

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01813179.4

[51] Int. Cl.

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 2/00 (2006.01)

C07K 5/00 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 5 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 1318084C

[22] 申请日 2001.5.23 [21] 申请号 01813179.4

[30] 优先权

[32] 2000. 5. 26 [33] US [31] 60/207,654

[86] 国际申请 PCT/US2001/016654 2001. 5. 23

[87] 国际公布 WO2001/091780 英 2001. 12. 6

[85] 进入国家阶段日期 2003. 1. 21

[73] 专利权人 奥索 - 麦克尼尔药品公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 V·史密斯 - 斯文托斯基 M·伦兹

C·普拉塔 - 萨拉曼 L·乔利菲

F·法雷尔 D·L·约翰森

[56] 参考文献

US5767078A 1998. 6. 16

审查员 温庭江

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥

权利要求书 8 页 说明书 35 页 附图 25 页

[54] 发明名称

神经保护肽

[57] 摘要

公开了通过给予具有人红细胞生成素的神经学治疗活性的组合物治疗神经系统疾病的方法被公开。这些组合物包括具有人红细胞生成素全部生物活性或只具有红细胞生成素某些生物活性的治疗剂,例如肽、肽二聚体、多肽和蛋白。也提供其中红细胞生成素以低于刺激血细胞生成所需要的浓度给予的改良治疗方案。

1. 一种肽在制备用于治疗由神经毒性、神经变性或神经病学损伤介导的病症的药物中的应用，其中所述肽包含一个或多个长 8 到
5 约 40 个氨基酸并与 EPO 受体结合的单体肽，每一个单体肽包含一个氨基酸序列 $X_4X_5X_aX_bX_6X_cX_dX_7$ (SEQ ID NO: 47)，其中

X_a 是 G 或 A;

X_b 是 P 或 A;

X_c 是 T 或 A;

10 X_d 选自 W、A 和 F;

X_4 选自 R、H、Y、L 和 W，或者 X_4 不存在;

X_5 选自 F、M 和 I;

X_6 独立选自 20 种遗传编码的 L-氨基酸和立体异构的 D-氨基酸;
和

15 X_7 选自 D、V、E、I 和 L。

2. 权利要求 1 中所述的应用，其中所述序列是 $X_4X_5GPX_6TWX_7$ (SEQ ID NO: 48); 其中

X_4 选自 R、H、Y、L 和 W，或者 X_4 不存在;

X_5 选自 F、M 和 I;

20 X_6 独立选自 20 种遗传编码的 L-氨基酸和立体异构的 D-氨基酸;
和

X_7 选自 D、V、E、I 和 L。

3. 权利要求 2 中所述的应用，其中所述序列是 $X_3X_4X_5GPX_6TWX_7X_8$ (SEQ ID NO: 1)，其中

25 X_3 选自 C、E、A、 α -氨基- γ -溴丁酸和高半胱氨酸(Hoc);

X_4 选自 R、H、Y、L 和 W，或者 X_4 不存在;

X_5 选自 F、M 和 I;

X_6 独立选自 20 种遗传编码的 L-氨基酸和立体异构的 D-氨基酸;

X₇选自 D、V、E、I 和 L; 和

X₈选自 C、K、A、 α -氨基- γ -溴丁酸和高半胱氨酸(Hoc)。

4. 权利要求 3 中所述的应用, 条件是 X₃ 或 X₈ 是 C 或高半胱氨酸(Hoc)。

5 5. 权利要求 4 中所述的应用, 其中 X₃ 或 X₈ 是 C。

6. 权利要求 3 中所述的应用, 其中

X₃ 选自 C、E 和 A;

X₄ 选自 R、H 或 Y, 或者 X₄ 不存在;

X₆ 选自 V、L、I、M、E 和 A; 和

10 X₇ 是 D 或 V; 和

X₈ 选自 C、K 和 A。

7. 权利要求 3 中所述的应用, 其中所述肽是各自包含一个 YX₂X₃X₄X₅GPX₆TWX₇X₈ (SEQ ID NO: 2)氨基酸序列的所述单体肽的二聚体, 其中

15 X₂ 和 X₆ 各自独立地选自 20 种遗传编码的 L-氨基酸;

X₃ 是 C; 和

X₈ 是 C。

8. 权利要求 7 中所述的应用, 其中

X₂ 选自 L、S、H、M、A 和 I, 或 X₂ 不存在; 和

20 X₆ 选自 V、L、I、M、E 和 A。

9. 权利要求 7 中所述的应用, 其中每一个所述单体肽包含一个 X₁YX₂X₃X₄X₅GPX₆TWX₇X₈X₉X₁₀X₁₁ (SEQ ID NO: 3)的氨基酸序列, 其中 X₁、X₂、X₆、X₉、X₁₀ 和 X₁₁ 中的每一个独立地选自 20 种遗传编码的 L-氨基酸。

25 10. 权利要求 9 中所述的应用, 其中

X₃ 选自 C、E 和 A;

X₄ 选自 R、H 和 Y, 或者 X₄ 不存在;

X₇ 是 D 或 V;

X_8 是 C 或 K;

X_9 是 K、G、L、Q、R、S 或 T; 和

X_{10} 是 A、G、P、R 或 Y。

11. 权利要求 10 中所述的应用, 其中

5 X_1 是 D、E、L、N、S、T 或 V;

X_2 选自 L、S、H、M、A 和 I, 或者 X_2 不存在;

X_9 选自 K、Q、R、S 和 G; 和

X_{10} 选自 P、Y 和 A。

10 12. 权利要求 1 中所述的应用, 其中每一个所述单体肽包含一个独立地选自以下的序列:

GGLYLCRFGPVTWDCGYKGG	(SEQ ID NO:7);
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-1) (SEQ ID NO:8);
GGDYHCRMGPLTWVCKPLGG	(SEQ ID NO:9);
VGNYMCHFGPITWVCRPGGG	(SEQ ID NO:10);
GGVYACRMGPITWVCSPLGG	(SEQ ID NO:11);
VGNYMAHMGPIWVCRPGG	(SEQ ID NO:12);
GGTYSCHFGPLTWVCKPQ	(aka EMP-16) (SEQ ID NO:13);
GGLYACHMGPMTWVCQPLRG	(aka EMP-36) (SEQ ID NO:14);
TIAQYICYMGPETWECRSPKA	(aka EMP-38) (SEQ ID NO:15);
YSCHFGPLTWVCK	(aka EMP-20) (SEQ ID NO:16);
YCHFGPLTWVC	(aka EMP-23) (SEQ ID NO:17);
SCHFGPLTWVCK	(aka EMP-24) (SEQ ID NO:18);
GGTASCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-6) (SEQ ID NO:19);
GGTYSCHFAPLTWVCKPQGG	(aka EMP-9) (SEQ ID NO:20);
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-27) (SEQ ID NO:21);
TYSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-17) (SEQ ID NO:22);
TYSCHFGPLTWVCKPQ	(aka EMP-18) (SEQ ID NO:23);
YSCHFGPLTWVCKP	(aka EMP-19) (SEQ ID NO:24);
YSCHFGPLTWVC	(aka EMP-21) (SEQ ID NO:25);

YSCHFGALTWVCK	(aka EMP-22) (SEQ ID NO:26);
GGCRIGPITWVCGG	(aka EMP-25) (SEQ ID NO:27);
HFGPLTWV	(aka EMP-26) (SEQ ID NO:28);
GGTTSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-7) (SEQ ID NO:29);
GGTFSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-8) (SEQ ID NO:30);
GGTYSCHFGALTWVCKPQGG	(aka EMP-10) (SEQ ID NO:31);
GGTYSCHFGPATWVCKPQGG	(aka EMP-11) (SEQ ID NO:32);
GGTYSCHFGPLAWVCKPQGG	(aka EMP-12) (SEQ ID NO:33);
GGTYSCHFGPLTAVCKPQGG	(aka EMP-13) (SEQ ID NO:34);
GGTYSCHFGPLTFVCKPQGG	(aka EMP-14) (SEQ ID NO:35);
GGTYSCHFGPLTWVCKAQGG	(aka EMP-15) (SEQ ID NO:36);
GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-28, X = D-Tyr) (SEQ ID NO:37);
GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-29, X = <i>p</i> -NO ₂ -Phe) (SEQ ID NO:38);
GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-30, X = <i>p</i> -NH ₂ -Phe) (SEQ ID NO:39);
GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-31, X = <i>p</i> -F-Phe) (SEQ ID NO:40);
GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-32, X = <i>p</i> -I-Phe) (SEQ ID NO:41);
GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-33, X = 3,5- 二溴 -Tyr) (SEQ ID NO:42);
Ac-GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-34) (SEQ ID NO:43);
GGLYACHMGPMTWVCQPLGG	(aka EMP-35) (SEQ ID NO:44);
LGRKYSCHFGPLTWVCQPAKKD	(aka EMP-37) (SEQ ID NO:45);和
GGTYSEHFGPLTWVKKPQGG	(aka EMP-39) (SEQ ID NO:46)。

13. 权利要求 12 中所述的应用, 其中每一个所述单体肽独立地选自:

GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG	(SEQ ID NO:8);
GGTASCHFGPLTWVCKPQGG	(SEQ ID NO:19);
GGTYSCHFAPLTWVCKPQGG	(SEQ ID NO:20); 和
YCHFGPLTWVC	(SEQ ID NO:17)。

14. 权利要求 1 中所述的应用, 其中所述肽是由聚乙二醇接头通过共价键形成的二聚体。

15. 权利要求 14 中所述的应用, 其中所述二聚体的每一个单体肽是 N-末端到 N-末端共价结合的。

16. 权利要求 14 中所述的应用, 其中所述二聚体的每一个单体肽是 N-末端到 C-末端共价结合的。

5 17. 权利要求 1 中所述的应用, 其中所述单体肽在活化的苯并二氮杂草(benodiazepins)、oxazolones、氮杂内酯、胺化酰亚胺或二酮哌嗪上二聚化。

18. 权利要求 17 中所述的应用, 其中所述单体肽是 N-末端到 N-末端共价结合的。

10 19. 权利要求 17 中所述的应用, 其中所述单体肽是 N-末端到 C-末端共价结合的。

20. 权利要求 2 中所述的应用, 其中所述肽至少包含一个肽二聚体。

15 21. 权利要求 2 中肽的二聚体在制备用于诱导所述神经保护性生物活性的药物中的应用, 其中所述肽的序列是 $X_4X_5GPX_6TWX_7$ (SEQ ID NO: 48); 其中

X_4 选自 R、H、Y、L 和 W, 或者 X_4 不存在;

X_5 选自 F、M 和 I;

X_6 独立选自 20 种遗传编码的 L-氨基酸和立体异构的 D-氨基酸;

20 和

X_7 选自 D、V、E、I 和 L。

22. 权利要求 21 中所述的应用, 其中所述细胞表面受体是 EPO 受体。

25 23. 权利要求 21 中所述的应用, 其中所述肽二聚体是选自以下的一种细胞表面受体激动剂: GH 激动剂、PDGF 激动剂、EGF 激动剂、G-CSF 激动剂、TPO (血小板生成素)激动剂、VEGF 激动剂、FGF 激动剂、胰岛素激动剂、IL-3 激动剂、IL-5 激动剂、IL-6 激动剂和 IL-2 激动剂。

24. 权利要求 21 中所述的应用, 其中所述激动剂包含一个 $YX_2X_3X_4X_5GPX_6TWX_7X_8$ (SEQ ID NO: 2)的氨基酸序列, 其中 X_2 和 X_6 中的每一个独立选自 20 种遗传编码的 L-氨基酸; X_3 是 C; X_4 是 R、H、L 或 W; X_5 是 M、F 或 I; X_7 是 D、E、I、L 或 V; 和 X_8 是 C。

5 25. 权利要求 21 中所述的应用, 其中所述激动剂包含一个 $X_1YX_2X_3X_4X_5GPX_6TWX_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ (SEQ ID NO: 3)的氨基酸序列, 其中 X_1 、 X_2 、 X_6 、 X_9 、 X_{10} 和 X_{11} 中的每一个独立选自 20 种遗传编码的 L-氨基酸中的任何一种; X_3 是 C; X_4 是 R、H、L 或 W; X_5 是 M、F 或 I; X_7 是 D、E、I、L 或 V; 和 X_8 是 C。

10 26. 权利要求 21 中所述的应用, 其中所述激动剂包含一个 $X_1YX_2X_3X_4X_5GPX_6TWX_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ (SEQ ID NO: 3)的氨基酸序列, 其中 X_1 、 X_2 和 X_{11} 中的每一个独立选自 20 种遗传编码的 L-氨基酸中的任何一种; X_3 是 C; X_4 是 R 或 H; X_5 是 F 或 M; X_6 是 I、L、T、M 或 V; X_7 是 D 或 V; X_9 是 G、K、L、Q、R、S 或 T; 和 X_{10} 是 A、G、P、R 或 Y。

15 27. 权利要求 21 中所述的应用, 其中所述激动剂包含一个 $X_1YX_2X_3X_4X_5GPX_6TWX_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ (SEQ ID NO: 3)的氨基酸序列, 其中 X_1 是 D、E、L、N、S、T 或 V; X_2 是 A、H、K、L、M、S 或 T; X_3 是 C; X_4 是 R 或 H; X_5 是 M、F 或 I; X_6 和 X_{11} 独立地是 20 种遗传编码的 L-氨基酸中的任何一种; X_7 是 D、E、I、L 或 V; X_8 是 C; X_9 是 K、R、S 或 T; 和 X_{10} 是 P。

28. 权利要求 21 中所述的应用，其中所述激动剂选自：

GGLYLCRFGPVTWDCGYKGG	(SEQ ID NO:7);
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-1) (SEQ ID NO:8);
GGDYHCRMGPLTWVCKPLGG	(SEQ ID NO:9);
VGNYMCHFGPITWVCRPGGG	(SEQ ID NO:10);
GGVYACRMGPITWVCSPLGG	(SEQ ID NO:11);
VGNYPMAHMGPIWVCRPGG	(SEQ ID NO:12);
GGTYSCHFGPLTWVCKPQ	(aka EMP-16) (SEQ ID NO:13);
GGLYACHMGPMTWVCQPLRG	(aka EMP-36) (SEQ ID NO:14);
TIAQYICYMGPETWECRPSPKA	(aka EMP-38) (SEQ ID NO:15);
YSCHFGPLTWVCK	(aka EMP-20) (SEQ ID NO:16);
YCHFGPLTWVC	(aka EMP-23) (SEQ ID NO:17);
SCHFGPLTWVCK	(aka EMP-24) (SEQ ID NO:18);
GGTASCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-6) (SEQ ID NO:19);
GGTYSCHFAPLTWVCKPQGG	(aka EMP-9) (SEQ ID NO:20);
GGTYSCHFGLTWVCKPQGG	(aka EMP-27) (SEQ ID NO:21);
TYSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-17) (SEQ ID NO:22);
TYSCHFGPLTWVCKPQ	(aka EMP-18) (SEQ ID NO:23);
YSCHFGPLTWVCKP	(aka EMP-19) (SEQ ID NO:24);
YSCHFGPLTWVC	(aka EMP-21) (SEQ ID NO:25);
YSCHFGALTWVCK	(aka EMP-22) (SEQ ID NO:26);
GGCRIGPITWVCGG	(aka EMP-25) (SEQ ID NO:27);
HFGPLTWV	(aka EMP-26) (SEQ ID NO:28);
GGTTSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-7) (SEQ ID NO:29);
GGTFSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-8) (SEQ ID NO:30);
GGTYSCHFGALTWVCKPQGG	(aka EMP-10) (SEQ ID NO:31);
GGTYSCHFGPATWVCKPQGG	(aka EMP-11) (SEQ ID NO:32);
GGTYSCHFGPLAWVCKPQGG	(aka EMP-12) (SEQ ID NO:33);
GGTYSCHFGPLTAVCKPQGG	(aka EMP-13) (SEQ ID NO:34);
GGTYSCHFGPLTFVCKPQGG	(aka EMP-14) (SEQ ID NO:35);
GGTYSCHFGPLTWVCKAQGG	(aka EMP-15) (SEQ ID NO:36);

GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG (aka EMP-28, X = D-Tyr) (SEQ ID NO:37);
GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG (aka EMP-29, X = *p*-NO₂-Phe)
(SEQ ID NO:38);
GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG (aka EMP-30, X = *p*-NH₂-Phe)
(SEQ ID NO:39);
GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG (aka EMP-31, X = *p*-F-Phe) (SEQ ID NO:40);
GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG (aka EMP-32, X = *p*-I-Phe) (SEQ ID NO:41);
GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG (aka EMP-33, X = 3,5- 二溴 -Tyr)
(SEQ ID NO:42);
Ac-GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG (aka EMP-34) (SEQ ID NO:43);
GGLYACHMGPMTWVCQPLGG (aka EMP-35) (SEQ ID NO:44);
LGRKYSCHFGPLTWVCQPAKKD (aka EMP-37) (SEQ ID NO:45); 和
GGTYSEHFGPLTWVKKPQGG (aka EMP-39) (SEQ ID NO:46)。

29. 权利要求 21 中所述的应用, 其中所述肽二聚体是由聚乙二醇接头通过共价键形成的。

神经保护肽

5 相关申请的交叉参照

本申请要求在 2000 年 5 月 26 日申请的美国临时申请顺序号 60/207654 的权益。

10 发明领域

本发明涉及通过给予具有人红细胞生成素的治疗活性的组合物治疗涉及神经系统的疾病和病症的方法。这些组合物包括具有人红细胞生成素所有生物活性或只具有红细胞生成素某些生物活性的治疗剂，例如肽、肽二聚体、多肽和蛋白。本发明还提供了改良的治疗方案，其中所述治疗剂以低于刺激红细胞生成所需要的浓度给予。

15

发明背景

红细胞生成素(EPO)是由肾脏对组织缺氧应答而产生的糖蛋白激素，在骨髓中刺激血红细胞的生成。如美国专利号 4,703,008 中所描述的，红细胞生成素的基因已经被克隆并在中国仓鼠卵巢细胞(CHO)中表达。重组人红细胞生成素(rHuEPO 或 Epoetin α)具有与人尿红细胞生成素相同的氨基酸序列，它们在化学检测、物理检测和免疫检测上无法区分。重组人红细胞生成素通过增加能够分化成为成熟红细胞的细胞数量、触发它们的分化和增加发育中成红细胞的血红蛋白的合成来起作用(Krantz SB. *Blood* (1991) 77: 419-434, Beckman BS, Mason-Garcia M. *The Faseb Journal* (1991) 5: 2958-2964)。

25

Epoetin α 在迄今为止进行的研究中可以被很好的耐受。在用 Epoetin α 治疗的透析患者中偶尔会有高血压性脑病和癫痫发作的记述，详细地讲是在治疗的早期当血细胞比容升高时(Eschbach JW, Egrie

JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW. *New Engl J Med* (1987) 316: 73-78, Winearls CG, Oliver DO, Pippard MJ 等, *Lancet* (1986) 2(8517): 1175-1177)。这类报告会因为逐渐获得使用所述化合物的经验而变得更加罕见。偶尔地, Epoetin α 治疗的癌症患者会经历一个与血细胞比容明显升高有关的血压升高。然而, 所述风险实际上显示出低于慢性肾衰竭患者。

在用 Epoetin α 治疗达到2年的患者中不能够例证和确证抗 Epoetin α 抗体的效价, 这表明缺乏对 Epoetin α 的免疫敏感性。皮疹和风疹很少被观察到, 当有报道时实际上已经是轻微和短暂的, 但这些事件暗示了对 Epoetin α 制剂中某些组分的超过敏性。

Epoetin α 在许多国家批准上市用于治疗慢性肾衰竭贫血症(透析和透析前)、齐多夫定治疗 HTV 阳性患者的贫血症(US)、接受基于铂化疗的癌症患者的贫血症, 作为自体捐血前的促进剂和在进行整形手术的患者中作为围手术辅助剂以减少要求异源输血的可能性。

EPO 也许在胚胎发育过程中、以及可能在体外分化实验中影响神经元干细胞(Juul 等 *Pediatr Dev Pathol* (1999) 2(2) 148-158, Juul 等 *Pediatr Res* (1998) 43(1) 40-49)。此外, 遭受由于低氧、脑膜炎和心室内出血而导致 CNS 损伤的新生儿和婴儿显示出 EPO 诱导的神经保护作用(Juul 等 *Ped Res* (1999) 46(5) 543-547)。

一旦损伤导致低氧, EPO 可以帮助防止神经组织的细胞凋亡。这有可能是星形胶质细胞局部产生 EPO 的结果(Morishita 等 *Neuroscience* (1996) 76(1) 105-116)。神经保护已经在沙土鼠海马组织和大鼠大脑皮质组织中得到例证(Sakanaka 等 *PNAS* (1998) 95(8) 4635-4640, Sadamoto 等 *Biochem Biophys Res Commun* (1998) 253(1) 26-32)。

EPO 诱导 PC12 细胞的生物效应, 包括 Ca^{2+} 的变化、跨膜电位的变化和促进神经元存活。这被解释为 EPO 可以刺激神经功能和存活能力(Koshimura 等 *J. Neurochem* (1999) 72(6) 2565-2572. Tabria 等 *Int J*

Dev Neurosci (1995) 13(3/4) 241-252)。

O'Brien 等提出, EPO 的一个 17 个氨基酸肽序列可以通过 EPO-R (红细胞生成素受体)在 NS20Y、SK-N-MC 和 PC12 细胞中诱发生物活性, 包括出芽、分化和神经保护。令人惊奇的是, 这种肽并不促进血
5 细胞的增殖, 因此它看来在熟知对于 EPO 活性敏感的细胞系中无活性。(Campana 等 *Int J Mol Med* (1998) 1(1) 235-241 和 O'Brien 等的于 12/23/1999 授予的美国专利号 5,700,909、于 11/5/1996 授予的美国专利号 5,571,787、于 2/3/1998 授予 5,714,459 和于 12/9/1997 授予的美国专利号 5,696,080)。

10 EPO 可以影响神经元干细胞定型从而促进神经元不向星形胶质细胞或少突胶质细胞分化。这与 EPO 促进造血干细胞定型产生红细胞 (RBC)的类似活性相比拟。在 CNS 低氧性损伤导致从星形胶质细胞产生 EPO 促进神经元干细胞分化为神经元、以及同时还对存在的神经元发挥神经保护作用之间明显有关联(WIPO 公布号 WO99/21966, 于
15 5/6/1999 公布, Weiss 等)。

发明概述

本发明涉及通过给予具有人红细胞生成素神经治疗活性的组合物来治疗涉及神经系统的疾病和病症的方法。

20 在第一个实施方案中, 本发明涉及一种用于治疗患有特征为神经毒性、神经变性或神经损伤的病症的患者的方法, 所述方法包括对所述患者给予治疗有效量的肽, 该肽含有一个或多个长 8 到约 40 个氨基酸并与 EPO 受体结合的单体肽, 每一个单体肽包含一个氨基酸序列 $X_4X_5X_aX_bX_6X_cX_dX_7$ (SEQ ID NO: 47), 其中

25 X_a 是 G 或 A;
 X_b 是 P 或 A;
 X_c 是 T 或 A;
 X_d 选自 W、A 和 F;

X₄选自 R、H、Y、L 和 W，或者 X₄ 不存在；

X₅选自 F、M 和 I；

X₆独立选自 20 种遗传编码的 L-氨基酸或立体异构的 D-氨基酸；

和

5 X₇选自 D、V、E、I 和 L。

详细地讲，所述序列是 X₃X₄X₅GPX₆TWX₇X₈ (SEQ ID NO: 1)，其中

X₃选自 C、E、A、 α -氨基- γ -溴丁酸和高半胱氨酸(Hoc)；和

X₈选自 C、K、A、 α -氨基- γ -溴丁酸和高半胱氨酸(Hoc)。

10 在第二个实施方案中，本发明涉及做为细胞表面受体的激动剂和拮抗剂的肽，以及显现出结合生长因子类受体并且启动生长因子类受体信号的这类肽的二聚体和多聚体。在一个实施方案中，本发明提供了做为 EPO 激动剂的肽。这些肽可以是这类肽的二聚体或多聚体，优选长 14 至约 20 个残基，包含一个 X₃X₄X₅GPX₆TWX₇X₈ (SEQ ID NO: 1) 的核心氨基酸序列，其中每一个氨基酸通过标准单字母缩写来表示；

15 X₃可以是 C、E、A、 α -氨基- γ -溴丁酸或 Hoc，其中 Hoc 是高半胱氨酸；X₄可以是 R、H、Y、L 或 W，或者 X₄ 不存在；X₅可以是 M、F 或 I；X₆独立地是 20 种遗传编码的 L-氨基酸或立体异构 D-氨基酸中的任何一种；X₇可以是 D、E、I、L 或 V；和 X₈可以是 C、K、A、 α -氨基- γ -溴丁酸或 Hoc，其中 Hoc 是高半胱氨酸。

20

优选所述二聚体或多聚体的单体肽单位包含一个 YX₂X₃X₄X₅GPX₆TWX₇X₈ (SEQ ID NO: 2)氨基酸核心序列，其中 X₂和 X₆ 中的每一个独立地是 20 种遗传编码的 L-氨基酸中的任何一种；X₃是 C；和 X₈是 C。

25 优选所述二聚体的单体肽单位包含一个 X₁YX₂X₃X₄X₅GPX₆TWX₇X₈X₉X₁₀X₁₁ (SEQ ID NO: 3)氨基酸核心序列，其中 X₁、X₂、X₆、X₉、X₁₀和 X₁₁ 中的每一个独立选自 20 种遗传编码的 L-氨基酸。详细地讲，X₃可以是 C、E、A；X₄可以是 R、H

或 Y, 或者 X_4 不存在; X_5 可以是 M、F 或 I; X_7 可以是 D 或 V; 和 X_8 可以是 C、K 或 A。

在一个更优选的实施方案中, X_3 和 X_8 都是 C, 因此所述二聚体的单体肽单位包含一个 $X_1YX_2CX_4X_5GPX_6TWX_7CX_9X_{10}X_{11}$ (SEQ ID NO: 4) 氨基酸核心序列。详细地讲, 所述单体肽单位包含一个 $X_1YX_2CX_4X_5GPX_6TWX_7CX_9X_{10}X_{11}$ (SEQ ID NO: 5) 氨基酸核心序列, 其中 X_4 可以是 R 或 H; X_5 可以是 F 或 M; X_6 可以是 I、L、T、M 或 V; X_7 是 D 或 V; X_9 可以是 G、K、L、Q、R、S 或 T; 和 X_{10} 可以是 A、G、P、R 或 Y。更详细地讲, 所述二聚体的单体肽单位会包含一个 $X_1YX_2CX_4X_5GPX_6TWX_7CX_9X_{10}X_{11}$ (SEQ ID NO: 6) 氨基酸核心序列, 其中 X_1 可以是 D、E、L、N、S、T 或 V; X_2 可以是 A、H、K、L、M、S 或 T; X_4 是 R 或 H; X_9 可以是 K、R、S 或 T; 和 X_{10} 是 P。

优选所述二聚体的单体肽单位会包含一个 $X_1YX_2CX_4X_5GPX_6TWX_7CX_9X_{10}X_{11}$ (SEQ ID NO: 6) 氨基酸核心序列, 其中 X_1 可以是 D、E、L、N、S、T 或 V; X_2 可以是 A、H、K、L、M、S 或 T; X_4 是 R 或 H; X_9 可以是 K、R、S 或 T; 和 X_{10} 是 P。

所述二聚体的特别优选的单体肽单位包括:

GGLYLCRFGPVTWDCGYKGG	(SEQ ID NO:7);
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-1) (SEQ ID NO:8);
GGDYHCRMGPPLTWVCKPLGG	(SEQ ID NO:9);
VGNYMCHFGPITWVCRPGGG	(SEQ ID NO:10);
GGVYACRMGPITWVCSPLGG	(SEQ ID NO:11);
VGNYMAHMGPIWVCRPGG	(SEQ ID NO:12);
GGTYSCHFGPLTWVCKPQ	(aka EMP-16) (SEQ ID NO:13);
GGLYACHMGPMPTWVCQPLRG	(aka EMP-36) (SEQ ID NO:14);
TIAQYICYMGPETWECRSPKA	(aka EMP-38) (SEQ ID NO:15);
YSCHFGPLTWVCK	(aka EMP-20) (SEQ ID NO:16);
YCHFGPLTWVC	(aka EMP-23) (SEQ ID NO:17);
SCHFGPLTWVCK	(aka EMP-24) (SEQ ID NO:18);
GGTASCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-6) (SEQ ID NO:19);
GGTYSCHFAPLWVCKPQGG	(aka EMP-9) (SEQ ID NO:20);
GGTYSCHFGLTWVCKPQGG	(aka EMP-27) (SEQ ID NO:21);
TYSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-17) (SEQ ID NO:22);
TYSCHFGPLTWVCKPQ	(aka EMP-18) (SEQ ID NO:23);
YSCHFGPLTWVCKP	(aka EMP-19) (SEQ ID NO:24);
YSCHFGPLTWVC	(aka EMP-21) (SEQ ID NO:25);
YSCHFGALTWVCK	(aka EMP-22) (SEQ ID NO:26);
GGCRIGPITWVCGG	(aka EMP-25) (SEQ ID NO:27);
HFGPLTWV	(aka EMP-26) (SEQ ID NO:28);

GGTTSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-7) (SEQ ID NO:29);
GGTFSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-8) (SEQ ID NO:30);
GGTYSCHFGALTWVCKPQGG	(aka EMP-10) (SEQ ID NO:31);
GGTYSCHFGPATWVCKPQGG	(aka EMP-11) (SEQ ID NO:32);
GGTYSCHFGPLAWVCKPQGG	(aka EMP-12) (SEQ ID NO:33);
GGTYSCHFGPLTAVCKPQGG	(aka EMP-13) (SEQ ID NO:34);
GGTYSCHFGPLTFVCKPQGG	(aka EMP-14) (SEQ ID NO:35);
GGTYSCHFGPLTWVCKAQQG	(aka EMP-15) (SEQ ID NO:36);
GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-28, X = D-Tyr) (SEQ ID NO:37);
GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-29, X = <i>p</i> -NO ₂ -Phe) (SEQ ID NO:38);
GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-30, X = <i>p</i> -NH ₂ -Phe) (SEQ ID NO:39);
GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-31, X = <i>p</i> -F-Phe) (SEQ ID NO:40);
GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-32, X = <i>p</i> -I-Phe) (SEQ ID NO:41);
GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-33, X = 3,5- 二溴 -Tyr) (SEQ ID NO:42);
Ac-GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-34) (SEQ ID NO:43);
GGLYACHMGPMTWVCQPLGG	(aka EMP-35) (SEQ ID NO:44);
LGRKYSCHFGPLTWVCQPAKKD	(aka EMP-37) (SEQ ID NO:45); 和
GGTYSEHFGPLTWVKKPQGG	(aka EMP-39) (SEQ ID NO:46).

优选所述二聚体的单体肽单位包括:

GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-1) (SEQ ID NO:8);
GGTASCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-6) (SEQ ID NO:19);
GGTYSCHFAPLTWVCKPQGG	(aka EMP-9) (SEQ ID NO:20); 和
YCHFGPLTWVC	(aka EMP-23) (SEQ ID NO:17).

5 依照本发明, 所述二聚体的单体单位可以相同或不同。

在一个优选的实施方案中, 聚乙二醇(PEG)可以被用作接头通过共价键形成本发明所述的二聚体肽。

在另一个实施方案中，本发明涉及包含至少一种本发明所述肽和一种药用载体、用于治疗或预防神经毒性的方法中的药用组合物。

在再一个实施方案中，本发明提供了一个通过给予至少一种本发明所述肽来治疗性治疗患有由神经毒性事件、神经变性事件或神经损伤事件所引起的疾病或病症的哺乳动物的方法。

在又一个实施方案中，提供了一个通过使用至少一种本发明所述肽来治疗性治疗具有可以由 EPO 调节的神经毒性病症、神经损伤性病症或神经变性病性的哺乳动物的方法。

10

附图简述

图 1 画面 A 和画面 B 显示 EPO 受体在大鼠海马培养物和皮质培养物中表达。

图 2 显示 EPO 受体在神经元细胞系：PC12 和 SK-N-MC 细胞中表达。

15

图 3 显示 EPO 在 PC12 细胞中诱导基因表达。(顶部)从用 1nm EPO 处理 24 小时的 PC-12 细胞中分离的总 RNA 进行 RT-PCR，来定量特定 BCL 家族成员基因表达的变化。用 EPO 预处理导致抗细胞凋亡基因 BCL_{XL} 的表达增长 6 倍，并导致促细胞细胞凋亡基因 Bak 的表达降低超过 5 倍。这些结果与暗示 EPO 保护性作用的可能机制的基因芯片结果一致。(底部)显示了描述 Bcl_{XL} 和 Bak 的调节的 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶。m - 标记物、1 - RT-PCR 阴性对照、2 道 - 未处理、3 道 - 50 ng/ml NGF、4 道 - 1 nm EPO。

20

图 4 显示 rhEPO 保护大鼠脑皮质神经元免受谷氨酸毒性。

图 5 显示 rhEPO 保护大鼠 PC12 细胞免受谷氨酸诱发的细胞死亡。PC-12 细胞的 7 天培养物在暴露于毒性浓度的谷氨酸(200 μ m)之前用红细胞生成素处理 24 小时。让培养物恢复 24 小时，然后利用台盼蓝排除测定法确定细胞存活。1 至 10 pm 红细胞生成素处理 24 小时，然后暴露于谷氨酸 15 分钟，明显增加细胞存活(p<0.001, Student 氏 t-检验)。

25

在更高剂量下所述 EPO 的保护活性降低。

图 6 显示 rhEPO 保护大鼠 PC12 细胞免受 NGF 停药诱发的细胞死亡。PC12 细胞培养物在 NGF 存在下生长 7 天，然后在转移到不存在 NGF 的培养基中之前用 EPO 处理 24 小时。细胞存活通过在去除 NGF 后立即计数活细胞数并将其与生长因子停药后 12hr、24hr、48hr 和 72hr 的活细胞数进行比较来确定。细胞存活能力以形态学特征为基础，包括相差亮度、存在轴突和没有膜泡形成来确定。EPO 处理增加了在生长因子停药后的每个时间点的活细胞数，最适浓度为 10 pm。

图 7 显示 rhEPO 在大鼠脑培养物中促进神经突突起(outgrowth)。

图 8 显示 rhEPO 在大鼠海马培养物中促进神经突突起。

图 9 显示 EMP-1 在大鼠脑皮质培养物中促进神经突突起。

图 10 显示 EMP-1 在大鼠海马培养物中促进神经突突起。

图 11 显示 EMP-6 在大鼠脑皮质培养物中促进神经突突起。

图 12 显示 EMP-6 在大鼠海马培养物中促进神经突突起。

图 13 显示 EMP-9 在大鼠脑皮质培养物中促进神经突突起。

图 14 显示 EMP-9 在大鼠海马培养物中促进神经突突起。

图 15 显示 EMP-23 在大鼠脑皮质培养物中促进神经突突起。

图 16 显示 EMP-23 在大鼠海马培养物中促进神经突突起。

图 17 显示 EMP-27 在大鼠脑皮质培养物中促进神经突突起。

图 18 显示 EMP-27 在大鼠海马培养物中促进神经突突起。

图 19 显示 EPO 防止局部缺血性损伤：研究 I 通过微型渗透泵连续静脉输注。

图 20 显示研究 I 的血浆测定。

图 21 显示 EPO 不防止局部缺血性损伤：研究 II 大剂量单一静脉滴注。

图 22 显示研究 II 的血浆测定。

图 23 显示 EPO 防止局部缺血性损伤：研究 III 重复大剂量静脉滴注。

图 24 显示研究 III 的血浆测定。

发明详述

用在这里的“红细胞生成素”(EPO)包括具有人红细胞生成素所有生物活性(例如,造血活性和神经活性)或只具有红细胞生成素某些特定生物活性(例如,只有造血活性或只有神经活性)的那些肽、肽二聚体、多肽和蛋白,以及红细胞生成素类似物、红细胞生成素同种型、红细胞生成素模拟物、红细胞生成素片段、杂合红细胞生成素蛋白、融合蛋白、上面所述的寡聚体和多聚体、上面所述的同源物、上面所述的糖基化形式变体和上面所述的突变蛋白,而不论生物活性是否相同,也不论用何种合成或制造的方法,所述方法包括但不限于是从 cDNA 还是从基因组 DNA 重组产生、合成、转基因和基因活化方法。红细胞生成素的具体例子包括: Epoetin α (EPREX[®]、ERYPO[®]、PROSCRIT[®]); NEORECORMON; 新型红细胞生成刺激蛋白(NESP 或 ARANESP, 描述于欧洲专利申请 EP640619 中的重组人红细胞生成素(Epoetin)的高糖基化类似物); 人红细胞生成素 - 例如那些描述于国际专利申请 WO 99/66054 中的人血清白蛋白融合蛋白; 例如那些描述于国际专利申请 WO 99/38890 中的人红细胞生成素突变体; ω 红细胞生成素,它可以由美国专利号 5,688,679 中所描述的人红细胞生成素基因的 Apa I 限制性片段产生; 例如那些描述于国际专利申请 WO 99/11781 中的改变的糖基化人红细胞生成素; 例如那些描述于 WO 98/05363 或美国专利号 5,643,575 中的 PEG 缀合红细胞生成素类似物。经修饰用于表达内源人红细胞生成素的细胞系的具体例子描述于国际专利申请 WO 99/05268 和 WO 94/12650 中。EPO 的通常优选形式是纯化后的重组人 EPO (rhEPO), 目前以 EPREX[®]、ERYPO[®]或 PROSCRIT[®]商标配制和分发。

用于此处的缩写“EMP”是指 EPO 的肽模拟物,特别是描述于美国专利号 5,767,078 和 5,773,569 中的某些肽。

下列是用于详述各种肽的氨基酸缩写列表。单个氨基酸残基是根据本领域技术人员所熟知和使用的单字母代码和三字母代码来标识的。

<u>氨基酸</u>	<u>缩写</u>	
	3 字母	1 字母
丙氨酸	ala	A
缬氨酸	val	V
亮氨酸	leu	L
异亮氨酸	ile	I
脯氨酸	pro	P
苯丙氨酸	phe	F
色氨酸	trp	W
甲硫氨酸	met	M
甘氨酸	gly	G
丝氨酸	ser	S
苏氨酸	thr	T
半胱氨酸	cys	C
酪氨酸	tyr	Y
天冬酰胺	asn	N
谷氨酰胺	gln	Q
天冬氨酸	asp	D
谷氨酸	glu	E
赖氨酸	lys	K
精氨酸	arg	R
组氨酸	his	H

5

在第一个实施方案中，本发明涉及利用包含作为细胞表面受体激

动剂的治疗活性肽以及显现出生长因子类受体的结合和信号启动作用的这类肽的二聚体和多聚体的药用组合物处理神经元细胞的方法。在一个实施方案中，本发明提供了作为 EPO 激动剂的肽。详细地讲，这些肽可以是具有两个长 8 至 40 个或者更多氨基酸，优选长 14 至约 20 个残基的‘单体’肽单位的二聚体或多聚体，所述单体肽单位包含一个 X₃X₄X₅GPX₆TWX₇X₈ (SEQ ID NO: 1)核心氨基酸序列，其中每一个氨基酸通过标准单字母缩写来表示；X₃ 可以是 C、E、A、α-氨基-γ-溴丁酸或 Hoc，其中 Hoc 是高半胱氨酸；X₄ 可以是 R、H、Y、L 或 W，或者 X₄ 不存在；X₅ 可以是 M、F 或 I；X₆ 独立地是 20 种遗传编码的 L-氨基酸或立体异构 D-氨基酸中的任何一种；X₇ 可以是 D、E、I、L 或 V；和 X₈ 可以是 C、K、A、α-氨基-γ-溴丁酸或 Hoc，其中 Hoc 是高半胱氨酸，条件是 X₃ 或 X₈ 是 C 或 Hoc。优选所述二聚体或多聚体的单体肽单位包含一个 YX₂X₃X₄X₅GPX₆TWX₇X₈ (SEQ ID NO: 2)核心序列，其中每一个氨基酸通过标准单字母缩写来表示；X₁、X₂、X₆、X₉、X₁₀ 和 X₁₁ 中的每一个独立选自 20 种遗传编码的 L-氨基酸；X₃ 可以是 C、E、A、α-氨基-γ-溴丁酸或 Hoc，其中 Hoc 是高半胱氨酸；X₄ 可以是 R、H、Y、L 或 W，或者 X₄ 不存在；X₅ 可以是 M、F 或 I；X₇ 可以是 D、E、I、L 或 V；和 X₈ 可以是 C、K、A、α-氨基-γ-溴丁酸或 Hoc，其中 Hoc 是高半胱氨酸。更优选 X₃ 或 X₈ 是 C 或 Hoc。

优选所述二聚体或多聚体的单体肽单位包含一个 YX₂X₃X₄X₅GPX₆TWX₇X₈ (SEQ ID NO: 2)氨基酸核心序列，其中 X₂ 和 X₆ 中的每一个独立地是 20 种遗传编码的 L-氨基酸中的任何一种；X₃ 是 C；和 X₈ 是 C。

优选所述二聚体的单体肽单位包含一个 X₁YX₂X₃X₄X₅GPX₆TWX₇X₈X₉X₁₀X₁₁ (SEQ ID NO: 3)氨基酸核心序列，其中 X₁、X₂、X₆、X₉、X₁₀ 和 X₁₁ 中的每一个独立选自 20 种遗传编码的 L-氨基酸。详细地讲，X₃ 可以是 C、E、A；X₄ 可以是 R、H 或 Y，或者 X₄ 不存在；X₅ 可以是 M、F 或 I；X₇ 可以是 D 或 V；和

X₈可以是C、K或A。

在一个更优选的实施方案中，X₃和X₈都是C，因此所述二聚体的单体肽单位包含一个X₁YX₂CX₄X₅GPX₆TWX₇CX₉X₁₀X₁₁ (SEQ ID NO: 4)氨基酸核心序列。详细地讲，所述单体肽单位包含一个
5 X₁YX₂CX₄X₅GPX₆TWX₇CX₉X₁₀X₁₁ (SEQ ID NO: 5)氨基酸核心序列，其中X₄可以是R或H；X₅可以是F或M；X₆可以是I、L、T、M或V；X₇是D或V；X₉可以是G、K、L、Q、R、S或T；和X₁₀可以是A、G、P、R或Y。更详细地讲，所述二聚体的单体肽单位会包含一个X₁YX₂CX₄X₅GPX₆TWX₇CX₉X₁₀X₁₁ (SEQ ID NO: 6)氨基酸核心序
10 列，其中X₁可以是D、E、L、N、S、T或V；X₂可以是A、H、K、L、M、S或T；X₄是R或H；X₉可以是K、R、S或T；和X₁₀是P。

优选所述二聚体的单体肽单位会包含一个X₁YX₂CX₄X₅GPX₆TWX₇CX₉X₁₀X₁₁ (SEQ ID NO: 6)氨基酸核心序列，其中X₁可以是D、E、L、N、S、T或V；X₂可以是A、H、K、L、
15 M、S或T；X₄是R或H；X₉可以是K、R、S或T；和X₁₀是P。

所述二聚体的特别优选的单体肽单位包括:

GGLYLCRFGPVTWDCGYKGG	(SEQ ID NO:7);
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-1) (SEQ ID NO:8);
GGDYHCRMGPLTWVCKPLGG	(SEQ ID NO:9);
VGNYMCHFGPITWVCRPGGG	(SEQ ID NO:10);
GGVYACRMGPITWVCSPLGG	(SEQ ID NO:11);
VGNYMAHMGPIWVCRPGG	(SEQ ID NO:12);
GGTYSCHFGPLTWVCKPQ	(aka EMP-16) (SEQ ID NO:13);
GGLYACHMGPMTWVCQPLRG	(aka EMP-36) (SEQ ID NO:14);
TIAQYICYMGPETWECPSPKA	(aka EMP-38) (SEQ ID NO:15);
YSCHFGPLTWVCK	(aka EMP-20) (SEQ ID NO:16);
YCHFGPLTWVC	(aka EMP-23) (SEQ ID NO:17);
SCHFGPLTWVCK	(aka EMP-24) (SEQ ID NO:18);
GGTASCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-6) (SEQ ID NO:19);
GGTYSCHFAPLTWVCKPQGG	(aka EMP-9) (SEQ ID NO:20);
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-27) (SEQ ID NO:21);
TYSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-17) (SEQ ID NO:22);
TYSCHFGPLTWVCKPQ	(aka EMP-18) (SEQ ID NO:23);
YSCHFGPLTWVCKP	(aka EMP-19) (SEQ ID NO:24);
YSCHFGPLTWVC	(aka EMP-21) (SEQ ID NO:25);
YSCHFGALTWVCK	(aka EMP-22) (SEQ ID NO:26);
GGCRIGPITWVCGG	(aka EMP-25) (SEQ ID NO:27);
HFGPLTWV	(aka EMP-26) (SEQ ID NO:28);
GGTTSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-7) (SEQ ID NO:29);
GGTFSCHFGPLTWVCKPQGG	(aka EMP-8) (SEQ ID NO:30);
GGTYSCHFGALTWVCKPQGG	(aka EMP-10) (SEQ ID NO:31);
GGTYSCHFGPATWVCKPQGG	(aka EMP-11) (SEQ ID NO:32);
GGTYSCHFGPLAWVCKPQGG	(aka EMP-12) (SEQ ID NO:33);
GGTYSCHFGPLTAVCKPQGG	(aka EMP-13) (SEQ ID NO:34);
GGTYSCHFGPLTFVCKPQGG	(aka EMP-14) (SEQ ID NO:35);
GGTYSCHFGPLTWVCKAQGG	(aka EMP-15) (SEQ ID NO:36);

GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG (aka EMP-28, X = D-Tyr) (SEQ ID NO:37);
 GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG (aka EMP-29, X = *p*-NO₂-Phe)
 (SEQ ID NO:38);
 GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG (aka EMP-30, X = *p*-NH₂-Phe)
 (SEQ ID NO:39);
 GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG (aka EMP-31, X = *p*-F-Phe) (SEQ ID NO:40);
 GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG (aka EMP-32, X = *p*-I-Phe) (SEQ ID NO:41);
 GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG (aka EMP-33, X = 3,5- 二溴 -Tyr)
 (SEQ ID NO:42);
 Ac-GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG (aka EMP-34) (SEQ ID NO:43);
 GGLYACHMGPMTWVCQPLGG (aka EMP-35) (SEQ ID NO:44);
 LGRKYSCHFGPLTWVCQPAKKD (aka EMP-37) (SEQ ID NO:45); 和
 GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG (aka EMP-39) (SEQ ID NO:46).

最优选所述二聚体的单体肽单位包括:

GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG (aka EMP-1) (SEQ ID NO:8);
 GGTASCHFGPLTWVCKPQGG (aka EMP-6) (SEQ ID NO:19);
 GGTYSCHFAPLTWVCKPQGG (aka EMP-9) (SEQ ID NO:20); 和
 YCHFGPLTWVC (aka EMP-23) (SEQ ID NO:17).

5 正如对于本领域技术人员显而易见的, EPO 可通过适合于被治疗的特定患者的任何合适方法给药。用于此的短语“治疗有效的”在患者与患者之间是不同的, 并取决于拟给予的 EPO 分子所具有的生物活性的特定范围。通常, 对于具有造血活性的 EPO 而言, 治疗有效量将从约 1 至 500 I.U./kg 体重, 更优选地从 50 至 300 I.U./kg 体重, 尤其是
 10 当通过皮下给予红细胞生成素时。对于不具有造血活性的 EPO 分子而言, 治疗有效量可以多于或少于具有造血活性的 EPO 分子的剂量。优选的给药方法是静脉给药(iv)和皮下给药(sc), 通常优选皮下给药。造血活性 EPO 是在每剂约 50-1000 U/kg 的范围内每周 1 至 5 次给药。在另外一个实施方案中, 所述 EPO 组合物直接给予神经系统。这个给药

途径包括但不限于大脑内给药途径、室内给药途径、脑室内给药途径、鞘内给药途径、池内给药途径、脊髓内给药途径和/或脊髓周给药途径，它们可以使用颅内针和脊椎内针，和带有或不带有泵装置的导管。输注剂量的范围可以为例如在几分钟至几天的时间范围内从约 1.0 至 50,000 U/kg/min 的 EPO 组合物。如果男性或者女性患者显现出血色素水平超过约 15 g/dL，则造血活性 EPO 给药要延迟或停药。

本发明在其中一个实施方案中提供了一个治疗急性和慢性神经变性疾病的方法，所述方法包括给予 EPO 或其模拟物。急性神经变性疾病包括但不限于与神经细胞死亡或包括脑血管不足、病灶性或弥散性脑外伤、弥散性脑损伤和脊髓损伤在内的损害有关的各种类型的急性神经变性疾病。急性神经变性疾病的例子是：脑缺血或包括栓塞性和血栓性闭塞、急性缺血后再灌注、围产期低氧-缺氧损伤后、心搏停止、以及各种类型的颅内出血(例如硬膜外出血、硬膜下出血、蛛网膜下出血和大脑内出血)、和颅内损害及脊柱内损害(例如挫伤、穿透、剪伤、压迫和撕裂)、和急性颈部扭伤颤动婴儿头部振摇综合征。可以用本发明的一种或多种方法治疗的慢性神经变性疾病包括但不限于早老性痴呆、Pick 病、弥漫性雷维小体病、进行性核上麻痹(Steel-Richardson 综合征)、多系统变性(夏-德综合征)、与神经变性有关的慢性癫痫性病症、运动神经元疾病包括肌萎缩侧索硬化、变性共济失调、皮质基底变性、关岛 ALS-帕金森病-痴呆综合征、亚急性硬化性全脑炎、亨廷顿舞蹈病、帕金森病、synucleinopathies (包括多系统萎缩症)、原发性进行性失语症、纹状体黑质变性、Machado-Joseph 氏病/ 3 型脊髓小脑性共济失调和橄榄体桥脑小脑变性、Gilles De La Tourette 氏病、延髓性麻痹和假延髓病型麻痹、脊髓性肌萎缩和脊髓延髓性肌萎缩症(Kennedy 氏病)、原发性侧索硬化症、家族性痉挛性截瘫、Werdnig-Hoffmann 病、Kugelberg-Welander 病、Tay-Sach 氏病、Sandhoff 病、家族性痉挛性疾病、Wohlfart-Kugelberg-Welander 病、痉挛性轻截瘫、进行性多病灶性脑白质病、家族性自主神经机能异常

(Riley-Day 综合征)和朊病毒病(包括但不限于 Creutzfeldt-Jakob 病、Gerstmann-Sträussler-Scheinker 病、库鲁病和致命性家族性失眠症)。

5 由于由 rhEPO 引起的神经保护和神经突突起的结合, 可以用本发明的一种或多种方法治疗其他临床病症, 包括治疗和/或预防与外周疾病有关的神经学表现(包括但不限于认知的)和精神病学表现(包括但不限于精神病理学、抑郁症或焦虑), 包括但不限于 EPO 缺乏(即肾病)、任何类型的失血(包括但不限于血液渗析、腹膜透析、诊断性采样、隐性胃肠道出血)、肾衰竭和晚期肾病、肾移植和其他与贫血、神经学表现和神经精神病学表现有关的病症, 包括但不限于血液性恶性肿瘤/癌
10 和非血液性恶性肿瘤/癌、接受化疗(包括但不限于顺铂)和其他药物(包括但不限于齐多夫定)治疗患者的症状或并发症、其他血液性疾病(包括但不限于镰状红细胞贫血症和地中海贫血)、炎症性疾病和传染性疾病(包括但不限于人免疫缺陷病毒性感染)、慢性系统性自身免疫病(包括但不限于系统性红斑狼疮)、Henoch Schonlein 紫癜和溶血性尿毒症
15 综合征。同样包括在本发明中的是治疗和/或预防由于神经系统的化学性损伤、毒性损伤、感染性损伤和放射性损伤以及由于早熟引起的神经学表现和神经精神病学表现, 以及治疗和/或预防包括但不限于由于那些缺氧性局部缺血、肝病、糖血症、尿毒症、电解质和内分泌引起的脑病的神经学后遗症和神经精神病学后遗症。

20 同样, 由于由 rhEPO 引起的神经保护和神经突突起的结合, 这种分子同样也可以应用于治疗和/或预防丛病(包括神经丛麻痹)、多病灶性神经病、感觉神经病、运动神经病、感觉-运动神经病、传染性神经病、自主神经病、感觉-自主神经病、脱髓鞘性神经病(包括但不限于 Guillain-Barre 综合征和慢性炎症性脱髓鞘多神经根性神经瘤)、其他炎症性神经病和免疫性神经病、由药物引起的神经病、药物治疗引起的
25 神经病、毒素引起的神经病、创伤性神经病(包括但不限于受压性神经病、压碎性(crush)神经病、撕裂性(laceration)神经病和节段性神经病)、代谢性神经病、内分泌性神经病和副肿瘤性神经病和其他神经病, 例

如进行性神经性肌萎缩(la型、lb型、2型、4a型、1-X连锁型(linked))、Friedreich 共济失调、异染性脑白质营养不良、Refsum 病、肾上腺脊髓神经病(adrenomyeloneuropathy)、Déjerine-Sottas 神经病(A型和B型)、Lambert-Eaton 综合征和脑神经疾病。

5 下列实施例例证了本发明，然而并不限制本发明。

实施例 1

rhEPO 在原代大鼠神经元培养物和神经元细胞系中的表达

原代神经元细胞培养

10 如先前所描述(Mattson 等, 1994), 分离的海马细胞培养物和皮质细胞培养物从胎儿期 18 天的大鼠胎鼠开始建立。简要地讲, 胎鼠依照 the AVMA Panel on Euthanasia 通过剖腹产术从氟烷麻醉的怀孕母体 (Sprague-Dawley) 中取出。将幼鼠断头, 取脑, 放入 HEPES 缓冲的 Hank 氏平衡盐溶液(HBSS; Gibco)中。解剖出海马和皮质, 并根据组织类型合并。组织用胰蛋白酶消化 15 分钟(1mg/ml 胰蛋白酶-HBSS; Worthington), 用新鲜 HBSS 漂洗, 然后在胰蛋白酶抑制剂(1mg/ml; Sigma)中孵育 5 分钟, 再用新鲜 HBSS 漂洗, 然后用火琢玻璃移液管将组织捣碎于 1ml 新鲜 HBSS 中。分离的细胞以 30,000 细胞/孔接种到聚 D-赖氨酸包被的 96 孔板(Collaborative BioScience)上。每孔含有由 26mM NaHCO₃ (Sigma)、56mM 葡萄糖(Sigma)、15mM KCl (Sigma)、1mM 丙酮酸钠(Sigma)、1.1mM L-谷氨酰胺(Sigma)、10% (v/v)热灭活胎牛血清(Hyclone)和 0.001%硫酸庆大霉素(Sigma)补充的 100μl Eagle 氏最低必需培养基(MEM; Gibco) (pH 7.4)。在实验处理之前让细胞在潮湿的 37℃ 5% CO₂ 培养箱中贴壁 24 小时。每三天将所述培养基吸出并用新鲜培养基更换。

25

免疫细胞化学

平行的海马培养物和皮质培养物按照上面所述进行处理, 并按照

以前所述方法(Smith Swintosky 等, 1997)加工以进行免疫细胞化学(ICC)。简要地讲, 将细胞接种到 4 室聚 D-赖氨酸包被的玻璃载玻片(LabTek, Naperville, IL)上。在培养的第 7 天, 取出培养基, 用 Dulbecco 磷酸缓冲盐水(DPBS; Sigma)洗涤细胞一次, 然后在室温下用 10%磷酸缓冲福尔马林固定 15 分钟。固定后, 培养物用 DPBS 漂洗, 然后放入封闭血清(正常马血清; 1:50 稀释到 DPBS 中; Vector Labs, Burlingame, CA)中 10 分钟。培养物再次漂洗, 然后在 1:75 稀释到抗体稀释剂(Zymed, South San Francisco, CA)中的特异性针对 EPO 受体(EBP-7)的抗小鼠单克隆抗体中孵育 30 分钟。培养物用 DPBS 漂洗几次, 然后暴露于生物素酰化的第二抗体(Vector Labs)中 30 分钟。培养物最后漂洗一次, 然后在亲和素-生物素酰化的辣根过氧化物酶复合物(小鼠 IgG ABC 试剂盒, Vector Labs)中孵育 30 分钟。第一抗体的存在是利用 3'3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB, Biomed, Foster City, CA)-暴露两次, 每次 5 分钟来检测的。然后细胞用苏木精复染、脱水、澄明(clear)、盖盖玻片和 Olympus BX-2 光学显微镜下照像。

结果

在海马培养物和皮质培养物的神经元和神经胶质中都发现了 EPO 受体的稳健染色(图 1a 和图 1b)。EPO 受体的表达水平看来随培养时间而增高。

讨论

这些结果表明 EPO 在神经系统、详细地讲是在海马和大脑皮质的早期发育阶段起作用。

神经元细胞系的免疫组织化学

使用来源于大鼠肾上腺的嗜铬细胞瘤的神经元细胞系 PC-12 (Greene 和 Tischler, 1976)和从人脑的神经上皮瘤获得的神经元细胞系

SK-N-MC (Spengler 等, 1973); PC-12 细胞在神经生长因子(NGF)存在情况下可以被可逆地诱导出神经元表型。让 PC-12 细胞于聚 D-赖氨酸包被的组织培养皿上在 0.1 μ g/ml NGF 存在下包含 10%马血清和 5% FBS 的 DMEM 中生长 7 天, 诱导神经元表型。SK-N-MC 细胞在补充了 1.0 mM 丙酮酸钠、1.5 g/L 碳酸氢钠、2mM 谷氨酰胺和 10% FBS 的最低必需培养基中培养 4 天。PC-12 和 SK-N-MC 细胞于来自 Greiner 的 96 孔板上培养, 以有助于显微镜检查。在实验当天细胞固定于包含 10%蔗糖的 10%福尔马林中, 并在封闭缓冲液(40 mM Tris HCl、pH 8.0、27mM NaCl 和 0.2% Tween 20)中孵育。红细胞生成素受体是通过用兔多克隆抗-红细胞生成素受体抗体(来自 Santa Cruz 的 C-20)和 FITC 缀合的第二抗体孵育细胞来检测的。利用荧光显微镜(ATTO)目测检查标记细胞。

结果

如在图 2 (右面部分)中所见抗红细胞生成素受体的多克隆抗体既标记了 SK-N-MC 细胞, 也标记了 PC-12 细胞。所有在低倍放大下可见的 SK-N-MC 细胞看来都被所述抗体标记。大多数可检测到的 PC-12 细胞是被抗-红细胞生成素受体抗体标记的。在这个制备过程中保留有特征性神经元表型的少数完整 PC 12 细胞显示出整个轴突以及胞体都被染色。单独的第二抗体不标记这两种类型的细胞(图 2, 左面部分)。

因此, 这些结果例证了这些细胞 - 来自人神经上皮瘤的 SK-N-MC 细胞和来自大鼠嗜铬细胞瘤的 PC-12 细胞表达所述红细胞生成素受体。因此这些细胞系可以对红细胞生成素做出反应并可以为研究红细胞生成素对神经元的作用提供一个良好的系统。

实施例 2

在 PC 12 细胞中 EPO 诱导的基因表达

细胞培养

5 PC-12 细胞(来自大鼠嗜铬细胞瘤)培养于聚 D-赖氨酸包被的组织培养塑料制品上包含 10% FBS 和 5% 马血清的 DMEM 中。为了在 PC-12 细胞中诱导神经元表型, 去除血清并且用 NGF (50 ng/ml) 处理所述细胞。细胞在 NGF 存在下生长 7 天然后用于实验。

EPO 处理和 RNA 分离

10 PC-12 细胞如实施例 1 中所述在一个聚 D-赖氨酸包被的 10cm 组织培养皿中培养。细胞在 1U/ml EPO 存在下孵育 24 小时。然后利用 Qiagen RNeasy 小量制备试剂盒分离总 RNA, 再用于 RT-PCR。

定量 RT-PCR

15 利用来自 Roche Molecular Biochemicals 的轻便循环仪(light cycler)和 RNA 扩增试剂盒在一个反应中进行实时逆转录和 PCR。定量 RNA 然后将等量的 RNA 加入到包括 dsDNA 特异性染料 SYBR green I 的反应混合物中。通过检测在每个 PCR 循环的反应中的荧光量来定量特异性 PCR 反应产物。最后的分析利用包括所述轻便循环装置所带有的数据分析软件来进行。

20

概述

如图 3 中所见, 用 EPO (1U/ml) 预处理 PC-12 细胞 24 小时造成 bcl-2 家族成员 *bcl_{XL}* 和 *bak* 基因表达的显著变化。用 EPO 处理细胞显示出抗-细胞凋亡基因 *bcl_{XL}* 的表达增长 6 倍和促-细胞凋亡基因 *bak* 的表达降低 5 倍。以前 EPO 已经显示出通过增加 *bcl_{XL}* 表达来增加红细胞祖细胞的存活(Silva 等, 1996)。这些结果显示, EPO 利用相似的机制保护神经元使其不经历对损伤应答的细胞凋亡。*bak* 的调节表明, EPO

25

可以影响另外基因的表达以诱发该效应。

实施例 3

rhEPO 对大鼠海马细胞、皮质细胞和 PC 12 细胞的神经保护作用 and 神经突起作用

原代神经元细胞培养

如先前所描述(Mattson 等, 1994), 分离的海马细胞培养物和皮质细胞培养物从胎儿期 18 天的大鼠胎鼠开始建立。简要地讲, 胎鼠依照 the AVMA Panel on Euthanasia 通过剖腹产术从氟烷麻醉的怀孕母体 (Sprague-Dawley) 中取出。将幼鼠断头, 取脑, 放入 HEPES 缓冲的 Hank 氏平衡盐溶液(HBSS; Gibco)中。解剖出海马和皮质, 并根据组织类型合并。组织用胰蛋白酶消化 15 分钟(1mg/ml 胰蛋白酶-HBSS; Worthington), 用新鲜 HBSS 漂洗, 然后在胰蛋白酶抑制剂(1mg/ml; Sigma)中孵育 5 分钟, 再用新鲜 HBSS 漂洗, 然后用火琢玻璃移液管将组织捣碎于 1ml 新鲜 HBSS 中。分离的细胞以 30,000 细胞/孔接种到聚 D-赖氨酸包被的 96 孔板(Collaborative BioScience)上。每孔含有由 26mM NaHCO₃ (Sigma)、56mM 葡萄糖(Sigma)、15mM KCl (Sigma)、1mM 丙酮酸钠(Sigma)、1.1mM L-谷氨酰胺(Sigma)、10% (v/v)热灭活胎牛血清(Hyclone)和 0.001%硫酸庆大霉素(Sigma)补充的 100μl Eagle 氏最低必需培养基(MEM; Gibco) (pH 7.4)。在实验处理之前让细胞在潮湿的 37°C 5% CO₂ 培养箱中贴壁 24 小时。每三天将所述培养基吸出并用新鲜培养基更换。

谷氨酸毒性测定

皮质细胞以 200,000 个细胞/培养皿接种到聚合氮丙啶包被的 35mm 培养皿上。每个培养皿包含 1.5ml 如上所述补充过的 MEM。在培养的第 7 天, 用 Nikon Diaphot 倒置显微镜(10 倍放大)观察每个预先标记培养皿的四个视野并在实验处理前照相。紧接着, 用溶媒或重组

人红细胞生成素(rhEPO; 批号 41C514; 0.2M 柠檬酸盐中的 50 μ M 储液, 0.585g/L NaCl 以适当浓度稀释到磷酸缓冲盐溶液中(DPBS; Sigma) + 0.1%牛血清白蛋白(BSA; Sigma))处理所述培养物。24 小时后所述培养物用 100 μ M 谷氨酸(Sigma)处理。谷氨酸处理 24 小时后, 每个平皿的四个视野再次照相。通过计数每个视野中实验处理前和实验处理后的活细胞来测量细胞存活率。如果神经元具有在直径上一致并且外表光滑的神经突以及形状圆滑并且为圆形至卵圆形的胞体, 神经元就被认为是活的。数据以对照的百分比表达(溶媒, 平均值 $\pm$ SD)。

10 PC12 细胞培养

PC-12 细胞(来自大鼠嗜铬细胞瘤)培养于聚 D-赖氨酸包被的组织培养塑料制品上包含 10% FBS 和 5% 马血清的 DMEM 中。为了在 PC-12 细胞中诱导神经元表型, 去除血清并且用 NGF(50 ng/ml)处理所述细胞。细胞在 NGF 存在下生长 7 天然后用于实验。

15

谷氨酸毒性

按上面所述培养 PC-12 细胞。损害前 24 小时, 细胞用浓度范围在 1 pm 至 1 nm 的 rhEPO 处理。在实验当天, 细胞暴露于 200 μ M 谷氨酸 30 分钟。然后细胞用新鲜培养基清洗两次以清除谷氨酸, 再培养于包含 NGF 但不含 EPO 的新鲜培养基中。24 小时后, 利用台盼蓝排除测定法测定细胞的存活力。简要地讲, 去除培养基然后在 0.4% 台盼蓝中孵育所述细胞 5 分钟。然后用 PBS 轻轻地清洗细胞, 再用 10% 福尔马林固定。细胞存活力通过计数总细胞数与台盼蓝阳性细胞(死细胞)数之比来确定。

20

NGF 停药

如上所述, PC-12 细胞培养于 96 孔聚 D-赖氨酸包被的多孔板上, 并在 NGF 停药前用 rhEPO (1 pm 至 10 nm)处理 24 小时。在实验当天,

所述细胞用缓冲液清洗 3 次以清除 NGF，然后培养于不含 NGF 的新鲜培养基中。立即计数 NGF 洗出细胞 ($t=0$) 以确定活细胞数量。细胞存活力基于形态学特征，包括相差亮度、存在轴突和没有泡形成。在 12 小时、24 小时、48 小时和 72 小时计数细胞并纪录活细胞数量。

5

神经突突起测定

平板接种后 24 小时，培养物用溶媒(PBS+0.1% BSA)、100ng 不同的生长因子(脑源性神经营养因子(BDNF; Promega)、神经胶质细胞源性神经营养因子(GDNF; Promega)、神经生长因子(NGF; Boehringer Mannheim)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF; Boehringer Mannheim)、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1; Boehringer Mannheim)、神经营养蛋白-3 (NT3; Calbiochem)、神经营养蛋白-4 (NT4; Calbiochem)、睫状神经营养因子(CNTF; Calbiochem)、表皮生长因子(EGF; Calbiochem)、血管内皮生长因子(VEGF; Calbiochem))或 rhEPO (与上面一样制备的; 10fM-10nM))处理。每种处理条件进行 4 次或 8 次重复。在培养的第三天时，吸出所述培养基，用新鲜培养基代替并检测化合物。在培养一周时，所述细胞用 10%磷酸缓冲的福尔马林固定 15 分钟，然后用 DPBS (Sigma)漂洗，再放入封闭血清(马血清; 1:50 稀释在 DPBS 中; Vector Labs)中 30 分钟。再用 DPBS 漂洗培养物，然后在第一抗体中孵育 2 小时(微管相关蛋白-2 (MAP-2)作为树突的选择性标记; 抗小鼠单克隆 (Chemicon); MAP-2 以 1:1000 稀释在抗体稀释剂(Zymed))中。阴性对照孔只在抗体稀释剂中孵育。本底信号通过用抗体孵育或不用抗体孵育的空白对照孔(无细胞)来确定。培养物再用 DPBS 漂洗，然后放入荧光素中 1 小时(FITC; 抗小鼠 IgG; 大鼠吸附的; 1: 50 稀释在 DPBS 中; Vector Labs)。培养物用 DPBS 漂洗最后一次，然后将所述平板在 Cytofluor 4000 荧光平板读出仪读数。神经突突起以与对照相比变化的百分数来表示(溶媒; 平均荧光 $\pm$ SD)。

25

结果

用原代神经元培养物进行的神经保护研究：在给予谷氨酸前用 rhEPO 预处理培养物 24 小时，导致了神经元存活率显著增加(图 4)。细胞存活率比平行的只用谷氨酸处理的培养物最大增加大约 200%。
5 rhEPO 的所述神经保护作用是浓度依赖性的，在细胞存活率高于或等于溶媒(无谷氨酸)处理培养物的 pM 浓度处发现了最大作用。

用 PC 12 细胞进行的神经保护研究：在 PC-12 细胞中用 EPO 预处理导致了由谷氨酸毒性和生长因子停药诱发的细胞死亡显著降低(图 5
10 和图 6)。在两个实验中所述神经保护作用的峰值浓度是 10pm。EPO 的所述神经保护作用的剂量反应曲线是双相的，EPO 保护细胞抵抗细胞毒性的能力在大于 10pm 浓度下降低，而在 1nm 浓度下没有明显的作用。这些结果表明，EPO 可以预防暴露于各种细胞毒性损害的神经元的细胞凋亡反应。

15

用原代神经元培养物进行的神经突突起研究：培养物用 rhEPO 处理，导致用 MAP2-FITC 免疫荧光法测量的神经突突起显著增加。所述神经突突起促进作用是浓度依赖性的，在 pM 水平发现最大活性(图 7
和图 8)。所述结果显示，rhEPO 处理在海马培养物中(高于对照 12-44%)
20 比在皮质培养物中(高于对照 15-29%)诱导出更大的突起反应。rhEPO 和已知生长因子之间的比较显示出它们在神经突突起促进能力上展现了区域性差异。rhEPO 在皮质培养物中增加神经突突起的能力要大于或等于那些已知生长因子的能力。由于只有少数因子对皮质细胞具有这样的作用，因此这个发现是引人注目和重要的。另一方面，许多生
25 长因子在海马中发挥强大的突起反应(高于对照 38-86%)。与这些生长因子相比，rhEPO 显示出中等但稳固的突起促进活性，然而，它的活性要高于几种生长因子包括 BDNF、NGF 和 VEGF。

讨论

所述神经保护研究证实了先前的证据,即在体外 rhEPO 在 pM 浓度下有抵抗谷氨酸毒性和血清停药的保护作用。

5 令人惊奇的是,我们发现了 rhEPO 在原代哺乳动物神经元细胞中促进神经突突起。所述作用对于海马细胞和皮质细胞是稳固的。所述作用是有用的,在亚-皮摩尔浓度下检查到功效,远比任何先前与 EPO 有关的观测结果有效。此外,在只对少数生长因子反应的大脑皮质神经元中, rhEPO 在诱导神经突突起上优于大多数已知生长因子。

10 从治疗前景来看, rhEPO 在大脑皮质神经元中促进神经保护和神经突突起是非常重要的。在神经变性过程中,神经细胞可以处于不同的发展阶段。一些可能处于应激状态,另外一些经历显著的神经突回缩和丧失突触输入,最后所有受影响的细胞将死亡。可以在多水平上干预这个进程的治疗剂可以对神经细胞的复原以及最终神经功能的恢复具有很大的益处。本数据支持 rhEPO 通过保护所述细胞、通过增加
15 它们的存活率、通过促进突触接触和突触联系的重建和通过稳定神经元回路和神经回路来完成这个任务。

同样应该特别指出,考虑到极少数生长因子在大脑皮质神经元中是有用的,以及极少数生长因子在皮质神经元中显示出作为神经突突起的神经保护剂和促进剂的双重活性,所述数据尤其重要。尤其相关
20 的是, rhEPO 的这种双重活性在亚-皮摩尔/皮摩尔浓度下被检查到。

实施例 4

EPO 模拟肽刺激神经突突起

细胞培养

25 如先前所描述(Mattson 等, 1994),分离的海马细胞培养物和皮质细胞培养物从胎儿期 18 天的大鼠胎鼠开始建立。简要地讲,胎鼠依照 the AVMA Panel on Euthanasia 通过剖腹产术从氟烷麻醉的怀孕母体 (Sprague-Dawley)中取出。将幼鼠断头,取脑,放入 HEPES 缓冲的 Hank

氏平衡盐溶液(HBSS; Gibco)中。解剖出海马和皮质, 并根据组织类型合并。组织用胰蛋白酶消化 15 分钟(1mg/ml 胰蛋白酶-HBSS; Worthington), 用新鲜 HBSS 漂洗, 然后在胰蛋白酶抑制剂(1mg/ml; Sigma)中孵育 5 分钟, 再用新鲜 HBSS 漂洗, 然后用火琢玻璃移液管将组织捣碎于 1ml 新鲜 HBSS 中。分离的细胞以 30,000 细胞/孔接种到聚 D-赖氨酸包被的 96 孔板(Collaborative BioScience)上。每孔含有由 26mM NaHCO₃ (Sigma)、56mM 葡萄糖(Sigma)、15mM KCl (Sigma)、1mM 丙酮酸钠(Sigma)、1.1mM L-谷氨酰胺(Sigma)、10% (v/v)热灭活胎牛血清(Hyclone)和 0.001%硫酸庆大霉素(Sigma)补充的 100μl Eagle 氏最低必需培养基(MEM; Gibco) (pH 7.4)。在实验处理之前让细胞在潮湿的 37℃ 5% CO₂ 培养箱中贴壁 24 小时。每三天将所述培养基吸出并用新鲜培养基更换。

神经突突起测定

15 平板接种后 24 小时, 培养物用溶媒(PBS+0.1% BSA)、100ng 不同的生长因子(脑源性神经营养因子(BDNF; Promega)、神经胶质细胞源性神经营养因子(GDNF; Promega)、神经生长因子(NGF; Boehringer Mannheim)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF; Boehringer Mannheim)、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1; Boehringer Mannheim)、神经营养蛋白-3 (NT3; Calbiochem)、神经营养蛋白-4 (NT4; Calbiochem)、睫状神经营养因子(CNTF; Calbiochem)、表皮生长因子(EGF; Calbiochem)、血管内皮生长因子(VEGF; Calbiochem))或 EPO 模拟肽(EMP1、EMP6、EMP9、EMP23 和 EMP27; 稀释在 DPBS+0.1% BSA 中; 10fM-10nM; 表 1)处理。每种处理条件进行 4 次重复。在培养的第三天时, 吸出所述培养基, 用新鲜培养基和实验化合物更换。在培养一周时, 所述细胞用 10%磷酸缓冲的福尔马林固定 15 分钟, 然后用 DPBS (Sigma)漂洗, 再放入封闭血清(马血清; 1:50 稀释在 DPBS 中; Vector Labs)中 30 分钟。再用 DPBS 漂洗培养物, 然后在第一抗体中孵育 2 小时(微管相关蛋白

-2 (MAP-2)作为树突的选择性标记; 抗小鼠单克隆(Chemicon); MAP-2 以 1:1000 稀释在抗体稀释剂(Zymed)中)。阴性对照孔只在抗体稀释剂中孵育。本底信号通过用抗体孵育或不用抗体孵育的空白对照孔(无细胞)来确定。培养物再用 DPBS 漂洗, 然后放入荧光素中 1 小时 (FITC; 抗小鼠 IgG; 大鼠吸附的; 1: 50 稀释在 DPBS 中; Vector Labs)。培养物用 DPBS 漂洗最后一次, 然后将所述平板在 Cytofluor 4000 荧光平板读出仪上读数。神经突突起以与对照相比变化的百分数来表示(溶媒; 平均荧光 ± SEM)。

表 1: 红细胞生成素模拟肽(EMP)		
SEQ.ID.NO	序列名称	序列
7	EMP-1	GGTYSCHFGLTWVCKPQGG
19	EMP-6	GGTASCHFGLTWVCKPQGG
20	EMP-9	GGTYSCHFAPLTWVCKPQGG
17	EMP-23	Y-CHFGLTWVC
21	EMP-27	GGTYSC-FGLTWVCKPQGG

10 结果

神经突突起研究: 用 EMP 处理培养物导致 MAP2-FITC 免疫荧光法测量的神经突突起明显增加。所述神经突突起促进作用是浓度依赖性的, 在 pM 水平发现最大活性(图 9-图 18)。所述结果显示 EMP 展现出不同的活性分布曲线。在所检测的浓度下, EMP-1 和 EMP-6 在海马培养物中展现出典型钟形剂量反应分布曲线, 在 30-300pM 之间检查到峰值活性(比溶媒增长 83-117%)。EMP-9 和 EMP-27 在海马培养物中展现出平坦反应分布曲线, 在与 EMP-1 和 EMP-6 相似的浓度处检查到峰值活性, 但反应范围大大减小(比溶媒增长 29-32%)。EMP-23 在海马培养物中对 EPO 有一个中等反应, 在 30 pM-1 nM 之间检查到峰值活性, 从而导致比溶媒反应增长 43-46%。在所述皮质培养物中, EMP-1、EMP-9 和 EMP-27 展现出与大多数已知生长因子相似的反应分布曲线 - 总体来说最大活性发生在 30-300pM 之间从而高于溶媒反

应 32-40%的平坦反应分布曲线。EMP-6 和 EMP-23 展现出典型钟形剂量反应分布曲线，在 30-300pM 之间检测到峰值活性，从而导致在突起上比溶媒反应水平增长 68-87%。总体来说，EMP-6 在海马培养物和皮质培养物中都促进稳固的神经突突起活性，然而，与在皮质培养物中相比，EMP-1 在海马培养物中显示出选择性作用，以及 EMP-23 在皮质培养物中的作用高于在海马细胞中的作用。总的来说 EMP-9 和 EMP-27 神经突突起反应给人的印象不太深刻。

所述 EMP 和已知生长因子间的比较显示出，它们在神经突突起促进能力上展现出区域性差异。所述 EMP 在皮质培养物中增加神经突突起的能力要高于或等于已知生长因子的能力(图 9-图 18)。由于只有少数因子对皮质细胞具有这样的作用，因此这个发现是引人注目和重要的。另一方面，许多生长因子在海马中发挥强大的突起反应(高于对照 38-86%)。与这些生长因子相比，所述 EMP 显示出中等但稳固的突起促进活性，然而，它们表现出高于 BDNF、NGF 和 VEGF 的活性。

讨论

EMP 在哺乳动物细胞中促进神经突突起。所述作用对于海马细胞和皮质细胞是稳固的。所述神经突突起促进作用要优于各种生长因子的作用。所述作用是有效的，在皮摩尔浓度下检查到功效。

同样应该特别指出，考虑到极少数生长因子或模拟物在大脑皮质神经元中在促进神经突突起上是有效的，所述数据尤其重要。尤其相关的是，所述 EMP 的这种活性在亚-皮摩尔/皮摩尔浓度下被检查到。

实施例 5

EPO 防止缺血性损伤

研究对象

给重量在 250-300g 之间的雄性自发性高血压大鼠(Charles River)称重，然后用氯胺酮(100mg/ml)/赛拉嗪(20mg/ml)混合剂(1.2ml/kg; i.p.)

5 麻醉。麻醉剂的水平通过角膜反射(空气吹入眼中)和对尾部或足部挤掐的小腿反射来评估。一旦大鼠被麻醉,把它放在一个小的动物外科手术板上,并在手术过程中固定。用直肠探头连续监测所述大鼠的体温并利用体内平衡加热垫(homeostatic heating pad)将体温保持在 37℃。

脑缺血的实验模型

10 通过串联闭合左颈总动脉(common carotid artery)和左脑中动脉(middle cerebral artery) 2 小时造成大鼠局部缺血,接着利用 Brint 和他的合作者所描述技术(*J. Cereb Blood Flow Metab* 8: 474-485, 1988)的改进方法进行 22 小时的再灌注。具体地说,所述左 CCA 通过在颈部腹侧表面的切开术分离。对于同侧 MCA 的分离,在左眼的外眦和对应的外耳道之间作第二个切口以裸露出下面的头颅。所述 MCA 通过在 Zeiss 手术显微镜直接观察下在颧弓和鳞骨融合部位嘴侧 2-3mm 钻的 15 5mm 孔来暴露。用无菌的 26g 针打开硬膜,将铂合金金属丝(直径 0.1mm)插入到所述 MCA 下面刚刚高于下面的皮质静脉。如 Aronowski 和他的同事所述(*Stroke*, 25: 第 2235-2240 页, 1994),所述 MCA 通过抬高和压迫穿过所述合金金属丝(across the alloy wire)的血管来暂时闭合。同时,所述 CCA 用动脉瘤夹闭合。所述 CCA 和所述 MCA 的闭合持续时间 20 是 2 小时。在这个时期结束时,将所述金属丝和所述瘤夹小心移去,使得所述血管再灌注,并缝合所述切口区域。所述大鼠在返回到其原来的笼内之前将它放入一个分离笼内进行恢复。

研究设计

25 研究 I: 通过微型渗透泵递送 EPO 和溶媒

启动局部缺血前 20 小时,充有溶媒或 EPO 的微型渗透泵(型号 1003D; Alza)放入所述大鼠的肩胛骨之间。将连接所述泵的导管插入并拴在右颈静脉中以 1μl/小时的速率连续输注药物。大鼠分为 5 组: (1)

假手术 溶媒处理, (2)局部缺血 溶媒处理, (3)局部缺血 1.32U/天 EPO 处理, (4)局部缺血 132U/天 EPO 处理和(5)局部缺血 1321U/天 EPO 处理。在第二天, 如上所述致使大鼠局部缺血。22 小时后, 评估所述大鼠的行为表现, 收集血液样品用于 EPO 的末端血浆水平, 然后让所述大鼠安乐死, 取脑, 切片并染色以用于组织学分析。

研究 II: 以单一静脉大剂量注射递送 EPO 和溶媒

在第一天, 如上所述致使大鼠局部缺血。大鼠分为 4 组: (1)局部缺血 溶媒处理, (2)局部缺血 1000U/kg EPO 处理, (3)局部缺血 2500U/kg EPO 处理和(4) 5000U/kg EPO 处理。闭合后 15 分钟, 所述大鼠以静脉内大剂量注射接受溶媒或 EPO。22 小时后, 评估所述大鼠的行为表现, 收集血液样品用于 EPO 的末端血浆水平分析, 然后让所述大鼠安乐死, 取脑, 切片并染色以用于组织学分析。

研究 III: 以重复静脉大剂量注射递送 EPO 和溶媒

在第一天, 如上所述致使大鼠局部缺血。大鼠分为 2 组: (1)局部缺血 溶媒处理和(2)局部缺血 2500U/kg EPO 处理。药物在闭合后 15 分钟、2 小时、4 小时和 6 小时以静脉内大剂量给药, 总剂量为 10,000U/kg。22 小时后, 评估所述大鼠的行为表现, 收集血液样品用于 EPO 的末端血浆水平分析, 然后让所述大鼠安乐死, 取脑, 切片并染色以用于组织学分析。

结果测量

血浆测定: 在处死时通过眶窦从每只大鼠收集血液样品。分离血浆, 冰冻和通过 EPO ELISA 分析来确定血浆浓度(U/ml)。

梗塞体积: 取脑, 封闭在 1mm 厚片上并在室温下用氯化 2,3,5-三苯基四唑鎓染料(TTC; Sigma)染色 15 分钟。染色后的切片在 40C 保存于 10%缓冲福尔马林中。通过 Nikon SMZ-U 显微切割镜观察这些切

片。利用 CCD 照相机捕捉每一个脑切片图像并利用 Image Pro Phase III 软件处理来计算梗塞体积。

结果

5 研究 I: 通过微型渗透泵以 132U/天或 1321U/天连续输注给予的 EPO 显著减少梗塞体积(图 19)。血浆浓度与所述保护作用相关(图 20)。

研究 II: 在这个模型中闭合后 15 分钟以 1000U/kg、2500U/kg 或 5000U/kg 单一静脉内大剂量给予的 EPO 并不保护预防局部缺血性损伤(图 21)。每组中的血浆浓度低(图 22)。

10 研究 III: 闭合后 15 分钟、2 小时、4 小时和 6 小时以 2500U/kg 重复静脉内大剂量给予的 EPO 导致梗塞体积显著减少(图 23)。目前正在测定血浆浓度(图 24)。

讨论

15 数据支持在通过短暂串联闭合所述 CCA 和 MCA 致使局部缺血的自发性高血压大鼠中,以低至中等浓度的 EPO 连续给药或重复给药可以显著减少可以梗塞体积。所述结果同样支持为了保护性作用的发生在 EPO 给予的量和时间上存在一个临界关系。在较长时期内低剂量的 EPO 给药比以同样方式高剂量给药或以单一大剂量输注给药更有益。

20 这与显示出在低剂量(pM)时观察到 EPO 最大保护性作用和实际上在较高剂量(μ M)时丧失功效的体外数据是一致的。

参考文献

- Johnson, D. L., Farrell, F. X., Barbone, F. P., McMahon, F. J., Tullai, J., Hoey K., Wrighton, N. C., Livnah, O., Middleton, S. A., Loughney, D., Stura, E. A., Dower, W. J., Mulcahy, L. S., Wilson, I. A.和 Jolliffe L. K.,
5 红细胞生成素的13个氨基酸肽模拟物的鉴定和对EMP1模拟物活性重要的氨基酸的描述, *Biochemistry* 37, 3699-3710 (1998)。
- Johnson, D. L., Farrell, F. X., Barbone, F. P., McMahon, F. P., Tullai, J., Kroon, D., Freedy, J., Zivin, R. A., Mulcahy, L. S.和 Jolliffe, L. K. 红细胞生成素模拟肽的氨基末端二聚作用导致红细胞生成活性增强,
10 *Chemistry & Biology* 4, 939-950 (1997)。
- Johnson, Dana L.; Zivin, Robert A. 激动剂肽二聚物。美国专利号 5,767,078
- Campana, W. M., Misasi, R.和 O'Brien, J. S. (1998) 红细胞生成素的神经营养性序列的鉴定。 *Inter. J. Mol. Med.* 1: 235-241。
- 15 专利申请 WO 95/03821, O'Brien, J. S., Kishimoto, Y.和 Altman, D. E. 标题: 作为治疗剂的 Prosaposin 和细胞因子延伸肽。
- Sadamoto, Y, Igase, K, Sakanaka, M., Sato, K, Otsuka, H., Sakaki, S., Masuda, S.和 Sasaki, R. (1998) 在脑中动脉永久闭合的大鼠中红细胞生成素防止定位障碍(place navigation disability)和皮质闭合。 *Biochem*
20 *Biophys Res Comm.* 253: 26-32。
- Tabira, T., Konishi, Y.和 Gallyas, F. (1995) 在体外造血细胞因子对胆碱能神经元和其他神经元的神经营养作用。 *Int. J. Dev. Neurosci.* 13: 241-252。
- Morishita, E., Masuda, S., Nagao, M., Yasuda, Y.和 Sasaki, R. (1997)
25 细胞生成素受体在大鼠海马神经元和大脑皮质神经元中表达红, 并且在体外红细胞生成素防止谷氨酸诱导的神经元死亡。 *Neurosci* 76: 105-116。
- Sakanaka, M, Wen T-C, Matsuda, S, Masuda, S., Morishita, E., Nagao, M.和 Sasaki, R. (1998). 红细胞生成素保护神经元免受局部缺血

损害的体内证据。Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 4635-4640。

Marti, H. H., Gassman, M., Wenger, R. H., Kvietikova, I., Morganti-Kossmann, M. C., Kossmann, T., Trentz, O.和 Bauer, C. (1997) 在人体液中检测红细胞生成素: 在大脑中固有的红细胞生成素生产。Kidney Int. 51: 416-418。

Konishi, Y., Chui, D-H, Hirose, H., Kunishita, T.和 Tabira, T. (1993) 红细胞生成素和其他血细胞生成因子在体外和体内对中枢胆碱能神经元的营养作用。Brain Res. 609: 29-35。

Bernaudin, M., Marti, H. H., Roussel, S., Divoux, D., Nouvelot, A., MacKenzie, E. T.和 Petit, E. (1999). 红细胞生成素在小鼠病灶性永久性脑缺血中的潜在作用。J. Cereb. Blood Flow Metab. 19: 643-51。

Nakamura, T., Ebihara, I., Shimada, N.和 Koide, H. (1998). 抑郁患者脑脊液中提高的红细胞生成素水平。Amer. J Med Sci 315: 199-201。

Masuda, S., Okano, M., Yamagishi, K., Nagao, M., Ueda, M.和 Sasaki, R. (1994). 红细胞生成素生产的新位点。在培养的大鼠星形胶质细胞中的氧依赖性生产。J. Biol. Chem. 269: 19488-93。

专利申请 WO 98-CA991, Weiss, S 和 Sorokan, S. T. 标题: 红细胞生成素介导的神经发生。

Campana, W. M., Misasi, R.和 O'Brien, J. S. (1998). 红细胞生成素神经营养序列的鉴定。Inter. J. Mol. Med. 1: 235-241。

专利申请: WO 95/03821, O'Brien, J. S., Kishimoto, Y.和 Altman, D. E. 标题: 作为治疗剂的 Prosaposin 和细胞因子衍生肽。

Konishi, Y., Chui, D-H, Hirose, H., Kunishita, T.和 Tabira, T. (1993). 红细胞生成素和其他血细胞生成因子在体外和体内对中枢胆碱能神经元的营养作用。Brain Res. 609: 29-35。

Mattson, M. P., Barger, S. W., Begley, J 和 Mark, R. J. (1994). 原代细胞培养物中钙、自由基和兴奋毒性神经元死亡。Methods Cell Biol. 46: 187-216。

Smith-Swintosky VL, Cheo-Isaacs CT, D'Andrea MR, Santulli RJ, Darrow, AL, Andrade Gordon P. (1997) 蛋白酶活化受体 2(PAR-2)存在于大鼠海马并与神经变性有关。J. Neurochem., 69: 1890-1896。

- 5 Silva, M., Grillot, D., Benito, A., Richard, C., Nunez, G., Fernandez-Luna, J. L. (1996). 红细胞生成素可以抑制通过 Bcl-xL 和 Bcl-2 的细胞凋亡来促进类红细胞祖细胞的存活。Blood 88, 1576-1582。

图 1A

大鼠脑皮质培养物表达 EPO 受体

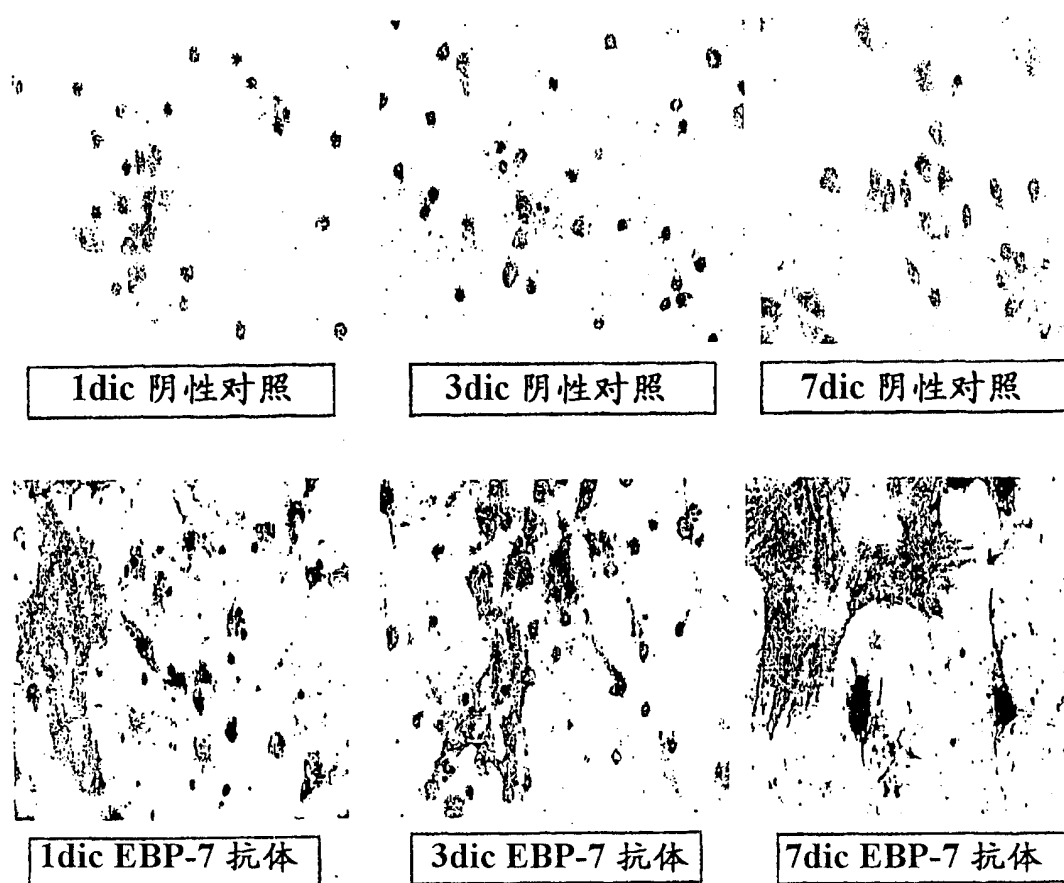


图 1B

大鼠海马培养物表达 EPO 受体

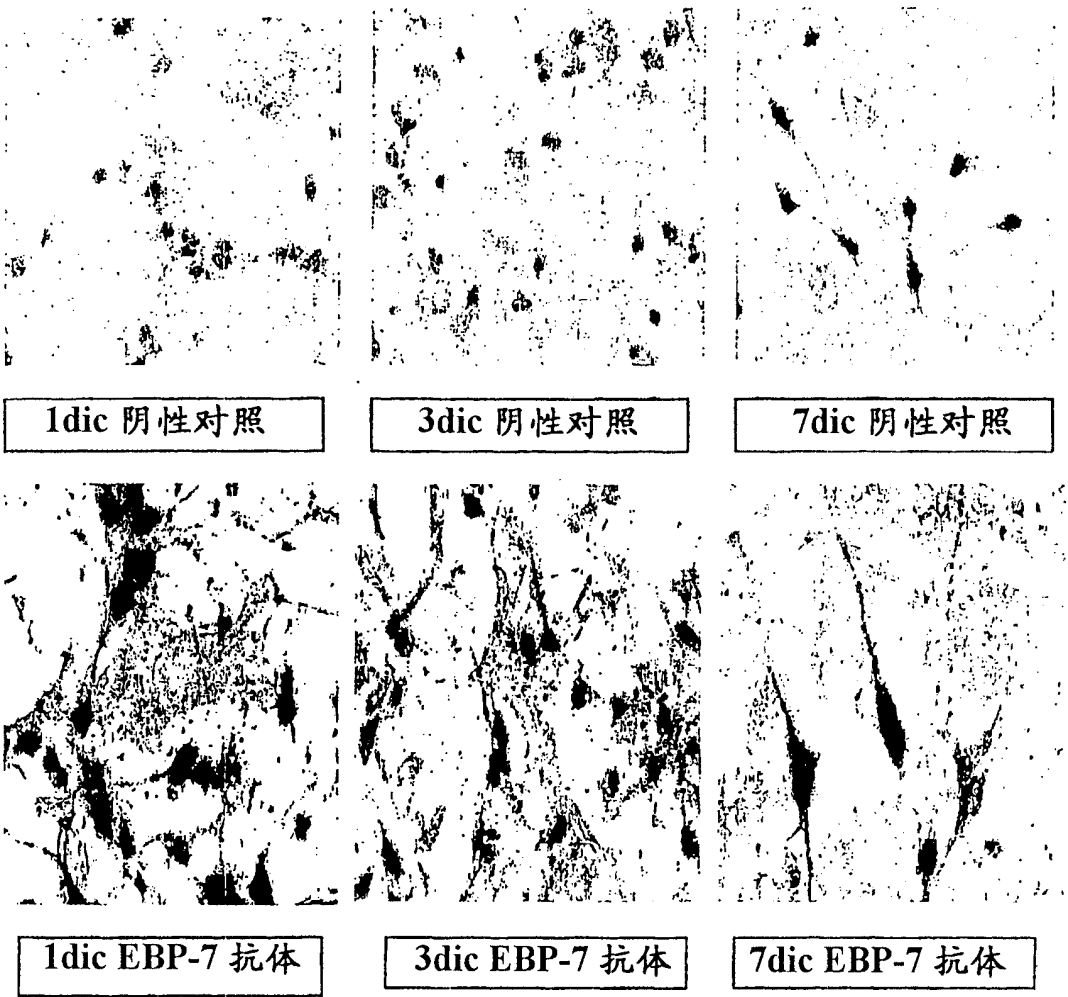


图 2

EPO 受体在 PC12 和 SK-N-MC 细胞上表达

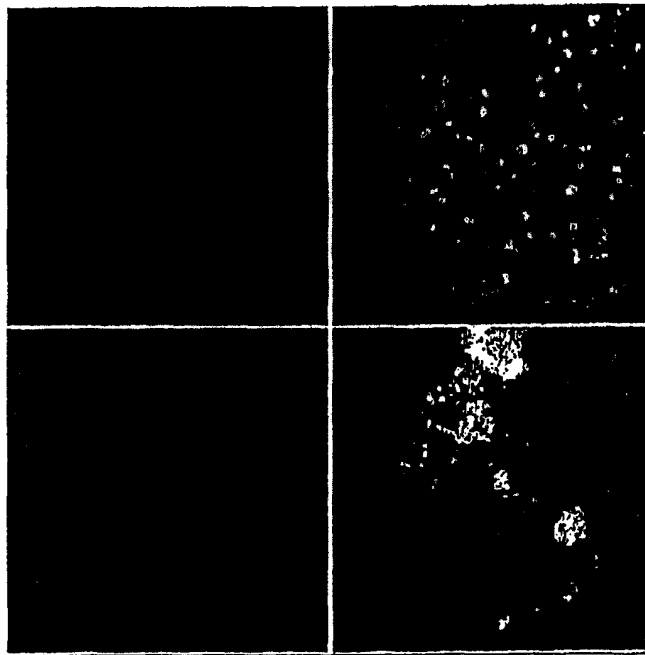
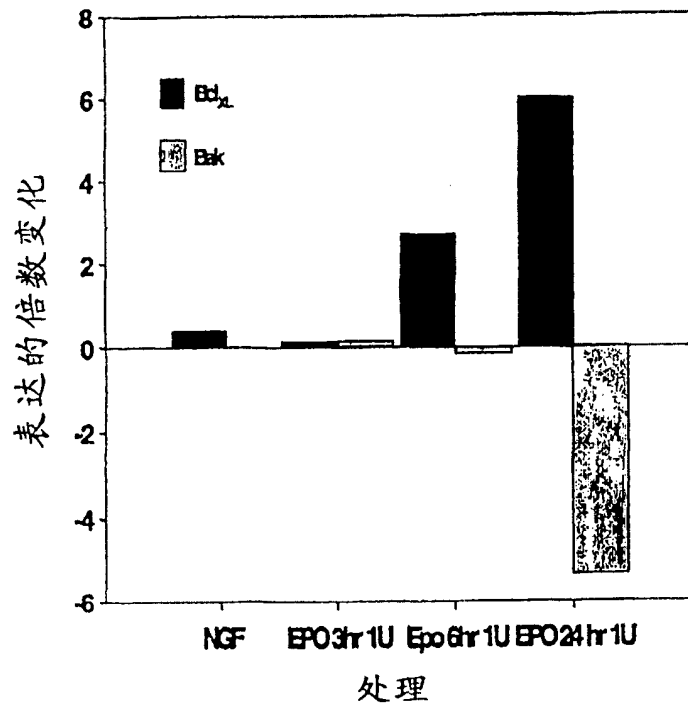


图 3

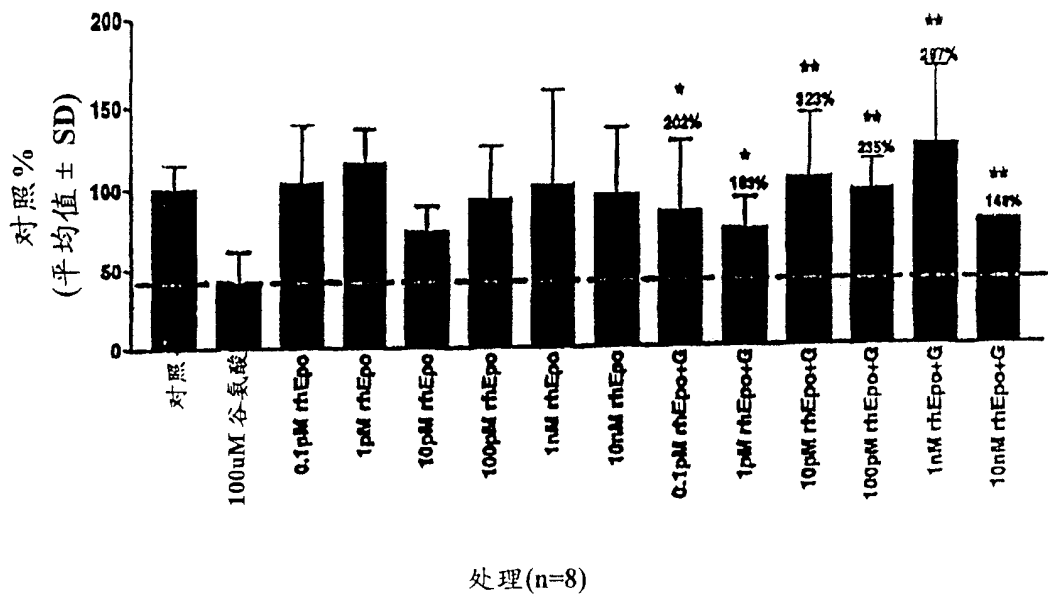
在 PC12 细胞中 EPO 诱导的基因表达



红细胞生成素调节 BCL 家族成员 Bcl_{XL} 和 Bak 的表达。

图 4

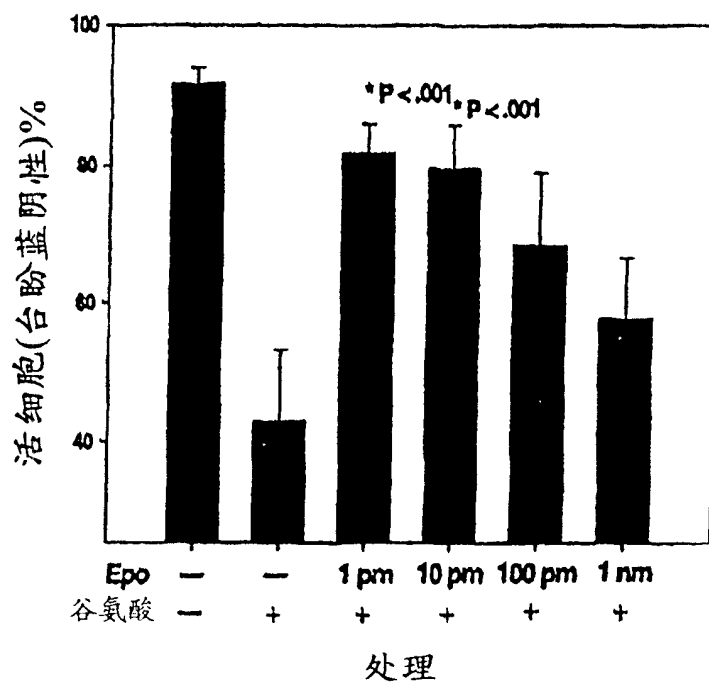
EPO 保护大鼠脑皮质细胞免受谷氨酸毒性



处理之间 t-检验(单尾)比较 *p<0.01; **p<0.001

图 5

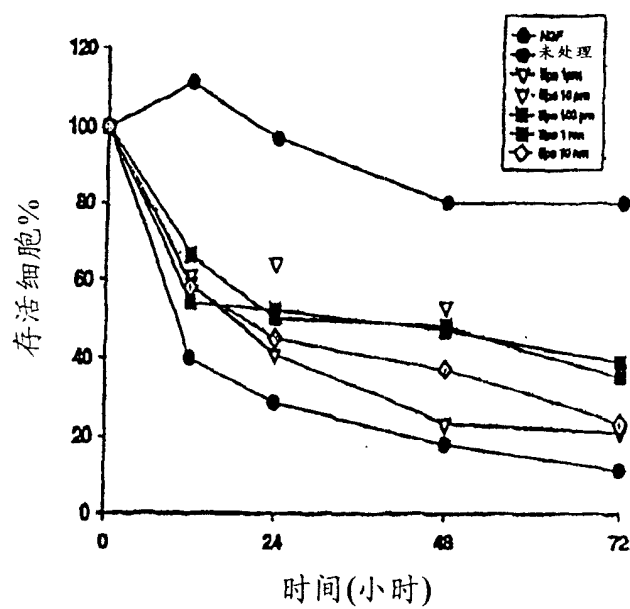
EPO 保护 PC12 细胞免受谷氨酸诱导的细胞死亡



红细胞生成素保护 PC-12 细胞免受谷氨酸介导的细胞毒性。

图 6

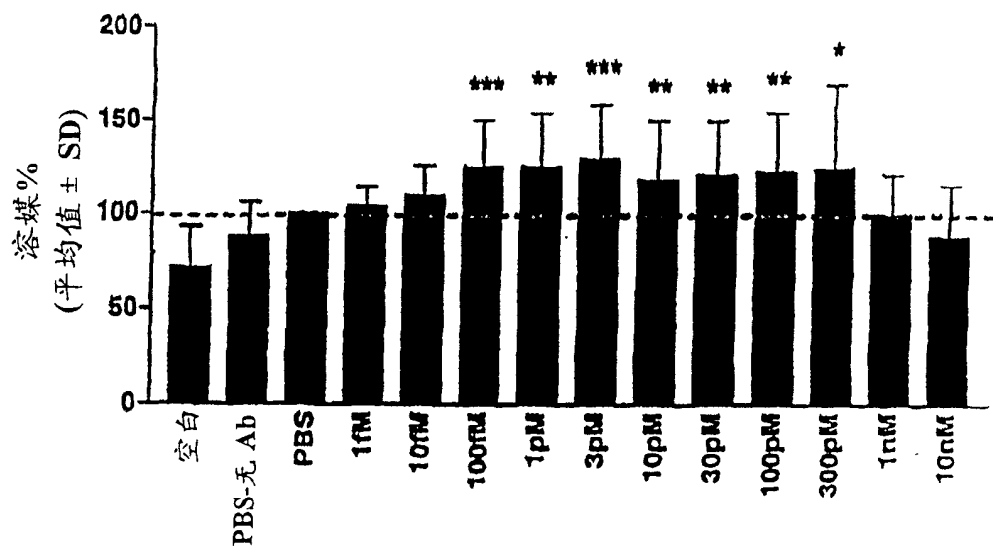
EPO 保护 PC12 细胞免遭 NGF 停药诱导的细胞死亡



红细胞生成素保护 PC-12 细胞免遭 NGF 停药诱导的死亡。

图 7

在大鼠脑皮质培养物中 EPO 促进神经突起



rhEPO 浓度(n=44)

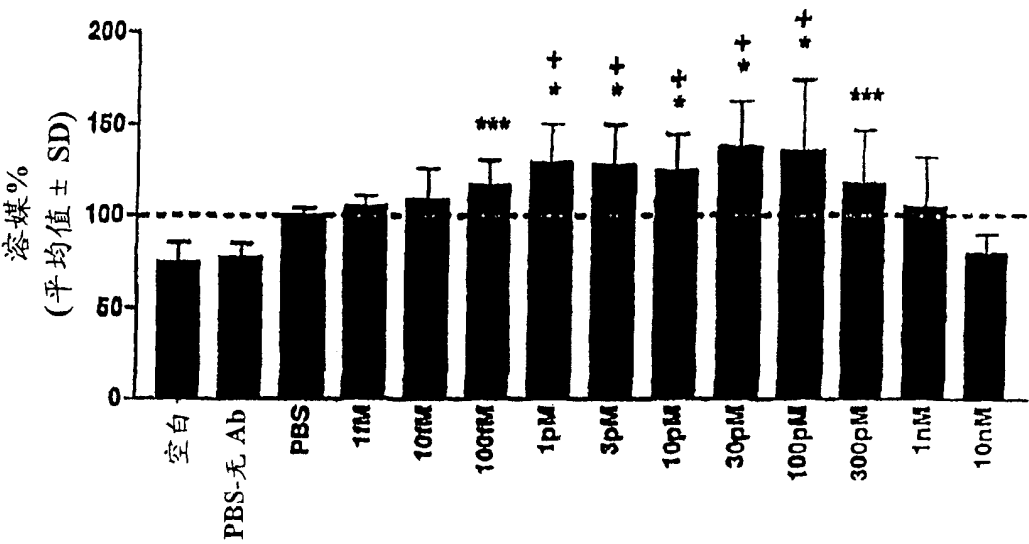
组间单因素 ANOVA 比较 $p < 0.0001$;

Dunnett 多重比较检验 $p > 0.05$, ns

不成对 t-检验(单因素) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

图 8

在大鼠海马培养物中 EPO 促进神经突突起

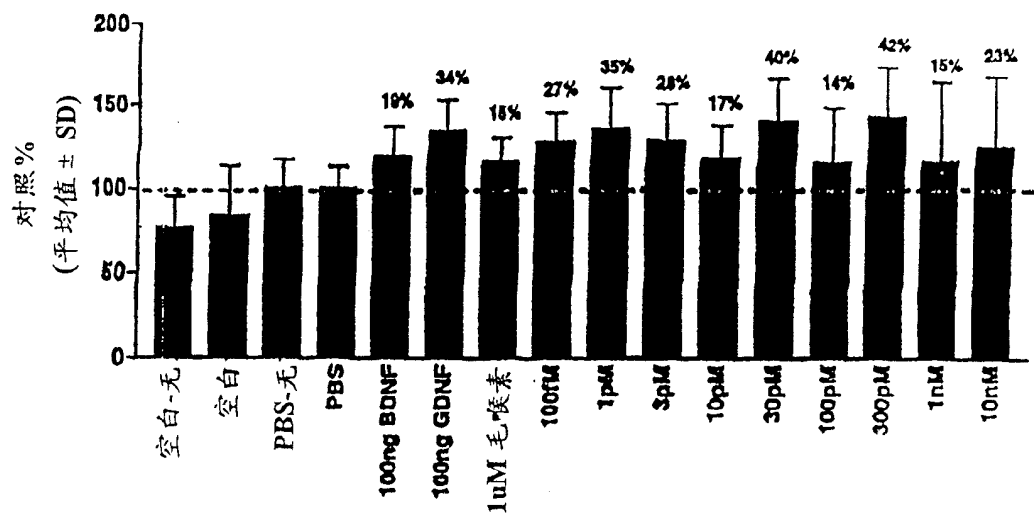


rhEPO 浓度(n=32)

处理组间单因素 ANOVA 比较 $p<0.0001$;
Dunnett 多重比较检验 $*p<0.01$;
不成对 t-检验(单因素) $***p<0.001$; $+ p<0.0001$

图 9

在大鼠脑皮质培养物中 EMP-1 促进神经突突起



EMP-1 浓度 (n=20)

图 10

在大鼠海马培养物中 EMP-1 促进神经突突起

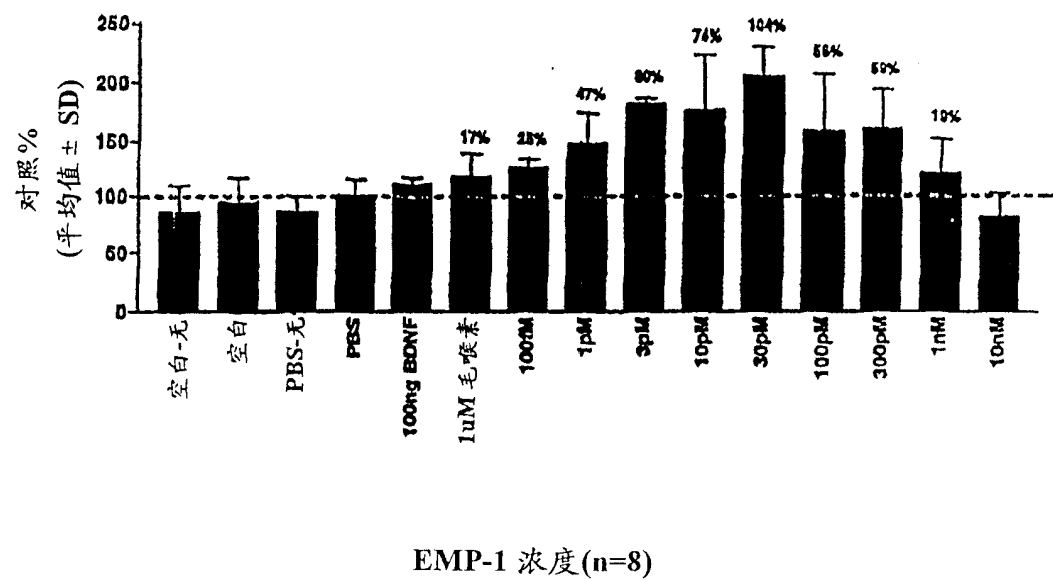
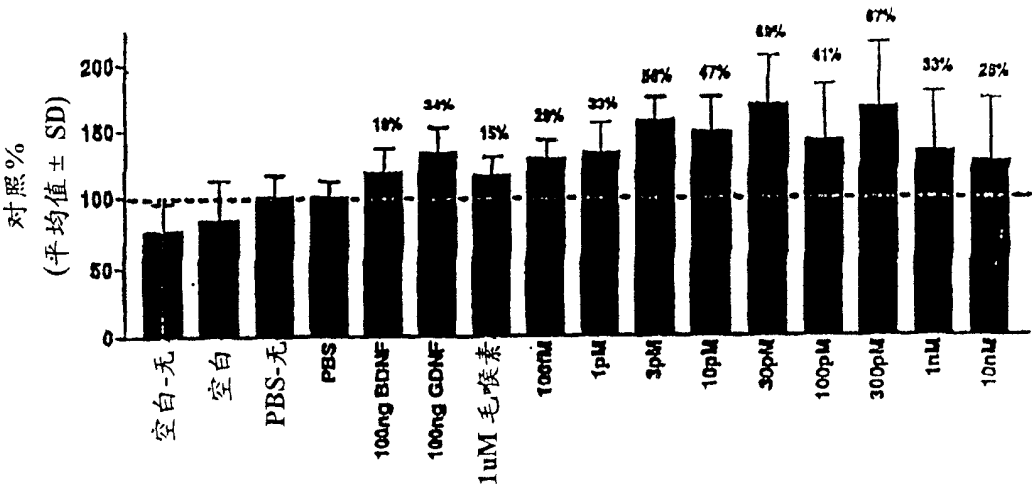


图 11

在大鼠脑皮质培养物中 EMP-6 促进神经突突起



EMP-6 浓度(n=20)

图 12

在大鼠海马培养物中 EMP-6 促进神经突突起

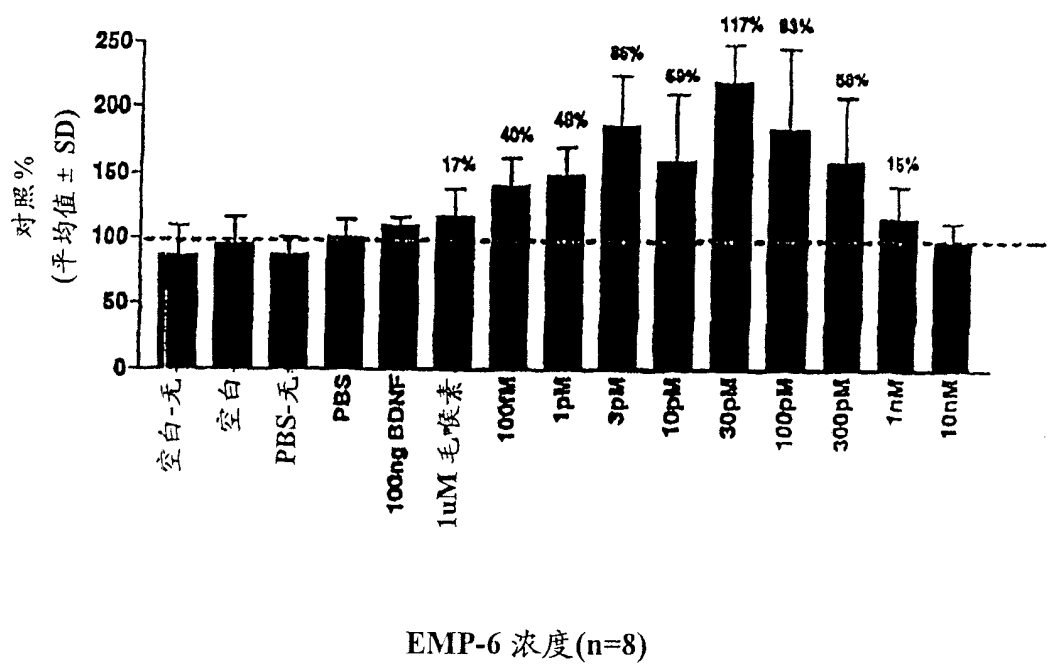
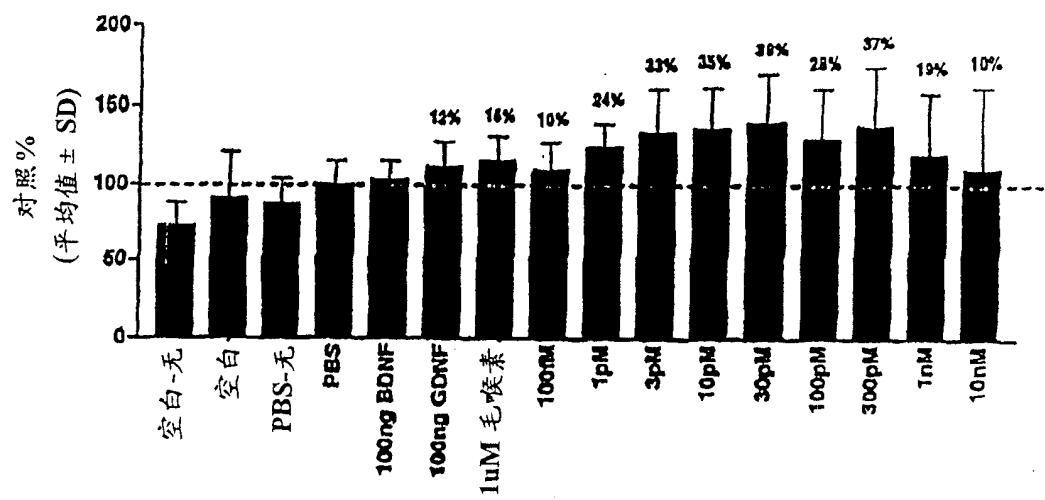


图 13

在大鼠脑皮质培养物中 EMP-9 促进神经突突起



EMP-9 浓度(n=16)

图 14

在大鼠海马培养物中 EMP-9 促进神经突突起

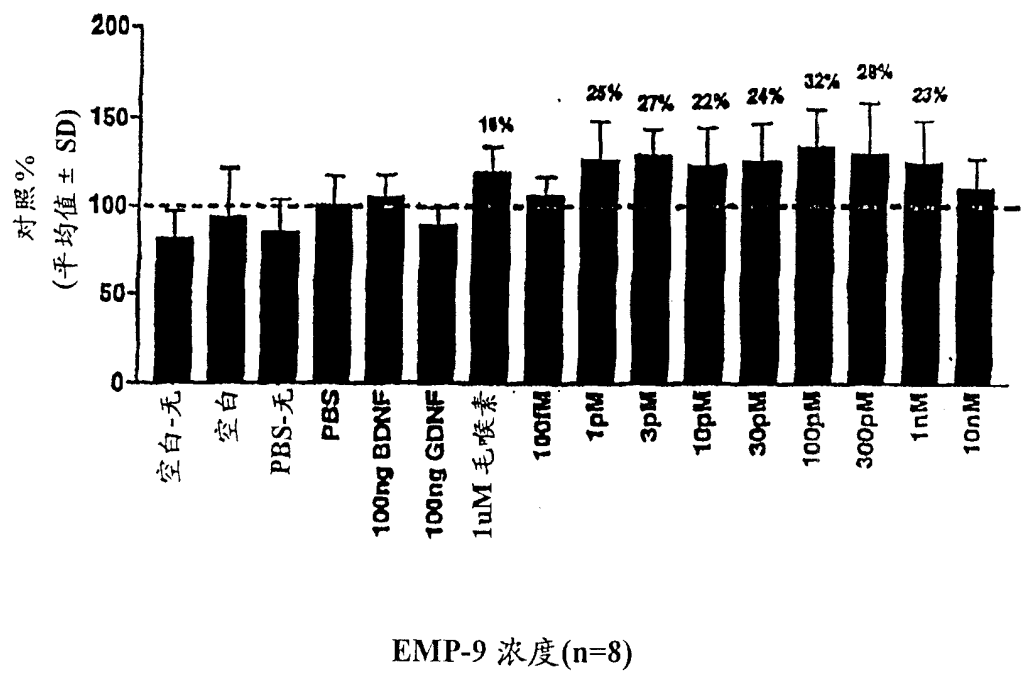


图 15

在大鼠脑皮质培养物中 EMP-23 促进神经突起

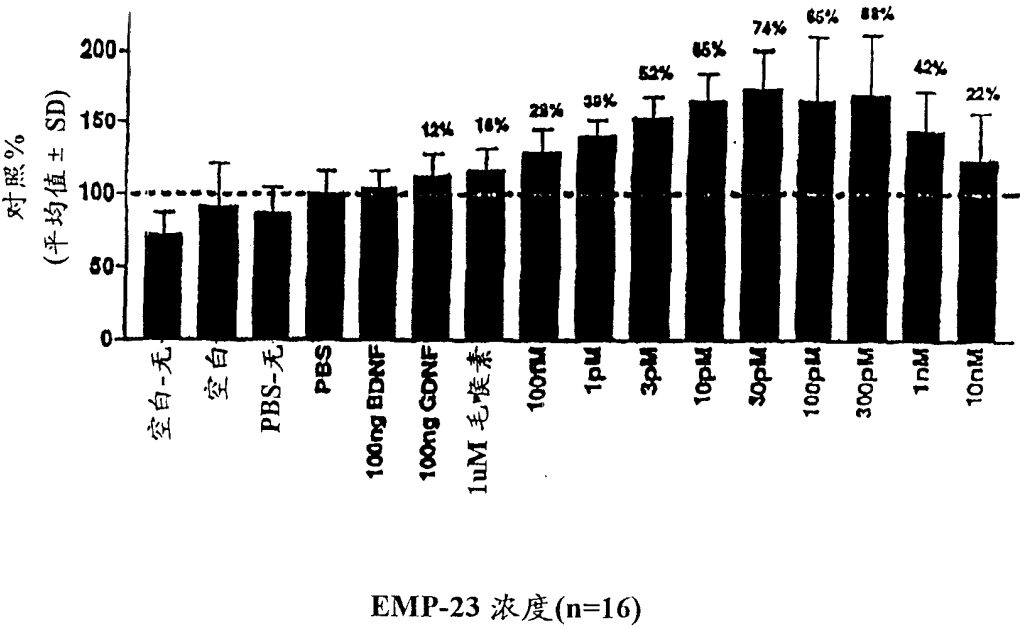
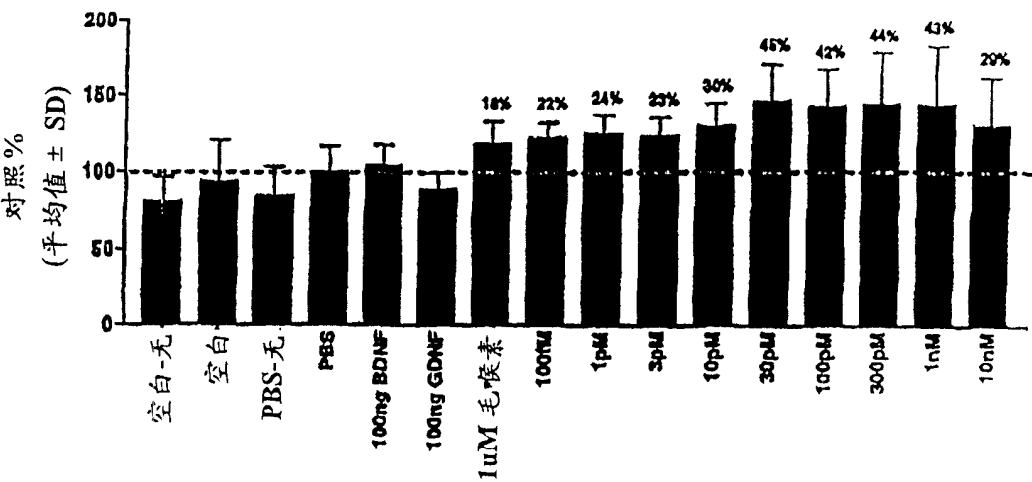


图 16

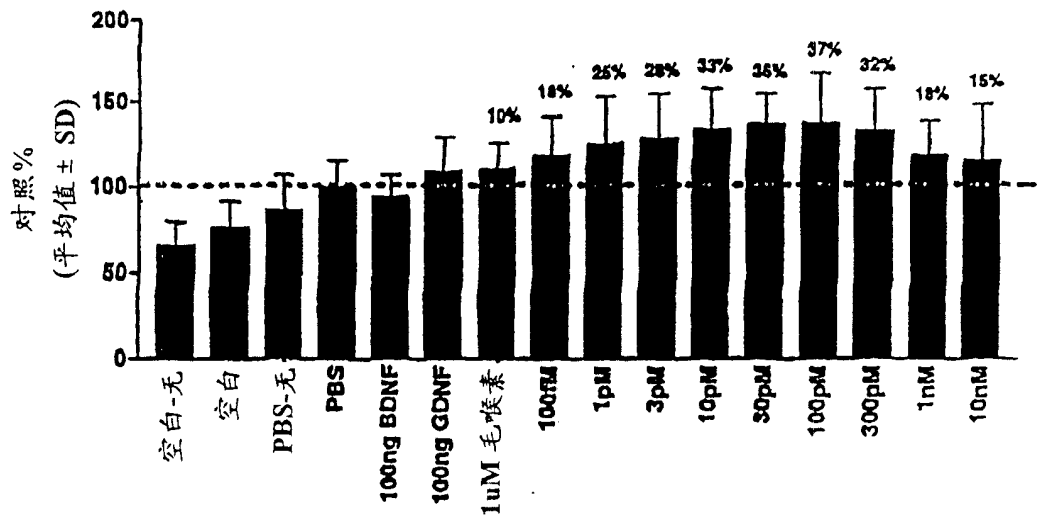
在大鼠海马培养物中 EMP-23 促进神经突突起



EMP-23 浓度(n=8)

图 17

在大鼠脑皮质培养物中 EMP-27 促进神经突起



EMP-27 浓度(n=16)

图 18

在大鼠海马培养物中 EMP-27 促进神经突突起

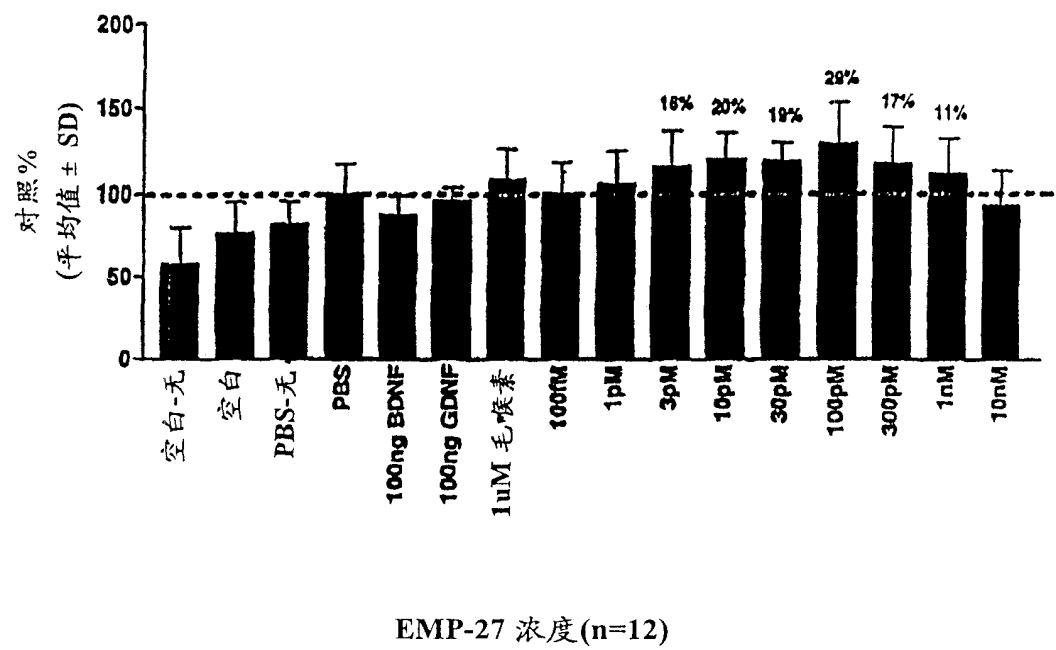
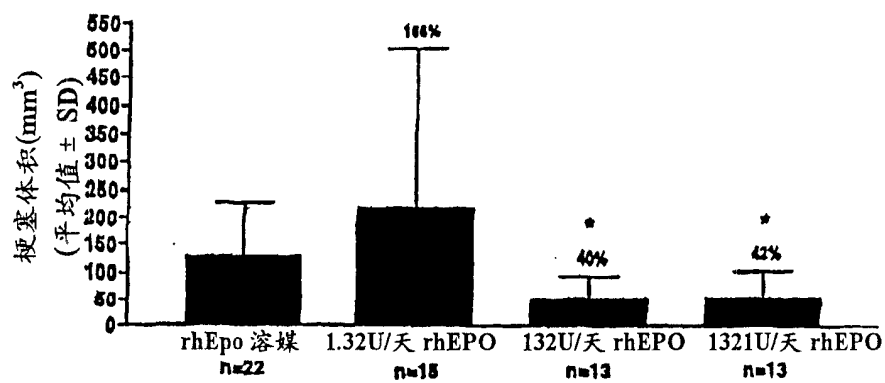


图 19

研究 I: EPO 通过微型渗透泵连续静脉输注防止局部缺血性损伤



处理之间单因素 ANOVA 比较 $p=0.01$

处理之间 t-检验(单尾)比较 $*p\leq 0.01$

图 20

研究 I：血浆测定

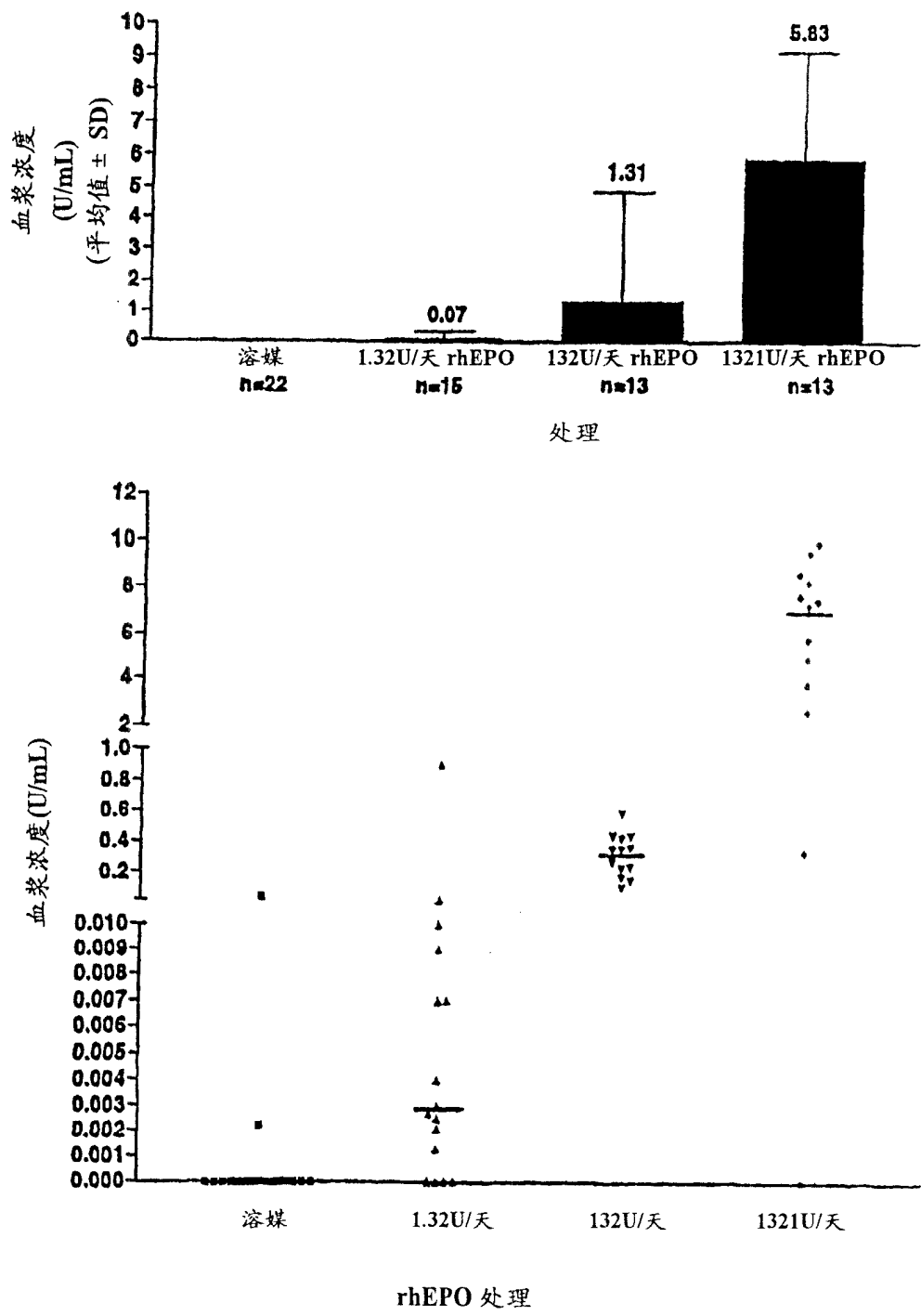
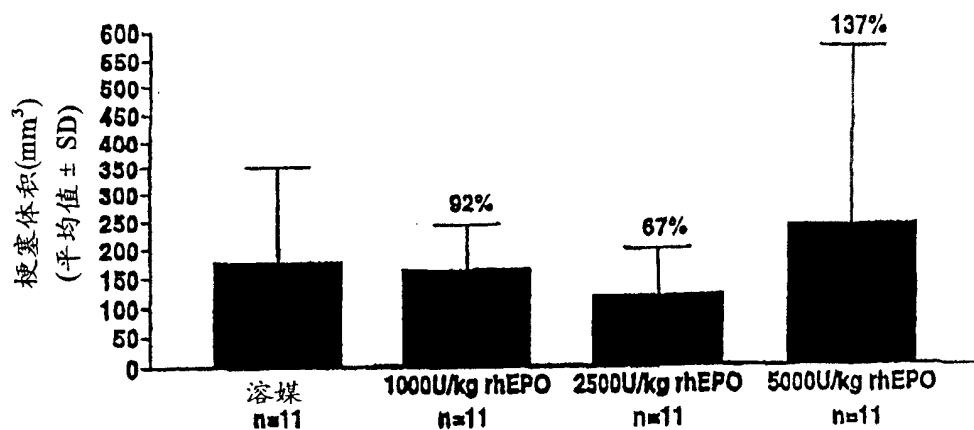


图 21

研究 II： EPO 在一次大剂量静脉给予时不防止局部缺血性损伤



处理组之间单因素 ANOVA 比较; $p > 0.05$, n.s.

图 22

研究 II：血浆测定

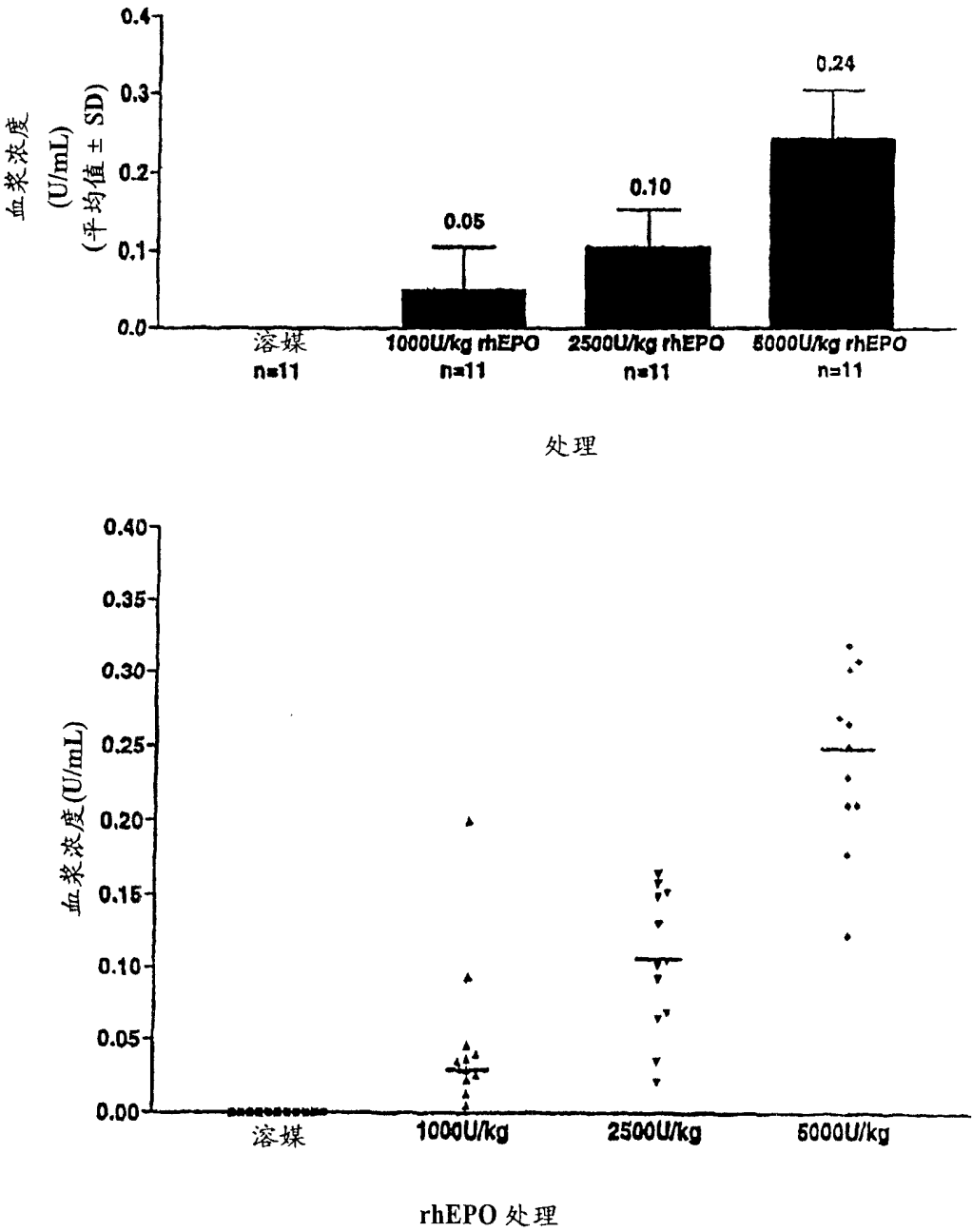
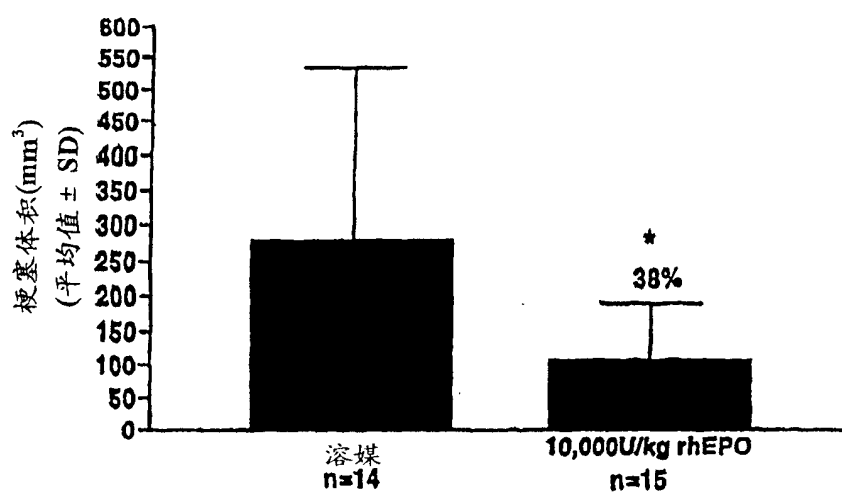


图 23

研究 III： EPO 通过重复大剂量静脉给药防止局部缺血性损伤



处理组之间单因素 ANOVA 比较 $p=0.02$

Dunnett 多重比较 t-检验 $*p<0.05$

图 24

研究 III：血浆测定

研究 III：血浆浓度

重复大剂量静脉给药后 24 小时的 EPO 血浆浓度

