

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680041301.2

[51] Int. Cl.

C07K 7/04 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/14 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 10 月 14 日

[11] 公开号 CN 101558080A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 38/08 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

[22] 申请日 2006.11.13

[21] 申请号 200680041301.2

[30] 优先权

[32] 2005.11.10 [33] US [31] 60/735,472

[86] 国际申请 PCT/US2006/043921 2006.11.13

[87] 国际公布 WO2007/059000 英 2007.5.24

[85] 进入国家阶段日期 2008.5.5

[71] 申请人 罗斯坎普研究有限责任公司

地址 美国佛罗里达州

[72] 发明人 D·帕里斯 M·J·穆兰

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘冬 黄可峻

权利要求书 4 页 说明书 53 页 附图 16 页

[54] 发明名称

A β 肽片段对血管生成的调节

[57] 摘要

本发明提供用于抑制血管生成的 A β 肽片段。
本发明还提供通过给予有效量的 A β 片段，用于治疗病理性或不需要的血管生成及其相关病症和疾病的方法。在一个具体的实施方案中，肽片段包括序列 HHQKLVFF。

1. 一种抗血管生成 A β 肽片段或其变异体或同源物, 其中所述片段的长度介于 8 和 39 个氨基酸之间。

2. 权利要求 1 的抗血管生成 A β 肽片段, 其中所述片段的长度为 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 或 39 个氨基酸。

3. 权利要求 1 的抗血管生成 A β 肽片段, 其中所述片段是 A β_{1-28} 、A β_{10-35} 、A β_{12-28} 或 A β_{13-20} 。

4. 权利要求 3 的抗血管生成 A β 肽片段, 其中所述片段是 A β_{12-28} 。

5. 权利要求 1 的抗血管生成 A β 肽片段, 其中所述片段是 A β_{13-20} 。

6. 权利要求 5 的抗血管生成 A β 肽片段, 其中所述 A β_{12-28} 片段包含氨基酸序列 HHQKLVFF 或其变异体或同源物。

7. 权利要求 5 的抗血管生成 A β 肽片段, 其中所述 A β_{13-20} 肽片段是氨基酸序列 HHQKLVFF 或其变异体或同源物。

8. 权利要求 1 的抗血管生成 A β 肽片段, 其中所述变异体或同源物具有与天然 A β 肽片段约 80.0%至约 99.9%的氨基酸同一性。

9. 权利要求 1 的抗血管生成 A β 肽片段, 其中所述片段是含有至少一个氨基酸置换的变异体。

10. 权利要求 9 的抗血管生成 A β 肽片段, 其中所述氨基酸置换是非天然氨基酸或氨基酸类似物。

11. 权利要求 1 的抗血管生成 A β 肽片段, 还另包含接头。

12. 权利要求 1 的抗血管生成 A β 肽片段, 其中所述片段与第二肽或蛋白质连接。

13. 一种药物组合物, 所述组合物包含权利要求 1 的抗血管生成 A β 肽片段和药学上可接受的载体。

14. 权利要求 13 的药物组合物, 其中所述药物组合物是控释剂

型。

15. 权利要求 14 的药物组合物,其中所述控释剂型是聚合物骨架片。

16. 一种治疗由病理性血管生成介导的疾病或病症的方法,该方法包括给予有需要的受治疗者有效量的生物活性 A β 肽片段或其变异体或同源物,其中所述片段的长度介于 8 和 39 个氨基酸之间。

17. 权利要求 16 的方法,其中所述片段的长度为 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 或 39 个氨基酸。

18. 权利要求 16 的方法,其中所述片段是 A β ₁₋₂₈。

19. 权利要求 16 的方法,其中所述片段是 A β ₁₀₋₃₅。

20. 权利要求 16 的方法,其中所述片段是 A β ₁₂₋₂₈。

21. 权利要求 16 的方法,其中所述片段是 A β ₁₃₋₂₀。

22. 权利要求 16 的方法,其中所述片段是氨基酸序列 HHQKLVFF 或其变异体或同源物。

23. 权利要求 16 的方法,其中所述疾病或病症是癌症。

24. 权利要求 16 的方法,其中所述疾病或病症是增殖性疾病。

25. 权利要求 16 的方法,其中所述疾病或病症是炎性疾病。

26. 权利要求 16 的方法,其中所述受治疗者是哺乳动物。

27. 权利要求 16 的方法,其中所述受治疗者是人。

28. 权利要求 16 的方法,其中所述生物活性 A β 肽片段通过选自以下的途径给予:口服、胃肠外、静脉内、动脉内、肺部、黏膜、局部、经皮、皮下、肌内、直肠、颅内、脑室内、大脑内、阴道内、子宫内、鞘内或腹膜内给药。

29. 权利要求 16 的方法,其中所述生物活性 A β 肽片段与药学上可接受的载体联合给予受治疗者。

30. 权利要求 16 的方法,其中所述 A β 肽片段是以控释剂型给予受治疗者。

31. 权利要求 16 的方法, 其中所述控释剂型包括聚合物骨架片。

32. 权利要求 16 的方法, 该方法还包括一种或多种另外的治疗药与生物活性 A β 肽片段联合或交替给药。

33. 权利要求 32 的方法, 其中所述另外的治疗药是化疗药物。

34. 权利要求 16 的方法, 其中所述 A β 肽片段作为融合肽给予患者。

35. 一种治疗癌症的方法, 该方法包括给予有需要的受治疗者有效量的生物活性 A β 肽片段或其变异体或同源物, 其中所述片段的长度介于 8 和 39 个氨基酸之间。

36. 权利要求 35 的方法, 其中所述片段的长度为 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 或 39 个氨基酸。

37. 权利要求的 35 方法, 其中所述片段选自 A β_{1-28} 、A β_{10-35} 、A β_{12-28} 和 A β_{13-20} 。

38. 权利要求 37 的方法, 其中所述片段是 A β_{13-20} 。

39. 权利要求 38 的方法, 其中所述 A β_{13-20} 肽片段是氨基酸序列 HHQKLVFF 或其变异体或同源物。

40. 权利要求 35 的方法, 其中所述癌症选自肺癌、乳腺癌、前列腺癌、子宫癌、结肠癌和非霍金奇淋巴瘤。

41. 权利要求 35 的方法, 其中所述受治疗者是哺乳动物。

42. 权利要求 35 的方法, 其中所述受治疗者是人。

43. 权利要求 35 的方法, 该方法还包括给予一种或多种另外的治疗药。

44. 权利要求 43 的方法, 其中所述另外的治疗药是化疗药物。

45. 权利要求 44 的方法, 其中所述化疗药物选自烷化剂、亚硝基脲、抗代谢药、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂、皮质类固醇抑制剂。

49. 一种鉴定干预 A β 诱导的血管生成抑制的化合物的方法, 该

方法包括(a)使能够进行血管生成的第一生物样品与试验化合物、生物活性量的 A β 肽片段和血管生成药接触；和(b)测定发生在第一生物样品中血管生成的程度。

50. 权利要求 49 的方法，该方法还包括(c)单独使能够进行血管生成的第二生物样品与生物活性量的 A β 肽片段和血管生成药接触；(d)测定发生在第二生物样品中血管生成的程度和(e)将发生在第一生物样品中血管生成的程度与发生在第二生物样品中的血管生成的程度进行比较。

51. 抗血管生成 A β 肽片段或其变异体或同源物，任选与药学上可接受的载体一起在制备用于治疗病理性血管生成相关疾病或病症的药物中的用途，其中所述片段的长度介于 8 和 39 个氨基酸之间。

52. 权利要求 51 的用途，其中所述片段是包含氨基酸序列 HHQKLVFF 的 A β_{1-28} 片段或其变异体或同源物。

53. 权利要求 51 的用途，其中所述肽片段具有氨基酸序列 HHQKLVFF 或其变异体或同源物。

54. 权利要求 51 的用途，其中所述药学上可接受的载体适于：口服、胃肠外、静脉内、动脉内、肺部、黏膜、局部、经皮、皮下、肌肉内、直肠、颅内、脑室内、大脑内、阴道内、子宫内、鞘内或腹膜内给药。

A β 肽片段对血管生成的调节

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求 2005 年 11 月 10 日申请的美国临时申请号 60/735,472 的权益，其内容通过引用结合到本文中。

发明领域

[0002] 本发明涉及用于治疗由病理性血管生成介导的疾病和病理病症或过程的组合物和方法，该方法包括给予受累于这些疾病、病症或过程的患者全长 A β 肽的生物活性片段。

相关领域描述

[0003] 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是西方国家老年性痴呆的主要原因，以胞内神经原纤维缠结的进行性累积、胞外实质老年斑和脑血管沉积物为特征(Sissodia 等, F.A.S.E.B. J. 9:366-370 (1995))。老年斑和脑血管沉积物的主要成分是 β -淀粉样肽,是由 39-43 个氨基酸残基 A β 肽组成的聚合形式,由淀粉样前体蛋白(APP)蛋白水解后产生(Naidu 等, 1995 J. Biol. Chem. 270:1369-1374; Gorevic 等, 1986 J. Neuropathol. Exp. Neurol. 45, 647-64; Selkoe 等, 1986 J. Neurochem. 46, 1820-34)。老年斑的主要蛋白质成分是 β /A4 淀粉样蛋白,是一种 42-43 个氨基酸的肽。

[0004] 伴有脑淀粉样蛋白血管病(CAA)的血管病理是晚期 AD 病例的标准,脑淀粉样蛋白血管病是在尸体解剖时观察到的一种最普遍的异常情况(Ellis 等, Neurology 46:1592-1596 (1996))。某些血管病变,例如影响脑内皮和室周白质病变的微血管变性,在大多数 AD 病例中清晰可见(Ellis 等, Neurology 46:1592-1596 (1996); Kalaria, Ann. N.Y. Acad. Sci. 893:113-125 (1999))。此外,在 AD 脑微血管和毛细血

管中观察到形态变化;具体地说,末端小血管通常具有局灶性收缩及具有不规则形状和排列的平滑肌细胞(Hashimura 等, *Jpn. J. Psychiatry Neurol.* 45:661-665 (1991))。AD 脑的毛细血管通常显示出具有不规则收缩的异常的管腔表面(abluminal surface),并沿其管道扩张(Kimura 等, *Jpn. J. Psychiatry Neurol.* 45:671-676 (1991))。包括正电子发射断层扫描(PET)和单光子发射计算机断层扫描(SPECT)的功能成像技术揭示,在符合 AD 临床标准之前个体存在血液灌注不足,表明血管畸形发生在疾病过程的早期(Nagata 等, *Neurobiology of Aging* 21:301-307 (2000); Johnson 等, *Neurobiology of Aging* 21:289-292 (2000))。在包括脑血管损伤(例如创伤性脑损伤、脑卒中和脑动静脉畸形)的其它疾病中,血管生成是主要的反应(Mendis 等, *Neurochem. Res.* 23:1117-23 (1998); Slevin 等, *Stroke* 31:1863-70 (2000); Hashimoto 等, *Circ. Res.* 89:111-3 (2001))。已知有关 AD 脑内脑血管损伤多血症的报道,预期会引起血管生成修复反应,尽管在这一领域中的研究甚少。

[0005] 已经开发出几种测定法以研究参与血管生成过程(粘附、迁移、生长、侵袭和分化)的具体步骤。了解 A β 对血管生成的作用,可能对了解其在 AD 中所观察到的微脑血管畸形中的作用具有价值。在 AD 脑内,已知 A β 肽在血管周围形成原纤维沉积物,引起脑淀粉样蛋白血管病(CAA) (Pardridge 等, 1987 *J. Neurochem.* 49, 1394-401; Jellinger K.A., Attems J. 2005 *J. Neurol. Sci.* 229-230, 37-41)。在 AD 脑内可溶性和沉积性 A β 水平的增加可能引起血管损伤、炎症/神经胶质增生,减少脑血流量(Paris 等, 2000 *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 903, 97-109; Johnson 等, 2005 *Radiology.* 234, 851-9)。多项研究表明,血管功能削弱和血流量减少是 AD 脑特有的特征(Nicoll 等, 2004 *Neurobiol. Aging.* 25, 589-97 和 603-4; Paris 等, 2004 *Brain Res.* 999, 53-61; Beckmann 等, 2003 *J. Neurosci.* 23, 8453-9; Farkasm 等, 2001 “Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease (衰老和阿尔茨海默病的脑微血管病理)”, *Prog. Neurobiol.* 64, 575-611)。最近,有研

究表明 AD 中血管生成削弱, 这与参与血管分化的基因改变有关(Wu 等, 2005 Nat. Med. 11, 959-65)。已知在 AD 转基因小鼠模型中, 脑毛细血管密度降低(Paris 等, 2004 Neurosci. Lett. 360, 80-5; Lee 等, 2005 Brain Res. Bull. 65, 317-22)。从 TgAPPsw 小鼠脑获取的内皮细胞和动脉外植体中, 在重建的基底膜上, 毛细血管样结构形成削弱, 表明在 TgAPPsw 小鼠中血管生成反应的异常变化得到最新的证实(Paris 等, 2004 Neurosci. Lett. 360, 80-5)。

[0006] Paris 等人的美国专利公布号 2003/0077261 公开了 A β 肽可以用作抗血管生成药, 而且公开了 A β 肽和 APP 的序列以及编码它们的核酸序列, 这些序列见图 10 所附序列表。

[0007] 在多项不同的体外和体内测定中, 血管生成均被 A β 肽抑制(Paris 等, 2004 Angiogenesis. 7, 75-85)。在体外, 人脑微血管内皮细胞接种至基质胶(Matrigel)时, A β_{1-40} 和 A β_{1-42} 可以剂量依赖性地抑制毛细血管形成, 在高剂量时可促使毛细血管变性。还发现全长 A β 肽的突变型(包括 1 或 2 个氨基酸置换), 是有生物活性的抗血管生成药。然而, 低剂量时, A β 似乎是促血管生成的(Paris 等, 2004 Angiogenesis. 7, 75-85; Cantara 等, 2004 F.A.S.E.B. J. 18, 1943-5)。

发明概述

[0008] 我们预料不到地发现, 全长 A β 肽的生物活性片段可用作抗血管生成药。这些抗血管生成 A β 肽片段可用来治疗由不需要和/或不受控制的血管生成介导的病理病症(称为“血管生成性疾病”), 如本文将进一步描述一样。

[0009] 因此, 第一方面, 本发明提供多种抗血管生成 A β 肽片段以及包含一种或多种该类片段的组合物。在一个实施方案中, 生物活性 A β 肽片段的长度可为 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 或 39 个氨基酸。

[0010] 在一个具体的实施方案中，抗血管生成 $A\beta$ 肽片段是 $A\beta_{1-28}$ 肽片段、 $A\beta_{10-35}$ 肽片段、 $A\beta_{12-28}$ 肽片段、 $A\beta_{13-20}$ 肽片段或其其它生物活性片段或变异体或同源物。

[0011] 在一个具体的实施方案中，抗血管生成 $A\beta$ 肽片段是 $A\beta_{12-28}$ ，含有氨基酸序列 HHQKLVFF 或其生物活性片段、变异体或同源物。

[0012] 在另一个具体的实施方案中，抗血管生成 $A\beta$ 肽片段是 $A\beta_{13-20}$ 或氨基酸序列 HHGKLVFF 或其生物活性变异体或同源物。变异体可以包括例如氨基酸置换。

[0013] 在另一个实施方案中，本发明是包含抗血管生成 $A\beta$ 肽片段和一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的药物组合物。

[0014] 第二方面，本发明提供通过给予有需要的受治疗者有效量的生物活性 $A\beta$ 肽片段，用于治疗由病理性血管生成介导的疾病或病症的方法，其中所述片段的长度介于 8 和 39 个氨基酸之间。抗血管生成 $A\beta$ 肽片段任选与一种或多种治疗药物联合或交替给药。受治疗者可以是例如哺乳动物(例如人)。

[0015] 在一个实施方案中，本发明是通过给予有需要的受治疗者有效量的生物活性 $A\beta$ 肽片段用于治疗癌症的方法，任选与一种或多种化疗药物联合或交替给药。

[0016] 在一个具体的实施方案中，本发明是通过给予有需要的受治疗者有效量的 $A\beta_{12-38}$ 肽片段治疗癌症的方法，所述肽片段含有氨基酸序列 HHQKLVFF 或其生物活性片段、变异体或同源物。

[0017] 在另一个具体的实施方案中，治疗癌症的方法包括给予有需要的受治疗者有效量的 $A\beta_{13-20}$ 肽片段或氨基酸序列 HHQKLVFF 或其生物活性变异体或同源物。

[0018] 可以通过任何合适的方式给予生物活性 $A\beta$ 肽片段，该方式包括但不限于口服、胃肠外、静脉内、动脉内、肺部、黏膜、局

部、经皮、皮下、肌内、鞘内或腹膜内给药。

[0019] 本发明第三方面提供诊断方法和用于检测和测定生物体液和组织中抗血管生成 A β 肽片段活性的试剂盒。

[0020] 本发明第四方面提供诊断方法和筛选化合物的试剂盒，所述化合物通过干预 A β 肽片段的抗血管生成作用，在治疗阿尔茨海默病中是有效的治疗药。

[0021] 本发明另一方面是肽片段在……中的用途

附图简述

[0022] 图 1 是毛细血管总长度的曲线图，用剂量为 0 μ M、1 μ M、5 μ M 和 10 μ M 的实施例 8 所述的各种 A β 肽片段占对照治疗的百分比表示。

[0023] 图 2A 和图 2B 是 HUVEC 样品细胞增殖和细胞粘附的直方图，用与实施例 9 所述的各种 A β 肽片段孵育后占对照的百分比表示。

[0024] 图 3 是毛细血管总长度的直方图，用实施例 10 所述的肝素(0.5mg/ml 或 1mg/ml)、A β_{1-42} 肽、A β + 肝素(500 μ g/ml)和 A β + 肝素(1mg/ml)治疗占对照治疗的百分比表示。

[0025] 图 4 是毛细血管总长度的曲线图，用剂量为 0 μ M、1 μ M、5 μ M 和 10 μ M 的实施例 11 所述的 A β_{1-28} 、A β_{1-28} GGQGL 和 A β_{1-28} AAQAL 占对照治疗的百分比表示。

[0026] 图 5 是与实施例 11 所述的 A β 肽片段孵育后形成的毛细血管照片(放大 4 倍)。

[0027] 图 6 是毛细血管总长度的曲线图，用剂量为 0 μ M、1 μ M、5 μ M 和 10 μ M 的实施例 12 所述肽 HHHQKL VFF、VHHQKL VII 和 VHHQKL VKK 占对照治疗的百分比表示。

[0028] 图 7 是响应实施例 13 所述的 200ng VEGF、VEGF + 0.5 μ g A β_{12-28} 、VEGF + 2.5 μ g A β_{12-28} 和 VEGF + 5.0 μ g A β_{12-28} 的大鼠角

膜微囊袋试验(corneal micropocket assay)中血管生成指数(AI)的直方图。

[0029] 图 8 是响应实施例 14 所述的 VEGF、5 μ g A β ₁₋₂₈ GGQGL 及 0.5 μ g、2.5 μ g 和 5 μ g A β ₁₂₋₂₈ 和 HHH-肽(HHHQKL VFF)的大鼠角膜微囊袋试验中血管生成指数(AI)的直方图。

[0030] 图 9 是按实施例 14 所述经 7 天孵育后大鼠角膜微囊袋的代表型照片, 包括 VEGF 对照和 0.5 μ g、2.5 μ g 和 5.0 μ g A β ₁₂₋₂₈。

[0031] 图 10 是 A β 肽和 APP 以及编码它们的核酸的序列表, 参见 Paris 等人的美国专利公布号 2003/0077261。

发明详述

[0032] 抗血管生成疗法是用于抑制肿瘤进程的颇有吸引力的方法, 因为肿瘤生长取决于足够的血液供给。本文公开了抑制血管生成的衍生自 A β 序列的短肽, 可用于抗癌疗法。

[0033] 本发明提供抗血管生成 A β 肽片段, 可用于治疗不需要和/或不受控制的血管生成或病理性血管生成介导的病理病症。本文提供具体的抗血管生成基序(HHQLVFF), 可用于抗肿瘤疗法或抗血管生成疗法。

抗血管生成肽片段

[0034] 本发明提供抗血管生成 A β 肽片段, 用于治疗与病理或不需要的血管生成相关的病症或疾病。

[0035] 本文所用术语“A β 肽片段”是指全长 A β 肽的抗血管生成片段(例如 A β ₁₋₄₀、A β ₁₋₄₂、A β ₁₋₄₃), 包括 A β 肽片段变体、同源物(例如哺乳动物的直向同源物)和同等型(isoform), 除非另有说明。该术语还包括被一个或多个等同氨基酸或非天然氨基酸置换的片段。

[0036] 在一个实施方案中, A β 肽片段的氨基酸数比全长 A β 肽所得到的氨基酸总数少至少一个氨基酸。全长 A β 肽衍生自一种或多

种淀粉样前体蛋白(APP)同等型,即跨膜糖蛋白的蛋白酶解加工产物(Kang, J.等, Nature (Lond.). (1987) 325: 733-736)。39-43个氨基酸长的 $A\beta$ 肽氨基酸序列始于APP的胞外域,并延伸至跨膜区。APP被 β -分泌酶和 γ -分泌酶连续切割后形成 $A\beta$ 。在所有类型的AD斑块中都分别发现了 $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-43}$ 的形式,表明这些形式在AD病理中十分重要。

[0037] 在一个具体的实施方案中, $A\beta$ 肽片段的氨基酸数比全长 $A\beta_{1-40}$ 肽中存在的氨基酸总数少至少一个氨基酸。 $A\beta_{1-40}$ 肽片段由例如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或39个氨基酸组成。

[0038] 在另一个具体的实施方案中, $A\beta$ 肽片段的氨基酸数比全长 $A\beta_{1-42}$ 肽中存在的氨基酸总数少至少一个氨基酸。 $A\beta_{1-42}$ 片段由例如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或41个氨基酸组成。

[0039] 在另一个具体的实施方案中, $A\beta$ 肽片段的氨基酸数比全长 $A\beta_{1-43}$ 肽中存在的氨基酸总数少至少一个氨基酸。 $A\beta_{1-43}$ 片段由例如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、41或42个氨基酸组成。

[0040] 在一个实施方案中,片段由例如8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28个或更多个氨基酸残基组成,包括序列HHQKLVFF。

[0041] 在一个实施方案中,一种或多种以下的生物活性 $A\beta$ 肽片段可以用来治疗与不需要或病理性血管生成相关的疾病或病症: $A\beta_{1-28}$ 肽、 $A\beta_{10-35}$ 肽、 $A\beta_{12-28}$ 肽、 $A\beta_{13-20}$ 肽或其生物活性片段或变体。

[0042] 抗血管生成 $A\beta$ 肽片段优选含有HHQK蛋白聚糖结合区,因为无该序列的片段($A\beta_{25-35}$ 、 $A\beta_{17-28}$ 和 $A\beta_{34-42}$)没有活性,这表明

需要肝素结合基序 HHQK 来介导 A β 的抗血管生成活性。A β_{10-16} 片段是无活性的, 即使含有 HHQK 序列, 这表明 HHQK 蛋白聚糖结合基序不足以抑制血管生成, 需要其它相邻的残基。具体地说, 抑制血管生成还需要紧接 HHQK 域后的 LVFF 序列。因此, 优选的 A β 肽片段含有氨基酸序列 HHQKLVFF。

[0043] 在一个实施方案中, 片段由例如 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、25、36、37、38 个或更多个氨基酸残基组成并且包括序列 HHQKLVFF。该片段可能包括一个或多个(例如 2、3 或 4 个)等同氨基酸(例如包括非天然氨基酸)置换。

[0044] 在一个实施方案中, A β 肽片段是含有氨基酸序列 HHQKLVFF 的 A β_{12-28} 肽或其生物活性片段或变异体。

[0045] 在另一个实施方案中, A β 肽片段是 A β_{13-20} 肽片段或氨基酸序列 HHQKLVFF 或其生物活性片段或变异体。

[0046] 在另一个实施方案中, A β 肽片段是例如 10、20、30 或 40 个氨基酸的 A β 肽片段。

[0047] 肽片段可以通过例如化学合成法得到, 或者由宿主细胞重组产生。

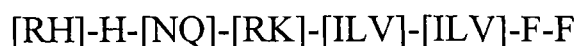
[0048] 同样地, 术语变异体和同源物也可互换使用。“变异”或“同源”肽片段应理解为是指相对于天然多肽序列, 含有修饰的多肽序列, 修饰例如至少一个氨基酸的缺失、添加或置换, 嵌合异源多肽的截短、延伸或添加。任选“变异”或“同源”肽片段可含有突变或翻译后修饰。

[0049] 在“变异”或“同源”多肽或肽片段中, 优选为其氨基酸序列与天然多肽序列具有 80.0%-99.9% (含 80.0% 和 99.9%) 同一性的多肽或肽片段。这些百分数是纯粹统计性质的, 两个肽序列之间的差异可能随机分布并遍及整个序列长度中。

[0050] 与本发明多肽具有百分比同一性的“变异”或“同源”

多肽序列可任选与本发明多肽序列具有以下百分比同一性：80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。术语等同氨基酸在本文是指能够在基础结构中有一个氨基酸被置换，而基本上不改变相应肽的生物活性的任何氨基酸，见下文。

[0051] 可对A β 的HHQKLVFF(基序)区进行数个置换而又能保持置换肽的抗血管生成性质。准确地讲，下式表示对于HHQKLVFF的这种等同置换：



[0052] 该基序的示例性序列见表1。如果具体的肽序列是天然存在蛋白质的一部分，则注明了来源。

表1

氨基酸序列	来源(如果天然存在的话)
HHQKLVFF	人 APP/A β
RHQKLVFF	大鼠/小鼠 APP/A β
HHNKL VFF	
RHNKL VFF	
HHQRL VFF	
RHQRL VFF	
HHNRL VFF	
RHNRL VFF	
HHQKIVFF	
RHQKIVFF	
HHNKIVFF	
RHNKIVFF	
HHQRIVFF	
RHQRIVFF	tr:Q3YB12_BACST 推定调节子[嗜热脂肪地芽孢杆菌(<i>Geobacillus stearothermophilus</i>)]
HHNRIVFF	
RHNRIVFF	
HHQKV VFF	
RHQKV VFF	

HHNKVVFF	
RHNKVVFF	
HHQRVVFF	[Q6CET0]耶罗威亚解脂酵母(<i>Yarrowia lipolytica</i>) 耶罗威亚解脂酵母菌株 CLIB99 染色体 B (trembl)。
RHQRVVFF	
HHNRVVFF	
RHNRVVFF	
HHQKLIF	
RHQKLIF	
HHNKLIF	
RHNKLIF	
HHQRLIF	
RHQRLIF	
HHNRLIF	
RHNRLIF	
HHQKIIF	
RHQKIIF	
HHNKIIF	
RHNKIIF	
HHQRIIF	
RHQRIIF	
HHNRIIF	
RHNRIIF	
HHQKVIFF	
RHQKVIFF	
HHNKVIFF	
RHNKVIFF	
HHQRVIFF	
RHQRVIFF	
HHQKLLFF	
RHQKLLFF	
HHNKLLFF	
RHNKLLFF	
HHQRLLFF	
RHQRLFF	

HHNRLFF	
RHNRLFF	Trembl 序列登录号 tr:Q7QS20_GIALA
HHQKILFF	
RHQKILFF	
HHNKILFF	
RHINKILFF	
HHQRILFF	
RHQRILFF	
HHNRILFF	
RHNRILFF	
HHQKVLFF	
RHQKVLFF	
HHNKVLFF	
RHINKVLFF	
HHQRVLFF	
RHQRVLFF	
HHNRVIFFF	
RHNRVIFFF	

[0053] 使用检索自 <http://motif.genome.jp/MOTIF2.html> 的基序以在 NR-AA Trembl/Swissprot 数据库中检索肽组合。本领域已知肽序列中物理化学等同氨基酸的置换(Eisenberg 等, 1984 “Amino acid scale: Normalized consensus hydrophobicity scale (氨基酸标度: 归一化共有疏水性标度)”, J. Mol. Biol. 179:125-142; Mathura 等, 2001, “New quantitative descriptors for amino acids based on multidimensional scaling of a large number of physical-chemical properties (用于氨基酸的基于大量理化性质多维定标的新的定量描述符)”, J. Mol. Modeling 7:445-453)。

[0054] 在一个实施方案中, AB 肽片段由表 1 所列的一个肽序列组成, 或者包括表 1 所列的一个肽序列, 任选具有等同氨基酸置换。

[0055] 本发明还提供能够诱发免疫反应的生物活性肽片段。免疫反应可提供与肽片段反应的组分(抗体或细胞免疫反应组分(例如 B-

细胞, 辅助、细胞毒和/或抑制性 T-细胞))。

[0056] 可以用蛋白酶(例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶或胶原酶)或用化学试剂(例如溴化氰(CNBr))切割多肽来获得本文所述片段。或者, 可以在高的酸性环境(例如 pH 2.5)产生多肽片段。还可以通过化学合成, 或者使用用含有多肽片段编码核酸的表达载体转化的宿主制备这些多肽片段。转化宿主细胞含有核酸, 按照众所周知的方法进行培养; 因此, 在合适的调节和/或表达元件控制下, 可表达这些片段。

[0057] 可以通过 A β 基因转录产物拼接中的变化、基因重组或者通过化学合成对肽进行修饰。这些肽与待修饰多肽序列相比可含有至少一个修饰。这些修饰可包括包含在多肽内氨基酸的添加、置换、缺失。

[0058] 保守置换即一种类型的一个氨基酸被同一类型的另一个氨基酸置换落入本发明的范围内, 只要置换不实质性改变多肽的生物活性。例如, 非极性氨基酸的类型包括 Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Gly 和 Trp; 不带电荷的极性氨基酸类型包括 Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn 和 Gln; 酸性氨基酸的类型包括 Asp 和 Glu; 碱性氨基酸的类型包括 Lys、Arg 和 His。在一些情况下, 可以进行非保守置换, 只是这些置换不显著降低多肽的生物活性。

[0059] 为了延长所提供的多肽的寿命, 采用非天然氨基酸, 例如 D 型氨基酸或者氨基酸类似物(例如含硫的氨基酸形式), 可能是有利的。还可以采用延长多肽寿命的备选方法。例如, 肽片段可通过重组修饰以包括延长血浆或血清半寿期的元件。这些元件包括但不限于抗体恒定区(参见例如美国专利第 5,565,335 号, 特此通过引用全部结合到本文中, 包括其中引用的所有参考文献), 或者其它元件, 例如参见美国专利号 6,319,691、6,277,375 或 5,643,570, 这些专利中的每一个都通过引用全部结合到本文中, 包括各相应专利中所引用的所有参考文献。或者, 多核苷酸和基因可重组性融合到用于制备免疫原性构建体的元件中, 该构建体是为了疫苗制剂目的, 或者用于分离所提供

的多肽。

[0060] 所公开的肽片段可进一步含有促进片段与用于递送或诊断目的的载体分子连接的接头。接头还可用来使片段与固相支持基质连接，用于亲和纯化法。在一个实施方案中，接头尤其不包括其中片段是蛋白质序列数据库检索中已鉴定的其它肽、多肽或蛋白质的亚序列。换句话说，其它肽、多肽或蛋白质的非相同部分，不被认为是这一方面的“接头”。适于实施本发明“接头”的非限制性实例包括化学接头(例如 Pierce 公司，Rockford, Ill.出售的化学接头)、允许免疫原性片段与载体分子连接的肽(参见例如美国专利号 6,121,424、5,843,464、5,750,352 和 5,990,275 所公开的接头，特此通过引用全部结合到本文中)。在不同实施方案中，接头的长度可多达 50 个氨基酸，多达 40 个氨基酸，多达 30 个氨基酸，多达 20 个氨基酸，多达 10 个氨基酸或多达 5 氨基酸。

[0061] 在其它具体的实施方案中，肽可表示为融合或嵌合蛋白产物(通过肽键与异源蛋白质序列(例如不同的蛋白质)连接)。可以通过本领域已知方法将合适的编码所需氨基酸序列的核酸序列在合适的编码框内与其它序列连接，通过本领域公知的方法表达嵌合产物，来制备这样的嵌合产物(参见例如美国专利第 6,342,362 号，特此通过引用全部结合到本文中；Altendorf 等，1999-WWW, 2000 “Structure and Function of the F₀ Complex of the ATP Synthase from Escherichia Coli (来自大肠杆菌的 ATP 合酶 F₀复合体的结构与功能)”，J. of Experimental Biology 203:19-28, G. B.; Baneyx 1999 Biotechnology 10:411-21; Eihauer 等，2001 J. Biochem. Biophys. Methods 49:455-65; Jones 等，1995 J. Chromatography 707:3-22; Jones 等，1995 J. of Chromatography A. 707:3-22; Margolin 等，2000 Methods 20:62-72; Puig 等，2001 Methods 24:218-29; Sassenfeld 等，1990 Tib. Tech. 8:88-93 ; Sheibani 等，1999 Prep. Biochem. & Biotechnol. 29(1):77-90; Skerra 等，1999 Biomolecular Engineering 16:79-86;

Smith 等, 1998 *The Scientist* 12(22):20; Smyth 等, 2000 *Methods in Molecular Biology*, 139:49-57; Unger 等, 1997 *The Scientist* 11(17):20; 这些文献的每一篇都通过引用全部结合到本文中)。或者, 可以通过蛋白质合成技术(例如使用肽合成仪)来制备这样的嵌合产物。融合肽可包含如上所述的多肽和一个或多个蛋白转导域(protein transduction domain)。这些融合肽特别用于递送货物多肽(cargo polypeptide)穿过细胞膜。

[0062] 增加组织内 A β 肽片段的活性量用于治疗多种血管生成性疾病, 例如癌症、肿瘤和/或恶性肿瘤。因此, 按照所提供的方法, 可以通过直接给予罹患血管生成性疾病的患者 A β 肽片段(例如外部递送 A β 肽片段), 或者通过间接方法或基因方法(例如给予编码 A β 肽片段的多核苷酸或者上调内源 A β 肽片段活性), 来增加组织内 A β 肽片段的活性量。可以用本发明方法治疗的这些癌症、肿瘤和/或恶性肿瘤的非限制性实例包括前列腺癌、乳腺癌、黑素瘤、慢性髓细胞白血病、子宫颈癌、腺癌、成淋巴细胞白血病、结肠直肠癌和肺癌。

[0063] 肽片段或其编码核酸可用于筛选或辅助诊断罹患血管源性或血管生成介导的疾病的个体。本文所公开的肽片段及其编码核酸可以通过使用互补序列, 用来检测杂交测定中的 A β 肽。A β 肽片段含量显著增加的存在与阿尔茨海默病适应症有关。A β 肽含量显著减少的存在与血管生成性疾病适应症(例如恶性肿瘤或癌症)有关。可以通过众所周知的方法检测 A β 基因产物, 包括但不限于蛋白质印迹、酶联免疫测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、RNA 印迹、DNA 印迹、基于 PCR 的测定或本领域技术人员已知的用于基因产物定量测定的其它测定法。这些资料结合专业人员可获得的其它资料, 有助于作出诊断。

[0064] 一方面, 本发明涉及通过给予患者生物活性 A β 肽片段, 抑制需要抗血管生成疗法的患者的血管生成的方法。

[0065] 在一个实施方案中, 通过给予患者治疗有效量的 A β 肽

片段治疗的病理病症选自癌症、关节炎、动脉粥样硬化、牛皮癣、黄斑变性和糖尿病性视网膜病。

[0066] 在一个实施方案中,使用生物活性 A β 肽片段的变异体,其中变异体在 21 位氨基酸、或 22 位氨基酸、或 23 位氨基酸上或其组合位上有置换。在一个具体的实施方案中,置换是保守置换,它并不实质性地改变多肽的生物活性。

[0067] 可以利用将多肽递送至细胞的各种方法以实施本发明所提供的方法。例如,蛋白转导域(protein transduction domain, PTD)可与多肽融合,产生融合多肽,其中 PTD 能够将多肽货物跨血浆膜转导(Wadia, J. S.和 Dowdy, S. F., Curr. Opin. Biotechnol. 2002, 13(1), 52-56)。PTD 的实例包括果蝇(*Drosophila*)同源异型转录蛋白触角足(Antp)、单纯疱疹病毒结构蛋白 VP22 和人免疫缺陷疾病 1 (HIV-1)转录激活因子 Tat 蛋白。

[0068] 按照本发明所提供的血管生成抑制方法,可以给予患者重组细胞,其中重组细胞经基因修饰以表达本文所公开的 A β 肽片段。

[0069] 可以采用本发明所提供的血管生成抑制方法治疗患有癌症的患者或者作为癌症预防方法。可以采用本发明所提供的肿瘤抑制方法治疗患有多种癌症的患者,癌症包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、黑素瘤、慢性髓细胞白血病、子宫颈癌、腺癌、成淋巴细胞白血病、结肠直肠癌和肺癌。按照本发明所提供的方法,可与 A β 肽片段联合给予其它不同的抗癌或抗肿瘤化合物,例如细胞毒药物。

编码 A β 片段的核苷酸序列

[0070] 另一方面,本发明提供分离和/或纯的核苷酸序列,该核苷酸序列包含编码本文所公开的肽片段氨基酸序列的多核苷酸序列。

[0071] 本发明还提供分离的核酸分子,该核酸分子包含编码 A β 肽片段的多核苷酸。本发明一方面提供分离的核酸分子,该核酸分子包含具有选自以下核苷酸序列的多核苷酸:(a)编码本文所述(包括表 1

所列)多肽的任何氨基酸序列的核苷酸序列; 和(b)与(a)中任何核苷酸序列互补的核苷酸序列。

[0072] 本发明另外的实施方案包括分离的核酸分子, 该核酸分子包含多核苷酸, 具有与上述(a)或(b)中任何核苷酸序列有至少 90%同一性的核苷酸序列, 更优选至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性。

[0073] 根据本发明, 核苷酸、多核苷酸或核酸序列应当理解为是指双链 DNA、单链 DNA 或所述 DNA 的转录产物(例如 RNA 分子)。核酸、多核苷酸或核苷酸序列可以通过分离方法分离的、纯化的(或部分纯化的), 分离方法包括但不限于离子交换层析、分子大小排阻层析(molecular size exclusion chromatography)、亲和层析或基因工程方法例如扩增、克隆或亚克隆。

[0074] 任选多核苷酸序列还可含有一个或多个编码异源多肽序列的多核苷酸(例如促进本发明多肽纯化的标记(参见例如美国专利第 6,342,362 号, 特此通过引用全部结合到本文中; Altendorf 等, 1999-WWW, 2000 “Structure and Function of the F₀ Complex of the ATP Synthase from Escherichia Coli (来自大肠杆菌的 ATP 合酶 F₀复合体的结构与功能)”, J. of Experimental Biology 203:19-28, G. B.; Baneyx 1999 Biotechnology 10:411-21; Eihauer 等, 2001 J. Biochem. Biophys. Methods 49:455-65; Jones 等, 1995 J. Chromatography 707:3-22; Jones 等, 1995 J. of Chromatography A. 707:3-22; Margolin 等, 2000 Methods 20:62-72; Puig 等, 2001 Methods 24:218-29; Sassenfeld 等, 1990 Tib. Tech. 8:88-93; Sheibani 等, 1999 Prep. Biochem. & Biotechnol. 29(1):77-90; Skerra 等, 1999 Biomolecular Engineering 16:79-86; Smith 等, 1998 The Scientist 12(22):20; Smyth 等, 2000 Methods in Molecular Biology, 139:49-57; Unger 等, 1997 The Scientist 11(17):20; 这些文献的每一篇都通过引用全部结合到本文中), 或者可从商家购买的标记例如 STRATAGENE (La Jolla, Calif.)、

NOVAGEN (Madison, Wis.)、QIAGEN, Inc., (Valencia, Calif.)或者 INVITROGEN (San Diego, Calif.)。

载体

[0075] 其它方面提供含有一种或多种本发明所提供的多核苷酸的载体, 例如含有编码生物活性 A β 肽片段的核苷酸的载体。载体可以是疫苗载体、复制载体或扩增载体。在一些实施方案中, 多核苷酸与能够引起多核苷酸序列表达的调节元件操作性连接。这种载体还包括染色体载体、附加型载体和病毒衍生载体, 例如衍生自细菌质粒、噬菌体、转座子、酵母附加体、插入元件、酵母染色体元件、病毒(例如杆状病毒)、乳多空病毒(例如 SV40)、痘苗病毒、腺病毒、禽痘病毒、假性狂犬病病毒和反转录病毒的载体, 以及衍生自上述载体来源组合的载体, 例如衍生自质粒和噬菌体基因元件(例如黏粒和噬菌粒)的载体。

[0076] 如上所述, 载体还包含提供在给定宿主细胞中, 表达和/或分泌由所提供的核苷酸序列编码的多肽(例如 A β 肽片段)所必需的元件。载体可含有一种或多种选自以下的元件: 启动子、翻译起始信号、翻译终止信号和合适的转录调节区。在某些实施方案中, 载体可以稳定地保存在宿主细胞内, 任选含有指导翻译蛋白质分泌的信号序列。其它实施方案提供在转化宿主细胞内不稳定的载体。载体可以整合到宿主基因组中, 或者可以是自主复制载体。

[0077] 在一个具体的实施方案中, 载体包含启动子与以下成分操作性连接: 编码蛋白质或肽的核酸序列、一个或多个复制起点和任选一个或多个选择标记(例如抗生物素抗性基因)。用于多肽表达的非限制示例性的载体包括 pBr 型载体、pET 型质粒载体(PROMEGA)、pBAD 质粒载体(INVITROGEN)或下面实施例中所提供的载体。此外, 载体用于转化宿主细胞以克隆或表达所提供的核苷酸序列。

[0078] 可以用来控制表达的启动子包括但不限于 CMV 启动

子、SV40 早期启动子区(Bernoist 和 Chambon 1981 Nature 290:304-310)、劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)中 3'长末端重复序列内所包含的启动子(Yamamoto 等, 1980 Cell 22:787-797)、疱疹病毒胸苷激酶启动子(Wagner 等, 1981 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445)、金属硫蛋白基因的调节序列(Brinster 等, 1982 Nature 296:39-42); 含有启动子的原核载体, 例如 β -内酰胺酶启动子(Villa-Kamaroff 等, 1978 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-3731)或 tac 启动子(DeBoer 等, 1983 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25); 还可参见“Useful Proteins from Recombinant Bacteria (得自重组细菌的有益蛋白质)”, Scientific American, 1980, 242:74-94; 包含胭脂氨酸合成酶启动子区的植物表达载体(Herrera-Estrella 等, 1983 Nature 303:209-213)或花椰菜花叶病毒 35S RN 启动子(Gardner 等, 1981 Nucl. Acids Res. 9:2871)和光合作用酶核酮糖二磷酸羧化酶启动子(Herrera-Estrella 等, 1984 Nature 310:115-120); 得自酵母或真菌的启动子元件, 例如 Gal 4 启动子、ADC (醇脱氢酶)启动子、PGK (磷酸甘油激酶)启动子和/或碱性磷酸酶启动子。

同源核苷酸序列

[0079] 本文所提供的有“同源的”或“修饰的”核苷酸序列。修饰的核酸序列应当理解是指按照本领域技术人员熟知的技术经诱变获得, 并且与正常序列相比是被修饰的任何核苷酸序列。例如, 表达多肽的调节序列和/或启动子序列的突变, 导致多肽表达水平改进, 提供了“修饰的核苷酸序列”。同样地, 置换、缺失或添加核酸至多核苷酸提供“同源的”或“修饰的”核苷酸序列。在不同实施方案中, “同源的”或“修饰的”核酸序列具有与天然(天然存在的)A β 肽片段基本相同的生物活性或血清活性。“同源的”或“修饰的”核苷酸序列还应理解是指本发明多核苷酸或编码如下所述“修饰多肽”的任何核苷酸序列的剪接变体。

[0080] 本文所述同源核苷酸序列包括与所述核苷酸序列碱基的百分比同一性介于至少(或者至少约) 80.0%-99.9% (含 80.0%和 99.9%)之间、或 85%-99%之间、或 90%-99%之间、或 95%-99%之间的核苷酸序列。

[0081] 在不同实施方案中,与所述核苷酸序列碱基具有百分比同一性的同源序列,可与本发明多核苷酸序列具有以下的百分比同一性: 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%。

[0082] 可以运用本领域已知的各种序列比较算法和程序,评价蛋白质和核酸序列同源性。这些算法和程序包括但绝不仅限于 TBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTA 和 CLUSTALW (Pearson 和 Lipman, 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85(8):2444-2448; Altschul 等, 1990 J. Mol. Biol. 215(3):403-410; Thompson 等, 1994 Nucleic Acids Res. 22(2):4673-4680; Higgins 等, 1996 Methods Enzymol. 266:383-402; Altschul 等, 1990 J. Mol. Biol. 215(3):403-410; Altschul 等, 1993 Nature Genetics 3:266-27)。

[0083] 本发明还提供与本文所公开的任何多核苷酸序列互补的核苷酸序列。因此,本发明应理解为包括其核苷酸与本发明序列核苷酸互补的任何 DNA, 以及方向是逆转的 DNA (例如反义序列)。

[0084] 本发明还进一步提供本文所公开的多核苷酸序列的片段。多核苷酸序列的代表性片段应当理解为是指具有从其所衍生序列的至少 8 或 9 个连续核苷酸、优选至少 12 个连续核苷酸、更优选至少 15 个连续核苷酸或至少 20 个连续核苷酸的任何核苷酸片段。这些片段的上限是 A β ₁₋₄₂ 肽编码序列中存在的多核苷酸的总数(或者在某些实施方案中,是本文所规定的可读框(ORF))。还使用编码具体肽的合适片段。例如,可以用之前规定的是 A β 肽片段同源物或其片段的核苷酸序列,来实施本发明抑制血管生成的方法。

杂交和检测探针

[0085] 在这些代表性片段中, 优选能够在严格条件与核苷酸序列杂交的片段。下文将提供高度严格或中等严格的条件, 选择以使两个互补的 DNA 片段杂交。按照本领域众所周知的方法(参见例如 Sambrook 等, 1989 Molecular Cloning, A Laboratory Manual (分子克隆实验室指南), 第二版, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 第 9.47-9.57 页), 对于较长或较短的寡核苷酸, 本领域技术人员将采用用于大小约 300 个碱基的多核苷酸的杂交条件。

[0086] 本发明还提供检测探针(例如所公开的多核苷酸序列的片段)用于与目标序列或者与由目标序列产生的扩增子杂交。这种检测探针最好具有至少以下数目核苷酸的序列: 9、12、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100。或者, 检测探针可包含所公开核酸的连续核苷酸的以下个数: 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127 个和多至例如 128 个。本发明中, 检测探针还可用作标记探针或引物。标记探针或引物用放射性化合物或者用另一类型的标记进行标记。或者, 非标记核苷酸序列可以直接用作探针或引物; 然而, 序列一般用放射性元素(^{32}P 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{125}I)标记, 或者用例如生物素、乙酰氨基苄、洋地黄毒苷、5-溴-脱氧尿苷或荧光素等分子标记, 以提供可用于多项应用中的探针。

[0087] 本发明所公开的核苷酸序列还可用于分析系统, 例如

DNA 芯片。DNA 芯片及其用途是本领域众所周知的(参见例如美国专利号 5,561,071、5,753,439、6,214,545、Schena 等, 1996 BioEssays 18:427-431; Bianchi 等, 1997 Clin. Diagn. Virol. 8:199-208; 这些文献的每一篇都通过引用全部结合到本文中)和/或由供应商提供, 例如 AFFYMETRIX, Inc. (Santa Clara, Calif.)。

[0088] 可以采用不同严格性程度的杂交。条件越严格, 双链体形成需要的互补性越高。条件的严格程度可通过温度、探针浓度、探针长度、离子强度、时间等予以控制。优选本领域众所周知的技术在中等至高度严格性条件下进行杂交, 参见例如 Keller, G. H., M. M. Manak 1987 DNA Probes (DNA 探针), Stockton Press, New York, N.Y., 第 169-170 页。

[0089] 举例来说, 在 DNA 印迹上用 ^{32}P 标记的基因特异性探针与固定化 DNA 的杂交可通过标准方法进行(Maniatis 等, 1982 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子克隆实验室指南), Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。一般而言, 在允许检测与示例性多核苷酸序列同源的目标序列的中等至高度严格性条件下, 进行杂交和随后的洗涤。对于双链 DNA 基因探针, 可在 6x SSPE、5x Denhardt 杂交溶液(Denhardt's solution)、0.1% SDS、0.1mg/ml 变性 DNA 中, 在低于 DNA 杂合解链温度(T_m) 20-25°C 下过夜进行杂交。解链温度用以下公式表示(Beltz 等, 1983 Methods of Enzymology, R. Wu, L. Grossman 和 K. Moldave [主编] Academic Press, New York 100:266-285)。

[0090] $T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 \log[\text{Na}^+] + 0.41(\%G+C) - 0.61(\% \text{甲酰胺}) - 600/\text{碱基对双链体长度}$ 。

[0091] 通常如下进行洗涤:

[0092] (1) 在 1x SSPE、0.1% SDS 中于室温下两次 15 分钟(低严格性洗涤);

[0093] (2) 在 0.2x SSPE、0.1% SDS 中于 $T_m - 20^\circ\text{C}$ 下一次 15 分

钟(中等严格性洗涤)。

[0094] 对于寡核苷酸探针,可以在 6x SSPE、5x Denhardt 杂交溶液、0.1% SDS、0.1mg/ml 变性 DNA 中,在低于杂合解链温度(T_m) 10-20°C 下过夜进行杂交。可以用下列公式求出寡核苷酸探针的 T_m :

[0095] $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 (\text{T/A 碱基对数目}) + 4 (\text{G/C 碱基对数目})$ (Suggs 等, 1981 ICN-UCLA Symp. Dev. Biol. Using Purified Genes (使用纯化基因), D. D. Brown [主编], Academic Press, New York, 23:683-693)。

[0096] 洗涤可如下进行:

[0097] (1) 在 1x SSPE、0.1% SDS 中于室温下两次 15 分钟(低严格性洗涤);

[0098] (2) 在 1x SSPE、0.1% SDS 中于杂交温度下一次 15 分钟(中等严格性洗涤)。

[0099] 一般而言,可以改变盐和/或温度以改变严格性。标记 DNA 片段长度 >70 个左右的碱基时,可以采用下列条件:

[00100] 1 低: 1 或 2X SSPE, 室温, 低: 1 或 2X SSPE, 42°C。
中等: 0.2X 或 1X SSPE, 65°C。高: 0.1X SSPE, 65°C。

[00101] 再以另一个非限制性实例来说,步骤还可用高严格性条件如下进行: 在 65°C 下,在由 6x SSC、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% 菲可(Ficoll)、0.02% BSA 和 500μg/ml 变性鲑鱼精 DNA 组成的缓冲液中,使含有 DNA 的滤膜进行预杂交 8 小时至过夜。在含有 100μg/ml 变性鲑鱼精 DNA 和 $5\text{-}20 \times 10^6$ cpm ^{32}P 标记探针的预杂交混合物中,使滤膜在 65°C (优选的杂交温度)下进行杂交 48 小时。或者,在 SSC 缓冲液、对应于 0.15M NaCl 和 0.05M 柠檬酸钠的 1x SSC 存在下,在 65°C 下进行杂交步骤。随后,可在含有 2x SSC、0.01% PVP、0.01% 菲可和 0.01% BSA 的溶液中,在 37°C 下将滤膜洗涤 1 小时后,在 0.1x SSC 中于 50°C 洗涤 45 分钟。或者,可以在含有 2x SSC 和 0.1% SDS 或者 0.5x SSC 和 0.1% SDS 或者 0.1x SSC 和 0.1% SDS 的溶液中,在 68°C 下将滤膜洗涤 15 分钟时间。洗涤

步骤后,可用放射自显影检测杂交探针。可以采用的其它高严格性条件是本领域众所周知的(参见例如 Sambrook 等, 1989 Molecular Cloning, A Laboratory Manual (分子克隆实验室指南), 第二版, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 第 9.47-9.57 页; Ausubel 等, 1989 Current Protocols in Molecular Biology (最新分子生物学实验技术), Green Publishing Associates 和 Wiley Interscience, N.Y., 每个文献都通过引用全部结合到本文中)。

[00102] 使用中等严格性条件步骤的另一非限制性实例如下: 使含有 DNA 的滤膜预杂交,然后在 5x SSC 缓冲液和标记探针存在下,在 60℃温度下杂交。随后,在 50℃下。在含有 2x SSC 的溶液中进行滤膜洗涤,可通过放射自显影检测杂交探针。可以采用的其它中等严格性条件是本领域众所周知的(参见例如 Sambrook 等, 1989 Molecular Cloning, A Laboratory Manual (分子克隆实验室指南), 第二版, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 第 9.47-9.57 页; Ausubel 等, 1989 Current Protocols in Molecular Biology (最新分子生物学实验技术), Green Publishing Associates 和 Wiley Interscience, N.Y., 每个文献都通过引用全部结合到本文中)。

[00103] 双链体形成和稳定性取决于两条杂合链之间的实际的互补性,以及如上观察到的可以耐受的某种程度的错配。因此,本发明的探针序列包括所述序列的突变(单突变和多突变)、缺失、插入及其组合,其中所述突变、插入和缺失使得与目标靶多核苷酸形成稳定的杂合。可按许多方法在给定的多核苷酸序列中产生突变、插入和缺失,这些方法为普通技术人员所知。其它方法可能在不久的将来为大众所知。

[00104] 本领域还众所周知的是,可以使用限制性内切酶获得本发明 DNA 序列的功能片段。例如, Bal31 外切核酸酶可以方便地用于 DNA 的定时有限消化(一般称作“碱基除去(erase-a-base)法”)。参见例如 Maniatis 等, 1982 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分

子克隆实验室指南), Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Wei 等, 1983 J. Biol. Chem. 258:13006-13512。本发明所公开的核酸序列还可用作核酸分析方法中的分子量标记。

宿主细胞

[00105] 本发明提供用本发明的多核苷酸转化的宿主细胞和由转化宿主细胞产生的 A β 肽片段。在一些实施方案中, 转化细胞包含表达载体, 该表达载体含有 A β 肽片段的多核苷酸序列。其它实施方案提供用核酸转化的宿主细胞。还有其它实施方案提供包含表达载体的转化细胞, 该载体中含有 A β 片段多核苷酸序列。可以在允许所提供的核苷酸序列复制和/或表达的条件下培养转化宿主细胞。按照本领域已知方法, 从培养基中回收表达多肽, 纯化待进一步使用。

[00106] 可以用杆状病毒载体, 从真核系统或原核系统选择宿主细胞, 例如细菌细胞(革兰氏阴性或革兰氏阳性)、酵母细胞、动物细胞、植物细胞和/或昆虫细胞。在一些实施方案中, 用于多肽表达的宿主细胞包括但不限于以下文献所给出的宿主细胞: 美国专利号 6,319,691、6,277,375、5,643,570、5,565,335; Unger 等, 1997 The Scientist 11(17):20; 或者 Smith 等, 1998 The Scientist 12(22):20, 这些文献中的每一篇都通过引用全部结合到本文中, 包括各相应专利或文献中所引用的所有参考文献。其它示例性和非限制性宿主细胞包括葡萄球菌(*Staphylococcus* spp.)、肠球菌(*Enterococcus* spp.)、大肠杆菌(*E. coli*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*); 真菌细胞, 例如链霉菌(*Streptomyces* spp.)、曲霉菌(*Aspergillus* spp.)、酿酒酵母(*S. cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluveromyces lactis*)和解脂耶罗维亚酵母(*Yarrowia lipolytica*); 昆虫细胞例如果蝇 S2 和夜蛾(*Spodoptera*) Sf9 细胞; 动物细胞例如 CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、293 和 Bowes 黑素瘤细胞和植物细胞。可以使用各种各

样的表达系统以产生本文所提供的多肽，可以按照本领域已知方法对多核苷酸进行修饰以提供用于在具体表达系统中表达的最佳密码子使用。

[00107] 此外，可以选择调节插入序列表达，修饰基因产物，和/或以特殊方式加工基因产物的宿主细胞菌株。在某些诱导物存在下，可提高某些启动子的表达；因此，可以控制基因工程多肽的表达。此外，不同的宿主细胞对于蛋白质翻译和翻译后的加工和修饰(例如糖基化、磷酸化)具有特征性和特异性机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统以确保所表达的外源蛋白质所需要的修饰和加工。例如，在细菌系统中表达可以用来产生未糖基化的核心蛋白产物，而在酵母中表达将产生糖基化产物。在哺乳动物细胞内表达可以用来提供异源蛋白质的“天然”糖基化。此外，不同的载体/宿主表达系统可能不同程度地影响加工反应。

[00108] 可以通过众所周知的方法将核酸和/或载体导入宿主细胞，例如磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、转染、显微注射、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、划痕标记(scrape loading)、基因枪(ballistic introduction)和感染(参见例如 Sambrook 等, 1989 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子克隆实验室指南), 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)。

[00109] 本发明还提供由本文所公开的多核苷酸序列编码的多肽、衍生物或变异体(例如剪接变异体)的表达。或者，本发明提供表达的多肽片段，该多肽片段得自多肽、衍生物或变异体，而多肽、衍生物或变异体由衍生自本文所公开的多核苷酸序列的多核苷酸片段编码。在任一个实施方案中，所公开的序列可被第二核酸序列调节，使得在用本发明的重组 DNA 分子转化的宿主内表达多肽或片段。例如本领域已知的任何启动子/增强子元件可控制蛋白质或肽的表达。

[00110] 本发明还提供用于鉴定样品中 A β 基因或其片段或变

异体存在的基于核酸的方法。这些方法可利用本发明提供的核酸，并且是本领域技术人员熟知的(参见例如 Sambrook 等，1989 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 第 9.47-9.57 页或 Abbaszadega 等，2001 Reviews in Biology and Biotechnology (生物学与生物工程学综述), 1(2):21-26)。用于这些方法的技术中有酶促基因扩增(或者 PCR)、DNA 印迹、RNA 印迹或利用核酸杂交，用于鉴定样品中多核苷酸序列的其它技术。可以利用核酸来筛选个体与 A β 基因或其转录产物失调相关的疾病。

[00111] 本发明还提供由本发明核苷酸序列编码的多肽。本发明还提供至少 5 个氨基酸的多肽片段，该多肽由本发明的多核苷酸编码。

药物剂型和给药

[00112] 本文所用术语“给药”或“给予”是指将药物递送给患者的方法。可以改变给药方法，这取决于一种或多种药物和所需的效果。可以适于治疗药的任何方法实施给药，例如通过口服、胃肠外、黏膜、肺部、局部、基于导管、直肠、颅内、脑室内、大脑内、阴道内或子宫内递药。胃肠外递药可包括例如皮下、静脉内、肌内、动脉内注射和注射到器官组织内，特别是注射到肿瘤组织内。黏膜递药可包括例如鼻内递药。口服或鼻内递药可包括抛射剂给药。肺部递药可包括药物吸入。基于导管的递药可包括通过离子电渗导管型递药 (iontopheretic catheter-based delivery)。口服递药可包括口服包衣丸剂递药或者口服液体制剂给药。给药一般还可包括与药学上可接受的载体一起递药，载体例如缓冲剂、多肽、肽、多糖缀合物、脂质体和/或脂质。也可考虑给予基因疗法，其中治疗药是当作为转录物或多肽进入患者体内表达时，能够实现治疗目的的多核苷酸。

[00113] 在一个实施方案中，以有效量给予 A β 肽片段以抑制病理性血管生成。本文所用术语“血管生成”是指新血管形成的过程，

其对各种正常身体活动(例如生殖、发育和伤口修复)是必不可少的。据信该过程包括复杂的分子相互影响,既刺激又抑制内皮细胞(毛细血管的主要细胞)的生长。在正常条件下,这些分子似乎较长期地维持微脉管系统在静止状态下(即无毛细血管生长的状态)。然而,必要时(例如伤口修复期间),这些细胞可进行快速的增殖,并在短时间内更新。尽管在正常条件下,血管生成是受高度调节的过程,但许多病症(以“血管生成性疾病”为特征)是由血管生成持续性失调引起的。换句话说,血管生成失调既可直接引起具体的病理病症,又可使现有病理病症恶化。例如眼部新血管形成被认为是最普遍的致盲原因,引起大约 20 种眼病。在某些现有疾病中(例如关节炎),新形成的毛细血管侵袭关节,破坏软骨。糖尿病中,在视网膜中新形成的毛细血管侵袭玻璃体,出血,致盲。肿瘤的生长和转移也依赖于血管生成(Folkman, J., *Cancer Research*, 46:467-473, 1986; Folkman, J., *Journal of the National Cancer Institute*, 82:4-6, 1989)。例如,有研究表明,增大超过 2mm 的肿瘤,必需获得自身血供给,并且是通过诱导新毛细血管的生长来实现的。一旦这些新血管深入到肿瘤内,便为肿瘤细胞进入循环,转移至远距离位置(例如肝、肺或骨)提供了途径(Weidner, N.等, *The New England Journal of Medicine*, 324(1):1-8, 1991)。

[00114] 可以按照制备药用组合物的已知方法,制备本发明的药物组合物。各种剂型记载于多种已知的并且易为本领域技术人员获得的资料中。例如 Remington's Pharmaceutical Sciences (雷氏药学大全) (Martin E W 1995 Easton Pennsylvania Mack Publishing Company, 19^{sup}.th ed.)记载了可与本发明联用的剂型。适于胃肠外给药的剂型包括例如无菌注射水溶液,它含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和为待接受者提供血液等渗剂型的溶质;水性和非水性无菌混悬剂,它可包括悬浮剂和增稠剂。剂型可装入单位剂量容器或多剂量容器内,例如密封的安瓿瓶和小瓶,并且可以保存在冻干条件下,临用前仅需要无菌液体载体(例如水)条件以注射。可以由无菌粉针剂、颗粒剂、片剂等

制备临用时配制的注射溶液剂和混悬剂。应当理解的是，除上述具体提及的成分以外，本发明的剂型可包括本领域常用的考虑所述剂型类型的其它药物。

[00115] 在一个实施方案中，以缓释剂型递送 A β 肽片段。该剂型释出延长，半寿期延长。适于使用的控释系统包括但不限于扩散控制系统、溶剂控制系统和化学控制系统。扩散控制系统包括例如贮库装置(reservoir device)，其中一种或多种 A β 肽片段被包封在一个装置内，因此肽片段的释放受到穿过扩散屏障渗透的控制。常见的贮库装置包括例如膜、胶囊、微胶囊、脂质体和中空纤维。单片(基质)装置(Monolithic (matrix) device)是第二种类型的扩散控制系统，其中 A β 肽片段分散或者溶于控速骨架片(例如聚合物骨架片)。肽片段均匀分散在整个控速基质中，通过基质扩散来控制释药速度。适用于单片基质装置的聚合物包括天然存在的聚合物、合成聚合物、合成性修饰的天然聚合物以及聚合物衍生物。

[00116] 可以采用本领域已知方法，确定 A β 肽片段的治疗有效剂量和最佳剂量范围。本文所公开的示例性测定法提供了对于获得抗血管生成和/或抗肿瘤效果的合适剂量的指导。同样地，可以确定获得治疗效果的 A β 肽片段的最低剂量。在一个实施方案中，以 μ M 剂量范围的等同剂量给予 A β 肽片段。在另一个实施方案中，以等同于约 1 μ M 至约 100 μ M 的量给予 A β 肽片段。在另一个实施方案中，以等同于约 2 μ M 至约 10 μ M 的量给予 A β 肽片段。可以给予的药物剂型可包括例如 1-10,000mg、10-1000mg、50-900mg、100-800mg 或 200-500mg。

[00117] 本发明还涉及诊断和/或筛选方法以及筛选化合物的试剂盒，该化合物通过干预 A β 肽片段的抗血管生成作用，在阿尔茨海默病治疗中是有效的治疗药。

[00118] 一方面，本发明包括鉴定干预 A β 诱导的血管生成抑制的化合物的方法，其中该方法包括以下步骤：(a)使能够进行血管生成的第一生物样品与试验化合物、生物活性量的 A β 肽片段和血管生成

药接触；和(b)测定发生在第一生物样品中血管生成的程度。任选该方法可包括以下步骤：(c)单独使能够进行血管生成的第二生物样品与生物活性量的 A β 肽片段和血管生成药接触；(d)测定发生在第二生物样品中血管生成的程度；和(e)将发生在第一生物样品中血管生成的程度与发生在第二生物样品中的血管生成程度进行比较。这样，步骤(c)-(d)可用作对照。优选在第一和第二生物样品中使用相同的 A β 肽片段。

[00119] 可用本领域已知方法(例如本文所述方法)进行血管生成程度的测定，并且可以定性或定量测定。例如，可以利用癌症或肿瘤生长的分子标记或细胞标记。还可通过测定生物样品中内皮细胞增殖量或血管生长程度，来测定血管生成的程度。

[00120] 方法和试剂盒中使用的生物样品可包括具有血管生成和/或肿瘤发育的各种生物液体和组织。例如，生物样品可以是动脉组织、角膜组织、内皮细胞、脐带组织、绒毛尿囊膜等等。

[00121] 血管生成药可以是在生物样品中能够诱导血管生成的任何分子、化合物或细胞。例如，血管生成药可以是营养因子，例如神经营养因子。血管生成因子可以是细胞因子或生长因子例如血管内皮生长因子、血小板衍生生长因子和碱性成纤维细胞生长因子。可在体内(例如在动物模型内)或体外进行本发明的诊断和/或筛选方法。

[00122] 另一方面，本发明包括试剂盒，用于鉴定干预 A β 诱导的血管生成抑制的化合物。试剂盒可包括含有至少一种 A β 肽片段的隔室和任选含有血管生成药的隔室。此外，试剂盒可任选包括含有一种或多种生物样品的隔室。

[00123] 另一方面，本发明提供用于鉴定干预 A β 诱导的抗肿瘤活性的化合物的方法，该方法包括以下步骤：(a)使第一肿瘤组织与试验化合物和生物活性量的 A β 肽片段接触；和(b)测定发生在肿瘤组织中的肿瘤生长程度。任选该方法还可包括以下步骤：(c)单独使第二肿瘤组织与生物活性量的 A β 肽片段接触；(d)测定发生在第二肿瘤组织中的肿瘤生长程度；和(e)将发生在第一肿瘤组织中的肿瘤生长程度与

发生在第二肿瘤组织中的肿瘤生长程度进行比较。这样,可利用步骤(c)-(d)作为对照。可用本领域已知方法(包括本文所述方法)定量或定性测定肿瘤生长的程度。例如,可以利用癌症或肿瘤生长的分子标记或细胞标记。

[00124] 另一方面,本发明包括用于鉴定干预 A β 诱导的抗肿瘤活性的化合物的试剂盒。试剂盒可包括含有至少一种 A β 肽片段的隔室和任选含有至少一种肿瘤组织的隔室。此外,试剂盒可任选包括含有一种或多种生物样品的隔室。

[00125] 可以用本发明的方法和试剂盒筛选的试验化合物可包括任何物质、药物或分子,包括例如小分子和活细胞或死细胞。

[00126] 本方法可以治疗许多患者,包括任何脊椎动物种类。优选患者是哺乳动物种类。从所公开的治疗方法中获益的哺乳动物种类包括但不限于猿、黑猩猩、猩猩、人、猴;驯养动物(例如宠物),例如狗、猫、豚鼠、仓鼠、越南大肚猪(Vietnamese pot-bellied pig)、兔和白鼬;驯养农用动物,例如牛、水牛、野牛、马、驴、猪、绵羊和山羊;一般是见于动物园的外来动物,例如熊、狮子、老虎、豹、大象、河马、犀牛、长颈鹿、羚羊、树懒、瞪羚、斑马、角马、草原土拨鼠、树袋熊、袋鼠、负鼠、浣熊、熊猫、土狼、海豹、海狮、海象、水獭、鼠海豚、海豚和鲸。

肿瘤和癌症的治疗

[00127] 在一个实施方案中,本发明提供用于治疗需要这种治疗的动物或人的肿瘤、癌症或其它增殖性疾病的方法,该方法包括给予治疗有效量的(任选以单位剂型)本文所述的 A β 肽片段。本发明还提供抑制有需要的动物或人的血管生成的方法,该方法包括给予治疗有效量的(任选以单位剂型)本文所公开的 A β 肽片段。

[00128] 本发明提供在一个实施方案中用来治疗肿瘤和癌症的 A β 肽片段和包含该片段的药物组合物,所述肿瘤和癌症包括但不限

于以下组织或器官的癌症或肿瘤：乳腺、前列腺、肺、支气管、结肠、尿道、膀胱、肾、胰腺、甲状腺、胃、脑、食道、肝、肝内胆管、子宫颈、皮肤、喉、心脏、睾丸、小肠、甲状腺、外阴、胆囊、胸膜、眼、鼻、耳、鼻咽、输尿管、胃肠系统、直肠组织、胰腺、头颈部。可以治疗的癌症包括但不限于非霍金奇淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)、黑素瘤、多发性骨髓瘤、急性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、霍金奇淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、慢性髓细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、癌、腺癌；肉瘤；淋巴瘤和白血病。

[00129] 在一个细分实施方案中，可以使用 A β 肽片段治疗例如前列腺癌、肺癌、结肠直肠癌、膀胱癌、皮肤黑素瘤、胰腺癌、白血病、乳腺癌、子宫内膜癌、非霍金奇淋巴瘤和卵巢癌。

[00130] 在另一个细分实施方案中，可以使用 A β 肽片段治疗上皮细胞癌和肿瘤，包括皮肤癌、子宫颈癌、肛门癌、食道癌、肝细胞癌(肝内)、喉癌、肾细胞癌(肾内)、胃癌、睾丸癌和甲状腺癌。

[00131] 在另一个细分实施方案中，A β 肽片段用来治疗血液恶性肿瘤(血液和骨髓)，包括白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

[00132] 在又一个细分实施方案中，A β 肽片段用来治疗肉瘤，包括骨肉瘤(骨内)、软骨肉瘤(起于软骨)和横纹肌肉瘤(肌内)。

[00133] 在另一个细分实施方案中，A β 肽片段用来治疗各种各样起源的癌症和肿瘤，包括脑肿瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、间皮瘤(胸膜或心包膜内)、胸腺瘤、畸胎瘤和黑素瘤。

[00134] 可以治疗的肿瘤的实例包括但不限于恶性脑肿瘤，例如成胶质细胞瘤；恶性肺肿瘤，例如腺癌；或者乳腺恶性肿瘤、结肠恶性肿瘤、肾恶性肿瘤、膀胱恶性肿瘤、头颈部恶性肿瘤。

[00135] 可以治疗的增殖性疾病包括但不限于造血异常，例如白血病、淋巴瘤或红细胞增多症；眼病，例如糖尿病性视网膜病、黄斑变性、青光眼或色素性视网膜炎。可以治疗的炎性疾病包括但不限于类风湿性关节炎、骨关节炎、肺纤维变性、结节病样肉芽肿(sarcoid

granulomas)、牛皮癣或哮喘。

[00136] 在一个实施方案中,可以使用 A β 肽片段治疗癌、肉瘤、淋巴瘤、白血病和/或骨髓瘤。在其它实施方案中,可以使用本文所公开的 A β 肽片段治疗实体瘤。

[00137] 在其它实施方案中,本文所述的 A β 肽片段可用于治疗癌症,包括但不限于下表 2a 中所列癌症。

表 2a: 癌症类型	
成人急性成淋巴细胞白血病	毛细胞白血病
儿童急性成淋巴细胞白血病	头颈部癌
成人急性髓细胞白血病	成人(原发性)肝细胞癌
儿童急性髓细胞白血病	儿童(原发性)肝细胞癌
肾上腺皮质癌	成人霍金奇淋巴瘤
儿童肾上腺皮质癌	儿童霍金奇淋巴瘤
AIDS 相关癌	妊娠期霍金奇淋巴瘤
AIDS 相关淋巴瘤	下咽癌
肛门癌	儿童下丘脑和视觉路径神经胶质瘤
儿童小脑星形细胞瘤	眼内黑素瘤
儿童大脑星形细胞瘤	小岛细胞癌(内分泌性胰腺癌)
基底细胞癌	卡波西肉瘤(Kaposi's Sarcoma)
肝外胆管癌	肾(肾细胞)癌
膀胱癌	儿童肾癌
儿童膀胱癌	喉癌
骨癌、骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤	儿童喉癌
儿童脑干神经胶质瘤	成人急性成淋巴细胞白血病
成人脑肿瘤	儿童急性成淋巴细胞白血病
儿童脑肿瘤、脑干神经胶质瘤	成人急性髓细胞白血病
儿童脑肿瘤、小脑星形细胞瘤	儿童急性髓细胞白血病
儿童脑肿瘤、脑星形细胞瘤/恶性神经	

表 2a: 癌症类型

胶质瘤	慢性淋巴细胞白血病
儿童脑肿瘤、室管膜瘤	慢性髓细胞白血病
儿童脑肿瘤、成神经管细胞瘤	毛细胞白血病
儿童脑肿瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤(Supratentorial Primitive Neuroectodermal Tumor)	唇癌和口腔癌
儿童脑肿瘤、视觉路径和下丘脑神经胶质瘤(Visual Pathway and Hypothalamic Glioma)	成人(原发性)肝癌
儿童脑肿瘤	儿童(原发性)肝癌
乳腺癌	非小细胞肺癌
儿童乳腺癌	小细胞肺癌
男性乳腺癌	AIDS 相关淋巴瘤
儿童支气管腺瘤/类癌瘤	伯基特淋巴瘤
伯基特淋巴瘤(Burkitt's Lymphoma)	皮肤 T 细胞淋巴瘤, 参见蕈样肉芽肿和赛塞利综合征
儿童类癌瘤	成人霍金奇淋巴瘤
胃肠类癌瘤	儿童霍金奇淋巴瘤
原发灶不明癌	妊娠期霍金奇淋巴瘤
原发性中枢神经系统淋巴瘤	成人非霍金奇淋巴瘤
儿童小脑星形细胞瘤	儿童非霍金奇淋巴瘤
儿童脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤	妊娠期非霍金奇淋巴瘤
子宫颈癌	原发性中枢神经系统淋巴瘤
儿童癌症	瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症
慢性淋巴细胞白血病	骨恶性纤维组织细胞瘤/骨肉瘤
慢性髓细胞白血病	儿童成神经管细胞瘤
慢性骨髓增生性疾病	黑素瘤
结肠癌	眼内黑素瘤
	默克尔细胞癌
	成人恶性间皮瘤
	儿童间皮瘤

表 2a: 癌症类型

儿童结肠直肠癌	原发灶不明的转移性颈部鳞状细胞癌
皮肤 T 细胞淋巴瘤, 参见蕈样肉芽肿 (Mycosis Fungoides) 和赛塞利综合征 (Sézary Syndrome)	儿童多发性内分泌肿瘤综合征
子宫内膜癌	多发性骨髓瘤/浆细胞瘤
儿童室管膜瘤	蕈样肉芽肿
食道癌	骨髓增生异常综合征
儿童食道癌	骨髓增生异常/骨髓增殖性疾病
尤因家族肿瘤(Ewing's Family of Tumors)	慢性髓细胞白血病
儿童颅外生殖细胞瘤	成人急性髓细胞白血病
性腺外生殖细胞瘤(Extragenital Germ Cell Tumor)	儿童急性髓细胞白血病
肝外胆管癌	多发性骨髓瘤
眼癌、眼内黑色素瘤	慢性骨髓增殖性疾病
眼癌、视网膜细胞瘤	鼻腔癌和副鼻窦癌
胆囊癌	鼻咽癌
胃癌	儿童鼻咽癌
儿童胃癌	成神经细胞瘤
胃肠类癌瘤	成人非霍奇金淋巴瘤
儿童颅外生殖细胞瘤	儿童非霍奇金淋巴瘤
性腺外生殖细胞瘤	妊娠期非霍奇金淋巴瘤
卵巢生殖细胞肿瘤	非小细胞肺癌
妊娠滋养细胞肿瘤	儿童口癌
成人神经胶质瘤	口腔癌、唇癌和口咽癌
儿童脑干神经胶质瘤	骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤
儿童脑星形细胞瘤神经胶质瘤	儿童卵巢癌
	卵巢上皮癌
	卵巢生殖细胞肿瘤
	卵巢低度恶性肿瘤

表 2a: 癌症类型

儿童视觉途径和下丘脑神经胶质瘤	胰腺癌
皮肤癌(黑素瘤)	儿童胰腺癌
默克尔细胞皮肤癌(Merkel Cell Skin Carcinoma)	小岛细胞胰腺癌
小细胞肺癌	副鼻窦癌和鼻腔癌
小肠癌	副甲状腺癌
成人软组织肉瘤	阴茎癌
儿童软组织肉瘤	成嗜铬细胞瘤
鳞状细胞癌, 参见皮肤癌(非黑素瘤)	儿童成松果体细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤
原发灶不明的转移性颈部鳞状细胞癌	垂体瘤
胃癌	浆细胞瘤/多发性骨髓瘤
儿童胃癌	胸膜肺胚细胞瘤
儿童幕上原始神经外胚层肿瘤	妊娠与乳腺癌
皮肤 T 细胞淋巴瘤, 参见蕈样肉芽肿	妊娠与霍金奇淋巴瘤
和赛塞利综合征	妊娠与非霍金奇淋巴瘤
睾丸癌	原发性中枢神经系统淋巴瘤
儿童胸腺瘤	前列腺癌
胸腺瘤和胸腺癌	直肠癌
甲状腺癌	肾细胞(肾)癌
儿童甲状腺癌	儿童肾细胞(肾)癌
肾盂和输尿管移行细胞癌	肾盂和输尿管移行细胞癌
妊娠滋养细胞肿瘤	成视网膜细胞瘤
成人原发部位不明癌	儿童横纹肌肉瘤
儿童原发部位不明癌	唾腺癌
儿童不寻常癌	儿童唾腺癌
输尿管和肾盂移行细胞癌	肉瘤、尤因家族肿瘤
	卡波西肉瘤

表 2a: 癌症类型	
尿道癌	成人软组织肉瘤
子宫内膜癌	儿童软组织肉瘤
子宫肉瘤	子宫肉瘤
阴道癌	赛塞利综合征
儿童视觉路径和下丘脑神经胶质瘤	皮肤癌(非黑素瘤)
外阴癌	儿童皮肤癌
瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症 (Macroglobulinemia, Waldenström's)	
维尔姆斯瘤(Wilms' Tumor)	

Aβ 肽片段的抗血管生成活性

[00138] 虽然不局限于任何理论,但是有可能序列 HHQKLVFF 正是赋予抗血管生成活性的 Aβ 序列。

[00139] 多项研究表明,细胞表面上的肝素和各种蛋白聚糖可与 Aβ 肽结合(Snow 等, 1995 Arch. Biochem. Biophys. **320**, 84-95; McLaurin 等, 2000 Eur. J. Biochem. **267**, 6353-61; McKeon J, Holland LA. 2004 Electrophoresis **25**, 1243-8), 并且有研究表明, 硫酸乙酰肝素蛋白聚糖与 AD 脑内的淀粉样蛋白沉积物缔合(van Horssen 等, 2001 Acta Neuropathol. (Berl). **102**, 604-14)。硫酸肝素蛋白聚糖还通过允许特定的生长因子(例如碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和血管内皮生长因子(VEGF))与细胞表面相互作用, 而在血管生成中发挥重要作用。因此, 蛋白聚糖被认为可调节生长因子与受体的相互作用(Rusnati M, Presta M. 1996 Int. J. Clin. Lab. Res. **26**, 15-23; Dougher 等, 1997 Growth Factors. **14**, 257-68)。本文显示, 加入外源肝素能够有效地使 Aβ₁₋₄₂ 抗血管生成活性逆转。仅加入肝素引起轻微地血管生成抑制, 这与表明过量肝素对血管生成抑制作用的研究是一致的。有研究指出, 这种作用的机制是通过增加组织因子途径抑制剂的释放(Mousa SA,

Mohamed S. 2004 *Thromb. Haemost.* **92**, 627-33).

[00140] 细胞表面蛋白聚糖(例如硫酸乙酰肝素蛋白聚糖)可与各种生长因子(包括 VEGF 和 bFGF)结合并表现出活性(Iozzo RV, San Antonio JD. 2001 *J. Clin. Invest.* **108**, 349-55; Presta 等, 2005 *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 159-78; Sanderson 等, 2005 *J. Cell Biochem.* 9 月 7 日, (先期电子出版物)). A β 有可能与这些蛋白聚糖结合, 对生长因子与细胞的结合和相互作用产生影响。因此, 当血管生成测定含有肝素结合性生长因子时, 加入过量肝素可能起着结合到 A β 肽外部的作用, 防止了它们与细胞表面结合, 从而对抗 A β 的抗血管生成活性。或者, 有研究表明, A β 与 VEGF 上的肝素结合基序发生直接的相互作用(Yang 等, 2005 *J. Neurochem.* **93**, 118-27); 因此, A β 与肝素的结合有可能阻止其与 VEGF 结合, 逆转了 A β 的抗血管生成活性。肝素(和其它糖胺聚糖)还可能影响 A β 肽的构象性质, 改变原纤维形成速率(Castillo 等, 1999 *J. Neurochem.* **72**, 1681-7; Cohlberg 等, 2002 *Biochemistry.* **41**, 1502-11), 从而提供不能阻止血管生成的肽。A β 肽体外的抗血管生成活性似乎与其构象性质有关, 因为含有较高 β -折叠含量的 A β 制品是较有效的抗血管生成剂(Gebbink 等, 2000 *Biochim. Biophys. Acta.* 1502, 16-30)。另外, 肽的可溶性低聚体是特别抗血管生成的, 然而原纤维形式则是无活性的(Paris 等, 2005 *Brain Res. Mol. Brain Res.* **136**, 212-30; Skovseth 等, 2005 *Blood* 105, 1044-51), 这表明为了抑制血管生成, A β 肽中的特定残基需要暴露出来。

[00141] A β 肽序列内对于赋予抗血管生成活性很重要的一个基序是推定蛋白聚糖结合区(HHQQK) (Cardin, A.D.; Weintaub, H.J.R. 1989 *Arteriosclerosis.* 9, 21-32; Snow 等, 1995 *Arch. Biochem. Biophys.* 320, 84-95; McLaurin 等, 2000 *Eur. J. Biochem.* 267, 6353-61; McKeon 等, 2004 *Electrophoresis.* 25, 1243-8)。已知蛋白聚糖在血管生成期间起着调节作用(Moon 等, 2005 *J. Cell Physiol.* 203, 166-76; Tkachenko 等, 2005 *Circ. Res.* 96, 488-500; Presta 等, 2005 *Cytokine Growth Factor*

Rev. 16, 159-78)。同样地, 多项研究表明硫酸乙酰肝素蛋白聚糖在 AD 发病机制中的重要作用, 这就表明干预这些分子与 $A\beta$ 结合可以是治疗上有益的(Leveugle 等, 1994, Neuroreport. 5, 1389-92; Kisilevsky 等, 2002 J. Mol. Neurosci. 19, 45-50)。

[00142] 对于抗血管生成活性的另一个可能的重要序列是与 HHQK 基序相邻, 向着 C 端部分的 4 个氨基酸(LVFF)。已知该区是组成 β 链的部分, 因此对于肽的低聚反应很重要(Morimoto 等, 2004 J. Biol. Chem. 279, 52781-8; Irie 等, 2005 J. Biosci. Bioeng. 99, 437-47)。最近有研究表明, 在 $A\beta_{10-42}$ 的构象模型中, 其高度疏水残基 17-20 暴露于二聚体中, 而在另一项研究中则显示该区埋入原纤维体(fibrillar form)中(Mathura 等, 2005 Biochem. Biophys. Res. Commun. 332, 585-92; Olofsson 等, 2005 J. Biol. Chem. 10 月 7 日, (先期电子出版物))。

[00143] 为了进一步研究 $A\beta$ 可通过在细胞表面上阻止生长因子与蛋白聚糖结合而起作用的可能性, 置换 $A\beta_{12-28}$ 的推定蛋白聚糖结合序列 HHQK 上的三个残基。本文显示用天然氨基酸置换型 GGQG 或 AAQA 替换野生型 HHQK, 完全破坏野生型 $A\beta_{12-28}$ 肽的抗血管生成作用。此外, 通过用 VEGF 诱导血管生成的大鼠角膜微囊袋模型, 证实了 $A\beta_{12-28}$ 体内的抗血管生成功效。AD 患者脑内的 VEGF 水平增加(Kalaria 等, 1998 Brain Res. Mol. Brain Res. 62, 101-5; Tarkowski 等, 2002 Neurobiol Aging. 23, 237-43), 但是这与脑血管形成增加无关(Buee 等, 1997 Ann. N. Y. Acad. Sci. 826, 7-24)。因此, AD 脑内 $A\beta$ 的累积可导致 VEGF 活性的抑制。VEGF 是神经营养性的, 对于维持血管完整性很重要, 还是脑卒中或头损伤后血管重塑的关键因子(Slevin 等, 2000 Neuroreport 11, 2759-64; Shore 等, 2004 Neurosurgery. 54, 605-12)。 $A\beta$ 在 AD 脑内对 VEGF 的拮抗作用可以解释为什么 AD 患者和 AD 转基因小鼠模型在脑卒中后恢复不良(Koistinaho 等, 2002 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 1610-5; Wen 等, 2004 J. Biol. Chem. 279, 22684-92; Koistinaho M, Koistinaho J. 2005 Brain Res. Brain Res.

Rev. **48**, 240-50)。

[00144] 本文所提供的实施例支持仅蛋白聚糖结合基序可能不足以诱发抗血管生成作用,需要紧接该序列的氨基酸(LVFF)以介导A β 的抗血管生成活性的结论。有研究表明在A β 低聚体的构象模型中,LVFF序列(氨基酸17-20)是肽的暴露区(Mathura等,2005 Biochem. Biophys. Res. Commun. **332**, 585-92)。

[00145] 还观察到A β_{34-42} 的促血管生成作用。在本文所述的网络实验(network assay)中观察到A β_{34-42} 片段的促血管生成活性与之前曾观察到的低浓度下A $\beta_{1-40/42}$ 肽的促血管生成活性是一致的(Paris等,2004 Angiogenesis. **7**, 75-85; Cantara等,2004 F.A.S.E.B. J. **18**, 1943-5)。当形成单体和二聚体时,A β 的折叠可使C端34-42序列暴露出来。随后该区可以埋入更高层次的低聚体或原纤维体中。A β_{1-42} 原纤维最新的NMR研究证实,残基28-42是溶剂达不到的,而且即使在长时间后,主干酰胺也不会发生氘交换(Olofsson等,2005 J. Biol. Chem. **10**月7日,(先期电子出版物))。因此,低浓度下A $\beta_{1-40/42}$ 肽的促血管生成作用可能是由其主要的单体或二聚体状态暴露出C端区的促血管生成基序所致(Olofsson等,2005 J. Biol. Chem. **10**月7日,(先期电子出版物)); Fraser等,1994 J. Mol. Biol. **244**, 64-73; van Horssen等,2001 Acta Neuropathol. (Berl). **102**, 604-14; Rusnati, M; Presta, M. 1996 Int. J. Clin. Lab. Res. **26**, 15-23; Dougher等,1997 Growth Factors. **14**, 257-68; Mousa等,2004 Thromb. Haemost. **92**, 627-33; Iozzo等,2001 J. Clin. Invest. **108**, 349-55; Presta等,2005 Cytokine Growth Factor Rev. **16**, 159-78; Sanderson等,2005 J. Cell Biochem. **9**月7日,(先期电子出版物))。

联合疗法

[0001] 一方面,为了治疗癌症、肿瘤或其它增殖性疾病,本文所公开的肽片段可与至少一种另外的化疗药物联用。另外的药物可与

本文所公开的化合物联合或交替给药。药物可以形成同一组合物的部分，或者以单独的组合物在同一时间或不同时间给药。

[0002] 第二治疗药的实例包括但不限于 IL-12、类视色素、干扰素、血管生长抑素、内皮生长抑素、沙利度胺、凝血酶致敏蛋白-1、凝血酶致敏蛋白-2、卡托普利(captopryl)、抗肿瘤药物例如 α 干扰素、COMP (环磷酰胺、长春新碱、甲氧蝶呤和泼尼松)、依托泊苷、mBACOD (甲氧蝶呤、博来霉素、多柔比星、环磷酰胺、长春新碱和地塞米松)、PRO-MACE/MOPP (泼尼松、甲氧蝶呤(w/leucovorin rescue)、多柔比星、环磷酰胺、泰素、依托泊苷/氮芥、长春新碱、泼尼松和丙卡巴肼)、长春新碱、长春碱、血管抑制素(angioinhibin)、TNP-470、聚硫酸戊聚糖、血小板因子 4、血管生长抑素、LM-609、SU-101、CM-101、Techgalan、沙利度胺、SP-PG 和放射性药物。

[0003] 其它实例包括具有抗有丝分裂作用的药物(抗有丝分裂抑制剂)，例如靶向细胞骨架组分的抗有丝分裂抑制剂，包括微管调节剂例如紫杉烷类(taxane)药物(例如泰素、紫杉醇、泰素帝、多西他赛)、鬼臼毒素或长春花属生物碱(长春新碱、长春碱)；抗代谢药(例如 5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吉西他滨、嘌呤类似物例如喷司他丁、甲氧蝶呤)；烷化剂或氮芥类(例如亚硝基脲、环磷酰胺或异环磷酰胺)；靶向 DNA 的药物例如蒽环霉素药类、阿霉素、多柔比星、盐酸表柔比星制剂或表柔比星；靶向拓扑异构酶的药物(拓扑异构酶抑制剂)例如依托泊苷；激素类和激素激动剂或拮抗剂例如雌激素、抗雌激素(他莫昔芬及相关化合物)和雄激素、氟他胺、亮丙瑞林、戈舍瑞林、环丙孕酮或奥曲肽；靶向肿瘤细胞信号转导的包括抗体衍生物在内的药物例如曲妥单抗；烷化药物例如铂类药物(顺铂、卡铂、奥沙利铂、伯尔定)或亚硝基脲；可能影响肿瘤转移的药物例如基质金属蛋白酶抑制剂；基因疗法和反义药物；抗体治疗药；海洋源的其它生物活性化合物例如膜海鞘素类(didemnin)例如 aplidine；皮质类固醇；类固醇类似物，例如地塞米松；抗炎药物，包括非甾类药物(例如对乙酰氨基酚或布洛芬)或类固醇类

及其衍生物，特别是地塞米松和镇吐药，包括 5HT-3 抑制剂(例如格拉司琼或昂丹司琼)。

[0004] 第二治疗药的其它实例包括下表 1a 所公开的药物。

表 1a:

化疗药物

- 13-顺-维 A 酸	- 环磷酰胺注射剂
- 2-氨基-6-巯基嘌呤	- Neulasta
- 2-CdA	- 纽密伽(Neumega)
- 2-氯脱氧腺苷	- Neupogen
- 5-氟尿嘧啶	- Nilandron
- 5-FU	- 尼鲁米特
- 6-TG	- 氮芥
- 6-硫鸟嘌呤	- Novaldex
- 6-巯基嘌呤	- 诺消灵(Novantrone)
- 6-MP	- 奥曲肽
- Accutane	- 醋酸奥曲肽
- 放射菌素-D	- Oncospar
- 阿霉素	- 硫酸长春新碱(Oncovin)
- Adrucil	- 地尼白介素 2
- 阿那格雷(Agrylin)	- Onxal
- 氢化可的松(Ala-Cort)	- 奥普瑞白介素
- 阿地白介素	- Orapred
- 阿仑单抗	- 泼尼松制剂
- 阿利维 A 酸	- 奥沙利铂
- Alkaban-AQ	- 紫杉醇
- 爱克兰	- 帕米膦酸(Pamidronate)

- 全反式维 A 酸	- 0.1%阿利维 A 酸凝胶剂
- α 干扰素	- 伯尔定
- 六甲蜜胺	- 泼尼松磷酸钠制剂
- 甲氨蝶呤	- PEG 干扰素(PEG Interferon)
- 氨磷汀	- 培门冬酶
- 氨鲁米特	- Pegfilgrastim
- 阿那格雷	- PEG-干扰素
- 安得乐(Anandron)	- PEG-L-天冬酰胺酶
- 阿那曲唑	- 苯丙氨酸氮芥(Phenylalanine Mustard)
- 阿拉伯糖胞嘧啶	- 川铂注射剂
- 阿糖胞苷(Ara-C)	- 川铂注射剂-AQ
- Aranesp	- 泼尼松龙
- 阿可达	- 泼尼松
- 瑞宁得	- Prelone
- 阿诺新(Aromasin)	- 丙卡巴肼
- 三氧化二砷	- 重组人类红细胞生成素 α
- 天冬酰胺酶	- Proleukin
- ATRA	- Prolifeprospan 20 与卡莫司汀植入剂
- Avastin	- 巯嘌呤
- BCG	- 雷洛昔芬
- BCNU	- Rheumatrex
- 贝伐单抗	- Rituxan
- 贝沙罗汀	- 利妥昔单抗
- 比卡鲁胺	- Roveron-A (干扰素 α -2a)
- BiCNU	- Rubex
- 硫酸博来霉素	- 盐酸红比霉素
- 博来霉素	- 善宁

- 硼替佐米	- 善宁 LAR
- 白消安	- 沙格司亭
- 马利兰针(Busulfex)	- 氢可琥钠制剂
- C225	- 甲强龙制剂
- 亚叶酸钙	- STI-571
- Campath	- 链佐星
- Camptosar	- 他莫昔芬
- 喜树碱-11	- Targretin
- 卡培他滨	- 泰素
- Carac	- 泰素帝
- 卡铂	- Temodar
- 卡莫司汀	- 替莫唑胺
- 卡莫司汀糯米纸囊剂	- 替尼泊苷
- 康士德	- TESP A
- CCNU	- 沙利度胺
- CDDP	- Thalomid
- CeeNU	- TheraCys
- 盐酸柔红霉素(Cerubidine)	- 硫鸟嘌呤
- 西妥昔单抗	- 硫鸟嘌呤片剂
- 苯丁酸氮芥	- 塞替派(Thiophosphoamide)
- 顺铂	- 塞替派粉针剂
- 亚叶酸(Citrovorum Factor)	- 塞替派
- 克拉屈滨	- TICE
- 可的松	- 拓扑杀
- 放线菌素粉针剂	- 托泊替康
- CPT-11	- 托瑞米芬
- 环磷酰胺	- 曲妥单抗
- 氨鲁米特片剂	- 维 A 酸

- 阿糖胞苷	- Trexall
- 阿糖胞苷脂质体	- Trisenox
- 阿糖胞苷粉针剂	- TSPA
- 环磷酰胺制剂	- VCR
- 达卡巴嗪	- 硫酸长春碱制剂
- 放射菌素 D	- 万珂(Velcade)
- Darbepoetin alfa	- 凡必士
- 道诺霉素	- 维 A 酸胶囊剂
- 柔红霉素	- 醋酸亮丙瑞林植入剂
- 盐酸柔红霉素	- 长春碱
- 柔红霉素脂质体	- 硫酸长春碱
- 枸橼酸柔红霉素脂质体	- 硫酸长春碱注射剂
- 地塞米松	- 长春新碱
- 泼尼松龙(Delta-Cortef)	- 长春瑞滨
- 泼尼松	- 酒石酸长春瑞滨
- 地尼白介素 2	- VLB
- 脂质体阿糖胞苷注射剂	- VP-16
- 地塞米松	- 卫萌
- 醋酸地塞米松	- 适罗达
- 地塞米松磷酸钠	- 链佐星粉针剂
- 地塞米松磷酸钠(Dexasone)	- 泽娃灵(Zevalin)
- 右雷佐生	- 右雷佐生粉针剂
- DHAD	- 诺雷德
- DIC	- 唑来膦酸
- Diodex	- Zometa
- 多西他赛	- 卡氮芥糯米纸囊剂
- 盐酸多柔比星脂质体	- 甲磺酸依马替尼

- 多柔比星	- GM-CSF
- 多柔比星脂质体	- 戈舍瑞林
- 羟基脲(Droxia)	- 粒细胞集落刺激因子
- DTIC	- 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子
- 氮烯咪胺(DTIC-Dome)	- 氟甲睾酮制剂
- 醋酸甲泼尼龙(Duralone)	- 曲妥单抗
- 氟尿嘧啶(Efudex)	- 地塞米松(Hexadrol)
- Eligard	- 克瘤灵
- Ellence	- 六甲蜜胺(Hexamethylmelamine)
- 奥沙利铂	- HMM
- 爱施巴	- 和美新粉针剂
- Emcyt	- 羟基脲(Hydrea)
- 表柔比星	- Hydrocort Acetate
- 阿法依泊汀	- 氢化可的松
- 爱必妥(Erbix)	- 氢化可的松磷酸钠
- 欧文氏菌属 L-天冬酰胺酶	- 氢化可的松琥珀酸钠
- 雌莫司汀	- Hydrocortone phosphate
- 氨磷汀(Ethyol)	- 羟基脲
- 凡毕复	- Ibritumomab
- 依托泊苷	- 替伊莫单抗
- 磷酸依托泊苷	- 盐酸伊达比星(Idamycin)
- Eulexin	- 伊达比星
- 雷洛昔芬(Evista)	- 异环磷酰胺粉针剂
- 依西美坦	- IFN- α
- 枸橼酸托瑞米芬(Fareston)	- 异环磷酰胺
- 氟维司群(Faslodex)	- IL-2
- 富马乐(Femara)	- IL-11

- 非格司亭	- 甲磺酸伊马替尼
- 氟尿苷	- 达卡巴嗪(Imidazole Carboxamide)
- 氟达拉滨(Fludara)	- 干扰素 α
- 氟达拉滨(Fludarabine)	- 干扰素 α -2b (PEG 缀合物)
- Fluoroplex	- 白介素-2
- 氟尿嘧啶	- 白介素-11
- 氟尿嘧啶(乳膏剂)	- 甘乐能 A (干扰素 α -2b)
- 氟甲睾酮	- 亚叶酸
- 氟他胺	- 留可然
- 亚叶酸	- 白细胞素
- FUDR	- 亮丙立德
- 氟维司群	- 长春新碱(Leurocristine)
- G-CSF	- 克拉屈滨
- 吉非替尼(Gefitinib)	- Liposomal Ara-C
- 吉西他滨	- Liquid Pred
- 吉姆单抗奥佐米星	- 洛莫司汀
- 健择	- L-PAM
- 格列卫(Gleevec)	- L-沙可来新
- 醋酸亮丙瑞林	- 泼尼松(Meticorten)
- 醋酸亮丙瑞林贮库制剂	- 丝裂霉素
- 丙卡巴肼制剂	- 丝裂霉素-C
- Maxidex	- 米托蒽醌
- 氮芥	- M-Prednisol
- 盐酸氮芥	- MTC
- 甲泼尼龙(Medrolone)	- MTX
- 美卓乐	- 氮芥(Mustargen)
- 美格施	- 氮芥(Mustine)

- 甲地孕酮	- 丝裂菌素制剂
- 甲醋酸地孕酮	- 马利兰
- 美法仑	- 易瑞沙(Iressa)
- 巯嘌呤	- 伊立替康
- 美钠	- 异维 A 酸
- 美钠针剂	- 天冬酰胺酶
- 甲氨蝶呤	- 醋酸氢可的松
- 甲氨蝶呤钠	- L-天冬酰胺酶
- 甲泼尼龙	- LCR
- Mylocel	
- 来曲唑	

[00146] 用于本文所公开肽的测定法

[00147] 可以采用本领域已知的血管生成测定法。参见例如美国专利申请 2003/0077261A1 (Paris 等), 其中记载了大鼠主动脉环、牛、小鼠和人的血管生成测定法。

[00148] 可以采用环微血管增生定量测定法, 参见例如美国专利申请 2003/0077261A1 (Paris 等), 其中用与奥林巴斯(OLYMPUS) BX60 显微镜连接的数码摄像机, 拍摄环微血管培养物, 用 Image Pro Plus 软件有选择性地检测增生区域。

[00149] 可以采用内皮细胞迁移测定法, 参见美国专利申请 2003/0077261A1 (Paris 等), 其中采用改进的 Boyden 小室测定法(BD BioCoat MATRIGEL 侵袭小室), 评价成人脑内皮细胞的迁移, 参见 Soker 等 1998、Nakamura 等 1997。

[00150] 可以采用裸小鼠肿瘤异种移植物模型, 参见例如美国专利申请 2003/0077261A1 (Paris 等), 其中将 A-549 (人肺腺癌)和 U87-MG (人成胶质细胞瘤)细胞植入 8 周龄的雌性裸小鼠体内。在用 A β 肽治疗前、治疗后和治疗期间, 测量生长在动物内的肿瘤。在每

项体内抗肿瘤研究结束之日，摘取肿瘤，定量测定微血管。

[00151] 根据以下非限制性实施例，将更详尽地理解本发明。

实施例

(材料与方法在实施例 1-7 提供)

实施例 1: 细胞培养和试剂

[00152] 所有体外实验都使用传代 3-4 次的原代人脐静脉内皮细胞(HUVEC)，细胞购自美国典型培养物保藏中心(ATCC, VA)。将细胞培养在 F12K 培养基(ATCC, VA)中，培养基补充了 10%胎牛血清(Invitrogen, CA)、0.1mg/ml 肝素和 0.03mg/ml 内皮细胞生长补充剂(Sigma-Aldrich, MO)。在所有时间内，细胞都保存在 37°C 和 5% CO₂ 的无菌细胞培养箱内。

实施例 2: A β 肽的制备

[00153] 所有肽都购自 Biosource, CA，需要时配制。为了使 β -折叠结构的形成减到最少并促进 α -螺旋二级结构，将 1mg 冻干肽溶于 1ml 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFIP)。使肽在化学通风橱中风干 1 小时后，在真空离心蒸发浓缩器(Thermo-Savant, NY)中再干燥 30 分钟。将所得透明薄膜重新悬浮于 100%二甲亚砜(DMSO)至 1mM 浓度。随后将肽等分并保存在-80°C 下。

实施例 3: 毛细血管形成测定法

[00154] 将 500 μ l 培养基中的 HUVEC (7.5×10^4 细胞/ml)接种至 24 孔板内的 F12K 培养基(ATCC, VA)的基质胶基底膜基质(Invitrogen, CA)的顶层，培养基含有 4%血清(Invitrogen, CA)、0.1mg/ml 肝素和 0.03mg/ml 内皮细胞生长补充剂(Sigma-Aldrich, MO)。使细胞与肽(或对照条件)孵育 24 小时。对照孔接收相同体积的用于稀释肽的溶媒(DMSO)。按一式三份进行网络形成实验，每孔随机选择至少 2 个视野，用四倍物镜拍照。用 Image Pro Plus 软件(Media

Cybernetic, Inc., MD)测量毛细血管长度。

实施例 4: 细胞增殖测定法

[00155] 将 HUVEC (5×10^3 细胞/孔)接种至 96 孔板。使细胞与肽(或对照条件)孵育 24 小时。按照生产商的方法(Biovision Inc., CA)进行快速细胞增殖测定。

实施例 5: 细胞粘附测定法

将 HUVEC (1×10^4 细胞/孔)接种至预包被有基底膜蛋白复合物的 96 孔板上。使细胞与肽(或对照条件)孵育 2.5 小时。对于细胞粘附测定, 采用 Innocyte 细胞粘附测定法(Calbiochem, CA)和按照生产商说明书的方法。

实施例 6: 大鼠角膜微囊袋试验

[00156] 按前述方法(Paris D, Townsend K, Quadros A, Humphrey J, Sun J, Brem S, Wotoczek-Obadia M, DelleDonne A, Patel N, Obregon DF, Crescentini R, Abdullah L, Coppola D, Rojiani AM, Crawford F, Sebt SM, Mullan M. (2004) Angiogenesis. 7, 75-85), 用仅含 VEGF (200ng), 或者含有 VEGF (200ng)与不同含量 A β 肽片段组合的 hydron 小珠, 进行该项测定。植入后 7 天测定血管生长反应。测量血管增生的长度和宽度, 运用公式 $L \times W = AI$ 计算血管生成指数(AI)。大鼠用胶态炭灌注, 摘出眼球, 在 10%缓冲福尔马林中固定。在奥林巴斯(Olympus)解剖显微镜下取出角膜, 放在有晶体封固剂的载玻片上。

实施例 7: 统计分析

[00157] 用 ANOVA 与用 Scheffe 或 Bonferroni 事后比较, 对于 Windows 版本 10.1 用 SPSS, 进行统计分析。

实施例 8: A β 肽片段对毛细血管形成的作用

[00158] 在实施例 3 所述测定中,检测不同的 A β 肽和肽片段抑制毛细血管网络形成的能力,包括 1 μ M、5 μ M 和 10 μ M 的 A β_{1-42} 、A β_{1-40} 、A β_{1-28} 、A β_{12-28} 、A β_{17-28} 、A β_{25-35} 、A β_{10-35} 、A β_{10-16} 和 A β_{34-42} 。对于每个治疗组($n \geq 8$)定量测定毛细血管总长度,用占对照治疗的百分比表示(图 1)。

[00159] 事后分析显示在 5 μ M 和 10 μ M 剂量下,对照与 A β_{1-40} 、A β_{1-42} 、A β_{1-28} 、A β_{10-35} 和 A β_{12-28} 之间的显著性差异($P < 0.005$)。所测肽中, A β_{1-28} 、A β_{12-28} 、A β_{10-35} 、A β_{1-40} 和 A β_{1-42} 活性最强。A β_{25-35} 在 5 μ M 下略有活性,但在 10 μ M 没有活性,其它肽(A β_{10-16} 、A β_{17-28} 和 A β_{34-42})不显示任何抗血管生成活性(图 1)。与之相反, A β_{34-42} 以剂量依赖性方式促进血管生成。这些数据表示保持 A β 肽抗血管生成活性所需要的最小序列包括在残基 12-28 内。此外, A β_{12-28} 片段抗血管生成,而 17-28 片段(缺失 HHQK 基序)无活性的观察结果表明,存在于残基 13-16 之间的蛋白聚糖结合区(HHQK)是抗血管生成活性所必需的。

实施例 9: A β 肽片段对细胞增殖和细胞粘附的作用

[00160] 分别用实施例 4 和实施例 5 所述测定法,检测不同的 A β 肽片段对细胞增殖和细胞粘附到基底膜复合物上的抑制能力。

[00161] 所有的肽治疗显著地抑制细胞增殖($P < 0.005$)。ANOVA 显示任何所测肽之间没有显著性的重要作用。事后检验法显示不同肽之间无显著性差异($P > 0.005$)。虽然所有所测片段都能够抑制 HUVEC 的细胞增殖,但是不同肽之间在功效上没有明显差异(图 2a)。然而, ANOVA 和事后检验法显示,所测片段中都不能显著影响细胞粘附到包含层粘连蛋白、胶原 IV、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖和巢蛋白的基底膜复合物上($P > 0.005$)(图 2b)。因此, A β 肽片段抗血管生成活性的差异可能与对细胞增殖或粘附的作用无关。

实施例 10: 肝素对毛细血管形成的作用

[00162] 为了证实 A β 肽内的推定肝素结合序列的重要性, 将肝素加到样品中, 用实施例 3 所述毛细血管形成测定法, 定量测定 A β 肽的抗血管生成活性。

[00163] 定量测定每个治疗组($n \geq 8$)的毛细血管总长度, 用占对照治疗的百分比表示。事后分析显示以下情况的显著性差异: 对照和所有治疗组之间($P < 0.001$)、A β 和 A β + 肝素 500 μ g/ml 之间($P < 0.001$)、A β 和 A β + 肝素 1mg/ml 之间($P < 0.001$)。加入 500 μ g/ml 和 1mg/ml 的肝素有效地逆转由 A β_{1-42} 诱导的毛细血管形成抑制(图 3)。仅加入肝素还引起轻微的血管生成抑制。

实施例 11: 蛋白聚糖结合区突变型 A β 肽片段对毛细血管形成的作用

[00164] 因为加入肝素逆转 A β_{1-42} 的抗血管生成活性, 所以推测肽内的蛋白聚糖结合区对赋予抗血管生成活性十分重要。为了验证这个假设, 用氨基酸置换(存在于 HHQK 蛋白聚糖结合基序的 3 个氨基酸置换为 GGQG 或 AAQA)制备成一种抗血管生成的肽片段(A β_{1-28}), 已知该氨基酸置换有效抑制 A β 与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖结合(McLaurin 等, Eur. J. Biochem. 2000, 267, 6353-61; Olofssen 等, J. Biol. Chem 2005, 10 月 7 日, 先期电子出版物)。然后, 用实施例 3 所述毛细血管形成测定法, 测定突变型 A β 肽片段的作用。

[00165] 定量测定每个治疗组($n \geq 8$)的毛细血管总长度, 用占对照的百分比表示。ANOVA 显示野生型 A β_{1-28} 显著的剂量依赖的重要作用($P < 0.001$), A β_{1-28} GGQGL ($P = 0.566$)或 A β_{1-28} AAQAL ($P = 0.380$) 则没有重要作用。事后分析显示野生型 A β_{1-28} 在 1 μ M、5 μ M 和 10 μ M 下有显著作用($P < 0.005$), 但是突变型 A β_{1-28} 肽在任何测试剂量下都没有显著作用。

[00166] A β 蛋白聚糖结合区的氨基酸置换完全破坏了 A β_{1-28} 肽的抗血管生成活性(图 4)(见表 2 肽序列一览表)。

表 2: 10 μ M A β 肽序列抗血管生成活性一览表

肽	氨基酸序列	抗血管生成?
A β ₁₋₄₂	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	是
A β ₁₋₄₀	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	是
A β ₁₂₋₂₈	VHHQKLVFFAEDVGSNK	是
A β ₁₇₋₂₈	LVFFAEDVGSNK	否
A β ₁₀₋₃₅	YEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLM	是
A β ₂₅₋₃₅	GSNKGAIIGLM	否
A β ₁₀₋₁₆	YEVHHQK	否
A β ₃₄₋₄₂	LMVGGVVIA	否
A β ₁₋₂₈ 野生型	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK	是
A β ₁₋₂₈ 突变型 1	DAEFRHDSGYEVGGQGLVFFAEDVGSNK	否
A β ₁₋₂₈ 突变型 2	DAEFRHDSGYEVAAQALVFFAEDVGSNK	否
片段 1	HHHQKLVFF	是
片段 2	VHHQKLVII	否
片段 3	VHHQKLVKK	否

实施例 12: LVFF 突变型 A β 肽片段对毛细血管形成的作用

[00167] 用实施例 3 所述毛细血管形成测定法, 通过测定始于 HHQK 序列由 9 个氨基酸组成的肽片段(表 2, 片段 1-3), 来确定接近 HHQK 序列 C 端一侧 VFF 氨基酸序列的作用。

[00168] 定量测定每个治疗组($n \geq 6$)的毛细血管总长度, 用占对照的百分比表示。ANOVA 显示对于野生型(HHHQKLVFF)的显著性重要作用, 但是对于突变型肽则无。事后分析显示野生型肽在 1 μ M、5 μ M 和 10 μ M 下有显著作用($P < 0.005$), 但是 LVFF 突变型肽在任何测试剂量下都无显著作用。

[00169] 这些结果都支持仅含有 HHQK 和 VFF 基序的肽序列才

有效抑制毛细血管形成测定中血管生成的结论(图 6)。然而, 仅含有 YEVHHQK 序列的 $A\beta_{10-16}$ 片段无活性, 表明仅该区不足以具备抗血管生成活性。

实施例 13: 大鼠角膜微囊袋试验中 $A\beta_{12-28}$ 肽片段的作用

[00170] 为了确定体外表现出抗血管生成的 $A\beta_{12-28}$ 肽片段是否体内也抗血管生成, 用实施例 6 所述大鼠角膜微囊袋试验测定 $A\beta_{12-28}$ 。使角膜微囊袋孵育 7 天。在对 200ng VEGF、VEGF + 0.5 μ g $A\beta_{12-28}$ 、VEGF + 2.5 μ g $A\beta_{12-28}$ 和 VEGF + 5.0 μ g $A\beta_{12-28}$ 的反应中, 对从大鼠角膜微囊袋试验得到的数据进行定量。ANOVA 显示 $A\beta$ 剂量显著性的重要作用, 事后分析显示在 5 μ g 剂量下的显著性作用($P < 0.001$)。血管生成指数用平均值 $\pm$ SEM 表示。

[00171] 这些结果支持在该体内测定法中 $A\beta_{12-28}$ 能够剂量依赖性地抑制 VEGF 诱导的血管生成的结论(图 7), 证实了得自体外实验的数据。

实施例 14: $A\beta_{12-28}$ 、 $A\beta_{12-28}$ 突变型和 $A\beta_{13-20}$ 在大鼠角膜微囊袋试验中的作用

[00172] 按照实施例 6 所述大鼠角膜微囊袋试验方法, 测试不同 $A\beta$ 肽片段和突变型的作用。对得自响应 200ng VEGF、5.0 μ g $A\beta_{12-28}$ GGQGL 突变型肽和 0.5 μ g、2.5 μ g 和 5.0 μ g $A\beta_{12-28}$ 和 $A\beta_{13-20}$ (HHH-肽或 HHQKLVFF) 反应的测定数据进行定量。 $A\beta_{12-28}$ GGQGL 突变型在体内对抑制血管生成无活性。较短的 HHH-肽在体内表现出抗血管生成($P < 0.05$, 以剂量依赖性方式)。结果见图 8。图 9 是毛细血管的四倍放大照片。

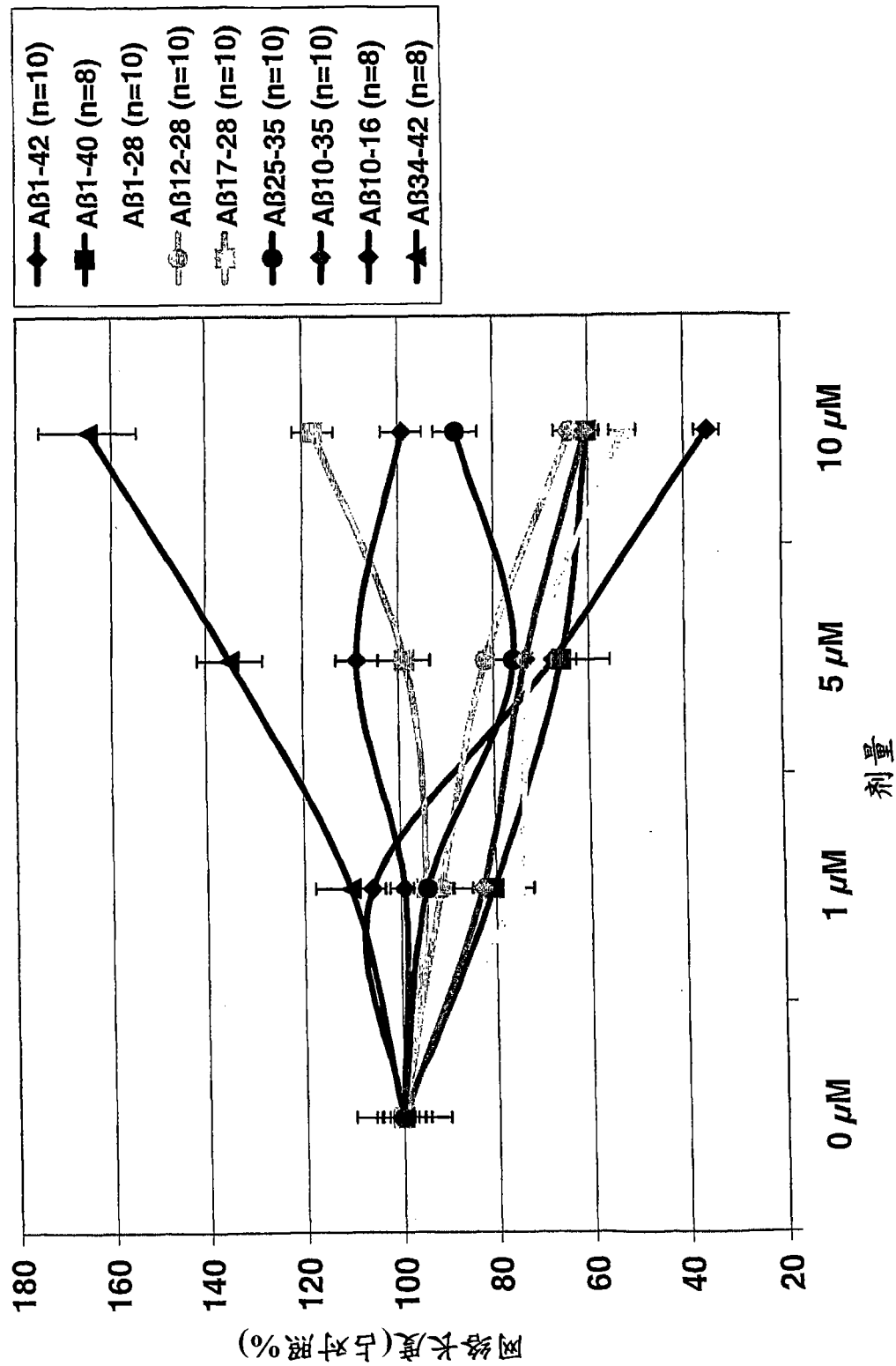


图 1

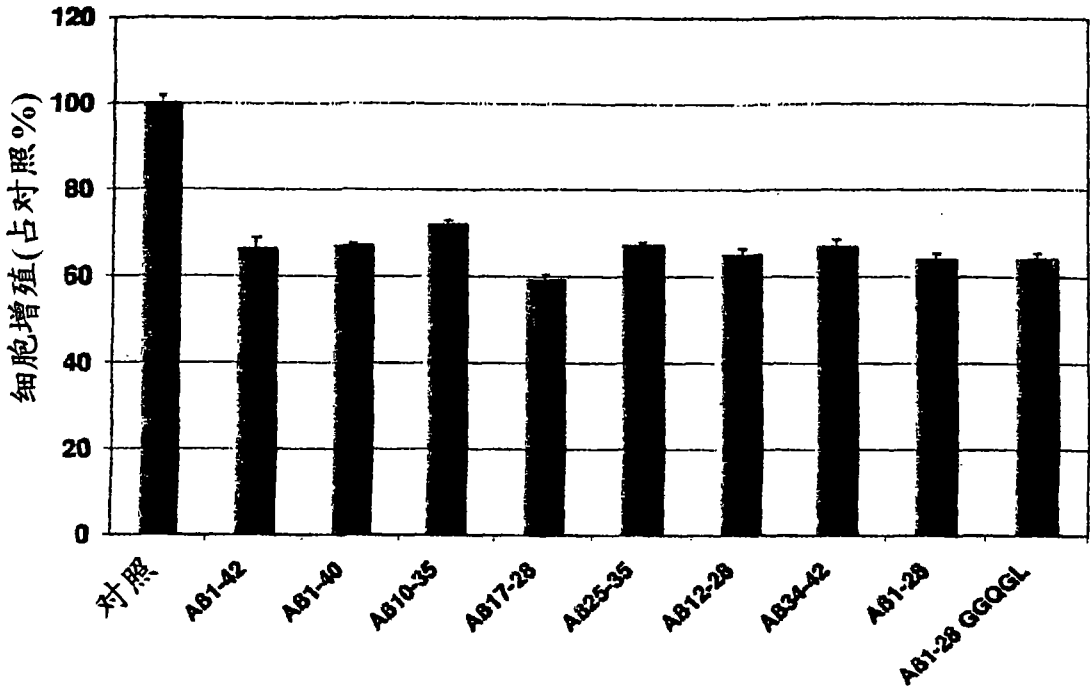


图 2A

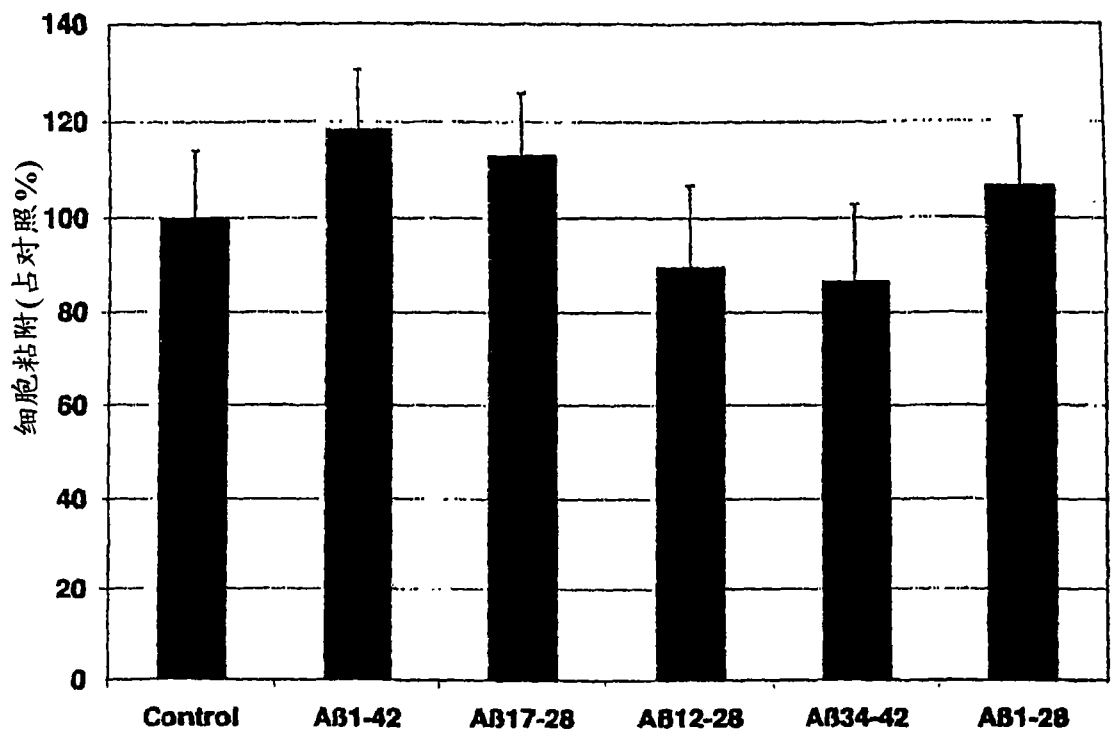


图 2B

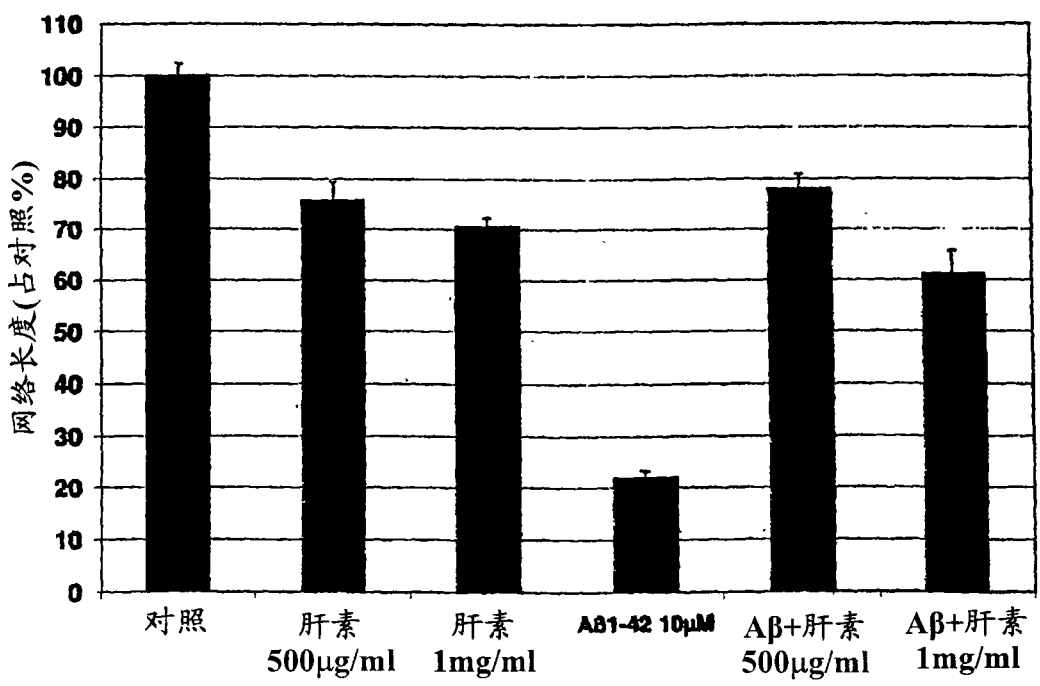


图 3

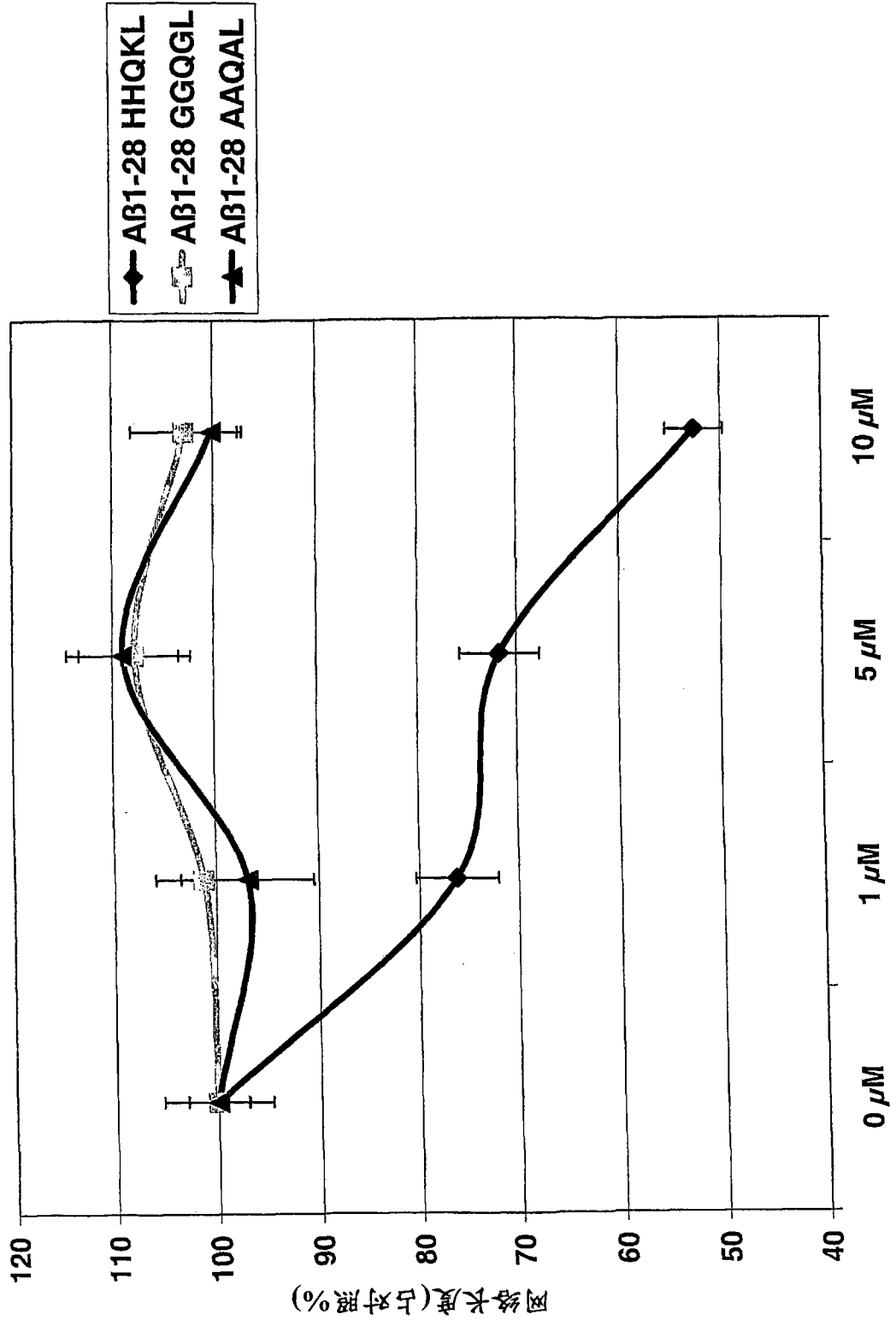


图 4

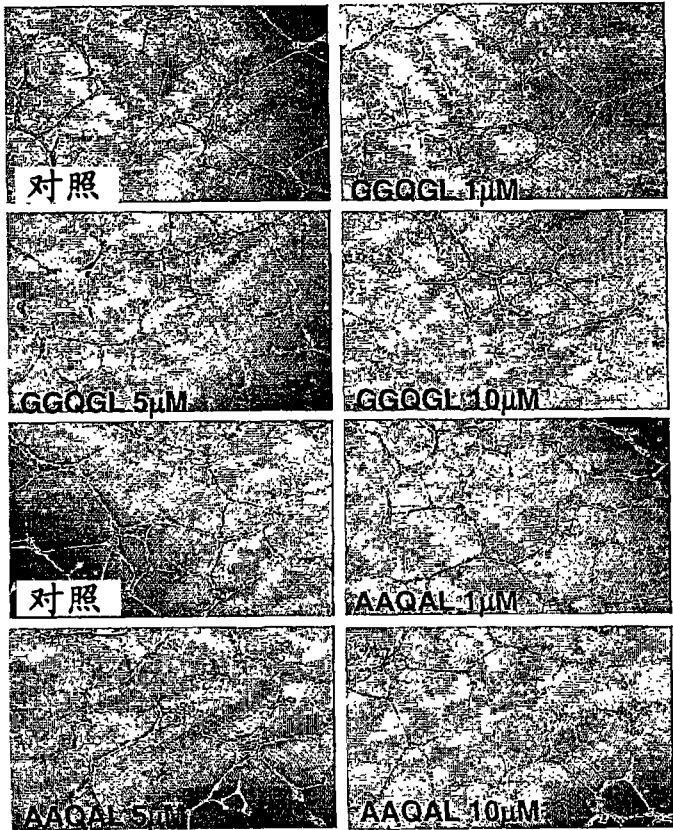


图 5

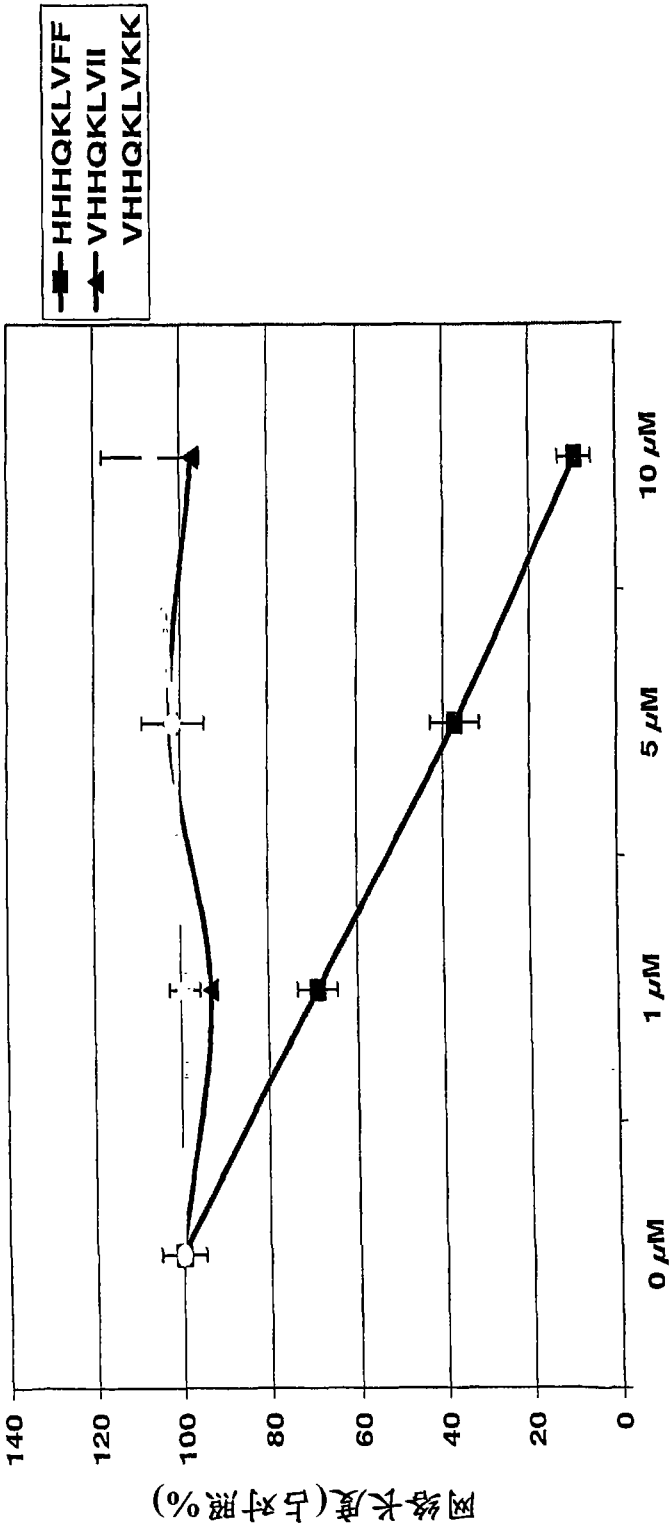


图6

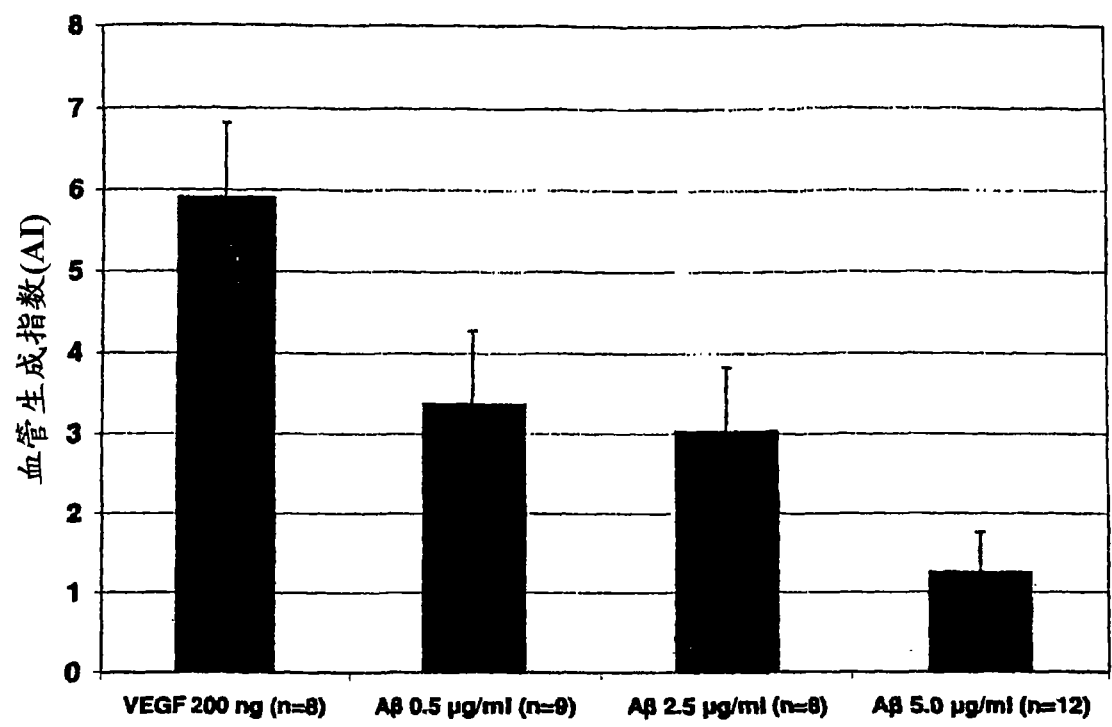


图 7

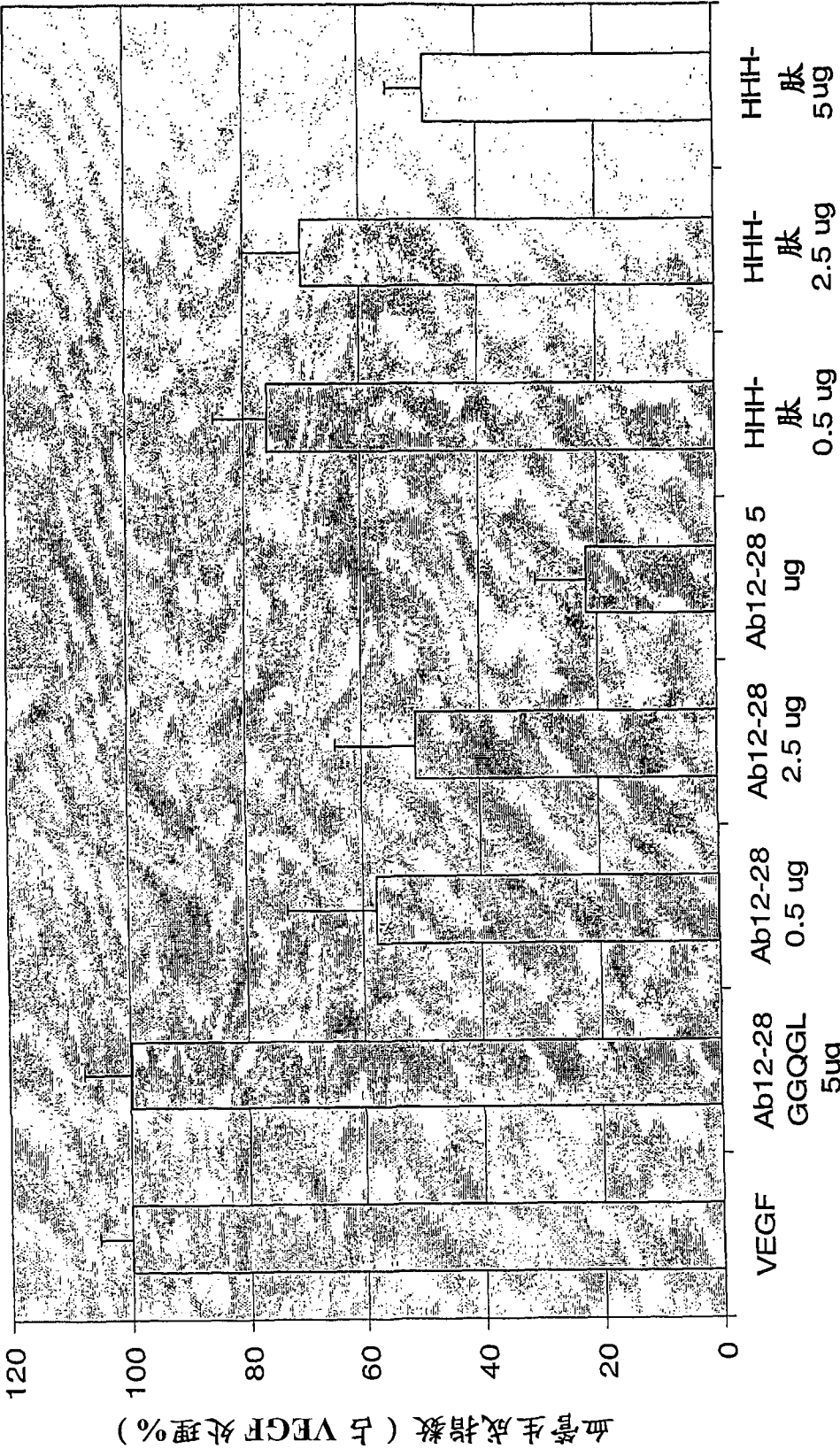
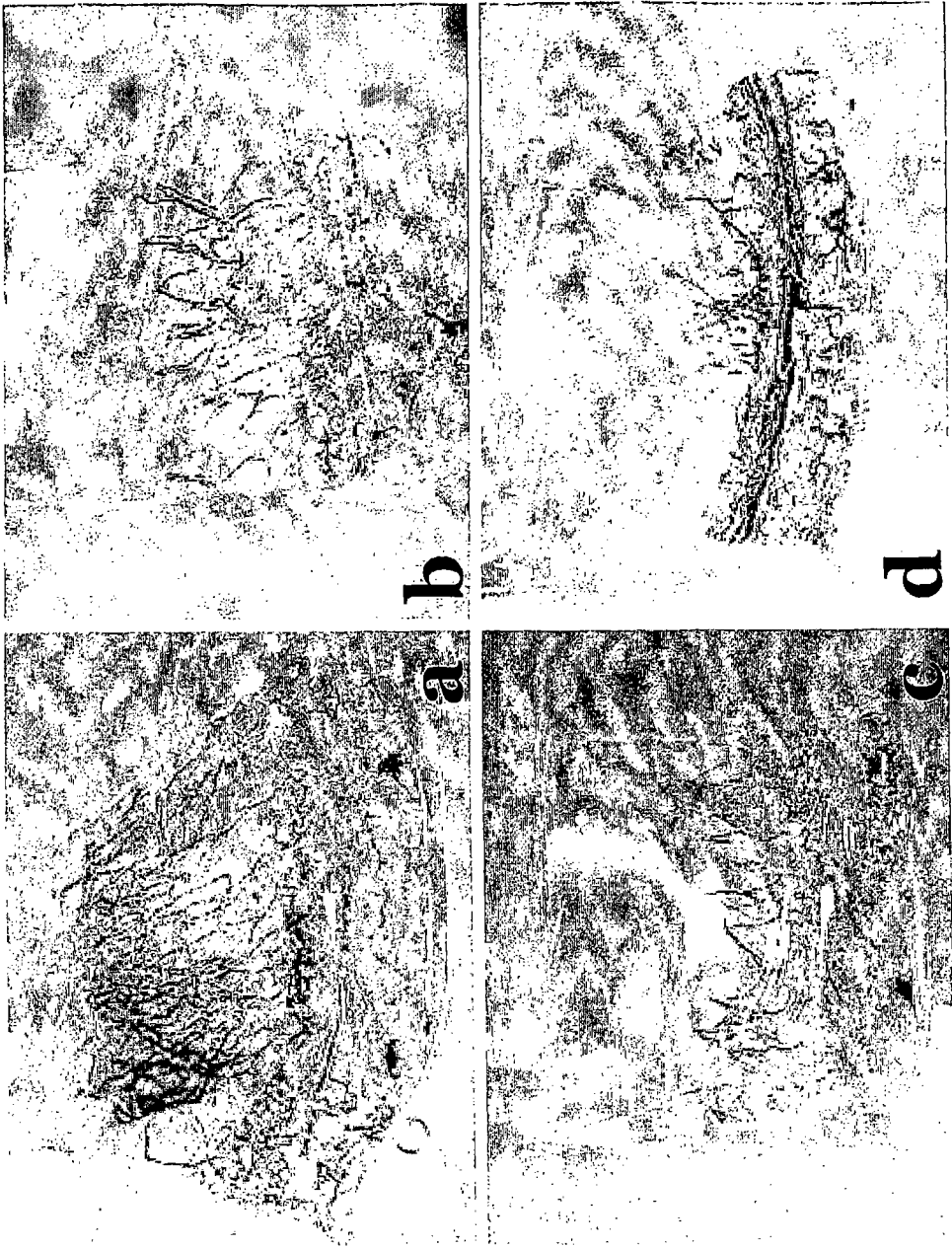


图 8



a) VEGF 对照(200ng); b) Aβ12-28 (0.5μg); c) Aβ12-28 (2.5μg); d) Aβ12-28 (5.0μg)

图 9

SEQUENCE LISTING

<160> NUMBER OF SEQ ID NOS: 11

<210> SEQ ID NO 1

<211> LENGTH: 43

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<220> FEATURE:

<221> NAME/KEY: PEPTIDE

<222> LOCATION: (1)..(43)

<223> OTHER INFORMATION: A-beta 1-43 peptide

<400> SEQUENCE: 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
 35 40

<210> SEQ ID NO 2

图 10

```

<211> LENGTH: 42
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: PEPTIDE
<222> LOCATION: (1)..(42)
<223> OTHER INFORMATION: A-beta 1-42 peptide

<400> SEQUENCE: 2
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1          5          10          15
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20          25          30
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35          40

<210> SEQ ID NO 3
<211> LENGTH: 40
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: PEPTIDE
<222> LOCATION: (1)..(40)
<223> OTHER INFORMATION: A-beta 1-40 peptide

<400> SEQUENCE: 3
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1          5          10          15
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20          25          30
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
35          40

<210> SEQ ID NO 4
<211> LENGTH: 40
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: scrambled A-beta 1-40 peptide

<400> SEQUENCE: 4
Val Ile Gly Lys Tyr His Gly Met Ser Asn Leu Val Gly Arg Ser Phe
1          5          10          15
Glu Val His Gln Gly Lys Gly Ala Glu Val Asp Ala His Gly Leu Phe
20          25          30
Asp Ile Glu Ala Phe Val Asp Val
35          40

<210> SEQ ID NO 5
<211> LENGTH: 770
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: MISC_FEATURE
<222> LOCATION: (1)..(770)
<223> OTHER INFORMATION: Amyloid precursor protein

<400> SEQUENCE: 5
Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
1          5          10          15
Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
20          25          30

```

图 10, 续。

-续

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
 35 40 45
 Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
 50 55 60
 Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
 65 70 75 80
 Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
 85 90 95
 Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
 100 105 110
 Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
 115 120 125
 Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
 130 135 140
 Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
 145 150 155 160
 Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
 165 170 175
 Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
 180 185 190
 Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
 195 200 205
 Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
 210 215 220
 Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
 225 230 235 240
 Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
 245 250 255
 Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
 260 265 270
 Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
 275 280 285
 Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile
 290 295 300
 Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe
 305 310 315 320
 Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr
 325 330 335
 Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr
 340 345 350
 Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala
 355 360 365
 Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp
 370 375 380
 Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala
 385 390 395 400
 Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala
 405 410 415
 Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile
 420 425 430

图 10, 续。

-续

```

Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn
435                               440                   445

Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met
450                               455                   460

Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu
465                               470                   475                   480

Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys
485                               490                   495

Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe
500                               505                   510

Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser
515                               520                   525

Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Gln Arg Met Asn Gln Ser
530                               535                   540

Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp
545                               550                   555                   560

Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val
565                               570                   575

Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala
580                               585                   590

Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro
595                               600                   605

Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe
610                               615                   620

Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val
625                               630                   635                   640

Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser
645                               650                   655

Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
660                               665                   670

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
675                               680                   685

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly
690                               695                   700

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu
705                               710                   715                   720

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val
725                               730                   735

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
740                               745                   750

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
755                               760                   765

Gln Asn
770

```

```

<210> SEQ ID NO 6
<211> LENGTH: 3579
<212> TYPE: DNA
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: misc_feature
<222> LOCATION: (1)..(3579)
<223> OTHER INFORMATION: nucleotide encoding Amyloid precursor protein

```

图 10, 续。

-续

<400> SEQUENCE: 6

```

agtttcctcg gcagcggtag gcgagagcac gcggaggagc gtgcgcgggg gccccgggag    60
acggcgggcg tggcgggcg gcagagacaa ggacgcggcg gatccactc gcacagcagc    120
gcactcgggtg ccccgcgcg ggtcgcgatg ctgcccggtt tggcactgct cctgctggcc    180
gcctggacgg ctccggcgct ggaggtaacc actgatggta atgctggcct gctggctgaa    240
cccgagattg ccatgttctg tggcagactg aacatgcaca tgaatgtcca gaatgggaag    300
tgggatttcag atccatcagg gaccaaaacc tgcatgtata ccaaggaaag catcctgcag    360
tattgccaaag aagtctaccc tgaaactgcg atcaccatg tggtagaagc caaccaacca    420
gtgaccatcc agaaactggtg caagcgggcg cgcagcaggt gcaagaccca tccccacttt    480
gtgattccct accgctgctt agttgggtgag ttgtgaagtg atgcctctct cgttcctgac    540
aagtgcacaa tcttacacca ggagaggatg gatgtttgcg aaactcatct tcactggcac    600
accgtcgcca aagagacatg cagtgcgaag agtaccnaact tgcattgacta cggcatgttg    660
ctgccctgcy gaattgcaca gtcccgaggg gttagagtttg tgtgttgccc actggctgaa    720
gaaagtgaca atgtggattc tgctgatgcg gaggaggatg actcggtatg ctggtggggc    780
ggagcagaca cagactatgc agatgggagt gaagacaaag tagtagaagt agcagaggag    840
gaagaaagtg ctgagggtga agaaagaaag gccgatgatg acgagggacg tagggatggt    900
gatgaggtag aggaagaggc tgaggaaacc tacgaagaaag ccacagagag aaccacacgc    960
attgccacca ccaccaccac caccacagag tctgtggaag aggtggttgg agaggtgtgc   1020
tctgaacaaag ccgagacggg gccgtgccga gcaatgatct ccgctggtta ctttgatgtg   1080
actgaaggga agtgtgtccc attcttttac ggcggatgtg gcggcaaccg gaaccaacttt   1140
gacacagaag agtactgcct ggcgtgtgtt ggcagcgcca tgtcccaag tttactcaag   1200
actacccagg aacctcttgc ccgagatcct gtttaacttc ctacaaacgc agccagtacc   1260
cctgatgcgg ttgacaagta tctcgagaca cctggggatg agaatgaaca tgcccatttc   1320
cagaagacca aagagaggct tgaggccaag caccgagaga gaatgtocaa ggtcatgaga   1380
gaatgggaag aggcagaacg tcaagcaaaag aacttgccca aagotgataa gaaggcagtt   1440
atccagcatt tccagggaga agtggaatct ttggaacagg aagcagccaa cgaagagacg   1500
cagctggttg agacacacat ggccagagtg gaagccatgc tcaatgaccg ccgcccgtcg   1560
gccctggaga actacatcac cgctctgcag gctgttcctc ctgggcctcg tcacgtgttc   1620
aatatgtaa agaaagtatg ccgcgcagaa cagaaggaca gacagcacac cctaaagcat   1680
ttcgagcatg tgcgcatggt ggtatcccaag aaagccgctc agatccggtc ccaggttatg   1740
acacacctcc gtgtgtttta tgagcgcatg aatcagtcct tctccctgct ctacaacgtg   1800
cctgcagtgg ccgaggagat tcaggatgaa gttgatgagc tgottcagaa agagcaaaac   1860
tattcagatg acgtcttggc caacatgatt agtgaaccaa ggatcagtta cggaaacgat   1920
gctctcatgc catctttgac cgaacgaaa accaccgtgg agctccttcc cgtgaatgga   1980
gagttcagcc tggacgatct ccagccgtgg cattcttttg gggctgactc tgtgccagcc   2040
aacacagaaa acgaagtga gcctgttgat gccgcacctg ctgcggaccg aggactgacc   2100
actcgacagc gttctgggtt gacaaatata aagacggagg agatctctga agtgaagatg   2160
gatgcagaat tccgacatga ctcaggatat gaagttcatc atcaaaaatt ggtgttcttt   2220

```

图 10, 续。

-续

```

gcagaagatg tgggttcaca caaagggtga atcattggac tcatgggtgg cgggtgtgtc 2280
atagcgacag tgatagtoat caacttgggt atgtcgaaga agaaccagta cactccatt 2340
catcatgggt tgggtggagg tgacgacgct gtcacccag aggagcgcca cctgtccaag 2400
atgcagcaga accggtacga aaatccacc tacaagttct ttgagcagat gcagaactag 2460
accccgccca cagcagcctc tgaagttgga cagcaaaacc attgcttcac taccatcgg 2520
tgtccattta tagaataatg tgggaagaaa caaacccgtt ttatgattta ctcatatcg 2580
ccttttgaca gctgtgctgt aacacaagta gatgcctgaa cttgaattaa tccacacatc 2640
agtaatgtat tctatctctc ttacattttt ggtctctata ctacattatt aatgggtttt 2700
gtgtactgta aagaatttag ctgtatcaaa ctagtgcatt aatagattct ctactgatta 2760
tttatcactat agcccttag coagttgtat attattcttg tggtttgtga cccaattaa 2820
tctacttta catatgcttt aagaatogat gggggtgct tcatgtgaac gtgggagttc 2880
agctgcttct cttgcctaag taticctttc ctgactacta tgcattttta agttaaacat 2940
ttttaagtat ttcatgtgct tttagagat tttttttcca tgactgcatt ttactgtaca 3000
gattgctgct tctgtatat ttgtatata ggaattaaga ggatcacac gtttgtttct 3060
tcgtgcctgt tttatgtgca cacttaggc attgagactt caagottttt ttttttctc 3120
cacgtatctt tgggtctttg ataaagaaaa gaatccctgt tcatgtgaag caottttacg 3180
gggggggtgg ggggggtgc tctgtggtt ttcaattacc aagaattctc caaacaatt 3240
ttctgcagga tgattgtaca gaatcattgc ttatgacatg atcgcttctt caactgtatt 3300
acataaata attaataaa ataaccctgg gcaagacttt totttgaagg atgactacag 3360
acattaata atcgaagtaa ttttgggtgg ggagaagagg cagattcaat tttctttaac 3420
cagtctgaag ttctattat gatacaaaag aagatgaaa tggaggtggc aatataagg 3480
gatgaggaag gcatgcctgg acaaaccctt ctttaagat gtgtcttcaa tttgtataa 3540
atgggtgttt catgtaaata aatcattctt tggaggagc 3579

```

```

<210> SEQ ID NO 7
<211> LENGTH: 42
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: 21G-A-beta 1-42 (Flemish) mutant

```

```

<400> SEQUENCE: 7

```

```

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1           5           10          15
Leu Val Phe Phe Gly Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20          25          30
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35          40

```

```

<210> SEQ ID NO 8
<211> LENGTH: 42
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: 22Q-A-beta 1-42 (Dutch) mutant

```

```

<400> SEQUENCE: 8

```

```

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

```

图 10, 续。

-续

```

1           5           10          15
Leu Val Phe Phe Ala Gln Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
      20           25           30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
      35           40

```

```

<210> SEQ ID NO 9
<211> LENGTH: 42
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: 22K-A-beta 1-42 (Italian) mutant

```

```

<400> SEQUENCE: 9

```

```

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1           5           10          15

Leu Val Phe Phe Ala Lys Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
      20           25           30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
      35           40

```

```

<210> SEQ ID NO 10
<211> LENGTH: 42
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: 22G-A-beta 1-42 (Arctic) mutant

```

```

<400> SEQUENCE: 10

```

```

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1           5           10          15

Leu Val Phe Phe Ala Gly Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
      20           25           30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
      35           40

```

```

<210> SEQ ID NO 11
<211> LENGTH: 42
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: 23N-A-beta 1-42 (Iowa) mutant

```

```

<400> SEQUENCE: 11

```

```

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1           5           10          15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asn Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
      20           25           30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
      35           40

```

图 10, 续。