[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
A61K 38/00
C12P 21/02
C12N 15/09

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 92105070.4

[45]授权公告日 2001 年 5 月 16 日

[11]授权公告号 CN 1065768C

[22]申请日 1992.5.19 [24]颁证日 2001.1.27
[21]申请号 92105070.4
[30]优先权
[32]1991.7.10 [33]US [31]727,704
[73]专利权人 里珍纳龙药品有限公司
地址 美国纽约州
共同专利权人 马克斯普朗克科学促进协会
[72]发明人 V·王 C·拉济祖斯基
P·迪施特凡诺
[56]参考文献
WO91/04316 1991. 4. 4
DEVEL BIOL VOL124 1987. 1. 1 DORHRMANN ET AL
J. NEUROSCIENCE VOL10 NO. 11 1990. 11. 1 Y. ARAKAWA ET AL

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 汪 洋
审查员 曾繁辉

权利要求书 1 页 说明书 29 页 附图页数 7 页

[54]发明名称 应用 BDNF/NT-3/NGF 分子族成员治疗运动神经元疾病的方法

[57]摘要

本发明涉及运动神经元紊乱例如肌萎缩性侧索硬化(Lou Gehriy 氏病)的治疗 方法,包括给需要该治疗的病人使用有效量的神经营养性因子,该因子是 BD NF/NT-3/NGF 分子家族的一个成员,它支持运动神经元的存活,生 长和/或分化。本发明部分地基于 BDNF 和 NT-3 均能增加运动神经元培 养物中胆碱乙酰转移酶活性的发现。在本发明特定优选实施例中:BDNF 或 NT-3 和一种第二试剂如 CNTF 的联合使用,可用于治疗运动神经元疾病 。本发明也提供提高运动神经元在体外存活,生长和/或分化能力的方法,诊 断方法和检测系统,该系统可被用于辨别具有 BDNF 或 NT-3 样活性,并 可用于治疗运动神经元疾病的动物模型,该动物模型的制备是用 BDNF/N T-3/NGF 家族成员或其衍生物免疫动物或给动物使用抗 BDNF/NT -3/NGF 家族成员的抗体。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1.脑源性神经营养因子在制备用于治疗运动神经元疾病或损伤的药物中的应用。

2.脑源性神经营养因子在制备用于治疗运动神经元疾病的药物中的应用,其中脑源性神经营养因子是与睫状神经营养因子相结合的。

3.权利要求1或2的应用,其中运动神经元疾病是肌萎缩性侧索硬化、运动神经元创伤、进行性脊柱肌肉萎缩、婴儿或幼年肌肉萎缩、脊髓灰质炎或脊髓灰质炎后综合症、进行性神经性腓骨肌萎缩、进行性延髓麻痹或儿童进行性延髓麻痹、影响运动神经元的感染、梗塞、退化性疾病或恶性病,或暴露于毒素。

4.权利要求1或2的应用,其中损伤是由创伤引起的。

5.一种促进运动神经元生存、生长和/或分化的体外方法,其包括使运动神经元暴露于脑源性神经营养因子。

6.可检测标记的脑源性神经营养因子在制备用于诊断脑源性神经营养因子相关的运动神经元疾病或损伤的药物中的应用,所述方法包括注入标记的脑源性神经营养因子,使其逆向转移,其中逆向转移失败与运动神经元功能丧失相关。

7.权利要求6的应用,其中疾病或损伤如权利要求3或4中定义。

8.脑源性神经营养因子在制备用于促进运动神经元存活、生长和/或分化的药物中的应用。

9.脑源性神经营养因子在制备用于诊断运动神经元疾病或损伤的药剂中的应用,所述诊断包括比较患者样品中的脑源性神经营养因子的水平和正常个体类似样品的水平,由此检测患者中神经营养因子水平的异常,所述神经营养因子水平和运动神经元疾病的存在是正相关的。

10.权利要求9的应用,其中疾病或损伤如权利要求3或4所述。

说 明 书

应用BDNF／NT－3／NGF分子族成员治疗运动神经元疾病的方法

本发明涉及运动神经元疾病的治疗方法，包括给需要这种治疗的患者服用有效剂量的神经营养因子，这种神经营养因子是BDNF／NT－3／NGF分子族成员，并且支持运动神经元的存活、生长、和／或分化，尤选BDNF或NT－3。本发明也提供了运动神经元的培养方法，运动神经元疾病的诊断方法，用于鉴别对运动神经元有益或有害的因素的鉴别系统和运动神经元疾病的动物模型。

运动神经元和肌肉细胞之间的相互作用决定肌肉的紧张度，并引起肌肉有效地收缩，因此是所有自主性和非自主性运动的基础。

运动神经元传统分类为上位运动神经元或下位运动神经元。上位运动神经元位于大脑中央前回，并传出长突往下到下位运动神经元上的突触，下位运动神经元位于脊髓灰质体的腹侧灰质区。脊髓的前侧灰质区，下位运动神经元的轴突连合形成腹侧根。这些轴突最后终止于一条或多条肌肉纤维。通过下位运动神经元的纤维末端的树枝状分枝，每条下位运动神经元与少则几条多则100－200或更多肌肉纤维相连接形成一个“运动单元”。(Adams and Victor, 1985, in "Principles of Neurology" Mc Graw-Hill, Inc, New York, P.37.)

运动神经元疾病导致不同程度的肌肉无力，引起功能丧失，轻则难于完成繁重任务，重则到完全瘫痪。下位运动神经元疾病一般与弛

缓瘫痪和肌肉张力下降相关。受单个神经或脊髓中与其邻近的该运动神经元支配的相邻肌肉会受到影响，引起程度很深的萎缩，整个肌肉组织的７０－８０％会受到影响。病态的运动神经元变得过敏，它控制的肌肉纤维与其它单元离散间隙放电，产生一种可见的颤搐或自发性收缩。相反，当上位运动神经元受损，一般结果是伴随肌肉张力增加和腱反射亢进的痉挛瘫痪。通常是人体的整个肢体或半侧躯体受到影响，而不是单个肌群受影响。萎缩是轻微的，典型的起因是废用性痿缩，不出现自发性收缩。对代表上位或下位运动神经受损的临床症状进行鉴别有利于进行诊断和治疗。

相当多的各种神经机能障碍影响运动神经元。例如，上位运动神经元主要受脑血管意外，肿瘤、感染和创伤影响。然后，下位运动神经元或前灰质角细胞才受这些因素影响，但除此之外它还易患许多机能失调，其中前灰质角细胞受损是最初症状，包括肌萎缩性外侧硬化，婴儿或幼年脊柱肌肉萎缩，脊髓灰质炎和脊髓灰质炎后综合症，遗传性运动和感觉神经病变，和中毒性运动神经病变（如，长春花新碱）。

在这些主要的前侧灰质角细胞（ＡＨＣ）机能失调中，肌萎缩性外侧硬化（ALS 或Lou Gehrig's病)是最常见的（见Williams和Windebank, 1991, Mayoclin. Proc. 66:54-82 for review)。

ＡＬＳ多数患者最初的不适是无力，上肢更为常见(Gubbay et al., 1985, J.Neurol. 232:295-300; Vejjajiva et al., 1967, J. Heurol. Sci. 4:299-314; Li et al., 1988, J, Neurol. Neurosurg. Psychiatry 51:778-784)。一般无力、萎缩、和其它神经病征状是不对称性的，并且经常是局部性的(Munsat et al., 1988, Neurol. 38:409-413)。肌肉痛性痉挛，感觉异常（刺麻感）和疼痛

是常见的不适症状(Williams and Windebank,supra)。分布广的自发性收缩经常出现(id.)。这种疾病的发展快慢每个患者都不相同(Gubbay et al.,1985, J. Neurol, 232:295-300)，但实际上这种病所有情况的最终结果是完全功能丧失,广泛性瘫痪（包括呼吸瘫痪）和死亡。

解剖学上，最显著的改变是脊髓和相连的前侧根萎缩和外侧体的硬化（因此叫肌萎缩性外侧硬化；Williams and Windebank, supra）。在ＡＬＳ病中上位运动神经元也受到牵涉和变性。尽管由于受上位运动神经元的影响而经常出现运动和前运动皮质萎缩，但在显微镜下，大脑却是正常的。中枢前皮质中的贝茨氏细胞和其他锥体细胞广泛性的受损，伴随发生反应性神经胶质增生(Hammar et al., 1979, Exp, Neurol 63:336-346）。

流行病学的研究表明环境因素和遗传因素在疾病发展过程中起重要作用(Williams and Windebank,supra ）。有人曾认为ＡＬＳ是一种中年疾病，近来更倾向于认为它是一种老年疾病(id.)。

目前的疗法包括对症治疗，减轻肌肉痛性痉挛、疼痛、易疲性。假体装置用于补偿肌肉无力，尽管如此，改变疾病进程的药物疗法还是极不成功的。促甲状腺激素释放激素的公认治疗优点也已遇到矛盾性的结果(Brooks, 1989, Ann, N.Y.Acad. Sci .553:431-461)。服用神经节甙脂已经无效(Lacomblez. et al.,1989, Neurol. 39:1635-1637)。血浆取出法无论单用还是与免疫抑制疗法结合应用都已没有治疗上的优点(Olarte et al., 1980, Ann. Neurol, 8:644-645; kelemen et al., 1983, Arch, Neurol. 40:752-753。已报道抗病毒剂胍具有潜在的短期效果，但这种效果不能重现(Munsat et al .,

1981, Neurol. 31:1054-1055) 在一个简短的研究中报道服用支链氨基酸激活谷氨酸脱氢酶可降低患者衰退的速度(Platitakis et al., 1988; Lancet 1:1015-1018)。近来许多治疗试验，有些在进行之中，包括全身淋巴系统扩散，使用氨基酸N－乙酰半胱氨酸，N－乙酰蛋氨酸，L－苏氨酸和长期鞘内输入促甲状腺激素释放激素(Williams and Windeband, supra) 。

与ＡＬＳ监床和病理上相似的动物模型包括Mnd小鼠，它是一种常染色体支配的突变体，其表现是后加上的上位和下位运动神经元累进性变质（Messer and Flaherty, 1986, J, Neurogen. 3:345-355)；Wobble小鼠，由于肌肉失去神经支配而表现出早年前肢软弱和萎缩，以及在Brittany猎中表现出犬遗传性脊柱肌肉萎缩（Sack et al., 1984, Ann Neurol. 15:369-373; Sillevis et al.,1989,J Neurol, Sci,91:231-258;Bird et al., 1971, Acta Neuropathol 19:39-50）。

在近来１９９１年４月４日公开的ＷＯ９１／０４３１６ＰＣＴ申请中（本文引用了该参考文献）已经表明睫状神经营养因子(CNTF）能够促进运动神经元在体内和体外存活，含ＣＮＴＦ明胶海绵植入物易使在分离出的新生小鼠面神经的运动神经元存活。ＣＮＴＦ是一种神经营养因子，它显示的生物活性与包括ＢＤＮＦ，ＮＴ－３，和ＮＧＦ在内的运动神经营养族因子所显示的生物活性有很大差别。

本发明涉及肌萎缩性外侧硬化（Lou Gehrig's)等运动神经元疾病的治疗方法，包括给需要这种治疗的患者服用有效剂量的神经营养因子，这种神经营养因子是ＢＤＮＦ／ＮＴ－３／NGF分子族成员，并且支持运动神经元的存活、生长和／或分化。据不完全发现ＢＤＮＦ和ＮＴ－３两者都能增加培养的运动神经元的胆碱乙

酰基转移酶的活性，并且由坐骨神经向脊髓逆向转运。在本发明优选的特定实施例中，ＢＤＮＦ或NT－３和第二种因子如ＣＮＴＦ一起用于运动神经元疾病治疗。

本发明也提供了促进体外运动神经元的存活，生长和／或分化的方法，这种方法是给运动神经元培养物加入有效浓度的ＢＤＮＦ／ＮＴ－３／ＮＧＦ基因族成员。

在另外的实施例中，本经明提供了一种鉴别体系，这种体系可以用来鉴别有ＢＤＮＦ或ＮＴ－３样活性的因子，并且可应用于运动神经元疾病的治疗。

本发明还提供了运动神经元疾病的动物模型，制备这些模型方法是给动物免疫接种ＢＤＮＦ／ＮＴ－３／ＮＧＦ族成员或其衍生物，还可给动物服用抗ＢＤＮＦ／ＮＴ－３／ＮＧＦ族成员的抗体或ＢＤＮＦ／ＮＴ－３／ＮＧＦ的反义寡聚核苷酸。

ＢＤＮＦ　脑源性神经营养因子

ｂＦＧＦ　基本纤维生长因子

ＣＡＴ　胆碱乙酰基转移酶

ＮＧＦ　神经生长因子

ＮＴ－３　神经营养素－３

图１．富含动物神经元的培养物在无血清，化学定义的培养基中生长两天，测定胆碱乙酰基转移酶活性（cpm/hr/well+/-ＳＥＭ）。用磷酸盐缓冲液（ＰＢＳ）／０．５ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡ作稀释剂平皿接种时以１０ｐｇ／ｍｌ到１００ｎｇ／ｍｌ浓度范围加入ＢＤＮＦ。对照组只加入ＰＢＳ／０．５ｍｇ／ｍｌＢＳＡ。

图２．富含运动神经元的培养物在无血清、化学定义的培养基中生长

两天，测定胆碱乙酰基转移酶活性（cpm/hr/well+/-SEM）。在平皿接种时加入用ＰＢＳ／０．５ｍｇ／ｍｌ ＢＳＡ稀释的ＧＮＴＦ，ＢＤＮＦ，ｂＦＧＦ，ＮＧＦ和ＣＮＴＦ／ＢＤＮＦ浓度均为５０ｍｇ／ｍｌ。对照组培养物加入ＰＢＳ／０．５ｍｇ／ｍｌ ＢＳＡ。

图３．富含运动神经元的培养物在无血清，化学定义的培养基中生长两天，测定胆碱乙酰基转移酶活性（cpm/hr/well+/-SEM)。以１０ｐｇ／ｍｌ到１００ｎｇ／ｍｌ的浓度范围在平皿接种时加入ＮＴ－３。

图４．按第８部分描述的方法纯化的重组体ＢＤＮＦ在背侧根神经节移出物生物测定中的剂量－反应曲线。

图５．出生时单侧面神经损害后７天龄小鼠脑干面运动神经元形态学。ａ）ＢＤＮＦ治疗后的损害一侧；ｂ）ＮＴ－３治疗后的损害一侧；ｃ）ＮＧＦ治疗后的损害一侧；ｄ）作为对照ＢＳＡ治疗后的损害一侧；ｅ）ａ）中相同动物的未损害侧作为对照;ｆ）损害且用ＣＮＴＦ治疗后作为对照。放大×４００。

为了使公开更清楚，且不作为限定，本发明的详细描述分为以下几部分：

(i)根据本发明所使用的ＢＤＮＦ／ＮＴ－３／ＮＧＦ分子族成员；

(ii)治疗应用；

(iii)体内应用；

(iv)诊断应用；

(v) 检测系统; 和

(vi)动物模型。

5.1 本发明所使用的BDNF/NT-3/NGF 分子族成员

已发现BDNF或NT－３．可诱发运动神经元培养物中胆碱乙酰基转移酶活性增加，这表明神经营养因子家族中特定成分可用来促进运动神经元的存活，生长和／或分化（见后面的第6、7部分中例子）。观察到的BDNF和NT－３逆向转运到运动神经元的位置腹侧脊髓，支持神经营养因子对运动神经元直接作用的观点（见下面的第９部分举例）。

本发明提供了促进运动神经元的存活、生长和／或分化的方法，这种方法是使用BDNF/NT-3/NGF分子族成员。

本发明优选实施例中，使用BDNF/NT-3/NGF族成分，相对于未处理的运动神经元而言，可导致用药的运动神经元中胆碱乙酰基转移酶活性增加。

在本发明的最佳实施例中，BDNF或NT－３用于促进运动神经元的存活和／或分化，其中BDNF或NT-3已在１９９１年３月２１日公开的ＷＯ９１／０３５６８ＰＣＴ申请中和１９９１年３月２１日公开的ＷＯ９１／０３５６９ＰＣＴ申请中描述，本发明引用这两篇文献。如在下面第６和７部分举例中所示，BDNF或NT-3可用来增加培养基中运动神经元胆碱乙酰基转移酶活性。另外，BDNF/NT-3/NGF分子族的其他成员可按ＰＣＴ申请中所提出的方法分辨。

只要确定能够支持运动神经元的生长和／或分化本文所参考引用的ＷＯ９１／０３５６８和ＷＯ９１／０３５６９参考文献可以用于本发明。而且，合成的分子，尽管它不同于任何已知BDNF/NT-3/NGF分子族成员的基本结构，它能支持运动神经元的生长和／或分化，即可用于本发明。因为BDNF和NT-3比NGF更能增加运动神经元中胆碱乙酰基转移酶活性，这种合成分子最好更类似于BDNF和NT-3而不是ＮＧＦ。

本发明中所用的BDNF/NT-3/NGF族成分，可用本领域中任何已知方法制得。它们可从天然组织中纯提，化学合成，或重组ＤＮＡ表达体系如在原核和真核生物表达体系中生成。例如,象ＣＯＳ细胞体系。生成这些分子的方法包括ＰＣＴ申请ＷＯ９１／０３５６８和ＷＯ９１／０３５６９中所描述的方法。

在本发明的特定优选实施例中，BDNF或NT-3可从表达BDNF的真核细胞（如BDNF转染的中国仓鼠卵巢细胞（ＣＨＯ））的条件培养基中分离。采用两个步骤：阳离子交换和凝胶过滤色谱法。以BDNF为例，用表达BDNF的细胞接种从Opticell生物反应器中（Charles River)收集到的条件培养基，并用蒸馏水以１．２５：１比率稀释，然后连续装在S-Sepharose Fast Flow (pharmacia)柱上。例如，稀释总容量为１０．６Ｌ经大约５天时间过１５ml（１．６cm内径）柱子。柱子用５０ml 20mM ＭＥＳ缓冲液pH５．８洗涤，接着用含２５０mM NaCl 的５０ml相同缓冲液，再用不含NaCl的相同ＭＥＳ缓冲液洗涤直到在２８０nm处吸收值达到基线水平。然后用２５ml ２０mM Ｎ－二（羟乙基）甘氨酸缓冲液pH８．５洗涤，再用含１００mM NaCl的１５ml相同缓冲液洗涤。柱子依次用１５０ml，１００mM到７５０mM NaCl梯度的２０mM Ｎ－二（羟乙基）甘氨酸缓冲液pH８．５洗脱。流速大约为２．５ml／分钟，洗脱液吸收值在２８０nm处单位满刻度０．２０吸收率的灵敏度下进行测定。含重组体BDNF的馏分可用ＤＲＧ移出物生物测定法来鉴别。具有最高特定活性的馏分与NaCl浓度在５００至７５０nm相对应。合并这些馏分，并用3 KDa Omega(Ω)型膜或一个可使BDNF低程度非特异性结合的等同膜进行高压超滤浓缩。浓缩样品然后上到例如一种120ml(1.6cm内径)Sephacryl S-100HR凝

胶过滤柱上(pharmacia)。填充柱子并用含400mM NaCl的20mM HEPES缓冲液pH7.6平衡。以0.25ml/分钟速度洗脱柱子。收集馏分并用DRG移出物生物鉴定法测定BDNF的活性。在80和90ml之间的洗脱馏分含有生物活性的大脑源性重组生长因子。合并这些馏分并用还原性SDS聚丙烯酰胺电泳分析，进行N-末端序列测定和氨基酸的定量分析。在适当处调节容量。

BDNF/NT-3/NGF分子族包括由具有与BDNF,NT-3和NGF基本同源的区域的基因编码的分子。本发明所用的BDNF/NT-3/NGF族成员可通过测试促进运动神经元生存或分化的生物活性来选择。举例说明但不作为限定，表现出下列任何一作用的BDNF/NT-3/NGF族成员均可用于本发明:

(i)增加培养基中运动神经元的存活时间;

(ii)增加在培养基或体内运动神经元的轴突生长;

(iii)增加在培养基或体内运动神经元相关分子的生成如，胆碱乙酰基转移酶或乙酰胆碱酯酶(见下面第6和7部分测定技术的举例);

(iv)减少体内运动神经元机能失调症状。

以上这些作用可用本领域中任何已知方法测定。优选的非限定性实施方案，运动神经元存活时间的增加可用Arakawa等人提到的方法测定(1990, J, Neurosci, 10:3507-3515)；运动神经元轴突生长增加可用Pestronk等人(1980, Exp. Neurol, 70:65-82)或Brown等人(1981, Ann, Rev. Neurosci, 4:19-42) 提到的方法测定;运动神经元相关分子的生成增加可用生物测定法,酶测定法，抗体结合,Northern印迹分析测定法,等来测定,选用什么方法取决于所测定的分子;运动神经元机能失调可通过分析运动神经元功能紊乱的内科表现例如

无力，运动神经元传导速率，或功能丧失来确定。

在本发明的另一些实施例中，本发明的BDNF/NT-3/NGF族成员可与第二种因子联合使用来支持运动神经元存活和/或分化。第二种因子最好也能有效地促进运动神经元的存活和/或分化。例如，在本发明中的较好实施例中，BDNF/NT-3/NGF族成员可与CNTF结合使用以促进运动神经元的存活和/或分化。正如在下面第6部分讨论的，BDNF与CNTF结合使用可观察到对运动神经元CAT活性具有至少一种叠加作用。

5.2 治疗应用

本发明提供了治疗运动神经元疾病方法，包括给需要这种治疗的患者服用有效量的神经营养因子，这种神经营养因子是BDNF/NT-3/NGF分子族成员并能支持运动神经元的存活，生长或分化。

如本文所用的，所定义的运动神经元紊乱指任何能影响运动神经元正常功能的状况。这种失调可能或不能特异性地或甚至选择性地影响运动神经元。例如，本发明可治疗的运动神经元紊乱包括但不局限于下面这些功能紊乱。如梗塞、感染、中毒、创伤、外科损伤、退化性疾病或恶性病，这些可影响到运动神经元及神经系统的其他成分。本发明方法也直接用于选择性影响神经元的疾病，如肌萎缩性外侧硬化，并且包括但不局限于此，进行性脊柱肌肉萎缩，进行性延髓麻痹，初级外侧僵化，婴儿和幼年肌肉萎缩，童年进行性延髓麻痹(Fazia-Londe综合症)，脊髓灰质炎和脊髓灰质炎后综合征和遗传性运动感觉神经病变(进行性神经性腓骨肌萎缩)。

可用于本发明的BDNF/NT-3/NGF族成员在上文第5.1部分中已作描述。有效剂量可由本领域熟练技术人员已知的方法测得。可以对有效剂量和毒性剂量(如果有毒性的话)进行测定，任何一已知BDNF/NT-3/

NGF族成分都没有测定出毒付作用。最好在活体内测得，以分辨出最佳剂量范围。(参见下文第5.3部分)

在本发明各种特定的实施例中BDNF/NT-3/NGF族的神经营养因子可与至少一种有效剂量的其它药剂一起使用，所说的这种其它药剂本身也能促进运动神经元的存活、生长和/或分化。例如BDNF/NT-3/NGF族成员可与CNTF一起给药。在本发明的一个优选实施例中BDNF和CNTF可一起给药用于运动神经元的治疗。

在提及BDNF/NT-3/NGF家族成员的同时，本发明也包括使用BDNF/NT-3/NGF族神经营养分子的片断，衍生物、促效药或拮抗药。

本发明神经营养因子可用任何药学上可接受的载体形式给药。给药途径可以是本领域中任何已知的给药方式，包括，但不局限于，静脉给药，鞘内给药，皮下给药，向相关组织内注射，动脉内，鼻内，口服给药或使用一种植入物。本发明提供药物组合物，它包含BDNF/NT-3/NGF族的成员如BDNF或NT-3，并含有CNTF，和某种药学上可接受的载体。

给药后可导致本发明的神经营养因子分散于整个人体或局部区域中。如在涉及到神经系统的相离区域情况下，适合采用静脉内或鞘内给以神经营养因子。另外的情况是,但不限制本发明，当涉及到神经系统的局部区域时，如因创伤或外科手术引起的运动神经元疾病，适合采用局部给药。在这种情况下，可以将一个含有神经营养因子的植入物埋入损伤区或其附近。合适的植入物包括但不局限于，凝胶、海绵、蜡、或微小颗粒型植入物。

5.3 体外应用

本发明提供了一种提高运动神经元存活、生长和/或分化能力的

方法，包括露置运动神经元在有效浓度的一种神经营养性因子中，该因子是BDNF/NT-3/NGF分子家族的一个成员，这种方法可用于体内(见上)或体外，优选方案是，BDNF/NT-3/NGF家族成员是BDNF或NT-3。

在体外试验的情况下，神经营养性因子的有效量可根据具体情况按需要而定，因从不同的组织或不同种类得到的运动神经元对神经营养性因子显示不同的敏感性。对任何特定的培养，最好建立一条神经营养性因子浓度和运动神经元反应性相关的剂量反应曲线，为估价运动神经元存活、生长和/或分化，使用例如活体染色估价存活。相对照显微镜和/或神经纤维染色测定轴突生长或测定运动神经元相关化合物如胆碱乙酰转移酶(CAT)活性的技术，来比较露置在BDNF/NT-3/NGF家族成员神经营养性因子中的运动神经元与未露置在该因子中的神经元是很有用的。测定CAT活性可用下述方法，例如，通过收集和溶解处理过或未处理过的运动神经元在20mM Tris-盐酸(pH8.6)溶液中，该溶液含有约0.1% Triton X-100，取出几微升的等分试样，用含有 0.2 ml[1-^{14}C]乙酰辅酶A,300mM NaCl,8mM溴化胆碱、20 mM EDTA和0.1mM新斯的明的50mM NaH_2 (pH7.4)缓冲液作为底物，运用micro-Fonnum 方法测定 CAT活性，该方法描述在Fonnum，1975，J. Neurochem.24:407-409中，其完整的方法在此一并作为参考(也可参见下面的7.1.5节)。

在一个非限制本发明的具体实施例中，运动神经元可通过以下方法在体外制备和培养。从球状物，感觉神经节和粘性的脑膜无菌获得和分离至少一部分脊髓，特别是从胚胎生物例如小鼠获得的脊髓。然后分离腹侧的脊髓，因为运动神经元座落在脊髓的腹侧(前侧)角上。将腹侧脊髓分成小块和在37℃下接种在含约0.1%胰蛋白酶和0.01%I型

脱氧核糖核酸酶的无钙和镁的磷酸盐缓冲液盐水(PBS)中20分钟，然后移去胰蛋白酶溶液，漂洗细胞并将其置于新鲜的培养基中，培养基如45%的Eagle's 最小基本培养基(MEM)，45% Ham's 营养混合培养基 F_{12}，5%加热失活的胎牛血清，5%加热失活的马血清，谷氨酰胺(2mM)，青霉素G(0.5U/ml)和链霉素(0.5μg/ml)。组织可通过巴斯德玻璃管轻轻捣碎机械地分解，收集上清液并用尼龙滤器(始Nitex, Tetko; 40m)过滤，过滤细胞悬浮物可使用Schnaar and Schaffer (1981, J, Neurosc.L:204-217)的修改方法进行分级。新有步骤在4℃进行合适。将甲泛影酰胺溶解在F_{12}:MEM培养基(1：1)中，建立下列不连续梯度溶液包括 18% 甲泛影酰胺基液(如0.5ml)，3ml 17%甲泛影酰胺；3ml 12%甲泛影酰胺和3ml 8%甲泛影酰胺过滤细胞悬浮物(即2.5ml)，通过逐级梯度溶液分层，试管在2500g下用离心机(如Sorvall HB_4)离心15分钟，离心液将使细胞分为三层：第一部分(在0-8%界面)，第二部分(在8-12%界面)和第三部分(在12-17%界面)。第一部分富集运动神经元，可取出小量(如约1ml)以无血清的定义培养基冲洗两次，所说培养基可以是50% F_{12}和50% MEM，加上谷酰胺(2mM)，胰岛素(5μg/ml)，转铁蛋白(100μg/ml)，黄体酮(20nM)，腐胺(100μM)，亚硒酸钠(30nM,参见Bottenstein and Sato, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:514-517)。可靠的细胞数量可通过在锥虫兰存在下以血球计计数获得。富集运动神经元的悬浮物可以１００，０００细胞／cm^2的密度接种在予先覆盖有聚Ｌ－鸟氨酸（如１０μg／ml）和昆布氨酸（Laminin如10μg/ml)的组织培养孔板(优选的是6mm)上。然后加入神经营养性因子，如在具体实施例中，BDNF的加入可达到最终浓度约0.01-100ng/ml，较好是约50nm/ml，或NT-3的加入可达到最终浓度约

0.01-100ng/ml，较好是约50ng/ml，或上述浓度的BDNF与浓度至少1ng/ml,较好是10ng/ml的CNTF合用。然后，运动神经元培养物在95%空气/5%CO_2 气和相对湿度为100%·37℃条件下保存在无血清的定义培养基中。

5.4 诊断应用

本发明也提供了一种诊断病人运动神经元紊乱的方法，包括比较取自病人和取自正常人的样品中，是BDNF/NT-3/NGF家族成员的神经营养性因子水平，以测定出在病人中与运动神经元紊乱正性相关的神经营养性因子的异常水平。可由本方法诊断的运动神经元紊乱包括但不限于如上5.2节列出的那些。

神经营养性因子水平可由本领域的任何已知方法进行测定，这些方法包括但不限于酶联免疫吸附“夹层”试验或其它任何应用抗神经营养性因子抗体的试验，包括Western印迹分析和原位杂交，生物活性研究，Northern 印迹分析等。

病人样品可取自任何正常组织或体液，包括但不限于神经和脑组织或脑脊髓液或血。

神经营养性因子水平异常可解释为病人和正常人神经营养性因子水平在统计学上的显著差异。异常可以是比正常水平增加或减少，病人可以是全身性的也可以仅是局部性的。使用神经营养性因子会特别有益于表现出这种因子减少的病人(参见上5.2节)。表现出神经营养性因子增加的病人可表达出非正常因子或可能患因子受体缺乏病。具有少量，或非正常因子受体的病人可通过检测取自病人的细胞以检查正常神经营养性因子受体来辨别，例如，通过比较这种细胞结合可测的标记的神经营养性因子的能力和正常细胞的结合能力。具有少数受

体或非正常受体的病人可能会也可能不会得益于补充神经营养性因子治疗，特别是得益于用神经营养性因子拮抗剂类似物治疗。

此外，BDNF或NT-3显示出被运动神经元逆行转移的发现提供了一种诊断BDNF或NT-3相关性运动神经元紊乱的方法。包括用某种方式将可测标记的BDNF或NT-3注入，使得标记的BDNF进入一种运动神经，并测定标记的BDNF或NT-3是否逆向转移，其中逆向转移的失败与运动神经元机能失调相关。这种方法可用于但不限于诊断肌萎缩性测索硬化，进行性脊柱肌肉萎缩，婴儿肌肉萎缩，脊髓灰质炎，后灰质综合症，进行性神经性腓骨肌萎缩和神经创伤或损伤。

5.5 检测系统

本发明提供了辨别那些可用于治疗运动神经元紊乱的化合物的检测系统，此试验系统评价某种被测试剂阻碍BDNF或NT-3与运动神经元结合的能力。相应地，本发明提供了一种检测某试剂提高运动神经元存活、生长或分化能力的方法，包括在标记的BDNF或NT-3能与运动神经元结合的条件下，露置的培养物中运动神经元于可测标记的BDNF或NT-3(或任何合适的BDNF/NT-3/NGF家族成员)。同时露置运动神经元在测试试剂中，其中测试试剂对标记BDNF或NT-3结合的抑制表明试验试剂可应用于治疗运动神经元紊乱。在这种试验系统中为阳性的那些试验试剂需要在体外或体内进一步估价其提高培养中的运动神经元存活生长或分化的能力。为阴性的试剂有些情况下可以是BDNF或NT-3样活性的拮抗剂。

BDNF或NT-3可以用任何方法进行可测性标记，包括结合上放射性标记的氨基酸，和连接一个可测的“末端”到神经营养性因子分子上，这样一个末端可以是荧光性的，可以有酶活性，可以是一个与神经营

养性因子结合的抗体，可以是抗原性的，并能够结合抗体(例如，部分myc抗原能与抗-myc抗体结合)。

按照本发明，可应用的试验试剂包括，但不限于，是BDNF/NT-3/NGF家庭成员的神经营养性因子或其片断的衍生物，其它肽类化合物、肽衍生物，和非肽类化合物。

在具体的，但非限定本发明的实施例中给出了一个例子，在允许BDNF结合的条件下，将放射性标记的BDNF与非标记的试验试剂和运动神经元在培养基中培养。作为比较，将相同的运动神经元培养物露置于放射性标记的BDNF中(无试验试剂)，如果试验试剂能结合BDNF受体，它便可竞争性抑制标记BDNF的结合。当后来清洗细胞以除去未结合的BDNF时，包含试验试剂的培养物可望较对照培养物具有较小的放射性。

5.6 动物模型系统

本发明进一步提供了运动神经元系乱的动物模型系统，包括那些系统或全部缺失BDNF或NT-3的动物。BDNF或NT-3的全部缺失可以通过产生一种能表达抗BDNF或NT-3抗体的动物而完成，这类动物可以是用取自其它动物种类的BDNF或NT-3或那些被化学修饰成有较强免疫性的BDNF或NT-3免疫动物产生的。局部缺失可通过在局部引入抗BDNF或抗NT-3抗体产生，例如，通过在中央前回附近植入杂交瘤产生。更进一步，可制备转基因动物，这种动物的内源性BDNF或NT-3基因通过同源重组而被“缺失”。

6 实施例：BDNF增加腹侧脊髓运动神经元培养物中胆碱乙酰转移酶的活性

6.1 材料和方法

6.1.1实验动物

所有试验采用sprague-Dawleg小鼠(HSD或Zivic-Miller)胚胎(E_{14})，孕鼠用CO_2 窒息处死，然后迅速取出胚胎，置入冰冻的培养基中以备解剖用。

6.1.2.组织培养技术

在无菌条件下，从孕14天的鼠胚胎中移出脊髓，脊髓从尾部和延髓(在第一脊神经节处)切断，去除感觉神经节和粘性脑脊膜，然后将脊髓索部分分成腹侧和中背部分分别培养。将腹侧脊髓组织切成小块，在0.1%胰蛋白酶(GIBCO)，0.01% I型脱氧核糖核酸酶(sigma)的无钙镁磷酸缓冲盐液(PBS)中37℃培养20分钟，然后去除胰蛋白溶液，冲洗细胞，然后加入到培养基中，培养基由45% Eagle's最小必须培养基(MEM),45% Ham's营养混合物F_{12}(F_{12})，5%热失活胎牛血清(GIBCO)，5%热失活马血清(GIBCO)，谷氨酸(2mM)，青霉素G(0.5μ/ml)和链霉素(0.5μg/ml)组成。然后将组织用巴斯德管轻轻研磨机械分离，收集上清液，用尼龙过滤器(Nitex, Tetko; 40μm)过滤。然后将过滤细胞悬浮液用于下述6.1.3部分所述的分馏步骤。

6.1.3 对腹侧脊髓细胞进行甲泛影酰胺密度梯度分级分离

本分级分离的方法是Schnaar和Schaffner所述的方法(1981, J. Neurosci, 1:204-217) 的改进方法。所有的步骤都在4℃温度下进行。将甲泛影酰胺溶于F_{12}:MEM(1:1)的培养基，建立一个不连续梯度液，包括18%甲泛影酰胺缓冲液(0.5ml)，3ml 17%甲泛影酰胺，3ml 12%甲泛影酰胺和3ml 8%甲泛影酰胺。由上述方法获得的2.5ml过滤的腹侧脊髓细胞悬浮液在梯度液中分层，试管用离心机(Sorvall HB_4)2500 g离心15分钟，离心液分为三层细胞液：第一部分(在0-8界面)，第二部分(在8-12%界面)，第三部分(在12-17%界面)，第一部分富含运

动神经元。在这0-8%的界面移出一小部分体积(大约1ml)，用含有50% F_{12}和50% MEM谷氨酸(2mM)，胰岛素(5μg/ml)转铁蛋白(100μg/ml)，孕酮(20nM)，腐胺(100μM)和亚硒酸钠（30mM）的无血清定义培养基洗涤两次(Bottenstein and Sato, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:514-517)。在锥虫蓝存在的条件下用细胞计数器计数活细胞。然后将第一部分的细胞悬浮液（富含运动神经元）以密度为100000细胞/cm^2 接种到预先装涂聚-L-鸟氨酸(Sigma, 10μg/ml)和昆布氨酸(Laminin) (GIBCO; 10μg/ml)的6mm培养孔中。接种的当天用生长因子(CNTF和BDNF)处理，在相对湿度近100%,温度为37℃的95%空气/5% CO_2 气中将培养物保持在无血清定义培养基中。两天后(48小时)采收细胞，测量胆碱乙酰转移酶（CAT; Fonnum, 1975, J, Neurochem. 24: 407-409)和参见下述7.1.5节。

6.1.4 脑源性神经营养因子(BDNF)

BDNF用CHO细胞产生和从CHO细胞条件培养基中纯化，均质度用丙烯酰胺凝胶和氨基酸序列分析评价(见下述8节)。

6.1.5. 睫状神经营养因子(CNTF)

所有试验所用的CNTF为在大肠杆菌中表达并纯化的重组鼠CNTF。用 Masiakowski et al. WO 91/04316中描述的方法。

6.1.6 其它因子

研究中采用的 NGF (2.55)用Mobley等,1976,Biochemistry 15: 5543-5551)所述的方法从小鼠唾液腺中纯化，基本的FGF从协作研究者获得。

6.2 结果

6.2.1 BDNF对胆碱乙酰基转移酶活性的效果

与未处理的对照相比，用BDNF处理的富含运动神经元培养物 48小时后CAT活性显示出有4-5倍的最大激发。如图1所示，CAT活性的增长似乎取决于BDNF剂量，其最大反应剂量为大约10ng/ml。

6.2.2. BDNF和CNTF合用对胆碱乙酰转移酶活性的影响。

由于睫状神经营养因子(CNTF)显示出提高小鼠运动神经元在体外的存活能力(Wong 等，1990，Soc. Neurosci. Abst.)。我们寻求确定这两种因子(BDNF和CNTF)所引起的CAT活性增加是有叠加作用。结果表明，饱和浓度的BDNF (50ng/ml)和CNTF 50ng/ml共同使用对培养物中的运动神经元的CAT活性不只是叠加增加(图2)，表明两种因子是协同作用并具有不同的调节通路。BDNF和CNTF的共同加入所得的最大相加效果比对照高出15倍。与对照培养物相比NGF或bFGF对CAT活性都不具显著的影响(图2B)。

脊髓腹侧运动神经元的退化和坏死是肌萎缩性侧索硬化(ALS;Lou Gehrig's disease)，脊髓损伤和其它运动神经元疾病病理生理过程的主要方面。上述结果表明，BDNF单独或与CNTF一块使用治疗上述疾病时可以促进胆碱能表达。

7 实施例：NT-3处理增加脊髓运动神经元培养物中胆碱乙酰转移酶活性

7.1 材料和方法

7.1.1 实验动物

Sprague-Dawley鼠(HSD或Zivic-Miller)的胚胎(阶段E14)用于所有的实验,通过CO_2 窒息处死怀孕鼠迅速摘取胚胎并放置在冰冷的培养基中，以备进一步分离。

7.1.2 组织培养方法

将脊髓从妊娠14天的小鼠胚胎中无菌地摘取并按在上面的6.1.2节中叙述的已有技术制备。

7.1.3. 用甲泛影酰胺密度梯度分级分离腹侧脊髓细胞

分级分离方法是按在6.1.3节中所述进行，不同的是在接种当天用NT-3处理细胞。如图3所示，与未处理的对照组相比，以NT-3处理能引起运动神经元CAT活性的3-4倍的最大激发。CAT活性的增长依赖于剂量，最大增长可达1n g/ml。

7.1.4 神经营养因子-3(NT-3)

如下面第8节所述制备BDNF的方法，NT-3是由CHO细胞产生的，并是从CHO细胞条件培养基中纯化得到的同种纯化物。并由银染色聚丙酰胺凝胶和氨基酸序列分析进行评价。

7.1.5. 胆碱乙酰转移酶的分析

通过溶解细胞于含有0.1% Triton X-100的20mM三羟甲基氨基甲烷盐酸(Tris-HCl) (pH8.6) 溶液中得到培养物。取2微升的细胞溶解物按micro-Fonnum方法(Fonnum, 1975, J. Neurochem. 24: 407-409)进行胆碱乙酰转移酶活性分析。最后的底物组合物由0.2mM [1-^{14}C]乙酰辅酶A (NEN, 54.4 mCi/mmol), 300mM 氯化钠，8mM溴化胆碱，20mM EDTA和0.1mM新斯地明的50 mM磷酸二氢钠(pH7.4)缓冲液组成。在这种酶和底物浓度下，使酶反应连续进行90-120分钟。胆碱乙酰转移酶诱导的特异性可通过在测定过程中加入一种特定的胆碱乙酰转移酶活性抑制剂来进行检查。该抑制剂为N-羟乙基－4－(1-萘基乙烯基)苯基偶氮二氨基吡啶(HNP)(White and Cavallito 1970, J, Neurochem. 17:1579-1589)。

7.2 结果

如上述所讨论的，在脊髓腹侧运动神经元的衰退和死亡是肌萎缩性(脊髓)侧索硬化(ALS, Lou Gehrig's病)，脊髓损伤和其他运动神经元疾病病生理过程的主要因素。目前的结果表示NT-3处理的运动神经元中增强了胆碱乙酰转移酶的活性，这表明NT-3可用于治疗这些疾病而促进胆碱能的表达。

8 实施例:从中国仓鼠卵巢细胞的条件培养基中纯化重组脑源性生长因子的步骤

8.1 材料和方法

通过由阳离子交换和凝胶过滤色谱法组成的两个步骤,将重组BDNF从CHO细胞条件培养基中分离出来。

对从Opticell生物器(Charles River)中收集到的接种了可表达BDNF的CHO细胞的条件培养基 用蒸馏水稀释(比例1.25：1)。4℃下连续装入15ml(1.6cm内径)S-琼脂糖快速S-Sepharose Fast Flow (pharmacia)柱中。10.6升(稀释过的)总体积过柱五天。该柱用pH5.8和50ml的20mM MES 缓冲液(4-吗啉乙烷-磺酸溶液，用氢氧化钠调pH到5.8)洗涤，再经50ml含有250mM氯化钠的同样的缓冲液洗涤，再经不含氯化钠同样的MES缓冲液洗涤直到在250nm处的吸收率达到基线水平。然后该柱用25ml pH8.5的20mM N-二(羟乙基)甘氨酸缓冲液洗涤。再经15ml含有100mM氯化钠的同样缓冲液洗涤。接着，该柱用150毫升，100mM到750mM梯度氯化钠的20mM N-二(羟乙基)甘氨酸缓冲液(pH8.8)进行洗脱,流速为2.5ml/分钟,洗脱的吸收率在280nm，单位满刻度0.2吸收率的灵敏度下进行检测。含有重组BDNF的馏分经脊神经节(DRG)移出生物检定进行鉴别。最高特异性活性的馏分与氢氧化钠浓度在

500和750mM之间相对应。这些馏分合并(45ml)并使用KDa Omega型膜高压膜超滤出浓缩至2ml，选择可使BDNF低非特异结合的膜。浓缩的样品再置于120ml(1.6cm内径)Sephaeryl S-100 HR凝胶过滤柱上(Pharmacia)。该柱填充后以pH７．６含有４００mM 氯化钠的２０mM HEPES 缓冲剂平衡。该柱以０．２５ml／分钟的速度洗脱，收集２ml量的馏分并以DRG 移植生物检定法对BDNF活性进行检定，发现在８０到９０毫升之间洗脱的流分含有生物活性重组BDNF，合并这些馏分并采用还原性SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳，N－末端序列测定和氨基酸定量分析法进行分析。凝胶电泳（１８％聚丙烯酰胺）显示两条与细胞素C同时迁移的相近分离谱带。N－末端分析和氨基酸定量分析使用标准的步骤来进行。

N－末端序列分析表明，分离出的物质由全长度BDNF（约６６％）和缺少前６个氨基酸残基的截断BDNF 组成。样品的氨基酸定量分析显示蛋白质浓度大约平均值为０．０４３mg／ml，根据这个值的计算，最终纯生物活性BDNF的产量为０．４３０毫克，DRG移植生物检定要求该材料半饱和量大约为１．２ng／ml。

８．２结果：BDNF的氨基酸定量分析

纯化的BDNF的氨基酸定量分析在贝克曼（Beckman）６３００氨基酸分析仪上完成,结果（表I）表明，蛋白质的平均浓度约为0.043 Mg／ml；图４描绘了通过标准DRG移植生物检定所得出的BDNF量数曲线。

表I　BDNF序列分析

样品１：脑来源的神经营养性因子馏分＃２３，BDNF ＃２，１００μl，２０mM HEPES 和４００mM NaCl。

样品用75%丙酮冰冻（－20℃）过夜沉淀，在13000 rpm 下离心10分钟收集蛋白沉淀物，溶解在70%三氟乙酸中的蛋白质被测定序列：

周期	序 列 I	序 列 II	参照
1	His 17.5pmol	Arg 18.6pmol	His
2	Ser 14.1	Gly 8.5	Ser
3	Asp 26.2	Glu 8.8	Asp
4	Pro 25.0	Leu 10.8	Pro
5	Ala 36.0	Ser 12.3	Ala
6	Arg 54.6	Val 19.0	Arg
7	Arg 44.1	-	Arg
8	Gly 16.9	Asp 8.2	Gly
9	Glu 13.6		Glu
10	Leu 10.7		Leu
11	Ser 7.4		Ser
12	Val 15.7		Val
13	-		Cys
14	Asp 8.1		Asp
15	Ser 4.0		Ser
16	Ile 5.0		Ile

估计量：

蛋白I： 36.0×2.5=90.1 pmol(ALa-5)

蛋白II：19.0×2.5=47.7 pmol(Val-6)

蛋白I 和蛋白II的比率为2.1 。

9　实施例　^{125}I-BDNF 和^{125}I-NT-3 向鼠腹侧脊髓的逆向转运。

9．1　材料和方法

9．1．1　神经营养因子

用前面第 8 节所述方法，在条件培养基中制备重组体。BDNF和NT-3 用乳过氧化物酶方法对BDNF和 NT-3 进行放射性碘标记（Yip et al; 1983, J.Neurosci.3: 2172-2182 ）至3000-7800 cpm/fmol 的特定活性。在转移研究前除去游离^{125}I。

9．1．2．　实验动物

雄性 Sprague-Dawley 鼠（250－300g）从 Zivic Miller 获得，用于所有的逆向转移研究。

9．1．3．　逆向转移研究

以每公斤体重 3 ml的水合氯醛（4%）和戊巴比妥钠（88%）混合物麻醉鼠。暴露坐骨神经并在闭孔内肌腱远侧 0．4cm 处弄破 10 秒钟，损伤的目地是暴露最大数量的受体点以使BDNF接近。损伤后，在损伤位置注入 2 μl含有^{125}I－标记的BDNF或NT－3 的 10 mg／ml　BSA 的液或注入未标记的BDNF，NT－3 或NGF （超过 100 倍）PBS/BSA　缓冲液。16 ng BDNF　14 ng NT-3 的总量被注入（分别为 4×10^{6} 和 2.2×10^{6} cpm ）。伤口被缝合，让鼠恢复 18 小时。杀死鼠，取出腰 4 和腰 5 脊髓片断并切成右（同侧的）和左（对侧的）两半。样品放置在 4%仲甲醛磷酸盐（pH 7．4 ）缓冲液中，以 gamma　计数器计数。数据以每个右或左脊髓转移的^{125}I 神经营养因子的渺摩尔(10^{-18} 摩尔）± S.E.M 表示。

9．2　结果

表Ⅱ显示了在损伤坐骨神经部位注入^{125}I－BDNF 的鼠脊髓中有BDNF的积累。在注射的一边观察到有计数（每分钟３００－４００计数，相当于约５０渺摩尔），但是与在对测边积累的背景计数相近。对测边出现低的积累计数可能起源于通过系统循环从注射边泄漏到有意义边。对脊髓转移研究来说这种背景计数通常是注射边的１５－２５%，并在整个试验中保持相对不变。超过１００倍的BDNF 明显阻碍转移，而NGF 和NT－3（＞１００倍）仅部分阻碍转移。脊髓组织的乳液自动放射照片分析揭示有大的腹侧角神经元（在腹侧角的背外侧四分体中）被标记，这种神经元形态上表现为运动神经元。在背侧脊髓中，仅可见背景标记

表Ⅱ　^{125}I－BDNF逆向转移至鼠脊髓

注　　射	渺摩尔 R	L
^{125}I-IBDNF+PBS	56±15	10±4
^{125}I-BDNF+BDNF	7±3*	3±1
^{125}I-BDNF+NT-3	35±1	6±3
^{125}I-BDNF+NGF	48±5	8±3

所有试验中BDNF注入右边损伤的座骨神经。

结果用３－４只动物的平均数±S．E．M 表示。

R．右脊髓；L．左脊髓

＊P．与^{125}I－BDNF＋PBS 比较＜０．０５

表Ⅲ揭示了NT-3 也被转移到脊髓中去，超过１００倍的同源配位体明显减少转移，但NGF 和BDNF 对 NT－3 的转移没有明显作用。

表Ⅲ　^{125}I－NT－3逆向转移至鼠脊髓

	渺摩尔NT-3	
注　射	R	L
^{125}I-NT-3+PBS	37±3	14±9
^{125}I-NT-3+NT-3	16±7*	11±6
^{125}I-NT-3+BDNF	28±5	10±2
^{125}I-NT-3+NGF	32±6	18±4

结果用３－４只动物的平均数±S.E.M.表示。

R，右脊髓；　　L，左脊髓

*P 与^{125}I－NT－3 + PBS 比较＜０．０５

１０．实施例　脑源性神经营养性因子和神经营养物－３支持新生鼠的损伤运动神经元存活

下列数据由Max-Planck 精神病学院神经化学和神经生物化学系的 M.Sendtner,B.Holtmann,R.Kolbeck,H.Thoenen 和Y.-A.Barche 的手稿提供。

１０．１　材料和方法

１０．１．１　外科学和组织学方法

按照Sendtner 等人（1990,Nature,345:440-441 ）描述的方法

进行幼鼠右侧面神经横切实验。概括地说，新生Wistar 鼠通过低温麻醉，直接在右耳后切出约 3 mm 长的口子。面部神经在基突乳突处暴露，在距这个位置约 1 mm 处横切两神经根。凝胶泡沫（Spongostan,Paesel,Frankfurt, Germany ）被切成小块（ 1 × 1 × 3 mm ），浸入含有 5 μg BSA （Cohn Fraction V, Sigma, Deisenhofen,Germanoy ）或营养因子的 3 0 μl PBS 中。凝胶泡沫插于损伤部位,固定在覆盖这个部位的韧带下。皮肤以丝织物(Ethikon 3-0 ）湿润，并将该动物归还给它们的母亲。出生后七天，通过超剂量乙醚和经血管灌注 5 0 ml 4 %甲醛处死动物。解剖脑干，固定 1 小时后，以水冲洗，用递增浓度的乙醇（ 7 0 － 1 0 0 %）脱水，在石蜡打底后，将全部脑干用系列切片机（ Reichert-Jung 2050 Supercut ）制成系列切片（ 7 μ m），切片以羟甲苯基紫罗兰（Sigma,Deisenhofen,Germany ）染色，对比边和损伤边的面部运动神经元核仁在光学显微镜（放大 1 2 5 × ）下计数，按Sendtnea 等人描述的方法每隔 5 片计数，其计数没有用分裂核进行校正。

1 0 . 1 . 2 NGF,BDNF 和 NT-3 的产生和特性

从成熟雄性鼠的颌下腺分离神经生长因子（ 2 . 5 S ），重组鼠BDNF和 NT-3均可通过重组牛痘病毒转染的兔肾细胞产生，并可从上清液纯化。

1 0 . 2 结果

如果面部运动神经元轴突被切断和损伤，则 8 0 %以上的损伤细胞可在几天内变化退化。CNTF应用于损伤部位显示出增加这种细胞的存活率将近100%，在相同的条件下，应用5μg NGF不能明显提高运动神经元的存活能力。

与用NGF处理的动物相反，如果BDNF应用于切断的面部神经，可观察到较高的存活率。平均50%的损伤运动神经在损伤后一周仍然存活(表Ⅳ)。损伤部位神经元的存活率范围为765至4580。在仅765个神经元可被测得的动物中，包含营养因子的凝胶泡沫已从损伤部位移位，这可能解释这一个实验中观察到的BDNF的低存活作用。

和用BDNF的结果一样，在NT-3处理后也能提高运动神经元的存活能力(表Ⅳ)。然而其作用小于BDNF的作用，平均27%的损伤运动神经元可在损伤部位被挽救，相比而言BSA可使18%的运动神经元被挽救，NT-3提高存活能力的作用在统计学上具有显著意义($P<0.05$)。

形态上，以BDNF和NT-3处理动物的损伤运动神经元细胞体较小，显示出典型的反应性变化(表5)。BDNF和NT-3处理的动物中，细胞核被移位，染色质溶解显著,然而，当与用BSA-凝胶泡沫处理的对照动物比较时，细胞核体积显得较大，(图5)。

表Ⅳ新生鼠面神经损伤后运动神经元的存活能力:神经营养因子的作用

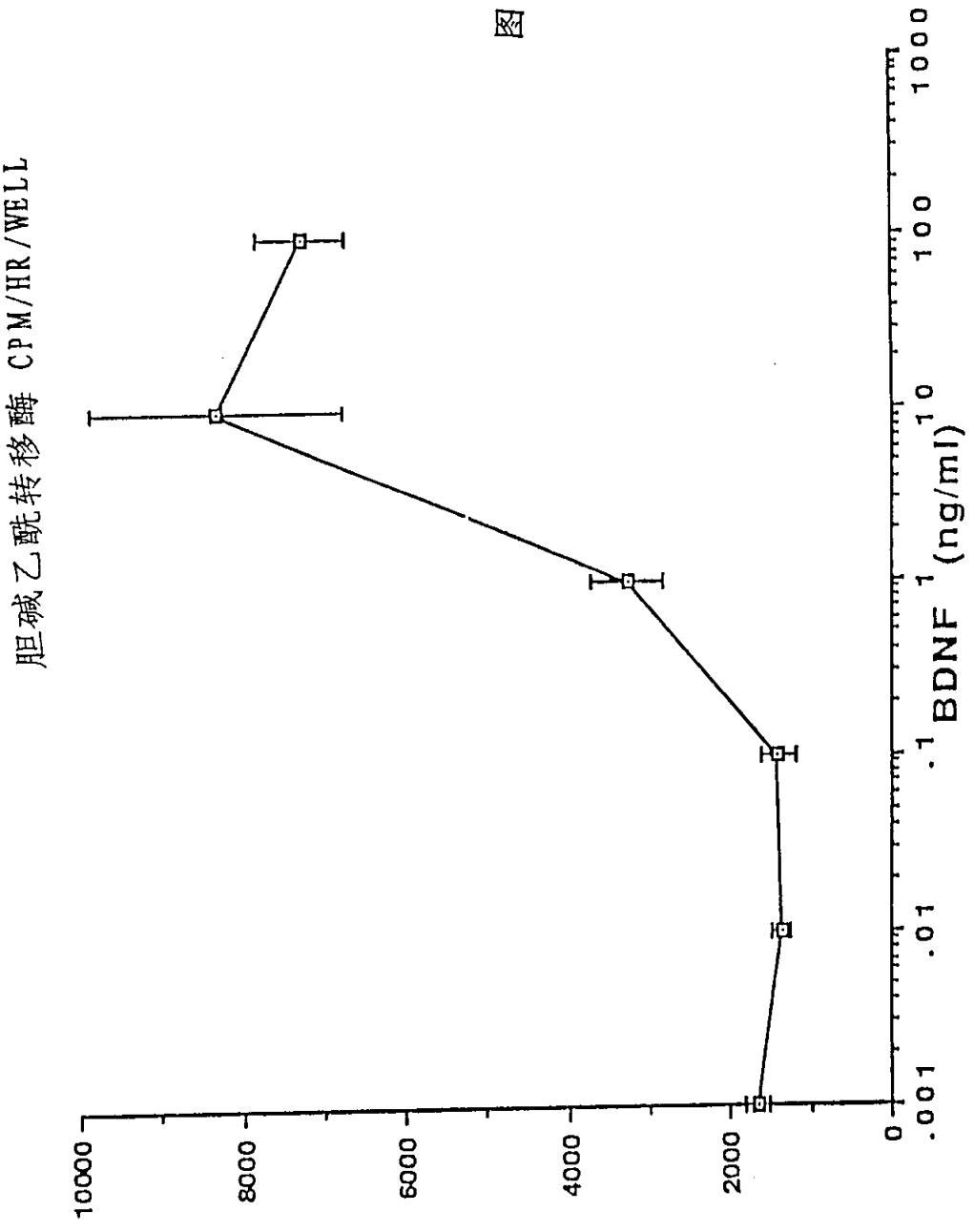
	存活神经元数目±SEM	
	损伤边	未损伤边
用BSA凝胶泡沫处理的动物(n=8)	844±115	4597±222
用含NGF的凝胶泡沫处理的动物(n=3)	500±322	4160±409
用含BDNF的凝胶泡沫处理的动物(n=9)	2222±446	4534±129
用含NT-3的凝胶泡沫处理的动物(n=6)	1155±109	4273±415

10.3 讨论

在本发明的研究中，我们发现BDNF能够支持新生鼠大量面部运动神经元轴索切断后的存活。此外，虽活性较低，NT-3似乎对这些细胞也有活性。相反NGF却不支持这些细胞轴突切断后的存活。这些数据说明，神经营养因子基因家族成员能以类似CNTF的方式在体内影响运动神经元的存活。

本文引用了几篇对比文献， 其中所述内容全部一并引用作为参考。

图 1


胆碱乙酰转移酶 CPM/HR/WELL
10000
8000
6000
4000
2000
0
.001
.01
.1
1
10
100
1000
BDNF (ng/ml)

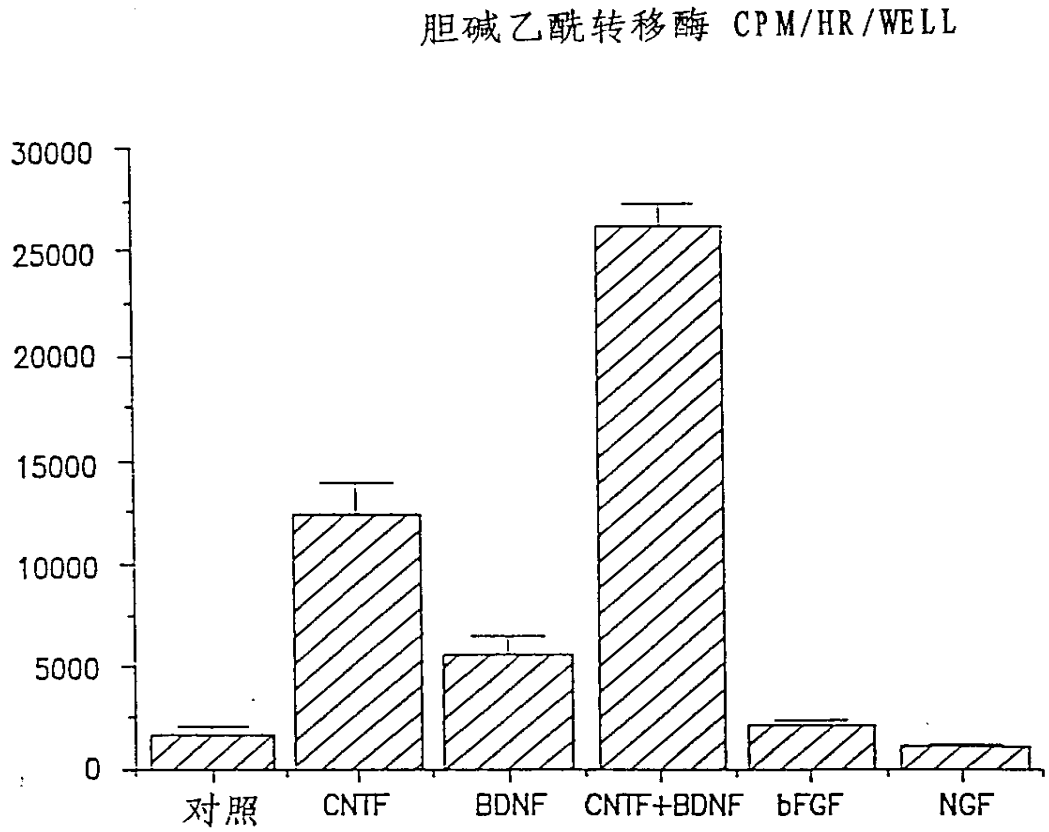

胆碱乙酰转移酶 CPM/HR/WELL
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
对照
CNTF
BDNF
CNTF+BDNF
bFGF
NGF

图 2

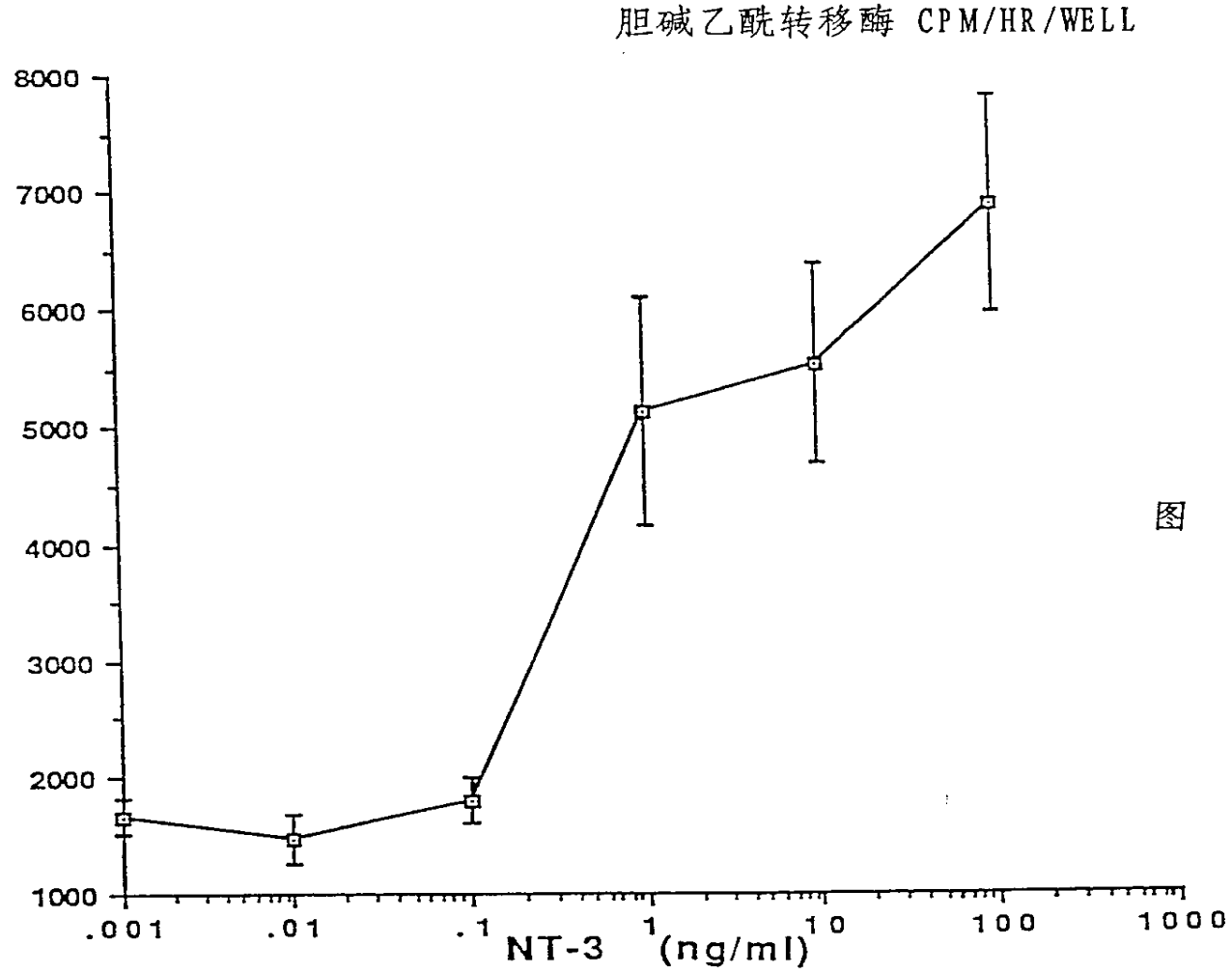

胆碱乙酰转移酶 CPM/HR/WELL
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
.001
.01
.1
1
10
100
1000
NT-3 (ng/ml)

图 3

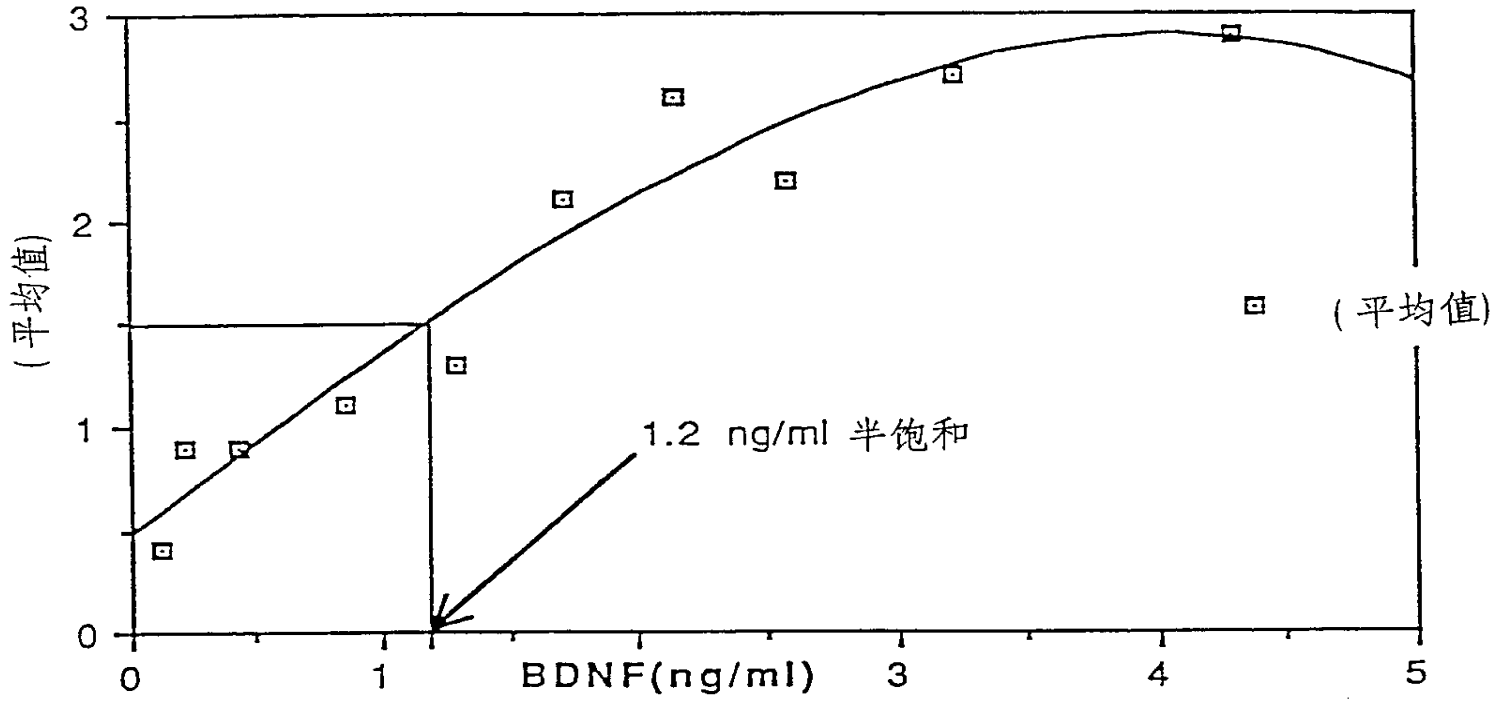


图 4

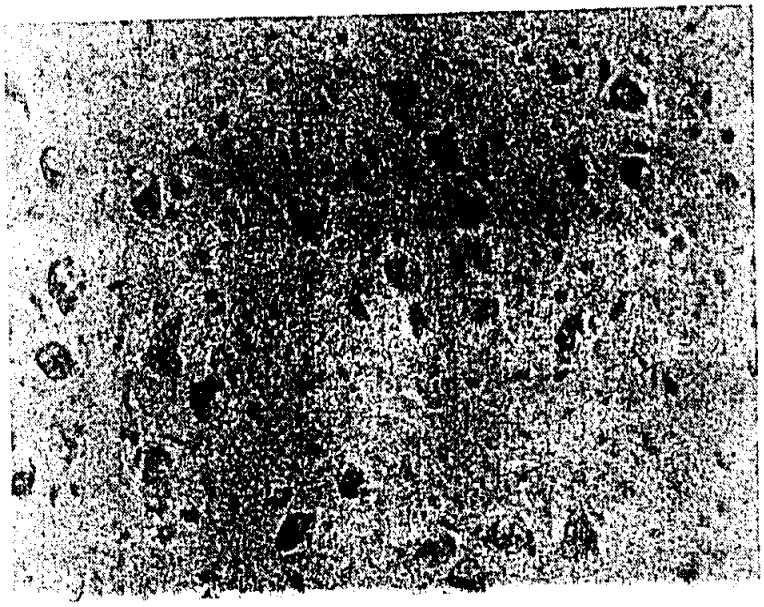


图 5a

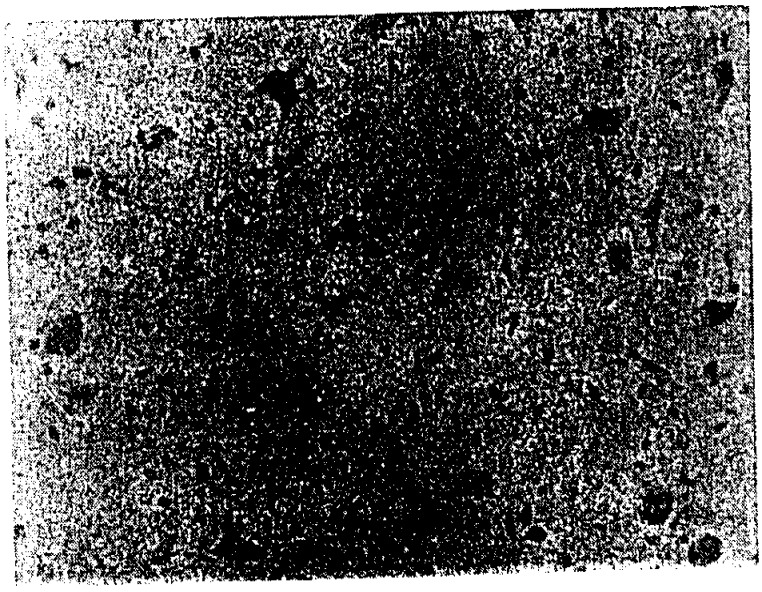


图 5b

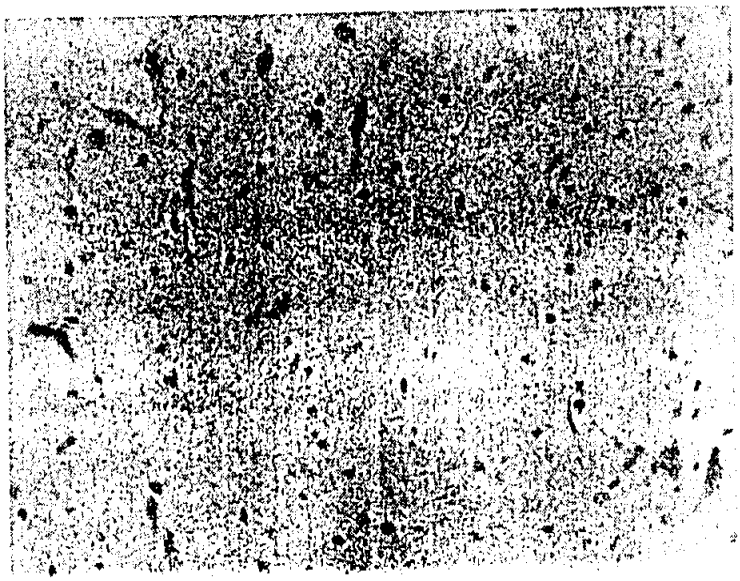


图 5 C

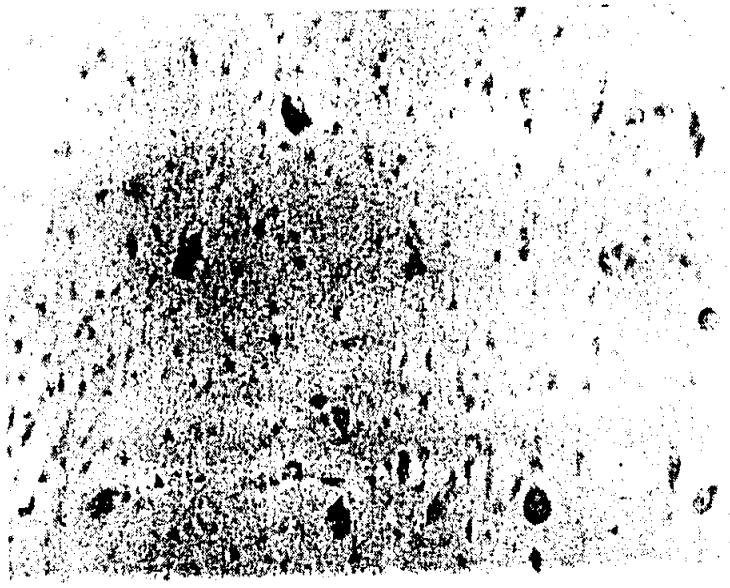


图 5 d

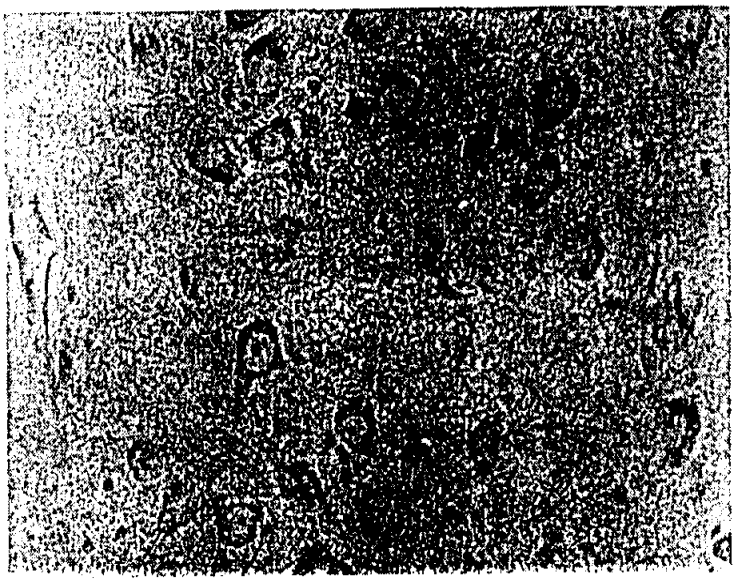


图 5e

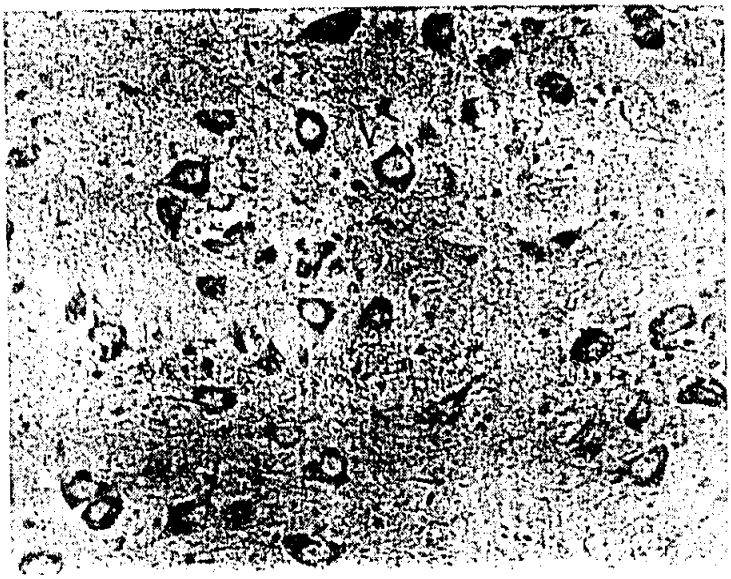


图 5f