

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480006114.1

[51] Int. Cl.

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 4 月 5 日

[11] 公开号 CN 1756838A

[22] 申请日 2004.1.5

[21] 申请号 200480006114.1

[30] 优先权

[32] 2003.1.7 [33] US [31] 60/438,643

[86] 国际申请 PCT/EP2004/000027 2004.1.5

[87] 国际公布 WO2004/061096 英 2004.7.22

[85] 进入国家阶段日期 2005.9.6

[71] 申请人 杰诺瓦有限公司

地址 百慕大群岛(英)哈密尔顿

[72] 发明人 L·布盖勒瑞特 I·屈赞

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 2 页 说明书 98 页 序列表 9 页
附图 1 页

[54] 发明名称

心血管疾病中减少的分泌性多肽种类(来自壳
三糖苷酶的片段)

[57] 摘要

本发明提供了含有氨基酸序列 SEQ ID NO 3-4 的
新的人分泌性多肽。本发明的多肽在心血管疾病
患者的血浆中以降低的水平循环。本发明还提供了
包括所述多肽、编码它们的多核苷酸和对这些多肽
特异的抗体的组合物。还提供了产生这些组合物的
方法,并提供了使用本发明的组合物诊断、预后、
和治疗心血管疾病的方法。

1. 筛选和/或诊断受试者心血管疾病的方法，其包括步骤：

i)检测和/或定量来自所述受试者生物样品中多肽的水平，其中该多肽选自：

a. 含有选自 SEQ ID NO:3-5 的氨基酸序列的多肽；

b. 变体，其相对于 SEQ ID NO:3-5 的氨基酸序列具有至少 95 % 的序列同一性，具有一个或多个氨基酸替代、缺失或插入；和

c. 如上面 i)或者 ii)定义的多肽的片段，其长为至少 10 个氨基酸；以及

ii)比较所述水平与对照样品的水平，

其中所述水平相对于对照的水平降低表明为心血管疾病。

2. 预测受试者心血管疾病的方法，其包括步骤：

i)检测和/或定量来自所述受试者生物样品中多肽的水平，其中该多肽选自：

a. 含有选自 SEQ ID NO:3-5 的氨基酸序列的多肽；

b. 变体，其相对于 SEQ ID NO:3-5 的氨基酸序列具有至少 95 % 的序列同一性，具有一个或多个氨基酸替代、缺失或插入；和

c. 如上面 i)或者 ii)定义的多肽的片段，其长为至少 10 个氨基酸；以及

ii)比较所述水平与对照样品的水平，

其中所述水平相对于对照的水平降低表明具有患心血管疾病的危险。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述心血管疾病为冠状动脉病(CAD)。

4. 权利要求 1 到 3 任一项的方法，其中所述生物样品为血浆。

5. 权利要求 1 到 4 任一项的方法，其中通过质谱法检测和/或定量所述多肽。

6. 权利要求 1 到 4 任一项的方法，其中通过酶联免疫吸附测定法检测和/或定量所述多肽。

7. 分离的多肽, 其含有选自 SEQ ID NOs:3-4 的氨基酸序列。

8. 权利要求 7 的多肽, 其中所述多肽与异源多肽序列融合。

9. 分离的多肽, 其相对于 SEQ ID NO:3-4 的氨基酸序列包含具有一个或多个氨基酸替代、缺失或插入的改变的氨基酸序列, 且相对于 SEQ ID NO:3-4 的氨基酸序列具有至少 95% 的序列同一性。

10. 分离的多肽, 其是权利要求 7 或 9 的多肽的片段, 其长为至少 10 个氨基酸。

11. 组合物, 其含有根据权利要求 7、9 或 10 的多肽, 并进一步含有载体或稀释剂。

12. 权利要求 11 的组合物, 其中所述多肽以有效量存在。

13. 抗心血管疾病血浆多肽(CPP)抗体, 其选择性结合含有选自 SEQ ID NO:3-4 的氨基酸序列的多肽。

14. 将抗体结合至心血管疾病血浆多肽(CPP)的方法, 其包括步骤:

- i) 将权利要求 13 的抗体与生物样品在允许抗体结合的条件下接触; 和
- ii) 除去污染物。

15. 权利要求 14 的方法, 其中所述抗体附着有标记基团。

16. 权利要求 14 的方法, 其中所述样品为人血浆。

17. 鉴定心血管疾病血浆多肽(CPP)调节剂的方法, 其包括步骤:

- i) 将受试化合物与选自 SEQ ID NO:1-5 的多肽在允许至少一种 CPP 生物活性的样品条件下接触;
- ii) 确定所述至少一种 CPP 生物活性的水平;
- iii) 将所述水平与缺少所述受试化合物的对照样品的水平比较; 和
- iv) 选择导致所述水平改变的受试化合物以进一步测试作为心血管疾病的预防性和/或治疗性治疗的 CPP 调节剂。

18. 预防心血管疾病的方法, 其包括对个体施用权利要求 11 或 12 的组合物的步骤。

19. 治疗心血管疾病的方法, 其包括对个体施用权利要求 11 或 12 的组合物的步骤。

20. 权利要求 18 或 19 的方法, 其中通过注射施用所述组合物。

心血管疾病中减少的分泌性多肽种类(来自壳三糖苷酶的片段)

发明领域

本发明涉及这样的分泌性多肽种类，其在患有心血管疾病个体的血浆中不存在，但是存在于没有该疾病的个体的血浆中，还涉及编码此类多肽的分离的多核苷酸、其多态性变体，还涉及所述核酸和其多肽或者组合物在检测测定法中的用途，用于心血管疾病诊断，用于心血管疾病治疗和用于药物开发。

发明背景

心血管疾病是工业化世界的主要健康危险。冠状动脉病(CAD)的特征是动脉粥样硬化或者动脉硬化。动脉粥样硬化是心血管疾病中最普遍的，是心脏病发作、中风和四肢坏疽的主要病因，从而在美国是死亡的主要病因。动脉粥样硬化是一种复杂的疾病，其包括许多细胞类型和分子因素(在例如 Ross, 1993, Nature 362: 801-809 中描述)。在正常情况下，针对动脉壁内皮和平滑肌细胞(SMCs)损害的保护性应答为在炎症之前和伴随着炎症形成纤维脂肪状和纤维状病斑或者斑块。动脉粥样硬化的晚期病斑可以堵塞相关动脉，该晚期病斑是针对多种不同形式的损害的过度炎性-纤维增殖应答导致。血管内皮的损伤或者功能异常是许多病症的普通特征，所述病症使个体倾向于动脉粥样硬化心血管病加速发展。

动脉粥样硬化斑堵塞相关血管并限制血流，导致局部缺血。局部缺血是一种病症，其特征是由于不充分灌流导致器官的组织中氧供应不足。这种不充分灌流可以具有许多天然原因，包括动脉粥样硬化或者再狭窄病变，或者中风。心脏中局部缺血的最常见的原因是心外膜冠状动脉的动脉粥样硬化病。动脉粥样硬化通过减小这些血管的管腔导致基底状态心肌灌流的绝对减少或者当需要增加流量时限制灌流中适当增加。冠状血流也可以受

到动脉血栓块、痉挛和冠状栓塞(罕见)以及梅毒性主动脉炎导致的心门狭窄的限制。先天性异常,如肺动脉的左冠状动脉前降支的异常,可以导致婴儿中心肌缺血和梗死形成,但是该病因在成年人中非常罕见。

如果心肌氧需求异常增加,如由于高血压或者主动脉狭窄导致的严重心室肥大中心肌氧需求异常增加,也可以发生心肌缺血。主动脉狭窄可以导致绞痛,其与冠状动脉粥样硬化导致的绞痛难以区分。如在极严重的贫血或者存在碳氧血红蛋白时血液的氧携带能力降低是心肌缺血的罕见病因。通常,局部缺血的两种或多种病因共存,如由于左心室肥大导致的氧需求增加和冠状动脉粥样硬化继发的氧供应减少。

大量临床研究已经鉴定了增加心血管疾病的危险因素。这些危险因素的一些,如年龄、性别、和家族史不能改变。其他危险因素包括下面的:吸烟、高血压、高脂肪和高胆固醇饮食、糖尿病、缺少锻炼、肥胖和压力。

幸运的是,许多危险因素可以通过生活方式改变而可控制。吸烟者的心血管疾病的危险是不吸烟者的两倍。当人停止吸烟时,不管他或她在过去吸了多少烟,他们患疾病的危险都快速下降。血清胆固醇水平与心血管疾病的发病率直接相关,高血压是重要的危险因素。已经推测身体活动通过多种机理减小患心血管疾病的危险性:它增加心肌氧供应、减少氧需求、和改善心肌收缩和其电脉冲稳定性。氧需求和心肌工作减小反映在休息时心率和血压降低。身体活动还增加冠状动脉直径和膨胀能力,增加侧枝动脉形成,和减小冠状动脉粥样硬化恶化的速度。通过活动减少肥胖和血清脂肪酸。

休息时可能没有可注意到的心血管疾病的症状,但是随着活动增加或者压力,可以发生诸如胸压的症状。可以出现的其他初步病征为烧心、恶心、呕吐、麻木、呼吸急促、大量冷汗、不能解释的疲劳和感觉焦虑。心血管疾病的最严重的症状是胸痛(心绞痛)、心律紊乱(心率不齐)、中风、或者心脏病发作(心肌梗死)。中风和心脏病发作分别由脑和心脏组织中动脉堵塞导致。因为症状不同,所选的测试和治疗可以在患者之间非常不同。

用于确定心血管疾病的程度和严重性的诊断测试包括:心电图

(EKG)、负荷试验、核扫描、冠状血管造影、静止 EKG、EKG 多相信息诊断指数、Holter 监测、晚电位、心电图作图、超声心动图、铀扫描、PET、MRI、CT、血管造影照片和 IVUS。额外的危险因素测量和有用的诊断学是常见的并且可以由医学领域中技术人员最好地应用。根据疾病的严重性，有许多不同的治疗方法。对于许多人，通过改变生活方式和药物可以控制心血管疾病。较严重的诊断指出需要进行手术治疗。

局部缺血性动脉粥样硬化的手术方法包括旁路移植、冠状血管成形术、激光血管成形术、动脉粥样硬化斑切除术 (atherectomy)、动脉内膜切除术、和经皮冠状动脉腔内血管成形术 (PCTA)。使用这些方法后由于再狭窄(其中阻塞复发并且通常变得更坏)导致的失败率非常高(30-50%)。似乎多数再狭窄是由于进一步炎症、平滑肌积累和血栓形成。心血管疾病的其他治疗方法包括在诸如心脏局部缺血和四肢疾病中刺激血管生成和组织重塑的治疗。

多数 CAD 和心血管疾病症状的非特异性使得难以进行确定性诊断。许多定量诊断方法在个体之间和单个个体的读数之间具有易变性。从而，诊断测量必须标准化并且应用于具有详细记载和大量病史的个体。此外，当前的诊断方法通常不能揭示给定观察或者读数的潜在原因。因此，基于特定阳性结果的治疗策略可能不能解决成因问题并且甚至对个体有害。

依赖核苷酸检测的方法包括基因方法和表达图谱。例如，可以使用常规基因型鉴定技术，如测序、基于杂交的技术或者 PCR 筛选公知与心血管疾病有关的基因的突变。在另一实例中，可以通过标准技术，包括 RT-PCR、多种基于杂交的技术，和测序追踪已知基因的表达。这些策略通常不能使得从业人员检测 mRNA 加工和剪接、翻译速度、mRNA 稳定性、和翻译后修饰如蛋白质水解加工、磷酸化、糖基化和酰胺化中的差异。

为了解决本领域当前对于心血管疾病的诊断状态的不足之处，本发明提供了与心血管疾病有关的多肽。本发明提供了多肽种类的身份，所述多肽种类在患有冠状动脉病的个体中检测不到，但是存在于对照血浆中。通过提供实际的多肽种类，揭示了 mRNA 加工和剪接、翻译速度、mRNA

稳定性和翻译后修饰如蛋白质水解加工、磷酸化、糖基化和酰胺化中的差异。从而将本发明的多肽描述为“心血管疾病血浆多肽”或者 CPPs。将这些多肽序列描述为 SEQ ID NO:3-4, 并且所述多肽含有选自表 1 的胰蛋白酶消化肽段的氨基酸序列的至少一种。

本发明公开了“心血管疾病血浆多肽”(CPPs)、CPPs 的片段、和翻译后修饰种类, 它们在从患有冠状动脉病(CAD)的个体所得血浆中减少。本发明的优选片段为如 SEQ ID NOs:3-4 所描述的那些。从而, 本发明的 CPPs 代表重要的诊断工具, 其用于确定 CAD、冠心病(CHD)、外周血管病、脑局部缺血(中风)、充血性心力衰竭、动脉粥样硬化、高血压和其他心血管疾病的危险。CPPs 为分泌因子并且是基于蛋白质疗法的理想候选者。对于临床背景中的剂量调节, 蛋白质疗法较基因疗法更好, 其中所述基因疗法受到缺少可精细调节的表达而产生的限制。此外, 作为分泌性因子, 本发明的多肽种类容易用例如, 小分子或者蛋白质调节剂靶定。从而, 本发明的多肽种类可用于药物开发和设计治疗策略以防止和治疗心血管疾病。

发明概述

本发明涉及与分泌性活性多肽种类有关的组合物, 所述多肽种类尽管存在于正常人血浆中, 但是在患有心血管疾病的个体的血浆中检测不到。这些多肽种类在本文中称作“心血管疾病血浆多肽”, 或者 CPPs。具体地, 本发明的优选 CPPs 为如 SEQ ID NO:3-4 中描述的片段, 并且在本文中称作 CPP6 和 CPP7。组合物包括 CPP 前体、对 CPPs 特异的抗体包括单克隆抗体和从其来源的其他结合组合物。还包括生产和使用这些组合物的方法。本发明的前体包括未经修饰的前体、SEQ ID NOs:1-5 的蛋白质水解前体, 和从 SEQ ID NOs:1-5 的氨基酸序列中备选蛋白质水解位点产生的中间体。

本发明的优选实施方案包括具有翻译后修饰的 CPPs, 所述修饰为诸如磷酸化、糖基化、乙酰化、酰胺化, 或者 C-、N-、或者 O-连接的糖基。

其他优选的为具有导致更高级结构的分子内或者分子间相互作用例如二硫键和氢键的 CPPs。还优选差异 mRNA 加工或者剪接导致的 CPPs。优选地，CPPs 代表翻译后修饰的种类、结构变体或者剪接变体，它们在患有或者有发展为心血管疾病危险的个体的血浆中差别地减少。

另一方面，本发明包括含有与 SEQ ID NOs:3-5 具有至少 95% 相同的序列的 CPPs。优选地，本发明包括含有与选自 SEQ ID NOs:3-5 的任一序列具有至少 97%，更优选至少 98%，更优选至少 99% 同一性的多肽。更优选地，本发明包括含有与 SEQ ID NOs:3-5 具有至少 99% 同一性的序列的多肽。

另一方面，本发明包括 CPPs 的天然变体，其在所选群体中的频率为至少 2%。更优选地，这种天然变体在所选群体中的频率为至少 5%，更优选至少 10%。最优选地，这种天然变体在所选群体中频率为至少 20%。所选群体可以是群体遗传学领域中任何公认的研究群体。优选地，所选群体为高加索人、黑人或者亚洲人。更优选地，所选群体为法国人、德国人、英国人、西班牙人、瑞士人、日本人、中国人、爱尔兰人、韩国人、新加坡人、冰岛人、北美人、以色列人、阿拉伯人、土耳其人、希腊人、意大利人、波兰人、太平洋岛上居民、芬兰人、挪威人、瑞典人、爱沙尼亚人、奥地利人，或者印第安人。更候选的，所选群体为冰岛人、萨米人、芬兰人、白种人祖先的法国人、瑞士人、中国人祖先的新加坡人、韩国人、日本人、魁北克人、北美比马棉印第安人、宾夕法尼亚系安曼教派人和安曼教派门诺派教徒、纽芬兰人，或玻里尼西亚人。

本发明的优选方面提供了含有分离的 CPP 的组合物，即不含与 CPP 显著不同的等电点或者显著不同的表观分子量的蛋白质或者蛋白质同种型的 CPP。CPP 的等电点和分子量可以通过基于亲和和大小的分离层析、二维凝胶分析和质谱表示。

在优选的方面，本发明提供了具体多肽种类，其含有选自 SEQ ID NOs:3-5 的氨基酸序列。优选地，具体多肽种类还含有连续氨基酸序列，其来自选自 SEQ ID NOs:1 和 2 的合适的全长序列。优选种类为这样的多

肽, 其 i) 含有选自 SEQ ID NOs:3-5 的氨基酸序列; ii) 在没有心血管疾病的对照个体的血浆中以较高水平出现; 和 iii) 从选自 SEQ ID NOs:1 和 2 的全长多肽序列的蛋白质水解加工产生。尤其优选的多肽为 CPP6 (SEQ ID NO:3) 和 CPP 7 (SEQ ID NO:4)。

在另一方面, 本发明包括经修饰的 CPPs。这些修饰包括保护/封闭基团, 与抗体分子或其他细胞配体的连接, 和可检测标记, 如酶、荧光、同位素或者亲和标记, 所述标记允许检测和分离蛋白质。可通过公知的技术实施化学修饰, 这些技术包括但不限于, 通过溴化氰的特异化学切割、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、木瓜蛋白酶、V8 蛋白酶、 NaBH_4 、乙酰化、甲酰化、氧化、还原, 或者衣霉素存在时代谢合成。

本发明还提供了本发明多肽的化学修饰的衍生物, 其可以提供额外的优点, 如多肽的增加的溶解度、稳定性和循环时间, 或者减小的免疫原性(例如, 水溶性聚合物, 如聚乙二醇、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇)。CPPs 在分子内的随机位置, 或者该分子内的预定位置得到修饰, 并且可以包括 1、2、3 或多个附着的化学分子。

在另一实施方案中, 本发明提供了鉴定至少一种 CPP 生物活性的调节剂的方法, 其包括步骤: i) 将 CPP 生物活性的受试调节剂与含有选自 SEQ ID NOs:1-5 的氨基酸序列的多肽接触; ii) 检测所述 CPP 生物活性的水平; 和 iii) 比较所述 CPP 生物活性的水平与缺少所述受试调节剂的对照样品的水平。如果 CPP 蛋白质生物活性水平的不同为水平降低, 则受试调节剂为至少一种 CPP 生物活性的抑制剂。当 CPP 生物活性的水平的不同为水平增加时, 受试物质为至少一种 CPP 生物活性的激活剂。

另一方面, 本发明包括编码本发明 CPP 的多核苷酸、编码具有选自 SEQ ID NOs:1-5 氨基酸序列的多肽的多核苷酸、与这些序列互补的反义寡核苷酸、与诊断和分析测定法 (例如, PCR、基于杂交的技术) 的 CPP 基因序列互补的寡核苷酸, 和表达 CPPs 的载体。

另一方面, 本发明提供了含有编码 CPP 的 DNA 的载体。本发明还包括含有这种载体的宿主细胞和转基因非人动物。还提供了生产 CPP 或者

CPP 前体的方法。一种优选方法包括步骤:(a)提供含有如上文公开的表达载体的宿主细胞; (b)在所述 DNA 片段表达的条件下培养宿主细胞; 和(c)回收该 DNA 片段编码的蛋白质。另一种优选方法包括步骤:(a)提供能够表达 CPP 的宿主细胞; (b)在允许所述 CPP 表达的条件下培养所述宿主细胞; 和(c)回收所述 CPP。在一个实施方案中, 表达载体还含有与所述 DNA 片段有效连接的分泌信号序列, 细胞将该蛋白质分泌到细胞培养基, 从该培养基回收所述蛋白质。生产 CPP 的一种尤其优选的方法包括化学合成, 使用标准的肽合成技术, 如题为“CPP 组合物的化学生产”的章节和实施例 3 中所描述。

另一方面, 本发明包括分离的抗体, 其对上述任何多肽、肽片段或者肽特异。优选地, 本发明的抗体是单克隆抗体。还优选仅结合 CPP 的抗体, 即, 不识别其他多肽, 例如, 不识别那些非来源于选自 SEQ ID NOs:1-5 的多肽。抗-CPP 抗体具有纯化、诊断和治疗应用, 尤其用于治疗 CPP 相关疾病。优选的用于纯化和诊断的抗-CPP 抗体连接有标记基团。所诊断的优选的 CPP 相关疾病包括冠状动脉病(CAD)、冠心病(CHD)、外周血管病、脑局部缺血(中风)、充血性心力衰竭、动脉粥样硬化、高血压和其他心血管疾病。治疗和诊断方法包括, 但不限于, 使用对 CPPs 抗原特异的抗体或者抗体来源的组合物的那些方法。用以检测特定组织样品和生物学液体(优选血浆), 和用于检测组织中 CPPs 的表达水平的诊断方法也构成本发明的部分。含有一种或多种上述抗体, 以及可药用载体的组合物也在本发明范围内。

本发明还提供了诊断心血管疾病的方法, 其包括检测体液优选血浆的样品中本文所公开的至少一种 CPP 或者其任何组合的存在或者水平。这些方法也适于临床筛选、预后、监视治疗结果, 鉴定最可能应答特定治疗性治疗的患者, 药物筛选和开发, 和鉴定药物治疗的新靶标。

本发明提供了试剂盒, 其可以用于上述方法中并且可以含有单一或者多种制剂, 或者抗体, 以及其他试剂、标记基团、底物, 如果需要, 还包括用法说明。该试剂盒可用于诊断疾病, 或者可以在测定法中鉴定新的诊

断剂和/或治疗剂。

在一个实施方案中,通过至少一种症状的出现定义冠状动脉病(CAD)。这些症状随着疾病的发展变得更严重。CAD 通常伴随着左心室能力或者输出减小。早期 CAD 症状包括胆固醇和低密度脂蛋白(特别是氧化形式)的血浆水平升高,以及富含血小板的血浆聚集。血管内皮应答炎症从而形成斑块并且炎性和血纤蛋白原因子的水平增加。此外,CAD 或者动脉粥样硬化的特征是血管钙化和动脉硬化。所导致的血管的部分堵塞导致高血压和缺血性心脏病。最终全部血管堵塞导致心力衰竭、中风,或者坏疽。

在优选实施方案中,检测到本发明的至少一种 CPP 的血浆水平降低表明个体患 CAD 的危险增加。优选地,所述检测表明个体患 CAD 的可能性增加至少 1.05 倍、1.1 倍、1.15 倍,和更优选地至少 1.2 倍。备选地,检测到本发明的至少一种 CPP 的血浆水平降低表明该个体患有 CAD。个体血浆样品中观察到的 CPP 减少的量与对照样品比较将与 CAD 的预测或预后的确定性相关。由于个体血浆 CPP 水平将依赖于家族史和其他危险因素而不同,所以优选基于每一病例检查每种血浆 CPP 水平。在优选实施方案中,通过本发明方法检测人血浆样品中的 CPP。特别优选的技术是质谱和免疫检测。优选地,CAD 的预测或者诊断基于与对照相比实验 CPP 水平至少降低 1.1-、1.15-、1.2-、1.25-倍,和更优选地,降低 1.5 倍。

本发明还包括使用 CPP 组合物治疗个体中与 SEQ ID NOs:3-4 的 CPPs 的异常表达或加工有关的疾病的方法。优选的 CPP 相关疾病包括冠状动脉病(CAD)、冠心病(CHD)、外周血管病、脑局部缺血(中风)、充血性心力衰竭、动脉粥样硬化、高血压和其他心血管疾病。还包括使用 CPP 组合物,包括与 CPP 基因和/或信使 RNA 互补的引物和抗 CPP 抗体,用以检测和测量组织和生物学体液优选血浆中 CPPs 的量的方法。本发明还包括筛选增加 CPPs 表达的化合物方法,以及筛选与 CPPs 相互作用和/或增加其活性的化合物方法。本发明还包括筛选抑制 CPPs 的表达的化合物的方法,以及筛选与 CPPs 相互作用和/或抑制其活性的化合物方法。本发明还包括因而鉴定的化合物,以及其组合物。

再一方面,本发明包括药物组合物和制剂,它们含有具有选自 SEQ ID NOs:1-5 的氨基酸序列的多肽,和可药用载体化合物。

在说明书和权利要求书中还描述了本发明的其他方面。

序列表简述

SEQ ID NO:1 代表全长壳三糖苷酶(SwissProt Q13231)的氨基酸序列。

SEQ ID NO:2 代表成熟壳三糖苷酶多肽的氨基酸序列。

SEQ ID NO:3 和 4 是患有冠状动脉病的个体的血浆中不存在或者减少的血浆蛋白质的氨基酸序列,它们在本文中分别称作 CPP6 和 CPP7。

SEQ ID NO:5 描述通过 MS-MS 和/或 MS-MALDI 质谱在没有冠状动脉病的个体的血浆样品中发现的胰蛋白酶消化肽段的氨基酸序列。

表格简述

表 1 列出了在没有冠状动脉病(CAD)的对照个体的分级分离血浆中发现并且不存在于 CAD 患者血浆中的胰蛋白酶消化肽段。根据本文实施例 1 步骤 3 中描述的方案,标记的 CEX 栏表明在 18 种阳离子交换级分中胰蛋白酶消化肽段所洗脱至的级分,标记的盐栏表明洗脱这些级分的 NaCl 浓度。根据本文实施例 1 步骤 4 中描述的方案,RP1 指反相级分(级分 1-30),%B 表明这些级分的洗脱缓冲液的百分数。第二种反向级分(级分 1-24)表示为运行号(Run Number)的最后两位数。

附图简述

图 1 显示了人壳三糖苷酶前蛋白质的序列(SEQ ID NO:1)、成熟壳三糖苷酶多肽序列(SEQ ID NO:2)、和心血管疾病血浆多肽 6-7 的序列(SEQ ID NOs:3-4)。通过串联质谱在对照血浆样品中观察到的胰蛋白酶消化肽段以粗体表示并且阐明为 SEQ ID NO:5。信号序列以下划线标出。二碱基蛋白质水解切割位点通过斜体和下划线字母表示。所得加工肽 CPP 6-7 的氨基酸序列 (SEQ ID NOs:3-4)在下面列出。以粗体和下划线显示该蛋白质的

推定活性位点(Boot, R.G.等人, J. Biol. Chem., (1995), 270, 26252-56 页)。

发明详述

下文详细描述的本发明提供了有用的方法、组合物和试剂盒,它们用于筛选、诊断和治疗哺乳动物个体的心血管疾病;鉴定最可能应答特定治疗性治疗的个体;监视心血管疾病治疗的结果;筛选 CPP 调节剂;和药物开发。当本发明用于药物开发,例如,确定 CPP 调节剂或者候选药物诱导抗心血管疾病应答的能力时,用于分析至少一种 CPP 的体液优选来自非人哺乳动物。非人哺乳动物优选为这样的非人哺乳动物,其中通过内源和/或外源试剂对抗心血管疾病应答的诱导可以预测这种应答在人体中的诱导。啮齿类动物(小鼠、大鼠等等)和灵长类动物尤其适宜用于本发明的该方面。本发明还包括对哺乳动物个体施用治疗性组合物以治疗或预防心血管疾病。哺乳动物个体可以是非人哺乳动物,但是优选为人,更优选成年人。为了阐明本公开,并且不用于限制,本发明将通过血浆样品的分析来描述。然而,本领域技术人员可以理解下面描述的测定法和技术可应用于来自处于心血管疾病危险中或者患有心血管疾病的个体的其他生物学体液样品(例如,脑脊液、淋巴、胆汁、血清、唾液或者尿)或者组织样品。本发明的方法和组合物可用于筛选、诊断和预后活的个体,但是也可用于个体的死后诊断,例如,用以鉴定处于患相同疾病危险的家族成员。

定义

本文中所用术语“核酸”和“核酸分子”旨在包括 DNA 分子(例如, cDNA 或者基因组 DNA)和 RNA 分子(例如, mRNA)和用核苷酸类似物产生的 DNA 或 RNA 的类似物。核酸分子可以是单链或者双链的,但是优选双链 DNA。在本说明书全文中,表述“核苷酸序列”可用于无差别地表示多核苷酸或者核酸。更确切地,表述“核苷酸序列”包括核酸物质自身,从而不限于通过生物化学表征特定 DNA 或者 RNA 分子的序列信息(即,选自四个碱基字母的连续字母)。而且,本文中可以互换使用术语“核酸”、

“寡核苷酸”，和“多核苷酸”。

“分离的”核酸分子是与存在于该核酸的天然来源的其他核酸分子分开的核酸分子。优选地，“分离的”核酸没有该核酸所来源的生物的基因组 DNA 中在天然存在于该核酸侧翼的序列(即，位于该核酸 5'和 3'末端的序列)。例如，在多种实施方案中分离的 CPP 核酸分子可以含有小于约 5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb 或 0.1 kb 核苷酸序列，该核苷酸序列天然位于所述核酸所来源细胞的基因组 DNA 中该核酸分子的侧翼。此外，“分离的”核酸分子，如 cDNA 分子，当通过重组技术产生时可以基本上没有其他细胞材料，或者培养基，或者当化学合成时基本上没有化学前体或者其他化学品。使用标准分子生物学技术和本文中提供的序列信息可以分离本发明的核酸分子。使用核酸的全部或者部分作为杂交探针，利用标准杂交和克隆技术(例如 Sambrook, J., Fritsh, E. F., 和 Maniatis, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 中描述的)可用于分离 CPP 核酸分子。

本文中所用术语“杂交”旨在描述适度严格性或者高严格性杂交条件，优选其中杂交和洗涤条件允许相互至少 60% 同源的核苷酸序列以保持相互杂交。优选地，条件使得相互至少约 70%，更优选至少约 80%，甚至至少约 85%、90%、95%或 98%同源的序列通常保持相互杂交。严格条件是本领域中技术人员公知的并且可以在 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 中找到。在优选的、非限制性实例中，核酸相互作用的严格杂交条件如下：在 65℃，存在 6 × SSC 缓冲液，5 × Denhardt 溶液，0.5% SDS，和 100 μg/ml 鲑精 DNA 时实现杂交步骤。通过四个洗涤步骤实现杂交步骤：

- 两次 5 分钟洗涤，优选 65℃，2 × SSC 和 0.1% SDS 缓冲液；
- 一次 30 分钟洗涤，优选 65℃，2 × SSC 和 0.1% SDS 缓冲液；
- 一次 10 分钟洗涤，优选 65℃，0.1 × SSC 和 0.1% SDS 缓冲液；

这些杂交条件适于长约 20 个核苷酸的核酸分子。可以理解能根据目的核酸

长度调整上述杂交条件,按照本领域中熟知的技术,例如,根据 Hames B.D. 和 Higgins S.J. (1985) *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*. Hames 和 Higgins 编者, IRL Press, Oxford; 和 *Current Protocols in Molecular Biology* (如前)中公开的教导进行调整。

“百分同源性”在本文中用于指核酸序列和氨基酸序列。本文中所用氨基酸或核酸“同一性”等价于氨基酸或核酸“同源性”。为了确定两种氨基酸或者两种核酸的百分同源性,将序列为了最佳比较目的进行比对(例如,可以在第一种氨基酸或者核酸序列的序列中导入缺口以与另一种氨基酸或者核酸序列最佳比对,并且为了比较目的,可以不理睬非同源序列)。为了比较目的所比对的参比序列的长度为该参比序列长度的至少 30%,优选至少 40%,更优选至少 50%,甚至更优选至少 60%,甚至更优选至少 70%、80%、90%或 95%。然后比较相应氨基酸位置或者核苷酸位置上的氨基酸残基或者核苷酸。当第一种序列中的位置被第二种序列中相应位置上相同氨基酸残基或者核苷酸占据时,这两种分子在该位置上同源。两种序列的百分同源性为这些序列共有的相同位置数的函数(即, %同源性=相同位置数/总位置数 $\times$ 100)。

可以用数学算法实现两种序列之间序列比较和百分同源性确定。用于序列比较的数学算法的一个优选的、非限制性实例为 Karlin 和 Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-68 的算法,其在 Karlin 和 Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-77 中得到改进,将这些文献的公开完整并入本文作为参考。这种算法被整合到 Altschul,和(1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10 的 NBLAST 和 XBLAST 程序(2.0 版)中。可以用 NBLAST 程序,分值=100,字长=12 实施 BLAST 核苷酸搜索得到与本发明的序列同源的核苷酸序列。可以用 XBLAST 程序,分值=50,字长=3 实施 BLAST 蛋白质搜索得到与本发明的多肽序列同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的缺口比对,可以使用 Altschul 等人,(1997) *Nucleic Acids Research* 25(17):3389-3402 中描述的带缺口的 BLAST。当利用 BLAST 和带缺口的 BLAST 程序时,可以使用各自程序(例如, XBLAST

和 NBLAST)的默认参数。见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>，将其公开完整并入本文作为参考。用于序列比较的数学算法的另一个优选的、非限制性实例为 Myers 和 Miller, CABIOS (1989)的算法，将其公开完整并入本文作为参考。这种算法整合到 ALIGN 程序(2.0 版)，其中所述 ALIGN 程序(2.0 版)是 GCG 序列比较软件包的一部分。当利用 ALIGN 程序比较氨基酸序列时，可以使用 PAM120 权重残基表，缺口长度罚分为 12，且缺口罚分为 4。

术语“多肽”指氨基酸的聚合物，不考虑该聚合物的长度；从而，多肽的定义包括肽、寡肽，和蛋白质。该术语还不限定或者排除多肽的翻译后修饰，例如，术语多肽明显包括含有共价连接糖基、乙酰基、磷酸、酰胺、脂质、羧基、酰基或者糖基的多肽。该定义还包括含有氨基酸的一种或多种类似物(包括，例如，非天然存在的氨基酸、仅在不相关生物系统中天然存在的氨基酸，来自哺乳动物系统的修饰氨基酸，等等)的多肽、具有取代连接以及本领域中公知的天然存在和非天然存在的其他修饰的多肽。

本文中所述术语“蛋白质”可以与术语“多肽”同义使用或者还可以指通过不同于肽键的键连接的两种或多种多肽的复合体，例如，组成蛋白质的这些多肽可以通过二硫键连接。术语“蛋白质”也可以包括具有相同氨基酸序列但是不同翻译后修饰，尤其当这些蛋白质在真核宿主中表达时可以加入的翻译后修饰的多肽家族。

“分离的”或者“纯化的”蛋白质或者其生物活性部分基本上无细胞材料或者来自本发明蛋白质(即，CPP 或者其生物活性片段)所来源的细胞或者组织的其他污染性蛋白质，或者当化学合成时基本上无化学前体或者其他化学品。术语“基本上无细胞材料”包括这样的本发明蛋白质制备物，其中蛋白质与其从中分离或者重组产生的细胞的细胞组分分离。在一个实施方案中，术语“基本上无细胞材料”包括这样的本发明蛋白质制备物，其中不同于本发明蛋白质的蛋白质(也称作“污染性蛋白质”)小于约 30%(按干重计)，更优选不同于本发明蛋白质的蛋白质小于约 20%，更优选不同于本发明蛋白质的蛋白质小于约 10%，最优选不同于本发明蛋白质的蛋白

质小于约 5%。当重组产生本发明的蛋白质或者其生物活性部分时，还优选该蛋白质或者其生物活性部分基本上无培养基，即，培养基小于蛋白质制备物体积的约 20%，更优选小于约 10%，最优选小于约 5%。

术语“基本上无化学前体或者其他化学品”包括这样的本发明蛋白质制剂，其中该蛋白质与参与该蛋白质的合成的化学前体或者其他化学品分离。在另一实施方案中，术语“基本上无化学前体或者其他化学品”包括这样的本发明蛋白质制剂，其中含有少于约 30% (按干重计) 化学前体或者非蛋白质化学品，更优选少于约 20% 化学前体或者非蛋白质化学品，更优选少于约 10% 化学前体或者非蛋白质化学品，最优选少于约 5% 化学前体或者非蛋白质化学品。

术语“重组多肽”在本文中用于指这样的多肽，其已经人工设计并且含有至少两种多肽序列，未发现这两种多肽序列在它们最初的天然环境中为相邻的多肽序列，或者指自重组多核苷酸表达的多肽。

术语“心血管疾病血浆多肽”或者“CPP”指含有 SEQ ID NOs:3-5 任一个，优选含有 SEQ ID NO:5 的多肽序列的多肽。这种多肽可以如本文中描述的受到翻译后修饰。CPPs 还可以含有导致复杂二级或三级结构的其他结构或者化学修饰，如二硫键或者氨基酸侧链相互作用，如氢键和酰胺键。CPPs 还包括突变多肽，如缺失、添加、交换、或者截短突变体、含有这类多肽的融合多肽，和选自 SEQ ID NOs:3-5 序列的至少 3 个，但是优选 8、10、12、15、或 21 个连续氨基酸的多肽片段。还包括选自 SEQ ID NOs:1-5 序列的 CPP 蛋白质水解前体和中间体。本发明体现了 CPP 基因或者 CPP mRNA 种类优选人 CPP 基因和 mRNA 种类的核酸序列编码的多肽，包括分离的 CPPs，其由、基本上由 SEQ ID NOs:1-5 的任一个的序列组成，或者含有 SEQ ID NOs:1-5 的任一个的序列。优选的 CPPs 具有含有序列 SEQ ID NOs:3-5 的序列。优选的 CPPs 保留 SEQ ID NOs:3-4 的 CPPs 的至少一种生物活性。

本文中所用术语“生物活性”指由 CPP 实施的任何功能。这些功能包括但不限于：(1) 保护免于心血管疾病；(2) 通过血流循环；(3) 抗原性，或

者结合抗-CPP 特异抗体的能力；(4)免疫原性，或者产生抗-CPP 特异抗体的能力；或者(5)与 CPP 靶分子优选蛋白质相互作用。

本文中所用的“CPP 调节剂”或者“CPP 6 调节剂”或者“CPP7 调节剂”为能够调节(即，增加或减小)本发明的 CPPs 的表达或生物活性的分子(例如，多核苷酸、多肽、小分子，或者抗体)。增强 CPP 表达或活性的 CPP 调节剂描述为 CPP 活化剂或者激动剂。相反地，抑制 CPP 表达或者活性的 CPP 调节剂描述为 CPP 抑制剂或者拮抗剂。优选地，CPP 调节剂增加/减小表达或者活性至少 5、10 或 20%。CPP 抑制剂包括抗-CPP 抗体、其片段、反义多核苷酸，和通过如本文中描述的筛选方法鉴定的分子。CPP 激动剂包括多核苷酸表达载体和通过如本文中描述的筛选方法鉴定的分子。

“CPP 相关疾病”或者“CPP 相关病症”描述心血管疾病。优选的疾病包括冠状动脉病(CAD)、冠心病(CHD)、外周血管病、脑局部缺血(中风)、充血性心力衰竭、动脉粥样硬化、高血压和其他心血管疾病。优选地，通过减小的至少一种 CPP 的血浆水平指出个体将患有或者已经患有这种疾病的可能性。

本发明的另一方面涉及抗-CPP 抗体。本文中所用术语“抗体”指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性部分，即，含有特异结合抗原，如 CPP 或与该抗原免疫反应的抗原结合部位的分子，或者其生物活性片段或者同系物。优选的抗体仅结合选自 SEQ ID NOs:3-4 的一种 CPP 并且不以高亲和性结合其他多肽序列。免疫球蛋白分子的免疫学活性部分的实例包括 F(ab)和 F(ab')₂ 片段，它们可以通过用酶(如胃蛋白酶)处理抗体产生。本发明提供了结合 CPP 的多克隆和单克隆抗体，或者其生物活性片段或者同系物。本文中所用术语“单克隆抗体”或者“单克隆抗体组合物”指仅含有能够与 CPP 的特定表位免疫相互作用的抗原结合部位的一个种类的抗体分子群体。从而单克隆抗体组合物通常显示出对与其相互作用的具体 CPP 的单一结合亲和性。优选的 CPP 抗体连接有标记基团。

本文中所用“标记基团”为任一化合物，当其连接到多核苷酸或者多

肽(包括抗体)时,允许检测或纯化所述多核苷酸或者多肽。可以通过另一化合物,包括对所述标记基团特异的抗体直接或者间接检测或纯化标记基团。有用的标记基团包括放射性同位素(例如, ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{125}I)、荧光化合物(例如,5-溴脱氧尿苷、伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯、藻红蛋白乙酰氨基苄、地高辛配基)、发光化合物(例如,鲁米诺、GFP、萤光素、水母发光蛋白)、酶或者酶辅因子可检测的标记(例如过氧化物酶、萤光素酶、碱性磷酸酶、半乳糖苷酶,或者乙酰胆碱酯酶),或者被另一因子识别的化合物,如链亲和素、GST或者生物素。优选地,标记基团以不干扰该多核苷酸或多肽生物活性的方式连接至多核苷酸或者多肽。

通过例如直接计数放射、胶片曝光,或者通过闪烁计数检测放射性同位素。通过确定适宜底物向产物的转化(通常导致荧光反应)检测酶标记。通过例如放射、荧光显微术、荧光激活细胞分类术,或者光度计检测荧光和发光化合物和反应。

如本文中关于抗体所用的,如果抗体识别和结合目标靶标但是基本上不识别和结合包括目标靶标的样品中例如生物样品中的其他分子时,那么说该抗体“选择性结合”或者“特异结合”靶标。

本文中所用术语“载体”指能够运输其已经连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体为“质粒”,其指环状双链DNA环,其中可以连接额外的DNA片段。另一种类型的载体为病毒载体,其中额外的DNA片段可以连接到该病毒基因组中。某些载体能够在它们所导入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制原点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如,非附加型哺乳动物载体)当导入到宿主细胞中时整合到该宿主细胞的基因组中,从而随着宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导与它们有效连接的基因的表达。这些载体在本文中称作“表达载体”。通常,用于重组DNA技术中的表达载体通常为质粒的形式。由于质粒是载体的最常用形式,所以在本说明书中,“质粒”和“载体”可以互换使用。然而,本发明旨在包括起到等价功能的表达载体的其他形式,如病毒载体

(例如, 复制缺陷的逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

本文中所用“有效量”描述足够产生目的效果的试剂优选本发明的 CPP 或者 CPP 调节剂的量。例如, 抗心血管疾病有效量为使个体中心血管疾病的症状减少至少 1、2、5、10、15、或优选 25% 所需的试剂量。该术语还描述减轻个体心血管疾病的症状所需的试剂量。心血管疾病的常见症状包括: 胸压、烧心、恶心、呕吐、麻木、呼吸急促、大量冷汗、不能解释的疲劳, 和感觉焦虑。心血管疾病的最严重的症状是胸痛(心绞痛)、心律紊乱(心率不齐)、中风、或者心脏病发作。具体患者的有效量可以根据诸如所测量的症状的诊断方法、所治疗的病症的状态、患者的总体健康、施用方法和副作用的严重性的这些因素而变。

本发明的 CPPs

本发明的心血管疾病血浆多肽(CPPs)在 SEQ ID NOs:3-4 所列的序列中描述。具有选自 SEQ ID NOs:3-5 的氨基酸序列的 CPPs 经分泌并在血浆中循环。优选地, 这些 CPPs 可含有来自 SEQ ID NO:1 或 2 的全长人蛋白质中的额外氨基酸。这些额外氨基酸与所选序列在框内融合以形成全长人蛋白质的连续片段。

有趣的是, 在患有心血管疾病的个体的血浆中本发明 CPPs 的水平下降并且检测不到。同样, 本发明的 CPPs 提供了有用的诊断工具, 其中 CPP 的下降的水平表明患心血管疾病危险性增加或者存在心血管疾病。此外, CPPs 可用于药物设计和用于心血管疾病的预防和治疗的治疗性策略中。

SEQ ID NO:1 的序列为几丁质酶家族的蛋白质壳三糖苷酶的序列。几丁质酶催化几丁质聚合物中 β -1,4-N-乙酰基-D-葡萄糖胺键的水解。已经在多种非脊椎动物物种中发现几丁质酶。已经鉴定了几丁质酶的人类同系物壳三糖苷酶。壳三糖苷酶是糖基水解酶家族 18 的成员, 其特征是与催化反应有关的保守谷氨酸(Boot RG, 等人, JBC, (1998); 273: 25680-25685)。该酶主要由活化的巨噬细胞表达。

壳三糖苷酶主要被分泌, 但是部分加工成 39kDa 形式, 其在溶酶体中积累。50-kDa 壳三糖苷酶的 C-末端延伸含有含唾液酸的 O-连接的聚糖。

观察到在巨噬细胞中，备选剪接产生不同的壳三糖苷酶 mRNA 种类，其编码在 C-末端截短的 40kDa 壳三糖苷酶。该酶与通过蛋白质水解加工从 50kDa 壳三糖苷酶形成的 39kDa 壳三糖苷酶相同。该 C-末端存在于 50kDa 壳三糖苷酶中，但是不存在于 39-kDa 同种型中，其介导对几丁质的紧密结合。然而，39kDa 壳三糖苷酶仍然具有对于可溶性底物的活性。在血流中，主要为分泌性 50kDa 壳三糖苷酶，而组织中存在大量 39kDa 形式。

壳三糖苷酶自高歇病 (Gaucher) 患者的异常巨噬细胞的分泌显著增加(Giraldo P, 等人, *Haematologica*, Sep (2001); 86(9): 977-984)。高歇病由溶酶体水解酶 β -葡糖脑苷脂酶中常染色体隐性遗传缺陷导致，所述缺陷导致组织巨噬细胞的溶酶体中脂质积累。该酶缺陷导致脂质葡糖脑苷脂在肝、脾和骨髓中积累。在包括不同脂质积累的某些其他遗传的溶酶体贮积疾病，特别是神经鞘脂贮积症，如尼曼病 (Niemann Pick)、GM1-神经节苷脂沉积症和 Krabbe 病中，已经观察到血浆壳三糖苷酶的较有限的升高。此外，动脉粥样硬化斑中存在的巨噬细胞表达更高水平的酶。这些观察已经导致推测壳三糖苷酶参与组织重塑。

这里我们描述了在正常人血浆中循环的本发明的“心血管疾病血浆多肽”。本发明的多肽种类代表重要且准确的诊断工具，其用于确定冠状动脉病(CAD)、冠心病(CHD)、外周血管病、脑局部缺血(中风)、充血性心力衰竭、动脉粥样硬化、高血压和其他心血管疾病的危险性。本发明的多肽是小分泌性因子并且同样是基于蛋白质的疗法的理想候选者。对于临床背景中的剂量调节，蛋白质疗法优于基因疗法，其中所述基因疗法的局限为缺少可以精细调节表达。此外，作为分泌性因子，本发明的多肽种类容易用例如小分子或者蛋白质抑制剂靶定。从而，本发明的多肽种类可用于药物开发和设计预防和治疗心血管疾病的治疗性策略。

本发明的多肽种类含有壳三糖苷酶的推定活性位点并且描述为 SEQ ID NOs:3-5。

术语“心血管疾病血浆多肽”和“CPP”在本文中用于包括本发明的

任何和所有肽、多肽和蛋白质。本发明的多核苷酸编码的多肽以及含有这些多肽的融合多肽也形成本发明的部分。本发明体现了来自人的 CPPs，包括由、基本上由选自 SEQ ID NOs:3-5 的氨基酸序列组成，或者含有选自 SEQ ID NOs:3-5 的氨基酸序列的经分离或纯化的 CPP。还包括选自 SEQ ID NOs:1-2 序列的 CPP 蛋白质水解前体和中间体。

本发明具体涉及具有 CPP 生物活性的分离、纯化和重组的多肽，其含有至少 3 个氨基酸，优选至少 8 到 10 个氨基酸的一段连续序列。在优选实施方案中，氨基酸的一段连续序列含有突变或者功能突变位点，包括 CPP 序列中氨基酸的缺失、添加、交换或者截短。本发明还涉及本发明的 CPP 核苷酸序列或者其互补序列或者片段编码的多肽。

本发明的一方面涉及适于用作免疫原以产生抗-CPP 抗体的分离的 CPPs，和其生物活性部分，以及多肽片段。在一个实施方案中，可以通过适宜的纯化方案使用标准蛋白质纯化技术从血浆、细胞或者组织来源分离天然 CPP 肽。在另一实施方案中，通过重组 DNA 技术产生 CPPs。作为重组表达的备选方案，可以使用如题为“CPP 组合物的化学生产”和实施例 3 中描述的肽合成技术化学合成 CPP。

通常，生物活性部分含有具有 CPP 的至少一种活性的结构域或者基序。生物活性 CPP 可以例如，含有来自选自 SEQ ID NOs:3-5 序列的至少 1、2、3 或 5 个氨基酸改变，或者含有来自选自 SEQ ID NOs:3-5 的序列的氨基酸中至少 1%、2%、3%、5%、8%、10% 或 15% 的改变。

CPPs 的表征

通过表 1 中所列 SEQ ID NO: 5 的胰蛋白酶消化肽段定义本发明的多肽 CPPs。如实施例 1 中描述的，该肽通过从没有冠状动脉病(CAD)的对照个体的血浆分离的种类的质谱分析鉴定并且根据 MicroProt.TM 方法表征。在患有 CAD 的患者的血浆中检测不到该种类。

本发明的 CPPs 的分子量都小于或者约为 20kDa，因为血浆样品基于分子量被首先分离。通过不同方法分离和表征较高分子量的多肽种类。如实施例 1 中描述的，将血浆样品进行多种层析分离。关于这些层析方法的

细节在实施例 1 中给出。

在阳离子交换层析柱上进行首次分离，用增加的盐浓度洗脱。收集 18 种级分。表 1 中的 CEX 栏列出哪种级分含有胰蛋白酶消化肽段，以及其洗脱条件。通过阳离子交换分离提供了多肽种类的总体正电荷的指示。阳离子交换继之以反相 HPLC 分离。表 1 中的 RP1 栏列出在 30 种级分中的哪种级分中洗脱出胰蛋白酶消化肽段，以及它们的洗脱条件。通过反相分离提供了多肽种类的总体疏水性的指示。标注的运行号栏中的最后两位数指出 24 种洗脱级分中那些含有来自第二次反相 HPLC 分离(见实施例 1)的胰蛋白酶消化肽段。

表 1 中提供的信息揭示了没有 CAD 的个体的血浆中存在的多肽种类的特征。例如，在 RP1 分离的一种以上的级分中发现相同的胰蛋白酶消化肽段。因为那些 RP1 级分相隔很远，这表明该胰蛋白酶消化肽段来自不同的循环多肽种类。因此，表 1 中 RP1 分离的级分 16 和级分 20 中出现的相同肽序列表明存在该胰蛋白酶所源于的两种多肽种类，它们具有不同的总疏水性。

如实施例 1 中描述的，所观察的 SEQ ID NO:5 的胰蛋白酶消化肽段来源于 SEQ ID NOs:3-4 用胰蛋白酶消化后的多肽。除去 SEQ ID NO:1 多肽预测的信号序列并通过在双碱性位点的连续蛋白质水解后得到 SEQ ID NOs:3-4 的多肽。考虑到对所检测的种类(在实施例 1 的步骤 2 中描述)根据分子量的分离，所以 CPP6 和 7(分别为 SEQ ID NOs:3 和 4)代表 SEQ ID NO:5 的胰蛋白酶消化肽段来源并且在 RP1 级分 16 和 20(表 1)中观察到的可能的血浆多肽。同样，CPP6 和 7 对于涉及心血管疾病的诊断和治疗策略特别有价值。

CPP 核酸

本发明的一方面涉及如本文中进一步描述的编码 CPPs 或者其生物活性部分的纯化或分离的核酸分子，以及其核酸片段。所述核酸可用于例如治疗和诊断方法和药物筛选测定法中，如下文中进一步描述。

本发明的一个目的是编码 CPP 的纯化的、分离的或者重组核酸、其

互补序列,和其片段。本发明还涉及纯化或分离的核酸,其含有与编码 CPP 的多核苷酸具有至少 95%核苷酸同一性,有利地与编码 CPP 的多核苷酸具有 99%核苷酸同一性,优选 99.5%核苷酸同一性,最优选 99.8%核苷酸同一性的多核苷酸,或者所述核酸的互补序列或者生物活性片段。本发明的另一个目的涉及纯化的、分离的或者重组核酸,其含有在本文中描述的严格杂交条件下与编码 CPP 的多核苷酸杂交的多核苷酸,或者所述核酸的互补序列或者变体或者生物活性片段。

在另一优选的方面,本发明涉及编码 CPP 的一部分或者变体的纯化或分离的核酸分子,其中所述部分或者变体显示出本发明的 CPP 生物活性。优选地,所述部分或者变体为天然存在的 CPP 或者其前体的部分或者变体。

本发明的另一目的是编码含有选自 SEQ ID NOs:3-5 的氨基酸序列的 CPP 的纯化、分离或重组核酸,或者其片段,其中该分离的核酸分子编码一种或多种基序(如 CPP 靶标结合区、分泌信号肽,或者双碱性切割位点)。

从 CPP 编码基因的克隆确定的核苷酸序列允许产生经设计用于鉴定和/或克隆其他 CPPs(例如,共同具有新的功能结构域)的探针和引物,以及来自其他物种的 CPP 同系物。

通过分离编码 CPP 的核苷酸序列的一部分(其编码具有 CPP 生物活性的多肽),然后表达 CPP 的编码部分(例如,通过体外或体内重组表达)并评估 CPP 的编码部分的活性可以制备编码“CPP 的生物活性部分”的核酸片段。

本发明还包括由于遗传密码简并性而与本发明的 CPP 核苷酸不同并且编码本发明的相同 CPPs 的核酸分子。

除了上述 CPP 核苷酸序列,本领域中技术人员将理解群体(例如,人类群体)中可以存在导致 CPPs 中氨基酸序列中改变的 DNA 序列多态性。这种遗传多态性可以由于天然等位基因变异而存在于群体内的个体之间。这些天然等位基因变异通常导致 CPP 编码基因的核苷酸序列或者核酸序列中 1-5% 变异。

相应于本发明 CPP 核酸的天然等位基因变体和同系物的核酸分子可以基于它们与本文中公开的 CPP 核酸分子的同源性得到分离,使用本文中公开的 cDNAs 或者其部分作为杂交探针,根据标准杂交技术在严格杂交条件下可以实施所述分离。

可以理解本发明包括具有由本发明的任一种多核苷酸编码的氨基酸序列的多肽。

CPP 核酸的用途

编码 CPPs 的多核苷酸序列(或者其互补序列)具有多种用途,包括用作杂交探针,用于染色体和基因作图,和用于产生反义 RNA 和 DNA。此外, CPP 编码核酸可用作药理学干预的靶标,例如,用于开发 DNA 疫苗或者反义组合物,和通过重组技术制备 CPPs,如本文中描述。本文中描述的多核苷酸(包括其序列变体)可用于诊断测定法中。因此,基于检测体液或者组织样品中这类多核苷酸存在的诊断方法是本发明的一个特征。根据本发明的基于核酸的检测测定法的实例包括但不限于杂交测定法,例如,原位杂交和基于 PCR 的测定法。如本文中描述的多核苷酸,包括其延长的多核苷酸、序列变体和片段可以用于产生杂交探针或者 PCR 引物以用于这些测定法中。这些探针和引物将能够检测多核苷酸序列,包括与本文中描述的 CPP 多核苷酸相似或者互补的基因组序列。

本发明包括用于实施 PCR 以扩增本发明多核苷酸片段的引物对。引物对的每种引物为具有长为 15 到 30 个核苷酸的寡核苷酸从而 i)该引物对的一种引物与本发明的多核苷酸的一条链形成完美匹配的双链体,引物对的另一种引物与相同核苷酸的互补链形成完美匹配的双链体,和 ii)引物对的引物在多核苷酸上通过 10 到 2500 个核苷酸的距离分开的位点处形成这种完美匹配的双链体。优选地,引物对的每种引物与其各自互补序列的退火温度基本上相同。

来源于本发明多核苷酸的杂交探针可用于例如,对组织样品,如在显微镜载玻片上制备的固定或者冰冻组织切片或者悬浮细胞实施原位杂交。简言之,在受控条件下,允许标记的 DNA 或者 RNA 探针结合显微制备的

组织切片中其 DNA 或者 RNA 靶标样品。通常，由克隆到质粒或者噬菌体 DNA 载体中的目标 DNA 组成的 dsDNA 用于该目的，尽管也可以使用 ssDNA 或者 ssRNA 探针。探针通常为长为约 15 到 40 个核苷酸的寡核苷酸。任选地，探针可以通过 PCR 随机引发的引物延伸或者从质粒体外转录 RNA(核探针)产生的多核苷酸探针。后一探针通常长为数百碱基对。可以通过多种标记基团之一标记探针并且具体检测方法将相应于用于该探针的标记的类型(例如，如适宜，可使用放射自显影、X-射线检测、荧光或者光学显微镜分析)。使用针对所用检测分子的标记的免疫细胞化学技术，如针对荧光标记的探针上存在的荧光素部分的抗体进一步原位扩增反应物。特定标记和原位检测方法可以在例如，Howard, G. C., 编者, *Methods in Nonradioactive Detection*, Appleton & Lange, Norwalk, Conn., (1993) 中找到，这里将该文献并入作为参考。

杂交探针和 PCR 引物可以选自相应于按照本发明鉴定的全长蛋白质的基因组序列，包括编码天然存在的多肽的基因的启动子、增强子元件和内含子。编码 CPP 的核苷酸序列也可用于构建杂交探针，其用于编码该 CPP 的基因的作图和个体的遗传分析。通过多种技术在 DNA 水平上可以检测携带编码本发明的 CPP 的基因中变异或者突变的个体。用于诊断的核酸可从患者的细胞，包括例如组织活组织检查和尸检材料得到。基因组 DNA 可直接用于检测或者可以通过分析前使用 PCR(Saiki, 等人 *Nature* 324:163-166 (1986)) 酶促扩增。RNA 或者 cDNA 可用于相同的目的。作为实例，与本发明的核酸互补的 PCR 引物可用于鉴定和分析本发明基因中的突变。可以通过与正常基因型相比所扩增产物的大小的改变检测缺失和插入。通过扩增 DNA 与本发明的放射标记的 RNA，或者备选地本发明的反义 DNA 序列的杂交可以鉴定点突变。特定位置上的序列改变可以通过核酸酶保护测定法，如 RNA 酶和 S1 保护或者化学切割方法(例如 Cotton, 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397-4401 (1985))，或者通过解链温度的差异揭示。“分子信标”(Kostrikis L. G. 等人, *Science* 279:1228-1229 (1998)) 一含有与本发明的核酸互补的探针序列的发夹状单链合成的寡核苷

酸可以用于检测点突变或者其他改变以及监视 CPPs 的表达水平。

寡核苷酸和反义化合物

通过常规方法在通过商业途径可获得的自动化 DNA 合成仪, 例如, Applied Biosystems (Foster City, CA) 模型 380B、392 或 394 DNA/RNA 合成仪, 或者类似仪器上合成本发明的寡核苷酸, 包括 PCR 引物和反义化合物。优选地, 使用亚磷酰胺化学, 例如, 在下面的参考文献中公开的: Beaucage 和 Iyer, *Tetrahedron*, 48: 2223-2311 (1992); Molko 等人, 美国专利 4,980,460; Koster 等人, 美国专利 4,725,677; Caruthers 等人, 美国专利 4,415,732; 4,458,066; 和 4,973,679; 等等。对于治疗用途, 优选核酸酶抗性主链。可以利用赋予核酸酶抗性的许多类型的经修饰寡核苷酸, 例如, 许多文献中描述的硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、氨基磷酸酯等等, 例如, 硫代磷酸酯: Stec 等人, 美国专利 5,151,510; Hirschbein, 美国专利 5,166,387; Bergot, 美国专利 5,183,885; 氨基磷酸酯: Froehler 等人, 国际申请 PCT/US90/03138; 关于其他可应用的化学的综述: Uhlmann 和 Peyman (上文中引用)。反义寡核苷酸的长度必须足够大以确保仅在所希望的靶标核苷酸并且不在其他偶然位点发生特异结合。长度的上限由几种因素决定, 这些因素包括合成和纯化长度大于约 30-40 个核苷酸的寡聚体的不方便性和费用、较长的寡核苷酸比较短寡核苷酸对于错配具有更大的耐受性, 等等。优选地, 本发明的反义寡核苷酸的长度为约 15 到 40 个核苷酸。更优选地, 该寡核苷酸部分具有约 18 到 25 个核苷酸的长度。

引物和探针

通过任何适宜的方法可以制备本发明的引物和探针, 这些方法包括例如, 克隆和限制适宜的序列, 和直接化学合成, 这可通过诸如 Narang SA 等人 (*Methods Enzymol* 1979; 68: 90-98) 的磷酸二酯方法, Brown EL 等人 (*Methods Enzymol* 1979; 68: 109-151) 的磷酸二酯方法, Beaucage 等人 (*Tetrahedron Lett* 1981, 22: 1859-1862) 的二乙基氨基磷酸酯方法和 EP 0 707 592 中描述的固态载体方法, 这些文献的公开完整并入本文作为参考。

检测探针通常为核酸序列或者不带电核酸类似物, 例如, 在国际专利

申请 WO 92/20702 中公开的肽核酸, 美国专利号 5,185,444; 5,034,506 和 5,142,047 中描述的吗啉代类似物。如果希望, 可以使探针“不可延长”, 因为不能向该探针加入额外的 dNTPs。类似物中或者它们自身是不可延长的并且通过修饰探针的 3' 末端使得羟基不再能够参与延长而使得核酸探针不可延长。例如, 可以将探针的 3' 末端用捕获和检测标记物官能化以消耗或者封闭羟基。

如果希望, 通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学或者化学方法可以标记本发明的任何多核苷酸。额外的实例包括核酸片段的非放射性标记, 如 Urdea 等人 (Nucleic Acids Research. 11:4937-4957, 1988) 或 Sanchez-Pescador 等人 (J. Clin. Microbiol. 26(10):1934-1938, 1988) 中描述的。此外, 根据本发明的探针可以具有允许信号放大的结构特征, 这些结构特征例如, 有分枝的 DNA 探针, 如 Urdea 等人 (Nucleic Acids Symp. Ser. 24:197-200, 1991) 或者欧洲专利号 EP 0225807 (Chiron) 中描述的。

标记物还可以用于捕获引物, 以便利于引物或者引物延伸产物如扩增的 DNA 在固相载体上的固定。捕获标记可以附着到引物或者探针并且可以是特定结合成员, 其与固相试剂的特定结合成员 (例如, 生物素和链亲和素) 形成结合对。因此, 根据多肽或者探针携带的标记类型, 该标记可用于捕获或检测靶标 DNA。此外, 将理解本文中提供的多核苷酸、引物或者探针本身可作为捕获标记。例如, 对于固相试剂的结合成员为核酸序列的情况, 可以选择核酸序列使得其结合引物或者探针的互补部分从而将该引物或探针固定到固相。对于多核苷酸探针自身作为结合成员的情况, 本领域中技术人员将认识到探针将含有不与靶标互补的序列或者“尾部”。对于多核苷酸引物自身作为捕获标记的情况, 该引物的至少一部分将是游离的以便与固相上核酸杂交。DNA 标记技术是技术人员熟知的。

本发明的探针可用于多种目的。它们可以特别用于与基因组 DNA 的 DNA 杂交。这些探针可用于检测 PCR 扩增产物。它们可用于使用其他技术检测 CPP 编码基因或者 mRNA 中的错配。

本发明的核酸、多核苷酸、引物和探针的任一种可以方便地固定在固

相支持体上。固相支持体是本领域中技术人员公知的并且包括反应板的孔壁、试管、聚苯乙烯珠、磁珠、硝酸纤维素带、膜、微粒如乳胶颗粒、绵羊(或其他动物)血红细胞、耐久细胞(duracytes)和其他。固相支持体不是关键的并且可以由本领域技术人员选择。从而, 乳胶颗粒、微粒、磁性或非磁性珠、膜、塑料管、微量滴定孔壁、玻璃或者硅芯片、绵羊(或其他动物)血红细胞和耐久细胞都是适宜的实例。将核酸固定在固相支持体上的适宜方法包括离子、疏水、共价相互作用等等。本文中所用固相支持体指不可溶或者可以通过随后反应使得不可溶的任何材料。可以根据固相支持体吸引或者固定捕获试剂的内在能力而选择该固相支持体。备选地, 固相可以保留有额外的受体, 其能够吸引和固定所捕获的试剂。额外的受体包括带电物质, 其相对于所捕获试剂本身或者缀合捕获试剂的带电物质而言带相反电荷。作为再一个备选方案, 受体分子可以是附着到固相支持体的任何特定结合成员并且其能够通过特异结合反应捕获试剂。受体分子能够使得在实施测定法之前或者测定法实施期间捕获试剂而间接结合到固相支持体材料。从而, 固相可以是塑料、衍生化塑料、磁性或非磁性金属、试管的玻璃或者硅表面、微量滴定孔、板、珠、微粒、芯片、绵羊(或其他动物)血红细胞、耐久细胞和本领域中普通技术人员公知的其他构造。本发明的核酸、多核苷酸、引物和探针可以单独地或者以每组至少 2、5、8、10、12、15、20、或 25 种本发明的不同多核苷酸附着或者固定在单个固相支持体上。此外, 不同于本发明多核苷酸的多核苷酸可以附着到本发明的一种或多种多核苷酸所附着的同一固相支持体。

本文中提供的任何多核苷酸可以附着在固相支持体上的重叠区域或者随机位置。备选地, 本发明的多核苷酸可以附着在有序阵列中, 其中每种多核苷酸附着在固相支持体的不同区域, 其不与任何其他多核苷酸的附着位点重叠。优选地, 将这种多核苷酸的有序阵列设计为“可寻址的”, 其中不同位置可以记录下来并作为阵列步骤的一部分存取。可寻址多核苷酸阵列通常含有多种不同的寡核苷酸探针, 它们偶联到不同的已知位置中的底物的表面。每种多核苷酸位置的精确位置的知识使得这些“可寻址”阵

列尤其可用于杂交阵列中。本领域中公知的任何可寻址的阵列技术可用于本发明的多核苷酸。这些多核苷酸阵列的一种具体实施方案公知为基因芯片，并且已经在美国专利 5,143,854、PCT 公布 WO 90/15070 和 92/10092 中进行了一般性描述，这里将这些文献的公开完整并入本文作为参考。

得到变体核酸和多肽的方法

除了群体中可能存在 CPP 序列的天然存在的等位基因变体，技术人员将理解可以通过将突变导入编码 CPPs 的核苷酸序列导入改变，从而导致所编码的 CPPs 的氨基酸序列改变，而改变或者不改变 CPP 的功能能力。

考虑了一些类型的变体，包括 1) 其中一个或多个氨基酸残基被保守或非保守氨基酸残基替代并且这种替代的氨基酸残基可以为或者不为遗传密码编码的氨基酸残基的变体，或者 2) 其中一个或多个氨基酸残基包括取代基的变体，或 3) 其中突变的 CPP 与另一种化合物，如用以增加多肽半寿期的化合物(例如，聚乙二醇)融合的变体，或 4) 其中额外的氨基酸与 CPP 融合的变体，如前导序列、信号序列或者锚定序列，用于纯化 CPP 的序列，或者来自前体蛋白质的序列。认为这些变体在本领域技术人员范围之内。

例如，可以在序列中进行导致氨基酸替代的核苷酸替代，该核苷酸替代不显著改变蛋白质的生物活性。可以从编码 CPP 的野生型序列，或者其生物活性片段或者同系物改变氨基酸残基而不改变生物活性。通常，在本发明的 CPPs 中共有的氨基酸残基较少受到改变。

另一方面，本发明涉及这样的编码 CPPs 的核酸分子，其含有氨基酸残基改变，所述改变导致增加的生物活性，或者改变的生物活性。在另一方面，本发明涉及这样的编码 CPPs 的核酸分子，其含有对于 CPP 生物活性必要的氨基酸残基中的改变。这些 CPPs 与 SEQ ID NOs:3-4 的氨基酸序列不同并且表现出更小的活性，或者基本上缺少一种或多种 CPP 生物活性。

通过标准技术，如定点诱变和 PCR 介导的诱变可以向 SEQ ID NOs:1-5 的任一个导入突变、替代、添加、或者缺失。例如，可以在一个或多个预测的非必需氨基酸残基进行保守氨基酸替代。“保守氨基酸替代”

为这样的替代，其中氨基酸为具有相似侧链的氨基酸残基所替换。本领域中已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如，天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电极性侧链的氨基酸(例如，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有 β 分枝侧链的氨基酸(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)，和具有芳香族侧链的氨基酸(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。从而，CPP、其生物活性片段或同系物中所预测的非必需氨基酸可以用来自相同侧链家族的另一种氨基酸残基替换。备选地，在另一实施方案中，可以沿着 CPP 编码序列的全部或者部分序列随机导入突变，例如，通过饱和诱变，并且可以筛选所得突变体的 CPP 生物活性以鉴定保持活性的突变体。诱变编码 SEQ ID NOs:1-5 之一的核苷酸后，可以重组表达所编码的蛋白质并且可以以任何适宜的测定法，例如，本文中提供的测定法确定蛋白质的活性。

本发明还提供了 CPP 嵌合或融合蛋白。本文中所用的 CPP “嵌合蛋白”或者“融合蛋白”包括与非 CPP 多肽序列有效连接或融合的本发明的 CPP 或者其片段。在优选实施方案中，CPP 融合蛋白含有 CPP 的至少一种生物活性部分。在另一种优选的实施方案中，CPP 融合蛋白含有 CPP 的至少两种生物活性部分。例如，在一个实施方案中，融合蛋白为 GST-CPP 融合蛋白，其中 CPP 结构域序列与 GST 序列的 C-末端融合。这些融合蛋白可以方便重组 CPPs 的纯化。在另一实施方案中，融合蛋白为在其 N-末端含有异源信号序列的 CPP，例如，以允许在某种宿主细胞中的目的细胞定位。在再一个实施方案中，该融合为 CPP 生物活性片段与免疫球蛋白分子的融合。这些融合蛋白可用于例如，增加 CPP 结合位点的效价。例如，通过将生物活性 CPP 片段与 IgG Fc 蛋白质融合可以形成二价 CPP 结合位点。

本发明的 CPP 融合蛋白可以掺入药物组合物并体内施用于受试者。此

外, 本发明的 CPP 融合蛋白可以用作免疫原以在受试者中产生抗-CPP 抗体, 用于纯化 CPP 或者 CPP 配体, 和用于筛选测定法中以鉴定调节 CPP 与 CPP 靶分子相互作用的分子。

此外, CPP 的分离的片段也可以通过筛选从编码这些肽的核酸的相应片段重组产生的肽得到。此外, 使用本领域中公知的技术, 如常规 Merrifield 固相 f-Moc 或者 t-Boc 化学可以化学合成片段。例如, 可以将本发明的 CPP 任意分成具有所希望的长度且没有片段重叠的片段, 或者优选分成具有所希望的长度的重叠片段。可以产生(重组或者通过化学合成)并测试所述片段以例如, 通过微注射测定法或者体外蛋白质测定法鉴定具有 CPP 生物活性的那些肽酰片段。在阐明性实施方案中, 通过表达为硫氧还蛋白融合蛋白测试 CPP 的肽酰部分, 如 CPP 靶标结合区的 CPP 活性, 其中所述硫氧还蛋白融合蛋白的每一种含有 CPP 的不同片段(见, 例如, 美国专利 5,270,181 和 5,292,646, 和 PCT 公布 WO94/02502, 将它们的公开并入本文作为参考)。

此外, CPP 编码序列的片段文库可用于产生 CPP 片段的多样化群体以筛选和随后选择 CPP 的变体。在一个实施方案中, 通过将 CPP 编码序列的双链 PCR 片段用核酸酶在每个分子仅发生一次切口的条件下处理, 使双链 DNA 片段变性, 然后 DNA 复性以形成双链 DNA, 其可以包括来自不同切口产物的正义/反义对, 通过用 S1 核酸酶从重新形成的双链体除去单链部分, 并将所得片段文库连接到表达载体, 可以产生编码序列片段的文库。通过该方法, 可以得到表达文库, 其编码 CPP 的不同大小的 N-末端、C-末端和内部片段。

可以用经修饰的 CPPs 增强治疗或者预防功效, 或者稳定性(例如, 体外贮存期限和对体内蛋白质水解降解的抗性)。这些修饰肽当经设计以保留该蛋白质的天然存在形式的至少一种活性时, 认为这些修饰肽是本文中详细描述的功能等价物。这些修饰肽可以例如, 通过氨基酸替代、缺失或者添加产生。

肽的氨基酸序列中的改变是否可导致功能 CPP 同系物可以通过评估

该变体肽的至少一种 CPP 生物活性容易地确定。可以以相同的方式测试已经发生一次以上替换的肽。

本发明还考虑了产生当前公开的 CPPs 以及截短和片段化突变体的组合突变体组的方法，该方法尤其可用于鉴定潜在变体序列，其在结合 CPP 靶蛋白中有功能但是与蛋白质的野生型形式的不同之处在于例如，功效、潜能和/或细胞内半寿期。筛选这些组合物文库的一个目的是，例如，分离新的 CPP 同系物，其与野生型蛋白质相比具有改变的生物活性，或者备选地，同时具有新的活性。例如，诱变可以产生胞内半寿期与相应野生型蛋白质显著不同的 CPP 同系物。可以使所改变的蛋白质对于蛋白质水解降解或者导致 CPP 破坏或者失活的细胞过程更稳定或者更不稳定。这些 CPP 同系物和编码它们的基因可用于通过调节重组蛋白质的半寿期改变特定重组 CPP 的表达。例如，短半寿期可以产生与特定重组 CPP 相关的更短暂的生物学效应并且当是可诱导的表达系统的部分时，可以允许更紧密地控制细胞和循环血浆中重组蛋白质水平。如上文，这些蛋白质，尤其它们的重组核酸构建体，可用于基因治疗方案中。

在该方法的阐明性实施方案中，将 CPP 同系物或者其他相关蛋白质的群体的氨基酸序列比对，优选使得最高同源性成为可能。这种变体的群体可包括，例如，来自一种或多种物种的 CPP 同系物，或者来自相同物种但是由于突变而不同的 CPP 同系物。选择在比对序列的每个位置出现的氨基酸以产生组合序列的简并组。有许多方法可用于从简并的寡核苷酸序列产生潜在的 CPP 同系物文库。可以在自动化 DNA 合成仪中实施简并基因序列的化学合成，并且可以将合成的基因连接到用以表达的适宜的基因中。基因的简并组的目的是在一种混合物中提供编码所希望的潜在 CPP 序列组的所有序列。简并寡核苷酸的合成是本领域中熟知的(见例如，Narang, SA (1983) Tetrahedron 393; Itakura 等人(1981) Recombinant DNA, Proc 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, 编者 AG Walton, Amsterdam: Elsevier 273-289 页; Itakura 等人(1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura 等人(1984) Science 198:1056; Ike 等人(1983) Nucleic Acid Res.

11:477)。这些技术已经用于其他蛋白质的定向进化中(见,例如, Scott 等人(1990) *Science* 249:386-390; Roberts 等人(1992) *PNAS* 89:2429-2433; Devlin 等人(1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla 等人(1990) *PNAS* 87: 6378-6382;以及美国专利号: 5,223,409, 5,198,346, 和 5,096,815)。将上面参考文献的公开完整并入本文作为参考。

备选地,可以用其他形式的诱变产生组合文库,尤其当还没有测序其他天然存在的同系物时。例如,使用例如,丙氨酸扫描诱变等(Ruf 等人(1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang 等人(1994) *J Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint 等人(1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg 等人(1993) *Eur. J Biochem.* 218:597-601; Nagashima 等人(1993) *J Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman 等人(1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; 和 Cunningham 等人 1989) *Science* 244:1081-1085),通过接头扫描诱变(Gustin 等人(1993) *Virology* 193:653-660; Brown 等人(1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644 2652; McKnight 等人(1982) *Science* 232:316);通过饱和诱变(Meyers 等人(1986) *Science* 232:613);通过 PCR 诱变(Leung 等人(1989) *Method Cell Mol Biol* 1: 1-19);或者通过随机诱变(Miller 等人(1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; 和 Greener 等人(1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34, 将上面参考文献的公开完整并入本文作为参考)通过筛选可以从文库产生并分离 CPP 同系物(激动剂和拮抗剂形式)。

另一种方法利用自动化蛋白质设计产生蛋白质文库以筛选和优化本发明蛋白质的序列。见,例如,美国专利 6403312, 将其公开并入本文作为参考。简言之,基于 CPP 的序列和结构特征用计算机处理产生一级文库。一般说来,计算机处理的目的是确定导致任何可能的序列最低能量构象的一组优化蛋白质序列。然而,不是全局最小的许多序列具有低能量并且也是可用的。这样,产生了含有通常按理论定量稳定性排列的一组序列的一级文库。这些序列可用于合成或者表达表现出更长的半寿期或者与 CPP 结合化合物和蛋白质稳定相互作用的肽。

本领域中公知许多技术可以用于筛选通过点突变产生的组合文库，以及筛选 cDNA 文库中具有某种性质的基因产物。这些技术通常适于通过 CPPs 的组合诱变所产生的基因文库的快速筛选。用于筛选大基因文库的最广泛使用的技术包括将基因文库克隆到可复制的表达载体中，用所得载体文库转化适宜的细胞，并在一定条件下表达组合基因，在所述条件下对目的活性的检测促进相对容易地分离载体，其中检测所述载体编码的基因产物。

如果必要可以将下面描述的每一种阐明性测定法进行高通量分析以筛选通过组合诱变技术产生的大量简并 CPP 序列。在一种筛选测定法中，候选基因产物展示在细胞或者病毒颗粒的表面上，并在“淘选测定法”中通过基因产物检测特定细胞或者病毒颗粒结合 CPP 靶标分子(例如，修饰的肽底物)的能力。例如，可以将基因文库克隆到细菌细胞的表面膜蛋白的基因中，并通过淘选检测所得融合蛋白(Ladner 等人, WO 88/06630; Fuchs 等人(1991) *BioTechnology* 9:1370-1371, 和 Goward 等人(1992) *TIBS* 18:136 140)。以类似的方式，可以将荧光标记的 CPP 靶标用于为潜在的功能 CPP 同系物打分。可以通过视觉检查细胞并在荧光显微镜下分离细胞，或者当细胞的形态允许时，通过荧光激活细胞分类器分离细胞。

在备选实施方案中，基因文库表达为病毒颗粒表面上的融合蛋白。例如，在丝状噬菌体系统中，外来肽序列可以在感染性噬菌体的表面上表达，从而赋予两种重要的益处。首先，因为这些噬菌体可以非常高的浓度应用于亲和基质，所以可以一次筛选大量噬菌体。其次，因为每种感染性噬菌体在其表面展示组合基因产物，如果以低产率从亲和基质回收特定噬菌体，可以通过另一轮感染扩增该噬菌体。几乎相同的大肠杆菌丝状噬菌体 M13、fd 和 f1 最常用于噬菌体展示文库中，因为噬菌体 gIII 或 gVIII 外壳蛋白可用于产生融合蛋白而不破坏病毒颗粒的最终包装(Ladner 等人, PCT 公布 WO 90/02909; Garrard 等人, PCT 公布 WO 92/09690; Marks 等人, (1992) *J Biol. Chem.* 267:16007-16010; Griffiths 等人, (1993) *EMBO J* 12:725-734; Clackson 等人, (1991) *Nature* 352:624-628; 和 Barbas 等人,

(1992) PNAS 89:4457 4461, 将这些文献的公开完整并入本文作为参考)。在阐明性实施方案中, 可以容易地修饰重组噬菌体抗体系统(RPAS, Pharmacia 目录号 27-9400-01)以用于表达 CPP 组合文库, 可以在固定化 CPP 靶标分子(谷胱甘肽固定的 CPP 靶标-GST 融合蛋白或者固定的 DNA)上淘选 CPP 噬菌体文库。连续几轮噬菌体扩增和淘选可以极大地富集 CPP 同系物, 其保留结合 CPP 靶标的能力并且可以随后在自动化测定法中进一步筛选生物学活性, 以便区分激动剂和拮抗剂。

本发明还提供了鉴定和减小 CPP 功能结构域的功能性最小尺寸以产生能够破坏本发明的多肽与 CPP 靶分子结合的模拟物, 例如, 肽或者非肽试剂。从而, 上述的这些诱变技术也可以用于对参与与例如结合 CPP 靶蛋白有关的蛋白质-蛋白质相互作用的 CPPs 的决定簇。作为阐明, 可以确定参与 CPP 靶标的分子识别的 CPP 的关键残基并将其用于产生竞争性抑制 CPP 与 CPP 靶标结合的 CPP 靶标-13P-衍生的肽模拟物。例如, 可以用逆向倒置肽(例如, 见美国专利 5,116,947 和 5,219,089; 和 Pallai 等人(1983) Int J Pept Protein Res 21:84-92)、苯二氮(例如, 见 Freidinger 等人, Peptides: Chemistry and Biology, G.R. Marshall 编者, ESCOM Publisher: Leiden, 荷兰, 1988)、azepine(例如, 见 Huffman 等人, Peptides. Chemistry and Biology, G.R. Marshall 编者, ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988)、取代的 γ 内酰胺环(Garvey 等人, Peptides: Chemistry and Biology, G.R. Marshall 编者, ESCOM Publisher: Leiden, 荷兰, 1988)、酮-亚甲基假肽(Ewenson 等人(1986) J Med Chem 29:295; 和 Ewenson 等人, Peptides: Structure and Function (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985)、P-转角二肽核心(Nagai 等人(1985) Tetrahedron Lett 26:647; 和 Sato 等人(1986) J Chem Soc Perkin Trans 1: 123 1)、和 P-氨基醇 (Gordon 等人(1985) Biochem Biophys Res Commun 126:419; 和 Dann 等人(1986) Biochem Biophys Res Commun 134:71, 将它们的公开完整并入本文作为参考)可以产生这些残基的不可水解的肽类似物。

CPP 组合物的化学生产

通过标准技术(例如, Stewart 和 Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 第二版, Pierce Chemical Company, Rockford, IL, 1984)合成本发明的肽。优选地, 使用商业肽合成仪, 例如, Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA) model 430A, 本发明的多肽可以从多种单独合成和纯化的肽以汇集合成方法(例如, Kent 等人, 美国专利 6,184,344 和 Dawson 和 Kent, *Annu. Rev. Biochem.*, 69: 923-960 (2000))装配。本发明的肽可以通过固相合成在交联的聚苯乙烯支持体上从羧基末端残基开始装配并逐步加入氨基酸直到形成完整肽。下面的参考文献是合成期间所用的化学方法的指导: Schnolzer 等人, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 40: 180-193 (1992); Merrifield, J. *Amer. Chem. Soc.*, 85 卷, 2149 页 (1963); Kent 等人, 185 页, *Peptides 1984*, Ragnarsson, 编者(Almquist 和 Weksell, Stockholm, 1984); Kent 等人, 217 页, *Peptide Chemistry 84*, Izumiya 编者(Protein Research Foundation, B.H. Osaka, 1985); Merrifield, *Science*, 232 卷, 341-347 页 (1986); Kent, *Ann. Rev. Biochem.*, 卷 57, 957-989 页(1988), 和后两种参考文献中引用的参考文献。

优选地, 通过天然化学连接(如 Dawson 等人, *Science*, 266: 776-779 (1994) 和 Kent 等人, 美国专利 6,184,344 描述)装配肽片段实施本发明多肽的化学合成。简言之, 在该方法中, 提供了第一种肽, 其 N-末端半胱氨酸具有未氧化的巯基侧链, 还提供了第二种肽, 其具有 C-末端硫酯。然后, N-末端半胱氨酸的未氧化巯基侧链与 C 末端硫酯缩合产生中间体肽片段, 其以 β -氨基硫酯键连接第一和第二种肽片段。中间体肽片段的 β -氨基硫酯键然后经历分子内重排产生肽片段产物, 其以酰胺键连接第一种和第二种肽片段。优选地, 内部片段的 N-末端半胱氨酸受到如下文描述的环状噻唑烷保护基的保护而不发生不希望的环化和/或连接反应。优选地, 这种环状噻唑烷保护基为硫代脯氨酰基。

可以如下面文献中描述的具有 C-末端硫酯的肽片段, 将这些文献并入作为参考: Kent 等人, 美国专利 6,184,344; Tam 等人, *Proc. Natl. Acad.*

Sci., 92: 12485-12489 (1995); Blake, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 17: 273 (1981); Canne 等人, *Tetrahedron Letters*, 36: 1217-1220 (1995); Hackeng 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 7845-7850 (1997); 或 Hackeng 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 10068-10073 (1999)。优选地, 使用 Hackeng 等人(1999)描述的方法。简言之, 在固相支持体(下文描述)上通常以 0.25 mmol 规模通过使用 Schnolzer 等人, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 40: 180-193 (1992)(将其并入作为参考)公开的 Boc 化学的原位中和/HBTU 活化方法合成肽片段(HBTU 是 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒阳离子六氟磷酸, Boc 为叔丁氧基羰基)。每个合成循环为通过用纯 TFA 处理 1 到 2 分钟除去 N^α-Boc, 1 分钟 DMF 流洗, 在 DIEA 存在下用 1.0 mmol 预活化的 Boc-氨基酸偶联 10 到 20 分钟, 然后再次 DMF 流洗。(TFA 为三氟乙酸, DMF 为 N,N-二甲基甲酰胺, DIEA 为 N,N-二异丙基乙胺)。在过量 DIEA(3mmol)存在下用 1.0 mmol HBTU (在 DMF 中 0.5 M)预活化 N^α-Boc-氨基酸(1.1 mmol)3 分钟。每个偶联步骤之后, 通过用例如 Sarin 等人, *Anal. Biochem.*, 117: 147-157 (1981)中公开的常规定量茚三酮测定法测量残留的游离胺而测定产率。Gln 残基偶联后, 在用 TFA 去保护之前或之后用 DCM 流洗以防止可能的高温(TFA/DMF)-催化形成吡咯烷酮。链装配完成后, 通过用无水 HF 在 0℃处理 1 小时, 以 4%对甲酚作为清除剂从树脂去保护并切割肽片段。咪唑侧链 2,4-二硝基苯基(dnp)保护基保留在 His 残基上, 这是因为 dnp-除去方法与 C-末端硫酯基不相容。然而, 在连接反应期间通过硫醇逐渐除去 dnp。切割后, 将肽片段用冰冷的二乙醚沉淀, 溶于水性乙腈中, 并冻干。

优选在如 Hackeng 等人(1999)或者相当方案生产的三苯甲基结合的硫基丙酸-亮氨酸(TAMPAL)树脂上合成上述硫酯肽片段。简言之, 在 6 mmol DIEA 存在下用 3.6 mmol HBTU 活化 N^α-Boc-Leu (4 mmol)并用 2 mmol 对甲基二苯甲基胺(MBHA)树脂或等价物偶联 16 分钟。接下来, 在 6 mmol DIEA 存在下用 2.7 mmol HBTU 活化 3 mmol S-三苯甲基巯基丙酸并偶联到 Leu-MBHA 树脂 16 分钟。所得 TAMPAL 树脂在用 TFA 中 3.5%三异

丙基硅烷和 2.5% H₂O 处理两次, 每次 1 分钟以除去三苯甲基保护基后可以用作多肽链装配的起始树脂。使用如 Schnolzer 等人(上文中引用)中公开的标准原位中和肽偶联方案用任何希望的氨基酸处理 1 小时可以形成硫酯键。用无水 HF 处理最终肽片段产生 C-末端活化的巯基丙酸-亮氨酸(MPAL)硫酯肽片段。

优选地, 噻唑烷保护的硫酯肽片段中间物在如 Hackeng 等人(1999)描述的条件或者类似条件下用于天然化学连接中。简言之, 将含有 6M 胍、4% (体积/体积) 苯甲基硫醇和 4% (体积/体积) 苯硫酚的 0.1M 磷酸缓冲液 (pH 8.5) 加入所要连接的干燥肽以得到约 pH 7 的 1-3 mM 最终肽浓度, pH 降低是因为加入了来自冻干肽的硫醇和 TFA。优选地, 在 37℃ 的加热区中实施连接反应并定期涡旋以平衡硫醇添加剂。可以通过 MALDI-MS 或 HPLC 和电喷雾电离 MS 监视反应的程度。

天然化学连接反应完成或停止后, 通过在 pH 3.5-4.5 下 37℃ 用半胱氨酸去保护剂, 如 O-甲基羟基胺(0.5M)处理 2 小时打开产物的 N-末端噻唑烷环, 之后向反应混合物加入 10 倍过量的三-(2-羧基乙基)-磷以完全还原任何氧化性组分, 然后通过常规制备性 HPLC 纯化产物。优选地, 通过电喷雾 MS 鉴定含有连接产物的级分, 将其合并, 并冻干。

合成完成并且终产物纯化后, 可以通过常规技术, 例如, Creighton, Meth. Enzymol., 107: 305-329 (1984); White, Meth. Enzymol., 11: 481-484 (1967); Wetlaufer, Meth. Enzymol., 107: 301-304 (1984); 等等重折叠最终多肽产物。优选地, 通过下面的方法或者类似方法通过空气氧化重折叠终产物。将还原的冻干产物溶解(约 0.1 mg/mL)在 1 M 盐酸胍(或者类似离液剂)与 100 mM Tris, 10 mM 甲硫氨酸(pH 8.6)中。轻微过夜搅拌后, 用常规方案通过反相 HPLC 分离重折叠产物。

重组表达载体和宿主细胞

本文中描述的多核苷酸序列可用于重组 DNA 分子中, 该重组 DNA 分子指导相应多肽在适宜的宿主细胞中表达。因为遗传密码的简并性, 其他 DNA 序列可以编码等价氨基酸序列, 或者可以用于克隆和表达 CPPs。可

以选择具体宿主细胞优选的密码子并能将其替换到天然存在的核苷酸序列中以增加表达速度和/或效率。可以将编码目的 CPP 的核酸(例如, cDNA 或者基因组 DNA)插入用于克隆(扩增 DNA)或者表达的可复制的载体中。根据本领域中公知的方法(Ausubel, 等人, 编者, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1990)可以在多种表达系统的任一种中重组表达多肽。适宜的宿主细胞包括酵母、细菌、原细菌、真菌、和昆虫和动物细胞, 包括哺乳动物细胞, 例如, 初级细胞, 包括干细胞, 包括但不限于骨髓干细胞。更具体地, 这些宿主细胞包括, 但不限于用重组噬菌体、质粒或者粘粒 DNA 表达载体转化的微生物, 如细菌, 和用酵母表达载体转化的酵母。还包括用重组昆虫病毒(如杆状病毒)感染的昆虫细胞, 和哺乳动物表达系统。可以通过多种方法将所要表达的核酸序列插入载体中。通常, 用本领域中公知的技术将 DNA 插入适宜的限制性内切酶位点中。载体组分通常包括, 但不限于, 一种或多种信号序列、复制原点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子, 和转录终止序列。含有一种或多种这些组件的适宜载体的构建使用技术人员公知的标准连接技术。

通过培养用含有编码 CPP 的核酸的表达载体转化的宿主细胞, 在诱导或者导致 CPP 表达的条件下产生本发明的 CPPs。适于 CPP 表达的条件将随着所选的表达载体和宿主细胞而变, 这可以由本领域中技术人员确定。例如, 在表达载体中使用组成型启动子需要常规地优化宿主细胞生长和繁殖。而使用可诱导的启动子需要用于诱导的适宜生长条件。此外, 在某些实施方案中, 收获的时间选择是重要的。例如, 用于昆虫细胞表达的杆状病毒系统是裂解性病毒, 从而收获时间选择对于产物产率是关键的。

可以选择能够以所希望的方式调节插入序列的表达或者加工所表达的蛋白质的宿主细胞株系。蛋白质的这些修饰包括, 但不限于, 糖基、乙酰基、磷酸、酰胺、脂质、羧基、酰基或者糖基的修饰。翻译后加工切割蛋白质的“前蛋白原”形式, 对于正确插入、折叠和/或功能也是重要的。作为实例, 宿主细胞如 CHO、HeLa、BHK、MDCK、293、W138 等具有

这些翻译后活性的特定细胞结构和特征性机理并且可以选用以确保所导入的外来蛋白质的正确修饰和加工。尤其重要的是果蝇(*Drosophila melanogaster*)细胞、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和其他酵母、大肠杆菌(*E.Coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、SF9 细胞、C129 细胞、293 细胞、脉孢菌(*Neurospora*)、BHK、CHO、COS、和 HeLa 细胞、成纤维细胞、施旺细胞瘤细胞系、永生化哺乳动物骨髓和淋巴细胞系、Jurkat 细胞、人细胞和其他初级细胞。

编码 CPP 的核酸可以通过将其置于与另一种核酸序列的功能关系中而“有效连接”。例如，前序列或者分泌前导序列的 DNA 如果表达为参与多肽分泌的前蛋白质，那么将该 DNA 与所述多肽的 DNA 有效连接；启动子或者增强子如果影响编码序列的转录，那么将该启动子或者增强子与编码序列有效连接；或者如果核糖体结合位点的定位可以促进翻译，那么将该核糖体结合位点与编码序列有效连接。通常，“有效连接的”DNA 序列是连续的，并且对于分泌前导序列或者其他多肽序列，是连续的并且处于可阅读相位。然而，增强子不必是连续的。通过在方便的限制位点连接实现连接。如果这些位点不存在，根据常规实践使用合成的多核苷酸连接物或者接头。启动子序列编码组成型或者可诱导的启动子。启动子可以是天然存在的启动子或者杂合启动子。杂合启动子组合一个以上的启动子元件，也是本领域中公知的，并且可用于本发明。表达载体可以含有额外的元件，例如，表达载体可以具有两种复制系统，从而允许其保留在两种生物中，例如，保留在哺乳动物或者昆虫细胞中用以表达，而保留在原核宿主中用以克隆和扩增。表达和克隆载体都含有使得载体在一种或多种所选宿主细胞中复制的核酸序列。熟知这些序列用于多种细菌、酵母和病毒。来自质粒 pBR322 的复制原点适于多数革兰氏阴性细菌，2 μ 质粒原点适于酵母，多种病毒原点(SV40、多形瘤、腺病毒、VSV 或 BPV)适于哺乳动物细胞中的克隆载体。此外，为了整合表达载体，该表达载体含有至少一种位于表达载体侧翼的与宿主细胞基因组同源的序列，优选两种同源序列。通过选择包含在载体中的适宜同源序列可以将整合载体导向宿主细胞中的特定基

因座。整合载体的构建体是本领域中熟知的。在额外实施方案中，异源表达控制元件可以通过同源重组(在美国专利 6410266 和 6361972 中公开，将其完整并入本文作为参考)与宿主细胞中的内源基因有效连接。该序列允许用所选控制元件将表达调节到希望的水平而确保宿主细胞内源表达的 CPP 的正确加工和修饰。有用的异源表达控制元件包括但不限于 CMV 即时早期启动子、HSV 胸苷激酶启动子、早和晚 SV40 启动子、逆转录病毒 LTRs 的启动子，如劳氏肉瘤病毒(RSV)的启动子，和金属硫蛋白启动子。

优选地，表达载体含有可选择的标记基因以允许选择所转化的宿主细胞。选择基因是本领域中熟知的并且将随着所用的宿主细胞而变。表达和克隆载体将通常含有选择基因，其也称作选择(性)标记。通常的选择基因编码(a)赋予抗生素或者其他毒素例如，氨苄西林、新霉素、氨甲蝶呤，或者四环素抗性，(b)互补营养缺陷型缺陷，或者(c)提供从复合培养基不能得到的关键营养物的蛋白质的基因，例如，编码芽孢杆菌的 D-丙氨酸消旋酶的基因。

用编码 CPP 的核苷酸序列转化的宿主细胞可以培养在适于表达和从培养基回收所编码的蛋白质的条件下。根据所用的序列和/或宿主，重组细胞产生的蛋白质可以是分泌的、膜结合的、或者包含在细胞内。如本领域中技术人员将理解的，可以设计含有编码 CPP 的多核苷酸的表达载体具有信号序列，其指导 CPP 通过原核或者真核细胞膜分泌。所希望的 CPP 不仅可以直接产生，而且可以作为与异源多肽的融合多肽重组产生，所述异源多肽可以是在成熟蛋白质或者多肽的 N-末端具有特定切割位点的信号肽或者其他多肽。通常，信号序列可以是载体的组分，或者其可以是插入到载体的 CPP 编码 DNA 的部分。信号序列可以是原核信号序列，其选自例如，碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp、或者热稳定的肠毒素 II 前导序列。对于酵母分泌，信号肽可以是例如酵母转化酶前导序列、 α 因子前导序列(包括酵母属 (*Saccharomyces*) 和克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) α -因子前导序列，后者在美国专利号 5,010,182 中描述)、或者酸性磷酸酶前导序列、白色念珠菌 (*C. albicans*) 葡糖淀粉酶前导序列(EP 362,179, 1990

年4月4日公布)、或者1990年11月15日公布的WO 90113646中描述的信号序列。在哺乳动物细胞表达中,哺乳动物信号序列可用于指导蛋白质表达,如来自相同或相关物种的分泌多肽的信号序列,以及病毒分泌性前导序列。根据所选的表达系统,将编码序列插入到适宜的载体中,该载体可以需要存在某些特征性“控制元件”或者“调节序列”。适宜的构建体是本领域中公知的(Ausubel, 等人, 1990)并且,在许多情况下,可以从供应商如Invitrogen (San Diego, Calif.)、Stratagene (La Jolla, Calif.)、Gibco BRL (Rockville, Md.) 或 Clontech (Palo Alto, Calif.)得到。

细菌系统中的表达

使用可诱导的启动子,如“BLUESCRIPT”噬菌粒(Stratagene)或者“pSPORT1”(Gibco BRL)的杂合 lacZ 启动子实现细菌细胞的转化。此外,可以选择许多表达载体用于细菌细胞中以产生易于检测和/或纯化的可切割的融合蛋白,这些表达载体包括,但不限于“BLUESCRIPT”(α-半乳糖苷酶; Stratagene)或 pGEX (谷胱甘肽-S 转移酶; Promega, Madison, Wis.)。适宜的细菌启动子为能够结合细菌 DNA 聚合酶并启动 CPP 基因编码序列的下游(3')转录成 mRNA 的任何核酸序列。细菌启动子具有转录起始区,其通常置于接近编码序列的 5'末端。该转录起始区通常包括 RNA 聚合酶结合位点和转录起始位点。编码代谢途径酶的序列提供了尤其有用的启动子序列。实例包括来源于糖代谢酶,如半乳糖酶、乳糖酶和麦芽糖酶的启动子序列,和来源于生物合成酶,如色氨酸生物合成酶的序列。还可以使用来自噬菌体的启动子并且其是本领域中公知的。此外,也可以使用合成启动子和杂合启动子;例如, tat 启动子是 trp 和 lac 启动子序列的杂合体。此外,细菌启动子可以包括能够结合细菌 RNA 聚合酶并启动转录的非细菌来源的天然存在的启动子。有效核糖体结合位点也是所希望的。表达载体还可以包括信号肽序列,其提供细菌中 CPP 的分泌。如本领域中熟知的,信号序列通常编码含有疏水氨基酸的信号肽,其指导蛋白质从细胞分泌。蛋白质被分泌到生长培养基(革兰氏阳性细菌)或者分泌到位于细胞的内膜和外膜之间的壁膜间隙(革兰氏阴性细菌)。细菌表达载体也可以包括选择

标记基因以允许选择已经被转化的细菌株系。适宜的选择基因包括药物抗性基因，如氨苄西林、氯霉素、红霉素、卡那霉素、新霉素和四环素抗性基因。选择标记还包括生物合成基因，如组氨酸、色氨酸和亮氨酸生物合成途径中的那些基因。当需要大量 CPPs，例如，用于诱导抗体时，指导高水平表达易于纯化的融合蛋白的载体是所希望的。这些载体包括，但不限于，多功能大肠杆菌克隆和表达载体，如 BLUESCRIPT (Stratagene)，其中 CPP 编码序列可以连接到载体中与 β -半乳糖苷酶的氨基末端 Met 和随后的 7 个残基符合读框，从而产生杂种蛋白质；PIN 载体(Van Heeke & Schuster J Biol Chem 264:5503-5509 1989)); PET 载体(Novagen, Madison Wis.);等等。细菌的表达载体包括上面提出的多种组件，并且是本领域中熟知的。实例包括枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、乳酪链球菌(*Streptococcus cremoris*)、和变铅青链球菌(*Streptococcus lividans*) 等等的载体。用本领域中熟知的技术，如氯化钙介导的转染、电穿孔等等将细菌表达载体转化到细菌宿主细胞中。

酵母中表达

酵母表达系统是本领域中熟知的，并且包括酿酒酵母、白色念珠菌(*Candida albicans*)、和 *C. maltosa*、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*)和乳酸克鲁维酵母(*K. lactis*)、*Pichia guilliermondii*和巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)的表达载体。用于酵母宿主中的适宜的启动子的实例包括 3-磷酸甘油酸激酶(Hitzeman 等人, J. Biol. Chem. 255:2073 (1980)) 或者其他糖酵解酶(Hess 等人, J. Adv. Enzyme Reg. 7:149 (1968); Holland, Biochemistry 17:4900 (1978))的启动子，如烯醇化酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡糖异构酶、 α 因子的启动子、ADH2IGAPDH 启动子、葡糖激酶醇氧化酶和 PGH 的启动子。见，例如，Ausubel 等人, 1990; Grant 等人, Methods in Enzymology 153:516-544, (1987)。具有转录受到生长条件控制的额外优点的可诱导的其他酵母启动

子包括乙醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮代谢有关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶，和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。在 EP 73,657 中进一步描述了用于酵母表达中的适宜载体和启动子。酵母选择标记包括 ADE2.HIS4.LEU2.TRP1 和 ALG7，其赋予衣霉素抗性；CUP1 基因，其允许细胞在铜离子存在下生长。可以构建酵母表达载体以从编码目标 CPP 的 DNA 胞内产生或者分泌 CPP。例如，可以将所选的信号肽和适宜的组成型或者可诱导的启动子插入所选质粒的适宜限制位点以直接胞内表达 CPP。为了选择 CPP，可以将编码 CPP 的 DNA 与编码启动子的 DNA、酵母 α -因子分泌信号/前导序列和接头序列(如果需要)克隆到所选质粒中以表达 CPP。然后可以如上面描述的用表达质粒转化酵母细胞，并将其培养在适宜的发酵培养基中。通过这种转化酵母产生的蛋白质可以用 10% 三氯乙酸沉淀浓缩并通过 SDS-PAGE 和用考马斯蓝染料将凝胶染色进行分析。随后可以通过本领域中技术人员公知的技术从发酵培养基分离和纯化重组 CPP。

在哺乳动物细胞中表达

CPP 可以在哺乳动物细胞中表达。哺乳动物表达系统是本领域中公知的，包括逆转录病毒载体介导的表达系统。可以用许多不同的基于病毒的表达系统的任一种(如腺病毒)转化哺乳动物宿主细胞，其中编码区可以连接到由晚期启动子和三联前导序列组成的腺病毒转录/翻译复合体中。病毒基因组的非必需 E1 或 E3 区的插入导致能够在受感染的宿主细胞中表达目标多肽的活病毒。优选的表达载体系统是如通常在 PCT/US97/01019 和 PCT/US97/101048 中描述的逆转录病毒载体系统。适宜的哺乳动物表达载体含有哺乳动物启动子，其是能够结合哺乳动物 RNA 聚合酶并且启动 CPP 的编码序列的下游(3')转录成 mRNA 的任何 DNA 序列。启动子具有转录起始区(其通常置于编码序列的 5'末端附近)和 TATA 盒，其使用转录起始位点上游定位的 25-30 个碱基对。认为 TATA 盒指导 RNA 聚合酶 II 在正确的位点开始 RNA 合成。哺乳动物启动子还可含有上游启动子元件(增强子元件)，其通常位于 TATA 盒的上游 100 到 200 个碱基对以内。上游启

动子元件决定转录起始的速度并且可以以任一方向作用。尤其可用作哺乳动物启动子的是来自哺乳动物病毒基因的启动子，因为病毒基因通常高效表达并且具有广泛的宿主范围。实例包括来自下述病毒的基因组的启动子，所述病毒为诸如多形瘤病毒、禽痘病毒(1989年7月5日公布的UK 2,211,504)、腺病毒(如腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、鸟肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和猿病毒40(SV40)，还包括异源哺乳动物启动子，例如，肌动蛋白启动子或者免疫球蛋白启动子和热休克启动子，条件是这些启动子与宿主细胞系统相容。通过将增强子序列插入载体中可以增加高等真核生物对编码CPP的DNA的转录。增强子为DNA的顺式作用元件，其通常为约10到300 bp，作用于启动子以增强其转录。现在公知来自哺乳动物基因(球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、 α -胎儿球蛋白，和胰岛素)的许多增强子序列。然而，通常，将使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制原点的晚侧的多形瘤增强子，和腺病毒增强子。增强子优选位于启动子的5'。通常，被哺乳动物细胞识别的转录终止序列和多腺苷酸化序列为位于翻译终止密码子3'的调节区，从而与启动子元件一起位于编码序列侧翼。通过位点特异的翻译后切割和多腺苷酸化形成成熟mRNA的3'末端。转录终止子和多腺苷酸化信号的实例包括来源于SV40的那些转录终止子和多腺苷酸化信号。可以在稳定表达系统中实现重组蛋白质的长期、高产率生产。含有病毒复制原点或者内源表达元件和选择标记基因的表达载体可用于该目的。含有用于哺乳动物细胞的选择标记的适宜载体可容易地通过商业途径获得并且是本领域中技术人员公知的。这些选择标记的实例包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶，它们分别用于tk-或者hpert-细胞中。将外源核酸导入哺乳动物宿主以及其他宿主的方法是本领域中熟知的并且将随着所用宿主细胞而变。技术包括葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物介导的转染、原生质体融合、电穿孔、病毒感染、在脂质体中包封的多核苷酸、和将DNA直接注射到细胞核。

可以通过携带 CPP 编码序列的表达载体瞬时转染或者稳定转化的哺乳动物细胞的培养上清液纯化 CPPs。优选地,从 pcD 表达载体瞬时转染的 COS7 细胞的培养上清液纯化 CPP。如下用 pcD 转染 COS7 细胞:转染前一天,将约 10^6 个 COS7 猴细胞接种在 100 mm 平板中含有 10% 胎牛血清和 2 mM 谷氨酰胺的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DME)中。进行转染时,从每个平板吸出该培养基并用含有 50 mM Tris.HCl pH 7.4, 400 mg/ml DEAE-葡聚糖和 50 μ g 质粒 DNA 的 4 ml DME 替换。将平板在 37℃ 孵育 4 小时,然后移出含有 DNA 的培养基,并用 5 ml 无血清的 DME 洗涤平板 2 次。将 DME 回加到平板,然后将该平板在 37℃ 再孵育 3 小时。用 DME 洗涤平板 1 次,之后加入含有标准浓度的 4% 胎牛血清、2 mM 谷氨酰胺、青霉素(100 U/L)和链霉素(100 μ g/L)的 DME。然后 37℃ 孵育细胞 72 小时,之后收集生长培养基用以纯化 CPP。通过将含有编码 CPP 的 cDNA 插入片段的 pcD(SR α) 或者类似表达载体在大肠杆菌 MC1061(Casadaban 和 Cohen, J. Mol. Biol., 卷 138, 179-207 页(1980)描述)或者类似生物中生长得到用于转染的质粒 DNA。通过标准技术,例如, Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989)或 Ausubel 等人(1990, 上文中引用)从培养物分离质粒 DNA。

在昆虫细胞中表达

还可以在昆虫细胞中生产 CPPs。用于转化昆虫细胞的表达载体,尤其基于杆状病毒的表达载体是本领域中熟知的。在一种这样的系统中,编码 CPP 的 DNA 与杆状病毒表达载体内所含的表位标记的上游融合。用苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)作为载体在草地夜蛾 Sf9 细胞或者粉纹夜蛾(*Trichoplusia*)幼虫中表达外来基因。将 CPP 编码序列克隆到该病毒的非必需区,如多角体蛋白基因中,并置于多角体蛋白启动子的控制下。CPP 编码序列的成功插入将使得多角体蛋白基因失活并产生缺少外壳蛋白的外壳的重组病毒。然后用该重组病毒感染草地夜蛾或者粉纹夜蛾幼虫,其中 CPP 得到表达(Smith 等人, J. Wol. 46:584 (1994); Engelhard E K 等

人, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **91**:3224-3227 (1994)). 用于融合到编码 CPP 的 DNA 的适宜的表位标记包括聚-his 标记和免疫球蛋白标记(像 IgG 的 Fc 区)。可以使用多种质粒, 包括通过商业途径可得到的质粒, 如 pVL1393 (Novagen)。简言之, 通过 PCR, 使用与 5'和 3'区互补的引物扩增编码 CPP 的 DNA 或者 CPP 的目的 DNA 部分。5'引物可以掺入侧翼限制位点。然后将 PCR 产物用所选的限制酶消化并亚克隆到表达载体中。通过用 lipofectin (可通过商业途径从 GIBCO-BRL 获得)或者本领域中技术人员公知的其他方法将上面的质粒和 BaculoGold™ 病毒 DNA (Pharming)共转染到草地夜蛾("Sf9")细胞(ATCC CRL 1711)中产生重组杆状病毒。通过在 28℃培养 Sf9 细胞 4-5 天产生病毒, 并将其用于进一步扩增。如 O'Reilley 等人, *BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL*, Oxford University Press (1994)中描述的实施方法。可以如 Rupert 等人, *Nature* **362**:175-179 (1993)中描述的从重组病毒感染的 Sf9 细胞制备提取物。备选地, 通过亲和层析可以纯化所表达的表位标记的 CPP, 或者例如, 使用层析技术, 包括蛋白质 A 或者蛋白质 G 柱层析可以实施 IgG 标记的(或者 Fc 标记的)CPP 的纯化。

基因表达的评估

通过例如使用本领域中技术人员公知的标准技术如用以确定 mRNA 的转录的 RNA 印迹、点印迹(DNA 或者 RNA)或者原位杂交, 使用适宜的标记探针, 基于本文中提供的序列直接评估样品中基因的表达。备选地, 在测定法中可以用抗体检测多肽、核酸, 如特定双链体, 包括 DNA 双链体、RNA 双链体, 和 DNA-RNA 杂种双链体或者 DNA-蛋白质双链体。可以标记这些抗体并实施测定法, 其中双链体结合到表面, 从而当在该表面上形成双链体时, 可以检测到与该双链体结合的抗体的存在。备选地, 通过细胞或者活组织切片的免疫组织化学染色和细胞培养物或者体液的测定法可以测量基因表达以直接评估 CPP 多肽或者多核苷酸的表达。用于这些免疫学测定法的抗体可以是单克隆或者多克隆的, 并且可以针对天然序列 CPP 制备。还可以通过质谱检测蛋白质水平。蛋白质检测的另一种方法是

使用蛋白质芯片。

所表达蛋白质的纯化

使用本领域中技术人员公知的多种方法的任一种，可以表达后纯化或分离所表达的 CPP。适宜的技术将根据样品中存在哪些其他组分而变。通过分离或者纯化除去的污染性组分是通常干扰多肽的诊断或者治疗性用途的材料，并且可以包括酶、激素、和其他溶质。所选的纯化步骤将取决于例如所用的生产方法的性质和产生的具体 CPP。当 CPPs 被分泌时，可以从培养基回收它们。备选地，可以从宿主细胞裂解物回收 CPP。如果是膜结合的，可以用适宜的去污剂溶液(例如，Triton-X 100)或者通过酶切割从膜释放 CPP。备选地，可以通过多种物理或化学方法，如冷冻-解冻循环、超声处理、机械破碎或者通过使用细胞裂解剂破坏用于 CPP 表达中的细胞。代表性纯化方法包括但不限于离子交换柱层析；使用硅胶或者阳离子交换树脂如 DEAE 的层析；使用例如，Sephadex G-75 的凝胶过滤；蛋白质 A Sepharose 柱用以除去污染物如 IgG；使用金属螯合柱层析以结合 CPP 的表位-标记的形式；乙醇沉淀；反相 HPLC；层析聚焦；SDS-PAGE；和硫酸铵沉淀。通常，通过至少一种纯化步骤制备分离的 CPP。例如，可以用标准抗-CPP 抗体柱纯化 CPP。还可以使用超滤和透析技术，联合蛋白质浓缩(见，例如，Scopes, R., PROTEIN PURIFICATION, Springer-Verlag, New York, N.Y., 1982)。所需要的纯化的程度将根据 CPP 的用途而变。在某些情况中，将不需要纯化。一旦表达并如所需要的那样纯化，本发明的 CPPs 和核酸可用于许多应用中，如本文中详述。

转基因动物

本发明的宿主细胞可用于产生非人转基因动物。例如，在一个实施方案中，本发明的宿主细胞为已经导入 CPP 编码序列的受精卵母细胞或者胚胎干细胞。这些宿主细胞可以用于产生非人转基因动物，其中它们的基因组中已经导入外源 CPP 序列，或者产生同源重组动物，其中内源 CPP 序列已经被改变。这些动物可用于研究 CPP 或者其片段的功能和/或活性和鉴定和/或评估 CPP 生物活性的调节剂。本文中所用“转基因动物”为非

人动物，优选哺乳动物，更优选啮齿类动物，如大鼠或小鼠，其中该动物的一种或多种细胞包括转基因。转基因动物的其他实例包括非人灵长类、绵羊、狗、奶牛、山羊、鸡、两栖动物，等等。转基因因为整合到细胞的基因组的外源 DNA，转基因动物从该细胞发育而来，并且所述外源基因保持在成熟动物的基因组中，从而指导所编码的基因产物在该转基因动物的一种或多种细胞类型或者组织中表达。本文中所用“同源重组动物”为非人动物，优选哺乳动物，更优选小鼠，其中通过内源基因和导入动物细胞例如导入该动物的胚胎细胞的外源 DNA 分子之间的同源重组改变了该内源基因，然后发育成动物。

通过将 CPP 编码核酸导入受精的卵母细胞的雄性原核，例如通过微注射或者逆转录病毒感染，并允许该卵母细胞在假孕雌性代孕动物中发育可以产生本发明的转基因动物。可以将 CPP cDNA 序列或者其片段作为转基因导入非人动物的基因组中。备选地，人 CPP 编码基因的非人同系物，如来源于小鼠或大鼠的同系物可以用作转基因。转基因中还可以包括内含子序列和多腺苷酸化信号以增加该转基因的表达效率。组织特异的调节序列可以与 CPP 转基因有效连接以指导 CPP 在特定细胞中表达。通过胚胎操作和微注射产生转基因动物尤其诸如小鼠的方法已经成为本领域中常规技术并且在例如美国专利号 4,736,866 和 4,870,009(都为 Leder 等人)，Wagner 等人的美国专利号 4,873,191，和 Hogan, B., *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986，将其公开完整并入本文作为参考)中描述。类似的方法用于产生其他转基因动物。可以基于动物的基因组中存在 CPP 转基因和/或该动物的组织或细胞中表达 CPP mRNA 来鉴定转基因起始动物。然后该转基因起始动物可用于繁殖携带该转基因的其它动物。此外，携带编码 CPP 的转基因的转基因动物可以与携带其他转基因的其他转基因动物配种。

为了产生其中已经通过同源重组向基因组中导入目的核酸的动物，制备含有 CPP 编码序列的至少一部分的载体，该 CPP 编码序列中已经导入

缺失、添加或者替代，从而改变例如功能地破坏 CPP 编码序列。该 CPP 编码序列可以是人基因，但是更优选地，为人 CPP 编码序列的非人同系物(例如，通过与编码 CPP 的核苷酸序列严格杂交分离的 cDNA)。例如，小鼠 CPP 编码序列可用于构建适于改变小鼠基因组中内源基因的同源重组载体。在优选实施方案中，设计载体使得同源重组时，内源 CPP 编码序列被功能性地破坏(即，不再编码功能蛋白质；也称作“剔除”载体)。备选地，可以设计载体使得同源重组时内源 CPP 编码序列被突变或者改变，但是仍然编码功能蛋白质(例如，可以改变上游调节区从而改变内源 CPP 编码序列的表达)。在同源重组载体中，内源 CPP 编码序列的改变的部分在其 5'和 3'端侧翼为 CPP 基因的其它核酸序列以允许在载体携带的外源序列和胚胎干细胞中的内源基因之间发生同源重组。其它侧翼核酸序列具有足够长度以与内源基因成功地同源重组。通常，载体中包括几千 kb 侧翼 DNA(都在 5'和 3'端)(关于同源重组载体的描述，见，例如，Thomas, K. R. 和 Capecchi, M. R. (1987) *Cell* 51:503,将其公开完整并入本文作为参考)。将载体导入胚胎干细胞系(例如，通过电穿孔)并且选择其中所导入的 CPP 编码序列已经与内源基因同源重组的细胞(见，例如，Li, E. 等人(1992) *Cell* 69:915, 将其公开完整并入本文作为参考)。然后将所选细胞注射到动物(例如，小鼠)的胚泡以形成聚集嵌合体(见，例如，Bradley, A. *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells. A Practical Approach*, E. J. Robertson 编 (IRL, Oxford, 1987) 113-152 页,将其公开完整并入本文作为参考)。可以将嵌合胚胎植入适宜的假孕雌性代孕动物并且胚胎进入妊娠期。在它们的生殖细胞中含有同源重组的 DNA 的子代可用于繁殖动物，其中通过转基因的种系传递，该动物的所有细胞都含有同源重组的 DNA。构建同源重组载体和同源重组动物的方法在 Bradley, A. (1991) *Current Opinion in Biotechnology* 2:823-829 和 PCT 国际公布号 WO 90/11354(Le Mouellec 等人); WO 91/01140 (Smithies 等人); WO 92/0968(Zijlstra 等人);和 WO 93/04169 (Berns 等人)中公开,将它们的公开完整并入本文作为参考)中进一步描述。

另一实施方案中，可以产生转基因非人动物，其含有所选的允许该转

基因受调节地表达的系统。这种系统的一个实例是噬菌体 P1 的 cre/loxP 重组酶系统。关于 cre/loxP 重组酶系统的描述, 见, 例如, Lakso 等人(1992) PNAS 89:6232-6236, 将其公开完整并入本文作为参考。重组酶系统的另一个实例是酿酒酵母的 FLP 重组酶系统(O'Gorman 等人(1991) Science 251:1351-1355, 将其公开完整并入本文作为参考)。如果用 cre/loxP 重组酶系统调节转基因的表达, 需要含有编码 Cre 重组酶和所选蛋白质的转基因的动物。这些通过构建“双”转基因动物, 例如, 通过两种转基因动物的交配来提供, 所述两种转基因动物的一种含有编码所选蛋白质的转基因, 另一种含有编码重组酶的转基因。

评估 CPP 活性

可以理解本发明还提供了测试 CPPs 和 CPP 序列的功能片段和变体的活性或者得到所述功能片段和变体的方法。这些方法包括提供变体或者经修饰的 CPP-编码核酸并评估所编码的多肽是否表现出 CPP 生物活性。从而本发明包括评估 CPP 的功能的方法, 其包括:(a)提供 CPP, 或者其生物活性片段或者同系物; 和(b)测试所述 CPP, 或者其生物活性片段或者同系物的 CPP 生物活性。可以使用任何适宜的形式, 包括无细胞形式、基于细胞的形式和体内形式。例如, 所述测定法可以包括在宿主细胞中表达 CPP 核酸, 观察所述细胞和其他受影响的细胞中的 CPP 活性。在另一实施方案中, 将 CPP 或者其生物活性片段或者同系物与细胞接触, 并观察 CPP 生物活性。

CPP 生物活性可以是本文中描述的任何活性, 如(1)保护免受心血管病; (2)通过血流循环; (3)抗原性, 或者结合抗-CPP 特异抗体的能力; (4)免疫原性, 或者产生抗-CPP 特异抗体的能力; 或者(5)与 CPP 靶分子优选蛋白质相互作用。

通过本领域中任何公知的方法可以评估 CPP 生物活性。可以如标题为“抗 CPP 抗体”和“CPP 抗体的用途”的章节中描述的那样检测抗原性和免疫原性。可以如“诊断和预后用途”中描述的那样检测血浆中的循环。可以根据本文中, 例如, 标题为“药物筛选测定法”的章节中描述的

方法之一检测与 CPP 靶分子的相互作用。

通过本领域中技术人员使用任一种对个体确定为适宜的方法诊断心血管疾病。症状和诊断法的其他实例可以在“背景”章节中发现，并且由本领域技术人员基于患者的具体特性最适当地确定。

通过基于序列的结构预测可以检测分子内相互作用。这些预测通常基于具有相似序列的多肽的 X-射线晶体学或者 NMR 结构数据。还可以用 SDS-PAGE 实现分子内相互作用的检测。例如对于二硫键，给定蛋白质的不同部分之间形成的连接导致更紧密的蛋白质，从而减小表观分子量。可以通过还原剂，例如，二硫苏糖醇(DTT)破坏二硫键。通过 SDS-PAGE 可以将已经用还原剂处理的蛋白质样品与未处理的对照比较以检测表观分子量的改变。这些方法是本领域中惯用的。

通过比较样品肽的分子量与相同肽的酰胺化形式的分子量检测酰胺化。可以根据常用方法，例如，美国专利 4708934 中公开的方法制备酰胺化形式。根据本领域中任何常用方法，如 SDS-PAGE、凝胶层析或者质谱容易地比较分子量。还可以通过比较样品肽的分子量与已知分子量的肽的分子量检测蛋白质水解。优选地，通过质谱得到受试肽的分子量并与数据库比较，该数据库包括具有翻译后修饰的肽的分子量。代表性数据库包括 Genpept、SWISSPROT、EMBL、和蛋白质序列数据库(Protein Sequence Database)。这些技术在下文中进一步描述。

抗-CPP 抗体

本发明提供了对 CPPs 特异的抗体和结合组合物。这些抗体和结合组合物包括多克隆抗体、单克隆抗体、Fab 和其单链 Fv 片段、双特异性抗体、异源缀合物、人源化抗体，等等。可以以多种方法产生这些抗体和结合组合物，这些方法包括杂交瘤培养物，在细菌或哺乳动物细胞培养物中重组表达，在转基因动物中重组表达，等等。文献中有大量教导以选择特定生产方法，例如 Chadd 和 Chamow, Curr. Opin. Biotechnol., 12: 188-194 (2001)。

生产方法的选择取决于若干因素，包括目的抗体结构、糖部分对抗体

的重要性、培养和纯化的容易度、成本，等等。用标准表达技术可以产生许多不同的抗体结构，这些抗体结构包括全长抗体、抗体片段，如 Fab 和 Fv 片段，以及含有来自不同种类的组分的嵌合抗体。可以在细菌表达系统中产生不具有效应子功能和有限的药物动力学活性的小尺寸的抗体片段，如 Fab 和 Fv 片段。单链 Fv 片段对体内肿瘤具有高度选择性，显示出高度肿瘤穿透和低免疫原性，并且从血液中快速清除，例如，Freyre 等人，*J. Biotechnol.*, 76: 157-163 (2000)。从而，这些分子是放射免疫检测和原位放射疗法所希望的。当治疗目的需要增加的半寿期形式的药物动力学活性时，优选全长抗体。例如，免疫球蛋白 G(IgG)分子可以是四个亚类： $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、或 $\gamma 4$ 之一。如果需要具有效应子功能的全长抗体，那么优选 IgG 亚类 $\gamma 1$ 或 $\gamma 3$ ，最优选 IgG 亚类 $\gamma 1$ 。 $\gamma 1$ 和 $\gamma 3$ 亚类显示出强力效应子功能，补体活性，和通过与特异 Fc 受体的相互作用促进依赖抗体的细胞介导的细胞毒性，例如，Raju 等人，*Glycobiology*, 10: 477-486 (2000); Lund 等人，*J. Immunol.*, 147: 2657-2662 (1991)。

多克隆抗体

本发明的抗-CPP 抗体可以是多克隆抗体。例如，在一次或多次注射免疫试剂，优选佐剂后，可以在哺乳动物中产生这些多克隆抗体。通常，通过一系列皮下或者腹膜内注射可以将免疫试剂和/或佐剂注射到哺乳动物中。免疫试剂可以包括 CPPs 或者其融合蛋白。其可用于将抗原缀合到已知在所要免疫的哺乳动物中具有免疫原性的蛋白质。这些免疫原性蛋白质的实例包括，但不限于，匙孔血蓝蛋白(KLH)、甲基化牛血清白蛋白(mBSA)、牛血清白蛋白(BSA)、乙型肝炎表面抗原、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白和大豆胰蛋白酶抑制剂。佐剂包括，例如，弗氏完全佐剂和 MPL-TDM 佐剂(单磷酸基脂质 A，合成的海藻糖 dicoryno-mycolate)。本领域技术人员基于标准方案或者通过常规实验可以确定免疫方案。

备选地，已经富集 CPP 或者其部分的粗蛋白质制备物可用于产生抗体。将这些蛋白质、片段或者制剂在适宜的佐剂存在下导入非人哺乳动物中。如果血清含有针对目的表位的多克隆抗体，通过免疫亲和层析纯化多

克隆抗体。

通过与抗原和宿主种类有关的许多因素实现有效多克隆抗体生产。而且，宿主动物对于接种部位和剂量的应答不同，不足和过量的抗原剂量导致低效价抗血清。在多个皮内部位施用的抗原的小剂量(ng 水平)似乎最可靠。生产和加工多克隆抗血清的技术是本领域中公知的，见，例如，Mayer 和 Walker (1987)，将其公开完整并入本文作为参考。兔的有效免疫方案在 Vaitukaitis, J. 等人 J. Clin. Endocrinol. Metab. 33:988-991(1971)中公开，将其公开完整并入本文作为参考。可以每隔一定时间进行强化注射，当抗血清的抗体效价开始下降时收获抗血清，可以半定量地例如通过在针对已知浓度的抗血清的琼脂中双向免疫扩散确定抗体效价。见，例如，Ouchterlony, O. 等人, 第 19 章: Handbook of Experimental Immunology D. Wier (编者) Blackwell (1973)。抗体的平台浓度在 0.1 到 0.2 mg/ml 血清(约 $12 \mu\text{M}$)的范围内。通过制备竞争性结合曲线，如 Fisher, D., 第 42 章: Manual of Clinical Immunology, 第二版 (Rose 和 Friedman, 编者) Amer. Soc. For Microbiol., Washington, D. C. (1980)所描述的确抗原的抗血清亲和力。

单克隆抗体

备选地，抗-CPP 抗体可以是单克隆抗体。可以通过杂交瘤产生单克隆抗体，其中用免疫剂免疫小鼠、仓鼠，或者其他适宜的宿主动物以引起淋巴细胞，该淋巴细胞产生或者能够产生特异结合所述免疫剂的抗体，例如，Kohler 和 Milstein, Nature 256:495 (1975)。免疫剂通常包括 CPP 或者其融合蛋白和任选地载体。备选地，可以体外免疫淋巴细胞。通常，如果希望非人哺乳动物来源，使用脾细胞或者淋巴结细胞，或者如果希望人来源的细胞，则使用外周血单核细胞(“PBLs”)。用适宜的融合试剂，如聚乙二醇将淋巴细胞与永生化细胞系融合以产生杂交瘤细胞，例如，Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE, Academic Press, 59-103 页(1986); Liddell 和 Cryer, A Practical Guide to Monoclonal Antibodies (John Wiley & Sons, New York, 1991); Malik 和

Lillenoj, Editors, Antibody Techniques (Academic Press, New York, 1994).

通常,永生化细胞系为转化的哺乳动物细胞,例如,大鼠、小鼠、牛或者人来源的骨髓瘤细胞。杂交瘤细胞培养在适宜的培养基中,该培养基优选含有抑制未融合的永生化细胞的生长或存活的一种或多种物质。例如,如果亲代细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤转磷酸核糖基酶(HGPRT),杂交瘤的培养基将通常含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(HAT),这些物质将防止 HGPRT-缺陷细胞的生长。优选的永生化细胞系为有效融合、提供抗体的稳定的高水平生产,并对培养基如 HAT 培养基敏感的细胞系。更优选的永生化细胞系为鼠或者人骨髓瘤细胞系,其可以例如从美国典型培养物保藏中心(ATCC), Rockville, MD 得到。已经描述了人骨髓瘤和小鼠-人异骨髓瘤细胞系生产人单克隆抗体,例如, Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984); Brodeur 等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, 51-63 页(1987)。

可以测定杂交瘤在其中培养的培养基(上清液)针对 CPP 的单克隆抗体的存在。优选地,通过免疫沉淀或者体外结合测定法,如放射免疫测定法(RIA)或者酶联免疫吸附测定法(ELISA)确定杂交瘤上清液中存在的单克隆抗体的结合特异性。适宜的技术和测定法是本领域中公知的。可以通过例如 Munson 和 Pollard, Anal. Biochem. 107:220 (1980)的斯卡查德分析法确定单克隆抗体的结合亲和力。鉴定了产生抗体的目的杂交瘤细胞后,可以通过有效稀释方法克隆所述细胞并通过标准方法生长 (Goding, 1986,如前)。用于该目的的适宜的培养基包括,例如, Dulbecco 改良的 Eagle 培养基和 RPMI-1640 培养基。备选地,杂交瘤可以作为腹水在哺乳动物体内生长。通过本领域中技术人员惯用的免疫球蛋白纯化方法,例如,蛋白质 A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或者亲和层析可以从培养基或者腹水液分离或者纯化所选克隆分泌的单克隆抗体。

还可以通过重组 DNA 方法,如美国专利号 4,816,567 中描述的那些方法制备单克隆抗体。可以从 CPP 特异杂交瘤细胞分离编码本发明的单克隆抗体的 DNA,并例如通过使用能够与编码鼠抗体的重链和轻链的基因特异

结合的寡核苷酸探针对所述 DNA 测序。一旦分离，可以将该 DNA 插入表达载体，然后将其转染到不产生免疫球蛋白的宿主细胞如猿 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或者骨髓瘤细胞，以得到在重组宿主细胞中合成单克隆抗体。例如，通过用鼠重链和轻链恒定结构域的编码序列代替同源的人序列(Morrison 等人, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851-6855 (1984); Neuberger 等人, *Nature* 312:604-608 (1984); Takeda 等人, *Nature* 314:452-454 (1985)), 或者通过将非免疫球蛋白多肽的编码序列的所有或部分序列共价连接到该免疫球蛋白编码序列可以修饰所述 DNA。非免疫球蛋白多肽可以替代本发明抗体的恒定区, 或者可以替代本发明抗体的一个抗原结合位点的可变结构域以产生嵌合的二价抗体。抗体还可以是单价抗体。制备单价抗体的方法是本领域中熟知的。例如, 体外方法适于制备单价抗体。用本领域中公知的常规技术可以是完整抗体的消化以产生其片段, 尤其 Fab 片段。

通过重组方法, 通过提取信使 RNA, 构建 cDNA 文库, 并选择编码抗体分子的节段的克隆, 也可以产生本发明杂交瘤特征性抗体和抗体片段。下面是公开生产抗体的重组技术的代表性参考文献: Wall 等人, *Nucleic Acids Research*, 5 卷, 3113-3128 页(1978); Zakut 等人, *Nucleic Acids Research*, 8 卷, 3591-3601 页(1980); Cabilly 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81 卷, 3273-3277 页(1984); Boss 等人, *Nucleic Acids Research*, 12 卷, 3791-3806 页(1984); Amster 等人, *Nucleic Acids Research*, 8 卷, 2055-2065 页(1980); Moore 等人, 美国专利 4,642,334; Skerra 等人, *Science*, 240 卷, 1038-1041 页(1988); Huse 等人, *Science*, 246 卷, 1275-1281 页(1989); 和美国专利 6,054,297; 5,530,101; 4,816,567; 5,750,105; 和 5,648,237, 将这些专利并入作为参考。具体地, 这些技术可用于产生种间单克隆抗体, 其中一个物种的抗体结合区与另一物种的抗体非结合区组合以减小免疫原性, 例如, Liu 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 卷 84, 3439-3443 页 (1987), 和专利 6,054,297 和 5,530,101。优选地, 重组产生的 Fab 和 Fv 片段在细菌宿主系统中表达。优选地, 通过哺乳动物细胞培养技术产生全长抗体。更优选地,

在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或者 NSO 细胞中表达全长抗体。

通过 ELISA 可以筛选多克隆和单克隆抗体。如在其他固相免疫测定法中, 试验可以基于大分子非特异吸附到塑料的倾向性。该反应的不可逆性(不损失免疫学活性)使得可以形成抗原-抗体复合体, 将这些复合体与未结合的物质简单分离。为了滴定抗肽血清, 肽缀合到不同于用于免疫的载体的载体, 所述肽吸附到 96 孔微量滴定板的孔中。然后让吸附的抗原在含有抗肽血清稀释液的孔中反应。洗除未结合的抗体, 并允许剩余的抗原-抗体复合体与对所免疫动物的 IgG 特异的抗体反应。该第二抗体缀合有酶如碱性磷酸酶。当加入酶底物时产生可见的有色反应物指出哪些孔具有结合的抗肽抗体。使用分光光度计读数允许更好地定量所结合的肽特异的抗体的量。高效价抗血清在 10^{-3} 到 10^{-5} 稀释之间产生线性滴定曲线。

CPP 肽载体

本发明包括源于 CPPs 的免疫原, 和含有本发明的载体和肽之间缀合物的免疫原。本文中所用术语免疫原指能够导致免疫应答的物质。本文中所用术语载体指任何物质, 其当化学缀合到本发明的肽时允许用所得缀合物免疫的宿主生物产生对该缀合肽特异的抗体。载体包括血红细胞、噬菌体、蛋白质或者合成颗粒, 如琼脂糖珠。优选地, 载体为蛋白质, 如血清白蛋白、 γ -球蛋白、匙孔血蓝蛋白、甲状腺球蛋白、卵清蛋白、血纤蛋白原, 等等。

将合成肽与载体连接的一般技术在若干文献中描述, 例如, Walter 和 Doolittle, "针对合成肽的抗体", Setlow 等人编者 Genetic Engineering, 5 卷, 61-91 页(Plenum Press, N.Y., 1983); Green 等人, Cell, 28 卷, 477-487 页(1982); Lerner 等人, Proc. Natl. Acad. Sci., 78 卷, 3403-3407 页(1981); Shimizu 等人, 美国专利 4,474,754; 和 Ganfield 等人, 美国专利 4,311,639。因此, 将这些参考文献并入作为参考。而且, 用于将半抗原连接到载体的技术基本上与上面参考的技术相同, 例如, Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, New York, 1985) 中的第 20 章。将肽连接到载体的四种最常用的方案是(1)用于氨基偶联的戊二醛, 例如, Kagan 和

Glick, 在 Jaffe 和 Behrman 编, *Methods of Hormone Radioimmunoassay* 一书的 328-329 页 (Academic Press, N.Y., 1979), 和 Walter 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 卷 77, 5197-5200 页 (1980) 中公开的; (2) 用于将羧基偶联到氨基的水溶性碳二亚胺, 例如, Hoare 等人, *J. Biol. Chem.*, 卷 242, 2447-2453 页 (1967) 所公开的; (3) 用于酪氨酸向酪氨酸侧链偶联的二-重氮基联苯胺(BDB), 如 Bassiri 等人, 46-47 页, Jaffe 和 Behrman 编 (上文引用), 和 Walter 等人 (上文引用) 公开的; 和 (4) 用于将半胱氨酸(或者其他巯基)偶联到氨基的马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羧基琥珀酰亚胺酯(MBS), 如 Kitagawa 等人, *J. Biochem. (Tokyo)*, 79 卷, 233-239 页 (1976), 和 Lerner 等人 (上文引用) 中公开的。选择用于将给定肽偶联到蛋白质载体的适宜方法的一般原则可以陈述如下: 参与连接的基团必须在序列中仅出现一次, 优选出现在片段的适宜的末端。例如, 如果酪氨酸残基出现在由于其潜在抗原特征而选择的序列的主要部分, 那么将不使用 BDB。类似地, 位于中央的赖氨酸排除了戊二醛方法, 天冬氨酸和谷氨酸的经常出现排除了碳二亚胺方法。另一方面, 适宜的残基可以位于作为附着点的所选序列片段的任一末端, 而不管这些残基是否在“天然”蛋白质序列中出现。不像氨基和羧基末端, 内部节段在“未附着的末端”将与天然蛋白质中发现的相同序列显著不同, 天然蛋白质中多肽主链是连续的。通过乙酰化 α 氨基然后通过羧基末端附着该肽可以一定程度地补救该问题。使用放射性标记的肽可以方便地测量载体蛋白的偶联效率, 可以在一步合成中使用放射性氨基酸或者通过碘化酪氨酸残基标记完成的肽可以制备所述放射性标记的肽。肽中存在酪氨酸也允许建立灵敏的放射免疫测定法(如果希望)。因此, 如果酪氨酸不是天然多肽所定义的肽序列的部分, 可以将酪氨酸导入作为末端残基。

优选的载体为蛋白质, 优选的蛋白质载体包括牛血清白蛋白、肌球蛋白、卵清蛋白(OVA)、匙孔血蓝蛋白(KLH), 等等。通过 MBS 可以将肽经半胱氨酸连接到 KLH, 如 Liu 等人, *Biochemistry*, 18 卷, 690-697 页 (1979) 所公开。将肽溶于磷酸缓冲盐溶液(pH 7.5), 0.1 M 硼酸钠缓冲液(pH 9.0)

或者 1.0 M 乙酸钠缓冲液(pH 4.0)。选择肽溶解的 pH 以优化肽溶解性。通过 Ellman 的方法(Ellman, Arch. Biochem. Biophys., 82 卷, 7077 页 (1959)) 确定可溶肽的游离半胱氨酸含量。对于每种肽, 将 0.25 ml 10mM 磷酸缓冲液(pH 7.2)中的 4 mg KLH 与 0.7 mg MBS(溶于二甲基甲酰胺)在室温下反应并搅拌 30 分钟。逐滴加入 MBS 以确保甲酰胺的局部浓度不会过高, 因为 KLH 在>30%甲酰胺中是不溶的。然后将反应产物 KLH-MBS 通过用 50 mM 磷酸钠缓冲液(pH 6.0)平衡的 Sephadex G-25 以除去游离 MBS, 从柱洗脱液(通过 OD280 监视)的峰级分回收的 KLH 经估计约为 80%。然后 KLH-MBS 与溶于 1 ml 所选缓冲液中的 5 mg 肽反应。调节 pH 到 7-7.5, 并在室温下搅拌反应物 3 小时。通过将缀合物样品对磷酸缓冲盐溶液透析用放射性肽监视偶联效率, 偶联效率为 8% 到 60%。一旦得到肽-载体缀合物, 通过如 Campbell, Monoclonal Antibody Technology (Elsevier, New York, 1984); Hurrell 编, Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications (CRC Press, Boca Raton, FL, 1982); Schreier 等人, Hybridoma Techniques (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1980); 美国专利 4,562,003 等公开的标准技术生产多克隆或单克隆抗体。尤其将美国专利 4,562,003 并入作为参考。

人源化抗体

本发明的抗-CPP 抗体还可以包括人源化抗体或者人抗体。术语“人源化抗体”指非人(例如, 鼠)抗体的人源化形式, 其为嵌合抗体, 以及该人源化形式的免疫球蛋白链或者片段(如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')、或者抗体的其他抗原结合部分序列), 所述人源化形式、其免疫球蛋白链或者片段含有来源于非人抗体的序列的某部分。人源化抗体包括这样的人免疫球蛋白, 其中来自人免疫球蛋白的互补决定区(CDR)的残基被具有目的结合特异性、亲和力和能力的非人物种如小鼠、大鼠或兔 CDR 的残基替换。通常, 人抗体将基本上含有至少一个, 通常两个可变结构域的所有部分, 其中所有或者基本上所有 CDR 区相应于非人免疫球蛋白的那些 CDR 区并且所有或者基本上所有 FR 区为人免疫球蛋白共有序列的那些 FR 区。人源

化抗体任选将还含有免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,该免疫球蛋白恒定区通常为人免疫球蛋白的恒定区(Jones 等人, *Nature* 321:522-525 (1986) 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992))。人源化非人抗体的方法是本领域中熟知的。通常,人源化抗体具有导入该抗体的来自非人来源的一个或多个氨基酸以便更像人抗体,而仍然保持该抗体的最初结合活性。抗体的人源化方法在 Jones 等人, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann 等人, *Nature* 332:323-327 (1988);和 Verhoeyen 等人, *Science* 239:1534-1536 (1988)中进一步详述。这些“人源化”抗体是嵌合抗体,因为基本上小于完整人可变结构域已经被来自非人物种的相应序列替换。

异缀合抗体 (heteroconjugate antibody)

本发明范围内还包括含有两种共价连接抗体的异缀合抗体。可以使用合成蛋白质化学中公知的方法体外制备异缀合抗体,所述方法包括使用交联剂的方法。例如,可以用二硫化物交换反应或者通过形成硫醚键制备免疫毒素。

双特异性抗体

双特异性抗体具有对至少两种不同抗原的结合特异性。这些抗体为单克隆的,优选人抗体或者人源化抗体。本发明的双特异性抗体的结合特异性之一是针对 CPP,另一种优选针对细胞表面蛋白质或者受体或者受体亚单位。制备双特异性抗体的方法是本领域中公知的,并且通常,双特异性抗体的重组产生是基于杂交瘤细胞中两种免疫球蛋白重链/轻链对的共同表达,其中两种重链具有不同的特异性,例如, Milstein 和 Cuello, *Nature* 305:537-539 (1983)。考虑到免疫球蛋白重链和轻链的随机分配导致杂交瘤可能产生 10 种不同的抗体分子,所以正确分子的纯化通常需要某种类型的亲和纯化,例如亲和层析。

CPP 抗体的用途

CPP 抗体可用作功能拮抗剂。优选地,这些抗体对 CPPs 特异。更优选地,本发明的拮抗剂包含对 CPPs 特异的片段或者结合组合物。本文中所用术语“重链可变区”指这样的多肽:(1)其长为 110 到 125 个氨基酸,

和(2)从重链的 N'-末端氨基酸开始, 该多肽的氨基酸序列相应于本发明抗体重链的氨基酸序列。同样, 术语“轻链可变区”指这样的多肽, (1)其长为 95 到 115 个氨基酸, 和(2)从轻链的 N'-末端氨基酸开始, 该多肽的氨基酸序列相应于本发明抗体轻链的氨基酸序列。本文中所用术语“单克隆抗体”指能够特异结合 CPPs 的免疫球蛋白的同种群体。优选地, 本发明的拮抗剂来源于对 CPPs 特异的单克隆抗体。通过抑制 CPPs 的生物活性的能力选择能够阻断、或者中和 CPPs 的单克隆抗体。

抗体片段的用途也是熟知的, 例如, Fab 片段: Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Amsterdam, 1985); 和 Fv 片段: Hochman 等人, Biochemistry, 12 卷, 1130-1135 页(1973), Sharon 等人, Biochemistry, 15 卷, 1591-1594 页(1976) 和 Ehrlich 等人, 美国专利 4,355,023; 和抗体半分子: Auditore- Hargreaves, 美国专利 4,470,925。

优选地, 单克隆抗体、来源于本发明单克隆抗体的 Fv 片段、Fab 片段或者其他结合组合物具有对 CPPs 的高亲和力。可以通过常规技术, 包括胞质共振、ELISA 或者平衡透析可以测量单克隆抗体和相关分子对 CPPs 的亲和力。例如, 使用 BIAcore 2000 仪器 (Biacore AB, Uppsala, Sweden), 按照生产商推荐的方案可以通过胞质共振技术实施亲和力测量。优选地, 通过 ELISA 如美国专利 6,235,883 或者类似参考文献中描述的那样测量亲和力。优选地, 本发明的 CPPs 和单克隆抗体之间的解离常数为小于 10^{-5} 摩尔。更优选地, 该解离常数小于 10^{-8} 摩尔; 更优选地, 该解离常数小于 10^{-9} 摩尔; 最优选地, 该解离常数为 10^{-9} 到 10^{-11} 摩尔范围。

此外, 本发明的抗体可用于检测 CPPs。这些检测方法可有利地用于诊断心血管疾病, 尤其冠状动脉病。本发明的抗体可用于包括抗原-抗体反应的多数测定法中。测定法可以是均相或多相的。在均相测定方法中, 样品可以是生物样品或者体液, 如血清、尿、全血、淋巴液、血浆、唾液、细胞、组织和体外培养的细胞或组织分泌的物质。如果需要, 可以将样品预处理以除去不想要的物质。免疫学反应通常包括特异抗体、标记的分析物和怀疑含有该抗原的样品。可以用本文中描述的任何标记基团直接标记

抗原。当抗体与所标记的分析物结合时，来自该标记的信号被直接或间接改变。在均相溶液中实施免疫学反应和其程度的检测。可以使用的免疫化学标记包括自由基、荧光染料、酶、噬菌体、辅酶，等等。

在多相测定方法中，试剂通常为样品、特异抗体以及可产生可检测信号的物质。通常将样本置于支持体，如平板或者载玻片上，并与液相中的抗体接触。然后该支持体与液相分离并检查支持体相或者液相的可检测信号，使用产生这种信号的方法或者信号产生系统。信号与样品中抗原的存在相关。产生可检测信号的方法包括使用放射性标记、荧光化合物、酶等等。代表性多相免疫测定法为放射免疫测定法、荧光免疫方法、酶联免疫测定法，等等。

关于上面的免疫测定法技术的详细讨论，见 "Enzyme-Immunoassay," Edward T. Maggio, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1980。还参见例如美国专利号 3,690,834; 3,791,932; 3,817,837; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,966,345; 和 4,098,876, 上面的列举并不是穷尽的。将标记缀合到抗体和抗体片段的方法是本领域中熟知的。这些方法可以在美国专利号 4,220,450; 4,235,869; 3,935,974; 和 3,966,345 中发现。其中可以使用本发明抗体的技术的另一实例是免疫过氧化物酶标记 (Sternberger, Immunocytochemistry (1979)104-169 页)。备选地，抗体可以结合到放射性物质或者药物以分别形成放射性药物或者药品(Carrasquillo 等人, Cancer Treatment Reports (1984) 68:317-328)。

使用本发明抗体的测定法的一个实施方案包括使用本发明的单克隆抗体附着的表面。该表面的根本结构可以采取不同的形式，具有不同的成分或者可以是成分的混合物或者层状材料或者它们的组合。根据使用和测量方式，该表面可以为多种形状和形式并且可以具有不同的尺寸规格。说明性表面可以是衬垫、珠、盘，或者带，它们可以是平的、凹的或凸的。厚度不是关键的，通常厚为约 0.1 到 2 mm，并且为任何方便的直径或者其他尺寸规格。该表面通常在棒、管、毛细管、纤维、带、盘、板、比色杯

上支持并且将通常是多孔的和多功能的或者能够多功能化以便允许共价结合抗体和允许结合其他化合物,所述化合物形成产生可检测信号的方法的一部分。多种有机和无机聚合物(天然和合成的)和它们的组合可用作固体表面的材料。阐明性聚合物包括聚乙烯、聚丙烯、聚(4-甲基丁烯)、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸酯、聚(对苯二甲酸乙二酯)、人造丝、尼龙、聚(乙烯基丁酸酯)、硅酮、聚甲醛、纤维素、乙酸纤维素、硝酸纤维素和胶乳。其他表面包括纸、玻璃、陶瓷、金属、准金属、半导体材料、水泥、硅酸盐等等。还包括形成凝胶、明胶、脂多糖、硅酸盐、琼脂糖和聚丙烯酰胺的基质或者形成若干水相的聚合物,如葡聚糖、聚烷撑二醇(2到3个碳原子的亚烷基)或者表面活性剂,如磷脂。通过文献中通常可得到的熟知技术可以实现抗体对表面的结合(见,例如,“Immobilized Enzymes,” Ichiro Chibata, Press, New York (1978) 和 Cuatrecasas, J. Bio. Chem., 245: 3059 (1970))。在按照本发明的该方面实施测定法中,将样品与水性介质混合并将介质与结合抗体的表面接触。该水性介质中可以包括标记,该标记可以同时或者随后加入,以便提供与表面结合的可检测信号。产生可检测信号的方法包括掺入标记的分析物或者可以包括使用缀合标记的另一种单克隆抗体。如果需要,实施分离和洗涤步骤。所检测的信号与样品中 CPP 的存在有关。本发明的范围内包括对样品支持体的校准。作为阐明而不是限制,根据本发明测定法的一个具体实施方案包括使用诸如载玻片或者培养皿孔的支持体。该技术包括用适宜的固定材料将样品固定在支持体上并将在载玻片上的样品与单克隆抗体孵育。用适宜的缓冲液如磷酸缓冲盐溶液洗涤后,将支持体与针对该抗体的经标记特异结合性配偶体接触。如所希望的孵育后,用水性缓冲液再次洗涤载玻片并确定所标记的单克隆抗体与所述抗原的结合。如果标记为荧光性的,可以用盖玻片上的荧光抗体固定液覆盖载玻片然后用荧光显微镜检查以确定结合的程度。另一方面,标记可以是缀合到单克隆抗体的酶,可以通过检查载玻片酶活性的存在确定结合程度,可以通过形成沉淀、颜色等等指示所述酶活性。使用本发明抗体测定法的具体实例为双决定簇 ELISA 测定法。通过常规技术,将支持体如玻璃

或者乙烯基板用 CPP 特异抗体覆盖。该支持体与怀疑含有 CPP 的样品(通常在水性介质中)接触。孵育 30 秒到 12 小时后,支持体与所述介质分离,用例如水或者水性缓冲液介质洗涤支持体以除去未结合的 CPP,并将支持体与 CPP 特异抗体(通常仍在水性介质中)接触。将抗体用酶例如辣根过氧化物酶或者碱性磷酸酶直接和间接标记。孵育后,支持体与介质分离,如上洗涤。确定支持体或者水性介质的酶活性。该酶活性与样品中 CPP 的量相关。

本发明还包括用于实施上面公开的方法的试剂盒,例如,诊断性测定试剂盒。在一个实施方案中,该试剂盒在包装组合中含有(a)上面更详细定义的单克隆抗体和(b)与上面的单克隆抗体特异结合的配偶体的缀合物和能够产生可检测信号的标记。所述试剂还可包括辅助试剂,如缓冲剂和蛋白质稳定剂,例如多糖等等。该试剂盒可以还包括(需要时),信号产生系统的其他成员,其中所述标记是所述系统的成员,还包括用于在试验中降低背景干扰的试剂、对照试剂、用于实施试验的装置,等等。在其他实施方案中,诊断试剂盒包括本发明的单克隆抗体的缀合物和能够产生可检测信号的标记。还可以存在上述辅助试剂。

此外,通过标准技术,如亲和层析或者免疫沉淀可以用抗-CPP 抗体(例如,单克隆抗体)分离 CPPs。例如,抗-CPP 抗体可以方便从细胞纯化天然 CPPs 和纯化宿主细胞中表达的重组产生的 CPP。此外,抗-CPP 抗体可用于分离 CPP 以帮助检测低浓度 CPP(例如,血浆、细胞裂解物或者细胞上清液中)或者评估 CPP 的丰度和表达模式。抗-CPP 抗体可诊断性地作为临床试验方法的部分监视组织中蛋白质水平,例如,以确定特定治疗方案的功效。通过将抗体偶联(例如,物理连接)到标记基团可以方便检测。

蛋白质阵列

本发明多肽的检测、纯化和筛选可以用如美国专利 6225027 和美国专利申请 20010014461(将它们的公开完整并入本文作为参考)存留层析(优选,蛋白质阵列或芯片)完成。简言之,存留层析描述了这样的方法,其中多肽(和/或其他样品组分)保留在吸附剂(例如,阵列或芯片)上并随后检测。

这些方法包括(1)在许多不同的吸附剂/洗脱剂组合(“选择性条件”)下将来自样品的多肽选择性吸附到基质和(2)通过解吸光谱测定法(例如,通过质谱)检测所吸附的多肽的存留。在常规层析方法中,多肽在检测前从吸附剂洗脱下来。通过解吸光谱测定法检测吸附层析的偶联提供了额外的灵敏性,能够快速分析具有不同选择性条件的存留组分,以及平行处理在不同洗脱条件下吸附到不同位点(即,“亲和位点”,或者“点”)的组分。

这些方法可用于:组合地、生物化学分离和纯化 CPPs; 研究差异的基因表达; 检测蛋白质水平的不同(例如,用于诊断); 和检测分子识别事件(例如,用于筛选和药物发现)。从而,本发明提供了分子发现和诊断装置,其特征在于包括平行和多路多肽加工能力。本发明的多肽和 CPP-结合物质优选附着到标记基团,并从而可以直接检测,使得在一次单位操作期间从相同的“电路”(即,可寻址的“芯片”位置)同时传输两种或多种信号。

通过质谱法检测 CPPs

根据本发明,可以用任何仪器、方法、程序等确定样品中蛋白质的身份和丰度。得到身份的优选方法是通过质谱法,其中样品中的蛋白质分子受到电离,然后检测和确定蛋白质离子的所得质量和电荷。

为了使用质谱法分析蛋白质,优选将蛋白质转化成气体-离子相。可以使用多种蛋白质电离方法,包括例如快速离子轰击(FAB)、等离子体解吸、激光解吸、热解吸,优选地,电喷雾电离(ESI)和基质辅助的激光解吸/电离(MALDI)。可以用许多不同的质量分析仪分析肽和蛋白质,包括但不限于,飞行时间(TOF)、离子阱(ITMS)、傅立叶变换离子回旋加速器(FTMS)、四极离子阱和扇形(电和/或磁)分光计。关于离子阱 MS, 见,例如,美国专利号 5,572,025。质量分析仪可以单独使用或者与其他质量分析仪以串联质谱使用。在后一情况中,第一个质量分析仪可用于将蛋白质离子(前体离子)相互分开并确定样品中多种蛋白质成分的分子量。第二个质量分析仪可以用于分析每种分开的成分,例如,通过使用例如,惰性气体将前体离子打断成产物离子。可以使用质量分析仪的任何希望的组合,包括,例如,三重四极、串联飞行时间、离子阱和/或它们的组合。

不同种类的检测器可用于检测蛋白质离子。例如,可以使用破坏性检测器,如离子电子倍增器或者低温检测器(例如,美国专利号 5,640,010)。此外,可以使用非破坏性检测器,如离子阱,其用作四极离子阱质量分析仪或者 FTMS 中的离子电流拾波器装置。

对于 MALDI-TOF,可以使用许多样品制备方法,包括干燥小滴(Karas and Hillenkamp, Anal. Chem., 60:2299-2301, 1988),真空干燥(Winberger 等人, Proceedings of the 41st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, San Francisco, 5 月 31 日-6 月 4 日, 1993, 75a-b 页),碾碎晶体(Xiang 等人, Rapid Comm. Mass Spectrom., 8:199-204, 1994),缓慢晶体生长(Xiang 等人, Org. Mass Spectrom., 28:1424-1429, 1993);活性膜(Mock 等人, Rapid Comm. Mass Spectrom., 6:233-238, 1992; Bai 等人, Anal. Chem., 66:3423-3430, 1994),气动喷雾(Kochling 等人, Proceedings of the 43rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics; Atlanta, GA, 5 月 21-26, 1995, 1225 页);电喷雾(Hensel 等人, Proceedings of the 43rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics; Atlanta, GA, 5 月 21 -26, 1995, 947 页);快速溶剂蒸发(Vorm 等人, Anal. Chem., 66:3281-3287, 1994);夹层(Li 等人, J. Am. Chem. Soc., 118:11662-11663, 1996);和两层法(Dal 等人, Anal. Chem., 71:1087-1091, 1999)。还参见,例如 Liang 等人, Rapid Commun. Mass Spectrom., 10: 1219-1226, 1996; van Adrichem 等人, Anal. Chem., 70:923-930, 1998。

对于 MALDI 分析,通过将样品与液相的能量吸收化合物或者胶体(基质)混合,并最后在惰性探针的表面上干燥该溶液得到固态将样品制备成固态或者共晶体或者薄膜。在某些情况下,能量吸收分子(EAM)为呈递至表面的整体样本组分。不管 EAM 应用策略如何,探针含量允许干燥成固态后导入激光解吸/电离飞行时间质谱仪(LDIMS)中。

通常用电发射检测器如电子倍增器(EMP)或者微通道板(MCP)实现 TOF 质谱法中离子检测。这些装置都通过将初级入射带电离子转化成二

级、三级、四级等等电子的级联。通过单个入射带电颗粒的撞击产生的二级电子的概率被转化成该带电颗粒的离子-电子转化效率(或者更简单地,转化效率)。级联事件的总电子产率当与入射带电颗粒的总数相比时通常描述为检测器增益。因为通常 MCPs 的总应答时间远远优于 EMPs 的,所以 MCPs 是用于增强质量/电荷分辨率的优选的电-发射检测器。然而, EMPs 在检测支出动能的离子群体中运行良好,其中快速应答时间和宽频率带宽不是必要的。

在优选方面,为了分析所消化的蛋白质,使用液相层析串联质谱仪(LC-TMS)。该系统提供了通过使用液相层析随后串联质谱法分离样品的额外阶段。

在优选方面,用 MS 和 MS-MS 分析分析了根据实施例 1 中描述的柱洗脱的蛋白质。例如,可以将从 RP2 洗脱的完整蛋白质的小部分转化成使用 LC-ESI MS 的在线检测。将蛋白质在平板上等分试样,允许用或不用胰蛋白酶消化,为 MALDI-MS 以及 ESI-MS 作准备,以及制备具有不同基质的 MALDI 板。从而,这些方法除了允许得到关于完整质量的信息外,还允许通过肽质量指纹和 MS-MS 技术进行分析。

本文中描述的分离和分级分离蛋白质的方法提供了含有少数不同蛋白质的单独的蛋白质或者级分。通过用质谱确定这些蛋白质片段化导致的蛋白质和肽的分子质量可以鉴定这些蛋白质。使用蛋白质序列数据库中可以利用的信息,可以比较硅上产生的蛋白质水解肽质量模式和通过试验观察到的肽质量。可以编辑“目标蛋白质名单”,并基于(或其他标准)理论和实验蛋白质水解片段之间匹配数排列候选蛋白质。可以进入一些网站,它们提供用于蛋白质在线鉴定的软件,所述鉴定是基于肽作图和序列数据库搜索策略(例如, <http://www.expasy.ch>)。使用 MS 进行肽作图和测序的方法在 WO 95/252819、美国专利号 5,538,897、美国专利号 5,869,240、美国专利号 5,572,259、和美国专利号 5,696,376 中描述,还见 Yates, J. Mass Spec., 33:1 (1998)。

从质谱仪收集的数据通常包括每种检测事件的强度和质荷比。可以以

任何适宜的形式记录光谱数据，这些形式包括，以图、数字或者数字或模拟形式的电子形式。光谱优选记录在保存介质中，该介质包括，例如，磁性介质，如软盘、磁带，或者硬盘；光介质，如 CD-ROM 或者光盘；或者 ROM-CHIPS。

给定样品的质谱通常提供关于蛋白质强度、质荷比和分子量的信息。在本发明的优选实施方案中，样品中蛋白质的分子量用作匹配标准以查询数据库。常规地计算分子量，例如，通过带单电荷的质子化分子离子减去电离质子的质量，通过将所测量的质荷比与多电荷离子的电荷数相乘并减去电离质子的数计算分子量。

根据本发明可以使用多种数据库。有用的数据库包括，包含基因组数据、表达的基因序列，和/或表达的蛋白质序列的数据库。优选的数据库包括已知生物、器官、组织或者细胞类型中存在的蛋白质的核苷酸序列来源的分子量。有许多算法可以鉴定可读框(ORF)和将核苷酸序列转化成蛋白质序列和分子量信息。可以利用若干可以公开进入的数据库，包括 SwissPROT/TrEMBL 数据库 (<http://www.expasy.ch>)。

通常，质谱仪装备商业软件，其鉴定高于某个阈值水平的峰、计算所检测的离子的质量、电荷和强度。可以直接从光谱数据完成分子量与特定输出峰的关联，即，其中离子上电荷为 1 并且因此分子量等于计数器值减去电离质子的质量。然而，多种平衡离子和加合物，如 N、C 和 K⁺ 使得蛋白质离子复杂化。在这种情况下，预期给定蛋白质离子将显示出多个峰，如三重峰，代表相同蛋白质的不同的离子态(或者种类)。从而，可能需要分析和处理光谱数据以确定从相同蛋白质得到的峰。可以常规地，如 Mann 等人，anal. Chem., 61:1702-1708 (1989)所描述的实施该分析。

在从质谱仪计算的分子量与从数据库如基因组或表达基因数据库预测的分子量匹配中，可能必须考虑翻译后加工。有多种加工事件修饰蛋白质结构，这些事件包括蛋白质水解加工、除去 N-末端甲硫氨酸、乙酰化、甲基化、糖基化、磷酸化，等等。

可以查询数据库中匹配所述分子量的一系列未知蛋白质。范围窗口可

以由仪器的准确性、用于制备样品的方法等决定。基于光谱中命中数(命中为匹配), 鉴定或者分类未知蛋白质或者肽。

通过质谱法鉴定一种或多种 CPP 的方法可用于心血管疾病的诊断和预后。优选地, 这些方法用于检测人血浆中存在的一种或多种 CPP。代表性技术在美国专利申请 02/0060290、02/0137106、02/0138208、02/0142343、02/0155509 中描述, 将这些专利申请的公开完整并入本文作为参考。

诊断和预后用途

本文中描述的核酸分子、蛋白质、蛋白质同系物、和抗体可用于一种或多种下面的方法中:如本文中进一步描述的诊断测定法、预后测定法、监视临床试验、筛选测定法、和药物遗传学。

本发明提供了用于检测 CPP 核酸和蛋白质的诊断和预后测定法, 如进一步描述。还提高了用于检测 CPPs 和 CPP 靶分子尤其天然激动剂和拮抗剂之间相互作用的诊断和预测测定法。

本发明提供了鉴定在两种或多种样品之间差异表达的多肽的方法。

“差异表达”指样品之间多肽的数量或质量中的不同。可以在从转录到翻译后修饰的蛋白质表达的任一阶段导致这些不同。例如, 使用蛋白质阵列方法, 两种样品结合到吸附物(例如, 芯片)的不同组上的亲和位点并比较识别图以鉴定通过两组吸附物差别存留的多肽。差别存留包括该多肽中的定量存留以及定性不同。例如, 蛋白质的翻译后修饰中的不同可以导致识别图的不同, 其可以检测为结合特征的不同(例如, 糖基化蛋白质不同地结合凝集素吸附剂)或者质量的不同(例如, 翻译后切割产物)。在某些实施方案中, 吸附物可以具有亲和点阵列, 这些点选自诊断疾病或者综合征的标记的组合。

将样品暴露于多种条件以通过解吸光谱法(例如, 质谱法)分析可以鉴定样品间多肽水平的差异(例如, 血浆样品中差异表达的 CPPs)。通过检测理化特征(例如, 分子质量)可以鉴定未知蛋白质, 并且该信息可以用于搜寻数据库中具有相似图谱的蛋白质。

检测 CPP 的优选方法利用质谱法技术。这些方法提供了关于样品,

例如为了诊断或者预后提交的生物样品中存在的**CPP**同种型的大小和特征的信息。质谱法技术在标题为“通过质谱法检测**CPPs**”的章节中详述。实施例1概述了优选的检测方案，其中在质谱法表征前通过层析分离生物样品。本发明提供了检测生物样品中**CPP**的方法，其包括步骤：通过至少一个层析步骤分级分离生物样品(例如，血浆、血清、淋巴、脑脊液、特定组织的细胞裂解物)；将级分进行质谱法；将质谱法中观察到的多肽种类的特征与**CPP**多肽(例如，**CPP6-7**，如图1中公开)的已知特征比较。

本发明的分离的核酸分子可用于例如检测**CPP mRNA**(例如，生物样品)或者**CPP**编码基因中的遗传改变，和调节**CPP**活性，如下文中进一步描述。**CPP**可用于治疗特征为**CPP**的产生不足或者**CPP**靶标分子过量产生的疾病。此外，**CPPs**可用于筛选天然存在的**CPP**靶分子，筛选调节优选激活**CPP**活性的药物或化合物，以及治疗特征是**CPP**产生不足或者产生与野生型**CPP**相比活性降低或者异常的**CPP**形式的疾病。此外，本发明的抗-**CPP**抗体可以用于检测和分离**CPP**，调节**CPP**的生物利用度，和调节**CPP**活性。

本发明的一个实施方案涉及使用方法(例如，诊断测定法、预后测定法或者治疗的预防/治疗方法)，其中使用本发明的分子(例如，**CPP**、**CPP**核酸或者**CPP**抑制剂或者激活剂)，例如，以诊断、预后和/或治疗疾病，所述疾病中表现出前面提到的**CPP**活性的任一种。在另一实施方案中，本发明包括使用方法(例如，诊断测定法、预后测定法或者治疗的预防/治疗方法)，其中使用本发明的分子，例如，以诊断、预后和/或治疗受试者，优选人类受试者，其中前述活性的任一种受到病理性干扰。在优选实施方案中，使用方法包括对受试者，优选人类受试者施用本发明的分子以诊断、预后和/或治疗性治疗。在另一实施方案中，使用方法包括对人类受试者施用本发明的分子。

例如，本发明包括确定**CPP**是否在生物样品中表达的方法，该方法包括：**a)**将所述生物样品与**i)**在严格条件下与**CPP**核酸杂交的多核苷酸；或者**ii)**选择性结合**CPP**的检测性多肽(例如，抗体)接触；和**b)**检测所述多核

苷酸和所述样品中 RNA 种类之间是否存在杂交,或者所述检测性多肽是否与所述样品中多肽结合。检测到所述杂交或者所述结合表明所述 CPP 在所述样品中表达。优选地,所述多核苷酸为引物,其中通过检测含有所述引物序列的扩增产物的存在检测所述杂交,或者所述检测性多肽为抗体。

在某些实施方案中,检测包括在聚合酶链式反应(PCR)(见,例如,美国专利号 4,683,195 和 4,683,202,将它们的公开完整并入本文作为参考),如锚定 PCR 或者 RACE PCR,或者备选地,在连接链式反应(LCR)(见,例如,Landegren 等人 (1988) Science 241:1077-1080;和 Nakazawa 等人 (1994) PNAS 91:360-364,将它们的公开完整并入本文作为参考)中使用探针/引物,连接链式反应可尤其用于检测 CPP-编码基因中的点突变(见 Abravaya 等人 (1995) Nucleic Acids Res. 23:675-682,将其公开完整并入本文作为参考)。

还考虑了确定哺乳动物优选人具有升高或降低的 CPP 表达水平的方法,该方法包括:a)提供来自所述哺乳动物的生物样品;和 b)将所述生物样品的 CPP 或者编码 CPP 的 CPP RNA 种类的量与从对照样品检测或者预期的水平比较。与所述对照样品中检测或预期的所述水平相比,所述生物样品内所述 CPP 或者所述编码 CPP 的 CPP RNA 种类的量增加表明所述哺乳动物具有水平升高的 CPP 表达,与所述对照样品中检测或预期的所述水平相比,所述生物样品内所述 CPP 或者所述编码 CPP 的 CPP RNA 种类的量减少表明所述哺乳动物具有水平降低的 CPP 表达。

本发明还涉及预测医学领域,其中诊断测定法、预后测定法,和监视临床试验用于预后目的以预防性地治疗个体。因此,本发明的一方面涉及诊断测定法,其用于确定生物样品(例如,血液、血浆、细胞、组织)背景中 CPP 和/或核酸表达以及 CPP 活性,从而确定个体是否受到与异常 CPP 表达或者活性有关的疾病或疾病的折磨,或者处于患有与异常 CPP 表达或者活性有关的疾病的危险中。本发明还提供了预后(或预测)测定法,其用于确定个体是否处于患有与 CPP、核酸表达或者活性有关的疾病的危险中。例如,可以测定生物样品中 CPP 编码基因中突变。这些测定法可用于

预后或者预测性目的以在特征为 CPP 表达或活性或者与 CPP 表达或活性有关的疾病发作前预防性治疗该个体。

术语“生物样品”旨在包括从个体分离的组织、细胞和生物体液，以及个体中存在的组织、细胞和体液。即，本发明的检测方法可用于体外以及体内检测生物样品中的 CPP mRNA、蛋白质或者基因组 DNA。优选的生物样品为生物体液，如淋巴、脑脊液、血液和特别是血浆。例如，用于检测 CPP mRNA 的体外技术包括 RNA 杂交和原位杂交。用于检测 CPP 的体外技术包括质谱法、酶联免疫吸附测定法(ELISAs)、蛋白质印迹、免疫沉淀和免疫荧光。用于检测编码 CPP 的基因组 DNA 的体外技术包括 DNA 印迹。此外，用于检测 CPP 的体内技术包括向个体导入标记的抗-CPP 抗体。

在优选实施方案中，主题方法可表征为总体上包括检测个体(例如人类患者)的组织样品中是否存在至少以以下两者之一表征的遗传病变：(i)编码主题 CPP 之一的基因的突变或者(ii)CPP 编码基因的错误表达。为了阐明，可以通过确定如下几项的至少一种检测这些遗传病变：(i)从 CPP 编码基因缺失一个或多个核苷酸，(ii)向该基因添加一个或多个核苷酸，(iii)该基因的一个或多个核苷酸替代，(iv)该基因的重大染色体重排或者扩增，(v)该基因的信使 RNA 转录物水平的重大改变，(vi)该基因的异常修饰，如基因组 DNA 的甲基化模式的异常，(vii)存在该基因的信使 RNA 转录物的非野生型剪接模式，和(viii)表达水平降低，表明编码 CPP 的转录物的调节元件中损伤或者稳定性降低。

在又一个代表性实施方案中，可以通过用对甲基化敏感并且针对 CPP 编码基因(包括侧翼和内含子序列)中存在的识别位点的一种或多种限制性内切核酸酶消化来自患者的基因组 DNA 可以检测 CPP 核酸的异常甲基化模式。见，例如，Buiting 等人 (1994) Human Mol Genet 3:893-895。通过凝胶电泳分离消化的 DNA，并与来源于例如基因组或者 cDNA 序列的探针杂交。可以通过比较从样品 DNA 产生的限制性模式与已知甲基化的标准的限制性模式确定 CPP 编码基因的甲基化状态。

在又一个实施方案中, 提供了诊断测定法, 其检测 CPP 结合细胞表面或者胞外蛋白质的能力。例如, 将希望检测 CPP 突变体, 其尽管在细胞中以明显水平表达, 但是在结合 CPP 靶蛋白质中有缺陷(对于靶标的结合亲和力减小或者增加)。这些突变体可以从例如突变(如点突变)产生, 所述突变用诊断性 DNA 测序技术, 或者通过上述免疫测定法检测是不切实际的。本发明因此还考虑了诊断性筛选测定法, 其通常还包括从样品组织克隆一种或多种 CPP 表达基因, 和在允许检测该重组基因产物与靶蛋白相互作用的条件下表达所克隆的基因。如从本文标题为“药物筛选测定法”的章节中提出的多种测定法的描述可以明显看出, 可以用多种技术确定 CPP 结合其他组分的能力。这些技术可用于检测 CPP 编码基因中的突变, 所述突变产生这样的突变蛋白, 其相对于野生型 CPP 对 CPP 靶蛋白的结合亲和力更高或更低。相反地, 通过转换 CPP 靶蛋白和 CPP 哪一个是“诱饵”和哪一个来源于患者样品, 该主题测定法还可用于检测 CPP 靶蛋白突变体, 其相对于 CPP 靶蛋白的野生型对 CPP 具有更高或更低的结合亲和力。

在代表性实施方案中, 如通过使用本文中描述的 GST 融合蛋白和谷胱甘肽处理的微量滴定板可以提供作为固定化蛋白质(“靶标”)的靶蛋白。

在另一实施方案中, 所述方法还包括从对照受试者得到生物样品, 将所述对照样品与能够检测 CPP、mRNA 或者基因组 DNA 的化合物或试剂接触, 从而检测到该生物样品中 CPP、mRNA 或者基因组 DNA 的存在, 和比较对照样品中 CPP、mRNA 或者基因组 DNA 的存在与受试样品中 CPP、mRNA 或者基因组 DNA 的存在。本发明还包括用于检测生物样品中 CPP、mRNA 或者基因组 DNA 存在的试剂盒。例如, 该试剂盒可以含有:能够检测生物样品中 CPP、mRNA 或者基因组 DNA 的存在的标记的化合物或者试剂; 确定该样品中 CPP 的量的方法; 和比较该样品与标准中的 CPP 量的方法。该化合物或试剂可以包装在适宜的容器中。该试剂盒还可以含有使用该试剂盒检测 CPP 或核酸的使用说明。

药物筛选测定法

本发明提供了鉴定候选调节剂(例如,小分子、肽、抗体、肽模拟物或者其他药物)的方法(此处也称作“筛选测定法”),所述候选调节剂结合 CPPs,对例如 CPP 表达或者优选 CPP 生物活性具有抑制或者活化作用,或者对例如 CPP 靶分子的活性具有抑制或者活化作用。在一些实施方案中,小分子可以用组合化学产生或者可以从天然产物文库得到。测定法可以基于细胞的或者基于非细胞的测定法。药物筛选测定法可以是结合测定法或者更优选地功能测定法,如进一步的描述。

当本发明用于药物开发,例如,以确定 CPP 多肽或者候选调节剂诱导抗-心血管疾病应答的能力时,用于分析至少一种 CPP 水平的体液优选来自非人哺乳动物。非人哺乳动物优选为这样的非人哺乳动物,其中内源和/或外源试剂对抗心血管疾病应答的诱导可以预测人体中这种应答的诱导。啮齿类(小鼠、大鼠等等)和灵长类动物尤其适宜用于本发明的该方面。

使用如本文中进一步描述的筛选测定法发现调节 CPP 活性至少 5%,更优选至少 10%,更优选至少 30%,更优选至少 50%,更优选至少 70%,甚至更优选至少 90%的试剂可以选用于进一步测试其作为预防性和/或治疗性抗心血管疾病剂。

发现增加 CPP 活性的试剂可以单独或者与其他适宜的试剂或者治疗联合用于例如减轻心血管疾病的症状。发现抑制 CPP 活性的试剂可用于例如调节心血管疾病的治疗方案。

另一方面,使用如本文中进一步描述的筛选测定法发现调节 CPP 表达至少 5%,更优选至少 10%,更优选至少 30%,更优选至少 50%,更优选至少 70%,甚至更优选至少 90%的试剂可以选用于进一步测试其作为预防性和/或治疗性抗心血管疾病剂。

蛋白质阵列方法可用于筛选和药物发现。例如,受体/配体对的一个成员停靠到吸附物,并且在受试物质的存在下确定该成员结合结合配偶体的能力。因为可以快速试验吸附,可以容易地筛选受试物质的组合文库调节相互作用的能力。在优选的筛选方法中, CPPs 停靠到所述吸附物。优选标记结合配偶体,从而使得可以检测相互作用。

备选地,在某些实施方案中,受试物质停靠到吸附物。本发明的多肽暴露于受试物质并筛选结合。优选的受试物质包括与疾病或疾病相关的物质,如在疾病(优选心血管疾病)中差异存在的蛋白质、脂质,或者内分泌因子。

在其他实施方案中,测定法是基于细胞的测定法,其中表达 CPP 或者其生物活性部分的细胞与受试化合物接触并确定受试化合物抑制、活化或者增加 CPP 活性的能力。可以通过监视 CPP 或者其生物活性部分的生物活性而确定受试化合物抑制、活化或增加 CPP 活性的能力。细胞例如可以为哺乳动物来源、昆虫来源、细菌来源或者酵母细胞。

在一个实施方案中,本发明提供了筛选候选或受试化合物的测定法,所述候选或受试化合物为 CPP 或者其生物活性部分的靶分子。在另一实施方案中,本发明提供了筛选候选或受试化合物的测定法,所述候选或受试化合物结合或调节 CPP 或者其生物活性部分的活性。使用本领域中组合文库方法中公知的多种方法的任一种可以得到本发明的受试化合物,所述方法包括:生物学文库;可空间寻址的平行固相或者溶液相文库;需要去卷积(deconvolution)的合成文库方法;“一珠一化合物”文库方法;和使用亲和层析选择的合成文库方法。生物学文库方法与肽文库一起使用,而其他四种方法可应用于肽、非肽寡聚体或者小分子化合物文库(Lam, K. S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145, 将其公开完整并入本文作为参考)。

合成分子文库的方法的实例可以在本领域中发现,例如,在:DeWitt 等人 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6909; Erb 等人 (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann 等人 (1994). *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho 等人 (1993) *Science* 261:1303; Carrell 等人 (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059 和 2061;和 Gallop 等人 (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233 中,将这些文献的公开完整并入本文作为参考。

可以在溶液中(例如, Houghten (1992) *Biotechniques* 13:412-421), 或者珠子(Lam (1991) *Nature* 354:82-84)、芯片(Fodor (1993) *Nature* 364:555-556)、细菌(Ladner 美国专利号 5,223,409)、孢子(Ladner 美国专

利号'409)、质粒(Cull 等人 (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869)或噬菌体(Scott 和 Smith (1990) *Science* 249:386-390); (Devin (1990) *Science* 249:404-406); (Cwirla 等人 (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382); (Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310); (Ladner 如前)上展示化合物文库。

确定受试化合物抑制或者增加 CPP 活性的能力可以例如,通过将 CPP 或者其生物活性部分与标记基团偶联来实现,从而该 CPP 或者其生物活性部分与其同源靶分子的结合可以通过检测复合体中标记的 CPP 或者其生物活性部分来确定。例如,复合体形成的程度可以通过免疫沉淀该复合体或者通过实施凝胶电泳来测量。

本发明的范围内还包括确定化合物与其相关靶分子相互作用的能力而不标记任何相互作用物。例如,可以用微型生理功能测定计检测化合物与其同源靶分子的相互作用而不用标记该化合物或者该靶分子。McConnell, H. M. 等人 (1992) *Science* 257:1906-1912, 将其公开完整并入本文作为参考。微型生理功能测定计如细胞传感器是一种分析仪器,其使用光可寻址的电势测定传感器(LAPS)测量细胞酸化其环境的速度。该酸化速度的改变可以用于指示化合物和受体的相互作用。

在优选实施方案中,该测定法包括:将表达 CPP 或者其生物活性分子的细胞与靶分子接触以形成测定混合物,将所述测定混合物与受试化合物接触,并确定该受试化合物抑制或增强该 CPP 或者其生物活性部分的活性的能力。确定该受试化合物抑制或增强该 CPP 或者其生物活性部分的活性的能力包括:确定该受试化合物抑制或增强该 CPP 表达细胞的生物活性(例如,与 CPP 靶分子相互作用,如上面讨论)的能力。

在另一优选实施方案中,该测定法包括将应答 CPP 或者其生物活性部分的细胞与 CPP 或者其生物活性部分接触,以形成测定混合物,将所述测定混合物与受试化合物接触,并确定该受试化合物调节该 CPP 或者其生物活性部分的活性的能力。确定该受试化合物调节该 CPP 或者其生物活性部分的活性的能力包括确定该受试化合物调节该 CPP 应答细胞的生物活

性的能力。

在另一实施方案中，测定法为基于细胞的测定法，其包括将表达 CPP 靶分子(即，与 CPPs 相互作用的分子)与受试化合物接触并确定该受试化合物调节(例如，刺激或抑制)该 CPP 靶分子的活性的能力。确定该受试化合物调节 CPP 靶分子的活性的能力可以例如通过评估靶分子的活性，或者评估 CPP 结合或者与 CPP 靶分子相互作用的能力来实现。

确定 CPP 结合或者与 CPP 靶分子相互作用的能力例如，可以通过上述关于直接或间接测定结合的方法之一来实现。在优选实施方案中，该测定法包括将 CPP 或者其生物活性部分与结合所述 CPP 的已知化合物(例如，CPP 抗体或者靶分子)接触以形成测定混合物，将所述 CPP 与受试化合物在所述已知化合物之前或之后接触，并确定该受试化合物与 CPP 相互作用的能力。确定所述受试化合物与 CPP 相互作用的能力包括确定与该已知化合物相比，该受试化合物优先结合该 CPP 或者其生物活性部分的能力。确定该 CPP 结合 CPP 靶分子的能力也可以使用诸如实时生物分子相互作用分析(BIA)的技术实现。Sjolander, S. 和 Urbaniczky, C. (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345 和 Szabo 等人 (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705, 将它们的公开完整并入本文作为参考。如本文中所用的“BIA”为实时研究生物特异相互作用而不标记任何相互作用物的技术(例如，BIAcore)。表面胞质共振(SPR)的光学现象的改变可用于指示生物分子之间实时反应。

在另一实施方案中，测定法为无细胞的测定法，其中 CPP 或者其生物活性部分与受试化合物接触并确定该受试化合物调节(例如，刺激或抑制)该 CPP 或者其生物活性部分的能力。在优选实施方案中，确定 CPP 调节或者与 CPP 靶分子相互作用的能力可以通过确定靶分子的活性确定。例如，通过靶分子与 CPP 或者其片段接触并测量靶标的细胞第二信使(例如，cAMP、STAT3、Akt、细胞内 Ca^{2+} 、二酰甘油、IP3 等)的诱导，检测靶标对适宜的底物的催化/酶活性，检测报告基因(含有与编码可检测标记例如萤光素酶的核酸有效连接的靶标应答性调节元件)，或者检测靶标调节的细

胞应答,例如,信号转导或者蛋白质:蛋白质相互作用可以确定靶标分子的活性。

本发明的无细胞测定法可以使用分离蛋白质(例如, CPPs 或者其生物活性部分或者 CPPs 靶标结合的分子)的可溶和/或膜结合的形式。对于使用分离蛋白质膜结合形式的无细胞测定法,希望利用增溶剂从而保留在溶液中的为经分离蛋白质的膜结合形式。这些增溶剂的实例包括非离子去污剂,如正-辛基葡糖苷、正-十二烷基葡糖苷、正十二烷基麦芽苷、辛酰基-N-甲基葡糖酰胺 (glucamide)、癸酰基-N-甲基葡糖酰胺、Triton TM X-100、Triton TM X-114、Thesit TM、异十三烷基聚(乙二醇醚)_n、3-[(3-胆酰胺丙基)二甲基氨基]-1-丙烷磺酸(CHAPS)、3-[(3-胆酰胺丙基)二甲基氨基]-2-羟基-1-丙磺酸(CHAPSO),或者 N-十二基 = N,N-二甲基-2-氨基-1-丙磺酸。

在本发明的上述测定方法的又一个实施方案中,希望固定 CPP 或者其靶分子以方便将一种或两种蛋白质的复合形式与未复合的形式分离,以及适应测定法的自动化。存在或不存在候选化合物时受试化合物与 CPP 的相互作用,或者 CPP 与靶分子的相互作用可以在适于含有反应物的任何容器中或者通过本文中描述的任何固定化方案实现。备选地,复合物可以从基质解离,并使用标准技术确定 CPP 结合水平或者活性。

将蛋白质固定在基质上的其他技术可以用于本发明的筛选测定法中。例如,利用生物素和链亲和素可以固定 CPP 或者 CPP 靶分子。用本领域中公知的技术(例如,生物素化试剂盒, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.)可以从生物素-NHS(N-羟基-琥珀酰亚胺)制备生物素化 CPP 或者靶分子,并将所述分子固定在链亲和素包被的 96 孔板(Pierce Chemical)的孔中。备选地,与 CPP 或者靶分子反应但是不干扰 CPP 与其靶分子结合的抗体可以衍生化到板的孔中,并且未结合的靶标或者 CPP 通过抗体缀合捕获在孔中。检测这些复合物的方法(除了上述关于 GST-固定化复合物的那些方法)包括用与 CPP 或者靶分子反应的抗体免疫检测复合物,以及酶联测定法,其依赖于检测与 CPP 或者靶分子结合的酶活性。

在另一实施方案中,在一种这样的方法中鉴定了 CPP 表达调节剂,

其中细胞与候选化合物接触并确定细胞中 CPP mRNA 或者蛋白质的表达。存在候选化合物时 CPP mRNA 或者蛋白质的表达水平与不存在候选化合物时 CPP mRNA 或者蛋白质的表达水平相比较。然后基于该比较可以将候选化合物鉴定为 CPP 表达的调节剂。例如, 当存在候选化合物时 CPP mRNA 或者蛋白质的表达比不存在该候选化合物时的更大(统计学显著更大)时, 将该候选化合物鉴定为 CPP mRNA 或者蛋白质表达的刺激剂。备选地, 当存在候选化合物时 CPP mRNA 或者蛋白质的表达比不存在该候选化合物时的更小(统计学显著更小)时, 将该候选化合物鉴定为 CPP mRNA 或者蛋白质表达的抑制剂。通过本文中关于检测 CPP mRNA 或者蛋白质所描述的方法可以确定细胞中 CPP mRNA 或者蛋白质的表达水平。

在本发明的另一方面, CPP 可以用作双杂交测定法或者三杂交测定法中的“诱饵蛋白质”(见, 例如, 美国专利号 5,283,317; Zervos 等人 (1993) *Cell* 72:223-232; Madura 等人 (1993) *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054; Bartel 等人 (1993) *Biotechniques* 14:920-924; Iwabuchi 等人 (1993) *Oncogene* 8:1693-1696; 和 Brent WO94/10300, 将它们的公开完整并入本文作为参考), 以鉴定其他蛋白质, 所述其他其他蛋白质结合或者与 CPPs 相互作用(“CPP 结合蛋白”或者“CPP-bp”)并且与 CPP 活性有关。这些 CPP 结合蛋白也可能通过 CPP 或者 CPP 靶标作为例如 CPP 介导的信号途径的下游元件而参与信号的传播。备选地, 这些 CPP 结合蛋白质可能是 CPP 抑制剂。

双杂交系统是基于多数转录因子的调节性质, 这些转录因子由可分离的 DNA-结合和活化结构域组成。简言之, 该测定法利用两种不同的 DNA 构建体。在一种构建体中, 编码 CPP 或者其片段的基因与编码已知转录因子(例如 GAL-4)的 DNA 结合结构域的基因融合。在其他构建体中, 来自 DNA 序列文库的编码未鉴定的蛋白质(“猎物”或者“样品”)的 DNA 序列与编码已知转录因子的活化结构域的基因融合。如果“诱饵”和“猎物”蛋白质能够体内相互作用而形成依赖 CPP 的复合体, 那么该转录因子的 DNA-结合和活化结构域非常接近。该接近允许转录报导基因(例如, LacZ),

其与应答转录因子的转录调节位点有效连接。可以检测报导基因的表达并且可以分离含有功能转录因子的细胞菌落并将其用于得到编码与所述CPP相互作用的蛋白质的克隆基因。

本发明还涉及通过上述筛选测定法鉴定的新试剂和通过使用这些测定法产生这些试剂的方法。因此，在一个实施方案中，本发明包括通过包括前述筛选测定法(例如，基于细胞的测定法或者无细胞测定法)的任一步骤的方法可以得到的化合物或试剂。

因此，在本发明范围内还包括如本文中鉴定的试剂在适宜的动物模型中的用途。例如，如本文中鉴定的试剂(例如，CPP调节剂，或者CPP结合配偶体)可以用于动物模型中以确定用这种试剂处理的功效、毒性，或者副作用。备选地，如本文中鉴定的试剂可用于动物模型中以确定这种试剂的作用机理。此外，本发明涉及通过上述筛选测定法鉴定的新试剂的用途，用于如本文中描述的治疗。优选地，这些试剂活化或增强CPP生物活性。

本发明还涉及通过上述筛选测定法鉴定的新试剂的用途，用于如本文中描述的诊断、预后、预防和治疗。因此，本发明范围内还包括这些试剂的用途，用于设计、配制、合成、制造和/或产生用于如本文中描述的诊断、预后、或预防的药物或药物组合物。例如，在一个实施方案中，本发明包括通过参考通过上述筛选测定法之一可以得到的化合物的结构和/或性质合成或者生产药物或者药物组合物的方法。例如，基于通过一种方法得到的化合物的结构和/或性质可以合成药物或者药物组合物，在所述方法中表达CPP靶分子的细胞与受试化合物接触，并确定该受试化合物结合、调节CPP靶分子的活性的能力。在另一代表性实施方案中，本发明包括基于通过一种方法得到化合物的结构和/或性质可以合成或产生药物或者药物组合物的方法，在得到化合物的结构和/或性质的方法中，CPP或者其生物活性部分与受试化合物接触并确定该受试化合物结合、或调节(例如，刺激或抑制)CPP或者其生物活性部分的活性的能力。

基于动物的药物筛选

还有利地是实施体内药物筛选测定法。在非人动物中实施体内筛选测

定法以发现可能在心血管疾病中起作用的有效 CPP 调节剂。心血管疾病的基于动物的模型系统包括,但不限于,非重组动物和转基因动物。

心血管疾病的非重组动物模型可以包括,例如,遗传模型。这些遗传心血管疾病模型包括 apoB 或者 apoR 缺陷猪(Rapacz, 等人, 1986, Science 234:1573-1577) 和 Watanabe 可遗传的高脂血(WHHL)兔(Kita 等人, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 84: 5928-5931)。动脉粥样硬化的非重组的、非遗传的动物模型可以包括,例如,猪、兔或者大鼠模型,其中动物已经例如暴露于通过饮食添加 LDL 导致的化学创伤,或者通过气球导管血管成形术导致的机械创伤。

如现有技术(Ferns, G. A. A. 等人 (1991) Science, 253:1129-1132) 中所指出的,再狭窄的大鼠颈动脉损伤模型可以是潜在治疗作用的有用指征。该模型的一个实例在美国专利 6500859 中公开,将该专利公开并入本文作为参考。简言之,由国家老年动物照料和使用研究所委员会(National Institute on Aging Animal Care and use Committee)批准的方案使用来自 GRC 群体的 6 个月 Wistar 大鼠,这些大鼠经 20 mg/kg 体重戊巴比妥, 2 mg/kg 体重氯胺酮,和 4 mg/kg 体重甲苯噻嗪腹膜内麻醉。左外颈动脉经 2-French Fogarty 栓子切除术导管插管,用盐水膨胀并上下穿过颈总动脉三次以产生膨胀的、去内皮损伤。将动物在损伤后 2 小时开始用适宜剂量的受试物质或者仅用载体腹膜内注射进行治疗(例如,基于体重每天施用,在适宜的溶液如 1:2:2:165 DMSO:Cremophor EL:脱水乙醇:磷酸缓冲盐溶液中)。在接下来的 4 天,受试物质或者仅载体腹膜内注射每天施用一次。11 天后,如上文麻醉动物(8 只处理的和 10 只载体处理的)并分离颈动脉并将其在 10% 缓冲福尔马林中固定并用石蜡包埋。将颈动脉的横断切片固定在显微镜载玻片上并用苏木精和伊红染料染色。将颈动脉图像投影到数字板并测量内膜和中膜的截面面积。新生内膜面积(增厚)的减小表明受试物质是有效的抗再狭窄剂。

发现干扰来自肠道腔的胆汁酸再循环以因果关系减小血清胆固醇水平。已经积累了流行病学数据,其表明这种减小导致动脉粥样硬化的疾病

状态的改善(Stedronsky, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1210, 255-287 (1994))。已经证明抑制胆固醇酯转移蛋白(CETP)有效改变血浆 HDL/LDL 比例, 并且预期阻碍某些心血管疾病的恶化和/或形成。CETP 的抑制将导致血浆 HDL 胆固醇升高和血浆 LDL 胆固醇降低, 从而提供治疗上有益的血浆脂质特性(McCarthy, *Medicinal Res. Revs.*, 13, 139-59 (1993))。抑制兔回肠将 ^{14}C -牛磺胆酸摄入胆汁(CETP 抑制)的化合物的体内测定法在美国专利 6489366 和 Une, 等人 *Biochimica et Biophysica Acta*, 833, 196-202 (1985)中公开, 将这些文献并入本文作为参考。

简言之, 用仲丁硫巴比妥 (100mg/kg) 麻醉雄性 Wistar 大鼠(200-300 g)。用 10 英寸长的 PE10 管对胆管插管。小肠暴露并摆在网垫上。在从小肠和盲肠接头的 12cm 处插入套管(1/8" luer 锁紧套口, 锥形内螺纹接头)。在该相同接头 4cm 处切下切口(使用 8cm 长回肠)。用 20 毫升加温的 Dulbecco 磷酸缓冲盐溶液, pH 6.5(PBS)冲洗肠节段。将远端开口用 20 cm 长硅酮管(0.02" I.D..倍数.0.037" O.D.)插管。近端管安装到蠕动泵并用加温的 PBS 以 0.25 ml/分钟洗涤肠 20 分钟。连续监视肠节段的温度。在实验开始时, 用 3 ml 注射器将 2.0ml 对照样品(0.05 mCi/mL ^{14}C 牛磺胆酸与 5 mM 未放射标记的牛磺胆酸)装入肠节段并开始收集胆汁样品。对照样品以 0.25 ml/分钟的速度灌注 21 分钟。在该方法的前 27 分钟每 3 分钟收集胆汁样品级分。21 分钟的样品灌注后, 用 20 ml 温 PBS(使用 30 ml 注射器)洗涤回肠环, 然后用温 PBS 以 0.25 ml/分钟洗涤该环 21 分钟。如上描述的开始第二次灌注, 但是使用受试化合物(21 分钟施用后洗涤 21 分钟), 并在前 27 分钟内每 3 分钟收集胆汁样品。如果必要, 如上进行第三次灌注, 其通常含有对照样品。

此外, 测量肝胆固醇浓度是确定受试物质针对心血管疾病的有效性的有用测定法。在该测定法中, 将肝脏组织称重并在氯仿:甲醇(2:1)中匀浆。匀浆和离心后分离上清液并将其在氮气下干燥。将残渣溶于异丙醇中并通过酶学方法使用胆固醇氧化酶和过氧化物酶, 如 Allain, C. A. 等人, *Clin. Chem.*, 20, 470 (1974)(将其并入本文作为参考)描述的测量胆固醇含量。

类似地，可以如下确定血清胆固醇。使用 Wako Fine Chemicals (Richmond, Va.) 的商业试剂盒；胆固醇 C11，目录号 276-64909 测量总血清胆固醇。用 Sigma Chemical Co. HDL 胆固醇试剂，目录号 352-3 (硫酸葡聚糖方法) 沉淀 VLDL 和 LDL 后，可以用所述相同试剂盒测定 HDL 胆固醇。还用 Sigma Chemical Co. GPO-Trinder，目录号 337-B 通过酶法测定总血清甘油三酯(空白)(TGI)。VLDL 和 LDL(VLDL+LDL) 胆固醇浓度计算为总胆固醇和 HDL 胆固醇之间的差。相对于对照受试物质处理的样品中 VLDL+LDL 胆固醇的减少表明为有效抗心血管疾病剂。

例如，如美国专利 6489366 描述的，还可以利用用于评估脂质降低药物的狗模型。

简言之，从卖主如 Marshall 农场的重量为 6-12kg 雄性小猎兔犬每天一次喂食两小时，并随意给水。可以将狗随机分配到剂量组，每组 6 到 12 条狗，如：载体，i.g.；1 mg/kg，i.g.；2 mg/kg，i.g.；4 mg/kg，i.g.；2 mg/kg，p.o. (胶囊中粉剂)。可以用管饲管胃内施用溶于水性溶液(例如，0.2% 吐温 80 溶液[聚氧乙烯一油酸，Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.]) 中的治疗物质。最初给药前，可以在喂食前在上午从头静脉抽取血样以便评估血清胆固醇(总的和 HDL) 和甘油三酯。在上午喂食前对动物给药，持续连续的几天。允许动物吃 2 小时，之后除去任何剩余的食物。将在研究结束时 2 天期间内收集粪便并分析其胆汁酸或者脂质含量。在处理期结束时还采集血样以与研究前血清脂质水平比较。用标准斯氏 T 检验以 $p < 0.05$ 确定统计学显著性。

类似地测量血清脂质。从禁食狗的头静脉收集血液并置于血清分离管 (Vacutainer SST, Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, N.J.) 中。将血液以 2000 转/分钟离心 20 分钟并倒出血清。可以用 Wako 酶诊断试剂盒(胆固醇 CII) (Wako Chemicals, Richmond, Va.) 以 96 孔形式测量总胆固醇，利用胆固醇氧化酶反应产生过氧化氢，通过比色法测量过氧化氢。以平板的前 2 列制备从 0.5 到 10 μg 胆固醇的标准曲线。将血清样品(20-40 μl ，取决于预期的脂质浓度)或者已知血清对照样品一式两份地加入单独的孔

中。加入水使每孔体积达到 100 μ l。向每孔加入显色试剂的 100 μ l 等分试样，并在 37°C 孵育 15 分钟后在 500 nm 对平板读数。

可以用 Sigma 试剂盒号 352-3 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) 测定 HDL 胆固醇，该试剂盒利用硫酸葡聚糖和 Mg 离子选择性沉淀 LDL 和 VLDL。将每种血清样品 150 μ l 体积加入每个离心管中，然后加入 15 μ l HDL 胆固醇试剂(Sigma 352-3)。混合样品并以 5000 转/分钟离心 5 分钟。将上清液的 50 μ l 等分试样与 200 μ l 盐水混合并用与总胆固醇测量相同的方法测定。

用 Sigma 试剂盒号 337 以 96 孔板形式测量甘油三酯。该方法将测量甘油三酯与脂蛋白脂肪酶反应后释放的甘油。1 到 24 μ g 甘油的标准溶液(Sigma 339-11)可以用于产生标准曲线。将血清样品(20-40 μ l，取决于预期的脂质浓度)一式两份加入孔中。加入水使每孔体积达到 100 μ l。向每孔加入 100 μ l 显色试剂。孵育 15 分钟后在 540 nm 对平板读数并从标准曲线计算甘油三酯值。用空白酶试剂运行平行测定平板以校正血清样品中的内源性甘油。

可以如 US 6462046(将其公开并入本文作为参考)中描述的评估受试化合物对 db/db 小鼠(C578BL/KsJ-db/db Jcl)中血清葡萄糖和血清胰岛素的影响。将化合物溶于载体(例如，由蒸馏水中的 2% 吐温 80 组成)并经口施用。通过体重确定剂量。通常根据动物生物医学研究的国际指导原则(International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals)(CIOMS Publication No. ISBN 92 90360194, 1985)实施包括动物的实验法和处理的工作的所有方面。用葡萄糖-HA 测定试剂盒(Wako, 日本)确定血清葡萄糖，用 ELISA 小鼠胰岛素测定试剂盒 (SPI bio, 法国)确定胰岛素。适宜的阳性对照为曲格列酮(Helios Pharmaceutical, Louisville, Ky.)。

将动物分成 20 组，每组 4 只动物。动物在 8-10 周龄时重为 52 $\pm$ 5 gms。在实验期间动物可以自由接近实验室食物(Fwusow Industry Co., 台湾)和水。处理前，从每只动物采集血样(处理前血液)。四组动物为载体组，它

们仅接受载体剂量。载体组的每只动物经口接受 100、30、10 或 1 ml 载体/kg 体重。曲格列酮溶液(10 ml/kg 体重, 溶于吐温 80/水)经口施用于四个阳性对照组, 剂量分别为 100、30、10 和 1 ml/kg 体重。将受试化合物类似地作为溶液经口施用于四组动物, 每组接受化合物的不同剂量。抽取处理前血液即刻后、24 小时后和 48 小时后施用载体、阳性对照和受试化合物溶液。施用最后剂量后 1.5 小时抽血(处理后血液)。通过酶法(Mutaratose-GOD)确定血清葡萄糖并通过 ELISA(小鼠胰岛素测定试剂盒)确定胰岛素水平。计算每组的平均 SEM, 通过比较处理前血液和处理后血液得到血清葡萄糖和胰岛素的抑制百分数。确定相对于处理前血样, 处理后血液中血清葡萄糖和胰岛素水平降低的百分数, 并对对照和试验溶液组和载体组之间的比较应用未配对斯氏 t 检验。在 $P < 0.05$ 时认为是显著差异。曲格列酮作为有效的抗心血管疾病剂, 在 10 mg/kg 体重施用导致血糖水平降低($25 \pm 2\%$)。

美国专利 6121319(将其公开并入本文)描述了高胆固醇血症兔中动脉粥样硬化恶化的测定法。处死兔并得到主动脉。将主动脉用苏丹-4 染色并分析染色程度。对受试物质治疗和未治疗的喂饲脂质的兔中病变覆盖的百分数主动脉表面积作图。用有效抗动脉粥样硬化剂治疗的兔的主动脉具有更少的染色, 表明动脉粥样硬化减轻。此外, 对主动脉切片用针对 VCAM-1 或 Ram-11 抗原的抗体对 VCAM-1 表达或者巨噬细胞累积染色。与对照处理的样品相比降低的 VCAM-1 表达和巨噬细胞积累表明为有效试剂。

还可以在灵长类模型中确定 LDL 胆固醇的减少。例如, 在受试化合物给药前通过喂饲高脂肪胆固醇食物使猕猴成为高胆固醇血症型。然后用受试化合物或者对照载体对猕猴经口施用两周。猴子中血清 LDL 胆固醇百分数随时间期间降低表明受试化合物为有效抗动脉粥样硬化剂。

药物组合物

当本发明的多肽以可溶形式例如作为转化的酵母或者哺乳动物细胞的分泌产物表达时, 可以根据本领域中的标准方法纯化所述多肽, 这些方法包括硫酸铵沉淀、离子交换层析、凝胶过滤、电泳、亲和层析, 根据例

如,“酶纯化和相关技术”, *Methods in Enzymology*, 22:233-577 (1977), 和 *Scopes, R., Protein Purification: Principles and Practice* (Springer-Verlag, New York, 1982) 提供这些纯化的指导。同样,当本发明的多肽以不溶性形式表达,例如,表达为聚集体或者包含体时,可以通过适宜的方法纯化它们,这些技术包括通过离心从破碎的宿主细胞分离包含体,用离液剂或者还原剂使包含体溶解,稀释溶解的混合物,降低离液剂和还原剂的浓度从而所述多肽采取生物活性构象。后一方法在下面的参考文献中公开,将这些参考文献并入作为参考:Winkler 等人, *Biochemistry*, 25: 4041-4045 (1986); Winkler 等人, *Biotechnology*, 3: 992-998 (1985); Koths 等人, 美国专利 4,569,790;和欧洲专利申请 86306917.5 和 86306353.3。

能够调节并优选地增加 CPP 生物活性的化合物,优选小分子而且包括本发明的肽、CPP 核酸分子、CPP 和抗-CPP 抗体,可以掺入到适于施用的药物组合物中。这些组合物通常含有可药用载体。本文中所用术语“可药用载体”旨在包括与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂,等等。这些介质和试剂用于药理学活性物质是本领域中熟知的。除去与所述活性化合物不相容的任何常规介质或试剂外,考虑将常规介质或试剂用于本组合物。该组合物中还可以掺入补充的活性化合物。

配制本发明的药物组合物以与其计划的施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外例如,静脉内、皮内、皮下、经口(例如,吸入)、透皮(局部)、透粘膜、和直肠施用。用于肠胃外、皮内或者皮下应用的溶液剂或悬浮剂可以包括下面的组分:无菌稀释剂,如注射用水、盐水溶液、固定化油、聚乙二醇类、甘油、丙二醇或者其他合成溶剂;抗细菌剂,如苯甲醇或者羟苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或者亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸;缓冲剂,如乙酸盐、柠檬酸盐或者磷酸盐和调节张力的试剂,如氯化钠或者右旋糖。可以用酸或者碱,如盐酸或者氢氧化钠调节 pH。肠胃外制剂可以封闭在安瓿、一次性注射器或者玻璃或者塑料制造的多剂量小瓶中。

适于可注射用途的药物组合物包括无菌水性溶液(当水可溶时)或者分散剂和用于临时制备无菌可注射溶液或者分散剂的无菌粉剂。对于静脉内施用,适宜的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL® (BASF, Parsippany, N.J.)或者磷酸缓冲盐溶液(PBS)。在所有情况下,组合物必须是无菌的并且应该为容易注射的流体。所述组合物在生产和保存条件下是稳定的并且防止微生物如细菌和真菌的污染活性。载体可以是溶剂或者分散剂介质,其含有例如,水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇、和液态聚乙二醇,等等),和其适宜的混合物。例如,通过使用包衣如卵磷脂,对于分散剂通过保持所需要的颗粒大小并通过使用表面活性剂可以保持适当流动性。通过多种抗细菌和抗真菌剂,例如,对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞,等等可以防止微生物活动。在许多情况下,优选在该组合物中包括等渗剂,例如,糖、多元醇,如甘露醇、山梨糖醇、氯化钠。通过在该组合物中包括延迟吸收,例如,单硬脂酸铝或者明胶可以延长可注射组合物的吸收。

当活性化合物为蛋白质,例如抗-CPP 抗体时,可以通过将活性化合物以需要的量掺入适宜的溶剂,如果需要,与上面列举的成分的一种或组合联合,然后过滤除菌可以制备无菌可注射溶液。通常,通过将活性化合物掺入含有基本分散介质和来自上面列举的其他需要的成分的无菌载体可以制备分散剂。对于用于制备无菌可注射溶液的无菌粉剂,优选制备方法为真空干燥和冰冻干燥,其产生活性成分加上来自前面无菌过滤溶液的任何额外的所希望成分的粉剂。

经口组合物通常包括惰性稀释剂或者可食用载体。这些组合物可以封闭在明胶胶囊或者压缩成片剂。为了经口治疗施用,可以将活性化合物掺入赋形剂并以片剂、锭剂或者胶囊剂的形式使用。对于通过吸入施用,以来自受压容器或分配器的气溶胶喷雾的形式递送化合物,所述容器或分配器含有适宜的推进剂,例如气体,如二氧化碳,或者以雾化器形式递送化合物。系统性施用也可以是通过透粘膜或者透皮方式。对于透粘膜或者透皮施用,适宜渗透屏障的渗透剂可用于制剂中。这些渗透剂是本领域中公

知的并且包括例如对于透粘膜施用的去污剂、胆汁盐和梭链孢酸衍生物。使用鼻喷雾剂或者栓剂可以实现透粘膜施用。对于透皮施用，将活性化合物配制成本领域中公知的软膏剂、药膏、凝胶剂或者霜剂。最优选地，通过静脉内注射将活性化合物递送到受试者。

在一个实施方案中，活性化合物与保护该化合物免于从机体快速清除的载体制备，如控释制剂，包括植入物和微囊化递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物，如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备这些制剂的方法将对于本领域技术人员是显而易见的。也可以通过商业途径从 Alza Corporation 和 Nova Pharmaceuticals, Inc 获得这些材料。脂质体悬浮液(包括用针对病毒抗原的单克隆抗体靶定受感染细胞的脂质体)也可以用作可药用载体。可以根据本领域中技术人员公知的方法，例如，如美国专利号 4,522,811(将其公开完整并入本文作为参考)中描述的制备这些脂质体悬浮液。

在另一实施方案中，活性化合物可以在微芯片药物递送装置上包衣。这些装置可用于蛋白质组合物受控地递送到个体的血液、脑脊液、淋巴或者组织中而不让这些组合物受到消化或者对该个体进行注射。使用微芯片药物递送装置的方法在美国专利 6,123,861 和 5,797,898 和美国专利申请 20020119176A1 中描述，将这些参考文献完整并入本文作为参考。

特别有利地是为了易于施用和剂量的一致性，以剂量单位形式制剂经口或优选肠胃外组合物。本文中所用剂量单位形式指适于作为所治疗的受试者的单位剂量的物理上分立的单位；每个单位含有预定量的活性化合物，经计算该预定量联合所希望的药物载体产生所希望的治疗效果。本发明的剂量单位形式的规格受到并且直接取决于活性化合物的独特特征和所要实现的具体治疗效果，并受到用于个体治疗的这种活性化合物的内在限制。

通过细胞培养物或者实验动物中的标准药理学方法，例如，关于确定 LD₅₀(群体的 50 % 的致死剂量)和 ED₅₀(50 % 群体中年治疗有效量)的方法可以确定这些化合物的毒性和治疗功效。毒性和治疗效果之间的剂量比为

治疗指数并且其可以表达为比例 LD50/ED50。优选显示出大治疗指数的化合物。尽管可以使用表现出毒副作用的化合物，但应该注意设计将这些化合物靶向所感染组织部位的递送系统，以便对未受感染细胞的潜在伤害最小，从而减小副作用。

从细胞培养测定法和动物研究所得数据可配制用于人类的一系列剂量。这些化合物的剂量优选在包括 ED50 并且有很小或没有毒性的循环浓度范围内。根据所用的剂型和施用途径可以在该范围内改变剂量。对于用于本发明方法的任何化合物，可以从细胞培养测定法初步估计治疗有效剂量。可以在动物模型中配制剂量以实现循环，其用于更准确地确定人体中的有用剂量。例如，通过高效液相层析可以测量血浆中水平。

药物组合物可以包含在容器、包装或者分配器中，连同施用的用法说明。

CPPs 的治疗性用途

本发明的 CPPs、CPP 调节剂和抗-CPP 抗体可以用于治疗或预防 CPP 相关疾病。不像可以导致免疫反应或者证明对宿主有毒的所生产小分子治疗剂，本发明的肽是正常分泌的并且认为是对它们所施用的宿主无毒的。从而，一方面，本发明涉及含有作为活性成分的 CPP，优选含有可药用载体或者稀释剂的药物组合物。该载体或者稀释剂优选适于经口、静脉内、肌肉或者皮下施用。还可以将 CPPs 制备成用于吸入的溶液剂。药物组合物可含有、组成为或者组成基本为本文中描述的 CPPs 的任一种。任选地，CPP 可以作为原肽或者前原肽施用。

许多试剂可用于治疗和预防心血管疾病。这些试剂可以有利地与 CPP 组合施用。

例如，细胞周期抑制剂和原癌基因(Simari 和 Nabel, *Semin. Intervent. Cardiol.* 1:77-83 (1996)); NO (一氧化氮)供体药物;促进凋亡剂，如 bcl-x (Pollman 等人, *Nature Med.* 2:222-227 (1998));疱疹病毒胸苷激酶(tk)基因和系统性 9-[1,3-二羟-2-丙氧甲基]鸟嘌呤(Ohno 等人, *Science* 265:781-784 (1994); Guzman 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10732-10736 (1994);

Chang 等人, Mol. Med. 1:172-181 (1995); 和 Simari 等人, Circulation 92:1-501 (1995)) 已经用于治疗动脉粥样硬化、再狭窄和新内膜平滑肌增殖。将上面参考文献的公开完整并入本文。

可以与本发明的肽联合使用的抗血栓剂包括, 例如, IIb/IIIa 整合蛋白抑制剂; 组织因子抑制剂; 和抗凝血酶剂。还可以使用抗心率不齐剂, 如局部麻醉剂(I 类试剂)、交感神经拮抗剂(II 类试剂)、抗纤维性颤动剂(III 类试剂)、钙通道试剂(IV 类试剂)或者阴离子拮抗剂(V 类试剂), 如 Vukmir, Am. J. Emer. Med. 13:459-470 (1995); Grant, PACE 20:432-444 (1997); Assmann I., Curr. Med. Res. Opin. 13:325-343 (1995); 和 Lipka 等人, Am. Heart J. 130:632-640 (1995)中描述, 将这些文献的公开完整并入本文作为参考。I 类试剂的实例包括:普鲁卡因酰胺、奎尼丁或者丙吡胺、利多卡因、苯妥英、妥卡胺或者美西律、恩卡胺、氟卡胺、氟卡尼、丙胺苯丙酮(III)或者莫雷西嗪。交感神经拮抗剂包括:普萘洛尔、艾司洛尔、美托洛尔、atenolol, 或者醋丁洛尔。抗纤维性颤动剂的实例为溴苯乙胺、乙胺碘呋酮、甲磺胺心定(II)或者 N -乙酰基普鲁卡因酰胺。IV 类试剂包括异搏定、地尔硫革和苻普地尔、以及阴离子拮抗剂如烯丙尼定。

充血性心力衰竭治疗剂包括 TNF 抑制剂如 Embrel.TM. (Immunex Corp.; Seattle, Wash.)、TBC11251,或者 ACE (血管紧张素转化酶)抑制剂, 如脑利钠肽 (nesiritide; Scios, Inc.)。血管生成剂, 例如, 重组 VEGF 同种型, 如 Genentech 开发的 rhVEGF; 编码 VEGF 的 121 个氨基酸同种型的核酸分子(BioByPass.TM.; GenVec/Parke Davis);或者编码 VEGF-2 的核酸 (Vascular Genetics, Inc.); FIBLAST.TM., Scios, Inc. (Mountain View, Calif.) 和 Wyeth Ayerst Laboratories (Radnor, Pa.)开发的 FGF-2 的重组形式, GENERX.TM., 或者 Collateral Therapeutics (San Diego, Calif.) 和 Schering AG 开发的编码 FGF-4 的腺病毒基因治疗载体(见 Miller 和 Abrams, Gen. Engin. News 18:1 (1998))(将其公开完整并入本文作为参考)也可以与本发明的 CPP 相关组合物联合使用。最后, 钙拮抗剂, 如阿洛地平(Marche 等人, Int. J. Cardiol. 62(Suppl.):S17-S22 (1997); Schachter, Int.

J. Cardiol. 62(Suppl.):S85-S90 (1997));硝吡胺甲酯、硝苯吡啶、萘异丙促胺、硝酸异山梨酯、地尔硫革和伊拉地平(Nayler (Ed.) Calcium Antagonists 157-260 页, London: Academic Press (1988); Schachter, Int. J. Cardiol. 62(Suppl.):S9-S15 (1997)) 也是心血管疾病的有利的治疗剂。

已经一般性描述了本发明,通过参考一些具体实施例可以得到进一步理解,这些实施例在本文中提供仅是为了阐明的目的,并且除非特别说明,不用于限制本发明。

实施例

实施例 1 表征实验和对照群体中 CPP 水平

基于冠状动脉病选择心血管疾病 Duke 数据库(Duke Databank for Cardiovascular Disease)中注册的受试者。对共 241 名 CAD 患者和对照个体关于性别、年龄、和种族进一步匹配并排除血浆异常的个体。建立了 53 名 CAD 患者组和 53 名对照个体组。从每组合并 6 升血浆。从每个个体保留血浆等分试样,从而允许为群体的每个成员证实合并样品中的阳性结果。这种证实对于除去具有与心血管疾病不相关的特定多肽的异常水平的个体造成可能的混淆性结果是有价值的。根据如下的 Microprot.TM 方法通过多个层析步骤分离来自每个群体的 2.5 升合并血浆:

步骤 1:HSA/IgG 耗竭

将 125ml 冷冻血浆解冻并在无菌通风厨中 0.45 μ m 无菌过滤器上过滤。

滤液注射到两个串联柱子上,分别为 300 ml HAS 配体 Sepharose 快速流动柱(Amersham, Upsala, 瑞典), 5cm ID, 15 cm 长;和 100 ml 蛋白质 G Sepharose 快速流动柱(Amersham, Upsala, 瑞典), 5 cm ID, 5 cm 长。

平衡柱子并用 50 mM PO₄ 缓冲液, pH 7.1, 0.15M NaCl 洗涤。流速为 5 ml/分钟。

冰冻未存留的级分(250ml)直到第二步。实施 20 次运行。

步骤 2:凝胶过滤/反相捕获步骤

将来自步骤 1 的样品解冻并在无菌通风厨中 0.45 μ m 无菌过滤器上过滤。

滤液注射到两个串联凝胶过滤柱:2 X 9.5 升 Superdex 75 (Amersham,

UK) 柱, 14 cm ID, 62 cm 长。用 50mM PO₄ 缓冲液 pH 7.4, 0.1 M NaCl, 8M 尿素平衡柱子。疏水杂质保留在反相预柱上:150 ml PLRPS (Polymer Labs, UK)。将预柱转到样品注射。以 40ml/分钟的流速实施凝胶过滤。

低分子量蛋白质(<20kDa)定向到串联反相捕获柱:50 ml PLRPS 100 埃 (Polymer labs, UK)。控制 PLRPS 柱上注射的三路阀门以 33 mAU (280 nm)的截断开关以将凝胶过滤滤液送到反相捕获柱。通过首先使用 SDS-PAGE 提供 OD 值的估计范围并随后评估三种截断值(OD 范围的高、中、低值)建立该截断值。选择最终截断值以最大化所得低分子量蛋白质, 低分子量蛋白质比例为至少 85%。通过水中的 0.1% TFA, 80% CH₃CN 的一个柱体积梯度从反相捕获 PLRPS 柱洗脱低分子量蛋白质和肽。

冰冻洗脱液级分(50 ml)直到下一步。实施 20 次运行。在该步骤末期时, 解冻所有反相洗脱液, 合并(1 升)并分装入 7 个聚丙烯容器(143ml)中。容器在-20℃保存直到用于下个步骤。

步骤 3:阳离子交换

将来自步骤 2 的样品(147ml)解冻并与等体积阳离子交换缓冲液 A(Gly/HCl 缓冲液 50 mM, pH 2.7, 尿素 8M)混合。

将样品注射在 100 ml Source 15S 柱(Amersham, Upsala, Sweden), 35 mm ID, 100 mm 长。用缓冲液 A 平衡并洗涤柱子。流速为 10ml/分钟。

用从 100%缓冲液 A 到 100%缓冲液 B(含有 1M NaCl 的缓冲液 A)洗脱蛋白质和肽:

3 个柱体积 7.5% B (75 mM NaCl)

3 个柱体积 10% B (100 mM NaCl)

3 个柱体积 17.5% B (175 mM NaCl)

2 个柱体积 22.5% B (225 mM NaCl)

2 个柱体积 27.5% B (275 mM NaCl)

2 个柱体积 100% B (1 M NaCl)

基于峰收集 45 到 60 个级分。实施 7 次运行。实现 7 次运行后, 合并运行内和运行间的级分以得到 18 种级分。将级分在-20℃保存直到用于下

一个步骤。

步骤 4:还原/烷基化和反相 HPLC 分级分离 1

用浓 Tris-HCl 调节 pH 到 8.5 后,将 18 种阳离子交换级分的每一种用二硫赤藓糖醇(DTE, 30 mM, 37°C 3 小时)还原并用碘代乙酰胺(120 mM, 25°C 下黑暗中 1 小时)烷基化。通过加入 DTE (30 mM)然后酸化(TFA, 0.1%)中止后一反应。然后将级分注射到 Uptispher C8, 5 μ m, 300 埃柱上(Interchim, France), 21 mm ID, 150 mm 长。以 10ml/分钟流速实施注射。

用水中 0.1% TFA(溶液 A)平衡和洗涤 C8 柱。在 60 分钟内用 100% A 直到 100% B (水中 0.1% TFA, 80% CH₃CN) 的双相梯度洗脱蛋白质和肽。流速为 20 ml/分钟。收集 30 个级分, 每个级分 40 ml。

基于每种级分在 280 nm 下测量的光密度(OD), 其反映了该级分中的蛋白质浓度, 为每个级分产生相似蛋白质含量的等分试样。

所有等分试样都经冰冻并保存备用, 只是每种级分的一个等分试样在加入 500 微升水中 10% 甘油后用 Speed Vac (Savant, Fischer, Geneva)冻干, 以便防止过分干燥。干燥的级分在 -20°C 保存直到用于下一个步骤。

步骤 5:反相 HPLC 分级分离 2

将来自步骤 4 的干燥样品重悬在 1 ml 溶液 A(水中 0.03% TFA)并注射在 Vydac LCMS C4 柱上, 5 微米, 300 埃 (Vydac, USA), 4.6 mm ID, 150 mm 长。流速为 0.8 ml/分钟。

用溶液 A 平衡和洗涤 C4 柱并用适应于反相 HPLC 分级分离 1 中样品的洗脱位置的双相梯度洗脱蛋白质和肽。用电喷雾离子捕获质谱法(Electrospray Ion Trap Mass spectrometry)得到完整质量数据。以 CH₃CN 浓度范围 -/+ RP1 级分相应溶剂浓度的 5% CH₃CN 使用 16 种不同的梯度。对于以溶剂浓度等于或大于 30% CH₃CN 的 RP1 洗脱的蛋白质, RP2 梯度的起始洗脱条件设定(以 CH₃CN 浓度)为 RP1 中洗脱浓度减去 30%。采用关于最优 SpeedVac 浓度设计的优化的不同的收集构造并进一步机器人处理在深孔板中收集 24 个洗脱级分。

步骤 6:质量检测

反相 HPLC 分级分离 2 后将约 13,000 个级分收集到 96 孔深孔板(DWP)中。用 LC-ESI-MS (Bruker Esquire)在线分析小比例(2.5%)的体积。未消化蛋白质的等分试样与 MALDI 基质混合,并与质量校准标准和灵敏度标准一起点在 MALDI 板上。使用自动化点样装置(Bruker MALDI 样品制备机器人)。使用两种不同的 MALDI 基:芥子酸(SA),也称作 sinapinic acid,反式-3,5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸,和 α -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)。用 Bruker Reflex III MALDI MS apparatus 对 MALDI 板进行质量检测。96 孔板在 +4℃ 保存。

回收 96 孔板(DWP)并将其进行两个连续的浓缩步骤。通过用 SpeedVac 干燥将体积从 0.8 ml 浓缩到约 50 微升/孔,然后再溶解到约 200 微升并再次浓缩到约 50 微升/孔,并在 +4℃ 保存。然后通过再缓冲,向孔中加入胰蛋白酶,密封并将平板在 37℃ 孵育 12 小时,然后淬灭(加入甲酸使 pH 降低到 2.0)消化蛋白质。基于每个具体级分在 280 nm 记录的 OD 调节加入孔中的胰蛋白酶的浓度。这确保胰蛋白酶的最佳利用和多数浓缩级分的完全消化。用自动化点样装置(Bruker MALDI 样品制备机器人)将来自每孔的体积(与 HCCA 基质预混合)与灵敏度和质量校准标准一起沉积在 MALDI 板上。用 Bruker Reflex III MALDI MS 装置分析 MALDI 板。用 LC-ESI-MS-MS Bruker Esquire ESI Ion-Trap MS 装置分析 96 孔板的每种含量。

步骤 7:检测和鉴定人血浆中的低丰度肽

对分离的级分进一步实施质谱法(基质辅助的激光解吸/电离(MALDI)和 MS-MS)以分离和检测。

整合完整质量数据、肽质量指纹和肽序列数据以进行蛋白质鉴定和表征。用 Mascot 软件(Matrix Science Ltd., London, UK)鉴定蛋白质,并通过手工分析光谱检查肽鉴定的结果。

在通过该方法鉴定的蛋白质中,发现钙粒蛋白 A (S100 钙结合蛋白 A8, SwissProt 登录号 P05109)在来自对照的合并样品中比来自 CAD 患者的合并样品中以更大程度表达(例如,观察到对照级分中来自所述蛋白质的

肽为疾病级分中的两倍，并且对于对照样品，该蛋白质的质谱鉴定期间所得累积得分比患病样品高 2.5 倍)。已经将钙粒蛋白 A 表征为促炎性蛋白 (Odink, 等人, Nature 330 (6143), 80-82 (1987) 和许多后面的参考文献)。它由炎症应答期间外渗的骨髓细胞表达，其中该蛋白质结合到上皮细胞上的糖胺聚糖结构(Robinson, 等人, JBC 277:3658-65 (2002))。有趣的是，PCT 公布号 WO 00/61742 公开了钙粒蛋白 A 用于治疗例如动脉粥样硬化导致的心功能不全。此外，PCT 公布 WO 00/18970 公开了钙粒蛋白 A 用作血管膜生长的抑制剂以防止心肌梗死和高血压。因此，显然本文中描述的蛋白质分离和鉴定方法有效提供了这样的蛋白质，所述蛋白质当在对照样品中检测到比疾病样品中水平更高时，具有治疗所研究的疾病的有益效果。

相反地，该实施例中描述的蛋白质分离和鉴定方法允许鉴定基质 Gla 蛋白(SwissProt 登录号 P08493)，其与来自对照的合并样品相比在来自 CAD 患者的合并样品中过量表达(例如，观察到疾病级分中来自所述蛋白质的肽为对照级分中的几乎两倍，并且对于患病样品，该蛋白质的质谱鉴定所得的累积得分高 2 倍)。MGP 是依赖维生素 K 的蛋白质，其与骨和软骨的有机基质结合。Mori 等人阐明 MGP 能够抑制血管钙化(FEBS Letters 433:19-22 (1998))。动脉粥样硬化斑中 MGP 水平增加可能是对血管钙化的反馈应答。PCT 公布 WO 01/02863 和 WO 01/25427 描述 MGP 作为动脉粥样硬化和心血管疾病的生物标记。因此，显然本文中描述的蛋白质分离和鉴定方法可以有效提供这样的蛋白质，其在所研究疾病的诊断中具有被认知的用途。

实施例 2:CPPs 的纯化和表征

通过如实施例 1 中描述的多种层析柱分级分离人血浆。通过质谱法分析级分。发现不同的胰蛋白酶级分，如表 1 和 SEQ ID NO:5 中描述。

在没有冠状动脉的对照个体的血浆中通过 MS-MS 观察到表 1 中所列的胰蛋白酶消化肽段(SEQ ID NO:5)。CAD 患者血浆中存在的 CPP 肽包括 SEQ ID NOs:3 和 4 的 CPPs 6 和 7。与胰蛋白酶消化肽段相关的全长多肽

序列描述为 SEQ ID NOs:1 和 2。在 CAD 样品中没有发现所列肽。Microprot.TM 方法能够检测血浆浓度为 50 pM 范围内的极低丰度蛋白质。从而, CAD 血浆中缺少所列的肽表明 CPPs 以趋于 0 的低水平存在于 CAD 患者中或者不存在。

胰蛋白酶消化肽段的存在表明在起始人血浆样品中存在分子量低于 20kDa 并且含有氨基酸序列 FTTLVQDLANAFQQEAQTSGK 的多肽。这些多肽包括含有选自 SEQ ID NOs:3-4 的氨基酸序列的那些多肽。

实施例 3:CPPs 的化学合成

在该实施例中, 合成本发明的 CPP。首先合成肽片段中间体, 然后将其装配成所希望的多肽。

最初可以以例如 5 个片段制备 CPP, 选择所要偶联的片段的 N-末端具有 Cys 残基。片段 1 最初偶联到片段 2 以得到第一种产物, 然后制备性 HPLC 纯化后, 第一种产物偶联到片段 3 得到第二种产物。制备 HPLC 纯化后, 第二种产物偶联到片段 4 得到第三种产物。最后, 制备 HPLC 纯化后, 第三种产物偶联到片段 5 得到所希望的多肽, 将其纯化和重折叠。

硫酯形成

如上所述, 在硫酯产生树脂上合成片段 2、3、4 和 5。为此, 准备下面的树脂: 在基本如 Hackeng 等人(1999)描述的条件下, S-乙酰基巯基乙酸五氟苯基酯偶联到 Leu-PAM 树脂。在第一种情况下, 用 DMF 中 10% 巯基乙醇、10% 吡啶处理 30 分钟除去乙酰基保护基后, 所得树脂用作 0.2 mmol 规模的肽链延长的起始树脂。通过将 Boc-硫脯氨酸(Boc-SPr, 即 Boc-L-硫脯氨酸)偶联到各自链的末端代替具有常规 N^α或 S^β保护的 Cys 保护片段 2 到 5 的 N-末端 Cys 残基的 N^α, 例如 Brik 等人, J. Org. Chem., 65: 3829-3835 (2000)。

肽合成

在来自 Applied Biosystems 为用户改造的 433A 肽合成仪上实施固相合成, 使用逐步 Boc 化学链延长的原位中和/2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,1,3,3-四甲基脲阳离子六氟-磷酸(HBTU)活化方案, 如 Schnolzer 等

人, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 40: 180-193 (1992)描述。每个合成循环为通过用纯 TFA 处理 1 到 2 分钟除去 N^{α} -Boc, 1 分钟 DMF 流洗, 过量 DIEA 存在下用 2.0 mmol 预活化的 Boc-氨基酸偶联 10 分钟, 然后再次 DMF 流洗。在过量 DIEA(6mmol)存在下用 1.8 mmol HBTU (DMF 中 0.5 M)预活化 N^{α} -Boc-氨基酸(2 mmol)3 分钟。Gln 残基偶联后, 在用 TFA 去保护之前和之后用二氯甲烷流洗以防止可能的高温(TFA/DMF)-催化形成吡咯烷酮羧酸。侧链受保护的氨基酸为 Boc-Arg(对-甲苯磺酰)-OH、Boc-Asn(咕吨基)-OH、Boc-Asp(O-环己基)-OH、Boc-Cys(4-甲基苯甲基)-OH、Boc-Glu(O-环己基)-OH、Boc-His(二硝基苯基甲基)-OH、Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH、Boc-Ser(苯甲基)-OH、Boc-Thr(苯甲基)-OH、Boc-Trp(环己基羧基)-OH 和 Boc-Tyr(2-Br-Z)-OH (Orpagen Pharma, Heidelberg, 德国)。所用的其他氨基酸没有侧链保护。在 Boc-Leu-O-CH₂-Pam 树脂 (0.71mmol/g 装载的树脂)上合成 C-末端片段 1, 而对于片段 2 到 5, 在 Boc-Xaa-S-CH₂-CO-Leu-Pam 树脂上开始机器辅助合成。通过标准条件下将 S-乙酰基巯基乙酸五氟苯基酯偶联到 Leu-PAM 树脂得到该树脂。用 DMF 中 10% 巯基乙醇、10% 吡啶处理 30 分钟除去乙酰基保护基后, 所得树脂用作 0.2 mmol 规模的肽链延长的起始树脂。

链装配完成后, 将肽片段去保护并通过无水氟化氢在 0℃ 处理 1 小时, 以 5% 对甲酚作为清除剂从树脂切割肽片段。在除了片段 1 之外的所有情况下, 咪唑侧链 2,4-二硝基苯基(DNP)保护基保留在 His 残基上, 这是因为 DNP-去除方法与 C-末端硫酯基团不相容。然而, 在连接反应期间通过硫醇逐渐除去 DNP, 产生去保护的 His。切割后, 将肽片段用冰预冷的二乙醚沉淀, 溶于水性乙腈中, 并冻干。将肽片段通过 RP-HPLC 纯化, 使用 Waters 的 C18 柱, 使用溶于缓冲液 A(H₂O/0.1% 三氟乙酸)中的缓冲液 B(乙腈/0.1% 三氟乙酸)的线性梯度, 在 214nm 下紫外检测。通过电喷雾质谱法 (ESMS), 使用 Esquire 仪器(Brücker, Bremen, 德国)或者类似仪器分析样品。

天然化学连接

如下面更完整描述的,如下实施未受保护片段的连接:将干燥肽溶于等摩尔量的 6M 盐酸胍(GuHCl), 0.2M 磷酸盐, pH 7.5 中以得到最终肽浓度为 1-8mM, pH 约 7, 并加入 1% 苯甲基硫醇, 1% 苯硫酚。通常, 反应过夜进行并通过 HPLC 和电喷雾质谱法监视反应。随后处理连接产物以除去仍然存在的保护基。打开 N-末端噻唑烷环还需要加入固态甲氧胺到 0.5M 终浓度, pH3.5, 并在 37℃再孵育 2 小时。制备性 HPLC 纯化前加入 10 倍过量 Tris(2-羧基乙基)膦。通过 ESMS 鉴定含有多肽链的级分, 合并, 并冻干。

在 6M GuHCl(pH 7.0)中实施片段 4 和 5 的连接。每种反应物的浓度为 8mM, 加入 1% 苯甲基硫醇和 1% 苯硫酚以产生还原环境和促进连接反应。37℃过夜搅拌后观察到几乎定量的连接反应。在该反应点, 向溶液中加入 $\text{CH}_3\text{-O-NH}_2\cdot\text{HCl}$ 得到 0.5M 终浓度, 并调节 pH 到 3.5 以便打开 N-末端噻唑烷环。37℃下孵育 2 小时后, 用 ESMS 证实反应的完成。随后用肽片段的 10 倍过量 Tris(2-羧基乙基)膦处理反应混合物并且 15 分钟后, 用制备 HPLC(例如, C4, 20-60% CH_3CN , 0.5% /分钟)纯化连接产物, 冻干, 并在-20℃保存。

对于剩余的连接重复相同的方法, 只是稍加改变。

肽折叠

将还原的冻干蛋白质(约 0.1 mg/mL)溶于 1M GuHCl, 100mM Tris, 10mM 甲硫氨酸, pH 8.6 中通过空气氧化重折叠全长肽。过夜轻微搅拌后, 如上述通过 RP-HPLC 纯化蛋白质溶液。

实施例 4:制备 CPP 抗体组合物

得到基本上纯的 CPP 或者其部分。例如, 通过在 Amicon 滤器装置上将最终制备物中蛋白质的浓度调节到每 ml 几微克。然后如标题为“单克隆抗体”和“多克隆抗体”的章节中描述的制备针对该蛋白质的单克隆或多克隆抗体。简言之, 为了产生抗-CPP 单克隆抗体, 将小鼠用几微克 CPP 或者其片段在几周时间内反复接种。然后处死小鼠, 并分离脾脏的抗体生

产细胞。通过聚乙二醇将该脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合，通过将该体系在含有氨基蝶呤的选择培养基(HAT 培养基)上生长破坏过量未融合的细胞。稀释成功融合的细胞并将稀释液的等分试样置于微量滴定板的孔中，在孔中培养物继续生长。通过免疫测定方法，如最初由 Engvall, E., *Meth. Enzymol.* 70: 419 (1980)(将其公开完整并入本文作为参考)描述的 ELISA 检测细胞的上清液中的抗体鉴定产生抗体的克隆。可以扩大所选的阳性克隆并收获它们的单克隆抗体产物备用。关于单克隆抗体生产的详细方法在 Davis, L. 等人 *Basic Methods in Molecular Biology* Elsevier, New York. 章节 21-2 中描述，将其完整并入本文作为参考。

对于通过免疫产生多克隆抗体，通过用 CPP 或者其部分免疫小鼠制备含有针对 CPP 或者其部分中的异源表位的含有抗体的多克隆抗血清，CPP 或者其部分可以未经修饰或者经修饰以增强其免疫原性。可以选择任何适宜的非人动物，优选非人哺乳动物，包括大鼠、兔、山羊或者马。

根据单克隆或者多克隆方案制备的抗体制备物可用于定量免疫测定法，该测定法测定生物样品中 CPP 的浓度；或者这些制备物也可半定量或者定量使用以鉴定生物样品中抗原的存在。所述抗体也可用于治疗组合物中，用以杀死表达该蛋白质的细胞或者降低机体中该蛋白质的水平。

表 1

肽序列 (SEQ ID NO:5)	CEX	盐	RP1	% B	运行#
FTTLVQDLANAFQQEAQTSGK	9	175 mM	16	49.0	154234_15
FTTLVQDLANAFQQEAQTSGK	9	175 mM	16	49.0	154234_13
FTTLVQDLANAFQQEAQTSGK	9	175 mM	20	56.7	130966_07
FTTLVQDLANAFQQEAQTSGK	9	175 mM	16	49.0	154234_16
FTTLVQDLANAFQQEAQTSGK	9	175 mM	16	49.0	154234_14
FTTLVQDLANAFQQEAQTSGK	9	175 mM	16	49.0	154234_12

<110> 杰诺瓦有限公司

<120> 心血管疾病中减少的分泌性多肽种类(来自壳三糖苷酶的片段)

<130> 5031-W001

<150> US 60/438,643

<151> 2003-01-07

<160> 5

<170> PatentIn 版本 3.1

<210> 1

<211> 466

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

Met Val Arg Ser Val Ala Trp Ala Gly Phe Met Val Leu Leu Met Ile
1 5 10 15

Pro Trp Gly Ser Ala Ala Lys Leu Val Cys Tyr Phe Thr Asn Trp Ala
20 25 30

Gln Tyr Arg Gln Gly Glu Ala Arg Phe Leu Pro Lys Asp Leu Asp Pro
35 40 45

Ser Leu Cys Thr His Leu Ile Tyr Ala Phe Ala Gly Met Thr Asn His
50 55 60

Gln Leu Ser Thr Thr Glu Trp Asn Asp Glu Thr Leu Tyr Gln Glu Phe
65 70 75 80

Asn Gly Leu Lys Lys Met Asn Pro Lys Leu Lys Thr Leu Leu Ala Ile

85	90	95
Gly Gly Trp Asn Phe Gly Thr Gln Lys Phe Thr Asp Met Val Ala Thr		
100	105	110
Ala Asn Asn Arg Gln Thr Phe Val Asn Ser Ala Ile Arg Phe Leu Arg		
115	120	125
Lys Tyr Ser Phe Asp Gly Leu Asp Leu Asp Trp Glu Tyr Pro Gly Ser		
130	135	140
Gln Gly Ser Pro Ala Val Asp Lys Glu Arg Phe Thr Thr Leu Val Gln		
145	150	155
Asp Leu Ala Asn Ala Phe Gln Gln Glu Ala Gln Thr Ser Gly Lys Glu		
165	170	175
Arg Leu Leu Leu Ser Ala Ala Val Pro Ala Gly Gln Thr Tyr Val Asp		
180	185	190
Ala Gly Tyr Glu Val Asp Lys Ile Ala Gln Asn Leu Asp Phe Val Asn		
195	200	205
Leu Met Ala Tyr Asp Phe His Gly Ser Trp Glu Lys Val Thr Gly His		
210	215	220
Asn Ser Pro Leu Tyr Lys Arg Gln Glu Glu Ser Gly Ala Ala Ala Ser		
225	230	235
Leu Asn Val Asp Ala Ala Val Gln Gln Trp Leu Gln Lys Gly Thr Pro		
245	250	255
Ala Ser Lys Leu Ile Leu Gly Met Pro Thr Tyr Gly Arg Ser Phe Thr		

260	265	270
Leu Ala Ser Ser Ser Asp Thr Arg Val Gly Ala Pro Ala Thr Gly Ser		
275	280	285
Gly Thr Pro Gly Pro Phe Thr Lys Glu Gly Gly Met Leu Ala Tyr Tyr		
290	295	300
Glu Val Cys Ser Trp Lys Gly Ala Thr Lys Gln Arg Ile Gln Asp Gln		
305	310	315 320
Lys Val Pro Tyr Ile Phe Arg Asp Asn Gln Trp Val Gly Phe Asp Asp		
325	330	335
Val Glu Ser Phe Lys Thr Lys Val Ser Tyr Leu Lys Gln Lys Gly Leu		
340	345	350
Gly Gly Ala Met Val Trp Ala Leu Asp Leu Asp Asp Phe Ala Gly Phe		
355	360	365
Ser Cys Asn Gln Gly Arg Tyr Pro Leu Ile Gln Thr Leu Arg Gln Glu		
370	375	380
Leu Ser Leu Pro Tyr Leu Pro Ser Gly Thr Pro Glu Leu Glu Val Pro		
385	390	395 400
Lys Pro Gly Gln Pro Ser Glu Pro Glu His Gly Pro Ser Pro Gly Gln		
405	410	415
Asp Thr Phe Cys Gln Gly Lys Ala Asp Gly Leu Tyr Pro Asn Pro Arg		
420	425	430
Glu Arg Ser Ser Phe Tyr Ser Cys Ala Ala Gly Arg Leu Phe Gln Gln		

435	440	445
Ser Cys Pro Thr Gly Leu Val Phe Ser Asn Ser Cys Lys Cys Cys Thr		
450	455	460
Trp Asn		
465		
<210> 2		
<211> 444		
<212> PRT		
<213> 人		
<400> 2		
Lys Leu Val Cys Tyr Phe Thr Asn Trp Ala Gln Tyr Arg Gln Gly Glu		
1	5	10 15
Ala Arg Phe Leu Pro Lys Asp Leu Asp Pro Ser Leu Cys Thr His Leu		
20	25	30
Ile Tyr Ala Phe Ala Gly Met Thr Asn His Gln Leu Ser Thr Thr Glu		
35	40	45
Trp Asn Asp Glu Thr Leu Tyr Gln Glu Phe Asn Gly Leu Lys Lys Met		
50	55	60
Asn Pro Lys Leu Lys Thr Leu Leu Ala Ile Gly Gly Trp Asn Phe Gly		
65	70	75 80
Thr Gln Lys Phe Thr Asp Met Val Ala Thr Ala Asn Asn Arg Gln Thr		
85	90	95
Phe Val Asn Ser Ala Ile Arg Phe Leu Arg Lys Tyr Ser Phe Asp Gly		
100	105	110

Leu Asp Leu Asp Trp Glu Tyr Pro Gly Ser Gln Gly Ser Pro Ala Val
115 120 125

Asp Lys Glu Arg Phe Thr Thr Leu Val Gln Asp Leu Ala Asn Ala Phe
130 135 140

Gln Gln Glu Ala Gln Thr Ser Gly Lys Glu Arg Leu Leu Leu Ser Ala
145 150 155 160

Ala Val Pro Ala Gly Gln Thr Tyr Val Asp Ala Gly Tyr Glu Val Asp
165 170 175

Lys Ile Ala Gln Asn Leu Asp Phe Val Asn Leu Met Ala Tyr Asp Phe
180 185 190

His Gly Ser Trp Glu Lys Val Thr Gly His Asn Ser Pro Leu Tyr Lys
195 200 205

Arg Gln Glu Glu Ser Gly Ala Ala Ala Ser Leu Asn Val Asp Ala Ala
210 215 220

Val Gln Gln Trp Leu Gln Lys Gly Thr Pro Ala Ser Lys Leu Ile Leu
225 230 235 240

Gly Met Pro Thr Tyr Gly Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Ser Asp
245 250 255

Thr Arg Val Gly Ala Pro Ala Thr Gly Ser Gly Thr Pro Gly Pro Phe
260 265 270

Thr Lys Glu Gly Gly Met Leu Ala Tyr Tyr Glu Val Cys Ser Trp Lys
275 280 285

Gly Ala Thr Lys Gln Arg Ile Gln Asp Gln Lys Val Pro Tyr Ile Phe
290 295 300

Arg Asp Asn Gln Trp Val Gly Phe Asp Asp Val Glu Ser Phe Lys Thr
305 310 315 320

Lys Val Ser Tyr Leu Lys Gln Lys Gly Leu Gly Gly Ala Met Val Trp
325 330 335

Ala Leu Asp Leu Asp Asp Phe Ala Gly Phe Ser Cys Asn Gln Gly Arg
340 345 350

Tyr Pro Leu Ile Gln Thr Leu Arg Gln Glu Leu Ser Leu Pro Tyr Leu
355 360 365

Pro Ser Gly Thr Pro Glu Leu Glu Val Pro Lys Pro Gly Gln Pro Ser
370 375 380

Glu Pro Glu His Gly Pro Ser Pro Gly Gln Asp Thr Phe Cys Gln Gly
385 390 395 400

Lys Ala Asp Gly Leu Tyr Pro Asn Pro Arg Glu Arg Ser Ser Phe Tyr
405 410 415

Ser Cys Ala Ala Gly Arg Leu Phe Gln Gln Ser Cys Pro Thr Gly Leu
420 425 430

Val Phe Ser Asn Ser Cys Lys Cys Cys Thr Trp Asn
435 440

<210> 3

<211> 146

<212> PRT

<213> 人

<400> 3

Met Asn Pro Lys Leu Lys Thr Leu Leu Ala Ile Gly Gly Trp Asn Phe
 1 5 10 15

Gly Thr Gln Lys Phe Thr Asp Met Val Ala Thr Ala Asn Asn Arg Gln
 20 25 30

Thr Phe Val Asn Ser Ala Ile Arg Phe Leu Arg Lys Tyr Ser Phe Asp
 35 40 45

Gly Leu Asp Leu Asp Trp Glu Tyr Pro Gly Ser Gln Gly Ser Pro Ala
 50 55 60

Val Asp Lys Glu Arg Phe Thr Thr Leu Val Gln Asp Leu Ala Asn Ala
 65 70 75 80

Phe Gln Gln Glu Ala Gln Thr Ser Gly Lys Glu Arg Leu Leu Leu Ser
 85 90 95

Ala Ala Val Pro Ala Gly Gln Thr Tyr Val Asp Ala Gly Tyr Glu Val
 100 105 110

Asp Lys Ile Ala Gln Asn Leu Asp Phe Val Asn Leu Met Ala Tyr Asp
 115 120 125

Phe His Gly Ser Trp Glu Lys Val Thr Gly His Asn Ser Pro Leu Tyr
 130 135 140

Lys Arg
 145

<210> 4
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 4

Tyr Ser Phe Asp Gly Leu Asp Leu Asp Trp Glu Tyr Pro Gly Ser Gln
 1 5 10 15

Gly Ser Pro Ala Val Asp Lys Glu Arg Phe Thr Thr Leu Val Gln Asp
 20 25 30

Leu Ala Asn Ala Phe Gln Gln Glu Ala Gln Thr Ser Gly Lys Glu Arg
 35 40 45

Leu Leu Leu Ser Ala Ala Val Pro Ala Gly Gln Thr Tyr Val Asp Ala
 50 55 60

Gly Tyr Glu Val Asp Lys Ile Ala Gln Asn Leu Asp Phe Val Asn Leu
 65 70 75 80

Met Ala Tyr Asp Phe His Gly Ser Trp Glu Lys Val Thr Gly His Asn
 85 90 95

Ser Pro Leu Tyr Lys Arg
 100

<210> 5
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 5

Phe Thr Thr Leu Val Gln Asp Leu Ala Asn Ala Phe Gln Gln Glu Ala

1	5	10	15
Gln Thr Ser Gly Lys			
20			

图 1

SEQ ID NO:1

1 MVRSVAWAGF MVLLMIPWGS AAKLVCFYTN WAQYRQGEAR FLPKDLDPST CTHLIYAFAG
 61 MTNHQLSTTE WNDETLYQEF NGLKKMNPKL KTLAIGGWN FGTQKFTDMV ATANNRQTFV
 121 NSAIRFLRKY SFDGLDLDWE YPGSQGSPAV DKERFTTLVQ DLANAFQOE QTSGKERLLL
 181 SAAVPAGQTY VDAGYEVDKI AQNLDFVNL MAYDFHGSWEK VTGHNSPLYK RQESGAAAS
 241 LNVDAVQW LQKGPASKL ILGMPYGRS FTLASSSDTR VGAPATGSGT PGPFTKEGGM
 301 LAYYEVCSWK GATKQRIQDQ KVPYIFRDNQ WVGFDVSEF KTKVSYLKQK GLGGAMVWAL
 361 DLDDFAGFSC NQGRYPLIQT LRQELSLPYL PSQTPELEVP KPGQPSEPEH GPSPGQDTFC
 421 QGKADGLYPN PRERSSFYSC AGRLEQQSC PTGLVFSNSC KCCTWN

SEQ ID NO:2

1 KLVCYFTNWA QYRQGEARFL PKDLDPSTCT HLIYAFAGMT NHQLSTTEWN DETLYQEENG
 61 LKKMNPKLKT LLAIGGWNFG TQKFTDMVAT ANNRTFVNS AIRFLRKYSF DGLDLDWEYF
 121 GSQGSFAVDK ERFTTLVQDL ANAFQOE AQT SGKERLLLSA AVFAGQTYVD AGYEVDKIAQ
 181 NLDFVNL MAYDFHGSWEKVT GHNSPLYKRQ EESGAAASLN VDAVQWQLQ KGPASKLIL
 241 GMPYGRSFT LASSSDTRVG APATGSGTPG PFTKEGGM LA YEVCSWKGA TKQRIQDQKV
 301 PYIFRDNQW GFDDVESFKT KVSYLKQKGL GGAMVWALDL DDFAGFSCNQ GRYPLIQT LR
 361 QELSLPYLPS GTPELEVPKP GQPSEPEHGP SPGQDTFCQG KADGLYPNPR ERSSFYSCAA
 421 GRLEQQSCPT GLVFSNSCKC CTWN

SEQ ID NO:3

1 MNPKLKTLLA IGGWNFGTQK FTDVATANN RQTFVNSAIR FLRKYSFDGL DLDWEYPGSQ
 61 GSPAVDKERF TTLVQDLANA FQOEAQTSGK ERLLSAAVP AGQTYVDAGY EVDKIAQNLD
 121 FVNL MAYDFH GSWEKVTGHN SPLYKR

SEQ ID NO:4

1 YSFDGLDLDW EYPGSQGSPA VDKERFTTLV QDLANAFQOE AQTSGKERLL LSAVPAGQT
 61 YVDAGYEVDK IAQNLDVNL MAYDFHGSWE KVTGHNSPLY KR

SEQ ID NO:5

1 FTTLVQDLAN AFQOEAQTSG K