(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118633024 A
(43)申请公布日 2024.09.10

(21)申请号 202280085090.1
(22)申请日 2022.12.20
(30)优先权数据
10-2021-0183885 2021.12.21 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.06.21
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2022/020770 2022.12.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/121199 KO 2023.06.29
(71)申请人 财团法人峨山社会福祉财团
地址 韩国
申请人 蔚山大学校产学协力团
人文景观有限公司
(72)发明人 李范熙 张旼厚 许善熙 都孝尚 姜旼志
(74)专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243
专利代理师 许静 宋海花
(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
C12Q 1/6883(2006.01)
A61K 31/4245(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)

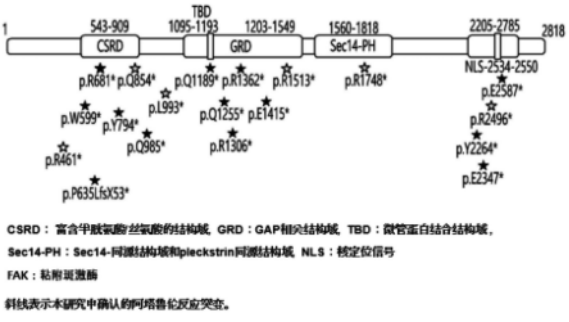
权利要求书3页 说明书15页 附图4页

(54)发明名称

作为神经纤维瘤病的治疗和诊断靶点的被激活的Ras及其用途

(57)摘要

本发明涉及一种使用Ras活性程度预测对神经纤维瘤病治疗药物的易感性的生物标志物组合物以及包括Ras活性抑制剂的用于预防或治疗神经纤维瘤病的药物组合物,其中,生物标志物组合物通过在个体的生物样品中与GTP结合而被激活的RAS(Ras-GTP)蛋白和被激活的p-ERK蛋白或编码所述蛋白质的基因的表达水平的简单方法,可以准确地诊断对神经纤维瘤治疗药物的易感性,并且由于药物组合物抑制Ras蛋白的活性,因此将有效地用于预防或治疗Ras蛋白的活性程度增加的神经纤维瘤病。



CN 118633024 A

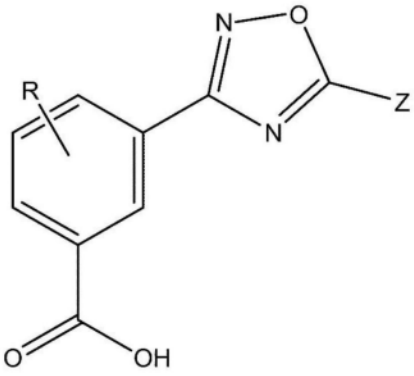
1.一种用于预测对神经纤维瘤病治疗药物的易感性的生物标志物组合物,其包括制剂,所述制剂测量(1)选自由与GTP结合而被激活的RAS(Ras-GTP)蛋白和被激活的p-ERK蛋白组成的组中的任意一种或多种蛋白质或

(2)编码所述蛋白质的基因的表达水平。

2.根据权利要求1所述的用于预测对神经纤维瘤病治疗药物的易感性的生物标志物组合物,其中,

所述神经纤维瘤病治疗药物为下面的化学式1所示的化合物或其药学上可接受的盐:

[化学式1]



在所述化学式中,

Z是卤素、羟基、被取代或未被取代的烷基、被取代或未被取代的烷氧基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基、被取代或未被取代的杂环或者被取代或未被取代的杂环烷基;

R是氢或卤素。

3.根据权利要求2所述的用于预测对神经纤维瘤病治疗药物的易感性的生物标志物组合物,其中,

所述化学式1所示的化合物为3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]恶二唑-3-基]-苯甲酸。

4.根据权利要求1所述的用于预测对神经纤维瘤病治疗药物的易感性的生物标志物组合物,其中,

所述能够测量所述蛋白质的表达水平的制剂选自由与所述蛋白质特异性结合的单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、配体、肽核酸、核酸适配体和纳米颗粒组成的组。

5.根据权利要求1所述的用于预测对神经纤维瘤病治疗药物的易感性的生物标志物组合物,其中,

所述能够测量编码所述蛋白质的基因的表达水平的制剂选自由与所述基因特异性结合的引物对、探针和反义核苷酸组成的组。

6.根据权利要求1所述的用于预测对神经纤维瘤病治疗药物的易感性的生物标志物组合物,其中,

所述神经纤维瘤病在NF1基因中携带终止密码子突变。

7.一种用于预测对神经纤维瘤病治疗药物的易感性的试剂盒,其包括根据权利要求1至6中任一项所述的生物标志物组合物。

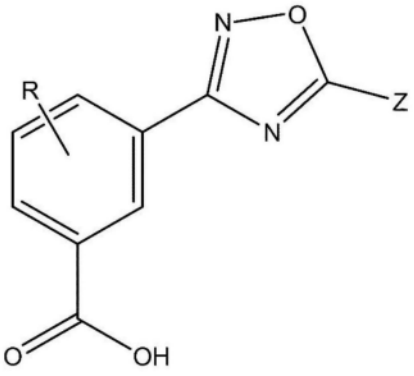
8.一种提供预测对神经纤维瘤病治疗药物的易感性而所需的信息的方法,其包括:在从个体中获得的生物样品中,

测量(1)选自由与GTP结合而被激活的RAS(Ras-GTP)蛋白和被激活的p-ERK蛋白组成的组中的任意一种或多种蛋白质或

(2)编码所述蛋白质的基因的表达水平。

9.一种用于预防或治疗神经纤维瘤病的药物组合物,其包括下面的化学式1所示的化合物或其药学上可接受的盐作为活性成分:

[化学式1]



在所述化学式中,

Z是卤素、羟基、被取代或未被取代的烷基、被取代或未被取代的烷氧基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基、被取代或未被取代的杂环或者被取代或未被取代的杂环烷基;

R是氢或卤素。

10.根据权利要求9所述的用于预防或治疗神经纤维瘤病的药物组合物,其中,所述化学式1所示的化合物为3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]恶二唑-3-基]-苯甲酸。

11.根据权利要求9所述的用于预防或治疗神经纤维瘤病的药物组合物,其中,所述神经纤维瘤病在NF1基因中携带终止密码子突变。

12.根据权利要求9所述的用于预防或治疗神经纤维瘤病的药物组合物,其中,所述神经纤维瘤病的Ras蛋白活性程度增加。

13.一种生物标志物的用途,其包括制剂,

所述制剂能够测量(1)选自由与GTP结合而被激活的RAS(Ras-GTP)蛋白和被激活的p-ERK蛋白组成的组中的任意一种或多种蛋白质或

(2)编码所述蛋白质的基因的表达水平,从而预测对神经纤维瘤病治疗药物的易感性。

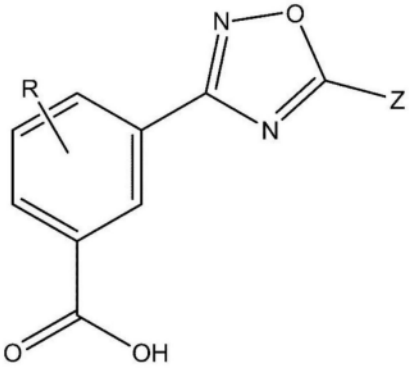
14.一种预测神经纤维瘤病患者对神经纤维瘤病治疗药物的易感性的方法,其包括:在从个体中获得的生物样品中,

测量(1)选自由与GTP结合而被激活的RAS(Ras-GTP)蛋白和被激活的p-ERK蛋白组成的组中的任意一种或多种蛋白质或

(2)编码所述蛋白质的基因的表达水平。

15.一种预防或治疗神经纤维瘤病的方法,其包括向个体施用包括下面的化学式1所示的化合物或其药学上可接受的盐作为活性成分的组合物:

[化学式1]



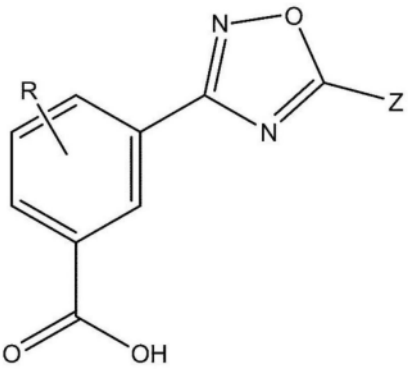
在所述化学式中，

Z是卤素、羟基、被取代或未被取代的烷基、被取代或未被取代的烷氧基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基、被取代或未被取代的杂环或者被取代或未被取代的杂环烷基；

R是氢或卤素。

16.一种包括下面的化学式1所示的化合物或其药学上可接受的盐作为活性成分的组合物在制备用于预防或治疗神经纤维瘤病的治疗药物中的用途：

[化学式1]



在所述化学式中，

Z是卤素、羟基、被取代或未被取代的烷基、被取代或未被取代的烷氧基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基、被取代或未被取代的杂环或者被取代或未被取代的杂环烷基；

R是氢或卤素。

17.一种神经纤维瘤病治疗药物的筛选方法，其包括：

(a)使携带NF1基因突变的生物样品与受试物接触；以及

(b)在所述被接触的生物样品中，测量(1)选自由与GTP结合而被激活的RAS(Ras-GTP)蛋白和被激活的p-ERK蛋白组成的组中的任意一种或多种蛋白质或(2)编码所述蛋白质的基因的表达水平。

作为神经纤维瘤病的治疗和诊断靶点的被激活的Ras及其用途

技术领域

[0001] 涉及一种作为神经纤维瘤病的治疗和诊断靶点的被激活的Ras及其用途。

背景技术

[0002] 神经纤维瘤病I型(neurofibromatosis type 1,NF1)是一种常染色体显性遗传病,它是全球发病率较高的遗传病之一,每3000人中就有1人发病。该遗传病是由NF1基因突变引起的,其特征是多发性牛奶咖啡斑以及皮肤上出现神经纤维瘤,不同程度的神经系统、骨骼系统表现和肿瘤性表现可能会对患者产生重大影响。NF1患者具有罹患中枢和末梢神经系统肿瘤的风险,该比率比一般人群高1000倍。

[0003] 现有的神经纤维瘤病I型的唯一治疗方法是对症疗法,其包括化疗、放射治疗和外科手术切除等,然而,当该疾病在多个器官多发时,通常无法进行手术。

[0004] 近日,作为MEK抑制剂的司美替尼(selumetinib)获得FDA和韩国国内的孤儿药资格认定,以用作神经纤维瘤病I型患者的非侵入性治疗药物。据报道,另一种治疗药物,即作为酪氨酸激酶抑制剂的卡博替尼(Carbozantinib)在临床试验中显现出安全性和肿瘤抑制作用,但其局限性在于不能缩小或完全消除各种肿瘤。此外,由于神经纤维瘤病I型患者对上述所有治疗药物并不是都具有反应,因此需要更多的治疗药物。

[0005] 另一方面,对韩国神经纤维瘤病患者的基因突变类型的调查结果显示,约30%的患者携带终止密码子突变(stop-codon mutation)。此外,最近,可通读(read-through)提前终止密码子的阿塔鲁伦(Ataluren;PTC THERAPEUTICS,美国)作为肌肉疾病的治疗药物正被临床研究当中,并且有人提到其具有潜力,有望成为终止密码子突变的神经纤维瘤病患者的治疗药物,但目前尚无对该药物功效的研究。

发明内容

[0006] 技术问题

[0007] 一方面提供一种生物标志物组合物,其能够使用Ras活性程度或p-ERK活性程度来预测神经纤维瘤病患者对通读提前终止密码子的化合物的易感性。

[0008] 另一方面提供一种用于预测神经纤维瘤病患者对包括所述组合物的所述化合物的易感性的试剂盒。

[0009] 再一方面提供一种使用所述生物标志物组合物来提供预测神经纤维瘤病患者对所述化合物的易感性而所需的信息的方法。

[0010] 再一方面提供一种用于预防或治疗神经纤维瘤病的药物组合物,其包括能够抑制Ras活性的化合物。

[0011] 再一方面包括以下步骤的神经纤维瘤病治疗药物的筛选方法:使携带NF1基因突变的生物样品与受试物接触;在所述被接触的生物样品中,测量(1)选自由与GTP结合而被激活的RAS(Ras-GTP)蛋白和被激活的p-ERK蛋白组成的组中的任意一种或多种蛋白质或

(2)编码所述蛋白质的基因的表达水平。

[0012] 再一方面提供一种生物标志物的用途,其包括制剂,所述制剂能够测量(1)选自由与GTP结合而被激活的RAS(Ras-GTP)蛋白和被激活的p-ERK蛋白组成的组中的任意一种或多种蛋白质或(2)编码所述蛋白质的基因的表达水平,从而预测对于神经纤维瘤病治疗药物的易感性。

[0013] 再一方面提供一种预测神经纤维瘤病患者对神经纤维瘤病治疗药物的易感性的方法,其包括以下步骤:在从个体中获得的生物样品中,测量(1)选自由与GTP结合而被激活的RAS(Ras-GTP)蛋白和被激活的p-ERK蛋白组成的组中的任意一种或多种蛋白质或(2)编码所述蛋白质的基因的表达水平。

[0014] 再一方面提供一种预防或治疗神经纤维瘤病的方法,其包括向个体施用包括所述化合物或其药学上可接受的盐作为活性成分的组合物。

[0015] 再一方面提供一种包括所述化合物或其药学上可接受的盐作为活性成分的组合物在制备用于预防或治疗神经纤维瘤病的治疗药物中的用途。

[0016] 解决问题方法

[0017] 为了实现上述目的,一方面提供一种用于预测对神经纤维瘤病治疗药物的易感性的生物标志物组合物,其包括制剂,所述制剂能够测量(1)选自由与GTP结合而被激活的RAS(Ras-GTP)蛋白和被激活的p-ERK蛋白组成的组中的任意一种或多种蛋白质或(2)编码所述蛋白质的基因的表达水平。

[0018] 术语“RAS蛋白”是一种低分子量鸟苷三磷酸(Guanosine triphoshate,GTP)结合蛋白,其可以指存在同源异构体(isoform)的蛋白质,例如K-Ras蛋白、H-Ras蛋白和N-Ras蛋白等。Ras蛋白能够负责介导由各种细胞外刺激引起的细胞增殖、分化和黏附等信号从上游的酪氨酸激酶受体到下游的效应器的功能。

[0019] Ras蛋白与鸟苷三磷酸(Guanosine triphosphate,GTP)结合的状态(Ras-GTP)呈激活态,与鸟苷二磷酸(Guanosine diphosphate,GDP)结合的状态(Ras-GDP)呈非激活态,其通过改变激活态和非激活态的状态,可以调控细胞增殖等。另一方面,在人类癌症中,Ras蛋白发生高频率突变,已知由于这种突变导致Ras蛋白持续处于激活态。

[0020] 具有转化活性的激活态Ras存在对于与GDP或GTP的鸟嘌呤环或磷酸基团相互作用很重要的氨基酸突变,其可能表现为内在的GTP水解活性降低或GDP解离速率增加。根据其表达情况,细胞内与GTP结合的激活态的比例会增加,这可能会导致细胞增殖控制异常。与GTP结合的激活态Ras可以通过与Raf结合,从而直接控制从Raf到MAP激酶的丝氨酸-苏氨酸激酶级联。

[0021] 所述ERK可能是受Ras蛋白调控的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Ser/Thr protein kinase)之一。未被激活的ERK可以驻留在细胞质(cytoplasm)中,但被激活的ERK可以移动至细胞核。此外,被激活的ERK可以通过将靶蛋白磷酸化或激活其他蛋白激酶(protein kinases)以控制信号转导系统。

[0022] 术语“易感性”可以指特定药物是否对每个神经纤维瘤病患者表现出治疗效果。已知即使是被认定为对治疗神经纤维瘤病有效的治疗药物类型也会根据每个患者的情况,存在显现效果和不显现效果的情形。就像这样,治疗药物对于每个患者的神经纤维瘤病是否存在显现效果可以被称为对治疗药物的易感性。所述“易感性”可以与“对治疗的反应”互换

使用,并且“用于预测易感性”可以与“用于预测对治疗的反应”或“用于伴随诊断”互换使用。

[0023] 术语“伴随诊断(Companion Diagnosis)”可以指用于预测患者对治疗的反应的诊断技术。

[0024] 所述用于伴随诊断的组合物可以用于旨在提供以下内容:施用神经纤维瘤病治疗药物的必要性;对神经纤维瘤治疗药物产生耐药性的可能性;对神经纤维瘤治疗药物的易感性;或关于预测通过神经纤维瘤病治疗药物的治疗的预后的信息。

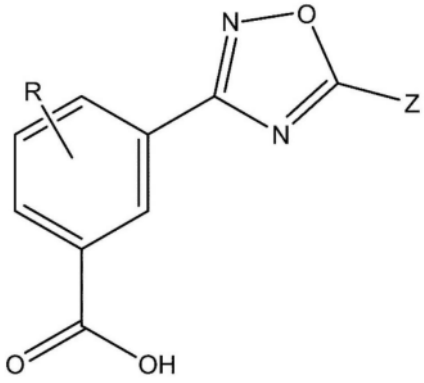
[0025] 术语“生物标志物”还可以称作伴随诊断标志物,其可以指生物样品中能够提前预测患者对特定药物治疗的反应的物质。其可以包括与从正常个体中获得的生物样品相比,从神经纤维瘤病患者身上采集的生物样品中增加或减少的诸如多肽或核酸(例如,mRNA等)、脂质、糖脂、糖蛋白或糖(例如,单糖、双糖、低聚糖等)等的有机生物分子等。

[0026] 在一具体实施例中,用于预测对所述神经纤维瘤病治疗药物的易感性的生物标志物可以是与GTP结合而被激活的RAS(Ras-GTP)蛋白或编码所述蛋白质的基因。如果其表达水平高,则可以判断为对神经纤维瘤治疗药物的易感性高,相反,如果其表达水平低,则可以判断为对神经纤维瘤治疗药物的易感性低。

[0027] 在一具体实施例中,用于预测对所述神经纤维瘤病治疗药物的易感性的生物标志物可以是被激活的p-ERK蛋白或编码所述蛋白质的基因。如果其表达水平高,则可以判断为对神经纤维瘤治疗药物的易感性高,相反,如果其表达水平低,则可以判断为对神经纤维瘤治疗药物的易感性低。

[0028] 可以是一种用于预测对神经纤维瘤病治疗药物的易感性的生物标志物组合物,其中,所述神经纤维瘤病治疗药物可以是下面的化学式1所示的化合物或其药学上可接受的盐:

[0029] [化学式1]

[0030] 

[0031] 在所述化学式中,

[0032] Z是卤素、羟基、被取代或未被取代的烷基、被取代或未被取代的烷氧基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基、被取代或未被取代的杂环或者被取代或未被取代的杂环烷基;

[0033] R可以是氢或卤素。

[0034] 除非另有说明,术语“卤素”可以指氟(F)、氯(Cl)、溴(Br)或碘(I)。

[0035] 除非另有说明,术语“羟基”可以指具有化学式-OH的基团,其是由一个氢原子和一个氧原子组成的单价原子团。

[0036] 除非另有说明,术语“烷基”可以指直链或支链的饱和烃残基。例如,“C_{1-10}烷基”是指由1至10个碳原子组成骨架的烷基。具体地,C_{1-10}烷基可以包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、叔戊基、仲戊基、新戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基等。

[0037] 除非另有说明,术语“烷氧基”可以指具有如上所定义的烷基通过氧原子附着于母体化合物的化学式-O-烷基的基团。烷氧基的烷基部分可以具有1至20个碳原子(即,$C_{1-C_{20}}$烷氧基)、1至12个碳原子(即,C_1-C_{12}烷氧基)或1至6个碳原子(即,C_1-C_6烷氧基)。合适的烷氧基的实例包括甲氧基(-O-CH_3或-OMe)、乙氧基(-OCH_2CH_3或-OEt)和叔丁氧基(-O-$C(CH_3)_3$或-O-tBu)等。

[0038] 术语“芳基”可以指通过从母体芳香族环系统的六个碳原子中除去一个氢原子而衍生的芳香族烃基。例如,芳基可以具有6至20个碳原子、6至14个碳原子或6至12个碳原子。

[0039] 术语“环烷基”是指环中仅包括碳原子的饱和单环或多环。环烷基作为单环可以具有3至7个碳原子,作为双环烷基可以具有7至12个碳原子,而作为多环可以最多具有约20个碳原子。

[0040] 术语“杂环”是指具有一个或多个杂原子的定向或非定向环,其可以饱和或不饱和,并且其可以是单环或多环。例如,“4至10元的杂环”是指由包括杂原子和碳原子的总共4至10个原子构成骨架的杂环。具体地,4至10元的杂环可以包括氮杂环丁烷、二氮杂环丁烷、四氢吡咯、吡咯、咪唑啉、咪唑、吡唑烷、吡唑、恶唑烷、恶唑、异恶唑烷、异恶唑、噻唑烷、噻唑、异噻唑烷、异噻唑、哌啶、吡啶、哌嗪、二嗪、吗啉、硫代吗啉、氮杂环庚烷、二氮杂环庚烷等。

[0041] 术语“杂芳基”是指环中具有一个或多个杂原子的芳香族杂环基。杂芳基的非限制性实例包括吡啶基、吡咯基、恶唑基、吲哚基、异吲哚基、噁呤基、呋喃基、噻吩基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、呫唑基、咪唑基、噻唑基、异恶唑基、吡唑基、异噻唑基,喹啉基、异喹啉基、哒嗪基、嘧啶基,吡嗪基(它们的环上可以具有一个或多个取代基)等。

[0042] 术语“杂环烷基”可以指环中具有一个或多个杂原子的非芳香族杂环基。杂环烷基可以在由于双键的存在而使环在不具有芳香性(Aromatic)的范围内在环中具有一个或多个碳-碳双键或碳-杂原子双键。杂环烷基的非限制性实例包括氮杂环丁烷基、氮丙啶基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、高哌嗪基、吗啉代、硫代吗啉、四氢呋喃基、硫代四氢呋喃基、四氢吡喃基、吡喃基(它们的环上可以具有一个或多个取代基)等。

[0043] 术语“杂原子”是指碳(C)以外的原子,具体可以是氮(N)、氧(O)或硫(S)原子。

[0044] 术语“取代”可以指用取代基取代分子结构体中的氢原子,使得该取代产生化学上稳定的化合物而不超过指定原子上的化合价(Valence)。例如,“基团A被取代基B取代”是指与构成基团A的骨架的碳或其他原子键合的氢原子被取代基B取代,使得基团A和取代基B形成共价键。

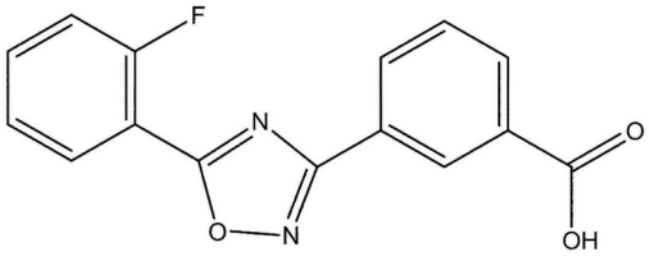
[0045] 所述Z中Z可以是对甲苯基、(4-氯甲基-苯基)、(2-氯-吡啶-3-基(2-氟-苯基)、(3,4-二氟-苯基)、(4-甲氧基-苯基)、苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-基、(4-乙基-苯基)、邻甲苯基、(2-氯-苯基)、(3-甲基-噻吩-2-基)、苯并[b]噻吩-2-基、(3-氟-苯基)、(4-叔丁基-苯基)、(2-甲氧基-苯基)、(2,二氟-苯基)、噻吩-2-基、(2,4-二氟-苯基)、(3-氯-苯基)、间甲苯基、(4-三氟甲基-苯基)、(4-氟-苯基)、(3-甲氧基-苯基)、苯基、(2,6-二氟-苯基)、(2,二

甲基-呋喃-3-基)、(4-吡咯-1-基-苯基)、(3-二甲氨基-苯基)、4-联苯基、(4-二甲氨基-苯基)、苯并[1,2,5]恶二唑-基、间甲苯基、(2-三氟甲基-苯基)、(6-氯-吡啶-3-基)、(3,双-三氟甲基-苯基)、呋喃-2-基、(4-硝基-苯基)、(3,4-二甲氧基-苯基)、(3-三氟甲氧基-苯基)、1-萘基、环己基、吡啶-3-基、吡啶-4-基、环戊基、环丙基、(4-戊氧基-苯基)、(3,4,三甲氧基-苯基)、(4-异丁基-苯基)、环丁基、(1-乙酰基-哌啶-4-基)、异恶唑基、(2-氯-6-氟-苯基)-甲基-异恶唑-4-基]或(2-氯-苯基)-甲基-异恶唑-4-基]。具体地,所述Z可以是(2-氟-苯基)、(3,4-二氟-苯基)、(2-氯-苯基)、(3-氟-苯基)、(2,5-二氟-苯基)、(2,4-二氟-苯基)、(3-氯-苯基)、(4-氟-苯基)或(2,6-二氟-苯基)。

[0046] 所述化学式1所示的化合物可以通读提前终止密码子(premature stop codons)。

[0047] 所述化学式1所示的化合物可以是3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]恶二唑-3-基]-苯甲酸。所述化合物可由下面的化学式2表示:

[0048] [化学式2]

[0049] 

[0050] 所述化学式2所示的化合物也称为阿塔鲁伦(Ataluren)、PCT124或Translarna,其能够通读提前终止密码子(premature stop codons)。

[0051] 所述神经纤维瘤病治疗药物可以包括所述化合物的药学上可接受的盐。所述药学上可接受的盐对人体应具有低毒性,并且不会对母体化合物的生物学活性和理化性质产生任何负面影响。

[0052] 例如,所述药学上可接受的盐可以是碱金属盐(钠盐等)或碱土金属盐(钾盐等)。所述碱金属盐或碱土金属盐例如可以通过将所述化合物溶解在过量的碱金属氢氧化物或碱土金属氢氧化物溶液中后,过滤未溶解的化合物盐,然后蒸发并干燥滤液来获得。

[0053] 另外,所述化合物可以具有手性碳中心,因此可以以R或S异构体、外消旋化合物、单独的对映异构体或混合物、单独的非对映异构体或混合物形式存在,并且所有这样的立体异构体和其混合物可以属于本发明的范畴。

[0054] 另外,所述化合物可以包括所述化合物的水合物和溶剂化物。所述水合物和溶剂化物可以使用已知的方法制备,并且优选是无毒的和水溶性的水合物和溶剂化物。特别地,优选地所述水合物和溶剂化物可以分别是水和醇溶剂(特别是乙醇等)的1至5个分子组合而成的。

[0055] 所述测量Ras-GTP蛋白和/或被激活的p-ERK蛋白的表达水平是确认在个体的生物样品中是否存在所述蛋白质和该蛋白质的表达水平的过程,以预测对神经纤维瘤病治疗药物的易感性,其可以使用与所述蛋白质特异性结合的分子来确认蛋白质的量。

[0056] 所述能够测量蛋白质的表达水平的制剂可以包括选自由单克隆(monoclonal)抗体、多克隆(polyclonal)抗体、嵌合(chimeric)抗体、配体(ligand)、肽核酸(peptide nucleic acid,PNA)、核酸适配体(aptamer)和纳米颗粒组成的组中的任意一种或多种,但

不限于此。

[0057] 为此的分析方法有蛋白质印迹法(Western blotting)、酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)、放射免疫测定法(Radioimmunoassay,RIA)、放射免疫扩散法(radioimmunodiffusion)、奥克特洛尼(Ouchterlony)免疫扩散法、火箭(rocket)免疫电泳法、免疫沉淀法(immunoprecipitation assay)、免疫组织化学分析法(immunohistochemical analysis)、补体结合测定法(Complement Fixation Assay)、荧光活化细胞分类计(Fluorescence activated cell sorter,FACS)、蛋白质芯片(protein chip)、二维电泳分析法、蛋白质质谱分析、液相色谱-质谱联用技术(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry,LC-MS)、液相色谱-串联质谱联用技术(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry,LC-MS/MS)、基质解吸/电离飞行时间质谱法(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry,MALDI-TOF)、表面增强激光解吸/电离飞行时间质谱法(Sulface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry,SELDI-TOF)等,但不限于此。

[0058] 根据一具体实施例,能够测量所述Ras-GTP蛋白的表达水平的制剂可以是与Ras-GTP蛋白特异性结合但与Ras-GDP蛋白不结合的制剂。

[0059] 根据一具体实施例,能够测量所述被激活的p-ERK蛋白的表达水平的制剂可以是与p-ERK蛋白特异性结合的制剂。

[0060] 测量编码所述蛋白质的基因的表达水平是确认在个体的生物样品中是否存在编码所述蛋白质的基因和该基因的表达水平的过程,以预测对神经纤维瘤病治疗药物的易感性,其可以使用与所述基因特异性结合的分子来确认基因的量。

[0061] 所述能够测量编码所述蛋白质的基因的表达水平的制剂可以是选自由与所述基因特异性结合的引物(primer)对、探针(probe)和反义核苷酸(antisense nucleotide)组成的组中的任意一种或多种,但不限于此。

[0062] 对此的分析方法有逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction,RT-PCR)、实时聚合酶链式反应(real time-polymerase chain reaction)、RNA酶保护分析法(RNA酶保护分析法(RNase protection assay,RPA)、Northern印迹杂交(Northern blotting)和DNA芯片等,但不限于此。

[0063] 所述神经纤维瘤病可能在NF1基因中携带终止密码子突变。

[0064] 术语“终止密码子突变(stop codon mutation)”可以指碱基序列的一部分由于突变而变成终止密码子UAG、UAA和UAG中的一个,从而停止多肽的合成。

[0065] 所述终止密码子突变可能是由DNA碱基被其他碱基取代的点突变(point mutation)之一的无义突变(nonsense mutation)或移码突变(Frameshift mutation)引起的。

[0066] 术语“无义突变(nonsense mutation)”是指当DNA碱基序列转变为蛋白质时,碱基序列的一部分转变为终止密码子(UAG、UAA和UGA中的一个),从而不再进行蛋白质合成的突变。

[0067] 术语“移码突变(Frameshift mutation)”可以是指由于在DNA碱基序列中插入(insert)或缺失(deletion)1个或2个或不是3的倍数的核苷酸的突变而导致经过基因的转

录和翻译过程而产生的蛋白质的氨基酸排列发生很大的变化的突变。

[0068] 在一实施例中,所述终止密码子突变可以是i)作为NF1基因的DNA碱基序列中的第5242个碱基的胞苷(C)被取代为胸腺嘧啶(T),使得构成NF1蛋白的第1748个氨基酸,即精氨酸(Arg,R)转换为终止密码子;ii)作为NF1基因的DNA碱基序列中的第2560个碱基的胞苷(C)被取代为胸腺嘧啶(T),使得构成NF1蛋白的第854个氨基酸,即谷氨酰胺(Gln,Q)转换为终止密码子;iii)作为NF1基因的DNA碱基序列中的第4537个碱基的胞苷(C)被取代为胸腺嘧啶(T),使得构成NF1蛋白的第1513个氨基酸,即精氨酸(Arg,R)转换为终止密码子;iv)作为NF1基因的DNA碱基序列中的第2978个碱基的胞苷(C)被取代为鸟嘌呤(G),使得构成NF1蛋白的第993个氨基酸,即亮氨酸(Leu,L)转换为终止密码子;v)作为NF1基因的DNA碱基序列中的第7486个碱基的胞苷(C)被取代为胸腺嘧啶(T),使得构成NF1蛋白的第2496个氨基酸,即精氨酸(Arg,R)转换为终止密码子的终止密码子突变。

[0069] 在另一实施例中,在神经纤维瘤病患者中,筛选出NF1基因中携带终止密码子突变的患者,测量所选患者的成纤维细胞中的Ras-GTP活性程度后,用阿塔鲁伦(ataluren)进行处理,其结果,与正常人相比Ras-GTP表达显着增加的患者组的Ras-GTP和p-ERK蛋白的表达显着降低,由此可以证实阿塔鲁伦对神经纤维瘤病治疗具有效果。因此,可以通过在NF1基因中携带终止密码子突变的神经纤维瘤病患者中,激活状态的Ras(Ras-GTP)和/或被激活的p-ERK蛋白的表达是否增加或降低来预测对阿塔鲁伦的易感性。

[0070] 另一方面提供用于预测对包括所述生物标志物组合物的神经纤维瘤病治疗药物的易感性的试剂盒。

[0071] 所述试剂盒可以使用从个体分离的生物样品来预测对所述神经纤维瘤病治疗药物的易感性。具体地,所述试剂盒可以使用从个体中采集的成纤维细胞来预测对所述神经纤维瘤病治疗药物的易感性。

[0072] 所述试剂盒不仅可以包括用于测量所述蛋白质或基因的表达水平的制剂,还可以包括免疫学分析中常用的工具和试剂等。

[0073] 所述工具或试剂的实例可以包括但不限于合适的载体、能够产生可检测信号的标记物质、生色基、溶解剂、洗涤剂、缓冲剂和稳定剂等。如果标记物质是酶,则其可以包括能够测量酶活性的底物和反应终止剂。载体包括可溶性载体和不溶性载体,而可溶性载体的一个实例包括本领域已知的生理学上可接受的缓冲液,例如PBS,不溶性载体的一个实例可以是聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚酯纤维、聚丙烯腈、氟树脂、交联葡聚糖、多糖、高分子如在胶乳上镀金属的磁性微粒、其他纸、玻璃、金属、琼脂糖及其组合。

[0074] 所述生物标志物组合物如上所述。

[0075] 再一方面提供一种提供预测对神经纤维瘤病治疗药物的易感性而所需的信息的方法,其包括以下步骤:在从个体中获得的生物样品中,测量(1)选自由与GTP结合而被激活的RAS(Ras-GTP)蛋白和被激活的p-ERK蛋白组成的组中的任意一种或多种蛋白质或(2)编码所述蛋白质的基因的表达水平。

[0076] 所述方法可以进一步包括以下步骤:当与从正常个体中获得的生物样品中测量的表达水平相比,被激活的Ras-GTP蛋白或将所述蛋白质编码的基因的表达水平增加时,判断为对神经纤维瘤病治疗药物的易感性高,反之,其表达水平低时,判断为对神经纤维瘤病治疗药物的易感性低。

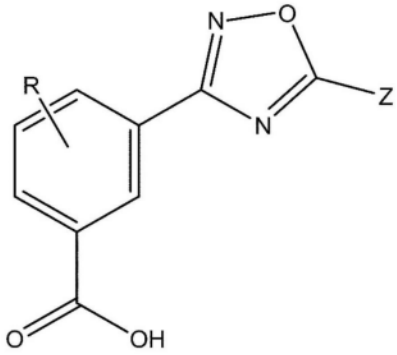
[0077] 所述方法可以进一步包括以下步骤:当与从正常个体中获得的生物样品中测量的表达水平相比,被激活的p-ERK蛋白或将所述蛋白质编码的基因的表达水平增加时,判断为对神经纤维瘤病治疗药物的易感性高,反之,其表达水平低时,判断为对神经纤维瘤病治疗药物的易感性低。

[0078] 术语“生物样品”可以是指能够测量根据一方面的Ras-GTP蛋白或编码所述蛋白质的基因的表达水平和/或测量p-ERK蛋白或编码所述蛋白质的基因的表达水平的从个体中获得的所有样品。

[0079] 所述生物样品可以是血液、血浆、血清、尿液、唾液、痰、脑脊液、细胞、细胞培养液、组织提取物或肿瘤组织,但不限于此。具体地,所述生物样品可以是从个体中采集的成纤维细胞。所述生物样品可以通过本领域常用的方法进行处理来准备。

[0080] 再一方面提供一种用于预防或治疗神经纤维瘤病的药物组合物,其包括下面的化学式1所示的化合物或其药学上可接受的盐作为活性成分。

[0081] [化学式1]

[0082] 

[0083] 在所述化学式中,

[0084] Z是卤素、羟基、被取代或未被取代的烷基、被取代或未被取代的烷氧基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基、被取代或未被取代的杂环或者被取代或未被取代的杂环烷基;

[0085] R可以是氢或卤素。

[0086] 所述化学式1所示的化合物及其药学上可接受的盐如上所述。

[0087] 所述化学式1所示的化合物可以是3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]恶二唑-3-基]-苯甲酸。

[0088] 所述神经纤维瘤病可能在NF1基因中携带终止密码子突变。

[0089] 所述神经纤维瘤病的Ras蛋白活性程度可能增加。

[0090] 所述神经纤维瘤病如上所述。

[0091] 在一实施例中,在神经纤维瘤病患者中,筛选出NF1基因中携带终止密码子突变的患者,测量所选患者的成纤维细胞中的Ras-GTP活性程度后,用阿塔鲁伦(ataluren)进行处理,其结果,与正常人相比Ras-GTP活性程度显着增加的患者组的Ras-GTP和p-ERK蛋白的表达显着降低,由此可以证实阿塔鲁伦对神经纤维瘤病具有治疗效果。因此,阿塔鲁伦可以用于治疗激活状态的Ras(Ras-GTP)的表达增加的NF1基因中携带终止密码子突变的神经纤维瘤病患者。

[0092] 基于组合物的总重量,其量按重量计,所述药物组合物可以包括约0.1%至约

90％,具体为约0.5％至约75％,更具体为约1％至约50％的所述化合物作为活性成分。

[0093] 所述药物组合物可以包括常规且无毒的药学上可接受的添加剂,所述添加剂根据常规方法配制成制剂。例如,所述药物组合物可以进一步包括药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0094] 所述药物组合物中使用的添加剂的实例可以包括甜味剂、结合剂、溶剂、增溶剂、润湿剂、乳化剂、等渗剂、吸收剂、崩解剂、抗氧化剂、保存剂、润滑剂、助滑剂、填充剂和增香剂等。例如,所述添加剂可以包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露醇、山梨糖醇、纤维素、甘氨酸、二氧化硅、滑石、硬脂酸、硬脂酸甘油、硬脂酸镁、硅酸镁铝、淀粉、明胶、黄蓍胶、海藻酸、海藻酸钠、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、琼脂、水、乙醇、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、氯化钠、氯化钙、橙子香精、草莓香精和香草香精等。

[0095] 所述药物组合物可以配制成用于口服施用(例如,片剂、丸剂、粉剂、胶囊、糖浆或乳液)或肠胃外施用(例如,肌肉内、静脉内或皮下注射)的各种制剂形式。

[0096] 具体地,所述药物组合物可以配制成用于口服施用的制剂,此时使用的添加剂可以包括纤维素、硅酸钙、玉米淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、磷酸钙、硬脂酸、硬脂酸镁、硬脂酸钙、明胶、滑石、表面活性剂、悬浮剂、乳化剂和稀释剂等。另外,作为助滑剂(Glidant)的实例有胶体二氧化硅(Colloidal Silicon Dioxide)和硅酸镁(Magnesuim Sillicate)等;稀释剂(Diluent)的实例有微晶纤维素(Microcrystalline Cellulose)、无水乳糖(Lactose Anhydrous)、乳糖一水合物(Lactose Monohydrate)和硅化(silicified)微晶纤维素(MCC)HD90等;崩解剂(Disintegrant)的实例有交联羧甲基纤维素钠(Croscarmellose Sodium)和交联聚维酮(Crospovidone)等;润滑剂(Lubricant)的实例有硬脂酸镁(Magnesium Stearate)、十二烷基硫酸钠(Sodium Lauryl Sulfate)和硬脂酸(Stearic Acid)等。

[0097] 另外,用于口服施用的液体制剂的实例可以举出悬浮剂、乳剂和糖浆剂等,除常用的水、液体石蜡等简单稀释剂外,还可以包括各种赋形剂,例如润湿剂、甜味剂、芳香剂和保存剂等。

[0098] 另外,用于肠胃外施用的制剂包括无菌水溶液、非水溶液、悬浮剂、乳剂、冻干制剂和栓剂。非水溶液和悬浮剂可以使用植物油如丙二醇、聚乙二醇和橄榄油以及可注射酯如油酸乙酯。栓剂的基础成分可以使用半合成脂肪酸酯(Witepsol)、聚乙二醇(Macrogol)、吐温61、可可脂、月桂酯和甘油明胶等。另一方面,注射剂可以包括现有的添加剂,例如溶解剂、等渗剂、悬浮剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂等。

[0099] 所述药物组合物可以以治疗有效量或药学有效量施用于患者。

[0100] 术语“治疗有效量”或“药学有效量”是指有效预防或治疗目标疾病的化合物或组合物的量,其是足以以适用于医学治疗的合理的效益/风险比来治疗疾病且不会引起副作用的量。所述有效量的水平可以由以下因素确定:患者的健康状况、疾病的类型和严重程度、药物的活性、对药物的敏感度、施用方法、施用时间、施用途径和排泄率、治疗周期、包括配制或同时使用的药物的因素以及医学领域众所周知的其他因素。

[0101] 所述药物组合物可以作为单独的治疗药物或与其他治疗药物组合施用,可以与现有的治疗药物依次或同时施用,并且可以单次或多次施用。考虑到所有上述因素,重要的是施用能够以最小量达到最大效果且没有副作用的量,并且这可以由本领域技术人员容易地确定。

[0102] 具体地,所述药物组合物中的所述化合物的有效量可以根据患者的年龄、性别和体重而变化,并且通常为每体重kg可以每天或隔天或每日一次至三次施用约0.1mg至约1000mg或约5mg至约200mg。然而,由于其可以根据施用途径、疾病的严重程度、性别、体重、年龄等而增加或减少,因此范围不限于此。

[0103] 另外,所述药物组合物可以与化疗、放射治疗、免疫治疗、激素治疗、骨髓移植、干细胞替代治疗、其他生物治疗、手术干预或与这些组合组合施用以用于肿瘤治疗。例如,其可以作为其他长期进行的治疗策略的辅助治疗或用于危重患者的肿瘤消退,或者维持预防性化疗后患者的状态。

[0104] 再一方面提供一种包括以下步骤的神经纤维瘤病治疗药物的筛选方法:(a)使携带NF1基因突变的生物样品与受试物接触;以及(b)在所述被接触的生物样品中,测量(1)选自由与GTP结合而被激活的RAS(Ras-GTP)蛋白和被激活的p-ERK蛋白组成的组中的任意一种或多种蛋白质或(2)编码所述蛋白质的基因的表达水平。

[0105] 所述生物样品可以是细胞或动物模型。所述样品可以是从患有神经纤维瘤病的患者身上分离的样品。

[0106] 根据一具体实施例,所述筛选方法可以包括以下步骤:当与受试物接触前相比,与所述受试物接触之后的生物样品中的Ras-GTP蛋白或编码所述蛋白质的基因的表达水平降低时,将所述受试物判断为神经纤维瘤病治疗药物。

[0107] 根据一具体实施例,所述筛选方法可以包括以下步骤:当与受试物接触前相比,与所述受试物接触之后的生物样品中的p-ERK蛋白或编码所述蛋白质的基因的表达水平降低时,将所述受试物判断为神经纤维瘤病治疗药物。

[0108] 所述筛选方法可以包括以下步骤:将与所述受试物接触的生物样品中的Ras-GTP蛋白或编码所述蛋白质的基因的表达水平的测量结果与未与受试物接触的生物样品中测量的结果进行比较。

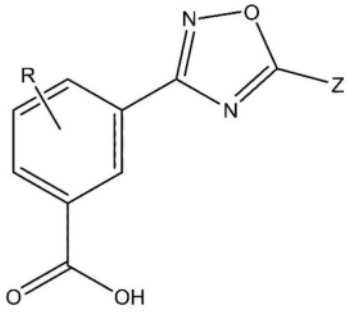
[0109] 所述筛选方法可以包括以下步骤:将与所述受试物接触的生物样品中的p-ERK蛋白或编码所述蛋白质的基因的表达水平的测量结果与未与受试物接触的生物样品中测量的结果进行比较。

[0110] 再一方面提供一种生物标志物的用途,其包括制剂,所述制剂能够测量(1)选自由与GTP结合而被激活的RAS(Ras-GTP)蛋白和被激活的p-ERK蛋白组成的组中的任意一种或多种蛋白质或(2)编码所述蛋白质的基因的表达水平,从而预测对神经纤维瘤病治疗药物的易感性。

[0111] 再一方面提供一种预测神经纤维瘤病患者对神经纤维瘤病治疗药物的易感性的方法,其包括以下步骤:在从个体中获得的生物样品中,测量(1)选自由与GTP结合而被激活的RAS(Ras-GTP)蛋白和被激活的p-ERK蛋白组成的组中的任意一种或多种蛋白质或(2)编码所述蛋白质的基因的表达水平。

[0112] 再一方面提供一种预防或治疗神经纤维瘤病的方法,其包括向个体施用包括下面的化学式1所示的化合物或其药学上可接受的盐作为活性成分的组合物。

[0113] [化学式1]

[0114] 

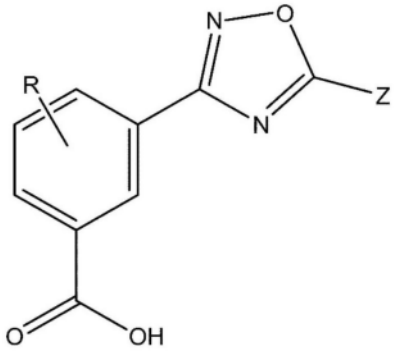
[0115] 在所述化学式中，

[0116] Z是卤素、羟基、被取代或未被取代的烷基、被取代或未被取代的烷氧基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基、被取代或未被取代的杂环或者被取代或未被取代的杂环烷基；

[0117] R可以是氢或卤素。

[0118] 再一方面提供一种包括下面的化学式1所示的化合物或其药学上可接受的盐作为活性成分的组合物在制备用于预防或治疗神经纤维瘤病的治疗药物中的用途：

[0119] [化学式1]

[0120] 

[0121] 在所述化学式中，

[0122] Z是卤素、羟基、被取代或未被取代的烷基、被取代或未被取代的烷氧基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基、被取代或未被取代的杂环或者被取代或未被取代的杂环烷基；

[0123] R可以是氢或卤素。

[0124] 考虑到本说明书的复杂性，省略了重复的内容，并且本说明书中未另外定义的术语具有本发明所属技术领域中通常使用的含义。

[0125] 发明效果

[0126] 当使用根据一方面的用于预测对神经纤维瘤病治疗药物的易感性的生物标志物组合物时，通过测量在个体的生物样品中与GTP结合而被激活的RAS(Ras-GTP)蛋白或编码所述蛋白质的基因和/或被激活的p-ERK蛋白或编码所述蛋白质的基因的表达水平的简单方法来准确诊断对神经纤维瘤病治疗药物的易感性。

[0127] 由于当使用根据一方面的用于预防或治疗神经纤维瘤病的药物组合物时，抑制Ras蛋白的活性，因此其可以有效地用于预防或治疗Ras蛋白活性程度增加的神经纤维瘤病。

附图说明

[0128] 图1是示出根据一方面被筛选出的NF1基因中携带终止密码子突变的神经纤维瘤病患者的终止密码子突变信息的图。

[0129] 图2是示出测量与根据一方面被筛选出的NF1基因中携带终止密码子突变的神经纤维瘤病患者的GTP结合而被激活的RAS(Ras-GTP)蛋白的表达量的结果。

[0130] 图3是示出在根据一方面被筛选出的NF1基因中携带终止密码子突变的神经纤维瘤病患者中对Ras-GTP高表达的患者的成纤维细胞施用30μg/ml的阿塔鲁伦(PTC)之前和之后的Ras-GTP表达量的变化的测量结果。

[0131] 图4是示出为了比较在根据一方面被筛选出的NF1基因中携带终止密码子突变的神经纤维瘤病患者中对Ras-GTP高表达的患者的成纤维细胞施用20μg/ml或30μg/ml的阿塔鲁伦(PTC-124)之前和之后的p-ERK表达量而进行电泳的结果。

[0132] 图5是示出在根据一方面被筛选出的NF1基因中携带终止密码子突变的神经纤维瘤病患者中对Ras-GTP高表达的患者的成纤维细胞施用20μg/ml或30μg/ml的阿塔鲁伦(PTC-124)之前和之后的ERK与p-ERK的表达比率的测量结果。

具体实施方式

[0133] 下面,通过实施例对本发明进行更详细的描述。然而,这些实施例仅用于示例性地描述本发明,本发明的范围不受这些实施例的限制。

[0134] 实施例1.筛选出神经纤维瘤病患者中在NF1基因中携带终止密码子突变的患者

[0135] 针对从神经纤维瘤病患者提取的DNA,使用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增作为神经纤维瘤病的致病基因的NF1基因,然后进行了桑格测序(sanger sequencing)。基于分析结果,筛选出了22名在NF1基因中携带终止密码子突变的患者。所选患者的NF1基因中携带的终止密码子突变信息如下表1所示(图1)。

[0136] 【表1】

[0137]

序列号	姓名首字母	NF1 突变	
NF-08	LJS	c.7759G>T	p.Glu2587Ter (p.Q2587*)
NF-09*	HSW	c.5242C>T	p.Arg1748Ter (p.R1748*)
NF-10	SDE	c.1381C>T	p.Arg461Ter (p.R461*)
NF-11*	MJW	c.2560C>T	p.Gln854Ter (p.Q854*)
NF-13	LYJ	c.7039G>T	p.Glu234Ter (p.E2347*)
NF-14*	KSH	c.4537C>T	p.Arg1513Ter (p.R1513*)
NF-19	KH	c.4084C>T	p.Arg1362Ter (p.R1362*)
NF-20	YSH	c.4243G>T	p.Glu1415Ter (p.E1415*)
NF-21	KJS	c.3916C>T	p.Arg1306Ter (p.R1306*)
NF-22	CJW	c.1381C>T	p.Arg461Ter (p.R461*)
NF-23	YJH	c.4537C>T	p.Arg1513Ter (p.R1513*)
NF-24	PJS		p.Gln1255Ter (p.Q1255*)

[0138]

NF-25	PCJ	c.6792C>A	p.Tyr2264Ter (p.Y2264*)
NF-26*	KJW	c.2978T>G	p.Leu993Ter (p.L993*)
NF-27	KDH		p.Gln985Ter (p.Q985*)
NF-28	KN	c.1797G>A	p.Trp599Ter (p.W599*)
NF-29	HKW	c.6792C>A	p.Tyr2264Ter (p.Y2264*)
NF-30	NYS	c.3916C>T	p.Arg1306Ter (p.R1306*)
NF-31	HKH	c.3565C>T	p.Gln1189Ter (p.Q1189*)
NF-32	KDH	c.1904del	p.Pro635Leufs*53 (p.P635LfsX53)
NF-33	LYJ	c.2382T>A	p.Tyr794Ter (p.Y794*)
NF-34*	PCK	c.7486C>T	p.Arg2496Ter (p.R2496*)

[0139] 实施例2.测量被筛选出的神经纤维瘤病患者的RAS蛋白活性程度

[0140] 按以下方法比较正常人与实施例1中被筛选出的神经纤维瘤病的患者的皮肤成纤维细胞中的RAS蛋白活性程度。

[0141] 将来自捐赠的正常人和神经纤维瘤病患者的皮肤成纤维细胞分别在DMEM+10％FBS+1％青霉素-链霉素(Penicillin-Streptomycin)培养基中进行培养。将细胞密度培养至容器的70％-80％后,用不含FBS的培养基进行替换后培养细胞,并进行24小时的饥饿(starvation)处理。接下来,将细胞移至含有FBS的培养基中,然后将作为Ras激动剂(activator)的表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)稀释至100ng/ml浓度后用其处理细胞,并在37℃下反应5分钟以准备每个样品。使用Cytosculpture公司的G-LISA Ras活化检测生物化学试剂盒(G-LISA Ras activation Assay Biochem Kit)(基于吸光度(Absorbance Based))(Cytosculpture,货号(Cat No.)BK131)进行RAS蛋白活性程度分析,该试剂盒补充了现有测量方式下拉测定(Pull-down assay)的缺点,可以测量少量细胞的同时测量大量样品。

[0142] 简单说明分析RAS蛋白活性程度的方法,即进行EGF处理后,使用试剂盒中包含的细胞裂解液(cell lysis)裂解细胞,仅获得上清液,然后对上清液中所含的蛋白质进行定量。将来自所有样品的相同量的蛋白质添加到与Ras-GTP结合蛋白(Ras-GTP binding protein)结合的培养板的孔中,然后在搅拌器中以300rpm摇动的同时在4℃下反应30分钟。之后,用洗涤液洗涤3次以去除未结合的蛋白质,然后加入抗Ras(anti-Ras)抗体并在室温下以300rpm的速度在搅拌器中反应45分钟,然后进行3次的洗涤过程。完全去除洗涤液后,加入二抗,然后与一抗反应过程相同,在室温下以400rpm的速度在搅拌器中反应45分钟,然

后进行3次的洗涤过程。通过这些过程,与激活状态(active state)的GTP结合的Ras(GDP-bound Ras)蛋白保留下来,而与非激活状态(inactive state)的GDP结合的Ras(GDP-bound Ras)蛋白在洗涤过程中被去除。接下来,添加HRP检测试剂(detection reagent)并在室温下反应15分钟,然后测量490nm处的吸光度,从而通过Ras-GTP的存在量来测量Ras蛋白活性程度。

[0143] 其结果,通过与正常人相比,在大多数神经纤维瘤病患者来源的成纤维细胞中测量到高的Ras-GTP信号,证实了Ras蛋白活性程度增加(图2)。

[0144] 实施例3.测量通过阿塔鲁伦(Ataluren)处理的RAS蛋白活性程度的变化

[0145] 在DMEM+10%FBS+1%青霉素-链霉素(Penicillin-Streptomycin)培养基中,用20ug/ml和30ug/ml浓度的阿塔鲁伦分别处理来自捐赠的正常人和神经纤维瘤病患者的皮肤成纤维细胞,然后培养3天。将细胞密度培养至容器的70%-80%后,用不含FBS的培养基进行替换后培养细胞,并进行24小时的饥饿(starvation)处理。接下来,将细胞移至含有FBS的培养基中,然后将作为Ras激动剂的表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)稀释至100ng/ml浓度后用其处理细胞,并在37℃下反应5分钟以准备每个样品。以与实施例2中所述的相同的方式测量每个样品中的Ras蛋白活性程度。

[0146] 其结果证实了,当用阿塔鲁伦处理与正常人相比Ras蛋白活性程度增加的神经纤维瘤病患者的皮肤成纤维细胞时,Ras-GTP的信号显着降低(图3)。由此发现,阿塔鲁伦通过降低Ras蛋白活性程度来有效治疗神经纤维瘤病。

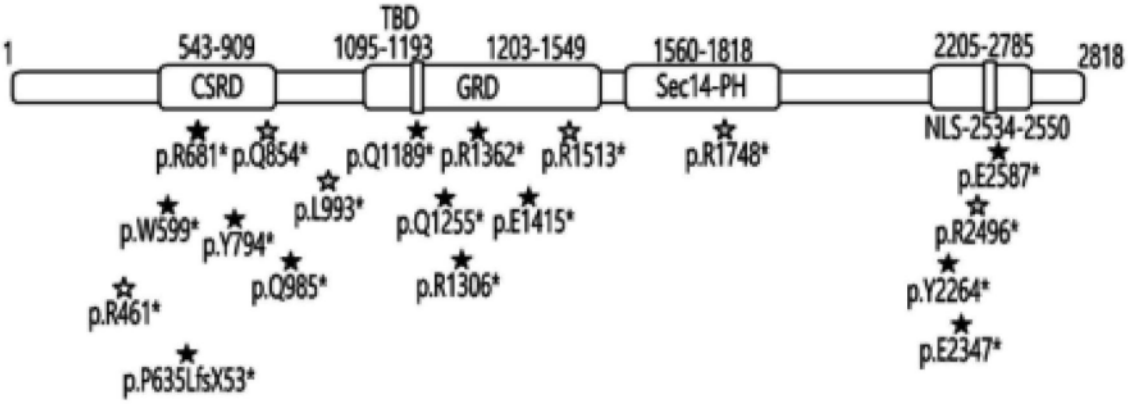
[0147] 实施例4.测量通过阿塔鲁伦处理的p-ERK/ERK蛋白的表达水平的变化

[0148] 使用NuPAGETM 4-12%Bris-Tris凝胶(英杰公司(Invitrogen))对与实施例3中测量Ras活性程度相同的蛋白质进行电泳。

[0149] 其结果证实了,在正常人的成纤维细胞中,通过阿塔鲁伦处理的激活状态的磷酸化ERK(p-ERK)的表达没有发生变化,但在通过阿塔鲁伦处理的Ras蛋白的活性程度降低的神经纤维瘤病患者的成纤维细胞中,p-ERK表达降低(图4)。

[0150] 为了更准确地比较ERK活性程度,将所述进行电泳的蛋白质移至hybond-ECL膜(membrane),然后使用3%脱脂牛奶(skim milk)封闭(blocking)膜。接下来,ERK和p-ERK抗体在膜(membrane)上于4℃下反应24小时,然后用TBST洗涤3次。二抗在室温下反应1小时,然后用TBST洗涤3次。测量洗涤后的膜上的ERK和p-ERK的表达比率。

[0151] 其结果证实了,在正常人的成纤维细胞中,通过阿塔鲁伦处理的p-ERK蛋白的表达水平略有增加,但在通过阿塔鲁伦处理的Ras蛋白活性程度降低的神经纤维瘤病患者的成纤维细胞中,p-ERK表达降低(图5)。



CSRD：富含半胱氨酸/丝氨酸的结构域，GRD：GAP相关结构域，TBD：微管蛋白结合结构域，

Sec14-PH：Sec14-同源结构域和pleckstrin同源结构域，NLS：核定位信号

FAK：粘附斑激酶

斜线表示本研究中确认的阿塔鲁伦反应突变。

图1

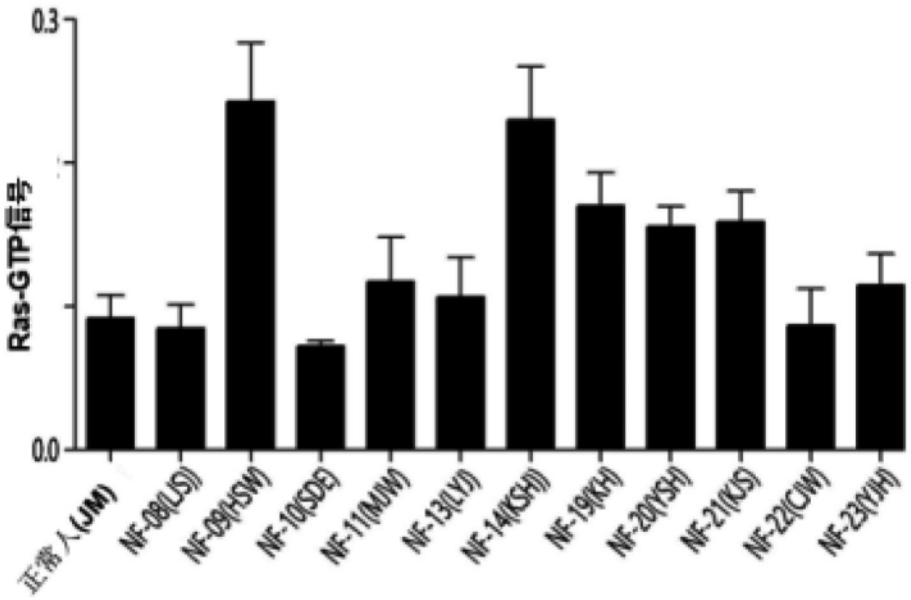


图2

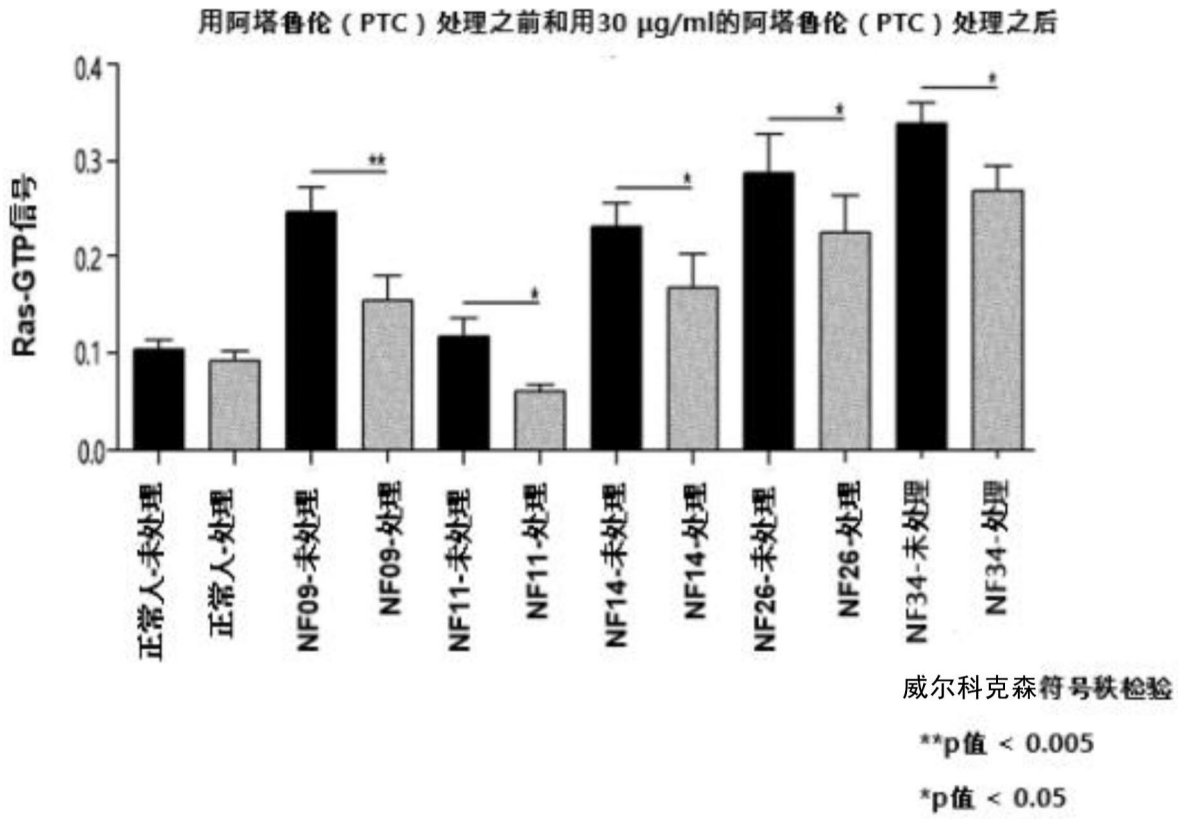

用阿塔鲁伦（PTC）处理之前和用30 μg/ml的阿塔鲁伦（PTC）处理之后
Ras-GTP信号
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
**
*
*
*
*
正常人-未处理
正常人-处理
NF09-未处理
NF09-处理
NF11-未处理
NF11-处理
NF14-未处理
NF14-处理
NF26-未处理
NF26-处理
NF34-未处理
NF34-处理
威尔科克森符号秩检验
**p值 < 0.005
*p值 < 0.05

图3

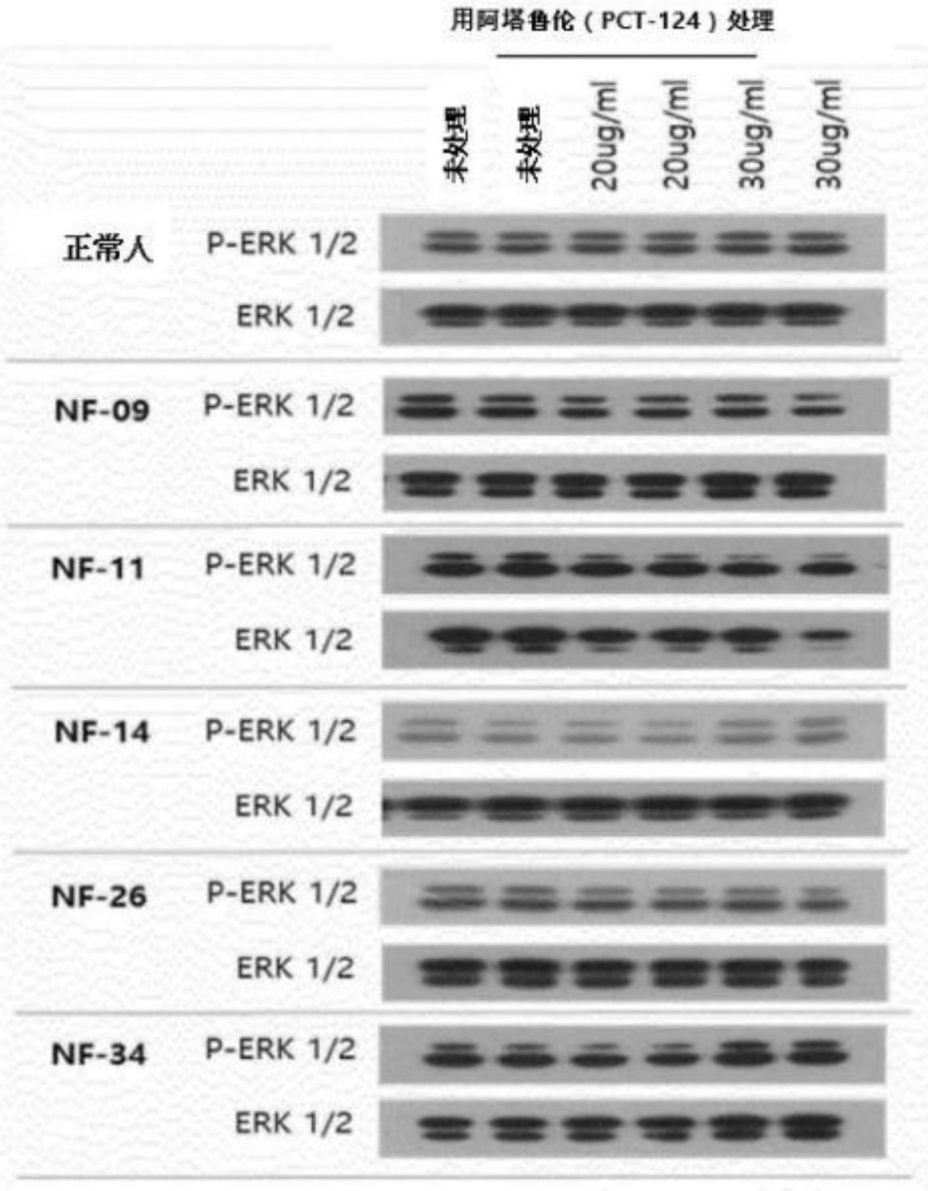

用阿塔鲁伦（PCT-124）处理
未处理
未处理
20ug/ml
20ug/ml
30ug/ml
30ug/ml
正常人
P-ERK 1/2
ERK 1/2
NF-09
P-ERK 1/2
ERK 1/2
NF-11
P-ERK 1/2
ERK 1/2
NF-14
P-ERK 1/2
ERK 1/2
NF-26
P-ERK 1/2
ERK 1/2
NF-34
P-ERK 1/2
ERK 1/2

图4

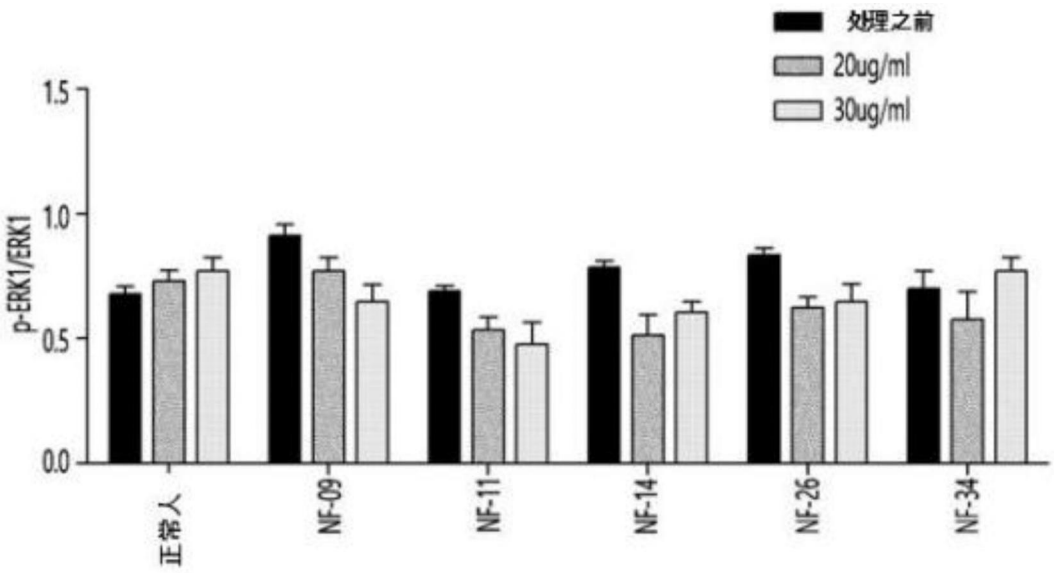

处理之前
20ug/ml
30ug/ml
p-ERK1/ERK1
1.5
1.0
0.5
0.0
正常人
NF-09
NF-11
NF-14
NF-26
NF-34

图5