



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101384622 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 27

(21) 申请号 200780003349. 9

(22) 申请日 2007. 01. 23

(30) 优先权数据

06001457. 8 2006. 01. 24 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 07. 24

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2007/000538 2007. 01. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02007/085412 EN 2007. 08. 02

(73) 专利权人 泰克诺根股份公司

地址 意大利卡塞塔

(72) 发明人 M·普莱斯塔 M·卡莫兹

M·鲁斯纳提 M·克罗姆伯

D·马斯特罗安尼

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C07K 14/71 (2006. 01)

C12N 15/12 (2006. 01)

A61K 38/18 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

Marco Presta et al..Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. 《Cytokine & Growth Factor Reviews》.2005, 第 16 卷 159-178.

Marco Rusnati et al..Marco Rusnati et al.. 《blood》.2004, 第 104 卷第 92-99 页.

Catherine Perollet et al..Platelet Factor 4 Modulates Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2) Activity and Inhibits FGF-2 Dimerization. 《blood》.1998, 第 91 卷 3289-3299.

审查员 孙尚瑜

权利要求书 1 页 说明书 19 页

序列表 6 页 附图 7 页

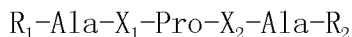
(54) 发明名称

FGF2 结合肽及其用途

(57) 摘要

本文描述了 FGF2 结合肽,其被设计为由 PTX3 的 N-末端区域开始,特别是横跨 PTX3(82-110) 的区域。与该序列相关的合成肽能够结合 FGF2 并在体外抑制 FGF2 促血管生成活性,且在体内对先天免疫没有预期的影响。

1. 式 I 的 FGF2 结合肽：



(I)

其中：

X₁ 是 Arg 的氨基酸；

X₂ 是 Cys 的氨基酸；

R₁ 或者不存在,或者由选自 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列组成；

R₂ 或者不存在,或者由选自 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列组成,遵从如下规定：

当 R₁ 不存在时,R₂ 也不存在；当 R₁ 是 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列时,R₂ 是 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列；当 R₁ 是 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列时,R₂ 是选自 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列；其药学可接受的盐。

2. 根据权利要求 1 的肽,其由选自 SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列组成。

3. 核酸分子,该核酸分子编码根据上述任一权利要求的肽,或包含其简并序列。

4. 含有根据权利要求 3 的核酸分子的表达载体。

5. 用根据权利要求 4 的表达载体转化的宿主细胞。

6. 根据权利要求 5 的宿主细胞,其中肽是分泌的或表达在细胞膜表面上。

7. 用作药物的权利要求 1 或 2 的肽。

8. 用于抗由血管生成的改变而导致的疾病的权利要求 1 或 2 的肽。

9. 权利要求 8 的肽,其中血管生成的改变是由生长因子 FGF2 的活性改变引起的。

10. 权利要求 8 或 9 的肽,其中疾病选自关节炎疾病,肿瘤转移,糖尿病性视网膜病变,牛皮癣,慢性炎症,动脉硬化或肿瘤。

11. 权利要求 10 的肽,其中肿瘤选自:肉瘤,癌症,类癌,骨瘤或神经内分泌瘤。

12. 权利要求 1 或 2 的肽,其用于抗与不受控制的 FGF2 依赖的成纤维细胞或平滑肌细胞的增殖,与成纤维细胞响应过度相关的瘢痕形成,以及血管成形后的再狭窄相关的疾病。

13. 药物组合物,其含有治疗有效量的根据权利要求 1 或 2 的肽以及适当的稀释剂和/或赋形剂和/或佐剂。

FGF2 结合肽及其用途

[0001] 发明领域

[0002] 本发明涉及成纤维细胞生长因子 2 (FGF2) 结合肽,其在体外和体内能与 FGF2 结合并抑制 FGF2 的促血管生成活性,但对先天免疫没有预期影响。

[0003] 发明背景

[0004] 正五聚蛋白是以五聚体结构为特征的蛋白超家族¹。经典的短正五聚蛋白 C-反应蛋白 (CRP) 和血清淀粉样蛋白 P 组分 (SAP) 是分别在人和老鼠体内由肝产生的,对炎症介质应答的急性期蛋白^{2,3}。正五聚蛋白与多种配体结合并涉及到对微生物的先天的抗性,以及对细胞碎片和细胞外基质组分的清除^{1,4-6}。

[0005] 长正五聚蛋白的特点在于具有无关的与类正五聚蛋白的 C 末端结构域相连的 N-末端结构域⁷。原型长正五聚蛋白 PTX3^{8,9} 是一个主要由 10-20 聚体的多聚体组装成的 45kD 的糖基化蛋白¹⁰。对初始炎症信号响应时,由不同类型的细胞,特别是单核吞噬细胞,树突细胞和内皮细胞局部产生并释放出 PTX3¹¹。对 $ptx3^{-/-}$ 老鼠的研究显示,在体内从富含透明质酸的细胞外基质的装配,到雌性生育力和抵抗各种微生物的先天免疫,该分子起着复杂的而非多余的作用^{12,13}。这些至少部分地与 PTX3 高亲和力地与补体成分 C1q,细胞外基质蛋白质 TSG6 和选择的微生物结合的能力,补体激活的活化作用和促进巨噬细胞和树突细胞的病原体识别有关^{1,14}。因此,PTX3 是一种在多种病理生理条件下具有独特的而非多余的功能的可溶解模式的识别受体^{1,14}。

[0006] 成纤维细胞生长因子 2 (FGF2) 是一种肝素结合生长因子,其在培养的内皮细胞中通过与高亲和力酪氨酸激酶受体 (FGFRs) 的相互作用诱导细胞增殖,趋化性,和蛋白酶的产生¹⁵。FGF2 在体内诱导血管生成并在伤口愈合,炎症,动脉粥样硬化,和肿瘤的生长期间调节新血管生成¹⁶。在细胞外环境中,几种分子与 FGF2 螯合,因此阻止了它与内皮细胞 FGFRs 的相互作用并抑制了它的血管生成活性 (¹⁶ 中的评论)。许多这种抑制剂是局部和/或全身性产生/释放的,这是血管生成过程复杂调节的基础。

[0007] 长 PTX3 高亲和力且特异地与 FGF2 结合。因此,长 PTX3 在体外抑制 FGF2 依赖的内皮细胞增殖,在体内抑制血管生成¹⁷。还有,在动脉受损后,整个 PTX3 抑制 FGF2 依赖的平滑肌细胞活化和内膜加厚¹⁸。因此,PTX3 有可能潜在地有助于在以两种蛋白共表达为特征的不同病理背景下调节 FGF2 的活性,所述病理背景包括炎症,伤口愈合,动脉粥样硬化,和肿瘤形成。然而,已经揭示该蛋白没有治疗作用,表明无法利用这种大分子以及该蛋白的其他的活性。事实上,PTX3 通过 C 末端正五聚蛋白结构域与 C1q 结合¹⁰。

[0008] 目前,还没有发现 PTX3 的 N-末端的生物学功能。基于此,发明人研究了 PTX3N-末端与 FGF2 的相互作用的能力。

[0009] 发明详述

[0010] 已经发现逆转录病毒转导的过表达 PTX3 的 N-末端片段 (1-178) 的内皮细胞,显示出降低的响应 FGF2 的促有丝分裂活性。纯化的重组体 PTX3 (1-178) 结合 FGF2 并阻止了 PTX3/FGF2 的相互作用。还有,识别 PTX3 (87-99) 表位的单克隆抗体 mAb-MNB4 也阻止了 FGF2/PTX3 的相互作用并消除了 PTX3 的 FGF2 拮抗活性。发明人惊奇地发现非常短的

肽也保持这样的活性并可用作治疗药物。同样地,合成的肽 PTX3(82-110),PTX3(97-110),PTX3(97-107) 和 PTX3(100-104) 也结合 FGF2,并抑制 FGF2 与固定在 BIAcore 传感器芯片上的整个长 PTX3 相互作用及体内 FGF2 依赖的内皮细胞增殖和血管生成。因此,这些数据允许在 PTX3N- 末端扩展区(跨度为 PTX3(97-110) 的区域)内鉴定非常短的 FGF2 结合结构域。与该序列相关的合成肽能够结合 FGF2 并在体外抑制 FGF2 促血管生成,并且在体内对先天免疫没有预期的影响。

[0011] 因此本发明的主要目的是式 I 的 FGF2 结合肽:

[0012] $R_1\text{-Ala-X}_1\text{-Pro-X}_2\text{-Ala-R}_2$

[0013] (I)

[0014] 其中:

[0015] X_1 是选自 Arg 和 Lys 的氨基酸;

[0016] X_2 是选自 Cys 和 Thr 的氨基酸;

[0017] R_1 或者不存在或者由选自 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列组成;

[0018] R_2 或者不存在或者由选自 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列组成,并遵从如下如下规定:

[0019] 当 R_1 不存在时, R_2 也不存在;当 R_1 是氨基酸序列 SEQ ID NO:1 时, R_2 是氨基酸序列 SEQ ID NO:2;当 R_1 是氨基酸序列 SEQ ID NO:3 时, R_2 是选自 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列;其功能衍生物,前体和药学上可接受的盐。

[0020] 优选 X_1 是 Arg。更优选的是 X_2 是 Cys。甚至更优选所述肽由选自 SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列组成。

[0021] 本发明进一步的目的是缀合嵌合肽,其含有式 I 的肽或其功能衍生物。

[0022] 术语“肽”一般用于指包含 4 到 100 或更多的连续氨基酸的多肽链,通常是 5 到 20 个连续氨基酸。

[0023] 术语“功能”定义为肽显示 FGF2 结合特性,能大大降低 FGF2 生物学活性。FGF2 的生物学活性包括促有丝分裂和血管生成作用。特别地,本发明的肽能够抑制 FGF2 诱导的内皮细胞或平滑肌细胞的增殖。

[0024] “前体”是通过新陈代谢和酶促的加工在施用到细胞或人体之前或之后能够转变为本发明化合物的化合物。

[0025] 本文中,术语“盐”指的是本发明的肽,多肽,或其类似物的羧基基团的盐和氨基的酸加成盐。羧基基团的盐可以通过本领域已知的方法制成,包括无机盐,例如:钠,钙,铵,三价铁的或锌盐等等,以及因制备而带有有机碱的盐,例如带有胺,比如三乙醇胺,精氨酸或赖氨酸,哌啶,普鲁卡因等等。酸加成盐包括,例如,用无机酸的盐,例如:盐酸或硫酸,和用有机酸的盐,例如,乙酸或草酸。任何一种这样的盐应该基本上具有本发明的肽和多肽或其类似物的类似的活性。

[0026] 本文中所用的术语“衍生物”指的是可以根据已知的方法由存在于氨基酸部分的侧链或 N- 或 C- 末端基团上的官能团制备的衍生物。这样的衍生物包括例如羧基基团的酯或脂肪族氨化物,游离氨基基团的 N- 酰基衍生物,或游离羟基基团的 O- 酰基衍生物以及由酰基基团例如 alkanoyl- 或芳酰基- 基团形成的衍生物。本发明还包括已经披露的肽的肽模拟物,其中肽的性质已经在氨基酸侧链,氨基酸手性和 / 或肽主链水平上以化学方法

改变。这些改变意欲用于提供具有类似的（如果没有改善）治疗，诊断及药代动力学性质的 FGF2 结合制剂。

[0027] 例如，当注射到受体后，肽容易被肽酶裂解，用不可裂解的肽模拟物替换特别敏感的肽键可以提供一种更稳定的肽，因此治疗时更有效。同样地，L-氨基酸残基的置换是一种标准方式，用于使肽对蛋白水解作用具有较低的敏感性，而最终更类似于有机化合物而非肽。还可采用氨基末端的封闭基团比如叔丁基氧羰基，乙酰基，琥珀酰基，甲氧基琥珀酰基，环庚基，己二酰基，壬二酰基（azelayl），丹酰基，苄氧基羰基，苄基甲氧基羰基，甲氧基壬二酰基，甲氧基己二酰基，甲氧基环庚基，和 2,4-二硝基苯基。许多其他的用于增加效力，延长活性，促进提纯，和 / 或延长半衰期的修饰在本领域都是已知的。

[0028] 本发明的肽的性质可以在突变的肽中保持，甚至加强。正如本领域已知的方法决定的或下面的实例所披露的，突变的肽包括其中一个或多个氨基酸残基被保守替代的氨基酸序列，只要它们在相等甚至较高水平上显示出表征本发明的相同的生物学活性。

[0029] 根据本发明，突变肽优选的改变通常是已知的“保守”或“安全”替代。保守氨基酸替代是用那些具有十分类似的化学性质的氨基酸进行的，以保持分子的结构和生物学功能。文献提供了许多模型，利用这些模型可以基于对天然蛋白质的序列和 / 或结构的统计学和物理化学的研究来进行保守氨基酸替代的选择。

[0030] 突变的肽可以由传统的编码 DNA 定点诱变技术，编码 DNA 序列（比如 DNA 移码，噬菌体展示 / 选择）或氨基酸水平上的组合技术，计算机辅助设计研究，或任何其他的已知的适当技术来产生，这些技术提供了一个基本上与突变肽相应的有限集合，而这些肽通常可以由本领域的技术人员利用现有技术和本专利申请的实施例的教导来获得或验证。

[0031] 本发明的另一个目的是融合嵌合肽，其含有式 (I) 的肽或其功能衍生物。为肽融合和 / 或嵌合肽的 FGF2 结合肽包含式 (I) 肽的氨基酸序列或任何如上面所定义的它们的突变体 / 衍生物，以及属于除 PTX3 以外的蛋白序列的氨基酸序列，以提供额外的性质而不会显著削弱 FGF2 结合活性。

[0032] 可包含在融合和 / 或嵌合的蛋白内的额外的蛋白序列可以选自膜结合序列，膜结合蛋白的胞外区域，免疫球蛋白的恒定区，多聚化（multimerization）结构域，胞外蛋白，含信号肽的蛋白，含输出信号的蛋白。

[0033] 由融合和 / 或嵌合的多肽或肽显示出的额外性质是更容易提纯的能力，在体液中更长的持续半衰期，或细胞外定位等。这个后天的特性对特定的包括在上述定义内的一组融合或嵌合蛋白来说具有特别的重要意义，因为它允许本发明的肽定位在一个空间内，在这个空间里不但使肽的分离和提纯变得更为方便，而且在其中 PTX3 与 FGF2 自然地相互作用。

[0034] 与 FGF2 结合肽融合的一个或多个序列的选择取决于所述的肽特殊用途。

[0035] 做为一般方法，融合蛋白的制备可以通过生成编码其的核酸片段，利用普通的遗传工程技术，在用于修饰原核或真核宿主细胞的病毒或质粒源的可复制载体中克隆，利用附加型或非- / 同源整合载体，以及基于转化，侵染，或转染的技术。这些载体将允许包括 FGF2 结合剂在内的融合蛋白在原核或真核宿主细胞中，在其自身的转录起始 / 终止调节序列的控制下表达，这些调节序列在所述的细胞中选择为组成型活性或是可诱导的。然后可以分离提供稳定细胞系的细胞系。特别地，不论何时，被修饰用于表达本发明的 FGF2 结合

剂的细胞被直接利用或施用,优选细胞为正常表达 PTX3 的人类细胞。如胞外序列,输出信号,或信号肽的情况下,当额外的蛋白序列允许 FGF2 结合结构域分泌到细胞外空间中时,考虑到下一步的处理,试剂可以更容易地从培养细胞中收集和纯化,或者可选择地直接使用或施用细胞。

[0036] 如膜结合蛋白序列的情况下,当额外的蛋白允许 FGF2 结合剂固定在细胞表面时,考虑到下一步的处理,试剂可能不太容易从培养细胞中收集和纯化,但可以直接使用或施用细胞,以一种对应于某种天然 PTX3 的形式提供试剂,尽可能地提高其性能。

[0037] 还可以通过计算机辅助药物设计的方法来鉴定本发明 FGF2 结合肽,该方法利用本发明的肽结构和 / 或序列,或如上面定义的相应的活性突变体。利用计算模拟技术可更有效地用本发明的肽研究 PTX3 与 FGF2 之间的相互作用。这种计算机辅助分析可被用来开发合成的有机分子或肽(例如:4-20 个氨基酸长度)形式的改善的肽或非肽拟似药。一旦这些化合物经筛选并发现能与 FGF2 结合,那么将利用细胞或动物模型对其用途进行评定。

[0038] 本发明的多肽可以与异源部分共价或非共价结合,或直接或通过使用偶合剂或接头构成活性缀合物或复合物,这些异源部分可以选自细胞毒性剂,标记(例如,生物素,荧光标记),药物或其他的治疗剂。可以利用本领域已知的分子和方法(放射性或荧光标记,生物素,细胞毒性剂,药物或其他的治疗剂)制备可用的缀合物或复合物。细胞毒性剂包括化疗剂,毒素(例如,细菌,真菌,植物或动物来源的酶活性毒素或其片段),或者放射性同位素(即,放射性缀合物)。能用的酶活性毒素及其片段包括白喉 A 链,白喉毒素非结合活性的片段,外毒素 A 链(源自绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)),蓖麻毒蛋白 A 链,相思豆毒蛋白 A 链,蒴莲根毒素(modeccin)A 链, α -帚曲霉素(α -Sarcin),油桐(*Aleurites fordii*)蛋白,石竹素蛋白,美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白(PAPI, PAPII, 和 PAP-S),苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂,麻枫树素蛋白,巴豆毒蛋白,石碱草(*Saponaria officinalis*)抑制剂,白树毒蛋白(gelonin),mitogellin,局限曲菌素,酚霉素,伊诺霉素,和单端孢霉烯族化合物(tricothecenes)。各种放射性核素可用于制备放射性缀合蛋白。实例包括 ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , 和 ^{186}Re 。

[0039] 还可以制备可用的缀合物或者复合物以改善试剂的药物的递送效力。为此,本发明的肽可以与分子比如聚乙二醇及其他天然的或合成的聚合物形成活性缀合物或者复合物(Harris JM 和 Chess RB, *Nat Rev Drug Discov.* (2003), 2(3):214-21; Greenwald RB 等, *Adv Drug Deliv Rev.* (2003), 55(2):217-50; Pillai O 和 Panchagnula R, *Curr Opin Chem Biol.* (2001), 5(4):447-51)。在这一点上,正如在本文中公开的,本发明关注以化学方法修饰的肽,其中肽是与聚合物连接的。一般,聚合物是水溶性的,以便缀合物在水相环境,比如生理环境中不会沉淀。用于治疗缀合物可以包含药学可接受的水溶性聚合物部分。适用的水溶性聚合物包括聚乙二醇(PEG),单甲氧基-PEG,单-(C1-C10)烷氧基 PEG,芳氧基-PEG,聚-(N-乙烯基吡咯烷酮)PEG, tresyl 单甲氧基 PEG, PEG 丙醛,双-琥珀酰亚胺基(succinimidyl)碳酸盐 PEG,丙二醇均聚物,聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物,聚氧乙烯多元醇(例如,甘油),聚乙烯醇,葡聚糖,纤维素,或其他的基于碳水化合物的聚合物。适用的 PEG 可以具有从大约 600 到大约 60,000,包括,例如,5,000, 12,000, 20,000 和 25,000 的分子量。缀合物也可以包含这些水溶性聚合物的混合物。

[0040] 缀合物的实例包含了本发明的肽和附着至所述多肽 N-末端的聚羟基氧化物部

分。PEG 是一种合适的聚羟基氧化物。作为说明,本发明的肽可以用 PEG 来修饰,该过程被称为“PEG 化”。可以用本领域已知的任何 PEG 化反应来进行 PEG 化。例如,可以用反应性的聚乙二醇分子通过酰基化反应或者烷基化反应进行 PEG 化。在一种替换的方法中,通过缩合激活的 PEG 形成缀合物,其中 PEG 的末端羟基或氨基已经被活性接头替代。

[0041] 本发明的另一个目的是提供编码本发明的 FGF2 结合肽的核酸,与上述核酸杂交的核酸,具有简并序列的核酸。

[0042] 本发明还包括病毒或质粒源的表达载体,其使本发明的核酸得以表达,以及用这样的载体转化的原核或真核宿主细胞和由此得到的稳定的细胞系,这些细胞表达 FGF2 结合剂,所述 FGF2 结合剂可以被分泌或在膜表面上表达。实例是人类 B 细胞。

[0043] 本发明的 FGF2 结合肽可以利用这样的方法制备,即在适当的培养基中培养上面描述的宿主细胞并收集 FGF2 结合剂。

[0044] 编码本发明的肽的 DNA 序列可以插入并连接到适当的载体中。一旦制成,将表达载体导入适当的宿主细胞中,该宿主细胞随后表达出肽。

[0045] 利用适当的表达载体,在真核细胞(例如,酵母,昆虫或哺乳动物细胞)或原核细胞中可以表达任何在本文中提到的本发明重组肽。可以采用本领域已知的任何方法。

[0046] 为了能够表达所需的蛋白,表达载体应该还包含含有与编码所需蛋白的 DNA 相连的转录和翻译调节信息的特定核苷酸序列,由此使得基因表达并产生该蛋白。首先,为了转录基因,基因之前必须有可被 RNA 聚合酶识别的启动子,聚合酶与之结合并由此开始转录过程。

[0047] 通用的这种启动子有很多种,其以不同的效率(强启动子和弱启动子)起作用。

[0048] 对于真核宿主,可以根据宿主的特性,采用不同的转录和翻译调节序列。它们可能衍生自病毒,比如腺病毒,牛乳头瘤病毒,猿猴病毒等等,其中的调节信号与具有高表达水平的特殊基因相关。实例是疱疹病毒的 TK 启动子,SV40 早期启动子,酵母 gal4 基因的启动子,等等。可以选择能够允许抑制和激活的转录起始调节信号,以便调节基因的表达。

[0049] 将含有编码本发明蛋白的核苷酸序列的 DNA 分子插入到具有有效连接的转录和翻译调节信号的载体中,该载体能够将所需的基因序列整合到宿主细胞中。

[0050] 也可以通过导入一个或多个允许用于选择包含表达载体的宿主细胞的标记来选择已被导入的 DNA 稳定转化的细胞。标记还可以为营养缺陷型的宿主提供光合营养,还可以提供抗微生物剂抗性,如抗生素抗性,或重金属抗性比如铜抗性等等。可选择的标记基因可以直接与待表达的 DNA 基因序列连接,也可以通过共转染导入到同一个细胞中。

[0051] 载体的附加元件还可能有利于获得本发明蛋白的最佳产品,特别是对于选择特别的包含质粒或病毒载体的细胞;易于从不含载体的受体细胞中识别并挑选出包含载体的受体细胞;在特殊的宿主中要求的载体的拷贝数;以及载体是否能如意地在不同种类的宿主细胞间“穿梭”。

[0052] 一旦制备好用于表达的包含构建体的载体或 DNA 序列,就可以采用任何合适的方法:转化,转染,接合,原生质体融合,电穿孔法,磷酸钙沉淀,直接的显微注射等等将 DNA 构建体导入到适当的宿主细胞中。

[0053] 宿主细胞可以是原核的或真核的。优选真核的宿主,例如哺乳动物细胞,比如人,猴子,小鼠,以及中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,因为它们提供蛋白质分子的翻译后修饰,包括

正确的折叠或在正确的位点糖基化。酵母细胞也可以进行包括糖基化作用的肽的翻译后修饰。存在许多利用强启动子序列和质粒高拷贝数的重组 DNA 策略可以用于在酵母中制备所需蛋白。酵母能识别克隆的哺乳动物基因产物的前导序列并分泌具有前导序列的肽（也就是前肽）。

[0054] 导入载体后，在选择培养基中培养宿主细胞，该培养基用于筛选包含载体的细胞的生长。克隆基因序列的表达导致产生出所需的蛋白。

[0055] 许多综述和书籍提供了如何利用载体和原核或真核宿主细胞克隆并生产重组蛋白的教导，例如一些由牛津大学出版社出版的系列标题为“实践方法”的书籍（“DNA 克隆 2：表达体系”1995；“DNA 克隆 4：哺乳动物体系”，1996；“蛋白表达”1999；“蛋白纯化技术”，2001）。

[0056] 化学合成技术的实例是固相合成和液相合成，其为生产本发明的 FGF2 结合剂（以肽或肽模拟物的形式）提供了更多的指导。例如固相合成时，与待合成的肽 C-末端对应的氨基酸结合到不溶于有机溶剂的支持物上，随着反应的交替重复，具有其氨基和侧链官能团用适当的保护基团保护的氨基酸依次从 C-末端到 N-末端缩合，再释放出与树脂结合的氨基酸或肽的氨基保护基，如此延伸肽链。

[0057] 根据使用的保护基团的类型，固相合成方法主要分为 tBoc 方法和 Fmoc 方法。一般使用的保护基团包括用于氨基的 tBoc（叔丁氧基羰基），Cl-Z（2-氯苄氧羰基），Br-Z（2-溴苄氧羰基），Bzl（苄甲基），Fmoc（9-芴甲氧羰基），Mbh（4,4'-二甲氧基二苄甲基），Mtr（4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺酰基），Trt（三苄甲基），Tos（甲苯磺酰基），Z（苄氧基羰基）和 Cl₂-Bzl（2,6-二氯苄甲基）；用于胍基基团的 NO₂（硝基）和 Pmc（2,2,5,7,8-五甲基色烷-6-磺酰基）；和用于羟基的 tBu（叔丁基）。需要的肽合成后，对其进行脱保护反应并从固体支持物上将其切下。这种肽的切除反应，对于 Boc 方法可以用氟化氢或三氟代甲烷磺酸进行，而对于 Fmoc 方法则用 TFA。

[0058] 通过 DNA 重组或化学合成技术获得的 FGF2 结合剂最终要经过一次或多次的纯化。可以通过任何用于此目的的已知的方法来进行纯化，也就是，任何包括萃取，沉淀，层析，电泳等等的常规方法。例如可以使用 HPLC（高效液相色谱法）。可以利用通常用于蛋白纯化的基于水-乙腈的溶剂进行洗脱。本发明包括了本发明 FGF2 结合剂的纯化制剂。本文中使用的纯化制剂指的是本发明的化合物干重至少 1%，优选至少 5% 的制剂。

[0059] 如上所述的本发明的化合物（蛋白，肽，有机化合物）可以用做药物。优选用于抗由于血管生成改变导致的疾病。更优选由生长因子 FGF2 的活性改变引起血管生成的改变。更加优选疾病选自关节炎疾病，肿瘤转移，糖尿病性视网膜病变，牛皮癣，慢性炎症，动脉硬化或肿瘤。优选地肿瘤选自：肉瘤，癌，类癌，骨瘤或神经内分泌瘤。

[0060] 如上所述的本发明的化合物（蛋白，肽，有机化合物）可被用于抗与 FGF2 依赖的成纤维细胞或平滑肌细胞增殖不受控制，与成纤维细胞反应过度相关的瘢痕形成以及血管成形后再狭窄相关的疾病。

[0061] 事实上，本发明的 FGF2 结合肽一旦与 FGF2 结合，就成了 FGF2 的抑制剂。实际上本发明的肽能够抑制 FGF2 诱导的内皮细胞或平滑肌细胞的增殖。所以这种分子的治疗潜力在于预防和/或治疗在其中抑制 FGF2 有好处的疾病。其随后的效果还可以用来减少表达 FGF2 的细胞的数量。

[0062] 本发明的 FGF2 结合肽可被用作用于预防和 / 或治疗由血管生成改变导致的疾病的药物组合物中的活性成分,其中的血管生成改变是由于 FGF2 的活性改变引起的。所述疾病的实例是:关节炎疾病,肿瘤转移,糖尿病性视网膜病变,牛皮癣,慢性炎症,动脉硬化或肿瘤,其中肿瘤是,例如,肉瘤,癌,类癌,骨瘤或神经内分泌瘤。

[0063] 本发明的 FGF2 结合剂还可被用作用于预防和 / 或治疗与 FGF2 依赖的成纤维细胞或平滑肌细胞增殖不受抑制相关的疾病(例如与成纤维细胞反应过度相关的瘢痕形成以及血管成形后再狭窄)的药物组合物中的活性成分。

[0064] 本发明还提供了用于预防和 / 或治疗上述疾病的,含有治疗有效量的式 I 的肽或其功能衍生物以及适当的稀释剂和 / 或赋形剂和 / 或佐剂药物的药物组合物。这些药物组合物可以与药学可接受的载体,赋形剂,稳定剂,或稀释剂一起配制。根据制剂的性质,药物组合物可以用于与 CD4+T 细胞有关的疾病,例如自身免疫疾病,炎症,或感染。

[0065] 包含本发明的 FGF2 结合肽的药物组合物包括了所有的组合物,其中所述的化合物为治疗有效量,也就是在待治疗的动物中达到医学上期望的效果的有效量。药物组合物中可以包含适当的药学可接受的载体,生物学相容的适于对动物给药的介质(例如,生理盐水)和最后包含的,便于将活性化合物加工成制剂(其在药学上可被使用)的辅剂(像赋形剂,稳定剂或稀释剂)。

[0066] 药物组合物可以按照任何可接受的方法配制以满足给药方式的需要。用于药物递送的生物材料及其他聚合物的使用,以及不同的用于验证给药的特定方式的技术和模型在文献中已有披露。对本发明的化合物进行改进以促进其穿透血脑屏障也是有利的。

[0067] 本领域的技术人员可以决定并采用任何可接受的给药方式。例如,可以通过各种肠胃外途径比如经皮下,静脉内,皮内,肌内,腹膜内,鼻内,经皮,口腔,或面颊来给药。可以通过推注或长时间的平缓灌注来进行肠胃外给药。用于肠胃外给药的制剂包括无菌水或非水性溶液,悬浮剂,和乳剂,其可以包含本领域已知的助剂或赋形剂,并且可以按常规方法制备。此外,活性化合物悬浮剂如油性注射悬浮剂可以用于给药。适当的亲脂性的溶剂或介质包括脂肪油,例如,芝麻油,或合成脂肪酸酯,例如,芝麻油,或合成脂肪酸酯,例如,油酸乙酯或甘油三酸酯。

[0068] 水性注射悬浮液可以包含增加悬浮剂粘性的物质,包括,例如,羧甲基纤维素钠盐,山梨糖醇,和 / 或葡聚糖。任选地,悬浮剂还可以包含稳定剂。药物组合物包括适当的用于注射给药的溶液,并包含从大约百分之 0.01 到 99,优选从大约百分之 20 到 75 的与赋形剂一起的活性化合物。可以直肠给药的组合物包括栓剂。

[0069] 应理解的是给药剂量将取决于受体的年龄,性别,健康和体重,以及同时发生的治疗方式,如果有,还有治疗的频率,以及要求的效果的性质。正如本领域技术人员明白和可决定的,剂量要适合个体目标。每种治疗所需的总剂量可以通过多次剂量或单次剂量给药。本发明的药物组合物可以直接针对病况或针对病况的其他症状单独或连同其他的疗法给药。通常活性成分的每日剂量在 0.01 到 100 毫克每公斤体重之间。

[0070] 本发明的化合物可以在药学可接受的载体(例如生理盐水)中通过静脉内给病人施用。可以采用肽的胞内递送的标准方法,例如,通过脂质体递送。这些方法对于本领域的技术人员来说是众所周知的。本发明的制剂可以用于肠胃外给药,例如静脉内,皮下,肌内,和腹膜内。

[0071] 正如医学领域公知的,用于任何一个的病人的剂量取决于许多因素,包括病人的个体大小,体表面积,年龄,待施用的特殊化合物,性别,给药时间和途径,综合的健康状况,和将同时施用的其它药物。

[0072] 本文所有引用的文献在此以引用方式完全并入,包括被引用的参考文献中的所有数据,表格,图形和正文。此外,在本文中引用的参考文献中引用的参考文献的所有内容也以引用方式完全并入本文。无论如何,对已知方法步骤,常规方法步骤,已知的方法或常规方法的参考文献不属于在相关技术领域中披露,教导或建议本发明的任何方面,描述或具体实施方案。

[0073] 一旦了解本申请披露的方法和产品的特点,可以很容易地通过现有技术的综述推导出必要的和额外的步骤,对于描述本发明基本细节和一些应用的非限制性的附图和实施例也是如此。

附图说明

[0074] 图 1. 通过逆转录病毒转导的 N_{term} -PTX3 对 FGF2 的促有丝分裂活性的抑制。(A) 对用 EGFP, 人全长 PTX3, sC_{term} -PTX3, 或 N_{term} -PTX3 逆转录病毒感染的鼠科主动脉内皮 (MAE) 细胞的条件培养的蛋白质印迹分析。在 sC_{term} -PTX3 泳道中存在两条对应于糖基化和非糖基化形式的重组蛋白¹⁰ 的免疫反应性的条带。(B) 用 FGF2 (0.55nM) 刺激逆转录病毒感染的 MAE 细胞。48 小时后,用胰蛋白酶处理细胞并进行计数。数据表示为在模拟物感染的 FGF2 处理的细胞中观察到的增殖的百分比 (细胞群体增加 0.8 倍)。(C) 用来自感染的 MAE 细胞的条件培养基温育 GM7373 细胞并立即用 0.55nM 的 FGF2 处理。24 小时后,用胰蛋白酶处理细胞并进行计数。数据表示为在添加有 FGF2 的新鲜培养基中温育的 GM7373 细胞中观察到的增殖的百分比 (细胞群体增加 1.0 倍)。在 B 和 C 中,数据是一式三份的 3 个独立实验的平均数 $\pm$ SD。

[0075] 图 2. 重组 N_{term} -PTX3 对 FGF2/PTX3 的相互作用的抑制。(A) 由转化的大肠杆菌细胞表达并纯化重组的带 6xHis 标签的 N_{term} -PTX3 和 C_{term} -PTX3。(插图显示的是加载纯化蛋白的 SDS-PAGE 凝胶的银染)。然后,涂有 FGF2 的孔与全长 PTX3, N_{term} -PTX3 或 C_{term} -PTX3 (都是 44nM) 在 37°C 温育 30 分钟。通过与如在材料和方法中所描述的兔抗 PTX3 多克隆抗体一起温育来免疫检测与固定化的 FGF2 结合的蛋白的相对的量。(B) 在不含或含过量 10 倍摩尔量的全长 PTX3, N_{term} -PTX3 或 C_{term} -PTX3 的条件下,涂有 FGF2 的孔与生物素化 (biotinylated) 的 PTX3 (bPTX3, 22nM) 一起温育。然后,测定与固定的 FGF2 结合的 bPTX3 的量,数据表示为在不含任何竞争者的条件下测定的结合的百分比。所有的数据都是一式三份的 3 个独立实验的平均数 $\pm$ SD。

[0076] 图 3. PTX3 表位图谱。(A) 利用单克隆抗体 mAb-MNB4 和 mAb-16B5 对全长 PTX3, N_{term} -PTX3, 和 C_{term} -PTX3 (200ng/泳道) 进行蛋白质印迹分析。(B) 通过点合成技术将横跨整个人 PTX3 序列的 128 个重叠的 13 肽排列在纤维素膜上。然后,用抗体 mAb-MNB4 (黑色柱) 和 mAb-16B5 (灰色柱) 对膜进行探测,并用光密度分析法对膜上的免疫复合物进行定量分析。被两种抗体识别的 PTX3 肽的氨基酸序列以带下划线的斜体字体以单字母代码表示。

[0077] 图 4. mAb-MNB4 阻碍 FGF2/PTX3 的相互作用。(A) 用 22nM 的 bPTX3 在不含或含全

长 PTX3, mAb-MNB4, 或 mAb-16B5 (全都是 220nM) 的条件下温育涂有 FGF2 的孔。然后, 测定与固定的 FGF2 结合的 bPTX3 的量, 数据表示为在不含任何竞争者的条件下测定的结合的百分比。(B) 用 FGF2 (0.55nM) 外加 PTX3 (220nM) 在不含或含 mAb-MNB4, 或 mAb-16B5 (两者都是 2.2 μ M) 的条件下培养 GM7373 细胞。24 小时后, 用胰蛋白酶处理细胞并进行计数。数据表示为在仅用 FGF2 培养的 GM7373 细胞中观察到的增殖的百分比。所有的数据都是一式三份的 3 个独立实验的平均数 $\pm$ SD。

[0078] 图 5. 合成的 PTX3 肽对 FGF2/PTX3 相互作用的抑制。(A) 人 PTX3 的 N-末端和相关的合成 PTX3 肽的示意图。(B) 涂有标明的 PTX3 肽的孔 (200 μ g/孔) 加入 FGF2 (80nM), 并测定 FGF2 结合的量。数据是一式三份的 3 个独立实验的平均数 $\pm$ SD, 其表示为与涂有 PTX3 的孔结合的 FGF2 量的百分比。(C) 上图: FGF2 (0.8 μ M) 注射到涂有 PTX3 或明胶的 BIAcore 传感器芯片上。下图: Sensogram 覆盖板显示递增量的 FGF2 (0.1, 0.5, 0.8 和 1.1 μ M) 与固定的 PTX3 的结合。反应记录为时间函数 (以共振单位 RU 表示)。(D) 在增加浓度的全长 PTX3 (■) 或合成的 PTX3 肽 (82-110) (●), 混杂的 PTX3 (82-110) (○), 或 PTX3 (57-85) (□) 的存在下将 FGF2 (0.8 μ M) 注射到涂有 PTX3 的 BIAcore 传感芯片上。在注射结束时记录反应并绘制为拮抗剂浓度的函数。对于每一种肽, 在 2-3 个的独立实验中都得到了类似的结果。(E) 在不含 PTX3 或含 PTX3 (220nM) 或含标明的 PTX3 肽 (都是 66 μ M) 的条件下, 用 FGF2 (0.55nM) 培养 GM7373 细胞。数据是一式三份的 3 个独立实验的平均数 $\pm$ SD, 其表示为在仅用 FGF2 培养的 GM7373 细胞中观察到的增殖的百分比。

[0079] 图 6. PTX3 (97-110) 肽做为 FGF2 拮抗剂。(A) PTX3 (82-110) 区间肽示意图。(B) 涂有标明的 PTX3 肽 (200 μ g/孔) 的孔用 FGF2 (80nM) 温育并测定结合的 FGF2 的量。数据是一式三份的 3 个独立实验的平均数 $\pm$ SD, 表示为与涂有 PTX3 的孔结合的 FGF2 量的百分比。(C) 在 PTX3 (82-110) (●), PTX3 (97-110) (○), PTX3 (82-101) (■), 或 PTX3 (82-96) (▲) 浓度增加的条件将 FGF2 (0.8 μ M) 注射到涂有 PTX3 的 BIAcore 传感器芯片上。在注射结束时记录反应并绘制为拮抗剂浓度的函数。对于每一种肽, 在 2-3 个的独立实验中都得到了类似的结果。(D) 在不含或含标明的 PTX3 肽 (都是 66 μ M) 的条件下用 FGF2 (0.55nM) 温育 GM7373 细胞。数据是一式三份的 3 个独立实验的平均数 $\pm$ SD, 表示为在仅用 FGF2 温育的 GM7373 细胞中观测到的增殖的百分比。(E) 在 PTX3 (97-110) (●) PTX3 (100-110) (●), PTX3 (97-104) (▲), 或 PTX3 (97-107) (▼), PTX3 (104-113) (◆), PTX3 (100-113) (▲), PTX3 (100-104) (■) 浓度增加的条件将 FGF2 (0.8 μ M) 注射到涂有 PTX3 的 BIAcore 传感器芯片上。在注射结束时记录反应并绘制为拮抗剂浓度的函数。对于每一种肽, 在 2-3 个的独立实验中都得到了类似的结果。

[0080] 图 7. PTX3 (82-110) 肽的抗血管生成活性。在第 11 天将含有介质 (a) 或含 16pmol 的 FGF2 且不含 (b) 或含有 (c) 3nmol 的 PTX3 (82-110) 的藻酸盐珠子植入鸡胚胎绒毛尿囊膜 (CAM), 在第 14 天对其进行拍照。原始放大倍数, $\times 5$ 。

[0081] 实施例

[0082] 实施例 1

[0083] 材料和方法

[0084] 化学药品

[0085] 分别在大肠杆菌和和中国仓鼠卵巢细胞中表达人重组 FGF2 (登记号码 09038) 和

PTX3(登记号码 swi ss-prot P26022) 并依照文献^{10,19}进行纯化。合成的人 PTX3(31-60), PTX3(57-85), 和 PTX3(107-132) 肽由 Primm(Milan, 意大利) 提供, 其他所有的肽由 Tecnogen(Piana di Monteverna, Caserta, 意大利) 提供 (HPLC 纯度 $\geq 95\%$)。表 1 以单字母代码显示了所有的肽的氨基酸序列, 编号是从 PTX3 前导序列位置 1 中的甲硫氨酸残基开始。

[0086] 表 1. 人 PTX3 的 N- 末端区间的合成肽。

[0087]

肽	氨基酸序列	SEQ ID NO :
PTX3(31-60)	DNEIDNGLHPTEDPTPCDCGQEHSEWDKLF	8
PTX3(57-85)	DKLFIMLENSQMRERMLLQATDDVLRGEL	9
PTX3(82-110)	RGELQRLREELGRLAESLARPCAPGAPAE	10
混杂的 PTX3(82-110)	EGLRGELRGSREAELLRQAARAPACPLPE	11
PTX3(107-132)	APAEARLTSALDELLQATRDAGRRLA	12
PTX3(82-96)	RGELQRLREELGRLA	13
PTX3(82-101)	RGELQRLREELGRLAESLAR	14
PTX3(97-110)	ESLARPCAPGAPAE	5
PTX3(97-104)	ESLARPCA	15
PTX3(97-107)	ESLARPCAPGA	6
PTX3(100-104)	ARPCA	7
PTX3(100-110)	ARPCAPGAPAE	16
PTX3(82-99)	RGELQRLREELGRLAESL	1
PTX3(105-110)	PGAPAE	2
PTX3(97-99)	ESL	3
PTX3(105-107)	PGA	4

[0088]

[0089] 针对纯化的人 PTX3 的大鼠单克隆抗体在之前有所描述^{10,20}(MNB1 目录号 ALX-804-463, MNB4 目录号 ALX-804-464, Alexis Biochemicals)。

[0090] 细胞培养

[0091] 胎牛主动脉内皮 GM7373 细胞²¹在含有 10% 胎牛血清 (FCS) 的 Eagle's MEM 培养基中生长。人胚肾 (EcoPack2-293) 包装细胞 (Clontech, CA, 美国) 在含有 10% FCS 的 DMEM 培养基 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) 中生长。Balb/c 鼠科主动脉内皮 22106 细胞 (MAE 细胞) 获自 R. Auerbach (Wisconsin 大学, Madison, WI) 并在加有 10% FCS 的 DMEM 培养基中生长。

[0092] 逆转录病毒感染

[0093] 编码人 PTX3 和增强型绿色荧光的蛋白 (EGFP) 的 cDNA 根据已有的文献¹⁷描述获得。通过 PCR 和标准的克隆技术由 pLX-PTX3¹⁷产生编码与用于 PTX3 分泌的前导序列 PTX3(1-17) 融合的 N- 末端片段 PTX3(1-178) (Nterm-PTX3) 和 C 末端片段 PTX3(179-381) (sC_{term}-PTX3) 的 cDNA。所有的 cDNA 克隆到 pBABE 逆转录病毒载体中, 生成 pBABE-PTX3, pBABE-N_{term}-PTX3, pBABE-sC_{term}-PTX3, 和 pBABE-EGFP, 用于在 Lipofectamin¹⁷存在的条件下转染 EcoPack2-293 包装细胞 (packaging cells)。用嘌呤霉素 (1 μ g/ml, Sigma) 筛选转导的细胞, 持续 2 周。病毒滴定度高于 10⁶cfu/mL 的克隆用于进一步的实验。然后在含有聚凝胺 (8 μ g/ml, Sigma) 的条件下, 将 MAE 细胞的铺满培养物用来自 pBABE-PTX3, pBABE-N_{term}-PTX3, pBABE-sC_{term}-PTX3, 或 pBABE-EGFP 包装细胞的培养液温育 24 小时。

用嘌呤霉素筛选受感染的细胞群并持续 7 天。用落射荧光显微镜 (Axiovert S100 显微镜, $\times 10/0.25$; Zeiss **Göttingen**, 德国) 对感染 EGFP 细胞的观测显示逆转录病毒的感染效率高于 80%。为了评定受感染细胞的转基因蛋白的表达和释放的水平, 在无血清条件下培养细胞 2 天。然后, 收集条件培养基, 离心分离, 用 Centricon YM-10 过滤器 (Millipore) 浓缩 10 倍, 取 100 μ l 的等分试样进行蛋白质印迹检测分析。

[0094] 细胞增殖试验

[0095] 按照文献描述²² 用内皮细胞进行细胞增殖试验。简而言之, GM7373 或 MAE 细胞接种在 96 孔的平皿中, 接种量分别为 75,000 细胞/ cm^2 或 25,000 细胞/ cm^2 。16 小时后, 在含或不含不同拮抗剂条件下, 在包含 0.4% FCS 外加 FGF2 (0.55nM) 的新鲜培养基中温育细胞。分别在 24 或 48 小时后, 在 Burkner 小室中对细胞进行胰蛋白酶处理和计数。

[0096] 重组的带 6xHis- 标签的 PTX3 片段的大肠杆菌的表达和纯化

[0097] 利用含外加的核苷酸的引物通过 PCR 由 pLX-PTX3 扩增出 N_{term} -PTX3 和 C_{term} -PTX3 的 cDNA:

[0098] PTX3-N:

[0099] (+) CACCGAGAACTCGGATGATTATGA8 (SEQ ID 17);

[0100] (-) TTAACCTGCCGGCAGCCAGCTCC (SEQ ID 18);

[0101] PTX3-C:

[0102] (+) CACCTGTGAAACAGCTATTTTA (SEQ ID19);

[0103] (-) TTATGAAACATACTGAGCTCC (SEQ ID 20).

[0104] 将这些 cDNA 克隆到 pENTR TOPO 载体中 (pENTR Diectinonal TOPOCloningKit, Invitrogen) 并测序。然后利用 **Gateway**® 技术 (Invitrogen), 将源自 pENTR TOPO 载体的 N_{term} -PTX3 和 C_{term} -PTX3 的 cDNA 克隆到 pDEST17 载体中, 使得 6xHis 标签插入到重组蛋白的 C- 末端上。然后用这两个重组质粒转化大肠杆菌 BL21-AI 细胞 (Invitrogen), 并使大肠杆菌在 37°C 下, 在含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基上生长。在 0.2% 的 L- 阿拉伯糖存在的条件下, 30°C 培养过夜以诱导重组蛋白的表达。诱导后, 将细胞重悬于缓冲溶液中 (20mM 磷酸钠, 0.5M NaCl, 10mM 咪唑, pH7.4) 并用超声处理使细胞裂解。澄清的悬浮液用 0.45 μ m 的过滤器过滤并上样到 3.0ml HiTrap Immobilized MetalAffinity Column (IMAC) (Amersham Biosciences) 上用镍提纯。用含有 100mM 咪唑的结合缓冲液冲洗层析柱, 并依照厂商的说明用 300mM 的咪唑洗脱下结合的蛋白。通过免疫印记探测出含有重组蛋白的流分, 收集阳性流分并在 PBS 中通过凝胶过滤层析法 (Sephadex G25column PD10, Amersham) 进行脱盐。通过 SDS-PAGE 随后为凝胶的银染的测定显示重组蛋白的纯度高于 90% (参见图 2A 的插图)。

[0105] 固相结合试验

[0106] 在 4°C 下用含有 FGF2 (270nM) 100 μ l/ 孔 100mM NaHCO_3 , pH9.6 (覆盖缓冲液) 温育的 ELISA 微平板 16 小时。然后, 在室温下用含 5% 脱脂奶粉的覆盖缓冲液涂敷小孔 2 小时。接下来, 在 37°C 在涂有 FGF2 的小孔上温育 100 μ l 等份试样的含有全长 PTX3, 重组 N_{term} -PTX3 或 C_{term} -PTX3 (全都是 44nM) 的 PBS30 分钟。然后, 用兔抗 PTX3 的多克隆抗体 (1:2000 稀释) (在蛋白质印迹和 ELISA 中, 该抗体以相同的效率识别 PTX3 片段) 在 37°C

继续温育小孔 1 小时,用抗兔生物素化的抗体 (1 : 2000),和 100 μ l 的抗生蛋白链菌素-辣根过氧化物酶 (1 : 5000,Amersham) 在室温下温育 1 小时。然后加入 100 μ l/ 孔的色原体底物 2,29- 联氨基-双-(3- 乙基苯并二氢噻唑磺酸) (2,29-azinobis(3-ethylbenzthiazolinesulfonicacid))。在自动 ELISA 读取器中读取 405nm 处的吸光值。在某些实验中,是在有或者没有竞争物的条件下在涂有 FGF2 的小孔上,于 37°C 温育 100 μ l 等份试样的含有生物素标记的 PTX3 (bPTX3) (22nM) 的 PBS30 分钟。然后,冲洗小孔,并如文献描述¹⁷ 测定结合 bPTX3 的量。可选择地,将合成的 PTX3 肽如上所述固定到 ELISA 的微平板孔上 (200 μ g/ 孔)。然后,加入 FGF2 (80nM),并如上所述通过用兔抗 FGF2 的多克隆抗体 (1 : 7000) 在 37°C 温育 1 小时,随后为免疫复合物检测,对与固定肽结合的 FGF2 进行检测。

[0107] PTX3 表位图谱

[0108] 为了确定与抗 PTX3 单克隆抗体结合的表位的氨基酸序列,通过点合成技术²³ 将 128 个肽排列在纤维素膜上。肽长度是 13 个氨基酸,且具有 3 个氨基酸的移码。用在 Tween-TBS (MBS) 中的 2% 的牛奶在 4°C 封闭膜 16 小时。洗涤后,用单克隆抗体 mAb MNB4 或 mAb16B5 (都是在 MBS 中 1 : 1000 稀释) 在 37°C 孵育薄膜 90 分钟,然后再用兔的碱性磷酸酶缀合的抗大鼠 IgG (1 : 30,000, Sigma) 在 MBS 中于 37°C 孵育 90 分钟。如文献描述²³ 发生显色反应,利用光密度分析法对薄膜的信号强度进行检测。

[0109] BIAcore 结合试验

[0110] 采用 BIAcore X 设备 (BIAcore Inc, Piscataway, NJ)。利用表面等离子体共振来检测由 FGF2 结合固定在 BIAcore 传感器芯片上的 PTX3 的能力引起的折射率变化。为此,允许 PTX3 (2.2 μ M) 与 CM4 传感器芯片的流动细胞反应,所述细胞提前用 50 μ l 的 0.2M N- 乙基-N'-(3- 二甲基氨基丙基)- 碳二亚胺氢氯化物与 0.05M 的 N- 羟基琥珀酰亚胺的混合物激活。这些实验条件得以固定住 5,000 共振单位 (RUs),相当于大约 0.1pmol 的 PTX3。明胶固定也获得了类似的结果,其作为阴性对照,用于空白扣除。然后,在有或者没有合成 PTX3 肽的条件下,用 4 分钟将浓度增加的 FGF2 注射到覆盖在 PTX3 表面的稀释缓冲液 (PBS 外加 0.005% 表面活性剂 P20, 5.0 μ g/mL 的 CaCl_2 和 MgCl_2) 中 (使得其与固定的 PTX3 接触),然后洗涤直至观察到分离。

[0111] 鸡胚胎绒毛尿囊膜 (CAM) 试验

[0112] 如文献描述²⁴ 制备包含介质或 16pmol 的 FGF2,并含有或者不含合成的 PTX3 肽的藻酸盐珠子 (5 μ l) 并在温育的第 11 天将其置于受精的白色来亨鸡卵的 CAM 的顶端 (每实验组 10 个鸡卵)。72 小时后,在立体显微镜 (STEMI-SR, $\times 2/0.12$; Zeiss) 下两个观测者以双盲的方式统计朝着植入物方向汇合的血管。

[0113] 结果

[0114] PTX3N- 末端区域结合 FGF2

[0115] PTX3 蛋白的特点在于与经典的短正五聚蛋白 CRP 和 SAP 同源的 C 末端 203 氨基酸区域 (C_{term} -PTX3),以及显示出与任何其他已知的蛋白没有任何明显的同源性 N- 末端 178- 氨基酸扩展区 (N_{term} -ptx3)⁸。在鉴定 PTX3 的抗血管生成的 FGF2 结合结构域的尝试中,评估了 C_{term} 或 N_{term} -PTX3 部分与 FGF2 相互作用的能力。

[0116] 上述的观测显示由于释放的 PTX3 结合到外源生长因子上和它的胞外环境聚集¹⁷, 所以全长 PTX3 的过表达导致内皮细胞中 FGF2 依赖的增殖被抑制。在此基础上,用含有人

全长 PTX3, PTX3N- 末端扩展区 N_{term} -PTX3, 或与 PTX3 前导序列融合用于分泌的 PTX3C- 末端 (sC_{term} -PTX3) 的逆转录病毒感染鼠科主动脉内皮 (MAE) 细胞。对照细胞用含 EGFP 的逆转录病毒感染。受感染的细胞过表达并释放出相似数量的相应蛋白 (图 1A), 而且显示出在基本条件下相似的生长速度。然而, 在对外源 FGF2 响应时, 与全长 PTX3 过表达类似, N_{term} -PTX3 的过表达导致受感染细胞增殖能力的明显下降 (图 1B)。当与受 EGFP 感染的对照细胞相比时, sC_{term} -PTX3 的过表达反而没有产生抑制。

[0117] 为了进一步确定 N_{term} -PTX3 作为 FGF2 拮抗剂的能力, 用被感染的 MAE 细胞的条件培养基来评估其影响内皮 GM7373 细胞的 FGF2 依赖的增殖的能力 (图 1C)。如同预期的, 在 N_{term} -PTX3 感染或 PTX3 感染的 MAE 细胞的条件培养基存在的条件下, 用 FGF2 温育 GM7373 细胞导致对生长因子的促有丝分裂活性的明显抑制, 而 sC_{term} -PTX3 感染的和 EGFP 感染的 MAE 细胞的条件培养基却没有效果 (图 1C)。所有条件培养基都不导致由 10% FCS 引起的 GM7373 细胞增殖的明显抑制, 因此证实了作用的特异性。

[0118] 为了证实 N_{term} -PTX3 的 FGF2 拮抗活性是由于其与生长因子直接相互作用的能力, 由转化的大肠杆菌表达和纯化重组的带 6xHis- 标签的蛋白 N_{term} PTX3; 纯化的重组的带 6xHis- 标签的 C_{term} -PTX3 用作对照 (图 2A, 插图)。当评估 FGF2 的相互作用时, 全长 PTX3 和重组的 N_{term} -PTX3 片段显示出与固定在非组织培养的塑料制品上的 FGF2 结合的能力。相反没有观察到与重组 C_{term} -PTX3 间的相互作用 (图 2A)。因此, 过量 10 倍摩尔量的重组 N_{term} -PTX3 或全长 PTX3, 而不是 C_{term} -PTX3, 阻止了生物素化的 PTX3 (bPTX3) 与固定的 FGF2 的结合 (图 2B)。

[0119] 综上所述, 这些结果暗示了 PTX3N- 末端区域与 FGF2 的相互作用。

[0120] 抗 N_{term} -PTX3 的单克隆抗体对 FGF2/PTX3 相互作用的抑制

[0121] 针对抗人全长 PTX3 的一组大鼠单克隆抗体的筛选鉴定出抗体 mAb-MNB4²⁰ (MNB4 目录号 ALX-804-464, Alexis Biochemicals) 和 mAb-16B5¹⁰ (MNB1 目录号 ALX-804-463, Alexis Biochemicals), 二者在蛋白质印迹中分别选择性地结合重组 N_{term} -PTX3 和 C_{term} -PTX3 (图 3A)。

[0122] 为了标出被两种抗体识别的 PTX3 表位, 作者利用了点合成技术²³, 通过这种技术在纤维素膜上排列了横跨全部人 PTX3 序列的 128 个重叠的 13 肽。当用二个单克隆抗体对该膜进行探测时, 免疫复合物检测显示 mAb-MNB4 识别存在于 PTX3N- 末端扩展区的表位 PTX3 (87-99), 而 mAb-16B5 识别位于 PTX3C- 末端区域的表位 PTX3 (306-312) (图 3B)。

[0123] 当针对影响 FGF2/PTX3 相互作用的能力进行测试时, mAb-MNB4, 而不是 mAb-16B5, 阻止了 bPTX3 与固定的 FGF2 的结合, 类似于过量摩尔量的游离的无标记的 PTX3 (图 4A)。因此, mAb-MNB4 消除了全长 PTX3 在内皮 GM7373 细胞中抑制由 FGF2 产生的促有丝分裂活性的能力, 而 mAb-16B5 则没有作用 (图 4B)。因此, mAb-MNB4 对 N- 末端 PTX3 (87-99) 表位的识别中和了 FGF2/PTX3 的相互作用。

[0124] 做为 FGF2 拮抗剂的合成的 N_{term} -PTX3 相关肽

[0125] 为了进一步确定在 PTX3N- 末端扩展区域中的 FGF2 结合区, 发明人对合成肽 PTX3 (82-110) 以及部分横跨 N_{term} -PTX3 氨基酸序列的三个不同的合成肽 PTX3 (31-60), PTX3 (57-85), 和 PTX3 (107-132) 的 FGF2 拮抗活性进行了评估, 所述合成肽 PTX3 (82-110) 包含被中和性 mAb-MNB4 识别的 PTX3 (87-99) 表位 (参见上面) (图 5A)。

[0126] 在第一组实验中,在固相结合试验中,评价了四个合成的PTX3片段与FGF2相互作用的能力。如图5B所示,游离的FGF2与固定在非组织培养的塑料制品上的PTX3(82-110)结合,而不是与固定的PTX3(31-60)或PTX3(57-85)结合,与固定的PTX3(107-132)仅显示出有限的相互作用。

[0127] 接下来,利用表面等离子共振(surface plasmon resonance)来评价四种肽影响FGF2/PTX3相互作用的能力。结果显示,FGF2($0.8\mu\text{M}$)具有很强的与固定在BIAcore传感器芯片上的PTX3结合的能力(在注射阶段末期结合了350-400RU)(图5C,上图)。与涂有明胶的传感器芯片没有结合证明了相互作用的特异性。还将浓度增加的FGF2(从 0.1 到 $1.1\mu\text{M}$,图5C,下图)注射在PTX3表面上,以测定FGF2/PTX3相互作用的动力学参数。结合数据证明发生的相互作用的动力学解离常数(k_{off})是 $6\times 10^{-5}\text{s}^{-1}$,动力学缔合常数(K_{on})是 $0.2\times 10^3\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$,因此产生的Kd值等于 $0.3\times 10^{-6}\text{M}^{-1}$ 。在此基础上,在流动相中评估了四种合成的PTX3肽整合FGF2的能力,由此阻止了FGF2与PTX3传感器芯片相互作用。如图5D所示,PTX3(82-110)以剂量依赖方式抑制了FGF2与PTX3表面的结合,其效力比游离的全长PTX3所显示出的效力低30倍(而对于游离的PTX3和PTX3(82-110)肽 ID_{50} 分别等于 $1.0\mu\text{M}$ 和 $30\mu\text{M}$)。在同样的实验条件下,使用PTX3(31-60),PTX3(57-85),和PTX3(107-132)肽反而没有抑制效果(图5D及其他搜集的数据)。还有,氨基酸组成相当于PTX3(82-110)的混杂的合成肽(scrambled synthetic peptide)[sPTX3(82-110),表1]显示出有限的抑制效果($\text{ID}_{50}>3000\mu\text{M}$)(图5D),由此表明PTX3(82-110)中的一级氨基酸序列对FGF2相互作用是很重要的。

[0128] PTX3(82-110)肽与FGF2的结合能力促使了发明人对其做为FGF2拮抗剂的能力进行评价。当对内皮GM7373细胞进行试验时,全长PTX3和PTX3(82-110)都能抑制由外源FGF2产生的促有丝分裂活性,而混杂的PTX3(82-110),PTX3(31-60),PTX3(57-85),和PTX3(107-132)肽则没有作用(图5E)。剂量响应曲线证实PTX3(82-110)的FGF2拮抗活性是剂量依赖型的(对于PTX3(82-110)和PTX3, ID_{50} 分别等于 $30\mu\text{M}$ 和 30nM)。

[0129] PTX3的N-末端扩展区域中最小的线性FGF2结合序列的识别

[0130] 综上所述,上述数据表明在PTX3N-末端扩展区域中的线性氨基酸序列82-110在FGF2相互作用中起着重要的作用。在试图鉴定最小的线性FGF2结合序列时,在固相结合试验中,横跨整个PTX3(82-110)序列的三个重叠的合成肽PTX3(82-96),PTX3(82-101),和PTX3(97-110)(图6A和表1)被用来评估其与FGF2相互作用的能力。在同样的实验条件下,游离的FGF2与固定的PTX3(97-110)结合,与亲本PTX3(82-110)和全长PTX3一样,而与PTX3(82-96)或PTX3(82-101)没有相互作用(图6B)。因此,在流动相中,PTX3(97-110)结合FGF2,由此阻止了FGF2与固定在BIAcore传感器芯片上的PTX3相互作用(图6C)。PTX3(97-110)的抑制活性与亲本肽PTX3(82-110)类似,而PTX3(82-96)和PTX3(82-101)则没有作用(图6C)。与这些观测相一致的是,在内皮GM7373细胞中PTX3(97-110),而不是PTX3(82-96)或PTX3(82-101)抑制了由FGF2产生的促有丝分裂活性(图6D)。

[0131] 为了进一步研究横跨肽PTX3(97-110)的最小的线性FGF2结合序列,发明人通过测定FGF2与固定在BIAcore传感器芯片上的PTX3相互作用分析了下列短肽与FGF2的结合:PTX3(97-107),PTX3(97-104),PTX3(100-104)和PTX3(100-110),(图6E)。肽PTX3(97-107)和PTX3(100-104)显示出明显的与FGF2的结合。相反,肽PTX3(97-104)和

PTX3(100-110) 则没有阻止游离的 FGF2 与固定在 BIAcore 传感器芯片上的 PTX3 结合 (图 6E)。因此,PTX3(100-104) 似乎代表了在 PTX3N- 末端扩展区域中最小的线性 FGF2 结合氨基酸序列。因此,PTX3(100-104) 抑制 FGF2 诱导的内皮细胞增殖。

[0132] 合成的 N_{term} -PTX3 相关肽抑制 FGF2 的血管生成活性

[0133] 为了评估 N_{term} -PTX3- 相关肽影响体内 FGF2 诱导的新血管形成的能力,将仅吸附 FGF2 或添加有 PTX3 肽的海绵胶植入 11 天的鸡胚 CAMs 的顶端。如图 7 所示,与吸附介质的藻酸盐珠子相比,吸附 FGF2(16pmol/ 胚胎) 的珠子产生有效的血管生成反应 (肉眼可见朝着植入物的血管会聚,对于二个实验组分别为 44 ± 7 和 11 ± 5 条血管 / 胚胎)。与体外观测一致的是,通过在 FGF2 植入物中加入 3.0nmol 的 PTX3(82-110) 肽,体内 FGF2 依赖的血管生成反应明显减少 (28 ± 5 条血管 / 胚胎,方差分析 $p < 0.05$) (图 7)。因此,80nmol 的 PTX3(97-110) 导致由 FGF2 引起的血管生成反应 50% 被抑制;PTX3(82-96) 反而无效。

[0134] 讨论

[0135] 发明人指出 FGF2 的相互作用是由 PTX3 的 N- 末端扩展区域介导的。还有,用中和性单克隆抗体和合成的 PTX3 相关肽进行的实验指出氨基酸线性序列 PTX3(97-110) 是造成该相互作用的原因。这些结论是以下列实验证据为基础的:i) 短正五聚蛋白 CRP 和 SAP 是低效率的 FGF2 结合剂¹⁷ 尽管它们的序列与 PTX3 的 C- 末端同源⁷;ii) PTX3 的 N- 末端片段 (1-178) (N_{term} -PTX3),而不是 sC_{term} -PTX3 的逆转录病毒转导在内皮细胞中抑制了由外源的 FGF2 产生的促有丝分裂活性;iii) 重组 N_{term} -PTX3,而不是 C_{term} -PTX3,与固定的 FGF2 结合并抑制 PTX3/FGF2 的相互作用;iv) 针对线性表位 PTX3(87-99) 的单克隆抗体 mAb-MNB4 阻止了 FGF2/PTX3 的相互作用并在内皮细胞中消除了 PTX3 的 FGF2 拮抗活性;v) 基于 PTX3 的 N- 末端不同区域的合成的肽 PTX3(82-110) 和较短的肽 PTX3(97-110),PTX3(97-107) 和 PTX3(100-104),而不是其他的肽,通过结合 FGF2 阻止了 FGF2/PTX3 的相互作用,由此抑制了体外 FGF2 依赖的内皮细胞增殖和体内的血管生成。

[0136] PTX3 由巨噬细胞²⁷,成纤维细胞⁹,成肌细胞²⁸,小胶质细胞²⁹,和内皮细胞⁸ 产生,表明它对内皮能够产生旁分泌 (paracrine) 和自分泌 (autocrine) 的功能。类似地,各种刺激,包括炎症介质 IL-1 和一氧化氮^{30,31} 在遭受刺激的自分泌环的内皮细胞中诱导 FGF2 的表达。因此,PTX3 和 FGF2 都可以由内皮细胞及其它类型的细胞表达。因此,由炎症细胞或内皮细胞自身产生的 PTX3 可以在体外和体内影响由内皮上的 FGF2 产生的自分泌和旁分泌活性。这些将允许通过血管生成抑制剂和刺激剂的产生来精密调节新血管形成。

[0137] FGF2 是多效性的生长因子,其刺激各种内胚层和中胚层起源的细胞类型³²。因此,在各种病理生理条件下由 FGF2 产生的作用不限于其血管生成活性。例如,FGF2 刺激伤口愈合期间的成纤维细胞以及动脉粥样硬化^{33,34} 和再狭窄³⁵ 期间的平滑肌细胞的迁移和增殖。同时,它可以在受损的中枢神经系统中促进神经元细胞的存活和神经胶质细胞的增殖³⁶。在所有的这些情况中,PTX3 的伴随产生^{37,38} 调节由这些细胞上的 FGF2 产生的活性。事实上 PTX3 体外抑制 FGF2 依赖的平滑肌细胞活化,体内抑制在动脉受损后的内膜加厚¹⁸。

[0138] 总之,发明人首次证明了 PTX3 的 N- 末端涉及 FGF2 的相互作用。PTX3 在先天免疫,炎症,基质沉积,和雌性生育力之间的交叉点是个多功能的可溶解的模式识别受体。它通过与许多具有不同分子性质的配体相互作用发挥其多功能的活性。

[0139] 参考文献

- [0140] 1. Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol.* 2005 ;23:337-366
- [0141] 2. Steel DM, Whitehead AS. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today.* 1994 ;15:81-88
- [0142] 3. Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol.* 1983 ;34:141-212
- [0143] 4. Du Clos TW. The interaction of C-reactive protein and serum amyloid P component with nuclear antigens. *Mol Biol Rep.* 1996 ;23:253-260
- [0144] 5. Gewurz H, Zhang XH, Lint TF. Structure and function of the pentraxins. *Curr Opin Immunol.* 1995 ;7:54-64
- [0145] 6. Nauta AJ, Daha MR, van Kooten C, Roos A. Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. *Trends Immunol.* 2003 ;24:148-154
- [0146] 7. Goodman AR, Cardozo T, Abagyan R, Altmeyer A, Wisniewski HG, Vilcek J. Long pentraxins: an emerging group of proteins with diverse functions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996 ;7:191-202
- [0147] 8. Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, Peri G, Bottazzi B, Bairoch A, Saccone S, Marzella R, Predazzi V, Rocchi M, et al. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem.* 1992 ;267:22190-22197
- [0148] 9. Lee GW, Lee TH, Vilcek J. TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentaxin family of acute phase proteins. *J Immunol.* 1993 ;150:1804-1812
- [0149] 10. Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A, De Gioia L, Matteucci C, Peri G, Spreafico F, Pausa M, D'Ettore C, Gianazza E, Tagliabue A, Salmona M, Tedesco F, Introna M, Mantovani A. Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem.* 1997 ;272:32817-32823
- [0150] 11. Basile A, Sica A, d'Aniello E, Breviario F, Garrido G, Castellano M, Mantovani A, Introna M. Characterization of the promoter for the human long pentraxin PTX3. Role of NF-kappaB in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta regulation. *J Biol Chem.* 1997 ;272:8172-8178
- [0151] 12. Salustri A, Garlanda C, Hirsch E, De Acetis M, Maccagno A, Bottazzi B, Doni A, Bastone A, Mantovani G, Bock Peccoz P, Salvatore G, Mahoney DJ, Day AJ, Siracusa G, Romani L, Mantovani A. PTX3 plays a key role in the organization

of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. Development. 2004 ;131:1577-1586

[0152] 13. Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, Salustri A, De Acetis M, Nota R, Maccagno A, Riva F, Bottazzi B, Peri G, Doni A, Vago L, Botto M, De Santis R, Carminati P, Siracusa G, Altruda F, Vecchi A, Romani L, Mantovani A. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. Nature. 2002 ;420:182-186

[0153] 14. Mantovani A, Garlanda C, Bottazzi B. Pentraxin 3, a non-redundant soluble pattern recognition receptor involved in innate immunity. Vaccine. 2003 ;21 Suppl 2: S43-47

[0154] 15. Gerwins P, Skoldenbergh E, Claesson-Welsh L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. Crit Rev. Oncol. Hematol. 2000 ;34:185-194

[0155] 16. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. Cytokine Growth Factor Rev. 2005 ;16:159-178

[0156] 17. Rusnati M, Camozzi M, Moroni E, Bottazzi B, Peri G, Indraccolo S, Amadori A, Mantovani A, Presta M. Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. Blood. 2004 ;104:92-99

[0157] 18. Camozzi M, Zacchigna S, Rusnati M, Coltrini D, Ramirez-Correa G, Bottazzi B, Mantovani A, Giacca M, Presta M. Pentraxin 3 inhibits fibroblast growth factor 2-dependent activation of smooth muscle cells in vitro and neointima formation in vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 ;25:1837-1842

[0158] 19. Isacchi A, Statuto M, Chiesa R, Bergonzoni L, Rusnati M, Sarmientos P, Ragnotti G, Presta M. A six-amino acid deletion in basic fibroblast growth factor dissociates its mitogenic activity from its plasminogen activator-inducing capacity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 ;88:2628-2632

[0159] 20. Peri G, Introna M, Corradi D, Iacuitti G, Signorini S, Avanzini F, Pizzetti F, Maggioni AP, Moccetti T, Metra M, Cas LD, Ghezzi P, Sipe JD, Re G, Olivetti G, Mantovani A, Latini R. PTX3, A prototypic long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. Circulation. 2000 ;102:636-641

[0160] 21. Ginspan JB, Mueller SN, Levine EM. Bovine endothelial cells transformed in vitro by benzo(a)pyrene. J Cell Physiol. 1983 ;114:328-338

[0161] 22. Presta M, Maier JA, Rusnati M, Ragnotti G. Basic fibroblast growth factor: production, mitogenic response, and post-receptor signal transduction in cultured normal and transformed fetal bovine aortic endothelial cells. J Cell Physiol. 1989 ;141:517-526

[0162] 23. Frank R, Overwin H. SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. Methods Mol Biol. 1996 ;66:149-169

- [0163] 24. Knoll A, Schmidt S, Chapman M, Wiley D, Bulgrin J, Blank J, Kirchner L. A comparison of two controlled-release delivery systems for the delivery of amiloride to control angiogenesis. *Microvasc Res.* 1999 ;58:1-9
- [0164] 25. Emsley J, White HE, O' Hara BP, Oliva G, Srinivasan N, Tickle IJ, Blundell TL, Pepys MB, Wood SP. Structure of pentameric human serum amyloid P component. *Nature.* 1994 ;367:338-345
- [0165] 26. Eriksson AE, Cousens LS, Weaver LH, Matthews BW. Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991 ;88:3441-3445
- [0166] 27. Vouret-Craviari V, Matteucci C, Peri G, Poli G, Introna M, Mantovani A. Expression of a long pentraxin, PTX3, by monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipooligosaccharide. *Infect Immun.* 1997 ;65:1345-1350
- [0167] 28. Introna M, Alles VV, Castellano M, Picardi G, De Gioia L, Bottazzai B, Peri G, Breviaro F, Salmona M, De Gregorio L, Dragani TA, Srinivasan N, Blundell TL, Hamilton TA, Mantovani A. Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. *Blood.* 1996 ;87:1862-1872
- [0168] 29. Polentarutti N, Bottazzi B, Di Santo E, Blasi E, Agnello D, Ghezzi P, Introna M, Bartfai T, Richards G, Mantovani A. Inducible expression of the long pentraxin PTX3 in the central nervous system. *J Neuroimmunol.* 2000 ;106:87-94
- [0169] 30. Samaniego F, Markham PD, Gendelman R, Gallo RC, Ensoli B. Inflammatory cytokines induce endothelial cells to produce and release basic fibroblast growth factor and to promote Kaposi's sarcoma-like lesions in nude mice. *J Immunol.* 1997 ;158:1887-1894
- [0170] 31. Ziche M, Parenti A, Ledda F, Dell'Era P, Granger HJ, Maggi CA, Presta M. Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. *Circ Res.* 1997 ;80:845-852
- [0171] 32. Rifkin DB, Moscatelli D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol.* 1989 ;109:1-6
- [0172] 33. Blotnick S, Peoples GE, Freeman MR, Eberlein TJ, Klagsbrun M. T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 ;91:2890-2894
- [0173] 34. Peoples GE, Blotnick S, Takahashi K, Freeman MR, Klagsbrun M, Eberlein TJ. T lymphocytes that infiltrate tumors and atherosclerotic plaques produce heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor: a potential pathologic role. *Proc Natl Acad Sci U S*

A. 1995 ;92:6547-6551

[0174] 35. Reidy MA, Fingerle J, Lindner V. Factors controlling the development of arterial lesions after injury. *Circulation*. 1992 ;86:III43-46

[0175] 36. Logan A, Berry M. Transforming growth factor-beta 1 and basic fibroblast growth factor in the injured CNS. *Trends Pharmacol Sci*. 1993 ;14:337-342

[0176] 37. Ravizza T, Moneta D, Bottazzi B, Peri G, Garlanda C, Hirsch E, Richards GJ, Mantovani A, Vezzani A. Dynamic induction of the long pentraxin PTX3 in the CNS after limbic seizures: evidence for a protective role in seizure-induced neurodegeneration. *Neuroscience*. 2001 ;105:43-53

[0177] 38. Rolph MS, Zimmer S, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A, Hansson GK. Production of the long pentraxin PTX3 in advanced atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 ;22:e10-14

[0001]	序列表
[0002]	<110>TECNOGEN S. C. p. a.
[0003]	PRESTA, Marco
[0004]	CAMOZZI, Maura
[0005]	RUSNATI, Marco
[0006]	COLOMBO, Maurizio
[0007]	MASTROIANNI, Domenico
[0008]	<120>FGF2 结合肽及其用途
[0009]	<130>PCT 96729
[0010]	<150>EP 06 001 457.8
[0011]	<151>2006-01-24
[0012]	<160>20
[0013]	<170>PatentIn version 3.3
[0014]	<210>1
[0015]	<211>18
[0016]	<212>PRT
[0017]	<213> 人工序列
[0018]	<220>
[0019]	<223> 合成肽
[0020]	<400>1
[0021]	Arg Gly Glu Leu Gln Arg Leu Arg Glu Glu Leu Gly Arg Leu Ala Glu
[0022]	1 5 10 15
[0023]	Ser Leu
[0024]	<210>2
[0025]	<211>6
[0026]	<212>PRT
[0027]	<213> 人工序列
[0028]	<220>
[0029]	<223> 合成肽
[0030]	<400>2
[0031]	Pro Gly Ala Pro Ala Glu
[0032]	1 5
[0033]	<210>3
[0034]	<211>3
[0035]	<212>PRT
[0036]	<213> 人工序列
[0037]	<220>
[0038]	<223> 合成肽

[0039]	<400>3
[0040]	Glu Ser Leu
[0041]	1
[0042]	<210>4
[0043]	<211>3
[0044]	<212>PRT
[0045]	<213> 人工序列
[0046]	<220>
[0047]	<223> 合成肽
[0048]	<400>4
[0049]	Pro Gly Ala
[0050]	1
[0051]	<210>5
[0052]	<211>14
[0053]	<212>PRT
[0054]	<213> 人工序列
[0055]	<220>
[0056]	<223> 合成肽
[0057]	<400>5
[0058]	Glu Ser Leu Ala Arg Pro Cys Ala Pro Gly Ala Pro Ala Glu
[0059]	1 5 10
[0060]	<210>6
[0061]	<211>11
[0062]	<212>PRT
[0063]	<213> 人工序列
[0064]	<220>
[0065]	<223> 合成肽
[0066]	<400>6
[0067]	Glu Ser Leu Ala Arg Pro Cys Ala Pro Gly Ala
[0068]	1 5 10
[0069]	<210>7
[0070]	<211>5
[0071]	<212>PRT
[0072]	<213> 人工序列
[0073]	<220>
[0074]	<223> 合成肽
[0075]	<400>7
[0076]	Ala Arg Pro Cys Ala
[0077]	1 5

[0078]	<210>8
[0079]	<211>30
[0080]	<212>PRT
[0081]	<213> 人工序列
[0082]	<220>
[0083]	<223> 合成肽
[0084]	<400>8
[0085]	Asp Asn Glu Ile Asp Asn Gly Leu His Pro Thr Glu Asp Pro Thr Pro
[0086]	1 5 10 15
[0087]	Cys Asp Cys Gly Gln Glu His Ser Glu Trp Asp Lys Leu Phe
[0088]	20 25 30
[0089]	<210>9
[0090]	<211>29
[0091]	<212>PRT
[0092]	<213> 人工序列
[0093]	<220>
[0094]	<223> 合成肽
[0095]	<400>9
[0096]	Asp Lys Leu Phe Ile Met Leu Glu Asn Ser Gln Met Arg Glu Arg Met
[0097]	1 5 10 15
[0098]	Leu Leu Gln Ala Thr Asp Asp Val Leu Arg Gly Glu Leu
[0099]	20 25
[0100]	<210>10
[0101]	<211>29
[0102]	<212>PRT
[0103]	<213> 人工序列
[0104]	<220>
[0105]	<223> 合成肽
[0106]	<400>10
[0107]	Arg Gly Glu Leu Gln Arg Leu Arg Glu Glu Leu Gly Arg Leu Ala Glu
[0108]	1 5 10 15
[0109]	Ser Leu Ala Arg Pro Cys Ala Pro Gly Ala Pro Ala Glu
[0110]	20 25
[0111]	<210>11
[0112]	<211>29
[0113]	<212>PRT
[0114]	<213> 人工序列
[0115]	<220>
[0116]	<223> 合成肽

[0117]	<400>11
[0118]	Glu Gly Leu Arg Gly Glu Leu Arg Gly Ser Arg Glu Ala Glu Leu Leu
[0119]	1 5 10 15
[0120]	Arg Gln Ala Ala Arg Ala Pro Ala Cys Pro Leu Pro Glu
[0121]	20 25
[0122]	<210>12
[0123]	<211>26
[0124]	<212>PRT
[0125]	<213> 人工序列
[0126]	<220>
[0127]	<223> 合成肽
[0128]	<400>12
[0129]	Ala Pro Ala Glu Ala Arg Leu Thr Ser Ala Leu Asp Glu Leu Leu Gln
[0130]	1 5 10 15
[0131]	Ala Thr Arg Asp Ala Gly Arg Arg Leu Ala
[0132]	20 25
[0133]	<210>13
[0134]	<211>15
[0135]	<212>PRT
[0136]	<213> 人工序列
[0137]	<220>
[0138]	<223> 合成肽
[0139]	<400>13
[0140]	Arg Gly Glu Leu Gln Arg Leu Arg Glu Glu Leu Gly Arg Leu Ala
[0141]	1 5 10 15
[0142]	<210>14
[0143]	<211>20
[0144]	<212>PRT
[0145]	<213> 人工序列
[0146]	<220>
[0147]	<223> 合成肽
[0148]	<400>14
[0149]	Arg Gly Glu Leu Gln Arg Leu Arg Glu Glu Leu Gly Arg Leu Ala Glu
[0150]	1 5 10 15
[0151]	Ser Leu Ala Arg
[0152]	20
[0153]	<210>15
[0154]	<211>8
[0155]	<212>PRT

[0156]	<213> 人工序列	
[0157]	<220>	
[0158]	<223> 合成肽	
[0159]	<400>15	
[0160]	Glu Ser Leu Ala Arg Pro Cys Ala	
[0161]	1 5	
[0162]	<210>16	
[0163]	<211>11	
[0164]	<212>PRT	
[0165]	<213> 人工序列	
[0166]	<220>	
[0167]	<223> 合成肽	
[0168]	<400>16	
[0169]	Ala Arg Pro Cys Ala Pro Gly Ala Pro Ala Glu	
[0170]	1 5 10	
[0171]	<210>17	
[0172]	<211>24	
[0173]	<212>DNA	
[0174]	<213> 人工序列	
[0175]	<220>	
[0176]	<223> 引物	
[0177]	<400>17	
[0178]	caccgagaac tcggatgatt atga	24
[0179]	<210>18	
[0180]	<211>23	
[0181]	<212>DNA	
[0182]	<213> 人工序列	
[0183]	<220>	
[0184]	<223> 合成引物	
[0185]	<400>18	
[0186]	ttaacctgcc ggcagccagc tcc	23
[0187]	<210>19	
[0188]	<211>22	
[0189]	<212>DNA	
[0190]	<213> 人工序列	
[0191]	<220>	
[0192]	<223> 合成引物	
[0193]	<400>19	
[0194]	cacctgtgaa acagctattt ta	22

[0195]	<210>20	
[0196]	<211>21	
[0197]	<212>DNA	
[0198]	<213> 人工序列	
[0199]	<220>	
[0200]	<223> 合成引物	
[0201]	<400>20	
[0202]	ttatgaaaca tactgagctc c	21

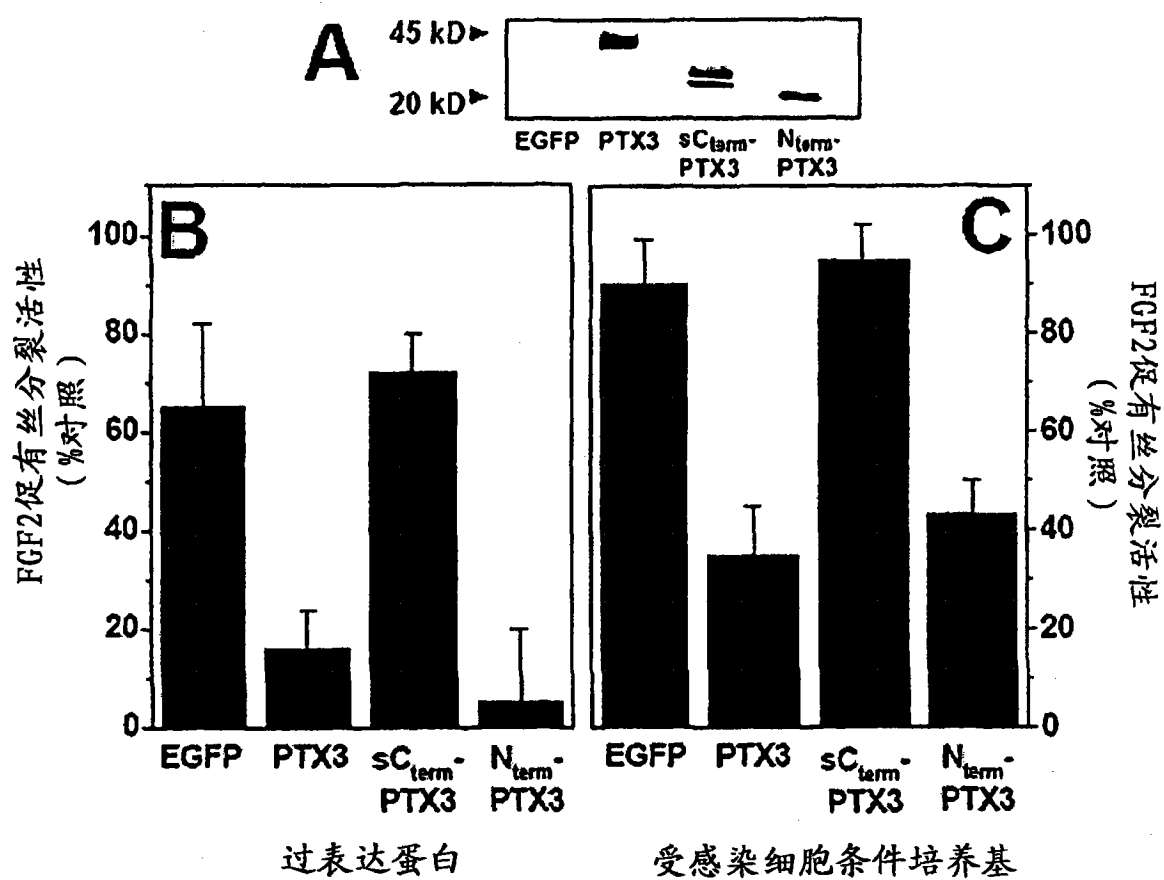


图 1

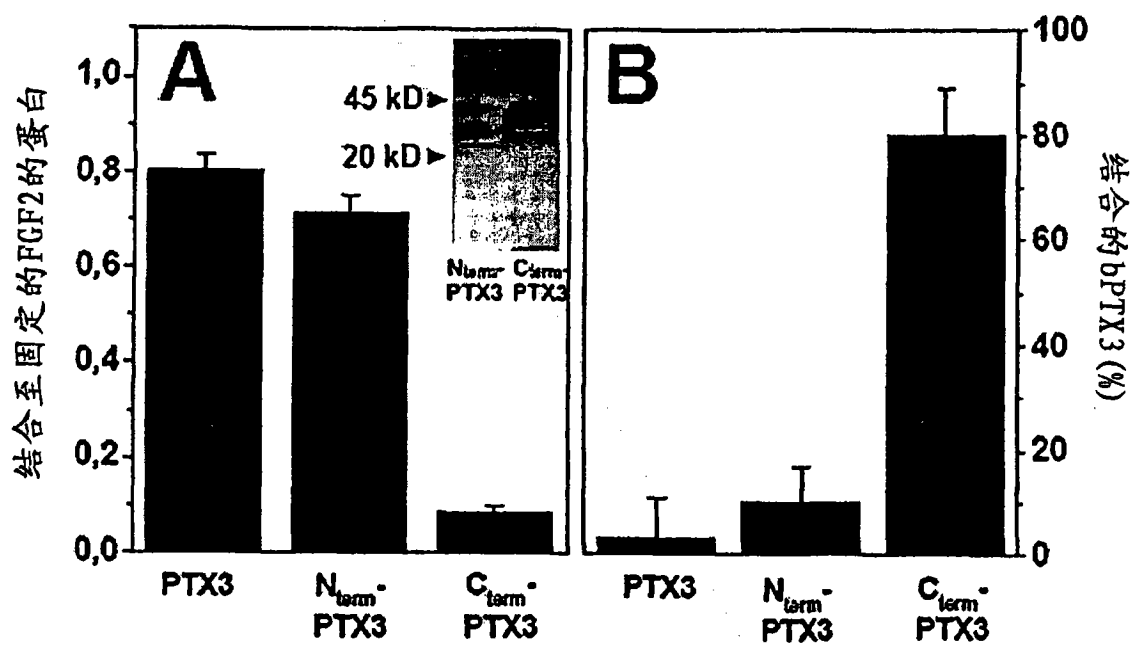


图 2

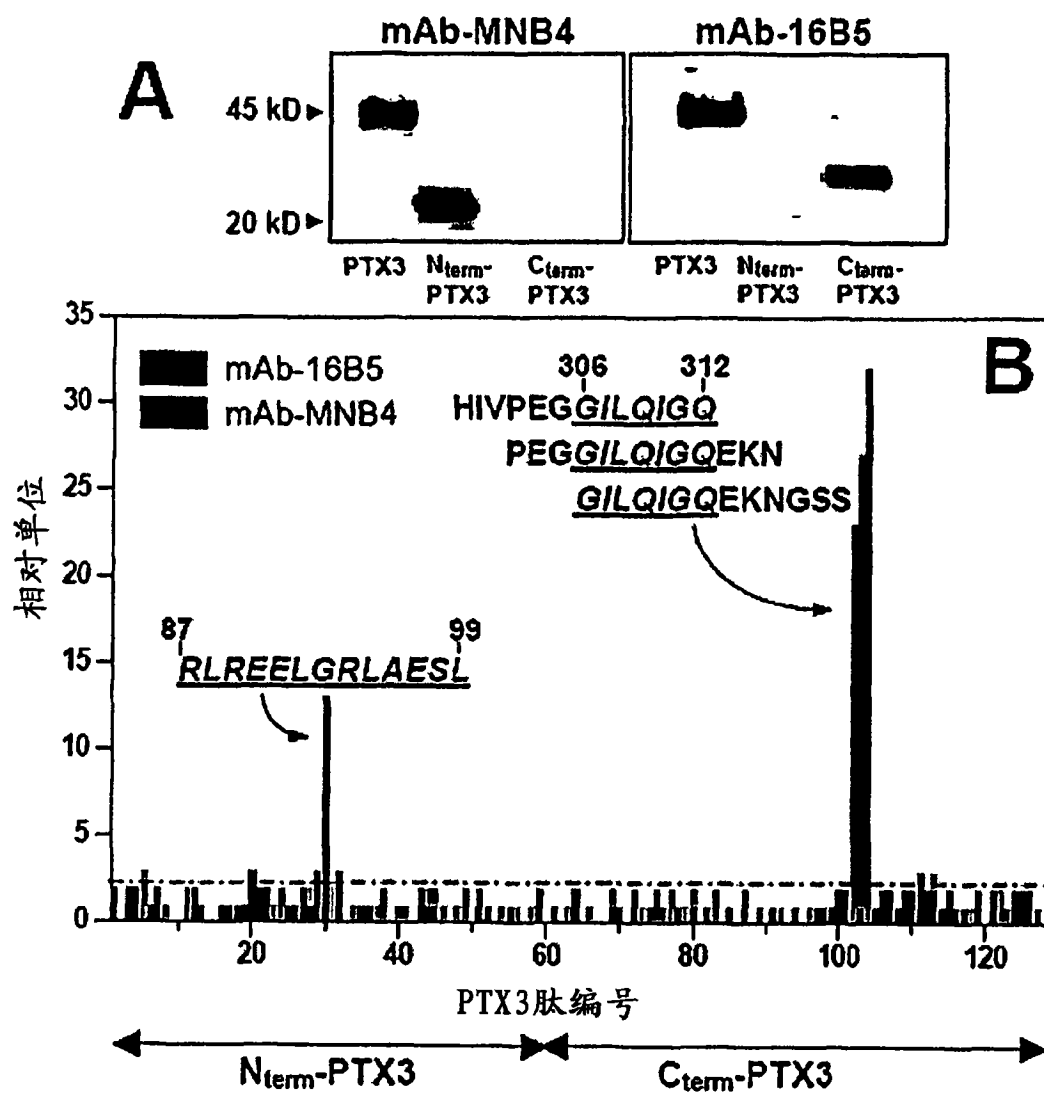


图 3

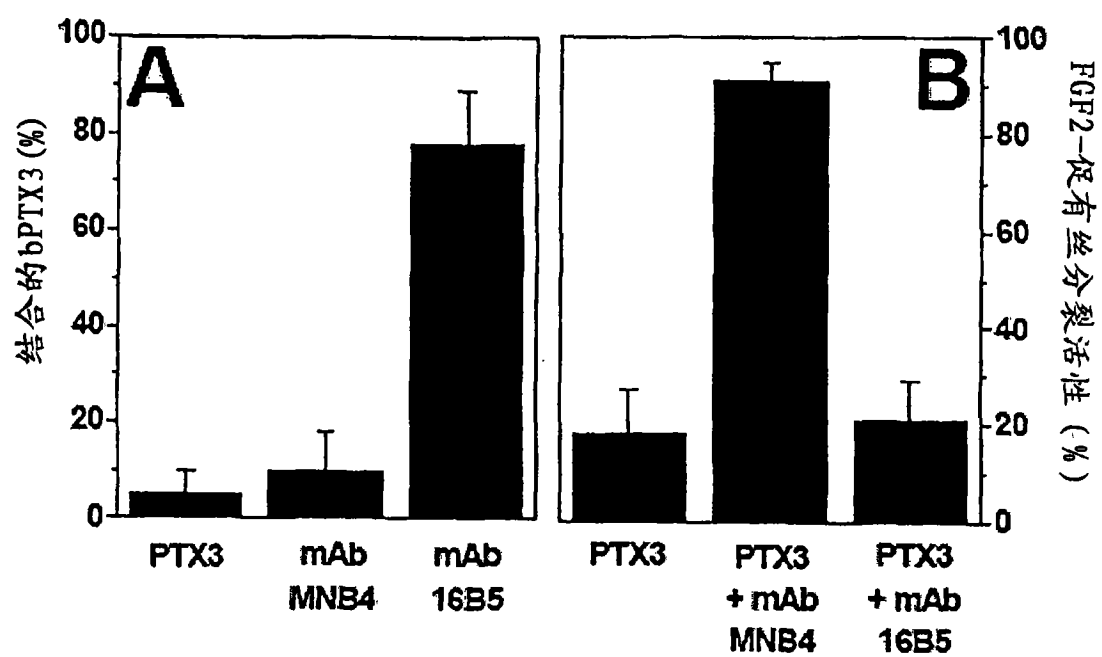


图 4

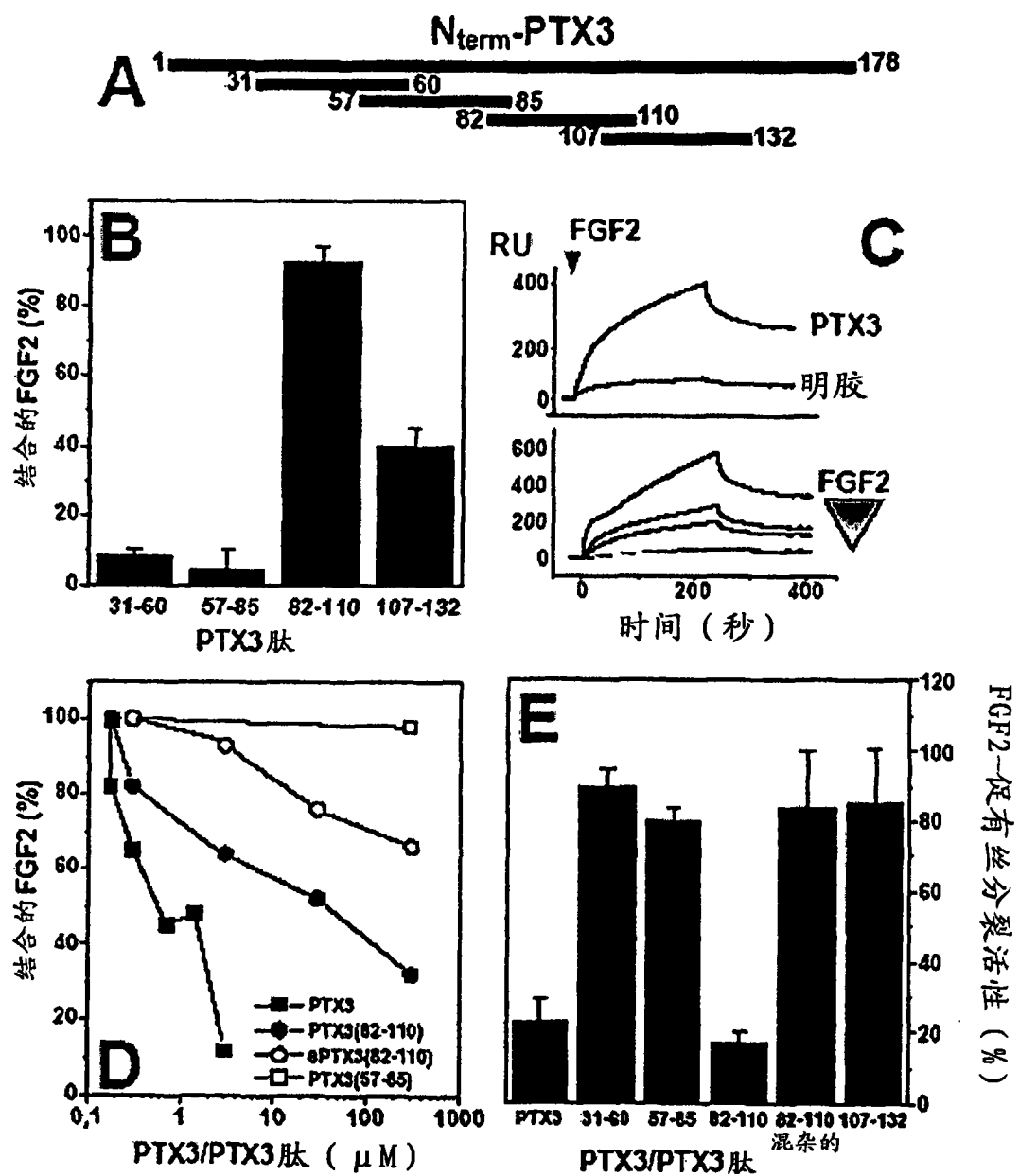


图 5

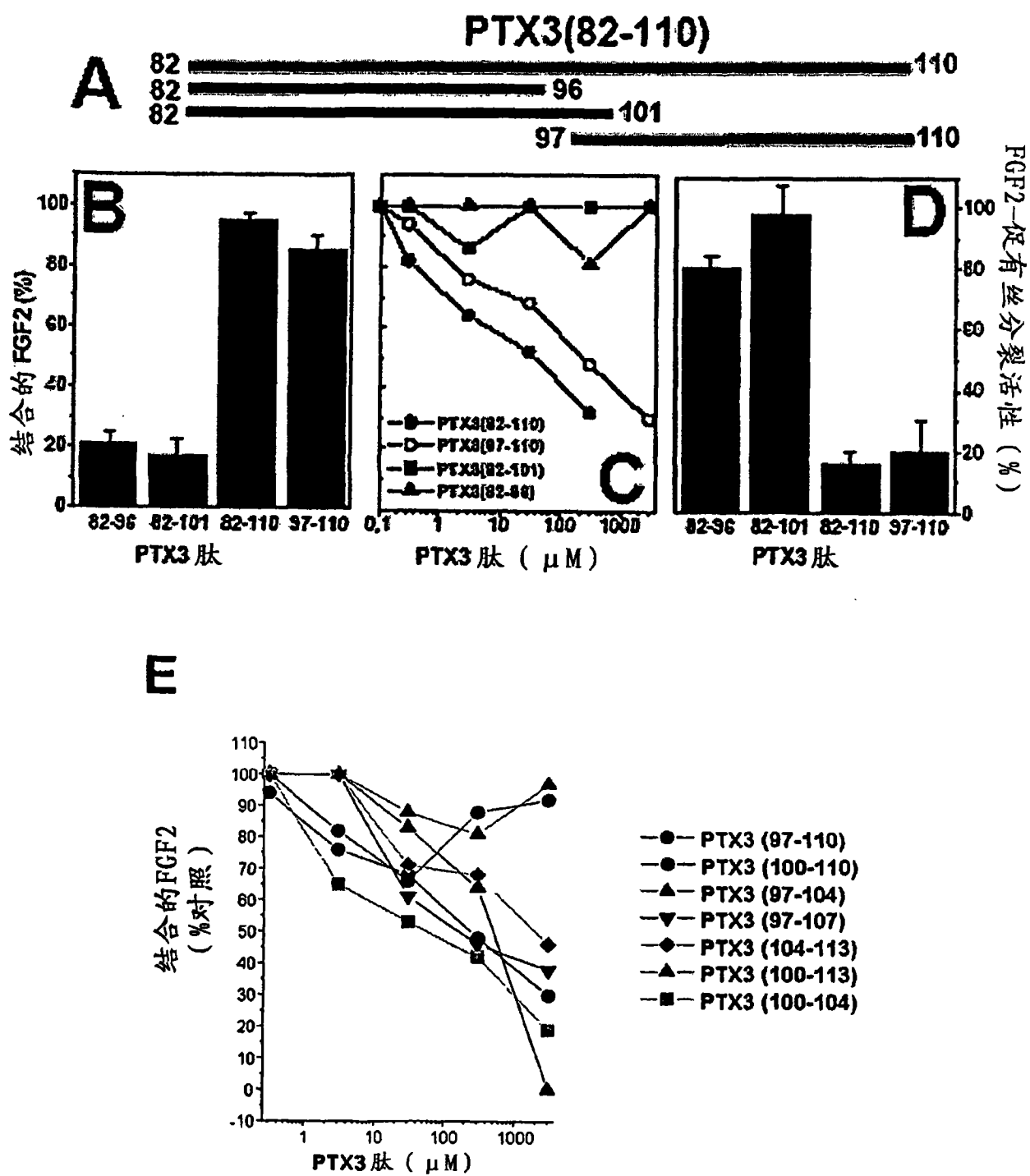


图 6

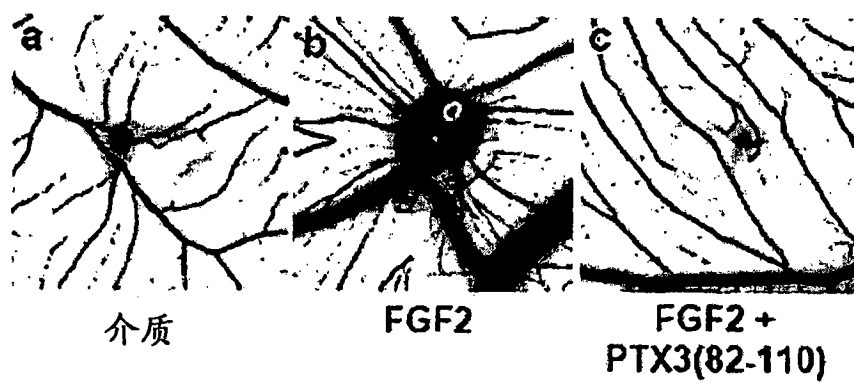


图 7