[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580028412.5

[43] 公开日 2007 年 8 月 29 日

[11] 公开号 CN 101027320A

[22] 申请日 2005.6.17
[21] 申请号 200580028412.5
[30] 优先权
[32] 2004.6.18 [33] DK [31] PA200400963
[86] 国际申请 PCT/DK2005/000400 2005.6.17
[87] 国际公布 WO2005/123759 英 2005.12.29
[85] 进入国家阶段日期 2007.2.25
[71] 申请人 恩卡姆医药公司
地址 丹麦哥本哈根
[72] 发明人 伊莎贝思·博克
弗拉迪米尔·贝雷津
[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 封新琴 巫肖南
权利要求书 6 页 说明书 47 页 序列表 2 页
附图 6 页

[54] 发明名称

FGFR 结合肽

[57] 摘要

本发明涉及可以直接结合成纤维细胞生长因子受体(FGFR)并活化该受体的新的肽化合物。本发明的化合物包括来自神经细胞黏着分子(neuralcell adhesion molecule，NCAM)的纤连蛋白 III 型构件 1(F3，1)的 NCAM 肽片段。本发明的肽序列可以刺激学习和记忆和/或神经突长出和/或神经细胞存活。肽序列和包含它们的化合物，根据本发明，可以有益地用于治疗和/或预防 FGFR 和/或 NCAM 在病理和疾病恢复中起作用的病理状况。因此，包含本发明的肽序列和化合物的药物组合物也在保护范围之内。

1. 11 到 18 个氨基酸残基的肽序列，其包含式（I）的氨基酸基序

$K/R\text{-}x^{p}\text{-}D/E/N/Q\text{-}x^{p}\text{-}x_0\text{-}S\text{-}x_1\text{-}x_2\text{-}x_3\text{-}D/E/N/Q\text{-}x^{p}$

其中

x^{p} 是任何疏水性氨基酸残基，

x_0 是 K, R 或 Y，且

x_1, x_2 和 x_3 独立地为任何氨基酸残基。

2. 权利要求 1 的肽序列，其中 x^{p} 选自 A, F, I, L, P, V 或 W。

3. 权利要求 2 的肽序列，其中 x^{p} 选自 A, V 或 W。

4. 权利要求 3 的肽序列，其中所述氨基酸基序是

$K/R\text{-}V/A\text{-}D/E/N/Q\text{-}W\text{-}x_0\text{-}S\text{-}x_1\text{-}x_2\text{-}x_3\text{-}D/E/N/Q\text{-}V/A$，其中 x_0, x_1, x_2 和 x_3 如权利要求 1 所定义。

5. 权利要求 2 的肽序列，其中 x^{p} 选自 A, V 或 P。

6. 权利要求 5 的肽序列，其中所述氨基酸基序是 $K/R\text{-}V/A\text{-}D/E/N/Q\text{-}P\text{-}x_0\text{-}S\text{-}x_1\text{-}x_2\text{-}x_3\text{-}D/E/N/Q\text{-}V/A$，其中 x_0, x_1, x_2 和 x_3 如权利要求 1 所定义。

7. 权利要求 1 到 6 任一项的肽序列，其中 x_1, x_2 和 x_3 独立地选自 A, G, L, S, T 或 E。

8. 权利要求 7 的肽序列，其中肽序列具有 11 到 14 个氨基酸残基的长度。

9. 权利要求 7 的肽序列，其中肽序列具有 15 到 18 个氨基酸残基的长度。

10. 权利要求 9 的肽序列，其中肽序列是 KAEWKSLGEEAWHSK (SEQ ID NO: 1)。

11. 权利要求 9 的肽序列，其中肽序列是 SIDRVEPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 2)

12. 权利要求 9 的肽序列，其中肽序列是 SIDRVNPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 3)。

13. 权利要求 1 - 12 中任一项的肽序列，其中所述肽序列配制为包含所述单个肽序列的两个或多个拷贝的多聚体化合物。

14. 权利要求 13 的肽序列，其中多聚体化合物是二聚体，其包含权利要求 1 - 12 的任一项的单个肽序列的两个相同拷贝。

15. 权利要求 13 的肽序列，其中多聚体化合物是二聚体，其包含权利要

求 1－12 的两个不同的肽序列。

16. 权利要求 13 的肽序列，其中多聚体化合物是二聚体，其包含权利要求 1－12 的任一项的序列和选自 EVYVVAENQQGKSKA (SEQ ID NO: 4)或 TIMGLKPETR/TYAVR (SEQ ID NO: 5)的序列。

17. 权利要求 13 的肽序列，其中多聚体化合物是树状聚体，其包含连接到 3 个赖氨酸残基的骨架结构的、权利要求 1－12 任一项的肽序列的 4 个相同拷贝。

18. 前述任一权利要求的肽序列，其中肽片段能够结合和活化成纤维细胞生长因子受体（FGFR）家族的受体，包括成纤维细胞生长因子受体-1（FGFR-1），成纤维细胞生长因子受体-2（FGFR-2），成纤维细胞生长因子受体-3（FGFR-3），成纤维细胞生长因子受体-4（FGFR-4）和成纤维细胞生长因子受体-5（FGFR-5）。

19. 权利要求 18 的肽序列，其中受体是 FGFR-1。

20. 前述任一权利要求的肽序列，所述序列能够刺激学习和记忆。

21. 11 到 18 个氨基酸残基的肽序列在制备刺激记忆和学习的药物中的用途，所述肽序列包含式（I）的氨基酸基序:

K/R-x^p-D/E/N/Q-x^p-x_0-S-x_1-x_2-x_3-D/E/N/Q-x^p

其中

x^p 是任何疏水性氨基酸残基,

x_0 是 K, R 或 Y，且

x_1, x_2 和 x_3 独立地为任何氨基酸残基。

22. 权利要求 21 的用途，其中 x^p 选自 A, F, I, L, P, V 或 W。

23. 权利要求 22 的用途，其中 x^p 选自 A, V 或 W。

24. 权利要求 23 的用途，其中氨基酸基序为

K/R-V/A-D/E/N/Q-W-x_0-S-x_1-x_2-x_3-D/E/N/Q-V/A，其中 x_0, x_1, x_2 和 x_3 如权利要求 1 所定义。

25. 权利要求 22 的用途，其中 x^p 选自 A, V 或 P。

26. 权利要求 25 的用途，其中氨基酸基序是

K/R-V/A-D/E/N/Q-P-x_0-S-x_1-x_2-x_3-D/E/N/Q-V/A，其中 x_0, x_1, x_2 和 x_3 如权利要求 1 所定义。

27. 权利要求 21 到 26 任一项的用途，其中 x_1, x_2 和 x_3 独立地选自 A, G, L, S, T 或 E。

28. 权利要求27的用途，其中肽序列具有11到14个氨基酸残基的长度。

29. 权利要求27的用途，其中肽序列具有15到18个氨基酸残基的长度。

30. 权利要求29的用途，其中肽序列是KAEWKSLGEEAWHSK (SEQ ID NO: 1)。

31. 权利要求29的用途，其中肽序列是SIDRVEPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 2)。

32. 权利要求29的用途，其中肽序列是SIDRVNPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 3)。

33. 权利要求21-32任一项的用途，其中权利要求21-32任一项的肽序列被配制为包含所述单个肽序列的两个或多个拷贝的多聚体化合物。

34. 权利要求33的用途，其中多聚体化合物是二聚体，其包含权利要求21－32任一项的单个肽序列的两个相同拷贝。

35. 权利要求33的用途，其中多聚体化合物是二聚体，其包含权利要求21－32的两个不同的肽序列。

36. 权利要求33的用途，其中多聚体化合物是二聚体，其包含权利要求21－32任一项的序列和选自TIMGLKPETR/TYAVR (SEQ ID NO: 4)或EVYVVAENQQGKSKA(SEQ ID NO: 5)的序列。

37. 权利要求33的用途，其中多聚体化合物是树状聚体，其包含连接到3个赖氨酸残基的骨架结构的、权利要求21－32任一项的肽序列的4个相同拷贝。

38. 权利要求21-37任一项的用途，其中肽片段能够结合和活化成纤维细胞生长因子受体（FGFR）家族的受体，包括成纤维细胞生长因子受体-1（FGFR-1），成纤维细胞生长因子受体-2（FGFR-2），成纤维细胞生长因子受体-3（FGFR-3），成纤维细胞生长因子受体-4（FGFR-4）和成纤维细胞生长因子受体-5（FGFR-5）。

39. 权利要求38的肽序列，其中受体是FGFR-1。

40. 11到18个氨基酸残基的肽序列，其包含式（II）的氨基酸序列

$K/R\text{-}x^{p}\text{-}D/E/N/Q\text{-}x^{p}\text{-}x_0\text{-}S\text{-}x_1\text{-}x_2\text{-}x_3\text{-}D/E/N/Q\text{-}x^{p}$

其中

x^{p}是除了P以外的任何疏水性氨基酸残基，

x_0是K, R或Y，且

x_1, x_2和x_3独立地为任何氨基酸残基。

41. 权利要求 40 的肽序列，其中 x^p 是 A，V 或 W。

42. 权利要求 40 的肽序列，其中 x_0 是 K 或 R。

43. 权利要求 40 的肽序列，其中 x_1, x_2 和 x_3 独立地选自 G, V, L 或 E。

44. 权利要求 43 的肽序列，其中 x_1 是 L 或 V, x_2 是 G，x_3 是 E。

45. 权利要求 40-44 任一项的肽序列，其中所述序列能够结合和活化成纤维细胞生长因子受体（FGFR）家族的受体，包括成纤维细胞生长因子受体-1（FGFR-1），成纤维细胞生长因子受体-2（FGFR-2），成纤维细胞生长因子受体-3（FGFR-3），成纤维细胞生长因子受体-4（FGFR-4）和成纤维细胞生长因子受体-5（FGFR-5）。

46. 权利要求 45 的肽序列，其中受体是 FGFR-1。

47. 权利要求 46 的肽序列，其中所述序列是 KAEWKSLGEEAWHSK (SEQ ID NO: 1)，或该序列的片段，或变体或同源物。

48. 权利要求 40－47 任一项的肽序列，其中所述肽序列能刺激神经元分化，神经元存活和/或神经元可塑性。

49. 权利要求 48 的肽序列，其中所述神经元分化是神经前体细胞的分化和/或神经元的分化，例如神经突长出和/或分枝过程。

50. 权利要求 47 的肽序列，其中所述同源物是与 SEQ ID NO: 1 的序列具有至少 40%的同一性，且具有 SEQ ID NO: 1 的序列的至少一种功能活性的肽序列，该功能活性如权利要求 45、48 或 49 所定义。

51. 权利要求 47 的肽序列，其中所述片段是 SEQ ID NO: 1 的序列的至少 3 个连续氨基酸残基的肽序列，具有 SEQ ID NO: 1 的如权利要求 45、48 或 49 所定义的至少一种功能活性。

52. 权利要求 47 的肽序列，其中所述变体是与 SEQ ID NO: 1 的序列具有至少 60%的同一性且具有 SEQ ID NO: 1 的至少一种功能活性的肽序列，该功能活性如权利要求 45、48 或 49 所定义。

53. 权利要求 40－52 任一项的分离的肽序列，该序列能够刺激学习和/或记忆。

54. 权利要求 40－53 任一项的化合物在制备药物中的用途。

55. 权利要求 54 的用途，其中所述药物用于病症或疾病的治疗，其中刺激神经细胞分化、神经细胞存活、学习和记忆、和/或调节 FGFR 家族的受体的活性对所述治疗是有益的。

56. 权利要求 55 的方法，其中所述病症或疾病是中枢和周围神经系统的

病症或疾病。

57. 权利要求 56 的用途，其中所述病症或疾病选自手术后神经损害，外伤性神经损害，神经纤维髓鞘形成障碍，缺血后损伤，例如中风后，糖尿病相关神经退变，影响昼夜节律钟或神经肌肉传递的障碍。

58. 权利要求 54 的用途，其中所述药物用于治疗病症或疾病，所述病症或疾病选自肌肉的病症或疾病，包括神经肌肉连接功能障碍的病症，例如器官移植后，或例如遗传性或外伤性萎缩性肌肉功能障碍。

59. 权利要求 54 的用途，其中所述药物用于治疗与新生血管发生、组织重塑和/或细胞运动增加相关的病症或疾病。

60. 权利要求 59 的用途，其中所述疾病是癌症。

61. 权利要求 60 的用途，其中所述癌症是任何涉及新生血管发生的癌症。

62. 权利要求 60 的用途，其中所述癌症是神经系统的癌症。

63. 权利要求 56 的用途，其中所述病症或疾病是学习能力障碍和/或记忆障碍。

64. 权利要求 56 或 63 的用途，其中所述病症或疾病是帕金森氏症，阿尔茨海默病，亨廷顿氏舞蹈病或痴呆如多发性梗塞痴呆。

65. 权利要求 56 的用途，其中所述病症或疾病是精神病，例如思维和/或情绪（mood）障碍，神经精神障碍包括双相型障碍（bipolar (BPD)）、遗传相关的单相型情感障碍(genetically related unipolar affective disorders)，妄想性障碍，妄想痴呆，妄想性精神病，精神分裂症，分裂型障碍，情感分裂性精神障碍(schizoaffective disorder)，情感分裂性双相型和遗传相关的单相型情感障碍，心理性精神病(psychogenic psychosis)，紧张症(catatonia)，周期性双相型和遗传相关的单相型情感障碍，循环性精神病（cycloid psychosis），分裂样人格障碍，妄想性人格障碍（paranoid personality disorder），双相型和遗传相关的单相型情感障碍相关的情感障碍和单相型情感障碍的亚型。

66. 权利要求 54 的用途，其中所述药物用于治疗与酒精消耗导致的身体损害相关的病症或疾病。

67. 权利要求 54 的用途，其中所述药物用于治疗朊病毒疾病。

68. 包含权利要求 40－53 任一项的肽序列的药物。

69. 用于刺激学习和/或记忆的药物，其包含权利要求 1－20 任一项的肽

序列和/或权利要求 40－53 任一项的肽序列。

70. 包含有效量的权利要求 68 的药物的药物组合物。

71. 包含有效量的权利要求 69 的药物的药物组合物。

72. 用于治疗与学习能力障碍和/或记忆障碍相关的病症或疾病的方法，包括对需要的个体施用有效量的权利要求 1－20 的任一项的肽序列和/或权利要求 40－53 的任一项的肽序列，权利要求 68 或 69 的药物，或权利要求 70 或 71 的药物组合物。

73. 治疗病症的方法，该病症中刺激神经细胞分化、神经细胞存活，神经细胞可塑性和/或调节 FGFR 活性对治疗是有益的，所述方法包括使用权利要求 40－53 任一项的单个的肽序列、权利要求 68 的药物或权利要求 71 的药物组合物。

74. 权利要求 1－20 和/或权利要求 40－53 的任一项的肽序列用于制备抗体的用途。

75. 能够识别和结合包含权利要求 1－20 和/或权利要求 40－53 的任一项的肽序列的表位的抗体。

76. 权利要求 75 的抗体，其中所述抗体能够调节 NCAM 和/或 FGFR 介导的生物活性。

77. 权利要求 75 和/或 76 的抗体在制备药物中的用途。

78. 包含权利要求 75 或 76 的抗体的药物组合物。

FGFR 结合肽

发明领域

本发明涉及新的肽化合物，其来自神经细胞黏着分子（neural cell adhesion molecule, NCAM）的纤连蛋白 III 型构件（module）1（F3, 1）的序列，其能结合成纤维细胞生长因子受体（FGFR）。本发明还涉及包括该化合物的药物组合物和它们用于治疗和/或预防 FGFR 和/或 NCAM 在病理和疾病恢复中起作用的不同病理状况的用途。

背景技术

脑可塑性（brain plasticity）和控制可塑性的机制，对学习和记忆，以及脑损伤后的功能恢复有主要意义。人们清楚神经营养因子是在成人中枢神经系统（CNS）中持续调控脑可塑性的分子类群之一，但细胞黏着分子（CAMs）在例如长时程增强效应、神经元的保存以及再生中扮演着较少为人理解却同样深刻的角色。但讽刺的是，在例如阿尔茨海默病（Alzheimer's disease）和多发性硬化等病症中，CAMs 也可以重新组织（reorganise）细胞外空间，并导致促使脑病理发生的紊乱。候选分子包括淀粉状蛋白前体蛋白（amyloid precursor protein），其与经典的 CAM 和 β-淀粉状蛋白有许多共同的性质，可以伪装成伪（pseudo）CAM。β-淀粉状蛋白在阿尔茨海默病中充当老年斑形成的病灶（nidus），并像 CAM 一样，为神经营养因子和其他 CAMs 的组织提供环境。炎症应答在该环境中发展，且可能引发由小胶质、补体和其他因子介导的永久性神经元损害的恶性循环（Cotman 等人（1998）Prog Neurobiol. 55:659-69）。

在早期发育中和成体中，免疫球蛋白超家族的神经细胞黏着分子（CAMs）在关键部位集结（nucleate）并维持细胞群。除了它们的黏着性之外，CAMs 的同源（homophylic）和异源（heterophylic）相互作用可能影响细胞内信号传导。因此它们影响发育事件包括细胞迁移、扩增和分化的能力，可能是它们的黏着和信号传导性质二者的结果。

神经细胞黏着分子，NCAM，是第一种被发现的神经 CAM。自从被发现后 NCAM 已经受到深入的研究，现在它的性质已经得到了充分的描述

（Ronn 等人，（2000）Int J Dev Neurosci 18:193-9）。NCAM 属于免疫球蛋白（Ig）超家族。它的胞外部分由 5 个 Ig 样和 2 个纤连蛋白 III 型（F3）构件（module）构成。NCAM 协助细胞-细胞和细胞-基质的相互作用。NCAM 结合多种细胞外基质组分例如肝素/硫酸乙酰肝素、硫酸软骨素蛋白聚糖，和不同种类的胶原。细胞-细胞相互作用大多被 NCAM 同源作用所协助。已经证明不同的 NCAM 分子执行不同的功能。因此，目前认为 NCAM 同源作用依赖于最先的 3 个 Ig 构件。肝素结合序列定位于 Ig2 构件。NCAM 还结合神经细胞黏着分子 L1。该相互作用被认为发生在 NCAM 的第 4 个 Ig 构件和 L1 上表达的寡聚甘露糖苷部分之间。NCAM 的两个近膜（membrane-proximal）F3 构件已被证明参与了成纤维细胞生长因子受体（FGFR）结合。

数个研究组已经积累了大量证据，显示作为 NCAM 介导的轴突长出（outgrowth）的基础的细胞内信号传导级联类似于由 FGFR 刺激而活化的信号转导级联（Povlsen 等人，（2003） Neurochem Res 1:127-41）。

成纤维细胞生长因子受体（FGFRs）是四种密切相关的受体蛋白酪氨酸激酶的家族，该激酶在胞外由 3 个 Ig 样构件组成，在胞内由断裂的（split）酪氨酸激酶构件组成（Powers 等人（2000）Endor Relat Cancer 7:165-97）。已知所述受体是形态发生、发育、血管发生和创伤愈合的关键调控者。FGFR 的活化和信号传导依赖于该受体的二聚体化（dimerization），这是由其配体—成纤维细胞生长因子的高亲和结合所诱导的，而且还需要细胞表面的肝素或硫酸乙酰肝素蛋白聚糖的参与。成纤维细胞生长因子在周围和中枢神经系统的功能行使中起着突出的作用（Jungnickel 等人（2004）Mol Cell Neurosci. 25:21-9; Reuss 和 von Bohlen und Halbach（2003）, Cell Tissue Res. 313:139-57）。

NCAM 被看作是一类新的假设的 FGFR 替代配体的一个成员，而且最近获得了 NCAM 与受体的直接相互作用的证据（Kiselyov 等人（2003）Structure（Camb）11:691-701; WO 04/056865）。被鉴定的直接参与和 FGFR 相互作用的 NCAM 片段具有序列 EVYVVAENQQGKSKA，并且源自 NCAM 的第 2 个纤连蛋白 III 型（F3,2）构件。

近来，还有人提出 NCAM 的其他片段也可能参与 NCAM-FGFR 相互作用。这类肽片段是源自 NCAM 的第 1 个纤连蛋白 III 型（F3,1）构件。由此，

WO 01/96364 公开了 13 个氨基酸残基的序列 SIDRVEPYSSTAQ，其中基序（motif）DRVE 据称对刺激神经突长出是必需的，而基序 PYSSTA 负责该序列刺激细胞生存的能力。包含后者基序的序列和其肽片段被提出用来治疗与创伤或疾病所致的神经细胞损失相关的疾病和作为刺激神经细胞分化和存活的药物。最近，另一专利申请 WO 05/014623 描述了 NCAM F31 的 14 氨基酸残基的片段，其具有序列 TIMGLKPETRYAVR。该序列已被证明是神经突长出的刺激物。上述两个申请都没有显示所述序列与 FGFR 的直接结合和受体的活化。

发明概述

本发明的作者在此显示，WO 01/96364 的 13 氨基酸残基的序列被延伸为 17 氨基酸残基，其中 4 个附加的氨基酸残基被添加到该序列的 C 末端后，这样的序列不再具有刺激神经突长出或神经元细胞存活的能力，但是，令人惊讶的是，这样的 17 个氨基酸残基的序列能够刺激学习和记忆。另外，该 17 个氨基酸残基的序列还可以直接结合和活化 FGFR。本发明的作者将后者序列的这些新特征与附加的 C 末端 4 个氨基酸残基的存在联系起来，这四个氨基酸残基包含了氨基酸基序 K/R-x^p-D/E/N/Q-x^p-x_0-S-x_1-x_2-x_3-D/E/N/Q-x^p 的关键(essential)氨基酸残基，上述基序中 x^p 是任何疏水性氨基酸残基，x_0 是 K，R 或 Y，x_1，x_2，x_3 独立地为任何氨基酸残基。本发明的作者在此声称，该基序对于肽序列刺激与学习和记忆相关的神经可塑性的能力是必需的。

据此，本发明的第一个方面涉及 11 到 18 个氨基酸残基的连续（contigous）的肽片段，包含式（I）的氨基酸基序

K/R-x^p-D/E/N/Q-x^p-x_0-S-x_1-x_2-x_3-D/E/N/Q-x^p

其中

x^p 是任何疏水性氨基酸残基，

x_0 是 K，R 或 Y，且

x_1，x_2，x_3 独立地为任何氨基酸残基。

包含所述基序的序列可以用来制造刺激学习和记忆的药物。

式（I）的基序对于肽序列直接结合 FGFR 并活化该受体也是重要的，但是，令人惊奇的是，本发明的作者发现，该基序中的疏水性残基的选择决定了包含该基序的肽序列所具有的诸生物活性。因此，在该基序的任何

x^P位置上脯氨酸（P）残基的存在将该序列的能力限制为仅有刺激学习和记忆的能力，而 x^P位置上的其他任何疏水性氨基酸赋予该序列刺激学习和记忆的能力、刺激神经突长出的能力和刺激神经元细胞存活的能力。由此，本发明在另一个方面涉及包含 11 到 18 个氨基酸残基的连续的肽序列，其包含式（II）的氨基酸基序

$K/R\text{-}x^P\text{-}D/E/N/Q\text{-}x^P\text{-}x_0\text{-}S\text{-}x_1\text{-}x_2\text{-}x_3\text{-}D/E/N/Q\text{-}x_p$

其中

x^P是除了 P 以外的任何疏水性氨基酸，

x_0是 K，R 或 Y，且

x_1，x_2，x_3独立地为任何氨基酸残基。

根据本发明，包含后者基序的肽序列能够刺激神经突长出，刺激神经细胞存活，刺激与学习和记忆相关的神经可塑性，并能够结合和活化 FGFR。这样的序列根据本发明可以有利地用于制造药物来治疗多种 NCAM 和/或 FGFR 在其中起主要作用的疾病。

本发明还涉及包含本发明的肽序列的药物组合物和药物。另外，本发明特别描述了包含施用根据本发明的肽序列和/或药物组合物和/或药物的步骤的治疗方法。另外，本发明涉及抗体，其能够识别和结合包含本文所公开的通式的氨基酸序列的表位，以及该抗体用于调节 NCAM 和/或 FGFR 介导的生物活性的用途。

附图描述

图 1 A 显示了 CDL (SEQ ID NO:1)、ABL (SEQ ID NO: 2)和 EFL (SEQ ID NO: 5)肽对培养中的大鼠小脑颗粒神经元（cerebellar granular neurons，CGNs）的神经突长出的作用。CDL 和 EFL 刺激 CGN 的神经突长出。**B**. EFL 刺激的神经突长出被成纤维细胞生长因子受体 1（FGFR1）抑制剂 SU5402 所抑制。四个独立实验的结果都表示为百分比±SEM，其中未处理的对照细胞设为 100%。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001，与对照比较。配对 student's t 检验。实验如下进行：用所述肽处理来自 7 日龄（7-old-day）大鼠的 CGNs 24 小时。用 4%多聚甲醛固定培养物，再用 1% BSA 封闭，然后先用兔抗大鼠 GAP-43 第一抗体，再用 AlexaFluor®488 山羊抗兔第二抗体进行免疫染色。

图 2 A 显示了树状聚体（dendrimeric）形式的 CDL (SEQ ID NO: 1) (CDLd)

和 ABL (SEQ ID NO: 2) (CDLd)肽对培养中的大鼠小脑颗粒神经元存活的作用。将该肽的作用与源自神经胶质的神经营养因子（GDNF）和树状聚体形式的 C3 肽（C3d）的作用相比较。**B** 显示 EFL (SEQ ID NO: 5)的树状聚体（dendrimer）（EFLd）对培养中的大鼠小脑颗粒神经元存活的作用。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001，与对照相比。配对 student's t 检验。

图 3 显示了单体形式的 CDL (SEQ ID NO: 1) (**A**) (CDloop)和 EFL (SEQ ID NO: 5) (**B**) (EFloop)对于培养基中的低浓度 KCl（5 mM）和高浓度 KCl（40 mM）中的大鼠小脑颗粒神经元培养物中的胱天蛋白酶 3（caspase-3）样活性的作用。*P<0.05, **P<0.01，配对 student's t 检验。

图 4 显示了具有"链-环-链"（strand-loop-strand）结构的 NCAM Fn-III, 1 构件的 4 种不同的片段与重组 FGFR1 的结合，其是通过表面等离子体共振（SPR）分析研究的。结合表示为：与固定了 FGFR1 构件的传感芯片的结合和与空白传感芯片的结合（非特异性结合）之间的响应差异（response difference, Resp. Diff.）。缩写：AB－A 链-环-B 链（相应于 SEQ ID NO: 2 的 ABL 肽）；CD－C 链-环-D 链（相应于 SEQ ID NO: 1 的 CDL 肽）；EF－E 链-环-F 链（相应于 SEQ ID NO: 5 的 EFL 肽）；BC－NCAM 的 F3,1 构件的 B 链-环-C 链；DE－NCAM 的 F3,1 构件的 D 链-环-E 链；FG－NCAM 的 F3,1 构件的 F 链-环-G 链。

图 5 显示了 ABL、CDL 和 EFL 肽对 FGFR-1 的磷酸化的定量分析结果。至少 4 次独立实验的结果表示为 FGFR1 磷酸化百分率±SEM。实验如下进行：转染了含 C 末端 StrepII 标签的 FGFR 的 TREX-293 细胞用不同浓度的肽刺激 30 min。刺激后，活化的 FGFR 用抗磷酸酪氨酸（phosphtyrosine）的抗体免疫纯化，然后用抗 StrepII 标签的抗体进行 western 印迹来分析。用处理过的细胞所得的结果与用未处理的细胞（对照，设为 100%）所得的结果比较，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001，配对 student's t 检验。

图 6 显示了体内施用 CDL (Cdl)和 EFL 肽对大鼠社交行为（social bihavior）的作用（社交识别试验（social recognition test））。**A** 施用肽/载体 1 小时后，第一次遇见（T1）和第二次遇见（T2）时社交性探察行为（social investigation）所用的时间。结果来自 8－9 只大鼠，表示为百分率±SEM。配对 student's t 检验（*P<0.05 且 ***P<0.001）。**B** 施用肽/载体 24 小时后，第一次遇见（T1）和第二次遇见（T2）时社交探察所用的时间。结果来自 9 只大鼠，表示为百分率±SEM。配对 student's t 检验（*P<0.05）。

发明详述

从发展治疗多种疾病和病理状况的有效药物的角度看，能够调节成纤维细胞生长因子受体（FGFR）和/或神经细胞黏着分子（NCAM）的功能的化合物具有最重要的意义。因此，本发明的目的是提供可以结合并由此活化FGFR的新化合物。

1. 肽序列

本发明中对氨基酸残基使用标准的单字母代码和标准的三字母代码。氨基酸的缩写是根据 IUPAC-IUB 生物化学命名联合委员会 Eur. J. Biochem, 1984, vol. 184, pp 9-37 的推荐。在整个说明书和权利要求中三字母代码或单字母代码都被使用。未指明 L 或 D 型之处，应当理解为所述氨基酸具有天然的 L 型，参见 Pure & Appl. Chem. Vol. (56(5) pp 595-624 (1984)，或 D 型，以使得所形成的肽由 L 型氨基酸，D 型氨基酸，或 L 型和 D 型混合的序列所构成。

在未指明之处应当理解，本发明的肽的 C 末端氨基酸作为游离的羧酸存在，其也可以指明为“-OH”。但是，本发明的化合物的 C 末端氨基酸可以是酰胺化的衍生物，其表示为“$-NH_2$”。在未另外说明之处，多肽的 N 末端包含游离的氨基，其也可表示为“H-”。

在未另外指明之处，氨基酸可以选自任何氨基酸，不管是否是天然的，例如 α 氨基酸. β 氨基酸，和/或 γ 氨基酸。因此，该类群包含但不限于：Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His Aib, Nal, Sar, Orn，赖氨酸类似物，DAP, DAPA 和 4Hyp。

同样，根据本发明，可以对所述化合物/肽进行修饰，例如氨基酸的糖基化和/或乙酰化。

碱性氨基酸残基根据本发明由 Arg, Lys 和 His 氨基酸残基代表，酸性氨基酸 - 由 Glu 和 Asp 氨基酸残基代表，疏水性氨基酸残基 - 由 Leu，Ile，Val，Phe，Trp，Pro 和 Ala 氨基酸残基代表，极性不带电氨基酸残基 - 由 Tyr, The, Ser, Gln 和 Asn 氨基酸残基代表。

本发明在第一个方面中提供 11 到 18 个氨基酸残基的肽序列，其包含式（I）的氨基酸基序：

$K/R\text{-}x^p\text{-}D/E/N/Q\text{-}x^p\text{-}x_0\text{-}S\text{-}x_1\text{-}x_2\text{-}x3\text{-}D/E/N/Q\text{-}x^p$

其中

x^p是任何疏水性氨基酸残基，

x_0是 K，R 或 Y，且

x_1，x_2，x_3独立地为任何氨基酸残基。

“任何疏水性残基”的意思是残基选自 A, I, L, P, V, F 或 W 氨基酸的残基。

因此，在一个实施方案中，残基 x^p可以独立地选自任何疏水性残基。在另一个实施方案中，残基残基 x^p可以独立地选自 A, P, V 或 W。术语“独立地”在本文的语境中指没有对任何指定的位置上的氨基酸残基的选择作任何特定的要求。

另外，在另一实施方案中 x^p氨基酸残基可以选自 A, V 或 W，氨基酸基序优选为

K/R-V/A-D/E/N/Q-W-x_0-S-x_1-x_2-x_3-D/E/N/Q-V/A，

其中

x_0是 K, R 或 Y，且

x_1, x_2, x_3独立地为任何氨基酸残基。

在另一实施方案中 x^p氨基酸残基可以选自 A, V 或 P，氨基酸基序优选为

K/R-V/A-D/E/N/Q-P-x_0-S-x_1-x_2-x_3-D/E/N/Q-V/A

其中

x_0是 K, R 或 Y，且

x_1, x_2, x_3独立地为任何氨基酸残基。

根据本发明，上述基序中的残基 x_1, x_2, x_3对于包含上述基序的肽序列的生物活性没有显著的重要性，因此该残基可以独立地选自任何氨基酸残基。但是，在一些实施方案中，残基 A, G, L, I, S, T 和 E 可能是优选的。序列 x_1-x_2-x_3 可以是由连续地互相连接的后者残基所组成的任何序列，例如序列 I-G-L, L-G-I, A-G-L, A-T-L, L-G-E, I-G-E, A-G-I, S-T-A 或 S-G-A 中的任何序列。在一些实施方案中序列 S-T-A 和 L-G-E 是优选的。

因此，本发明的肽序列是 11 到 18 个氨基酸残基的连续序列，包含像任何上述的基序那样的基序。本发明涉及序列，其是分离的肽序列。在本文的语境中，这意味着肽序列作为单个化学实体存在，并且作为单个化学实体用于本文的目的。本发明并不涉及这样的包含上述基序的肽序列：它们

天然或重组多肽的整合的部分，例如神经细胞黏着分子（NCAM）的多肽或片段的整合的部分。

在一个实施方案中，肽序列可能具有 11 到 14 个氨基酸残基的长度；在另一个实施方案中，该序列可能具有 15 到 18 个氨基酸残基的长度。依赖于实施方案，例如 11, 12, 13, 14, 15, 16,17 或 18 个氨基酸残基的序列长度可能是优选的。

本发明将上面描述的结构特征，与肽序列的结合和活化 FGFR、以及刺激学习和记忆、神经突长出和/或神经元细胞存活的能力联系起来。

本发明在本文中公开了能够刺激记忆和学习的具体序列，即序列 KAEWKSLGEEAWHSK (SEQ ID NO: 1), SIDRVEPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 2)和 SIDRVNPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 3)。

在一些实施方案中序列 KAEWKSLGEEAWHSK (SEQ ID NO: 1)可能是优选的，而在另外的实施方案中序列 SIDRVEPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 2)或序列 SIDRVNPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 3)可能是优选的。

序列 KAEWKSLGEEAWHSK (SEQ ID NO: 1)，SIDRVEPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 2)和 SIDRVNPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 3)全都能够直接结合 FGFR 并刺激该受体，而且它们都能够刺激学习和记忆。但是，序列 KAEWKSLGEEAWHSK (SEQ ID NO: 1)与序列 SIDRVEPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 2)和 SIDRVNPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 3)相比具有一些额外的生物活性，即它能够刺激神经突长出和神经细胞存活，而序列 SIDRVEPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 2)和序列 SIDRVNPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 3)不具有这样的能力。发明人在此鉴定了这样的结构特征，其赋予序列结合和活化 FGFR、刺激学习和记忆、刺激神经突长出和神经细胞存活的能力。该特征是：能够结合和活化 FGFR、刺激学习和记忆、刺激神经突长出和神经细胞存活的肽序列包含式（II）的氨基酸基序：$K/R\text{-}x^{P}\text{-}D/E/N/Q\text{-}x^{P}\text{-}x_0\text{-}S\text{-}x_1\text{-}x_2\text{-}x_3\text{-}D/E/N/Q\text{-}x^{P}$，其中 x^{P} 位置上的 P（脯氨酸残基）被排除在疏水性氨基酸残基的选择之外。

因此，定义为如下式（II）的基序：

$K/R\text{-}x^{P}\text{-}D/E/N/Q\text{-}x^{P}\text{-}x_0\text{-}S\text{-}x_1\text{-}x_2\text{-}x_3\text{-}D/E/N/Q\text{-}x^{P}$

其中

x^{P} 是除 P 以外的任何疏水性氨基酸残基，

x_0 是 K，R 或 Y，且

x_1-x_2-x_3 独立地为任何氨基酸残基，

是这样的结构基序，它赋予含有该基序的序列以结合和活化 FGFR、刺激学习和记忆、刺激神经突长出和神经细胞存活的能力。在一些实施方案中，这样的序列可能具有位置 x_0 上的残基 Y。但是，在这个位置上残基 K 或 R 是优选的。上面讨论了残基 x_1，x_2 和 x_3 的不同的实施方案。位置 x_1，x_2 和 x_3 的残基的优选的实施方案是残基 G, V, L 或 E，其中在位置 x_1 上更优选 L 或 V，位置 x_2 上更优选 G，位置 x_3 上更优选 E。

根据本发明，位置 x^p 上残基 P 的存在可能将包含上述基序的肽序列的能力限制为结合和活化 FGFR 和刺激学习和记忆的能力，例如序列 SIDRVEPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 2)和 SIDRVNPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 3)的能力。

本发明涉及包含式（II）的基序的肽序列的片段、变体和同源物:

K/R-x^p-D/E/N/Q-x^p-x_0-S-x_1-x_2-x_3-D/E/N/Q-x^p

其中

x^p 是除 P 以外的任何疏水性氨基酸残基，

x_0 是 K，R 或 Y，且

x_1-x_2-x_3 独立地为任何氨基酸残基，

其已详述如上。

在本文的语境中，本发明定义了:

i）片段，其是这样的序列，该序列具有包含上述基序特别是 SEQ ID NO: 1 的序列的长度的至少 40%，更优选至少 50%，更优选至少 60%，更优选至少 70%，更优选至少 80%，更优选至少 90%，更优选至少 95%;

ii）变体，其是与包含上述基序特别是 SEQ ID NO: 1 的序列具有至少 60%，更优选至少 70%，更优选至少 80%，更优选至少 90%，更优选至少 95%的同源性的氨基酸序列，或者其是这样的氨基酸序列: 与包含上述基序特别是 SEQ ID NO: 1 的序列相比，该氨基酸序列具有至少 60%，更优选至少 70%，更优选至少 80%，更优选至少 90%，更优选至少 95%的正氨基酸匹配（positive amino acid matches）。“正氨基酸匹配”在本文中定义为在被比较的两个序列中具有相同位置的氨基酸残基之间物理和/或化学性质的同一性或相似性。本发明的优选的正氨基酸匹配为 K 对 R, E 对 D, L 对 M, Q 对 E, I 对 V, I 对 L, A 对 S, Y 对 W, K 对 Q, S 对 T, N 对 S 和 Q 对 R。一个氨基酸序列和另一个氨基酸的同源性在本文中定义为在两个被比较的

(collated)序列中同样的氨基酸的百分比。序列的同源性可以用熟知的算法例如 BLOSUM 30, BLOSUM 40, BLOSUM 45, BLOSUM 50, BLOSUM 55, BLOSUM 60, BLOSUM 62, BLOSUM 65, BLOSUM 70, BLOSUM 75, BLOSUM 80, BLOSUM 85, 或 BLOSUM 90 来计算;

3）同源物，其是这样的氨基酸序列：该序列与包含上述的基序特别是 SEQ ID NO: 1 的序列具有少于 60%但多于 30%，如 50-59%，例如 55%，如 40-49%，例如 45%，如 30-39%，例如 35%的同源性。

设想如上定义的片段、变体和同源物保持原来的序列的至少某些生物活性，例如刺激神经细胞分化、记忆和学习、神经细胞存活，和/或结合和活化 FGFR 的能力。

本发明的优选的同源物是这样的同源物，其与 SEQ ID NO: 1 的序列具有至少 40%的同源性，如 40-44%的同源性，更优选至少 45%的同源性，如 45-49%的同源性，更优选至少 50%的同源性，如 51-54%的同源性，更优选至少 55%的同源性，如 56-59%的同源性。本发明的优选的片段是这样的片段，其由 SEQ ID NO:1 的序列的至少 3 个连续的氨基酸残基组成，更优选由 4 个氨基酸残基，更优选 5 个氨基酸残基，更优选 6 个氨基酸残基，更优选 7 个氨基酸残基，更优选 8－11 个氨基酸残基组成。本发明的优选的变体是这样的肽序列，其与 SEQ ID NO: 1 的序列具有至少 70%的同源性，如 71-74%的同源性，更优选 75%的同源性，如 76-79%的同源性，更优选至少 80%的同源性，如 81-84%的同源性，更优选至少 85%的同源性，如 86-89%的同源性，更优选至少 90%的同源性，如 91-94%的同源性，更优选至少 95%的同源性，如 96-99%的同源性。

根据本发明，如上所述的分离的肽序列可以制为化合物，

化合物可以含有选自上述任一的单个氨基酸序列的单一拷贝，或者其可含有这样的氨基酸序列的两个或多个拷贝。这意味着本发明的化合物可以被制为肽序列的单体（单体化合物），例如含有单个单独肽序列，或者其可以被制为肽序列的多聚体（多聚体化合物），即含有两个或多个单独的肽序列，其中所述单独的肽序列可以体现为相同序列的两个或多个拷贝，或两个或更多不同的单独肽序列。多聚体也可以包含全长序列和其一或多个片段的组合。在一个实施方案中，化合物可包含两个氨基酸序列，这样的化合物在本文中定义为二聚体（dimer），在另一个实施方案中，化合物可以含有多于两个氨基酸序列，例如 3 个，4 个或更多的序列。本发明优选

地涉及含有 2 个或 4 个肽序列的化合物。但是含有 3、5、6、7、8 或更多序列的化合物也在本发明的范围内。

如上面所述的，多聚体化合物可以含有同样的肽序列，或者所述序列可以是不同的。其中序列不同的化合物的例子可以是含有 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 的化合物，另一例子可以是含有 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 3 的化合物。根据本发明不同的实施方案，可以对本发明的序列作任意组合。所述序列可以通过键，例如肽键彼此连接，或通过接头分子或集聚（grouping）彼此连接。肽序列通过接头分子或集聚彼此连接的化合物是优选的。在另一实施方案中，化合物可以含有序列的两个或多个同样的拷贝，例如选自 SEQ ID NO: 1，2 或 3 的序列的两个拷贝，其中所述两个拷贝通过接头集聚（linker grouping）彼此连接。优选序列通过接头集聚而连接的化合物。这样的接头集聚的例如可以有非手性的二-，三-或四羧酸。在本发明的说明书中进一步详述了合适的二-，三-或四羧酸、生产这样的化合物的方法，和配体呈递组装（ligand presentation assembly）（LPA）方法。可能的接头的另一个例子可能是氨基酸赖氨酸。单独的肽序列可以附着到核心分子例如赖氨酸上，从而形成单独的肽序列的树枝状多聚体（树状聚体）。树状聚体的生产是本领域熟知的（PCT/US90/02039, Lu 等人, (1991) Mol Immunol. 28: 623-630; Defoort 等人, (1992) Int J Pept Prot Res. 40:214- 221; Drijfhout et al.(1991) Int J Pept Prot Res. 37: 27-32），而且目前树状聚体在研究和医疗用途有广泛的应用。本发明的一个优选的实施方案提供树状聚体化合物，其包含附着于赖氨酸核心分子的 4 个不同的单独氨基酸序列。同样优选的是，所述 4 个单独的氨基酸序列中至少一个包含如上定义的通式的氨基酸序列。更优选的是，树状聚体化合物的 4 个单独的氨基酸序列各自单独地包含选自上面讨论的那些基序的氨基酸基序。

本发明的多聚体化合物，如 LPA-二聚体或溶素（lysin）树状聚体，是本发明的优选化合物。但是，取决于实施方案，含有两个或多个单独的本发明的序列的其他种类的多聚体化合物可以是优选的。

本发明的范围中还有这样的化合物：其包含单独的本发明的序列或其片段、变体或同源物的一个或多个拷贝，以及另一生物活性的实体，例如另一肽序列。这样的化合物中，最优选的是如下那些：它们包含至少一个本发明的肽序列，以及能够刺激成纤维细胞生长因子受体的肽序列，例如肽序列 EVYVVAENQQGKSKA (SEQ ID NO: 4) 或肽序列

TIMGLKPETRYAVR (SEQ ID NO: 5)。

因此，在一个优选的实施方式中，本发明的多聚体化合物是包含单独的肽序列的两个同样的拷贝的二聚体，所述肽序列包含本发明的基序。在另一个优选的实施方案中，本发明的多聚体化合物是包含单独的肽序列的两个同样的拷贝的二聚体，所述肽序列包含本发明的基序。另外，在另一个优选的实施方案中，本发明的多聚体化合物是包含两个不同肽序列的二聚体，所述肽序列包含本发明的基序。优选的多聚体化合物还可能是包含包括本发明的基序的序列和选自 TIMGLKPETRYAVR (SEQ ID NO: 5)或 EVYVVAENQQGKSKA (SEQ ID NO: 4)的化合物。而且，本发明的优选的多聚体化合物中还有这样的多聚体化合物：它是树状聚体，包含与 3 个赖氨酸残基的骨架结构相连接的 4 个同样拷贝的肽序列，其中该肽序列包含本发明的基序。

多聚体化合物中的肽序列的方向可以是 N 到 C，C 到 N，或混合的。术语“N 到 C 方向”是指两个预先确定的序列通过它们的 N 末端氨基酸残基连接到接头，例如(COOH)肽序列(NH_2)-接头-(NH_2)肽序列(COOH) 类型的化合物。术语“C 到 N 方向”是指两个预先确定的序列通过它们的 N 末端氨基酸残基与接头连接，例如 (NH_2)肽序列(COOH)-接头-(COOH)肽序列(NH_2)类型的化合物。术语“混合方向”指两个预先确定的序列通过它们的 C 末端或 N 末端氨基酸残基与接头连接，例如一个肽序列通过其 N 末端氨基酸残基而另一肽序列通过其 C 末端氨基酸残基，例如下面的类型：(NH_2)肽序列(COOH)-接头- (NH_2)肽序列(COOH)的化合物。

根据本发明，如上定义的肽序列和包含所述序列的化合物能够结合并活化 FGFR。

2. 生物活性

由此，本发明的肽序列能够结合和活化功能性的细胞表面受体，它是成纤维细胞生长因子受体（FGFR）家族的受体，包括成纤维细胞生长因子受体-1（FGFR-1）、成纤维细胞生长因子受体-2（FGFR-2）、成纤维细胞生长因子受体-3（FGFR-3）、成纤维细胞生长因子受体-4（FGFR-4）和成纤维细胞生长因子受体-5（FGFR-5），优选为 FGFR-1。

配体在胞外结合受体，导致受体的活化，其意味着受体变得能够活化至少一条细胞内信号转导途径，造成一种或其他的细胞应答。

术语“结合”在本文中指本发明的肽序列与 FGFR 的直接相互作用。术语“相互作用”意味着肽序列与 FGFR 有暂时的或永久的直接接触。用语“受体的活化”意味着受体变得能够将“配体结合”的效应传递到细胞内总称为“受体信号传导”或“信号转导”的生物反应的级联，结果产生细胞的生理应答。

因此，能够结合和活化细胞受体的本发明的肽序列就可以模仿天然受体配体的作用，而且，在本文的语境中，它们应理解为受体配体，特别是 FGFR 配体的模拟物（mimics）。已知的是，受体可能具有数种不同的配体，这些配体与受体的结合活化不同的信号转导途径，结果产生不同的细胞应答。

本发明优选地涉及 FGFR-1 相关的信号转导途径。在本文中 FGFR-1 的活化由 FGFR-1 酪氨酸磷酸化的程度来定义，根据本发明，该程度由于本发明的序列的结合而增加。在本文中，FGFR-1 相关的信号转导途径的活化定义为参与 FGFR-1 相关信号转导途径的一种或多种细胞内蛋白质的活化分子，例如蛋白质 STAT1、JNK、PLCγ、ERK、STATS、PI3K、PKC、FRS2 和/或 GRB2 的活化分子的存在。在本文中，参与 FGFR-1 相关信号转导途径的一种或多种细胞内蛋白质的分子的活化状态定义为所述分子的磷酸化程度，该程度由于本发明的序列结合 FGFR 而增加或减少。磷酸化程度估计为比对照值高/低至少 20%，如至少 20-200%，例如至少 50-200%。对照值估计为细胞环境中不存在能够结合和活化 FGFR 的化合物时，目标蛋白质的磷酸化程度。涉及依赖 FGFR-1 信号传导的细胞应答时，本发明特别地涉及选自但不限于下列的细胞应答:

1）细胞分化的诱导，例如神经元细胞、干细胞或癌细胞的分化，神经再生，神经突长出和分枝（branching），细胞扩增的抑制;

2）细胞存活的增加，例如由于身体创伤性损伤（body traumatic damage）或疾病的神经元细胞存活，抑制凋亡;

3）细胞可塑性的增加，例如形态可塑性，例如与记忆和学习相关的神经细胞可塑性。

本发明的肽序列可以源自神经细胞黏着分子（NCAM），例如源自 GenBank 数据库中以 Swiss-Prot 登录号 P13591, P13592, P13596 或 P13595 标识的 NCAM 多肽。这样的肽序列的例子可以为序列 KAEWKSLGEEAWHSK (SEQ ID NO:1)或序列 SIDRVEPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 2)。这些肽序列是 NCAM 多肽的组成序列，当作为分离的肽

序列时，根据本发明，它们能够模拟与 FGFR 功能相关的 NCAM 活性，例如刺激 NCAM-FGFR 依赖的神经细胞分化、存活和可塑性。但是，本发明并不将本发明的肽序列的能力限定为模拟 NCAM 的功能。最近，已经描述了一类新的低亲和度 FGFR 配体，其能够以与 NCAM 结合相近的亲和度，以与 NCAM 相同的结合位点结合到受体分子上（WO 04/056865）。根据本发明，本文中所描述的 NCAM 的肽序列与 WO 04/056865 中所述 NCAM 的肽序列代表 NCAM 的 FGFR 结合位点的不同部分。通过该结合位点，NCAM 与 FGFR 上的结合位点相互作用，该 FGFR 上的结合位点与 WO 04/056865 所述的低亲和度 FGFR 配体是共有的。因此，本发明的肽序列可能可以模仿来自后者的 FGFR 配体组的低亲和度配体与 FGFR 的结合，从而模仿所述配体的生物活性。因此，本发明的范围包括下列与 FGFR 功能相关的蛋白质的任何生物活性：

神经细胞黏着分子 L1 (Swiss-Prot 登录号: Q9QYQ7, Q9QY38, P11627, Q05695 或 P32004),

- 神经细胞黏着分子-2 (NCAM-2) (Swiss-Prot 登录号: P36335)

- 神经元-胶质细胞黏着分子(Ng-CAM) (Swiss-Prot 登录号: Q03696 或 Q90933),

- 神经细胞黏着分子 CALL (Swiss-Prot 登录号: O00533),

- 神经胶质蛋白(Swiss-Prot 登录号: P91767 或 P20241),

- Nr-CAM(HBRAVO, NRCAM, NR-CAM 12) (Swiss-Prot 登录号: Q92823, O 15179 或 Q9QVN3),

- 轴突蛋白-1/TAG-1 (Swiss-Prot 登录号: Q02246, P22063 或 P28685),

- 轴突相关细胞黏着分子(AxCAM) (Swiss-Prot 登录号: Q8TC35 或 NP_031544.1),

- 髓鞘相关糖蛋白(MAG) (Swiss-Prot 登录号: P20917),

- 神经细胞黏着分子 BIG-1(Swiss-Prot 登录号: Q62682),

- 神经细胞黏着分子 BIG-2(Swiss-Prot 登录号: Q62845),

- 成束蛋白(FAS-2) (Swiss-Prot 登录号: P22648),

- 神经细胞黏着分子 HNB-3/NB-3 (Swiss-Prot 登录号: Q9UQ52, P97528 或 Q9JMB8)

- 神经细胞黏着分子 HNB-2/NB-2 (Swiss-Prot 登录号: O 94779, P07409 或 P97527),

- 钙黏着蛋白(Swiss-Prot 登录号: Q9VW71),

- 连接黏附分子-1 (JAM-1) (Swiss-Prot 登录号:Q9JKD5 或 O 88792),

- 神经细胞黏附 F3/F11 (接触蛋白) (Swiss-Prot 登录号: Q63198, P1260,Q12860, Q28106, P14781 或 O 93250),

- 神经束蛋白(Swiss-Prot 登录号: Q90924,Q91 Z60 或 042414),

- B 淋巴细胞黏附分子 CD22 (Swiss-Prot 登录号: Q9R094 或 P20273),

- Neogenin(NE O 1) (Swiss-Prot 登录号: Q92859, P97603, Q90610 或 P97798),

- 细胞间细胞黏附分子-5 (ICAM-5/telencephalin) (Swiss-Prot 登录号:Q8TAM9, Q60625),

- 结合半乳糖的凝集素-12(半乳凝素-12) (Swiss-Prot 登录号:Q91 VD1, Q9JKX2 或 Q9NZ03),

- 结合半乳糖的凝集素-4 (半乳凝素-4) (Swiss-Prot 登录号: Q8K419; P38552),

- 成纤维细胞生长因子受体 1 (FGFR1) (Swiss-Prot 登录号: Q9QZM7, Q99AVV7, Q9UD50 或 Q63827),

- 成纤维细胞生长因子受体 2 (FGFR2) (Swiss-Prot 登录号: Q96KM2, P21802 或 Q63241),

- 成纤维细胞生长因子受体 3 (FGFR3) (Swiss-Prot 登录号:Q95M13, AF487554 或 Q99052),

- 成纤维细胞生长因子受体 4 (FGFR4) (Swiss-Prot 登录号: Q91742),

- 神经营养蛋白酪氨酸激酶 2 型 (NTRKT-2) (Swiss-Prot 登录号: Q8WXJ5),

- 白细胞抗原相关的蛋白质-酪氨酸磷酸酶(LAR-PTPRF)(Swiss-Prot 登录号:Q9EQ17, Q64605, Q64604, Q9QW67,Q9VIS8 或 P10586),

- Nephrin (Swiss-Prot 登录号: Q925S5, Q9JIX2, Q9ET59, Q9R044,或 Q9QZS7, Q06500),

- 蛋白质-酪氨酸磷酸酶受体 S 型 (PTPRS) (Swiss-Prot 登录号: Q64699,Q13332 或 O 75870),

- 蛋白质-酪氨酸磷酸酶受体 κ 型(R-PTP-kappa) (Swiss-Prot 登录号: Q15262),

- 蛋白质-酪氨酸磷酸酶受体 D 型 (PTPRD) (Swiss-Prot 登录号:

Q8WX65, Q9IAJ1, P23468 或 Q64487),

- 肝配蛋白(Ephrin)A 型受体 8(EPHA8/酪氨酸-蛋白质激酶受体 EEK) (Swiss-Prot 登录号: 009127 或 P29322),

- 肝配蛋白 A 型受体 3 (EPHA8/酪氨酸-蛋白质激酶受体 ETK-1/CEK4) (Swiss-Prot 登录号: P29318),

- 肝配蛋白 A 型受体 2 (Swiss-Prot 登录号: Q8N3Z2)

- 胰岛素受体 (IR) (Swiss-Prot 登录号: Q9PWN6)

- 胰岛素样生长因子-1 受体(IGF-1) (Swiss-Prot 登录号: Q9QVW4, P08069, P24062, Q60751, P15127 或 P15208)

- 胰岛素相关受体(IRR) (Swiss-Prot 登录号: P14616),

- 酪氨酸-蛋白质激酶受体 Tie-1 (Swiss-Prot 登录号: 06805, P35590 或 Q06806),

- Roundabout 受体-1(robo-1) (Swiss-Prot 登录号: O 44924, AF041082 或 Q9Y6N7),

- 神经元烟碱性乙酰胆碱受体 α3 亚基 (CHRNA3) (Swiss-Prot 登录号: Q8VHH6, P04757, Q8R4G9 或 P32297)

- 神经元烟碱性乙酰胆碱受体 α6 亚基(Swiss-Prot 登录号:Q15825 或 Q9R0W9)

- 血小板源性生长因子受体 β (PDGFRB) (Swiss-Prot 登录号: Q8R406 或 Q05030),

- 白介素-6 受体 (IL-6R) (Swiss-Prot 登录号: Q00560),

- 白介素-23 受体 (IL-23R) (Swiss-Prot 登录号: AF461422),

- 白介素-3，白介素-5 和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（GmCSF）的 β-共通细胞因子受体（Beta-common cytokine receptor）(Swiss-Prot 登录号:P32927)

- 细胞因子受体样分子 3(CRLF1) (Swiss-Prot 登录号: Q9JM58),

- 第 I 类细胞因子受体(ZCYTOR5) (Swiss-Prot 登录号: O 9UHH5)

- Netrin-1 受体 DCC (Swiss-Prot 登录号: P43146),

- 白细胞Fc受体样蛋白(IFGP2) (Swiss-Prot登录号: Q96PJ6 或 Q96KM2),

- 巨噬细胞清除剂受体 2(MSR2) (Swiss-Prot 登录号: Q91YK7),

- 粒细胞集落刺激因子受体(G-CSF-R) (Swiss-Prot 登录号: Q99062),

- 串珠蛋白聚糖（perlecan）(Swiss-Prot 登录号: P98160),

- ADAM-8 (Swiss-Prot 登录号:Q05910),
- ADAM-19(Swiss-Prot 登录号:Q9H013 或 O 35674),
- ADAM-8 (Swiss-Prot 登录号: P78325),
- ADAM-12 (Swiss-Prot 登录号: O 43184 或 Q61824),
- ADAM-28 (Swiss-Prot 登录号: Q9JLN6, Q61824, Q9XSL6 或 Q9UKQ2),
- ADAM-33 前体(Swiss-Prot 登录号: Q8R533 或 Q923W9),
- ADAM-9 (Swiss-Prot 登录号:Q13433 或 Q61072),
- ADAM-7 (Swiss-Prot 登录号: Q9H2U9, O 35227 或 Q63180),
- ADAM-1 A 受精蛋白 α (Swiss-Prot 登录号: Q8R533),
- ADAM-15 (Swiss-Prot 登录号: Q9QYV0, O88839 或 Q13444),
- 含金属蛋白酶-desintegrin 域的蛋白 (TECAM) (Swiss-Prot 登录号: AF163291),
- 金属蛋白酶 1 (Swiss-Prot 登录号: O 95204 或 Q9BS16),
- 胶原蛋白 VII 型(Swiss-Prot 登录号: Q63870),
- 纤连蛋白(Swiss-Prot 登录号: Q 95KV4, Q95KV5, P07589, Q28377, U42594, O 95609 或 P11276),
- 生腱蛋白(Tenascin)-R (Swiss-Prot 登录号:Q15568, O 00531, Q90995 或 P10039),
- 细胞因子样因子-1 (CLF-1) (Swiss-Prot 登录号: O 75462)

两分子间的任何相互作用都可以用相互作用的亲和度来描述，相互作用的亲和性是指两个分子之间的吸引的强度。相互作用的亲和度通常表示为解离平衡常数 Kd 的值。Kd 反映两个分子之间解离速率和结合速率的比，因此是两个分子之间结合强度的量度。较低的 Kd 值反映较强的结合。

上述 FGFR 配体具有亲和度相对较低的 FGFR 结合。本发明的低亲和度相互作用的特征是 Kd 值为 10^{-3} 到 10^{-10} M，例如 10^{-4} 到 10^{-8} M。因此，本发明涉及肽序列和 FGFR 之间的相互作用的亲和度，其为 10^{-3} 到 10^{-10} M，优选 10^{-4} 到 10^{-8} M。

本发明在不同的实施方案中可以涉及本发明的肽序列的不同生物活性。因此在一个实施方案中，本发明可能涉及肽序列刺激与学习和记忆相关的神经可塑性的能力。根据本发明，这样的肽序列可以选自本文描述的任何序列。优选的序列可以是序列 KAEWKSLGEEAWHSK (SEQ ID NO: 1), 或序列 SIDRVEPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 2)。

在另一个实施方案中本发明可以涉及肽序列刺激神经元分化，例如神经前体细胞的分化或神经元分化，包括所述过程的神经突长出和/或分枝的能力。根据本发明，该活性与包含基序 K/R-x^P-D/E/N/Q-x^P-x_0-S-x_1-x_2-x_3-D/E/N/Q-x^P 的肽序列相关联，

其中

x^P 是除了 P 以外的任何疏水性氨基酸残基，

x_0 是 K，R 或 Y，且

x_1-x_2-x_3 相互独立地为任何氨基酸残基，

因此，这样的实施方案的优选序列可以是序列 KAEWKSLGEEAWHSK (SEQ ID NO: 1)。包含上述基序的肽序列也能够构刺激细胞存活，优选神经元细胞存活，因此本发明的一些优选实施方案可涉及肽序列刺激细胞，优选神经元细胞存活的能力。这样的实施方案的优选序列也可以是序列 KAEWKSLGEEAWHSK (SEQ ID NO: 1)。当本发明涉及具有选自

i）刺激学习和记忆，

ii）刺激神经细胞存活，

iii）刺激神经细胞分化

的两种或更多的生物活性时，也可以优选包含上述基序的序列。

这样的实施方案的优选序列也是序列 KAEWKSLGEEAWHSK (SEQ ID NO: 1)。

3. 肽片段的生产

本发明的肽可以通过任何常规合成方法、重组 DNA 技术、肽序列所来源的全长蛋白的酶切割，或这些方法的组合来制备。

重组制备

因此，在一个实施方案中，本发明的肽是使用重组 DNA 技术生产的。

编码肽或该肽所来源的相应全长蛋白的 DNA，可以用确立的标准方法，例如 Beaucage 和 Caruthers, 1981, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1869 所述的亚磷酰胺（phosphoamidine）法或 Matthes 等人，1984, EMBO J. 3: 801-805 所述的方法，通过合成制备。根据亚磷酰胺法，寡核苷酸在例如自动化 DNA 合成仪中合成，纯化，退火，连接并克隆到合适的载体中。

编码肽的 DNA 序列还可以通过将编码肽来源的相应全长蛋白的 DNA

片段化来制备，使用 DNAaseI，按照标准操作规程(Sambrook 等人, Molecular cloning: A Laboratory manual. 2 rd ed. , CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) 进行。

或者，编码全长蛋白的 DNA 序列可以使用特异性的限制性内切核酸酶来片段化。DNA 片段进一步使用 Sambrook 等人, Molecular cloning: A Laboratory manual. 第二版, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 中描述的标准程序来纯化。

编码全长蛋白的 DNA 序列还可以是基因组或 cDNA 来源的，例如这样获得：制备基因组或 cDNA 文库，并按照标准技术（参考 Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. , Cold Spring Harbor, 1989）使用合成的寡核苷酸探针进行杂交，来筛选编码所述全长蛋白的全部或部分的 DNA 序列。

然后，将 DNA 序列插入重组表达载体，该载体可以是任何能够方便地接受重组 DNA 操作的载体。载体的选择经常取决于其要导入的宿主细胞。因此，载体可以是自主复制的载体，即作为染色体外的实体存在，其复制不依赖于染色体复制的载体，例如质粒。或者，所述载体也可以是这样的载体：当它被导入宿主细胞后，整合到宿主细胞基因组中，并与其整合进入的染色体共同复制。

在载体中，编码肽或全长蛋白的 DNA 序列应当与合适的启动子序列可操作地连接。启动子可以是任何 DNA 序列，其在所选的宿主细胞中显示转录活性，并可来源于编码宿主细胞的内源或外源蛋白的基因。适于在哺乳动物细胞中指导编码 DNA 序列的转录的启动子的例子有：SV40 启动子（Subramani 等人, 1981, Mol. Cell Biol. 1: 854-864），MT-1（金属硫蛋白基因）启动子(Palmiter 等人, 1983, Science 222: 809-814)，或腺病毒 2 主要晚期启动子。适用于昆虫细胞的启动子有多角体蛋白启动子（Vasuvedan 等人, 1992, FEBS Lett.311:7-11）。适用于酵母宿主细胞的启动子包括来自酵母糖酵解基因（Hitzeman 等人, 1980, J. Biol Chem. 255:12073-12080; Alber 和 Kawasaki, 1982, J. Mol. Appl. Gen. 1: 419-434）或醇脱氢酶基因（Young 等人, 1982, 于 Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals 中，Hollaender 等人编, Plenum Press, New York）的启动子，或 TPI1（US 4,599,311）或 ADH2-4c （Russell 等人, 1983, Nature 304:652-654）启动子。适用于丝状真菌宿主细胞的启动子有例如 ADH3 启动子（McKnight 等人, 1985, EMBO J. 4:

2093-2099）或 tpiA 启动子。

编码 DNA 序列也可以可操作地连接到合适的终止子，例如人生长激素终止子（Palmiter 等人，同前所引）或（对真菌宿主）TPI1（Alber 和 Kawasaki，同前所引）启动子。载体还可以包含多聚腺苷酸化信号（例如来自 SV40 或腺病毒 5 的 Elb 区）、转录增强子序列（例如 SV40 增强子）和翻译增强序列（例如编码腺病毒 VA RNA 的那些）等元件。

重组表达载体还可以包含使得该载体可以在所述宿主细胞中复制的 DNA 序列。这样的序列的例子（当宿主细胞是哺乳动物细胞时）有 SV40 的复制起点。载体还可以包含可选择标记，例如，其产物可补偿宿主细胞的缺陷的基因，如编码二氢叶酸还原酶（DHFR）的基因，或其产物可赋予针对药物如新霉素、潮霉素或氨甲喋呤的抗性的基因。

分别连接编码所述肽或全长蛋白、启动子和终止子，并将它们插入合适的含有复制必需信息的载体所用的方法，对本领域的技术人员是熟知的（参考，例如，Sambrook 等人，同上所引）。

为了获得本发明的重组肽，编码 DNA 序列可以有用地与第二肽编码序列和蛋白酶切割位点编码序列融合，产生编码融合蛋白的 DNA 构建体，其中蛋白酶切割位点编码序列位于 HBP 片段和第二肽编码序列之间，插入重组表达载体，并在重组宿主细胞中表达。在一个实施方案中，所述第二肽选自，但不限于谷胱甘肽-S-还原酶，小牛胸腺素，细菌硫氧还蛋白或人泛素的天然或合成变体，或其肽。在另一实施方案中，包含蛋白酶切割位点的肽序列可以是：Xa 因子，切割位点氨基酸序列为 *IEGR*；肠激酶，切割位点氨基酸序列为 *DDDDK*；凝血酶，切割位点氨基酸序列为 *LVPR/GS*；或水解无色杆菌（*Acharombacter lyticus*），切割位点氨基酸序列为 *XKX*。

表达载体所导入的宿主细胞可以是任何能够表达所述肽或全长蛋白的细胞，优选为真核细胞，例如无脊椎动物（昆虫）细胞或脊椎动物细胞，例如非洲爪蟾（*Xenopus laevis*）卵母细胞或哺乳动物细胞，特别是昆虫和哺乳动物细胞。合适的哺乳动物细胞系有 HEK293 (ATCC CRL-1573), COS (ATCC CRL-1650), BHK (ATCC CRL-1632, ATCC CCL-10)或 CHO (ATCC CCL- 61)细胞系。转染哺乳动物细胞并在该细胞中表达导入的 DNA 序列的方法在例如 Kaufman 和 Sharp, J. Mol. Biol. 159,1982, pp. 601-621; Southern 和 Berg, 1982, J. Mol. Appl. Genet. 1:327- 341; Loyter 等人, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 422-426; Wigler 等人, 1978, Cell 14: 725; Corsaro 和

Pearson, 1981,于 Somatic Cell Genetics 7, p. 603; Graham 和 van der Eb, 1973, Virol. 52: 456; 及 Neumann 等人, 1982, EMBO J. 1:841-845 中有描述。

或者，真菌细胞（包括酵母细胞）可以用作宿主细胞。合适的酵母细胞的例子包括糖酵母属（*Saccharomyces*）的菌种或裂殖酵母属（*Schizosaccharomyces*）的菌种的细胞，特别是酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的菌株。其他真菌细胞的例子有丝状真菌，例如曲霉属（*Aspergillus*）菌种或脉孢菌属（*Neurospora*）菌种，特别是米曲霉（*Aspergillus oryzae*）或黑曲霉（*Aspergillus niger*）的细胞。曲霉属菌种用于表达蛋白的用途在例如 EP 238 023 中有记载。

用于培养细胞的培养基可以是任何适于培养哺乳动物细胞的常规培养基，例如含血清或无血清的、含合适的补充物的培养基，或适于培养昆虫、酵母或真菌细胞的培养基。合适的培养基可从供应商获得或者根据公开的配方（例如在美国典型培养物保藏中心的目录中）制备。

然后，可以通过常规程序从培养基中回收由所述细胞重组表达的肽或全长蛋白质，所述常规程序包括：通过离心或过滤从培养基中分离宿主细胞，用盐例如硫酸铵沉淀上清或滤液中的蛋白质组分，及用多种色谱程序，例如 HPLC、离子交换色谱，亲和色谱等等来纯化。

合成制备

合成生产肽的方法在本领域是熟知的。生产合成肽的详细的描述以及实践建议可以在 Synthetic Peptides: A User's Guide (Advances in Molecular Biology), Grant G. A 编辑, Oxford University Press, 2002, 或: Pharmaceutical Formulation: Devel- opment of Peptides and Proteins, Frokjaer 和 Hovgaard 编辑, Taylor and Francis, 1999 中找到。

可以例如用 Fmoc 化学，使用 Acm 保护的半胱氨酸（cysteins）来合成肽。用反相 HPLC 纯化后，可以进一步加工肽来获得例如环状的或 C-或 N-端修饰的同种型（isoforms）。环化和末端修饰的方法在本领域是熟知的，在上面引用的手册中有详述。

在优选的实施方案中，本发明的肽序列是合成生产的，具体地，是通过上面的手册中所描述的序列协助的肽合成（Sequence Asisted Peptide Synthesis，SAPS）来生产的。

或者，单独的本发明的序列的合成可以从商业生产商例如

Sigma-Genosys (美国)订购或购买。

LPA 方法生产单独的肽序列的多聚体

LPA 方法是 WO 00/18791 所公开的。该方法主要包括下列步骤:

(a) 通过固相合成或片段偶联 (fragment coupling) 提供包含所需序列的肽片段, 肽片段附着于固相;

(b) 如果需要, 在肽片段仍附着于固相时, 对任何 N 末端氨基脱保护;

(c) 将具有脱保护的 N 末端基团的肽片段与非手性的二-, 三-或四羧酸反应以提供具有环结构的构建体; 及

(d) 将构建体从固相上切下, 以提供包含具有游离 C 末端基团的肽片段的 LPA。

在上述方法中, 步骤 (d) 之前可以进行下列步骤:

(c1) 如果存在任何来源步骤 (c) 中所用的羧酸的 N-保护基团, 则将其脱保护,

(c2) 继续固相合成或片段偶联, 以提供包含具有至少一个 N-保护的 N 末端氨基酸基团和/或附着的化学部分的所需序列,

(c3) 如果存在任何 N 末端氨基, 则将其脱保护 (在步骤 (d) 之前或之后)。

该方法提供了, 除了其他的, 呈现 N 到 C 方向的所需的本发明的序列的 LPA (步骤 (c))。同时还有 C 到 N 方向的序列 (步骤 (c2))。

因此, 为得到本发明的化合物, 附着于固相的两条肽链要通过非手性的二-, 三-或四羧酸来组装。将用于本方法的合适的非手性二-, 三-或四羧酸具有通式

X[(A)nCOOH][(B)mCOOH]

其中 n 和 m 独立地为 1 到 20 的整数, X 为 HN, A 和 B 独立地为取代或非取代的 C_{1-10} 烷基, 取代或非取代的 C_{2-10} 烯基, 取代或非取代的环部分, 取代或非取代的杂环部分, 取代或非取代的芳香部分, 或者 A 和 B 共同形成取代或非取代的环部分, 取代或非取代的杂环部分, 取代或非取代的芳香部分。

在另一实施方案中, 将用于本方法的合适的非手性二-, 三-或四羧酸具有通式

X[(A)nCOOH][(B)mCOOH]

其中 n 和 m 为 0 或 1 - 20 的整数，X 为 $H_2N(CR_2)pCR$，$RHN(CR_2)pCR$，p 为 0 或 1 到 20 的整数，其中各个 R 独立地为 H，取代或非取代的 C_{1-10} 烷基，取代或非取代的 C_{2-10} 烯基，取代或非取代的环部分，取代或非取代的杂环部分，取代或非取代的芳香部分，或者 A 和 B 共同形成取代或非取代的环部分，取代或非取代的杂环部分，取代或非取代的芳香部分。

在另一实施方案中，将用于本方法的合适的非手性二-，三-或四羧酸具有通式

X[(A)nCOOH][(B)mCOOH]

其中 n 和 m 为 0 或 1-20 的整数，X 为 $HO(CR_2)pCR$，$HS(CR_2)pCR$，卤素 $-(CR_2)pCR$，$HOOC(CR_2)pCR$，$ROOC(CR_2)pCR$，$HCO(CR_2)pCR$，$RCO(CR_2)pCR$，或[HOOC(A)n][HOOC(B)m]$CR(CR_2)pCR$，其中 p 为 0 或 1 到 20 的整数，各个 R 独立地为 H，取代或非取代的 C_{1-10} 烷基，取代或非取代的 C_{2-10} 烯基，取代或非取代的环部分，取代或非取代的杂环部分，取代或非取代的芳香部分，或者 A 和 B 共同形成取代或非取代的环部分，取代或非取代的杂环部分，取代或非取代的芳香部分。

在另一实施方案中，将用于本方法的合适的非手性二-，三-或四羧酸具有通式

X[(A)nCOOH][(B)mCOOH]

其中 n 和 m 为 0 或 1-20 的整数，X 为 $H_2N(CR_2)p$，$RHN(CR_2)p$，$HO(CR_2)p$，$HS(CR_2)p$，卤素 $-(CR_2)p$，$HOOC(CR_2)p$，$ROOC(CR_2)p$，$HCO(CR_2)p$，$RCO(CR_2)p$，或[HOOC(A)n][HOOC(B)m]$CR(CR_2)p$，其中 p 为 0 或 1 到 20 的整数，各个 R 独立地为 H，取代或非取代的 C_{1-10} 烷基，取代或非取代的 C_{2-10} 烯基，取代或非取代的环部分，取代或非取代的杂环部分，取代或非取代的芳香部分，或者 A 和 B 共同形成取代或非取代的环部分，取代或非取代的杂环部分，取代或非取代的芳香部分。

术语 C_{1-10} 烷基指具有 1 - 10 个碳原子的直链或支链烷基，例如甲基、乙基、异丙基、丁基和叔丁基。

术语 C_{2-10} 烯基指具有 2 - 10 个碳原子的直链或支链烯基，例如乙烯基、丙烯基、异丙烯基、丁烯基和叔丁烯基。

术语环部分指环己烷（cyclohexan）和环戊烷。

术语芳香部分指苯基。

“A 和 B 形成环、杂环或芳香部分”指环己烷、哌啶、苯和吡啶。

通过与羧酸反应，得到了

X (CO-序列)2-固相

型的构建物，其中 X 如上定义。

术语“序列”在本文的内容中意指天然存在或非天然存在的氨基酸，PNA 序列，或肽模拟物（peptidomimetic）。“天然存在氨基酸”的意指自然界中发现的 L-和 D-型的 20 种氨基酸（acid）。非天然存在的氨基酸是例如经过修饰的天然存在的氨基酸。术语“序列”还意图包括一种或多种这样的序列。合适的肽模拟物的例子在 Marshall G.R., (1993) 49: 3547-3558 中有记载。术语“化学部分”（chemical moieties）指提高 LPA 的溶解性或生物活性的实体，和将 LPA 导向其目标或标记物的实体。这些序列的优选的实施方式如上所述。

基团 X 使得相同序列，或者不同序列和/或部分的直接或间接连续分步合成或片段偶联成为可能。LPA 中肽片段的方向（N 到 C 或 C 到 N）按照需要来确定。在一个实施方案中本发明特别描述了具有 N 到 C 方向的 LPA，在另一个实施方案中本发明涉及序列同时呈现 N 到 C 和 C 到 N 的化合物，在另一实施方案中，所述序列具有 C 到 N 方向。

当 X 包含暂时被保护的氨基官能（function）时，合成或偶联可以在保护后直接进行。使用半当量（half-equivalent）的羧酸可以保证所有含羧基基团适当活化而提供环系统的有效生成（于步骤(c)，见上述）。在三或四羧酸的情况下，活化的羧基还可以进一步衍生化，衍生化使用二胺例如乙二胺，或合适地官能化用于进一步反应的胺，例如巯基、氧代基团(oxy)、桥氧基(oxo)或羧基。在二胺的情况下，肽合成或片段偶联可以根据所需的序列或化学部分直接地连续进行。在优选的实施方案中使用 Fmoc 保护方案，但根据合成或偶联策略，任何氨基保护基团都可以使用。例如 Boc 保护基团策略。

由于所述连续分步合成或片段偶联是用一个氨基酸，或者，在双官能化学部分例如赖氨酸的情况下，用两个氨基酸进行的，令人惊奇地发现，与 MAP 合成所得的常规的四体赖氨酸树状聚体相比，可以获得好得多的效果。另外，对于附着于固相的单链，可以使用最优的肽合成程序或偶联程序，可以在形成 LPA 之前验证它们的均一性。从固相上切下和同时侧链脱保护

可以按照标准的肽合成程序（如上述）进行。由此可以得到具有最优且明确的组成的终产物。如果希望或者需要，可以容易地使用标准色谱方法例如 HPLC 或凝胶过滤进行纯化。

用于提供环结构的优选的二-、三-和四羧酸可以选自亚氨二乙酸，2-氨基丙二酸，3-氨基戊二酸，3-甲氨基戊二酸，3-氯戊二酸，3-甲氧基-羰基戊二酸，3-乙酰戊二酸，戊二酸，丙三羧酸，3,4-双-羧甲基己二酸，4-(2-羧乙基)-庚二酸，(3,5-双-羧甲基-苯基)-乙酸，3,4-双-羧甲基-己二酸(adipic acid)，苯-1,2,4,5-四羧酸，4-(3-羧基-烯丙基氨基) -丁-2-烯酸，4,4-亚氨基-二苯甲酸，1,4-二氢吡啶-3,5-二羧酸，5-氨基间苯二酸，2-氯丙二酸，3-羟基戊二酸，及苯-1,3,5-三羧酸。

片段偶联（片段偶联或片段缩合）可以根据标准程序，如按照 Peptide Synthesis protocols, Methods in Molecular Biology Vol. 35, Chapter 15,303-316, Nyfeler R, Pennington MW 和 Dunne BM 编，Humana Press, 1994 所述的进行。相应地，片段可以按照上述在固相上合成、从固相上切下同时完全保持保护基团、纯化和鉴定特征。合适的片段也可以通过上述其他的技术得到。

本发明的一个优选的实施方案使用上述的 LPA 方法来生产本发明的化合物。

4. 抗体

本发明的一个目的是提供这样的抗体，抗原结合片段或重组蛋白，其能够识别并选择性结合表位，该表位包含或被包含于肽序列或其片段、变体或同源物，所述肽序列包含如上所述的基序的任意基序。在一个优选的实施方式中，所述抗体是识别并结合包含基序 K/R-x^p-D/E/N/Q-x^p-x_0-S-x_1-x_2-x_3-D/E/N/Q-x^p 的抗体，其中 x^p 是任何疏水性氨基酸残基，x_0 是 K，R 或 Y，且 x_1、x_2 和 x_3 独立地为任何氨基酸残基。

在另一优选的实施方案中，抗体能够识别和结合 NCAM 上的表位，所述表位包含基序 K/R-x^p-D/E/N/Q-x^p-x_0-S-x_1-x_2-x_3-D/E/N/Q-x^p，其中是 W 或 P，x0 是 K、R 或 Y，且 x_1、x_2 和 x_3 独立地为任何氨基酸残基。更优选识别和结合这样的表位的抗体，所述表位包含或被包含于 NCAM 的序列 KAEWKSLGEEAWHSK (SEQ ID NO:1)和/或序列 SIDRVEPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 2)。

术语“表位”是指（抗原分子上的）被（该抗原的）抗体所识别（从而

导致免疫反应）的特定原子群。术语“表位”与术语“抗原决定簇”是等同的。表位可包含 3 个或更多氨基酸残基，例如 4，5，6，7，8 个氨基酸残基，其位置紧密靠近，例如在连续的（contiguous）氨基酸序列内，或者位于抗原的氨基酸序列中远离的位置，但由于蛋白质折叠而相互靠近。

抗体分子属于称为免疫球蛋白的血浆蛋白家族，免疫球蛋白的基本结构单元（building block）—免疫球蛋白折叠（fold）或结构域，被以不同的形式用于免疫系统或其他生物识别系统的许多分子中。典型的免疫球蛋白有 4 条多肽链，其包含称为可变区的抗原结合区域和称为恒定区的不变化的区域。

天然的抗体和免疫球蛋白通常是约 150,000 道尔顿的异源四聚体糖蛋白，由两条相同的轻（L）链和两条相同的重（H）链组成。每条轻链由一个共价二硫键连接于重链，而不同的免疫球蛋白同种型的重链之间二硫键的数目有变化。每个重链和轻链还有规律间隔的链间二硫桥。每条重链在一端有可变区（VH），其后随多个恒定区。每条轻链在一端有可变区（VL），在其另一端有恒定区。轻链的恒定区与重链的第一恒定区对齐，轻链的可变区与重链的可变区对齐。特定的氨基酸残基被认为形成轻链和重链可变区之间的界面（Novotny J 和 Haber E. Proc Natl Acad Sci U S A. 82(14):4592-6, 1985）。

根据它们重链恒定区的氨基酸序列，免疫球蛋白可以归于不同的类型。免疫球蛋白至少有 5 个主要的类型：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，上述的一些类型还可以进一步分成亚类（同种型），例如 IgG-1、IgG-2、IgG-3 和 IgG-4；IgA-1 和 IgA-2。对应于不同类型的免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 alpha(α)、delta (β)、epsilon(ε)、gamma(γ)和 mu (μ)。抗体的轻链根据它们的恒定区的氨基序列可以归于两种截然不同的类型—kappa（κ）和 lambda（λ）之一。不同类型的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是熟知的。

术语“可变”在用于抗体的多变区时，是指可变区的特定部分在抗体之间序列差异很大。可变区用于结合，并决定每个特定抗体对其特定抗原的特异性。但是，可变性不是均匀分布于抗体的整个可变区的。它集中在 3 个片段上，这 3 个片段称为互补决定区（CDRs），而且在轻链和重链中又都被称为高变区。

可变区中保守性较高的部分称为框架（FR）。天然的重链和轻链的可变区各自包含 4 个 FR 区，其主要采取 β-片层构型，由 3 个 CDRs 连接，这些

CDRs 形成连接该 β-片层结构且在某些情况下构成其部分的环。每条链中的 CDRs 被 FR 区保持紧密靠近，而且与来自另一链的 CDRs 一起对抗体的抗原结合位点的形成起贡献。恒定区并不直接涉及抗体与抗原的结合，但其显示多种效应物（effector）功能，例如抗体参与抗体依赖性细胞毒作用。

因此，本发明考虑使用的抗体可以是多种形式中的任何形式，包括完整的免疫球蛋白，抗体片段例如 Fv、Fab 和类似的片段，包含可变区互补决定区（CDR）的单链抗体，及类似的形式，所有这些都属于如本文定义的广义术语“抗体”。本发明考虑到多克隆或单克隆抗体的任何特异性的用途，并不限于识别特定抗原并与之免疫反应的抗体。在优选的实施方案中，使用对本发明的抗原或表位免疫特异性的抗体或其片段。

术语“抗体片段”指全长抗体的部分，一般为抗原结合区或可变区。抗体片段的例子包括 Fab、Fab', $F(ab')_2$ 和 Fv 片段。用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段，称为 Fab 片段，其各自具有单个抗原结合位点；以及剩余的“Fc”片段，因其易于结晶而得名。胃蛋白酶处理产生能够交联抗原的有两个抗原结合片段的 $F(ab')_2$ 片段，及剩余的另一片段（称为 pFc'）。其他片段可包括由抗体片段形成的双抗体、线性抗体（linear antibody）、单链抗体分子和多特异性抗体（multispecific antibody）。如本文中使用的，“功能片段”用于抗体时，指 Fv、F (ab)和 $F (ab')_2$ 片段。

术语“抗体片段”在本文中可以与术语“抗原结合片段”互换使用。

抗体片段可以小到约 4 个氨基酸，5 个氨基酸，6 个氨基酸，7 个氨基酸，9 个氨基酸，大约 12 个氨基酸，大约 15 个氨基酸，大约 17 个氨基酸，大约 18 个氨基酸，大约 20 个氨基酸，大约 25 个氨基酸，大约 30 个氨基酸或更多。一般地，本发明的抗体片段只要与特异性地结合下述表位的抗体具有相似的或相关的免疫性质，其大小的上限可以是任意的：所述表位包含选自本文中表示为 SEQ ID NOs: 1-3 的任一序列的肽序列。因此，在本文的语境中术语“抗体片段”和术语“抗原结合片段”是一致的。

抗体片段保留某些选择性结合其抗原或受体的能力。几种抗体片段如下定义：

（1）Fab 是含有抗体分子的单价抗原结合片段的片段。Fab 片段可以通过用木瓜蛋白酶消化整个抗体产生完整的轻链和一重链的一部分而产生。

（2）Fab'是可以如下述得到的片段：用胃蛋白酶处理整个抗体，然后还原，产生完整的轻链和部分重链。每个抗体分子得到两个 Fab'片段。

Fab'和 Fab 的不同在于重链 CH1 结构域的羧基末端附加了少数残基，包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。

（3）$(Fab')_2$ 是可以用胃蛋白酶处理整个抗体而不进行后续还原而得到的抗体片段。

（4）$F(ab')_2$ 是由两个二硫键连接到一起的两个 Fab'片段的二聚体。

Fv 是包含完整的抗原识别和结合位点的最小的抗体片段。该区域是由一条重链轻链可变区和一条轻链可变区紧密非共价结合的二聚体（V_H-V_L 二聚体）构成的。正是在这样的构型中，每个可变区的 3 个 CDR 相互作用从而在 V_H-V_L 二聚体表面定义出抗原结合位点。总体而言，这六个 CDR 赋予抗体结合抗原的特异性。但是，即使是单个可变区（或半个 Fv，只包含 3 个抗原特异性的 CDR）也具有识别和结合抗原的能力，尽管比完整的结合位点的亲和力要低。

（5）单链抗体（“SCA”），定义为基因工程改造的分子，含有轻链可变区、重链可变区，其由合适的肽接头连接称为基因融合的单链分子。这样的单链抗体又称为“单链 Fv”或“sFv”抗体片段。一般地，Fv 多肽在 VH 和 VL 区之间还包含肽接头，其使得 sFv 得以形成抗体结合的所希望的结构。sFv 的综述可以参见 Pluckthun，于 The Pharmacology of Monoclonal Antibodies 113: 269-315，Rosenburg 和 Moore 编. Springer-Verlag, NY, 1994。

术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小抗体片段，该片段包含在同一多肽链（VH-VL）中相互连接的重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）。通过使用太短而使得同一链上的两个区域不能配对的接头，迫使所述区域与另一链的互补区域配对而形成两个抗原结合位点。更完整的关于双抗体的描述可见，例如，EP 404,097; WO 93/11161，和 Hollinger 等人, Proc. Natl. Acad Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)。

本发明考虑到多克隆和单克隆抗体，抗原结合片段，和其能够结合根据本发明的表位的重组蛋白。

多克隆抗体的制备对于本领域技术人员是熟知的。参见，例如，Green 等人 1992. Production of Polyclonal Antisera, 于 Immunochemical Protocols (Manson 编)，第 1-5 页 (Humana Press); Coligan 等人, Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats Mice and Hamsters, 于 Current Protocols in Immunology，第 2.4.1 节，在此将其通过引用并入本文。

同样，单克隆抗体的制备也是常规的。参见，例如，Kohler 和 Milstein,

Nature, 256: 495-7 (1975); Coligan 等人，第 2.5.1- 2.6.7 节；和 Harlow 等人，于 Antibodies: A Laboratory Manual, 第 726 页，Cold Spring Harbor Pub. (1988)。单克隆抗体可以通过多种确立的技术从杂交瘤培养物中分离和纯化。这样的分离技术包括 Protein-A Sepharose 亲和色谱、大小排阻色谱和离子交换色谱，参见，例如，Coligan 等人，第 2.7.1-2.7.12 节和第 2.9.1-2.9.3 节；Barnes 等人，Purification of lmmunoglobulin G(IgG). 于 Methods in Molecular Biology, 1992,10:79-104, Humana Press, NY。

体外和体内操作单克隆抗体的方法对本领域技术人员是熟知的。例如，根据本发明使用的单克隆抗体可以按照 Kohler 和 Milstein, 1975, Nature 256, 495-7 首先描述的杂交瘤方法制备，或通过重组方法，例如 US 4,816,567 所述制备。用于本发明的单克隆抗体还可以从噬菌体文库中筛选，使用 Clackson 等人，1991, Nature 352: 624- 628 及 Marks 等人，1991, J Mol Biol 222: 581-597 所述的技术。另一种方法涉及通过重组手段将单克隆抗体人源化以产生含有人特异性和可识别序列的抗体。综述可见例如 Holmes 等人，1997, JImmunol 158: 2192-2201 和 Vaswani 等人，1998, Annals Allergy, Asthma & Immunol 81:105-115。

本文中所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上均一的抗体群体——即除了可能以微量存在的天然突变外，构成该群体的抗体个体是相同的——中获得的抗体。单克隆抗体是高度特异性的，针对单个抗原性位点（antigenic site）。与通常包含针对不同决定簇（表位）的多种抗体的常规多克隆抗体制剂不同，每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除了其特异性外，单克隆抗体的优点在于它们是通过杂交瘤培养合成的，不被其他免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示抗体的特征是其得自基本上均一的抗体的群体，不能理解为要求用任何具体的方法生产该抗体。

这里的单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体（免疫球蛋白），其中部分重链和/或轻链与来自特定物种或属于特定抗体类型或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，而这些链的其余部分与来自另一特定物种或属于另一特定抗体类型或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，以及这样的抗体的片段，只要它们显示所需的生物活性(US4,816,567); Morrison 等人，1984, Proc Natl Acad Sci 81: 6851-6855。

制备抗体片段的方法也是本领域已知的（参见例如 Harlow 和 Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1988,

在此通过引用并入本文）。本发明的抗体片段可以通过抗体的蛋白水解或在大肠杆菌中表达编码该片段的 DNA 来制备。抗体片段可以通过常规方法用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化整个抗体来获得。例如抗体片段可以这样制备：用胃蛋白酶酶切抗体，提供表示为 $F(ab)_2$ 的 5S 片段。该片段可以进一步切割：使用硫醇还原剂，或任选的用于二硫键切割产生的巯基的保护基团，产生 3.5S Fab'单价片段。或者，用胃蛋白酶酶切直接产生两个单价 Fab' 片段和 Fc 片段。这些结果在例如 US 4,036,945 和 US 4,331,647 及其参考文献中有描述。在此通过引用将这些专利以全文并入本文。

也可以使用其他切割抗体的方法，例如分离重链形成单价轻-重链片段，进一步切割片段，或其他酶、化学或基因技术，只要该片段结合被完整抗体所识别的抗原。例如，Fv 片段包含 VH 和 VL 片段的缔合（association）。该缔合可以是非共价的，或者可变链可以通过分子间二硫键连接或通过戊二醛等化学物质交联。优选地，Fv 片段包含通过肽接头连接的 VH 和 VL 链。单链抗体结合蛋白（sFv）是通过构建包含由寡核苷酸连接的、编码 VH 和 VL 区的 DNA 序列的结构基因而制备的。将结构基因插入表达载体，再将表达载体导入宿主细胞例如大肠杆菌。重组宿主细胞合成单个多肽链，其中接头肽在所述两个 V 区域之间架桥。制备 sFv 的方法在例如 Whitlow 等人，1991，于 Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 2: 97; Bird 等人，1988，Science 242: 423-426; US 4,946,778; 及 Pack 等人，1993，BioTechnology 11:1271-77。

抗体片段的另一形式是编码单个互补决定区（CDR）的肽。CDR 肽（“最小识别单位”）经常参与抗原识别和结合。CDR 肽可以通过克隆或构建编码目的抗体的 CDR 的基因来获得。这样的基因是通过，例如，从抗体产生细胞的 RNA 使用聚合酶链式反应合成所述可变区而制备的。参见，例如，Larrick 等人，Methods: a Companion to Methods in Enzymology, Vol. 2, 第 106 页(1991)。

本发明考虑到人源抗体和人源化形式的非人（例如鼠）抗体。这样的人源化抗体是嵌合的免疫球蛋白，免疫球蛋白链或其片段（例如 Fv、Fab、Fab'、$F(ab')_2$ 或抗体的其他抗原结合性子序列），其含有来源于非人免疫球蛋白的最小序列，例如表位识别序列。一般而言，人源化抗体是人免疫球蛋白（受体抗体），其中来自受体的互补决定区（CDR）中的残基被置换为来自非人物种例如小鼠、大鼠或兔子，且具有所希望的特异性、亲和性和容

量（capacity）的 CDR（供体抗体）中的残基。含有本发明的抗体的最小序列例如识别本文所述的表位的序列的人源化抗体是本发明优选的实施方案之一。

在一些情形下，人源免疫球蛋白的 Fv 框架残基被相应的非人源残基所取代。进一步地，人源化的抗体可包含在受体抗体或导入的 CDR 或框架序列中都不存在的残基。进行这些修饰是为了进一步改善和优化抗体的性能。一般地，人源化抗体可包含基本上全部的至少 1 个，典型为 2 个可变区，其中全部或基本上全部的 CDR 区对应于非人源免疫球蛋白的那些 CDR 区，且全部或基本上全部的 FR 区是人源免疫球蛋白共有序列的那些 FR 区。人源化抗体最好还包含至少部分免疫球蛋白恒定区（Fc），典型地为人源免疫球蛋白的恒定区。进一步的细节可参见 Jones 等人, 1986, Nature 321, 522-525; Reichmann 等人, 1988, Nature 332,323-329; Presta, 1992, Curr Op Struct Biol 2: 593-596; Holmes 等人, 1997, J Immunol 158:2192-2201 及 Vaswani 等人, 1998, Annals Allergy, Asthma & Immunol 81: 105-115。

可以用本领域生产多克隆和单克隆抗体的任何标准方法来产生抗体，使用包含上述基序的肽片段，例如序列 KAEWKSLGEEAWHSK (SEQ ID NO: 1)和/或序列 SIDRVEPYSSTAQVQFD(SEQ ID NO: 2)的片段。这样的抗体还可以使用 SEQ ID NO:1 和 2 的肽序列的变体或同源物来产生。在一些实施方案中，优选使用 SEQ ID NO:1 生产抗体，在另一实施方案中优选使用 SEQ ID NO:2。

所述抗体也可以被要受治疗的个体在体内产生，例如，通过对所述个体施用根据本发明的免疫原性片段。因此，本发明还涉及包含上述的免疫原性片段的疫苗。

本申请还涉及生产本发明的抗体的方法，所述方法包括提供上述的免疫原性片段的步骤。

本发明涉及 1)抗体，其可以调节，例如增强或减弱，本文所述的人 NCAM 和/或 FGFR 和/或 FGFR 配体的生物学功能，特别是与细胞分化和存活，和/或学习和记忆相关的神经可塑性相关联的功能，和 2）抗体，其可识别并特异地结合于 NCAM 而不调节其生物学功能。优选地，这样的抗体是使用上述的免疫原性肽序列生产的。

本发明涉及上述的抗体用于下列的用途: 1）涉及调节本文所述的 FGFR 和/或 NCAM 和/或 FGFR 配体的活性的治疗应用；2）体外和/或体内检测和

/或监测 NCAM 多肽或其片段用于诊断/预后目的，4）研究目的。

本发明在一个实施方案中涉及包含上述抗体的药物组合物。

5. 药物

细胞死亡在正常的神经元发育中起关键作用，在正常的神经元发育中，50%的发育中的神经元通过细胞程序性死亡而被清除；其还在神经变性病症如阿尔茨海默病和帕金森氏症的病理生理中起关键作用。FGFR 和它们的配体已被证明是发育中和成人阶段中神经元存活的重要决定者（Reuss 和 von Bohlen und Halbach (2003) Cell tissue Res, 313: 139-57）。因此，能够通过结合和活化 FGFR 促进神经元细胞存活的化合物是非常理想的。于是，本发明在一个方面中特别描述了促进神经细胞存活并能够用作药物治疗涉及神经细胞死亡的病症的化合物。但是，本发明的化合物也可以作为药物用于促进其他类型的细胞，例如不同类型的肌肉细胞的存活，或者用于提高其他类型的细胞的死亡，例如癌细胞，因为在肌肉和癌细胞中 FGFR 信号传导已被证明是存活因子(Ozen 等人.(2001) J Nat Cancer Inst. 93: 1783-90;Miyamoto 等人. (1998) J Cell Physiol. 177: 58-67; Detilliux 等人. (2003) Cardiovasc Res. 57:8-19)。

在旨在实现功能性细胞的补偿的策略中，另一条途径是建立所述功能性细胞的新的库，例如通过使祖（干）细胞分化为新的分化细胞群体，或引发受损细胞中的再生过程。FGFR 在引发多种祖细胞类型（Eswarakumar 等人(2005) Cytokine Growth Factor Rev. 16 (2):139-49）、癌细胞(St Bernard 等人(2005) Endocrinology 146 (3):1145-53)和神经细胞(Sapieha 等人(2003) Mol Cell Neurosci. 24(3):656-72）的分化的机制中起重要作用。

细胞表面受体的活性在健康生物中是受严格调控的。受体或受体配体的突变、异常表达或加工（processing）导致受体活性的异常，并因此造成受体的功能障碍。而受体的功能障碍是导致使用该受体维持多种细胞过程的细胞发生功能障碍的原因。后者即是疾病的表现。还已证明 FGFR 信号传导的减弱导致多种不同病理症状的发生，例如糖尿病（Hart 等人, Nature 2000,408:864-8）。FGF 受体的活化在正常和病理的血管发生中都有涉及（Slavin, Cell Biol Int 1995,19:431-44）。它对于骨骼肌细胞、心肌细胞和神经元的发育、增殖、功能行使和存活都是重要的（Merle 等人, J Biol Chem 1995, 270:17361-7; Cheng 和 Mattson, Neuron 1991, 7:1031-41; Zhu 等人,

Mech Ageing Dev 1999,108:77-85）。它在正常肾脏结构的位置中起作用（Cancilla 等人, Kidney Int 2001, 60:147-55），还涉及伤口愈合和癌症疾病（Powers 等人, Endocr Relat Cancer. 2000,7:165-97）。

还报道说FGFR的活性对记忆和学习相关的神经可塑性的刺激和位置重要(Reuss 等人(2003) Cell Tissue Res. 313 (2):139-57; Oomura 等人(1996) Ann N Y Acad Sci. 786:337- 47）

本发明提供能够调节 FGFR 的活性，特别是刺激 FGFR 的活性的化合物。因此，本发明涉及这些化合物用于制备药物来治疗疾病，其中激活依赖 FGFR 活性的生物学活性被认为对治疗是有益的。

因此，本发明的药物可用于下列的预防和/或治疗:

1）中枢和周围神经系统，或肌肉或多种器官的疾病和病症，和/或

2）中枢和周围神经系统的疾病或病症，例如手术后神经损害（postoperative nerve damage），外伤性神经损害（traumatic nerve damage），神经纤维髓鞘形成障碍（impaired myelination of nerve fibers），缺血后损伤（postischaemic damage），例如中风导致的，帕金森氏症，阿尔茨海默氏病，亨廷顿氏舞蹈病（Huntington's disease），痴呆例如多发性硬化性痴呆（multiinfarct dementia），糖尿病相关神经退变（nerve degeneration associated with diabetes mellitus），影响昼夜节律钟（circadian clock）或神经肌肉传递（neuro-muscular transmission）的障碍，及精神分裂症，心境障碍，例如躁狂忧郁（manic depression）；用于治疗肌肉的疾病或病症，包括神经肌肉连接（neuro-muscular connections）功能障碍的病症，例如器官移植后，或例如遗传性或外伤性萎缩性肌肉功能障碍（genetic or traumatic atrophic muscle disorders）；或用于治疗多种器官的疾病或病症，例如生殖腺变性病症，胰腺变性病症例如 I 型和 II 型糖尿病，肾变性病症例如肾病，和心脏、肝脏及肠的变性病症，和/或

3）手术后神经损害，外伤性神经损害，神经纤维髓鞘形成障碍，缺血后损伤，例如中风导致的，帕金森氏症，阿尔茨海默氏病，亨廷顿氏舞蹈病，痴呆例如多发性硬化性痴呆，硬化，糖尿病相关神经退变，影响昼夜节律钟或神经肌肉传递的功能障碍，及精神分裂症，情绪障碍，例如躁狂忧郁，和/或

4）癌症疾病，和/或

5) 朊病毒(prion)疾病。

本发明涉及任何类型的需要新生血管发生（neoangiogenesis）的实体瘤。神经系统的癌症是本发明特别感兴趣的。

本发明涉及选自绵羊疯痒病（scrapie）和雅-克二氏病（Creutzfeldt-Jakob disease）的朊病毒疾病。已经证明 FGFR 在朊病毒疾病中起明显的作用（Castelnau 等人(1994) Exp Neurobiol. 130: 407-10; Ye 和 Carp (2002) J Mol Neurosci. 18:179-88）。

在另一实施方案中，本发明的化合物可以用来制备用于下列的药物:

1）促进伤口愈合，和/或

2）防止心肌细胞的细胞死亡，例如在急性心肌梗塞后，或在血管发生后，和/或

3）血运重建（revascularsation），和/或

4）学习和/或短期和/或长期记忆能力的刺激

在另一实施方案中，本发明的化合物可以用来制备用于下列的药物:

1）防止缺血导致的细胞死亡;

2）防止由酒精消耗导致的身体损伤;

在另一实施方案中本发明的化合物可以用来制备治疗正常、变性或损伤的细胞，这些细胞在正常情况下表达一种或多种选自下列的 FGFR 低亲和性配体:

神经细胞黏着分子 (NCAM),

- 神经细胞黏着分子 L1,
- 神经细胞黏着分子-2 (NCAM-2),
- 神经元-胶质细胞黏附分子(Ng-CAM),
- 神经细胞黏着分子 CALL,
- 神经胶质蛋白,
- Nr-CAM (HBRAVO, NRCAM, NR-CAM 12),
- 轴突蛋白-1/TAG-1,
- 轴突相关细胞黏附分子(AxCAM),
- 髓鞘相关糖蛋白(MAG),
- 神经细胞黏着分子 BIG-1,
- 神经细胞黏着分子 BIG-2,
- 成束蛋白 (FAS-2),
- 神经细胞黏着分子 HNB-3/NB-3,

- 神经细胞黏着分子 HNB-2/NB-2,
- 钙黏着蛋白,
- 连接黏附分子-1 (JAM-1),
- 神经细胞黏附 F3/F11(Contactin),
- 神经束蛋白,
- B 淋巴细胞黏附分子 CD22,
- Neogenin(NE01),
- 细胞间细胞黏附分子-5 (ICAM-5/telencephalin),
- 结合半乳糖的凝集素-12 (半乳凝素-12),
- 结合半乳糖的凝集素-4 (半乳凝素-4),
- 成纤维细胞生长因子受体 1 (FGFR1), - 成纤维细胞生长因子受体 2 (FGFR2),
- 成纤维细胞生长因子受体 3 (FGFR3),
- 成纤维细胞生长因子受体 4 (FGFR4),
- 神经营养蛋白酪氨酸激酶 2 型(NTRKT-2),
- 白细胞抗原相关的蛋白质-酪氨酸磷酸酶(LAR-PTPRF),
- N 肝配蛋白（Nephrin）,
- 蛋白质-酪氨酸磷酸酶受体 S 型(PTPRS),
- 蛋白质-酪氨酸磷酸酶受体 κ 型(R-PTP-kappa),
- 蛋白质-酪氨酸磷酸酶受体 D 型(PTPRD),
- 肝配蛋白 A 型受体 8 (EPHA8/酪氨酸-蛋白质激酶受体 EEK)
- 肝配蛋白 A 型受体 3 (EPHA8/酪氨酸-蛋白质激酶受体 ETK- 1/CEK4),
- 肝配蛋白 A 型受体 2,
- 胰岛素受体 (IR),
- 胰岛素样生长因子-1 受体 (IGF-1),
- 胰岛素相关受体(IRR),
- 酪氨酸-蛋白质激酶受体 Tie-1,
- Roundabout 受体-1(robo-1),
- 神经元烟碱性乙酰胆碱受体 α3 亚基(CHRNA3),
- 神经元烟碱性乙酰胆碱受体 α6 亚基,
- 血小板源性生长因子受体 β(PDGFRB),
- 白介素-6 受体(IL-6R),

- 白介素-23 受体(IL-23R),
- 白介素-3，白介素-5 和 GmCSF 的 β-共通细胞因子受体
- 细胞因子受体样分子 3 (CRLF1),
- 第 I 类细胞因子受体(ZCYTOR5),
- 导蛋白-1 受体 DCC,
- 白细胞 Fc 受体样蛋白(IFGP2),
- 巨噬细胞清除剂受体 2 (MSR2),
- 粒细胞集落刺激因子受体,
- 串珠蛋白聚糖,
- ADAM-19,
- ADAM-8,
- ADAM-12,
- ADAM-28,
- ADAM-33,
- ADAM-9,
- ADAM-7,
- ADAM-1 A 受精蛋白 α,
- ADAM-15,
- 含金属蛋白酶-desintegrin 域的蛋白(TECAM),
- 金属蛋白酶 1,
- 胶原蛋白 VII 型,
- 纤连蛋白,
- 生腱蛋白-R,
- 细胞因子样因子-1(CLF-1).

根据本发明，上述蛋白质是 FGFR 的天然低亲和性配体，而在上述的蛋白质的功能受障碍的条件下，包含至少一种本发明的能够结合 FGFR 和活化 FGFR 信号传导的肽片段的化合物可有利地用作上述任何蛋白质的模拟物。特别地，这样的化合物可用于治疗正常、变性或损伤的 NCAM 呈现细胞（NCAM presenting cells）。

根据本发明的药物包含有效量的如上所定义的一种或多种肽序列或化合物，或包含一种或多种本发明的化合物和药学上可接受的添加剂的药物组合物。

当制造药物或制备药物组合物，应当考虑与本发明的肽序列（如上所述）的特定结构特征相关的生物活性。在一些实施方案中，可以优选地使用序列 KAEWKSLGEEAWHSK (SEQ ID NO:1)制造药物，另一实施方案中序列 SIDRVEPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 2)可以是优选的，在其他实施方案中优选使用包含上述二者的化合物，或其他本申请中讨论的任何类型的化合物。因此，在一个优选的实施方案中本发明的药物和/或药物组合物可用于刺激学习和记忆，在另一实施方案中药物组合物可用于刺激神经元存活，在另一实施方案中药物组合物可用于刺激神经细胞分化，在另一实施方案中药物组合物可用于 i）刺激记忆和学习和刺激细胞存活，或 ii）用于刺激记忆和学习和刺激神经突长出，或 iii）用于刺激神经突长出和细胞存活。当涉及治疗上述 FGFR 配体起作用的病症或疾病时，优选使用药物组合物来增强或减弱所述配体的功能和/或生物活性，其可以与上述的生物活性不同。

本发明还涉及包含如上所述的本发明的抗体的药物和药物组合物。

本发明的另一个方面是制备药物组合物的方法，包括将有效量的一种或多种本发明的化合物或根据本发明的药物组合物与一种或多种药学上可接受的添加剂或载体混合。

在上述的方法的一个实施方案中，所述化合物与假体装置（prosthetic device）联合使用，其中所述装置是假体神经导管（nerve guide）。于是，在一个进一步的方面中，本发明涉及假体神经导管，其特征在于其包含一种或多种如上定义的化合物或药物组合物。神经导管是本领域已知的。

本发明涉及包含本发明的化合物的药物和/或药物组合物用于治疗或预防任何选自下列的疾病和病症的用途。

这样的药物和/或药物组合物可合适地配制为口服、经皮、肌肉内、静脉内、颅内、鞘内、室内(intracerebroventricular)、鼻内或肺施用。

基于本发明的化合物的药物和组合物的制剂开发策略大体上符合任何其他基于蛋白质的药物产品的制剂策略。可能的问题及克服这些问题的指导在多种教科书中都有涉及，例如“Therapeutic Peptides and Protein Formulation. Processing and Delivery Systems”，A. K. Banga 编，Technomic Publishing AG, Basel, 1995。

注射剂（injectables）通常制备为液体溶液或悬液，适于在注射前溶液于或悬浮于液体中的固体形式。制剂也可以被乳化。活性成分经常与药学

上可接受的且与活性成分相容的赋形剂混合。

合适的赋形剂有，例如，水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇等，及其组合。另外，如果需要，制剂可包含微量的辅助物质例如润湿或乳化剂，pH缓冲剂，或提高制剂的有效性或转运的物质。

本发明的化合物的制剂可以用本领域技术人员知道的技术来制备。制剂可含有药学上可接受的载体和赋形剂，包括微球、脂质体、微胶囊、纳米颗粒（nanoparticles）等。

该制剂可以合适地通过注射施用，任选地在活性成分将要发挥作用的部位。适于其他施用模式的更多制剂包括栓剂，鼻、肺及某些情况下口服制剂。用于栓剂的传统的粘合剂和载体包括聚亚烷基二醇或甘油三酸酯。这样的栓剂可以用含有 0.5-10%，优选 1-2%的活性成分的混合物来生成。口服制剂包括常用的赋形剂例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠(sodium saccharine)、纤维素、碳酸镁等等。这些组合物的形式有溶液、悬液、片、丸、胶囊、缓释制剂或粉末，且一般含有 10－95%的活性成分，优选 25-70%。

其他制剂有适于鼻或肺使用的制剂，例如吸入剂（inhalator）和气雾剂。

活性的化合物可以配制微中性的或盐的形式。药学上可接受的盐包括酸加成盐（与肽化合物的游离氨基形成的）和与无机酸例如盐酸或磷酸、或有计算，例如乙酸，草酸、酒石酸、苦杏仁酸等所成的。与游离羧基所成的盐也可以从无机碱例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁，或有机碱例如异丙胺、三甲胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等衍生得到。

制剂以与剂量制剂相容的方式使用，使用治疗有效的量。要施用的量依赖于要治疗的受试者，包括，例如受试者的重量和年龄，要治疗的疾病和疾病的状态。合适的剂量范围为通常每次施用每千克体重数百微克有效成分的数量级，优选的范围为每千克体重大约 0.1 μg 到 5000 μg。使用单体形式的所述化合物时，合适的剂量经常为每千克体重 0.1 μg 到 5000 μg 的范围，例如每千克体重大约 0.1 μg 到 3000 μg 的范围，特别是每千克体重大约 0.1 μg 到 1000 μg 的范围。使用多聚体形式的所述化合物时，合适的剂量经常为每千克体重 0.1 μg 到 1000 μg 的范围，例如每千克体重大约 0.1 μg 到 750 μg 的范围，特别是每千克体重大约 0.1 μg 到 500 μg 的范围，例如每千克体重大约 0.1 μg 到 250 μg 的范围。特别是当通过鼻施用时，施用比其他施用

途径较小的剂量。施用可以进行一次，或者可以后续施用。剂量依赖于施用途径并随要治疗的受试者的年龄和重量而改变。多聚体形式的优选的剂量是每 70 kg 体重 1 mg 到 70 mg 之间。

对于某些适应证，局部的或基本上局部的施用是优选的。

对于另一种应用，鼻内施用是优选的。

一些本发明的化合物是足够活性的，但对于另一些，如果制剂中还包含药学上可接受的添加剂和/或载体，效果会增强。这样的添加剂和载体将是本领域已知的。在一些情况下，包含促进活性物质向目标送递的化合物可以是有利的。

在很多情况下，必须多次施用该制剂。施用可以是连续输注，例如室内输注，或施用更多剂量，例如每日更多次，每日一次，每周更多次，每周一次，等等。优选在个体经受可能导致细胞死亡的因素之前或之后不久施用该药物。优选在从该因素发起 8 小时之内，例如从该因素发起 5 小时之内施用该药物。许多所述化合物显示长期效应，藉此可以以长的间隔施用所述化合物，例如 1 周或 2 周。

与神经导管的使用相结合时，施用可以是连续的，或者分为基于活性化合物的控释的小部分。另外，可以使用前体，以控制释放速率和/或释放位置。其他种类的植入物和口服施用也可以类似地基于控释和/或前体的使用。

6. 治疗

在一个实施方案中，使用根据本发明的化合物/组合物治疗，可用于诱导分化、调节增殖、刺激再生、神经元可塑性和细胞例如被植入或移植的细胞的存活。当使用具有长期效应的化合物时这是特别有用的。

在进一步的实施方案中，所述治疗可能是刺激因为多种因素而有死亡危险的细胞的存活，所述多种因素例如：外伤或损伤，急性疾病，慢性疾病和/或功能障碍，特别是通常导致细胞死亡的变性疾病，其他外部因素，例如可能导致自由基产生或具有细胞毒作用的内科和/或外科治疗和/或诊断方法，如 X-射线和化疗。关于化疗，根据本发明的结合 FGFR 的化合物在针对所有呈现 FGFR 的癌细胞的癌症治疗中是有用的。

因此，所述治疗包括与中枢和周围神经系统的疾病或病症相关的细胞死亡的治疗或预防，所述疾病或病症例如：手术后神经损害，外伤性神经损害，例如脊髓损伤导致的，神经纤维髓鞘形成障碍，缺血后损伤，例如中

风导致的，多发性硬化性痴呆，多发性硬化，糖尿病相关神经退变，神经肌肉退变（neuro-muscular degeneration），精神分裂症，阿尔茨海默氏病，帕金森氏症，或亨廷顿氏舞蹈病。

另外，关于肌肉的疾病或病症，包括神经肌肉连接功能障碍的病症，例如遗传性或外伤性萎缩性肌肉功能障碍；或用于治疗多种器官的疾病或病症，例如生殖腺变性病症，胰腺变性病症例如 I 型和 II 型糖尿病，肾变性病症例如肾病，根据本发明的化合物可以用来诱导分化、调节增殖、刺激再生、神经元可塑性和存活，例如刺激存活。

另外，所述化合物和/或药物组合物可用于防止心肌细胞的细胞死亡，例如在急性心肌梗塞后，以诱导血管发生。另外，在一个实施方案中该化合物和/或药物组合物用于刺激心肌细胞的存活，例如急性心肌梗塞后的存活。在另一个方面中化合物和/或药物组合物用于血运重建，例如在损伤后。

本发明的范围还包括使用所述化合物和/或药物组合物促进伤口愈合。所述化合物可以刺激血管发生因此促进伤口愈合过程。

本发明还公开了所述化合物和/或药物在治疗癌症中的用途。FGFR 活化的调控对肿瘤血管发生、增殖和扩散是重要的。

在另一个实施方案中所述化合物和/或药物被用于刺激学习和/或短期和/或长期记忆能力，因为 FGFR 活性对神经细胞的分化是重要的。

在另一个实施方案中本发明的化合物和/或药物用于治疗酒精消耗所致的身体损害。胎儿发育畸形，长期神经行为改变（long-term neurobehavioral alterations），特别涉及酒精性肝病（alcoholic liver disease）。

肮病毒疾病的治疗，包括使用化合物和/或药物组合物，是本发明的另一个实施方案。

具体地，本发明的化合物和/或药物组合物可以用于治疗临床病症，例如新生物(Neoplasms)，如恶性新生物，良性新生物，原位癌和行为不定的新生物，内分泌腺疾病，例如糖尿病，精神病，例如老年性和早老性器质性精神病症（senile and presenile organic psychotic conditions），酒精性精神病（alcoholic psychoses），药物性精神病（drug psychoses），暂时性器质性精神病症（transient organic psychotic conditions），阿尔茨海默氏病，脑脂质沉积（cerebral lipidoses），癫痫，全身麻痹性痴呆（general paresis）[梅毒]，肝豆状核变性，亨廷顿舞蹈病（Huntington's chorea），雅-克二氏病(Jakob-Creutzfeldt)，多发性硬化，脑皮克氏病（Pick's disease of the brain），

梅毒，精神分裂性障碍(Schizophrenic disorder)，情感性精神病(affective psychoses)，神经症性障碍(neurotic disorders)，人格障碍，包括性格神经症(character neurosis)，器质性(organic)脑病综合征相关的非精神性人格障碍(nonpsychotic personality disorder)，偏执型人格障碍(paranoid personality disorder)，狂信型人格(fanatic personality)，类偏执性人格(paranoid personality)(障碍)，类偏执性特征（paranoid traits），性偏离和障碍，精神发育迟缓(mental retardation)，神经系统和感觉器官疾病，认知异常（cognitive anomalies），中枢神经系统炎性疾病，例如脑（脊）膜炎，脑炎，脑变性例如阿尔茨海默氏病，皮克氏(pick's)病，脑老年性变性，交通性脑积水，梗阻性脑积水(hydrocephalus)，帕金森氏症包括其他锥体外束(pyramidal)病和异常运动障碍，脊髓小脑疾病，小脑性共济失调(cerebellar ataxia)，马里氏（Marie's）、桑格-布朗氏（Sanger-Brown）肌阵挛性小脑协同失调(Dyssynergia cerebellaris myoclonica)，原发性小脑变性（primary cerebellar degeneration），例如脊髓性肌萎缩，家族性、青少年、成人脊髓性肌萎缩，运动神经元病，肌萎缩性侧索硬化（amyotrophic lateral sclerosis），运动神经元病，进行性延髓性麻痹，假性延髓性麻痹，原发性侧索硬化，其他前角细胞疾病，前角细胞疾病，未指定的，其他脊髓疾病，脊髓空洞症和延髓空洞症(syringomyelia and syringobulbia)，血管性脊髓病，急性脊髓梗塞(栓塞性)(非栓塞性)，脊髓动脉血栓形成，脊髓水肿，亚急性坏死性脊髓病（subacute necrotic myelopathy），其他疾病中的亚急性合并脊髓变性，脊髓病，药物诱导的，辐射诱导的脊髓炎，自主神经系统功能障碍，周围自主、交感、副交感或植物神经系统障碍，家族性自主神经机能异常（familial dysautonomia）[赖利-戴(Riley-Day)综合征]，特发性周围自主神经病（idiopathic peripheral autonomic neuropathy），颈动脉窦晕厥或综合征(carotid sinus syncope or syndrome)，颈交感神经营养不良（cervical sympathetic dystrophy）或麻痹，其他障碍中的周围自主神经病，淀粉样变，周围神经系统疾病，臂丛损伤(brachial plexus lesions)，颈肋(crevical rib)综合征，肋锁(costoclavicular)综合征，前斜角肌(scalenus anterior)综合征，胸腔出口(thoracic outlet)综合征，臂丛神经炎或神经根炎(brachial neuritis)，包括新生儿中的。炎性和中毒性神经病，包括急性感染性多神经炎，吉兰-巴雷(Guillain-Barre)综合征，感染后多神经炎，胶原血管病中的多神经炎，影响眼多结构的障碍，化脓性眼内炎，耳和乳突的疾病，慢性风湿性心脏病，缺血性心脏病，心律失常，肺系疾病，新生

儿器官和软组织异常，包括神经系统中，产程和分娩中施用麻醉剂或其他镇静剂的并发症，皮肤疾病包括感染，循环不足（insufficient circulation）问题，损伤，包括手术后的，挤压伤，烧伤。神经和脊髓的损伤，包括神经分开（division of nerve）、连续性病损（lesion in continuity）（有或没有开放性创伤），创伤性神经瘤（有或没有开放性创伤），创伤性暂时性麻痹（有或没有开放性创伤），医疗程序中意外的刺伤或撕裂，视神经和通路的损伤，视神经损伤，第二脑(cranial)神经，视交叉损伤，视通路（optical pathways）损伤，视皮层损伤，未特指盲（unspecified blindness），其他脑神经的损伤，和其他及未指明神经的损伤。药物，药用物质和生物物质中毒，遗传性或外伤性萎缩性肌肉功能障碍；或用于治疗多种器官的疾病或病症，例如生殖腺变性病症，胰腺变性病症例如 I 型和 II 型糖尿病，肾变性病症例如肾病。绵羊疯痒病(Scrapie)，雅-克二氏症(Creutzfeldt-Jakob)、和 Gerstmann-Straussler-Scheinker（GSS）病。

根据本发明，上述病症和症状的治疗和/或预防包含对需要的个体施用有效量的本发明的化合物和/或药物组合物的步骤。

实施例

这里称为 EFL 肽的 NCAM 的肽片段 NCAM TIMGLKPETRYAVR (SEQ ID NO: 5)和这里称为 FGL 肽的 EVYVVAENQQGKSKA (SEQ ID NO: 4)在下面的实验中用作阳性对照。

序列 KAEWKSLGEEAWHSK (SEQ ID NO: 1)在此称为 CDL 肽，序列 SIDRVEPYSSTAQVQFD (SEQ ID NO: 2)在此称为 ABL 肽。

实施例 1 神经突长出的刺激

基本按前人所述的(Neiiendam 等人, (2004) J Neurochem. 91 (4):920-35)，从生后 7 日的 Wistar 大鼠制得小脑颗粒神经元（CGN）。在保持在冰上的改良的克-林二氏（Krebs-Ringer）溶液中剥离小脑组织，并按所述处理获得上面的海马神经元。所有细胞培养物都在 37℃下含 5% CO_2 的加湿的气氛下孵育。所有的动物都遵照国家动物福利指南（national guideline for animal welfare）来操作。

解离的细胞以 10,000 细胞/cm^2 铺在未包被的 8 孔 permanox Lab-Tek 培养玻片(chamber slides)上，于添加了 0.4%(w/v)牛血清白蛋白（BSA;

Sigma-Aldrich）、2 % (v/v) B27 Neurobasal 添加物、1 % (v/v) glutamax，100 U/ml 青霉素，100 μg/ml 链霉素和 2 % 1 M HEPES (都来自 Gibco, BRL)的 Neurobasal 培养基中。加入有或没有多种信号转导途径抑制剂的肽溶液到 300 μl/cm^2 的总体积，将玻片在 37℃培养。24 小时后，用 4%甲醛固定神经元 20 分钟，然后用兔抗 GAP-43 第一抗体和 Alexa Fluor 山羊抗兔第二抗体免疫染色。使用如先前描述的计算机辅助的荧光显微技术，(Ronn 等人, 2000 同上所引)系统地对每个单独实验地每个组获得至少 200 个神经元的图像。简单地说，带 Nikon Plan 20x 物镜的 Nikon Diaphot(Nikon, Tokyo, 日本)倒置显微镜与摄像机（Grundig Electronics, 德国）相连，用作记录。使用与上述用于多巴胺能神经突长出测定的相同的软件包来处理记录的图像。

如图 1（A 和 B）所示，NCAM F3,1 的 EFL 和 CDL 肽是没有底物的培养物中生长的神经元的神经突长出的强力刺激物，而 ABL 肽在这些培养条件下没有活性。EFL 肽的作用可以被已知的 FGFR 抑制剂 SU 5402 的施用所消除，这提示所述刺激是依赖于受体的活化。

实施例 2 神经元存活的刺激

存活测定

将原代培养的 CGN 以 100,000 细胞/cm^2 的密度铺在聚赖氨酸包被的 8 孔 permanox 玻片上，于添加有 2 % (v/v) B27，0.5 % (v/v) glutamax，100 U/ml 青霉素，100 μg/ml 链霉素和 KCl 的 Neurobasal-A 培养基(Gibco, BRL)中，使培养基中 KCl 的终浓度为 40 mM。铺板后 24 小时，加入胞嘧啶-β-D-阿拉伯呋喃糖苷（Ara-C; Sigma-Aldrich）到终浓度 10 μM 以避免神经胶质细胞的生长，然后让神经元在 37℃再分化 6 天。洗涤 2 次并将培养基换为添加有 1 % (v/v)谷胺酰胺，100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素，3.5 g D-葡萄糖/l 和 1% (v/v)丙酮酸钠(Gibco BRL)以及不同浓度的肽的 Eagle 基本培养基（BME; Gibco BRL），以诱导凋亡性细胞死亡。这样培养物中的钾浓度被降低到 5 mM KCl。诱导凋亡后 2 天，细胞用 4%甲醛固定并用 Hoechst 33258 染色，如使用海马神经元的存活测定所述的。

该测定按照 D'Mello 等人，(1993) (Proc Natl Acad Sci U S A. 90: 10989-93) 所描述的进行。

Caspase-3 样活性测定

如上述制备 CGN 的原代培养物并如上述在细胞中诱导凋亡。

对于 Caspase-3 测定，解离（dislodge）培养的 CGN，用离心收集并裂解之。用等份的裂解细胞作测定，测定根据制造商的指示（Promega，美国）进行。

结果

从图 2（A 和 B）可见 CDL 和 EFL 肽（树状聚体）（相应为图 2A 和 2B）显著地促进了培养中的 CGN 的存活，且其效果高于熟知的细胞存活促进剂例如 C3 肽（Berezin V 和 Bock E. (2004) J Mol Neurosci 22 (1-2):33-39）和 GDNF (Krieglstein K (2004) Cell Tissue Res 318(1):73-80) (图 2A)的效果。ABL 肽不影响培养中的 CGN 神经元的存活。

图 3 显示 CDL 和 EFL 肽在保持于没有 KCl 的培养基中的细胞中抑制凋亡相关的 Caspase-3 样活性，且该效应类似于高 KCl（40 mM）的效应。

实施例 4 NCAM F3,1 片段结合 FGFR1

合成制备了表现 NCAM F3,1 的全部“链-环-链”结构域（AB-A 链-环-B 链（对应于 ABL 肽 SEQ ID NO:2）；CD -C 链-环-D 链 (对应于 CDL 肽 SEQ ID NO:1); EF - E 链-环-F 链(对应于 EFL 肽 SEQ ID NO: 5); BC - B 链-环-C 链; DE - D 链-环-E 链; FG - F 链-环-G 链)的不同肽片段。

在果蝇 S2 细胞(Invitrogen，美国)中根据制造商的指示表达了 FGFR Ig 构件 3 和构件 2,3。所有的蛋白用 Ni^{2+}-NTA 树脂（Qiagen，美国）亲和色谱和/或离子交换色谱和凝胶过滤纯化。

使用 BIAcoreX 仪(Biosensor AB)在 25℃下进行结合测定，使用 10 mM 磷酸钠 pH7.4，150 mM NaCl 作为运行缓冲液。流速为 5 μl/min。使用制造商的软件进行非线性曲线拟合来分析数据。FGFR Ig 构件 2，3 被固定在传感芯片 CM5 上，使用胺基偶联试剂盒（Biosensor AB）按如下进行：1）用 20 μl 活化溶液将芯片的两半（称为 Fc1 和 Fc2）活化；2）使用 10 mM 磷酸钠缓冲液 pH 6.0 中 20 μg/ml 的蛋白质 12 μl，将蛋白质固定在 Fc1 上；3）用 35 μl 封闭溶液封闭 Fc1 和 Fc2。如下所述考察各种化合物与固定的 FGFR 构件的结合：将化合物同时注射入 Fc1（带有固定的 FGFR 构件）和 Fc2（无固定）。从表示蛋白质结合固定的 FGFR 构件和 Fc1 表面的曲线减去表示化合物非特异性地结合 Fc2 表面的曲线。用所得的曲线进行分析。结合实验的结果如图 4 所示。从图 4 可见 NCAM F3,1 的 ABL、CDL 和 EFL 肽能

够直接结合 FGFR。

实施例 5 FGFR 磷酸化

TREX-293 细胞（Invitrogen）被稳定转染具有 C 末端 StrepII 标签的人 FGFR1（IBA biotech），使用 Flp-In 系统（Invitrogen）。磷酸化的考察如下进行: ~2x10^7 个细胞饥饿过夜后用指定的化合物刺激 20 min。细胞在 PBS 中用 1% NP-40 和第 II 组磷酸盐抑制剂合剂（phosphatase inhibitors cocktail set II）（Calbiochem）裂解。澄清的细胞裂解物与 50 μl 琼脂糖偶联的抗磷酸酪氨酸抗体（4G10-AC, Upstate Biotechnologies）4℃下孵育 3 小时。注意校正所用细胞的量，使得可以检测到磷酸化 FGFR 的显著的增加。洗涤结合的蛋白，用 150 mM 磷酸苯酯（Sigma）洗脱，12%三氯乙酸沉淀，冷丙酮洗涤，并溶解于 SDS-PAGE 样品缓冲液中。用抗重组 StrepII 标签的抗体（IBA biotech）进行免疫印迹。

如图 5 可见，与非刺激的细胞相比，ABL，CDL 和 EFL 肽增加（2-3 倍）FGFR 的磷酸化。

实施例 6 学习和记忆范式（paradigm）

关联性条件恐惧训练测试（The Contextual Fear Conditioning test，CFC）

在实验的第一天之前，每天处理大鼠 120 秒，持续 3 天。在第 1 天（训练），大鼠每分钟接受 1 秒的电击（非条件刺激），持续 2 天。训练后立即给大鼠注射 5 μl 的 EFL, ABL, CDL 或对照肽，或载体。每一处理组由 11－14 只大鼠组成。总共评估了 39 只大鼠（animals）。在第 2、7 和 30 天测试大鼠，将它们置于条件训练用的房间内 8 分钟，但没有电击。使用时间采样（time-sampling）程序，每 2 秒钟将每只大鼠评定为“木僵”（freezing）或“活跃”（active）。

条件训练后第 1 天和第 8 天测试大鼠时检测到，与接受安慰剂或对照的大鼠相比，施用所述肽以后，木僵的时间增加（第 1 天为从 40.0%到约 50.3%（EFL），第 8 天为从 32%到 42.5%（CDL 和 EFL））。这提示 EFL 和 CDL 肽在训练后施用于成年雄性 Wistar 大鼠后能够促进条件化恐惧反应（conditioned fear response）的长期保持。

社交识别测试（social recognition test, SRT）

在皮下注射所述肽或载体后 1 小时和 24 小时后，用 SRT 评估所述大鼠。

习惯化阶段（habituation session）：在社交识别测试（SRT）前一天进行习惯化阶段，使用于测试阶段相似的条件，以适应实验用房间、测试进行时的时间、测试笼，及与幼鼠的接触（习惯化阶段与社交识别阶段使用不同的幼鼠）。习惯化阶段试验间隔为 1 小时。

实验阶段：实验阶段由初步试验和测试试验组成，试验之间的间隔（保持）为 2 小时。

初步试验. 测试前 1 小时将成年大鼠单独放在测试笼里。测试如下进行：将幼鼠放入笼中，并累计测量大鼠的社交性探察行为 4 分钟。对身体部位的嗅探（sniffing）和梳理（grooming），肛门生殖器嗅探（anogenital sniffing），及紧随行为（close following）都被记录下来。用数字摄像机摄录以获得行为记录并直接保存到数字视盘（digital video disks，dvd）上。在 2 小时的保持时间中，大鼠保持独处。幼鼠同样地在测试成年鼠之前独处 1 小时，在 2 小时的保持时间中亦保持独处。

测试试验. 延迟 2 小时后，在与初步试验基本相同的实验条件下进行再测试。用陌生的幼鼠做测试，这样就使每只成年鼠接触到其先前未经验过的幼鼠。

如果成年鼠用于探察先前接触过的幼鼠的时间显著地较少，则确定在第二次接触中存在幼鼠的识别。

若在第一和第二次接触中探察幼鼠所用的时间缺少差异，则提示成年鼠未能识别熟悉的幼鼠。

进一步地，使用识别比（recognition ratio）（RR）：$T_2/(T_1+T_2)$作为社交识别记忆（social recognition memory）的指标，其中 T_1 和 T_2 分别是第一次（初步）和第二次（测试）试验中用于探察幼鼠的时间（Kogan 等人, 2000）。如果成年大鼠对幼鼠表现攻击性、消极（探察时间少于总接触时间的 25%）或性行为，则对该大鼠不予记录。

数据分析和统计计算

仔细地将所得的数据（T_1 和 T_2）输入计算机数据库（GRAPH PAD 第 4 版）。分析下面的参数

1）T_1 和 T_2 的持续时间：

a）同一大鼠的 T_1 和 T_2 之间的显著差异（由配对 t 检验获得）被作为

社交记忆存在的指征;

b）不同处理组的 T_1 之间的显著差异（对 2 组之间的比较用非配对 t 检验；对多于 2 组之间的比较用单向(one-way)ANOVA 然后 Neuman-Keuls post-hoc 检验得到）被作为处理影响了大鼠探察行为的指征。

2）社交识别比（RR）：其估计为 $T_2/(T_1+T_2)$，其中 T_1 和 T_2 分别是第一次和第二次遇见中用于探察幼鼠的时间。RR 的评估可用作均一化不同测试中得到的数据的手段。

a）不同处理组的 RR 与理论值 0.5 之间的显著差异（由单样本 t 检验获得）被作为社交记忆存在的指征;

b）不同处理组的 RR 之间的显著差异（对 2 组之间的比较用非配对 t 检验；对多于 2 组之间的比较用单向 ANOVA 然后 Neuman-Keuls post-hoc 检验得到）被作为处理影响了大鼠社交记忆行为的指征。

c）当大鼠接触熟悉的幼鼠时，相对于当大鼠接触新的幼鼠时，不同处理组的 RR 之间的显著差异，被认为指示了熟悉的幼鼠中观察到的效应是对认知特异性的。

测试肽（ABL 和 EFL）或载体（水）以 4 mg/kg（2 mg/ml）的浓度皮下施用。

SRT 的结果如图 6 所示。CDL 和 EFL 肽显示相同大鼠的 T_1 和 T_2 之间的显著差异（用配对 t 检验分析得到），显示社交记忆的存在。

统计分析

所得结果表示为算术平均±SEM。肽的效应的统计评估是对不同的三组大鼠的 CFC 或 SRT 进行单向 ANOVA，然后，如果 ANOVA 的值达到 $P\leq 0.05$ 则进行最小显著差异（least significance difference，LSD）检验。用带重复的 ANOVA 评价 STR 程序的特异性，通过比较引见已知 JR 和未知 JR 之后大鼠组的结果作为重复手段。对 CFC 或社交记忆的肽效应的统计分析是用单向 ANOVA 进行的。

<110> 恩卡姆医药公司(ENKAM Pharmaceuticals A/S)

<120> FGFR 结合肽

<130> P955PC00

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDL 肽, NCAM F3,1 片段

<400> 1

Lys Ala Glu Trp Lys Ser Leu Gly Glu Glu Ala Trp His Ser Lys
1 5 10 15

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ABL 肽, NCAM F3,1 片段

<400> 2

Ser Ile Asp Arg Val Glu Pro Tyr Ser Ser Thr Ala Gln Val Gln Phe
1 5 10 15

Asp

<210> 3
<211> 17
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> ABL 肽 E/N 突变体

<400> 3

Ser Ile Asp Arg Val Asn Pro Tyr Ser Ser Thr Ala Gln Val Gln Phe
1 5 10 15

Asp

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FGL 肽, NCAM F3,2 片段

<400> 4

Glu Val Tyr Val Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10 15

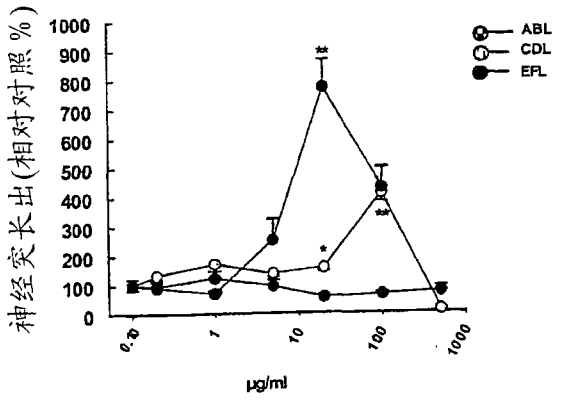
<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EFL 肽, NCAM F3,1 片段

<400> 5

Thr Ile Met Gly Leu Lys Pro Glu Thr Arg Thr Tyr Ala Val Arg
1 5 10 15

A


神经突长出(相对对照%)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0.10
1
10
100
1000
μg/ml
ABL
CDL
EPL
**
*
**

B

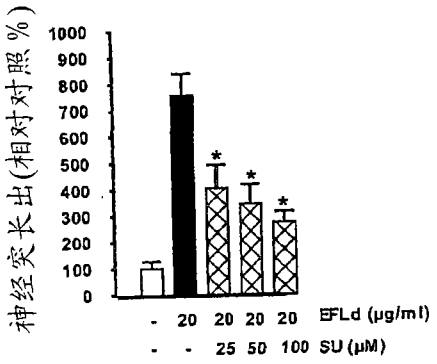

神经突长出(相对对照%)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
*
*
*
- 20 20 20 20 EFLd (μg/ml)
- - 25 50 100 SU (μM)

图 1

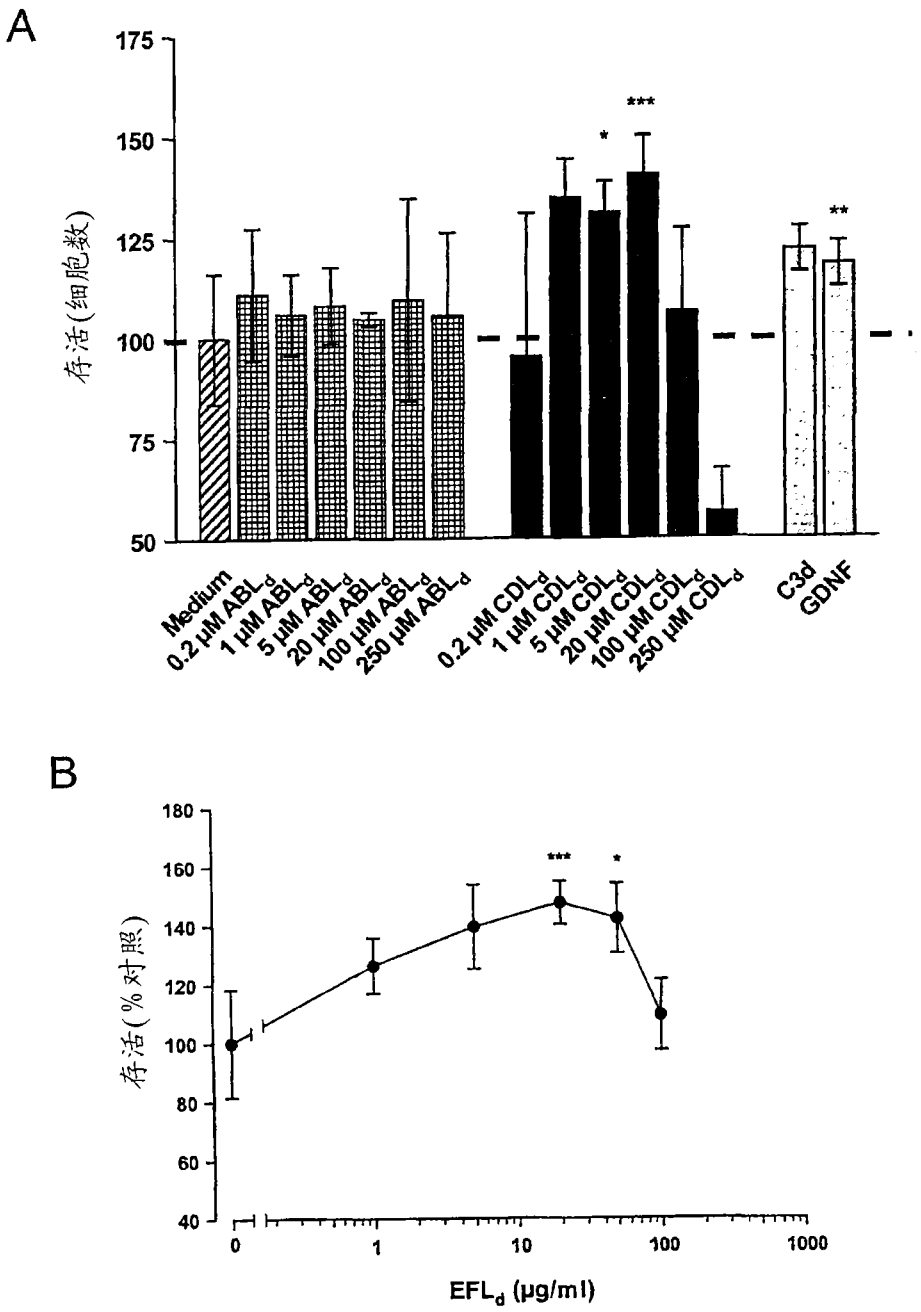

A
存活(细胞数)
175
150
125
100
75
50
***
*
**
Medium
0.2 μM ABLd
1 μM ABLd
5 μM ABLd
20 μM ABLd
100 μM ABLd
250 μM ABLd
0.2 μM CDLd
1 μM CDLd
5 μM CDLd
20 μM CDLd
100 μM CDLd
250 μM CDLd
C3d
GDNF
B
存活(%对照)
180
160
140
120
100
80
60
40
***
*
0
1
10
100
1000
EFLd (μg/ml)

图 2

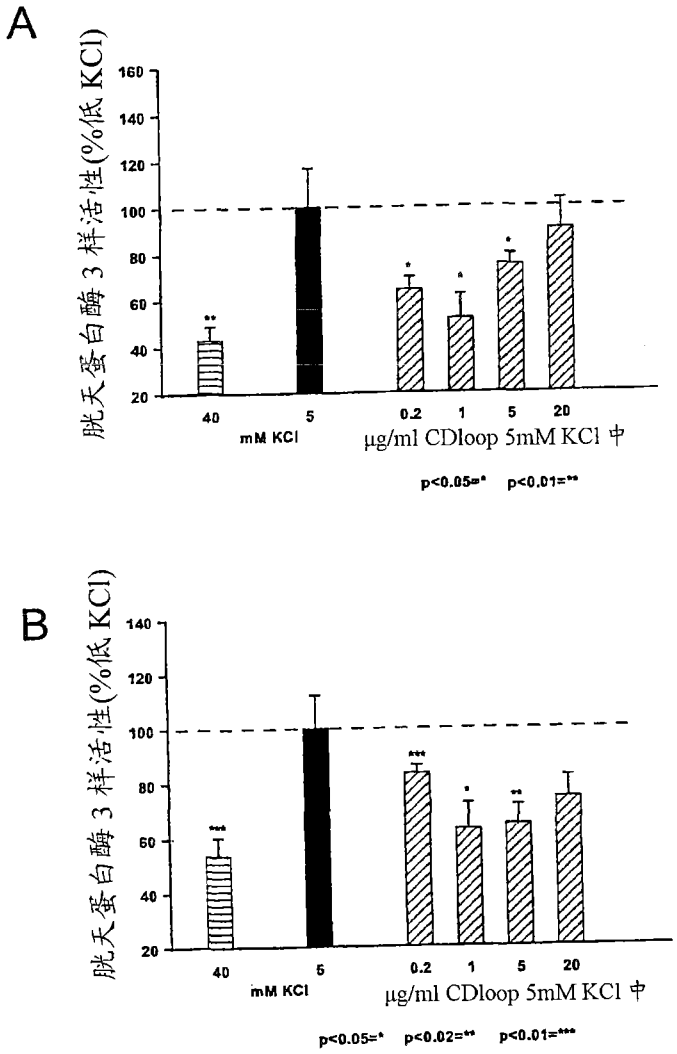

A
胱天蛋白酶 3 样活性(%低 KCl)
160
140
120
100
80
60
40
20
40
5
0.2
1
5
20
mM KCl
μg/ml CDloop 5mM KCl 中
p<0.05=* p<0.01=**
B
胱天蛋白酶 3 样活性(%低 KCl)
140
120
100
80
60
40
20
40
5
0.2
1
5
20
mM KCl
μg/ml CDloop 5mM KCl 中
p<0.05=* p<0.02=** p<0.01=***

图 3

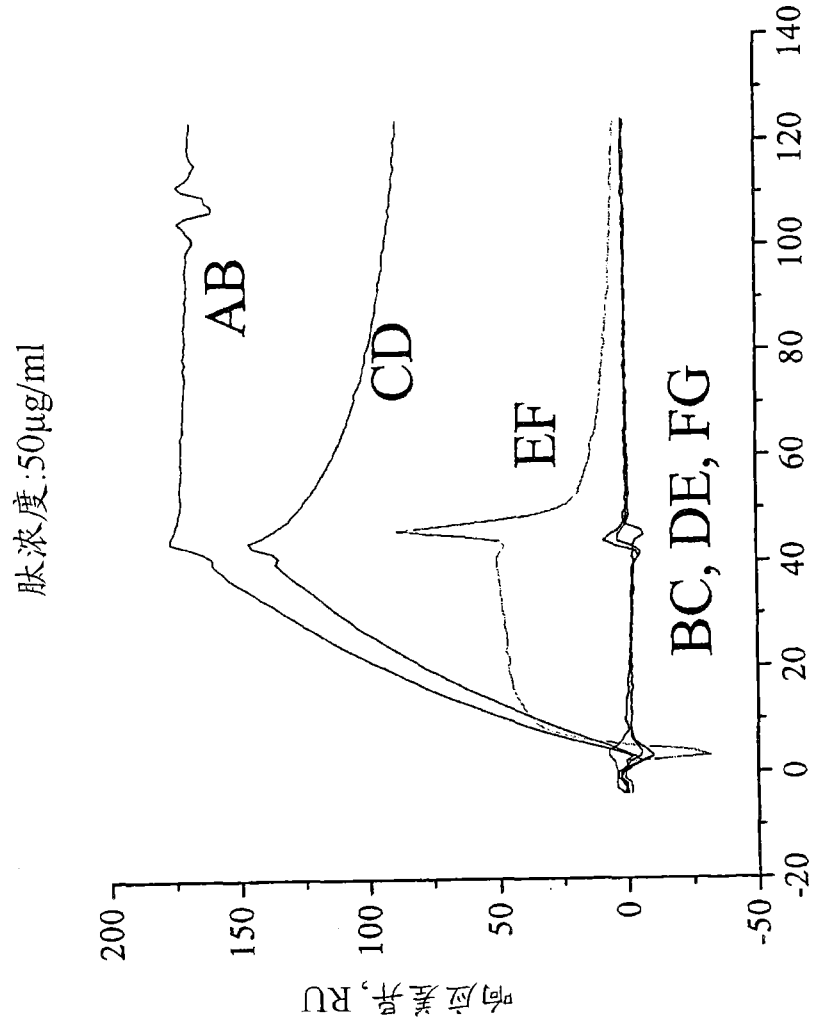

肽浓度:50μg/ml
AB
CD
EF
BC, DE, FG
响应差异, RU
200
150
100
50
0
-50
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
时间,秒

图 4

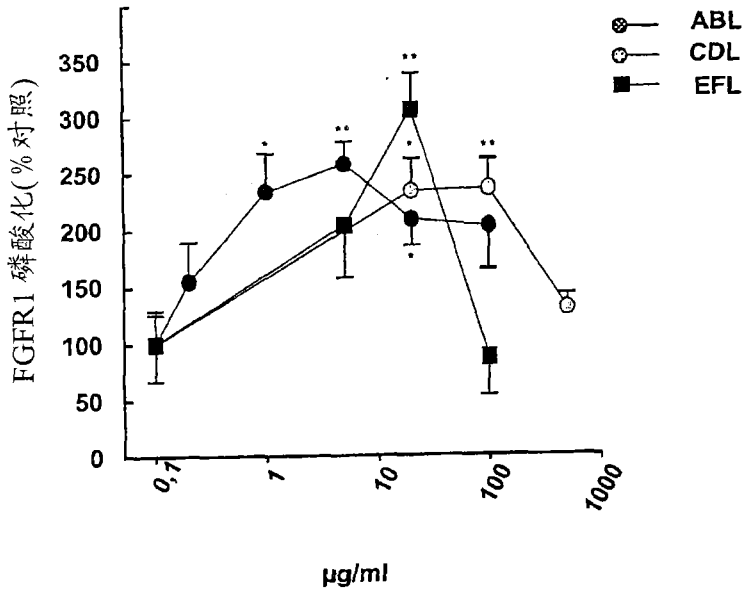

ABL
CDL
EFL
FGFR1 磷酸化(%对照)
350
300
250
200
150
100
50
0
0,1
1
10
100
1000
μg/ml

图 5

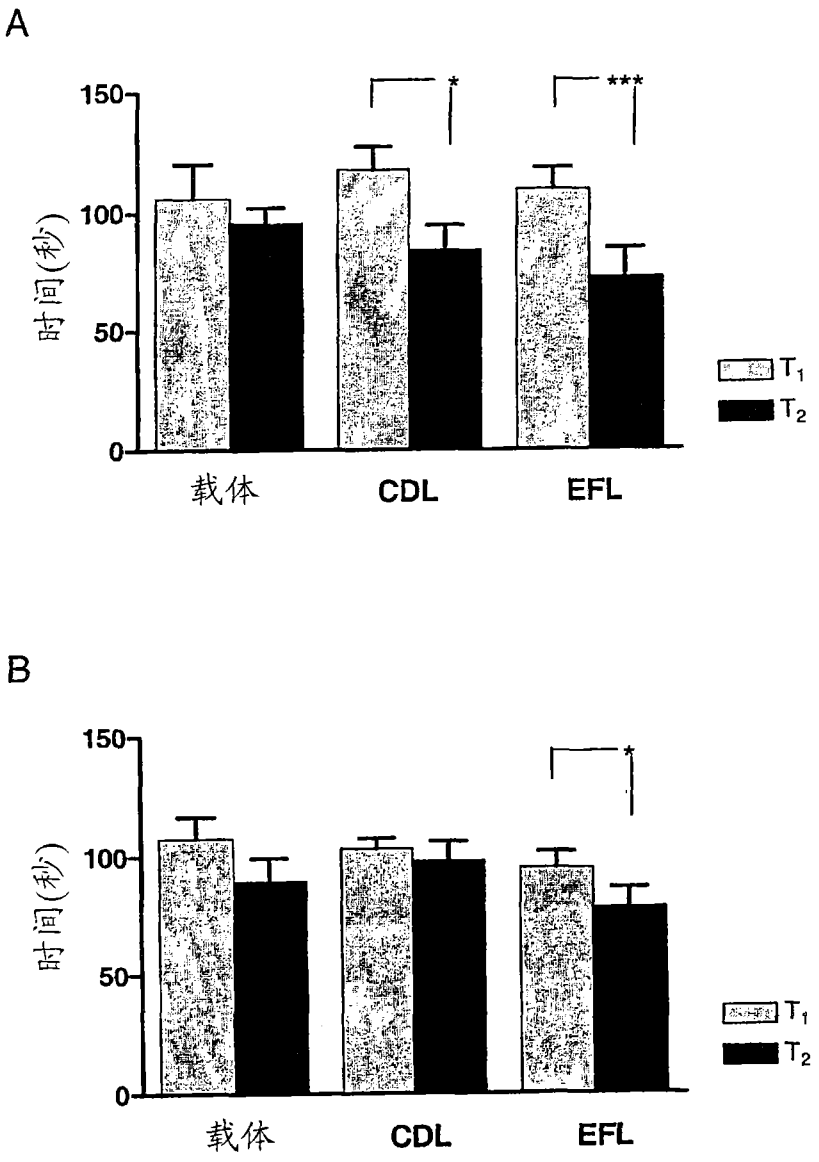

A
150
100
50
0
时间(秒)
*
***
载体
CDL
EFL
T1
T2
B
150
100
50
0
时间(秒)
*
载体
CDL
EFL
T1
T2

图 6