

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 38/17
A61P 35/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02806204.3

[43] 公开日 2004 年 9 月 15 日

[11] 公开号 CN 1529613A

[22] 申请日 2002.3.8 [21] 申请号 02806204.3
[30] 优先权
[32] 2001. 3. 8 [33] US [31] 60/273,957
[86] 国际申请 PCT/IB2002/001959 2002.3.8
[87] 国际公布 WO2002/074323 英 2002.9.26
[85] 进入国家阶段日期 2003.9.8
[71] 申请人 尼莫克斯药品公司
地址 加拿大魁北克省
[72] 发明人 保罗·艾弗巴克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 温宏艳 张广育

权利要求书 5 页 说明书 42 页 附图 16 页

[54] 发明名称 使用神经丝蛋白治疗肿瘤和需要除去或破坏细胞的其它状况的方法

[57] 摘要

本发明涉及使用神经丝蛋白及相关分子治疗需要除去或破坏患者的有害或不需要的细胞, 如良性和恶性肿瘤的状况的方法。

NTP, 122 个氨基酸
(美国专利第 5,830,670, 5,948,636 和 5,948,888 的序列 40)
NCBI Entrez 蛋白登记号 #AAE25447 FID g10048340
氨基酸序列
1 Met-Met-Val-Cys-Trp-Asn-Arg-Phe-Gly-Lys-
M M V C W N R F G K
11 Trp-Val-Tyr-Phe-Ile-Ser-Ala-Ile-Phe-Asn-
W V Y F I S A I F N
21 Phe-Gly-Pro-Arg-Tyr-Leu-Tyr-Ile-Gly-Val-
F G F R Y L Y H G V
31 Pro-Phe-Tyr-Phe-Leu-Ile-Leu-Val-Arg-Ile-
P F Y L I L V R I
41 Ile-Ser-Phe-Leu-Ile-Gly-Asp-Met-Glu-Asp-
I S F L I G D W E D
51 Val-Leu-Leu-Asn-Cys-Thr-Leu-Leu-Lys-Arg-
V L L N C T L L K R
61 Ser-Ser-Arg-Phe-Arg-Phe-Trp-Gly-Ala-Leu-
S S R F R F W G A L
71 Val-Cys-Ser-Met-Asp-Ser-Cys-Arg-Phe-Ser-
V C S M D S C R F S
81 Arg-Val-Ala-Val-Thr-Tyr-Arg-Phe-Ile-Thr-
R V A V T Y R F I T
91 Leu-Leu-Asn-Ile-Pro-Ser-Pro-Ala-Val-Trp-
L L N I P S P A V W
101 Met-Ala-Arg-Asn-Thr-Ile-Asp-Gln-Glu-Val-
M A R N T I D Q Q V
111 Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-
L S R I K L E I K R
121 Cys-Leu-
C L

1. 一种治疗患者状况的方法，所述状况需要除去或破坏细胞，该方法包括给予有需要的哺乳动物治疗有效量的神经丝蛋白(NTP)。

2. 根据权利要求1所述的方法，其中所述NTP是通过选自口服，
5 皮下，真皮内，静脉内，肌内，鞘内，腹膜内，大脑内(实质内)，脑室内，眼内，动脉内，鼻内，瘤内，病变内，局部，和经皮的方法给药。

3. 根据权利要求1所述的方法，其中所述治疗是在患者进行选自
10 外科手术切除，移植，嫁接，化学治疗，免疫治疗，接种，热，微波或电切除，冷冻治疗，激光治疗，光照治疗，基因治疗和放射治疗的治疗之前，之中，或之后给予患者的。

4. 根据权利要求1所述的方法，其中所述状况是组织的良性或恶性肿瘤，所述组织选自肺，乳腺，胃，胰腺，前列腺，膀胱，骨，卵巢，皮肤，肾，窦，结肠，肠，胃，直肠，食道，心脏，脾，唾液腺，
15 血液，脑及其覆盖物，脊髓及其覆盖物，肌肉，结缔组织，肾上腺，甲状旁腺，甲状腺，子宫，睾丸，垂体，生殖器官，肝，胆囊，眼，耳，鼻，咽喉，扁桃体，口腔，和淋巴结及淋巴系统。

5. 根据权利要求1所述的方法，其中所述状况选自组织的增生，肥大或过度生长，所述组织选自肺，乳腺，胃，胰腺，前列腺，膀胱，
20 骨，卵巢，皮肤，肾，窦，结肠，肠，胃，直肠，食道，心脏，脾，唾液腺，血液，脑及其覆盖物，脊髓及其覆盖物，肌肉，结缔组织，肾上腺，甲状旁腺，甲状腺，子宫，睾丸，垂体，生殖器官，肝，胆囊，眼，耳，鼻，咽喉，扁桃体，口腔，和淋巴结及淋巴系统。

6. 根据权利要求5所述的方法，其中所述状况是扁桃体肥大。

25 7. 根据权利要求5所述的方法，其中所述状况是前列腺增生。

8. 根据权利要求1所述的方法，其中所述状况选自病毒，细菌，或寄生虫改变的组织，所述组织选自肺，乳腺，胃，胰腺，前列腺，膀胱，骨，卵巢，皮肤，肾，窦，结肠，肠，胃，直肠，食道，心脏，脾，唾液腺，血液，脑及其覆盖物，脊髓及其覆盖物，肌肉，结缔组织，
30 肾，肾上腺，甲状旁腺，甲状腺，子宫，睾丸，垂体，生殖器官，肝，胆囊，眼，耳，鼻，咽喉，扁桃体，口腔，和淋巴结及淋巴系统。

9. 根据权利要求1所述的方法，其中所述状况是组织的畸形，所

述组织选自肺, 乳腺, 胃, 胰腺, 前列腺, 膀胱, 骨, 卵巢, 皮肤, 肾, 窦, 结肠, 肠, 胃, 直肠, 食道, 心脏, 脾, 唾液腺, 血液, 脑及其覆盖物, 脊髓及其覆盖物, 肌肉, 结缔组织, 肾上腺, 甲状旁腺, 甲状腺, 子宫, 睾丸, 垂体, 生殖器官, 肝, 胆囊, 眼, 耳, 鼻, 咽喉, 扁桃体, 口腔, 和淋巴结及淋巴系统。

10. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述状况是对组织的整容修饰。

11. 根据权利要求 10 所述的方法, 其中所述组织选自皮肤, 眼, 耳, 鼻, 咽喉, 口腔, 肌肉, 结缔组织, 脂肪, 毛发, 和乳腺。

12. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述状况是血管疾病。

13. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述状况是痔疮。

14. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述状况是静脉曲张。

15. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中所述血管疾病是动脉粥样硬化或动脉硬化。

16. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述状况选自炎症性疾病, 自身免疫性疾病, 代谢性疾病, 遗传性/基因性疾病, 创伤性疾病或身体损伤, 营养缺乏性疾病, 感染性疾病, 淀粉样疾病, 纤维化疾病, 贮积病, 先天性畸形, 酶缺陷疾病, 毒化, 中毒, 环境性疾病, 辐射性疾病, 内分泌疾病, 变性疾病, 和机械性疾病。

17. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述 NTP 与选自抗体, 抗体片段, 抗体样结合分子的分子偶联, 连接, 或结合, 其中所述分子对肿瘤或其它目标的结合亲和性比对其它细胞的结合亲和性要高。

18. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述 NTP 与蛋白或其它分子偶联或连接或结合, 其中所述组合物通过肿瘤-或位点-特异性酶或蛋白酶或通过定向于肿瘤或其它不需要的细胞的抗体偶联物而在肿瘤或其它不需要的细胞的位点或该位点附近裂解, 并释放出 NTP。

19. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述 NTP 与蛋白或其它分子偶联或连接或结合, 其中当所要治疗的组织暴露于光(如在激光疗法或其它光-动力或光-活化疗法中), 其它形式的电-磁辐射, 如红外辐射, 紫外辐射, X-射线或 γ -射线辐射, 局部热, α 或 β 辐射, 超声发射或其它局部能量来源后, 所述组合物释放出 NTP。

20. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述 NTP 与适于所治疗适应

症的其它药物组合物，如细胞因子，生长因子，抗生素，编程性细胞死亡诱导剂，抗炎剂，和/或化疗剂联合使用。

21. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述 NTP 与树枝型聚合物，富勒烯，和其它合成分子，聚合物及高分子联合使用，其中所述 NTP
5 与分子，聚合物或高分子偶联，附着或封闭在其中，这是通过自身或与分子结合进行的，所述分子对肿瘤或其它目标的结合亲和性比对其
它细胞的结合亲和性要高。

22. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述 NTP 是单个新克隆的重组分子的一部分，所述单个新克隆的重组分子由 NTP 和选自抗体，抗
10 体片段，及抗体样结合分子的分子组成，其中所述分子对肿瘤或其它目标的结合亲和性比对其它细胞的结合亲和性要高。

23. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述 NTP 选自 AD7c-NTP (SEQ ID NO. 1)，由 SEQ ID NOs. 2-9 鉴定的蛋白，神经胰腺丝蛋白，胰腺
15 丝蛋白及其任何片段，同系物，变体，衍生物，肽模拟物，反向-D 肽和对映异构体。

24. 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述 NTP 是通过选自口服，皮下，真皮内，静脉内，肌内，鞘内，腹膜内，大脑内(实质内)，脑
室内，眼内，动脉内，鼻内，瘤内，病变内，局部，和经皮的方法给药。

25. 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述治疗是在患者进行选
20 自外科手术切除，移植，嫁接，化学治疗，免疫治疗，接种，热或电切除，冷冻治疗，激光治疗，光照治疗，基因治疗和放射治疗之前，
之中，或之后给予患者的。

26. 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述状况是组织的良性或
25 恶性肿瘤，所述组织选自肺，乳腺，胃，胰腺，前列腺，膀胱，骨，卵巢，皮肤，肾，窦，结肠，肠，胃，直肠，食道，心脏，脾，唾液腺，
血液，脑及其覆盖物，脊髓及其覆盖物，肌肉，结缔组织，肾上腺，甲状旁腺，甲状腺，子宫，睾丸，垂体，生殖器官，肝，胆囊，
眼，耳，鼻，咽喉，扁桃体，口腔，和淋巴结及淋巴系统。

27. 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述状况选自组织的增生，
30 肥大或过度生长，所述组织选自肺，乳腺，胃，胰腺，前列腺，膀胱，骨，卵巢，皮肤，肾，窦，结肠，肠，胃，直肠，食道，心脏，脾，

唾液腺, 血液, 脑及其覆盖物, 脊髓及其覆盖物, 肌肉, 结缔组织, 肾上腺, 甲状旁腺, 甲状腺, 子宫, 睾丸, 垂体, 生殖器官, 肝, 胆囊, 眼, 耳, 鼻, 咽喉, 扁桃体, 口腔, 和淋巴结及淋巴系统。

28. 根据权利要求 27 所述的方法, 其中所述状况是扁桃体肥大。

5 29. 根据权利要求 27 所述的方法, 其中所述状况是前列腺增生或痔疮。

30. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中所述状况选自病毒, 细菌, 或寄生虫改变的组织, 所述组织选自肺, 乳腺, 胃, 胰腺, 前列腺, 膀胱, 骨, 卵巢, 皮肤, 肾, 窦, 结肠, 肠, 胃, 直肠, 食道, 心脏, 10 脾, 唾液腺, 血液, 脑及其覆盖物, 脊髓及其覆盖物, 肌肉, 结缔组织, 肾上腺, 甲状旁腺, 甲状腺, 子宫, 睾丸, 垂体, 生殖器官, 肝, 胆囊, 眼, 耳, 鼻, 咽喉, 扁桃体, 口腔, 和淋巴结及淋巴系统。

31. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中所述状况是组织的畸形, 所述组织选自肺, 乳腺, 胃, 胰腺, 前列腺, 膀胱, 骨, 卵巢, 皮肤, 15 肾, 窦, 结肠, 肠, 胃, 直肠, 食道, 心脏, 脾, 唾液腺, 血液, 脑及其覆盖物, 脊髓及其覆盖物, 肌肉, 结缔组织, 肾上腺, 甲状旁腺, 甲状腺, 子宫, 睾丸, 垂体, 生殖器官, 肝, 胆囊, 眼, 耳, 鼻, 咽喉, 扁桃体, 口腔, 和淋巴结及淋巴系统。

32. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中所述状况是对组织的整容 20 修饰。

33. 根据权利要求 32 所述的方法, 其中所述组织选自皮肤, 眼, 耳, 鼻, 咽喉, 口腔, 肌肉, 结缔组织, 脂肪, 毛发, 和乳腺。

34. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中所述状况是血管疾病。

35. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中所述状况是痔疮。

25 36. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中所述状况是静脉曲张。

37. 根据权利要求 30 所述的方法, 其中所述血管疾病是动脉粥样硬化或动脉硬化。

38. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中所述状况选自炎症性疾病, 自身免疫性疾病, 代谢性疾病, 遗传性/基因性疾病, 创伤性疾病或身体损伤, 营养缺乏性疾病, 感染性疾病, 淀粉样疾病, 纤维化疾病, 30 贮积病, 先天性畸形, 酶缺陷疾病, 毒化, 中毒, 环境性疾病, 辐射性疾病, 内分泌疾病, 变性疾病, 和机械性疾病。

39. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中所述 NTP 与选自抗体, 抗体片段, 抗体样结合分子的分子偶联, 连接, 或结合, 其中所述分子对肿瘤或其它目标的结合亲和性比对其它细胞的结合亲和性要高。

5 40. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中所述 NTP 是单个新克隆的重组分子的一部分, 所述单个新克隆的重组分子由 NTP 和选自抗体, 抗体片段, 及抗体样结合分子的分子组成, 其中所述分子对肿瘤或其它目标的结合亲和性比对其它细胞的结合亲和性要高。

10 41. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中所述 NTP 与蛋白或其它分子偶联或连接或结合, 其中所述组合物通过肿瘤-或位点-特异性酶或蛋白酶或通过针对肿瘤或其它不需要的细胞的抗体偶联物而在肿瘤或其它不需要的细胞的位点或该位点附近裂解, 并释放出 NTP。

15 42. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中所述 NTP 与蛋白或其它分子偶联或连接或结合, 其中当所要治疗的组织暴露于光(如在激光疗法或其它光-动力或光-活化疗法中), 其它形式的电-磁辐射, 如红外辐射, 紫外辐射, X-射线或 γ -射线辐射, 局部热, α 或 β 辐射, 超声发射或其它局部能量来源后, 所述成分释放出 NTP。

43. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中所述 NTP 与适于所治疗适应症的其它药物组合物, 如细胞因子, 生长因子, 抗生素, 编程性细胞死亡-诱导剂, 抗炎剂, 和/或化疗剂联合使用。

20 44. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中所述 NTP 与树枝型聚合物, 富勒烯, 和其它合成分子, 聚合物及高分子联合使用, 其中所述 NTP 与分子, 聚合物或高分子偶联, 附着或封闭在其中, 这是通过自身或与分子联合进行的, 所述分子对肿瘤或其它目标的结合亲和性比对其它细胞的结合亲和性要高。

25 45. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中所述 NTP 是单个新克隆的重组分子的一部分, 所述单个新克隆的重组分子由 NTP 和选自抗体, 抗体片段, 及抗体样结合分子的分子组成, 其中所述分子对肿瘤或其它目标的结合亲和性比对其它细胞的结合亲和性要高。

30 46. 一种治疗患者状况的方法, 所述状况需要除去或破坏细胞, 该方法包括给予肿瘤或其它靶细胞治疗有效量的 NTP 基因, 其中诱导所述 NTP 基因的表达从而导致 NTP 蛋白的表达。

使用神经丝蛋白治疗肿瘤和需要除去或
破坏细胞的其它状况的方法

5

发明领域

本发明涉及使用神经丝蛋白 (neural thread protein, NTP) 及相关分子治疗需要除去或破坏细胞元件的状况, 如人的良性或恶性肿瘤的方法。所述方法包括, 但不限制于, 单独或与载体偶联, 肌内, 口服, 静脉内, 鞘内, 瘤内, 鼻内, 局部, 经皮等给予该化合物。

10

发明背景

很多医学治疗和操作的本质都涉及有害或不需要的组织的除去或破坏。这种重要治疗的例子包括外科手术除去癌的生长, 通过化疗破坏转移瘤, 和减少腺体 (例如, 前列腺) 增生。其它例子包括除去不需要的的面部毛发, 除去疣, 和除去不需要的脂肪组织。

15

人们非常需要一种能够破坏并因此促进除去或抑制有害或不需要的细胞及组织进一步生长的有效试剂, 而且这种试剂主要发挥局部作用, 而且全身毒性达到最小或没有。

神经丝蛋白及其相关分子就是这种试剂。

癌和良性肿瘤的过度生长

20

癌是细胞内部调节机制的异常, 可导致细胞的无控生长和繁殖。正常细胞构成组织, 而且当这些细胞失去它们作为特化, 受控, 和协调单位 (去分化) 的能力时, 缺陷可导致在细胞群之间的混乱。当这些情况发生时, 肿瘤形成。

组织的良性过度生长也属异常, 因此需要除去生物体中的细胞。

25

良性肿瘤是指细胞增殖, 它不会转移到整个机体, 但会引起疾病症状。如果这些肿瘤位于器官, 如脑中难以接近的区域, 那么它们可能是致命的。有很多器官都会发生良性肿瘤, 如肺, 脑, 皮肤, 垂体, 甲状腺, 肾上腺皮质和髓质, 卵巢, 子宫, 睾丸, 结缔组织, 肌肉, 肠, 耳, 鼻, 咽喉, 扁桃体, 口腔, 肝, 胆囊, 胰腺, 前列腺, 心脏, 和其它器官。

30

癌症的治疗

外科手术常常是癌症治疗的第一步。进行外科手术的目的不尽相

同。有时是为了除去尽可能多的显著肿瘤，或至少使它“去容积（debulk）”（除去肿瘤的绝大部分体积，以便减少对其它治疗方法的需要）。根据癌症类型和位置的不同，外科手术还应该为患者提供某些症状的缓解。例如，如果外科医生除去扩张脑肿瘤的一大部分，
5 则颅内压降低，导致患者的症状改善。

并不是所有肿瘤都能够经受外科手术。位于身体某些部分的肿瘤就不能完全除去。这些肿瘤的例子是脑干（脑的一部分，可控制呼吸）中的肿瘤或在主要血管之中和周围生长的肿瘤。在这些情况下，由于与除去肿瘤相关的危险性很高，因此外科手术的作用有限。

10 在某些情况下，并不使用外科手术脱去大部分肿瘤，这是因为它不是必需的。其中一个例子是何杰金氏淋巴瘤，一种淋巴结癌，它对化疗和放疗联合的反应非常好。在何杰金氏淋巴瘤中，很少需要利用外科手术治疗，但几乎总是用于确立诊断。

化疗是癌症治疗的另一种普遍形式。本质上，它包括药物（通常是口服或注射给药）的使用，该药物特异性攻击机体中迅速分裂的细胞（例如，在肿瘤中发现的那些）。这使得化疗可有效用于治疗已经转移的癌症，以及很可能通过血液和淋巴系统扩散，但在原发肿瘤之外并不显著的肿瘤。化疗还可用于提高局部肿瘤对外科手术和放疗的反应。例如，某些头颈部癌。

20 不幸地是，人体中正常迅速分裂的其它细胞（如，胃和毛发的衬细胞）也会受到化疗的影响。由于这个原因，有些（虽然不是全部）化疗剂可导致恶心或脱发。这些副作用是暂时的。而且医生可进行药物处理，他们可为减轻这些副作用提供帮助。因此，通常，化疗可被患者较好地耐受。随着我们知识的不断增长，研究人员已经开发了更
25 新的化疗剂，它们不仅可以更好地杀死癌细胞，而且对患者的副作用更小。

化疗可以各种方式给予患者。有些是丸剂，可每天服用，或一周一次或按照其它方案给药，还有一些是通过静脉内注射给药。对于可注射的化疗剂而言，患者可到医生办公室或医院进行治疗。其它化疗
30 剂需要1天24小时连续输注到血流中。对于这些类型的化疗剂而言，可进行一次较小的外科手术操作，植入一个小泵，由患者佩戴。然后，该泵缓慢地给予药物。在许多情况中，永久口位于患者的静脉中，从

而免去了重复扎针的需要。

放疗是抗癌中经常使用的另一个武器。放疗通过破坏肿瘤细胞内的 DNA 而杀死细胞。放疗以两种可能的方式“施用”。首先，而且最普遍的是，以高度准确的方式将射线束对准患者的肿瘤。为了操作，患者躺在桌子上，射线束围绕他/她移动。这只需花费几分钟，但要每周 5 天，连续治疗 3-6 周（取决于肿瘤的类型），从而达到特定的总的规定“剂量”。

有时也可使用其它放疗方法，称作短疗法（brachytherapy），包括将放射性颗粒状物（“种子”）或线植入机体中的肿瘤区域。植入物可以是临时的或永久的。对于永久植入物而言，种子中的射线在几天或几周后衰退或逐渐消失，这样一来，患者就不是放射性的了。对于临时植入物而言，放疗的全部剂量通常在大约 2 天内递送，而且在那段时间，患者必需留院观察。对于两种类型的短疗法而言，射线通常被递送到非常特定的区域，从而局部控制癌症（与化疗法治疗整个机体相反）。

某些高度选择的患者可进行骨髓移植。进行该过程通常是因为患者患有癌症，特别是侵入性癌症，或是因为用常规疗法治疗之后，癌症复发。骨髓移植是一个复杂的过程。有很多种类型，而且它们引起副作用和治疗的可能性不同。绝大多数移植是在特定的中心进行的，而且在很多情况下，它们的使用被认为是研究性的。

还有很多其它疗法，虽然它们中绝大多数仍然处于临床试验阶段，而且仍然没有成为标准方法。例子包括免疫疗法，单克隆抗体，抗-血管生成因子，和基因疗法的使用。

免疫疗法：有多种技术都被设计用来帮助患者自身的免疫系统抵抗癌症，它们与放疗或化疗完全不同。有时为了达到目的，研究人员用特殊来源的疫苗给患者注射。这方面的绝大多数研究已经在黑素瘤上进行，虽然现在也针对其它癌症。

单克隆抗体：这些是被特别设计用来附着癌细胞（而不是正常细胞）的小蛋白，利用的是癌细胞和非-癌细胞的细胞膜差异。在把抗体给予患者之前，它们常常是与各种细胞毒性化合物“标记”（附着），或被制成放射性的，这样所述抗体优选定向于癌细胞，由此将毒性试剂递送给预定的细胞。

抗-血管发生因子: 由于癌细胞的迅速分裂和肿瘤的生长, 不久, 它们的生长会超过血液的供给。为了补偿, 某些肿瘤会分泌出一种化合物, 可帮助诱导它们附近血管的生长, 由此确保给癌细胞连续提供营养物。近来, 研究人员正在研究避开这个过程 (终止血管生长) 的方法。

基因疗法: 癌是一系列突变的产物, 最终导致癌细胞的产生及其过度增殖。癌症可通过下列方法治疗, 即把基因引入到癌细胞中, 阻止或终止癌的增殖, 启动细胞的程序性细胞机制, 从而破坏细胞, 提高细胞的免疫识别, 或表达可转化成毒性代谢物的前体药物或抑制肿瘤生长的细胞因子。

良性肿瘤和畸形的治疗

良性肿瘤和畸形也可通过各种方法治疗, 包括外科手术, 放疗, 药物治疗, 热或电切除, 冷冻疗法等。虽然良性肿瘤不会转移, 但它们会越长越大并复发。良性肿瘤的外科手术摘除具有一般外科手术的所有困难和副作用, 而且对于某些良性肿瘤而言, 常常需要反复进行, 如垂体腺瘤, 脑膜瘤, 前列腺增生等。

还有其它涉及不需要的细胞元件的疾病, 其中选择性的细胞除去是必需的。例如, 心脏病和中风通常是由动脉粥样硬化引起的, 它是纤维脂肪性和修饰过的平滑肌元件的增殖损害, 可使血管壁扭曲, 腔变狭窄, 血流收缩, 易有病灶性血块, 并最终导致阻塞和梗塞。对动脉粥样硬化的各种治疗包括旁路移植; 人工移植; 血管成形术及再造管术, 刮除术, 辐射, 激光或其它除去; 通过减少脂类抑制动脉粥样硬化的药物治疗; 抗凝疗法; 和饮食, 锻炼, 及生活方式的一般性方法。因此, 需要一种除去动脉粥样硬化损害, 而且没有外科手术过程的危险和副作用的方法。

需要进行选择性细胞除去的, 不需要的细胞元件的其它例子包括病毒诱导的生长, 如疣。另一个例子是在炎症状况中发现的肥大炎症团块, 和肥大瘢痕或瘢痕瘤。其它例子是在整容领域发现的, 如不需要的毛发, 例如, 面部毛发的除去, 或用于整容目的的不需要的组织区域收缩, 如面部的真皮和结缔组织, 或四肢的真皮和结缔组织。

其它例子对于本领域那些技术人员而言是显而易见的。在全部或绝大多数的这些例子中, 需要这样一种治疗, 它可除去或破坏不需要

的细胞元件，而且没有常规疗法的危险和副作用，或可更准确地除去不需要的细胞元件。

神经丝蛋白

神经丝蛋白 (NTP) 是目前描述过的脑蛋白的一个新家族。这个家族的其中一个成员，AD7C-NTP，是一个约 41 kD 的膜相关磷蛋白，它的功能与神经突出芽和细胞死亡有关 (de la Monte 等, *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-3104 (1997) ; de la Monte 等, *Alz. Rep.*, 2: 327-332 (1999) ; de la Monte SM 和 Wands JR, *Journal of alzheimer's Disease*, 3: 345-353 (2001))。AD7C-NTP 的基因和预测的蛋白序列已经被鉴定并描述过 (de la Monte 等, *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-3104 (1997))。除了约 41 kD 的种类外，其它种类的神经丝蛋白 (约 26 kD, 约 21 kD, 约 17 kD, and 约 15kD) 也已经被鉴定过，而且与神经外胚层肿瘤，星形细胞瘤，和成胶质细胞瘤有关，而且与低氧，缺血，或脑梗塞导致的损伤有关 (Xu 等, *Cancer Research*, 53: 3823-3829 ; de la Monte 等, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55 (10): 1038-50 (1996) , de la Monte 等, *J. Neurol. Sci.*, 138 (1-2): 26-35 (1996) ; de la Monte 等, *J. Neurol. Sci.*, 135 (2): 118-25 (1996) ; de la Monte 等, *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-3104 (1997) ; 和 de la Monte 等, *Alz. Rep.*, 2: 327-332 (1999))。

神经丝蛋白已经被描述过并要求了保护，例如见美国专利第 5,948,634; 5,948,888; 和 5,830,670, “神经丝蛋白的表达和阿尔茨海默氏病的检测” 和美国专利第 6,071,705, “检测神经疾病或功能障碍的方法”。这些专利的方法和详细特别说明引入此处作为参考。

有强有力的证据证明 AD7C-NTP 与阿尔茨海默氏病 (AD) 有关。与对照组相比，AD7C-NTP 的 mRNA 在 AD 患者的脑中上调；AD 患者脑中和 CSF 中的 AD7C-NTP 蛋白水平要对照组高；而且 AD7C-NTP 的免疫反应性是在 AD 和唐氏综合症患者脑中的老年斑，神经原纤维缠结 (NFT)，退化神经元，神经纤维网丝，和营养不良性神经神经芽中找到的 (Ozturk 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 419-423 (1989) ; de la Monte 等, *J. Clin. Invest.*, 86 (3): 1004-13 (1990) ; de la Monte 等, *J. Neural. Sci.*, 113 (2): 152-64 (1992) ; de la Monte 等, *Ann.*

Neurol., 32 (6): 733-42 (1992); de la Monte 等, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55 (10): 1038-50 (1996), de la Monte 等, *J. Neurol. Sci.*, 138 (1-2): 26-35 (1996); de la Monte 等, *J. Neurol. Sci.*, 135 (2): 118-25 (1996); de la Monte 等, *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-3104 (1997); 和 de la Monte 等, *Alz. Rep.*, 2: 327-332 (1999)). AD7C-NTP 已经在唐氏综合症患者的脑组织中鉴定过(Wands 等, 国际专利公开号 WO 90/06993; de la Monte 等, *Alz. Rep.*, 2: 327-332 (1999)). AD7C-NTP 与阿尔茨海默氏病的细胞死亡过程有关(de la Monte 和 Wands, *J. Neuropathol. and Exp. Neuro.*, 60: 195-207 (2001)).

现有技术仍然需要一种新的, 毒性较小的治疗方法来治疗不需要的细胞元件。本发明满足了这些需要。

发明概述

本发明涉及新的治疗不需要的细胞增殖, 如良性和恶性肿瘤, 腺(例如, 前列腺)增生, 不需要的面部毛发, 疣, 和不需要的脂肪组织的方法。这种方法包括给予有需要的哺乳动物治疗有效量的神经丝蛋白(NTP)。

NTP 可单独或与载体或抗体偶联给药。此外, NTP 可与治疗良性和恶性肿瘤及其它不需要的或有害细胞生长的疗法联合使用。

前面的一般性描述和下面的详细描述是为了举例和说明, 并为本发明的权利要求提供进一步的解释。根据下面本发明的详细描述, 其它目的, 优点, 和新的特征对于本领域那些技术人员而言都是显而易见的。

附图简述

图 1: 表示 AD7c-NTP 基因和该基因 AD7c-NTP 蛋白产物的完全氨基酸序列及核酸序列。(美国专利第 5,830,670, 5,948,634, 和 5,948,888; de la Monte 等, *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-3104 (1997) 的序列 120 和 121; NCBI Entrez-蛋白登记号 #AAC08737; PID g3002527) [SEQ ID NO. 1]。

图 2: 表示 122 个氨基酸的神经丝蛋白的完全氨基酸序列(美国专利第 5,830,670, 5,948,634, 和 5,948,888 的序列 40; NCBI Entrez-蛋白登记号 #AAE25447 PID g10048540) [SEQ ID NO. 2]。

图 3:表示 112 个氨基酸的神经丝蛋白的完全氨基酸序列 (NCBI Entrez-蛋白登记号#XP_032307 PID g15928971) [SEQ ID NO. 3]。

图 4:表示 106 个氨基酸神经丝蛋白样蛋白的完全氨基酸序列 (NCBI Entrez-蛋白登记号#AAH14951 PID g15928971) [SEQ ID NO. 4]。

图 5:表示 106 个氨基酸的神经丝蛋白样蛋白的完全氨基酸序列 (NCBI Entrez-蛋白登记号#XP_039102 PID g18599339) [SEQ ID NO. 5]。

图 6:表示 98 个氨基酸的神经丝蛋白的完全氨基酸序列 (美国专利第 5,830,670, 5,948,634, 和 5,948,888 的序列 30; NCBI Entrez-蛋白登记号#AAE25445, PID g10048538) [SEQ ID NO. 6]。

图 7:表示 75 个氨基酸的神经丝蛋白的完全氨基酸序列 (源于美国专利第 5,830,670, 5,948,634, 和 5,948,888 的序列 48; NCBI Entrez-蛋白登记号#AAE25448, PID g10048541) [SEQ ID NO. 7]。

图 8:表示 68 个氨基酸的神经丝蛋白的完全氨基酸序列 (源于美国专利第 5,830,670, 5,948,634, 和 5,948,888 的序列 36; NCBI Entrez-蛋白登记号#AAE25446, PID g10048539) [SEQ ID NO. 8]。

图 9:表示 61 个氨基酸的神经丝蛋白样蛋白的完全氨基酸序列 (NCBI Entrez-蛋白登记号#AAH02534, PID g12803421) [SEQ ID NO. 9]。

图 10: 表示注射后 24 小时, AD7C-NTP 注射位点的皮下组织和肌肉坏死。光学显微镜检查, 苏木精和曙红染剂, x400;

图 11: 表示注射后 24 小时, AD7C-NTP 注射位点的皮下组织和肌肉坏死。光学显微镜检查, 苏木精和曙红染剂, x400;

图 12: 表示注射后 24 小时, AD7C-NTP 注射位点的皮下组织和肌肉坏死。光学显微镜检查, 苏木精和曙红染剂, x400;

图 13: 表示注射后 24 小时, AD7C-NTP 注射位点的皮下组织和肌肉坏死。光学显微镜检查, 苏木精和曙红染剂, x1000;

图 14: 表示注射后 24 小时, AD7C-NTP 注射位点的皮下组织和肌肉坏死。光学显微镜检查, 苏木精和曙红染剂, x1000;

图 15:表示 AD7C-NTP 注射后 24 小时的肿瘤坏死。光学显微镜检查, 苏木精和曙红染剂, x200;

图 16: 表示 AD7C-NTP 注射后 24 小时的肿瘤坏死。光学显微镜检查, 苏木精和曙红染剂, x400;

图 17: 表示 AD7C-NTP 注射后 24 小时的肿瘤坏死。光学显微镜检查, 苏木精和曙红染剂, x1000;

5 图 18: 表示 AD7C-NTP 注射后 24 小时的肿瘤坏死。光学显微镜检查, 苏木精和曙红染剂, x40; 和

图 19: 表示 AD7C-NTP 注射后 24 小时的肿瘤坏死。光学显微镜检查, 苏木精和曙红染剂, x200。

优选实施方案的详细描述

10 定义

除非另有说明, 这里使用的术语和短语在下面定义。

术语“AD7c-NTP”是指约 41kD 的蛋白, 编码它的基因和核酸序列, 它们在 de la Monte 等, *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-104 (1997), 美国专利第 5,948,634, 5,948,888, 和 5,830,670 的序列 120 及 121
15 和 Gen Bank #AF010144 中描述, 它的核酸及氨基酸序列在图 1 中列出。术语“AD7c-NTP”还包括 AD7c-NTP 的生物活性片段, 变体和衍生物, 同系物, 肽模拟物, 反向-D 肽, 和对映异构体。

术语“NTP”或“神经丝蛋白”是指神经丝蛋白及相关分子(包括胰腺丝蛋白)和编码这些蛋白的核酸序列, 还包括(但不限制于)下列蛋白和编码这些蛋白氨基酸序列的核酸序列:

(a) AD7c-NTP;

(b) 神经丝蛋白的约 42, 约 26, 约 21, 约 17, 约 14, 和约 8kD 种类, 在美国专利第 5,948,634, 5,948,888, 5,830,670, 和 6,071,705 及 de la Monte 等, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55(10):1038-
25 50(1996), de la Monte 等, *J. Neurol. Sci.*, 138(1-2):26-35(1996); de la Monte 等, *J. Neurol. Sci.*, 135(2):118-25(1996), de la Monte 等, *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-3104(1997) 和 de la Monte 等, *Alz. Rep.*, 2: 327-332(1999) 中描述;

(c) 由保藏在美国典型培养物保藏中心, Manassas, Va., 保藏号为 HB-12546 的单克隆抗体#2 或保藏在美国典型培养物保藏中心, Manassas Va., 保藏号为 HB-12545 的单克隆抗体特异性识别的蛋白;

(d) 由 AD7c-NTP 基因编码的蛋白;

(e) 122 个氨基酸的神经丝蛋白, 在美国专利第 5,830,670, 5,948,634, 和 5,948,888 的序列 40 中描述, 并在 NCBI Entrez-蛋白登记号 #AAE25447, PID g10048540 中列出, 它的氨基酸序列在图 2 中列出;

5 (f) 112 个氨基酸的神经丝蛋白, 在 NCBI Entrez-蛋白登记号 #XP_032307, PID g14725132 中列出, 它的氨基酸序列在图 3 中列出;

(g) 106 个氨基酸的神经丝蛋白样蛋白, 在 NCBI Entrez-蛋白登记号 #AAH14951 PID g15928971 中列出, 它的氨基酸序列在图 4 中列出;

10 (h) 106 个氨基酸的神经丝蛋白样蛋白, 在 NCBI Entrez-蛋白登记号 #XP_039102, PID g18599339 中列出, 它的氨基酸序列在图 5 中列出;

(i) 98 个氨基酸的神经丝蛋白, 在美国专利第 5,830,670, 5,948,634, 和 5,948,888 的序列 30 中描述, 并在 NCBI Entrez-蛋白登记号 #AAE25445, PID g10048538 中列出, 它的氨基酸序列在图 6 中列出;

20 (j) 75 个氨基酸的神经丝蛋白, 在美国专利第 5,830,670, 5,948,634, 和 5,948,888 的序列 48 中描述, 并在 NCBI Entrez-蛋白登记号 #AAE25448, PID g10048541 中列出, 它的氨基酸序列在图 7 中列出;

(k) 68 个氨基酸的神经丝蛋白, 在美国专利第 5,830,670, 5,948,634, 和 5,948,888 的序列 36 中描述, 并在 NCBI Entrez-蛋白登记号 #AAE25446, PID g10048539 中列出, 它的氨基酸序列在图 8 中列出;

25 (l) 61 个氨基酸的神经丝蛋白-样蛋白, 在 NCBI Entrez-蛋白登记号 #AAH02534, PID g12803421 中列出, 它的氨基酸序列在图 9 中列出;

(m) 胰腺丝蛋白;

30 (n) 神经胰腺丝蛋白 (nPTP), 在美国专利第 6,071,705 中描述; 和

(o) 由杂交瘤产生的抗体特异性识别的蛋白, 所述杂交瘤是保藏在美国典型培养物保藏中心的 HB 9934, HB 9935, 和 HB 9936。

术语“NTP”还包括 NTP 的生物活性片段，变体和衍生物，同系物，肽模拟物，反向-D 肽，及对映异构体。

术语“生物活性的”是指这样的蛋白，多肽片段，变体，衍生物，同系物，反向-D 肽，肽模拟物，或对映异构体，它们具有破坏并因此促进除去或抑制有害或不需要的细胞及组织的能力，但主要是局部作用，全身毒性达到最小或没有，而且具有（但不限制于）杀死或降低此处实施例 1 的细胞培养物细胞毒性测定法中细胞生存力的能力，具有引起此处实施例 2 的体内组织测定法中细胞损耗和/或组织坏死的能力，或具有引起此处实施例 3 的肿瘤测定法中细胞损耗，组织坏死或肿瘤收缩的能力。

术语“片段”是指由 NTP 蛋白或其变体，衍生物，同系物，反向-D 肽或对映异构体的氨基酸序列的连续亚序列组成的生物活性蛋白或多肽，还包括天然存在的片段，例如由天然存在的体内蛋白酶的活性产生的剪接变体和片段。这种片段可在氨基末端，羧基末端，和/或内部（例如通过天然剪接）截短，还可以是 NTP 蛋白的变体或衍生物。这种片段可以使用或不用氨基末端的甲硫氨酸制备。术语“片段”包括来源于同一 NTP 蛋白的相同或不同片段，或具有或不具有共有的，直接或通过键连接在一起的连续氨基酸序列的片段。

术语“变体”是指这样的生物活性蛋白或多肽，其中与 NTP 蛋白的氨基酸相比，存在着一个或多个氨基酸的取代，缺失和/或插入，还包括 NTP 蛋白天然存在的等位基因变体或可变剪接变体。术语“变体”包括用相似或同源的氨基酸或不相似的氨基酸替换肽序列中的一个或多个氨基酸。把氨基酸分为相似或同源的标准有很多。(Gunnar von Heijne, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, p.123-39 (Academic Press, New York, NY 1987)。优选变体包括一个或多个氨基酸位置的丙氨酸取代。其它优选的取代包括保守取代，它对总的净电荷，极性，或蛋白疏水性的影响很小或没有影响。保守取代在下面的表 I 中列出。

表 I
保守氨基酸取代

5	碱性:	精氨酸
		赖氨酸
		组氨酸
10	酸性:	谷氨酸
		天门冬氨酸
	不带电极性:	谷氨酰胺
15		天门冬酰胺
		丝氨酸
		苏氨酸
20	非-极性:	酪氨酸
		苯丙氨酸
		色氨酸
25		半胱氨酸
		甘氨酸
		丙氨酸
30		缬氨酸
		脯氨酸
		甲硫氨酸
35		亮氨酸
		异亮氨酸

25 表 II 列出氨基酸取代的其它方案:

表 II

	原始残基	取代
30	Ala	gly; ser
	Arg	lys
	Asn	gln; his
35	Asp	glu
	Cys	ser

	Gln	asn
	Glu	asp
	Gly	ala; pro
	His	asn; gln
5	Ile	leu; val
	Leu	ile; val
	Lys	arg; gln; glu
	Met	leu; tyr; ile
	Phe	met; leu; tyr
10	Ser	thr
	Thr	ser
	Trp	tyr
	Tyr	trp; phe
	Val	ile; leu

- 15 其它变体可由较少的氨基酸取代组成，例如选择作用明显不同的残基，所述作用是指维持(a) 取代区域中多肽主链的结构，例如，折叠或螺旋构象，(b) 靶位点的分子电荷或疏水性，或(c) 侧链的大小。通常对功能具有更显著影响的取代是其中(a) 甘氨酸和/或脯氨酸被其它氨基酸取代，或被缺失或插入；(b) 亲水残基，例如，丝氨酰基或苏
- 20 氨酰基，取代疏水残基，例如亮氨酰基，异亮氨酰基，苯丙氨酰基，缬氨酰基或丙氨酰基（或被其取代）；(c) 半胱氨酸残基取代任何其它的残基（或被其取代）；(d) 具有正电性侧链的残基，例如赖氨酰基，精氨酰基，或组氨酰基，取代带有负电荷的残基，例如谷氨酰基或天门冬氨酰基（或被其取代）；或(e) 具有庞大侧链的残基，例如，苯丙
- 25 氨酸，取代不具有这种侧链，例如甘氨酸的残基（或被其取代）的那些。其它变体包括被设计产生新的糖基化和/或磷酸化位点的那些，或被设计缺失现有糖基化和/或磷酸化位点的那些。变体在糖基化位点，蛋白水解裂解位点和/或半胱氨酸残基含有至少一个氨基酸取代。变体还包括在连接肽上的 NTP 氨基酸序列之前或之后，具有附加氨基酸残
- 30 基的 NTP 蛋白，片段，衍生物，同系物，反向-D 肽和对映体。例如，为了通过二硫键的形成而使 NTP 片段环化，可将半胱氨酸残基加入到 NTP 片段的氨基和羧基末端。术语“变体”还包括 NTP 或 AD7c-NTP 的

片段, 衍生物, 同系物, 反向-D 肽和对映异构体的变体。

术语“衍生物”是指生物活性, 化学修饰的蛋白或多肽, 它们已经通过自然过程, 如加工和其它翻译后修饰而被化学修饰, 还可通过化学修饰技术而被化学修饰, 例如, 加入一个或多个聚乙二醇分子, 糖, 磷酸盐, 和/或其它这种分子, 所述分子与野生型 NTP 蛋白不是自然连接的。衍生物包括盐。这种化学修饰已经在基础教材, 更详细的专论和大量研究文献中很好地描述, 而且它们对于本领域那些技术人员而言是熟知的。我们应当认识到, 相同类型的修饰可以相同或不同程度存在于已知蛋白或多肽的多个位点。而且, 已知的蛋白或多肽还可含有许多类型的修饰。修饰可在蛋白或多肽的任何地方发生, 包括肽主链, 氨基酸侧链, 和氨基或羧基末端。修饰包括, 例如, 乙酰化, 酰化, ADP 核糖基化, 酰胺化, 黄素的共价连接, 血红素部分的共价连接, 核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接, 脂类或脂类衍生物的共价连接, 磷酸酯肌醇的共价连接, 交联, 环化, 二硫键的形成, 脱甲基化, 共价交联的形成, 半胱氨酸的形成, 焦谷氨酸盐的形成, 甲酰化, γ -羧化, 糖基化, GPI 锚的形成, 羟基化, 碘化, 甲基化, 肉豆蔻酰基化, 氧化, 蛋白水解加工, 磷酸化, 异戊二烯化, 外消旋化, 糖基化, 脂类连接, 硫酸化, 谷氨酸残基的 γ -羧化, 羟基化和 ADP-核糖基化, 硒化, 硫酸化, 转运 RNA 介导的氨基酸到蛋白的加入, 如精氨酰化, 和遍在化。见, 例如, *Proteins--Structure And Molecular Properties*, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993) 和 WoldF., “翻译后的蛋白的修饰: 透视和前景,” pgs. 1-12 in *Posttranslational Covalent Modification Of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983); Seifter 等, *Meth. Enzymol.* 182: 626-646 (1990) 和 Rattan 等, “蛋白合成: 翻译后的修饰和老化,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 663: 48-62 (1992)。术语“衍生物”包括使蛋白或多肽变为分枝的或环状的, 有或没有分支的化学修饰。环状的, 分枝的及分枝环状的蛋白或多肽可由翻译后的自然过程产生, 并通过完全合成方法制造。术语“衍生物”还包括片段, 变体, 同系物, 反向-D 肽, 肽模拟物, 和对映异构体的衍生物。

术语“同系物”是指与 NTP 蛋白或 AD7c-NTP 的氨基酸序列至少 75

%相同的生物活性蛋白，这一点是利用通常用于比较两个多肽氨基酸位置相似性的标准方法测定的。两个蛋白之间相似性或同一性的程度可通过已知方法很容易地计算，包括但不限于在 *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988 ; *Biocomputing : Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993 ; *Computer Analysis of Sequence Data*, Part I, Griffin, A. M., 和 Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987 ; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. 和 Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; 和 Carillo H. 和 Lipman, D., SIAM, *J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988) 中描述的那些。测定同一性的优选方法被设计在两个测试序列之间提供最大的匹配。在可公开得到的计算机程序中汇编测定同一性和相似性的方法。

15 测定两个序列之间的同一性和相似性的优选计算机程序方法包括，但不限制于，GCG 程序包 (Devereux, J. 等, *Nucleic Acids Research*, 12(1): 387 (1984)) , BLASTP, BLASTN, 和 FASTA , Atschul, S. F. 等, *J. Molec. Biol.*, 215: 403-410 (1990)。BLAST X 程序是从 NCBI 和其它来源公开得到的 (BLAST Manual, Altschul, S. 等, NCBI NLM NIH Bethesda , Md. 20894 ; Altschul, S. 等 , *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1990)。作为实例，使用计算机算法，如 GAP (Genetic Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.)，将待测定序列同一性百分比的两个蛋白或多肽进行序列比对，从而使各自的氨基酸最佳匹配 (“匹配的跨距”，通过算法测定)。空位开放罚分 (按照平均对角线的 3 倍计算；“平均对角线”是所用比较矩阵的对角线的平均值；“对角线”是根据特定比较矩阵得到的每个完全氨基酸的值或数) 和空位伸展罚分 (它通常是缺口开放困难的 1/10)，以及比较矩阵，

25 如 PAM 250 或 BLOSUM 62 是与算法联合使用的。标准比较矩阵 (PAM250 比较矩阵见 Dayhoff 等, in: *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5, supp. 3 [1978]; BLOSUM 62 比较矩阵见 Henikoff 等, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 10915-10919 [1992]) 也被算法使用。然后通过算法计算同一性百分比。与 NTP 或 AD7c-NTP 相比，同

30

系物通常具有一个或多个氨基酸取代, 缺失, 和/或插入。

术语“肽模拟物”是指模拟肽或蛋白的生物活性, 但化学性质不再是肽性的生物活性化合物, 即, 它们不再含有任何肽键(即, 氨基酸之间的酰胺键)。这里的肽模拟物广义上包括性质上不再是完全肽性的分子, 如假肽, 半肽和类肽。广义肽模拟物的例子在下面描述(其中肽的一部分被没有肽键的结构替换)。不论完全还是部分的非-肽, 本发明的肽模拟物都可提供反应化学部分的空间排列, 它们以肽模拟物为基础, 近似模拟 NTP 蛋白活性基团的三维排列。由于活性位点几何学的这种相似性, 肽模拟物对与肽生物活性相似的生物系统有影响。优选本发明的肽模拟物与上述 NTP 肽的三维形态和生物活性基本相似。本领域已知的, 对肽进行结构修饰, 从而生产肽模拟物的方法的例子包括主链手性中心的反转, 它可产生 D-氨基酸残基结构, 这种结构可以, 特别是在 N-末端可以提高对蛋白水解降解的稳定性, 而且不会对活性产生不利的影响。其中一个实例在“Tritiated D-ala. sup. 1-Peptide T Binding”, Smith C. S. 等, Drug Development Res., 15, pp. 371-379 (1988) 中给出。第二种方法是为了稳定而改变环状结构, 如 N-C 的链间亚胺和内酰胺(Ede, Smith 和 Rivier (Eds.) “Peptides : Chemistry and Biology”, Escom, Leiden (1991), pp. 268-270)。所给出的其中一个例子是构象上限制的五肽胸腺素 (thymopentin) 样化合物, 例如在美国专利第 4,457,489 (1985), Goldstein, G. 等中公开的那些, 公开的全部内容均引入此处作为参考。第三种方法是用假肽键取代 NTP 肽中的肽键, 所述假肽键可带来蛋白水解抗性。已经描述过的很多假肽键通常都不会影响肽的结构和生物活性。这种方法的其中一个例子是取代 retro-inverso 假肽键 (“五肽胸腺素的生物活性 retroinverso 类似物”, Sisto A. 等, Rivier, J. E. 和 Marshall, G. R. (eds) “Peptides, Chemistry, Structure and Biology”, Escom, Leiden (1990), pp. 722-773) 和 Dalpozzo, 等 (1993), *Int. J. Peptide Protein Res.*, 41: 561-566, 引入此处作为参考)。按照这种修饰, 肽的氨基酸序列可与上述 NTP 肽的序列相同, 只是其中一个或多个肽键被 retro-inverso 假肽键替换。优选绝大多数 N-末端肽键都被取代, 因为这种取代可带来蛋白水解抗性, 所述蛋白水解则是作用于 N-末端的外肽酶导致的。进一步的

修饰还可通过用相似结构的其它化学基团替换氨基酸的化学基团进行。已知可提高对酶裂解的稳定性,没有或很少生物活性损失的其它适宜假肽键是还原的等排假肽键(Couder,等(1993),*Int. J. Peptide Protein Res.*, 41:181-184,全部引入此处作为参考)。因此,这些

5 肽的氨基酸序列可与 NTP 蛋白的序列相同,只是一个或多个肽键被等排假肽键替换。优选绝大多数 N-末端肽键都被取代,因为这种取代可带来蛋白水解抗性,所述蛋白水解则是由作用于 N-末端的外肽酶导致的。具有一个或多个还原等排假肽键的肽的合成是本领域已知的(Couder,等(1993),上面引证的)。其它例子包括引入酮亚甲基或甲基

10 硫化物键来替换肽键。

NTP 肽的类肽衍生物代表了另一类肽模拟物,它保留了具有生物活性的重要结构决定簇,但消除了肽键,由此带来蛋白水解抗性(Simon,等,1992,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:9367-9371,全部引入此处作为参考)。类肽是 N-取代甘氨酸的低聚物。已经描述过很多 N-烷基,

15 每一个与天然氨基酸的侧链相对应(Simon 等(1992),上面引证的,全部引入此处作为参考)。NTP 的一些或全部氨基酸是用与所替换氨基酸相对应的 N-取代甘氨酸替换的。

术语“反向-D 肽”是指与 NTP 蛋白,片段,变体或同系物的 L-氨基酸序列相比,由按照相反顺序排列的 D-氨基酸序列组成的生物活性

20 蛋白或肽。因此,L-氨基酸 NTP 蛋白,片段,变体或同系物的羧基末端残基变成上述 D-氨基酸肽的氨基末端。例如,AD7c-NTP 片段,HVGQAG,变为 G_dA_dQ_dG_dV_dH_d,其中 A_d,G_d,H_d,Q_d,和 V_d分别是与 L-氨基酸 A,G,H,Q,和 V 相对应的 D-氨基酸。

术语“对映异构体”是指 NTP 蛋白,片段,变体或同系物氨基酸

25 序列中的一个或多个 L-氨基酸被相应的 D-氨基酸残基替换的生物活性蛋白或肽。

此处所述氨基酸和氨基酸残基可按照下表提供的一个或三个字母的代码表示。除非另有说明,这些氨基酸或残基是天然存在的 L 立体异构体形式。

表 III

	氨基酸	一个字母的符号	三个字母的符号
	丙氨酸	A	Ala
5	精氨酸	R	Arg
	天门冬酰胺	N	Asn
	天门冬氨酸	D	Asp
	半胱氨酸	C	Cys
	谷氨酰胺	Q	Gln
10	谷氨酸	E	Glu
	甘氨酸	G	Gly
	组氨酸	H	His
	异亮氨酸	I	Ile
	亮氨酸	L	Leu
15	赖氨酸	K	Lys
	甲硫氨酸	M	Met
	苯丙氨酸	F	Phe
	脯氨酸	P	Pro
	丝氨酸	S	Ser
20	苏氨酸	T	Thr
	色氨酸	W	Trp
	酪氨酸	Y	Tyr
	缬氨酸	V	Val

25 NTP 蛋白和片段的制备

本发明的 NTP 蛋白(包括 AD7c-NTP, 片段, 变体, 衍生物, 和同系物)可使用本领域那些技术人员已知的方法制备, 例如重组 DNA 技术, 蛋白的合成及天然存在的 NTP 和 AD7c-NTP 及其片段和变体的分离。

30 NTP 蛋白可利用熟知的重组 DNA 技术, 如在 Sambrook 等 (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. [1989]) 和/或 Ausubel

等, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishers Inc. 及 Wiley 和 Sons, N.Y. [1994] 中提出的那些制备。

编码 NTP 蛋白的基因或 cDNA 可通过筛选基因组或 cDNA 文库, 或通过 PCR 扩增获得。用于筛选该文库的探针或引物可根据来源于相同
5 或相关基因家族的其它已知基因或基因片段的序列信息生产, 例如, 在其它 NTP 蛋白中发现的保守基序。此外, 已经鉴定了其中一个种类的编码 NTP 蛋白的基因, 该基因的全部或一部分可被用作鉴定其它种类同源基因的探针。所述探针或引物可用于筛选据信表达 NTP 基因的, 各种组织来源的 cDNA 库。通常, 筛选时要求使用非常严格的条件, 从而
10 而使筛选时的假阳性数达到最小。

制备编码 NTP 蛋白的基因的另一个方法是使用本领域技术人员熟知的化学合成方法, 例如由 Engels 等 (Angew. Chem. Intl. Ed., 28: 716-734 [1989]) 描述的那些。此外, 这些方法还包括, 用于核酸合成的磷酸三酯, 亚磷酰胺, 和 H-磷酸酯方
15 法。这种化学合成的优选方法是利用标准亚磷酰胺化学进行的聚合物-支持的合成。通常, 编码 NTP 蛋白的 DNA 的长度为几百个核苷酸。大于约 100 个核苷酸的核酸可使用这些方法被合成为若干个片段。然后将所述片段连接在一起, 形成全长 NTP 蛋白。通常, 编码蛋白氨基末端的 DNA 片段具有 ATG, 其编码甲硫氨酸残基。该甲硫氨酸残基是否以
20 NTP 蛋白的成熟形式存在取决于在宿主细胞中产生的蛋白是否被设计从该细胞中分泌。

编码 NTP 蛋白的基因, cDNA, 或其片段可利用标准连接技术而被插入到适宜的表达或扩增载体中。通常选择在所用的特定宿主细胞中起作用的载体(即, 载体与宿主细胞机制相容, 这样才能发生基因的扩
25 增和/或表达)。编码 NTP 蛋白的基因, cDNA, 或其片段可在原核, 酵母, 昆虫(杆状病毒系统)和/或真核宿主细胞中扩增/表达。宿主细胞的选择部分取决于 NTP 蛋白是否将糖基化和/或磷酸化。如果是, 优选酵母, 昆虫或哺乳动物宿主细胞。

通常, 在任何宿主细胞中使用的载体都含有 5' 侧翼序列(也称为
30 “启动子”)和其它调节元件, 如增强子, 复制元件的起点, 转录终止元件, 含有供体和受体剪接位点的完全内含子序列, 信号肽序列, 核糖体结合位点元件, 聚腺苷酸化序列, 插入编码所表达多肽的核酸的

多接头区, 和可选择的标记元件。这些元件在下面讨论。可选择地, 所述载体可含有“标记”序列, 即, 位于 NTP 蛋白编码序列的 5' 或 3' 末端的寡核苷酸分子; 编码多 His (如六 His) 的寡核苷酸分子, 或其它“标记”, 如 FLAG, HA (血细胞凝集素流感病毒) 或 myc, 它们是从现有的市售抗体得到的。该标记通常在多肽表达后与多肽融合, 并可作为从宿主细胞亲和纯化 NTP 蛋白的工具。例如, 亲和纯化可通过柱层析完成, 其中使用抗所述标记的抗体作为亲和基质。可选择性地, 所述标记随后可通过各种方法, 例如使用特定的肽酶而从纯 NTP 蛋白除去。

人免疫球蛋白的铰链和 Fc 区可由本领域技术人员在 NTP 蛋白的 N-末端或 C-末端融合。随后, 利用 A 蛋白亲和柱纯化 Fc 融合蛋白。已知 Fc 在体内具有较长的药动学半衰期, 而与 Fc 融合的蛋白的体内半衰期要比没有融合的相应物长很多。而且, 与 Fc 区的融合可使分子二聚/多聚, 这对于某些分子的生物活性而言是有益的。

5' 侧翼序列可以是同源的 (即, 与宿主细胞来源于同一物种和/或株), 异源的 (即, 来源于除宿主细胞物种或株之外的物种), 杂交的 (即, 超过一个来源的 5' 侧翼序列的结合), 合成的, 或它还可以是天然 NTP 蛋白基因的 5' 侧翼序列。同样, 5' 侧翼序列的来源可以是任何单细胞的原核或真核生物体, 任何脊椎动物或无脊椎动物生物体, 或任何植物, 只要 5' 侧翼序列可在宿主细胞中起作用, 而且可被宿主细胞机制激活。

用于本发明载体中的 5' 侧翼序列可通过本领域熟知的任何一种方法获得。通常, 除了 NTP 基因的侧翼序列之外, 此处所用的 5' 侧翼序列先前已经通过绘图和/或限制性内切核酸酶消化而被鉴定, 并因此可使用适宜的限制性内切核酸酶从适宜的组织来源中分离出来。在某些情况下, 5' 侧翼序列的完全核苷酸序列是已知的。这里, 5' 侧翼序列可使用上述用于核酸合成或克隆的方法合成。

如果 5' 侧翼序列的全部或仅仅一部分是已知的, 那么它可使用 PCR 和/或通过筛选基因组文库获得, 其中使用了来源于相同或其它物种的适宜的寡核苷酸和/或 5' 侧翼序列。

如果 5' 侧翼序列是未知的, 那么含有 5' 侧翼序列的 DNA 片段可从 DNA 的较大片段中分离出来, 其中所述 DNA 可以含有例如编码序列或甚至其它基因。分离可通过使用一个或多个仔细挑选过的酶进行限

制性内切核酸酶消化，从而分离适当的 DNA 片段完成。消化后，所需片段可通过琼脂糖凝胶纯化，Qiagen. RTM. 柱或本领域技术人员已知的其它方法分离。为实现此目的而对酶进行适宜的选择对于本领域的普通技术人员而言是显而易见的。

- 5 复制元件的起点通常是市售原核表达载体的一部分，并可帮助宿主细胞中载体的扩增。在某些情况下，载体到一定程度拷贝数的扩增对于 NTP 蛋白的最适表达是很重要的。如果选择的载体不含有复制位点起点，那么人们可根据已知序列化学合成，并将它连接到载体中。转录终止元件通常位于编码 NTP 蛋白的序列的 3' 末端，可终止 NTP
- 10 蛋白的转录。通常，原核细胞中的转录终止元件是富含 G-C 的片段，接着是聚 T 序列。而该元件很容易从库克隆，或甚至作为载体的一部分从市场上购买，还可使用核酸合成方法，例如上面描述的那些很容易地合成它。

- 可选择的标记基因编码选择性培养基中的宿主细胞存活和生长所必需的蛋白。典型的选择标记基因可编码蛋白，而该蛋白(a)为原核宿主细胞带来对抗生素或其它毒素，例如，氨苄西林，四环素，或卡那霉素的抗性，(b)补充细胞的营养缺陷；或(c)提供不能从复合培养基中得到的重要营养物。优选的可选择标记是卡那霉素抗性基因，氨苄西林抗性基因，和四环素抗性基因。
- 15 核糖体结合元件，通常被称作 Shine-Dalgarno 序列(原核生物)或 Kozak 序列(真核生物)，通常是 mRNA 翻译开始所必需的。该元件通常位于启动子的 3' 端及所合成 NTP 蛋白的编码序列的 5' 端。Shine-Dalgarno 序列是各式各样的，但通常是多嘌呤(即，具有较高的 A-G 含量)。已经鉴定了很多 Shine-Dalgarno 序列，它们中的每一个都可

- 20 使用上述方法很容易地合成，并用于原核载体中。
- 25 在需要从宿主细胞分泌 NTP 蛋白的那些情况下，信号序列可用于指导 NTP 蛋白从其合成处的宿主细胞中分离出来，而且蛋白的羧基-末端部分可被缺失，以便防止膜固着。通常，信号序列位于 NTP 基因或 cDNA 的编码区，或直接位于 NTP 基因编码区的 5' 末端。已经鉴定了很多信号序列，可在所选宿主细胞中起作用的它们中的任何一个都可与

- 30 NTP 基因或 cDNA 联合使用。因此，信号序列与 NTP 基因或 cDNA 可以是同源的或异源的，而且与 NTP 基因或 cDNA 可以是同源的或异源的。

此外,信号序列可以是利用上述方法化学合成的。在绝大多数情况下,多肽在信号肽存在下自宿主细胞的分泌可导致氨基末端的甲硫氨酸自多肽的除去。

在很多情况下,NTP基因或cDNA的转录是通过载体中一个或多个内含子的存在增加的;而当NTP蛋白在真核宿主细胞,特别是在哺乳动物宿主细胞中产生时,这一点特别确实。所用内含子可以是NTP基因内天然存在的,特别是其中所用的基因是全长基因组序列或其片段。在内含子不是天然存在于基因(绝大多数cDNA)内的情况下,内含子可从其它来源获得。内含子相对于侧翼序列以及NTP基因的位置通常都是比较重要的,这是因为内含子必需被转录才有效。照此,当插入到表达载体中的NTP基因是cDNA分子时,内含子的优选位置是转录起始位点的3'侧,和聚A转录终止序列的5'侧。对于NTP cDNA而言,优选内含子位于cDNA的其中一侧或另一侧(即,5'或3'),这样它就不会间断编码序列。任何来源,包括任何病毒,原核及真核(植物或动物)生物体的任何内含子都可用于进行本发明,只要它与所要插入其中的宿主细胞相容。这里还包括合成的内含子。可选择性地,载体中可使用超过一个的内含子。

在所用载体中不存在上述一个或多个元件的情况下,它们可单独获得,并连接到载体中。获得每个元件的方法是本领域技术人员熟知的,而且可与上述方法(即,DNA的合成,文库筛选等)相似。

用于进行本发明的最终载体通常是从起始载体,如市售载体构造的。这种载体可含有或不含有完全载体包含的一些元件。如果起始载体中没有所需元件,那么可通过用适宜的限制性内切核酸酶切割载体而将每个元件单独连接到载体中,这样元件的末端可被连接,而载体的末端适于连接。在某些情况下,必需“钝化”待连接的末端,以便获得令人满意的连接。钝化首先是在所有四种核苷酸都存在的情况下,使用Klenow DNA聚合酶或T4 DNA聚合酶填充“粘性末端”实现的。此过程是本领域熟知的,并在Sambrook等, supra 中描述。可选择性地,插入到载体中的两个或多个元件首先连接在一起(如果它们彼此相邻),然后才被连接到载体中。

构造载体,将各种元件全部连接在一起的其它方法可在一个反应混合物中同时进行。在这里,由于元件的错误连接或插入,产生了很

多没有意义或非功能性的载体，然而功能性载体可通过限制性内切核酸酶消化而鉴定并选择。

本发明的优选载体是与细菌，昆虫，和哺乳动物宿主细胞相容的那些。此外，这种载体还包括 pCRII, pCR3, 和 pcDNA3.1 (Invitrogen Company, San Diego, Calif.), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, Calif.), pET15b (Novagen, Madison, Wis.), PGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, Calif.), pETL (BlueBacII; Invitrogen), 和 pFastBacDual (Gibco/BRL, Grand Island, N.Y.).

在构造了载体，并将编码全长或截短 NTP 蛋白的核酸分子插入到载体的适当位点之后，可将完全的载体插入到适宜的宿主细胞中，进行扩增和/或多肽表达。宿主细胞可以是原核宿主细胞(如大肠埃希氏菌)或真核宿主细胞(如酵母细胞，昆虫细胞，或脊椎动物细胞)。宿主细胞，当在适宜的条件下培养时，可合成 NTP 蛋白，随后从培养基中采集(如果宿主细胞将它分泌到培养基中)或直接从产生它的宿主细胞采集。

采集后，可使用分子筛层析，亲和层析等方法纯化 NTP 蛋白。为产生 NTP 蛋白而对宿主细胞进行的选择部分取决于 NTP 蛋白是否是糖基化或磷酸化的(优选真核宿主细胞)，以及宿主细胞将蛋白“折叠”成其天然三级结构的方式(例如，二硫桥的适当定向)，这样就可通过具有生物活性的 NTP 蛋白制备生物活性蛋白，所述 NTP 蛋白可在使用下面讨论的适宜化学条件合成后“折叠”。适宜的细胞或细胞系可以是哺乳动物细胞，如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)，人胚胎肾(HEK)293或293T细胞，或3T3细胞。适宜哺乳动物宿主细胞的选择以及转化，培养，扩增，筛选和产物产生及纯化的方法是本领域已知的。其它适宜的哺乳动物细胞系是猴COS-1和COS-7细胞系，及CV-1细胞系。其它哺乳动物宿主细胞的例子包括灵长类动物的细胞系和啮齿类动物的细胞系，包括转化的细胞系。来源于原代组织和原代外植体的体外培养物的正常二倍体细胞，细胞株也是适宜的。候选细胞在选择基因中可能是基因型缺陷的，或可能含有显性作用选择基因。其它适宜的哺乳动物细胞系包括，但不限制于，小鼠成神经细胞瘤N2A细胞，HeLa，小鼠L-929细胞，来源于Swiss, Balb-c或NIH小鼠的3T3系，BHK或

HaK 仓鼠细胞系。

同样适于本发明的宿主细胞是细菌细胞。例如，大肠埃希氏菌的各种菌株（例如，HB101，DH5. α ., DH10，和 MC1061）是生物技术领域熟知的宿主细胞。枯草芽孢杆菌，假单胞菌，其它芽孢杆菌，链霉菌等5 5 等的各种菌株也可用于该方法中。本领域那些技术人员已知的很多酵母菌株也可用作本发明多肽表达的宿主细胞。

此外，如果需要，本发明方法还可使用昆虫细胞系统。这种系统在例如，Kitts 等 (*Biotechniques*, 14: 810-817 [1993])，Lucklow (*Curr. Opin. Biotechnol.*, 4: 564-572 [1993]) 和 Lucklow 10 等 (*J. Virol.*, 67: 4566-4579 [1993]) 中描述。优选的昆虫细胞是 Sf-9 和 Hi5 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.)。

载体在所选宿主细胞中的插入（也称作“转化”或“转染”）可使用氯化钙，电穿孔，微量注射，脂转染，或 DEAE-葡聚糖方法完成。所选择的方法部分与所用宿主细胞的类型有关。这些方法和其它适宜15 的方法是本领域技术人员熟知的，并在 Sambrook 等, *supra* 中描述。

含有载体的宿主细胞（即，转化或转染的）可使用本领域技术人员熟知的标准培养基培养。该培养基通常含有细胞生长和存活必需的所有营养物。培养大肠埃希氏菌的适宜培养基是，例如，Luria 培养液 (LB) 和/或 Terrific 培养液 (TB)。培养真核细胞的适宜培养基20 是 RPMI 1640，MEM，DMEM，它们全部补充有培养特定细胞系所需的血清和/或生长因子。昆虫培养的适宜培养基是 Grace's 培养基，按照需要，其中补充有 yeastolate，乳清蛋白水解物，和/或胎牛血清。通常，把用于转化细胞选择性生长的抗生素或其它化合物作为补充物加入到培养基中。所用化合物受存在于质粒上的可选择标记元件支配，宿主25 细胞是用该质粒转化的。例如，当可选择标记元件是卡那霉素抗性时，加入到培养基中的化合物将是卡那霉素。

宿主细胞中产生的 NTP 蛋白的量可使用本领域已知的标准方法评估。这种方法包括，但不限制于，蛋白质印迹分析，SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，非-变性凝胶电泳，HPLC 分离，免疫沉淀，和/或活性测定30 法，如 DNA 结合凝胶移位测定法。

如果 NTP 蛋白已经被设计从宿主细胞分泌，那么 NTP 蛋白的大部分将在细胞培养基中找到。以这种方式制备的蛋白通常没有氨基末端

的甲硫氨酸，这是因为它已经在从细胞分泌的过程中被除去。然而，如果 NTP 蛋白不是从宿主细胞分泌的，那么它将存在于胞质和/或核(真核宿主细胞)或胞质溶胶(革兰氏阴性菌宿主细胞)中，而且可能具有氨基末端的甲硫氨酸。

- 5 对于位于宿主细胞胞质和/或核中的 NTP 蛋白而言，宿主细胞通常首先被机械或使用去污剂破裂，从而释放细胞内的内含物到缓冲溶液中。然后从该溶液中分离 NTP 蛋白。

NTP 蛋白从溶液的纯化可使用各种技术完成。如果该蛋白已经合成，则它在其羧基或氨基末端含有标记，如六组氨酸(NTP 蛋白/六 His)或其它小肽如 FLAG(Sigma-Aldrich, St.Louis, MI)或钙调蛋白结合肽(Stratagene, La Jolla, CA)，它基本上是在一步过程中被纯化的，例如直接使溶液通过亲和柱，其中的柱基质对标记或蛋白(即，特异性识别 NTP 蛋白的单克隆抗体)具有较高的亲和性。例如，多组氨酸可以较高的亲和性及特异性与镍，锌和钴结合，由此固定金属离子亲和层析，所述金属离子亲和层析使用的是基于镍的亲和树脂(在 Qiagen's QIAexpress 系统或 Invitrogen's Xpress 系统中使用的)或基于钴的亲和树脂(在 BD Biosciences-CLONTECH's Talon 系统中使用的)，它们可用于纯化 NTP 蛋白/多 His(见，例如，Ausubel 等, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Section 10.11.8, John Wiley & Sons, New York [1993])。

- 20 如果 NTP 蛋白是在没有标记连接的情况下制备的，而且没有获得抗体，那么可使用其它熟知的纯化过程。这种过程包括，但不限制于，与凝胶洗脱，和制备型等电点聚焦联合使用的离子交换层析，羟磷灰石层析，疏水作用层析，分子筛层析，HPLC，天然凝胶电泳("Isoprime" 机器/技术, Hoefer Scientific)。在某些情况下，可将这些技术的两种或多种联合使用，以便提高纯度。

如果预期主要在细胞内找到 NTP 蛋白，那么可使用本领域技术人员已知的任何标准技术从宿主细胞中提取胞内物质(包括革兰氏阴性菌的内含体)。例如，通过弗氏细胞压碎，均化，和/或超声波，然后离心而使宿主细胞溶解，从而释放周质/胞质的内含物。如果 NTP 蛋白已经在胞质溶胶中形成内含体，那么所述内含体常常与内层和/或外层细胞膜结合，并因此主要在离心后的颗粒状物中找到。然后，在 pH 极

端情况下处理颗粒状物,或在有还原剂如碱性 pH 的二硫苏糖醇或酸性 pH 的 tris 乙基胍存在的条件下,用离液剂如去污剂,胍,胍衍生物,尿素,或尿素衍生物处理颗粒状物,从而释放,破裂分离,并溶解内含体。然后利用凝胶电泳,免疫沉淀等方法分析可溶形式的 NTP 蛋白。

5 如果需要分离 NTP 蛋白,那么可使用标准方法完成分离,例如下面提出的那些,以及 Marston 等(*Meth. Enz.*, 182: 264-275 [1990])描述的。在某些情况下, NTP 蛋白在分离后可能就不是生物活性的了。“重折叠”或将多肽转化成其三级结构并产生二硫键的各种方法可用于恢复生物活性。这种方法包括在有特定浓度离液剂存在的条件下,使可溶性多肽暴露于通常高于 7 的 pH。离液剂的选择与用于内含体溶解的选择非常相似,但通常浓度较低,而且无需与溶解所用的离液剂相同。

10 在绝大多数情况下,重折叠/氧化溶液还含有还原剂或特定比例的还原剂及其氧化形式,从而产生特定的氧化还原能力,使二硫键在蛋白半胱氨酸桥的形成中出现。通常所用的一些氧化还原对包括半胱氨酸/胱胺,谷胱甘肽 (GSH) / 二硫双 GSH, 氯化铜, 二硫苏糖醇 (DTT) / 二噻烷 DTT, 2-巯基乙醇 (bME) / 二硫-b (ME)。在很多情况下,助溶剂是必需的,以提高重折叠的效率,用于此目的的更多普通试剂包括甘油,各种分子量的聚乙二醇和精氨酸。

15

如果宿主细胞中没有形成较高程度的 NTP 蛋白内含体,那么 NTP 蛋白则主要在离心后的细胞匀浆上清液中找到,然后使用下面所述的那些方法将 NTP 蛋白从上清液中分离出来。

20

在优选部分或完全分离 NTP 蛋白的那些情况下,纯化可使用技术人员熟知的标准方法实现。这些方法包括,但不限制于通过电泳然后电洗脱而分离,各种类型的层析(免疫亲和,分子筛,和/或离子交换),和/或高压液相层析。在某些情况下,优选使用超过一种的这些方法进行完全纯化。

25

除了使用重组 DNA 技术制备和纯化 NTP 蛋白之外, NTP 蛋白及其衍生物还可使用本领域已知的技术,通过化学合成方法(如固相肽合成)制备,所述技术是例如 Merrifield 等, (*J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149 [1963]), Houghten 等 (*Proc Natl Acad. Sci. USA*, 82: 5132 [1985]), 及 Stewart 和 Young (*Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. [1984])描述的那些。这种多肽可

30

使用或不用氨基末端上的甲硫氨酸合成。化学合成的 NTP 蛋白可使用这些参考文献中提出的方法被氧化，从而形成二硫桥。与重组产生或从天然来源纯化的 NTP 蛋白相比，预期所述 NTP 蛋白具有生物活性，并因此可与重组或天然 NTP 蛋白交换使用。

- 5 本发明的范围内还包括化学修饰过的 NTP 蛋白组合物，其中 NTP 蛋白与聚合物连接。所选聚合物通常是水溶性的，这样与它连接的蛋白就不会在含水环境，如生理环境中沉淀。所选聚合物通常被修饰具有单一的反应基团，如进行酰化的活性酯，或进行烷基化的醛，这样才能控制本发明方法的聚合程度。聚合物可以是任何分子量的，而且
- 10 可以是分枝或不分枝的。聚合物的混合物也包括在 NTP 蛋白聚合物的范围之内。

在某些情况下，希望制备天然存在的 NTP 蛋白的核酸和/或氨基酸变体。核酸变体可使用定点诱变，PCR 扩增，或其它适宜方法生产，其中的引物具有希望的点突变（见 Sambrook 等，*supra*，和 Ausubel

15 等，*supra*，诱变技术的描述）。使用 Engels 等，*supra* 描述的方法进行化学合成，也可用于制备这种变体。还可使用技术人员已知的其它方法。

优选的核酸变体是含有核苷酸取代的那些，所述核苷酸取代用于解释宿主细胞中用于生产 NTP 蛋白的密码子的偏好。这种“密码子的最优化”可通过计算机算法测定，其中加入了密码子频率表，如用于

20 高水平表达的细菌基因的密码子偏好的“Ecohigh.Cod”，这是由 University of Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group, Madison, Wis 提供的。其它有用的密码子频率表包括

“*Celegans-high.cod*”，“*Celegans-low.cod*”，

25 “*Drosophila-high.cod*”，“*Human-high.cod*”，“*Maize-high.cod*”，和“*Yeast-high.cod*”。与野生型相比，其它优选变体是编码上述保守氨基酸改变的那些（例如，通过用不同的氨基酸取代，基本上没有改变天然存在的氨基酸侧链的电荷或极性），和/或被设计产生新的糖基化和/或磷酸化位点的那些，或被设计缺失现存糖基化和/或磷酸化位

30 点的那些。

NTP 片段，及其同系物，变体，衍生物和盐可使用本领域普通技术人员已知的常规肽合成技术生产。这些技术包括化学偶联方法（参见

Wunsch, E: "Methoden der organischen Chemie", Volume 15, Band 1+2, *Synthese von Peptiden*, thime Verlag, Stuttgart (1974), 和 Barrany, G.; Marrifield, R. B.: "The Peptides", eds. E. Gross, J. Meienhofer, Volume 2, Chapter 1, pp. 1-284, Academic Press (1980)), 酶偶联方法 (参见 Widmer, F. Johansen, J. T., *Carlsberg Res. Commun.*, Vol. 44, pp. 37-46 (1979), 和 Kullmann, W.: "Enzymatic Peptide Synthesis", CRC Press Inc. Boca Raton, Fla. (1987), 和 Widmer, F., Johansen, J. T. In "Synthetic Peptides in Biology and Medicines:", eds. Alitalo, K., Partanen, P., Vattieri, A., pp. 79-86, Elsevier, Amsterdam (1985)), 或化学和酶方法的组合, 只要所述方法对加工设计有利, 而且更经济。本领域那些技术人员可改变 NTP 蛋白的肽序列, 从而制造与原始或天然 NTP 蛋白具有相同或相似生物活性 (生物活性) 的同系物。

使用已知 NTP 蛋白的模拟物比使用蛋白本身更为有利, 这是因为蛋白通常会显示出两种不良的性质: (1) 较差的生物利用度; 和 (2) 较短的作用持续时间。肽模拟物则可围绕这两个主要的障碍提供途径, 这是因为有关的分子足够小, 既能够广泛得到, 又具有较长的作用持续时间。此外, 生产肽模拟物比生产蛋白和肽更便宜。最后, 肽模拟物不存在与蛋白和肽的稳定性, 贮藏, 和免疫反应性有关的问题。

因此, 上述 NTP 肽可用于研制这种具有相似生物活性, 并因此具有相似治疗效用的小化合物。NTP 蛋白的肽模拟物可使用本领域已知的组合化学技术和其它技术研制 (见, 例如, *Proceedings of the 20th European Peptide Symposium*, ed. G. Jung, E. Bayer, pp. 289-336, 引入此处作为参考)。

本领域已知的, 对肽进行结构修饰从而生产肽模拟物的方法的例子包括, 可产生 D-氨基酸残基结构的主链手性中心的反转, 这种 D-氨基酸残基结构可以, 特别是在 N-末端可以提高对蛋白水解降解的稳定性, 而且不会对活性产生不利的影响。其中一个实例在 "Tritiated D-ala. sup. 1-Peptide T Binding", Smith C. S. 等, *Drug Development Res.*, 15, pp. 371-379 (1988) 中给出。

第二种方法是为了稳定而改变环状结构, 如 N-C 的链间亚胺和内酰胺 (Ede, Smith 和 Rivier (Eds.) "Peptides: Chemistry and

Biology”, Escom, Leiden(1991), pp.268-270)。所给出的其中一个例子是构象上限制的五肽胸腺素样化合物,例如在美国专利第4,457,489 (1985),Goldstein,G.等中公开的那些,公开的全部内容均引入此处作为参考。

- 5 第三种方法是用假肽键取代 NTP 肽中的肽键,所述假肽键可带来蛋白水解抗性。已经描述过的很多假肽键通常都不会影响肽的结构和生物活性。这种方法的其中一个例子是取代 retro-inverso 假肽键 (“五肽胸腺素的生物活性 retroinverso 类似物”,Sisto A. 等, Rivier, J.E. 和 Marshall,G.R. (eds) “Peptides,Chemistry, 10 Structure and Biology”, Escom, Leiden(1990), pp.722-773) 和 Dalpozzo, 等(1993), *Int. J. Peptide Protein Res.*, 41:561-566, 引入此处作为参考)。按照这种修饰,肽的氨基酸序列可与上述 NTP 肽的序列相同,只是其中一个或多个肽键被 retro-inverso 假肽键替换。优选绝大多数 N-末端肽键都被取代,因为这种取代可带来蛋白水解抗性,所述蛋白水解则是作用于 N-末端的外肽酶导致的。

- 用一个或多个还原 retro-inverso 假肽键合成肽是本领域已知的 (Sisto (1990) 和 Dalpozzo, 等(1993), 上面引证的)。因此,肽键可被非-肽键替换,使肽模拟物接受相似的结构,并因此具有原始肽的生物活性。进一步的修饰还可通过用相似结构的其它化学基团替换氨基酸的化学基团进行。已知可提高对酶裂解的稳定性,没有或很少生物活性损失的其它适宜假肽键是还原的等排假肽键 (Couder, 等 20 (1993), *Int. J. Peptide Protein Res.*, 41:181-184, 全部引入此处作为参考)。因此,这些肽的氨基酸序列可与 NTP 蛋白的序列相同,只是一个或多个肽键被等排假肽键替换。优选绝大多数 N-末端肽键都被取代,因为这种取代可带来蛋白水解抗性,所述蛋白水解则是由作用于 N-末端的外肽酶导致的。具有一个或多个还原等排假肽键的肽的合成是本领域已知的 (Couder, 等(1993), 上面引证的)。其它例子包括 25 引入酮亚甲基或甲基硫化物键来替换肽键。

- NTP 肽的类肽衍生物代表了另一类肽模拟物,它保留了具有生物活性的 30 重要结构决定簇,但消除了肽键,由此带来蛋白水解抗性 (Simon, 等,1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:9367-9371, 全部引入此处作为参考)。类肽是 N-取代甘氨酸的低聚物。已经描述过很多 N-烷

基，每一个与天然氨基酸的侧链相对应(Simon 等(1992)，上面引证的，全部引入此处作为参考)。NTP 的一些或全部氨基酸是用与所替换氨基酸相对应的 N-取代甘氨酸替换的。

利用 NMR 光谱，晶体照相术和/或计算机辅助的分子模型化，通过
5 确定原始 NTP 肽的三级结构可帮助研究肽模拟物。这些技术可帮助研
制新的组合物，它们比原始肽具有更高的效用和/或更大的生物利用度
和/或更高的稳定性 (Dean(1994), *BioEssays*, 16:683-687; Cohen
和 Shatzmiller(1993), *J Mol. Graph.*, 11:166-173 ; 及 Wiley 和
Rich (1993), *Med. Res. Rev.*, 13:327-384 ; Moore(1994), *Trends*
10 *Pharmacol Sci.*, 15:124-129 ; Hruby(1993), *Biopolymers*,
33:1073-1082; Bugg 等(1993), *Sci. Am.*, 269:92-98, 全部引入此处
作为参考)。

一旦确定了有效的肽模拟物，就可使用下面实施例中给出的方法
合成并测定它，从而评估其活性。本发明还包括通过上述方法获得的
15 肽模拟化合物，它具有 NTP 肽的生物活性以及相似的三维结构。从上
述具有一个或多个修饰的 NTP 肽生产肽模拟物对于本领域技术人员而
言是显而易见的。除了它们作为治疗化合物的效用之外，本发明的肽
模拟物还可用于研制更有效的非-肽化合物，这也是显而易见的。

NTP 蛋白的测定法

20 本发明还包括 NTP 蛋白及其相应核酸分子的用途，用于定性或定
量测试哺乳动物组织或体液样品中 NTP 蛋白，NTP DNA 或相应 RNA 的
存在。NTP 蛋白及其相应的核酸分子可用于这种测定法中的制备，不论
NTP 蛋白或所编码的 NTP 蛋白是否具有生物活性。NTP 核酸序列可能是
杂交探针的有效来源，从而定性或定量测试哺乳动物组织或体液样品
25 中，NTP DNA 或相应 RNA 的存在。自身不具有生物活性的 NTP 蛋白可
用于制备识别和/或与 NTP 蛋白结合的抗体。这种抗体可使用标准方法
制备。因此，与 NTP 蛋白反应的抗体，及这种抗体的短链的抗体片段
和其它反应性片段也是本发明范围所预期的。所述抗体可以是多克
隆，单克隆，重组，嵌合，单链和/或双特异性的。通常，抗体或其片
30 段或者是人类来源的，或者是“人源化的”，即，当给予患者时，可
防止或使对抗体的免疫反应最小。优选的抗体是人类抗体，多克隆或
单克隆的。所述抗体片段可以是与本发明 NTP 蛋白反应的任何片段，

如 F_{ab} , F_{ab} 等。本发明还提供了杂交瘤,它是通过使用任何一种 NTP 蛋白作为所选哺乳动物的抗原,然后利用已知技术使哺乳动物细胞(例如,脾细胞)与特定的癌细胞融合,产生无限增殖化的细胞系而产生的。本发明还包括生产这种细胞系和针对 NTP 蛋白的全部或一部分的

5 抗体的方法。

所述抗体还可进一步用于体内和体外的诊断或研究目的,例如以标记形式检测体液或细胞样品中 NTP 蛋白的存在。

所治疗的状况

本发明涉及治疗各种状况的新方法,所述状况需要除去细胞,如

10 良性和恶性肿瘤,腺体(例如,前列腺)增生,不需要的的面部毛发,疣,和不需要的的脂肪组织。这种方法包括在需要时,给予哺乳动物治疗有效量的 NTP。

所述疾病可以是,例如,肺,乳腺,胃,胰腺,前列腺,膀胱,骨,卵巢,皮肤,肾,窦,结肠,肠,胃, 直肠,食道,血液,脑及其覆盖物,脊髓及其覆盖物,肌肉,结缔组织,肾上腺,甲状旁腺,甲状腺,子宫,睾丸,垂体,生殖器官,肝,胆囊,眼,耳,鼻,咽喉,扁桃体,口腔,和淋巴结及淋巴系统,以及其它器官的肿瘤。

15

此处所用术语“恶性肿瘤”包括人类癌,肉瘤和黑素瘤的所有形式,它们以较差分化,适度分化,和较好分化的形式存在。

本发明满足了本领域治疗的需要,可以较小的危险和较少的外科手术副作用除去良性肿瘤。特别需要一种除去外科手术危险区域,如机体深处(例如,脑,心脏,肺等)良性肿瘤的方法。

20

治疗必须除去细胞的状况的方法可与治疗这种状况的常规方法,如外科手术切除,化疗和放疗联合使用。NTP 可在这种常规治疗进行之前,之中,或之后给予。

25

所治疗的状况还可以是组织的增生,肥大,或过度生长,所述组织选自肺,乳腺,胃,胰腺,前列腺,膀胱,骨,卵巢,皮肤,肾,窦,结肠,肠,胃, 直肠,食道,血液,脑及其覆盖物,脊髓及其覆盖物,肌肉,结缔组织,肾上腺,甲状旁腺,甲状腺,子宫,睾丸,垂体,生殖器官,肝,胆囊,眼,耳,鼻,咽喉,扁桃体,口腔,和淋巴结及淋巴系统。

30

可使用本发明方法治疗的其它状况是病毒,细菌或寄生虫改变的

组织, 所述组织选自肺, 乳腺, 胃, 胰腺, 前列腺, 膀胱, 骨, 卵巢, 皮肤, 肾, 窦, 结肠, 肠, 胃, 直肠, 食道, 血液, 脑及其覆盖物, 脊髓及其覆盖物, 肌肉, 结缔组织, 肾上腺, 甲状旁腺, 甲状腺, 子宫, 睾丸, 垂体, 生殖器官, 肝, 胆囊, 眼, 耳, 鼻, 咽喉, 扁桃体, 口腔, 和淋巴结及淋巴系统。

所治疗的状况还可以是组织的畸形, 所述组织选自肺, 乳腺, 胃, 胰腺, 前列腺, 膀胱, 骨, 卵巢, 皮肤, 肾, 窦, 结肠, 肠, 胃, 直肠, 食道, 血液, 脑及其覆盖物, 脊髓及其覆盖物, 肌肉, 结缔组织, 肾上腺, 甲状旁腺, 甲状腺, 子宫, 睾丸, 垂体, 生殖器官, 肝, 胆囊, 眼, 耳, 鼻, 咽喉, 扁桃体, 口腔, 和淋巴结及淋巴系统。

特别是, 所治疗的状况可以是扁桃体肥大, 前列腺增生或痔疮。所治疗的状况可以是血管疾病, 如动脉粥样硬化或动脉硬化, 或血管疾病, 如静脉曲张。所治疗的状况还可以是对组织, 如皮肤, 眼, 耳, 鼻, 咽喉, 口腔, 肌肉, 结缔组织, 毛发, 或乳腺组织的整容修饰。

15 NTP 组合物

NTP 蛋白的治疗组合物也在本发明的范围之内。这种组合物可含有与药学上可接受的载体混合的治疗有效量的 NTP 蛋白。所述载体物质可以是注射用水, 优选补充有给予哺乳动物的溶液中通常使用的其它物质。通常, 治疗用途的 NTP 蛋白是以组合物形式给药的, 所述组合物含有纯化 NTP 蛋白以及一种或多种生理可接受的载体, 赋形剂, 或稀释剂。中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水是代表性的适宜载体。优选, 使用适宜的赋形剂 (例如, 蔗糖) 将产物配制成冷冻干燥物。如果需要, 还可含有其它标准载体, 稀释剂和赋形剂。其它代表性的组合物还含有约 pH 7.0-8.5 的 Tris 缓冲液, 或约 pH 4.0-5.5 的醋酸盐缓冲液, 其中还可含有山梨糖醇或其适当的替代物。

本发明的范围还包括与抗体, 抗体片段, 抗体样分子, 或对特定肿瘤标记具有较高亲和性的分子, 例如细胞受体, 信号肽或过量表达的酶偶联或连接或结合的 NTP 蛋白的用途, 它们可定向于不需要的细胞元件。抗体, 抗体片段, 抗体样分子, 或对特定肿瘤标记具有高亲和性的分子可用于使 NTP 蛋白偶联物定向于特定的细胞或组织目标。例如, 抗体, 抗体片段, 或抗体样结合分子可定向于具有不同表面抗原或表达抗原的肿瘤, 而 NTP 蛋白则可杀死肿瘤。这种利用抗体导向

的方法具有预期的优点，如降低剂量，提高与靶细胞结合及靶细胞摄取的可能性，并增加导向和治疗转移瘤和显微大小肿瘤的有效性。

5 本发明还包括用与蛋白或其它分子偶联或连接或结合的 NTP 蛋白形成组合物，通过肿瘤-或位点-特异性酶或蛋白酶，或通过定向于肿瘤或其它不需要的细胞的抗体偶联物在肿瘤或其它不需要的细胞的位点或附近裂解该组合物，然后在肿瘤或其它不需要的细胞的位点或附近释放 NTP 蛋白。

10 本发明还包括用与蛋白或其它分子偶联或连接或结合的 NTP 蛋白形成组合物，在所要治疗的组织暴露于光(例如在激光疗法或其它光-动力或光-活化疗法中)，其它形式的电-磁辐射后，释放 NTP 蛋白或 NTP 蛋白的某些生物活性片段，其中所述其它形式的电-磁辐射如红外辐射，紫外辐射，x-射线或 γ -射线辐射，局部热， α 或 β 辐射，超声发射，或其它局部能量来源。

15 NTP 蛋白可单独使用，或与其它药物组合物联合使用，例如适于所治疗适应症的细胞因子，生长因子，抗生素，编程性细胞死亡诱导剂，抗炎剂，和/或化疗剂。

20 本发明还包括使用了树枝型聚合物，富勒烯，和其它合成分子，聚合物及高分子的 NTP 治疗组合物，其中 NTP 蛋白和/或其相应的 DNA 分子与分子，聚合物或高分子偶联，附着或封闭在其中，它们可自身，或与其它种类分子，如肿瘤-特异性标记偶联，附着或封闭。例如，美国专利第 5,714,166, *Bioactive and/or Targeted Dendimer Conjugates*, 提供了一种制备并使用树枝状聚合物偶联物的方法，所述树枝状聚合物偶联物由至少一种具有靶指示剂的树枝型聚合物和至少一种与它偶联的生物活性剂组成。

25 本发明还包括 NTP 蛋白和/或基因与药物递送载体的治疗组合物，所述药物递送载体如脂类乳液，微胶粒聚合物，聚合物微球，电活性的聚合物，水凝胶和脂质体。

30 本发明的范围还包括转移到不需要的细胞的 NTP 或相关基因或基因等价物。肿瘤内 NTP 的过量表达可用于诱导肿瘤中细胞的死亡，并因此减少肿瘤细胞群。预期用于治疗不需要的细胞元件的 NTP 基因或基因等价物的转移具有剂量小，并可被传递到靶细胞元件的细胞后代的优点，因此所需的治疗频率和总的治疗都较少。本发明还包括编码

含有 NTP 的融合蛋白的基因到不需要的细胞或相邻细胞的转移，然后基因表达，融合蛋白产生和/或分泌，所述融合蛋白是由天然的酶或蛋白酶或前体药物裂解的，在不需要的细胞处或或其附近释放 NTP 蛋白。

本发明的范围还包括克隆重组 NTP-抗体偶联物；克隆重组 NTP 抗体片段偶联物；及克隆重组 NTP 抗体样-蛋白偶联物的用途。与导向偶联物（如抗体，抗体片段，抗体样分子，或对癌-特异性受体或其它肿瘤标记具有较高亲和性的分子）结合的克隆 NTP 的优点是，除了制造以及克隆偶联分子的标准生产之外，这种分子还结合了上述导向的优点。

10 给药形式

口服给药的固体剂型包括但不限于，胶囊剂，片剂，丸剂，粉剂，和颗粒剂。在这种固体剂型中，活性化合物与下列至少一种混合：(a)一种或多种惰性赋形剂（或载体），如枸橼酸钠或磷酸二钙；(b)填料或补充剂，如淀粉，乳糖，蔗糖，葡萄糖，甘露糖醇，和硅酸；(c)15 粘合剂，如羧甲基纤维素，藻酸盐，明胶，聚乙烯吡咯烷酮，蔗糖和阿拉伯胶；(d)保湿剂，如甘油；(e)崩解剂，如琼脂-琼脂，碳酸钙，马铃薯或木薯淀粉，海藻酸，某些复合硅酸盐，和碳酸钠；(f)溶液阻聚剂，如石蜡；(g)吸收促进剂，如季铵化合物；(h)润湿剂，如乙醇和硬脂酸单甘油酯；(i)吸附剂，如高岭土和膨润土；和(j)润滑剂，20 如滑石粉，硬脂酸钙，硬脂酸镁，固体聚乙二醇，十二烷基硫酸钠，或其混合物。对于胶囊剂，片剂，和丸剂而言，给药形式还可含有缓冲剂。

口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳液，溶液，悬浮液，糖浆剂和酏剂。除了活性化合物外，液体剂型还可含有本领域通常所25 用的惰性稀释剂，如水或其它溶剂，增溶剂，和乳化剂。代表性的乳化剂是乙醇，异丙醇，碳酸乙酯，乙酸乙酯，苯甲醇，苯甲酸苄酯，丙二醇，1,3-丁二醇，二甲基甲酰胺，油，如棉籽油，花生油，玉米胚油，橄榄油，蓖麻油，和芝麻油，甘油，四氢糠醇，聚乙二醇，脱水山梨糖醇脂肪酸酯，或这些物质的混合物等。

30 除了这种惰性稀释剂外，所述组合物还可含有佐剂，如润湿剂，乳化剂和悬浮剂，甜味剂，调味剂，和加香剂。

本发明组合物中活性成分的实际剂量水平各不相同，只要对于特

殊的组合物和给药方法而言, NTP 的量可有效获得所期望的治疗反应。因此, 所选择的剂量水平取决于所需的治疗效果, 给药途径, 治疗所需持续时间, 和其它因素。

有效量可根据哺乳动物, 包括人的体表面积给予。各种大小, 物种的动物和人(基于 mg/体表 M²) 的剂量的相互关系由 E. J. Freireich 等, *Cancer Chemother. Rep.*, 50(4):219(1966)描述。体表面积可根据个体的身高和体重大概确定(见, 例如, *Scientific Tables*, Geigy Pharmaceuticals, Ardsley, N. Y. pp. 537-538 (1970))。

给予宿主的 NTP 总的每日剂量可以是单一或均分的剂量。剂量单位组合物可含有其因数的量, 用于构成每日剂量。然而, 应当理解, 任何特定患者的特殊剂量水平取决于各种因素, 包括体重, 一般的健康状况, 性别, 饮食, 给药时间和途径, 所给予药物的效能, 吸收和排泄的速率, 与其它药物的组合及所治疗特定疾病的严重程度。

给药方法

本发明给予 NTP 组合物的方法包括, 但不限制于, 肌内, 口服, 静脉内, 腹膜内, 大脑内(实质内), 脑室内, 肿瘤内, 病变内, 真皮内, 鞘内, 鼻内, 眼内, 动脉内, 局部, 经皮, 经由气溶胶, 输注, bolus 注射, 植入装置, 持续释放系统等给予化合物。

给予本发明 NTP 的另一个方法是经皮或透皮途径。这种实施方案的其中一个例子是药膏的使用。具体而言, 可用二甲基亚砜(DMSO)或 DMSO 与棉籽油混合物中的 NTP 精细悬浮液制备药膏, 然后使药膏与哺乳动物肿瘤处的皮肤接触, 并远离皮肤凹陷内的肿瘤位点。其它介质或与其它溶剂和固体支持物的混合物也可发挥相同的作用。药膏可含有溶液或悬浮液形式的 NTP 化合物。然后将药膏施用在患者的皮肤上, 例如, 将药膏植入到通过将患者皮肤折叠并保持而形成的皮肤凹陷中, 同时利用缝线, 夹子或其它夹具。该药膏应当以这种方式使用, 这样才能确保药膏与皮肤持续接触, 而且不会干扰哺乳动物。除了利用皮肤药膏外, 还可使用任何一种装置, 只要与皮肤接触的药膏可牢固地放置。

NTP 还可以持续释放的制剂或制品形式给药。持续释放制品的适宜例子包括以一定形状物品形式存在的半渗透性聚合物基质, 例如膜, 或微胶囊。持续释放的基质包括聚酯, 水凝胶, 聚交酯(US 3, 773, 919,

EP 58,481), L-谷氨酸和 γ 乙基-L-谷氨酸酯的共聚物(Sidman 等, *Biopolymers*, 22:547-556[1983]), 聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)(Langer 等, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:167-277[1981] 和 Langer, *Chem. Tech.*, 12:98-105[1982]), 乙烯乙酸乙烯酯(Langer 等, *supra*)或聚-D(-)-3-羟丁酸(EP 133,988)。持续释放的组合物还可含有脂质体, 它可通过本领域已知的任何一种方法制备(例如, Eppstein 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-3692 [1985]; EP 36,676; EP 88,046; 和 EP 143,949)。

给予本发明 NTP 的另一个方法是直接或间接将 NTP 输注到所要治疗的肿瘤或其它组织中。这种实施方案的其中一个例子是将 NTP 直接注射到所要治疗的肿瘤或其它组织中。所述治疗可包括单次或多次注射, 或在几个小时, 几天或几个月内一次或连续注射, 所治疗肿瘤或其它组织的消退或破坏可利用活组织检查, 成像或其它监测组织生长的方法监测。到所治疗肿瘤或其它组织中的注射是通过插入到鼻, 口腔, 耳, 阴道, 直肠, 尿道口中的装置, 或通过切口进行的, 以便到达体内的肿瘤或组织, 还可与成像或光学系统, 如超声或纤维光学观测仪器联合进行的, 从而确定适宜的注射点。这种实施方案的另一个例子是使用随时间为组织提供 NTP 恒定输注的装置。

给予本发明 NTP 的另一个方法是与外科手术或相似的过程联合使用, 所述外科手术或相似的过程用于物理切除, 除去或杀死或破坏需要被除去或破坏的肿瘤或其它组织或细胞元件, 其中将本发明的 NTP 直接给予其中的肿瘤或其它组织已经被除去的周围紧邻区域, 从而破坏或阻碍不能被上述过程除去或破坏的任何肿瘤细胞或其它细胞元件的生长。

给予本发明 NTP 的另一个方法是在所要治疗的肿瘤或其它组织内植入装置。这种实施方案的其中一个例子是在所要治疗的肿瘤或其它组织中植入含有 NTP 的薄片。薄片随时间释放治疗剂量的 NTP 到组织中。可选择性或附加地, 所述组合物还可通过将吸收了本发明 NTP 的薄膜, 海绵状物或其它适宜材料植入到受影响的区域中而给药。在使用植入装置时, 所述装置可被植入到任何适宜的组织或器官中, 本发明 NTP 的递送可直接通过装置, 单次大量输注(bolus), 或连续给药, 或使用连续输注的导管。

给药的可选性方法是将 NTP 基因的一个或多个拷贝引入到所要治疗的细胞中,如果需要,诱导基因的拷贝在细胞内产生 NTP。应用基因疗法的其中一个方式是使用 NTP 基因(或者是编码本发明 NTP,或其片段,变体,或衍生物的基因组 DNA, cDNA, 和/或合成 DNA),它与组成型或诱导型启动子可操作连接,形成“基因疗法 DNA 构建体”。所述启动子与内源性 NTP 基因可以是同源的或异源的,只要它在插入所述构建体的细胞或组织类型中是活性的。基因疗法 DNA 构建体的其它成分可选择性地包括,如果需要,为位点-特异性整合而设计的 DNA 分子(例如,用于同源重组的内源性侧翼序列),组织-特异性启动子,增强子或沉默子,较之亲代细胞具有选择性优点的 DNA 分子,用作标记从而鉴定转化细胞的 DNA 分子,负选择系统,细胞特异性结合剂(例如,用于细胞定向),细胞-特异性内化因子,和通过载体提高表达的转录因子,以及能够制造载体的因子。

体内或体外递送基因到细胞或组织的方法包括(但不限制于)直接注射裸 DNA,冲击方法,脂质体-介导的转移,受体-介导的转移(配体-DNA 复合体),电穿孔,和磷酸钙沉淀。见美国专利第 4,970,154, WO 96/40958, 美国专利第 5,679,559, 美国专利第 5,676,954, 和美国专利第 5,593,875。它们还包括使用病毒载体,如逆转录病毒,腺病毒,腺伴随病毒,痘病毒,慢病毒,乳头瘤病毒或单纯疱疹病毒,使用 DNA-蛋白偶联物,以及使用脂质体。基因治疗载体的使用在美国专利第 5,672,344, 美国专利第 5,399,346, 美国专利第 5,631,236, 和美国专利第 5,635,399 中描述。

NTP 基因可通过植入到患者特定的细胞中而递送,所述细胞已经使用这里所述的那些方法在体外被基因工程改造过,从而表达和分泌本发明的 NTP 或其片段,变体,或衍生物。这种细胞可以是动物或人的细胞,可来源于患者自身的组织或其它来源,人类或非-人类。可选择性地,所述细胞可以是无限增殖化的细胞或干细胞。然而,为了减少免疫应答的机会,优选将所述细胞封闭起来,从而避免渗透到周围组织中。封闭材料通常是生物相容的,半-渗透性的聚合外壳或薄膜,它们可释放蛋白产物,并防止细胞被患者的免疫系统或源于周围组织的其它决定因素破坏。用于细胞薄膜封闭的方法是技术人员熟知的,封闭细胞的制备和它们在患者中的植入可在不进行过度实验的情况下进

行。见，例如，美国专利第 4,892,538; 5,011,472; 和 5,106,627。封闭活细胞的系统在 PCT WO 91/10425 中描述。制剂化各种其它的持续释放或控释递送工具，如脂质体载体，生物-腐蚀性颗粒或珠子的技术也是本领域已知的那些，在美国专利第 5,653,975 中描述。封闭或
5 没有封闭的细胞都可被植入到患者适当的机体组织或器官中。

给出下列实施例用来举例说明本发明。然而，应当可以理解，本发明并不限制于这些实施例中描述的特定条件或细节。说明书中任何可公开得到的文献，包括美国专利全部引入此处作为参考。

实施例 1

10 本实施例的目的是试验 NTP 对神经胶质瘤细胞和成神经细胞瘤细胞的细胞毒性作用。

成神经细胞瘤是一种主要影响儿童的癌症。它开始于颈部，胸部，腹部，或骨盆中的神经组织。它通常发生于腹部的肾上腺组织中。到被确诊的时候，癌症常常已经扩散，大部分已经扩散到淋巴结，肝，
15 肺，和/或骨髓。

神经胶质瘤是脑部肿瘤。神经胶质瘤破坏性很强，这是因为它迅速生长，并在脑内扩散。每年，大约有 20,000 个美国人被查出患有神经胶质瘤。18 个月内，有超过一半的人死亡。

细胞培养:

20 冷冻保存的神经胶质瘤细胞和成神经细胞瘤细胞是从美国典型培养物保藏中心 (ATCC), Virginia 获得的。将细胞融解并稀释在悬浮培养基中，4℃时，700rpm 离心 7 分钟。然后将细胞颗粒状物重悬浮在 CACO-2 培养基中，并于 37℃和 5% CO₂ 的条件下，在标准的 75 或 175cm² 烧瓶中培养，直到大致融合。然后使细胞经过胰蛋白酶消化，
25 并重悬浮在 CACO-2 培养基中，获得 1.5 X 10⁵ 个细胞/ml 的最终细胞密度。然后以 50μl 等分试样/样品加入到 96 孔平板的各个孔中。

给药:

对于实验 I 而言，向每个样品的培养物中加入 50μl PBS (磷酸盐缓冲溶液) (阴性对照)，磷酸盐缓冲盐水 PBS 中的 100μM 他莫昔芬
30 (阳性对照)，或试验品。

对于实验 II 而言，将 DMSO (二甲基亚砷) 中的 1mM 他莫昔芬稀释到 CACO-2 培养基中的 100μM 浓度，以 100μl/孔加入到阳性对照孔中。

将含有 CACO-2 培养基中的 1% DMSO 的载体对照也加入到该实验中。其它阴性对照包括人和牛血清白蛋白及其它非毒性多肽。

MTT 测定法:

MTT 测定法对于细胞增殖的测量而言是一种比较灵敏的测定法,它是以四氮唑盐 3, [4, 5-二甲基噻唑-2-基]-2, 5-二苯基四氮唑溴化物 (MTT) 的还原为基础的。

用对照或试验物质孵育后, 吸出培养基, 向每个孔中加入 100 μ l MTT。然后在 37℃ 和 5%CO₂ 的条件下孵育 3 小时。用酸化 (0.4 N HCl) 的异丙醇替换 MTT, 覆盖平板, 4℃ 过夜储存。然后在旋转摇动器中轻轻摇动平板 1 分钟, 在自动平板阅读器上, 分光光度测量 570nm 发射吸光度和 650nm 本底吸光度之间的差异。

结果:

实验 I:

培养成神经细胞瘤和神经胶质瘤细胞 24 小时, 然后用试验材料或对照溶液处理。这时, 向所有培养物中加入 MTT。结果以平均吸光度差值表达, 以占阴性对照的百分比表示, 结果在表 1 (神经胶质瘤细胞中的细胞毒性) 和表 2 (成神经细胞瘤细胞中的细胞毒性) 中给出。

表 1: 神经胶质瘤细胞中的细胞毒性: 24 小时

试验物 鉴定	浓度	ABS 570-650			活细胞 百分比
		样品	平均值	SD	
NC (PBS)		0.064	0.061	0.005	100
NC (PBS)		0.057			
VC (DMSO)		0.051	0.054	0.004	100
VC (DMSO)		0.056			
PC (他莫昔芬)	100 μ M	0.017	0.015	0.004	28
PC (他莫昔芬)	100 μ M	0.012			
AD7C-NTP	100-1000ng/ml	0.022	0.025	0.004	41
AD7C-NTP	100-1000ng/ml	0.028			

20 缩略语: ABS, 吸光度; NC, 阴性对照

PC, 阳性对照; SD, 标准差;

VC, 载体对照

表 2: 成神经细胞瘤细胞：24 小时孵育

试验物 鉴定	浓度				活细胞 百分比
		样品	平均值	SD	
		0.089	0.096	0.009	100
NC (PBS)		0.102			
VC (DMSO)		0.073	0.070	0.004	100
VC (DMSO)		0.067			
PC (他莫昔芬)	100μM	0.010	0.010	0.001	14
PC (他莫昔芬)	100μM	0.009			
AD7C-NTP	100-1000ng/ml	0.012	0.013	0.001	14
AD7C-NTP	100-1000ng/ml	0.014			

缩略语: ABS, 吸光度; NC, 阴性对照

PC, 阳性对照; SD, 标准差;

5 VC, 载体对照

实验 2:

本实验使用的是神经胶质瘤细胞和成神经细胞瘤细胞。向平板中加入 MTT，然后用对照或试验溶液孵育 24 小时。在第 24 小时的时候，用新鲜的培养基，对照，或试验溶液重新补足其它平板，3 天后观察。

10 结果以平均吸光度差值和占阴性对照的百分比表示，结果在表 3 (神经胶质瘤细胞) 和表 4 (成神经细胞瘤细胞) 中给出。

表 3:神经胶质瘤细胞中的细胞毒性：4 天

试验物 鉴定	浓度	ABS 570-650			活细胞 百分比
		样品	平均值	SD	
NC (PBS)		0.107	0.093	0.016	100
NC (PBS)		0.790			
VC (DMSO)		0.076	0.079	0.004	100
VC (DMSO)		0.081			
PC (他莫昔芬)	100μM	0.018	0.015	0.003	19
PC (他莫昔芬)	100μM	0.012			
AD7C-NTP	100-1000ng/ml	0.012	0.012	0.001	11
AD7C-NTP	100-1000ng/ml	0.011			

缩略语: ABS, 吸光度; NC, 阴性对照

PC, 阳性对照; SD, 标准差;

5 VC, 载体对照

表 4: 试验物对成神经细胞瘤细胞的细胞毒性作用：4 天解育

试验物 鉴定	浓度	ABS 570-650			活细胞 百分比
		样品	平均值	SD	
NC (PBS)		0.088	0.022	0.022	100
NC (PBS)		0.082			
VC (DMSO)		0.076	0.076	0.001	100
VC (DMSO)		0.077			
PC (他莫昔芬)	100μM	0.016	0.019	0.003	25
AD7C-NTP	100-1000ng/ml	0.007	0.010	0.004	11
AD7C-NTP	100-1000ng/ml	0.012			

缩略语: ABS, 吸光度; NC, 阴性对照

PC, 阳性对照; SD, 标准差;

10 VC, 载体对照

结论:

用 AD7C-NTP 处理 24 小时和 96 小时后,对神经胶质瘤细胞和成神经细胞瘤细胞的细胞毒性作用是显著的。

实施例 2

5 本实施例的目的是测定 NTP 对注射处组织的影响。

用浓度为 0.1-10 $\mu\text{g/mL}$ 的,盐水中的纯化重组 AD7C-NTP 给 8 只正常大鼠在皮肤和皮下注射,每只注射 3 个不同的位置,所述重组 AD7C-NTP 从塑料注射器,通过不锈钢 26 号针递送。

10 观察动物 24 小时,并在第 24 小时的时候,将它们无痛处死。切除渗透的 24 个单独部位,在 10%福尔马林中固定,用石蜡包埋,并染色,然后通过标准的组织病理学方法检测。

相似组的对照大鼠注射了(1)盐水中的 0.1%牛血清白蛋白,(2)正常人的血清,(3)生理盐水,(4)没有 AD7C-NTP 的,来源于载体的大肠埃希氏菌蛋白,它是使用与 AD7C-NTP 纯化相似的过程纯化的,(5)在大肠埃希氏菌中表达并纯化的非-NTP 重组蛋白,然后按照上面所述检测并处死,切除注射治疗的部位。

结果

20 在注射过 AD7C-NTP 的所有例子中,注射部位都产生了大量的组织急性坏死(图 1-5)。坏死在注射过 AD7C-NTP 的肌肉组织,皮下结缔组织,和真皮中比较明显。第 24 小时的时候,细胞变苍白,缩小并坏死,而且有炎性细胞的浸润。坏死与注射区域有关,但不会扩散到注射位置之外。

25 除了轻度炎性区域之外,对照组没有明显的坏死或细胞损耗。与注射 AD7C-NTP 出现的肌肉纤维层全部区域的坏死相反,对照组很少或没有肌肉的改变。对照注射组的注射位置有轻度到最小的急性炎症,而且针孔处有局灶微量出血。

实施例 3

本实施例的目的是测定 NTP 对不同的人类和非-人类来源的肿瘤的作用。

30 在各种不同人类和非-人类来源的肿瘤上试验 AD7C-NTP 浸润,包括乳腺癌,皮肤癌和乳头状瘤,结肠癌,脑神经胶质瘤,和啮齿类动物模型的其它癌。按照实施例 2 所述,用 AD7C-NTP 直接浸润肿瘤,观

察实验动物，在 24 小时-2 周的间隔后将它们无痛处死。处死后，按照如上所述，进行组织的组织病理学检查。

进行试验的对照肿瘤(1)没有处理过，(2)用正常人血清浸润，(3)用牛血清白蛋白浸润，和(4)用生理盐水浸润。

5 结果

在试验过的所有例子中，AD7C-NTP 浸润后的肿瘤细胞有明显的坏死(图 6-10)。2 次注射间隔 24 小时的情况比注射一次对肿瘤的破坏更大。在某些例子中，肿瘤几乎完全消退。在注射一次的其它例子中，如果不再注射 AD7C-NTP，那么肿瘤会在 1-2 周后长得更大。在注射一次 AD7C-NTP 的某些肿瘤中，2 周后进行组织病理学检查，发现先前有肿瘤的地方变成较大的空洞，周围是肿瘤的边缘，这表明浸润过的肿瘤在坏死后空洞化并消失。2 周后，对注射了一次的其它肿瘤进行组织病理学检查，发现肿瘤内有广泛的纤维化，而这在对照组中是看不到的，这是由于肿瘤的破坏和随后的纤维化。对照例子仅仅显示出局灶的微量出血和炎症及偶然的扭曲，暂时的不显著的坏死，而且没有在 AD7C-NTP 输注中列举的大量坏死。

在不背离本发明精神和范围的前提下，对本发明的方法和组合物进行各种改进和改变对于本领域那些技术人员而言是显而易见的。因此，本发明还包括本发明的改进和改变及其等价物，它们落在权利要求的范围之内。

AD7c-NTP

核酸和氨基酸序列

(美国专利第 5,830,670, 5,948,634, 和 5,948,888; de la Monte 等, *J. Clin. Invest.*, 100: 3093-3104 (1997)) 的序列 120 和 121)

NCBI Entrez-蛋白登记号# AAC08737; PID g3002527

```

1 tttttttttttgag  ATG GAG TTT TCG CTC TTG TTG CCC AGG CTG GAG TGC AAT GGC GCA ATC  62
1      M  E  F  S  L  L  L  P  R  L  E  C  N  G  A  I  16
      Met-Glu-Phe-Ser-Leu-Leu-Leu-Pro-Arg-Leu-Glu-Cys-Asn-Gly-Ala-Ile-

63 TCA GCT CAC CGC AAC CTC CGC CTC CCG GGT TCA AGC GAT TCT CCT GCC TCA GCC TCC CCA 122
17 S  A  H  R  N  L  R  L  P  G  S  S  D  S  P  A  S  A  S  P  36
      Ser-Ala-His-Arg-Asn-Leu-Arg-Leu-Pro-Gly-Ser-Ser-Asp-Ser-Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Pro-

123 GTA GCT GGG ATT ACA GGC ATG TGC ACC CAC GCT CGG CTA ATT TTG TAT TTT TTT TTA GTA 182
37 V  A  G  I  T  G  M  C  T  H  A  R  L  I  L  Y  F  F  L  V  56
      Val-Ala-Gly-Ile-Thr-Gly-Met-Cys-Thr-His-Ala-Arg-Leu-Ile-Leu-Tyr-Phe-Phe-Leu-Val-

183 GAG ATG GAG TTT CTC CAT GTT GGT CAG GCT GGT CTC GAA CTC CCG ACC TCA GAT GAT CCC 242
57 E  M  E  F  L  H  V  G  Q  A  G  L  E  L  P  T  S  D  D  P  76
      Glu-Met-Glu-Phe-Leu-His-Val-Gly-Gln-Ala-Gly-Leu-Glu-Leu-Pro-Thr-Ser-Asp-Asp-Pro-

243 TCC GTC TCG GCC TCC CAA AGT GCT AGA TAC AGG ACT GGC CAC CAT GCC CGG CTC TGC CTG 302
77 S  V  S  A  S  Q  S  A  R  Y  R  T  G  H  H  A  R  L  C  L  96
      Ser-Val-Ser-Ala-Ser-Gln-Ser-Ala-Arg-Tyr-Arg-Thr-Gly-His-His-Ala-Arg-Leu-Cys-Leu-

```

图 1A

303 GCT AAT TTT TGT GGT AGA AAC AGG GTT TCA CTG ATG TGC CCA AGC TGG TCT CCT GAG CTC 362
 97 A N F C G R N R V S L M C P S W S P E L 116
 Ala-Asn-Phe-Cys-Gly-Arg-Asn-Arg-Val-Ser-Leu-Met-Cys-Pro-Ser-Trp-Ser-Pro-Glu-Leu-

363 AAG CAG TCC ACC TGC CTC AGC CTC CCA AAG TGC TGG GAT TAC AGG CGT GCA GCC GTG CCT 422
 117 K Q S T C L S L P K C W D Y R R A A V P 136
 Lys-Gln-Ser-Thr-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-

423 GGC CTT TTT ATT TTA TTT TTT TTA AGA CAC AGG TGT CCC ACT CTT ACC CAG GAT GAA GTG 482
 137 G L F I L F F L R H R C P T L T Q D E V 156
 Gly-Leu-Phe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu-Arg-His-Arg-Cys-Pro-Thr-Leu-Thr-Gln-Asp-Glu-Val-

483 CAG TGG TGT GAT CAC AGC TCA CTG CAG CCT TCA ACT CCT GAG ATC AAG CAT CCT CCT GCC 542
 157 Q W C D H S S L Q P S T P E I K H P P A 176
 Gln-Trp-Cys-Asp-His-Ser-Ser-Leu-Gln-Pro-Ser-Thr-Pro-Glu-Ile-Lys-His-Pro-Pro-Ala-

543 TCA GCC TCC CAA GTA GCT GGG ACC AAA GAC ATG CAC CAC TAC ACC TGG CTA ATT TTT ATT 602
 177 S A S Q V A G T K D M H H Y T W L I F I 196
 Ser-Ala-Ser-Gln-Val-Ala-Gly-Thr-Lys-Asp-Met-His-His-Tyr-Thr-Trp-Leu-Ile-Phe-Ile-

603 TTT ATT TTT AAT TTT TTG AGA CAG AGT CTC AAC TCT GTC ACC CAG GCT GGA GTG CAG TGG 662
 197 F I F N F L R Q S L N S V T Q A G V Q W 216
 Phe-Ile-Phe-Asn-Phe-Leu-Arg-Gln-Ser-Leu-Asn-Ser-Val-Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-

663 CGC AAT CTT GGC TCA CTG CAA CCT CTG CCT CCC GGG TTC AAG TTA TTC TCC TGC CCC AGC 722
 217 R N L G S L Q P L P P G F K L F S C P S 236
 Arg-Asn-Leu-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Gly-Phe-Lys-Leu-Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-

723 CTC CTG AGT AGC TGG GAC TAC AGG CGC CCA CCA CGC CTA GCT AAT TTT TTT GTA TTT TTA 782
 237 L L S S W D Y R R P P R L A N F F V F L 256
 Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Pro-Pro-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe-Phe-Val-Phe-Leu-

783 GTA GAG ATG GGG TTC ACC ATG TTC GCC AGG TTG ATC TTG ATC TCT GGA CCT TGT GAT CTG 842
 257 V E M G F T M F A R L I L I S G P C D L 276
 Val-Glu-Met-Gly-Phe-Thr-Met-Phe-Ala-Arg-Leu-Ile-Leu-Ile-Ser-Gly-Pro-Cys-Asp-Leu-

图 1B

843 CCT GCC TCG GCC TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA GGC GTG AGC CAC CAC GCC CGG CTT ATT 902
 277 P A S A S Q S A G I T G V S H H A R L I 296
 Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Gln-Ser-Ala-Gly-Ile-Thr-Gly-Val-Ser-His-His-Ala-Arg-Leu-Ile-

903 TTT AAT TTT TGT TTG TTT GAA ATG GAA TCT CAC TCT GTT ACC CAG GCT GGA GTG CAA TGG 962
 297 F N F C L F E M E S H S V T Q A G V Q W 316
 Phe-Asn-Phe-Cys-Leu-Phe-Glu-Met-Glu-Ser-His-Ser-Val-Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-

963 CCA AAT CTC GGC TCA CTG CAA CCT CTG CCT CCC GGG CTC AAG CGA TTC TCC TGT CTC AGC 1022
 317 P N L G S L Q P L P P G L K R F S C L S 336
 Pro-Asn-Leu-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-

1023 CTC CCA AGC AGC TGG GAT TAC GGG CAC CTG CCA CCA CAC CCC GCT AAT TTT TGT ATT TTC 1082
 337 L P S S W D Y G H L P P H P A N F C I F 356
 Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly-His-Leu-Pro-Pro-His-Pro-Ala-Asn-Phe-Cys-Ile-Phe-

1083 ATT AGA GGC GGG GTT TCA CCA TAT TTG TCA GGC TGG TCT CAA ACT CCT GAC CTC AGG tgac
 1143
 357 I R G G V S P Y L S G W S Q T P D L R
 375
 Ile-Arg-Gly-Gly-Val-Ser-Pro-Tyr-Leu-Ser-Gly-Trp-Ser-Gln-Thr-Pro-Asp-Leu-Arg

1144 ccacctgcctcagccttccaaagtctgggattacaggcgtgagccacctcaccagccggctaatttagataaaaaaat
 1223

1224 atgtagcaatgggggtcttgctatgttcccagctggtctcaaacttctggcttcagcaatccttccaaatgagcca
 1303

1304 caacaccagccagtcacatTTTTTaaacagttacatctttatTTtagtataactagaaagtaatacaataaacatgtcaa
 1383

1384 acctgcaaattcagtagtaacagagttcttttataactTTTaaacaaagcttttagagca 1442

图 1C

NTP, 122 个氨基酸

(美国专利第 5,830,670, 5,948,634, 和 5,948,888 的序列 40)

NCBI Entrez- 蛋白登记号 #AAE25447 PID g10048540

氨基酸序列

```

1   Met-Met-Val-Cys-Trp-Asn-Arg-Phe-Gly-Lys-
    M  M  V  C  W  N  R  F  G  K

11  Trp-Val-Tyr-Phe-Ile-Ser-Ala-Ile-Phe-Asn-
    W  V  Y  F  I  S  A  I  F  N

21  Phe-Gly-Pro-Arg-Tyr-Leu-Tyr-His-Gly-Val-
    F  G  P  R  Y  L  Y  H  G  V

31  Pro-Phe-Tyr-Phe-Leu-Ile-Leu-Val-Arg-Ile-
    P  F  Y  F  L  I  L  V  R  I

41  Ile-Ser-Phe-Leu-Ile-Gly-Asp-Met-Glu-Asp-
    I  S  F  L  I  G  D  M  E  D

51  Val-Leu-Leu-Asn-Cys-Thr-Leu-Leu-Lys-Arg-
    V  L  L  N  C  T  L  L  K  R

61  Ser-Ser-Arg-Phe-Arg-Phe-Trp-Gly-Ala-Leu-
    S  S  R  F  R  F  W  G  A  L

71  Val-Cys-Ser-Met-Asp-Ser-Cys-Arg-Phe-Ser
    V  C  S  M  D  S  C  R  F  S

81  Arg-Val-Ala-Val-Thr-Tyr-Arg-Phe-Ile-Thr-
    R  V  A  V  T  Y  R  F  I  T

91  Leu-Leu-Asn-Ile-Pro-Ser-Pro-Ala-Val-Trp-
    L  L  N  I  P  S  P  A  V  W

101 Met-Ala-Arg-Asn-Thr-Ile-Asp-Gln-Gln-Val-
    M  A  R  N  T  I  D  Q  Q  V

111 Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-
    L  S  R  I  K  L  E  I  K  R

121 Cys-Leu
    C  L

```

图 2

NTP, 112 个氨基酸

NCBI Entrez- 蛋白登记号 #XP_032307 PID g14725132

氨基酸序列

```

1   Met-Ala-Gln-Ser-Arg-Leu-Thr-Ala-The-Ser-
    M  A  Q  S  R  L  T  A  T  S

11  Ala-Ser-Arg-Val-Gln-Ala-Ile-Leu-Leu-Ser-
    A  S  R  V  Q  A  I  L  L  S

21  Gln-Pro-Pro-Lys-Gln-Leu-Gly-Leu-Arg-Ala-
    Q  P  P  K  Q  L  G  L  R  A

31  Pro-Ala-Asn-Thr-Pro-Leu-Ile-Phe-Val-Phe-
    P  A  N  T  P  L  I  F  V  F

41  Ser-Leu-Glu-Ala-Gly-Phe-His-His-Ile-Cys-
    S  L  E  A  G  F  H  H  I  C

51  Gln-Ala-Gly-Leu-Lys-Leu-Leu-Thr-Ser-Gly-
    Q  A  G  L  K  L  L  T  S  G

61  Asp-Pro-Pro-Ala-Ser-Ala-Phe-Gln-Ser-Ala-
    D  P  P  A  S  A  F  Q  S  A

71  Gly-Ile-Thr-Gly-Val-Ser-His-Leu-Thr-Gln-
    G  I  T  G  V  S  H  L  T  Q

81  Pro-Ala-Asn-Leu-Asp-Lys-Lys-Ile-Cys-Ser-
    P  A  N  L  D  K  K  I  C  S

91  Asn-Gly-Gly-Ser-Cys-Tyr-Val-Ala-Gln-Ala-
    N  G  G  S  C  Y  V  A  Q  A

101 Gly-Leu-Lys-Leu-Leu-Ala-Ser-Cys-Asn-Pro-
    G  L  K  L  L  A  S  C  N  P

111 Ser-Lys
    S  K
  
```

图 3

NTP, 106 个氨基酸

NCBI Entrez- 蛋白登记号 #AAH14951 PID g15928971

```

1    Met-Trp-Thr-Leu-Lys-Ser-Ser-Leu-Val-Leu-
      M   W   T   L   K   S   S   L   V   L

11   Leu-Leu-Cys-Leu-Thr-Cys-Ser-Tyr-Ala-Phe-
      L   L   C   L   T   C   S   Y   A   F

21   Met-Phe-Ser-Ser-Leu-Arg-Gln-Lys-Thr-Ser-
      M   F   S   S   L   R   Q   K   T   S

31   Glu-Pro-Gln-Gly-Lys-Val-Pro-Cys-Gly-Glu-
      E   P   Q   G   K   V   P   C   G   E

41   His-Phe-Arg-Ile-Arg-Gln-Asn-Leu-Pro-Glu-
      H   F   R   I   R   Q   N   L   P   E

51   His-Thr-Gln-Gly-Trp-Leu-Gly-Ser-Lys-Trp-
      H   T   Q   G   W   L   G   S   K   W

61   Leu-Trp-Leu-Leu-Phe-Ala-Val-Val-Pro-Phe-
      L   W   L   L   F   A   V   V   P   F

71   Val-Ile-Leu-Lys-Cys-Gln-Arg-Asp-Ser-Glu-
      V   I   L   K   C   Q   R   D   S   E

81   Lys-Asn-Lys-Val-Arg-Met-Ala-Pro-Phe-Phe-
      K   N   K   V   R   M   A   P   F   F

91   Leu-His-His-Ile-Asp-Ser-Ile-Ser-Gly-Val-
      L   H   H   I   D   S   I   S   G   V

101  Ser-Gly-Lys-Arg-Met-Phe
      S   G   K   R   M   F

```

图 4

NTP, 106 个氨基酸

NCBI Entrez- 蛋白登记号 #XP_039102, PID g18599339

```

1    Met-Phe-Phe-Val-Leu-Tyr-Arg-Phe-Cys-Phe-
      M   F   F   V   L   Y   R   F   C   F

11   Cys-Phe-Phe-Glu-Thr-Glu-Ser-His-Ser-Leu-
      C   F   F   E   T   E   S   H   S   L

21   Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-Cys-Glu-Leu-
      T   Q   A   G   V   Q   W   C   E   L

31   Gly-Ser-Pro-Gln-Pro-Leu-Pro-Ser-Gly-Phe-
      G   S   P   Q   P   L   P   S   G   F

41   Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Leu-Ser-
      K   R   F   S   C   L   S   L   L   S

51   Ser-Trp-Asp-Tyr-Ser-His-Glu-Pro-Pro-His-
      S   W   D   Y   S   H   E   P   P   H

61   Pro-Val-Ile-Cys-Ser-Phe-Leu-Met-Glu-Lys-
      P   V   I   C   S   F   L   M   E   K

71   Cys-Leu-Ile-Leu-Tyr-Lys-Pro-Asn-Gly-Asp-
      C   L   I   L   Y   K   P   N   G   D

81   Thr-Ile-Gly-Pro-Ile-Leu-Val-Gln-Gln-Gly-
      T   I   G   P   I   L   V   Q   Q   G

91   Lys-Arg-Gln-Lys-Leu-Tyr-Ile-Ser-Ala-Asp-
      K   R   Q   K   L   Y   I   S   A   D

100  Leu-Val-His-Leu-Ile-Ala
      L   V   H   L   I   A

```

图 5

NTP, 98 个氨基酸

(美国专利第 5,830,670, 5,948,634, 和 5,948,888 的序列 30)

NCBI Entrez- 蛋白登记号 # AAE25445, PID g10048538

```
1   Glu-Ala-Tyr-Tyr-Thr-Met-Leu-His-Leu-Pro-
    E   A   Y   Y   T   M   L   H   L   P

11  Thr-Thr-Asn-Arg-Pro-Lys-Ile-Ala-His-Cys
    T   T   N   R   P   K   I   A   H   C

21  Ile-Leu-Phe-Asn-Gln-Pro-His-Ser-Pro-Arg-
    I   L   F   N   Q   P   H   S   P   R

31  Ser-Asn-Ser-His-Ser-His-Pro-Asn-Pro-Leu-
    S   N   S   H   S   H   P   N   P   L

41  Lys-Leu-His-Arg-Arg-Ser-His-Ser-His-Asn-
    K   L   H   R   R   S   H   S   H   N

51  Arg-Pro-Arg-Ala-Tyr-Ile-Leu-Ile-Thr-Ile-
    R   P   R   A   Y   I   L   I   T   I

61  Leu-Pro-Ser-Lys-Leu-Lys-Leu-Arg-Thr-His-
    L   P   S   K   L   K   L   R   T   H

71  Ser-Gln-Ser-His-His-Asn-Pro-Leu-Ser-Arg-
    S   Q   S   H   H   N   P   L   S   R

81  Thr-Ser-Asn-Ser-Thr-Pro-Thr-Asn-Ser-Phe-
    T   S   N   S   T   P   T   N   S   F

91  Leu-Met-Thr-Ser-Ser-Lys-Pro-Arg
    L   M   T   S   S   K   P   R
```

图 6

NTP, 75 个氨基酸

(美国专利第 5,830,670, 5,948,634, 和 5,948,888 的序列 48)

NCBI Entrez· 蛋白登记号 #AAE25448, PID g10048541

```
1   Ser-Ser-Ser-Leu-Gly-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-
    S   S   S   L   G   L   P   K   C   W

11  Asp-Tyr-Arg-His-Glu-Leu-Leu-Ser-Leu-Ala-
    D   Y   R   H   E   L   L   S   L   A

21  Leu-Met-Ile-Asn-Phe-Arg-Val-Met-Ala-Cys
    L   M   I   N   F   R   V   M   A   C

31  Thr-Phe-Lys-Gln-His-Ile-Glu-Leu-Arg-Gln-
    T   F   K   Q   H   I   E   L   R   Q

41  Lys-Ile-Ser-Ile-Val-Pro-Arg-Lys-Leu-Cys-
    K   I   S   I   V   P   R   K   L   C

51  Cys-Met-Gly-Pro-Val-Cys-Pro-Val-Lys-Ile-
    C   M   G   P   V   C   P   V   K   I

61  Ala-Leu-Leu-Thr-Ile-Asn-Gly-His-Cys-Thr-
    A   L   L   T   I   N   G   H   C   T

71  Trp-Leu-Pro-Ala-Ser
    W   L   P   A   S
```

图 7

NTP, 68 个氨基酸

(美国专利第 5,830,670, 5,948,634, 和 5,948,888 的序列36)

NCBI Entrez- 蛋白登记号 #AAE25446, PID g10048539

```
1   Met-Phe-Val-Phe-Cys-Leu-Ile-Leu-Asn-Arg-  
    M   F   V   F   C   L   I   L   N   R  
  
11  Glu-Lys-Ile-Lys-Gly-Gly-Asn-Ser-Ser-Phe-  
    E   K   I   K   G   G   N   S   S   F  
  
21  Phe-Leu-Leu-Ser-Phe-Phe-Phe-Ser-Phe-Gln-  
    F   L   L   S   F   F   F   S   F   Q  
  
31  Asn-Cys-Cys-Gln-Cys-Phe-Gln-Cys-Arg-Thr-  
    N   C   C   Q   C   F   Q   C   R   T  
  
41  Thr-Glu-Gly-Tyr-Ala-Val-Glu-Cys-Phe-Tyr-  
    T   E   G   Y   A   V   E   C   F   Y  
  
51  Cys-Leu-Val-Asp-Lys-Ala-Ala-Phe-Glu-Cys-  
    C   L   V   D   K   A   A   F   E   C  
  
61  Trp-Trp-Phe-Tyr-Ser-Phe-Asp-Thr  
    W   W   F   Y   S   F   D   T
```

图 8

NTP, 61 个氨基酸

NCBI Entrez- 蛋白登记号 #AAH02534, PID gl2803421

```
1   Met-Glu-Pro-His-Thr-Val-Ala-Gln-Ala-Gly-  
    M  E  P  H  T  V  A  Q  A  G  
  
11  Val-Pro-Gln-His-Asp-Leu-Gly-Ser-Leu-Gln-  
    V  P  Q  H  D  L  G  S  L  Q  
  
21  Ser-Leu-Leu-Pro-Arg-Phe-Lys-Arg-Phe-Ser-  
    S  L  L  P  R  F  K  R  F  S  
  
31  Cys-Leu-Ile-Leu-Pro-Lys-Ile-Trp-Asp-Tyr-  
    C  L  I  L  P  K  I  W  D  Y  
  
41  Arg-Asn-Met-Asn-Thr-Ala-Leu-Ile-Lys-Arg-  
    R  N  M  N  T  A  L  I  K  R  
  
51  Asn-Arg-Tyr-Thr-Pro-Glu-Thr-Gly-Arg-Lys-  
    N  R  Y  T  P  E  T  G  R  K  
  
61  Ser  
    S
```

图 9

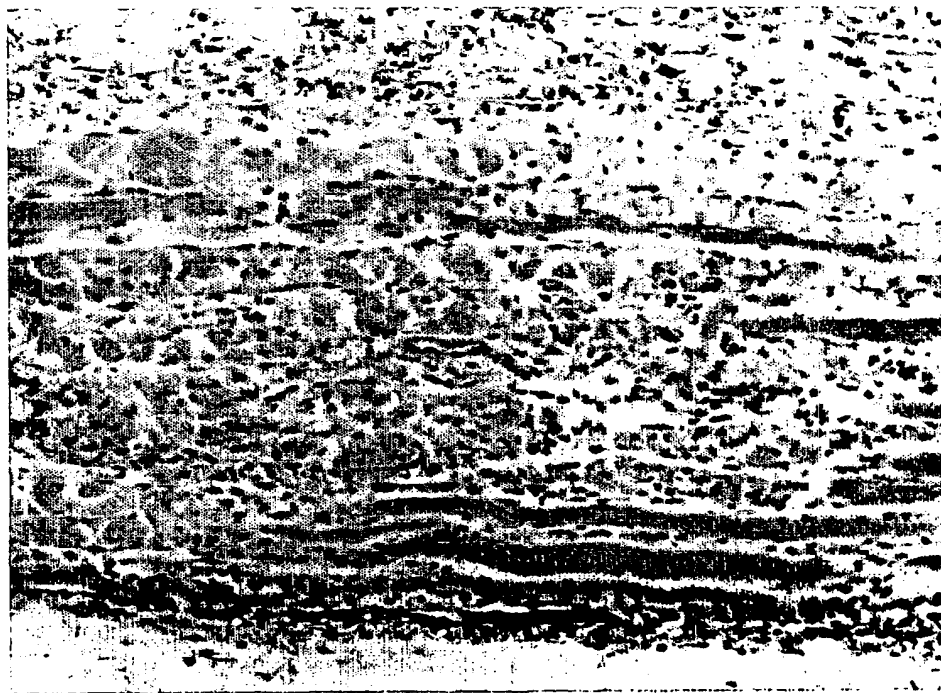


图 10

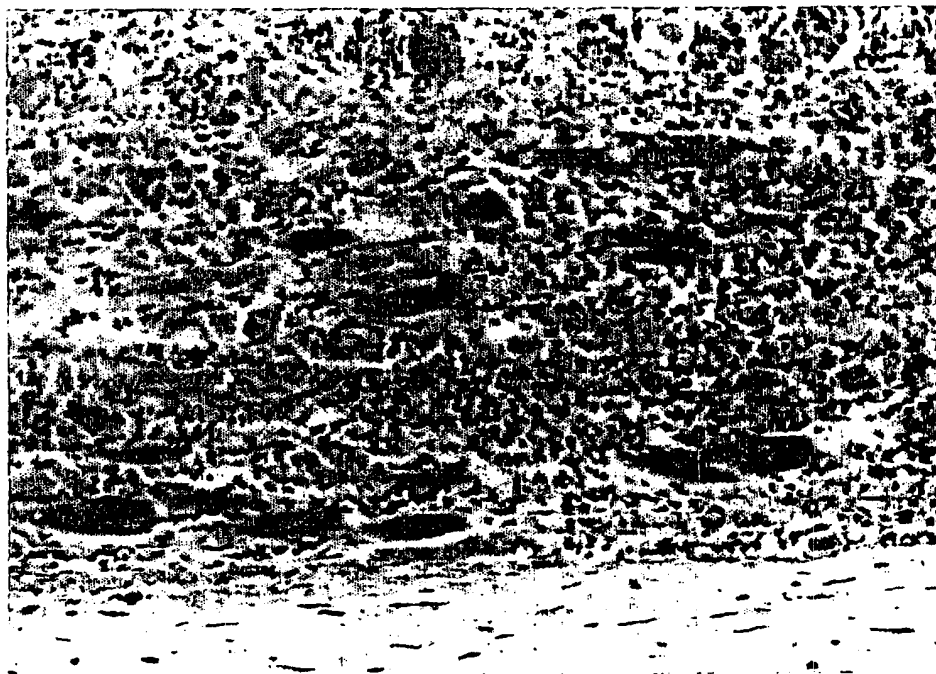


图 11



图 12

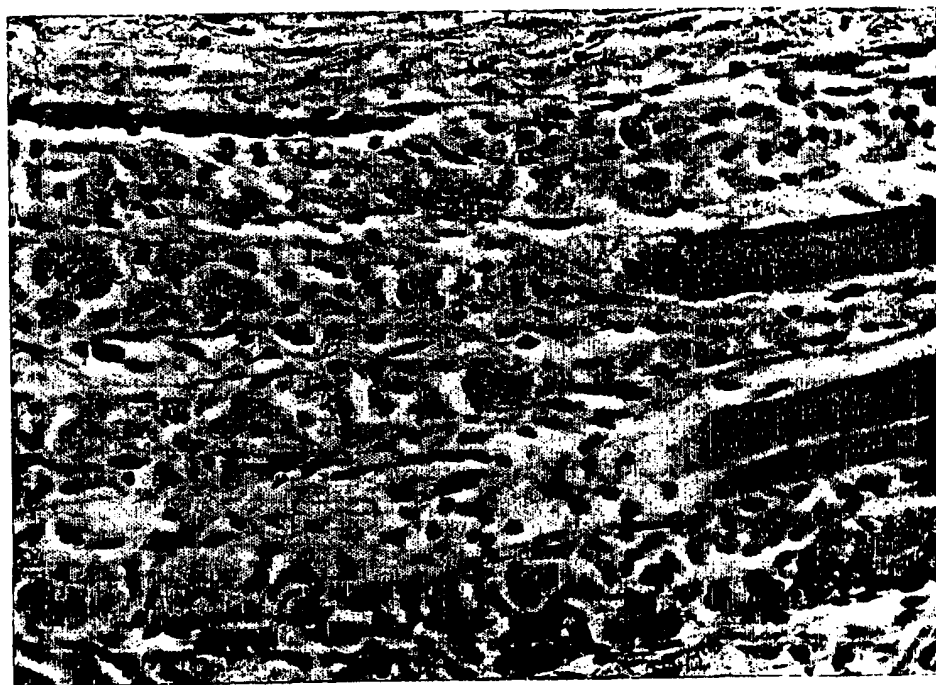


图 13

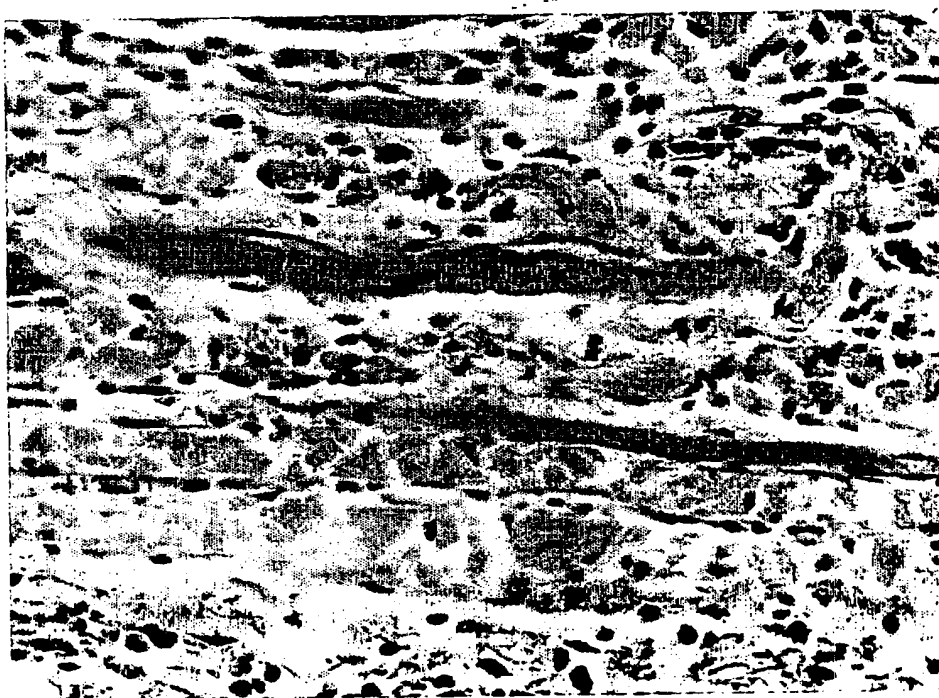


图 14



图 15

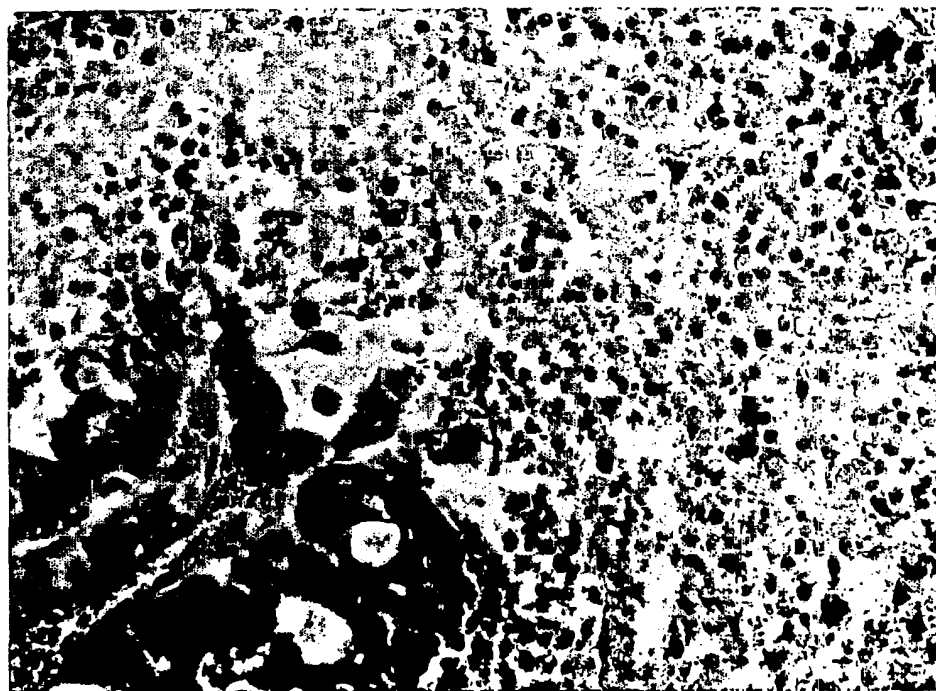


图 16



图 17

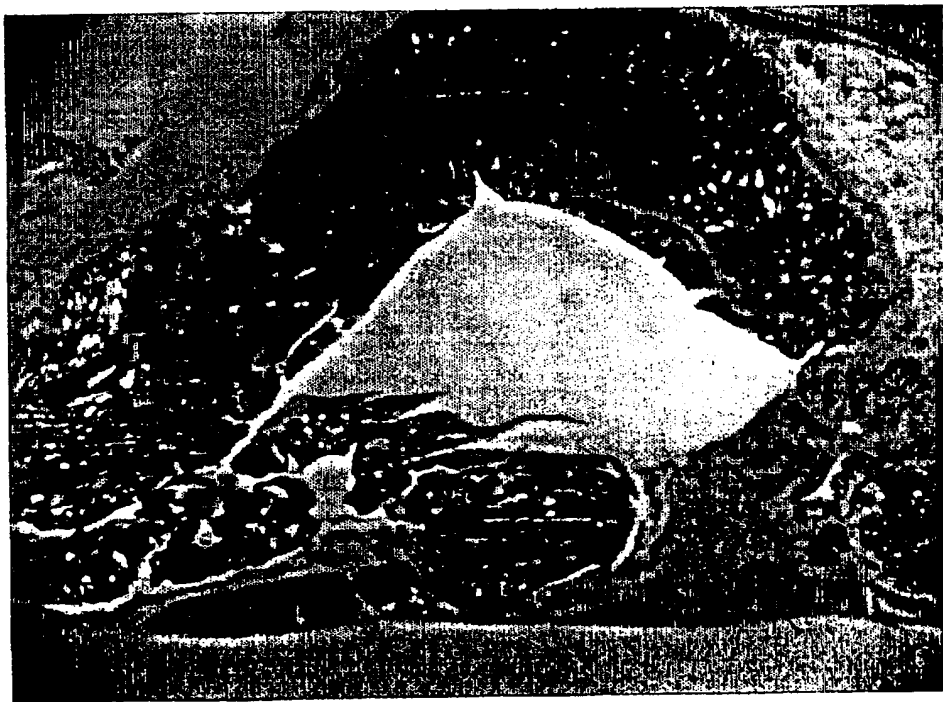


图 18

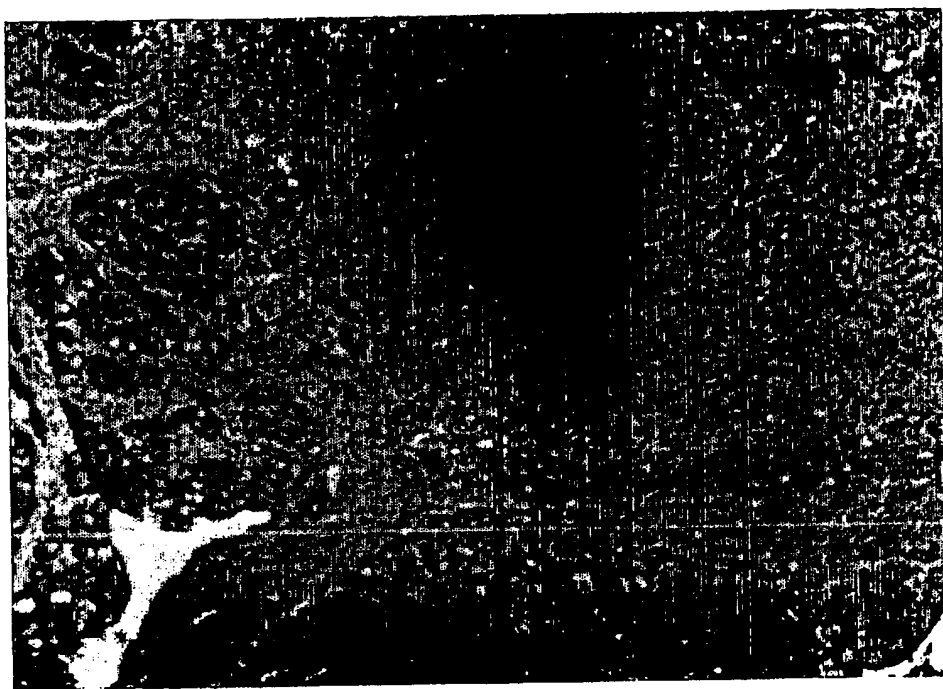


图 19