



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101925364 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 30

(21) 申请号 200880125674. 7

(22) 申请日 2008. 11. 26

(30) 优先权数据

60/990, 520 2007. 11. 27 US

61/077, 123 2008. 06. 30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 07. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2008/002154 2008. 11. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/067820 EN 2009. 06. 04

(73) 专利权人 不列颠哥伦比亚大学

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

(72) 发明人 安东尼·马罗塔 阿齐兹·加哈里

沃尔特·沃洛季米·彼得·马克瑟莫
威奇

鲁汗吉兹·盖拉尼

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

公司 11227

代理人 顾晋伟 田旻

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

A61K 38/08 (2006. 01) (续)

(56) 对比文件

US 2004/0152630 A1, 2004. 08. 05,

US 2004/0152630 A1, 2004. 08. 05,

US 5948765 A, 1999. 09. 07,

US 5948765 A, 1999. 09. 07,

Umahara T, et al.. Intranuclear
localization and isoform-dependent
translocation of 14-3-3 proteins in human
brain with infarction. 《Journal of the
Neurological Sciences》. 2007, 第 260 卷 (第
1-2 期), 159-166.

Umahara T, et al.. Intranuclear
localization and isoform-dependent
translocation of 14-3-3 proteins in human
brain with infarction. 《Journal of the
Neurological Sciences》. 2007, 第 260 卷 (第
1-2 期), 159-166.

Van Everbroeck B R J, et al.. 14-3-3
γ-isoform detection distinguishes
sporadic Creutzfeldt-Jakob disease from
other dementias. 《Journal of Neurology,
Neurosurgery, and Psychiatry》. 2005, 第 76 卷
(第 1 期), 100-102.

Van Everbroeck B R J, et al.. 14-3-3
γ-isoform detection distinguishes
sporadic Creutzfeldt-Jakob disease from
other dementias. 《Journal of Neurology,
Neurosurgery, and Psychiatry》. 2005, 第 76 卷
(续)

审查员 幸颖

权利要求书2页 说明书41页

序列表38页 附图8页

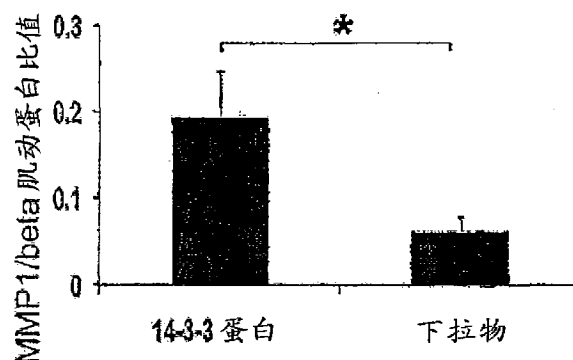
(54) 发明名称

用于预防和治疗关节炎的 14-3-3 拮抗剂

(57) 摘要

本发明提供了用于治疗关节炎的方法,其包
括 14-3-3 拮抗剂,其能够特异性结合位于细胞外
的 14-3-3 η 和 / 或 14-3-3 γ 蛋白同工型。在一
些优选实施方案中,所述 14-3-3 拮抗剂是抑制性
肽或抗 14-3-3 抗体。所述 14-3-3 拮抗剂还被配
制成药物组合物并用于降低患者滑膜液中基质金
属蛋白酶 (MMP) 表达的方法中,其中所述 MMP 是

MMP-1 或 MMP-3。



[转续页]

[接上页]

(51) Int. Cl.

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

(56) 对比文件

(第1期), 100-102.

Satoh J, et al..The 14-3-3 protein ϵ isoform expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis binds to vimentin and glial fibrillary acidic protein in cultured human astrocytes. 《American Journal of Pathology》.2004, 第165卷(第2期), 577-592.

Satoh J, et al..The 14-3-3 protein ϵ isoform expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple

sclerosis binds to vimentin and glial fibrillary acidic protein in cultured human astrocytes. 《American Journal of Pathology》.2004, 第165卷(第2期), 577-592.

Satoh J, et al..The 14-3-3 protein ϵ isoform expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis binds to vimentin and glial fibrillary acidic protein in cultured human astrocytes. 《American Journal of Pathology》.2004, 第165卷(第2期), 577-592.

Kilani R T, et al..Detection of high levels of 2 specific isoforms of 14-3-3 proteins in synovial fluid from patients with joint inflammation. 《The Journal of Rheumatology》.2007, 第34卷(第8期), 1650-1657.

1. 用于治疗关节炎的 14-3-3 拮抗剂,其中所述 14-3-3 拮抗剂能够特异性结合位于细胞外的 14-3-3 蛋白,其中所述 14-3-3 蛋白选自 γ 和 η 同工型,其中所述 14-3-3 拮抗剂是抗 14-3-3 η 抗体,所述抗 14-3-3 η 抗体能够结合选自 SEQ ID NO:1-32 的氨基酸序列,或者其中所述 14-3-3 拮抗剂是抗 14-3-3 γ 抗体,所述抗 14-3-3 γ 抗体能够结合选自 SEQ ID NO:33-62 的氨基酸序列。

2. 根据权利要求 1 的 14-3-3 拮抗剂,其中所述抗体是单克隆抗体。

3. 根据权利要求 2 的 14-3-3 拮抗剂,其中所述单克隆抗体是人源化单克隆抗体。

4. 根据权利要求 1 的 14-3-3 拮抗剂,其中所述抗 14-3-3 η 抗体能够特异性结合选自 SEQ ID NO:1、8、9、11、22、23、27 和 31 的氨基酸序列。

5. 根据权利要求 1 的 14-3-3 拮抗剂,其中所述抗 14-3-3 η 抗体能够特异性结合氨基酸序列 VKAYTEKIEKE (SEQ ID NO:8)。

6. 根据权利要求 1 的 14-3-3 拮抗剂,其中所述抗 14-3-3 η 抗体能够特异性结合氨基酸序列 LDKFLIKNSNDF (SEQ ID NO:30)。

7. 根据权利要求 1 的 14-3-3 拮抗剂,其中所述抗 14-3-3 η 抗体能够特异性结合氨基酸序列 KKLEKVKAYR (SEQ ID NO:31)。

8. 根据权利要求 1 的 14-3-3 拮抗剂,其中所述抗 14-3-3 η 抗体能够特异性结合氨基酸序列 KNSVVEASEAAYKEA (SEQ ID NO:32)。

9. 根据权利要求 1 的 14-3-3 拮抗剂,其中所述抗 14-3-3 γ 抗体能够结合选自 SEQ ID NO:33、39、40、44、51、56、57 和 61 的氨基酸序列。

10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项的 14-3-3 拮抗剂,其中所述抗体由杂交瘤产生。

11. 14-3-3 拮抗剂用于制备治疗关节炎之药物的用途,其中所述 14-3-3 拮抗剂能够特异性结合位于细胞外的 14-3-3 蛋白,其中所述 14-3-3 蛋白选自 γ 和 η 同工型。

12. 根据权利要求 11 的用途,其中所述 14-3-3 拮抗剂是肽。

13. 根据权利要求 11 的用途,其中所述肽包含 R-18 的氨基酸序列。

14. 根据权利要求 11 的用途,其中所述肽由 R-18 的氨基酸序列组成。

15. 根据权利要求 11 的用途,其中所述肽包含 R-18 之氨基酸序列的区段。

16. 根据权利要求 11 的用途,其中所述 14-3-3 拮抗剂是抗 14-3-3 抗体。

17. 根据权利要求 16 的用途,其中所述抗体是单克隆抗体。

18. 根据权利要求 17 的用途,其中所述单克隆抗体是人源化单克隆抗体。

19. 根据权利要求 16 的用途,其中所述抗 14-3-3 抗体是抗 14-3-3 η 抗体。

20. 根据权利要求 19 的用途,其中所述抗 14-3-3 η 抗体是泛 14-3-3 抗体。

21. 根据权利要求 19 的用途,其中所述抗 14-3-3 η 抗体能够区分 14-3-3 蛋白的同工型。

22. 根据权利要求 19 的用途,其中所述抗 14-3-3 η 抗体能够特异性结合环、螺旋或非螺旋的 14-3-3 η 肽。

23. 根据权利要求 19 的用途,其中所述抗 14-3-3 η 抗体能够结合选自 SEQ ID NO:1-32 的氨基酸序列。

24. 根据权利要求 19 的用途,其中所述抗 14-3-3 η 抗体能够特异性结合氨基酸序列 LDKFLIKNSNDF (SEQ ID NO:30)。

25. 根据权利要求 19 的用途,其中所述抗 14-3-3 η 抗体能够特异性结合氨基酸序列 KKLEKVKAYR(SEQ ID NO :31)。

26. 根据权利要求 19 的用途,其中所述抗 14-3-3 η 抗体能够特异性结合氨基酸序列 KNSVVEASEAAYKEA(SEQ ID NO :32)。

27. 根据权利要求 16 的用途,其中所述抗 14-3-3 抗体是抗 14-3-3 γ 抗体。

28. 根据权利要求 27 的用途,其中所述抗 14-3-3 γ 抗体是泛 14-3-3 抗体。

29. 根据权利要求 27 的用途,其中所述抗 14-3-3 γ 抗体能够区分 14-3-3 蛋白的同工型。

30. 根据权利要求 27 的用途,其中所述抗 14-3-3 γ 抗体能够特异性结合环、螺旋或非螺旋的 14-3-3 γ 肽。

31. 根据权利要求 27 的用途,其中所述抗 14-3-3 γ 抗体能够结合选自 SEQ ID NO :33-62 的氨基酸序列。

32. 根据权利要求 16 至 31 中任一项的用途,其中所述抗体由杂交瘤产生。

33. 根据权利要求 19 的用途,其中所述抗 14-3-3 η 抗体能够特异性结合选自 SEQ ID NO :1、8、9、11、22、23、27 和 31 的氨基酸序列。

34. 根据权利要求 19 的用途,其中所述抗 14-3-3 η 抗体能够特异性结合氨基酸序列 VKAYTEKIEKE(SEQ ID NO :8)。

35. 根据权利要求 27 的用途,其中所述抗 14-3-3 γ 抗体能够结合选自 SEQ ID NO :33、39、40、44、51、56、57 和 61 的氨基酸序列。

36. 14-3-3 拮抗剂用于制备减少患者滑膜中 MMP 表达的药物的用途,其中所述 14-3-3 拮抗剂能够特异性结合位于细胞外的 14-3-3 蛋白。

37. 根据权利要求 36 的用途,其中所述 MMP 选自 MMP-1、3、8、9、10、11 和 13。

38. 根据权利要求 37 的用途,其中所述 MMP 是 MMP-1 或 MMP-3。

用于预防和治疗关节炎的 14-3-3 拮抗剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2007 年 11 月 27 日提交的美国临时专利申请序列号 No. 60/990, 520 和 2008 年 6 月 30 日提交的美国临时专利申请序列号 No. 61/077, 123 的权益, 其均通过引用以整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及 14-3-3 蛋白与关节炎的关系, 以及预防和治疗关节炎的组合物和方法。

背景技术

[0004] 关节炎或关节痛一般是指机体关节的炎性疾病, 通常伴随有疼痛、肿胀和僵硬。关节炎可由几种原因中的任意种引起, 包括感染、外伤、退行性疾病、代谢疾病或紊乱或者其它未知病因。骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是常见的关节炎形式, 其可在关节外伤后、关节感染后发生或者仅仅由衰老而引起。骨关节炎也称为退行性关节病。传统上认为类风湿性关节炎 (RA) 是造成免疫系统攻击关节的慢性炎性自身免疫病。这是一种致残且疼痛的炎性疾病, 其可导致由于疼痛和关节破坏引起的运动能力基本丧失。强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 是慢性、疼痛的退行性炎性关节炎, 其主要影响脊柱和骶髂关节, 最终导致脊柱融合。

[0005] 机体的关节连接称为滑膜关节, 每个滑膜关节一般包括两个相邻骨的相对末端。骨的末端被包覆在软骨组织中, 而整个关节区域被包覆在称为“滑膜”的保护性软组织中, 所述滑膜包括滑液膜 (synovial membrane)。滑液膜产生并释放润滑性滑膜液进入关节腔中。在正常关节中, 滑膜液的体积相当小。除了润滑功能之外, 滑膜液也作为溶质以及少量静息单核细胞和滑膜细胞的储库。

[0006] 响应于被认为促使发生关节炎的许多损伤 (包括关节的外伤和 / 或机体免疫系统的功能紊乱), 滑膜可受到刺激并变厚。这些损伤的结果包括滑膜液过度产生和释放进入关节, 由此导致关节区域内和周围的肿胀。体积的增加通常伴随有滑膜液中成纤维细胞样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocyte cell, FLS 细胞)、促炎细胞因子 (例如白介素 -1 (IL-1) 和肿瘤坏死因子 (TNF- α))、组胺蛋白和肽以及降解性酶 (例如基质金属蛋白酶 (MMP)) 浓度的增加。FLS 细胞构成了正常滑膜液中约三分之二的滑膜细胞, 其具有已充分表征的分泌系统, 并且在外伤或炎症的情况下通常分泌大量 MMP (特别是 MMP-1、3、8、9、10、11 和 13) 进入滑膜液。MMP-1 和 MMP-3 被认为在软骨及其下层骨组织 (包括关节) 的进行性结构损伤中具有重要作用。已知激活 FLS 细胞产生 MMP-1 和 MMP-3 的因子包括 IL-1 和 TNF- α 。

[0007] RA、SA 和 OA 的致病原目前尚未明确。但是, 与所述疾病进展有关的生理学事件是已知的, 从由关节中滑膜液过度积累所导致的肿胀和炎症的延长, 到通过降解性酶的活性所导致的软骨及其下层骨组织的降解和损坏, 以及伴随的 FLS 细胞增殖进入骨 (这导致永

久性结构损伤)。如果检测足够早,则可使用适当的物理和医学治疗逆转疾病潜在的长期有害作用,或者至少使其最小化。因此,已有很多努力致力于鉴定用于早期鉴定关节炎的合适生物标志物。为此,Kilani 等人(2007, J. Rheum. 34 :1650-1657 ;WO 2007/128132)报道了 14-3-3 蛋白家族的两个成员(具体为 14-3-3 η 和 14-3-3 γ)存在于关节炎患者的滑膜液和血清中,这些同工型与滑膜液和血清中 MMP-1 和 MMP-3 的水平直接相关。

[0008] 14-3-3 蛋白是在真核生物中普遍表达的保守的细胞内调节分子家族。14-3-3 蛋白能够结合多种功能各异的信号传导蛋白质,包括激酶、磷酸酶和跨膜受体。事实上,已报道超过 100 种信号传导蛋白质为 14-3-3 的配体。14-3-3 蛋白可以被认为是 34 肽重复超家族(Tetratricopeptide Repeatsuperfamily)的演化成员。它们一般具有 9 或 10 个 α 螺旋,并通常沿其氨基端螺旋形成同二聚体和 / 或异二聚体相互作用。这些蛋白质含有多个已知结构域,包括二价阳离子相互作用区域、磷酸化和乙酰化区域以及蛋白质水解切割区域等。14-3-3 蛋白有七种不同基因编码的已知在哺乳动物中表达的同工型,其中每种同工型包含 242 ~ 255 个氨基酸。所述七种 14-3-3 蛋白同工型分别称为 14-3-3 α / β (alpha/beta)、14-3-3 δ / ξ (delta/zeta)、14-3-3 ϵ (epsilon)、14-3-3 γ (gamma)、14-3-3 η (eta)、14-3-3 τ / θ (tau/theta) 和 14-3-3 σ (sigma/stratifin)。

发明内容

[0009] 本发明部分地来源于下列发现:(i) 在关节炎中 14-3-3 蛋白异常定位于细胞外滑膜腔(synovial space)中,(ii) 这些细胞外 14-3-3 蛋白可诱导关节炎的效应物,以及(iii) 针对这些细胞外 14-3-3 蛋白的 14-3-3 拮抗剂可减少关节炎的效应物。

[0010] 在一个方面中,本发明提供了治疗关节炎的方法。在一个优选实施方案中,本发明提供了治疗选自下列疾病的方法:强直性脊柱炎、白塞病(**Behçet's Disease**)、弥漫性特发性骨肥厚症(diffuse idiopathic skeletal hyperostosis, DISH)、埃-当综合征(Ehlers-Danlos Syndrome, EDS)、费尔蒂综合征(Felty's Syndrome)、纤维肌痛、痛风、感染性关节炎、幼年性关节炎、狼疮、混合性结缔组织病(mixed connective tissue disease, MCTD)、骨关节炎、佩吉特病(Paget's Disease)、风湿性多肌痛、多肌炎和皮炎、假性痛风、银屑病关节炎、雷诺现象(Raynaud's Phenomenon)、反应性关节炎、类风湿性关节炎、硬皮病、舍格伦综合征(**Sjögren's Syndrome**)、斯蒂尔病(Still's Disease)和韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)。

[0011] 所述方法包括向受影响患者施用 14-3-3 拮抗剂,其中所述 14-3-3 拮抗剂靶向位于细胞外的 14-3-3 蛋白。在一个优选实施方案中,所述 14-3-3 蛋白是 14-3-3 η 或 14-3-3 γ 。

[0012] 所用的 14-3-3 拮抗剂可以是现有技术组合物,或者本文公开的新型组合物。配制治疗性组合物,并施用以使得这样递送的 14-3-3 拮抗剂可结合细胞外 14-3-3 蛋白。在一个实施方案中,所述 14-3-3 拮抗剂是肽或抗 14-3-3 抗体。

[0013] 在一个优选实施方案中,所用的 14-3-3 拮抗剂能够抑制其所结合的 14-3-3 蛋白对 MMP 的诱导。优选地, MMP 选自 MMP-1、3、8、9、10、11 和 13,尤其优选 MMP-1 和 MMP-3。

[0014] 在一个实施方案中,所述方法包括联合治疗,其中除了施用一种或多种 14-3-3 拮抗剂之外还施用至少一种另外的治疗剂。在一个优选实施方案中,所述治疗剂选自:改变病

因的抗风湿药物 (disease-modifying antirheumatic drug, DMARD)、改变病因的骨关节炎药物 (disease-modifying osteoarthritis drug, DMOAD ;例如参见 Loeser, *Reumatologia*, 21 :104-106, 2005)。在一个特别优选的实施方案中,一种或多种抗 14-3-3 拮抗剂与至少一种选自以下的药剂组合施用:抗 TNF α 抗体、抗 IL-1 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CTLA4 抗体、抗 IL-6 抗体、抗 CD20 抗体、来氟米特、柳氮磺吡啶和甲氨蝶呤。

[0015] 在一个实施方案中,以编码核酸的形式施用 14-3-3 拮抗剂,所述核酸表达以递送 14-3-3 拮抗剂。

[0016] 在一个实施方案中,所述方法包括向患者施用递送 14-3-3 拮抗剂的细胞。在一个优选实施方案中,这样递送的 14-3-3 拮抗剂是肽或抗 14-3-3 抗体。在一个优选实施方案中,所述细胞是成纤维细胞或 FLS 细胞。

[0017] 在一个方面中,本发明提供了在具有发生关节炎之风险的对象中预防关节炎发生的预防性方法。所述方法包括向所述对象施用一种或多种 14-3-3 拮抗剂。

[0018] 在一个方面中,本发明提供了用于减少由外伤引起的关节损伤的方法。所述方法包括向具有外伤受损关节的对象施用一种或多种 14-3-3 拮抗剂。在一个实施方案中,14-3-3 拮抗剂作为本文所述联合治疗的组分来施用。

[0019] 在一个方面中,本发明提供了降低 MMP 表达的方法。在一个实施方案中,待降低的 MMP 表达是在滑膜中。所述方法包括向存在产生 MMP 之细胞的组织或区室递送一种或多种 14-3-3 拮抗剂,其中产生 MMP 的细胞响应于结合 14-3-3 拮抗剂的 14-3-3 蛋白。可以直接或间接地递送至受影响组织或区室。在一个优选实施方案中,所述响应细胞是成纤维细胞或 FLS 细胞。

[0020] 在一个优选实施方案中,待降低的 MMP 表达是与关节炎相关的 MMP 表达。

[0021] 在一个优选实施方案中,待降低的 MMP 表达是选自以下 MMP 的表达:MMP-1、3、8、9、10、11 和 13。在一个特别优选的实施方案中,待降低的 MMP 表达是 MMP-1 或 MMP-3 的表达。

[0022] 在一个方面中,本发明提供了抑制 14-3-3 蛋白对 MMP 之诱导的方法。抑制可以是部分的或完全的。所述方法包括向存在产生 MMP 之细胞的组织或区室递送一种或多种 14-3-3 拮抗剂,其中所述产生 MMP 的细胞响应于 14-3-3 拮抗剂特异性结合的 14-3-3 蛋白。可以直接或间接递送至受影响组织或区室。在一个优选实施方案中,将所述一种或多种 14-3-3 拮抗剂施用到滑膜。在一个优选实施方案中,所述响应细胞是成纤维细胞或 FLS 细胞。

[0023] 在一个优选实施方案中,待抑制的 MMP 诱导是对在关节炎中上调之 MMP 的诱导。

[0024] 在一个优选实施方案中,待抑制的 MMP 诱导是对选自以下 MMP 的诱导:MMP-1、3、8、9、10、11 和 13。在一个特别优选的实施方案中,待抑制的 MMP 诱导是 MMP-1 或 MMP-3 的诱导。

[0025] 在一个方面中,本发明提供了降低对象中关节肿胀的方法。所述方法包括向受影响对象施用一种或多种 14-3-3 拮抗剂。

[0026] 在一个方面中,本发明提供了降低对象中软骨降解的方法。所述方法包括向受影响对象施用一种或多种 14-3-3 拮抗剂。

[0027] 在一个方面中,本发明提供了降低对象中骨降解的方法。所述方法包括向受影响对象施用一种或多种 14-3-3 拮抗剂。

[0028] 在一个方面中,本发明提供了降低滑膜液中促炎细胞因子积累的方法。所述方法包括向受影响对象施用一种或多种 14-3-3 拮抗剂。

[0029] 在一个优选实施方案中,对于涉及向受影响对象施用 14-3-3 拮抗剂的方法,使用囊内递送拮抗剂。在另一实施方案中,使用系统性递送拮抗剂。配制治疗性组合物,并施用以使得这样递送的 14-3-3 拮抗剂可结合位于细胞外的 14-3-3 蛋白。

[0030] 在一个实施方案中,所述 14-3-3 拮抗剂是肽。在一个优选实施方案中,所述肽包括称为“R-18”的氨基酸序列。在另一优选实施方案中,所述肽基本上由 R-18 序列组成。在一个实施方案中,所述肽包含 R-18 序列的多个重复。在另一优选实施方案中,所述肽与 14-3-3 蛋白中能够结合 R-18 的区域结合。在另一优选实施方案中,所述肽与 14-3-3 蛋白中能够结合细胞内 14-3-3 结合伴侣(优选 Raf)的区域结合。在一个实施方案中,所述肽结合 14-3-3 蛋白,而不破坏 14-3-3 蛋白与细胞内 14-3-3 结合伴侣的结合。

[0031] 在一个实施方案中,所述 14-3-3 拮抗剂是磷酸肽。

[0032] 在一个实施方案中,所述 14-3-3 拮抗剂是本领域已知的 I 型磷酸肽。

[0033] 在另一实施方案中,所述 14-3-3 拮抗剂是本领域已知的 II 型磷酸肽。

[0034] 在一个实施方案中,所述 14-3-3 拮抗剂是抗 14-3-3 抗体。在一个实施方案中,所述抗 14-3-3 抗体是泛 14-3-3 抗体(pan 14-3-3 antibody)。在另一实施方案中,所述抗 14-3-3 抗体能够区分 14-3-3 的同工型。在一个优选实施方案中,所述抗 14-3-3 抗体特异性结合选自以下的肽:14-3-3 环肽、14-3-3 螺旋肽和非螺旋 14-3-3 肽。

[0035] 在一个实施方案中,所述抗 14-3-3 抗体是抗 14-3-3 γ 抗体。在一个优选实施方案中,抗 14-3-3 γ 抗体结合包含 SEQ ID NO:64 所示氨基酸序列之区段的 14-3-3 肽。在一个优选实施方案中,所述区段的长度为至少 6 个氨基酸、更优选至少 7 个氨基酸、更加优选至少 8 个氨基酸。

[0036] 在一个优选实施方案中,抗 14-3-3 γ 抗体结合的 14-3-3 肽是 14-3-3 γ 环肽。在一个优选实施方案中,所述 14-3-3 γ 环肽包含选自 SEQ ID NO:44-49 的氨基酸序列。在另一实施方案中,所述 14-3-3 γ 环肽基本上由选自 SEQ ID NO:44-49 的氨基酸序列组成。在又一实施方案中,抗 14-3-3 γ 抗体与对应于选自 SEQ ID NO:44-49 之序列的氨基酸序列重叠的 14-3-3 γ 区域结合。

[0037] 在另一优选实施方案中,抗 14-3-3 γ 抗体结合的 14-3-3 肽是 14-3-3 γ 螺旋肽。在一个优选实施方案中,14-3-3 γ 螺旋肽包含选自 SEQ ID NO:33-43 的氨基酸序列。在另一实施方案中,所述 14-3-3 γ 螺旋肽基本上由选自 SEQ ID NO:33-43 的氨基酸序列组成。在又一实施方案中,抗 14-3-3 γ 抗体与对应于选自 SEQ ID NO:33-43 之序列的氨基酸序列重叠的 14-3-3 γ 区域结合。

[0038] 在另一优选实施方案中,抗 14-3-3 γ 抗体结合的 14-3-3 肽是非螺旋 14-3-3 γ 肽。在一个优选实施方案中,所述非螺旋 14-3-3 γ 肽包含选自 SEQ ID NO:50-62 的氨基酸序列。在另一实施方案中,所述非螺旋 14-3-3 γ 肽基本上由选自 SEQ ID NO:50-62 的氨基酸序列组成。在又一实施方案中,抗 14-3-3 γ 抗体与对应于选自 SEQ ID NO:50-62 之序列的氨基酸序列重叠的 14-3-3 γ 区域结合。

[0039] 在一个实施方案中,所述抗 14-3-3 抗体是抗 14-3-3 η 抗体。在一个优选实施方案中,所述抗 14-3-3 η 抗体结合包含 SEQ ID NO:63 所示氨基酸序列之区段的 14-3-3 肽。

在一个优选实施方案中,所述区段的长度为至少 6 个氨基酸、更优选至少 7 个氨基酸、更加优选至少 8 个氨基酸。

[0040] 在一个实施方案中,本发明的抗 14-3-3 η 抗体不与位于人 14-3-3 η 蛋白 N 端的表位结合。

[0041] 在一个优选实施方案中,抗 14-3-3 η 抗体结合的 14-3-3 肽是 14-3-3 η 环肽。在一个优选实施方案中,所述 14-3-3 η 环肽包含选自 SEQ ID NO:11-16 的氨基酸序列。在另一实施方案中,所述 14-3-3 η 环肽基本上由选自 SEQ ID NO:11-16 的氨基酸序列组成。在又一实施方案中,抗 14-3-3 η 抗体与对应于选自 SEQ ID NO:11-16 之序列的氨基酸序列重叠的 14-3-3 η 区域结合。

[0042] 在另一优选实施方案中,抗 14-3-3 η 抗体结合的 14-3-3 肽是 14-3-3 η 螺旋肽。在一个优选实施方案中,所述 14-3-3 η 螺旋肽包含选自 SEQ ID NO:1-10 的氨基酸序列。在另一实施方案中,所述 14-3-3 η 螺旋肽基本上由选自 SEQ ID NO:1-10 的氨基酸序列组成。在又一实施方案中,抗 14-3-3 η 抗体与对应于选自 SEQ ID NO:1-10 之序列的氨基酸序列重叠的 14-3-3 η 区域结合。

[0043] 在另一优选实施方案中,抗 14-3-3 η 抗体结合的 14-3-3 肽是非螺旋 14-3-3 η 肽。在一个优选实施方案中,所述非螺旋 14-3-3 η 肽包含选自 SEQ ID NO:17-32 的氨基酸序列。在另一实施方案中,所述非螺旋 14-3-3 η 肽基本上由选自 SEQ ID NO:17-32 的氨基酸序列组成。在又一实施方案中,抗 14-3-3 η 抗体与对应于选自 SEQ ID NO:17-32 之序列的氨基酸序列重叠的 14-3-3 η 区域结合。

[0044] 在一个特别优选的实施方案中,本发明的抗 14-3-3 η 抗体与选自以下之氨基酸序列结合:LDKFLIKNSNDF(SEQ ID NO:30)、KKLEKVKAYR(SEQ ID NO:31) 和 KNSVVEASEAAYKEA(SEQ ID NO:32)。

[0045] 示例性的 14-3-3 η 环、螺旋和非螺旋肽公开于本文表 1 中。要注意的是,SEQ ID NO:30 与对应的 14-3-3 η 序列的不同在于:14-3-3 η 序列中的半胱氨酸被丝氨酸所替换以避免形成二硫键。在一个实施方案中,本发明提供了这样的抗体,其还结合与 SEQ ID NO:30 相关的包含半胱氨酸的天然 14-3-3 序列。在一个实施方案中,本发明提供了能够结合如下肽序列的抗体,所述肽序列与表位表中所列肽序列的不同在于用丝氨酸替换半胱氨酸。

[0046] 在一个优选实施方案中,抗 14-3-3 抗体能够区分 14-3-3 蛋白同工型。

[0047] 在一个优选实施方案中,抗 14-3-3 抗体是单克隆抗体。

[0048] 在一个优选实施方案中,抗 14-3-3 抗体是人源化抗体。

[0049] 在一个方面中,本发明提供了新型 14-3-3 拮抗剂。在一个实施方案中,本发明提供了新型 14-3-3 拮抗剂肽。在另一实施方案中,本发明提供了新型抗 14-3-3 抗体。在一个方面中,本发明提供了制备 14-3-3 拮抗剂的方法。

[0050] 在一个方面中,本发明提供了编码肽或抗体形式的 14-3-3 拮抗剂的核酸。还提供了包含这些核酸的载体,包括表达载体。还提供了包含这些核酸的宿主细胞以及包含这些载体的宿主细胞。还提供了制备 14-3-3 拮抗剂的方法,其包括使用这些宿主细胞。

[0051] 在一个方面中,本发明提供了能够产生 14-3-3 拮抗剂的细胞。

[0052] 在一个实施方案中,所述细胞是杂交瘤,所述 14-3-3 拮抗剂是抗 14-3-3 抗体。

[0053] 在另一实施方案中,所述细胞是经遗传修饰的成纤维细胞或 FLS 细胞,所述

14-3-3 拮抗剂是肽或抗 14-3-3 抗体。

[0054] 在一个方面中,本发明提供了筛选 14-3-3 拮抗剂的方法。在一个实施方案中,所述方法包括筛选能够分别抑制 14-3-3 η 蛋白或 14-3-3 γ 蛋白与 14-3-3 η 配体或 14-3-3 γ 配体结合的候选药剂。在一个实施方案中,所述配体是 14-3-3 拮抗剂肽。在一个实施方案中,所述配体是抗 14-3-3 抗体。在一个实施方案中,所述配体是细胞内 14-3-3 结合伴侣。在一个实施方案中,所述方法包括分析候选药剂抑制 14-3-3 蛋白诱导 MMP 的能力。

[0055] 在一个实施方案中,14-3-3 拮抗剂竞争性抑制 14-3-3 η 蛋白或 14-3-3 γ 蛋白与本文公开的抗 14-3-3 抗体或 14-3-3 拮抗剂肽的结合。在一个实施方案中,所述 14-3-3 拮抗剂是小分子化学组合物。

[0056] 在一个优选实施方案中,14-3-3 拮抗剂与 14-3-3 蛋白中能够结合 R-18 的区域结合。在一个优选实施方案中,14-3-3 拮抗剂与 14-3-3 蛋白中能够结合细胞内 14-3-3 结合伴侣(优选 Raf)的区域结合。在一个实施方案中,14-3-3 拮抗剂结合 14-3-3 蛋白,而不抑制细胞内 14-3-3 结合伴侣的结合。

[0057] 在一个方面中,本发明提供了治疗关节炎的药物组合物。所述药物组合物包含一种或多种 14-3-3 拮抗剂。所述药物组合物被配制成提供所述 14-3-3 拮抗剂与细胞外 14-3-3 蛋白结合。

[0058] 在一个方面中,本发明提供了制备可用于治疗关节炎之药物的方法。这样的药物包含一种或多种 14-3-3 拮抗剂。所述药剂被配制成通过所述 14-3-3 拮抗剂与细胞外 14-3-3 蛋白结合。

[0059] 在一个方面中,本发明因此涉及 14-3-3 拮抗剂(例如能够特异性结合位于细胞外的 14-3-3 蛋白并抑制所述 14-3-3 蛋白活性的 14-3-3 拮抗剂)用于治疗关节炎或用于制备治疗关节炎之药物的用途。

附图说明

[0060] 图 1. ELISA :小鼠抗 AUG1-CLDK 免疫血清(第二次加强后)针对 AUG1-CLDK-BSA 抗原的测试血液效价(仅 IgG 应答)。

[0061] 图 2. ELISA :小鼠抗 AUG2-KKLE 免疫血清(第二次加强后)针对 AUG2-KKLE-BSA 抗原的测试血液效价(仅 IgG 应答)。

[0062] 图 3. ELISA :小鼠抗 AUG3-CKNS 免疫血清(第二次加强后)针对 AUG3-CKNS-BSA 抗原的测试血液效价(仅 IgG 应答)。

[0063] 图 4. 多种 14-3-3 蛋白同工型的序列比对。

[0064] 图 5. R-18 与细胞外 14-3-3 蛋白相互作用,并抑制细胞外 14-3-3 蛋白对 MMP-1 表达的诱导。

[0065] 图 6. Western 印迹,显示由针对人全长重组 14-3-3 η 产生之单克隆抗体免疫沉淀的来自细胞裂解物之 14-3-3 η 蛋白和人重组 14-3-3 η 。

[0066] 图 7. Western 印迹,显示由针对来自蛋白质非螺旋区的人 14-3-3 η 肽片段 142-158SEQ ID NO:24 产生之单克隆抗体免疫沉淀的来自细胞裂解物之 14-3-3 η 蛋白和人重组 14-3-3 η 。

[0067] 图 8. ELISA :小鼠抗 14-3-3 η 免疫血清 (第二次加强后) 针对 14-3-3 η 抗原的测试血液效价 (仅 IgG 应答)。

[0068] 发明详述

[0069] 本发明提供了治疗关节炎的方法,包括治疗以下疾病的方法:强直性脊柱炎、白塞病、弥漫性特发性骨肥厚症 (DISH)、埃-当综合征 (EDS)、费尔蒂综合征、纤维肌痛、痛风、感染性关节炎、幼年性关节炎、狼疮、混合性结缔组织病 (MCTD)、骨关节炎、佩吉特病、风湿性多肌痛、多肌炎和皮炎、假性痛风、银屑病关节炎、雷诺现象、反应性关节炎、类风湿性关节炎、硬皮病、舍格伦综合征、斯蒂尔病和韦格纳肉芽肿病。

[0070] 本文所用的“关节炎”或“关节痛”是指机体关节的炎性疾病。关节炎疾病常涉及疼痛、肿胀、僵硬和运动困难。关节炎可由于数种原因中的任意种引起,包括感染、外伤、退行性疾病、代谢疾病或紊乱或者其它未知病因。

[0071] 可使用本领域已知的技术来测量或定量关节炎的进展或严重程度。例如,可使用“疾病活动度评分 (Disease Activity Score, DAS)”来测量患者中关节炎的活动度或状态。DAS 是临床实践中所用的几种标准或评分之一。DAS 的计算可包括以下参数:触摸疼痛 (tender to the touch, TEN) 的关节数、肿胀关节 (swollen joint, SW) 数、红细胞沉降率 (erythrocyte sedimentation rate, ESR) 和患者对疾病活动度的评估 (VAS)。或者, DAS 可包括 C 反应蛋白标志物评估 (CRP) (Skogh T 等人 2003. Ann Rheum Dis 62 :681-682)。或者,可利用诊断性生物标志物 (包括 14-3-3 η 和 / 或 γ) 来测量疾病的存在与否或者确定疾病严重程度。

[0072] 本文中,术语“治疗”是指预防性治疗以及治愈性或改变病因的治疗,包括治疗具有患病风险或怀疑患有疾病之患者以及患病或已诊断为患病或医学病症之患者,并包括抑制临床复发。

[0073] 所述方法包括施用一种或多种 14-3-3 拮抗剂。本发明的 14-3-3 拮抗剂与 14-3-3 蛋白 (特别是 14-3-3 η 或 γ) 结合并拮抗其活性。

[0074] 本文所用的“同工型 (isoform)”是指两种或更多种功能上类似的蛋白质,其具有类似但不相同的氨基酸序列,并且由不同基因或者来自同一基因的原始的或经加工的不同 RNA 转录物编码。

[0075] 提及 14-3-3 η 蛋白或 14-3-3 γ 蛋白时可包括其片段。例如,在一个实施方案中,本发明提供了筛选 14-3-3 拮抗剂的方法,在一个优选实施方案中,其包括筛选能够抑制 14-3-3 配体与 14-3-3 蛋白结合的候选药剂。应理解,14-3-3 蛋白的合适片段可用于所述测定中。

[0076] 14-3-3 拮抗剂的实例是 R18 抑制性肽 (Wang 等人 1999- 参考文献 35)。R18 肽 (本文中也称为“R18”) 是能够阻断 14-3-3 蛋白与 Raf-1 结合的小肽。其它结合 14-3-3 蛋白的肽的实例是已知的 (参见例如, Wang 等人 1999- 参考文献 35, 同下; Yaffe 等人, Cell, 91 :961-971, 1997; Shaw 等人, U. S. 5, 948, 765; Petosa 等人, JBC 273 :16305-16310, 1998; Fu 等人, US2004/0152630)。当配制成结合异常定位于细胞外的 14-3-3 蛋白时,这些及其它可在本发明中用作关节炎治疗的治疗剂。

[0077] “抗体”是指包含特异性结合相应抗原之蛋白质的组合物,并且其具有免疫球蛋白的一般共同结构。术语“抗体”特别地包括多克隆抗体、单克隆抗体、二聚体、多聚体、多特

异性抗体（例如双特异性抗体）以及抗体片段，只要它们表现出期望的生物活性即可。抗体可以是鼠源的、人源的、人源化的、嵌合的或者源自其它物种。通常，抗体会包含由二硫键相互连接的至少两个重链和两个轻链，当它们组合时形成与抗原相互作用的结合结构域。每个重链包含重链可变区（VH）和重链恒定区（CH）。重链恒定区包括三个结构域——CH1、CH2 和 CH3，并且可以为 μ 、 δ 、 γ 、 α 和 ϵ 同种型。类似地，轻链包含轻链可变区（VL）和轻链恒定区（CL）。轻链恒定区包含一个结构域构成——CL，其可以为 κ 或 λ 同种型。VH 和 VL 区域还可进一步细分成高变区（称为互补决定区（CDR）），其被称为框架区（FR）的较保守区域间隔开。每个 VH 和 VL 包含 3 个 CDR 和 4 个 FR，从氨基端至羧基端以下列顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子（包括免疫系统的多种细胞（例如，效应细胞）和经典补体系统的第一组分（C1q））的结合。重链恒定区介导免疫球蛋白与宿主组织或宿主因子的结合，特别是通过细胞受体（例如 Fc 受体（例如，Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII 等））的结合。如本文所用，抗体还包括免疫球蛋白中保留了结合抗原之能力的抗原结合部分。这些包括例如 F(ab)——VL CL 和 VH CH 抗体结构域的单价片段；和 F(ab')₂ 片段——包含由铰链区二硫键相连的两个 Fab 片段的二价片段。术语“抗体”还指重组的单链 Fv 片段（scFv）和双特异性分子，例如双抗体、三抗体和四抗体（参见例如美国专利 No. 5, 844, 094）。

[0078] 抗体可以多种形式制备和使用，包括抗体复合物。本文使用的术语“抗体复合物”是指一种或多种抗体与另一抗体或者与抗体片段的复合物，或者是两种或更多种抗体片段的复合物。抗体复合物包括多聚形式的抗 14-3-3 抗体，例如如本发明所述的同缀合物和异缀合物以及其它交联抗体。

[0079] “抗原”作广义理解，其是指可特异性结合抗体的任何分子、组合物或颗粒。抗原具有一个或多个与抗体相互作用的表位，尽管其不一定诱导该种抗体的产生。

[0080] 术语“交联”及其语法上的等同形式是指两个或更多个抗体结合形成抗体复合物，也可称为多聚化。交联或多聚化包括两个或更多个同样抗体的结合（例如，同二聚化），以及两个或更多个不同抗体的结合（例如，异二聚化）。本领域技术人员还会了解，交联或多聚化也称为形成抗体同缀合物和抗体异缀合物。这样的缀合物可包括同一克隆来源的两个或更多个单克隆抗体的结合（同缀合物）或者两个或更多个不同克隆来源的抗体的结合（也称为异缀合物或双特异性）。抗体可通过非共价或共价结合进行交联。本领域技术人员会了解适于交联的多种技术。可通过使用特异性针对第一抗体种类的第二抗体来实现非共价结合。例如，可使用山羊抗小鼠（goat anti-mouse, GAM）第二抗体来交联小鼠单克隆抗体。可通过使用化学交联剂来实现共价结合。

[0081] “表位”是指能够特异性结合抗体的决定簇。表位是通常存在于分子表面上并且有机会与抗体相互作用的化学特征。典型的化学特征是具有三维结构特征以及包括电荷、亲水性和亲脂性等化学性质的氨基酸和糖部分。构象表位与非构象表位的不同在于：其在分子的空间要素变化而没有任何内在化学结构的变化时丧失与抗体的反应性。

[0082] “人源化抗体”是指尽可能少地含有源自非人免疫球蛋白之序列的免疫球蛋白分子。人源化抗体包括这样的人免疫球蛋白（受者抗体），其中来自受者互补决定区（CDR）的残基被具有所需特异性、亲和力和容量的来自非人物种例如小鼠、大鼠或兔的 CDR（供者抗

体)的残基替换。在一些情形中,人免疫球蛋白的 Fv 框架残基被相应的非人残基所替换。人源化抗体还可包含在受者抗体或者所引入的 CDR 或框架序列中均不存在的残基。一般地,人源化抗体会包含至少一个以及通常两个可变结构域的基本全部,其中全部或基本上全部的 CDR 区域对应于非人免疫球蛋白中的那些,全部或基本上全部的框架 (FR) 区是人免疫球蛋白共有序列中的那些。人源化抗体还涵盖包含免疫球蛋白恒定区 (Fc) 之至少一部分 (其一般是人免疫球蛋白的) 的免疫球蛋白 (Jones 等人, Nature 321 :522-525 (1986) ; Reichmann 等人, Nature 332 :323-329 (1988))。

[0083] “免疫原”是指刺激产生免疫应答的物质、化合物或组合物。

[0084] 术语“免疫球蛋白基因座”是指这样的遗传元件或者一组连锁的遗传元件,其包含 B 细胞或 B 细胞前体可利用来表达免疫球蛋白多肽的信息。该多肽可以是重链多肽、轻链多肽或者重链和轻链多肽的融合物。在未经重排基因座的情形中, B 细胞前体对遗传元件进行组装以形成编码免疫球蛋白多肽的基因。在经重排基因座的情形中,基因座内包含编码免疫球蛋白多肽的基因。

[0085] “同种型 (isotype)”是指由重链恒定区定义的抗体类别。重链一般分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ , 并命名为 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。每个同种型内的差异又将其分为多种亚型,例如 IgG 的亚型分为 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4,而 IgA 分为 IgA1 和 IgA2。IgY 同种型是鸟类特有的。

[0086] “单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单一分子组成的抗体分子制备物。单克隆抗体组合物显示出对特定表位的单一结合特异性和亲和力。

[0087] 术语“人单克隆抗体”包括具有来源于人免疫球蛋白序列的可变区和 / 或恒定区 (如果存在的话) 的显示单一结合特异性的抗体。在一个实施方案中,人单克隆抗体由这样的杂交瘤产生,所述杂交瘤包含与永生化细胞融合的、具有包含人重链转基因和轻链转基因之基因组的、从转基因非人动物 (例如转基因小鼠) 获得的 B 细胞。

[0088] “单链 Fv”或“scFv”是指包含抗体 VH 和 VL 区域的抗体,其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,scFv 还包含 VH 和 VL 结构域之间的多肽接头,其使得 scFv 形成抗原结合的所需结构。

[0089] “对象”或“患者”可互换使用,其是指哺乳动物例如人和非人灵长类以及兔、大鼠、小鼠、山羊、猪以及其它哺乳动物物种,另有指明除外。

[0090] “重组抗体”是指所有通过重组技术产生的抗体。这些包括从免疫球蛋白基因座为转基因的动物获得的抗体、从重组表达载体表达的抗体或者通过将任意免疫球蛋白基因序列剪接成任何其它核酸序列而产生、制备和表达的抗体。

[0091] 抗 14-3-3 抗体

[0092] 在一个方面中,本发明提供了新型抗 14-3-3 抗体,其特异性结合 14-3-3 η 或 14-3-3 γ 蛋白。优选地,本发明的抗 14-3-3 抗体能够特异性结合天然三维构型的 14-3-3 蛋白。特异性结合“天然构型”的 14-3-3 蛋白意指有如在体内接触时结合 14-3-3 蛋白的能力。这可例如通过抗体对来自生物样品之 14-3-3 η 蛋白进行免疫沉淀的能力来证明。

[0093] 在一个优选实施方案中,本发明的抗 14-3-3 η 抗体能够结合在关节炎中异常定位于细胞外滑膜腔中的 14-3-3 蛋白。这可通过例如对存在于关节炎患者之滑膜液样品中的 14-3-3 蛋白进行免疫沉淀来证明。

[0094] 在一个优选实施方案中,本发明的抗 14-3-3 抗体能够区分 14-3-3 蛋白的同工型。这样的抗体能够特异性结合特定的 14-3-3 蛋白同工型,并且在同样条件下相比于其它 14-3-3 蛋白同工型来说优先结合该同工型。这可以例如使用 ELISA 测定来证明,所述 ELISA 测定可使用例如杂交瘤克隆的上清液来进行。优选使用对照(例如免疫前血清)。“选择性”抗体能够识别特定的 14-3-3 同工型,并且与其它的 14-3-3 同工型相比产生更高的针对该同工型的信号,优选相比于其它同工型高出至少 1.5 倍的信号,更优选高出至少 2 倍的信号。在一个优选实施方案中,相比于其它 14-3-3 同工型,选择性抗体能够选择性免疫沉淀特定的 14-3-3 η 。

[0095] 在一个优选实施方案中,相比于 14-3-3 α 、 β 、 δ 、 ϵ 、 γ 、 τ 和 ξ 蛋白来说,所述抗 14-3-3 抗体表现出针对 14-3-3 η 蛋白的这种选择性。这可以通过例如 ELISA 来证明。

[0096] 在另一优选实施方案中,相比于 14-3-3 α 、 β 、 δ 、 ϵ 、 η 、 τ 和 ξ 蛋白来说,所述抗 14-3-3 抗体表现出针对 14-3-3 γ 蛋白的这种选择性。这可以通过例如 ELISA 来证明。

[0097] 在一个优选实施方案中,本发明的抗 14-3-3 抗体是 14-3-3 拮抗剂,尽管其它抗 14-3-3 抗体也在本发明考虑的范围之内。

[0098] 在一个优选实施方案中,抗 14-3-3 抗体能够抑制 14-3-3 蛋白(特别是 14-3-3 γ 或 14-3-3 η)对 MMP 的诱导。优选地,所述 MMP 选自 MMP-1、3、8、9、10、11 和 13,特别优选 MMP-1 和 MMP-3。该能力可通过体外测定或体内测定来确定。如本领域技术人员所了解地,设计该测定使得在不存在抗 14-3-3 抗体时,14-3-3 蛋白的存在会导致 MMP 诱导。降低 14-3-3 蛋白对 MMP 之诱导的能力可证明抗 14-3-3 抗体的这种功能抑制能力。

[0099] 在一方面中,本发明提供了抗 14-3-3 η 抗体。在一个优选实施方案中,所述抗 14-3-3 η 抗体与包含 SEQ ID NO:63 所示氨基酸序列之区段的 14-3-3 肽结合。在一个优选实施方案中,所述区段的长度为至少 6 个氨基酸、更优选至少 7 个氨基酸、更加优选至少 8 个氨基酸。

[0100] 在一个实施方案中,本发明的抗 14-3-3 η 抗体不与位于人 14-3-3 η 蛋白 N 端的表位结合。

[0101] 在一个优选实施方案中,抗 14-3-3 η 抗体结合的 14-3-3 肽是 14-3-3 η 环肽。在一个优选实施方案中,所述 14-3-3 η 环肽包含选自 SEQ ID NO:11-16 的氨基酸序列。在另一实施方案中,所述 14-3-3 η 环肽基本上由选自 SEQ ID NO:11-16 的氨基酸序列组成。在又一实施方案中,抗 14-3-3 η 抗体与对应于选自 SEQ ID NO:11-16 之序列的氨基酸序列重叠的 14-3-3 η 区域结合。

[0102] 在另一优选实施方案中,抗 14-3-3 η 抗体结合的 14-3-3 肽是 14-3-3 η 螺旋肽。在一个优选实施方案中,所述 14-3-3 η 螺旋肽包含选自 SEQ ID NO:1-10 的氨基酸序列。在另一实施方案中,所述 14-3-3 η 螺旋肽基本上由选自 SEQ ID NO:1-10 的氨基酸序列组成。在又一实施方案中,抗 14-3-3 η 抗体与对应于选自 SEQ ID NO:1-10 之序列的氨基酸序列重叠的 14-3-3 η 区域结合。

[0103] 在另一优选实施方案中,抗 14-3-3 η 抗体结合的 14-3-3 肽是非螺旋 14-3-3 η 肽。在一个优选实施方案中,所述非螺旋 14-3-3 η 肽包含选自 SEQ ID NO:17-32 的氨基酸序列。在另一实施方案中,所述非螺旋 14-3-3 η 肽基本上由选自 SEQ ID NO:17-32 的氨基酸序列组成。在又一实施方案中,抗 14-3-3 η 抗体与对应于选自 SEQ ID NO:17-32 之序列

的氨基酸序列重叠的 14-3-3 η 区域结合。

[0104] 在一个特别优选的实施方案中,本发明的抗 14-3-3 η 抗体结合选自以下的氨基酸序列:LDKFLIKNSNDF(SEQ ID NO:30)、KKLEKVKAYR(SEQ ID NO:31)和KNSVVEASEAAYKEA(SEQ ID NO:32)。

[0105] 示例性的 14-3-3 η 环、螺旋和非螺旋肽公开于本文表 1 中。要注意的是,SEQ ID NO:30 与对应的 14-3-3 η 序列的不同在于:14-3-3 η 序列中的半胱氨酸被丝氨酸所替换以避免形成二硫键。在一个实施方案中,本发明提供了这样的抗体,其还结合与 SEQ ID NO:30 相关的包含半胱氨酸的天然 14-3-3 序列。在一个实施方案中,本发明提供了能够结合如下肽序列的抗体,所述肽序列与表位表中所列肽序列的不同在于用丝氨酸替换半胱氨酸。

[0106] 在一方面中,本发明提供了抗 14-3-3 γ 抗体。在一个优选实施方案中,所述抗 14-3-3 γ 抗体结合包含 SEQ ID NO:64 所示氨基酸序列之区段的 14-3-3 肽。在一个优选实施方案中,所述区段的长度为至少 6 个氨基酸、更优选至少 7 个氨基酸、更加优选至少 8 个氨基酸。

[0107] 在一个优选实施方案中,抗 14-3-3 γ 抗体结合的 14-3-3 肽是 14-3-3 γ 环肽。在一个优选实施方案中,所述 14-3-3 γ 环肽包含选自 SEQ ID NO:44-49 的氨基酸序列。在另一实施方案中,所述 14-3-3 γ 环肽基本上由选自 SEQ ID NO:44-49 的氨基酸序列组成。在又一实施方案中,抗 14-3-3 γ 抗体与对应于选自 SEQ ID NO:44-49 之序列的氨基酸序列重叠的 14-3-3 γ 区域结合。

[0108] 在另一优选实施方案中,抗 14-3-3 γ 抗体结合的 14-3-3 肽是 14-3-3 γ 螺旋肽。在一个优选实施方案中,所述 14-3-3 γ 螺旋肽包含选自 SEQ ID NO:33-43 的氨基酸序列。在另一实施方案中,所述 14-3-3 γ 螺旋肽基本上由选自 SEQ ID NO:33-43 的氨基酸序列组成。在又一实施方案中,抗 14-3-3 γ 抗体与对应于选自 SEQ ID NO:33-43 之序列的氨基酸序列重叠的 14-3-3 γ 区域结合。

[0109] 在另一优选实施方案中,抗 14-3-3 γ 抗体结合的 14-3-3 肽为非螺旋 14-3-3 γ 肽。在一个优选实施方案中,所述非螺旋 14-3-3 γ 肽包含选自 SEQ ID NO:50-62 的氨基酸序列。在另一实施方案中,所述非螺旋 14-3-3 γ 肽基本上由选自 SEQ ID NO:50-62 的氨基酸序列组成。在又一实施方案中,抗 14-3-3 γ 抗体与对应于选自 SEQ ID NO:50-62 之序列的氨基酸序列重叠的 14-3-3 γ 区域结合。

[0110] 单克隆抗体、杂交瘤及其制备方法

[0111] 本公开内容提供了特异性结合 14-3-3 η 蛋白的单克隆抗体以及特异性结合 14-3-3 γ 蛋白的单克隆抗体。还提供了能够产生这些抗体的杂交瘤细胞系。

[0112] 在一个方面中,本发明提供了结合 14-3-3 η 环、螺旋或非螺旋肽的抗 14-3-3 η 抗体。在一个优选实施方案中,所述肽包含选自 SEQ ID NO:1-32 的氨基酸序列。在一个特别优选的实施方案中,本发明提供了特异性结合选自以下氨基酸序列的抗 14-3-3 η 单克隆抗体:LDKFLIKNSNDF(SEQ ID NO:30)、KKLEKVKAYR(SEQ ID NO:31)和KNSVVEASEAAYKEA(SEQ ID NO:32)。还提供了能够产生这些抗体的杂交瘤细胞系。

[0113] 在一个方面中,本发明提供了通过将来源于用包含 14-3-3 η 环、螺旋或非螺旋肽之免疫原免疫的小鼠之脾细胞融合产生的杂交瘤。在一个优选实施方案中,所述肽包含选自 SEQ ID NO:1-32 的氨基酸序列。在一个特别优选的实施方案中,本发明提供了通过将来

源于用包含以下之免疫原免疫的小鼠之脾细胞融合产生的杂交瘤: LDKFLIKNSNDF (SEQ ID NO:30)、KKLEKVKAYR (SEQ ID NO:31) 或 KNSVVEASEAAYKEA (SEQ ID NO:32)。还提供了这些杂交瘤产生的单克隆抗体。

[0114] 在一个优选实施方案中, 本发明提供了结合 14-3-3 γ 环、螺旋或非螺旋肽的抗 14-3-3 γ 单克隆抗体。在一个优选实施方案中, 所述肽包含选自 SEQ ID NO:33-62 的氨基酸序列。还提供了能够产生这些抗体的杂交瘤细胞系。

[0115] 在一个方面中, 本发明提供了通过将来源于用包含 14-3-3 γ 环、螺旋或非螺旋肽之免疫原免疫的小鼠之脾细胞融合产生的杂交瘤。在一个优选实施方案中, 所述肽包含选自 SEQ ID NO:33-62 的氨基酸序列。还提供了这些杂交瘤产生的单克隆抗体。

[0116] 本公开内容还提供了产生这些单克隆抗体或其衍生物的方法, 包括在合适条件下培养本发明的杂交瘤, 由此产生单克隆抗体, 并从细胞和 / 或细胞培养基获得抗体和 / 或其衍生物。

[0117] 本领域技术人员可容易地制备抗体。由杂交瘤制备单克隆抗体的一般性方法已是本领域公知的。参见例如 M. Schreier 等人, *Hybridoma Techniques* (Cold Spring Harbor Laboratory) 1980; Hammerling 等人, *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (Elsevier Biomedical Press) 1981。

[0118] 在一些实施方案中, 这些方法包括在合适条件下培养产生所述抗体的杂交瘤细胞, 以及从所述细胞和 / 或细胞培养基获得抗体和 / 或其衍生物。

[0119] 本发明还考虑到使用噬菌体文库来筛选能够结合本文所述之对象 14-3-3 肽的抗体。例如参见 Konthur 等人, *Targets*, 1:30-36, 2002。

[0120] 可通过本领域技术人员已知的方法来纯化通过任意方法制备的抗体。纯化方法包括选择性沉淀、液相色谱、HPLC、电泳、色谱聚焦和多种亲和技术等。选择性沉淀可使用硫酸铵、乙醇 (Cohn 沉淀)、聚乙二醇或其它本领域可用的试剂。液相色谱介质包括离子交换介质 DEAE、聚天冬氨酸、羟磷灰石、尺寸排阻 (例如, 基于交联琼脂糖、丙烯酰胺、葡聚糖等的尺寸排阻)、疏水性基质 (例如 Blue Sepharose)。亲和技术通常依赖于与免疫球蛋白 Fc 结构域相互作用的蛋白质。来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的蛋白 A 可用于纯化基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体 (Lindmark 等人, *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983))。来自 C 群和 G 群链球菌的蛋白 G 可用于所有小鼠同种型和人 $\gamma 3$ (Guss 等人, *EMBO J.* 5:15671575 (1986))。蛋白 L (一种大消化链球菌 (*Peptostreptococcus magnus*) 细胞壁蛋白质, 其通过 κ 轻链相互作用与免疫球蛋白 (Ig) 结合 (BD Bioscience/ClonTech, Palo Alto, CA) 可用于 Ig 亚类 IgM、IgA、IgD、IgG、IgE 和 IgY 的亲纯化。这些蛋白质的重组形式也有市售。如果所述抗体含有金属结合残基 (例如构建成含有组氨酸标签的噬菌体展示抗体), 可使用金属亲和色谱法。当有足够量的特异性细胞群可用时, 可用细胞制备抗原亲和基质以提供纯化所述抗体的亲和方法。

[0121] 在一个优选实施方案中, 分离包括使用合适的 14-3-3 蛋白或其片段的亲和色谱法。

[0122] 本发明提供了本文所述的抗体, 以及相应的抗体片段和抗原结合部分。所有这些都涵盖在术语“抗 14-3-3 抗体”中。本文所用的本发明术语“抗体片段”或抗体的“抗原结合部分” (或简称“抗体部分”) 是指保留了特异性结合抗原能力的一个或多个抗体片段。

已显示,抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段来实现。术语“抗体片段”或抗体的“抗原结合部分”所涵盖的结合片段实例包括:(i)Fab 片段——由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段——包含由铰链区二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段;(iii)由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段;(iv)由抗体单个臂上的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段,(v)dAb 片段(例如,Ward 等人,(1989)Nature 341:544-546),其由 VH 结构域组成;(vi)分离的互补决定区(CDR),和(vii)双特异性单链 Fv 二聚体(例如 PCT/US92/09965)。此外,尽管 Fv 片段的两个结构域(VL 和 VH)由单独的基因编码,但可以通过合成的接头使用重组方法将它们连接,所述接头使得它们能够制备成单个蛋白质链,其中 VL 和 VH 区域对形成单价分子(称为“单链 Fv(scFv)”);参见例如 Bird 等人(1988)Science 242:423-426;以及 Huston 等人(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。这样的单链抗体也旨在涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,使用与完整抗体同样的方式筛选片段。可对所述抗体片段进行修饰。例如,可通过整合入连接 VH 和 VL 结构域的二硫桥来稳定所述分子(Reiter 等人,1996, Nature Biotech. 14:1239-1245)。

[0123] 可将免疫球蛋白分子切割成片段。所述分子的抗原结合区域可分为 $F(ab')_2$ 或 Fab 片段。 $F(ab')_2$ 片段是二价的,可用于 Fc 区域是不期望的或不需要的特征时。Fab 片段是单价的,可用于抗体对其抗原具有非常高的亲和力时。从抗体中去除 Fc 区域降低了 Fc 区域与具有 Fc 受体之细胞之间的非特异性结合。为了得到 Fab 或 $F(ab')_2$ 片段,用酶消化抗体。在免疫球蛋白分子的铰链区进行切割的蛋白酶保留了连接 Fab 结构域的二硫键,使它们在切割后仍连在一起。适于此目的的蛋白酶是胃蛋白酶。为产生 Fab 片段,选择蛋白酶以使得切割发生在含有连接重链之二硫键的铰链区以上,但其仍保留连接重链和轻链的完整二硫键。适于制备 Fab 片段的蛋白酶是木瓜蛋白酶。通过上述方法纯化所述片段,需要完整 Fc 区域的亲和方法除外(例如蛋白 A 亲和色谱法)。

[0124] 可通过抗体的有限蛋白水解产生抗体片段,其称为蛋白水解抗体片段。这些包括但不限于: $F(ab')_2$ 片段、Fab' 片段、Fab' -SH 片段和 Fab 片段。通过将抗体有限暴露于蛋白水解酶(例如胃蛋白酶或无花果蛋白酶)而从抗体释放“ $F(ab')_2$ 片段”。 $F(ab')_2$ 片段包含两个“臂”,其中每个臂均包含针对共同抗原并与其特异性结合的可变区。两个 Fab' 分子通过重链铰链区中的链间二硫键连接;所述 Fab' 分子可以针对相同(二价)或不同(双特异性)的表位。“Fab' 片段”含有单个抗原结合结构域,其包含 Fab 以及穿过铰链区的额外重链部分。“Fab' -SH 片段”通常由 $F(ab')_2$ 片段制备,其在 $F(ab')_2$ 片段中由 H 链之间的二硫键连接在一起。用弱还原剂(例如但不限于, β -巯基乙醇)处理,断裂二硫键,继而从 $F(ab')_2$ 片段释放两个 Fab' 片段。Fab' -SH 片段是单价且单特异性的。“Fab 片段”(即含有抗原结合结构域并包含轻链和由二硫键桥连之部分重链的抗体片段)可通过木瓜蛋白酶消化完整抗体来产生。简便的方法是使用固定于树脂上的木瓜蛋白酶,从而可容易地除去所述酶并终止消化。Fab 片段不具有 $F(ab')_2$ 片段中存在的 H 链之间的二硫键。

[0125] “单链抗体”是一类抗体片段。术语“单链抗体”常缩写为“scFv”或“sFv”。这些抗体片段使用 DNA 重组技术制备。单链抗体由多肽链组成,所述多肽链包含 V_H 和 V_L 结构域,其相互作用以形成抗原结合位点。所述 V_H 和 V_L 结构域通常由 10 ~ 25 个氨基酸残基的

肽连接。

[0126] 术语“单链抗体”还包括但不限于：二硫键连接的 Fv(dsFv)，其中两个单链抗体（每个可针对不同的表位）通过二硫键连接在一起；双特异性 sFv，其中具有不同特异性的两个独立的 scFv 通过肽接头相连；双抗体（当第一 sFv 的 V_H 结构域与第二 sFv 的 V_L 结构域组装以及所述第一 sFv 的 V_L 结构域与所述第二 sFv 的 V_H 结构域组装时形成的二聚化 sFv；双抗体的两个抗原结合区域可针对相同或不同的表位）；以及三抗体（三聚化 sFv，以类似于双抗体的方式形成，只是其中在单个复合物中形成三个抗原结合结构域；所述三个抗原结合结构域可针对相同或不同的表位）。

[0127] “互补决定区肽”或“CDR 肽”是另一种抗体片段形式。在一个实施方案中，本发明提供了这样的 CDR 肽，即 14-3-3 拮抗剂。CDR 肽（也称为“最小识别单位”）是对应于单个互补决定区（CDR）的肽，并且可通过构建编码目的抗体之 CDR 的基因来制备。例如通过使用聚合酶链式反应从产生抗体之细胞的 RNA 合成可变区来制备这些基因。参见，例如 Larrick 等人，Methods:A Companion to Methods in Enzymology 2:106,1991。

[0128] 在“经半胱氨酸修饰的抗体”中，通过基因操作将半胱氨酸插入或替换于抗体表面上，用于将所述抗体与另一分子通过例如二硫桥进行缀合。抗体的半胱氨酸替换或插入已有描述（参见美国专利 No. 5, 219, 996）。将 Cys 残基引入 IgG 抗体恒定区中用于抗体之位点特异性缀合的方法描述于 Stimmell 等人（J. Biol. Chem 275 :330445-30450, 2000）。

[0129] 本公开内容还提供了人源化和非人源化的抗体。人源化形式的非人（例如小鼠）抗体是尽可能少地含有来源于非人免疫球蛋白之序列的嵌合抗体。通常，人源化抗体是非人抗体，其可变结构域框架区替换为人抗体中存在的序列。人源化抗体可以是这样的人免疫球蛋白（受者抗体），其中来自受者高变区的残基被来自非人物种（例如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类）的具有期望特异性、亲和力和容量的高变区（供者抗体）的残基所替换。在一些情形中，人免疫球蛋白的框架区（FR）残基被相应的非人残基所替换。此外，人源化抗体可包含在受者抗体或供者抗体中均不存在的残基。进行这些修饰以进一步优化抗体的性能。一般地，人源化抗体会包含至少一个以及通常两个可变结构域的基本上全部，其中全部或基本上全部的高变环对应于非人免疫球蛋白中的高变环，并且全部或基本上全部的 FR 是人免疫球蛋白序列中的 FR。任选地，人源化抗体还会包含至少部分的免疫球蛋白恒定区（Fc）（通常是人免疫球蛋白的 Fc）。

[0130] 一般地，在人源化抗体中，除 CDR 以外的整个抗体均由人源的多核苷酸编码，或者除了 CDR 以外均与此抗体一致。将 CDR（其中一些或全部由非人生物来源之核酸编码）“嫁接”于人抗体可变区的 β -片层框架，产生特异性由所“嫁接”CDR 决定的抗体。这些抗体的产生描述于例如 W092/11018, Jones, 1986, Nature 321 :522-525, Verhoeyen 等人, 1988, Science 239 :1534-1536 中。人源化抗体还可使用具有遗传改造之免疫系统的小鼠来得到，例如 Roque 等人, 2004, Biotechnol. Prog. 20 :639-654。

[0131] 在效应物功能方面对本发明抗体进行修饰可以是理想的。例如，可将半胱氨酸残基引入 Fc 区域，从而允许在该区域中形成链间二硫键。还可使用异双功能交联剂来制备同二聚化抗体，例如 Wolff 等人 Cancer Research, 53 :2560-2565 (1993)。或者，可改造抗体使其具有两个 Fc 区域。参见例如，Stevenson 等人, Anti-Cancer Drug Design, 3 :219-230 (1989)。

[0132] 经修饰抗体

[0133] 在一个方面中,本发明提供了 14-3-3 抗体,其为来源于特异性结合 14-3-3 蛋白之抗体的经修饰抗体。经修饰抗体还包括如本发明所述的重组抗体。

[0134] 本领域技术人员会了解多种类型的经修饰抗体或重组抗体。合适类型的经修饰或重组抗体包括但不限于:经改造单克隆抗体(例如嵌合单克隆抗体、人源化单克隆抗体)、结构域抗体(例如 Fab、Fv、VH、scFv 和 dsFv 片段)、多价或多特异性抗体(例如双抗体、微抗体(minibody)、微抗体(miniantibody)、(scFv)₂、三抗体和四抗体)以及如本文所述的抗体缀合物。

[0135] 在一方面中,本发明提供了作为结构域抗体的抗 14-3-3 抗体。“结构域抗体”是抗体的功能性结合结构域,其对应于人抗体的重链(VH)或轻链(VL)的可变区。结构域抗体可具有约 13kDa 的分子量或者小于完整抗体大小的十分之一。它们在多种宿主中很好地表达,包括细菌、酵母和哺乳动物细胞系统。另外,结构域抗体高度稳定,并且甚至在经历苛刻条件(例如冷冻干燥或热变性)之后仍保持活性。参见例如,美国专利 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; 6,172,197; 美国序列号 No. 2004/0110941; 欧洲专利 0368684; 美国专利 6,696,245、W004/058821、W004/003019 和 W003/002609。在一个实施方案中,本发明的结构域抗体是单结构域。单结构域抗体可如例如美国专利 No. 6,248,516 中所述来制备。

[0136] 在另一方面中,本发明包括多特异性抗体。多特异性抗体包括双特异性、三特异性抗体等。双特异性抗体可通过重组手段制备,例如通过使用亮氨酸拉链部分(即,来自 Fos 和 Jun 蛋白,其优先形成异二聚体;例如 Kostelny 等人,1992, J. Immunol. 148:1547)或者其它锁钥相互作用结构域结构来实现,例如美国专利 No. 5,582,996 中所述。其它可用的技术包括美国专利 No. 5,959,083 和美国专利 No. 5,807,706 中所述的技术。

[0137] 双特异性抗体有时也称为“双抗体”。它们是与两种(或更多种)不同抗原结合的抗体。本领域中还已知三抗体(三聚化 sFv,以类似于双抗体的形式形成,只是其中在单个复合物中形成三个抗原结合结构域;所述三个抗原结合结构域可针对相同或不同表位)或四抗体(在单个复合物中形成四个抗原结合结构域,其中所述四个抗原结合结构域可针对相同或不同表位)。双抗体、三抗体或四抗体可采用本领域中已知的各种方法来制备(例如 Holliger 和 Winter,1993, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449),例如化学方法制备或者从杂交瘤制备。另外,这些抗体及其片段可通过基因融合来构建(例如, Tomlinson 等人,2000, Methods Enzymol. 326:461-479; W094/13804; Holliger 等人,1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:6444-6448)。

[0138] 在另一实施方案中,本发明提供了微抗体,其是最小化的抗体样蛋白质,包含与 CH3 结构域连接的 scFv(其来源于特异性结合 14-3-3 蛋白的抗体)。微抗体可如本领域中所所述来制备(例如, Hu 等人,1996, Cancer Res. 56:3055-3061)。

[0139] 在另一实施方案中,本发明提供了 14-3-3 结合结构域-免疫球蛋白融合蛋白。在一个实施方案中,所述融合蛋白可包含与免疫球蛋白铰链区多肽融合的 14-3-3 结合结构域多肽,所述铰链区多肽与融合了免疫球蛋白重链 CH3 恒定区多肽的免疫球蛋白重链 CH2 恒定区多肽融合。在本发明中,14-3-3 抗体融合蛋白可通过本领域技术人员所了解的方法来制备(参见例如,公开的美国专利申请 No. 20050238646、20050202534、20050202028、

2005020023、2005020212、200501866216、20050180970 和 20050175614)。

[0140] 在另一实施方案中,本发明提供了来源于 14-3-3 抗体的重链蛋白。已利用天然重链抗体(例如不具有轻链的骆驼抗体)开发抗体衍生的治疗性蛋白质,其通常保留了天然重链抗体的结构和功能性质。它们在本领域中称作“纳米抗体(nanobody)”。可通过本领域技术人员了解的方法来制备来源于 14-3-3 重链抗体的重链蛋白(参见例如,公开的美国专利申请 No. 20060246477、20060211088、20060149041、20060115470 和 20050214857)。此外,有关在轻链缺陷型小鼠中生产仅含重链的抗体,参见例如 Zou 等人, JEM, 204 :3271-3283, 2007。

[0141] 在一个方面中,本发明提供了作为人抗体的经修饰抗体。在一个实施方案中,提供了全人 14-3-3 抗体。“全人抗体”是指仅具有来源于人染色体之抗体基因序列的人抗体。所述抗 14-3-3 全人抗体可通过使用产生人抗体的小鼠的方法获得,所述小鼠具有含人抗体重链和轻链基因的人染色体片段[参见例如, Tomizuka, K. 等人, Nature Genetics, 16, 133-143 页, 1997; Kuroiwa, Y. 等人, Nuc. Acids Res., 26, 3447-3448 页, 1998; Yoshida, H. 等人, Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects 卷 10, 69-73 页 (Kitagawa, Y., Matuda, T. 和 Iijima, S. 编), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 722-727, 2000]; 或者通过选择人抗体文库的噬菌体展示获得人抗体的方法获得(参见例如, Wormstone, I. M. 等人, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 43 (7), 2301-8 页, 2002; Carmen, S. 等人, Briefings in Functional Genomics and Proteomics, 1 (2), 189-203 页, 2002; Siriwardena, D. 等人, Ophthalmology, 109 (3), 427-431 页, 2002)。

[0142] 在一个方面中,本发明提供了作为抗体类似物的 14-3-3 抗体,其有时称作“合成抗体”。例如,可使用“嫁接”了 CDR 的替代性蛋白质骨架或人工骨架。这些骨架包括但不限于例如由生物相容性聚合物组成的合成骨架。参见例如, Korndorfer 等人, 2003, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 卷 53, Issue 1: 121-129; Roque 等人, 2004, Biotechnol. Prog. 20 : 639-654。此外,可使用肽抗体模拟物(peptide antibody mimetics, “PAM”)以及利用纤连蛋白组分作为骨架的抗体模拟物。

[0143] 在一个方面中,本发明提供了交联抗体,其包含彼此结合形成抗体复合物的本文所述两个或更多个抗体。交联抗体也称为抗体多聚体、同缀合物和异缀合物。

[0144] 在一些实施方案中,本文提供的抗体复合物包括多聚体形式的抗 14-3-3 抗体。例如,本发明的抗体复合物可采用单体免疫球蛋白分子的抗体二聚体、三聚体或更高级多聚体的形式。可通过本领域已知的多种方法进行抗体的交联。例如,抗体交联可通过抗体的天然聚集、通过化学或重组连接技术或本领域已知的其它方法来实现。例如,经纯化的抗体制备物可自发地形成含有抗体同二聚体以及其它更高级抗体多聚体的蛋白质聚集体。

[0145] 在一个实施方案中,本发明提供了特异性结合 14-3-3 抗原的同二聚化抗体。

[0146] 可通过本领域已知的连接技术对抗体进行交联或二聚化。可利用非共价连接方法。在一个具体实施方案中,可通过使用第二交联剂抗体来实现抗体的交联。所述交联剂抗体可来源于不同于目的抗体的动物。例如,可将山羊抗小鼠抗体(Fab 特异性)添加到小鼠单克隆抗体中以形成异二聚体。该二价交联剂抗体识别两种目的抗体的 Fab 或 Fc 区域,从而形成同二聚体。

[0147] 在本发明的一个实施方案中,使用山羊抗小鼠抗体 (GAM) 交联特异性结合 14-3-3 抗原的抗体。在另一实施方案中, GAM 交联剂识别两种抗体的 Fab 或 Fc 区域, 其中每种抗体均特异性结合 14-3-3 抗原。

[0148] 还可使用共价或化学连接抗体的方法。化学交联剂可以是同双功能的或异双功能的, 并且会共价结合两个抗体, 形成同二聚体。交联剂是本领域中公知的; 例如, 公知同双功能接头或异双功能接头 (参见, 2006 Pierce Chemical Company Crosslinking Reagents Technical Handbook; Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, CA (1996); Aslam M. 和 Dent AH., Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences, Houndsmills, England: Macmillan Publishers (1999); Pierce: Applications Handbook & Catalog, PerbioScience, Ermodegem, Belgium (2003-2004); Haughland, R. P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals Eugene, 第 9 版, Molecular Probes, OR (2003) 以及美国专利 No. 5, 747, 641)。本领域技术人员会了解多种官能团对修饰抗体氨基酸 (包括交联) 的适合性。用于抗体交联的合适化学交联剂实例包括但不限于: SMCC [4-(马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯]、SATA [S-硫代乙酰基-乙酸 N-琥珀酰亚胺酯]、N-羟基琥珀酰亚胺的半琥珀酸酯; N-羟基硫代琥珀酰亚胺; 羟基苯并三唑和对硝基酚; 二环己基碳二亚胺 (DCC)、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (ECD) 和 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺甲碘化物 (EDCI) (参见例如, 美国专利 No. 4, 526, 714, 其公开内容通过引用整体并入本文)。其它连接试剂包括谷胱甘肽、3-(二乙氧基磷酰氧基)-1,2,3-苯并三嗪-4(3H)-酮 (3-(diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one, DEPBT)、基于鎓盐的偶联剂、基于聚环氧乙烷的异双功能交联试剂等 (Haitao 等人, Organ Lett 1:91-94 (1999); Albericio 等人, J Organic Chemistry 63:9678-9683 (1998); Arpicco 等人, Bioconjugate Chem. 8:327-337 (1997); Frisch 等人, Bioconjugate Chem. 7:180-186 (1996); Deguchi 等人, Bioconjugate Chem. 10:32-37 (1998); Beyer 等人, J. Med. Chem. 41:2701-2708 (1998); Drouillat 等人, J. Pharm. Sci. 87:25-30 (1998); Trimble 等人, Bioconjugate Chem. 8:416-423 (1997))。用于形成抗体同二聚体的示例性方案在美国专利公开 20060062786 中给出。将治疗性化合物与抗体缀合的方法也描述于 Arnon 等人, "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancers Therapy," Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld 等人编, 243-256 页, Alan R. Liss, Inc. (1985); Thorpe 等人 "The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody Toxin Conjugates," Immunol. Rev. 62:119-58 (1982) 以及 Pietersz, G. A., "The linkage of cytotoxic drugs to monoclonal antibodies for the treatment of cancer," Bioconjugate Chemistry 1(2):89-95 (1990) 中, 所有参考文献均通过引用并入本文。

[0149] 另外, 本发明的抗体-抗体缀合物可通过本领域已知的技术彼此共价结合, 例如使用异双功能交联试剂——GMBS (maleimidobutryloxysuccinimide, 马来酰亚胺丁氧基琥珀酰亚胺) 和 SPDP (3-(2-吡啶二硫基) 丙酸 N-琥珀酰亚胺酯) [参见例如, Hardy, "Purification And Coupling Of Fluorescent Proteins For Use In Flow Cytometry", Handbook Of Experimental Immunology, 卷 1, Immunochemistry, Weir 等人 (编), 31.4-31.12 页, 第 4 版, (1986) 以及 Ledbetter 等人, 美国专利 No. 6, 010, 902]。

[0150] 另外,抗体可通过硫醚交联进行连接,如美国专利公开 20060216284、美国专利 No. 6, 368, 596 中所述。如本领域技术人员所了解地,抗体可以在 Fab 区域交联。在一些实施方案中,理想的是,化学交联剂不与抗体的抗原结合区域相互作用,因为这可能影响抗体功能。

[0151] 缀合抗体

[0152] 本文公开的 14-3-3 拮抗剂包括与无机或有机化合物缀合的抗体,包括例如但不限于:其它蛋白质、核酸、碳水化合物、类固醇和脂质(参见例如,Green 等人, *Cancer Treatment Reviews*, 26 :269-286 (2000))。所述化合物可以具有生物活性。“生物活性”是指:与未暴露于化合物的细胞相比,所述化合物对细胞具有生理作用。生理作用是生物过程中的变化,包括例如但不限于:DNA 复制和修复、重组、转录、翻译、分泌、膜周转、细胞粘附、信号转导、细胞死亡等。生物活性化合物包括药物化合物。在一个实施方案中,将 14-3-3 抗体与 14-3-3 拮抗剂肽(优选 R-18)缀合,优选通过接头进行缀合。

[0153] 肽

[0154] 在一个方面中,本发明提供了作为肽的 14-3-3 拮抗剂。这些肽包括 CDR 肽。

[0155] 在一个实施方案中,所述肽与 14-3-3 蛋白中能够结合抗 14-3-3 抗体或其它 14-3-3 拮抗剂肽的区域结合。本文使用的术语“肽”或“寡肽”意在涵盖肽类似物、衍生物、融合蛋白等以及肽组合物,包括本公开内容中例举的那些。

[0156] 在一个优选实施方案中,所述肽包含称为“R-18”的氨基酸序列。在另一优选实施方案中,所述肽基本上由 R-18 序列组成。在又一优选实施方案中,所述肽包含 R-18 序列的区段。在另一优选实施方案中,所述肽包含 R-18 序列的多个重复,优选由接头分隔开。

[0157] 在另一优选实施方案中,所述肽与 14-3-3 蛋白中能够结合 R-18 的区域结合。在另一优选实施方案中,所述肽与 14-3-3 蛋白中能够结合细胞内 14-3-3 结合伴侣(优选 Raf)的区域结合。

[0158] 在一个实施方案中,所述肽结合 14-3-3 蛋白而不破坏 14-3-3 蛋白与细胞内 14-3-3 结合伴侣的结合。

[0159] 在一个实施方案中,所述 14-3-3 拮抗剂是磷酸肽。

[0160] 肽修饰

[0161] 可以本领域技术人员公知的多种常规方法来修饰目的肽。可进行多种修饰以获得具有期望特征的肽。本发明的肽所需要的是保留作为 14-3-3 拮抗剂的能力。

[0162] 修饰的实例包括以下这些。所述肽的末端氨基和/或羧基和/或氨基酸侧链可通过烷基化、酰胺化或酰基化进行修饰,以提供酯、酰胺或经取代的氨基。在脂肪族修饰基团中可包含杂原子。这可使用常规化学合成法来进行。其它修饰包括谷氨酰基和天冬酰胺酰基残基分别脱氨基为相应的谷氨酰基和天冬氨酰基残基;脯氨酸和赖氨酸的羟基化;丝氨酸或苏氨酸的羟基磷酸化;以及赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链氨基的甲基化(参见例如, T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co. San Francisco, Calif., 1983)。

[0163] 在另一方面中,所述肽的一端或两端(通常为一端)可被亲脂性基团(通常为脂肪族或芳烷基,其可包含杂原子)取代。链可以是饱和或不饱和的。方便地,可使用市售的脂肪族脂肪酸、醇和胺,例如辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸和肉豆蔻醇、棕榈酸、棕榈油酸、

硬脂酸和硬脂胺、油酸、亚油酸、二十二碳六烯酸等（参见美国专利 No. 6, 225, 444）。优选 14 ~ 22 个碳原子长的无支链天然脂肪酸。其它亲脂性分子包括甘油脂类和固醇，例如胆固醇。可根据常规方法将亲脂性基团与寡肽上合适的官能团反应，常常在支持物上合成期间进行，其取决于寡肽与支持物的连接位点。在将寡肽与其它治疗剂一起引入脂质体腔中用于将所述肽和药剂施用到宿主中时，可使用脂质连接。

[0164] 在另一些实施方案中，所述肽的 N 端或 C 端任一或者两者可延长不超过总共约 100 个氨基酸，通常不超过总共约 30 个氨基酸，更通常不超过约 20 个氨基酸，常常不超过约 9 个氨基酸，其中所述氨基酸具有少于 25%、更通常少于 20% 的极性氨基酸，更特别地少于约 20% 的带电荷氨基酸。因此，上述序列任一方向的延长主要用亲脂性不带电氨基酸（特别是非极性脂肪族氨基酸和芳族氨基酸）进行。所述肽可包含 L- 氨基酸，D- 氨基酸或者 D- 和 L- 氨基酸的混合物。当寡肽表达为融合蛋白或嵌合蛋白时，要考虑氨基酸延长数的例外情况，如下所述。

[0165] 所述肽还可采用寡聚物的形式，尤其是肽二聚体（其可以头对头、尾对尾或者头对尾），优选不超过该肽的约 6 个重复。所述寡聚物可包含一个或多个 D- 立体异构氨基酸，最多至全部氨基酸。所述寡聚物是否包含肽之间的接头序列均可。合适的接头包括但不限于包含不带电氨基酸的接头以及 (Gly)_n（其中 n 是 1-7）、Gly-Ser（例如 (GS)_n、(GSGGS)_n 和 (GGGS)_n，其中 n 至少是 1）、Gly-Ala、Ala-Ser 或者其它如本领域已知的柔性接头。可使用 Gly 或 Gly-Ser 接头，因为这些氨基酸是相对非结构化的，其允许各个肽与细胞靶分子相互作用并限制寡聚物的肽之间的结构干扰。应理解，可使用除氨基酸之外的接头来构建寡聚肽。

[0166] 肽还可以采用结构上受约束的形式，例如环状肽，优选约 9 ~ 50 个氨基酸，通常为 12 ~ 36 个氨基酸，其中除了指定氨基酸之外的氨基酸可以作为桥。因此，例如，在末端添加半胱氨酸允许形成二硫键，从而形成环状肽。在一些情形中，可使用氨基酸之外的物质来使所述肽环化。双功能交联剂可用于连接所述肽的两个或更多个氨基酸。形成的环的其它方法是本领域已知的，参见例如 Chen, S. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :5872-5876(1992) ;Wu, T. P. 等人, Protein Engineering 6 :471-478(1993) ;Anwer, M. K. 等人, Int. J. Pep. Protein Res. 36 :392-399(1990) ;以及 Rivera-Baeza, C. 等人, Neuropeptides 30 :327-333(1996)。或者，可通过向肽的 N 端和 C 端添加二聚化序列来产生结构上受约束的肽，其中二聚化序列之间的相互作用导致形成环型结构（参见，例如 WO/0166565）。在另一些情形中，所述对象肽表达成与其它蛋白质的融合物，其为表面暴露结构（例如卷曲螺旋的环或者 β -转角结构）上的受约束展示提供了骨架。

[0167] 根据其预定用途，特别是用于施用给哺乳动物宿主，对象肽还可进行如下修饰：为掺入载体分子而与其它化合物连接、改变肽的生物利用度、增加或缩短半衰期、控制向不同组织或血流的分配、减少或增加与血液组分的结合等。所述对象肽可通过接头与这些另外的组分结合，所述接头是生理环境中可切割的或不可切割的（例如被滑膜中的 MMP 所切割）。所述肽可以在存在官能团之肽的任一点处连接，所述官能团例如羟基、硫醇、羧基、氨基等。理想地，修饰位于 N 端或 C 端。例如，可以通过共价连接聚合物（例如聚乙二醇、聚丙二醇、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷、聚脯氨酸、聚（二乙烯基-乙醚-共-马来酸酐）、聚（苯乙烯-共-马来酸酐）等）来修饰对象肽。已知与未经修饰化

合物相比,水溶性聚合物(例如聚乙二醇和聚乙烯吡咯烷)降低所连接化合物从血流中清除。所述修饰还可增加水性介质中的溶解度以及减少所述肽的聚集。当递送和/或释放所述肽时,所述肽需要保留 14-3-3 拮抗剂功能。

[0168] 肽缀合物和融合蛋白

[0169] 在一个实施方案中,所述肽与小分子缀合以检测和分离所述肽,或者靶向或运送所述寡肽到特定细胞、组织或器官。小分子缀合物包括半抗原,所述半抗原是当单独将其引入动物时不引发免疫应答的物质。一般地,半抗原是分子量小于约 2kD、更优选小于约 1kD 的小分子。半抗原包括小有机分子(例如对硝基酚、地高辛、海洛因、可卡因、吗啡、麦司卡林(mescaline)、麦角酸、四氢大麻酚、大麻酚、类固醇、喷他咪(pentamidine)、生物素等)。使用半抗原特异性抗体或特异性结合伴侣(例如与生物素结合的亲和素)来结合半抗原,例如用以检测或纯化。

[0170] 还可使用将所述缀合物靶向至特定细胞或组织的小分子。

[0171] 应理解,也可将本领域中公知的标记与本发明的肽相连接,用以在诊断方法中使用此类缀合物。

[0172] 在一个实施方案中,针对不同目的,将所述肽与多种其它肽或蛋白质中的任意种相连。所述肽可以与肽或蛋白质连接,以提供用于键合的方便官能性,例如氨基用以形成酰胺或取代胺(例如还原胺化);硫醇基用以形成硫醚或二硫化物;羧基用以形成酰胺;等等。特别关注具有至少 2 个赖氨酸基团、通常 3 个赖氨酸基团、不超过约 60 个赖氨酸基团的肽,特别是约 4~20 个赖氨酸单元、通常 6~18 个赖氨酸单元的聚赖氨酸,这被称为“多抗原性肽系统(multiple antigenic peptide system, MAPS)”,其中对象肽与赖氨酸基团(通常占可用氨基的至少约 20%、更通常至少约 50%)键合,以提供多肽产物(Butz, S. 等人, *Pept. Res.* 7:20-23(1994))。以这种方式,在所述对象肽的取向为同一方向时获得具有多个所述对象肽的分子;实际上,此连接基团提供了尾对尾的二聚化或寡聚化。

[0173] 在一个实施方案中,所述肽与其它肽或蛋白质缀合,用以将所述寡肽靶向到细胞和组织,或者将额外的功能性添加到所述肽。就靶向而言,用于缀合的蛋白质或肽将根据治疗所靶向的细胞或组织进行选择(Lee, R. 等人, *Arthritis. Rheum.* 46:2109-2120(2002); Pasqualini, R., Q. J. *Nucl. Med.* 43:159-62(1999); Pasqualini, R., *Nature* 380:364-366(1996))。所述蛋白质还可包括聚氨基酸,其包括但不限于聚精氨酸;和聚赖氨酸、聚天冬氨酸等,其可以掺入到其它聚合物(例如聚乙二醇)中,用以制备含有所述缀合肽的囊泡或颗粒。

[0174] 在一个实施方案中,所述对象肽可与其它肽或蛋白质一起表达或合成为多肽链的一部分,其位于内部或者在 N 端或 C 端,以形成嵌合蛋白或融合蛋白。本文的“融合多肽”或“融合蛋白”或“嵌合蛋白质”意指由多个蛋白质组分构成的蛋白质,所述蛋白质组分通常以天然状态连接并通过肽键以各自的氨基端和羧基端相连而形成连续多肽。应理解,所述蛋白质组分可直接相连或者通过肽接头/间隔序列相连。

[0175] 可将多种肽或蛋白质制备成融合多肽,从而以构象受限的形式展示所述对象寡肽,用以靶向细胞和组织、用以靶向细胞内区室、在细胞或生物中示踪融合蛋白以及筛选与该寡肽结合的其它分子。可用于产生融合蛋白的蛋白质包括多种报告蛋白、结构蛋白、细胞表面受体、受体配体、毒素和酶。示例性蛋白质包括荧光蛋白质(例如 *Aequodina victoria*

GFP、海肾 (Renilla reniformis)GFP、Renilla muelledi GFP、萤光素酶等以及其变体);
β-半乳糖苷酶;碱性磷酸酶;大肠杆菌麦芽糖结合蛋白;丝状噬菌体的外壳蛋白;T 细胞受体;蝎毒素 (charybdotoxin) 等。

[0176] 融合蛋白还涵盖与蛋白质或其它肽之片段的融合物,其单独存在或者作为更大蛋白质序列的一部分。因此,所述融合多肽可包含融合伴侣。本文的“融合伴侣”意指与肽结合的序列,其赋予该类别蛋白质的所有成员以共同的功能或能力。融合伴侣可以是异源的(即对宿主细胞来说不是天然的)或者合成的(即对任何细胞来说都不是天然的)。融合伴侣包含但不限于:a) 呈递结构 (presentation structure),其提供构象受限或稳定形式的寡肽;b) 靶向序列,其允许将所述肽定位于亚细胞区室或细胞外区室;c) 稳定性序列,其影响稳定性或者保护所述肽或其编码核酸免受降解;d) 接头序列,其在构象上使得所述寡肽与融合伴侣去偶联;以及 e) 上述任意组合。

[0177] 在一个方面中,所述融合伴侣是呈递结构。本文所用的“呈递结构”意指当与对象肽融合时呈递构象受限形式之肽的序列。优选的呈递结构通过将肽呈递在暴露于溶剂的外表面上来增强与其它结合伴侣的结合相互作用。一般地,这些呈递结构包含与所述寡肽 N 端连接的第一部分以及与所述寡肽 C 端连接的第二部分。也就是说,将本发明的肽插入所述呈递结构中。优选地,选择或设计所述呈递结构使其在靶细胞中表达时具有尽可能小的生物活性。

[0178] 优选地,所述呈递结构通过展示或呈递所述肽或外部环而使得具有尽可能高的可接近性。合适的呈递结构包括但不限于:卷曲螺旋茎结构、微抗体结构、β-转角上的环、二聚化序列、半胱氨酸连接结构、转谷氨酰胺酶连接结构、环肽、螺旋管 (helical barrel)、亮氨酸拉链基序等。

[0179] 在一个实施方案中,所述呈递结构是卷曲螺旋结构,其允许在外部环上呈递所述对象肽(例如 Myszka, D. G. 等人, Biochemistry 33:2363-2373(1994)),例如在卷曲螺旋亮氨酸拉链结构域上 (Martin, F. 等人, EMBO J. 13:5303-5309(1994))。所述呈递结构还可包括微抗体结构,其基本上由最小抗体互补区域组成。所述微抗体结构一般提供两个肽区域,它们沿着折叠蛋白质中三级结构的单个界面呈递(例如 Bianchi, E. 等人, J. Mol. Biol. 236:649-659(1994);Tramontano, A. 等人, J. Mol. Recognit. 7:9-24(1994))。

[0180] 在另一方面中,所述呈递结构包含两个二聚化序列。所述二聚化序列(可以是相同或不同的)在生理条件下以足够的亲和力非共价连接,从而在结构上约束所展示的肽。因此,如果在对象寡肽的每一端使用二聚化序列,则所得结构可展示结构受限或受约束形式的对象肽。多种序列适于用作二聚化序列(参见例如 WO 99/51625;其通过引用并入本文)。任何数目的本领域已知蛋白质-蛋白质相互作用序列可用于该目的。

[0181] 在另一方面,所述呈递序列赋予结合金属离子的能力,从而产生构象受限的二级结构。因此,例如,使用 C2H2 锌指序列。C2H2 序列具有两个半胱氨酸和两个组氨酸,其位置使得锌离子被螯合。已知锌指结构域在多种锌指肽中独立地存在,形成结构上独立的柔性连接结构域(例如 Nakaseko, Y. 等人, J. Mol. Biol. 228:619-636(1992))。一般性共有序列为(5个氨基酸)-C-(2至3个氨基酸)-C-(4至12个氨基酸)-H-(3个氨基酸)-H-(5个氨基酸)(SEQ ID NO:66)。优选的实例有 -FQCEEC-3 至 20 个氨基酸的随机肽 -HIRSHTG(SEQ ID NO:67)。类似地,可使用具有共有序列为 -C-(2个氨基酸)-C-(4至20个氨基酸的

随机肽)-H-(4个氨基酸)-C-(SEQ ID NO:68) (Bavoso, A. 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. 242:385389(1998)) 的 CCHC 盒。其它实例包括:(1)-VKCFNC-4 至 20 个随机氨基酸-HTARNCR-(SEQ ID NO:69),其基于核衣壳蛋白 P2;(2) 修饰自 Laspl LIM 结构域天然锌结合肽之序列的序列 (Hammarstrom, A. 等人, Biochemistry 35:12723-32(1996));以及 (3)-MNPNCARCG-4 至 20 个随机氨基酸-HKACF-(SEQ ID NO:70),其基于 NMR 结构系综 IZFP (Hammarstrom 等人, 同上)。

[0182] 在又一方面中,所述呈递结构是包含两个或更多个半胱氨酸残基的序列,从而可形成二硫键,得到构象上受约束的结构。也就是说,在对象寡肽的每一端使用含半胱氨酸的肽序列产生如上所述的环状肽结构。环状结构降低了所呈递肽对蛋白质水解的敏感性,并增加对其靶分子的可接近性。如本领域技术人员所理解地,该特定实施方案特别适于使用分泌型靶向序列将所述肽引导至细胞外间隙的情况。另外,可使用被蛋白酶(例如基质金属蛋白酶(例如 MMP-1、MMP-3))识别并切割的序列。这些残基用于形成环状肽,以增加肽的半衰期或膜透性。随后用合适的蛋白酶在期望之位置切割所述环状肽,释放活性的线性形式肽。

[0183] 在另一实施方案中,所述融合伴侣是靶向序列。靶向序列包含能够将所表达产物与预定分子或分子类别结合而同时又保留所表达产物之生物活性的结合序列;指示选择性降解融合蛋白或结合伴侣的序列;以及能够组成性地将肽定位于预定细胞位置的序列。典型的细胞定位包括亚细胞定位(例如高尔基体、内质网、细胞核、核仁、核膜、线粒体、分泌小泡、溶酶体)以及通过利用分泌信号的细胞外定位。

[0184] 多种靶向序列在本领域中是已知的,包括膜锚定序列。通过信号序列将肽引导至膜,并通过疏水性跨膜结构域(称为 TM)稳定地掺入所述膜中。将 TM 区段适当地置于所表达的融合蛋白上,从而在细胞内或细胞外展示对象肽,如本领域中已知地。尤其优选的是细胞外呈递。膜锚定序列和信号序列包括但不限于(a)来源于 I 类整合膜蛋白(例如 IL-2 受体 β -链 (Hatakeyama, M. 等人, Science 244:551-556(1989)) 和胰岛素受体 β -链 (Hatakeyama 等人, 同上))的那些;(b)来源于 II 类整合膜蛋白(例如中性内肽酶 (Malfroy, B. 等人 Biochem. Biophys. Res. Commun. 144:59-66(1987))的那些;(c)来源于 III 型蛋白质(例如人细胞色素 P450 NF25 (Hatakeyama 等人, 同上))的那些;以及来自 CD8、ICAM-2、IL-8R 和 LFA-1 的那些。

[0185] 膜锚定序列还包括 GPI 锚,其使得在 GPI 锚定序列和脂双层之间通过糖基-磷脂酰肌醇形成共价键。GPI 锚定序列在多种蛋白质中发现,包括 Thy-1 和 DAF (Homans, S. W. 等人, Nature 333:269-272(1988))。类似地,酰基化序列允许脂质部分的连接,例如异戊二烯化(即,法尼基和香叶基-香叶基;参见 Farnsworth, C. C. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11963-11967(1994) 以及 Aronheim, A. 等人, Cell 78:949-61(1994))、肉豆蔻酰化 (Stickney, J. T. Methods Enzymol. 332:64-77(2001)) 或棕榈酰化。在一个方面中,所述对象肽在一端与脂质基团结合,从而能够结合脂质膜,例如脂质体。

[0186] 在另一方面中,所述靶向序列是实现所述肽分泌的分泌信号序列。已知很多分泌序列当被置于目的肽的氨基端时引导肽分泌进入细胞外间隙,特别是使肽被细胞(包括经移植的细胞)分泌。合适的分泌信号包括 IL-2 (Villinger, F. 等人, J. Immunol. 155:3946-3954(1995))、生长激素 (Roskam, W. G. 等人, Nucleic Acids Res. 7:305-320(1979))、

前胰岛素原和流感病毒 HA 蛋白中发现的分泌信号。

[0187] 融合伴侣还可包含稳定性序列,其赋予融合蛋白或其编码核酸以稳定性。因此,例如,在起始甲硫氨酸之后掺入甘氨酸(例如 MG 或 MGG)可稳定融合肽或保护融合肽免受根据 Varshavsky 之“N 端原则”的泛素化降解,从而使得在细胞中的半衰期增加。

[0188] 可出于检测或纯化的目的添加额外的氨基酸用于标记所述肽。这些序列可包含抗体所识别的表位或结合配体(例如金属离子)的序列。多种标签序列和配体结合序列是本领域中公知的。这些包括但不限于:聚组氨酸(例如 6×His 标签,其被抗体所识别并且还结合二价金属离子);聚组氨酸-甘氨酸(聚-his-gly)标签;流感 HA 标签多肽;c-my 标签;Flag 肽(例如,Hopp 等人,BioTechnology 6:1204-1210(1988));KT3 表位肽;微管蛋白表位肽(例如,Skinner 等人,J. Biol. Chem. 266:15163-12166(1991));和 T7 基因 10 蛋白肽标签(例如,Lutz-Freyermuth 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6363-6397(1990))。

[0189] 融合伴侣包括接头或拴系序列(tethering sequence),如本文所述,用于连接所述肽以及用于呈递无位阻结构的肽。

[0190] 在本发明中,可使用融合伴侣的组合。任何数目的呈递结构、靶向序列、标签序列和稳定性序列的组合可以与或不与接头序列一起使用。

[0191] 肽制备和盐

[0192] 本发明的肽可采用多种方法制备。肽的化学合成是本领域公知的。常用固相合成,并且有多种市售的合成设备可用,例如自动化合成仪(Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.; Beckman; 等等)。也可使用液相合成法,特别是对于大规模生产来说。通过使用这些标准技术,可用非天然氨基酸(特别是 D- 立体异构体)替换天然氨基酸,以及用具有不同长度或功能之侧链的氨基酸替换天然氨基酸。可以在化学合成期间将用以缀合小分子、标记部分、肽或蛋白质或者用于形成环化肽的官能团引入所述分子。另外,可以在合成过程期间连接小分子和标记部分。优选地,所述官能团的引入以及与其它分子的缀合最低限度地影响所述对象肽的结构和功能。

[0193] 本发明的肽还可以盐的形式存在,通常以可药用的盐形式。这些包括钠、钾、锂、铵、钙、镁、铁、锌、铜、锰等的无机盐。也可制成所述肽的多种有机盐,包括但不限于使用乙酸、丙酸、丙酮酸、马来酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、水杨酸等。

[0194] 寡肽及其衍生物的合成还可通过使用重组技术来进行。对于重组产生而言,可制备编码单个寡肽(或优选地与插入氨基酸或序列串联的多个对象肽)的核酸序列,其允许切割成单个肽或“头对尾”二聚体。在缺少甲硫氨酸或色氨酸时,可掺入间插的甲硫氨酸或色氨酸,其分别允许使用 CNBr 或 BNPS-Skatole(2-(2- 硝基苯基亚磺酰基)-3- 甲基-3- 溴吲哚切割单个氨基酸。或者,通过使用被用于酶切割之特定蛋白酶识别的序列或者作为自切割位点的序列来实现切割(例如,口蹄疫病毒和心病毒的 2A 序列;Donnelly, M. L., J. Gen. Virol. 78:13-21(1997);Donnelly, M. L., J. Gen. Virol. 82:1027-41(2001))。所述对象肽还可作为较大肽的一部分来制备,其可进行分离并通过蛋白水解切割或化学切割获得所述寡肽。具体序列和制备方式将根据方便性、经济性、所需纯度等确定。为了制备这些组合物,将编码特定肽、蛋白质或融合蛋白的基因与编码本发明寡肽的 DNA 序列相连接,形成融合核酸,并将其引入表达载体中。所述融合核酸的表达处于合适启动子和其它控制序列的控制之下,如下文所定义的,用以表达在特定宿主细胞或生物中(Sambrook

等人, *Molecular Biology :A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (第3版 2001); Ausubel, F. 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N. Y., (更新至 2002) (1988))。

[0195] 为了将不同的分子与本发明的肽缀合, 在合适缀合(例如交联)剂存在下将寡肽上的官能团与另一分子反应。所用缀合剂或交联剂的类型将取决于官能团, 例如使用伯胺、巯基、羰基、糖和羧酸。优选地, 在将所述肽与其它反应性分子偶联之前保护寡肽上未选作修饰的反应性官能团, 以限制不希望的副反应。本文使用的“保护基团”是与特定官能团结合的分子, 其可选择性地移除以重新暴露所述官能团 (Greene, T. W. 和 Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., New York (第3版 1999))。所述肽可由经保护的氨基酸前体合成, 或者与在合成后但与交联剂反应之前与保护基团反应。缀合还可以是间接的, 例如通过连接生物素部分, 所述生物素部分可以与偶联有链霉亲和素或亲和素的化合物或分子相接触。

[0196] 对于在缀合形式中活性降低的寡肽, 在一个优选实施方案中, 选择所述寡肽与缀合化合物之间的连接使其不稳定而足以导致在预计条件下进行切割, 例如在运送到期望细胞或组织后。生物学不稳定的共价键(例如亚胺键(imino bond)和酯)是本领域中公知的(参见例如, 美国专利 No. 5, 108, 921)。这些修饰允许施用活性可能较低形式的所述寡肽, 其随后通过切割不稳定键而活化。

[0197] 核酸、表达载体和引入方法

[0198] 可使用其编码核酸来合成 14-3-3 拮抗剂, 其为蛋白质包括肽和抗体。这可产生随后进行分离待用的 14-3-3 拮抗剂。或者, 这些核酸可用于治疗。

[0199] 在一个实施方案中, 将所述核酸克隆进表达载体并引入细胞或宿主。所述表达载体是自我复制染色体外载体或者整合进宿主染色体的载体, 例如基于逆转录病毒的载体、具有位点特异性重组序列或者通过同源重组的载体。通常, 这些载体包括与编码所述寡肽的核酸有效连接的控制序列。“控制序列”意指对象肽在特定宿主生物中表达所必需的核酸序列。因此, 控制序列包括核酸转录和翻译所需的序列, 包括但不限于启动子序列、增强子或转录活化序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、多腺苷酸化信号等。

[0200] 在一个优选实施方案中, 所述细胞是成纤维细胞或 FLS 细胞。优选地, 所述细胞是滑膜细胞。优选地, 所述细胞经改造而表达 14-3-3 拮抗剂。所述细胞可以在体外操作并引入受者中。或者, 所述细胞可以在体内操作。

[0201] 多种启动子可用于表达本发明的肽。启动子可以是组成型、可诱导和/或细胞特异性的, 并且可包括天然启动子、合成启动子(例如 tTA 四环素可诱导启动子)或者多种启动子的杂合体。基于待表达蛋白质的细胞或生物、期望表达水平以及任何期望的表达调控等诸多因素来选择启动子。合适的启动子是细菌启动子(例如 pL1 噬菌体启动子、tac 启动子、lac 启动子等); 基于酵母的启动子(例如 GAL4 启动子、乙醇脱氢酶启动子、色氨酸合酶启动子、铜诱导型 CUP1 启动子等)、植物启动子(例如 CaMVS35、胭脂碱(nopaline)合酶启动子、烟草花叶病毒启动子等)、昆虫启动子(例如 γ 纹夜蛾(Autographa)核型多角体病毒(nuclear polyhedrosis virus)、伊蚊 DNV 病毒 p 和 p61、hsp70 等)以及用于哺乳动物细胞表达的启动子(例如泛素基因启动子、核糖体基因启动子、β-珠蛋白启动子、胸苷激酶启动子、热休克蛋白启动子和核糖体基因启动子等), 以及特别地病毒启动子例如巨细胞

病毒 (CMV) 启动子、猿猴病毒 (SV40) 启动子和逆转录病毒启动子。

[0202] 本文的“有效连接”意为将核酸置于与另一核酸的功能性关系中。在本发明背景中,有效连接意指所述控制序列相对于编码对象 14-3-3 拮抗剂之核酸序列的位置采用使得所编码拮抗剂进行表达的形式。所述载体可包括质粒或包括病毒载体,例如逆转录病毒载体(其在细胞是分裂细胞时可用作递送系统)或者慢病毒和腺病毒载体(当细胞是非分裂细胞时使用)。特别优选的是自我失活逆转录病毒载体(self-inactivating retroviral vector, SIN 载体),其在 3' -LTR 具有失活的病毒启动子,从而允许通过使用插入到病毒载体中的非病毒启动子来控制异源基因的表达(参见例如, Hofmann, A. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 :5185-5190(1996))。本领域技术人员会了解,通过假型包装(pseudotyping)对系统进行修饰允许针对所有真核细胞使用逆转录病毒载体,特别是针对高等真核生物(Morgan, R. A. 等人, J. Virol. 67 :4712-4721(1993); Yang, Y. 等人, Hum. Gene Ther. 6 :1203-1213(1995))。

[0203] 另外,所述表达载体还含有选择标记基因,从而允许选择转化的宿主细胞。通常,所述选择会赋予可检测表型,其使含有所述表达载体的细胞富集,并且还允许区分表达和不表达选择基因的细胞。选择基因是本领域公知的,并且根据所用宿主细胞而有所不同。合适的选择基因包括使细胞对药物具有抗性的基因、允许在营养缺陷型介质中生长的基因以及报告基因(例如 β -半乳糖苷酶、荧光蛋白、葡萄糖醛酸酶(glucouronidase)等),所有这些均是本领域是公知的并且对于本领域技术人员来说是可获得的。

[0204] 有多种可用于将核酸引入活细胞中的方法。本文中“引入”意指核酸以适于该核酸随后表达的方式进入细胞。用于引入核酸的技术根据核酸是否体外转移进培养细胞或是体内转移进预定宿主生物的细胞而有所不同,其还取决于宿主生物的类型。用于体外引入核酸的方法包括使用脂质体、LipofectinTM、电穿孔、显微注射、细胞融合、DEAE 葡聚糖、磷酸钙沉淀和基因枪颗粒轰击。体内转移的技术包括直接引入核酸、使用病毒载体(通常为逆转录病毒载体)以及脂质体介导的转染,包括病毒包被的脂质体介导的转染。表达本发明 14-3-3 拮抗剂的核酸可在细胞中瞬时或稳定存在,或者稳定整合进宿主的染色体中。

[0205] 在一些情形中,理想的是包括靶向靶细胞或组织的药剂,例如特异性针对细胞表面蛋白或靶细胞(例如成纤维细胞或 FLS 细胞)的抗体、靶细胞上受体的配体、细胞膜上的脂质组分或细胞表面上的碳水化合物。如果使用脂质体,可使用与细胞表面被内吞之蛋白质结合的蛋白质来靶向和/或有助于摄入。这些包括但不限于:针对特定细胞类型的衣壳蛋白或其片段、经历内化之蛋白质的抗体(Wu, G. Y. 等人, J. Biol. Chem. 262 :4429-4432(1987); Wagner, E. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 :3410-3414(1990)),或者增加体内半衰期。

[0206] 表达在从原核生物到真核生物的广泛范围的宿主细胞中进行,包括细菌、酵母、植物、昆虫和动物。本发明的寡肽可表达于大肠杆菌、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、裂殖酵母(*Saccharomyces pombe*)、烟草或拟南芥植物、昆虫 Schneider 细胞和哺乳动物细胞(例如 COS、CHO、HeLa 等),其在细胞内表达或者通过与合适信号肽融合而以分泌形式表达。可通过将编码所述寡肽的 DNA 与编码信号肽的 DNA 融合来实现从宿主细胞中分泌。对于细菌、酵母、昆虫、植物和哺乳动物系统中的分泌信号是本领域中公知的。可以将表达所述寡肽的核酸插入细胞(例如用于组织表达的干细胞或者用于肠道表达的细

菌,以及移植进宿主的细胞)中,以提供所述寡肽的体内来源。

[0207] 经纯化的肽

[0208] 在一个优选实施方案中,本发明的寡肽可以在合成或表达之后进行纯化或分离。“纯化”或“分离”意指所述肽离开其合成或表达的环境并采取其可实际使用的形式。因此,“纯化”或“分离”意指所述肽或其衍生物基本上是纯的,即纯度超过 90%,优选纯度超过 95%,优选纯度超过 99%。根据样品中存在的其它组分,所述寡肽及其衍生物可通过本领域技术人员所知的方法进行纯化和分离。标准纯化方法包括电泳技术、免疫技术和色谱技术,包括离子交换、疏水、亲和、尺寸排阻、反相 HPLC 和色谱聚焦。所述蛋白质还可通过选择性溶解进行纯化,例如在盐或有机溶剂存在下进行。必要的纯化程度将取决于对象寡肽的用途。因此,在有些情况下,纯化不是必需的。

[0209] 对于大多数应用,相对于与产物制备方法、纯化方法以及预定用途(例如用于治疗目的的药物载体)有关的污染物来说,所用组合物将包含至少 20%(重量)的期望产物,更通常至少约 75%(重量)的期望产物,优选至少约 95%(重量)的期望产物,通常至少约 99.5%(重量)的期望产物。通常,所述百分比是基于总蛋白质而言的。

[0210] 药物组合物、施用和剂量

[0211] 可将本发明的 14-3-3 拮抗剂掺入适于向对象施用的药物组合物中。通常,所述药物组合物包含本发明的 14-3-3 拮抗剂以及可药用载体。本文使用的“可药用载体”包括任意及全部的生理相容性溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。可药用载体的实例包括水、盐水、磷酸盐缓冲液、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合中的一种或多种。在许多情形中,优选在所述组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。可药用物质例如润湿物质或少量辅助物质(如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂)提高了 14-3-3 拮抗剂的保存期或有效性。

[0212] 所述 14-3-3 拮抗剂靶向位于细胞外的 14-3-3 蛋白。因此,配制治疗性组合物,并施用以使得这样递送的 14-3-3 拮抗剂可供与细胞外的 14-3-3 蛋白结合之用。

[0213] 本发明的组合物可采用多种形式。这些包括例如液体、半固体和固体剂型,例如液体溶液(例如注射液和输注液)、分散系或混悬液、片剂、丸剂、粉末剂、脂质体和栓剂。优选形式取决于预定的施用模式和治疗性应用。典型的优选组合物采用注射液或输注液的形式,例如与用其它抗体对人进行被动免疫时使用的组合物类似的组合物。优选的施用模式是肠胃外(例如静脉内、皮下、腹膜内、肌内,其中尤其优选囊内)施用。在一个实施方案中,所述 14-3-3 拮抗剂通过静脉内输注或注射施用。在另一优选实施方案中,所述 14-3-3 拮抗剂通过肌内或皮下注射施用。在一个优选实施方案中,直接注射进滑膜内。

[0214] 治疗性组合物通常必须是无菌的并且在制备和储存条件下是稳定的。所述组合物可以配制成溶液、微乳剂、分散系、脂质体或适于高药物浓度的其它有序结构。可如下制备无菌注射液:将所需量的活性化合物掺入根据需要含有一种上文所列成分或成分组合的合适溶剂中,随后过滤除菌。一般地,如下制备分散系:将所述活性化合物掺入含有基础分散介质和所需的其它上文所列成分的无菌载体中。对于用来制备无菌注射液的无菌粉末来说,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其得到来自先前经过滤灭菌之溶液的活性成分和任意额外所需成分的粉末。可例如通过使用包衣(例如卵磷脂)、在分散系的情形中通过维持所需粒径以及通过使用表面活性剂来维持溶液的适当流动性。注射用组合物的延长

吸收可通过在组合物中包含延迟吸收的药剂（例如单硬脂酸盐和明胶）来实现。

[0215] 本发明的 14-3-3 拮抗剂可通过本领域已知的多种方法来施用，包括静脉内注射或输注。直接施用至滑膜是一种优选的施用途径。如本领域技术人员所了解地，施用途径和/或模式将根据期望结果而有所不同。在某些实施方案中，所述活性化合物可与保护该化合物免于快速释放的载体一起制备，例如受控释放制剂，包括植入物、透皮贴剂和微胶囊化递送系统。可使用可生物降解的生物相容性聚合物，例如乙烯-醋酸乙烯、聚酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚正酯和聚乳酸。制备这些制剂的许多方法都是专利方法或者是本领域技术人员一般所知的。参见例如，Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson 编, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。代表性的制备技术在 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 19 版, Mack Publishing Co., Easton, PA (1995) 和 Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第 3 版, Kibbe, A. H. 编, Washington DC, American Pharmaceutical Association (2000) 等中有教导。

[0216] 在某些实施方案中，本发明的 14-3-3 拮抗剂可经口施用，例如，与惰性稀释剂或可吸收食用载体一起施用。所述化合物（及其它成分，如果需要的话）还可封装在硬壳或软壳明胶胶囊中，压制成片剂或者直接掺入对象的饮食中。为了经口治疗性施用，所述活性化合物中可掺入赋形剂并采用可摄入片剂、口含片剂、锭剂、胶囊剂、酏剂、混悬液、糖浆、薄片等形式。为了通过肠胃外施用之外的方式施用本发明化合物，可能有必要使用防止其失活的材料对所述化合物进行包衣或者与所述化合物共施用。

[0217] 还可将补充性活性化合物掺入所述组合物中。在某些实施方案中，本发明的 14-3-3 拮抗剂与一种或多种另外的治疗剂共配制和/或共施用。例如，DMARD 或 DMOAD。这样的联合治疗可有利地利用较低剂量的所施用治疗剂，从而避免了与各种单一治疗相关的可能毒性或并发症。

[0218] 本发明的药物组合物可包含“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明抗体。“治疗有效量”是指在必要的剂量和时间下有效实现期望治疗结果的量。所述 14-3-3 拮抗剂的治疗有效量可根据例如个体的疾病状况、年龄、性别和重量以及所述 14-3-3 拮抗剂在该个体中引发期望应答的能力等因素而有所不同。治疗有效量也是治疗有益作用胜过抗体任何毒性或有害作用的量。“预防有效量”是指在必要的剂量和时间下有效实现期望预防结果的量。通常，由于预防性剂量在疾病之前或早期阶段用于对象，因此预防有效量会少于治疗有效量。

[0219] 可以调整给药方案以提供最佳的期望应答（例如治疗性或预防性应答）。例如，可施用单次剂量，可随时间施用若干分开的剂量，或者可根据治疗情况的迫切性来按比例减少或增加剂量。配制成剂量单位形式的胃肠外组合物是尤其有利的，因为这便于施用且剂量均一。本文使用的“剂量单位形式”是指适合作为待治疗哺乳动物对象之单次剂量的物理上离散的单位；每单位含有经计算产生期望治疗效果的预定量的活性化合物以及所需的药物载体。本发明剂量单位形式的规格由 (a) 所述活性化合物的独特特性和待实现之特定治疗或预防效果，以及 (b) 在制备这样的活性化合物以用于个体敏感治疗的领域中固有的限制所决定并直接取决于它们。

[0220] 本发明抗体的治疗或预防有效量的示例性非限制性范围是 0.1 ~ 20mg/kg，更优选 1 ~ 10mg/kg。应当注意，剂量值可随着待缓解病症的类型和严重程度而变化。还应理解，

对于任何特定对象来说,具体给药方案应根据个体需要以及施加或指导施用所述组合物的人的专业判断随时间进行调整,本文所设定的剂量范围仅为示例性的且不意在限制所要求保护之组合物的范围或实施。

[0221] 本文所述的药物组合物可置于单位剂量或多剂量容器(例如密封安瓿或小瓶/管)中。此类容器通常以保持所述制剂的无菌和稳定性直至使用的方式进行密封。一般地,制剂可作为油或水性介质中的混悬液、溶液或乳剂来保存,如上文所示。或者,药物组合物可以冻干状态保存,其仅需要在临使用前加入无菌液体载体即可。

[0222] 14-3-3 拮抗剂的治疗性用途

[0223] 本文中“治疗”意指针对疾病、病症或不希望的状态的治疗性或预防性治疗或者抑制性手段。“治疗”涵盖在疾病症状出现之前和/或疾病的临床表现或其它表现之后向对象施加适当形式的 14-3-3 η 拮抗剂,从而降低疾病的严重程度、停止疾病发展或消除疾病。疾病的预防包括拖延或延迟疾病或病症之症状的出现,优选在疾病易感性提高的对象中。

[0224] 在一个方面中,本发明提供了治疗关节炎的方法,包括治疗以下疾病的方法:强直性脊柱炎、白塞病、弥漫性特发性骨肥厚症(DISH)、埃-当综合征(EDS)、费尔蒂综合征、纤维肌痛、痛风、感染性关节炎、幼年性关节炎、狼疮、混合性结缔组织病(MCTD)、骨关节炎、佩吉特病、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、假性痛风、银屑病关节炎、雷诺现象、反应性关节炎、类风湿性关节炎、硬皮病、舍格伦综合征、斯蒂尔病和韦格纳肉芽肿病。

[0225] 一般地,所述方法包括向患者单独施用 14-3-3 拮抗剂或者与其它治疗剂联合施用以增加治疗效力。

[0226] 筛选 14-3-3 拮抗剂的方法

[0227] 在一个方面中,本发明提供了筛选 14-3-3 拮抗剂的方法。所筛选的化合物范围可以从小的有机分子到大的聚合物和生物聚合物,可包括例如但不限于:小的有机化合物、糖类、碳水化合物、多糖、凝集素、肽及其类似物、多肽、蛋白质、抗体、寡核苷酸、多核苷酸、核酸等。

[0228] 在一个实施方案中,所筛选的候选化合物是小有有机分子,优选具有约 100 ~ 2500 道尔顿的分子量,尽管也可使用其它分子。这些候选分子常包含由碳原子或碳原子与一个或多个杂原子混合构成的环状结构和/或芳族、多环芳族、杂芳族和/或多环芳族结构。所述候选物质可包含多个官能团取代基。在一个实施方案中,所述取代基独立地选自已知与蛋白质相互作用的取代基,例如胺、羰基、羟基和羧基。

[0229] 可基于逐个筛选化合物来筛选候选化合物,或者,使用本领域常用的众多文库技术之一。例如,可使用本发明的测定来筛选合成组合化合物文库、天然产物文库和/或肽文库,以鉴定与 14-3-3 配体竞争结合 14-3-3 蛋白的化合物。这些竞争性结合测定可鉴定出与 14-3-3 配体在大致相同的位点与 14-3-3 蛋白结合的化合物。进行竞争性结合测定的众多方法是本领域已知的。任何这些技术均可用于本发明中。

[0230] 这些结合实验可完全在溶液中进行,或者使用固体支持物(例如玻璃或其它珠)或固体表面(例如培养皿的底)来固定试剂。所述固定可通过非共价相互作用或共价相互作用来介导。用于将多种类型的化合物和蛋白质固定于固体支持物上的方法是公知的。可使用这些方法中的任一种。

[0231] 不论是在溶液中进行还是用固定的 14-3-3 蛋白或候选化合物进行,所述 14-3-3

蛋白和候选化合物通常在有利于结合的条件下彼此接触。尽管实际所用的条件可有所不同,但是结合测定通常在生理条件下进行。适于特定测定的实际浓度对本领域技术人员来说是显而易见的。

[0232] 在一个实施方案中,所述测定还包括候选物质拮抗 14-3-3 蛋白活性之能力的功能性测定。在一个实施方案中,所述测定包括测定候选物质减少 14-3-3 蛋白诱导 MMP 的能力。在一个实施方案中,候选物质与 14-3-3 蛋白混合,然后可将该混合物添加到能够响应于 14-3-3 蛋白而诱导 MMP 的细胞。在另一实施方案中,将候选物质与 14-3-3 蛋白一起添加到能够响应于 14-3-3 蛋白而诱导 MMP 的细胞。可进行其它功能性测定,其测定候选物质抑制 14-3-3 蛋白诱导细胞(优选成纤维细胞或 FLS 细胞)中可测量变化的能力,并因此对作为 14-3-3 拮抗剂的候选物进行表征。

[0233] 本文所有引文(包括下文所列的)通过引用以整体明确地并入本文。

[0234] 实验

[0235] 表 1:14-3-3 η 表位

[0236]

SEQ ID NO :1	93-107	螺旋	LETVCNDVLSLLDKF
SEQ ID NO :2	191-199	螺旋	EQACLLAKQ
SEQ ID NO :3	144-155	螺旋	NSVVEASEAAYK
SEQ ID NO :4	144-152	螺旋	NSVVEASEA

[0237]

SEQ ID NO :5	147-155	螺旋	VEASEAAYK
SEQ ID NO :6	163-170	螺旋	EQMQPTHP
SEQ ID NO :7	168-177	螺旋	THPIRLGLAL
SEQ ID NO :8	82-92	螺旋	VKAYTEKIEKE
SEQ ID NO :9	68-79	螺旋	QKrMADGNEKKL
SEQ ID NO :10	138-146	螺旋	ASGEKKNSV
SEQ ID NO :11	69-77	环	KTMADGNEK
SEQ ID NO :12	32-40	环	ELNEPLSNE
SEQ ID NO :13	103-117	环	LLDKFLIKNCNDFQY
SEQ ID NO :14	130-143	环	YYRYLAEVASGEKK
SEQ ID NO :15	184-194	环	YEIQNAPEQAC

SEQ ID NO :16	206-218	环	AELDTLNEDSYKD
SEQ ID NO :17	44-57	非螺旋	LLSVAYKNVVGARR
SEQ ID NO :18	15-23	非螺旋	EQAERYDDM
SEQ ID NO :19	130-138	非螺旋	YYRYLAEVA
SEQ ID NO :20	118-125	非螺旋	ESKVFYLK
SEQ ID NO :21	210-218	非螺旋	TLNEDSYKD
SEQ ID NO :22	77-84	非螺旋	KKLEKVK
SEQ ID NO :23	76-86	非螺旋	EKKLRKVKAYR
SEQ ID NO :24	142-158	非螺旋	KKNSVVEASEAAYKEAF
SEQ ID NO :25	105-120	非螺旋	DKFLIKNCNDFQYESK
SEQ ID NO :26	237-246	非螺旋	QQDEEAGEGN
SEQ ID NO :27	75-82	非螺旋	NEKKLEKVK
SEQ ID NO :28	104-116	非螺旋	LDKFLIKNCNDFQ
SEQ ID NO :29	141-146	非螺旋	EKKNSV
SEQ ID NO :30	104-115	非螺旋	LDKFLIKNS * NDF
SEQ ID NO :31	77-86	非螺旋	KKLEKVKAYR
SEQ ID NO :32	143-157	非螺旋	KNSVVEASEAAYKEA
SEQ ID NO :65	1-12	非螺旋	DREQLLQRARLA

[0238] * 内部半胱氨酸氨基酸被丝氨酸氨基酸所替换,以防止形成二硫键。

[0239] 表 2 :14-3-3 γ 表位

[0240]

SEQ ID NO :33	93-107	螺旋	LEAVCQDVLSLLDNY
SEQ ID NO :34	191-199	螺旋	EQACHLAKT
SEQ ID NO :35	144-155	螺旋	ATVVESSEKAYS
SEQ ID NO :36	144-152	螺旋	ATVVESSEK

SEQ ID NO :37	147-155	螺旋	VESSEKAYS
SEQ ID NO :38	168-177	螺旋	THPIRLGLAL
SEQ ID NO :39	82-92	螺旋	VRAYREKIEKE
SEQ ID NO :40	68-79	螺旋	QKTSADGNEKKI
SEQ ID NO :41	138-146	螺旋	ATGEKRATV
SEQ ID NO :42	163-170	螺旋	EHMQPTHP
SEQ ID NO :43	141-146	螺旋	EKRATV
SEQ ID NO :44	69-77	环	KTSADGNEK
SEQ ID NO :45	32-40	环	ELNEPLSNE
SEQ ID NO :46	103-117	环	LLDNYLIKNCSETQY
SEQ ID NO :47	130-143	环	YYRYLAEVATGEKR
SEQ ID NO :48	184-194	环	YEIQNAPEQAC
SEQ ID NO :49	206-218	环	AELDTLNEDSYKD
SEQ ID NO :50	44-57	非螺旋	LLSVAYKNVVGARR
SEQ ID NO :51	75-83	非螺旋	NEKKIEMVR
SEQ ID NO :52	15-23	非螺旋	EQAERYDDM
SEQ ID NO :53	130-138	非螺旋	YYRYLAEVA
SEQ ID NO :54	118-125	非螺旋	ESKVFYLK
SEQ ID NO :55	210-218	非螺旋	TLNEDSYKD
SEQ ID NO :56	77-84	非螺旋	KKIEMVRA
SEQ ID NO :57	76-86	非螺旋	EKKIEMVRAYR

[0241]

SEQ ID NO :58	142-158	非螺旋	KRATVSESSEKAYSEAH
SEQ ID NO :59	105-120	非螺旋	DNYLIKNCSETQYESK

SEQ ID NO :60	237-246	非螺旋	QQDDDGGEEN
SEQ ID NO :61	75-82	非螺旋	NEKKIEMV
SEQ ID NO :62	104-116	非螺旋	LDNYLIKNCSETQ

[0242] 表 3. 人重组 14-3-3 η (SEQ ID NO :63) 和人重组 14-3-3 γ (SEQ ID NO :64) 的蛋白质序列

[0243]

SEQ ID NO:63	MGDREQLLQR	ARLAEQAERY	DDMASAMKAV	TELNEPLSNE	40
	DRNLLSVAYK	NVVGARRSSW	RVISSIEQKT	MADGNEKKLE	80
	KVKAYREKIE	KELETVCNDV	LSLLDKFLIK	NCNDFQYESK	120
	VFYLMKMGDY	YRYLAEVASG	EKKNSVVEAS	EAAYKEAFEI	160
	SKEQMOPHP	IRLGLALNFS	VFYYEIQNAP	EQACLLAKQA	200
	FDDAIAELDT	LNEDSYKDST	LIMQLLRDNL	TLWTSDDQQDE	240
	EAGEGN				
SEQ ID NO:64	MVDREQLVQK	ARLAEQAERY	DDMAAAMKNV	TELNEPLSNE	40
	ERNLLSVAYK	NVVGARRSSW	RVISSIEQKT	SADGNEKKIE	80
	MVRAYREKIE	KELEAVCQDV	LSLLDNYLIK	NCSETQYESK	120
	VFYLMKMGDY	YRYLAEVATG	EKRATVVESS	EKAYSEAHEI	160
	SKEHMOPHP	IRLGLALNYS	VFYYEIQNAP	EQACHLAKTA	200
	FDDAIAELDT	LNEDSYKDST	LIMQLLRDNL	TLWTSDDQQDD	240
	DGGEGNN				

[0244] 在一个实施方案中,在包含半胱氨酸残基的序列中,半胱氨酸残基被丝氨酸残基替换,以避免形成二硫键。所述半胱氨酸可以是内部半胱氨酸残基或末端半胱氨酸残基。

[0245] 可出于多种目的修饰肽表位,包括与另一部分缀合,例如与产生免疫原(包含表位)的部分缀合。如所了解地,可适当地放置半胱氨酸用于连接载体并暴露希望暴露以产生抗体的区域。在 KKLE 的情形中,将半胱氨酸加至 C 末端,从而暴露另一侧。所用的载体可以是相当大的,并且可遮盖最初几个氨基酸。

[0246] 实施例 1:14-3-3 η 免疫原序列和抗 14-3-3 η 抗体

[0247] 为了制备单特异性抗 14-3-3 η 抗体,基于我们自己的标准选择长度为 8~15 个氨基酸的多种肽。将这些肽以及全长重组天然(无标签)14-3-3 η 用作产生单克隆抗体的免疫原。7 种 14-3-3 同工型的蛋白质序列比对示于图 4 中(14-3-3 γ (SEQ ID NO :64)、14-3-3 η (SEQ ID NO :63)、14-3-3 α/β (SEQ ID NO :71)、14-3-3 ξ (SEQ ID NO :72)、14-3-3 θ (SEQ ID NO :73)、14-3-3 σ (SEQ ID NO :74) 和 14-3-3 ϵ (SEQ ID NO :75))。

[0248] 免疫原 #1:C-LDKFLIKNSNDF(SEQ ID NO :76)(104-115 位氨基酸序列;“AUG1-CLDK”)。通过加入用于连接载体的 N 端半胱氨酸部分以及替换内部 112 位半胱氨酸部分以避免形成内部二硫键来修饰对应于人 14-3-3 η 104-115 位残基区段的肽。

[0249] 免疫原 #2:KKLEKVKAYR-C(SEQ ID NO :77)(77-86 位氨基酸序列;“AUG2-KKLE”)。通过加入用于连接载体的 C 端半胱氨酸部分来修饰对应于人 14-3-3 η 77-86 位残基区段的

肽。

[0250] 免疫原 #3 :C-KNSVVEASEAAYKEA (SEQ ID NO :78) (143-157 位氨基酸序列 ;“AUG3-CKNS”)。通过加入用于连接载体的 N 端半胱氨酸部分来修饰对应于人 14-3-3 η 143-157 位残基区段的肽。

[0251] 免疫原 #4 :人全长重组 14-3-3 η (SEQ ID NO :63), 蛋白质登记号 :NP_003396。

[0252] 免疫

[0253] 每只小鼠使用完全弗氏佐剂中的 50 μ g 抗原 (免疫原 #1、#2、#3 或 #4), 经腹膜内注射对多组由 4 只雌性 BALB/c 小鼠组成的组进行初始免疫。使用不完全弗氏佐剂中的抗原如上所述进行四次后续加强免疫, 以 3 周为间隔。当通过 ELISA 所测的血清效价与免疫前血清样品相比上升 10 倍以上时, 用 100 μ l 无菌 PBS (pH 7.4) 中的 10 μ g 抗原经静脉内对每组中 2 只最高应答者逐一进行加强免疫。从第二次加强免疫后的经免疫小鼠中取出的血清样品之效价示于图 1 (免疫原 #1 ;CLDK)、图 2 (免疫原 #2 ;KKLE)、图 3 (免疫原 #3 ;CKNS) 和图 8 (免疫原 #4) 中。

[0254] 融合方法

[0255] 最后一次加强免疫后三天, 处死供体小鼠, 收获脾细胞并合并。如前所述 (Kohler 等人, 如下) 进行脾细胞与 SP2/OBALB/c 亲代骨髓瘤细胞的融合, 唯一不同的是进行杂交瘤的一步式选择和克隆。融合后 11 天挑取克隆, 重悬于 96 孔组织培养板的孔中含 1% 次黄嘌呤 / 胸腺嘧啶、20% 胎牛血清、2mM GlutaMax I、1mM 丙酮酸钠、50 μ g/ml 庆大霉素、1% OPI 和 0.6ng/ml IL-6 的 200 μ l DMEM 培养基中。4 天后, 利用包被有 1 μ g/ 孔的经纯化抗原的板通过 ELISA 筛选上清液中的抗体活性。

[0256] 生长缓慢的杂交瘤克隆的复苏方法

[0257] 生长缓慢或看起来不健康的杂交瘤细胞系通常可通过添加富营养生长培养基来挽救, 所述培养基中含有 : 含 1% 次黄嘌呤 / 胸腺嘧啶、20% 胎牛血清、2mM GlutaMax I、1mM 丙酮酸钠、50 μ g/ml 庆大霉素、1% OPI、20% 条件化 EL-4 组织培养物上清液和 0.6ng/ml IL-6 的 DMEM 培养基。EL-4 是鼠胸腺瘤细胞系, 当用 12- 肉豆蔻酰 -12- 佛波醇乙酯 (PMA, 来自 Sigma 货号 P-8139) 刺激时导致所述细胞分泌白介素 2 (IL-2)、B 细胞分化因子 (EL-BCDF-nak) 和两种 B 细胞生长因子 (BSF-p1 和 EL-BCGF-swa) 以及其它另外的淋巴因子, 这些大大地提高淋巴细胞的生长和分化。参见 G. Kohler 和 C. Milstein, Preparation of monoclonal antibodies, Nature 25 (1975) 256-259 ; Ma, M., S. Wu, M. Howard 和 A. Borkovec. 1984. Enhanced production of mouse hybridomas to picomoles of antigen using EL-4 conditioned media with an in vitro immunization protocol. In Vitro 20 : 739。

[0258] 30 天的稳定性测试之后, 获得总共 100 个分泌能够识别重组 14-3-3 η 之 IgG 的存活克隆。出于鉴定随后使用之克隆 (lead clone to pursue) 的目的, 使用一系列方法对所述 100 个存活克隆进行筛选, 所述方法包括 : 免疫印迹 (点印迹)、诱捕测定和自定的捕获 (夹心法) ELISA。还使用自定的捕获 (夹心法) ELISA 测试全部 100 个克隆对另外六种 14-3-3 同工型的交叉反应性。

[0259] 实施例 2 : 在捕获 ELISA 中使用生物素化 14-3-3 同工型测试来自杂交瘤克隆的组织培养物 (TC) 上清液的交叉反应性

[0260] 我们利用自定的捕获 ELISA, 使用 7 种 14-3-3 同工型作为“钓饵”, 来确定我们已得到的任一杂交瘤克隆是否识别除 14-3-3 η 以外的六种同工型之任意种或与其发生交叉反应。如表 4 中示出的代表性数据所表明地, 所选的杂交瘤克隆中的 4 种 (AUG3-CKNS-2D5、AUG3-CKNS-7F8、AUG3-CKNS-7H8、AUG4-ETA-8F10) 结合并识别两个连续稀释度的 14-3-3 η , 但是不结合任何其它 14-3-3 同工型或与其发生交叉反应 (即使在所测试的较低稀释度下)。该数据清楚地表明, 这些克隆对 14-3-3 η 具有高度特异性。相反, 一个克隆——AUG3-CKNS-4F10——与另外三种 14-3-3 同工型 (分别主要是 14-3-3 γ 、 β 和 ξ) 结合或发生交叉反应。综上, 这些数据显示我们自定的捕获 ELISA 代表了用于筛选和鉴定针对 14-3-3 η 同工型具有高度特异性之杂交瘤克隆的有效方法。

[0261] 如下进行表 4 中自定的捕获 ELISA 实验。用纯的过度生长 TC 上清液以 100 μ L/孔包被 ELISA 板, 并在 4°C 孵育过夜。以 1/500 至超过 1/16000 滴定经生物素标记的 14-3-3 (对应于所有 7 种同工型), 并在室温下孵育 1 小时。然后, 用 PBS (pH 7.4) 中 3% 脱脂奶粉以 100 μ L/孔封闭板, 并在室温下孵育 1 小时。用 PBS-吐温稀释成 1/8000 链霉亲和素-HRP0, 以 100 μ L/孔添加并于 37°C 振摇孵育 1 小时。以 50 μ L/孔添加 TMB 缓冲液, 并在室温下避光孵育。10 分钟后用每孔 50 μ L 1M HCl 终止反应, 并于 OD_{450nm} 处读数。

[0262] 表 4a: 通过 ELISA 测试交叉反应性

[0263]

在捕获ELISA中使用生物素化的14-3-3同工型作为钓饵测试来自杂交瘤克隆之组织培养物(TC)上清液的交叉反应性(在 OD _{450nm} 处测量)														
14-3-3 同工型: 稀释度:	Gamma (γ)		Beta (β)		Sigma (σ)		Theta/Tau (θ)		Zeta (ζ)		Epsilon (ε)		Eta (η)	
TC 上清液:	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00
AUG3-CKNS-2D5	0.076	0.073	0.085	0.075	0.084	0.076	0.101	0.082	0.097	0.076	0.074	0.064	0.351	0.263
*AUG3-CKNS-4F10	0.084	0.076	0.096	0.085	0.125	0.102	0.185	0.153	0.167	0.122	0.139	0.101	0.114	0.09
AUG3-CKNS-7F8	0.072	0.067	0.078	0.076	0.083	0.076	0.116	0.104	0.093	0.084	0.089	0.076	0.946	0.741
AUG3-CKNS-7H8	0.07	0.066	0.072	0.063	0.087	0.078	0.098	0.083	0.089	0.08	0.074	0.064	0.774	0.608
AUG4-ETA-8F10	0.072	0.069	0.073	0.069	0.092	0.084	0.109	0.097	0.099	0.082	0.099	0.09	0.169	0.131
免疫前血清 (1:250)	0.097	0.074	0.093	0.081	0.136	0.113	0.193	0.158	0.152	0.119	0.144	0.115	0.152	0.11

[0264] * 对照抗体

[0265] 表 4b: 通过 ELISA 测试交叉反应性 (背景 (免疫前血清) 值已减去)

[0266] 在捕获 ELISA 中使用生物素化的 14-3-3 同工型作为钓饵测试来自杂交瘤克隆之组织培养物 (TC) 上清液的交叉反应性 (在 OD_{450nm} 处测量)

[0267]

14-3-3 同工型: 稀释度:	Gamma (γ)		Beta (β)		Sigma (σ)		Theta/Tau (θ)		Zeta (ζ)		Epsilon (ε)		Eta (η)	
	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00
TC 上清液:														
AUG3- CKNS-2D5	-0.021	-0.001	-0.008	-0.006	-0.052	-0.037	-0.092	-0.076	-0.055	-0.043	-0.070	-0.051	0.199	0.153
*AUG3- CKNS- 4F10	-0.013	0.002	0.003	0.004	-0.011	-0.011	-0.008	-0.005	0.015	0.003	-0.005	-0.014	-0.038	-0.020
AUG3- CKNS-7F8	-0.025	-0.007	-0.015	-0.005	-0.053	-0.037	-0.077	-0.054	-0.059	-0.035	-0.055	-0.039	0.794	0.631
AUG3- CKNS-7H8	-0.027	-0.008	-0.021	-0.018	-0.049	-0.035	-0.095	-0.075	-0.063	-0.039	-0.070	-0.051	0.622	0.498
AUG4- ETA-8F10	-0.025	-0.005	-0.020	-0.012	-0.044	-0.029	-0.084	-0.061	-0.053	-0.037	-0.045	-0.025	0.017	0.021

[0268] * 对照抗体

[0269] 实施例 3 : 受 RA 影响之患者的滑膜液和血清中的 14-3-3 表达

[0270] 使用角质形成细胞裂解物 (K) 作为阳性对照, 通过 Western 印迹来分析合并的患者滑膜液 (SF) 和血清 (PS) 样品中不同 14-3-3 蛋白质同工型 (β、γ、ε、η、τ、σ 和 ζ) 的水平。在 SF 样品中仅检出 η 和 γ 同工型, 并且与 PS 相比染色更强。来自 17 位表现出活动性滑膜炎但尚未接受抗 TNF 抗体治疗的 RA 患者的关节滑膜液样品也显示出一致的 14-3-3 η 同工型表达 (数据未显示)。所有患者均具有大于 6.0 的疾病活动度评分 (disease activity score, DAS)。

[0271] 实施例 4 : 患者滑膜液血清中的 MMP 表达

[0272] 为了确定这些变化是否与同一滑膜液样品中的 MMP-1 和 MMP-3 之变化相关联, 同时评价了总共 12 份 RA 滑膜液样品及其匹配的血清样品中的 14-3-3 η 和 γ 以及 MMP-1 和 MMP-3 蛋白。在所有样品中均检测到 14-3-3 η。在 SF 和 PS 的所有样品中均检测到 MMP-1, 而 MMP-3 的检测水平则更多变。在患者滑膜液和血清样品中也检测到 14-3-3 γ 同工型 (数据未显示)。

[0273] MMP-1 和 MMP-3 的表达表明了滑膜液和血清中与 14-3-3 η 和 γ 同工型表达的显著相关性 (表 5)。

[0274] 表 5 : 血清和滑膜液中 MMP 和 14-3-3 蛋白水平的相关性

[0275]

	14-3-3 η 血清	14-3-3 η 滑膜	14-3-3 γ 血清	14-3-3 γ 滑膜
MMP-1	r=0.62; p=0.02	r=0.83; p=0.03	r=0.77; p=0.02	r=0.65; p=0.03
MMP-3	r=0.68; p=0.01	r=0.77; p=0.003	r=0.80; p=0.03	r=0.76; p=0.04

[0276] 实施例 5 : Western 印迹检测患者血清和滑膜液样品中的 14-3-3 蛋白的灵敏度

[0277] 为了确定滑膜液和血清样品中 14-3-3 的检测水平, 将来自 12 位受 RA 影响之患者或正常患者的样品合并, 通过 Western 印迹分析经合并样品的有限稀释物。14-3-3 η 在低至 0.1 μl 有效滑膜液体积和 1.0 μl 有效血清体积的稀释度范围内均可检出 (数据未显示)。

[0278] 将 2 μl 经合并的正常血清 (normal serum, NS) 或患者血清 (patient serum, PS)

在 $0.05 \sim 2.0 \mu\text{g}$ 的已知浓度重组 14-3-3 η 旁边跑胶。经估计, $2 \mu\text{l}$ 体积的 NS 和 PS 样品分别具有约 $1 \sim 1.5$ 和 $15 \sim 20 \mu\text{g}$ 的 14-3-3 η (数据未显示)。这提示, 与正常患者相比, 14-3-3 η 的水平在受 RA 影响的患者血清中高出约 10 倍。

[0279] 更多细节和结果, 参见 Kilani 等人, J. Rheumatology, 34 :1650-1657, 2007。

[0280] 实施例 6 :R-18 肽与细胞外 14-3-3 蛋白相互作用, 并抑制细胞外 14-3-3 蛋白对 MMP-1 表达的诱导。

[0281] 生物素化 R18 的序列如下 :生物素-Pro-His-Cys-Val-Pro-Arg-Asp-Leu-Ser-Trp-Leu-Asp-Leu-Glu-Ala-Asn-Met-Cys-Leu-Pro-OH (SEQ ID NO :79)。

[0282] 为了证明 R-18 阻断或抑制 14-3-3 蛋白之 MMP 诱导作用的能力, 我们用角质形成细胞样细胞条件化培养基 (keratinocyte-like cell conditioned medium, KLCCM) 处理亚汇合 (subconfluent) 的皮肤成纤维细胞培养物, 所述培养基已通过质谱证明含有数种 14-3-3 同工型 (未发表的数据)。由于其诱导皮肤成纤维细胞中 MMP-1 表达的高能力, 这些实验中使用的 KLCCM 取自细胞转分化第 28 天 (数据未显示)。所述条件化培养基 (KLCCM) 的一些样品暴露于生物素化 R-18 和亲和素琼脂糖凝胶, 以除去或“下拉”KLCCM 中存在的 14-3-3 蛋白。

[0283] 结果表明, 在用 KLCCM 处理后皮肤成纤维细胞表达 MMP-1, 并且用生物素化 R-18 和亲和素琼脂糖凝胶 (其会选择性耗尽 KLCCM 的 14-3-3 蛋白) 预处理 KLCCM 可部分地抑制 MMP-1 的表达 (减少 68.8%) (图 5, A 图“下拉”)。

[0284] 以 $5 \mu\text{g/ml}$ (“下拉”-) 或者暴露后 (“下拉”+) 的已知诱导 MMP-1 的重组 14-3-3 σ (stratifin) 用作阳性对照。用未经条件化的培养基 (DMEM (49%)、KSFM (49%) 加 2% FBS) 处理的皮肤成纤维细胞作为阴性对照 (“下拉”-)。图 5 的 B 图显示 MMP-1/ β -肌动蛋白比值的密度分析。来自三个独立实验的发现显示出统计学显著性 (P 值 :0.02)。

[0285] 实施例 7 人重组 14-3-3 η 与来自 HeLa 细胞的内源 14-3-3 η 的免疫沉淀

[0286] 测定来自实施例 1 的抗 14-3-3 单克隆抗体免疫沉淀或“捕获”重组和内源细胞 14-3-3 η 的能力。对于本文所述的本发明治疗方法来说, 优选使用能够免疫沉淀或识别天然三维构型 14-3-3 η 的抗体。在 4°C 将来自抗 14-3-3 η 杂交瘤克隆的培养物上清液与含有 100ng 人重组 14-3-3 η 的缓冲液或者含有来自裂解 HeLa 细胞之上清液的缓冲液 ($200 \mu\text{g}$ 蛋白质) 一起孵育 2 小时。使用标准方法利用蛋白 A/G 琼脂糖收集免疫沉淀。通过 SDS-PAGE 和 Western 印迹对免疫沉淀进行分析。图 6 显示使用杂交瘤克隆 7B11 获得的 Western 印迹, 其使用免疫原 #4 (全长重组 14-3-3 η) 制得。第 1 泳道 :仅有蛋白 A/G 琼脂糖珠 ;第 2 泳道 :蛋白 A/G 琼脂糖珠与细胞裂解物混合 ;第 3 泳道 :蛋白 A/G 琼脂糖珠与人重组 14-3-3 η 混合 ;第 4 泳道 :蛋白 A/G 琼脂糖珠与杂交瘤上清液混合 ;第 5 泳道 :蛋白 A/G 琼脂糖珠与杂交瘤上清液和细胞裂解物混合 ;第 6 泳道 :蛋白 A/G 琼脂糖珠与杂交瘤上清液和重组 14-3-3 η 混合。数据显示, 克隆 7B11 与 HeLa 细胞来源的 14-3-3 η (第 5 泳道) 和人重组 14-3-3 η (第 6 泳道) 发生免疫沉淀。

[0287] 图 7 显示通过使用由免疫原 #3 (CKNS) 制得的杂交瘤克隆 2D5 获得的 Western 印迹。第 1 泳道 :仅有蛋白 A/G 琼脂糖珠 ;第 2 泳道 :蛋白 A/G 琼脂糖珠与细胞裂解物混合 ;第 3 泳道 :蛋白 A/G 琼脂糖珠与人重组 14-3-3 η 混合 ;第 4 泳道 :蛋白 A/G 琼脂糖珠与杂交瘤上清液混合 ;第 5 泳道 :蛋白 A/G 琼脂糖珠与杂交瘤上清液和细胞裂解物混合 ;第 6 泳

道:蛋白 A/G 琼脂糖珠与杂交瘤上清液和重组 14-3-3 η 混合。数据显示,克隆 2D5 与 HeLa 细胞裂解物来源的 14-3-3 η (第 5 泳道) 和人重组 14-3-3 η (第 6 泳道) 均发生免疫沉淀。

[0288] 对另外几种杂交瘤克隆进行类似的分析(数据未显示)。这些实验表明,实施例 1 中得到的单克隆抗体能够结合以及免疫沉淀或“捕获”天然构型的 14-3-3 η ,如来自 HeLa 细胞裂解物之蛋白质的免疫沉淀所证明。

[0289] 实施例 8:抗 14-4-3 抗体降低小鼠 RA 模型中的 MMP 表达;14-3-3 拮抗剂肽降低小鼠 RA 模型中的 MMP 表达

[0290] 通过在尾基部注射 100 μ g 经弗氏完全佐剂乳化的纯化 II 型胶原蛋白在雄性 DBA 小鼠中诱导胶原蛋白诱发的关节炎,如 Williams 等人,PNAS,89:9784-9788,1992 中所述。之后每天检查小鼠,将一肢或多肢中表现出红斑和 / 或肿胀的小鼠随机分配以接受使用本文所述一种或多种拮抗剂 14-3-3 η 的治疗方案或者安慰剂治疗。或者,在用 II 型胶原蛋白免疫之前一天开始进行治疗。使用 10 只小鼠的组来进行各治疗方案,如下所示:

[0291] (1) 将 R-18 肽以 0.1 ~ 20mg/kg 的不同剂量 (a) 经腹膜内或 (b) 滑膜内施用,一周两次。

[0292] (2) 将从实施例 1 中杂交瘤上清液获得并纯化的所选抗 14-3-3 η 抗体以 0.10 ~ 20mg/kg 的不同剂量 (a) 经腹膜内施用或者 (b) 滑膜内施用,一周两次。

[0293] 3) 安慰剂治疗

[0294] 在 20 天的治疗期间监测关节炎,评价以下疾病指标。

[0295] 临床评分评估小鼠肢体的肿胀、红斑、关节僵硬和爪肿胀。与安慰剂对照相比,在治疗方案发生效用的动物中关节炎临床指标降低。

[0296] 滑膜中 14-3-3、MMP-1 和 / 或 MMP-3 的表达在多个时间点取滑液样品,并测定 14-3-3 (优选 14-3-3 γ 和 / 或 14-3-3 η)、MMP-1 和 / 或 MMP-3 水平。与安慰剂对照相比,在治疗方案发生效用的动物中 MMP-1 和 MMP-3 的水平降低。

[0297] 组织病理学评估固定患关节炎的爪,将其在石蜡中包埋,切片并用苏木精和伊红染色,以用于显微镜检评估。根据下列标准对每个关节中关节炎的严重程度进行分级:轻度=滑膜炎很少、软骨损失并且骨侵蚀限于离散的点;中度=滑膜炎并存在侵蚀但正常关节结构完整;重度=滑膜炎,大范围的侵蚀,以及关节结构破坏。与安慰剂对照相比,在治疗方案发生效用的动物中,通过组织病理学检测的关节炎严重程度降低。

[0298] 实施例 9 抗 14-4-3 抗体降低兔 RA 模型中的 MMP 表达;14-3-3 拮抗剂肽降低通过植入分泌 IL-1 的细胞而产生的兔 RA 模型中的 MMP 表达

[0299] 在兔模型中评价本发明的 14-3-3 η 拮抗剂,所述兔模型中的关节炎通过将 5×10^5 个产生 IL-1 之细胞植入新西兰白兔膝关节来诱导,如 Yao 等人,Arthritis Research and Therapy 2006,8:R16 中所述,其可在线获得 <http://arthritis-research.com/content/8/1/R16>。基本上如实施例 8 所述进行测试与评价。

[0300] 实施例 10 抗 14-4-3 抗体降低 RA 模型中的 MMP 表达;14-3-3 拮抗剂肽降低 RA 中的 MMP 表达

[0301] 通过将重组 14-3-3 η 蛋白注射入腿关节滑膜中而在 Brown Norway 大鼠或新西兰白兔中诱导实验性关节炎。基本上如实施例 8 所述进行测试与评价。

[0302] 可用于本发明方法的其它类风湿性关节炎模型(胶原蛋白诱导的关节炎,“CIA”)

和实验设计可在例如下列参考文献中找到:Williams,Methods Mol Med. 2004 ;98 :207-16. Collagen-induced arthritis as a model for rheumatoid arthritis ;Brand, Com. Med. , 55 :114-122, 2005 ;Vierboom 等人, Drug Discovery Today, 12 :327-335, 2007 ;Sakaguchi 等人, Curr. Opin. Immunol. , 17 :589-594, 2005。

[0303] 在特定动物模型中开始初始治疗方案之前,优选首先验证该模型是涉及 14-3-3 的炎症疾病模型。优选地,确定 14-3-3 和 MMP (优选 14-3-3 η 和 / 或 14-3-3 γ ,并优选 MMP-1 和 / 或 MMP-3) 的水平以显示在该模型中诱导实验性关节炎之后所述水平升高。

[0304] 一般方法

[0305] Western 印迹

[0306] 对样品 (滑膜液或血清 (各 2 μ l)、人重组 14-3-3 η 、细胞裂解物或细胞裂解物免疫沉淀物) 进行 SDS-PAGE 分析 (其使用 12 ~ 15% (重量 / 体积) 丙烯酰胺凝胶), 并电转至 PVDF 膜上。用 PBS-0.1% 吐温 -20 中 5% 脱脂奶粉过夜封闭膜上的非特异性蛋白质。使用 2 μ g/ml 的 7 种同工型特异性之兔抗人 14-3-3 多克隆抗体进行实施例 3 的免疫印迹 (Martin H, Patel Y, Jones D, Howell S, Robinson K 和 Aitken A 1993. Antibodies against the major brain isoforms of 14-3-3 protein. An antibody specific for the N-acetylated amino-terminus of a protein. FEBS Letters. 331 :296-303)。在一些实验中 (主要是实施例 7), 将来自实施例 1 中杂交瘤克隆的抗体用于免疫沉淀或“捕获”实验。通过 SDS-PAGE 来分离免疫沉淀物, 并用脱脂乳封闭膜, 然后与 14-3-3 η 第一抗体 (1 : 1000, BioMol International SE-486) 一起孵育, 之后与合适的经辣根过氧化物酶缀合之抗兔 IgG 或抗小鼠 IgG 第二抗体 (1 : 2500 稀释) 一起孵育。然后, 使用 ECL 加 Western 印迹检测系统使免疫反应性蛋白质可见。角质形成细胞裂解物 (K)、重组蛋白质和 / 或 HeLa 细胞裂解物用作阳性对照。SF : 滑膜液 ;PS : 患者血清。

[0307] 患者样品

[0308] 在进行抗 TNF 抗体治疗之前从患有活动性滑膜炎之患者的膝关节获得滑膜液。所有患者均具有 > 6.0 的 DAS 评分。通过标准静脉穿刺方法获得相匹配的血液样品。通过离心除去凝块。

[0309] 重组 14-3-3 η

[0310] 按照下述方法, 从提取自人角质形成细胞的总 RNA 制备角质形成细胞来源之 14-3-3 η 的 cDNA, 将其克隆并表达于大肠杆菌中, 并进行亲和纯化 ;Ghahary 等人 2004 J Invest Dermatol 122 :1188-1197 (参考文献 36, 如下)。用于 14-3-3 η cDNA PCR 扩增的引物为 :

[0311] (GCGAATTCCTGCAGCGGGCGCGGCTGGCCGA) (SEQ ID NO :80) 和

[0312] (GCTCGAGCCTGAAGGATCTTCAGTTGCCTTC) (SEQ ID NO :81)。

[0313] 无标签的重组 14-3-3 蛋白

[0314] 从人来源获得 cDNA, 将其克隆并表达于大肠杆菌中, 并进行亲和纯化。用于 14-3-3 η cDNA PCR 扩增的引物为 : (agaattcagttgccttctcctgctt) (SEQ ID NO :82) 和 (acatatgggggaccggga) (SEQ ID NO :83) ; 14-3-3 γ 为 : (agaattcttaattgttgcttgccttcgccg) (SEQ ID NO :84) 和 (acatatggttgaccgcgagc) (SEQ ID NO :85) ; 14-3-3 β 为 : (acatatgacaatggataaaagtgcagctg) (SEQ ID NO :86) 和 (agaattcttagttctctcctccccagc)

(SEQ ID NO:87); 14-3-3 ϵ 为:(acatatggatgatcgagaggatctg)(SEQ ID NO:88) 和 (agaattctcactgatttttctgtcttcac)(SEQ ID NO:89); 14-3-3 σ 为:(acatatggagagagccagtctgatcc)(SEQ ID NO:90) 和 (agaattcagctctggggctcctg)(SEQ ID NO:91);

[0315] 14-3-3 θ 为:(acatatggagaagactgagctgatcc)(SEQ ID NO:92) 和 (agaattcttagttttcagcccttctgc)(SEQ ID NO:93); 14-3-3 ζ 为:(acatatggataaaaatgagctggttc)(SEQ ID NO:94) 和 (agaattcttaattttccctccttctcct)(SEQ ID NO:95)。

[0316] ELISA 测定条件

[0317] 针对筛选和测试:对于筛选和测试来说,将 dH₂O(50 μ L/孔)中 1.0 μ g/孔的抗 AUG1-CLDK 抗体、抗 -AUG2-KKLE 抗体、抗 -AUG3-CKNS 抗体或抗 14-3-3 η 抗原抗体包被于 ELISA 板上,在 37 $^{\circ}$ C 干燥过夜。对 14-3-3 η 抗原的测试,在碳酸酯包被缓冲液中包被 0.25 μ g/孔,在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

[0318] 针对抗体诱捕测定的测试:将碳酸酯包被缓冲液(pH 9.6)(100 μ L/孔)中 1/10000 山羊抗小鼠 IgG/IgM 诱捕抗体(Pierce,货号 31182)包被于 ELISA 板上,在 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。

[0319] 针对阴性对照抗原的测试:将 dH₂O(50 μ L/孔)中 0.5 μ g/孔 HT(人转铁蛋白)抗原包被于 ELISA 板上,在 37 $^{\circ}$ C 干燥过夜。

[0320] 针对捕获 ELISA 的测试:用纯的过度生长 TC 上清液以 100 μ L/孔包被 ELISA 平板,在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。以 1/500 至超过 1/16000 滴定经生物素标记的 14-3-3 η (或者六种另外的 14-3-3 家族成员之一),在室温下孵育 1 小时。

[0321] 封闭:用 PBS(pH 7.4)中 3%脱脂奶粉以 100 μ L/孔封闭板,在室温下孵育 1 小时。

[0322] 第一抗体:以 100 μ L/孔加入小鼠抗 AUG1-CLDK 抗体、抗 AUG2-KKLE 抗体、抗 AUG3-CKNS 抗体或抗 14-3-3 η 杂交瘤组织培养物上清液以及小鼠单克隆对照,用以筛选和测试。将小鼠抗 AUG1-CLDK 抗体、抗 AUG2-KKLE 抗体、抗 AUG3-CKNS 抗体或抗 14-3-3 η 免疫血清以及小鼠免疫前血清用 SP2/0 组织培养物上清液以 1/500 稀释,并以 100 μ L/孔加入,用以筛选和测试。在 37 $^{\circ}$ C 摇动孵育 1 小时,用于筛选和测试。

[0323] 用于筛选和测试的第二抗体:使用 1/25000 经 HRP 缀合的山羊抗小鼠 IgG Fc(Jackson,货号 115-035-164)进行筛选和测试。用 PBS-吐温稀释的第二抗体以 100 μ L/孔添加,并在 37 $^{\circ}$ C 振摇孵育 1 小时。

[0324] 用于捕获 ELISA 的链霉亲和素:添加 100 μ L/孔的链霉亲和素 HRP0(1:8000, CedarLane,货号 CLCSA1007),在室温下振摇孵育 1 小时。

[0325] 底物:以 50 μ L/孔添加 TMB 缓冲液(BioF_x,货号 TMBW-1000-01),在室温下避光孵育。10 分钟后用 50 μ L/孔 1M HCl 终止筛选和测试的反应,在 OD_{450nm} 处读数。

[0326] 点印迹条件:

[0327] 针对筛选:使用 Millipore, Immobilon 转移膜(货号 IPVH304F0)。将 14-3-3 η 抗原在样品缓冲液中煮沸 5 分钟,使其冷却。使用移液器将抗原点样,总共 6 μ g 的点样量。在使抗原干燥 15 分钟后,用 PBS-吐温(pH7.4)清洗印迹数遍。在整个筛选过程中,将印迹保持在分别的培养皿中。

[0328] **封闭**:在室温下用 PBS (pH7.4) 中 5%奶粉将 PVDF 膜封闭 1 小时。封闭 15 分钟后,用 PBS-吐温 (pH7.4) 清洗印迹数遍。使印迹面朝上在纸巾上干燥 10 分钟,然后施加第一抗体。

[0329] **第一抗体**:将小鼠 AUG1-CLDK 抗体、抗 AUG2-KKLE 抗体、抗 AUG3-CKNS 抗体或抗 14-3-3 η 杂交瘤组织培养物上清液以及小鼠单克隆对照与各培养皿中的印迹一起孵育。将小鼠抗 AUG1-CLDK 抗体、抗 AUG2-KKLE 抗体、抗 AUG3-CKNS 抗体或抗 14-3-3 η 免疫血清以及小鼠免疫前血清用 SP2/0 组织培养物上清液以 1/500 稀释,以用作对照。将印迹在室温下振动孵育 1 小时。在与第一抗体孵育 30 分钟后,用 PBS-吐温 (pH7.4) 将印迹清洗 5 遍。

[0330] **第二抗体**:将用 PBS-吐温 (pH7.4) 以 1/5000 稀释的经碱性磷酸酶缀合之山羊抗小鼠 IgG/IgM(H+L) (Rockland 610-4502) 添加至印迹,并于室温下在培养皿中振摇孵育 1 小时。在第二抗体孵育 30 分钟后,用 PBS-吐温 (pH7.4) 将印迹清洗 5 遍。在室温下用 Tris 0.1M (pH 9) 缓冲液使印迹平衡 10 分钟,然后在加入底物前下滴干燥。

[0331] **底物**:在室温下将 BCIP/NBT developer 1 组分 AP 膜底物 (BioFX, 产品号 BCID-1000-01) 滴在印迹上。5 分钟后,用冷自来水终止反应,肉眼定量测定结果并给出评分:强阳性 +++, 中等阳性 ++, 弱阳性 +, 轻微阳性 +/-, 阴性 -。

[0332] 参考文献

[0333] 1. Harris ED Jr., History and Epidemiology of Rheumatoid Arthritis: How long has it affected us, and who is at risk? In: Rheumatoid Arthritis. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1997: 21-27.

[0334] 2. Harris ED Jr., Introduction. In: Rheumatoid Arthritis. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1997: xix-xxiii.

[0335] 3. Harris ED Jr., Rheumatoid Synovium: Complex, and More Than the Sum of its Parts. In: Rheumatoid Arthritis. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1997: 127-149.

[0336] 5. Firestein GS. (1997). Rheumatoid synovitis and pannus. In: J. H. Klippel and P. A. Dieppe, Editors, Rheumatology, Mosby, London, pp. 5/13. 1-5/13. 5, 1997.

[0337] 6. Pap T, Shigeyama Y, Kuchen S. (2000). Arthritis Rheum. 43: 1226-1232.

[0338] 7. Tolboom TCA, Pieterman E, van der Laan WE. Ann. Rheum. Dis. 61: 975-980, 2002.

[0339] 8. Sorsa T, Konttinen YT, Lindy O. Arthritis Rheum. 22: 44-53, 1992.

[0340] 9. Lindy O, Konttinen YT, Sorsa T. Arthritis Rheum. 40: 1391-1399, 1997.

[0341] 10. Ahrens D, Koch AE, Pope RM. Arthritis Rheum. 39: 1576-1587, 1996.

[0342] 11. Smeets TJM, Dayer JM, Karan MC. Arthritis Rheum. 43: 270-274, 2000.

[0343] 12. Poole AR; Cartilage in health and disease. In: Koopman WJ. Ed. Arthritis and Allied conditions. A textbook of rheumatology. 14th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 2001: 226-284.

[0344] 13. Konttinen YT, Ceponis A, Takagi M, Ainola M, Sorsa T, Sutinen M, et al. Matrix Biol. 17: 585-601, 1998.

[0345] 14. Katrib. A, McNeil HP, Youssef PP; Inflamm. Res. 51: 170-175, 2002.

- [0346] 15. Harris ED Jr., Cytokines, Lymphokines, Growth Factors, and Chemokines. In : Rheumatoid Arthritis. Philadelphia : W. B. Saunders Company, 1997 : 105-125.
- [0347] 16. Jasser, M. Z., Mitchell P. G. and Cheung, H. S. : induction of stromelysin-1 and collagenase synthesis in fibrochondrocytes by TNF- α . Matrix Biology 14 : 241, 1994.
- [0348] 17. Burger D, Rezzonico R, Li JM, Modoux C, Pierce RA, Welgus HG, Dayer JM. Arthritis Rheum. 41(10) : 1748-59, 1998
- [0349] 18. Y. Yamamura, R. Gupta, Y. Morit, X. He, R. Pai, J. Endres, A. Freiberg, K. Chung and D. A. Fox. J. Immunol. 166(2001), pp. 2270-2275
- [0350] 19. Miranda-Carus ME, Balsa A, Benito-Miguel M, Perez de Ayala C, Martin-Mola E. J. Immunol. 173 : 1463-1476, 2004
- [0351] 20. Cho ML, Yoon CH, Hwang CY. Arthritis Rheum. 50 : 776-784, 2004
- [0352] 21. Bombara MP, Webb DL, Conrad P. J. Leukocyte Biol. 54 : 399-406, 1993.
- [0353] 22. McInnes IB, Leung BP, Liew FY. Arthritis Res. 2(5) : 374-8. 34, 2000.
- [0354] 23. FU H, Subramanian RR, Masters SC : Annu Rev Pharmacol Toxicol 40 : 617-647, 2000.
- [0355] 24. Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ, Lee KH, Harrington MG : N Engl J Med 335 : 924-30, 1996
- [0356] 225. Wilker E, Yaffe MB : J Mol Cell Cardiol 37 : 633-642, 2004.
- [0357] 26. Moore et al. 1967.
- [0358] 27. Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, Yamauchi T, Fujisawa H (1987) FEBS Lett. 219 : 79-82.
- [0359] 28. Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, Takahashi N, Araki K, Kuwano R, Akahashi Y (1988) .. Proc Natl Acad Sci USA, 85 : 7084-8.
- [0360] 29. Toker A, Ellis CA, Sellers LA, Atiken A 1990. Eur J Biochem 191 : 421-429.
- [0361] 30. Craparo A, Freund R, Gustafson T (1997). J Biol Chem 272 : 11663-69.
- [0362] 31. Yaffe MB (2002). FEBS Lett 513(1) : 53-57.
- [0363] 32. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. Mol Cell 1 : 3-11, 1997.
- [0364] 33. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Nature 401 : 616-620, 1999.
- [0365] 34. Laronga C, Yang HY, Neal C, Lee MH (2000). J. Biol. Chem. 275 : 23106-23112.
- [0366] 35. Wang B, Yang H, Liu Y, Jelinek T, Zhang L, Ruoslahti E, Fu H (1999) Biochemistry 38 : 12499-12504.
- [0367] 36. Ghahary A, Karimi-Busheri F, Marcoux Y, Li Y, Tredget EE, Kilani RT, Li L, Zheng J, Karami A, Keller B, Weinfeld M. J. Invest. Dermatol. 122(5) : 1188-1197, 2004.
- [0368] 所有引文均明确地通过引用全部并入本文中。

[0001]

序 列 表

[0002]

<110> 不列颠哥伦比亚大学

<120> 预防和治疗关节炎的组合物和方法

<130> 80021-1053

<140> PCT/CA2008/002154

<141> 2008-11-26

<150> US 60/990,520

<151> 2007-11-27

<150> US 61/077,123

<151> 2008-06-30

<160> 95

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

Leu Glu Thr Val Cys Asn Asp Val Leu Ser Leu Leu Asp Lys Phe

1

5

10

15

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Glu Gln Ala Cys Leu Leu Ala Lys Gln

1

5

[0003]

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 3

Asn Ser Val Val Glu Ala Ser Glu Ala Ala Tyr Lys

1

5

10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

Asn Ser Val Val Glu Ala Ser Glu Ala

1

5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 5

Val Glu Ala Ser Glu Ala Ala Tyr Lys

1

5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

Glu Gln Met Gln Pro Thr His Pro

1

5

[0004]

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 7

Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu

1

5

10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 8

Val Lys Ala Tyr Thr Glu Lys Ile Glu Lys Glu

1

5

10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 9

Gln Lys Thr Met Ala Asp Gly Asn Glu Lys Lys Leu

1

5

10

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 10

Ala Ser Gly Glu Lys Lys Asn Ser Val

1

5

[0005]

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 11

Lys Thr Met Ala Asp Gly Asn Glu Lys
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 12

Glu Leu Asn Glu Pro Leu Ser Asn Glu
1 5

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> 人

<400> 13

Leu Leu Asp Lys Phe Leu Ile Lys Asn Cys Asn Asp Phe Gln Tyr
1 5 10 15

<210> 14
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<400> 14

Tyr Tyr Arg Tyr Leu Ala Glu Val Ala Ser Gly Glu Lys Lys

[0006]

1	5	10
---	---	----

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 15

Tyr Glu Ile Gln Asn Ala Pro Glu Gln Ala Cys

1	5	10
---	---	----

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 16

Ala Glu Leu Asp Thr Leu Asn Glu Asp Ser Tyr Lys Asp

1	5	10
---	---	----

<210> 17

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 17

Leu Leu Ser Val Ala Tyr Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg

1	5	10
---	---	----

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 18

[0007]

Glu Gln Ala Glu Arg Tyr Asp Asp Met
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 19

Tyr Tyr Arg Tyr Leu Ala Glu Val Ala
1 5

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 20

Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 21

Thr Leu Asn Glu Asp Ser Tyr Lys Asp
1 5

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 22

[0008]

Lys Lys Leu Glu Lys Val Lys Ala

1

5

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 23

Glu Lys Lys Leu Arg Lys Val Lys Ala Tyr Arg

1

5

10

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 24

Lys Lys Asn Ser Val Val Glu Ala Ser Glu Ala Ala Tyr Lys Glu Ala

1

5

10

15

Phe

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<400> 25

Asp Lys Phe Leu Ile Lys Asn Cys Asn Asp Phe Gln Tyr Glu Ser Lys

1

5

10

15

<210> 26

[0009]

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 26

Gln Gln Asp Glu Glu Ala Gly Glu Gly Asn
1 5 10

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 27

Asn Glu Lys Lys Leu Glu Lys Val Lys
1 5

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 28

Leu Asp Lys Phe Leu Ile Lys Asn Cys Asn Asp Phe Gln
1 5 10

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> 人

<400> 29

Glu Lys Lys Asn Ser Val
1 5

[0010]

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 源自人 14-3-3 η 104-115 位残基的肽

<400> 30

Leu Asp Lys Phe Leu Ile Lys Asn Ser Asn Asp Phe
1 5 10

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 31

Lys Lys Leu Glu Lys Val Lys Ala Tyr Arg
1 5 10

<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> 人

<400> 32

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

<210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> 人

<400> 33

[0011]

Leu Glu Ala Val Cys Gln Asp Val Leu Ser Leu Leu Asp Asn Tyr
1 5 10 15

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 34

Glu Gln Ala Cys His Leu Ala Lys Thr
1 5

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 35

Ala Thr Val Val Glu Ser Ser Glu Lys Ala Tyr Ser
1 5 10

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 36

Ala Thr Val Val Glu Ser Ser Glu Lys
1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 37

[0012]

Val Glu Ser Ser Glu Lys Ala Tyr Ser
1 5

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 38

Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu
1 5 10

<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<400> 39

Val Arg Ala Tyr Arg Glu Lys Ile Glu Lys Glu
1 5 10

<210> 40
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 40

Gln Lys Thr Ser Ala Asp Gly Asn Glu Lys Lys Ile
1 5 10

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

[0013]

<400> 41

Ala Thr Gly Glu Lys Arg Ala Thr Val
1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 42

Glu His Met Gln Pro Thr His Pro
1 5

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> 人

<400> 43

Glu Lys Arg Ala Thr Val
1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 44

Lys Thr Ser Ala Asp Gly Asn Glu Lys
1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

[0014]

<400> 45

Glu Leu Asn Glu Pro Leu Ser Asn Glu

1 5

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> 人

<400> 46

Leu Leu Asp Asn Tyr Leu Ile Lys Asn Cys Ser Glu Thr Gln Tyr

1 5 10 15

<210> 47

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 47

Tyr Tyr Arg Tyr Leu Ala Glu Val Ala Thr Gly Glu Lys Arg

1 5 10

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 48

Tyr Glu Ile Gln Asn Ala Pro Glu Gln Ala Cys

1 5 10

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

[0015]

<213> 人

<400> 49

Ala Glu Leu Asp Thr Leu Asn Glu Asp Ser Tyr Lys Asp
1 5 10

<210> 50

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 50

Leu Leu Ser Val Ala Tyr Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg
1 5 10

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 51

Asn Glu Lys Lys Ile Glu Met Val Arg
1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 52

Glu Gln Ala Glu Arg Tyr Asp Asp Met
1 5

<210> 53

<211> 9

[0016]

<212> PRT

<213> 人

<400> 53

Tyr Tyr Arg Tyr Leu Ala Glu Val Ala

1 5

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 54

Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 55

Thr Leu Asn Glu Asp Ser Tyr Lys Asp

1 5

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 56

Lys Lys Ile Glu Met Val Arg Ala

1 5

<210> 57

[0017]

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 57

Glu Lys Lys Ile Glu Met Val Arg Ala Tyr Arg

1 5 10

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 58

Lys Arg Ala Thr Val Val Glu Ser Ser Glu Lys Ala Tyr Ser Glu Ala

1 5 10 15

His

<210> 59

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<400> 59

Asp Asn Tyr Leu Ile Lys Asn Cys Ser Glu Thr Gln Tyr Glu Ser Lys

1 5 10 15

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 60

[0018]

Gln Gln Asp Asp Asp Gly Gly Glu Gly Asn
1 5 10

<210> 61
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 61

Asn Glu Lys Lys Ile Glu Met Val
1 5

<210> 62
<211> 13
<212> PRT
<213> 人

<400> 62

Leu Asp Asn Tyr Leu Ile Lys Asn Cys Ser Glu Thr Gln
1 5 10

<210> 63
<211> 246
<212> PRT
<213> 人

<400> 63

Met Gly Asp Arg Glu Gln Leu Leu Gln Arg Ala Arg Leu Ala Glu Gln
1 5 10 15

Ala Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Ser Ala Met Lys Ala Val Thr Glu
20 25 30

Leu Asn Glu Pro Leu Ser Asn Glu Asp Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala
35 40 45

[0019]

Tyr Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg Ser Ser Trp Arg Val Ile Ser
50 55 60

Ser Ile Glu Gln Lys Thr Met Ala Asp Gly Asn Glu Lys Lys Leu Glu
65 70 75 80

Lys Val Lys Ala Tyr Arg Glu Lys Ile Glu Lys Glu Leu Glu Thr Val
85 90 95

Cys Asn Asp Val Leu Ser Leu Leu Asp Lys Phe Leu Ile Lys Asn Cys
100 105 110

Asn Asp Phe Gln Tyr Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly
115 120 125

Asp Tyr Tyr Arg Tyr Leu Ala Glu Val Ala Ser Gly Glu Lys Lys Asn
130 135 140

Ser Val Val Glu Ala Ser Glu Ala Ala Tyr Lys Glu Ala Phe Glu Ile
145 150 155 160

Ser Lys Glu Gln Met Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala
165 170 175

Leu Asn Phe Ser Val Phe Tyr Tyr Glu Ile Gln Asn Ala Pro Glu Gln
180 185 190

Ala Cys Leu Leu Ala Lys Gln Ala Phe Asp Asp Ala Ile Ala Glu Leu
195 200 205

Asp Thr Leu Asn Glu Asp Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln

[0020]

210

215

220

Leu Leu Arg Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp Gln Gln Asp Glu
225 230 235 240

Glu Ala Gly Glu Gly Asn
245

<210> 64

<211> 247

<212> PRT

<213> 人

<400> 64

Met Val Asp Arg Glu Gln Leu Val Gln Lys Ala Arg Leu Ala Glu Gln
1 5 10 15

Ala Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Ala Ala Met Lys Asn Val Thr Glu
20 25 30

Leu Asn Glu Pro Leu Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala
35 40 45

Tyr Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg Ser Ser Trp Arg Val Ile Ser
50 55 60

Ser Ile Glu Gln Lys Thr Ser Ala Asp Gly Asn Glu Lys Lys Ile Glu
65 70 75 80

Met Val Arg Ala Tyr Arg Glu Lys Ile Glu Lys Glu Leu Glu Ala Val
85 90 95

Cys Gln Asp Val Leu Ser Leu Leu Asp Asn Tyr Leu Ile Lys Asn Cys

[0021]

100	105	110
Ser Glu Thr Gln Tyr Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly		
115	120	125
Asp Tyr Tyr Arg Tyr Leu Ala Glu Val Ala Thr Gly Glu Lys Arg Ala		
130	135	140
Thr Val Val Glu Ser Ser Glu Lys Ala Tyr Ser Glu Ala His Glu Ile		
145	150	155 160
Ser Lys Glu His Met Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala		
165	170	175
Leu Asn Tyr Ser Val Phe Tyr Tyr Glu Ile Gln Asn Ala Pro Glu Gln		
180	185	190
Ala Cys His Leu Ala Lys Thr Ala Phe Asp Asp Ala Ile Ala Glu Leu		
195	200	205
Asp Thr Leu Asn Glu Asp Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln		
210	215	220
Leu Leu Arg Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp Gln Gln Asp Asp		
225	230	235 240
Asp Gly Gly Glu Gly Asn Asn		
245		

<210> 65

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

[0022]

<400> 65

Asp Arg Glu Gln Leu Leu Gln Arg Ala Arg Leu Ala
1 5 10

<210> 66

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一般共有序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1).. (5)

<223> Xaa = 任意天然氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (7).. (8)

<223> Xaa = 任意天然氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (9).. (9)

<223> Xaa = 任意天然氨基酸, 第 9 位的 Xaa 可以存在或不存在

<220>

<221> misc_feature

<222> (11).. (14)

<223> Xaa = 任意天然氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (15).. (22)

<223> Xaa = 任意天然氨基酸, 第 15-22 位的 Xaa 可以存在或不存在

<220>

<221> misc_feature

[0023]

<222> (24).. (26)

<223> Xaa = 任意天然氨基酸, 第 24-26 位的 Xaa 可以存在或不存在

<220>

<221> misc_feature

<222> (28).. (32)

<223> Xaa = 任意天然氨基酸, 第 28-32 位的 Xaa 可以存在或不存在

<400> 66

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5				10					15		

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	His	Xaa	Xaa	Xaa	His	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				20				25					30		

<210> 67

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一般共有序列的优选实例

<220>

<221> misc_feature

<222> (7).. (9)

<223> Xaa = 任意天然氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (10).. (26)

<223> Xaa = 任意天然氨基酸, 第 10-26 位的 Xaa 可以存在或不存在

<400> 67

Phe	Gln	Cys	Glu	Glu	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5				10					15		

[0024]

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Ile Arg Ser His Thr
20 25 30

Gly

<210> 68
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CCHC 盒的共有序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> Xaa = 任意天然氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(8)
<223> Xaa = 任意天然氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(24)
<223> Xaa = 任意天然氨基酸, 第 9-24 位的 Xaa 可以存在或不存在

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(29)
<223> Xaa = 任意天然氨基酸

<400> 68

Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

[0025]

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
20 25 30

<210> 69
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基于核壳蛋白 P2 的共有序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(10)
<223> Xaa = 任意天然氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(26)
<223> Xaa = 任意天然氨基酸, 第 11-26 位的 Xaa 可以存在或不存在

<400> 69

Val Lys Cys Phe Asn Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Thr Ala Arg Asn Cys
20 25 30

Arg

<210> 70
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0026]

<223> 基于 NMR 结构系综 IZFP 的共有序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(13)

<223> Xaa = 任意天然氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(29)

<223> Xaa = 任意天然氨基酸, 第 14-29 位的 Xaa 可以存在或不存在

<400> 70

Met	Asn	Pro	Asn	Cys	Ala	Arg	Cys	Gly	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10					15	

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	His	Lys	Ala
				20					25						30	

Cys Phe

<210> 71

<211> 246

<212> PRT

<213> 人

<400> 71

Met	Thr	Met	Asp	Lys	Ser	Glu	Leu	Val	Gln	Lys	Ala	Lys	Leu	Ala	Glu
1				5					10					15	

Gln	Ala	Glu	Arg	Tyr	Asp	Asp	Met	Ala	Ala	Ala	Met	Lys	Ala	Val	Thr
				20					25					30	

Glu Gln Gly His Glu Leu Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val

[0027]

35	40	45
Ala Tyr Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg Ser Ser Trp Arg Val Ile		
50	55	60
Ser Ser Ile Glu Gln Lys Thr Glu Arg Asn Glu Lys Lys Gln Gln Met		
65	70	75 80
Gly Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Ile Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ile Cys		
85	90	95
Asn Asp Val Leu Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Leu Ile Pro Asn Ala Thr		
100	105	110
Gln Pro Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly Asp Tyr Phe		
115	120	125
Arg Tyr Leu Ser Glu Val Ala Ser Gly Asp Asn Lys Gln Thr Thr Val		
130	135	140
Ser Asn Ser Gln Gln Ala Tyr Gln Glu Ala Phe Glu Ile Ser Lys Lys		
145	150	155 160
Glu Met Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn Phe		
165	170	175
Ser Val Phe Tyr Tyr Glu Ile Leu Asn Ser Pro Glu Lys Ala Cys Ser		
180	185	190
Leu Ala Lys Thr Ala Phe Asp Glu Ala Ile Ala Glu Leu Asp Thr Leu		
195	200	205

[0028]

Asn Glu Glu Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg
210 215 220

Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ser Glu Asn Gln Gly Asp Glu Gly Asp
225 230 235 240

Ala Gly Glu Gly Glu Asn
245

<210> 72
<211> 245
<212> PRT
<213> 人

<400> 72

Met Asp Lys Asn Glu Leu Val Gln Lys Ala Lys Leu Ala Glu Gln Ala
1 5 10 15

Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Ala Cys Met Lys Ser Val Thr Glu Gln
20 25 30

Gly Ala Glu Leu Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala Tyr
35 40 45

Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg Ser Ser Trp Arg Val Val Ser Ser
50 55 60

Ile Glu Gln Lys Thr Glu Gly Ala Glu Lys Lys Gln Gln Met Ala Arg
65 70 75 80

Glu Tyr Arg Glu Lys Ile Glu Thr Glu Leu Arg Asp Ile Cys Asn Asp
85 90 95

[0029]

Val Leu Ser Leu Leu Glu Lys Phe Leu Ile Pro Asn Ala Ser Gln Ala
100 105 110

Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly Asp Tyr Tyr Arg Tyr
115 120 125

Leu Ala Glu Val Ala Ala Gly Asp Asp Lys Lys Gly Ile Val Asp Gln
130 135 140

Ser Gln Gln Ala Tyr Gln Glu Ala Phe Glu Ile Ser Lys Lys Glu Met
145 150 155 160

Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn Phe Ser Val
165 170 175

Phe Tyr Tyr Glu Ile Leu Asn Ser Pro Glu Lys Ala Cys Ser Leu Ala
180 185 190

Lys Thr Ala Phe Asp Glu Ala Ile Ala Glu Leu Asp Thr Leu Ser Glu
195 200 205

Glu Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg Asp Asn
210 215 220

Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp Thr Gln Gly Asp Glu Ala Glu Ala Gly
225 230 235 240

Glu Gly Gly Glu Asn
245

<210> 73

<211> 245

<212> PRT

[0030]

<213> 人

<400> 73

Met Glu Lys Thr Glu Leu Ile Gln Lys Ala Lys Leu Ala Glu Gln Ala
1 5 10 15

Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Thr Cys Met Lys Ala Val Thr Glu Gln
20 25 30

Gly Ala Glu Leu Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala Tyr
35 40 45

Lys Asn Val Val Gly Gly Arg Arg Ser Ala Trp Arg Val Ile Ser Ser
50 55 60

Ile Glu Gln Lys Thr Asp Thr Ser Asp Lys Lys Leu Gln Leu Ile Lys
65 70 75 80

Asp Tyr Arg Glu Lys Val Glu Ser Glu Leu Arg Ser Ile Cys Thr Thr
85 90 95

Val Leu Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Leu Ile Ala Asn Ala Thr Asn Pro
100 105 110

Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly Asp Tyr Phe Arg Tyr
115 120 125

Leu Ala Glu Val Ala Cys Gly Asp Asp Arg Lys Gln Thr Ile Asp Asn
130 135 140

Ser Gln Gly Ala Tyr Gln Glu Ala Phe Asp Ile Ser Lys Lys Glu Met
145 150 155 160

[0031]

Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn Phe Ser Val
165 170 175

Phe Tyr Tyr Glu Ile Leu Asn Asn Pro Glu Leu Ala Cys Thr Leu Ala
180 185 190

Lys Thr Ala Phe Asp Glu Ala Ile Ala Glu Leu Asp Thr Leu Asn Glu
195 200 205

Asp Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg Asp Asn
210 215 220

Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp Ser Ala Gly Glu Glu Cys Asp Ala Ala
225 230 235 240

Glu Gly Ala Glu Asn
245

<210> 74

<211> 248

<212> PRT

<213> 人

<400> 74

Met Glu Arg Ala Ser Leu Ile Gln Lys Ala Lys Leu Ala Glu Gln Ala
1 5 10 15

Glu Arg Tyr Glu Asp Met Ala Ala Phe Met Lys Gly Ala Val Glu Lys
20 25 30

Gly Glu Glu Leu Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala Tyr
35 40 45

[0032]

Lys Asn Val Val Gly Gly Gln Arg Ala Ala Trp Arg Val Leu Ser Ser
50 55 60

Ile Glu Gln Lys Ser Asn Glu Glu Gly Ser Glu Glu Lys Gly Pro Glu
65 70 75 80

Val Arg Glu Tyr Arg Glu Lys Val Glu Thr Glu Leu Gln Gly Val Cys
85 90 95

Asp Thr Val Leu Gly Leu Leu Asp Ser His Leu Ile Lys Glu Ala Gly
100 105 110

Asp Ala Glu Ser Arg Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly Asp Tyr Tyr
115 120 125

Arg Tyr Leu Ala Glu Val Ala Thr Gly Asp Asp Lys Lys Arg Ile Ile
130 135 140

Asp Ser Ala Arg Ser Ala Tyr Gln Glu Ala Met Asp Ile Ser Lys Lys
145 150 155 160

Glu Met Pro Pro Thr Asn Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn Phe
165 170 175

Ser Val Phe His Tyr Glu Ile Ala Asn Ser Pro Glu Glu Ala Ile Ser
180 185 190

Leu Ala Lys Thr Thr Phe Asp Glu Ala Met Ala Asp Leu His Thr Leu
195 200 205

Ser Glu Asp Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg
210 215 220

[0033]

Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ala Asp Asn Ala Gly Glu Glu Gly Gly
225 230 235 240

Glu Ala Pro Gln Glu Pro Gln Ser
245

<210> 75

<211> 255

<212> PRT

<213> 人

<400> 75

Met Asp Asp Arg Glu Asp Leu Val Tyr Gln Ala Lys Leu Ala Glu Gln
1 5 10 15

Ala Glu Arg Tyr Asp Glu Met Val Glu Ser Met Lys Lys Val Ala Gly
20 25 30

Met Asp Val Glu Leu Thr Val Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala
35 40 45

Tyr Lys Asn Val Ile Gly Ala Arg Arg Ala Ser Trp Arg Ile Ile Ser
50 55 60

Ser Ile Glu Gln Lys Glu Glu Asn Lys Gly Gly Glu Asp Lys Leu Lys
65 70 75 80

Met Ile Arg Glu Tyr Arg Gln Met Val Glu Thr Glu Leu Lys Leu Ile
85 90 95

Cys Cys Asp Ile Leu Asp Val Leu Asp Lys His Leu Ile Pro Ala Ala
100 105 110

[0034]

Asn Thr Gly Glu Ser Lys Val Phe Tyr Tyr Lys Met Lys Gly Asp Tyr
115 120 125

His Arg Tyr Leu Ala Glu Phe Ala Thr Gly Asn Asp Arg Lys Glu Ala
130 135 140

Ala Glu Asn Ser Leu Val Ala Tyr Lys Ala Ala Ser Asp Ile Ala Met
145 150 155 160

Thr Glu Leu Pro Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn
165 170 175

Phe Ser Val Phe Tyr Tyr Glu Ile Leu Asn Ser Pro Asp Arg Ala Cys
180 185 190

Arg Leu Ala Lys Ala Ala Phe Asp Asp Ala Ile Ala Glu Leu Asp Thr
195 200 205

Leu Ser Glu Glu Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu
210 215 220

Arg Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp Met Gln Gly Asp Gly Glu
225 230 235 240

Glu Gln Asn Lys Glu Ala Leu Gln Asp Val Glu Asp Glu Asn Gln
245 250 255

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

[0035]

<220>

<223> 人 14-3-3 η 104-115 位残基的经修饰区段

<400> 76

Cys Leu Asp Lys Phe Leu Ile Lys Asn Ser Asn Asp Phe
1 5 10

<210> 77

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 14-3-3 η 77-86 位残基的经修饰区段

<400> 77

Lys Lys Leu Glu Lys Val Lys Ala Tyr Arg Cys
1 5 10

<210> 78

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 14-3-3 η 143-157 位残基的经修饰区段

<400> 78

Cys Lys Asn Ser Val Val Glu Ala Ser Glu Ala Ala Tyr Lys Glu Ala
1 5 10 15

<210> 79

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0036]

<223> 生物素化 R18

<220>

<221> BINDING

<222> (1)..(1)

<223> 生物素

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Xaa = 3Hyp 或 4Hyp

<400> 79

Pro His Cys Val Pro Arg Asp Leu Ser Trp Leu Asp Leu Glu Ala Asn

1 5 10 15

Met Cys Leu Xaa

20

<210> 80

<211> 31

<212> DNA

<213> 人

<400> 80

gcgaattcct gcagcgggcg cggctggccg a 31

<210> 81

<211> 31

<212> DNA

<213> 人

<400> 81

gctcgagcct gaaggatctt cagttgcctt c 31

<210> 82

<211> 25

[0037]

<212>	DNA	
<213>	人	
<400>	82	
agaattcagt	tgccttctcc	tgctt
		25
<210>	83	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人	
<400>	83	
acatatgggg	gaccggga	
		18
<210>	84	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人	
<400>	84	
agaattctta	attgttgcct	tcgccg
		26
<210>	85	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人	
<400>	85	
acatatggtg	gaccgcgagc	
		20
<210>	86	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人	
<400>	86	
acatatgaca	atggataaaa	gtgagctg
		28

[0038]

<210>	87	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人	
<400>	87	
	agaattctta gttctctccc tccccagc	28
<210>	88	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人	
<400>	88	
	acatatggat gatcgagagg atctg	25
<210>	89	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人	
<400>	89	
	agaattctca ctgattttcg tcttcac	28
<210>	90	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人	
<400>	90	
	acatatggag agagccagtc tgatcc	26
<210>	91	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人	
<400>	91	
	agaattcagc tctggggctc ctg	23

[0039]

<210> 92

<211> 26

<212> DNA

<213> 人

<400> 92

acatatggag aagactgagc tgatcc

26

<210> 93

<211> 28

<212> DNA

<213> 人

<400> 93

agaattctta gttttcagcc ctttctgc

28

<210> 94

<211> 26

<212> DNA

<213> 人

<400> 94

acatatggat aaaaatgagc tggttc

26

<210> 95

<211> 29

<212> DNA

<213> 人

<400> 95

agaattctta attttccct ctttctcct

29

ELISA: 测试小鼠抗AUG1-CLDK免疫血清(第2次加强后)
对AUG1-CLDK-BSA抗原的血液效价-只有IgG应答

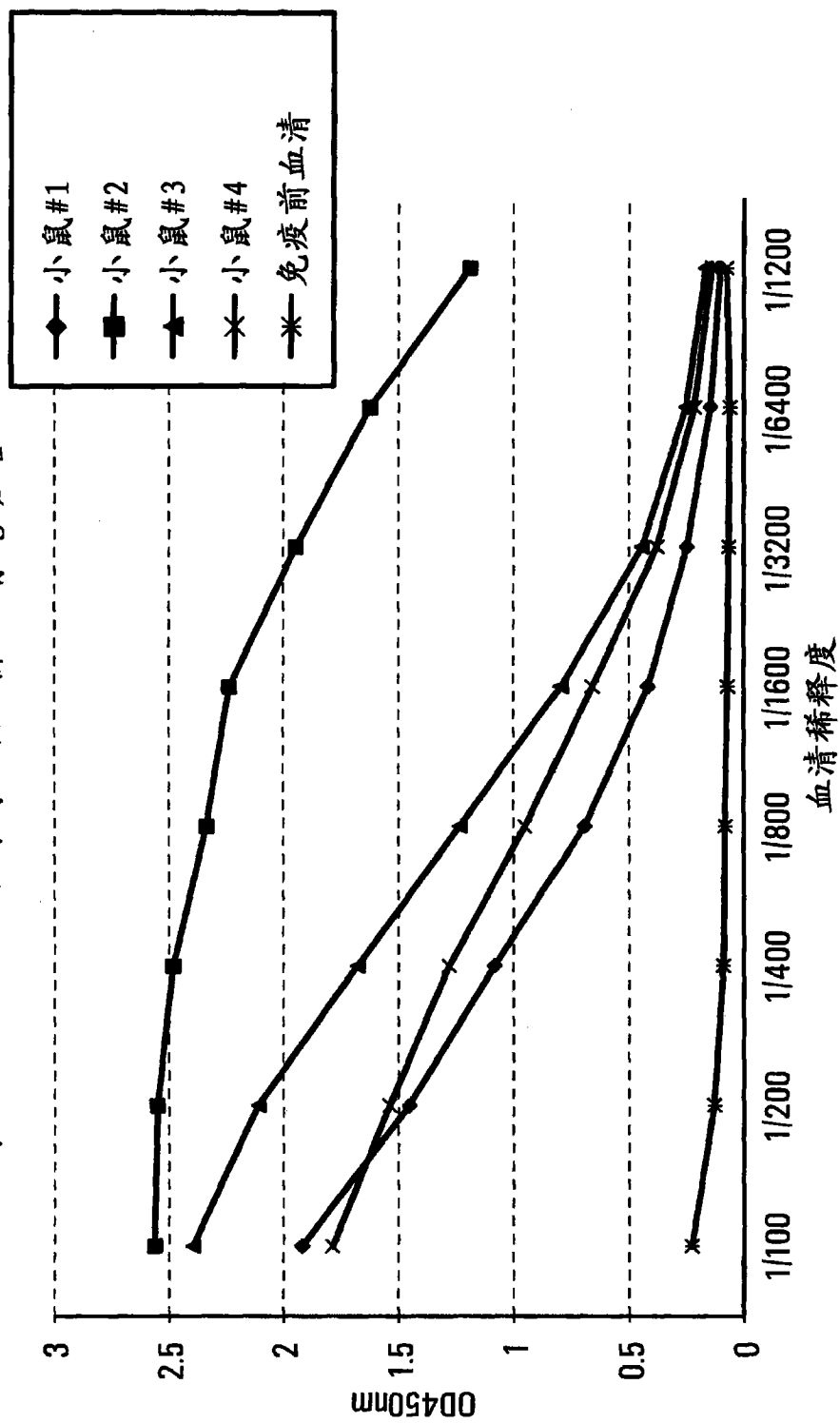


图 1

ELISA: 测试小鼠抗AUG2-KKLE免疫血清(第2次加强后)
对AUG2-KKLE-BSA抗原的血液效价-只有IgG应答

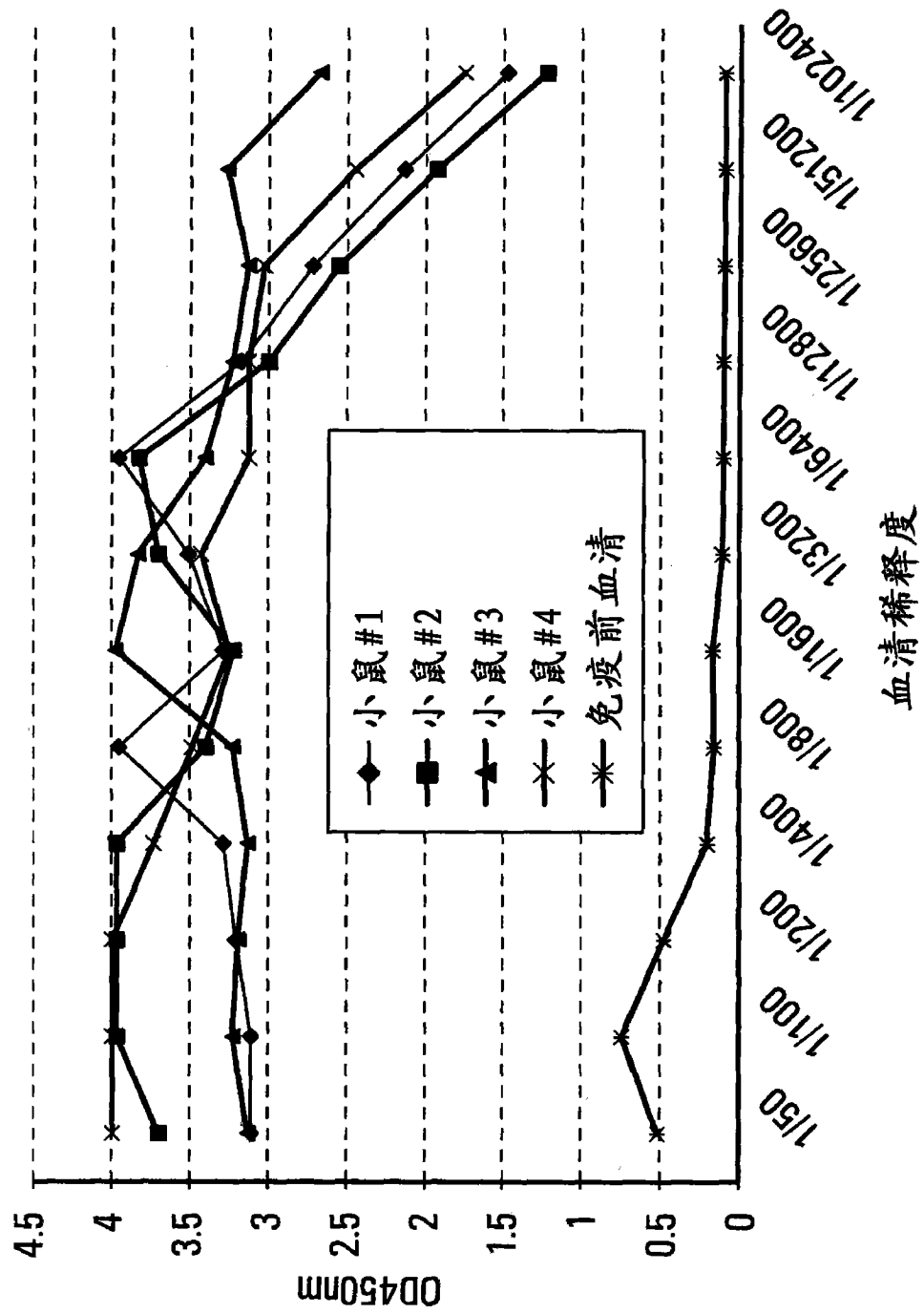


图 2

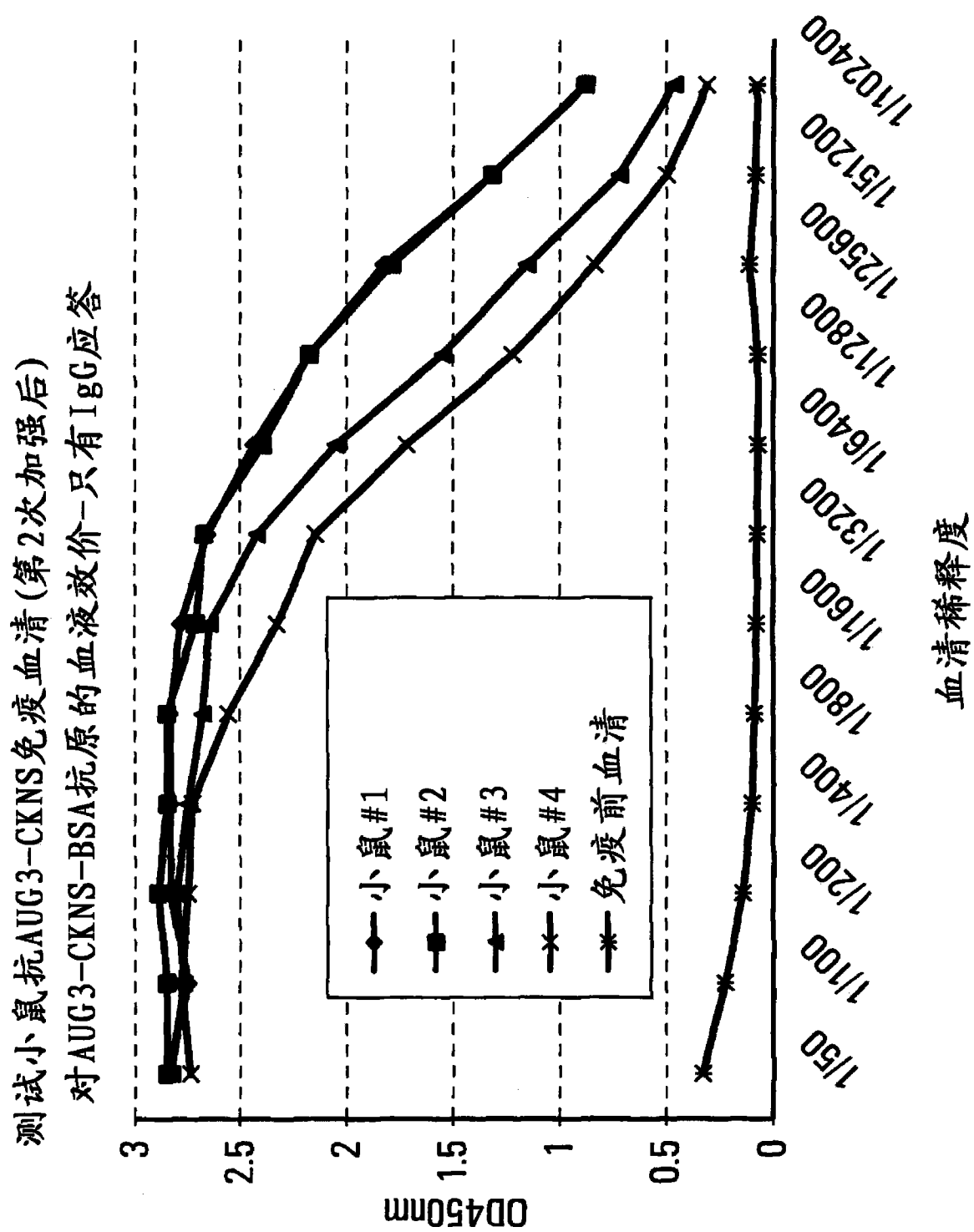


图 3

```

- MVDREQLVQARLAEQAERYDDMAAAKKNVTNELNEPLSNEERNLLSVAYKNVVGARRSS 59
-MGDREQLLQRLARLAEQAERYDDMASAMKAVTELNEPLSNEDRNLLSVAYKNVVGARRSS 59
MTMDKSELVQAKLAEQAERYDDMAAAKKNVTTEQGHLSNEERNLLSVAYKNVVGARRSS 60
--MDKNELVQAKLAEQAERYDDMAAAKKNVTTEQGAELSNERNLLSVAYKNVVGARRSS 58
--MEKTELTVQAKLAEQAERYDDMATCKMKAETEQAELSNERNLLSVAYKNVVGARRSA 58
--MERASLQKAKLAEQAERYDDMAAFMKGAVEKGEELSCEERNLLSVAYKNVVGQRAA 58
-MDDREDLVYQAKLAEQAERYDDVESMKKVGADVELTVEERNLLSVAYKNVIGARRAS 59
:: :*:*****::: ** . . . * :*::*****::*:::
WRVSSIEQKTSADGNEKKIENVRAYREKTEKELEAVQDVLSLDNVLIKNCSQYES 119
WRVSSIEQKTMADGNIEKKLEKVKAYREKTEKELETQDNDVLSLDKFLIKNCDFYES 119
WRVSSIEQKT--ERNEKKQMKGREYREKTEIAELQDNCNDVLELDKYLIPNASQ--ES 114
WRVSSIEQKT--EGAEKKQMKGREYREKTEIRLQDNCNDVLSLEKFLIPNASQ--ES 114
WRVSSIEQKT--DTSDDKLQLTKDYREKVESELSRISCTTVLELDKYLIANATNP--ES 114
WRVLSIEQKSNEEGSEEKPEVREYREKVEVTELGQVDTVLGLLDSHLIKEAGDA--ES 116
WRISSIEQKEENKGGEDKLKHIREYRQMVETELKICDILDVLDKHLIPAAATG--ES 117
:::***** . . . * :*::*****::*:::
KVFYLNKMGDYYRYLAEVATGEKRAVWESSEKAYSEAHSEISKEHMQTHPIRLGLALNY 179
KVFYLNKMGDYYRYLAEVASGEGKNKSWEASEAAYKEAFEISKEQMPTHPIRLGLALNF 179
KVFYLNKMGDYYRYLSEVASGDNKQTTVNSQQAQYQEAFAEISKEMQTHPIRLGLALNF 176
KVFYLNKMGDYYRYLAEVAAAGDDKKGTVDQQAQYQEAFAEISKEMQTHPIRLGLALNF 174
KVFYLNKMGDYYRYLAEVACGDDRKQTTIDNSQGAQYQEAFAEISKEMQTHPIRLGLALNF 174
RVFYLNKMGDYYRYLAEVATGDDKKRIIDSARSAYQEAAMDISKEMPTHPIRLGLALNF 176
KVFYLNKMGDYYRYLAEFATGDNDRKEAENS LVAYKAASDIAMTELPTHPIRLGLALNF 177
:::*****::*::: . . . * :*::*****::*:::
SVFYEIQNAPEQAQCHLAKTAFDDAIAELDTLINEDSYKDSSTLIMQLLRDNLTLWTSDDQD 239
SVFYEIQNAPEQAQLAKAQAFDDAIAELDTLINEDSYKDSSTLIMQLLRDNLTLWTSDDQD 239
SVFYEILNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLINESYKDSSTLIMQLLRDNLTLWTSENQG 236
SVFYEILNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLINESYKDSSTLIMQLLRDNLTLWTSDTQG 234
SVFYEILNPELACTLAKTAFDEAIAELDTLINEDSYKDSSTLIMQLLRDNLTLWTSDSAG 234
SVFHYEIANSPPEATISLAKTTFDEAMADLHTLSEDSYKDSSTLIMQLLRDNLTLWTDADNAG 236
SVFYEILNSPDRACRLAKAAFDDAIAELDTLINESYKDSSTLIMQLLRDNLTLWTSDDHQG 237
:::***::*::: * :*::*****::*:::
DDG---GEGNN----- 247
EEA---GEGN----- 246
DEG-DAGEG-EN----- 246
DEA-EAGEGEN----- 245
EEC-DAAEGAEN----- 245
EEGGEAPQEPQS----- 248
DGEEQNKEALQDVEDENQ 255

```

图 4

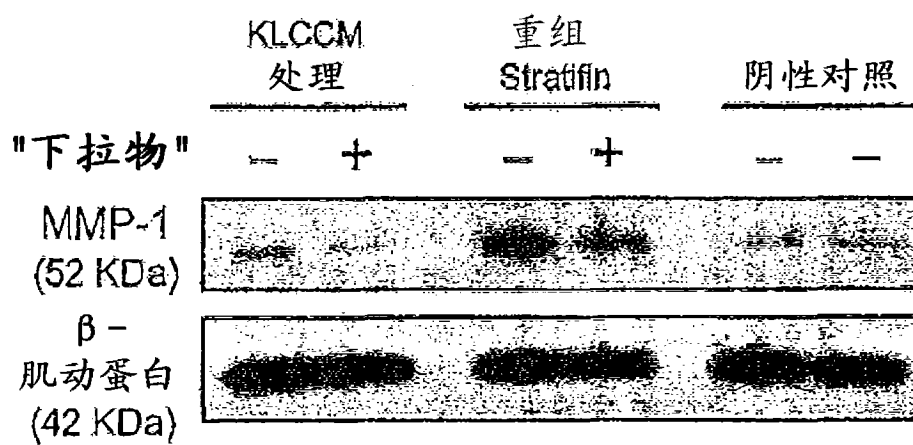


图 5A

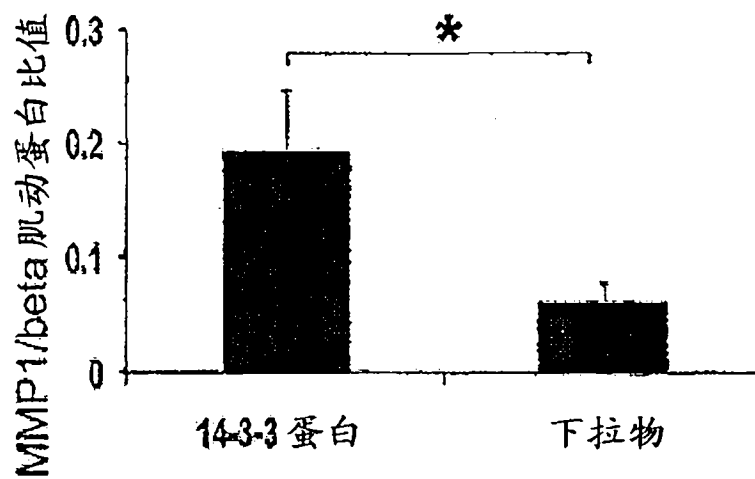


图 5B



泳道: 1 2 3 4 5 6

图 6



泳道: 1 2 3 4 5 6

图 7

ELISA: 测试小鼠抗14-3-3 ETA免疫血清(第2次加强后)

对14-3-3 ETA抗原的血液效价-只有IgG应答

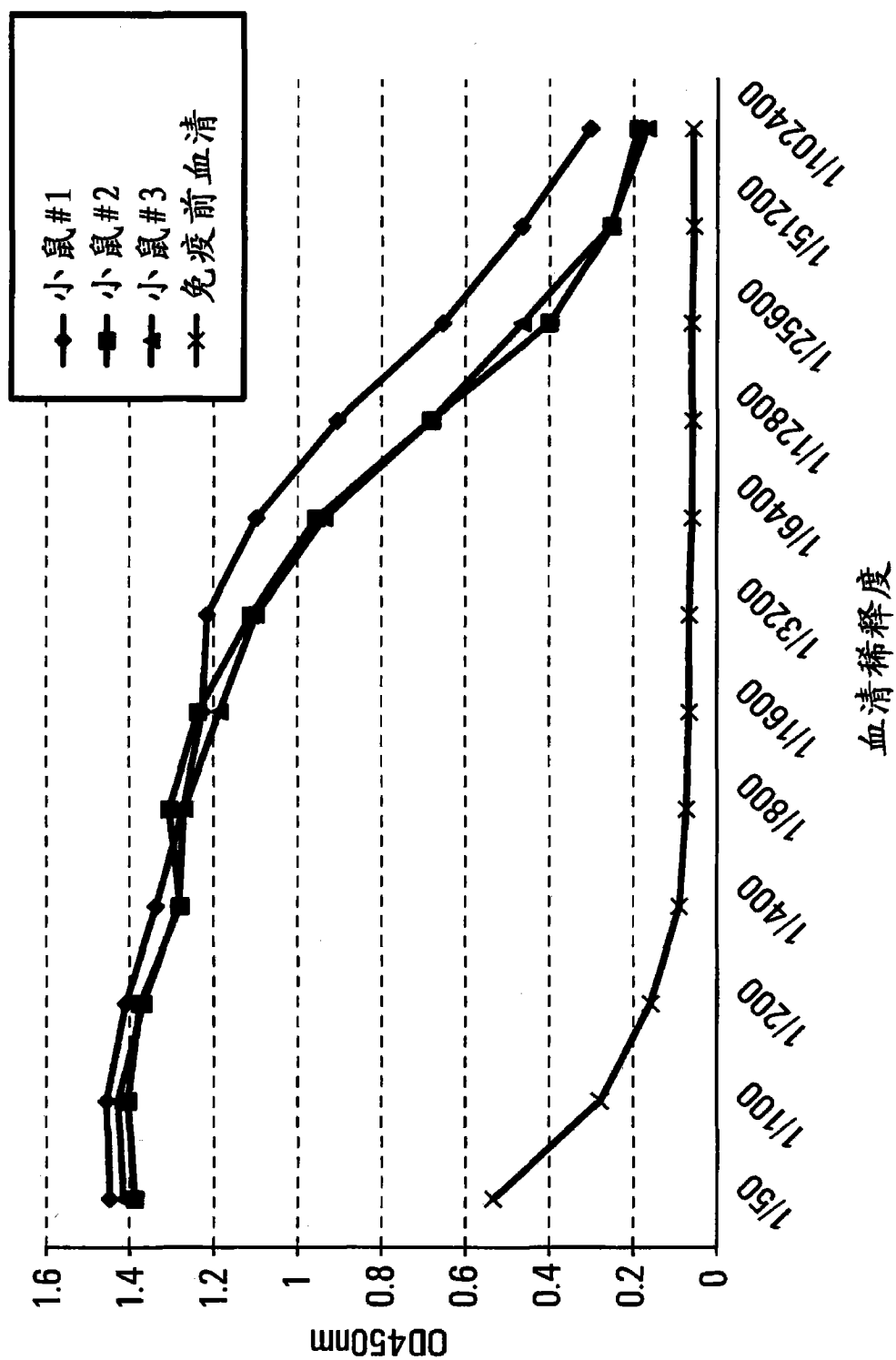


图 8