



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102712683 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201080047979. 8
(22) 申请日 2010. 08. 20
(30) 优先权数据
61/235, 776 2009. 08. 21 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2012. 04. 17
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2010/046192 2010. 08. 20
(87) PCT国际申请的公布数据
W02011/022667 EN 2011. 02. 24
(73) 专利权人 吉联亚生物科技有限公司
地址 美国加利福尼亚州
(72) 发明人 S·麦克考雷 V·史密斯
(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100
代理人 余颖
(51) Int. Cl.
C07K 14/435 (2006. 01)
(56) 对比文件
US 2009053224 A1, 2009. 02. 26, 说明书第
0137 和 0138 段 .

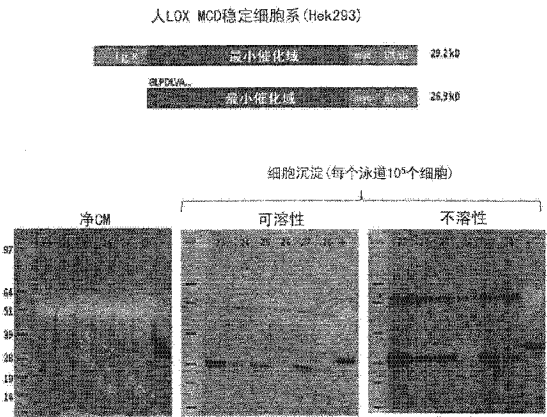
US 2009053224 A1, 2009. 02. 26, 说明书第
0137 和 0138 段 .
US 2008286808 A1, 2008. 11. 20, 说明书第
0194, 0195, 0197 段 .
CN 1622998 A, 2005. 06. 01, 全文 .
Peroutka et al.. Enhanced protein
expression in mammalian cells using
engineered SUMO fusions: Secreted
phospholipase A2. 《Protein Science》. 2009,
第 17 卷第 1586 - 1595 页 .

审查员 段珊

权利要求书1页 说明书29页
序列表12页 附图7页

(54) 发明名称
赖氨酰氧化酶和 LOXL2 的催化结构域
(57) 摘要

本文公开了人和小鼠的 LOX 和 LOXL2 蛋白的
分离催化域的氨基酸序列和编码核苷酸序列。还
提供了这些分离催化域的制备方法和用途。



1. 一种分离的多肽,所述多肽包含:
人 LOXL2 蛋白的催化域,其中:
所述催化域的氨基酸序列选自下组:SEQ ID NO:3 和不含初始 TA 残基的 SEQ ID NO:3;
并且
所述多肽不含来自所述人 LOXL2 蛋白在所述催化域外的序列。
2. 如权利要求 1 所述的分离的多肽,其特征在于,所述催化域是 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列。
3. 如权利要求 1 或权利要求 2 所述的多肽,其特征在于,所述多肽还包含信号序列、表位标签和纯化标签。
4. 如权利要求 3 所述的多肽,其特征在于,所述信号序列是免疫球蛋白 κ 信号序列。
5. 如权利要求 3 所述的多肽,其特征在于,所述表位标签是 myc 标签。
6. 如权利要求 3 所述的多肽,其特征在于,所述纯化标签是 His6 标签。
7. 如权利要求 1 所述的多肽,其特征在于,所述多肽的氨基酸序列是 SEQ ID NO:11。
8. 如权利要求 3 所述的多肽,其特征在于,所述多肽由所述催化域、所述信号序列、所述表位标签和所述纯化标签组成。
9. 如权利要求 1 或权利要求 2 所述的多肽,其特征在于,所述多肽由所述催化域组成。
10. 一种分离的多核苷酸,所述多核苷酸具有编码权利要求 1 或权利要求 2 所述的多肽的核苷酸序列。
11. 如权利要求 10 所述的多核苷酸,其特征在于,所述多核苷酸的序列是 SEQ ID NO:4。
12. 包含权利要求 10 所述的多核苷酸的表达载体。

赖氨酰氧化酶和 LOXL2 的催化结构域

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2009 年 8 月 21 日提交的美国临时专利申请第 61/235,776 号的权益，该专利申请通过引用全文纳入本文。

[0003] 有关联邦资助的说明

[0004] 无。

技术领域

[0005] 本申请涉及酶学和分子生物学领域。

背景技术

[0006] 结缔组织提供构架使身体的细胞和器官驻留其中。脊椎动物中结缔组织的主要成分是胞外基质。胞外基质的两种主要结构组分是多糖和纤维状蛋白，多糖形成胶状基质，而纤维状蛋白包埋在所述基质中。这些纤维状蛋白中最常见的两种是胶原蛋白和弹性蛋白。胶原蛋白纤维由胶原纤维的自缔合形成，胶原纤维自身通过三螺旋胶原分子的交联而形成。这种交联由赖氨酰氧化酶 (LOX) 和相关酶 (“赖氨酰氧化酶样”或“LOXL”) 催化，所有这些酶都含有催化域使赖氨酸和羟赖氨酸残基的 ϵ -氨基团脱氨导致肽基赖氨酸转化成肽基- α -氨基己二酸- δ -半醛 (醛赖氨酸)。醛赖氨酸残基能彼此自发缩合，导致胶原分子的交联。

[0007] 胞外基质在多种病理 (包括, 例如纤维化和转移) 中的作用已日益突出。参见例如, WO 01/83702 (2001 年 11 月 8 日); WO 2004/047720 (2004 年 6 月 10 日); WO 2007/126457 (2007 年 8 月 11 日); US 2006/0127402 (2006 年 6 月 15 日); US 2007/0225242 (2007 年 9 月 27 日); US 2009/0053224 (2009 年 2 月 26 日); US 2009/0104201 (2009 年 4 月 23 日); Csiszar (2001) Prog. Nucleic Acid Res. and Molec. Biol. 70 :1-32; Kirschmann 等 (2002) Cancer Research 62 :4478-4483。由于赖氨酰氧化酶和赖氨酰氧化酶样酶在胞外基质形成中通过交联胶原起关键作用, 它们代表了重要的治疗靶标。因此, 需要筛选这些胶原交联酶的抑制剂的方法, 鉴定结合这些酶的分子的方法, 以及用于不同治疗用途 (例如, 伤口愈合) 的胶原交联活性的来源。

发明内容

[0008] 本发明提供来自人和小鼠的赖氨酰氧化酶 (LOX) 和赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 酶的分离的催化域, 以及编码这些催化域的核酸。因此, 提供下列肽以及编码这些肽的核酸: 人 LOX 催化域, 人 LOXL2 催化域, 鼠 LOX 催化域和鼠 LOXL2 催化域。因此, 本发明提供:

[0009] 1. 包含人赖氨酰氧化酶 (LOX) 催化域的氨基酸序列的多肽。(SEQ ID NO :1)

[0010] 2. 包含编码人赖氨酰氧化酶 (LOX) 催化域的核苷酸序列的多核苷酸。(SEQ ID NO :2)

[0011] 3. 包含人赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 催化域的氨基酸序列的多肽。(SEQ ID NO :3)

[0012] 4. 包含编码人赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 催化域的核苷酸序列的多核苷酸。(SEQ ID NO :4)

[0013] 5. 包含鼠赖氨酰氧化酶 (LOX) 催化域的氨基酸序列的多肽。(SEQ ID NO :5)

[0014] 6. 包含编码鼠赖氨酰氧化酶 (LOX) 催化域的核苷酸序列的多核苷酸。(SEQ ID NO :6)

[0015] 7. 包含鼠赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 催化域的氨基酸序列的多肽。(SEQ ID NO :7)

[0016] 8. 包含编码鼠赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 催化域的核苷酸序列的多核苷酸。(SEQ ID NO :8)

[0017] 还提供：

[0018] 1a. 包含如本文所述 (SEQ ID NO :1) 人赖氨酰氧化酶 (LOX) 催化域的全部或部分氨基酸序列，而不含人 LOX 催化域外序列的多肽。

[0019] 2a. 所含核苷酸序列编码如本文所述 (SEQ ID NO :2) 人赖氨酰氧化酶 (LOX) 催化域的全部或部分，而不编码人 LOX 催化域外序列的多核苷酸。

[0020] 3a. 包含如本文所述 (SEQ ID NO :3) 人赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 催化域的全部或部分氨基酸序列，而不含人 LOXL2 催化域外序列的多肽。

[0021] 4a. 所含核苷酸序列编码如本文所述 (SEQ ID NO :4) 人赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 催化域的全部或部分，而不编码人 LOXL2 催化域外序列的多核苷酸。

[0022] 5a. 包含如本文所述 (SEQ ID NO :5) 鼠赖氨酰氧化酶 (LOX) 催化域的全部或部分氨基酸序列，而不含鼠 LOX 催化域外序列的多肽。

[0023] 6a. 所含核苷酸序列编码如本文所述 (SEQ ID NO :6) 鼠赖氨酰氧化酶 (LOX) 催化域的全部或部分，而不编码鼠 LOX 催化域外序列的多核苷酸。

[0024] 7a. 包含如本文所述 (SEQ ID NO :7) 鼠赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 催化域的全部或部分氨基酸序列，而不含鼠 LOXL2 催化域外序列的多肽。

[0025] 8a. 所含核苷酸序列编码如本文所述 (SEQ ID NO :8) 鼠赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 催化域的全部或部分，而不编码鼠 LOXL2 催化域外序列的多核苷酸。

[0026] 还提供包含前述核酸和 / 或多核苷酸的表达载体。这些表达载体可选含有启动子 (例如, T7 启动子、T3 启动子、SP6 启动子、大肠杆菌 (*E. coli*) RNA 聚合酶启动子、CMV 启动子、SV40 启动子、PGK 启动子、EF-1 α 启动子), 转录终止信号 (例如, SV40 终止信号), 剪接位点 (例如, SV40 剪接位点、 β -珠蛋白剪接位点), 核糖体结合位点, 信号序列 (例如, 免疫球蛋白 κ 信号序列), 表位标签 (例如, myc), 纯化标签 (例如, His₆), 复制起点和药物选择标记。本文公开的表达载体中也可有编码接头氨基酸和 / 或包含限制性酶识别位点的接头序列, 或任何其它类型的接头序列。

[0027] 因此, 本发明还提供：

[0028] 9. 一种多肽, 其包含人 LOX 催化域的全部或部分氨基酸序列, 不含人 LOX 催化域外氨基酸序列, 还含有信号序列、表位和 His₆ 纯化标签中的一种或多种; 例如, 包含信号肽、人 LOX 催化域、myc 表位标签和 His₆ 纯化标签的多肽 (如 SEQ ID NO :9)。

[0029] 10. 编码实施方式 9 所述多肽的多核苷酸; 例如, 包含编码信号肽、人 LOX 催化域、myc 表位标签和 His₆ 纯化标签的序列的多核苷酸 (如 SEQ ID NO :10)。

[0030] 11. 包含实施方式 10 所述多核苷酸的表达载体。

[0031] 12. 如实施方式 11 所述的表达载体,还包含启动子、药物筛选标记和复制起点中任一种、任意组合或其全部。

[0032] 13. 一种多肽,其包含人 LOXL2 催化域的全部或部分氨基酸序列,不含人 LOXL2 催化域外氨基酸序列,还含有信号序列、表位标签和 His₆ 纯化标签中的一种或多种;例如,包含信号序列、人 LOXL2 催化域、myc 表位标签和 His₆ 纯化标签的多肽(如 SEQ ID NO:11)。

[0033] 14. 编码实施方式 13 所述多肽的多核苷酸;例如,包含编码信号序列、人 LOXL2 催化域、myc 表位标签和 His₆ 纯化标签的序列的多核苷酸(如 SEQ ID NO:12)。

[0034] 15. 包含实施方式 14 所述多核苷酸的表达载体。

[0035] 16. 如实施方式 15 所述的表达载体,还包含启动子、药物筛选标记和复制起点中任一种、任意组合或其全部。

[0036] 17. 一种多肽,其包含鼠 LOX 催化域的全部或部分氨基酸序列,不含鼠 LOX 催化域外氨基酸序列,还含有信号序列、表位和 His₆ 纯化标签中的一种或多种;例如,包含信号序列、鼠 LOX 催化域、myc 表位标签和 His₆ 纯化标签的多肽(如 SEQ ID NO:13)。

[0037] 18. 编码实施方式 17 所述多肽的多核苷酸;例如,包含编码信号序列、鼠 LOX 催化域、myc 表位标签和 His₆ 纯化标签的序列的多核苷酸(如 SEQ ID NO:14)。

[0038] 19. 包含实施方式 18 所述多核苷酸的表达载体。

[0039] 20. 如实施方式 19 所述的表达载体,还包含启动子、药物筛选标记和复制起点中任一种、任意组合或其全部。

[0040] 21. 一种多肽,其包含鼠 LOXL2 催化域的全部或部分氨基酸序列,不含鼠 LOXL2 催化域外氨基酸序列,还含有信号序列、表位标签和 His₆ 纯化标签中的一种或多种;例如,包含信号序列、鼠 LOXL2 催化域、myc 表位标签和 His₆ 纯化标签的多肽(如 SEQ ID NO:15)。

[0041] 22. 编码实施方式 21 所述多肽的多核苷酸;例如,包含编码信号序列、鼠 LOXL2 催化域、myc 表位标签和 His₆ 纯化标签的序列的多核苷酸(如 SEQ ID NO:16)。

[0042] 23. 包含实施方式 22 所述多核苷酸的表达载体。

[0043] 24. 如实施方式 23 所述的表达载体,还包含启动子、药物筛选标记和复制起点中任一种、任意组合或其全部。

[0044] 附图简要说明

[0045] 图 1 显示由转染了 pHLOXMCD 表达载体的 HEK293 细胞表达人赖氨酰氧化酶(hLOX)蛋白的催化域。显示通过免疫印迹分析 6 株稳定转染的细胞系(编号 23 至 28)。左图显示含各获自所述 6 株细胞系的未稀释生长培养基(净 CM)样品(15 μ l)的聚丙烯酰胺凝胶的免疫印迹。中图显示可溶性胞内物质的分析,而右图显示不溶性胞内物质的分析。对于这些图,各泳道含有来自约 10⁵ 个细胞的物质。所有印迹用小鼠抗-His₆ 一抗探测,然后与 HRP 偶联驴抗小鼠二抗反应。HRP 活性用 Chemi-Glow[®]试剂(阿尔法新技术公司(Alpha Innotech),加利福尼亚州圣莱安德罗)显示。加工后催化域的预测分子量为 26.9kD。

[0046] 各图中标为“+”的泳道包括含 His₆ 序列的蛋白,用作抗-His₆ 抗体的阳性对照。

[0047] 图 2 显示转染了 pHLOXL2MCD 表达载体的 HEK293 细胞表达人赖氨酰氧化酶样 2(hLOXL2)蛋白的催化域。左图显示一些稳定转染细胞系(由各泳道顶部数字标示)的全细胞裂解液的免疫印迹,各泳道含有来自约 1x10⁵ 个细胞的物质。右图显示含各获自六个细胞系(由数字标示)的未稀释生长培养基(15 μ l 净 CM)样品的聚丙烯酰胺凝胶免疫印

迹。所有印迹用小鼠抗-His₅一抗探测,然后与HRP偶联驴抗小鼠二抗反应。HRP活性用Chemi-Glow®试剂(阿尔法新技术公司,加利福尼亚州圣莱安德罗)显示。加工后催化域的预测分子量为31kD。

[0048] 左图中标为“+”的泳道包括含His₅序列的蛋白,用作抗-His₅抗体的阳性对照。

[0049] 图3显示由转染了pmLOXMCD表达载体的HEK293细胞表达鼠赖氨酰氧化酶(mLOX)蛋白的催化域。显示通过免疫印迹对5株稳定转染细胞系(编号为4、9、12、18和19)的分析。左图显示含各获自6株细胞系的未稀释生长培养基(净CM)样品(15u1)的聚丙烯酰胺凝胶的免疫印迹。右图显示对这6株中5株的可溶性和不溶性胞内部分的分析,各泳道含有来自约10⁵个细胞的物质。所有印迹用小鼠抗-His₅一抗探测,然后与HRP偶联驴抗小鼠二抗反应。HRP活性用Chemi-Glow®试剂(阿尔法新技术公司,加利福尼亚州圣莱安德罗)显示。加工后催化域的预测分子量为27kD。

[0050] 图4显示人和鼠LOX催化域在分泌和氨基酸序列上的差异。详见实施例10。

[0051] 图5显示分离的人LOXL2催化域在Amplex®Red试验中的试卤灵(resorufin)生成时程(由590nm的吸光度测定)。详见实施例12。

[0052] 图6显示本发明中各种多肽的氨基酸序列的比对,包括衍生自人(hLOX、hLOXL1、hLOXL2等)和小鼠(mLOX和mLOXL2)的多肽。氨基酸残基的编号在所示的最N-末端残基处始于“1”,且不必与本领域常规一致。星号“*”表示所有显示的多肽在该位置的氨基酸均相同,冒号“:”表示保守性氨基酸取代,而单点“.”表示半保守性氨基酸取代,均按照欧洲生物信息研究所(European Bioinformatics Institute, EMBL-EBI)提供的ClustalW2程序。

[0053] 图7显示本发明中各种多肽的氨基酸序列的比对,仅包括衍生自人的那些多肽。编号和图例与图6所用相同。

[0054] 发明详述

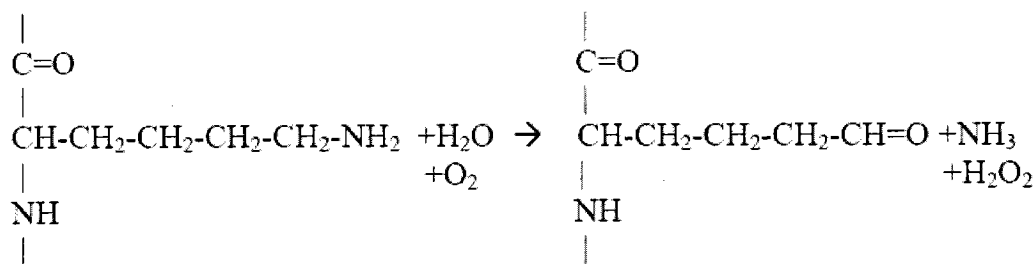
[0055] 除非另有说明,本文的实施采用细胞生物学、毒理学、分子生物学、生物化学、细胞培养、免疫学、肿瘤学、重组DNA领域和相关领域中的标准方法和常规技术,所述方法和技术在本领域技术范围内。这些技术描述于文献中并因而本领域技术人员可用。参见例如Alberts, B.等“Molecular Biology of the Cell(《细胞分子生物学》)”,第5版,纽约州纽约市的加兰德科学出版社(Garland Science),2008;Voet, D.等“Fundamentals of Biochemistry:Life at the Molecular Level(《基础生物化学:分子水平的生命》)”第3版,新泽西州霍博肯的约翰威利出版社(John Wiley&Sons),2008;Sambrook, J.等,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual(《分子克隆:实验室手册》)”第3版,冷泉港实验出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),2001;Ausubel, F.等,“Current Protocols in Molecular Biology(《新编分子生物学实验指南》)”纽约的约翰威利出版社,1987,定期更新;Freshney, R. I.,“Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique(《动物细胞培养:基本技术手册》)”第4版,新泽西州萨默塞特的约翰威利出版社,2000;“Methods in Enzymology(《酶学方法》)”丛书,加利福尼亚州圣地亚哥的学术出版社(Academic Press)。

[0056] 赖氨酰氧化酶型酶

[0057] 本文所用术语“赖氨酰氧化酶型酶”或“赖氨酰氧化酶”指含催化域催化赖氨酸和

羟赖氨酸残基的 ϵ -氨基氧化脱氨的蛋白家族成员,该氧化脱氨导致肽基赖氨酸转变成肽基- α -氨基己二酸- δ -半醛(醛赖氨酸)并释放化学计量的氨和过氧化氢:

[0058]



肽基赖氨酸

肽基醛赖氨酸

[0059] 此反应最常胞外发生于胶原和弹性蛋白中的赖氨酸残基上。醛赖氨酸的醛基具有反应性且能与其它醛赖氨酸和赖氨酸残基自发缩合,导致胶原分子交联以形成胶原纤维。

[0060] 已从鸡、大鼠、小鼠、牛和人中纯化赖氨酰氧化酶。所有赖氨酰氧化酶都包含长约 205 个氨基酸的共有催化域,其位于所述蛋白羧基末端部分且含有该酶的活性位点。所述活性位点包括含保守氨基酸序列的铜结合位点,所述序列含配位 Cu(II) 原子的 4 个组氨酸残基。所述活性位点还包含赖氨酰酪氨酰酮 (LTQ) 辅因子,由赖氨酸和酪氨酸残基(对应于大鼠赖氨酰氧化酶的 lys314 和 tyr349,以及人赖氨酰氧化酶的 lys320 和 tyr355) 之间的分子内共价连接形成。形成 LTQ 辅因子的酪氨酸残基周边序列也在赖氨酰氧化酶中保守。所述催化域还包含 10 个保守性半胱氨酸残基,其参与 5 个二硫键的形成。所述催化域还包括纤连蛋白结合域。最后,所述催化域中存在含有 4 个半胱氨酸残基的类似生长因子和细胞因子受体结构域的氨基酸序列。

[0061] 尽管存在这些保守区,不同赖氨酰氧化酶型酶可在催化域内和之外通过核苷酸和氨基酸序列不同的区域来彼此区分。

[0062] 此酶家族中分离和表征的第一个成员是赖氨酰氧化酶 (EC 1.4.3.13);也称为蛋白-赖氨酸 6-氧化酶、蛋白-L-赖氨酸:氧 6-氧化还原酶(脱氨基)或 LOX。参见例如 Harris 等, Biochim. Biophys. Acta (1974) 341:332-344; Rayton 等, (1979) J. Biol. Chem. 254:621-626; Stassen, (1976) Biophys. Acta 438:49-60。

[0063] 随后发现了其它赖氨酰氧化酶型酶。这些蛋白称为“LOX 样”或“LOXL”。它们都包含上述共有催化结构域并具有类似酶活性。目前,已知人和小鼠中都存在 5 种不同赖氨酰氧化酶:LOX 和 4 种 LOX 相关或 LOX 样蛋白 LOXL1(也标注为“赖氨酰氧化酶样”、“LOXL”或“LOL”)、LOXL2(也标注为“LOR-1”)、LOXL3 和 LOXL4。编码所述 5 种不同赖氨酰氧化酶型酶的基因各位于不同染色体。参见例如 Molnar 等 (2003) Biochim Biophys Acta. 1647:220-24; Csiszar (2001) Prog. Nucl. Acid Res. 70:1-32; 2001 年 11 月 8 日公开的 WO 01/83702 和美国专利第 6,300,092 号,其都通过引用纳入本文。已从鼠 EC 细胞系中分离出名为 LOXC 的 LOX 样蛋白,其与 LOXL4 具有一些相似性但表达模式不同。Ito 等 (2001) J. Biol. Chem. 276:24023-24029。已从果蝇 (Drosophila) 中分离了 2 种赖氨酰氧化酶 DmLOXL-1 和 DmLOXL-2。

[0064] 尽管所有赖氨酰氧化酶型酶共有共同的催化域,但它们也彼此不同,特别是在其氨基末端区。所述 4 种 LOXL 蛋白与 LOX 相比具有氨基末端延伸。因此,人前 LOX 原

(preproLOX) (例如, 信号序列切割前的初级翻译产物, 见下) 包含 417 个氨基酸残基; LOXL1 包含 574 个, LOXL2 包含 638 个, LOXL3 包含 753 个而 LOXL4 包含 756 个。本领域对全长赖氨酰氧化酶型酶的常规编号起始于信号序列的最 N- 末端残基处从“1”开始。

[0065] LOXL2、LOXL3 和 LOXL4 在其氨基末端区含有 4 个重复的富含半胱氨酸的清除受体 (SRCR) 结构域。这些结构域在 LOX 或 LOXL1 中不存在。在分泌、跨膜或胞外基质蛋白中发现 SRCR 结构域, 已知该结构域在许多分泌和受体蛋白中介导配体结合。Hoheneste 等 (1999) *Nat. Struct. Biol.* 6 :228-232 ;Sasaki 等 (1998) *EMBO J.* 17 :1606-1613。LOXL3 在 SRCR 结构域外还包含氨基末端区的核定位信号。富含脯氨酸的结构域看来是 LOXL1 特有的。Molnar 等 (2003) *Biochim. Biophys. Acta* 1647 :220-224。各种赖氨酰氧化酶型酶的糖基化模式也不同。

[0066] 所述赖氨酰氧化酶型酶的组织分布也不同。人 LOX mRNA 在心脏、胎盘、睾丸、肺、肾和子宫中高表达, 但在脑和肝中微弱表达。人 LOXL1mRNA 在胎盘、肾、肌肉、心脏、肺和胰腺中表达, 且与 LOX 类似, 在脑和肝中表达水平低许多。Kim 等 (1995) *J. Biol. Chem.* 270 :7176-7182。高水平的 LOXL2mRNA 在子宫、胎盘和其它器官中表达, 但如 LOX 和 LOXL, 其在脑和肝中低水平表达。Jourdan Le-Saux 等 (1999) *J. Biol. Chem.* 274 :12939 :12944。LOXL3mRNA 在睾丸、脾和前列腺中高表达, 在胎盘中中等表达, 在肝中不表达, 而在肝中观察到高水平的 LOXL4mRNA。Huang 等 (2001) *Matrix Biol.* 20 :153-157 ;Maki 和 Kivirikko (2001) *Biochem. J.* 355 :381-387 ;Jourdan Le-Saux 等 (2001) *Genomics* 74 :211-218 ;Asuncion 等 (2001) *Matrix Biol.* 20 :487-491。

[0067] 不同赖氨酰氧化酶在疾病中的表达和 / 或参与也可改变。参见例如 Kagen (1994) *Pathol. Res. Pract.* 190 :910-919 ;Murawaki 等 (1991) *Hepatology* 14 :1167-1173 ;Siegel 等 (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 :2945-2949 ;Jourdan Le-Saux 等 (1994) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 199 :587-592 ;Kim 等 (1999) *J. Cell Biochem.* 72 :181-188。赖氨酰氧化酶型酶还与许多癌症有关, 包括头颈癌、膀胱癌、结肠癌、食管癌和乳腺癌。参见例如 Wu 等 (2007) *Cancer Res.* 67 :4123-4129 ;Gorrough 等 (2007) *J. Pathol.* 212 :74-82 ;Csiszar (2001) *Prog. Nucl. Acid Res.* 70 :1-32 和 Kirschmann 等 (2002) *Cancer Res.* 62 :4478-4483。

[0068] 因此, 尽管所述赖氨酰氧化酶型酶在结构和功能上呈现某些重叠, 它们看来还各具有独特的功能。例如, 就结构而言, 针对人 LOX 蛋白催化域产生的某些抗体不结合人 LOXL2。就功能而言, 据报道小鼠中靶向缺失 LOX 看来对分娩致命, 而 LOXL1 缺陷不引起严重的发育表型。Hornstra 等 (2003) *J. Biol. Chem.* 278 :14387-14393 ;Bronson 等 (2005) *Neurosci. Lett.* 390 :118-122。

[0069] 尽管最广泛记载的赖氨酰氧化酶型酶活性是氧化细胞外胶原和弹性蛋白中的特定赖氨酸残基, 但有证据显示赖氨酰氧化酶型酶还参与许多胞内过程。例如, 据报道某些赖氨酰氧化酶型酶调节基因表达。Li 等 (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 :12817-12822 ;Giampuzzi 等 (2000) *J. Biol. Chem.* 275 :36341-36349。此外, 据报道 LOX 氧化组蛋白 H1 中的赖氨酸残基。LOX 的其它胞外活性包括诱导单核细胞、成纤维细胞和平滑肌细胞趋化性。Lazarus 等 (1995) *Matrix Biol.* 14 :727-731 ;Nelson 等 (1988) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 188 :346-352。LOX 自身表达受许多生长因子和类固醇如 TGF- β 、TNF- α 和干扰素诱

导。Csiszar(2001)Prog.Nucl.Acid Res.70:1-32。近期研究显示 LOX 在多种生物学功能如发育调节、肿瘤抑制、细胞迁移和细胞衰老中具有其它作用。

[0070] 来自各种来源的赖氨酰氧化酶 (LOX) 蛋白的示例包括具有的氨基酸序列与以下序列之一所表达或翻译的多肽基本相同的酶:EMBL/GenBank 登录号:M94054;AAA59525.1-mRNA;S45875;AAB23549.1-mRNA;S78694;AAB21243.1-mRNA;AF039291;AAD02130.1-mRNA;BC074820;AAH74820.1-mRNA;BC074872;AAH74872.1-mRNA;M84150;AAA59541.1-基因组 DNA。LOX 的一个实施方式是人赖氨酰氧化酶 (hLOX) 前原蛋白。

[0071] 赖氨酰氧化酶样酶编码序列的示例性公开如下:LOXL1 由以 GenBank/EMBL BC015090 保藏的 mRNA 编码;AAH15090.1;LOXL2 由以 GenBank/EMBL U89942 保藏的 mRNA 编码;LOXL3 由以 GenBank/EMBL AF282619 保藏的 mRNA 编码;AAK51671.1;LOXL4 由以 GenBank/EMBL AF338441 保藏的 mRNA 编码;AAK71934.1。

[0072] 称为前原肽的 LOX 蛋白初级翻译产物包含从氨基酸 1-21 延伸的信号序列。此信号序列在小鼠和人 LOX 中都通过 Cys21 与 Ala22 间的切割来胞内释放,从而产生 LOX 的 46-48kDa 前肽形式,在本文中也称为全长形式。所述前肽在通过高尔基体时进行 N-糖基化以产生 50kDa 蛋白,然后分泌到胞外环境中。在此阶段,所述蛋白没有催化活性。在小鼠 LOX 的 Gly168 和 Asp169 之间、人 LOX 的 Gly174 和 Asp175 之间的进一步切割产生成熟、具催化活性的 30-32kDa 酶,释放 18kDa 前肽。此最终切割事件由金属内切蛋白酶前胶原 C 蛋白酶催化,该酶也称为骨形态发生蛋白-1 (BMP-1)。有趣的是,该酶还在 LOX 底物—胶原的加工中发挥作用。然后去除 N-糖基单元。

[0073] 预测可能的信号肽切割位点在 LOXL1、LOXL2、LOXL3 和 LOXL4 的氨基末端。所预测信号切割位点为:LOXL1 在 Gly25 和 Gln26 之间,LOXL2 在 Ala25 和 Gln26 之间,LOXL3 在 Gly25 和 Ser26 之间,LOXL4 在 Arg23 和 Pro24 之间。

[0074] 已鉴定 LOXL1 蛋白的 BMP-1 切割位点在 Ser354 和 Asp355 之间。Borel 等 (2001) J. Biol. Chem. 276:48944-48949。已预测其它赖氨酰氧化酶型酶的潜在 BMP-1 切割位点,预测是根据前胶原和前 LOX 中 BMP-1 切割的共有序列位于 Ala/Gly-Asp 序列,之后通常是酸性或带电残基。LOXL3 中预测的 BMP-1 切割位点位于 Gly447 和 Asp448 之间;加工此位点可产生与成熟 LOX 大小类似的成熟肽。也在 LOXL4 内鉴定了潜在的 BMP-1 切割位点,位于残基 Ala569 和 Asp570 之间。Kim 等 (2003) J. Biol. Chem. 278:52071-52074。LOXL2 也可与其它 LOXL 家族成员类似地进行蛋白水解切割并分泌。Akiri 等 (2003) Cancer Res. 63:1657-1666。

[0075] 基于赖氨酰氧化酶型酶中存在共同催化域,活性位点所在的酶原 C-末端 30kDa 区的某些氨基酸残基高度保守。在所述前肽结构域中观察到较为适度的保守性 (约 60-70%)。

[0076] 就本公开的目的而言,术语“赖氨酰氧化酶型酶”包括所有上述 5 种赖氨酸氧化酶,即 LOX、LOXL1 (也鉴定为 LOXL)、LOXL2、LOXL3 和 LOXL4),还包括基本保留酶活性如能催化赖氨酰残基脱氨的 LOX、LOXL1、LOXL2、LOXL3 和 LOXL4 的功能片段和 / 或衍生物。在关于氨基酸序列或多核苷酸序列 (例如,“衍生自”LOXL2 的氨基酸序列) 的语境中,“片段和 / 或衍生物”意在表示所述多肽或核酸含有某天然产生赖氨酰氧化酶型酶蛋白或其编码核酸的全部或部分的连续序列,而不用来对所述蛋白质或核酸制备的来源或方法构成限制。

[0077] 通常,功能片段或衍生物保留其至少 50% 的赖氨酸氧化活性。在一些实施方式中,功能片段或衍生物保留其至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 或 100% 的赖氨酸氧化活性。

[0078] 赖氨酰氧化酶型酶的功能片段还旨在包括不显著改变催化活性的保守性氨基酸取代(就天然多肽序列而言)。术语“保守性氨基酸取代”指基于某些共有结构和/或性质的氨基酸分组。就共有结构而言,氨基酸可分成含非极性侧链(甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸和色氨酸),含极性不带电侧链(丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸和半胱氨酸)和含极性带电侧链(赖氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和组氨酸)。含芳族侧链的氨基酸组包括苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。脯氨酸、色氨酸和组氨酸中存在杂环侧链。在含非极性侧链的氨基酸组中,具有短烃侧链的氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸)可与具有较长、非烃侧链的氨基酸(甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸和色氨酸)相区分。在具有极性带电侧链的氨基酸组中,酸性氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸)可与带碱性侧链的氨基酸(赖氨酸、精氨酸和组氨酸)相区分。

[0079] 一种确定个体氨基酸共有性质的功能性方法是分析同源生物体对应蛋白之间氨基酸改变的归一化频率(Schulz, G. E. 和 R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure(《蛋白结构原理》),施普林格出版公司(Springer-Verlag),1979)。根据此类分析,可限定氨基酸组,同源蛋白中优选组内的氨基酸相互取代,从而对总体的蛋白结构具有相似的影响(Schulz, G. E. 和 R. H. Schirmer,《蛋白结构原理》,施普林格出版公司,1979)。根据此类分析,“保守性氨基酸取代”指用某一氨基酸残基取代与其共有氨基酸侧链的化学和物理性质(例如,电荷、大小、疏水性/亲水性)的另一氨基酸残基。以下为共有某些化学和/或物理性质的氨基酸残基的示例:

[0080] (i) 含带电基团的氨基酸,由 Glu、Asp、Lys、Arg 和 His 组成,

[0081] (ii) 含带正电基团的氨基酸,由 Lys、Arg 和 His 组成,

[0082] (iii) 含带负电基团的氨基酸,由 Glu 和 Asp 组成,

[0083] (iv) 含芳族基团的氨基酸,由 Phe、Tyr 和 Trp 组成,

[0084] (v) 含氮环基团的氨基酸,由 His 和 Trp 组成,

[0085] (vi) 含大的脂肪族非极性基团的氨基酸,由 Val、Leu 和 Ile 组成,

[0086] (vii) 含微极性基团的氨基酸,由 Met 和 Cys 组成,

[0087] (viii) 含小残基的氨基酸,由 Ser、Thr、Asp、Asn、Gly、Ala、Glu、Gln 和 Pro 组成,

[0088] (ix) 含脂肪族基团的氨基酸,由 Val、Leu、Ile、Met 和 Cys 组成,以及

[0089] (x) 含羟基的氨基酸,由 Ser 和 Thr 组成。

[0090] 某些“保守性取代”可包括在以下各组氨基酸残基内的取代:Gly、ala;val、ile、leu;asp、glu;asn、gln;ser、thr;lys、arg;和 phe、tyr。

[0091] 因此,如上所示范,氨基酸的保守性取代为本领域技术人员已知且可常规进行而不改变所得分子的生物学活性。本领域技术人员还认识到,多肽非必需区域的单一氨基酸取代通常不显著改变生物学活性。参见例如 Watson 等“Molecular Biology of the Gene(《基因分子生物学》)”第 4 版,1987,加利福尼亚州门洛帕克的本杰明/卡明斯出版公司(The Benjamin/Cummings Pub. Co.),224 页。

[0092] 其它关于赖氨酰氧化酶的信息,参见例如 Rucker 等(1998)Am. J. Clin. Nutr. 67:

996S-1002S 和 Kagan 等 (2003) J. Cell. Biochem 88 :660-672。还可参见共有的美国专利申请 US 2009/0053224 (2009 年 2 月 26 日) 和 US 2009/0104201 (2009 年 4 月 23 日);其内容通过引用纳入本文用于描述赖氨酰氧化酶和赖氨酰氧化酶样酶、这些酶的调节剂和鉴定这些酶的调节剂的方法。还可参见 WO 2004/47720 (2004 年 6 月 10 日);WO 2007/126457 (2007 年 8 月 11 日);WO 2009/010974 (2009 年 1 月 22 日);US 2006/0127402 (2006 年 6 月 15 日);US 2007/0021365 (2007 年 1 月 25 日) 和 US 2007/0225242 (2007 年 9 月 27 日);所有这些都通过引用纳入本文用于描述赖氨酰氧化酶和赖氨酰氧化酶样酶、这些酶的调节剂以及鉴定这些酶的调节剂的方法。

[0093] 具有赖氨酰氧化酶或赖氨酰氧化酶型酶的催化域的多肽

[0094] 本发明提供具有赖氨酰氧化酶型酶的活性的多肽,例如如上所述根据国际生物化学与分子生物学联盟 (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) 命名法属于 EC 1.4.3.13 的那些酶。含有信号序列和 / 或前肽的全长蛋白都可在蛋白获得全部体内催化活性前被切割。全长赖氨酰氧化酶或赖氨酰氧化酶样酶的长度可以超过 100、200、300、400、500、700 个,至多 754 个或更多个氨基酸残基。不含信号序列和 / 或前肽的成熟全长蛋白的长度可以超过 100、200、240、480、720、730 个,至多 740 个或更多个氨基酸残基。

[0095] 本发明的多肽可衍生自成熟的全长 LOX 或 LOXL 蛋白 (例如,不含信号肽和 / 或前肽)。示例性多肽可以具有图 6 和图 7 所示的任意氨基酸序列。

[0096] 图 6 显示由人 LOX、人 LOXL1、人 LOXL2、人 LOXL3、人 LOXL4、鼠 LOX 和鼠 LOXL2 所衍生多肽的氨基酸序列的比对。图 7 显示仅由人 LOX/LOXL 蛋白所衍生多肽的序列比对。为方便起见,对氨基酸残基的编号在图 6 和 7 所示最 N- 末端残基处从“1”开始。因此,本发明的多肽可参照图 6 和图 7 中所示序列使用的编号系统或如前文所述本领域所用编号系统描述。或者,所述多肽可参照本文给出的序列标识号描述。图 6 和图 7 中的星号“*”表示所有显示的多肽在该位置的氨基酸均相同,冒号“:”表示保守性氨基酸取代,而单点“.”表示半保守性氨基酸取代,均按照欧洲生物信息研究所 (European Bioinformatics Institute, EMBL-EBI) 提供的 ClustalW2 程序所用图例。

[0097] 本发明的多肽可以涵盖具有赖氨酰氧化酶型酶 C- 末端部分的至少约 50 个、至少约 75 个、至少约 100 个、至少约 120 个、至少约 140 个、至少约 150 个、至少约 170 个、至少约 180 个、至少约 200 个、至少约 220 个、多到至少约 240 个或更多个氨基酸的多肽。例如,本发明的多肽可含有图 6 中 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :17 所示的 C- 末端 207 个氨基酸残基。本发明的多肽还涵盖那些所含氨基酸序列少于天然产生的全长赖氨酰氧化酶型酶的多肽。多肽可含有 LOX 或 LOXL- 蛋白的 C- 末端部分的多达约 25 个、多达约 50 个、多达约 75 个、多达约 100 个、多达约 120 个、多达约 140 个、多达约 160 个、多达约 180 个、多达约 200 个、多达约 220 个、多达约 230 个或更多的氨基酸残基,如图 6 和图 7 中的序列所示例。所述多肽可排除信号序列,前肽,和 / 或 LOX 或 LOXL- 蛋白在图 6 和图 7 所示序列 N- 末端方向的任意部分。

[0098] 本发明的多肽还可参照上述本领域所用编号系统来描述,该编号系统中氨基酸编号“1”表示含有信号序列的全长 LOX 或全长 LOXL- 蛋白的最 N- 末端的氨基酸残基。根据该编号,所述多肽可描述为具有的氨基酸序列从 LOX (例如,SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :5)

中残基号约 190-240, 约 200-230, 或约 210-220 起始的多肽。所述多肽可含有从 LOXL1 中残基号约 350-360, 约 340-370, 或约 330-380 起始的氨基酸序列。或者, 所述多肽可含有从 LOXL2 (例如, SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:7) 中残基号约 540-550, 约 530-560, 或约 520-570 起始的氨基酸序列。所述多肽还可含有从 LOXL3 中残基号约 520-530, 约 510-540, 或约 500-550 起始的氨基酸序列。所述多肽还可含有从 LOXL4 中残基号约 530-540, 约 540-550, 或约 530-560 起始的氨基酸序列。

[0099] 本发明的多肽涵盖那些与图 6 和图 7 所示氨基酸序列相比具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 或更多个氨基酸取代, 例如保守性氨基酸取代的多肽。对于氨基酸取代的指导可从图 6 和图 7 所提供的比对中获得。可被取代的氨基酸残基可以位于并非高度保守的残基位置, 例如那些未用星号、冒号或点符标注的残基位置。本领域普通技术人员应当了解, 基于所示比对, 与其他残基位置相比, 某些残基位置的氨基酸残基可容许取代、缺失和 / 或插入而不改变多肽整体的物理和化学性质。

[0100] 本发明的多肽涵盖所含氨基酸序列与图 6 所示任意多肽至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 或 100% 相同的那些多肽。例如, 图 6 所示鼠 LOX 催化域多肽的氨基酸序列与人 LOX 催化域多肽的氨基酸序列有 98% 的氨基酸序列相同性。

[0101] 根据上述说明, 可从中衍生本发明多肽的蛋白包括 LOX (GenBank 登录号 NP_002308), LOXL1 (NP_005567), LOXL2 (NP_002309), LOXL3 (NP_115882) 和 LOXL4 (NP_115587), 其中上述 GenBank 登录号表示人序列。除了在人中所发现的以外, 这些 LOX 或 LOXL 蛋白还可包括在小鼠或其它哺乳动物中发现的那些。例如, LOX、LOXL1 或 LOXL2 蛋白可以源自鼠 (GenBank 登录号分别为 NP_034858、NP_034859、NP_201582)。

[0102] 主题多肽可包括衍生自赖氨酰氧化酶型酶 (例如, LOX 或 LOXL2) 的氨基酸序列, 还包含异源氨基酸序列, 例如 LOX 或 LOXL2 序列连接有并非 LOX 或 LOXL2 蛋白部分的多肽。这类多肽可以是融合蛋白, 如含有表位标签、纯化标签和 / 或可检测标记的融合蛋白。融合蛋白可在异源序列和衍生自赖氨酰氧化酶型酶的氨基酸序列之间任选地包括接头序列。本领域熟知在提供有核酸序列时产生感兴趣融合蛋白的方法。下文详述其它异源元件和示例性融合蛋白。

[0103] 含有异源元件的示例性多肽可包括 myc 和 / 或 His₆ 标签, 并可任选地包括侧接的接头序列, 例如 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:15 中所示。

[0104] 本发明的多肽还涵盖那些连接有报道多肽如荧光蛋白和 / 或偶联有某分子的多肽。与所述多肽偶联的分子可以是载体分子或当存在于动物中时会引起免疫应答的已知免疫原 (例如, 佐剂)。其它偶联物可包括那些有助于主题多肽的递送和 / 或提高其半衰期的偶联物。

[0105] 本发明所述多肽还可含有一个或多个聚乙二醇 (PEG) 部分。这些多肽被称为“PEG 化多肽”。本领域熟知适用于多肽 PEG 化的方法和试剂。通常, 适于偶联多肽的 PEG 往往在室温下可溶于水, 且具有通式 $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, 其中 R 为氢或保护基团如烷基或链烷醇基团, 且其中 n 是 1-1000 的整数。R 为保护基团时, 其通常含有 1-8 个碳原子。

[0106] PEG 可有至少一个经修饰羟基以产生官能团与所述多肽中的氨基 (例如, 赖氨酸残基中的 ϵ -氨基或多肽 N-末端的游离氨基) 或羧基反应。

[0107] 其它 PEG 的衍生物包含末端硫代羧酸基团 $-COSH$, 其与氨基选择性反应产生酰胺

衍生物。在其它实施方式中,PEG 含有活性酯,例如在 PEG 链末端的 N- 羟基丁二酰亚胺。这种含 N- 羟基丁二酰亚胺的 PEG 分子在特定 pH 条件如 6.5-7.5 左右的中性 pH 下与选定氨基反应。

[0108] PEG 可直接与所述多肽的氨基酸残基偶联,或可通过接头连接。在一些实施方式中,所述多肽添加接头,形成接头修饰的多肽。这些接头提供各种功能,例如,将 PEG 试剂与接头修饰的多肽偶联的反应基团如巯基、氨基或羧基。

[0109] 与所述多肽偶联的 PEG 可以是直链或支链的。支链 PEG 衍生物包括但不限于:美国专利第 5,643,575 号中所述,“星形 PEG(star-PEG)”和多分支 PEG 如谢氏聚合物有限公司(Shearwater Polymers)产品目录“聚乙二醇衍生物 1997-1998”中所述的那些。本领域对星形 PEG 有描述,例如在美国专利第 6,046,305 号中。

[0110] 编码含赖氨酰氧化酶型酶催化域多肽的多核苷酸

[0111] 本发明考虑的多核苷酸含有编码前述具赖氨酰氧化酶型酶活性多肽的核酸序列。本文所考虑的核酸具有的核苷酸序列与编码上述任意多肽的核酸的连续序列的相同性至少为 70% (例如,至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99% 或 100%)。相同性百分数是基于所比较序列中的较短序列。可利用熟知的程序如 BLASTN(2.0.8) (Altschul 等 (1997) Nucl. Acids. Res. 25 :3389-3402) 采用默认参数无过滤来进行序列比较。由于遗传编码的简并性,核酸序列相同性 (例如,编码相同氨基酸序列的两个不同多核苷酸之间) 可以低于氨基酸序列相同性的百分数。

[0112] 编码本发明多肽的多核苷酸中的核酸序列示例包括 SEQ ID NO :2 (人 LOX- 衍生的), SEQ ID NO :4 (人 LOX2- 衍生的), SEQ ID NO :6 (鼠 LOX- 衍生的) 和 SEQ ID NO :8 (鼠 LOX2- 衍生的)。也可在表达载体中提供这些核酸序列。

[0113] 本文提供的表达载体含有前述核酸和 / 或多核苷酸。这些表达载体可含有启动子 (例如, T7 启动子、T3 启动子、SP6 启动子、大肠杆菌 (E. coli) RNA 聚合酶启动子、CMV 启动子、SV40 启动子、PGK 启动子、EF-1 α 启动子), 转录终止信号 (例如, SV40 终止信号), 剪接位点 (例如, SV40 剪接位点、 β - 珠蛋白剪接位点), 核糖体结合位点, 信号序列 (例如, 免疫球蛋白 κ 信号序列), 表位标签 (例如, myc), 纯化标签 (例如, His₆), 复制起点和药物选择标记。在本文所述载体中, 还可将编码接头氨基酸和 / 或含有限制性酶识别位点的接头序列或任何其它类型的接头序列, 与编码主题多肽的核酸操作性连接。下文详述载体及其应用。

[0114] 制备本发明多肽的方法

[0115] 本发明的多肽可用任何适当方法制得, 包括重组和非重组方法 (例如, 化学合成)。主题多肽可用本领域熟知的固相合成方法 (例如, Fmoc- 或 t-Boc 化学法) 制备, 例如 Merrifield(1963) J. Am. Chem. Soc. 85 :2149 和 Methods in Molecular Biology (《分子生物学方法》) 第 35 卷 Peptide Synthesis Protocols (《肽合成方法》) 中所述的那些方法。

[0116] 用重组技术制备所述多肽时, 所述方法可包括任何适当构建物和任何适当宿主细胞, 其可以是原核或真核细胞 (例如, 细菌宿主细胞、酵母宿主细胞或培养的哺乳动物宿主细胞)。例如, 将遗传物质引入宿主细胞中的方法包括转化、电穿孔、脂质转染、接合、磷酸钙法等。可选择转移的方法以提供所引入的多肽编码核酸的稳定表达。所述多肽编码核酸可

作为可遗传的游离元件（例如质粒）提供，或可经基因组整合。

[0117] 用于转移多肽编码核酸的合适载体在组成上可有变化。整合载体可以是条件性复制或自杀质粒、噬菌体等。所述构建体可包括各种元件，包括例如，启动子、选择性遗传标记（例如，提供抗生素抗性的基因（例如，新霉素、G418、氨甲喋呤、氨苄青霉素、卡那霉素、红霉素、氯霉素或庆大霉素）、复制起点（以促进在宿主细胞如细菌宿主细胞中的复制）等。对载体的选择取决于各种因素，如需要增殖的细胞类型和增殖的目的。某些载体可用于扩增和制备大量所需 DNA 序列。其它载体适用于在培养的细胞中表达蛋白。还有其它载体适用于在整个动物的细胞中进行转移和表达。对合适载体的选择是本领域众所周知的技术。很多这样的载体可市售购得。

[0118] 所用载体可以是基于附加体质粒的表达载体，所述质粒包含选择性药物抗性标记和用于在不同宿主细胞内提供自主复制的元件。本领域技术人员熟知的大量出版物详细描述了载体，所述出版物包括例如，Short Protocols in Molecular Biology(《分子生物学简明实验方案》)(1999)F. Ausubel 等编，韦利父子出版公司 (Wiley&Sons)。载体可提供编码主题多肽的核酸的表达，可提供主题核酸的增殖，或两者均可。

[0119] 可通过例如将感兴趣的多核苷酸插入到构建体主链中，通常采用 DNA 连接酶结合载体中经切割限制性酶位点来制备构建体。或者，插入所需核苷酸序列可通过同源重组或位点特异性重组，或可通过一种或多种扩增方法（例如，PCR）。通常通过将同源区域与载体在所需核苷酸序列侧翼连接来完成同源重组，而通过采用促进位点特异性重组的序列（例如，cre-lox、att 位点等）来完成位点特异性重组。可通过例如连接寡核苷酸或采用同时包含同源区域和所需核苷酸序列一部分的引物进行聚合酶链反应来加入包含这类序列的核酸。

[0120] 就感兴趣多肽的表达而言，可采用表达盒。因此，本发明提供包含主题核酸的重组表达载体。所述表达载体可提供转录和翻译调节序列，还可提供用于诱导型或组成型表达，其中编码区操作性置于转录起始区（例如，启动子或增强子）和转录与翻译终止区的转录控制下。这些控制区可以相对主题多肽得以衍生的赖氨酰氧化酶型酶为天然的，或者可以衍生自外源性来源。如此，来自外源性来源的控制区可视为操作性连接编码主题多肽的核酸的异源元件。通常，所述转录和翻译调节序列可包括但不限于，启动子序列、核糖体结合序列、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列以及增强子或激活序列。启动子可以是组成型或诱导型，并可以是强组成型启动子（例如 T7 等）。

[0121] 表达载体通常具有位于启动子序列附近的便捷限制性位点，其，以便插入编码感兴趣蛋白质的核酸序列。可存在表达宿主中可操作的选择性标记以促进对包含所述载体的细胞的选择。此外，所述表达构建体可包含其它元件。例如，所述表达载体可具有一个或多个复制系统，由此使其能保持于例如用于表达的哺乳动物或昆虫细胞中和用于克隆和扩增的原核宿主中。此外，所述表达构建体可包含选择性标记基因以能够选择转化的宿主细胞。选择基因在本领域中熟知，随采用的宿主细胞而变化。

[0122] 应注意，本发明所述多肽还可包含其它元件，如可检测标记，例如，放射性标记、荧光标记、生物素标记、免疫学可检测标记（例如，血凝素（HA）标签、多组氨酸标签）等。可提供其它元件（例如，在融合多肽的形式中）以通过多种方法促进本发明所述多肽的表达（例如，N-末端甲硫氨酸和 / 或促进宿主细胞中表达的异源信号序列）和 / 或分离（例如，

生物素标签、免疫学可检测标签)。所述多肽还能可选地通过共价或非共价连接固定在支撑物上。编码主题多肽的示例性核酸可含有 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:16。所述核酸可编码衍生自人或鼠赖氨酰氧化酶型酶的具有 myc 标签、His₆ 标签和 / 或接头序列的多肽。

[0123] 可根据本领域已知方法完成主题多肽的分离和纯化。术语“分离的”旨在表示某化合物(例如,多肽或多核苷酸)与其全部或某些天然伴随成分相分离。“分离的”还指某化合物与其全部或某些制备中(例如,化学合成、重组表达、生长培养基等)的伴随成分相分离的状态。

[0124] 例如,本发明所述多肽可分离自经遗传改良以表达主题多肽的细胞裂解液,分离自细胞生长培养基上清,或分离自合成反应混合物。分离还可以通过免疫亲和纯化实现,所述方法通常包括使样品接触针对所述多肽的某表位(例如,与衍生自赖氨酰氧化酶型酶的氨基酸序列融合的异源表位)的抗体(可选为固定化的),清洗除去非特异性结合物质,并洗脱特异性结合的多肽。分离的多肽还可通过透析和蛋白质纯化中常规采用的其它方法纯化,例如金属螯合层析、离子交换和尺寸排阻法。

[0125] 本发明还考虑含有编码一种或多种本发明所述多肽的外源多核苷酸的重组宿主细胞。

[0126] 筛选方法

[0127] 本发明所述具有赖氨酰氧化酶催化活性的多肽可用于赖氨酰氧化酶型酶活性的调节剂的筛选方法。表达足量前述主题多肽可用于提供底物给下述的筛选试验。

[0128] 赖氨酰氧化酶型酶活性的调节剂(和待测试调节活性的候选化合物)可包括大分子,例如蛋白质(如抗体、转录因子)和核酸(如形成三链体的寡核苷酸,反义寡核苷酸,核酶, siRNA, shRNA);以及有机小分子,例如由合成有机方法和 / 或组合化学所得分子。

[0129] 赖氨酰氧化酶型酶活性的调节剂包括激活剂(激动剂)和抑制剂(拮抗剂),并可用多种筛选试验选出。在一种实施方式中,调节剂可通过确定测试化合物是否结合本文所述多肽的催化域来鉴定;其中,若发生结合,则所述化合物为候选调节剂。任选地,可对此类候选调节剂进行其它测试。或者,候选化合物可接触本文所述多肽,并分析所述多肽的生物活性;改变所述多肽生物活性的化合物为赖氨酰氧化酶型酶的调节剂。通常,降低所述多肽生物活性的化合物是该酶的抑制剂。

[0130] 鉴定赖氨酰氧化酶型酶活性的调节剂的其它方法包括将候选化合物在细胞培养物中孵育并分析所述细胞的一种或多种生物活性或特征,其中所述细胞表达一种或多种本发明的多肽。改变培养物中所述细胞的生物活性或特征的化合物是赖氨酰氧化酶型酶活性的潜在调节剂。可供分析的生物活性包括例如,赖氨酸氧化、过氧化物生成、氨生成、赖氨酰氧化酶型酶的水平、编码赖氨酰氧化酶型酶的 mRNA 水平、本发明所述多肽的水平、编码本发明所述多肽的 mRNA 水平和 / 或某赖氨酰氧化酶型酶特异的一种或多种功能。

[0131] 在前述试验的其它实施方式中,在不与候选化合物接触的情况下,将所述一种或多种生物活性或细胞特征与一种或多种赖氨酰氧化酶型酶的水平或活性相关联。例如,所述生物活性可以是细胞功能如迁移,趋化,上皮-间充质转化(EMT)或间充质-上皮转化(MET),且所述变化通过与一种或多种对照或参比样品的比较测得。

[0132] 还可使用对照。作为示例,阴性对照样品可包括具有减弱水平的本发明多肽的培

养物（或不表达本发明多肽的培养物），其中加有候选化合物；或者是与测试培养物具有等量本发明多肽的培养物，但不添加候选化合物。对照可包括添加模拟候选化合物或已知激活或抑制赖氨酰氧化酶活性的试剂。在一些实施方式中，含有不同水平的本发明多肽的单独培养物接触候选化合物。若观察到生物活性的变化，并且若所述变化在具有高水平所述多肽的培养物中更大，则所述化合物鉴定为赖氨酰氧化酶型酶活性的调节剂。确定所述化合物是否是赖氨酰氧化酶型酶的激活剂或抑制剂可以由所述化合物引发的表型凸显，或可能需要进一步试验，例如测试所述化合物对一种或多种赖氨酰氧化酶型酶的酶促活性的影响。

[0133] 本领域已知获得赖氨酰氧化酶型酶的生化或重组方法，以及细胞培养和酶促试验方法以鉴定上述赖氨酰氧化酶型酶活性的调节剂。

[0134] 赖氨酰氧化酶型酶的酶促活性可以用多种不同方法测试。例如，评价赖氨酰氧化酶的酶促活性可通过检测和 / 或定量分析过氧化氢、氨离子和 / 或醛的生成，通过分析赖氨酸氧化和 / 或胶原交联，或通过测量细胞侵袭能力、细胞粘附、细胞生长或转移性生长进行。参见例如，Trackman 等 (1981) *Anal. Biochem.* 113 :336-342 ;Kagan 等 (1982) *Meth. Enzymol.* 82A :637-649 ;Palamakumbura 等 (2002) *Anal. Biochem.* 300 :245-251 ;Albini 等 (1987) *Cancer Res.* 47 :3239-3245 ;Kamath 等 (2001) *Cancer Res.* 61 :5933-5940 ;美国专利第 4,997,854 号和美国专利申请公开号 2004/0248871。

[0135] 例如，测试化合物包括但不限于：有机小化合物（例如分子量在约 50-2,500Da 的有机分子），如核酸或蛋白质。所述化合物或多种化合物可以由化学合成或微生物制备和 / 或包含在例如样品中，例如来自植物、动物或微生物的细胞提取物。用于分析赖氨酰氧化酶型酶的反应混合物可以是无细胞的提取物，或者可以含有细胞培养物或组织培养物。例如，多种化合物可以加至反应化合物、加至生长培养基、注入细胞内或给予转基因动物。例如，试验中所用细胞或组织可以是细菌细胞、真菌细胞、昆虫细胞、脊椎动物细胞、哺乳动物细胞、灵长类动物细胞、人细胞，或可含有或取自非人的转基因动物。

[0136] 若在本发明所述方法中鉴定含有某化合物或多种化合物的样品，则可能从鉴定为含有能抑制或激活主题多肽的化合物的初始样品中分离出所述化合物，或可以进一步细分所述初始样品，例如若该样品由多种不同化合物组成时，从而减少每个样品中的不同物质数量，并对所述初始样品的细分物重复所述方法。取决于所述样品的复杂性，上述步骤可进行数次（例如，通过有限稀释法），直至按本发明所述方法鉴定的样品仅包含有限数量或仅一种物质。在一些实施方式中，所述样品包含具有相似化学和 / 或物理性质的物质，而在一些实施方式中，所述物质相同。

[0137] 此外，上述方法可用于构建衍生自赖氨酰氧化酶型酶的结合表位。类似方法已成功描述用于抗 -p24(HIV-1) 单克隆抗体的肽抗原，参见 Kramer(1997) *Cell* 97 :799-809。Kramer(1995) *Mol. Immunol.* 32 :459-465 中描述了采用聚集的氨基酸肽文库进行肽 - 抗体相互作用的指纹分析的通用途径。此外，赖氨酰氧化酶型酶的拮抗剂可由与本发明所述肽特异性反应的单克隆抗体按 Doring(1994) *Mol. Immunol.* 31 :1059-1067 中所述方法衍生和鉴定。

[0138] 本领域技术人员已知多种方法能用于产生和筛选大型文库以鉴定对某靶标如赖氨酰氧化酶型酶或本发明所述多肽具有特定亲和性的化合物。这些方法包括噬菌体展示

方法,其中随机肽由噬菌体展示并采用固定化受体通过亲和层析进行筛选。参见例如,WO 91/17271、WO 92/01047 和美国专利第 5,223,409 号。在另一方法中,用光刻法合成固定在固相支撑物(如“芯片(chip)”)上的聚合物组合文库。参见如美国专利第 5,143,854 号,WO 90/15070 和 WO 92/10092。固定化聚合物接触带标记的多肽(例如,赖氨酰氧化酶型酶或本发明所述多肽),并扫描支撑物以确定标记的位置,从而鉴定结合所述多肽的聚合物。

[0139] 例如,在 Kramer(1998)Methods Mol. Biol. 87 :25-39 中描述了在连续纤维素膜支撑物上合成并筛选肽文库,其能用于鉴定感兴趣多肽(例如,赖氨酰氧化酶型酶或本发明所述多肽)的结合配体(例如,激活剂或抑制剂)。由此试验鉴定的配体是感兴趣蛋白的候选调节剂,并可选用于进一步测试。例如,该方法还可用于测得感兴趣蛋白的结合位点和识别基序。参见例如, Rudiger(1997)EMBO J. 16 :1501-1507 和 Weiergraber(1996)FEBS Lett.

[0140] WO 98/25146 描述了用于筛选具有所需性质的化合物复合物文库的其它方法,所需性质如激活、结合或拮抗多肽或其结合伴侣的能力。这种文库中的复合物包括待测试的化合物,记录所述化合物合成中至少一步的标签,和易被报道分子修饰的系留部分(tether)。采用系留部分的修饰来凸显某复合物含有具备某所需性质的化合物。可解码所述标签以显示该化合物合成中的至少一步。用于鉴定与赖氨酰氧化酶型酶(或与本发明所述多肽)相互作用的化合物的其它方法有例如,用噬菌体展示系统的体外筛选,滤膜结合实验,和相互作用的“实时”测定,采用如 BIAcore 仪器(法玛西亚公司(Pharmacia))。

[0141] 所有这些方法可按本发明所述用于鉴定赖氨酰氧化酶型酶或相关多肽的活化剂/激动剂和抑制剂/拮抗剂。

[0142] 用于此类活化剂或抑制剂基本结构的各种来源可采用和包含,例如,本发明所述多肽的模拟类似物。例如,本发明所述多肽或其生物活性片段的模拟类似物可通过用例如立体异构体即 D-氨基酸取代预期对生物活性关键的氨基酸;参见例如 Tsukida(1997)J. Med. Chem. 40 :3534-3541。此外,对于用多肽片段设计生物活性类似物的情况,可将前模拟物(pro-mimetic)组分纳入肽以重建可能在去除初始多肽的部分时丧失的至少某些构象性质;参见例如 Nachman(1995)Regul. Pept. 57 :359-370。

[0143] 天然氨基酸序列的这种假肽类似物能很有效地模拟母体蛋白质。Benkirane(1996)J. Biol. Chem. 271 :33218-33224。例如,将易得的非手性 α -氨基酸残基掺入本发明所述多肽或其片段可使酰胺键被脂链的聚亚甲基单元取代,从而提供构建肽模拟物的便捷策略。Banerjee(1996)Biopolymers 39 :769-777。其它系统中小肽激素的强效拟肽类似物也已有描述。Zhang(1996)Biochem. Biophys. Res. Commun. 224 :327-331。

[0144] 也可通过由连续酰胺烷化合成肽模拟物组合文库,然后测试所得化合物,例如测试其结合和免疫学性质,来鉴定肽模拟物。拟肽类组合文库的产生和使用方法已有描述。参见例如, Ostresh, (1996)Methods in Enzymology 267 :220-234 和 Dorner(1996)Bioorg. Med. Chem. 4 :709-715。此外,本发明所述多肽的三维和/或晶体结构可用于设计肽模拟物。Rose(1996)Biochemistry 35 :12933-12944 ;Rutenber(1996)Bioorg. Med. Chem. 4 :1545-1558。

[0145] 基于结构的设计和合成模拟天然生物性多肽活性的低分子量合成分子的进一步描述可参见例如, Dowd(1998)Nature Biotechnol. 16 :190-195 ;Kieber-Emmons(1997)

Current Opin. Biotechnol. 8 :435-441 ;Moore(1997)Proc. West Pharmacol. Soc. 40 : 115-119 ;Mathews(1997)Proc. West Pharmacol. Soc. 40 :121-125 和 Mukhija(1998) European J. Biochem. 254 :433-438。

[0146] 本领域技术人员还熟知可以设计、合成并评估有机小化合物的模拟物,例如,能作为赖氨酰氧化酶型酶或本发明所述多肽的底物或配体的模拟物。例如,已描述海帕洛素(hapalosin)的D-葡萄糖模拟物在细胞毒性中拮抗多药耐药相关蛋白方面显示与海帕洛素类似的功效。Dinh(1998)J. Med. Chem. 41 :981-987。

[0147] 可以研究赖氨酰氧化酶型酶或本文所述多肽的结构,用来指导选择调节剂,例如,小分子、肽、肽模拟物和抗体。赖氨酰氧化酶型酶和本发明所述多肽的结构性质有助于鉴定能结合赖氨酰氧化酶型酶或作为其配体、底物、结合伴侣或受体的天然或合成分子。参见例如,Engleman(1997)J. Clin. Invest. 99 :2284-2292。例如,可采用适当的计算机程序对赖氨酰氧化酶型酶结构基序进行折叠模拟和计算机重新设计。Olszewski(1996)Proteins 25 : 286-299 ;Hoffman(1995)Comput. Appl. Biosci. 11 :675-679。蛋白质折叠的计算机模拟可用于详细的肽和蛋白质结构的构象与能量分析。Monge(1995)J. Mol. Biol. 247 :995-1012 ;Renouf(1995)Adv. Exp. Med. Biol. 376 :37-45。适当的程序可用于利用计算机协助搜索互补肽序列来鉴定赖氨酰氧化酶型酶上和/或本发明所述多肽上与配体和结合伴侣相互作用的位点。Fassina(1994)Immunomethods 5 :114-120。本领域描述了用于设计蛋白质和肽的其它系统,例如Berry(1994)Biochem. Soc. Trans. 22 :1033-1036 ;Wodak(1987), Ann. N. Y. Acad. Sci. 501 :1-13 ;和Pabo(1986)Biochemistry 25 :5987-5991。上述结构分析所得结果可用于,例如,制备能对一种或多种赖氨酰氧化酶型酶的活性起调节剂作用的有机分子、肽和肽模拟物,和用于制备本发明所述多肽的模拟物。

[0148] 本文中待筛选的抑制剂例如抗体,可以是竞争性抑制剂、无竞争性抑制剂、混合型抑制剂或非竞争性抑制剂。竞争性抑制剂通常和底物具有结构相似性,往往结合活性位点,且通常在较低底物浓度下更有效。存在竞争性抑制剂时,表观 K_M 有提高。无竞争性抑制剂通常结合酶-底物复合物或结合底物结合活性位点后可用的位点,并可能使活性位点变形。存在无竞争性抑制剂时,表观 K_M 和 V_{max} 都降低,且底物浓度对抑制的影响很小或没有。因此,无竞争性抑制剂的抑制通常在高底物浓度下最显著。混合型抑制剂既能结合游离酶,也能结合酶-底物复合物,并因此对底物结合与催化活性都有影响。非竞争性抑制是混合型抑制的特例,其中此类抑制剂以相等亲和力结合酶与酶-底物复合物,抑制不受底物浓度影响。非竞争性抑制剂通常与酶在活性位点外的区域结合。对于酶抑制的更多细节可参见例如,Voet等,同上。对于酶如赖氨酰氧化酶型酶而言,其天然底物(例如,胶原蛋白、弹性蛋白)通常在体内以极大过量存在(与任何抑制剂在体内能实现的浓度相比),非竞争性抑制剂因为不受底物浓度影响而具有优势。

[0149] 抗体制备

[0150] 本发明还提供本发明所述多肽的特异性抗体的制备方法。所述抗体可以是分离的,例如,处于其天然产生环境以外的环境中。对主题多肽特异的合适抗体包括任意同种型的抗体、单链Fv、Fab、Fab₂、Fv、F(ab')₂、人工抗体、人源化抗体,其片段,等等。

[0151] 合适的抗体可通过用包含全部或部分主题多肽的肽免疫宿主动物来获得。当要免疫动物时,本发明提供了含有主题多肽的免疫原性组合物。主题免疫原性组合物可包括主

题多肽和佐剂。佐剂为本领域已知,且可包括适用于人或其它哺乳动物的那些佐剂。

[0152] 供免疫的合适宿主动物包括小鼠、大鼠、绵羊、山羊、仓鼠、兔、驴等。本领域熟知免疫动物的方法,包括所用佐剂、加强方案、注射位点、适当动物等(例如,Harlow 等 *Antibodies :A Laboratory Manual* (《抗体:实验室手册》)(1988),纽约州冷泉港),以及对多种哺乳动物和鸟类描述了将活细胞给予动物,例如 McKenzie 等 (1989) *Oncogene* 4 : 543-548 ;Scuderi 等 (1985) *Med. Oncol. Tumor Pharmacother* 2 :233-242 ;Roth 等 (1984) *Surgery* 96 :264-272 和 Drebin 等 (1984) *Nature* 312 :545-548。免疫后,生成产抗体的细胞群。所述细胞群可用本领域技术人员熟知的杂交瘤方法产生(参见例如,Harlow,同上)。将表达抗体的细胞与永生化细胞如骨髓瘤或转化细胞融合,永生化细胞能在细胞培养中无限复制,从而产生永生的免疫球蛋白分泌型细胞系。所用永生细胞系可选择成缺乏利用某些营养素所必需酶的细胞系。本领域技术人员已知很多此类细胞系(如骨髓瘤),包括例如:胸苷激酶(TK)-缺陷型或次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT)-缺陷型细胞系。这些缺陷使得能够选择融合细胞,例如,按细胞在次黄嘌呤/氨基蝶呤/胸苷(HAT)培养基中生长的能力选择。在替代实施方式中,表达单克隆抗体的细胞群可用噬菌体展示方法制得。

[0153] 针对主题多肽的抗体还可通过基因工程制得。在该技术中,与标准杂交瘤过程相同,将产抗体的细胞对所需抗原或免疫原致敏。用分离自免疫脾细胞或杂交瘤的信使 RNA 作为模板利用 PCR 扩增产生 cDNA。通过将所扩增免疫球蛋白 cDNA 的适当部分插入表达载体产生载体文库,载体各自含有保留了初始抗原特异性的一条重链基因和一条轻链基因。可通过组合所述重链基因文库与轻链基因文库构建组合文库。这产生共同表达重链和轻链(类似于抗体分子的 F_{ab} 片段或抗原结合片段)的克隆库。将携带这些基因的载体共同转染入宿主(例如,细菌、昆虫细胞、哺乳动物细胞或其它适当的产蛋白宿主细胞)。在转染宿主中诱导抗体基因合成时,重链和轻链蛋白自体装配产生能通过用抗原或免疫原筛选来测定的活性抗体。

[0154] 生成抗体的另一方法涉及噬菌体展示。噬菌体展示用于蛋白质相互作用的高通量筛选。该方法中,利用噬菌体来展示抗体库或组合抗体文库(例如,人或鼠的)表达的抗原结合域。利用多肽靶标,例如用带标记的多肽或在固体表面或珠粒上结合或捕获的多肽来选择或鉴定表达能结合感兴趣主题多肽的抗原结合域的噬菌体。这些方法中所用噬菌体通常为丝状噬菌体,包括 fd 和 M13。结合域可包含与噬菌体基因 III 或基因 VIII 蛋白重组融合的 F_{ab} 、 F_v (来自轻链或重链的个体 F_v 区)或二硫稳定化的 F_v 抗体结构域。例如,EP 368684B1 ;美国专利 5,969,108, Hoogenboom, H. R. 和 Chames (2000) *Immunol. Today* 21 : 371 ;Nagy 等 (2002) *Nat. Med.* 8 :801 ;Huie 等 (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 :2682 ;Lui 等 (2002) *J. Mol. Biol.* 315 :1063 中提供了示例性方法,这些文献各通过引用纳入本文。多篇文献(例如,Marks 等 (1992) *Bio/Technology* 10 :779-783)描述了用链改组以及重组感染和体内重组作为大型噬菌体文库的构建策略来生成高亲和性人抗体。

[0155] 在相关实施方式中,可以用核糖体展示作为展示平台。参见例如,Hanes 等 (2000) *Nat. Biotechnol.* 18 :1287 ;Wilson 等 (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 :3750 和 Irving 等 (2001) *J. Immunol. Methods* 248 :31)。

[0156] 可从细胞表面文库筛选抗体 (Boder 等 (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 :

10701 ;Daugherty 等 (2000) J. Immunol. Methods 243 :211。此类过程提供了传统杂交瘤技术的替代方法以用于单克隆抗体的分离和后续克隆。

[0157] 在噬菌体展示法中,功能性抗体结构域展示在携带其编码多核苷酸序列的噬菌体颗粒表面上。例如,从动物 cDNA 文库(例如,人或鼠的淋巴组织 cDNA 文库)或合成 cDNA 文库扩增或另行分离编码重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)的 DNA 序列。编码 V_H 和 V_L 区的 DNA 可以通过 scFv 接头相连(例如,通过 PCR)并克隆入噬菌粒载体(如 p CANTAB 6 或 pComb 3HSS)。将该载体电穿孔到大肠杆菌中,用辅助噬菌体感染该大肠杆菌。编码 V_H 或 V_L 区的序列通常与噬菌体的基因 III 或基因 VIII 序列重组融合。表达能结合感兴趣抗原(即,主题多肽)的抗原结合域的噬菌体可以用抗原选择或鉴定,如利用带标记抗原或者在固体表面或珠粒上结合或捕获的抗原。

[0158] 噬菌体展示法的其它示例包括下述中公开的方法:PCT 申请号 PCT/GB91/01134; PCT 公开 WO 90/02809、WO 91/10737、WO 92/01047、WO92/18619、WO 93/11236、WO 95/15982、WO 95/20401;和美国专利号 5,698,426、5,223,409、5,403,484、5,580,717、5,427,908、5,750,753、5,821,047、5,571,698、5,427,908、5,516,637、5,780,225、5,658,727、5,733,743 和 5,969,108;各通过引用全文纳入本文。

[0159] 制剂、药盒和给予途径

[0160] 还提供包含本文所述催化域的治疗组合物。这些组合物通常包含所述催化域(或编码所述催化域的核酸)和药学上可接受的载体。补充的活性化合物也可纳入所述组合物。

[0161] 本文所用的术语“治疗有效量”或“有效量”指单独或与另一治疗剂联合给予细胞、组织或对象(例如哺乳动物如人或非人动物,如灵长类动物、啮齿动物、牛、马、猪、羊等)时,有效防止或缓解疾病病症或疾病进展的治疗剂含量。治疗有效剂量还指足以引起症状完全或部分缓解如治疗、治愈、防止或缓解相关医学病症或者治疗、治愈、防止或缓解这些病症的速度提高的化合物量。试剂的有效量是,当以单次或多次剂量给予时,导致个体内赖氨酰氧化酶型酶相关的一种或多种症状的严重程度比没有所述试剂治疗时所述一种或多种症状的严重程度减轻至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90% 或超过 90%。这种严重程度减轻可表现为,例如,改善伤口愈合或促进血管生成。

[0162] 赖氨酰氧化酶型酶催化域(例如,LOX 或 LOXL2 催化域)的治疗有效量随疾病或紊乱类型、疾病或紊乱的广泛性、患有疾病或紊乱的生物体大小而改变。

[0163] 根据本公开,本领域技术人员已知各种药物组合物和其制备及应用技术。合适药物组合物和其给予技术的详细列表可参见以下文本,例如:Remington's Pharmaceutical Sciences(《雷明顿药物科学》),第 17 版,1985;Brunton 等“Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics(《古德曼吉尔曼治疗学的药理学基础》)”,麦格劳希尔公司(McGraw-Hill),2005;费城科学大学(编),“Remington:The Science and Practice of Pharmacy(《雷明顿:药物科学和实践》)”,LWW 出版社(Lippincott Williams&Wilkins),2005;及费城科学大学(编),“Remington:The Principles of Pharmacy Practice(《雷明顿:药物实践原理》)”LWW 出版社,2008。

[0164] 公开的治疗组合物还包括药学上可接受的材料、组合物或载剂,如液体或固体填

料、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料，即运载体。这些运载体参与将主题组合物从一个器官或机体区域转运到另一器官或机体区域。各运载体从与制剂的其它成分的相容性和对患者无害的意义上而言应“可接受”。能用作药学上可接受运载体的材料的一些示例包括：糖，如乳糖、葡萄糖和蔗糖；淀粉，如玉米淀粉和土豆淀粉；纤维素和其衍生物，如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素；黄耆胶粉；麦芽；明胶；滑石；赋形剂，如可可油和栓剂蜡；油，如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；二醇，如丙二醇；多元醇，如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇；酯，如油酸乙酯和月桂酸乙酯；琼脂；缓冲剂，如氢氧化镁和氢氧化铝；藻酸；无热原水；等渗盐水；林格溶液；乙醇；磷酸盐缓冲液；和药物制剂中采用的其它无毒相容性物质。所述组合物中还可存在湿润剂，乳化剂和润滑剂如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁，以及着色剂，释放剂，涂覆剂，甜味剂，增味剂和芳香剂，防腐剂和抗氧化剂。

[0165] 本发明的另一方面涉及用于给予对象本文所述赖氨酰氧化酶型酶催化域或编码此类催化域的核酸的药盒。在一种实施方式中，所述药盒包含配制于药学运载体中的赖氨酰氧化酶型酶的催化域（或编码赖氨酰氧化酶型酶催化域的核酸）。

[0166] 制剂和递送方法一般根据待治疗疾病的位置和类型调整。示例性制剂包括但不限于适于胃肠外给药例如静脉内、动脉内、眼内、肌肉内或皮下给药的制剂，包括包封于胶束、脂质体或药物释放胶囊（活性剂纳入设计用于缓释的生物相容性包衣内）的制剂；可摄取的制剂；外用制剂，如乳膏、油膏和凝胶；和其它制剂如吸入剂、气溶胶和喷雾剂。本文的化合物剂量根据治疗需求的程度和严重性、所给予组合物的活性、对象的整体健康状况和技术人员熟知的其它考量而变化。

[0167] 在其它实施方式中，本文所述组合物局部递送。局部递送可使组合物非全身递送到例如伤口或纤维化区域，比全身递送降低了组合物的身体负担。例如，这种局部递送可通过使用各种医疗植入装置实现或者通过注射或手术实现，所述装置包括但不限于支架和导管。本领域已确立包封、植入、包埋、和使所需药剂附于医疗装置如支架和导管的其它方法，本文已考虑这些方法。

[0168] 植入式支架已用于携带药用试剂，例如血栓溶解剂。美国专利号 5,163,952 公开了在支架自身材料中配制携带药用试剂的热记忆膨胀塑料支架器件。美国专利号 5,092,877 公开了一种聚合物材料的支架，其具有与化合物递送相关的涂层。涉及利用生物可降解和生物可吸收聚合物型器件的其它专利包括美国专利号 4,916,193 和美国专利号 4,994,071。举例而言，美国专利号 5,304,121 公开了一种用于支架的涂层，其由水凝胶聚合物和预选的化合物如细胞生长抑制剂或肝素组成。美国专利号 5,464,650 描述了携带治疗性物质的涂层血管内支架的制备方法，其中聚合物涂层材料溶解于溶剂，而所述治疗性物质分散在所述溶剂中。然后在接触所述支架后挥发所述溶剂。

[0169] 美国专利号 6,120,536 描述了用于包括支架在内的多种假体器件的其它类型涂层。可用于给予本文所述组合物的其它医用或假体器件的示例包括但不限于：换血装置、血管通口、中央静脉导管、心血管导管、体外回路、人造血管、泵、心脏瓣膜和心血管缝线。

[0170] 应用涂覆有本文所述组合物的器件（包括支架和导管），使得所述组合物能递送到特定或局部位点。此类位点特异性递送可提供手段来使用那些由于溶解度、全身毒性顾虑或其它问题而原本不适合全身递送的组合物和 / 或其剂量。举例而言，已知 β -氨基丙

脲 (BAPN) 可用作赖氨酰氧化酶型酶的抑制剂, 但该化合物为高度毒性, 对其全身给药时的有效应用造成了问题。将支架、导管或其它医疗器件用于递送活性药剂或化合物如 BAPN, 使得能以靶向或局部方式以有效剂量应用所述化合物, 从而降低与此类化合物相关的全身毒性。

[0171] 用途

[0172] 本文所述多肽有多种用途。例如, 它们可用作测试赖氨酰氧化酶的酶活性 (例如, 胶原蛋白交联) 的标准品 (例如, 阳性对照)。此类测试的一种用途是用于如 LOX 或 LOXL2 蛋白和 / 或其基因的突变分析。包含具有赖氨酰氧化酶活性的催化域的所述多肽还可用于鉴定赖氨酰氧化酶型酶的新型和已有抗体。

[0173] 本文公开的多肽还可用于鉴定能结合例如 LOX 和 / 或 LOXL2 催化域的分子, 例如有机小分子或大分子 (例如, 多肽)。这些结合分子中的某些可起到催化活性调节剂的作用 (即, 激活剂或抑制剂)。

[0174] 本文公开的主题多肽还能用于产生抗体特异性针对人和鼠 LOX 和 LOXL2 蛋白及其它赖氨酰氧化酶型酶的催化活性区。此类抗体可用于例如以赖氨酰氧化酶活性水平的病理性提高为特征的疾病或紊乱的医疗和 / 或治疗应用。

[0175] 此外, 主题多肽可用于需要胶原蛋白交联的医疗和 / 或治疗应用: 例如伤口愈合和治疗糖尿病性溃疡。分离的催化域尺寸较小 (与全长蛋白相比), 有助于其用作治疗剂, 例如提高稳定性和加快吸收。

实施例

[0176] 实施例 1 : 人 LOX 催化域

[0177] 包括人 LOX 蛋白催化域的多肽含有 207 个氨基酸残基, 并具有以下氨基酸序列:

[0178] GLPDLVADPYYIQASTYVQKMSMYNLRCAAEEENCLASTAYRADVRDYDH

[0179] RVLLRFPQRVKNGTSDFLPSRPRYSWEWHSCHQHYHSMDEFSHYDLLDA

[0180] NTQRRVAEGHKASFCELTSCDYGYHRRFACTAHTQGLSPGCYDITYGADI

[0181] DCQWIDITDVKPGNYILKVSVNPSYLPESDYTNNVVRCDIRYTGHHAYAS

[0182] GCTISPY (SEQ ID NO :1)

[0183] 在某些实施方式中, 含有人 LOX 催化域的多肽不包括以上所示序列中的起始甘氨酸和亮氨酸残基 (“GL”)。

[0184] 编码含所述 LOX 催化域的主题多肽的人 DNA 序列为:

[0185] GGTCTCCCAGACCTGGTGGCCGACCCCTACTACATCCAGGCGTCCACGT

[0186] ACGTGCAGAAGATGTCCATGTACAACCTGAGATGCGCGGCGGAGGAAA

[0187] ACTGTCTGGCCAGTACAGCATACAGGGCAGATGTCAGAGATTATGATCA

[0188] CAGGGTGCTGCTCAGATTTCCCCAAAGAGTGAAAAACCAAGGGACATC

[0189] AGATTTCTTACCCAGCCGACCAAGATATTCCTGGGAATGGCACAGTTGT

[0190] CATCAACATTACCACAGTATGGATGAGTTTAGCCACTATGACCTGCTTG

[0191] ATGCCAACACCCAGAGGAGAGTGGCTGAAGGCCACAAAGCAAGTTTCT

[0192] GTCTTGAAGACACATCCTGTGACTATGGCTACCACAGGCGATTTGCATG

[0193] TACTGCACACACAGGGATTGAGTCCTGGCTGTTATGATACCTATGGT

- [0194] GCAGACATAGACTGCCAGTGGATTGATATTACAGATGTAAACCTGGAA
- [0195] ACTATATCCTAAAGGTCAGTGTAACCCAGCTACCTGGTTCCTGAATCT
- [0196] GACTATACCAACAATGTTGTGCGCTGTGACATTCGCTACACAGGACATC
- [0197] ATGCGTATGCCTCAGGCTGCACAATTCACCGTATTAG (SEQ ID NO :2)
- [0198] 实施例 2 :人 LOXL2 催化域
- [0199] 包括人 LOXL2 蛋白催化域的多肽具有以下氨基酸序列 :
- [0200] TAPDLVLNAEMVQQTTYLED RPFMLQCAMEENCL SASAAQTDPTTGYR
- [0201] RLLRFSSQIHNGQSDFRPKNGRHAWIWHDCRHYHSM EVFTHYDLLNLN
- [0202] GTKVAEGHKASF CLEDTECEGDIQKNYECANFGDQG ITMGCWDMYRHDID
- [0203] CQWVDITDVPPGDYLFQVVINPNFEVAESDYSNNIMKCRSRYDGHRIWMY
- [0204] NCHIGGSFSEET EKKFEHFSGLLNNQLSPQ (SEQ ID NO :3)
- [0205] 在某些实施方式中,含有人 LOXL2 催化域的多肽不包括以上所示序列中的起始苏氨酸和丙氨酸残基 (“TA”)。
- [0206] 编码所述 LOXL2 催化域的人 DNA 序列为 :
- [0207] ACCGCCCCTGACCTGGTCTCAATGCGGAGATGGTGCAGCAGACCACCT
- [0208] ACCTGGAGGACCGGCCCATGTTTCATGCTGCAGTGTGCCATGGAGGAGAA
- [0209] CTGCCTCTCGGCTCAGCCGCGCAGACCGACCCACACGGGCTACCGC
- [0210] CGGCTCCTGCGCTTCTCCTCCAGATCCACAACAATGGCCAGTCCGACTT
- [0211] CCGGCCCAAGAACGGCCGCCACGCGTGGATCTGGCACGACTGTCACAG
- [0212] GCACTACCACAGCATGGAGGTGTTCACCCACTATGACCTGCTGAACCTC
- [0213] AATGGCACCAAGGTGGCAGAGGGCCACAAGGCCAGCTTCTGCTTGGAG
- [0214] GACACAGAATGTGAAGGAGACATCCAGAAGAATTACGAGTGTGCCAAC
- [0215] TTCGGCGATCAGGGCATCACCATGGGCTGCTGGGACATGTACCGCCATG
- [0216] ACATCGACTGCCAGTGGGTTGACATCACTGACGTGCCCCCTGGAGACTA
- [0217] CCTGTTCCAGGTTGTTATTAACCCCACTTCGAGGTTGCAGAATCCGATT
- [0218] ACTCCAACAACATCATGAAATGCAGGAGCCGCTATGACGGCCACCGCAT
- [0219] CTGGATGTACAAC TGCCACATAGGTGGTTCCTTCAGCGAAGAGACGGAA
- [0220] AAAAAGTTTGAGCACTTCAGCGGGCTCTTAAACAACCAGCTGTCCCCGC
- [0221] AGTAA (SEQ ID NO :4)
- [0222] 实施例 3 :鼠 LOX 催化域
- [0223] 包括鼠 LOX 蛋白的催化域的多肽具有以下氨基酸序列 :
- [0224] GLPDLVPDPYYIQASTYVQKMSMYNLRCAA EENCLASAYRADVRDYDHR
- [0225] VLLRFQVRVKNQGTSDFLPSRPRYSWEHWSCHQHYHSMDEF SHYDLLDAN
- [0226] TQRRVAEGHKASF CLEDTSCDYGYHRRFACTAHTQGLSPGCYDTYAADID
- [0227] CQWIDITDVQP GNYILKVSVNPSYLPESDYTNNVVRCDIRYTGHHAYASG
- [0228] CTISPY (SEQ ID NO :5)
- [0229] 在某些实施方式中,含有鼠 LOX 催化域的多肽不包括以上所示序列中的起始甘氨酸和亮氨酸残基 (“GL”)。
- [0230] 编码含所述 LOX 催化域的多肽的鼠 DNA 序列为 :

- [0231] GGTCTCCCGGACCTGGTGCCCGACCCCTACTACATCCAGGCTTCCACGT
- [0232] ACGTCCAGAAGATGTCTATGTACAACCTGAGATGCGCTGCGGAAGAAA
- [0233] ACTGCCTGGCCAGTTCAGCATATAGGGCGGATGTCAGAGACTATGACCA
- [0234] CAGGGTACTGCTACGATTTCCGCAAAGAGTGAAGAACCAAGGGACATC
- [0235] GGACTTCTTACCAAGCCGCCCTCGGTACTCCTGGGAGTGGCACAGCTGT
- [0236] CACCAACATTACCACAGCATGGACGAATTCAGCCACTATGACCTGCTTG
- [0237] ATGCCAACACACAGAGGAGAGTGGCTGAAGGCCACAAAGCAAGCTTCT
- [0238] GTCTGGAGGACACGTCCTGTGACTATGGGTACCACAGGCGCTTTGCGTG
- [0239] CACTGCACACACACAGGGATTGAGTCCTGGATGTTATGACACCTATGCG
- [0240] GCAGACATAGACTGCCAGTGGATTGATATTACAGATGTACAACCTGGAA
- [0241] ACTACATTCTAAAGGTCAGTGTAACCCCAAGCTACCTGGTGCCTGAATC
- [0242] AGACTACACTAACAATGTTGTACGCTGTGACATTGCTACACAGGACAT
- [0243] CATGCCTATGCCTCAGGCTGCACAATTTACCGTATTAG
- [0244] (SEQ ID NO :6)
- [0245] 实施例 4 :鼠 LOXL2 催化域
- [0246] 包括鼠 LOXL2 蛋白的催化域的多肽具有以下氨基酸序列 :
- [0247] TAPDLVLNAEIVQQTAYLEDPRPMSLLQCAMEENCLSASAVHTDPTRGHRRL
- [0248] LRFSSQIHNNQSDFRPKNGRHAWIWHDCRHYHSMEVFYYDLLSLNGT
- [0249] KVAEGHKASFCELEDTECEGDIQKSYECANFGEQGITMGCWDMYRHDIDCQ
- [0250] WIDITDVPPGDYLFQVVINPNYEVPESDFSNNIMKCRSRYDGYRIWMYNCH
- [0251] VGGAFSEETEQKFEHFSGLLNNQLSVQ (SEQ ID NO :7)
- [0252] 在某些实施方式中,含有鼠 LOXL2 催化域的多肽不包括以上所示序列中的起始苏氨酸和丙氨酸残基 (“TA”)。
- [0253] 编码含所述 LOXL2 催化域的多肽的鼠 DNA 序列为 :
- [0254] ACTGCACCTGACCTGGTGCTTAATGCTGAGATTGTCCAGCAGACTGCCT
- [0255] ACCTGGAGGACAGGCCCATGTCTTGCTGCAGTGTGCCATGGAGGAGAA
- [0256] CTGCCTCTCCGCTCCGCTGTGCACACCGACCCACCAGAGGCCACCGG
- [0257] CGCCTTTTACGCTTCTCCTCCCAGATCCACAACAATGGCCAGTCTGACTT
- [0258] CCGCCCCAAGAATGGCCGCCATGCGTGGATTTGGCACGACTGCCACAGG
- [0259] CACTACCACAGCATGGAAGTCTTCACTTACTATGACCTGCTGAGCCTCA
- [0260] ACGGCACCAAGGTGGCTGAGGGCCACAAGGCCAGCTTCTGCCTGGAGG
- [0261] AACTGAGTGTGAGGGAGACATTCAGAAGAGTTACGAGTGTGCCAACTT
- [0262] TGGAGAACAAGGCATCACCATGGGCTGCTGGGACATGTACCGTCATGAC
- [0263] ATTGACTGCCAGTGGATAGACATCACCGATGTGCCCCCTGGAGACTACC
- [0264] TGTTCCAGGTTGTCATTAACCCCAACTATGAAGTGCCAGAATCAGATTTC
- [0265] TCTAACAACATCATGAAGTGCAGGAGCCGCTATGATGGCTACCGCATCT
- [0266] GGATGTACAACGTGACGTAGGTGGAGCCTTCAGTGAGGAGACAGAAC
- [0267] AGAAGTTCGAACACTTCAGTGGACTTCTAAATAACCAGCTCTCTGTACA
- [0268] GTAA (SEQ ID NO :8)

[0269] 实施例 5 :哺乳动物细胞中人 LOX 催化域的表达

[0270] 用于表达含人 LOX 催化域的多肽的表达盒利用人 LOX cDNA (GenBankNM_002317, 获自复能基因公司 (Genecopoeia), 马里兰州德国镇) 为模板通过 PCR 扩增构建得到。将含有编码所述催化域的序列的扩增产物克隆入 pSecTag2/Hygro B 载体 (英杰公司 (Invitrogen), 加利福尼亚州卡尔斯巴德), 产生 pSecTag2hygro-hLOX MCD (也称作 pHLOXMCD) 质粒。该克隆用 T7RNA 聚合酶转录产生的 mRNA 编码含 (从 N- 末端至 C- 末端依次) 免疫球蛋白 κ 信号序列、人 LOX 催化域、myc 表位标签和 His₆ 纯化标签的多肽。该多肽的氨基酸序列如下:

[0271] METDTLLLWVLLLWVPGSTGD *AAQPA* GLPDLVADPYYIQASTYVQKMSMY

[0272] NLRCAAEENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQRVKNQGTSDFLPSRPRYS

[0273] WEWHSCHQHYHSMDEFSHYDLLDANTQRRVAEGHKASFCELTSCDYGY

[0274] HRRFACTAHTQGLSPGCDYTGADIDCQWIDITDVKPGNYILKVSVNPSYL

[0275] VPESDYTNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY *GP* EQKLISEEDL *NSAVD* HHH

[0276] HHH (SEQ ID NO :9)

[0277] 所述信号肽和 myc 标签的序列标有下划线。斜体格式的序列代表氨基酸序列部分或全部由载体序列和用于克隆的限制性位点编码 (AAQP 和 GP) 与接头序列编码 (NSAVD)。

[0278] 编码该多肽的 DNA 序列 (其中标有下划线的序列表示编码信号序列和 myc 标签的核苷酸, 而接头序列用小写字母表示) 为:

[0279] ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAG

[0280] GTTCCACTGGTGACgcggcccccagccggccGGTCTCCCAGACCTGGTGGCCGACC

[0281] CCTACTACATCCAGGCGTCCACGTACGTGCAGAAGATGTCCATGTACAA

[0282] CCTGAGATGCGCGCGGAGGAAACTGTCTGGCCAGTACAGCATACAG

[0283] GGCAGATGTCAGAGATTATGATCACAGGGTGCTGCTCAGATTTCCCCAA

[0284] AGAGTGAAAAACCAAGGGACATCAGATTTCTTACCCAGCCGACCAAGA

[0285] TATTCCTGGGAATGGCACAGTTGTCATCAACATTACCACAGTATGGATG

[0286] AGTTTAGCCACTATGACCTGCTTGATGCCAACACCCAGAGGAGAGTGGC

[0287] TGAAGGCCACAAAGCAAGTTTCTGTCTTGAAGACACATCCTGTGACTAT

[0288] GGCTACCACAGGCGATTTGCATGTACTGCACACACACAGGGATTGAGTC

[0289] CTGGCTGTTATGATACCTATGGTGCAGACATAGACTGCCAGTGGATTGA

[0290] TATTACAGATGTAAACCTGGAACTATATCCTAAAGGTCAGTGTAAC

[0291] CCCAGCTACCTGGTTCCTGAATCTGACTATACCAACAATGTTGTGCGCTG

[0292] TGACATTCGCTACACAGGACATCATGCGTATGCCTCAGGCTGCACAATT

[0293] TCACCGTATgggcccGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGaatagcgcc

[0294] gtcgacCATCATCATCATCATATTGA (SEQ ID NO :10)

[0295] 将 pHLOXMCD 表达载体如下转染入 HEK293 细胞。将 7×10^5 个细胞接种到 6 孔培养皿的孔内, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 下生长于完全 DMEM (达氏修正依氏培养基 + 10% 胎牛血清 + 2mM L-谷氨酰胺) 中。培养过夜后, 采用 Lipofectamine2000 (英杰公司, 加利福尼亚州卡尔斯巴德) 按生产商说明用 pHLOXMCD 转染所述细胞。四小时后, 吸出培养基, 更换为 2ml 完全 DMEM, 将转染细胞培养过夜。通过在完全 DMEM (cDMEM) + 0.8mg/ml 潮霉素 B (hygro) 中有限稀释选择

稳定细胞系。将选择中存活的个体克隆如下扩增并筛选 hLOX 催化域的表达。通过将细胞克隆在 6 孔培养皿中培养至 75% 汇合实现扩增。此时吸出培养基并添加新鲜的 cDMEM+hygro。五天后,收集培养基,如下所述直接分析 LOX 催化域的存在。通过添加 PBS+5mM EDTA 至培养皿将细胞从培养皿表面移除。离心脱落的细胞液。将约 5×10^5 个沉淀细胞(来自总量 $\sim 1 \times 10^6$) 在 0.1mM-PER 哺乳动物蛋白抽提试剂(皮尔斯公司(Pierce),伊利诺斯州罗克福德)中裂解。冰上孵育 20 分钟后,将细胞裂解液在台式离心机中 15,000rpm 离心 10 分钟。收集可溶组分(上清液),并如下所述分析 LOX 催化域的存在。将不溶性组分(沉淀)用 M-PER 清洗 2 次,重悬于 M-PER 并如下所述分析 LOX 催化域的存在。

[0296] 实施例 6 :通过蛋白质免疫印迹法检测人 LOX 催化域

[0297] 通过免疫印迹法分析六个不同克隆的培养基、可溶组分和不溶性组分的样品中存在的 pHLOXMCD 表达载体所表达的 LOX 催化域。对于培养基的分析,将 150ul 条件培养基和 50ul NuPAGE®4X LDS 样品缓冲液(英杰公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德)混合,取 20ul 所得混合物上样于凝胶(见下文)。对于可溶和不溶性胞内组分,各样品对应于 1×10^5 个细胞。将胞内组分的样品与 NuPAGE®4X LDS 样品缓冲液(英杰公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德)和 NuPAGE®10X 还原试剂混合至两种试剂的终浓度均为 1X,煮沸 5 分钟,然后在 NuPAGE®Novex Bis-Tris 凝胶(4-12% 丙烯酰胺)上电泳。电泳缓冲液是 NuPAGE®MOPS 缓冲液(英杰公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德)。电泳结束后,用 iBlot 设备(英杰公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德)将蛋白质从凝胶转移至 PVDF。

[0298] 为了检测,将印迹用 3% 牛血清白蛋白(BSA)在 PBS+0.01% 吐温中室温封闭 3 小时。然后将印迹与小鼠抗 His₅ 抗体(凯杰公司(Qiagen),加利福尼亚州瓦伦西亚)在室温下孵育 1 小时,然后与辣根过氧化物酶(HRP)-偶联的驴抗小鼠抗体(杰克逊免疫研究公司(Jackson ImmunoResearch, PA),宾夕法尼亚州西格罗夫)在室温下孵育 1 小时并用 Chemi-Glow®(阿尔法新技术公司(Alpha Innotech),加利福尼亚州圣莱安德罗)显影。

[0299] 图 1 显示六个克隆(标为 23-28)的结果。最左侧的图显示生长培养基的分析,表明除克隆 23(箭头标示)有少量分泌产物外,所述催化域极少或没有分泌。分泌的蛋白显示的表现分子量为 29kD,是未加工多肽的特征分子量。这可能是由于缺少信号肽的切割(或不完全切割)或是由于分泌多肽的翻译后修饰。

[0300] 来自瞬时转染 pHLOXMCD 表达载体的 HEK293 细胞的生长培养基的三氯乙酸沉淀发现在所述生长培养基中存在不溶性 LOX 催化域。

[0301] 在 6 个克隆中的 5 个检测到可溶和不溶性组分(图 1,居中和右侧小图)中的催化域胞内表达。此外,在不溶性胞内组分中测得高分子量聚集体。

[0302] 因为溶解度可指示正确折叠和加工的多肽,存在可溶性胞内多肽产物表明转染细胞中可能产生正确折叠、具有酶促活性的催化域。

[0303] 在 HEK293 细胞外,还在其它细胞类型中观察到 LOX 催化域的表达。pHLOXMCD 表达载体在 CHO_{k1} 细胞中的暂时表达产生所述催化域的胞内表达(在全细胞裂解液中测得),但未测得所述催化域的分泌。SW620 细胞中的暂时表达也产生胞内表达而无可测分泌。

[0304] 实施例 7 :哺乳动物细胞中人 LOXL2 催化域的表达

[0305] 用于含人 LOXL2 催化域的多肽表达的表达盒(复能基因公司,马里兰州德国镇)利用人 LOXL2cDNA 为模板通过 PCR 扩增构建得到。将含有编码所述催化域的序列的

扩增产物克隆入 pSecTag2/Hygro B 载体（英杰公司，加利福尼亚州卡尔斯巴德），产生 pSecTag2hygro-hLOXL2MCD（也称作 pHLOXL2MCD）表达载体。该克隆用 T7RNA 聚合酶转录产生的 mRNA 编码含（从 N- 末端至 C- 末端依次）免疫球蛋白 κ 信号序列、人 LOXL2 催化域、myc 表位标签和 His₆ 纯化标签的多肽。该多肽的氨基酸序列如下：

[0306] METDTLLLWVLLLWVPGSTGD *AAQPARRARRTKL* TAPDLVLNAEMVQQT

[0307] YLEDRPMFMLQCAMEENCLASAAQTDPTTGYYRLLRFSSQIHNNQSDFR

[0308] PKNGRHAWIWHDCRHYHSMEVFTHYDLLNLNGTKVAEGHKASFCLEDT

[0309] ECEGDIQKNYECANFGDQGITMGCWDMYRHDIDCQWVDITDVPPGDYLFQ

[0310] VVINPNFEVAESDYSNNIMKCRSRYDGHRIWMYNCHIGGSFSEETEKKEFH

[0311] FSGLLNNQLSPQ *SRGGP* EQKLISEEDL *NSAVD* HHHHHH. (SEQ ID NO :11)

[0312] 所述信号肽和 myc 标签的序列标有下划线。斜体格式的序列代表氨基酸序列部分或全部由载体序列和用于克隆的限制性位点编码 (AAQPARRARRTKL 和 SRGGP) 与接头序列编码 (NSAVD)。

[0313] 编码该多肽的 DNA 序列（其中标有下划线的序列表示编码前导和 myc 标签的那些，而接头序列用小写字母表示）为：

[0314] ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAG

[0315] GTTCCACTGGTGACgcgggcccagccggccagggcgcgcgccgtacgaagcttACCGCCCCCT

[0316] GACCTGGTCCTCAATGCGGAGATGGTGACGACGACCTACCTGGAGG

[0317] ACCGGCCCATGTTTCATGCTGCAGTGTGCCATGGAGGAGAACTGCCTCTC

[0318] GGCCTCAGCCGCGCAGACCGACCCACCGGGCTACCGCCGGCTCCTG

[0319] CGCTTCTCCTCCCAGATCCACAACAATGGCCAGTCCGACTTCCGGCCCA

[0320] AGAACGGCCGCCACGCGTGGATCTGGCACGACTGTACAGGCACTACCA

[0321] CAGCATGGAGGTGTTCACCCACTATGACCTGCTGAACCTCAATGGCACC

[0322] AAGGTGGCAGAGGGCCACAAGGCCAGCTTCTGCTTGGAGGACACAGAA

[0323] TGTGAAGGAGACATCCAGAAGAATTACGAGTGTGCCAACTTCGGCGATC

[0324] AGGGCATCACCATGGGCTGCTGGGACATGTACCGCCATGACATCGACTG

[0325] CCAGTGGGTTGACATCACTGACGTGCCCCCTGGAGACTACCTGTTCCAG

[0326] GTTGTTATTAACCCCAACTTCGAGGTTGCAGAATCCGATTACTCCAACA

[0327] ACATCATGAAATGCAGGAGCCGCTATGACGGCCACCGCATCTGGATGTA

[0328] CAACTGCCACATAGGTGGTTCCTTCAGCGAAGAGACGGAAAAAAGTTT

[0329] GAGCACTTCAGCGGGCTCTTAAACAACCAGCTGTCCCCGAGtctcgaggagg

[0330] gcccGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGaatagcgcccgtcgacCATCAT

[0331] CATCATCATATTGA (SEQ ID NO :12)

[0332] HEK293 细胞用 pHLOXL2MCD 表达载体进行转染，通过有限稀释选出稳定细胞系，并用实施例 5 中就 pHLOXMCD 载体所述的相同方法扩增克隆。收集培养基用于分析，细胞如实施例 5 中所述脱落并沉淀。

[0333] 实施例 8：通过蛋白质免疫印迹法检测人 LOXL2 催化域

[0334] 通过免疫印迹分析如实施例 7 所述获得的约含 5×10^5 个细胞的沉淀细胞样品。将约含 5×10^5 个细胞的细胞悬液以 6,000rpm 离心 10 分钟，吸除上清液。将沉淀重悬于 100ul

M-PER 裂解缓冲液,然后冰上孵育 20 分钟。15,000rpm 离心 20 分钟去除不溶性细胞碎片,取 75ul 上清液(澄清的细胞裂解液)与 30ulNuPAGE®4X LDS 样品缓冲液(英杰公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德)和 10ulNuPAGE®10X 还原试剂混合。混合物煮沸 5 分钟,然后置于冰上直至上样到凝胶。通常,将 20ul 各样品(对应于~1x10⁵ 个细胞)在 NuPAGE®Novex Bis-Tris 凝胶(4-12%丙烯酰胺)上进行电泳。电泳缓冲液是 NuPAGE®MOPS 缓冲液(英杰公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德)。电泳结束后,用 iBlot 设备(英杰公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德)将蛋白质从凝胶转移至 PVDF。

[0335] 为了检测,将印迹如实施例 6 中就 pHLOXMCD 表达产物所述进行处理。

[0336] 图 2 左侧小图所示结果表明 LOXL2 催化域在 9 个不同克隆中的胞内表达。单体和聚集体形式的蛋白均有测得,单体形式为主。

[0337] 为确定是否分泌人 LOXL2 催化域,按实施例 7 就 pHLOXMCD- 转染细胞所述获得的细胞克隆在 cDMEM+hygro 中培养 90 小时,此时取 15ul 培养基与 5ul 4X LDS 样品缓冲液+还原试剂(NuPAGE®,英杰公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德)混合,煮沸 5 分钟,如上文就全细胞裂解液所述进行聚丙烯酰胺凝胶电泳并分析。图 2 右侧小图所示结果显示,与人 LOX 催化域相反,HEK293 细胞分泌人 LOXL2 催化域的量在未浓缩生长培养基中可以测得。

[0338] 实施例 9 :哺乳动物细胞中鼠 LOX 催化域的表达

[0339] 用于表达含鼠 LOX 催化域的多肽的表达盒利用小鼠 LOX cDNA (GenBankBC018439, 获自加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司)为模板通过 PCR 扩增构建得到。将含有编码所述催化域的序列的扩增产物克隆入 pSecTag2/Hygro B 载体(英杰公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德),产生 pSecTag2hygro-mLOX MCD(也称作 pmLOXMCD)表达载体。该克隆用 T7RNA 聚合酶转录产生的 mRNA 编码含(从 N- 末端至 C- 末端依次)免疫球蛋白 κ 信号序列、鼠 LOX 催化域、myc 表位标签和 His₆ 纯化标签的多肽。该多肽的氨基酸序列如下:

[0340] METDTTLLWVLLLWVPGSTGD *AAQPA* GLPDLVPDPYYIQASTYVQKMSMY

[0341] NLRCAAEENCLASSAYRADVRDYDHRVLLRFPQRVKNQGTSDFLPSRPRYS

[0342] WEWHSCHQHYHSMDEFSHYDLLDANTQRRVAEGHKASFCELTSCDYGY

[0343] HRRFACTAHTQGLSPGCYDTYAADIDCQWIDITDVQPGNYILKVSVPNSYL

[0344] VPESDYTNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY *GP* EOKLISEEDL *NSAVD* HHH

[0345] HHH(SEQ ID NO :13)

[0346] 所述信号肽和 myc 标签的序列标有下划线。斜体格式的序列代表氨基酸序列部分或全部由载体序列或用于克隆的限制性位点编码(AAQP 和 GP)和接头序列编码(NSAVD)。

[0347] 编码该多肽的 DNA 序列(其中标有下划线的序列表示编码前导和 myc 标签的那些,而接头序列用小写字母表示)为:

[0348] ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTCCAG

[0349] GTTCCACTGGTGAC*gcggcccccagccggccGGTCTCCCGGACCTGGTGCCCGACC*

[0350] CCTACTACATCCAGGCTTCCACGTACGTCCAGAAGATGTCTATGTACAA

[0351] CCTGAGATGCGCTGCGGAAGAAAACTGCCTGGCCAGTTCAGCATATAGG

[0352] GCGGATGTCAGAGACTATGACCACAGGGTACTGCTACGATTTCCGCAAA

[0353] GAGTGAAGAACCAAGGGACATCGGACTTCTTACCAAGCCGCCCTCGGTA

[0354] CTCCTGGGAGTGGCACAGCTGTCACCAACATTACCACAGCATGGACGAA

[0355] TTCAGCCACTATGACCTGCTTGATGCCAACACACAGAGGAGAGTGCGCTG
 [0356] AAGGCCACAAAGCAAGCTTCTGTCTGGAGGACACGTCCTGTGACTATGG
 [0357] GTACCACAGGCGCTTTGCGTGCACTGCACACACACAGGGATTGAGTCCT
 [0358] GGATGTTATGACACCTATGCGGCAGACATAGACTGCCAGTGGATTGATA
 [0359] TTACAGATGTACAACCTGGAACTACATTCTAAAGGTCAGTGTAACCC
 [0360] CAGCTACCTGGTGCCTGAATCAGACTACACTAACAATGTTGTACGCTGT
 [0361] GACATTGCTACACAGGACATCATGCCTATGCCTCAGGCTGCACAATTT
 [0362] CACCGTATgggcccGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGaatagcgccgt
 [0363] cgacCATCATCATCATCATCATTGA (SEQ ID NO :14)

[0364] HEK293 细胞用 pmLOXMCD 表达载体进行转染,通过有限稀释选出稳定细胞系,并用实施例 5 中就 pHLOXMCD 载体所述的相同方法扩增克隆。收集培养基用于分析,细胞如实施例 5 中所述脱落、沉淀并分成可溶和不溶性组分。

[0365] 采用实施例 6 中就人催化域分析所述的相同方法通过免疫印迹分析鼠 LOX 催化域的表达。图 3 所示结果表明鼠 LOX 催化域以可检测量分泌(左侧小图),这与人 LOX 催化域相反。mLOX 催化域的胞内表达概况与 hLOX 催化域类似,单体蛋白在可溶和不溶性组分中都有,而聚集体存在于不溶性组分。

[0366] 实施例 10 :由哺乳动物细胞分泌人 LOX 催化域

[0367] 图 4 所示示意图显示人(顶部)和鼠(底部)LOX 催化域的氨基酸序列之间的差异。可见两种序列仅在 4 个位置上有差异。如上所示,并如图 4 中左侧小图所证实,采用十倍浓缩的条件生长培养基(10X CM),转染有鼠 LOX 催化域(M)编码载体的细胞分泌该催化域,而人 LOX 催化域(H)不分泌。因此,若需要分泌人 LOX 催化域,可以将残基 7、38、146 或 160(编号参照本文所述 pHLOXMCD 和 pmLOXMCD 表达载体中所表达催化域的氨基酸序列中的位置)中任意残基,或这些残基的任意组合,或所有这四个残基从人序列改变成鼠序列。例如,可进行下列氨基酸序列改变中的任一种或全部或任意组合:A7P、T38S、G146A、K160Q。

[0368] 相反地,若需要减少鼠 LOX 催化域的分泌,从而将该多肽更多保留在胞内,则可以将残基 7、38、146 和 160 从鼠序列改变为人序列。因此,例如,可进行下列氨基酸序列改变中的任一种或全部或任意组合:P7A、S38T、A146G、Q160K。

[0369] 实施例 11 :哺乳动物细胞中鼠 LOXL2 催化域的表达

[0370] 用于表达含鼠 LOXL2 催化域的多肽的表达盒利用小鼠 LOXL2cDNA(根据 GenBank NM033325 商业合成)为模板通过 PCR 扩增构建。将含有编码所述催化域的序列的扩增产物克隆入 pSecTag2/Hygro B 载体(英杰公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德),产生 pSecTag2hygro-mLOXL2MCD(也称作 pmLOXL2MCD)表达载体。该克隆用 T7RNA 聚合酶转录产生的 mRNA 编码含(从 N-末端至 C-末端依次)免疫球蛋白 κ 信号序列、鼠 LOXL2 催化域、myc 表位标签和 His₆ 纯化标签的多肽。该多肽的氨基酸序列如下(前导序列和 myc 标签标有下划线):METDTL~~LL~~WV~~LL~~WVPGSTGD ***AAQPA***TAPDLVLNAEIVQQTAYLED~~R~~PM~~S~~LLQCAMEENCL~~S~~ASAVHTDPTRGHRRLRFSSQIHNNQSDFRPKNGRHAWI~~W~~HDCHRH~~Y~~HSMEVFTYYD~~L~~LSLNGTKVAEGHKASFCLEDTECEGDIQKSYECANFGEQGITMGCWDMYRHDIDCQWIDITDVPPGDYLFQVVINPNYEVPE~~S~~DFSNNIMKCRSRYDGYRIWMYNCHVGGAFSEETE~~Q~~KFEHFSGL~~L~~NNQLSVQ ***GPEOKLISEEDLNSAVD***HHHHHHH(SEQ ID NO :15)

[0371] 所述信号肽和 myc 标签的序列标有下划线。斜体格式的序列代表氨基酸序列部分

或全部由载体序列和用于克隆的限制性位点编码 (AAQP 和 GP) 和接头序列编码 (NSAVD)。

[0372] 编码该多肽的 DNA 序列 (其中标有下划线的序列表示编码前导和 myc 标签的那些,而接头序列用小写字母表示)为:

[0373] ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAG

[0374] GTTCCACTGGTGACcgggcccccagccggccACTGCACCTGACCTGGTGCTTAATG

[0375] CTGAGATTGTCCAGCAGACTGCCTACCTGGAGGACAGGCCCATGTCCTT

[0376] GCTGCAGTGTGCCATGGAGGAGAACTGCCTCTCCGCCTCCGCTGTGCAC

[0377] ACCGACCCCAACAGAGGCCACCGGCGCCTTTTACGCTTCTCCTCCCAGA

[0378] TCCACAACAATGGCCAGTCTGACTTCCGCCCCAAGAATGGCCGCCATGC

[0379] GTGGATTTGGCACGACTGCCACAGGCACTACCACAGCATGGAAGTCTTC

[0380] ACTTACTATGACCTGCTGAGCCTCAACGGCACCAAGGTGGCTGAGGGCC

[0381] ACAAGGCCAGCTTCTGCCTGGAGGACACTGAGTGTGAGGGAGACATTCA

[0382] GAAGAGTTACGAGTGTGCCAACTTTGGAGAACAAGGCATCACCATGGG

[0383] CTGCTGGGACATGTACCGTCATGACATTGACTGCCAGTGGATAGACATC

[0384] ACCGATGTGCCCCCTGGAGACTACCTGTTCCAGGTGTCATTAACCCCA

[0385] ACTATGAAGTGCCAGAATCAGATTTCTCTAACAACATCATGAAGTGCAG

[0386] GAGCCGCTATGATGGCTACCGCATCTGGATGTACAACGTGCACGTAGGT

[0387] GGAGCCTTCAGTGAGGAGACAGAACAGAAGTTCGAACACTTCAGTGGA

[0388] CTTCTAAATAACCAGCTCTCTGTACAGggggcccGAACAAAAACTCATCTCA

[0389] GAAGAGGATCTGaatagcgccgctcgacCATCATCATCATCATTGA

[0390] (SEQ ID NO :16)

[0391] HEK293 细胞用 pmLOXL2MCD 表达载体转染,通过有限稀释选出稳定细胞系,并用实施例 5 中就 pHLOXMCD 载体所述的相同方法扩增克隆。收集培养基用于分析,细胞如实施例 5 中所述脱落、沉淀并分成可溶和不溶性组分。

[0392] 采用实施例 6 中就人催化域分析所述的相同方法通过免疫印迹分析鼠 LOXL2 衍生多肽的表达。

[0393] 实施例 12 :由瞬时转染的细胞产生具酶活性的人 LOXL2 催化域

[0394] 将 293F 细胞 (HEK293 细胞系的亚克隆,适于悬浮培养,加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司)按生产商方案在旋转瓶中培养。一旦培养物密度达到 $0.8-1.2 \times 10^6$ 细胞 / 毫升,就把细胞培养物转移入 CB22 袋 (WAVE,GE 医疗保健公司 (GE Health),新泽西州皮斯卡特维)。采用 293fectin 试剂 (英杰公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德)用 8mg pHLOXL2 载体转染 8 升细胞培养物。转染细胞在 CB22 袋中培养 3 天,此后所述细胞培养液在 Allegra 6R 台式离心机 (贝克曼库尔特公司 (Beckman Coulter Co.)) 中以水平转子 3,000rpm 离心 10 分钟。收集上清液并通过 0.22mm PES 膜过滤。

[0395] 从所述细胞培养上清液在镍-琼脂糖凝胶 (Ni-Sepharose) 树脂 (GE 医疗保健公司,新泽西州皮斯卡特维)上纯化出所述 LOXL2- 衍生多肽。所述树脂经 pH8.0 的 0.1M Tris-Cl 平衡。将条件培养基 (即,细胞培养上清液)上样到经平衡树脂上,然后用 10 倍柱体积的 0.1M Tris-Cl,pH 8.0、0.25M NaCl、0.02M 咪唑清洗该柱。用 5 倍柱体积的 0.1M Tris-Cl,pH 8.0、0.15M NaCl、0.3M 咪唑洗脱带 His- 标签的催化域。洗脱液在 Amicon

Ultra 1510kD MWCL(密理博公司(Millipore),马塞诸塞州比尔瑞卡)上浓缩,浓缩物质用 pH 8.0 的 0.05M 硼酸盐于 4℃ 透析过夜。样品在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶(4-12% 梯度 Bis-Tris 凝胶,加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司,)上以还原条件分析。

[0396] 实施例 13 :人 LOXL2 催化域的酶促活性

[0397] 如上文实施例 12 所述生成含有人 LOXL2 催化域的多肽。采用将过氧化物生成(1,5-二氨基戊烷脱氨后由 LOXL2 释放)与 HRP- 催化 Amplex® 红转化成荧光产物(试卤灵)相偶联的生化试验来评估酶活性。Palamakumbura 等(2002)Anal. Biochem. 300 :245-251。反应板从康宁公司(Corning)获得。Amplex® 红试剂来自英杰公司(加利福尼亚州卡尔斯巴德)。辣根过氧化物酶(HRP)、1,5-二氨基戊烷和消泡剂来自西格玛公司(Sigma,密苏里州圣路易斯)。所有其它试剂均为现有最优质试剂。

[0398] 通过将 10uL 合并的峰组分(见实施例 12)加入 40uL 试验溶液(62.5mM 硼酸钠, pH 8.0, 5 单位/毫升 HRP, 10ppm 消泡剂)来装配酶混合液。底物溶液含 50mM 硼酸钠, 100uM Amplex® 红试剂, 20mM 1,5-二氨基戊烷, 10ppm 消泡剂。通过混合 50uL 酶混合液与 50uL 底物溶液启动反应。一个反应还含有 2mM β APN(β -氨基丙腈, 赖氨酰氧化酶和 LOXL2 的催化活性的抑制剂)。反应混合液在分子仪器公司(Molecular Devices)M5 酶标仪中于 37℃ 孵育, 酶标仪设置成以动力学模式持续 1 小时测量荧光(激发 = 544nm, 发射 = 590nm)。数据记录为随时间变化的荧光斜率。

[0399] 图 5 以试卤灵生成的时间过程形式显示该试验的结果, 试卤灵生成以相对荧光单位(RFU)表示。所述人 LOXL2- 衍生多肽显示可测的酶活性, 且所述活性被 β APN 抑制。因此, 所述多肽包含 LOXL2 的酶活性催化域。

[0001]

序列表

<110> 吉联亚生物科技有限公司 (GILEAD BIOLOGICS, INC.)

S·麦克考雷 (McCauley, Scott)

V·史密斯 (Smith, Victoria)

<120> 赖氨酰氧化酶和 LOXL2 的催化结构域

<130> ARBS-010WO

<140> PCT/US2010/046192

<141> 2010-08-20

<150> US 61/235,776

<151> 2009-08-21

<160> 22

<170> FastSEQ Windows 版 4.0

<210> 1

<211> 207

<212> PRT

<213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 1

Gly	Leu	Pro	Asp	Leu	Val	Ala	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Gln	Ala	Ser	Thr
1				5					10					15	
Tyr	Val	Gln	Lys	Met	Ser	Met	Tyr	Asn	Leu	Arg	Cys	Ala	Ala	Glu	Glu
			20					25					30		
Asn	Cys	Leu	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Arg	Ala	Asp	Val	Arg	Asp	Tyr	Asp
		35					40					45			
His	Arg	Val	Leu	Leu	Arg	Phe	Pro	Gln	Arg	Val	Lys	Asn	Gln	Gly	Thr
50					55					60					
Ser	Asp	Phe	Leu	Pro	Ser	Arg	Pro	Arg	Tyr	Ser	Trp	Glu	Trp	His	Ser
65				70					75					80	
Cys	His	Gln	His	Tyr	His	Ser	Met	Asp	Glu	Phe	Ser	His	Tyr	Asp	Leu
			85					90					95		
Leu	Asp	Ala	Asn	Thr	Gln	Arg	Arg	Val	Ala	Glu	Gly	His	Lys	Ala	Ser
		100					105						110		
Phe	Cys	Leu	Glu	Asp	Thr	Ser	Cys	Asp	Tyr	Gly	Tyr	His	Arg	Arg	Phe
		115					120						125		
Ala	Cys	Thr	Ala	His	Thr	Gln	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	Cys	Tyr	Asp	Thr
		130				135					140				
Tyr	Gly	Ala	Asp	Ile	Asp	Cys	Gln	Trp	Ile	Asp	Ile	Thr	Asp	Val	Lys
145				150					155					160	
Pro	Gly	Asn	Tyr	Ile	Leu	Lys	Val	Ser	Val	Asn	Pro	Ser	Tyr	Leu	Val
			165					170					175		
Pro	Glu	Ser	Asp	Tyr	Thr	Asn	Asn	Val	Val	Arg	Cys	Asp	Ile	Arg	Tyr
		180					185						190		
Thr	Gly	His	His	Ala	Tyr	Ala	Ser	Gly	Cys	Thr	Ile	Ser	Pro	Tyr	
		195					200						205		

[0002]

<210> 2
 <211> 624
 <212> DNA
 <213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 2
 ggtctcccag acctggtggc cgaccctac tacatccagg cgtccacgta cgtgcagaag 60
 atgtccatgt acaacctgag atgcgcggcg gaggaact gtctggccag tacagcalac 120
 agggcagatg tcagagatta tgatcacagg gtgctgctca gatttcccca aagagtgaag 180
 aaccaaggga catcagattt cttaccacag cgaccaagat attcctggga atggcacagt 240
 tgtcatcaac attaccacag tatggatgag tttagccact atgacctget tgatgccaac 300
 acccagagga gagtggctga aggccacaaa gcaagtctct gtcttgaaga cacatcctgt 360
 gactatggct accacaggcg atttgcattg actgcacaca cacagggtt gagtcctggc 420
 tggttatgata cctatggtgc agacatagac tgccagtggg ttgatattac agatgtaaaa 480
 cctggaaact atatcctaaa ggtcagtgtg aaccccgagt acctggttcc tgaatctgac 540
 tataccaaca atgtgtgctg ctgtgacatt cgctacacag gacatcatgc gtatgcctca 600
 ggctgcacaa tttcacgta ttag 624

<210> 3
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 3
 Thr Ala Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Met Val Gln Gln Thr Thr
 1 5 10 15
 Tyr Leu Glu Asp Arg Pro Met Phe Met Leu Gln Cys Ala Met Glu Glu
 20 25 30
 Asn Cys Leu Ser Ala Ser Ala Ala Gln Thr Asp Pro Thr Thr Gly Tyr
 35 40 45
 Arg Arg Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln Ser
 50 55 60
 Asp Phe Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp Cys
 65 70 75 80
 His Arg His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr His Tyr Asp Leu Leu
 85 90 95
 Asn Leu Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys
 100 105 110
 Leu Glu Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Asn Tyr Glu Cys
 115 120 125
 Ala Asn Phe Gly Asp Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met Tyr
 130 135 140
 Arg His Asp Ile Asp Cys Gln Trp Val Asp Ile Thr Asp Val Pro Pro
 145 150 155 160
 Gly Asp Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Phe Glu Val Ala
 165 170 175
 Glu Ser Asp Tyr Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr Asp
 180 185 190
 Gly His Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Ile Gly Gly Ser Phe Ser
 195 200 205
 Glu Glu Thr Glu Lys Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn Asn
 210 215 220

[0003]

Gln Leu Ser Pro Gln
225

<210> 4

<211> 690

<212> DNA

<213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 4

```

accgcccctg acctggctct caatgcggag atggtgcagc agaccaccta cctggaggac 60
cggcccatgt tcatgctgca gtgtgccatg gaggagaact gcctctcggc ctcagccgcg 120
cagaccgacc ccaccacggg ctaccgccgg ctctgcgct tctctccca gatccacaac 180
aatggccagt ccgacttcgg gcccagaac ggccgccacg cgtggatctg gcacgactgt 240
cacaggcaact accacagcat ggagggtgtt acccactatg acctgctgaa cctcaatggc 300
accaaggtgg cagagggccca caaggccagc ttctgcttgg aggacacaga atgtgaagga 360
gacatccaga agaattacga gtgtgccaac ttcggcgatc agggcatcac catgggctgc 420
tgggacatgt accgccatga catcgactgc cagtgggttg acalcactga cgtgcccctt 480
ggagactacc tgttccaggt tgttattaac cccaacttcg aggttgcaga atccgattac 540
tccaacaaca tcatgaaatg caggagccgc tatgacggcc accgcactcg gatgtacaac 600
tgccacatag gtggttcctt cagcgaagag acggaaaaaa agtttgagca cttcagcggg 660
ctcttaaaaca accagctgtc cccgcagtaa                                690

```

<210> 5

<211> 207

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 5

```

Gly Leu Pro Asp Leu Val Pro Asp Pro Tyr Tyr Ile Gln Ala Ser Thr
  1             5             10             15
Tyr Val Gln Lys Met Ser Met Tyr Asn Leu Arg Cys Ala Ala Glu Glu
      20             25             30
Asn Cys Leu Ala Ser Ser Ala Tyr Arg Ala Asp Val Arg Asp Tyr Asp
      35             40             45
His Arg Val Leu Leu Arg Phe Pro Gln Arg Val Lys Asn Gln Gly Thr
      50             55             60
Ser Asp Phe Leu Pro Ser Arg Pro Arg Tyr Ser Trp Glu Trp His Ser
      65             70             75             80
Cys His Gln His Tyr His Ser Met Asp Glu Phe Ser His Tyr Asp Leu
      85             90             95
Leu Asp Ala Asn Thr Gln Arg Arg Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser
      100            105            110
Phe Cys Leu Glu Asp Thr Ser Cys Asp Tyr Gly Tyr His Arg Arg Phe
      115            120            125
Ala Cys Thr Ala His Thr Gln Gly Leu Ser Pro Gly Cys Tyr Asp Thr
      130            135            140
Tyr Ala Ala Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Gln
      145            150            155            160
Pro Gly Asn Tyr Ile Leu Lys Val Ser Val Asn Pro Ser Tyr Leu Val
      165            170            175
Pro Glu Ser Asp Tyr Thr Asn Asn Val Val Arg Cys Asp Ile Arg Tyr
      180            185            190
Thr Gly His His Ala Tyr Ala Ser Gly Cys Thr Ile Ser Pro Tyr

```

[0004]

195

200

205

<210> 6

<211> 624

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 6

```

gggtctcccg accctgggtgcc cgacccttac tacatccagg ctccacgta cgtccagaag 60
atgtctatgt acaacctgag atgcgtgctg gaagaaaact gcctggccag ttcagcatat 120
agggcggatg tcagagacta tgaccacagg gtactgctac gatttccgca aagagtgaag 180
aaccaaggga catcggactt cttaccaagc cgccctcggt actcctggga gtggcacagc 240
tgtcaccaac attaccacag catggacgaa ttcagccact atgacctgct tgaigccaac 300
acacagagga gagtggctga aggccacaaa gcaagcttct gtctggagga cagtcctgt 360
gactatgggt accacaggcg ctttgcgtgc actgcacaca cacagggatt gagtcttga 420
tgttatgaca cctatgcggc agacatagac tgccagtgga ttgatattac agatgtacaa 480
cctggaaact acattctaaa ggtcagtgtg aaccccagct acctgggtgcc tgaatcagac 540
tacactaaca atgttgtacg ctgtgacatt cgctacacag gacatcatgc ctatgcctca 600
ggctgcacaa tttcacgta ttag                                     624

```

<210> 7

<211> 229

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 7

```

Thr Ala Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Ile Val Gln Gln Thr Ala
1           5           10          15
Tyr Leu Glu Asp Arg Pro Met Ser Leu Leu Gln Cys Ala Met Glu Glu
20          25          30
Asn Cys Leu Ser Ala Ser Ala Val His Thr Asp Pro Thr Arg Gly His
35          40          45
Arg Arg Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln Ser
50          55          60
Asp Phe Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp Cys
65          70          75          80
His Arg His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr Tyr Tyr Asp Leu Leu
85          90          95
Ser Leu Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys
100         105         110
Leu Glu Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Ser Tyr Glu Cys
115         120         125
Ala Asn Phe Gly Glu Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met Tyr
130         135         140
Arg His Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Pro Pro
145         150         155         160
Gly Asp Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Tyr Glu Val Pro
165         170         175
Glu Ser Asp Phe Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr Asp
180         185         190
Gly Tyr Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Val Gly Gly Ala Phe Ser
195         200         205
Glu Glu Thr Glu Gln Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn Asn

```

[0005]

```

210          215          220
Gln Leu Ser Val Gln
225

<210> 8
<211> 690
<212> DNA
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 8
actgcacctg acctgggtgct taatgctgag attgtccagc agactgccta cctggaggac 60
aggcccatgt ccttgctgca gtgtgccatg gaggagaact gccctctccgc ctccgctgtg 120
cacaccgacc ccaccagagg ccaccggcgc cttttacgct tctctctcca gatccacaac 180
aatggccagt ctgacttccg ccccaagaat ggccgccatg cgtggatttg gcacgactgc 240
cacaggcact accacagcat ggaagtcttc acttactatg acctgctgag cctcaacggc 300
accaaggtgg ctgagggccca caaggccagc ttctgcttgg aggacactga gtgtgaggga 360
gacattcaga agagttacga gtgtgccaac ttgggagaac aaggcatcac catgggctgc 420
tgggacatgt accgtcatga cattgactgc cagtggatag acatcaccca tgtgcccctt 480
ggagactacc tgttccaggt tgtcattaac cccaactatg aagtgccaga atcagatttc 540
tctaacaaca tcatgaagtg caggagccgc tatgatggct accgcacttg gatgtacaac 600
tgtcacgtag gtggagcctt cagtgaggag acagaacaga agttcgaaca cttcagtgga 660
cttctaaata accagctctc tgtacagtaa                                690

<210> 9
<211> 256
<212> PRT
<213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 9
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1          5          10          15
Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Gly Leu Pro Asp Leu Val
20          25          30
Ala Asp Pro Tyr Tyr Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Val Gln Lys Met Ser
35          40          45
Met Tyr Asn Leu Arg Cys Ala Ala Glu Glu Asn Cys Leu Ala Ser Thr
50          55          60
Ala Tyr Arg Ala Asp Val Arg Asp Tyr Asp His Arg Val Leu Leu Arg
65          70          75          80
Phe Pro Gln Arg Val Lys Asn Gln Gly Thr Ser Asp Phe Leu Pro Ser
85          90          95
Arg Pro Arg Tyr Ser Trp Glu Trp His Ser Cys His Gln His Tyr His
100         105         110
Ser Met Asp Glu Phe Ser His Tyr Asp Leu Leu Asp Ala Asn Thr Gln
115         120         125
Arg Arg Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu Glu Asp Thr
130         135         140
Ser Cys Asp Tyr Gly Tyr His Arg Arg Phe Ala Cys Thr Ala His Thr
145         150         155         160
Gln Gly Leu Ser Pro Gly Cys Tyr Asp Thr Tyr Gly Ala Asp Ile Asp
165         170         175
Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Lys Pro Gly Asn Tyr Ile Leu
180         185         190

```

[0006]

Lys Val Ser Val Asn Pro Ser Tyr Leu Val Pro Glu Ser Asp Tyr Thr
 195 200 205
 Asn Asn Val Val Arg Cys Asp Ile Arg Tyr Thr Gly His His Ala Tyr
 210 215 220
 Ala Ser Gly Cys Thr Ile Ser Pro Tyr Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile
 225 230 235 240
 Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 245 250 255

<210> 10
 <211> 771
 <212> DNA
 <213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 10
 atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggtlccagg ttccactggt 60
 gacgcggccc agccggccgg tctcccagac ctgggtggccg acccctacta catccaggcg 120
 tccacgtacg tgcagaagat gtccatgtac aacctgagat gcgcggcgga ggaaaactgt 180
 ctggccagta cagcalacag ggcagatgtc agagattatg atcacagggt gctgtcaga 240
 ttccccaaa gagtgaaaaa ccaagggaca tcagatttct taccagccg accaagatat 300
 tcttggaat ggcacagtig tcatcaacat taccacagta tggatgagtt tagccactat 360
 gacctgcttg atgccaacac ccagaggaga gtggtgaag gccacaaagc aagtttctgt 420
 ctgaagaca catcctgtga ctatggctac cacaggcgat ttgcatgtac tgcacacaca 480
 cagggttgta gtcttgctg ttatgatacc tatggtgcag acatagactg ccagtggatt 540
 gatattacag atgtaaaacc tggaaactat atcctaaagg tcagtgtaaa cccagctac 600
 ctggttctg aatctgacta taccaacaat gttgtgcgt gtgacattcg ctacacagga 660
 catcatcgt atgcctcagg ctgcacaatt tcaccgtatg ggcccgaaca aaaactcatc 720
 tcagaagagg atctgaatag cgccgtcgac catcatcatc atcatcattg a 771

<210> 11
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 11
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
 20 25 30
 Lys Leu Thr Ala Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Met Val Gln Gln
 35 40 45
 Thr Thr Tyr Leu Glu Asp Arg Pro Met Phe Met Leu Gln Cys Ala Met
 50 55 60
 Glu Glu Asn Cys Leu Ser Ala Ser Ala Ala Gln Thr Asp Pro Thr Thr
 65 70 75 80
 Gly Tyr Arg Arg Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly
 85 90 95
 Gln Ser Asp Phe Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His
 100 105 110
 Asp Cys His Arg His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr His Tyr Asp
 115 120 125
 Leu Leu Asn Leu Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser
 130 135 140

[0007]

Phe Cys Leu Glu Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Asn Tyr
 145 150 155 160
 Glu Cys Ala Asn Phe Gly Asp Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp
 165 170 175
 Met Tyr Arg His Asp Ile Asp Cys Gln Trp Val Asp Ile Thr Asp Val
 180 185 190
 Pro Pro Gly Asp Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Phe Glu
 195 200 205
 Val Ala Glu Ser Asp Tyr Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg
 210 215 220
 Tyr Asp Gly His Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Ile Gly Gly Ser
 225 230 235 240
 Phe Ser Glu Glu Thr Glu Lys Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu
 245 250 255
 Asn Asn Gln Leu Ser Pro Gln Ser Arg Gly Gly Pro Glu Gln Lys Leu
 260 265 270
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 275 280 285
 His

<210> 12
 <211> 870
 <212> DNA
 <213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 12
 atggagacag acacacaccc gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
 gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtacgaagc ttaccgcccc tgacctggtc 120
 ctcaatgcgg agatggtgca gcagaccacc tacctggagg accggcccat gticcatgtg 180
 cagtgtgcca tggaggagaa ctgcctctcg gcctcagccg cgcagaccga ccccaccacg 240
 ggctaccgcc ggctcctgcg ctctctctcc cagatccaca acaatggcca gtccgacttc 300
 cggcccaaga acggccgcca cgcgtggatc tggcacgact gtcacaggca ctaccacagc 360
 atggaggtgt tcaccacta tgacctgtg aacctcaatg gcaccaaggt ggcagagggc 420
 cacaaggcca gcttctgctt ggaggacaca gaatgtgaag gagacatcca gaagaattac 480
 gagtgtgcca acttcggcga tcagggcac accatgggct gctgggacat gtaccgccat 540
 gacatcgact gccagtgggt tgacatcact gacgtgcccc ctggagacta cctgttccag 600
 gttgttatta accccaactt cgagggttga gaatccgatt actccaaca catcatgaaa 660
 tgcaggagcc gctatgacgg ccaccgcac tggatgtaca actgccacat aggtgggttc 720
 ttcagcgaag agacggaaaa aaagtttgag cacttcagcg ggctctttaa caaccagctg 780
 tccccgcagt ctcgaggagg gcccgaaaa aaactcatct cagaagagga tctgaatagc 840
 gccgtcgacc atcatcatca tcattcattga 870

<210> 13
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 13
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Gly Leu Pro Asp Leu Val
 20 25 30

[0008]

```

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

```

<210> 14

<211> 771

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 14

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
gacgcggccc agccggccgg tctcccggac ctgggtgccc accctacta catccaggct 120
tccacgtacg tccagaagat gtctatgtac aacctgagat gcgctgcgga agaaaactgc 180
ctggccagtt cagcatatag ggcggatgtc agagactatg accacagggt actgetacga 240
tttccgcaaa gagtgaagaa ccaagggaca tcggacttct taccaagccg cctcggtag 300
tcctgggagt ggcacagctg tcaccaacat taccacagca tggacgaatt cagccactat 360
gacctgcttg atgccaacac acagaggaga gtggctgaag gccacaaagc aagcttctgt 420
ctggaggaca cgtcctgtga ctatgggtac cacaggcgct ttgcgtgcac tgcacacaca 480
cagggattga gtcctggatg ttatgacacc tatgcggcag acatagactg ccagtggatt 540
gatattacag atgtacaacc tggaaactac attctaaagg tcagtgtaaa cccagctac 600
ctgggtgcctg aatcagacta cactaacaat gttgtacgct gtgacattcg ctacacagga 660
catcatgcct atgcctcagg ctgcacaatt tcaccgtatg ggcccgaaaca aaaactcatc 720
tcagaagagg atctgaatag cgccgtcgac catcatcatc atcatcattg a 771

```

<210> 15

<211> 278

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

[0009]

<400> 15

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Thr Ala Pro Asp Leu Val
 20 25 30
 Leu Asn Ala Glu Ile Val Gln Gln Thr Ala Tyr Leu Glu Asp Arg Pro
 35 40 45
 Met Ser Leu Leu Gln Cys Ala Met Glu Glu Asn Cys Leu Ser Ala Ser
 50 55 60
 Ala Val His Thr Asp Pro Thr Arg Gly His Arg Arg Leu Leu Arg Phe
 65 70 75 80
 Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln Ser Asp Phe Arg Pro Lys Asn
 85 90 95
 Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp Cys His Arg His Tyr His Ser
 100 105 110
 Met Glu Val Phe Thr Tyr Tyr Asp Leu Leu Ser Leu Asn Gly Thr Lys
 115 120 125
 Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu Glu Asp Thr Glu Cys
 130 135 140
 Glu Gly Asp Ile Gln Lys Ser Tyr Glu Cys Ala Asn Phe Gly Glu Gln
 145 150 155 160
 Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met Tyr Arg His Asp Ile Asp Cys
 165 170 175
 Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Pro Pro Gly Asp Tyr Leu Phe Gln
 180 185 190
 Val Val Ile Asn Pro Asn Tyr Glu Val Pro Glu Ser Asp Phe Ser Asn
 195 200 205
 Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr Asp Gly Tyr Arg Ile Trp Met
 210 215 220
 Tyr Asn Cys His Val Gly Gly Ala Phe Ser Glu Glu Thr Glu Gln Lys
 225 230 235 240
 Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn Asn Gln Leu Ser Val Gln Gly
 245 250 255
 Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp
 260 265 270
 His His His His His His
 275

<210> 16

<211> 837

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 16

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
 gacgcggccc agccggccac tgcacctgac ctggtgctta atgctgagat tgtccagcag 120
 actgcctacc tggaggacag gcccatgtcc ttgctgcagt gtgccatgga ggagaactgc 180
 ctctccgcct ccgctgtgca caccgacccc accagaggcc accggcgctt ttacgcttc 240
 tectcccaga tccacaacaa tggccagtct gacttcgcc ccaagaatgg ccgccatgcg 300
 tggatttggc acgactgcca caggcactac cacagcatgg aagtcttcac ttactatgac 360
 ctgctgagcc tcaacggcac caaggtggct gagggccaca aggccagctt ctgcctggag 420
 gacactgagt gtgagggaga cattcagaag agttacgagt gtgccaaatt tggagaacaa 480

[0010]


```

ggcatcacca tgggctgctg ggacatgtac cgtcatgaca ttgactgcca gtggatagac 540
atcaccgatg tgccccctgg agactacctg ttccaggttg tcattaaccc caactatgaa 600
gtgccagaat cagatttctc taacaacatc atgaagtga ggagccgcta tgatggctac 660
cgcatctgga tgtacaactg tcacgtagggt ggagccttca gtgaggagac agaacagaag 720
ttcgaacact tcagtggact tctaaataac cagctctctg tacaggggcc cgaacaaaaa 780
ctcatctcag aagaggatct gaatagcgcc gtcgaccatc atcatcatca tcattga 837

```

<210> 17

<211> 207

<212> PRT

<213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 17

```

Gly Leu Pro Asp Leu Val Pro Asp Pro Asn Tyr Val Gln Ala Ser Thr
 1              5              10              15
Tyr Val Gln Arg Ala His Leu Tyr Ser Leu Arg Cys Ala Ala Glu Glu
              20              25              30
Lys Cys Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Ala Pro Glu Ala Thr Asp Tyr Asp
              35              40              45
Val Arg Val Leu Leu Arg Phe Pro Gln Arg Val Lys Asn Gln Gly Thr
              50              55              60
Ala Asp Phe Leu Pro Asn Arg Pro Arg His Thr Trp Glu Trp His Ser
65              70              75              80
Cys His Gln His Tyr His Ser Met Asp Glu Phe Ser His Tyr Asp Leu
              85              90              95
Leu Asp Ala Ala Thr Gly Lys Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser
              100             105             110
Phe Cys Leu Glu Asp Ser Thr Cys Asp Phe Gly Asn Leu Lys Arg Tyr
              115             120             125
Ala Cys Thr Ser His Thr Gln Gly Leu Ser Pro Gly Cys Tyr Asp Thr
              130             135             140
Tyr Asn Ala Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Gln
145             150             155             160
Pro Gly Asn Tyr Ile Leu Lys Val His Val Asn Pro Lys Tyr Ile Val
              165             170             175
Leu Glu Ser Asp Phe Thr Asn Asn Val Val Arg Cys Asn Ile His Tyr
              180             185             190
Thr Gly Arg Tyr Val Ser Ala Thr Asn Cys Lys Ile Val Gln Ser
              195             200             205

```

<210> 18

<211> 227

<212> PRT

<213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 18

```

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

```

[0011]

```

      50              55              60
Asp Phe Arg Pro Lys Ala Gly Arg His Ser Trp Val Trp His Glu Cys
65              70              75              80
His Gly His Tyr His Ser Met Asp Ile Phe Thr His Tyr Asp Ile Leu
      85              90              95
Thr Pro Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys
      100             105             110
Leu Glu Asp Thr Glu Cys Gln Glu Asp Val Ser Lys Arg Tyr Glu Cys
      115             120             125
Ala Asn Phe Gly Glu Gln Gly Ile Thr Val Gly Cys Trp Asp Leu Tyr
      130             135             140
Arg His Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Lys Pro
145             150             155             160
Gly Asn Tyr Ile Leu Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Phe Glu Val Ala
      165             170             175
Glu Ser Asp Phe Thr Asn Asn Ala Met Lys Cys Asn Cys Lys Tyr Asp
      180             185             190
Gly His Arg Ile Trp Val His Asn Cys His Ile Gly Asp Ala Phe Ser
      195             200             205
Glu Glu Ala Asn Arg Arg Phe Glu Arg Tyr Pro Gly Gln Thr Ser Asn
      210             215             220
Gln Ile Ile
225

```

<210> 19

<211> 226

<212> PRT

<213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 19

```

Ser Ala Pro Asp Leu Val Met Asn Ala Gln Leu Val Gln Glu Thr Ala
 1              5              10              15
Tyr Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser Gln Leu Tyr Cys Ala His Glu Glu
      20             25             30
Asn Cys Leu Ser Lys Ser Ala Asp His Met Asp Trp Pro Tyr Gly Tyr
      35             40             45
Arg Arg Leu Leu Arg Phe Ser Thr Gln Ile Tyr Asn Leu Gly Arg Thr
      50             55             60
Asp Phe Arg Pro Lys Thr Gly Arg Asp Ser Trp Val Trp His Gln Cys
65             70             75             80
His Arg His Tyr His Ser Ile Glu Val Phe Thr His Tyr Asp Leu Leu
      85             90             95
Thr Leu Asn Gly Ser Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys
      100            105            110
Leu Glu Asp Thr Asn Cys Pro Thr Gly Leu Gln Arg Arg Tyr Ala Cys
      115            120            125
Ala Asn Phe Gly Glu Gln Gly Val Thr Val Gly Cys Trp Asp Thr Tyr
      130            135            140
Arg His Asp Ile Asp Cys Gln Trp Val Asp Ile Thr Asp Val Gly Pro
145            150            155            160
Gly Asn Tyr Ile Phe Gln Val Ile Val Asn Pro His Tyr Glu Val Ala
      165            170            175
Glu Ser Asp Phe Ser Asn Asn Met Leu Gln Cys Arg Cys Lys Tyr Asp

```

[0012]

<400> 22
Gly Leu Pro Asp Leu Val Pro
1 5

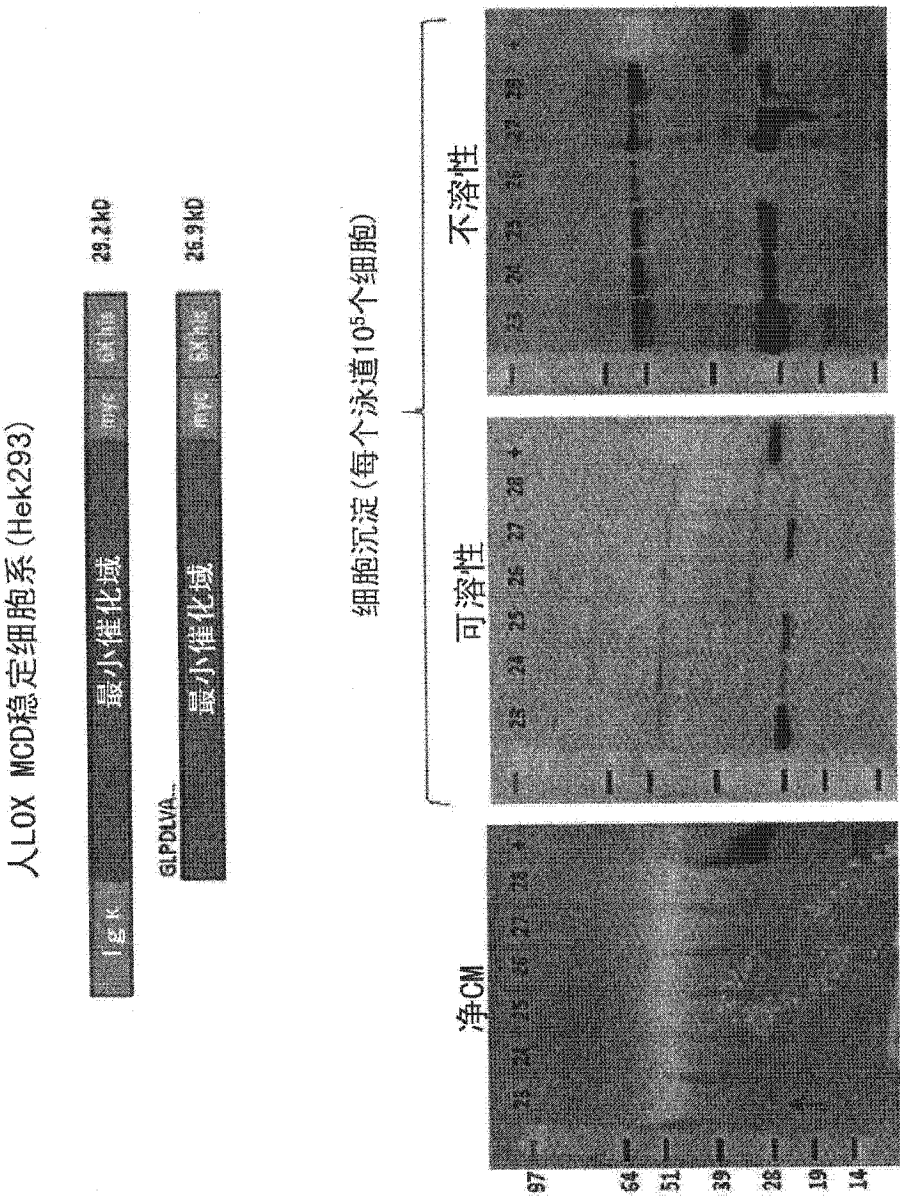
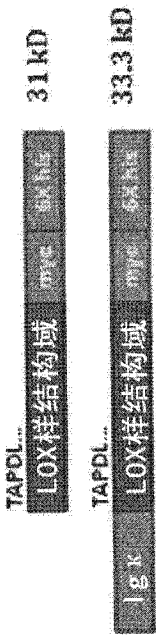


图 1

Hek293中hLOXL2 MCD稳定细胞系



全细胞裂解液的筛选

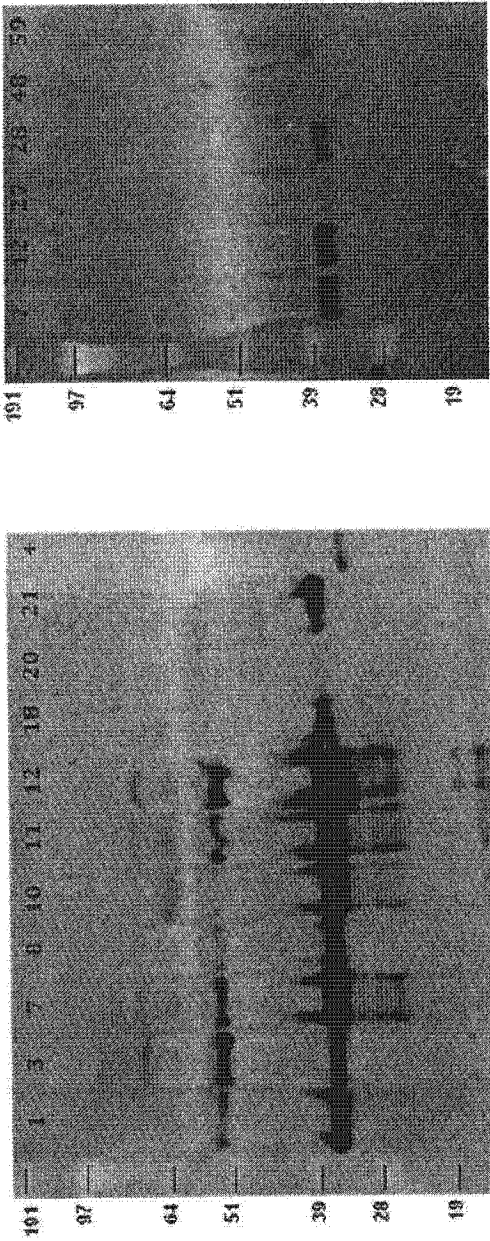


图 2

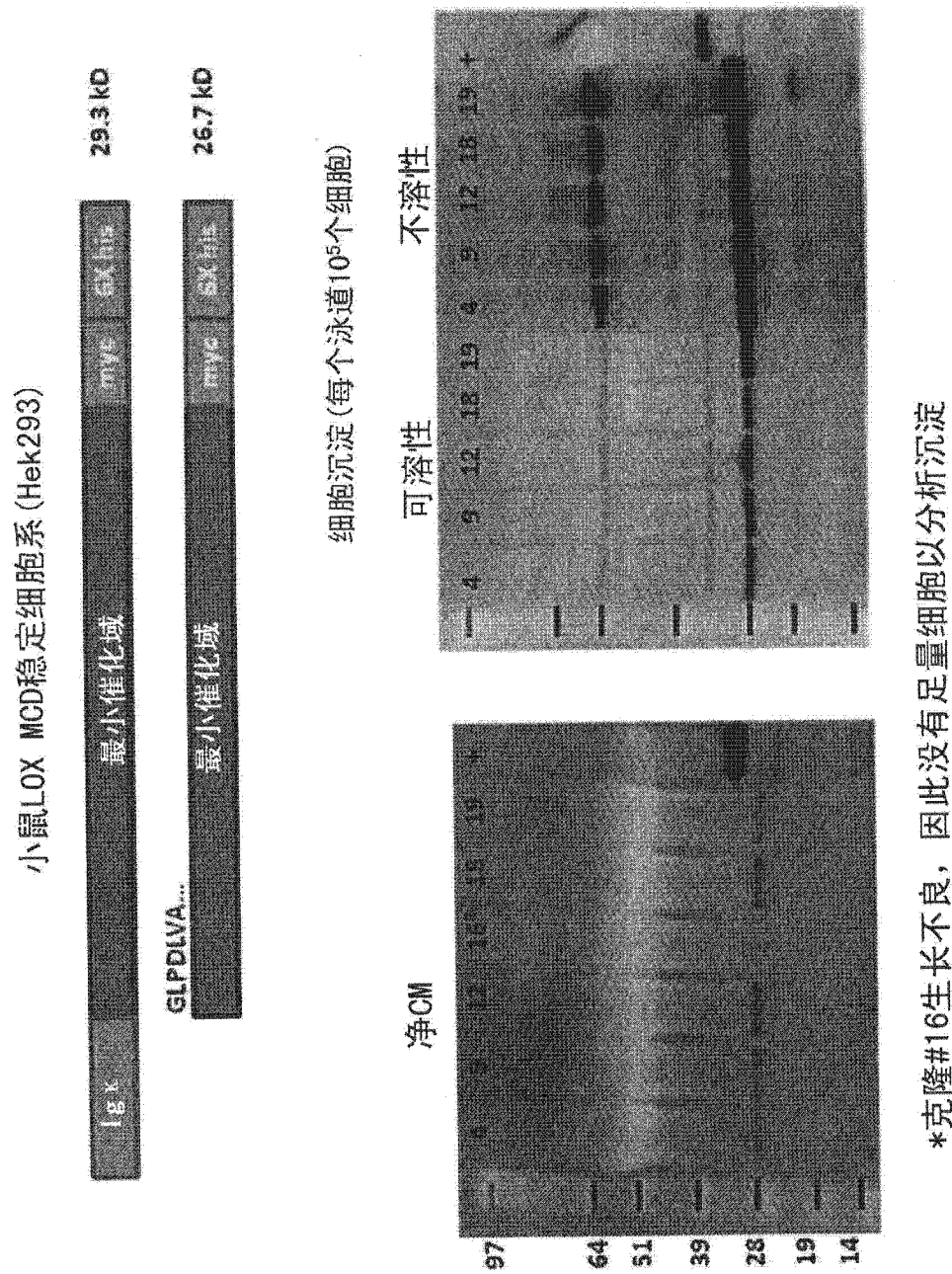


图 3

mLOX和hLOX MCD之间的可变表达

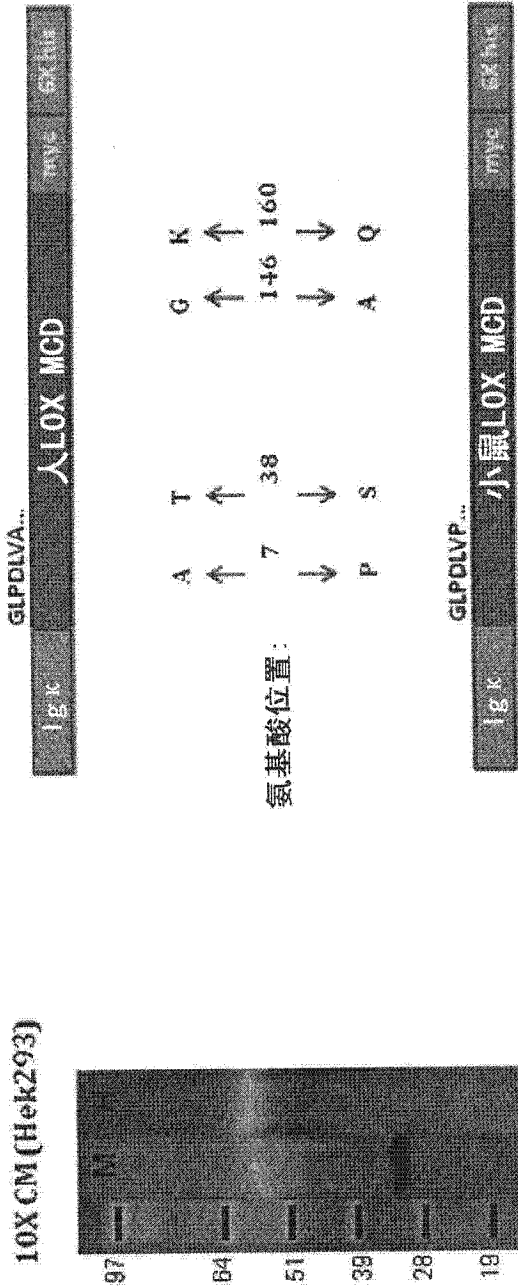


图 4

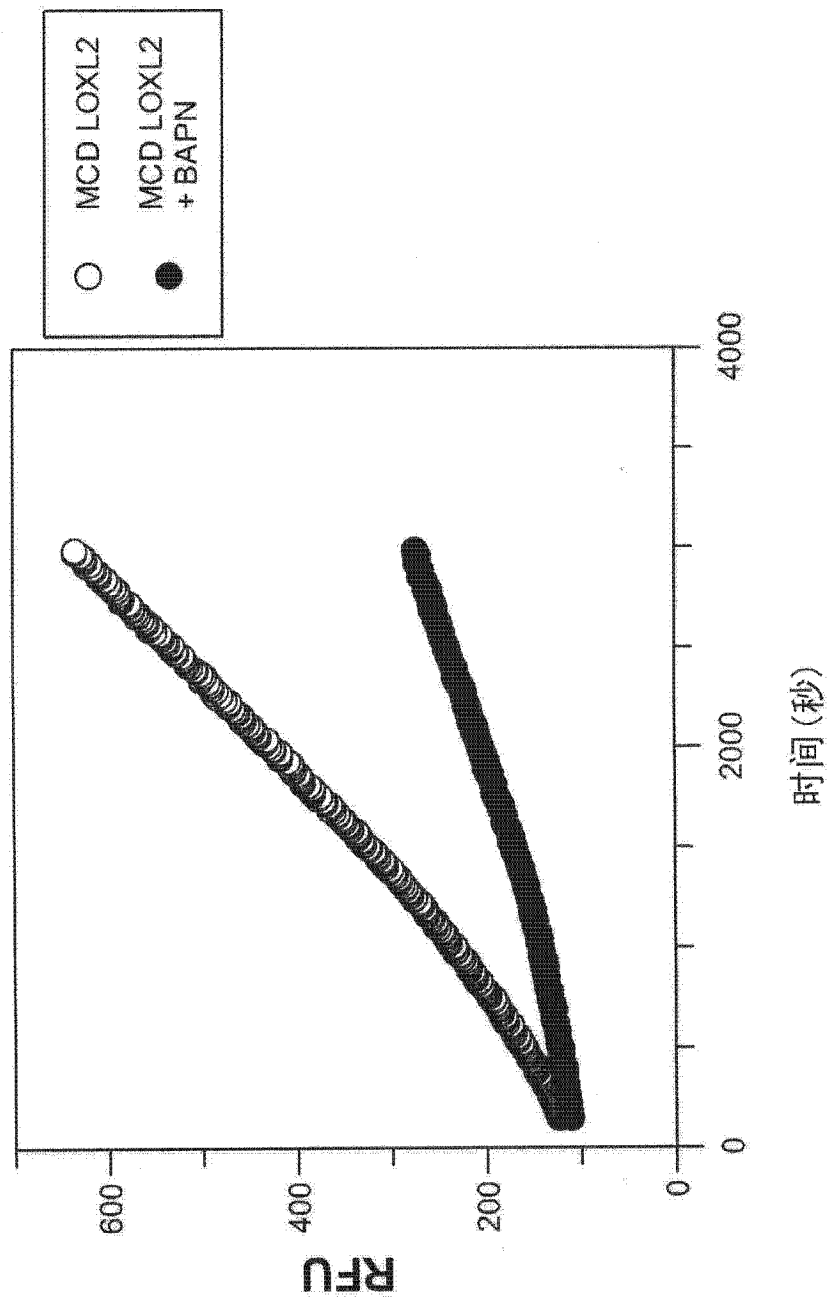


图 5


```

hLOX      GLPDLVADPYIYQASTYVQKMSMYNLRCAAEEENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQRVK 60
hLOXL1    GLPDLVDPFNYVQASTYVQRAHLYSLRCAAEEKCLASTAYAPEATDYDVRVLLRFPQRVK 60
mLOX      GLPDLVDPFYIYQASTYVQKMSMYNLRCAAEEENCLASSAYRADVRDYDHRVLLRFPQRVK 60
hLOXL2    TAPDLVLNAEMVQQTTYLEDPRPMFMLQCAMEENCLASASAAQTDPT-TGYRRLRFRSSQIH 59
mLOXL2    TAPDLVLNAEIVQQTAYLEDPRMSLLQCAMEENCLASASAVHTDPT-RGHRRLRFRSSQIH 59
hLOXL3    TASDLLLHSALVQETAYIEDRPLHMLYCAAEEENCLASSARSANWP-YGHRRLRFRSSQIH 59
hLOXL4    SAPDLVMNAQLVQETAYLEDRPLSQLYCAHEENCLSKSADHMDWP-YGYRRLRFRSTQIY 59
          .** :. : * :*: : : * ** **:*: : * : . * ****. : :

hLOX      NQGTSDFLPSRPRYSWEWHSCHQHYHSMDEFESHYDILLDANTQRRVAEGHKASFCELTSC 120
hLOXL1    NQGTADFLPNRPRHTWEWHSCHQHYHSMDEFESHYDILLDAATGKKVAEGHKASFCELTSC 120
mLOX      NQGTSDFLPSRPRYSWEWHSCHQHYHSMDEFESHYDILLDANTQRRVAEGHKASFCELTSC 120
hLOXL2    NNGQSDFRPKNGRHWIWHDCRHYHSMDEFESHYDILLNLN-GTKVAEGHKASFCELTSC 118
mLOXL2    NNGQSDFRPKNGRHWIWHDCRHYHSMDEFESHYDILLNLN-GTKVAEGHKASFCELTSC 118
hLOXL3    NLGRADFRPKACRHSWVWHECHGHYHSMDEFESHYDILTPN-GTKVAEGHKASFCELTSC 118
hLOXL4    NLGRDFRPKTGRDSWVWHQCHRHYHSIEVFTHYDILLTLN-GSKVAEGHKASFCELTSC 118
          * * :** * . * : * ** .** ****: : **:*: * :*****: *

hLOX      DYGYHRRFACTAH-TQGLSPGCYDITYGADIDCQWIDITDVKPGNYILKVSVPNPSYLVPE 179
hLOXL1    DFGNLKRYACTSH-TQGLSPGCYDITYNADIDCQWIDITDVQPGNYILKVHVPNPKYIVLES 179
mLOX      DYGYHRRFACTAH-TQGLSPGCYDITYAADIDCQWIDITDVQPGNYILKVSVPNPSYLVPE 179
hLOXL2    EGDYQKSYECANFGDQGITMGCWDMYRHDIDCQWIDITDVPPGDYLFQVVPNPNFEVAES 178
mLOXL2    EGDYQKSYECANFGDQGITMGCWDMYRHDIDCQWIDITDVPPGDYLFQVVPNPNFEVAES 178
hLOXL3    QEDVSKRYECANFGDQGITVGCWDLRYRHDIDCQWIDITDVKPGNYILQVVPNPNFEVAES 178
hLOXL4    PTGLQRRYACANFGDQGVTVGCWDTYRHDIDCQWIDITDVGPGNYIFQVVPNPNFEVAES 178
          . : : * : . ** : : **: * * *****:***** **:*: : * : *

hLOX      DYTNNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY----- 207
hLOXL1    DFTNNVVRCDIRYTGRIYVSATNCKIVQS----- 207
mLOX      DYTNNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY----- 207
hLOXL2    DYSNNIMKCRSRYDGHRIWMYNCHIGGSFSEETEKKEHFSGLLNNQLSPQ 229
mLOXL2    DFSNNIMKCRSRYDGYRIWMYNCHVGGAFSEETEQKEHFSGLLNNQLSVQ 229
hLOXL3    DFTNNAMKCCKYDGHRIWVHNCHIGDAFSEANRRFERYPGQTSNQII-- 227
hLOXL4    DFSNNMLQCRCKYDGHVWLHNCHTGNSTPANAELSLEQEQLRNNLI--- 226
          *: ** : : * : * * . *

hLOX      (SEQ ID NO:1)
hLOXL1    (SEQ ID NO:17)
mLOX      (SEQ ID NO:5)
hLOXL2    (SEQ ID NO:3)
mLOXL2    (SEQ ID NO:7)
hLOXL3    (SEQ ID NO:18)
hLOXL4    (SEQ ID NO:19)

```

图 6

```

hLOX      GLPDLVADPYIYQASTYVQKMSMYNLRCAAEEENCLASTAYRADVRDYDHRVLLRFPQRVK 60
hLOXL1    GLPDLVDPNYPVQASTYVQRAHLYSLRCAAEEKCLASTAYAPEATDYDVRVLLRFPQRVK 60
hLOXL2    TAPDLVLNAEMVQQTTYLEDPRPMFMLQCAMEENCLASASAAQTDPT-TGYRRLLRFSQIH 59
hLOXL3    TASDLLLHSAIVQETAYIEDRPLHMLYCAAEEENCLASARSANWP-YGHRRLLRFSQIH 59
hLOXL4    SAPDLVMNAQLVQETAYLEDRLPSQLYCAHEENCLSKSADHMDWP-YGYRRLLRFSQIY 59
          .** : . . : * : : : : : * * * * : : : * : . * * * * . : :

hLOX      NQGTSDFLPSRPRYSWEWHSCHQHYHSMDEFSSHLDLLDANTQRRVAEGHKASFCLEDTSC 120
hLOXL1    NQGTADFLPNRPRHTWEWHSCHQHYHSMDEFSSHLDLLDAATGKKVAEGHKASFCLEDSTC 120
hLOXL2    NNGQSDFRPKNGRHWIWDCHRHYSMEVFTHYDILLNLN-GTKVAEGHKASFCLEDTEC 118
hLOXL3    NLGRADFRPKAGRHSWVWHECHGHYSMDIFTHYDILTPN-GTKVAEGHKASFCLEDTEC 118
hLOXL4    NLGRTDFRPKTCGRDSWVWHQCHRHYSIEVFTHYDILLTLN-GSKVAEGHKASFCLEDTNC 118
          * * : * * * . * : * * * . * * * * : : * : * * : * : * * * * * : *

hLOX      DYG YHRRFACTAH-TQGLSPGCDYTYGADIDCQWIDITDVKPGNYILKVSVPNPSYLVPS 179
hLOXL1    DFGNLKRYACTSH-TQGLSPGCDYTYNADIDCQWIDITDVQPGNYILKVHVPNPKYIVLES 179
hLOXL2    EGDQKQNYECANFGDQGITMGCWDMYRHDIDCQWVDITDVPPGDYLFQVVPNPNFEVAES 178
hLOXL3    QEDVSKRYECANFGEGQGITVGCWDLYRHDIDCQWIDITDVKPGNYILQVVPNPNFEVAES 178
hLOXL4    PTGLQRRYACANFGEGQGVTVGCWDTYRHDIDCQWVDITDVGPNGYIFQVVPNPNFEVAES 178
          . : : * : . * * : : * * * * : * * * * * : * * : * * : * *

hLOX      DYTNNVVRCDIRYTGHHAYASGCTISPY----- 207
hLOXL1    DFTNNVVR CN IHYTGRYVSATNCKIVQS----- 207
hLOXL2    DYSNNIMKCRSRYDGHRIWMYNCHIGGSFSEETEKKFEHFSGLLNNQLSPQ 229
hLOXL3    DFTNNAMKCNC KYDGHRIWVHNCHIGDAFSEEANRRFERYPGQTSNQII-- 227
hLOXL4    DFSNNMLQCRC KYDGHVWLHNCHTGN SYPANAELSLEQEQLRNLI--- 226
          * : : * * : * : * : . *

hLOX      (SEQ ID NO:1)
hLOXL1    (SEQ ID NO:17)
hLOXL2    (SEQ ID NO:3)
hLOXL3    (SEQ ID NO:18)
hLOXL4    (SEQ ID NO:19)

```

图 7