



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101743474 B

(45) 授权公告日 2015.06.03

(21) 申请号 200880021887.5

(22) 申请日 2008.05.12

(30) 优先权数据

60/928,541 2007.05.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009.12.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/006060 2008.05.12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/140814 EN 2008.11.20

(73) 专利权人 阿索尔达治疗公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 X·彦 A·O·卡加诺

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 李瑛

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

C07K 14/435(2006.01)

C12N 5/08(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1655804 A, 2005.08.17,

Eugene H. Herman et al.. Use of cardiac
troponin T levels as an indicator of
doxorubicin-induced cardiotoxicity..

《Cancer Research》.1998, 第58卷

Coralie Poizat et al..

Phosphorylation-dependent degradation
of p300 by doxorubicin-activated p38
mitogen-activated protein kinase in
cardiac cells.. 《Molecular and Cellular
Biology》.2005, 第25卷

Asangi R. K. Kumarapeli et al.. A novel
transgenic mouse model reveals deregulation
of the ubiquitin-proteasome system in
the heart by doxorubicin.. 《The FASEB
Journal》.2005, 第19卷

Adamcova et al.. In vitro and in
vivo examination of cardiac troponins
as biochemical markers of drug-induced
cardiotoxicity.. 《Toxicology》.2007, 第237
卷

Vincent Ricchiuti et al.. Cardiac
troponin I and T alterations in hearts
with severe left ventricular remodeling..
《Clinical Chemistry》.1997, 第43卷

审查员 毕秀华

权利要求书1页 说明书16页 附图16页

(54) 发明名称

检测心脏损伤的方法

(57) 摘要

本发明涉及检测患者心脏损伤的方法。本发明还涉及治疗鉴定为患有心脏损伤的患者的方法。本发明进一步涉及评价为治疗患者受损心脏而设计的正在进行治疗方案的功效的方法。

1. 包含治疗有效剂量的神经胶质生长因子 2 (GGF2) 的组合物用于制造治疗个体中的心脏损伤的药物的用途, 其中所述个体显示出该个体的心脏组织中的心脏肌钙蛋白 T (cTnT) 或心脏肌钙蛋白 I (cTnI) 蛋白质的胞内水平下降迹象, 并且其中该个体心脏组织中 cTnT 或 cTnI 蛋白质的胞内水平相对于心脏组织对照样品的 cTnT 或 cTnI 蛋白质的胞内水平降低至少 50% 表示该个体中的心脏损伤。

2. 权利要求 1 的用途, 其中通过确定心脏功能正常个体的心脏组织中的 cTnT 或 cTnI 蛋白质的胞内水平来建立心脏组织中的 cTnT 或 cTnI 蛋白质的对照或正常胞内水平。

3. 权利要求 1 的用途, 其中所述的心脏损伤是心脏毒性、高血压、瓣膜障碍、心肌梗塞、病毒性心肌炎或硬皮病的结果。

4. 权利要求 3 的用途, 其中所述的心脏毒性是由使用化疗剂、辐射或用于非治疗性、娱乐目的的药剂的治疗所引起的。

5. 权利要求 3 的用途, 其中心脏组织中的 cTnT 或 cTnI 蛋白质的对照或正常胞内水平是通过确定具有正常心脏功能的个体的心脏组织中的 cTnT 或 cTnI 蛋白质的胞内水平建立的。

6. 权利要求 4 的用途, 其中心脏组织中的 cTnT 或 cTnI 蛋白质的对照或正常胞内水平是通过在能够引起心脏损伤的治疗开始之前确定个体的心脏组织中的 cTnT 或 cTnI 蛋白质的胞内水平建立的。

7. 权利要求 1 的用途, 其中所述的个体是哺乳动物。

8. 权利要求 7 的用途, 其中所述的哺乳动物是人。

9. 权利要求 1 的用途, 其中所述的组合物还包含蛋白酶体抑制剂。

检测心脏损伤的方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请依据 35USC § 119(e) 要求 2007 年 5 月 10 日提交的美国临时申请系列 No. 60/928, 541 的优先权, 在此特意将该申请全部引入作为参考。

发明领域

[0003] 本发明涉及医学诊断领域。更特别地, 本发明涉及检测患者体内心脏损伤的方法。本发明还涉及治疗鉴定为患有心脏损伤的患者。本发明还涉及评价设计用来治疗患者受损心脏的正在进行中的治疗方案的功效的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 该申请中提及了几个出版物和专利文件, 以更全面地描述本发明所属领域的进展情况。这些出版物和文件每篇的公开内容在此引入作为参考。

[0006] 心力衰竭在原因上与损害心脏的多种病症相关, 包括冠心病, 伴有或没有心脏病发作; 高血压; 影响心肌的疾病、感染或毒素; 和心瓣膜的疾病。心力衰竭的发作可以快速发生, 从几天至几周, 但更常见的是随着心脏逐渐和渐进地变弱, 在几年的过程中缓慢发展。

[0007] 针对患者体内癌细胞负荷降低的治疗干预常常 (如果不是总是) 伴随各种有害的副作用。实际上, 用作治疗各种癌症的化疗剂的细胞生长抑制剂常常呈现出潜在的致命副作用, 包括心脏毒性。细胞抑制治疗中常用的药剂包括大环内酯类柔红霉素及其前药, 佐柔比星, 阿霉素 (亚德里亚霉素) 和表柔比星, 以及合成的抗生素米托蒽醌。大环内酯类, 例如, 代表一类基于柔红糖胺和四氢 - 萘并萘 - 二酮的化疗剂。将这些化合物用于治疗各种癌症, 包括白血病和淋巴瘤, 和乳房、子宫、卵巢和肺的实体肿瘤。除了在正在接受化疗的患者体内观察到的预期的不利反应, 如脱发和恶心以外, 涉及大环内酯给药的治疗干预因这类化合物的明显心脏毒性而复杂化和受到限制。与大环内酯使用相关的心脏毒性与给药的总剂量相关并且常常是不可逆的。这些化合物的抑制细胞效应和心脏毒性是由于 (至少部分地) 由大环内酯结合细胞膜成分引起的膜流动性和渗透性的改变所引起的。还认为心脏中自由基形成和大环内酯代谢产物的蓄积引起心脏损伤。心脏毒性常常呈现于心电图 (EKG) 异常和心律失常中或表现为心肌病, 其最终可能导致充血性心力衰竭。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明涉及提供新的诊断方法, 用于筛选患者以鉴定呈现出心脏损伤病征的那些。然后用药物制剂治疗如此鉴定的患者, 该药物制剂用于治疗在此所述的心脏损伤。在本发明的特定方面中, 提出了筛选患者的方法, 以鉴定呈现出由于例如心脏毒性、高血压、瓣膜障碍、心肌梗塞、病毒性心肌炎或硬皮病引起的心脏损伤信号的那些。在特定的方面中, 本发明集中于鉴定呈现出由化疗干预引起的心脏毒性的患者。这些患者的归类用来鉴定需要治疗干预以缓解心脏毒性的短期和长期影响的患者亚组。可以用药物制剂治疗如此鉴定的患者亚组, 该药物制剂用于治疗与使用心脏毒性剂量的药物或化学物质相关而产生的心脏损伤。在其中鉴定的患者的心脏损伤是由于正患有的病症 (如高血压、瓣膜障碍、心肌梗

塞、病毒性心肌炎或硬皮病)引起的情况下,也可以配制合适的药物制剂来治疗患有心脏损伤的患者。

[0010] 本发明还包括根据心脏损伤的程度或类型将患者分级的方法,该知识指导熟练的医师来选择合适的治疗方案。本发明还包括评价治疗方案的功效的方法。

[0011] 本发明的新方法是基于以下发现:完整的心脏组织中心脏肌钙蛋白 I(cTnI) 和心脏肌钙蛋白 T(cTnT) 的胞内水平变化可以用作心脏损伤存在的指示。更具体地,本发明已经发现了完整心脏组织中胞内 cTnI 和 cTnT 水平的降低作为诊断标记来鉴定处于心脏损伤风险中或经历心脏损伤的患者。可以从患者摘除心脏组织,并使用本领域已知的分子成像实验方案在体外测试或在体内分析。

[0012] 使用任一种方法,将对于患者的心脏组织确定的胞内 cTnI 和 cTnT 水平与表达野生型或正常水平的胞内 cTnI 和 cTnT 的对照心脏组织的胞内 cTnI 和 cTnT 水平相比较。通过下列方法容易确定患者心脏组织中降低水平的胞内 cTnI 和/或 cTnT,即,定量蛋白水平,这可以使用标准方法来实现,和分析结果以确定相对于对照胞内 cTnI 和 cTnT 水平的统计学上显著的下降在患者的心脏组织中是否明显。将显示出降低的胞内 cTnI 和/或 cTnT 水平迹象的患者作上标记,以使用选定的合适组合物进行治疗,从而恢复(至少部分地)正常的心脏功能,如通过胞内 cTnI 和 cTnT 水平的升高或胞内 cTnI 和 cTnT 正常水平的恢复所反映的。

[0013] 在本发明的实施方案中,通过测定心脏功能正常患者的心脏组织中 cTnT 或 cTnI 任一种胞内水平来建立心脏组织中 cTnT 或 cTnI 任一种的对照或正常胞内水平。在本发明的另一个实施方案中,通过在能够引起心脏损伤的治疗开始之前确定患者心脏组织中 cTnT 或 cTnI 任一种的胞内水平来建立心脏组织中 cTnT 或 cTnI 任一种的对照或正常胞内水平。

[0014] 在本发明的一个方面中,心脏损伤是心脏毒性、高血压、瓣膜障碍、心肌梗塞、病毒性心肌炎或硬皮病的结果。在本发明的再一个方面中,心脏毒性是由使用化疗剂或辐射的治疗所引起的。

[0015] 通过测量治疗过的患者的心脏组织中的胞内 cTnI 和 cTnT 水平来评价设计用来至少部分地恢复正常心脏功能的治疗方案的功效也在本发明的范围之内。根据本发明,相对于治疗前测定的胞内 cTnI 和 cTnT 水平,治疗过的患者的心脏组织内的胞内 cTnI 和 cTnT 水平的升高是治疗正起作用以恢复心脏功能的阳性指示。

[0016] 应当理解心脏组织中 cTnI 或 cTnT 任一种的胞内水平或心脏组织中 cTnI 和 cTnT 两者的胞内水平可以用作心脏组织活动和/或功能的指示。这适用于本发明的所有方面,包括涉及评价或诊断心脏损伤的方法,涉及相对于特定的治疗方案将患者分级的方法和涉及评价治疗方案的功效的方法。

[0017] 根据本发明,心脏组织中降低的 cTnI 和/或 cTnT mRNA 水平也表示心脏损伤,并可以用来将患者群分级。因此,正常 cTnI 和/或 cTnT mRNA 水平的部分或完全恢复也是如上所述就蛋白水平而论的治疗功效的阳性指示。

[0018] 一般来说,本发明涉及动物,更具体地,涉及哺乳动物,更特别地,涉及人。因此,患者优选是动物,包括但不限于如奶牛、猪、马、鸡、猫、狗等的动物,并且优选哺乳动物,最优选人。因此,术语“患者”或“病人”可以用来指人。

[0019] 本发明还包括联合治疗方案,其中将 GGF2 或由神经调节蛋白基因编码的表皮生

长因子样 (EGFL) 结构域和蛋白酶体抑制剂一起来给药,以治疗心脏损伤。用于本发明中的示例性蛋白酶体抑制剂是 Proscript 519,其是有效的和选择性的蛋白酶体抑制剂。在本发明中有用的其他蛋白酶体抑制剂包括 Velcade™和乳胞素。另外的蛋白酶体抑制剂是本领域技术人员已知的。实际上,蛋白酶体抑制剂已经用作治疗剂,用于治疗各种疾病,包括一些癌症和神经变性疾病。

[0020] 本发明还包括 GGF2 或由神经调节蛋白基因编码的表皮生长因子样 (EGFL) 结构域在制备药物中的用途,该药物给予通过本发明的诊断方法鉴定为呈现出心脏损伤的患者。本发明进一步包括 GGF2 或由神经调节蛋白基因编码的表皮生长因子样 (EGFL) 结构域和蛋白酶体抑制剂一起在制备药物中的用途,该药物给予通过本发明的诊断方法鉴定为呈现出心脏损伤的患者。

[0021] 从以下优选实施方案的描述和从权利要求书中将清楚本发明的其他特征和优点。

[0022] 附图简述

[0023] 图 1A-1C 显示了存活图 (A)、柱状图 (B-C) 和免疫印迹 (C)。对于存活分析 (A),给小鼠注射单剂量的阿霉素 [20mg/kg, 腹膜内 (i. p.)], 使用或没用伴随的注射 NRG1 (0.75mg/kg, s. c. 每日)。通过 Kaplan-Meier 方法分析十四天存活。关于血清肌酸激酶 (CK) 水平的测定 (B),在对照、Dox- 处理和阿霉素注射后四天 Dox-NRG1 处理的小鼠中测量血清 CK 水平。图 1C 显示了 NRG1 注射减轻了小鼠中阿霉素诱导的 cTnI、cTnT 和 cTnC 蛋白水平的下调。用阿霉素 (20mg/kg, i. p.) 处理小鼠,使用或没用伴随的 NRG1 注射 (0.75mg/kg, s. c. 每日)。阿霉素处理后五天,通过 Western 印迹分析测量 cTnI、cTnT 和 cTnC 的蛋白水平。

[0024] 图 2A-D 显示了探测的免疫印迹,来检测所示的蛋白。图 2A 揭示了 NRG1 减轻了新生大鼠心肌细胞 (RNCM) 中阿霉素诱导的 cTnI 和 cTnT 蛋白水平的下调。在 NRG1 (20ng/ml 或 50ng/ml) 的存在或不存在下,用阿霉素 (1 μ M) 处理 RNCM。阿霉素处理后 48 小时,通过 Western 印迹分析测量 cTnI 和 cTnT 蛋白水平。图 2B 显示了 erbB2 的抑制消除了 NRG1 对 cTnI 和 cTnT 的作用。在 AG879 (10 μ M) 和 AG1478 (10 μ M) 的存在和不存在下,用阿霉素 (1 μ M) 和 NRG1 (20ng/ml) 处理 RNCM。通过 Western 印迹分析来分析 cTnI 和 cTnT 的蛋白水平。如图 2C 中所示的,在 LY294002 (10 μ M)、Akti (5 μ M)、PD98059 (50 μ M) 和雷帕霉素 (10nM) 的存在下,用阿霉素和 NRG1 处理 RNCM。通过 Western 印迹分析来分析 cTnI 和 cTnT 蛋白水平。图 2D 显示了在放线菌酮 (5 μ g/ml)、Z-VAD (100 μ M) 或 MG132 (10 μ M) 的存在下,用阿霉素或阿霉素 +NRG1 处理 RNCM。通过 Western 印迹分析来测量 cTnI 和 cTnT 的蛋白水平。

[0025] 图 3A-3D 显示了免疫印迹 (A、C、D) 和柱状图 (B)。图 3A 呈现了其中在不同天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (20 μ M) 的存在下用阿霉素 (1 μ M) 处理 RNCM 的结果。通过 Western 印迹分析来测量 cTnI 和 cTnT 的蛋白水平。图 3B 显示了阿霉素处理的 RNCM 中天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活的作用。用 Dox、Dox+NRG1 或 Dox+NRG1+LY 处理细胞。通过天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活测试来分析天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活。图 3C 显示了 NRG1 降低了阿霉素诱导的细胞色素 C 释放。用 Dox 或 Dox+NRG1 处理 RNCM。通过细胞分级分离和 Western 印迹分析来分析细胞色素 c 释放。图 3D 揭示了 NRG1 降低了阿霉素诱导的 cTnI 的遍在化。用 Dox 或 Dox+NRG1 处理 RNCM。用 cTnI 抗体使细胞

裂解物免疫沉淀并用遍在蛋白抗体探测。

[0026] 图 4A-4B 显示出溴化乙锭染色的琼脂糖凝胶 (A) 和免疫印迹 (B)。图 4A 揭示了 NRG-1 抑制了阿霉素诱导的 cTnI、cTnT 和心脏特异性转录因子的 mRNA 水平的下调。用 Dox 或 Dox+NRG1 处理 RNCM。通过定量 RT-PCR 分析 cTnI、cTnT、GATA4、MEF2c 和 NKX2.5 的 mRNA 水平。图 4B 显示了 NRG1 抑制了阿霉素诱导的翻译分子的脱磷酸作用。用 Dox、Dox+NRG1 或 Dox+NRG1+LY 来处理 RNCM。通过 Western 印迹分析来分析 mTOR、P70S6K、S6、4EBP 和 EIF4G 的脱磷酸水平。

[0027] 图 5A-5C 显示了存活图 (A)、柱状图 (B) 和免疫印迹 (C)。图 5A 显示了阿霉素处理的小鼠中的存活分析, 该小鼠具有结构域阴性 PI3K (dnPI3K) 的心肌细胞 - 特异性超表达。用单剂量的阿霉素 (20mg/kg, 腹膜内) 处理小鼠, 使用或未使用伴随的 NRG1 治疗 (0.75mg/kg, s. c.)。通过 Kaplan-Meier 方法分析十四天存活。图 5B 描绘了阿霉素处理的 dnPI3K 小鼠中的血液动力学测量。用单剂量的阿霉素 (20mg/kg, 膜膜内) 处理小鼠。阿霉素处理后六天进行血液动力学测量。图 5C 显示了用 Dox 或 Dox+NRG1 处理的 dnPI3K 小鼠中的 cTnI 蛋白水平。

[0028] 图 6A-D 显示了 GGF2 的氨基酸和核酸序列。

[0029] 图 7 显示了 EGFL1 的氨基酸和核酸序列。

[0030] 图 8 显示了 EGFL2 的氨基酸和核酸序列。

[0031] 图 9 显示了 EGFL3 的氨基酸和核酸序列。

[0032] 图 10 显示了 EGFL4 的氨基酸和核酸序列。

[0033] 图 11 显示了 EGFL5 的氨基酸和核酸序列。

[0034] 图 12 显示了 EGFL6 的氨基酸和核酸序列。

[0035] 发明详述

[0036] 通常, 当患者到医院报告胸痛时, 采取以下的诊断步骤来评价患者心脏的状况, 并确定所鉴定的任何问题的严重程度。首先, 询问患者来汇编症状的一览表, 使得健康护理医师可以排除非心脏相关的问题。其次, 进行心电图 (EKG) 阅读, 心电图记录了由心脏产生的电波。EKG 是用于测定与心脏状况相关的胸痛严重程度和测量心脏损伤程度的必需工具。还进行了验血来检测特定因子升高的血清水平, 某些因子如肌钙蛋白和肌酸激酶 (CK), 以及肌酸激酶的心脏特异性更强的亚型 (CK-MB), 其表示了心脏损伤。CK、CK-MB 和肌钙蛋白的血清水平的升高是由于这些分子在心肌细胞死亡后的释放所引起的, 并且因此用作坏死的血清标记。随着作为长期缺血结果的心肌细胞死亡, 例如, 细胞膜破裂, 将胞内内含物释放至胞外流体空间中, 从该处进入淋巴细胞, 并随后进入血流中。成像测试, 包括心回波图和灌注闪烁扫描法, 也可以用于诊断内容中。

[0037] 心脏坏死可用的最特异性标记是心脏肌钙蛋白。这些蛋白是心肌细胞收缩装置的组成部分。两种心脏肌钙蛋白, cTnI 和 cTnT, 已经商业化, 并且已经证明了这些标记的检测对于最小水平心肌损伤的检测是可靠而特异性的测试。心脏肌钙蛋白, 如 CK-MB, 在细胞膜破裂时从死亡的心肌细胞中释放出来, 并且最终在血液中可检测到。坏死作为长期心肌缺血的结果发生, 但也可以是由其他诱因 (如感染、创伤或充血性心力衰竭) 引起的心肌细胞损伤引起的。

[0038] 本发明在多个方面不同于现有技术中描述的那些程序。开始, 其涉及测量完整心

脏组织中的 cTnI 和 cTnT 的胞内水平,而不是这些标记的血清水平。此外,本发明已经发现了完整心脏组织中胞内 cTnI 和 cTnT 水平的降低作为诊断标记来鉴定处于心脏损伤风险中或经历心脏损伤的患者。该方法与那些标记的血清水平的测量明显相反,血清水平的提高表示心脏损伤。此外,这些标记的血清水平的提高是心脏损伤的急性或短暂标记,而完整心脏组织中 cTnI 和 cTnT 胞内水平的测量作为反应心脏状况的稳定标记。根据本发明,呈现出完整心脏组织中胞内 cTnI 和 cTnT 水平降低的患者的鉴定还提供了一种筛选方法,使用该方法将患者分成不同的种类,用于随后的治疗。将显示出降低的胞内 cTnI 和 cTnT 水平迹象的患者作上标记,以使用选定的合适组合物来治疗,以恢复(至少部分地)正常的心脏功能,如该标记水平恢复所反应的。

[0039] 用于包含在这样的组合物中的示例性治疗剂是神经胶质生长因子 2(GGF2)。图 6A-6D 中呈现了 GGF2 的氨基酸和核酸序列。治疗组合物还可以包括其他示例性多肽,如由神经调节蛋白基因编码的表皮生长因子样(EGFL)结构域,如图 7-12 中所示的,并且描述于美国专利号(USPN)5,530,109 中,在此以其整体引入作为参考。

[0040] 为了更清楚地阐述本发明的参数,使用以下的定义:

[0041] 如本说明书和所附权利要求中所用的,单数形式“一种(a)”、“一种(an)”和“该(the)”包括复数指代物,除非文中另外清楚地指出。因此,例如,“该方法”包括一种或多种方法,和/或在此所述的和/或本领域技术人员在阅读该公开内容后将变得清楚的类型的步骤。

[0042] 可以给予含有本发明的分子或化合物的组合物,用于诊断和/或治疗处理。在诊断应用中,将组合物给予患者,以确定患者是否具有心脏损伤和/或关于预期的治疗方案将患者分级、在治疗应用中,将组合物以足以治疗患者的含量给予诊断为具有心脏损伤的患者,由此至少部分抑制疾病及其并发症的症状。将足以实现该目的的量限定为“治疗有效量或剂量”。对于该用途有效的量将取决于疾病的严重程度以及患者的体重和一般状况。

[0043] 如在此所用的,短语“心脏组织的对样品”指的是其 cTnI 和 cTnT 的胞内水平在正常范围内的正常或野生型范围,在这些实验中,如由熟练的医师所确定的,具有健康心脏功能的患者的正常心脏组织被用作与未知相比较的标准品。表示正常心脏的标准品,例如,可以获自对没有心脏病迹象的尸体进行的新鲜尸体解剖。

[0044] 相似地,术语“对照或正常水平”指的是如在此所述建立或确定的并且本领域理解为在与健康功能相关的范围内的水平。就本发明而论,健康功能指的是健康的心脏功能,其可以通过本领域技术人员使用标准方法来测定,所述的标准方法如测量收缩和舒张压,测量指示蛋白如 CK、CK-MB 和肌钙蛋白的血清水平,进行 EKG 和/或给予应力测试。熟练的医师将会知道一般被认为是这些蛋白的正常血清水平的那种状态。

[0045] 例如,关于 CK 的血清水平,已经提出了各种研究,并且已经建立了一般指导。在一项这样的研究中,例如,怀疑患有心肌梗塞(MI)并具有 280IU/L 或更高的血清肌酸激酶水平的患者非常可能已经患有 MI;具有 80 至 279IU/L 的血清肌酸激酶水平的患者很可能已经患有 MI;具有 40 至 79IU/L 的肌酸激酶水平的患者不太可能已经患有 MI;具有低于 40IU/L 的肌酸激酶水平的患者更不太可能已经患有 MI。关于被认为是 CK 或肌钙蛋白的正常血清水平的那种状态,应当理解不同的医院已经建立了变化甚微的标准。此外,熟练的医师将

会知道在医师工作的特定临床环境（例如，特定的医院）中的公认标准。

[0046] 肌钙蛋白也被认为是用于心脏损伤的敏感性和特异性的标记。实际上，认为血清肌钙蛋白 I (sTnI) 的检测对于 MI 的诊断比肌酸激酶-MB 浓度更精确，并且提供更有用的预后信息。sTnI 的检测还可以早期鉴定具有急性冠状综合症并处于提高的死亡风险中的那些患者。sTnI 对于具有总肌酸激酶少量增加的患者中不太严重的缺血性心肌损伤的检测比肌酸激酶-MB 浓度更灵敏，并且避免了与使用肌酸激酶-MB 作为围术期 MI 诊断标记相关的假性诊断的高发生率。在一项研究中，例如，具有中度升高的血清肌钙蛋白 I (0.4-2.0 $\mu\text{g/L}$) 的患者与没有相似升高的患者相比时，具有显著更高的死亡率和更长的重症监护和留院时间。在中度升高的肌钙蛋白浓度范围内，较高的滴定度与提高的死亡风险、更长的留院和重症监护时间以及较高的心肌梗塞 发病率相关。用 β -阻断剂和阿司匹林治疗呈现出等于或高于 2 $\mu\text{g/L}$ 的最大血清肌钙蛋白浓度的患者改善了他们的预后。

[0047] 关于胞内 cTnI 和 cTnT 的正常水平，通过使用确定蛋白水平的标准方法（如在此教导的和本领域已知的那些）评价正常的心脏组织来建立这样的测定。降低的胞内 cTnI 和 cTnT 水平，如表示受损或患病心脏的那些，被确定为这些蛋白相对于建立的正常水平的降低。例如，相对于健康心脏组织（正常对照），待测试损伤的心脏组织中 cTnI 和 cTnT 水平至少 50% 的降低作为待测试心脏组织受到损伤的阳性指示，并且从其取出受损组织的患者将得益于如在此教导的那些治疗干预。在更特别的实例中，相对于健康心脏组织（正常对照），待测试损伤的心脏组织中 cTnT 水平至少 75% 的降低作为待测试心脏组织受到损伤的阳性指示，并且从中取出受损组织的患者将得益于如在此教导的那些治疗干预。

[0048] 本领域技术人员还将会知道大量关于正常和患病心脏组织中胞内 cTnI 和 cTnT 的活性和水平的科学文献。关于正常和患病心脏组织中胞内 cTnI 和 cTnT 的参考文献的实例包括：Latif 等 (2007, J HeartLung Transplant 26:230-235)；Birks 等 (2005, Circulation 112(9 Suppl):I57-4)；Day 等 (2006, Ann NY Acad Sci 1080:437-450)；VanBuren 等 (2005, Heart Fail Rev 10:199-209)；de Jonge 等 (2005, Int J Cardiol 98:465-470)；Wen 等 (2008, J Biol Chem Apr 22, Epub ahead of print)；Li 等 (2008, Biochem Biophys Res Commun 369:88-99)；Robinson 等 (2007, Circ Res 101:1266-1273)；Solzin 等 (2007, Biophys J 93:3917-3931)；(Chen 等 (2007, Cardiovasc Toxicol 7:114-121)；Solaro 等 (2007, Circ Res 101:114-115)；Kubo 等 (2007, J Am Coll Cardiol 49:2419-2426)；Day 等 (2007, J Mol Med 85:911-921)；Milting 等 (2006, Mol Cell Cardiol 41:441-450)；在此将每篇的全部内容引入作为参考。

[0049] 在本发明的另一个实施方案中，如通过测定治疗方案之前和之中（或之后）的蛋白水平所确定的，胞内 cTnI 和 cTnT 水平的提高证明了该方案的治疗功效并提供了该方案促进正常心脏功能恢复的证据。实际上，胞内 cTnI 和 cTnT 水平的改善可以用作改善的心脏功能的替代终点（即，打算用来替代临床终点的生物标记）。然而，如果胞内 cTnI 和 cTnT 水平保持在降低的水平或在治疗干预后进一步降低，那么熟练的医师将会对于待治疗的患者重新考虑该方案的价值，并改变或可能地缩短该治疗方案。

[0050] 如在此所用的，“防止”指的是获得或产生疾病或障碍的风险降低，即，在疾病发作之前引起至少一种疾病的临床症状没有在暴露于疾病诱发剂或易患病的患者中产生。

[0051] 术语“预防”与“防止”相关，并且指的是其目的为防止，而不是治疗或治愈疾病的

方法或程序。预防性方法的非限制性实例包括给予疫苗；将低分子量肝素给予由于例如固定而处于血栓形成风险中的住院患者；在去疟疾是地方病或接触疟疾风险高的地理区域就诊之前，给予抗疟疾药，如氯喹。

[0052] 在一个实施方案中，术语任何疾病或障碍的“治疗”指的是改善疾病或障碍（即，停止疾病或降低其至少一种临床症状的表现、程度或严重性）。在另一个实施方案中，“治疗”指的是改善至少一个物理参数，其可能通过患者是不能辨别的。再一个实施方案中，“治疗”指的是调节疾病或障碍，身体上的（例如，可辨别症状的稳定）、生理上的（例如，物理参数的稳定）或两者。

[0053] 用于分离组织的入侵性程序

[0054] 心肌活检是常见程序，其中在胸廓切开术过程中或在开胸外科手术过程中，通过导管从心脏获得心脏组织。其通常用于诊断心力衰竭的病因学。在组织学上和生化上分析心脏组织。这些测试的结果在诊断心力衰竭的诱因中是有用的。对于临床环境中心肌活检的综述，参见Veinot(2002, Can J Cardiol. 18(3) :287-96)，在此将其完整的公开内容引入作为参考。

[0055] 心肌活检的结果指出心力衰竭是如硬皮病、病毒性心肌炎、药物毒性这样的诱因或许多心力衰竭诱因的结果。该诊断将指出哪个（如果存在）治疗干预是有用的，并且应当使用。

[0056] 心肌活检（或心脏活检）是入侵性程序，其中将例如活检刀（在末端带有抓取装置的小导管）用于获得可以分析的小块心肌组织。心肌活检可以用于评价心脏移植排斥和诊断心肌炎（心脏的炎症）。

[0057] 尽管熟练的医师知道使用导管进行心肌活检的基础实验方案，其实质上包括以下内容：使用局部麻醉以使患者的颈部或腹股沟麻木；医师将塑料导入器外壳（短的、中空的管子，通过其来放置导管）插入麻木部分的血管中；通过外壳插入活检刀并穿至患者的右心室；并且使用活检刀的抓取装置从心脏收集样品。在该程序的过程中，通常使用 x- 射线相机来正确地放置活检刀。样品大约为针头大小。收集足够数量的样品时，取出导管并通过紧压来控制局部的出血患者在该过程中可以是清醒和有知觉的。

[0058] 已经常规地测量了心肌事件后血流中的某些蛋白，以预测和诊断心肌是否受到损伤以及损伤的程度。这些蛋白包括，但不限于，肌酸激酶和肌钙蛋白。检测血流中这些和其他蛋白的特异性亚型是蛋白从心肌中释放出来的诊断，并因此是损伤的诊断。血清中这些指示蛋白的检测通常用于怀疑其中为心脏事件的急性情况中，并且已经证明了在确定用于患者的最佳治疗中是有用。尽管在急性情况中是有用的，但在心脏事件后超过几天的血流中心脏蛋白水平在诊断或预测心力衰竭中是没有价值的，它们在确定心脏病的病因学或正确的治疗过程中也没有任何价值。因为血液中的心脏蛋白水平没有升高，除了心脏事件后即刻，在血流中这些蛋白质的测量关于心肌状态几乎没有揭示。

[0059] 相反，本发明描述了心肌活检来预测哪些患者响应保护心脏的、恢复心脏的和其他心力衰竭治疗的用途。预测哪些患者将响应这些治疗将通过促进确保正确的患者接受特异性治疗来改善治疗，并显著地限制了接受具有很少价值并因此只将患者暴露于潜在的严重副作用风险中的治疗的患者数量。因此，心肌活检和某些蛋白含量的测定可以证明哪些患者正在响应某些治疗和应当对哪些患者持续治疗。

[0060] 在此呈现的数据表明,如所预测的,心脏攻击后即刻,可以检测血流中的某些蛋白,包括肌酸激酶和肌钙蛋白。该数据还证明了可以测量取自在血流中的心脏蛋白已经恢复至正常的低水平很久以后的心肌样品的心肌蛋白的稳定下降。这些数据还表明用神经调节蛋白治疗衰弱的心脏可以防止减退期并恢复患病心脏的心脏蛋白含量。这种恢复与提高的存活和心脏生理学相关。

[0061] 此外,这些数据证明神经调节蛋白可以恢复损伤后心肌的肌钙蛋白含量。肌钙蛋白是心脏收缩性能必需的关键蛋白。因此,肌钙蛋白含量的恢复对于恢复正常的心脏生理学是重要的。心肌活检中心肌肌钙蛋白含量测量来确定降低的肌钙蛋白心肌含量是否是降低的心脏功能的组成部分的用途将帮助预测哪些患者可以响应心脏恢复性治疗,如给药神经调节蛋白。此外,心肌肌钙蛋白含量测量可以用作确定哪些患者响应心脏恢复性治疗如神经调节蛋白的测试。知道患者何时顺利地响应治疗将帮助预测这样的患者是否以及何时应当再次治疗、观察或停止治疗。心肌肌钙蛋白含量测量可以用来优化给予待使用心脏恢复性治疗来治疗心脏病的个体患者的剂量。相似地,在其中发生心肌肌钙蛋白水平持续下降的慢性疾病状态中,心肌肌钙蛋白水平的维持可以表示心脏保护性治疗的成功,如正发生着的疾病存在下的神经调节蛋白。以这种方式,心肌肌钙蛋白水平相似地可以用于预测对治疗的响应和给药剂量的优化。

[0062] 对于GGF2或神经调节蛋白的EGFL结构域的给药剂量,例如,最初可以为约100mg/kg和基于患者响应滴定至较高水平的给药剂量,包括患者心脏组织中cTnI和cTnT胞内水平的测定。

[0063] 一旦分离,可以通过在此提供的实施例中所述的和本领域已知的方法来确定心脏组织中的cTnI和cTnT胞内水平。例如,可以使用各种技术(包括但不限于免疫印迹分析,酶联免疫吸附测定法(ELISA)和质谱)分析分离的心脏组织的细胞裂解物和从其产生的沉淀物。实际上,已经研发了ELISA实验方案以利用高亲和性的、心脏特异性的抗体(M11.7)来检测心脏特异性肌钙蛋白T。该测定的检测极限低于使用交叉反应抗体1B10的第一代ELISA实验方案的检测极限(分别为0.0123 $\mu\text{g/L}$ 与0.04 $\mu\text{g/L}$)。

[0064] 检测体内肌钙蛋白I和T水平的方法

[0065] 分子成像领域中的技术进展使得非入侵的、高分辨率的体内成像技术成为可能,该技术能够使医师在分子和细胞水平诊断和评价治疗功效。实际上,术语分子成像“广义地被定义为细胞和分子水平的生物过程的体内表征和测量”。参见Weissleder等(Radiology219:316-333,2001),在此将其整体引入作为参考。核成像,例如,其包括正电子发射断层扫描(PET),微PET,单正电子发射计算机断层扫描(SPECT)和平面成像,通常包括使用作为检测探针的特异性放射性药物来观察内源和表达的蛋白质。例如,PET能够产生三维图像和体内功能过程的图谱,这有助于细胞内的细胞成分和分子相互作用的实时分析。PET可以用作医学和研究工具。关于医学应用,其广泛用于临床肿瘤学中,使肿瘤成像和检测转移,以及用于各种脑病,尤其是与痴呆相关的那些脑病的临床诊断中。对患者进行重复PET分析的能力使熟练的医师能比较随着时间的结果,使得可以例如评价疾病进展和选定的治疗方案的功效。PET也已经用作研究工具,绘制正常的人脑和心脏功能的图谱。

[0066] 备选的扫描方法包括x-射线计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI)、功能性磁共振成像(fMRI)和超声波。成像扫描如CT和MRI非常适于观察体内的器官解剖变化,而

如上所述,PET 扫描仪,如 SPECT 和 fMRI,具有分辨率来检测分子水平的变化,甚至在解剖水平的变化明显之前。根据目标组织的类型和功能,成像扫描如 PET 通过使用呈现出不同吸收速率的放射性标记的分子探针来实现该目的。在各种解剖结构中区域血流的改变也可以利用 PET 扫描观测和定量。根据所用放射性同位素的相容性,以上扫描技术中的一些可以结合使用,使得提供更全面的信息,这提高了临床测定的准确度。以下将参照 SPECT 成像来讨论这。

[0067] 如上所述,核成像技术,如 PET、微 PET、SPECT 和平面成像,涉及使用放射性药物作为检测探针来观察内源或表达的蛋白。编码胞内酶的成像标记基因和编码细胞表面蛋白或受体的成像标记基因已经被成功地用于各种实验系统中以在体内使特异性的分子成像。还可以通过标记表示特定胞内酶的水平 and / 或活性的副产物来测定胞内酶的活性。例如,PET 和微 PET 使用正电子标记的分子,使代谢、细胞通讯和基因表达中所涉及的过程成像。分子成像技术描述于 Kim(Korean JRadiology 4:201-210,2003) 中,在此将其整体引入作为参考。

[0068] PET 扫描中所用的放射性核素通常是具有短半衰期的同位素,如 ^{11}C (~20 分钟), ^{13}N (~10 分钟), ^{15}O (~2 分钟) 和 ^{18}F (~110 分钟)。将这些放射性核素引入通常被身体利用的化合物中,如葡萄糖、水或氨,然后注射至体内,以追踪它们的分布。将这样标记的化合物称为放射性示踪剂。这些放射性示踪剂的短半衰期限制了临床 PET 主要使用 ^{18}F 标记的示踪剂,其具有 110 分钟的半衰期,并可以在使用前转运合理的距离,或限于使用 ^{82}Rb ,其可以在便携式产生器中形成并用于心肌灌注研究。

[0069] SPECT 是使用 γ 射线的核医学断层扫描成像技术的实例。与使用 γ 相机的常规核医学平面成像非常相似。然而,与平面成像不同,SPECT 可以提供真实的 3D 信息。通常作为穿过患者的截面切片来呈现该信息,但对于呈现可以按照需要来改变。通过 γ 相机成像获得的图像是放射性核素 3- 维分布的 2- 维图。因为 SPECT 获取与平面 γ 相机成像非常相似,相同的放射性药物可以用于任一种实验方案。如果使用可替换类型的核医学扫描来检查患者,例如,但图像是非诊断性的,可以使用 SPECT 进行随后的成像扫描,通过重新装配相机,用于 SPECT 图像获取,同时将患者保持在桌上或将患者移动到 SPECT 仪器上。

[0070] SPECT 还可以用于心脏门控获取。为了获得关于心脏在其周期的各个部分的差别信息,可以使用门控心肌 SPECT 来获得心动周期的各个部分过程中关于心肌灌注、厚度和心肌收缩性的定量信息。还用于帮助计算左心室射血分数、搏出量和心输出量。

[0071] 心肌灌注成像 (MPI) 是功能性心脏成像的实例,其用于诊断缺血性心脏病。其基于以下的原理:受损的或患病的心肌接受比应力条件下正常心肌少的血流。简而言之,给予心脏特异性放射性药物,例如, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - 替曲膦 (MyoviewTM, GE healthcare) 或 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - 甲氧异腈 (**Cardiolite®**, Bristol-Myers Squibb),在该给药后,将心率升高来诱导心肌应力。根据标准实践,提高的心率通常是锻炼诱发的或使用腺苷、多巴酚丁胺或潘生丁药物引发的。应力诱发后进行的 SPECT 成像揭示了放射性药物的分布,并且因此揭示了心肌不同部位的相对血流。通过将应力图像与随后在休息时获得的一组图像比较来进行诊断。

[0072] 因为肌钙蛋白是细胞骨架和酶的结构组分,因此预见分子成像技术能在体内测量胞内 cTnI 和 cTnT 水平。

[0073] 实际上,心脏肌钙蛋白 T 以高浓度存在于肌细胞中,同时在胞内和结构上结合的

蛋白集合中。胞内集合占据 6%，而肌原纤维中的含量对应于心肌细胞中总肌钙蛋白 T 质量的 94%。鉴于肌细胞中通常存在的高水平，标记肌钙蛋白 T 的任何一个或两个集合将产生足够的用于观察的信号，具有合理的准确度和分辨率。

[0074] 一种设想用于观察体内心脏组织中肌钙蛋白复合物的潜在方法利用了该复合物的钙 (Ca^{2+}) 结合特性。已知横纹肌中的收缩通过 Ca^{2+} 与肌钙蛋白 (Tn) 结合来启动，更特别的通过 Tn 的 Ca^{2+} 结合亚基 (TnC) 来启动，其导致肌球蛋白结合肌动蛋白，产生力并收缩。通过肌动蛋白丝上的肌球蛋白结合位点的可用性来调节力的水平，肌动蛋白丝通过肌动蛋白表面上的原肌球蛋白 (Tm) 的位置来控制。Tn 的抑制亚基 (TnI) 在 Ca^{2+} 不存在下结合肌动蛋白，锚定 Tm，使得抑制肌球蛋白结合。当 Ca^{2+} 结合 TnC 时，其诱导强烈的 TnI-TnC 相互作用并削弱 TnI-肌动蛋白相互作用，导致提高的 Tm 可动性和肌动蛋白上强烈的肌球蛋白结合位点的暴露。此外，肌球蛋白结合肌动蛋白导致交联桥形成，认为这进一步从阻断位置中置换出 Tm，并且是骨骼肌中肌动蛋白丝的最大激活所需的。

[0075] 鉴于以上的特性，熟练的医师将会想象使用 Ca^{2+} 放射性核素来观察体内心脏组织中的细胞骨架成分，并且更特别地，观察肌钙蛋白水平。或者，可以用放射性核素标记特异性识别 cTnI 或 cTnT 的小分子并给予患者来观察这些蛋白的胞内水平。熟练的医师将预见各种标记的探针在本发明方法中的实用性，包括配体、抗体和 cTnI 或 cTnT 的底物和 / 或与 cTnI 或 cTnT 反应的蛋白。

[0076] 如 USPN5, 324, 502 中所述那些的放射性核素也可以用于本发明方法的优势中，用于使心肌组织成像。如 USPN5, 324, 502 中所述的，通过形成放射性金属离子与金属螯合配体的亲脂性、阳离子的复合物来制备这样的放射性药物，金属螯合配体含有三胺和四胺的 Schiff 碱加合物，带有任选取代的水杨醛。这些亲脂性、阳离子的放射性复合物在心肌组织中呈现出高吸收和保持力。可以将根据本发明的优选镓 -68 (III) 复合物用于使心脏成像，使用正电子发射断层扫描。在本发明的一个方面中，这样的放射性药物可以用作将结合肌钙蛋白的药剂的摄入靶向心脏组织的工具。

[0077] 药物组合物

[0078] 本发明还提供药物组合物。这样的组合物含有治疗有效量的药剂和药物学上可接受的载体。在特定的实施方案中，术语“药物学上可接受的”表示由联邦政府或州政府的管理机构批准或列于美国药典或其他公认的药典中，用于动物中，更特别地用于人中。术语“载体”指的是与治疗剂一起给予的稀释剂、助剂、赋形剂或载体。这样的药物载体可以是无菌液体，如水和油，包括石油、动物、植物或合成来源的那些，如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当将药物组合物静脉内给药时，水是优选的载体。盐水溶液以及含水葡萄糖和甘油溶液也可以用作液体载体，特别是用于注射液。

[0079] 合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要，组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂，或 pH 缓冲剂。这些组合物可以采取溶液、悬浮液、乳浊液、片剂、丸剂、胶囊、粉末、持续释放制剂等的形式。可以将组合物配制成药丸，使用传统的粘合剂和载体，如甘油三酯。口服制剂可以包括标准载体，如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适的药物载体的实例描述于 E. W. Martin 的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中，在此将其整体引入作为参考。

这样的组合物含有治疗有效量的化合物,优选纯化形式的,与合适量的载体一起,使得提供适于给予患者的形式。制剂应当适合给药方式。

[0080] 在特定的实施方案中,根据常规程序将组合物配制成适于静脉内给予人的药物组合物。通常,用于静脉内给药的组合物是无菌等渗含水缓冲液中的溶液。在需要的情况中,组合物还可以包括增溶剂和局部麻醉剂,如利多卡因,以减轻注射部位的疼痛。通常,在单位剂型中分开或混在一起提供各种成分,例如,作为密封容器中干燥的冻干粉末或无水浓缩物,密封容器为表明活性剂含量的安瓿或小药囊。在通过输液给予组合物的情况中,可以用含有无菌药物级水或盐水的输液瓶将其分配。在通过注射给予组合物的情况中,可以提供无菌注射水或盐水的安瓿,使得在给药之前将成分混合。

[0081] 本发明的化合物可以配制成中性或盐的形式。药物学上可接受的盐包括用游离氨基形成的那些和用游离羧基形成的那些,游离氨基如源自盐酸、磷酸、醋酸、草酸、酒石酸等的那些,游离羧基如源自氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化铁、氢氧化钙、异丙胺、三乙胺、2-乙胺基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等。

[0082] 可以基于本发明的描述通过标准临床技术来确定在治疗心脏损伤中有效的本发明化合物的量。此外,可以任选使用体外测试来帮助鉴定最佳剂量范围。制剂中使用的精确剂量还将取决于给药途径和疾病或障碍的严重性,并且应当根据医师的判断和每位患者的情况来决定。然而,用于静脉内给药的合适剂量范围通常为约 20-500 微克活性化合物/公斤体重。对于鼻内给药的合适剂量范围通常为约 0.01pg/kg 体重至 1mg/kg 体重。栓剂通常含有 0.5%至 10%重量范围的活性成分;口服制剂优选含有 10%至 95%活性成分。有效剂量可以从剂量响应曲线推断出来,剂量响应曲线从体外或动物模型测试系统获得。

[0083] 各种递送系统是已知的并可以用于给药本发明的化合物,例如,脂质体中的包裹、微粒、微胶囊、能够表达化合物的重组细胞、受体介导的胞吞作用(参见,例如, Wu 和 Wu (1987) J. Biol. Chem. 262 :4429-4432),以及作为逆转录病毒或其他载体的一部分的核酸的构建。引入的方法可以是经肠或非肠道的,并包括但不限于皮层内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。可以通过任何方便的途径来给药化合物,例如,通过输液或弹丸注射,通过上皮或粘膜与皮肤内层吸入(例如,口腔粘膜、直肠和肠粘膜等),并可以与其他生物活性剂一起给药。给药可以是全身的或是局部的。此外,理想的是通过任何合适的途径将本发明的药物组合物引入中枢神经系统中,包括心室内和鞘内注射;可以通过心室内导管,例如,连接存储器(如 Ommaya 存储器)的导管,来促进心室内注射。还可以使用肺部给药,例如,通过使用吸入器或喷雾器,并使用雾化剂来配制。

[0084] 在具体的实施方案中,可能期望局部给予本发明的药物组合物,例如,通过外科手术过程中的局部输液,局部应用,例如,通过注射,通过导管,或通过植入物,所述植入物是多孔、无孔或凝胶状材料,如 sialastic 膜,或纤维。

[0085] 在另一个实施方案中,可以在载体(特别是脂质体)中递送化合物或药剂(参见 Langer (1990) Science 249 :1527-1533; Treat 等,见 Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer(传染病和癌症治疗中的脂质体), Lopez-Berestein 和 Fidler(编辑), Liss, 纽约, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, 同上, pp. 317-327; 总地参见同上)。

[0086] 在再一个实施方案中,可以在受控释放系统中递送化合物或药剂。在一个实施

方案中,可以使用泵(参见 Langer, 同上; Sefton (1987) CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14 : 201; Buchwald 等 (1980) Surgery 88 : 507; Saudek 等, 1989, N. Engl. J. Med. 321 : 574)。在另一个实施方案中,可以使用聚合材料(参见 Medical Applications of Controlled Release (受控释放的医学应用), Langer and Wise (编辑), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability (受控药物生物利用率), Drug Product Design and Performance (药品设计和性能), Smolen and Ball (编辑), Wiley, 纽约 (1984); Ranger 和 Peppas, J., 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23 : 61; 还可以参见 Levy 等 (1985) Science 228 : 190; During 等 (1989) Ann. Neurol. 25 : 351; Howard 等 (1989) J. Neurosurg. 71 : 105)。在再一个实施方案中,可以在治疗靶(即,受损心脏)附近放置受控释放系统,从而只需要全身剂量的一部分(参见,例如, Goodson, 见 Medical Applications of Controlled Release (受控释放的医学应用), 同上, vol. 2, pp. 115-138 (1984))。其他受控释放系统在 Langer 的综述中有讨论 (1990, Science 249 : 1527-1533)。

[0087] 除非另外限定,在此所用的所有技术和科学术语都具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解相同意义。尽管在本发明的实践或测试中可以使用与在此所述的那些相似或等价的任何方法和材料,但现在将描述特定的方法和材料。在此提及的所有出版物都在此引入作为参考,用来公开和描述与所引用的出版物相关的方法和/或材料。

[0088] 实施例 1

[0089] 本发明人之前已经报道了 GGF2 (重组神经调节蛋白-1) 提高了阿霉素处理的小鼠的存活和心脏功能。如在此所述的,本发明人已经在体内和体外心肌细胞中研究了 GGF2 是否防止阿霉素诱导的心脏肌原纤维损耗。在此呈现的结果已经导致产生了新发现:特定心脏蛋白的胞内表达水平是有用的正常心脏功能的指示。更具体地,本发明人已经发现了完整心脏组织中心脏肌钙蛋白 I (cTnI) 和心脏肌钙蛋白 T (cTnT) 的胞内水平变化可以用作心脏损伤的指示。在本发明的特定方面中,已经表明完整心脏中胞内 cTnI 和 cTnT 水平的降低是鉴定处于心脏损伤风险中或正在经历心脏损伤的患者的有用诊断标记。然后给这些患者选择如在此所述的合适的预防或治疗干预。完整心脏组织中胞内 cTnI 和 cTnT 水平的测定还可以用来有利于评价正在进行的治疗干预的功效,因为正常胞内 cTnI 和 cTnT 水平的恢复可以作为正在改善心脏功能或恢复正常心脏功能的治疗的阳性指示。

[0090] 材料和方法

[0091] 材料

[0092] C57BL/6 小鼠和 Wistar 大鼠获自 Charles River 实验室。阿霉素获自 Bedford 实验室。神经胶质生长因子 2 是 Acorda Therapeutics, Inc. 赠予的。MG132, 放线菌酮和放线菌素获自 Sigma。LY294002 和 PD98059 来自 Cell Signalling Technology。抗体获自以下卖方:肌钙蛋白 I、GATA4 和 Nkx2.5 来自 Santa Cruz Biotechnology; α -横纹肌肌动蛋白、肌钙蛋白 T、肌钙蛋白 C、原肌球蛋白和心脏肌钙蛋白 T 来自 Abcam; 肌间线蛋白和 α -辅肌动蛋白来自 Sigma, 心脏肌钙蛋白 I 来自 GeneTex。MEM、Hank 氏溶液和胎牛血清获自 Invitrogen。用于细胞培养的所有其他试剂获自 Sigma。

[0093] 动物模型

[0094] 将八至十周大的 C57BL/6 雄性小鼠用于分析,其中将心脏样品分离。将亚急性阿霉素心脏毒性模型用于该研究。用单剂量的阿霉素 (20mg/kg, i. p.) 处理小鼠。在阿霉素

处理之前二十四小时、处理当天和处理后每天,用 GGF2 (0.75mg/kg, s. c.) 或安慰剂 (用于 GGF2 的配制缓冲液) 处理小鼠。在阿霉素处理后 4.5 天,将小鼠处死。收集心脏样品 (n = 3-4/ 组),并在液氮中急冻。

[0095] 关于那些其中测量了心脏功能的分析 (如以下所详述的),用单剂量的阿霉素 (20mg/kg, i. p.) 处理三个月大的 C57BL/6 小鼠。在阿霉素处理之前一天和阿霉素处理之后每天一次,将神经胶质生长因子 2 (GGF2-Dox, 0.75mg/kg, s. c., n = 74) 或安慰剂 (用于溶解 GGF2 的缓冲液,安慰剂 -Dox, n = 73) 注射至小鼠中。将没有用阿霉素处理的小鼠用作对照 (n = 20)。在阿霉素处理后四天和两周,通过直接左心室 (LV) 插管来测定心脏功能。通过 Kaplan-Meier 方法分析两周存活。

[0096] 新生心肌细胞培养

[0097] 按照之前所述的 (Okoshi 等, Journal of Cardiac Failure. 2004;10:511-518), 将新生心肌细胞解离。简而言之,将来自第 0 天 - 第 3 天 Wistar 大鼠的心室在胰蛋白酶和 DNA 酶 II 中解离。将细胞洗涤并预先涂布于 100mm 培养皿中含有 5% 胎牛血清的 MEM 中。30 分钟后,将肌细胞悬浮于含有 0.1mmol/L 溴脱氧尿苷的相同培养基中,然后以 500-1000 细胞 /mm² 的密度涂布在 100mm 培养皿中。解离后四十八小时后,将培养基变成含有 0.1% BSA 的无血清 MEM,并在刺激前培养过夜。

[0098] NRG1 改善了阿霉素处理的小鼠的存活和心脏功能。

[0099] 本发明的结果揭示了阿霉素处理后两周,与未处理的对照小鼠相比较,阿霉素处理的小鼠的存活明显下降。然后,与安慰剂处理的小鼠 (Dox- 安慰剂) 相比,使用 NRG1 的伴随处理 (Dox-NRG1) 明显提高了阿霉素损伤小鼠的存活 (图 1A)。在阿霉素注射后五天进一步测定心脏功能,在该时间点,在阿霉素处理的小鼠中,存活开始下降。如表 1 中所示的,与对照 (未处理) 小鼠相比,在 Dox- 安慰剂和 Dox-NRG1 小鼠中,体重 (BW)、心脏重 (HW) 和左心室重 (LVW) 都明显下降。与对照小鼠相比,Dox- 安慰剂小鼠中通过胫骨长标准化的 HW 和 LVW (HW/TL 和 LVW/TL) 明显下降。然而,这些指标在 Dox-NRG1 和对照小鼠之间没有差异。与对照相比,Dox- 安慰剂小鼠中的 LV 收缩压 (LVSP)、心脏输出和 dP/dt 分钟明显下降。相反,在 Dox-NRG1 小鼠和对照小鼠之间,心脏功能的这些指示没有明显差异,表明与安慰剂处理的小鼠 (Dox- 安慰剂) 相比, NRG1 (Dox-NRG1) 处理的小鼠心脏收缩功能的改善。还测定了血清肌酸激酶 (CK) 水平 (心脏损伤的指标) 来提供另外的心脏功能读出。如图 1B 中所示的,与对照小鼠相比,Dox- 安慰剂和 Dox-NRG1 小鼠中的 CK 水平明显提高。然后,与 Dox- 安慰剂小鼠相比,Dox-NRG1 小鼠中的 CK 水平明显下降。这些结果证明了 NRG-1 处理显著改善了阿霉素损伤小鼠中的存活和心脏收缩功能。

[0100] 表 1. Dox+ 安慰剂和 Dox+NRG1 处理的 C57BL/6 小鼠中血液动力学测量

[0101]

组	对照 (n=8)	Dox+安慰剂(n=9)	Dox+NRG1 (n=8)
BW (g)	25 ± 0.4	20 ± 0.4 [†]	21 ± 0.9 [†]
TL (mm)	16.7 ± 0.6	16.3 ± 0.2	16.0 ± 0.0
HW (mg)	110 ± 3	83 ± 3 [†]	89 ± 3 [†]
LVW (mg)	88 ± 2	70 ± 1 [†]	75 ± 3 [†]
HW/BW (mg/g)	4.5 ± 0.1	4.1 ± 0.1 [†]	4.2 ± 0.1
LVW/BW (mg/g)	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.6 ± 0.1
HW/TL (mg/mm)	6.6 ± 0.3	5.1 ± 0.1 [†]	5.7 ± 0.2
LVW/TL (mg/mm)	5.4 ± 0.2	4.4 ± 0.1 [†]	4.8 ± 0.2
LVSP (mmHg)	100 ± 3	84 ± 2 [*]	91 ± 4
LVEDP (mmHg)	3.9 ± 1.4	3.6 ± 0.9	4.1 ± 1.1
dP/dt max (mmHg/sec)	10914 ± 856	7067 ± 884	9709 ± 1181
dP/dt 分钟 (mmHg/sec)	7859 ± 510	5021 ± 602 [*]	7211 ± 725
EF (%)	27 ± 2	17 ± 2 [†]	20 ± 2 [*]
心脏输出 (μl/分钟)	3276 ± 469	1185 ± 203 [†]	2052 ± 423
HR (跳动/分钟)	512 ± 40	407 ± 39	540 ± 45

[0102] *p < 0.05; †相对于对照 p < 0.01

[0103] NRG1 缓解了体内心肌细胞中阿霉素诱导的 cTnI 和 cTnT 的下调。

[0104] 阿霉素诱导的心脏毒性的一种机制是心脏肌原纤维的损失。如在此所述的, 本发明人研究了体内 NRG1 注射是否抑制了阿霉素诱导的肌原纤维损失。在此呈现的结果证明心脏结构蛋白、α-横纹肌激动蛋白、α-辅肌动蛋白、肌钙蛋白 T(TnT)、肌钙蛋白 I(TnI)、肌钙蛋白 C(TnC) 和原肌球蛋白的水平在阿霉素处理的肝脏中明显下降。体内 NRG1 注射明显提高了阿霉素损伤的肝脏中 cTnI、cTnT 和 cTnC 的蛋白水平 (图 1C), 但对 α-横纹肌激动蛋白、α-辅肌动蛋白和原肌球蛋白的蛋白水平没有作用。

[0105] NRG1 消除了体外心肌细胞中阿霉素诱导的 cTnI 和 cTnT 蛋白的下调。

[0106] 为了进一步研究 NRG 1 如何抑制阿霉素诱导的 cTnI 和 cTnT 下调的机制, 本发明人使用新生大鼠心肌细胞培养物 (NRCM) 进行了体外研究。如图 2A 中所示的, 阿霉素明显降低了 NRCM 中 cTnI 和 cTnT 的蛋白水平; 然而, NRG-1 的存在维持了这些蛋白在阿霉素处理的细胞中的水平。这些结果进一步证明了通过 erbB2、PI3K、Akt、mTOR 或 ERK 的抑制剂阻断了 NRG1 的这些作用 (图 2B 和 2C), 但没有受到 erbB4 (图 2B)、p38 或 PKC 的抑制剂的阻断。即时的结果还表明放线菌酮 (蛋白翻译抑制剂) 阻断了 NRG1 的预防性和 / 或恢复性作用 (图 2D), 但没有受到放线菌素 D (转录抑制剂) 的阻断。Z-VAD (pan- 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂) 和 MG132 (蛋白酶体抑制剂) 消除了阿霉素诱导的 cTnI 和 cTnT

的下调(图 2D),但没有被巴佛洛霉素 A1(溶酶体抑制剂)消除。

[0107] NRG1 抑制了体外心肌细胞中阿霉素诱导的 cTnI 和 cTnT 的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶和蛋白酶体降解。

[0108] 细胞中蛋白水平的维持是一个动态过程。其取决于蛋白的合成和降解速率。本发明人研究了阿霉素降低 cTnI 和 cTnT 的蛋白水平的机理,以确定是否通过提高降解和/或通过降低合成引起了这种作用以及 NRG1 是否阻断了阿霉素这种作用中的任一种。

[0109] 为了研究 NRG1 是否抑制了阿霉素诱导的 cTnI 和 cTnT 的 caspase 降解,本发明人首先鉴定了引起阿霉素诱导的 cTnI 和 cTnT 降解的特异性天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶。如图 3A 中所示,天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-6 或天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-9(内在途径)的抑制剂阻断了阿霉素诱导的 cTnI 和 cTnT 的下调。此外,通过天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-10(内在途径)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-2、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-13 或天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-5 的抑制剂阻断了 cTnI 的下调。另一方面,天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-2 和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-13 还阻断了 cTnT 的下调。本发明人随后测试了是否阿霉素激活了和是否 NRG1 抑制了这些天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶的激活。体外天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活测试揭示了阿霉素明显提高了天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3、6 和 9 以及天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-10、2 和 5 的激活。心肌细胞的 NRG1 处理显著抑制了阿霉素诱导的这些天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶的激活(图 3B)。PI3K 抑制剂 LY294002 消除了 NRG1 的这些作用。本发明人进一步证明了阿霉素诱导了提高的细胞色素 c 释放至 NRCM 的细胞溶质中。然而, NRG1 处理抑制了阿霉素的这一作用(图 3C)。该结果,结合天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3、6 和 9 激活的发现,表明阿霉素提高了线粒体外膜渗透性,其负责天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3、6 和 9 的激活,而 NRG1 阻断了阿霉素的这些作用。这些结果证明了 NRG-1 抑制了阿霉素诱导的内在和外来天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活的激活,这至少部分引起了 cTnI 和 cTnT 的降解。

[0110] 本发明人进一步证明了阿霉素诱导的 cTnI 的下调受到 MG132 的阻断(图 2D)。简而言之,本发明人研究了是否阿霉素提高了 cTnI 的蛋白酶体降解和是否 NRG1 阻断了这种作用。如图 3D 中所示,阿霉素提高了 cTnI 的遍在化;NRG1 处理消除了阿霉素的这种作用。该结果证明了 NRG1 提高了阿霉素诱导的 cTnI 的蛋白酶体降解。

[0111] NRG1 缓解了体外心肌细胞中阿霉素诱导的 cTnI 和 cTnT 合成的降低。

[0112] 为了进一步测试阿霉素是否降低了 cTnI 和 cTnT 的转录和 NRG1 是否逆转了阿霉素的这种作用,测量了 Dox-安慰剂和 Dox-NRG1 处理的心肌细胞中这些蛋白的 mRNA 水平。如图 4A 中所示的,阿霉素降低了 cTnI 和 cTnT 两者的 mRNA。另一方面, NRG1 维持了阿霉素处理的心肌细胞中 cTnI 和 cTnT 的 mRNA 水平。此外, NRG1 维持了 GATA4 的 mRNA 水平,并略微提高了 MEF2c 和 Nkx2.5 的 mRNA 水平(图 4A),其对于心脏特异性基因转录是重要的转录因子。

[0113] 本发明的结果显示了 NRG-1 对 cTnI 和 cTnT 的作用受到了放线菌酮的阻断(图 2D),表明 NRG1 提高了这些蛋白的翻译。我们确定了 Dox-安慰剂和 Dox-NRG1 处理的心肌细胞中几个转录机制和相关信号传导途径的激活。如图 4B 中所示的,处理后 48 小时, Dox-安慰剂处理的心肌细胞中的 mTOR(Ser 2448)、P70S6K(Thr421/Ser424)、S6(Ser240/244)

和 eIF4G (Ser1108) 的磷酸化水平降低,而在 Dox-NRG1 处理的心肌细胞中得到了维持。LY294002 阻断了 NRG-1 的这些作用。这些结果表明 NRG 通过 PI3K 维持了阿霉素处理的心肌细胞中蛋白翻译机制的激活,这可能负责维持 cTnI 和 cTnT 的蛋白水平。

[0114] 这些结果证明了 NRG1 通过多个机制缓解了阿霉素诱导的 cTnI 和 cTnT 的下调,这些机制包括内在和外来天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活以及炎症激活的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶的抑制,cTnI 表达的抑制以及转录的提高和翻译信号传导和机制的激活。这些结果还表明 PI3K 对于 NRG1 在维持心肌细胞中的 cTnI 和 cTnT 起了主要作用。

[0115] 为了进一步研究 PI3K 在介导体内 NRG1 的心脏保护性效应中的作用,本发明人使用了转基因小鼠,该小鼠带有显性阴性 PI3K 的心肌细胞特异性超表达,并如上所述用阿霉素处理它们。如图 5A 中所示的,与 WT-Dox- 安慰剂小鼠相比, dnPI3K-Dox- 安慰剂小鼠中的存活率下降。NRG1 (WT-Dox-NRG) 处理改善了阿霉素损伤的 WT (WT-Dox- 安慰剂) 小鼠中的存活 (67%与 33%)。令人感兴趣的,这种提高的规模高于 C57BL/6 小鼠中所观察到的 (图 1A)。本发明的结果进一步表明了存活率的这种改善在阿霉素处理的 dnPI3K 小鼠中受到了抑制 (dnPI3K-Dox-NRG :56%与 WT-Dox-NRG :67%)。

[0116] 还在这些小鼠中评价了心脏功能。如图 5B 中所示的, dnPI3K-Dox- 安慰剂小鼠与 dnPI3K 对照相比比 WT-Dox- 安慰剂小鼠与 WT 小鼠相比, LVSP、dP/dt max 和 dP/dt 分钟以及心输出量受到了更严重的抑制,表明 dnPI3K-Dox- 安慰剂小鼠中的心脏功能障碍更严重。

[0117] 本发明人测量了阿霉素处理的 WT 和 dnPI3K 小鼠中的 cTnI 和 cTnT 蛋白水平。没有用阿霉素处理, WT 和 dnPI3K 心脏中的 cTnI 和 cTnT 蛋白水平相似。阿霉素注射后两周,与未处理的 dnPI3K 心脏相比,在 dnPI3K-Dox- 安慰剂处理的肝脏中观察到 cTnI 蛋白水平的下降。令人惊讶地, NRG1 处理仍然消除了 dnPI3K 心脏中阿霉素诱导的 cTnI 下调 (dnPI3K-Dox-NRG, 图 5C)。在这点上,与对照小鼠相比较,在阿霉素处理小鼠的心脏中没有观察到 cTnT 蛋白水平的变化。

[0118] 这些结果证明 GGF2 特异性地维持了阿霉素损伤心脏中的 TnT 和 TnI 蛋白水平。此外,这些发现表明 GGF2 提高了阿霉素处理小鼠的存活,并且这与心脏功能的改善相关,如在使用阿霉素和 GGF2 两者处理的小鼠中明显可见的。

[0119] 尽管以上已经描述和具体地举例说明了本发明的某些优选实施方案,但不打算将本发明限制于这样的实施方案。可以对其进行各种改变,而不脱离如以下权利要求书所示的本发明的范围和精神。

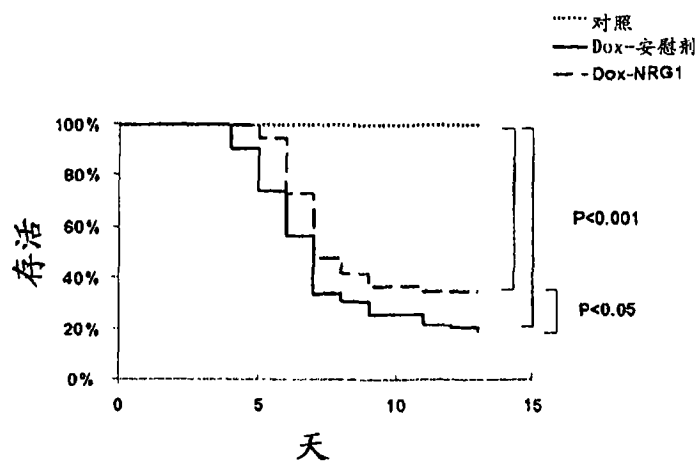


图 1A

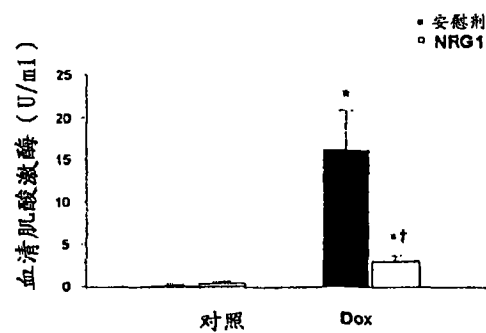
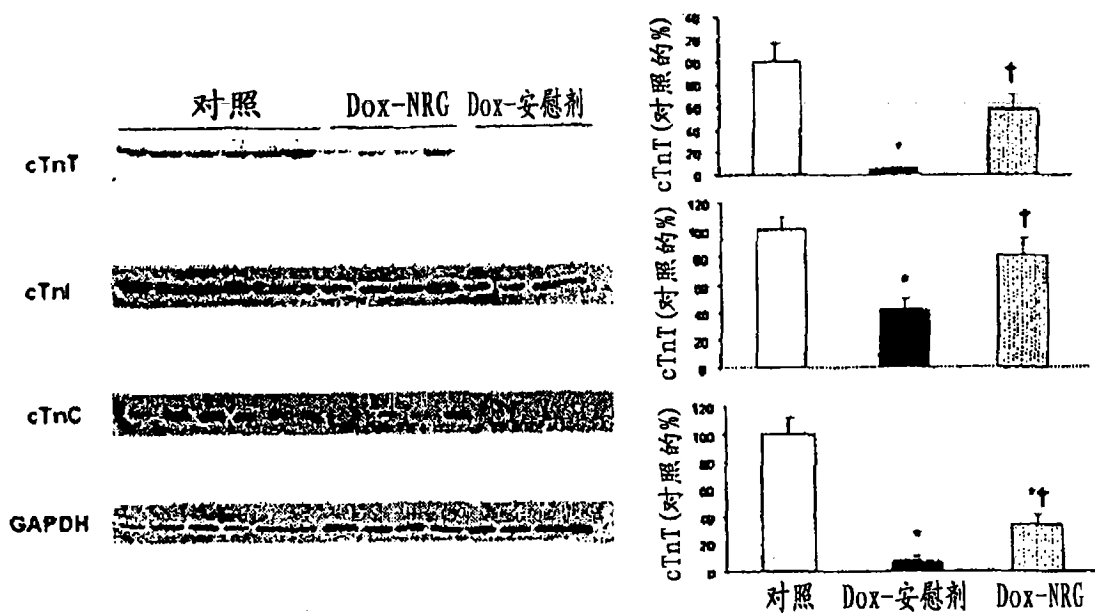


图 1B



*相对于对照 $p<0.05$; †相对于安慰剂-Dox $p<0.05$

图 1C

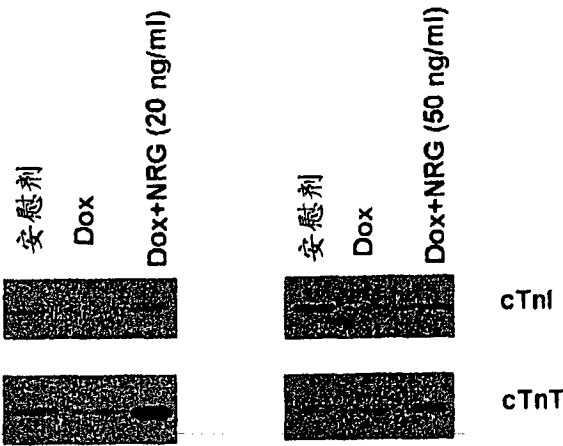


图 2A

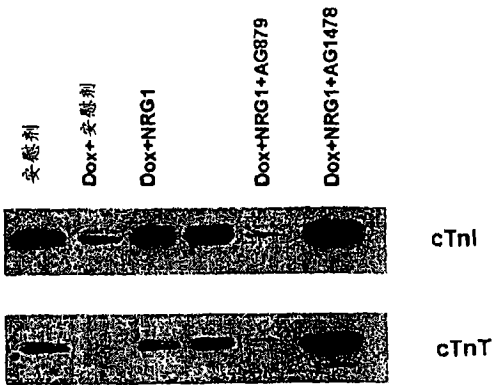


图 2B

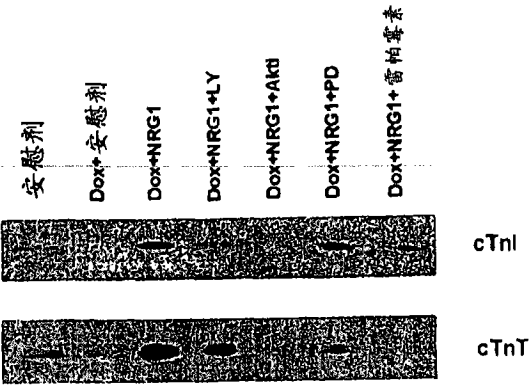


图 2C

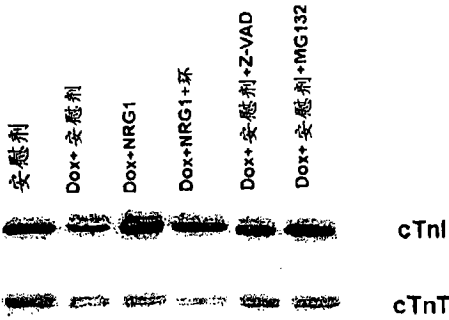


图 2D

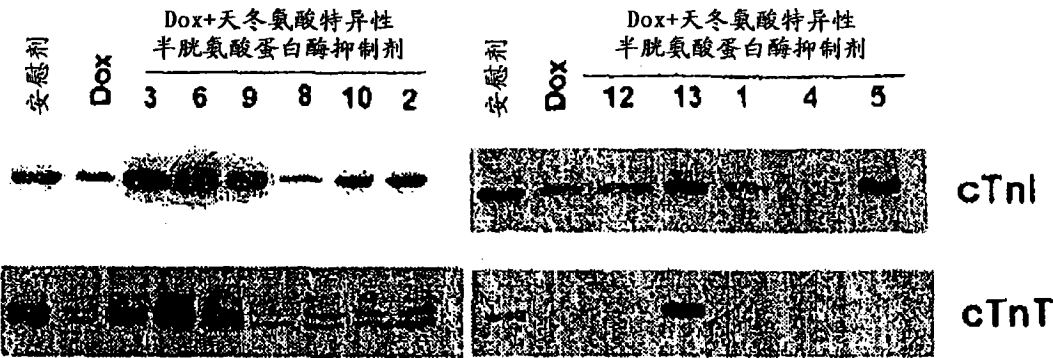
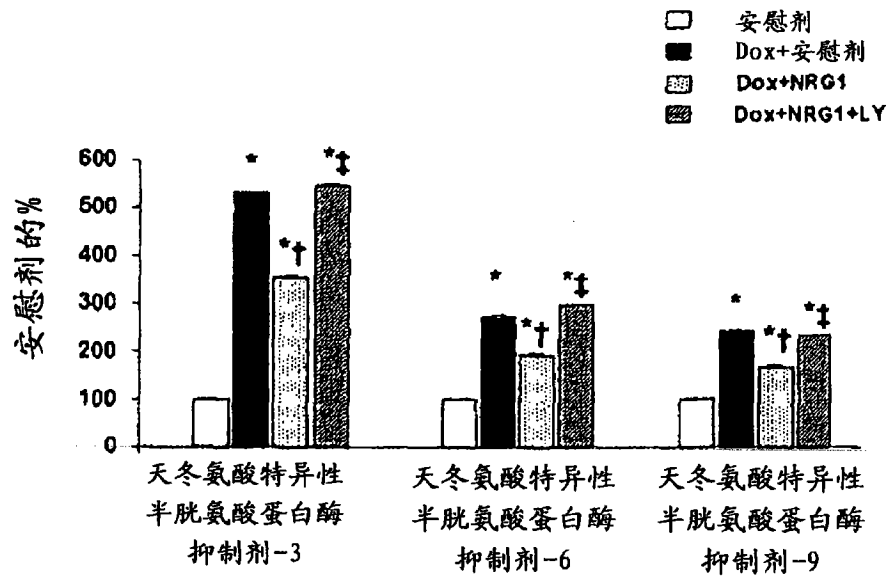
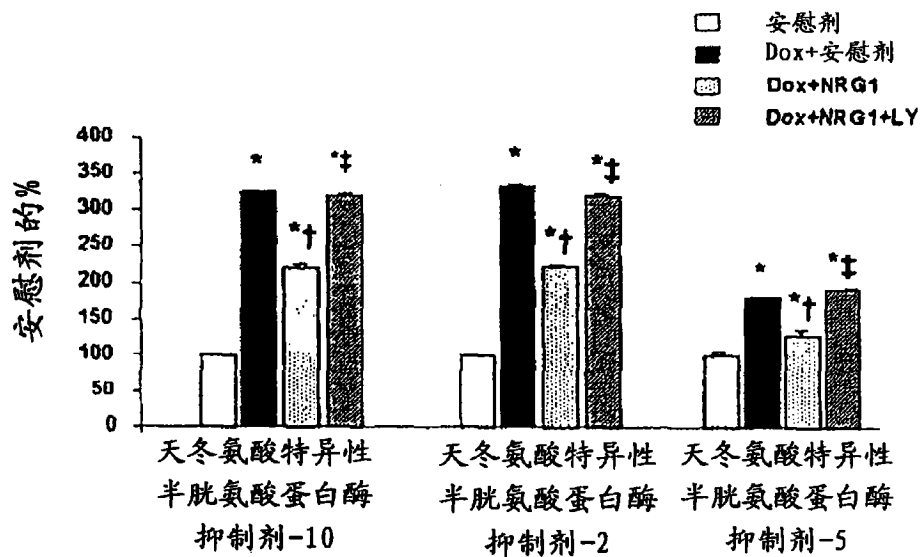


图 3A



*相对于安慰剂 $p < 0.001$; †相对于Dox+安慰剂 $p < 0.01$; ‡相对于Dox+NRG1 $p < 0.01$



*相对于安慰剂 $p < 0.001$; †相对于Dox+安慰剂 $p < 0.01$; ‡相对于Dox+NRG1 $p < 0.01$

图 3B

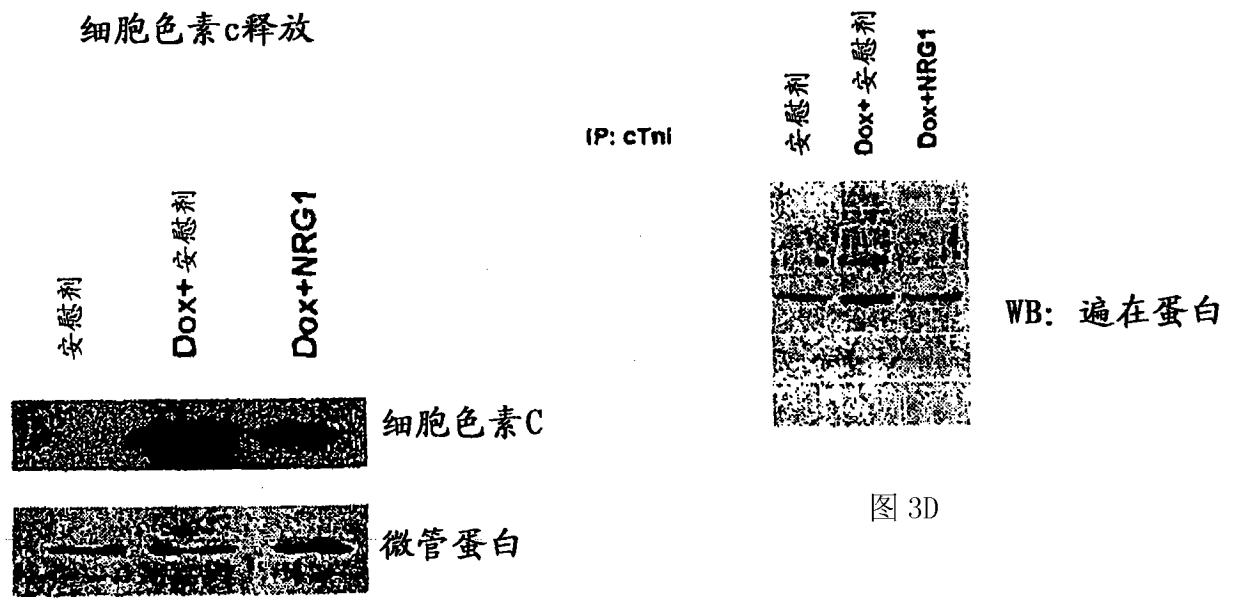


图 3D

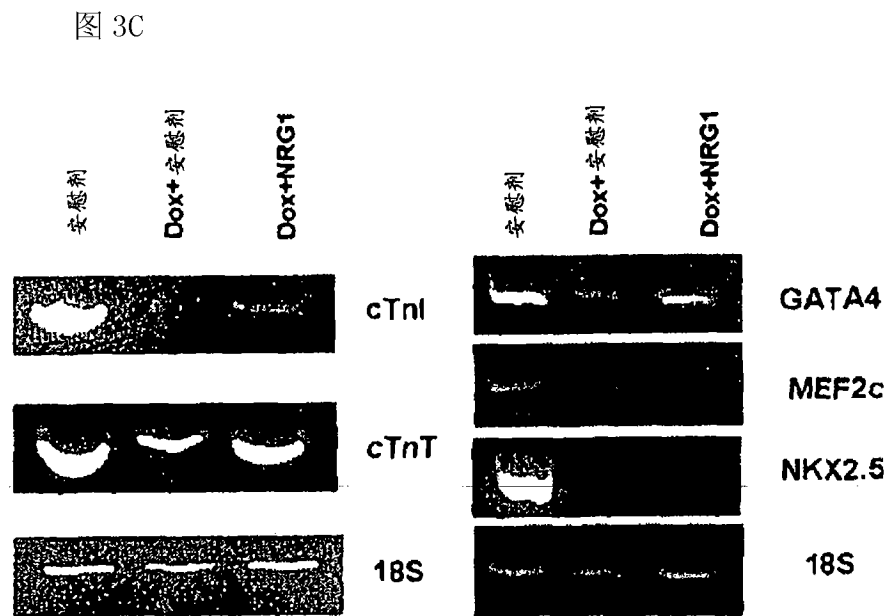


图 4A

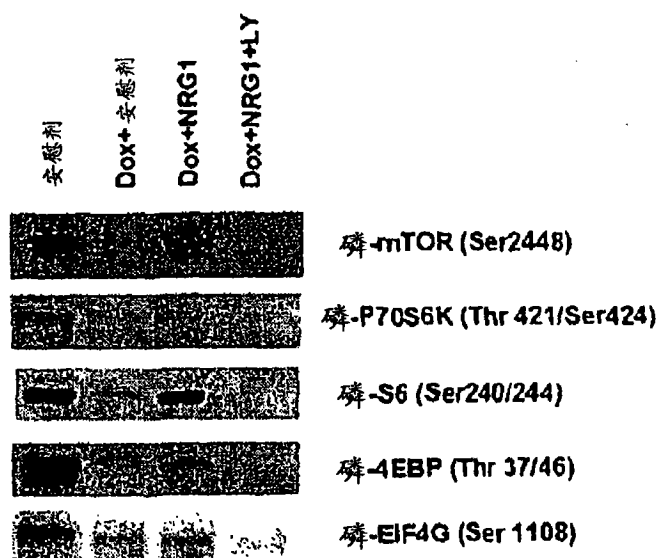


图 4B

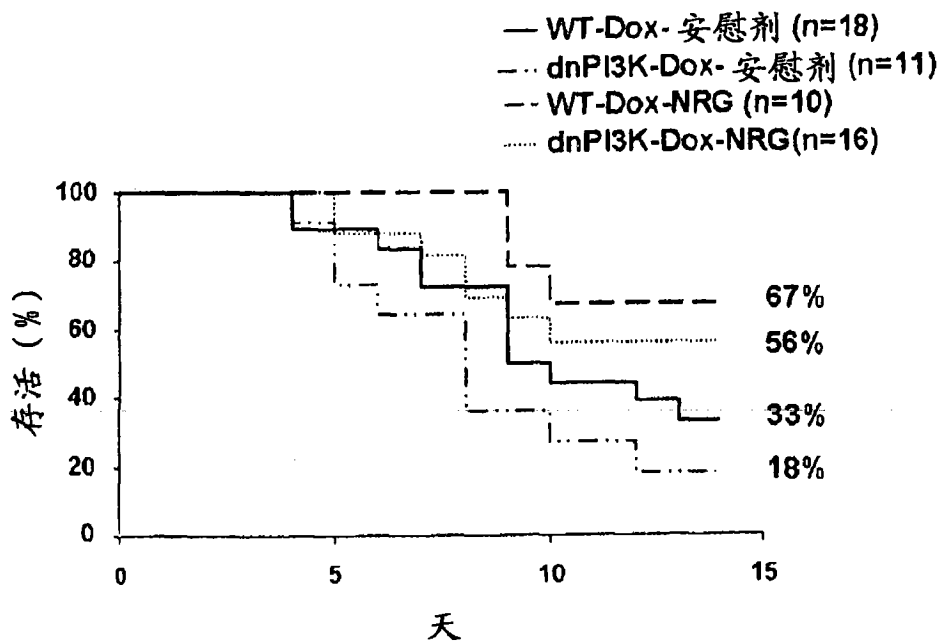


图 5A

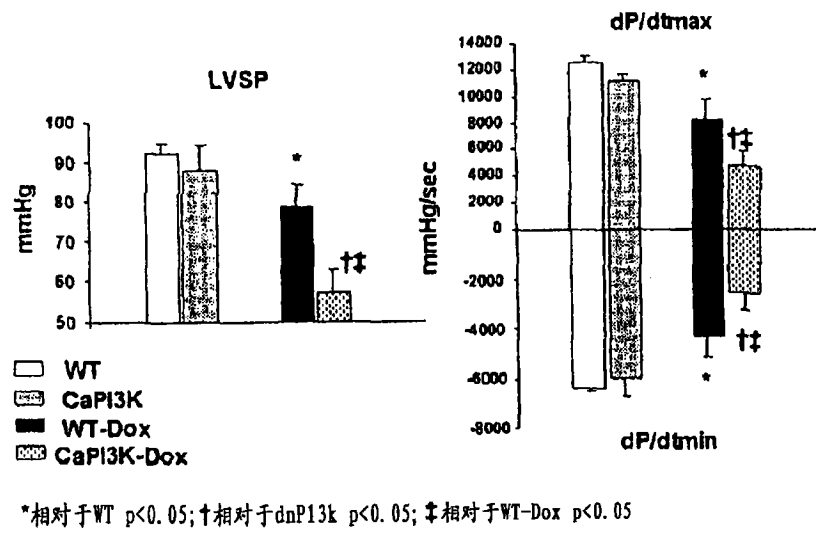


图 5B

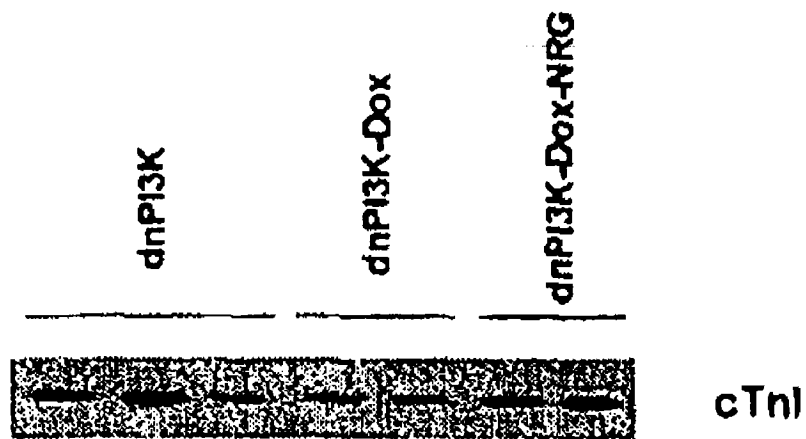


图 5C

GGF2HBS5的核苷酸序列&推断的氨基酸序列

60	GGAATTCCTT TTTTTTTTTT TTTTTTCTT NNTTTTTTTT TGCCCTTATA CCTCTTCGCC
120	TTTCTGTGGT TCCATCCACT TCTTCCCCCT CCTCTCCCA TAAACAATC TCCATACCCCT
180	GCACCCCAAA TAAATAAATA AAAGGAGGAG GGCAAGGGG GAGGAGGAG AGTGGTGCTG
240	CGAGGGGAAG GAAAAGGAG GCAGCGCGAG AAGAGCCGG CAGAGTCCGA ACCGACAGCC
291	AGAAGCCCGC ACGCACCTCG CACC ATG AGA TGG CGA CGC GCC CCG CGC CGC Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg
339	TCC GGG CGT CCC GGC CCC CGG GCC CAG CGC CCC GGC TCC GCC GCC CGC Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg
387	TCG TCG CCG CCG CTG CCG CTG CCA CTA CTG CTG CTG GGG ACC Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Thr Val Val Cys Leu Leu Thr Val GGF-II 09
435	GCG GCC CTG GCG CCG GGG GCG GCG GCC GGC AAC GAG GCG GCT CCC GCG Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala Ala Ala Leu Pro Pro
483	GGG GCC TCG GTG TGC TAC TCG TCC CCG CCC AGC GTG GGA TCG GTG CAG Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln Ala Ser Pro Val Ser Val Gly Ser Val Gln GGF-II 08
531	GAG CTA GCT CAG CGC GCC GCG GTG GTG ATC GAG GGA AAG GTG CAC CCG Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro Glu Leu Val Gln Arg Trp Phe Val Val Ile Glu Gly Lys GGF-II 04

图 6A

GGF2HBS5的核苷酸序列&推断的氨基酸序列

579	CAG CGG CGG CAG CAG GGG GCA CTC GAC AGG AAG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala Ala
627	GGC GAG GCA GGG CCG TGG GGC GAT CGC GAG CCG CCA GCC GCG GCG GCG Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly
675	CCA CGG GCG CTG GCG CCG CCC GCG GAG GAG CCG CTG CTC GCC GCC AAC Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro Ala Glu Glu Pro Leu Ala Ala Asn
723	GGG ACC GTG CCC TCT TGG CCC ACC GCC CCG GTG CCC AGC GCC GCG GAG Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro Thr Ala Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu
771	CCC GGG GAG GAG GCG CCC TAT CTG GTG AAG GTG CAC CAG GTG TGG GCG Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr Leu Val Lys Val His Gln Val Trp Ala Lys Val His Glu Val Trp Ala GGF-II 01 & GGF-II 11
819	GTG AAA GCC GGG GGC TTG AAG AAG GAC TCG CTG CTC ACC GTG GCG CTG Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Ala Lys Asp Leu Leu Leu Xaa Val GGF-II 10
867	GGG ACC TGG GGC CAC CCC GCC TTC CCC TCC TGC GGG AGG CTC AAG GAG Gly Thr Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Gly Ala Trp Gly Pro Pro Ala Phe Pro Val Xaa Tyr GGF-II 03
915	GAC AGC AGG TAC ATC TTC TTC ATG GAG CCC GAC GCC AAC AGC ACC AGC Asp Ser Arg Tyr ile Phe Phe Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser Tyr ile Phe Phe Met Glu Pro Gla Ala Xaa Ser Ser Gly GGF-II 02

图 6B

GGF2HBS5的核苷酸序列&推断的氨基酸序列

CGC GCG CCG GCC GCC TTC CGA GCC TCT TTC CCC CCT CTG GAG ACG GGC Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly	963
CGG AAC CTC AAG AAG GAG GTC AGC CGG GTG CTG TGC AAG CGG TGC GCC Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys Ala	1011
TTG CCT CCC CAA TTG AAA GAG ATG AAA AGC CAG GAA TCG GCT GCA GGT Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly	1059
TCC AAA CTA GTC CTT CGG TGT GAA ACC AGT TCT GAA TAC TCC TCT CTC Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Leu Val Leu Arg	1107
GGF-II 06	
AGA TTC AAG TGG TTC AAG AAT GGG AAT GAA TTG AAT CGA AAA AAC AAA Arg Phe Lys Lys Trp Phe Lys Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys	1155
CCA CAA AAT ATC AAG ATA CAA AAA AAG CCA GGG AAG TCA GAA CTT CGC Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg	1203
ATT AAC AAA GCA TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAG TAT ATG TGC AAA GTG Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Xaa Lyx	1251
GGF-II 12	
ATC AGC AAA TTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAT ATC ACC ATC GTG Ile Ser Lys Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val	1299
GAA TCA AAC GCT ACA TCT ACA TCC ACC ACT GGG ACA AGC CAT CTT GTA Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val	1347

图 6C

GGF2HBS5的核苷酸序列&推断的氨基酸序列

AAA TGT GCG GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT GGA GGG GAG TGC Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys	1395
TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAC CCC TCG AGA TAC TTG TGC AAG TGC Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys	1443
CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser	1491
TTC TAC AGT ACG TCC ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT GAA Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu	1530
TAGGAGCATG CTCAGTTGGT GCTGCTTTCT TGTGCTGCA TCTCCCTCTCA GATTCCACCT	1590
AGAGCTAGAT GTGTCTTACC AGATCTAATA TTGACTGCCT CTGCCTGTCG CATGAGAACA	1650
TTAAACAAAAG CAATTGTATT ACTTCCCTCTG TTCGCGACTA GTTGGCTCTG AGATACTAAT	1710
AGGTGTGTGA GGCTCCGGAT GTTTCCTGGAA TTGATATTGA ATGATGTGAT ACAAATTGAT	1770
AGTCAATATC AAGCAGTGAA ATATGATAAT AAAGGCATTT CAAAGTCTCA CTTTATTGA	1830
TAAATAAATA ATCATTCTAC TGAACAGTCC ATCTTCTTTA TACAATGACC ACATCCCTGAA	1890
AAGGGTGTG CTAAGCTGTA ACCGATATGC ACTTGAAATG ATGGTAAAGTT AATTTTGATT	1950
CAGAATGTGT TATTGTCTAC AAATAAACAT AATAAAAGGA AAAAAAAAAAAA AAA	2003

图 6D

EGFL1										
AGC	CAT	CTT	GTC	AAG	TGT	GCA	GAG	AAG	GAG	48
Ser	His	Leu	Val	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	
GGA	GGC	GAG	TGC	TTC	ATG	GTG	AAA	GAC	CTT	96
Gly	Gly	Glu	Cys	Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	
TTG	TGC	AAG	TGC	CCA	AAT	GAG	TTT	ACT	GGT	144
Leu	Cys	Lys	Cys	Pro	Asn	Glu	Phe	Thr	Gly	
GTA	ATG	GCC	AGC	TTC	TAC	AGT	ACG	TCC	ACT	192
Val	Met	Ala	Ser	Phe	Tyr	Ser	Thr	Ser	Thr	
GAA	TAG									198
Glu										

图 7

EGFL2

AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT	48
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn	
GGA GGC GAG TGC TTC ATG ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC	96
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr	
TTG TGC AAG TGC CAA CCT GGA TTC ACT GGA GCG AGA TGT ACT GAG AAT	144
Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn	
GTG CCC ATG AAA GTC CAA ACC CAA GAA AAA GCG GAG GAG CTC TAC TAA	192
Val Pro Met Lys Val Gln Thr Thr Gln Glu Lys Ala Glu Leu Tyr	

图 8

EGFL3

AGC	CAT	CTT	GTC	AAG	TGT	GCA	GAG	AAG	GAG	AAA	ACT	TTC	TGT	GTG	AAT	48
Ser	His	Leu	Val	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn	
GGA	GGC	GAG	TGC	TTC	ATG	GTG	AAA	GAC	CTT	TCA	AAT	CCC	TCA	AGA	TAC	96
Gly	Gly	Glu	Cys	Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr	
TTG	TGC	AAG	TGC	CCA	AAT	GAG	TTT	ACT	GGT	GAT	CGC	TGC	CAA	AAC	TAC	144
Leu	Cys	Lys	Cys	Pro	Asn	Glu	Phe	Thr	Gly	Asp	Arg	Cys	Gln	Asn	Tyr	
GTA	ATG	GCC	AGC	TTC	TAC	AAA	GCG	GAG	GAG	CTC	TAC	TAA				183
Val	Met	Ala	Ser	Phe	Tyr	Lys	Ala	Glu	Glu	Leu	Tyr					

图 9

EGFL4

AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT	48
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn	
GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC	96
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr	
TTG TGC AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC	144
Leu Cys Lys Cys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr	
GTA ATG GCC AGC TTC TAC AAG CAT CTT GGG ATT GAA TTT ATG GAG AAA	192
Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Lys	
GCG GAG GAG CTC TAC TAA	210
Ala Glu Glu Leu Tyr	

图 10

EGFL5

ACG CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn	48
GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr	96
TTG TGC AAG TGC CAA CCT GGA TTC ACT GGA GCG AGA TGT ACT GAG AAT Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn	144
GTG CCC ATG AAA GTC CAA ACC CAA AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT Val Pro Met Lys Val Gln Thr Thr Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr	192
GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC TTC TAC AGT ACG TCC Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser	240
ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT GAA TAG Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu	267

图 11

EGFL6

AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT	48
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn	
GGA GGC GAG TGC TTC ATG ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC	96
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr	
TTG TGC AAG TGC CAA CCT GGA TTC ACT GGA GCG AGA TGT ACT GAG AAT	144
Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn	
GTG CCC ATG AAA GTC CAA ACC CAA AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT	192
Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr	
GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC TTC TAC AAA GCG GAG	240
Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu	
GAG CTC TAC TAA	252
Glu Leu Tyr	

图 12