



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102292101 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 21

(21) 申请号 200980155346. 6

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

(22) 申请日 2009. 11. 25

11105

代理人 张红春

(30) 优先权数据

61/118, 180 2008. 11. 26 US

(51) Int. Cl.

A61K 38/57(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

C07K 14/81(2006. 01)

2011. 07. 26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/065991 2009. 11. 25

(87) PCT申请的公布数据

W02010/062995 EN 2010. 06. 03

(71) 申请人 五佳医疗股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 森托科研究及发展股份有限公司

(72) 发明人 A. 布拉斯 K. 沙利文 J. 芬纳

E. 博希 K. 博伊尔 B. 旺格

K. 皮尔斯 K. 巴维 A. 达斯

F. 法雷尔 P. 西瓦库马

权利要求书 2 页 说明书 33 页

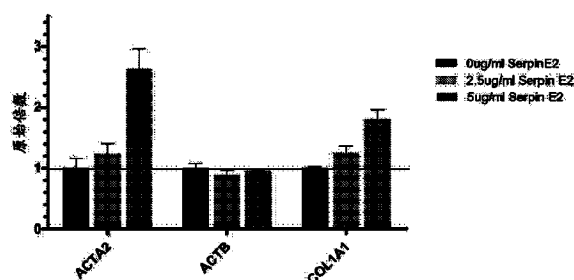
序列表 9 页 附图 4 页

(54) 发明名称

通过 SERPINE2 来调节胶原和平滑肌肌动蛋白表达的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涵盖使用 SERPINE2 和 SERPINE2 的拮抗剂来提高或降低肺成纤维细胞中的胶原 1A1 表达和 / 或 α -平滑肌肌动蛋白表达的方法和组合物。本发明还涵盖用于提高或降低成肌纤维细胞形成的方法和组合物。本发明进一步提供了用于治疗肺病, 诸如特发性肺纤维化和慢性阻塞性肺病的方法和组合物。



1. 一种用于抑制暴露于 SERPINE2 的人类肺成纤维细胞中的胶原 1A1 和 / 或 α -平滑肌肌动蛋白表达水平的方法,包括对所述人类肺成纤维细胞施用 SERPINE2 的拮抗剂。

2. 权利要求 1 的方法,进一步包括检测所述肺成纤维细胞中胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达的降低。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述肺成纤维细胞在暴露于所述拮抗剂之前暴露于 TGF- β 。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述肺成纤维细胞在暴露于所述拮抗剂之前暴露于 IL-13。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述 SERPINE2 的拮抗剂是抗体。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述抗体是单克隆抗体。

7. 权利要求 1 的方法,其中所述 SERPINE2 的拮抗剂是 RNAi 分子。

8. 权利要求 1 的方法,其中所述 SERPINE2 的拮抗剂是反义核酸分子。

9. 权利要求 1 的方法,其中所述 SERPINE2 的拮抗剂是肽。

10. 权利要求 1 的方法,其中所述 SERPINE2 的拮抗剂是 SERPINE2 的小分子抑制剂。

11. 权利要求 1 的方法,其中所述胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达水平受到抑制。

12. 权利要求 1 的方法,其中所述胶原 1A1 水平受到抑制。

13. 权利要求 1 的方法,其中所述 α -平滑肌肌动蛋白表达水平受到抑制。

14. 一种用于抑制自暴露于升高水平的 SERPINE2 的人类肺成纤维细胞形成成肌纤维细胞的方法,包括对所述人类肺成纤维细胞施用 SERPINE2 的拮抗剂。

15. 权利要求 14 的方法,进一步包括检测所述肺成纤维细胞中胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达的降低。

16. 权利要求 14 的方法,其中所述肺成纤维细胞在暴露于所述拮抗剂之前暴露于 TGF- β 。

17. 权利要求 14 的方法,其中所述肺成纤维细胞在暴露于所述拮抗剂之前暴露于 IL-13。

18. 权利要求 14 的方法,其中所述 SERPINE2 的拮抗剂是抗体。

19. 权利要求 17 的方法,其中所述抗体是单克隆抗体。

20. 权利要求 14 的方法,其中所述 SERPINE2 的拮抗剂是 RNAi 分子。

21. 权利要求 14 的方法,其中所述 SERPINE2 的拮抗剂是反义核酸分子。

22. 权利要求 14 的方法,其中所述 SERPINE2 的拮抗剂是肽。

23. 权利要求 14 的方法,其中所述 SERPINE2 的拮抗剂是 SERPINE2 的小分子抑制剂。

24. 一种用于提高人类肺成纤维细胞中的胶原 1A1 生成水平的方法,包括对细胞施用 SERPINE2 并检测所述人类肺成纤维细胞中胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达的升高。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述 SERPINE2 在表达载体中施用。

26. 权利要求 24 的方法,其中所述 SERPINE2 作为纯化的蛋白质施用。

27. 权利要求 24 的方法,其中所述胶原表达的升高通过测量胶原 1A1 RNA 水平的升高来检测。

28. 权利要求 24 的方法,其中所述 α -平滑肌肌动蛋白表达的升高通过测量 α -平滑肌肌动蛋白 RNA 水平的升高来检测。

29. SERPINE2 的拮抗剂在制备用于治疗医学状况的药物中的用途,其中所述医学状况

是肺纤维化。

30. SERPINE2 的拮抗剂在制备用于治疗医学状况的药物中的用途,其中所述医学状况是特发性肺纤维化 (IPF)。

31. SERPINE2 的拮抗剂在制备用于治疗医学状况的药物中的用途,其中所述医学状况是慢性阻塞性肺病 (COPD)。

32. 权利要求 29 的用途,其中所述 SERPINE2 的拮抗剂是抗体。

33. 权利要求 29 的用途,其中所述抗体是单克隆抗体。

34. 权利要求 29 的用途,其中所述 SERPINE2 的拮抗剂是 RNAi 分子。

35. 权利要求 29 的用途,其中所述 SERPINE2 的拮抗剂是反义核酸分子。

36. 权利要求 29 的用途,其中所述 SERPINE2 的拮抗剂是肽。

37. 权利要求 29 的用途,其中所述 SERPINE2 的拮抗剂是 SERPINE2 的小分子抑制剂。

38. 权利要求 1 的方法,其中所述人类肺成纤维细胞暴露于升高水平的 SERPINE2。

通过 SERPINE2 来调节胶原和平滑肌肌动蛋白表达的组合物和方法

[0001] 发明背景

[0002] 有许多不同类型的肺病涉及肺纤维化, 诸如特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)、急性肺损伤 (ALI)、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、哮喘、和慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)。Howell et al., Am. J. Path. 159 :1383-1395 (2001), U. S. Patent Publ. No. 2009/0136500 A1。

[0003] 例如, 特发性肺纤维化 (IPF) 是间质性肺病的一种常见形式, 特征在于成纤维细胞增殖和过度胶原沉积。Hardie 等, Am. J. of Respir. Cell Mol. Biol. 327 :309-321 (2007)。IPF 可源自慢性炎性过程, 其启动细胞外基质在间质中的病灶性积聚。或者, IPF 可源自肺上皮损伤, 其可导致异常伤口愈合及过度细胞外基质形成。至今, 没有针对 IPF 的有效疗法。Hardie 等, (2007); Meltzer 等, Orphanet Journal of Rare Diseases, 3 :8 (2008)。

[0004] 肺成纤维细胞变成成肌纤维细胞 (myofibroblast) 的转变是特发性肺纤维化和其它肺病, 诸如慢性阻塞性肺病 (COPD) 的一项病理生理学特征。Dunkern 等, Eur J Pharmacol. 572 (1) :12-22 (2007)。

[0005] 抗纤维蛋白溶解活性水平据报告在 IPF 患者的肺泡液中降低。Chapman 等, Am. Rev. Respir. Dis. 133 :437-443 (1986)。纤溶酶原活化物抑制剂 (PAI-1) 抗原 (也称作 SERPINE1) 在肺液中的水平和 PAI-2 抗原 (也称作 SERPINB2) 在肺细胞溶胞物中的水平据报告在患者中比在正常受试者中要更高。同前。PAI-1 涉及肺纤维化。Gharee-Kermani 等, Expert Opin. Investig. Drugs 17 :905-916, 2008。尿激酶纤溶酶原活化物 (uPA) 是血管外组织中纤维蛋白溶解的主要活化物。同前。PAI-1 抑制 uPA。同前。如此, 纤溶酶原系统的蛋白水解特性可在调控肺修复和纤维化中发挥重要作用。同前。

[0006] SERPINE2 是一种不可逆的细胞外丝氨酸蛋白酶抑制剂。它在胰、结肠、和胃的癌症中过表达。Neesse 等, Pancreatology 7 :380-385, 2007。SERPINE2 也称作蛋白酶微管连接蛋白 I (PN-1) 和神经胶质衍生微管连接蛋白 (GDN)。SERPINE2 也抑制细胞外尿激酶纤溶酶原活化物。Scott 等, J. Biol. Chem. 258 :4397-4403, 1983。

[0007] 用 SERPINE2 转染胰腺癌细胞系引起异种移植物肿瘤的局部侵袭力增强, 伴有侵袭性肿瘤中的细胞外基质 (ECM) 生成大大升高。Buchholz 等, Cancer Research 63 :4945-4951 (2003)。ECM 沉积物对 I 型胶原、纤连蛋白、和层粘连蛋白呈阳性。同前。

[0008] SERPINE2 蛋白被发现在小鼠和人类肺中表达。DeMeo 等, Am. J. Hum. Gen. 78 :253-264 (2006)。这篇论文提出 SERPINE2 过表达与慢性阻塞性肺病有关联。SERPINE2 被证明是胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶, 诸如凝血酶、胰蛋白酶、纤溶酶、和尿激酶的细胞外抑制剂。同前。

[0009] SERPINE2 由成纤维细胞分泌。Farrell 等, J. Cell Physiol. 134 :179-188, 1988。SERPINE2 与细胞外环境中的某些丝氨酸蛋白酶, 包括凝血酶、尿激酶、和纤溶酶形成复合物, 然后被细胞内化并降解。同前。SERPINE2 存在于成纤维细胞的表面上, 结合至细胞外基质。同前。

[0010] 自硬皮病患者的皮肤损害分离的成纤维细胞过表达胶原和其它基质成分。Strehlow 等, J. Clin. Invest. 103 :1179-1190 (1999)。SERPINE2 在硬皮病成纤维细胞中过表达。同前。SERPINE2 在小鼠 3T3 成纤维细胞中的瞬时或稳定表达分别提高胶原 α -1(I) 启动子活性或内源胶原转录物水平。同前。在其活性位点处诱变的 SERPINE2 未能提高胶原启动子活性。同前。SERPINE2 以反义取向的过表达表现出抑制小鼠 3T3 成纤维细胞中来自胶原启动子的表达。同前。在 Strehlow 等, 1999 中, 进行了人类 SERPINE2 点突变, R364K 和 S365T, 并确认了缺乏与凝血酶的更高级复合物的形成。

[0011] 低密度脂蛋白受体相关蛋白 (LRP) 是一种负责蛋白酶-SERPINE2 复合物内化的受体。Knauer 等, J. Biol. Chem. 272 :29039-29045, 1997。凝血酶-SERPINE2 对 LRP 的结合由氨基酸 47-58 介导。Knauer 等, J. Biol. Chem. 272 :12261-12264, 1997。LRP 结合区中的 SERPINE2 点突变, H48A, 及双重突变体 H48A 和 D49A 具有相似的凝血酶复合物形成速率, 与野生型相似, 但是异化和内化降低至野生型的 50% 和 15%。Knauer 等, J. Biol. Chem. 274 :275-281, 1999。

[0012] IPF 中的主要效应细胞是成肌纤维细胞。Scotton 和 Chambers, Chest 132 :1311-1321 (2007)。成肌纤维细胞高度合成胶原, 具有可收缩表型, 且特征在于存在 α -平滑肌肌动蛋白应力纤维。同前。成肌纤维细胞可通过固有的肺成纤维细胞活化 / 增殖、上皮-间充质分化、或循环成纤维细胞干细胞 (纤维细胞) 募集来衍生。同前。成肌纤维细胞涉及伤口愈合过程。Hinz 等, Am. J. Pathology 170 :1807-1816 (2007)。转化生长因子 (TGF) β 1 显示出涉及诱导成肌纤维细胞生成。同前。

[0013] 在具有肺纤维化的患者的一项研究中, 观察到编码肌肉蛋白质 (诸如 α -平滑肌肌动蛋白、 γ -平滑肌肌动蛋白、和钙调蛋白 (calponin)) 和整联蛋白 α 7 β 1 的基因的表达的显著升高。Zuo 等, P. N. A. S. 99 :6292-6297 (2002)。

[0014] 在肺纤维化的一种小鼠模型中, 用 TGF- α 诱导纤维化在 1-4 天内引起数种细胞外基质蛋白质 (包括 I 型前胶原、 α 1(COL1A1)、COL3A1、COL5A2、和 COL15A1) 和弹性蛋白的肺 RNA 水平升高。Hardie 等, 2007。在 TGF- α 不再表达后编码防御 / 免疫蛋白质的许多 RNA 的水平升高, 包括 SERPINE2 的。同前。注意到 SERPINE2 尚未与 IPF 关联起来。同前。

[0015] SERPINE2 与凝血酶起反应的速率受肝素提高。Wallace 等, Biochem J. (1989) 257, 191-196。SERPINE2 的肝素结合位点已通过定点诱变得定位。Stone 等, Biochem. 33 :7731-7735, 1994。SERPINE2 的肝素结合区已鉴定为氨基酸 90-105。将所有 7 个赖氨酸残基突变成谷氨酸残基消除肝素结合、肝素介导的加速凝血酶复合物形成的能力、和凝血酶-SERPINE1 结合至成纤维细胞细胞表面的能力, 如经由降解所测量的。Stone 等, 1994 ; Knauer 等, JBC 1997, 272 :29039-29045, 1997。

[0016] 丝氨酸蛋白酶抑制剂由三个 β 片层和 8-9 个螺旋构成。Law 等, Genome Biology 7 :216, 2006。反应性中心环 (RCL) 与靶蛋白酶相互作用。同前。丝氨酸蛋白酶抑制剂的切割导致扭曲蛋白酶活性位点的构象变化, 这阻止酰基中间体的有效水解和随后蛋白酶的释放。同前。如此, 丝氨酸蛋白酶抑制剂是不可逆的自杀式抑制剂。同前。

[0017] 生成了许多不同类型的拮抗性丝氨酸蛋白酶抑制剂。例如, 针对 SERPINE2 的单克隆抗体能阻断其对靶蛋白酶的抑制。Wagner 等, Biochemistry 27 :2173-2176, 1988 ; Boulaftali 等, Blood First Edition Paper, prepublished online October 23, 2009 ;

DOI 10.1182/blood-2009-04-217240。类似地,生成了针对 SERPINE1(即纤溶酶原活化物抑制剂-1)的中和性抗体,包括 scFV 片段。参见例如 Verbeke 等, J. Thromb. Haemost. 2 : 298-305, 2004 ; Brooks 等, Clinical & Experimental Metastasis 18 : 445-453, 2001。反义 RNA 和寡核苷酸也用于抑制 SERPINE2 和 SERPINE1 表达。Kim 和 Loh, Mol. Biol. Cell. 17 : 789-798, 2006 ; Sawa 等, J. Biol. Chem. 269 : 14149-14152, 1994。

[0018] RNA 干扰也用于遏制 SERPINE1 表达。Kortlever 等, Nature Cell Biology 8 : 877-884, 2006。使用一种与 SERPINE1 的反应性中心环对应的 14 个氨基酸的肽灭活 SERPINE1 也成功了。Eitzman 等, J. Clin. Invest. 95 : 2416-2420, 1995。其它丝氨酸蛋白酶抑制剂同样被与反应性中心环对应的肽所抑制。Bjork 等, J. Biol. Chem. 267 : 1976-1982, 1992 ; Schulze 等, Eur. J. Biochem. 194 : 51-56, 1990。一种低分子量分子, XR5967, 它是一种哌嗪二酮, 也显示出抑制 SERPINE1 活性。Brooks 等, Anticancer Drugs 15 : 37-44, 2004。

[0019] 有许多纤维化肺病涉及肺成纤维细胞。例如,特发性肺纤维化是一种慢性的、进行性的、且常常致命的间质性肺病,对其没有已证实的药物疗法。Gharaee-Kermani 等, 2008。如此,存在对别的用于治疗涉及肺成纤维细胞的纤维化肺病,诸如 IPF 和 COPD 的组合物和方法的需要。

[0020] 发明概述

[0021] 已经发现,对人类肺成纤维细胞施用纯化的 SERPINE2 导致胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达升高。施用缺乏结合低密度脂蛋白受体相关蛋白 (LRP) 的能力的 SERPINE2 LRP 结合突变体也导致胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达升高。施用缺乏与其靶蛋白酶相互作用的能力的 SERPINE2 蛋白酶相互作用突变体显示出没有能力提高胶原 1A1 表达和 α -平滑肌肌动蛋白表达。施用应当保留与其靶蛋白酶相互作用的能力但不完全阻断蛋白酶活性的 SERPINE2 蛋白酶抑制突变体 (Strehlow 等, 1999) 导致中间水平的胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达。

[0022] 施用针对 SERPINE2 的多克隆抗体以剂量依赖性方式消除了 SERPINE2 诱导的胶原 1A1 升高。另外, TGF- β 诱导正常人类肺成纤维细胞中的 SERPINE2 mRNA 表达大大升高,而且用博来霉素处理小鼠引起肺溶胞物中的 SERPINE2 蛋白质表达水平升高。

[0023] 这些结果指出了 SERPINE2 能引起活化的成肌纤维细胞形成升高及胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达升高,正如在特发性肺纤维化中看到的。本发明涵盖用于在肺成纤维细胞中提高胶原 1A1 表达和 / 或提高 α -平滑肌肌动蛋白表达的方法和组合物。例如,可将重组 SERPINE2 添加至肺成纤维细胞以提高胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达和成肌纤维细胞形成。由于 SERPINE2 是一种细胞外蛋白酶抑制剂,它可以由肺成纤维细胞自身生成或来自另一来源,诸如添加的蛋白质或邻近细胞生成。这些组合物和方法可用于提高肺成纤维细胞中的胶原 1A1 和 / 或 α -平滑肌肌动蛋白表达及针对 SERPINE2 的拮抗剂的药物筛选测定法。这些组合物和方法也可用于针对在体内拮抗纤维化活性的组合物的药物测定法。例如,可给小鼠施用纯化的 SERPINE2, 以及其它化合物,并用于筛选拮抗纤维化的化合物。本发明的组合物和方法也可用于提高活化的成肌纤维细胞形成以帮助伤口愈合。

[0024] 在各种实施方案中,本发明涵盖用于提高人类肺成纤维细胞中的胶原 1A1 生成和 / 或 α -平滑肌肌动蛋白生成水平的方法,包括对细胞施用 SERPINE2 并检测所述人类肺成纤维细胞中胶原 1A1 和 / 或 α -平滑肌肌动蛋白表达的升高。在多个优选的实施方案中,

所述 SERPINE2 在表达载体中或作为纯化的蛋白质来施用。优选地,所述胶原表达的升高通过测量胶原 1A1RNA 水平的升高和 / 或通过测量 α -平滑肌肌动蛋白 RNA 生成水平的升高来检测。

[0025] 由于人类肺成纤维细胞暴露于升高水平的 SERPINE2 引起胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达升高,其通过干扰 SERPINE2 结合其蛋白酶靶的能力而被阻断,SERPINE2 的拮抗剂能引起暴露于升高水平的 SERPINE2 的人类肺成纤维细胞中的胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达降低。这样,SERPINE2 的拮抗剂能阻断将人类肺成纤维细胞暴露于升高水平的 SERPINE2 的效果,诸如成肌纤维细胞生成。如此,本发明涵盖使用 SERPINE2 的拮抗剂来在肺成纤维细胞中降低胶原 1A1 表达和 / 或降低 α -平滑肌肌动蛋白表达的方法和组合物。此类拮抗剂可用于降低肺成纤维细胞中的胶原 1A1 和 / 或 α -平滑肌肌动蛋白表达及预防由肺成纤维细胞,诸如通过成肌纤维细胞的作用介导的纤维化。

[0026] 在各种实施方案中,本发明涵盖用于抑制暴露于升高水平的 SERPINE2 的人类肺成纤维细胞中的胶原 1A1 和 / 或 α -平滑肌肌动蛋白表达水平的方法,包括对所述人类肺成纤维细胞施用 SERPINE2 的拮抗剂。在一个实施方案中,所述方法包括检测所述肺成纤维细胞中胶原 1A1 和 / 或 α -平滑肌肌动蛋白表达的降低。在各种实施方案中,所述肺成纤维细胞在暴露于所述拮抗剂之前暴露于 TGF- β 。在一些实施方案中,所述肺成纤维细胞在暴露于所述拮抗剂之前暴露于 IL-13。优选地,所述 SERPINE2 的拮抗剂是 SERPINE2 的抗体、RNAi 分子、反义核酸分子、肽、或小分子抑制剂。

[0027] 所述 SERPINE2 的拮抗剂也可与其它肺纤维化抑制剂,包括 SERPINE1 拮抗剂,诸如抗体,等组合使用。

[0028] 本发明还涵盖用于抑制自暴露于升高水平的 SERPINE2 的人类肺成纤维细胞形成成肌纤维细胞的方法,包括对所述人类肺成纤维细胞施用 SERPINE2 的拮抗剂。在各种实施方案中,所述肺成纤维细胞在暴露于所述拮抗剂之前暴露于 TGF- β 。在一些实施方案中,所述肺成纤维细胞在暴露于所述拮抗剂之前暴露于 IL-13。优选地,所述 SERPINE2 的拮抗剂是 SERPINE2 的抗体、RNAi 分子、反义核酸分子、肽、或小分子抑制剂。

[0029] 本发明进一步提供了用于抑制暴露于 SERPINE2 的人类肺成纤维细胞中的胶原 1A1 和 / 或 α -平滑肌肌动蛋白表达水平的方法,包括对所述人类肺成纤维细胞施用 SERPINE2 的拮抗剂。在一个实施方案中,所述方法包括检测所述肺成纤维细胞中胶原 1A1 和 / 或 α -平滑肌肌动蛋白表达的降低。在各种实施方案中,所述肺成纤维细胞在暴露于所述拮抗剂之前暴露于 TGF- β 。在一些实施方案中,所述肺成纤维细胞在暴露于所述拮抗剂之前暴露于 IL-13。优选地,所述 SERPINE2 的拮抗剂是 SERPINE2 的抗体、RNAi 分子、反义核酸分子、肽、或小分子抑制剂。

[0030] 在本发明的语境中,SERPINE2 的拮抗剂包括任何能特异性抑制 SERPINE2 的 RNA 表达、蛋白质表达、或蛋白质活性的分子。如此,SERPINE2 的拮抗剂包括特异性结合 SERPINE2 并抑制其生物学活性的抗体;干扰 SERPINE2 表达的反义核酸 RNA;干扰 SERPINE2 表达的小干扰 RNA;SERPINE2 的小肽抑制剂,和 SERPINE2 的小分子抑制剂。例如,可将特异性结合 SERPINE2 并阻断其生物学活性的拮抗性抗体添加至暴露于升高水平的 SERPINE2 的肺成纤维细胞以降低胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达。类似地,可将特异性 SERPINE2 的拮抗性抗体添加至暴露于升高水平的 SERPINE2 的肺成纤维细胞以降低成肌纤维细胞形成。

[0031] 升高的 SERPINE2 水平对提高胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达的影响向发明人提示将人类肺成纤维细胞暴露于升高水平的 SERPINE2 促进成肌纤维细胞形成,成肌纤维细胞是涉及多种肺病,包括 IPF 和 COPD 的主要效应细胞。如此,本发明涵盖通过对肺成纤维细胞施用 SERPINE2 的拮抗剂和通过降低成肌纤维细胞形成,在具有胶原 1A1 表达和 / 或 α -平滑肌肌动蛋白过表达的患者,诸如 IPF 和 COPD 患者的肺成纤维细胞中降低胶原 1A1 表达和 / 或降低 α -平滑肌肌动蛋白表达的方法和组合物。

[0032] 本发明包括 SERPINE2 的拮抗剂在制备用于治疗医学状况的药物中的用途,其中所述医学状况是肺纤维化,尤其是其中人类肺成纤维细胞暴露于升高水平的 SERPINE2 的肺纤维化。在多个优选的实施方案中,所述医学状况是特发性肺纤维化 (IPF) 或慢性阻塞性肺病 (COPD)。优选地,所述 SERPINE2 的拮抗剂是抗体,例如单克隆抗体。在各种实施方案中,所述 SERPINE2 的拮抗剂是 SERPINE2 的 RNAi 分子、反义核酸分子、肽、或小分子抑制剂。所述 SERPINE2 的拮抗剂也可与其它肺纤维化抑制剂,包括 SERPINE1 拮抗剂,诸如抗体,等组合使用。

[0033] 这样,本发明提供了用于治疗肺病,诸如 IPF、ALI、ARDS、哮喘、和 COPD 的方法和组合物。此类组合物可预防性或治疗性提供给患有或有风险患上此类疾病的症状的患者。

[0034] 附图简述

[0035] 参照附图来更全面地理解本发明,其中:

[0036] 图 1 描绘了纯化的 SERPINE2 蛋白对人类肺成纤维细胞的影响的测定结果。对用浓度为 0、2.5、或 5 μ g/ml 的纯化的 SERPINE2 及 0.5ng/ml TGF- β 处理 48 小时的正常人类肺成纤维细胞实施了 bDNA 测定法。测量了 β -肌动蛋白 (ACTB)、 α -平滑肌肌动蛋白 (ACTA2)、和胶原 1A1 (COL1A1) RNA 水平。

[0037] 图 2 描绘了来自经野生型 (WT) SERPINE2、SERPINE2 LRP 结合突变体、SERPINE2 蛋白酶抑制突变体、和 SERPINE2 蛋白酶相互作用突变体转染的细胞的蛋白质上清液对 β -肌动蛋白 (ACTB)、 α -平滑肌肌动蛋白 (ACTA2)、和胶原 1A1 (COL1A1) RNA 水平的影响的测定结果。还使用了来自载体对照 (VCM) 的上清液。对用含 SERPINE2 或 VCM 上清液及用 0.05ng/ml TGF- β 处理 48 小时的正常人类肺成纤维细胞实施了 bDNA 测定法。

[0038] 图 3 描绘了来自经野生型 (WT) SERPINE2、SERPINE2 LRP 结合突变体、SERPINE2 蛋白酶抑制突变体、和 SERPINE2 蛋白酶相互作用突变体转染的细胞的蛋白质上清液对 β -肌动蛋白 (ACTB)、 α -平滑肌肌动蛋白 (ACTA2)、和胶原 1A1 (COL1A1) RNA 水平的影响的测定结果。还使用了来自载体对照 (VCM) 的上清液。对用含 SERPINE2 或 VCM 上清液及用 0.5ng/ml TGF- β 处理 48 小时的正常人类肺成纤维细胞实施了 bDNA 测定法。

[0039] 图 4A 和 B 描绘了在两种不同浓度的 TGF- β 1 存在下通过提高 SERPINE2 蛋白浓度来诱导胶原蛋白生成。

[0040] 图 5 描绘了在 NHLF 细胞中用 TGF- β 1 来诱导 SERPINE2 RNA 生成。

[0041] 图 6 描绘了使用针对小鼠 SERPINE2 的多克隆抗体来抑制肺成纤维细胞中小鼠 SERPINE2 诱导的胶原生成。####,与无处理相比 $p < 0.001$, ***,与 0.5ng/ml of TGF β 相比 $p < 0.001$,单向 ANOVA 和 Newman Keuls。

[0042] 图 7 描绘了用盐水或博来霉素处理 7 或 14 天的小鼠的肺溶胞物中的 SERPINE2 蛋白水平。统计学显著性使用单向 ANOVA 及 Tukey 氏事后检验 (Tukey's Post test) 来确

定。SERPINE2 水平 (51KD 条带) 在 SERPINE2 蛋白升高的博来霉素处理的肺溶胞物中显著升高,***,与盐水处理的小鼠肺相比 $p < 0.0001$ 。

[0043] 发明详述

[0044] 本发明涵盖使用 SERPINE2 在肺成纤维细胞中提高胶原 1A1 表达和 / 或提高 α -平滑肌肌动蛋白表达的方法和组合物。

[0045] 本发明进一步涵盖使用 SERPINE2 的拮抗剂在肺成纤维细胞中降低胶原 1A1 表达和 / 或降低 α -平滑肌肌动蛋白表达的方法和组合物。可将 SERPINE2 的拮抗剂添加至暴露于升高水平的 SERPINE2 的肺成纤维细胞以降低胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达。类似地,可将 SERPINE2 的拮抗剂添加至暴露于升高水平的 SERPINE2 的肺成纤维细胞以降低成肌纤维细胞形成。

[0046] 肺成纤维细胞暴露于 SERPINE2 可通过施用 SERPINE2 的拮抗剂来抑制。拮抗剂能降低或阻断 SERPINE2 的 RNA 表达、蛋白质表达、或蛋白质活性。

[0047] “升高”水平的 SERPINE2 指超出细胞和 / 或组织的平均值的 SERPINE2 蛋白水平。例如,将 SERPINE2 添加至肺成纤维细胞细胞培养物导致升高水平的 SERPINE2。还有,超出支气管灌洗样品的 SERPINE2 平均值的患者支气管灌洗中的 SERPINE2 水平是升高的。

[0048] 肺成纤维细胞暴露于升高水平的 SERPINE2 可通过施用 SERPINE2 的拮抗剂来抑制。拮抗剂能降低或阻断 SERPINE2 的 RNA 表达、蛋白质表达、或蛋白质活性。

[0049] 本发明涵盖通过将 SERPINE2 的拮抗剂施用于肺成纤维细胞及通过降低成肌纤维细胞形成,用于在 IPF 患者的肺成纤维细胞中降低胶原 1A1 表达和 / 或降低 α -平滑肌肌动蛋白表达的方法和组合物。这样,本发明提供了用于治疗特发性肺纤维化的方法和组合物。

[0050] 核酸分子

[0051] 在一个实施方案中,本发明涉及某些分离的 SERPINE2 核苷酸序列,其不含污染性内源材料。“核苷酸序列”指分开的片段形式或作为更大核酸构建物的组件的多核苷酸分子。核酸分子衍生自如下的 DNA 或 RNA,其至少一次以实质性纯的形式并以能够鉴定、操作、和回收其组件核苷酸序列的数量或浓度得到分离,这通过标准生物化学方法来进行(诸如 Sambrook 等, Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) 中概述的那些)。优选地,以未被内部非翻译序列或内含子(通常存在于真核基因中)中断的可读框的形式来提供和 / 或构建此类序列。非翻译 DNA 的序列可存在于可读框的 5' 或 3', 其中它们不干扰编码区的操作或表达。

[0052] SERPINE2 核酸分子包括单链和双链形式二者的 DNA, 及其 RNA 互补物。DNA 包括例如 cDNA、基因组 DNA、化学合成 DNA、通过 PCR 扩增的 DNA、及其组合。本发明的 DNA 分子包括编码 SERPINE2 的全长基因及其多核苷酸和片段。本发明的核酸通常衍生自人类来源,但是本发明也包括那些衍生自其它来源的。

[0053] 本发明特别优选的核苷酸序列是 SEQ ID NO :1 所示人类 SERPINE2 序列。由 SEQ ID NO :1 的 DNA 编码的氨基酸序列显示于 SEQ ID NO :2。

[0054] 由于已知的遗传密码简并性,其中超过一种密码子可编码同一氨基酸,DNA 序列可不同于 SEQ ID NO :1 所示序列且仍编码具有 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的多肽。此类变

体 DNA 序列可源自沉默突变（例如 PCR 扩增期间发生的），或者可以是对天然序列的有意诱变的产物。

[0055] 本发明如此涵盖分离的编码 SERPINE2 多肽的 DNA 序列，其选自：(a) 包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的 DNA；(b) 编码 SEQ ID NO:2 所示多肽的 DNA；(c) 能够在中等严格性条件下与 (a) 或 (b) 的 DNA 杂交且编码 SERPINE2 或其片段的 DNA；(d) 能够在高严格性条件下与 (a) 或 (b) 的 DNA 杂交且编码 SERPINE2 或其片段的 DNA；和 (e) 因遗传密码而与 (a)、(b)、(c)、或 (d) 中限定的 DNA 简并且编码 SERPINE2 或其片段的 DNA。当然，本发明涵盖由此类 DNA 序列编码的多肽。

[0056] 本发明如此提供了等同的分离的编码生物学活性 SERPINE2 多肽的 DNA 序列，其选自：(a) 自天然哺乳动物 SERPINE2 基因的编码区衍生的 DNA；(b) SEQ ID NO:1 所示 DNA 或其片段；(c) 能够在中等严格性条件下与 (a) 或 (b) 的 DNA 杂交且编码生物学活性 SERPINE2 多肽的 DNA；和 (d) 因遗传密码而与 (a)、(b) 或 (c) 中限定的 DNA 简并且编码生物学活性 SERPINE2 多肽的 DNA。本发明涵盖由此类 DNA 等同序列编码的 SERPINE2 多肽。还涵盖由自其它哺乳动物物种衍生的 DNA 编码的 SERPINE2 多肽，其中所述 DNA 会与 SEQ ID NO:1 所示 DNA 的互补物杂交。

[0057] 如本文中使用的，“中等严格性”条件意味着使用用于硝酸纤维素滤器的 5XSSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH 8.0) 预清洗溶液，约 50% 甲酰胺、6XSSC、约 42℃ 的杂交条件（或其它相似杂交溶液，诸如 Stark 氏溶液、约 50% 甲酰胺、约 42℃），和约 60℃、0.5XSSC、0.1% SDS 的清洗条件。“高严格性条件”意味着如上所述的杂交条件，及大约 68℃、0.2XSSC、0.1% SDS 的清洗。

[0058] 作为本发明的实施方案，还包括编码 SERPINE2 多肽片段和包含保守氨基酸替代的多肽的 DNA，如下文所描述的。

[0059] 在另一个实施方案中，本发明的核酸分子还包含与天然 SERPINE2 序列至少 80% 相同的核苷酸序列。还涵盖如下的实施方案，其中核酸分子包含与天然 SERPINE2 序列至少 90% 相同、至少 95% 相同、至少 98% 相同、至少 99% 相同、或至少 99.9% 相同的序列。

[0060] 如本文中使用的，两条核酸序列的百分比同一性可通过使用由 Devereux 等 (Nucl. Acids Res. 12:387, 1984) 记载的且自威斯康星大学遗传学计算机小组 (UWCGC) 可得的 GAP 计算机程序 6.0 版比较序列信息来确定，为 GAP 程序使用缺省参数，包括：(1) 用于核苷酸的一元比较矩阵（含有同一性为 1 而非同一性为 0 的值）和 Gribskov 和 Burgess, Nucl. Acids Res. 14:6745, 1986 的加权比较矩阵，如记载于 Schwartz 和 Dayhoff, 编, Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979；(2) 每个缺口为 3 的罚分及每个缺口中每个符号额外 0.10 的罚分；及 (3) 末端缺口无罚分。

[0061] 本发明还提供了分离的可用于生成多肽的核酸。此类多肽可通过许多常规技术来制备。可将编码 SERPINE2 或其期望片段的 DNA 序列亚克隆入表达载体来生成多肽或片段。有利地，将 DNA 序列融合至编码合适的前导或信号肽的序列。或者，可使用已知技术化学合成期望片段。DNA 片段也可如下生成，即限制性内切核酸酶消化全长克隆 DNA 序列，并在琼脂糖凝胶上通过电泳来分离。在必要时，可将把 5' 或 3' 末端重建至期望点的寡核苷酸连接至通过限制酶消化产生的 DNA 片段。此类寡核苷酸可另外在期望编码序列上游含有限制

性内切核酸酶切割位点,并在编码序列 N 端安置起始密码子 (ATG)。

[0062] 也可采用公知的聚合酶链式反应 (PCR) 规程来分离和纯化编码期望蛋白质片段的 DNA 序列。采用限定期望 DNA 片段末端的寡核苷酸作为 5' 和 3' 引物。寡核苷酸可另外含有限制性内切核酸酶的识别位点,以便于将扩增的 DNA 片段插入表达载体。PCR 技术记载于 Saiki 等, Science 239 :487(1988) ;Recombinant DNA Methodology, Wu 等, 编, Academic Press, Inc., San Diego(1989), pp.189-196 ;PCR Protocols :A Guide to Methods and Applications, innis 等, 编, Academic Press, Inc. (1990)。

[0063] 多肽及其片段

[0064] 本发明涵盖各种形式的多肽及其片段,包括那些天然存在的或经由各种技术生成的,诸如涉及重组 DNA 技术的规程。例如,编码 SERPINE2 多肽的 DNA 可通过体外诱变衍生自 SEQ ID NO :1,包括定点诱变、随机诱变、和体外核酸合成。此类形式包括但不限于衍生物、变体、和寡聚物,及其融合蛋白或片段。

[0065] SERPINE2 多肽包括由上文所述核酸序列编码的全长蛋白质。特别优选的 SERPINE2 多肽包含 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列。

[0066] 本发明还提供了保留期望生物学活性的 SERPINE2 多肽和片段,诸如激活胶原 1A1 或 α -平滑肌肌动蛋白生成或自人类肺成纤维细胞生成成肌纤维细胞。优选地,此类片段是可溶性多肽。

[0067] 本文中还提供了不同长度的多肽片段。在一个实施方案中,一种优选的 SERPINE2 多肽片段包含氨基酸序列的至少 6 个连续氨基酸。在其它实施方案中,一种优选的 SERPINE2 多肽片段包含 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的至少 10 个、至少 20 个、至少 30 个、多至至少 100 个连续氨基酸。这些多肽可以可溶性形式生成。多肽片段也可用作免疫原,用于生成抗体。

[0068] 本发明涵盖 SERPINE2 及其片段的变体。优选地, SERPINE2 变体包含与 SEQ ID NO :2 或其片段显示至少 50%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99% 同一性的氨基酸序列。此类片段的大小可以为例如 50 个、100 个、150 个、200 个、250 个、300 个、350 个、或 375 个氨基酸。

[0069] 百分比同一性可通过使用由 Devereux 等 (Nucl. Acids Res. 12 :387, 1984) 记载的且自威斯康星大学遗传学计算机小组 (UWGCG) 可得的 GAP 计算机程序 6.0 版比较序列信息来确定。GAP 程序利用 Needleman 和 Wunsch (J. Mol. Biol. 48 :443, 1970) 的比对方法,如 Smith 和 Waterman (Adv. Appl. Math 2 :482, 1981) 综述的。GAP 程序优选的缺省参数包括 : (1) 用于核苷酸的一元比较矩阵 (含有同一性为 1 而非同一性为 0 的值) 和 Gribskov 和 Burgess, Nucl. Acids Res. 14 :6745, 1986 加权比较矩阵,如记载于 Schwartz 和 Dayhoff, 编, Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979 ; (2) 每个缺口为 3 的罚分及每个缺口中每个符号额外 0.10 的罚分 ;及 (3) 末端缺口无罚分。

[0070] 多肽及其片段的生成

[0071] 本发明的多肽和片段的表达、分离、和纯化可通过任何合适技术来实现,包括但不限于下述。

[0072] 表达系统

[0073] 本发明还提供了含有 SERPINE2 DNA 的重组克隆和表达载体,以及含有所述重组载体的宿主细胞。包含 SERPINE2 DNA 的表达载体可用于制备由所述 DNA 编码的 SERPINE2 多肽或片段。一种用于生成多肽的方法包括在促进所述多肽表达的条件下培养经编码所述多肽的重组表达载体转化的宿主细胞,然后自培养物回收所表达的多肽。技术人员会领会,用于纯化所表达的多肽的规程会随多种因素而变化,诸如所采用的宿主细胞的类型及多肽是膜结合的还是由宿主细胞分泌的可溶性形式的。

[0074] 可采用任何合适表达系统。载体包括编码本发明 SERPINE2 多肽或片段的 DNA,其可操作连接至合适转录或翻译调节性核苷酸序列,诸如那些衍生自哺乳动物、微生物、病毒、或昆虫基因的。调节序列的例子包括转录启动子、操纵基因、或增强子、mRNA 核糖体结合位点、和控制转录和翻译起始和终止的适宜序列。当调节序列在功能上与 DNA 序列相关时,核苷酸序列是可操作连接的。如此,若启动子核苷酸序列控制 DNA 序列的转录,则启动子核苷酸序列与 DNA 序列可操作连接。一般将赋予在期望宿主细胞中复制的能力的复制起点和用于鉴定转化子的选择基因掺入表达载体。

[0075] 另外,可以将编码适宜信号肽(天然的或异源的)的序列掺入表达载体。可以以符合读码框的方式将信号肽(分泌前导物)的 DNA 序列与本发明的核酸序列融合,使得所述 DNA 首先被转录,然后使 mRNA 翻译成包含信号肽的融合蛋白。在预定宿主细胞中有功能的信号肽促进多肽的细胞外分泌。在多肽自细胞分泌时,信号肽被自所述多肽切掉。

[0076] 适合于多肽表达的宿主细胞包括原核生物、酵母或高等真核细胞。哺乳动物或昆虫细胞一般优选用作宿主细胞。适宜与细菌、真菌、酵母、和哺乳动物细胞宿主一起使用的克隆和表达载体记载于例如 Pouwels 等, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, (1985)。使用自本文中公开的 DNA 构建物衍生的 RNA,也可使用无细胞翻译系统来生成多肽。

[0077] 原核系统

[0078] 原核生物包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体。适合于转化的原核宿主细胞包括例如大肠杆菌 (*E. coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、和假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、和葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 内的多种其它物种。在原核宿主细胞,诸如大肠杆菌中,多肽可包括 N 端甲硫氨酸残基以推动重组多肽在原核宿主细胞中的表达。N 端 Met 可自所表达的重组多肽切掉。

[0079] 供原核宿主细胞中使用的表达载体一般包含一种或多种表型选择标志基因。表型选择标志基因是例如编码赋予抗生素抗性或供应自养需要的蛋白质的基因。可用于原核宿主细胞的表达载体的例子包括那些衍生自商品化质粒诸如克隆载体 pBR322 (ATCC 37017) 的。pBR322 含有氨苄青霉素和四环素抗性的基因并如此提供鉴定经转化的细胞的简单手段。将适宜启动子和 DNA 序列插入 pBR322 载体。其它商品化载体包括例如 pKK223-3 (Pharmacia FineChemicals, Uppsala, Sweden) 和 pGEM1 (Promega Biotec, Madison, Wis., USA)。

[0080] 常用于重组原核宿主细胞表达载体的启动子序列包括 β -内酰胺酶(青霉素酶)、乳糖启动子系统 (Chang 等, *Nature* 275:615, 1978; Goeddel 等, *Nature* 281:544, 1979)、色氨酸 (trp) 启动子系统 (Goeddel 等, *Nucl. Acids Res.* 8:4057, 1980; EP-A-36776) 和

tac 启动子 (Maniatis, Molecular Cloning :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 412, 1982)。一种特别有用的原核宿主细胞表达系统采用噬菌体 λ PL 启动子和 cI857ts 热不稳定阻抑物序列。自美国典型培养物保藏中心可得, 掺有 λ PL 启动子衍生物的质粒载体包括质粒 pHUB2 (驻留在大肠杆菌菌株 JMB9, ATCC 37092 中) 和 pPLc28 (驻留在大肠杆菌 RR1, ATCC 53082 中)。

[0081] 可以以符合读码框的方式将 SERPINE2 DNA 克隆入普通细菌表达载体的多克隆位点。理想地, 所述载体会在克隆位点的上游含有可诱导启动子, 使得在研究人员选择的时间添加诱导物导致高水平生成重组蛋白。对于有些蛋白质, 可通过在启动子和目的基因之间掺入编码融合配偶 (诸如六组氨酸) 的密码子来强化表达水平。所得“表达质粒”可在多种大肠杆菌菌株中扩增。

[0082] 为了表达重组蛋白, 在生长培养基中扩增细菌细胞直至达到预定的光密度。然后诱导重组蛋白表达, 例如通过添加 IPTG (异丙基 - β -D- 硫代吡喃型半乳糖苷), 其自含有 lac 操纵基因 / 启动子的质粒激活蛋白质表达。诱导 (通常 1-4 小时) 后, 通过离心 (例如在 5,000XG、20 分钟、4°C 的条件下) 形成团粒来收获细胞。

[0083] 为了回收所表达的蛋白质, 形成团粒的细胞可在十倍体积的 50mM Tris-HCl (pH 8) / 1M NaCl 中重悬浮, 然后两次或三次流过弗氏 (French) 细胞压碎器。大多数高度表达的重组蛋白形成称作包涵体的不溶性聚集体。通过以 5,000XG、20 分钟、4°C 条件离心形成团粒, 可将包涵体与可溶性蛋白质纯化开。用 50mM Tris-HCl (pH 8) / 1% Triton X-100 清洗包涵体团粒, 然后在 50mM Tris-HCl (pH 8) / 8M 尿素 0.1M DTT 中溶解。通过离心 (10,000XG, 20 分钟, 20°C) 除去任何不能溶解的物质。在大多数情况中, 目的蛋白质会是所得澄清上清液中最丰富的蛋白质。通过针对 50mM Tris-HCl (pH 8) / 5mM CaCl_2 / 5mM $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ / 1mM GSSG / 0.1mM GSH 透析, 这种蛋白质可“重折叠”成活性构象。重折叠后, 可通过多种层析方法进行纯化, 诸如离子交换或凝胶过滤。在有些方案中, 可在重折叠之前进行初步纯化。例如, 可在固定化的镍上部分纯化带六组氨酸标签的融合蛋白。

[0084] 虽然前述纯化和重折叠规程假设自包涵体回收蛋白质最好, 但是蛋白质纯化领域的技术人员会领会, 许多重组蛋白自细胞溶胞物的可溶性级分纯化最好。在这些情况中, 常常不需要重折叠, 而且可直接通过标准层析方法进行纯化。

[0085] 酵母系统

[0086] 或者, SERPINE2 多肽可在酵母宿主细胞中表达, 优选地来自糖酵母 / 酵母属 (*Saccharomyces*) 的例如 (啤酒糖酵母 / 酿酒酵母 (*S. cerevisiae*))。也可采用其它属的酵母, 诸如毕赤氏酵母 (*Pichia*) 或克鲁维氏酵母 (*Kluyveromyces*)。酵母载体常常会含有来自 2 μ m 酵母质粒的复制起点序列、自主复制序列 (ARS)、启动子区、聚腺苷酸化的序列、转录终止的序列、和选择标志基因。适合于酵母载体的启动子序列包括金属硫蛋白、3- 磷酸甘油酸激酶 (Hitzeman 等, J. Biol. Chem. 255 :2073, 1980) 或其它糖酵解 (Hess 等, J. Adv. Enzyme Reg. 7 :149, 1968 ;Holland 等, Biochem. 17 :4900, 1978) 诸如烯醇化酶、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖 -6- 磷酸异构酶、3- 磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸 - 葡萄糖异构酶、和葡萄糖激酶的启动子等。其它适合于在酵母表达中使用的载体和启动子进一步记载于 Hitzeman, EPA-73, 657。另一个备选方案是葡萄糖阻抑型 ADH2 启动子, 记载于 Russell 等 (J. Biol. Chem. 258 :

2674,1982) 和 Beier 等 (Nature 300 :724,1982)。在酵母和大肠杆菌中都能复制的穿梭载体可通过将来自 pBR322、供大肠杆菌中选择和复制用的 DNA 序列 (Amp^r 基因和复制起点) 插入上文所述酵母载体来构建。

[0087] 可采用酵母 α -因子前导序列来指导多肽的分泌。常常将 α -因子前导序列插入启动子序列和结构基因序列之间。参见例如 Kurjan 等, Cell 30 :933,1982 和 Bitter 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :5330,1984。其它适合于推动酵母宿主分泌重组多肽的前导序列是本领域技术人员已知的。前导序列可在其 3' 端附近修饰以含有一种或多种限制性位点。这会便于前导序列融合至结构基因。

[0088] 酵母转化方案是本领域技术人员已知的。这样一种方案记载于 Hinnen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 :1929,1978。Hinnen 等人的方案在选择性培养基中选择 Trp⁺ 转化子, 其中选择性培养基由 0.67% 酵母氮碱基 (yeast nitrogen base)、0.5% 酪蛋白氨基酸、2% 葡萄糖、10mg/ml 腺嘌呤和 20mg/ml 尿嘧啶组成。

[0089] 经含有 ADH2 启动子序列的载体转化的酵母宿主细胞可在“丰富”培养基中培养以诱导表达。丰富培养基的一个例子是一种由补充有 80mg/ml 腺嘌呤和 80mg/ml 尿嘧啶的 1% 酵母提取物、2% 蛋白胨、和 1% 葡萄糖组成的。当培养基中的葡萄糖被耗尽时, 发生对 ADH2 启动子的去阻抑。

[0090] 哺乳动物或昆虫系统

[0091] 也可采用哺乳动物或昆虫宿主细胞培养系统来表达重组 SERPINE2 多肽。用于在昆虫细胞中生成异源蛋白的杆状病毒系统综述于 Luckow 和 Summers, Bio/Technology 6 : 47 (1988)。也可采用哺乳动物起源的已建立细胞系。合适哺乳动物宿主细胞系的例子包括猴肾细胞的 COS-7 系 (ATCC CRL1651) (Gluzman 等, Cell 23 :175,1981)、L 细胞、C127 细胞、3T3 细胞 (ATCC CCL 163)、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、HeLa 细胞、和 BHK (ATCC CRL 10) 细胞系, 及自非洲绿猴肾细胞系 CV1 (ATCC CCL 70) 衍生的 CV1/EBNA 细胞系, 如记载于 McMahan 等 (EMBO J. 10 :2821,1991)。

[0092] 用于将 DNA 导入哺乳动物细胞的已建立方法已有记载 (Kaufman, R. J., Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990, pp. 15-69)。可使用别的使用商品化试剂诸如 Lipofectamine 脂试剂 (Gibco/BRL) 或 Lipofectamine-Plus 脂试剂的方案来转染细胞 (Felgner 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 :7413-7417,1987)。另外, 可使用电穿孔, 使用常规规程, 诸如 Sambrook 等 (Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 第2版, 第1-3卷, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 描述的, 来转染哺乳动物细胞。稳定转化子的选择可使用本领域已知方法来实施, 诸如例如对细胞毒性药物的抗性。Kaufman 等, Meth. in Enzymology 185 :487-511, 1990 记载了数种选择方案, 诸如二氢叶酸还原酶 (DHFR) 抗性。一种适合于 DHFR 选择的宿主株可以是 CHO 株 DX-B11, 其是 DHFR 缺陷的 (Urlaub 和 Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :4216-4220, 1980)。可将表达 DHFR cDNA 的质粒导入株 DX-B11, 而且只有含有该质粒的细胞能在适宜选择性培养基中生长。其它可掺入表达载体中的选择标志的例子包括赋予对抗生素诸如 G418 和潮霉素 B 的抗性的 cDNA。包含载体的细胞可基于对这些化合物的抗性来选择。

[0093] 可以自病毒基因组切出用于哺乳动物宿主细胞表达载体的转录和翻译控制序列。常用的启动子序列和增强子序列衍生自多瘤病毒、腺病毒 2、猿病毒 40 (SV40)、和人类巨细

胞病毒。可使用自 SV40 病毒基因组衍生的 DNA 序列例如 SV40 启动、早期和晚期启动子、增强子、剪接、和聚腺苷酸化信号来提供其它用于在哺乳动物宿主细胞中表达结构基因序列的遗传元件。病毒早期和晚期启动子是特别有用的,因为二者易于以片段的形式自病毒基因组获得,该片段还可含有病毒复制起点 (Fiers 等, Nature 273 :113,1978 ;Kaufman, Meth. in Enzymology,1990)。也可使用更小或更大的 SV40 片段,前提是包括位于 SV40 病毒复制起点位点中的自 Hind III 位点向 Bgl I 位点延伸的大约 250bp 序列。

[0094] 别的显示出提高哺乳动物表达载体表达异源基因的控制序列包括诸如自 CHO 细胞衍生的表达提升序列元件 (EASE) (Morris 等, Animal Cell Technology, 1997, pp. 529-534 和 PCT Application WO 97/25420) 和来自腺病毒 2 的三元前导序列 (TPL) 和 VA 基因 RNA (Gingeras 等, J. Biol. Chem. 257 :13475-13491, 1982) 等元件。病毒起源的内部核糖体进入位点 (IRES) 序列容许双顺反子 mRNA 有效翻译 (Oh 和 Sarnow, Current Opinion in Genetics and Development 3 :295-300, 1993 ;Ramesh 等, Nucleic Acids Research 24 :2697-2700, 1996)。异源 cDNA 作为双顺反子 mRNA 一部分 (后面是选择标志 (例如 DHFR) 的基因) 的表达显示出提高宿主的可转染性和异源 cDNA 的表达 (Kaufman, Meth. in Enzymology, 1990)。采用双顺反子 mRNA 的例示性表达载体有由 Mosser 等, Biotechniques 22 :150-161, 1997 记载的 pTR-DC/GFP 和由 Morris 等, Animal Cell Technology, 1997, pp. 529-534 记载的 p2A5I。

[0095] 其它供哺乳动物宿主细胞中使用的表达载体可以如 Okayama 和 Berg (Mol. Cell. Biol. 3 :280, 1983) 所述来构建。在又一个备选方案中,载体可衍生自逆转录病毒。另一种有用表达载体是 pFLAG®。FLAG® 技术聚焦于低分子量 (1kD)、亲水性 FLAG® 标志肽对由 pFLAG® 表达载体表达的重组蛋白 N 端的融合。

[0096] 纯化

[0097] 本发明还包括分离和纯化多肽及其片段的方法。分离的和纯化的依照本发明的 SERPINE2 多肽可如上所述由重组表达系统来生成或自天然存在细胞纯化。SERPINE2 多肽可以是基本上纯化的,如通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析时单一蛋白质条带所指示的。一种用于生成 SERPINE2 的工艺包括在足以促进 SERPINE2 表达的条件下培养经包含编码 SERPINE2 多肽的 DNA 序列的表达载体转化的宿主细胞。然后自培养液或细胞提取物回收 SERPINE2 多肽,这取决于所采用的表达系统。

[0098] 用于纯化 SERPINE2 多肽的例示性方法是本领域已知的。例如, SERPINE2 多肽可通过中空纤维过滤继以肝素-Sephrose 柱上的再循环来分离和纯化 (Howard 等, J. Biol. Chem. 261 :684-689, 1986 ;Scott 等, J. Biol. Chem. 258 :10439-10444, 1983 ;Scott 等, J. Biol. Chem. 258 :4397-4403, 1983)。也可采用使用针对 SERPINE2 的特异性多克隆抗体的亲和层析 (Howard 等, 1986)。

[0099] 分离和纯化

[0100] 如本文中使用的,表述“分离的和纯化的”意指 SERPINE2 本质上没有与其它宿主 DNA、蛋白质、或多肽结合在一起,例如,作为重组宿主细胞培养的纯化产物或作为来自非重组来源的纯化产物。“分离的和纯化的”SERPINE2 蛋白可包括其它添加至 SERPINE2 以稳定或辅助 SERPINE2 蛋白纯化的蛋白质,诸如清蛋白。如本文中使用的,术语“基本上纯化的”指这样的混合物,其含有 SERPINE2 且本质上没有联合其它 DNA、蛋白质、或多肽,但是存在

可使用特异性抗体清除的已知 DNA 或蛋白质,而且基本上纯化的 SERPINE2 蛋白保留生物学活性。术语“纯化的 SERPINE2”指“分离的和纯化的”形式的 SERPINE2 或“基本上纯化的”形式的 SERPINE2,正如二者在本文中的描述。

[0101] 术语“生物学活性”在指 SERPINE2 蛋白时意指 SERPINE2 蛋白能够与 SERPINE2 靶胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶诸如凝血酶、胰蛋白酶、纤溶酶、和尿激酶结合,并灭活它们。

[0102] 在一个优选的实施方案中,重组多肽或片段的纯化可使用将 SERPINE2 多肽或片段与其它多肽融合以帮助多肽或片段的纯化来实现。此类融合配偶可包括 poly-His、Fc 模块、或其它抗原性鉴定肽。

[0103] 关于任何类型的宿主细胞,正如熟练技术人员已知的,用于纯化重组多肽或片段的规程会随诸如所采用的宿主细胞的类型和重组多肽或片段是否分泌入培养液等因素而变化。

[0104] 一般而言,重组 SERPINE2 多肽或片段可以自宿主细胞(如果不分泌的话)或者自培养液或上清液(如果可溶且分泌的话)分离,接着是一个或多个浓缩、盐析、离子交换、疏水相互作用、亲和层析、或大小排阻层析步骤。至于实现这些步骤的具体方式,首先可以使用商品化蛋白质浓缩滤器来浓缩培养液,例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤单元。浓缩步骤之后,可以将浓缩液应用于纯化基质,诸如凝胶过滤介质。或者,可以采用阴离子交换树脂,例如具有悬挂二乙基氨基乙基(DEAE)基团的基质或底质。基质可以是丙烯酰胺、琼脂糖、葡聚糖/右旋糖苷、纤维素或蛋白质纯化中常用的其它类型。或者,可采用阳离子交换步骤。合适的阳离子交换剂包括各种包含磺丙基或羧甲基基团的不溶性基质。另外,可采用层析聚焦步骤。或者,可采用疏水相互作用层析步骤。合适的基质可以是结合至树脂的苯基或辛基模块。另外,可采用基质选择性结合重组蛋白的亲和层析。所采用的此类树脂的例子有肝素柱、凝集素柱、染料柱、和金属螯合柱。最后,可采用一个或多个采用疏水性 RP-HPLC 介质(例如硅胶或具有悬挂甲基、辛基、辛基癸基或其它脂肪族基团的聚合物树脂)的反相高效液相层析(RP-HPLC)步骤来进一步纯化多肽。各式各样组合的一些或所有上述纯化步骤是公知的且可用于提供分离的和纯化的重组蛋白。

[0105] 在细菌培养物中生成的重组蛋白通常通过首先破碎宿主细胞、离心、自细胞团粒提取来分离(如果是不溶性多肽的话),或者自上清液分离(如果是可溶性多肽的话),接着是一个或多个浓缩、盐析、离子交换、亲和纯化或大小排阻层析步骤。最后,可采用 RP-HPLC 作为最后的纯化步骤。可通过任何便利方法来破碎微生物细胞,包括冻融循环、超声处理、机械破碎、或使用溶胞剂。

[0106] 也可能利用包含 SERPINE2 结合蛋白(诸如针对 SERPINE2 多肽生成的单克隆抗体)的亲和柱来亲和纯化表达的多肽。可以使用常规技术自亲和柱移除这些多肽,例如在高盐洗脱缓冲液中,然后透析入盐较低的缓冲液供使用或通过根据所利用亲和基质来改变 pH 或其它成分,或使用亲和基质的天然存在底物(诸如自本发明衍生的多肽)来竞争性移除。

[0107] 期望的纯度取决于蛋白质的预定用途。例如当 SERPINE2 多肽要体内施用,想要相对较高的纯度。在此类情况中,纯化 SERPINE2 多肽使得在通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析时检测不到与其它蛋白质对应的蛋白质条带。有关领域的技术人员会领会,由于差异糖基化、差异翻译后加工、等等,通过 SDS-PAGE 可显现多个与多肽对应的条

带。最优选地,本发明的多肽纯化至基本上同质,如通过 SDS-PAGE 分析时单一蛋白质条带所指示的。蛋白质条带可通过银染色、考马斯 (Coomassie) 蓝染色、或(如果蛋白质被放射性标记的话)通过放射自显影来显现。

[0108] 纯化的 SERPINE2 制备物是商品化的,而且可用于本发明的方法。

[0109] SERPINE2 的拮抗剂

[0110] 本发明涵盖 SERPINE2 的拮抗剂。SERPINE2 的拮抗剂干扰 SERPINE2 功能,例如通过消除 SERPINE2 的蛋白酶抑制性功能来实现。在多个优选的实施方案中,所述拮抗剂下调或降低由升高水平的 SERPINE2 引起的胶原 1A1 表达。在多个优选的实施方案中,所述拮抗剂下调或降低由升高水平的 SERPINE2 引起的 α -平滑肌肌动蛋白表达。最优选地,所述拮抗剂下调或降低由升高水平的 SERPINE2 引起的胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达。优选地,所述下调在肺成纤维细胞中,最优选地,在人类肺成纤维细胞中。表达可直接(通过测量 RNA)或间接(例如通过测量蛋白质)测量。

[0111] 此类拮抗剂包括特异性结合 SERPINE2 且抑制 SERPINE2 生物学活性的抗体;干扰 SERPINE2 表达的反义核酸 RNA;干扰 SERPINE2 表达的小干扰 RNA;与 SERPINE2 的反应性中心环对应的小肽;和 SERPINE2 的小分子抑制剂。

[0112] 可通过本领域已知的和/或本申请中公开的多种技术来对候选 SERPINE2 的拮抗剂筛选功能,诸如干扰 SERPINE2 对胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶(诸如凝血酶、胰蛋白酶、纤溶酶、和尿激酶)的抑制的能力;在体外对胶原和/或 α -平滑肌肌动蛋白表达的抑制;和针对小鼠模型中博来霉素诱导的纤维化的保护。

[0113] 抗体

[0114] 在一个实施方案中,所述 SERPINE2 的拮抗剂是抗体。抗体可以是合成的、单克隆的、或多克隆的,而且可以通过本领域公知技术来生成。此类抗体经抗体的抗原结合位点特异性结合 SERPINE2(与非特异性结合相反)。可采用上文所列 SERPINE2 多肽、片段、变体、融合蛋白、等作为免疫原来生成对其有免疫反应性的抗体。更具体地,所述多肽、片段、变体、融合蛋白、等含有引发抗体形成的抗原决定簇或表位。

[0115] 这些抗原决定簇或表位可以是线性的或者是构象性的(不连续的)。线性表位由多肽的一段氨基酸构成,而构象性的或不连续的表位由来自多肽链的不同区域、在蛋白质折叠时变成密切接近的多段氨基酸构成(C. A. Janeway, Jr. 和 P. Travers, *Immuno Biology* 3:9(Garland Publishing Inc., 第2版,1996))。因为折叠后的蛋白质具有复杂的表面,所以可及表位的数目相当多;然而,由于蛋白质的构象和空间位阻,实际结合表位的抗体的数目少于可及表位的数目(C. A. Janeway, Jr. 和 P. Travers, *Immuno Biology* 2:14(Garland Publishing Inc., 第2版,1996))。可通过本领域已知的任何方法来鉴定表位。

[0116] 如此,本发明的一个方面涉及 SERPINE2 多肽的抗原性表位。此类表位可用于生成抗体,特别是单克隆抗体,如下文详细描述。另外,来自 SERPINE2 多肽的表位可用作研究试剂,用于测定法,及用于自诸如多克隆血清或来自培养的杂交瘤的上清液等物质纯化特异性结合抗体。此类表位或其变体可使用本领域公知技术来生成,诸如固相合成、化学或酶促切割多肽、或使用重组 DNA 技术。

[0117] 本发明涵盖特异性结合 SERPINE2 且阻断其抑制靶蛋白酶的抗体(包括 scFV 片段)。此类抗体可例如使用 Verbeke 等, *J. Thromb. Haemost.* 2:298-305, 2004 及 Brooks 等,

Clinical & Experimental Metastasis 18:445-453, 2001 中所列规程来生成。

[0118] 本发明涵盖阻断其抑制靶蛋白酶的针对 SERPINE2 的单克隆抗体。例示性的针对 SERPINE2 的阻断性单克隆抗体记载于 Wagner 等, Biochemistry 27:2173-2176, 1988 及 Boulaftali 等, Blood First Edition Paper, prepublished online October 23, 2009; DOI 10.1182/blood-2009-04-217240。

[0119] 特别地, 优选阻断 SERPINE2 结合其靶蛋白酶或阻断 SERPINE2 结合肝素的单克隆抗体。此类抗体可使用常规体外结合测定法或使用实施例中所列测定法来筛选。

[0120] 在一个实施方案中, 生成了结合 SERPINE2 之蛋白酶相互作用域的单克隆抗体。这种抗体可使用完整 SERPINE2 多肽或含有 SERPINE2 之蛋白酶相互作用域的 SERPINE2 片段作为免疫原来生成。可对所述抗体评估其阻断 SERPINE2 与靶蛋白酶相互作用的能力。

[0121] 抗体能够以高亲合力和特异性二者结合它们的靶物。它们是相对较大的分子(约 150kDa), 当抗体结合位点与蛋白质-蛋白质相互作用位点接近时, 这能在空间上抑制两种蛋白质(例如 SERPINE2 和其靶蛋白酶)之间的相互作用。如此, 在一个实施方案中, 本发明涵盖结合 SERPINE2 的“反应性中心环”(RCL) 并抑制有关蛋白酶结合的抗体, 这能阻止 SERPINE2 对有关蛋白酶的灭活。本发明涵盖结合直接接触蛋白酶的 RCL 残基的抗体。本发明进一步涵盖结合与 SERPINE2-蛋白酶结合位点密切接近的表位的抗体。

[0122] 在各种实施方案中, 本发明涵盖结合接触 SERPINE2 辅因子诸如肝素的残基或与辅因子结合位点接近的残基的抗体, 其通过干扰辅因子介导的对 SERPINE2 抑制活性的增强来削弱 SERPINE2 抑制性活性。

[0123] 在各种实施方案中, 本发明涵盖干扰分子间相互作用(例如蛋白质-蛋白质相互作用)的抗体, 以及扰乱分子内相互作用(例如分子内的构象变化)的抗体。如此, 本发明涵盖如下的抗体, 其结合 SERPINE2 之 RCL, 优选 SERPINE2 之氨基酸 348 至 364 或氨基酸 348 至 374, 并在蛋白酶结合后阻止该环插入“ β -片层 A”及阻止 SERPINE2 抑制性活性, 这通过干扰所附着的蛋白酶扭曲和随后降解来实现。类似地, 本发明涵盖如下的抗体, 其迫使未被占据的 SERPINE2 的 RCL 适应“插入”构象并干扰丝氨酸蛋白酶抑制性活性, 这通过保持蛋白酶结合位点隔绝且不能供蛋白酶结合来实现。

[0124] 抗体结合特定靶物的能力已被用于将各种类型的功能性分子特异性投递至感兴趣靶标。此类分子的实例包括毒素、细胞因子、放射性同位素、和小分子药物或前药。在此类情况中, 可经共价化学或肽接头将这些分子附着至抗体, 或者在多肽诸如细胞因子的情况中, 可经肽键来直接连接它们。类似地, 可使用靶向 SERPINE2 的抗体来投递特异性灭活其蛋白酶抑制性活性的分子。在一个实施方案中, 本发明涵盖直接将突变型蛋白酶投递至 SERPINE2 的抗体。此突变型蛋白酶可保留蛋白酶活性、与 SERPINE2 形成共价酯键、切割 RCL、及诱导 RCL 插入 β 片层, 但是不保留结合(并因此切割)其自身天然底物的能力。由于 SERPINE2 以 1:1 摩尔比结合其关联蛋白酶, 而且由于 SERPINE2 当其结合并灭活蛋白酶时自身遭到破坏, 所以通过抗体将此突变型蛋白酶投递至 SERPINE2 能有效耗尽 SERPINE2 供应, 提高天然关联蛋白酶活性的水平。可经共翻译或翻译后手段将突变型蛋白酶附着至抗体。

[0125] 可对抗体筛选阻断 SERPINE2 之生物学活性或 SERPINE2 对配体的结合的能力和/或其它特性。例如, 可对抗体筛选在体外结合及阻断胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶诸如凝血酶、

胰蛋白酶、纤溶酶、和尿激酶的能力。参见例如 Wagner 等, *Biochemistry* 27:2173-2176, 1988。还有,可对抗体筛选在暴露于升高水平的 SERPINE2 的人类肺成纤维细胞中抑制胶原 1A1 和 / 或 α -平滑肌肌动蛋白表达或阻断成肌纤维细胞形成的能力,这使用本文所列规程来进行。另外,可对抗体筛选在体内针对博来霉素诱导的肺纤维化提供保护的能力,这使用 Yaekashiwa 等, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156:1937-1944(1997) 及 Dohi 等, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162:2302-2307(2000) 中记载的小鼠模型来进行。

[0126] 至于能由 SERPINE2 多肽的表位引发的抗体,无论所述表位已经分离或者仍是多肽的一部分,多克隆和单克隆抗体都可通过下文所述常规技术来制备。

[0127] 在本发明的这个方面,可利用 SERPINE2 和基于 SERPINE2 氨基酸序列的肽来制备特异性结合 SERPINE2 的抗体。术语“抗体”意图包括多克隆抗体、单克隆抗体、其片段,诸如 $F(ab')_2$ 和 Fab 片段、单链可变片段 (scFv)、单域抗体片段 (V_H 或纳米抗体)、二价抗体片段 (双抗体)、以及任何重组和合成生成的结合配偶。

[0128] 如果抗体以大于或等于约 $10^7 M^{-1}$ 的 K_a 结合 SERPINE2 多肽,那么将它们定义为特异性结合。结合配偶或抗体的亲和力可使用常规技术容易地测定,例如 Scatchard 等, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 51:660(1949) 中记载的那些。

[0129] 多克隆抗体可使用本领域公知规程容易地自多种来源生成,例如马、牛、山羊、绵羊、犬、鸡、家兔、小鼠、或大鼠。一般地,将适当偶联的纯化的 SERPINE2 或基于 SERPINE2 氨基酸序列的肽施用于宿主动物,通常经由胃肠外注射。SERPINE2 的免疫原性可经由使用佐剂来增强,例如弗氏完全或不完全佐剂。强化免疫接种后,收集小份血清样品并测试对 SERPINE2 多肽的反应性。可用于此类测定的多种测定法的例子包括 *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow 和 Lane 编, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 中记载的那些;以及诸如对流免疫电泳 (CIEP)、放射性免疫测定法、放射性免疫沉淀、酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、点印迹测定法、和三明治式测定法等规程。参见美国专利 No. 4, 376, 110 和 4, 486, 530。

[0130] 单克隆抗体可使用公知规程容易地制备。参见例如美国专利 No. RE32, 011; 4, 902, 614; 4, 543, 439; 和 4, 411, 993; *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennett, McKeam, 和 Bechtol 编, 1980 中记载的规程。

[0131] 例如,可给宿主动物诸如小鼠腹膜内注射至少一次和优选至少两次 (以约 3 周间隔) 分离的和纯化的 SERPINE2 或偶联的 SERPINE2 肽,例如包含氨基酸 348 至 364 或氨基酸 348 至 374 或者由氨基酸 348 至 364 或氨基酸 348 至 374 组成的肽,任选有佐剂存在。然后通过常规点印迹技术或抗体捕捉 (ABC) 来测定小鼠血清以确定哪只动物最适合融合。大约 2-3 周后,给予小鼠静脉内强化 SERPINE2 或偶联的 SERPINE2 肽。稍后处死小鼠并遵循已建立的方案将脾细胞与商品化骨髓瘤细胞诸如 Ag8. 653 (ATCC) 融合。简言之,将骨髓瘤细胞在培养基中清洗数次并以约 3 个脾细胞对 1 个骨髓瘤细胞的比与小鼠脾细胞融合。融合剂可以是本领域中使用的任何合适试剂,例如聚乙二醇 (PEG)。将融合物分配入装有容许融合细胞选择性生长的培养基的板。然后可容许融合细胞生长大约 8 天。自所得杂交瘤收集上清液并添加至首先用山羊抗小鼠 Ig 包被的板。清洗后,将标记物诸如经标记的 SERPINE2 多肽添加至每个孔,接着温育。随后可检测阳性孔。可以大批培养来培养阳性克隆并随后

在蛋白 A 柱 (Pharmacia) 上纯化上清液。

[0132] 本发明的单克隆抗体可使用备选技术来生成, 诸如那些记载于 Alting-Mees 等, " Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas", *Strategies in Molecular Biology* 3:1-9 (1990) 的, 通过述及收入本文。类似地, 可使用重组 DNA 技术掺入编码特定结合抗体的基因的可变区来构建结合配偶。这样一种技术记载于 Larrick 等, *Biotechnology*, 7:394 (1989)。

[0133] 本发明还涵盖此类抗体的抗体结合片段, 其可通过常规技术来生成。此类片段的例子包括但不限于 Fab 和 $F(ab')_2$ 片段。还提供了通过遗传工程技术生成的抗体片段和衍生物。

[0134] 本发明的单克隆抗体包括嵌合抗体, 例如鼠单克隆抗体的人源化形式。此类人源化抗体可通过已知技术来制备, 而且当该抗体施用于人类时提供免疫原性降低的优点。在一个实施方案中, 人源化单克隆抗体包含鼠抗体的可变区 (或仅仅是其抗原结合位点) 和自人类抗体衍生的恒定区。或者, 人源化抗体片段可包含鼠单克隆抗体的抗原结合位点和自人类抗体衍生的可变区片段 (缺少抗原结合位点)。用于生成嵌合的和进一步改造的单克隆抗体的规程包括 Riechmann 等 (*Nature* 332:323, 1988), Liu 等 (*PNAS* 84:3439, 1987), Larrick 等 (*Bio/Technology* 7:934, 1989), 及 Winter 和 Harris (*TIPS* 14:139, May, 1993) 中记载的那些。转基因生成抗体的规程可见于 GB2, 272, 440, 美国专利 No. 5, 569, 825 和 5, 545, 806。

[0135] 可使用通过遗传工程方法生成的抗体, 诸如嵌合和人源化单克隆抗体, 其包括人和非人部分二者, 可使用标准重组 DNA 技术来生成。此类嵌合和人源化单克隆抗体可使用本领域已知的标准 DNA 技术通过遗传工程来生成, 例如使用下列文献中记载的方法: Robinson 等, 国际公开号 WO 87/02671; Akira 等, 欧洲专利申请 0184187; Taniguchi, M., 欧洲专利申请 0171496; Morrison 等, 欧洲专利申请 0173494; Neuberger 等, PCT 国际公开号 WO 86/01533; Cabilly 等, 美国专利 No. 4, 816, 567; Cabilly 等, 欧洲专利申请 0125023; Better 等, *Science* 240:1041-1043, 1988; Liu 等, *PNAS* 84:3439-3443, 1987; Liu 等, *J. Immunol.* 139:3521-3526, 1987; Sun 等, *PNAS* 84:214-218, 1987; Nishimura 等, *Canc. Res.* 47:999-1005, 1987; Wood 等, *Nature* 314:446-449, 1985; 及 Shaw 等, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559, 1988; Morrison, S. L., *Science* 229:1202-1207, 1985; Oi 等, *BioTechniques* 4:214, 1986; Winter, 美国专利 No. 5, 225, 539; Jones 等, *Nature* 321:552-525, 1986; Verhoeyan 等, *Science* 239:1534, 1988; 及 Beidler 等, *J. Immunol.* 141:4053-4060, 1988。

[0136] 关于合成的和半合成的抗体, 此类术语意图涵盖但不限于抗体片段、同种型转换的抗体、人源化抗体、杂合物 (例如小鼠-人类、人类-小鼠)、具有多种特异性的抗体、和完全合成的抗体样分子。

[0137] 在一个优选的实施方案中, 所述拮抗剂是特异性识别 SERPINE2 之活性位点 (即反应性中心环) 的抗体。对于治疗性应用, 具有人类恒定区和可变区的 "人" 单克隆抗体常常是优选的, 以使患者针对该抗体的免疫应答最小化。此类抗体可通过免疫含有人类免疫球蛋白基因的转基因动物来生成。参见 Jakobovits 等, *Ann NY Acad Sci* 764:525-535 (1995)。

[0138] 针对 SERPINE2 多肽的人类单克隆抗体也可通过构建组合免疫球蛋白库来制备, 诸如 Fab 噬菌体展示库或 scFv 噬菌体展示库, 其使用自受试者淋巴细胞衍生的 mRNA 制备的免疫球蛋白轻链和重链 cDNA 来进行。参见例如 McCafferty 等, PCT 公开文本 WO 92/01047 ;Marks 等 (1991) J. Mol. Biol. 222 :581-597 ;及 Griffths 等 (1993) EMBO J 12 : 725-734。另外, 可通过突变已知的人类抗体来生成抗体可变区的组合文库。例如, 可突变已知结合 SERPINE2 的人类抗体的可变区, 通过例如使用随机改变的诱变寡核苷酸来进行, 以生成突变型可变区的文库, 然后可对它们筛选对 SERPINE2 的结合。在免疫球蛋白重链和 / 或轻链的 CDR 区内诱导随机诱变的方法、杂交随机化的重链和轻链以形成配对的方法及筛选方法可见于例如 Barbas 等, PCT 公开文本 WO 96/07754 ;Barbas 等 (1992) Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 89 :4457-4461。

[0139] 免疫球蛋白库可通过一群展示包装 (优选自丝状噬菌体衍生的) 表达以形成抗体展示库。特别适合在生成抗体展示库中使用的方法和试剂的例子可见于例如 Ladner 等, 美国专利美国专利 No. 5, 223, 409 ;Kang 等, PCT 公开文本 WO 92/18619 ;Dower 等, PCT 公开文本 WO 91/17271 ;Winter 等, PCT 公开文本 WO 92/20791 ;Markland 等, PCT 公开文本 WO 92/15679 ;Breitling 等, PCT 公开文本 WO 93/01288 ;McCafferty 等, PCT 公开文本 WO 92/01047 ;Garrard 等, PCT 公开文本 WO 92/09690 ;Ladner 等, PCT 公开文本 WO 90/02809 ;Fuchs 等 (1991) Bio/Technology 9 :13701372 ;Hay 等 (1992) HumAntibod Hybridomas 3 :8185 ;Huse 等 (1989) Science 246 :1275 1281 ;Griffths 等 (1993) supra ;Hawkins 等 (1992) J Mol Biol 226 :889 896 ;Clackson 等 (1991) Nature 352 :624 628 ;Gram 等 (1992) PNAS 89 :3576 3580 ;Garrard 等 (1991) Bio/Technology 9 :1373 1377 ;Hoogenboom 等 (1991) Nuc Acid Res 19 :41334137 ;及 Barbas 等 (1991) PNAS 88 :7978 7982。一旦在展示包装 (例如丝状噬菌体) 的表面上展示, 即筛选抗体库以鉴定和分离表达结合 SERPINE2 多肽的抗体的包装。在一个优选的实施方案中, 对文库的一级筛选涉及用固定化 SERPINE2 多肽来淘选并选择展示包装, 该展示包装表达与固定的 SERPINE2 多肽结合的抗体。

[0140] 有机和肽小分子抑制剂

[0141] 在本发明的其它实施方案中, 使用的拮抗剂是基于它们结合 SERPINE2 的活性位点 (即反应性中心环) 的能力的存在, 作为 SERPINE2 的配体设计的肽、多肽、蛋白质、或模拟肽。此类分子作为整联蛋白的配体的设计例示于例如 Pierschbacher 等, J. Cell. Biochem. 56 :150-154 (1994) ;Chorev 等, Biopolymers 37 :367-375 (1995) ;Pasqualini 等, J. Cell. Biol. 130 :1189-1196 (1995) ;Smith 等, J. Biol. Chem. 269 :32788-32795 (1994) 中。

[0142] 使用与反应性中心环对应的氨基酸肽来灭活 SERPINE2 的例示性规程提供于 Eitzman 等, J. Clin. Invest. 95 :2416-2420, 1995 ;Bjork 等, J. Biol. Chem. 267 :1976-1982, 1992 ;Schulze 等, Eur. J. Biochem. 194 :51-56, 1990 中。

[0143] 在本发明的其它实施方案中, 使用的拮抗剂是灭活或抑制 SERPINE2 活性的低分子量有机分子。使用低分子量有机分子来灭活 SERPINE2 的例示性规程提供于 Brooks 等, Anticancer Drugs 15 :37-44, 2004 ;美国专利 7, 368, 471、7, 259, 182、和 6, 599, 925 中, 它们提供了低分子量有机分子来灭活 SERPINE1。

[0144] 反义核酸分子

[0145] 在本发明的一些实施方案中,使用反义核酸分子作为 SERPINE2 的拮抗剂。反义核酸分子是核酸的互补寡核苷酸链,其设计成结合特定核苷酸序列以抑制靶蛋白生成。

[0146] 依照本发明,反义或有义寡核苷酸包含 DNA (SEQ ID NO :1) 的片段。此类片段一般包含至少约 14 个核苷酸,优选约 14 个至约 30 个核苷酸。基于编码给定蛋白质的 cDNA 序列推导反义或有义寡核苷酸的能力记载于例如 Stein 和 Cohen (Cancer Res. 48 :2659,1988) 和 van der Krol 等 (BioTechniques 6 :958,1988) 中。

[0147] 可以如 Kim 和 Loh, Mol. Biol. Cell. 17 :789-798,2006 及 Sawa 等, J. Biol. Chem. 269 :14149-14152,1994 所述生成反义 RNA 和寡核苷酸并用来抑制 SERPINE2 表达。

[0148] 给予这些成分的编码链序列,即可以依照 Watson 和 Crick 碱基配对规则来设计反义核酸。反义核酸分子可以与 mRNA 的整个编码区互补,但是更优选的是,仅对 mRNA 的编码区或非编码区的部分反义的寡核苷酸。例如,反义寡核苷酸可以与 mRNA 的翻译起始位点周围的区域互补。反义寡核苷酸的长度可以为例如约 10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 个核苷酸。可以使用本领域中已知的规程使用化学合成和酶促连接反应来构建反义核酸。例如,可以使用天然存在的核苷酸或以各种方式修饰的核苷酸来化学合成反义核酸(例如反义寡核苷酸),所述以各种方式修饰的核苷酸设计用于提高该分子的生物学稳定性或者用于提高反义和有义核酸之间形成的双链体的物理稳定性,例如可以使用硫代磷酸酯衍生物和吡啶取代核苷酸。可以用于生成反义核酸的修饰核苷酸的例子包括 5- 氟尿嘧啶、5- 溴尿嘧啶、5- 氯尿嘧啶、5- 碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4- 乙酰基胞嘧啶、5-(羧基甲基) 尿嘧啶、5- 羧基氨基甲基 -2- 硫尿核苷、5- 羧基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 β -D- 半乳糖基腺苷 (galactosylqueosine, galactosylqueuosine)、肌苷、N6- 异戊烯基腺嘌呤 (isopentenyladenine)、1- 甲基鸟嘌呤、1- 甲基肌苷、2,2- 二甲基鸟嘌呤、2- 甲基腺嘌呤、2- 甲基鸟嘌呤、3- 甲基胞嘧啶、5- 甲基胞嘧啶、N6- 腺嘌呤、7- 甲基鸟嘌呤、5- 甲氨基甲基尿嘧啶、5- 甲氧基氨基 -2- 硫尿嘧啶、 β -D- 甘露糖基腺苷 (mannosylqueosine)、5'- 甲氧基氨基甲基尿嘧啶、5- 甲氧基尿嘧啶、2- 甲硫基 -N6- 异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶 -5- 含氧乙酸 (oxyacetic acid) (v)、怀丁氧苷 (wybutoxosine)、假尿嘧啶、腺苷 (queosine)、2- 硫胞嘧啶、5- 甲基 -2- 硫尿嘧啶、2- 硫尿嘧啶、4- 硫尿嘧啶、5- 甲基尿嘧啶、尿嘧啶 -5- 含氧乙酸甲酯 (oxyacetic acid methylester)、尿嘧啶 -5- 含氧乙酸 (v)、5- 甲基 -2- 硫尿嘧啶、3-(3- 氨基 -3-N-2- 羧丙基) 尿嘧啶、(acp3)w、和 2,6- 二氨基嘌呤。或者,可以使用已经将核酸以反义取向(即,自所插入核酸转录的 RNA 对感兴趣靶核酸而言是反义取向的)亚克隆入其中的表达载体来以生物学方式生成反义核酸。

[0149] 反义或有义寡核苷酸对靶核酸序列的结合导致双链体的形成,其通过数种手段之一阻断或抑制蛋白质表达,包括增强 RNA 酶 H 对 mRNA 的降解、抑制剪接、转录或翻译过早终止、或通过其它手段。反义寡核苷酸如此可用于阻断 SERPINE2 表达。反义或有义寡核苷酸进一步包含具有修饰糖 - 磷酸二酯主链(或其它糖连接,诸如 W091/06629 中记载的那些)且其中此类糖连接对内源核酸酶有抗性的寡核苷酸。此类具有抗性糖连接的寡核苷酸在体外是稳定的(即能够抵抗酶促降解)但保留序列特异性以能够结合靶核苷酸序列。

[0150] 有义或反义寡核苷酸的其它例子包括那些共价连接有有机模块的寡核苷酸,诸如 WO 90/10448 中记载的那些,和提高寡核苷酸对靶核酸序列的亲合力的其它模块,诸如聚-(L- 赖氨酸)。另外,可将插入剂(诸如椭圆玫瑰树碱 (ellipticine)) 和烷化剂或金属

复合物附着至有义或反义寡核苷酸以改变反义或有义寡核苷酸对靶核苷酸序列的结合特异性。

[0151] 可通过任何基因转移方法将反义或有义寡核苷酸导入含有靶核酸序列的细胞,例如脂转染、CaPO₄ 介导的 DNA 转染、电穿孔、或通过使用基因转移载体诸如 Epstein-Barr 病毒。

[0152] 优选地,通过将有义或反义寡核苷酸插入合适的逆转录病毒载体,然后在体内或离体地使细胞与含有插入序列的逆转录病毒载体接触来将有义或反义寡核苷酸导入含有靶核酸序列的细胞。合适的逆转录病毒载体包括鼠逆转录病毒 M-MuLV、N2(一种自 M-MuLV 衍生的逆转录病毒)、或称作 DCT5A、DCT5B 和 DCT5C 的双拷贝载体(参见 PCT 申请美国流水号 90/02656)。

[0153] 也可通过与配体结合分子的偶联物的形成将有义或反义寡核苷酸导入含有靶核苷酸序列的细胞,如 WO 91/04753 中记载的。合适的配体结合分子包括但不限于细胞表面受体、生长因子、其它细胞因子、或结合细胞表面受体的其它配体。优选地,配体结合分子的偶联没有实质性干扰配体结合分子结合其相应分子或受体的能力,或阻断有义或反义寡核苷酸或其偶联形式进入细胞。

[0154] 或者,可通过寡核苷酸-脂质复合物的形成将有义或反义寡核苷酸导入含有靶核酸序列的细胞,如 WO 90/10448 中记载的。优选地,有义或反义寡核苷酸-脂质复合物在细胞内被内源脂肪酶分解。

[0155] 可以作为反义寡核苷酸诸如 RNA 来提供反义拮抗剂(参见例如 Murayama 等, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7:109-114(1997))。也可在病毒载体中提供反义基因,诸如例如在乙肝病毒中(参见例如 Ji 等, J. Viral Hepat. 4:167-173(1997));在腺伴随病毒中(参见例如 Xiao 等, Brain Res. 756:76-83(1997));或在其它系统中,包括但不限于 HVJ(仙台病毒)-脂质体基因投递系统(参见例如 Kaneda 等, Ann. N. Y. Acad. Sci. 811:299-308(1997));“肽载体”(参见例如 Vidal 等, CR Acad. Sci III 32:279-287(1997));作为附加体或质粒载体中的基因(参见例如 Cooper 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94:6450-6455(1997);Yew 等, Hum Gene Ther 8:575-584(1997));作为肽-DNA 聚集体中的基因(参见例如 Niidome 等, J. Biol. Chem. 272:15307-15312(1997));作为“裸 DNA”(参见例如美国专利 No. 5,580,859 和 5,589,466);及在脂载体系统中(参见例如 Lee 等, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 14:173-206(1997))。

[0156] 小干扰 RNA

[0157] 在本发明的一些实施方案中,使用 RNAi 分子作为 SERPINE2 的拮抗剂。RNAi 经一种遍在机制通过以序列特异性方式降解靶 mRNA 来调节基因表达。McManus 等,2002, Nat Rev Genet 3:737-747。在哺乳动物细胞中,可通过 21 至 23 个核苷酸的双链体 siRNA 来触发干扰性 RNA(RNAi)。Lee 等,2002, Nat Biotechnol 20:500-505;Paul 等,2002, Nat Biotechnol. 20:505-508;Miyagishi 等,2002, Nat Biotechnol. 20:497-500;Paddison 等,2002, Genes Dev. 16:948-958。在哺乳动物细胞中,由 U6 启动子驱动的 siRNA 或短发夹 RNA(shRNA) 表达有效介导靶 mRNA 降解。合成 siRNA 双链体和质粒衍生的 siRNA 能通过特异性降解 HIV 基因组 RNA 来抑制 HIV-1 感染和复制。McManus 等, J. Immunol. 169:5754-5760;Jacque 等,2002, Nature 418:435-438;Novina 等,2002, Nat Med 8:681-686。还有,靶向

HCV 基因组 RNA 的 siRNA 抑制 HCV 复制。Randall 等, 2003, Proc Natl Acad Sci USA 100 : 235-240 ; Wilson 等, 2003, Proc Natl Acad Sci USA 100 : 2783-2788。被 siRNA 靶向的 Fas 保护肝脏免于暴发性肝炎和纤维化。Song 等, 2003, Nat Med 9 : 347-351。

[0158] 在多个优选的实施方案中, 使用 RNA 干扰 (RNAi) 分子来降低 SERPINE2 的基因表达。RNA 干扰 (RNAi) 指使用双链 RNA (dsRNA) 或小干扰 RNA (siRNA) 来遏制包含相关核苷酸序列的基因的表达。RNAi 也称作转录后基因沉默 (PTGS)。由于正常情况下在细胞的胞质中找到的唯一 RNA 分子是单链 mRNA 的分子, 所以细胞具有识别 dsRNA 并将 dsRNA 切割成含有 21-25 个碱基对的片段 (大约两匝双螺旋且其称作小干扰 RNA 或 siRNA) 的酶。该片段的反义链与有义链足够分开, 使得它与内源细胞 mRNA 分子的互补有义序列杂交。此杂交触发在双链区中切割 mRNA, 如此破坏其翻译成多肽的能力。导入与特定基因对应的 dsRNA 因此在特定组织中和 / 或在选定时间敲除细胞自身对该基因的表达。

[0159] 使用 RNA 干扰来遏制 SERPINE2 表达的例示性规程见 Kortlever 等, Nature Cell Biology 8 : 877-884, 2006。

[0160] 可使用双链 (ds) RNA 来干扰哺乳动物中的基因表达。使用 dsRNA 作为本发明核酸分子的功能的抑制性 RNA 或 RNAi 以产生与 SERPINE2 核酸分子的无效突变体相同的表型 (参见 Wianny 和 Zernicka-Goetz, 2000, Nature Cell Biology 2 : 70-75)。

[0161] 或者, 可直接将 siRNA 导入细胞以介导 RNA 干扰 (Elbashir 等, 2001, Nature 411 : 494-498)。已开发了多种方法来生成 siRNA, 例如化学合成或体外转录。一旦生成, 就经瞬时转染将 siRNA 导入细胞。也已开发了多种表达载体来在瞬时和稳定转染的哺乳动物细胞中持续表达 siRNA (Brummelkamp 等, 2002 Science 296 : 550-553 ; Sui 等, 2002, PNAS 99 (6) : 5515-5520 ; Paul 等, 2002, Nature Biotechnol. 20 : 505-508)。已改造这些载体中的一些来表达小发夹 RNA (shRNA), 其在体内被加工成能够进行基因特异性沉默的 siRNA 样分子。另一类 siRNA 表达载体编码在分开的 pol III 启动子控制下的有义和反义 siRNA 链 (Miyagishi 和 Taira, 2002, Nature Biotechnol. 20 : 497-500)。来自这种载体的 siRNA 链, 像另一载体的 shRNA, 具有 3' 胸苷终止信号。两类表达载体的沉默功效都与通过瞬时转染 siRNA 诱导的相当。

[0162] 可直接将 RNA 导入细胞 (即细胞内) ; 或导入细胞外的腔隙, 间质空间, 导入生物体的循环, 或口服导入。也可使用导入核酸的物理方法, 例如直接注射入细胞或细胞外注射入生物体。血管或血管外循环、血液或淋巴系统、和脑脊液是可导入 RNA 的部位。

[0163] 导入核酸的物理方法包括注射含有 RNA 的溶液、用覆盖有 RNA 的颗粒轰击、在 RNA 的溶液中浸泡细胞或生物体、或在 RNA 存在下对细胞膜电穿孔。包装入病毒颗粒的病毒构建物会实现表达构建物高效导入细胞和由表达构建物编码的 RNA 转录二者。可使用本领域已知的用于将核酸导入细胞的其它方法, 诸如脂质介导的载体转运、化学品介导的转运诸如磷酸钙介导的转运, 等等。如此, 可与实施一种或多种下述活性的成分一起导入 RNA : 增强细胞对 RNA 的摄取, 促进双链体链的退火, 稳定退火的链, 或以其它方式提高对靶基因的抑制。

[0164] RNA 可包含一条或多条多聚的核糖核苷酸的链。它可包括对磷酸-糖主链或核苷酸的修饰。例如, 可修饰天然 RNA 的磷酸二酯连接以包括氮或硫杂原子中至少一种。可调整 RNA 结构中的修饰以容许特异性遗传抑制同时避免一些生物体中由 dsRNA 产生的一般性

恐慌应答 (general panic response)。类似地,可修饰碱基以阻断腺苷脱氨酶的活性。RNA 可酶促地或通过部分 / 完全有机合成来生成,可通过体外酶促或有机合成来导入任何修饰核糖核苷酸。

[0165] 双链结构可由一条自我互补 RNA 链或两条互补 RNA 链形成。RNA 双链体形成可在细胞内或细胞外启动。可以以容许投递每个细胞至少一个拷贝的量导入 RNA。更高剂量 (例如每个细胞至少 5、10、100、500 或 1000 个拷贝) 的双链材料可产生更有效的抑制;更低剂量也可用于特定应用。抑制是序列特异性的,其在于遗传抑制靶向与 RNA 双链区对应的核苷酸序列。RNA 分子的长度可以是至少 10、12、15、20、21、22、23、24、25、30 个核苷酸。

[0166] 含有与靶基因一部分相同的核苷酸序列的 RNA 是抑制所优选的。发现相对于靶序列具有插入、删除、和单一点突变的 RNA 序列对于抑制也是有效的。如此,可优化序列同一性,其通过本领域已知的序列比较和比对算法 (参见 Gribskov 和 Devereux, Sequence Analysis Primer, Stockton Press, 1991, 及其中引用的参考文献) 并通过例如 Smith-Waterman 算法 (如 BESTFIT 软件程序中执行的) 使用缺省参数 (例如 University of Wisconsin Genetic Computing Group) 计算核苷酸序列间的百分比差异。优选抑制性 RNA 和靶基因一部分之间大于 90% 序列同一性或甚至 100% 序列同一性。或者,可将 RNA 的双链体区在功能上限定为能够与靶基因转录物一部分杂交的核苷酸序列 (例如在 400mM NaCl、40mM PIPES pH 6.4、1mM EDTA 中于 50°C 或 70°C 杂交 12-16 小时;接着清洗)。相同核苷酸序列的长度可以是至少 25、50、100、200、300 或 400 个碱基。

[0167] 本发明的实施不要求 RNA 和靶基因之间百分百的序列同一性。如此,本发明具有能够容忍因遗传突变、株系多态性、或进化趋异可预期的序列变异的优点。

[0168] RNA 可在体内或在体外合成。细胞的内源 RNA 聚合酶能介导体内转录,或者可使用克隆的 RNA 聚合酶来进行体内或体外转录。对于自转基因 (体内) 或表达构建物转录,可使用调节区 (例如启动子、增强子、沉默子、剪接供体和受体、聚腺苷酸化) 来转录 (一条或多条) RNA 链。抑制可通过器官、组织、或细胞类型中的特异性转录;环境条件 (例如感染、应力、温度、化学诱导物) 的刺激;和 / 或工程化改造某发育阶段或年龄时的转录来实现靶向性。RNA 链可聚腺苷酸化;RNA 链可以能够由细胞翻译装置翻译成多肽。RNA 可通过手工或自动化反应化学地或酶促地合成。RNA 可由细胞 RNA 聚合酶或噬菌体 RNA 聚合酶 (例如 T3、T7、SP6) 合成。表达构建物的使用和生成是本领域已知的 (还可参见 WO 97/32016; 美国专利 No. 5, 593, 874; 5, 698, 425; 5, 712, 135; 5, 789, 214; 和 5, 804, 693; 及其中引用的参考文献)。如果化学地或通过体外酶促合成来合成,那么可在导入细胞之前纯化 RNA。例如,可通过用溶剂或树脂提取、沉淀、电泳、层析、或其组合自混合物纯化 RNA。或者,可以在不纯化或最低限度的纯化下使用 RNA 以避免样品加工所致损失。RNA 可干燥供贮存或溶解在水溶液中。溶液可含有缓冲剂或盐以促进退火和 / 或稳定双链体链。

[0169] 本发明可用于将 RNA 导入细胞以治疗或预防疾病,诸如 IPF。例如,可将 dsRNA 导入人类肺成纤维细胞并由此抑制 SERPINE2 的基因表达。治疗会包括任何与疾病有关的症状或与病理有关的临床适应证的改善。

[0170] 配制和施用

[0171] 在所有药剂师知道的处方集中能找到多种适合于 SERPINE2 的拮抗剂的配制剂: Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 15 版, Mack Publishing Company, Easton,

Pa., 1975, 特别是其中第 87 章, Blaug, Seymour。这些配制剂包括例如粉剂、糊剂、软膏剂、胶冻剂、蜡、油、脂、无水吸收基质、水包油或油包水乳剂、乳剂碳蜡（各种分子量的聚乙二醇）、半固体凝胶剂、和含有碳蜡的半固体混合物。

[0172] 本发明包括 SERPINE2 的拮抗剂在制备用于治疗医学状况, 特别是肺纤维化, 尤其是人类肺成纤维细胞暴露于升高水平的 SERPINE2 的肺纤维化的药物中的用途。在多个优选的实施方案中, 所述医学状况是 ALI、IPF、COPD、哮喘、或 ARDS。优选地, 所述 SERPINE2 的拮抗剂是 SERPINE2 的抗体例如单克隆抗体、RNAi 分子、反义核酸分子、肽、或小分子抑制剂。

[0173] 本发明包括治疗具有肺纤维化的患者的方法, 包括对该患者施用 SERPINE2 的拮抗剂。优选地, 所述肺纤维化是人类肺成纤维细胞暴露于升高水平的 SERPINE2 的肺纤维化。在多个优选的实施方案中, 所述患者具有 ALI、IPF、COPD、哮喘、或 ARDS。优选地, 所述 SERPINE2 的拮抗剂是 SERPINE2 的抗体例如单克隆抗体、RNAi 分子、反义核酸分子、肽、或小分子抑制剂。

[0174] 在各种实施方案中, 一月一次或少于一月一次, 例如每 2、3、4、5、或 6 个月一次将有效剂量的本发明组合物施用于受试者。在其它实施方案中, 多于一月一次, 诸如例如每两周或每周一次施用有效剂量的本发明组合物。至少一次将有效剂量的本发明组合物施用于受试者。在某些实施方案中, 可多次施用有效剂量的组合物, 包括至少一个月、至少六个月、或至少一年的时段。

[0175] 在各种实施方案中, 以每天为基础施用本发明的组合物至少 1-5 天的时段, 尽管具有已建立肺纤维化的患者可接受治疗性剂量达数月至数年的时段。如本文中使用的, “治疗性剂量” 为预防、减轻、消除、或以其它方式降低患者中症状严重程度的剂量。

[0176] 由于 SERPINE2 是细胞外蛋白酶抑制剂, 所以细胞外施用拮抗性蛋白质（例如抗体或肽）或小分子足以抑制 SERPINE2 功能。对 SERPINE2 表达的抑制（例如反义或 RNAi）要求拮抗剂进入表达 SERPINE2 的细胞。在一个优选的实施方案中, 所述细胞是人类肺成纤维细胞。

[0177] 本领域知道多种给 IPF 患者投递药物的模式。例如, 已实施了多项临床研究, 使用多种投递分子的例示性模式来治疗 IPF。已经在一项临床研究中使用单次 IV 输注一种抗结缔组织生长因子特异性单克隆抗体来治疗 IPF。另外, 在多项临床研究中已经采用吸入小分子及皮下注射和气雾剂吸入干扰素- γ 。另外, 在一项临床研究中已经通过每周两次皮下注射使用依那西普来治疗 IPF。Raghu 等, *Am J Respir Crit Care Med.* 178:948-55, 2008。

[0178] 对于抗体, 给患者施用的剂量通常是 0.1mg/kg 至 100mg/kg 患者体重。优选地, 给患者施用的剂量介于 0.1mg/kg 和 20mg/kg 患者体重之间, 更优选 1mg/kg 至 10mg/kg 患者体重。一般地, 由于对外来多肽的免疫应答, 人抗体和人源化抗体在人体内具有比来自其它物种的抗体更长的半衰期。如此, 更低剂量的人抗体和更不频繁的施用常常是可能的。

[0179] 有效治疗所必需的活性组分的量会取决于多种不同因素, 包括施用手段、靶位点、患者的生理状态、和施用的其它药物。如此, 应调整治疗剂量以优化安全性和功效。典型地, 在体外使用的剂量在对可用于原位施用活性组分的量方面能提供有用指导。用于治疗特定病症的有效剂量的动物测试会提供人类剂量的进一步预示性指示。例如 Goodman and Gilman's *the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第 7 版, 1985, MacMillan

Publishing Company, New York 及 Remington 's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, 1990, Mack Publishing Co, Easton Pa 中描述了对此的多种考虑。其中讨论了用于施用的方法, 包括口服、静脉内、腹膜内、肌肉内、经皮、鼻、离子电渗施用、诸如此类。优选地, 将配制剂施用入肺。更优选地, 吸入配制剂。

[0180] 优选地, 采用局部投递至肺来减轻系统投递可能发生的潜在副作用。这样, 可局部投递的剂量可实质性高于系统 (例如胃肠外) 投递模式可耐受的剂量。对于肺病, 诸如特发性肺纤维化、囊性纤维化、结核病、肺肿瘤或其它炎症, 经吸入路径的局部投递是优选的。静脉内施用也是优选的。

[0181] 将小分子投递至肺可通过本领域已知技术来实现。另外, 可通过本领域已知技术经吸入将蛋白质药物投递至肺。例如, 局部投递至肺的蛋白质药物, 从胰岛素到抗体, 展现一定范围的分子量。

[0182] 虽然胰岛素是可吸入蛋白质的最好的已知例子 (Exubera), 但是靶向肺 (其中不想要系统投递) 的蛋白质有许多例子。最老的例子之一是干扰素 α 或 γ , 其已被雾化来治疗肺结核 (Am J Respir Crit Care Med Vol 158, pp1156-1162, 1998; Antimicrobial Agents and Chemotherapy, June 1984, p. 729-734)。今天, 气雾剂干扰素 γ 正处于特发性肺纤维化的 1 期临床试验。皮下投递显示出对这种适应证无效。使用喷射雾化器及压缩空气, 干扰素的气雾剂小滴一般在 0.3-3.4 μm 的范围中。小颗粒尺寸确保深入到肺。

[0183] 更大的蛋白质诸如抗体也可直接投递至肺。例如, 气雾化的对 T 细胞受体特异性的单克隆抗体已成功用于气道炎症和高反应性的临床前研究 (Intl Archives of Allergy and Immunology, 134, 49-55, 2004)。又例如, 发现气雾化的针对蓖麻毒蛋白毒素的抗体保护了吸入了毒素的动物的肺 (Toxicon, 34, 1037-1033, 1996)。接受对照抗体的动物形成气道上皮坏死及所有肺叶重度水肿和炎症并在蓖麻毒蛋白施用后 48-96 小时死亡。相反, 给予雾化抗蓖麻毒蛋白抗体的动物没有形成肺损害, 且所有动物都存活。

[0184] 有多种装置可用于帮助液体配制剂的肺投递, 诸如雾化器和喷雾器。干粉吸入器可用于固体颗粒配制剂。现有装置能以“主动”或“被动”模式来投递。

[0185] 在一个实施方案中, 针对 SERPINE2 的抗体可直接自液体溶液雾化, 作为投递至肺的一种路径。在另一个实施方案中, 针对 SERPINE2 的抗体可与固体颗粒诸如脂质体或多乳酸化合物 (poly-lactide) 微球体 (GRAS 材料) 一起混合或封装。多空颗粒能够实现很高的药物载荷且还能提供药物的缓慢持续释放。颗粒可制成均一尺寸, 5 μm 是大多数肺投递策略所优选的。固体颗粒还能抑制来自肺的潜在系统暴露。液体和固体肺投递模式都可容易地在动物模型诸如博来霉素诱导的纤维化小鼠模型中优化。肺组织中的和血流中的药物水平可容易地使用标准测定法诸如 ELISA 来优化。

[0186] 本发明的组合物可以以多种单位剂量形式来施用, 这取决于施用的方法。例如, 适合于口服施用的单位剂量形式包括固体剂量形式诸如粉剂、片剂、丸剂、胶囊剂、和锭剂, 和液体剂量形式诸如酏剂、糖浆剂、和悬浮剂。活性组分也可以以无菌液体剂量形式胃肠外施用。明胶胶囊含有活性组分和作为无活性组分的粉状载体, 诸如葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露醇、淀粉、纤维素或纤维素衍生物、硬脂酸镁、硬脂酸、糖精钠、滑石、碳酸镁诸如此类。为了提供期望的颜色、口味、稳定性、缓冲能力、分散或其它已知期望特征可添加的别的无活性组分的例子有红氧化铁 (red iron oxide)、硅胶、月桂基硫酸钠、二氧化钛、可食用白墨水

诸如此类。可使用类似的稀释剂来生成压制片。片剂和胶囊剂都可制成持续释放产品以提供药物在数小时时段里的连续释放。压制片可包糖衣或薄膜衣以掩蔽任何令人不快的口味及保护片剂免于接触大气,或者包肠溶衣以在胃肠道中选择性崩解。供口服施用的液体剂量形式可含有着色剂和调味剂以提高患者接受度。

[0187] 本发明组合物在药物配制剂中的浓度可在大范围内变化,即从少于约 0.1%、通常为或至少约 2%至多达 20%至 50%或更多(以重量计),而且会主要根据流体体积、粘度、等依照所选择的具体施用模式来选择。

[0188] 本发明的组合物也可经脂质体来施用。脂质体包括乳剂、泡沫、微团/胶束、不溶性单层、液晶、磷脂分散体、片状层(lamellar layers)诸如此类。在这些制备物中,作为脂质体的一部分、单独地或与结合期望靶的分子(诸如抗体)联合或与其它治疗性或免疫原性组合物一起来掺入要投递的本发明组合物。如此,与期望的本发明组合物一起填充或装饰的脂质体可系统施用,或者可引导至感兴趣组织,然后脂质体在那里投递选定的治疗性/免疫原性肽组合物。

[0189] 供本发明中使用的脂质体可自标准泡囊形成脂质形成,其一般包括中性的和带负电荷的磷脂和固醇,诸如胆固醇。脂质的选择一般受例如脂质体尺寸、酸不稳定性和脂质体在血流中的稳定性的考虑指导。多种方法可用于制备脂质体,如记载于例如 Szoka 等, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467(1980);美国专利 No. 4,235,871;4,501,728;4,837,028;和 5,019,369。

[0190] 含有本发明组合物的脂质体悬浮液可以以随施用方式、所投递的本发明组合物、和所治疗的疾病的阶段等而变化的剂量静脉内、局部、表面、等施用。

[0191] 对于固体组合物,可使用常规无毒固体载体,包括例如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁、诸如此类。对于口服施用,通过掺入任何通常采用的赋形剂(诸如先前列出的那些载体)和一般 10-95%的活性组分(就是说,一种或多种本发明组合物,且更优选 25%-75%的浓度)来形成药学可接受的无毒组合物。

[0192] 对于气雾剂施用,优选与表面活性剂和推进剂一起以微细形式供应本发明的组合物。本发明组合物的优选百分比是 0.01%-20%(以重量计),优选 1-10%。当然,表面活性剂必须是无毒的,而且优选可溶于推进剂。此类试剂的代表是含有 6-22 个碳原子的脂肪酸(诸如己酸、辛酸、月桂酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、油硬脂酸(olestheric acid)和油酸)与脂肪族多元醇的酯或部分酯或其环酐。可采用混合酯,诸如混合的或天然的甘油酯。表面活性剂可占组合物的 0.1%-20%(以重量计),优选 0.25-5%。组合物的余额通常是推进剂。还可根据需要来包括载体,如例如用于鼻内投递的卵磷脂。

[0193] 另外,可通过本领域公知技术在储药库(depot)型系统、封装形式、或植入物中投递本发明的构建物。类似地,可经泵将构建物投递至感兴趣组织。

[0194] 任何上述配制剂可适合于依照本发明的治疗和疗法,前提是配制剂中的活性剂未被所述配制剂灭活且所述配制剂是生理相容的。

[0195] SERPINE2 活性的测定法和 SERPINE2 的拮抗剂

[0196] 可通过在 SERPINE2 存在下温育人类肺成纤维细胞并评估它对胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白的影响来评估 SERPINE2 对肺成纤维细胞的影响,例如如本文中所描述的。例如,可在含有胰岛素、rhFGF-B、硫酸庆大霉素、两性霉素-B、和胎牛血清(FBS)的成纤

维细胞生长培养基中培养正常人类肺成纤维细胞 (NHLF) 细胞 (Lonza, Product number CC-2512)。

[0197] 可用 Accutase 自烧瓶收获 NHLF 细胞,用胰蛋白酶中和溶液中和酶,将细胞沉淀,并在生长培养基中重悬浮,计数,并在 Falcon 96 孔板中以 8000 个细胞每孔以 200u1 每孔分配,并于 37℃,5% CO₂ 温育 6 小时。分配后 6 小时,使细胞血清饥饿,即除去完全生长培养基并对细胞添加 200u1 饥饿培养基 (Clonetics 成纤维细胞基础培养基 (FBM) (Lonza Cat. #CC-3131)+0.5% BSA 级分 V) 并于 37℃,5% CO₂ 温育 16-24 小时。

[0198] 自细胞除去饥饿培养基并添加 75u1 共处理,立即继以 75u1 蛋白质处理。共处理为饥饿培养基及以三种剂量之一添加的 TGF-β 1 或 IL-13, TGF 低处理为 0.1ng/ml TGF-β 1 (实验中的终浓度为 0.05ng/ml); TGF 高处理为 1.0ng/ml TGF-β 1 (实验中的终浓度为 0.5ng/ml); IL-13 处理为 10ng/ml IL-13 (实验中的终浓度为 5ng/ml)。SERPINE2 蛋白处理为 75u1 饥饿培养基及添加的重组 SERPINE2。SERPINE2 水平可以为 0ng/ml 至 10,000ng/ml。添加蛋白质处理后,将细胞于 37℃,5% CO₂ 温育 48 小时。

[0199] 48 小时处理后,除去培养基并对细胞溶胞。测定胶原 1A1 和 α-平滑肌肌动蛋白 RNA 水平。可通过本领域已知的众多技术来测定 RNA 表达水平,诸如 S1 核酸酶 /RNA 酶保护、PCR、bDNA、Northern 印迹、等。可采用对照,诸如 β-肌动蛋白。

[0200] 可对遭受升高水平的 SERPINE2 的肺成纤维细胞施用 SERPINE2 的拮抗剂以逆转升高水平的 SERPINE2 对这些细胞的影响。例如,可将 SERPINE2 的拮抗剂 (例如单克隆抗体) 添加至肺成纤维细胞,并在 48 小时温育时间后,可测定胶原 1A1 和 α-平滑肌肌动蛋白 RNA 水平。SERPINE2 的拮抗剂的水平可以是 1ng/ml 至 10,000ng/ml。可通过运行平行样品或通过比较添加拮抗剂之前的样品的等分试样与施用拮抗剂之后一些时间 (例如 24、48、72 小时) 的样品的等分试样来比较在拮抗剂存在和缺失下的 RNA 水平。

[0201] 还可通过与 SERPINE2 一起温育拮抗剂并测定 SERPINE2 与胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶,诸如凝血酶、胰蛋白酶、纤溶酶、和尿激酶复合并抑制它的能力是否改变来评估拮抗剂的效果。参见例如 Wagner 等,1988。

[0202] 可在肺纤维化的小鼠模型中检验 SERPINE2 的拮抗剂对胶原 1A1 和 α-平滑肌肌动蛋白合成的影响。在这种模型中,通过气管内注射抗肿瘤药物硫酸博来霉素,在小鼠的肺中诱导纤维化。博来霉素诱导的纤维化与人类特发性肺纤维化非常相似,如具有这种疾病的小鼠和人类二者中形态学、生物化学和 mRNA 变化的研究所证明的 (Phan, S.H. Fibrotic mechanisms in lung disease. In: Immunology of Inflammation, edited by P.A. Ward, New York: Elsevier, 1983, pp121-162; Zhang 等 (1994) Lab. Invest. 70:192-202; Phan 和 Kunkel (1992) Exper. Lung Res. 18:29-43)。

[0203] 可通过施用博来霉素并优选地随后 (例如第 10 天) 施用 SERPINE2 的拮抗剂来处理小鼠。参见例如 Moeller 等,2008。在施用拮抗剂后第 10-21 天,可收获小鼠的肺并用盐水冲洗以除去血液,并提取 mRNA,并可评估胶原蛋白和 α-平滑肌肌动蛋白表达。施用 SERPINE2 的拮抗剂能改善小鼠肺中纤维化的症状。

实施例

[0204] 实施例 1: 纯化的 SERPINE2 蛋白对 RNA 表达的影响

[0205] 评估了 SERPINE2 对肺成纤维细胞的影响,即在成纤维细胞生长培养基中温育正常人类肺成纤维细胞 (NHLF)。收获 NHLF 细胞。然后将细胞沉淀,在生长培养基中重悬浮,以 8000 个细胞每孔以 200ul 每孔分配,并于 37℃,5% CO₂ 温育 6 小时。分配后 6 小时,使细胞血清饥饿,即除去完全生长培养基并对细胞添加 200ul 饥饿培养基 (Clonetics 成纤维细胞基础培养基 (FBM) (Lonza Cat. #CC-3131)+0.5% BSA 级分 V) 并于 37℃,5% CO₂ 温育 16-24 小时。

[0206] 自细胞除去饥饿培养基并添加 75ul 共处理,立即继以 75ul 蛋白质处理。共处理为饥饿培养基及以三种剂量之一添加的 TGF- β 1 或 IL-13, TGF 低处理为 0.1ng/ml TGF- β 1 (实验中的终浓度为 0.05ng/ml); TGF 高处理为 1.0ng/ml TGF- β 1 (实验中的终浓度为 0.5ng/ml); IL-13 处理为 10ng/ml IL-13 (实验中的终浓度为 5ng/ml)。SERPINE2 蛋白处理为 75ul 饥饿培养基及添加的重组 SERPINE2。SERPINE2 水平为大约 0-5000ng/ml。添加蛋白质处理后,将细胞于 37℃,5% CO₂ 温育 48 小时。人类 TGF- β 1 (240-B-010)、重组人类 IL-13 (213-IL-025)、重组人类 SERPINE2 (2980-PI) 得自 R&D Systems。

[0207] 48 小时处理后,除去 150ul 培养基并在 100ul 含蛋白酶 K 的 1x 溶胞缓冲液中对细胞溶胞。使用 bDNA 测定法 (Panomics) 来测定胶原 1A1、 β -肌动蛋白、和 α -平滑肌肌动蛋白水平。遵循 Panomics 试剂盒关于在滤板上过夜杂交和加工样品的指令。在最后一步中,在 80ul 中重悬浮珠并在 Luminex 读板仪上运行。

[0208] 纯化的 SERPINE2 蛋白和 0.05ng/ml TGF- β 的测定结果显示于图 1。对照 RNA, β -肌动蛋白,没有随 SERPINE2 蛋白添加而显示出任何升高。然而,在所有三种实验条件下,胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白水平随提高的 SERPINE2 蛋白而以剂量依赖性方式升高。这些结果指出了将人类肺成纤维细胞暴露于升高水平的 SERPINE2 引起胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达二者升高。

[0209] 实施例 2:表达野生型 SERPINE2 的构建物的生成

[0210] 生成了含有野生型 SERPINE2 DNA 的核苷酸序列且表达野生型 SERPINE2 蛋白的构建物。

[0211] 野生型 SERPINE2 DNA 的核苷酸序列是:

[0212] atgaactggcatctccccctcttctcttggcctctgtgacgctgccttccatctgctcccactt

[0213] caatcctctgtctctcgaggaactaggctccaacacggggatccagggttttcaatcagattgtga

[0214] agtcgaggcctcatgacaacatcgatctctccccatgggattgcgtcggtcctggggatgctt

[0215] cagctgggggacggacggcaggaccaagaagcagctcgccatggtgatgagatacggcgtaaattgg

[0216] agttggtaaaatattaaagaagatcaacaaggccatcgctctccaagaagaataaagacattgtga

[0217] cagtggttaacgccgtgtttgttaagaatgcctctgaaattgaagtgccttttgttacaaggaac

[0218] aaagatgtgttccagtgtgaggtccggaatgtgaactttgaggatccagcctctgcctgtgatcc

[0219] catcaatgcatgggttaaaaacgaaaccagggtatgattgacaatctgctgtccccagatctta

[0220] ttgatggtgtgctcaccagactggctcctcgtcaacgcagtgatatttcaagggtctgtggaaatca

[0221] cggttccaacccgagaaacacaaagaaacgcactttcgtggcagccgacgggaaatcctatcaagt

[0222] gccaatgctggcccagctctccgtgttccggtgtgggtcgacaagtgcccccaatgatttatggt

[0223] acaacttcattgaactgccctaccacggggaaagcatcagcatgctgattgcaactgccgactgag

[0224] agctccactccgctgtctgccatcatccacacatcagcaccaagaccatagacagctggatgag

[0225] catcatgggtccccaagagggtgcagggtgatcctgcccaggttcacagctgtagcacaacagatt
[0226] tgaaggagccgctgaaagttcttggcattactgacatgtttgattcatcaaaggcaaattttgca
[0227] aaaataacaagggtcagaaaacctccatgtttctcatatcttgcaaaaagcaaaaattgaagtcag
[0228] tgaagatggaaccaaagcttcagcagcaacaactgcaattctcattgcaagatcatcgccctccct
[0229] ggtttatagtagacagaccttttctgtttttcatccgacataatcctacaggtgctgtgttattc
[0230] atggggcagataaacaacccc (SEQ ID NO :1)。

[0231] 野生型 SERPINE2 蛋白的氨基酸序列是：

[0232] MNWHLPLFLLASVTLPSICSHFNPLSLEELGSNTGIQVFNQIVKSRPHDNIVISPHGIASVLGML
[0233] QLGADGRTKKQLAMVMRYGVNGVGKILKKINKAIVSKKNKDIVTVANAVFVKNASEIEVPFVTRN
[0234] KDVFQCEVRNVNFEDPASACDSINAWVKNETRDMIDNLLSPDLIDGVLTRLVLVNAVYFKGLWKS
[0235] RFQPENTKKRTFVAADGKSYQVPMLAQLSVFRCGSTAPNDLWYNFIELPYHGESISMLIALPTE
[0236] SSTPLSAIIPHISTKTIDSWMSIMVPKRVQVILPKFTAVAQTDLKEPLKVLGITDMFDSSKANFA
[0237] KITRSENHVSILQKAKIEVSEDGTKASAATTAILIARSSPPWFIVDRPFLFFIRHNPTGAVLF
[0238] MGQINKP (SEQ ID NO :2)。

[0239] 实施例 3 :不结合 LRP 的 SERPINE2 突变蛋白的生成

[0240] 生成了含有不能结合低密度脂蛋白受体相关蛋白 (LRP) 的 SERPINE2 突变蛋白的核苷酸序列的构建物。这种突变蛋白含有 SERPINE2 氨基酸位置 48 和 49 处的如下突变：H48A 和 D49E。

[0241] SERPINE2 的 LRP 结合突变蛋白的 DNA 核苷酸序列是：

[0242] atgaactggcatctccccctcttctcttggcctctgtgacgctgccttccatctgctcc
[0243] cacttcaatctctgtctctcgaggactaggctccaacacggggatccaggttttcaat
[0244] cagattgtgaagtcgaggcctgcagaaaacatcgatgatctctccccatgggattgctgctg
[0245] gtcctggggatgcttcagctgggggacggcaggaccaagaagcagctcgccatgggtg
[0246] atgagatacggcgtaaatggagttggtaaaatattaaagaagatcaacaaggccatcgctc
[0247] tccaagaagaataaagacattgtgacagttggctaacgccgtgtttgttaagaatgcctct
[0248] gaaattgaagtgccttttgttacaaggaacaaagatgtgttccagttgaggtccggaat
[0249] gtgaactttgaggatccagcctctgcctgtgattccatcaatgcatgggttaaaaaacgaa
[0250] accagggatatgattgacaatctgctgtccccagatcttattgatgggtgtgctcaccaga
[0251] ctggctctcgtcaacgcagttgtatttcaagggtctgtggaaatcacgggtccaacccgag
[0252] aacacaaagaaacgcactttcgtggcagccgacgggaaatcctatcaagtgccaatgctg
[0253] gccagctctccgtgttccggtgtgggtcgacaagtgcccccaatgatttatggtacaac
[0254] ttcatgtaactgccctaccacgggaaagcatcagcatgctgattgcaactgccgactgag
[0255] agctccactccgtgtctgccatcatccacacatcagcaccaagaccatagacagctgg
[0256] atgagcatcatggtccccaagagggtgcagggtgatcctgcccaggttcacagctgtagca
[0257] caaacagattttgaaggagccgctgaaagttcttggcattactgacatgtttgattcatca
[0258] aaggcaaattttgcaaaaataacaagggtcagaaaacctccatgtttctcatatcttgcaa
[0259] aaagcaaaaattgaagtcagtgaagatggaaccaaagcttcagcagcaacaactgcaatt
[0260] ctcatgcaagatcatcgccctccctggtttatagtagacagaccttttctgtttttcate
[0261] cgacataatcctacaggtgctgtgttattcatggggcagataaacaacccc (SEQ ID NO :3)。

[0262] SERPINE2 的 LRP 结合突变蛋白的氨基酸序列是：

[0263] MNWHLPLFLLASVTLPISCSHFNPLSLEELGSNTGIQVFNQIVKSRPAENIVISPHGIASVLGML

[0264] QLGADGRTRKKQLAMVMRYGVNGVGKILKKINKAIVSKKNKDIVTVANAVFVKNAIEVPFVTRN

[0265] KDVFQCEVRNVNFEDPASACDSINAWVKNETRDMIDNLLSPDLIDGVLTRLVLVNAVYFKGLWKS

[0266] RFQPENTKKRTFVAADGKSYQVPMLAQLSVFRCGSTSAPNDLWYNFIELPYHGESISMLIALPTE

[0267] SSTPLSAIIPHISTKTIDSWMSIMVPKRVQVILPKFTAVAQTDLKEPLKVLGITDMFDSSKANFA

[0268] KITRSENHVVSHILQKAKIEVSEDGTKASAATTAILIARSSPPWFIVDRPFLFFIRHNPTGAVLF

[0269] MGQINKP (SEQ ID NO :4)。

[0270] 实施例 4 :能结合靶蛋白酶但不会不可逆抑制蛋白酶的 SERPINE2 突变蛋白的生成

[0271] 生成了含有能结合靶蛋白酶但不会不可逆抑制蛋白酶的 SERPINE2 突变蛋白的核苷酸序列的构建物。这种突变蛋白（抑制突变蛋白）含有 SERPINE2 氨基酸位置 364 和 365 处的如下突变：R364K 和 S365T。

[0272] SERPINE2 抑制突变蛋白的 DNA 核苷酸序列是：

[0273] atgaactggcatctccccctcttctcttggcctctgtgacgctgccttccatctgctcc

[0274] cacttcaatcctctgtctctcgaggactaggtccaacacggggatccaggttttcaat

[0275] cagattgtgaagtcgaggcctcatgacaacatcgatgatctctccccatgggattgcgtcg

[0276] gtcctggggatgcttcagctgggggacggcaggaccaagaagcagctcgccatgggtg

[0277] atgagatacggcgtaaatggagttggtaaaatattaaagaagatcaacaaggccatcgctc

[0278] tccaagaagaataaagacattgtgacagttggctaacgccgtgtttgttaagaatgcctct

[0279] gaaattgaagtgccttttgttacaaggaacaaagatgtgttccagttgaggtccggaat

[0280] gtgaactttgaggatccagcctctgcctgtgattccatcaatgcatgggttaaaaacgaa

[0281] accagggatatgattgacaatctgctgtccccagatcttattgatgggtgtgctcaccaga

[0282] ctggctctcgctcaacgcagttgatttcaagggtctgtggaaatcacgggtccaacccgag

[0283] aacacaaagaaacgcactttcgtggcagccgacgggaaatcctatcaagtgccaatgctg

[0284] gccagctctccgtgttccggtgtgggtcgacaagtgcccccaatgatttatggtacaac

[0285] ttcatgtgaactgccctaccacggggaaagcatcagcatgctgattgcactgccgactgag

[0286] agctccactccgtgtctgccatcatccacacatcagcaccaagaccatagacagctgg

[0287] atgagcatcatggtccccaagagggtgcaggtgatcctgcccagttcacagctgtagca

[0288] caaacagattttgaaggagccgctgaaagtcttggcattactgacatgtttgattcatca

[0289] aaggcaaattttgcaaaaataacaaggtcagaaaacctccatgtttctcatatcttgcaa

[0290] aaagcaaaaattgaagtcagtgaagatggaaccaaagcttcagcagcaacaactgcaatt

[0291] ctcatgtcaaaaacatcgccctccctgggtttatagtagacagacctttctgtttttcatc

[0292] cgacataatcctacaggtgctgtgttattcatggggcagataaacaaccc (SEQ ID NO :5)。

[0293] SERPINE2 抑制突变蛋白的氨基酸序列是：

[0294] MNWHLPLFLLASVTLPISCSHFNPLSLEELGSNTGIQVFNQIVKSRPHDNIVISPHGIASVLGML

[0295] QLGADGRTRKKQLAMVMRYGVNGVGKILKKINKAIVSKKNKDIVTVANAVFVKNAIEVPFVTRN

[0296] KDVFQCEVRNVNFEDPASACDSINAWVKNETRDMIDNLLSPDLIDGVLTRLVLVNAVYFKGLWKS

[0297] RFQPENTKKRTFVAADGKSYQVPMLAQLSVFRCGSTSAPNDLWYNFIELPYHGESISMLIALPTE

[0298] SSTPLSAIIPHISTKTIDSWMSIMVPKRVQVILPKFTAVAQTDLKEPLKVLGITDMFDSSKANFA

[0299] KITRSENHVSILQKAKIEVSEDGTKASAATTAILIAKTSPPWFIVDRPFLFFIRHNPTGAVLF

[0300] MGQINKP (SEQ ID NO :6)。

[0301] 实施例 5 :不能结合靶蛋白酶的 SERPINE2 突变蛋白的生成

[0302] 生成了含有不能结合靶蛋白酶的 SERPINE2 突变蛋白 (相互作用突变蛋白) 的核苷酸序列的构建物。这种突变蛋白含有 SERPINE2 氨基酸位置 364 和 365 处的如下突变 : R364P 和 S365P。

[0303] SERPINE2 的相互作用突变蛋白的 DNA 核苷酸序列是 :

[0304] atgaactggcatctccccctcttctcttggcctctgtgacgctgccttccatctgctcc

[0305] cacttcaatcctctgtctctcgaggactaggtccaacacggggatccaggttttcaat

[0306] cagattgtgaagtcgaggcctcatgacaacatcgtgatctctccccatgggattgcgtcg

[0307] gtcctggggatgcttcagctgggggacggcaggaccaagaagcagctcgccatgggtg

[0308] atgagatacggcgtaaatggagttggtaaaatattaaagaagatcaacaaggccatcgtc

[0309] tccaagaagaataaagacattgtgacagtggttaacgccgtgtttgttaagaatgcctct

[0310] gaaattgaagtgccctttgttacaaggaacaaagatgtgttccagtgtaggtccggaat

[0311] gtgaactttgaggatccagcctctgcctgtgattccatcaatgcatgggttaaaaacgaa

[0312] accagggatatgattgacaatctgctgtccccagatcttattgatgggtgtgctcaccaga

[0313] ctggctctcgtcaacgcagtgatattcaagggtctgtggaaatcacgggtccaacccgag

[0314] aacacaaagaaacgcactttcgtggcagccgacgggaaatcctatcaagtgccaatgctg

[0315] gccagctctccgtgttccggtgtgggtcgacaagtgcccccaatgatttatggtacaac

[0316] ttcatgtaactgccctaccacggggaaagcatcagcatgctgattgcaactgccgactgag

[0317] agctccactccgctgtctgccatcatccacacatcagcaccaagaccatagacagctgg

[0318] atgagcatcatggtccccaagagggtgcaggtgatcctgcccagttcacagctgtagca

[0319] caaacagatttgaaggagccgctgaaagtcttggcattactgacatgtttgattcatca

[0320] aaggcaaattttgcaaaaataacaaggtcagaaaacctccatgtttctcatatcttgcaa

[0321] aaagcaaaaattgaagtcagtgaagatggaacaaagcttcagcagcaacaactgcaatt

[0322] ctcatgaccaccatcgccctccctgggttatagtagacagacctttctgtttttcatc

[0323] cgacataatcctacaggtgctgtgttattcatggggcagataaacaaccc (SEQ ID NO :7)。

[0324] SERPINE2 的相互作用突变蛋白的氨基酸序列是 :

[0325] MNWHLPLFLLASVTLPISCSHFNPLSLEELGSNTGIQVFNQIVKSRPHDNIVISPHGIASVLGML

[0326] QLGADGRTRKKQLAMVMRYGVNGVGKILKKINKAIVSKKNKDIVTVANAVFVKNASEIEVPFVTRN

[0327] KDVFAQCEVRNVNFEDPASACDSINAWVKNETRDMIDNLLSPDLIDGVLTRLVLVNAVYFKGLWKS

[0328] RFQPENTKKRTFVAADGKSYQVPMLAQLSVFRCGSTSAPNDLWYNFIELPYHGESISMLIALPTE

[0329] SSTPLSAIIPHISTKTIDSWSIMVPKRVQVILPKFTAVAQTDLKEPLKVLGITDMFDSSKANFA

[0330] KITRSENHVSILQKAKIEVSEDGTKASAATTAILIAPPSPPWFIVDRPFLFFIRHNPTGAVLF

[0331] MGQINKP (SEQ ID NO :8)。

[0332] 实施例 6 :SERPINE2 突变蛋白对胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达的影响

[0333] 将对照载体构建物和表达野生型 SERPINE2 或 SERPINE2 突变蛋白的构建物转染入细胞并收获细胞上清液。

[0334] 为了表达,将编码 SERPINE2 和突变蛋白的 cDNA 克隆入含有 CMV 启动子的质粒。将

质粒与脂质试剂Fugene6复合并转染入人类HEK293T细胞,在补充有10% FBS的DMEM培养基中分配并于37℃在5% CO₂中温育。40小时后,在PBS中清洗细胞并用补充有5% FBS的DMEM培养基更换培养基并于37℃在5% CO₂中再温育48小时。自293T细胞取出含有表达的蛋白质的细胞上清液并在基于细胞的测定法中用于处理NHLF细胞。

[0335] 将正常人类肺成纤维细胞用细胞上清液及0.05ng/ml TGF- β 处理48小时。如实施例1那样实施了bDNA测定法。结果显示于图2和3。持家对照RNA, β -肌动蛋白,没有显示出任何随野生型SERPINE2或SERPINE2突变蛋白添加的升高。然而,胶原1A1和 α -平滑肌肌动蛋白水平随添加野生型SERPINE2蛋白而升高。一种具有SERPINE2 LRP结合区突变的SERPINE2突变蛋白与野生型SERPINE2无法区别。SERPINE2的蛋白酶相互作用区的突变消除了所述效果。一种仍能结合靶蛋白酶但不能不可逆抑制它们的突变体具有中等效果。这些结果指出了SERPINE2抑制其它蛋白酶的能力涉及暴露于升高水平的SERPINE2的人类肺成纤维细胞的胶原1A1和 α -平滑肌肌动蛋白表达的升高。

[0336] 实施例7:SERPINE2在人类肺成纤维细胞中诱导胶原蛋白

[0337] 在150 μ l成纤维细胞生长培养基(FGM, Lonza)中以8000个细胞/96孔板的孔分配正常人类肺成纤维细胞,于37℃过夜。次日(时间0)在吸掉培养基后添加的150 μ l FGM的溶液中进行处理(0.05ng/ml TGF- β , 0.5ng/ml TGF- β , 和rhSerpine2剂量曲线)。24小时时在吸掉培养基后添加的150 μ l FGM中含有25 μ g/ml抗坏血酸的溶液中进行处理。72小时时,用PBS清洗细胞并使用95%乙醇固定。然后在1% BSA/PBS中封闭细胞并使用3 μ g/ml的小鼠抗人类胶原1抗体#AB6308(Abcam)作为一抗和1:5000的山羊抗小鼠cat#115-035-071(Jackson Labs)作为二抗来探查。使用HRP-TMB来检测并在450nm读取吸光度。结果显示于图4。SERPINE2在两种TGF- β 剂量都显示出在诱导NHLF细胞中的胶原蛋白表达方面具有强有力的活性。

[0338] 实施例8:人类肺成纤维细胞中的SERPINE2表达

[0339] 在96孔板中以8000个细胞每孔分配NHLF细胞(Lonza)并血清饥饿过夜(补充有0.5% BSA(Invitrogen)的FBM(Lonza)),然后在新鲜饥饿培养基中用TGF- β 1(R&D Systems)处理48小时。使用RNeasy Plus Micro试剂盒(Qiagen)提取RNA。对于每种处理条件合并来自3个独立处理孔的细胞溶胞物来分离RNA。

[0340] 使用QuantiTect逆转录试剂盒(Qiagen)逆转录RNA并使用QuantiTectSYBR Green PCR试剂盒(Qiagen)及对人类SERPINE2(Qiagen QT00008078)和GusB(QT00046046)特异性的引物遵循制造商的方案在ABI 7000仪器上实施qRT-PCR。使用delta-delta CT方法(Applied Biosystems, Foster City, CA)将SERPINE2数据相对于GusB持家基因标准化并显示相对于未处理细胞的标准化mRNA。结果显示于图5。NHLF细胞中的SERPINE2 mRNA水平随TGF- β 处理剂量依赖性地升高。

[0341] 实施例9:使用针对小鼠SERPINE2的多克隆抗体抑制肺成纤维细胞中小鼠SERPINE2诱导的胶原生成

[0342] 在96孔组织培养板中以8000个细胞每孔接种正常人类肺成纤维细胞并容许贴壁过夜。用渐增剂量的TGF- β (阳性对照)或TGF- β +小鼠SERPINE2刺激细胞。对于抗体处理,将SERPINE2与多克隆抗小鼠SERPINE2抗体或同种型对照抗体一起于室温预温育30分钟,之后添加至所述细胞。24小时后,吸掉培养基并在25 μ g/ml L-抗坏血酸存在下

再用上述试剂刺激细胞 24 小时。刺激后,在 PBS 中清洗细胞三次,在 95%乙醇中于室温固定 10 分钟,再次在 PBS 中清洗,并在 1% BSA-PBS 中于室温封闭 2 小时。然后用含有 0.1% tween-20 的 PBS 清洗细胞三次并与小鼠抗人类胶原 I 抗体 (Abcam Ab6308) (在封闭缓冲液中 1 : 2000 稀释) 一起温育 2 小时。如前所述清洗板,添加二抗 (抗小鼠 IgG-HRP,在封闭缓冲液中 1 : 5000 稀释) 并于室温温育 1 小时。如前所述清洗板,并在黑暗中用 TMB One 溶液显色 20 分钟。通过添加 2N 硫酸来终止测定,并于 450nm 读取光密度 (OD)。结果显示于图 6。

[0343] 用 TGF- β 处理肺成纤维细胞导致生成的胶原的量的剂量依赖性升高。与 TGF- β 一起添加小鼠 SERPINE2 导致胶原蛋白与单独的 TGF- β 相比显著升高。如图所示,小鼠 SERPINE2 与多克隆抗小鼠 SERPINE2 抗体一起预温育以剂量依赖性方式完全消除 SERPINE2 诱导的胶原 I 升高,而同种型对照抗体没有影响。

[0344] 实施例 10 :博来霉素处理的小鼠中的 SERPINE2 诱导

[0345] 将大约 6 至 8 周龄的 C57BL/6 雌性小鼠 (ACE laboratories) 分组,麻醉 (异氟烷),并在第 0 天施用 (I. T.) 40 μ l 无菌磷酸盐缓冲盐水 (Gibco 14190) 或第 0 天施用 (I. T.) 40 μ l 硫酸博来霉素 (Sigma B57705) (1U/ml,在 0.9%无菌盐水中)。

[0346] 在第 7 天或第 14 天通过 i. p. 氯胺酮注射对小鼠处以安乐死并用于肺组织收集。经由心给动物灌注以自肺除去血液。一旦灌注,自小鼠切出肺叶并快速冷冻并保存在快速制备管中直至进一步加工。

[0347] 在 Invitrogen Cat # FNN0021 溶胞缓冲液 + 来自 Sigma 的蛋白酶抑制剂鸡尾酒 (Protease Inhibitor Cocktail) 和磷酸酶抑制剂鸡尾酒 (Phosphatase Inhibitor Cocktail) 1 和 2 中用 FastPrep Matrix D 管制备肺溶胞物。使用 Pierce BCA 测定法量化溶胞物并使用 Biorad 加载缓冲液 (Cat# 161-0791)+BME 于 95°C 煮沸 5 分钟。在 4-12% Bis-Tris 凝胶的每条道中加载 2ug 总蛋白质并在 MOPS 缓冲液中以 200V 运行 50 分钟。使用 Invitrogen IBlot 系统进行转移。于 4°C 用 0.1ug/ml R&D AF2175 探查印迹过夜。用 PBS/0.5% Tween 20 清洗 3 次后,于 RT 以 1 : 10,000 使用过氧化物酶偶联的牛抗山羊 (Jackson Cat#805-035-180) 1 小时。然后用 PBS/0.5% Tween 20 清洗印迹 6 次并使用 GE Biosciences ECLPlus 作为检测试剂。使用 30 秒钟、2 分钟和 4 分钟曝光来使胶片显影。

[0348] 使用 ImageJ 软件 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) 来量化平均像素亮度。具体地,将图像颠倒,并将固定尺寸的矩形区域置于每条带内以测量平均像素亮度。使用 GraphPad Prism 将原始 API 值绘图,并使用单向 ANOVA 及 Tukey 氏事后检验来确定统计学显著性。结果显示于图 7。SERPINE2 水平 (51KD 条带) 在博来霉素处理的肺溶胞物中与盐水处理的相比显著升高。

[0349] 实施例 11 :抑制人类肺成纤维细胞中 SERPINE2 对胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达的影响

[0350] 可构建结合 SERPINE2 并阻断其与靶蛋白酶,诸如凝血酶相互作用的单克隆抗体。Wagner 等, *Biochemistry* 27 :2173-2176, 1988。可使用体外结合测定法用纯化的抗体和纯化的蛋白质来测定这种抗体阻断 SERPINE2 与靶蛋白酶相互作用的能力。

[0351] 可将渐增量的抗体与固定量的 SERPINE2 一起在实施例 1 所述测定法中温育。可使用 bDNA 测定法来测定人类肺成纤维细胞表达胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白的水平。提

高抗体的量能引起人类肺成纤维细胞表达胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白的水平降低。

[0352] 实施例 12 :抑制博来霉素小鼠模型中 SERPINE2 对胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达的影响

[0353] 可在博来霉素处理后的多个时间,例如,在第 12 天开始,以渐增的量经由气雾剂将实施例 11 的抗体投递至肺。在抗体处理后的多个时间,例如博来霉素处理后的第 15 天,收获小鼠的肺并用盐水冲洗以除去血液,提取 mRNA,并评估胶原和 α -平滑肌肌动蛋白表达。提高抗体的量能引起人类肺成纤维细胞表达胶原 1A1 和 α -平滑肌肌动蛋白的水平降低。施用抗体能改善小鼠肺中纤维化的症状。根据这些研究能确定在人类中治疗肺纤维化所必需的抗体投递的量和时机。

[0001]

序列表

<110> 五佳医疗股份有限公司 (Five Prime Therapeutics, Inc.)

<120> 通过 SERPINE2 来调节胶原和平滑肌肌动蛋白表达的组合物和方法

<130> SERPINE2

<150> 61/118,180

<151> 2008-11-26

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1191

<212> DNA

<213> 人

<400> 1

```
atgaactggc atctccccct cttcctcttg gccctcgtga cgctgccctc catcigctcc      60
cacttcaatc cctgtctctc cgaggaaacta ggctccaaca cggggatcca ggttttcaat      120
cagattgtga agtcgaggcc tcatgacaac atcgtgatct ctccccatgg gattgcgtcg      180
gtcctgggga tgcttcagct gggggcggac ggcaggacca agaagcagct cgccatgggtg      240
atgagatacg gcgtaaatgg agttggtaaa atattaaaga agatcaacaa ggccatcgtc      300
tccaagaaga ataaagacat tgtgacagtg gctaacgccg tgtttgttaa gaatgcctct      360
gaaattgaag tgccttttgt tacaaggaac aaagatgtgt tccagtgta ggtccggaat      420
gtgaactttg aggatccagc ctctgccctg gatccatca atgcatgggt taaaaacgaa      480
accagggata tgattgacaa tctgtctgcc ccagatctta ttgatgggtg gctcaccaga      540
ctggtcctcg tcaacgcagt gtatttcaag ggtctgtgga aatcacgggt ccaacccgag      600
aacacaaaga aacgcacttt cgtggcagcc gacgggaaat cctatcaagt gccaatgctg      660
gcccagctct ccgtgttccg gtgtgggtcg acaagtgcgc ccaatgattt atggtlacaac      720
ttcattgaac tgcctacca cggggaaagc atcagcatgc tgattgcact gccgactgag      780
agctccactc cgctgtctgc catcatccca cacatcagca ccaagaccat agacagctgg      840
atgagcatca tggcccccaa gaggggtcag gtgatcctgc ccaagttcac agctgtagca      900
caaacagatt tgaaggagcc gctgaaagtt cttggcatta ctgacatgtt tgattcatca      960
aaggcaaatt ttgcaaaaat aacaaggtca gaaaacctcc atgtttctca tatcttgcaa      1020
aaagcaaaaa ttgaagtcag tgaagatgga accaaagctt cagcagcaac aactgcaatt      1080
ctcattgcaa gatcagcgcc tccctgggtt atagtagaca gacctttct gttttcaco      1140
cgacataatc ctacagggtc tgtgttatcc atggggcaga taaacaaacc c      1191
```

<210> 2

<211> 397

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

```
Met Asn Trp His Leu Pro Leu Phe Leu Leu Ala Ser Val Thr Leu Pro
1              5              10              15
```

[0002]

Ser	Ile	Cys	Ser	His	Phe	Asn	Pro	Leu	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Gly	Ser	20	25	30	
Asn	Thr	Gly	Ile	Gln	Val	Phe	Asn	Gln	Ile	Val	Lys	Ser	Arg	Pro	His	35	40	45	
Asp	Asn	Ile	Val	Ile	Ser	Pro	His	Gly	Ile	Ala	Ser	Val	Leu	Gly	Met	50	55	60	
Leu	Gln	Leu	Gly	Ala	Asp	Gly	Arg	Thr	Lys	Lys	Gln	Leu	Ala	Met	Val	65	70	75	80
Met	Arg	Tyr	Gly	Val	Asn	Gly	Val	Gly	Lys	Ile	Leu	Lys	Lys	Ile	Asn	85	90	95	
Lys	Ala	Ile	Val	Ser	Lys	Lys	Asn	Lys	Asp	Ile	Val	Thr	Val	Ala	Asn	100	105	110	
Ala	Val	Phe	Val	Lys	Asn	Ala	Ser	Glu	Ile	Glu	Val	Pro	Phe	Val	Thr	115	120	125	
Arg	Asn	Lys	Asp	Val	Phe	Gln	Cys	Glu	Val	Arg	Asn	Val	Asn	Phe	Glu	130	135	140	
Asp	Pro	Ala	Ser	Ala	Cys	Asp	Ser	Ile	Asn	Ala	Trp	Val	Lys	Asn	Glu	145	150	155	160
Thr	Arg	Asp	Met	Ile	Asp	Asn	Leu	Leu	Ser	Pro	Asp	Leu	Ile	Asp	Gly	165	170	175	
Val	Leu	Thr	Arg	Leu	Val	Leu	Val	Asn	Ala	Val	Tyr	Phe	Lys	Gly	Leu	180	185	190	
Trp	Lys	Ser	Arg	Phe	Gln	Pro	Glu	Asn	Thr	Lys	Lys	Arg	Thr	Phe	Val	195	200	205	
Ala	Ala	Asp	Gly	Lys	Ser	Tyr	Gln	Val	Pro	Met	Leu	Ala	Gln	Leu	Ser	210	215	220	
Val	Phe	Arg	Cys	Gly	Ser	Thr	Ser	Ala	Pro	Asn	Asp	Leu	Trp	Tyr	Asn	225	230	235	240
Phe	Ile	Glu	Leu	Pro	Tyr	His	Gly	Glu	Ser	Ile	Ser	Met	Leu	Ile	Ala	245	250	255	
Leu	Pro	Thr	Glu	Ser	Ser	Thr	Pro	Leu	Ser	Ala	Ile	Ile	Pro	His	Ile	260	265	270	
Ser	Thr	Lys	Thr	Ile	Asp	Ser	Trp	Met	Ser	Ile	Met	Val	Pro	Lys	Arg	275	280	285	
Val	Gln	Val	Ile	Leu	Pro	Lys	Phe	Thr	Ala	Val	Ala	Gln	Thr	Asp	Leu	290	295	300	

[0003]

Lys Glu Pro Leu Lys Val Leu Gly Ile Thr Asp Met Phe Asp Ser Ser
 305 310 315 320
 Lys Ala Asn Phe Ala Lys Ile Thr Arg Ser Glu Asn Leu His Val Ser
 325 330 335
 His Ile Leu Gln Lys Ala Lys Ile Glu Val Ser Glu Asp Gly Thr Lys
 340 345 350
 Ala Ser Ala Ala Thr Thr Ala Ile Leu Ile Ala Arg Ser Ser Pro Pro
 355 360 365
 Trp Phe Ile Val Asp Arg Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg His Asn Pro
 370 375 380
 Thr Gly Ala Val Leu Phe Met Gly Gln Ile Asn Lys Pro
 385 390 395

<210> 3
 <211> 1191
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 3
 atgaactggc atctcccccct ctctctcttg gcctctgtga cgtctgcttc catctgctcc 60
 cacttcaatc ctctgtctct cgaggaacta ggctccaaca cggggatcca ggttttcaat 120
 cagatttga agtcaggcc tgcagaaaac atcgtgatct ctcccatgg gattgctgc 180
 gtcttggga tgcttcagct gggggcggac ggcaggacca agaagcagct cgccatggg 240
 atgagatacg gcgtaaatgg agtiggtaaa atattaaaga agatcaacaa ggccatcgtc 300
 tccaagaaga ataaagacat tgtgacagt gctaacgccg tgtttgttaa gaatgcctct 360
 gaaattgaag tgccttttgt tacaaggaa aaagatgtgt tccagtgtga ggtccggaat 420
 gtgaacttg aggatccagc ctctgcctgt gattccatca atgcatgggt taaaaacgaa 480
 accagggata tgattgacaa tctgctgtcc ccagatctta ttgatgggt gctcaccaga 540
 ctggtcctcg tcaacgcagt gtatttcaag ggtctgtgga aatcacgggt ccaacccgag 600
 aacacaaaga aacgcacttt cgtggcagcc gacgggaaat cctatcaagt gccaatgctg 660
 gccagctct ccgtgttccg gtgigggtcg acaagtgcgc ccaatgattt atggtacaac 720
 ttcatagaac tgcctacca cggggaaagc atcagcatgc tgattgcact gccgactgag 780
 agctccactc cgtgtctgc catcatccca cacatcagca ccaagacat agacagctgg 840
 atgagcatca tggccccaa gaggggtcag gtgatcctgc ccaagttcac agctgtagca 900
 caaacagatt tgaaggagcc gctgaaagtt ctggcatta ctgacatgtt tgattcatca 960
 aaggcaatt ttgcaaaaat aacaaggta gaaaacctcc atgtttctca tatcttgcaa 1020
 aaagcaaaa ttgaagtcag tgaagatga accaaagctt cagcagcaac aactgcaatt 1080
 ctcattgcaa gatcatgcc tccctgggtt atagtagaca gacctttct gttttcatc 1140
 cgacataatc ctacaggcgc tgtgttattc atggggcaga taacaaacc c 1191

[0004]

```

<210> 4
<211> 397
<212> PRT
<213> 人

<400> 4

Met Asn Trp His Leu Pro Leu Phe Leu Leu Ala Ser Val Thr Leu Pro
1 5 10 15

Ser Ile Cys Ser His Phe Asn Pro Leu Ser Leu Glu Glu Leu Gly Ser
20 25 30

Asn Thr Gly Ile Gln Val Phe Asn Gln Ile Val Lys Ser Arg Pro Ala
35 40 45

Glu Asn Ile Val Ile Ser Pro His Gly Ile Ala Ser Val Leu Gly Met
50 55 60

Leu Gln Leu Gly Ala Asp Gly Arg Thr Lys Lys Gln Leu Ala Met Val
65 70 75 80

Met Arg Tyr Gly Val Asn Gly Val Gly Lys Ile Leu Lys Lys Ile Asn
85 90 95

Lys Ala Ile Val Ser Lys Lys Asn Lys Asp Ile Val Thr Val Ala Asn
100 105 110

Ala Val Phe Val Lys Asn Ala Ser Glu Ile Glu Val Pro Phe Val Thr
115 120 125

Arg Asn Lys Asp Val Phe Gln Cys Glu Val Arg Asn Val Asn Phe Glu
130 135 140

Asp Pro Ala Ser Ala Cys Asp Ser Ile Asn Ala Trp Val Lys Asn Glu
145 150 155 160

Thr Arg Asp Met Ile Asp Asn Leu Leu Ser Pro Asp Leu Ile Asp Gly
165 170 175

Val Leu Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Val Tyr Phe Lys Gly Leu
180 185 190

Trp Lys Ser Arg Phe Gln Pro Glu Asn Thr Lys Lys Arg Thr Phe Val
195 200 205

Ala Ala Asp Gly Lys Ser Tyr Gln Val Pro Met Leu Ala Gln Leu Ser
210 215 220

Val Phe Arg Cys Gly Ser Thr Ser Ala Pro Asn Asp Leu Trp Tyr Asn
225 230 235 240

Phe Ile Glu Leu Pro Tyr His Gly Glu Ser Ile Ser Met Leu Ile Ala
245 250 255

Leu Pro Thr Glu Ser Ser Thr Pro Leu Ser Ala Ile Ile Pro His Ile

```

[0005]

260	265	270
Ser Thr Lys Thr Ile Asp Ser Trp Met Ser Ile Met Val Pro Lys Arg		
275	280	285
Val Gln Val Ile Leu Pro Lys Phe Thr Ala Val Ala Gln Thr Asp Leu		
290	295	300
Lys Glu Pro Leu Lys Val Leu Gly Ile Thr Asp Met Phe Asp Ser Ser		
305	310	315
Lys Ala Asn Phe Ala Lys Ile Thr Arg Ser Glu Asn Leu His Val Ser		
325	330	335
His Ile Leu Gln Lys Ala Lys Ile Glu Val Ser Glu Asp Gly Thr Lys		
340	345	350
Ala Ser Ala Ala Thr Thr Ala Ile Leu Ile Ala Arg Ser Ser Pro Pro		
355	360	365
Trp Phe Ile Val Asp Arg Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg His Asn Pro		
370	375	380
Thr Gly Ala Val Leu Phe Met Gly Gln Ile Asn Lys Pro		
385	390	395
<210> 5		
<211> 1191		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 5		
atgaactggc atctccccct ctctctcttg gccctctgta cgtctccctc cactctctcc	60	
cacttcaatc ctctgtctct cgaggaacta ggctccaaca cggggatcca ggttttcaat	120	
cagattgtga agtcgaggcc tcatgacaac atcgtgatct ctcccatgg gattgcgtcg	180	
gtcctgggga tgccttcagct gggggcggac gccaggacca agaagcagct cgccatgggtg	240	
atgagatacg gcgtaaatgg agttggtaaa atattaaaga agatcnacaa ggccatcgtc	300	
tccaagaaga ataaagacat tgtgacagtg gctaacgccg tgtttgttaa gaatgcctct	360	
gaaattgaag tgccctttgt tacaaggaac aaagatgtgt tccagtgtga ggtccggaat	420	
gtgaactttg aggatccagc ctctgcctgt gattccatca atgcatgggt taaaaacgaa	480	
accagggata tgattgacaa tctgctgtcc ccagatctta ttgatgggt gctcaccaga	540	
ctggctctcg tcaacgcagt gtatttcaag ggtctgtgga aatcacggtt ccaacccgag	600	
aacacaaaga aacgcacttt cgtggcagcc gacgggaaat cctatcaagt gccaatgctg	660	
gcccagctct ccgtgttccg gtgtgggtcg acaagtgcce ccaatgattt atggtacaac	720	
ttcattgaac tgccctacca cggggaaagc atcagcatgc tgattgcact gccgactgag	780	
agctccactc cgtgtcttgc catcatccca cacatcagca ccaagaccat agacagctgg	840	
atgagcatca tggcccccaa gaggggtcag gtgatcctgc ccaagttcac agctgtagca	900	
caaacagatt tgaaggagcc gctgaaagtt ctggcatta ctgacaigtt tgattcatca	960	

[0006]

```

aaggcaaatt ttgcaaaaat aacaaggta gaaaacctcc atgtttctca tatcttgcaa      1020
aaagcaaaaa ttgaagtcag tgaagatgga accaaagctt cagcagcaac aactgcaatt      1080
ctcatttgcaa aaacatcgcc tccctgggtt atagtagaca gaccttttct gtttttcac      1140
cgacataatc ctacaggtgc tgggttattc atggggcaga taaacaaacc c                1191

```

```

<210> 6
<211> 397
<212> PRT
<213> 人

```

```

<400> 6

```

```

Met Asn Trp His Leu Pro Leu Phe Leu Leu Ala Ser Val Thr Leu Pro
1              5              10             15

```

```

Ser Ile Cys Ser His Phe Asn Pro Leu Ser Leu Glu Glu Leu Gly Ser
                20              25             30

```

```

Asn Thr Gly Ile Gln Val Phe Asn Gln Ile Val Lys Ser Arg Pro His
                35              40             45

```

```

Asp Asn Ile Val Ile Ser Pro His Gly Ile Ala Ser Val Leu Gly Met
50              55             60

```

```

Leu Gln Leu Gly Ala Asp Gly Arg Thr Lys Lys Gln Leu Ala Met Val
65              70             75             80

```

```

Met Arg Tyr Gly Val Asn Gly Val Gly Lys Ile Leu Lys Lys Ile Asn
                85              90             95

```

```

Lys Ala Ile Val Ser Lys Lys Asn Lys Asp Ile Val Thr Val Ala Asn
100             105            110

```

```

Ala Val Phe Val Lys Asn Ala Ser Glu Ile Glu Val Pro Phe Val Thr
115             120            125

```

```

Arg Asn Lys Asp Val Phe Gln Cys Glu Val Arg Asn Val Asn Phe Glu
130             135            140

```

```

Asp Pro Ala Ser Ala Cys Asp Ser Ile Asn Ala Trp Val Lys Asn Glu
145             150            155            160

```

```

Thr Arg Asp Met Ile Asp Asn Leu Leu Ser Pro Asp Leu Ile Asp Gly
165             170            175

```

```

Val Leu Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Val Tyr Phe Lys Gly Leu
180             185            190

```

```

Trp Lys Ser Arg Phe Gln Pro Glu Asn Thr Lys Lys Arg Thr Phe Val
195             200            205

```

```

Ala Ala Asp Gly Lys Ser Tyr Gln Val Pro Met Leu Ala Gln Leu Ser
210             215            220

```

[0007]

Val Phe Arg Cys Gly Ser Thr Ser Ala Pro Asn Asp Leu Trp Tyr Asn
 225 230 235 240
 Phe Ile Glu Leu Pro Tyr His Gly Glu Ser Ile Ser Met Leu Ile Ala
 245 250 255
 Leu Pro Thr Glu Ser Ser Thr Pro Leu Ser Ala Ile Ile Pro His Ile
 260 265 270
 Ser Thr Lys Thr Ile Asp Ser Trp Met Ser Ile Met Val Pro Lys Arg
 275 280 285
 Val Gln Val Ile Leu Pro Lys Phe Thr Ala Val Ala Gln Thr Asp Leu
 290 295 300
 Lys Glu Pro Leu Lys Val Leu Gly Ile Thr Asp Met Phe Asp Ser Ser
 305 310 315 320
 Lys Ala Asn Phe Ala Lys Ile Thr Arg Ser Glu Asn Leu His Val Ser
 325 330 335
 His Ile Leu Gln Lys Ala Lys Ile Glu Val Ser Glu Asp Gly Thr Lys
 340 345 350
 Ala Ser Ala Ala Thr Thr Ala Ile Leu Ile Ala Lys Thr Ser Pro Pro
 355 360 365
 Trp Phe Ile Val Asp Arg Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg His Asn Pro
 370 375 380
 Thr Gly Ala Val Leu Phe Met Gly Gln Ile Asn Lys Pro
 385 390 395

<210> 7
 <211> 1191
 <212> DNA
 <213> 人
 <400> 7
 atgaactggc atctccccct ctctctcttg gccctctgtga cgtgccttc catctgtccc 60
 cacttcaatc ctctgtctct cgaggaacta ggctccaaca cggggatcca ggttttcaat 120
 cagattgtga agtcgaggcc tcatgacaac atcgtgatct ctcccatgg gattgcgtcg 180
 gtcctgggga tgcttcagct gggggcggac ggcaggacca agaagcagct cgccatggtg 240
 atgagatacg gcgtaaatgg agttggtaaa atattaaaga agatcaacaa ggccatcgtc 300
 tccaagaaga ataaagacat tgtgacagtg gctaacgccg tgtttgttaa gaatgcctct 360
 gaaattgaag tgccttttgt tacaaggaac aaagatgtgt tccagtgta ggtccggaat 420
 gtgaactttg aggatccagc ctctgcctgt gattccatca atgcatgggt taaaaacgaa 480
 accagggata tgattgacaa tctgcgtgcc ccagatctta ttgatggtgt gctcaccaga 540
 ctggtcctcg tcaacgcagt gtatttcaag ggtctgtgga aatcacgggt ccaacccgag 600
 aacacaaaga aacgcacttt cgtggcagcc gacgggaaat cctatcaagt gccaatgtct 660

[0008]

```

gcccagctct ccgtgtccg ggtgggtcg acaagtgcc ccaatgatt atggacaac      720
ttcattgaac tgcctacca cggggaagc atcagcatgc tgattgcact gccgactgag      780
agctccactc cgctgtctgc catcatcca cacatcagca ccaagacat agacagctgg      840
atgagcatca tggccccaa gaggtgcag gtgatcctgc ccaagttcac agctgtagca      900
caaacagatt tgaaggagcc gctgaaagtt ctggcatta ctgacatgtt tgattcatca      960
aaggcaaat ttgcaaaaat aacaaggta gaaaacctcc atgtttctca tattttgcaa     1020
aaagcaaaaa ttgaagtcag tgaagatga accaaagctt cagcagcaac aactgcaatt     1080
ctcattgcac caccatgcc tccctgggtt atagtagaca gaccttttct gtttttcac     1140
cgacataatc ctacaggtgc tgtgttattc atggggcaga taaacaaacc c              1191

```

<210> 8
 <211> 397
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 8

```

Met Asn Trp His Leu Pro Leu Phe Leu Leu Ala Ser Val Thr Leu Pro
1              5              10              15

```

```

Ser Ile Cys Ser His Phe Asn Pro Leu Ser Leu Glu Glu Leu Gly Ser
                20              25              30

```

```

Asn Thr Gly Ile Gln Val Phe Asn Gln Ile Val Lys Ser Arg Pro His
          35              40              45

```

```

Asp Asn Ile Val Ile Ser Pro His Gly Ile Ala Ser Val Leu Gly Met
          50              55              60

```

```

Leu Gln Leu Gly Ala Asp Gly Arg Thr Lys Lys Gln Leu Ala Met Val
65              70              75              80

```

```

Met Arg Tyr Gly Val Asn Gly Val Gly Lys Ile Leu Lys Lys Ile Asn
          85              90              95

```

```

Lys Ala Ile Val Ser Lys Lys Asn Lys Asp Ile Val Thr Val Ala Asn
          100             105             110

```

```

Ala Val Phe Val Lys Asn Ala Ser Glu Ile Glu Val Pro Phe Val Thr
          115             120             125

```

```

Arg Asn Lys Asp Val Phe Gln Cys Glu Val Arg Asn Val Asn Phe Glu
          130             135             140

```

```

Asp Pro Ala Ser Ala Cys Asp Ser Ile Asn Ala Trp Val Lys Asn Glu
145             150             155             160

```

```

Thr Arg Asp Met Ile Asp Asn Leu Leu Ser Pro Asp Leu Ile Asp Gly
          165             170             175

```

```

Val Leu Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Val Tyr Phe Lys Gly Leu

```

[0009]

180	185	190
Trp Lys Ser Arg Phe Gln Pro Glu Asn Thr Lys Lys Arg Thr Phe Val 195 200 205		
Ala Ala Asp Gly Lys Ser Tyr Gln Val Pro Met Leu Ala Gln Leu Ser 210 215 220		
Val Phe Arg Cys Gly Ser Thr Ser Ala Pro Asn Asp Leu Trp Tyr Asn 225 230 235 240		
Phe Ile Glu Leu Pro Tyr His Gly Glu Ser Ile Ser Met Leu Ile Ala 245 250 255		
Leu Pro Thr Glu Ser Ser Thr Pro Leu Ser Ala Ile Ile Pro His Ile 260 265 270		
Ser Thr Lys Thr Ile Asp Ser Trp Met Ser Ile Met Val Pro Lys Arg 275 280 285		
Val Gln Val Ile Leu Pro Lys Phe Thr Ala Val Ala Gln Thr Asp Leu 290 295 300		
Lys Glu Pro Leu Lys Val Leu Gly Ile Thr Asp Met Phe Asp Ser Ser 305 310 315 320		
Lys Ala Asn Phe Ala Lys Ile Thr Arg Ser Glu Asn Leu His Val Ser 325 330 335		
His Ile Leu Gln Lys Ala Lys Ile Glu Val Ser Glu Asp Gly Thr Lys 340 345 350		
Ala Ser Ala Ala Thr Thr Ala Ile Leu Ile Ala Pro Pro Ser Pro Pro 355 360 365		
Trp Phe Ile Val Asp Arg Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg His Asn Pro 370 375 380		
Thr Gly Ala Val Leu Phe Met Gly Gln Ile Asn Lys Pro 385 390 395		

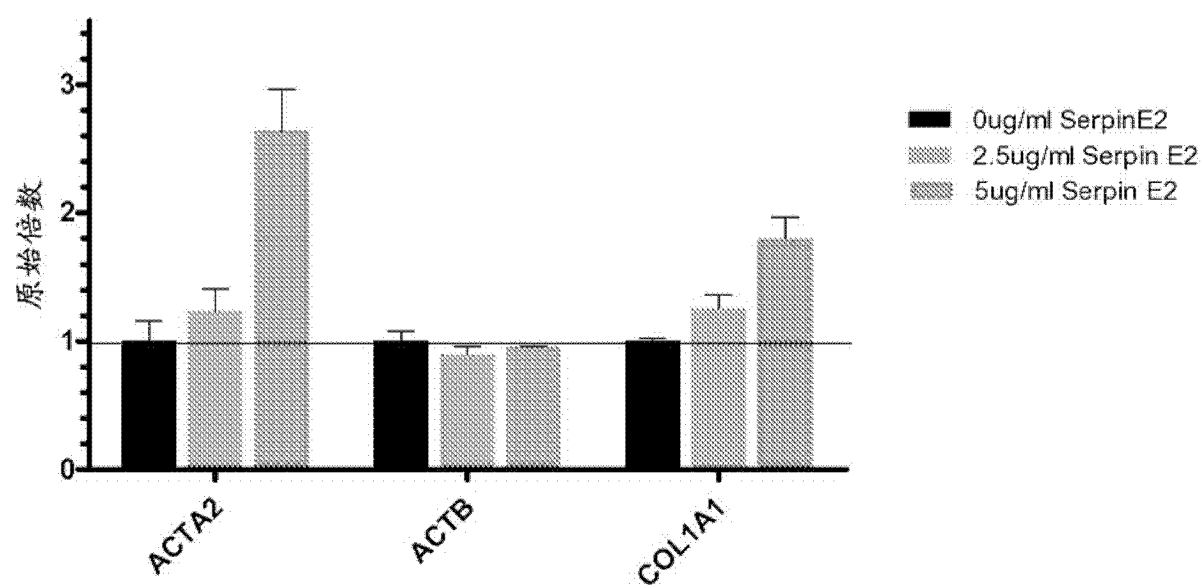


图 1

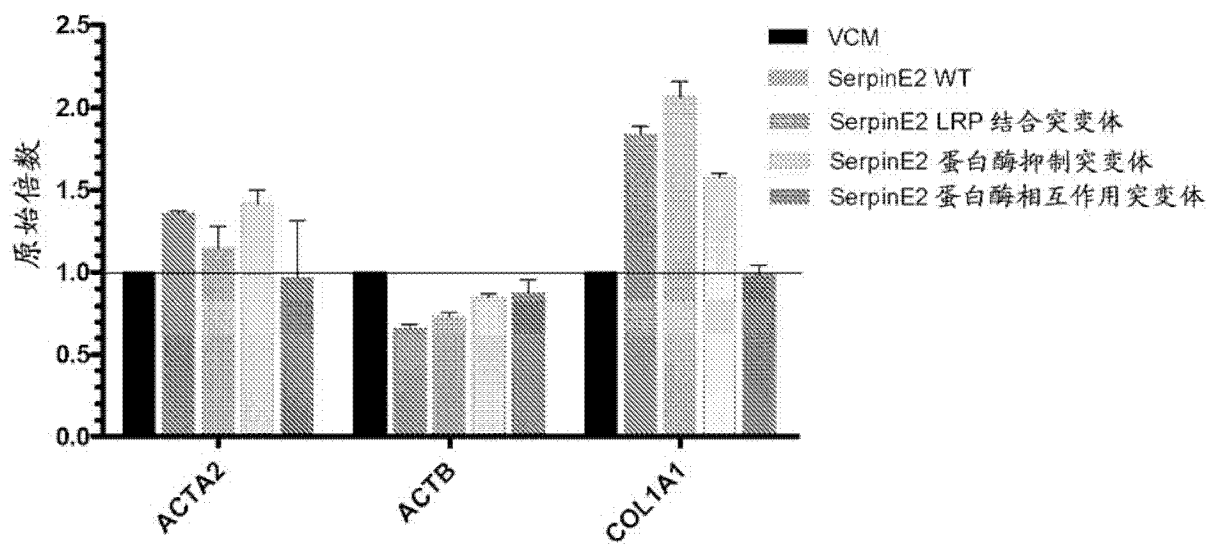


图 2

原始倍数

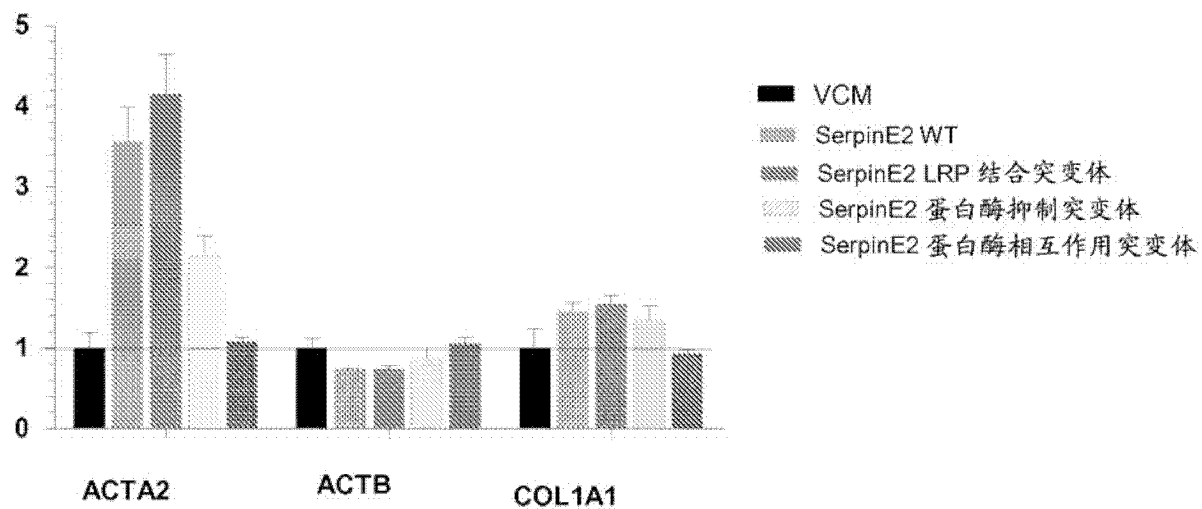


图 3

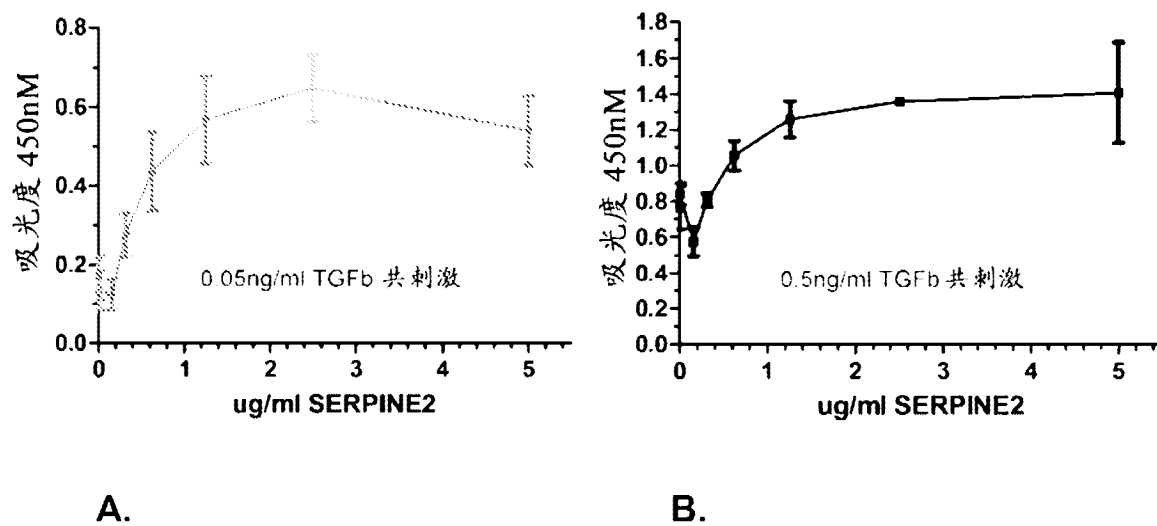


图 4

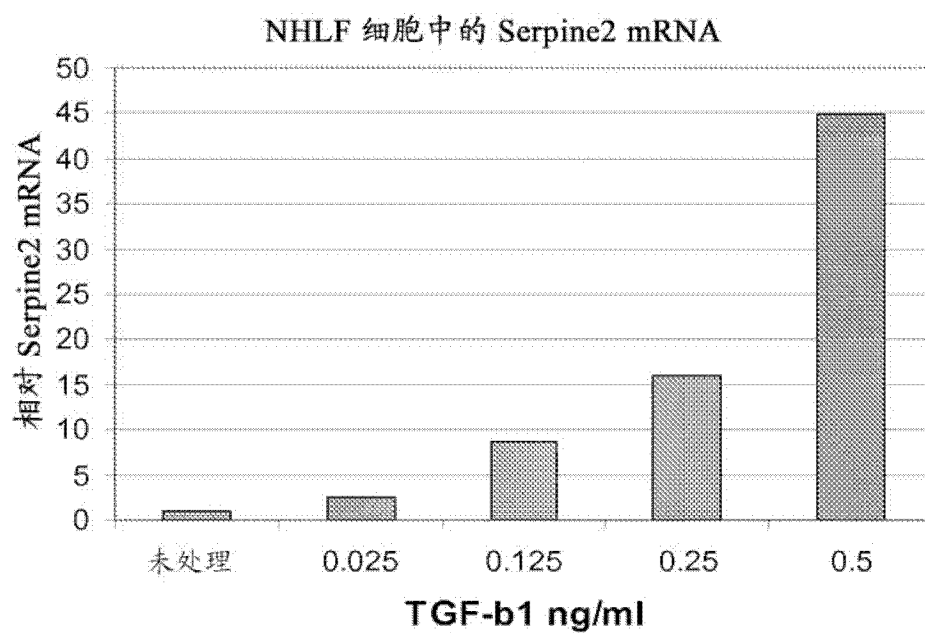


图 5

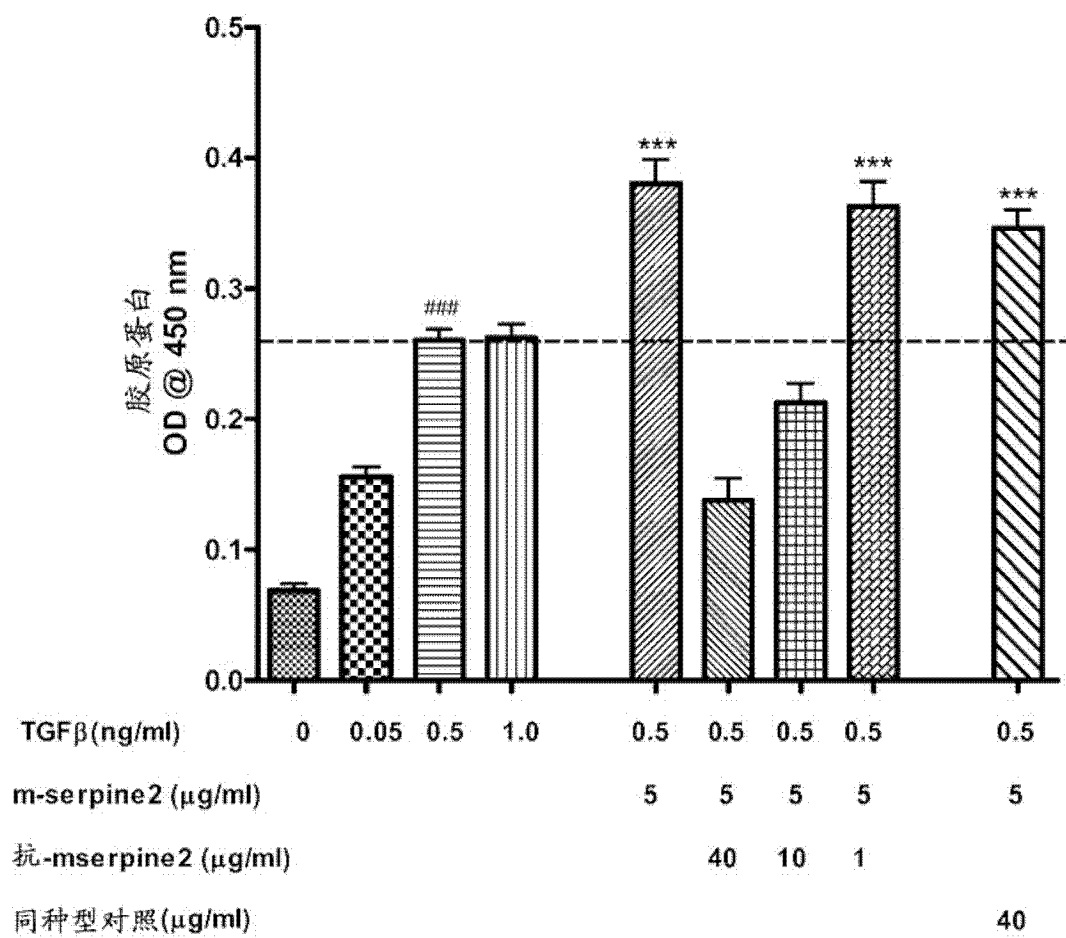


图 6

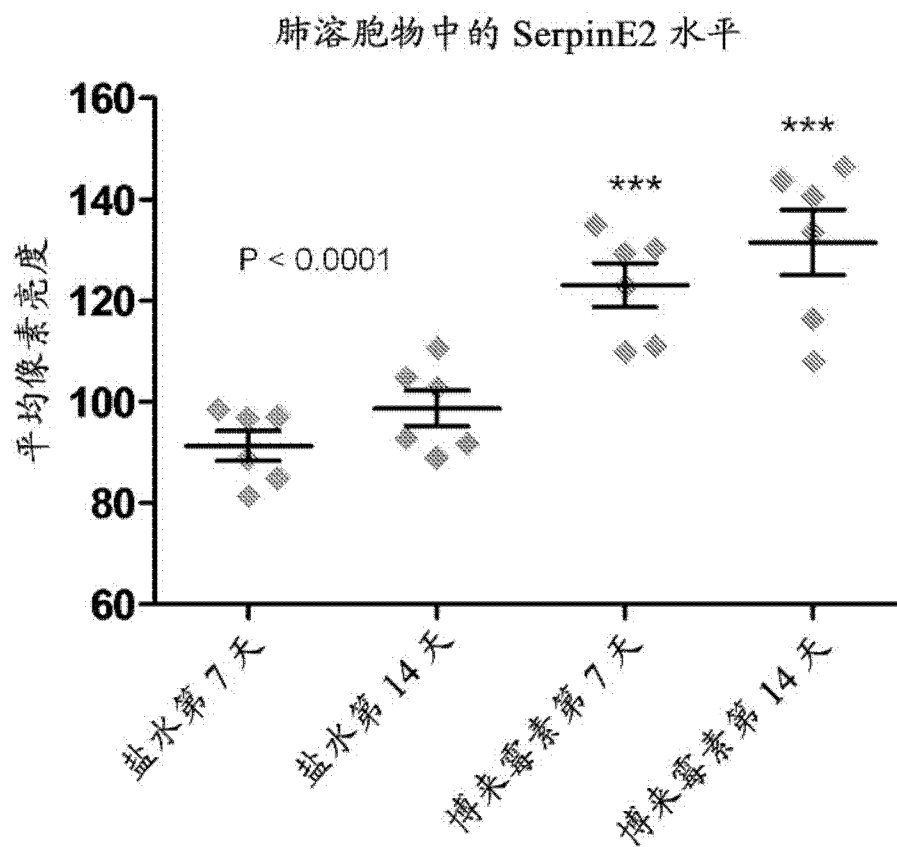


图 7