

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780006719.4

[51] Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年3月18日

[11] 公开号 CN 101389760A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

[22] 申请日 2007.2.28

[21] 申请号 200780006719.4

[30] 优先权

[32] 2006.2.28 [33] US [31] 60/776,933

[86] 国际申请 PCT/CA2007/000318 2007.2.28

[87] 国际公布 WO2007/098588 英 2007.9.7

[85] 进入国家阶段日期 2008.8.26

[71] 申请人 尼莫克斯股份有限公司

地址 加拿大魁北克

[72] 发明人 P·A·艾弗白克 J·杰梅尔

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 余颖

权利要求书 3 页 说明书 36 页

[54] 发明名称

有效治疗肿瘤或其他需要除去或破坏细胞的病症的肽

[57] 摘要

本发明包括用小肽化合物治疗需要除去或破坏细胞元件的人类病症，如良性或恶性肿瘤的方法。所述方法包括，但不限于通过肌内、经口、静脉内、鞘内、肿瘤内、鼻内、局部、透皮等单独或与载体偶联给予所述化合物。

1. 一种分离的肽，所述肽由 SEQ ID NO. 1 (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu) 所示氨基酸序列构成的肽的片段构成。

2. 如权利要求 1 所述的肽，其特征在于，所述肽选自下组：

a) 由 SEQ ID NO. 2 (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile) 所示氨基酸序列构成的肽；

b) 由 SEQ ID NO. 3 (Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu) 所示氨基酸序列构成的肽；

c) 由 SEQ ID NO. 4 (Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys) 所示氨基酸序列构成的肽；

d) 由 SEQ ID NO. 5 (Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys) 所示氨基酸序列构成的肽；

e) 由 SEQ ID NO. 6 (Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu) 所示氨基酸序列构成的肽；和

f) 由 SEQ ID NO. 7 (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile) 所示氨基酸序列构成的肽。

3. 一种组合物，所述组合物包含至少一种如权利要求 1 所述的肽和载体。

4. 一种如权利要求 1 所述的肽的模拟物。

5. 一种分离的肽，所述肽包含由 SEQ ID NO. 1 (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu) 所示氨基酸序列构成的肽的至少两个片段。

6. 一种分离的肽，所述肽包含由 SEQ ID NO. 1 (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu) 所示氨基酸序列构成的肽的片段的至少两个重复。

7. 一种分离的肽，根据由 SEQ ID NO. 1 (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu) 所示氨基酸序列构成的肽的片段的氨基酸序列，该分离的肽包含的氨基酸序列为反-D 顺序。

8. 一种分离的肽，所述肽包含与抗体、抗体片段或抗体样分子融合的由 SEQ ID NO. 1 (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu) 所示氨基酸序列构成的肽的片段。

9. 一种分离的肽，所述肽包含由 SEQ ID NO. 1 (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu) 所示氨基酸序列构成的肽的片段和至少 1 个到至多 25 个侧接在该肽 3' 或 5' 末端的额外氨基酸，其中所述分离的肽不包含由 SEQ ID NO. 1 (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu) 所示氨基酸序列构成的肽。

10. 一种核酸，所述核酸编码与权利要求 1 所述的肽及其同源物、片段和变体相对应的氨基酸序列。

11. 一种组合物，所述组合物包含一种或多种核酸如权利要求 10 所述的核酸和药学上可接受的载体。

12. 一种治疗哺乳动物的病症的方法，所述病症要求除去或破坏细胞，所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的如权利要求 1 所述的肽。

13. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述肽通过选自下组的方法给予：经口、皮下、真皮内、鼻内、静脉内、肌内、鞘内、鼻内、肿瘤内、局部、和透皮。

14. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，在用选自下组的治疗方法治疗该哺乳动物之前、期间或之后对所述哺乳动物实施所述方法：手术切除、移植、嫁接、化疗、免疫疗法、疫苗接种、热或电消融、冷冻疗法、激光疗法、光疗、基因疗法、和放疗。

15. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述病症是选自下组的组织的良性或恶性肿瘤：肺、乳房、胃、胰、前列腺、膀胱、骨、卵巢、皮肤、肾、窦、结肠、肠、胃、直肠、食道、心、脾、唾液腺、血液、大脑和其覆盖物、脊髓和其覆盖物、肌肉、结缔组织、肾上腺、副甲状腺、甲状腺、子宫、睾丸、垂体、生殖器官、肝脏、胆囊、眼、耳、鼻、喉、扁桃腺、口、以及淋巴结和淋巴系统。

16. 如权利要求 12 所述的方法, 其特征在于, 所述病症是选自下组的组织的增生、肥大或过度生长: 肺、乳房、胃、胰、前列腺、膀胱、骨、卵巢、皮肤、肾、窦、结肠、肠、胃、直肠、食道、心、脾、唾液腺、血液、大脑和其覆盖物、脊髓和其覆盖物、肌肉、结缔组织、肾上腺、副甲状腺、甲状腺、子宫、睾丸、垂体、生殖器官、肝脏、胆囊、眼、耳、鼻、喉、扁桃腺、口、以及淋巴结和淋巴系统。

17. 如权利要求 12 所述的方法, 其特征在于, 所述病症是受病毒、细菌或寄生虫改变的组织, 所述组织选自: 肺、乳房、胃、胰、前列腺、膀胱、骨、卵巢、皮肤、肾、窦、结肠、肠、胃、直肠、食道、心、脾、唾液腺、血液、大脑和其覆盖物、脊髓和其覆盖物、肌肉、结缔组织、肾上腺、副甲状腺、甲状腺、子宫、睾丸、垂体、生殖器官、肝脏、胆囊、眼、耳、鼻、喉、扁桃腺、口、以及淋巴结和淋巴系统。

18. 如权利要求 12 所述的方法, 其特征在于, 所述病症是选自下组的组织的畸形: 肺、乳房、胃、胰、前列腺、膀胱、骨、卵巢、皮肤、肾、窦、结肠、肠、胃、直肠、食道、心、脾、唾液腺、血液、大脑和其覆盖物、脊髓和其覆盖物、肌肉、结缔组织、肾上腺、副甲状腺、甲状腺、子宫、睾丸、垂体、生殖器官、肝脏、胆囊、眼、耳、鼻、喉、扁桃腺、口、以及淋巴结和淋巴系统。

19. 一种预防或抑制支架的狭窄、封闭或堵塞的方法, 所述方法包括用至少治疗有效量的如权利要求 1 所述肽涂布该支架。

有效治疗肿瘤或其他需要除去或破坏细胞的病症的肽

相关申请的交叉参考

本申请要求 2006 年 2 月 28 日提交的美国临时申请 No. 60/776,933 的优先权，在此将它们全文并入以供参考。

发明背景

1. 发明领域

本发明包括用基于小肽的化合物治疗需要除去或破坏细胞元件(cellular element)，如良性或恶性肿瘤的人类病症的方法。所述方法包括，但不限于，肌内、经口、静脉内、鞘内、肿瘤内、鼻内、局部、透皮等单独或与载体联合给予所述化合物。

2. 相关技术的描述

许多医学治疗和处理方法的实质包括除去或破坏有害或不需要的组织。这种重要治疗的例子包括手术切除癌性生长物、通过化疗破坏转移性肿瘤和减少腺(如前列腺)增生。其它例子包括除去不需要的面部毛发、除去疣、以及除去不需要的脂肪组织。

明显需要有效试剂能破坏以便除去或抑制有害或不需细胞和组织的进一步生长，但主要具有局部效应而全身毒性最小或没有。

该类试剂描述于待审批美国专利申请序列号 10/092,934，题为“用神经丝状蛋白治疗肿瘤和相关病症的方法(Methods of Treating Tumors and Related Conditions Using Neural Thread Proteins)”；序列号 10/153,334，题为“有效治疗肿瘤和其它需要除去或破坏细胞的病症的肽(Peptides Effective In The Treatment Of Tumors And Other Conditions Requiring The Removal Or Destruction Of Cells)”；序列号 10/198,069，题为“有效治疗肿瘤和其它需要除去或破坏细胞的病症的肽(Peptides Effective In The Treatment Of Tumors And Other Conditions

Requiring The Removal Or Destruction Of Cells)”; 序列号 10/198,070, 题为“有效治疗肿瘤和其它需要除去或破坏细胞的病症的肽(Peptides Effective In The Treatment Of Tumors And Other Conditions Requiring The Removal Or Destruction Of Cells)”; 序列号 10/294,891, 题为“有效治疗肿瘤和其它需要除去或破坏细胞的病症的肽(Peptides Effective In The Treatment Of Tumors And Other Conditions Requiring The Removal Or Destruction Of Cells)”; 以及序列号 10/920,313, 题为“有效治疗肿瘤和其它需要除去或破坏细胞的病症的肽(Peptides Effective In The Treatment Of Tumors And Other Conditions Requiring The Removal Or Destruction Of Cells)”, 它们各自的内容全部纳入本文供参考。

本文披露的是一种此类肽试剂 (SEQ ID NO. 1 : Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu) 的组合物、片段和亚序列, 它们还可用于治疗肿瘤和其他需要除去或破坏细胞的病症。

癌是细胞内部调节机制发生的异常, 导致不受控制的细胞生长和繁殖。正常细胞构成组织, 当这些细胞失去作为专门化、受控制和协同单元的能力(去分化)时, 这种缺陷会导致细胞群发生混乱。当它发生时, 即形成肿瘤。

组织的良性过度生长是异常情况, 此时需要从机体中除去细胞。良性肿瘤是不会全身转移但能引起病症症状的细胞增殖。如果这种肿瘤位于器官如脑中难以到达的区域, 它们可能是致命的。良性肿瘤存在于许多器官中, 包括肺、脑、皮肤、垂体、甲状腺、肾上腺皮质和肾上腺髓质、卵巢、子宫、睾丸、结缔组织、肌肉、肠、耳、鼻、喉、扁桃腺、口、肝脏、胆囊、胰、前列腺、心、以及其他器官。

在癌症治疗中手术通常是第一步。手术的目的不同。有时用手术尽可能多地除去明显的肿瘤, 或至少使它“除块”(除去主要的肿瘤块从而减少对其它方法治疗的需要)。取决于癌种类和位置, 手术也可为病人提供一些症状缓解。例如, 如果手术切除了大部分扩增的脑肿瘤, 颅内压将减少, 使病人的症状改善。

不是所有的肿瘤都适于手术。一些肿瘤可能位于不能完全除去的身体部位。这些肿瘤例子是脑干(脑中控制呼吸的部分)中的肿瘤或生长在主要血管中和周围的肿瘤。在这些情况中, 由于肿瘤切除相关的高风险, 手术的作用有限。

在一些情况中，不用手术切除肿瘤块，因为简单不需要。一个例子是霍奇金淋巴瘤，这是对化疗和放疗组合有良好反应的淋巴结癌症。在霍奇金淋巴瘤中，很少需要手术来实现治愈，而手术几乎都是用于确定诊断。

化疗是癌症治疗的另一种常用形式。其实质上包括使用能特异性攻击全身中快速分裂细胞(如肿瘤中所见的细胞)的药物(通常通过口服或注射给予)。这使化疗可用于治疗转移癌以及通过血液和淋巴系统扩散的可能性高但尚未明显超过原发性肿瘤部位的肿瘤。化疗也可用于提高局部肿瘤对手术和放疗的反应。例如对于一些头部和颈部的癌症。

不幸的是，人体中正常快速分裂的其它细胞(如胃的内皮层和毛发)也会受到化疗影响。由于这个原因，许多化疗剂会导致不良副作用如恶心、呕吐、贫血、脱发或其它症状。这些副作用是暂时性的，目前的药物可帮助减轻许多这些副作用。随着我们的知识持续增长，学者们设计了更新的化疗剂，它们不仅能更好地杀死癌细胞且对病人的副作用更小。

化疗药物可以多种方式给予病人。一些是药丸，一些通过静脉内或其它部位注射给药。就可注射的化疗药物而言，病人须到医生诊所或医院接受治疗。其它化疗剂需要一天 24 小时连续输入血流中。对于这些类型的化疗药物，可进行小手术给病人植入小泵。用泵慢慢给药。在许多情况中，须在病人静脉中安置永久性输液管口以免需要反复针刺。

放疗是常用的另一种抗癌武器。放射线通过破坏肿瘤细胞内的 DNA 来杀死癌(细胞)。射线可用不同方式传送。最普通的方法包括以高精度方式使放射线束指向病人，集中照射在肿瘤上。为此，病人须躺在台上光束围绕他/她周围移动。此可程持续几分钟，但可每天进行，连续数周(取决于肿瘤类型)以达到特定的总处方放射量。

有时采用称为近程治疗的另一种放射方法，包括采用放射性小丸(“辐射盒(seed)”)或电线，将它们植入身体的肿瘤区域中。植入物可以是暂时或永久性的。就永久性植入而言，辐射盒中的射线在几天或几周中“衰变”从而病人不会有放射性。就暂时性植入而言，总放射剂量通常须在数天中输入，病人在此时间中必须住院。对于这两种近程治疗，一般须将放射线递送精确区域以获得对癌症的局部控制(此与全身治疗，如化疗相反)。

一些高度选择的病人可求助于骨髓移植。通常进行此种治疗是因为病人患有显著的侵袭性癌或因为他们经常疗法治疗后癌症复发。骨髓移植是一复杂的过程。有许多种类且它们引起副作用和治愈的可能性不同。大多数移植须在特定的医疗中心进行，在许多情况中采用移植认为是研究性的。

有许多其它治疗方法，尽管大部分仍在临床考核中探索，未成为标准治疗方法。例子包括免疫治疗、单克隆抗体、抗血管生成因子和基因治疗。

免疫治疗：设计了多种技术以促进病人自身免疫系统抵抗癌症，这与放疗或化疗完全不同。为达到此目的，学者们常用特制疫苗给病人注射。

单克隆抗体：利用癌和非癌细胞之间抗原性或/或其它特征的差异设计用于粘附癌细胞(而非正常细胞)的抗体。抗体可单独给予病人，或与各种细胞毒化合物偶联或采用放射性形式，从而使抗体优先靶向癌性细胞，藉此将毒性剂或放射剂递送给需要的细胞。

抗血管生成因子：由于癌细胞迅速分裂和肿瘤生长，它们可能很快长得超过其血液供应。为补偿这点，一些肿瘤可分泌据信能协助诱导其周围血管生长的物质，从而向癌细胞提供血管来源的营养物。已设计了实验性疗法以阻止血管长入肿瘤。

基因疗法：癌症是一系列突变的产物，最终导致癌细胞产生及其过度增殖。治疗癌症可通过将能阻止或停止癌增殖的基因引入癌细胞、开启细胞的程序性细胞（死亡）机制以破坏癌细胞、增强细胞的免疫识别、或表达能转变成毒性代谢物的前体药物或抑制肿瘤生长的细胞因子。

良性肿瘤和畸形也可通过多种方法治疗，包括手术、放疗、药物治疗、热和电烧灼、冷冻疗法等。尽管良性肿瘤不转移，它们可长大且可复发。手术根除良性肿瘤通常有困难和手术副作用，而一些良性肿瘤，如垂体腺瘤、脑膜瘤、前列腺增生等须要反复进行手术。

还有其它一些疾患包含不需要的细胞元件，需要选择性去除这些细胞。例如心脏病和中风一般由动脉粥样硬化所引起，而动脉粥样硬化是纤维脂肪和改性的平滑肌元件的增殖性损伤致使血管壁扭曲、血管腔狭窄、血流收缩、易发病灶性血栓并最终导致阻塞和梗塞。治疗动脉粥样硬化的各种方法包括：旁路移植；人工移植；采用血管再通、刮除、放射、激光或其它去除阻塞的血管成

形术；通过降低脂质抑制动脉粥样硬化的药物治疗；抗凝血治疗；和饮食、锻炼及生活方式的常规手段。仍需要一种除去动脉粥样硬化性损伤而无手术过程的风险和副作用的方法。

其它需要选择性去除不想要的细胞元件的例子包括病毒诱导的生长物如疣。另一个例子是炎症情况中所见的肥大炎性块和肥大疤痕或瘢痕瘤。其它例子见于化妆美容时例如除去不想要的毛发如面部汗毛，或为美容目的须除去面部皮肤和结缔组织中或四肢皮肤和结缔组织中皱缩的不需要的组织区域。

其他需要选择性细胞除去或抑制细胞增殖的不需要细胞元件的例子包括循环系统中的任何动脉、瓣膜或管，包括但不限于瓣膜(例如包括大动脉瓣膜孔狭窄的大动脉狭窄)，冠状动脉的(例如包括冠状动脉口狭窄的冠状动脉硬化)，颈动脉和肾动脉的狭窄或再狭窄。其他例子包括抑制或去除不良细胞生长或聚集，这些生长或聚集导致例如置于或移植于血管内用于治疗其中的狭窄、缩窄或动脉瘤，或置于或移植于尿道和胆管内的医疗设备部分或完全阻塞。

其它例子是此领域一般技术人员知道的。在所有或大部分这些例子中，都需要能除去或破坏不想要的细胞元件而无常规疗法的风险和副作用，和更精确除去不想要细胞元件的治疗方法。

在包括上述相关领域描述在内的整篇说明书中，本文所述的任何和所有公开文献，包括任何和所有美国专利均专门全文纳入本文以供参考。上述相关领域的描述不是以任何方式承认包括待审批美国专利申请在内的任何本文所述文献是本发明的现有技术。此外，本文描述的与这些产品、方法和/和仪器有关的缺点不是为了限制本发明。事实上，本发明的各方面可以包括所述产品、方法和/或仪器的某些特征，而不受其缺点所限。

发明概述

此领域仍需要新的、毒性较弱的治疗不需要的细胞元件的方法。本发明可满足这些需求。

本发明部分基于发现某些肽，包括氨基酸序列 Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu 描述的特定肽，能够治疗和/或杀死不需要的细胞增殖。这些不需要的细胞增殖包括例如

良性和恶性肿瘤、腺(如前列腺)增生、不需要的面部毛发、疣和不需要的脂肪组织等。

本发明部分基于这项令人吃惊且出乎意料的发现，即肽 Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu (“S05A 肽”)的某些肽片段和亚序列也能够治疗和/或杀死不需要的细胞增殖。

一些实施方式涉及治疗不需要的细胞增殖(良性或恶性肿瘤、腺(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，该方法包括给予有此需要的哺乳动物治疗有效量的 S05A 肽。

这种 S05A 肽可单独或者结合载体或抗体施用。用通过肌肉、经口、静脉内、腹膜内、脑内(实质内)、脑室内、肿瘤内、病灶内(interlesionally)、真皮内、鞘内、鼻内、眼内、动脉内、局部、透皮、通过气雾剂、灌输、推注、移植装置、缓释系统等单独或结合载体施用 S05A 肽。另外，由于遗传改变或其它方式，可通过施用表达 S05A 肽的基因、通过施用诱导这类生成的疫苗或通过引入体内表达该肽的细胞、细菌或病毒而在体内表达 S05A 肽。

此外，S05A 肽可结合其它剂剂使用来治疗良性和恶性肿瘤和其它不需要或有害的细胞生长。

上述一般描述和以下详述是示范性和说明性的，是对所宣称发明的进一步说明。从以下的发明详述中，其它目标、优点和特征对于本领域技术人员是显而易见的。

优选实施方式详述

在描述本发明的蛋白质、核苷酸序列、肽等和方法之前，应理解本发明不限于所述的具体方法、方案、细胞系、载体和试剂，因为这些都可以变化。还应该理解本文所用的术语仅为描述具体实施例，不是要限制本发明的范围，该范围仅由权利要求来限制。

除非另有说明，这里使用的术语和词组按如下定义。

除非文中另有明确指出，在整篇说明书中，单数“一”包括复数意义。因此例如“一个宿主细胞”包括多个这样的宿主细胞，而述及“一种抗体”述及了一种或多种抗体及其本领域技术人员已知的等价物，依此类推。

可根据下表提供的所接受的单字母或三字母密码述及本文所述的氨基酸和氨基酸残基。

表 1

三个字母氨基酸	单字母符号	符号
丙氨酸	A	Ala
精氨酸	R	Arg
天冬酰胺	N	Asn
天冬氨酸	D	Asp
半胱氨酸	C	Cys
谷氨酰胺	Q	Gln
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
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
苏氨酸	T	Thr
色氨酸	W	Trp
酪氨酸	Y	Tyr
缬氨酸	V	Val

术语“肽”在本文中是指至少有两个氨基酸的链，包括该肽的同源物、衍生物、片段和变体。表述“S05A 肽”指含有 SEQ ID NO. 1 (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu) 所示肽的至少一个片段或亚序列的肽，除非另有说明，还包括该肽的任何同源物、片段、衍生物、变体、融合蛋白和肽模拟物。表述“S05A 肽”包括(但不限于)包含至少一个选自下组的肽的肽：

a) SEQ ID NO. 2 (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile)中的氨基酸序列表示的肽；

b) SEQ ID NO. 3 (Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu)中的氨基酸序列表示

的肽；

c) SEQ ID NO. 4 (Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys)中的氨基酸序列表示的肽；

d) SEQ ID NO. 5 (Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys)中的氨基酸序列表示的肽；

e) SEQ ID NO. 6 (Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu)中的氨基酸序列表示的肽；和

f) SEQ ID NO. 7 (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile)中的氨基酸序列表示的肽。

术语“片段”或“亚序列”是指由蛋白质或肽的氨基酸序列的连续亚序列构成的蛋白质或多肽，包括天然产生的片段，如剪接变体以及体内蛋白酶活性天然产生的片段。这种片段可在氨基末端、羧基末端和/或中间(如自然剪接)截短。可将这种片段制备成含或不含氨基末端甲硫氨酸。术语“片段”包括来自相同蛋白质或肽的片段，可以相同或不同，共有或没有毗连的氨基酸序列，直接或通过接头连在一起。其结果是，包含 SEQ ID NO. 1 片段的任何肽可以是选自以上的任何肽，其他片段或亚序列将是本领域技术人员显而易见的，为简便起见在文中不再赘述。技术人员利用文中列出的指导和方法能够选择合适的片段用于本发明。

术语“变体”指一种蛋白质或多肽，其中与该蛋白或肽的氨基酸序列相比存在一个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入，并包括天然产生的蛋白或肽的等位基因变体或者旁路剪接变体。术语“变体”包括用类似或同源氨基酸或不相似氨基酸的置换肽序列中的一个或多个氨基酸。可根据许多标准将氨基酸分为类似或同源的(Gunnar von Heijne, 《分子生物学的序列分析》(Sequence Analysis in Molecular Biology), 123-39 页, 学术出版社(Academic Press), 纽约, 纽约州, 1987)。优选的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对蛋白质的整体净电荷、极性或疏水性影响小或没有影响的保守性取代。保守性取代列于下表 2 中。

表 2

保守性氨基酸取代

碱性:	精氨酸 赖氨酸 组氨酸
酸性:	谷氨酸 天冬氨酸
未带电极性:	谷氨酰胺 天冬酰胺 丝氨酸 苏氨酸 酪氨酸
非极性:	苯丙氨酸 色氨酸 半胱氨酸 甘氨酸 丙氨酸 缬氨酸 脯氨酸 甲硫氨酸 亮氨酸 异亮氨酸

表 3 列出氨基酸取代的另一种方案:

表 3

原始残基	取代
丙氨酸	甘氨酸; 丝氨酸
精氨酸	赖氨酸
天冬酰胺	谷氨酰胺; 组氨酸
天冬氨酸	谷氨酸
半胱氨酸	丝氨酸
谷氨酰胺	天冬酰胺
谷氨酸	天冬氨酸
甘氨酸	丙氨酸; 脯氨酸
组氨酸	天冬酰胺; 谷氨酰胺
异亮氨酸	亮氨酸; 缬氨酸
亮氨酸	异亮氨酸; 缬氨酸
赖氨酸	精氨酸; 谷氨酰胺; 谷氨酸
甲硫氨酸	亮氨酸; 酪氨酸; 异亮氨酸
苯丙氨酸	甲硫氨酸; 亮氨酸; 酪氨酸
丝氨酸	苏氨酸
苏氨酸	丝氨酸
色氨酸	酪氨酸
酪氨酸	色氨酸; 苯丙氨酸
缬氨酸	异亮氨酸; 亮氨酸

其它变体可由保守性较小的氨基酸取代组成,如选择的残基在它们维持(a)取代区域中多肽主链的结构,例如片层或螺旋构型,(b)分子靶位点的电荷或疏水性,(c)侧链大小的作用不同更为显著。通常预期对功能有更显著作用的取代是(a)甘氨酸和/或脯氨酸被另一种氨基酸取代或缺失或插入;(b)亲水性残基如丝氨酸或苏氨酸取代(或被)疏水性残基,如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸或丙氨酸(取代);(c)半胱氨酸残基取代(或被)任何其它残基(取代);(d)具有正电荷侧链的残基如赖氨酸、精氨酸或组氨酸取代(或被)具有负电荷的残基如谷氨酸或天冬氨酸(取代);或(e)具有大侧链的残基如苯丙氨酸取代(或被)没有这种侧链的残基如甘氨酸(取代)。其它变体包括设计为产生新的糖基化和/或磷酸化位点的,或设计为缺失现有糖基化和/或磷酸化位点的那些残基。变体包括糖基化位点、蛋白酶切割位点和/或半胱氨酸残基处的至少一个氨基酸取代。变体还包括在接头肽上该蛋白或肽氨基酸序列之前或之后具有其它氨基酸残基的蛋白或肽。例如,可将半胱氨酸残基加在 S05A 肽的氨基和羧基末端以形成二硫键从而使该肽环化。术语“变体”还包括具有 S05A 肽的氨基酸序列的多肽,它在 S05A 肽的 3'或 5'末端侧接有至少 1 个和至多达 25 个或更多额外的氨基酸。

术语“衍生物”指化学修饰的蛋白质或多肽,它们通过天然过程如加工和其它翻译后修饰而被化学修饰,也可通过化学修饰技术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,其中这类分子不是天然结合于野生型蛋白或 S05A 肽的分子。衍生物包括盐。这种化学修饰描述可见基础教材和更详细的专论以及大量研究文献中,它们是本领域技术人员所熟知的。应该知道,给定蛋白质或多肽的一些位点上可以存在程度相同或不同的相同类型的修饰。同样,给定蛋白质或多肽可包含许多种类的修饰。修饰可发生在蛋白质或多肽的任何地方,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、黄素的共价结合、血红素部分的共价结合、核苷酸或核苷酸衍生物的共价结合、脂质或脂质衍生物的共价结合、磷脂酰肌醇的共价结合、交联、环化、二硫键形成、脱甲基化、形成共价交联、形成半胱氨酸、形成焦谷氨酸、甲酰化、 γ -羧基化、糖基化、GPI 锚(anchor)形成、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、蛋白酶解加工、磷酸化、异

戊二烯化、外消旋化、糖基化、脂质结合、硫酸化、谷氨酸残基的 γ -羧基化、羟基化和 ADP-核糖基化、硒基化(selenoylation)、转运 RNA 介导的氨基酸加入蛋白质, 如精氨酰化和泛素化。参见例如《蛋白质-结构和分子性质》(Proteins-Structure And Molecular Properties), 第二版, T. E. Creighton, WHF 公司(T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company), 纽约 (1993)和 Wold, F., “翻译后蛋白质修饰: 观点和前景”(Posttranslational Protein Modification: Perspective and Prospects), 刊于《蛋白质的翻译后共价修饰》(Posttranslational Covalent Modification of Proteins), 1-12 页, B. C. Johnson 编, 学术出版社, 纽约(1983); Seifter 等, Meth. Enzymol. 182: 626-646(1990)和 Rattan 等, “蛋白质合成: 翻译后修饰和衰老”(Posttranslational Modification and Aging), Ann. N. Y. Acad. Sci. 663: 48-62(1992)。术语“衍生物”包括化学修饰导致蛋白质或多肽变成分支状或者有或没有分支的环状。环状、分支状和分支环状蛋白质或多肽可能由翻译后天然加工产生并也可完全由合成方法产生。

术语“同源物”指根据常用于比较两种多肽的氨基酸位置相似性的标准方法测定到氨基酸序列与 S05A 肽的氨基酸序列至少有 60%相同的蛋白质。两种蛋白质之间的相似性或相同性程度不难用已知方法计算, 包括但不限于以下所描述的那些方法:《计算分子生物学》(Computational Molecular Biology), Lesk, A. M. 编, 牛津大学出版社(Oxford University Press), 纽约, 1988;《生物计算: 信息学和基因组计划》(Biocomputing: Informatics and Genome Projects), Smith, D.W.编, 学术出版社, 纽约, 1993;《序列数据的计算机分析》(Computer Analysis of Sequence Data), 第 I 部分, Griffin, A. M. 和 Griffin, H. G.编, 休玛纳出版社(Humana Press), 新泽西州, 1994;《分子生物学序列分析》(Sequence analysis in Molecular Biology), von Heinje, G., 学术出版社, 纽约, 1987;《序列分析引物》(Sequence analysis Primery), Gribskov, M.和 Devereux, J.编, MS 出版社(M Stockton Press), 纽约, 1991; Carillo H.和 Lipman, D., SIAM, J. Applied Math., 48: 1073(1988)。设计了测定相同性的优选方法来给出测试序列之间的最大匹配。在公众可得到的计算机程序中编入了测定相同性和相似性的方法。

用于确定两种序列之间相同性和相似性的优选计算机程序方法包括但不限于 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)。公众可从 NCBI 和其它来源获得 BLASTX 程序(BLAST 手册, Altschul, S.等, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S.等, J. Mol. Biol., 215: 403-410(1990)。例如采用计算机算法如 GAP(遗传学计算机组, 威斯康星州大学(University of Wisconsin), 威斯康星州麦迪逊(Madison, Wis.)), 排列对比两种待测定的蛋白质或多肽的序列相同性百分比用于最佳匹配它们各自的氨基酸(算法确定“匹配范围”)。

空位开放罚分(gap opening penalty)(计算为 $3x$ 平均对角线; “平均对角线”是所用比较矩阵的对角线平均值; “对角线”是通过特定比较矩阵赋予各优选氨基酸的评分或数值)和空位延伸罚分(gap extension penalty)(通常是空位开放罚分的 $1/10$)以及比较矩阵例如 PAM250 或 BLOSUM 62 可与此算法结合使用。算法也可使用标准的比较矩阵(PAM250 比较矩阵参见 Dayhoff 等, 《蛋白质序列和结构图谱集》(Atlas of Protein Sequence and Structure), 第 5 卷, 增补本 3 [1978]; BLOSUM 62 比较矩阵参见 Henikoff 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10915-10919)。然后用该算法计算相同性百分比。同源物与对照蛋白或肽相比, 通常具有一个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入, 视情况而定。

术语“融合蛋白”指一种蛋白质, 其中一条或多条肽重组融合或化学偶联(包括共价或非共价)于一蛋白质, 例如(但不限于)抗体或抗体片段, 如 F_{ab} 片段或短链 F_v 等。术语“融合蛋白”还指肽的多聚体(即二聚体、三聚体、四聚体和更高的多聚体)。这些多聚体包括含有一种肽的同聚多聚体、含有一种以上肽的异聚多聚体及含有至少一种肽和至少一种其他蛋白质的异聚多聚体。这些多聚体可以是疏水、亲水、离子和/或共价作用、键或接头的作用, 可以用接头分子交联形成, 或可以通过例如, 形成脂质体而间接连接。

术语“肽模拟物”或“模拟物”指能模拟肽或蛋白质的生物活性但在化学性质上不再是肽的生物活性化合物, 即它们不再含任何肽键(即氨基酸间的酰胺键)。这里术语肽模拟物用于更广泛含义, 包括性质上不再完全是肽的分子如假肽、半肽和拟肽(peptoid)。广泛含义的肽模拟物的例子(其中肽的一部分被缺乏肽键的结构取代)在下面描述。无论完全是或部分是非肽, 本发明的肽模拟物提供了反应性化学部分的空间排列, 所述部分与肽模拟物所依据的肽中活

性基团的三维排列极其相似。由于这种相似的活性位点的几何结构，肽模拟物对生物系统的作用类似于该肽的生物活性。

本发明的肽模拟物优选在三维形状和生物活性上基本上类似于本文所述的肽。在结构上修饰本领域已知的肽以产生肽模拟物的方法的例子包括倒置主链手性中心产生 D-氨基酸残基结构，具体是在 N-末端，从而增强了对蛋白酶降解的稳定性而不会不利地影响活性。在论文“含氚 D-丙氨酸¹-肽 T 结合 (Tritiated D-ala.sup.1-Peptide T Binding)”，Smith C. S.等，*Drug Development Res.*, 15, 371-379 页(1988)中描述了一个例子。第二种方法是为稳定性改变环状结构，如 N 到 C 链间的二酰亚胺和内酰胺(Ede 等，Smith 和 Rivier 编，《肽的化学和生物学》(Peptides: Chemistry and Biology), Escom, Leiden, 1991, 268-270 页)。例子见构型限制的胸腺五肽样化合物，如美国专利号 4,457,489 (1985), Goldstein, G.等所公开的那样，其内容全部纳入本文供参考。第三种方法是用能赋予蛋白水解抗性的假肽键替换肽中的肽键。

许多假肽键一般不影响肽的结构和生物活性。此方法的一个例子是取代逆反(retro-inverso)假肽键(“胸腺五肽的生物活性逆反类似物”)(Biologically active retroinverso analogue of thymopentin), Sisto A 等, Rivier, J. E.和 Marshall, G. R. 编, “肽、化学、结构和生物学”(Peptides, Chemistry, Structure and Biology), Escom, Leiden, 1990, 722-773 页)和 Dalpozzo 等(1993), *Int. J. Peptide Protein Res.*, 41: 561-566, 纳入本文供参考)。根据此修饰，肽的氨基酸序列可能与上述肽的序列相同，除了一个或多个肽键被逆反假肽键所取代。优选大部分 N-末端肽键被取代，因为这种取代是通过外肽酶作用于 N-末端而能赋予蛋白水解抗性。也可用其它类似结构的化学基团替代氨基酸的化学基团作进一步修饰。另一种已知可提高对酶切割稳定性而生物活性没有或很少损失的合适假肽键是还原型等构物(reduced isostere)假肽键(Couder 等(1993), *Int. J. Peptide Protein Res.*, 41: 181-184, 全部纳入本文供参考)。

因此，这些肽的氨基酸序列可能与某肽的序列相同，除了一个或多个肽键被等构排物假肽键替代外。优选大部分 N-末端肽键被取代，因为这种取代是通过外肽酶作用于 N-末端而能赋予蛋白水解抗性。合成具有一个或多个还原型等构物排假肽键的肽是本领域已知的(Couder 等, (1993), 上面所引用)。其

它例子包括导入酮亚甲基(ketomethylene)键或甲基硫化物(methylsulfide)键来替代肽键。

肽的拟肽衍生物代表了另一类肽模拟物,拟肽保留了生物活性的重要结构决定簇,但去除肽键,从而赋予蛋白水解抗性(Simon 等,1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 9367-9371, 全部纳入本文供参考)。拟肽是 N-取代的甘氨酸的寡聚物。已报道了一些 N-烷基基团,各对应于天然氨基酸的侧链(Simon 等,1992, 上面所引用)。肽的一些或所有氨基酸用对应于替代氨基酸的 N-取代甘氨酸所替代。

术语“肽模拟物”或“模拟物”还包括下面定义的反-D 肽和对映异构体。

术语“反-D 肽”指与肽的 L-氨基酸序列相比,由反向顺序排列的 D-氨基酸组成的生物活性蛋白质或肽。因此, L-氨基酸肽的羧基末端残基成为 D-氨基酸肽的氨基末端,等等。例如,该肽的 ETESH 变成 $H_dS_dE_dT_dE_d$, 其中 E_d 、 H_d 、 S_d 和 T_d 是分别对应于 L-氨基酸 E、H、S 和 T 的 D-氨基酸。

术语“对映异构体”指一种生物活性蛋白质或肽,其中肽的氨基酸序列中一个或多个 L-氨基酸残基被相应的 D-氨基酸残基替代。

本文所用的“组合物”广义上指含有列举的肽或氨基酸序列的任何组合物。该组合物可包括干制剂、水溶液或灭菌组合物。可利用含肽的组合物作为杂交探针。该探针可以冻干形式保存,并可以加入稳定剂如碳水化合物。杂交时,该探针可在含盐如 NaCl、洗涤剂如十二烷基硫酸钠(SDS)和其它组分,例如 Denhardt 溶液、干奶粉、鲑鱼精子 DNA 等的水溶液中使用。

本发明涉及含有如本发明上文所定义的 S05A 肽的组合物。

此外,本发明包括含有全部或部分 S05A 肽的其他蛋白质,从而该蛋白质优选具有与该肽相同、类似或增强的生物活性。采用本文所提供的指导,此领域的一般技术人员能够根据任何 S05A 肽的氨基酸序列合成特定蛋白质,所述 S05A 肽发现是造成细胞死亡的有效试剂并测试了它们作为导致细胞死亡试剂的效力。

衍生自 S05A 肽(发现它们是造成细胞死亡的有效试剂)的其它肽序列也是造成细胞死亡的有效试剂。根据本文的教导,此领域的一般技术人员无需过度实验,就可合成跨越该蛋白质的整个氨基酸序列的有效肽的片段,以便鉴定其

它有效的肽序列。

特别优选的实施方式中的 S05A 肽包括包括，但不限于，以下这些：

SEQ ID NO. 2	IDQQVLSRI	Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile
SEQ ID NO. 3	KLEIKRCL	Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu
SEQ ID NO. 4	VLSRIK	Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys
SEQ ID NO. 5	RIKLEIK	Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg
SEQ ID NO. 6	VLSRIKLEIKRCL	Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu
SEQ ID NO. 7	IDQQVLSRIKLEI	Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile

本领域技术人员能够明白，可选择上述 S05A 肽的其它较小片段，而使这些片段具有相同或相似的生物学活性。本领域技术人员可选择其他片段，而使这些肽具有相同或相似的生物学活性。本发明的肽包含这些其他片段。总的说来本发明的肽具有至少 6 个氨基酸，优选至少 5 个氨基酸，更优选至少 4 个氨基酸。

本发明还包括含有连接在一起的两条或多条 S05A 肽的 S05A 肽。只要一条 S05A 肽具有所需生物活性，两条这样的肽也具有所需生物活性。

可用本领域技术人员已知的方法制备本发明包括的 S05A 肽及其片段、变体、衍生物、同源物、融合蛋白和模拟物，例如重组 DNA 技术、蛋白质合成和分离天然产生的肽、蛋白、AD7c-蛋白和其片段、变体、衍生物和同源物。

采用本领域技术人员已知的方法，可从其它肽、蛋白质及其片段、变体、衍生物、同源物制备 S05A 肽及其片段、变体、衍生物、同源物、融合蛋白和模拟物。这些方法包括(但不限于)用蛋白酶将肽或蛋白切割成所需的 S05A 肽。

S05A 肽可用熟知的重组 DNA 技术方法制备，如列于 Sambrook 等，《分子克隆：实验室手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)，冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)，纽约州冷泉港(Cold Spring Harbor, N.Y.)和/或 Ausubel 等编的《新编分子生物学实验指南》(Current Protocols in Molecular Biology)，格林出版社有限公司(Green Publishers Inc.)及威利父子公司(Wiley and Sons)，纽约州(N.Y.)的方法。

可通过，例如筛选基因组或 cDNA 文库或通过 PCR 扩增获得编码 S05A 肽的基因或 cDNA。用于筛选文库的探针或引物可依据其它已知基因或相同或相

关基因家族的基因片段的序列信息，如在其它肽或蛋白中发现的保守基序产生。此外，如果鉴定了编码 S05A 肽的基因，该基因的全部或部分可用作探针以鉴定同源基因。探针或引物可用于从认为表达 S05A 肽基因的多种组织来源中筛选 cDNA 文库。通常，可使用高严谨性条件来尽可能减少筛选获得的假阳性数量。

另一种制备编码 S05A 肽的基因的方法采用化学合成，使用技术人员熟知的方法，如 Engels 等 (*Angew. Chem. Intl. Ed.*, 28: 716-734)描述的方法。这些方法包括磷酸三酯、亚磷酰胺、H-磷酸酯等方法来合成核酸。这种化学合成的优选方法是使用标准亚磷酰胺化学的聚合物-支持的合成。一般，编码肽的 DNA 长度为几百个核苷酸。可用这些方法将大于约 100 个核苷酸的核酸合成为几个片段。然后片段可连接在一起形成全长的肽或蛋白质。通常，编码蛋白质的氨基末端的 DNA 片段具有编码甲硫氨酸的 ATG。此甲硫氨酸可以或可不存在于蛋白或肽的成熟形式，这取决于宿主细胞中产生的蛋白质是否设计成从该细胞中分泌。

编码 S05A 肽的基因、cDNA 或其片段可用标准连接技术插入合适表达或扩增载体中。通常选择在所用具体宿主细胞中有功能的载体(即载体与宿主细胞机制相容，从而可扩增基因和/或表达基因)。编码 S05A 肽的基因、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 S05A 肽是否糖基化和/或磷酸化。如果这样，优选酵母、昆虫或哺乳动物宿主细胞。

通常，任何宿主细胞中所用的载体包含至少一个 5'侧翼序列(也称为“启动子”)，还包含其它调节元件，例如增强子、复制元件的起点、转录终止元件、含供体和受体剪接位点的完整内含子序列、信号肽序列、核糖体结合位点元件、多腺苷酸化序列、用于插入编码待表达多肽的核酸的多接头区域、可选择的标记元件。下文各自讨论了这些元件。任选的是，载体可包含标签序列，即位于蛋白或肽编码序列的 5'或 3'末端的寡核苷酸分子；寡核苷酸分子编码多组氨酸(PolyHis)(如六组氨酸(HexaHis))或其它标签如 FLAG、HA(流感病毒血凝素)或存在商品化抗体的 myc。此标签常在表达多肽时融合到多肽，从而可作为亲和纯化宿主细胞的蛋白或肽的方法。例如可使用抗该标签的抗体作为亲

和基质，通过柱层析完成亲和纯化。任选地，随后通过多种方法如用某些肽酶从纯化的蛋白或肽中去除标签。

本领域技术人员可将人免疫球蛋白铰链和 Fc 区在 S05A 肽的 N-或 C-末端融合。随后可用 A 蛋白亲和柱纯化 Fc 融合蛋白。已知 Fc 体内表现的药物动力学半衰期长且发现融合 Fc 的蛋白质在体内表现出的半衰期显著大于未融合蛋白质。同样，融合至 Fc 区使对一些分子的生物活性有用的分子二聚化/多聚化。

5'侧翼序列可以是同源(即来自与宿主细胞相同的种类和/或菌株)、异源(即来自与宿主细胞不同的种类或菌株)、杂合(即来自超过一个来源的 5'侧翼序列组合)、合成的，或可以是天然蛋白或肽基因 5'侧翼序列。同样，5'侧翼序列的来源可以是单细胞原核或真核生物、任何脊椎动物或无脊椎动物、或任何植物，只要 5'侧翼序列有功能且可被宿主细胞机制活化。

本发明载体中有用的 5'侧翼序列可通过任何本领域中熟知的几种方法获得。通常，本文除了蛋白或肽基因侧翼序列外的有用 5'侧翼序列在以前通过作图和/或限制性内切酶消化得到鉴定，因此可用合适的限制性内切酶从适当组织来源中分离。在一些情况中，5'侧翼序列的全核苷酸序列可以是已知的。这里可用上述核酸合成或克隆的方法合成 5'侧翼序列。

当 5'侧翼序列的全部或仅部分已知时，它可用合适的寡核苷酸和/或相同或另一种类的 5'侧翼序列片段，采用 PCR 和/或通过筛选基因组文库获得。

如果不知道 5'侧翼序列，可从包含例如编码序列或甚至另一种基因或多种基因的较大片段 DNA 中分离含 5'侧翼序列的 DNA 片段。可用一种或多种仔细选择的酶，通过限制性内切酶消化完成分离，从而分离适当的 DNA 片段。消化后，所需片段可通过琼脂糖凝胶纯化、Qiagen®柱或技术人员已知的其它方法来分离。选择适当酶以达到此目的对此领域的一般技术人员是显然的。

复制元件的起点通常是商业购买的原核表达载体的一部分，其协助宿主细胞中的载体扩增。在一些情况中，载体扩增到一定拷贝数对最佳表达蛋白或肽是重要的。如果所选载体不包含复制位点的起点，可根据已知序列化学合成起点并连接入载体。转录终止元件一般位于蛋白或肽编码序列的 3'末端，其用于终止蛋白或肽的转录。通常，原核细胞中的转录终止元件是后面有聚 T 序列的 G-C 丰富片段。虽然可从文库克隆或作为载体部分商业购买元件，但用上述核

酸合成方法也不难合成。

可选择的标记基因元件编码宿主细胞在选择性培养基中存活和生长所必需的蛋白质。典型的选择标记基因元件编码的蛋白质能(a)赋予原核宿主细胞对抗生素或其它毒素的抗性,如氨卡青霉素、四环素或卡那霉素,(b)补充细胞的营养缺陷型缺乏;或(c)提供复合培养基没有的关键营养物。优选的可选择标记是卡那霉素抗性基因、氨卡青霉素抗性基因和四环素抗性基因。

一般称为SD序列(Shine-Dalgarno sequence)(原核生物)或Kozak序列(真核生物)的核糖体结合元件对mRNA翻译起始通常是必需的。该元件通常连接于启动子的3'端和待合成的蛋白或肽编码序列的5'端。SD序列不同但一般是聚嘌呤(即A-G含量高)。鉴定了许多SD序列,用上述方法不难合成各序列并可用于原核载体。

在需要S05A肽从宿主细胞分泌的情况中,可使用信号序列指导肽到合成它的宿主细胞外,且可删除蛋白质的羧基末端部分以防止膜锚定。通常,信号序列位于S05A肽基因或cDNA的编码区域,或直接在S05A肽基因编码区的5'末端。鉴定了许多信号序列,任何在所选宿主细胞中有功能的序列可与该肽的基因或cDNA结合使用。因此信号序列可与该肽的基因或cDNA同源或异源,且可与该肽的基因或cDNA同源或异源。另外,信号序列可用上述方法化学合成。在大部分情况中,通过信号肽的存在从宿主细胞分泌多肽会导致多肽的氨基末端甲硫氨酸中去除。

在许多情况中,S05A肽基因或cDNA的转录可通过载体中存在一个或多个内含子来增加;当S05A肽在真核宿主细胞,特别是哺乳动物宿主细胞中产生时尤其如此。所用内含子可以是S05A肽基因中天然产生的,特别是当所用基因是全长基因组序列或其片段时。当内含子不在基因中天然产生时(对于大部分cDNAs),内含子可获自另一来源。由于内含子必须转录有效,内含子相对侧翼序列和S05A肽基因的位置一般是重要的。同样,当插入表达载体中的S05A肽基因是cDNA分子时,内含子的优选位置是转录起始位点3'端和多A转录终止序列5'端。对于该肽的cDNA优选的是,一个或多个内含子位于cDNA一侧或另一侧(即5'或3')从而使它不中断此编码序列。如果内含子与其插入的宿主细胞相容,任何来源的任何内含子可用于实践本发明,来源包括任何病毒、

原核和真核(植物或动物)生物。本文还包括合成内含子。任选地,在载体中可使用超过一个的内含子。

当上述一个或多个元件不存在于待使用的载体中时,它们可单独获得并接入载体。用于获得各元件的方法是技术人员熟知的,且与上述方法(即合成DNA、文库筛选等)相当。

用于实践本发明的最终载体可从起始载体,如商业购买的载体构建。这种载体可以包含或不包含包括在完整载体中的一些元件。如果没有所需元件存在于起始载体中,可通过用合适的限制性内切酶切割载体使待接入的元件末端和载体末端对于连接是相容的,从而将各元件单独连接入载体。在一些情况中,必须使要连接一起的末端成为“平端”以获得满意的连接。通过首先用 Klenow DNA 聚合酶或 T4 DNA 聚合酶在所有四种核苷酸存在时填补“粘端”来获得平端。此过程在本领域熟知,在例如 Sambrook 等(同上)中有所描述。另外,待插入载体的两个或多个元件可首先连接一起(如果它们的位置彼此相邻),随后连接入载体。

另一种构建载体的方法在一种反应混合物中同时进行多种元件的所有连接。这里,由于元件的不适当连接或插入产生许多无义和无功能载体,然而可通过限制性内切酶消化来鉴定和选择功能性载体。

实践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载体。这种载体包括 pCRII、pCR3 和 pcDNA3.1(加州圣地亚哥英杰公司)Invitrogen Company, San Diego, Calif.))、pBSII(加州拉卓拉斯图特基因公司(Stratagene Company, La Jolla, Calif.))、pET15b(威斯康星州麦迪逊诺弗根公司(Novagen, Madison, Wis.))、PGEX(新泽西州皮斯卡塔韦法玛西亚生物技术公司(Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.))、pEGFP-N2(加州帕洛阿托克隆技术有限公司(Clontech, Palo Alto, Calif.))、pETL(BlueBacII; 英杰公司)和 pFastBacDual (Gibco/BRL, 纽约州格兰特岛(Grand Island, N.Y.))。

在载体构建和将编码全长或截短的蛋白或肽的核酸分子插入载体的适当位点后,完整载体可插入合适的宿主细胞用于扩增和/或多肽表达。宿主细胞可以是原核宿主细胞(如大肠杆菌)或真核宿主细胞(如酵母细胞、昆虫细胞或脊椎动物细胞)。当宿主细胞在合适条件下培养时,可合成蛋白或肽,该蛋白或肽

随后从培养基中(如果宿主细胞将其分泌到培养基中)或直接从生成它的宿主细胞(如果它不被分泌)中收集。

收集后, S05A 肽可用分子筛层析、亲和层析等方法纯化。选择产生蛋白或肽的宿主细胞部分取决于该肽是否糖基化或磷酸化(该情况中优选真核宿主细胞)、宿主细胞能将蛋白质折叠成其天然三级结构(如二硫桥的适当方向等)的方式从而通过具生物活性的肽制备生物活性蛋白质, 合成后可用下面讨论的合适化学条件折叠该肽。合适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。本领域已知选择合适的哺乳动物宿主细胞和转化、培养、扩增、筛选和产物生成及纯化的方法。其它合适的哺乳动物细胞系是猴 COS-1 和 COS-7 细胞系及 CV-1 细胞系。其它示范性哺乳动物宿主细胞包括灵长类细胞系和啮齿动物细胞系, 包括转化的细胞系。正常二倍体细胞、衍生自初级组织体外培养的细胞株以及原代外植体也是合适的。候选细胞可以是选择基因中的遗传型缺陷或可包含显性开放选择基因。其它合适的哺乳动物细胞系包括但不限于小鼠成神经细胞瘤 N2A 细胞、海拉细胞、小鼠 L-929 细胞、衍生自 Swiss、Balb-c 或 NIH 小鼠的 3T3 系、BHK 或 HaK 仓鼠细胞系。

与适合于本发明的宿主细胞同样有用的是细菌细胞。例如, 多种大肠杆菌菌株(如 HB101、DH5 α 、DH10 和 MC1061)是生物技术领域中熟知的宿主细胞。枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)、假单胞菌属(*Pseudomonas spp.*)、其它芽孢杆菌属(*Bacillus spp.*)、链霉菌属(*Streptomyces spp.*)等的多种菌株可用于此方法。本领域技术人员已知的许多酵母细胞菌株也可作为表达本发明多肽的宿主细胞。

另外, 需要时昆虫细胞系统可用于本发明的方法。在例如 Kitts 等(*Biotechniques*, 14: 810-817)、Lucklow(*Curr. Opin. Biotechnol.*, 4: 564-572)和 Lucklow 等(*J. Virol.*, 67: 4566-4579)中已描述了这种系统。优选的昆虫细胞是 Sf-9 和 Hi5(加州卡尔斯拜德英杰公司(Invitrogen, Carlsbad, Calif.))。

插入(也称为转化或转染)载体到所选宿主细胞中可用例如氯化钙、电穿孔、显微注射、脂转染或 DEAE-葡聚糖方法等方法实现。选择的方法部分是待使用宿主细胞类型的功能。这些方法和其它合适方法是技术人员熟知的, 见诸例如 Sambrook 等, 同上。

含载体(即转化的或转染的)的宿主细胞可用技术人员熟知的标准培养基培养。培养基通常包含所有细胞生长和存活必需的营养物。培养大肠杆菌细胞的合适培养基是例如 Luria Broth(LB)和/或 Terrific Broth(TB)。培养真核细胞的合适培养基是 RPMI1640、MEM、DMEM, 它们都可添加血清和/或培养特定细胞系所需的生长因子。培养昆虫(细胞)的合适培养基是 Grace 培养基, 其视需要添加有必需的酵母提取物(yeastolate)、乳白蛋白水解产物和/或胎牛血清。通常, 抗生素或其它仅用于选择性生长转化细胞的化合物作为添加物加入培养基。待使用化合物由转化宿主细胞的质粒上存在的可选择标记元件决定。例如, 当可选择标记元件是卡那霉素抗性时, 加入培养基的化合物是卡那霉素。

宿主细胞中产生的 S05A 肽的量可用本领域已知的标准方法评估。这种方法包括但不限于蛋白质印迹分析、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、非变性凝胶电泳、HPLC 分离、质谱、免疫沉淀和/或活性试验如 DNA 结合凝胶移位试验。

如果蛋白或肽设计为从宿主细胞中分泌, 大部分蛋白或肽可在细胞培养基中发现。以此方法制备的蛋白质通常不具有氨基末端甲硫氨酸, 因为它从细胞中分泌时被去除。然而如果蛋白或肽不从宿主细胞中分泌, 它会存在于细胞质和/或核中(真核宿主细胞)或在细胞溶质中(革兰氏阴性菌宿主细胞), 且可具有氨基末端甲硫氨酸。

就位于宿主细胞细胞质和/或核中的 S05A 肽而言, 通常首先通过机械方式或用去垢剂破碎宿主细胞以释放胞内成分到缓冲溶液中。然后可从此溶液中分离该肽。

从溶液中纯化 S05A 肽可用多种技术完成。如果合成的蛋白质含标签如六组氨酸(例如肽/六组氨酸)或其它小肽如 FLAG(密歇根州圣路易斯西格玛公司(Sigma-Aldrich, St.Louis, MI))或在其羧基或氨基末端含有钙调蛋白-结合肽(加州拉卓拉斯图特基因公司), 基本上可通过一步方法使溶液穿过亲和柱来纯化, 其中柱基质对标签或直接对蛋白质有高亲和性(即特异识别该肽的单克隆抗体)。例如, 多组氨酸以高亲和性和特异性结合镍、锌及钴; 因而使用镍亲和树脂(如用于恰根公司(Qiagene)的 QIAexpress 系统或英杰公司的 Xpress 系统)或钴亲和树脂(如用于 BD Biosciences-CLONTECH 的 Talon 系统)的固定金属离子亲和层析可用于纯化肽/多组氨酸。(参见例如, Ausubel 等编的《新编分子生

物实验指南》第 10.11.8 章, 约翰威利父子公司(John Wiley & Sons), 纽约)。

当制备的 S05A 肽未结合标签且无抗体可用时, 可使用其它熟知的纯化方法。这些方法包括但不限于离子交换层析、羟磷灰石层析、疏水作用层析、分子筛层析、HPLC、结合凝胶洗脱的天然凝胶电泳以及制备型等电聚焦(Isoprime 机器/技术, 侯弗科技公司(Hoefer Scientific))。一些情况下, 可将这些技术中的两种或多种组合以得到较高纯度。

如果预期 S05A 肽主要发现于胞内, 可用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包含体)。例如可通过弗氏压碎器、匀浆化和/或超声处理, 然后离心来裂解宿主细胞以释放周质/细胞质的内含物。如果该肽在细胞溶质中形成包含体, 包含体通常可结合内和/或外细胞膜, 因此离心后主要在沉淀物质中发现。然后可在极端 pH 或在有还原剂, 如碱性 pH 的二硫苏糖醇或酸性 pH 的三羧乙基磷存在下用离液剂如去垢剂、胍、胍衍生物、尿素或尿素衍生物处理沉淀物质以释放、断裂和溶解包含体。然后可用凝胶电泳、免疫沉淀等分析目前处于可溶形式的肽。如果需要分离该肽, 可用标准方法完成分离, 如下文和 Marston 等(Meth. Enz., 182: 264-275)列出的方法。

在一些情况中, S05A 肽分离后可以没有生物活性。可采用再折叠或将多肽转化成其三级结构并产生二硫键的多种方法恢复生物活性。这些方法包括使溶解的多肽暴露于通常高于 7 的 pH 中且存在特定浓度的离液剂。离液剂的选择非常类似于用于溶解包含体的选择, 但通常浓度较低且未必是溶解所用的相同离液剂。在大部分情况中, 再折叠/氧化溶液也包含还原剂或特定比例的还原剂加其氧化形式, 以产生特定氧化还原电势使二硫化物改组形成蛋白质的半胱氨酸桥。一些常用的氧化还原对包括半胱氨酸/胱胺、谷胱甘肽(GSH)/二硫双 GSH(dithiobis GSH)、氯化铜、二硫苏糖醇(DTT)/二噻烷 DTT、2-巯基乙醇(bME)/二硫-b(ME)。在许多情况中, 需要共溶剂提高再折叠的效率, 用于此目的更多常规试剂包括甘油、不同分子量的聚乙二醇和精氨酸。

如果宿主细胞中不形成显著程度的 S05A 肽包含体, 细胞匀浆离心后发现 S05A 肽主要位于上清液中, S05A 肽可用下列方法从上清液中分离。

在优选部分或完全分离 S05A 肽的情况中, 可用技术人员熟知的标准方法

完成纯化。这些方法包括但不限于电泳分离,接着电洗脱、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。在一些情况中,优选使用超过一种的这些方法来完全纯化。

除了用重组 DNA 技术制备和纯化 S05A 肽, S05A 肽和它们的片段、变体、同源物、融合蛋白、肽模拟物和衍生物可使用本领域已知技术通过化学合成方法制备(如固相肽合成),例如 Merrifield 等(*J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149)、Houghten 等(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5132)、Stewart 和 Young(《固相肽合成》(*Solid Phase Peptide Synthesis*), 伊利诺斯州罗克福德皮尔斯化学制品公司(Pierce Chemical Co., Rockford, IL))中所述。可以合成在氨基末端有或没有甲硫氨酸的这种肽。化学合成的 S05A 肽可用参考文献所列方法氧化以形成二硫桥。预期 S05A 肽具有可与重组产生或纯化自天然来源的肽相当的生物活性,因此可与重组或天然肽交换使用。

其中肽与聚合物相连的化学修饰 S05A 肽组合物包括在本发明范围内。所选聚合物通常可溶于水从而使得与它结合的蛋白质不会在水性环境,如生理环境中沉淀。所选聚合物通常被修饰以具有单个反应基团如用于酰化的活性酯或用于烷化的醛,从而可如本方法所提供的控制聚合程度。聚合物可以是任何分子量,可以是分支或未分支。包括在肽聚合物范围中的是聚合物的混合物。

在一些情况中,需要制备天然产生 S05A 肽的核酸和/或氨基酸变体。核酸变体可用定点诱变、PCR 扩增或其它合适方法产生,其中引物有所需点突变(诱变技术的描述参见 Sambrook 等,同上, Ausubel 等,同上)。使用 Engels 等(同上)所述的化学合成方法也可用于制备这种变体。其它技术人员已知的方法也可使用。

优选的核酸变体是包含在产生 S05A 肽的宿主细胞中导致密码子偏好的核苷酸取代的那些核酸。这种“密码子最优化”可通过计算机算法确定,所述算法结合密码子频率表如“Ecohigh.Cod”作为高度表达细菌基因的密码子偏好,例如威斯康星州麦迪逊市威斯康星州立大学 9.0 版本软件包,遗传学计算机组提供。其它有用的密码子频率表包括“Celegans_high.cod”、“Celegans_low.cod”、“Drosophila_high.cod”、“Human_high.cod”、“Maize_high.cod”和“Yeast_high.cod”。其它优选变体是编码与野生型相比上述保守性氨基酸变化

(如其中天然产生氨基酸侧链的电荷或极性不因用不同氨基酸的取代而显著改变)的变体、和/或设计为产生新的糖基化和/或磷酸化位点的变体、或设计为删除现存糖基化和/或磷酸化位点的变体。

S05A 肽及其片段、同源物、变体、融合蛋白、肽模拟物、衍生物和盐可用技术人员已知的常规肽合成技术产生。这些技术包括化学偶联方法(参见 Wunch, E: “有机化学方法” (Methoden der organischen Chemie), 第 15 卷, 1+2 区, “肽合成” (Synthese von Peptiden), thime Verlag, 斯图加特(Stuttgart) (1974) 和 Barrany, G.; Marrifield, R. B.: “肽” (The Peptides), E. Gross, J. Meienhofer 编, 第 2 卷, 第 1 章, 1-284 页, 学术出版社(1980))、酶偶联方法(参见 Widmer, F. Johansen, J. T., Carlsverg Res. Commun., 第 44 卷, 37-46 页(1979)和 Kullmann, W.: “酶肽合成” (Enzymatic Peptide Synthesis), CRC 出版社公司(CRC Press Inc.), Boca Raton, Fla.(1987)和 Widmer, F., Johansen, J. T., “生物和医学中的合成肽” (Synthetic Peptides in Biology and Medicines), Alitalo, K., Partanen, P., Vatiari, A.编, 79-86 页, Elsevier, Amsterdam(1985))、或化学和酶方法的组合, 如果这对于方法设计和经济有优势。使用本文提供的指南和教导, 本领域技术人员能改变 S05A 肽的肽序列以产生具有与原始或天然 S05A 肽相同或类似生物活性的同源物。

使用给定的 S05A 肽的模拟物而不是该肽本身具有优点。通常, 与蛋白质和肽相比, 肽模拟物的生物利用度更高, 作用时间更长且生产成本更低。

因此, 上述肽可用于开发具有类似生物活性从而具有类似治疗作用的小化学化合物。可使用组合化学技术和本领域已知的其它技术开发 S05A 肽的肽模拟物(参见例如《第 20 届欧洲肽专题讨论会记录》(Proceedings of the 20th European Peptide Symposium), G. Jung, E. Bayer 编, 289-336 页, 和其中的参考文献)。

结构上修饰肽以产生肽模拟物的本领域已知方法的例子包括倒置主链手性中心产生 D-氨基酸残基结构, 具体是在 N-末端, 从而增强了蛋白酶降解稳定性而没有不利地影响活性。在论文“含氚 D-丙氨酸¹-肽 T 结合” (Tritiated D-ala.sup.1-Peptide T Binding), Smith C. S.等, Drug Development Res., 15, 371-379 页(1988)中给出了一个例子。

第二种方法是改变稳定性所需的环状结构,如 N 到 C 链间的二酰亚胺和内酰胺(Ede 等, Smith 和 Rivier 编,《肽:化学和生物学》(Peptides: Chemistry and Biology), Escom, Leiden, 1991, 268-270 页)。例子见构型限制的胸腺五肽样化合物,如美国专利号 4,457,489 (1985), Goldstein, G.等所公开的那样,其内容全部纳入本文供参考。

第三种方法是用能赋予蛋白水解抗性的假肽键替换 S05A 肽中的肽键。一般不影响肽的结构和生物活性的许多假肽键已见诸描述。此方法的一个例子是取代逆反假肽键(“胸腺五肽的生物活性逆反同源物”(Biologically active retroinverso analogues of thymopentin), Sisto A 等, Rivier, J. E.和 Marshall, G. R.编,“肽、化学、结构和生物学”(Peptides, Chemistry, Structure and Biology), Escom, Leiden, 1990, 722-773 页)和 Dalpozzo 等(1993), Int. J. Peptide Protein Res., 41: 561-566, 纳入本文供参考)。根据此修饰,肽的氨基酸序列可能与上述肽的序列相同,除了一个或多个肽键被逆反假肽键所取代。优选大部分 N-末端肽键被取代,因为这种取代是通过外肽酶作用于 N-末端而能赋予蛋白水解抗性。

合成具一个或多个还原型逆反假肽键的肽在本领域已知(Sisto(1990)和 Dalpozzo 等(1993), 上面所引用)。因此肽键可用非肽键替代使肽模拟物获得与原始肽相似的结构,从而生物活性相似。也可用其它类似结构的化学基团替代氨基酸的化学基团作进一步修饰。另一种已知可提高对酶切割的稳定性而生物活性没有或很少损失的合适假肽键是还原型等构物假肽键(Couder 等(1993), Int. J. Peptide Protein Res., 41: 181-184, 全部纳入本文供参考)。因此,这些肽的氨基酸序列可能与某肽的序列相同,除了一个或多个肽键被等构物假肽键替代外。优选大部分 N-末端肽键被取代,因为这种取代是通过外肽酶作用于 N-末端而能赋予蛋白水解抗性。合成具有一个或多个还原型等构物假肽键的肽是本领域已知的(Couder 等, 上面所引用)。另一个例子包括导入酮亚甲基键或甲基硫化物键来替代肽键。

S05A 肽的拟肽衍生物代表了另一类肽模拟物,拟肽保留了生物活性的重要结构决定簇,但去除肽键,从而赋予对蛋白水解的抗性(Simon 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 9367-9371, 全部纳入本文供参考)。拟肽是 N-取代

的甘氨酸的寡聚物。已报道了一些 N-烷基基团，各对应于天然氨基酸的侧链 (Simon 等, 1992, 上面所引用)。该肽的一些或所有氨基酸用对应于替代氨基酸的 N-取代甘氨酸替代。

可通过 NMR 光谱学、结晶学和/或计算机-辅助的分子建模确定原始肽的三级结构来协助开发肽模拟物。这些技术帮助开发具有与原始肽相比效力更高和/或生物利用率更高和/或稳定性更高的新组合物(Dean(1994), *BioEssays*, 16: 683-687; Cohen 和 Shatzmiller(1993), *J. Mol. Graph.*, 11: 166-173; Wiley 和 Rich (1993), *Med. Res. Rev.*, 13: 327-384; Moore(1994), *Trends Pharmacol. Sci.*, 15: 124-129; Hruby(1993), *Biopolymers.*, 33: 1073-1082; Bugg 等(1993) *Sci. Am.*, 269: 92-98, 全部纳入本文供参考)。

一旦一种潜在的肽模拟物化合物被鉴定，它可以用下面例子中概括的方法合成和分析以评估其活性。用上述方法获得的具有肽的生物活性和类似三维结构的肽模拟化合物属于本发明范围。对于本领域技术人员显而易见的是，肽模拟物可从携带一种或多种上述修饰的任何肽中产生。更显然的是，本发明的肽模拟物除了作为治疗化合物的效用，可进一步用于开发更有效的非肽化合物。

今天许多机构都能够合成本文所述的肽。例如，获得一种 S05A 肽的序列，这些机构就能合成肽并提供合成的肽以及肽身份的随附文件和证据。

本发明还包括使用 S05A 肽和它们相应的核酸分子用于试验，以定性或定量测试哺乳动物组织或体液样品中是否存在 S05A 肽、S05A 肽 DNA、或相应 RNA。S05A 肽和它们相应的核酸分子可用于这些试验的准备，无论该肽或者该肽的编码 DNA 是否显示生物活性。S05A 肽核酸序列可作为有用的杂交探针源以定性或定量测试哺乳动物组织或体液样品中是否存在该肽的 DNA 或相应 RNA。本身不具生物活性的 S05A 肽核酸序列可用来制备识别和/或结合 S05A 肽的抗体。这种抗体可用标准方法制备。因此，与 S05A 肽反应或结合的抗体以及这种抗体的短链抗体片段和其它反应片段也属于本发明范围。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，抗体或其片段是人来源或“人源化”，即制备成在给予患者时能防止或尽可能降低对抗体的免疫反应。优选的抗体是人抗体，无论多克隆或单克隆。抗体片段可以是与本发明的肽反应的任何片段，如 Fab、Fab'等。本发明也提供了杂交瘤，它是通过

将任何 S05A 肽作为抗原呈递给所选哺乳动物，接着用已知技术融合哺乳动物的细胞(如脾细胞)和某些癌细胞以产生无限增殖化细胞系而产生的。产生这种细胞系和抗所有或部分 S05A 的抗体的方法也属于本发明范围。

抗体还可用于体内和体外诊断或研究目的，如以标记形式来检测体液或细胞样品中是否存在 S05A 肽。

本发明也包括一种或多种 S05A 肽在试验中作为校验标准品的应用，所述试验定性或定量测试哺乳动物组织或体液样品中是否存在 S05A 肽、蛋白、肽 DNA、蛋白质 DNA 或相应的 RNA。

本发明涉及治疗需要除去细胞的病症的方法，如良性或恶性肿瘤、腺(如前列腺)增生、不需要的面部毛发、疣和不需要的脂肪组织，或抑制或防止不需要的细胞增殖，如支架(stent)的再狭窄。这种方法包括将治疗有效量的 S05A 肽给予有此需要的哺乳动物，或用于涂布例如支架等装置。

所述病症可以是，例如，肺、乳腺、胃、胰、前列腺、膀胱、骨、卵巢、皮肤、肾、窦、结肠、肠、胃、直肠、食道、血液、大脑和其覆盖物、脊髓和其覆盖物、肌肉、结缔组织、肾上腺、副甲状腺、甲状腺、子宫、睾丸、垂体、生殖器官、肝脏、胆囊、眼、耳、鼻、喉、扁桃腺、口、淋巴结和淋巴系统及其它器官的肿瘤。

如本文所用，术语“恶性肿瘤”包括人类癌、肉瘤和黑素瘤的所有形式，它们以低度分化、适度分化、高度分化的形式出现。

本发明满足本领域对于除去良性肿瘤而风险较低和手术的不良副作用较少的治疗需要。特别需要去除手术危险区如体内深部(例如脑、心脏、肺等)良性肿瘤的方法。

治疗必须除去细胞的病症的方法可与治疗这些病症的常规方法，如手术切除、化疗和放疗结合使用。肽可在这些常规治疗之前、期间或之后施用。

待治疗的病症也可以是组织增生、肥大或过度生长，所述组织选自：肺、乳房、胃、胰、前列腺、膀胱、骨、卵巢、皮肤、肾、窦、结肠、肠、胃、直肠、食道、血液、大脑和其覆盖物、脊髓和其覆盖物、肌肉、结缔组织、肾上腺、副甲状腺、甲状腺、子宫、睾丸、垂体、生殖器官、肝脏、胆囊、眼、耳、鼻、喉、扁桃腺、口、以及淋巴结和淋巴系统。

可用本发明方法治疗的其它病症包括但不限于：病毒、细菌或寄生虫改变的组织，所述组织选自肺、乳房、胃、胰、前列腺、膀胱、骨、卵巢、皮肤、肾、窦、结肠、肠、胃、直肠、食道、血液、大脑和其覆盖物、脊髓和其覆盖物、肌肉、结缔组织、肾上腺、副甲状腺、甲状腺、子宫、睾丸、垂体、生殖器官、肝脏、胆囊、眼、耳、鼻、喉、扁桃腺、口、以及淋巴结和淋巴系统。

待治疗的病症也可以是组织畸形或异常，所述组织选自肺、乳房、胃、胰、前列腺、膀胱、骨、卵巢、皮肤、肾、窦、结肠、肠、胃、直肠、食道、血液、大脑和其覆盖物、脊髓和其覆盖物、肌肉、结缔组织、肾上腺、副甲状腺、甲状腺、子宫、睾丸、垂体、生殖器官、肝脏、胆囊、眼、耳、鼻、喉、扁桃腺、口、以及淋巴结和淋巴系统。

具体是，待治疗的病症可以是扁桃体肥大、前列腺增生、银屑病、湿疹、皮肤病或痔。待治疗的病症可以是血管病如动脉粥样硬化或动脉硬化，或者是血管病如静脉曲张、动脉或支架的狭窄或重狭窄。待治疗的病症也可以是例如皮肤、眼、耳、鼻、喉、口、肌肉、结缔组织、毛发或乳房组织等组织的美容修饰。

S05A 肽的治疗组合物属于本发明范围。这种组合物可包括与药学上可接受载体混合的治疗有效量的 S05A 肽。载体物质可以是注射用水，优选添加溶液中常用的其它物质以施用给哺乳动物。通常，用于治疗 S05A 肽以组合物形式使用，组合物包括纯化的肽结合一种或多种生理上可接受载体、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适当载体的范例。优选地，产物用合适赋形剂(如蔗糖)制成冻干物。如果需要可包括其它标准载体、稀释剂和赋形剂。组合物包括此领域的一般技术人员已知的 pH 值范围合适的缓冲液，包括约 pH7.0-8.5 的 Tris 缓冲液、或约 pH4.0-5.5 的乙酸缓冲液，缓冲液可进一步包括山梨醇或其合适的替代物。

采用偶联或连接或结合于抗体、抗体片段、抗体样分子或对特异性肿瘤标记，如细胞受体、信号肽或过度表达的酶有高亲和性的分子的 S05A 肽来靶向不需要的细胞元件也属于本发明范围。抗体、抗体片段、抗体样分子或对特异性肿瘤标记有高亲和性的分子用于将所述肽偶联物靶向特定细胞或组织。例如，有特殊表面抗原或表达抗原的肿瘤可由抗体、抗体片段、抗体样结合分子

靶向且肿瘤细胞可被该肽杀死。这种使用抗体靶向的方法的优点是降低剂量、提高结合和被靶细胞摄入的可能性、提高靶向和治疗转移性肿瘤和微观大小肿瘤的效率。

本发明也包括采用偶联或连接或结合于蛋白质或其它分子的 S05A 肽以形成组合物，通过肿瘤-特异性或位点-特异性酶或蛋白酶或者通过靶向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位置或者附近切割后能在肿瘤或其它不需要的细胞的位置或附近释放该肽。

本发明也包括使用偶联或连接或结合于蛋白质或其它分子的 S05A 肽以形成组合物，在待治疗组织暴露于光(如激光疗法或其它光动力学或光活化疗法)、其它形式电磁辐射，例如红外线辐射、紫外线辐射、x 射线或 γ 射线辐射、局部加热、 α 或 β 辐射、超声波射线或其它局部能量源后，组合物释放该肽或该肽的一些生物活性片段。

S05A 肽可单独、一起或结合其它药物组合物使用，如适合于所治疗适应症的细胞因子、生长因子、抗生素、细胞凋亡诱导剂、抗炎症和/或化疗剂。

本发明也包括使用树状聚体、富勒烯和其它合成分子、聚合物及大分子的 S05A 组合物，其中所述肽和/或其相应 DNA 分子通过其本身或与其它种类分子如肿瘤特异性标记一起，与上述分子、聚合物或大分子偶联、结合或包含于其中。例如，美国专利号 5,714,166 《生物活性和/或靶向的树状聚体偶联物》(Bioactive and/or Targeted Dendrimer Conjugates)提供了制备和使用树状聚合物偶联物的方法，该偶联物包括至少一个树状聚体和导靶物以及至少一种与之偶联的生物活性剂。美国专利 5,714,166 公开的内容总体纳入本文以供参考。

本发明也包括 S05A 和/或基因及药物传递载体的治疗组合物，所述载体如脂质乳剂、胶束聚合物、聚合物微球、电活化聚合物、水凝胶和脂质体。

使用转移到不需要细胞的 S05A 或相关基因或基因同等物也属于发明范围。肿瘤内过度表达肽可用于诱导肿瘤中的细胞死亡，因而减少肿瘤细胞群。基因或基因同等物转移 S05A 以治疗不需要的细胞元件，预计其优点是所需剂量更少、被传递到靶细胞元件的细胞后代上从而使治疗频率更低、以及总体治疗更少。本发明也包括将编码含 S05A 的融合蛋白的基因转移到不需要的细胞或其邻近细胞，表达基因及产生和/或分泌融合蛋白后，融合蛋白由天然酶或蛋

白酶或者前体药物切割以释放该肽到不需要的细胞或附近。

使用克隆的重组肽-抗体偶联物；克隆的重组肽-抗体片段偶联物；克隆的重组肽-抗体样蛋白偶联物也属于发明范围。除了制造和标准化生产克隆的结合分子的优点，克隆的 S05A 肽结合靶向偶联物(如抗体、抗体片段、抗体样分子或者对癌特异性受体或其它肿瘤标记有高亲和性的分子)的优点是这种分子组合上述的靶向优点。

本发明还包括采用 S05A 肽或基因或基因等价物的治疗组合物作为包被医疗装置如支架的成分，以消除、抑制或预防不良细胞增殖或累积。

口服施用的固体剂形包括但不限于胶囊、片剂、药丸、粉末和颗粒。在这种固体剂量形式中，活性化合物与至少一种下列物质混合：(a)一种或多种惰性赋形剂(或载体)，如柠檬酸钠或磷酸二钙；(b)填充剂或膨胀剂，如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸；(c)粘合剂，如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯树胶；(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)溶液缓聚剂，如石蜡；(g)吸收加速剂，如季铵化合物；(h)润湿剂，如乙酰醇和甘油单硬脂酸酯；(i)吸收剂，如高岭土和膨润土；(j)滑润剂，如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠和它们的混合物。就胶囊、片剂、药丸而言，剂形也可包含缓冲剂。

口服施用的液体剂形包括药学上可接受乳剂、溶液、悬浮液、糖浆和酞剂。除了活性化合物，液体剂形可包含本领域常用的惰性稀释剂如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂。乳化剂范例是乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺，油如棉子油、花生油、玉米胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油，甘油、四氢糠醇、聚乙二醇、山梨聚糖的脂肪酸酯或这些物质的混合物等。

除了这种惰性稀释剂，组合物也可包含佐剂，如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂和香味剂。

就具体组合物和施用方法而言，可改变发明组合物中活性成分的实际剂量水平以获得能有效获得所需治疗反应的 S05A 肽量。因此选择剂量水平取决于所需治疗效果、施用途径、所需治疗的持续时间以及其它因素。

可根据体表面积给予哺乳动物包括人的有效量。用于不同大小、种类的动物和人的剂量相互关系(根据 mg/体表的 M^2) 描述于 E. J. Freireich 等, *Cancer Chemother. Rep.*, 50(4): 219(1966)。体表面积可从个体高度和重量大致确定(参见例如《科学表》(Scientific Tables), 吉格药物公司(Geigy Pharmaceuticals), 阿德斯雷(Ardsley), 纽约 537-538 页(1970))。

施用给宿主的 S05A 肽的每天总剂量可以是单一或分开的剂量。剂量单位组合物包含构成每天剂量的用量的几分之一。然而应该知道, 任何具体病人的特定剂量水平取决于多种因素, 包括体重、整体健康、性别、饮食、施用时间和途径、施用药物的效力、吸收和排泄的比例、与其它药物的组合以及治疗的具体病症的严重性。

根据本发明施用 S05A 肽组合物的方法包括但不限于肌内、经口、静脉内、腹膜内、大脑内(实质内)、脑室内、肿瘤内、病灶内、真皮内、鞘内、鼻内、眼内、动脉内、局部、透皮、通过气雾剂、输注、推注、移植装置、缓释系统等施用化合物。

另一种施用发明 S05A 肽的方法是经皮或透皮途径。这种实施方案的一个例子是使用贴片。具体是, 可在例如二甲亚砜(DMSO)或 DMSO 与棉子油的混合物中用肽的精细悬浮液制备贴片, 使之接触携带肿瘤的哺乳动物皮肤而远离皮肤囊(pouch)内肿瘤定位部位。含其它溶剂和固体支持物的其它介质或其混合物也可同样起作用。贴片可包含溶液或悬浮液形式的肽化合物。然后将贴片应用于病人皮肤, 例如将它插入借助针、夹子或其它夹持装置将皮肤折叠和夹持在一起而形成的病人皮肤囊中。应确保囊与皮肤连续接触而不受哺乳动物干扰。除了使用皮肤囊, 可使用任何能保证将贴片牢固放置而与皮肤接触的装置。例如, 可用粘附绷带将贴片夹持在皮肤上。

S05A 肽可在缓释制剂或制品中施用。缓释制品的合适例子包括成形物品形式的半透性聚合物基质, 如薄膜或微胶囊。缓释基质包括聚酯、水凝胶、聚交酯(美国 3,773,919、EP58,481)、L-谷氨酸和 γ 乙基-L-谷氨酰胺的共聚物(Sidman 等, *Biopolymers*, 22: 547-556)、聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)(Langer 等, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 和 Langer 等, *Chem. Tech.*, 12: 98-105)、乙烯乙酸乙烯酯(Langer 等, 同上)或聚-D(-)-3-羟基丁酸(EP133,988)。缓释组合

物也可包括脂质体，可由任何本领域已知的一些方法来制备(如 Eppstein 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-3692; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949)。

另一种施用本发明 S05A 肽的方法是使 S05A 肽直接或间接输注到待治疗的肿瘤或其它组织。这种实施方案的一个例子是直接注射肽到待治疗的肿瘤或其它组织。治疗可由单次注射、一段时间多次注射或在几小时、几天或几个月期间内的一系列注射组成，通过活组织检查、成像或其它监控组织生长的方法监控待治疗肿瘤或其它组织的消退或破坏。注射入待治疗的肿瘤或其它组织可通过插入孔，如鼻、口、耳、阴道、直肠或尿道中的装置或经切口到达体内的肿瘤或组织，并且可结合成像或光学系统如超声波或纤维光镜进行以确定注射的合适部位。这种实施方案的另一个例子是使用可使 S05A 肽恒定输注组织的装置。

施用本发明 S05A 肽的另一种方法是结合手术或与物理切除、剥除或者杀死或破坏肿瘤或需要或希望除去或破坏其它组织或细胞元件所用相类似的过程，其中本发明的 S05A 肽施用给围绕除去肿瘤或组织的区域的紧邻区域，从而破坏或阻止未被该过程除去或破坏的任何肿瘤细胞或其它细胞元件的生长。

施用本发明 S05A 肽的另一种方法是将某装置移植到待治疗的肿瘤或其它组织中。这种实施方案的一个例子是将含肽的薄片移植到待治疗的肿瘤或其它组织中。薄片随时间的推移将治疗剂量的肽释放到组织中。另外，可通过将吸收了 S05A 肽的膜、海绵或其它合适物质移植到受影响区域中而局部施用组合物。如果使用移植装置，可将该装置移植到任何合适的组织或器官，递送肽可以是直接通过装置，经推注或经连续施用或经导管采用连续输注。

另一种施用方法是将一个或多个拷贝的 S05A 肽-编码基因导入靶向的细胞，如果必要，诱导多拷贝的基因开始胞内产生肽。一种可应用基因治疗的方式是使用 S05A 肽-编码基因(基因组 DNA、cDNA 和/或编码该肽(或其片段、变体、同源物或衍生物)的合成 DNA)，它可操作连接于组成型或可诱导启动子以形成“基因治疗 DNA 构建物”。如果启动子在构建物插入的细胞或组织类型中具有活性，它可与内源性肽-编码基因同源或异源。如果需要，基因治疗 DNA 构建物的其它成分可任选地包括设计用于位点特异性整合的 DNA 分子(如用于同源重组的内源性侧翼序列)，组织特异性启动子、一个或多个增强子或一个

或多个沉默子，能提供胜过亲代细胞的选择性优势的 DNA 分子、用于标记以鉴定转化细胞的 DNA 分子、阴性选择系统、细胞特异结合剂(例如用于细胞靶向)细胞特异性内在化因子、增强载体表达的转录因子以及能使载体生产的因子。

体内或离体递送基因到细胞或组织中的方法包括(但不限于)直接注射裸露 DNA、弹道法(ballistic method)、脂质体介导的转移、受体介导的转移(配体-DNA 复合物)、电穿孔和磷酸钙沉淀，参见美国专利号 4,970,154、WO 96/40958、美国专利号 5,679,559、美国专利号 5,676,954 和美国专利号 5,593,875，各自的内容全部纳入本文供参考。还包括采用病毒载体，如逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、痘病毒、慢病毒、乳头瘤病毒或单纯疱疹病毒，采用 DNA-蛋白偶联物和采用脂质体。已报道了基因治疗载体的应用，见美国专利 5,672,344；5,399,346；5,631,236 和 5,635,399。这些专利各自的内容整体引入以供参考。

可通过移植将 S05A 肽-编码基因递送到某些患者细胞中，细胞使用本文所述方法离体遗传工程改造以表达和分泌 S05A 肽或其片段、变体、同源物或衍生物。这种细胞可以是动物或人细胞，可获得自病人自身组织或来自人或非人的另一来源。任选地，细胞可以是无限增殖化或干细胞。然而为减少免疫应答的可能性，优选将细胞包裹以防止周围组织的渗透。包裹物质一般是生物相容的半透性聚合封闭物或膜，它们能使蛋白产物释放但防止病人免疫系统或来自周围组织的其它有害因素破坏细胞。用于膜包裹细胞的方法是技术人员所熟悉的，可制备包裹的细胞并移植到病人中而不需要过度的实验。参见例如美国专利号 4,892,538；5,001,472 和 5,106,627，它们公布的内容全部纳入本文供参考。包裹活细胞的系统描述于 PCT WO 91/10425。制成多种其它持续或受控递送方式的技术是本领域技术人员已知的，如脂质体载体、生物可侵蚀的颗粒或珠，这些技术描述于例如美国专利号 5,653,975，其内容全部纳入本文供参考。有或没有包裹的细胞可移植到病人的适当身体组织或器官中。

治疗需要除去或破坏细胞的病症的方法的特别优选实施方式中是给予一种或多种本发明肽，所述需要除去或破坏的细胞在这里是淋巴组织。其他优选实施方式包括治疗需要除去或破坏细胞的病症，如任何一种单独或组合选自下组的病症：扁桃体肥大、前列腺增生、血管病(动脉粥样硬化或动脉硬化)、痔、

静脉曲张、银屑病、湿疹、皮肤病、以及组织的美容修饰。其他可治疗的病症包括：动脉或放置在或植入动脉内的支架的狭窄、再狭窄、封闭或堵塞。在优选实施方式中可治疗的合适组织包括：皮肤、眼、耳、鼻、喉、口、肌肉、结缔组织、毛发或乳房。

可根据本发明治疗的其他优选病症包括选自下组的那些：炎性疾病、自身免疫疾病、代谢疾病、遗传疾病、创伤性疾病或生理损伤、营养缺乏性疾病、传染病、淀粉样疾病、纤维变性病、贮积病、先天性畸形、酶缺乏性疾病、中毒、醉酒、环境病、辐射病、内分泌疾病、变性性疾病和机能性疾病。在其他优选的实施方式中，所述肽偶联于、连接于或结合于一种分子，所述分子选自抗体、抗体片段和抗体样结合分子，其中所述分子结合肿瘤或其它靶标的亲和力高于结合其它细胞的亲和力。在其他实施方式中，所述肽是一种新克隆的重组分子的一部分，所述重组分子由该肽和某种分子构成，所述分子选自抗体、抗体片段和抗体样结合分子，其中所述分子结合肿瘤或其它靶标的亲和力高于结合其它细胞的亲和力。

提供以下例子以阐明本发明。然而应理解的是本发明不限于这些例子中所述的具体条件和细节。在说明书中，包括美国专利在内的任何和所有公众可得到的文献专门纳入以供参考。

具体地说，本发明特别包括待批美国专利申请序列号 10/092,934：“用神经丝状蛋白治疗肿瘤和相关病症的方法”中列出的实施例以供参考，该份申请显示完整的 AD7c-蛋白是在体外胶质瘤和成神经细胞瘤培养物中以及体内正常啮齿动物肌肉组织、皮下结缔组织和真皮以及多种不同人和非人来源的肿瘤(包括啮齿动物模型中的乳腺癌、皮肤癌和乳头状瘤、结肠癌、脑胶质瘤和其它肿瘤)中造成细胞死亡的有效试剂。本发明还特别包括待批美国专利申请序列号 10/153,334，题为“有效治疗肿瘤和其它需要除去或破坏细胞的病症的肽”；序列号 10/198,069，题为“有效治疗肿瘤和其它需要除去或破坏细胞的病症的肽”；序列号 10/198,070，题为“有效治疗肿瘤和其它需要除去或破坏细胞的病症的肽”；序列号 10/294,891，题为“有效治疗肿瘤和其它需要除去或破坏细胞的病症的肽”；以及序列号 10/920,313，题为“有效治疗肿瘤和其它需要除去或破坏细胞的病症的肽”中列出的实施例以供参考，它们各自揭示其中所述的某

些肽是在体内正常啮齿动物肌肉组织、皮下结缔组织、真皮和其它组织中造成细胞死亡的有效试剂。

实施例 1

此例子的目的是确定 S05A 肽对注射部位组织的效果。

以下 S05A 肽采用标准方法合成：

S05A-2 (SEQ ID NO. 2) IDQQVLSRI (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile);

S05A-3 (SEQ ID NO. 3) KLEIKRCL (Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu);

S05A-4 (SEQ ID NO. 4) VLSRIK (Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys);

S05A-5 (SEQ ID NO. 5) RIKLEIK (Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys);

S05A-6 (SEQ ID NO. 6) VLSRIKLEIKRCL (Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Cys-Leu);

S05A-7 (SEQ ID NO. 7) IDQQVLSRIKLEI (Ile-Asp-Gln-Gln-Val-Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile)。

在前列腺可视手术后，用乙醚麻醉雄性 Sprague-Dawley 大鼠(300 克重量范围)并通过前列腺内输注给予上述 S05A 肽之一，对照仅注射生理盐水或不注射。注射由 300 μ l S05A 肽(用 PBS pH 7.4 配成 1 mg/ml)(1.0mg/kg)(n=36)构成。24 小时(n=12)、72 小时(n=12)或 7 天(n=12)后无痛杀死大鼠。摘除前列腺，在 10%缓冲的福尔马林中固定 24 小时，石蜡包埋，切片，并用 H&E 染色。各只动物的完整前列腺都作包埋和切片。用组织学方法检查和测定所有的染色切片。每个前列腺至少检查 2 张组织切片，检测每张组织切片彼此呈 90 度的两个横切面直径(D)(每个前列腺总共测量大于等于 8 次)。根据 $V=4/3\pi(D/2)^3$ 用各组的平均横截面直径(D)估算体积，并计算各组的平均体积。按照以下标准评估组织学改变：

-	无
+	当前，最小
++	当前，中等
+++	当前，中等并发散
++++	当前，发散并广泛

结论：下面的表 4 列出了观察到的细胞死亡的组织学改变。

表 4

S05A 肽	24 小时细胞死亡的组织学改变	72 小时细胞死亡的组织学改变
S05A-2	++++	++++
S05A-3	+	+
S05A-4	+	+
S05A-5	+	+
S05A-6	+	+
S05A-7	++++	++++

之前仅注射 1 mg/mL PBS 的对照研究显示无组织学改变或组织学改变最小，包括针头(附近)有轻微灶性炎症(参见以下申请中的实施例：待审批美国专利申请序列号 10/153,334：题为“有效治疗肿瘤和其它需要除去或破坏细胞的病症的肽”；序列号 10/198,069，题为“有效治疗肿瘤和其它需要除去或破坏细胞的病症的肽”；序列号 10/198,070，题为“有效治疗肿瘤和其它需要除去或破坏细胞的病症的肽”；序列号 10/294,891，题为“有效治疗肿瘤和其它需要除去或破坏细胞的病症的肽”；以及序列号 10/920,313，题为“有效治疗肿瘤和其它需要除去或破坏细胞的病症的肽”，以供参考)。

下面的表 5 列出了观察到的体积改变。

表 5

S05A 肽	计算的平均体积(mm ³)			
	24 小时	72 小时	7 天	总的
S05A-2	180	249	165	198
S05A-3	249	435	463	382
S05A-4	357	408	333	366
S05A-5	249	408	392	350
S05A-6	310	493	408	404
S05A-7	180	165	357	234

与对照相比，预计注射 S05A 肽 S05A-2 和 S05A-7 的大鼠中前列腺体积的整体减小平均>40%。用 S05A-2 和 S05A-7 处理的大鼠显示出广泛的细胞死亡、坏死、腺上皮流失和萎缩。对照显示出最小改变或没有改变，包括注射部位的急性炎症和针头的灶性微出血。

本领域技术人员应理解，可对本发明的方法和组合物作出多种改进和改变而不背离发明的精神或范围。