

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/52

[12] 发明专利申请公开说明书

A61K 38/19 G01N 33/53

C12N 15/19

[21] 申请号 00802780.3

[43] 公开日 2002 年 3 月 20 日

[11] 公开号 CN 1341120A

[22] 申请日 2000.1.13 [21] 申请号 00802780.3

[30] 优先权

[32] 1999.1.13 [33] US [31] 09/229,304

[86] 国际申请 PCT/CA00/00031 2000.1.13

[87] 国际公布 WO00/42069 英 2000.7.20

[85] 进入国家阶段日期 2001.7.13

[71] 申请人 骨药公司

地址 加拿大安大略

[72] 发明人 彻克·兴·泰姆

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 12 页 说明书 22 页 附图页数 3 页

[54] 发明名称 骨刺激因子

[57] 摘要

增加或促进哺乳动物骨生长的多肽、相关的核苷酸序列、抗体、诊断试剂盒和治疗。多肽 Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Glu Ser 的亚序列表现出促进生长。亚序列包括 Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种多肽，包括：

5 在哺乳动物中促进骨生长的多肽片段，该片段含有选自 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列或者 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:19 的保守变体中的至多 13 个连续的氨基酸。

10 2. 权利要求 1 所述的多肽，其中所述片段含有选自 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列或者 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:19 的保守变体中的至多 12 个连续的氨基酸。

15 3. 权利要求 2 所述的多肽，其中所述片段含有选自 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列或者 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:19 的保守变体中的至多 11 个连续的氨基酸。

4. 权利要求 3 所述的多肽，其中所述片段含有选自 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列或者 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:19 的保守变体中的至多 10 个连续的氨基酸。

20 5. 权利要求 4 所述的多肽，其中所述片段含有选自 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列或者 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:19 的保守变体中的至多 9 个连续的氨基酸。

25 6. 权利要求 5 所述的多肽，其中所述片段含有选自 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列或者 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:19 的保守变体中的至多 8 个连续的氨基酸。

30 7. 权利要求 1、2、3、4、5 或 6 中任一项所述的多肽，其中所述片段具有至少 8 个氨基酸的长度，并包括 SEQ ID NO:18 所示氨基酸序列或其保守变体。

8. 一种多肽，包括：

在哺乳动物中促进骨生长的多肽片段，该片段含有选自 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列中的至多 13 个连续的氨基酸。

5

9. 权利要求 8 所述的多肽，其中所述片段含有选自 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列中的至多 12 个连续的氨基酸。

10

10. 权利要求 9 所述的多肽，其中所述片段含有选自 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列中的至多 11 个连续的氨基酸。

11. 权利要求 10 所述的多肽，其中所述片段含有选自 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列中的至多 10 个连续的氨基酸。

15

12. 权利要求 11 所述的多肽，其中所述片段含有选自 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列中的至多 9 个连续的氨基酸。

13. 权利要求 12 所述的多肽，其中所述片段含有选自 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列中的至多 8 个连续的氨基酸。

20

14. 权利要求 8、9、10、11、12 或 13 中任一项所述的多肽，其中所述片段具有至少 8 个氨基酸的长度，并包括 SEQ ID NO:18 所示氨基酸序列或其保守变体。

25

15. 一种经分离的多肽，包括：

在哺乳动物中促进骨生长的多肽片段，该片段具有主要由 SEQ ID NO:18 所示序列构成的氨基酸序列或其保守变体。

30

16. 一种经分离的多肽，包括：

在哺乳动物中促进骨生长的多肽片段，该片段具有主要由 SEQ ID

NO:18 所示序列构成的氨基酸序列。

17. 前述权利要求中任一项所述的多肽，其中 N 端氨基酸和 C 端氨基酸中的一个或二者均包括保护基。

5

18. 一种在哺乳动物中促进骨生长的第一多肽，含有主要由至多 13 个氨基酸构成的氨基酸序列，并足以重复第二多肽，该第二多肽为权利要求 1 所限定的多肽片段，以致第一多肽由在严格条件下与编码第二多肽的 DNA 杂交的 DNA 所编码。

10

19. 一种在哺乳动物中促进骨生长的第一多肽，包括基本上由至多 12 个氨基酸构成的氨基酸序列，并足以重复第二多肽，该第二多肽为权利要求 2 所限定的多肽片段，以致第一多肽由在严格条件下与编码第二多肽的 DNA 杂交的 DNA 所编码。

15

20. 一种在哺乳动物中促进骨生长的第一多肽，包括基本上由至多 11 个氨基酸构成的氨基酸序列，并足以重复第二多肽，该第二多肽为权利要求 3 所限定的多肽片段，以致第一多肽由在严格条件下与编码第二多肽的 DNA 杂交的 DNA 所编码。

20

21. 一种在哺乳动物中促进骨生长的第一多肽，包括基本上由至多 10 个氨基酸构成的氨基酸序列，并足以重复第二多肽，该第二多肽为权利要求 4 所限定的多肽片段，以致第一多肽由在严格条件下与编码第二多肽的 DNA 杂交的 DNA 所编码。

25

22. 一种在哺乳动物中促进骨生长的第一多肽，包括基本上由至多 9 个氨基酸构成的氨基酸序列，并足以重复第二多肽，该第二多肽为权利要求 5 所限定的多肽片段，以致第一多肽由在严格条件下与编码第二多肽的 DNA 杂交的 DNA 所编码。

30

23. 一种在哺乳动物中促进骨生长的第一多肽，包括基本上由至多 8 个氨基酸构成的氨基酸序列，并足以重复第二多肽，该第二多肽为权利要求 6 所限定的多肽片段，以致第一多肽由在严格条件下与编码第二多肽的 DNA 杂交的 DNA 所编码。

5

24. 权利要求 18-23 中任一项所述的第一多肽，其中所述第一多肽具有至少 8 个氨基酸的长度。

10

25. 一种在哺乳动物中促进骨生长的第一多肽，包括基本上由至多 13 个氨基酸构成的氨基酸序列，并足以重复第二多肽，该第二多肽为权利要求 8 所限定的多肽片段，以致第一多肽由在严格条件下与编码第二多肽的 DNA 杂交的 DNA 所编码。

15

26. 一种在哺乳动物中促进骨生长的第一多肽，包括基本上由至多 12 个氨基酸构成的氨基酸序列，并足以重复第二多肽，该第二多肽为权利要求 9 所限定的多肽片段，以致第一多肽由在严格条件下与编码第二多肽的 DNA 杂交的 DNA 所编码。

20

27. 一种在哺乳动物中促进骨生长的第一多肽，包括基本上由至多 11 个氨基酸构成的氨基酸序列，并足以重复第二多肽，该第二多肽为权利要求 10 所限定的多肽片段，以致第一多肽由在严格条件下与编码第二多肽的 DNA 杂交的 DNA 所编码。

25

28. 一种在哺乳动物中促进骨生长的第一多肽，包括基本上由至多 10 个氨基酸构成的氨基酸序列，并足以重复第二多肽，该第二多肽为权利要求 11 所限定的多肽片段，以致第一多肽由在严格条件下与编码第二多肽的 DNA 杂交的 DNA 所编码。

30

29. 一种在哺乳动物中促进骨生长的第一多肽，包括基本上由至多 9 个氨基酸构成的氨基酸序列，并足以重复第二多肽，该第二多肽

为权利要求 12 所限定的多肽片段，以致第一多肽由在严格条件下与编码第二多肽的 DNA 杂交的 DNA 所编码。

5 30. 一种在哺乳动物中促进骨生长的第一多肽，包括基本上由至多 8 个氨基酸构成的氨基酸序列，并足以重复第二多肽，该第二多肽为权利要求 13 所限定的多肽片段，以致第一多肽由在严格条件下与编码第二多肽的 DNA 杂交的 DNA 所编码。

10 31. 权利要求 1-30 中任一项所述的多肽，其中所述多肽基本上是纯的，其分子量为约 1000~约 4000，或约 1200~3000，或约 1800~，或约 1200~1500。

15 32. 用于预防和治疗骨减少相关疾病的物质，包括权利要求 1-31 中任一项所述的多肽作为活性成分。

33. 促进骨生长的药物组合物，包括治疗有效量的权利要求 1-31 中任一项所述的多肽。

20 34. 通过施给治疗有效量的一种多肽而在哺乳动物中增加骨生长的方法，所述多肽具有权利要求 1-31 中任一项所限定的多肽的氨基酸序列。

25 35. 权利要求 1-31 中任一项所述的多肽用于治疗骨质疏松的用途。

36. 权利要求 1-31 中任一项所述的多肽用于在哺乳动物中促进骨生长的用途。

30 37. 权利要求 1-31 中任一项所述的多肽在药品制备中的用途，所述药品用于促进骨生长或治疗骨质疏松。

38. 用于确定权利要求 1-31 中任一项所述的多肽存在的诊断试剂盒，包括连接到报告系统上的所述多肽的抗体，其中，当预定量的所述多肽和所述抗体结合时，报告系统产生可测的反应。

5

39. 一种经分离的 DNA 片段和一种 DNA，所述经分离的 DNA 片段编码权利要求 1-31 中任一项所述的多肽中任一种多肽的表达，所述 DNA 由于遗传密码子简并而与所述片段有所不同。

10

40. 包括 DNA 序列的载体，所述 DNA 序列编码权利要求 1-31 所述多肽中任一种多肽的表达。

41. 包括异源 DNA 序列的载体，所述 DNA 序列包括权利要求 39 所述的 DNA 片段。

15

42. 产生权利要求 1-31 中任一项所述的多肽的方法，包括：

a) 制备含有编码所述多肽的核苷酸序列的 DNA 片段；

b) 将所述 DNA 片段导入表达载体以获得重组 DNA 片段，该重组 DNA 片段含有所述 DNA 片段并能够复制；

20

c) 用所述重组 DNA 片段转化宿主细胞，以分离可表达所述多肽的转化体；和

d) 培养所述转化体以使转化体产生所述多肽，和从所得的培养混合物中回收所述多肽。

25

说明书

骨刺激因子

5 本申请要求申请日为 1999 年 1 月 13 日的美国专利申请 No.09/229,304 的优先权，后者是在先的美国专利申请 No.09/048,058(申请日为 1998 年 3 月 26 日)的部分继续申请，这两个在先申请皆引入本文做参考。

10 本发明涉及能刺激骨生长的多肽。

 对有关骨生长和强度的问题在过去的几年中有了进一步的理解。例如，在国际专利申请 No.PCT/CA94/00144(1994 年 9 月 15 日公开，公开号为 94/20615)、国际专利申请 No.PCT/CA96/00653(1997 年 4 月 3 日公开，公开号为 WO97/12036)、美国专利 No.5320970 和欧洲专利申请 No.92302446(1992 年 9 月 23 日公开，公开号为 505210)中有这方面的概述。将这些申请的内容在此引入本文做参考。

 下面描述本发明的背景。嗜中性粒细胞活化性肽(NAP-2; SEQ ID NO:1)和 NAP-2 的变体(在此称作“NAP-2V”(SEQ ID NO:2)为人们所知已有一段时间了(Walz, A.和 M.Baggiolini, 1989, 生化与生物物理研究通讯(Biochem. Biophys. Res. Commun.), 159: 969)。英国专利 No. 2231872(英国专利 2231872, 发明人为 M.Baggiolini, K.J.Clemetson 和 A.Walz, 1990 年 6 月 14 日公布)描述了 NAP-2 的氨基酸序列及 3 个显然天然存在的变体, 包括 NAP-2V。另外两个变体在 NAP-2 序列的 N 末端多出四个(SEQ ID NO:3)和三个(SEQ ID NO:4)氨基酸。NAP-2 是 β -血小板球蛋白(β -TG; SEQ ID NO:5)的亚序列, β -TG 在 N 末端多出 11 个氨基酸, β -TG 本身是结缔组织活化性肽(CTAP-III; SEQ ID NO:6)的亚序列, CTAP-III 在 N 末端多出 4 个氨基酸, 是血小板碱性蛋白(PBP; SEQ ID NO:7)的亚序列, PBP 在

N 末端多出 9 个氨基酸。

5 NAP-2 与白细胞介素-8 (人 IL-8; SEQ ID NO:8; 猪 IL-8 SEQ ID NO:9) 和黑素瘤生长刺激活性 (MGSA) 一起, 被指定为已知的 α -趋化因子的亚家族。通常, 在高度保守的位置, α -趋化因子彼此带有 4 个半胱氨酸残基, 其内含分子的核心区, 如 Brandt 等描述的那样 (Ehlert, J.E., F.Peterson, M.H.G. Kubbuta, J.Gerdes, H.D.Flad 和 E.Brandt, 1995. 生物化学杂志 (J.Biol. Chem) 270: 6338)。Brandt 等发现一个显然天然存在的 C 末端截短的 NAP-2 变体, 其缺少了 NAP-2 的后面 4 个氨基酸, 刺激嗜中性白细胞脱粒的效力增强。Brandt 等还合成了缺少 NAP-2 的 C 末端最后 1 个、2 个、3 个、5 个和 6 个氨基酸的变体。所有这些 C 端截短的多肽, 效力比 NAP-2 适度增加, 只具有 NAP-2 前面 64 个氨基酸的序列除外。对于 NAP-2 的结构及其功能, Brandt 等对序列修饰的可能意义进行了讨论。

15 血小板因子 4 (PF4; SEQ ID NO:10) 为一 70 个氨基酸的多肽 (Hermanson, M., G.Schmer 和 K.Kurachi, 1977, 生物化学杂志 (J.Biol. Chem), 252: 6276; Morgan, F.J., G.S.Begg, C.N.Chesterman, 1979, Tromb. Haemost. 42:1652)。PF4 表现出对两种成骨骨肉瘤细胞系增生的抑制, 这两种细胞系为 Saos-2 和 G-292 (美国专利号为 No.5304542, 发明人: D.M.Takakis, 1994 年 4 月 19 日出版)。吲哚美辛明显地不影响由 PF4 诱导的对细胞增生的抑制。特定片断 PF4 (58-70)、PF4 (47-70) 以及单体低亲合力 PF4 (LAPF4) 也被认为是有作用的, LAPF4 与 PF4 有 50%的同源性并包含 α 螺旋的 C 末端。因此, 在抑制成骨细胞增生的方法中, PF4 和这些有关的多肽是有用的, 尤其是用于患骨质疏松症的人。

25 NAP-2V 的前 70 个氨基酸与 PF4 的序列有大约 51%的同源性, 4 个半胱氨酸的位置在两个多肽中是保守的。

5 早先结果显示，NAP-2、NAP-2V 以及 NAP-2V 的某些亚序列，
表现骨刺激作用，同时某些亚序列不表现骨刺激活性。发现 NAP-2V-
(1-26) (SEQ ID NO:11) 和 NAP-2V-(13-26; gln²⁵→glu²⁵)(SEQ ID NO:12)
提高骨敷着速率，后者的作用比前者更大，NAP-2V-(10-26) (SEQ ID
NO:13) 引起所观察的骨的敷着速率小量提高，尽管这种所观察到的提
高的统计学意义值得怀疑。NAP-2V-(11-26) (SEQ ID NO:14) 和 NAP-
2V-(12-26) (SEQ ID NO:15) 对骨矿物质敷着速率没有作用。

10 依照本发明，发现受到保护的 NAP-2V-(13-26; gln²⁵→glu²⁵) (SEQ
ID NO:17) 和 NAP-2V-(15-22) (SEQ ID NO:18) 具有骨刺激活性。

因此，本发明中的多肽包括：

15 促进哺乳动物骨生长的多肽片段，该片段含有选自 SEQ ID
NO:12、SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列或者 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID
NO:19 的保守变体的至多 13 个连续氨基酸。

20 另一方面，本发明是这样一个多肽，其中所述片段包含选自 SEQ ID
NO:12、SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列或者 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID
NO:19 的保守变体的至多 12 个连续氨基酸。

所述片段也可包含选自 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:19 所示氨基
酸序列或者 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:19 的保守变体的至多 11、10、
9 或 8 个连续氨基酸。

25 要指出的是，氨基酸序列 SEQ ID NO:19 是一个对应于 SEQ ID
NO:12 的 14 个氨基酸的序列，但是它直接以天然存在的序列如 SEQ ID
NO:2 为基础。

30 多肽从其中获得活性的氨基酸序列优选长度至少为 8 个氨基酸。
该序列优选是 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:19 (或者是其 N 末端和/或

C 末端得到保护的形式) 的亚序列, 或者其经保守替换的变体。最优选地, 亚序列包含 SEQ ID NO:18 (在此是指氨基酸序列本身) 或者其经保守替换的变体。更加优选地, 亚序列为 SEQ ID NO:18。

5 另一方面, 本发明是一个多肽, 包括: 促进哺乳动物骨生长的多肽片段, 该片段包含选自 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列的至多 13 个连续氨基酸。

10 这种多肽的片段可以包含选自 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列的至多 12 个连续氨基酸, 或者含有选自 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列的至多 11、10、9 或 8 个连续的氨基酸。

15 优选地, 该片段至少为 8 个氨基酸的长度, 且包括 SEQ ID NO:18 或其保守变体所示氨基酸序列。

20 另一方面, 本发明是一个经分离的多肽, 包括促进哺乳动物骨生长的多肽片段, 该片段具有主要由 SEQ ID NO:18 或其保守变体所示序列组成的氨基酸序列。经分离的多肽优选包括在哺乳动物中促进骨生长的多肽片段, 该片段具有主要由 SEQ ID NO:18 所示序列组成的氨基酸序列。

25 本发明的多肽的 N 末端或 C 末端或两端的氨基酸可以带有保护基团。

30 另一方面, 本发明被限定为第一多肽, 它在哺乳动物中促进骨生长, 包括基本上由至多 13 个氨基酸组成的氨基酸序列, 并足以重复第二多肽, 第二多肽为如上所述的多肽片段, 因此第一多肽是由在严格的条件下与编码第二多肽的 DNA 杂交的 DNA 编码的。

这样的第一多肽可以主要由至多 12、11、10、9 或 8 个氨基酸组成，长度优选至少为 8 个氨基酸。

5 优选地，本发明的多肽基本上是纯的，其分子量为约 1000~约 4000，或约 1200~3000，或约 1800~，或约 1200~1500。

本发明包括一种物质，用于预防和治疗与骨减少相关的疾病，它包括上述的本发明的多肽。

10 本发明包括促进骨生长的药物组合物，包括有效治疗量的本发明多肽。

本发明包括一种通过给予有效治疗量的本发明多肽而增加哺乳动物骨生长的方法。

15 本发明包括使用本发明的多肽以治疗骨质疏松。

本发明包括使用本发明的多肽以促进哺乳动物骨生长。

20 本发明包括在药品制备中使用本发明的多肽，所述药品用于促进骨生长或治疗骨质疏松。

25 本发明包括一个诊断试剂盒，用于确定本发明多肽的存在，包括针对连接到报告系统上的所述多肽的抗体，其中，当预定量的多肽和抗体结合在一起时，报告系统产生可检测的反应。

30 本发明包括一个经分离的 DNA 片段和 DNA，所述经分离的 DNA 片段编码本发明任一多肽的表达，所述 DNA 由于遗传密码的简并性而不同于该片段。

本发明包括一个包括 DNA 序列的载体，它可表达地编码本发明的多肽。

本发明包括产生本发明多肽的方法，包括：

- 5 a) 制备 DNA 片段，其中含有编码所述多肽的核苷酸序列；
- b) 将所述 DNA 片段导入到表达载体中，以获得重组 DNA 片段，
该重组 DNA 片段包含所述 DNA 片段并能进行复制；
- c) 用所述重组 DNA 片段转化宿主细胞，以分离能够表达所述多肽的转化体；和
- 10 d) 培养所述转化体以使转化体产生所述多肽，和从产生的培养混合物中回收所述多肽。

本发明包括从本发明任一多肽“衍生”的化合物。

- 15 因此，本发明包括一种多肽，其中氨基酸序列主要包括：
- (I) 对应于 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列；
- (II) 包含多数所述氨基酸序列的(I)的多肽的变体；或
- (III) (I)或(II)的多肽的经保守替换的变体。

- 20 由 Walz 等公开的 NAP-2V 的 DNA 序列（英国专利 No.2231872，
发明人：M.Baggiolini, K.J.Clemetson 和 A.Walz，1990 年 6 月 14 日发表，嗜中性白细胞活化性肽-2 和产生 NAP-2、B-TG、CTAP-III 及 PBP 的过程）在此定为 SEQ ID NO:16。

- 25 短语“选择性杂交”是指，当具有预定序列的分子（即第二多肽）
存在于制备的 DNA 或 RNA 制备物中，在适当严格的杂交条件下，核酸分子主要只是在彼此间杂交、成双或结合。对于核酸分子设计和退火条件的讨论，参看如 Sambrook 等，分子克隆：实验室手册（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）（第二版），1-3 卷，Cold Spring Harbor
30 实验室（1989）；或分子生物学中的现代方法（Current Protocols in

Molecular Biology), F.Ausabel 等编, Green Publishing and wiley-interscience, 纽约 (1987)。

“严格的杂交条件”对于本领域的技术人员, 是用了它的一般含义。促进核酸杂交的适当严格条件, 例如, $6\times$ 氯化钠/柠檬酸钠 (SSC) 大约 45°C , 已为本领域的技术人员所知, 下面的例子是在分子生物学现代方法中发现的 (Current Protocols in Molecular Biology, John Miley & Sons, NY(1989), 6.3.1-6.3.6): 对于 50ml 第一个适合的杂交液, 混合 24ml 甲酰胺、12ml $20\times$ SSC、0.5ml pH 7.6 的 2M Tris-HCl、0.5ml $100\times$ Denhardt's 溶液、2.5ml 去离子水、10ml 50%硫酸葡聚糖及 0.5ml 10% SDS。第二个适合的杂交液可以是 1%结晶 BSA(组分 V)、1 mM EDTA、0.5 M pH 7.2 的 Na_2HPO_4 、7% SDS。清洗步骤中盐浓度可以选自从低严格的 $2\times$ SSC、 50°C 到高严格的 $0.2\times$ SSC、 50°C , 这两种洗液都可含 0.1% SDS。另外, 清洗步骤中的温度, 可以从室温 (大约 22°C) 下的低严格条件提高到高严格条件 (大约 65°C), 所列参考文献提供更详细的说明, 但合适的清洗严格程度依赖于同源性程度和探针的长度。如果同源性为 100%, 可以使用高温 ($65^{\circ}\text{C}\sim 75^{\circ}\text{C}$), 如果同源性低, 则必须使用较低的清洗温度。然而, 如果探针很短 ($<100\text{bp}$), 即使 100% 同源, 也必须使用较低的温度。一般地, 在低温 ($37^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$) 下开始清洗, 并以 $3\text{-}5^{\circ}\text{C}$ 的间隔提高温度, 直到背景足够低而不在放射自显影中成为主要因素。

本发明包括许多被制成具有本发明多肽的氨基酸序列的嵌合骨刺激因子。

另一方面, 本发明是一种用于预防和治疗与骨缩减相关的疾病的物质, 包括本发明的任一 (些) 多肽作为活化成分。

本发明包括使用该多肽或这些多肽制备药物, 该药物用于促进骨生长或治疗骨质疏松。

本发明包括应用由 SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:13 或者其经保守替换的变体所示氨基酸序列组成的多肽合成的抗体。

5 附图说明

图 1 说明对于用化学合成的多肽注射的大鼠，所观察到的骨矿物质敷着速率 ($\mu\text{m}/\text{天}$)。所述化学合成的多肽的序列为 SEQ ID NO:17 (第二柱)、SEQ ID NO:18 (第三柱)，对照为 (第一柱)。误差为 ± 1 S.E.。

10 图 2 说明对于用标明数量的 SEQ ID NO:18 所示多肽注射的大鼠，骨矿物质敷着速率 ($\mu\text{m}/\text{天}$) 的剂量依赖性。误差为 ± 1 S.E.。

图 3 说明所测多肽的氨基酸序列，其对应于相互对比的氨基酸，活性肽显示在线条上方，未被发现刺激骨生长的序列显示在线条下方，大致的分子量显示在序列识别号的下方。

15 材料、方法和结果

早先发现，序列与 SEQ ID NO:1、2、11、12 或 13 相符合的多肽刺激骨生长。

20 所做试验确认，带有序列 SEQ ID NO:17 和 18 的多肽序列具有骨刺激活性。根据本领域的技术人员已知的标准方法，直接化学合成这些多肽。带有序列 SEQ ID NO:12 的多肽，以前已显现具有骨刺激活性，分别在赖氨酸-苏氨酸之间和赖氨酸-天冬酰胺之间，存在两个易受肽酶纤溶酶切割的位点。

25

9 只雌性的 Sprague-Dawley 大鼠 (平均重量大约 300 克)，分成三组，每组 3 只。第一组 (对照组) 的每一只大鼠，注射 400 μl 缓冲液 (50mM 醋酸钠，调 pH 为 4.5)，随后立刻注射 200 μl 1M 盐酸四环素溶液，每种溶液经肌内给药至臀大肌。第二组大鼠，同样地每只注射 400 μl 缓冲液，其中含 100 纳摩尔化学合成的多肽，其序列为 SEQ ID

30

NO:17, 随后立刻注射 200 μ l 1M 盐酸四环素溶液。第三组大鼠每只注射 400 μ l 缓冲液, 其中含 100 纳摩尔化学合成的多肽, 其序列为 SEQ ID NO:18, 随后立刻注射 200 μ l 1M 盐酸四环素溶液。

5 约 48 小时后, 给每只大鼠施用第二剂四环素盐酸, 再过大约 24 小时, 大鼠用二氧化碳麻醉致死。

10 将右股骨下干骺端切片用于测定骨矿物质敷着速率。解剖后立刻将骨样品放入 10% pH 7.4 的甲醛溶液中固定。同日晚些时候, 用 1: 1 的水-丙酮溶液更换甲醛溶液, 第二天用丙酮更换两次, 再过一天用 1: 1 的丙酮-Spurr 氏介质溶液更换, 当日晚些时候用 Spurr 氏介质更换。第二天, 每一样品包埋入新换的 Spurr 氏介质中, 60 $^{\circ}$ C 下烘烤 24 小时, 随后 80 $^{\circ}$ C 烘烤 24 小时。

15 使用配备了装有金刚石的刀片的 Leltz 锯型切片机, 将每个干块切成 400 μ m 厚的切片。在两个预先用金刚沙粉糙化的磨砂玻璃板之间, 将相对厚的切片最后磨削成大约 10 μ m 厚, 用水作为润滑剂。弄干薄切片, 在 Permout(Fisher)中封固, 且未被沾污。

20 用 Leltz 扫描光学显微镜光度计 MPV-CD 放大切片 16 倍来进行测定, 如国际专利申请 No.PCT/CA94/00144 中所述, 所得结果见表 1 和图 1。

表 1: 骨敷着速率 (μ g/天) 算术平均数的组间比较, 各组施用的多肽为 SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、对照溶液, 见图 3

	对照	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
平均数	1.256 μ m/天	1.859 μ m/天	2.406 μ m/天
标准误差	0.06	0.10	0.25
样本数	3	3	3

在另一套试验中，评估了所测定的骨矿物质敷着速率对多肽（SEQ ID NO:18）量的剂量依赖性。28 只雌性 Sprague-Dauley 大鼠（平均重量大约 300 克）分成 7 组，每组 4 只。大鼠的处理如前一套试验所述，待测多肽的量除外，改变为：25、50、100、200、400 和 800 纳摩尔，

5

表 2：骨敷着速率（ $\mu\text{m}/\text{天}$ ）对多肽（SEQ ID NO:18）量的剂量依赖性							
	对照	25 纳摩尔	50 纳摩尔	100 纳摩尔	200 纳摩尔	400 纳摩尔	800 纳摩尔
平均数	1.320	1.686	1.753	1.907	2.209	2.123	2.139
标准误差	0.04	0.08	0.03	0.03	0.08	0.06	0.03
样本数	4	4	4	4	4	4	4

如图 1 所示，氨基端和羧基端受到保护的 NAP-2V-(15-22)（SEQ ID NO:18）比类似保护的 NAP-2V-(13-26; $\text{gln}^{25} \rightarrow \text{glu}^{25}$)（SEQ ID NO:17）具有更大的骨刺激活性。

10

序列 NAP-2V-(15-22)或 NAP-2V-(13-26; $\text{gln}^{25} \rightarrow \text{glu}^{25}$)都未保留 cys^{10} 和 cys^{12} 残基。所有这些 NAP-2V 亚序列缺失母体 NAP-2V 中存在的 cys^{36} 和 cys^{52} 。早先观察到的 NAP-2V-(10-26)、NAP-2V-(11-26)和 NAP-2V-(12-26)活性下降，有可能是由于自发形成分子间二硫键，阻止了骨刺激效应所需的多肽-受体相互作用，但这点还不确定。

15

NAP-2V-(13-26; $\text{gln}^{25} \rightarrow \text{glu}^{25}$)的序列与相应的 NAP-2V 的亚序列在 25 号位置上不同，谷氨酸残基代替了谷氨酰胺残基。当然希望，带有 NAP-2V 中同样的谷氨酰胺残基的亚序列在哺乳动物中也刺激骨生长。

20

已经假定 NAP-2 包含两个内部的二硫键，分别处在 Cys-5 与 Cys-31, 及 Cys-7 与 Cys-47 之间(Baggiolini, M., Clemetson, K.J., Walz, A., 国

际专利申请 No.PCT/EP89/01389, 1990 年 6 月 14 日公布, 公开号 WO90/06321)。扩展一下, 此处公开的带有相应的半胱氨酸残基的序列和亚序列在其间可能有类似的连接。

5 思想不受限制, 当然就会理解, 有可能进行多种其它氨基酸的替换, 同时保持起此处公开的 NAP-2V 亚序列的骨刺激作用的结构。保守替换在专利文献中已经描述, 例如, 美国专利 No.5264558。因此就希望, 比如, 非极性脂肪族中性氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸和异亮氨酸)之间可以互换。同样, 极性脂肪族中性氨基酸(丝氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺)之间可以替换, 带电荷的酸性氨基酸(天冬氨酸和谷氨酸)之间可以替换, 带电荷的碱性氨基酸(赖氨酸和精氨酸)也可以替换。芳香族氨基酸之间的替换也是有可能的, 包括苯丙氨酸、组氨酸、色氨酸和酪氨酸。这类替换和互换为本领域的技术人员所熟知。其他的替换很有可能。所带氨基酸序列可与 SEQ ID NO:17 或 SEQ ID NO:18 的序列对比及与其同源性小于 100%的肽, 至少可以保留部分骨刺激效应。当然也希望, 更大的同源性百分比, 如 70%、80%、90%或更大, 能够提高保留骨刺激活性的程度。

20 此处所用的“序列同一性或同源性”是指两个多肽分子之间或两个核酸分子之间序列的相似性。比如, 两个相比较的多肽序列的某个位置被相同的氨基酸占据时(例如, 如果两个多肽分子的某个位置是丙氨酸), 那么在这个位置上这两个分子是同源的或者两个序列是一致的。两个分子间同源性的百分比或两个序列间的序列同一性是一个函数, 即两个序列共有的这些匹配的位置数除以相比较的位置数再乘上 100。例如, 两个序列中 10 个位置有 6 个是相同的, 那么这两个序列 60%是同源的, 或者具有 60%的序列同一性。通过举例, 多肽序列 METLIA 和 MPTWIF 享有 50%同源性或序列同一性。一般地, 两个序列对比到给出最大同源性时才进行比较。

30

在两个序列间比较序列和确定同源性百分比，可以用数学算法来完成。可以根据两种方法进行序列对比，即 Clustal 方法和 J.Hein 的方法，其中 Clustal 的方法是优选的。

5 推荐 Clustal 算法（如此处应用的，软件来自 DNASTAR 公司，1228 South Park Street, Madison, Wisconsin, USA 1994），用于对比序列，这些序列的相似性可以不必是进化的。该算法由 Higgins, D.G.等介绍（1989, CABIOS 5:151）。同样的软件程序根据 Jotun Hein 的方法提供用于对比序列，推荐它用来对比具有清楚的进化关系的经高度演变的家族的序列。该算法述于 Hein J., 1990, Methods in Enzymology 183: 10 626。使用程序默认设置（标准参数）。在根据进化替换方式、电荷、结构和化学相似性加权氨基酸的情况下，使用 PAM250 默认设置。为了蛋白序列对比，成对的对比参数为：Ktuple=1, Gap penalty =3, Window=5，并使用 Diagonals Saved =5。

15

就一个或多个氨基酸的缺失受到关注而论，任何序列的每个末端缺失少量氨基酸是可能的，结果，由得到 SEQ ID NO:14 和 15 的缺失所产生的多肽不表现出增强骨生长。

20

在序列末端增加氨基酸是很有可能做到的，而且与缺失一样，有可能在显现骨刺激活性的序列的羧基和氨基末端对称或近似对称地增加。

25

针对降解的可能性，就象在存在蛋白酶时在体内会发生降解一样，可能要改进本发明的多肽，比如，保护多肽的 C 末端、N 末端或 C 末端和 N 末端都保护。

30

如此处所用的，“受保护的”末端氨基基团是指加上了各种可用于肽合成中的氨基末端保护基团中任一种的末端氨基基团（N 末端）。合适的基团例子包括酰基保护基团，例如，甲酰基、乙酰基、苯甲酰

基、三氟乙酰基、琥珀酰基和甲氧琥珀酰基；芳香族氨基甲酸酯保护基团，如苄氧羰基；脂肪族氨基甲酸酯保护基团，如叔丁氧羰基或金刚烷氧羰基(Gross 和 Mienhofer 编, The Peptides, 3 卷, 3-88 页(Academic Press, New York, 1981)) 。

5

如此处所用的，“受到保护的”末端羧基基团是指加上各种羧端保护基团的末端羧基基团(C 末端)。对本领域的技术人员，很显然，合适的基团包括叔丁基、苄基或其它可接受的基团，其通过酯键或醚键连到末端羧基基团上。

10

此发明范围内的化合物可以化学合成，方法为本领域已知，例如，固相肽合成方法。合成从肽的羧基末端起始，使用 α -氨基保护的氨基酸。可以使用叔丁氧羰基(Boc)保护基团，或其它合适的保护基团(Stewart 等，“固相肽合成”(Solid-Phase Peptide Synthesis)，W.H.Freeman Co., 旧金山(1969)；Merrifield, J.Am.Chem.Soc. 85:2149-2154(1963)；Vale 等, Science 213,1394-1397(1981)；及 Marke 等, J.Am.Chem.Sci. 103,3178(1981))。合成方法在 M.Bodansky 编著的《肽合成原理》(Principles of Peptide Synthesis, Spring-Verlag 1984)一书中也有介绍。肽合成的这些方法和其它方法也由美国专利举例说明，专利号为 No.3862925、3842067、3972859、4105602、4683291、4244946 和 4305872。

15

20

25

化合物也可以用人工或自动化技术进行合成，例如，实用的生物系统 430A 肽合成仪(Foster 市，加利福尼亚)或 Biosearch SAM 11 全自动肽合成仪(Biosearch Inc., San Rafael, 加利福尼亚)。

30

从具有特定氨基酸序列的多肽中“衍生”出的化合物，是任何分子实体，与该多肽一致、基本同源或者功能或结构与该多肽等价。因此，从特定多肽衍生出的分子，可以包含该多肽的氨基酸序列、该多肽的任何部分或者其他对刺激骨生长起作用的分子实体。来自这样一

个键合域的分子，将模仿衍生此分子的多肽。这些分子实体可以包括肽模拟物等等。

“肽模拟物”即是在与受体分子相互作用中作为肽的替代物起作用的（参见 Morgan 等（1989）*Ann.Reports Med. Chem.* 24: 243-252, 肽模拟物综述）。如此处所用的，肽模拟物包括合成的结构，它们可以包含或不包含氨基酸和/或肽键，但保留衍生它们的肽的结构和功能特性。术语“肽模拟物”还包括类肽或寡聚类肽，是 N-替换的氨基酸构成的肽或寡聚体（Simon 等（1972），*Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 89: 9367-9371）。肽模拟物进一步包括肽文库，其为所设计具有给定氨基酸长度并代表与之相应的氨基酸所有可以想象到的序列的肽的集合。

在多肽的规定长度上，至少大约 85%（优选地至少大约 85%到 90%，而最优选地至少大约 95%）的核苷酸或氨基酸匹配时，两个多肽序列“基本同源”。如此处所用的，基本同源还指与特定多肽序列一致的序列。

在结构和功能上模仿此处描述的具有骨刺激活性的多肽的肽模拟物，也将在此找到用处，而且可以用下面的策略和方法产生。一般地，通过用 D-氨基酸系统取代 L-氨基酸、用甲基基团或具有不同电学性质的假等排基团取代侧链部分（参见 Hruby 等（1990）*Biochem. J.* 268: 249-262）以及用酰胺键系统取代上述肽抑制剂中的肽键，获取信息资料，在此基础上设计模拟物。例如，含有酰胺键替代物的类似物，可以用于检查肽的结构和功能，例如骨架中的旋转自由度、分子内和分子间的氢键方式、局部和整体极性、疏水性的改变、口服的生物利用率。

局部构象限制也可引入，以确定具有骨刺激活性的潜在肽模拟物的活性的构象要求，例如， β,β -分布的氨基酸可以用来考查构象限制对肽活性的影响（参见，如 Manning 等（1982）*J.Med. Chem.* 25: 408-414;

Mosberg 等 (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 506-512; Pelton 等 (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 236-239)。

模拟物可以包括电子等排的酰胺键，如 ψ [CH₂S]、 ψ [CH₂NH]、 ψ [CNH₂]、 ψ [NHCO]、 ψ [COCH₂]和 ψ [(E) 或 (Z) CH=CH] (综述参见, Spatola(1983), 选自《氨基酸、肽和蛋白的化学与生物化学》(Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins), 第七卷 (Weinstein 编著), Marcel Dekker, New York, 267-357)。合成的分子还可以包括 D-氨基酸, 以稳定或促进转角构象, 帮助稳定分子不被酶降解, (参见, 如, Freidinger 等 (1985), 选自《肽: 结构与功能》(Peptides: Structure and Function) (Deber 等编著), Pierce Chem Co., Rockford, III, 549-552; Sawyer 等 (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5754-5758; Torchiana 等 (1978), Arch. Int. Pharmacol. Ther, 235: 170-176)。环形的氨基酸类似物可用来迫使氨基酸残基成特定的构象状态, 例如, α,α' -和 β,β -替换的环形氨基酸如 1-氨基环戊烷甲酸 (环亮氨酸) 和 β,β -环戊亚甲基- β -巯基丙酸 (参见 Hruby 等 (1990), 见上)。

模拟物还可以包括模仿多肽的二级结构——可以把氨基酸的三维取向作到已知的蛋白二级构象中——包括 β -转角模拟物, 如 phenoxathin 环系统, 及 β 折叠模拟物, 如 epindolidione 结构, 设计合成和构象分析诱导模板的 α -螺旋已有描述 (Kemp 等 (1988) Tetrahedron Lett. 29: 4931; Kemp 等 (1988) Tetrahedron Lett. 29: 4935)。

针对衍生出模拟物的多肽制备抗体, 通过测定化合物对多肽抗体的亲合力, 可以检测或预筛选潜在模拟物作为骨刺激化合物的潜在活性。如上针对多肽所述, 与已知肽的抗体发生阳性反应的那些模拟物, 例如, 可使用此处描述的针对大鼠的系统在活体内检测骨刺激效应。针对具有氨基酸序列 SEQ ID NO:9 的多肽制备的抗体, 在本文中特别有用。

将发现类肽在这的用处。类肽是经 N-替换的氨基酸的寡聚体 (Simon 等 (1972), 见上), 可以用作基元, 来产生新分子的化学多样性文库, 然后可检测它们的结合和骨刺激的活性。单体可以掺入基于叔丁基的侧链和 9-苄基甲氧羰基 α -胺保护基。类肽单体的寡聚体化, 可以通过原位活化来进行, 例如, 使用六氟磷酸苯并三唑-1-基氧代三(吡咯烷基)磷或六氟磷酸溴代三(吡咯烷基)磷。其它步骤与通常的使用 α -(9-苄基甲氧羰基)氨基酸的肽合成方法是一样的。寡聚类肽具有与相应的多肽可比的亲合力, 这可以得到确认, 因此, 作为骨刺激剂, 寡聚类肽是潜在有用的。

本发明的化合物和其组合物在各种治疗和预防应用中找到用途, 用于预防和治疗涉及疾病的骨缩减。因而化合物可用作治疗来促进骨生长, 例如, 通过任何合适的途径, 治疗骨质疏松。优选的途径适合把多肽类的化合物送到目标对象的血流中, 并按多肽要求进行正确贮存和处理, 多肽例如为此处描述的那些多肽。

因此, 本发明还提供包含有效量的本发明化合物的组合物, 包括其无毒的加成盐、酰胺和酯, 它们可以单独起作用, 提供上述治疗的好处。这些组合物还可以随同生理可耐受的液体、凝胶或固体稀释剂、佐剂和赋形剂一起提供。

在以上涉及 NAP-2V 亚序列的样例中, 每次给药是动物每公斤体重用大约 70 纳摩尔多肽。实际上, 人类受治对象是特别受到关注的, 每日剂量为每公斤体重 0.01-300mg 或更多一点比较好。优选地, 剂量应该是在每公斤体重大约 0.1-约 30mg 附近。也许优选的给药频率应该每天多于一次或少于一次, 取决于给药途径、方便程度、以及治疗效果随给药频率和每次给药的数量的变化。给药剂量也取决于个体。任何一种或多种化合物的剂量取决于许多因素, 包括使用的特定化合物或化合物组合、给药的方式、以及受治疗的哺乳动物。利用常规方法,

能够确定特定化合物或化合物组合的剂量；例如，习惯性地比较目标化合物和已知药剂的不同活性，意思就是，利用适当的药理学方法，在其中，例如，随时测定受治对象的骨密度。

5 药物制剂包括制备成可注射的溶液，包括刚好在用前制备的可注射溶液的任何化合物，用于促进骨生长和/或治疗骨质疏松。注射液可以是液体溶液或悬浮液；注射前适合在液体中溶解或悬浮的固体形式也可制备。制剂也可以是乳化的。活性多肽常常和生理上可耐受的和与多肽相容的稀释剂和赋形剂混合在一起。合适的稀释剂和赋形剂有，
10 例如，水、盐水、右旋糖、甘油等等，以及其组合。另外，如果需要的话，组合物可以包含少量的辅助物质，如湿润剂、乳化剂、稳定剂或 pH 缓冲剂等等。

 药物制剂包括化合物与常规赋形剂混合在一起应用。赋形剂就是
15 药学可接受的有机或无机载体物质，不与化合物发生有害反应，而且可能提高化合物贮存和处理的稳定性。制备方法可以包括对药物制剂灭菌。化合物可以与辅助剂混合在一起，如润滑剂、防腐剂、稳定剂、影响渗透压的盐等，它们与化合物不发生有害反应。

20 组合物通常是通过注射来肠胃外给药，例如，经皮下或静脉注射给药。适合其它给药方式的另外一些制剂包括栓剂、鼻内气雾剂、以及在某些情况下的口服制剂。对于栓剂，传统的粘合剂和赋形剂可以包括，例如，聚（亚烷基）二醇或甘油三酯；这些栓剂可以由混合物形成，所述混合物含有活性成分在 0.5%-10%，优选 1%-2%。口服制剂
25 包括那些经常使用的赋形剂，例如，药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等等。这些组合物采用的形式有溶液、悬浮液、片剂、胶囊、缓释制剂或粉剂，而且含有 10-95%的活性成分，优选为 25-70%。这些口服制剂包括为保护肽直到能被吸收而设计的制剂。

30

肽化合物可以中性或盐形式配制到组合物中。药物可接受的无毒盐包括酸加成盐（由游离氨基基团形成），其由无机酸如盐酸或磷酸形成，或由有机酸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等等形成。由游离羧基形成的盐可以从无机碱如氢氧化钠、氢氧化钾、氨水、氢氧化钙或氢氧化铁衍生，以及由有机碱如异丙胺、三甲胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等等衍生。

本发明的化合物能够自身均聚（比如(肽)_n）或相互杂聚。化合物还可以结合到可生物相容的多聚体化合物上，如 BLOPOL™(WR Grace & Co.,-Conn.)。

如果用重组技术制备，编码本发明目的多肽的 DNA 序列用标准的自动化技术合成，或者从 cDNA 或基因组文库中获取编码序列或其中部分序列。将该 DNA 连接到合适的表达载体中，再将这些载体转化到适当的宿主中。有很多表达载体/宿主细胞系统可以利用，包括原核和真核生物培养系统。

原核生物经常是以大肠杆菌的各种菌株为代表的。然而，其它微生物株也可应用，例如杆菌如枯草芽胞杆菌、各种假单胞菌或其他细菌菌株。在这些原核生物系统中，应用的质粒载体包含复制起点以及来自与宿主相容的物种的调控序列。例如，典型地用 pBR322 的衍生物转化大肠杆菌，质粒 pBR322 源自大肠杆菌（Bolivar 等（1977）基因（Gene）2：95）。经常使用的原核生物调控序列，在此定义为包括用于转录起始、选择性带有操纵基因、带有核糖体结合位点序列的启动子，包括常用的这些启动子如β-内酰胺酶（青霉素酶）、乳糖（lac）启动子系统（Chang 等（1977）Nature 198：1056）、色氨酸（Trp）启动子系统（Goeddel 等，（1990）Nucleic Acids Res. 8：4057）、以及来自人字点的 P_L 启动子和 N-基因核糖体结合位点（Shimatake 等，（1981）Nature 292：128）。然而，可以获得的与原核生物相容的任何启动子系统都能应用。

用于本发明真核生物系统的表达系统包括来自适当真核生物基因的启动子。例如，用于酵母的一类启动子包括用于合成糖酵解酶的启动子如醇脱氢酶启动子，甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子(Holland和Holland
5 (1980) J.Biol. Chem. 25: 2596)、 α -因子启动子(Bitter等(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 5330)、半乳糖启动子(Johnston和David, (1984) Mol. Cell. Biol. 4: 1440)，它们用于3-磷酸甘油酸激酶(Hitzeman等，(1980) J.Biol. Chem. 256: 1385)或 YEp13 中得到的 Leu2 基因(Broach. J. 等，(1978) Gene 8: 121)。

10

适合的哺乳动物启动子包括来自 SV40 早期和晚期启动子(Fiers等，(1978) Nature 273: 113)或其他病毒的启动子如来自多形瘤、II型腺病毒、牛乳头状瘤病毒、禽类肉瘤病毒的启动子。合适的病毒和哺乳动物增强子在上文引用。如果植物细胞用作表达系统，胭脂碱合成启动子是适合的(Depicker, A.等，(1982) J.Mol.Appl.Gen. 1: 56)。

15

将表达系统包括在复制载体上或整合到重组宿主的染色体中。对其中载体包括复制系统的系统，它们的拷贝数或低或高，通常拷贝数少于约 1000，虽然在某些情况下可以应用失控载体。无论是在要整合
20 的载体上或是在复制系统中提供，编码本发明多肽的序列可以与扩增基因如二氢叶酸还原酶、金属硫蛋白、胸腺嘧啶激酶等等串连。在原核生物系统中，扩增基因和靶基团两者能够处在同一个转录和翻译调控区的调控之下。

20

通常，载体包含一个标记，用来筛选包含表达系统的宿主细胞；这些标记的性质取决于宿主并为本领域所了解。除了所需的调控元件如启动子之外，另外的序列如增强子也可应用，以便加强转录的水平。如果多肽是将被分泌的，可以应用编码信号肽的上游序列，如美国专利 No. 4336336、4338397 和 4546082 所描述的那些。当多肽产物分泌
30 时，信号序列被酶切除。

25

30

根据所用的宿主细胞，利用适合这些细胞的标准技术进行转化。用氯化钙进行的钙处理（Cohen, S.N.(1972) Proc.Natl. Acad. Sci USA 69: 2110）或 RbCl 方法（Maniatis 等，《分子克隆实验手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)（1982）Cold Spring Harbor Press. 254 页）用于原核生物或其他带有大量细胞壁屏障的细胞。将根瘤土壤杆菌感染（Shaw, C.H.(1938)等, Gene 23: 315）用于某些植物细胞。对于没有细胞壁的哺乳动物细胞，优选磷酸钙沉淀方法（Graham 和 Van der Eb (1978) Virology 52: 2: 546）。例如根据 Van Solingen, P. 等（（1977）J.Bacter 130: 946）和 Hsiao, C.L.等（（1979）Proc. Natl. Acad. Sci USA 76: 3829）的方法，进行了向酵母中的转化。

一般来说，合适的表达系统构建以后，将该系统转染到适当的宿主中，由表达载体上带有的标记筛选成功的转化体。然后培养成功转化的群落，以生产所需的多肽。有时候优选使用由环境中的调控条件控制的启动子，这样，在编码本发明所要多肽的基因不表达的条件下，细胞能够生长，然后通过适当条件的操纵诱导产生多肽。例如，当色氨酸启动子用于大肠杆菌中时，有色氨酸存在时细胞生长，然后通过减小色氨酸的浓度或添加色氨酸类似物如吲哚乙酸来诱导表达。如果基因由 PL 启动子控制，那么在相对低的温度如 35℃下细胞生长到合适的密度，然后提高温度激活该启动子。如果在细菌宿主中生成成熟的胞内多肽，N 末端甲硫氨酸可以切除或不切除。在哺乳动物系统中，例如，使用金属硫蛋白启动子，允许通过添加重金属或糖皮质激素进行诱导。优选使用这种方法阻止可能对细胞生长有害的多肽过早积累。

多肽可以胞内产生，或是通过构建载体以分泌形式产生，其中使能够在适当宿主中起作用的信号肽置于肽的前面。

应用本领域普遍已知的适当技术，从培养基或从细胞中获取多肽，通过各种方法进行纯化，例如，进行离子交换层析、硫酸铵沉淀、凝

胶渗透层析等等。

通过此处公开的发明制得的多肽可用来得到其抗血清（Stites, D.P. 和 A.I.Terr. 1991。基础与临床免疫学（Basic & Clinical Immunology），第七版，Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut and San Matea California）。可利用多肽的抗体开发方法和产品，用于测定所述抗体与之结合的多肽。很明显，至少对于具有 CTAP-III 的序列（SEQ ID NO:3）的多肽，这方面的工作已经完成（Baggiolini M., Clemetson, K.J., Walz, A. 国际专利申请 No.PCT/EP89/01389, 1990 年 6 月 14 日公开，公开号 WO90/06321）。可利用多肽的抗体开发方法和产品，用于测定所述抗体与之结合的多肽。

例如，抗体可以连接到报告系统上或与报告系统偶联，该系统的建立是要表明多肽对抗体的阳性结合。著名的报告系统包括放射免疫分析（RIA）或免疫放射分析（IRMA）。此外，酶联免疫吸附分析（ELISA）和 RIA 与 IRMA 一样具有相对高的灵敏度，但一般不依靠使用放射性同位素。可产生可直观测定的物质或至少在分光光度计中可测定的物质。可以应用依赖于测定酶结合物的荧光的分析。可以理解，根据本发明，有大量的报告系统可以用于检测特殊多肽的存在。使用标准化的样品收集和处理，能够很好地确定血清中处在临界量以上的多肽的存在。

这样一种由抗体连接的报告系统，可用于确定目标血清是否含有数量不足的多肽的方法中。如果给出这种多肽在所给类型的个体的血清中的正常临界溶液，这样就可以开发检测试剂盒。

正如本领域内所知，通过蛋白的嵌合形成可以获得进一步的好处。例如，编码完整蛋白或蛋白一部分的 DNA 序列，可以由此与编码大肠杆菌 β -半乳糖苷酶 C 末端部分的序列连接在一起，产生融合蛋白。例如，美国专利 No.5288630（1994 年 2 月 22 日发表）和其中所引用的

参考文献，描述了用于人呼吸合胞病毒糖蛋白 F 和 G 的表达系统。

本说明书中引用的所有参考文献引入本文作为参考，包括美国临时专利申请 No.004314，申请日为 1995 年 9 月 26 日。

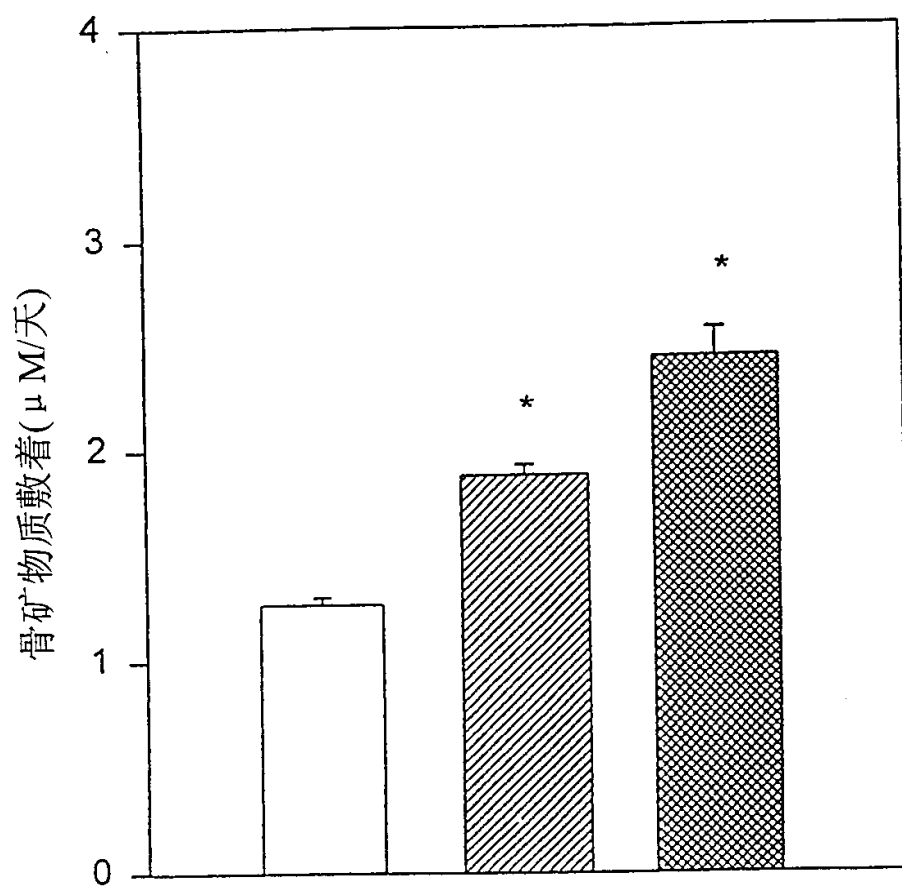


图 1

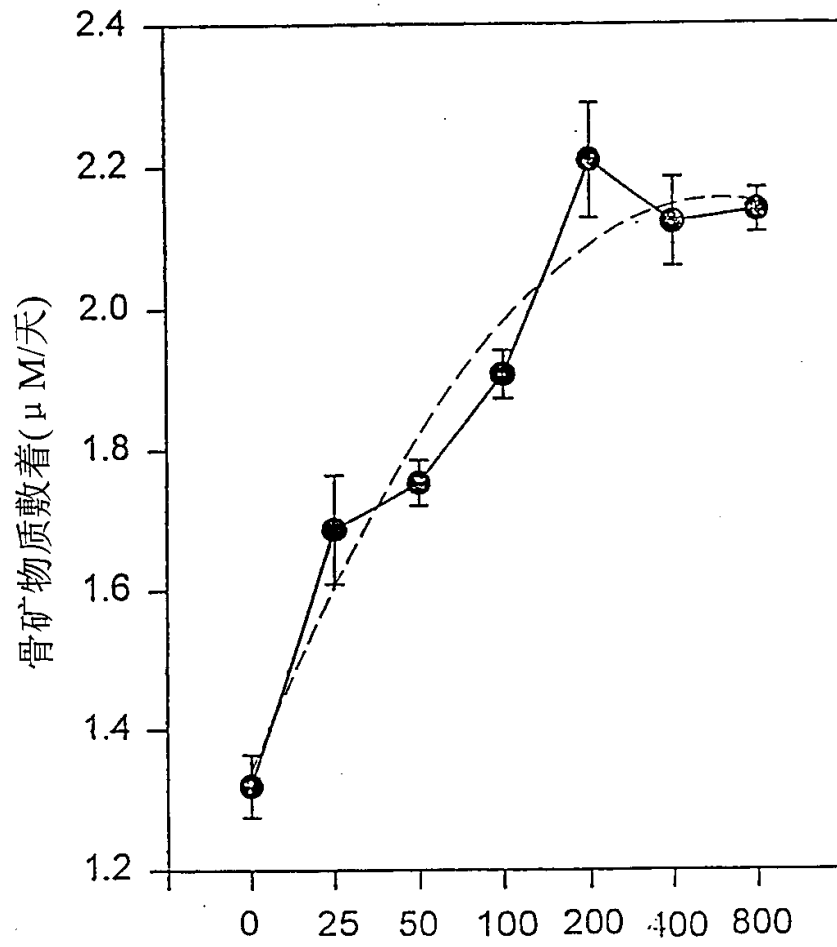


图 2

序列表

<110> 骨药公司;彻克·兴·泰姆
 <120> 骨刺激因子
 <130> 46913/00102
 <140>
 <141> 2000-01-13
 <150> US 09/229,304
 <151> 1999-01-13
 <160> 19
 <170> Wordperfect 6.1
 <210> 1
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 1
 Ala Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro
 1 5 10 15
 Lys Asn Ile Gln Ser Leu Glu Val Ile Gly Lys Gly Thr His Cys Asn
 20 25 30
 Gln Val Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asp Gly Arg Lys Ile Cys Leu
 35 40 45
 Asp Pro Asp Ala Pro Arg Ile Lys Lys Ile Val Gln Lys Lys Leu Ala
 50 55 60
 Gly Asp Glu Ser Ala Asp
 65 70
 <210> 2
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 2
 Asp Ser Asp Leu Tyr Ala Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile Lys Thr Thr
 1 5 10 15
 Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Leu Glu Val Ile Gly Lys
 20 25 30
 Gly Thr His Cys Asn Gln Val Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asp Gly
 35 40 45
 Arg Lys Ile Cys Leu Asp Pro Asp Ala Pro Arg Ile Lys Lys Ile Val
 50 55 60
 Gln Lys Lys Leu Ala Gly Asp Glu Ser Ala Asp
 65 70 75

<210> 3
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3
 Ser Asp Leu Tyr Ala Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile Lys Thr Thr Ser
 1 5 10 15
 Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Leu Glu Val Ile Gly Lys Gly
 20 25 30
 Thr His Cys Asn Gln Val Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asp Gly Arg
 35 40 45
 Lys Ile Cys Leu Asp Pro Asp Ala Pro Arg Ile Lys Lys Ile Val Gln
 50 55 60
 Lys Lys Leu Ala Gly Asp Glu Ser Ala Asp
 65 70

<210> 4
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4
 Asp Leu Tyr Ala Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly
 1 5 10 15
 Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Leu Glu Val Ile Gly Lys Gly Thr
 20 25 30
 His Cys Asn Gln Val Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asp Gly Arg Lys
 35 40 45
 Ile Cys Leu Asp Pro Asp Ala Pro Arg Ile Lys Lys Ile Val Gln Lys
 50 55 60
 Lys Leu Ala Gly Asp Glu Ser Ala Asp
 65 70

<210> 5
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 5
 Gly Lys Glu Glu Ser Leu Asp Ser Asp Leu Tyr Ala Glu Leu Arg Cys
 1 5 10 15
 Met Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser
 20 25 30
 Leu Glu Val Ile Gly Lys Gly Thr His Cys Asn Gln Val Glu Val Ile
 35 40 45
 Ala Thr Leu Lys Asp Gly Arg Lys Ile Cys Leu Asp Pro Asp Ala Pro
 50 55 60

Arg Ile Lys Lys Ile Val Gln Lys Lys Leu Ala Gly Asp Glu Ser Ala
65 70 75 80

Asp

<210> 6
<211> 85
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6
Asn Leu Ala Lys Gly Lys Glu Glu Ser Leu Asp Ser Asp Leu Tyr Ala
1 5 10 15

Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys
20 25 30

Asn Ile Gln Ser Leu Glu Val Ile Gly Lys Gly Thr His Cys Asn Gln
35 40 45

Val Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asp Gly Arg Lys Ile Cys Leu Asp
50 55 60

Pro Asp Ala Pro Arg Ile Lys Lys Ile Val Gln Lys Lys Leu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ser Ala Asp
85

<210> 7
<211> 94
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7
Ser Ser Thr Lys Gly Gln Thr Lys Arg Asn Leu Ala Lys Gly Lys Glu
1 5 10 15

Glu Ser Leu Asp Ser Asp Leu Tyr Ala Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile
20 25 30

Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Leu Glu Val
35 40 45

Ile Gly Lys Gly Thr His Cys Asn Gln Val Glu Val Ile Ala Thr Leu
50 55 60

Lys Asp Gly Arg Lys Ile Cys Leu Asp Pro Asp Ala Pro Arg Ile Lys
65 70 75 80

Lys Ile Val Gln Lys Lys Leu Ala Gly Asp Glu Ser Ala Asp
85 90

<210> 8
<211> 79
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8
Glu Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys
1 5 10 15

Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Phe His Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu
 20 25 30
 Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro His Cys Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val
 35 40 45
 Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp
 50 55 60
 Val Gln Arg Val Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser
 65 70 75
 <210> 9
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> 猪
 <400> 9
 Met Thr Ser Lys Leu Ala Val Ala Phe Leu Ala Val Phe Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Ala Leu Cys Glu Ala Asp Val Leu Ala Arg Val Ser Ala Glu Leu
 20 25 30
 Arg Cys Gln Cys Ile Asn Thr His Ser Thr Pro Phe His Pro Lys Phe
 35 40 45
 Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Phe His Cys Glu Asn Ser
 50 55 60
 Glu Ile Ile Val Lys Leu Val Asn Gly Lys Glu Val Cys Leu Asp Pro
 65 70 75 80
 Lys Glu Lys Trp Val Gln Lys Val Val Gln Ile Phe Leu Lys Arg Thr
 85 90 95
 Glu Lys Gln Gln Gln Gln Gln
 100
 <210> 10
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 10
 Glu Ala Glu Glu Asp Gly Asp Leu Gln Cys Leu Cys Val Lys Thr Thr
 1 5 10 15
 Ser Gln Val Arg Pro Arg His Ile Thr Ser Leu Glu Val Ile Lys Ala
 20 25 30
 Gly Pro His Cys Pro Thr Ala Gln Leu Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly
 35 40 45
 Arg Lys Ile Cys Leu Asp Leu Glu Ala Pro Leu Tyr Lys Lys Ile Ile
 50 55 60
 Lys Lys Leu Leu Glu Ser
 65 70

<210> 11
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 11
 Asp Ser Asp Leu Tyr Ala Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile Lys Thr Thr
 1 5 10 15

Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser
 20 25

<210> 12
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 12
 Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Glu Ser
 1 5 10

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 13
 Cys Met Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln
 1 5 10 15

Ser

<210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 14
 Met Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 15
 Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 228
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 16
 gac agt gac ttg tat gct gaa ctc cgc tgc atg tgt ata aag aca acc 48
 Asp Ser Asp Leu Tyr Ala Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile Lys Thr Thr
 1 5 10 15

tct gga att cat ccc aaa aac atc caa agt ttg gaa gtg atc ggg aaa 96
 Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Leu Glu Val Ile Gly Lys
 20 25 30

gga acc cat tgc aac caa gtc gaa gtc ata gcc aca ctg aag gat ggg 146
 Gly Thr His Cys Asn Gln Val Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asp Gly
 35 40 45

agg aaa atc tgc ctg gac cca gat gct ccc aga atc aag aaa att gta 192
 Arg Lys Ile Cys Leu Asp Pro Asp Ala Pro Arg Ile Lys Lys Ile Val
 50 55 60

cag aaa aaa ttg gca ggt gat gaa tct gct gat taa 228
 Gln Lys Lys Leu Ala Gly Asp Glu Ser Ala Asp TER
 65 70 75

<210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> 修饰位点
 <222> ...²
 <223> / 注 = "Xaa 为N-乙酰基异亮氨酸 "

<220>
 <221> 修饰位点
 <222> 14...
 <223> / 注 = "Xaa 为丝氨酰胺 "

<400> 17
 Xaa Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Glu Xaa
 1 5 10

<210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> 修饰位点
 <222> ...²
 <223> / 注 = "Xaa 为N-乙酰基苏氨酸 "

<220>
 <221> 修饰位点
 <222> 14...
 <223> / 注 = "Xaa 为赖氨酰胺 "

<400> 18
 Xaa Thr Ser Gly Ile His Pro Xaa
 1 5

<210> 19
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 19
 Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser
 1 5 10