



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102232084 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 28

(21) 申请号 200980144923. 1 CN 1276381 A, 2000. 12. 13, 说明书第 7 页第 25-30 行及实施例 4.
(22) 申请日 2009. 11. 09 WO 2006/076041 A2, 2006. 07. 20, 图 1.
(30) 优先权数据
61/118, 566 2008. 11. 28 US 审查员 夏文静

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2011. 05. 09

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2009/001236 2009. 11. 09

(87) PCT国际申请的公布数据
W02010/060265 EN 2010. 06. 03

(73) 专利权人 上海泽生科技开发有限公司
地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园
区居里路 68 号

(72) 发明人 周明东

(51) Int. Cl.
C07K 14/475(2006. 01)
A61P 9/10(2006. 01)
A61K 38/18(2006. 01)

(56) 对比文件
WO 2006/076041 A2, 2006. 07. 20, 图 1. 权利要求书1页 说明书12页
序列表4页 附图1页

(54) 发明名称
纽兰格林及其用途

(57) 摘要
本发明提供了特定的纽兰格林多肽, 能够用于预防、治疗或延迟各种疾病或紊乱的方法和组合物中。

1. 一种纽兰格林多肽,其氨基酸序列为 SEQ ID NO :5。
2. 一种药物制剂,其含有纽兰格林多肽以及药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂,所述纽兰格林多肽的氨基酸序列为 SEQ ID NO :5。
3. 一种纽兰格林多肽在用于制备治疗心力衰竭药物中的用途,包括给需要治疗的个体施用有效剂量的纽兰格林多肽,所述纽兰格林多肽的氨基酸序列为 SEQ ID NO :5。
4. 权利要求 3 所述的用途,其中所述个体是人。
5. 权利要求 3 所述的用途,其中纽兰格林多肽是通过静脉给药的。

纽兰格林及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及对 ErbB2 受体有高亲和力的神经调节蛋白及其治疗各种心脏疾病及紊乱的用途。

背景技术

[0002] 心脏（心室）肥大是对增大的心脏工作压力或需求的一种重要的适应性生理反应。肥大刺激因素作用后发生的早期细胞变化之一是线粒体合成以及伴随单个细胞大小成比例增加的肌原纤维扩增（室壁增厚），但细胞数量没有（或极少）增加。

[0003] 当心室受到压力时，最初的反应是肌小节长度的增加。随后是总体肌肉量的增加。当负荷过于严重时，心肌收缩力将减弱。在最轻微的状态，这种减弱体现为无负荷心肌收缩速度的减小或等长收缩时力量发展速率的减小。当心肌收缩力进一步减弱时，出现无负荷心肌缩短速度的更大程度下降，并伴随等长收缩肌肉力量发展及收缩长度下降。此时，循环补偿仍可由心脏扩大以及心肌质量的增加提供，它倾向于维持心室壁应力在正常水平。当收缩力继续下降时，会出现明显的充血性心衰，表现为心输出量或工作力的下降，和 / 或心室舒张末期容积和舒张压的上升。

[0004] 从肥大到心衰的过渡以几个细胞组织的变化为特征。例如，正常的肥大的细胞有较大的尺寸，伴有增强的且有序的收缩单位以及较强的细胞 - 细胞粘连。反之，病理状态的肥大的细胞，其尺寸亦较大并有蛋白聚集，表现出收缩蛋白的无序化（肌小节结构紊乱）以及较差的细胞 - 细胞粘附（肌纤维紊乱）。因此，在病理状态的肥大中，细胞尺寸的增加以及收缩蛋白的聚集与肌小节结构的无序组装和牢固的细胞 - 细胞相互作用的缺失相关联。

[0005] 大约有 5 百万美国人患有心衰，并且每年新增病人在 55 万以上。当前治疗心衰的药物主要集中于血管紧张素转化酶（ACE）抑制剂，这些血管舒张剂引起血管扩张、降低血压并减少心脏的工作量。虽然死亡率的百分数下降是具有统计学差异的，但使用 ACE 抑制剂后实际的死亡率下降平均仅为 3% - 4%，并且还有几种潜在的副作用。

[0006] ACE 抑制剂也与其他药物联用，比如洋地黄，能增加心脏收缩的力量；和 / 或某种利尿剂，通过引起肾脏排除血液中更多的钠和水从而有助于减轻心脏的工作量。然而，至少有一项研究证明在 II-III 级心衰病人使用洋地黄与安慰剂相比，其生存率没有什么差异。此外，利尿剂能改善心衰的某些症状，但不适宜用来单独治疗。

[0007] 预防或治疗心衰的其他选择亦有相应的局限。比如，心脏移植显然比药物治疗更昂贵及更具侵入性，并且还进一步受有无供体心脏的限制。使用机械装置，比如双心室心脏起搏器，同样是侵入性的并且较昂贵。因此，由于当前治疗手段的不足，需要有新的治疗措施。

[0008] 一种很有前途的新的治疗手段包括给心衰患者或有心衰风险的患者施用纽兰格林（此后称为“NRG”）。NRGs 由一个结构上相关的生长和分化因子家族组成，包括 NRG1、NRG2、NRG3 和 NRG4 及其异构体。例如，已鉴定的 NRG1 的异构体超过 15 个，可以根据它们基本的表皮生长因子（EGF）类似区的差异分成 α 和 β 两大类。NRG-1 在如下文献资料中

被提及,如美国专利 5,530,109,5,716,930,7,037,888 ;Lemke, Mol. Cell. Neurosci. 1996, 7:247-262 ;Peles 和 Yarden,1993, BioEssays 15 :815-824,1993 ;Peles et al.,1992, Cell 69 :205-216 ;Wen et al.,1992, Cell 69 :559-572 ;Holmes et al.,1992, Science 256 :1205-1210 ;Falls et al.,1993, Cell 72 :801-815, Marchionni et al.,1993, Nature 362 :312-8,以上内容通过引用完整的合并于此。NRG-2 在如下文献资料中提及,如 Chang et al.,1997,Nature 387 :509-512 ;Carraway et al.,1997,Nature 387 :512-516 ; Higashiyama et al.,1997, J. Biochem. 122 :675-680 ;Busfield et al.,1997, Mol. Cell. Biol. 17 :4007-4014 和 WO 97/09425,以上内容通过引用完整的合并于此。NRG-3 在如下文献资料中提及,如 Hijazi et al.,1998, Int. J. Oncol. 13 :1061-1067,其内容通过引用完整的合并于此。NRG-4 在如下文献资料中提及,如 Harari et al.,1999, Oncogene. 18 :2681-2689,其内容通过引用完整的合并于此。

[0009] NRG 与 EFG 受体家族的成员结合,该受体家族包括 EGFR、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4,其中每一个受体在多种细胞功能中都发挥重要的作用,包括细胞生长、分化和存活。它们都是蛋白酪氨酸激酶受体,由一个细胞外配体结合结构域、跨膜结构域和细胞质酪氨酸激酶结构域组成。NRG 结合至 ErbB3 或 ErbB4 的细胞外结构域后,能够诱导构象改变从而引起 ErbB3、ErbB4 和 ErbB2 之间形成异二聚体,或者 ErbB4 自身形成同源二聚体,这样就会导致受体细胞内 C-末端结构域的磷酸化。然后磷酸化的细胞内结构域与细胞内其他的信号蛋白结合,活化相应的下游 AKT 或 ERK 信号传导途径,并诱导一系列的细胞反应,比如刺激或抑制细胞增殖、细胞分化、细胞凋亡、细胞迁移或细胞粘附。在这些受体中,主要是 ErbB2 和 ErbB4 在心脏表达。

[0010] 已有研究表明 NRG1 的 EGF 类似区,约 50 至 64 个氨基酸,足以结合并活化这些受体。以前的研究表明纽兰格林-1 β (NRG-1 β) 能以高亲和力直接结合 ErbB3 和 ErbB4。孤儿受体 ErbB2 能与 ErbB3 或 ErbB4 形成异源二聚体并且其亲和力比 ErbB3 或 ErbB4 同源二聚体要高。神经发育的研究结果提示交感神经系统的形成需要完整的 NRG-1 β 、ErbB2 和 ErbB3 信号传导系统。靶向破坏 NRG-1 β 、或 ErbB2 或 ErbB4 后由于心脏发育缺陷而导致胚胎致死。最近的研究也突显了 NRG-1 β 、ErbB2 和 ErbB4 在心血管发育以及维持成年正常心脏功能方面具有重要作用。研究表明 NRG-1 β 能增强成年心肌细胞的肌小节的组织结构。短期施用一种重组的 NRG-1 β EGF 类似区能显著改善或防止三种不同心衰动物模型的心肌功能的恶化。更重要的是,NRG-1 β 能显著延长心衰动物的存活。这些效应使得 NRG-1 β 有望成为一种治疗多种普通疾病导致的心衰的广谱治疗物或先导化合物。然而,仍然需要一种应用 NRG 的更有效的方法,可以在临床上用来预防、治疗或延迟心衰和 / 或心脏肥大。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明的第一个方面是提供了对 ErbB 受体有高亲和力的纽兰格林多肽。在某些实施方案中,纽兰格林多肽包含神经调节蛋白的 EGF 功能域。在某些实施方案中,纽兰格林多肽包含人神经调节蛋白 β 2 异构体的 EGF 功能域。在某些实施方案中,对 ErbB 受体有高亲和力的纽兰格林多肽包含 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列。

[0013] 本发明的纽兰格林多肽比野生型全长神经调节蛋白对 ErbB 受体有更强的亲和力。除了与 ErbB 受体连接,本发明的纽兰格林多肽也具备一项或多项天然神经调节蛋白的生物功能。

[0014] 纽兰格林多肽的制备可以依据任何本技术领域内熟知的相关技术。在此提供制备纽兰格林多肽的典型的技术。在某些实施方案中,纽兰格林多肽可以是重组的。在某些实施方案中,纽兰格林多肽是合成的,例如通过液相或固相肽合成。

[0015] 本发明的另一个方面是提供了纽兰格林多肽相关的核酸、载体以及宿主细胞。该核酸或其互补序列编码纽兰格林多肽或其中的片段。核酸可以是双链或单链的 DNA 或 RNA,能被插入到合适的载体中以便增殖和纽兰格林多肽的表达。改造后的载体转入到合适的宿主细胞内,如可表达重组纽兰格林多肽的宿主细胞。

[0016] 本发明的另一个方面是提供了纽兰格林多肽在治疗和非治疗方面的应用。特别是纽兰格林多肽在预防、治疗或延迟各种心脏疾病及紊乱的应用。相应地,本发明提供包含纽兰格林多肽的药物制剂以及相关治疗方法。

[0017] 本发明的另一个方面是提供了治疗哺乳动物心衰的方法。在某些实施方案中,该方法包括将纽兰格林多肽注入哺乳动物体内。

[0018] 本发明的另一个方面是提供了诱导细胞内 ErbB 受体磷酸化的方法。在某些实施方案中,该方法包括用纽兰格林多肽接触细胞。

[0019] 本发明的另一个方面是提供了诱导并维持心脏细胞内的 AKT 信号通路的活化。在某些实施方案中,该方法包括用纽兰格林多肽接触心脏细胞。

[0020] 本发明的另一个方面是提供了诱导并维持心脏细胞内的 ERK 信号通路的活化。在某些实施方案中,该方法包括用纽兰格林多肽接触心脏细胞。

[0021] 图片简要说明

[0022] 图 1 显示不同浓度的 NRG55、NRG57 和 NRG59 对心肌细胞 AKT 磷酸化的影响。GADPH 作为对照。

[0023] 发明详述

[0024] A. 释义

[0025] 除另有定义,这里使用的所有技术及科技术语与本发明所属技术领域的普通技术人员理解含义相同。此处所提到的所有专利、申请、公开的申请以及其他出版物都通过引用完整的合并于此。如果本部分所提出的定义与通过引用合并于此的专利、申请、公开的申请以及其他出版物中提出的定义相反或不一致时,则以本部分提出的定义为准。

[0026] 除非特别指明,在此所用“一个”的意思是“至少一个”或“一个或多个”。

[0027] 此处所用“EGF 样功能域”或“EGF-like domain”是指由 neuregulin 基因所编码的可以结合并激活 ErbB2、ErbB3、ErbB4 或其异源或同源二聚体的多肽片段,并且与下述参考文献中描述的 EGF 受体结合区域具有结构相似性:WO 00/64400;Holmes 等, Science, 256:1205-1210(1992);美国专利 5,530,109 和 5,716,930;Hijazi 等, Int. J. Oncol., 13:1061-1067(1998);Chang 等, Nature, 387:509-512(1997);Carraway 等, Nature, 387:512-516(1997);Higashiyama 等, J. Biochem., 122:675-680(1997);以及 WO 97/09425,以上内容通过引用完整的合并于此。在某些实施方案中,EGF 样功能域结合并激活 ErbB2/ErbB4 或 ErbB2/ErbB3 异源二聚体。在某些实施方案中,EGF 样功能域包含 NRG-1 的受体结合区氨基酸。在某些实施方案中,EGF 样功能域是指 NRG-1 的第 177-226 位、177-237 位或 177-240 位氨基酸。在某些实施方案中,EGF 样功能域包含 NRG-2 的受体结合区氨基酸。在某些实施方案中,EGF 样功能域包含 NRG-3 的受体结合区氨基酸。在某些实施方案中,EGF

样功能域包含 NRG-4 的受体结合区氨基酸。在某些实施方案中, EGF 样功能域包含美国专利 5, 834, 229 中描述的氨基酸序列: Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro (SEQ ID NO :11)。

[0028] 此处所用的治疗特定疾病的活性成分的“有效剂量”是足以改善、或以某种方式减少该疾病相关症状的剂量。这一剂量也许能治愈疾病, 但典型的情况下是用来改善疾病的症状。

[0029] 此处所用的“活性成分”是用来诊断、治愈、缓解、治疗或预防人或其他动物所患疾病, 或者增强身体或心理健康的任何物质。

[0030] 此处所用的特定紊乱症状的“改善”是指通过施用特定的活性成分而永久的或暂时地、持续或瞬时地减轻症状, 而这一减轻能归因于或与施用该试剂有关。

[0031] 此处所用的“治疗”或“处理”是指可以使不适、紊乱或疾病的症状改善或向好的方向改变的任何方式。其效果可以是预防性的, 比如完全或部分防止某一疾病或其症状发生, 也可以是治疗性的, 比如部分或完全治愈某一疾病和 / 或该疾病引起的不利影响。治疗还包括此处所述组合物的任何药物用途。

[0032] 此处所用的“载体 (或质粒)”是指用来将异源 DNA 引入细胞以在其中表达或复制的分散组件。选择并使用这此载体对技术人员来说非常熟悉。表达载体包括能表达与调控序列连接之 DNA 的载体, 调控序列如启动子区能影响这些 DNA 片段的表达。因此, 表达载体指重组的 DNA 或 RNA 组件, 比如质粒、噬菌体、重组病毒或其他载体, 当被引入适当的宿主细胞就导致克隆的 DNA 表达。适当的表达载体是本领域的技术人员广知的, 包括那些在真核细胞和 / 或原核细胞复制的载体以及那些保持游离的或那些整合到宿主细胞基因组的载体。

[0033] 此处所用的“心肌细胞分化”是指以如下情况为特征的状态, DNA 合成减少 10% 以上、抑制其他因素刺激的 DNA 合成大于 10%、有序的肌小节结合和细胞 - 细胞粘联、MAP 激酶的持续活化、以及 p21^{Cip1} 的增强表达。进一步的讨论参见 W000/37095, 其内容通过引用完整地合并于此。

[0034] 此处所用的“射血分数 (ejection fraction)”或“EF”是指一次心搏从充满的左心室泵出的血液的比例。可用下列公式来定义: (左心室舒张末期容积 - 左心室收缩末期容积) / 左心室舒张末期容积。

[0035] 此处所用的“收缩分数 (fractional shortening)”或“FS”是指左心室收缩状态和舒张状态直径变化的比值。可用下列公式来定义: (左心室舒张末期内径 - 左心室收缩末期内径) / 左心室舒张末期内径。

[0036] 此处所用的“心衰”是指心脏不能以代谢的组织需要的速度泵血的心功能异常。心衰包括多种疾病状态如充血性心衰、心肌梗死、快速性心律不齐、家族性心肌肥大症、缺血性心脏病、先天性扩张性心肌症、心肌炎等等。心衰可以由多种因素引起, 包括, 但不限于: 缺血的、先天的、风湿的、或原发形式。慢性心脏肥大是一种明显的疾病状态, 是充血性心衰和心脏停跳的前兆。

[0037] 此处所用的“心肌梗死”是指冠状动脉阻断或血流中断导致的严重而持续的缺血引起的部分心肌的斑块性坏死。

[0038] 此处所用的“肌小节或肌小节结构的有序的、增强的排列”是指通过心肌细胞中

α -辅肌动蛋白免疫荧光染色展示的以收缩蛋白的整齐排列为特征的状态。细胞中 α -辅肌动蛋白的整齐排列可以通过显微镜及其相连的照相设备来识别。此处所用的“肌小节或肌小节结构的紊乱或不整齐”是与“肌小节或肌小节结构的有序的、增强的排列”相反的情况。

[0039] 此处所用的“细胞骨架结构的有序的或增强的排列”是指心肌细胞中经鬼笔环肽 (phalloidin) 染色显示的以肌动蛋白纤维有序排列为特征的状态。细胞中肌动蛋白纤维的整齐排列可以通过显微镜及其相连的照相设备来识别,如本发明图片中的例示。此处所用的“细胞骨架结构的紊乱或不整齐”是指与“细胞骨架结构的有序的,或增强的排列”相反的情况。

[0040] 此处所用的“蛋白”与“多肽”或“肽”的含义相同,除非文中另有明确说明。

[0041] 此处所用的“MAP 激酶的持续活化”是指细胞中 MAP 激酶——p42/44 的磷酸化状态维持至少 21 小时。W000/37095 里面有进一步的讨论,其内容通过引用合并于此。

[0042] “协同的”,“协同效应”或类似术语在此是用来描述通过联合一种或多种治疗试剂和一种或多种维甲酸化合物而获得的改善的治疗效果。尽管在某些领域里面协同效应意味着大于加和的效果(例如, $1+1 = 3$),但是在医疗领域,一种加和 ($1+1 = 2$) 或小于加和 ($1+1 = 1.6$) 效应也可以是协同的。比如,如果两种药物之一单独施用可抑制 50% 的心室肌细胞肥大的扩展,就不能指望两种药物联用可完全停止心室肌细胞肥大的发展。在许多情况下,由于不能接受的副作用,两种药物不能一起施用。在其他情况下,药物之间相互拮抗,在联合使用时减缓心室肌细胞肥大的发展小于 50%。因此,如果两种药物合用减缓心室肌细胞肥大的发展大于 50% 且不增加不能接受的副作用,就获得了协同效应。

[0043] 此处所用的“心脏肥大”是指特征如下的状况:单个心室肌细胞大小的增加,细胞大小的增加足以导致对病人作出临床诊断或足以认定细胞变大(例如,比非肥大细胞大两倍或更多)。它可能伴随着单个心肌细胞中收缩蛋白的积聚和胚胎基因表达的激活。

[0044] 用来检测心室肌细胞肥大的方法有体外法和体内法两种。体外检测心室肌细胞肥大的方法包括 W000/37095 中所描述的那些方法,比如细胞尺寸的增加以及心钠素 (ANP) 表达的增加。细胞尺寸的改变被用于一种评分系统来测定肥大的程度。可用倒置相差显微镜来观察这些改变,肥大的程度用人造的 7-0 的评分尺度来衡量,7 分表示完全肥大的细胞,3 分表示未刺激的细胞。3 分和 7 分所代表的状态可分别参见 Simpson 等 (1982) *Circulation Res.* 51:787-801 中的图 2A 和 B。肥大评分与细胞表面积 (μm^2) 的关系被发现呈线性(相关系数 = 0.99)。在苯肾上腺素诱导的肥大中,未暴露(正常)细胞的肥大评分为 3,细胞表面积为 $581 \mu\text{m}^2$;而完全肥大细胞的肥大评分为 7,表面积为 $1811 \mu\text{m}^2$,或约为正常值的 200%。肥大评分为 4 的细胞的表面积为 $771 \mu\text{m}^2$,或比未暴露细胞大约 30%;肥大评分为 5 的细胞的表面积为 $1109 \mu\text{m}^2$,或比未暴露细胞大约 90%;肥大评分为 6 的细胞的表面积为 $1366 \mu\text{m}^2$,或比未暴露细胞大约 135%。存在心室肌细胞肥大主要包括细胞表现出约 15% 的尺寸增加(肥大评分 3.5) 或更多。通过上述分析方法评分可反映肥大诱导剂诱导最大肥大反应能力的不同。例如,内皮素 (endothelin) 诱导的细胞尺寸增加的最大值大约为肥大评分 5 分。

[0045] 此处所用的“心脏肥大抑制”是指表征肥大的参数之一相对于肥大情况下有减小,或阻止表征肥大的参数之一相对于正常情况增大。例如,心室肌细胞肥大的抑制可通过测

量细胞尺寸相对于肥大情况下减小来显示。心肌细胞肥大的抑制是指相对于肥大状况下所观察到的大小细胞尺寸要减小 10% 或更多。优选的条件下,肥大的抑制意味着细胞尺寸的减少在 50% 或以上。参照用苯肾上腺素为诱导剂时的肥大分析计分法,这些减少分别相当于肥大计分约 6.5 或更小、5.0-5.5、和 4.0-5.0。当使用不同的诱导剂时,通过测量相对于诱导剂存在时的最大细胞尺寸(或肥大评分)的评分值来显示抑制。

[0046] 防止心肌细胞肥大是通过阻止细胞尺寸在足以诱导肥大的诱导剂浓度下相对于正常细胞增加来确定的。例如,防止肥大是指在最大刺激浓度的诱导剂存在时细胞尺寸相对于未诱导细胞增加不到 200%。优选的条件下,防止肥大意味着细胞尺寸相对于未诱导细胞增加小于 135%;最优的条件下,防止肥大意味着细胞尺寸相对于未诱导细胞增加小于 90%。相对于用苯肾上腺素为诱导剂时肥大计分分析法,在最大刺激浓度的苯肾上腺素存在时,防止肥大的肥大计分分别为约 6.0-6.5、5.0-5.5、和 4.0-5.0。

[0047] 肥大的体内测定包括测量心血管参数比如血压、心率、体循环阻力、收缩力、心跳力量、向心性肥大或扩张性肥大、左心室收缩压、左心室平均压、左心室舒张末期压、心输出量、每搏指数(stroke index)、组织学参数、以及心室大小和室壁厚度。用来测定体内心肌细胞肥大的发展和抑制的动物模型包括压力过载小鼠模型、右室失功能小鼠模型、转基因小鼠模型、以及心肌梗死大鼠模型。用来评估病人心肌细胞肥大的存在、发展及抑制的医学方法已广为人知,包括测量舒张和收缩参数、评估心室重量以及肺静脉流量。

[0048] 肥大可来自任何对维甲酸有反应的因素包括先天性病毒的、先天的、心脏营养性的、肌肉营养性的因素,或者作为缺血或缺血性损伤比如心肌梗死的结果。典型的情况是,进行治疗以阻止或减缓肥大的进程,尤其是在心脏损伤后,比如缺血发生后。优选的,为治疗心肌梗死,试剂在心肌梗死后立即给予,以预防或减轻肥大。

[0049] 此处所用的“活性单位”或“1U”是指能引起 50% 最大反应的标准产品的用量。换句话说,为了测定某一活性制剂的活性单位,必须测定 EC₅₀。例如,如果某一产品的 EC₅₀ 是 0.067 μg/ml,则这个量就是 1 个单位。进一步来说,如果使用了 1 μg 该产品,就是使用了 14.93U(1/0.067)。可以用本领域已知的任何方法来测定 EC₅₀,包括下面的实施例中发明人所使用的方法。活性单位的测定对于遗传工程产品和临床使用药物的质量控制是重要的,这样可以使不同医药品和 / 或不同批次的产品以同样的标准来定量。

[0050] 在某些例子中,纽兰格林的单位是通过用激酶受体活化酶联免疫吸附法(KIRA-ELISA)测量纽兰格林的活性而确定的,如 W003/099300 和 Sadick et al., 1996, *Analytical Biochemistry*, 235 :207-14 中详细描述,其内容通过引用而完整地合并于此。简言之,该方法测量了纽兰格林诱导的贴壁的乳腺癌细胞系 MCF-7 的 ErbB2 活化和磷酸化。用 Triton X-100 裂解液来溶解膜蛋白,其中的受体被包被在 ELISA 孔中的与 ErbB3 或 ErbB4 无交叉反应的 ErbB2 特异性抗体(如 H4)捕获。受体的磷酸化程度通过抗磷酸化酪氨酸抗体 ELISA 测定。

[0051] B. 纽兰格林

[0052] 本发明提供的纽兰格林多肽能结合 ErbB 受体。在某些实施方案中,纽兰格林多肽对 ErbB 受体亲和力加强。在某些实施方案中,纽兰格林多肽含有神经调节蛋白 EGF 功能区域。在某些实施方案中,纽兰格林多肽含有人神经调节蛋白 β2 异构体的 EGF 功能区域。在某些实施方案中,纽兰格林多肽含有 SEQ ID NO :3、5、7、9 的氨基酸序列。

[0053] 在某些实施方案中,纽兰格林多肽含有 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列。在更优的实施方案中,纽兰格林多肽为 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列。

[0054] 在某些实施方案中,纽兰格林多肽含有 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列。在更优的实施方案中,纽兰格林多肽为 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列。

[0055] 在某些实施方案中,纽兰格林多肽含有 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列。在更优的实施方案中,纽兰格林多肽为 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列。

[0056] 本发明的纽兰格林多肽比野生型全长神经调节蛋白对 ErbB 受体有更强的亲和力。除了与 ErbB 受体连接,纽兰格林多肽也具备一项或多项天然神经调节蛋白的生物功能。

[0057] 纽兰格林多肽的制备

[0058] 纽兰格林多肽的制备可以依据任何明显的相关技术。制备纽兰格林多肽的典型的技术可参见,如美国专利 7, 226, 907 和 5, 367, 060, W094/026298 和 W003/099300, 其内容通过引用完整地合并于此。

[0059] 本发明纽兰格林多肽的制备可以依据任何本技术领域内熟知的相关技术。在某些实施方案中,纽兰格林多肽是合成的,例如通过液相或固相肽合成,参见 Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85 :2149 ;Fields et al., 1990, Int JPept Protein Res. 35 :161-214 ; Fields et al., 1991, Pept Res. 4 :95-101, 其内容通过引用完整地合并于此。

[0060] 在优化的实施方案中,纽兰格林多肽可以从天然资源、合成或商业途径获得。在某些实施方案中,纽兰格林多肽可以通过重组表达蛋白之后纯化获得。

[0061] 纽兰格林多肽可以用本领域已知的任何技术纯化,如高效液相层析,离子交换层析,凝胶电泳,亲和层析等。本领域技术人员熟知具体的纽兰格林多肽的纯化条件。

[0062] 纽兰格林多肽的使用

[0063] 纽兰格林多肽可以根据本领域的熟练技术人员判断来施用。这方面的例子包括如下文件描述的方法:美国专利 7, 226, 907 和 5, 367, 060, W094/026298 和 W003/099300, 其内容通过引用完整地合并于此。

[0064] 纽兰格林多肽对治疗一系列疾病和紊乱有效果。典型的疾病和紊乱包括心脏疾病如心衰,病毒性心肌炎,扩张(充血)型心肌病(DCM),心脏毒性或心肌梗塞。

[0065] 在某些实施方案中,本发明提供了一种方法,通过施用有效剂量的纽兰格林多肽来治疗心衰。

[0066] 纽兰格林多肽可能以药物制剂的形式来施用。

[0067] 纽兰格林多肽的施用方式由本领域熟练的技术人员判断,包括但不限于口服、静脉注射、灌胃给药、直肠给药、腹(膜)腔内给药或脑室注射给药。

[0068] 在一个优选的实施方案中,用于给药的组合物是药物制剂。药物制剂可以是含有预防或治疗剂量的一种或多种预防或治疗的药剂(例如,含有纽兰格林多肽和其他预防或治疗药剂的复合体),和药学上可接受的载体或赋形剂。在某个实施方案和本文中,“药学上可接受的”是指已被国家相关部门通过的或是在美国制药学或其他被广泛认可的制药学上记载的可用于动物特别是人身上的。“载体”是指稀释剂、佐剂(如弗氏完全佐剂和不完全佐剂)、赋形剂或其它帮助治疗剂施用的载体。药物载体可以是无菌的液体,如水和油,油包括石油、动物油、植物油或合成的油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等之类的。通

过静脉注射药物制剂时最佳的载体是水。在制备注射剂型合剂时,可以采用盐水、葡萄糖和甘油液体。合适的药学载体的例子在 E. W. Martin 写的《雷明顿制药学》(Remington's Pharmaceutical Sciences) 中有描述。

[0069] 典型的药物制剂和剂型含有一种或多种赋形剂。合适的赋形剂药学领域的熟练技术人员公知,包括但不限于淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、云母、氯化钠、脱脂乳粉、丙烯、乙二醇、水、酒精等之类的。某种赋形剂是否适合整合到药物制剂或剂型取决于该领域公知的很多因素,包括但不限于,剂型施用于病人的方式和剂型中的特殊的活性组分。如有需要,制剂或单一的剂型可以含有微量的湿润剂、乳化剂或 pH 缓冲剂。

[0070] 药物制剂含有本领域熟知的赋形剂或是刊登在如美国药典 (USP) SP (XXI) / NF (XVI) 上的赋形剂。一般来说,无乳糖制剂含有活性组分,粘合剂 / 填充剂,和药学上兼容并且剂量可接受的润滑剂。典型的无乳糖剂型含有活性组分,微晶纤维素,预糊化淀粉和硬脂酸镁。

[0071] 本发明的药物制剂和剂型含有一种或多种降低活性组分分解速率的化合物。该化合物此处称为“稳定剂”,它包括但不仅限于抗氧化剂如抗坏血酸, pH 缓冲液或盐缓冲液。

[0072] 药物制剂和单一剂型可采用以下形式:溶液、悬浮、乳剂、药片、胶囊、粉末、持续释放形式等之类。口服的制剂含有标准的载体如药品级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。该药剂和剂型含有预防或治疗剂量的纯化的起预防或治疗作用的药剂,为了能够较好得施用给病人会和一定量的载体混合以赋形。药剂形式应该适合给药的方式。在优化的实施方案中,药物制剂或单一剂型应该是无菌的并且以合适的形式施用,优选的是对象是动物,更优选的对象是哺乳动物,最优选的对象是人。

[0073] 含有纽兰格林的药物制剂的形式应能适应其给药方式。给药方式包括但不局限于注射(比如静脉、肌肉、皮下或皮内注射)、口服、口腔(如舌下)、吸入、鼻内、通过皮肤、局部、通过粘膜、肿瘤内、滑膜内和直肠给药。在某个特定实施方案中,制剂的制定可参考某种常规程序,比如用来制备以静脉或皮下或肌肉注射、口服、鼻内或局部给药方式施用给人的药物制剂的常规程序。在某个实施例中,药物制剂的形式符合皮下注射给药的常规方式。典型地,静脉注射给药方式的制剂是无菌等渗溶液。如有需要,该制剂也能含有增溶剂和局部麻醉剂如利多卡因以便缓解注射部位的疼痛。

[0074] 剂型包括但不局限于以下形式:药片、囊片、胶囊如软弹性明胶胶囊、扁囊剂、片剂、锭剂、分散剂、栓剂、药膏、泥罨剂(膏状药)、糊剂、粉末、敷料、乳剂、膏药、溶液、药物贴片、气溶剂(如喷鼻剂或吸入器)、胶体;液体剂型适合口服或粘膜给药的病人,液体剂型包括悬浮液(如含水或非水悬浮液、水包油乳化液或油包水乳化液)、溶液和万能药;液体剂型适合注射用药的病人;无菌固体(如晶体或非晶体)可通过重建变成适合注射用药病人的液体剂型。

[0075] 根据用途不同,纽兰格林多肽的制剂、形状和剂型类别也将不同。举例来说,用于急性治疗紊乱的剂型可能比相同疾病长期治疗的剂型含有更多的纽兰格林多肽。同样地,针对不同癌症有治疗效果的剂型也各不相同。类似地,注射剂型含有的活性组分的量比治疗相同疾病或紊乱的口服剂型的量少。本领域熟练技术人员熟知上述制剂方式以及本发明中所包含的其它特殊剂型各不相同。详见《雷明顿制药学》,第 18 版, Mack 出版社, 伊斯顿,

宾夕法尼亚州 (1990)。

[0076] 纽兰格林多肽给药可以根据本领域的熟练技术人员的判断以任何途径进行,包括但不局限于这些:口服、静脉注射、灌胃给药、十二指肠给药、腹膜内给药或脑室注射给药。

[0077] C. 剂量和给药途径

[0078] 本发明中的纽兰格林的用量将随着疾病或不适状况的性质和严重程度不同、以及活性组分的给药途径的不同而变化。给药频率和剂量也将随着每一个病人的特殊因素而变化,取决于特定的治疗(例如,治疗性或预防性制剂)、机能紊乱、疾病、或不适的严重程度、给药途径、以及年龄、体重、反应情况、还有病人的既往用药史。可以从体外或动物模型测试系统获得的剂量-反应曲线来推测有效剂量。

[0079] 纽兰格林的可效仿的使用剂量包括给药对象每公斤体重用多少毫克或微克的纽兰格林(如,约1微克每公斤体重至约500毫克每公斤体重、约100微克每公斤体重至约5毫克每公斤体重、或约1微克每公斤体重至约50微克每公斤体重)。如给病人的用药剂量,典型情况下是病人每公斤体重所用的活性肽的重量为0.001mg/kg-15mg/kg。适宜的用量还有:0.001mg/kg-15mg/kg、0.005mg/kg-10mg/kg、0.01mg/kg-5mg/kg、0.001mg/kg-4mg/kg、0.005mg/kg-3mg/kg、0.01mg/kg-2mg/kg、0.001mg/kg-1mg/kg、0.005mg/kg-0.5mg/kg、0.010mg/kg-0.2mg/kg、0.005mg/kg-0.050mg/kg。

[0080] 纽兰格林的可效仿的使用剂量还包括给药对象每公斤体重用多少单位(U)或单位量的纽兰格林(如,约1U每公斤体重至约5,000U每公斤体重、约10U每公斤体重至约1,000U每公斤体重、或约100U每公斤体重至约500U每公斤体重)。如给病人的用药剂量,典型情况下是病人每公斤体重所用的活性肽的单位为10U/kg-1,000U/kg。适宜的用量还有:1U/kg-10,000U/kg、1U/kg-5,000U/kg、10U/kg-5,000U/kg、10U/kg-1,000U/kg、50U/kg-2,000U/kg、50U/kg-1,000U/kg、50U/kg-500U/kg、100U/kg-1,000U/kg、100U/kg-500U/kg、100U/kg-200U/kg。

[0081] 一般而言,对于此处所描述的多种疾病,本发明的方法中所推荐的纽兰格林每天的用量范围为:每天约0.001mg至1000mg。特定情况下,每天的用药总量的范围可为:0.001mg-15mg、0.005mg-10mg、0.01mg-5mg、0.001mg-4mg、0.005mg-3mg、0.01mg-2mg、0.001mg-1mg、0.005mg-0.5mg、0.010mg-0.2mg。给病人安排治疗时,开始可以用低剂量,比如每天约0.1 μ g-1 μ g,如果必要的话可以增至每天约20 μ g-1,000 μ g,可以单剂量使用也可以分次使用,取决于病人的整体反应。在某些情况下,所用活性组分的剂量有必要超出此处所讲的范围,这对于本领域的普通技术人员来说是显而易见的。此外,应该指出的是临床医生或治疗医师应该知道根据病人个体的反应情况从而怎样以及何时中断、调整或终止治疗。在一些具体情况下,纽兰格林的使用量为约1U/天-10,000U/天。在某些具体情况下,纽兰格林的使用量为约1U/天-5,000U/天。在某些具体情况下,纽兰格林的使用量为约10U/天-2,000U/天。在某些具体情况下,纽兰格林的使用量为约10U/天-1,000U/天。在某些具体情况下,纽兰格林的使用量为约100U/天-200U/天。

[0082] 纽兰格林还可以通过剂量计划表或“治疗周期”来给药。治疗周期内每天的剂量在上面已经详细列出。治疗周期可以持续2天、5天、7天、10天、2周、3周、4周、5周或6周。

[0083] 在一些具体情况下,在治疗周期内每天都使用纽兰格林。在某些具体情况下,在一个治疗周期内纽兰格林的持续用药时间为3、4、5、6、7、8、9、10、11或12天。在一些具体情

况下,在一个治疗周期的第一天给予纽兰格林,在治疗周期余下的一天或数天则不给予纽兰格林。在某些具体情况下,在一个治疗周期内,每天给予纽兰格林并持续 3、5、7 或 10 天,该周期内余下的时间则不给药。

实施例

[0084] 实施例 1 纽兰格林多肽化学合成

[0085] 纽兰格林多肽 NRG53(SEQ ID NO :3),纽兰格林多肽 NRG55(SEQ ID NO :4),纽兰格林多肽 NRG57(SEQ ID NO :5),纽兰格林多肽 NRG59(SEQ ID NO :6),纽兰格林多肽 NRG61(SEQ ID NO :1) 由上海吉尔生化公司合成。

[0086] NRG61 含有如下氨基酸序列 :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 AsnGlu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln(SEQ ID NO :1),即人 NRG-1 氨基酸序列 177-237。

[0087] 上述氨基酸序列对应的核酸序列为 :agccatcttg taaaatgtgc ggagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggggagtgc ttcattggtga aagaccttc aaaccctcg agatacttgt gcaagtgcc aatgagttt actggtgatc gctgccaaaa ctacgtaatg gcgagcttct acaaggcgga ggagctgtac cag(SEQ ID NO :2)。

[0088] 纽兰格林多肽 EGF53 的氨基酸序列如下 :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(SEQ ID NO :3)。

[0089] 上述氨基酸序列对应的核酸序列为 :agccatcttg taaaatgtgc ggagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggggagtgc ttcattggtga aagaccttc aaaccctcg agatacttgt gcaagtgcc aatgagttt actggtgatc gctgccaaaa ctacgtaatg gcgagcttc(SEQ ID NO :4)。

[0090] 纽兰格林多肽 NRG55 的氨基酸序列如下 :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(SEQ ID NO :5)。

[0091] 上述氨基酸序列对应的核酸序列为 :agccatcttg taaaatgtgc ggagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggggagtgc ttcattggtga aagaccttc aaaccctcg agatacttgt gcaagtgcc aatgagttt actggtgatc gctgccaaaa ctacgtaatg gcgagcttct acaag(SEQ ID NO :6)。

[0092] 纽兰格林多肽 NRG55 的氨基酸序列如下 :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(SEQ ID NO :5)。

[0093] 上述氨基酸序列对应的核酸序列为 :agccatcttg taaaatgtgc ggagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggggagtgc ttcattggtga aagaccttc aaaccctcg agatacttgt gcaagtgcc aatgagttt actggtgatc gctgccaaaa ctacgtaatg gcgagcttct acaag(SEQ ID

NO :6)。

[0094] 纽兰格林多肽NRG57的氨基酸序列如下: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(SEQID NO :7)。

[0095] 上述氨基酸序列对应的核酸序列为:agccatcttg taaaatgtgc ggagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggggagtgc ttcattggtga aagaccttc aaaccctcg agatacttgt gcaagtgcc aatgagttt actggtgatc gctgcaaaa ctacgtaatg gcgagcttct acaaggcgga g(SEQ ID NO :8)。

[0096] 纽兰格林多肽NRG59的氨基酸序列如下: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(SEQ ID NO :9)。

[0097] 上述氨基酸序列对应的核酸序列为:agccatcttg taaaatgtgc ggagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggggagtgc ttcattggtga aagaccttc aaaccctcg agatacttgt gcaagtgcc aatgagttt actggtgatc gctgcaaaactacgtaatg gcgagcttct acaaggcgga ggagctg(SEQ ID NO :10)。

[0098] 将上述多肽分别溶解在 Buffer 1(0.1M Na_2HPO_4 ,0.1M 柠檬酸,6M 尿素,1mM EDTA- Na_2 ,5mM DTT,pH8.0)中,浓度为1mg/ml,溶解液放置室温1小时,将1ml溶解液和9ml Buffer2(0.01M Na_2HPO_4 ,0.01M 柠檬酸,6M 尿素,1mM EDTA- Na_2 ,0.5mM GSSG,0.5mM GSH,pH8.0)混合,多肽终浓度为0.1mg/ml。再将混合液在室温搅拌90分钟,之后4℃放置16小时。用交联葡聚糖凝胶G25分离样本并收集溶解在 Buffer 3(20mM Na_2HPO_4 ,20mM NaH_2PO_4 ,pH6.0)中。

[0099] 实施例2 受体与化学合成的纽兰格林多肽的结合

[0100] 收集MCF-7细胞,计数、离心并重悬于DMEM(10%血清,9μg/ml胰岛素)中,细胞密度为 5×10^4 /ml。铺96孔板,每孔加入100μl悬浮液,37℃过夜。第二天用PBS洗三遍细胞,换液用无血清DMEM培养24小时。

[0101] 用包被缓冲液(50mM Na_2CO_3 - NaHCO_3 ,pH9.6)稀释ErbB2抗体H4(ErbB2单克隆抗体,泽生)到6μg/ml,加到96孔板中,每孔50μl。4℃反应过夜使抗体与板结合。

[0102] 吸去MCF-7细胞中的DMEM培养液,将NRG、NRG53、NRG55、NRG57、NRG59、NRG61用DMEM经连续稀释后加入孔中,每孔100μl。空白对照仅加DMEM。37℃孵育20分钟,用PBS缓冲液洗一遍,再加入100μl/孔裂解缓冲液(50mM Hepes,pH8.0,150mM NaCl,2mM 原钒酸钠,0.01%硫汞撒,1% Triton X-100和1片蛋白酶抑制剂混合偏/25ml),4℃裂解30分钟,之后轻晃板使细胞从板上脱落,离心15,000rpm 15分钟。

[0103] 抗体包被的板用洗液(10mM PBS,pH7.4,0.05% Tween 20)冲洗5遍,每孔加入200μl 15%脱脂牛奶的洗液,37℃孵育2小时,再用洗液洗3次。

[0104] 将裂解后的细胞液按每孔90μl加入相应的包被板中,37℃孵育1小时,之后用洗液洗5遍,加入100μl合适浓度的辣根过氧化氢酶(HRP)联磷酸酪氨酸抗体(圣克鲁斯生物技术),37℃孵育1小时。洗液洗5遍,加入新鲜的准备好的HRP底物溶液(50mM 柠檬酸,

100mM Na_2HPO_4 , pH5.0, 0.2mg/ml 四甲基联苯胺 (TMB), 0.003% H_2O_2 , 37°C 共孵育 10 分钟。最后每孔加入 50 μl 2M H_2SO_4 破坏 HRP 活性以终止反应。在酶标仪 (BIORAD Model 550) 上测量 450nm 每孔 OD 值, EC50 是达到最大吸光值一半的纽兰格林多肽的浓度。EC50 值越低, 受体与纽兰格林多肽的亲合力越高。

[0105] NRG (全长野生型神经调节蛋白 β 2 肽段)、NRG53、NRG55、NRG57、NRG59 和 NRG61 的 EC50 值如表 1 所示。

[0106] 表 1 NRG、NRG53、NRG55、NRG57、NRG59 和 NRG61 的 EC50 值

[0107]

样品	EC50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
NRG	0.2772
NRG53	0.814
NRG55	0.0492
NRG57	0.9783
NRG59	0.4605
NRG61	1.439

[0108] 如表 1 所示, NRG55 的 EC50 值远低于 NRG 的 EC50 值

[0109] 实施例 3 心肌细胞中纽兰格林多肽对 AKT 磷酸化的影响

[0110] 为了研究心肌细胞中合成的多肽对 ErbB2 和 ErbB4 信号通路的影响, 取用新生大鼠左心室的心脏细胞。

[0111] 在有血清的培养基中培养心脏细胞, 培养两天, 当细胞长满约 80% 时, 将培养基换成无血清培养基。培养 24 小时后, 各孔单独加入不同量的合成的纽兰格林多肽或神经调节蛋白, 反应 20 分钟。之后吸去培养基, 加入凝胶电泳上样缓冲液以裂解细胞, 之后收集样品并上样, 开始凝胶电泳做蛋白质印迹分析。

[0112] 图 1 显示的是不同浓度的纽兰格林多肽对 AKT 磷酸化的影响。如图 1 所示, NRG57 和 NRG59 几乎能达到 NRG 的同等功效, 而 NRG55 比 NRG 有更强的磷酸化作用。结果显示 NRG55 可能是治疗心脏疾病的更有效的多肽。

[0113] 本发明的范围不局限于实施例的描述。对本发明可以进行许多修改和变化, 而不背离其精神和范围, 这对本领域的技术人员将是显而易见的。这里所述的具体实施方案仅通过实施例加以提供, 本发明仅由所附权利要求以及与之等效的全部范畴所限定。

[0001]

序列表

<110> 上海泽生科技开发有限公司

<120> 纽兰格林及其用途

<130> ZS-024-228

<150> US 61/118,566

<151> 2008-11-28

<160> 11

<210> 1

<211> 61

<212> PRT

<213> 人类

<400> 1

```

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1           5           10           15
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
           20           25           30
Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
           35           40           45
Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln
           50           55           60

```

<210> 2

<211> 183

<212> DNA

<213> 人类

<400> 2

```

agccatcttg t aaaatgtgc g gagaaggag a aaactttct g tgtgaatgg a ggggagtgc 60
ttcatggtga a agaccttc a aaccctcg a gatacttgt g caagtgcc a aatgagttt 120
actggtgatc g ctgcaaaa c tacgtaatg g cgagcttct a caaggcggg a gagctgtac 180
cag 183

```

[0002]

<210> 3
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 3
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 35 40 45
 Val Met Ala Ser Phe
 50

<210> 4
 <211> 159
 <212> DNA
 <213> 人类

<400> 4
 agccatcttg t aaaatgtgc g gagaaggag a aaactttct g tgtgaatgg a ggggagtgc 60
 ttcatggtga a agaccttcc a aacctctcg a gatacttgt g caagtgcc a aatgagttt 120
 actggtgatc g ctgccaaaa c tacgtaatg g cgagcttc 1 59

<210> 5
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 5
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 35 40 45
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys
 50 55

[0003]

<210> 6

<211> 165

<212> DNA

<213> 人类

<400> 6

agccatcttg t aaaatgtgc g gagaaggag a aaactttct g tgtgaatgg a ggggagtgc 60

ttcatggtga a agaccttc a aaccctcg a gatacttgt g caagtgcc a aatgagttt 120

actggtgatc g ctgcaaaa c tacgtaatg g cgagcttct a caag 1 65

<210> 7

<211> 57

<212> PRT

<213> 人类

<400> 7

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
35 40 45

Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu
50 55

<210> 8

<211> 171

<212> DNA

<213> 人类

<400> 8

agccatcttg t aaaatgtgc g gagaaggag a aaactttct g tgtgaatgg a ggggagtgc 60

ttcatggtga a agaccttc a aaccctcg a gatacttgt g caagtgcc a aatgagttt 120

actggtgatc g ctgcaaaa c tacgtaatg g cgagcttct a caaggcgga g 1 71

[0004]

<210> 9
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 9
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 35 40 45
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu
 50 55

<210> 10
 <211> 177
 <212> DNA
 <213> 人类

<400> 10
 agccatcttg t aaaatgtgc g gagaaggag a aaactttct g tgtgaatgg a ggggagtgc 60
 ttcatggtga a agaccttcc a aaccctctg a gatacttgt g caagtgcc a aatgagttt 120
 actggtgatc g ctgccaaaa c tacgtaatg g cgagcttct a caaggcgga g gagctg 1 77

<210> 11
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 11
 Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met
 1 5 10 15
 Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro
 20

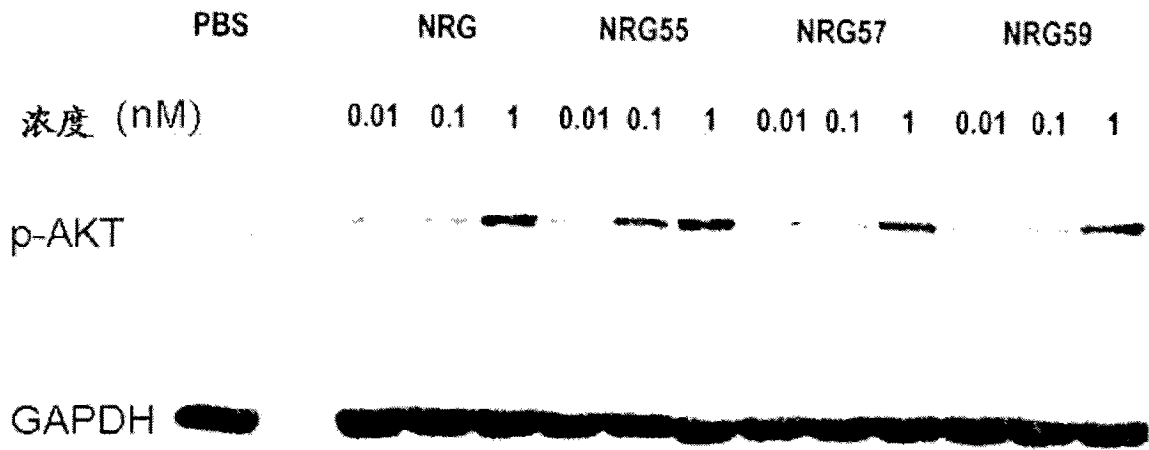


图 1