[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680016324.8

[43] 公开日 2008 年 5 月 7 日

[11] 公开号 CN 101175769A

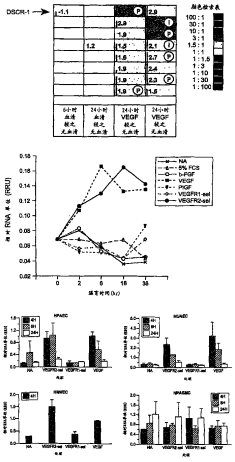
[22] 申请日 2006.3.9
[21] 申请号 200680016324.8
[30] 优先权
[32] 2005. 3.10 [33] US [31] 60/660,172
[86] 国际申请 PCT/US2006/008316 2006.3.9
[87] 国际公布 WO2006/098998 英 2006.9.21
[85] 进入国家阶段日期 2007.11.12
[71] 申请人 健泰科生物技术公司
地址 美国加利福尼亚州
[72] 发明人 汉斯 - 彼得 • 格伯
鲍里斯 • A • 赫瑟
[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 张红春 封新琴
权利要求书 2 页 说明书 69 页 附图 12 页

[54] 发明名称

用于调控血管完整性的方法和组合物

[57] 摘要

本发明提供了可用于调控血管完整性的方法和组合物。



1. 调控内皮细胞中的DSCR1活性的DSCR1调控物。
2. 权利要求1的DSCR1调控物，其中所述调控物调控经由VEGF受体2(VEGFR-2)的信号传导诱导的DSCR1活性。
3. 任何前述权利要求的DSCR1调控物，其中所述调控物调控DSCR1-钙依赖磷酸酶A (CnA)途径。
4. 任何前述权利要求的DSCR1调控物，其中所述调控物调控与NFAT活性有关的细胞事件。
5. 权利要求4的DSCR1调控物，其中所述细胞事件是NFAT磷酸化、NFAT核易位或NFAT转录活性。
6. 任何前述权利要求的DSCR1调控物，其中所述调控物包括编码能够拮抗CnA诱导的基因表达的多肽的核酸。
7. 权利要求6的DSCR1调控物，其中所述多肽包括至少包含DSCR1一部分的肽，其中所述肽能够与CnA相互作用。
8. 权利要求6或7的DSCR1调控物，其中所述多肽包含人DSCR1的大约第96位到大约第125位或者大约第108位到第122位氨基酸。
9. 权利要求1或2的DSCR1调控物，其中所述调控物能够拮抗DSCR1功能。
10. 权利要求9的DSCR1调控物，其中所述调控物包括在存在于内皮细胞中时抑制细胞中的DSCR1活性的核酸。
11. 权利要求10的DSCR1调控物，其中所述核酸包括反义寡核苷酸。
12. 权利要求10的DSCR1调控物，其中所述核酸包括抑制性/干扰性RNA。
13. 权利要求12的DSCR1调控物，其中所述抑制性/干扰性RNA是抑制性/干扰性小RNA (siRNA)。
14. 权利要求12或13的DSCR1调控物，其中所述核酸包含选自下组的一种或多种序列：GCUCAGACCUUACACAUAG、GGACAUCACCUUUCAGUAU、GAAAGAAUGAGGAGACCUA、GACAUCACCUUUCAGUAUU、AACGUAUGACAAGGACAUCAC、AAGGACAUCACCUUUCAGUAU、AAGUUAUAUUUUGCUCAGACC和AAGAUGCGACCCCAGUCAUAA。
15. 权利要求10的DSCR1调控物，其中所述核酸包括适体。

16. 治疗与异常血管炎症有关的病症的方法，所述方法包括对受试者施用有效量的权利要求1-15任一项的DSCR1调控物，由此治疗该病症。
17. 权利要求16的方法，其中所述调控物增强与血管系统有关的炎症。
18. 权利要求16的方法，其中所述调控物抑制与血管系统有关的炎症。
19. 治疗与异常血管炎症有关的免疫学病症的方法，所述方法包括对受试者施用有效量的权利要求1-15任一项的DSCR1调控物，由此治疗该病症。
20. 权利要求19的方法，其中所述调控物增强与血管系统有关的炎症。
21. 权利要求19的方法，其中所述调控物抑制与血管系统有关的炎症。
22. 治疗与血管完整性侵扰有关的病症的方法，所述方法包括对受试者施用有效量的权利要求1-15任一项的DSCR1调控物，由此治疗该病症。
23. 权利要求22的方法，其中所述血管完整性侵扰与血管/内皮细胞相关炎症有关。
24. 权利要求23的方法，其中所述调控物增强与血管系统有关的炎症。
25. 权利要求23的方法，其中所述调控物抑制与血管系统有关的炎症。
26. 减轻与抗炎疗法有关的副作用的方法，包括连同抗炎疗法对受试者施用权利要求1-15任一项的DSCR1调控物，由此减轻所述副作用。
27. 权利要求26的方法，其中所述DSCR1调控物抑制内皮细胞中的DSCR1活性。
28. 权利要求26或27的方法，其中所述抗炎疗法包括抑制炎症的药剂。
29. 权利要求26的方法，其中所述调控物增强与血管系统有关的炎症。
30. 权利要求26的方法，其中所述调控物抑制与血管系统有关的炎症。
31. 治疗与不希望的血管发生有关的病症的方法，所述方法包括对患有该病症的受试者施用抗血管发生剂和权利要求1-15任一项的DSCR1调控物。
32. 抑制肿瘤生长或癌细胞生长的方法，所述方法包括对肿瘤或癌细胞施用有效量的抗癌剂和有效量的权利要求1-15任一项的DSCR1调控物，其中所述组合有效量抑制肿瘤或癌细胞的生长。
33. 权利要求32的方法，其中所述抗癌剂包括抗血管发生剂。
34. 权利要求33的方法，其中所述抗血管发生剂包括VEGF拮抗剂。
35. 权利要求34的方法，其中所述VEGF拮抗剂是抗VEGF抗体。

用于调控血管完整性的方法和组合物

相关申请

本申请是依据37 CFR 1.53(b)(1)提交的非临时申请，依据35 USC 119(e)要求2005年3月10日提交的临时申请60/660,172的优先权，在此收入其内容作为参考。

技术领域

一般而言，本发明涉及治疗疾病和其它病理学状况的领域。更具体的说，本发明关注用于调控与血管发生(angiogenesis)有关的分子事件和结果的方法和组合物。

发明背景

血管系统在维持正常生理学功能中发挥重要作用。例如，血管系统的内皮细胞在正常情况下形成细胞屏障，用来调控流体、电解质和蛋白质进入组织和器官的运动。虽然引起内皮屏障功能丧失的事件是相当复杂的，而且尚未完全理解，但是血管系统完整性的形成和维持已有广泛研究。参见例如Kagsbrun & Moses, Chemistry & Biology (1999), 6:R217-R224; Ferrara, Endocrine Reviews (2004), 25(4):581-611。

不过，清楚的是，血管系统完整性的侵扰(perturbation)与多种疾病和病理学状况的病因有关，范围从癌症到炎性疾病，诸如自身免疫性病症。参见例如美国专利申请公布号2004/0167198; Cines et al., Blood (1998), 91(10):3527-3561; Kumar et al., Curr. Opin. In Nephrology and Hypertension (2005), 14:33-37; Carmeliet & Collen Am. J. Physiol. (1997), 273:H2091-H2104。另一方面，应当注意，在某些生理学背景下，形成和/或维持受损状态血管系统(vasculature)的能力是人们所希望的，而且在缺陷时其自身可导致病理学问题或亚最佳治疗结果。

与血管系统有关的炎症已经鉴定为常常与血管完整性侵扰有关的胞外血管发生性刺激的下游事件。Kirkpatrick et al., Int. J. Microcirc. (1997),

17:231-240。例如，越来越多的证据表明，炎症过程可能在多种血管相关病症的病理生理学过程中发挥重大作用，诸如高血压。参见例如Touyz, Cur. Opin. Nephrology and Hypertension (2005), 14:125-131; Kobayashi & Lin, Frontiers in Bioscience (2005), 10:666-674; Bacon, Curr. Opin. Rheumatol. (2004), 17:49-55; Paleolog, J. Clin. Pathol.: mol. Pathol. (1997), 50-225-233; Mullenix et al., Ann. Vasc. Surg. (2005), 19:130-138。正如Touyz注意到的，在血管系统中观察到指示炎症的事件，例如表面粘附分子及其配体的表达、炎症细胞浸润、细胞因子生成、趋化因子释放、氧化应激和先天免疫激活升高。内皮细胞受到侵扰还表现为冯维勒布兰德(von Willebrand)因子和E-选择蛋白的释放，后者只在内皮细胞中表达。Kuenen et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. (2002), 22:1500-1505。持续和/或不受调控的炎症可导致组织/血管损伤。炎症应答典型地涉及血管通透性、白细胞溢出（粘附、变移(transmigration)和趋化性）和组织修复的改变。Touyz, supra。

不幸的是，迄今为止，仍然缺乏关于在胞外血管发生性刺激与相关下游事件（诸如内皮细胞相关炎症）之间介导信号传导的胞内分子的信息。这妨碍了开发能够精密调节血管发生过程以将不希望有的炎症引起的对血管完整性的侵扰降至最低或者在需要时诱导产生对血管完整性的侵扰的治疗策略的努力。因此，确实需要鉴定可作为新治疗干预的焦点的“中间”(intermediate)分子靶物和途径。本文中描述的发明满足了这一需要并且还提供了其它好处。

完整收入本文中所引用的所有参考文献，包括专利申请和出版物，作为本文的参考。

发明概述

本发明至少部分基于以下发现：唐氏(Down)综合征关键区域(critical region)蛋白质家族的成员是血管发生因子的胞外信号传导与调控血管完整性的下游事件的胞内调控之间的关键中间分子连接。具体而言，唐氏综合征关键区域1（下文中的“DSCR1”）在本文中显示为在活化的内皮细胞中在受到血管发生调控物诸如血管内皮生长因子(VEGF)的刺激后诱导的胞内分子，由此DSCR1的诱导继而调控与血管/内皮细胞炎症有关的基因的表达。如上所述，已经将与血管系统(vasculature)有关的炎症与众多病症联系起来。值得

注意的是，DSCR1是治疗性调控的特别有利的靶，因为它在胞外血管发生信号与胞内血管炎症调控之间的介导中经由负调控反馈环起作用。不受理论束缚，根据细胞/生理学环境，DSCR1，在其作为负调控反馈环的成分的能力方面，预计对正调控或负调控都是敏感的，以改变在正常情况下与调控反馈环有关的分子和信号传导平衡。与此一致，如本文所示，内皮细胞中DSCR1活性的升高和降低都凭经验证明导致对细胞存活结果的相似调控。如此，本文中所公开的数据揭示了一种重要的分子靶物/途径，其在受到干预时，导致对血管发生信号传导相关的关键下游事件之一，即血管系统相关炎症的调控。在某些情况下，诸如炎症，如果置之不理，可造成不希望发生的病理学后果。而在其它情况中，增强此类炎症可能是希望的。本发明提供可用于调控此类炎症的方法、组合物、试剂盒和制品，其通过干预DSCR1功能/活性，从而调控血管炎症及由此调控血管完整性来实现。

一方面，本发明提供了调控内皮细胞中的DSCR1活性的DSCR1调控物。在一个实施方案中，所述DSCR1调控物调控经由VEGF受体2 (VEGFR-2)的信号传导诱导的DSCR1活性。本发明的DSCR1调控物可调控DSCR1-钙依赖磷酸酶A (calcineurin A, CnA)途径的一个或多个方面。例如，在一个实施方案中，本发明的DSCR1调控物调控与NFAT活性有关的一个或多个细胞事件，包括例如NFAT磷酸化、NFAT核易位或NFAT转录活性（例如NFAT介导CnA对基因表达的调控的能力）。

本发明的DSCR1调控物可以以适于临床使用的任何形式提供。例如，本发明的调控物可以以核酸或多肽的形式提供和/或施用。相应地，在一个实施方案中，本发明的DSCR1调控物包括编码能够拮抗CnA诱导的基因表达的多肽的核酸。例如，所述多肽可包括至少包含DSCR1一部分的肽，其中所述肽能够与CnA相互作用。在一个实施方案中，所述多肽包含部分但非完整的成熟DSCR1蛋白质。在一个实施方案中，所述多肽包含全长成熟DSCR1蛋白质。在一个实施方案中，所述多肽包含人DSCR1的大约第96位到大约第125位或者大约第108位到大约第122位氨基酸，其中氨基酸位置指SEQ ID NO:1（图9）所示序列。在一个实施方案中，所述多肽包含与人DSCR1大约第96位到大约第125位或者人DSCR1大约第108位到大约第122位氨基酸的序列具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%序列同一性或相似性的序列，其中氨基酸位置指SEQ ID NO:1（图9）所示序列，只要该多肽保留拮抗CnA诱

导的基因表达的能力。在一个实施方案中，所述多肽包含人DSCR1的丝氨酸-脯氨酸(SP)序列的至少一部分及N和/或C-末端钙依赖磷酸酶结合结构域的至少一部分，其中所述多肽能够结合CnA以抑制CnA调控的基因表达。在一个实施方案中，所述多肽包含(i)人DSCR1大约第96位到大约第125位或者人DSCR1的大约第108位到大约第122位的序列，其中氨基酸位置指SEQ ID NO:1（图9）所示序列；(ii)丝氨酸-脯氨酸(SP)序列的至少一部分；及(iii)人DSCR1的N和/或C-末端钙依赖磷酸酶结合结构域的至少一部分，其中所述多肽能够结合CnA以抑制CnA调控的基因表达。

一方面，本发明提供了能够拮抗DSCR1活性的DSCR1调控物。相应地，在一个实施方案中，本发明的DSCR1调控物包括在存在于内皮细胞（例如活化的内皮细胞）中时抑制细胞中的DSCR1活性（包括但不限于基因表达）的核酸。在一个实施方案中，所述核酸包括反义寡核苷酸。在另一个实施方案中，所述核酸包括抑制性/干扰性RNA。在一个实施方案中，所述抑制性/干扰性RNA是抑制性/干扰性小RNA (siRNA)。例如，包含siRNA的DSCR1调控物可包含选自下组的一种或多种序列：GCUCAGACCUUACACAUAG、GGACAUCACCUUUCAGUAU 、 GAAAGAAUGAGGAGACCUA 和GACAUCACCUUUCAGUAUU。又例如，包含siRNA的DSCR1调控物可包含选自下组的一种或多种序列： AACGUAUGACAAGGACAUCAC、AAGGACAUCACCUUUCAGUAU 、 AAGUUAUAUUUUGCUCAGACC 和AAGAUGCGACCCCAGUCAUAA。在一个实施方案中，包含siRNA的DSCR1调控物包含选自下组的一种或多种序列：GCUCAGACCUUACACAUAG、GGACAUCACCUUUCAGUAU 、 GAAAGAAUGAGGAGACCUA 、GACAUCACCUUUCAGUAUU 、 AACGUAUGACAAGGACAUCAC 、AAGGACAUCACCUUUCAGUAU 、 AAGUUAUAUUUUGCUCAGACC 和AAGAUGCGACCCCAGUCAUAA。

在一个实施方案中，所述核酸包括适体(aptamer)。

在一个实施方案中，本发明的DSCR1调控物包括抗体。在一个实施方案中，施用抗体使得它进入靶内皮细胞以抑制该细胞中的DSCR1，即抗体得到内在化。在另一个实施方案中，抗体由导入（例如转染）到靶内皮细胞的核酸编码。

一方面，本发明提供了用于治疗与内皮细胞相关炎症有关的多种病症的

方法。例如，一方面，本发明提供了治疗与异常血管炎症有关的病症的方法，所述方法包括对受试者施用有效量的本发明DSCR1调控物，由此治疗该病症。在一个实施方案中，所述调控物增强与血管系统有关的炎症。在一个实施方案中，所述调控物抑制与血管系统有关的炎症。

一方面，本发明提供了治疗与异常血管炎症有关的免疫学病症的方法，所述方法包括对受试者施用有效量的本发明DSCR1调控物，由此治疗该病症。在一个实施方案中，所述调控物增强与血管系统有关的炎症。在一个实施方案中，所述调控物抑制与血管系统有关的炎症。

又一方面，本发明提供了治疗与血管完整性侵扰有关的病症的方法，所述方法包括对受试者施用有效量的本发明DSCR1调控物，由此治疗该病症。在一个实施方案中，所述血管完整性侵扰与血管/内皮细胞相关炎症有关，例如在存在不希望的较高或较低量的血管/内皮细胞相关炎症时。在一个实施方案中，所述调控物增强与血管系统有关的炎症。在一个实施方案中，所述调控物抑制与血管系统有关的炎症。

一方面，本发明提供了减轻与抗炎疗法有关的副作用的方法，包括联合抗炎疗法对受试者施用本发明的DSCR1调控物，由此减轻所述副作用。在一个实施方案中，所述DSCR1调控物抑制内皮细胞中的DSCR1活性。在一个实施方案中，所述抗炎疗法包括抑制炎症的药剂，例如所述药剂可抑制免疫细胞活性。在一个实施方案中，所述药剂是环孢霉素类炎症抑制剂，诸如环孢霉素A (CsA)。在一个实施方案中，所述调控物增强与血管系统有关的炎症。在一个实施方案中，所述调控物抑制与血管系统有关的炎症。

又一方面，本发明提供了治疗与不希望的血管发生有关的病症（诸如癌症）的方法，所述方法包括对患有该病症的受试者施用抗血管发生剂和本发明的DSCR1调控物。

另一方面，本发明提供了抑制肿瘤生长或癌细胞生长的方法，所述方法包括对肿瘤或癌细胞施用有效量的抗癌剂和有效量的本发明DSCR1调控物，其中所述组合有效量抑制肿瘤或癌细胞的生长。

在一个实施方案中，抗癌剂包括抗血管发生剂，例如VEGF拮抗剂。在一个实施方案中，所述VEGF拮抗剂是抗VEGF抗体。在一个实施方案中，所述抗VEGF抗体包含抗体A4.6.1的抗原结合序列或其亲和力成熟变体。在一个实施方案中，所述抗原结合序列包含抗体A4.6.1或其亲和力成熟变体的重

链的至少一个、两个或三个高变区。在一个实施方案中，所述抗原结合序列包含抗体A4.6.1或其亲和力成熟变体的轻链的至少一个、两个或三个高变区。在一个实施方案中，所述抗原结合序列包含抗体A4.6.1或其亲和力成熟变体的重链可变域的人源化形式。在一个实施方案中，所述抗原结合序列包含抗体A4.6.1或其亲和力成熟变体的轻链可变域(variable domain)的人源化形式。抗体A4.6.1是由保藏于美国典型培养物保藏中心、保藏号为HB 10709 (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA)的杂交瘤细胞系生成的抗VEGF抗体。在一个实施方案中，所述抗VEGF抗体是bevacizumab（贝伐单抗）。在一个实施方案中，所述抗VEGF抗体是与bevacizumab结合人VEGF的相同表位的抗体。在一个实施方案中，所述抗VEGF抗体是与bevacizumab竞争结合人VEGF的抗体。在一个实施方案中，所述抗VEGF抗体结合VEGF的受体，例如VEGFR2。在这些方法的一个实施方案中，本发明的DSCR1调控物联合抗癌剂诸如化疗剂施用于受试者。在一个实施方案中，所述DSCR1调控物抑制与血管完整性侵扰有关的副作用。例如，所述血管完整性侵扰可能与血栓溶解有关。

一方面，本发明提供了通过增强血管发生来治疗病症的方法，所述方法包括对患有病症的受试者施用有效量的诱导血管发生的药剂和有效量的DSCR1调控物，由此治疗该病症。在一个实施方案中，所述诱导血管发生的药剂包括促血管发生物质，例如本文中所公开的一种或多种血管发生因子。在一个实施方案中，所述血管发生因子是VEGF。在一个实施方案中，所述DSCR1调控物抑制血管完整性侵扰。可通过此方法治疗的病症包括任何本文中所公开的病症，包括例如伤口、缺血、心血管病症、动脉粥样硬化、血管炎等。

一方面，本发明提供了调控内皮细胞存活的方法，包括使细胞接触DSCR1调控物。在一个实施方案中，所述内皮细胞是活化的。在一个实施方案中，所述内皮细胞是用编码DSCR1反义序列的表达载体转染的。在一个实施方案中，所述内皮细胞是用编码DSCR1有义序列的表达载体转染的。在一个实施方案中，所述DSCR1调控物包括抑制性/干扰性RNA，其在一个实施方案中是小干扰RNA (siRNA)。

在其中本发明的DSCR1调控物联合另一种治疗剂施用的本发明方法中，施用DSCR1调控物的时间安排相对于施用所述另一种治疗剂的时间安排将

是任何凭经验和/或在临床上认为对治疗有益的安排。例如，在一个实施方案中，所述DSCR1调控物的施用在所述另一种治疗剂的施用之前。在一个实施方案中，所述DSCR1调控物的施用在所述另一种治疗剂的施用之后。在另一个实施方案中，所述DSCR1调控物的施用与所述另一种治疗剂的施用是同时的。在一个实施方案中，所述另一种治疗剂具有抗炎活性。在一个实施方案中，所述两种药剂是作为分开的组合物施用的。在一个实施方案中，所述两种药剂是作为单一组合物施用的。

一方面，本发明提供了鉴定有风险形成与包括血管发生调控的病症治疗有关的副作用的受试者的方法，所述方法包括测量组织或细胞中DSCR1表达或活性的量，并将该量与正常的对应组织或细胞的量进行比较，其中量的差异表明有风险形成所述副作用。一般而言，所述副作用是由于与炎症有关的血管完整性受到侵扰。所述鉴定方法可在临床干预过程中任何方便和/或有益的时间点实施。例如，它可以发生在施用治疗剂以治疗所讨论病症之前、期间或之后。

一方面，本发明提供了鉴定DSCR1调控物（诸如可用于调控血管完整性侵扰/血管炎症的分子）的方法，所述方法包括使候选物质接触DSCR1（或其功能性变体，如下文所定义的），并测定存在和不存在所述候选物质时DSCR1（或其功能性变体）的量，其中存在和不存在所述候选物质时DSCR1（或其功能性变体）的量不同表明所述候选物质是DSCR1的调控物。DSCR1的量可通过本领域已知的任何合适的定性或定量测量法来测定。例如，DSCR1的量可通过RNA或蛋白质的水平来指示。又例如，DSCR1的量可通过DSCR1活性（例如CnA的抑制）来指示。本发明的方法可用于鉴定DSCR1的拮抗剂或激动剂。例如，在一个实施方案中，DSCR1的量在存在候选物质时较低。在另一个实施方案中，DSCR1的量在存在候选物质时较高。通过本发明的方法鉴定的调控物可具有用于本发明方法所要求的任何特征。例如，可以选择能够调控血管完整性和/或与内皮细胞有关的炎症的候选物质。或者，候选物质可进行另外的评估以选择缺乏某些不希望的特征的物质。例如，可以选择基本上不调控内皮细胞增殖的候选物质。

如上所述，本发明的DSCR1调控物和方法可用于治疗怀疑或已知与不当血管完整性调控有关的多种病症。例如，这些病症包括但不限于血管（诸如心血管）、内皮、血管发生性（诸如肿瘤/癌症）或免疫学（诸如自身免疫）

病症范畴中的病症。不过，在有些实施方案中，这些病症不是心血管的或免疫学的。在有些实施方案中，这些病症不是内皮的或血管发生性的。而在其它实施方案中，所述病症与组织炎症（急性的或慢性的），例如自身免疫性病症有关。还应当注意，有些疾病可能具有两种或多种病症范畴之间交叠的特征。

一般而言，本发明提供了可用于治疗免疫介导的病症的调控物分子和方法。在一个实施方案中，本发明涉及自身免疫性病症的治疗，诸如本文中所指明的。在一个实施方案中，病症涉及移植物排斥或移植物抗宿主疾病。

在其中治疗方法包括促进血管发生(angiogenesis)/新血管形成以治疗病症的本发明方法的有些实施方案中，所述病症可以是但不限于例如血管创伤、伤口、撕裂伤、切口、烧伤、溃疡（例如糖尿病性溃疡、压迫性溃疡、血友病性溃疡、静脉曲张性溃疡）、组织生长、体重增加、外周动脉疾病、引产、毛发生长、大疱性表皮松解症、视网膜萎缩、骨折、骨脊柱融合(bone spinal fusion)、半月板撕裂等。

在临床上适当或希望时，本发明的方法可进一步包括另外的治疗步骤。例如，在一个实施方案中，本发明的方法进一步包括其中使靶细胞和/或组织（例如癌细胞）暴露于放射治疗或化疗剂的步骤。

一方面，本发明提供了包含一种或多种本发明DSCR1调控物和载体的组合物。在一个实施方案中，所述载体是药学可接受的。

一方面，本发明提供了编码本发明DSCR1调控物的核酸。在一个实施方案中，本发明的核酸编码DSCR1调控物，其是或包含多肽（例如寡肽）。在一个实施方案中，本发明的核酸编码DSCR1调控物，其是或包含抗体或其片段。在一个实施方案中，本发明的核酸编码抑制DSCR1表达/活性（例如DSCR1基因转录或DSCR1蛋白质翻译）的核酸序列。

一方面，本发明提供了包含本发明核酸的载体。

一方面，本发明提供了包含本发明核酸或载体的宿主细胞。载体可以是任何类型的，例如重组载体，诸如表达载体。可以使用任何多种宿主细胞。在一个实施方案中，宿主细胞是原核细胞，例如大肠杆菌。在一个实施方案中，宿主细胞是真核细胞，例如哺乳动物细胞，诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在一个实施方案中，本发明的核酸或载体在内皮细胞中表达。

一方面，本发明提供了制备本发明的DSCR1调控物的方法。例如，本发

明提供了制备其是或包含抗体（或其片段）的DSCR1调控物的方法，所述方法包括在合适的宿主细胞中表达编码所述抗体（或其片段）的本发明重组载体，并回收所述抗体（或其片段）。又例如，本发明提供了制备其是或包含多肽（诸如寡肽）的DSCR1调控物的方法，所述方法包括在合适的宿主细胞中表达编码所述多肽（诸如寡肽）的本发明重组载体，并回收所述多肽（诸如寡肽）。

一方面，本发明提供了制品，其包含容器；及装在所述容器内的组合物，所述组合物包含一种或多种本发明的DSCR1调控物。在一个实施方案中，所述组合物包含本发明的核酸。在一个实施方案中，包含DSCR1调控物的组合物进一步包含载体，其在有些实施方案中是药学可接受的。在一个实施方案中，本发明的制品进一步包含关于施用所述组合物（例如DSCR1调控物）以治疗本文中所指明的病症的说明书。

一方面，本发明提供了试剂盒，其包含第一容器，其中装有包含一种或多种本发明DSCR1调控物的组合物；及第二容器，其中装有缓冲剂。在一个实施方案中，所述缓冲剂是药学可接受的。在一个实施方案中，包含DSCR1调控物的组合物进一步包含载体，其在有些实施方案中是药学可接受的。在一个实施方案中，所述试剂盒进一步包含关于施用所述组合物（例如DSCR1调控物）以治疗本文中所指明的病症的说明书。

附图简述

图1。使用基因召唤技术(GeneCall technology)和RT-PCR的基因表达分析。(A) 将原代HUVEC分别暴露于无血清培养基或补充有VEGF或5% FCS的无血清培养基达0、6或24小时。将内皮细胞溶胞并分离总RNA，通过基因召唤分析基因表达。每栏代表一系列二元比较（已经进行了彼此比较）的输出结果。然而，证实了标有“P”（P=中毒）或“I”（I=分离、克隆、测序和中毒）的基因。发现所示选择的基因在6和24小时时受到VEGF的诱导，但非5% FCS的刺激；VEGF的倍数刺激表示为每个格中的数值。灰色格表明在6和24小时有血清较之无血清的二元比较中没有观察到表达变化。放大的索引图中的垂直黑色条表明基因召唤的置信水平。(B) 通过实时PCR的DSCR1表达分析[21]。在所示时间阶段将HUVEC保持在无血清条件下并用5% FCS、b-FGF (10ng/mL)、VEGF (30 ng/mL)、PlGF (100ng/mL)、VEGFR1-sel

(100ng/mL)或VEGFR2-sel (30ng/mL)刺激。所有突变型蛋白质是VEGFR2-sel (KDR 选 择 性):VEGF D63S/G65M/L66R 和 Flt 选 择 性 VEGF I43A/I46A/Q79A/I83[25]。(C) 通过实时PCR的DSCR1表达分析。将HPAEC、HDMEC和HUAEC在存在0.5% FCS (NA)时或在存在0.5% FCS和VEGF (30ng/mL)或与VEGFR1 (VEGFR1-sel, 100ng/mL)或VEGFR2 (VEGFR2-sel, 30 ng/mL) 结合的VEGF突变型时[26]温育4 (■)、8 (□)和24 (□)小时。作为对照细胞，使用不表达显著水平VEGF受体的HUPASMC（数据未显示）。所示数据代表了代表性的总共3次独立实验的一式三份样品的平均值±SD。相对RNA单位(RRU)如Gerber等人[3]所述计算，使用cyclophylin作为参比基因。(D) 通过实时PCR的DSCR1表达分析。将HUVEC在存在CsA (1μM)时温育2小时，然后用VEGF (30ng/mL)、VEGFR2-sel (30ng/mL)、VEGFR1-sel (100ng/mL)、PMA (200ng/mL)和IO (5μM)、毒胡萝卜素(thapsigargin)(50nM)或TNF-α (10ng/mL)刺激5.5小时，如所示的。所示数据代表了一式两份平行进行的代表性的总共2次独立实验的平均值± SD。(E) HUVEC全细胞提取物的Western印迹分析，HUVEC在0% 血清、0.5% BSA和5% FCS、hVEGF (30ng/mL)、b-FGF (10 ng/mL)、TNF-α (10ng/mL)和PMA或伊屋诺霉素(ionomycin, IO)中培养5小时，如所示的。作为对照，包括100ng重组DSCR1蛋白质。

图2。DSCR1和NFATc1磷酸化的细胞定位。(A) 经Ad-DSCR1-FLAG或对照Ad-LacZ (MOI=100)转导并暴露于VEGF (30ng/mL)的HUVEC的IHC分析。经VEGF刺激20分钟后，将细胞固定并分析NFATc1的细胞定位。(B) NFATc1磷酸化的Western印迹分析。将HUVEC用所示腺病毒载体转导(MOI=100)或只暴露于转导培养基(NA)。转导后2天，向细胞中添加CsA (1μM)，2小时后将细胞用PMA (200ng/mL)/IO (5μM)刺激4小时。将总细胞提取物进行Western印迹分析，使用独立于磷酸化状态识别NFATc1的抗NFATc1抗体。所示数据来自代表性的总共3次实验。

图3。DSCR1干扰活化的内皮细胞中的NFAT转录活性。(A)包括编码C-末端表位标记形式的DSCR1 (DSCR1-FLAG)的CMV驱动表达载体或等量空载体的混合物转染的HUVEC的荧光素酶报道基因分析。荧光素酶报道构建物包含3个NFAT结合位点(NFAT-Luc)或3个拷贝的AP1 (B)结合位点。转染后48小时，将细胞用PMA (200ng/mL)、毒胡萝卜素(50nM)或IO (5μM)刺激6小时。将细胞溶胞并分析报道基因表达。所示数据代表了相对于SV40-RL活性

的荧光素酶活性。数据代表了代表性的4次独立实验的一式三份样品的平均值±SD。

图4。活化的内皮细胞上DSCR1对炎症标志物基因表达的抑制。(A) 用编码DSCR1 (Ad-DSCR1-FLAG)或对照LacZ (Ad-LacZ)的腺病毒载体转导(MOI=100)的HUVEC的实时RT-PCR分析。转导后2天，将细胞只与生长培养基一起或与补充有PMA (200ng/mL)和IO (5μM)、VEGF (30ng/mL)、毒胡萝卜素(50nM)或其所示组合的生长培养基一起温育5-6小时。分离总RNA并通过实时RT-PCR分析来分析Cox-2 (i)、E-选择蛋白(ii)和TF (iii)的水平。所示数据代表了代表性的总共3次独立实验的一式三份样品的平均值±SD。RRU如Gerber等人[3]所述计算，使用GAPDH作为参比基因。(B) 经各种化合物刺激的瞬时转染内皮细胞的FACS分析。向转导细胞中添加CsA (1μM)，2小时后用PBS (NA)、PMA (200ng/mL)、IO (5μM)、TNF-α (10ng/mL)或其组合刺激细胞。刺激后24小时，通过在25mM EDTA (乙二胺四乙酸)/PBS中温育10分钟，从培养皿中取出细胞。对细胞分析E-选择蛋白、VCAM-1、TF和ICAM-1的表达。层析图下的白色区域代表用Ad-DSCR1转导的细胞上的表达水平；灰色区域代表LacZ转导细胞上的表达水平。所示数据来自代表性的总共3次独立实验。(C) HUVEC总细胞提取物分别对于Cox-2和TF的Western印迹分析。为了控制相等的荷载，使用识别2γ-衔接蛋白的抗体。所示数据来自代表性的3次独立实验。

图5。内皮细胞上VEGF对炎症标志物基因的瞬时调控。(A) 所示时间阶段保持在无血清条件下并用VEGF (30ng/mL)刺激、或者只有无血清培养基的HUVEC的实时RT-PCR分析。对表达水平进行了TaqMan分析。所示相对表达水平是通过将存在VEGF时的基因表达RRU除以未刺激水平得到的。(B) 活化的内皮细胞中DSCR1的负反馈调控环的示意图，导致VEGF或激活CnA信号传导的化合物刺激后对钙依赖磷酸酶信号传导的干扰。

图6。siRNA对内源DSCR1的敲低(knock down)增强活化的内皮细胞中的NFAT活性。(A) 用siRNA和PRKN-DSCR1-Flag表达载体共转染的HUVEC的Western印迹分析。使用抗FLAG抗体分析了全细胞提取物。(B) 对siDSCR1转染的HUVEC分析内源DSCR1水平，通过使用多克隆抗血清检测人DSCR1。(C) 来自NFAT荧光素酶报道构建物和靶向DSCR1、NFATc1或对照的siRNA瞬时转染并IO/PMA（6小时）或VEGF（D; 12小时）分别刺激后的HUVEC

的细胞提取物中NFAT活性的荧光素酶报道基因测定法。所示数据来自代表性的一式三份进行的总共3次独立实验。误差条 =SD。*P＜.01，**P＜.001，使用方差分析(ANOVA)，通过比较si对照(siControl)和siDSCR1组进行分析。

图7。内源DSCR1的敲低诱导活化的内皮细胞上炎症标志物的表达。(A)用编码GFP和siDSCR1、siNFATc1或si对照(siControl)siRNA的表达载体瞬时共转染的HUVEC的FACS分析。对细胞分析PMA/IO刺激或对照处理(NA)后4小时GFP+细胞上TF、VCAM-1和E-选择蛋白的细胞表面表达。(B) 用VEGF刺激的HUVEC的FACS分析，分析了TF（4小时）、VCAM-1（20小时）和E-选择蛋白（20小时）的表达。所示数据对应于一组代表性的3次独立实验。

图8。DSCR1的调控影响内皮细胞的存活。暴露于应激条件，包括血清饥饿、H_2O_2暴露和PMA/IO处理的内皮细胞中Ad-DSCR1引起的DSCR1过表达诱导内皮细胞死亡，正如DSCR1反义构建物的表达降低内源DSCR1所为。(A) 包括编码有义或反义DSCR1的腺病毒构建物的DSCR1调控在血清饥饿后24小时降低原代人内皮细胞(HUVEC)的存活。(B) 包括编码有义或反义DSCR1的腺病毒构建物的DSCR1调控在存在胱天蛋白酶抑制剂ZVAD时在血清饥饿后24小时降低原代人内皮细胞(HUVEC)的存活。

图9。人DSCR1氨基酸序列的一个例示性实施方案(SEQ ID NO:1)。

实施本发明的方式

本发明提供了通过调控内皮细胞中的DSCR1来治疗多种病症的方法、组合物、试剂盒和制品。本文提供了这些方法、组合物、试剂盒和制品的详情。

通用技术

除非另有说明，本发明的实施将采用分子生物学（包括重组技术）、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术，这些都在本领域的技术范围内。文献中充分阐述了这些技术，诸如“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, second edition (Sambrook et al., 1989); “Oligonucleotide Synthesis”, (M. J. Gait, ed., 1984); “Animal Cell Culture”, (R. I. Freshney, ed., 1987); “Methods in Enzymology”, (Academic Press, Inc.); “Current Protocols in Molecular Biology”, (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates); “PCR: The Polymerase Chain Reaction”, (Mullis et al., ed., 1994); “A Practical

Guide to Molecular Cloning", (Perbal Bernard V., 1988)。

定义

在用于本文时，术语“脉管/血管”或“脉管/血管系统”及其变化指遍及哺乳动物肉体运输血液（包括淋巴液）的脉管/血管系统。

“血管”指哺乳动物脉管系统的任何脉管，包括动脉、微动脉(arteriole)、毛细管、微静脉(venule)、静脉、窦和血管滋养管。在本发明的一个方面，将DSCR1调控物直接导入为心肌供应血液的脉管管道。此类脉管管道包括冠状动脉以及诸如隐静脉或乳内动脉移植物等脉管。在一个实施方案中，血管包括活化的内皮细胞。

“动脉”指来自心脏的血液流过其中的血管。冠状动脉供应心脏自身的组织（特别是心肌），而其它动脉供应身体剩余器官。动脉的一般结构由多层动脉壁围绕内腔组成。

术语“血管发生”在用于本文时指导致新血管形成的细胞事件，其中血管内皮细胞增殖、修剪(prune)和重新组织(reorganize)，从而自先前存在的血管网络形成新的血管。血管发生是包括以下各项的连续过程：(1)局部事发地的胞外基质在蛋白酶释放后降解；(2)毛细管内皮细胞增殖；及(3)毛细管向血管发生性刺激迁移。参见例如Ferrara et al., Endocrine Rev. (1992), 13:18-32; Ferrara, Nature Reviews (2002), 2:795-803。

在用于本文时，短语“血管完整性”及其变化指血管系统未受损伤的状态，其中未受损伤的状态包括血管系统中充当分子在两个隔室/两侧间自由运动的屏障的正常生理学能力。更具体的说，所述两个隔室/两侧一般涉及血管系统的内腔和腔外空间（一般包括血管系统附近的组织和/或细胞）。

在用于本文时，短语“血管完整性侵扰”及其变化指异常和/或不希望的血管完整性变化，其导致血管系统不能充当两个隔室间运动的屏障。例如，血管系统的炎症是与血管完整性侵扰有关的常见起因。血管完整性侵扰可表现为一种或多种组织和细胞状况的形式，包括但不限于与内皮细胞坏死、内皮细胞凋亡、内皮创伤、损伤、血管渗漏、高血压和血管损伤有关的状况。进一步的例子包括影响血管内皮的创伤，例如对遭受创伤的动物（一般是哺乳动物）或人的血管包括器官的血管网络的创伤（诸如损伤）；此类创伤将包括伤口、切口、和溃疡（例如糖尿病性溃疡）和血管/内皮细胞的伤口或撕

裂。创伤包括由内部事件引起的状况以及由外部因子诸如病原体造成的状况。

在用于本文时，“与血管完整性侵扰有关的病症”、“与异常血管炎症有关的病症”及其变化一般指认为或已知与血管完整性侵扰和/或异常血管炎症有关的病理学疾患。这些病症包括但不限于血管（诸如心血管）病症、内皮细胞病症、血管发生性病症（例如癌症）和免疫学病症（例如炎性病症，包括自身免疫病）。例如，这些病症包括与血管发生失调有关的病理学疾患。可通过本发明的调控物分子和方法治疗的病症包括但不限于不希望的或异常的肥大、关节炎、类风湿性关节炎(RA)、银屑病、银屑病斑块、结节病、动脉粥样硬化、动脉粥样硬化斑块、源自心肌梗死的水肿、糖尿病性和其它增殖性视网膜病包括早产儿视网膜病、晶状体后纤维组织增生、新生血管性青光眼、年龄相关黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿、角膜新血管形成、角膜移植片新血管形成、角膜移植片排斥、视网膜/脉络膜新血管形成、眼角的新血管形成（发红(rubeosis)）、眼新血管疾病、血管再狭窄、动静脉畸形(AVM)、脑脊膜瘤、血管瘤、血管纤维瘤、甲状腺增生（包括格雷夫斯氏(Graves)病）、角膜和其它组织移植、慢性炎症、肺炎、急性肺损伤/ARDS、败血症(脓毒症)、高血压(例如原发性肺动脉高压)、恶性肺积液(malignant pulmonary effusion)、脑水肿（例如与急性中风(stroke)/闭合性头部外伤/创伤有关的）、滑膜炎症、RA中的血管翳形成、骨化性肌炎、肥大性骨形成、骨关节炎(OA)、顽固性腹水、多囊卵巢病、子宫内膜异位症、第三空间流体病(3rd spacing of fluid diseases)（胰腺炎、间隔综合征、烧伤、肠病）、子宫纤维瘤(uterine fibroids)、早产、慢性炎症诸如IBD（克罗恩氏(Crohn)病和溃疡性结肠炎）、肾同种异体移植物排斥、炎性肠病、肾病综合征、不希望的或异常的组织块生长（非癌性的）、肥胖症、脂肪组织块生长、血友病性关节、肥厚性瘢痕、毛发生长的抑制、奥-韦二氏(Osler-Weber)综合征、脓性肉芽肿晶状体后纤维组织增生、硬皮病、沙眼、血管粘连、滑膜炎、皮炎、先兆子痫、腹水、心包积液（诸如与心包炎有关的）、胸腔积液、胃肠溃疡、慢性气道炎症和血管炎。

血管发生失调可导致可通过本发明的组合物和方法来治疗的许多病症。这些病症包括非肿瘤性的和肿瘤性的疾患。肿瘤性病症包括但不限于上文所描述的那些。非肿瘤性病症包括但不限于不希望的或异常的肥大、关节炎、类风湿性关节炎(RA)、银屑病、银屑病斑块、结节病、动脉粥样硬化、动脉

粥样硬化斑块、糖尿病性和其它增殖性视网膜病包括早产儿视网膜病、晶状体后纤维组织增生、新血管性青光眼(neovascular glaucoma)(年龄相关黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿、角膜新血管形成、角膜移植片新血管形成、角膜移植片排斥、视网膜/脉络膜新血管形成、眼角的新血管形成（发红）、眼新血管疾病、血管再狭窄、动静脉畸形(AVM)、脑脊膜瘤、血管瘤、血管纤维瘤、甲状腺增生（包括格雷夫斯氏(Graves)病）、角膜和其它组织移植、慢性炎症、肺炎、急性肺损伤/ARDS、败血症、原发性肺动脉高压、恶性肺积液(malignant pulmonary effusion)、脑水肿(例如与急性中风/闭合性头部外伤/创伤有关的)、滑液炎症、RA中的血管翳形成、骨化性肌炎、肥大性骨形成、骨关节炎(OA)、顽固性腹水、多囊卵巢病、子宫内膜异位症、第三空间流体病(3rd spacing of fluid diseases)（胰腺炎、间隔综合征、烧伤、肠病）、子宫纤维瘤(uterine fibroids)、早产、慢性炎症诸如IBD（克罗恩氏(Crohn)病和溃疡性结肠炎）、肾同种异体移植物排斥、炎性肠病、肾病综合征、不希望的或异常的组织块生长（非癌性的）、血友病性关节、肥厚性瘢痕、毛发生长的抑制、奥-韦二氏(Osler-Weber)综合征、脓性肉芽肿晶状体后纤维组织增生、硬皮病、沙眼、血管粘连、滑膜炎、皮炎、先兆子痫、腹水、心包积液（诸如与心包炎有关的）和胸腔积液

“病症”指将受益于本发明DSCR1调控物和/或方法的治疗的任何状况。这包括慢性和急性病症或疾病，包括使哺乳动物易患所讨论病症的病理状况。本文中待治疗的病症的非限制性例子包括恶性和良性肿瘤；非白血病和淋巴恶性肿瘤；神经元、神经胶质、星形胶质细胞、下丘脑和其它腺体、巨噬细胞、上皮、基质和囊胚腔的病症；及炎性（例如自身免疫性炎症）、血管发生性和免疫学病症。

“自身免疫病”在本文中指源于且针对个体自身组织的非恶性疾病或病症。自身免疫病在本文中明确排除恶性或癌性疾病或疾患，尤其排除B细胞淋巴瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病和慢性成髓细胞白血病。自身免疫性疾病或病症的例子包括但不限于炎性应答，诸如炎性皮肤病，包括银屑病和皮炎（例如特应性皮炎）；系统性硬皮病和硬化；与炎性肠病有关的应答（诸如克罗恩氏(Crohn)病和溃疡性结肠炎）；呼吸窘迫综合征（包括成人呼吸窘迫综合症(ARDS)）；皮炎；脑膜炎；脑炎；葡萄膜炎；结肠炎；肾小球肾炎；过敏状况，诸如湿疹和哮喘

及涉及T细胞浸润和慢性炎性应答的其它状况；动脉粥样硬化；白细胞粘着缺陷；类风湿性关节炎；系统性红斑狼疮(SLE)；糖尿病（例如I型糖尿病或胰岛素依赖性糖尿病）；多发性硬化；雷诺氏(Reynaud)综合征；自身免疫性甲状腺炎；变应性脑脊髓炎；斯耶格伦氏(Sjogren)综合征；幼发型糖尿病；通常在结核病、结节病、多肌炎、肉芽肿病和血管炎中发现的与细胞因子和T-淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏感性有关的免疫应答；恶性贫血（阿狄森氏(Addison)病）；涉及白细胞渗出的疾病；中枢神经系统(CNS)炎性病症；多器官损伤综合征；溶血性贫血（包括但不限于冷球蛋白血症或库姆斯氏(Coombs)阳性贫血）；重症肌无力；抗原-抗体复合物介导的疾病；抗肾小球基膜病；抗磷脂综合症；过敏性神经炎；格雷夫斯氏(Graves)病；朗-伊二氏(Lambert-Eaton)肌无力综合症；大疱性类天疱疮；天疱疮；自身免疫性多种内分泌腺病；莱特氏(Reiter)病；僵人综合症(stiff-man syndrome)；贝切特氏(Behcet)病；巨细胞动脉炎；免疫复合物肾炎；IgA肾病；IgM多神经病；免疫性血小板减少性紫癜(ITP)或自身免疫性血小板减少症等。

“血管发生因子”或“血管发生剂”在用于本文时指刺激血管发育，例如促进血管发生(angiogenesis)、内皮细胞生长、血管稳定性和/或血管生成(vasculogenesis)等的分子。在一个实施方案中，血管发生因子在所要求的发明中指VEGF和VEGF家族的成员（A、B、C、D和E）。在一个实施方案中，血管发生因子在所要求的发明中指PlGF和/或PDGF家族的成员。在一个实施方案中，血管发生因子在所要求的发明中指TIE配体（血管生成素）。在一个实施方案中，血管发生因子在所要求的发明中指肝配蛋白（ephrin）。在一个实施方案中，血管发生因子在所要求的发明中指加速伤口愈合的因子，包括但不限于一种或多种生长激素、胰岛素样生长因子-I (IGF-I)、VIGF、表皮生长因子(EGF)、CTGF及其家族的成员、及TGF-α和TGF-β。参见例如Klagsbrun and D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, Nature Medicine 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., Oncogene, 22:6549-6556 (2003) (例如列举已知血管发生因子的表1); Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003)。

短语“副作用”或其变化在用于本文时指在接受病症治疗的受试者中可测量的和/或可观察的临床的、医学的、生理的、生理学的和/或生物化学的作用，其中所述作用不是预定治疗结果的一部分。一般而言，所述作用在所

治疗受试者的健康和/或舒适状态、所治疗受试者的健康风险、和/或所治疗受试者对治疗的耐受性方面是不希望的。

如上所述，在治疗本文所述炎性疾病（例如自身免疫病或自身免疫相关疾患）时，受试者可用本发明的DSCR1调控物连同第二治疗剂诸如免疫抑制剂（即抗炎剂）诸如多种药物方案来治疗。DSCR1调控物可以与免疫抑制剂同时、序贯或交替施用。免疫抑制剂可以以本领域所列相同或更低的剂量施用。优选的辅助性免疫抑制剂将取决于许多因素，包括所治疗病症的类型以及患者的病史。

“免疫抑制剂”在用于本文时指作用于抑制或掩盖患者的免疫系统和/或炎性应答的物质。此类药剂将包括抑制细胞因子生成、下调或抑制自身抗原表达、或掩盖MHC抗原的物质。此类药剂的例子包括类固醇，诸如糖皮质类固醇，例如泼尼松(prednisone)、甲泼尼龙(methylprednisolone)和地塞米松(dexamethasone)；2-氨基-6-芳基-5-取代的嘧啶(参见美国专利第4,665,077号)；硫唑嘌呤(azathioprine)（或环磷酰胺(cyclophosphamide)，如果对硫唑嘌呤有不良反应的话）；溴隐亭(bromocryptine)；戊二醛（它掩盖MHC抗原，如美国专利第4,120,649号中所记载的）；针对MHC抗原和MHC片段的抗独特型抗体；环孢菌素A；细胞因子或细胞因子受体拮抗剂，包括抗干扰素-γ、-β或-α抗体；抗肿瘤坏死因子-α抗体；抗肿瘤坏死因子-β受体；抗白介素-2抗体和抗IL-2受体抗体；抗L3T4抗体；异源抗淋巴细胞球蛋白；泛(pan) T抗体，优选抗CD3或抗CD4/CD4a抗体；含有LFA-3结合域的可溶性肽(WO 90/08187，公布于90年7月26日)；链激酶；TGF-β；链道酶；来自宿主的RNA或DNA；FK506；RS-61443；脱氧精胍菌素(deoxyspergualin)；雷帕霉素(rapamycin)；T细胞受体(美国专利第5,114,721号)；T细胞受体片段(Offner et al., Science 251:430-432 (1991)；WO 90/11294；WO 91/01133)；及T细胞受体抗体(EP 340,109)，诸如T10B9。

术语“DSCR1”在用于本文时涵盖能够以与野生型DSCR1相似的方式调控钙依赖磷酸酶（及例如炎性标志基因诸如组织因子、E-选择蛋白和Cox-2的表达）的天然序列多肽、多肽变体、及天然序列多肽和多肽变体的片段（本文中有进一步定义）。本文中所描述的DSCR1多肽可以从多种来源分离，诸如人组织类型或其它来源，或者通过重组或合成方法制备。术语“DSCR1”、“DSCR1多肽”、“DSCR1蛋白质”和“DSCR1分子”还包括本文中所公开

的DSCR1多肽的变体。本发明的“DSCR1调控物”指调控“DSCR1多肽”或“DSCR1蛋白质”的正常生物学功能/活性的分子。

“天然序列DSCR1多肽”包括与衍生自自然界的相应DSCR1多肽具有相同氨基酸序列的多肽。在一个实施方案中，天然序列DSCR1多肽包含SEQ ID NO:1（见图9）的蛋白质编码氨基酸序列，其中第一个甲硫氨酸是第1位氨基酸。此类天然序列DSCR1多肽可以从自然界分离，或者可通过重组或合成手段生成。术语“DSCR1多肽”和“DSCR1蛋白质”在用于本文时明确涵盖天然存在的截短或其它翻译后修饰形式的特定DSCR1多肽、该多肽的天然存在变体形式（例如可变剪接形式）和天然存在等位变体。

“DSCR1多肽变体”或其变化意指与本文中所公开的天然序列DSCR1多肽序列具有至少约80%氨基酸序列同一性的DSCR1多肽，一般是本文中所定义的活性DSCR1多肽。此类DSCR1多肽变体包括例如在天然氨基酸序列的N-或C-末端添加或删除一个或多个氨基酸残基的DSCR1多肽。通常，DSCR1多肽变体与本文中所公开的天然序列DSCR1多肽序列将具有至少约80%的氨基酸序列同一性，或者至少约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸序列同一性。通常，DSCR1变体多肽的长度为至少约10个氨基酸，或者长度为至少约20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600个氨基酸，或更多。任选的是，DSCR1变体多肽与天然DSCR1多肽序列相比将具有不超过一处保守氨基酸替代，或者与天然DSCR1多肽序列相比具有不超过2、3、4、5、6、7、8、9或10处保守氨基酸替代。

关于肽或多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为对比序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后，且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分时，候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。为测定百分比氨基酸序列同一性目的的对比可以本领域技术范围内的多种方式进行，例如使用公众可得到的计算机软件，诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)软件。本领域

技术人员可决定用于测量对比的适宜参数，包括对所比较序列全长获得最大对比所需的任何算法。然而，为了本发明的目的，%氨基酸序列同一性值是使用序列比较计算机程序ALIGN-2获得的，如美国专利第6,828,146号中所记载的。

在用于本文时，术语“肽”和“多肽”可互换使用，只是术语“肽”一般指包含少于200个连续氨基酸的多肽。

术语“载体”在用于本文时意指能够运输与其连接的其它核酸的核酸分子。一类载体是“质粒”，指其中可连接另外的DNA区段的环状双链DNA环。另一类载体是噬菌体载体。另一类载体是病毒载体，其中可将另外的DNA区段连接到病毒基因组中。某些载体能够在其所导入的宿主细胞中自主复制（例如具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体）。其它载体（例如非附加型哺乳动物载体）可在导入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中，由此随着宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够指导与其可操作连接的基因表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”（或简称为“重组载体”）。通常，在重组DNA技术中有用的表达载体常常是质粒形式。在本说明书中，“质粒”和“载体”可互换使用，因为质粒是载体的最常用形式。

“多核苷酸”或“核酸”在本文中可互换使用，指任何长度的核苷酸聚合物，包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经过修饰的核苷酸或碱基、和/或其类似物，或者是可通过DNA或RNA聚合酶或者通过合成反应掺入聚合物的任何底物。多核苷酸可包含经过修饰的核苷酸，诸如甲基化核苷酸及其类似物。如果有的话，对核苷酸结构的修饰可以在装配聚合物之前或之后进行。核苷酸序列可以由非核苷酸组分中断。多核苷酸可以在合成后进一步修饰，诸如通过与标记物偶联。其它类型的修饰包括例如“帽”，将一个或多个天然存在的核苷酸用类似物替代，核苷酸间修饰诸如例如具有不带电荷连接（例如膦酸甲酯、磷酸三酯、磷酰胺酯(phosphoamidate)、氨基甲酸酯等）和具有带电荷连接（例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等）的修饰，含有悬垂模块(pendant moiety)，诸如例如蛋白质（例如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚L-赖氨酸等）的修饰、具有嵌入剂（例如吖啶、补骨脂素等）的修饰、含有螯合剂（例如金属、放射性金属、硼、氧化性金属等）的修饰、含有烷化剂的修饰、具有经修饰连接（例如α端基异构核酸(anomeric nucleic acid)等）的修饰、以及未修饰形式的多核苷酸。

另外，通常存在于糖类中的任何羟基可以用例如膦酸(phosphonate)基团、磷酸(phosphate)基团替换，用标准保护基团保护，或活化以制备与另外的核苷酸的另外的连接，或者可偶联至固相或半固相支持物。5'和3'末端OH可磷酸化或者用胺或1-20个碳原子的有机加帽基团模块取代。其它羟基也可衍生成标准保护基团。多核苷酸还可含有本领域普遍知道的核糖或脱氧核糖糖类的类似物形式，包括例如2'-氧-甲基、2'-氧-烯丙基、2'-氟-或2'-叠氮-核糖，碳环糖类似物，α-端基异构糖，差向异构糖诸如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖，无环类似物及脱碱基核苷类似物诸如甲基核糖核苷。可用备选连接基团替换一个或多个磷酸二酯连接。这些备选连接基团包括但不限于如下实施方案，其中磷酸酯用P(O)S（“硫代酸酯”(thioate)）、P(S)S（“二硫代酸酯”(dithioate)）、(O)NR_2（“酰胺酯”(amidate)）、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH_2（“甲缩醛”(formacetal)）替代，其中R或R'各自独立为H或者取代或未取代的烷基（1-20个C），任选含有醚（-O-)连接、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基(araldyl)。并非多核苷酸中的所有连接都必需是相同的。上述描述适用于本文中提及的所有多核苷酸，包括RNA和DNA。

“寡核苷酸”在用于本文时通常指短多核苷酸，通常是单链，通常是合成的，长度通常但不是必需小于约200个核苷酸。术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”并不互相排斥。上文关于多核苷酸的描述同样且完全适用于寡核苷酸。

术语“宿主细胞”（或“重组宿主细胞”）在用于本文时意图指通过导入外源多核苷酸诸如重组质粒或载体，遗传上已经改变或者能够在遗传上改变的细胞。应当理解，此类术语意图不仅指特定的受试细胞，还指此类细胞的后代。因为在后代中可能由于突变或环境影响而存在某些改变，所以此类后代可能事实上与亲本细胞不同，但是在用于本文时仍然包括在术语“宿主细胞”的范围内。

“抗体”(Ab)和“免疫球蛋白”(Ig)是具有相同结构特征的糖蛋白。虽然抗体展现出对特定抗原的结合特异性，但是免疫球蛋白包括抗体及通常缺乏抗原特异性的其它抗体样分子二者。后一类多肽例如由淋巴系统以低水平生成而由骨髓瘤以升高的水平生成。

术语“抗体”和“免疫球蛋白”以最广义互换使用，包括单克隆抗体（例如全长或完整单克隆抗体）、多克隆抗体、单价、多价抗体、多特异性抗体

（例如双特异性抗体，只要它们展现出期望的生物学活性），而且还可以包括某些抗体片段（如本文中更为详细描述的）。抗体可以是嵌合的、人的、人源化的和/或亲和力成熟的。

“抗体片段”只包含完整抗体的一部分，其中所述部分优选保留该部分存在于完整抗体中时通常与之有关的至少一项、优选大多数或所有功能。在一个实施方案中，抗体片段包含完整抗体的抗原结合位点，如此保留结合抗原的能力。在另一个实施方案中，抗体片段，例如包含Fc区的抗体片段，保留通常与Fc区存在于完整抗体中时通常与之有关的至少一项生物学功能，诸如FcRn结合、抗体半衰期调控、ADCC功能和补体结合。在一个实施方案中，抗体片段是体内半衰期与完整抗体基本上相似的单价抗体。例如，此类抗体片段可包含一个抗原结合臂且其与能够赋予该片段以体内稳定性的Fc序列相连。

抗体的“可变区”或“可变域”指抗体重链或轻链的氨基末端结构域。这些结构域通常是抗体的最易变部分且包含抗原结合位点。

术语“高变区”、“HVR”或“HV”在用于本 文时指抗体可变域中序列上高度可变和/或形成结构上定义的环的区域。通常，抗体包含六个高变区：三个在VH中（H1、H2、H3），三个在VL中（L1、L2、L3）。本文中使用且涵盖许多高变区的叙述。Kabat互补决定区(CDR)是以序列变异性为基础的，而且是最常用的(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothia改为指结构环的位置(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987))。AbM高变区代表Kabat CDR和Chothia结构环之间的折衷，而且得到Oxford Molecular的AbM抗体建模软件的使用。“接触”高变区是以对可获得的复合物晶体结构的分析为基础的。下文记录了这些高变区中每一个的残基。

环	Kabat	AbM	Chothia	接触
---	---	---	---	---
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B

	(Kabat编号)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(Chothia编号)			
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

“框架”或“FR”残基指可变区中除本文中所定义的高变区残基外的那些可变域残基。

术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体，即构成群体的各个抗体相同，除了可能以极小量存在的可能的天然存在突变外。单克隆抗体是高度特异性的，针对单一抗原。此外，与典型的包含针对不同决定簇（表位）的不同抗体的多克隆抗体制备物不同，每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。

单克隆抗体在本文中明确包括“嵌合”抗体，其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，以及此类抗体的片段，只要它们展现出期望生物学活性(美国专利第4,816,567号; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984))。

非人（例如鼠）抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在极大程度上，人源化抗体指人免疫球蛋白（受体抗体）中的高变区残基用具有期望特异性、亲和力和能力的非人物种（供体抗体）诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中，将人免疫球蛋白的框架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外，人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有找到的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。一般而言，人源化抗体将包含至少一个、通常两个基本上整个如下可变区，其中整个或基本上整个高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环，且整个或基本上整个FR是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体任选还将包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc)，通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992)。还可参见以下综述及其引用的参考文献: Vaswani and

Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)。

“人抗体”指拥有与由人生成的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列和/或使用本文所公开的用于生成人抗体的任何技术生成的抗体。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

“亲和力成熟的”抗体指在其一个或多个CDR/HVR中具有导致抗体对抗原的亲和力与没有这些改变的亲本抗体相比有所改进的一处或多处改变的抗体。优选的亲和力成熟的抗体将具有纳摩尔或甚至皮摩尔水平的对靶抗原的亲和力。亲和力成熟的抗体可通过本领域已知流程生成。Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992)记载了通过VH和VL结构域改组的亲和力成熟。下列文献记载了CDR/HVR和/或框架残基的随机诱变: Barbas *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91: 3809-3813 (1994); Schier *et al.*, *Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton *et al.*, *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7): 3310-9 (1995); Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992)。

术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C-末端区，它可以通过用木瓜蛋白酶消化完整抗体来产生。Fc区可以是天然序列Fc区或变异Fc区。尽管免疫球蛋白重链Fc区的边界可有所变化，然而人IgG重链Fc区通常定义为从Cys226位置附近或Pro230位置附近的氨基酸残基至Fc区的羧基末端的区段。免疫球蛋白的Fc区通常包含两个恒定域，CH2结构域和CH3结构域，任选包含CH4结构域。“Fc区链”在本文中指Fc区的两条多肽链之一。

短语“基本上相似”或“基本上相当”在用于本文时表示两个数值之间足够高的相似程度，以致本领域技术人员将认为在用所述数值所测量的生物学特性背景内两个数值之间的差异具有很小的或没有生物学显著性。所述两个数值之间的差异优选小于约50%，优选小于约40%，优选小于约30%，优选小于约20%，优选小于约10%。

术语“细胞毒剂”在用于本文时指抑制或阻止细胞的功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语意图包括放射性同位素（例如At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}和Lu的放射性同位素）、化疗剂、和毒素诸如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素，包括其片段和/或变体。

“化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂类(alkylating agents)，诸如塞替派(thiotepa)和CYTOXAN®环磷酰胺(cyclophosphamide)；磺酸烷基酯类(alkyl sulfonates)，诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶类(aziridines)，诸如苯佐替派(benzodepa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedepa)和乌瑞替派(uredepa)；乙撑亚胺类(ethylenimines)和甲基蜜胺类(methylamelamines)，包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺(triethylenephosphoramide)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramide)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine)；番荔枝内酯类(acetogenins)(尤其是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone))；δ-9-四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol)(屈大麻酚(dronabinol)，MARINOL®)；β-拉帕醌(lapachone)；拉帕醇(lapachol)；秋水仙素类(colchicines)；白桦脂酸(betulinic acid)；喜树碱(camptothecin)(包括合成类似物托泊替康(topotecan)(HYCAMTIN®)、CPT-11(伊立替康(irinotecan)，CAMPTOSAR®)、乙酰喜树碱、东莨菪亭(scopoletin)和9-氨基喜树碱)；苔藓抑素(bryostatin)；callystatin；CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物)；鬼臼毒素(podophyllotoxin)；鬼臼酸(podophyllinic acid)；替尼泊苷(teniposide)；隐藻素类(cryptophycins)(特别是隐藻素1和隐藻素8)；多拉司他汀(dolastatin)；duocarmycin(包括合成类似物，KW-2189和CB1-TM1)；艾榴塞洛素(eleutherobin)；pancratistatin；sarcodictyin；海绵抑素(spongistatin)；氮芥类(nitrogen mustards)，诸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)；亚硝脲类(nitrosoureas)，诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine)；抗生素类，诸如烯二炔类抗生素(enediyne)(例如加利车霉素(calicheamicin)，尤其是加利车霉素γ1I和加利车霉素ωI1(参见例如Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994))；蒽环类抗生素(dynemicin)，包括dynemicin A；埃斯波霉

素(esperamicin)；以及新制癌素(neocarzinostatin)发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素(actinomycin)、氨茴霉素(anthramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素C (cactinomycin)、carabicin、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycin)、放线菌素D (dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星(doxorubicin)(包括ADRIAMYCIN®、吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星、盐酸多柔比星脂质体注射剂(DOXIL®)和脱氧多柔比星)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素类(mitomycins)诸如丝裂霉素C、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、potfiromycin、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)；抗代谢物类，诸如甲氨喋呤(methotrexate)、吉西他滨(gemcitabine)(GEMZAR®)、替加氟(tegafur) (UFTORAL®)、卡培他滨(capecitabine) (XELODA®)、埃坡霉素(epothilone)和5-氟尿嘧啶(5-FU)；叶酸类似物，诸如二甲叶酸(denopterin)、甲氨喋呤(methotrexate)、蝶酰三谷氨酸(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤类似物，诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤(mercaptopurine)、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine)；嘧啶类似物，诸如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)；雄激素类，诸如卡鲁睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、表硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone)；抗肾上腺类，诸如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；叶酸补充剂，诸如亚叶酸(folinic acid)；醋葡醛内酯(aceglatone)；醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid)；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吖啶(amsacrine)；bestrabucil；比生群(bisantrene)；依达曲沙(edatraxate)；地磷酰胺(defosfamide)；地美可辛(demecolcine)；地吖醌(diaziquone)；elfornithine；依利醋铵(elliptinium

acetate); 依托格鲁(etoglucid); 硝酸镓; 羟脲(hydroxyurea); 香菇多糖(lentinan); 氯尼达明(lonidamine); 美登木素生物碱类(maytansinoids), 诸如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocin); 米托胍腙(mitoguazone); 米托蒽醌(mitoxantrone); 莫哌达醇(mopidamol); 二胺硝吖啶(nitracrine); 喷司他丁(pentostatin); 蛋氨氮芥(phenamet); 吡柔比星(pirarubicin); 洛索蒽醌(losoxantrone); 2-乙基酰肼(ethylhydrazide); 丙卡巴肼(procarbazine); PSK®多糖复合物(JHS Natural Products, Eugene, OR); 雷佐生(razoxane); 根霉素(rhizoxin); 西佐喃(sizofiran); 螺旋锗(spirogermanium); 细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid); 三亚胺醌(triaziquone); 2,2',2"-三氯三乙胺; 单端孢菌素类(trichothecenes)(尤其是T-2毒素、疣孢菌素(verrucarin) A、杆孢菌素(roridin) A和蛇行菌素(anguidin)); 乌拉坦(urethan); 长春地辛(vindesine) (ELDISINE®, FILDESIN®); 达卡巴嗪(dacarbazine); 甘露莫司汀(mannomustine); 二溴甘露醇(mitobronitol); 二溴卫矛醇(mitolactol); 哌泊溴烷(pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷(arabinoside) ("Ara-C"); 塞替派(thiotepa); 类紫杉醇类(taxoids), 例如紫杉醇(paclitaxel) (TAXOL®)、清蛋白改造的纳米颗粒剂型紫杉醇(ABRAXANE™)和多西他塞(doxetaxel) (TAXOTERE®)); 苯丁酸氮芥(chlorambucil); 6-硫鸟嘌呤(thioguanine); 巯基嘌呤(mercaptopurine); 甲氨喋呤(methotrexate); 铂类似物, 诸如顺铂(cisplatin)和卡铂(carboplatin); 长春碱(vinblastine) (VELBAN®); 铂(platinum); 依托泊苷(etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺(ifosfamide); 米托蒽醌(mitoxantrone); 长春新碱(vincristine) (ONCOVIN®); 奥沙利铂(oxaliplatin); 亚叶酸(leucovorin); 长春瑞滨(vinorelbine) (NAVELBINE®); 能灭瘤(novantrone); 依达曲沙(edatrexate); 道诺霉素(daunomycin); 氨基蝶呤(aminopterin); 伊本膦酸盐(ibandronate); 拓扑异构酶抑制剂RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸(DMFO); 类视黄酸类(retinoids), 诸如视黄酸(retinoic acid); 任何上述物质的药剂学可接受盐、酸或衍生物; 以及两种或多种上述物质的组合, 诸如CHOP(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙联合疗法的缩写)和FOLFOX(奥沙利铂(ELOXATIN™)联合5-FU和亚叶酸的治疗方案的缩写)。

该定义还包括作用为调节、降低、阻断、或抑制可促进癌生长的激素效果的抗激素剂, 且常常是系统或全身治疗的形式。它们自身可以是激素。实例包括抗雌激素类和选择性雌激素受体调节剂类(SERM), 包括例如他莫昔

芬(tamoxifen)（包括NOLVADEX®他莫昔芬）、雷洛昔芬(raloxifene)(EVISTA®)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、那洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮(onapristone)和托瑞米芬(toremifene)(FARESTON®)；抗孕酮类；雌激素受体下调剂类(ERD)；雌激素受体拮抗剂，诸如氟维司群(fulvestrant) (FASLODEX®)；功能为抑制或关闭卵巢的药剂，例如促黄体生成激素释放激素(LHRH)激动剂，诸如醋酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)（LUPRON®和ELIGARD®）、醋酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、醋酸布舍瑞林（buserelin acetate）和曲普瑞林(triptorelin)；其它抗雄激素类，诸如氟他米特(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)和比卡米特(bicalutamide)；及抑制在肾上腺中调节雌激素生成的芳香酶的芳香酶抑制剂，诸如例如4(5)-咪唑、氨鲁米特(aminoglutethimide)、醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)(MEGASE®)、依西美坦(exemestane) (AROMASIN®)、福美坦(formestane)、法倔唑(fadrozole)、伏氯唑(vorozole) (RIVISOR®)、来曲唑(letrozole)(FEMARA®)和阿那曲唑(anastrozole) (ARIMIDEX®)。另外，化疗剂的这种定义包括二膦酸盐类(bisphosphonates)，诸如氯膦酸盐(clodronate)（例如BONEFOS®或OSTAC®)、依替膦酸钠(etidronate) (DIDROCAL®)、NE-58095、唑来膦酸/唑来膦酸盐(zoledronic acid/zoledronate) (ZOMETA®)、阿伦膦酸盐(alendronate) (FOSAMAX®)、帕米膦酸盐(pamidronate) (AREDIA®)、替鲁膦酸盐(tiludronate) (SKELID®)或利塞膦酸盐(risedronate) (ACTONEL®)；以及曲沙他滨(troxacitabine)（1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物）；反义寡核苷酸，特别是那些抑制涉及粘着细胞增殖的信号途经中的基因表达的反义寡核苷酸，诸如例如PKC-α、Raf、H-Ras和表皮生长因子受体(EGF-R)；疫苗，诸如THERATOPE®疫苗和基因疗法疫苗，例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗和VAXID®疫苗；拓扑异构酶1抑制剂（例如LURTOTECAN®）；rmRH (例如ABARELIX®)；lapatinib ditosylate（ErbB-2和EGFR双重酪氨酸激酶小分子抑制剂，也称为GW572016）；COX-2抑制剂，诸如celecoxib（CELEBREX®；4-(5-(4-甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-1-基)苯磺酰胺；及任何上述物质的药剂学可接受盐、酸或衍生物。

“阻断性”抗体或“拮抗性”抗体指抑制或降低其所结合的抗原的生物学活性的抗体。此类阻断可以任何手段发生，例如通过干扰蛋白质-蛋白质相互作用，诸如配体与受体的结合。在一个实施方案中，阻断性抗体或拮抗

性抗体实质或完全抑制抗原的生物学活性。

术语“癌症”和“癌性”指向或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长/增殖不受调控的生理疾患。癌症的例子包括但不限于癌、淋巴瘤（例如何杰金氏(Hodgkin)淋巴瘤和非何杰金氏淋巴瘤）、母细胞瘤、肉瘤和白血病。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、肺的鳞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、肝瘤(hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)及各种类型的头和颈癌。

在用于本文时，“治疗”指试图改变所治疗个体或细胞的自然进程的临床干预，可以是为了预防或在临床病理学的进程中进行。治疗的期望效果包括预防疾病的发生或复发、缓解症状、削弱疾病的任何直接或间接病理学后果、预防转移、减缓疾病进展的速率、改善或减轻疾病状态、及免除或改善预后。在有些实施方案中，本发明的调控物分子和方法用于延迟疾病或病症的发展。

“有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的治疗或预防效果的量。治疗剂的“治疗有效量”可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重及该抗体在个体中引发期望应答的能力等因素而变化。治疗有效量还指该治疗剂的治疗有益效果胜过任何有毒或有害后果的量。“预防有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的预防效果的量。通常而非必然，由于预防剂量是在疾病发作之前或在疾病的早期用于受试者的，因此预防有效量将低于治疗有效量。

本发明的组合物和方法

A. DSCR1调控物抗体

在一个实施方案中，本发明提供了可在本文中用作治疗剂和/或诊断剂的DSCR1调控物抗体。例示性的抗体包括多克隆的、单克隆的、人源化的、双特异性的、和异源偶联的抗体。抗体的生成、鉴定、表征、修饰和生产方面是本领域已经建立的技术，例如记载于美国专利申请公布号2005/0042216，第522-563段、第604-608段和第617-688段。

本文中所公开的DSCR1调控物抗体可配制成任何合适形式供投递至靶

细胞/组织。例如，抗体可以配制成免疫脂质体。“脂质体”是由各种类型的脂质、磷脂和/或表面活性剂构成的、可用于将药物投递至哺乳动物的小囊泡。脂质体的成分通常排列成双层形式，与生物膜的脂质排列相似。含有抗体的脂质体可通过本领域已知方法来制备，诸如Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); 美国专利第4,485,045号和第4,544,545号; WO97/38731, 公布于1997年10月23日中所记载的。循环时间延长的脂质体披露于美国专利第5,013,556号。

特别有用的脂质体可以用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂类组合物通过反相蒸发法来生成。将脂质体挤过具有限定孔径的滤器，产生具有期望直径的脂质体。可将本发明抗体的Fab'片段经二硫化物交换反应与脂质体偶联，如Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982)中所记载的。任选在脂质体中包含化疗剂。参见Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989)。

B. DSCR1调控物多肽

一方面，本发明的DSCR1调控物包括多肽。在一个实施方案中，调控物多肽拮抗内皮细胞中的NFAT活性。在一个实施方案中，调控物多肽拮抗内皮细胞中的CnA活性。在一个实施方案中，多肽结合，优选特异性结合DSCR1或与DSCR1或CnA相互作用的胞内分子。多肽可以使用已知的肽合成方法学化学合成，或者可以使用重组技术制备和纯化。在一个实施方案中，DSCR1调控物多肽的长度是至少约5个氨基酸，或者长度为至少约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100个氨基酸或更长，其中此类多肽能够调控DSCR1活性。这些多肽无需过多试验就可使用公知技术来鉴定。在这点上，注意到用于对寡肽文库筛选能够特异性结合多肽靶物的寡肽的技术是本领域公知的(参见例如美国专利号5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; PCT公布号WO 84/03506和WO 84/03564; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 3998-4002 (1984); Geysen et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 178-182 (1985); Geysen et al., in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth. 102: 259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol. 140: 611-616 (1988); Cwirla, S. E. et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6378; Lowman, H.B. et al., (1991) Biochemistry 30: 10832; Clackson, T. et al., (1991) Nature 352: 624; Marks, J. D. et al., (1991), J. Mol. Biol. 222: 581; Kang, A.S. et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8363; Smith, G. P., (1991) Current Opin. Biotechnol. 2: 668)。

在这点上，噬菌体展示是一种可以筛选大型寡肽文库来鉴定那些文库中能够特异性结合多肽靶物的成员的公知技术。噬菌体展示是将变体多肽作为与外壳蛋白的融合蛋白展示在噬菌体颗粒表面的一种技术(Scott, J.K. and Smith, G. P. (1990) Science 249: 386)。噬菌体展示的效用在于，可以对选择性随机化蛋白质变体（或随机克隆cDNA）的大型文库迅速且有效的分选那些以高亲和力结合靶分子的序列。在噬菌体上展示肽(Cwirla, S. E. et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6378)或蛋白质(Lowman, H.B. et al., (1991) Biochemistry 30: 10832; Clackson, T. et al., (1991) Nature 352: 624; Marks, J. D. et al., (1991) J. MoI. Biol. 222: 581; Kang, A.S. et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8363)文库已经用于对数百万多肽或寡肽筛选具有特异结合特性的那些(Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol. 2: 668)。分选随机突变体的噬菌体文库需要构建和扩增大量变体的策略，使用靶受体进行亲和纯化的流程，及评估结合富集的结果的手段。参见美国专利5,223,409, 5,403,484, 5,571,689和5,663,143。

尽管大多数噬菌体展示方法已经使用丝状噬菌体，λ类(lambdoid)噬菌体展示系统(WO 95/34683; US 5,627,024)、T4噬菌体展示系统(Ren et al., Gene, 215: 439 (1998); Zhu et al., Cancer Research, 58(15): 3209-3214 (1998); Jiang et al., Infection & Immunity, 65(11): 4770-4777 (1997); Ren et al., Gene, 195(2):303-311 (1997); Ren, Protein Sci., 5: 1833 (1996); Efimov et al., Virus Genes, 10: 173 (1995))和T7噬菌体展示系统(Smith and Scott, Methods in Enzymology, 217: 228-257 (1993); U.S. 5,766,905)也是已知的。

现在已经对基础噬菌体展示概念开发了很多其它改进和变异。这些改进增强了展示系统对肽文库筛选与选定靶分子的结合及展示功能性蛋白质的能力，所述功能性蛋白质具有对这些蛋白质筛选期望特性的潜力。

已经开发了用于噬菌体展示反应的组合反应装置(WO 98/14277)，而且噬菌体展示文库已经用于分析和控制生物分子相互作用(WO 98/20169; WO 98/20159)和受约束螺旋肽的特性(WO 98/20036)。WO 97/35196描述了分离亲和配体的方法，其中使噬菌体展示文库接触第一种溶液和第二种溶液以选择性分离结合的配体，在第一种溶液中配体将结合靶分子，而在第二种溶液中亲和配体将不会结合靶分子。WO 97/46251描述了这样一种方法，即用亲和纯化的抗体生物淘选随机噬菌体展示库，然后分离结合的噬菌体，随后使用微量板的孔进行淘选过程以分离高亲和力结合的噬菌体。已经报道了金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)蛋白A作为亲和标签的使用(Li et al., (1998) Mol. Biotech. 9: 187)。WO 97/47314描述了底物扣除文库用于区别酶特异性的用途，其中使用可以是噬菌体展示库的组合文库。WO 97/09446描述了使用噬菌体展示选择适用于洗涤剂的酶的方法。美国专利5,498,538, 5,432,018和WO 98/15833中描述了选择特异性结合的蛋白质的其它方法。

产生肽文库和筛选这些文库的方法还公开于美国专利5,723,286, 5,432,018, 5,580,717, 5,427,908, 5,498,530, 5,770,434, 5,734,018, 5,698,426, 5,763,192, 和5,723,323。

用于生成、鉴定、表征、修饰和生产调控物多肽的方法是本领域已经建立的，例如记载于美国专利申请公布号2005/0042216第606-608段和第614-688段。

在一个实施方案中，用于拮抗DSCR1依赖性CnA活性的多肽可在DSCR1结构域结构的基础上设计，例如如Rothermel et al., Trends Cardiovascular Med. (2003), 13(1):15-21; Vega et al., J. Biol. Chem. (2002), 277(33):30401-30407中所记载的。例如，所述多肽可包含人DSCR1的大约第96位到大约第125位或者大约第108位到大约第122位氨基酸。在另一个实施方案中，所述多肽包含人DSCR1的丝氨酸-脯氨酸(SP)序列的至少一部分及N和/或C-末端钙依赖磷酸酶结合结构域的至少一部分，其中所述多肽能够结合CnA以抑制CnA调控的基因表达。

C. DSCR1调控物小分子

在一个实施方案中，DSCR1调控物小分子指本文所定义的寡肽或抗体以外，调控DSCR1活性的有机分子。DSCR1调控物小分子可以使用已知方法学来鉴定和化学合成(参见例如PCT公开号WO 00/00823和WO 00/39585)。

DSCR1调控物有机小分子的大小通常小于约2000道尔顿，或者其大小小于约1500、750、500、250或200道尔顿，其中此类有机小分子无需过多实验就可使用公知技术来鉴定。在这点上，注意到用于对有机分子文库筛选能够结合多肽靶物的分子的技术是本领域公知的(参见例如PCT公开号WO 00/00823和WO 00/39585)。DSCR1调控物有机小分子可以是例如醛、酮、肟、腙、缩氨基脲(semicarbazone)、卡巴肼(carbazide)、伯胺、仲胺、叔胺、N-取代的肼、酰肼、醇、醚、硫醇、硫醚、二硫化物、羧酸、酯、酰胺、脲、氨基甲酸酯(carbamate)、碳酸酯(carbonate)、缩酮、硫缩酮(thioketal)、缩醛、硫缩醛、芳基卤、芳基磺酸酯(aryl sulfonate)、烃基卤、烃基磺酸酯(alkyl sulfonate)、芳香族化合物、杂环化合物、苯胺、烯烃、炔烃、二醇、氨基醇、噁唑烷、噁唑啉、噻唑烷、噻唑啉、烯胺、磺酰胺(sulfonamide)、环氧化物、吖丙啶(aziridine)、异氰酸酯(isocyanate)、磺酰氯、重氮化合物、酰基氯(acid chloride)等。

D. 包含核酸的DSCR1调控物

一方面，本发明的DSCR1调控物包括核酸分子。例如，核酸分子可包括有义/反义寡核苷酸、抑制性/干扰性RNA（例如抑制性/干扰性小RNA(siRNA)）或适体。用于筛选、鉴定和生成这些核酸调控物的方法是本领域已知的。

例如，siRNA已经证明能够调控其中传统的拮抗剂诸如小分子或抗体已经失败的基因表达(Shi Y., Trends in Genetics 19(1):9-12 (2003))。长度小于30个核苷酸（例如大约15-25、17-20、18-20、19-20或21-23个核苷酸）的体外合成的双链RNA可充当干扰性RNA (iRNA)且可特异性抑制基因表达(参见例如Fire A., Trends in Genetics (1999), 391; 806-810; 美国专利申请09/821832, 09/215257; 美国专利6,506,559; PCT/US01/10188; 欧洲申请流水号00126325)。认为这些iRNA至少部分通过介导其靶RNA的降解起作用。然而，由于它们的长度低于30个核苷酸，因此它们不会触发细胞抗病毒防御机制。此类机制包括干扰素生成及宿主细胞蛋白质合成的全面停止。实践中，siRNA可人工合成，然后克隆到DNA载体中。此类载体可转染，并使之以高水平表达siRNA。高水平的siRNA表达用于“敲低”(knockdown)或显著降低细胞中产生的蛋白质的量，如此认为它可用于蛋白质的过表达与病理学病症有关的细胞背景。

适体是能够结合靶分子诸如DSCR1蛋白质的核酸分子。适体的生成和治疗用途是本领域已经建立的。参见例如美国专利第5,475,096号，及Macugen®(Eyetech, New York)用于治疗年龄相关黄斑变性的治疗功效。

反义技术是本领域已经建立的。关于这种技术的进一步详情见下文。

E. 药用配制剂

可如下制备依照本发明使用的DSCR1调控物的治疗用配制剂，即以冻干剂型或水溶液的形式，将具有期望纯度的DSCR1调控物与任选的药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol,A. Ed., 1980)。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的，包括缓冲剂，诸如醋酸盐、Tris、磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂（诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵；氯化己烷双胺；苯扎氯铵、苯索氯铵；酚、丁醇或苯甲醇；对羟基苯甲酸烷基酯，诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间甲酚）；低分子量（少于约10个残基）多肽；蛋白质，诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，诸如EDTA；张力调节剂(tonicifier)，诸如海藻糖和氯化钠；糖类，诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；表面活性剂，诸如聚山梨醇酯；成盐反荷离子，诸如钠；金属复合物（例如Zn-蛋白质复合物）；和/或非离子表面活性剂，诸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

本文中的配制剂还可含有超过一种所治疗具体适应症所必需的活性化合物，优选活性互补且彼此没有不利影响的。例如，在DSCR1调控物之外，可能还期望在一种配制剂中含有另外的调控物，例如结合DSCR1蛋白质上不同表位的第二种抗体，或针对一些其它靶物的抗体。或者/另外，所述组合物还可包含化疗剂、细胞毒剂、细胞因子、生长抑制剂、抗激素剂和/或心脏保护剂。合适的是，此类分子以对于预定目的有效的量组合存在。

活性成分还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中（例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊）、在胶状药物投递系统中（例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊）、或在粗滴乳状液中。此类技术披露于例如Remington's

Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol,A. Ed., 1980。

可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质，该基质是定型产品的形式，例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶（例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇)）、聚交酯(美国专利3,773,919)、L-谷氨酸和L-谷氨酸γ-乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如LUPRON DEPOT™（由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体）及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这可容易的通过使用无菌滤膜过滤来实现。

F. 使用本发明DSCR1调控物的治疗

本发明的DSCR1调控物具有多种非治疗应用。所述调控物可用于表达DSCR1的疾病的分期或检测（例如在放射成像中）。抗体、寡肽和有机小分子也可用于自细胞纯化或免疫沉淀DSCR1，供体外DSCR1检测和定量，例如在ELISA或Western印迹中，以调控细胞群中的细胞事件。

现在，根据癌症的分级，癌症的治疗涉及下列疗法中的一种或它们的组合：手术去除癌性组织，放疗和化疗。包含DSCR1调控物的疗法对于不能很好承受化疗的毒性和副作用的老年患者和放疗具有有限效用的转移性疾病可能是尤其想要的。对于治疗性应用，可单独使用DSCR1调控物，或者用于与例如激素、抗血管发生剂(antiangiogen)或放射标记的化合物，或者与手术、冷冻疗法和/或放疗的联合疗法。DSCR1调控物可与其它形式的常规疗法联合施用，与常规疗法连续、在之前或之后施用。化疗药物诸如TAXOTERE®多西他塞(doxetaxel)、TAXOL®紫杉醇(paclitaxel)、雌莫司汀(estramustine)和米托蒽醌(mitoxantrone)用于治疗癌症，特别是无风险(good risk)的患者。通常将DSCR1调控物与治疗有效剂量的化疗剂一起施用。在另一个实施方案中，联合化疗施用DSCR1调控物以降低源自化疗剂例如紫杉醇的副作用。Physicians' Desk Reference (PDR)公开了已经在多种癌症的治疗中使用的这些药剂的剂量。这些前述化疗药物在治疗上有效的剂量给药方案和剂量将取决于所治疗的具体癌症、疾病的程度、及有本领域技术的内科医师所熟悉的其它因素、且可以由内科医师确定。

将DSCR1调控物依照已知方法施用给人类患者，诸如静脉内施用，例如

作为推注(bolus)或一段时间的连续输注，通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入路径。在本发明的一个实施方案中，优选静脉内或皮下施用抗体、寡肽或有机小分子。

DSCR1调控物的施用可联合其它治疗方案。联合施用包括使用分开的配制剂或单一的药用配制剂的共施用，及任意顺序的连续施用，其中优选有一段时间所有两种（或多种）活性剂同时发挥其生物学活性。优选的是，此类联合疗法导致协同治疗效果和/或降低不希望的副作用。

可能还期望将DSCR1调控物的施用与针对与特定病理学疾患有关的另一种抗原的治疗剂的施用联合。

在另一个实施方案中，本发明的治疗性处理方法涉及DSCR1调控物与一种或多种化疗剂或生长抑制剂的联合施用，包括不同化疗剂的混合物(cocktail)的共施用。化疗剂包括磷酸雌莫司汀(estramustine phosphate)、泼尼莫司汀(prednimustine)、顺铂、5-氟尿嘧啶、美法仑(melphalan)、环磷酰胺、羟基脲和羟基脲紫杉烷(hydroxyureataxane)（诸如紫杉醇和多西他塞(doxetaxel)）和/或蒽环类(anthracycline)抗生素。此类化疗剂的制备和剂量给药方案可依照制造商的说明书使用或由熟练从业人员根据经验确定。此类化疗的制备和剂量给药方案还可参阅Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)。

DSCR1调控物可与抗激素化合物以此类分子的已知剂量联合，例如抗雌激素化合物，诸如他莫昔芬(tamoxifen)；抗孕酮化合物，诸如奥那司酮(onapristone)(见EP 616, 812)；或抗雄激素化合物，诸如氟他米特(flutamide)。当待治疗癌症是雄激素非依赖性癌症时，患者可能先前已经接受过抗雄激素疗法，并在癌症变成雄激素非依赖性时，可以给患者施用DSCR1调控物。

有时，还给患者共施用心脏保护剂（以预防或降低与疗法有关的心肌功能障碍）或一种或多种细胞因子可能也是有益的。除了上述治疗方案，在DSCR1调控物疗法之前、同时、或之后，可给患者进行手术去除癌细胞和/或放疗。任何上述共施用药剂的合适剂量就是那些目前所使用的剂量，而且可由于该药剂与DSCR1调控物的联合作用（协同作用）而降低。

为了预防或治疗疾病，施用的剂量和模式可以由内科医师依照已知标准来选择。DSCR1调控物的适宜剂量将取决于如上定义的待治疗疾病的类型、疾病的严重程度和进程、施用DSCR1调控物是为了预防还是治疗目的、先前

的疗法、患者的临床史及对DSCR1调控物的响应、及主治医师的判断。恰当的将DSCR1调控物一次性或在一系列治疗中施用给患者。在一个实施方案中，将DSCR1调控物通过静脉内输注或通过皮下注射来施用。根据疾病的类型和严重程度，约1μg/kg至约50mg/kg体重（例如约0.1-15mg/kg/剂）的抗体可作为初始候选剂量施用给患者，无论是例如通过一次或多次分开的施用，或是通过连续输注。剂量给药方案可包括施用约4mg/kg的初始加载剂量，后续约2mg/kg DSCR1调控物抗体的每周维持剂量。然而，其它剂量方案也可使用。根据上述因素，典型的每日剂量可在约1μg/kg到100mg/kg或更大的范围内。对于持续几天或更长时间的重复施用，根据状况，维持治疗直到发生对疾病症状的期望遏制。这种疗法的进展可容易地通过常规方法和测定法，并基于内科医师或其它本领域技术人员知道的标准来监测。

在将多肽调控物（例如多肽、抗体等）施用给患者之外，本发明设想通过基因疗法来施用调控物。包含/编码DSCR1调控物的核酸的此类施用涵盖在表述“施用治疗有效量的DSCR1调控物”中。关于使用基因疗法来产生胞内抗体的用途参见例如1996年3月14日公开的WO 96/07321。

有两种主要方法使核酸（任选包含在载体中）进入患者的细胞，即体内和回体(*ex vivo*)。对于体内投递，通常在需要DSCR1调控物的部位将核酸直接注射到患者体内。对于回体治疗，采集患者的细胞，将核酸导入这些分离的细胞，并将经过修饰的细胞或是直接施用于患者，或是例如装入多孔膜内并植入患者体内（参见例如美国专利4,892,538和5,283,187）。有多种技术可用于将核酸导入活细胞。这些技术根据是将核酸转移至预期宿主的体外培养细胞还是体内细胞而有所变化。适于在体外将核酸转移到哺乳动物细胞中的技术包括使用脂质体、电穿孔、显微注射、细胞融合、DEAE-右旋糖苷、磷酸钙沉淀法等。常用于回体投递基因的载体是逆转录病毒。

在一个实施方案中，体内核酸转移技术包括用病毒载体（诸如腺病毒、I型单纯疱疹病毒或腺伴随病毒）和基于脂质的系统（可用于脂质介导的基因转移的脂质有例如DOTMA、DOPE和DC-Chol）进行的转染。关于目前已知的基因标记和基因治疗方案的综述参见Anderson et al., Science 256: 808-813 (1992)。还可参见WO 93/25673及其引用的参考文献。

本发明的DSCR1调控物抗体可以是本文中“抗体”定义所涵盖的不同形式。因此，抗体包括全长或完整抗体，抗体片段，天然序列抗体或氨基酸变

体，人源化的、嵌合的或融合抗体，及其功能性片段。

本发明提供了包含DSCR1调控物及载体的组合物。在又一个实施方案中，组合物可包含DSCR1调控物并联合其它治疗剂诸如细胞毒剂或生长抑制剂，包括化疗剂。本发明还提供了包含DSCR1调控物及载体的配制剂。在一个实施方案中，所述配制剂是包含药剂学可接受载体的治疗用配制剂。

G. 制品和试剂盒

本发明的另一个方面是包含可用于治疗病症的物质的制品，其中使用DSCR1调控物。制品包括容器和所述容器上或与其相关联的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶子、小管、注射器等。容器可用各种材料制成，诸如玻璃或塑料。容器中装有有效治疗疾患的组合物，而且可具有无菌存取口（例如容器可以是具有皮下注射针头可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小管）。组合物中的至少一种活性剂是本发明的DSCR1调控物。标签或包装插页指示该组合物用于治疗特定病症。标签或包装插页进一步包含给患者施用组合物的说明书。另外，制品还可包括第二容器，其中装有药学可接受的缓冲剂，诸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏(Ringer)溶液和右旋糖溶液。它还可包括商业和用户立场上所需的其它物质，包括其它缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。

还提供了可用于多种目的的试剂盒。可以提供包含本发明DSCR1调控物的试剂盒，用于DSCR1的体外检测和定量，例如在ELISA或Western印迹中。与制品相同，试剂盒包括容器和所述容器上或与其相关联的标签或包装插页。容器中装有包含至少一种本发明DSCR1调控物的组合物。可包括另外的容器，其中装有例如稀释剂和缓冲剂、对照抗体。标签或包装插页可提供对组合物的描述以及用于预期体外或检测用途的说明书。

H. 包含多肽或核酸的DSCR1调控物 – 具体的形式和应用

在一个实施方案中，本发明的核酸包括反义或有义寡核苷酸/多核苷酸，包括能够结合内源DSCR1核酸或编码DSCR1多肽的单链核酸序列（或是RNA或是DNA）。依照本发明，反义或有义寡核苷酸包含DSCR1 DNA编码区的至少一个片段。此类片段通常包含至少约14个核苷酸，优选约14至30个核苷酸。根据编码给定蛋白质的cDNA序列来衍生反义或有义寡核苷酸的能力描述于例如Stein and Cohen, Cancer Res. 48: 2659, 1988和van der Krol et al., BioTechniques 6: 958, 1988。

反义或有义寡核苷酸与靶核酸序列的结合导致双链体的形成，其通过多种手段之一阻断靶序列的转录或翻译，所述手段包括双链体的降解增强、转录或翻译的过早终止、或其它手段。此类方法涵盖在本发明中。反义寡核苷酸因此可用于阻断内皮细胞中DSCR1蛋白质的表达。反义或有义寡核苷酸还包括具有经过修饰的糖-磷酸二酯骨架（或其它糖键(linkage)，诸如WO 91/06629中所述）的寡核苷酸，且其中此类糖键对内源核酸酶有抗性。具有抗性糖键的此类寡核苷酸在体内是稳定的（即能够抵抗酶促降解），但保留了能够结合靶核苷酸序列的序列特异性。

用于反义结合的优选基因内位点包括掺入基因开放阅读框(ORF)的翻译起始密码子（5'-AUG/5'-ATG）或终止密码子（5'-UAA、5'-UAG和5-UGA/5'-TAA、5'-TAG和5'-TGA）的区域。这些区域指mRNA或基因中涵盖从翻译起始或终止密码子起任一方向（即5'或3'）的约25个至约50个毗连核苷酸的部分。用于反义结合的其它例示性区域包括：内含子；外显子；内含子-外显子连接处；开放阅读框(ORF)或“编码区”，即翻译起始密码子和翻译终止密码子之间的区域；mRNA的5'帽，其包含经由5'-5'三磷酸酯键与mRNA的最5'端残基连接的N7-甲基化鸟苷残基，包括5'帽结构自身以及与帽相邻的前50个核苷酸；5'非翻译区(5'UTR)，即mRNA中从翻译起始密码子起5'方向的部分，因此包括mRNA中5'帽位点和翻译起始密码子之间的核苷酸或基因上的相应核苷酸；和3'非翻译区(3'UTR)，即mRNA中从翻译终止密码子起3'方向的部分，因此包括mRNA中翻译终止密码子和的3'末端之间的核苷酸或基因上的相应核苷酸。

可用于抑制DSCR1多肽表达的反义化合物的具体例子包括包含经修饰骨架或非天然核苷间键的寡核苷酸。具有经修饰骨架的寡核苷酸包括那些在骨架中保留磷原子的以及那些在骨架中没有磷原子的寡核苷酸。为了本说明书的目的，而且有时候在本领域内参考，在其核苷间骨架中没有磷原子的经修饰寡核苷酸也可认为是寡核苷酸。例示性的经修饰寡核苷酸骨架包括例如具有正常3'-5'键的硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨烷基磷酸三酯(aminoalkylphosphotriester)、甲基和其它烃基膦酸酯包括3'-亚烷基膦酸酯(3'-alkylene phosphonate)、5'-亚烷基膦酸酯(5'-alkylene phosphonate)和手性膦酸酯、亚磷酸酯、氨基磷酸酯包括3'-氨基氨基磷酸酯(3'-amino phosphoramidate)和氨烃基氨基磷酸酯

(aminoalkylphosphoramidate)、硫羰氨基磷酸酯(thionophosphoramidate)、硫羰烃基膦酸酯(thionoalkylphosphonate)、硫羰烃基磷酸三酯(thionoalkylphosphotriester)、硒代磷酸酯(selenophosphate)和溴代磷酸酯(borano-phosphate)，它们的2'-5'连接类似物，及那些具有反向极性的类似物，其中一个或多个核苷酸间键是3'到3'、5'到5'、或2'到2'键。具有反向极性的例示性寡核苷酸在最3'端核苷酸间键包含单一3'到3'键，即可以是无碱基（核碱基缺失或以羟基取代）的单一反向核苷残基。多种盐、混合盐和游离酸的形式也包括在内。教导含磷键的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,194,599; 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697; 和5,625,050，在此收入每一项作为参考。

其中不含磷原子的经修饰寡核苷酸骨架的例子具有由短链烃基或环烃基核苷间键、混合杂原子和烃基或环烃基核苷间键、或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键形成的骨架。这些包括那些具有吗啉代键（部分由核苷的糖部分形成）；硅氧烷骨架；硫化物、亚砜和砜骨架；甲酰基(formacetyl)和硫代甲酰基(thioformacetyl)骨架；亚甲基甲酰基(formacetyl)和硫代甲酰基(thioformacetyl)骨架；核糖乙酰基骨架；含烯(alkene)骨架；氨基磺酸酯(sulfamate)骨架；亚甲基亚氨基和亚甲基肼基(methylenehydrazino)骨架；磺酸酯和磺酰胺(sulfonamide)骨架；酰胺骨架；及其它具有混合N、O、S和CH_2组成部分的骨架。教导此类寡核苷酸的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 5,792,608; 5,646,269; 和5,677,439，在此收入每一项作为参考。

在反义寡核苷酸的其它例子中，核苷酸单元的糖和核苷间键，即骨架，用新基团取代。保持碱基单元以与适宜的核酸靶化合物杂交。已显示出具有卓越杂交特性的这样一种寡聚化合物，即寡核苷酸模拟物，称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中，寡核苷酸的糖骨架以含酰胺骨架取代，特别是氨

乙基甘氨酸骨架。核碱基得到保留并直接或间接结合骨架酰胺部分的氮杂氮原子。教导PNA化合物的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利5,539,082; 5,714,331; 和5,719,262，在此收入每一项作为参考。PNA化合物的更多教导可参见Nielsen et al., 1991, Science 254: 1497-1500。

反义寡核苷酸的例子掺入了硫代磷酸酯骨架和/或杂原子骨架，特别是-CH_2-NH-O-CH_2-、-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-（称为亚甲基(甲基亚氨基)或MMI骨架）、-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-、上述美国专利5,489,677中描述的-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-和-O-N(CH_3)-CH_2-CH_2-（其中天然磷酸二酯骨架表示为-O-P-O-CH_2-）、及上述美国专利5,602,240的酰胺骨架。上述美国专利5,034,506的具有吗啉代骨架结构的反义寡核苷酸也是另外的例子。

经修饰的寡核苷酸还可以包含一种或多种取代糖模块。例示性的寡核苷酸在2'位置包含如下之一: OH; F; O-烷基, S-烷基, 或N-烷基; O-烯基, S-烯基, 或N-烯基; O-炔基, S-炔基, 或N-炔基; 或O-烃基-O-烃基，其中烷基、烯基和炔基可以是取代的或未取代的C_1到C_{10}烷基或C_2到C_{10}烯基和炔基。特别优选的是O[(CH_2)$_n$O]$_m$$CH_3$、O($CH_2$)$_n$$OCH_3$、O($CH_2$)$_n$$NH_2$、O($CH_2$)$_n$$CH_3$、O($CH_2$)$_n$$ONH_2$、和O($CH_2$)$_n$ON[($CH_2$)$_n$$CH_3$)]$_2$，其中n和m是1到约10。其它例示性的反义寡核苷酸在2'位置包含如下之一: C_1到C_{10}低级烃基，取代的低级烃基，烯基，炔基，烃芳基(alkaryl)，芳烃基(aralkyl)，O-烃芳基或O-芳烃基，SH，SCH_3，OCN，Cl，Br，CN，CF_3，OCF_3，$SOCH_3$，SO_2CH_3，ONO_2，NO_2，N_3，NH_2，杂环烃基，杂环烃芳基，氨烃基氨基(aminoalkylamino)，聚烃基氨基(polyalkylamino)，取代的甲硅烷基，RNA切割基团(cleaving group)，报道基团(reporter group)，嵌入剂，用于提高寡核苷酸的药动学性质的基团，或用于提高核苷酸的药效学性质的基团，及具有相似性质的其它取代基。一种可能的修饰包括2'-甲氧基乙氧基（2'-O-$CH_2CH_2OCH_3$，也称作2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE）(Martin et al., 1995, HeIv. Chim. Acta 78: 486-504)即烃氧基烃氧基(alkoxyalkoxy)。进一步优选的修饰包括2'-二甲氨基氧基乙氧基，即O(CH_2)$_2$ON(CH_3)$_2$基团，也称作2'-DMAOE，和2'-二甲氨基乙氧基乙氧基（本领域也称作2'-O-二甲氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE），即2'-O-(CH_2)$_2$-O-(CH_2)$_2$-N(CH_3)$_2$。

进一步的修饰包括锁定核酸(Locked Nucleic Acid, LNA)，其中2'-羟基与糖环的3'或4'碳原子相连，由此形成双环糖模块。键可以是桥接2'氧原子和4'

碳原子的亚甲基(methelyne) (-CH_2-)$_n$基团，其中n是1或2。LNA及其制备参见WO 98/39352和WO 99/14226。

其它的修饰包括2'-甲氧基(2'-O-CH_3)，2'-氨丙氧基(2'-O$CH_2CH_2CH_2NH_2$)，2'-烯丙基(2'-CH_2-CH=CH_2)，2'-O-烯丙基(2'-O-CH_2-CH=CH_2)和2'-氟(2'-F)。2'-修饰可以在阿拉伯糖(arabino)(上)位或核糖(ribo)(下)位。一种2'-阿拉伯糖修饰是2'-F。也可在寡核苷酸上的其它位置进行类似的修饰，特别是3'末端核苷酸的糖的3'位置或在2'-5'连接的寡核苷酸中和5'末端核苷酸的5'位置。寡核苷酸还可具有糖模拟物，诸如用环丁基模块取代呋喃戊糖基(pentofuranosyl)糖。教导此类经过修饰的糖结构的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 5,792,747; 和5,700,920，在此完整收入每一项作为参考。

寡核苷酸还可包括核碱基（本领域内通常简称为“碱基”）修饰或替代。在用于本文时，“未修饰的”或“天然的”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)，及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。经过修饰的核碱基包括其它合成的和天然的核碱基，诸如5-甲基胞嘧啶 (5-me-C)，5-羟甲基胞嘧啶，黄嘌呤，次黄嘌呤，2-氨基腺嘌呤，腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烃基衍生物，腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烃基衍生物，2-硫尿嘧啶，2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶，5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶， 5-丙炔基(-C≡C-CH3或-CH2-C≡CH)尿嘧啶和胞嘧啶及嘧啶碱基的其它炔基衍生物，6-偶氮(azo)尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶，5-尿嘧啶（假尿嘧啶），4-硫尿嘧啶，8-卤代、8-氨基、8-巯基(thiol)、8-硫烃基(thioalkyl)、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤，5-卤代特别是5-溴、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶，7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤，2-F-腺嘌呤，2-氨基-腺嘌呤，8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤，7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤和3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。进一步修饰的核碱基包括三环嘧啶，诸如吩噁嗪胞苷(1H-嘧啶[5,4-b][l,4]苯丙噁嗪-2(3H)-酮)，吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶[5,4-b][l,4]苯丙噻嗪-2(3H)-酮)，G-夹环(G-clamps)诸如取代的吩噁嗪胞苷(例如9-(2-氨乙氧基)-H-嘧啶[5,4-b][l,4]苯并噁嗪-2(3H)-酮)，咔唑胞苷(2H-嘧啶[4,5-b]吲哚-2-酮)，吡啶并吲哚胞苷(H-吡啶[3',2':4,5]吡咯[2,3-d]嘧啶-2-酮)。经修饰的核碱基还可

包括那些其中嘌呤或嘧啶碱基用其它杂环，例如7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、2-氨基吡啶和2-吡啶酮取代的核碱基。更多核碱基包括美国专利3,687,808中公开的那些；The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990中公开的那些；和Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613中公开的那些。这些核碱基中的某些特别可用于提高本发明寡聚化合物的结合亲和力。这些包括5-取代的嘧啶，6-氮杂嘧啶和N-2、N-6和O-6取代的嘌呤，包括2-氨丙基腺嘌呤，5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶取代已显示出将核酸双链体的稳定性提高0.6-1.2°C (Sanghvi et al., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)而且是例示性的碱基取代，例如在与2'-O-甲氧基乙基糖修饰结合时。教导经修饰核碱基的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利3,687,808，以及美国专利4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,830,653; 5,763,588; 6,005,096; 5,681,941; 和5,750,692，在此收入每一项作为参考。

反义寡核苷酸的另一种修饰包括与寡核苷酸化学连接提高寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取的一种或多种模块或共轭物(conjugate)。本发明的化合物可包含与功能基团诸如伯羟基或仲羟基共价连接的共轭基团(conjugate group)。本发明的共轭基团包括嵌入剂、报道分子、多胺、聚酰胺、聚乙二醇、聚醚、提高寡聚体药效学性质的基团、和提高寡聚体药动学性质的基团。典型的共轭基团包括胆固醇、脂质、阳离子脂质、磷脂、阳离子磷脂、生物素、吩嗪、叶酸(folate)、菲啶、蒽醌、吖啶、荧光素、罗丹明、香豆素、和染料。在本发明的内容中，提高药效学性质的基团包括提高寡聚体摄取、提高寡聚体对降解的抗性、和/或增强与RNA的序列特异性杂交的基团。在本发明的内容中，提高药动学性质的基团包括提高寡聚体摄取、分布、代谢或排泄的基团。共轭物模块包括但不限于脂质模块，诸如胆固醇模块(Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6553-6556)，胆酸(Manoharan et al., 1994, Bioorg. Med. Chem. Let. 4: 1053-1060)，硫醚例如己基-S-三苯甲基硫醇(tritylthiol)(Manoharan et al., 1992, Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 306-309; Manoharan et al., 1993, Bioorg. Med. Chem. Let. 3: 2765-2770)，硫代

胆固醇(Oberhauser et al., 1992, Nucl. Acids Res. 20: 533-538)，脂肪族链例如十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras et al., 1991, EMBO J. 10: 1111-1118; Kabanov et al., 1990, FEBS Lett. 259: 327-330; Svinarchuk et al., 1993, Biochimie 75: 49-54)，磷脂例如二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙基-铵1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油-3-H-膦酸酯(Manoharan et al., 1995, Tetrahedron Lett. 36: 3651-3654; Shea et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18: 3777-3783)，多胺或聚乙二醇链(Manoharan et al., 1995, Nucleosides & Nucleotides 14: 969-973)，或醋酸金刚烷(Manoharan et al., 1995, Tetrahedron Lett. 36: 3651-3654)，棕榈基模块(Mishra et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta 1264: 229-237)，或十八烷胺或己氨基-羰基-羟胆固醇模块。本发明的寡核苷酸还可与活性药物物质偶联，例如阿司匹林(aspirin)、华法林(warfarin)、苯基丁氮酮(phenylbutazone)、布洛芬(ibuprofen)、舒洛芬(suprofen)、芬布芬(fenbufen)、酮洛芬(ketoprofen)、(S)-(+)-普拉洛芬(pranoprofen)、卡洛芬(carprofen)、丹磺酰肌氨酸(dansylsarcosine)、2,3,5-三碘苯甲酸、氟芬那酸(flufenamic acid)、亚叶酸(folinic acid)、苯并噻二嗪(benzothiadiazide)、氯噻嗪(chlorothiazide)、二氮䓬杂䓬(diazepine)、吲哚美辛(indomethacin)、巴比妥酸盐(barbiturate)、头孢菌素(cephalosporin)、磺胺药(sulfa drug)、抗糖尿病药(antidiabetic)、抗菌药(antibacterial)或抗生素。寡核苷酸-药物偶联物及其制备参见美国系列申请09/334,130 (1999年6月15日提交)和美国专利4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717, 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241, 5,391,723; 5,416,203, 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928; 和5,688,941，在此收入每一项作为参考。

不必对给定化合物中的所有位置作均一的修饰，事实上可以在单一化合物中甚至在寡核苷酸内的单一核苷处掺入超过一种上述修饰。本发明还包括作为嵌合化合物的反义化合物。在本发明的内容中，“嵌合的”反义化合物

或“嵌合物”指包含两个或多个在化学上不同的区的反义化合物，特别是寡核苷酸，每个区由至少一个单体单元构成，在寡核苷酸化合物的情况中即为核苷酸。这些寡核苷酸通常包含至少一个区，其中寡核苷酸经过修饰而赋予该寡核苷酸以提高的对核酸酶降解的抗性、提高的细胞摄取、和/或提高的对靶核酸的结合亲和力。寡核苷酸的额外区可充当能够切割RNA:DNA或RNA:RNA杂合物的酶的底物。举例而言，RNA酶H是切割RNA:DNA双链体的RNA链的细胞内切核酸酶。因此，RNA酶H的活化导致对RNA靶物的切割，由此大大提高寡核苷酸抑制基因表达的效率。因此，在使用嵌合寡核苷酸时，与杂交于相同靶区的硫代磷酸酯脱氧寡核苷酸相比，用较短的寡核苷酸通常获得可比的结果。本发明的嵌合反义化合物可形成为如上所述的两种或多种寡核苷酸、经修饰的寡核苷酸、寡核苷和/或寡核苷酸模拟物的复合结构。例示性的嵌合反义寡核苷酸在3'-末端掺入至少一个2'修饰的糖（优选2'-O-$(CH_2)_2$-O-CH_3）以赋予核酸酶抗性，及具有至少4个相连2'-H糖的区域以赋予RNA酶H活性。此类化合物在本领域也称为杂合物(hybrid)或接合物(gapmer)。例示性的接合物(gapmer)在由具有至少4个相连2'-H糖的至少一个区分隔的3'-末端和5'末端具有2'修饰的糖（优选2'-O-$(CH_2)_2$-O-CH_3）的区，且可以掺入硫代磷酸酯骨架键。教导此类杂合物结构的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356; 和5,700,922，在此完整收入每一项作为参考。

依照本发明使用的反义化合物可方便且常规的通过众所周知的固相合成技术来制备。有多家销售商销售用于此类合成的设备，包括例如Applied Biosystems (Foster City, Calif.)。另外/或者，可采用本领域已知的用于此类合成的任何其它手段。众所周知使用类似技术来制备寡核苷酸，诸如硫代磷酸酯和烃基化衍生物。本发明的化合物还可与其它分子、分子结构或化合物的混合物混合、胶囊化、偶联或以其它方式关联成例如脂质体，受体靶向分子，口服的、直肠的、局部的或其它剂型以帮助摄取、分布和/或吸收。教导此类摄取、分布和/或吸收辅助剂型的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利5,108,921; 5,354,844; 5,416,016; 5,459,127; 5,521,291; 5,543,158; 5,547,932; 5,583,020; 5,591,721; 4,426,330; 4,534,899; 5,013,556; 5,108,921; 5,213,804; 5,227,170; 5,264,221; 5,356,633; 5,395,619; 5,416,016; 5,417,978; 5,462,854;

5,469,854; 5,512,295; 5,527,528; 5,534,259; 5,543,152; 5,556,948; 5,580,575; 和5,595,756，在此收入每一项作为参考。

有义或反义寡核苷酸的其它例子包括那些与有机模块，诸如WO 90/10048中描述的那些，及提高寡核苷酸对靶核酸序列的亲和力的其它模块，诸如聚-(L-赖氨酸)共价连接的寡核苷酸。而且，嵌入剂，诸如玫瑰树碱(ellipticine)和烷化剂或金属络合物可附着于有义或反义寡核苷酸以调整反义或有义寡核苷酸对靶核苷酸序列的结合特异性。

可通过任何基因转移方法将反义或有义寡核苷酸导入包含靶核酸序列的细胞，包括例如$CaPO_4$介导的DNA转染、电穿孔、或通过使用基因转移载体诸如埃巴二氏病毒(Epstein-Barr virus)。在一种例示性的流程中，将反义或有义寡核苷酸插入合适的逆转录病毒载体。使包含靶核酸序列的细胞在体内或回体接触重组逆转录病毒载体。合适的逆转录病毒载体包括但不限于那些衍生自鼠逆转录病毒M-MuLV的那些，N2（衍生自M-MuLV的逆转录病毒），或命名为DCT5A、DCT5B和DCT5C的双拷贝载体(见WO 90/13641)。

还可通过与配体结合分子形成偶联物将有义或反义寡核苷酸导入包含靶核苷酸序列的细胞，如WO 91/04753中所述。合适的配体结合分子包括但不限于细胞表面受体、生长因子、其它细胞因子、或结合细胞表面受体的其它配体。一般而言，与配体结合分子的偶联优选基本不干扰所述配体结合分子结合其相应分子或受体的能力或者阻断有义或反义寡核苷酸或其偶联物型式进入细胞。

或者，可通过形成寡核苷酸-脂质复合物将有义或反义寡核苷酸导入包含靶核酸序列的细胞，如WO 90/10448中所述。有义或反义寡核苷酸-脂质复合物优选在细胞内由内源脂肪酶解离。

反义或有义RNA或DNA分子的长度通常是至少约5个核苷酸，或者长度为至少约6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820,

830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 或1000个核苷酸，其中在此内容中术语“约”指所述核苷酸序列长度加或减该长度的10%。

编码DSCR1调控物多肽的核酸还可用于基因疗法。在基因疗法应用中，将基因导入细胞以实现治疗上有效的基因产物的体内合成，例如用于替代缺陷基因。“基因疗法”包括常规基因疗法和施用基因治疗剂两种，前者通过一次处理获得持续的效果，后者涉及一次或反复施用治疗上有效的DNA或mRNA。反义RNA和DNA可作为治疗剂用于在体内阻断某些基因的表达。已经显示可以将短反义寡核苷酸输入它们在其中起抑制剂作用的细胞，尽管由于细胞膜对它们的摄取有限，因而它们的胞内浓度低(Zamecnik et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4143-4146)。可以修饰寡核苷酸以提高它们的摄取，例如通过用不带电荷的基团取代它们带负电荷的磷酸二酯基团。

有多种技术可用于将核酸导入活细胞。这些技术根据是将核酸转移到体外的培养细胞中，还是体内的预期宿主的细胞中而有所变化。适于在体外将核酸转移到哺乳动物细胞中的技术包括使用脂质体、电穿孔、显微注射、细胞融合、DEAE-右旋糖苷、磷酸钙沉淀法等。目前优选的体内基因转移技术包括使用病毒（通常是逆转录病毒）载体的转染和病毒外壳蛋白-脂质体介导的转染(Dzau et al., 1993, Trends in Biotechnology 11: 205-210)。在有些情况中，期望与靶向靶细胞的试剂一起提供核酸来源，诸如对细胞表面膜蛋白或靶细胞特异的抗体、靶细胞上受体的配体等。在采用脂质体时，结合与胞吞有关的细胞表面膜蛋白的蛋白质可用于靶向和/或促进摄取，例如对特定细胞类型有向性的衣壳蛋白或其片段、在循环中经历内在化的蛋白质的抗体、靶向胞内定位并增强胞内半衰期的蛋白质。受体介导的胞吞的技术参见例如Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432; 和Wagner et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3410-3414。关于基因标记和基因疗法方案的综述见Anderson et al., 1992, Science 256: 808-813。

本发明的DSCR1调控物多肽及核酸分子可在诊断上用于组织分型，其中DSCR1多肽可能在一种组织中与另一种组织相比，优选在患病组织中与相同组织类型的正常组织相比差异表达。

本发明涵盖筛选化合物以鉴定那些调控DSCR1的化合物的方法。用于拮抗剂药物候选物的筛选测定法设计成鉴定与DSCR1多肽结合或复合，或者以

其它方式干扰DSCR1多肽与其它细胞蛋白质相互作用的化合物，包括例如抑制细胞表达DSCR1多肽。此类筛选测定法包括适应高通量筛选化学文库的测定法，使得它们特别适用于鉴定小分子药物候选物。

可以多种形式进行测定法，包括本领域已经很好表征的蛋白质-蛋白质结合测定法、生物化学筛选测定法、免疫测定法和基于细胞的测定法。

用于拮抗剂的所有测定法的共同之处在于它们需要使药物候选物接触DSCR1多肽，其条件和时间足以使这两种组分相互作用。

在结合测定法中，相互作用指结合，所形成的复合物可在反应混合物中分离或检测。在一个具体的实施方案中，将DSCR1多肽或药物候选物通过共价或非共价附着固定在固相上，例如微量滴定板。非共价附着通常通过用DSCR1多肽溶液包被固相表面并干燥来实现。或者，对待固定的DSCR1多肽特异的固定化抗体例如单克隆抗体可用于将它锚定到固相表面上。测定法如下进行，将可以用可检测标记物标记的非固定化组分加到固定化组分例如包含锚定组分的包被表面上。在反应完成时，例如通过清洗除去未反应的组分，并检测锚定到固相表面上的复合物。若最初的非固定化组分携带可检测标记物，检测出固定到表面上的标记物表明发生了复合作用。若最初的非固定化组分不携带标记物，可例如通过使用特异性结合已固定复合物的标记抗体来检测复合作用。

如果候选化合物与DSCR1多肽相互作用但不结合，那么它与DSCR1的相互作用可通过用于检测蛋白质-蛋白质相互作用的公知方法来测定。此类测定法包括传统方法，诸如例如交联、免疫共沉淀、和通过梯度或层析柱的共纯化。另外，可以如Chevray and Nathans, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5789-5793所公开的，使用Fields及其同事 (Fields and Song, 1989, Nature (London) 340:245-246; Chien et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9578-9582)描述的基于酵母的遗传系统来监测蛋白质-蛋白质相互作用。许多转录激活物，诸如酵母GAL4，由两个空间上离散的模块结构域组成，一个起DNA结合结构域的作用，另一个起转录激活结构域的功能。上述出版物中描述的酵母表达系统（通称为“双杂交系统”）利用了此特性，采用两种杂合蛋白质，在一个中将靶蛋白质与GAL4的DNA结合结构域融合，而在另一个中将候选激活蛋白质与激活结构域融合。GAL1-*lac*Z报道基因在GAL4激活的启动子控制下的表达依赖于GAL4活性经由蛋白质-蛋白质相互作用的重

建。用β-半乳糖苷酶的显色底物检测包含相互作用多肽的菌落。使用双杂交技术鉴定两种特定蛋白质之间的蛋白质-蛋白质相互作用的完整试剂盒(MATCHMAKER™)可从Clontech购买。此系统还可延伸到对参与特定蛋白质相互作用的蛋白质结构域的作图以及指出对这些相互作用至关重要的氨基酸残基。

干扰DSCR1与其它胞内或胞外组分相互作用的化合物可如下测试: 通常在足以使两种产物相互作用和结合的条件和时间下制备包含DSCR1及胞内或胞外组分的反应混合物。为了测试候选化合物抑制结合的能力，在缺乏和存在测试化合物时进行反应。另外，可以向第三份反应混合物中加入安慰剂，作为阳性对照。如上所述监测混合物中存在的DSCR1和胞内或胞外组分之间的结合（复合物形成）。对照反应物中形成复合物但含有测试化合物的反应混合物中没有形成复合物表明，测试化合物干扰DSCR1与其反应配偶体的相互作用。

为了测定拮抗剂，可将DSCR1多肽与要筛选特定活性的化合物一起加到细胞中，在存在DSCR1多肽时该化合物抑制目的活性的能力表明，该化合物是DSCR1多肽的拮抗剂。DSCR1多肽可进行标记，诸如通过放射性，使得与受体分子结合的DSCR1多肽分子的数目可用于确定潜在拮抗剂的效力。

潜在的DSCR1拮抗剂是使用反义技术制备的反义RNA或DNA构建物，其中例如反义RNA或DNA分子通过与靶mRNA杂交并防止蛋白质翻译来起直接阻断mRNA翻译的作用。反义技术可用于通过三股螺旋形成或反义DNA或RNA来控制基因表达，二者都基于多核苷酸与DNA或RNA的结合。例如，可将编码成熟DSCR1蛋白质的多核苷酸序列的5'编码部分用于设计长度为约10-40个碱基对的反义RNA寡核苷酸。将DNA寡核苷酸设计成与基因中参与转录的区互补(三股螺旋-参见Lee et al., 1979, Nucl. Acids Res. 6: 3073; Cooney et al., 1988, Science 241: 456; Dervan et al., 1991, Science 251:1360)，由此防止转录和产生DSCR1多肽。反义RNA寡核苷酸与mRNA在体内杂交并阻断mRNA分子翻译成为DSCR1多肽(反义-Okano, 1991, Neurochem. 56: 560; Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press: Boca Raton, FL, 1988)。上述寡核苷酸还可投递至细胞，使得反义RNA或DNA可在体内表达以抑制DSCR1多肽的生成。在使用反义DNA时，优选衍生自靶基因核苷酸序列的翻译起始位点（例如约-10到+10位置之间）的寡

脱氧核糖核苷酸。

潜在的拮抗剂包括结合DSCR1多肽的活性位点、蛋白质相互作用位点、或其它相关结合位点，由此阻断DSCR1多肽的正常生物学活性的小分子。小分子的例子包括但不限于小肽或肽样分子，优选可溶性肽，和合成的非肽基有机或无机化合物。

核酶是能够催化对RNA的特异性切割的酶性RNA分子。核酶通过与互补靶RNA发生序列特异性杂交，随后进行内切核酸水解(endonucleolytic)切割来起作用。可通过已知技术来鉴定潜在RNA靶物内的特定核酶切割位点。更多细节参见例如Rossi, 1994, Current Biology 4: 469-471和PCT公开号WO 97/33551 (1997年9月18日公开)。

用于抑制转录的三股螺旋结构中的核酸分子应当是单链的且由脱氧核苷酸组成。设计这些寡核苷酸的碱基组成，使得它通过Hoogsteen碱基配对原则促进三股螺旋形成，这通常需要在双链体的一条链上有大段嘌呤或嘧啶。更多细节参见例如PCT公开号WO 97/33551，见上文。

这些小分子可通过上文讨论的一种或多种筛选测定法和/或通过本领域技术人员公知的任何其它筛选技术来鉴定。

在一个实施方案中，内在化抗体是优选的。抗体可具有某些特征，或者经过修饰后具有此类特征，以致于增强抗体进入细胞的投递。用于实现这一效果的技术是本领域已知的。在又一个实施方案中，抗体可以在靶细胞中表达，通过将能够表达该抗体的核酸导入靶细胞。参见例如美国专利号6,703,019; 6,329,173; PCT发表号2003/077945。还可以用脂转染或脂质体将抗体投递到细胞中。在使用抗体片段时，特异性结合靶蛋白质的结合结构域的最小抑制性片段一般是有益的。例如，根据抗体的可变区序列，可以设计保留与靶蛋白质序列结合能力的肽分子。此类肽可以化学合成和/或通过重组DNA技术生成。参见例如Marasco et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7889-7893。

调控物多肽进入靶细胞可通过本领域已知的技术来增强。例如，某些序列，诸如那些衍生自HIV Tat或触角(Antennapedia)同源域蛋白(homeodomain protein)的序列，能够指导异源蛋白质穿过细胞膜的高效摄取。参见例如Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), 96:4325-4329。

本文中的配制剂还可含有所治疗具体适应症所必需的超过一种的活性

化合物，优选那些活性互补且彼此没有不利影响的。或者/另外，组合物可包含增强其功能的药剂，诸如例如细胞毒剂、细胞因子、化疗剂、或生长抑制剂。合适的是，此类分子以对于预定目的有效的量组合存在。

下面是本发明方法和组合物的实施例。应当理解，根据上文提供的一般描述，可实施各种其它实施方案。提供实施例仅仅为了例示目的，而非意图以任何方式限制本发明的范围。

实施例

我们对内皮细胞中受到血管发生因子调控的基因进行了基因组范围的分析，鉴定出DSCR1是最显著诱导的基因之一。与拮抗钙依赖磷酸酶(CnA)信号传导的功能一致，DSCR1在内皮细胞中的表达阻断涉及介导CnA信号传导的一种转录因子，活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T cell, NFAT)的脱磷酸化、核易位和活性。DSCR1不仅受到VEGF的诱导，而且还受到激活CnA信号传导的其它化合物的诱导，说明DSCR1在活化的内皮细胞中有更普遍的作用。如本文所示，DSCR1的瞬时表达削弱多种炎性标志物基因，鉴定了先前不知道的DSCR1在活化的内皮细胞中的调控作用。内源DSCR1的敲低对活化的内皮细胞提高NFAT活性并刺激炎性基因表达。如此，所鉴定的内皮细胞中DSCR1与CnA信号传导之间的负调控反馈环代表了炎性基因在内皮细胞活化（例如由VEGF通过VEGFR2而活化）后表达的潜在分子机制。

血管内皮生长因子(VEGF)结合2种跨膜酪氨酸激酶受体，称为VEGFR-1和-2，它们调控多种多样的信号转导途径，包括磷脂酶C-γ、磷脂酰肌醇3 (PI-3)激酶/AKT、Ras鸟苷三磷酸酶活化蛋白和Src家族，由此控制多种血管功能(综述见Ferrara and Gerber[1])。VEGF代表了与多种疾病有关的生理性和病理性血管发生的关键调控物，包括肿瘤生长、慢性炎症和糖尿病性视网膜病。一般而言，与病理性血管发生有关的恶性肿瘤中VEGF活性的干预常常减缓疾病进展，得到较好耐受，而且不显著影响健康的、成熟的血管系统(综述见Ferrara et al.[2])。VEGF还称为血管通透性因子(VPF)，这是基于其侵扰血管完整性和诱导血管渗漏的的能力[36,37]。选择性结合VEGFR-2的VEGF突变体充当内皮细胞促分裂原和通透性增强剂，而VEGFR-1选择性VEGF突变体表现为不具有这些活性。VEGF经由VEGFR-2的信号传导和血管侵扰表现为血管渗漏增加的主要途径，认为这与VEGF在治疗性血管发生背景中的有些用途有关。内

皮细胞中受到VEGF特异性调控的新基因的鉴定导致了在病理性较之正常血管系统中差异表达的基因的鉴定。

我们采用了已建立的体外内皮细胞存活测定法，其中添加VEGF有力抑制了由血清饥饿诱导的内皮细胞凋亡。这种测定法在鉴定内皮细胞中的信号传导途径的分子成分中特别有用。例如，这种测定系统有助于鉴定PI-3激酶/Akt信号转导途径的关键作用及Bcl2对内皮细胞存活的重要性[3,4]。当前的研究选择了相似的条件，因为它们模拟内皮细胞在新血管发生过程中对VEGF的显著依赖性，正如在临床前体内研究中所观察到的。使用GeneCalling技术(CuraGen, Branford, CT)，我们试图检测整个人内皮转录组中的VEGF靶基因[5]。

在这里，我们描述了内皮细胞中DSCR1作为新VEGF靶基因的鉴定，及DSCR1作为抗炎信号传导分子的功能特征。人的基因(DSCR1)是位于人染色体21 (HC21)最小区域内的50-100种基因之一，它在以超过2个拷贝存在时引起智力发育迟缓，统称为唐氏综合征(DS)[6]。DSCR1属于一个保守的蛋白质家族，也称为calcipressins[38,39,40]或调控性钙依赖磷酸酶相互作用蛋白(MCIP)，在人类中包含3个成员，即DSCR1/MCIP1、ZAKI-4/DSCR1L1/MCIP2和DSCR1L2/MCIP3，共享结合钙依赖磷酸酶的能力。DSCR1发挥胞质信号传导小分子的功能，受到Ca2+/钙调蛋白依赖性丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酶2B (PP2B)或钙依赖磷酸酶A (CnA)的调控。与负调控反馈环一致，CnA活性受到DSCR1结合的抑制。DSCR1在发育中的中枢神经系统和心脏中高度表达，而在成人中，在众多组织和细胞类型中检测到中度表达，包括横纹肌细胞和心肌细胞[6]。其中，DSCR1在体内动物模型中显示出干扰横纹肌细胞中的CnA信号传导[7]及抑制心脏肥大[8]。Minami et al. (J. Biol. Chem. (2004), 279(48): 50537-50554)也报道了DSCR1可以受凝血酶诱导。DSCR1的长期过表达也已与疾病诸如阿尔茨海默氏病联系起来，而且血管炎症和血管侵扰参与阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆等。Ermak et al., J. Biol. Chem. (2001), 276(42):38787-38794[41,43]。Townsend et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. (2002), 977: 65-76; Iadecola et al., Stroke, (2003), 34:335-337。

CnA在对多种胞外信号和环境应激的细胞应答中发挥关键作用，而且对于凋亡、记忆过程、及骨骼肌和心肌生长和分化的调控是重要的(综述见Rothermel et al.[9]和Crabtree and Olson[10])。CnA对活化T细胞核因子转录因子

(nuclear factor of activated T-cell transcription factor, NFATc1)的脱磷酸化促进其易位至核，在那里它与其它转录因子协同作用，包括AP1、cMAF、GATA或MEF2家族的成员[11]。这个基因家族的4个成员(NFATc1-c4)在许多组织中表达，而且在神经元导向、骨骼肌和心肌肥大、及贲门瓣发育期间发挥关键作用(综述见Hill-Eubanks et al.[12])。在它们在炎症细胞中的调控作用之外，最近在小鼠中进行的基因消融实验说明NFAT转录因子家族的有些成员有独立血管功能。这些发现说明NFAT转录因子可能不是内皮细胞存活所必需的，但是对血管成熟过程中的正确血管装配发挥重要作用[13-15]。

先前的研究证明了暴露于刺激CnA信号传导的药剂诸如佛波醇(phorbol)[12]-肉豆蔻酸盐/酯(myristate)[13]-醋酸盐/酯(PMA)和伊屋诺霉素(ionomycine, IO)[16,17]的内皮细胞中NFAT发生磷酸化和核易位。环孢菌素A(cyclosporin,CsA)是CnA的有力抑制剂，而且基于CsA对基因表达的抑制作用，在活化的内皮细胞中描述了多种潜在CnA靶基因，包括粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)[16]、Cox-2[18]、白介素8 (IL-8)[19]和组织因子(TF)[20]。如此，尽管在内皮细胞中鉴定了数种潜在CnA靶基因并在淋巴细胞和心肌细胞中描述了DSCR1对CnA信号传导的拮抗活性，但是尚不知道DSCR1在内皮细胞中在CnA信号传导中的作用。

本发明鉴定了DSCR1是活化的内皮细胞中CnA的新内源抑制物并描述了在内皮细胞中调控DSCR1水平对炎症标志物基因表达的生物学后果。例如，如本文所示，对内源DSCR1的干预提高了NFAT活性并刺激了数种炎症标志物的表达，证明对DSCR1内源水平的调控足以影响血管炎症。

材料和方法

人DSCR1的克隆

通过聚合酶链式反应(PCR)克隆DSCR1，其中使用商品化表达序列标签(EST)克隆(Incyte, Palo Alto, CA)，使用设计成在5'端引入ClaI位点(DSCR1-5'ClaI)及在3'端引入EcoR1位点(DSCR1-3'EcoR1)的引物。将PCR片段克隆入经过ClaI和EcoRI切割的巨细胞病毒(CMV)驱动的表达载体PRKN(Genentech, South San Francisco, CA)，并通过测序验证插入片段，然后进行进一步的实验。在C-末端另外引入了FLAG表位(DSCR1-Flag)。

试剂。除非另有说明，所有一抗来自BD Pharmingen (San Diego, CA)，

重组人VEGF (rhVEGF)得自Genentech，而碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)将肿瘤坏死因子α (TNF-α)购自R&D Systems (Minneapolis, MN)。

细胞和细胞测定法。原代人内皮细胞购自Clonetics (Santa Rosa, CA)并依照制造商的说明书培养。为了进行基因召唤实验(gene calling experiments)，从Clonetics (BioWhittaker, Walkersville, MD)购得人脐静脉内皮细胞(HUVEC)并遵循制造商的说明书在补充有5%胎牛血清(FCS)的内皮生长培养基(EBM-2)中维持。将细胞($1x10^7$)以19,000个细胞/cm^2的细胞密度分配并一式三份对每种条件进行平行实验。分配细胞后24小时，将细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)和含0.1%牛血清清蛋白(BSA)或0.1% BSA+VEGF (30ng/mL)或5% FCS的培养基(Clonetics)清洗3次。如文献所述进行RNA分子和逆转录-PCR (RT-PCR)分析[21]。对于细胞培养实验，使用以下条件：人(h) VEGF, 30 ng/mL; hTNF-α, 10ng/mL; PMA, 200ng/mL (Calbiochem, La Jolla, CA); CsA, 1μM (Calbiochem); IO, 5μM (Sigma, St Louis, MO); 毒胡萝卜素(thapsigargin), 50nM (Sigma)。在一种情况中，由Dharmacon (Lafayette, CO)基于各基因的全长cDNA并使用"Smart-pool"装置(Dharmacon, Lafayette, CO)生成抑制性(si) RNA。为了进行腺病毒转导存活实验，遵循制造商的说明书在补充有5% FCS的内皮生长培养基(EBM-2)中维持人脐静脉内皮细胞(HUVEC)。给6孔板(Primaria, BD Biosciences, Bedford, MA)的每各孔分配$3x10^5$个细胞并一式两份对每种条件进行平行实验。将细胞在立式摇床上于室温在不含血清、含10mM $CaCl_2$和10nM $MgCl_2$的培养基中用编码gD肽(Ad-对照)、DSCR1 (Ad-DSCR1)或具有倒置编码序列的反义构建物(Ad-DSCR1-AS)的腺病毒感染(MOI=100) 2小时。然后，加入5倍体积的含5% FCS的常规生长培养基并将细胞在CO_2培养箱中放置1天。然后，将细胞用PBS清洗3次，并加入含0.1% BSA的基础培养基(Clonetics, Santa Rosa, CA)，PMA/IO、H_2O_2和ZVAD如所示的。血清饥饿和剂量给药后24小时，在Coulter牌style 细胞计数仪上对细胞计数。对于细胞培养实验，使用以下条件：PMA, 200ng/ml (Calbiochem, La Jolla, CA); 伊屋诺霉素, 5μM (Sigma, St. Louis, MO); 将3% H_2O_2溶液在基础培养基, 0.1% BSA中1:300稀释以得到0.01% H_2O_2溶液; ZVAD 5μM。

腺病毒载体的生成和内皮细胞的转导

基本上如制造商所述，通过将NotI-NotI cDNA插入片段克隆入Ad-easy载体构建试剂盒(Stratagene, La Jolla, CA)的多接头位点来构建

Ad-DSCR1-Flag和Ad-LacZ。

基因召唤

为了鉴定差异表达的新基因，使用了“开放式”(open)技术诸如基因表达系列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)和基因召唤(GeneCalling)。基因召唤在文献中有记载[5,22]。

将来自各个处理组的样品逆转录，并进行定量表达分析(QEA)[5]。分析聚焦于调控至少2倍的基因的鉴定。探索条件依赖性基因表达概况的初步分析通过QEA或基因召唤来进行，如先前所述[5]。

Western印迹和免疫沉淀

将在10cm培养皿中培养的细胞用Tris (三(羟甲基)氨基甲烷)缓冲盐水清洗2次，并加入0.6mL RIPA缓冲液(10mM PBS, 1% Nonidet P-40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% 十二烷基硫酸钠[SDS], 100mg/mL 苯甲基磺酰氟, 30μg/mL 抑肽酶, 1mM 原钒酸钠)及蛋白酶抑制剂(Roche Pharmaceuticals, Gaithersburg, MD)。针对人NFATc1、c2和c3的小鼠单克隆抗体(mAb)购自Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)。亲和纯化的针对人E-选择蛋白、血管细胞粘附分子-1 (VCAM-1)、胞间粘附分子-1 (ICAM-1)和Cox-2的山羊多克隆抗体来自BD Pharmingen。内皮细胞总提取物、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、印迹和免疫检测依照Santa Cruz Biotechnology的方案进行。将总共60mg全细胞提取物加载至4% - 16%聚丙烯酰胺凝胶的每条泳道。增强化学发光(ECL)反应试剂盒购自Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ)，使用来自Vector Laboratories (Burlingame, CA)的辣根过氧化物酶-链霉亲合素。对于NFATc1实验，加载等量的细胞提取物以显现NFATc1 (mAb 7A6; 1:500; Santa Cruz Biotechnology)，加载对照是α-微管蛋白(单抗来自ICN, Santa Ana, CA; 1:5000)。对于Cox-2和TF免疫印迹分析，将等量的细胞溶胞物加载至6% - 12%梯度SDS-PAGE。用抗Cox2 mAb (RDI, 1:500)分析Cox-2，用1:500稀释的Genentech的抗hTF单抗(克隆7G11)分析TF。将样品加载至凝胶前，对蛋白质的量定量，并作相应调整。作为加载对照，在4% - 20%聚丙烯酰胺凝胶上使用抗γ-衔接蛋白单抗(adaptin)(1:1000)。

内皮细胞凋亡的分析

对于荧光激活细胞分拣(FACS)分析，将细胞通过异硫氰酸荧光素偶联的膜联蛋白V和通过荧光染料碘化丙啶(PI)染色，基本上如Gerber et al. J Biol

Chem. 1998; 273: 30336-30343所记载的。

原代人内皮细胞的瞬时转染和荧光素酶测定法

对于HUVEC和人微血管内皮细胞(HMVEC)瞬时转染，将3mL生长培养基(Primaria; BD Biosciences, Bedford, MA)中的细胞($7.5x10^4$)分配至6孔板的每个孔。为总共3个孔的转染计算脂转染混合物中所使用的质粒DNA的量。然后，将1.25μg表达载体、3.75μg荧光素酶报道物和2.0μg SV-Renilla参照报道物混合，并加入14μL F1脂转染试剂(Targeting Systems, Santee, CA)。然后，向混合液中加入4.5mL高葡萄糖Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)。如制造商所推荐的进行瞬时转染。对于报道基因表达实验，遵循制造商的推荐通过在300μL 1x被动溶胞缓冲液(passive lysis buffer)中使用双重荧光素酶报道物试剂盒(Dual Luciferase Reporter Kit, Promega, San Luis Obispo, CA)将细胞溶胞。

对于包括siRNA的瞬时转染实验，如关于瞬时转染实验所述将HUVEC分配入6孔板。对于一式6份样，将600pmol siRNA (Dharmacon, Lafayette, CO)、7.5μg荧光素酶和4μg Renilla报道构建物在6mL高葡萄糖DMEM中混合。对于FACS和免疫组织化学(IHC)实验，加入11.5μg增强绿色荧光蛋白(EGFP)质粒替代荧光素酶质粒。在于37°C温育25-30分钟前，向混合物中加入30μL Targefect溶液A和60μL Targefect溶液B (Targeting Systems)；将1mL该溶液用于所述的脂转染。将细胞用PBS清洗2次，然后加入不含血清的培养基并按指定时间给药。

DSCR1和NFATC1的siRNA拮抗物

基因名称	作为基础的编号	有义链的序列5'->3'
在血管发生因子（例如VEGF）活化研究中作为混合物使用:		
DSCR1	NM_004414	GCUCAGACCUACACAUAG
DSCR1	NM_004414	GGACAUCACCUUUCAGUAU
DSCR1	NM_004414	GAAAGAAUGAGGAGACCUA
DSCR1	NM_004414	GACAUCACCUUUCAGUAUU
在PMA/IO活化研究中使用:		
DSCR1	NM_004414	AACGUAUGACAAGGACAUCAC

基因名称	作为基础的编号	有义链的序列5'->3'
NFATC1	NM_172390	CGUAUGAGCUUCGGAUUGA
NFATC1	NM_172390	GCAGAGCACGGACAGCUA
NFATC1	NM_172390	UCAGAAACUCCGACAUUGA
NFATC1	NM_172390	GCCGGAAUCCUGAAACUCA

注意：列出的所有siRNA在每一条链上具有UU作为3'-突出，而只有反义链上有5'-磷酸根。

免疫荧光显微镜检术

在染色前24小时将原代人内皮细胞($7x10^3$个细胞/cm^2)接种入8腔显微镜载波片(Nalgene Nunc, Naperville, IL)的每个孔。将细胞在立式摇床上于室温在不含血清、含10mM $CaCl_2$和10nM $MgCl_2$的培养基中用编码LacZ或DSCR1的腺病毒（感染复数[MOI]＝100）感染2小时。然后，加入5倍体积的常规生长培养基并将细胞在CO_2培养箱中放置2天。更换培养基后，将细胞用浓度为30ng/mL的hVEGF处理20分钟。在与各种抗体一起温育前，将细胞于-20°C用甲醇固定4分钟并于室温用PBS清洗。将细胞在含小鼠抗人NFATc1一抗(sc7294, Santa Cruz Biotechnology)的PBS中于室温温育1小时。然后将细胞用PBS清洗3次，并在含Alexa Fluor 488抗小鼠IgG (Molecular Probes, Eugene, OR)的PBS中温育。最后将细胞用PBS清洗3次，并在Vectashield培养基(Vector Laboratories)中封固在盖玻片下。使用配有AxioCam MR单色照相机(Zeiss, Thornwood, NY)的Zeiss Axiovert 200荧光显微镜进行显微镜检查和照相，其中使用x63油镜。

兔中人DSCR1的多克隆抗体的生成和Western印迹分析

使用DSCR1 cDNA作为模板用引物DSCR1-EcoRI-Pro 5'（添加额外的脯氨酸）和DSCR1-Stop-XhoI 3' PCR扩增DSCR1，并克隆入pGEX-KG。表达并纯化GST-DSCR1，基本上如先前所述[23]。通过用重组GST-DSCR1进行免疫来制备多克隆兔抗GST-DSCR1。将过滤后的粗制血清用于Western印迹(1:400)。寡聚物和TaqMan探针引物组如表1所示。

表1：寡聚物和TaqMan探针引物组

	引物组
HSDSCR1.1113FP	5' (FAM) -AGG TTG TGA AAA CAG CAG CAA TGC AAT GT- (TAMRA) P3'

HSDSCR1.1088.F	CCA CAG GAA GCC GCC TAG T
HSDSCR1.1171.R	TGA GGG AAG AAA GGA AAC GCT
HSGMCSF-571T	5' (FAM) -AGG TCC AGG CCA CTC CCA CC GT- (TAMRA) P3'
HSGMCSF-515F	GTC ATC TTG GAG GGA CCA A
HSGMCSF-610R	TTC TGC CAT GCC TGT ATC A
HSTF-1911T	5' (FAM) -TTA ACT GAC TTA AGT GGC ATT AAA CAT TTG AGA GCT AA GT- (TAMRA) P3'
HSTF-1880F	CAG CTT CCT AAT ATG CTT TAC AAT CT
HSTF-2025R	CAA TGT CAA CCA TAG AAG CTT TAA GTA
HSCOX-2-3152T	5' (FAM) -CCT GGC TAC CTG CAT GCT GTT CC GT- (TAMRA) P3'
HSCOX-2-3130F	CAG TAG GTG CAT TGG AAT CAA
HSCOX-2-3207R	TCT TAG CAA AAT GGC TAA AAG AAG
HSCD34-2497T	5' (FAM) -ATC CCT GCT CAA CCC CTC TGG A GT- (TAMRA) P3'
HSCD34-2447F	CCC AGG TCC TTG TTT GCT
HSCD34-2519R	TCC AAC CGT CAT TGA AAC C
HSVCAM-1-2686T	5' (FAM) -CGA AGT TTG TTC ATC AGA CTC CTG TGC GT- (TAMRA) P3'
HSVCAM-1-2665F	GCA TGG TAC GGA GAT GTT TC
HSVCAM-1-2730R	GGC CAC ATT GGG AAA GTT
DSCR1-EcoRI-Pro 5'	CCGAATTCCCATGCATTTTAGAAACTTTAACTA CAG
DSCR1-Stop-XhoI 3'	GGGCTCGAGCTAGCTGAGGTGGATCGGCGTG TACTCC

结果

新VEGF靶基因的鉴定

通过衍生自经VEGF (30ng/mL)或5% FCS刺激的HUVEC的基因表达概况相对于基础条件（未添加[NA]）的差异电扣除，分别鉴定了在缺乏血清时

受到VEGF的特异性调控的基因。所述分析的直观显示见图1A，证明了在刺激6小时和24小时后HUVEC中VEGF诱导的DSCR1 mRNA表达分别是4.8倍和2.9倍。存在5% FCS不显著改变DSCR1的表达水平。总之，我们在FCS刺激的细胞中在6和24小时后分别检测到1.8%和4.4%的痕迹有变化，代表基因表达的改变。对于VEGF刺激的细胞，我们观察到6和24小时后分别有1.7%和3.4%的基因发生变化。受到VEGF但非FCS特异性诱导的46种cDNA片段的身份如先前所述确定[5]。28种cDNA对应于已知基因或EST，其中DSCR1是受到最强烈诱导的。剩余18种cDNA片段与公开数据库内的任何已知序列都不匹配。28种已知基因中有13种(46%)属于分泌因子类，它们进一步强化了内皮作为分泌组织的重要作用[24]。总共6种基因(21%)属于胞质蛋白质类，可能涉及信号转导，包括DSCR1。剩余9种基因(37%)，包括3种核糖体的、2种线粒体的、2种转录因子、1种细胞周期调控基因和1种涉及翻译调控的基因，代表了涉及代谢和细胞周期调控的基因类别。

导致内皮细胞活化的条件诱导DSCR1表达

为了验证通过基因召唤技术得到的结果，我们通过实时RT-PCR分析(TaqMan)分析了经VEGF或其它内皮细胞促分裂原刺激的多种人内皮细胞中的RNA水平。这证实了我们先前的结果（图1A），将FCS或b-FGF添加至血清饥饿的HUVEC不显著改变DSCR1水平，而添加VEGF在HUVEC中诱导DSCR1表达延长，达到36小时（图1B）。这些发现证实了来自基因召唤实验的数据，说明DSCR1不是有丝分裂内皮细胞中表达的普遍标志物。

为了评估2种VEGFR介导DSCR1诱导的程度，我们测试了突变型VEGF，它们以排他方式活化每一种VEGFR，如先前所述[25,26]。VEGFR-2选择性突变型(VEGFR2-sel)与VEGF在诱导DSCR1表达方面具有同等效力。相反，VEGFR-1选择性配体(VEGFR1-sel和PlGF)未能诱导DSCR1表达的改变，表明VEGFR-2足以诱导DSCR1表达（图1B-C）。

分离自不同组织的内皮细胞可能在其VEGFR表达水平中或在其信号转导途径中有所不同，这可能影响其VEGF靶基因表达概况。为了测试所述潜在细胞类型特异性差异，我们用VEGF或受体选择性突变型刺激人肺主动脉内皮细胞(HPAEC)、人真皮微血管内皮细胞(HMVEC)和人主动脉内皮细胞(HUAEC)并通过实时RT-PCR分析DSCR1表达。作为阴性对照，我们测试了人肺主动脉平滑肌细胞(HPASMC)，它们不表达显著水平的VEGF受体（数据

未显示）。测试的所有内皮细胞展示出DSCR1表达水平应答VEGF和VEGFR2-sel但非VEGFR1-sel的升高，表明VEGFR-2是在各种内皮细胞中诱导DSCR1的必要且充分条件（图1C和未显示的数据）。一般而言，大多数细胞类型在用VEGF延长刺激后展示出不如HUVEC突出的DSCR1表达升高（图1B）。

为了评估一般导致内皮细胞活化的条件是否诱导DSCR1表达及CnA是否涉及DSCR1调控，我们用TNF-α或活化CnA信号传导的化合物诸如钙离子载体A23187 [GenBank] (IO)，单独或联合PMA和CnA信号传导的另一种激活物毒胡萝卜素刺激HUVEC。所有化合物在5.5小时（图1D）和18小时（数据未显示）后显著升高DSCR1 mRNA水平，而且这种诱导在存在CnA信号传导的抑制物CsA时受到有力抑制。有趣的是，TNF-α诱导DSCR1至与对VEGF观察到的相似的水平。自HUVEC制备的全细胞提取物的Western印迹分析证实了用VEGF、PMA/IO和毒胡萝卜素刺激6小时后DSCR1的诱导（图1E）。与关于mRNA水平的发现相似，在用b-FGF或5% FCS刺激后没有发现DSCR1蛋白质水平的显著升高。与关于mRNA水平的发现相反，我们未能在用TNF-α刺激的细胞中检测到DSCR1蛋白质水平的升高，说明VEGF和TNF-α对DSCR1表达的调控有不同机制。基于CsA对活化的内皮细胞上DSCR1水平的抑制性效果，我们得出结论，这种诱导主要是由CnA介导的。然而，用TNF-α刺激后CsA对mRNA表达的不完全抑制说明内皮细胞中存在别的、未知的调控机制。

DSCR1防止NFAT的核易位

VEGF在添加至人肺静脉内皮细胞(HPVEC)时早在刺激后20分钟就诱导NFATc1核易位[27]。如此，我们希望分析HUVEC中NFATc1核易位的动力学及DSCR1对此过程的干预达到什么程度。内皮细胞的IHC分析揭示了经VEGF刺激的细胞中NFATc1的显著核易位，这在表达DSCR1的细胞中在刺激后20分钟（图2A）及延长温育60和120分钟后（数据未显示）都不存在。据我们所知，这是首次证明活化的原代人内皮细胞中DSCR1与NFATc1之间的功能性干扰，防止NFATc1的核易位。另外，我们通过IHC法研究了在用编码表位标记的DSCR1的载体(Ad-DSCR1-FLAG)或对照载体(Ad-LacZ)经腺病毒转导的内皮细胞中DSCR1的亚细胞定位。与先前的报道一致[7,28,41]，我们检测了在用Ad-DSCR1-FLAG转导后DSCR1的胞质和核定位，这在存在VEGF或

IO/PMA时没有改变（数据未显示）。

丝氨酸苏氨酸磷酸酶CnA对NFATc1的脱磷酸化生成这种转录因子的活化形式，它能够进入细胞核并刺激转录[28]。如此，我们希望将DSCR1对内皮细胞中NFATc1的磷酸化状态的效果与CsA诱导的效果进行比较。与Johnson等人的发现相似[27]，对活化的内皮细胞的细胞提取物的分析证明了应答DSCR1的NFATc1的脱磷酸化形式向磷酸化形式（在图2B中标以“P”）的转变。这些变化与CsA诱导的效果相当，说明CnA的磷酸酶活性得到阻断。另外，DSCR1提高了总的NFATc1蛋白质水平，表明DSCR1表达可能影响NFATc1蛋白质的稳定性。相反，CsA不显著改变NFATc1蛋白质水平，说明CsA与DSCR1之间可能以不同的作用机制来调控CnA活性和NFATc1磷酸化。

DSCR1削弱NFAT的转录活性

使用转化的肿瘤细胞的实验证明了暴露于刺激CnA的化合物诸如IO和PMA的细胞中DSCR1和NFAT转录活性之间的功能性干扰[28]。为了测试这样一种机制是否存在于内皮细胞中，我们瞬时共转染DSCR1的表达载体，并通过分析内皮细胞中的荧光素酶报道基因表达来对NFAT活性水平定量。与CsA诱导的效果相似，DSCR1的表达强烈抑制经PMA、毒胡萝卜素、TNF-α或钙离子载体(calcium ionophore)A23187 [GenBank]刺激的内皮细胞中NFAT驱动的转录（图3A）。DSCR1不显著干扰AP1活性（图3B），证明该效果是对NFAT特异的。

DSCR1抑制活化的内皮细胞上炎症标志物基因的表达

为了研究DSCR1表达升高对CnA靶基因表达的影响，我们用表达DSCR1的腺病毒载体转导内皮细胞并在活化后分析CnA靶基因表达水平。测试的条件包括与VEGF、PMA/IO或毒胡萝卜素及其组合一起温育4小时。通过实时RT-PCR进行的mRNA水平分析揭示了活化的内皮细胞中COX2、E-选择蛋白和TF的显著诱导（图4A）。与先前的报道一致，应答VEGF刺激升高的2倍到3倍显著低于IO/PMA诱导的基因表达升高的10倍到20倍[20]。这些差异可能反映了胞内作用的PMA是相对于结合胞外表达的VEGFR2的VEGF而言CnA信号传导的更有力诱导物。正如本文第一次证明的，DSCR1的表达在经VEGF或IO/PMA刺激的内皮细胞中抑制炎症标志物基因表达。

为了验证RNA水平的这些变化是否与蛋白质水平的改变有关，我们进行了一系列FACS和Western印迹实验。图4B-C所示数据证明了DSCR1对E-选择

蛋白、VCAM-1、TF和Cox-2的下调。TF和Cox-2蛋白质水平应答DSCR1表达的降低在与单独使用CsA时诱导的效果相比时更突出（图4C，分别比较第4和7道与第4和5道及第6和9道与第6和5道）。这些发现证明了DSCR1在活化的人内皮细胞中比CsA更有效的降低数种炎症标志物基因的表达。

接着，我们监测了VEGF靶基因包括DSCR1应答VEGF刺激的表达动力学。正如预期的，GM-CSF、TF、COX-2、VCAM-1和E-选择蛋白RNA水平在VEGF施用后0和2小时之间升高（图5A）。然而，所述诱导是瞬时的，而且与对照未处理细胞相比，在刺激后6和36小时之间逆转成抑制。作为对照，我们分析了Bcl-2应答VEGF刺激的表达，它在整个实验过程中表达一致（图5A和Gerber et al.[3]）。总之，VEGF靶基因表达降低与DSCR1表达水平应答VEGF刺激的升高同时发生。组合的数据支持我们的模型，其中DSCR1可能在活化的内皮细胞中干扰CnA信号传导的负反馈调控环中起作用（图5B）。

使用腺病毒DSCR1的侵扰调控内皮细胞的存活

暴露于应激条件的内皮细胞中Ad-DSCR1引起的DSCR1过表达诱导内皮细胞死亡，正如DSCR1反义构建物的表达降低内源DSCR1。这是在血清饥饿、H_2O_2暴露和PMA/IO处理及在存在胱天蛋白酶抑制剂诸如具体如ZVAD的条件下看到的。

敲低DSCR1诱导NFAT活性和活化的内皮细胞上炎症标志物基因表达

为了测试用siRNA转染内皮细胞的效果，我们使用抗Flag抗体进行了用编码表位标记形式DSCR1 (DSCR1-FLAG)的表达载体共转染的细胞的Western印迹分析。或者，我们使用兔多克隆抗血清评估了DSCR1的内源水平。我们发现在用编码FLAG标记形式(PRKN-DSCR1-FLAG)的表达载体共转染后DSCR1蛋白质表达完全缺失（图6A），表明靶向DSCR1的siRNA有力降低DSCR1表达。正如预期的，我们发现内源DSCR1水平降低了50%至70%，与通过共转染GFP表达载体的细胞的荧光显微镜检术评估的相似转染效率一致（数据未显示）。这些数据说明用siDSCR1瞬时转染内皮细胞有效降低内皮细胞中的蛋白质水平。

接着，我们应用这些条件来调查内源DSCR1水平降低对CnA下游信号传导事件的影响。我们将siRNA与含NFAT结合位点的荧光素酶报道基因构建物瞬时共转染，并用VEGF或PMA/IO活化转染的内皮细胞。用siDSCR1转染的细胞的NFAT活性相对于对照转染细胞（si对照(siControl)）在存在IO/PMA和

VEGF、IO/PMA（图6C）或VEGF（图6D）时都有2倍和3倍提高。与siDSCR1转染细胞相反，siNFATc1转染细胞的NFAT活性有降低，证实了siRNA共转染方法对原代人内皮细胞的有效性（图6C-D）。

最后，我们希望分析敲低内源DSCR1表达对活化的内皮细胞中CnA靶基因表达的影响。为了选择经siRNA转染的细胞，我们将GFP表达载体添加到转染混合物中。GFP+细胞的FACS分析揭示了数种炎症标志物基因的表达在存在siDSCR1的条件下有升高，所述炎症标志物基因包括TF、E-选择蛋白和VCAM-1（图7A），而ICAM-1表达未受显著影响（数据未显示）。相反，用siNFATc1共转染细胞阻断基因表达，说明这种转录因子在活化的内皮细胞中的E-选择蛋白、VCAM-1和TF表达中起关键作用。有趣的是，VCAM-1的基础水平和活化水平都受到siNFATc1的抑制，证明NFATc1在VCAM-1的基础表达中起作用。经VEGF刺激的细胞中siDSCR1诱导炎症基因表达的程度明显低于对PMA/IO刺激细胞观察到的水平（图7A-B）。与其它报告相似[20]，这些发现进一步证明VEGF诱导钙依赖磷酸酶信号传导的潜力相对于药学化合物诸如PMA/IO降低。总之，我们的发现证明DSCR1的内源水平足以抑制经VEGF或其它CnA信号传导激活物刺激的内皮细胞上的炎症基因表达。

讨论

CsA与DSCR1间作用机制的差异

尽管DSCR1和CsA都干扰CnA活性，然而它们在干扰的机制和分子靶物方面有所不同。CsA和其它免疫抑制性药物像FK506通过与特定细胞抑免蛋白(immunophilin)（分别是FKB12和亲环蛋白(cyclophilin) A）形成复合物来抑制钙依赖磷酸酶，而且此复合物结合钙依赖磷酸酶上的多个位点。相反，DSCR1经在NFAT蛋白质中首先鉴定的类似钙依赖磷酸酶相互作用结构域的结构基序直接结合CnA。DSCR1内的这些保守基序表现出具有功能重要性，因为缺乏这些区的截短形式DSCR1在结合CnA方面是缺陷的[7](综述见Rothermel et al.[9])。因此，认为DSCR1直接接触钙依赖磷酸酶的活性位点，可能是通过抑制NFAT和其它磷蛋白底物的接近。

我们分析了它们的作用机制差异是否会转化为不同药理学效果。如图4所示，DSCR1和PMA/IO在经VEGF、毒胡萝卜素或PMA/IO刺激的内皮细胞中显著降低数种NFAT靶基因的表达，包括E-选择蛋白、TF和Cox-2。然而，

由DSCR1诱导的NFATc1基因表达和超磷酸化的降低在与CsA诱导的效果相比时通常更加突出（图4C）。总之，DSCR1对炎症基因表达的抑制效果相对于CsA的增加表现为是由DSCR1干扰内皮细胞中调控炎症事件的其它信号转导途径引起的。或者，差异应答可能是由添加到培养基中的CsA的药理学特性相对于在细胞中表达DSCR1的腺病毒载体的差异引起。

活化的内皮细胞上的DSCR1和炎症基因的调控

CnA和下游转录因子NFAT很可能在发育的血管发生过程中发挥作用。两个NFATc1等位基因都缺陷的小鼠展示出缺陷的主动脉瓣和肺动脉瓣发育及后续胚胎第14.5天左右的死亡，其是充血性心力衰竭的后果[13,15]。缺乏NFATc3和NFATc4的小鼠中的双重敲除实验不削弱瓣发育，但导致胚胎第11天作用的胚胎致死，这是由于血管装配中的泛发缺陷[14]。在两个CnA等位基因都缺陷的胚胎中观察到相似血管表型。这些发现说明CnA信号转导途径不直接调控内皮细胞存活，但对于血管成熟是重要的[29]。支持此想法的是，我们没有检测到内皮细胞存活应答DSCR1水平改变的任何显著变化（数据未显示）。

内皮细胞中DSCR1的负反馈环

在内皮细胞中，受到CsA抑制的许多基因[16,18-20]有独立记载说受到VEGF的调控[16,18-20,30-33]。这些观察结果暗示VEGF可能经由CnA调控这类基因。支持此理论的是，向经VEGF刺激的内皮细胞中添加CsA削弱IL-8、GM-CSF和Cox-2的表达水平[18,32-34]。所有这些基因以瞬时方式受到VEGF的上调，而且延长与VEGF的温育导致它们的下调。我们在内皮细胞中进行的工作指向介导CnA信号传导的一种转录因子NFATc1和抑制性蛋白质DSCR1的伴随上调，其中DSCR1在内皮细胞中产生负反馈环（图5B）。支持此信号传导途径的是，我们在VEGF刺激后2小时发现最高水平的E-选择蛋白、TF、COX-2和VCAM-1表达。相反，处理后6小时，这些基因的表达水平等于或低于未处理对照细胞的水平。在该实验的时程中，DSCR1水平在刺激后的前6小时升高，此后达到平台(plateau)（图5A）。与负反馈一致，VEGF靶基因的表达与DSCR1表达反向相关。

负反馈环的模型进一步预测敲低抑制性成分将导致内皮细胞上的炎症标志物基因的水平升高（图5B）。与此预期一致，靶向内源DSCR1的siRNA实验揭示了活化的内皮细胞上升高的NFAT转录活性（图6C）和CnA靶基因

表达，包括TF、VCAM-1和E-选择蛋白（图7A）。在分析用VEGF处理的内皮细胞时，通过siRNA敲低内源DSCR1导致升高的NFAT活性（图6D）和升高的TF、E-选择蛋白和VE-钙粘着蛋白表达水平（图7B）。总之，VEGF刺激的细胞中诱导的程度不如PMA/IO处理突出，这可能可以用后面的化合物刺激CnA活性的卓越效力来解释。

在其它生物学系统中已经记载了刺激性和抑制剂信号传导事件应答细胞因子刺激的相伴诱导。在淋巴细胞中记载了负反馈环来限制TNF-α或IL-1的延长的刺激的作用。这两种细胞因子都诱导在多种细胞类型中负干扰TNF-α信号传导的胞内衔接分子A20[35]。如此，与A20在TNF-α信号传导中的保护作用相似，我们认为DSCR1能在血管发生因子（例如VEGF）或其它刺激活化内皮细胞延长期间预防血管损伤。

总之，我们在本文中提供了DSCR1在用促炎化合物刺激的内皮细胞上对炎症基因的抑制中的作用的第一手直接证据。考虑到这些基因中的一些（包括Cox-2和TF）作为治疗靶的突出作用，我们的发现指向DSCR1作为新治疗靶来调控血管系统上炎症事件的表达并影响血管完整性的侵扰。

部分参考文献列表

1. Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. Acta Haematol. 2001;106: 148-156.
2. Ferrara N, Gerber H, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med. 2003;9: 669-676.
3. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. J Biol Chem. 1998;273: 13313-13316.
4. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. J Biol Chem. 1998;273: 30336-30343.
5. Shimkets RA, Lowe DG, Tai JT, et al. Gene expression analysis by transcript profiling coupled to a gene database query. Nat Biotechnol. 1999; 17: 798-803.
6. Fuentes JJ, Pritchard MA, Planas AM, Bosch A, Ferrer I, Estivill X. A new human gene from the Down syndrome critical region encodes a prolinerich protein highly expressed in fetal brain and heart. Hum Mol Genet. 1995;4: 1935-1944.
7. Rothermel B, Vega RB, Yang J, Wu H, Bassel-Duby R, Williams RS. A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. J Biol Chem. 2000;275: 8719-8725.
8. Rothermel BA, McKinsey TA, Vega RB, et al. Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98: 3328-3333.
9. Rothermel BA, Vega RB, Williams RS. The role of modulatory calcineurin-interacting proteins in calcineurin signaling. Trends Cardiovasc Med. 2003; 13: 15-21.
10. Crabtree GR, Olson EN. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. Cell. 2002; 109(Suppl): S67-79.

11. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. Annu Rev Immunol. 1997;15: 707-747.
12. Hill-Eubanks DC, Gomez MF, Stevenson AS, Nelson MT. NFAT regulation in smooth muscle. Trends Cardiovasc Med. 2003;13: 56-62.
13. de la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, et al. Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. Nature. 1998;392: 182-186.
14. Graef IA, Gastier JM, Francke U, Crabtree GR. Evolutionary relationships among Rel domains indicate functional diversification by recombination. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98: 5740-5745.
15. Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, et al.. The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. Nature. 1998;392: 186-190.
16. Cockerill GW, Bert AG, Ryan GR, Gamble JR, Vadas MA, Cockerill PN. Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and E-selectin expression in endothelial cells by cyclosporin A and the T-cell transcription factor NFAT. Blood. 1995;86: 2689-2698.
17. Alvarez-Arroyo MV, Yague S, Wenger RM, et al. Cyclophilin-mediated pathways in the effect of cyclosporin A on endothelial cells: role of vascular endothelial growth factor. Circ Res. 2002;91: 202-209.
18. Hernandez GL, Volpert OV, Iniguez MA, et al.. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. J Exp Med. 2001;193: 607-620.
19. Boss V, Wang X, Koppelman LF, Xu K, Murphy TJ. Histamine induces nuclear factor of activated T cell-mediated transcription and cyclosporin A-sensitive interleukin-8 mRNA expression in human umbilical vein endothelial cells. Mol Pharmacol. 1998;54: 264-272.
20. Armesilla AL, Lorenzo E, Gomez del Arco P, Martinez-Martinez S, Alfranca A, Redondo JM. Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor of activated T cells in human endothelial cells: a role for tissue factor gene expression. Mol Cell Biol. 1999;19: 2032-2043.

21. Gerber HP, Kowalski J, Sherman D, Eberhard DA, Ferrara N. Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenograft growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor. Cancer Res. 2000;60: 6253-6258.
22. Quinn-Senger KE, Ramachandran R, Rininger JA, Kelly KM, Lewin DA. Staking out novelty on the genomic frontier. Curr Opin Chem Biol. 2002; 6: 418-426.
23. Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. Gene. 1988;67: 31-40.
24. LeCouter J, Moritz DR, Li B, et al. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. Science. 2003;299: 890-893.
25. Li B, Fuh G, Meng G, et al. Receptor-selective variants of human vascular endothelial growth factor. Generation and characterization. J Biol Chem. 2000;275: 29823-29828.
26. Gille H, Kowalski J, Li B, et al. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. J Biol Chem. 2001;276: 3222-3230.
27. Johnson EN, Lee YM, Sander TL, et al. NFATc1 mediates vascular endothelial growth factor-induced proliferation of human pulmonary valve endothelial cells. J Biol Chem. 2003;278: 1686-1692.
28. Fuentes JJ, Genesca L, Kingsbury TJ, et al. DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. Hum Mol Genet. 2000;9: 1681-1690.
29. Graef IA, Chen F, Crabtree GR. NFAT signaling in vertebrate development. Curr Opin Genet Dev. 2001;11: 505-512.
30. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. J Exp Med. 1990;172: 1535-1545.

31. Clauss M, Weich H, Breier G, et al. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. J Biol Chem. 1996;271: 17629-17634.

32. Kim I, Moon SO, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GY. Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. J Biol Chem. 2001;276: 7614-7620.

33. Kim I, Moon SO, Park SK, Chae SW, Koh GY. Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression. Circ Res. 2001;89: 477-479.

34. Kluger MS, Johnson DR, Pober JS. Mechanism of sustained E-selectin expression in cultured human dermal microvascular endothelial cells. J Immunol. 1997;158: 887-896.

35. Jaattela M, Mouritzen H, Elling F, Bastholm L. A20 zinc finger protein inhibits TNF and IL-1 signaling. J Immunol. 1996;156: 1166-1173.

36. Sanger DR, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of the ascites fluid. Science 1983;219: 983-985.

37. Dvorak, HF, et al., Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am. J. Pathol. 1995;146: 1026-1039.

38. Ermak G. Harris CD. Davies KJ. The DSCR1 (Adapt78) isoform 1 protein calcipressin 1 inhibits calcineurin and protects against acute calcium-mediated stress damage, including transient oxidative stress. FASEB Journal. 16(8):814-24, 2002 Jun.

39. Parry RV. June CH. Calcium-independent calcineurin regulation. Nature Immunology. 4(9):821-3, 2003 Sep.

40. Ryeom S. Greenwald RJ. Sharpe AH. McKeon F. The threshold pattern of calcineurin-dependent gene expression is altered by loss of the endogenous inhibitor calcipressin. Nature Immunology. 4(9):874-81, 2003 Sep.

41. Pfister SC. Machado-Santelli GM. Han SW. Henrique-Silva F. Mutational analyses of the signals involved in the subcellular location of DSCR1. BMC Cell Biology. 3(1):24, 2002 Sep 11.
42. Leahy KP. Crawford DR. adapt78 protects cells against stress damage and suppresses cell growth. Archives of Biochemistry & Biophysics. 379(2):221-8, 2000 Jul 15.
43. Ermak G. Davies KJ. DSCR1(Adapt78)--a Janus gene providing stress protection but causing Alzheimer's disease?. IUBMB Life. 55(1):29-31, 2003 Jan.
44. Vega RB. Yang J. Rothermel BA. Bassel-Duby R. Williams RS. Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity. Journal of Biological Chemistry. 277(33):30401-7, 2002 Aug 16.
45. Detmar, VEGF up-regulates DSCR1: more surprises. Blood (2004), 104: 6-7.

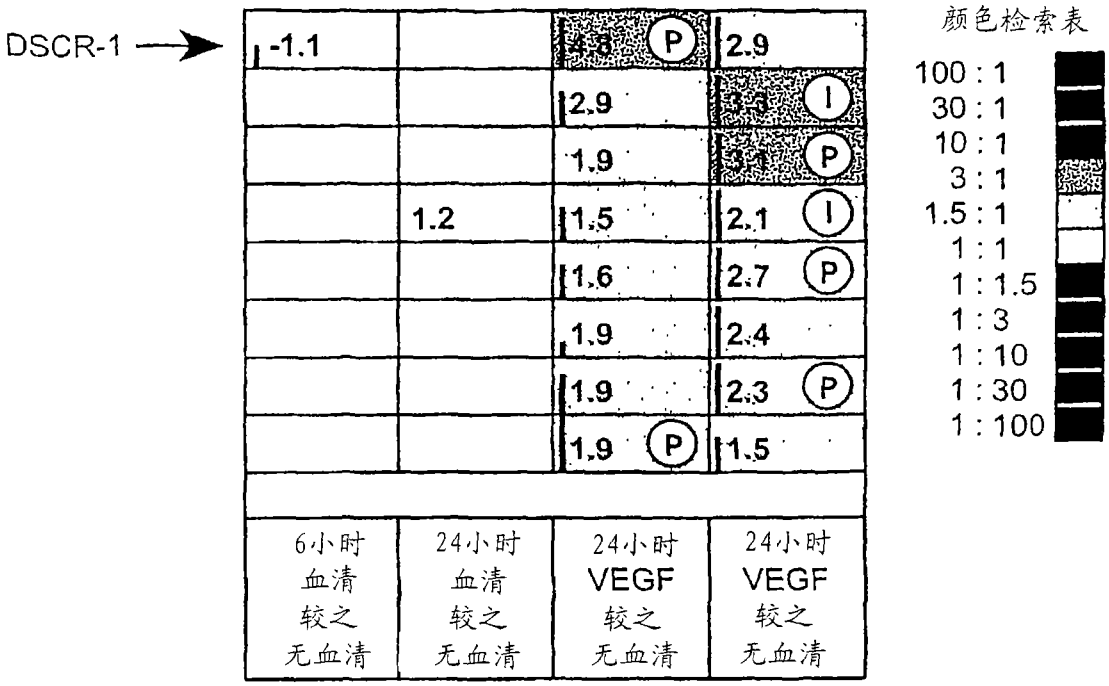

DSCR-1
-1.1
2.9
2.9
1.9
1.2
1.5
2.1
1.6
2.7
1.9
2.4
1.9
2.3
1.9
1.5
6小时 血清 较之 无血清
24小时 血清 较之 无血清
24小时 VEGF 较之 无血清
24小时 VEGF 较之 无血清
颜色检索表
100 : 1
30 : 1
10 : 1
3 : 1
1.5 : 1
1 : 1
1 : 1.5
1 : 3
1 : 10
1 : 30
1 : 100

图 1A

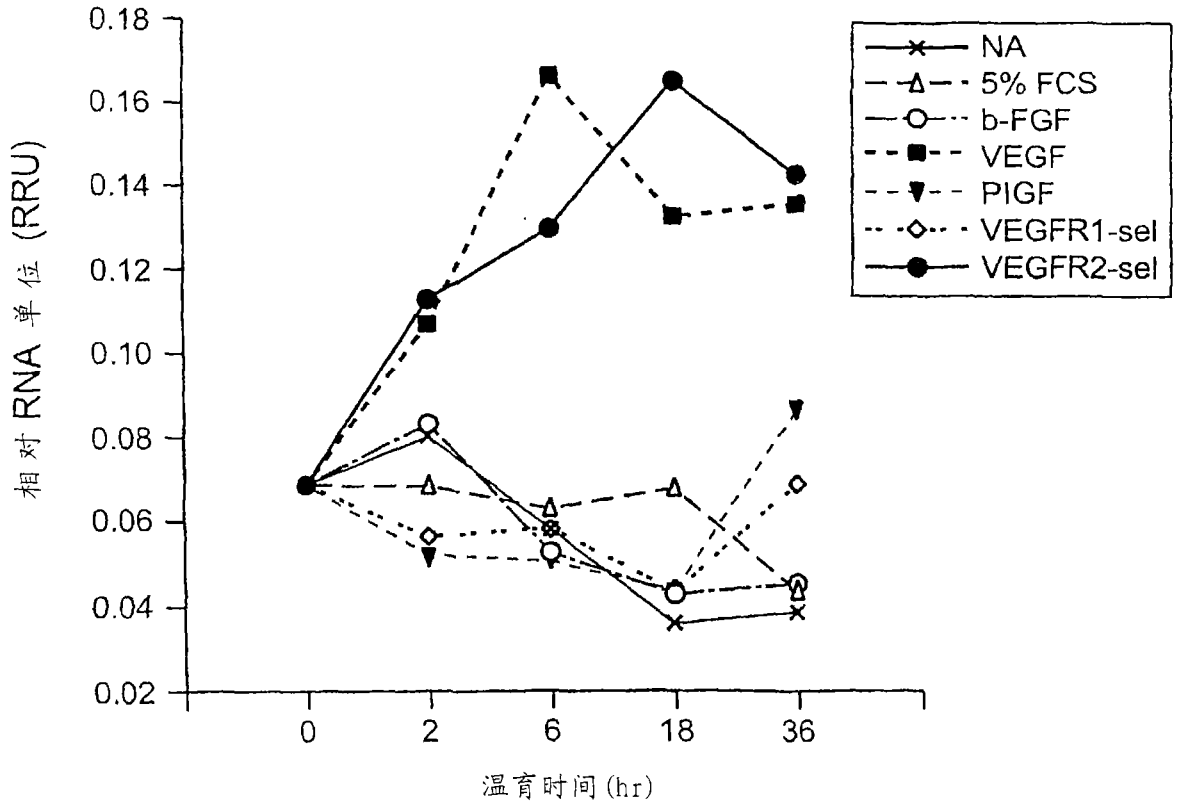

0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
相对 RNA 单位 (RRU)
0
2
6
18
36
温育时间(hr)
NA
5% FCS
b-FGF
VEGF
PIGF
VEGFR1-sel
VEGFR2-sel

图 1B

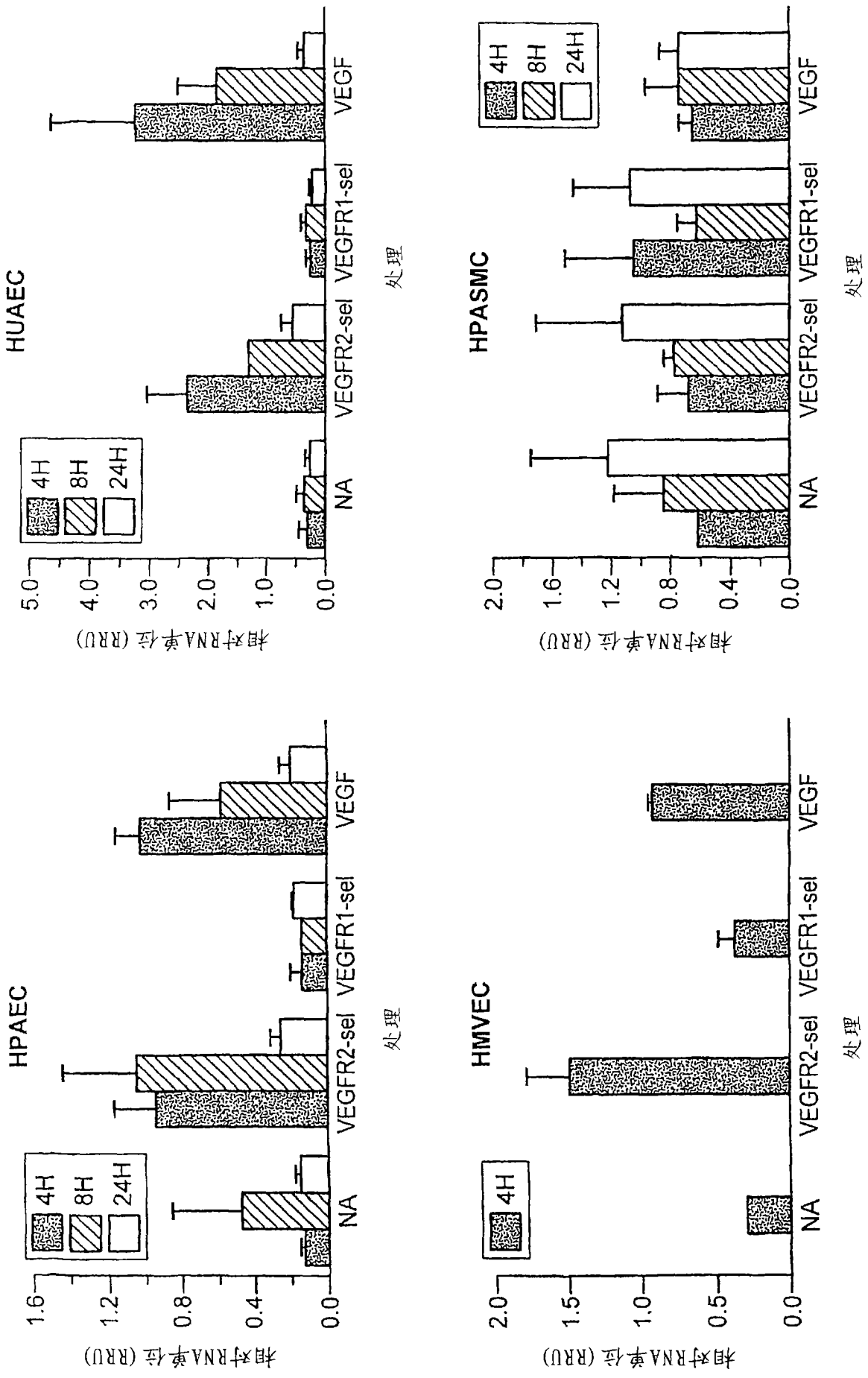

HUAEC
HPASMC
HPAEC
HMVEC
4H
8H
24H
NA
VEGFR2-sel
VEGFR1-sel
VEGF
处理
相对RNA单位 (RRU)
0.0
0.4
0.8
1.2
1.6
2.0
0.5
1.0
1.5
3.0
4.0
5.0

图 1C

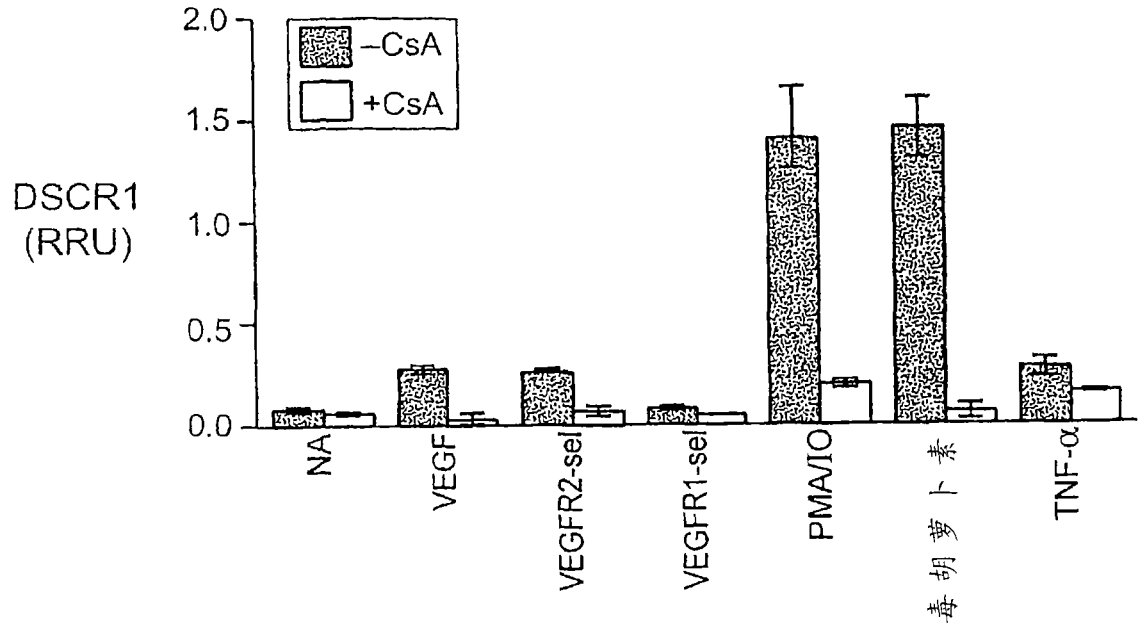

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
DSCR1
(RRU)
-CsA
+CsA
NA
VEGF
VEGFR2-sel
VEGFR1-sel
PMA/IO
毒胡萝卜素
TNF-α

图 1D

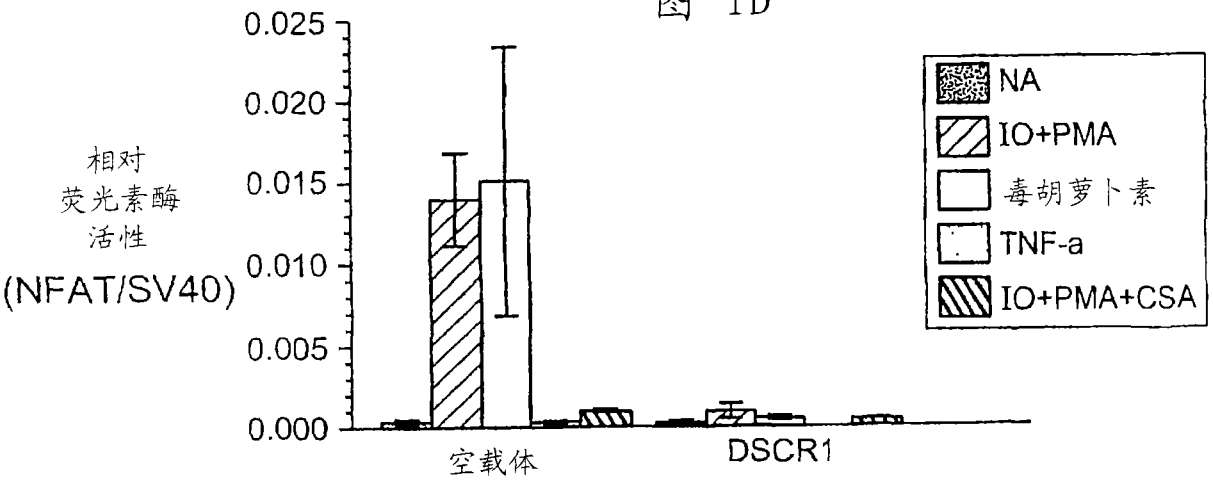

0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
相对
荧光素酶
活性
(NFAT/SV40)
NA
IO+PMA
毒胡萝卜素
TNF-a
IO+PMA+CSA
空载体
DSCR1

图 3A

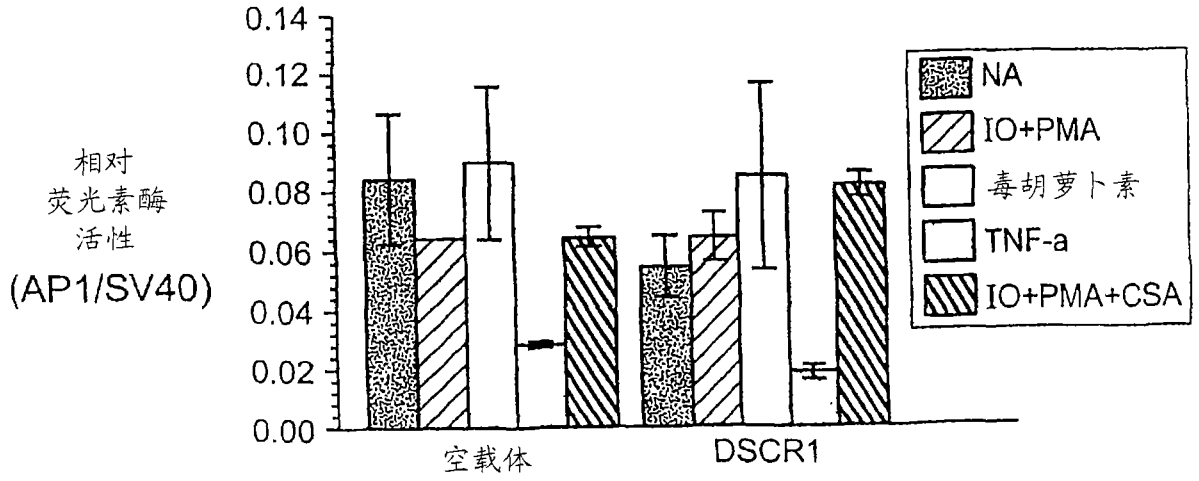

0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
相对
荧光素酶
活性
(AP1/SV40)
NA
IO+PMA
毒胡萝卜素
TNF-a
IO+PMA+CSA
空载体
DSCR1

图 3B

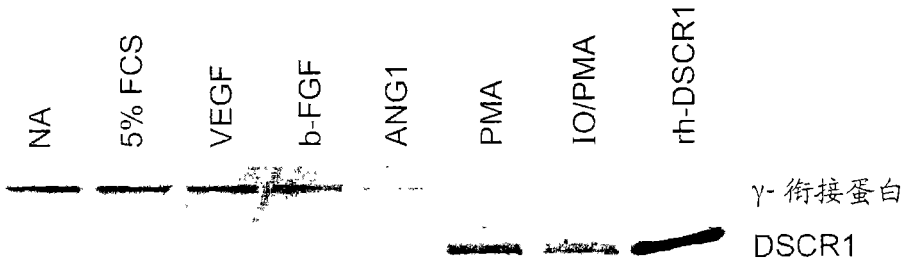

NA
5% FCS
VEGF
b-FGF
ANG1
PMA
IO/PMA
rh-DSCR1
γ-衔接蛋白
DSCR1

图 1E

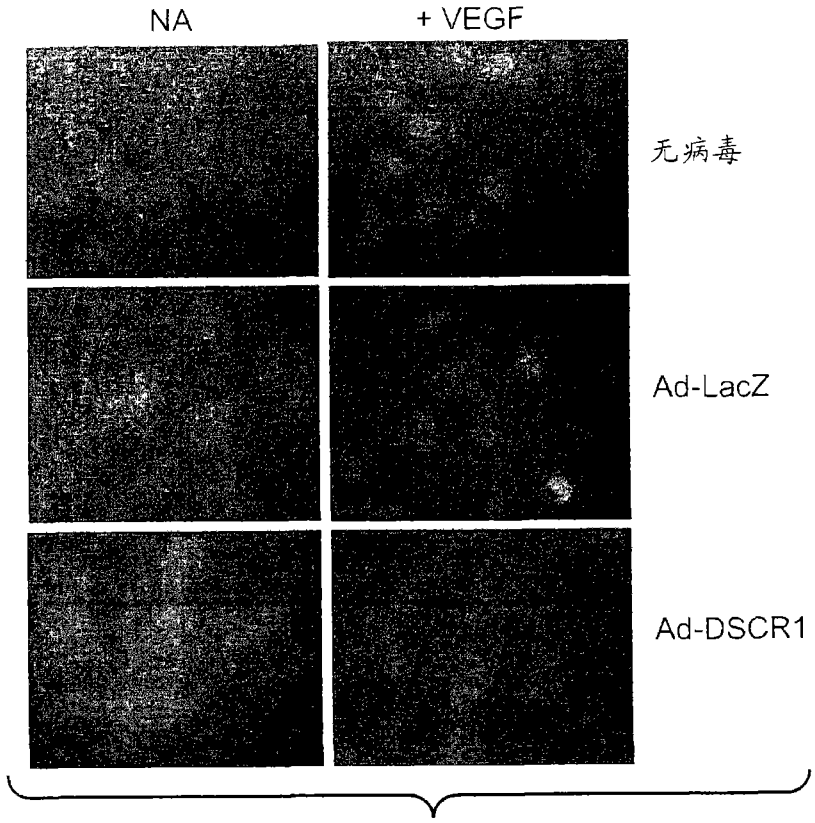

NA
+ VEGF
无病毒
Ad-LacZ
Ad-DSCR1

图 2A

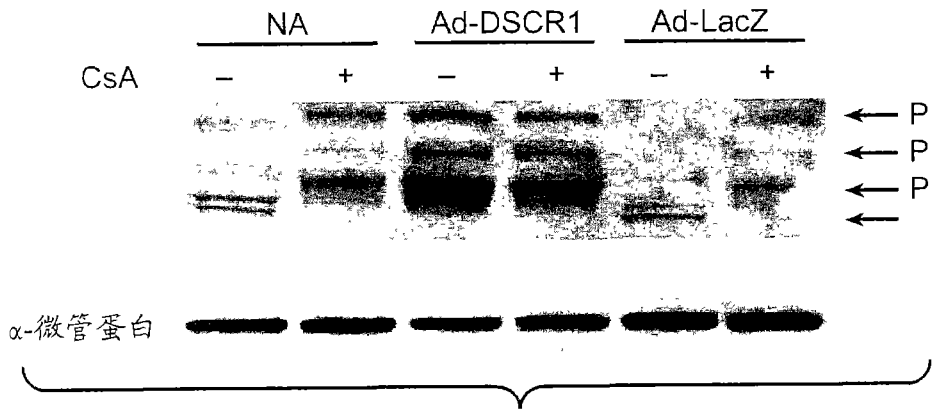

NA
Ad-DSCR1
Ad-LacZ
CsA
–
+
–
+
–
+
P
P
P
α-微管蛋白

图 2B

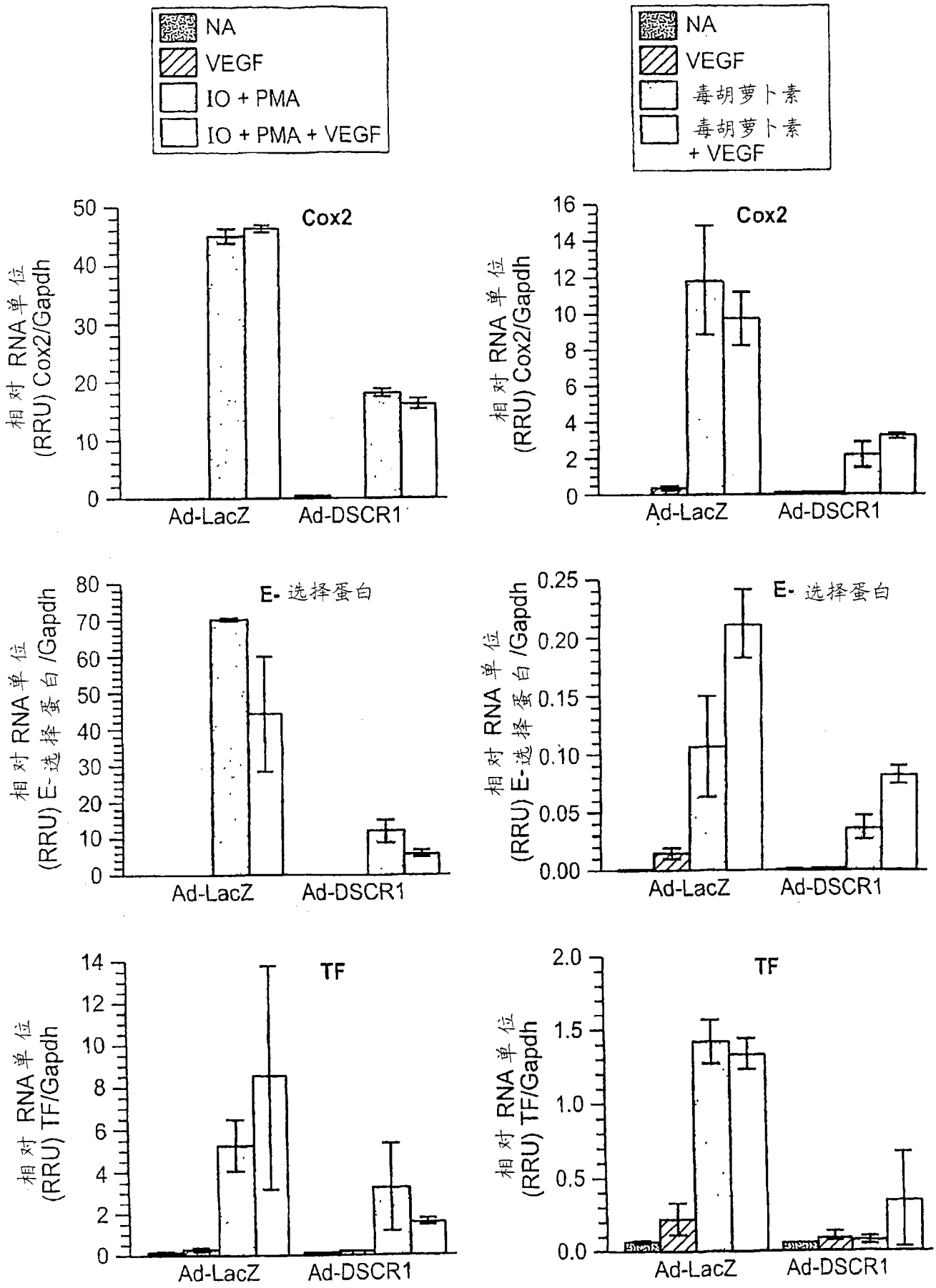

NA
VEGF
IO + PMA
IO + PMA + VEGF
NA
VEGF
毒胡萝卜素
毒胡萝卜素 + VEGF
Cox2
相对 RNA单位 (RRU) Cox2/Gapdh
Ad-LacZ
Ad-DSCR1
E-选择蛋白
相对 RNA单位 (RRU) E-选择蛋白/Gapdh
TF
相对 RNA单位 (RRU) TF/Gapdh

图 4A

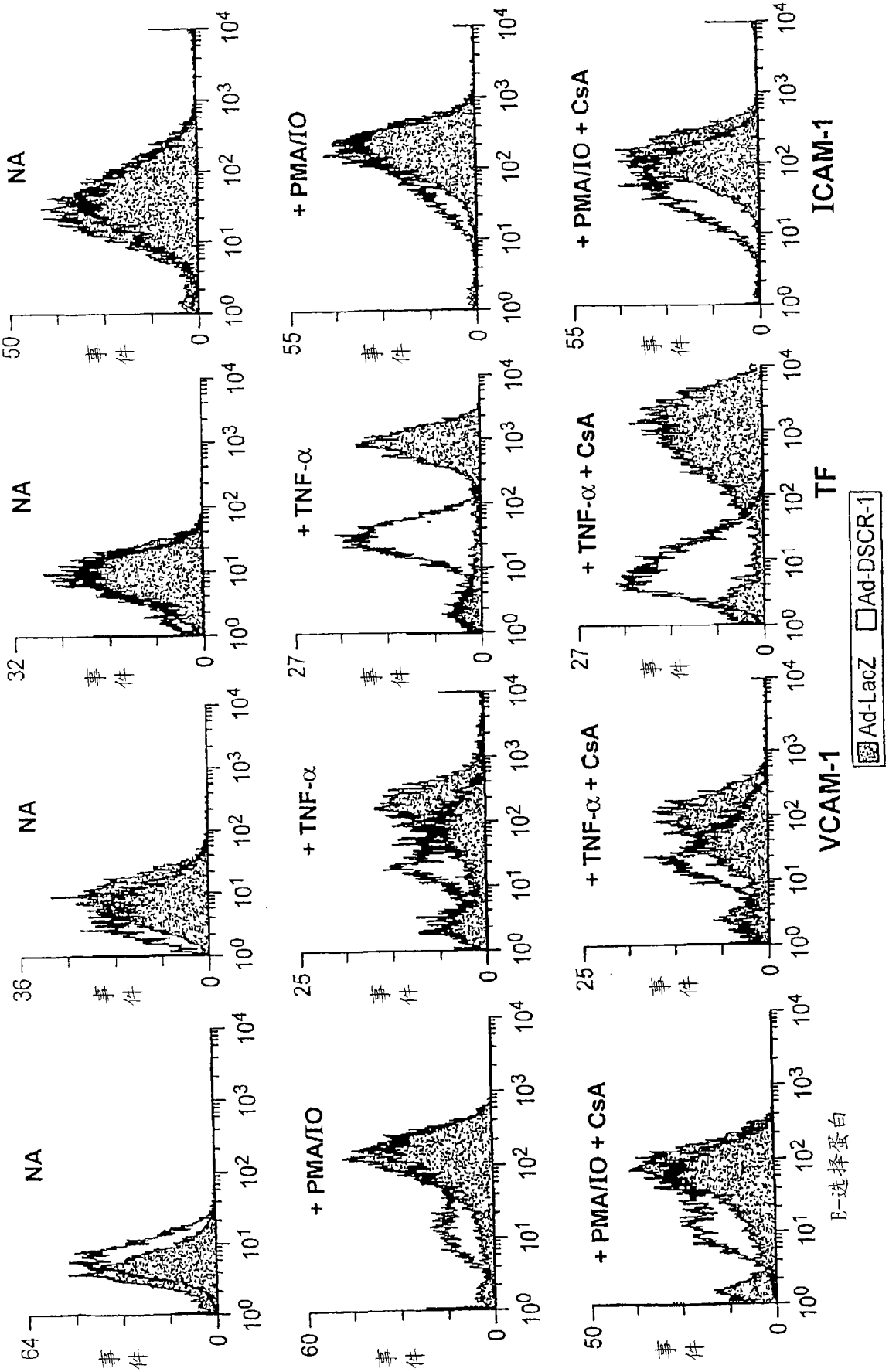

NA
+ PMA/IO
+ TNF-α
+ TNF-α + CsA
+ PMA/IO + CsA
事件
VCAM-1
TF
ICAM-1
E-选择蛋白
Ad-LacZ
Ad-DSCR-1

图 4B

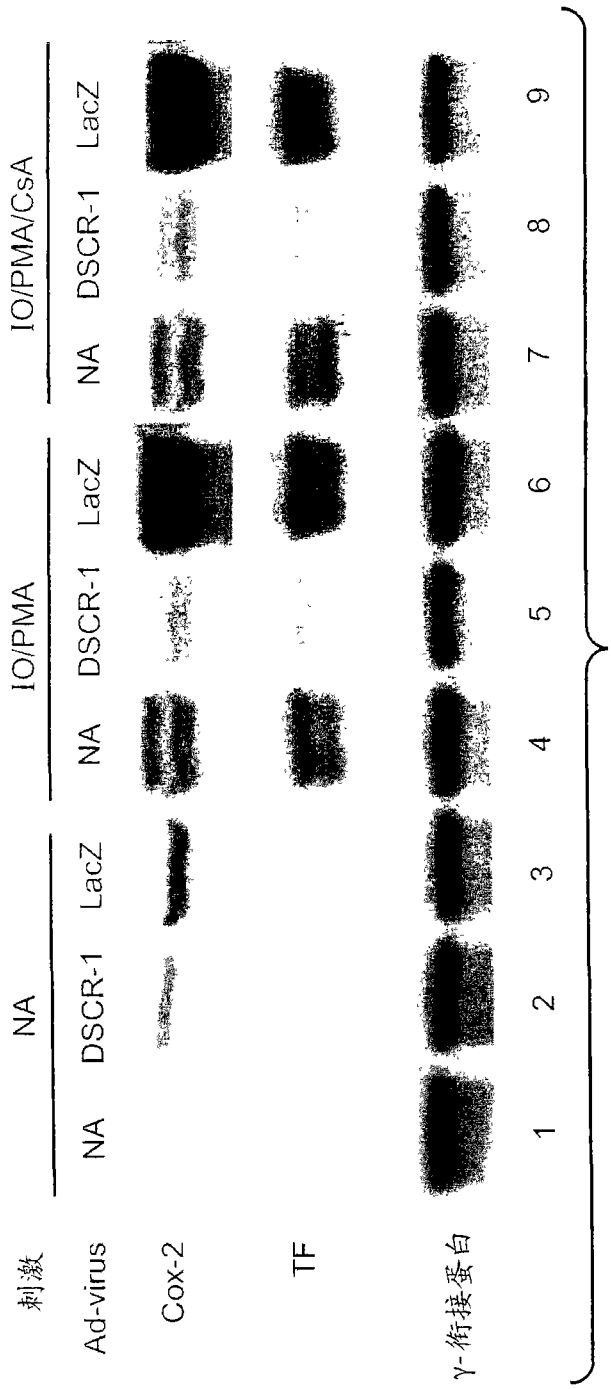

刺激
Ad-virus
NA
NA
DSCR-1
LacZ
IO/PMA
NA
DSCR-1
LacZ
IO/PMA/CsA
NA
DSCR-1
LacZ
Cox-2
TF
γ-衔接蛋白
1
2
3
4
5
6
7
8
9

图 4C

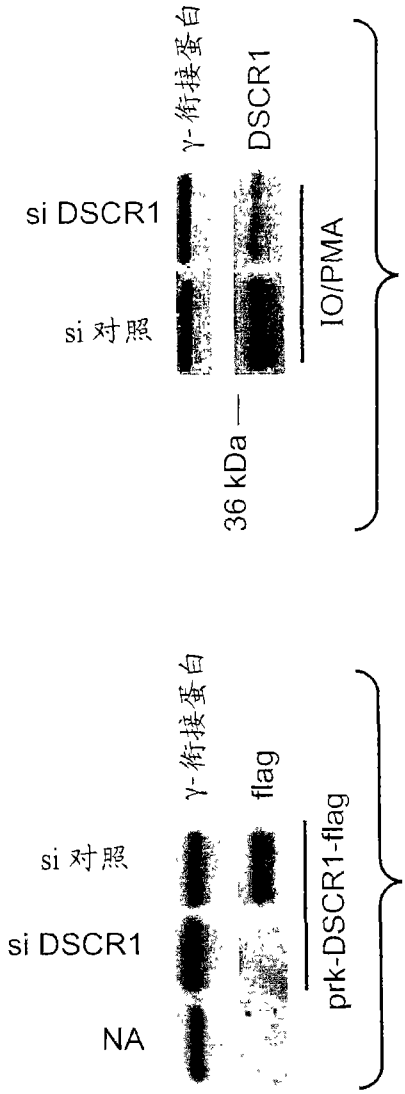

si DSCR1
si 对照
γ-衔接蛋白
DSCR1
36 kDa
IO/PMA

图 6B

NA
si DSCR1
si 对照
γ-衔接蛋白
flag
prk-DSCR1-flag

图 6A

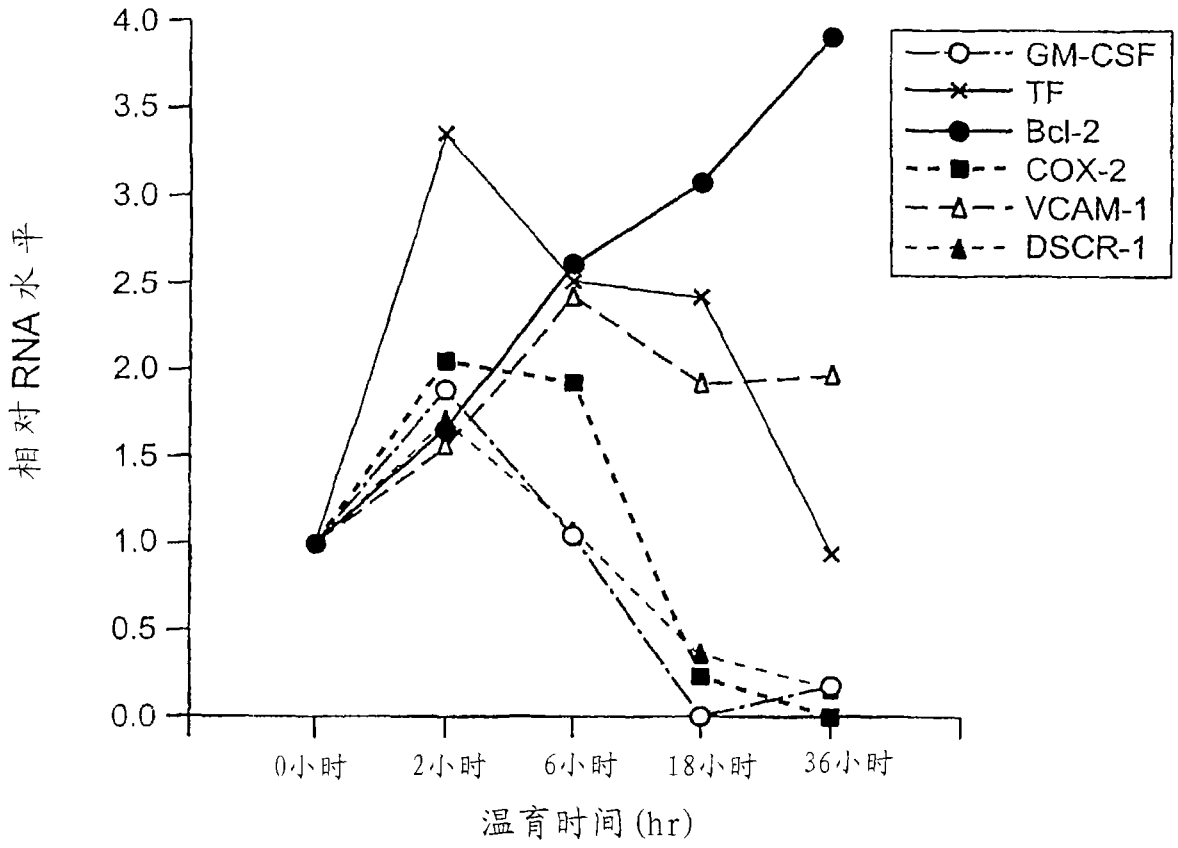

4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
相对RNA水平
GM-CSF
TF
Bcl-2
COX-2
VCAM-1
DSCR-1
0小时
2小时
6小时
18小时
36小时
温育时间(hr)

图 5A

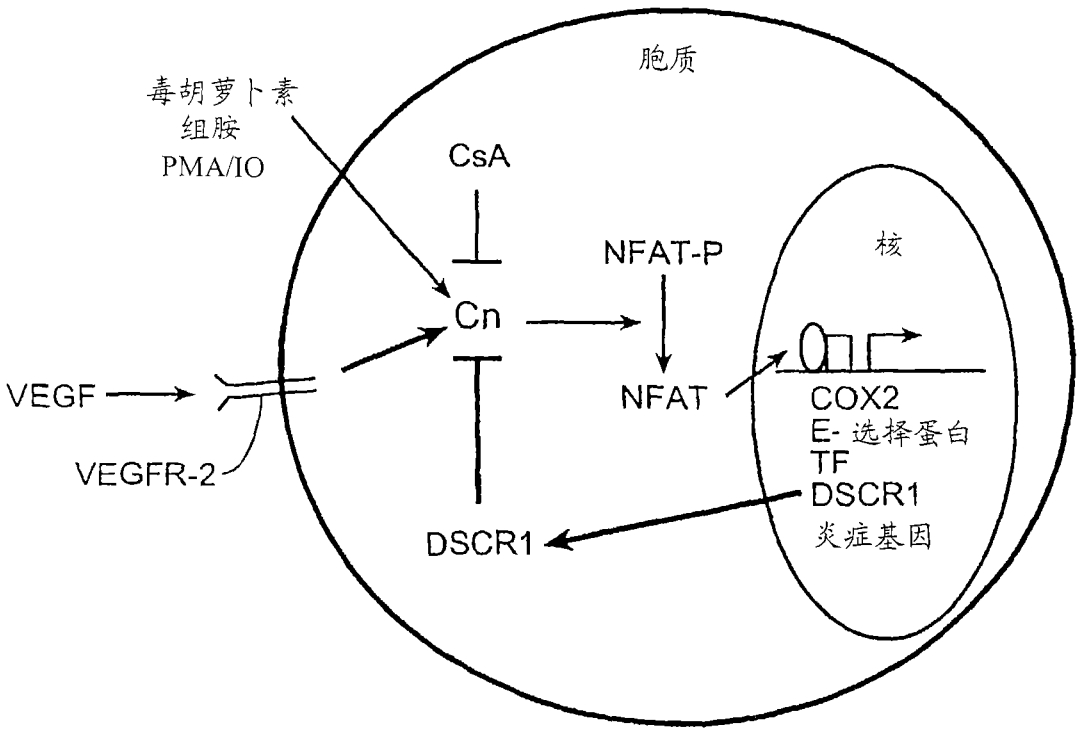

胞质
毒胡萝卜素
组胺
PMA/IO
CsA
NFAT-P
核
Cn
VEGF
NFAT
COX2
E-选择蛋白
TF
DSCR1
炎症基因
VEGFR-2
DSCR1

图 5B

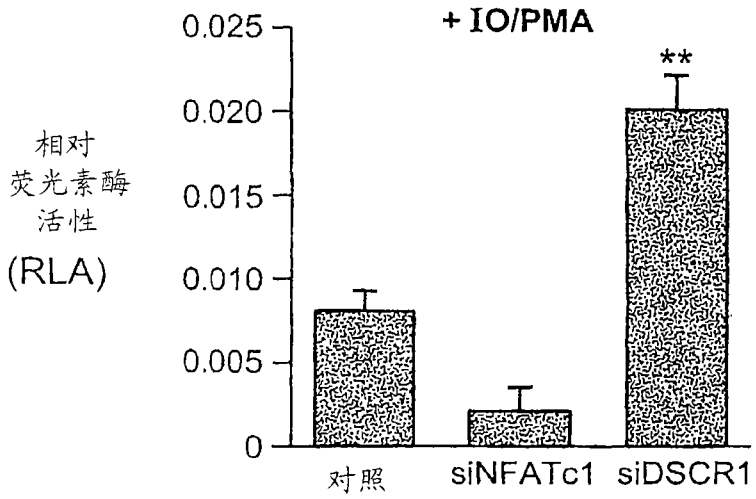


图 6C

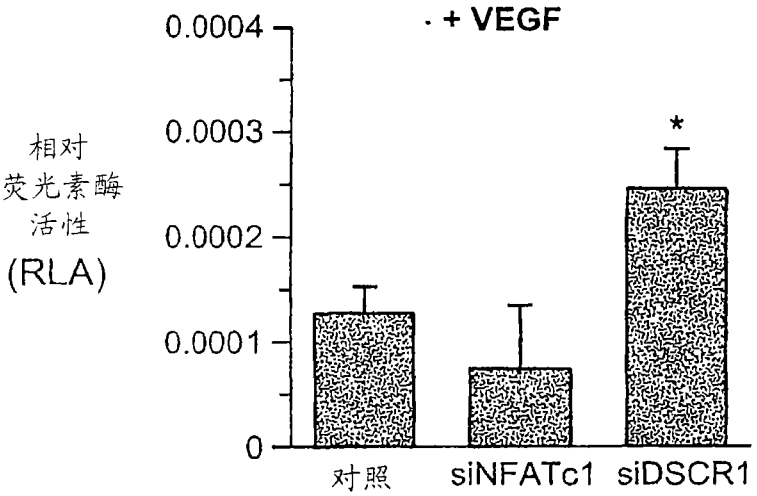


图 6D

MHFRNFNYSFSSLIACVANSDIFSESETRAK
FESLFRTYDKDITFQYFKSFKRVRINFSNPF
SAADARLQLHKTEFLGKEMKLYFAQTLHIGS
SHLAPPNPDKQFLISPPASPPVGWKQVEDA
TPVINYDLLYAISKLGPGEKYELHAATDTTPS
VVVHVCESDQEKEEEEEEMERMRRPKPKIIQT
RRPEYTPIHLS (SEQ. ID NO:1)

图 9

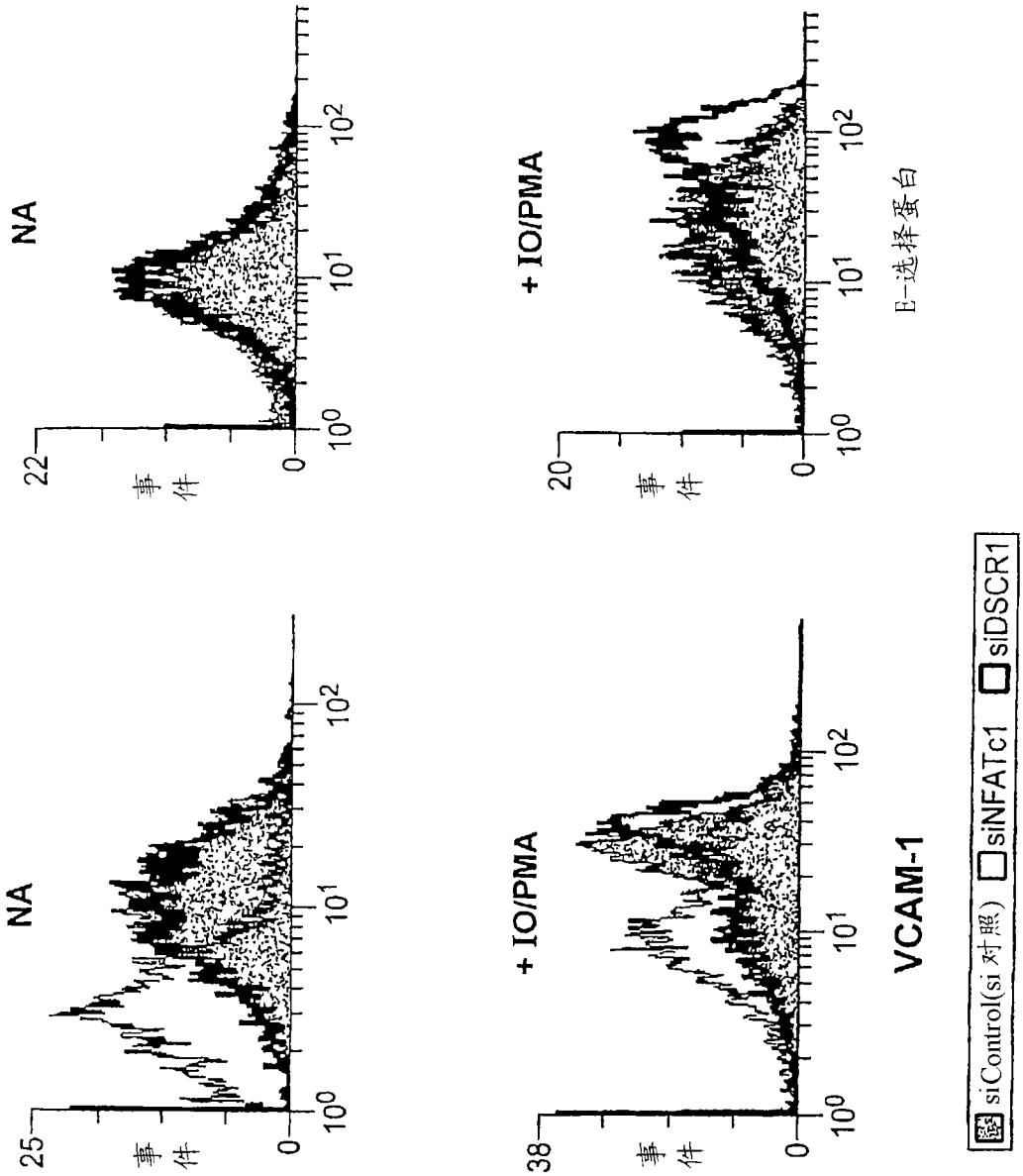


图 7A

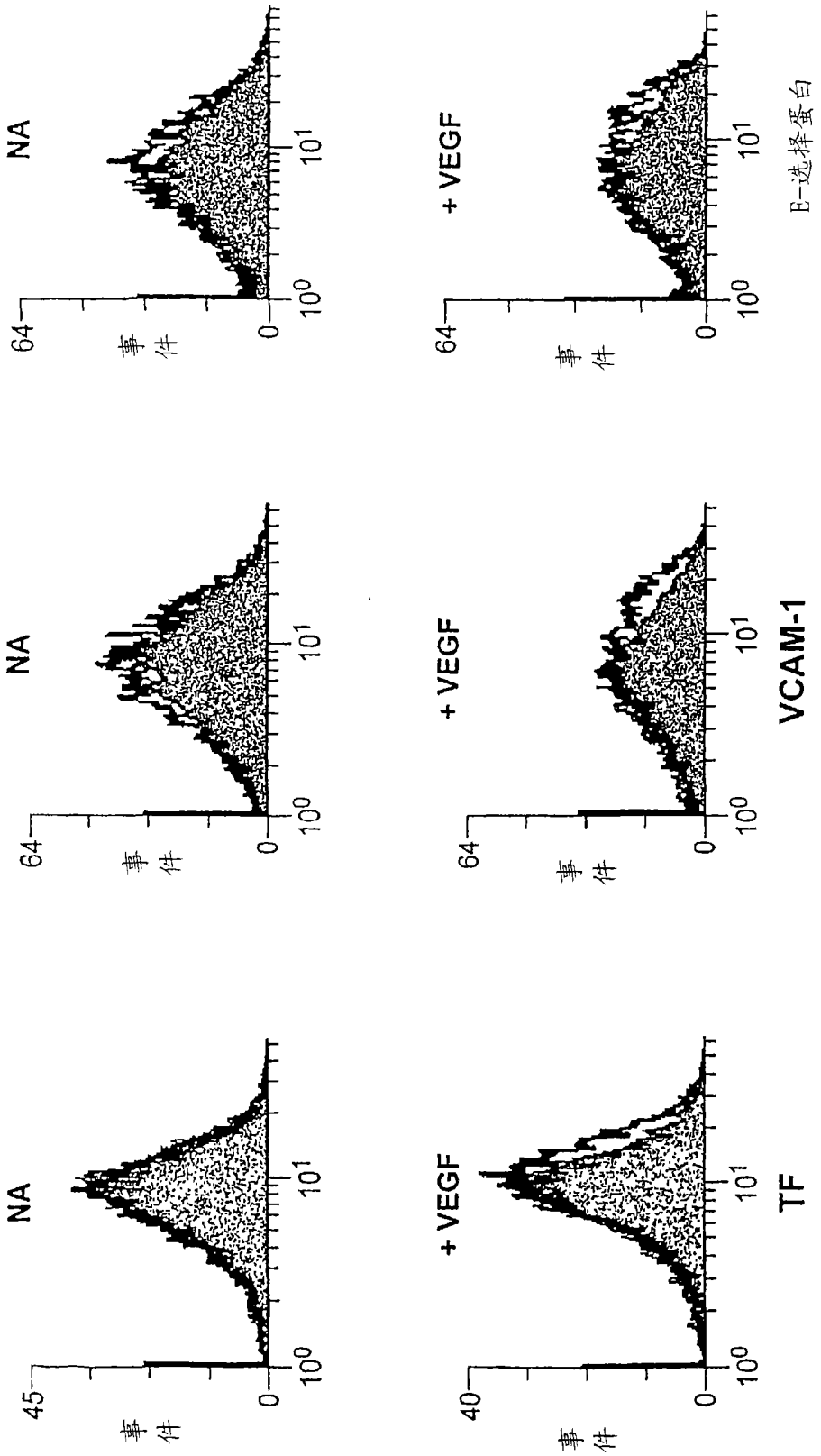

NA
+ VEGF
E-选择蛋白
NA
+ VEGF
VCAM-1
NA
+ VEGF
TF
事件
siControl(si对照)
siDSCR1

图 7B

编码有义或反义 DSCR1 的腺病毒构建物在存在胱天蛋白酶抑制剂 ZVAD 时在血清饥饿后 24 小时降低原代人内皮细胞(HUVEC)的存活

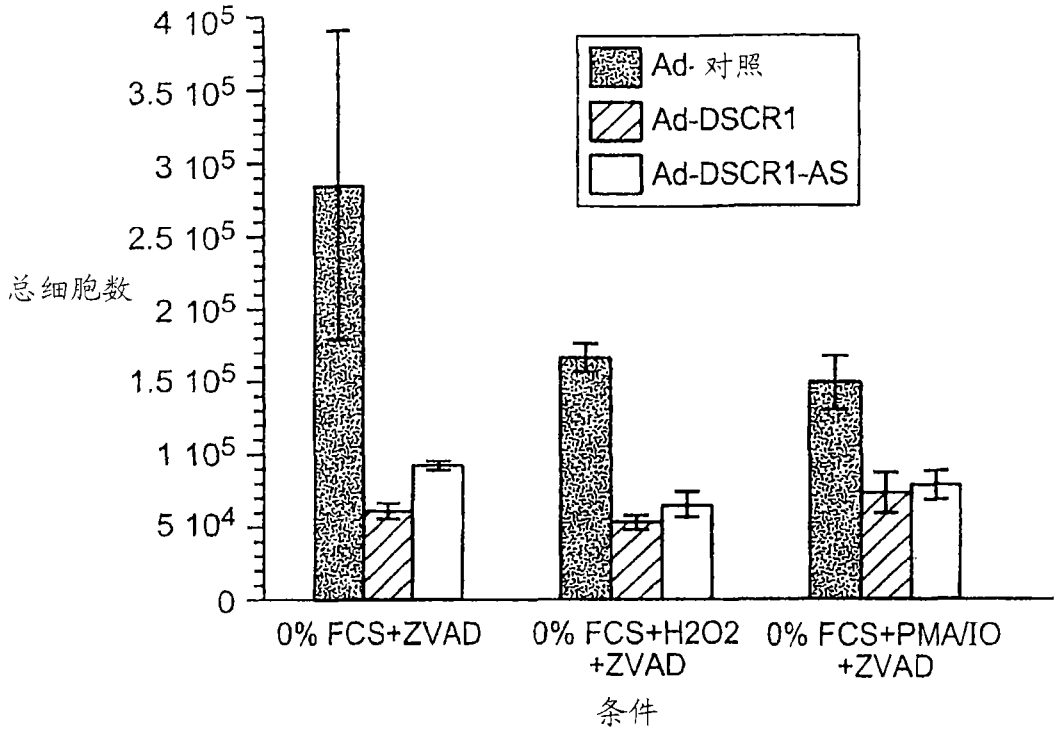


图 8A

编码有义或反义 DSCR1 的腺病毒构建物在血清饥饿后 24 小时降低原代人内皮细胞(HUVEC)的存活

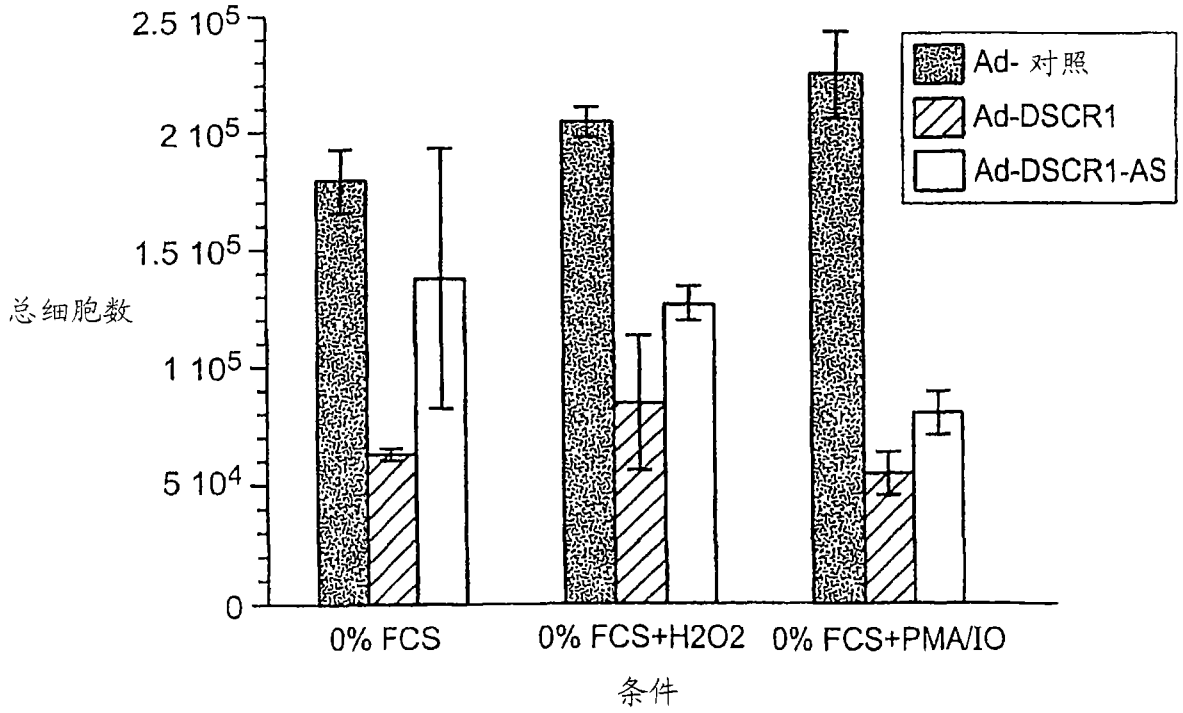


图 8B