

[0504] <400> 20
 [0505] cgataactag cagcatttcc tccaacgagg atccccgagg taagaagcta caccggccag 60
 [0506] tggccggggc ccgataacta gcagcatttc ctccaacgag gatccccgag gtaagaagct 120
 [0507] acaccggcca gtggccgggg ccgtggagcc gggggcatcc ggtgcctgag acagaggtgc 180
 [0508] tcaaggcagt ctccaccttt tgtctcccct ctgcagagag ccacattctg gaagtt 236
 [0509] <210> 21
 [0510] <211> 60
 [0511] <212> PRT
 [0512] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0513] <400> 21
 [0514] Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 [0515] 1 5 10 15
 [0516] Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 [0517] 20 25 30
 [0518] Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 [0519] 35 40 45
 [0520] Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr
 [0521] 50 55 60
 [0522] <210> 22
 [0523] <211> 61
 [0524] <212> PRT
 [0525] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0526] <400> 22
 [0527] Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 [0528] 1 5 10 15
 [0529] Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 [0530] 20 25 30
 [0531] Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 [0532] 35 40 45
 [0533] Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln
 [0534] 50 55 60
 [0535] <210> 23
 [0536] <211> 1269
 [0537] <212> DNA
 [0538] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0539] <400> 23
 [0540] atgagatggc gacgcgcccc gcgccgtcc gggcgctccg gccccgggc ccagcgcccc 60
 [0541] ggctccgcgc cccgtctgtc gccgccgtg ccgtctgtgc cactactgct gctgctgggg 120
 [0542] accgcggccc tggcgccggg ggcggcgccc ggcaacgagg cggctccgc gggggcctcg 180
 [0543] gtgtgtact cgtccccgcc cagcgtggga tcggtgcagg agctagctca gcgcgccgcg 240
 [0544] gtggtgatcg agggaaaggt gcacccgag cggcggcagc agggggcact cgacaggaag 300
 [0545] gcggcggcgg cggcgggcga ggcaggggcg tggggcggcg atcgcgagcc gccagccgcg 360

[0546] ggcccacggg cgctggggcc gcccgccgag gagccgctgc tcgccgcaa cgggaccgtg 420
 [0547] ccctcttggc ccaccgcccc ggtgcccgag gccggcgagc ccggggagga ggcgccctat 480
 [0548] ctggtgaagg tgcaccaggt gtgggcggtg aaagccgggg gcttgaagaa ggactcgctg 540
 [0549] ctcaccgtgc gcctggggac ctggggccac cccgccttcc cctcctgcgg gaggtcctaa 600
 [0550] gaggacagca ggtacatctt cttcatggag cccgacgcca acagcaccag ccgcgcgcgg 660
 [0551] gccgccttcc gagcctcttt cccccctctg gagacgggcc ggaacctcaa gaaggaggtc 720
 [0552] agccgggtgc tgtgcaagcg gtgcgccttg cctccccaat tgaaagagat gaaaagccag 780
 [0553] gaatcgctg caggttccaa actagtcctt cggtgtgaaa ccagttctga atactcctct 840
 [0554] ctcagattca agtggttcaa gaatgggaat gaattgaatc gaaaaaaca accacaaaat 900
 [0555] atcaagatac aaaaaagcc aggggaagtca gaacttcgca ttaacaaagc atcactggct 960
 [0556] gattctggag agtatatgtg caaagtatc agcaaattag gaaatgacag tgcctctgcc 1020
 [0557] aatatcacca tcgtggaatc aaacgtaca tctacatcca ccactgggac aagccatctt 1080
 [0558] gtaaaatgtg cggagaagga gaaaacttct tgtgtgaatg gaggggagtg cttcatgggt 1140
 [0559] aaagaccttt caaacccctc gagatacttg tgcaagtgcc caaatgagtt tactgggtat 1200
 [0560] cgctgcaaaa actacgtaat ggccagcttc tacagtacgt ccactccctt tctgtctctg 1260
 [0561] cctgaatag 1269
 [0562] <210> 24
 [0563] <211> 422
 [0564] <212> PRT
 [0565] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0566] <400> 24
 [0567] Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg
 [0568] 1 5 10 15
 [0569] Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu
 [0570] 20 25 30
 [0571] Leu Pro Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala
 [0572] 35 40 45
 [0573] Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser
 [0574] 50 55 60
 [0575] Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala
 [0576] 65 70 75 80
 [0577] Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala
 [0578] 85 90 95
 [0579] Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly
 [0580] 100 105 110
 [0581] Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro
 [0582] 115 120 125
 [0583] Ala Glu Glu Pro Leu Leu Ala Ala Asn Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro
 [0584] 130 135 140
 [0585] Thr Ala Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr
 [0586] 145 150 155 160
 [0587] Leu Val Lys Val His Gln Val Trp Ala Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys

| | | | |
|--------|---|-----|-----|
| [0588] | 165 | 170 | 175 |
| [0589] | Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Thr Trp Gly His Pro Ala | | |
| [0590] | 180 | 185 | 190 |
| [0591] | Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe | | |
| [0592] | 195 | 200 | 205 |
| [0593] | Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg | | |
| [0594] | 210 | 215 | 220 |
| [0595] | Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val | | |
| [0596] | 225 | 230 | 235 |
| [0597] | Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys Ala Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu | | |
| [0598] | 245 | 250 | 255 |
| [0599] | Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys | | |
| [0600] | 260 | 265 | 270 |
| [0601] | Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn | | |
| [0602] | 275 | 280 | 285 |
| [0603] | Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln | | |
| [0604] | 290 | 295 | 300 |
| [0605] | Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala | | |
| [0606] | 305 | 310 | 315 |
| [0607] | Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp | | |
| [0608] | 325 | 330 | 335 |
| [0609] | Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr | | |
| [0610] | 340 | 345 | 350 |
| [0611] | Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys | | |
| [0612] | 355 | 360 | 365 |
| [0613] | Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser | | |
| [0614] | 370 | 375 | 380 |
| [0615] | Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp | | |
| [0616] | 385 | 390 | 395 |
| [0617] | Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro | | |
| [0618] | 405 | 410 | 415 |
| [0619] | Phe Leu Ser Leu Pro Glu | | |
| [0620] | 420 | | |
| [0621] | <210> 25 | | |
| [0622] | <211> 11 | | |
| [0623] | <212> PRT | | |
| [0624] | <213> 智人(Homo sapiens) | | |
| [0625] | <400> 25 | | |
| [0626] | Val Cys Leu Leu Thr Val Ala Ala Leu Pro Pro | | |
| [0627] | 1 | 5 | 10 |
| [0628] | <210> 26 | | |
| [0629] | <211> 15 | | |

| | | |
|--------|---|-------------------|
| [0630] | <212> | PRT |
| [0631] | <213> | 智人 (Homo sapiens) |
| [0632] | <400> | 26 |
| [0633] | Ala Ser Pro Val Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Val Gln Arg | |
| [0634] | 1 | 5 10 15 |
| [0635] | <210> | 27 |
| [0636] | <211> | 8 |
| [0637] | <212> | PRT |
| [0638] | <213> | 智人 (Homo sapiens) |
| [0639] | <400> | 27 |
| [0640] | Trp Phe Val Val Ile Glu Gly Lys | |
| [0641] | 1 | 5 |
| [0642] | <210> | 28 |
| [0643] | <211> | 9 |
| [0644] | <212> | PRT |
| [0645] | <213> | 智人 (Homo sapiens) |
| [0646] | <400> | 28 |
| [0647] | Lys Val His Glu Val Trp Ala Ala Lys | |
| [0648] | 1 | 5 |
| [0649] | <210> | 29 |
| [0650] | <211> | 7 |
| [0651] | <212> | PRT |
| [0652] | <213> | 智人 (Homo sapiens) |
| [0653] | <220> | |
| [0654] | <221> | misc_feature |
| [0655] | <222> | (5) .. (5) |
| [0656] | <223> | Xaa可为任何天然存在的氨基酸 |
| [0657] | <400> | 29 |
| [0658] | Asp Leu Leu Leu Xaa Val Leu | |
| [0659] | 1 | 5 |
| [0660] | <210> | 30 |
| [0661] | <211> | 12 |
| [0662] | <212> | PRT |
| [0663] | <213> | 智人 (Homo sapiens) |
| [0664] | <220> | |
| [0665] | <221> | misc_feature |
| [0666] | <222> | (11) .. (11) |
| [0667] | <223> | Xaa可为任何天然存在的氨基酸 |
| [0668] | <400> | 30 |
| [0669] | Gly Ala Trp Gly Pro Pro Ala Phe Pro Val Xaa Tyr | |
| [0670] | 1 | 5 10 |
| [0671] | <210> | 31 |

[0672] <211> 13
[0673] <212> PRT
[0674] <213> 智人(Homo sapiens)
[0675] <220>
[0676] <221> misc_feature
[0677] <222> (10) .. (10)
[0678] <223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
[0679] <400> 31
[0680] Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Glu Ala Xaa Ser Ser Gly
[0681] 1 5 10
[0682] <210> 32
[0683] <211> 4
[0684] <212> PRT
[0685] <213> 智人(Homo sapiens)
[0686] <400> 32
[0687] Leu Val Leu Arg
[0688] 1
[0689] <210> 33
[0690] <211> 13
[0691] <212> PRT
[0692] <213> 智人(Homo sapiens)
[0693] <220>
[0694] <221> misc_feature
[0695] <222> (12) .. (12)
[0696] <223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
[0697] <400> 33
[0698] Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Xaa Lys
[0699] 1 5 10

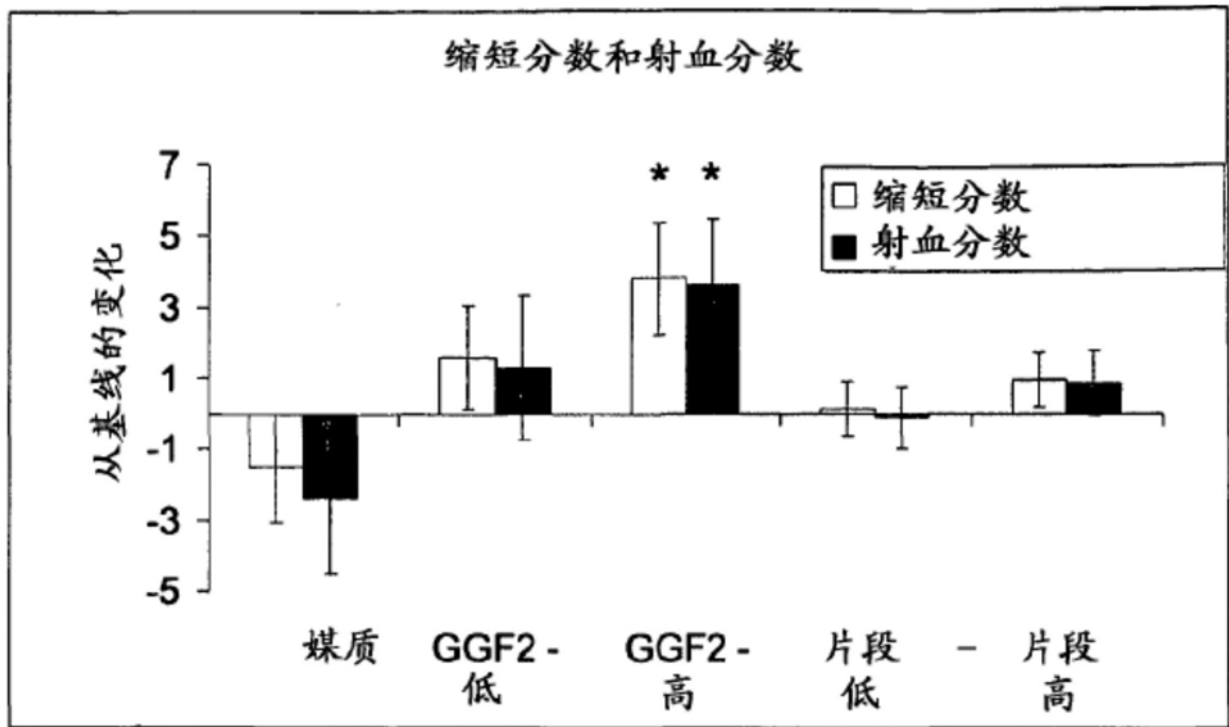


图1

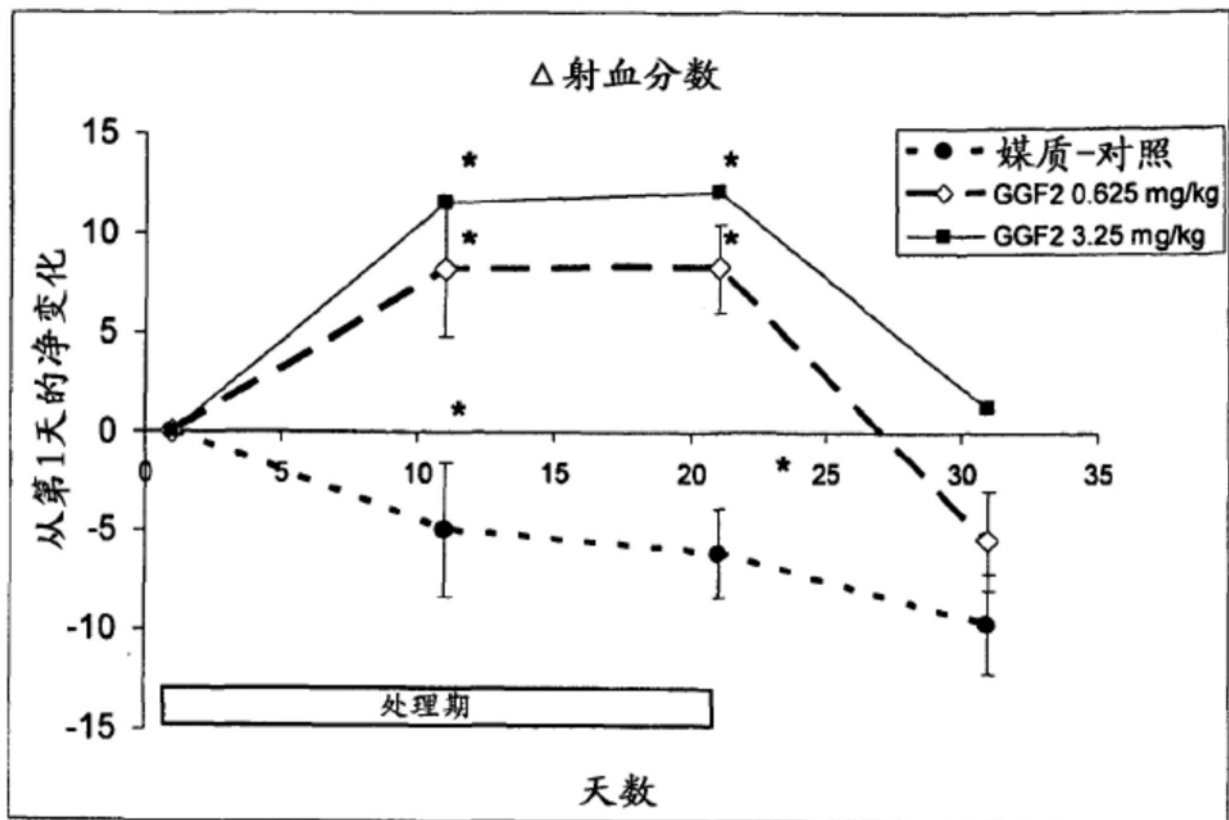


图2

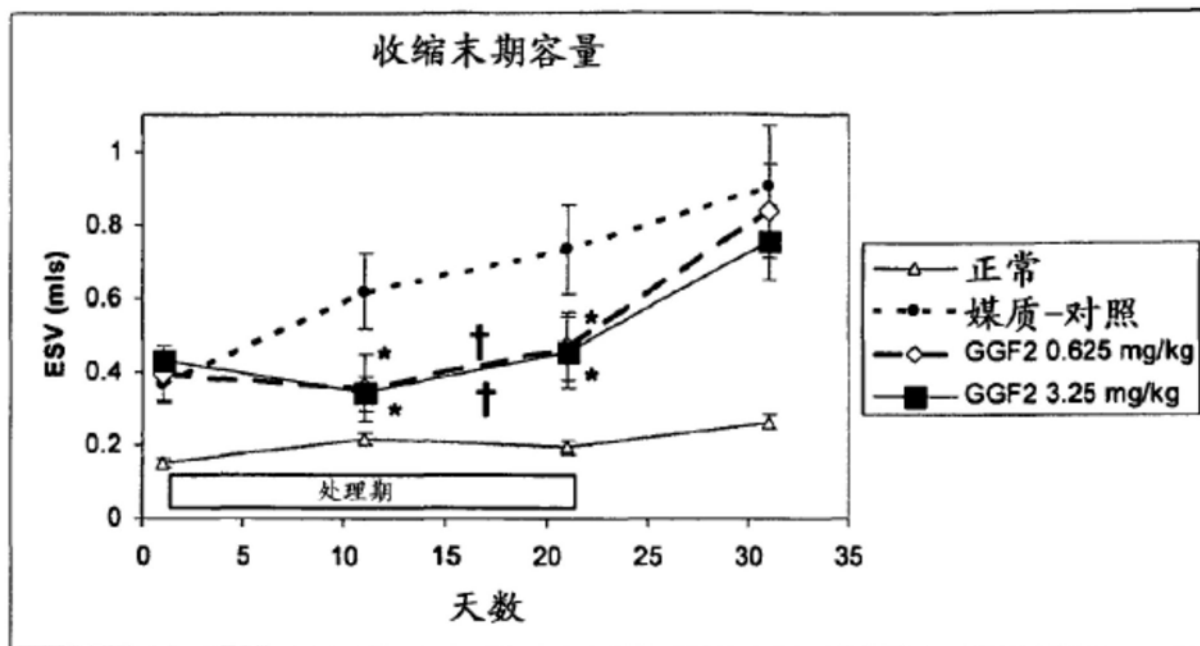


图3

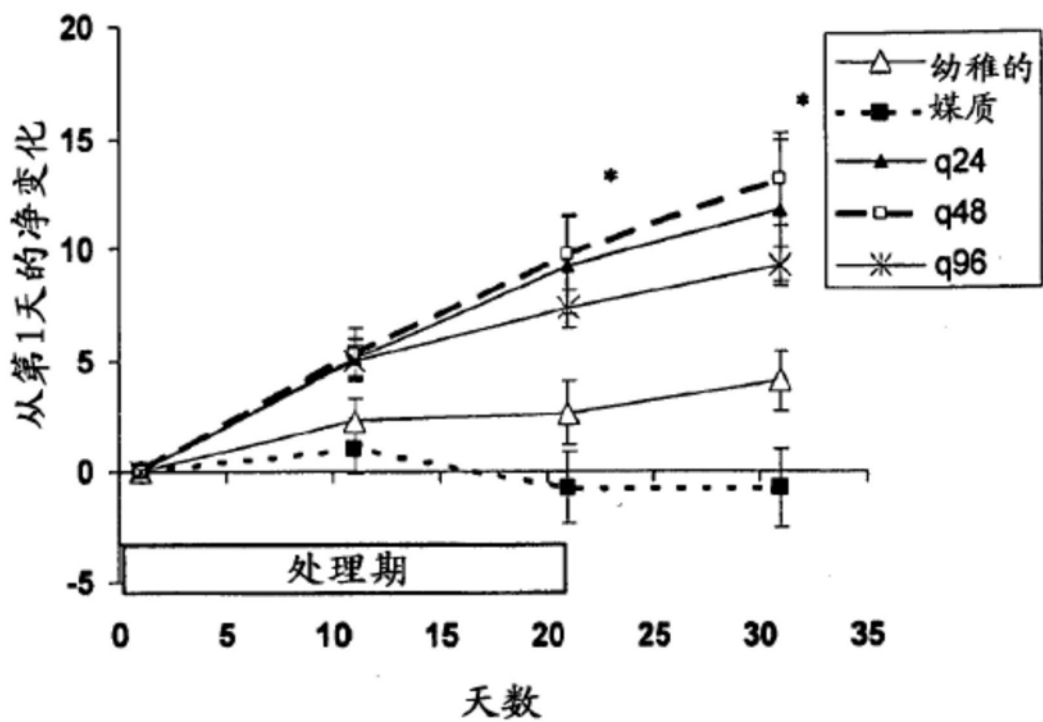


图4

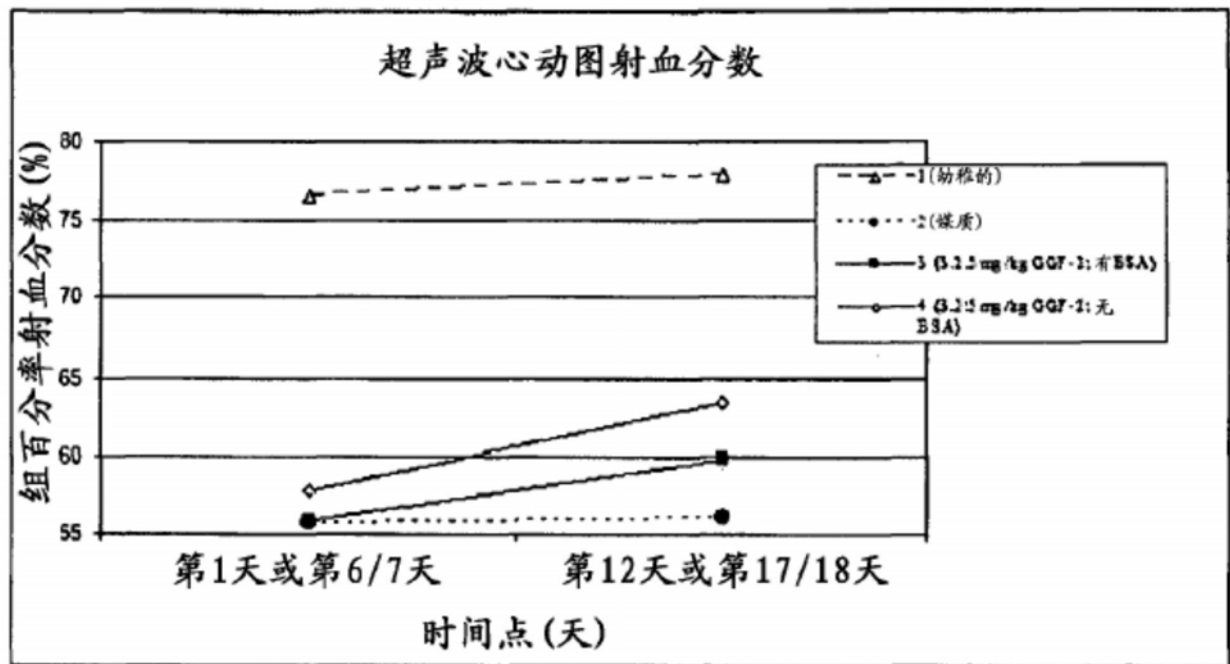


图5

通过静脉内途径的单个剂量的 $^{125}\text{rhGGF2}$ (组1) 后
雄性Sprague-Dawley大鼠血浆中放射性的平均浓度

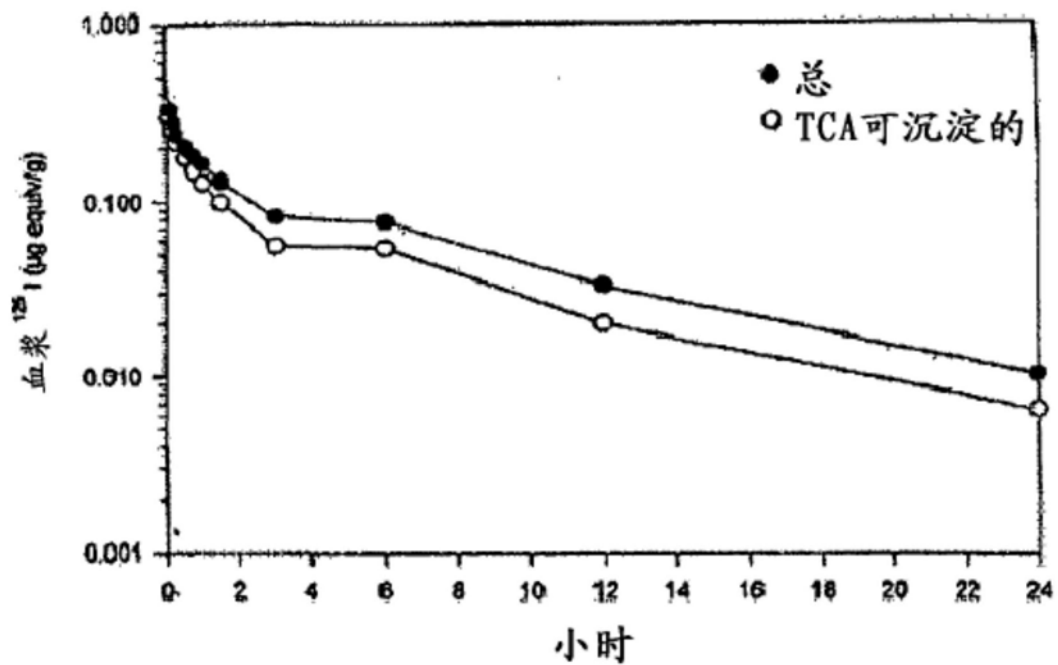


图6

通过皮下途径的单个剂量的 $^{125}\text{rhGGF2}$ (组1) 后
雄性Sprague-Dawley大鼠血浆中放射性的平均浓度

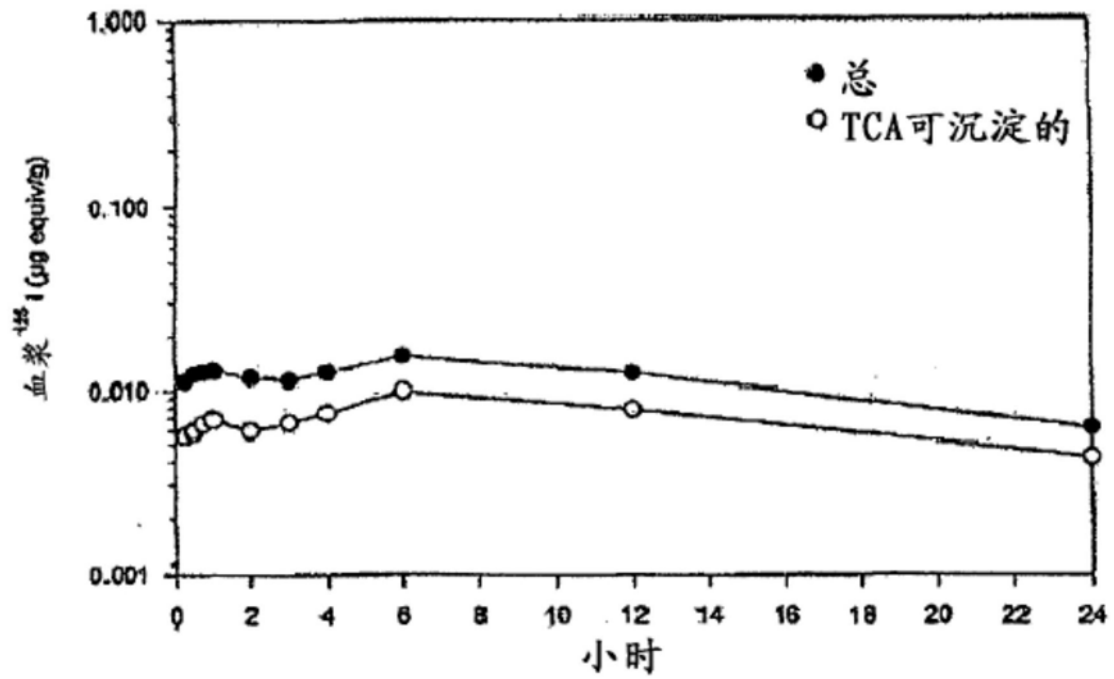


图7

GGF2HBS5的核酸序列及推断的氨基酸序列

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

图8C

GGF2HBS5的核酸序列及推断的氨基酸序列

| | |
|--|------|
| AAA TGT GCG GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT GGA GGG GAG TGC Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys | 1395 |
| TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAC CCC TCG AGA TAC TTG TGC AAG TGC Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys | 1443 |
| CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser | 1491 |
| TTC TAC AGT ACG TCC ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT GAA Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu | 1530 |
| TAGGAGCATG CTCAGTTGGT GCTGCTTTCT TGTTGCTGCA TCTCCCTCA GATTCCACCT | 1590 |
| AGAGCTAGAT GTGTCTTACC AGATCTAATA TTGACTGCCT CTGCCCTGTCG CATGAGAACA | 1650 |
| TTAACAAAAG CAATTGTATT ACTTCCTCTG TTCGCGACTA GTTGGCTCTG AGATACTAAT | 1710 |
| AGGTGTGTGA GGCTCCGGAT GTTCTCTGGAA TTGATATTGA ATGATGTGAT ACAAATTGAT | 1770 |
| AGTCAATATC AAGCAGTGAA ATATGATAAT AAAGGCATTT CAAAGTCTCA CTTTATTGA | 1830 |
| TAAATAAAA ATCATCTTAC TGAACAGTCC ATCTTCTTTA TACAATGACC ACATCCTGAA | 1890 |
| AAGGGTGTG CTAAGCTGTA ACCGATATGC ACTTGAAATG ATGGTAAGTT AATTTTGATT | 1950 |
| CAGAATGTGT TATTGTGCAC AAATAAACAT AATAAAAGGA AAAAAAAA AAA | 2003 |

图8D

EGFL1

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

图9

EGFL2

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

图10

EGFL3

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

图11

EGFL4

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

图12

EGFL5

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

图13

EGFL6

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

图14

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr

图15

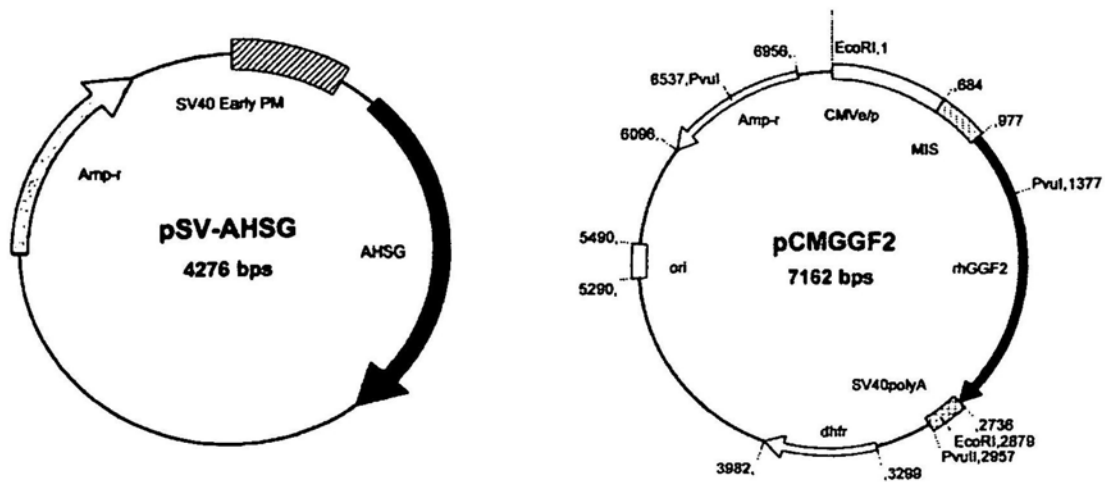


图16

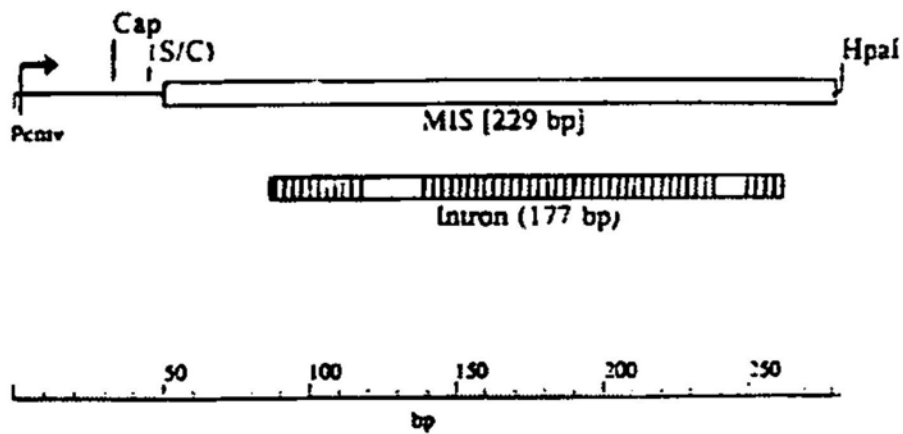


图17