



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110831960 A

(43)申请公布日 2020.02.21

(21)申请号 201880044874.3

(22)申请日 2018.05.04

(30)优先权数据

20175392 2017.05.04 FI

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.01.03

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/FI2018/050332 2018.05.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/202957 EN 2018.11.08

(71)申请人 赫尔辛基大学

地址 芬兰赫尔辛基

(72)发明人 玛特·萨尔玛 米科·艾拉瓦拉

梅尔贾·沃蒂莱宁 俞利英

玛丽亚·琳达尔

(74)专利代理机构 北京弘权知识产权代理事务
所(普通合伙) 11363

代理人 郭放 许伟群

(51)Int.Cl.

G07K 14/475(2006.01)

A61K 38/18(2006.01)

权利要求书3页 说明书22页

序列表5页 附图15页

(54)发明名称

C末端的CDNF和MANF片段、包含它们的药物
组合物及其用途

(57)摘要

本发明提供了C末端CDNF片段序列或与所述序列具有至少90%同源性的序列。所述C末端CDNF片段保护ER应激神经元、运动神经元和多巴胺能神经元,并且所述片段能够穿透神经元细胞膜以及血脑屏障。本发明还提供了所述片段和包含所述片段的药物组合物,用于治疗退行性疾病和病症,包括中枢神经系统疾病、糖尿病和视网膜病症。本发明还提供了C末端MANF片段序列或与所述序列具有至少90%同源性的序列,以及包含所述MANF片段的药物组合物,用于治疗退行性疾病和病症,包括中枢神经系统疾病、糖尿病和视网膜病症。

1. 一种C末端CDNF片段,其由以下SEQ ID NO:1:

MPAMKICEKL KKLDSQICEL KYEKTLDLAS VDLRKMRVAE LKQILHSWGE ECRACA EKTD
YVNLIQELAP KYAATHPKTE L

所示的序列或与SEQ ID NO:1的序列具有至少90%同源性或序列同一性的序列的至少50个连续氨基酸残基组成,

其中,所述片段是细胞膜穿透肽并且对神经元细胞具有保护作用,用作药物。

2. 根据权利要求1所述的片段,其用于治疗退行性疾病或病症。

3. 根据权利要求2所述的片段,其中,所述退行性疾病是神经退行性疾病。

4. 根据权利要求3所述的片段,其中,所述神经退行性疾病是选自以下的中枢神经系统(CNS)疾病:阿尔茨海默氏病,帕金森氏病,多系统萎缩症,肌萎缩侧索硬化症,额颞叶变性,路易体痴呆,轻度认知障碍,亨廷顿氏病,创伤性脑损伤,药物成瘾性和中风。

5. 根据权利要求4所述的片段,其中,所述CNS疾病是帕金森氏病。

6. 根据权利要求2所述的片段,其用于治疗I型或II型糖尿病。

7. 根据权利要求3所述的片段,其用于治疗肌萎缩侧索硬化症。

8. 根据权利要求2所述的片段,其用于治疗视网膜病症,例如色素性视网膜炎。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的片段,其中,所述片段通过静脉内给药、腹膜内、皮下、鞘内、脑室内、鼻内、透皮、脑内、肌内、眼内或动脉内给药来施用,或所述片段通过病毒表达载体来施用。

10. 根据权利要求9所述的片段,其中,所述静脉内给药是外周给药。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的片段,其中,与序列SEQ ID NO:1具有至少90%的同源性或序列同一性的所述序列由以下序列SEQ ID NO:3的至少50个连续氨基酸残基组成:

MPAMKICEKL KKLDSQICEL KYEKTLDLAS VDLRKMRVAE LKQILHSWGE ECXXCAEKTD
YVNLIQELAP KYAATHPKTE L

其中,X是任意氨基酸。

12. 根据权利要求11所述的片段,其中,与序列SEQ ID NO:1具有至少90%的同源性或序列同一性的所述序列包括SEQ ID NO:1的52-55位中的序列CKGC。

13. 根据权利要求1至10中任一项所述的片段,其中,所述片段具有以下序列SEQ ID NO:4:

KYEKTLDLAS VDLRKMRVAE LKQILHSWGE ECRACA EKTD YVNLIQELAP KYAATHPKTE L

或与序列SEQ ID NO:4具有至少90%同源性或序列同一性的序列。

14. 根据权利要求11至13中任一项所述的片段,其中,所述片段包括SEQ ID NO:1的81位中的C末端氨基酸L。

15. 根据权利要求1至13中任一项所述的片段,其中,所述片段缺少与SEQ ID NO:1的78-81位相对应的ER滞留信号KTEL。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的片段,其中,所述片段还包括保护所述片段免于酶促降解的修饰,所述修饰优选地选自C末端的酰胺化和N末端的乙酰化。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的片段,其还与可检测的化学或生物化学的部分缀合。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的片段,其中,所述片段是细胞穿透肽,并且能够穿透人血脑屏障。

19. 一种药物组合物,其包含如权利要求1至18中任一项所定义的C末端CDNF片段以及以下至少一种:生理上可接受的载体、缓冲剂、赋形剂、防腐剂和稳定剂。

20. 根据权利要求19所述的药物组合物,其用于静脉内给药、腹膜内、皮下、鞘内、脑室内、鼻内、透皮、脑内、肌内、眼内或动脉内给药,所述静脉内给药优选外周给药。

21. 根据权利要求19或20所述的药物组合物,其中,所述C-末端CDNF片段包括保护所述片段免于酶促降解的修饰,所述修饰优选地选自C-末端的酰胺化和N-末端的乙酰化。

22. 根据权利要求19或20所述的药物组合物,其中,所述C末端CDNF片段与可检测的化学或生物化学的部分缀合。

23. 根据权利要求19至22中任一项所述的药物组合物,其用作药物。

24. 根据权利要求23所述的药物组合物,其用于治疗退行性疾病或病症。

25. 根据权利要求24所述的药物组合物,其中,所述退行性疾病或病症是选自以下的中枢神经系统(CNS)疾病:阿尔茨海默氏病,帕金森氏病,多系统萎缩症,肌萎缩侧索硬化症,额颞叶变性,路易体痴呆,轻度认知障碍,亨廷顿氏病,创伤性脑损伤,药物成瘾性和中风。

26. 根据权利要求23所述的药物组合物,其用于治疗I型或II型糖尿病。

27. 根据权利要求23所述的药物组合物,其用于治疗视网膜病症,例如色素性视网膜炎。

28. 一种C末端MANF片段,其由以下SEQ ID NO:2:

ICEKLLKKDS QICELKYDKQIDLSTVDLKK LRVKELKKIL DDWGETCKGC AEKSDYIRKI
NELMPKYAPK AASARTDL

所示的序列或与序列SEQ ID NO:2具有至少90%同源性或序列同一性的序列的至少50个连续氨基酸残基组成,所述片段用于治疗退行性疾病或病症,其中,所述片段优选通过静脉内给药、腹膜内、皮下、鼻内、透皮、肌内、眼内或动脉内给药施用,所述静脉内给药更优选外周给药。

29. 根据权利要求28所述的片段,其中,所述片段具有序列SEQ ID NO:5:

KYDKQIDLSTVDLKK LRVKELKKIL DDWGETCKGC AEKSDYIRKI
NELMPKYAPK AASARTDL

或与序列SEQ ID NO:5具有至少90%同源性或序列同一性的序列。

30. 根据权利要求28或29所述的片段,其中,所述片段包括SEQ ID NO:2的78位中的C末端氨基酸L。

31. 根据权利要求28或29所述的片段,其中,所述片段缺乏与SEQ ID NO:2的75-78位相对应的ER滞留信号RTDL。

32. 根据权利要求28至31中任一项所述的片段,其中,所述片段还包括保护所述片段免于酶促降解的修饰,所述修饰优选地选自C末端的酰胺化和N末端的乙酰化。

33. 根据权利要求28至32中任一项所述的片段,其还与可检测的化学或生物化学的部分缀合。

34. 根据权利要求28至32中任一项所述的片段,其中,所述片段是细胞穿透肽,并且能够穿透人血脑屏障。

35. 根据权利要求28至34中任一项所述的片段,其中,所述退行性疾病是选自以下的中枢神经系统(CNS)疾病:阿兹海默氏病,帕金森氏病,多系统萎缩症,肌萎缩侧索硬化症,额颞叶变性,路易体痴呆,轻度认知障碍,亨廷顿氏病,创伤性脑损伤,药物成瘾性和中风。

36. 一种药物组合物,其包含根据权利要求28至34中任一项所述的C-末端MANF片段和以下至少一种:生理上可接受的载体、缓冲剂、赋形剂、防腐剂和稳定剂;所述药物组合物用于治疗中枢神经系统(CNS)疾病,其中,所述片段通过静脉内给药、腹膜内、皮下、鼻内、透皮、肌内、眼内或动脉内给药,所述静脉内给药优选外周给药。

37. 一种C末端MANF片段,其由以下SEQ ID NO:2:

ICEKLLKKKDS QICELKYDKQIDLSTVDLKK LRVKELKKIL DDWGETCKGC AEKSDYIRKI
NELMPKYAPK AASARTDL

所示的序列或与序列SEQ ID NO:2具有至少90%同源性或序列同一性的序列的至少50个连续氨基酸残基组成,所述片段用于治疗1型或2型糖尿病或视网膜疾病。

38. 根据权利要求37所述的片段,其中,所述片段具有序列SEQ ID NO:5:

KYDKQIDLSTVDLKK LRVKELKKIL DDWGETCKGC AEKSDYIRKI
NELMPKYAPK AASARTDL

或与序列SEQ ID NO:5具有至少90%同源性或序列同一性的序列。

39. 根据权利要求37或38所述的片段,其中,所述片段还包括保护所述片段免于酶促降解的修饰,所述修饰优选地选自C末端的酰胺化和N末端的乙酰化。

40. 根据权利要求37至39中任一项所述的片段,其中,所述片段是细胞穿透肽,并且能够穿透人血脑屏障。

41. 一种药物组合物,其包含根据权利要求37或38所述的C-末端MANF片段和以下至少一种:生理上可接受的载体、缓冲剂、赋形剂、防腐剂和稳定剂,所述药物组合物用于治疗1型或2型糖尿病或视网膜疾病。

42. 根据权利要求41所述的药物组合物,其用于静脉内给药,优选外周给药。

43. 根据权利要求41所述的药物组合物,其中,所述组合物通过静脉内、腹膜内、皮下、鞘内、脑室内、鼻内、透皮、脑内、肌内、眼内或动脉内给药来施用。

44. 一种治疗退行性疾病或病症的方法,包括向患者施用有效量的C末端CDNF片段,所述片段包含由以下SEQ ID NO:1:

MPAMKICEKL KKLDSQICEL KYEKTLDLAS VDLRKMVAE LKQILHSWGEECRACA EKTD
YVNLIQELAP KYAATHPKTE L

所示的序列或与SEQ ID NO:1的序列具有至少90%同源性或序列同一性的序列的至少50个连续氨基酸残基或由其组成。

45. 一种治疗退行性疾病、1型或2型糖尿病或视网膜疾病的方法,所述方法包括向患者施用有效量的C末端MANF片段,所述片段包含由以下SEQ ID NO:2:

ICEKLLKKKDS QICELKYDKQIDLSTVDLKK LRVKELKKIL DDWGETCKGCAEKSDYIRKI
NELMPKYAPK AASARTDL

所示的序列或与序列SEQ ID NO:2具有至少90%同源性或序列同一性的序列的至少50个连续氨基酸残基或由其组成。

C末端的CDNF和MANF片段、包含它们的药物组合物及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物活性蛋白片段和细胞膜穿透肽的领域,还涉及神经营养因子和定位 (located) 内质网 (ER) 蛋白的领域,更具体地涉及治疗退行性疾病或病症例如中枢神经系统疾病、糖尿病和视网膜病症的领域。

背景技术

[0002] 神经营养因子脑多巴胺神经营养因子 (CDNF) 和中脑星形胶质细胞源性神经营养因子 (MANF) (Lindholm和Saarma,2010;Lindhahl等,2017) 是目前对于帕金森氏病 (PD) 的6-OHDA模型中的大鼠治疗最有效的蛋白。当在毒素前施用,这两种因子均有效地预防了由6-OHDA诱导的帕金森氏病的行为和组织学症状 (Lindholm等,2007;Voutilainen等,2009)。更重要的是,当在6-OHDA诱导的帕金森氏病症状已经影响深远的阶段应用时,用这两种因子进行的后处理 (即6-OHDA诱导后的治疗) 都能有效地恢复正常的运动行为和纹状体的多巴胺能神经支配 (innervation)。 (Lindholm等,2007;Voutilainen等,2011)。在帕金森氏病的小鼠和恒河猴MPTP模型中,CDNF还能保护和修复多巴胺神经元。在猴MPTP模型以及严重的啮齿动物6-OHDA模型中,它在恢复黑质致密部 (SNPc) 中的多巴胺神经元和恢复运动行为方面比胶质细胞系来源的神经营养因子 (GDNF) 更有效 (Voutilainen等,2011;Airavaara等,2012;Voutilainen等,2015)。对这些因子的神经元保护作用背后的机制尚不完全清楚,但是已经表明,除了激活经典的促生存抗凋亡途径外,它们还调节未折叠蛋白反应 (UPR) 途径,旨在减轻氧化应激和ER应激并抑制ER应激诱导的凋亡细胞死亡 (Lindhahl等,2014;Lindhahl等,2017;Voutilainen等,2017)。许多病理生理状况和退行性疾病,包括糖尿病和诸如帕金森氏病、阿尔茨海默氏病 (AD)、肌萎缩侧索硬化症 (ALS) 和亨廷顿氏病 (HD) 的神经退行性疾病,都与触发了ER应激以及UPR途径激活的蛋白质错误折叠和聚集有关。因此,CDNF和MANF的作用已经在各种中枢神经系统疾病中显示出来 (W02009133247; W02007068803;和Airavaara等,2009)。此外,CDNF和MANF抑制神经炎症,神经炎症参与了大多数 (如果不是全部) CNS疾病和损伤的病理生理 (Nadella等,2014;Neves等,2016;Zhao等,2013)。

[0003] 此外,W02014191630公开了一种遗传修饰的非人类动物,其包含一种基因 (天然地编码并表达功能性MANF基因) 的断裂等位基因 (disrupted allele),其中所述动物由于该断裂的和非功能性MANF而显示出进行性的出生后胰腺β细胞量减少。还建议了递送有效量的MANF或CDNF多肽或其功能片段用于1型或2型糖尿病的胰腺内治疗的基因治疗载体 (gene therapy vector)。此外,Lindhahl等人 (2014年) 披露,MANF蛋白对于胰腺β细胞的增殖和存活是必不可少的,从而构成了用于β细胞保护和再生的治疗候选物。

[0004] W02013034805公开了长度为4个至40个氨基酸的可穿透细胞的MANF或CDNF肽,其包含序列CXXC,用于治疗阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、肌萎缩侧索硬化症、中风、周围神经病变、癫痫、糖尿病或药物成瘾性。

[0005] CDNF和MANF的结构研究表明,这些蛋白由两个结构域 (domain) 组成:saposin样N

末端结构域 (Parkash等,2009) 和SAP样C末端 (Hellman等,2011)。CXXC基序 (人MANF的残基149-152,NCBI参考序列:NP_006001.3) 位于C末端结构域 (C-MANF) 中在该结构域螺旋核心之外的loop区,并且半胱氨酸与二硫键连接 (Hellman等,2011)。CDNF的相应基序位于相同位置 (NCBI参考序列:NP_001025125.2)。已表明,在交感神经元内部表达时,C-MANF具有很强的体外抗凋亡作用 (Hellman等,2011)。**Lindström** 等人 (2013年) 披露了MANF和CDNF的结构与功能决定因素的特征。

[0006] 具有选择渗透性的细胞膜以与细胞内膜在内部区室中的行为相似的方式来控制在细胞质与细胞外环境之间的分子交换。由于这个原因,细胞质膜通常对许多分子,特别是高分子量分子例如全长蛋白的细胞内递送构成挑战性障碍。高分子量分子通过这种屏障的主动转运通常需要能够穿过脂质双层的特定载体。细胞穿透肽 (CPP) 通常是5-30个氨基酸长的肽 (或肽内的基序),它们由于其穿过细胞膜的能力而被广泛用于在细胞内递送蛋白质、质粒DNA、RNA、寡核苷酸、脂质体和抗癌药物 (Borrelli等,2018;Bode&**Löwik**,2017;Kalafatovic&Giralt,2017;Kristensen等,2016)。

发明内容

[0007] 在本发明中,已发现CDNF蛋白的C-末端片段在体外和体内出人意料地保护了ER应激的交感神经和多巴胺能神经元,与全长CDNF相反,该片段在体内能够穿透神经元细胞膜以及血脑屏障。

[0008] 因此,本发明的目的是提供一种C末端CDNF片段,其由SEQ ID NO:1所示的序列或优选与SEQ ID NO:1的序列具有至少90%同源性或序列同一性的序列的至少50个连续氨基酸残基组成:

[0009] MPAMKICEKL KKLDSQICEL KYEKTLDLAS VDLRKMRAE LKQILHSWGE ECRACA EKTD YVNLIQELAP KYAATHPKTE L。

[0010] 本发明还提供了一种药物组合物,其包含C末端CDNF片段和以下至少一种:生理上可接受的载体 (carrier)、缓冲剂、赋形剂、防腐剂和稳定剂。

[0011] 本发明的结果还提供了所述C末端CDNF片段,其用于治疗包括中枢神经系统 (CNS) 疾病、糖尿病或视网膜疾病在内的退行性疾病或病症,其中所述CNS疾病优选选自阿尔茨海默氏病,帕金森氏病,亨廷顿氏病和其他淀粉样病,多系统萎缩症,肌萎缩侧索硬化症,额颞叶变性 (frontotemporal lobar degeneration),路易体痴呆,轻度认知障碍,创伤性脑损伤,周围神经损伤,成瘾和中风。

[0012] 本发明还表明,与成熟的MANF蛋白相反,MANF的C-末端片段 (C-MANF) 能够穿透多巴胺神经元的细胞膜并保护培养物中的神经元。

[0013] 因此,本发明的另一个目的是提供一种C末端MANF片段,其由SEQ ID NO:2所示的序列或优选与SEQ ID NO:2的序列具有至少90%同源性或序列同一性的序列的至少50个连续氨基酸残基组成:

[0014] ICEKLKKKDS QICELKYDKQ IDLSTVDLKK LRVKELKKIL DDWGETCKGC AEKSDYIRKI NELMPKYAPK AASARTDL,

[0015] 用于治疗包括中枢神经系统 (CNS) 疾病的退行性疾病或病症,其中所述片段通过静脉内或外周给药、腹膜内、皮下、鼻内、透皮、肌内、眼内或动脉内给药来施用。

[0016] 此外,提供了一种药物组合物,其包含所述C末端MANF片段以及以下至少一种:生理上可接受的载体、缓冲剂、赋形剂和稳定剂,用于治疗包括中枢神经系统(CNS)疾病的退行性疾病或病症,其中所述片段通过静脉内或外周给药、腹膜内、皮下、鼻内、透皮、肌内、眼内或动脉内给药来施用。

[0017] 本发明进一步的目的是提供一种C末端MANF片段,其由SEQ ID NO:2所示的序列或优选与SEQ ID NO:2的序列具有至少90%同源性或序列同一性的序列的至少50个连续氨基酸残基组成:

[0018] ICEKLKKKDS QICELKYDKQ IDLSTVDLKK LRVKELKKIL DDWGETCKGC AEKSDYIRKI NELMPKYAPK AASARTDL,

[0019] 用于治疗1型或2型糖尿病或视网膜疾病。

[0020] 本发明还提供了用于治疗1型或2型糖尿病或视网膜疾病的药物组合物,其包含C-末端MANF片段和以下至少一种:生理上可接受的载体、缓冲剂、赋形剂、防腐剂和稳定剂。

[0021] 本发明的前述以及其他优点和益处以及所附权利要求中描述为特征的方式来实现。

附图说明

[0022] 图1. (A) CDNF具有两个结构域:N末端结构域和C末端结构域。N-末端结构域可以结合氧化的磷脂(并且至少MANF N-末端结构域还可以结合脂质硫苷脂(sulfatide),也称为3-O-磺基半乳糖基神经酰胺,参见Bai等人,2018),并且是saposin样结构域。C末端结构域具有C-X-X-C(即C-R-A-C)序列和C端ER滞留信号KTEL,并且是SAPLIP(鞘脂激活蛋白样蛋白)样结构域。CDNF可以在体外被蛋白酶解切割,从而产生这两个结构域。(B) MANF和CDNF的结构示意图。黑色竖线显示8个保守的半胱氨酸残基的位置。

[0023] 图2. 由质粒表达的CDNF和CDNF C末端片段保护了ER应激的颈上神经节(SCG)交感神经元。在实验中,对7日龄大鼠/小鼠的SCG神经元显微注射了表达CDNF、CDNF的C末端片段(C-CDNF)的指定质粒、对照质粒PCR3.1以及阳性对照,其中在培养基中加入了神经生长因子(NGF,以10ng/ml的量)。第二天,加入2 μ M的衣霉素(TM)触发ER应激诱导的细胞死亡,然后在三天后,对存活和荧光神经元进行计数,结果显示为初始神经元的百分比。

[0024] 图3. CDNF和CDNF片段蛋白在被微注射到细胞质中时保护了ER应激的SCG神经元。在实验中,由出生后1日龄小鼠制备SCG神经元,培养7天,然后分别注射重组人CDNF或C-CDNF蛋白。第二天加入衣霉素(2 μ M),并在3天后对存活的荧光神经元进行计数。结果显示为初始神经元的百分比。

[0025] 图4. MANF的C末端片段(C-MANF)保护培养物中的多巴胺能神经元。使胚胎13日龄(E13)NMRI小鼠中脑底(midbrain floor)的分散培养物伴随C-MANF、培养基中加入GDNF(阳性对照)或无生长因子以作为对照在96孔板上生长5天。此后,对培养物进行酪氨酸羟化酶(TH)染色。通过CellInsight™扫描图像,并通过CellProfiler和CellProfiler分析软件对免疫阳性神经元进行计数。数据表示为GDNF维持的TH阳性神经元的百分比。

[0026] 图5. CDNF的C末端片段(C-CDNF)在体外保护多巴胺能神经元。在将CDNF或CDNF片段以给定浓度添加到培养基中的情况下,使E13.5 NMRI小鼠中脑底的分散培养物在96孔板上生长5天。采用以GDNF(100ng/ml)培养的或未以神经营养因子培养的多巴胺神经元作为对照。培养物进行酪氨酸羟化酶(TH)免疫染色,通过CellInsight™扫描图像。通过

CellProfiler和CellProfiler分析软件对TH阳性神经元进行计数,并表示为GDNF维持的神经元的百分比。

[0027] 图6.CDNF的C末端片段(C-CDNF)和MANF的C末端片段(C-MANF)穿透多巴胺神经元和PC6细胞的细胞膜。A. ^{125}I -C-CDNF,而不是 ^{125}I -CDNF在体外被有效地内化到E14多巴胺神经元中,显示出C-CDNF的细胞穿透特性。将培养物中的E14多巴胺神经元伴随30,000cpm的碘化CDNF或C-CDNF在37°C孵育2小时。然后将细胞置于冰上并用0.2M乙酸,0.5M NaCl,pH 2.8洗涤,并在 γ 计数器中计数。测量细胞内部的放射性。B. ^{125}I -C-CDNF和 ^{125}I -C-MANF,而不是全长碘化CDNF穿透大鼠PC6细胞的细胞膜。将碘化CDNF或C-CDNF和C-MANF应用于PC6细胞,该PC6细胞在添加生长因子之前使用或不使用毒胡萝卜素(thapsigargin)进行处理3小时。使内化在37°C发生90分钟。将细胞置于冰上,然后用0.2M乙酸,0.5M NaCl,pH 2.8洗涤,并使用 γ 计数器测量细胞内部的放射性。

[0028] 图7. ^{125}I -CDNF、 ^{125}I -C-CDNF和 ^{125}I -C-MANF血脑屏障的穿透性。给大鼠皮下注射 ^{125}I -CDNF、 ^{125}I -C-CDNF和 ^{125}I -C-MANF。2小时后,用PBS对大鼠进行灌注,解剖大脑。用 γ 计数器分析脑中的放射性。数据显示为平均值 \pm SEM,** p <0.01,* p <0.05单因素方差分析后进行事后比较。

[0029] 图8.在PD的大鼠6-OHDA模型中,损伤后第2、4、6和8周的累计旋转。在6-OHDA损毁之后2周,纹状体内注射CDNF、N末端CDNF片段(N-CDNF)、C-CDNF或媒介物(PBS)到大鼠脑中。C-CDNF在恢复神经元功能方面比全长CDNF更有效,因为它显著降低了6-OHDA损伤大鼠中苯丙胺诱导的旋转的累计数量。数据显示为平均值 \pm SEM。单因素方差分析后进行Tukey-Kramer事后分析,**** p <0.0001

[0030] 图9.MANF的4个氨基酸长的C末端短片段(MANF4)在帕金森氏病的大鼠6-OHDA模型中无效,其中,在6-OHDA损伤后2周开始将该肽注入纹状体,并在损伤后1、4、6、8、10和12周(A)或累计地(B)测量苯丙胺诱导的旋转。GDNF用作阳性对照。

[0031] 图10.C末端MANF片段(C-MANF)刺激小鼠 β 细胞增殖。将小鼠胰岛伴随胎盘催乳素、C-MANF或MANF体外培养5天后,将Click EdU掺入 β 细胞中($n=3$ 孔/点)。* p <0.05,** p <0.01,*** p <0.001

[0032] 图11.用C-CDNF处理对ALS的超氧化物歧化酶(SOD)1小鼠模型的临床评分具有有益的影响。在13周龄时,对SOD1-G93A小鼠单次脑室内注射C-CDNF(3.75 μg)或PBS。(A)雌性动物的临床状况。C-CDNF处理减慢了症状发作,因为经C-CDNF处理的SOD1小鼠的临床评分在统计学上明显优于经PBS处理的小鼠。(B)用转棒法测定平衡、协调和肌肉力量。加速速度4-40rpm,截止时间4分钟。跌落潜伏期(latency to fall)在左侧显示。SOD1-G93A雌性。与PBS处理的小鼠相比,C-CDNF处理改善了SOD1-G93A小鼠的运动行为。

[0033] 图12.在SOD1-G93A小鼠ALS模型中以1.5 $\mu\text{g}/24\text{h}$ 的速度进行4周的C-CDNF脑室内慢性输注的效果。(A)体重的相对变化,无性别分类。第12周(在微型泵安装之前)显示为基线。在第18周和第19周检测到处理之间的体重的显著差异(p <0.05,双侧未配对 t 检验)。(B)在SOD1-G93A小鼠中,当通过转棒表现来测量时,4周的C-CDNF脑室内慢性输注改善了运动协调性。在转棒法测试中,使用4-40rpm的加速速度和4分钟的截止时间。从第13周到第19周,C-CDNF与PBS处理之间的差异显著(p <0.01,重复测量的方差分析)。

[0034] 图13.在脑缺血的大鼠模型中,皮下注射的C-CDNF减少了梗塞体积。在大脑中动脉

远端阻塞前30-50分钟和再灌注后立即以100 μ l的体积施用C-CDNF (50 μ g)。从大脑皮层的前部(rostral part)测量,C-CDNF处理可以减少梗死体积(Student's t检验 $p < 0.05$)。经C-CDNF处理的大鼠的损伤比媒介物治疗的大鼠小约50%。PBS用作对照。*表示 $P < 0.05$ 。该值表示为平均值 \pm SEM,为PBS的百分比, $n = 8-9$ 。C-CDNF全身给药不会影响血压和心率。众所周知,血压和心率的改变会引起病变体积的改变,因此,该数据表明C-CDNF具有直接的神经保护作用。

[0035] 图14.C-CDNF和C-MANF的序列比对和比较。两种神经营养因子的C末端结构均包含三个 α -螺旋基序(螺旋1、2和3)。

[0036] 图15.野生型小鼠皮下注射C-CDNF的作用。旷场实验的结果。皮下施用不同剂量的C-CDNF不会影响自主活动(locomotor activity)。

[0037] 图16.C-CDNF在亨廷顿氏病模型中的作用。A.跌落潜伏期。QA+PBS与QA+C-CDNF之间 $p = 0.01$ (重复测量的双因素方差分析)。B.抓力(左爪),3w:QA+PBS与QA+C-CDNF之间 $p = 0.004$;5w:QA+PBS与QA+C-CDNF之间, $p = 0.02$ (重复测量的方差分析)。成年Wistar大鼠接受单次单侧纹状体内喹啉酸(QA)注射。喹啉酸是一种通过兴奋性毒性过程诱导纹状体神经元死亡的毒素。C-CDNF在转棒法和抓力测试中均改善了运动表现。

具体实施方式

[0038] 本发明涉及神经营养因子蛋白CDNF。CDNF多肽是带有信号肽的全长人CDNF,其全长为187个氨基酸,不带有信号肽的成熟的人CDNF全长为161个氨基酸(见图1B)。

[0039] 本发明还涉及神经营养因子蛋白MANF。特别重要的MANF多肽是带有信号肽的全长人MANF,其全长为179个氨基酸,不带有信号肽的成熟的人MANF全长为158个氨基酸(见图1B)。

[0040] 如本文所用,应用于CDNF或MANF多肽的术语“C末端片段”通常可以包含位于所述多肽的C-末端SAP样结构域中的至少约50个相接或连续的氨基酸,通常至少约55个相接或连续的氨基酸,更通常地,至少约57个或60个相接或连续的氨基酸(参见图1A和1B)。C-末端片段的长度也可以大于61个或65个相接或连续的氨基酸,在某些情况下,大于70个相接或连续的氨基酸。最优选地,C末端片段包含C末端结构域的57-61个或60-65个相接或连续的氨基酸。这些C末端片段是“功能性片段”,其至少部分保留了完整多肽的生物活性,甚至可能具有完整多肽所不具有的特性。

[0041] 除了天然存在的CDNF/MANF的等位基因变体之外,还可以通过突变在CDNF/MANF核酸序列中引入改变,所述改变引起所编码的CDNF/MANF多肽或其C-末端片段的氨基酸序列中的变化诸如延伸、插入和缺失。在CDNF/MANF多肽及其C末端结构域的所述序列中,可以进行核苷酸替换,其导致在“非必需”氨基酸残基处的氨基酸替换。

[0042] “非必需”氨基酸残基是CDNF/MANF的野生型序列中可以进行修饰而不改变其生物活性的残基,而“必需”氨基酸残基为这样的生物活性所需要的。例如,在本发明的CDNF/MANF分子之中的保守的氨基酸残基被预期是必不可少的并且尤其不能改变。可以对其进行保守性替换的氨基酸是本领域众所周知的。

[0043] 每个氨基酸可以是天然或非天然氨基酸。术语“非天然氨基酸”是指作为天然氨基酸的同类物的有机化合物,其中其具有与天然氨基酸相似的结构,从而模拟天然氨基酸的

结构和反应性。非天然氨基酸可以是经修饰的氨基酸和/或氨基酸类似物,其不是20种常见的天然存在的氨基酸或稀有的天然氨基酸硒代半胱氨酸或吡咯赖氨酸(pyrolysine)中的一种。非天然氨基酸也可以是天然氨基酸的D-异构体。合适的氨基酸的实例包括但不限于丙氨酸,别异亮氨酸,精氨酸,天冬酰胺,天冬氨酸,半胱氨酸,环己基丙氨酸,2,3-二氨基丙氨酸,4-氟苯基丙氨酸,谷氨酰胺,谷氨酸,甘氨酸,组氨酸,高脯氨酸(homoproline),异亮氨酸,亮氨酸,赖氨酸,蛋氨酸,萘丙氨酸,正亮氨酸,苯丙氨酸,苯甘氨酸,哌啶酸(pipicolinic acid),脯氨酸,焦谷氨酸,肌氨酸,丝氨酸,硒代半胱氨酸,苏氨酸,色氨酸,酪氨酸,缬氨酸,它们的衍生物或组合。

[0044] 本发明的某些实施方案包括C末端CDNF片段或C末端MANF片段,其中至少一个、两个、三个、四个或更多个连续氨基酸具有交替的手性。如本文所用,手性是指氨基酸的“D”和“L”异构体。在本发明的特定实施方案中,至少一个、两个、三个、四个或更多个连续的氨基酸具有交替的手性,而其余的氨基酸是L-氨基酸。

[0045] 在本公开中,已经证明了本发明的C末端CDNF片段和C末端MANF片段到神经元细胞中的细胞摄取。在某些实施方案中,相比全长CDNF或MANF,该摄取优选要好至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12倍,并且具有特定肽的情况下,甚至比全长CDNF或MANF好13倍。在某些实施方案中,本发明证明了本发明的C-末端CDNF片段相比于对照例如全长人CDNF提高了细胞摄取效率。在某些实施方案中,本发明证明了本发明的C-末端MANF片段相比于对照例如全长人MANF提高了细胞摄取效率。

[0046] 如本文所用,细胞摄取效率是指C末端CDNF片段或C末端MANF片段穿过细胞膜的能力。本发明的C末端CDNF片段或C末端MANF片段的细胞摄取不依赖于受体或细胞类型。

[0047] 本领域技术人员可以通过比较(i)被一细胞类型(例如神经元细胞、内皮细胞)内化的细胞穿透肽(如C末端CDNF片段或C末端MANF片段)的量与(ii)被相同细胞类型内化的对照肽(如全长CDNF/MANF)的量,来检验C末端CDNF片段和/或C末端MANF片段的摄取效率。为了测量细胞摄取效率,可以将所述细胞类型在存在细胞穿透肽(如C末端CDNF片段或C末端MANF片段)的情况下孵育指定的时间段(例如30分钟、1小时、2小时等),然后对被细胞内化的细胞穿透肽的量进行定量。单独地,在存在所述细胞类型的情况下,将相同浓度的对照孵育相同的时间段,并对被细胞内化的第二种肽的量进行定量。可以通过荧光标记细胞穿透肽(如C末端CDNF片段或C末端MANF片段)(例如用FITC染料)并使用本领域众所周知的技术测量荧光强度来实现定量。

[0048] 相比于适用的对照,本发明的C-末端CDNF片段和C-末端MANF片段还显示出对细胞(例如神经元细胞)的保护作用。如本文所用,保护作用是指本发明的C末端CDNF片段或C末端MANF片段促进例如多巴胺能神经元或ER应激的神经元细胞存活的能力。本领域技术人员可以通过比较(i)本发明的C末端CDNF片段或C末端MANF片段对细胞类型(例如交感神经元细胞或多巴胺能神经元)的存活的量与(ii)对照肽通过相同细胞类型的存活水平或与未添加神经营养因子通过相同细胞类型的存活水平,来检测所述保护作用。为了测量细胞存活率,可以将所述细胞类型在存在本发明的C末端CDNF片段或C末端MANF片段的情况下孵育指定的时间段(例如30分钟、1小时、2小时等),然后对所述细胞的细胞存活率定量。单独地,在存在所述细胞类型的情况下,将相同浓度的对照肽孵育相同的时间段,并量化第二种肽通过所述细胞的细胞存活率。可选地,将所述细胞类型在没有神经营养因子的情况下孵育相

同的时间段,并量化所述细胞的细胞存活率。

[0049] 在一个实施方案中,为了测量细胞存活率,可以对该细胞类型注射本发明的C末端CDNF片段或C末端MANF片段,并孵育指定的时间段(例如30分钟、1小时、2小时等),然后量化该细胞的细胞存活率。给对照细胞注射缓冲液(即,没有神经营养因子),并将对照细胞孵育相同的时间段,并量化该细胞的细胞存活率。

[0050] 在某些实施方案中,相比于在未添加生长因子或被注射无生长因子的缓冲液的情况下孵育的细胞,本发明的C末端CDNF片段的保护作用(以细胞存活率衡量)为至少1.09倍,至少1.20倍,至少1.24倍,至少1.85倍,至少1.96,至少2.11倍或至少2.20倍。

[0051] 在一个实施方案中,相对于在未添加生长因子或被注射无生长因子的缓冲液的情况下孵育的细胞,所述保护作用是至少1.09倍。

[0052] 在一个实施方案中,相对于在未添加生长因子或被注射无生长因子的缓冲液的情况下孵育的细胞,所述保护作用是至少1.20倍。

[0053] 在一个实施方案中,相对于在未添加生长因子或被注射无生长因子的缓冲液的情况下孵育的细胞,所述保护作用是至少1.24倍。

[0054] 在一个实施方案中,相对于在未添加生长因子或被注射无生长因子的缓冲液的情况下孵育的细胞,所述保护作用是至少1.85倍。

[0055] 在一个实施方案中,相对于在未添加生长因子或被注射无生长因子的缓冲液的情况下孵育的细胞,所述保护作用是至少1.96倍。

[0056] 在一个实施方案中,相对于在未添加生长因子或被注射无生长因子的缓冲液的情况下孵育的细胞,所述保护作用是至少2.11倍。

[0057] 在一个实施方案中,相对于在未添加生长因子或被注射无生长因子的缓冲液的情况下孵育的细胞,所述保护作用是至少2.20倍。

[0058] 在某些实施方案中,相比于在未添加生长因子或被注射无生长因子的缓冲液的情况下孵育的细胞相比,本发明的所述C末端MANF片段的保护作用是至少1.18倍。

[0059] 因此,本发明提供了C末端CDNF片段,其由以下SEQ ID NO:1所示的序列或与SEQ ID NO:1的序列至少90%同源的序列的至少50个连续氨基酸残基组成:

[0060] MPAMKICEKL KKLDSQICEL KYEKTLDLAS VDLRKMRAE LKQILHSWGE ECRACAETD YVNLIQELAP KYAATHPKTE L。

[0061] 本发明还涉及C末端MANF片段,其由以下SEQ ID NO:2所示的序列或与SEQ ID NO:2的序列至少90%同源的序列的至少50个连续氨基酸残基组成:

[0062] ICEKLKKKDS QICELKYDKQ IDLSTVDLKK LRVKELKKIL DDWGETCKGC AEKSDYIRKI NELMPKYAPK AASARTDL。

[0063] 如本文在说明书和下面的权利要求书中所使用的,术语“片段”包括天然的肽(降解产物、合成的合成肽或重组肽)和经修饰的肽,所述经修饰的肽可以具有例如使肽更稳定或免疫原性更低的修饰。这样的修饰包括但不限于环化、N末端修饰、C末端修饰、肽键修饰、骨架修饰和残基修饰。该片段还可以包含进一步的延伸、缺失或插入。

[0064] 在本发明的实施方案中,片段的长度范围为50-81个氨基酸。优选地,片段的长度范围为55-75、55-70、55-61、61-65或61-70个氨基酸。更优选地,片段的长度范围为57-61、55-69、55-68、55-67、55-66、56-69、56-68、56-67、56-61、57-69、57-68、57-67、57-61、58-

69、58-68、58-67、58-61、59-69、59-68、59-67、59-61、60-69、60-68、60-67、60-66、60-64、60-63、61-62、61-63、61-64、61-65、61-66或61-67个氨基酸。例如,优选的片段可以由至少55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74或75个氨基酸组成。所述片段可以包含任何天然存在的氨基酸,如丙氨酸,精氨酸,天冬酰胺,天冬氨酸,半胱氨酸,谷氨酰胺,谷氨酸,甘氨酸,组氨酸,异亮氨酸,亮氨酸,赖氨酸,蛋氨酸,苯丙氨酸,脯氨酸,丝氨酸,苏氨酸,色氨酸,酪氨酸和缬氨酸,以及非常规或经修饰的氨基酸。优选地,所述片段与人CDNF或MANF蛋白中的C末端结构域的序列具有至少100%,99%,98%,97%,96%,95%,94%,93%,92%,91%,90%,85%或80%的同源性或序列同一性。更优选地,所述片段与人CDNF或MANF蛋白中的C末端结构域的序列具有至少80%的同源性或序列同一性。如本文所用,“同源性”或“同源的”是指参考序列与第二序列的至少一个片段之间的序列相似性。如下所述,BLAST将基于同一性百分比和相似度来比较序列。

[0065] 在关于两个或更多个氨基酸序列的上下文中的术语“相同”或“同一性”百分比涉及相同的两个或更多个序列或子序列。当在使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和目视检查进行测量时在比较窗口或指定区域上比较和比对最大的对应时,如果两个序列具有指定百分比的相同氨基酸残基(即,在指定区域或在(未指定时)整个序列中具有29%同一性,任选地30%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,99%或100%的同一性),则两个序列“基本相同”。任选地,同一性存在于长度为至少约10个氨基酸的区域上,或更优选地存在于长度为10、15、20、25、30或更多个氨基酸的区域上。

[0066] 为了进行序列比较,通常将一个序列用作参考序列,将其与检测序列进行比较。当使用序列比较算法时,将检测序列和参考序列输入计算机,必要时指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数,也可以指定备选参数。然后,序列比较算法根据程序参数来计算检测序列相对于参考序列的序列同一性百分比。当比较两个序列的同一性时,这些序列不必是连续的,但是任何空位都将带来降低总体同一性百分比的罚分。

[0067] 如本文所用,“比较窗口”包括对一段任意的一定数量的连续位置的引用,其中在两个序列被最佳比对(optimally aligned)之后,将序列与相同数目的连续位置的参考序列进行比较。用于比较的序列比对方法是本领域众所周知的,例如ClustalW或FASTA。

[0068] 适用于确定序列同一性百分比和序列相似性的算法的两个示例是BLAST和BLAST 2.0算法,其分别在Altschul等(1997) *Nucleic Acids Res* 25(17):3389-3402和Altschul等(1990) *J. Mol Biol* 215(3)-403-410中进行了描述。对于氨基酸序列,BLASTP程序默认使用3的字长和10的期望值(E)以及BLOSUM62评分矩阵[参见Henikoff和Henikoff,(1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89(22):10915-10919]比对(B)为50,期望值(E)为10,M=5,N=-4,以及两条链的比较。对于短的氨基酸序列,可以应用PAM30评分矩阵。

[0069] BLAST算法还对两个序列之间的相似性进行统计分析(参见例如Karlin和Altschul,(1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90(12):5873-5877)。BLAST算法提供了一种相似性度量是最小总和概率(P(N)),它提供了两个氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。

[0070] 优选地,与SEQ ID NO:1的序列至少90%同源的C末端CDNF包含SEQ ID NO:1的位置52-55中的序列CXXC,其中X是任意氨基酸。更优选地,与SEQ ID NO:1的序列至少90%同源的所述序列由以下SEQ ID NO:3的序列的至少50个连续氨基酸残基组成:

[0071] MPAMKICEKL KKLDSQICEL KYEKTLDLAS VDLRKMRAE LKQILHSWGE ECXXCAEKTD YVNLIQELAP KYAATHPKTE L

[0072] 其中X是任意氨基酸。

[0073] 在另一优选的实施方案中,与SEQ ID NO:1的序列至少90%同源的所述序列包含SEQ ID NO:1的位置52-55中的序列CKGC。

[0074] 在最优选的实施方案中,所述片段具有SEQ ID NO:4的序列:

[0075] KYEKTLDLAS VDLRKMRAE LKQILHSWGE ECRACA EKTD YVNLIQELAP KYAATHPKTE L

[0076] 或与SEQ ID NO:4的序列具有至少90%同源性或序列同一性的序列。

[0077] 在一个实施方案中,C末端CDNF片段不包含其天然的C末端氨基酸,即ER滞留信号(ER retention signal)。因此,在一个优选的实施方案中,该片段缺少与SEQ ID NO:1的位置78-81相对应的ER滞留信号KTEL。

[0078] 本发明还显示该片段可以缀合到可检测的化学或生物化学部分(moiety)如FITC标记物。如本文所用,“可检测的化学或生物化学部分”是指为了促进肽的检测而显示出氨基酸序列或可检测的化学或生物化学部分的标签,如选自可见、荧光、化学发光或其他可检测染料的可检测分子;在底物存在下可检测的酶,例如带有NBT加BCIP的碱性磷酸酶或带有合适底物的过氧化物酶;可检测的蛋白质,例如绿色荧光蛋白。优选地,标签不阻止或妨碍片段穿透到靶细胞中。

[0079] 还优选对C末端CDNF片段或C末端MANF片段进行N末端和/或C末端修饰以增大片段的稳定性和/或细胞通透性。CDNF片段或MANF片段末端的乙酰化-酰胺化(即N末端乙酰化和C末端酰胺化)是本领域已知的选择之一(参见Marino等,2015,ACS Chem.Biol.10:1754-1764)。

[0080] 由于C末端CDNF片段和C末端MANF片段均有效保护多巴胺神经元免于死亡(参见图4和图5),因此现有技术例如W02009133247和EP1969003表明了所述片段可以用于治疗中枢神经系统(CNS)疾病,如阿尔茨海默氏病,帕金森氏病(PD),多系统萎缩症,肌萎缩侧索硬化症(ALS),额颞叶变性,路易体痴呆,轻度认知障碍,亨廷顿氏病(HD),创伤性脑损伤,药物成瘾和中风。通过图8(显示了C-CDNF在PD模型中的作用)以及图11和图12(显示了C-CDNF在ALS模型中的作用)提供了支持本发明的进一步结果。还值得注意的是,在神经恢复性的、更临床取向的设置下(即在6-OHDA之后被添加)进行实验时,短的MANF肽(MANF4)在帕金森氏病的大鼠6-OHDA模型中无效(参见图9)。

[0081] C末端CDNF片段或C末端MANF片段在CNS中的作用不仅包括靶向神经元,还包括靶向CNS中的其他细胞类型,例如小胶质细胞、星形胶质细胞和神经干细胞或神经元前体细胞,并且除了存活,它们还具有其他任何特性,如迁移、增殖、分化和成熟等。

[0082] 在图10中显示的结果证实,C末端MANF片段可以在I型和II型糖尿病治疗中有效。此外,W02016057579公开了CDNF和MANF在视网膜病症中也有活性。因此,本发明涉及所述中枢神经系统(CNS)疾病、糖尿病和视网膜病症的治疗。ER应激诱导的凋亡细胞死亡也导致其他退行性疾病,其中受影响的组织或器官的功能或结构将随着时间的推移进行性恶化(有关综述,参见Oakes和Papa,Annu.Rev.Pathol.Mech.Dis 2015.10:173-94)。这种退行性疾病的一些其他例子是与年龄有关的黄斑变性,Stargardt病,青光眼,色素性视网膜炎和视神经变性;尼曼-皮克病;动脉粥样硬化;进行性核上性麻痹;癌症;Tay-Sachs病;圆锥角膜;

炎症性肠病 (IBD) ; 前列腺炎; 骨关节炎; 骨质疏松症; 和类风湿性关节炎以及更急性的病况, 如创伤性脑损伤或缺血性再灌注损伤, 例如心肌缺血性损伤、肾缺血性损伤, 或中风。因此, 本发明还涉及退行性疾病或病症的治疗。

[0083] 在治疗方法中, 将药学有效量的C-末端片段给药到患者。换言之, 根据本发明的片段用于治疗退行性疾病或病症, 包括中枢神经系统 (CNS) 疾病和其他神经疾病, 如阿尔茨海默氏病, 帕金森氏病 (PD), PD的非运动症状 (如便秘、抑郁症和幻觉), 多系统萎缩症, 肌萎缩侧索硬化症, 缺血性中风, 周围神经病变, 额颞叶变性, 路易体痴呆, 轻度认知障碍, 亨廷顿氏病, 癫痫, 创伤性脑损伤, 周围神经损伤, 出血性中风或成瘾 (例如, 可卡因、吗啡、苯丙胺或酒精的滥用), 以及I型和II型糖尿病或视网膜病症。更优选地, 该片段用于治疗帕金森氏病或肌萎缩侧索硬化症。

[0084] 可以根据物理和生理因素, 例如体重、病情严重程度, 所治疗疾病的类型, 既往或并存的治疗干预措施, 患者的特发性疾病以及给药途径来确定施用于患者的CDNF或MANF的C端片段的实际剂量 (例如有效量)。负责给药的医师可以针对个体受试者确定组合中活性成分的浓度和合适剂量。

[0085] 在本发明的一个实施方案中, 可以将C末端CDNF片段或MANF片段掺入药物组合中。通过将具有所需纯度的肽与任选的生理上可接受的载体 (例如纳米载体)、赋形剂或稳定剂 (Remington's Pharmaceutical Sciences (雷明顿药物科学), 第22版, Allen, Loyd V., Jr. (2012)) 混合, 以冻干块状物 (cake) 或水溶液的形式来制备本发明的此类组合物以用于储存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在使用的剂量和浓度下对接受者无毒, 并包括缓冲剂, 如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸; 低分子量 (少于约10个残基) 多肽; 蛋白质, 如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物, 如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸, 如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸; 单糖、二糖和其他碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合剂, 如EDTA; 糖醇, 如甘露醇或山梨醇; 形成盐的反离子, 如钠; 和/或非离子表面活性剂, 如Tween、Pluronic或聚乙二醇 (PEG)。

[0086] 所述片段还可以被包封在例如通过凝聚技术或通过界面聚合来制备的微胶囊 (例如, 分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯) 微胶囊) 中, 在胶体药物递送系统 (例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊) 中, 或在粗乳状液 (macroemulsion) 中。此类技术在上文的《雷明顿药物科学》中公开。

[0087] 在一个实施方案中, 药物组合物可以包含例如至少约0.1%的活性化合物。在其他实施方案中, 活性化合物可以占单位重量的约2%至约75%, 或例如约25%至约60%, 以及其中可导出的任何范围。

[0088] 在其他非限制性实施例中, 药物组合物或制剂的剂量可以包括: C末端CDNF片段或C末端MANF片段每次给药 (per administration) 从约1ng/kg/体重, 约5ng/kg/体重, 约10ng/kg/体重, 约50ng/kg/体重, 约100ng/kg/体重, 约200ng/kg/体重, 约350ng/kg/体重, 约500ng/kg/体重, 1 μ g/kg/体重, 约5 μ g/kg/体重, 约10 μ g/kg/体重, 约50 μ g/kg/体重, 约100 μ g/kg/体重, 约200 μ g/kg/体重, 约350 μ g/kg/体重, 约500 μ g/kg/体重, 约1mg/kg/体重, 约5mg/kg/体重, 约10mg/kg/体重, 约50mg/kg/体重, 约100mg/kg/体重, 约200mg/kg/体重, 约350mg/kg/体重, 约500mg/kg/体重, 至C末端CDNF片段或C末端MANF片段的约1000mg/kg/体重或更高, 以及其中可导出的任何范围。在可从本文所列数字导出的范围的非限制性实施

例中,基于上述数字,C末端CDNF片段或C末端MANF片段给药的范围可以为约5mg/kg/体重至约100mg/kg/体重,约5 μ g/kg/体重至约500mg/kg/体重。

[0089] 本发明的特征还在于可以进一步包括神经细胞的药物组合物。神经细胞可以是例如神经元,神经干细胞或神经元前体细胞。

[0090] 在另一实施方案中,所述药物组合物包含治疗有效量的:重组载体(vector),其包含编码如上定义的C末端片段的核苷酸序列;重组病毒载体,其包含编码如上定义的C末端片段的核苷酸序列;或宿主细胞,其表达如上定义的C末端片段。优选所述病毒载体选自腺病毒,腺伴随病毒,逆转录病毒如慢病毒,疱疹病毒和乳头瘤病毒,其包含编码如上定义的C-末端片段的多核苷酸。通常,重组载体和重组病毒载体包括表达控制序列,例如组织或细胞类型的特异性启动子,其指导本发明的多核苷酸在体外和体内在各种系统中的表达。载体也可以是杂合载体,其包含在多于一个的系统中进行表达所必需的调控元件。包含这些各种调节系统的载体是可商购的,并且本领域技术人员将能够容易地将如本文定义的C末端片段克隆到这样的载体中。适用于本发明的重组病毒载体的选择,用于将表达C末端片段的核酸序列插入载体的方法以及将病毒载体递送至感兴趣的细胞的方法在本领域技术范围内。参见,例如,Dornburg R (1995),Gene Therap.2:301-310。

[0091] 给药途径符合已知方法以及注射或输注的一般途径,即通过静脉内或外周给药、腹膜内、皮下、鞘内、脑室内(intracerebroventricular)、鼻内、透皮、脑内、肌内、眼内、动脉内或病灶内方式,或如下所述的缓释系统。C末端片段或包含所述片段的药物组合物可以通过输注或团注法(bolus injection)连续给药。通常,在疾病允许的情况下,应配制和给药该片段以进行位点特异性递送。给药可以是连续性的或周期性的。可以通过恒定流量或可编程流量的可植入泵或通过定期注射来完成给药。优选外围或全身给药,因为本发明表明C末端MANF和CDNF片段都能够穿透神经元细胞膜以及血脑屏障(见图6和图7)。其他优选的给药途径是皮下、鞘内、脑室内、鼻内或透皮给药。在图13中,示出了在具有诱发的脑中鼠的大脑中皮下注射C-CDNF蛋白的作用。

[0092] 缓释制剂的合适实施例包括含有该片段的固体疏水性聚合物的半透性基质(matrices),该基质为成型制品的形式,例如薄膜或微胶囊。缓释基质的实施例包括如Langer等,J.Biomed.Mater.Res.15:167-277(1981)和Langer,Chem.Tech.,12:98-105(1982)所述的聚酯、水凝胶,或聚乙烯醇、聚乳酸(美国专利NO.3,773,919,EP 58481)或不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯(Langer等,见上文)。

[0093] 可以使用如上文针对肽片段所定义的相应的给药方式将基因治疗载体递送至受试者,优选通过例如静脉内注射,或通过腹膜内、皮下、鞘内或脑室内给药。基因治疗载体的药物制剂可以包含可接受的稀释剂,或可以包含其中包埋了基因递送载体的缓释基质。

[0094] 图14的序列比对显示C末端CDNF和MANF肽的高度序列同一性。因此,本发明人从本文呈现的结果推断出,同样在C-末端MANF片段中,对于细胞膜穿透和对神经元细胞的保护作用至关重要的氨基酸序列基序也类似地位于序列中。因此,本发明涉及C末端MANF片段,其由以下SEQ ID NO:2所示的序列或与SEQ ID NO:2的序列具有至少90%同源性或序列同一性的序列的至少50个连续氨基酸残基组成:

[0095] ICEKLVKKDS QICELKYDKQ IDLSTVDLKK LRVKELKKIL DDWGETCKGC AEKSDYIRKI NELMPKYAPK AASARTDL

[0096] 用于治疗包括中枢神经系统 (CNS) 疾病的退行性疾病或病症,其中所述片段通过静脉内或外周给药、腹膜内、皮下、鼻内、透皮、肌内、眼内或动脉内给药来施用。

[0097] 基于图10所示的结果,本发明还涉及C末端MANF片段,其由以下SEQ ID NO:2所示的序列或与SEQ ID NO:2的序列至少90%同源的序列的至少50个连续氨基酸残基组成:

[0098] ICELKKKDS QICELKYDKQ IDLSTVDLKK LRVKELKKIL DDWGETCKGC AEKSDYIRKI NELMPKYAPK AASARTDL,用于治疗1型或2型糖尿病。

[0099] 对于所有上述实施方案,与SEQ ID NO:2的序列至少90%同源的所述序列优选包含在SEQ ID NO:2的位置47-50中的序列CXXC,其中X是任意氨基酸。

[0100] 更优选地,与SEQ ID NO:2的序列至少90%同源的所述序列由以下SEQ ID NO:6的序列的至少50个连续氨基酸残基组成:

[0101] QICELKYDKQ IDLSTVDLKK LRVKELKKIL DDWGETCXXC AEKSDYIRKI NELMPKYAPK AASARTDL

[0102] 其中X是任意氨基酸。

[0103] 最优选地,所述MANF片段具有以下SEQ ID NO:5的序列:

[0104] KYDKQ IDLSTVDLKK LRVKELKKIL DDWGETCKGC AEKSDYIRKI NELMPKYAPK AASARTDL

[0105] 或与SEQ ID NO:5的序列至少90%同源的序列。

[0106] 在一个实施方案中,C末端MANF片段不包含其天然的C末端氨基酸,即ER滞留信号。因此,在优选的实施方案中,该片段缺少与SEQ ID NO:2的位置75-78相对应的ER滞留信号RTDL。

[0107] C末端MANF片段可以以与上文针对C末端CDNF片段所讨论的相同方式进行修饰。

[0108] 本发明还涉及一种药物组合物,其包含C末端MANF片段和以下至少一种:生理上可接受的载体、缓冲剂、赋形剂和稳定剂,其用于治疗中枢神经系统 (CNS) 疾病,1型或2型糖尿病或视网膜病症。所述包含C-末端MANF片段的药物组合物优选经外周施用于患者,因此优选适于外周给药。

[0109] 本说明书还涉及用于治疗包括中枢神经系统 (CNS) 疾病、I型或II型糖尿病或视网膜病症的退行性疾病或病症的方法,其中是将如本文所定义的药物有效量的C末端CDNF片段或C末端MANF片段给药到患者。优选地,所述片段是经外周给药的。

[0110] 本说明书还涉及如本文所定义的C末端CDNF片段或C末端MANF片段在制造用于治疗包括中枢神经系统 (CNS) 疾病、I型或II型糖尿病或视网膜病症的退行性疾病或病症的药物中的用途。

[0111] 本发明还提供了分离的多核苷酸,其包含编码具有以下序列SEQ ID NO:4:

[0112] KYEKTLDLAS VDLRKMVAE LKQILHSWGE ECRACA EKTD YVNLIQELAP KYAATHPKTE L

[0113] 或与SEQ ID NO:4的序列具有至少90%同源性或序列同一性的序列的C-CDNF片段的核苷酸序列。

[0114] 本发明还提供了编码所述分离的多核苷酸的表达载体和用所述载体转化的宿主细胞。适于表达所述分离的多核苷酸的重组载体的选择,用于将表达所述C-CDNF片段的核酸序列插入载体的方法以及将重组载体递送至感兴趣的细胞的方法在本领域技术范围内。参见,例如,Tuschl, T. (2002), Nat. Biotechnol (生物技术), 20:446-448。

[0115] 本文所使用的用于阐明本发明的背景,尤其是提供关于其实践的附加细节出版物

和其他材料,通过引用合并在此。在以下实施例中进一步描述本发明,这些实施例不旨在限制本发明的范围。

[0116] 实验部分

[0117] 颈上神经节细胞的研究

[0118] 关于交感神经元的培养 (Hellman等,2011;Hamner等,2001;Lindholm等,2002;Sun等,2001;Aalto等,2007) 将出生后 (P) 日龄0-3天小鼠的颈上神经节用胶原酶 (2.5mg/ml; Worthington), 分散酶 (5mg/ml; Roche Molecular Biochemicals) 和胰蛋白酶 (10mg/ml; Worthington) 在37°C消化45分钟,并用硅化玻璃巴斯德吸管机械解离。通过进行大量的差速贴壁 (preplating) 去除非神经元细胞。使几乎纯的神经元在聚鸟氨酸/层粘连蛋白 (Sigma) 包被的35毫米塑料皿中、在存在30ng/ml小鼠神经生长因子 (NGF) (Promega) 的 Neurobasal培养基和B27补充剂 (Invitrogen/Gibco) 中小尺寸标准微岛 (small-size standard microisland) 中培养5-6天。通过大量洗涤并添加功能阻断性抗NGF抗体 (Roche), 除去NGF。用特殊的神经元显微注射设备对神经元进行压力显微注射 (Hellman等, 2011;Hamner等,2001;Lindholm等,2002;Sun等,2001;Yu等,2003) (Sun等,2001;Sun等,2003)。为了进行存活率分析,在实验的开始 (初始数量) 和结束 (三天) 对微岛上的所有神经元进行计数,并表示为初始的百分比。

[0119] 如先前所述进行交感神经元的显微注射 (Yu, L.Y., Jokitalo, E., Sun, Y.F., Mehlen, P., Lindholm, D., Saarma, M. 和 **Arumäe**, U. (2003) *J. Cell Biol.* 163, 987-997)。先前已经描述了用于CDNF的质粒。简而言之,新生小鼠SCG神经元与NGF (Promega) 生长5-6天,然后向细胞核微注射全长 (FL)-CDNF和C-CDNF的表达质粒以及增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 的报告质粒,每个实验中使用10ng/u1的载体浓度。用50ng/u1的质粒浓度获得了相似的结果。关于蛋白质显微注射,将PBS中200ng/u1的重组全长 (FL)-CDNF、C-CDNF蛋白与荧光报告基因Dextran Texas Red (MW 70000Da) (Invitrogen, Molecular Probes) 一起直接显微注射到细胞质中,所述荧光报告基因有助于鉴别被成功注射的神经元。第二天加入衣霉素 (2 μ M),并在3天后对存活的荧光神经元进行计数。三天后“在黑暗中 (blindly)”对存活荧光 (表达EGFP的或含有Dextran Texas Red的) 神经元进行计数,并表示为显微注射后2-3小时内计数的初始存活荧光神经元的百分比。关于质粒实验,利用质粒的实验在独立的培养物中重复了5次,并进行了四个独立的蛋白质注射实验。每个实验组平均成功注射了50-80个神经元。结果表示为平均值 \pm SEM。通过单因素方差分析和事后Dunnett's t检验,将每个实验组的数据与对照质粒PCR3.1 (载体) 或PBS (在蛋白质注射实验中) 进行比较。在 $p < 0.05$ 时拒绝零假设。

[0120] CDNF表达质粒

[0121] 通过TOPO/TA克隆系统 (Invitrogen) 或通过使用限制性核酸内切酶将编码全长 (FL) 或羧基末端 (C) 结构域的构建体插入pCR3.1载体 (Invitrogen)。pCR3.1载体中的全长CDNF分别长为537bp (179个氨基酸) 和561bp (187个氨基酸) 氨基酸,并且在它们的N末端具有ER靶向的信号序列。C-CDNF长186bp,对应于FL-CDNF中的氨基酸127-187。

[0122] E511 pCR3.1/双向TOPO TA中的人CDNF。带有终止密码子的全长cDNA (无标签)。氨苄青霉素选择性。DH5 α 。通过测序验证。

[0123] E811 pCR3.1 hCDNF C-具有信号序列的人CDNF C末端序列。通过PCR和

Invitrogen TA克隆系统克隆。插入大小为207bp。转化到DH5a细胞。Amp选择性。通过测序验证。

[0124] 表达蛋白质和肽片段的质粒

[0125] 人重组CDNF (全长pre-CDNF,由187个氨基酸组成,具有26个氨基酸长度的信号序列和161个氨基酸长度的成熟CDNF序列),人N-CDNF (由26个氨基酸的人CDNF信号序列和成熟CDNF的从氨基酸1-氨基酸100的部分所组成)以及人C-CDNF (由与成熟CDNF的从氨基酸101开始延伸到氨基酸161的C末端结构域融合的26个氨基酸长度的CDNF信号序列组成)。

[0126] 人重组MANF (全长pre-MANF,由179个氨基酸组成,具有21个氨基酸长度的信号序列和158个氨基酸长度的成熟MANF序列),人N-MANF (由21个氨基酸的人MANF信号序列和成熟MANF的从氨基酸1-氨基酸95的部分所组成)以及人C-MANF (由与成熟MANF的从氨基酸96开始延伸到氨基酸158的C末端结构域融合的21个氨基酸长度的CDNF信号序列组成)。

[0127] 使hMANF和hCDNF以及它们的结构域的cDNA合成优化的密码子订购自Genewiz,并构建了相应的pQMCF表达载体。N-CDNF、C-CDNF、N-MANF和C-MANF构建体在C端具有组氨酸标签。通过在最终载体中测序来验证cDNA。hMANF和hCDNF蛋白是由源自CHO的悬浮细胞系CHOEBNALT85产生的,使用化学成分明确(chemically defined)的无血清培养基培养细胞。

[0128] CHOEBNALT85细胞用1 μ g表达质粒转染。转染后48小时,加入700 μ g/ml的G418以选择含有质粒的细胞群。

[0129] 转染48小时后,在还原条件下,在细胞裂解物和上清液中分析蛋白质的表达和分泌。

[0130] hMANF和hCDNF蛋白通过两步离子交换色谱法纯化,并经凝胶过滤到pH 7.4的PBS中。基于SDS-PAGE以及利用CDNF和MANF抗体(MANF 4E12-HRP和CDNF-7D6-HRP,Icosagen Tartu,爱沙尼亚)的Western印迹分析,所用蛋白质的纯度超过99%。

[0131] 在Ni-亲和柱上纯化CDNF和MANF的C末端和N末端结构域,并通过SDS-PAGE以及利用对His标签的小鼠单克隆抗体(目录号A00186;GeneScript)的Western印迹法对蛋白质进行了分析。

[0132] 产生的蛋白质具有以下序列:

[0133] 成熟的人CDNF:

[0134] QEAGGRPGADCEVCKEFLNRFYKSLIDRGVNFSLDTIEKELISFCLDTKGKENRLCYYLGATKDAATK
ILSEVTRPMSVHMPAMKICEKLLKLDLSQICELKYEKTLDLASVDLRKMRVAELKQILHSWGEECRACA EKTDYVNL
IQELAPKYAATHPKTEL (SEQ ID NO:7)

[0135] 人N-CDNF:

[0136] QEAGGRPGADCEVCKEFLNRFYKSLIDRGVNFSLDTIEKELISFCLDTKGKENRLCYYLGATKDAATK
ILSEVTRPMSVHMPAMKICEKLLKLDLSQICEL (SEQ ID NO:8)

[0137] 人C-CDNF:

[0138] KYEKTLDLASVDLRKMRVAELKQILHSWGEECRACA EKTDYVNL IQELAPKYAATHPKTEL (SEQ ID
NO:4)

[0139] 成熟的人MANF:

[0140] LRPGDCEVCISYLGRFYQDLKDRDVTFSPATIENELIKFCREARGKENRLCYIIGATDDAATKI INEV
SKPLAHHIPVEKICEKLLKLDLSQICELKYDKQIDLSTVDLKKLRVKELKKILDDWGETCKGCAEKSDYIRKINELM

PKYAPKAASARTDL (SEQ ID NO:9)

[0141] 人N-MANF

[0142] LRPGDCEVCISYLGRFYQDLKDRDVTFSPATIENELIKFCREARGKENRLCYIIGATDDAATKIINEV
SKPLAHHIPVEKICEKLLKKKDSQICEL (SEQ ID NO:10)

[0143] 人C-MANF

[0144] KYDKQIDLSTVDLKKLRVKELKKILDDWGETCKGCAEKSDYIRKINELMPKYAPKAASARTDL (SEQ
ID NO:5)

[0145] 多巴胺神经元的研究

[0146] 为了研究多巴胺神经元 (Yu等,2008;Yu和Arumae,2008),从13.5日龄的NMRI品系小鼠胚胎的中脑腹侧(ventral mesencephali)解剖了中脑底(midbrain floor)。将组织与0.5%胰蛋白酶(ICN Biomedical)一起孵育,然后使用大的火焰抛光(fire polished)巴斯德吸管进行机械解离。使神经元在聚L-鸟氨酸包被(Sigma)96孔培养板上、在存在或不存在GDNF(100ng/ml)的情况下或和不同浓度的CDNF、MANF、C-CDNF和C-MANF多肽一起在含有N2补充剂(Invitrogen)的DMEM/F12培养基(Invitrogen)中生长五天。在实验开始时,将相同数量的神经元接种到每个孔中。没有添加神经营养因子的培养物用作阴性对照。由于中脑培养物包含多种神经元类型,因此将培养物固定并用对酪氨酸羟化酶(TH)的抗体(Millipore)免疫染色,其为多巴胺能神经元的特异性标记。通过CellInsight™扫描每个孔的图像,并通过CellProfiler和CellProfiler分析软件对免疫阳性神经元进行计数。数据表示为GDNF维持的TH阳性神经元的百分比。针对独立的培养物所有实验至少重复了3次。结果表示为平均值SEM,并通过单因素方差分析和Tukey事后检验或通过双侧Student t检验对显著性进行了检验。在 $P \leq 0.05$ 时拒绝虚假设。

[0147] CDNF、C-CDNF和C-MANF的碘化

[0148] 使用乳过氧化物酶方法,用 ^{125}I -Na碘化CDNF、C-CDNF和C-MANF。将所讨论的蛋白质溶于30 μl 的0.25M磷酸盐缓冲液(pH 7.5)中,并与 ^{125}I -Na(1mCi/2.8 μl ;1mCi=37mBq;GE Healthcare)混合。通过加入10 μl 的50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的乳过氧化物酶和0.05%的 H_2O_2 来开始反应。将混合物在室温孵育20分钟,并通过添加3体积的0.1M磷酸盐缓冲液(pH 7.5,含有0.1M NaI,0.42M NaCl)来终止反应,然后添加25 μl 的2.5%BSA。在Sephadex G-25柱(PM10;GE Healthcare)上通过凝胶过滤分离游离碘和碘化蛋白质。为了进行柱平衡和洗脱,使用0.1M磷酸盐缓冲液(pH 7.5)和1%BSA。有时使用YM-10Centricon柱(Millipore)来浓缩碘化生长因子。 ^{125}I 标记的CDNF、C-CDNF、N-CDNF、C-MANF和N-MANF的比活性(specific activity)是在Wizard 3 1480自动 γ 计数器(Perkin Elmer,Wallac)上测得的,约为 10^8 cpm/ μg 蛋白。将已标记的蛋白质保持在4 $^\circ\text{C}$,并在标记后3周内使用。

[0149] E13.5多巴胺能神经元的内化实验

[0150] 将在24孔板上在培养物中生长的小鼠E13.5多巴胺神经元用每孔30,000cpm碘化的CDNF或C-CDNF在37 $^\circ\text{C}$ 下孵育2小时。将细胞转移至冰上,并用0.5ml的冰冷培养基洗涤一次。然后将细胞转移到Eppendorf管中,并在4 $^\circ\text{C}$ 下用0.2M乙酸,0.5M NaCl,pH 2.8洗涤一次。在1000g离心10分钟后,将细胞溶于0.5ml的0.5N NaOH中,并在Wizard 3 1480自动 γ 计数器(Perkin Elmer,Wallac)上计数。

[0151] 大鼠中血脑屏障穿透性研究

[0152] 对成年雄性Wistar大鼠皮下注射¹²⁵I-CDNF、¹²⁵I C-CDNF或¹²⁵I C-MANF(所有蛋白质在10 μ l中以10⁶cpm)。2小时后用PBS对动物进行灌注。通过 γ 计数器分析了不同大脑区域的放射性。数据显示为平均值 \pm SEM。对组间差异进行了方差分析,然后进行了Tukey-Kramers事后检验。

[0153] PC6.3细胞的内化实验

[0154] 使大鼠PC6.3嗜铬细胞瘤细胞在24孔板上、在具有10%FCS和5%马血清的DMEM培养液中生长。用PBS洗涤细胞,并且每孔用30,000cpm的碘代的CDNF、C-CDNF或C-MANF在37 $^{\circ}$ C下孵育90分钟。将细胞置于冰上,用0.5ml冰冷培养基洗涤一次。然后将细胞转移到Eppendorf管中,并用0.2M乙酸,0.5M NaCl,pH 2.8洗涤一次。在1000g离心10分钟后,将细胞溶于0.5ml 0.5N NaOH中,并以Wizard 3 1480自动 γ 计数器(Perkin Elmer,Wallac)计数。

[0155] 大鼠中PD的6-OHDA模型中神经恢复研究

[0156] 在PD的神经恢复模型中,如之前所述利用6-OHDA使大鼠损伤(Voutilainen等,2009;Voutilainen等,2011,Penttinen等,2016)。简而言之,大鼠在异氟烷麻醉下接受左纹状体内(相对于前囟和硬脑膜的坐标A/P+1.6;L/M-2.8;D/V-6,A/P 0.0;L/M-4.1;D/V-5.5和A/P-1.2;L/M:-4.5;D/V-5.5)单侧立体定向注射3 \times 2 μ g 6-OHDA(以10度角)。两周后,根据苯丙胺诱导的旋转(rotation)结果(病变大小)将大鼠分组。此后,使用与6-OHDA相同的坐标,向大鼠纹状体内注射CDNF(10 μ g)、C-CDNF(与CDNF 10 μ g等摩尔的)和N-CDNF(与CDNF 10 μ g等摩尔的)。在参考实验中,将大鼠分组后,将渗透性微型泵插入皮下并将插管置于病变的纹状体中。微型泵将MANF4(即MANF肽CKGC,参见W02013034805)、GDNF或媒介物溶液递送到纹状体中持续两周,然后将微型泵和插管移除。在神经元内部6-OHDA具有协同作用的两种作用方式:1)积累在细胞质中并形成自由基,引起氧化应激;2)它是线粒体呼吸链复合物I和IV的有效抑制剂。通过使用NAT抑制剂地昔帕明(15mg/kg,i.p.,在6-OHDA注射前30分钟)保护去甲肾上腺素能神经元。在涉及经CDNF、C-CDNF、N-CDNF和PBS处理的大鼠的实验中在损伤后第2、4、6和8周,以及在涉及MANF4和GDNF的参考实验中在损伤后第1、4、8、10和12周,利用苯丙胺诱导的旋转行为来测量单侧病变的大小和治疗效果。在30分钟的适应期之后记录了120分钟内的苯丙胺诱导的(2.5mg/kg,i.p.)完全(360 $^{\circ}$)同侧和对侧旋转的次数。结果表示为净的患侧同侧旋转。排除标准为均值(净旋转) \pm 2 \times STDEV。

[0157] 酪氨酸羟化酶(TH)-免疫组化

[0158] 灌注和组织处理。在进行神经恢复研究后,立即用过量的戊巴比妥钠(90mg/kg,i.p.;Orion Pharma)麻醉大鼠,并用PBS然后用pH值为7.4的0.1M磷酸钠缓冲液中的4%多聚甲醛进行心内(intracardially)灌注。取出大脑,在4 $^{\circ}$ C下,后固定4小时并储存在含有20%蔗糖的磷酸钠缓冲液中。在滑动切片机上切下40 μ m深度的连续冠状冷冻切片。如别处所述进行免疫组化法(Voutilainen等,2009)。将经灌注的脑在4 $^{\circ}$ C下在多聚甲醛中后固定过夜,并储存在20%蔗糖中。将大脑切成的40 μ m厚的切片,一组六片(in series of six)。用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤自由漂浮的切片,并用0.3%的过氧化氢(Sigma Aldrich)淬灭内源性过氧化物酶活性。为了阻断抗体的非特异性结合,将切片在阻断缓冲液(1 \times PBS中的4%牛血清白蛋白和0.1%Triton X-100)中孵育1小时。将切片在阻断缓冲液中的小鼠单克隆抗酪氨酸羟化酶(TH)抗体(1:2,000;目录号MAB318;RRID:AB_2201528;Millipore,

Billerica, MA) 中于4℃孵育过夜,然后在生物素化的二抗(1:200;抗大鼠或抗小鼠; Vector, Burlingame, CA)中孵育。用抗生物素蛋白-生物素-酶复合物(ABC试剂盒; Vector)增强染色,并用3',3'-二氨基联苯胺作为发色剂将信号可视化。

[0159] 黑质的TH阳性细胞计数

[0160] 从横跨SNpc的六个切片,相对于前囟从大约A/P-4.5至-6.0,对黑质致密部(SNpc)中的TH阳性细胞进行了分析。使用Matlab (RRID:nlx_153890; MathWorks, Natick, MA) 算法从3DHitech扫描仪获得的图像中对细胞进行计数。扫描仪的分辨率为0.24μm/像素,具有×20NA 0.8物镜。

[0161] 纹状体中TH阳性神经突的光密度分析

[0162] 从每只大鼠的三个纹状体切片,相对于前囟分别从A/P+2.2,+0.84和-0.12,对纹状体中TH阳性神经突的光密度进行测定。为了减少背景信号,用自动扫描仪(3DHitech, 匈牙利布达佩斯,由赫尔辛基大学生物技术研究所(Institute of Biotechnology, University of Helsinki)提供扫描服务)扫描切片,并将图像转换为16位灰度。因为胼胝体没有TH信号,所以它被用作非特异性背景染色的量度。在ImageJ (NIH)中分析所得图像的除以面积的积分密度。数据以完整侧(intact side)的百分比表示。

[0163] β细胞增殖测定

[0164] 从雌性未生育过(virgin)的8周大C57b16Rcc小鼠中分离出胰岛。胰岛在生长培养基中进行回收o/n(过夜),第二天将等量的胰岛/孔(70个/孔)用胎盘催乳素(PL 500ng/ml)、C-MANF或MANF处理5天。每天将一半的培养基更换为具有生长因子的新鲜培养基。在胰岛收获前48小时,添加Edu,一种可替代BrdU的核苷类似物(**Click-iT®Edu**增殖试剂盒, Invitrogen)。用胰蛋白酶破碎胰岛,并在细胞离心机中将其离心到载玻片上。在细胞离心涂片(cytospins)后将细胞固定,并用Click-iT AlexaFluor叠氮化物显色剂对增殖细胞进行染色,然后在+4℃下进行胰岛素染色(几内亚猪1:200, Abcam, 英国剑桥) o/n,以检测β细胞。洗涤细胞并用与Alexa **Fluor®488** (1:400, Molecular Probes, Life Technologies, CA, USA)缀合的二抗染色。载玻片用含有DAPI的Vectashield封固介质(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)封固。使用配备有40x/Plan-Apochromat/0.95Corr M27和63x/Plan-Apochromat/1.400il/M27和483AxioCam HRm相机的荧光Zeiss AxioImager M2 482落射荧光显微镜、利用AxioVision4软件来获取十二张图像(放大倍数为10),并通过Image Pro Plus软件(Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA)进行分析,以对DAPI阳性细胞核的数量进行定量。对增殖的β细胞的相对数目进行定量,并与3至5次重复/处理的孔进行比较。

[0165] ALS的小鼠模型

[0166] 在本研究中,转基因SOD1 G93A小鼠用作ALS的转基因小鼠模型。含有各种人类SOD1突变的转基因小鼠会发展为进行性神经变性和运动神经元(MN)死亡,从而提供了一种动物模型,其通常用于临床前试验,并且极大地促进了对ALS发病机制的理解(Gurney等, 1994)。转基因SOD1小鼠表现出ALS样临床特征,其以常染色体显性方式进行传递。在这些小鼠中,作为最初症状在8-10周龄时出现后肢无力和颤动,随后是主要症状,如进行性运动麻痹和神经源性肌萎缩(Shibata 2001)。这些小鼠随后表现出步态、进食和饮水障碍(disability),并在几周内死亡,通常在14-16周龄。携带有甘氨酸93突变为丙氨酸的人类

SOD1的转基因小鼠最先获自Jackson实验室 (<http://www.jax.org>) Bar Harbor, ME; 菌株 B6SJL-TgN(SOD1-G93A) 1Gur)。如之前其他人所做的那样(参见Jackson Lab主页), 使用特定的寡核苷酸和条件, 通过DNA尾端检测(DNA tail test)和PCR来分析转基因表达。在所有实验中, 均包括野生型B6SJL-TgN(SOD1) 2Gur作为对照。

[0167] ALS小鼠中的实验设置

[0168] 在单次给药实验中, 大约13周龄的小鼠在异氟烷麻醉下接受了单次脑室内注射PBS或C-CDNF (3.75 μ g, 与以PBS稀释的全长CDNF 10 μ g等摩尔)。然后每周两次对小鼠的疾病体征和体重变化进行评定。通过一系列被设计用于评定小鼠运动能力的行为学测试来完成评价; 所述系列包括测试, 例如转棒法。

[0169] 在慢性输注实验中, 在异氟烷麻醉下, 12周龄的SOD1小鼠被插入脑输注插管(通过导管与Alzet渗透微型泵相连)到右侧脑室。输注C-CDNF (1.5 μ g/24小时) 28天。用转棒法评价运动行为。对小鼠的临床体征和体重变化进行评价。

[0170] ALS小鼠的临床评分

[0171] 使用Jackson实验室的说明对SOD1小鼠进行临床评分。小鼠12周大后, 每周仔细检查两次。通过尾巴的根部轻轻抬起动物并观察它们的震颤、僵硬和四肢伸展能力来对动物进行评分。根据ALSTDI (ALS therapy Development Institute) 后肢神经评分系统按1至5的等级进行临床评分。

[0172] 转棒法

[0173] 在转棒仪中, 将小鼠置于旋转棒(加速速度为4-40rpm/分钟)(意大利, Ugo Basile)上。截止时间为4分钟。小鼠12周大后, 每周进行2次转棒法测试。

[0174] 大脑中动脉远端阻塞作为脑中风的模型

[0175] 使用雄性Sprague Dawley大鼠(体重230-270克, Envigo, 荷兰)进行实验, 实验根据关于实验动物照料和使用的欧盟指导性的2010/63/EU的3R原则、当地法律和法规进行, 并获得芬兰国家动物实验委员会的批准。所有实验均以盲法进行, 并将大鼠随机分配至不同的治疗组。用水合氯醛(0.4g/kg, i.p.)麻醉大鼠。如前所述, 通过阻塞远端大脑中动脉(dMCA)并阻塞双侧颈总动脉(CCA)60分钟来诱发皮质中风(cortical stroke)(Chen等, 1986)。简言之, 通过颈部腹侧正中切口(ventral midline cervical incision)来确认并分离双侧CCA。将大鼠置于立体定位仪中, 并在右半球进行开颅手术。右(MCA)用10-0缝合线结扎, 双侧颈总动脉(CCA)用非创伤性动脉夹结扎60分钟。局部缺血六十分钟后, 移除MCA周围的缝合线和CCA上的动脉夹, 以引起再灌注损伤。从麻醉中恢复后, 将大鼠放回其家笼中。手术期间和之后的体温保持在37 $^{\circ}$ C。

[0176] 为了检验皮下C-CDNF的神经保护作用, 在dMCA阻塞前30-50分钟和再灌注后立即以100 μ l皮下注射50 μ gC-CDNF。磷酸盐缓冲盐水(PBS)用作媒介物对照。dMCAo后2天对大鼠实施安乐死, 通过2%的2,3,5-三苯基四唑氯化物(TTC; Sigma Aldrich, St.Louis, MO)染色来测量梗塞体积。将大鼠断头, 取出大脑, 用丙烯酸大鼠脑方块(acrylic rat brain block)切成2.0毫米厚的切片。将脑切片在室温下于2%TTC溶液(Sigma, St.Louis, MO, USA)中孵育15分钟, 然后转移至4%多聚甲醛溶液中进行固定。用数字扫描仪和ImageJ软件测量每个切片中的梗塞面积。由平均切片厚度(2毫米)与所检查的喙侧脑(rostral brain)切片中梗塞面积总和的乘积获得每只动物的梗塞体积。使用学生t检验进行统计分析。

[0177] 在健康的动物中皮下注射C-CDNF的效果

[0178] 野生型小鼠每周接受2次C-CDNF注射 (0.17mg/kg, 1.77或17.7mg/kg), 持续3周。皮下注射C-CDNF后, 每周一次在旷场实验中测量小鼠的自主活动60分钟。重复皮下注射C-CDNF后未见体重变化。在对照组和接受C-CDNF剂量的组之间, 在行为模式上没有检测到统计学差异。结果如图15所示。

[0179] C-CDNF在亨廷顿氏病大鼠模型中的作用

[0180] 成年Wistar大鼠接受单次、单侧纹状体内注射225nmol的喹啉酸(QA)到坐标:A/P+0,7;L/M+2,8;D/V-6,0。喹啉酸是一种通过兴奋性毒性过程诱导纹状体神经元死亡的毒素。2周后, 大鼠接受单次的纹状体内注射PBS、CDNF (10微克)、C-CDNF (与等摩尔CDNF相当的量)到相同的坐标。在治疗开始之前, 将大鼠随机分组。每周进行转棒和抓力实验。

[0181] 在转棒实验中和在抓力实验中, 在喹啉酸损毁后, 只有C-CDNF而不是CDNF在统计学上显著改善运动行为, C-CDNF在3周和5周的时间点产生了显著改善的性能。结果如图16所示。

[0182] 参考文献

[0183] Aalto, A.P., L.P. Sarin, A.A. van Dijk, M. Saarma, M.M. Poranen, U. Arumae, and D.H. Bamford. 2007. Large-scale production of dsRNA and siRNA pools for RNA interference utilizing bacteriophage phi6 RNA-dependent RNA polymerase. *RNA*. 13:422-429.

[0184] Airavaara, M., H. Shen, C.C. Kuo, J. Peranen, M. Saarma, B. Hoffer, and Y. Wang. 2009. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor reduces ischemic brain injury and promotes behavioral recovery in rats. *J. Comp. Neurol.* 515 (1) :116-124.

[0185] Airavaara M, Harvey BK, Voutilainen MH, Shen H, Chou J, Lindholm P, Lindahl M, Tuominen RK, Saarma M, Hoffer B, and Wang Y. CDNF protects the nigrostriatal dopamine system and promotes recovery after MPTP treatment in mice. *Cell Transplant.* 2012; 21 (6) :1213-23. doi:10.3727/096368911X600948.

[0186] Bai M, Vozdek R, Hnizda A, Jiang C, Wang B, Kuchar L, Li T, Zhang Y, Wood C, Feng L, Dang Y, and Ma DK. Conserved roles of *C.elegans* and human MANFs in sulfatide binding and cytoprotection. *Nat Commun.* 2018 Mar 1; 9 (1) :897. doi: 10.1038/s41467-018-03355-0.

[0187] Bode & Löwik, Constrained cell penetrating peptides. *Drug Discovery Today: Technologies*; 2017, Vol. 26, pages 33-42

[0188] Borrelli A, Tornesello AL, Tornesello ML, Buonaguro FM. Cell Penetrating Peptides as Molecular Carriers for Anti-Cancer Agents. *Molecules.* 2018 Jan 31; 23 (2) .pii:E295. doi:10.3390/molecules23020295.

[0189] Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke.* 1986; 17 (4) :738-743.

[0190] Dornburg R (1995), *Gene Therap.* 2:301-310.

- [0191] Gurney,ME.,Cutting,FB.,Zhai,P.,Doble,A.,Taylor,CP.,Andrus,PK.and Hall,ED.1996Benefit of vitamin E,riluzole,and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis.*Ann Neurol* 39 (2) 147-57
- [0192] Hamner,S.,U.Arumae,Y.Li-Ying,Y.F.Sun,M.Saarma,and D.Lindholm.2001.Functional characterization of two splice variants of rat bad and their interaction with Bcl-w in sympathetic neurons.*Mol.Cell.Neurosci.*17: 97-106.
- [0193] Hellman,M.,U.Arumae,L.Y.Yu,P.Lindholm,J.Peranen,M.Saarma,and P.Permi.2011.Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) has a unique mechanism to rescue apoptotic neurons.*J.Biol.Chem.*286:2675-2680.
- [0194] Kalafatovic&Giralt,Cell-Penetrating Peptides:Design Strategies beyond Primary Structure and Amphipathicity.*Molecules.*2017 Nov 8;22(11).pii: E1929.doi:10.3390/molecules22111929.
- [0195] Mie Kristensen,Ditlev Birch and Hanne **Mørck**Nielsen.Applications and Challenges for Use of Cell-Penetrating Peptides as Delivery Vectors for Peptide and Protein Cargos.*Int.J.Mol.Sci.*2016,17,185;doi:10.3390/ijms17020185
- [0196] Lindahl M,Saarma M,Lindholm P,M.2017 Unconventional neurotrophic factors CDNF and MANF:structure,physiological functions and therapeutic potential.*Neurobiology of Disease*,97,90-102.
- [0197] Lindahl M,Danilova T,Palm E,Pulkkila P,Voikar V,Hakonen E,Ustinov J, Andressoo J-O,Harvery B,Otonkoski T,Rossi J and Saarma M.2014.MANF is indispensable for the proliferation and survival of pancreatic β -cells.*Cell Reports*,7 (2) :366-75.
- [0198] Lindholm,D.,E.A.Mercer,L.Y.Yu,Y.Chen,J.Kukkonen,L.Korhonen,and U.Arumae.2002.Neuronal apoptosis inhibitory protein:Structural requirements for hippocalcin binding and effects on survival of NGF-dependent sympathetic neurons.*Biochim.Biophys.Acta.*1600:138-147.
- [0199] Lindholm,P.,and M.Saarma.2010.Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors.*Dev.Neurobiol.*70:360-371.
- [0200] Lindholm,P.,M.H.Voutilainen,J.Lauren,J.Peranen,V.M.Leppanen, J.O.Andressoo,M.Lindahl,S.Janhunen,N.Kalkkinen,T.Timmusk,R.K.Tuominen,and M.Saarma.2007.Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo.*Nature.*448:73-77.
- [0201] **Lindström**,R.,P.Lindholm,J. **Kallijärvi**,Y.Li-ying,T.P.Piepponen,U. **Arumäe**, M.Saarma and T.I.Heino,2013.Characterization of the Structural and Functional Determinants of MANF/CDNF in *Drosophila* In Vivo Model.*PLoS One* 8(9),e73928.
- [0202] Marino,Giada,Ulrich Eckhard,and Christopher M.Overall,Protein Termini and Their Modifications Revealed by Positional Proteomics.2015,ACS Chem.Biol.10:1754-1764

- [0203] Nadella R, Voutilainen MH, Saarma M, Gonzalez-Barrios JA, Leon-Chavez BA, Jiménez JM, Jiménez SH, Escobedo L, Martinez-Fong D. Transient transfection of human CDNF gene reduces the 6-hydroxydopamine-induced neuroinflammation in the rat substantia nigra. *J. Neuroinflammation*. 11:209, 2014.
- [0204] Neves J, Zhu J, Sousa-Victor P, Konjikusic M, Riley R, Chew S, Qi Y, Jasper H, Lamba DA. Immune modulation by MANF promotes tissue repair and regenerative success in the retina. *Science* 2016 Jul 1; 353(6294).
- [0205] Oakes and Papa, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2015. 10:173-94.
- [0206] Parkash, V., P. Lindholm, J. Peranen, N. Kalkkinen, E. Oksanen, M. Saarma, V. M. Leppanen, and A. Goldman. 2009. The structure of the conserved neurotrophic factors MANF and CDNF explains why they are bifunctional. *Protein Eng. Des. Sel.* 22:233-241.
- [0207] Penttinen AM, I. Suleymanova, K Albert, J Anttila, MH Voutilainen, M Airavaara. 2016 Characterization of a new low-dose 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease in rat. *J Neurosci Res.* Jan 13. doi:10.1002/jnr.23708
- [0208] Shibata, N. 2001. Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. *Neuropathology* 21(1): 82-92
- [0209] Sun, Y.F., L.Y. Yu, M. Saarma, and U. Arumae. 2003. Mutational analysis of N-Bak reveals different structural requirements for antiapoptotic activity in neurons and proapoptotic activity in nonneuronal cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 23: 134-143.
- [0210] Sun, Y.F., L.Y. Yu, M. Saarma, T. Timmusk, and U. Arumae. 2001. Neuron-specific Bcl-2 homology 3 domain-only splice variant of Bak is anti-apoptotic in neurons, but pro-apoptotic in non-neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 276:16240-16247.
- [0211] Voutilainen, M.H., S. Back, J. Peranen, P. Lindholm, A. Raasmaja, P. T. Mannisto, M. Saarma, and R. K. Tuominen. 2011. Chronic infusion of CDNF prevents 6-OHDA-induced deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 228:99-108.
- [0212] Voutilainen, M.H., S. Back, E. Porsti, L. Toppinen, L. Lindgren, P. Lindholm, J. Peranen, M. Saarma, and R. K. Tuominen. 2009. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is neurorestorative in rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 29:9651-9659. doi:10.1523/JNEUROSCI.0833-09.2009.
- [0213] Voutilainen, MH, **Arumäe** U, Airavaara M, Saarma M. 2015 Therapeutic potential of the endoplasmic reticulum located and secreted CDNF/MANF family of neurotrophic factors in Parkinson's disease. *FEBS letters* 589 3739-3748.
- [0214] Voutilainen MH, De Lorenzo F, Stepanova P, **Bäck** S, Yu LY, Lindholm P, **Pörsti** E, Saarma M, **Männistö** PT, Tuominen RK 2017 Evidence for an Additive Neurorestorative Effect of Simultaneously Administered CDNF and GDNF in Hemiparkinsonian Rats: Implications for Different Mechanism of

Action.eNeuro.Mar 13;4(1)

[0215] Yu,L.Y.,and U.Arumae.2008.Survival assay of transiently transfected dopaminergic neurons.J.Neurosci.Methods.169:8-15.

[0216] Yu,L.Y.,E.Jokitalo,Y.F.Sun,P.Mehlen,D.Lindholm,M.Saarma,and U.Arumae.2003.GDNF-deprived sympathetic neurons die via a novel nonmitochondrial pathway.J.Cell Biol.163:987-997.

[0217] Yu,L.Y.,M.Saarma,and U.Arumae.2008.Death receptors and caspases but not mitochondria are activated in the GDNF-or BDNF-deprived dopaminergic neurons.J.Neurosci.28:7467-7475.

[0218] Zhao H,Liu Y,Cheng L,Liu B,Zhang W,Guo YJ,Nie L.2013Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor inhibits oxygen-glucose deprivation-induced cell damage and inflammation by suppressing endoplasmic reticulum stress in rat primary astrocytes.J.Mol.Neurosci.51(3):671-8,2013.

[0219] 引用的专利出版物:

[0220] EP58481

[0221] EP1969003

[0222] US3773919

[0223] W02007068803

[0224] W02009133247

[0225] W02013034805

[0226] W02014191630

[0227] W02016057579

序列表

<110> 赫尔辛基大学

<120> C末端的CDNF和MANF片段、包含它们的药物组合物及其用途

<130> HY18PCT

<150> FI20175392

<151> 2017-05-04

<160> 10

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 81

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Pro Ala Met Lys Ile Cys Glu Lys Leu Lys Lys Leu Asp Ser Gln
 1 5 10 15
 Ile Cys Glu Leu Lys Tyr Glu Lys Thr Leu Asp Leu Ala Ser Val Asp
 20 25 30
 Leu Arg Lys Met Arg Val Ala Glu Leu Lys Gln Ile Leu His Ser Trp
 35 40 45
 Gly Glu Glu Cys Arg Ala Cys Ala Glu Lys Thr Asp Tyr Val Asn Leu
 50 55 60
 Ile Gln Glu Leu Ala Pro Lys Tyr Ala Ala Thr His Pro Lys Thr Glu
 65 70 75 80
 Leu

<210> 2

<211> 78

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

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

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

<210> 6

<211> 68

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 变体

<222> 38..39

<223> Xaa 为任意氨基酸.

<400> 6

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

Arg Thr Asp Leu

65

<210> 7

<211> 161

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

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

50	55	60																		
Ala	Ala	Thr	Lys	Ile	Leu	Ser	Glu	Val	Thr	Arg	Pro	Met	Ser	Val	His					
65					70					75				80						
Met	Pro	Ala	Met	Lys	Ile	Cys	Glu	Lys	Leu	Lys	Lys	Leu	Asp	Ser	Gln					
				85					90				95							
Ile	Cys	Glu	Leu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Thr	Leu	Asp	Leu	Ala	Ser	Val	Asp					
				100					105				110							
Leu	Arg	Lys	Met	Arg	Val	Ala	Glu	Leu	Lys	Gln	Ile	Leu	His	Ser	Trp					
				115					120				125							
Gly	Glu	Glu	Cys	Arg	Ala	Cys	Ala	Glu	Lys	Thr	Asp	Tyr	Val	Asn	Leu					
				130					135				140							
Ile	Gln	Glu	Leu	Ala	Pro	Lys	Tyr	Ala	Ala	Thr	His	Pro	Lys	Thr	Glu					
145					150					155				160						
Leu																				
<210>	8																			
<211>	100																			
<212>	PRT																			
<213>	智人																			
<400>	8																			
Gln	Glu	Ala	Gly	Gly	Arg	Pro	Gly	Ala	Asp	Cys	Glu	Val	Cys	Lys	Glu					
1				5					10				15							
Phe	Leu	Asn	Arg	Phe	Tyr	Lys	Ser	Leu	Ile	Asp	Arg	Gly	Val	Asn	Phe					
				20					25				30							
Ser	Leu	Asp	Thr	Ile	Glu	Lys	Glu	Leu	Ile	Ser	Phe	Cys	Leu	Asp	Thr					
				35					40				45							
Lys	Gly	Lys	Glu	Asn	Arg	Leu	Cys	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ala	Thr	Lys	Asp					
				50					55				60							
Ala	Ala	Thr	Lys	Ile	Leu	Ser	Glu	Val	Thr	Arg	Pro	Met	Ser	Val	His					
65					70					75				80						
Met	Pro	Ala	Met	Lys	Ile	Cys	Glu	Lys	Leu	Lys	Lys	Leu	Asp	Ser	Gln					
				85					90				95							
Ile	Cys	Glu	Leu																	
				100																
<210>	9																			
<211>	158																			
<212>	PRT																			
<213>	智人																			
<400>	9																			
Leu	Arg	Pro	Gly	Asp	Cys	Glu	Val	Cys	Ile	Ser	Tyr	Leu	Gly	Arg	Phe					

1	5	10	15
Tyr Gln Asp Leu Lys Asp Arg Asp Val Thr Phe Ser Pro Ala Thr Ile			
	20	25	30
Glu Asn Glu Leu Ile Lys Phe Cys Arg Glu Ala Arg Gly Lys Glu Asn			
	35	40	45
Arg Leu Cys Tyr Tyr Ile Gly Ala Thr Asp Asp Ala Ala Thr Lys Ile			
	50	55	60
Ile Asn Glu Val Ser Lys Pro Leu Ala His His Ile Pro Val Glu Lys			
65	70	75	80
Ile Cys Glu Lys Leu Lys Lys Lys Asp Ser Gln Ile Cys Glu Leu Lys			
	85	90	95
Tyr Asp Lys Gln Ile Asp Leu Ser Thr Val Asp Leu Lys Lys Leu Arg			
	100	105	110
Val Lys Glu Leu Lys Lys Ile Leu Asp Asp Trp Gly Glu Thr Cys Lys			
	115	120	125
Gly Cys Ala Glu Lys Ser Asp Tyr Ile Arg Lys Ile Asn Glu Leu Met			
	130	135	140
Pro Lys Tyr Ala Pro Lys Ala Ala Ser Ala Arg Thr Asp Leu			
145	150	155	
<210> 10			
<211> 95			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 10			
Leu Arg Pro Gly Asp Cys Glu Val Cys Ile Ser Tyr Leu Gly Arg Phe			
1	5	10	15
Tyr Gln Asp Leu Lys Asp Arg Asp Val Thr Phe Ser Pro Ala Thr Ile			
	20	25	30
Glu Asn Glu Leu Ile Lys Phe Cys Arg Glu Ala Arg Gly Lys Glu Asn			
	35	40	45
Arg Leu Cys Tyr Tyr Ile Gly Ala Thr Asp Asp Ala Ala Thr Lys Ile			
	50	55	60
Ile Asn Glu Val Ser Lys Pro Leu Ala His His Ile Pro Val Glu Lys			
65	70	75	80
Ile Cys Glu Lys Leu Lys Lys Lys Asp Ser Gln Ile Cys Glu Leu			
	85	90	95

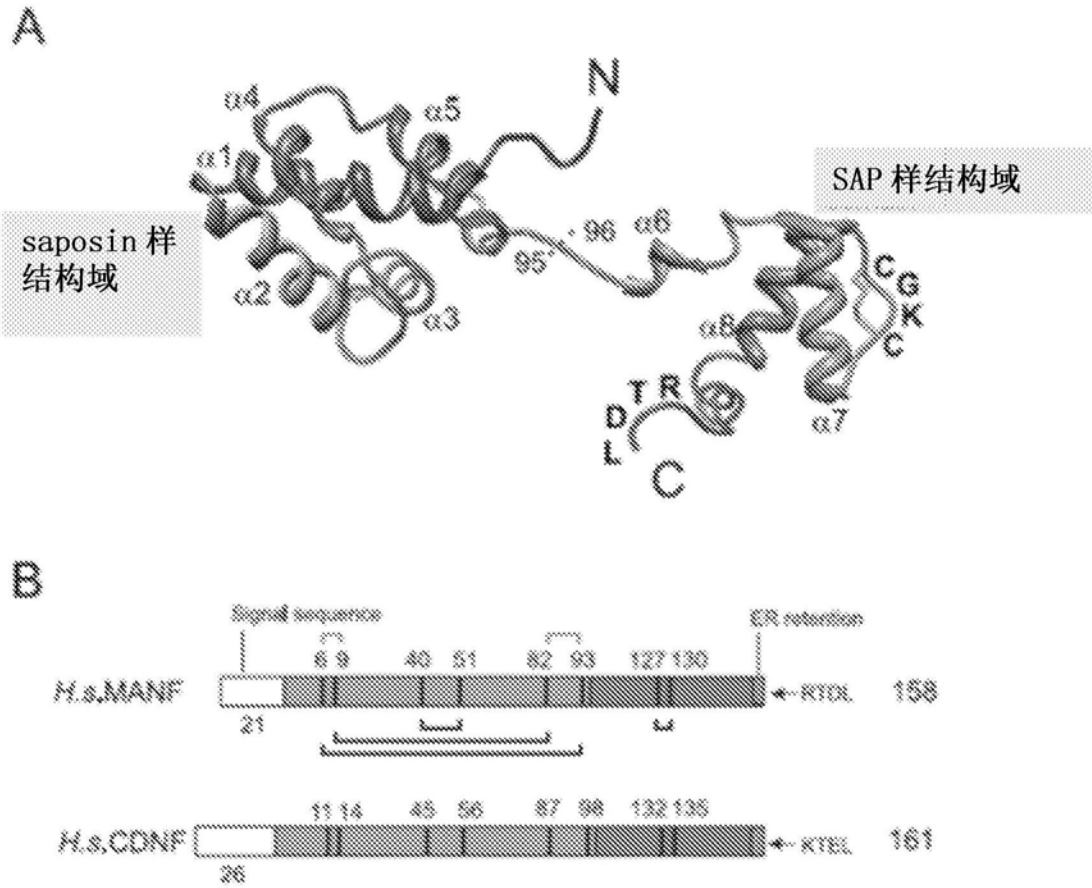
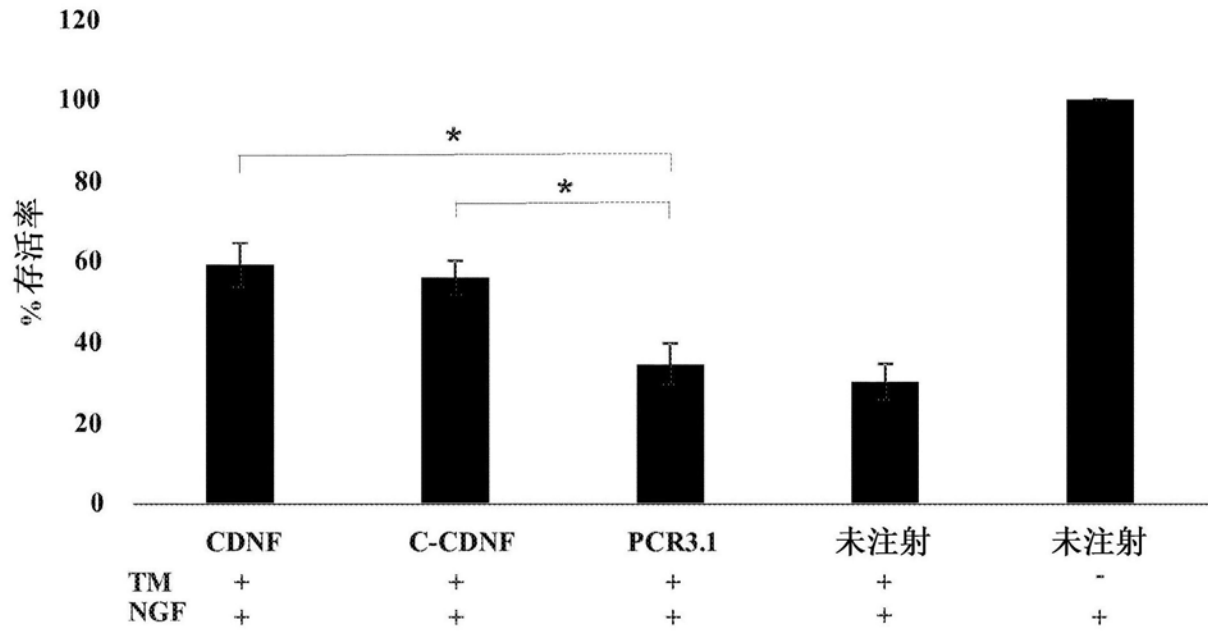


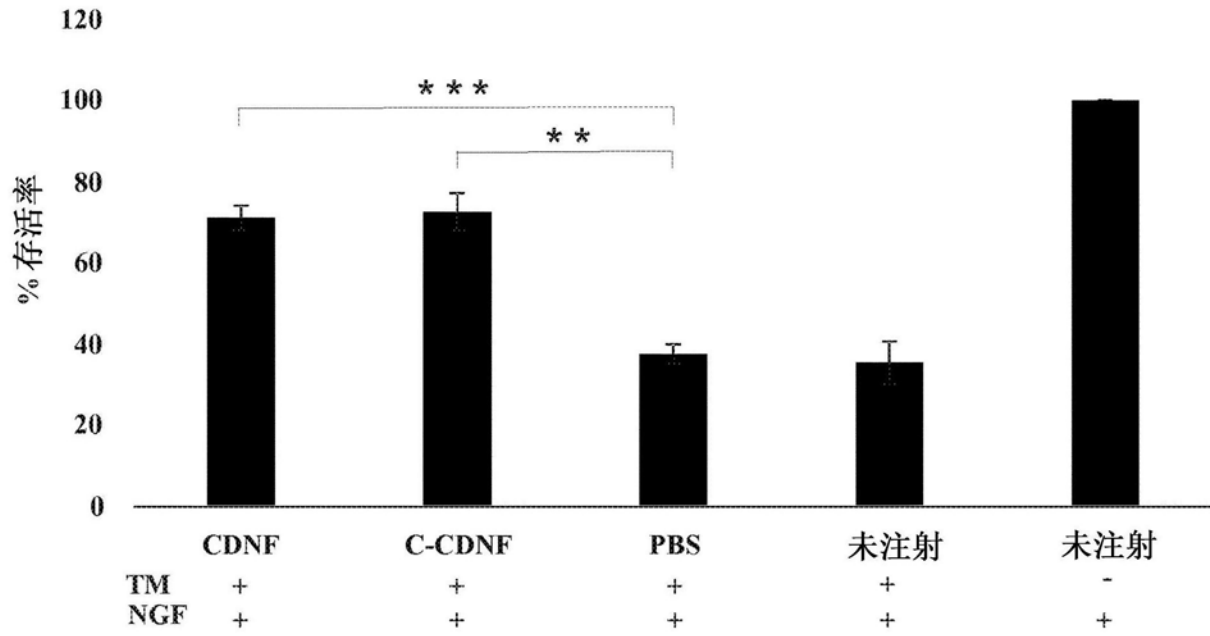
图1A和图1B



	CDNF	C-CDNF	PCR3.1	未注射, TM 2uM	未注射, NGF+
72 小时	59.05	55.90	34.53	30.15	100

	CDNF	C-CDNF
比率	1.96	1.85

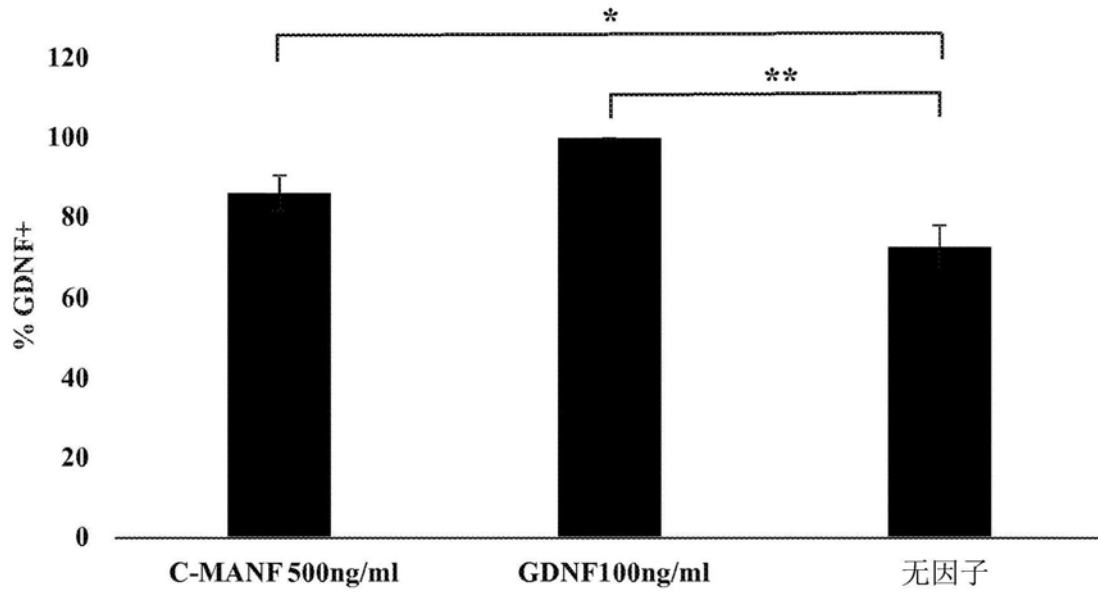
图2



	CDNF(TM+)	C-CDNF(TM+)	PBS (TM+)	未注射, TM+	NGF+
72 小时	68.41	71.00	32.34	29.02	100

	CDNF(TM+)	C-CDNF(TM+)
与 PBS 的比率	2.11	2.20

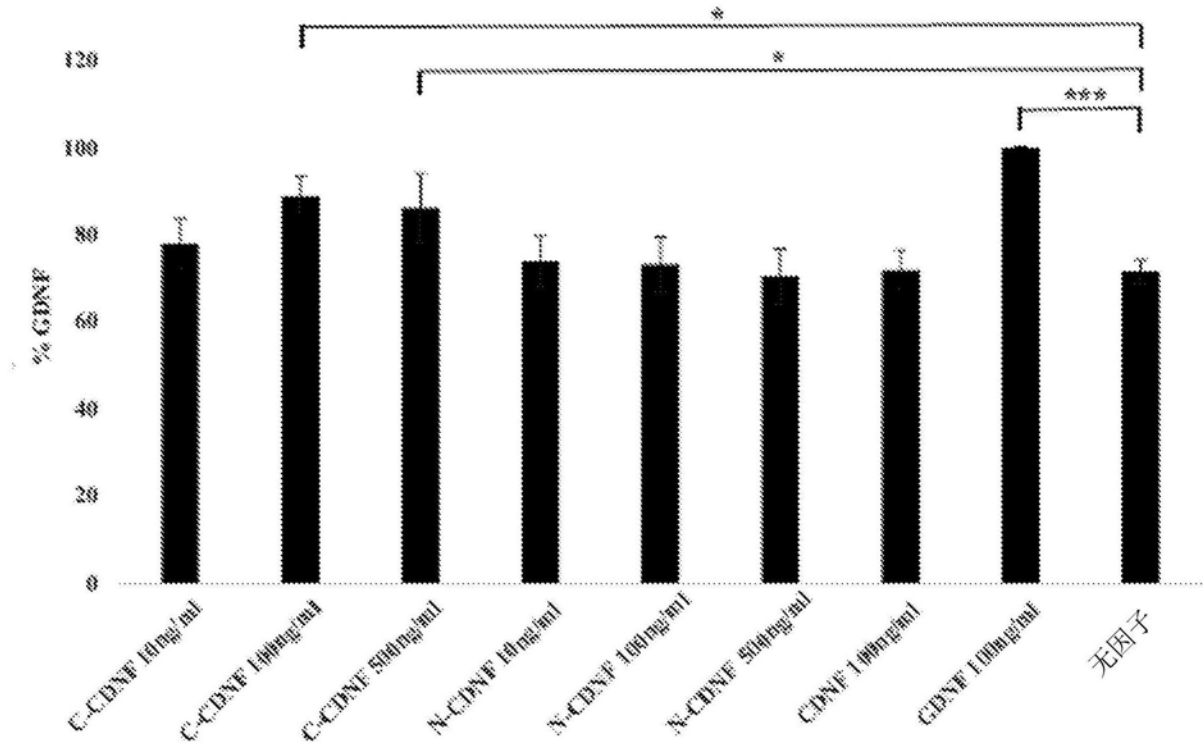
图3



	C-MANF 500	无因子
% GDNF	86.24	72.80

	C-MANF 500
比率	1.18

图4

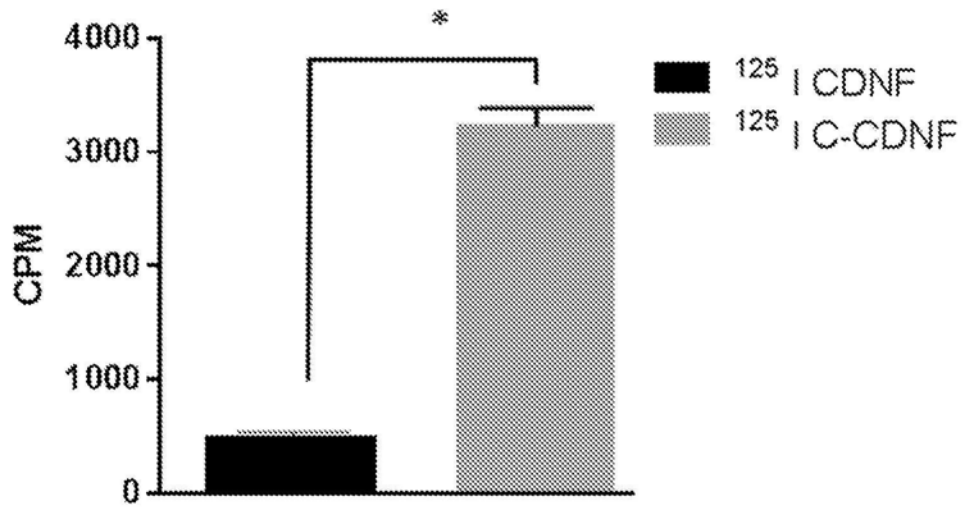


	C-CDNF 10	C-CDNF 100	C-CDNF 500	无因子
% GDNF	77.95	88.97	86.27	71.62

	C-CDNF 10	C-CDNF 100	C-CDNF 500
比率	1.09	1.24	1.20

图5

A



B

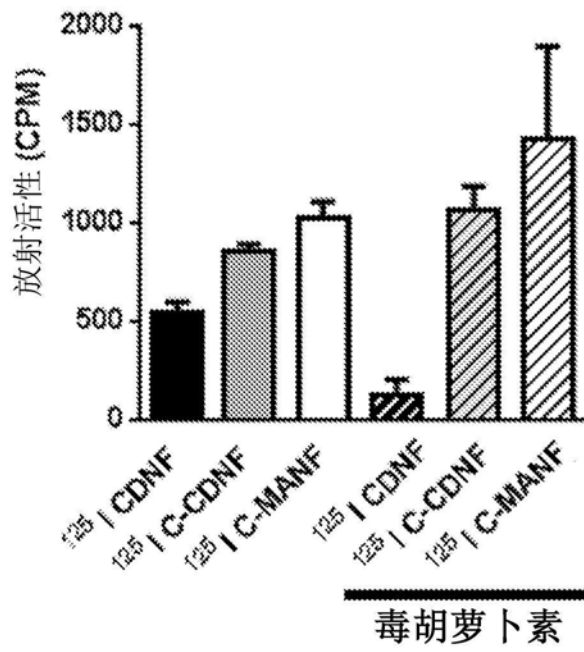


图6A和图6B

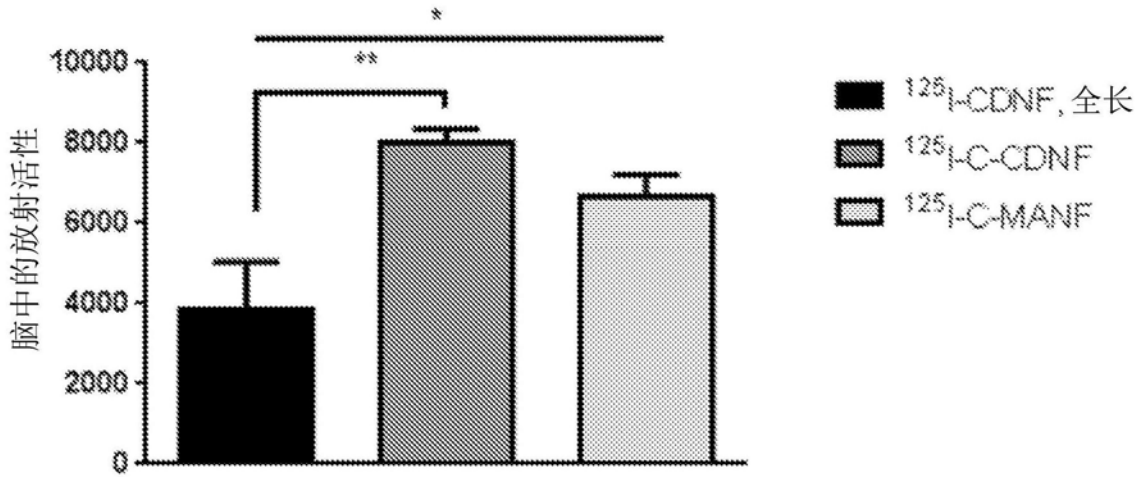


图7

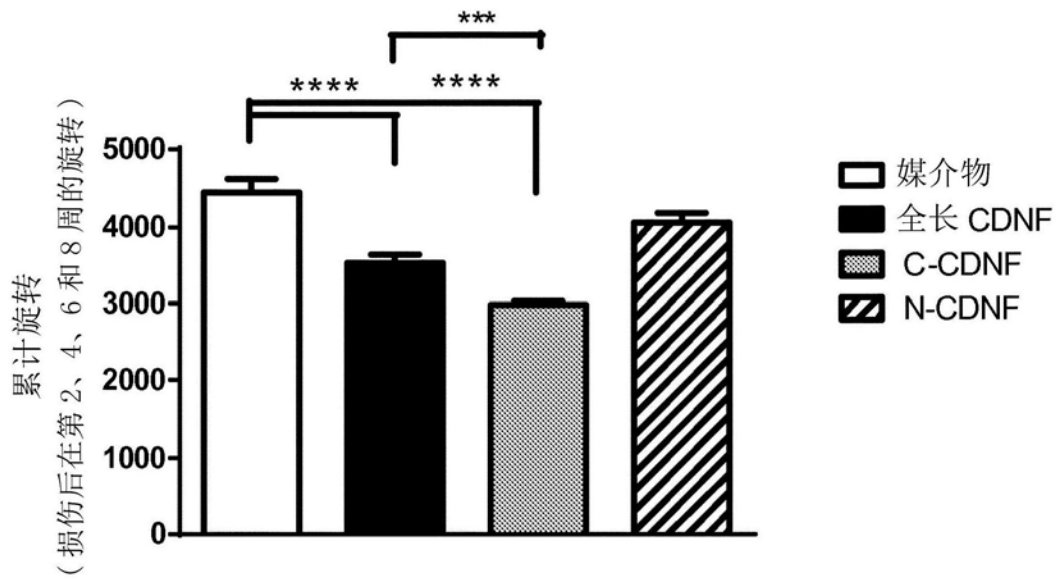
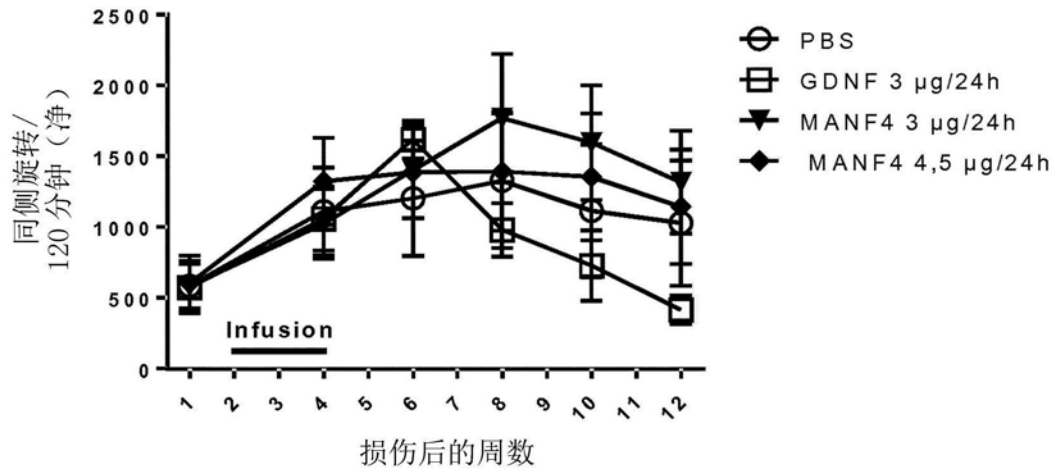


图8

A



B

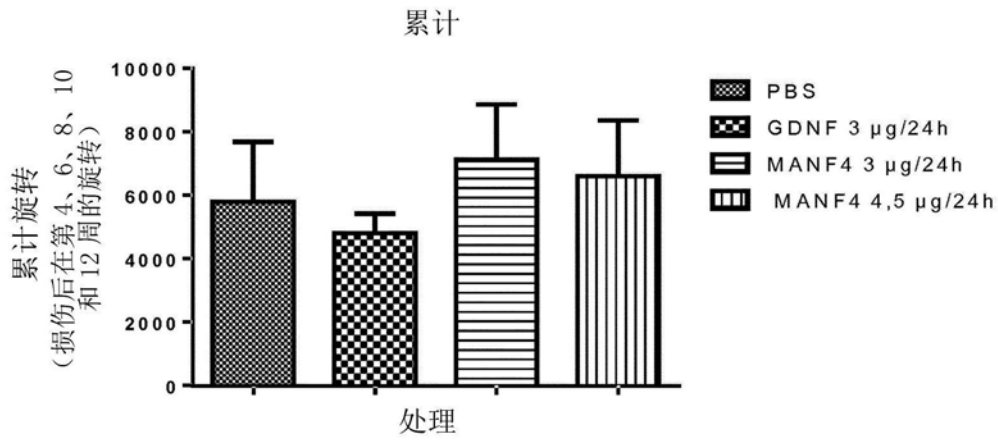


图9A和图9B

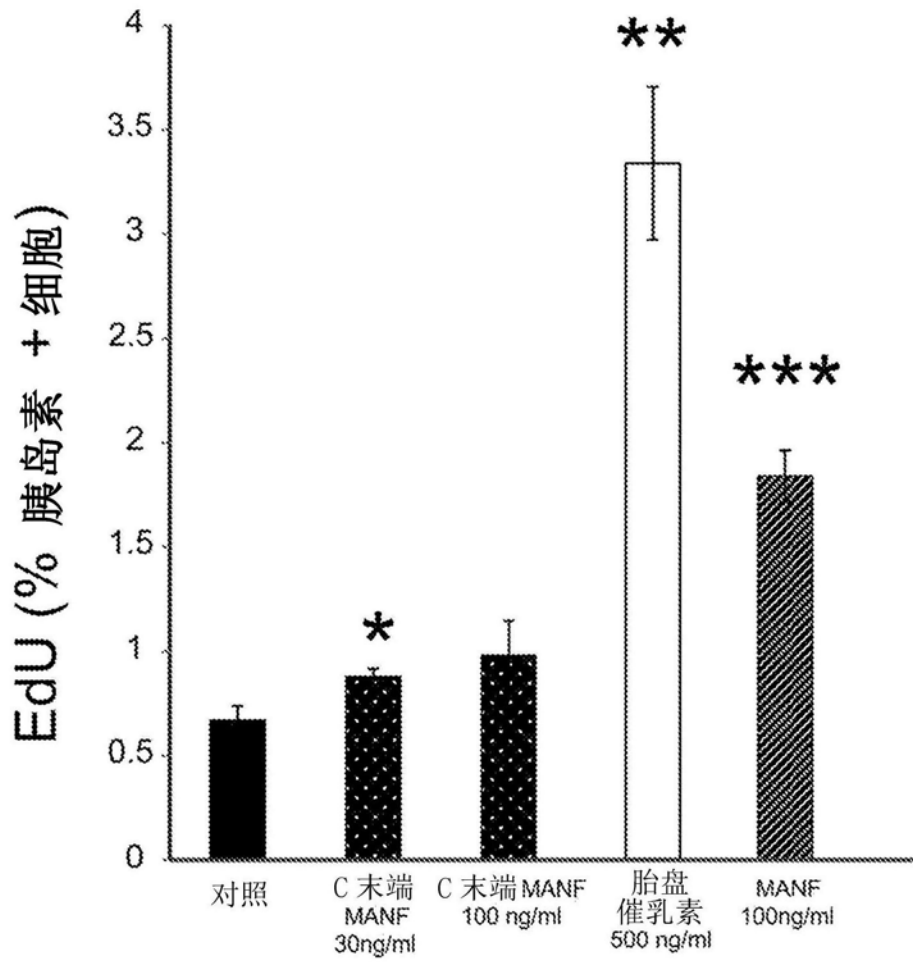
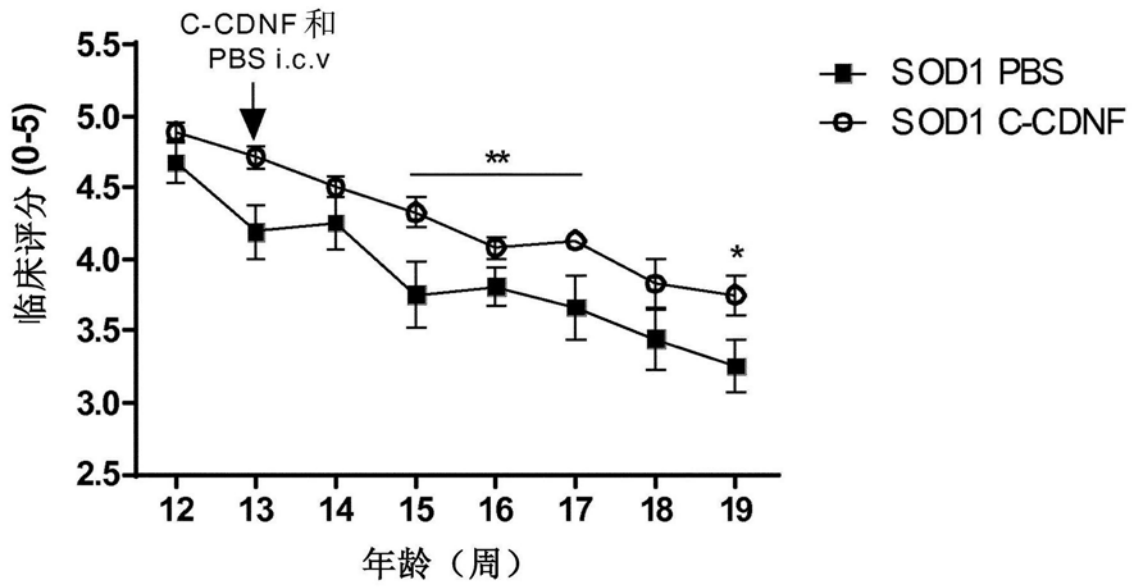


图10

A.



B.

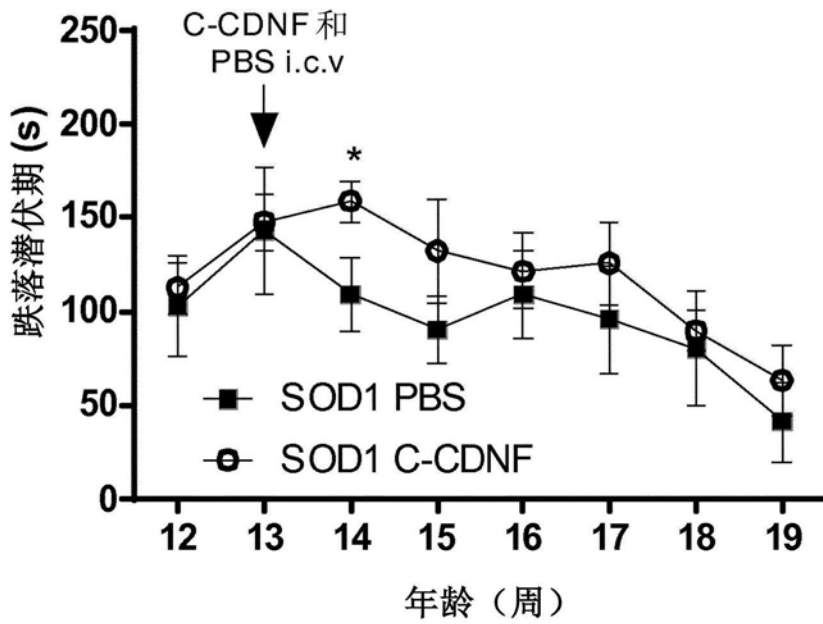


图11A和图11B

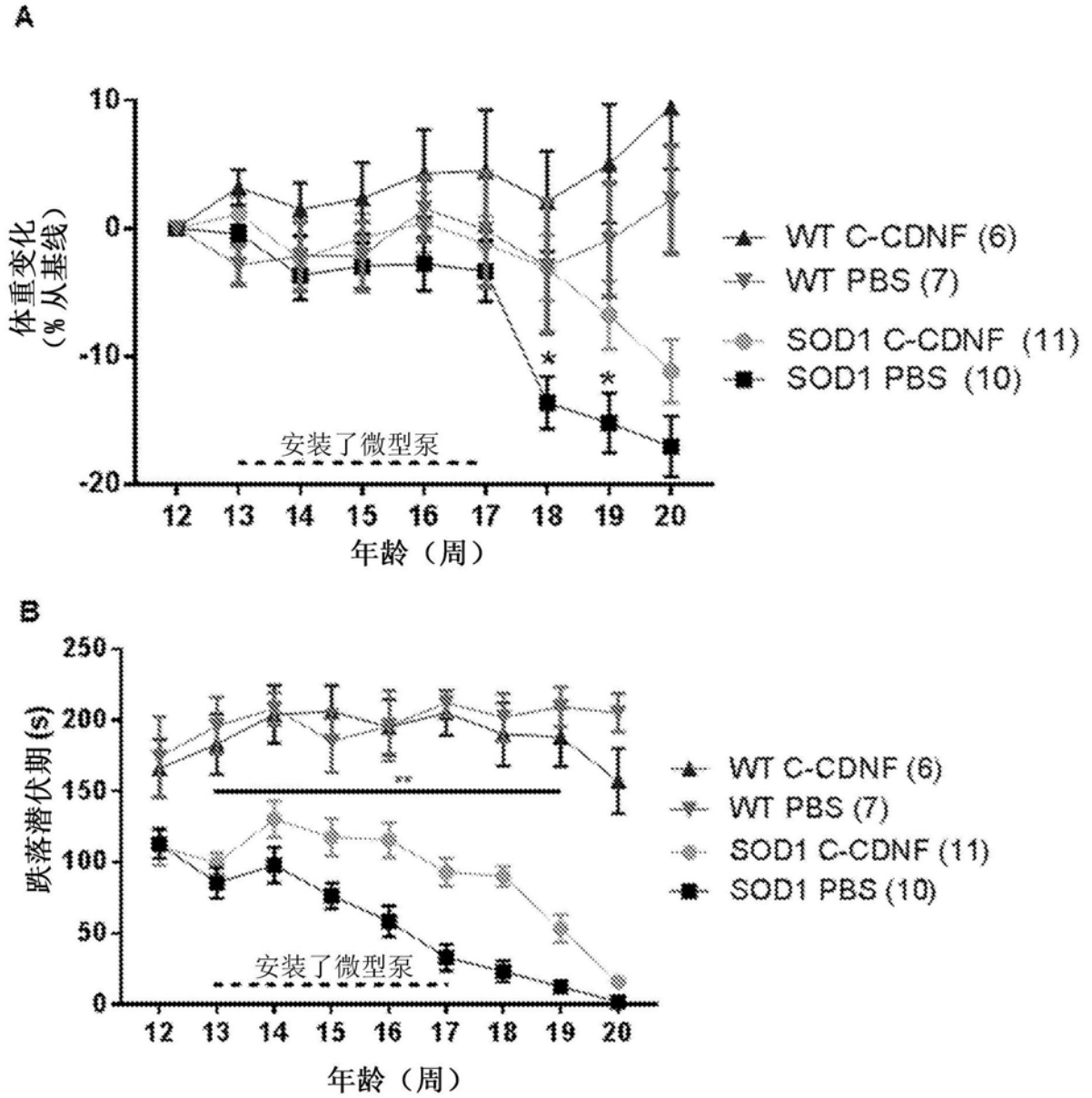


图12A和图12B

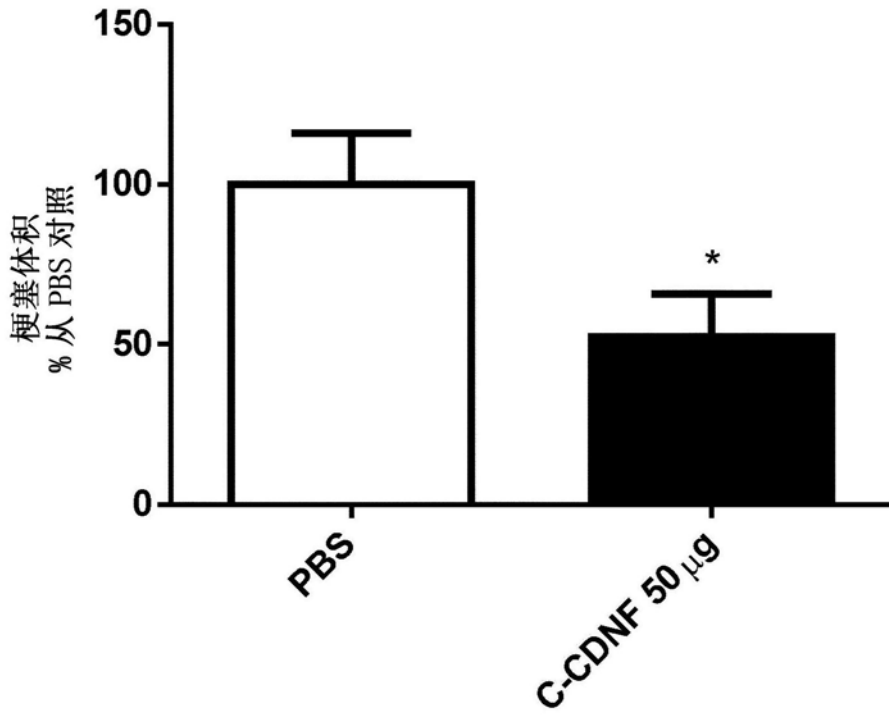


图13

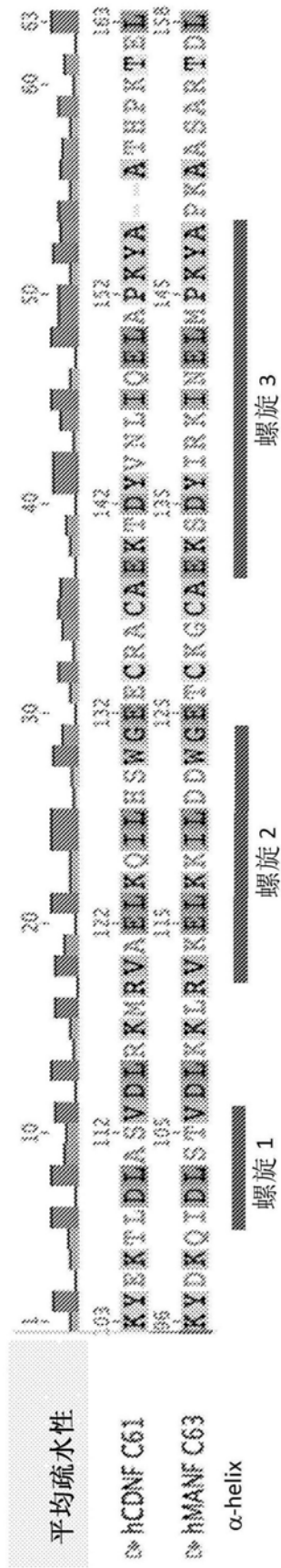


图14

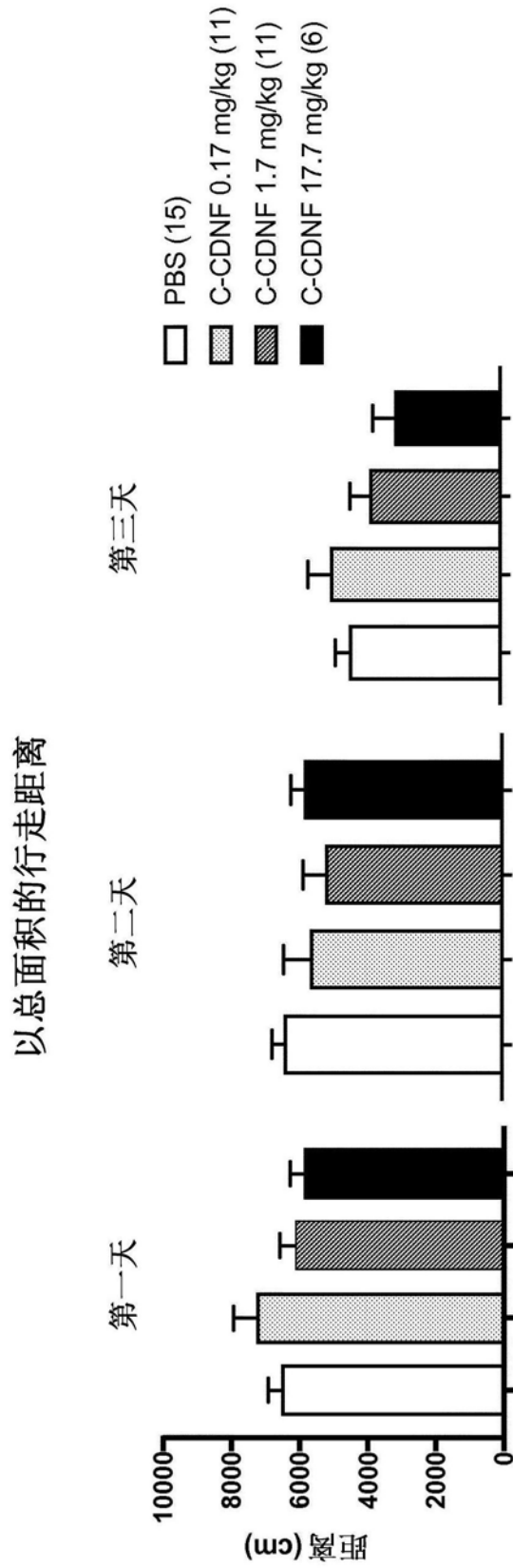
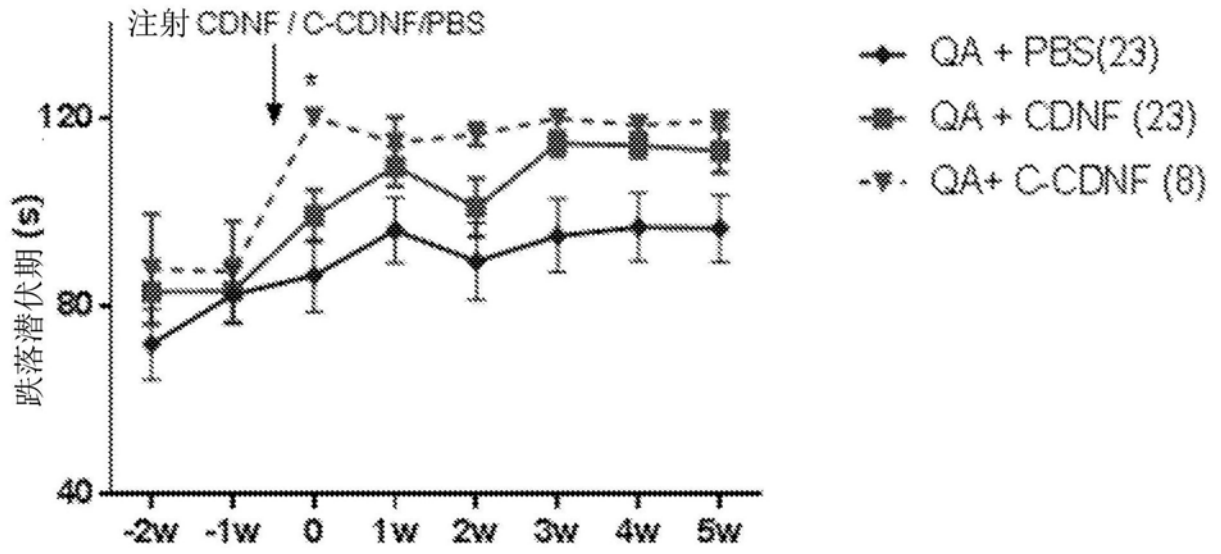


图15

A.



B.

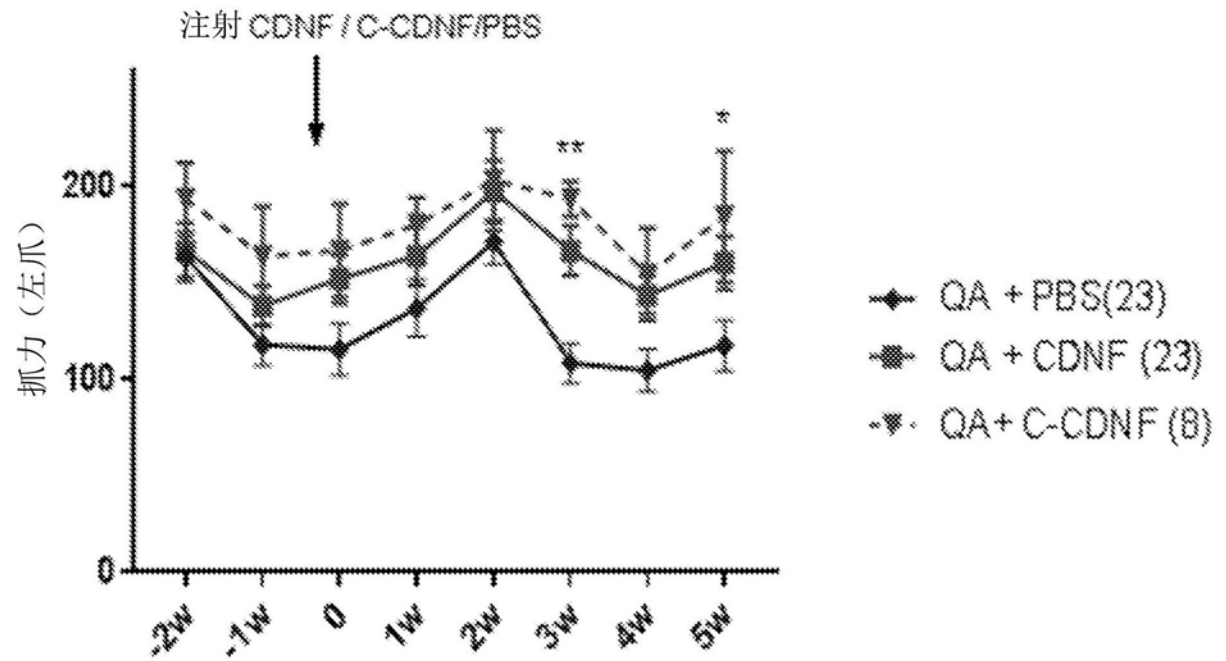


图16A和图16B