



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105263958 B

(45)授权公告日 2019.09.27

(21)申请号 201480021574.5

(22)申请日 2014.03.13

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105263958 A

(43)申请公布日 2016.01.20

(30)优先权数据  
61/780,170 2013.03.13 US  
61/885,387 2013.10.01 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2015.10.15

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2014/026620 2014.03.13

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02014/160438 EN 2014.10.02

(73)专利权人 比奥阿赛斯技术有限公司  
地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

(72)发明人 蒂莫西·维塔利斯

瑞恩哈德·加巴斯勒尔

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理  
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.  
C07K 14/79(2006.01)

(56)对比文件  
US 2002059032 A1,2002.05.16,  
US 2002059032 A1,2002.05.16,  
WO 2013022738 A1,2013.02.14,  
WO 9401463 A1,1994.01.20,

审查员 薛旻

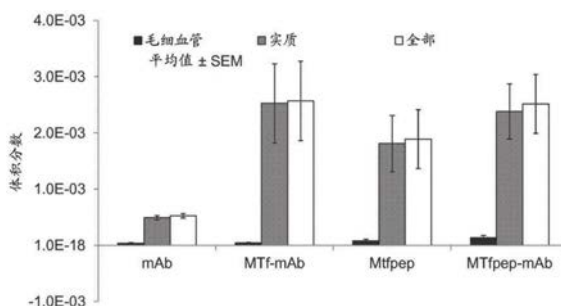
权利要求书1页 说明书70页  
序列表39页 附图19页

(54)发明名称

p97片段及其应用

(57)摘要

提供具有血脑屏障(BBB)转运活性的人p97(黑色素转铁蛋白)多肽的片段,包括其变体和组合物、含有所述p97片段的缀合物;也提供其应用的相关方法,例如促进治疗剂或诊断剂穿过BBB的转运。



1. 缀合物, 包括p97多肽, 其中所述p97多肽由氨基酸序列DSSHAFTLDELRL (SEQ ID NO: 13) 组成, 其中所述p97多肽与治疗剂可操作地连接, 以形成p97-治疗剂缀合物, 其中所述p97多肽具有转运治疗剂穿过血脑屏障 (BBB) 的能力。

2. 如权利要求1所述的缀合物, 其中所述p97多肽具有一个或多个末端半胱氨酸和/或酪氨酸。

3. 如权利要求1所述的缀合物, 其中所述治疗剂为抗体。

4. 如权利要求3所述的缀合物, 其中所述抗体选自下述的一种或多种: 曲妥珠单抗、西妥昔单抗、达利珠单抗、他尼珠单抗、3F8、8H9、阿巴伏单抗、阿德木单抗、阿夫土珠单抗、阿仑单抗、培化阿珠单抗、阿麦妥昔单抗、阿泊珠单抗、巴维昔单抗、贝妥莫单抗、贝利木单抗、贝伐单抗、莫-比伐珠单抗、贝伦妥单抗-维多汀、莫-坎妥珠单抗、拉-坎妥珠单抗、卡罗单抗-喷地肽、卡妥索单抗、泊-西他珠单抗、西妥木单抗、clivatuzumab (tetraxetan)、可那木单抗、达西珠单抗、达洛珠单抗、地莫单抗、drozitumab、依美昔单抗、依决洛单抗、依洛珠单抗、enavatuzumab、恩司昔单抗、依帕珠单抗、厄马索单抗、埃达珠单抗、法勒珠单抗、FBTA05、芬妥木单抗、flanvotumab、加利昔单抗、吉妥珠单抗、ganitumab、吉妥珠单抗 (奥佐米星)、吉瑞昔单抗、格莱木单抗-维多汀、替-伊莫单抗、icrucumab、伊戈伏单抗、拉-英达西单抗、英妥木单抗、伊珠单抗-奥佐米星、伊匹木单抗 (MDX-101)、伊妥木单抗、拉贝珠单抗、来沙木单抗、林妥珠单抗、莫-洛伏珠单抗、鲁卡木单抗、鲁昔单抗、马帕木单抗、马妥珠单抗、米拉珠单抗、米妥莫单抗、莫加珠单抗、moxetumomab (pasudotox)、他那可单抗、他那莫单抗、narnatumab、奈昔木单抗、尼妥珠单抗、纳武单抗、含有放射性碘的 **Neuradiab®**、不含放射性碘的 **Neuradiab®**、NR-LU-10、奥法木单抗、olaratumab、奥纳珠单抗、莫-奥珠单抗、奥戈伏单抗、帕尼单抗、帕曲土单抗、pentumomab、培妥珠单抗、普立木单抗、雷妥莫单抗、radretumab、雷莫芦单抗、利妥木单抗、利妥昔单抗、罗妥木单抗、奥马珠单抗、西罗珠单抗、司妥昔单抗、tabalumab、帕-他莫单抗、替妥莫单抗、替妥木单抗、TGN1412、替西木单抗、曲美木单抗、替加珠单抗、TNX-650、托西莫单抗、TRBS07、西莫白介素单抗、ublrituximab、乌瑞鲁单抗、维妥珠单抗、伏洛昔单抗、伏妥莫单抗以及扎芦木单抗。

5. 如权利要求1所述的缀合物, 其中所述治疗剂为抗体的抗原结合片段。

6. 如权利要求1所述的缀合物, 其中所述治疗剂为分子量小于2000道尔顿的小分子。

7. 组合物, 其包含权利要求1-6中任一项所述的缀合物和药学可接受的载体。

## p97片段及其应用

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求2013年3月13日提交的第61/780,170号美国临时申请和2013年10月1日提交的第61/885,387号美国临时专利申请的权益,两个申请都通过引用的方式整体并入本文。

[0003] 序列表的声明

[0004] 与本申请相关的序列列表以文本格式代替纸质拷贝提供,并且在此通过引用的方式并入到说明书中。含有序列表的文本文件的名称为BIOA\_003\_02WO\_ST25.txt。该文本文件为约40KB,于2014年3月13日建立,并且通过EFS-Web电子提交。

[0005] 发明背景

### 技术领域

[0006] 本发明总体涉及具有转运活性的人p97(黑素转铁蛋白)多肽片段,包括其变体和组合物、含有所述p97片段的缀合物,以及其应用的相关方法,例如,促进治疗剂和/或诊断剂穿过血脑屏障(BBB)的递送以及进入中枢神经系统。

[0007] 相关技术的描述

[0008] 克服向脑的特定区域递送治疗剂或诊断剂的困难,是治疗或诊断许多中枢神经系统(CNS)疾病(包括那些脑部疾病)的主要挑战。在血脑屏障(BBB)的神经保护作用中,其发挥功能来阻碍向脑递送许多潜在重要的诊断剂和治疗剂。

[0009] 治疗分子和基因不能以足够的量穿过BBB,否则它们可能在治疗和诊断中发挥效力。据报道,全部的治疗分子中,有超过95%不能穿过血脑屏障。

[0010] 因此,需要促进治疗剂和其它分子穿过血脑屏障递送的组合物和方法,例如,有效地治疗中枢神经系统(CNS)的某些疾病,如癌症,特别是那些能够转移至CNS的癌症。本发明解决这些需求并提供其它相关优势。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明的实施方案包括长度至多约300、400、500、600或700个氨基酸的分离的p97(黑素转铁蛋白)多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:2-18中一个或多个序列至少有70%同一性的氨基酸序列,或其活性片段或变体。在某些实施方案中,所述p97多肽包含SEQ ID NO:2-18中一个序列,任选地,包括由SEQ ID NO:1限定的相邻的C-端和/或N-端序列。在某些实施方案中,所述多肽包括SEQ ID NO:2-18中的2、3、4或5种序列,任选地,包括如SEQ ID NO:1限定的任何间插序列。

[0013] 在某些实施方案中,p97多肽包含SEQ ID NO:13和/或14中一个或两个序列,任选地包括如SEQ ID NO:1限定的间插序列。在某些实施方案中,p97的长度为约或至多约250、240、230、220、210、200、190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、90、80、70、60、50、40、30、25、20、15或10个氨基酸。

[0014] 在某些实施方案中,p97多肽融合至异源蛋白。

[0015] 还包含缀合物,包括本文描述的p97多肽,其中所述p97多肽与药剂共价连接或可

操作地 (operatively) 连接, 从而形成p97-药剂缀合物。在某些实施方案中, 所述药剂为小分子、多肽、肽模拟物、类肽、适配体或可检测的实体。

[0016] 在某些实施方案中, 所述小分子为选自下述中一种或多种的细胞毒性剂或化学治疗剂或抗血管生成剂: 烷化剂、抗代谢物、氨基环霉素、抗肿瘤抗生素、铂、I-型拓扑异构酶抑制剂、II-型拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱和紫衫烷。在某些实施方案中, 所述小分子选自下述的一种或多种: 苯丁酸氮芥、环磷酰胺、西仑吉肽、洛莫司汀 (CCNU)、美法仑、甲苄肼、塞替派、卡莫司汀 (BCNU)、enzastaurin、白消安、道诺霉素、阿霉素、吉非替尼、埃罗替尼、伊达比星、替莫唑胺、表阿霉素、米托蒽醌、博来霉素、顺铂、卡铂、奥沙利铂、喜树碱、伊立替康、拓扑替康、安丫啶、依托泊苷、磷酸依托泊苷、替尼泊苷、替西罗莫司、依维莫司、长春新碱、长春花碱、长春瑞滨、长春地辛、CT52923、紫杉醇、伊马替尼、达沙替尼、索拉菲尼、帕唑帕尼、苏尼替尼 (sunitinib)、瓦他拉尼、易瑞沙、埃罗替尼、AEE-788、二氯醋酸盐 (dichoroacetate)、他莫昔芬、法舒地尔、SB-681323、semaxanib、多奈哌齐 (donepezil)、加兰他敏、美金刚、卡巴拉汀、他克林、雷沙吉兰 (rasagiline)、纳曲酮、鲁比前列酮、沙芬酰胺、伊曲茶碱、匹莫范色林 (pimavanserin)、pitolisant、伊拉地平、pridopidine (ACR16)、四苯喹啉、蓓萨罗丁、醋酸格拉替雷 (glatirimer acetate)、芬戈莫德和米托蒽醌, 包括其药物可接受的盐或酸。

[0017] 在某些实施方案中, 所述多肽为抗体或其抗原结合片段, 或免疫球蛋白样分子。

[0018] 在某些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段特异性地与癌症相关抗原结合。在某些实施方案中, 所述癌症相关抗原是下述的一种或多种: 人Her2/neu、Her1/EGF受体 (EGFR)、Her3、A33抗原、B7H3、CD5、CD19、CD20、CD22、CD23 (IgE受体)、C242抗原、5T4、IL-6、IL-13、血管内皮生长因子VEGF (如VEGF-A)、VEGFR-1、VEGFR-2、CD30、CD33、CD37、CD40、CD44、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CD152、CD200、CD221、CCR4、HLA-DR、CTLA-4、NPC-1C、髓生蛋白、波形蛋白、胰岛素样生长因子-1受体 (IGF-1R)、甲胎蛋白、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、碳酸酐酶-9 (CA-IX)、癌胚抗原 (CEA)、整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、整合素 $\alpha_5\beta_1$ 、叶酸盐受体-1、跨膜糖蛋白NMB、成纤维细胞活化蛋白 $\alpha$  (FAP)、糖蛋白75、TAG-72、MUC1、MUC16 (或CA-125)、磷脂酰丝氨酸、前列腺特异性膜抗原 (PMSA)、NR-LU-13抗原、TRAIL-R1、肿瘤坏死因子受体超家族成员10b (TNFRSF10B或TRAIL-R2)、SLAM家族成员7 (SLAMF7)、EGP40泛癌抗原、B-细胞活化因子 (BAFF)、血小板源性生长因子受体、糖蛋白EpCAM (17-1A)、程序性死亡-1、蛋白二硫键异构酶 (PDI)、肝再生磷酸酶-3 (PRL-3)、前列腺酸磷酸酶、Lewis-Y抗原、GD2 (表达于神经外胚层起源的肿瘤中的双唾液酸神经节苷脂)、磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3) 或间皮素。

[0019] 在某些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段特异性地与疼痛相关抗原结合。在某些实施方案中, 所述疼痛相关抗原为神经生长因子 (NGF) 或原肌球蛋白相关激酶A (TrkA) 中的一种或多种。

[0020] 在某些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段或免疫球蛋白样分子与促炎性分子, 任选地与促炎性细胞因子或趋化因子特异性结合。

[0021] 在某些实施方案中, 所述促炎性分子为下述的一种或多种: TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、FasL、CD27L、CD30L、CD40L、Ox40L、4-1BBL、TRAIL、TWEAK和Apo3L、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、LIF、CCL5、GRO- $\alpha$ 、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、巨噬细胞集落刺激因子 (MCSF) 或粒细胞巨噬细胞集落刺激因子

(GM-CSF)。在某些实施方案中,所述促炎性分子为TNF- $\alpha$ ,且所述抗体或免疫球蛋白样分子为阿达木单抗、赛妥珠单抗、依那西普、戈利木单抗、英夫利昔单抗、D2E7、CDP 571或CDP 870或其抗原结合片段或变体。

[0022] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段与下述中的一种或多种特异性结合:人Her2/neu、Her1/EGFR、TNF- $\alpha$ 、B7H3抗原、CD20、VEGF、CD52、CD33、CTLA-4、髓生蛋白、 $\alpha$ -4 ( $\alpha$ 4) 整合素、IL-23、淀粉体- $\beta$ 、亨廷顿蛋白、CD25、神经生长因子(NGF)、TrkA或 $\alpha$ -突触核蛋白。

[0023] 在某些实施方案中,所述抗体选自下述的一种或多种:曲妥珠单抗、西妥昔单抗、达利珠单抗、他尼珠单抗、3F8、8H9、阿巴伏单抗、阿德木单抗、阿夫土珠单抗、阿仑单抗、培化阿珠单抗、阿麦妥昔单抗(amatumumab)、阿泊珠单抗、巴维昔单抗、贝妥莫单抗、贝利木单抗、贝伐单抗、莫-比伐单抗、贝伦妥单抗-维多汀、莫-坎妥珠单抗、拉-坎妥珠单抗、卡罗单抗-喷地肽、卡妥索单抗、泊-西他单抗、西妥木单抗、clivatuzumab(tetraxetan)、可那木单抗、达西珠单抗、达洛珠单抗、地莫单抗、drozitumab、依美昔单抗、依决洛单抗、依洛珠单抗、enavatuzumab、恩司昔单抗、依帕珠单抗、厄马索单抗、埃达珠单抗、法勒珠单抗、FBTA05、芬妥木单抗、flanvotumab、加利昔单抗、吉妥珠单抗、ganitumab、吉妥珠单抗(奥佐米星)、吉瑞昔单抗、格莱木单抗-维多汀、替-伊莫单抗、icrucumab、伊戈伏单抗、拉-英达西单抗、英妥木单抗、伊珠单抗-奥佐米星、伊匹木单抗(MDX-101)、伊妥木单抗、拉贝珠单抗、来沙木单抗、林妥珠单抗、莫-洛伏单抗、鲁卡木单抗、鲁昔单抗、马帕木单抗、马妥珠单抗、米拉珠单抗、米妥莫单抗、莫加珠单抗、moxetumomab(pasudotox)、他那可单抗、他那莫单抗、narnatumab、奈昔木单抗、尼妥珠单抗、纳武单抗、Neuradiab®(含有或不含放射性碘)、NR-LU-10、奥法木单抗、olaratumab、奥纳珠单抗、莫-奥珠单抗、奥戈伏单抗、帕尼单抗、帕曲土单抗、pentumomab、培妥珠单抗、普立木单抗、雷妥莫单抗、radretumab、雷莫芦单抗、利妥木单抗、利妥昔单抗、罗妥木单抗、奥马珠单抗(samalizumab)、西罗珠单抗、司妥昔单抗、tabalumab、帕-他莫单抗、替妥莫单抗、替妥木单抗(teprotumumab)、TGN1412、替西木单抗、曲美木单抗、替加珠单抗、TNX-650、托西莫单抗、TRBS07、西莫白介素单抗、ublrituximab、乌瑞鲁单抗、维妥珠单抗、伏洛昔单抗、伏妥莫单抗和扎芦木单抗,包括其抗原结合片段。

[0024] 在某些实施方案中,所述多肽为干扰素- $\beta$ 多肽或其活性片段或变体。

[0025] 在某些实施方案中,所述多肽与溶酶体贮积症有关。在某些实施方案中,所述多肽选自下述的一种或多种:天冬氨酰葡萄糖胺糖苷酶、酸性脂酶、半胱氨酸转运体、Lamp-2、 $\alpha$ -半乳糖苷酶A、酸性神经酰胺酶、 $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶、 $\beta$ -己糖胺酶A、GM2-神经节苷脂激活剂(GM2A)、 $\alpha$ -D-甘露糖苷酶、 $\beta$ -D-甘露糖苷酶、芳基硫酸酯酶A、saposin B、神经氨酸苷酶、 $\alpha$ -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶、磷酸转移酶、磷酸转移酶 $\gamma$ -亚基、L-艾杜糖醛酸酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、乙酰肝素-N-硫酸酯酶、 $\alpha$ -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶、乙酰辅酶A:N-乙酰转移酶、N-乙酰氨基葡萄糖6-硫酸酯酶、半乳糖6-硫酸酯酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、N-乙酰半乳糖胺4-硫酸酯酶、透明质酸葡萄糖胺酶、硫酸酯酶、十六烷酰蛋白硫酸酯酶、三肽基肽酶I、酸性鞘磷脂酶、组织蛋白酶A、组织蛋白酶K、 $\alpha$ -半乳糖苷酶B、NPC1、NPC2、唾液酸转运蛋白和唾液酸转运体,包括其活性片段和变体。

[0026] 在某些实施方案中,可检测的实体选自泛影酸、放射性同位素、荧光团/荧光染料

和纳米颗粒中的一种或多种。

[0027] 在某些实施方案中,所述药剂为非缀合形式的心脏毒性药物。在某些实施方案中,所述心脏毒性药剂为蒽环霉素/anthraquinolone、环磷酰胺、抗代谢物、抗微管药物、酪氨酸激酶抑制剂、贝伐单抗或曲妥珠单抗。在某些实施方案中,所述心脏毒性药剂为环戊烯基胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、卡培他滨、紫杉醇、多西他赛、阿霉素、多柔比星、表阿霉素、吐根碱、isotamide、丝裂霉素C、埃罗替尼、吉非替尼、伊马替尼、索拉菲尼、舒尼替尼、顺铂、萨利多胺、白消安、长春花碱、博来霉素、长春新碱、三氧化二砷、甲氨蝶呤、罗格列酮或米托蒽醌。

[0028] 一些实施方案包括包含本文描述的p97蛋白或缀合物的组合物(例如,药物组合物、治疗组合物、诊断组合物)和药学可接受的或药物级载体。

[0029] 也包括对有需要的对象进行治疗的方法,包括向对象施用本文描述的p97缀合物或组合物。

[0030] 某些实施方案包括治疗中枢神经系统(CNS)癌症,任选地治疗脑部癌症的方法。某些实施方案包括治疗CNS原发癌,任选地治疗脑原发癌的方法。某些实施方案包括治疗CNS转移癌,任选地治疗脑转移癌的方法。某些实施方案包括治疗下述疾病的方法:神经胶质瘤、脑膜瘤、垂体腺瘤、前庭神经鞘瘤、原发性CNS淋巴瘤、成神经细胞瘤或原始神经外胚层肿瘤(成神经管细胞瘤)。在一些实施方案中,神经胶质瘤为星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、室管膜瘤或脉络丛乳头状瘤。某些实施方案包括治疗多形性成胶质细胞瘤的方法。在一些实施方案中,多形性成胶质细胞瘤为巨细胞成胶质细胞瘤或胶质肉瘤。

[0031] 某些实施方案包括治疗溶酶体贮积症的方法。在一些实施方案中,所述溶酶体贮积症选自下述的一种或多种:天冬氨酰葡萄糖胺尿症、胆固醇酯贮积病、沃尔曼病、胱氨酸病、达农(Danon)病、法布里病、法伯脂质肉芽肿病、法伯病、岩藻糖苷贮积症、I/II型半乳糖唾液酸贮积症、I/II/III型戈谢病、戈谢病、球形细胞脑白质营养不良、克拉伯病、II型糖原贮积病、庞贝氏病、I/II/III型GM1-神经节苷脂贮积症、I型GM2-神经节苷脂贮积症、泰萨克斯病、II型GM2-神经节苷脂贮积症、山霍夫氏病、GM2-神经节苷脂贮积症、I/II型 $\alpha$ -甘露糖苷贮积症、 $\beta$ -甘露糖苷贮积症、异染性脑白质营养不良、I型粘脂质贮积症、I/II型唾液酸贮积症、II/III型粘脂质贮积症、I-细胞病、IIIC型粘脂质贮积症、假Hurler多营养障碍(pseudo-Hurler polydystrophy)、I型粘多糖贮积症、II型粘多糖贮积症(亨特氏综合征)、IIIA型粘多糖贮积症、圣菲利波氏症、IIIB型粘多糖贮积症、IIIC型粘多糖贮积症、IIID型粘多糖贮积症、IVA型粘多糖贮积症、莫基奥综合征、IVB型粘多糖贮积症、VI型粘多糖贮积症、VII型粘多糖贮积症、斯赖综合征、IX型粘多糖贮积症、多种硫酸酯酶缺乏症、神经元蜡样脂褐质沉积症、CLN1贝敦氏病、NB型尼曼-匹克病、尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、致密性成骨不全症、I/II型辛德勒病、辛德勒病和唾液酸转运体贮积病。

[0032] 某些实施方案包括治疗中枢神经系统(CNS)退行性或自身免疫性疾病的方法。在具体实施方案中,所述CNS退行性或自身免疫性疾病为阿尔兹海默病、亨廷顿氏舞蹈症、帕金森病或多发性硬化(MS)。

[0033] 在一些实施方案中,所述对象正在接受用其它的心脏毒性药剂进行的治疗。在某些实施方案中,所述心脏毒性药剂为蒽环霉素/anthraquinolone、环磷酰胺、抗代谢物、抗微管药物、酪氨酸激酶抑制剂、贝伐单抗或曲妥珠单抗。在具体实施方案中,所述心脏毒性药剂为环戊烯基胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、卡培他滨、紫杉醇、多西他赛、阿霉素、多柔比星、表阿

霉素、吐根碱、isotamide、丝裂霉素C、埃罗替尼、吉非替尼、伊马替尼、索拉菲尼、舒尼替尼、顺铂、萨利多胺、白消安、长春花碱、博来霉素、长春新碱、三氧化二砷、甲氨蝶呤、罗格列酮或米托蒽醌。

[0034] 在某些实施方案中,对象患有癌症。在某些实施方案中,所述癌症为下述的一种或多种:乳腺癌、前列腺癌、胃肠癌、肺癌、卵巢癌、睾丸癌、头颈癌、胃癌、膀胱癌、胰腺癌、肝癌、肾癌、鳞状细胞癌、CNS或脑癌、黑色素瘤、非黑色素瘤癌、甲状腺癌、子宫内膜癌、上皮性肿瘤、骨癌或造血系统癌症。

[0035] 在某些实施方案中,相对于施用非缀合形式的药剂,施用所述缀合物降低了药剂的心脏毒性。

[0036] 某些实施方案包括治疗疼痛的方法。在一些实施方案中,所述疼痛为急性疼痛、慢性疼痛、神经性疼痛和/或中枢性疼痛、

[0037] 某些实施方案包括治疗炎症病况的方法。在一些实施方案中,所述炎症病况包括中枢神经系统部分。在某些实施方案中,所述炎症病况为下述的一种或多种:脑膜炎、脊髓炎、脑脊髓炎、蛛网膜炎、肉状瘤病、肉芽肿瘤、药物引起的炎症、阿尔兹海默病、中风、HIV-痴呆、脑炎、寄生虫感染、炎性脱髓鞘病、CD8+T细胞介导的CNS自身免疫病、帕金森病、重症肌无力、运动神经病变、格林巴利综合征、自身免疫性神经病变、兰伯特-伊顿(Lambert-Eaton)肌无力综合征、副癌性神经疾病、副癌性小脑萎缩、非副癌性僵人综合征、渐进性小脑萎缩、拉斯马森脑炎、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、西登哈姆氏舞蹈病、抽动秽语综合征、自身免疫性多内分泌病、免疫异常神经病变、获得性神经性肌强直、多发性关节硬化症、视神经炎、中风、外伤性脑损伤(TBI)、椎管狭窄症、急性脊髓损伤和脊髓压迫症。

[0038] 在某些实施方案中,所述炎症病况与中枢神经系统感染有关。在某些实施方案中,所述感染是由下述中一种或多种引起的细菌性感染:B族链球菌(如亚型III)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*) (如血清型6、9、14、18和23)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) (如携带K1抗原)、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*) (如血清型IVb)、奈瑟菌感染如脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*) (脑膜炎球菌)、葡萄球菌感染、嗜血杆菌感染如B型流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、克雷伯氏菌、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*)或伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)。在某些实施方案中,所述感染为由下述中一种或多种引起的病毒性感染:肠病毒、1型或2型单纯疱疹病毒、人T-淋巴细胞病毒、水痘带状疱疹病毒、腮腺炎病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)或淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)。在某些实施方案中,所述炎症病况与CNS癌症,任选地与恶性脑膜炎有关。

[0039] 也包括使对象的器官或组织组成部分(component)成像的方法,包括:(a)向对象施用本文描述的人p97多肽,其中所述多肽与可检测的实体缀合,和(b)使对象中可检测的实体可视化。在某些实施方案中,所述器官和组织腔室(compartment)包括中枢神经系统。在某些实施方案中,所述器官和组织腔室包括脑。在某些实施方案中,使可检测实体可视化包括荧光镜检查、投影射线照相术、X-射线CT-扫描、正电子发射断层扫描(PET)、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)或磁共振成像(MRI)中的一种或多种。

[0040] 通过参考下述的详细说明和附图,本发明的这些和其它方面将是显而易见的。本文公开的所有参考文献在此通过引用的方式将其整体并入,如同将每项单独并入。

## 附图说明

[0041] 图1显示了CNBr消化的人黑色素转铁蛋白(p97)的SDS-PAGE分析。

[0042] 图2A-2D显示了通过对人p97溶液中的胰蛋白酶消化物进行MS/MS分析鉴定的一系列p97片段,图2E显示了该分析的序列覆盖图。

[0043] 图3显示了通过对CNBr消化的人p97进行MS/MS分析而鉴定的p97片段的序列覆盖图。将图1的SDS-PAGE中鉴定的三条条带进行胰酶消化和LC-MS/MS分析;图3A显示了条带1的结果,图3B显示了条带2的结果,图3C显示了条带3的结果。

[0044] 图4A显示了条带1中检测的肽与人p97的氨基酸序列的匹配,匹配的肽的序列覆盖以粗体显示。图4B列出了单独的肽和它们的某些物理特性。

[0045] 图5A显示了条带2中检测的肽与人p97的氨基酸序列的匹配,匹配的肽的序列覆盖以粗体显示。图5B列出了单独的肽和它们的某些物理特性。

[0046] 图6A显示了条带3中检测的肽与人p97的氨基酸序列的匹配,匹配的肽的序列覆盖以粗体显示。图6B列出了单独的肽和它们的某些物理特性。

[0047] 图7示例说明了血脑屏障(BBB)的体外模型,其中在腔室中的过滤器(3或4 $\mu$ m的过滤器)上有内皮细胞,以模拟从血液到中枢神经系统的屏障,并且在近腔室中有神经胶质细胞以模拟中枢神经系统。

[0048] 图8显示了使用BBB体外模型的测试方案的原理图。

[0049] 图9显示了人可溶性p97(SEQ ID NO:91;SEQ ID NO:1的第20-709位残基)的YASPIN二级结构预测(参见Yin et al.,Bioinformatics.21:152-159,2005)以及在BBB体外模型中被鉴定有显著转运活性的一些p97肽片段。图9A显示了穿过BBB的某些胰蛋白酶消化形成的肽段片段(加下划线的),图9B显示了穿过BBB的CNBr消化的肽片段中的三条(加下划线的)。

[0050] 图10显示了p97(MTf)-抗体缀合物的合成路线(参见实施例3)。

[0051] 图11显示了向小鼠施用MTf-抗体缀合物和对照蛋白后,其在脑部的分布(参见实施例3)。

[0052] 图12显示了p97(MTf)-HRP(12B)缀合物的合成路线(参见实施例4)。

[0053] 图13A-13C显示了用于评价测试蛋白在脑中的生物分布而进行的三维(3D)共聚焦显微镜检查的结果。图13A显示了PBS的结果,图13B显示了AF680标记的HRP的分布结果,图13C显示了AF680标记的MTf<sub>PEP</sub>-HRP缀合物的结果。图13C中的箭头突出了脑组织中AF680标记的MTf<sub>PEP</sub>-HRP缀合物的AF680荧光。

[0054] 发明详述

[0055] 本发明的实施方案部分基于具有穿过血脑屏障(BBB)转运的能力的人p97(黑色素转铁蛋白)最小片段的发现。

[0056] 因此,本发明的实施方案涉及人p97的具体多肽片段及其变体、含有所述多肽片段的组合物、具有附连的目标药剂或与目标药剂可操作地连接的p97片段的缀合物或混合物,及其应用的相关方法,包括治疗方法、诊断方法和测试方法,如医学成像。

[0057] 本文描述的人p97多肽片段在治疗和诊断领域可以有多种应用,例如增加药剂穿过血脑屏障的转移。而且,通过鉴定BBB转运活性所需的最小片段,本发明的某些方面允许使用更小的p97多肽,从而减少与更大多肽的合成/生产、纯化和药物制剂有关的一些困难。

[0058] 其它的优势对本领域技术人员将是显而易见的。

[0059] 定义

[0060] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科技术语与本发明所属领域的那些普通技术人员所理解的含义相同。尽管在本发明的实施和测试中可使用任何与本文描述的那些相似或等价的方法和材料,仍然描述了优选的方法和材料。为了本发明的目的,将下文的术语按如下来定义。

[0061] 本文使用的冠词“a”和“an”指一个或多于一个(即至少一个)的该冠词的语法受词。例如,“一元件(an element)”意为一个或多于一个元件。

[0062] “约(about)”意为量(quantity)、水平、值、数量、频率、百分率、尺寸(dimension)、大小(size)、量(amount)、重量或长度与其参考值相比有30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1%的不同。

[0063] 本文使用的术语“氨基酸”意图指天然存在的和非天然存在的氨基酸以及氨基酸的类似物和模拟物。天然存在的氨基酸包括在蛋白生物合成中使用的20种(L)-氨基酸和其它的氨基酸,如4-羟基脯氨酸、羟基赖氨酸、锁链素、异锁链素、同型半胱氨酸、瓜氨酸和鸟氨酸。非天然存在的氨基酸包括,例如本领域技术人员已知的(D)-氨基酸、正亮氨酸、正缬氨酸、p-氟苯丙氨酸、乙硫氨基酪酸等。氨基酸类似物包括天然存在的和非天然存在的氨基酸的修饰形式。此种修饰可包括,例如将氨基酸的化学基团或化学部分进行取代或替换,或者通过将氨基酸进行衍生。氨基酸模拟物包括,例如显示与参考氨基酸具有功能相似性特征(如电荷和电荷间距特征)的有机结构。例如,模拟精氨酸(Arg或R)的有机结构具有与天然存在的Arg氨基酸侧链的 $\epsilon$ -氨基相似的分子间隔分布的正电荷部分以及具有与其相同程度的迁移率。模拟物也包括约束结构以维持氨基酸或氨基酸功能基团的最适间距和电荷相互作用。那些本领域技术人员已知或可确定何种结构构成了功能等价的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。

[0064] 在整个本说明书中,除非上下文需要,否则术语“包括(comprise)”、“包括(comprises)”和“包括(comprising)”将被理解为意指包含所陈述的步骤或元件,或者步骤或元件的组,而不排除任何其它的步骤或元件或者步骤或元件的组。通过“由…组成”,意为包括并限于短语“由…组成”后跟的无论什么。因此,短语“由…组成”表明列出的元件是必须的或强制的,而且不可能出现其它的元件。通过“基本由…组成”,意为包括短语后列出的任何元件,并且限于不干扰或有助于列出的元件在公开内容中指定的活性或作用的任何元件。因此,短语“基本由…组成”表明列出的元件是必须的或强制的,而其它的元件是可选的,并且根据它们是否极大地影响列出的元件的活性或作用而可能或不可能出现。

[0065] 术语“缀合物”意指由于药剂或其它分子共价或非共价结合或连接,如生物活性分子与p97多肽结合或连接而形成的实体。缀合多肽的一个实例为“融合蛋白”或“融合多肽”,即,通过将两个或更多的编码序列连接而产生的多肽,其中所述编码序列最初编码单独的多肽;将连接的编码序列进行翻译产生单个的融合多肽,其通常具有来源于每个单独多肽的功能特性。

[0066] 本文使用的术语“功能(function)”和“功能的(functional)”等,指生物功能、酶功能或治疗功能。

[0067] “同源性(homology)”指相同的或组成保守型取代的氨基酸的数量的百分比。可通

过序列比对程序如GAP (Deveraux et al., Nucleic Acids Research. 12, 387-395, 1984) 来确定同源性, 将其通过引用的方式并入本文。这样可通过向队列中插入空位, 将本文引用的那些序列与相似或长度显著不同的序列进行比较, 可通过, 例如GAP使用的比较算法来确定此种空位。

[0068] 通过“分离的”, 意指基本上或实质上不与在物质的天然状态中通常与其相连的组分相连的物质。例如本文使用的“分离的肽”或“分离的多肽”等, 包括将肽或多肽分子从其天然的细胞环境中以及从与该细胞的其它组分的连接中进行体外的分离和/或纯化, 即所述肽或多肽分子不与体内物质显著相连。

[0069] 本文使用的术语“连接(linkage)”、“连接子(linker)”、“连接部分(linker moiety)”或“L”指可用于将p97多肽片段与目标药剂分隔的连接子, 或可用于将第一药剂与另外的药剂分隔的连接子, 例如将其中两种或多种药剂相连以形成p97缀合物。所述连接子可以是生理稳定的, 或可包含可释放的连接子, 例如酶可降解连接子(如可通过蛋白水解剪切的连接子)。在某些方面, 所述连接子可以是肽连接子, 例如作为p97融合蛋白的一部分。在一些方面, 所述连接子可以是非肽连接子或非蛋白连接子。在一些方面, 所述连接子可以是颗粒, 如纳米颗粒。

[0070] 术语“调整(modulating)”和“改变(altering)”包括“增加(increasing)”、“增强(enhancing)”或“促进(stimulating)”以及“降低(decreasing)”或“减少(reducing)”, 通常是相对于对照的统计上显著的或生理上显著的量或水平。“增加的”、“促进的”或“增强的”量通常为“统计上显著”的量, 并且可包括不存在组合物(如不含本发明缀合物的多肽)或对照组合物、样品或测试对象所产生的量的1.1、1.2、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30或更多倍(如500、1000倍)(包括其间的和大于1的所有整数和小数, 例如1.5、1.6、1.7、1.8等)的增加。“降低的”或“减少的”量通常为“统计上显著的”量, 并且可包括不存在组合物或对照组合物所产生的量的1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%(包括其间的所有整数)的减少。作为非限制性实例, 对照可以比较, 相对于单独的药剂, p97药剂缀合物的活性(如穿过血脑屏障转运/递送量或速率), 在中枢神经系统组织分布的速率和水平, 和/或血浆、中枢神经系统组织或任何其它的全身或外周非中枢神经系统组织的峰值浓度。本文描述了比较和“统计上显著的”量的其它实例。

[0071] 在某些实施方案中, 可具体限定组合物中任何给定药剂(例如, p97缀合物如融合蛋白)的“纯度”。例如, 某些组合物可包含纯度为至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的药剂, 包括其间的所有小数, 例如但决不限于, 通过高压液相色谱法(HPLC)来测定, HPLC是生物化学和分析化学中经常使用的柱色谱法的众所周知的形式, 其可将化合物分离、鉴定和定量。

[0072] 本文使用的术语“多肽(polypeptide)”和“蛋白(protein)”是可互换的, 其指的是氨基酸残基聚合物及其变体和合成类似物。因此, 这些术语适于一个或多个氨基酸残基为合成的非天然存在的氨基酸的氨基酸聚合物, (如相应的天然存在的氨基酸)以及天然存在的氨基酸聚合物的化学类似物。本文描述的多肽不限于特定长度的产物; 因此, 肽、寡肽和蛋白都包含于多肽的定义中, 并且除非特别指出, 这些术语可在本文中互换使用。本文描述

的多肽也可包括表达后修饰,如糖基化、乙酰化、磷酸化等,以及本领域已知的天然存在的和非天然存在的其它修饰。多肽可以是整个蛋白,或者是它的子序列、片段、变体或衍生物。

[0073] “生理上可剪切的 (physiologically cleavable)”或“可水解的 (hydrolyzable)”或“可降解的 (degradable)”键为在生理条件下与水反应的键 (即是水解的)。键在水中水解的趋势不仅取决于将两个中心原子相连的通常的连接类型,还取决于这些中心原子上附连的取代基。合适的水解不稳定或弱连接包括,但不限于:羧酸酯、磷酸酯、酸酐、乙缩醛、缩酮、酰氧基烷基醚、亚胺、原酸酯、含硫酯、硫酯、碳酸盐和脘、肽和寡核苷酸。

[0074] “可释放的连接子”包括但不限于,生理上可剪切的连接子和酶可降解的连接子。因此,“可释放的连接子”为在生理条件下,可经历自发水解或被一些其它机制剪切 (如酶催化、酸催化、碱催化等等) 的连接子。例如,“可释放的连接子”可涉及包含质子的碱脱除 (base abstraction) (如可电离的氢原子H<sup>a</sup>) 作为驱动力的消去反应。为了本文的目的,“可释放的连接子”是“可降解的连接子”的同义词。“酶可降解的连接”包括例如通过一种或多种酶 (如肽酶或蛋白酶) 来降解的连接如氨基酸序列。在具体实施方案中,可释放的连接子在pH 7.4、25°C时,例如在生理pH、人体温度 (如体内) 时的半衰期为约30分钟、约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约12小时、约18小时、约24小时、约36小时、约48小时、约72小时或约96小时或更短。

[0075] 术语“参考序列”通常指将另一序列与之比较的核酸编码序列或氨基酸序列。参考序列包括本文描述的所有多肽和多核苷酸序列,包括那些用名称描述的和那些在表格和序列列表中描述的。

[0076] 本文使用的术语“序列同一性”或例如,包含“与...具有50%序列同一性”指在比对窗口中,基于核苷酸与核苷酸或氨基酸与氨基酸的序列相同的程度。因此,可通过下述方法来计算“序列同一性百分比”:在比对窗口中将两条最优对齐的序列进行比较;确定在两条序列中都出现的具有相同的核酸碱基 (例如A、T、C、G、I) 或相同的氨基酸残基 (例如Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met) 的位点数量以得到匹配位点的数量;将匹配位点的数量除以比对窗口中所有位点的数量 (即,窗口大小),并且将结果乘以100以得到序列同一性百分比。包含与本文描述的任何参考序列 (参见,如序列列表) 具有至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的核苷酸和多肽,其中多肽变体通常保有参考多肽的至少一种生物活性。

[0077] 用于描述两个或更多的多核苷酸之间或多肽之间的序列关系的术语包括:“参考序列”、“比对窗口”、“序列同一性”、“序列同一性百分比”和“基本同一性”。“参考序列”的长度为至少12个,但通常为15-18个,且经常为至少25个单体单元,包括核苷酸和氨基酸残基。由于两条多核苷酸可能每条都包括 (1) 两条多核苷酸中的相似序列 (例如只有完整多核苷酸序列的一部分),和 (2) 两条多核苷酸中的差异序列,通常通过在“比对窗口”将两条多核苷酸的序列进行比对来实施两条 (或更多) 多核苷酸之间的序列比对,从而鉴定和比对具有序列相似性的局部区域。“比对窗口”指至少为6个连续位置,通常为约50至约100个,更通常为约100至约150个连续位置的概念上的部分,其中在将序列最优对齐后,将序列与具有相同数量连续位置的参考序列进行比对。为了将两条序列最优对齐,与参考序列 (其不包括插入或缺失) 相比,比对窗口可包括约20%或更少的插入或缺失 (即空位)。可通过算法

(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,Genetics Computer Group,575 Science Drive Madison,WI,USA)的计算机化实施或通过检查和任何选择的不同方法产生的最优对齐(即在比对窗口产生最高百分比的同源性)来进行用于对齐比对窗口的序列的最优对齐。也可参考例如Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389,1997公开的程序中的BLAST家族。可在Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley & Sons Inc,1994-1998,第15章第19.3单元中找到序列分析的详细讨论。

[0078] “统计上显著的”指结果不太可能偶然发生。可通过任何本领域已知的方法来测定统计显著性。通常使用的显著性方法包括p-值,如果零假设是正确的,p-值为观察的事件会发生的频率或可能性。如果得到的p值小于显著水平,则拒绝零假设。在简单情况下,将显著水平限定为p值为0.05或更低。

[0079] 术语“溶解度”指p97多肽片段或缀合物溶解于液体溶剂并形成均匀溶液的性质。溶解度通常表述为浓度,或通过每单位体积溶剂中溶质的质量(溶质g/溶剂kg、g/dL(100mL)、mg/ml等)、摩尔浓度、质量摩尔浓度、摩尔分数或其它类似的浓度的表述来表示。在特定条件下(包括温度、压力、pH和溶剂的性质),每单位溶剂能够溶解的溶质的最大平衡量称为溶质在该种溶剂中的溶解度。在某些实施方案中,在生理pH或其它pH,如在pH 5.0、pH 6.0、pH 7.0或pH 7.4时,测定溶解度。在某些实施方案中,在水中或生理缓冲液中,如PBS或NaCl(含有或不含NaP)中测定溶解度。在特殊实施方案中,在相对更低的pH(例如pH 6.0)和相对更高的盐浓度(例如500mM NaCl和10mM NaP)下测定溶解度。在某些实施方案中,在生物液体(溶剂),如血或血清中测定溶解度。在某些实施方案中,温度可以是大约室温(例如,约20、21、22、23、24、25℃)或约体温(~37℃)。在某些实施方案中,在室温或在约37℃,p97多肽或缀合物的溶解度为至少约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25或30mg/ml。

[0080] 本文使用的“对象”包括表现出可用本发明的p97缀合物治疗或诊断的症状或有表现出此种症状的风险的任何动物。合适的对象(患者)包括实验动物(如小鼠、大鼠、兔子或豚鼠)、农场动物(farm animals)和家畜或宠物(如猫或狗)。包括不含人类的灵长类动物,并且优选人类患者。

[0081] “基本上(substantially)”或“本质上(essentially)”指几乎全部或完全,例如某给定量的95%、96%、97%、98%、99%或更多。

[0082] “基本不含(substantially free)”指几乎完全或完全不含给定的量,例如少于某给定量的约10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或更少。例如,某些组合物可“基本不含”细胞蛋白、细胞膜、核酸、内毒素或其它污染物。

[0083] 本文使用的“治疗(Treatment)”或“治疗(treating)”包括对疾病或病况的症状或病理的任何可期望的效果,并且也可包括接受治疗的疾病或病况的一种或更多可测量的标志物的甚至是最小的变化或改善。“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”不一定表示疾病或病况或其相关症状完全根除或治愈。接受此种治疗的对象为任何有需要的对象。临床改善的示例性标志物对本领域技术人员将是显而易见的。

[0084] 术语“野生型(wild-type)”指基因或基因产物,其具有此种基因或基因产物从天然存在的来源中分离时的特性。野生型基因或基因产物(如多肽)指在种群中观察到的最高

频率的基因或基因产物,因而被任意地设定为基因的“正常”或“野生型”形式。

[0085] P97多肽序列和其缀合物

[0086] 本发明的实施方案通常涉及人p97(黑素转铁蛋白;MTf)多肽片段、包含此片段的组合物和其缀合物。在某些实例中,本文描述的p97多肽片段具有转运活性,即它们能够穿过血脑屏障(BBB)转运。在具体实施方案中,p97片段与目标药剂(如治疗剂、诊断剂或可检测的药剂)共价、非共价或可操作地(operatively)缀合,从而形成p97药剂缀合物。除本文描述的和本领域已知的其它药剂外,药剂的具体实例包括小分子和多肽,如抗体。示例性p97多肽序列和药剂在下文描述。也描述示例性的方法和组分,如将p97多肽与目标药剂缀合的连接子组。

[0087] p97序列。在一些实施方案中,p97多肽包括表1-7或图2-6或图9中鉴定的人p97片段中的至少一种,或基本由其组成,或由其组成。在具体实施方案中,p97多肽包括SEQ ID NOS:2-18中给出的人p97序列中的至少一种,或基本由其组成,或由其组成。

[0088] 在其它具体实施方案中,下面更详细地描述了p97多肽序列,其包括沿其长度,与表1-7或图2-6或图9中鉴定的人p97片段具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或同源性的序列。在一些实施方案中,p97多肽序列的变体包括沿其长度,与SEQ ID NOS:2-18中给出的人p97序列中的至少一种有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或同源性的序列。

[0089] 在一些实施方案中,p97多肽包括表1-7或图2-6或图9中鉴定的p97片段中的2、3、4或5种,或基本由其组成,或由其组成,任选地包括任何间插p97序列(即如果存在,来自SEQ ID NO:1的p97序列位于片段之间)。在具体实施方案中,p97多肽包括SEQ ID NOS:2-18中给出的p97序列中的2、3、4或5种,或基本由其组成,或由其组成,任选地包括任何间插p97序列(即如果存在,来自SEQ ID NO:1的p97序列位于SEQ ID NOS:2-18之间)(也参见表示SEQ ID NOS:2-18之间人p97初级结构关系的图9A和9B)。作为一个实例,p97多肽可包括SEQ ID NO:13和14,任选地包含来自SEQ ID NO:1的任何间插p97序列或其变体。

[0090] 在某些实施方案中,如SEQ ID NO:1所限定的,p97多肽片段的长度为约,至少约,或至多约5、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、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、700、710、720、730个或更多个氨基酸,包括其间的所有整数和范围,并且其可包括参考p97序列的全部或部分序列(参见,例如,序列表、表1-7、表B、图2-6和图9),包括参考p97片段的任何邻近的N-端和/或C端序列。

[0091] 在某些实施方案中,如SEQ ID NO:1限定的,p97多肽片段长度为约5-700、5-600、5-500、5-400、5-300、5-200、5-100、5-50、5-40、5-30、5-25、5-20、5-15、5-10、10-700、10-600、10-500、10-400、10-300、10-200、10-100、10-50、10-40、10-30、10-25、10-20、10-15、20-700、20-600、20-500、20-400、20-300、20-200、20-100、20-50、20-40、20-30、20-25、30-

700、30-600、30-500、30-400、30-300、30-200、30-100、30-50、30-40、40-700、40-600、40-500、40-400、40-300、40-200、40-100、40-50、50-700、50-600、50-500、50-400、50-300、50-200、50-100、60-700、60-600、60-500、60-400、60-300、60-200、60-100、60-70、70-700、70-600、70-500、70-400、70-300、70-200、70-100、70-80、80-700、80-600、80-500、80-400、80-300、80-200、80-100、80-90、90-700、90-600、90-500、90-400、90-300、90-200、90-100、100-700、100-600、100-500、100-400、100-300、100-250、100-200、100-150、200-700、200-600、200-500、200-400、200-300或200-250个氨基酸，并且包括参考p97序列的全部或部分（参见，例如，序列表、表1-7、表B、图2-6和图9），包括参考p97片段的任何邻近的N-端和/或C端序列。

[0092] 如式[X]<sub>n</sub>所示，某些实施方案包括一个或多个p97片段，例如2、3、4或5个片段，其中X为本文描述的p97片段，且n是从1到5的整数。在具体实施方案中，X为DSSHAFTLDELRL（SEQ ID NO:13）。

[0093] 在具体实施方案中，p97片段或其变体具有穿过BBB的能力，并且任选地，将目标药剂穿过BBB转运至中枢神经系统内。在某些实施方案中，p97片段或其变体能够与p97受体、LRP1受体和/或LRP1B受体特异性地结合。

[0094] 在一些实施方案中，p97片段具有一个或多个末端（如N-末端、C-末端）半胱氨酸和/或酪氨酸，可分别将其添加以进行缀合或碘化。

[0095] 下面更详细描述了参考p97多肽和其它参考多肽的变体和片段。

[0096] p97缀合物。如上文所指出的，某些实施方案包括与目标药剂相连的p97多肽，例如，小分子、多肽（如肽、抗体）、肽模拟物、类肽、适配体、可检测的实体或其任意组合。也包括包含多种目标药剂的缀合物，例如，与抗体和小分子缀合的p97片段。

[0097] 优选共价连接，但是也可应用非共价连接，包括那些利用相对强的非共价的蛋白-配体相互作用的非共价连接，如生物素与抗生物素蛋白之间的相互作用。也包括可操作连接，其不一定需要在p97片段和目标药剂之间直接的共价或非共价相互作用；该可操作连接的实例包括包含p97多肽和目标试剂的脂质体混合物。本文描述了产生蛋白缀合物的示例性方法，其它方法在本领域是已知的。

[0098] 小分子。在具体实施方案中，p97片段与小分子缀合。“小分子”指合成的或生物来源（生物分子）的有机化合物，但通常不是聚合物。有机化合物指分子中包含碳的一大类化合物，通常排除那些仅含有碳酸盐、简单的碳氧化物或氰化物的化合物。“生物分子”通常指由活的有机体产生的有机分子，包括大的聚合物分子（生物聚合物）如肽、多糖和核酸，和小分子如初级、次级代谢产物、脂质、磷脂、糖脂、固醇、甘油糖脂、维生素和激素。“聚合物”通常指由重复的结构单元组成的大分子或高分子，其通常由共价化学键连接。

[0099] 在某些实施方案中，小分子的分子量为小于约1000-2000道尔顿，通常为约300-700道尔顿，并且包括约50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000或2000道尔顿。

[0100] 某些小分子可具有用于描述抗体（下文）的“特异性结合”特性。例如，小分子可与本文描述的靶标特异性结合，其结合的亲和力（K<sub>d</sub>）为至少约0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、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、40或50nM。在某些实施方案中，小分子可与细胞表面受体或其

它细胞表面蛋白特异地结合。在一些实施方案中,所述小分子与本文描述的至少一种癌症相关抗原特异地结合。在具体实施方案中,所述小分子与本文描述的至少一种神经系统相关抗原、疼痛相关抗原和/或自身免疫相关抗原特异地结合。

[0101] 示例性的小分子包括细胞毒性剂、化学治疗剂和抗血管生成剂,例如那些被认为可用于治疗各种癌症(包括中枢神经系统癌症和转移至中枢神经系统的癌症)的药剂。小分子的具体类别包括但不限于:烷化剂、抗代谢物、氨基环霉素、抗肿瘤抗生素、铂、I-型拓扑异构酶抑制剂、II-型拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱和紫杉烷。

[0102] 小分子的具体实例包括:苯丁酸氮芥、环磷酰胺、西仑吉肽、洛莫司汀(CCNU)、美法仑、甲苄肼、塞替派、卡莫司汀(BCNU)、enzastaurin、白消安、道诺霉素、阿霉素、吉非替尼、埃罗替尼、伊达比星、替莫唑胺、表阿霉素、米托蒽醌、博来霉素、顺铂、卡铂、奥沙利铂、喜树碱、伊立替康、拓扑替康、安吡啶、依托泊苷、磷酸依托泊苷、替尼泊苷、替西罗莫司、依维莫司、长春新碱、长春花碱、长春瑞滨、长春地辛、CT52923和紫杉醇,以及以上任何小分子的药学可接受的盐、酸或其衍生物。

[0103] 小分子的其它实例包括那些用于治疗神经系统(如CNS)疾病的靶蛋白激酶,包括伊马替尼、达沙替尼、索拉菲尼、帕唑帕尼、苏尼替尼、瓦他拉尼、易瑞沙、埃罗替尼、AEE-788、二氯醋酸盐(dichoroacetate)、他莫昔芬、法舒地尔、SB-681323和semaxanib(SU5416)(参见Chico et al., Nat Rev Drug Discov. 8:829-909, 2009)。小分子的实例还包括多奈哌齐、加兰他敏、美金刚、卡巴拉汀、他克林、雷沙吉兰、纳曲酮、鲁比前列酮、沙芬酰胺、伊曲茶碱、匹莫范色林、pitolisant、伊拉地平、pridopidine(ACR16)、四苯喹啉和蓓萨罗丁(如用于治疗阿尔兹海默病、帕金森病、亨廷顿氏舞蹈症),以及醋酸格拉替雷、芬戈莫德、米托蒽醌(如用于治疗MS)。也包括以上任何小分子的药学可接受的盐、酸或其衍生物。

[0104] 小分子的其它实例包括:烷化剂如塞替派、环磷酰胺(CYTOXAN™);烷基磺酸盐如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮杂环丙烷如苯佐替哌、卡波醌、美妥替哌和乌瑞替哌;乙烯亚胺和甲基三聚氰胺,包括六甲蜜胺、三亚乙基蜜胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺;氮芥如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮芥、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺、盐酸氧化氮芥、美法仑、新恩比兴、苯芥胆甾醇、泼尼氮芥、曲洛磷酰胺、尿嘧啶氮芥;亚硝基脲如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀;抗生素如阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素、安曲霉素、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素、卡里奇霉素、卡柔比星(carabycin)、洋红霉素、嗜癌素、色霉素、放线菌素d、道诺霉素、地托比星、6-重氨基-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素、表阿霉素、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链脲菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢物如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物如二甲叶酸、甲氨蝶呤、喋罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物如氟达拉滨、6-巯嘌呤、硫脲嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、伊诺他滨、氟尿苷、5-FU;雄激素如卡普睾酮、屈他雄酮丙酸酯、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺素如氨鲁米特、米托坦、曲洛斯坦;叶酸补充剂如亚叶酸;醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;安吡啶;bestrabucil;比生群;伊达曲杀(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);秋水酰胺;地吡醌;elformithine;依利醋铵;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;米托胍脲;米托

葱醌;莫派达醇;硝基可润(nitracrine);喷司他丁;苯来美特;吡柔比星;鬼臼酸;2-乙基肼;甲苄肼;PSK;雷佐生;西佐喃;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2"-三氯三乙胺;氨基甲酸乙酯;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;gacytosine;阿糖胞苷("Ara-C");环磷酰胺;塞替派;紫衫烷如紫杉醇(TAXOL<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)和多西他赛(TAXOTERE<sup>®</sup>, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France);苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-硫代鸟嘌呤;巯嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物,如顺铂和卡铂;长春花碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托葱醌;长春新碱;长春瑞滨;去甲长春碱;米托葱醌;替尼泊苷;正定霉素;氨蝶呤;卡培他滨;伊班膦酸盐;CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);视黄酸衍生物如Targretin<sup>™</sup>(萆萨罗丁)、Panretin<sup>™</sup>(阿里维A酸);ONTAK<sup>™</sup>(地尼白介素);esperamicins;卡培他滨;以及以上任何小分子的药学可接受的盐、酸或其衍生物。

[0105] 还包括发挥调节或抑制激素对肿瘤作用的抗激素类药剂如抗雌激素,包括例如,他莫昔芬、雷洛昔芬、芳香化酶抑制4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、keoxifene、LY117018、奥那司酮和托瑞米芬(法乐通);和抗雄激素如氟他米特、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;以及以上任何小分子的药学可接受的盐、酸或其衍生物。

[0106] 如上文所指出的,在某些方面,所述小分子可以是另外的心脏毒性剂。心脏毒性小分子的具体实例包括但不限于:氨茴环霉素/antraquinolones、环磷酰胺、抗代谢物、抗微管药物和酪氨酸激酶抑制剂。除本文描述的和本领域已知的其它小分子外,心脏毒性剂的具体实例包括:环戊烯基胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、卡培他滨、紫杉醇、多西他赛、阿霉素、多柔比星、表阿霉素、吐根碱、isotamide、丝裂霉素C、埃罗替尼、吉非替尼、伊马替尼、索拉菲尼、舒尼替尼、顺铂、萨利多胺、白消安、长春花碱、博来霉素、长春新碱、三氧化二砷、甲氨蝶呤、罗格列酮和米托葱醌。

[0107] 多肽药剂。在具体实施方案中,目标药剂为肽或多肽。本文使用的术语“肽”和“多肽”是可互换的,然而在某些实例中,术语“肽”可指较短的多肽,例如由约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸组成的多肽,包括其间的所有整数和范围(如5-10、8-12、10-15)。如本文所述,多肽和肽可由天然存在的氨基酸和/或非天然存在的氨基酸组成。多肽也包括抗体。

[0108] 示例性的多肽药剂包括与溶酶体贮积症有关的多肽。此种多肽的实例包括:天冬氨酰葡萄糖胺糖苷酶、酸性脂酶、半胱氨酸转运体、Lamp-2、 $\alpha$ -半乳糖苷酶A、酸性神经酰胺酶、 $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶、 $\beta$ -己糖胺酶A、GM2-神经节苷脂激活剂(GM2A)、 $\alpha$ -D-甘露糖苷酶、 $\beta$ -D-甘露糖苷酶、芳基硫酸酯酶A、saposin B、神经氨酸苷酶、 $\alpha$ -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶、磷酸转移酶、磷酸转移酶 $\gamma$ -亚基、L-艾杜糖醛酸酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、乙酰肝素-N-硫酸酯酶、 $\alpha$ -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶、乙酰辅酶A:N-乙酰转移酶、N-乙酰氨基葡萄糖6-硫酸酯酶、半乳糖6-硫酸酯酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、N-乙酰半乳糖胺4-硫酸酯酶、透明质酸葡萄糖胺酶、硫酸酯酶、十六烷酰蛋白硫酸酯酶、三肽基肽酶-I、酸性鞘磷脂酶、组织蛋白酶A、组织蛋白酶K、 $\alpha$ -半乳糖苷酶B、NPC1、NPC2、唾液酸转运蛋白和唾液酸转运体,包括上述多肽的片段、变体和衍生物。

[0109] 某些实施方案包括经常用于治疗多发性硬化(MS)的多肽,诸如干扰素- $\beta$ 多肽,如干扰素- $\beta$ 1a(例如阿沃纳斯(Avonex)、利比(Rebif))和干扰素- $\beta$ 1b(例如倍泰龙

(Beraseron))。

[0110] 在一些实施方案中,如上文所指出的,上述多肽药剂为抗体或其抗原结合片段。本发明的缀合物或组合物中使用的抗体或抗原结合片段基本上可以是任何类型。具体实例包括治疗性抗体和诊断性抗体。本领域已知,抗体是能够通过位于免疫球蛋白分子可变区的至少一个抗原识别表位,与靶标(如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等)特异性结合的免疫球蛋白分子。

[0111] 本文使用的术语“抗体”不仅包含完整的多克隆或单克隆抗体,也包含其片段(如dAb、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv)、单链(ScFv)、合成的其变体、自然存在的变体、含有具有所需特异性的抗原结合片段的抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体以及含有具有所需特异性的抗原结合位点或片段(抗原识别表位)的免疫球蛋白分子的任何其它修饰构型。

[0112] 本文使用的术语“抗原结合片段”指含有与目标抗原结合的免疫球蛋白重链和/或轻链中至少一个CDR的多肽片段。在这点上,本文描述的抗体的抗原结合片段可包括来自抗体的VH和VL序列中的1、2、3、4、5或全部6个CDRs,所述抗体与治疗靶标或诊断靶标结合。

[0113] 术语“抗原”指可与选择性结合药剂(如抗体)结合的分子或分子的一部分,另外所述抗原能够用于动物以产生能够与其抗原表位结合的抗体。抗原可具有一个或多个抗原表位。

[0114] 术语“抗原表位”包括任何决定簇,优选为能够与免疫球蛋白或T细胞受体特异性结合的多肽决定簇。抗原表位是与抗体结合的抗原区域。在某些实施方案中,抗原表位决定簇包括分子的化学活性表面基团,如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基,并且在某些实施方案中可具有特殊的三维结构特性和/或特殊的电荷特性。抗原表位可与抗原的初级结构连续相关或不连续相关。

[0115] 如果分子(如抗体)与特定的细胞或物质的反应或结合比与其它细胞或物质的反应或结合更频繁、更迅速、持续时间更长和/或亲和力更强,则可说该分子表现出“特异性结合”或“优先结合”。如果抗体与靶标的结合比与其它物质的结合的亲和力更强、亲和性更强、更容易和/或持续时间更长,则抗体与该靶标“特异性结合”或“优先结合”。例如,与特定抗原表位特异性结合或优先结合的抗体是指,相比与其它抗原表位的结合,抗体与该特定表位的结合的亲和力更强、亲和性更强、更容易和/或持续时间更长。通过阅读该定义也可理解,例如,与第一靶标特异性或优先结合的抗体(或一部分或抗原表位),可能或不可能与第二靶标特异性或优先结合。照此,“特异性结合”或“优先结合”不一定需要(尽管可包括)专一性结合。通常但不一定,提到结合就是指优先结合。

[0116] 免疫结合通常指免疫球蛋白分子与其特定抗原之间发生的类型中的非共价相互作用,例如通过举例说明而非限制,由于静电的、离子的、亲水的和/或疏水的吸引或排斥;空间力;氢键;范德华力以及其它相互作用。免疫结合相互作用的强度或亲和力可以用术语相互作用的解离常数( $K_d$ )表示,其中 $K_d$ 越小,表示亲和力越强。可用本领域已知的方法来量化所选的多肽的免疫结合特性。此类方法中的一种需要测定抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中那些速率取决于复合物组成部分的浓度、相互作用的亲和力以及平等地影响两个方向的速率的几何参数。因此,可通过计算结合和解离的浓度和实际速率来确定“结合速率常数( $K_{on}$ )”和“解离速率常数( $K_{off}$ )”。 $K_{off}/K_{on}$ 的比值能够消除所有与亲和力无关的参数,并因此等于解离常数 $K_d$ 。

[0117] 可使用本领域已知的方法来量化所选抗体和多肽的免疫结合特性(参见Davies et al., Annual Rev. Biochem. 59:439-473, 1990)。在一些实施方案中,当平衡解离常数为约 $\leq 10^{-7}$ 或 $10^{-8}$ M时,认为抗体或其它多肽能够与抗原或其抗原表位特异性结合。在一些实施方案中,抗体的平衡解离常数可以是约 $\leq 10^{-9}$ M或 $\leq 10^{-10}$ M。在某些示例性实施方案中,抗体或其它多肽与本文描述的抗原或靶标(其与之特异性结合)的亲和力( $K_a$ )为至少约0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、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、40或50nM。

[0118] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段或其它多肽与细胞表面受体或其它的细胞表面蛋白特异性结合。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段或其它多肽与细胞表面受体或其它细胞表面蛋白的配体特异性结合。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段或其它多肽与细胞内蛋白特异性结合。

[0119] 在某些实施方案中,抗体或其抗体结合片段或其它多肽与癌症相关抗原或癌症抗原特异性结合。示例性的癌症抗原包括细胞表面蛋白如细胞表面受体。也包括的癌症相关抗原为与细胞表面蛋白或受体结合的配体。在具体实施方案中,抗体或抗原结合片段与细胞内癌症抗原特异性结合。在一些实施方案中,与癌症抗原相关的癌症选自下述的一种或多种:乳腺癌、转移性脑癌、前列腺癌、胃肠癌、肺癌、卵巢癌、睾丸癌、头颈癌、胃癌、膀胱癌、胰腺癌、肝癌、肾癌、鳞状细胞癌、CNS或脑癌、黑色素瘤、非黑色素瘤、甲状腺癌、子宫内膜癌、上皮性肿瘤、骨癌或造血系统癌症。

[0120] 在具体实施方案中,抗体或抗原结合片段或其它多肽与至少一种癌症相关抗原或癌症抗原特异性结合,如人Her2/neu、Her1/EGF受体(EGFR)、Her3、A33抗原、B7H3、CD5、CD19、CD20、CD22、CD23(IgE受体)、C242抗原、5T4、IL-6、IL-13、血管内皮生长因子VEGF(如VEGF-A)、VEGFR-1、VEGFR-2、CD30、CD33、CD37、CD40、CD44、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CD152、CD200、CD221、CCR4、HLA-DR、CTLA-4、NPC-1C、腱生蛋白、波形蛋白、胰岛素样生长因子-1受体(IGF-1R)、甲胎蛋白、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、碳酸酐酶-9(CA-IX)、癌胚抗原(CEA)、整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、整合素 $\alpha_5\beta_1$ 、叶酸盐受体-1、跨膜糖蛋白NMB、成纤维细胞活化蛋白 $\alpha$ (FAP)、糖蛋白75、TAG-72、MUC1、MUC16(或CA-125)、磷酸酰丝氨酸、前列腺特异性膜抗原(PMSA)、NR-LU-13抗原、TRAIL-R1、肿瘤坏死因子受体超家族成员10b(TNFRSF10B或TRAIL-R2)、SLAM家族成员7(SLAMF7)、EGP40泛癌抗原、B-细胞活化因子(BAFF)、血小板源性生长因子受体、糖蛋白EpCAM(17-1A)、程序性死亡-1、蛋白二硫键异构酶(PDI)、肝再生磷酸酶-3(PRL-3)、前列腺酸磷酸酶、Lewis-Y抗原、GD2(在起源于神经外胚层的癌症中表达的双唾液酸神经节苷脂)、磷脂酰肌醇聚糖-3(GPC3),和/或间皮素。

[0121] 在具体实施方案中,抗体或其抗原结合片段或其它多肽与人Her2/neu蛋白特异性结合。基本上可将任何抗-Her2/neu抗体、抗原结合片段或其它与Her2/neu特异性结合的药剂用于生产本发明的p97抗体缀合物。例如,在美国专利第5,677,171、5,720,937、5,720,954、5,725,856、5,770,195、5,772,997、6,165,464、6,387,371和6,399,063号中描述了示例性的抗-Her2/neu抗体,将上述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0122] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段或其它的多肽与人Her1/EGFR(表皮生长因子受体)特异性结合。基本上可将任何抗-Her1/EGFR抗体、抗原结合片段或其它与Her1/EGFR特异性结合的药剂用于生产本发明的p97抗体缀合物。例如,在美国专利第5,

844,093、7,132,511、7,247,301、7,595,378、7,723,484、7,939,072和7,960,516,号中描述了示例性的抗-Her1/EGFR抗体,将上述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0123] 在某些实施方案中,抗体为治疗性抗体如抗癌治疗性抗体,包括诸如下述抗体:3F8、8H9、阿巴伏单抗、阿德木单抗、阿夫土珠单抗、阿仑单抗、培化阿珠单抗、阿麦妥昔单抗、阿泊珠单抗、巴维昔单抗、贝妥莫单抗、贝利木单抗、贝伐单抗、莫-比伐珠单抗、贝伦妥单抗-维多汀、莫-坎妥珠单抗、拉-坎妥珠单抗、卡罗单抗-喷地肽、卡妥索单抗、西妥昔单抗、泊-西他珠单抗、西妥木单抗、clivatuzumab(tetraxetan)、可那木单抗、达西珠单抗、达洛珠单抗、地莫单抗、drozitumab、依美昔单抗、依决洛单抗、依洛珠单抗、enavatuzumab、恩司昔单抗、依帕珠单抗、厄马索单抗、埃达珠单抗、法勒珠单抗、FBTA05、芬妥木单抗、flanvotumab、加利昔单抗、吉妥珠单抗、ganitumab、吉妥珠单抗(奥佐米星)、吉瑞昔单抗、格莱木单抗-维多汀、替-伊莫单抗、icrucumab、伊戈伏单抗、拉-英达西单抗、英妥木单抗、伊珠单抗-奥佐米星、伊匹木单抗(MDX-101)、伊妥木单抗、拉贝珠单抗、来沙木单抗、林妥珠单抗、莫-洛伏珠单抗、鲁卡木单抗、鲁昔单抗、马帕木单抗、马妥珠单抗、米拉珠单抗、米妥莫单抗、莫加珠单抗、moxetumomab(pasudotox)、他那可单抗、他那莫单抗、narnatumab、奈昔木单抗、尼妥珠单抗、纳武单抗、**Neuradiab®**(含有或不含放射性碘)、NR-LU-10、奥法木单抗、olaratumab、奥纳珠单抗、莫-奥珠单抗、奥戈伏单抗、帕尼单抗、帕曲土单抗、pemtumomab、培妥珠单抗、普立木单抗、雷妥莫单抗、radretumab、雷莫芦单抗、利妥木单抗、利妥昔单抗、罗妥木单抗、奥马珠单抗、西罗珠单抗、司妥昔单抗、tabalumab、帕-他莫单抗、替妥莫单抗、替妥木单抗、TGN1412、替西木单抗、曲美木单抗、替加珠单抗、TNX-650、托西莫单抗、TRBS07、曲妥珠单抗、西莫白介素单抗、ublituximab、乌瑞鲁单抗、维妥珠单抗、伏洛昔单抗、伏妥莫单抗和扎芦木单抗。还包括这些抗体的片段、变体以及衍生物。

[0124] 在具体实施方案中,所述抗体为心脏毒性抗体,即当以非缀合物的形式施用其表现出心脏毒性。表现出心脏毒性的抗体的具体实例包括曲妥珠单抗和贝伐单抗。

[0125] 在具体实施方案中,用于p97缀合物的抗-Her2/neu抗体为曲妥珠单抗(**赫赛汀®**)或其片段、变体或衍生物。**赫赛汀®**是被批准用于治疗人乳腺癌的Her2/neu-特异性单克隆抗体。在某些实施方案中,Her2/neu-结合抗原结合片段包括Her2/neu抗体的一个或多个CDRs。就这点而言,在一些情况中显示,在仍保留期望的特异性结合时,仅能实施抗体的VHCDR3的转移(Barbas et al.,PNAS.92:2529-2533,1995)。也可参见McLane et al.,PNAS USA.92:5214-5218,1995和Barbas et al.,J.Am.Chem.Soc.116:2161-2162,1994。

[0126] 在其它具体实施方案中,用于本发明的缀合物的抗-Her1/EGFR抗体为西妥昔单抗(**爱必妥®**)或其片段或衍生物。在某些实施方案中,抗-Her1/EGFR结合片段包括Her1/EGFR抗体(如西妥昔单抗)的一个或多个CDRs。西妥昔单抗被批准用于治疗头颈癌和直肠结肠癌。西妥昔单抗包括对人EGFR的N末端部分具有特异性的225鼠EGFR单克隆抗体的Fv(可变区,抗原结合)区域和人IgG1重链和κ轻链恒定区(骨架)。

[0127] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段或其它多肽与和至少一种神经系统疾病有关的抗原特异性结合,所述神经系统疾病包括周围和/或中枢神经系统(CNS)疾病。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段或其它多肽与疼痛相关抗原(如治疗)特异性结合,所

述疼痛包括急性疼痛、慢性疼痛和神经性疼痛。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段或其它多肽与自身免疫疾病相关抗原(如治疗)特异性结合,所述自身免疫疾病包括神经系统或CNS自身免疫疾病。

[0128] 神经系统-、疼痛-和/或自身免疫-相关抗原的实例包括但不限于: $\alpha$ -4( $\alpha$ 4)整合素、CD20、CD52、IL-12、IL-23、IL-12和IL-23的p40亚基以及轴突再生和髓鞘再生抑制剂Nogo-A和LINGO、IL-23、淀粉样肽- $\beta$ (如 $A\beta_{(1-42)}$ )、亨廷顿蛋白、CD25(即IL-2受体的 $\alpha$ 链)、神经生长因子(NGF)、神经营养性酪氨酸激酶受体-1型受体(TrkA;NGF的高亲和力催化受体)以及 $\alpha$ -突触核蛋白。这些和其它靶标被认为可用于治疗各种神经系统疾病、疼痛和/或自身免疫疾病,如多发性硬化( $\alpha$ 4整合素、IL-23、CD25、CD20、CD52、IL-12、IL-23、IL-12和IL-23的p40亚基,以及轴突再生和髓鞘再生抑制剂Nogo-A和LINGO)、阿尔兹海默病( $A\beta$ )、亨廷顿氏舞蹈症(亨廷顿蛋白)、帕金森病( $\alpha$ -突触核蛋白)和疼痛(NGF和TrkA)。

[0129] 在具体实施方案中,用于p97缀合物的抗CD25抗体为达利珠单抗(即赛尼哌™)或其片段、变体或衍生物。达利珠单抗是人源化的单克隆抗体,其与CD25、IL-2受体的 $\alpha$ 亚基特异性结合。在其它实施方案中,所述抗体为利妥昔单抗、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、奥法木单抗或其与CD20特异性结合的变体或片段。在具体实施方案中,所述抗体为阿仑单抗或其与CD52特异性结合的变体或片段。在某些实施方案中,所述抗体为优特克单抗(CNT0 1275)或其与IL-12和IL-23的p40亚基特异性结合的变体或片段。

[0130] 在具体实施方案中,用于缀合物的抗-NGF抗体为他尼珠单抗或其片段、变体或衍生物。他尼珠单抗与NGF特异性结合,并阻止NGF与其高亲和力的膜结合催化受体原肌球蛋白相关激酶(TrkA)结合,TrkA存在于交感神经元和感觉神经元中;据信,减少NGF对TrkA的刺激可抑制该类神经元的疼痛传递活性。

[0131] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段或其它多肽(如免疫球蛋白样分子、可溶性受体、配体)与促炎性分子(如促炎性细胞因子或趋化因子)特异性结合。在这些和相关的实施方案中,如本文所述,可将p97缀合物用于治疗多种炎症病况。促炎性分子的实例包括:肿瘤坏死因子(TNF),如TNF- $\alpha$ 和TNF- $\beta$ ;TNF超家族分子如FasL、CD27L、CD30L、CD40L、Ox40L、4-1BBL、TRAIL、TWEAK和Apo3L;白介素-1(IL-1),包括IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ ;IL-2;干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ );IFN- $\alpha/\beta$ ;IL-6;IL-8;IL-12;IL-15;IL-17;IL-18;IL-21;LIF;CCL5;GRO $\alpha$ ;MCP-1;MIP-1 $\alpha$ ;MIP-1 $\beta$ ;巨噬细胞集落刺激因子(MCSF);粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF);CXCL2;CCL2等。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与前促炎性分子中一种或多种的受体,如TNF受体(TNFR)、IL-1受体(IL-1R)或IL-6受体(IL-6R)等特异性结合。

[0132] 在具体实施方案中,如上文所指出的,抗体或抗原结合片段或其它多肽与TNF- $\alpha$ 或TNF- $\beta$ 特异性结合。在具体实施方案中,所述抗-TNF抗体或其它TNF结合多肽为:阿达木单抗(Humira®)、妥珠单抗(Cimzia®)、依那西普(Enbrel®)、戈利木单抗(Cimzia®)或英夫利昔单抗(Remicade®)、D2E7、CDP 571或CDP 870,或其抗原结合片段或变体。在一些实施方案中,所述TNF结合多肽为可溶性受体或配体,如TNFRSF10B、TRAIL(即CD253)、TNFSF10、TRADD(肿瘤坏死因子-1型受体相关的死亡结构域蛋白)、TRAFs(TNF受体相关因子,包括TRAFs 1-7)或RIP(核糖体失活蛋白)。如本文所述,包含抗-TNF抗体或TNF结合多肽的缀合物可用于,例如治疗不同的炎症病况。此种p97缀合物也可用于治疗不同的神经性病

况或疾病,如阿尔兹海默病、中风、外伤性脑损伤(TBI)、椎管狭窄症、急性脊髓损伤和脊髓压迫症(参见美国专利第6,015,557、6,177,077、6,419,934、6,419,944、6,537,549、6,982,089和7,214,658号)。

[0133] 在具体实施方案中,如上文所指出的,抗体或抗原结合片段与IL-1 $\alpha$ 或IL-1 $\beta$ 特异性结合。在具体实施方案中,所述抗IL-1抗体为康纳单抗或gevokizumab,或其与IL-1 $\beta$ 特异性结合的变体或片段。除本文描述的其它炎症病况外,包含抗IL-1抗体的p97缀合物可用于治疗cryopyrin蛋白相关的周期性综合征(CAPS),包括家族性寒冷自发炎症综合征、Muckle-Wells综合征和新生儿发病的多系统性炎症疾病。

[0134] 可通过那些本领域技术人员已知的多种技术中的任何技术制备抗体。参见,如Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988。例如,可使用Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976中的技术以及对其的改进来制备对目标多肽具有特异性的单克隆抗体。还包括使用转基因动物如小鼠来表达人抗体的方法。参见,如Neuberger et al., *Nature Biotechnology* 14:826, 1996; Lonberg et al., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101, 1994以及Lonberg et al., *Internal Review of Immunology* 13:65-93, 1995。具体的实例包括利用REGENEREX®的VELOCIMMUNE®平台(参见,如美国专利第6,596,541号)。

[0135] 也可通过噬菌体展示文库或酵母展示文库来产生或鉴定抗体(参见,如美国专利第7,244,592号;Chao et al., *Nature Protocols* 1:755-768, 2006)。可利用的文库的非限制性实例包括克隆的或合成的文库,如人源组合抗体文库(HuCAL),其中通过7个重链和7个轻链可变区基因来代表人源抗体谱(repertoire)的结构多样性。在主文库中,这些基因的组合产生了49个骨架(architecture)。通过在这些骨架中,将高度可变的基因盒子(cassettes)(CDRs=互补决定区)叠加,可再次产生大的人源抗体谱。也包括用编码轻链可变区、重链CDR-3的人供体来源片段、编码重链CDR-1多样性的合成DNA以及编码重链CDR-2多样性的合成DNA设计的人文库。可使用的其它合适的文库对本领域技术人员将是显而易见的。可将本文描述的和在本领域已知的p97多肽用于纯化过程,例如亲和层析步骤。

[0136] 在某些实施方案中,如本文所述,抗体和其抗原结合片段包含在重链和轻链骨架区(FR)集之间分别插入的重链和轻链CDR集,骨架区集为CDRs提供支撑,并且限定了CDRs之间的空间关系。本文使用的术语“CDR集”指重链或轻链V区的三个高度可变区。从重链或轻链的N-端出发,这些区域分别被表示为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。因此,抗原结合位点包含6个CDRs,其包括来自每一重链和轻链V区的CDR集。包含单个CDR(如CDR1、CDR2或CDR3)的多肽在本文指“分子识别单元”。对许多抗原-抗体复合体的晶体学分析表明,CDRs的氨基酸残基与结合的抗原产生广泛接触,其中最广泛的抗原接触是与重链CDR3。因此,所述分子识别单元主要负责抗原结合位点的特异性。

[0137] 本文使用的术语“骨架区集”指四个侧面的氨基酸序列,其为重链或轻链V区的CDR集的CDRs的骨架。一些骨架区残基可与结合的抗原接触;然而骨架区主要负责将V区折叠成为抗原结合位点,特别地,所述骨架区残基与CDRs直接相邻。在骨架区内,某些氨基酸残基和某些结构特征是十分高度保守的。就这点而言,所有V区序列都包含约90个氨基酸残基的内部二硫键环。当V区折叠成为结合位点时,CDRs展现突出的环基序(motif),其形成抗原结合表面。通常认为,不管精确的CDR氨基酸序列,存在可影响CDR环的折叠形状成为某种“标

准”结构的骨架区的保守结构区。进一步,已知某些骨架区残基可参与非共价的域间接触,这可稳定抗体重链和轻链的相互作用。

[0138] 可通过参考Kabat,E.A.et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest.4th Edition.US Department of Health and Human Services.1987及其更新来确定免疫球蛋白可变域的结构和位置。

[0139] “单克隆抗体”指均质性抗体群,其中所述单克隆抗体包含涉及抗原表位选择性结合的氨基酸(天然存在的氨基酸和非天然存在的氨基酸)。单克隆抗体是高度特异性的,其针对单一抗原表位。术语“单克隆抗体”不仅包含完整的单克隆抗体和全长的单克隆抗体,也包括其片段(如Fab、Fab’、F(ab’)<sub>2</sub>、Fv)、单链(ScFv)、其变体、包含抗原结合部分的融合蛋白、人源化单克隆抗体、嵌合单克隆抗体以及含有具有所需特异性和与抗原表位结合的能力的抗原结合片段(抗原表位识别位点)的免疫球蛋白分子的任何其它修饰构型。并不意图限制抗体的来源或其制备方法(如,通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物)。该术语包括上文描述的在“抗体”定义之下的全部的免疫球蛋白以及片段等。

[0140] 蛋白水解酶的木瓜蛋白酶优先剪切IgG分子以得到一些片段,这些片段的两种(F(ab)片段)中每一种都包括含有完整的抗原结合位点的共价的异二聚体。胃蛋白酶能够剪切IgG分子以产生一些片段,包括包含两个抗原结合位点的F(ab’)<sub>2</sub>片段。可通过将IgM进行优先蛋白水解剪切,且极少将IgG或IgA免疫球蛋白分子剪切,而产生根据本发明的某些实施方案应用的Fv片段。然而,更通常使用本领域已知的重组技术获得Fv片段。所述Fv片段包括含有抗原结合位点的非共价V<sub>H</sub>:V<sub>L</sub>异二聚体,所述抗原结合位点保留了天然抗体分子的许多抗原识别和结合能力。参见Inbar et al.,PNAS USA.69:2659-2662,1972;Hochman et al.,Biochem.15:2706-2710,1976以及Ehrlich et al.,Biochem.19:4091-4096,1980。

[0141] 在某些实施方案中,包括单链Fv或scFv抗体。例如可根据本申请关于选择具有预期特异性的抗体的教导,利用标准的分子生物学技术来制备κ抗体(Ill et al.,Prot.Eng.10:949-57,1997)、微抗体(Martin et al.,EMBO J 13:5305-9,1994)、双价抗体(Holliger et al.,PNAS 90:6444-8,1993)或Janusins(Traunecker et al.,EMBO J 10:3655-59,1991和Traunecker et al.,Int.J.Cancer Suppl.7:51-52,1992)。

[0142] 单链Fv(sFv)多肽是共价相连的V<sub>H</sub>:V<sub>L</sub>异二聚体,其由包含由肽编码连接器相连的V<sub>H</sub>-和V<sub>L</sub>-编码基因的融合基因表达。Huston et al.(PNAS USA.85(16):5879-5883,1988)。描述了许多识别化学结构的方法,以将来自抗体V区的自然聚合而非化学分离的轻多肽链和重多肽链转变为sFv分子,所述sFv分子将折叠成为与抗原结合位点的结构基本相似的三维结构中。参见,如Huston et al的美国专利第5,091,513和5,132,405号,以及Ladner et al的美国专利第4,946,778号。

[0143] 在某些实施方案中,如本文所述的抗体是“双价抗体”的形式。双价抗体是多肽的多聚体,每一多肽包括含有免疫球蛋白轻链的结合区的第一结构域和含有免疫球蛋白重链结合区的第二结构域,这两个结构域是相连的(例如通过肽连接器),但却不能相互联接以形成抗原结合位点:通过将多聚体中一个多肽的第一结构域与多聚体中另一多肽的第二结构域相连而形成抗原结合位点(W094/13804)。抗体的dAb片段由V<sub>H</sub>结构域组成(Ward et al.,Nature 341:544-546,1989)。可通过,例如基因融合构建双价抗体和其它多价或多特异性的片段(参见W094/13804和Holliger et al.,PNAS USA.90:6444-6448,1993)。

[0144] 还包括包含与CH3结构域相连的scFv的微抗体(参见Hu et al.,Cancer Res.56:3055-3061,1996)。也参见Ward et al.,Nature.341:544-546,1989;Bird et al.,Science.242:423-426,1988;Huston et al.,PNAS USA.85:5879-5883,1988);PCT/US92/09965;W094/13804以及Reiter et al.,Nature Biotech.14:1239-1245,1996。

[0145] 在使用双特异性的抗体时,这些可以是可通过多种方法制备的常规的双特异性抗体(Holliger and Winter,Current Opinion Biotechnol.4:446-449,1993),例如化学制备的或来自杂交瘤的,或者可能是上文提及的任何双特异性抗体片段。可仅利用可变结构域,构建不含Fc区域的双价抗体和scFv,潜在地降低抗独特型反应的效果。

[0146] 与双特异性完全抗体不同,由于双特异性双价抗体可在大肠杆菌中容易地构建和表达,其可能特别有用。使用来自文库的噬菌体展示(W094/13804)可容易地选择具有合适结合特异性的双价抗体(和许多其它的多肽,如抗体片段)。如果双价抗体的一个臂要保持恒定,例如具有针对抗原X的特异性,则可构建其它臂是可变的文库,并且选择具有合适特异性的抗体。可通过“杵臼”(knobs-into-holes)工程技术(Ridgeway et al.,Protein Eng.,9:616-621,1996)制备双特异性完全抗体。

[0147] 在某些实施方案中,可以UniBody®的形式提供本文所述的抗体。UniBody®是铰链区被移除的IgG4抗体(参见GenMab Utrecht,The Netherlands;也参见如US20090226421)。这一抗体技术产生了比现有的小抗体形式具有预期的更长治疗窗的稳定、更小的抗体形式。IgG4抗体被认为是惰性的,因此其不与免疫系统相互作用。可通过去除抗体的铰链区来修饰完整的人IgG4抗体,从而获得相对于相应的完整IgG4(GenMab,Utrecht),具有明显稳定性能的半分子片段。将IgG4分子二等分使得UniBody®上仅有一个区域可与同族抗原结合(如疾病靶标),因此UniBody®只能与靶标分子上的一个位点单价结合。对于某些癌症细胞表面抗原,这一单价结合可能不会如使用具有同样的抗原特异性的二价抗体可见的那样刺激癌症细胞生长,因而UniBody®技术可为用常规抗体难以治疗的一些类型的癌症提供治疗方案。当治疗一些形式的癌症时,UniBody®的小尺寸可具有极大的优势,其允许分子在更大的实体瘤中更好地分布并可能增强疗效。

[0148] 在某些实施方案中,本文提供的抗体可以是纳米抗体的形式。微抗体是由单个基因编码的,且在几乎所有的原核和真核宿主中高效地产生,如大肠杆菌(参见美国专利第6,765,087号)、霉菌(如曲霉菌或木霉菌)和酵母(例如酵母菌、克鲁维酵母、汉逊酵母或毕赤酵母(参见美国专利第6,838,254号))。生产方法是可扩展的,并且已经生产了数公斤量的纳米抗体。可将纳米抗体配置为具有长保存期限的即用型溶液。纳米克隆方法(参见W0 06/079372)是产生针对期望的靶标的纳米抗体的专利方法,其基于B细胞的自动化高通量筛选。

[0149] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是人源化的。这些实施方案涉及通常用重组技术制备的嵌合分子,其具有来自非人类物种的免疫球蛋白的抗原结合位点和该分子的基于人免疫球蛋白的结构和/或序列的其余免疫球蛋白结构。所述抗原结合位点可以包括融合至恒定结构域的完整可变结构域,或者仅包括在可变结构域中连接至合适的骨架区域的CDRs。抗原表位结合位点可以是野生型的或可通过一个或多个氨基酸的取代将其进

行修饰。这消除了在人类个体中作为的免疫原的恒定区,但仍保留了对外来可变区产生免疫反应的可能性(LoBuglio et al.,PNAS USA 86:4220-4224,1989;Queen et al.,PNAS USA.86:10029-10033,1988;Riechmann et al.,Nature.332:323-327,1988)。抗体人源化的示例性方法包括在美国专利第7,462,697号中描述的方法。

[0150] 另一种方法不仅关注提供人来源的恒定区,也关注将可变区进行修饰,从而将它们按尽可能接近人源的形式来改造。已知重链和轻链的可变区都包含三个互补决定区(CDRs),其根据所针对的抗原表位而变化并决定了结合能力,侧面与在给定物种中相对保守的四个骨架区(FRs)相接,推定这四个骨架区为CDRs提供了支架。当制备涉及具体抗原表位的非人源抗体时,可通过将来自非人源抗体的CDRs连接至待修饰的人源抗体中存在的骨架区来对可变区进行“改造”或“人源化”。在Sato et al.,Cancer Res.53:851-856,1993;Riechmann et al.,Nature 332:323-327,1988;Verhoeyen et al.,Science 239:1534-1536,1988;Kettleborough et al.,Protein Engineering.4:773-3783,1991;Maeda et al.,Human Antibodies Hybridoma 2:124-134,1991;Gorman et al.,PNAS USA.88:4181-4185,1991;Tempest et al.,Bio/Technology 9:266-271,1991;Co et al.,PNAS USA.88:2869-2873,1991;Carter et al.,PNAS USA.89:4285-4289,1992以及Co et al.,J Immunol.148:1149-1154,1992中报道了该方法在不同抗体中的应用。在一些实施方案中,人源化抗体保留了所有的CDRs序列(例如包含来自小鼠抗体的所有6个CDRs的人源化小鼠抗体)。在其它实施方案中,人源化抗体含有根据原抗体改造的一个或多个CDRs(1、2、3、4、5、6个),其也被称为“来源于”原抗体中一个或多个CDRs的一个或多个CDRs。

[0151] 在某些实施方案中,本发明的抗体可以为嵌合抗体。就这一点而言,嵌合抗体包括与不同抗体的异源Fc部分可操作地连接或否则与之融合的抗体的抗原结合片段。在某些实施方案中,所述异源Fc结构域是人源的。在其它实施方案中,所述异源Fc结构域可来自亲本抗体中不同的Ig类型,包括IgA(包括亚型IgA1和IgA2)、IgD、IgE、IgG(包括亚型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)和IgM。在进一步的实施方案中,所述异源Fc可包括来自不同Ig类型中一种或多种的CH2和CH3结构域。如上文所指出的,关于人源化抗体,嵌合抗体的抗原结合片段可仅包括本文描述的抗体的一个或多个CDRs(如本文描述的抗体的1、2、3、4、5或6个CDRs),或者可以包括整个可变结构域(VL、VH或两种都有)。

[0152] 肽模拟物。某些实施方案使用“肽模拟物”。肽类似物通常在制药工业中被用作具有与那些模板肽类似的特性的非肽类药物。这种非肽类化合物被称为“肽模拟物(peptide mimetics)”或“模拟肽(peptidomimetics)”(Luthman et al.,A Textbook of Drug Design and Development,14:386-406,2nd Ed.,Harwood Academic Publishers,1996;Joachim Grante,Angew.Chem.Int.Ed.Engl.,33:1699-1720,1994;Fauchere,Adv Drug Res.,15:29,1986;Veber and Freidinger TINS,p.392(1985)以及Evans et al.,J.Med.Chem.30:229,1987)。模拟肽是模拟了肽的生物活性,但化学性质不再是肽的分子。模拟肽化合物在本领域是已知的,且描述于,例如美国专利第6,245,886号。

[0153] 肽模拟物可具有用于描述抗体(同上文)的“特异性结合”的特性。例如,肽模拟物可与本文描述的靶标特异性结合,其结合的亲和力( $K_d$ )为至少约0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、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、40或50nM。在一些实施方案中,肽模拟物与细胞表面受

体或其它的细胞表面蛋白特异性结合。在一些实施方案中,所述肽模拟物与本文描述的至少一种癌症相关抗原特异性结合。在具体实施方案中,所述肽模拟物与本文描述的至少一种神经系统相关抗原、疼痛相关抗原和/或自身免疫相关抗原特异性结合。

[0154] 类肽。本发明的缀合物也包括“类肽”。肽的类肽衍生物代表了另一种形式的修饰的肽,其保留了针对生物活性的重要结构决定簇,但是消除了肽键,因而对蛋白质水解具有抗性(Simon, et al., PNAS USA. 89:9367-9371, 1992)。类肽是N取代的甘氨酸的寡聚物。描述了许多N-烷基基团,每种对应于天然氨基酸的侧链。本发明的模拟肽包括其中至少一个氨基酸残基、几个氨基酸残基或全部氨基酸残基被相应N取代的甘氨酸取代的化合物。类肽文库描述于,例如美国专利第5,811,387号。

[0155] 类肽可具有用于描述抗体(同上文)的“特异性结合”的特性。例如,类肽可与本文描述的靶标特异性结合,其结合的亲和力( $K_d$ )为至少约0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、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、40或50nM。在某些实施方案中,类肽与细胞表面受体或其它的细胞表面蛋白特异性结合。在一些实施方案中,所述类肽与本文描述的至少一种癌症相关抗原特异性结合。在具体实施方案中,所述类肽与本文描述的至少一种神经系统相关抗原、疼痛相关抗原和/或自身免疫相关抗原特异性结合。

[0156] 适配体。本发明的p97缀合物也包括适配体(参见,例如Ellington et al., Nature. 346, 818-22, 1990以及Tuerk et al., Science. 249, 505-10, 1990)。适配体的实例包括核酸适配体(如DNA适配体、RNA适配体)和肽适配体。核酸适配体通常涉及通过多次的体外筛选或等同的方法如SELEX(通过指数富集进行配体的系统进化)被工程化的核酸种类,以与不同的分子靶标如小分子、蛋白、核酸以及甚至是细胞、组织和器官结合。参见,例如美国专利第6,376,190号和6,387,620号。

[0157] 肽适配体通常包括两端都与蛋白支架相连的可变肽环,双结构约束通常将肽适配体的亲和力增加至可与抗体的亲和力相比的水平(如在毫微摩尔的范围内)。在某些实施方案中,所述可变环的长度可包括约10-20个氨基酸(包括其间的所有整数),并且所述支架可包括具有好的溶解度和紧凑特性的任何蛋白。某些示例性实施方案可利用细菌蛋白硫氧还蛋白-A作为支架蛋白,可变环插入还原性活性位点(在野生蛋白中为-Cys-Gly-Pro-Cys-环),两个半胱氨酸侧链能够形成二硫键桥。鉴定肽适配体的方法描述于,例如美国专利申请第2003/0108532号。

[0158] 适配体可具有用于描述抗体(同上文)的“特异性结合”特性。例如,适配体可与本文描述的靶标特异性结合,其结合的亲和力( $K_d$ )为至少约0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、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、40或50nM。在具体实施方案中,适配体与细胞表面受体或其它的细胞表面蛋白特异性结合。在一些实施方案中,所述适配体与本文描述的至少一种癌症相关抗原特异性结合。在具体实施方案中,所述适配体与本文描述的至少一种神经系统相关抗原、疼痛相关抗原和/或自身免疫相关抗原特异性结合。

[0159] 可检测实体。在一些实施方案中,p97片段与“可检测的实体”缀合。示例性可检测实体包括但不限于:基于碘的标记物、放射性同位素、荧光团/荧光染料和纳米颗粒。

[0160] 示例性基于碘的标记物包括泛影酸(Hypaque®, GE Healthcare)和它的阴离子

形式泛影酸盐。泛影酸是用于先进的X射线技术如CT扫描的放射造影剂。也包括下文描述的碘放射性同位素。

[0161] 可用作可检测实体的示例性放射性同位素包括 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{55}\text{Fe}$ ，以及碘的同位素如 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 和 $^{131}\text{I}$ 。这些放射性同位素具有不同的半衰期、衰减类型和能量级，可将其进行调整以匹配具体方案的需要。例如通过与p97多肽缀合，这些放射性同位素中的某些能够选择性地靶向或更好地靶向CNS组织，从而改善这些组织的医学成像。

[0162] 可用作直接可检测实体的荧光团或荧光染料的实例包括荧光素、四甲基罗丹明、德克萨斯红、俄勒冈绿 (Oregon Green®) 和一些其它的染料 (如Haugland, Handbook of Fluorescent Probes-9th Ed., 2002, Molec. Probes, Inc., Eugene OR; Haugland, The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies-10th Ed., 2005, Invitrogen, Carlsbad, CA)。还包括发光的或其它可检测染料。染料发出的光可以是可见光或不可见光，如紫外光或红外光。在示例性实施方案中，所述染料可以是荧光共振能量转移 (FRET) 染料；咕吨染料，如荧光素和罗丹明；在 $\alpha$ 或 $\beta$ 位置有氨基的染料 (如萘胺染料、1-二甲基氨基萘基-5-磺酸盐、1-苯胺基-8-萘磺酸盐和2-p-touidiny1-6-萘磺酸盐)；含3-苯基-7-异氰酸基香豆素的染料；吡啶，如9-异硫氰基吡啶和吡啶橙；嵌二萘、苯并噁二唑和均二苯代乙烯；含3-( $\epsilon$ -羧基戊烷基)-3'-乙基-5,5'-二甲基氧杂羰花青 (CYA) 的染料；6-羧基荧光素 (FAM)；5&6-羧基罗丹明-110 (R110)；6-羧基罗丹明-6G (R6G)；N,N,N',N'-四甲基-6-羧基罗丹明 (TAMRA)；6-羧基-X-罗丹明 (ROX)；6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素 (JOE)；ALEXA FLUOR™；Cy2；德克萨斯红和罗丹明红；6-羧基-2',4,7,7'-四氯荧光素 (TET)；6-羧基-2',4,4',5',7,7'-六氯荧光素 (HEX)；5-羧基-2',4',5',7'-四氯荧光素 (ZOE)；NAN；NED；Cy3；Cy3.5；Cy5；Cy5.5；Cy7和Cy7.5；IR800CW、ICG、Alexa Fluor 350；Alexa Fluor 488；Alexa Fluor 532；Alexa Fluor 546；Alexa Fluor 568；Alexa Fluor 594；Alexa Fluor 647；Alexa Fluor 680或Alexa Fluor 750。某些实施方案包括与用可检测实体如荧光团 (例如俄勒冈绿 (Oregon Green®)，Alexa Fluor 488) 标记的化学治疗剂 (如紫杉醇、阿霉素) 缀合。

[0163] 纳米颗粒的尺寸范围通常为1-1000nm，且包括不同的化学结构，如金、银颗粒和量子点。当用成角度的入射白光照射时，约40-120nm的银或金的纳米颗粒将高强度地散射单色光。散射光的波长取决于颗粒的尺寸。很接近的4-5种不同颗粒中的每种将散射单色光，当将其叠加时会产生特定的、独特的颜色。衍生化的纳米颗粒如银或金颗粒能够与大量的分子相连，包括蛋白、抗体、小分子、受体配体和核酸。纳米颗粒的具体实例包括金属纳米颗粒和金属纳米壳，如金颗粒、银颗粒、铜颗粒、铂颗粒、镉颗粒、复合颗粒、金空心球体、金包被的二氧化硅纳米壳和二氧化硅包被的金壳。还包括二氧化硅、乳胶、聚苯乙烯、聚碳酸盐、聚丙烯酸酯、PVDF纳米颗粒以及任何这些材料的有色颗粒。

[0164] 量子点是直径为约1-5nm的荧光晶体，其可被大范围的波长的光激发。当被具有合适波长的光激发时，这些晶体可发射光，如单色光，发出的光的波长取决于晶体的化学组成和尺寸。量子点如CdSe、ZnSe、InP或InAs具有独特的光学特性；这些以及类似的量子点可从多种商业来源得到 (例如：NN-Labs, Fayetteville, AR；Ocean Nanotech, Fayetteville, AR；Nanoco Technologies, Manchester, UK；Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。

[0165] 多肽变体和片段。某些实施方案包括本文描述的参考多肽(不管是通过名称描述或是通过提及序列标识描述)的变体和片段,包括p97多肽和基于多肽的药剂如抗体。这些多肽的野生型或最普遍的序列在本领域是已知的,并且其可用作本文描述的变体和片段的对比。

[0166] 本文使用的术语多肽“变体”,指通常相比本文具体公开的多肽存在一个或多个取代、缺失、添加和/或插入的差异的多肽。多肽变体具有生物活性,即,它们继续具备参考多肽的酶活性或结合活性。此种变体可能通过,例如基因多态性和/或人工操作得到。

[0167] 在许多实例中,具有生物活性的变体将包含一个或多个保守取代。“保守取代”指其中一个氨基酸被具有相似特性的另一个氨基酸取代,从而肽化学领域的技术人员可以预测到多肽的二级结构和亲水性质基本不发生改变。如上所述,可以在本发明的多聚核苷酸和多肽结构内进行修饰,并仍可获得编码具有所期望特征的变体或衍生物的功能分子。当期望改变氨基酸序列以生成本发明多肽的等同物或者甚至是改进的变体或部分时,本领域技术人员通常将根据下述表A,改变编码DNA序列中的一个或多个密码子。

[0168]

表 A							
氨基酸			密码子				
丙氨酸	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU	
半胱氨酸	Cys	C	UGC	UGU			
天冬氨酸	Asp	D	GAC	GAU			
谷氨酸	Glu	E	GAA	GAG			
苯丙氨酸	Phe	F	UUC	UUU			
甘氨酸	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU	
组氨酸	His	H	CAC	CAU			
异亮氨酸	Ile	I	AUA	AUC	AUU		
赖氨酸	Lys	K	AAA	AAG			
亮氨酸	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG CUU
甲硫氨酸	Met	M	AUG				
天冬酰胺	Asn	N	AAC	AAU			
脯氨酸	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU	
谷氨酰胺	Gln	Q	CAA	CAG			
精氨酸	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG CGU
丝氨酸	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG UCU
苏氨酸	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU	
缬氨酸	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU	
色氨酸	Trp	W	UGG				
酪氨酸	Tyr	Y	UAC	UAU			

[0169] 例如,可在蛋白结构中的将某些氨基酸取代为其它的氨基酸,而不明显失去与诸如抗体的抗原结合域或底物分子的结合位点的结构之间相互结合的能力。由于蛋白的相互作用能力和它的性质限定了蛋白的生物功能活性,可在蛋白序列以及,当然,它的潜在的DNA编码序列中将某些氨基酸序列进行取代,并且仍可获得具有相似特性的蛋白。因此,本文包括在肽的功能没有明显丧失的情况下,可将公开的组合物的肽序列或编码所述肽的对应DNA序列进行不同的改变。

[0170] 在进行这些改变时,可考虑氨基酸的亲水指数。亲水氨基酸指数在赋予蛋白相互作用的生物功能方面重要性通常为本领域所理解(Kyte & Doolittle,1982,通过引用并入本文)。公认氨基酸的相对亲水特性影响所生成蛋白的二级结构,其反过来限制了蛋白与其它分子(如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等)之间的相互作用。基于氨基酸的疏水性和电荷特性,赋予每个氨基酸一个亲水指数(Kyte & Doolittle,1982)。这些值为:异亮氨酸(+4.5)、缬氨酸(+4.2)、亮氨酸(+3.8)、苯丙氨酸(+2.8)、半胱氨酸(+2.5)、甲硫氨酸(+1.9)、丙氨酸(+1.8)、甘氨酸(-0.4)、苏氨酸(-0.7)、丝氨酸(-0.8)、色氨酸(-0.9)、酪氨酸(-1.3)、脯氨酸(-1.6)、组氨酸(-3.2)、谷氨酸(-3.5)、谷氨酰胺(-3.5)、天冬氨酸(-3.5)、天冬酰胺(-3.5)、赖氨酸(-3.9)和精氨酸(-4.5)。本领域已知,某些氨基酸可被其它具有相似亲水指数或得分的氨基酸取代,且仍可产生具有相似生物活性的蛋白,即,仍可获得在生物功能上等价的蛋白。在作出这些改变时,优选取代那些亲水指数位于 $\pm 2$ 内的氨基酸,特别优选那些位于 $\pm 1$ 内的氨基酸,甚至更特别优选那些位于 $\pm 0.5$ 内的氨基酸。

[0171] 本领域已知,基于亲水性,可以有效地将相似的氨基酸进行取代。美国专利第4,554,101号(以引用的方式特别地将其整体并入本文)指出,受相邻氨基酸亲水性支配的蛋白亲水性的最大局部平均值与该蛋白的生物性质相关。如在美国专利第4,554,101号中所详述的,赋予氨基酸残基下述的亲水值:精氨酸(+3.0)、赖氨酸(+3.0)、天冬氨酸(+3.0  $\pm 1$ )、谷氨酸(+3.0  $\pm 1$ )、丝氨酸(+0.3)、天冬酰胺(+0.2)、谷氨酰胺(+0.2)、甘氨酸(0)、苏氨酸(-0.4)、脯氨酸(-0.5  $\pm 1$ )、丙氨酸(-0.5)、组氨酸(-0.5)、半胱氨酸(-1.0)、甲硫氨酸(-1.3)、缬氨酸(-1.5)、亮氨酸(-1.8)、异亮氨酸(-1.8)、酪氨酸(-2.3)、苯丙氨酸(-2.5)、色氨酸(-3.4)。应理解,一个氨基酸可被另一个具有相似亲水性值的氨基酸取代,且仍可获得生物等价且具体而言免疫等价的蛋白。在这些改变中,优选对那些亲水值在 $\pm 2$ 内的氨基酸进行取代,特别优选那些亲水值在 $\pm 1$ 内的氨基酸,并且更特别优选那些亲水值在 $\pm 0.5$ 内的氨基酸。

[0172] 如上文所概述的,因此氨基酸的取代通常基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如,它们的疏水性、亲水性、电荷、尺寸等。考虑各种前述特征的示例性取代对于本领域技术人员是已知的,其包括:精氨酸和赖氨酸、谷氨酸和天冬氨酸、丝氨酸和苏氨酸、谷氨酰胺和天冬酰胺,以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0173] 还可基于残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性的相似性对氨基酸进行进一步的取代。例如,带负电的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;具有相似亲水性值的不带电荷的极性头部基团的氨基酸包括:亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸;甘氨酸和丙氨酸;天冬酰胺和谷氨酰胺;以及丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。可代表保守改变的其它氨基酸组包括:(1) ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr;(2) cys、ser、tyr、thr;(3) val、ile、leu、met、ala、phe;(4) lys、arg、his;和(5) phe、tyr、trp、his。

[0174] 变体也可,或可选地,包含非保守改变。在一个优选实施方案中,变体多肽通过取代、缺失或添加少于约10、9、8、7、6、5、4、3、2个氨基酸,甚至1个氨基酸不同于天然序列。也可(或可选地)通过,例如缺失或添加对多肽的免疫原性、二级结构、酶活性和/或亲水特性影响最小的氨基酸,对变体进行修饰。

[0175] 如下面表B所示,在某些实施方案中,DSSHAFTLDELRL(SEQ ID NO:13)的变体可以基

于来自其它有机体的p97序列。将相对于人序列的变体氨基酸加了下划线。

[0176]

表 B					
常用名	物种	蛋白名称	% 同一性	序列	SEQ ID NO:

[0177]

人	<i>Homo Sapien</i>	黑素转铁蛋白	100%	DSSHAFTLDEL <sup>R</sup>	13
黑头松鼠猴	<i>Saimiri boliviensis boliviensis</i>	黑素转铁蛋白	100%	DSSHAFTLDEL <sup>R</sup>	13
倭黑猩猩	<i>Pan paniscus</i>	黑素转铁蛋白	100%	DSSHAFTLDEL <sup>R</sup>	13
黑猩猩	<i>Pan troglodytes</i>	黑素转铁蛋白	100%	DSSHAFTLDEL <sup>R</sup>	13
食蟹猕猴	<i>Macaca fascicularis</i>	假定蛋白	100%	DSSHAFTLDEL <sup>R</sup>	13
北部白颊长臂猿	<i>Nomascus leucogenys</i>	黑素转铁蛋白	100%	DSSHAFTLDEL <sup>R</sup>	13
东非狒狒	<i>Papio anubis</i>	黑素转铁蛋白	100%	DSSHAFTLDEL <sup>R</sup>	13
恒河猴	<i>Macaca mulatta</i>	假定蛋白	100%	DSSHAFTLDEL <sup>R</sup>	13
恒河猴	<i>Macaca mulatta</i>	假定蛋白	100%	DSSHAFTLDEL <sup>R</sup>	13
西部低地大猩猩	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	黑素转铁蛋白	100%	DSSHAFTLDEL <sup>R</sup>	13
普通狨	<i>Callithrix jacchus</i>	黑素转铁蛋白	100%	DSSHAFTLDEL <sup>R</sup>	13
非洲跳鼠	<i>Jaculus jaculus</i>	黑素转铁蛋白	92%	DSSDAFTLDEL <sup>R</sup>	93
小耳大婴猴	<i>Otolemur garnettii</i>	黑素转铁蛋白	92%	DSSHSFTLDEL <sup>R</sup>	94
苏门答腊猩猩	<i>Pongo abelii</i>	黑素转铁蛋白	92%	DSSDAFTLDEL <sup>R</sup>	95
十三条纹地松鼠	<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>	黑素转铁蛋白	92%	DSSYAFTLDEL <sup>R</sup>	96

[0178]

白犀牛	<i>Ceratotherium simum</i>	黑素转铁蛋白	92%	<u>N</u> SSHAFTLDEL <u>R</u>	97
羊驼	<i>Vicugna pacos</i>	黑素转铁蛋白	83%	<u>N</u> SS <u>Y</u> AFTLDEL <u>R</u>	98
美国鼠兔	<i>Ochotona princeps</i>	黑素转铁蛋白	83%	DSS <u>Y</u> AF <u>P</u> LDEL <u>R</u>	99
黑狐蝠	<i>Pteropus alecto</i>	黑素转铁蛋白	83%	<u>N</u> SS <u>Y</u> AFTLDEL <u>R</u>	100
宽吻海豚	<i>Tursiops truncatus</i>	黑素转铁蛋白	83%	<u>N</u> SS <u>Y</u> AFTLDEL <u>R</u>	101
中国树鼩	<i>Tupaia chinensis</i>	黑素转铁蛋白	83%	DSTHAFT <u>V</u> DEL <u>R</u>	102
藏羚羊	<i>Pantholops hodgsonii</i>	黑素转铁蛋白	83%	<u>N</u> SS <u>Y</u> AFTLDEL <u>R</u>	103
家猫	<i>Felis catus</i>	黑素转铁蛋白	83%	<u>N</u> SS <u>Y</u> AFTLDEL <u>R</u>	104
家牛	<i>Bos taurus</i>	黑素转铁蛋白	83%	<u>N</u> SS <u>Y</u> AFTLDEL <u>R</u>	105
家养雪貂	<i>Mustela putorius furo</i>	黑素转铁蛋白	83%	<u>N</u> SS <u>Y</u> AFTLDEL <u>R</u>	106
大熊猫	<i>Ailuropoda Melanoleuca</i>	黑素转铁蛋白	83%	<u>N</u> SS <u>Y</u> AFTLDEL <u>R</u>	107
山羊	<i>Capra hircus</i>	黑素转铁蛋白	83%	<u>N</u> SS <u>Y</u> AFTLDEL <u>R</u>	108
家鼠	<i>Mus musculus</i>	黑素转铁蛋白	83%	DSS <u>Y</u> S <u>F</u> TLDEL <u>R</u>	109
虎鲸	<i>Orcinus orca</i>	黑素转铁蛋白	83%	<u>N</u> SS <u>N</u> AFTLDEL <u>R</u>	110
长尾毛丝鼠	<i>Chinchilla lanigera</i>	黑素转铁蛋白	83%	DSS <u>S</u> AFTL <u>N</u> EL <u>R</u>	111
九带犰狳	<i>Dasypus novemcinctus</i>	黑素转铁蛋白	83%	DSS <u>Y</u> AFTLDEL <u>W</u>	112
沟鼠	<i>Rattus</i>	黑素转铁蛋白	83%	DSS <u>Y</u> S <u>F</u> TLDEL <u>R</u>	113

[0179]

	<i>norvegicus</i>				
太平洋海象	<i>Odobenus rosmarus divergens</i>	黑素转铁蛋白	83%	<u>N</u> SS <u>S</u> AFTLDEL <u>R</u>	114
橙腹草原田鼠	<i>Microtus ochrogaster</i>	黑素转铁蛋白	83%	DSS <u>S</u> <u>Y</u> SFTLDEL <u>R</u>	115
绵羊	<i>Ovis aries</i>	黑素转铁蛋白	83%	<u>N</u> SS <u>Y</u> AFTLDEL <u>R</u>	116
韦德尔氏海豹	<i>Leptonychotes weddellii</i>	黑素转铁蛋白	83%	<u>N</u> SS <u>Y</u> AFTLDEL <u>R</u>	117
野生双峰驼	<i>Camelus ferus</i>	黑素转铁蛋白	83%	<u>N</u> SS <u>Y</u> AFTLDEL <u>R</u>	118
野猪	<i>Sus scrofa</i>	黑素转铁蛋白	83%	<u>N</u> SS <u>Y</u> AFTLDEL <u>R</u>	119
牦牛	<i>Bos mutus</i>	黑素转铁蛋白	83%	<u>N</u> SS <u>Y</u> AFTLDEL <u>R</u>	120
(真菌)	<i>Cyphellophora europaea</i>	假定蛋白	75%	<u>A</u> T <u>S</u> H <u>A</u> I <u>T</u> LDEL <u>R</u>	121
非洲草原象	<i>Loxodonta africana</i>	黑素转铁蛋白	75%	<u>N</u> SS <u>Y</u> AFT <u>M</u> DEL <u>R</u>	122
中国仓鼠	<i>Cricetulus griseus</i>	黑素转铁蛋白	75%	D <u>R</u> <u>S</u> <u>Y</u> SFTLDEL <u>R</u>	123
家兔	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	黑素转铁蛋白	75%	D <u>S</u> <u>A</u> <u>Y</u> AFT <u>V</u> DEL <u>R</u>	124
八齿鼠	<i>Octodon degus</i>	黑素转铁蛋白	75%	DSS <u>S</u> <u>A</u> F <u>N</u> L <u>N</u> EL <u>R</u>	125
家犬	<i>Canis lupus familiaris</i>	黑素转铁蛋白	75%	<u>N</u> SS <u>D</u> <u>A</u> F <u>S</u> LDEL <u>R</u>	126
豚鼠	<i>Cavia porcellus</i>	黑素转铁蛋白	75%	DSS <u>S</u> <u>A</u> F <u>S</u> L <u>N</u> EL <u>R</u>	127
欧洲鬃鬃	<i>Sorex araneus</i>	黑素转铁蛋白	75%	<u>N</u> SS <u>D</u> <u>A</u> F <u>S</u> LDEL <u>R</u>	128
佛罗里达海	<i>Trichechus</i>	黑素转铁蛋白	75%	<u>N</u> SS <u>Y</u> AFT <u>M</u> DEL <u>R</u>	129

[0180]

牛	<i>manatus latirostris</i>				
金黄地鼠	<i>Mesocricetus auratus</i>	黑素转铁蛋白	75%	<u>DRSYSFTLDEL</u> R	130
灰短尾负鼠	<i>Monodelphis domestica</i>	黑素转铁蛋白	75%	<u>NSSYSFTLDEL</u> R	131
马	<i>Equus caballus</i>	黑素转铁蛋白	75%	<u>NSSYAFTVDEL</u> R	132
小马岛猬	<i>Echinops telfairi</i>	黑素转铁蛋白	75%	<u>NSSYAFTVDEL</u> R	133
星鼻鼯鼠	<i>Condylura cristata</i>	黑素转铁蛋白	75%	<u>NSSYAFSLDEL</u> R	134
人	<i>Homo sapien</i>	转铁蛋白	33%	SASD_LTWDNLK	135
人	<i>Homo sapien</i>	乳铁蛋白	17%	_SDTSLTWNSVK	136

[0181] 因此,在某些实施方案中,p97肽包括表B中的序列,或由其组成,或基本由其组成。在具体方面,所述p97肽在DSSHAFTLDEL(RSEQ ID NO:13)肽的C-端保有短的 $\alpha$ -螺旋(LDEL)。

[0182] 在某些实施方案中,多肽序列的长度为约,至少约或至多约5、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、55、60、65、70、75、80、85、90、95、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、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000或更多个连续的氨基酸,包括其间所有的整数,并且多肽序列可包括参考序列的全部或部分(参见序列表、表1-7、表B、图2-6和图9)。

[0183] 在其它具体实施方案中,多肽序列由约或不多于约5、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、55、60、65、70、75、80、85、90、95、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、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000个或更多连续的氨基酸组成,

包括其间的所有整数,并且多肽序列可包括参考序列的全部或部分(参见例如,序列表、表1-7、表B、图2-6和图9)。

[0184] 在其它具体实施方案中,多肽序列为约10-1000、10-900、10-800、10-700、10-600、10-500、10-400、10-300、10-200、10-100、10-50、10-40、10-30、10-20、20-1000、20-900、20-800、20-700、20-600、20-500、20-400、20-300、20-200、20-100、20-50、20-40、20-30、50-1000、50-900、50-800、50-700、50-600、50-500、50-400、50-300、50-200、50-100、100-1000、100-900、100-800、100-700、100-600、100-500、100-400、100-300、100-200、200-1000、200-900、200-800、200-700、200-600、200-500、200-400或200-300个连续的氨基酸,包括其间的所有范围,并且多肽序列包括参考序列的全部或部分。在某些实施方案中,任何参考多肽的C-端或N-端可被截短约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750或800或更多个氨基酸,或者截短约10-50、20-50、50-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-350、350-400、400-450、450-500、500-550、550-600、600-650、650-700、700-750、750-800或更多个氨基酸,包括其间的所有整数和范围(例如101、102、103、104、105),只要截短的多肽保有参考序列的结合特性和/或活性。通常,生物活性片段的活性不少于其源自的参考多肽生物活性的约1%、约5%、约10%、约25%或约50%。

[0185] 通常,变体表现出与参考多肽序列至少约30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的相似性或序列同一性或序列同源性。此外,本文包括通过添加、缺失、截短、插入或取代约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100个或更多个氨基酸,使序列不同于天然序列或母源序列,但仍保有母源或参考多肽序列的特性或活性的序列。

[0186] 在一些实施方案中,变体多肽与参考序列有至少一个,但少于50、40、30、20、15、10、8、6、5、4、3或2个氨基酸残基不同。在其它实施方案中,变体多肽与参考序列有至少1%,但少于20%、15%、10%或5%的残基不同(如果这一比对需要对齐,则序列应按最大相似性来对齐。由缺失或插入或错配导致的“环出”(looped out)序列都被认为是不同)。

[0187] 按下文计算序列之间的序列相似性或序列同一性(些术语在本文中可互换使用)。为了测定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分比,将所述序列对齐以进行最优比对(例如,为了最优对齐,可向第一和第二氨基酸序列或核酸序列中的一个或两个引入空位,并且为了比对可忽略非同源序列。)在某些实施方案中,用于比对目的而对齐的参考序列的长度为参考序列长度的至少30%,优选至少40%,更优选至少50%、60%,甚至更优选至少70%、80%、90%、100%。然后将相应的氨基酸位点或核苷酸位点的氨基酸残基或核苷酸进行比对。当第一序列某位点被与第二序列相应位点处的相同氨基酸残基或核苷酸占据时,则这两个分子在该位点处具有同一性。

[0188] 两序列之间的同一性百分比是序列之间共有的相同位点数目的函数,并考虑为将两序列进行最优对齐而需要引入的空位数目以及每一空位的长度。

[0189] 可用数学算法来完成两序列之间的序列比对和同一性百分比的测定。在优选实施方案中,利用已并入GCG软件包的GAP程序的Needleman和Wunsch算法(J.Mol.Biol.48:444-453,1970),其利用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,以及16、14、12、10、8、6或4的空位权重和

1、2、3、4、5或6的长度权重,来测定两条氨基酸序列之间的同一性百分比。在另一优选实施方案中,利用GCG软件包中的GAP程序,采用NWSgapdna.CMP矩阵,以及40、50、60、70或80的空位权重和1、2、3、4、5或6的长度权重,来测定两条核苷酸序列之间的同一性百分比。一系列具体优选参数(并且也是应该使用的,除非另有说明)为Blossum 62得分矩阵,其空位罚分为12,空位延伸罚分为2,且移码空位罚分为5。

[0190] 可利用已并入ALIGN程序(版本2.0)的E.Meyers和W.Miller算法(Cabios.4:11-17,1989),采用PAM120权重残基表,以及12的空位长度罚分和4的空位罚分,来测定两条氨基酸序列或核苷酸序列之间的同一性百分比。

[0191] 可将本文描述的核酸序列和蛋白质序列用作“查询序列(query sequence)”来对公共数据库进行检索,从而,例如鉴定其它的家族成员或相关序列。此种检索可利用Altschul,et al.,(1990,J.Mol.Biol,215:403-10)中的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)来进行。可用NBLAST程序来进行BLAST核苷酸检索,得分=100,字长=12,从而获得与本发明的核酸分子具有同源性的核苷酸序列。可用XBLAST程序来进行BLAST蛋白质检索,得分=50,字长=3,从而获得与本发明的蛋白质序列具有同源性的氨基酸序列。为了获得有空位的对齐以进行比对,可利用Altschul et al.,(Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1997)中描述的有空位的(Gapped)BLAST。当利用BLAST和有空位的BLAST程序时,可使用各自程序中的默认参数(如XBLAST和NBLAST)。

[0192] 在一个实施方案中,如上文所指出的,可利用BLAST对齐工具对多核苷酸和/或多肽进行评估。局部对齐简单地由一对序列片段组成,每一片段来自需比对的每条序列。Smith-Waterman或Sellers算法的修正将找到不能通过扩展或削减来提高分数的所有片段对,其被称为高分片段对(HSPs)。BLAST对齐的结果包括统计度量,以显示可仅从偶然发生预期BLAST得分的可能性。

[0193] 根据空位数目和与每一对齐的序列有关的取代来计算初始得分S,其中相似性得分越高表明对齐越显著。取代得分通过查表给出(参见PAM,BLOSUM)。

[0194] 通常将空位得分计算为空位开放罚分G和空位扩展罚分L的总和。对于空位长度n,空位代价将为G+Ln。按经验选择空位代价G和L,但是通常为G选择较高数值(10-15)例如11,并且为L选择较低数值(1-2)例如1。

[0195] 比特得分(bit score)S'来源于初始对齐得分S,其中将使用的评分系统的统计特征考虑在内。针对评分系统将比特得分标准化,从而可将其用于比较来自不同检索的对齐得分。术语“比特得分”和“相似性得分”可互换使用。比特得分显示了对齐的好坏:得分越高,对齐越好。

[0196] E-值或预期值描述了具有相似得分的序列在数据库中偶然发生的可能性。它是预期在数据库检索中偶然发生且具有与S相等或更高得分的不同对齐数目的预示。E-值越小,对齐越显著。例如,E值为 $e^{-117}$ 的对齐表示,具有相似得分的序列不太可能简单地偶然发生。此外,用于对齐氨基酸随机对的预期得分要求是负值,否则长对齐将趋向于具有高的得分,无论对齐的片段是否相关。而且,BLAST算法使用了合适的取代矩阵、核苷酸或氨基酸,并且将空位产生和扩展罚分用于有空位的对齐。例如,通常使用BLOSUM62矩阵来进行BLAST对齐和多肽序列比对,空位存在罚分为11,空位扩展罚分为1。

[0197] 在一个实施方案中,序列相似性得分报道自使用BLOSUM62矩阵进行的BLAST分析,

其空位存在罚分为11,空位扩展罚分为1。

[0198] 在具体实施方案中,本文提供的序列同一性/相似性得分指的是使用GAP版本10 (GCG,Accelrys,San Diego,Calif.),采用下述参数获得的值:使用空位权重为50、长度权重为3以及nws gapdna.cmp得分矩阵得到的核苷酸序列的%同一性和%相似性;使用空位权重为8、长度权重为2以及BLOSUM62得分矩阵 (Henikoff and Henikoff,PNAS USA.89:10915-10919,1992)得到的氨基酸序列的%同一性和%相似性。GAP使用Needleman和Wunsch算法 (J Mol Biol.48:443-453,1970)来寻找使两个完全序列匹配数目最大化且空位数目最小化的对齐。

[0199] 在一个具体实施方案中,变体多肽包括可与参考多肽序列最优对齐的氨基酸序列 (参见,如序列表),以产生至少约50、60、70、80、90、100、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、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、1000或更高的BLAST比特得分或序列相似性得分,包括其间的所有整数和范围,其中所述BLAST对齐使用BLOSUM62矩阵,空位存在罚分为11,空位扩展罚分为1。

[0200] 如上文所指出的,可用多种方法改变参考多肽,包括氨基酸取代、缺失、截短、添加和插入。此种操作的方法在本领域通常是已知的。例如,可通过在DNA上进行突变来制备参考多肽的氨基酸序列变体。诱变和核苷酸序列改变的方法在本领域是已知的。参见,例如Kunkel (PNAS USA.82:488-492,1985);Kunkel et al., (Methods in Enzymol.154:367-382,1987);美国专利第4,873,192号;Watson,J.D.et al., (“Molecular Biology of the Gene,”Fourth Edition,Benjamin/Cummings,Menlo Park,Calif.,1987),以及其中引用的参考文献。可在Dayhoff et al., (1978)Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl.Biomed.Res.Found.,Washington,D.C.)的模型中找到不影响目标蛋白的生物活性的合适的氨基酸取代的指导。

[0201] 筛选通过这些修饰产生的组合文库的基因产物的方法以及筛选具有选定特征的基因产物的cDNA文库的方法在本领域是已知的。这些方法可适用于参考多肽的组合诱变产生的基因文库的快速筛选。作为一个实例,可将递归整体诱变 (该技术能提高文库中功能性突变体的频率)与筛选分析组合使用以鉴定多肽变体 (Arkin and Yourvan,PNAS USA 89:7811-7815,1992;Delgrave et al.,Protein Engineering.6:327-331,1993)。

[0202] 缀合的示例性方法。可利用标准的化学、生物化学和/或分子技术将p97多肽序列缀合或结合至目标药剂。确实,如何根据现有公开内容,利用本领域可使用的方法来制备p97缀合物是显而易见的。当然,当将本发明的p97缀合物的初始组分进行结合时,通常优选的是,所使用的技术和产生的连接化学物基本不破坏缀合物中各个组分的预期功能或活性。

[0203] 应用的具体结合化学物将取决于生物活性药剂 (如小分子、多肽) 的结构、生物活性药剂中多种官能团的潜在存在、保护/脱保护步骤的需要、该药剂的化学稳定性等,并且其可被本领域技术人员容易地确定。可用于制备本发明的p97缀合物的示例性结合化学物

可参见,例如Wong(1991),“Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking”,CRC Press,Boca Raton,Fla.;and Brinkley“A Brief Survey of Methods for Preparing Protein Conjugation with Dyes,Haptens,and Crosslinking Reagents,”in Bioconjug.Chem.,3:2013,1992。优选地,作为应用缀合技术的结果,缀合物的结合能力和/或活性,相对于例如未缀合药剂或未缀合的p97多肽,基本不会降低。

[0204] 在某些实施方案中,可将p97多肽序列直接或间接缀合至目标药剂。当p97多肽序列和目标药剂都包含能够与另一个发生反应的取代基时,这两者之间可能发生直接反应。例如,在一个上的亲核基团如氨基或巯基,可能与在另一个上的含羰基基团如酸酐或酸性卤化物,或与含有好的离去基团(如卤化物)的烷基发生反应。

[0205] 可选地,将p97多肽序列与目标药剂通过连接子基团(包括非肽连接子和肽连接子)间接结合是可取的。连接子基团也可作为间隔区发挥功能以间隔目标药剂和p97多肽序列,从而避免干扰结合能力、靶向能力或其它的功能。连接子基团还可用于增强药剂上的取代基的化学反应性,并因此增加结合效率。化学反应性的增强可能也会促进药剂或其上的官能团的利用,否则这将是不可可能的。可释放的或稳定的连接子的选择也可用于改变p97缀合物和所连接的目标药剂的药代动力学。示例性连接子基团包括,例如二硫基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团和酯酶不稳定基团。在其它示例性实施方案中,所述缀合物包括连接基团,如美国专利第5,208,020号或EP专利0 425 235 B1以及 Chari et al.,Cancer Research.52:127-131,1992中公布的那些。其它的示例性连接子在下文中描述。

[0206] 在一些实施方案中,将多个p97多肽序列与药剂结合,或将p97多肽序列与多个药剂结合是可取的。例如,在某些实施方案中,多个p97多肽序列与一个药剂结合,或者可选地,一个或多个p97多肽与多个药剂缀合。所述p97多肽序列可以相同也可以不同。不管具体的实施方案是什么,可用多种方法制备含有多个p97多肽序列的缀合物。例如,可将多个多肽直接缀合至药剂,或者可使用能够为连接提供多个位点的连接子。可应用多种已知的异双功能交联策略中的任何策略来制备本发明的缀合物。应理解,这些实施方案中的许多可通过控制在缀合/交联步骤中所用材料的化学计量来实现。

[0207] 在某些示例性实施方案中,包含琥珀酸亚胺酯官能团的药剂与包含氨基的p97多肽反应,形成酰胺连接;包含氧羰基咪唑(oxy-carbonylimidazole)官能团的药剂与包含氨基的p97多肽反应,形成氨基甲酸酯连接;包含p-硝基苯基碳酸酯官能团的药剂与包含氨基的p97多肽反应,形成氨基甲酸酯连接;包含三氯苯基碳酸酯官能团的药剂与包含氨基的p97多肽反应,形成氨基甲酸酯连接;包含含硫酯官能团的药剂与包含n-端氨基的p97多肽反应,形成酰胺连接;包含丙醛官能团的药剂与包含氨基的p97多肽反应,形成仲胺连接。

[0208] 在一些示例性实施方案中,含有丁醛官能团的药剂与含有氨基的p97多肽反应,形成仲胺连接;含有乙缩醛官能团的药剂与含有氨基的p97多肽反应,形成仲胺连接;含有嘧啶酮官能团的药剂与含有氨基的p97多肽反应,形成仲胺连接;含有甲基酮官能团的药剂与含有氨基的p97多肽反应,形成仲胺连接;含有三氟乙基磺酸酯官能团的药剂与含有氨基的p97多肽反应,形成仲胺连接;含有马来酰亚胺官能团的药剂与含有氨基的p97多肽反应,形成仲胺连接;含有乙醛官能团的药剂与含有氨基的p97多肽反应,形成仲胺连接;并且含有胍官能团的药剂与含有羧酸基团的p97多肽反应,形成仲胺连接。

[0209] 在具体示例性实施方案中,含有马来酰亚胺官能团的药剂与含有硫醇基的p97多肽反应,形成硫醚连接;含有乙烯砜官能团的药剂与含有硫醇基的p97多肽反应,形成硫醚连接;含有硫醇官能团的药剂与含有硫醇基的p97多肽反应,形成二硫键连接;含有邻二硫吡啶基官能团的药剂与含有硫醇基的p97多肽反应,形成二硫键连接;并且含有碘乙酰胺官能团的药剂与含有硫醇基的p97多肽反应,形成硫醚连接。

[0210] 在具体实施方案中,使用胺-至-巯基交联剂制备缀合物。例如,在一个优选实施方案中,所述交联剂为琥珀酰亚胺-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)(Thermo Scientific),其为在中等长度的环己烷稳定的间隔区臂(8.3埃)的两端含有NHS-酯和马来酰亚胺反应基团的巯基交联剂。SMCC是不可剪切的、膜可渗透的交联剂,其可用于产生巯基反应性的、马来酰亚胺激活的药剂(如多肽、抗体),产生的药剂可用于后续与p97多肽序列的反应。在pH 7-9时,NHS酯与伯胺反应产生稳定的酰胺键。在pH 6.5-7.5时,马来酰亚胺与巯基基团反应,形成稳定的硫醚键。因此,SMCC的胺反应性的NHS酯与药剂的伯胺键迅速交联,然后所产生的巯基反应性的马来酰亚胺基团可与p97的半胱氨酸残基反应,从而得到特定的目标缀合物。

[0211] 在某些具体实施方案中,将p97多肽序列修饰以使其含有暴露的巯基基团,从而促进交联,例如促进与马来酰亚胺激活的药剂的交联。在更具体实施方案中,用修饰伯胺以添加保护性的巯基基团的试剂来修饰p97多肽序列。在更具体的实施方案中,使用试剂N-琥珀酰亚胺-S-乙酰硫代乙酸酯(SATA)(Thermo Scientific)以产生硫醇化的p97多肽。

[0212] 在其它具体实施方案中,在合适的条件下,将硫醇化的p97多肽与马来酰亚胺激活的药剂反应,以产生本发明的缀合物。应理解,通过操纵在这些反应中的SMCC、SATA、药剂和p97多肽的比例,可能产生具有不同的化学计量、分子量和特性的缀合物。

[0213] 在其它示例性实施方案中,使用双功能性蛋白偶联剂来制备缀合物,所述偶联剂如:N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯、亚氨基硫烷(IT)、亚胺酸酯的双功能性衍生物(如二甲基亚胺酸酯HCL)、活性酯(如二琥珀酰亚胺辛二酸酯)、醛类(如戊二醛)、双叠氮化合物(如双(p-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双-重氮化合物衍生物(如双(p-重氮化合物苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如甲苯2,6-二异氰酸酯)以及双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。具体的偶联剂包括N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)(Carlsson et al., Biochem.J.173:723-737[1978])和N-琥珀酰亚胺-4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP),以提供二硫键连接。

[0214] 除了许多合适的缀合策略实例中的几个外,可将本文讨论的具体的交联方案用于制备本发明的缀合物。对本领域技术人员来说显而易见的是,许多其它的双功能或多功能试剂,包括同功能性的和异功能性的(如在Pierce Chemical Co., Rockford, IL目录中描述的那些),可用作连接子基团。偶联可能受,例如氨基、羧基、巯基或氧化的碳水化合物残基的影响。有许多描述此类方法学的参考文献,例如Rodwell et al的美国专利第4,671,958号。

[0215] 具体的实施方案可应用一种或多种醛标签来促进p97多肽和药剂之间的缀合(参见美国专利第8,097,701号和第7,985,783号,以引用的方式并入本文)。在此,通过甲酰甘氨酸生成酶(FGE)的作用对醛标签的硫酸酯酶基序进行酶修饰,产生了甲酰甘氨酸(FGly)

残基。然后可将FGly残基的醛部分用作将目标部分在特异位点连接至多肽的化学柄(chemical handle)。在一些方面,所述目标部分为小分子、类肽、适配体或肽模拟物。在一些方面,所述目标部分为其它的多肽,如抗体。

[0216] 因此,具体实施方案包括含有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多异源的硫酸酯酶基序的p97多肽或多肽药剂,其中所述基序包括下述结构:

[0217]  $X_1Z_1X_2Z_2X_3$  (SEQ ID NO:19)

[0218] 其中 $Z_1$ 是半胱氨酸或丝氨酸; $Z_2$ 是脯氨酸或丙氨酸残基; $X_1$ 为存在或不存在,且当存在时它是任意氨基酸,其中当异源硫酸酯酶基序在醛标签的多肽的N-端时,优选 $X_1$ 为存在; $X_2$ 和 $X_3$ 分别独立地为任意氨基酸。

[0219] 可用FGE酶修饰具有上述基序的多肽,以产生具有FGly残基的基序,然后如上文所指出的,可将产生的基序用于与药剂(如第二多肽)的位点特异性连接,例如通过连接子部分。可通过,例如在表达FGE酶的哺乳动物、酵母或细菌细胞中表达含硫酸酯酶基序的多肽(如p97、抗体),或通过用分离的FGE酶将分离的多肽进行体外修饰来进行此种修饰(参见Wu et al., PNAS.106:3000-3005,2009;Rush and Bertozzi, J. Am Chem Soc.130:12240-1, 2008;和Carlson et al., J Biol Chem.283:20117-25,2008)。

[0220] 因此,一些实施方案包括含有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个具有甲酰甘氨酸残基的异源硫酸酯酶基序的p97多肽或多肽药剂,其中所述基序包括下述结构:

[0221]  $X_1$  (FGly)  $X_2Z_2X_3$  (SEQ ID NO:20)

[0222] 其中FGly是甲酰甘氨酸残基; $Z_2$ 是脯氨酸或丙氨酸残基; $X_1$ 为存在或不存在,且当存在时它是任意氨基酸,其中当异源硫酸酯酶基序在醛标签的多肽的N-端时,优选 $X_1$ 为存在; $X_2$ 和 $X_3$ 分别独立地为任意氨基酸。

[0223] 在具体实施方案中, $X_1$ 、 $X_2$ 和 $X_3$ 分别独立地为脂肪族氨基酸、含硫氨基酸或极性、不带电荷的氨基酸。例如, $X_1$ 可以是L、M、V、S或T;且 $X_2$ 和/或 $X_3$ 可独立地为S、T、A、V、G或C。

[0224] 在一些实施方案中,异源硫酸酯酶基序可以(a)长度少于16个氨基酸残基,包括长度为约4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个残基,(b)位于多肽的N-端,(c)位于多肽的C-端,(d)位于来自多肽的氨基酸序列的内部位置,(e)位于多肽的末端环内,(f)位于多肽的转录后修饰位点(如糖基化位点),或其任意组合。

[0225] 一些实施方案涉及以下物质的缀合物:(i)含硫酸酯酶基序(或醛标签)的p97多肽,和(ii)药剂(A)如用醛反应性基团将其功能化的小分子,其中(i)和(ii)通过硫酸酯酶基序的FGly残基和醛反应性基团共价连接。此种缀合物可具有下述通用结构中的一种:

[0226] p97 (FGly) - $R_1$ -A

[0227] 其中 $R_1$ 为至少一个醛反应性连接;且FGly为位于异源硫酸酯酶基序内的甲酰甘氨酸残基。

[0228] 一些实施方案涉及以下物质的缀合物:(i)含有硫酸酯酶基序(或醛标签)的p97多肽,和(ii)用醛反应性基团使之功能化的多肽药剂(pA),或者(i)用醛反应性基团使之功能化的p97多肽,和(ii)含有硫酸酯酶基序(或醛标签)的多肽药剂(pA),其中(i)和(ii)通过硫酸酯酶基序的FGly残基和醛反应性基团共价连接。此种缀合物可具有下述通用结构中的一种:

[0229] p97 (FGly) - $R_1$ -pA,或p97- $R_1$ - (FGly) pA

[0230] 其中R<sub>1</sub>为至少一个醛反应性连接;且FGly为位于异源硫酸酯酶基序内的甲酰甘氨酸残基。

[0231] 可用一种或多种醛反应性基团(如氨氧基、酰肼和氨基硫脲)将药剂或含有非醛标签的多肽(例如抗体、p97多肽)功能化,然后通过至少一个FGly残基将其共价连接至含有醛标签的多肽,从而形成醛反应性连接。氨氧基功能化的药剂(或含有非醛标签的多肽)的连接,在FGly残基和功能化的药剂(或含有非醛标签的多肽)之间产生了肟连接;酰肼功能化的药剂(或含有非醛标签的多肽)的连接,在FGly残基和功能化的药剂(或含有非醛标签的多肽)之间产生了肼连接;并且氨基硫脲功能化的药剂(或含有非醛标签的多肽)的连接,在FGly残基和功能化的药剂(或含有非醛标签的多肽)之间产生了肼硫代羧酰胺(carbothiamide)连接。因此,在这些及相关实施方案中,R<sub>1</sub>可以是含有席夫碱的连接,如肟连接、肼连接或肼硫代羧酰胺连接。

[0232] 某些实施方案包括下述物质的缀合物:(i)含有硫酸酯酶基序(或醛标签)的p97多肽,和(ii)含有硫酸酯酶基序(或醛标签)的多肽药剂(A),其中(i)和(ii)通过它们各自的FGly残基共价连接,任选地,通过双功能化的连接子部分或基团连接。例如,某些p97缀合物可包括下述结构:

[0233] p97 (FGly) -R<sub>1</sub>-L-R<sub>2</sub>- (FGly) A

[0234] 其中,R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>是相同的或不同的醛反应性连接;L是连接子部分,p97 (FGly) 是含有醛标签的p97多肽,且 (FGly) A是含有醛标签的药剂,如抗体或其它基于多肽的药剂。

[0235] 仅以示例的方式,在一些实施方案中,所述至少一个异源硫酸酯酶基序可以位于p97多肽的C-端以及位于基于多肽的药剂的N-端。在其它实施方案中,所述至少一个异源硫酸酯酶基序可以位于p97多肽的N-端以及位于基于多肽的药剂的C-端。在其它实施方案中,所述至少一个异源硫酸酯酶基序可以位于p97多肽的N-端以及位于基于多肽的药剂的N-端。在进一步的实施方案中,所述至少一个异源硫酸酯酶基序可以位于p97多肽的C-端以及位于基于多肽的药剂的C-端。如上文所指出的,所述至少一个异源基序可以位于p97多肽和/或基于多肽的药剂的内部位点。本领域技术人员应认识到,其它的组合也是可能的。

[0236] R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>的醛反应性连接可通过任何醛反应性基团独立地形成,所述醛反应性基团能够在(i)醛标签的甲酰甘氨酸 (FGly) 残基和(ii)用所述醛反应性基团功能化的连接子部分(例如,有两个醛反应性基团的双功能化连接子,这两个反应性基团可以相同也可以不同)之间形成共价键。醛反应性基团的实例包括氨氧基、酰肼和氨基硫脲基团,其将与FGly残基形成含有席夫碱的连接,分别包括肟连接、肼连接和肼硫代羧酰胺连接。因此,R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>可独立地为包含席夫碱(如肟连接、肼连接和肼硫代羧酰胺连接)的连接。

[0237] 在一些实施方案中,含有醛标签的p97多肽与含有醛标签的药剂通过多功能化的连接子(例如双功能化的连接子)连接(例如共价连接),后者被相同或不同的醛反应基团功能化。在这些和相关实施方案中,所述醛反应性基团允许连接子在p97多肽和药剂之间通过它们各自的FGly残基形成共价桥。连接子部分包括可被功能化的任何部分或化学品,并且优选被一个或多个醛反应性基团双功能化或多功能化。具体实例包括肽、水溶性聚合物、可检测实体、其它的治疗性化合物(例如细胞毒性化合物)、生物素/链霉亲和素部分和聚糖(参见Hudak et al., J Am Chem Soc.133:16127-35,2011)。聚糖(或糖苷)的具体实例包括氨氧基聚糖,如包含糖基-N-烯戊酰异羟肟酸配合物中间体的更高阶的聚糖(同上文)。本文

描述了示例性的连接子,并且其可根据本领域的常规技术用醛反应性基团功能化(参见,例如,Carrico et al.,*Nat Chem Biol*.3:321-322,2007;和美国专利第8,097,701号和7,985,783号)。

[0238] 也可通过各种“点击化学”技术制备p97缀合物,包括具有下述特点的反应:模块化、范围广泛、收率很高、产生的主要是可通过非色谱法移除的无害副产物,并且其可以是立体定向的而不必具有对映选择性(参见Kolb et al.,*Angew Chem Int Ed Engl*.40:2004-2021,2001)。具体实例包括叠氮化物和炔烃的Huisgen 1,3-偶极环加成反应,也被称为“叠氮化物-炔烃环加成”反应(参见Hein et al.,*Pharm Res*.25:2216-2230,2008)。叠氮化物-炔烃环加成反应的非限制性实例包括铜催化的叠氮化物-炔烃环加成(CuAAC)反应和钌催化的叠氮化物-炔烃环加成(RuAAC)反应。

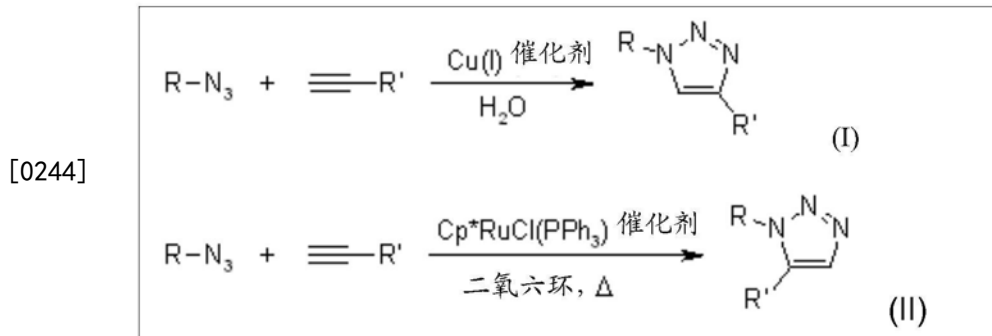
[0239] CuAAC可在广泛的温度范围内进行,其对水条件和4-12的pH范围不敏感,并且可耐受众多的官能团(参见Himo et al.,*J Am Chem Soc*.127:210-216,2005)。可通过,例如利用抗坏血酸钠作为还原剂,从Cu(I)盐或Cu(II)盐中产生有活性的Cu(I)催化剂。该反应形成1,4-取代的产物,使之具有区域特异性(参见Hein et al.,同上文)。

[0240] RuAAC利用能够催化叠氮化物至末端炔烃的环加成反应的五甲基环戊二烯基氯化钌[Cp\*RuCl]复合体,区域选择性地产生1,5-双取代1,2,3-三唑(参见Rasmussen et al.,*Org.Lett*.9:5337-5339,2007)。进一步,与CuAAC对比,RuAAC还可与内部炔烃同时使用以提供全部取代的1,2,3-三唑。

[0241] 某些实施方案因此包括包含至少一个具有叠氮化物侧链或炔烃侧链的非天然氨基酸的p97多肽,包含内部和末端非天然氨基酸(如N-端,C-端)。这些p97多肽中的某些可通过体内或体外(例如无细胞系统)并入非天然氨基酸而形成,所述非天然氨基酸含有叠氮化物侧链或炔烃侧链。示例性的体内技术包括细胞培养技术,例如使用修饰的大肠杆菌(参见Travis and Schultz,*The Journal of Biological Chemistry*.285:11039-44,2010;和Deiters and Schultz,*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*.15:1521-1524,2005);示例性的体外技术包括无细胞系统(参见Bundy,*Bioconjug Chem*.21:255-63,2010)。

[0242] 在一些实施方案中,包含至少一个具有叠氮化物侧链的非天然氨基酸的p97多肽,通过叠氮化物-炔烃环加成反应与含有至少一个炔烃基团的药剂(或连接子),如包含至少一个具有炔烃侧链的非天然氨基酸的多肽药剂缀合。在其它实施方案中,包含至少一个具有炔烃侧链的非天然氨基酸的p97多肽,通过叠氮化物-炔烃环加成反应与含有至少一个叠氮化物基团的药剂(或连接子),如包含至少一个具有叠氮化物侧链的非天然氨基酸的多肽药剂缀合。因此,某些实施方案包括含有通过1,2,3-三唑连接与药剂共价缀合的p97多肽的缀合物。

[0243] 可通过下述基于CuAAC或基于RuAAC的反应形成具体的p97缀合物,以使其分别包含下述结构(I)或(II)。



[0245] 其中R是p97多肽，R<sup>1</sup>是目标药剂(或连接子)；或者，其中R是目标药剂(或连接子)，而R<sup>1</sup>是p97多肽。

[0246] 在某些实施方案中，含有叠氮化物侧链的非天然氨基酸和/或具有炔烃侧链的非天然氨基酸是末端氨基酸(N-端、C-端)。在某些实施方案中，所述非天然氨基酸中的一个或多个位于内部。

[0247] 例如，某些实施方案包括与含有炔烃基团的药剂缀合的p97多肽，所述p97多肽包含具有叠氮化物侧链的N-端非天然氨基酸。一些实施方案包括与含有炔烃基团的药剂缀合的p97多肽，所述p97多肽包含具有叠氮化物侧链的C-端非天然氨基酸。具体实施方案包括与含有叠氮化物侧基的药剂缀合的p97多肽，所述p97多肽包含具有炔烃侧链的N-端非天然氨基酸。进一步的实施方案包括与含有叠氮化物侧基的药剂缀合的p97多肽，所述p97多肽包含具有炔烃侧链的C-端非天然氨基酸。一些实施方案包括与含有炔烃基团的药剂缀合的p97多肽，所述p97多肽含有至少一个具有叠氮化物侧链的内部非天然氨基酸。另外的实施方案包括与含有叠氮化物侧基的药剂缀合的p97多肽，所述p97多肽含有至少一个具有炔烃侧链的内部非天然氨基酸。

[0248] 具体实施方案包括与含有具有炔烃侧链的N-端非天然氨基酸的多肽药剂缀合的p97多肽，所述p97多肽含有具有叠氮化物侧链的N-端非天然氨基酸。其它实施方案包括与含有具有炔烃侧链的C-端非天然氨基酸的多肽药剂缀合的p97多肽，所述p97多肽含有具有叠氮化物侧链的C-端非天然氨基酸。其它实施方案包括与含有具有炔烃侧链的C-端非天然氨基酸的多肽药剂缀合的p97多肽，所述p97多肽含有具有叠氮化物侧链的N-端非天然氨基酸。进一步的实施方案包括与含有具有炔烃侧链的N-端非天然氨基酸的多肽药剂缀合的p97多肽，所述p97多肽含有具有叠氮化物侧链的C-端非天然氨基酸。

[0249] 其它实施方案包括与含有具有叠氮化物侧链的N-端非天然氨基酸的多肽药剂缀合的p97多肽，所述p97多肽含有具有炔烃侧链的N-端非天然氨基酸。进一步的实施方案包括与含有具有叠氮化物侧链的C-端非天然氨基酸的多肽药剂缀合的p97多肽，所述p97多肽含有具有炔烃侧链的C-端非天然氨基酸。另外的实施方案包括与含有具有叠氮化物侧链的C-端非天然氨基酸的多肽药剂缀合的p97多肽，所述p97多肽含有具有炔烃侧链的N-端非天然氨基酸。进一步的实施方案包括与含有具有叠氮化物侧链的N-端非天然氨基酸的多肽药剂缀合的p97多肽，所述p97多肽含有具有炔烃侧链的C-端非天然氨基酸。

[0250] 也包含制备p97缀合物的方法，所述方法包括：(a) 在(i) 含有至少一个具有叠氮化物侧链的非天然氨基酸的p97多肽与含有至少一个炔烃基团的药剂(例如具有炔烃侧链的非天然氨基酸)之间进行叠氮化物-炔烃环加成反应；或者在(ii) 含有至少一个具有炔烃侧

链的非天然氨基酸的p97多肽与含有至少一个叠氮化物基团的药剂(例如具有炔叠氮化物侧链的非天然氨基酸)之间进行叠氮化物-炔烃环加成反应;和(b)将p97缀合物从反应中分离,因而产生p97缀合物。

[0251] 当p97缀合物是融合多肽时,通常可使用标准技术来制备融合多肽。优选地,然而,在表达系统中将融合多肽表达为重组多肽,这是本文描述的,也是本领域已知的。本发明的融合多肽可以包含p97多肽序列的一个或多个拷贝,并且可包含基于多肽的目标药剂(如抗体或其抗原结合片段)的一个或多个拷贝,其以任何期望的排列存在。

[0252] 对于融合蛋白,可将编码p97多肽、多肽药剂(如抗体)和任选的多肽连接子组分的DNA序列分别组装,然后将其连入合适的表达载体。将编码一种多肽组分的DNA序列的3'端(用或不用肽连接子)与编码另一多肽组分的DNA序列的5'端相连,以使所述序列的阅读框同相(in phase)。将连接的DNA序列可操作地与合适的转录或翻译调控元件相连。所述负责DNA表达的调控元件仅位于编码第一多肽的DNA序列的5'区。类似地,中止翻译所需的中止密码子和转录中止信号也仅存在于编码最C-端多肽的DNA序列的3'区。这样就允许翻译为单个的融合多肽,其保有多个多肽组分的生物活性。

[0253] 可将相似的技术用于重组生产非融合蛋白,例如用于生产非融合缀合物的p97多肽和多肽药剂(如抗体药剂),所述技术主要是调控元件如启动子、终止密码子和转录终止信号的排列。

[0254] 本发明的多核苷酸和融合多核苷酸可包含编码p97多肽序列的核酸的一个或多个拷贝,和/或可包含编码多肽药剂的核酸的一个或多个拷贝。

[0255] 在一些实施方案中,将编码对象p97多肽、多肽药剂和/或p97-多肽融合蛋白的核酸直接引入宿主细胞,并且将细胞在足以诱导编码多肽表达的条件下培养。可通过将本领域技术人员已知的标准技术与本文提供的多肽和核酸序列组合,来制备本公开内容的多肽序列。

[0256] 因此,根据某些相关实施方案,提供重组的宿主细胞,其包含编码本文描述的多肽的多核苷酸或融合多核苷酸。可通过在合适的条件下培养含有多核苷酸的重组宿主细胞,来方便地实现在宿主细胞中表达p97多肽、多肽药剂或p97-多肽药剂融合蛋白。在通过表达生产之后,可利用任何合适的技术将多肽分离和/或纯化,然后根据需要使用时。

[0257] 在多种不同的宿主细胞中克隆和表达多肽的系统是已知的。合适的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、酵母和杆状病毒系统。本领域中可用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa细胞、仓鼠肾细胞、HEK-293细胞、NS0鼠黑色素瘤细胞以及许多其它的细胞。常用的、优选的细菌宿主是大肠杆菌。在原核细胞如大肠杆菌中表达多肽在本领域已经得到完善。为了查看,参见例如Pluckthun, A. *Bio/Technology*. 9:545-551 (1991)。作为重组生产多肽的选择,本领域技术人员也可将其在培养的真核细胞中表达(参见Ref, *Curr. Opinion Biotech.* 4:573-576, 1993; 和Trill et al., *Curr. Opinion Biotech.* 6:553-560, 1995)。

[0258] 可以选择或构建合适的载体,其包含合适的调控序列的,视情况包括启动子序列、终止子序列、聚腺苷酸化序列、增强子序列、标记物基因和其它序列。视情况,载体可以是质粒、病毒如噬菌体或噬菌粒。更进一步的细节参见,例如Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press。

在Current Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992, 或另外的其后续更新中, 详细描述了许多已知的核酸操作的技术和方案, 例如制备核酸构建体、诱变、将DNA引入细胞和基因表达以及蛋白分析。

[0259] 使用的术语“宿主细胞”指, 已经引入或能够引入编码本文描述的一种或多种多肽的核酸序列的细胞, 其进一步表达或能够表达所选择的目标基因, 如编码任何本文所述多肽的基因。术语“宿主细胞”包括母细胞的子细胞, 不管子细胞与其来源的母细胞的形态或基因组成是否相同, 只要其存在所选择的基因。可选择具有某些特征的宿主细胞, 例如表达甲酰甘氨酸生成酶 (FGE) 以将硫酸酯酶基序中的半胱氨酸或丝氨酸残基转变为甲酰甘氨酸 (FGly) 残基, 或者表达氨酰基tRNA合成酶, 其可将非天然氨基酸并入多肽, 包括具有叠氮化物侧链、炔基侧链或其它期望的侧链的非天然氨基酸, 从而促进缀合。

[0260] 因此, 本申请也考虑了包括向宿主细胞引入此类核酸的方法。核酸的引入可使用任何可用的技术。对于真核细胞, 合适的技术可以包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染和利用逆转录病毒或其它病毒的转导, 如牛痘, 或对于昆虫细胞而言, 杆状病毒。对于细菌细胞, 合适的技术可以包括氯化钙转化、电穿孔和利用细菌噬菌体的转染。可在引入之后, 引起或允许核酸表达, 例如通过在使基因表达的条件下培养宿主细胞。在一个实施方案中, 将核酸整合进宿主细胞的基因组 (如染色体)。根据标准技术, 可通过包含能够促进与基因组重组的序列来促进整合。

[0261] 在某些实施方案中, 本发明也提供在表达系统中使用本文描述的核酸构建体来表达特定多肽 (如本文描述的p97多肽、多肽药剂或p97-多肽药剂融合蛋白) 的方法。

[0262] 如上文所指出的, 某些p97缀合物 (如融合蛋白) 可使用一个或多个连接子基团, 包括非肽连接子 (如非蛋白质连接子) 和肽连接子。此类连接子可以是稳定的连接子, 也可以是可释放的连接子。

[0263] 示例性非肽稳定的连接包括: 琥珀酰亚胺、丙酸、羧甲基连接、醚类、氨基甲酸酯、酰胺、胺类、尿素、酰亚胺、脂肪族C-C键、硫醚键、硫代氨基甲酸酯、硫脲等。通常, 水解稳定的连接是在生理条件下, 表现出少于约1-2%至5%/天的水解速率的稳定连接。

[0264] 示例性非肽可释放的连接包括: 羧酸酯、磷酸酯、酸酐、乙缩醛、缩酮、酰氧基烷基醚、亚胺、原酸酯、含硫酯、硫醇酯、碳酸酯和脲连接。水解不稳定的或弱连接的其他示例性实施方案包括但不限于:  $-O_2C-(CH_2)_b-O-$ , 其中b为1-5;  $-O-(CH_2)_b-CO_2-(CH_2)_c-$ , 其中b为1-5, 且c为2-5;  $-O-(CH_2)_b-CO_2-(CH_2)_c-O-$ , 其中b为1-5, 且c为2-5;  $-(CH_2)_b-OP(O)_3-(CH_2)_{b'}$ , 其中b为1-5, 且b'为1-5;  $-C(O)-(NH-CHR-CO)_a-NH-CHR-$ , 其中a为2-20, 且R为 $\alpha$ -氨基酸上发现的取代基;  $-O-(CH_2)_b-CO_2-CHCH_2-CH_2-$ , 其中b为1-5;  $-O-C_6H_4-CH=N-(CH_2)_b-O-$ , 其中b为1-5; 以及  $-O-(CH_2)_b-CH_2-CH=N-(CH_2)_b-O-$ , 其中每个b独立为1-5。

[0265] 可释放的连接子的其它示例性实例可以是基于苯甲基消除的连接子、基于三烷基锁的连接子 (或基于三烷基锁内酯化)、基于N,N-二羟乙基甘氨酸的连接子和酸不稳定的连接子。酸不稳定的连接子可以是二硫键、含脲的连接子和含硫代丙酸酯的连接子。

[0266] 也包括在内化进细胞时可释放或可剪切的连接子。将药剂从这些连接子基团在细胞内释放的机制包括: 通过将二硫键还原而剪切 (如Spitler的美国专利第4, 489, 710号), 通过辐照对光不稳定的键 (如Senter et al. 的美国专利第4, 625, 014号), 通过将衍生化的

氨基酸侧链水解(如Kohn et al.的美国专利第4,638,045号),通过血清补体介导的水解(如Rodwell et al.的美国专利第4,671,958号),以及酸催化的水解(如Blattler et al.的美国专利第4,569,789号)。在一个实施方案中,可使用酸不稳定的连接子(Cancer Research 52:127-131,1992;和美国专利第5,208,020号)。

[0267] 在某些实施方案中,在连接子中使用“水溶性聚合物”来将p97多肽序列与目标药剂结合。“水溶性聚合物”指在水中可溶的聚合物,且其通常基本上是非免疫原性的,并且原子分子量通常大于1,000道尔顿。将两个多肽通过水溶性聚合物连接是可取的,因为此种修饰能够通过增加血清的半衰期来增加治疗指数,例如通过增加蛋白水解稳定性和/或减少肾脏的清除。此外,通过一个或多个聚合物的连接能够降低蛋白质药物的免疫原性。水溶性聚合物的具体实例包括聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧化烯烃或聚乙二醇与聚丙二醇的共聚物等。

[0268] 在一些实施方案中,水溶性聚合物具有高于约10,000Da,高于约20,000-500,000Da,高于约40,000-300,000Da,高于约50,000-70,000Da,通常高于约60,000Da的有效的水动力学分子量。“有效的水动力学分子量”指通过基于水的尺寸排阻色谱法(SEC)测定的聚合物链的有效的水溶剂化大小。当水溶性聚合物包含含有聚亚烷基氧化物重复单元(如环氧乙烷重复单元)的聚合物链时,每条链可具有约200Da-约80,000Da,或约1,500Da-约42,000Da的原子分子量,其中2,000-约20,000Da是特别期望的。也可包括直链、支链和末端带电的水溶聚合物。

[0269] 用作醛标记多肽之间的连接子的聚合物可具有广范围的分子量和聚合物亚基。这些亚基可包括生物聚合物、合成聚合物或其组合。此种水溶性聚合物的实例包括:葡聚糖和葡聚糖衍生物,包括硫酸葡聚糖、P-氨基交联的葡聚糖和羧甲基葡聚糖);纤维素和纤维素衍生物,包括甲基纤维素和羧甲基纤维素;淀粉和糊精),以及淀粉的衍生物和水解产物(hydrolylates);聚亚烷基二醇及其衍生物,包括聚乙二醇(PEG)、甲氧基聚乙二醇、聚乙二醇均聚物、聚丙二醇均聚物、乙二醇与丙二醇的共聚物,其中所述均聚物和共聚物为未被取代的,或在一端被烷基、肝素和肝素片段、聚乙烯醇和聚乙烯醚、聚乙烯吡咯烷酮、天冬酰胺和聚乙氧基化的多元醇取代,被葡聚糖和葡聚糖衍生物、糊精和糊精衍生物取代。应当理解,也包括具体描述的水溶性聚合物的不同衍生物。

[0270] 水溶性聚合物为本领域已知,特别是基于聚亚烷基氧化物的聚合物,如聚乙二醇“PEG”(参见Poly(ethylene glycol)Chemistry:Biotechnical and Biomedical Applications,J.M.Harris,Ed.,Plenum Press,New York,N.Y.(1992);以及Poly(ethylene glycol)Chemistry and Biological Applications,J.M.Harris and S.Zalipsky,Eds.,ACS(1997);和国际专利申请:WO 90/13540、WO 92/00748、WO 92/16555、WO 94/04193、WO 94/14758、WO 94/17039、WO 94/18247、WO 94/28937、WO 95/11924、WO 96/00080、WO 96/23794、WO 98/07713、WO 98/41562、WO 98/48837、WO 99/30727、WO 99/32134、WO 99/33483、WO 99/53951、WO 01/26692、WO 95/13312、WO 96/21469、WO 97/03106、WO 99/45964和美国专利第4,179,337号;第5,075,046号;第5,089,261号;第5,100,992号;第5,134,192号;第5,166,309号;第5,171,264号;第5,213,891号;第5,219,564号;第5,275,838号;第5,281,698号;第5,298,643号;第5,312,808号;第5,321,095号;第5,324,844号;第5,349,001号;第5,352,756号;第5,405,877号;第5,455,027号;第5,446,090

号;第5,470,829号;第5,478,805号;第5,567,422号;第5,605,976号;第5,612,460号;第5,614,549号;第5,618,528号;第5,672,662号;第5,637,749号;第5,643,575号;第5,650,388号;第5,681,567号;第5,686,110号;第5,730,990号;第5,739,208号;第5,756,593号;第5,808,096号;第5,824,778号;第5,824,784号;第5,840,900号;第5,874,500号;第5,880,131号;第5,900,461号;第5,902,588号;第5,919,442号;第5,919,455号;第5,932,462号;第5,965,119号;第5,965,566号;第5,985,263号;第5,990,237号;第6,011,042号;第6,013,283号;第6,077,939号;第6,113,906号;第6,127,355号;第6,177,087号;第6,180,095号;第6,194,580号;第6,214,966号,其通过引用并入)。

[0271] 示例性目标聚合物包括那些含有聚亚烷基氧化物、聚酰胺亚烷基氧化物或其衍生物的聚合物,包括含有式--(CH<sub>2</sub>--CH<sup>2</sup>--O)--的环氧乙烷重复单元的聚亚烷基氧化物和聚酰胺亚烷基氧化物。其它示例性目标聚合物包括含有分子量大于约1,000道尔顿的通式--[C(O)--X--C(O)--NH--Y--NH]<sub>n</sub>--或--[NH--Y--NH--C(O)--X--C(O)]<sub>n</sub>--的聚酰胺,其中X与Y为二价自由基,其可以相同或不同,也可为直链或支链,且n为2-100,通常为2-50的离散的整数,并且其中X和Y中两者或其中之一包含可能是直链或支链的生物相容且基本无抗原性的水溶性重复单元。

[0272] 其它示例性水溶性重复单元包括通式--(CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>--O)--或--(CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>--O)--的环氧乙烷。此种水溶性重复单元的数量可明显不同,通常其数量为2-500、2-400、2-300、2-200、2-100,且最通常为2-50。一个示例性实施方案为,X和Y中的一项或全部选自--((CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>--(CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>--O)<sub>n2</sub>--(CH<sub>2</sub>)--或--((CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>--(O--CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>)<sub>n2</sub>--(CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>--),其中n1为1-6、1-5、1-4,且最通常为1-3,其中n2为2-50、2-25、2-15、2-10、2-8,且最通常为2-5。又一示例性实施方案为,其中X为--(CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>)--,且Y为--(CH<sub>2</sub>--(CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>--O)<sub>3</sub>--CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>)--或--(CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>--(O--CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>--CH<sub>2</sub>)--,以及其它变型。

[0273] 在某些实施方案中,可使用肽连接子序列将p97缀合物的组分分离或结合。例如,对于多肽-多肽缀合物,肽连接子可通过足以确保每条多肽可折叠为其二级结构或三级结构的距离将缀合物的组分间隔。可使用本文描述的和本领域已知的标准技术将此种肽连接子序列并入缀合物(如融合蛋白)。可基于下述因素选择合适的肽连接子序列:(1)它们能够采用灵活的扩展构象;(2)它们不能采用可与第一和第二多肽的功能性表位相互作用的二级结构;和(3)缺少可与多肽的功能性表位反应的疏水的或带电荷的残基。可用作连接子的氨基酸序列包括在Maratea et al., Gene 40:39-46, 1985; Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262, 1986; 美国专利第4,935,233号和美国专利第4,751,180号中公开的那些序列。

[0274] 在某些示例性实施方案中,肽连接子为约1-5个氨基酸,5-10个氨基酸、5-25个氨基酸、5-50个氨基酸、10-25个氨基酸、10-50个氨基酸、10-100个氨基酸,或任何其间范围的氨基酸。在其它示例性实施方案中,肽连接子的长度包括约1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50或更多个氨基酸。具体的连接子的总氨基酸长度可以是约1-200个氨基酸、1-150个氨基酸、1-100个氨基酸、1-90个氨基酸、1-80个氨基酸、1-70个氨基酸、1-60个氨基酸、1-50个氨基酸、1-40个氨基酸、1-30个氨基酸、1-20个氨基酸、1-10个氨基酸、1-5个氨基酸、1-4个氨基酸、1-3个氨基酸,或约1、2、3、4、5、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、60、70、80、90、100个或更多个氨基酸。

[0275] 如在本文其它地方描述的,且在本领域已知,肽连接子可使用天然存在的氨基酸、非天然存在的氨基酸、氨基酸类似物和/或氨基酸模拟物中任何一种或多种。可用作连接子的某些氨基酸序列包括在Maratea et al.,Gene 40:39-46,1985;Murphy et al.,PNAS USA.83:8258-8262,1986;美国专利第4,935,233号和美国专利第4,751,180号中公开的那些序列。具体的肽连接子序列包含Gly、Ser和/或Asn残基。如果需要,也可将其它的接近中性的氨基酸如Thr和Ala用于肽连接子。

[0276] 某些示例性连接子包括含Gly、Ser和/或Asn的连接子,如下:[G]<sub>x</sub>、[S]<sub>x</sub>、[N]<sub>x</sub>、[GS]<sub>x</sub>、[GGS]<sub>x</sub>、[GSS]<sub>x</sub>、[GSGS]<sub>x</sub>(SEQ ID NO:21)、[GGSG]<sub>x</sub>(SEQ ID NO:22)、[GGGS]<sub>x</sub>(SEQ ID NO:23)、[GGGGS]<sub>x</sub>(SEQ ID NO:24)、[GN]<sub>x</sub>、[GGN]<sub>x</sub>、[GNN]<sub>x</sub>、[GNGN]<sub>x</sub>(SEQ ID NO:25)、[GGNG]<sub>x</sub>(SEQ ID NO:26)、[GGGN]<sub>x</sub>(SEQ ID NO:27)、[GGGGN]<sub>x</sub>(SEQ ID NO:28)连接子,其中<sub>x</sub>为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20,或者更多。这些和相关氨基酸的其它组合对本领域技术人员将是显而易见的。

[0277] 在具体实施方案中,所述连接子序列包括包含三个甘氨酸残基的Gly<sub>3</sub>连接子序列。在具体实施方案中,可通过能模拟DNA结合位点和多肽自身的计算机程序(Desjarlais & Berg,PNAS.90:2256-2260,1993;和PNAS.91:11099-11103,1994),或通过噬菌体展示方法来合理的设计灵活的连接子。

[0278] 肽连接子可以是生理上稳定的,也可以包括可释放的连接子,如生理可降解的或酶可降解的连接子(如可通过蛋白水解剪切的连接子)。在某些实施方案中,一种或多种可释放的连接子可使缀合物的半衰期更短,且清除更快速。这些或相关的实施方案可用于,例如,增加p97缀合物在血流中的溶解度和血液循环寿命,虽然这也将药剂递送进了血流(或穿过BBB),其在连接子被降解后基本上不与p97序列相连。在那些当将多肽或其他药剂与p97序列永久缀合时显示活性降低的情况下,这些方面是特别有用的。通过使用本文提供的连接子,当这些抗体为缀合形式时,其仍可维持它们的治疗活性。用这种和其它方法,可更有效地调整p97缀合物的特性,以随时间平衡抗体的生物活性和循环半衰期。

[0279] 可适用于本发明具体实施方案的酶可降解连接子包括但不限于:被丝氨酸蛋白酶如凝血酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、弹性蛋白酶、激肽释放酶或枯草杆菌蛋白酶剪切的氨基酸序列。凝血酶可剪切的氨基酸序列的示例性实例包括但不限于:-Gly-Arg-Gly-Asp-(SEQ ID NO:29)、-Gly-Gly-Arg-、-Gly-Arg-Gly-Asp-Asn-Pro-(SEQ ID NO:30)、-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-(SEQ ID NO:31)、-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys-(SEQ ID NO:32)、-Gly-Pro-Arg-、-Val-Pro-Arg-和-Phe-Val-Arg-。弹性蛋白酶可剪切的氨基酸序列的示例性实例包括但不限于:-Ala-Ala-Ala-、-Ala-Ala-Pro-Val-(SEQ ID NO:33)、-Ala-Ala-Pro-Leu-(SEQ ID NO:34)、-Ala-Ala-Pro-Phe-(SEQ ID NO:35)、-Ala-Ala-Pro-Ala-(SEQ ID NO:36)以及-Ala-Tyr-Leu-Val-(SEQ ID NO:37)。

[0280] 可适用于本发明具体实施方案的酶可降解的连接子还包括可被基质金属蛋白酶如胶原酶、基质溶素和明胶酶剪切的氨基酸序列。基质金属蛋白酶可剪切的氨基酸序列的示例性实例包括但不限于:-Gly-Pro-Y-Gly-Pro-Z-(SEQ ID NO:38)、-Gly-Pro-、Leu-Gly-Pro-Z-(SEQ ID NO:39)、-Gly-Pro-Ile-Gly-Pro-Z-(SEQ ID NO:40)和-Ala-Pro-Gly-Leu-Z-(SEQ ID NO:41),其中Y和Z为氨基酸。胶原酶可剪切的氨基酸序列的示例性实例包括但

不限于：-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg-Z- (SEQ ID NO:42)、-Pro-Leu-Gly-Leu-Leu-Gly-Z- (SEQ ID NO:43)、-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Trp- (SEQ ID NO:44)、-Pro-Leu-Gly-Cys (Me)-His- (SEQ ID NO:45)、-Pro-Leu-Gly-Leu-Tyr-Ala- (SEQ ID NO:46)、-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg- (SEQ ID NO:47) 和 -Pro-Leu-Ala-Tyr-Trp-Ala-Arg- (SEQ ID NO:48)，其中Z为氨基酸。基质溶素可剪切的氨基酸序列的示例性实例为-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Tyr-Met-Arg- (SEQ ID NO:49)；明胶酶可剪切的氨基酸序列的实例为Pro-Leu-Gly-Met-Tyr-Ser-Arg- (SEQ ID NO:50)。

[0281] 可适用于本发明具体实施方案的酶可降解的连接子还包括可被血管紧张素转化酶剪切的氨基酸序列，诸如，如-Asp-Lys-Pro-、-Gly-Asp-Lys-Pro- (SEQ ID NO:51) 和 -Gly-Ser-Asp-Lys-Pro- (SEQ ID NO:52)。

[0282] 可适用于本发明具体实施方案的酶可降解的连接子还包括可被组织蛋白酶B剪切的氨基酸序列，诸如，如-Val-Cit-、-Ala-Leu-Ala-Leu- (SEQ ID NO:53)、-Gly-Phe-Leu-Gly- (SEQ ID NO:54) 和 -Phe-Lys-。

[0283] 然而，在某些实施方案中，非肽连接子或肽连接子的任何一种或多种是任选的。例如，当融合蛋白的第一和第二多肽具有可用于将功能性结构域隔开并防止位阻影响的非必需的N-端和/或C端的氨基酸区域时，该融合蛋白中可能不需要连接子序列。

[0284] 可使用技术人员已知的多种方法来评估本文描述的p97多肽和p97多肽缀合物的功能特性，包括，例如，亲和力/结合分析(如表面等离子体共振、竞争性抑制分析)；使用体外或体内模型进行的细胞毒性分析、细胞存活分析、细胞增殖或分化分析、癌细胞和/或肿瘤生长抑制分析。例如，本文描述的缀合物可针对受体内化的影响、体外和体内效果等进行测试，包括穿过血脑屏障的运送速率。此类分析可通过技术人员已知的公认方案(参见Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publ.Assoc.Inc.& John Wiley & Sons, Inc., NY, NY); Current Protocols in Immunology (Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY)、或市售的试剂盒来进行。

[0285] 使用方法和药物组合物

[0286] 本发明的某些实施方案涉及本文描述的p97多肽和p97缀合物的组合物的使用方法。此类方法的实例包括治疗方法和诊断方法，包括例如，p97缀合物在某些器官/组织的医学成像中的用途，如神经系统的那些器官/组织。具体的实施方案包括诊断和/或治疗中枢神经系统(CNS)疾病或病况或者有CNS组分的疾病或病况的方法。

[0287] 因此，某些实施方案包括对有需要的对象进行治疗的方法，包括施用含有本文描述的p97缀合物的组合物。也包括将药剂递送至对象的神经系统(如中枢神经系统组织)的方法，包括施用含有本文描述的p97缀合物的组合物。在这些和相关实施方案的某些中，所述方法相对于例如通过仅含有药剂的组合物的递送而言，提高了将药剂递送至中枢神经系统组织的速率。

[0288] 在一些实例中，对象患有CNS疾病、障碍或病况，在此种情况下，相对于周围组织，增加治疗药剂穿过血脑屏障至CNS组织的递送可以改善治疗，例如，通过降低与将药剂暴露于周围组织有关的副作用。示例性的CNS疾病、障碍和病况包括不同的癌症，包括原发性和转移性中枢神经系统癌症、溶酶体贮积症、神经退行性疾病如阿尔兹海默症，以及自身免疫

疾病如多发性硬化。

[0289] 因此,某些实施方案涉及治疗中枢神经系统(CNS)(任选地为脑)癌症的方法,其中需接受治疗的对象患有此种癌症或有发展为此种病况的风险。在一些实施方案中,所述癌症为CNS原发性癌,如脑的原发癌。例如,所述方法可用于治疗神经胶质瘤、脑膜瘤、垂体腺瘤、前庭神经鞘瘤、原发性CNS淋巴瘤或原始神经外胚层肿瘤(成神经管细胞瘤)。在一些实施方案中,所述神经胶质瘤为星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、室管膜瘤或脉络丛乳头状瘤。在某些实施方案中,所述原发性CNS或脑癌是多形性成胶质细胞瘤,如巨细胞成胶质细胞瘤或胶质肉瘤。

[0290] 在具体实施方案中,所述癌症为CNS转移性癌症,例如已转移至脑的癌症。此种癌症的实例包括但不限于:乳腺癌、肺癌、泌尿生殖系统癌症、胃肠道癌症(如结肠直肠癌、胰腺癌)、骨肉瘤、黑色素瘤、头颈癌、前列腺癌(如前列腺的腺癌)以及淋巴瘤。因此,某些实施方案包括通过向患者施用治疗有效量的本文公开的缀合物(如在施用后,能够统计学上显著地抑制、预防或延缓癌症的转移的量,即相对本领域技术人员已知的合适的对照而言)来治疗、抑制或预防癌症转移的方法。在具体实施方案中,所述对象患有还未转移至中枢神经系统的癌症,除本领域已知的之外,还包括上文描述的癌症中的一种或多种。

[0291] 在具体实施方案中,所述癌症(细胞)表达或过表达下述的一种或多种:Her2/neu、B7H3、CD20、Her1/EGF受体、VEGF受体、PDGF受体、CD30、CD52、CD33、CTLA-4或髓生蛋白。

[0292] 还包括其它癌症的治疗,包括乳腺癌、前列腺癌、胃肠癌、肺癌、卵巢癌、睾丸癌、头颈癌、胃癌、膀胱癌、胰腺癌、肝癌、肾癌、鳞状细胞癌、黑色素瘤、非黑色素瘤癌、甲状腺癌、子宫内膜癌、上皮性肿瘤、骨癌或造血系统癌症。因此,在某些实施方案中,所述用p97多肽缀合物治疗的癌症细胞过表达癌症抗原,或与癌症抗原相关,如:人Her2/neu、Her1/EGF受体(EGFR)、Her3、A33抗原、B7H3、CD5、CD19、CD20、CD22、CD23(IgE受体)、C242抗原、5T4、IL-6、IL-13、血管内皮生长因子VEGF(如VEGF-A)、VEGFR-1、VEGFR-2、CD30、CD33、CD37、CD40、CD44、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CD152、CD200、CD221、CCR4、HLA-DR、CTLA-4、NPC-1C、髓生蛋白、波形蛋白、胰岛素样生长因子-1受体(IGF-1R)、甲胎蛋白、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、碳酸酐酶9(CA-IX)、癌胚抗原(CEA)、整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、整合素 $\alpha_5\beta_1$ 、叶酸盐受体-1、跨膜糖蛋白NMB、成纤维细胞活化蛋白 $\alpha$ (FAP)、糖蛋白75、TAG-72、MUC1、MUC16(或CA-125)、磷脂酰丝氨酸、前列腺特异性膜抗原(PMSA)、NR-LU-13抗原、TRAIL-R1、肿瘤坏死因子受体超家族成员10b(TNFRSF10B或TRAIL-R2)、SLAM家族成员7(SLAMF7)、EGP40泛癌抗原、B-细胞活化因子(BAFF)、血小板源性生长因子受体、糖蛋白EpCAM(17-1A)、程序性死亡-1、蛋白二硫键异构酶(PDI)、肝再生磷酸酶3(PRL-3)、前列腺酸磷酸酶、Lewis-Y抗原、GD2(在神经外胚层起源的肿瘤中表达的双唾液酸神经节苷脂)、磷脂酰肌醇聚糖-3(GPC3)和/或间皮素。

[0293] p97缀合物在治疗癌症(包括CNS癌症)方面的用途可与其它的治疗方式结合。例如可在其它治疗措施(包括对症护理、放射治疗、手术、移植、免疫治疗、激素治疗、光动力治疗、抗生素治疗,或其任何组合)之前、在其过程中或在其之后,向对象施用含有p97缀合物的组合物。对症护理包括施用皮质类固醇以减轻脑水肿、头痛、认知功能障碍和呕吐,也包括施用抗惊厥药以减轻痉挛。放射治疗包括全脑照射、分级放射治疗和放射外科手术,如立体定位放射外科手术,其可与常规手术进一步联合。

[0294] 在具体的组合疗法中,p97抗体缀合物的抗体部分包括西妥昔单抗,并且可将p97-

西妥昔单抗缀合物与放射治疗联合使用,对头部和颈部有局部或区域性晚期鳞状细胞癌的对象进行治疗。在其它方面,可将p97-西妥昔单抗与利用5-氟尿嘧啶(5-FU)的基于铂的治疗联合使用,对患有头部和颈部复发区域性疾病或转移性鳞状细胞癌的对象进行治疗。在一些方面,可将p97-西妥昔单抗缀合物与伊立替康联合使用,对患有表达EGFR的结肠直肠癌的对象进行治疗,该癌症难以用基于伊立替康的化学疗法来治疗。

[0295] 在一些实例中,所述对象患有溶酶体贮积症或有患溶酶体贮积症的风险。因此,某些方法涉及对有需要的对象的溶酶体贮积症进行治疗,任选地为那些与中枢神经系统有关的溶酶体贮积症。示例性的溶酶体贮积症包括:天冬氨酰葡萄糖胺尿症、胆固醇酯贮积病、沃尔曼病、胱氨酸病、达农(Danon)病、法布里病、法伯脂质肉芽肿病、法伯病、岩藻糖苷贮积症、I/II型半乳糖唾液酸贮积症、I/II/III型戈谢病、戈谢病、球形细胞脑白质营养不良、克拉伯病、糖原贮积病II、庞贝氏病、I/II/III型GM1-神经节苷脂贮积症、I型GM2-神经节苷脂贮积症、泰萨克斯病、II型GM2-神经节苷脂贮积症、山霍夫氏病、GM2-神经节苷脂贮积症、I/II型 $\alpha$ -甘露糖苷贮积症、 $\beta$ -甘露糖苷贮积症、异染性脑白质营养不良、I型粘脂质贮积症、I/II型唾液酸贮积症、II/III型粘脂质贮积症、I-细胞病、IIIC型粘脂质贮积症、假Hurler多营养障碍、I型粘多糖贮积症、II型粘多糖贮积症、亨特氏综合征、IIIA型粘多糖贮积症、圣菲利波氏症、IIIB粘多糖贮积症、IIIC型粘多糖贮积症、IIID型粘多糖贮积症、IVA型粘多糖贮积症、莫基奥综合征、IVB型粘多糖贮积症、莫基奥综合征、VI型粘多糖贮积症、VII型粘多糖贮积症、斯赖综合征、IX型粘多糖贮积症、多种硫酸酯酶缺乏症、神经元蜡样脂褐质沉积症、CLN1贝敦氏病、NB型尼曼-匹克病、尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、致密性成骨不全症、I/II型辛德勒病、辛德勒病以及唾液酸贮积症。在这些和相关实施方案中,如本文所述,可将p97多肽与一种或多种与溶酶体贮积症有关的多肽缀合。

[0296] 在某些实例中,所述对象患有自身免疫病和/或神经退行性疾病(任选为CNS),或有患该类疾病的风险。因此,也包括对有需要的对象的中枢神经系统(CNS)退行性或自身免疫性疾病进行治疗的方法。例如,在具体实施方案中,所述CNS退行性或自身免疫性疾病为阿尔兹海默症、亨廷顿氏舞蹈症、帕金森病或多发性硬化(MS)。因此,某些实施方案包括向患有阿尔兹海默症、亨廷顿氏舞蹈症、帕金森病或MS的对象施用p97缀合物。在具体实施方案中,p97多肽与能特异性结合阿尔兹海默症的淀粉体- $\beta$ (如 $AB_{(1-42)}$ )、亨廷顿氏舞蹈症的亨廷顿蛋白、帕金森病的 $\alpha$ -突触核蛋白,或者是MS的 $\alpha 4$ 整合素、CD25或IL-23的抗体或其它药剂缀合。在一些实施方案中,将p97多肽与干扰素- $\beta$ 多肽缀合,用于治疗MS。在具体实施方案中,将p97多肽与达利珠单抗缀合,用于治疗MS。

[0297] 也包括对有需要的对象的疼痛进行治疗的方法。实例包括急性疼痛、慢性疼痛和神经性疼痛,包括其组合。在一些方面,疼痛具有中枢性作用部分,如中枢性疼痛综合征(CPS),其疼痛与CNS损伤或功能障碍有关,包括脑、脑干和/或脊髓。在具体实施方案中,将p97多肽与能特异性结合NGF或TrkA的抗体或其它药剂缀合。在具体实施方案中,将p97多肽与他尼珠单抗缀合,用于治疗疼痛,任选地,用于治疗膝盖或臀部的骨关节炎、慢性腰部疼痛、骨癌疼痛或间质性膀胱炎。

[0298] 还包括对有需要的对象的炎症或炎症病况进行治疗的方法。“炎症(inflammation)”通常指组织对有害刺激(如病原体、损伤细胞(如创伤)和刺激物)的生物反应。术语“炎症反应(inflammatory response)”指炎症发生和调控的具体机制,包括(仅

以示例性方式)免疫细胞激活或迁移、细胞因子产生、血管舒张,除本文描述的和本领域已知的外,包括激肽释放、纤维蛋白溶解和凝固。理想地,炎症是身体移除有害刺激并启动受影响的组织的治愈过程的保护性尝试。在没有炎症的情况下,创伤和感染将不会痊愈,并导致组织的逐步损伤将威胁到生存的情形。另一方面,过度的炎症或慢性炎症可能与多种疾病有关,除本文描述的和本领域已知的疾病外,如枯草热、动脉粥样硬化和风湿性关节炎。

[0299] 本发明的p97缀合物可调节急性炎症、慢性炎症或二者。根据对象的需要,某些实施方案涉及减轻急性炎症或急性炎症反应,某些实施方案涉及减轻慢性炎症或慢性炎症反应。

[0300] 急性炎症涉及身体对可能的有害刺激的初始反应,并且涉及血浆和白细胞从血液进入损伤组织的移动的增加。急性炎症是短期过程,通常在几分钟或几小时内开始,并且在有害刺激移除后结束。急性炎症的特征可能为发红、热量增加、肿胀、疼痛和功能障碍中任何一种或多种。发红和热量主要是由于在身体核心温度下,血液向发炎部位的流动增加;肿胀是由流体积聚引起的;疼痛主要是由于刺激神经末梢的化学物质的释放;功能障碍有多种原因。

[0301] 急性炎症反应主要通过局部免疫细胞来启动,如常驻巨噬细胞、树突细胞、组织细胞、库普弗细胞和肥大细胞。在感染、烧伤或其它损伤开始时,这些细胞经历激活,并且释放负责炎症临床症状的炎症介质,如血管活性胺和类花生酸。血管舒张和它导致的血流增加,引起发红和热量增加。血管通透性增强导致血浆蛋白渗出和漏出并且流入组织中,产生肿胀。某些释放的介质(如缓激肽),增强了对疼痛的敏感性,并且改变了血管以允许白细胞如中性粒细胞的迁移和外渗,其通常沿由局部免疫细胞产生的趋化梯度迁移。

[0302] 急性炎症反应也包括一种或多种无细胞生化级联系统,其由预先形成的血浆蛋白调节组成,并行发挥作用以启动和传导炎症反应。这些系统包括主要由细菌激活的补体系统以及主要由坏死(如由某些感染、烧伤或其它创伤引起的组织损伤类型)激活的凝固和纤维蛋白溶解系统。因此,可将p97缀合物用于调节急性炎症或者个体急性炎症反应中的任意一种或多种。

[0303] 慢性炎症是延长的和延迟的炎症反应,其特征为炎症部位存在的细胞类型的逐渐改变,并且经常导致炎性过程中的组织同时或几近同时损伤和治愈。在细胞水平,慢性炎症反应涉及多种免疫细胞,如单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、浆细胞和纤维母细胞。与主要由粒细胞介导的急性炎症相比,慢性炎症主要由单个核的细胞如单核细胞和淋巴细胞介导。慢性炎症也涉及多种炎症介质,如IFN- $\gamma$ 和其它的细胞因子、生长因子、活性氧类和水解酶。慢性炎症可能持续数月或数年,并且可能导致非期望的组织损伤和纤维化。

[0304] 慢性炎症的临床征象取决于疾病的持续、炎性病灶、起因和受影响的解剖区域。(参见,例如Kumar et al.,Robbins Basic Pathology-8<sup>th</sup> Ed.,2009Elsevier,London; Miller,LM,Pathology Lecture Notes,Atlantic Veterinary College,Charlottetown, PEI,Canada)。慢性炎症与多种病理学病况或疾病有关,除本文描述的和本领域已知的其它疾病外,包括,例如过敏、阿尔兹海默病、贫血、主动脉瓣狭窄、关节炎如风湿性关节炎和骨关节炎、癌症、充血性心力衰竭、纤维肌痛、纤维化、心脏病、肾功能衰竭、狼疮、胰腺炎、中风、手术并发症、炎性肺部疾病、炎性肠病、动脉粥样硬化和牛皮癣。因此,可将p97缀合物用于治疗或控制慢性炎症,调节个体慢性炎症反应中的任意一种或多种,或治疗与慢性炎症

有关的任何一种或多种疾病或病况。

[0305] 在某些实施方案中，p97缀合物可在细胞水平调节炎症反应，如通过调节炎症中涉及的不同细胞的激活、炎性分子的分泌（如细胞因子或激肽的分泌）、增殖、活性、迁移或粘附。此种细胞的实例包括免疫细胞和血管细胞。免疫细胞包括，例如，粒细胞（如中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞）、巨噬细胞/单核细胞、淋巴细胞（如B细胞）、杀伤性T-细胞（即CD8+T-细胞）、辅助性T细胞（即CD4+T-细胞，包括Th1和Th2细胞）、自然杀伤细胞、 $\gamma$   $\delta$ T细胞、树突细胞和肥大细胞。血管细胞的实例包括平滑肌细胞、内皮细胞和纤维母细胞。还包括调节与一种或多种免疫细胞或血管细胞相关的炎症病况的方法，包括嗜中性粒细胞介导的、巨噬细胞介导的和淋巴细胞介导的炎症病况。

[0306] 在某些实施方案中，p97缀合物可调节炎性分子的水平或活性，包括血浆来源的炎性分子和细胞来源的炎性分子。包括促炎性分子和抗炎性分子。血浆来源的炎性分子的实例包括但不限于：补体系统、激肽系统、凝固系统和纤维蛋白溶解系统中任何一种或多种的蛋白或分子。补体系统成员的实例包括C1（其作为分子复合物存在于血清中，该复合物包含约6分子的C1q、2分子的C1r和2分子的C1s）、C2（a和b）、C3（a和B）、C4（a和b）、C5以及C5a、C5b、C6、C7、C8和C9组成的膜攻击复合物。激肽系统的实例包括缓激肽、胰激肽、激肽释放酶、羧肽酶、血管紧张素转化酶和中性肽链内切酶。

[0307] 细胞来源的炎性分子的实例包括但不限于：溶酶体颗粒中包含的酶、血管活性胺、类花生酸、细胞因子、急性期蛋白和可溶性气体如一氧化氮。血管活性胺包含至少一个氨基，并且靶向血管以改变血管的通透性或者引起血管舒张。血管活性胺的实例包括组胺和血清素。类花生酸指的是由二十个碳的必需脂肪酸氧化产生的信号转导分子，包括前列腺素、环前列腺素、凝血噁烷和白细胞三烯。

[0308] p97缀合物也可调节急性期蛋白的水平或活性。急性期蛋白的实例包括C反应蛋白、血清淀粉样蛋白A、血清淀粉样蛋白P和抗利尿激素。在某些实例中，急性期蛋白的表达可引起一系列非期望的全身效应，包括淀粉样变性、发热、血压升高、出汗减少、心神不宁、食欲不振以及嗜睡。因此，p97缀合物可调节急性期蛋白的水平或活性、其全身效应，或者两者都可调节。

[0309] 在某些实施方案中，p97缀合物减轻了局部炎症、全身性炎症或二者。在某些实施方案中，p97缀合物可减轻或维持（即防止进一步增强）局部炎症或局部炎症反应。在某些实施方案中，p97缀合物可减轻或维持（即防止进一步增强）全身性炎症或全身性炎症反应。

[0310] 在某些实施方案中，炎症或炎症反应的调节可与一种或多种组织或器官相关。此类组织或器官的非限制性实例包括：皮肤（如真皮、表皮、皮下层）、毛囊、神经系统（如脑、脊髓、周围神经、脑膜（包括硬脑膜、蛛网膜和软脑膜））、听觉系统或平衡器官（如内耳、中耳、外耳）、呼吸系统（如鼻、气管、肺）、胃食管组织、胃肠道系统（如口、食管、胃、小肠、大肠、直肠）、血管系统（如心脏、血管和动脉）、肝脏、胆囊、淋巴/免疫系统（如淋巴结、淋巴滤泡、脾脏、胸腺、骨髓）、泌尿生殖系统（如肾脏、输尿管、膀胱、尿道、子宫颈、输卵管、卵巢、子宫、外阴、前列腺、尿道球腺、附睾、前列腺、精囊、睾丸）、肌肉骨骼系统（如骨骼肌、平滑肌、骨、软骨、腱、韧带）、脂肪组织、乳房以及内分泌系统（如下丘脑、脑垂体、甲状腺、胰腺、肾上腺）。因此，可将p97缀合物用于调节与这些组织或器官中任何组织或器官有关的炎症，如治疗与这些组织或器官的炎症有关的病况或疾病。

[0311] 在具体实施方案中,所述炎症病况含有神经系统或中枢神经系统组分,包括脑、脊髓和/或脑膜的炎症。在具体实施方案中,脑膜炎(例如细菌性、病毒性)、脑炎(例如由感染或自身免疫性炎症(如急性播散性脑脊髓炎)引起的)、肉状瘤病、与肿瘤形成有关的非转移性疾病中的CNS炎症病况。神经系统或CNS有关的炎症病况的具体实例包括但不限于:脑膜炎(即覆盖脑和脊髓的保护性膜的炎症)、脊髓炎、脑脊髓炎(如肌痛性脑脊髓炎、急性播散性脑脊髓炎、脑脊髓炎传播或多发性硬化、自身免疫性脑脊髓炎)、蛛网膜炎(即蛛网膜炎,其是包围和保护中枢神经系统神经的一种膜)、肉芽肿瘤、药物引起的炎症或脑膜炎、神经退行性疾病(如阿尔兹海默症)、中风、HIV-痴呆、脑炎(如病毒性脑炎和细菌性脑炎)、寄生虫感染、炎性脱髓鞘疾病以及自身免疫性疾病(如CD8+T细胞介导的CNS自身免疫病)。另外的实例包括帕金森病、重症肌无力、运动神经病变、格林巴利综合征、自身免疫性神经病变、兰伯特-伊顿肌无力综合征、副癌性神经疾病、副癌性小脑萎缩、非副癌性僵人综合征、渐进地小脑萎缩、拉斯马森脑炎、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、西登哈姆氏舞蹈病、抽动秽语综合征、自身免疫性多内分泌病、免疫异常神经病变、获得性神经性肌强直、多发性关节挛缩症、视神经炎、僵人综合征、中风、外伤性脑损伤(TBI)、椎管狭窄症、急性脊髓损伤和脊髓压迫症。

[0312] 如上文所指出的,还包括与神经系统或CNS有关的炎症。与神经系统炎症有关的细菌感染的实例包括但不限于:链球菌感染如B族链球菌(如亚型III)和肺炎链球菌(如血清型6、9、14、18和23)、大肠杆菌(如携带K1抗原)、单核细胞增生李斯特氏菌(如血清型IVb)、奈瑟菌感染如脑膜炎奈瑟菌(脑膜炎球菌)、葡萄球菌感染、嗜血杆菌感染如B型流感嗜血杆菌、克雷伯氏菌和结核分枝杆菌。也包括葡萄球菌和假单胞菌以及其它的革兰氏阴性细菌引起的感染,主要涉及头盖骨创伤,这使得鼻腔中的细菌或装有脑部分流装置或相关装置(如体外脑室引流、Ommaya囊)的人体的细菌可能进入脑膜空间。与神经系统炎症相关的病毒感染的实例包括但不限于:肠病毒、1型和2型单纯疱疹病毒、人T-淋巴细胞病毒、水痘带状疱疹病毒(水痘和带状疱疹)、腮腺炎病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)以及淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)。由螺旋体如梅毒螺旋体(梅毒)和伯氏疏螺旋体(莱姆病)、寄生虫如疟疾(如脑型疟疾)、真菌如新型隐球菌,以及变形虫如福氏纳格里阿米巴原虫引起的感染也可导致脑膜炎。

[0313] 脑膜炎或其它形式的神经系统炎症可能还与癌症向脑膜的扩散(恶性脑膜炎)、某些药物(如非甾体抗炎药、抗生素和静脉免疫球蛋白)、肉状瘤病(或神经肉状瘤病)、结缔组织疾病(如系统性红斑狼疮)以及某些形式的血管炎(血管壁的炎症病况)如贝西氏病有关。表皮样囊肿和皮样囊肿可通过向蛛网膜下腔释放刺激性物质而引起脑膜炎。因此,可将p97缀合物用于治疗或控制这些病况的任何一种或多种。

[0314] 如上文所指出的,某些对象即将接受、或正在接受、或已经接受用另外的心脏毒性药剂(即其非缀合形式表现出心脏毒性的药剂(未与p97缀合的药剂))进行的治疗。相对于单独施用药剂,此类对象可从施用p97-药剂缀合物中受益,这部分地是因为p97能够通过据信是不同于其BBB转运特性的机制,对另外的心脏毒性药剂发挥心脏保护作用。因此,可将p97-心脏毒性药剂缀合物用于治疗此类对象的多种疾病病况,包括本文描述的CNS的疾病和与外围非CNS组织相关的疾病。

[0315] 示例性的心脏毒性药剂在本文其它地方描述,并且可根据已知的体内诊断和体外

筛选技术来进行鉴定。参见Bovelli et al., 2010, supra; Inoue et al., AATEX 14, Special Issue, 457-462, 2007; 和Dorr et al., Cancer Research. 48:5222-5227, 1988。

[0316] 例如, 可通过成像技术来对接受疑似心脏毒性药剂治疗的对象进行监测, 从而对LV心脏收缩和心脏舒张功能障碍、心脏瓣膜疾病、心包炎和心包积液, 以及颈动脉损伤进行评估。LV短轴缩短率和LVEF是用于评估心脏功能的最常见的LV收缩功能指数, 例如在化学治疗中。而且, 多普勒来源的舒张指数代表了正在经历治疗的患者的LV功能障碍的早期症状, 所以可将二尖瓣舒张期流动模式的评估、早期峰值流动速度与心房峰值流动速度(E/A)的比值、E波的减速时间和等容舒张时间用于检测收缩功能障碍发生之前LV功能的舒张变化。可在标准多普勒超声心动图检查过程中进行脉冲组织多普勒; 它可以可靠地提供心肌舒张和收缩性能的定量信息(E'波、A'波和S波速率)。LV侧二尖瓣环的组织多普勒有公认的预示作用, 其与二尖瓣血流的PW多普勒组合可提供关于LV充盈压力程度的准确信息。可通过多个LV部位的脉冲组织多普勒鉴定LV心肌功能的早期变化, 并且这是心脏毒性的相关决定因素。

[0317] 在具体实施方案中, 心脏毒性药剂是用于化学治疗的, 并且对象患有癌症。癌症的具体实例包括但不限于: 乳腺癌、前列腺癌、胃肠癌、肺癌、卵巢癌、睾丸癌、头颈癌、胃癌、膀胱癌、胰腺癌、肝癌、肾癌、鳞状细胞癌、CNS或脑癌(本文描述的)、黑色素瘤、非黑色素瘤癌、甲状腺癌、子宫内膜癌、上皮性肿瘤、骨癌和人造血系统癌症。

[0318] 在具体实施方案中, 对象患有表达Her2/neu的癌症, 如乳腺癌、卵巢癌、胃癌、侵袭性子宫颈癌或转移癌(如转移性CNS癌症), 并且p97多肽与曲妥珠单抗缀合。此类患者不仅能从p97和曲妥珠单抗组合产生的治疗协同作用中受益(特别是对于CNS癌症), 还能从p97可能的心脏保护作用导致的曲妥珠单抗心脏毒性的降低中受益。

[0319] 鉴定患有本文描述的一种或多种疾病或病况的对象的方法在本领域是已知的。

[0320] 也包括使对象的器官或组织部分成像的方法, 包括: (a) 向对象施用含有人p97(黑色素转铁蛋白)多肽或其变体的组合物, 其中将p97多肽与可检测的实体缀合, 和(b) 使对象、器官或组织的可检测实体可视化。

[0321] 在具体实施方案中, 所述器官或组织部分包括中枢神经系统(如脑、脑干、脊髓)。在具体实施方案中, 所述器官或组织部分包括脑或其部分, 例如脑实质。

[0322] 可使用多种方法使对象、器官或组织中的可检测实体可视化。示例性的非侵袭性方法包括放射线照射术如荧光镜检查 and 投影放射线照射术、CT扫描或CAT扫描(计算机断层扫描(CT)或计算机轴向断层扫描(CAT)), 是否使用X射线CT扫描, 正电子发射断层扫描(PET)、或单光子发射计算机断层扫描(SPECT)以及某些类型的磁共振成像(MRI)(特别是那些使用造影剂的), 包括上述的组合。

[0323] 仅以例示的方式, 可用正电子发射造影剂或放射性同位素如 $^{18}\text{F}$ 来实施PET, 可用发射 $\gamma$ 射线的造影剂或放射性同位素如 $^{201}\text{Tl}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{123}\text{I}$ 以及 $^{67}\text{Ga}$ 来实施SPECT, 并且可用造影剂或放射性同位素如 $^3\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{19}\text{F}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{23}\text{Na}$ 、 $^{31}\text{P}$ 、 $^{129}\text{Xe}$ 和Gd(钆; 螯合的有机Gd(III)复合体)来实施MRI。可将这些示例性造影剂或放射性同位素中任何一种或多种与p97多肽缀合或并入p97多肽, 并且为了成像目的向对象施用。例如, 可直接用这些放射性同位素中的一种或多种来标记p97多肽, 或者可将p97多肽与包含这些放射性同位素造影剂中的一种或多种的分子(如小分子)缀合, 或与本文描述的其它分子缀合。

[0324] 对于体内用途,例如对于人类疾病的治疗、医学成像或测试而言,在施用前通常将本文描述的缀合物掺入药物组合物。药物组合物包括本文描述的p97多肽或缀合物中的一种或多种,并组合有生理可接受的载体或赋形剂。

[0325] 为了制备药物组合物,将有效量或期望量的一种或多种p97多肽或缀合物与本领域技术人员已知的任何药物载体或赋形剂混合,使之适合于施用的具体方式。药物载体可以是液体、半液体或固体。用于肠胃外施用、皮内施用、皮下施用或局部施用的溶液或悬液可包括,例如,无菌稀释剂(如水)、盐溶液(如磷酸盐缓冲液;PBS)、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌剂(如苯甲醇和对羟基苯甲酸甲酯);抗氧化剂(如抗坏血酸和亚硫酸氢钠)以及螯合剂(如乙二胺四乙酸(EDTA));缓冲液(如醋酸、柠檬酸和磷酸)。如果通过静脉注射施用,合适的载体包括生理盐水或磷酸盐缓冲液(PBS),以及含有增稠剂和增溶剂的溶液,如葡萄糖、聚乙二醇、聚丙二醇和其混合物。

[0326] 可通过任何可接受的药剂施用方式来单纯施用或以合适的药物组合物的形式施用本文描述的多肽和缀合物,以提供类似的功用。可将多肽、或缀合物、或含有缀合物的组合物与合适的生理可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合来制备药物组合物,并且可制造为固体、半固体、液体或气体形式的制剂,如片剂、胶囊、散剂、颗粒、药膏、溶液、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球体和气雾剂。此外,其它的药学活性成分(包括如本文其它地方所述的其它的抗癌剂)和/或合适的赋形剂如盐、缓冲液和稳定剂,可能但不必需在组合物中出现。

[0327] 施用可通过多种不同的途径来实现,包括口服、肠胃外、鼻、静脉内、皮内、皮下或局部。优选的施用方式取决于治疗或预防的病况的性质。

[0328] 载体可以包括,例如,药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂,其在施用的剂量和浓度下,对与其接触的细胞或哺乳动物是无毒的。通常生理可接受的载体是水的pH缓冲溶液。生理可接受的载体的实例包括缓冲液如磷酸、柠檬酸和其它有机酸;抗氧化剂,包括坏血酸;低分子量(少于约10个残基)的多肽;蛋白,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性的聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、双糖以及其它的碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或葡聚糖;螯合剂,如EDTA;糖醇,如甘露醇或山梨醇;形成盐的抗衡离子,如钠;和/或非离子型表面活性剂,如聚山梨酸酯20(TWEEN™)、聚乙二醇(PEG)和泊洛沙姆(PLURONICS™)等。

[0329] 在某些方面,p97多肽序列和药剂分别单独或作为已存在的缀合物与颗粒结合或被包封于颗粒内,如纳米颗粒、珠子、脂质制剂、脂质颗粒或脂质体(如免疫脂质体)。例如,在具体实施方案中,将所述p97多肽结合于颗粒的表面,并且将目标药剂结合于颗粒的表面和/或包封于颗粒内。在这些和相关实施方案的一些中,仅通过颗粒本身(如纳米颗粒、脂质体)将p97多肽与药剂互相共价连接或可操作地连接,并且不以任何其它方式互相共价连接;即它们单独与同一颗粒结合。在其它实施方案中,p97多肽和药剂首先如本文所述互相共价连接或非共价连接(如通过连接子分子),然后与颗粒结合或包封于颗粒内(如免疫脂质体、纳米颗粒)。在具体实施方案中,所述颗粒为脂质体,且所述组合物包含一种或多种p97多肽、一种或多种目标药剂以及脂质的混合物以形成脂质体(如具有表面活性剂性质的磷脂、混合脂质链)。在一些方面,所述p97多肽和药剂分别与脂质/脂质体混合物混合,从而脂质体结构的形成将p97多肽和药剂可操作地连接而不需要共价缀合。在其它方面,首先如本文所述,将p97多肽和药剂互相共价或非共价缀合,然后将其与脂质混合以形成脂质体。

可将p97多肽、药剂或p97多肽-药剂缀合物包封进通过例如凝聚技术或界面聚合(如分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)制备的微胶囊中,包封进胶体药物递送系统(如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或粗乳液中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)。所述颗粒或脂质体可进一步包括其它的治疗剂或诊断剂,如细胞毒性剂。

[0330] 治疗的精确剂量和持续时间是治疗疾病的函数,并且可使用已知的测试方案或通过在本领域已知的模型系统中将组合物进行测试并由此推断来根据经验确定。也可进行受控的临床试验。也可根据即将缓解的病况严重性来改变剂量。通常制造和施用药物组合物,从而在发挥治疗有效性作用的同时将非期望的副作用最小化。组合物可以施用一次,也可将其分成许多更小剂量在时间间隔内施用。对于任何具体对象而言,可根据个体需要随时间调节具体的剂量方案。

[0331] 因此,这些和相关药物组合物的典型给药途径包括但不限于:口服给药、局部给药、经皮给药、吸入给药、肠胃外给药、舌下给药、口腔给药、直肠给药、阴道给药和鼻内给药。本文使用的术语“肠胃外”包括皮下注射、静脉注射、肌肉内注射、胸骨内注射或输液技术。制造根据本发明的某些实施方案的药物组合物,使得在向患者施用所述组合物时其含有的活性成分是生物可利用的。向对象或患者施用的组合物可以是一个或多个剂量单位的形式,例如片剂可以是单个计量单位,而本文描述的气雾剂形式组合物的容器内可含有多个计量单位。制备此种剂型的实际方法是已知的,或者对本领域那些技术人员将是显而易见的;例如,参见Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000)。不管怎样,用于治疗目标疾病或病况而施用的组合物应含有治疗有效量的本文描述的p97多肽、药剂或缀合物。

[0332] 药物组合物可以是固体或液体形式。在一个实施方案中,所述载体是微粒,以使所述组合物是,例如片剂或散剂形式。所述载体可以是液体,同时所述组合物是例如,口服油剂、可注射液体或气雾剂,其可用于如吸入施用。当意图口服给药时,所述药物组合物优选为固体或液体形式,其中半固体、半液体、悬液和凝胶形式也作为固体或液体形式包含于本文所考虑的形式之内。

[0333] 作为用于口服给药的固体组合物,可将所述药物组合物制备为粉剂、颗粒、压缩片、丸剂、胶囊、口香糖、圆片(wafer)等。此类固体组合物通常含有一种或多种惰性稀释剂或可食用载体。此外也可存在下述的一种或多种:粘合剂如羧甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素、黄芪胶或明胶;赋形剂如淀粉、乳糖或葡聚糖;崩解剂如海藻酸、海藻酸钠、初生凝胶(Primogel)、玉米淀粉等;润滑剂如硬脂酸镁或氢化植物油(Sterotex);助流剂如胶态二氧化硅;甜味剂如蔗糖或糖精;调味剂如薄荷、水杨酸甲酯或橙香精;和着色剂。当所述药物组合物是胶囊形式如明胶胶囊时,除上述类型的材料外,它还可以包含液体载体如聚乙二醇和油。

[0334] 所述药物组合物可以是液体形式,例如酏剂、糖浆、溶液、乳剂或悬液。作为两个实例,所述液体可用于口服给药或通过注射递送。当意图口服给药时,优选除存在的化合物外,组合物还包含甜味剂、防腐剂、干燥剂/着色剂或增味剂中的一种或多种。在意图通过注射给药的组合物中,可包含下述的一种或多种:表面活性剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、缓冲液、稳定剂和等张剂。

[0335] 所述液体组合物,不管它们是溶液、悬液或是其它相似的形式,可以包含下述佐剂中的一种或多种:用于注射的无菌稀释剂如水、盐溶液,优选生理盐水、林格氏溶液、等张氯化钠;固定油如合成的单甘酯或双甘酯,其可作为溶剂或悬浮介质;聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它的溶剂;抗菌剂如苯甲醇或苯甲酸甲酯;抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂如乙二胺四乙酸;缓冲液如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节张力(tonicity)的试剂,如氯化钠或右旋糖。可将肠胃外给药的制剂封闭于玻璃或塑料制成的安瓿瓶、一次性注射器或多剂量小瓶中。生理盐水是优选的佐剂。优选地,可注射的药物组合物是无菌的。

[0336] 意图肠胃外给药或口服给药的液体组合物应含有如本文所述的量的p97多肽或缀合物,以获得合适的剂量。通常,该量是在组合物中有至少0.01%的目标药剂。当意图口服给药时,该量可在组合物重量的0.1-约70%之间变化。某些口服的药物组合物含有约4%-约75%的目标药剂。在某些实施方案中,制备根据本发明的药物组合物和制剂,以使在被稀释前肠胃外剂量单位含有0.01-10%重量的目标药剂。

[0337] 可意图将所述药物组合物进行局部给药,在这种情况下,所述载体可以适合地包括溶液、乳剂、油膏或凝胶基质。所述基质,例如,可包括下述的一种或多种:凡士林、羊毛脂、聚乙二醇、蜂蜡、矿物油、稀释剂如水和醇,以及乳化剂和稳定剂。在局部施用的药物组合物中可以存在增稠剂。如果意图经皮给药,则所述组合物可以包括透皮贴剂或离子电渗疗法装置。

[0338] 可意图将所述药物组合物进行直肠给药,例如以栓剂的形式,其将在直肠中融化并释放药物。所述用于直肠给药的组合物可以包含油性基质作为合适的非刺激性赋形剂。此种基质包括但不限于:羊毛脂、可可油和聚乙二醇。

[0339] 所述药物组合物可以包含不同的材料,这些材料可对固体或液体剂量单位的外形进行修饰。例如,所述组合物可以包含在活性成分周围形成包衣壳的材料。形成包衣壳的材料通常是惰性的,并且可选自,例如糖、虫胶和其它肠溶性的包衣剂。可选地,可将所述活性成分包裹在明胶胶囊中。固体或液体形式的药物组合物可以包含与所述缀合物或药剂结合的药剂,并因此有助于化合物的递送。可发挥这一作用的合适药剂包括单克隆或多克隆抗体、一种或多种蛋白或脂质体。

[0340] 所述药物组合物可基本上由可作为气雾剂施用的剂量单位构成。使用术语“气雾剂”以表示从胶体性质的系统到由加压包组成的系统范围内的多种系统。可以通过液化的气体或加压的气体,或者通过将活性成分分散的合适的泵系统来进行递送。可以在单相、双相或三相系统中递送气雾剂以递送活性成分。气雾剂的递送包括必需的容器、活化剂、阀门、副容器等,可将其共同组成试剂盒。本领域普通技术人员不需过度实验即可确定优选的气雾剂。

[0341] 可将包含如本文所述缀合物的组合物与载体一起制备,所述载体可保护缀合物不被身体快速消除,其可为例如随时间释放的制剂或包衣。此类载体包括控释制剂,例如,但不限于:植入剂、微型胶囊递送系统和生物可降解、生物相容性聚合物,例如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、聚原酸酯、聚乳酸以及本领域普通技术人员已知的其它聚合物。

[0342] 可通过药物领域已知的方法学来制备所述药物组合物。例如,可通过将含有如本文所述缀合物的组合物和任选地盐、缓冲液和/或稳定剂中的一种或多种与无菌蒸馏水组合以形成溶液,从而制备意图通过注射给药的药物组合物。可加入表面活性剂以促进形成

均匀的溶液或悬液。表面活性剂是与缀合物非共价相互作用的化合物,以促进缀合物在水递送系统中的溶解或均匀悬浮。

[0343] 可施用治疗有效量的组合物,而治疗有效量可根据多种因素变化,这些因素包括:施用的具体化合物(如缀合物)的活性;化合物的代谢稳定性和作用时间长度;患者的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食;给药模式和给药时间;排泄速率;药物组合;具体疾病或病况的严重性以及正在接受治疗的对象。通常,治疗有效的日剂量为(对于70kg的哺乳动物)约0.001mg/kg(即~0.07mg)-约100mg/kg(即~7.0g);优选地,治疗有效剂量为(对于70kg的哺乳动物)约0.01mg/kg(即~0.7mg)-约50mg/kg(即~3.5g);更优选地,治疗有效剂量为(对于70kg的哺乳动物)约1mg/kg(即~70mg)-约25mg/kg(即~1.75g)。

[0344] 如本文所述,含有本文所述缀合物的组合物可与一种或多种其它治疗剂同时施用,或在其它治疗剂施用之前或之后施用。例如,在一个实施方案中,将所述缀合物与消炎药一同施用。消炎药或药物包括但不限于:类固醇和糖皮质激素,包括倍他米松、布地奈德、地塞米松、醋酸氢化可的松、氢化可的松、氢化可的松、甲基泼尼松龙、泼尼松龙、强的松、去炎松;非甾体类抗炎药(NSAIDs),包括阿司匹林、布洛芬、萘普生、甲氨蝶呤、柳氮磺胺吡啶、来氟米特、抗TNF药、环磷酰胺和霉酚酸酯。

[0345] 此类组合治疗可包括施用单一药物剂量的含有本发明化合物和一种或多种其他活性剂的制剂,以及施用含有本发明缀合物的组合物,组合物中的每一活性药剂为各自单独的药物剂量制剂。例如,可以用单一口服剂量组合物的形式向患者一起施用如本文所述的缀合物和其他活性药剂,如片剂或胶囊,或者以单独的口服剂量制剂的形式施用每一药剂。类似地,可以用单一肠胃外剂量组合物的形式向患者一起施用如本文所述的缀合物和其他活性药剂,如以盐溶液或其它生理可接受的溶液形式,或者以单独的肠胃外剂量制剂的形式施用每一药剂。当使用单独的剂量制剂时,可基本上在相同的时间(即同时)施用含有缀合物的组合物和一种或多种其他活性药剂,或者在分别错开的时间施用,即顺序地并按任何顺序;组合治疗被理解为包括所有这些方案。

[0346] 通过示例的方式而非限制的方式提供下述实施例。

## 实施例

[0347] 实施例1

[0348] 人黑色素转铁蛋白(p97)的片段的产生

[0349] 使用溴化氰(CNBr)和胰蛋白酶将人黑色素转铁蛋白(p97)进行测量的化学消化和酶消化,以产生p97片段用于在血脑屏障(BBB)转运的体外模型中进行测试。

[0350] CNBr消化:向500 $\mu$ L人p97蛋白样品(10mg/ml)中加入2.664ml88%的甲酸和166.5 $\mu$ L含5M CNBr的乙腈。将样品涡旋,用铝箔包裹,并将其在化学通风橱中在室温孵育24小时。加入10体积的MS级水以淬灭反应。将消化材料在-80 $^{\circ}$ C冷冻,并冻干过夜。将样品在-20 $^{\circ}$ C保存直至纯化。将消化材料在5mL 0.1%的甲酸中复溶,并用沃特世(Waters)公司的Sep-Pack C812cc色谱柱进行纯化。将纯化的消化材料在-80 $^{\circ}$ C冷冻,并冻干过夜。然后将冻干的产物在-20 $^{\circ}$ C保存。表1显示了CNBr消化得到的预测的p97片段的实例。

[0351] 表1:CNBr预测消化

[0352]

剪 切 位点	肽长度 (AA)	肽质量 (Da)	全长人 p97 (SEQ ID NO:1)的预 测的 p97 片段残基	SEQ ID NO:
2	2	206.3	1-2	N/A
20	18	2091.3	3-20	19
137	117	12432.1	21-137	20
293	156	16894.7	138-293	21
333	40	4578.1	294-333	22
363	30	3447.1	334-363	23
388	25	2884.4	364-388	24
609	221	24044.7	389-609	25
641	32	3670.1	610-641	26
685	44	4892.5	642-685	27
692	7	695.7	686-692	28

[0353] 对消化的和纯化的产物进行SDS-PAGE分析。将天然的和消化的蛋白样品上样于4-12%Bis-Tris凝胶,并使用200V的恒定电压电泳35分钟,初始电流为114mA,结束电流为65mA。电泳之后,用200mL Milli-Q水洗涤凝胶三次,每次洗涤5分钟。然后将凝胶用20mL GelCode Blue染色试剂染色过夜,随后用200mL Milli-Q水脱色1小时。SDS-PAGE分析显示于图1中(泳道1,空;泳道2,SeeBlue Latter;泳道2-5,空;泳道6,50 $\mu$ g未消化的p97;泳道7-9,空;泳道10,50 $\mu$ g CNBr-消化的p97;泳道11-12,空)。泳道6为未消化的蛋白样品,其有多条带显示p97蛋白有杂质。泳道10为CNBr消化的样品,有至少三条作为大的消化片段的可见带。

[0354] 将这三条带切下,用胰蛋白酶对凝胶进行消化,提取并用LC-MS/MS分析进行分析。结果显示于图3-6。图3显示了通过对CNBr消化的人p97进行MS/MS分析所鉴定的p97片段的序列覆盖图;图3A显示了条带1的结果,图3B显示了条带2的结果,图3C显示了条带3的结果。

[0355] 图4A显示了条带1中检测到的肽与人p97氨基酸序列的匹配结果;用粗体显示了匹配的肽的序列覆盖。图4B列出了单独的肽以及它们的某些物理特性。图5A显示了条带2中检测到的肽与人p97氨基酸序列的匹配结果;用粗体显示了匹配的肽的序列覆盖。图5B列出了单独的肽以及它们的某些物理特性。图6A显示了条带3中检测到的肽与人p97氨基酸序列的匹配结果;用粗体显示了匹配的肽的序列覆盖。图6B列出了单独的肽以及它们的某些物理特性。

[0356] 胰蛋白酶消化:向500 $\mu$ L人p97蛋白样品(10mg/ml)中加入0.5ml 25mM的碳酸氢铵。加入50 $\mu$ L 200mM DTT(于25mM Ambic中),在37 $^{\circ}$ C还原30分钟。加入200 $\mu$ L 200mM碘乙酰胺

(于25mM Ambic中),将游离半胱氨酸在37℃烷基化30分钟。接下来,向样品中加入250μg猪胰蛋白酶(Promega),在37℃消化过夜。用沃特世公司的Oasis HLB 6cc色谱柱纯化消化的材料。将纯化的消化材料冷冻于-80℃,并冻干过夜。将冻干的产物在-20℃保存。

[0357] 在1mL 0.1%的甲酸和3%的乙腈中将冻干的p97胰蛋白酶消化物再水化,以用于MS分析。向C18柱中上样1μg,并注射进LTQ Orbitrap Velos质谱仪(Thermo)。MS/MS分析显示,样品含有许多蛋白污染物,但是也确认了p97被胰蛋白酶成功消化。

[0358] 结果显示于图2中。图2A-2D显示了通过对人p97的溶液中胰蛋白酶消化物进行MS/MS分析而鉴定的一系列p97片段。

[0359] 实施例2

[0360] 在血脑屏障体外模型中对p97片段进行测试

[0361] 利用相关的和预测的BBB体外模型进行实验,以对p97肽片段混合物通过血脑屏障(BBB)进行评估(参见Cecchelli et al.,*Adv. Drug Deliv. Rev.* 36:165-178,1999)。该模型利用与神经胶质细胞共培养的脑毛细血管内皮细胞以近似地模拟体内BBB(参见Lundquist et al.,*Pharm. Res.* 16:976-981,2002)。

[0362] 基于细胞的BBB模型:通过在过滤器的一侧培养脑毛细血管内皮细胞并在另一侧培养支持性的神经胶质细胞建立了近似模拟体内BBB的共培养方法,以提供用于研究脑毛细血管功能的体外系统。具体地,在过滤器上部的室培养内皮细胞,并在塑料六孔板下部的室培养神经胶质细胞(参见图7和图8)。在这些条件下,内皮细胞保留了合适的内皮标志物(如因子VIII相关的抗原、不形成血栓的表面、环前列腺素的产生、血管紧张素转化酶活性),并且也保留了BBB的相关特性(如紧密连接的出现、胞饮小泡的缺乏、单胺氧化酶活性、 $\gamma$ -谷氨酰胺转肽酶活性、P-糖蛋白活性、低密度脂蛋白的特定受体和转铁蛋白)。

[0363] 神经胶质细胞培养。将神经胶质细胞的原代培养物从新生大鼠的大脑皮层分离(Booher & Sensenbrenner,*Neurobiology.* 2:97-105,1972)。在移除脑膜之后,使脑组织温和地经过尼龙筛。将添加了10% (v/v) 胎牛血清(FCS,与Fetal Bovine Serum:FBS相同)、2mM谷氨酰胺和50μg·ml<sup>-1</sup>庆大霉素的DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)培养基中用于脑组织的分离和神经胶质细胞的发育。接种后3周,神经胶质细胞培养物稳定下来,其包括星形胶质细胞(~60%)、少突胶质细胞和小胶质细胞(Descamps et al.,*Glia.* 42:46-58,2003)。

[0364] 过滤器嵌件的制备。用鼠尾胶原包被培养板嵌件(Transwell PE 3μm孔径;24-mm直径,COSTAR,3452/Transwell PC 3μm孔径;24-mm直径,COSTAR,3414)的上侧面。

[0365] 脑毛细血管内皮细胞与神经胶质细胞的共培养。将神经胶质细胞以约 $1.25 \times 10^5$ 细胞/ml的浓度接种于塑料六孔板中,并在37℃用5%的CO<sub>2</sub>培养。每周更换两次培养基。接种三周后,神经胶质细胞的培养物变得稳定。然后,将在第三代冻存的内皮细胞亚克隆在60-mm直径的明胶包被的有盖培养皿中培养。将汇合的内皮细胞用胰蛋白酶消化,并以 $4 \times 10^5$ 细胞/ml的密度接种于过滤器的上侧面。用于共培养的培养基为补充了10% (v/v) 小牛血清(CS)和10% (v/v) 马血清(HS)、2mM谷氨酰胺和50μg/ml庆大霉素的DMEM,并且每隔一天加入1ng/ml碱性成纤维细胞生长因子。在这些条件下,在约12天后,内皮细胞形成汇合的单层细胞。

[0366] 在对测试肽进行评估的过程中,使用荧光黄作为旁细胞(paracellular)标志物,

以确认BBB模型的完整性。这一小的亲水性分子表现出低的脑渗透,并且它的内皮通透性系数揭示了内皮细胞单层细胞的完整性,因此可用作对照。在进行实验的那一天,向六孔板(3mL/孔)的下部室(腔外侧(abluminal side))中加入Ringer-HEPES (NaCl, 150mM; KCl, 5.2mM; CaCl<sub>2</sub>, 2.2mM; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.2mM; NaHCO<sub>3</sub>, 6mM; HEPES, 5mM; 葡萄糖, 2.8mM)。将含有或不含内皮细胞的过滤器在37°C用Ringer-HEPES溶液洗涤10分钟,以使血清痕迹最小化,然后将其转移至六孔板的每孔中。在孔的上部室(腔内侧(luminal side))中放置1mL体积的含有与荧光黄(20μM)组合的肽片段的Ringer-HEPES溶液。

[0367] 用含有内皮细胞的汇合单层细胞的过滤器将实验重复三次(用于测试BBB的完整性或评估肽片段的通过),或用仅用胶原包被的空过滤器重复三次(过滤器测试)。37°C在摇床上孵育120分钟。如下文详述的,在孵育阶段结束时,收集等份的腔内侧和腔外侧液体用于荧光计数,从而对膜完整性进行评估(荧光黄),用于LC/MS分析以对p97肽片段穿过空过滤器或内皮单层细胞进行评估。

[0368] 荧光分析。使用荧光黄(20μM)作为旁细胞标志物以监测BBB的通透性,并通过荧光计数器(Flouroskan Ascent, Thermo Labs Systems)进行分析。对三次重复(triplicate)的每个下部室和初始溶液(含有测试肽和荧光黄)的代表性样品中的荧光进行测定。对于腔外侧(下部室),向96孔板中加入200μL的等份,并且通过荧光计数进行测量;对于腔内侧(上部室),从T0和T120分钟,向96孔板中加入20μL的等份,并通过荧光计数进行测量。

[0369] 胰蛋白酶消化物的LC/MS分析。从每孔中移出300μL并汇集到每一时间点/部分/孔径的单个管中。向每一样品中加入500μL 0.1%的甲酸用于酸化。用沃特世公司的Oasis HLB 10cc色谱柱将肽进行纯化,纯化的肽在-80°C冷冻,并冻干过夜。在30μl (20%乙腈、0.1%FA)中将样品再水化。将15μL的每一样品在LTQ Orbitrap Velos质谱仪(Thermo)上通过LC-MS/MS进行分析,并用Proteome Discoverer 1.3.0.339软件包(Thermo Scientific)分析数据(原始文件)。针对Uniprot-Swissprot数据库将峰值列表提交于Mascot 2.3服务器。计算用高置信度检测的每一蛋白的最高的三个肽的峰面积。

[0370] 120分钟后在0.3和0.4μm孔径的腔室(luminal compartment)和近腔室(abluminal compartment)中对胰蛋白酶消化形成的肽段进行检测。基于最高的三个p97肽的峰面积,腔内侧和腔外侧的肽比值为约2:1。具体的p97肽的结果显示于下文的表2(3μm孔径)和表3(4μm孔径)中。

[0371] 表2. 在3μm孔径胰蛋白酶消化形成的肽段

[0372]

胰蛋白酶消化形成的肽段序列 (SEQ ID NO:)	腔外侧 120: 面积	腔内侧 120: 面积	腔外 侧 120 置信 度	腔外 侧 120 离子 分数	腔外侧 120 Exp 值	腔内 侧 120 置信 度	腔内 侧 120 离子 分数	腔内侧 120 Exp 值
LFSHEGSSSQMFSSSEAYGQK (SEQ ID NO:55)	1.28E+09	4.55E+09	高	115	2.50E-11	高	130	8.40E-13
HTTVFDNTNGHNSEPWAAELR (SEQ ID NO:56)	1.28E+09	1.05E+10	高	106	2.80E-10	高	103	5.80E-10
HTTVFDNTNGHNSEPWAAELR (SEQ ID NO:56)	7.04E+09	1.92E+10	高	101	9.50E-10	高	109	1.40E-10
AVSDYFGGSCVPGAGETSYSESLCR (SEQ ID NO:57)	5.49E+08	5.51E+09	高	101	2.80E-10	高	125	1.20E-12
NYPSSLCALCVGDEQGR (SEQ ID NO:58)	7.34E+07	6.15E+08	高	100	6.60E-10	高	111	6.40E-11
TLPSWGQALLSQDFELLCR (SEQ ID NO:59)	2.25E+06	1.94E+09	高	94	5.10E-09	高	133	6.80E-13
AODLFGDDHKNKNGFK (SEQ ID NO:15)	9.09E+08	5.40E+08	高	87	2.40E-08	高	72	7.10E-07
CLAEGAGDVAQVFK (SEQ ID NO:60)	2.20E+09	4.38E+09	高	87	3.10E-08	高	92	7.90E-09
MFDSSNYHGQDLLFK (SEQ ID NO:61)	9.62E+08	2.06E+09	高	86	2.50E-08	高	81	7.20E-08
ADTDGGLIFR (SEQ ID NO:10)	1.59E+10	1.11E+10	高	82	8.50E-08	高	82	9.10E-08
LFSHEGSSSQMFSSSEAYGQK (SEQ ID NO:55)	1.94E+08	1.06E+09	高	81	5.50E-08	高	104	3.20E-10
MFDSSNYHGQDLLFK (SEQ ID NO:61)	5.67E+09	1.73E+10	高	79	1.40E-07	高	79	1.50E-07
MFDSSNYHGQDLLFK (SEQ ID NO:61)	3.22E+07	1.01E+08	高	79	1.10E-07	高	77	1.60E-07
CGDMAVAFR (SEQ ID NO:11)	3.58E+09	7.79E+09	高	76	1.50E-07	高	79	7.30E-08

[0373]

GDSSGEGVCDKSPLE (SEQ ID NO:6)	1.93E+09	5.08E+08	高	74	3.10E-07	高	82	4.20E-08
AQDLFGDDHKNKGF (SEQ ID NO:15)	4.27E+08	7.66E+07	高	74	3.80E-07	中	28	1.50E-02
CGDMAVAFR (SEQ ID NO:11)	4.54E+08	2.20E+08	高	71	3.40E-07	高	79	5.50E-08
LFSHEGSSFQMFSS EAYGQKDLLFK (SEQ ID NO:62)	1.30E+07	8.27E+07	高	70	1.40E-06	高	33	6.00E-03
RDSSHAFTLDEL R (SEQ ID NO:63)	1.66E+09	5.02E+09	高	68	2.70E-06	高	80	1.60E-07
AQDLFGDDHKNK (SEQ ID NO:64)	3.69E+09	1.08E+09	高	63	4.50E-06	高	55	2.60E-05
LSVMGCDVLK (SEQ ID NO:65)	2.43E+09	1.07E+10	高	62	9.70E-06	高	53	8.40E-05
SEDYELCPNGAR (SEQ ID NO:14)	2.52E+08	1.25E+08	高	62	3.90E-06	高	49	8.00E-05
EAGIQPSLLCVR (SEQ ID NO:66)	8.66E+08	1.99E+09	高	60	1.20E-05	高	59	1.40E-05
SSHVTIDTLKGVK (SEQ ID NO:4)	1.12E+08	4.73E+07	高	60	8.50E-06	高	57	1.30E-05
WCATSDPEQHK (SEQ ID NO:2)	1.01E+09	1.37E+08	高	59	5.00E-06	高	57	7.90E-06
HTTVFDNTNGHNS EPWAAELR (SEQ ID NO:56)	0.00E+00	2.95E+07	高	55	2.90E-05	高	51	6.20E-05
LSVMGCDVLK (SEQ ID NO:65)	4.85E+08	3.08E+09	高	55	4.70E-05	高	53	8.10E-05
DSSHAFTLDEL R (SEQ ID NO:13)	5.87E+09	1.03E+10	高	54	5.20E-05	高	59	1.70E-05
LCRGDSSGEGVCDK (SEQ ID NO:5)	2.64E+05	2.17E+05	高	52	2.90E-05	高	47	9.70E-05
SSHVTIDTLK (SEQ ID NO:67)	3.37E+09	1.74E+09	高	48	1.90E-04	高	43	6.80E-04
LKPEIQCVSAK (SEQ ID NO:12)	4.39E+09	1.00E+09	高	46	3.00E-04	高	45	4.20E-04
VPAHAVVVR (SEQ ID NO:9)	1.24E+08	3.48E+07	高	45	6.50E-05	高	40	2.00E-04
ADVTEWR (SEQ ID NO:8)	1.05E+10	9.31E+08	高	44	4.80E-04	高	48	2.30E-04
RSSHVTIDTLK (SEQ ID NO:3)	1.64E+08	9.53E+07	高	43	6.90E-04	高	45	4.10E-04
SEDYELCPNGAR (SEQ ID NO:14)	2.10E+09	2.51E+08	高	42	4.80E-04	高	60	7.40E-06
WCVLSTPEIQK (SEQ ID NO:68)	1.09E+07	0.00E+00	中	37	4.20E-03			
YYDYSGAFR (SEQ ID NO:7)	6.41E+09	1.00E+09	中	31	3.80E-03	高	51	3.70E-05
GLLCDPNR (SEQ ID NO:69)	1.65E+09	1.97E+08	中	30	8.60E-03	中	29	1.20E-02
DSSHAFTLDEL RGK (SEQ ID NO:70)	1.99E+07	0.00E+00	低	26	5.20E-02			
GLLCDPNRLPPYL R (SEQ ID NO:71)	6.75E+09	2.32E+10	低	25	3.20E-02	低	19	1.40E-01
EHGLKPVVGEVYD QEVGTSYYAVVRR (SEQ ID NO:72)	1.70E+07	0.00E+00	低	22	5.30E-02			
GLLCDPNRLPPYL R (SEQ ID NO:71)	1.09E+07	2.00E+08	低	18	2.00E-01	中	26	3.10E-02
CVGNSQERYGYR (SEQ ID NO:73)	4.94E+06	0.00E+00	低	18	1.30E-01			
CLVENAGDVAFVR (SEQ ID NO:74)	1.30E+08	5.49E+08	低	16	4.10E-01	高	72	1.20E-06
DSTSELVPIATQTY EAWLGHEYLHAMK (SEQ ID NO:75)	1.55E+07	3.56E+08	低	15	4.10E-01	低	11	1.00E+00
DSTSELVPIATQTY EAWLGHEYLHAMK (SEQ ID NO:75)	0.00E+00	0.00E+00	低	12	7.80E-01			
TLPWQGALLSQDF ELLCR (SEQ ID NO:59)	0.00E+00	0.00E+00				高	111	1.00E-10
LFSHEGSSFQMFSS EAYGQK (SEQ ID NO:55)	0.00E+00	0.00E+00				高	79	1.20E-07
IQAEQVDAVTLSG EDIYTAGK (SEQ ID NO:76)	0.00E+00	3.48E+06				高	75	4.30E-07
HSTVLENTDGK (SEQ ID NO:77)	0.00E+00	2.10E+07				高	66	2.70E-06
TVGWNVPVGYLV ESGR (SEQ ID NO:78)	0.00E+00	9.38E+07				高	62	8.40E-06
LLNEGQR (SEQ ID NO:79)	0.00E+00	1.71E+07				高	43	4.30E-04
LFSHEGSSFQMFSS EAYGQKDLLFK (SEQ ID NO:80)	0.00E+00	0.00E+00				高	40	1.20E-03
ADTDGGLIFRLL NEGQR (SEQ ID NO:81)	0.00E+00	3.69E+07				高	40	1.50E-03

[0374]

HTTVFDNTNGHNSEPWAAELR (SEQ ID NO:56)	0.00E+00	0.00E+00				高	38	1.20E-03
---	----------	----------	--	--	--	---	----	----------

[0375] 表3. 在4 $\mu$ m孔径胰蛋白酶消化形成的肽段

[0376]

胰蛋白酶消化形成的肽段序列	腔外侧 120: 面积	腔内侧 120: 面积	腔外 侧 120 置信 度	腔外 侧 120 离子 分数	腔外侧 120 Exp 值	腔体 侧 120 置信 度	腔体 侧 120 离子 分数	腔体侧 120 Exp 值
AVSDYFGGSCVPGAGETSYSESLCR (SEQ ID NO:57)	7.98E+08	5.03E+09	高	123	1.70E-12	高	110	3.80E-11
HTTVFDNTNGHNSEPWAAELR (SEQ ID NO:56)	9.47E+09	1.79E+10	高	116	3.10E-11	高	102	6.70E-10
LFSHEGSSSQMFSEAYGQK (SEQ ID NO:55)	2.07E+09	4.14E+09	高	109	1.00E-10	高	127	1.50E-12
TLPSWGQALLSQDFELLCR (SEQ ID NO:59)	2.21E+06	1.94E+09	高	103	6.90E-10	高	125	3.80E-12
HTTVFDNTNGHNSEPWAAELR (SEQ ID NO:56)	1.86E+09	1.01E+10	高	101	8.10E-10	高	97	2.20E-09
LFSHEGSSSQMFSEAYGQK (SEQ ID NO:55)	3.04E+08	1.24E+09	高	99	8.90E-10	高	97	1.60E-09
ADTDGGLIFR (SEQ ID NO:10)	1.57E+10	8.04E+09	高	88	2.40E-08	高	85	4.70E-08
NYPSSLCALCVGDEQGR (SEQ ID NO:58)	1.09E+08	5.52E+08	高	87	1.60E-08	高	84	2.70E-08
AQDLFGDDHKNKNGFK (SEQ ID NO:15)	5.25E+08	6.29E+07	高	85	3.20E-08	高	43	4.50E-04
CLAEGAGDVAFVK (SEQ ID NO:60)	2.06E+09	5.13E+09	高	83	6.90E-08	高	103	7.10E-10
MPDSSNYHGQDLLFK (SEQ ID NO:61)	9.03E+09	1.79E+10	高	78	1.60E-07	高	76	3.00E-07
GDSSGEGVCDKSPLER (SEQ ID NO:6)	2.34E+09	4.75E+08	高	78	1.20E-07	高	82	5.00E-08
CLVENAGDVAFVR (SEQ ID NO:74)	1.99E+08	5.41E+08	高	77	3.60E-07	高	72	1.20E-06
CGDMAVAFR (SEQ ID NO:11)	3.92E+09	8.68E+09	高	76	1.40E-07	高	76	1.40E-07
MPDSSNYHGQDLLFK (SEQ ID NO:61)	1.23E+09	2.13E+09	高	74	3.40E-07	高	90	9.30E-09
LFSHEGSSSQMFSEAYGQKDLLFK (SEQ ID NO:80)	0.00E+00	0.00E+00	高	73	6.80E-07	低	15	4.70E-01
CGDMAVAFR (SEQ ID NO:11)	5.90E+08	2.62E+08	高	70	3.60E-07	高	70	4.40E-07
SSHVTIDTLKGVK (SEQ ID NO:4)	1.37E+08	5.71E+07	高	70	7.30E-07	高	60	7.20E-06
AQDLFGDDHKNKNGFK (SEQ ID NO:15)	2.84E+09	5.20E+08	高	70	1.10E-06	高	64	4.90E-06
MPDSSNYHGQDLLFK (SEQ ID NO:61)	4.19E+07	1.06E+08	高	68	1.20E-06	高	86	2.10E-08
AQDLFGDDHKNK (SEQ ID NO:64)	4.05E+09	1.19E+09	高	67	1.80E-06	高	66	2.00E-06
DSSHAFTLDEL (SEQ ID NO:13)	9.64E+09	9.87E+09	高	67	2.70E-06	高	51	9.50E-05
SEDYELLCPNGAR (SEQ ID NO:14)	3.09E+08	9.88E+07	高	65	2.00E-06	高	35	2.10E-03
WCATSDPEQHK (SEQ ID NO:2)	1.42E+09	1.70E+08	高	64	1.50E-06	高	59	5.30E-06
RDSSHAFTLDEL (SEQ ID NO:63)	2.01E+09	5.70E+09	高	64	7.90E-06	高	75	5.90E-07
LSVMGCDVLK (SEQ ID NO:65)	3.34E+09	1.06E+10	高	60	1.60E-05	高	55	5.00E-05
LFSHEGSSSQMFSEAYGQKDLLFK (SEQ ID NO:80)	2.40E+07	8.63E+07	高	57	2.40E-05	高	39	1.70E-03
LSVMGCDVLK (SEQ ID NO:63)	6.72E+08	3.28E+09	高	53	7.00E-05	高	56	3.60E-05
SEDYELLCPNGAR (SEQ ID NO:14)	2.40E+09	1.84E+08	高	52	5.60E-05	高	73	3.90E-07
LCRGDSSGEGVCDK (SEQ ID NO:5)	5.97E+05	2.44E+05	高	51	3.70E-05	高	52	2.90E-05
EAGIQPSLLCVR (SEQ ID NO:66)	1.15E+09	1.92E+09	高	50	1.10E-04	高	60	1.10E-05
HTTVFDNTNGHNSEPWAAELR (SEQ ID NO:56)	1.48E+07	2.91E+07	高	49	9.70E-05	高	46	2.10E-04
RSSHVTIDTLK (SEQ ID NO:3)	2.23E+08	1.08E+08	高	48	1.90E-04	高	48	1.90E-04
CGNMSEAFR (SEQ ID NO:82)	2.53E+07	0.00E+00	高	48	4.70E-05			

[0377]

SSHVTIDTLK (SEQ ID NO:67)	3.87E+09	1.78E+09	高	46	5.20E-04	高	44	5.40E-04
VPAHAVVVR (SEQ ID NO:9)	1.50E+08	4.52E+07	高	45	6.40E-05	高	39	2.70E-04
ADVTEWR (SEQ ID NO:8)	1.10E+10	8.59E+08	高	44	4.80E-04	高	44	5.10E-04
LKPEIQCVSAK (SEQ ID NO:12)	4.96E+09	1.03E+09	高	43	6.80E-04	高	57	2.50E-05
DSTSELVPIATQTYEAWLGHEYLHAMK (SEQ ID NO:75)	1.42E+07	3.26E+08	中	41	1.00E-03	低	18	1.80E-01
WCVLSTPEIQK (SEQ ID NO:68)	1.67E+07	0.00E+00	中	40	1.90E-03			
TVGWNVPVGYLVESGR (SEQ ID NO:78)	1.38E+07	1.01E+08	中	40	1.60E-03	高	57	2.70E-05
YYDYSGAFR (SEQ ID NO:7)	6.88E+09	9.30E+08	高	39	7.90E-04	高	49	7.10E-05
DSSHAFTLDELGRK (SEQ ID NO:70)	2.37E+07	0.00E+00	低	33	8.70E-03			
EHGLKPVVGEVYDQEVGTSYYAVAVVRR (SEQ ID NO:72)	2.62E+07	0.00E+00	中	31	5.80E-03			
GLLCDPNR (SEQ ID NO:69)	1.84E+09	1.72E+08	低	29	1.20E-02	中	30	9.00E-03
GLLCDPNRLLPPYLR (SEQ ID NO:71)	9.69E+09	2.33E+10	低	26	2.40E-02	低	24	4.20E-02
ADTDGGLIFRLLNEGQR (SEQ ID NO:81)	5.53E+06	3.36E+07	低	26	4.10E-02	高	40	1.60E-03
CVGNSQERYGYR (SEQ ID NO:73)	6.84E+06	0.00E+00	低	19	7.60E-02			
ADVTEWRQCCHLAR (SEQ ID NO:83)	4.26E+06	0.00E+00	低	15	5.00E-01			
CLVENAGDVAFVR (SEQ ID NO:74)	5.55E+06	1.46E+07	低	12	1.00E+00	低	16	3.80E-01
TLPSWGQALLSQDFELLCR (SEQ ID NO:59)	0.00E+00	0.00E+00				高	107	2.90E-10
LFSHEGSSSQMFSSSEAYGQK (SEQ ID NO:55)	0.00E+00	1.27E+09				高	72	3.30E-07
HSTVLENTDGK (SEQ ID NO:77)	0.00E+00	2.59E+07				高	62	6.70E-06
IQAEQVDAVTLSGEDIYTAGK (SEQ ID NO:76)	0.00E+00	3.08E+06				高	53	7.70E-05
IQAEQVDAVTLSGEDIYTAGK (SEQ ID NO:76)	0.00E+00	4.79E+07				高	49	1.60E-04
LLNEGQR (SEQ ID NO:79)	0.00E+00	2.38E+07				高	43	4.70E-04
DLLFKDSTSELVPIATQTYEAWLGHEYL HAMK (SEQ ID NO:84)	0.00E+00	3.76E+07				高	34	3.90E-03
GLLCDPNRLLPPYLR (SEQ ID NO:71)	0.00E+00	2.30E+08				中	26	3.00E-02
IQAEQVDAVTLSGEDIYTAGK (SEQ ID NO:76)	0.00E+00	0.00E+00				低	24	5.90E-02
DSTSELVPIATQTYEAWLGHEYLHAMK (SEQ ID NO:75)	0.00E+00	0.00E+00				低	12	7.30E-01
MFDSSNYHGQDLLFKDATVR (SEQ ID NO:85)	0.00E+00	0.00E+00						
AVPVGEKTTYR (SEQ ID NO:86)	0.00E+00	0.00E+00						

[0378] CNBr消化物的LC/MS分析。从每孔中移出300 $\mu$ L,并汇集到每一时间点/部分/孔径的单个管中。向每一样品中加入500 $\mu$ L 0.1%的甲酸用于酸化。用Sep=Pak Vac 12cc C8色谱柱纯化CNBr蛋白片段。将纯化的片段在-80 $^{\circ}$ C冷冻,并冻干过夜。用25mM的碳酸氢铵将CNBr片段再水化,用DTT还原,并用碘乙酰胺将其烷基化。部分加入DTT使烷基化淬灭。向每孔中加入6 $\mu$ g纯化的猪胰蛋白酶,并将样品在37 $^{\circ}$ C培养箱中放置过夜。次日早上,用沃特世公司的Oasis HLB 10cc色谱柱纯化所述的肽。将纯化的肽在-80 $^{\circ}$ C冷冻,并冻干过夜。在30 $\mu$ l (20%乙腈,0.1%FA)中将样品再水化。将15 $\mu$ L的每一样品在LTQ Orbitrap Velos质谱仪(Thermo)上通过LC-MS/MS进行分析,并用Proteome Discoverer 1.3.0.339软件包(Thermo Scientific)分析数据(原始文件)。针对Uniprot-Swissprot数据库将峰列表提交于Mascot 2.3服务器。计算用高置信度检测的每一蛋白的最高的三个肽的峰面积。

[0379] 120分钟后在0.3和0.4 $\mu$ m孔径的腔室和近腔室中对来自CNBr p97片段的胰蛋白酶

消化形成的肽段进行检测。基于最高的三个p97肽的峰面积,腔体侧和腔外侧的肽的比值为约200:1。具体的p97肽的结果显示于下文的表4(3 $\mu$ m孔径)和表5(4 $\mu$ m孔径)中。对来自三个不同的p97CNBr片段的胰蛋白酶消化形成的肽段进行检测(参见图9B)。

[0380] 表4:在3 $\mu$ m孔径CNBr消化物

[0381]

CNBr 肽段序列	腔 外 侧 120: 面积	腔 体 侧 120: 面积	腔 外 侧 120 置 信 度	腔 外 侧 120 离 子 分 数	腔 外 侧 120 Exp 值	腔 体 侧 120 置 信 度	腔 体 侧 120 离 子 分 数	腔 体 侧 120 Exp 值
SEDYELLCPNGAR (SEQ ID NO:14)	3.92E+06	9.18E+08	高	65	1.50E-06	高	57	8.60E-06
FDSSNYHGQDLLFK (SEQ ID NO:87)	1.46E+08	2.16E+10	高	57	8.20E-06	高	68	6.40E-07
VRPDTNIFTVYGLLDK (SEQ ID NO:88)	1.71E+07	1.73E+10	高	56	3.70E-06	高	79	2.10E-08
FSSEAYGQK (SEQ ID NO:89)	1.70E+06	2.39E+08	高	42	3.40E-04	高	42	3.20E-04
DSSHAFTLDELRL (SEQ ID NO:13)	1.79E+06	1.18E+07	中	32	4.10E-03	高	55	2.40E-05
HTTVFDNTNGHNSEPWAAELR (SEQ ID NO:56)	0.00E+00	3.96E+08				高	110	3.20E-11
AVSDYFGGSCVPGAGETSYSESLCR (SEQ ID NO:57)	0.00E+00	1.02E+07				高	107	1.80E-11
NYPSSLCALCVGDEQGR (SEQ ID NO:58)	0.00E+00	2.34E+07				高	87	5.00E-09
ADTDGGLIFR (SEQ ID NO:10)	0.00E+00	3.25E+07				高	85	2.80E-08
SEDYELLCPNGAR (SEQ ID NO:14)	0.00E+00	5.04E+07				高	77	7.90E-08
CLVENAGDVAFVR (SEQ ID NO:73)	0.00E+00	2.69E+07				高	75	2.00E-07
TVGWNVPVGYLVESGR (SEQ ID NO:74)	0.00E+00	4.96E+07				高	67	6.90E-07

[0382]

FDSSNYHGQDLLFK (SEQ ID NO:86)	0.00E+00	9.22E+07				高	66	7.90E-07
WCVLSTPEIQK (SEQ ID NO:67)	0.00E+00	1.04E+08				高	66	1.80E-06
EAGIQPSLLCVR (SEQ ID NO:66)	0.00E+00	6.26E+08				高	64	1.50E-06
AQDLFGDDHMK (SEQ ID NO:64)	0.00E+00	2.28E+08				高	62	2.90E-06
WCATSDPEQHK (SEQ ID NO:2)	0.00E+00	4.78E+06				高	57	6.60E-06
HTTVFDNTNGHNSEPWAAELR (SEQ ID NO:56)	0.00E+00	1.83E+07				高	50	2.70E-05
YYDYSGAFR (SEQ ID NO:7)	0.00E+00	9.70E+06				中	30	3.70E-03
LKPEIQCVSAK (SEQ ID NO:12)	0.00E+00	8.35E+06				中	28	5.70E-03
GTSADHCVQLIAAQEADAITLDGG AIYEAGK (SEQ ID NO:90)	0.00E+00	2.39E+07				低	15	4.10E-02
GTSADHCVQLIAAQEADAITLDGG AIYEAGK (SEQ ID NO:90)	0.00E+00	0.00E+00				低	11	1.50E-01

[0383] 表5:在4 $\mu$ m孔径CNBr消化物

[0384]

CNBr 肽段序列	腔外侧 120: 面积	腔内侧 120: 面积	腔外 侧 120 置信 度	腔外 侧 120 离子 分数	腔外侧 120 Exp 值	腔内 侧 120 置信 度	腔内 侧 120 离子 分数	腔内 侧 120 Exp 值
VRPDTNIFTVYGLLDK (SEQ ID NO:88)	8.42E+07	1.86E+10	高	78	2.60E-08	高	78	2.60E-08
SEDYELCPNGAR (SEQ ID NO:14)	1.53E+07	1.04E+09	高	65	1.50E-06	高	59	6.20E-06
DSSHAFTLDELK (SEQ ID NO:13)	1.69E+07	5.27E+07	高	47	1.20E-04	高	44	2.80E-04
FSSEAYGQK (SEQ ID NO:89)	2.05E+06	1.59E+08	高	39	6.60E-04	高	45	1.60E-04
LKPEIQCVSAK (SEQ ID NO:12)	5.38E+06	1.46E+07	中	32	2.10E-03	高	54	1.40E-05
FDSSNYHGQDLLFK (SEQ ID NO:87)	1.32E+08	2.17E+10	低	26	1.00E-02	高	67	7.60E-07
HTTVFDNTNGHNSEPWAAELR (SEQ ID NO:56)	0.00E+00	4.20E+08				高	115	1.10E-11
NYPSSLCALCVGDEQGR (SEQ ID NO:58)	0.00E+00	5.79E+07				高	96	7.10E-10

[0385]

CLVENAGDVAFVR (SEQ ID NO:74)	0.00E+00	6.68E+07				高	79	7.00E-08
ADTDGGLIFR (SEQ ID NO:10)	0.00E+00	1.02E+07				高	73	4.50E-07
AQDLFGDDHMK (SEQ ID NO:64)	0.00E+00	1.98E+08				高	72	3.10E-07
FDSSNYHGQDLLFK (SEQ ID NO:87)	0.00E+00	1.07E+08				高	69	4.20E-07
TVGWNVPVGYLVESGR (SEQ ID NO:78)	0.00E+00	6.98E+07				高	67	7.80E-07
EAGIQPSLLCVR (SEQ ID NO:66)	0.00E+00	6.83E+08				高	66	1.00E-06
SEDYELLCPNGAR (SEQ ID NO:14)	0.00E+00	5.03E+07				高	65	1.30E-06
WCATSDPEQHK (SEQ ID NO:2)	0.00E+00	2.28E+06				高	62	1.90E-06
IQAEQVDAVTLGEDIYTAGK (SEQ ID NO:76)	0.00E+00	1.80E+05				高	56	9.30E-06
HTTVFDNTNGHNSEPWAAELR (SEQ ID NO:56)	0.00E+00	2.07E+07				高	50	2.80E-05
WCVLSTPEIQK (SEQ ID NO:68)	0.00E+00	2.22E+08				高	49	7.60E-05
GTSADHCVQLIAAQEADAITLDGG AIYEAGK (SEQ ID NO:90)	0.00E+00	3.05E+07				高	40	1.50E-04
TLPSWGQALLSQDFELLCR (SEQ ID NO:56)	0.00E+00	0.00E+00						
AVSDYFGGSCVPGAGETSYSESLCR (SEQ ID NO:57)	0.00E+00	0.00E+00						
IQAEQVDAVTLGEDIYTAGK (SEQ ID NO:76)	0.00E+00	0.00E+00						
CLAEGAGDVAFVK (SEQ ID NO:60)	0.00E+00	0.00E+00						
HSTVLENTDGK (SEQ ID NO:77)	0.00E+00	0.00E+00						
GTSADHCVQLIAAQEADAITLDGG AIYEAGK (SEQ ID NO:90)	0.00E+00	0.00E+00						

[0386] 将腔外侧120/腔内侧120峰面积的比值作为一个可能的标准,具有最高BBB转运活性的p97肽显示于下面表6(胰蛋白酶消化物)和表7(CNBr消化物)中。然而,显示在腔外侧120具有面积值的表2-5中任何p97片段都可以是具有BBB转运活性的潜在目标片段。

[0387] 表6. 基于腔外侧/腔内侧峰面积的比值,可穿过BBB的胰蛋白酶消化形成的肽段

[0388]

肽序列	置信度	腔外侧 120 /腔内侧 120		AA 位点	结构	SEQ ID NO:
		0.4 um 嵌件	3.0 um 嵌件			
WCATSDPEQHK	高	8.92	7.41	25-35	S-H	2
RSSHVTIDTLK	高	2.06	1.23	115-125	C-H	3
SSHVTIDTLKGVK	高	2.42	2.38	116-128		4
LCRGDSSGEGVCDK	高	2.45	1.21	188-201	C-H-C	5
GDSSGEGVCDKSPLER	高	4.93	3.80	191-206		6
YYDYSGAFR	高	7.40	NA	207-215		7
ADVTEWR	高	12.76	11.26	263-269	C	8
VPAHAVVVR	高	3.32	3.56	276-284	C-S-H	9
ADTDGGLIFR	高	1.95	1.44	285-294		10
CGDMAVAFR	高	2.26	2.06	379-387	H	11
LKPEIQCVSAK	高	4.81	4.37	391-401	C-S-CE	12
DSSHAFTLDELRL	高	0.98	NA	460-471	C-H-C	13
SEDYELLCPNGAR	高	13.05	8.38	596-608	C-S-C	14
AQDLFGDDHNKNGFK	高	5.45	1.68	645-659	H-C	15

[0389] 表7:基于腔外侧/腔内侧峰面积的比值,可穿过BBB的CNBr消化的p97片段

[0390]

肽序列	SEQ ID NO:
FSSEAYGQKDLLFKDSTSELVPIATQTYEAWLGHEYLHAM	16
ERIQAEQVDAVTLGEDIYTAGKTYGLVPAAGEHYAPEDSSNSYYVVAVVRRDSSHAFTLDELRLGK RSCHAGFGSPAGWDVPVVGALIQRGFIRPKDCDVLTAVERSEFFNASCVPVNNPKNYPSSLCALCVGDE QGRNKC VGNSQERYGYRGAFRCLVENAGDVAFVRHTTVFDNTNGHNSEPWAAELRSEDYELLC PNGARAEVVSQFAACNLAQIPPHAVM	17
VRPDTNIFTVYGLLDKAQDLFGDDHNKNGFKM	18

[0391] 实施例3

[0392] 血脑屏障体内模型中的p97片段

[0393] 将p97 (Mtf) 片段 (DSSHAFTLDELRL; SEQ ID NO:13) 与单克隆抗体 (mAb) 缀合, 与对照蛋白一同外周施用于小鼠, 并测试相对于对照蛋白, 缀合物在脑组织中的分布。为了进行定量测定, 根据常规技术, 将所有的测试蛋白用Alexa Fluor 647 (AF647) 标记。

[0394] 制备下述测试蛋白: AF647标记的单克隆抗体 (mAb)、AF647标记的MTf-mAb缀合物 (MTf-mAb; MTf是可溶的人p97)、AF647标记的MTf<sub>PEP</sub>-mAb缀合物 (MTf<sub>PEP</sub>-mAb; MTf<sub>PEP</sub>是人p97的DSSHAFTLDELRYC (SEQ ID NO:92) 片段); 以及不含抗体的AF647标记的MTf片段 (MTf<sub>PEP</sub>)。MTf-mAb和MTf<sub>PEP</sub>-mAb缀合物的合成路线显示于图10中。

[0395] 根据下面表8中的研究设计, 向小鼠施用AF647-标记的测试物。

[0396]

表 8: 测试小鼠的脑部生物分布的研究设计						
测试蛋白	途径 <sup>2</sup>	时 间 点(h)	剂量水平 <sup>1</sup> (mg/kg)	剂量水平 (毫微摩尔/kg)	血管灌注 <sup>3</sup>	小鼠数量 <sup>4</sup>
mAb	IV	2	10	66.7	是	3
MTf-mAb	IV	2	15	65.2	是	3
MTf <sub>pep</sub>	IV	2	5	1690.9	是	3
MTf <sub>pep</sub> -mAb	IV	2	10.2	63.0	是	3

<sup>1</sup> 注射体积 = 0.10 mL/小鼠  
<sup>2</sup> 注射途径 = IV (尾静脉)  
<sup>3</sup> 血管灌注 = 5 分钟 @ 4 ml/分钟, 用含 2.7% BSA、100 U/mL 肝素的 PBS, pH 7.4  
<sup>4</sup> 小鼠品系 = BALB/c 雌性 6-8 周龄 (17.4 ± 1.1 克 (平均值, S.D.))

[0397] 在施用测试蛋白后2小时,施用德克萨斯红,处死小鼠并移出脑组织。从脑组织的中部冠状部分和大脑皮层中5至6处随机区域进行冷冻切片。然后进行共聚焦显微镜检查,以评估测试蛋白的脑部生物分布。

[0398] 对于共聚焦显微镜检查,利用A Leica AOBs SP8激光扫描共聚焦显微镜(Leica, Heidelberg, Germany)获得荧光素标记的细胞的共聚焦图像。激发光波长为405 (DAPI)、595nm (德克萨斯红)和653nm (AF647),并且利用80MHz的白色激光器来收集各自的发射信号。所有的图像和光谱数据(除了DAPI)都由高度敏感的HyD探测器产生。通过可调滤波器(AOBs)递送来自样品的背向散射发射信号。

[0399] 为了进行三维(3D)图像/体积分数分析,获得一系列的二维(2D)图像(1024×1024像素)用于3D堆叠体积。从20微米的脑组织切片中捕获光学截面厚度(z轴)为约0.3微米的3D堆叠图像。对于每一组织体积,将z-截面图像进行编辑,并用Imaris (BITPLANE Scientific Software)对所述3维图像进行复原。对记录自大脑皮层的5处或更多处区域的3D图像数据集进行体积估算。应用高斯噪声移除过滤器(Gaussian noise removal filter)来界定前景和背景之间的界限,并设定直方图中较低的阈值水平来排除所有可能的背景体素值。将在该阈值水平之上的所有体素之和确定为体积。

[0400] 计算V<sub>BC</sub>(测试蛋白在脑毛细血管中的体积分数)、V<sub>BP</sub>(测试蛋白在脑实质中的体积分数)和V<sub>TOT</sub>(测试蛋白在脑毛细血管和脑实质中的体积分数)。如图11所示,未缀合的mAb在脑实质中的低分布说明其没有有效地穿过BBB。相比之下,将mAb与MTf或MTf<sub>PEP</sub>缀合使mAb在脑实质中的分布增加了约5倍。而且,未缀合的MTf<sub>PEP</sub>有效地穿过了BBB,并在脑实质中分布。这些结果说明,p97片段的缀合可用于显著增加多肽(如抗体)穿过BBB的递送,以及进入CNS组织如脑。

[0401] 实施例4

[0402] P97肽缀合物

[0403] 将p97<sub>PEP</sub>片段(DSSHAFTLDELRL; SEQ ID NO:13)与44kd的测试蛋白辣根过氧化物酶(HRP)缀合。将该缀合物与对照蛋白一起外周施用于小鼠(通过IV注射),并测试其相对于对照蛋白在脑组织中的分布。为了进行定量测定,根据常规技术将所有的测试蛋白用Alexa

Fluor 680 (AF680) 标记。

[0404] 制备下述的测试蛋白：AF680标记的HRP (HRP)、AF680标记的MTf<sub>PEP</sub>-HRP缀合物 (MTF<sub>PEP</sub>-HRP, MTF<sub>PEP</sub>为人p97的DSSHAFTLDELRYC (SEQ ID NO:92) 片段)。向MTf肽添加C端半胱氨酸和酪氨酸残基, 分别用于缀合和碘化。HRP缀合物的合成路线在图12中阐明。

[0405] 根据下面表9的研究设计, 向小鼠施用AF680标记的测试物。

[0406]

测试蛋白	途径 <sup>2</sup>	时 间 点(h)	剂量水平 <sup>1</sup> (mg/kg)	剂量水平 (毫微摩尔/kg)	血管灌注 <sup>3</sup>	小鼠数量 <sup>4</sup>
PBS	IV	2	N/A	N/A	是	1
HRP	IV	2	10.0	227	是	3
MTF <sub>PEP</sub> -HRP	IV	2	10.3	227	是	3

<sup>1</sup> 注射体积 = 0.10 mL/小鼠  
<sup>2</sup> 注射途径= IV (尾静脉)

[0407]

<sup>3</sup> 血管灌注 = 10 分钟 @ 1 ml/分钟, 用含 2.7% BSA、100 U/mL 肝素的 PBS, pH 7.4
<sup>4</sup> 小鼠品系= BALB/c 雌性 6-8 周龄 (16-20 克)

[0408] 在施用测试蛋白后2小时, 施用番茄凝集素-FITC (80 $\mu$ g, 施用10分钟) 以将脑部血管染色, 然后向心脏内灌注10ml肝素化盐水, 将脑组织移出并进行处理以用于显微镜检查分析。从脑组织的中部冠状部分三个随机区域进行冷冻切片, 将其在冷的丙酮/甲醇中固定, 并置于载片上以进行显微镜检查。然后进行3维 (3D) 共聚焦显微镜检查, 以对测试蛋白在脑部的生物分布进行评估。

[0409] 结果显示于图13A-C中。图13A显示了PBS的结果, 图13B显示了AF680标记的HRP的结果, 图13C显示了AF680标记的MTf<sub>PEP</sub>-HRP缀合物的结果。图13A和13B显示在脑组织中没有可检测的AF680标记物。相比之下, 图13C显示了可检测的AF680标记物, 如箭头处所示。这些结果表明, 与DSSHAFTLDELRYC肽缀合可显著增强目标蛋白穿过BBB的递送并进入脑部组织。

[0410] 可将本文描述的不同实施方案组合以提供进一步的实施方案。将本说明书涉及的和/或申请数据中列出的所有美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物, 通过引用整体并入本文。如果需要不同专利、申请和出版物中的理念以提供进一步的实施方案, 可对实施方案的方面进行修改。

[0411] 根据以上详细描述, 可对所述实施方案作出这些或其它的改变。通常, 在所附的权利要求中, 使用的术语不应被解释为将权利要求限于本说明书和权利要求中公开的具体实施方案, 而应被解释为包括所有可能的实施方案以及所享有的权利要求等效物的全部范围。因此, 所述权利要求不受本公开内容的限制。

序列表

<110> 比奥阿赛斯技术有限公司

<120> P97片段及其应用

<130> B10A-002/02W0

<150> US 61/780,170

<151> 2013-03-13

<150> US 61/885,387

<151> 2013-10-01

<160> 136

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 738

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

[0001]

Met Arg Gly Pro Ser Gly Ala Leu Trp Leu Leu Leu Ala Leu Arg Thr  
1 5 10 15

Val Leu Gly Gly Met Glu Val Arg Trp Cys Ala Thr Ser Asp Pro Glu  
20 25 30

Gln His Lys Cys Gly Asn Met Ser Glu Ala Phe Arg Glu Ala Gly Ile  
35 40 45

Gln Pro Ser Leu Leu Cys Val Arg Gly Thr Ser Ala Asp His Cys Val  
50 55 60

Gln Leu Ile Ala Ala Gln Glu Ala Asp Ala Ile Thr Leu Asp Gly Gly  
65 70 75 80

Ala Ile Tyr Glu Ala Gly Lys Glu His Gly Leu Lys Pro Val Val Gly  
85 90 95

Glu Val Tyr Asp Gln Glu Val Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val  
100 105 110

Val Arg Arg Ser Ser His Val Thr Ile Asp Thr Leu Lys Gly Val Lys  
115 120 125

Ser Cys His Thr Gly Ile Asn Arg Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val  
130 135 140

Gly Tyr Leu Val Glu Ser Gly Arg Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val  
145 150 155 160

Leu Lys Ala Val Ser Asp Tyr Phe Gly Gly Ser Cys Val Pro Gly Ala  
165 170 175

Gly Glu Thr Ser Tyr Ser Glu Ser Leu Cys Arg Leu Cys Arg Gly Asp  
180 185 190

Ser Ser Gly Glu Gly Val Cys Asp Lys Ser Pro Leu Glu Arg Tyr Tyr  
195 200 205

Asp Tyr Ser Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val  
210 215 220

Ala Phe Val Lys His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Lys Thr  
225 230 235 240

[0002]

Leu Pro Ser Trp Gly Gln Ala Leu Leu Ser Gln Asp Phe Glu Leu Leu  
245 250 255

Cys Arg Asp Gly Ser Arg Ala Asp Val Thr Glu Trp Arg Gln Cys His  
260 265 270

Leu Ala Arg Val Pro Ala His Ala Val Val Val Arg Ala Asp Thr Asp  
275 280 285

Gly Gly Leu Ile Phe Arg Leu Leu Asn Glu Gly Gln Arg Leu Phe Ser  
290 295 300

His Glu Gly Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Glu Ala Tyr Gly Gln  
305 310 315 320

Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Thr Ser Glu Leu Val Pro Ile Ala  
325 330 335

Thr Gln Thr Tyr Glu Ala Trp Leu Gly His Glu Tyr Leu His Ala Met  
340 345 350

Lys Gly Leu Leu Cys Asp Pro Asn Arg Leu Pro Pro Tyr Leu Arg Trp  
 355 360 365

Cys Val Leu Ser Thr Pro Glu Ile Gln Lys Cys Gly Asp Met Ala Val  
 370 375 380

Ala Phe Arg Arg Gln Arg Leu Lys Pro Glu Ile Gln Cys Val Ser Ala  
 385 390 395 400

Lys Ser Pro Gln His Cys Met Glu Arg Ile Gln Ala Glu Gln Val Asp  
 405 410 415

Ala Val Thr Leu Ser Gly Glu Asp Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Thr Tyr  
 420 425 430

Gly Leu Val Pro Ala Ala Gly Glu His Tyr Ala Pro Glu Asp Ser Ser  
 435 440 445

Asn Ser Tyr Tyr Val Val Ala Val Val Arg Arg Asp Ser Ser His Ala  
 450 455 460

[0003] Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg Gly Lys Arg Ser Cys His Ala Gly Phe  
 465 470 475 480

Gly Ser Pro Ala Gly Trp Asp Val Pro Val Gly Ala Leu Ile Gln Arg  
 485 490 495

Gly Phe Ile Arg Pro Lys Asp Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Ser Glu  
 500 505 510

Phe Phe Asn Ala Ser Cys Val Pro Val Asn Asn Pro Lys Asn Tyr Pro  
 515 520 525

Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Gln Gly Arg Asn Lys  
 530 535 540

Cys Val Gly Asn Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Arg Gly Ala Phe  
 545 550 555 560

Arg Cys Leu Val Glu Asn Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Arg His Thr  
 565 570 575

Thr Val Phe Asp Asn Thr Asn Gly His Asn Ser Glu Pro Trp Ala Ala

	580		585		590
	Glu Leu Arg Ser Glu Asp Tyr	Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg			
	595	600		605	
	Ala Glu Val Ser Gln Phe Ala Ala Cys Asn Leu Ala Gln Ile Pro Pro				
	610	615		620	
	His Ala Val Met Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly				
	625	630		635	640
	Leu Leu Asp Lys Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn				
		645		650	655
	Gly Phe Lys Met Phe Asp Ser Ser Asn Tyr His Gly Gln Asp Leu Leu				
		660		665	670
	Phe Lys Asp Ala Thr Val Arg Ala Val Pro Val Gly Glu Lys Thr Thr				
		675		680	685
[0004]	Tyr Arg Gly Trp Leu Gly Leu Asp Tyr Val Ala Ala Leu Glu Gly Met				
	690	695		700	
	Ser Ser Gln Gln Cys Ser Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ala Pro				
	705	710		715	720
	Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Ala Leu Ala Ala Arg Leu Leu Pro Pro				
		725		730	735
	Ala Leu				
	<210> 2				
	<211> 11				
	<212> PRT				
	<213> 智人				
	<400> 2				
	Trp Cys Ala Thr Ser Asp Pro Glu Gln His Lys				
	1	5		10	
	<210> 3				
	<211> 11				
	<212> PRT				

<213> 智人

<400> 3

Arg Ser Ser His Val Thr Ile Asp Thr Leu Lys  
1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Ser Ser His Val Thr Ile Asp Thr Leu Lys Gly Val Lys  
1 5 10

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

[0005]

Leu Cys Arg Gly Asp Ser Ser Gly Glu Gly Val Cys Asp Lys  
1 5 10

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Gly Asp Ser Ser Gly Glu Gly Val Cys Asp Lys Ser Pro Leu Glu Arg  
1 5 10 15

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

Tyr Tyr Asp Tyr Ser Gly Ala Phe Arg  
1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

Ala Asp Val Thr Glu Trp Arg  
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

Val Pro Ala His Ala Val Val Val Arg  
1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

Ala Asp Thr Asp Gly Gly Leu Ile Phe Arg  
1 5 10

[0006]

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 11

Cys Gly Asp Met Ala Val Ala Phe Arg  
1 5

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

Leu Lys Pro Glu Ile Gln Cys Val Ser Ala Lys  
1 5 10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

Asp Ser Ser His Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg  
1 5 10

<210> 14  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 14

Ser Glu Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg  
1 5 10

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

<400> 15

Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn Gly Phe Lys  
1 5 10 15

[0007]

<210> 16  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 16

Phe Ser Ser Glu Ala Tyr Gly Gln Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser  
1 5 10 15

Thr Ser Glu Leu Val Pro Ile Ala Thr Gln Thr Tyr Glu Ala Trp Leu  
20 25 30

Gly His Glu Tyr Leu His Ala Met  
35 40

<210> 17  
<211> 221  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 17

Glu Arg Ile Gln Ala Glu Gln Val Asp Ala Val Thr Leu Ser Gly Glu  
1 5 10 15

Asp Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Thr Tyr Gly Leu Val Pro Ala Ala Gly

	20	25	30
	Glu His Tyr Ala Pro Glu Asp Ser Ser Asn Ser Tyr Tyr Val Val Ala 35	40	45
	Val Val Arg Arg Asp Ser Ser His Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg 50	55	60
	Gly Lys Arg Ser Cys His Ala Gly Phe Gly Ser Pro Ala Gly Trp Asp 65	70	75 80
	Val Pro Val Gly Ala Leu Ile Gln Arg Gly Phe Ile Arg Pro Lys Asp 85	90	95
	Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Ser Glu Phe Phe Asn Ala Ser Cys Val 100	105	110
	Pro Val Asn Asn Pro Lys Asn Tyr Pro Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys 115	120	125
[0008]	Val Gly Asp Glu Gln Gly Arg Asn Lys Cys Val Gly Asn Ser Gln Glu 130	135	140
	Arg Tyr Tyr Gly Tyr Arg Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val Glu Asn Ala 145	150	155 160
	Gly Asp Val Ala Phe Val Arg His Thr Thr Val Phe Asp Asn Thr Asn 165	170	175
	Gly His Asn Ser Glu Pro Trp Ala Ala Glu Leu Arg Ser Glu Asp Tyr 180	185	190
	Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg Ala Glu Val Ser Gln Phe Ala 195	200	205
	Ala Cys Asn Leu Ala Gln Ile Pro Pro His Ala Val Met 210	215	220
	<210> 18		
	<211> 32		
	<212> PRT		
	<213> 智人		
	<400> 18		



<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X = 任何氨基酸或可能不存在  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> C- $\alpha$ -甲酰甘氨酸(FGly)  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa = 任何氨基酸  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa = Ala 或 Pro  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa = 任何氨基酸  
  
 <400> 20

[0010] Xaa Gly Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 21  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 肽连接子

<400> 21

Gly Ser Gly Ser  
1

<210> 22  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 肽连接子

<400> 22

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 23  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 肽连接子

<400> 23

Gly Gly Gly Ser  
 1

<210> 24  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 肽连接子

<400> 24

[0011] Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5

<210> 25  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 肽连接子

<400> 25

Gly Asn Gly Asn  
 1

<210> 26  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 肽连接子

<400> 26

Gly Gly Asn Gly  
 1

<210> 27  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 肽连接子

<400> 27

Gly Gly Gly Asn  
 1

<210> 28  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 肽连接子

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Asn  
 1 5

[0012]

<210> 29  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 可被凝血酶剪切的连接子

<400> 29

Gly Arg Gly Asp  
 1

<210> 30  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 可被凝血酶剪切的连接子

<400> 30

Gly Arg Gly Asp Asn Pro  
 1 5

<210> 31  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 可被凝血酶剪切的连接子

<400> 31

Gly Arg Gly Asp Ser  
 1 5

<210> 32  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 可被凝血酶剪切的连接子

<400> 32

Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys  
 1 5

[0013]

<210> 33  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 可被弹性蛋白酶剪切的连接子

<400> 33

Ala Ala Pro Val  
 1

<210> 34  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 可被弹性蛋白酶剪切的连接子

<400> 34

Ala Ala Pro Leu  
 1

<210> 35  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 可被弹性蛋白酶剪切的连接子

<400> 35

Ala Ala Pro Phe  
1

<210> 36  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 可被弹性蛋白酶剪切的连接子

<400> 36

Ala Ala Pro Ala  
1

[0014] <210> 37  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 可被弹性蛋白酶剪切的连接子

<400> 37

Ala Tyr Leu Val  
1

<210> 38  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 可被基质金属蛋白酶剪切的连接子

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa = 任何氨基酸

<220>

<221> 变体  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 38

Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa  
1 5

<210> 39  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 可被基质金属蛋白酶剪切的连接子

<220>  
<221> 变体  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 39

Leu Gly Pro Xaa  
1

[0015]

<210> 40  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 可被基质金属蛋白酶剪切的连接子

<220>  
<221> 变体  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 40

Gly Pro Ile Gly Pro Xaa  
1 5

<210> 41  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 可被基质金属蛋白酶剪切的连接子

<220>  
<221> 变体  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 41

Ala Pro Gly Leu Xaa  
1 5

<210> 42  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 可被胶原酶剪切的连接子

<220>  
<221> 变体  
<222> (7)..(7)  
<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 42

[0016] Pro Leu Gly Pro Asp Arg Xaa  
1 5

<210> 43  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 可被胶原酶剪切的连接子

<220>  
<221> 变体  
<222> (7)..(7)  
<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 43

Pro Leu Gly Leu Leu Gly Xaa  
1 5

<210> 44  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
 <223> 可被胶原酶剪切的连接子  
 <400> 44

Pro Gln Gly Ile Ala Gly Trp  
 1 5

<210> 45  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 可被胶原酶剪切的连接子  
 <400> 45

Pro Leu Gly Cys His  
 1 5

<210> 46  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

[0017] <220>  
 <223> 可被胶原酶剪切的连接子  
 <400> 46

Pro Leu Gly Leu Tyr Ala  
 1 5

<210> 47  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 可被胶原酶剪切的连接子  
 <400> 47

Pro Leu Ala Leu Trp Ala Arg  
 1 5

<210> 48  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>



<400> 52

Gly Ser Asp Lys Pro  
1 5

<210> 53

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可被组织蛋白酶B剪切的连接子

<400> 53

Ala Leu Ala Leu  
1

<210> 54

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可被组织蛋白酶B剪切的连接子

[0019]

<400> 54

Gly Phe Leu Gly  
1

<210> 55

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 55

Leu Phe Ser His Glu Gly Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Glu Ala  
1 5 10 15

Tyr Gly Gln Lys  
20

<210> 56

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人

<400> 56

His Thr Thr Val Phe Asp Asn Thr Asn Gly His Asn Ser Glu Pro Trp  
1 5 10 15

Ala Ala Glu Leu Arg  
20

<210> 57  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 57

Ala Val Ser Asp Tyr Phe Gly Gly Ser Cys Val Pro Gly Ala Gly Glu  
1 5 10 15

Thr Ser Tyr Ser Glu Ser Leu Cys Arg  
20 25

<210> 58  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 智人

[0020] <400> 58

Asn Tyr Pro Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Gln Gly  
1 5 10 15

Arg

<210> 59  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 59

Thr Leu Pro Ser Trp Gly Gln Ala Leu Leu Ser Gln Asp Phe Glu Leu  
1 5 10 15

Leu Cys Arg

<210> 60  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 60

Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys  
1 5 10

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 61

Met Phe Asp Ser Ser Asn Tyr His Gly Gln Asp Leu Leu Phe Lys  
1 5 10 15

<210> 62

<211> 25

<212> PRT

<213> 智人

<400> 62

Leu Phe Ser His Glu Gly Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Glu Ala  
1 5 10 15

[0021]

Tyr Gly Gln Lys Asp Leu Leu Phe Lys  
20 25

<210> 63

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 63

Arg Asp Ser Ser His Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg  
1 5 10

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 64

Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys  
1 5 10

<210> 65

<211> 10

<212> PRT  
<213> 智人

<400> 65

Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val Leu Lys  
1                   5                   10

<210> 66  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 66

Glu Ala Gly Ile Gln Pro Ser Leu Leu Cys Val Arg  
1                   5                   10

<210> 67  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 67

[0022]

Ser Ser His Val Thr Ile Asp Thr Leu Lys  
1                   5                   10

<210> 68  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 68

Trp Cys Val Leu Ser Thr Pro Glu Ile Gln Lys  
1                   5                   10

<210> 69  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 69

Gly Leu Leu Cys Asp Pro Asn Arg  
1                   5

<210> 70  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 70

Asp Ser Ser His Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg Gly Lys  
1 5 10

<210> 71

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 71

Gly Leu Leu Cys Asp Pro Asn Arg Leu Pro Pro Tyr Leu Arg  
1 5 10

<210> 72

<211> 28

<212> PRT

<213> 智人

<400> 72

Glu His Gly Leu Lys Pro Val Val Gly Glu Val Tyr Asp Gln Glu Val  
1 5 10 15

[0023]

Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Arg Arg  
20 25

<210> 73

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 73

Cys Val Gly Asn Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Arg  
1 5 10

<210> 74

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 74

Cys Leu Val Glu Asn Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Arg  
1 5 10

<210> 75

<211> 27

<212> PRT  
<213> 智人

<400> 75

Asp Ser Thr Ser Glu Leu Val Pro Ile Ala Thr Gln Thr Tyr Glu Ala  
1 5 10 15

Trp Leu Gly His Glu Tyr Leu His Ala Met Lys  
20 25

<210> 76  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 76

Ile Gln Ala Glu Gln Val Asp Ala Val Thr Leu Ser Gly Glu Asp Ile  
1 5 10 15

Tyr Thr Ala Gly Lys  
20

[0024]

<210> 77  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 77

His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Lys  
1 5 10

<210> 78  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 78

Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val Gly Tyr Leu Val Glu Ser Gly Arg  
1 5 10 15

<210> 79  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 79

Leu Leu Asn Glu Gly Gln Arg  
1 5

<210> 80  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 80

Leu Phe Ser His Glu Gly Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Glu Ala  
1 5 10 15

Tyr Gly Gln Lys Asp Leu Leu Phe Lys  
20 25

<210> 81  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 81

Ala Asp Thr Asp Gly Gly Leu Ile Phe Arg Leu Leu Asn Glu Gly Gln  
1 5 10 15

[0025]

Arg

<210> 82  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 82

Cys Gly Asn Met Ser Glu Ala Phe Arg  
1 5

<210> 83  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 83

Ala Asp Val Thr Glu Trp Arg Gln Cys His Leu Ala Arg  
1 5 10

<210> 84

<211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 84

Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Thr Ser Glu Leu Val Pro Ile Ala Thr  
 1                   5                   10                   15

Gln Thr Tyr Glu Ala Trp Leu Gly His Glu Tyr Leu His Ala Met Lys  
                  20                   25                   30

<210> 85  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 85

Met Phe Asp Ser Ser Asn Tyr His Gly Gln Asp Leu Leu Phe Lys Asp  
 1                   5                   10                   15

Ala Thr Val Arg  
                  20

[0026]

<210> 86  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 86

Ala Val Pro Val Gly Glu Lys Thr Thr Tyr Arg  
 1                   5                   10

<210> 87  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 87

Phe Asp Ser Ser Asn Tyr His Gly Gln Asp Leu Leu Phe Lys  
 1                   5                   10

<210> 88  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 88

Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly Leu Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

<210> 89  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 89

Phe Ser Ser Glu Ala Tyr Gly Gln Lys  
 1 5

<210> 90  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 90

Gly Thr Ser Ala Asp His Cys Val Gln Leu Ile Ala Ala Gln Glu Ala  
 1 5 10 15

[0027] Asp Ala Ile Thr Leu Asp Gly Gly Ala Ile Tyr Glu Ala Gly Lys  
 20 25 30

<210> 91  
 <211> 690  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 91

Gly Met Glu Val Arg Trp Cys Ala Thr Ser Asp Pro Glu Gln His Lys  
 1 5 10 15

Cys Gly Asn Met Ser Glu Ala Phe Arg Glu Ala Gly Ile Gln Pro Ser  
 20 25 30

Leu Leu Cys Val Arg Gly Thr Ser Ala Asp His Cys Val Gln Leu Ile  
 35 40 45

Ala Ala Gln Glu Ala Asp Ala Ile Thr Leu Asp Gly Gly Ala Ile Tyr  
 50 55 60

Glu Ala Gly Lys Glu His Gly Leu Lys Pro Val Val Gly Glu Val Tyr  
 65 70 75 80

Asp Gln Glu Val Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Arg Arg  
85 90 95

Ser Ser His Val Thr Ile Asp Thr Leu Lys Gly Val Lys Ser Cys His  
100 105 110

Thr Gly Ile Asn Arg Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val Gly Tyr Leu  
115 120 125

Val Glu Ser Gly Arg Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val Leu Lys Ala  
130 135 140

Val Ser Asp Tyr Phe Gly Gly Ser Cys Val Pro Gly Ala Gly Glu Thr  
145 150 155 160

Ser Tyr Ser Glu Ser Leu Cys Arg Leu Cys Arg Gly Asp Ser Ser Gly  
165 170 175

Glu Gly Val Cys Asp Lys Ser Pro Leu Glu Arg Tyr Tyr Asp Tyr Ser  
180 185 190

[0028]

Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val  
195 200 205

Lys His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Lys Thr Leu Pro Ser  
210 215 220

Trp Gly Gln Ala Leu Leu Ser Gln Asp Phe Glu Leu Leu Cys Arg Asp  
225 230 235 240

Gly Ser Arg Ala Asp Val Thr Glu Trp Arg Gln Cys His Leu Ala Arg  
245 250 255

Val Pro Ala His Ala Val Val Val Arg Ala Asp Thr Asp Gly Gly Leu  
260 265 270

Ile Phe Arg Leu Leu Asn Glu Gly Gln Arg Leu Phe Ser His Glu Gly  
275 280 285

Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Glu Ala Tyr Gly Gln Lys Asp Leu  
290 295 300

Leu Phe Lys Asp Ser Thr Ser Glu Leu Val Pro Ile Ala Thr Gln Thr  
 305 310 315 320

Tyr Glu Ala Trp Leu Gly His Glu Tyr Leu His Ala Met Lys Gly Leu  
 325 330 335

Leu Cys Asp Pro Asn Arg Leu Pro Pro Tyr Leu Arg Trp Cys Val Leu  
 340 345 350

Ser Thr Pro Glu Ile Gln Lys Cys Gly Asp Met Ala Val Ala Phe Arg  
 355 360 365

Arg Gln Arg Leu Lys Pro Glu Ile Gln Cys Val Ser Ala Lys Ser Pro  
 370 375 380

Gln His Cys Met Glu Arg Ile Gln Ala Glu Gln Val Asp Ala Val Thr  
 385 390 395 400

Leu Ser Gly Glu Asp Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Thr Tyr Gly Leu Val  
 405 410 415

[0029] Pro Ala Ala Gly Glu His Tyr Ala Pro Glu Asp Ser Ser Asn Ser Tyr  
 420 425 430

Tyr Val Val Ala Val Val Arg Arg Asp Ser Ser His Ala Phe Thr Leu  
 435 440 445

Asp Glu Leu Arg Gly Lys Arg Ser Cys His Ala Gly Phe Gly Ser Pro  
 450 455 460

Ala Gly Trp Asp Val Pro Val Gly Ala Leu Ile Gln Arg Gly Phe Ile  
 465 470 475 480

Arg Pro Lys Asp Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Ser Glu Phe Phe Asn  
 485 490 495

Ala Ser Cys Val Pro Val Asn Asn Pro Lys Asn Tyr Pro Ser Ser Leu  
 500 505 510

Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Gln Gly Arg Asn Lys Cys Val Gly  
 515 520 525

Asn Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Arg Gly Ala Phe Arg Cys Leu

530	535	540
Val Glu Asn Ala Gly Asp 545	Val Ala Phe Val Arg His Thr Thr Val Phe 550	
Asp Asn Thr Asn Gly His Asn Ser Glu Pro Trp Ala Ala Glu Leu Arg 565		570
Ser Glu Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg Ala Glu Val 580		585
Ser Gln Phe Ala Ala Cys Asn Leu Ala Gln Ile Pro Pro His Ala Val 595		600
Met Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly Leu Leu Asp 610		615
Lys Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn Gly Phe Lys 625		630
Met Phe Asp Ser Ser Asn Tyr His Gly Gln Asp Leu Leu Phe Lys Asp 645		650
Ala Thr Val Arg Ala Val Pro Val Gly Glu Lys Thr Thr Tyr Arg Gly 660		665
Trp Leu Gly Leu Asp Tyr Val Ala Ala Leu Glu Gly Met Ser Ser Gln 675		680
Gln Cys 690		
<210> 92		
<211> 14		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 92		
Asp Ser Ser His Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg Tyr Cys 1		5
		10
<210> 93		
<211> 12		
<212> PRT		









<210> 114  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 太平洋海象(*Odobenus rosmarus divergens*)

<400> 114

Asn Ser Ser Ser Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg  
 1                    5                    10

<210> 115  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 橙腹草原田鼠(*Microtus ochrogaster*)

<400> 115

Asp Ser Ser Tyr Ser Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg  
 1                    5                    10

<210> 116  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 绵羊(*Ovis aries*)

<400> 116

[0035]

Asn Ser Ser Tyr Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg  
 1                    5                    10

<210> 117  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 韦德尔氏海豹(*Leptonychotes weddellii*)

<400> 117

Asn Ser Ser Tyr Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg  
 1                    5                    10

<210> 118  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 野生双峰驼(*Camelus ferus*)

<400> 118

Asn Ser Ser Tyr Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg  
 1                    5                    10

<210> 119  
 <211> 12

<212> PRT  
<213> 野猪 (*Sus scrofa*)

<400> 119

Asn Ser Ser Tyr Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg  
1                   5                   10

<210> 120  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 牦牛 (*Bos mutus*)

<400> 120

Asn Ser Ser Tyr Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg  
1                   5                   10

<210> 121  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> *Cyphellophora europaea*

<400> 121

[0036]

Ala Thr Ser His Ala Ile Thr Leu Asp Glu Leu Arg  
1                   5                   10

<210> 122  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 非洲草原象 (*Loxodonta africana*)

<400> 122

Asn Ser Ser Tyr Ala Phe Thr Met Asp Glu Leu Arg  
1                   5                   10

<210> 123  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 中国仓鼠 (*Cricetulus griseus*)

<400> 123

Asp Arg Ser Tyr Ser Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg  
1                   5                   10

<210> 124  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 家兔 (*Oryctolagus cuniculus*)







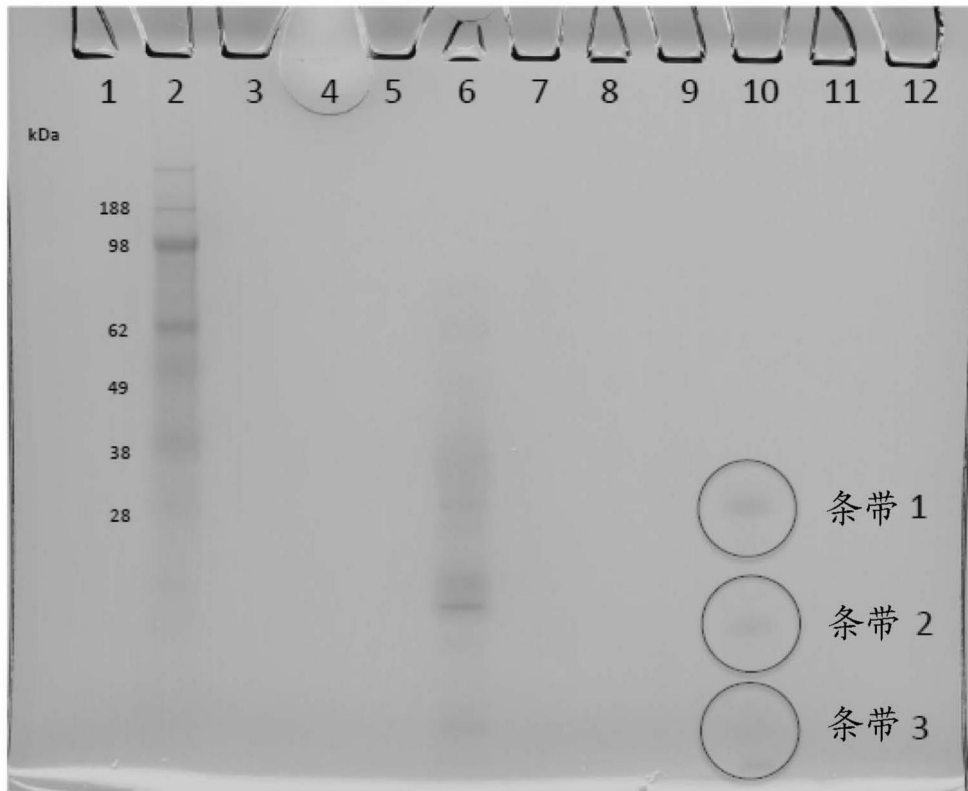


图1

置信度	序列	修饰	电荷	MH+ [Da]	$\Delta M$ [ppm]	RT [min]	# 未酶 切位点
高	LFSHEGSSFQMFSEAYGQK		2	2267. 00762	0.08	43. 95	0
高	HTTVFDNTNGHNSEPWAAELR		2	2396. 10185	0.15	36. 39	0
高	TLPSWGQALLSQDFELLcR	C18 (脛甲基化)	2	2234. 13017	1.19	72. 07	0
高	AVSDYFGGScVPGAGETSYSESLcR	C10 (脛甲基化); C24 (脛甲基化)	2	2656. 12822	-0.33	44. 59	0
高	NYPSSLcALcVGDEQGR	C7 (脛甲基化); C10 (脛甲基化)	2	1925. 84819	0.05	39. 87	0
高	ADTDGGLIFR		2	1064. 53679	-0.35	75. 63	0
高	mFDSSNYHGQDLLFK	M1 (氧化)	2	1817. 8167	0.18	40. 07	0
高	cGDMAVAFR	C1 (脛甲基化)	2	1026. 45098	1.32	35. 91	0
高	AQDLFGDDHNKnGFK	N12 (脱酰胺基的)	2	1706. 77641	-0.32	27. 41	1
高	LFSHEGSSFQmFSSEAYGQK	M11 (氧化)	2	2283. 00176	-0.26	38. 56	0
高	LLNEGQRLFSHEGSSFQMFSEAYGQK		3	3077. 44004	-0.73	47. 85	1

图2A

高	LFSHEGSSFQMFSSSEAYGQKDLLFK		3	2883. 36435	-0.54	52. 06	1
高	MFDSNNYHGQDLLFK		2	1801. 82317	0.95	45. 29	0
高	SEDYELLcPNGAR	C8(脛甲基化)	2	1523. 67937	-0.12	35. 44	0
高	cGDmAVAFR	C1(脛甲基化); M4(氧化) C2(脛甲基化);	2	1042. 4439	-0.61	22. 74	0
高	LcRGDSSGEGVcDK	C12(脛甲基化)	2	1539. 65276	0.04	13. 54	1
高	EAGIQPSLLcVR	C10(脛甲基化)	2	1342. 71453	-0.22	40. 47	0
高	LKPEIQcVSAK	C7(脛甲基化)	3	1272. 69797	-0.1	21. 58	0
高	HSTVLENTDGK		2	1200. 5855	-0.05	15. 92	0
高	GTSADHcVQLIAAQEADAITLDGGAIYE AGK	C7(脛甲基化)	3	3145. 51023	-0.18	55. 77	0
高	GDSSGEGVcDK	C9(脛甲基化)	2	1110. 43633	-0.48	10. 07	0
高	cLAEGAGDVAFVK	C1(脛甲基化)	2	1336. 65605	-0.44	37. 26	0
高	SSHVTIDTLKGVK		3	1384. 77948	-0.02	24. 42	1
高	TVGWNVPVGYLVESGR		2	1732. 90166	-0.06	54. 48	0
高	RDSSHAFTLDELRL		3	1546. 76072	-0.13	32. 63	1
高	IQAQEQVDAVTLGEDIYTAGK		3	2208. 10361	0.22	44. 72	0
高	YYDYSGAFR		2	1141. 49394	-0.85	68	0
高	AQDLFGDDHNK		3	1259. 56464	-0.41	20. 56	0
高	DSSHAFTLDELRL		2	1390. 65898	-0.58	76. 84	0
高	GDSSGEGVcDKSPLER	C9(脛甲基化)	3	1692. 74961	0.1	21. 09	1
高	WcATSDPEQHK	C2(脛甲基化)	2	1358. 57903	-0.29	19. 94	0
高	LLnEGqRLFSHEGSSFqMFSSEAYGQK	N3(脱酰胺基的); Q6(脱酰胺基的); Q17(脱酰胺基的)	3	3080. 3928	-0.5	57. 33	1
高	cLVENAGDVAFVR	C1(脛甲基化)	2	1449. 71599	0.3	39. 92	0

图2B

高	RSSHVTIDTLK		3	1256. 69574	-0.02	19. 02	1
高	GLLcDPNRLPPYLR	C4 (脛甲基化)	4	1683. 89943	-0.33	43. 29	1
高	MFDSSnYHGQDLLFK	N6 (脱酰胺基的)	3	1802. 8024	-1.71	45. 84	0
高	AQDLFGDDHNKNGFK		4	1705. 79641	2.03	25. 95	1
高	HTTVFDNTnGHNSEPWAAELR	N9 (脱酰胺基的) C8 (脛甲基化);	4	2397. 08584	0.13	38. 77	0
高	SEDYELLcPnGAR	N10 (脱酰胺基的)	2	1524. 65764	-3.88	36. 12	0
高	TLPSWGqALLSqDFELLcR	Q7 (脱酰胺基的); Q12 (脱酰胺基的); C18 (脛甲基化)	2	2236. 106	4.68	71. 93	0
高	LSVmGcDVLK	M4 (氧化); C6 (脛甲基化)	2	1137. 56389	-0.37	32. 07	0
高	SSHVTIDTLK		2	1100. 59477	0.11	22. 53	0
高	EHGLKPvVGEVYDQEVGTSYYAVAVVR R		4	3120. 61098	-0.13	44. 41	1
高	LSVMGcDVLK	C6 (脛甲基化)	2	1121. 56914	-0.23	41. 14	0
高	cGNMSEAFR	C1 (脛甲基化)	2	1071. 43474	0.05	24. 39	0
高	SPQHcMER	C5 (脛甲基化)	2	1044. 43474	-0.25	9.6 7	0
中	ADVTEWR		2	876.4 2131	0.3	26. 04	0
中	SPQHcMER	C5 (脛甲基化);	2	1060. 42974	-0.17	0.9 2	0
中	GLLcDPNR	M6 (氧化) C4 (脛甲基化)	2	944.4 616	-0.3	23. 83	0
中	TVGWNVPVGYLVESGRLSVMGcDVLK	C22 (脛甲基化)	3	2835. 45389	0.2	64. 55	1
中	GLLcDPnRLPPYLR	C4 (脛甲基化);	3	1684. 88028	-2.21	45. 01	1
低	DLLFKDSTSELVPIATQTYEAWLGHEYL HAMK	N7 (脱酰胺基的)	4	3706. 85024	1.06	70. 87	1
低	LLNEGQR		2	829.4 5293	0.3	15. 59	0
低	DSTSELVPIATQTYEAWLGHEYLHAMK		3	3090. 48777	-0.02	64. 02	0

图2C

低	DSTSELVPIATQTYEAWLGHEYLHAMK	C31 (脛甲基化)	3	4015. 92771	-1.03	70. 52	1
低	GLLcDPNR		2	947.5 7927	0.75	18. 33	0
低	VPAHAVVVR	Q12 (脱酰胺基的);	2	3090. 48777	-0.02	64. 02	0
低	DSTSELVPIATqTYEAWLGHEYLHAMK	C31 (脛甲基化)	3	4016. 93406	4.53	70. 55	1
低	GLLcDPNR		2	947.5 7927	0.75	18. 33	0

图2D

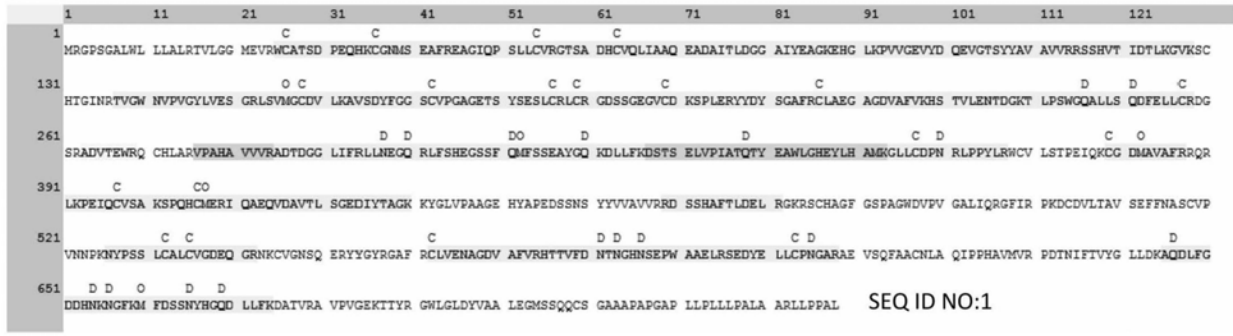


图2E

条带1

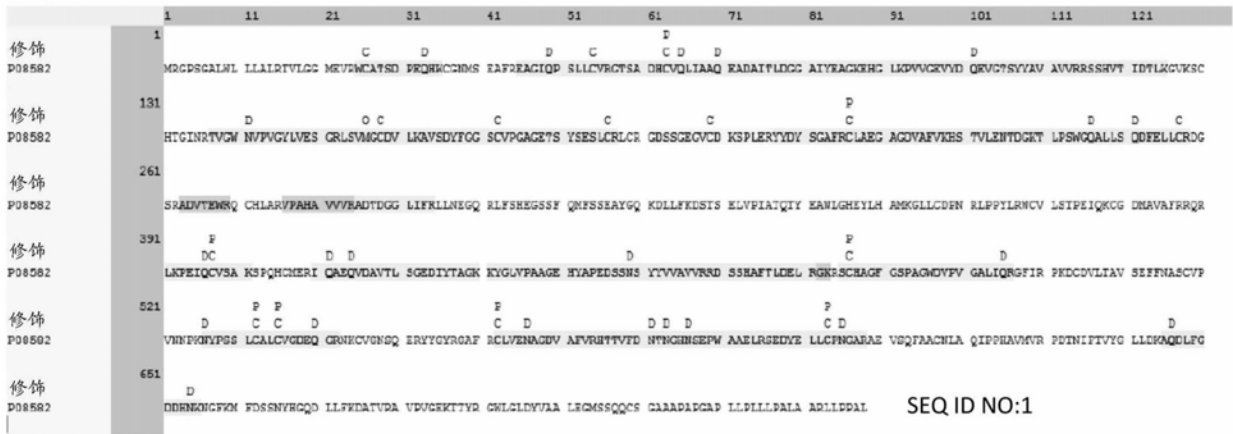
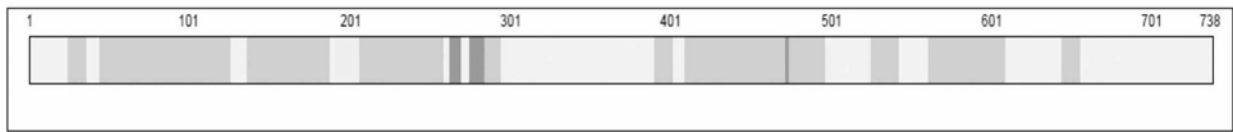
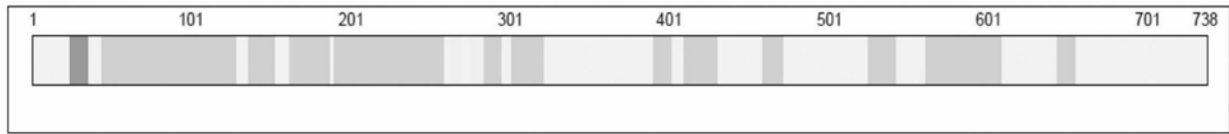


图3A

条带2



	1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101	111	121
修饰 P08582	1			C		D	F	P					D
							C	D	D				
修饰 P08582	131				D		D		D				D
修饰 P08582	261												
修饰 P08582	391												
修饰 P08582	521												
修饰 P08582	651												

SEQ ID NO:1

图3B

条带3



	1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101	111	121
修饰 P08582	1												
修饰 P08582	131												
修饰 P08582	261												
修饰 P08582	391												
修饰 P08582	521												
修饰 P08582	651												

SEQ ID NO:1

图3C

## 条带 1 (~28-38 kDa)

1	MRGPSGALWL	LLALRTVLGG	MEVRWCATSD	PEQHKCGNMS	EAFREAGIQP
51	SLLCVRG TSA	DHCVQLIAAQ	EADAITLDGG	AIYEAGKEHG	LKPVVGEVYD
101	QEVGTSYYAV	AVVRRSSHVT	IDTLKGVKSC	HTGINRTVGW	NVPVGYLVES
151	GRLSVMGCDV	LKAVSDYFGG	SCVPGAGETS	YSESLCRLCR	GDSSGEGVCD
201	KSPLERYYDY	SGAFRC LAEG	AGDVAFVKHS	TVLENTDGKT	LPSWGQALLS
251	QDFELLCRDG	SRADVTEWRQ	CHLARVPAHA	VVVRADTDGG	LIFRLLNEGQ
301	RLFSHEGSSF	QMFSSEAYGQ	KDLLFKDSTS	ELVPIATQTY	EAWLGHEY LH
351	AMKGLLCDPN	RLPPYLRWCV	LSTPEIQKCG	DMAVAFRRQR	LKPEIQCVSA
401	KSPQHCMERI	QAEQVDAVTL	SGEDIYTAGK	KYGLVPAAGE	HYAPEDSSNS
451	YVVAVVRRD	SSHAFTLDEL	RGKRSCHAGF	GSPAGWDVPV	GALIQRGFIR
501	PKDCDVLTA V	SEFFNASCVP	VNNPKNY PSS	LCALCVGDEQ	GRNKCVGNSQ
551	ERYYG YRGAF	RCLVENAGDV	AFVRHTTVFD	NTNGHNSEPW	AAELRSEDYE
601	LLCPNGARAE	VSQFAACNLA	QIPPHAVMVR	PDTNIFTVYG	LLDKAQDLFG
651	DDHNKNGFKM	FDSSNYHGQD	LLFKDATVRA	VPVGEKTTYR	GWLGLDYVAA
701	LEGMSSQQCS	GAAAPAPGAP	LLPLLLPALA	ARLLPPAL	[SEQ ID NO:1]

图4A

置信度	序列	修饰	离子分数	Exp值	电荷	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	RT [min]
低	GDSSGEGVcDKSPLEK	C9 (脲甲基化)	24	0.588637876	3	1692.74906	-0.23	11.73
低	LKPEIQcVSAK	C7 (脲甲基化)	27	0.772587143	3	1272.69925	0.91	11.84
低	SSHVTIDTLK		32	0.183325902	2	1100.59270	-1.77	12.05
低	AQDLFGDDHMK		49	0.001586224	2	1259.56499	-0.14	12.30
高	SSHVTIDTLKGVK		34	0.10947824	2	1384.77971	0.14	12.63
低	AqDLFGDDHMK	Q2 (脱酰胺基的)	24	0.316471818	3	1260.55002	0.67	13.00
低	GLLcDPNR	C4 (脲甲基化)	20	1.450903432	2	944.46153	-0.36	13.13
低	ADVTEWR		40	0.02157799	2	876.42064	-0.47	13.55
高	RDSSHAFTLDELK		36	0.102069849	3	1546.76017	-0.48	14.62
高	LSVmGcDVLK	M4 (氧化); C6 (脲甲基化)	57	0.000594205	2	1137.56389	-0.37	15.19
高	YYDYGAFK		22	0.582859505	2	1141.49455	-0.31	16.14
高	SEDIYELlcPwGAR	C8 (脲甲基化)	63	7.9564E-05	2	1523.67949	-0.04	16.22
高	cLAEGAGDVAFVK	C1 (脲甲基化)	47	0.007423868	2	1336.65703	0.29	16.22
高	DSSHAFTLDELK		39	0.031508659	3	1390.65891	-0.63	16.48
高	SEDIYELlcPwGAR	C8 (脲甲基化); N10 (脱酰胺基的)	65	4.30461E-05	2	1524.66850	3.24	16.59
高	HTTVFDNTNGHNSEPWAAELK		65	0.000115457	2	2396.10161	0.05	16.63
高	HTTVFDNTNGHNSEPWAAELK	N9 (脱酰胺基的)	29	0.352597977	4	2397.08681	0.54	16.95
低	SEDIYELlcPwGAR	C8 (丙酰胺); C8 (脲甲基化)	21	1.495576912	2	1537.69609	-37081.82	16.98
高	ADTDGGLIFK		85	1.02686E-06	2	1064.53740	0.23	17.05
高	cLVENAGDVAFVK	C1 (脲甲基化)	82	2.76997E-06	2	1449.71514	-0.29	17.22
高	mFDSSNYHGQDLLFK	M1 (氧化)	25	0.599293128	3	1817.81559	-0.43	17.30
高	HTTVFDNTNGHNSEPWAAELK	N9 (脱酰胺基的); N12 (脱酰胺基的)	17	5.447408025	4	2398.08730	7.41	17.41
高	NYPSSLcAlcVGDEQGR	C7 (脲甲基化); C10 (脲甲基化)	113	8.74972E-10	2	1925.84770	-0.21	17.42
高	SEDIYELlcPwGAR	C8 (丙酰胺); C8 (脲甲基化)	14	5.97825186	2	1538.67668	-37060.41	17.45
高	NYPSSLcAlcVGDEQGR	C7 (脲甲基化); C10 (脲甲基化)	106	4.05712E-09	2	1926.83391	0.93	17.71
高	cLVENAGDVAFVK	C1 (脲甲基化); N5 (脱酰胺基的)	77	7.23432E-06	2	1450.69866	-0.63	17.95
高	EAGIQPSSLcVR	C10 (脲甲基化)	76	7.27757E-06	2	1342.71514	0.24	17.97
高	NYPSSLcAlcVGDEQGR	C7 (脲甲基化); C10 (丙酰胺)	44	0.00733681	2	1939.86528	-29393.76	18.07
高	cLVENAGDVAFVK	C1 (丙酰胺); C1 (脲甲基化)	61	0.000356625	2	1463.73357	-38954.56	18.40
高	NYPSSLcAlcVGDEQGR	C7 (脲甲基化); C10 (丙酰胺)	47	0.003457106	2	1940.84905	-29378.99	18.43
高	AVSDYFGGScVPGAGETSYSESLeR	C10 (脲甲基化); C24 (脲甲基化)	93	5.3769E-08	2	2656.13042	0.49	18.51
高	EAGIQPSSLcVR	Q5 (脱酰胺基的); C10 (脲甲基化)	55	0.001031465	2	1343.69878	-0.04	18.52
低	ScHAGFGSPAGWDVpVNGALiQR	C2 (丙酰胺); C2 (脲甲基化)	14	19.48150831	3	2297.11759	-24821.17	18.74
高	EHGLKpVWGEVYDQEVGTSYYAVAVVRF		39	0.080559493	4	2964.51186	0.54	18.75
高	ScHAGFGSPAGWDVpVNGALiQR	C2 (脲甲基化)	50	0.005390434	3	2282.11502	0.62	20.48
高	ScHAGFGSPAGWDVpVNGALiQR	C2 (脲甲基化); Q21 (脱酰胺基的)	22	3.584246826	3	2283.09995	1.02	20.97
中	KYGLVPAAGEHYAPEDSSNSYYWAVVRF		11	55.84334183	3	3041.47208	-9.32	21.45
高	TVGWNVPVGYLVESGR		75	1.83654E-05	2	1732.90264	0.50	21.62
高	GTSADHcVQLIAAQEADAITLDGGATYcR	C7 (脲甲基化)	28	1.02247977	3	3145.51316	0.75	22.45
高	IQAQQVDAVTLSEEDITYAGK		121	4.90258E-10	2	2208.10674	1.63	23.33

图4B

## 条带 2 (~14-17 kDa)

1	MRGPSGALWL	LLALRTVLGG	MEVRWCATSD	PEQHKCGNMS	EAFREAGIQP
51	SLLCVRG TSA	DHCVQLIAAQ	EADAITLDGG	AIYEAGKEHG	VGEVYD
101	QEVGTSYYAV	AVVRRSSHVT	IDTLKGVKSC	HTGINRTVGW	NVPVGYLVES
151	GRLSVMGCDV	LKAVSDYFGG	SCVPGAGETS	YSESLCRLCR	GDSSGEGVCD
201	KSPLERYYDY	SGAFRC LAEG	AGDVAFVKHS	TVLENTDGKT	LPSWGQALLS
251	QDFELLCRDG	SRADVTEWRQ	CHLARVPAHA	VVVRADTDGG	LIFRLLNEGQ
301	RLFSHEGSSF	QMFSS EAYGQ	KDLLFKDSTS	ELVPIATQTY	EAWLGHEYLH
351	AMKGLLCDPN	RLPPYLRWCV	LSTPEIQKCG	DMAVAFRRQR	LKPEIQCVSA
401	KSPQHCMERI	QAEQVDAVTL	SGEDIYTAGK	KYGLVPAAGE	HYAPEDSSNS
451	YYVVAVVRRD	SSHAFTLDEL	RGKRSCHAGF	GSPAGWDVPV	GALIQRGFIR
501	PKDCDVLTA V	SEFFNASCVP	VNNPKNY PSS	LCALCVGDEQ	GRNKCVGNSQ
551	ERYYG YRGAF	RCLVENAGDV	AFVRHTTVFD	NTNGHNSEPW	AAELRSEDYE
601	LLCPNGARAE	VSQFAACNLA	QIPPHAVMVR	PDTNIFTVYG	LLDKAQDLFG
651	DDHNKNGFKM	FDSSNYHGQD	LLFKDATVRA	VPVGEKTTYR	GWLGLDYVAA
701	LEGMSSQQCS	GAAAPAPGAP	LLPLLLPALA	ARLLPPAL	[SEQ ID NO:1]

图5A

置信度	序列	修饰	离子分数	Exp值	电荷	MH+ [Da]	$\Delta M$ [ppm]	RT [min]
高	AVSDYFGGScVPGAGETSYSESLcR	C10 (腺甲基化); C24 (腺甲基化)	105	3.32619E-09	2	2656.13091	0.68	18.42
高	ADTDGGLIFR		88	5.66332E-07	2	1064.53667	-0.46	16.92
高	IQAEQVDAVTLSGEDIYTAGK		83	2.68245E-06	2	2208.10503	0.86	18.53
高	clVENAGDVAFVR	C1 (腺甲基化)	73	2.18803E-05	2	1449.71599	0.30	17.53
高	EAGIQPSLLcVR	C10 (腺甲基化)	72	1.893E-05	2	1342.71526	0.33	17.87
高	EAGIQPSLLcVR	Q5 (酰胺基); C10 (腺甲基化)	72	2.09047E-05	2	1343.69927	0.32	18.46
高	TVGWNVPVGYLVESGR		64	0.000214885	2	1732.90276	0.57	21.54
高	TVGWNVPVGYLVESGR	N5 (酰胺基)	61	0.00037243	2	1733.88884	1.76	22.34
高	clAEGAGDVAFVKHSTVLENTDgk	C1 (腺甲基化)	59	0.000716311	3	2518.22568	0.53	15.87
高	GTSADHcVQLIAAQEADAITLDGGAIY	C7 (腺甲基化)	50	0.006393688	3	3145.50913	-0.53	22.11
高	HSTVLENTDgk		49	0.002664503	2	1200.58537	-0.15	8.94
高	SSHVTIDTLKGVK		47	0.005004121	2	1384.77959	0.06	12.56
高	SEYELLCPhGAR	C8 (腺甲基化)	44	0.007060764	2	1523.67925	-0.20	16.38
高	clAEGAGDVAFVK	C1 (腺甲基化)	43	0.015618173	2	1336.65764	0.74	17.35
高	NYPSSLCALcVGDEQGR	C7 (腺甲基化); C10 (腺甲基化)	42	0.011117546	2	1925.85039	1.19	17.48
高	DSSHAFTLDELr		40	0.02400093	2	1390.65923	-0.41	17.41
高	LFSHEGSSFQmFSSEAYGQK	M11 (氧化)	34	0.067830844	3	2283.00125	-0.48	16.73
高	EHGLKPVVGEVYDQEVGTSYAVAVVr		18	9.497357658	3	2964.48630	-8.09	20.83
中	VPAHAVVr		37	0.016034535	2	947.57823	-0.35	9.83
中	YYDYSGAFr		32	0.058131104	2	1141.49529	0.33	16.02
低	ADVTEWR		42	0.014791458	2	876.42088	-0.19	13.46
低	SSHVTIDTLK		45	0.008209964	2	1100.59307	-1.44	12.00
低	GTSADHcVQLIAAQEADAITLDGGAIY	C7 (腺甲基化); Q14 (酰胺基)	13	30.54462867	3	3146.51181	5.41	21.09
低	RSSHVTIDTLK		21	2.359482024	3	1256.69629	0.41	10.68
低	clAEGAGDVAFVK	C1 (丙酰胺); C1 (腺甲基化)	49	0.004630097	2	1350.67266	-42216.82	17.34
低	RDSSHAFTLDELr		18	7.055056021	3	1546.75998	-0.60	15.58
低	GDSSGEGVcDKSPLER	C9 (腺甲基化)	26	0.349899255	2	1692.75029	0.50	11.53
低	GLLcDPNR	C4 (腺甲基化)	17	2.628224465	2	944.46153	-0.36	13.06
低	SEYELLCPhGAR	C8 (腺甲基化); N10 (酰胺基)	12	7.790573694	2	1524.66240	-0.76	16.62
低	AVSDYFGGScVPGAGETSYSESLcR	C10 (腺甲基化); C24 (丙酰胺)	32	0.094002039	2	2670.14946	-21353.40	19.02
低	GTSADHcVQLIAAQEADAITLDGGAIY	C7 (丙酰胺); C7 (腺甲基化)	11	56.65840641	3	3159.52512	-18047.90	26.07
低	GDSSGEGVcDKSPLER	C9 (丙酰胺); C9 (腺甲基化)	35	0.066541439	3	1706.76413	-33409.67	12.28
低	LKPEIQcVSAK	C7 (腺甲基化)	12	25.47451421	2	1272.69792	-0.13	11.81

图5B

## 条带 3 (~3-5 kDa)

1 MRGPSGALWL LLALRTVLGG MEVRWCATSD PEQHKCGNMS EAFREAGIQP  
 51 SLLCVRGTSA DHCVQLIAAQ EADAITLDGG AIYEAGKEHG LKPVVGEVYD  
 101 QEVGTSYYAV AVVRRSSHVT IDTLKGVKSC HTGINRTVGV NVPVGYLVES  
 151 GRLSVMGCDV LKAVSDYFGG SCVPGAGETS YSESLCRLCR GDSSGEGVCD  
 201 KSPLERYDYD SGAFRCCLAE AGDVAFVKHS TVLENTDGKT LPSWGQALLS  
 251 QDFELLCRDG SRADVTEWRQ CHLARVPAHA VVVRADTDGG LIFRLLNEGQ  
 301 RLFSHEGSSF QMFSSEAYGQ KDLLFKDSTS ELVPIATQTY EAWLGHEYLH  
 351 AMKGLLCDPN RLPPYLRWCV LSTPEIQKCG DMAVAFRQR LKPEIQCVSA  
 401 KSPQHCMERI QAEQVDAVTL SGEDIYTAGK KYGLVPAAGE HYAPEDSSNS  
 451 YYVVAVVRRD SSHAFTLDEL RGKRSCHAGF GSPAGWDVPV GALIQRGFIR  
 501 PKDCDVLTAV SEFFNASCVP VNNPKNYPSS LCALCVGDEQ GRNKCVGNSQ  
 551 ERYYG YRGAF RCLVENAGDV AFVRHTTVFD NTNGHNSEPW AAELRSEDYE  
 601 LLCPNGARAE VSQFAACNLA QIPPHAVMVR PDTNIFTVYG LLDKAQDLFG  
 651 DDHNKNGFKM FDSSNYHGQD LLFKDATVRA VPVGEKTTYR GWLGLDYVAA  
 701 LEGMSSQQCS GAAAPAPGAP LLPLLLPAL ARLLPAL [SEQ ID NO:1]

图6A

置信度	序列	修饰	离子分数	Exp值	电荷	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	RT [min]
高	EHGLKPWGEVYDQEVGTSYYAVAVF		92	3.98408E-07	3	2964.51340	1.06	18.72
高	ADTDGGLIFR		80	3.43802E-06	2	1064.53630	-0.81	17.05
高	IQAEQVDAVTLSGEDIYTAGK		77	1.11566E-05	2	2208.10503	0.86	18.53
高	cLAEGAGDVAFVK	C1 (腺甲基化)	69	4.64898E-05	2	1336.65679	0.11	16.37
高	AQDLFGDDHINK		54	0.000515661	2	1259.56474	-0.33	12.27
高	LKPEIQcVSAK	C7 (腺甲基化)	46	0.011480148	2	1272.69829	0.15	11.78
高	DSSHAFTLDEL		45	0.00851981	3	1390.65900	-0.57	17.45
高	YYDYSGAFR		42	0.005301934	2	1141.49443	-0.42	16.22
高	WcVLSTPEIQK	C2 (腺甲基化)	41	0.035667619	2	1360.69390	0.65	18.09
高	LKPEIQcVSAK	Q6 (脱酰胺基的); C7 (腺甲基化)	40	0.045361318	2	1273.68242	0.24	12.30
高	GTSADHcVQLIAAQEADAITLDGGAYF	C7 (腺甲基化)	16	15.05040921	3	3145.51242	0.52	22.45
中	mFDSSNYHGQDLLFK	M1 (氧化)	13	10.33638211	3	1817.81614	-0.13	17.30
低	SEDYELLcPNGAR	C8 (腺甲基化)	43	0.008580171	2	1523.68059	0.69	16.37
低	AqDLFGDDHINK	Q2 (脱酰胺基的)	20	0.820984659	3	1260.54947	0.23	12.97
低	LFSHEGSSFQmFSSEAYGQK	M11 (氧化)	16	5.227925584	3	2283.00437	0.88	16.79
低	RDSSHAFTLDEL		20	3.778030027	3	1546.76053	-0.25	15.62
低	GLLcDPNLR	C4 (腺甲基化)	28	0.21544481	2	944.46129	-0.62	13.00
低	GLLcDPNRLPPYLR	C4 (腺甲基化)	19	4.54838221	3	1683.89920	-0.47	18.45
低	LKPEIQcVSAK	C7 (丙酰胺); C7 (腺甲基化)	14	13.9717555	2	1286.71367	-44315.64	12.39

图6B

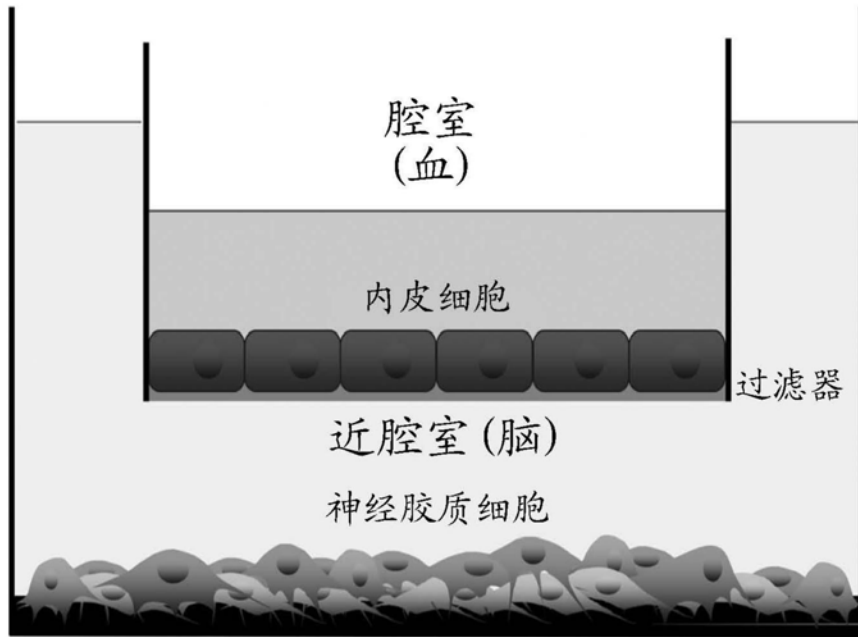


图7

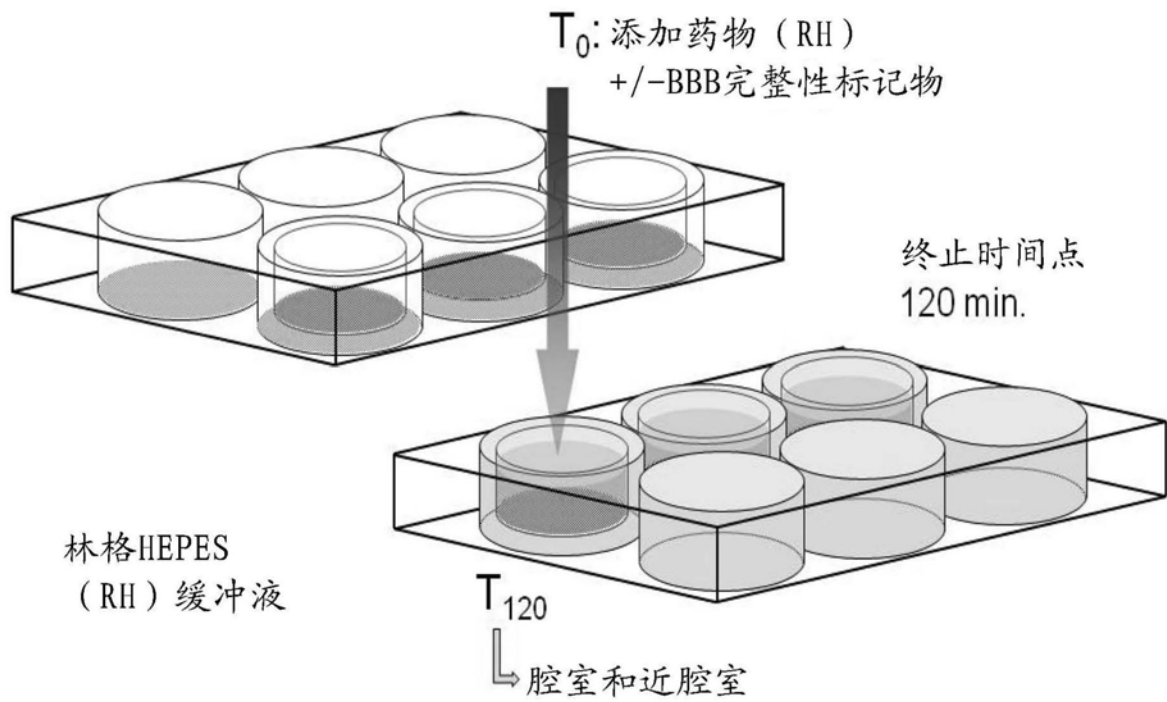


图8

AA: GMEVRWCATSDPEQHKCGNMSEAFREAGIQPSLLCVRGTSADHCVQLIAAQEADAITLDG  
 Pred: -EEEEEEEE-HHHHHHHHHHHHHHHHHHH---EEEEEE---HHHHHHHHH---EEEE-H

AA: GAIYEAGKEHGLKPVVGEVYDQEVGTSYYAVAVVRRSSHVTIDTLKGVKSCHTGINRTVG  
 Pred: HHHHHH-----EEEEEEEE-----EEEEEEEEEE-----HHH-----

AA: WNVPVGYLVESGRLVSVMGCDVLKAVSDYFGGSCVPGAGETSYSESLCRLCRGDSSGEGVC  
 Pred: EEEHHHHHHH-----HHHHHHHHHHH-----HHHHHH-----

AA: DKSPLERYDYSGAFRCLAEGAGDVAFVKHSTVLENTDGKTLPSWGGQALLSQDFELLCRD  
 Pred: -----HHHHHHHH---EEEEEE-----HHHHHH---

AA: GSRADVTEWRQCHLARVPAHAVVVRADTDGGLIFRLLNEGQRLFSHEGSSFMFSSEAYG  
 Pred: -----EEEE--EEEE--HHHHHHHHHHHHHHHH-----HHH-

AA: QKDLLFKDSTSELVPIATQTYEAWLGHEYLHAMKGLLCDPNRLPPYLRWCVLSTPEIQKC  
 Pred: --EEEE-----HHHHHHHHHHHHHH-----EEEEEE--HHHHHH

AA: GDMAVAFRRRLKPEIQCVSAKSPQHCMERIQAEQVDAVTLGEDIYTAGKTYGLVPAAG  
 Pred: HHHHHHHHH---EEEEEE---HHHHHHHHH---EEEEEE-HHHHHHHHHH---EEEE

AA: EHYAPEDSSNSYYVAVVRRDSSHAFTLDELRGKRSCHAGFGSPAGWDVPVGALIQRFI  
 Pred: EE-----EEEEEEEE-----HHH---EEE-----EEEE-HHHHH---

AA: RPKDCDVLTAVEFFNASCVPVNNPKNYSSLCALCVGDEQGRNKCVGNSQERYYGYRGA  
 Pred: -----EEEE-----HHHHHH-----H

AA: FRCLVENAGDVAFVRHTTVFDNTNGHNSPWAAELRSEDYELLCPNGARAEVSQFAACNL  
 Pred: HHHHH---EEEEEE--HHHH---HHHHHH---EEEEEE-----EE

AA: AQIPHAVMVRPDTNIFTVYGLLDKAQDLFGDDHNKNGFKMFDSSNYHGQDLLFKDATVR  
 Pred: EEE--EEEE--HHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEE--EE

AA: AVPVGEKTTYRGWLGLDYVAALEGMSSQQC  
 Pred: EEEE-----HHHH--HHHHHHHHHHHH---

**粗体: N端小叶**  
 正常: C端小叶  
 加下划线的: 胰蛋白酶消化形成的肽  
 AA: 靶标序列  
 Pred: (H)=螺旋, (E)=链, (-)=卷曲

图9A

AA: GMEVRCWCATSDPEQHKCGNMSEAFREAGIQPSLLCVRGTSADHCVQLIAAQEADAITLDG  
 Pred: -EEEEEEEE-HHHHHHHHHHHHHHHHHH---EEEEEE---HHHHHHHHH----EEEE-H

AA: GAIYEAGKEHGLKPVVGEVYDQEVGTSYYAVAVVRRSSHVITIDTLKGVKSCHTGINRTVG  
 Pred: HHHHHH-----EEEEEEEE-----EEEEEEEEEE-----HHH-----

AA: WNVVPGYLVESGRLSVMGCDVLKAVSDYFGGSCVPGAGETSYSSELCRLCRGDSSGEGVC  
 Pred: EEEEEHHHHHH-----HHHHHHHHHH-----HHHHHH-----

AA: DKSPLERYDYSGAFRCLAEGAGDVAFVKHSTVLENTDGTLPWSWGQALLSQDFELLCRD  
 Pred: -----HHHHHHHH---EEEEEE-----HHHHHH----

AA: GSRADVTEWRQCHLARVPAHAVVVRADTDGGLIFRLLNEGQRLFSHEGSSFQMFSEAYG  
 Pred: -----EEEE---EEEE---HHHHHHHHHHHHHHHH-----HHH-

AA: QKDLDFKDSSELVPIATQTYEAWLGHEYLHAMKGLLCDPNRLPPYLRWCVLSTPEIQKC  
 Pred: ---EEEE-----HHHHHHHHHHHHHH-----EEEEEE---HHHHHH

AA: GDMAVAFRRQRLKPEIQCVSAKSPQHCMERIQAEQVDAVTLGEDIYTAGKTYGLVPAAG  
 Pred: HHHHHHHHH-----EEEEEE---HHHHHHHHHH---EEEEEE-HHHHHHHHHHH---EEEEEE

AA: EHYAPEDSSNSYVAVVRRDSSHAFTLDELRGKRSCHAGFGSPAGWDVPVPGALIQRFI  
 Pred: EE-----EEEEEEEE-----HHH---EE-----EEEE-HHHHH----

AA: RPKDCDVLTAVERSEFNASCVPVNNPKNYPSLICALCVGDEQGRNKCVCNSQERYGYRGA  
 Pred: -----EEEE-----HHHHHH-----H

AA: FRCLVENAGDVAFVRHTTVFDNTNGHNSPWAALRSEDEYELLPNGARAEVSOFAACNL  
 Pred: HHHHH-----EEEEEE---HHHH-----HHHHHH-----EEEEEE-----EE

AA: AQIPPHAVM VRPDNIIFTVYGLDKAQDLFGDDHNKNGFKMFDSSNYHGQDLLFKDATVR  
 Pred: EEE---EEEEEE---HHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEEEE---EE

AA: AVPVGEKTTYRGWLGLDYVAALGEMSSQQC  
 Pred: EEEE-----HHHH--HHHHHHHHHHHHHH----

**粗体:N端小叶**  
 正常:C端小叶  
 加下划线的: CNBr消化形成的大片段  
 AA: 靶标序列  
 Pred: (H)=螺旋, (E)=链, (-)=卷曲

图9B

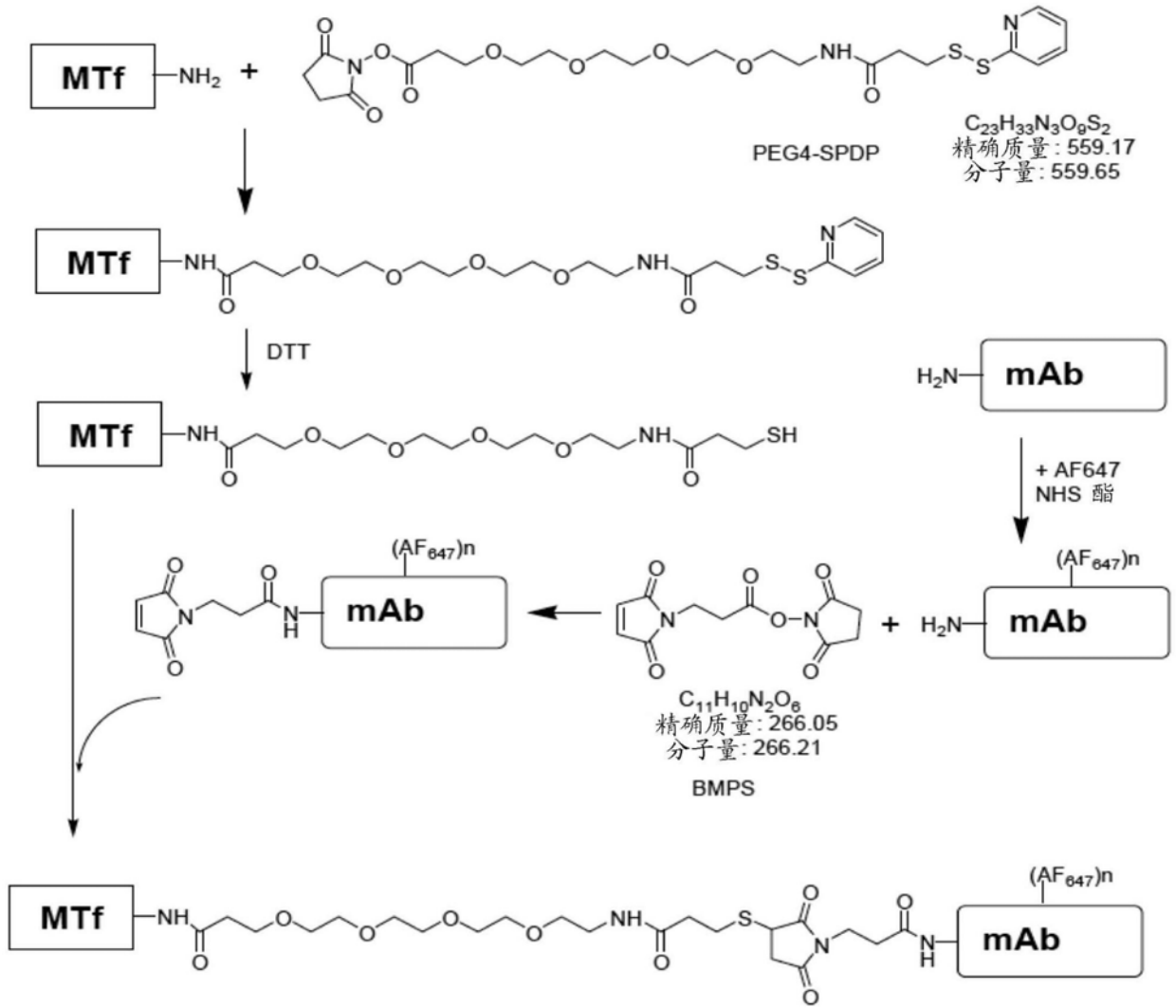


图10

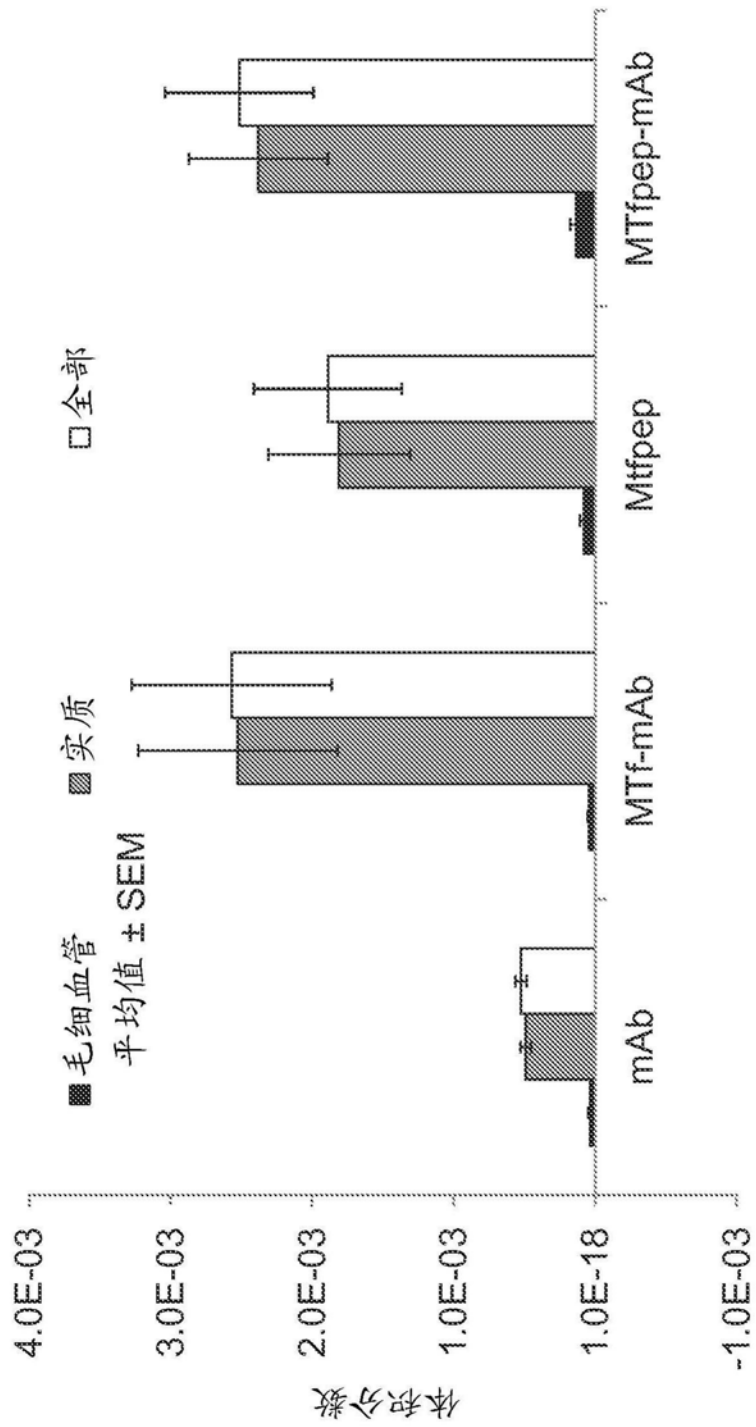


图11

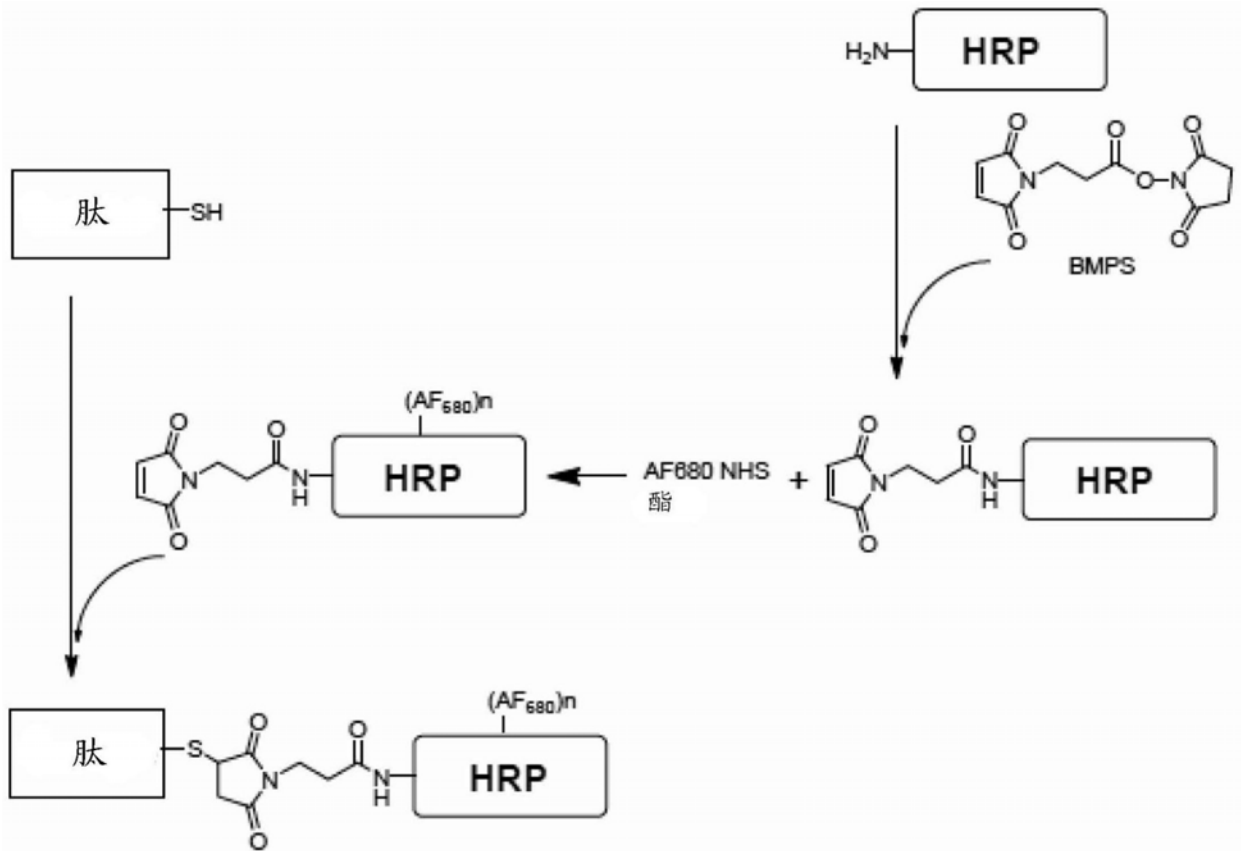


图12

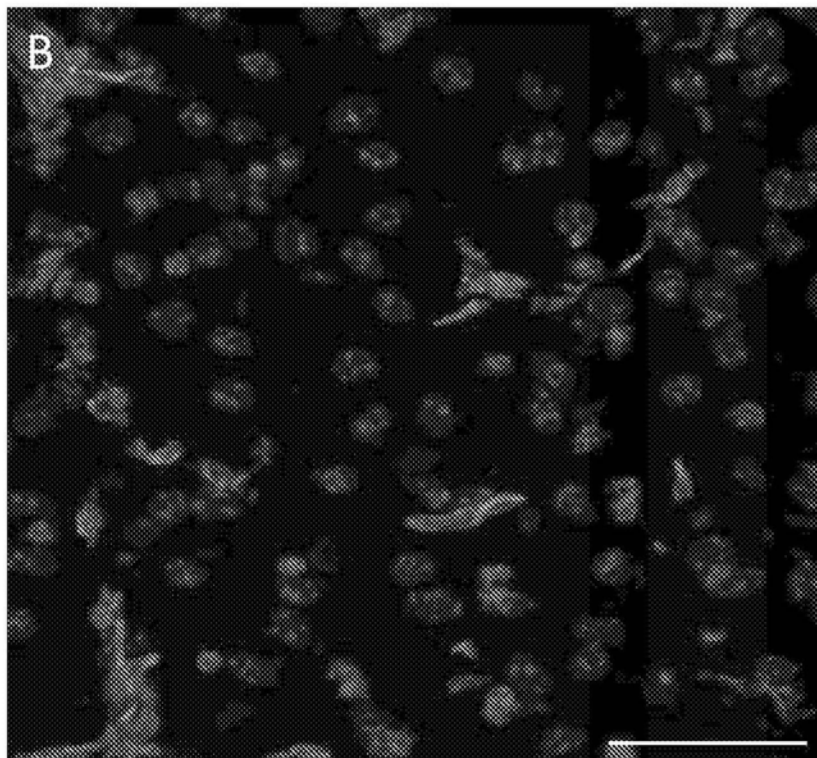
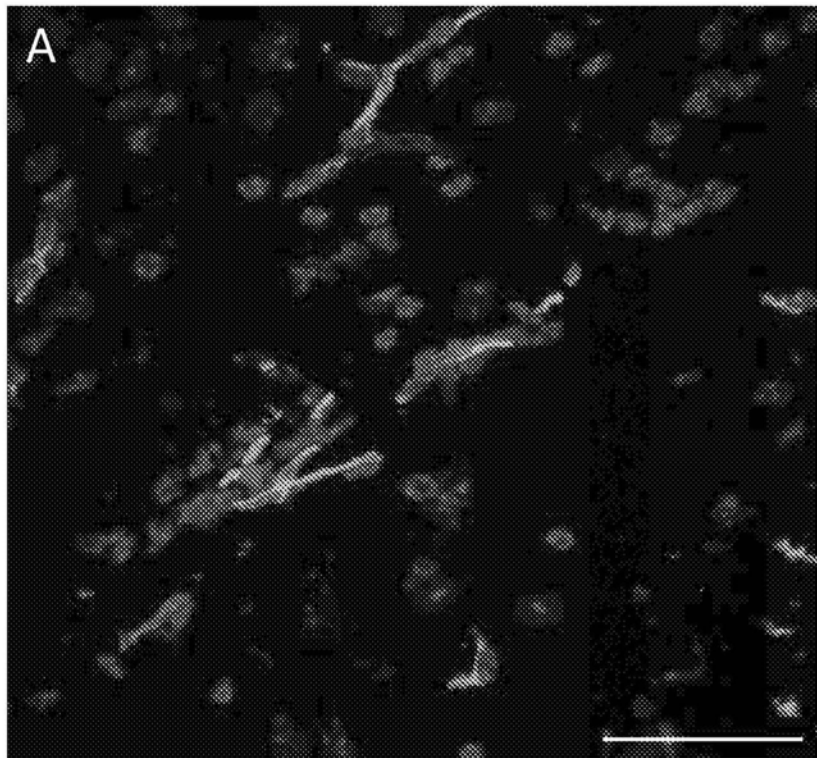


图13

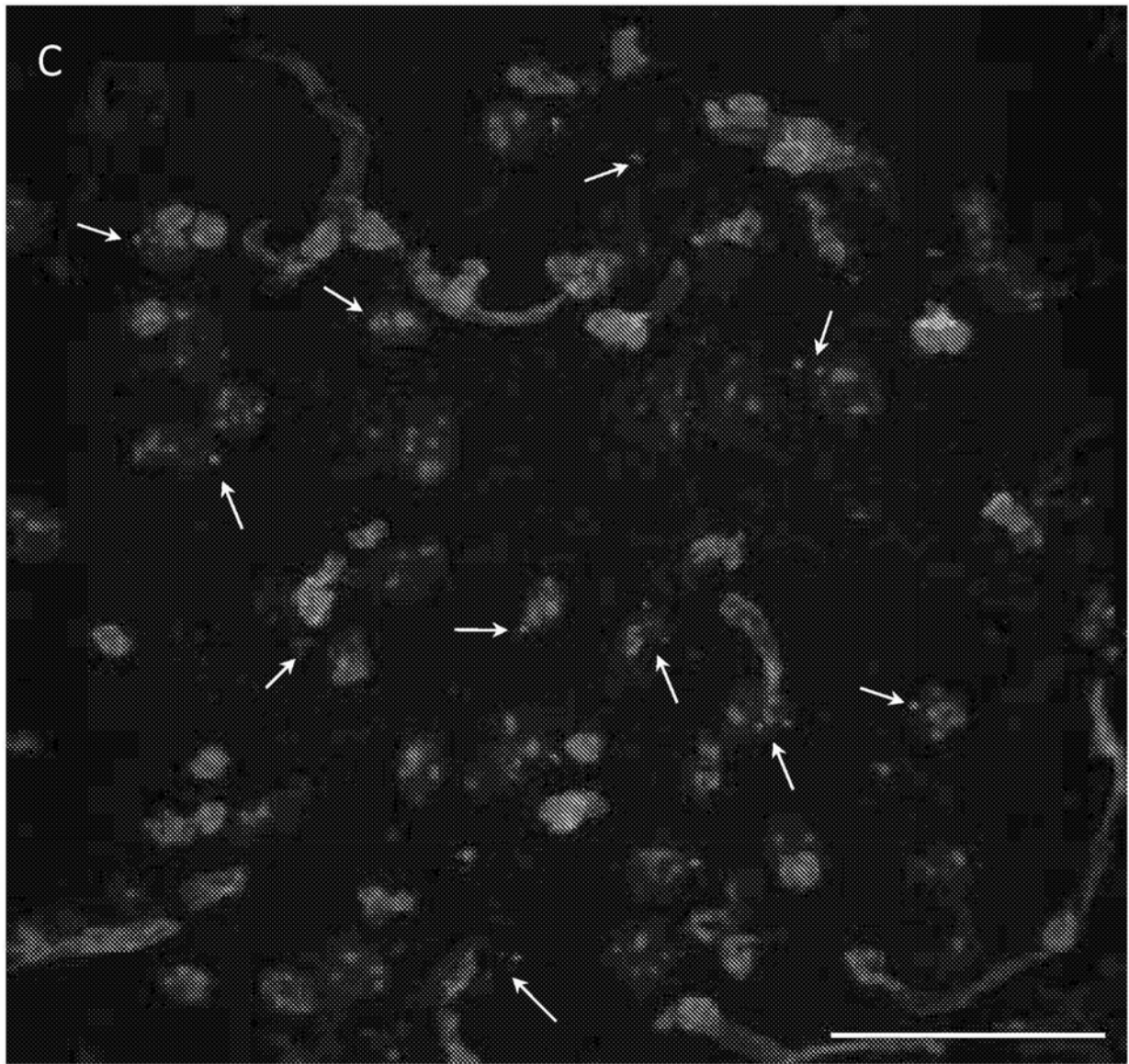


图13