



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104830812 B

(45)授权公告日 2017.09.05

(21)申请号 201510024397.2

(22)申请日 2010.03.16

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104830812 A

(43)申请公布日 2015.08.12

(30)优先权数据
61/160,630 2009.03.16 US
61/239,747 2009.09.03 US

(62)分案原申请数据
201080020335.X 2010.03.16

(73)专利权人 盘古生物制药有限公司
地址 中国香港中环皇后大道15号置地广场
公爵大厦18层
专利权人 aTYR 医药公司

(72)发明人 周洁 刘静芬 许志雯 罗咏诗
克瑞斯蒂·海伦·派尔
莱斯利·安·格林

(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.
C12N 9/00(2006.01)
A61K 38/53(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)

(56)对比文件
US 5663066 A,1997.09.02,

US 5663066 A,1997.09.02,
AMAAR,Y.G.AND David L.B..Cloning and
characterization of the C. elegans
histidyl-tRNA synthetase gene.《Nucleic
Acids Research》.1993,第21卷(第18期),4344-
4347.

Keisuke Wakasugi et al.A human
aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator.
《PNAS》.2002,第99卷(第1期),173-177.

Nina Raben et al.A motif in human
histidyl-tRNA synthetase which is shared
among several aminoacyl-tRNA synthetase
is a coiled-coil that is essential for
enzymatic activity and contains the major
autoantigenic epitope.《The journal of
biological chemistry》.1994,第269卷(第39
期),24280.

Ralph C. Nichols et al.Human
isoleucyl-tRNA synthetase: sequence of
the cDNA, alternative.《Gene》.1995,第155卷
(第2期),299-304.

Jie Jia et al.WHEP Domains Direct
Noncanonical Function of Glutamyl-Prolyl.
《Mol Cell. 》.2008,第29卷(第6期),679-690.

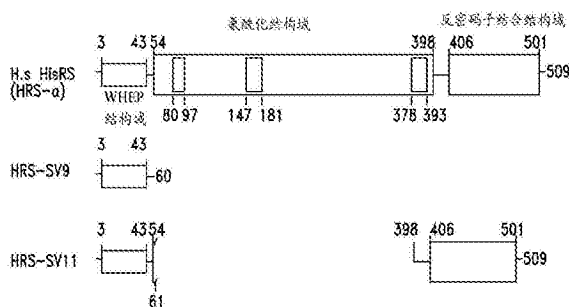
(续)

审查员 王莉

权利要求书2页 说明书61页
序列表9页 附图38页

(54)发明名称
包含具有非经典生物活性的组氨酰-tRNA合
成酶剪接变异体的组合物及方法

(57)摘要
提供了具有非经典生物活性的分离的组氨
酰-tRNA合成酶剪接变异体多核苷酸和多肽,及
其相关组合物和方法。



CN 104830812 B

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Nameki,N.,et al..Chain A, Solution Structures Of The Whep-Trs Domain Of Human Histidyl-Trna Synthetase.《PDB: 1X59_Ay》.2005,全文.

Nameki,N.,et al..Chain A, Solution Structures Of The Whep-Trs Domain Of Human Histidyl-Trna Synthetase.《PDB: 1X59_Ay》.2005,全文.

1. 分离的组氨酰-tRNA合成酶 (HRS) 剪接变异体多肽在制备用于降低炎症活性的药物中的用途,其中所述HRS多肽由SEQ ID NO:6或9的氨基酸序列组成,或者由其变体组成,所述变体通过在SEQ ID NO:6或9的N-末端缺失1个氨基酸而区别于SEQ ID NO:6或9,其中所述HRS多肽包含WHEP结构域,且缺少功能性氨酰化结构域。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述HRS多肽由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述HRS多肽由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成。

4. 分离的组氨酰-tRNA合成酶 (HRS) 剪接变异体多肽在制备用于降低炎症活性的药物中的用途,其中所述HRS多肽由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成,或者由其变体组成,所述变体通过在SEQ ID NO:11的N-末端缺失1个氨基酸而区别于SEQ ID NO:11,其中所述HRS多肽包含WHEP结构域,且缺少功能性氨酰化结构域。

5. 根据权利要求4所述的用途,其中所述HRS多肽由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成。

6. 分离的重组组氨酰-tRNA合成酶 (HRS) 在制备用于降低炎症活性的药物中的用途,其中所述HRS多肽由SEQ ID NO:6,9或11的氨基酸序列组成。

7. 根据权利要求1所述的用途,其中所述HRS多肽与异源融合伴侣融合。

8. 根据权利要求4所述的用途,其中所述HRS多肽与异源融合伴侣融合。

9. 根据权利要求6所述的用途,其中所述HRS多肽与异源融合伴侣融合。

10. 根据权利要求7-9任一项所述的用途,其中所述异源融合伴侣包含多组氨酸标签。

11. 根据权利要求7-9任一项所述的用途,其中所述异源融合伴侣包含Fc片段。

12. 根据权利要求1所述的用途,其中所述HRS多肽是通过聚乙二醇化修饰的。

13. 根据权利要求4所述的用途,其中所述HRS多肽是通过聚乙二醇化修饰的。

14. 根据权利要求6所述的用途,其中所述HRS多肽是通过聚乙二醇化修饰的。

15. 根据权利要求1所述的用途,其中所述HRS多肽在一个或多个组成性氨基酸处被至少一个化学或酶促衍生修饰,其中所述至少一个化学或酶促衍生选自乙酰化、羟基化、甲基化、酰胺化、糖基化以及脂化。

16. 根据权利要求4所述的用途,其中所述HRS多肽在一个或多个组成性氨基酸处被至少一个化学或酶促衍生修饰,其中所述至少一个化学或酶促衍生选自乙酰化、羟基化、甲基化、酰胺化、糖基化以及脂化。

17. 根据权利要求6所述的用途,其中所述HRS多肽在一个或多个组成性氨基酸处被至少一个化学或酶促衍生修饰,其中所述至少一个化学或酶促衍生选自乙酰化、羟基化、甲基化、酰胺化、糖基化以及脂化。

18. 分离的重组组氨酰-tRNA合成酶 (HRS) 多肽在制备用于降低炎症活性的药物中的用途,其中所述HRS多肽由SEQ ID NO:6或9的氨基酸序列组成,或者由其变体组成,所述变体通过在SEQ ID NO:6或9的N-末端缺失1个氨基酸而区别于SEQ ID NO:6或9,其中所述HRS多肽包含WHEP结构域,且缺少功能性氨酰化结构域。

19. 根据权利要求18所述的用途,其中所述HRS多肽与异源融合伴侣融合。

20. 根据权利要求19所述的用途,其中所述异源融合伴侣包含多组氨酸标签。

21. 根据权利要求19所述的用途,其中所述异源融合伴侣包含Fc片段。

22. 根据权利要求18所述的用途,其中所述HRS多肽是通过聚乙二醇化修饰的。

23. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物是包含生理上可接受的载体和所述HRS多

肽的药物组合物。

24. 如权利要求4所述的用途,其中所述药物是包含生理上可接受的载体和所述HRS多肽的药物组合物。

25. 如权利要求6所述的用途,其中所述药物是包含生理上可接受的载体和所述HRS多肽的药物组合物。

26. 如权利要求18所述的用途,其中所述药物是包含生理上可接受的载体和所述HRS多肽的药物组合物。

27. 根据权利要求23所述的用途,其中所述组合物被与组氨酸配制。

28. 根据权利要求24所述的用途,其中所述组合物被与组氨酸配制。

29. 根据权利要求25所述的用途,其中所述组合物被与组氨酸配制。

30. 根据权利要求26所述的用途,其中所述组合物被与组氨酸配制。

31. 药物组合物在制备用于治疗有需要的个体的炎性状况或自身免疫状况的药物中的用途,其中所述药物组合物包含药学上可接受的载体和组氨酰-tRNA合成酶(HRS)多肽剪接变体,其中所述HRS多肽由SEQ ID NO:6或9的氨基酸序列组成,或者由其变体组成,所述变体通过在SEQ ID NO:6或9的N-末端缺失1个氨基酸而区别于SEQ ID NO:6或9,以及其中所述HRS多肽包含WHEP结构域,且缺少功能性氨酰化结构域。

32. 药物组合物在制备用于治疗有需要的个体的炎性状况或自身免疫状况的药物中的用途,其中所述药物组合物包含药学上可接受的载体和组氨酰-tRNA合成酶(HRS)多肽,其中所述HRS多肽由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成,或由其变体组成,所述变体通过在SEQ ID NO:11的N-末端缺失1个氨基酸而区别于SEQ ID NO:11,以及其中所述HRS多肽包含WHEP结构域,且缺少功能性氨酰化结构域。

33. 药物组合物在制备用于治疗有需要的个体的炎性状况或自身免疫状况的药物中的用途,其中所述药物组合物包含药学上可接受的载体和组氨酰-tRNA合成酶(HRS)多肽,其中所述HRS多肽由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成,或由其变体组成,所述变体通过在SEQ ID NO:6的N-末端缺失1个氨基酸而区别于SEQ ID NO:6,其中所述HRS多肽包含WHEP结构域,以及其中所述HRS多肽与Fc片段融合。

34. 药物组合物在制备用于治疗有需要的个体的炎性状况或自身免疫状况的药物中的用途,其中所述药物组合物包含药学上可接受的载体和组氨酰-tRNA合成酶(HRS)多肽,其中所述HRS多肽由来自人组氨酰-tRNA合成酶(HRS)的WHEP结构域组成。

包含具有非经典生物活性的组氨酰-tRNA合成酶剪接变异体的组合物及方法

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C. §119 (e) 主张于2009年3月16日提交的美国临时专利申请61/160,630和于2009年9月3日提交的美国临时专利申请61/239,747的权益,所述专利申请的全部内容通过援引并入本文中。

[0003] 关于序列表的说明

[0004] 与本申请有关的序列表以文本格式提供,代替书面版本,并通过援引并入本说明书中。含有所述序列表的文本文件名称为120161_415PC_SEQUENCE_LISTING.txt。文本文件大小为20KB,于2010年3月16日创建,并通过EFS-Web电子提交。

[0005] 发明背景

发明领域

[0006] 本发明大体上涉及组氨酰-tRNA合成酶 (HRS) 剪接变异体多核苷酸和多肽,包含这些多核苷酸和多肽的组合物及其使用方法。

[0007] 相关技术说明

[0008] 催化tRNA分子氨酰化的氨酰-tRNA合成酶 (AARS) 蛋白质,对翻译过程中解码遗传信息是必不可少的。每个真核tRNA合成酶由与原核tRNA合成酶密切相关的核心酶,以及添加到氨基末端、羧基末端或插入到核心酶内部的其他结构域组成。例如,人类酪氨酰-tRNA合成酶 (TyrRS) 具有不属于原核和低等真核生物TyrRS分子部分的羧基末端结构域。

[0009] 已经证实有几个氨酰-tRNA合成酶具有不同于其参与翻译过程的非经典功能。例如,微型酪氨酰-tRNA合成酶 (mini-TyrRS),即对应于第1-364位氨基酸残基、被多形核细胞弹性蛋白酶和纤溶酶切割的TyrRS的N端结构域,是氨酰-tRNA合成酶 (AARS) 多功能细胞因子样蛋白质和肽的成员。已证明微型-TyrRS在体外刺激中性粒细胞激活和趋化作用,刺激内皮细胞增殖和迁移,并在鸡胚绒毛尿囊膜 (CAM) 和小鼠基质胶检测 (matrigel assay) 中促血管生成。微型-TyrRS具有ELR基序,所述ELR基序和诸如IL-8的CXC-趋化因子类似,可赋予微型-TyrRS趋化因子活性和血管生成活性。和其他含ELR的细胞因子类似,所述基序的突变抑制微型-TyrRS对白细胞的结合和刺激,并抑制血管生成。

[0010] 此外,已证明TrpRS的截短形式具有血管生成性能。在正常人体细胞中,有两种可检测的TrpRS形式:由全长分子(第1-471位氨基酸残基)组成的主要形式和次要的截短形式。次要形式是通过前体mRNA (pre-mRNA) 的可选剪接而使氨基末端结构域缺失所产生的。已确定微型TrpRS的氨基末端为全长TrpRS分子第48位的蛋氨酸残基。或者,截短TrpRS可以通过蛋白水解产生。例如,牛TrpRS在胰脏中高表达并分泌到胰液中,从而导致产生截短的TrpRS分子。进一步的研究表明,微型-TrpRS抑制VEGF诱导的细胞增殖和迁移 (Wakasugi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 99:173-177 (2002))。具体而言,鸡CAM实验表明,微型-TrpRS可阻止VEGF的血管生成活性。相比之下,全长TrpRS不抑制血管生成。因此,去除前48位氨基酸残基可显现出TrpRS抗血管生成活性。因此,与TyrRS一样,某些形式的TrpRS具有除tRNA氨

酰化以外的活性。

[0011] 鉴于这些与可变形形式TyrRS和TrpRS相关的、非经典的治疗相关活性的观察结果，需要鉴定其他氨酰-tRNA合成酶蛋白质的生物相关形式和/或活性，以开发该蛋白质家族的全部治疗潜力。因此，本发明满足这些需要，并提供其他相关的优点。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明大体上涉及具有非经典活性的分离的HRS剪接变异体多肽；编码HRS剪接变异体多肽的HRS剪接变异体多核苷酸；与HRS多肽结合的结合剂；HRS多肽和多核苷酸的类似物、变异体和片段，以及前述任一物质的组合物和其制备和使用方法。

[0014] 因此，根据一个方面，本发明提供具有至少一种非经典生物活性的分离的HRS剪接变异体多肽，及其活性片段和变异体。本文所用的“非经典”活性，一般是指本发明HRS多肽所具有的除氨酰化以外的活性，更具体地说，除了将组氨酸添加到tRNA^{His}分子上以外的活性。如本文所述，在某些实施方案中，本发明HRS多肽所显示的非经典生物活性可以包括，但不限于，细胞因子产生调节、细胞增殖调节、凋亡调节、细胞信号传导调节、血管生成调节、细胞迁移调节、细胞结合调节、细胞代谢调节等。

[0015] 在一个说明性实施方案中，本发明HRS剪接变异体多肽是至少包含HRS的WHEP结构域，如人类全长HRS蛋白质的第3-43位氨基酸残基，的HRS片段。在另一个实施方案中，本发明HRS剪接变异体多肽是至少包含HRS的反密码子结合结构域，如人类全长HRS蛋白质的第406-501位氨基酸残基的HRS片段。在又一个实施方案中，HRS剪接变异体多肽是缺失功能性氨酰化结构域，如人类全长HRS蛋白质的第54-398位氨基酸残基的HRS片段。在一个更具体的实施方案中，HRS剪接变异体多肽至少包含WHEP结构域和反密码子结合结构域，但缺失功能性氨酰化结构域。

[0016] 在一个更具体的实施方案中，本发明HRS多肽包含SEQ ID NO 6、9或11中公布的序列，或者是SEQ ID NO 6、9或11所示序列或是的SEQ ID NO 6、9或11所示多肽的连续片段。需要说明的是，所述片段实质上可以基本上是任意长度的，只要其保留至少一种感兴趣的非经典生物活性。例如，如本文进一步所述，这样的片段可以包含SEQ ID NO 6、9或11的至少约5、10、15、20、25、50、75、80或更多个连续氨基酸残基。

[0017] 在本发明的其他实施方案中，HRS多肽包含SEQ ID NOs:6、9或11所示序列的活性变异体（即保留至少一个感兴趣的非经典生物活性）。在一个更具体的实施方案中，活性变异体是一种沿着其长度与SEQ ID NO 6、9或11所示序列具有至少70%、80%、90%、95%或99%同一性的多肽。

[0018] 在另一个具体实施方案中，本发明HRS多肽不是由全长人类HRS蛋白第1-48位残基组成的多肽。

[0019] 根据本发明的另一个方面，提供了至少包含至少一个本文所述的HRS多肽和一个异源融合伴侣的融合蛋白。

[0020] 根据本发明的另一个方面，提供了编码本文所述多肽和融合蛋白的分离的多核苷酸，以及包含这种多核苷酸的表达载体和包含这种表达载体的宿主细胞。此外，还包括与HRS多核苷酸特异性杂交的寡核苷酸，如SEQ ID NO:5、8或10的多核苷酸。在某些实施方案中，寡核苷酸为引物、探针或反义寡核苷酸。其他实施方案涉及靶向HRS多核苷酸的RNAi剂（RNAi agents）。在某些实施方案中，寡核苷酸或RNAi剂与HRS剪接变异体特有的剪接点特

异性地杂交,或靶向所述剪接点。

[0021] 根据本发明的另一个方面,提供了对本发明HRS剪接变异体多肽(例如,SEQ ID NO:6、9或11)具有结合特异性的结合剂(例如,抗体和其抗原结合片段),或其细胞结合伴侣之一。在某些实施方案中,所述结合剂为抗体、所述抗体的抗原结合片段、肽、肽模拟物、小分子或适体。在一些实施方案中,所述结合剂拮抗HRS多肽的非经典活性。在其他实施方案中,所述结合剂促进HRS多肽的非经典活性。

[0022] 根据本发明的又一个方面,提供了包含生理上可接受的载体和至少一个本文所述的本发明的分离的多肽、融合蛋白、抗体、分离的多核苷酸、表达载体、宿主细胞等的组合物,如药物组合物。

[0023] 此外,还包括确定样品中HRS剪接变异体的多核苷酸序列的存在或水平的方法,所述方法包括使样品接触与SEQ ID NO:5、8或10所示的HRS剪接变异体特异性杂交的一种或更多种寡核苷酸,检测样品中寡核苷酸存在与否,并由此确定HRS剪接变异体的多核苷酸序列的存在或水平。

[0024] 还提供了确定样品中HRS剪接变异体的多核苷酸序列存在或水平的方法,包括使样品与至少两种特异性扩增SEQ ID NOs:5、8或10所示的HRS剪接变异体的寡核苷酸接触,进行扩增反应,检测扩增产物存在与否,并由此确定HRS剪接变异体的多核苷酸序列的存在或水平。在一些实施方案中,寡核苷酸与HRS剪接变异体特有的剪接点特异性地结合,或特异性地扩增所述剪接点。某些实施方案包括将HRS剪接变异体的存在或水平与对照样品或预定值比较。具体实施方案包括表征样品的状态,使其区别于对照。在具体实施方案中,所述样品和对照包括细胞或组织,所述方法包括区分不同类型的细胞或组织、不同组织或器官的细胞、不同细胞发育状态的细胞、不同细胞分化状态的细胞或健康和病变细胞。

[0025] 还包括鉴定与SEQ ID NOs:6、9或11所示的HRS剪接变异体多肽或一种或更多种HRS剪接变异体多肽的细胞结合伴侣特异性结合的化合物的方法,其包括a)使HRS多肽或其细胞结合伴侣或这两者与至少一种测试化合物在适当条件下结合,和b)检测HRS多肽或其细胞结合伴侣或这两者与所述测试化合物的结合,从而鉴定与HRS多肽或其细胞结合伴侣或这两者特异性结合的化合物。在某些实施方案中,所述测试化合物为多肽或肽、抗体或抗体的抗原结合片段、肽模拟物或小分子。在一些实施方案中,测试化合物促进HRS多肽或其细胞结合伴侣的非经典生物活性。在其他实施方案中,测试化合物拮抗HRS多肽或其细胞结合伴侣的非经典生物活性。此外,还包括由本文所提供的任意方法所识别的化合物。

[0026] 在其他方面,本发明还提供了通过使细胞或组织与本文所述的本发明组合物接触而调节细胞活性的方法。例如,在某些实施方案中,待调节的细胞活性选自细胞因子产生、细胞增殖、凋亡、细胞信号传导、细胞代谢、血管生成、细胞迁移、细胞结合等。在一个具体实施方案中,所述方法是调节细胞因子产生的方法。在一个更具体的实施方案中,所述方法是调节IL-2产生和/或分泌的方法。在一些实施方案中,所述方法是调节TNF- α 产生和/或分泌的方法。在其他实施方案中,所述方法是调节MIP1- α 产生和/或分泌的方法。

[0027] 在某些实施方案中,所述细胞活性为细胞因子受体活性。在具体的实施方案中,所述细胞因子受体是CCR1。在某些实施方案中,所述细胞活性为细胞迁移。一些实施方案包括减少单核细胞的细胞迁移。在某些实施方案中,所述细胞活性为通过Toll样受体(TLR)的细胞信号传导。

[0028] 在其他方面,本发明提供了通过给予本发明的组合物而治疗有需要的个体的疾病、病症或其他状况的方法。举例来说,这类疾病、病症或状况可以包括,但不仅限于,癌症、炎性疾病、免疫疾病(包括自身免疫疾病)和/或与异常血管生成相关的状况。

[0029] 在某些实施方案中,所述状况是神经系统状况。在具体实施方案中,神经系统状况与6-羟基多巴胺(6-OHDA)诱导的神经元死亡相关。在某些实施方案中,所述状况是炎性疾病。在具体的实施方案中,所述炎性疾病是关节炎性痛风或炎性肠疾病。

[0030] 还在其他方面,本发明的多肽、抗体和/或其他组合物实质上可用于本领域内已知及可用的任何类型的筛选试验。例如,本发明的组合物(例如,多肽、多核苷酸和/或抗体)实质上可以与任何已知的筛选方法结合使用,以鉴定顺应本发明疗法的合适的细胞类型和/或疾病状况。在其他实例中,本发明的组合物(例如,多肽、多核苷酸和/或抗体)可以与已知的筛选方法结合使用,以鉴定直接或间接介导或调节本文组合物的非经典活性的结合伴侣、竞争性抑制剂和/或其他细胞效应子。例如,在具体的实施例中,提供了鉴定测试化合物的筛选方法,所述测试化合物作为本发明组合物与所述组合物的受调节的结合伴侣、细胞效应子和/或细胞类型中的一种或更多种相互作用的抑制剂或增效剂。例如,这种方法可以包括下列步骤:形成反应混合物,所述反应混合物包括:(i)本发明的组合物,(ii)已知被所述组合物调节的结合伴侣、细胞效应子和/或细胞类型,(iii)测试化合物;以及检测测试化合物与结合伴侣、细胞效应子和/或细胞类型的相互作用。相对于不存在所述测试化合物时的相互作用,存在所述测试化合物时,所述活性或调节发生统计学上显著的变化(增强或抑制),表明所述测试化合物为潜在的活性激动剂(模拟物或增强剂)或拮抗剂(抑制剂)。

[0031] 序列标示符的简要说明

[0032] SEQ ID NO:1是引物序列(HRS-BPF)。

[0033] SEQ ID NO:2是引物序列(HRS-P1R)。

[0034] SEQ ID NO:3是HRS基因(NM_002109.3)的核酸序列。

[0035] SEQ ID NO:4是全长HRS蛋白(NP_002100.2)的氨基酸序列。

[0036] SEQ ID NO:5是HRS-SV9剪接变异体的核酸编码序列。

[0037] SEQ ID NO:6是由SEQ ID NO:5编码的HRS-SV9剪接变异体多肽的氨基酸序列。

[0038] SEQ ID NO:7是引物序列(HRS-3' -UTR)。

[0039] SEQ ID NO:8是HRS-SV11剪接变异体的核酸编码序列。

[0040] SEQ ID NO:9是由SEQ ID NO:8编码的HRS-SV11剪接变异体多肽的氨基酸序列。

[0041] SEQ ID NO:10是HRS-SV14剪接变异体的核酸编码序列。

[0042] SEQ ID NO:11是由SEQ ID NO:10编码的HRS-SV14剪接变异体多肽的氨基酸序列。

[0043] SEQ ID NO:12是引物序列(hsH1-E2F1)。

[0044] SEQ ID NO:13是引物序列(hsH1-E13R1)。

[0045] SEQ ID NO:14是引物序列(rnH1-E02F1)。

[0046] SEQ ID NO:15是引物序列(rnH1-E12J13R2)。

[0047] SEQ ID NO:16是苏门达腊猩猩(*Pongo abelii*) (猩猩)HRS的第112-171位氨基酸。

[0048] SEQ ID NO:17是牛HRS的第112-171位氨基酸。

[0049] SEQ ID NO:18是小鼠HRS的第112-171位氨基酸。

[0050] SEQ ID NO:19是金黄地鼠(*Mesocricetus auratus*) (金仓鼠)HRS的第112-171位

氨基酸。

[0051] SEQ ID NO:20是红鳍东方鲀 (*Fugu rubripes*) (日本河豚) HRS的第112-166位氨基酸。

[0052] SEQ ID NO:21是秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) HRS的第112-167位氨基酸。

[0053] SEQ ID NO:22是盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*) HRS的第112-169位氨基酸。

[0054] SEQ ID NO:23是粳稻 (*Oryza sativa* subsp. *japonica*) (水稻) HRS的第112-167位氨基酸。

[0055] SEQ ID NO:24是人HRS外显子3和外显子4的部分编码序列。

[0056] SEQ ID NO:25是人HRS外显子3和外显子4的部分氨基酸序列。

[0057] SEQ ID NO:26是人HRS外显子3和外显子4的部分编码序列。

[0058] SEQ ID NO:27是人HRS外显子10和外显子11的部分编码序列。

[0059] SEQ ID NO:28是人HRS外显子10和外显子11的部分氨基酸序列。

[0060] SEQ ID NO:29是HRS-SV11的第112-171位氨基酸。

[0061] 附图简要说明

[0062] 图1A-B显示从人类骨骼肌文库中识别HRS-SV9剪接变异体。图1A显示HRS基因的mRNA转录本和PCR反应引物位置 (BPF:正向引物, P4R:反向引物) 的图解。图1B显示人类骨骼肌、IMR32细胞和HEK293T细胞的PCR反应产物的凝胶照片。上面的箭头指向从HRS-SV9转录本扩增的DNA片段。下面的箭头指向从HRS参考序列扩增的DNA片段。

[0063] 图2A-C显示从IMR32细胞库和来自人脑的样品中识别HRS-SV11剪接变异体。图2A显示HRS基因的mRNA转录本和PCR反应引物位置 (BPF:正向引物, HRS-3' UTR:反向引物) 的图解。图2B显示IMR32细胞的PCR反应产物的凝胶照片。下面的箭头指向从HRS-SV11转录本扩增的DNA片段。上面的箭头指向从HRS参考序列扩增的DNA片段。图2C显示在人脑组织中识别的HRS-SV11剪接变异体转录本。

[0064] 图3A-D显示野生型全长HRS (HRS-ref)、HRS-SV9、HRS-SV11和HRS-SV14的mRNA转录本和蛋白质序列。图3A显示mRNA转录本的图解,其表明HRS-SV9具有从内含子2开始的插入,且HRS-SV11缺失外显子3至外显子10。图3B显示mRNA转录本编码的蛋白质的结构信息,其表明HRS-SV9仅具有HRS的前60位氨基酸,包括完整的WHEP结构域,而HRS-SV11缺失了整个氨酰化结构域,只留下WHEP结构域和反密码子结构域。图3C和图3D分别显示HRS-SV9、HRS-SV11和HRS-SV14的核酸编码序列 (SEQ ID NO:5、8和10) 及编码的蛋白质序列 (SEQ ID NO:6、9和11)。

[0065] 图4A-B显示在大鼠胫骨肌 (Tib)、比目鱼肌 (So1)、C2C12肌管 (C2)、成年大鼠脑 (Br) 和HEK293T细胞 (293T) 中使用抗-HRS抗体进行免疫印迹的结果。图4A显示使用N-末端HRS抗体 (抗第1-97位氨基酸) 的免疫印迹。图4A上面的箭头显示参考条带。图4A中下面的箭头指向的条带,其大小与HRS-SV11剪接变异体多肽的预测大小一致。图4B显示使用C-末端HRS抗体 (抗靠近C-末端的50-200位氨基酸) 的免疫印迹。上面的箭头指向参考蛋白,而下面的箭头指向的条带,其大小与使用N-末端抗体所观察的条带大小相似。

[0066] 图5A-C显示使用N-末端HRS单克隆抗体 (制备来抗野生型人HRS蛋白第1-97位氨基

酸)的免疫沉淀实验。图5A显示HEK293T细胞、C2C12成肌细胞(MB)和C2C12肌管(MT)的结果;下面的箭头指向的条带,其大小与HRS-SV9剪接变异体多肽的预测大小一致。图5B-C显示过量表达myc标记的HRS-SV11的IMR32和HEK293T细胞的全细胞裂解物的结果;用N-末端HRS mAb进行所述细胞的免疫印迹(图5B),或用多克隆HRS抗体(制备来抗野生型人HRS蛋白C-末端)进行免疫印迹(图5C)。在IMR32细胞裂解物中使用两种抗体均检测到一蛋白质条带(B和C中下面的箭头),其迁移比myc标记的HRS-SV11蛋白稍快,可能是HRS-SV11蛋白。

[0067] 图6A-C显示HRS、HRS-SV9和HRS-SV11在HEK293T细胞中重组产生后的分泌情况。野生型全长HRS(HRS-Ref)、HRS-SV9和HRS-SV11在HEK293T细胞中强烈表达。图6A即上面的图面(panel),显示指向在全细胞裂解物(TCL)中过量表达的蛋白质的箭头。图6B下面的图面显示,在培养基部分中,所有三种蛋白质均被检测出。HRS-Ref以抗Myc抗体探测,而HRS-SV9和HRS-SV11以抗HRS(N-末端)抗体探测。TCL中的微管蛋白印迹显示相同的装载,而培养基部分的微管蛋白印迹显示泄漏对照(leaky control)。图6C表明,当EGFP在HEK293T细胞中过量表达时,不会被分泌,如培养基部分中不存在EGFP条带(约35kDa)所示。

[0068] 图7显示重组HRS-SV9和HRS-SV11剪接变异体多肽在激活的Jurkat T细胞中增强IL-2分泌。在存在或不存在HRS-SV9或HRS-SV11的情况下,细胞经PMA(25ng/ml)和离子霉素(250ng/ml)处理48小时后,用ELISA分析培养基。

[0069] 图8显示HRS-SV9刺激PBMC(外周血单核细胞)释放TNF α 到培养上清中。使用LPS作为阳性对照。

[0070] 图9显示HRS-SV11保护培养的皮层神经元和PC12细胞抗神经毒素6-OHDA。图9A显示,用HRS-SV11预处理大鼠皮层神经元显著减少由25 μ M 6-OHDA诱导的皮层神经元死亡,其细胞生存力用MTT试验测量。HRS-SV11还有效地保护PC12细胞不会因6-OHDA(200 μ M)诱导而死亡,如MTT试验(图9B)和LDH试验(图9C)所示。如图9D所示,HRS-SV11的保护作用是一种急性效应,短时间预处理即可实现与24小时预处理类似的保护作用。数据为三个独立实验的平均值 \pm 标准差(S.D.)。叔丁基对苯二酚(tBHQ)和Triton X-100(简称为Triton)(2%)分别为MTT试验和LDH试验(B、C)的阳性对照。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

[0071] 图10显示HRS-SV11不能保护神经元免受 β -淀粉样蛋白、谷氨酸单钠(MSG)和MPP+诱导的毒性的侵袭。

[0072] 图10A显示用 β -淀粉样蛋白(1-42)(A β ₄₂)聚集体孵育24小时的结果,所述聚集体以剂量依赖的方式诱导皮层神经元死亡。图10B显示,经MTT试验测定,用1nM至1 μ M的HRS-SV11预处理皮层神经元24小时没有保护作用。图10C显示,经测量LDH释放,谷氨酸单钠(MSG)以剂量依赖的方式诱导皮层神经元死亡,图10D显示,HRS-SV11没有抗谷氨酸单钠导致的毒性的有益效果;作为阳性对照的10 μ M美金刚(memantine)显著防止神经元死亡。图10E显示,经MTT试验测定,MPP+以剂量依赖的方式诱导PC12细胞死亡,图10F则显示,经24小时预处理后,HRS-SV11不保护PC12细胞免受MPP+胁迫。数据为三个独立实验的平均值 \pm S.D.。

[0073] 图11显示HRS-SV11不利用细胞外机制保护神经元免受6-OHDA的侵袭。如图11A所示,添加HRS-SV11没有抑制对苯醌的聚集,而已知的抗氧化剂维生素C则抑制对苯醌聚集。图11B显示过氧化氢(H₂O₂)以剂量依赖的方式诱导皮层神经元死亡,图11C显示HRS-SV11预处理没有保护这些神经元免于死亡。如图11D所示,用HRS-SV11预处理皮层神经元减少由6-OHDA攻击所造成的神经元死亡,但HRS-SV11和6-OHDA的联合应用没有保护作用。在6-OHDA

应用前,在HRS-SV11预处理后洗涤和更新培养基不影响HRS-SV11的保护作用(参见图11E)。数据为三个独立实验的平均值 \pm S.D.。 $*p<0.05$, $**p<0.01$ 。

[0074] 图12显示HRS-SV11防止PC12细胞中6-OHDA诱导的DNA片段化。通过Hoechst 33258染色检查PC12细胞的凋亡。图12A显示经缓冲液对照单独处理的PC12细胞;图12B显示用6-OHDA (200 μ M) 处理8小时;图12C显示用HRS-SV11 (500nM) 预处理24小时,接着用6-OHDA (200 μ M) 攻击8小时。如图12D所示,通过计数凋亡细胞的数量(以片段化细胞核的存在为特征),表明用1 μ M HRS-SV11预处理大大降低了凋亡细胞的数量。

[0075] 图13显示HRS-SV11C-末端的半胱氨酸(Cys)残基的突变消除了所述保护功能。图13A显示,HRS-SV11 (SEQ ID NO:29) 包含三个Cys残基(C117、C169和C171)。其中,如多种HRS序列(SEQ ID NO:16至SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:29) 的第112位氨基酸至约171位氨基酸的比对所示,C117和C171(图13A,箭头所示)是在不同物种中高度保守的。如图13B所示,C2S(C169和C171突变成丝氨酸残基)和de1C(缺失末尾的3位氨基酸,包括C169和C171)突变体多为单体,而C117S突变体多为二聚体。野生型HRS-SV11在单体和二聚体之间有一个峰,表明这两种形式之间有非常动态的转换。如图13C所示,C169和C171突变成丝氨酸残基(HRS-SV11_C2S)或缺失末尾的三位氨基酸(包括C169和C171(HRS-SV11_de1C)),消除了HRS-SV11的神经保护功能,这提示这些半胱氨酸的关键作用。 $**p<0.01$ 。

[0076] 图14显示,抑制JAK2、JNK和p38抑制了HRS-SV11的神经保护作用。如图14A-B所示,HRS-SV11在PC12细胞中的神经保护作用可通过10 μ M SB202190对JNK和10 μ M SP600125对p38的共同抑制作用而被抑制(图14A),或通过40 μ M AG490抑制JAK2而被抑制(图14B)。图14B还显示,HRS-SV11的神经保护作用并没有经由U73122抑制磷脂酶C(PLC)或牛蒡甙元抑制MKK而被抑制。图14C和图14D显示,皮层神经元有类似的观察结果。数据为三个独立实验的平均值 \pm S.D.。 $*p<0.05$, $**p<0.01$ 。

[0077] 图15显示,HRS-SV11结合到表达CCR5的HEK293T细胞上,但没有结合到表达CCR1的细胞或未转染的细胞上。如图15A和图15B所示,HRS-SV11不结合HEK293T细胞(图15A),但结合表达CCR5的HEK293T细胞(图15B)。如图15C所示,用Met-RANTES预处理细胞不影响HRS-SV11与表达CCR-5的细胞的结合。图15D显示,由于在表达CCR1的细胞上没有观察到结合,因而这种结合是CCR5特异性的。对照细胞仅用FITC-His抗体进行孵育。

[0078] 图16显示HRS-SV14剪接变异体的识别和HRS-SV14的神经保护作用。图16A显示在人胎儿脑cDNA中的人HRS新的剪接变异体(箭头所示)的识别。如图16A和图16B所示,克隆和测序揭示,该HRS剪接变异体由野生型HRS转录本的外显子4至外显子10的跳跃而产生(SEQ ID NO:24至SEQ ID NO:28按从图16B的上部到下部排列)。在蛋白质水平,预测HRS-SV14蛋白包含WHEP结构域、反密码子结合结构域和氨酰化结构域的第一个基序(见图16C)。图16D显示,预处理24小时后,HRS-SV14保护PC12细胞免于6-OHDA诱导的神经元死亡;所述效果与HRS-SV11相当。数据为三个独立实验的平均值 \pm S.D.。 $*p<0.05$ 。

[0079] 图17显示在不同组织和细胞系中检测HRS-SV11和SV14转录本。此图显示位于HARS外显子2和外显子12侧翼的PCR产物的电泳结果,所述HARS来自成人脑、胎儿脑、肺、骨骼肌组织和IMR32、Jurkat和THP-1细胞的cDNA。如水平箭头所示,HRS-SV11存在于除胎儿脑以外的所有样品中。如斜箭头所示,在人类胎儿脑、肺、骨骼肌、Jurkat细胞和THP-1细胞中检测到HRS-SV14。

[0080] 图18显示HRS-SV11重组蛋白的保护作用并非来自于非蛋白污染物。图18A显示重组HRS-SV11蛋白制剂在进行或不进行蛋白酶K消化的情况下的考马斯亮蓝染色结果;与未经处理的HRS-SV11制剂(箭头指示HRS-SV11重组蛋白)相比,在蛋白酶K处理的HRS-SV11制剂中,没有检测到可见的蛋白质条带。如图18B和图18C所示,用蛋白酶K消化的HRS-SV11预处理皮层神经元(图18B)和PC12细胞(图18C),消除了其抗6-OHDA的保护作用。tBHQ作为阳性对照。NS表示无显著性。数据为三个独立实验的平均值±S.D.。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

[0081] 图19显示,SV9抑制单核细胞(THP-1细胞)向CCL5的迁移。

[0082] 图20显示,SV9抑制THP-1细胞向CCL-23的CCR1介导的迁移。

[0083] 图21显示,SV9激活巨噬细胞TLRs。LPS为阳性对照。

[0084] 图22A和图22B显示,SV9激活TLR2(22A)和TLR4(22B),但优先激活TLR4。

[0085] 图23显示,SV9刺激单核细胞(THP-1)中MIP-1 α 的分泌。

[0086] 发明的详细描述

[0087] 除非另有专门说明,本发明的实施将采用本领域内分子生物学和重组DNA技术的常规方法,下面介绍其中的很多方法以供说明。这些技术在文献中都进行了充分说明。参见,例如,Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(分子克隆实验指南)2nd Edition,1989(第二版,1989年);Maniatis et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(分子克隆实验指南)(1982年);DNA Cloning:A Practical Approach(DNA克隆实践指南),Vol.I&II(D.Glover ed.);Oligonucleotide Synthesis(寡核苷酸合成)(N.Gait ed.,1984);Nucleic Acid Hybridization(核酸杂交)(B.Hames&S.Higgins ed,1985);Transcription and Translation(转录和翻译)(B.Hames&S Higgins ed.,1984);Animal Cell Culture(动物细胞培养)(R.Freshney ed.,1986);A Practical Guide to Molecular Cloning(分子克隆实用指南)(B.Perbal ed.,1984)。

[0088] 本文所引用的所有出版物、专利和专利申请的全部内容通过引用并入本文。

[0089] 定义

[0090] 除非另有定义,否则,本文所用的所有的技术术语和科学术语与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的含义相同。虽然类似于或等同于本文所述方法和材料的任何方法和材料都可用于本发明的实践或测试中,但还是描述了优选的方法和材料。根据本发明的目的,下面定义下列术语。

[0091] 如本说明书和所附权利要求所用的,除非上下文另有明确规定,单数形式“a(一个)”、“an(一个)”包括复数引用。举例来说,“元件(an element)”是指一个元件或一个以上的元件。

[0092] “约”是指变化量高达参考数量、水平、值、数字、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度的30%、25%、20%、25%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的数量、水平、值、数字、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度。

[0093] “激动剂”是指强化或模拟HRS的非经典生物活性的分子。激动剂可以包括蛋白质、核酸、碳水化合物、小分子或通过HRS或其结合伴侣直接相互作用或通过作用于HRS参与的生物途径的组分而调节HRS活性的任何其他化合物或组合物。包括部分激动剂和完全激动剂。

[0094] 术语“拮抗剂”是指抑制或削弱HRS的非经典生物活性的分子。拮抗剂可以包括诸

如抗体的蛋白质、核酸、碳水化合物、小分子或通过HRS或其结合伴侣直接相互作用或通过作用于HRS参与的生物途径的组分而调节HRS或其结合伴侣活性的任何其他化合物或组合物。包括部分和完全拮抗剂。

[0095] “编码序列”是指对基因的多肽产物的编码有贡献的任何核酸序列。相反，术语“非编码序列”是指对基因的多肽产物的编码没有贡献的任何核酸序列。

[0096] 除非上下文另有要求，贯穿本说明书始终，短语“包含(comprise)”、“包含(comprises)”、“包含(comprising)”应当理解为，意味着包括所述步骤或元件或步骤或元件组，但不排除任何其他步骤或元件或步骤或元件组。

[0097] “由……组成”是指，包括并限于短语“由……组成”后面的任何内容。因此，短语“由……组成”表示所列出的元件是必需的或强制性的，不可有其他成分。“基本上由……组成”是指，包括所述短语后所列出的任何元件，并限于不干扰或有助于公开内容中指定的所列元件的活性或作用的其他成分。因此，短语“基本上由……组成”是指，所列元件是必需的或强制性的，但其他成分都是可选的，可以有或没有，取决于它们是否对所列元件的活性或作用有实质影响。

[0098] 本文所用的术语“功能”、“功能性的”等术语是指生物功能、酶促功能或治疗功能。

[0099] “基因”是占据染色体上的特定位点、由转录和/或翻译调节序列和/或编码区和/或非翻译序列(即，内含子、5'和3'非编码序列)组成的遗传单位。

[0100] “同源性”是指相同或构成保守取代的氨基酸的百分比数字。可使用序列比较程序如GAP(Deveraux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395)确定同源性，该程序通过引用并入本文。这样，与本文所引用的序列的长度类似或基本上不同的序列，可通过将缺口插入到队列(alignment)中来比较，这些缺口可通过例如GAP使用的比较算法而确定。

[0101] 术语“宿主细胞”包括单个细胞或细胞培养物，所述单个细胞或细胞培养物可以是或已经是本发明任何重组载体或分离的多核苷酸的受体。宿主细胞包括单个宿主细胞的子代，因自然、意外或故意突变和/或改变，所述子代可以不必与原亲本细胞完全一致(在形态上或在总DNA补体(complement)上)。宿主细胞包括用本发明重组载体或多核苷酸体内或体外转染或感染的细胞。包含本发明重组载体的宿主细胞是重组宿主细胞。

[0102] “分离的”是指材料基本上或实质上不含在其原生状态下通常伴随所述材料的组分。例如，本文所用的“分离的多核苷酸”，包括从序列中纯化的多核苷酸，所述序列在多核苷酸的天然存成的状态下位于所述多核苷酸的侧翼，例如，从序列中去除的DNA片段，所述序列通常与所述DNA片段相邻。或者，本文所用的“分离的肽”或“分离的多肽”等，包括从其天然细胞环境或与细胞其他组分关联中体外分离和/或纯化的肽或多肽分子；即，所述材料与体内物质不显著关联。

[0103] 本文所用的术语“mRNA”或有时称为的“mRNA转录本”，包括但不限于前体mRNA转录本、转录本加工中间体、用于翻译的成熟的mRNA及一个或多个基因的转录本，或源于所述mRNA转录本的核酸。转录本加工可以包括剪接、编辑和降解。如本申请所用，源于mRNA转录本的核酸指最终以mRNA转录本或其子序列作为其合成模板的核酸。从mRNA反转录的cDNA、从所述cDNA转录的RNA、从所述cDNA扩增的DNA、从所述扩增的DNA转录的RNA等，均源自于mRNA转录本，检测这些衍生产物，可表明样品中原转录本的存在和/或丰度。因此，源自于

mRNA的样品包括,但不仅限于,一个或多个基因的mRNA转录本、从mRNA反转录的cDNA、从所述cDNA转录的cRNA、从基因扩增的DNA、从DNA转录的RNA等等。

[0104] 本文所用的“非经典”活性,一般是指本发明HRS多肽所拥有的除氨酰化以外的活性,更具体地说,除将关联氨基酸添加到其关联tRNA分子以外的活性。非经典活性的非限制性实例包括RNA结合、氨基酸结合、细胞增殖调节、细胞迁移调节、细胞分化(如血细胞生成)调节、凋亡或其他形式的细胞死亡调节、细胞信号传导调节、血管生成调节、细胞结合调节、细胞代谢调节、细胞因子产生或细胞因子活性调节、细胞因子受体活性调节、炎症调节等。

[0105] 术语“调节”,包括与对照物相比以统计学上显著的或生理上显著的量“增加”或“刺激”、以及“减少”或“降低”。通常,“增加的”或“增强的”量,是“统计学上显著的”量,并且可以包括没有组合物(没有试剂或化合物)或对照组合物所产生的量增加1.1、1.2、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30或以上倍数(如,500、1000倍)(包括大于1的所有整数和其间的小数点,如1.5、1.6、1.7、1.8等)。通常,“减少的”或“降低的”量为“统计学上显著的”量,可以包括没有组合物(没有试剂或化合物)或对照组合物所产生的量减少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。本文还描述了“统计学上显著”的量的其他实例。

[0106] “获得自”是指,样品例如多核苷酸提取物或多肽提取物是分离或源自个体的特定来源。例如,可以从直接分离自个体的组织或生物流体获得提取物。“源自”或“获得自”也可以指多肽或多核苷酸序列的来源。例如,本发明的HRS序列可以“源自”于HRS蛋白水解片段或HRS剪接变异体的序列信息或其中的部分,无论是天然存在还是人工产生的,因此,HRS序列可包含该序列,或基本上由该序列组成,或由该序列组成。

[0107] 如本文所用的“序列同一性”或例如包括“序列与……具有50%的同一性”,是指在以核苷酸对核苷酸为基础或氨基酸对氨基酸为基础的比较窗口中,序列的同一性程度。因此,“序列同一性百分比”可以通过下列步骤计算:在比较窗口中,比较两个最佳比对的序列,确定位置数,在所述位置上,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)在两种序列中均存在,从而得到匹配位置数,用匹配位置数除以比较窗口内的总位置数(即窗口大小),并将结果乘以100,得到序列相同性的百分数。

[0108] 本文所用的“剪接点”包括在成熟mRNA转录本或编码的多肽的区域,在所述区域,第一个外显子的3'端和第二个外显子5'端相连。所述区域的大小可以不同,并可以包括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、100或更多(包括其间的所有整数)个在提取物残基任一侧的核苷酸或氨基酸残基,其中,一个外显子的3'端和另一个外显子的5'端相连。“外显子”是指,通过顺式剪接去除前体RNA的任一部分(内含子)或通过反式剪接连接两个或更多个前体RNA分子后,RNA分子成熟形式所代表的核酸序列。成熟RNA分子可以是信使RNA或非编码RNA如rRNA或tRNA的功能形式。根据上下文,外显子可以指DNA或其RNA转录本中的序列。“内含子”是指基因内的不翻译成蛋白质的非编码核酸区域。非编码内含子部分转录为前体mRNA(前体RNA(pre-mRNA))和一些其他的RNA(如长非编码RNA),随后在加工为成熟RNA的过程中通过剪接而去除。

[0109] “剪接变异体”是指经可选剪接而产生的成熟mRNA及其编码的蛋白质,通过所述可选剪接,RNA(初级基因转录本或前体mRNA)的外显子在RNA剪接过程中以多种方式重新连接。由此产生的不同mRNA可以被翻译成不同的蛋白同种型,从而使单个基因编码多种蛋白质。

[0110] 本文所用的“个体”,包括表现出症状或有表现出症状风险的任何动物,所述动物可以使用本发明HRS多核苷酸或多肽治疗或诊断。合适的个体(患者)包括实验动物(如小鼠、大鼠、兔或豚鼠)、农场动物和家畜或宠物(如猫或狗)。包括非人类灵长类动物,优选人类患者。

[0111] 本文所用的“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”,包括对疾病或状况的症状或病理的任何期望的效果,所述效果可以通过如本文所述的HRS多核苷酸或多肽的非经典活性影响实现,甚至可以包括在一个或多个正在接受治疗的疾病或状况的可测量标记物的极小变化或改善。此外,还包括涉及非HRS疗法的治疗,在所述治疗中,本文所述的HRS序列提供临床治疗标记物。“治疗”并不一定表示疾病或状况或其相关症状的彻底根除或治愈。接受这种治疗的个体是任何需要治疗的个体。临床改善的示例性标记物对本领域内技术人员来说是显而易见。

[0112] “载体”或“核酸构建体”是指多核苷酸分子,优选源自于例如质粒、噬菌体、酵母或病毒的DNA分子,在其中可以插入或克隆入多核苷酸。优选地,载体含有一个或多个独特的限制位点,并能够在限定的宿主细胞包括靶细胞或组织或其祖细胞或组织中自主复制,或能够与限定宿主的基因组整合,这样,克隆的序列可以复制。因此,所述载体可以是可自主复制载体,即作为染色体外的实体存在的载体,所述载体的复制不依赖于染色体复制,例如,线性或闭环状质粒、染色体外元件、微型染色体或人工染色体。载体可以含有保证自我复制的任何手段。或者,所述载体可以是一个导入宿主细胞时被整合到基因组中并与整合所述载体的染色体一同复制的载体。

[0113] 术语“野生型”和“天然存在的”可互换使用,指基因或基因产物,所述基因或基因产物从天然存在的来源分离时,具有该基因或基因产物的特性。野生型基因或基因产物(如多肽)是群体中最频繁观察到的基因或基因产物,因此,“正常”或“野生型”基因形式是任意设计的。

[0114] HRS剪接变异体多肽

[0115] 如上所述,根据本发明的一个方面,提供了具有与治疗相关的非经典活性的HRS“剪接变异体”多肽,以及包含所述多肽的组合物。

[0116] 在本文中术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可以互换使用,指氨基酸残基的聚合物,及其变异体和合成类似物。因此,这些术语适用于氨基酸聚合物,在所述氨基酸聚合物中,一个或多个氨基酸残基是人工合成的非天然存在的氨基酸,如相应天然存在的氨基酸的化学类似物,还适用于天然存在的氨基酸聚合物。

[0117] 多肽没有特别的长度限定,但是,在本发明的上下文中,通常表示全长蛋白质的片段,可以包括翻译后修饰,例如糖基化作用、乙酰化作用、磷酸化作用等,以及本领域内已知的其他修饰,可以是天然存在的,也可以是非天然存在的。本发明多肽和蛋白质可以使用任何一种众所周知的重组和/或合成技术制备,下面进一步讨论其说明性实例。

[0118] 提到“多肽变异体”是指,通过添加、缺失和/或取代至少一个氨基酸残基而区别于

参考HRS剪接变异体多肽(例如,SEQ ID NO:6、9、11)的多肽,其通常保留参考HRS剪接变异体多肽的非经典活性。在某些实施方案中,多肽变异体通过一个或多个取代而区别于参考多肽,如本申请所述以及本领域公知的,所述取代可以是保守的或非保守的。在某些实施方案中,多肽变异体包括保守取代,在这点上,本领域公知,一些氨基酸可以变为具有大致相似特性但未改变多肽活性本质的其他氨基酸。

[0119] 在某些实施方案中,多肽变异体包括与本文所述HRS参考多肽的相应序列具有至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或更高同一性或相似性的氨基酸序列,并保留了所述参考多肽的非经典活性。此外,还包括通过添加、缺失或取代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、110、120、130、140、150或更多个氨基酸而区别于参考HRS序列,但所述序列保留参考HRS多肽性质的序列。在其他实施方案中,变异体多肽与相应的HRS参考序列相差至少1%,但低于20%、15%、10%或5%的残基(如果这种比较需要比对,则所述序列应以最大相似性进行比对。缺失或插入造成的“环出”序列或错配视为差异)。适当地,所述差异是在非必需残基或保守取代上的差异或变化。

[0120] 还包括HRS参考多肽的生物活性“片段”。代表性的生物活性片段通常参与相互作用,例如,分子内或分子间相互作用。分子间相互作用可以是特异结合相互作用或酶促相互作用。分子间相互作用可以位于HRS多肽和细胞结合伴侣之间,如细胞受体或参与HRS多肽非经典活性的其他宿主分子的相互作用。

[0121] 通常,生物活性片段包含具有HRS参考多肽的至少一种活性的结构域或基序,可以包括各种活性结构域中的一个或更多个(在某些情形下,包括所有)活性结构域,并包括具有非经典活性的片段。在某些情形下,HRS多肽的生物活性片段具有该具体的截短片段所特有的生物活性,这样,全长HRS多肽可能不具有该活性。在某些情形下,生物活性可通过以下方式显示:从其他全长HRS多肽序列中分离生物活性HRS多肽,或改变全长HRS野生型多肽序列的某些残基以暴露生物活性结构域。

[0122] 例如,在一个说明性实施方案中,HRS剪接变异体多肽是至少包含HRS的WHEP结构域的HRS片段,或其活性片段或变异体。在另一个说明性实施方案中,多肽是包含HRS的至少反密码子结合结构域的HRS片段,或其活性片段或变异体。在另一个说明性实施方案中,多肽是包含HRS的至少WHEP结构域和反密码子结合结构域的HRS片段。在另一个说明性实施方案中,多肽是缺少氨酰化结构域且基本无氨酰化活性的HRS片段。

[0123] 在一个更具体的实施方案中,HRS剪接变异体多肽是包含SEQ ID NO:6、9或11所示序列的多肽。在另一个实施方案中,HRS剪接变异体多肽是包含SEQ ID NO:6、9或11的活性片段(即基本上保留SEQ ID NO:6、9或11所表现的至少一种非经典活性的SEQ ID NO:6、9或11的片段)的多肽。例如,这种片段可以包含SEQ ID NO:6、9或11的至少约5、10、15、20、25、50或更多个连续氨基酸残基,以及所有的中间长度。中间长度意在包括其间的所有整数,例如6、7、8等,51、52、53等。此外,这种片段可以包含SEQ ID NO:9的至少约5、10、15、20、25、50、75、100、125、150个或更多个连续氨基酸残基,以及所有的中间长度。

[0124] HRS参考多肽的生物活性片段可以是多肽片段,其是例如SEQ ID NO:6、9或11所示氨基酸序列的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170或更多

个连续或不连续的氨基酸,包括中间的整数。在某些实施方案中,任何HRS参考多肽的C端或N端区可以被截短约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或更多个氨基酸,包括中间的所有整数和范围(如101、102、103、104、105),只要截短的HRS多肽保留参考HRS剪接变异体多肽的非经典活性。适当地,所述生物活性片段具有不低于生物活性(即非经典活性)HRS参考多肽活性的约1%、10%、25%或50%的活性,所述生物活性片段来源于所述HRS参考多肽。

[0125] 在其他说明性实施方案中,SEQ ID NO:6、9或11的HRS片段的长度大小范围可以为约20-30、20-40、20-50、20-60、20-70、20-80、20-90、20-100、20-125、20-150或20-175个氨基酸。在其他实施方案中,所述片段的长度大小范围为约30-40、30-50、30-60、30-70、30-80、30-90、30-100、30-125、30-150或30-175个氨基酸。在其他实施方案中,所述片段的长度大小范围为约40-50、40-60、40-70、40-80、40-90、40-100、40-125、40-150或40-175个氨基酸。在另一个说明性实施方案中,所述片段的长度大小范围为约50-60、50-70、50-80、50-90、50-100、50-125、50-150或50-175个氨基酸。

[0126] 在其他实施方案中,本发明提供了HRS剪接变异体多肽(例如,SEQ ID NO:6、9或11)的活性变异体,其中,所述变异体基本上保留了SEQ ID NO:6、9或11表现出的至少一种非经典活性。SEQ ID NO:6、9或11所示序列的某些说明性变异体,包括沿着其长度与SEQ ID NO:6、9或11具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性(如下所述确定)的变异体。

[0127] 变异体可以通过一个或更多个取代、缺失、添加和/或插入区别于SEQ ID NO:6、9或11。这些变异体可以是天然存在的或可以是合成产生的,例如,通过使用本领域内众所周知的多种技术中的任何技术修饰SEQ ID NO:6、9或11(或编码SEQ ID NO:6、9或11的多核苷酸)并评估本文所述的生物活性。

[0128] 在某些实施方案中,变异体会含有保守取代。“保守取代”是这样的一种取代,其中,氨基酸被取代为具有类似性质的另一种氨基酸,这样,肽化学领域内的技术人员会预期所述多肽的二级结构和亲水本质基本上不变。可以修饰本发明多核苷酸和多肽的结构,并可仍然获得编码具有期望特性的变异体或衍生多肽的功能性分子。当期望改变多肽的氨基酸序列,从而创造一个相当的甚至改进的本发明HRS剪接变异体多肽的变异体时,本领域内技术人员,例如,可以根据表1,改变编码DNA序列的一个或更多个密码子。

[0129] 在蛋白质结构中,某些氨基酸可以被取代为其他氨基酸,而与例如抗体的抗原结合区或底物分子的结合位点等结构的相互作用结合能力没有可感知的损失。由于蛋白质的相互作用能力和本质通常限定该蛋白质的生物功能活性,因此,可以在蛋白质序列中进行某些氨基酸序列的取代,当然,也可以对其基本的DNA编码序列进行取代,仍然获得具有类似性质的蛋白质。因此,考虑可以在所公开的组物的多肽序列或编码所述多肽的相应DNA序列中进行各种变化,而不明显损失其期望的效用或活性。

[0130] 表1

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					
[0131] 亮氨酸	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU	
蛋氨酸	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					

[0132] 在进行这样的改变时,也要考虑氨基酸的亲水指数。氨基酸亲水指数在赋予蛋白相互作用生物功能上的重要性是本领域内公知的(Kyte and Doolittle,1982,通过引用在此并入)。例如,已知氨基酸的相对亲水特性有助于所产生蛋白质的二级结构,所述二级结

构反过来又限定了蛋白质和其他分子如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等的相互作用。根据其疏水性和电荷特性,给每种氨基酸赋予了亲水指数(Kyte and Doolittle,1982)。这些值是: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/半胱氨酸(+2.5);蛋氨酸(+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);天门冬氨酸(3.5);天冬酰胺(3.5);赖氨酸(3.9)和精氨酸(4.5)。

[0133] 某些氨基酸可以被具有类似亲水指数或分数的其他氨基酸取代,但仍然得到具有类似生物活性的蛋白质,即仍然得到在生物功能上等效的蛋白质,这是本领域已知的。在进行这样的改变时,优选取代亲水指数在2以内的氨基酸,特别优选亲水指数在1以内的氨基酸,更特别优选亲水指数在0.5以内的氨基酸。

[0134] 在亲水性的基础上,可有效地取代相似的氨基酸,这也是本领域已知的。如美国专利4,554,101所详细说明的,给氨基酸残基赋予了下列亲水性值:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0 1);谷氨酸(+3.01);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 1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);蛋氨酸(-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)。已知的是,氨基酸可以被取代为具有类似亲水性值的另一种氨基酸,仍可以得到生物等效的蛋白质。在这些改变中,优选取代亲水性值在2以内的氨基酸,特别优选亲水性值在1以内的氨基酸,更特别优选亲水性值在0.5以内的氨基酸。

[0135] 如上面所概述的,氨基酸取代可以基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如,其疏水性、亲水性、电荷、大小等。将上述不同特性考虑在内的示例性取代是本领域内技术人员所公知的,并包括:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天门冬氨酸;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。

[0136] 基于所述残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两性本质,可以进一步进行氨基酸取代。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;带具有相似亲水性值的不带电荷的极性头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。代表保守变化的其他氨基酸组包括:(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。或者,变体还可以含有非保守变化。在优选的实施方案,变体多肽通过取代、缺失或添加5个或更少的氨基酸区别于天然序列。变体也可以(或可选地)通过例如缺失或添加对所述多肽的二级结构和亲水本质影响最小的氨基酸而受到修饰。

[0137] 多肽可以包含蛋白质N末端的信号(前导)序列,所述信号序列在翻译过程中或翻译后引导所述蛋白质的转移。也可以将多肽缀合于连接体或其他序列,便于多肽(如poly-His)的合成、纯化或识别,或增强多肽与固体支持体的结合。例如,多肽可缀合于免疫球蛋白Fc区。

[0138] 当比较多肽序列时,如果两条序列中的氨基酸序列在针对最大对应性进行比对时相同,称这两种序列“相同”,如下所述。通常通过比较比较窗口的序列,来鉴定和比较序列相似性的局部区域,来进行两条序列的比较。本文所用的“比较窗口”是指至少约20个连续位置的区段,一般为30至约75、40至约50个,在这些位置上,序列可以与相同连续位置数的

参考序列在这两种序列以最佳方式比对后进行比较。

[0139] 可以进行序列的最佳比对来比较,例如,使用生物信息学软件Lasergene套件的Megalign程序(DNASTAR, Inc., Madison, WI),使用默认参数。这个程序包含下列参考文献所述的若干比对方案:Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins-Matrices for detecting distant relationships (蛋白进化改变模型-检测远源关系的矩阵), In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure (蛋白序列和结构的图集), National Biomedical Research Foundation (国家生物医学研究基金会), Washington DC Vol.5, Suppl.3, pp.345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp.626-645 Methods in Enzymology (酶学方法) vol.183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5: 151-153; Myers, E.W. and Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D. (1971) Comb.Theor 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol.Biol.Evol.4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy-the Principles and Practice of Numerical Taxonomy (数值分类学-数值分类学原理和实践), Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J. (1983) Proc.Nat'l Acad., Sci.USA 80:726-730。

[0140] 可选地,可以通过下列方法进行序列的最佳比对来比较:Smith and Waterman (1981) Add.APL.Math 2:482的局部同一性算法, Needleman and Wunsch (1970) J.Mol.Biol.48:443的同一性比对算法, Pearson and Lipman (1988) Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 85:2444的相似性寻找法,这些算法的计算机化实施(Wisconsin Genetics Software Package中GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) 或检查。

[0141] 适合确定序列同一性和序列相似性百分比的算法实例分别为Altschul et al. (1977) Nucl.Acids Res.25:3389-3402中描述的BLAST算法和Altschul et al. (1990) J.Mol.Biol.215:403-410中描述的BLAST 2.0算法。BLAST和BLAST 2.0可以使用例如本文所述的参数,确定本发明多核苷酸和多肽的序列同一性百分比。公众可从国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)获得进行BLAST分析的软件。对于氨基酸序列,可以使用评分矩阵计算累计得分。当累计比对得分从其最大可达到的数值减少了数量X,或由于一个或多个得负分的残基积累而累计积分变为0或以下,或到达序列的末端时,每个方向上的字符串(word hit)延伸停止。BLAST算法参数W、T和X决定比对的灵敏度和速度。

[0142] 在一个说明性的方法中,“序列同一性百分比”通过以下方式确定:在至少有20个位置的比较窗口中比较两个最佳比对的序列,其中比较窗口中的多肽序列部分,与用于两条序列最佳比对的参考序列(不包含添加或缺失)相比,包含20%或更少的添加或缺失(即缺口),一般为5%-15%,或10-12%。通过下列步骤计算所述百分比:确定两条序列具有相同的氨基酸残基的位置数,得到匹配位置数;匹配位置数除以参考序列位置总数(即窗口大小);所得结果乘以100,以得到序列同一性百分比。

[0143] 在本发明的某些实施方案中,提供了融合多肽以及编码所述融合多肽的多核苷酸。融合多肽是指直接或间接通过氨基酸连接体共价连接于一个或更多个异源多肽序列

(融合伴侣)的本发明HRS剪接变异体。形成所述融合蛋白的多肽,通常是C-末端与N-末端相连,但也可以是C-末端与C-末端相连,N-末端与N-末端相连,或N-末端与C-末端相连。所述融合蛋白的多肽可以是任何顺序。

[0144] 可以为基本上任何期望的目的而设计和包含融合伴侣,只要它们对所述多肽期望的活性不产生不利影响。例如,在一个实施方案中,融合伴侣包含比天然重组蛋白以更高产率协助表达蛋白的序列(表达增强剂)。还可以选择其他融合伴侣,以增加蛋白质的溶解度,或使蛋白质靶向期望的细胞内区隔,或使蛋白质分泌到细胞外。再进一步,融合伴侣可以包括便于蛋白质纯化的亲和标签。

[0145] 更普遍地,可以利用与异源序列如Fc片段的融合,消除HRS多肽不期望的特性或改善期望的特性(例如药物代谢动力学性质)。例如,与异源序列的融合可以增加化学稳定性、降低免疫原性、改善体内靶向和/或增加HRS多肽的循环半衰期。

[0146] 也可以使用与异源序列的融合产生双功能融合蛋白,如不仅通过所述HRS多肽具备所选的非经典活性而且还能通过异源多肽修饰(即刺激或抑制)其他通路的双功能蛋白。这些通路的实例包括,但不限于,各种免疫系统相关的通路,如先天或适应性免疫激活通路或细胞生长调节通路,如血管生成。在某些方面,所述异源多肽可以与HRS多肽协同作用来调节个体的细胞通路。可以用于产生双功能融合蛋白的异源多肽的实例包括但不限于血小板生成素、细胞因子(如IL-11)、趋化因子、各种造血生长因子及其生物活性片段/或变异体。

[0147] 融合多肽一般可使用标准技术制备。例如,可以单独组装编码期望的融合物多肽组分的DNA序列,然后,将其连接到适当的表达载体中。使用或不使用肽连接体(peptide linker),将编码多肽组分的DNA序列的3'末端与编码第二多肽组分的DNA序列的5'末端连接,使所述序列的阅读框同相。这样,可以翻译成保留了两种组分多肽的生物活性的单一融合多肽。

[0148] 如果需要,可以使用肽连接体序列将第一和第二多肽组分分离,两种多肽组分的间隔足以确保每一多肽折叠成其二级和三级结构。采用本领域内众所周知的标准技术,将这样的肽连接体并入所述融合蛋白中。某些肽连接体序列可以基于以下因素进行选择:(1)其采用灵活延伸构象的能力;(2)其不能采用可能与第一和第二多肽上的功能性表位相互作用的二级结构;和(3)缺少可能与多肽功能性表位反应的疏水或带电残基。优选的肽连接体序列含有GLY、ASN和SER残基。其他近中性氨基酸,如THR和ALA,也可以用于所述连接体序列中。可以有用地作为连接体使用的氨基酸序列,包括下列文献中所公开的氨基酸序列: Maratea et al, Gene 40:3946 (1985); Murphy et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262 (1986); 美国专利号4,935,233和美国专利号4,751,180。连接体序列的长度一般为1至约50个氨基酸。当第一和第二多肽具有非必需N端氨基酸区域时,不需要所述连接体序列,所述非必需N端氨基酸区域可用于分离功能性结构域,并防止空间干扰(steric interference)。

[0149] 将所连接的DNA序列与合适的转录或翻译调节元件可操作地连接。负责DNA表达的调节元件仅位于编码第一多肽的DNA序列的5'-末端。类似地,终止翻译和转录终止信号所需的终止密码子,仅存在于编码第二多肽的DNA序列的3'-末端。

[0150] 一般多肽和融合多肽(及其编码多核苷酸)是分离的。“分离”的多肽或核苷酸,是

指从其原环境中移出的多肽或核苷酸。例如,如果天然存在蛋白质是从自然系统中一些或所有共存材料中分离的,则其是分离的。优选地,这些多肽具有至少约90%的纯度,更优选至少约95%的纯度,最优选至少约99%的纯度。例如,如果多核苷酸被克隆到并非自然环境一部分的载体中,则认为其是分离的核苷酸。

[0151] 仍然在其他实施方案中,本发明HRS剪接变异体多肽可以是二聚体的部分。二聚体可以包括,例如,两个相同HRS多肽之间的同源二聚体,两个不同HRS多肽之间的异源二聚体和/或HRS多肽和异源多肽之间的异源二聚体。单体和/或二聚体可以是可溶的,且经分离或纯化可以是同质的。某些异源二聚体,如HRS多肽和异源多肽之间的异源二聚体,可以是双功能的。

[0152] 还包括HRS多肽的单体,包括分离的HRS单体,无论是由于一个或多个取代、截短、缺失、添加、化学修饰或这些改变的组合,所述HRS单体基本不会与自身二聚化(同源二聚化(homodimerize))或与第二HRS多肽二聚化(异源二聚化(heterodimerize))。在某些实施方案中,单体HRS多肽具有生物活性,包括二聚或多聚HRS多肽复合物所不具有的非经典活性。

[0153] 在其他实施方案中,本发明HRS多肽可以是多单元复合物的部分。本发明的多单元复合物可以包括,例如,至少2个、3个、4个、5个或更多个单体。本发明单体和/或多单元复合物可以是可溶的,且经分离或纯化可以为同质的。多单元复合物的单体单元彼此可以是不同的、同源的,大体上同源的或相同的。但是,本发明多单元复合物包括至少一个单体,所述单体包含本文所述的HRS多肽,或者,在其他实施方案中,包括至少两个或更多个本发明所述的HRS多肽。

[0154] 共价连接的单体可以直接(通过键)或间接(如通过连接体)连接。对于直接连接本文的多肽,修饰多肽以增强二聚化可以是有益的。例如,可以通过添加或用一个或更多个半胱氨酸取代,修饰HRS多肽的一个或更多个氨基酸残基。产生氨基酸取代如半胱氨酸取代或便于连接的其他修饰的方法,是本领域内技术人员所熟知的。

[0155] 本发明的某些实施方案还考虑了修饰的HRS多肽的用途,包括改善HRS期望的特性的修饰,如本申请所述。本发明HRS多肽的示例性修饰包括但不限于:一个或更多个组成氨基酸的化学和/或酶促衍生,包括侧链修饰、主链修饰和N-末端和/或C-末端修饰,包括乙酰化、羟基化、甲基化、酰胺化以及碳水化合物或脂类部分、辅因子等的附加。示例性修饰还包括HRS多肽的聚乙二醇化(参见,例如,Veronese and Harris, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:453-456, 2002, 通过引用在此并入)。

[0156] 在某些方面,可以使用化学选择性连接技术修饰本发明HRS多肽,例如以位点特异性的受控方式连接聚合物。这种技术通常依赖于将化学选择性锚点以化学的或重组的手段并入蛋白质主链,然后用携带互补连接体的聚合物修饰。因此,所产生的蛋白质-聚合物缀合物的装配过程和共价结构是可以控制的,从而能合理地优化药物性质,如功效和药物代谢动力学性质(参见,例如, Kochendoerfer, *Current Opinion in Chemical Biology* 9: 555-560, 2005)。

[0157] 本文所述的HRS多肽可以采用本领域技术人员已知的任何适当过程制备,如重组技术。例如,HRS多肽可以通过包括下列步骤的过程制备:(a) 制备包含编码HRS多肽且可操作地连接于调节元件的多核苷酸序列的构建体;(b) 将所述构建体引入宿主细胞;(c) 培养宿主细胞,以表达所述HRS多肽;以及(d) 从宿主细胞中分离HRS多肽。重组HRS多肽可以采用

标准实验技术以常规方式制备,例如Sambrook et al., (1989,同上),特别是第16和17部分;Ausubel et al., (1994,同上),特别是第10和16章;以及Coligan et al., Current Protocols in Protein Science (现代蛋白质科学实验技术) (John Wiley&Sons, Inc.1995-1997),特别是第1、5和6章中所述。

[0158] 除重组产生方法以外,本发明多肽及其片段可以通过采用固相技术(Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154 (1963))的直接肽合成而产生。蛋白质合成可以使用人工技术或自动合成。自动合成可以使用例如Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (多肽合成仪) (Perkin Elmer) 实现。可选地,可以单独化学合成各种片段,然后用化学方法结合,以产生期望的分子。

[0159] 多核苷酸组合物

[0160] 如本文所述,本发明还提供编码本发明的HRS剪接变异体多肽的分离的多核苷酸,以及包含这些多核苷酸的组合物。在某些实施方案中,通常由于以新的或特殊的方式与外显子结合的HRS剪接变异体具有特别的性质,HRS多核苷酸包含一个独特或特殊的剪接点。示例性的参考HRS剪接变异体的多核苷酸包括SEQ ID NO:5、8和10,及其变异体和补体。

[0161] 本发明HRS多核苷酸还包括引物、探针、反义寡核苷酸和包含全部或部分这些参考多核苷酸的RNA干扰剂,所述引物、探针、反义寡核苷酸和RNA干扰剂与这些参考多核苷酸的全部或部分互补,或与这些参考多核苷酸特异性地杂交,如本文所述。

[0162] 如本文所用,术语“DNA”和“多核苷酸”和“核酸”,是指从一特定物种的基因组总DNA中分离出的DNA分子。因此,编码多肽的DNA区段是指含有一个或更多个编码序列、但基本上从所述获取DNA区段的物种的基因组总DNA中分离出的或纯化出的DNA区段。术语“DNA区段”和“多核苷酸”内包括DNA区段以及这些区段的更小片段,还有重组载体,包括例如质粒、粘粒、噬菌粒、噬菌体、病毒等。

[0163] 如本领域内技术人员所理解,本发明的多核苷酸序列可以包括基因组序列、基因组外序列和质粒编码序列以及表达或可适应表达蛋白质、多肽、肽等的较小的工程基因区段。这些区段可以是天然分离的,或人工合成修饰的。

[0164] 如技术人员所认识到的,多核苷酸可以是单链(编码或反义)或双链的,且可以是DNA(基因组DNA、cDNA或合成的)或RNA分子。额外的编码或非编码序列可以但并不需要存在于本发明的多核苷酸中,多核苷酸可以但并不需要与其他分子和/或支持材料连接。

[0165] 多核苷酸可以包含天然序列(即编码本发明HRS多肽或其部分的内源性序列),或者可以包含这种序列的变异体或生物功能等效物。多核苷酸变异体可以含有一个或更多个取代、添加、缺失和/或插入,如下文进一步所述,优选地,这样,所编码多肽的期望的非经典活性相对于未修饰的多肽基本上未降低。对所编码多肽的活性的影响,一般可以如本文所述且本领域所公认的进行评估。

[0166] 本发明还提供了分离的多核苷酸片段,所述多核苷酸片段包含与本文所述HRS剪接变异体多核苷酸(如SEQ ID NO:5、8或10)相同或互补的序列的不同长度的连续序列段,其中分离的多核苷酸编码本发明的HRS剪接变异体多肽或其活性片段或其变异体。

[0167] 例如,本发明所提供了这样的多核苷酸,其编码至少约5、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、41、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170或更多、

以及所有中间长度的本发明HRS多肽的连续氨基酸残基。在上下文中，“中间长度”意味着所引用数值之间的任何长度，如21、22、23等；31、32、33等；41、42、43等，这是容易理解的。

[0168] 本发明的多核苷酸，不管编码序列本身的长度如何，可以与其他DNA序列如启动子、聚腺苷酸化信号、额外的限制性酶切位点、多克隆位点、其他编码区段等结合，这样，它们的总长度可以有很大的不同。因此，可以考虑使用几乎任何长度的多核苷酸片段；优选所述总长度限于，便于按照预期的重组DNA实验技术制备和使用。

[0169] 如上所述，某些实施方案涉及编码HRS多肽的HRS多核苷酸。除了其他用途，这些实施方案还可以用于重组产生期望的HRS多肽或其变异体，或在所选细胞或个体内表达所述HRS多肽。本领域内普通技术人员所理解的是，由于遗传密码的简并，有许多可以编码如本文所述的给定的HRS多肽的核苷酸序列。这些多核苷酸中的一些仅与参考核苷酸序列具有有限的同源性。然而，需要理解这些多核苷酸（即简并变异体多核苷酸）编码非常相似的多肽。相应地，本发明专门考虑了由于密码子使用的差异而有所不同的多核苷酸，例如为人类和/或灵长类动物密码子选择而优化的多核苷酸。

[0170] 此外，包含本文所提供的多核苷酸序列的基因的等位基因，落入本发明的范围内。等位基因是由于一个或更多个基因突变如核苷酸缺失、添加和/或取代而改变的内源性基因。由此产生的mRNA和蛋白可以但并不需要具有改变的结构或功能。可以使用标准技术如杂交、扩增和/或数据库序列比较鉴定等位基因。

[0171] 可以使用多种本领域已知的和可用的广为接受的多种技术中的任何一种制备、操纵和/或表达多核苷酸及其融合物。例如，可以在重组DNA分子中使用编码本发明多肽或其融合蛋白或功能性等效物的多核苷酸序列，以在适当的宿主细胞中直接表达本发明的HRS多肽。由于遗传密码固有的简并性，可以产生编码基本上相同的或功能上等效的氨基酸序列的其他DNA序列，可以使用这些序列克隆和表达给定的多肽。

[0172] 如本领域技术人员所理解，在有些情况下，产生编码多肽的具有非天然存在的密码子的核苷酸序列是有利的。例如，可以选择特定原核或真核宿主所优选的密码子，以增加蛋白表达的速率，或产生具有期望性质例如半衰期比自然存在序列产生的转录本的半衰期长的重组体RNA转录本。

[0173] 此外，可以使用本领域内众所周知的方法改造本发明的多核苷酸序列，以便出于种种原因改变编码多肽的序列，包括但不限于，修饰基因产物的克隆、加工、表达和/或活性的改变。

[0174] 为了表达期望的多肽，可以将编码多肽或功能性等效物的核苷酸序列插入合适的表达载体，即含有对所插入的编码序列的转录和翻译来说是必要元素的载体。可以使用本领域技术人员公知的方法构建表达载体，所述表达载体含有编码感兴趣的多肽的序列和适当的转录和翻译控制元件。这些方法包括体外重组DNA技术、合成技术及体内基因重组。这些技术描述于Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (分子克隆实验指南) (1989) 和Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (现代分子生物学实验技术) (1989) 中。

[0175] 已知多种表达载体/宿主系统，其可以用于包含和表达多核苷酸序列。这些表达载体/宿主系统包括但不限于，微生物，如用重组噬菌体、质粒或粘粒DNA表达载体转化的细菌；用酵母表达载体转化的酵母；用病毒表达载体（如杆状病毒）感染的昆虫细胞系统；用病

毒表达载体(如花椰菜花叶病毒(CaMV)、烟草花叶病毒(TMV))或用细菌表达载体(如Ti质粒或pBR322质粒)转化的植物细胞系统;或动物细胞系统,包括基于病毒的表达系统。

[0176] 存在于表达载体中的“控制元件”或“调节序列”是载体的非翻译区,即增强子、启动子、5'和3'非翻译区,其与宿主细胞蛋白相互作用进行转录和翻译。这些元件的强度和特异性可以有所不同。取决于所用的载体系统和宿主,可以使用任何数量合适的转录和翻译的元件,包括组成型和诱导型启动子。例如,当在细菌系统中克隆时,可以使用诱导型启动子,如PBLUESCRIPT噬菌粒(Stratagene, La Jolla, Calif.)或PSPORT1质粒(Gibco BRL, Gaithersburg, Md.)的杂合lacZ启动子等。在哺乳动物细胞系统中,一般优选来自哺乳动物基因或哺乳动物病毒的启动子。如果必须产生含有编码多肽的序列的多个拷贝的细胞系,基于SV40或EBV的载体可以有利地与适当的选择标记一同使用。

[0177] 具体的起始信号也可以用来实现编码感兴趣的多肽的序列更高效地翻译。这些信号包括ATG起始密码子和相邻序列。表达效率可以通过包含增强子而增强,所述增强子适合所用的特定细胞系统,例如文献中所描述的那些增强子(Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20:125-162(1994))。

[0178] 此外,可以选择能以期望的方式调节所插入序列的表达或加工所表达的蛋白质的宿主细胞株。这种多肽的翻译后修饰包括但不限于乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂化和酰化。切割蛋白质的“前体(prepro)”形式的翻译后加工,也可以用于促进正确的插入、折叠和/或功能。可以选择不同的宿主细胞,如CHO、HeLa、MDCK、HEK293和W138,以确保外源蛋白的正确修饰和加工,所述不同的宿主细胞具有用于此类翻译后活性的特定细胞机制和特性。

[0179] 对于长期、高产量的重组蛋白质产生,通常优选稳定的表达。例如,可以使用表达载体转化稳定表达感兴趣的多核苷酸的细胞系,所述表达载体可以含有病毒的复制起点和/或内源性表达元件,以及相同或单独载体上的选择标记基因。引入载体后,可以允许细胞在转入选择性培养基之前,在富集培养基中生长1-2天。选择标记的用途是赋予选择抗性,它的存在使成功表达所引入序列的细胞生长和回收。可以使用适合于细胞类型的组织培养技术增殖稳定转化的细胞的抗性克隆。

[0180] 可以用任何数量的选择系统回收转化的细胞。这些系统包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler et al., Cell 11:223-232(1977))和腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Lowy et al., Cell 22:817-823(1990))基因,所述基因可以分别用于tk细胞或aprt细胞。此外,可以使用抗代谢药、抗生素或除草剂抗性作为选择基础;例如,赋予甲氨喋呤抗性的dhfr(Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:3567-70(1980));赋予氨基糖苷类、新霉素和G-418抗性的NPT(Colbere-Garapin et al., Mol. Biol. 150:1-14(1981));以及分别赋予氯磺隆和草胺磷(phosphinotricin)乙酰转移酶抗性的ALS或PAT(Murry, 同上)。

[0181] 使用产物特异性的多克隆或单克隆抗体检测和测量多核苷酸编码产物表达的多种实验技术,是本领域内已知的。实例包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和荧光激活细胞分选(FACS)。除在其他地方以外,这些和其他测定还描述于Hampton et al., Serological Methods, a Laboratory Manual(血清学方法实验指南)(1990)和Maddox et al., J. Exp. Med. 158:1211-1216(1983)中。

[0182] 用感兴趣的多核苷酸序列转化的宿主细胞可以在适于蛋白质表达和从细胞培养

物中回收蛋白质的条件下培养。重组细胞所产生的蛋白质可以被分泌或包含于细胞内,这取决于所用的序列和/或载体。如本领域内技术人员所理解,含有本发明多核苷酸的表达载体可以设计为含有信号序列,所述信号序列指导编码的多肽通过原核或真核细胞膜分泌。可以使用其他重组构建体将编码感兴趣的多肽的序列连接于编码有利于可溶性蛋白质纯化的多肽结构域的核苷酸序列。

[0183] 除重组产生方法以外,本发明多肽及其片段可以通过采用固相技术的直接肽合成产生(Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154 (1963))。可以使用人工技术或自动化进行蛋白质的合成。例如,自动合成可以使用Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) 来实现。可选地,可以单独地化学合成不同片段,然后使用化学方法结合,以生产全长分子。

[0184] 根据本发明的另一个方面,可以将编码本发明多肽的多核苷酸递送到个体体内,例如,使用基因治疗技术递送。基因疗法一般是指将异源核酸转移到具有需要这种疗法的病症或状况的哺乳动物特别是人的某些细胞即靶细胞中。将核酸以表达异源DNA并产生所编码的治疗性产物的方式引入到所选的靶细胞中。

[0185] 可用于本发明所教导的基因疗法的各种病毒载体包括腺病毒、疱疹病毒、牛痘、腺伴随病毒(AAV),或者,优选诸如逆转录病毒的RNA病毒。优选地,逆转录病毒载体是鼠或禽逆转录病毒的衍生物或慢病毒载体。优选的逆转录病毒载体是慢病毒载体。可插入单个外源基因的逆转录病毒载体的实例包括但不限于:莫洛尼鼠白血病毒(MoMuLV)、哈维小鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、小鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、SIV、BIV、HIV和劳氏肉瘤病毒(RSV)。许多其他的逆转录病毒载体可以包含多个基因。所有这些载体可转移或包含选择标记的基因,从而可识别并产生转导细胞。例如,通过将感兴趣的锌指衍生DNA结合多肽序列与另一种编码特定靶细胞上的受体配体的基因一起插入病毒载体,可以使所述载体变成靶标特异性的。可以通过插入例如编码蛋白质(二聚体)的核苷酸而使逆转录病毒载体变成靶特异性的。说明性的靶向可以通过使用抗体靶向逆转录病毒载体而实现。那些本领域内的技术人员应该知道或可以不经过过度的试验而很容易地确定哪种可以插入到逆转录病毒基因组,从而使含有锌指核苷酸结合蛋白多核苷酸的逆转录病毒载体靶向特异性地递送。

[0186] 由于重组逆转录病毒是有缺陷的,它们需要协助以产生侵染性载体颗粒。这种协助可以通过例如使用辅助细胞系而提供,所述辅助细胞系含有编码所有在LTR内调节序列控制下的反转录病毒结构基因的质粒。这些质粒缺失启动包装机制以识别用于封装的RNA转录本的核苷酸序列。缺失包装信号的辅助细胞系包括但不限于,例如PSI.2、PA317和PA12。由于未包装基因组,所以这些细胞系产生空的病毒体。如果将逆转录病毒载体引入这种包装信号完整但结构基因被其他感兴趣的基因所替换的细胞内,可以包装所述载体,并且产生载体病毒体。用这种方法产生的载体病毒体接下来可以用以感染组织细胞系,如NIH 3T3细胞,以产生大量的嵌合逆转录病毒体。

[0187] 也可使用用于基因疗法的“非病毒”递送技术,包括,例如DNA-配体复合物、腺病毒-配体-DNA复合物、DNA直接注射、CaPO₄沉淀、基因枪技术、电穿孔、脂质体、脂转染等。这些方法中的任何方法均广泛地为本领域内技术人员所使用,且适于在本发明中使用。还有其他合适的方法可供本领域内技术人员使用,应当理解的是,本发明可以通过使用任何可用的转染方法实现。脂转染可以通过将分离的DNA分子封装在脂质体颗粒中,并且使所述脂

质体颗粒接触靶细胞的细胞膜而实现。脂质体是自组装的胶体颗粒,其中,由两亲分子诸如磷脂酰丝氨酸或磷脂酰胆碱组成的脂质双层封装周围培养基的一部分,从而脂质双层包围亲水内部。可以构造单层(unilamellar)或多层(multilamellar)脂质体,从而内部包含期望的化学品、药物或如本发明中的分离的DNA分子。

[0188] 某些实施方案包括与参考HRS多核苷酸序列或其补体在下述严格条件下杂交的多核苷酸。如本文所用,术语“在低严格、中等严格、高严格或极严格条件下杂交”,描述了杂交和洗涤的条件。可以在Ausubel et al., (1998,同上)的第6.3.1至6.3.6部分中找到进行杂交反应的指导。水性和非水性方法在该参考文献中进行了介绍,且都可以使用。

[0189] 本文提到低严格条件包括且包含至少约1%v/v到至少约15%v/v的甲酰胺和至少约1M到至少约2M的盐,用于42°C下杂交,以及至少约1M到至少约2M的盐,用于42°C下洗涤。低严格条件还可以包括1%的牛血清白蛋白(BSA)、1mM EDTA、0.5M NaHPO₄ (pH 7.2)和7% SDS,用于65°C下杂交,以及(i) 2×SSC和0.1%SDS或(ii) 0.5%BSA、1mM EDTA、40mM NaHPO₄ (pH 7.2)和5%SDS,用于在室温下洗涤。低严格条件的一个实施方案包括在约45°C下、在6×氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中杂交,然后至少在50°C下、在0.2×SSC和0.1%SDS中洗涤两次(低严格条件的洗涤温度可以升高到55°C)。

[0190] 中等严格条件包括且包含至少约16%v/v到至少约30%v/v的甲酰胺和至少约0.5M到至少约0.9M的盐,用于42°C下杂交,以及至少约0.1M到至少约0.2M的盐,用于55°C下洗涤。中等严格条件还可以包括1%的牛血清白蛋白(BSA)、1mM EDTA、0.5M NaHPO₄ (pH 7.2)和7%SDS,用于65°C下杂交,以及(i) 2×SSC和0.1%SDS或(ii) 0.5%BSA、1mM EDTA、40mM NaHPO₄ (pH 7.2)和5%SDS,用于在60-65°C下洗涤。中等严格条件的一个实施方案包括在约45°C下、在6×SSC中杂交,然后在60°C下、在0.2×SSC和0.1%SDS中洗涤一次或更多次。高严格条件包括且包含至少约31%v/v到至少约50%v/v的甲酰胺和至少约0.01M到至少约0.15M的盐,用于42°C下杂交,以及至少约0.01M到至少约0.02M的盐,用于55°C下洗涤。

[0191] 高严格条件还可以包括1%BSA、1mM EDTA、0.5M NaHPO₄ (pH 7.2)和7%SDS,用于65°C下杂交,以及(i) 0.2×SSC和0.1%SDS或(ii) 0.5%BSA、1mM EDTA、40mM NaHPO₄ (pH 7.2)和1%SDS,用于在超过65°C的温度下洗涤。高严格条件的一个实施方案包括在约45°C下、在6×SSC中杂交,然后在65°C下、在0.2×SSC和0.1%SDS中洗涤一次或更多次。极严格条件的一个实施方案包括在65°C下、在0.5M磷酸钠和7%SDS中杂交,然后在65°C下、在0.2×SSC和1%SDS中洗涤一次或更多次。

[0192] 其他严格条件是本领域众所周知的,本领域内的技术人员应当认识到,可以操控不同因素以优化杂交的特异性。对最后洗涤的严格性的优化能够用来确保高度杂交。详细的实例参见Ausubel et al. (同上)的第2.10.1至2.10.16页,以及Sambrook et al. (1989,同上)的第1.101至1.104部分。

[0193] 尽管严格洗涤一般在约42°C-68°C的温度下进行,但本领域内技术人员应当理解,其他温度也可以适用于严格条件。发生最大杂交率的温度一般比形成DNA-DNA杂合体的 T_m 低约20°C-25°C。本领域内众所周知, T_m 是解链温度,或两个互补多核苷酸序列解离的温度。 T_m 值的估算方法是本领域内众所周知的(参见Ausubel et al.,同上,第2.10.8页)。

[0194] 通常,完全匹配的DNA双链体的 T_m 可以以下列公式预测近似值: $T_m = 81.5 + 16.6 (\log_{10}M) + 0.41 (\%G+C) - 0.63 (\%甲酰胺) - (600/\text{长度})$,其中,M是Na⁺浓度,优选在0.01摩尔

至0.4摩尔的范围内；%G+C是鸟嘌呤核苷和胞嘧啶碱基的总和占总碱基数的百分比，范围在30%至75%；%甲酰胺是甲酰胺体积浓度的百分比；长度是所述DNA双链体中碱基对的数量。随机错配碱基对的数量每增加1%，双螺旋DNA的 T_m 约降低1°C。对于高严格性，洗涤一般在 $T_m-15^\circ\text{C}$ 下进行，或对于重度严格性，在 $T_m-30^\circ\text{C}$ 下进行。

[0195] 在杂交过程的一个实例中，使含有固定DNA的膜（如硝酸纤维素膜或尼龙膜）在42°C下、在含有标记的探针的杂交缓冲液（50%去离子甲酰胺、 $5\times\text{SSC}$ 、 $5\times\text{Denhardt}$ 溶液（0.1%聚蔗糖、0.1%聚乙烯吡咯烷酮和0.1%牛血清白蛋白）、0.1%SDS和200mg/mL变性鲑鱼精DNA）中，杂交过夜。然后，对所述膜进行两次连续的中等严格洗涤（即 $2\times\text{SSC}$ 和0.1%SDS，45°C下15分钟，然后， $2\times\text{SSC}$ 和0.1%SDS，50°C下15分钟），接着进行两次连续的较高严格洗涤（即 $0.2\times\text{SSC}$ 和0.1%SDS，55°C下12分钟，然后， $0.2\times\text{SSC}$ 和0.1%SDS溶液，65–68°C下12分钟）。

[0196] 本发明实施方案还包括寡核苷酸，用于检测、扩增、反义疗法或其他用途。对于这些和相关的目的，术语“寡核苷酸”或“寡”或“寡聚物”意图包含单个“寡核苷酸”以及复数个“寡核苷酸”，并指两个或更多个核苷酸、核苷、核碱基或相关化合物的任何聚合物，作为本发明扩增方法以及随后的检测方法中的试剂。寡核苷酸可以是DNA和/或RNA和/或其类似物。

[0197] 术语“寡核苷酸”并不一定表示试剂的任何特定功能，而是一般用来涵盖本文所述的所有这些试剂。寡核苷酸可以用于多种不同的功能，例如，如果它能够与互补链杂交且能够在核酸聚合酶的存在下进一步延伸，则它可以作为引物发挥功能；如果它含有可被RNA聚合酶识别的序列且允许转录，则它可以提供启动子；并且，如果被适当地定位和/或修饰，它可以发挥防止杂交或阻碍引物延伸的功能。寡核苷酸也可作为探针或反义试剂（antisense agent）发挥功能。寡核苷酸实际上可以是任何长度，仅受其特定功能的限制，例如在扩增反应中、在检测扩增反应的扩增产物中或在反义或RNA干扰应用中的功能。本文所述的任何寡核苷酸都可作为引物、探针、反义寡聚物或RNA干扰剂使用。

[0198] 本文所用的术语“引物”是指，可以在由例如缓冲液和温度所限定的适当条件下，在四种不同核苷三磷酸和聚合剂如DNA或RNA聚合酶或逆转录酶的存在下，能作为模板指导的DNA合成起始点的单链寡核苷酸。在任何给定的情形下，引物长度取决于，例如，引物的预期用途，虽然可以使用较短和较长的引物，但其一般范围为约15–30个核苷酸。较短的引物分子一般要求稍凉的温度，以与模板形成充分稳定的杂交复合体。引物不需要反映模板的确切顺序，但必须充分互补，以与这种模板杂交。引物位点是引物杂交到模板的区域。引物对是一对引物，包括与待扩增序列的5'端杂交的5'上游引物，和与待扩增序列的3'端补体杂交的3'下游引物。

[0199] 本文所用的术语“探针”是指表面固定的可以被特定靶标识别的分子。参见，例如，美国专利第6,582,908号中具有10、12及更多个碱基的探针所有可以组合的阵列的实例。本文所用的探针和引物，通常包含已知序列的至少10–15个连续核苷酸。为了提高特异性，也可以使用更长的探针和引物，例如包含HRS参考序列或其补体的至少20、25、30、40、50、60、70、80、90、100个或至少150个核苷酸的探针和引物。探针和引物可以比这些实例长得多，应当理解，可以使用本领域的知识及包括表格、图和序列列表在内的本说明书所支持的长度。

[0200] 制备和使用探针和引物的方法描述于参考文献中，例如Sambrook, J. et al.

(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆实验指南), 2. sup. nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press, Plainview N.Y.; Ausubel, F.M. et al. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology* (现代分子生物学实验技术), Greene Publ. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York N.Y.; Innis, M. et al. (1990) *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications* (PCR实验技术: 方法和应用指南), Academic Press, San Diego Calif. PCR引物对可以来自已知序列, 例如, 通过使用用于该目的的计算机程序, 如Primer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge Mass.)。

[0201] 作为引物或探针使用的寡核苷酸可以使用本领域内已知的软件进行选择。例如, OLIGO 4.06软件可用于选择各引物高达100个核苷酸的PCR引物对, 以及从高达32000个碱基的输入多核苷酸序列中分析寡核苷酸和高达5000个核苷酸的较大的多核苷酸。Primer3引物选择程序(由位于马萨诸塞州剑桥的怀特黑德研究所/麻省理工学院基因组研究中心向公众提供), 允许用户输入“引物错置库(mispriming library)”, 其中, 用户指定避免作为引物结合位点的序列。任何上述选择方法确定的寡核苷酸和多核苷酸片段可用于杂交技术, 作为例如PCR或测序引物、微阵列元件或特异性探针, 以鉴定核酸样品中完全或部分互补多核苷酸。寡核苷酸选择的方法并不限于本文所述的那些。

[0202] 术语“反义寡聚物”或“反义化合物”或“反义寡核苷酸”可互换使用, 并指由亚基间连接而连接的环状亚基序列, 每个环状亚基都携带碱基配对部分, 所述亚基间连接允许碱基配对部分与核酸(通常是RNA)靶序列通过Watson-Crick碱基配对杂交, 在靶序列中形成核酸-寡聚物异源双链体, 通常从而防止所述RNA的翻译。还包括其调节所选HRS转录本如剪接变体或蛋白水解片段和/或相应多肽表达的使用方法。

[0203] 反义寡核苷酸可以含有约8-40个亚基, 通常约8-25个亚基, 优选12-25个亚基。在某些实施方案中, 寡核苷酸可以与靶序列具有精确的序列互补性或近似互补性, 如以下所定义。在某些实施方案中, 靶序列和反义引导序列之间的互补性程度足以形成稳定的双链体。反义寡聚物与靶RNA序列的互补区域的长度可以短至8-11个碱基, 但优选12-15个碱基或更多, 如12-20个碱基或12-25个碱基, 包括这些范围之间的所有整数。约14-15个碱基的反义寡聚物, 其长度一般足够具有靶向所选HRS转录本的独特互补序列。

[0204] 在某些实施方案中, 长至40个碱基的反义寡聚物可以是合适的, 其中至少最低数量的碱基如10-12个碱基与靶序列互补。然而, 在一般情况下, 在寡聚物长度少于约30个碱基时, 细胞中的促进吸收或主动吸收被优化。对于下面进一步描述的某些寡聚物, 一般在18-25个碱基长度时, 出现结合稳定性和吸收的最佳平衡。包括由约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或40个碱基组成的反义寡聚物(如PNA、LNA, 2'-OME、MOE、吗啉代), 其中至少约6、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或40个连续或不连续碱基与其HRS靶序列或其变体互补。

[0205] 在某些实施方案中, 反义寡聚物可以与HRS核酸靶序列100%互补, 或者, 它可以包括错配, 例如, 为了适应变体, 只要寡聚物和HRS核酸靶序列之间形成的异源双链体足够稳定, 经得起细胞核酸酶和其他体内可发生的降解方式的作用。下面讨论不大容易被核酸酶切割的寡聚物主链。如果存在错配, 则靠近杂合双链体末端区域的错配比中间位置的错

配的不稳定性低。根据充分了解的双链体稳定性原则,允许的错配数量将取决于寡聚物的长度、双链体中G-C碱基对的百分比(G:C)以及双链中错配的位置。尽管这样的反义寡聚物不一定与HRS核酸靶序列100%互补,但是它对稳定地、特异性地与靶序列结合是有效的,从而,调节核酸靶标的生物活性,如HRS蛋白的表达。

[0206] 寡聚物和靶序列之间所形成的双链体的稳定性是结合 T_m 和双链体对于细胞酶促切割敏感性的函数。反义寡核苷酸相对于互补序列RNA的 T_m 可以通过常规方法测量,如Hames et al., *Nucleic Acid Hybridization* (核酸杂交), IRL Press, 1985, pp. 107-108或Miyada CG and Wallace R.B. 1987, *Oligonucleotide hybridization techniques*, *Methods Enzymol.* Vol. 154 pp. 94-107所描述的那些方法。在某些实施方案中,反义寡聚物相对于互补序列RNA的 T_m ,比体温度高,优选地,高于50°C。优选地, T_m 的范围为60-80°C或更高。根据众所周知的原则,寡聚物化合物相对于基于互补的RNA杂合体的 T_m ,可以通过增加双链体中C:G配对碱基的比例和/或增加异源双链体(在碱基对中)的长度而升高。

[0207] 反义寡聚物可以设计为阻止或抑制mRNA的翻译,或抑制天然前体mRNA的剪接加工或诱导靶mRNA的降解,且可以说是“定向”或“靶向”与其杂交的靶序列。在某些实施方案中,靶序列可以包括HRS mRNA转录本的任何编码或非编码序列,且因此可以在外显子或内含子内。在某些实施方案中,靶序列在HRS中相对独特或特殊,且选择性地降低所选HRS蛋白水解片段或剪接变异体的表达。在某些实施方案中,靶位点包括预加工mRNA的3'或5'剪接位点或分支点。剪接位点的靶序列可以包括mRNA序列,在预加工的mRNA中,所述mRNA序列在其5'端具有剪接受体接合点下游或剪接供体接合点上游的1至约25至约50个碱基对。在某些实施方案中,靶序列可以包括可选剪接HRS mRNA的剪接点,如不在全长HRS中出现的剪接点,或那个转录本来说是独特的或特殊的剪接点,因为所述剪接点在其他HRS剪接变异体中不出现或很少出现。更普遍地说,当寡聚物以本文所述的方式靶向靶标核酸时,其“靶向”生物相关的靶标,如参考HRS多核苷酸。

[0208] 寡核苷酸的“亚基”是指一个核苷酸(或核苷酸类似物)单元。所述术语可以指带或不带所连接的亚基间连接的核苷酸单元,但是,当提到“带电的亚基”时,电荷通常存在于亚基间连接(如磷酸盐或硫代磷酸酯连接或阳离子连接)中。

[0209] 寡核苷酸的环状亚基可以基于核糖或另一戊糖,或在某些实施方案中,替代或修饰的基团。修饰的寡核苷酸主链的实例包括但不限于硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯(aminoalkylphosphotriester)、甲基磷酸酯(methyl phosphonate)和其他烷基磷酸酯(alkyl phosphonate)(包括3'-亚烷基磷酸酯(3'-alkylene phosphonates)和手性磷酸酯(chiral phosphonate))、亚膦酸酯(phosphinates)、磷酰胺酯(phosphoramidate)(包括3'-氨基磷酰胺酯(3'-aminophosphoramidates)和氨基烷基磷酰胺酯(aminoalkylphosphoramidate))、硫逐磷酰胺酯(thionophosphoramidates)、硫逐烷基硫酸酯(thionoalkylphosphonates)、硫逐烷基磷酸三酯(thionoalkylphosphotriesters),以及具有正常3'-5'连接的硼烷磷酸酯(boranophosphates)、这些的2'-5'连接的类似物和那些极性相反的硼烷磷酸酯,其中,相邻核苷单元对由3'-5'连接到5'-3'或由2'-5'连接到5'-2'。还考虑肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)、2'-O-甲基寡核苷酸(2'-OMe)、2'-甲氧基乙氧基寡核苷酸(MOE)、吗啉代以及本领域内已知的其他寡核苷酸。

[0210] 嘌呤或嘧啶碱基配对部分通常是腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶或肌苷。还包括诸如以下的碱基：吡啶-4-酮(pyridin-4-one)、吡啶-2-酮(pyridin-2-one)、苯基、假尿嘧啶(pseudouracil)、2,4,6-三甲氧基苯(2,4,6-trimethoxy benzene)、3-甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶核苷、萘基、氨基苯基、5-烷基胞嘧啶核苷(如5-甲基胞嘧啶核苷)、5-烷基尿嘧啶核苷(如核糖胸腺嘧啶核苷)、5-卤代尿嘧啶核苷(如5-溴代尿嘧啶核苷)或6-氮杂嘧啶(6-azapyrimidine)或6-烷基嘧啶(如6-甲基尿嘧啶核苷)、丙炔、Q-核苷(quesosine)、2-硫尿嘧啶核苷、4-硫尿苷、怀丁苷(wybutosine)、怀丁氧苷(wybutoxosine)、4-乙酰胞嘧啶(4-acetylthymine)、5-(羧基羟甲基)尿苷、5'-羧基甲基氨基-2-硫尿苷、5-羧基甲基氨基尿苷、 β -D-半乳糖基Q核苷(β -D-galactosylqueosine)、1-甲基腺苷、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟苷、3-甲基胞苷、2-甲基腺苷、2-甲基鸟苷、N6-甲基腺苷、7-甲基鸟苷、5-甲氧基氨基-2-硫尿苷、5-甲基氨基尿苷、5-甲基羧基甲基尿苷、5-甲基氧尿苷(5-methyloxyuridine)、5-甲基-2-硫尿苷、2-甲基硫基-N6-异戊烯腺苷、 β -D-甘露糖基Q核苷、尿苷-5-氧乙酸、2-巯基胞苷(2-thiocytidine)、苏氨酸衍生物及其他(Burgin et al., 1996, Biochemistry (生物化学), 35, 14090; Uhlman Peyman, 同上)。在这方面的“修饰的碱基”，是指除腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)以外的核苷酸碱基，如上所述；这些碱基可以用在反义分子的任何位置。本领域内技术人员应认识到，取决于寡聚物的用途，T和U是可以互换的。例如，在其他反义化学物如更像RNA的2'-O-甲基反义寡核苷酸中，T碱基可以表示为U。

[0211] 寡核苷酸通常与靶序列互补，如靶DNA或RNA。术语“互补”和“互补性”是碱基配对规则所关联的多核苷酸(即核苷酸的序列)。例如，序列“A-G-T”与序列“T-C-A”互补。“互补性”可以是“部分的”，其中只有一些核酸的碱基按照碱基配对规则匹配。或者，核酸之间有“完全”或“全部”(100%)的互补性。核酸链之间的互补程度对核酸链之间的杂交效率和强度有显著影响。虽然期望完美的互补性，但一些实施方案中可以包括一个或更多个但优选20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个相对于靶序列的错配。在寡聚物内任何位置的变化都包括在内。在某些实施方案中，寡聚物末端附近序列的变化一般优选内部变化，如果存在的话，通常在5'和/或3'末端的约10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个核苷酸以内。

[0212] 术语“靶序列”是指寡核苷酸所针对的靶RNA的一部分，亦即与寡核苷酸通过互补序列的Watson-Crick碱基配对而杂交的序列。在某些实施方案中，靶序列可以是HRS mRNA的连续区(例如，HRS mRNA的独特剪接点)，或可以由所述mRNA的非连续区组成。

[0213] 术语“引导序列(targeting sequence)”或在某些实施方案中的“反义引导序列”，是指寡核苷酸中的序列，所述寡核苷酸与DNA或RNA靶分子的靶序列互补(另外，意思是基本上互补)。反义化合物的整个序列或仅部分序列可以与靶序列互补。例如，在有20-30个碱基的寡核苷酸中，约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29个可以是与靶区域互补的引导序列。通常，引导序列由连续碱基形成，但可选地可以由放在一起时的非连续序列形成，例如，从寡核苷酸的相对末端，组成跨越靶序列的序列。

[0214] 靶序列和引导序列当在反平行结构中发生杂交时彼此“互补”。引导序列可以与靶序列“近似”互补或“基本上”互补，而且还能为本发明目的发挥功能，也就是说，它可以还是功能上“互补”的。

[0215] 如果寡聚物与靶标(如HRS参考核苷酸或其补体)在生理条件下杂交,则寡核苷酸与靶多核苷酸“特异性杂交”, T_m 基本上高于45°C,优选至少50°C,通常为60-80°C或更高。这种杂交优选对应于严格杂交条件。在给定的离子强度和pH值下, T_m 是50%的靶序列与互补多核苷酸杂交的温度。同样,反义寡聚物与靶序列“近似”互补或“基本上”互补,以及精确互补时,可发生这种杂交。

[0216] 术语“特异性结合”或“特异性杂交”一般指寡核苷酸探针或多核苷酸序列不仅与样品中既定的靶基因序列在选定杂交条件下结合,还不与样品中的其他靶序列显著结合,由此区分靶标库中的其既定靶标和所有其他靶标。如本文所述,与其既定靶序列特异性杂交的探针,也可以在所选杂交条件下检测浓度差异。

[0217] 如上所述,本文提供的某些寡核苷酸包括肽核酸(PNA)。还包括“锁核酸”亚基(LNA)。LNA的结构是本领域内已知的,例如,Wengel et al.,*Chemical Communications* (1998) 455, *Tetrahedron* (1998) 54, 3607和*Accounts of Chem. Research* (1999) 32, 301; Obika et al., *Tetrahedron Letters* (1997) 38, 8735; (1998) 39, 5401和*Bioorganic Medicinal Chemistry* (2008) 16, 9230。某些寡核苷酸可以包括吗啉代基亚基,所述亚基携带碱基配对部分,通过不带电或基本上带电的连接而连接。术语“吗啉代寡聚物”或“PMO”(磷酸胺酯吗啉代寡聚物或磷二酰胺吗啉代寡聚物)是指由吗啉代亚基结构组成的寡核苷酸类似物,其中(i)所述结构通过含有磷的连接而连接在一起,长度为1-3个原子,优选2个原子,且优选不带电荷的或阳离子的,将一个亚基的氮原子连接于相邻亚基的5'-环外碳,(ii)每个吗啉代环携带对与多核苷酸中的碱基通过碱基特异性氢键作用结合有效的嘌呤或嘧啶或等效的碱基配对部分。

[0218] 在某些实施方案中,寡核苷酸可以采用上文所引用的参考文献中详细描述的方法,通过逐步固相合成而制备,下文有关具有混合物或不带电荷的和阳离子主链连接的寡核苷酸的合成。在某些情形下,可能期望将额外的化学部分添加到寡核苷酸上,例如,以增强药物代谢动力学特性或便于捕获或检测该化合物。这种部分可以根据标准合成方法共价连接,通常连接到寡聚物末端。例如,添加聚乙二醇部分或其他亲水性聚合物,例如有10-100个单体亚基的部分,可用于提高溶解度。一个或多个带电荷的基团,例如阴离子带电荷基团,如有机酸,可增强细胞吸收。

[0219] 可以使用多种可检测分子使得寡核苷酸可检测出,如可以直接检测(如,通过光发射)或间接检测(如,通过荧光标记的抗体的结合)的放射性同位素、荧光染料、染料、酶、纳米粒子、化学发光标记物、生物素或本领域内已知的其他单体。

[0220] 某些实施方案涉及RNA干扰(RNAi)剂,所述RNA干扰剂靶向HRS参考多核苷酸的一个或更多个mRNA转录本,包括其片段和变体。还包括使用其调节所选的HRS转录本如HRS剪接变体或蛋白水解片段的水平的方法。

[0221] 术语“双链”是指两个独立的核酸链,所述核酸链包含一个区域,在所述区域中双链的至少一部分链与氢键充分互补,并形成双链结构。术语“双链体”或“双链结构”是指双链分子的区域,在所述区域中,两个独立的链基本上互补,因而彼此杂交。“dsRNA”是指具有双链结构的核糖核酸分子,所述双链结构包含两个互补的反平行核酸链(即正义链和反义链)。并非所有的dsRNA的核苷酸都必须表现出Watson-Crick碱基对;两个RNA链可以是基本上互补的。RNA链可以有相同或不同数量的核苷酸。

[0222] dsRNA的链充分互补,以杂交形成双链结构。在某些实施方案中,互补的RNA链长度可以少于30个核苷酸、少于25个核苷酸或者甚至19-24个核苷酸。在某些方面,互补的核苷酸序列的长度可以是20-23个核苷酸或22个核苷酸。

[0223] 在某些实施方案中,RNA链的至少一条包括长度为1-4个核苷酸的核苷酸突出端。在其他实施方案中,链中的一条或两条是粘末端的。在某些实施方案中,dsRNA还可以包含至少一个化学修饰的核苷酸。

[0224] 本发明的某些实施方案可以包含微RNA (microRNA)。微RNA代表生物体中自然产生的一大群小RNA,其中一些微RNA调节靶基因的表达。微RNA由约70个核苷酸的单链发夹前体转录本通过Dicer形成(V.Ambros et al.,Current Biology 13:807,2003)。

[0225] 某些实施方案还可以采用短干扰RNA (siRNA)。siRNA剂的各链长度可以等于或小于35、30、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16或15个核苷酸。所述链的长度优选为至少19个核苷酸。例如,各链长度可以在21-25个核苷酸。优选的siRNA剂具有由17、18、19、29、21、22、23、24或25个核苷酸对的双链区以及一个或多个突出端,优选2-3个核苷酸的一个或两个3'突出端。

[0226] 如本文所用的“单链RNAi剂”,是由单个分子组成的RNAi剂。它可以包括由链内配对形成的双链区,例如,它可以为或包括发夹或锅柄 (pan-handle) 结构。单链RNAi剂的长度为至少14个、更优选长度为至少15、20、25、29、35、40或50个核苷酸。优选地,长度少于200、100或60个核苷酸。

[0227] 发夹RNAi调节剂可以具有双链区,所述双链区等于或至少有17、18、19、29、21、22、23、24或25个核苷酸对。优选地,双链区的长度可以等于或少于200、100或50个核苷酸对。双链区长度的某些范围是15-30、17-23、19-23、19-21个核苷酸对。发夹可以具有单链突出端或末端未配对区域,优选3'端,优选发夹的反义侧。在某些实施方案中,突出端的长度为2-3个核苷酸。

[0228] 本发明还包括使用核酶的寡核苷酸。还包括能够表达本文所述HRS引导序列的载体递送系统。包括表达siRNA或其他形成双链体的RNA干扰分子的载体。示例性的递送系统可以包括病毒载体系统(即病毒介导的转导),包括但不限于逆转录病毒(如慢病毒)载体、腺病毒载体、腺伴随病毒载体、疱疹病毒载体以及其他本领域内已知的载体。

[0229] 靶向HRS多核苷酸参考序列或其互补序列的一个或多个部分的寡核苷酸和RNAi剂,可以用于本文所述的并且对本领域技术人员来说是显而易见的任何治疗方法、诊断方法或药物筛选方法。

[0230] 抗体组合物、其片段以及其他结合剂

[0231] 根据另一个方面,本发明还提供了结合剂,如抗体、其抗原结合片段、可溶性受体、适体、小分子等,所述结合剂表现出与本文所公开的HRS剪接变异体多肽或它的细胞结合伴侣,或其部分、变异体或衍生物的结合特异性,以及使用所述结合剂的方法。

[0232] 在一些实施方案中,这类结合剂会有效地调节由本发明HRS多肽介导的一种或更多种非经典活性。例如,在某些其他实施方案中,所述结合剂是与本发明的HRS多肽结合,并抑制其结合到一种或更多种其细胞结合伴侣的能力的结合剂。因此,通过拮抗其活性,这类结合剂可用于治疗或预防由本发明HRS多肽介导或调节的疾病、病症或其他状况。例如,在某些实施方案中,结合剂结合到HRS多肽的细胞结合伴侣上,并模拟HRS多肽的活性,例如通

过增加或促进由HRS多肽介导的非经典活性。因此,通过部分或完全拮抗或促进其活性,这类结合剂可用于诊断、治疗或预防由本发明HRS多肽介导的疾病、病症或其他状况。

[0233] 如果结合剂如抗体或其抗原结合片段在可检测水平上(在例如ELISA测定中)与本发明的多肽反应,且在类似条件下不与无关的多肽可检测地反应,则认为它与所述多肽“特异性结合”、“免疫结合”和/或是“免疫反应性的”。

[0234] 如在上下文中使用的,免疫结合一般指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白的特异性抗原之间发生的非共价相互作用类型。免疫结合相互作用的强度或亲合力可以用相互作用的解离常数(K_d)表示,其中 K_d 越小,表示亲合力越大。所选多肽的免疫结合性可以使用本领域内众所周知的方法量化。一种这样的方法需要测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中这些速率取决于复合物伴侣的浓度、相互作用的亲和力以及在两个方向上等同时影响速率的几何参数。因此,“开速率常数”(K_{on})和“关速率常数”(K_{off})可以通过计算结合和解离的浓度和实际速率而确定。 K_{off}/K_{on} 比值,可以消除与亲合力无关的所有参数,并因此等于解离常数 K_d 。例如,参见Davies et al., (1990) Annual Rev. Biochem. 59:439-473。

[0235] 抗体的“抗原结合位点”或“结合部分”是指参与抗原结合的免疫球蛋白分子的部分。抗原结合位点由重链(H)和轻链(L)的N-末端可变(V)区的氨基酸残基形成。重链和轻链V区内的三段高度分叉的序列被称为“高变区”,所述高变区插入一段更保守的侧翼序列之间,所述侧翼序列通常所称为“框架区”或“FR”。因此,术语“FR”是指在免疫球蛋白的高变区之间或邻近于高变区,自然发现的氨基酸序列。在抗体分子中,轻链的三个高变区和重链的三个高变区在三维空间中彼此相对放置,形成抗原结合表面。所述抗原结合表面与被结合抗原的三维表面互补,重链和轻链中每一个链的三个高变区均被称为“互补性决定区”或“CDR”。

[0236] 结合剂可以是,例如,带有或不带有肽组分的核糖体、RNA分子或多肽。在优选的实施方案中,结合剂是抗体或其抗原结合片段。抗体可以由本领域内普通技术人员已知的各种技术中任何一种制备。参见,例如,Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (抗体实验手册), Cold Spring Harbor Laboratory (冷泉港实验室), 1988。感兴趣多肽的特异性单克隆抗体可以,例如使用Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol. 6:511-519, 1976的技术及其改进技术而制备。本发明多肽可以用于纯化过程,例如亲和层析步骤中的纯化过程。

[0237] 优选地,可以经蛋白水解切割IgM产生“FV”片段,在个别情况下,蛋白水解切割IgG或IgA免疫球蛋白分子。然而,更常见的是,使用本领域内已知的重组技术衍生Fv片段。Fv片段包括非共价 $V_H:V_L$ 异源二聚体,所述异源二聚体包括抗原结合位点,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。Inbar et al., (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69:2659-2662; Hochman et al., (1976) Biochem 15:2706-2710; 以及Ehrlich et al., (1980) Biochem 19:4091-4096。

[0238] 单链Fv (sFv) 多肽是共价连接的 $V_H:V_L$ 异源二聚体,所述异源二聚体表达自包括经肽编码连接体连接的 V_H -和 V_L -编码基因在内的基因融合物。Huston et al., (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85 (16):5879-5883。已经介绍了识别将自然聚集但化学分离的多肽轻链和重链从抗体V区转化到sFV分子中的化学结构的多种方法,所述sFV分子会折叠成与抗原结合位点结构基本上类似的三维结构。参见,例如,Huston等人的美国专利5091513

号和5132405号;及Ladner等人的美国专利4946778号。

[0239] 每一上述分子均包括重链CDR组和轻链CDR组,分别位于重链FR组和轻链FR组之间,所述重链FR组和轻链FR组为CDR提供支撑,并限制CDR相对于彼此的空间关系。如本文所用,术语“CDR组”是指重链或轻链V区的三个高变区。从重链或轻链的N-末端开始,分别将这些区域表示为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。因此,抗原结合位点包括6个CDR,包含来自每个重链和轻链V区的CDR组。包含单个CDR(如CDR1、CDR2或CDR3)的多肽在本文中被称为“分子识别单元”。多种抗原抗体复合物的结晶学分析表明,CDR的氨基酸残基与被结合抗原形成广泛接触,其中与重链CDR3的接触最广泛。因此,分子识别单元主要负责抗原结合位点的特异性。

[0240] 如本文所用,术语“FR组”是指将重链或轻链V区的CDR组的CDR框起来的四个侧翼氨基酸序列。一些FR残基可以接触被结合的抗原;但是,FR主要负责将V区折叠成抗原结合位点,特别是与CDR直接相邻的FR残基。在FR中,某些氨基酸残基和某些结构特征是非常高度保守的。在这方面,所有的V区序列均含有约90个氨基酸残基的内部二硫环。当V区折叠成结合位点时,CDR被显示为形成抗原结合表面的突出的环状基序。普遍认为,无论CDR氨基酸序列是否精确,存在FR的保守结构区,其影响CDR环折叠成某些“经典”结构的形状。此外,已知某些FR残基参加非共价键的结构域间接触,所述结构域间接触稳定抗体重链和轻链的相互作用。

[0241] 已经描述了许多包含源自非人类免疫球蛋白的抗原结合位点的“人源化”抗体分子,包括具有啮齿类动物V区的嵌合抗体及其相关的融合到人类恒定结构域的CDR(Winter et al., (1991) Nature 349:293-299;Lobuglio et al., (1989) Proc.Nat.Acad.Sci.USA 86:4220-4224;Shaw et al., (1987) J Immunol.138:4534-4538;和Brown et al., (1987) Cancer Res.47:3577-3583),在与适当的人类抗体恒定结构域融合前移植到人类支撑FR(human supporting FR)中的啮齿类动物CDR(Riechmann et al., (1988) Nature 332:323-327;Verhoeyen et al., (1988) Science 239:1534-1536;和Jones et al., (1986) Nature 321:522-525),以及由重组表面修饰的啮齿类动物FR(recombinantly veneered rodent FR)支撑的啮齿类动物CDR(欧洲专利公开号519596,1992年12月23日公开)。将这些“人源化”分子设计为最大限度地减少针对啮齿类动物抗人抗体分子的不必要的免疫反应,所述抗体限制了人类受体中的那些部分治疗应用的持续时间和效力。

[0242] 如上所述,“肽”作为结合剂包括在内。术语“肽”通常是指氨基酸残基的聚合物及其变异体和其合成类似物。在某些实施方案中,术语“肽”是指相对短的多肽,包括由约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个氨基酸组成的肽,包括其间的所有整数和范围(如5-10、8-12、10-15),且与HRS多肽或/和其细胞结合伴侣或两者相互作用。如本文所述,肽可以由天然存在的氨基酸和/或非天然存在的氨基酸组成。

[0243] 结合剂可以包括肽模拟物或其他小分子。“小分子”是指合成的或生物起源(生物分子)的有机化合物,但通常不是聚合物。有机化合物是指分子中含有碳的一大类化合物,通常不包括那些只含碳酸盐、简单的碳氧化物或氰化物的化合物。“生物大分子”一般是指有生命的生物体产生的有机分子,包括大的聚合物分子(生物聚合物),如肽、多糖和核酸,以及小分子,如主要次级代谢产物、脂质、磷脂、糖脂、固醇、甘油酯、维生素和激素。“聚合

物”一般是指由重复结构单元组成的大分子或巨大分子,所述重复结构单元通常由共价化学键连接。

[0244] 在某些实施方案中,小分子的分子量小于1000道尔顿,通常为约300-700道尔顿,包括约50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900或1000道尔顿。

[0245] 适体也作为结合剂包括在内。适体的实例包括核酸适体(例如DNA适体、RNA适体)和肽适体。核酸适体一般是指通过反复的体外筛选或等效方法如SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment(指数富集的配体系统进化))而改造,以与各种分子靶标如小分子、蛋白质、核酸甚至细胞、组织和生物体结合的核酸种类。因此,包括与本文所述HRS多肽和/或其细胞结合伴侣结合的核酸适体。

[0246] 肽适体通常包括连接到蛋白支架两端的可变肽环,双结构限制通常使所述肽适体的亲合力增加到与抗体的亲合力可比较的水平(例如在纳摩尔范围)。在某些实施方案中,可变环的长度可以为约10-20个氨基酸(包括两者之间的所有整数),支架可以包括具有良好的溶解性和压实性(compactness)的任何蛋白质。某些示例性实施方案可以利用细菌蛋白质的硫氧还蛋白A(Thioredoxin-A)作为支架蛋白,可变环插入还原活性位点(野生型蛋白质中的-Cys-Gly-Pro-Cys-环),两个半胱氨酸侧链能够形成一个二硫键。因此,包括与本文所述HRS多肽和/或其细胞结合伴侣结合的肽适体。可以使用本领域内已知的不同系统进行肽适体选择,包括酵母双杂交系统。

[0247] 如上所述,本发明的HRS多肽和结合剂可用于本文所述的任何诊断方法、药物开发方法或治疗方法中。

[0248] 在本发明另一个实施方案中,本发明结合剂如单克隆抗体可以与一个或多个感兴趣的试剂偶联。例如,治疗剂可以与适当的单克隆抗体直接或间接(如通过连接体基团)偶联(如共价键结合)。当试剂和抗体均具有能够与另一方反应的取代基时,它们之间可以直接反应。例如,一方上面的亲核基团,如氨基或巯基,能够与含羰基的基团如酸酐或酸性卤化物反应,或与另一方上面含良好离去基团如卤化物的烷基反应。

[0249] 可选地,可能期望通过连接体基团偶联治疗剂和抗体。连接体基团可以起到使抗体与试剂分离的间隔物作用,以避免干扰结合能力。连接体基团也可以用来增加试剂或抗体上取代基的化学反应性,从而增加偶联效率。化学反应性的增加也可以促进试剂或试剂上官能团的使用,否则将是不可能的。

[0250] 对本领域内技术人员显而易见的是,多种双功能或多功能试剂,无论功能相同或功能不同(例如在Pierce Chemical Co. (Rockford, IL) 目录中所描述的),均可以作为连接体基团。偶联可以通过例如氨基、羧基、巯基或氧化的碳水化合物残基实现。许多参考文献描述了这种方法,例如,Rodwell等人的美国专利号4671958。

[0251] 在治疗剂不含本发明免疫缀合物(immunokonjugate)的抗体部分时更加有效的情况下,可以期望使用在内化到细胞的过程中或紧接其后可切割的连接体基团。已经描述了许多不同的可切割的连接体基团。从这些连接体基团细胞内释放试剂的机理包括通过还原二硫键而切割(例如,Spitler的美国专利号4489710),通过照射光敏键(photolabile bond)而切割(例如,Senter等人的美国专利号4625014),通过水解衍生氨基酸侧链而切割(例如Kohn等人的美国专利号4638045),通过血清补体介导的水解而切割(例如Rodwell等

人的美国专利号4671958), 以及通过酸催化水解而切割(例如Blattler等人的美国专利号4569789)。

[0252] 可期望在抗体上偶联一个以上的试剂。在一个实施方案中, 一个抗体分子上偶联了试剂的多个分子。在另一个实施方案中, 一个抗体上可以偶联一个以上类型的试剂。无论具体的实施方案如何, 具有一个以上试剂的免疫缀合物可以不同方式制备。例如, 一个以上的试剂可以直接偶联到抗体分子上, 或者可以使用提供多个附着位点的连接体。

[0253] 配制和给药

[0254] 本发明的组合物(例如HRS剪接变异体多肽、多核苷酸、结合剂、抗体等)通常制成药学上可接受的或者生理上可接受的溶液, 供单独或者与一种或更多种其他治疗形式联合给予细胞、组织或动物。还应理解, 如果需要, 本发明的组合物可与其他试剂, 例如其他蛋白质或多肽或各种药学活性试剂联合给药。只要另外的试剂对使用本发明的HRS组合物所期望达到的效果没有不利影响, 则对所述组合物中所包括的其他组分实质上没有限制。

[0255] 本发明的药物组合物中, 在许多治疗用药法中, 包括例如口服、胃肠外、静脉内、鼻内、颅内和肌肉内给药和配制, 药学上可接受的赋形剂和载体溶液的配制是本领域的技术人员熟知的, 正如开发供使用本文所描述的具体组合物的合适的剂量给药方法和治疗方法一样。

[0256] 在某些应用中, 本文公开的药物组合物可通过口服给药递送给患者。这样, 这些组合物可与惰性稀释剂或可同化的食用载体一起配制, 或者可以将它们封装在硬胶囊或软胶囊中, 或者可以将它们压成片剂, 或者可以将它们直接混入食品中。

[0257] 例如, 如美国专利号5,543,158、美国专利号5,641,515和美国专利号5,399,363(将每个所述专利的全部内容特地在此通过援引并入)所述, 在某些情况下, 希望通过胃肠外、静脉内、肌肉内或甚至腹膜内递送本文公开的药物组合物。活性化合物溶液作为游离碱或药学上可接受的盐, 可以在适合与表面活性剂如羟丙基纤维素混合的水中制备。分散体也可在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和油中制备。在普通的储存和使用条件下, 这些制剂含有防止微生物生长的防腐剂。

[0258] 适合注射用的药物形式包括无菌水溶液或分散体以及用于无菌注射液或分散体临时制备的无菌粉末(美国专利号5,466,468, 特地将所述专利的全部内容通过援引并入本文)。在所有情况下, 所述形式应为无菌的且为在某种程度上存在易注射性的流体。这种形式在制造和储存条件下应当是稳定的, 保存时需防止微生物例如细菌和真菌的污染作用。载体可以是包括例如水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物和/或植物油的溶剂或分散介质。例如, 通过使用包衣如卵磷脂、通过在分散体的情况下保持需要的粒径以及通过使用表面活性剂, 可保持适当的流动性。各种抗菌剂和抗真菌剂, 例如对羟基本甲酸酯(paraben)、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等可促进预防微生物作用。在许多情况下, 优选包括等渗剂, 例如糖或氯化钠。通过在组合物中使用吸收延迟剂, 例如单硬脂酸铝和明胶, 可延长注射用组合物的吸收。

[0259] 对于水溶液的胃肠外给药, 例如, 必要时溶液应得以适当缓冲, 且首先用足够的盐水或葡萄糖使得所述液体稀释剂等渗。这些具体的水溶液尤其适合静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内给药。就此而言, 根据本申请的公开内容, 可使用的无菌含水介质是本领域的技术人员熟知的。例如, 可将一剂量溶于1ml等渗氯化钠溶液中, 或添加到1000ml皮下输液中或注

射到输注建议点(如,参见Remington's Pharmaceutical Sciences (雷明顿药物科学), 15th Edition (第15版), pp.1035-1038 and 1570-1580)。依接受治疗的患者状况而定,必然存在一些剂量的变化。无论如何,负责给药者将为患者个人决定适当剂量。此外,对于给予人,制剂应该满足生物制品标准的FDA办公室要求的无菌化、致热源性和一般的安全和纯度标准。

[0260] 按照要求,在适当溶剂中混合需要量的活性化合物和以上列举的各种其他成分,随后过滤灭菌,制备无菌注射液。通常,将各种灭菌的活性成分混合入无菌载体中制备分散体,所述无菌载体含有基本分散介质和源自以上列举的成分中的其他所需成分。在无菌粉末用于制备无菌注射液时,优选的制备方法为真空干燥和冷冻干燥技术,所述技术从原无菌过滤的溶液制备活性成分与任何期望的另外组分的粉末。

[0261] 本文公开的组合物可制成中性或盐形式。药学上可接受的盐,包括酸加成盐(用蛋白质的游离氨基形成)以及用无机酸例如盐酸或磷酸,或者醋酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等有机酸形成的盐。用游离羧基形成的盐也可源于无机碱,例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,以及有机碱,如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。配制后,溶液即以剂量制剂和治疗有效量相容的方式给药。所述制剂容易以多种剂型,例如注射液、释药胶囊等给药。

[0262] 本文所用的“载体”包括任何以及所有溶剂、分散介质、载体(vehicle)、包衣、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮液、胶体等。药学活性物质的此类介质和试剂的使用是本领域公知的。除了与活性成分不相容的范围内的任何常规介质或试剂,常规介质或试剂均可考虑用于所述治疗组合物中。补充性活性组分也能混入组合物中。

[0263] 短语“药学上可接受的”指当给予人或其他动物时,不产生过敏或类似不良反应的分子实体和组合物。本领域充分了解含有作为活性成分的蛋白质的含水组合物的制备。通常,所述组合物可制成注射用制剂(液体溶液或悬浮液);也能制备注射前适合溶解或悬浮在液体中的固体形式。所述制剂也能被乳化。

[0264] 在某些实施方案中,药物组合物可通过鼻内喷雾、吸入和/或其他气雾剂递送载体递送。例如,美国专利号5,756,353和美国专利号5,804,212(特地将每个专利申请通过引用全文并入本文)描述了通过鼻气雾剂喷雾将基因、多核苷酸和肽组合物直接递送至肺。同样,使用鼻内微粒树脂(Takenaga et al.,1998)和溶血磷脂酰甘油化合物(美国专利号5,725,871,特地将所述专利的全部内容通过引用并入本文)递送药物,也是药物领域公知的。同样,美国专利号5,780,045(特地将该专利申请的全部内容通过引用并入本文)描述了以聚四氟乙烯支持基体形式的经粘膜药物递送。

[0265] 在某些实施方案中,为了将本发明的组合物导入合适的宿主细胞,可使用脂质体、纳米胶囊、微粒、微球、脂质颗粒、囊泡(vesicle)等递送。具体而言,本发明的组合物可配制封装在脂质颗粒、脂质体、囊泡、纳米球、纳米粒子等中,用于递送。使用已知的常规技术能进行此类递送载体的配制和使用。

[0266] 包含本发明组合物的试剂盒

[0267] 在其他方面,本发明提供了包含一个或更多个容器的试剂盒,所述容器装有一种或更多种本文所述的本发明的HRS剪接变异体多肽、多核苷酸、抗体及其组合物等。所述试剂盒可以包括如何使用所述组合物的书面说明(例如,用于调节细胞信号传导、血管生成、

癌症、炎性疾病等)。

[0268] 本文的试剂盒也可包括一种或更多种其他治疗剂或其他对于所治疗的适应症合适的或期望的组分。如果需要,另外的治疗剂可容纳在第二容器中。另外的治疗剂的实例包括,但不限于,抗肿瘤剂、消炎剂、抗细菌剂、抗病毒剂、血管生成剂等。

[0269] 本文的试剂盒也可包括一个或更多个注射器或其他促进预期的递送模式必需的或期望的组分(例如支架、可植入贮库(implantable depot)等)。

[0270] 使用的方法

[0271] 本发明的实施方案还包括使用本文所述的用于诊断、药物开发和/或治疗目的的HRS组合物或“试剂”的方法。术语HRS“试剂”通常指本文所述的HRS多核苷酸、HRS多肽、结合剂和其他化合物。对于诊断目的,所述HRS试剂能以各种非限定方式使用,如用以区分不同的细胞类型或不同的细胞状态,或者鉴定具有相关疾病或状况的个体。对于药物开发目的,HRS试剂可用于鉴定HRS多肽的一种或更多种细胞“结合伴侣”,表征HRS多肽的一种或更多种“非经典”活性,鉴定选择性或非选择性地促进或拮抗HRS多肽与其结合伴侣相互作用的试剂,和/或鉴定选择性或非选择性地促进或拮抗HRS多肽的一种或更多种“非经典”活性的试剂。对于治疗目的,本文所提供的HRS试剂或组合物可用于治疗下面详述的多种疾病或状况。

[0272] A. 诊断学

[0273] 如上所述,本文所述HRS试剂可用于诊断分析。这些实施方案包括检测一种或更多种新鉴定的HRS剪接变异体的HRS多核苷酸序列或其相应多肽序列或其部分,和/或这些剪接变异体的一个或更多个剪接点。在某些实施方案中,至少一个剪接点的多核苷酸或相应多肽序列是该具体的HRS剪接变异体特有的。在某些实施方案中,一种或更多种新近鉴定的HRS剪接变异体的存在或水平与一种或更多种细胞类型或细胞状态伴随或相关,所述HRS剪接变异体的典型特征在于其剪接点的多核苷酸或相应多肽序列。因此,如上所述,HRS剪接变异体或其剪接点的存在或水平可用于区分不同的细胞类型或不同的细胞状态。根据基于多核苷酸和/或多肽的诊断技术,可以检测HRS剪接变异体或其剪接点的存在或水平。

[0274] 本文提供的某些方法依赖于HRS剪接变异体的差异表达,以表征细胞、组织或个体的状况或状态,并将其区别于其他细胞、组织或个体。非限定性的实例包括检测生物样品中HRS剪接变异体或其剪接点的存在或水平,以区分不同种类的细胞或组织、不同组织或器官的细胞、发育状态如新生状态和成体状态、细胞分化状态、状况如健康、患病或已治疗状况、以及胞内和胞外部分(fraction),除原代细胞培养和其他细胞培养例如永生细胞培养之外。

[0275] 差异表达通常指与适当对照中相同序列的表达水平相比,HRS多核苷酸或多肽序列的一个或更多个基因表达水平的统计学上显著的差异。统计学上显著的差异可以涉及通过RNA水平、蛋白质水平、蛋白质功能或本文所述的基因表达的任何其他相关测量措施所测量的表达水平的增加或减少。

[0276] 如果结果不太可能是偶然发生的,则通常将该结果视为在统计学上显著的。测试或结果的显著性水平传统上涉及到频率学派统计假设测试概念。在简单情况下,统计显著性可定义为当原假设实际上是真的时候,作出拒绝原假设的决定(称作第一类错误(Type I error)或“假阳性判定”(false positive determination))的概率。常常使用p值作出该决

定:如果p值小于显著性水平,则拒绝原假设。p值越小,结果的显著性越大。也可以使用贝叶斯因子(Bayes factor)确定统计显著性(例如,参见Goodman S.,Ann Intern Med 130:1005-13,1999)。

[0277] 在更加复杂但实际上重要的情况下,测试或结果的显著性水平可以反映分析,在所述分析中,当原假设实际上是真的时候,作出拒绝原假设的决定的概率不大于所述概率。此类分析允许决定拒绝的概率可以比原假设所包括的某些假定的显著性水平小得多的那些应用。

[0278] 在某些示例性实施方案中,统计学上显著的差异表达可以包括这些情形,在所述情形下,在疑似生物样品中,与适当对照相比,给定的HRS序列的表达水平提供了至少约1.2X、1.3X、1.4X、1.5X、1.6X、1.7X、1.8X、1.9X、2.0X、2.2X、2.4X、2.6X、2.8X、3.0X、4.0X、5.0X、6.0X、7.0X、8.0X、9.0X、10.0X、15.0X、20.0X、50.0X、100.0X或更大的表达差异(即可能更高或更低的差异表达),包括中间的所有整数和小数点(例如1.24X、1.25X、2.1X、2.5X、60.0X、75.0X等)。在某些实施方案中,统计学上显著的差异表达可以包括这些情形,在所述情形下,在疑似生物样品中,与适当对照相比,给定的HRS序列的表达水平提供了至少约4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%或者更大的表达差异(即可能更高或更低的差异表达),包括中间的所有整数和小数点。

[0279] 作为另一个实例中,通过实施本申请描述的并且本领域已知的Z检验(Z-testing),即计算绝对Z值(Z score),也可以确定差异表达(参见实施例1)。通常,Z检验用于鉴定样品平均值和总体平均值之间的显著性差异。例如,在95%置信区间(即5%显著性水平)下,与标准正态表(如对照组织)相比,绝对值大于1.96的Z值表明非随机性。对于99%置信区间,如果Z绝对值大于2.58,表示p小于0.01,差异甚至更加显著—能够在更大的置信度下拒绝原假设。在这些以及相关的实施方案中,包括中间的所有小数点(例如10.1、10.6、11.2等)在内的1.96、2、2.58、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或者更大的绝对Z值可提供统计显著性的有力度量。在某些实施方案中,大于6的绝对Z值可提供格外高的统计显著性。

[0280] 实质相似性通常涉及生物样品和参考对照之间缺乏表达水平的统计学显著性差异。实质相似表达水平的实例可以包括这些情况,其中,在疑似生物样品中,与参考样品相比,给定的SSCIGS的表达水平提供了于约0.05X、0.1X、0.2X、0.3X、0.4X、0.5X、0.6X、0.7X、0.8X、0.9X、1.0X、1.1X、1.2X、1.3X或1.4X的表达差异(即可能更高或更低的差异表达),包括中间的所有小数点(例如0.15X、0.25X、0.35X等)。在某些实施方案中,差异表达可以包括这些情况,其中,在疑似生物样品中,与参考样品相比,给定的HRS序列的表达水平提供了低于约0.25%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、30%、40%和50%的表达差异(也就是可能更高或更低的差异表达),包括中间的所有小数点。

[0281] 在某些实施方案中,例如当利用Affymetrix Microarray测量HRS多核苷酸或多肽序列的表达水平时,通过Affymetrix Microarray Suite 5软件(Affymetrix,Santa Clara,CA)或其他类似软件归纳的平均表达值,也可以确定差异表达,通常标度平均表达值

(scaled mean expression value)为1000。

[0282] 本发明的实施方案包括检测HRS多核苷酸或多肽参考序列或其部分的存在或水平,以区分不同生物体或物种的细胞、组织或其他生物样品的方法,其中所述序列的存在或水平与所选的生物体或物种有关。一般实例包括区分人与细菌、真菌、植物和其他非人动物的任何组合的方法。对于动物,包括区分人与脊椎动物和无脊椎动物的任何组合的方法,包括脊椎动物如鱼、两栖动物、爬行动物、鸟类和非人哺乳动物,以及无脊椎动物如昆虫、软体动物、甲壳动物和珊瑚。对于非人哺乳动物,包括区分人和非人哺乳动物的任何组合的方法,所述非人哺乳动物源自非洲猬目(Afrosoricida)、象鼯目(Macroscelidea)、管齿目(Tubulidentata)、蹄兔目(Hyracoidea)、长鼻目(Proboscidea)、海牛目(Sirenia)、有带下目(Cingulata)、披毛目(Pilosa)、攀缘目(Scandentia)、皮翼目(Dermoptera)、灵长目(Primates)、啮齿目(Rodentia)、兔形目(Lagomorpha)、猬形目(Erinaceomorpha)、鼯形目(Soricomorpha)、翼手目(Chiroptera)、鳞甲目(Pholidota)、鲸目(Cetacea)、食肉目(Carnivora)、奇蹄目(Perissodactyla)或偶蹄目(Artiodactyla)。灵长目所包括的除了本领域已知的其他动物外,还有猴子、猿类、大猩猩和黑猩猩。因此,本文所述HRS多核苷酸或多肽参考序列或变异体的存在或水平可用于通过区分这些生物体的任一组合,或区分人与这些生物体中的一种或更多种,例如生物体组,鉴定给定的生物样品例如细胞、组织或器官的来源。在某些具体实施方案中,也可通过比较HRS序列或其部分的存在或水平和预定值确定给定的生物样品的来源。

[0283] 本发明的实施方案包括检测HRS多核苷酸或多肽参考序列或其部分,以区分源于不同组织或器官的细胞或其他生物样品的方法。非限定的实例包括区分细胞或其他生物样品的方法,所述细胞或其他生物样品源于以下的任意组合:皮肤(例如真皮、表皮、皮下层)、毛囊、神经系统(例如脑、脊髓、周围神经)、听觉系统或平衡器官(例如内耳、中耳、外耳)、呼吸系统(例如鼻子、气管、肺)、胃食管组织、胃肠系统(例如口、食管、胃、小肠、大肠、直肠)、血管系统(例如心、血管和动脉)、肝脏、胆囊、淋巴/免疫系统(例如淋巴结、淋巴滤泡、脾、胸腺、骨髓)、泌尿生殖系统(例如肾、输尿管、膀胱、尿道、宫颈、输卵管、卵巢、子宫、阴门、前列腺、尿道球腺、附睾(epididymis)、前列腺、精囊、睾丸)、肌肉骨骼系统(例如骨骼肌、平滑肌、骨、软骨、腱、韧带)、脂肪组织、乳房和内分泌系统(例如下丘脑、脑垂体、甲状腺、胰脏、肾上腺)。因此,基于和本文所述HRS多核苷酸或多肽序列的关联,这些方法可用于鉴定或表征组织或器官,细胞或其他生物样品源于所述组织或器官。

[0284] 本发明的实施方案包括检测HRS多核苷酸或多肽参考序列或其部分的存在或水平,以区分或表征细胞的发育状态或分化状态的方法。也包括区分生殖细胞、干细胞和体细胞的方法。发育状态的实例包括新生细胞和成体细胞。细胞分化状态的实例包括全能细胞、多能细胞、多能祖干细胞和成熟的完全分化细胞之间的所有离散且可识别的阶段。

[0285] 虽然在某些情况下细胞能够去分化并恢复全能性,但是全能细胞具有完全的潜能,通常在有性和无性生殖中出现,并包括孢子和合子。多能细胞包括干细胞,所述干细胞具有分化成三个胚层中的任一个的潜能,所述胚层包括内胚层(内胃粘膜、胃肠道、肺)、中胚层(肌肉、骨头、血液、泌尿生殖器)和外胚层(表皮组织和神经系统)。通常,多能祖细胞能分化成数量有限的组织类型。多能细胞的实例包括,但不限于来自骨髓并产生免疫细胞如红血细胞、白血细胞和血小板的造血干细胞(成体干细胞)、来自骨髓并产生间质细胞、脂肪

细胞和各种类型骨细胞的间质干细胞(成体干细胞)、产生各种类型皮肤细胞的上皮干细胞(祖细胞),以及有助于分化的肌肉组织的肌卫星细胞(祖细胞)。因此,与对照或预定水平相比,具体HRS多核苷酸或多肽序列(例如HRS剪接变异体的剪接点)的存在或水平可用于区分或表征上述细胞的分化状态。

[0286] 本发明的实施方案包括检测HRS多核苷酸或多肽参考序列的存在或水平,以表征或诊断细胞、组织、器官或个体的状况的方法,其中所述状况表征为健康的、患病的、有患病风险或已治疗的。对于这类诊断目的,术语“诊断的(diagnostic)”或“已诊断的(diagnosed)”包括鉴定病理状况的存在或本质,表征发展这一状况的风险和/或测量响应治疗的病理状况的变化(或无变化)。诊断方法的灵敏度和特异性可以不同。在某些实施方案中,诊断试验的“灵敏度”指检测为阳性的患病细胞、组织或个体的百分比(“真阳性”百分比)。通常,未用所述试验检测到的患病细胞、组织或个体称为“假阴性”。未患病并且试验中检测为阴性的细胞、组织或个体可称作“真阴性”。在某些实施方案中,诊断试验的“特异性”可定义为(1)减假阳性率,其中“假阳性”率定义为没有疾病并且检测为阳性的样品或个体的比例。尽管具体诊断方法或许不能提供明确的状况诊断,但所述方法提供了有助于诊断的积极指示(positive indication)即可。

[0287] 在某些情况下,将一个或多个与状况相关的所选的HRS多核苷酸或多肽参考序列或其部分的存在或水平与合适的对照比较,不论水平升高或降低,都可以诊断病理状况存在或发展的风险。“合适的对照”或“适当的对照”包括组织或生物体的细胞或其它生物样品中,例如表现出正常特性例如状况缺乏的对照或正常细胞、组织或生物体中,所确定的值、水平、特征、特性或性能。在某些实施方案中,“合适的对照”或“适当的对照”为预定值、水平、特征、特性或性能。其它合适的对照是本领域的技术人员显而易见的。在本文的其他地方也描述了疾病和状况的实例。

[0288] 本发明的实施方案包括基于HRS多核苷酸或核酸的检测技术,由于检测的灵敏度,所述检测技术具有某些优点。因此,某些实施方案涉及作为诊断方法或试验的一部分的HRS多核苷酸的用途或检测。利用本领域中已知的任何方法可以测量HRS多核苷酸的存在和/或水平,包括杂交试验,例如Northern印迹、定量或定性聚合酶链式反应(PCR)、定量或定性逆转录PCR(RT-PCR)、微阵列、斑点印迹或狭缝印迹或者原位杂交如荧光原位杂交(FISH),以及其他方法。下面更详细地描述了某些所述方法。

[0289] 使用本领域中已知的技术,例如Kingston.(2002Current Protocols in Molecular Biology(现代分子生物学实验技术),Greene Publ.Assoc.Inc.&John Wiley& Sons,Inc.,NY,NY)(例如,参见Nelson et al.,Proc Natl Acad Sci U S A,99:11890-11895,2002所述)以及在别处描述的技术,可以从血液、生物流体、组织、器官、细胞系或其他相关样品中收集和/或产生HRS多核苷酸,例如DNA和RNA。

[0290] 使用本领域中已知的技术,例如Ausubel et al.,(2001Current Protocols in Molecular Biology(现代分子生物学实验技术),Greene Publ.Assoc.Inc.&John Wiley& Sons,Inc.,NY,NY)、Sambrook et al.,(Molecular Cloning(分子克隆)1989,Second Ed.,Cold Spring Harbor Laboratory,Plainview,NY)、Maniatis et al.,(Molecular Cloning(分子克隆)1982,Cold Spring Harbor Laboratory,Plainview,NY)以及在别处描述的技术,能够产生互补DNA(cDNA)文库。

[0291] 某些实施方案可使用杂交方法检测HRS多核苷酸序列。本领域中,已经很好地开发了实施多核苷酸杂交试验的方法。杂交试验程序和条件因应用不同而变化,并依照已知的一般结合方法选择,所述一般结合方法包括下述提到的方法:Maniatis et al.Molecular Cloning:A Laboratory Manual (分子克隆实验指南) (2nd Ed.Cold Spring Harbor,N.Y., 1989)、Berger and Kimmel Methods in Enzymology (酶学方法),Vol.152,Guide to Molecular Cloning Techniques (分子克隆技术指南) (Academic Press,Inc.,San Diego, Calif.,1987) 以及Young and Davism P.N.A.S,80:1194 (1983)。美国专利号5,871,928、5,874,219、6,045,996、6,386,749和6,391,623 (将所述各专利通过援引并入本文) 描述了实施反复的受控杂交反应的方法和装置。

[0292] 某些实施方案可以使用核酸扩增方法检测HRS多核苷酸序列。术语“扩增”或“核酸扩增”指产生含有预期特定靶核酸序列的至少一部分的靶核酸的多个拷贝。所述多个拷贝可称为扩增子或扩增产物。在某些实施方案中,扩增的靶标含有小于完全靶基因序列的序列(内含子和外显子)或表达的靶基因序列(外显子和侧翼非翻译序列的剪接转录本)。例如,使用扩增引物扩增靶多核苷酸的一部分,可以产生特异性扩增子,所述扩增引物与所述靶多核苷酸的内部位置杂交并从该位置启动聚合。优选地,扩增的部分含有可用多种公知方法中的任意方法检测的可检测靶序列。

[0293] 本文所用的“选择性扩增”或“特异性扩增”指根据本发明扩增靶核酸序列,其中靶序列的可检测扩增实质上限于扩增感兴趣的核酸样品所贡献的靶序列,所述核酸样品受到检测,并且不是由一些其他样品源所贡献的靶核酸序列所贡献的,例如在扩增反应使用的试剂中或实施扩增反应的环境中存在的污染。

[0294] “扩增条件”意味着,根据本发明,允许核酸扩增的条件。在一些实施方案中,扩增条件可以没有本文所描述的“严格杂交条件”严格。用于本发明的扩增反应的寡核苷酸在扩增条件下与其预期靶标杂交,但是在严格杂交条件下可能或不杂交。另一方面,本发明的检测探针通常在严格杂交条件下杂交。依据采用的具体扩增方法,本领域普通技术人员能容易地确定实施根据本发明的核酸扩增的可接受条件。

[0295] 许多公知的核酸扩增方法需要热循环,以交替地使双链核酸变性以及与引物杂交;然而,其他众所周知的核酸扩增方法是等温的。聚合酶链式反应(美国专利号4,683,195、4,683,202、4,800,159和4,965,188),通常称为PCR,使用变性、引物对退火至相反链以及引物延伸的多个循环,指数型地增加靶序列的拷贝数。在称为RT-PCR的变种中,逆转录酶(RT)用于从mRNA制备互补DNA(cDNA),然后通过PCR扩增cDNA产生DNA的多个拷贝。

[0296] 如上所述,术语“PCR”指选择性扩增靶核酸种类的多个扩增循环。包括本领域中充分描述的定量PCR(qPCR)、实时PCR(real-time PCR)、逆转录PCR(RT-PCR)和定量逆转录PCR(qRT-PCR)。术语“pPCR”指定量聚合酶链式反应,术语“qRT-PCR”指定量逆转录聚合酶链式反应。qPCR和qRT-PCR可用于扩增并同时定量靶cDNA分子。其能在cDNA池中检测和定量特定序列,例如所选的HRS基因或转录本。

[0297] 术语“实时PCR”可使用DNA结合染料结合PCR中的所有双链DNA(dsDNA),从而产生染料的荧光。因此,PCR过程中DNA产物的增加导致荧光强度的增加,而且每个循环中测量DNA产物的增加,从而允许定量DNA浓度。然而,dsDNA染料例如SYBR Green会与所有dsDNA PCR产物结合。在实时PCR热循环仪中检测和测量荧光,而且对应于产物指数型增长的荧光

的几何学增长用于确定每个反应中阈值循环(“Ct”)。

[0298] 术语“Ct值”指阈值循环数,所述阈值循环数为PCR扩增超过阈值水平的循环。如果样品中有更多数量的用于特定基因的mRNA,则由于有更多的起始RNA扩增,其会比低表达的基因更早越过该阈值。因此,低Ct值表示样品中高基因表达,而高Ct值表示低基因表达。

[0299] 某些实施方案可使用连接酶链式反应(Weiss,R.1991,Science 254:1292),通常称为LCR,所述LCR使用两组与靶核酸的邻近区杂交的互补DNA寡核苷酸。在热变性、杂交和连接的重复循环中,DNA寡核苷酸和DNA连接酶共价结合,产生可检测的双链连接的寡核苷酸产物。

[0300] 在某些实施方案中,可使用其他技术评价源自特定cDNA文库转录本的RNA转录本,包括微阵列分析(Han,M.et al.,Nat Biotechnol,19:631-635,2001;Bao,P.et al.,Anal Chem,74:1792-1797,2002;Schena et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:10614-19,1996和Heller et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:2150-55,1997)以及SAGE(基因表达系列分析)。虽然数量级少于源自诸如MPSS的技术的数量级,但是像MPSS一样,SAGE是数字化的,并能产生大量标识序列(例如,参见Velculescu,V.E.et al.,Trends Genet,16:423-425.,2000;Tuteja R.and Tuteja N.Bioessays.2004Aug;26(8):916-22)。

[0301] 在某些实施方案中,术语“微阵列”包括含有许多基质结合核酸的“核酸微阵列”,其与可单独检测的每个所述多个结合核酸杂交。所述基质可以是固体或多孔的、平面或非平面的、一元的或分布的。核酸微阵列包括所有在Schena(ed),DNA Microarrays:A Practical Approach(DNA微阵列实用方法)(Practical Approach Series)、Nature Genet.21(1)(suppl.):1-60(1999)和Schena(ed),Microarray Biochip:Tools and Technology(微阵列生物芯片工具和技术),Eaton Publishing Company/BioTechniques Books Division(2000)中称为DNA微阵列的装置。核酸微阵列可以包括许多基质结合核酸,其中所述许多核酸放置在许多珠子上,而不是放置在一元平面基质上,例如Brenner et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97(4):1665-1670(2000)所述。核酸微阵列的实例可见于美国专利号6,391,623、6,383,754、6,383,749、6,380,377、6,379,897、6,376,191、6,372,431、6,351,712、6,344,316、6,316,193、6,312,906、6,309,828、6,309,824、6,306,643、6,300,063、6,287,850、6,284,497、6,284,465、6,280,954、6,262,216、6,251,601、6,245,518、6,263,287、6,251,601、6,238,866、6,228,575、6,214,587、6,203,989、6,171,797、6,103,474、6,083,726、6,054,274、6,040,138、6,083,726、6,004,755、6,001,309、5,958,342、5,952,180、5,936,731、5,843,655、5,814,454、5,837,196、5,436,327、5,412,087和5,405,783中,上述专利公开内容通过引用并入。

[0302] 另外的实例包括市场上可买到的Affymetrix(Santa Clara,Calif.)的商标名为GeneChip™的核酸阵列。例如,美国专利号7,028,629、7,011,949、7,011,945、6,936,419、6,927,032、6,924,103、6,921,642和6,818,394提供了制造和使用阵列的其他示例性方法。

[0303] 涉及阵列和微阵列的本发明也涵盖了连接于固体基质的聚合物的许多用途。所这些用途包括基因表达监控、作图(profiling)、文库筛选、基因分型和诊断学。美国专利号5,800,992、6,013,449、6,020,135、6,033,860、6,040,138、6,177,248和6,309,822显示了基因表达监控和作图方法和对基因表达监测和作图有用的方法。美国序列号10/442,021和10/013,598(美国专利申请号2003/0036069)和美国专利号5,925,525、6,268,141、5,856,

092、6,267,152、6,300,063、6,525,185、6,632,611、5,858,659、6,284,460、6,361,947、6,368,799、6,673,579和6,333,179显示了基因分型及其用途。美国专利号5,871,928、5,902,723、6,045,996、5,541,061和6,197,506具体说明了可与本文公开的方法联合使用的其它核酸扩增、标记和分析方法。

[0304] 对于本领域的技术人员显而易见的是,某些实施方案可以使用寡核苷酸,例如引物或探针,用于本文所述的扩增或检测。虽然寡核苷酸的设计和序列依赖于其如本文所述的功能,通常考虑若干变量。最相关的变量包括:长度、解链温度(T_m)、特异性、与系统中其他寡核苷酸的互补性、G/C含量、多嘧啶(T、C)或多嘌呤(A、G)序列段和3'-末端序列。

[0305] 因此,某些实施方案包括检测样品中靶HRS多核苷酸的方法,通常其中多核苷酸包含本文所述的参考HRS多核苷酸的序列,所述方法包括a)将样品和包含与样品中靶多核苷酸互补的序列的探针杂交,并且探针在一定条件下与所述靶多核苷酸特异性杂交,由此在所述探针和所述靶多核苷酸或其片段之间形成杂交复合物,和b)检测所述杂交复合物的存在或不存在,并且如果存在,则检测杂交复合物的量。还包括检测样品中靶HRS多核苷酸的方法,所述多核苷酸包含本文所述的参考HRS多核苷酸的序列,所述方法包括a)扩增靶核苷酸或其片段,和b)检测所述扩增的靶核苷酸或其片段的存在或不存在,并且如果存在,则检测扩增的靶核苷酸或其片段的量。

[0306] 本发明的实施方案包括多种基于HRS多肽的检测技术,包括基于抗体的检测技术。这些实施方案包括使用HRS多肽产生抗体或其他结合剂(binder),所述抗体或其他结合剂随后可用于诊断方法和组合中,以检测或定量通常来自个体的细胞或其他生物样品中的所选的HRS多肽。

[0307] 某些实施方案可使用标准方法,例如蛋白质印迹(Western blotting)和免疫沉淀、酶联免疫吸附测定(ELISA)、流式细胞术和免疫荧光测定(IFA)。通常这些公知方法使用一种或更多种本文所述的单克隆或多克隆抗体,所述抗体特异性结合本发明的所选的HRS多肽或者所述HRS多肽的独特区域,且通常不显著结合其他HRS多肽,例如全长HRS多肽。在某些实施方案中,可用新近识别的可选剪接变异体的独特剪接点或特定三维结构编码HRS多肽的独特区域。

[0308] 某些实施方案可使用“阵列”,例如“微阵列”。在某些实施方案中,“微阵列”也可指具有多个基质结合多肽或集合的“肽微阵列”或“蛋白质微阵列”,可单独检测与每个所述多个结合多肽的结合。或者,肽微阵列可具有许多结合剂,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、噬菌体展示结合剂、酵母双杂交结合剂和适体,所述结合剂能特异性检测本文所述的HRS多肽的结合。如例如Robinson et al., Nature Medicine 8(3):295-301(2002)中所述,阵列可以基于HRS多肽的自身抗体检测。肽阵列的实例可见于WO 02/31463、WO 02/25288、WO 01/94946、WO 01/88162、WO 01/68671、WO 01/57259、WO 00/61806、WO 00/54046、WO 00/47774、WO 99/40434、WO 99/39210和WO 97/42507以及美国专利号6,268,210、5,766,960和5,143,854中,各上述专利通过引用并入。

[0309] 某些实施方案可应用MS或其他基于分子量的方法诊断性地检测HRS多肽序列。质谱法(MS)通常指确定样品或分子中元素组成的分析技术。MS也可用于确定例如肽或其他化合物等分子的化学结构。

[0310] 通常,MS的原理包括电离化合物以产生带电荷分子或分子片段,然后测量其质荷

比。在说明性MS程序中,将样品装载到MS仪器中,并进行汽化,通过多种方法中的一种(例如,用电子束撞击组分)电离样品的组分,形成带正电荷的颗粒,然后通过磁场加速所述正离子,当离子穿过电磁场时,基于离子运动的细节计算颗粒的质荷比(m/z)并检测离子,在前面步骤中,根据 m/z 分选所述离子。

[0311] 说明性MS仪器具有三个模块:离子源,其将气相样品分子转化成离子(或者,在电喷射离子化情形下,将存在于溶液中的离子移到气相中);质量分析器,其根据离子质量应用电磁场分选离子;和检测器,其测量指示剂数量值,从而提供用于计算每个存在的离子的丰度的数据。

[0312] MS技术具有定性和定量用途,包括识别未知化合物,确定分子中元素的同位素组成以及通过观察化合物的碎裂确定化合物的结构。其他用途包括定量样品中化合物的量或者研究气相离子化学(真空中离子和中性粒子化学)的原理。因此,根据本文所提供的方法中的任一种,可使用MS技术测量生物样品中本发明的HRS多肽的存在或水平,并将这些水平与对照样品或预定值比较。

[0313] B. 化合物和治疗制剂的开发

[0314] 某些实施方案涉及HRS多肽或HRS多核苷酸参考序列在药物开发中的用途,通常鉴定用于调节参考HRS的一种或更多种非经典活性的试剂。例如,某些实施方案包括鉴定HRS参考多肽或者包含HRS参考序列的多肽的一种或更多种“结合伴侣”的方法,所述多肽为例如细胞蛋白质或者与HRS多肽结合并参与HRS多肽非经典活性或多种活性的其它宿主分子。还包括鉴定化合物(例如多肽)或其他试剂的方法,所述化合物或其他试剂例如通过与HRS多肽和/或其一种或更多种细胞结合伴侣相互作用,促进或拮抗HRS参考多肽或其活性变异体的非经典活性。

[0315] 因此,某些实施方案包括鉴定HRS参考多肽的结合伴侣的方法,其包括a)在合适条件下混合HRS多肽和生物样品,和b)检测HRS多肽与结合伴侣的特异性结合,从而鉴定与HRS参考多肽特异性结合的结合伴侣。还包括筛选与HRS参考多肽或HRS多肽的结合伴侣特异性结合的化合物的方法,其包括a)在合适条件下使所述多肽或所述结合伴侣与至少一种测试化合物结合,和b)检测所述多肽或结合伴侣与测试化合物的结合,从而鉴定与所述多肽或其结合伴侣特异性结合的化合物。在某些实施方案中,所述化合物是多肽或肽。在某些实施方案中,所述化合物是小分子或其他(例如非生物)化学化合物。在某些实施方案中,所述化合物是肽模拟物。

[0316] 可应用任何适于检测蛋白质-蛋白质相互作用的方法鉴定细胞蛋白质,所述细胞蛋白质与HRS参考多肽相互作用、与一种或更多种细胞结合伴侣相互作用或者与两者相互作用。可应用的常规方法的实例包括细胞裂解物或从细胞裂解物中获得的蛋白质的免疫共沉淀、交联以及通过梯度或色谱柱的共纯化,主要用于鉴定与HRS多肽相互作用的裂解物中的蛋白质。

[0317] 在这些以及相关的实施方案中,使用本领域的技术人员熟知的技术,例如通过埃德曼降解技术,确定与HRS多肽或其结合伴侣相互作用的蛋白质的氨基酸序列的至少一部分。如参见Creighton *Proteins: Structures and Molecular Principles* (蛋白结构和分子原理), W.H. Freeman & Co., N.Y., pp. 3449, 1983。得到的氨基酸序列可作为用于产生寡核苷酸混合物的引导物(guide),所述寡核苷酸混合物可用于筛选编码此类蛋白质的基因序

列。例如,通过本文所述以及本领域已知的标准杂交技术或PCR技术,可以实现筛选。产生寡核苷酸混合物和筛选的技术是公知的。参见例如Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology* (现代分子生物学实验技术), Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989和Innis et al. ed. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (PCR技术:方法和应用指南) Academic Press, Inc., New York, 1990。

[0318] 此外,方法可用于同时鉴定编码结合伴侣或其他多肽的基因。所述方法包括,例如,使用标记的HRS蛋白质或者另一多肽、肽或融合蛋白,如与标记物(例如酶、荧光素、发光蛋白或染料)或者Ig-Fc结构域融合的变异体HRS多肽或HRS结构域,以与lambda-gt11文库的抗体探测法的熟知技术类似的方式的探测表达文库。

[0319] 检测体内蛋白质相互作用的一种方法为双杂交系统。所述系统的实例已有描述(Chien et al., *PNAS USA* 88:95789582, 1991),且可购自Clontech (Palo Alto, Calif.)。在某些情况下,双杂交系统或其他此类方法可用于筛选与“诱饵”基因产物相互作用的激活结构域文库。作为实例而非限制,HRS参考多肽或其变异体可作为诱饵基因产物使用。HRS结合伴侣也可作为“诱饵”基因产物使用。总基因组或cDNA序列与编码激活结构域的DNA融合。所述文库和质粒共转化入酵母报告株,并且筛选转化体中表达该报告基因的转化体,所述质粒编码与DNA结合结构域融合的诱饵HRS基因产物的杂合体。

[0320] 还包括三杂交系统,其检测酵母中RNA-蛋白质相互作用。参见例如Hook et al., *RNA* 11:227-233, 2005。因此,这些方法以及相关方法可用于鉴定HRS多肽的细胞结合伴侣。这些方法以及相关方法也可用于鉴定其他化合物,例如与HRS多肽、其细胞结合伴侣或者两者相互作用的结合剂或核酸。

[0321] 如上所述,一旦分离,就可鉴定结合伴侣,反过来,与标准技术结合使用,可用结合伴侣鉴定与其相互作用的蛋白质或其他化合物。因此,某些实施方案涉及筛选与HRS参考多肽的结合伴侣特异性结合的化合物的方法,其包括a) 在合适条件下使所述结合伴侣与至少一种测试化合物结合,和b) 检测所述结合伴侣与所述测试化合物的结合,从而鉴定与结合伴侣特异性结合的化合物。在某些实施方案中,所述测试化合物为多肽。在某些实施方案中,所述测试化合物为诸如小分子化合物或者肽模拟物的化学化合物。

[0322] 某些实施方案包括筛选调节HRS参考多肽的活性的化合物的方法,其包括a) 在允许所述多肽活性的条件下使多肽与至少一种测试化合物结合,b) 评估多肽在存在测试化合物时的活性,和c) 比较存在测试化合物时多肽的活性和不存在测试化合物时多肽的活性,其中,存在测试化合物时多肽的活性的变化表明所述化合物调节多肽的活性。

[0323] 某些实施方案包括筛选调节HRS参考多肽的结合伴侣的活性的化合物的方法,其包括a) 在允许结合伴侣的活性的条件下使多肽与至少一种测试化合物结合,b) 评估结合伴侣在存在测试化合物时的活性,和c) 比较存在测试化合物时结合伴侣的活性和不存在测试化合物时结合伴侣的活性,其中,存在测试化合物时结合伴侣的活性的变化表明所述化合物调节结合伴侣的活性。通常,这些实施方案以及相关实施方案包括评估与HRS多肽或其结合伴侣相关的所选的非经典活性。包括体外和体内条件,例如细胞培养条件。

[0324] 某些实施方案包括筛选能作为HRS参考多肽或其活性片段或变异体的完全激动剂或部分激动剂的化合物效力的方法,其包括a) 将包含多肽的样品暴露于化合物,和b) 通常通过测量HRS多肽的非经典活性的升高,检测样品中激动剂活性。某些方法包括a) 将包含

HRS多肽的结合伴侣的样品暴露于化合物,和b)通常通过测量HRS多肽的所选的非经典活性的升高,检测样品中激动剂活性。某些实施方案包括包含通过所述方法鉴定的激动剂以及药学上可接受的载体或赋形剂的组合物。

[0325] 还包括筛选能作为HRS参考多肽的完全拮抗剂或部分拮抗剂的化合物的方法,其包括a)将包含多肽的样品暴露于化合物,和b)通常通过测量HRS多肽的非经典活性的降低,检测样品中拮抗剂活性。某些方法包括a)将包含HRS多肽的结合伴侣的样品暴露于化合物,和b)通常通过测量HRS多肽的所选的非经典活性的降低,检测样品中拮抗剂活性。某些实施方案包括包含通过所述方法鉴定的拮抗剂化合物以及药学上可接受的载体或赋形剂的组合物。

[0326] 在某些实施方案中,可以将体外系统设计为鉴定能与HRS参考序列或其结合伴侣相互作用或调节所述HRS参考序列或其结合伴侣的化合物。通过所述系统鉴定的某些化合物可用于例如调节通路的活性以及详细说明通路自身的组分。所化合物也可用于筛选以鉴定中断通路的组分之间的相互作用的化合物;或者直接中断此类相互作用。示例性方法包括:在一定条件下和足以允许HRS多肽和测试化合物相互作用和结合的时间内,制备所述HRS多肽和测试化合物的反应混合物,从而形成能从反应混合物中移除或能在反应混合物中受到检测的复合物。

[0327] 可通过许多方式实施体外筛选试验。例如,可将HRS多肽、细胞结合伴侣或测试化合物锚定在固相上。在这些实施方案以及相关实施方案中,在反应结束时可在固相上捕获和检测产生的复合物。在这一方法的一个实例中,将HRS多肽和/或其结合伴侣锚定在固体表面上,可以直接或间接标记未被锚定的测试化合物,这样可以检测固体表面上的组分对测试化合物的捕获。在其他实例中,将测试化合物锚定在固体表面上,并标记未被锚定的HRS多肽和/或其结合伴侣,或以某种方式可检测所述HRS多肽和/或其结合伴侣。在某些实施方案中,可方便地使用微量滴定板作为固相。通过非共价或共价连接可以固定锚定的组分(或测试化合物)。通过用蛋白质溶液简单地包被固体表面并干燥,可实现非共价连接。可选地,待固定化的蛋白质特异性的固定的抗体,优选单克隆抗体,可用于将蛋白质锚定在固体表面。可以提前制备并储存所述表面。

[0328] 为了实施示例性试验,通常将非固定的组分加到含有锚定的组分的包被表面。反应完成后,在任何形成的特异性复合物保持固定在固体表面的条件下,除去未反应组分(例如通过洗涤)。用许多方式能够实现锚定在固体表面上的复合物的检测。例如,如果预先标记先前未固定的组分,则检测到固定在表面上的标记物表明复合物已形成。如果不预先标记先前未固定的组分,则间接标记物可用于检测锚定在表面上的复合物;例如,使用先前未固定的组分特异性的标记抗体(接着,可用标记的抗Ig抗体直接或间接标记所述抗体)。

[0329] 可选地,例如使用表面等离子共振(SPR)和作为指标的共振角的变化,可确定测试化合物的结合的存在或不存在,其中根据常规方法,将HRS多肽或细胞结合伴侣固定在商购的传感器芯片(sensorchip)(例如由BiacoreTM制造)上,使测试化合物与其接触,使用特定波长的光以特定角度照射所述传感器芯片。也可用一种方法检测与测试化合物相应的峰的出现,测量测试化合物的结合,在所述方法中,将HRS多肽或细胞结合伴侣固定在适用于质谱仪的蛋白质芯片的表面,使测试化合物与其接触,联合电离法例如MALDI-MS、ESI-MS、FAB-MS等和质谱仪(例如双聚焦质谱仪、四极杆质谱仪、飞行时间质谱仪、傅立叶变换质谱

仪、离子回旋质谱仪等)。

[0330] 在某些实施方案中,基于细胞的试验、基于膜囊泡的试验或基于膜部分的试验可用于鉴定化合物,所述化合物调节所选的HRS多肽的非经典通路中的相互作用。为此,可使用表达HRS多肽和/或结合伴侣或者含有所述蛋白质(或其组合)的结构域或片段的融合蛋白的细胞系,或者经基因工程技术表达此类蛋白质或融合蛋白的细胞系(例如COS细胞、CHO细胞、HEK293细胞、HeLa细胞等)。通过监控与对照或预定量相比的活性的变化(例如统计学上显著的变化),能鉴定影响非经典活性的测试化合物。

[0331] 例如,对于涉及反义和RNAi剂的实施方案,还包括筛选能改变HRS参考多核苷酸表达的化合物的方法,其包括a)将包含HRS参考多核苷酸的样品暴露于诸如如潜在反义寡核苷酸的化合物,和b)检测所述HRS多核苷酸表达的改变。在某些非限制性实例中,根据本领域的常规技术,将这些实施方案以及相关实施方案应用于基于细胞的试验或无细胞翻译试验中。还包括用此类方法鉴定的反义和RNAi剂。

[0332] 还包括上述方法的任一种方法,或者本领域中已知的其他筛选方法,所述方法适应于高通量筛选(HTS)。通常,HTS使用自动操作针对候选化合物的文库允许筛选试验,例如,测量本文所述的非经典活性的升高或降低的试验。

[0333] C. 治疗方法

[0334] 另一方面,本发明涉及使用本发明的组合物用本文所述的组合物治疗细胞、组织或个体的方法。可通过本发明调节的所述细胞或组织优选为哺乳动物细胞,或者更优选为人类细胞。所述细胞可以是健康状态或患病状态。

[0335] 因此,本文所述的HRS试剂,包括HRS多肽、HRS多核苷酸、基于HRS多核苷酸的载体、反义寡核苷酸、RNAi剂以及结合剂例如肽、抗体和抗原结合片段、肽模拟物和其他小分子,可用于治疗多种与参考HRS的非经典活性相关的非限制性疾病或状况。此类非经典活性的实例包括细胞增殖调节、细胞迁移调节、细胞分化(如血细胞生成)调节、细胞凋亡或其他形式的细胞死亡调节、细胞信号传导调节、血管生成调节、细胞结合调节、细胞代谢调节、细胞因子产生或活性调节、细胞因子受体活性调节、炎症调节等。

[0336] 包括基于多核苷酸的疗法,例如反义疗法和RNAi干扰疗法,其通常涉及靶分子例如HRS多肽的特定剪接变体或HRS多肽的细胞结合伴侣表达的降低,否则所述方法有助于其非经典活性。通常,反义或RNAi疗法拮抗所述非经典活性,例如通过降低HRS参考多肽的表达。还包括基于多肽、抗体、肽模拟物或其他小分子的疗法,所述疗法例如通过与HRS多肽、其细胞结合伴侣或两者直接相互作用,促进或拮抗HRS参考多肽的非经典活性。

[0337] 例如,在某些实施方案中,提供了调节治疗相关的细胞活性的方法,所述细胞活性包括但不限于细胞代谢、细胞分化、细胞增殖、细胞死亡、细胞固定、细胞迁移、免疫系统功能、基因转录、mRNA翻译、细胞阻抗、细胞因子产生等,所述方法包括将细胞与本文所述的HRS组合物接触。因此,HRS组合物实质上可用于治疗可能受益于一种或更多种此类活性的调节的任何细胞或组织或个体。

[0338] HRS组合物也可用于许多治疗背景中的任一个,包括例如,涉及肿瘤性疾病、免疫系统疾病(例如自身免疫疾病和炎症)、感染性疾病、代谢性疾病、神经元/神经疾病、肌肉/心血管疾病、与异常血细胞生成相关的疾病、与异常血管发生相关的疾病、与异常细胞存活相关的疾病以及其它疾病的治疗和预防的治疗背景。

[0339] 例如,本发明的组合物可作为免疫调节剂,通过调节直接或间接介导自身免疫和/或炎性疾病、状况或病症的细胞,治疗抗炎适应症或促炎适应症。利用本领域中已知且可用的现有技术中的任一种技术,监控本发明的组合物作为免疫调节剂的实用性,包括例如迁移试验(如使用白细胞、淋巴细胞、单核细胞)、细胞因子产生试验、细胞生存力试验(如使用B细胞、T细胞、单核细胞、NK细胞)等。

[0340] “炎症”通常指组织对有害刺激物例如病原菌、损伤细胞(如创伤)和刺激剂的生物反应。术语“炎症反应”指达到和调节炎症的特异机制,仅作为举例,包括免疫细胞激活或迁移、细胞因子产生、血管舒张,包括激肽释放、纤维蛋白溶解和凝固,以及其他本申请描述和本领域中已知的机制。理想的是,炎症是身体的保护性尝试,以除去有害刺激物并启动病变组织或组织的愈合过程。如果没有炎症,创伤和感染永远不会痊愈,从而造成组织的渐进性破坏将威胁生存的处境。另一方面,过度炎症或慢性炎症可能与多种疾病有关,例如花粉热、动脉粥样硬化和类风湿性关节炎,以及本申请描述的和本领域中已知的其他疾病。

[0341] 慢性炎症的临床体征依赖疾病持续时间、炎性病变、原因和病变解剖学面积(例如参见Kumar et al.,Robbins Basic Pathology-8th Ed.(罗宾斯基基础病理学(第八版)),2009Elsevier,London;Miller,LM,Pathology Lecture Notes,Atlantic Veterinary College,Charlottetown,PEI,Canada)。慢性炎症与多种病理状况或疾病有关,包括:例如变态反应、阿尔茨海默病、贫血、主动脉瓣狭窄、关节炎如类风湿性关节炎和骨关节炎以及关节炎性痛风、癌症、充血性心力衰竭、纤维肌痛、纤维变性、心脏病发作、肾功能衰竭、狼疮、胰腺炎、中风、外科并发症、炎性肺病、炎性肠病、动脉粥样硬化、神经障碍、糖尿病、代谢障碍、肥胖和银屑病,以及本文所述和本领域中已知的其他病理状况或疾病。因此,HRS组合物可用于治疗或处理慢性炎症,调节任意一种或更多种个体慢性炎症反应,或者治疗与慢性炎症有关的任一种或更多种疾病或状况。

[0342] 用于评价炎性或其他状况的体征和症状的标准对本领域技术人员是显而易见的,所述标准包括用于作出差异诊断以及用于监控治疗,例如根据公认的临床标准确定改善,以确定治疗过程中是否给予了治疗上有效的剂量,例如Berkow et al.,eds,The Merck Manual,16th edition(默克诊疗手册,第16版),Merck and Co.,Rahway,N.J.,1992;Goodman et al.,eds,Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,10th edition(古德曼和吉尔曼的治疗药理学基础,第10版),Pergamon Press,Inc.,Elmsford,N.Y.,(2001);Avery's Drug Treatment:Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics(埃弗里药物治疗:临床药理学和治疗学的原理和实践,第三版),ADIS Press,Ltd.,Williams and Wilkins,Baltimore,MD.(1987);Ebadi,Pharmacology(药理学),Little,Brown and Co.,Boston,(1985);Osolci et al.,eds,Remington's Pharmaceutical Sciences,18th edition(雷明顿药物科学,第18版),Mack Publishing Co.,Easton,PA(1990);Katzung,Basic and Clinical Pharmacology(基础和临床药理学),Appleton and Lange,Norwalk,CT(1992)的教导对上述标准进行了举例说明。

[0343] 还包括调节免疫反应例如先天性免疫反应的方法。本文所用的术语“免疫反应”包括免疫系统的一种或更多种细胞介导的对抗原、疫苗组合物或免疫调节分子的可测量或可观察的反应。免疫反应通常从抗原或免疫调节分子结合免疫系统细胞开始。许多细胞类型,

包括最初与抗原或免疫调节分子结合的细胞以及参与介导先天性免疫反应、体液免疫反应、细胞介导的免疫反应的细胞,可以介导对抗原或免疫调节分子的反应。

[0344] 本文所用的“先天性免疫反应”可涉及病原相关分子模式(PAMPs)或HRS多肽与细胞表面受体例如to11样受体的结合。响应于PAMPs或其他信号的to11样受体和Ipaf信号传导通路的激活,导致免疫调节分子例如细胞因子或共刺激分子的产生,所述免疫调节分子诱导和/或增强免疫反应。参与先天性免疫反应的细胞包括,例如树突细胞、巨噬细胞、天然杀伤细胞和中性粒细胞以及其他细胞。

[0345] 某些实施方案涉及提高先天性免疫反应。其他实施方案涉及降低先天性免疫反应。在某些方面,一种或更多种to11样受体(TLRs),例如TLR2和/或TLR4,介导先天性免疫反应。本发明的某些HRS多肽与TLRs如TLR2和/或TLR4结合。TLRs识别PAMPs,所述PAMPs区分自身与感染因子并介导免疫调节分子的产生,例如有效适应性免疫发生必需的细胞因子(Aderem, A and Ulevitch, R. J. Nature 406:782-787 (2000) 和Brightbill, H. D., Immunology 101:1-10 (2000), 在此以引用的方式并入)。to11样受体家族成员识别多种抗原类型,并能区别病原体。例如TLR2识别各种真菌、革兰氏阳性和分枝杆菌组分,TLR4识别革兰氏阴性产物脂多糖(LPS),而TLR9识别核酸,例如细菌DNA中的CpG重复序列。

[0346] 刺激先天免疫(例如通过TLR2和/或TLR4)的HRS组合物可单独或与其他疗法联合治疗各种各样的状况。所述状况的具体实例包括感染性疾病,例如细菌、病毒和寄生感染性疾病。刺激先天免疫的HRS组合物也可用作疫苗佐剂,以增强个体对原抗原(primary antigen)的免疫反应,不论所述抗原是在活疫苗、减毒疫苗或者其他类型疫苗中。

[0347] 病毒感染性疾病或因子(以及其相应疫苗)的实例包括但不限于甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、戊型肝炎、杯状病毒相关腹泻、轮状病毒腹泻、流感嗜血菌(Haemophilus influenzae) b型肺炎和侵袭性疾病、流感、麻疹、腮腺炎、风疹、副流感相关肺炎、呼吸道合胞病毒(RSV)肺炎、严重急性呼吸综合征(SARS)、人乳头状瘤病毒、单纯疱疹2型生殖器溃疡、HIV/AIDS、登革热、日本脑炎、蜱传脑炎(Tick-borne encephalitis)、西尼罗病毒相关疾病(West-Nile virus associated disease)、黄热病、Epstein-Barr病毒、拉沙热(Lassa fever)、克里木-刚果出血热(Crimean-Congo haemorrhagic fever)、埃博拉出血热(Ebola haemorrhagic fever)、马尔堡出血热(Marburg haemorrhagic fever)、狂犬病、裂谷热(Rift Valley fever)、天花、麻风病、上呼吸道感染和下呼吸道感染和脊髓灰质炎,以及在本文其他地方所描述的病毒感染性疾病或因子。

[0348] 细菌感染性疾病或因子的实例包括(但不限于):炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)、伯氏疏螺旋体(Borellia burgdorferi)、流产布鲁氏杆菌(Brucella abortus)、犬布鲁氏杆菌(Brucella canis)、马尔他布鲁氏杆菌(Brucella melitensis)、猪布鲁氏杆菌(Brucella suis)、空肠弯曲杆菌(Campylobacter jejuni)、肺炎衣原体(Chlamydia pneumoniae)、鹦鹉热衣原体(Chlamydia psitacci)、沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis)、肉毒梭菌(Clostridium botulinum)、艰难梭菌(C. difficile)、产气荚膜梭菌(C. perfringens)、破伤风梭菌(C. tetani)、白喉棒状杆菌(Corynebacterium diphtheriae)(即白喉(diphtheria))、肠球菌(Enterococcus)、大肠杆菌(Escherichia coli)、流感嗜血杆菌(Haemophilus influenza)、幽门螺杆菌(Helicobacter pylori)、嗜肺军团病杆菌(Legionella pneumophila)、钩端螺旋体(Leptospira)、单核细胞增生李斯

特菌 (*Listeria monocytogenes*)、麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*)、结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、淋病奈瑟球菌 (*Neisseria gonorrhoea*)、脑膜炎奈瑟球菌 (*N. meningitidis*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、立氏立克次体 (*Rickettsia rickettsii*)、伤寒沙门菌 (*Salmonella typhi*)、鼠伤寒杆菌 (*S. typhimurium*)、宋内志贺氏菌 (*Shigella sonnei*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*)、腐生葡萄球菌 (*S. saprophyticus*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、肺炎链球菌 (*S. pneumoniae*)、化脓链球菌 (*S. pyogenes*)、苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*)、鼠疫耶尔森菌 (*Yersinia pestis*)、百日咳博德特氏菌 (*Bordetella pertussis*) 以及中耳炎 (例如, 常常由肺炎链球菌、流感嗜血菌或卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*) 引起), 以及本文其他地方所描述的细菌感染性疾病或因子。

[0349] 寄生感染性疾病的实例包括 (但不限于) 阿米巴病 (例如阿米巴虫 (*Entamoeba histolytica*))、钩虫病 (例如线虫类寄生虫, 如美洲板口线虫 (*Necator americanus*) 和十二指肠钩虫 (*Ancylostoma duodenale*))、利什曼病、疟疾 (原生动植物寄生虫疟原虫属 (*Plasmodium*) 的四个物种; 恶性疟原虫 (*P. falciparum*)、间日疟原虫 (*P. vivax*)、卵形疟原虫 (*P. ovale*) 和三日疟原虫 (*P. malariae*))、血吸虫病 (寄生性血吸虫属 (*Schistosoma*); 曼氏血吸虫 (*S. mansoni*)、埃及血吸虫 (*S. haematobium*) 和日本血吸虫 (*S. japonicum*))、蟠尾丝虫 (*Onchocerca volvulus*) (盘尾丝虫病)、克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*) (查格斯氏病/美洲昏睡病) 以及麦地那龙线虫 (*Dracunculus medinensis*) 和淋巴性丝虫病。

[0350] 某些HRS组合物可用于治疗或减少内毒素性休克, 所述内毒素性休克通常由暴露于外来抗原引起, 例如脂多糖 (LPS)。因为内毒素性休克可通过TLR信号传导介导, 并且天然存在的内源HRS片段 (例如SV9) 可以刺激TLRs, 所以通过拮抗或者降低内源HRS片段介导的TLR2和/或TLR4的刺激, 本文提供的某些结合剂、反义试剂或RNAi剂可使个体更能抵御内毒素性休克。

[0351] 某些HRS组合物可用于降低或拮抗某些免疫活性。例如, 鉴于TLRs在调节细胞迁移例如单核细胞迁移中的作用, 通过TLRs发出信号的HRS组合物也可以调节细胞迁移。在某些方面, HRS组合物降低或拮抗CCL1介导的活性, 例如免疫细胞迁移, 包括单核细胞迁移。作为一个实例, 某些HRS组合物可激活TLR, 例如TLR2和/或TLR4, 所述TLR在某些情况下导致细胞因子分泌 (例如MIP1 α) 以及相关的细胞因子受体 (例如CCL1) 的水平或活性的下调。因此, HRS组合物可用于调节免疫活性, 例如与TLR和细胞因子受体如CCL1相关的细胞迁移, 从而治疗TLR和/或CCR1介导的疾病或状况。

[0352] 还包括治疗免疫疾病的方法。可根据本发明治疗的说明性免疫系统疾病、病症或状况包括但不限于原发性免疫缺陷、免疫介导的血小板减少症、川崎综合征 (Kawasaki syndrome)、骨髓移植 (例如成人或儿童的最近骨髓移植)、慢性B细胞淋巴瘤白血病、HIV感染 (例如成人或小儿HIV感染)、慢性炎性脱髓鞘性多神经病、输血后紫癜等。

[0353] 此外, 其他疾病、病症和状况包括格-巴二氏综合征 (Guillain-Barre syndrome)、贫血 (例如与细小病毒B19相关的贫血, 患有稳定的多发性骨髓瘤的患者受感染 (例如复发感染) 的风险很大)、自身免疫性溶血性贫血 (例如温型自身免疫性溶血性贫血)、血小板减少症 (例如新生儿血小板减少症和免疫介导的中性粒细胞减少症)、移植 (例如巨细胞病毒

(CMV)阳性器官的CMV阴性受体)、低丙种球蛋白血症(例如血丙种球蛋白过少的新生儿具有受感染或发病的危险因素)、癫痫(例如难治性癫痫)、全身性血管炎综合征、重症肌无力(例如重症肌无力中代偿失调)、皮炎、以及多肌炎。

[0354] 其他自身免疫疾病、病症和状况包括但不限于自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性新生儿血小板减少症、特发性血小板减少性紫癜、自身免疫性血细胞减少症、溶血性贫血、抗磷脂综合征、皮炎、变应性脑脊髓炎、心肌炎、复发性多软骨炎、风湿性心脏病、肾小球肾炎(例如IgA肾病)、多发性硬化、神经炎、葡萄膜炎、眼炎、多内分泌腺病、紫癜(例如亨-舒综合症)、Reiter病、僵人综合征、自身免疫性肺炎症、格-巴二氏综合征、胰岛素依赖型糖尿病以及自身免疫性炎性眼病。

[0355] 其他自身免疫疾病、病症或状况包括但不限于自身免疫性甲状腺炎;甲状腺功能减退症,包括桥本甲状腺炎和特征在于例如细胞介导的和体液甲状腺细胞毒性的甲状腺炎;SLE(其特征常常在于例如循环和局部产生的免疫复合物);古德帕斯丘综合征(Goodpasture's syndrome,其特征常常在于,例如抗基膜抗体);天疱疮(其特征常常在于例如表皮棘层松解抗体);受体自身免疫,例如格雷夫斯病(其特征常常在于例如抗促甲状腺激素受体抗体);重症肌无力(其特征常常在于例如乙酰胆碱受体抗体);胰岛素抗性(其特征常常在于例如胰岛素受体抗体);自身免疫性溶血性贫血(其特征常常在于,例如抗体致敏红血细胞的吞噬作用);以及自身免疫性血小板减少性紫癜(其特征常常在于例如抗体致敏血小板的吞噬作用)。

[0356] 其他自身免疫疾病、病症或状况包括但不限于类风湿性关节炎(其特征常常在于例如关节中的免疫复合物);具有抗胶原蛋白抗体的硬皮病(其特征常常在于例如核仁抗体和其他核抗体);混合性结缔组织病(其特征常常在于例如抗可提取的核抗原例如核糖核蛋白的抗体);多肌炎/皮炎(其特征常常在于例如非组蛋白抗核抗体);恶性贫血(其特征常常在于例如抗胃壁细胞、抗微粒体和抗内因子抗体);特发性阿狄森病(idiopathic Addison's disease,其特征常常在于例如体液介导和细胞介导的肾上腺细胞毒性);不育(其特征常常在于例如抗精子抗体(antispennatozoal antibodies));肾小球肾炎(其特征常常在于例如肾小球基膜抗体或免疫复合物);原发性肾小球肾炎,IgA肾病;大疱性类天疱疮(其特征常常在于例如基膜中的IgG和补体);舍格伦综合征(Sjogren's syndrome,其特征常常在于例如多种组织抗体和/或特异性非组蛋白抗核抗体(SS-B));糖尿病(其特征常常在于例如细胞介导和体液胰岛细胞抗体);以及肾上腺素能药抗性,包括具有哮喘或囊性纤维化的肾上腺素能药抗性(其特征常常在于例如 β 肾上腺素能受体抗体)。

[0357] 还有其他自身免疫疾病、病症或状况包括但不限于慢性活动型肝炎(其特征常常在于例如平滑肌抗体);原发性胆汁性肝硬化(其特征常常在于例如抗线粒体抗体);其他内分泌腺衰竭(在某些情况下,其特征在于,例如特异性组织抗体);白癫风(其特征常常在于例如抗黑色素细胞抗体);脉管炎(其特征常常在于,例如血管壁中的免疫球蛋白和补体和/或低血清补体);心肌梗塞后症状(其特征常常在于例如抗心肌抗体);心切开术综合征(其特征常常在于例如抗心肌抗体);荨麻疹(其特征常常在于例如IgE的IgG和IgM抗体);特异性皮炎(其特征常常在于,例如IgE的IgG和IgM抗体);哮喘(其特征常常在于,例如IgE的IgG和IgM抗体);炎性肌病;以及其他炎性、肉芽肿、退行性和萎缩性病症。

[0358] 还包括调节血细胞生成和相关状况的方法。可通过本发明的HRS多肽调节的造血

过程的实例包括但不限于髓系细胞 (myeloid cell) (例如红系细胞、肥大细胞单核细胞/巨噬细胞、骨髓树突细胞、诸如嗜碱性粒细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的粒细胞、巨核细胞和血小板) 和淋巴样细胞 (例如天然杀伤细胞、淋巴样树突细胞、B细胞和T细胞) 的形成。某些具体的造血过程包括: 红细胞生成、粒细胞生成、淋巴细胞生成、巨核细胞生成、血小板生成等。还包括调节造血细胞的转运或动员的方法, 所述造血细胞包括造血干细胞、祖细胞、红细胞、粒细胞、淋巴细胞、巨核细胞和凝血细胞。

[0359] 可在体内 (in vivo)、体外 (in vitro)、离体 (ex vivo) 或其任意组合实施调节血细胞生成的方法。这些方法能够用于含有能够随造血谱系细胞 (例如脂肪组织来源的干细胞) 分化的造血干细胞、造血祖细胞或其他干细胞或祖细胞的任何生物样品、细胞培养物或组织。对于体外和离体方法, 根据本文所述以及本领域中已知的技术和特征, 可以分离和鉴别干细胞和祖细胞, 不论其是造血来源的或其他来源的干细胞和祖细胞。

[0360] 还在其他实施方案中, 本发明的HRS组合物可用于调节血管生成, 例如通过调节内皮细胞增殖和/或信号传导。可使用适当的细胞系 (例如人肺微血管内皮细胞 (HMVEC-L) 和人脐静脉内皮细胞 (HUVEC)) 以及使用适当的试验 (例如内皮细胞迁移试验、内皮细胞增殖试验、管形成试验 (tube-forming assay)、体基质胶塞分析 (matrigel plug assay) 等) 监控内皮细胞增殖和/或细胞信号传导, 其中很多是本领域中已知和可用的。

[0361] 因此, 在相关实施方案中, 本发明的组合物实质上可用于治疗将受益于血管生成调节的任何细胞或组织或个体。例如, 在一些实施方案中, 可将正经历或易受血管生成 (例如血管生成状况) 影响的细胞或组织或个体与本发明的合适组合物接触, 以抑制血管生成状况。在其他实施方案中, 为了干扰血管生成抑制活性或促进血管生成, 可将正经历或易受血管生成不足 (例如血管生成抑制状况) 影响的细胞或组织与本发明的适当的组合物接触。

[0362] 血管生成状况的说明性实例包括但不限于老年性黄斑变性 (AMD)、癌症 (实体癌和血液癌)、发育异常 (器官发生)、糖尿病盲、子宫内膜异位、眼部新生血管形成、银屑病、类风湿性关节炎 (RA) 以及皮肤色素减退 (例如血管瘤、焰色痣或单纯性痣 (nevus simplex))。抗血管生成状况的实例包括但不限于心血管疾病、再狭窄、缺血组织再灌注或心力衰竭后组织损伤、慢性炎症和创伤愈合。

[0363] 在其他实施方案中, 本发明的HRS组合物可用于调节细胞增殖和/或存活, 从而治疗或预防特征为细胞增殖和/或存活异常的疾病、病症或状况。例如, 在某些实施例中, HRS组合物可用于调节凋亡和/或治疗与异常凋亡相关的疾病或状况。细胞凋亡是用于描述称作程序性细胞死亡的细胞信号级联的术语。对于诱导凋亡 (例如癌症) 的分子以及抑制凋亡 (即中风、心肌梗塞、败血病等) 的分子, 存在各种治疗适应症。可用许多本领域中已知和可用的技术监控细胞凋亡, 所述技术包括, 例如测量DNA片段化的试验、膜不对称性改变、细胞凋亡性半胱天冬氨酸蛋白酶 (caspases) 的激活和/或细胞色素C和AIF的释放。

[0364] 与细胞存活增加或细胞凋亡抑制相关的说明性疾病包括但不限于癌症 (例如滤泡性淋巴瘤、癌和激素依赖性肿瘤, 包括但不限于结肠癌、心脏肿瘤、胰腺癌、黑色素瘤、成视网膜细胞瘤、成胶质细胞瘤、肺癌、肠癌、睾丸癌、胃癌、成神经细胞瘤、粘液瘤、肌瘤、淋巴瘤、内皮瘤、成骨细胞瘤、破骨细胞瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、腺瘤、乳腺癌、前列腺癌、卡波西肉瘤和卵巢癌); 自身免疫疾病 (例如多发性硬化、舍格伦综合征、格雷夫斯病、桥本甲状腺炎、自身免疫性糖尿病、胆汁性肝硬化、贝赫切特病、克罗恩氏病、多肌炎、系统性红斑狼疮

(SLE)和免疫相关肾小球肾炎、自身免疫性胃炎、自身免疫性血小板减少性紫癜和类风湿性关节炎)和病毒感染(例如疱疹病毒、痘病毒和腺病毒)、炎症、移植物抗宿主疾病(急性和/或慢性)、急性移植排斥和慢性移植排斥。

[0365] 与细胞存活增加相关的其他说明性疾病或状况包括但不限于恶性肿瘤和相关病症的发展和/或转移,例如白血病(包括急性白血病(例如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病,包括成髓细胞、前髓细胞、骨髓单核细胞、单核细胞和红细胞白血病))和慢性白血病(例如慢性髓细胞(粒细胞)白血病和慢性淋巴细胞白血病)、骨髓增生异常综合征、真性红细胞增多症、淋巴瘤(例如霍奇金病和非霍奇金病)、多发性骨髓瘤、华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、重链病,以及实体瘤,包括但不限于肉瘤和癌,例如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管原癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、威尔曼瘤(Wilm's tumor)、宫颈癌、睾丸瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤(meningioma)、黑色素瘤、成神经细胞瘤和成视网膜细胞瘤。

[0366] 与凋亡增加相关的说明性疾病包括但不限于AIDS(例如HIV诱发的肾病和HIV脑炎)、神经退行性疾病(例如阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、色素性视网膜炎、小脑退化和脑瘤或原发性相关疾病)、自身免疫性疾病(例如多发性硬化、舍格伦综合征、格雷夫斯病、桥本甲状腺炎、自身免疫性糖尿病、胆汁性肝硬化、贝赫切特病、克罗恩氏病、多肌炎、系统性红斑狼疮、免疫相关肾小球肾炎、自身免疫性胃炎、血小板减少性紫癜和类风湿性关节炎、骨髓增生异常综合征(例如再生障碍性贫血)、移植物抗宿主疾病(急性和/或慢性)、缺血性损伤(例如心肌梗塞、中风和再灌注损伤引起的缺血性损伤)、肝损伤或疾病(例如肝炎相关肝损伤、肝硬化、缺血/再灌注损伤、胆汁郁积症(cholestasis)(胆管损伤)和肝癌)、毒素诱发的肝病(例如酒精引起的肝病)、败血病性休克、溃疡性结肠炎、恶病质和厌食症。

[0367] 还在其他实施方案中,本发明的组合物可用于治疗神经元/神经疾病或病症,其说明性实例包括帕金森病、阿尔兹海默病、皮克病、克-雅二氏病(Creutzfeldt-Jacob disease)、亨廷顿氏舞蹈病、交替性偏瘫、肌萎缩侧索硬化、共济失调、脑瘫、慢性疲劳综合征、慢性疼痛综合征、先天性神经异常、颅神经疾病、谵妄、痴呆、脱髓鞘疾病、自主神经机能异常、癫痫、头痛、亨廷顿病、脑积水、髓膜炎、运动障碍、肌病、神经系统肿瘤、神经皮肤综合征、神经变性疾病、神经毒性综合征、眼球运动障碍、周围神经系统障碍、垂体障碍、脑穿通畸形、雷特综合征(Rett's syndrome)、睡眠障碍、脊髓疾病、中风、西德纳姆舞蹈病(Sydenham's)、抽动秽语综合征(tourette syndrome)、神经系统创伤和损伤等。在某些实施方案中,神经症状与6-羟基多巴胺(6-OHDA)诱发的神经元死亡有关,所述6-羟基多巴胺被认为是参与某些神经症状例如帕金森病的发病机制或相关机制的神经毒素。

[0368] 此外,其他实施方案涉及本发明的组合物在治疗代谢病症中的用途,例如肾上腺脑白质营养不良、克拉伯病(Krabbe's disease,球形细胞脑白质营养不良)、异染性脑白质营养不良、亚历山大病(Alexander's disease)、卡纳万病(海绵状脑白质营养不良)、佩-梅

二氏病 (Pelizaeus-Merzbacher disease)、科凯恩氏综合征 (Cockayne's syndrome)、胡尔勒病 (Hurler's disease)、勒韦氏综合征 (Lowe's syndrome)、利氏病 (Leigh's disease)、威尔逊氏病 (Wilson's disease)、哈-斯二氏病 (Hallervorden-Spatz disease)、泰-萨克斯病 (Tay-Sachs disease) 等。可使用本领域中已知和可用的许多技术中的任一种,例如测量脂肪细胞脂肪产生或脂肪细胞脂解作用的试验,监控本发明的组合物在调节代谢过程中的实用性。

[0369] 在本发明的更具体实施方案中,本发明的HRS组合物可用于例如通过细胞信号传导蛋白调节细胞信号传导。可使用许多熟知试验中的任一种监控细胞信号传导。例如,通过多种靶蛋白的磷酸化模式的改变,监控一般细胞信号传导事件的诱导。因此,检测响应于使用HRS多肽进行细胞处理的细胞信号传导活性,充当不同的生物学效应的指标 (indicator)。选择所述试验所用的靶蛋白,以包含主要细胞信号级联的关键组分,从而提供细胞信号传导情况 (landscape) 及其治疗关联性的概貌。通常,所述试验包括使用HRS多肽进行细胞处理,然后使用特异性检测磷酸化 (激活) 形式的靶蛋白的抗体进行免疫检测。

[0370] 用于监控治疗相关的细胞信号传导事件的说明性靶蛋白可包括但不限于: p38MAPK (细胞分裂素激活的蛋白激酶;由细胞应激和炎性细胞因子激活;参与细胞分化和凋亡);SAPK/JNK (应激激活的蛋白激酶/Jun氨基末端激酶;由细胞应激和炎性细胞因子激活);Erk1/2, p44/42MAPK (细胞分裂素激活的蛋白激酶Erk1和Erk2;由各种胞外信号激活;参与细胞生长和分化的调节);以及Akt (由胰岛素和各种生长和存活因子激活;参与凋亡的抑制、糖原合成的调节、细胞周期调节和细胞生长)。也可以监控酪氨酸残基的一般磷酸化,作为磷酸化介导的细胞信号传导变化的一般指标。

[0371] 当然,应当认识到,也可以测定其他类蛋白,例如细胞粘附分子 (如钙粘蛋白、整联蛋白、紧密连接蛋白 (claudins)、连环蛋白、选择蛋白等) 和/或离子通道蛋白,以监控本发明的组合物调节的细胞事件或活性。

[0372] 在本发明的其他具体实施方案中,本发明的HRS组合物可用于调节细胞例如白细胞的细胞因子产生。可使用本领域中已知的许多试验 (即RT-PCR、ELISA、ELISpot、流式细胞术等) 中的任一种监控细胞因子产生。通常,所述试验包括使用HRS多肽处理细胞,然后检测细胞因子mRNA或多肽,以测量细胞因子产生中的变化。因此,检测响应于使用HRS多肽进行细胞处理的细胞因子产生的增加和/或减少,可充当不同生物学效应的指标。通过调节细胞因子产生,本发明的HRS多肽可诱导、增强和/或抑制免疫或炎性反应。例如,本发明的HRS多肽和组合物可用于改变个体中的细胞因子谱 (cytokine profile) (即,1型与2型)。可被测量以监控HRS组合物的生物学效应的说明性细胞因子包括但不限于IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-23、TGF- β 、TNF- α 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MCP-1、GM-CSF、G-CSF等。

[0373] 本说明书所涉及的所有出版物和专利申请在此以引用的方式并入,如同明确地、个别地指出每篇出版物或专利申请以引用的方式并入。

[0374] 虽然为了清楚理解,已通过说明和实例比较详细地描述了上述发明,根据本发明的教导,对本领域普通技术人员显而易见的是,可对本发明作出某些改变和修改而不偏离所附权利要求的精神或范围。仅作为说明 (而非限制),提供了下述实施例。本领域的技术人员会容易地认识到,可以改变或修改多种非关键参数以获得基本上相似的结果。

实施例

[0375] 实施例1:人组氨酰-tRNA合成酶(HRS)基因的选择性剪接变异体HRS-SV9的鉴定

[0376] 如下通过PCR鉴定HRS基因的称为HRS-SV 9的可选剪接变异体。使用一对引物寻找以前加利福尼亚圣克鲁斯EST数据库(University of California Santa Cruz EST database)报告的内含子2保留剪接事件(EST#BP267368),其中一个引物(HRS-BPF:AGTGGACAGCCGGGATGGCAGAGC(SEQ ID NO:1))覆盖5'非翻译区(5'-UTR)和外显子1的边界区域,另一个(HRS-P1R:CAGGAAGTCGCCTATCTGAAG(SEQ ID NO:2))靠近外显子4的3'端。使用cDNA作为模板的PCR反应产物产生一个大于参考条带(图1B,下箭头)的明显条带(图1B,上箭头),所述PCR反应产物是扩增自全长HRS基因(NM_002109.3;SEQ ID NO:3)的片段。在人骨骼肌cDNA文库而不是源于HEK293T或IMR32细胞的cDNA文库中检测到所述较大条带,表明所述剪接变异体的组织特异性。切出所述条带,用凝胶纯化试剂盒提取所述DNA片段,用于测序。

[0377] DNA测序证实了以前报告的从内含子2的插入,然而没有已报告的外显子2中T-C突变的证据,从而使其作为HRS基因的截然不同的可选剪接变异体(图3A)。从内含子2插入的序列紧接着外显子2引入终止密码子,这样编码的蛋白质序列只有全长HRS蛋白的前60个氨基酸(图3B)。图3C显示HRS-SV9剪接变异体的核酸编码序列(SEQ ID NO:5)和编码的蛋白质序列(SEQ ID NO:6)。

[0378] 实施例2:人组氨酰-tRNA合成酶(HRS)基因的选择性剪接变异体HRS-SV11的鉴别

[0379] 本实施例中,也鉴别了HRS基因的称为HRS-SV11的另一个可选剪接变异体。使用一对引物,一个(HRS-BPF:AGTGGACAGCCGGGATGGCAGAGC(SEQ ID NO:1))覆盖5'-UTR的3'端和外显子1的5'端的边界区域,另一个(HRS-3'-UTR:ATAGTGCCAGTCCCACTTCC(SEQ ID NO:7))覆盖3'-UTR的5'端的残基。cDNA的PCR扩增后,观察到小于参考条带(图2B,上箭头)的明显条带(图2B,下箭头)。切出所述条带,然后凝胶纯化并测序。DNA测序证实,其为含有从外显子3至外显子10的缺失的HRS基因的剪接变异体(图3A)。所述缺失没有导致移码(frame-shifting)。因此,在蛋白质水平,HRS-SV11包含参考HRS蛋白的N末端WHEP结构域和C末端反密码子结构域,但是缺少氨酰化结构域(图3B)。

[0380] 图3D显示HRS-SV11剪接变异体的核酸编码序列(SEQ ID NO:8)和编码的蛋白质序列(SEQ ID NO:9)。如图2C所示,在成人脑、肺、骨骼肌和THP-1细胞以及Jurkat细胞的总cDNA中发现了所述转录本。

[0381] 实施例3:剪接变异体HRS-SV9和HRS-SV11可以天然存在

[0382] 为了在蛋白质水平测试这些剪接变异体的天然存在,用抗HRS抗体免疫印迹总细胞提取物。使用许多细胞系,包括HEK293T、C2C12和源于成年大鼠的肌组织,包括胫骨肌(代表快肌)和比目鱼肌(代表慢肌),测试两个商用抗体,即具有源于氨基酸1-97的表位的单克隆抗体(Novus Biologicals)和具有近C末端附加50-200个氨基酸中的表位的多克隆抗体(Abcam)。N末端和C末端抗体检测了HEK293T、成体大鼠胫骨肌和比目鱼肌中的一个条带(图4A和4B中下箭头),所述条带的大小与HRS-SV11剪接变异体多肽的预期大小一致。

[0383] 使用N末端抗体的免疫沉淀检测到分化的C2C12肌管中的一个条带(图5A中下箭头),所述条带的大小与HRS-SV9剪接变异体多肽的预期大小一致。没有在HEK293T细胞或

C2C12分化的肌细胞中检测到条带。

[0384] 过度表达myc标记的HRS-SV11的HEK293T细胞的总细胞裂解物也用作内源性HRS-SV11蛋白的参照物,所述内源性HRS-SV11蛋白应稍微小于myc标记的HRS-SV11。如图5B和5C所示,在IMR32细胞中使用两种抗体检测到在20kDa周围运行但稍微小于myc标记的HRS-SV11的条带(图B和C中下箭头),这表明存在内源性HRS-SV11。

[0385] 实施例4:过度表达的剪接变异体HRS-SV9和HRS-SV11从HEK293T细胞中的分泌

[0386] 本实施例中,在HEK293T细胞中强烈表达了HRS-SV9和HRS-SV11,并测试确定它们是否从所述细胞分泌出来。

[0387] 为了构建质粒,通过EcoRI/XhoI分别将野生型HRS、HRS-SV9和HRS-SV11编码序列克隆到pCI-neo-myc-myc-C载体(Promega, Madison, WI)中。为了分泌试验,当HEK293T细胞达到60-70%融合时,转染HEK293T细胞。将1 μ g DNA和125 μ l Opti-MEM混合。将4 μ l脂质体(lipofectamine) 2000和125 μ l Opti-MEM混合。5分钟后,将DNA-Opti-MEM复合物添加到脂质体2000-Opti-MEM复合物中,同时温和地拍打几次。在室温下孵育所述混合物20分钟,然后逐滴添加到细胞上。温和地旋转后,将细胞还回到培养箱中。6-7小时后更新培养基。转染24小时后,将培养基换成无血清的达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)。再孵育6小时后收获培养基和总细胞提取物。用20%TCA(三氯乙酸)沉淀培养基中的蛋白质。在NuPAGE Novex 4-12%Bis-Tris Gel (Invitrogen)上分离培养基和总细胞提取物,然后用N末端HRS抗体和微管蛋白抗体(Invitrogen)进行免疫印迹。

[0388] 使用此方法,在培养基部分中检测到HRS-SV9和HRS-SV11以及全长HRS,这表明它们由HEK293T细胞分泌出来(图6)。相反,未分泌增强型绿色荧光蛋白(EGFP)(参见图6C)。如图6A-B所示,将微管蛋白用作泄露对照;微管蛋白存在于总细胞裂解物部分中,但不存在于培养基部分中,这表明本试验没有泄露。

[0389] 实施例5:剪接变异体HRS-SV9和HRS-SV11增加激活的T细胞中IL-2分泌

[0390] 当抗原用抗原呈递细胞(APC)呈递时,T细胞激活的最早可检测响应为细胞因子如IL-2的分泌。通过自分泌型分泌,IL-2触发T细胞增殖,从而产生去除抗原所需要的细胞。因此,IL-2分泌的调节剂作为T淋巴细胞介导的免疫反应的免疫调节剂。

[0391] 使用IL-2表达和释放作为激活的指标,白血病Jurkat T细胞(ATCC No:TIB-152)广泛用于T细胞激活研究。用佛波醇酯类(PMA)和离子霉素(IOM)刺激Jurkat T细胞,进行T细胞激活。用ELISA评价向培养基分泌的IL-2。与预期一样,PMA和离子霉素刺激Jurkat T细胞以剂量依赖方式释放IL-2。如图7所示,当与PMA和IOM同时使用时,HRS-SV9和HRS-SV11显著提高IL-2分泌。因此,HRS-SV9和HRS-SV11表现出意想不到的免疫调节活性。

[0392] 实施例6:剪接变异体HRS-SV9刺激PBMC中TNF-分泌

[0393] 从人血中分离外周血单核细胞(PBMC)。将细胞重悬浮于含10%FBS的RPMI培养基中至细胞浓度为1 \times 10⁶细胞/mL。用6.25、12.5、25、50、100和250nM HRS-SV9将一百万个PBMC细胞处理24小时。还用1EU/mL脂多糖(LPS)、PBS或100nM阴性对照蛋白质1或2处理PBMC。24小时后,2000 \times g离心10分钟收集细胞悬浮液,并在TNF-ELISA测定中(R&D Systems; Cat.DTA00C)评价细胞悬浮液。

[0394] 如图8所示,HRS-SV9以剂量依赖方式刺激PBMC分泌TNF-。相反,用PBS或阴性对照蛋白质处理的细胞分泌极少的TNF-或不分泌TNF-(PBS、阴性对照1和阴性对照2)。LPS是已

知的TNF-分泌诱导物,在1EU/ml时产生正信号。虽然最小量LPS存在于HRS-SV9蛋白质中(250nM时为约0.11EU/ml),但是观察到的HRS-SV9的TNF-信号超过可归因于LPS的信号。本实施例的结果表明HRS-SV9担当TNF-分泌的调节剂。

[0395] 实施例7:HRS-SV11保护大鼠皮层神经元和PC12细胞避免6-OHDA诱发的神经元细胞死亡

[0396] 由于神经元细胞系中鉴定到HRS-SV11转录本,通过使用培养的原代大鼠皮层神经元和PC12细胞,在神经保护试验中测试所述蛋白质。所用的试验为:(1)6-羟基多巴胺(6-OHDA)诱发的神经元死亡,所述6-羟基多巴胺是被认为参与帕金森病(PD)发病机制的神经毒素;(2) β -淀粉样蛋白(A β)诱发的神经元死亡(使用A β_{1-42} 形式),其再现阿尔兹海默病;(3)L-谷氨酸诱发的神经元死亡,在许多神经疾病例如中风中观察到所述神经元死亡;以及(4)MPP+诱发的PC12细胞死亡。人们已经广泛研究了这些实验模型,并且认为这些实验模型在生理上与人神经疾病相关。

[0397] 重组蛋白的制备。在没有终止密码子的情况下,将HRS-SV11克隆到pET20b载体(Novagen)的EcoRV/NotI位点。将来自pET20b载体的多组氨酸标签(6XHis)添加到HRS-SV11蛋白质的C末端,从而使其可以用Ni-NTA珠纯化。用pET20b-HRS-SV11质粒转化大肠杆菌Rosetta菌株(Novagen),并在37°C强烈搅拌下生长,直到OD₆₀₀达到0.6-0.8。添加200 μ M IPTG诱导蛋白质表达。使细菌在16°C生长过夜。

[0398] 虽然沉淀细菌,用1片完全无EDTA蛋白酶抑制剂(Roche)和300毫克溶菌酶(Sigma)将细菌重悬浮于50ml 1XNi-NTA缓冲液(50mM Tris,300mM氯化钠和25mM咪唑,pH8.0)中,并在4°C下放置在旋转轮上30分钟。用间隔5秒的6X10³脉冲(3个周期内将振幅从25%增加到50%,再增加到75%)超声处理裂解物。然后裂解物在4°C下14,000rpm离心沉降45分钟。收集上清液,并在50ml柱子中用1ml Ni-NTA树脂浆孵育10-15分钟。孵育后,用补充有0.1% Triton X-114的1XNi-NTA缓冲液(50mM Tris,300mM氯化钠和25mM咪唑,pH8.0)彻底地洗涤蛋白质-珠混合物,以去除细菌内毒素。洗涤完成后,即在10ml(1X)Ni-NTA洗脱缓冲液(50mM Tris,300mM氯化钠和300mM咪唑,pH8.0)中洗脱蛋白质。用2XPBS将蛋白质在10kDa cutoff slide-a-lyzer(Pierce)中透析三次,然后用10kDa cutoff Amicon centricon(Fisher)浓缩。将浓缩蛋白在-20°C下保存于50%甘油和2mM DTT中。将HRS-SV14和野生型HRS克隆到pET21a载体中,并用与HRS-SV11相同的方式纯化。

[0399] 细胞培养和处理。在37°C、5%CO₂下将PC12细胞维持在补充有8%马血清、8%胎牛血清、30IU/ml青霉素和30 μ g/ml链霉素的达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium,DMEM)(Invitrogen)中。对于神经保护试验,将PC12细胞以1.25X 10⁵个细胞/孔接种到24孔板中,并在接种后1天使用。

[0400] 在胚胎期的第18天(E18)从大鼠胚胎分离原代大鼠皮层神经元,与前述一样的条件(做了一些修改)下培养(Brewer et al.,1995)。简而言之,在补充有1mM丙酮酸钠和10mM HEPES(pH 7.4)但没有Ca²⁺和Mg²⁺的汉克平衡盐溶液(HBSS)(Gibco)中剥离皮层。在37°C下胰蛋白酶作用15分钟后,用平板培养基(含有10%马血清的DMEM,补充有0.5mM GlutaMAX、100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素)洗涤处理过的皮层,并研磨几次。使细胞沉降3分钟,然后在1200rpm离心5分钟以沉淀。将细胞沉淀悬浮于1ml平板培养基中并计数。将1.5x10⁵细胞接种于聚L-赖氨酸(0.1mg/ml)包被的24孔培养板中,并在37°C、5%CO₂下维持。4小时后,

用培养基 (Neurobasal培养基, 补充有0.5mM GlutaMAX和(1X) B27补充物) 替换平板培养基。一个星期更换一半培养基一次。除非另有说明, 在体外在第9天 (DIV 9) 进行实验。实验前一天更新一半培养基。

[0401] 在药物处理研究中, 将药物在培养基中稀释 (但是将6-OHDA在水中稀释), 然后用于细胞。对于谷氨酸单钠 (MSG) 诱发的神经毒性, 将神经元于MSG暴露20分钟, 然后用培养基洗涤一次, 并保存于新鲜培养基中。同时添加美金刚与MSG。对于 β -淀粉样蛋白诱发的毒性, 将 $A\beta_{1-42}$ 在37°C下孵育1天形成聚集物, 然后添加到细胞中。对于过氧化氢诱发的毒性, 在12.5ml水中溶解1片过氧化氢以制备母液, 然后添加到细胞中。

[0402] 在下面实验中确定和使用每种神经毒素的 EC_{50} 。用MTT和LDH试验测量神经元生存力。MTT试验基于活细胞对线粒体脱氢酶的利用, 其切割MTT的四唑环并产生紫色MTT甲月替 (formazan) 晶体, 而LDH试验测量由于膜完整性破坏引起的培养基中释放的LDH。对于MTT试验, 将MTT以终浓度为0.5mg/ml添加到培养基中, 并在37°C、5%CO₂下与细胞一起孵育2小时。线粒体脱氢酶切割MTT四唑环并产生紫色甲月替晶体。培养后, 吸出培养基, 加入500 μ l 二甲基亚砜 (DMSO) 以溶解月替晶体。轻轻地摇动微量培养板, 并在37°C下孵育5分钟。然后, 取100 μ l溶液填入96孔微量培养板中, 用分光光度计 (BMG Labtech, Offenburg, Germany) 在570nm (630nm作为参照) 读取吸光度。相对吸光度 (OD570-OD630) 作为细胞生存力的指标。

[0403] 对于LDH试验, 依照产品说明书, 用LDH试验试剂盒 (Roche) 测量培养基中释放的LDH。收集培养基并离心沉降。保存上清液, 将100 μ l上清液灌装到96孔微量培养板 (MP) 的孔中。将100 μ l新鲜制备的反应混合物添加到每个孔中, 然后用培养基室温下孵育15分钟。在添加反应混合物后, 使微量培养板避光。15分钟后用分光光度计 (BMG Labtech, Offenburg, Germany) 测量492nm的样品吸光度。200 μ l试验培养基用作背景对照。因为2% Triton X-100可渗透所有细胞膜并释放最高量的LDH, 所以将它用作阳性对照。

[0404] 在所述三个神经保护试验中, 当这些神经元用HRS-SV11预处理24小时时, 发现HRS-SV11以剂量依赖方式保护皮层神经元免于6-OHDA诱发的神经元死亡 (图9A), 但是对A β 、L-谷氨酸和MPP⁺诱发的神经元死亡具有很小影响, 甚至没有影响 (图10)。

[0405] 因为6-OHDA诱发的PC12细胞死亡模型也与PD有关, 并且已经很好地表征了所述模型, 所以也在所述模型中测试了HRS-SV11。用HRS-SV11预处理PC12细胞24小时后, 观察到类似的抗6-OHDA的保护作用 (图9B-C)。除24小时预处理之外, 甚至30分钟预处理后, HRS-SV11也发挥神经保护作用 (图5D), 这表明新蛋白质合成并非HRS-SV11的神经保护可必需的。

[0406] 实施例8: HRS-SV11通过非细胞外机制保护神经元

[0407] 人们还没有清楚地理解6-OHDA神经毒性的确切机制, 但是有更多的证据倾向于细胞外机制, 而不是细胞内机制 (参见Blum et al., 2000; Izumi et al., 2005; Hanrott et al., 2006)。在细胞外空间, 6-OHDA自体氧化成对苯醌和活性氧, 例如过氧化氢 (H₂O₂)。为了调查HRS-SV11是否像其他抗氧化剂一样, 通过减少细胞外空间中H₂O₂和对苯醌来保护PC12细胞, 利用对苯醌在490nm处具有独特的吸光度这个性质, 使用无细胞体系测量在HRS-SV11存在或不存在时对苯醌的聚集。

[0408] 如图11A所示, 6-OHDA在测试管内随时间自体氧化并产生对苯醌的聚集。HRS-SV11的添加不会减少所产生的对苯醌的量, 而维生素C其是已知的抗氧化剂, 有效地阻止对苯醌的产生。所述结果表明HRS-SV11不通过直接阻止细胞外空间中对苯醌的产生来预防6-OHDA

的神经毒性,而是利用另一机制。

[0409] 还测试了HRS-SV11是否阻止过氧化氢诱发的神经元死亡。过氧化氢是6-OHDA的另一个主要氧化产物,已经证明,过氧化氢酶很可能通过水解过氧化氢阻止6-OHDA诱发的PC12细胞死亡(参见Hanrott et al., 2006)。如图11B所示,EC₅₀约为120mM时,过氧化氢剂量依赖性地诱发皮层神经元死亡。然而,与单独的过氧化氢相比(120mM),用HRS-SV11(从1nM到高达1μM)预处理皮层神经元不会促进神经元存活(图11C)。所述结果表明,HRS-SV11既不预防也不减少细胞外空间中过氧化氢的产生,或者其不干扰过氧化氢引发的胞内死亡通路。

[0410] 当与氧化剂共同使用时,大多数抗氧化剂是有效的。例如,谷胱甘肽消除对苯醌的毒性,过氧化氢酶阻止过氧化氢的毒性。考虑到这种现象,为了证实以前的结果,同时使用HRS-SV11和6-OHDA。如图11D所示,共同使用HRS-SV11和6-OHDA在皮层神经元和PC12细胞中都没有显示挽救效应。

[0411] 还实施了洗净实验;在使用6-OHDA前,用HRS-SV11预先孵育后,用PBS洗涤神经元,并用培养基更新神经元以去除任何残留的HRS-SV11。这个方法减少了直接干扰6-OHDA的任何机会。如图11E所示,洗净不会影响HRS-SV11的保护功能。总而言之,这些数据强烈地证明,HRS-SV11通过可选的信号传导机制发挥神经保护作用,而不是通过减少细胞外的6-OHDA或其氧化产物。

[0412] 实施例9:HRS-SV11抑制6-OHDA诱发的PC12细胞的凋亡

[0413] 已提出凋亡是6-OHDA毒性的主要原因(参见Choi et al., 1999;Blum et al., 2001)。细胞核碎裂和凝缩是晚期凋亡的标志。在HRS-SV11存在或不存在时暴露于6-OHDA后,用烟酸己可碱33342(Hoechst 33342)染色和鉴定凋亡细胞。如图12所示,如烟酸己可碱染色所区分的,在暴露于200μM 6-OHDA 8小时后,约20%PC12细胞经历凋亡。用HRS-SV11(1000nM)预处理极大地降低了凋亡细胞部分(参见显示凋亡细胞计数的图12D)。所述结果表明,HRS-SV11通过抑制6-OHDA诱发的凋亡来保护PC12细胞。

[0414] 实施例10:半胱氨酸残基有助于HRS-SV11的神经保护作用

[0415] HRS-SV11含有三个半胱氨酸(Cys):Cys117、Cys169和Cys171。Cys169是倒数第三个氨基酸,Cys171是最后一个氨基酸(参见图13A)。修饰Cys169和Cys171,以获得用于结构研究的HRS-SV11的同源单体群。制备两种突变体:(1)HRS-SV11_de1C和(2)HRS-SV11_C2S。

[0416] HRS-SV11_de1C变异体(称为de1C)缺失HRS-SV11中的最后三个氨基酸(包括Cys169和Cys171)。HRS-SV11_C2S变异体(称为C2S)的Cys169和Cys171突变成丝氨酸残基(Ser)。

[0417] 使用AKTA FPLC系统(GE Healthcare)对蛋白质实行分析型凝胶过滤层析。将蛋白质样品装载到Superose 1210/300GL柱子(GE Healthcare)上,所述柱子用含有50mM Tris-HCl pH 7.5、100mM氯化钠和1mM DTT的缓冲液平衡。如通过分析型凝胶过滤所分析的(参见图13B),HRS-SV11_C2S具有一个对应于单体形式的峰,而HRS-SV11_de1C具有两个峰,一个对应于单体大峰和一个对应于二聚体小峰。还将Cys177修饰成丝氨酸(C117S变异体),图13显示所述突变将HRS-SV11固定在二聚体形式。野生型HRS-SV11具有二聚体和单体之间的形式,这表明HRS-SV11蛋白在二聚体和单体之间动态地转换。

[0418] 还在6-OHDA诱发的PC12细胞死亡模型中测试HRS-SV11突变体。如图13C所示,所述

C2S和de1C突变体失去了用野生型HRS-SV11蛋白观察到的保护功能,这表明这两个半胱氨酸对HRS-SV11神经保护的重要性。

[0419] 实施例11:HRS-SV11通过JAK2、JNK和P38发挥神经保护作用

[0420] 为了探索HRS-SV11的神经保护信号通路,使用许多特异性化学抑制剂干扰特异性信号分子。结果如图14所示。在一组抑制剂中,发现共同抑制JAK2(被40 μ M AG490抑制)、JNK和p38(被10 μ M SB202190和10 μ M SP600125抑制)抑制了HRS-SV11的保护作用,而通过U73122单独抑制磷脂酶C(PLC),或通过牛蒡甙元单独抑制MKK,或单独抑制JNK或p38,对PC12细胞没有影响。这些结果表明JAK2、JNK和p38参与HRS-SV11的信号传导。

[0421] 实施例12:HRS-SV11与CCR5结合

[0422] 为了进一步理解HRS-SV11的神经保护作用,鉴别了细胞表面潜在同源受体。含有HRS的氨基酸1-48(1-48a.a.)的人工片段和野生型HRS蛋白质诱发表达CCR5的HEK293T迁移,但是没有氨基酸1-48的缺失突变体不诱导所述迁移(Howard et al.,2002)。由于HRS-SV11含有野生型HRS的氨基酸1-48,将CCR5作为HRS-SV11的候选受体进行测试。

[0423] 扩增人CCR5并将其克隆到pEGFP-N1载体中。包括人CCR1受体,作为对照,其也是CC趋化因子受体。用CCR5-EGFP或CCR1-EGFP质粒转染HEK293T细胞,转染1天后,用PBS洗涤细胞并用胰蛋白酶将细胞从培养皿上分离。在100 μ l完全培养基中将1 \times 10⁶个细胞添加到FACS试管中,然后置于冰上(在后面的试验中保持细胞冷却)。用重组HRS-SV11蛋白质将细胞45处理分钟。然后用1ml染色缓冲液(1XPBS+3%FBS)洗涤细胞一次,并在4 $^{\circ}$ C、400x g下离心沉降10分钟。洗涤后,在100 μ l染色缓冲液用0.3 μ l抗V5-FITC一抗(3 μ g/ μ l)在黑暗条件下(在后面的试验中保持黑暗条件)将细胞孵育30分钟。然后用1ml染色缓冲液将细胞洗涤两次,并在4 $^{\circ}$ C、400x g下离心沉降10分钟。最后一次洗涤后,将细胞沉淀重悬浮于800 μ l染色缓冲液中,并直接用FACS分析。

[0424] 如预期一样转染当到HEK293T细胞中时,CCR5-EGFP和CCR1-EGFP蛋白适当地定位于细胞膜(数据未显示)。通过荧光激活细胞分选术(FACS),发现将重组HRS-SV11蛋白质应用于表达CCR5的HEK293T细胞,增强了曲线右移所反映的组氨酸标签抗体的表面结合(图15B),但是在表达CCR1的细胞中没有移动(图15D),这表明CCR5是HRS-SV11的潜在受体。如图15C所示,用Met-RANTES即CCR5激动剂预处理表达CCR5的HEK293T细胞不影响所述移动。由于Met-RANTES与CCR5受体的N末端结合,该数据表明CCR5的N末端不参与HRS-SV11与CCR5的结合。

[0425] 实施例13:人组氨酰-tRNA合成酶(HRS)基因的神经保护可选剪接变异体HRS-SV14的鉴定

[0426] 在本实验中,通过巢式PCR(nested PCR)鉴别了来自于人胎儿脑的HRS基因的另一个剪接变异体,其称为HRS-SV14(参见图16A,箭头所示)。为了建立第一PCR反应,产生了10 μ l反应混合物,其含有第一链cDNA 1 μ l、1X Advantage 2PCR缓冲液(Clontech)、各dNTP(Ambion)200 μ M、250pM各正向和反向引物(IDT oligo)和1.25X Advantage 2聚合酶混合物(Polymerase Mix)(Clontech)。第一PCR的引物为hsH1-E2F1(5'-TGA AAC TGA AGG CAC AGC TG-3')(SEQ ID NO:12)和hsH1-E13R1(5'-TCT TCT CTT CGG ACA TCC AC-3')(SEQ ID NO:13)。第一PCR的热循环条件是在95 $^{\circ}$ C下1分钟,然后在95 $^{\circ}$ C下20秒、在58 $^{\circ}$ C下30秒和在72 $^{\circ}$ C下1分钟,并循环20次,最后在72 $^{\circ}$ C下延伸5分钟。巢式PCR的PCR建立和热循环条件与第一

PCR一样,除了在巢式PCR中,模板是1000倍稀释的第一PCR产物,引物是rnH1-E02F1 (5'-AAC AGA AGT TCG TCC TCA AAA C-3') (SEQ ID NO:14) 和rnH1-E12J13R2 (5'-TCC ACC TCT TCT CTG CTC GTC A-3') (SEQ ID NO:15)。电泳分离巢式PCR产物。用NucleoSpin Extract II试剂盒(Macherey-Nagel)分离和纯化截然不同的PCR产物。使用TOPO TA Cloning Kit (TOPO TA克隆试剂盒)(Invitrogen)克隆分离的PCR产物,用于测序。得到并测序成功地插入了PCR产物的质粒。为了鉴定可选的剪接事件,在NCBI数据库中将PCR产物序列与人HARS mRNA序列(登录号:NM_002109)进行比对。

[0427] 序列比对显示HRS-SV14转录本具有从人HRS基因的外显子4至外显子10的894bp缺失(图16B),如图16C所示,这使得HRS-SV14蛋白缺乏野生型HRS蛋白的第101-398位氨基酸。除了保留外显子3外,HRS-SV14与HRS-SV11相似,所述外显子3翻译成氨酰化结构域的40a.a.。

[0428] 然后产生重组HRS-SV14蛋白,并在6-OHDA诱发的PC12细胞死亡模型中测试其神经保护作用。如图16D所示,用500nM HRS-SV14预处理PC12细胞24小时,能显著地减少暴露于6-OHDA后的PC12细胞死亡,且神经保护水平和HRS-SV11的水平相当。

[0429] 实施例14:组氨酰-tRNA合成酶剪接变异体SV9抑制THP-1迁移

[0430] 为了表征SV9的性质,SV9是组氨酰-tRNA合成酶剪接变异体(氨基酸1-60),基于现有文献建立了迁移试验,所述现有文献提出全长组氨酰-tRNA合成酶及其片段(氨基酸1-48)的化学引诱物性质(Howard et al. (2002), J.Exp.Med., 196:781-791)。

[0431] 将THP-1细胞(ATCC, Catalog#TIB-202)培养在补充有10%热灭活FBS (Invitrogen, Catalog#10082147) 和0.05mM 2-β-巯基乙醇的RPMI-1640培养基(ATCC, Catalog#30-2001)中。细胞密度保持在(2-4) x 10⁵个细胞/ml。在迁移试验前,通过离心收集THP-1细胞,将其调节至密度6x10⁶个细胞/ml,并在含有6μl/ml钙黄绿素AM (Calcein AM, Invitrogen, Catalog No.C3099)的迁移缓冲液(含0.1%BSA的RPMI-1640培养基)中饥饿45分钟。同时,以不同终浓度将SV9(或PBS作为对照)添加到细胞中。将用SV9预处理的100μl细胞(含有6x10⁵个细胞)添加到迁移装置的上室。将含有CCL-5或PBS缓冲液的600μl迁移缓冲液添加到下室,并使细胞迁移2小时。收集迁移到下室的细胞并重悬浮于100μl PBS中,将细胞转入384孔不透明Greiner平板中,然后在平板读取器中读取荧光。

[0432] 如图19所示,SV9出乎意料地抑制THP-1细胞向其他配体如CCL-5的迁移。

[0433] 实施例15:组氨酰-tRNA合成酶剪接变异体SV9抑制CCR-1介导的THP-1迁移

[0434] 由于CCL-5可以与三个受体(CCR1、CCR3和CCR5)结合,为了进一步表征SV9的性质,用迁移试验确定SV9与哪个受体结合,从而抑制THP-1细胞迁移。

[0435] 将THP-1细胞(ATCC, Catalog#TIB-202)培养在补充有10%热灭活FBS (Invitrogen, Catalog#10082147) 和0.05mM 2-β-巯基乙醇的RPMI-1640培养基(ATCC, Catalog#30-2001)中。将细胞密度保持在(2-4) x 10⁵个细胞/ml。在迁移试验前,通过离心收集THP-1细胞,将其调节至密度为6x10⁶个细胞/ml,并在含有6μl/ml钙黄绿素 (Calcein) AM (Invitrogen, Catalog No.C3099)的迁移缓冲液(含0.1%BSA的RPMI-1640培养基)中饥饿45分钟。同时,以不同终浓度将SV9(或PBS作为对照)添加到细胞中。将用SV9预处理的100μl细胞(含有6x10⁵个细胞)添加到迁移装置的上室。将含有CCL-23或PBS缓冲液的600μl迁移缓冲液添加到下室,使细胞迁移2小时,CCL-23是只对CCR-1具有已知反应性的配体。收集迁

移到下室的细胞并重悬浮于100 μ l PBS中,将细胞转移到384孔不透明Greiner平板中,然后在平板读取器中读取荧光。

[0436] 图20显示SV9抑制THP-1细胞向CCL-23的迁移,因此可能灭活CCR1受体通路。

[0437] 实施例16:组氨酰-tRNA合成酶剪接变异体SV9激活Toll样受体

[0438] 以前的研究(Parker et al., (2004), J. Immunol., 172:4977-4986)表明, Toll样受体激活能下调CCR1。我们使用基于细胞的报告试验(reporter assay)确定SV9是否也能激活Toll样受体。

[0439] 将表达各种Toll样受体的RAW-Blue™细胞(InvivoGen, raw-sp)维持在补充有10% FBS和1xHEK-Blue™ Selection(InvivoGen, hb-sel)的DMEM培养基(Invitrogen)中。在试验当天,除去培养基,用PBS将细胞冲洗两次。胰蛋白8酶处理细胞或刮细胞,并重悬浮于新鲜生长培养基中以制备浓度约为550,000个细胞/ml的细胞悬浮液。将不同浓度的20 μ l SV9或对照添加到含有阴性对照(例如无内毒素水)的平底96孔板的孔中。将180 μ l细胞悬浮液(约100,000个细胞)加入到每个孔中,37°C下在5%二氧化碳培养箱中孵育平板18-24小时。第二天,根据制造商说明书制备QUANTI-Blue™溶液。将160 μ l重悬的QUANTI-Blue™转入96孔板的孔中,随后加入40 μ l诱导的RAW-Blue™细胞上清液。然后在37°C下将平板孵育30分钟至6小时。使用分光光度计在620-655nm处确定分泌型碱性磷酸酶(SEAP)的水平。

[0440] 图21显示SV9蛋白质激活存在于RAW-Blue™细胞表面的Toll样受体,并刺激SEAP报告基因的产生。

[0441] 实施例17:组氨酰-tRNA合成酶剪接变异体SV9优先激活Toll样受体4

[0442] 为了进一步表征SV9与哪个Toll样受体结合,在相似的报告试验中使用只表达TLR-2或TLR-4的细胞。

[0443] 将表达TLR-2或TLR-4的293细胞(InvivoGen, Catalog#hb2-cells)维持在补充有10% FBS和1xHEK-Blue™ Selection(InvivoGen, Catalog#hb-sel)的DMEM培养基(Invitrogen)中。在试验当天,将20 μ l不同浓度的SV9或对照添加到平底96孔板的孔中。在测试培养基(DMEM, 10%热灭活FBS)中制备每ml含有5x10⁵个细胞的HEK-Blue™-hTLR2或TLR4细胞的细胞悬浮液。将90 μ l细胞悬浮液(约50,000个细胞)添加到每个孔中,37°C下在二氧化碳培养箱中将平板孵育20-24小时。第二天,根据制造商说明书制备QUANTI-Blue™溶液。将180 μ l重悬浮的QUANTI-Blue™(InvivoGen: Catalog#rep-qb1)转入96孔板的孔中,随后添加20 μ l诱发的HEK-Blue™-hTLR2或TLR4细胞悬浮液。然后在37°C下将平板孵育1-3小时。使用分光光度计在650纳米处确定分泌型碱性磷酸酶(SEAP)的水平。

[0444] 图22显示SV9蛋白质激活TLR2(22A)和TLR4(22B),但是对TLR4显著地更加有效。

[0445] 实施例18:组氨酰-tRNA合成酶剪接变异体SV9刺激MIP-1 α 分泌

[0446] 已经证明, Toll样受体激活导致MIP-1 α 分泌,反过来, MIP-1 α 分泌能触发CCR1下调(Parker et al. (2004), J. Immunol., 172:4977-4986)。我们使用ELISA测定确定SV9与TLR-2和/或TLR-4的结合是否导致MIP-1 α 分泌。

[0447] 将THP-1细胞(ATCC, Catalog#TIB-202)培养在补充有10%热灭活FBS(Invitrogen, Catalog#10082147)和0.05mM 2- β -巯基乙醇的RPMI-1640培养基(ATCC, Catalog#30-2001)中。

[0448] 将细胞以1x10⁶/ml的密度接种到24孔板中,并将不同浓度的SV9或LPS添加到每个

孔中。孵育24小时后,通过250x g离心以及除去上清液,从每个孔中收集上清液。根据制造商说明书,使用人CCL3/MIP-1 α Immunoassay Quantikine试剂盒(R&D,Catalog#DMA00)确定来自于每个样品的MIP-1 α 的表达水平。

[0449] 图23显示SV9以有别于LPS的动力学特性刺激MIP-1 α 分泌。

[0450] 以上公开内容是描述性的、说明性的的和示例性的,且不能认为限制随后所附权利要求定义的范围。

序列表

- <110> aTyr Pharma Inc.
Zhou, Jie
Fun, Lau Ching
Xu, Zhiwen
Lo, Wing Sze
Piehl, Kristi Helen
Greene, Leslie Ann
- <120> 包含具有非经典生物活性的组氨酰-tRNA合成酶剪接变异体的组合物及方法
- <130> 120161.415PC
- <140> PCT
<141> 2010-03-16
- <160> 29
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 引物
- [0001] <400> 1
agtggacagc cgggatggca gacc 24
- <210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 引物
- <400> 2
caggaagtcg cctatctgaa g 21
- <210> 3
<211> 1981
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)
- <400> 3
tcgatagccg gaagtcatcc ttgctgagcc tggggcaacc accgcaggtc gagacagcag 60
gcggctcaag tggacagccg ggatggcaga gcgtgcggcg ctggaggagc tggtgaaact 120
tcaggagagag cgggtgcgag gectcaagca gcagaaggcc agegccgagc tgatecagga 180
ggaggtggcg aaactcctga aactgaaggc acagctgggt cctgatgaaa gcaaacagaa 240
atitgtgctc aaaaacccca agggcacaag agactatagt ccccggcaga tggcagttcg 300
cgagaagggtg tttgacgtaa tcatecgttg cttcaagcgc caeggtgcag aagtcattga 360
tacacctgta tttgaactaa aggaacact gatgggaaag tatggggaag actccaagct 420
tatctatgac ctgaaggacc agggcgggga gctcctgtcc cttecgctag acctcaactgt 480
tecttttgcg cggtatitgg caatgaataa actgaccaac attaaagct accacatagc 540
aaaggfataf cggcgggata acccagccat gaccctggc cgataccggg aattctacca 600
gtgtgatitf gacattgctg ggaactitga tccatgatc cctgatgcag agtgctgaa 660
gatcatgtgc gagatcctga gttaacttca gataggcgac ttectgttca aggtaaacga 720
tcgaecatt ctgatggga tgtttgetaf ctgtgtgttt tetgacagca agttccgtac 780

```

catctgctcc tcagtagaca agctggacaa ggtgtcctgg gaagaggatga agaatgagat 840
ggtggggagag aaggccttg cacctgaggt ggctgaccgc attggggact atgtccagca 900
acatggtggg gtatccctgg tggaaacagct getccaggat cctaaactat cccaaaacaa 960
gcaggccttg gagggcctgg gagacctgaa gttgctcttt gactacctga ccttatttgg 1020
cattgafgac aanaatctct ttgacctgag cettgctcga gggctggatt actacactgg 1080
ggtgatctat gaggcagtgc tgcctacagac ccagcccag gcaggggaag agcccctggg 1140
tgtgggcagt gtggetgctg gaggacgcta tgatgggcta gtgggcatgt tegaccecaa 1200
agggcgaag gtccatgtg tgggctcag cattggggtg gageggattt tctecatgt 1260
ggaacagaga ctagaggctt tggaggagaa gatacggacc acggagacac aggtgcttgt 1320
ggcatctgca cagaagaage tgctagagga aagactaaag cttgtctcag aactgtggga 1380
tgetgggac aaggetgagc tgetgtacaa gaagaacca aagetactga accagttaca 1440
gtactgtgag gaggcaggca tcccactggg gcttatcctc ggcgagcagg aactcaagga 1500
tggggtcact aagetccgtt cagtgcagag cagggaaagag gtgatgtcc gaagagaaga 1560
ccttgtggag gaaatcaaaa ggagaacagg ccagcccctc tgcactgct gaactgaaca 1620
aactatcaga ggaaggaag tgggactggc actatttgag gttaagacaa actgcatatg 1680
tactteaatt gettgeact tttccgttc agcggaaagac ctgaagagtg gtcagaacag 1740
agcctttgat tttattatg gttatttat tgattattac tggcaaaaac ggccaggtac 1800
aacacctttt tcatacaagg cccaggagge ttagtccagt ctgtgctect gggetacaag 1860
gacccagcct gagatggctc catctgcagg gccccgcacc agttggagca gatgcctccc 1920
caccaccaat tgccaaaggt ccaataaaat gectcaacca eggaaaaaaa aaaaaaaaaa 1980
a

```

<210> 4
 <211> 509
 <212> PRT
 <213> 智人

[0002] <400> 4

Met	Ala	Glu	Arg	Ala	Ala	Leu	Glu	Glu	Leu	Val	Lys	Leu	Gln	Gly	Glu
1				5					10					15	
Arg	Val	Arg	Gly	Leu	Lys	Gln	Gln	Lys	Ala	Ser	Ala	Glu	Leu	Ile	Glu
			20					25					30		
Glu	Glu	Val	Ala	Lys	Leu	Leu	Lys	Leu	Lys	Ala	Gln	Leu	Gly	Pro	Asp
		35					40					45			
Glu	Ser	Lys	Gln	Lys	Phe	Val	Leu	Lys	Thr	Pro	Lys	Gly	Thr	Arg	Asp
	50				55						60				
Tyr	Ser	Pro	Arg	Gln	Met	Ala	Val	Arg	Glu	Lys	Val	Phe	Asp	Val	Ile
65				70					75					80	
Ile	Arg	Cys	Phe	Lys	Arg	His	Gly	Ala	Glu	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Val
				85					90					95	
Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Lys	Tyr	Gly	Glu	Asp	Ser	Lys
			100					105					110		
Leu	Ile	Tyr	Asp	Leu	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Arg
			115				120					125			
Tyr	Asp	Leu	Thr	Val	Pro	Phe	Ala	Arg	Tyr	Leu	Ala	Met	Asn	Lys	Leu
						135					140				
Thr	Asn	Ile	Lys	Arg	Tyr	His	Ile	Ala	Lys	Val	Tyr	Arg	Arg	Asp	Asn
145					150					155				160	
Pro	Ala	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Tyr	Arg	Glu	Phe	Tyr	Gln	Cys	Asp	Phe
				165					170					175	
Asp	Ile	Ala	Gly	Asn	Phe	Asp	Pro	Met	Ile	Pro	Asp	Ala	Glu	Cys	Leu
			180					185					190		
Lys	Ile	Met	Cys	Glu	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Ile	Gly	Asp	Phe	Leu
		195					200					205			
Val	Lys	Val	Asn	Asp	Arg	Arg	Ile	Leu	Asp	Gly	Met	Phe	Ala	Ile	Cys
		210				215					220				
Gly	Val	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Arg	Thr	Ile	Cys	Ser	Ser	Val	Asp	Lys
225					230					235				240	
Leu	Asp	Lys	Val	Ser	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	Asn	Glu	Met	Val	Gly	Glu
				245						250				255	
Lys	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Arg	Ile	Gly	Asp	Tyr	Val	Gln
			260					265					270		
Gln	His	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Lys
		275					280					285			

Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
 290 295 300
 Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
 325 330 335
 Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
 340 345 350
 Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
 355 360 365
 Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 370 375 380
 Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
 385 390 395 400
 Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
 405 410 415
 Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
 420 425 430
 Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
 435 440 445
 Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
 450 455 460
 Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
 465 470 475 480
 Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
 485 490 495
 Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
 500 505

[0003]

<210> 5
 <211> 183
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 5
 atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgagge 60
 ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
 ctgaaggaac agetgggtcc tgatgaaage aaacagaaat ttgtgetcaa aaccccccaag 180
 tag 183

<210> 6
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 6
 Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1 5 10 15
 Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
 20 25 30
 Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
 35 40 45
 Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys
 50 55 60

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 7
 atagtgcag teccacttcc 20

<210> 8
 <211> 516
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 8
 atggcagage gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaaacttc agggagagcg cgtgcgagge 60
 etcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
 ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
 gctttggagg agaagatacg gaccacggag acacaggtgc ttgtggcacc tgcacagaag 240
 aagetgctag aggaaagact aaagcttctc tcagaactgt gggatgctgg gatcaaggct 300
 gagctgctgt acaagaagaa cccaaageta ctgaaccagt tacagtactg tgaggaggca 360
 ggcateccac tgggtgctat catcgggcag caggaactca aggatggggg catcaagctc 420
 cgttcagtga cgagcagga agaggtgat gtccgaagag aagaccttgt ggaggaaatc 480
 aaaaggagaa caggccagcc cctctgcatc tgetga 516

<210> 9
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> 智人

[0004] <400> 9
 Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1 5 10 15
 Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
 20 25 30
 Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
 35 40 45
 Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Ala Leu Glu Glu
 50 55 60
 Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys
 65 70 75 80
 Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala
 85 90 95
 Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn
 100 105 110
 Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile
 115 120 125
 Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr
 130 135 140
 Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile
 145 150 155 160
 Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
 165 170

<210> 10
 <211> 636
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 10
 atggcagage gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaaacttc agggagagcg cgtgcgagge 60
 etcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
 ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
 ggcacaagag actatagctc cggcgagatg gcagttcgcg agaaggtggt tgacgtaate 240
 atccgttctc tcaagcgcca cgggtgcagaa gtcattgata caccigtatt tgaactaaag 300
 gctttggagg agaagatacg gaccacggag acacaggtgc ttgtggcacc tgcacagaag 360
 aagetgctag aggaaagact aaagcttctc tcagaactgt gggatgctgg gatcaaggct 420
 gagctgctgt acaagaagaa cccaaageta ctgaaccagt tacagtactg tgaggaggca 480
 ggcateccac tgggtgctat catcgggcag caggaactca aggatggggg catcaagctc 540

cgttcagtga cgagcaggga agaggtggat gtccgaagag aagaccttgt ggaggaaatc 600
 aaaaggagaa caggccagcc cctctgcata tgctga 636

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

<400> 11
 Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1 5 10 15
 Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
 20 25 30
 Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
 35 40 45
 Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
 50 55 60
 Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
 65 70 75 80
 Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
 85 90 95
 Phe Glu Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln
 100 105 110
 Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys
 115 120 125
 Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr
 130 135 140
 Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala
 145 150 155 160
 Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly
 165 170 175
 Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg
 180 185 190
 Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
 195 200 205
 Cys Ile Cys
 210

[0005]

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物序列 hsH1-E2F1

<400> 12
 tgaactgaa ggcacagctg 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物序列 hsH1-E13R1

<400> 13
 tcttctcttc ggacatecac 20

<210> 14
 <211> 22
 <212> DNA

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物序列 rnH1-E02F1	
	<400> 14	
	aacagaagtt cgtcctcaaa ac	22
	<210> 15	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物序列 rnH1-E12J13R2	
	<400> 15	
	tecacctcctt ctctgctcgt ca	22
	<210> 16	
	<211> 60	
	<212> PRT	
	<213> 苏门达腊猩猩 (<i>Pongo abelii</i>)	
	<400> 16	
	Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile	
	1 5 10 15	
	Ile Gly Glu Gln Glu Leu Glu Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val	
	20 25 30	
	Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu	
	35 40 45	
[0006]	Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys	
	50 55 60	
	<210> 17	
	<211> 60	
	<212> PRT	
	<213> 牛 (<i>Bos taurus</i>)	
	<400> 17	
	Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Thr Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile	
	1 5 10 15	
	Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val	
	20 25 30	
	Ala Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu	
	35 40 45	
	Ile Lys Arg Arg Thr Ser Gln Pro Leu Cys Ile Cys	
	50 55 60	
	<210> 18	
	<211> 60	
	<212> PRT	
	<213> 小鼠 (<i>Mus musculus</i>)	
	<400> 18	
	Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile	
	1 5 10 15	
	Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val	
	20 25 30	
	Ala Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Gln Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu	
	35 40 45	
	Ile Arg Arg Arg Thr Asn Gln Pro Leu Ser Ile Cys	

50 55 60

<210> 19
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> 金黄地鼠 (*Mesocricetus auratus*)

<400> 19
 Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Thr Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile
 1 5 10 15
 Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val
 20 25 30
 Ala Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu
 35 40 45
 Ile Arg Arg Arg Thr Asn Gln Pro Leu Tyr Val Cys
 50 55 60

<210> 20
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> 红鳍东方鲀 (*Fugu rubripes*)

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

[0007]

<210> 21
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> 秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*)

<400> 21
 Thr Gln Phe Gln Tyr Ala Glu Glu Arg Arg Ile Pro Leu Ala Ile Val
 1 5 10 15
 Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Val Lys Leu Arg Asn Val
 20 25 30
 Val Thr Arg Asp Glu Gln Thr Ile Lys Leu Asp Gln Leu Ile Thr Ala
 35 40 45
 Val Arg Asp Thr Leu Ala Ala Leu
 50 55

<210> 22
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> 盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*)

<400> 22
 Ala Gln Leu Asn Thr Ala Asp Glu Ser Asn Ile Pro Leu Ile Ile Ile
 1 5 10 15
 Ile Gly Lys Ser Glu Val Glu Thr Asn Ser Leu Ser Val Lys Thr Met
 20 25 30
 His Asp Arg Lys Gln Val Ser Ile Glu Arg Ser Asn Phe Thr Val Lys
 35 40 45
 Ile Lys Glu Ile Leu Ser Thr Ile Pro Lys

50 55

<210> 23
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> 粳稻 (Oryza sativa subsp. japonica)

<400> 23
 Asn His Leu Lys Tyr Ala Thr Gln Ser Gly Ile Pro Trp Met Val Leu
 1 5 10 15
 Val Gly Glu Ser Glu Ile Ser Ser Gly Lys Val Lys Leu Lys Asn Leu
 20 25 30
 Ala Ala Ser Gln Glu Glu Glu Val Asp Arg Thr Glu Phe Ala Gln Val
 35 40 45
 Leu Lys Gln Lys Leu Arg Asn Pro
 50 55

<210> 24
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 24
 aagtcattga tacacctgta ttggaactaa aggaacact gatgggaaag tat 53

<210> 25
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人

[0008]

<400> 25
 Glu Val Ile Asp Thr Pro Val Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly
 1 5 10 15
 Lys Tyr

<210> 26
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 26
 gtcattgata cacctgtatt tgaactaaag gctttggagg agaagatacg gaccacggag 60
 ac 62

<210> 27
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 27
 ggaacagaga ctagaggctt tggaggagaa gatacggace acggagaca 49

<210> 28
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 28
 Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr
 1 5 10 15

<210> 29
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 29
 [0009] Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile
 1 5 10 15
 Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val
 20 25 30
 Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu
 35 40 45
 Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
 50 55 60

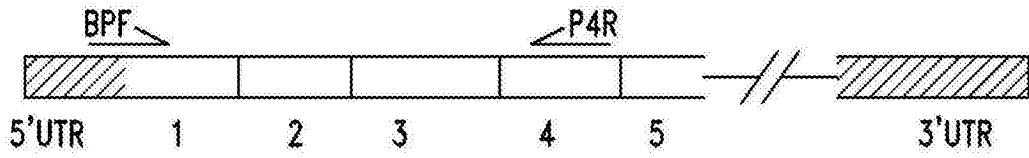


图1A

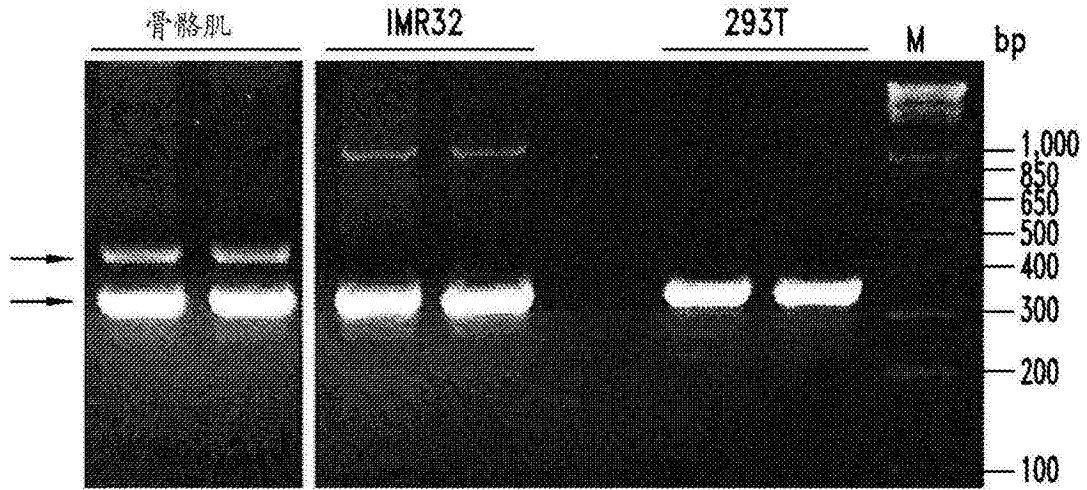


图1B

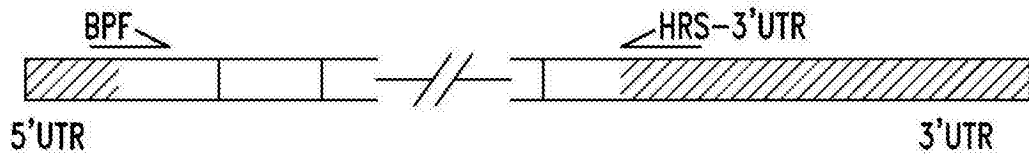


图2A

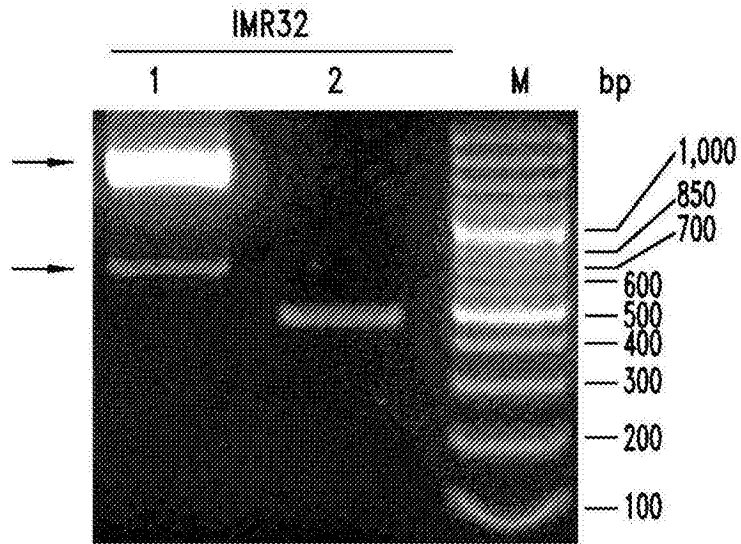


图2B

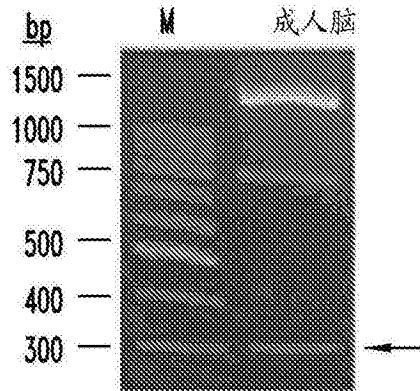


图2C

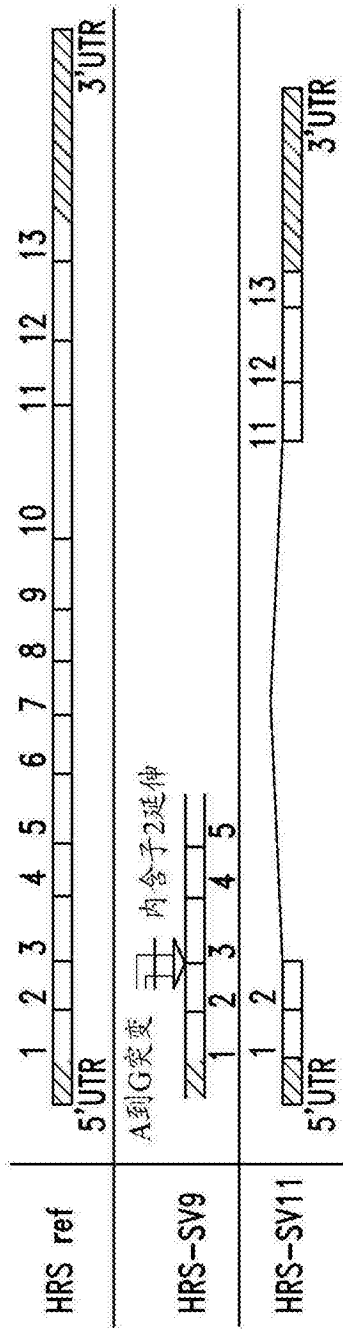


图3A

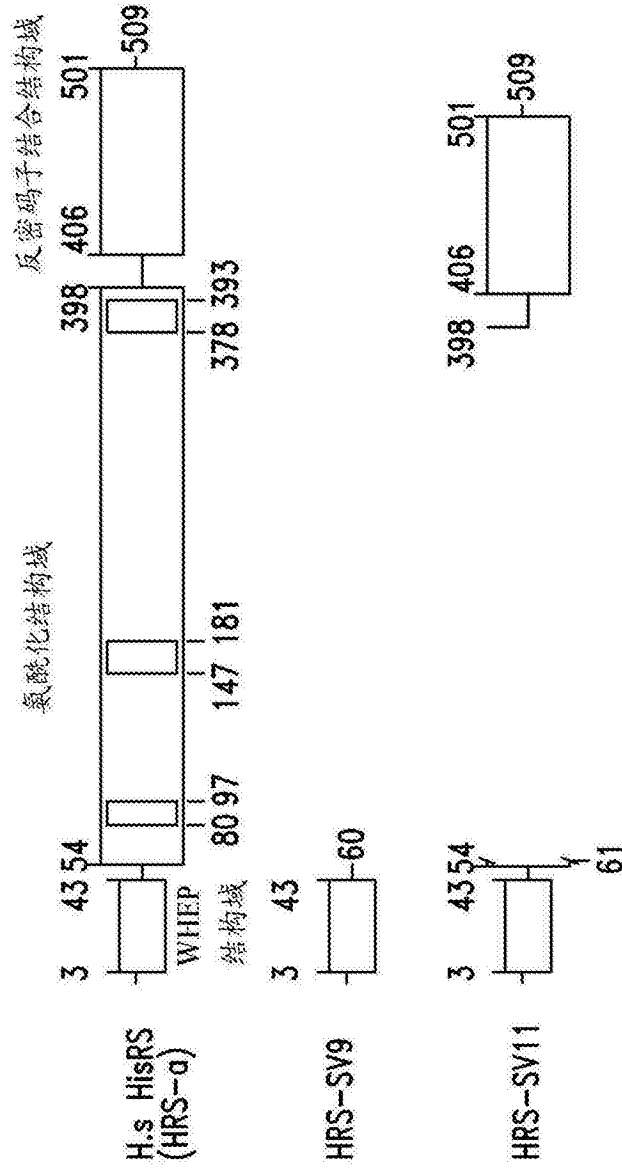


图3B

HRS-SV9:
 1ATGGCAGAGCGTGGCGCGCTGGAGGAGCTGGTGA AACTTCAGGGAGAGCGCGTGGAGGGCTCAAGCAGCAGA
 AGGCCAGCGCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTGATGA
 AAGCAAACAGAAATTTGTGCTCAAAACCCCAAGTAG⁶⁵

HRS-SV11:
 1ATGGCAGAGCGTGGCGCGCTGGAGGAGCTGGTGA AACTTCAGGGAGAGCGCGTGGAGGGCTCAAGCAGCAGA
 AAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTCCTGAAACTGAAG
 GCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTGCTCAAAACCCCAAGGCTTTGGAGG
 AGAAGATACGGACCACGGAGACACAGGTGCTTGTGGCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGG
 AAAGACTAAAGCTTGTCTCAGA AACTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAA
 GAACCCAAAGCTACTGAACCAAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCA TCCCACTGGTGGCTATC
 ATCGGCGAGCAGGA AACTCAAGGATGGGGTCA TCAAGCTCCGTT CAGTGACGAGCAGGGAAGAG
 GTGGATGTCCGAAGAGAAGACCTTGTGGAGGAAATCAA AAGGAGAACAGGCCAGCCCTCTGC
 ATCTGCTGA⁶⁶

HRS-SV14:
 1ATGGCAGAGCGTGGCGCGCTGCAGGAGCTGGTGA AACTTCAGGGAGAGCGCGTGGAGGGCTCAAGCAGCAGA
 AGGCCAGCGCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTGATGA
 AAGCAAACAGAAATTTGTGCTCAAAACCCCAAGGGCACAAGAGACTATAGTCCCCGGCAGATGGCAGTTCGGG
 AGAAGGTGTTTGACCTAATCATCCGTTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAGAAGTFCATTGATACACCTGTATTTGAA
 CTAAAGGCTTTGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAGACACAGGTGCTTGTGGCATCTGCACAGAAGAAGCTGC
 TAGAGGAAAGACTAAAGCTTGTCTCAGA AACTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGAA
 CCCAAAGCTACTGAACCAAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCA TCCCACTGGTGGCTATCATCGGCGAGCAGG
 AACTCAAGGATGGGGTCA TCAAGCTCCGTT CAGTGACGAGCAGGGAAGAGCTGGATGTCCGAAGAGAAGACCT
 TGTGGAGGAAATCAA AAGGAGAACAGGCCAGCCCTCTGCATCTGCTGA⁶⁷

图3C

HRS-SV9:
 1MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPD ESKQK FVLKTPK⁶⁸

HRS-SV11:
 1MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPD ESKQK FVLKTPKALEEK IRTTETQV LVAS
 AQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAE LLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAHGEQELKDGVIKLSVTSREEVDVRREDL
 VEEIKRRRTGQPLCIC¹⁷¹

HRS-SV14:
 1MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPD ESKQK FVLKTPKGTDRDYSRQMAVREKY
 FDVHIRCFKRHGA EVIDTPVPELKALEEK IRTTETQV LVASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAE LLYKKNPKLLNQLQ
 YCEEAGIPLVAHGEQELKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRRTGQPLCIC²¹²

图3D

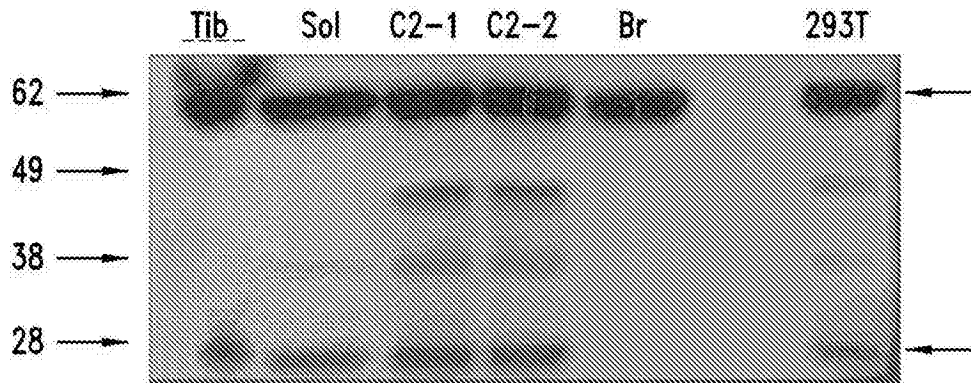


图4A

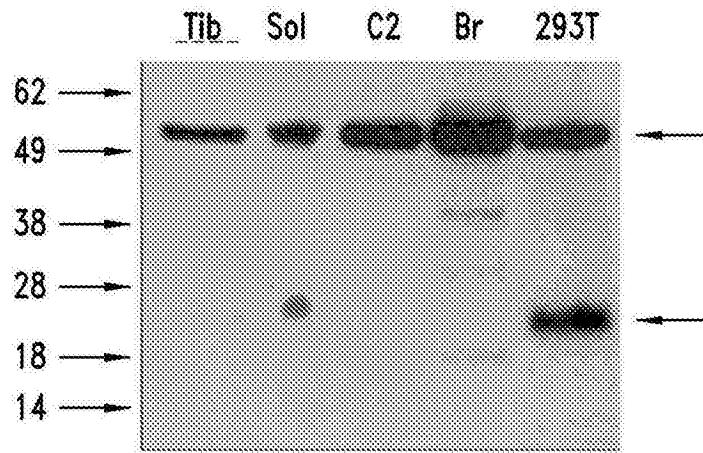


图4B

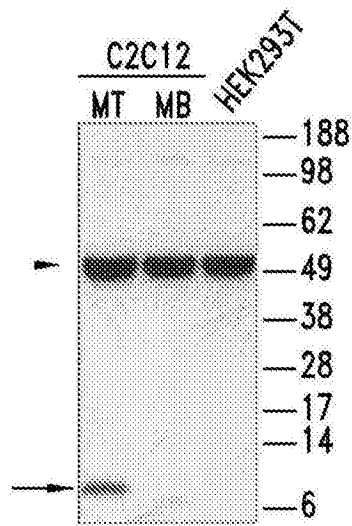


图5A

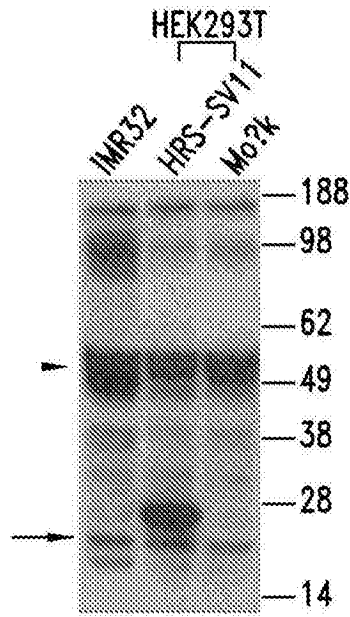


图5B

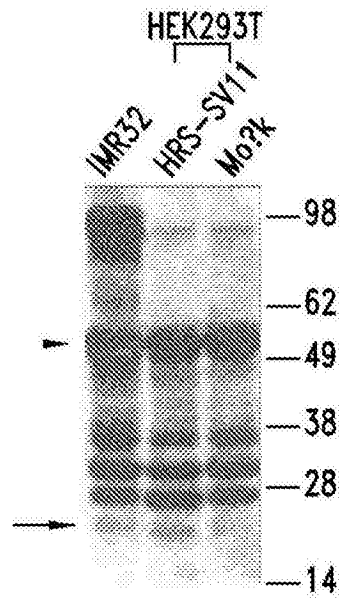


图5C

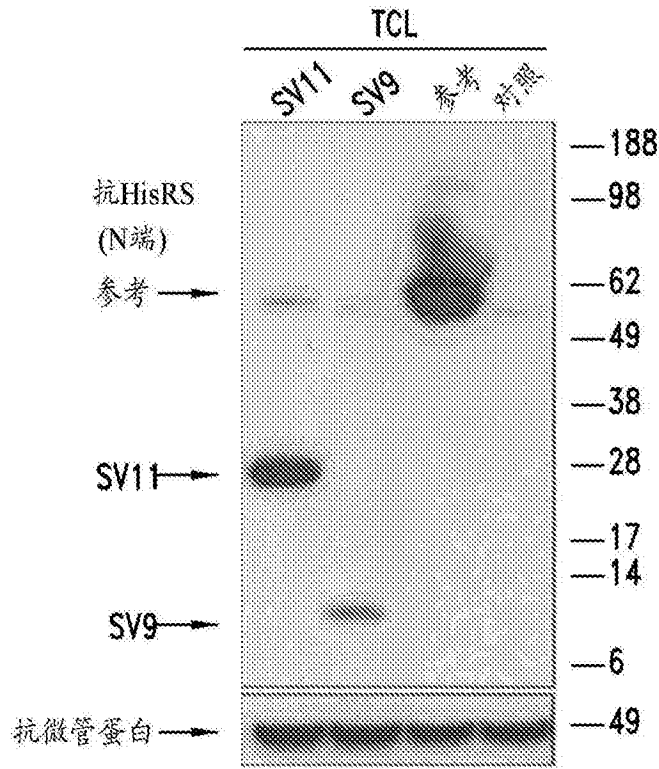


图6A

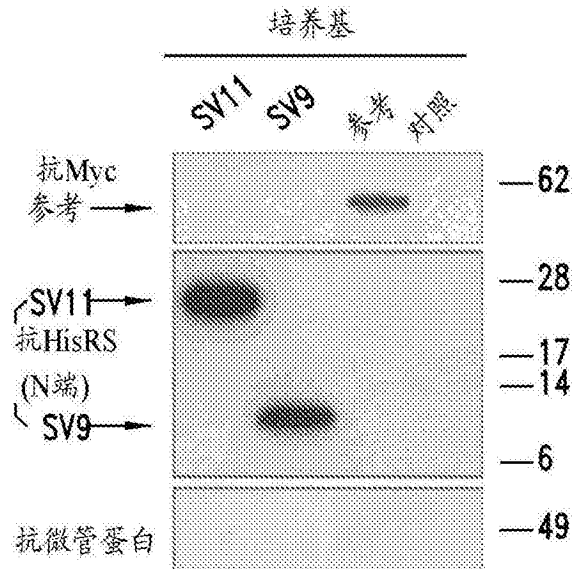


图6B

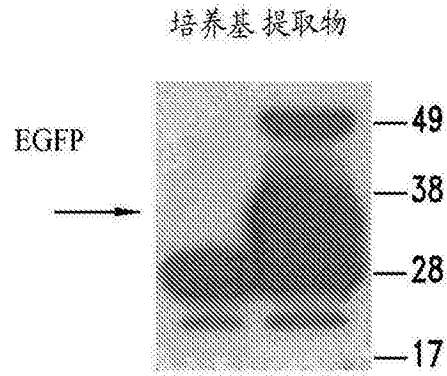


图6C

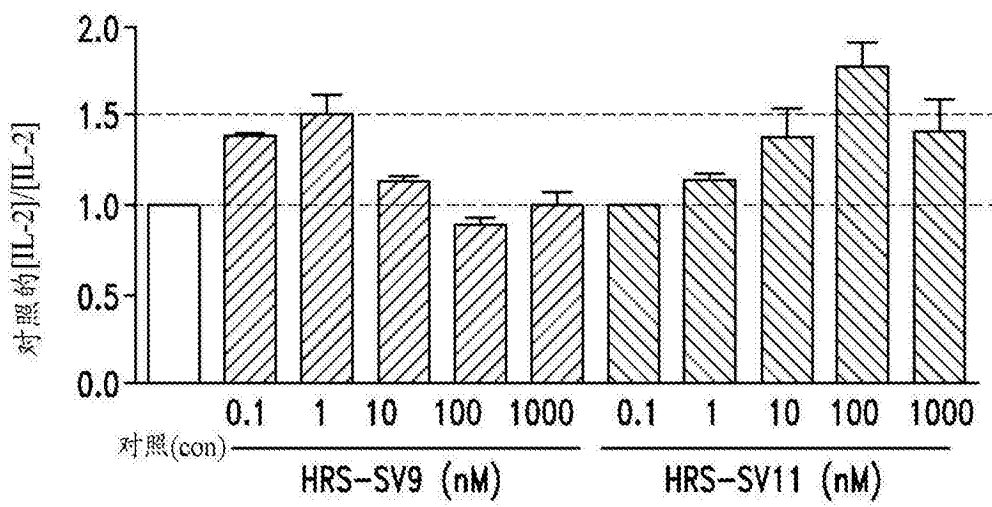


图7

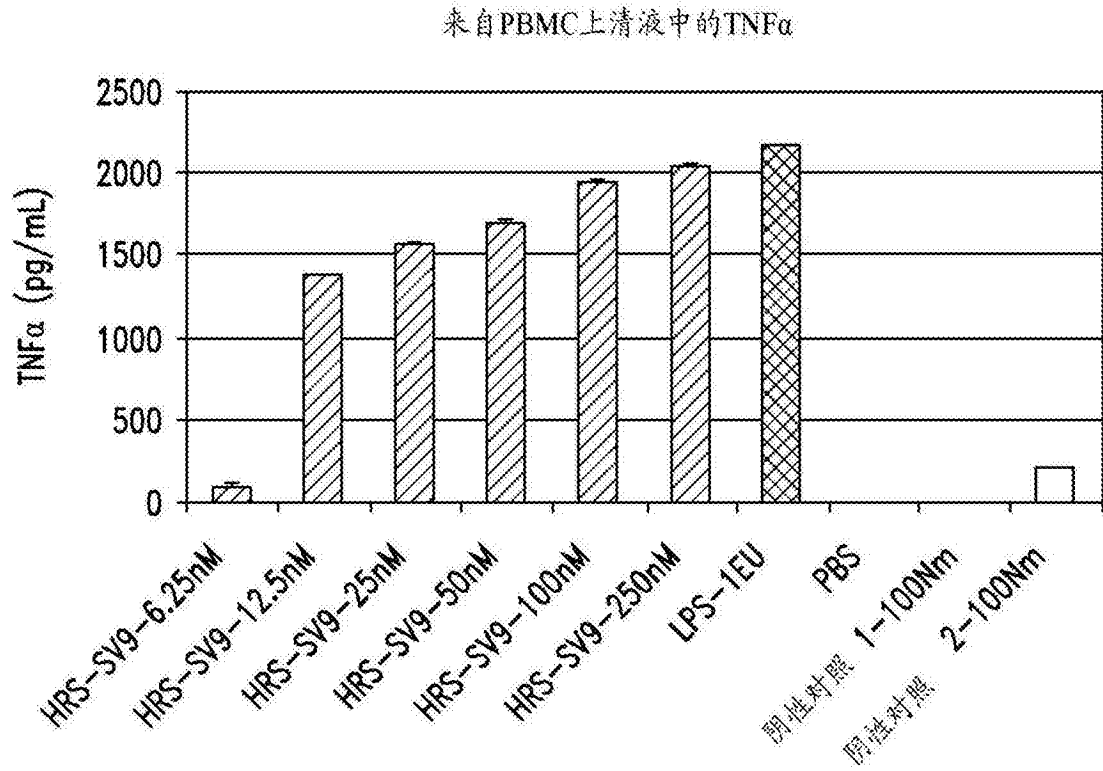


图8

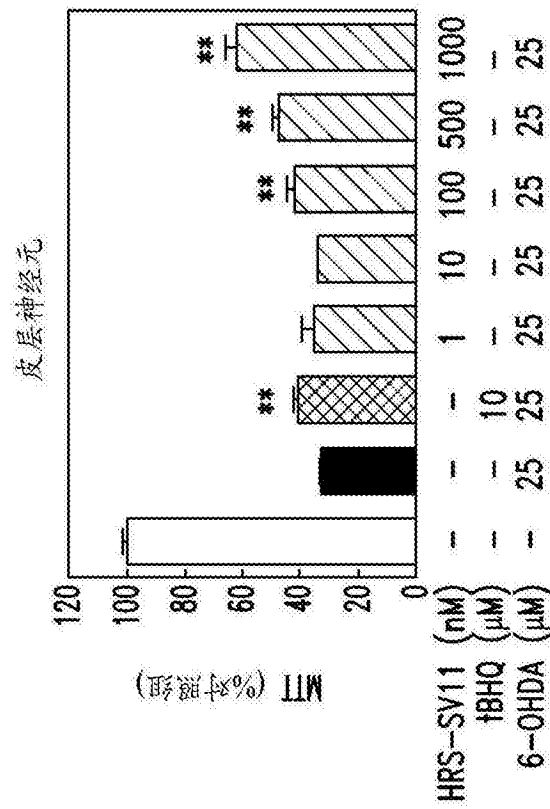


图9A

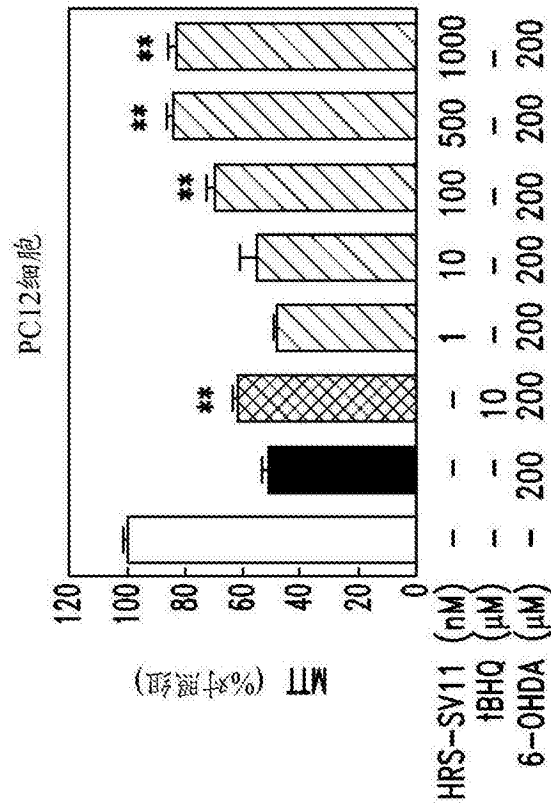


图9B

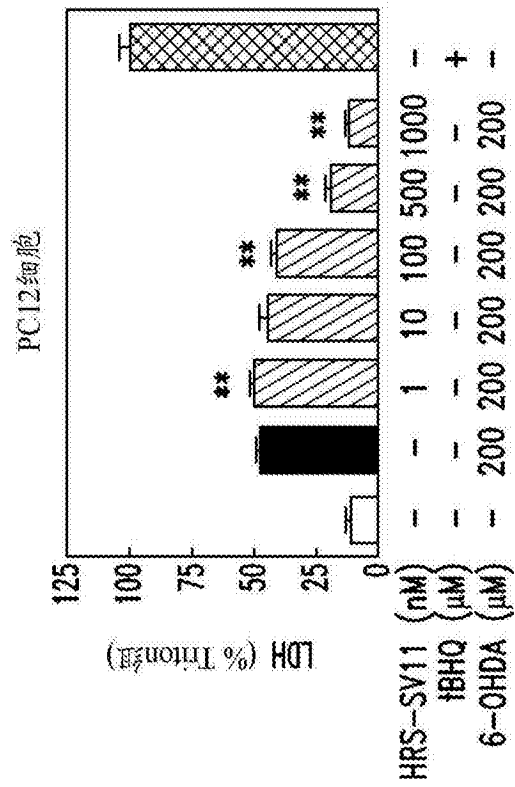


图9C

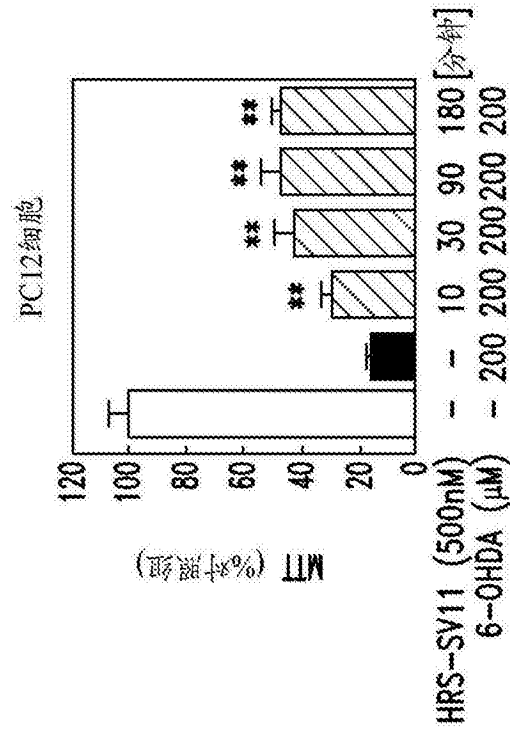


图9D

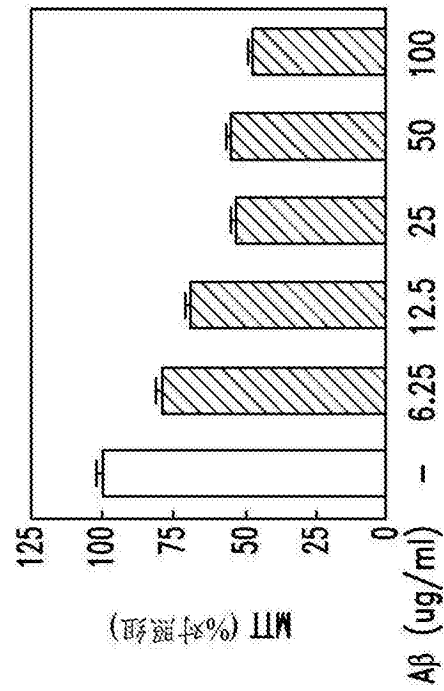


图10A

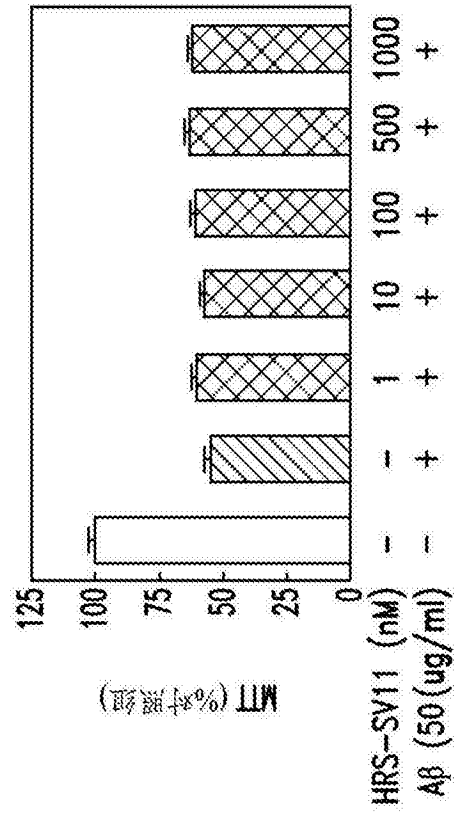


图10B

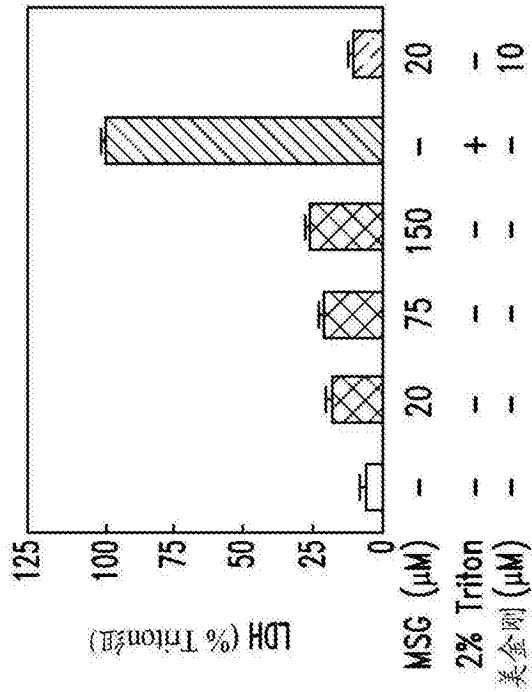


图10C

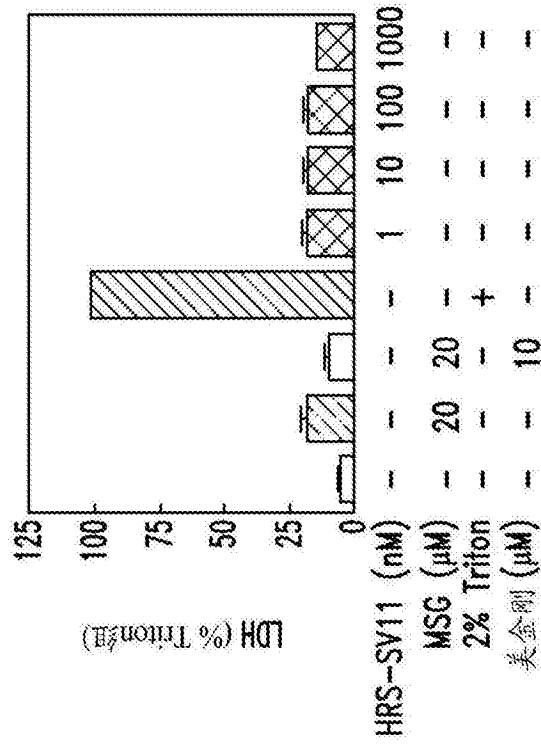


图10D

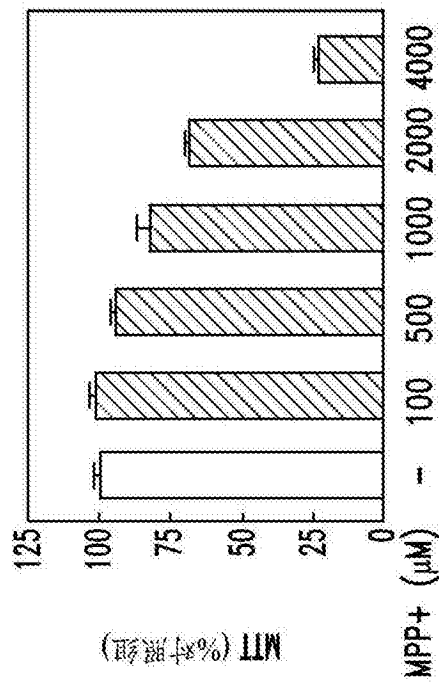


图10E

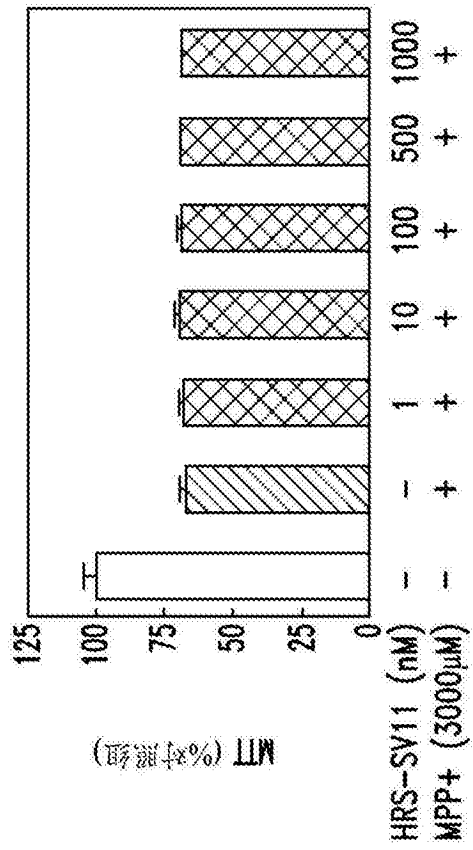


图10F

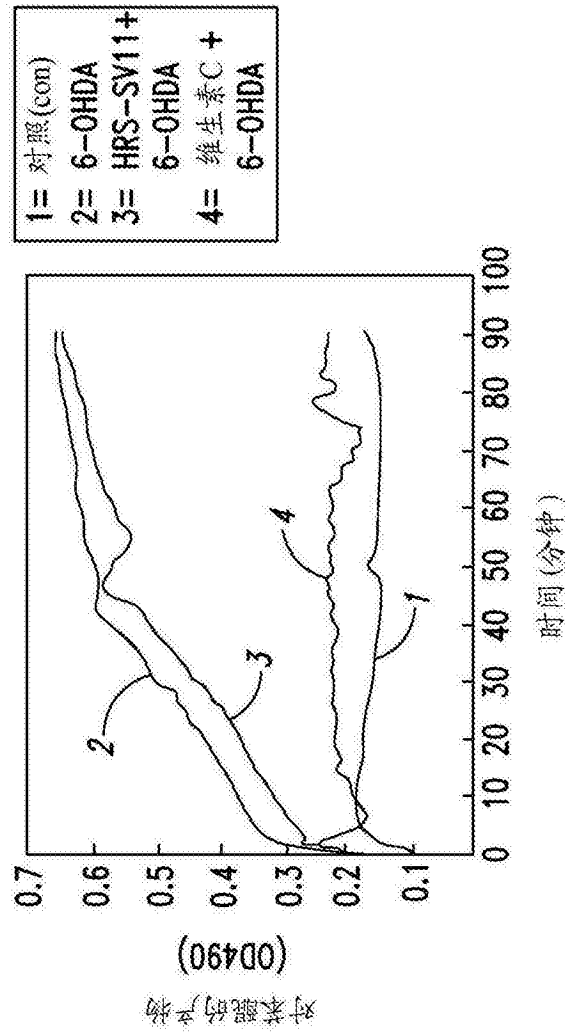


图11A

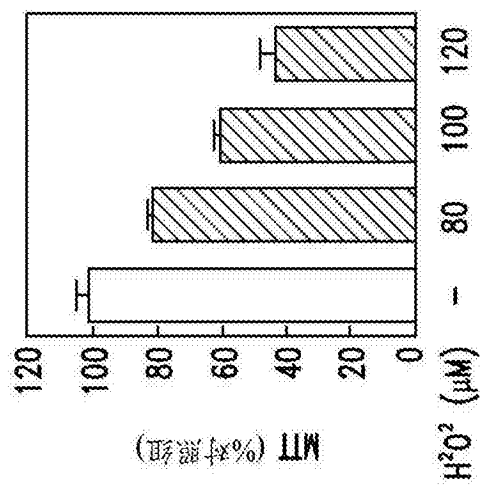


图11B

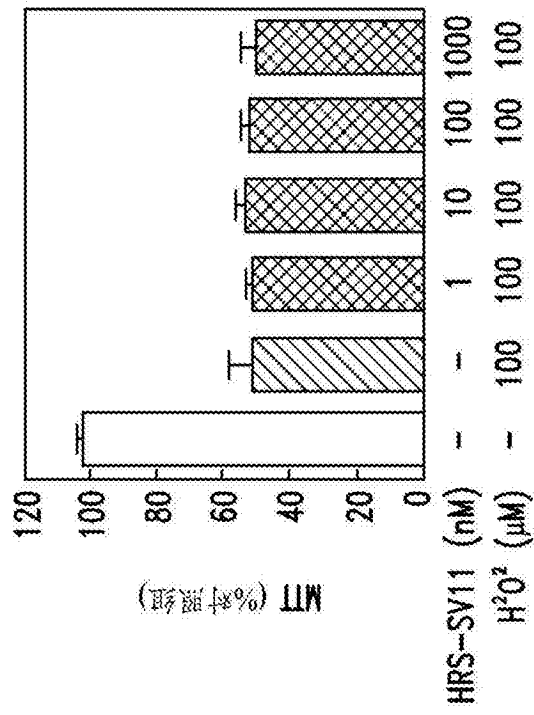


图11C

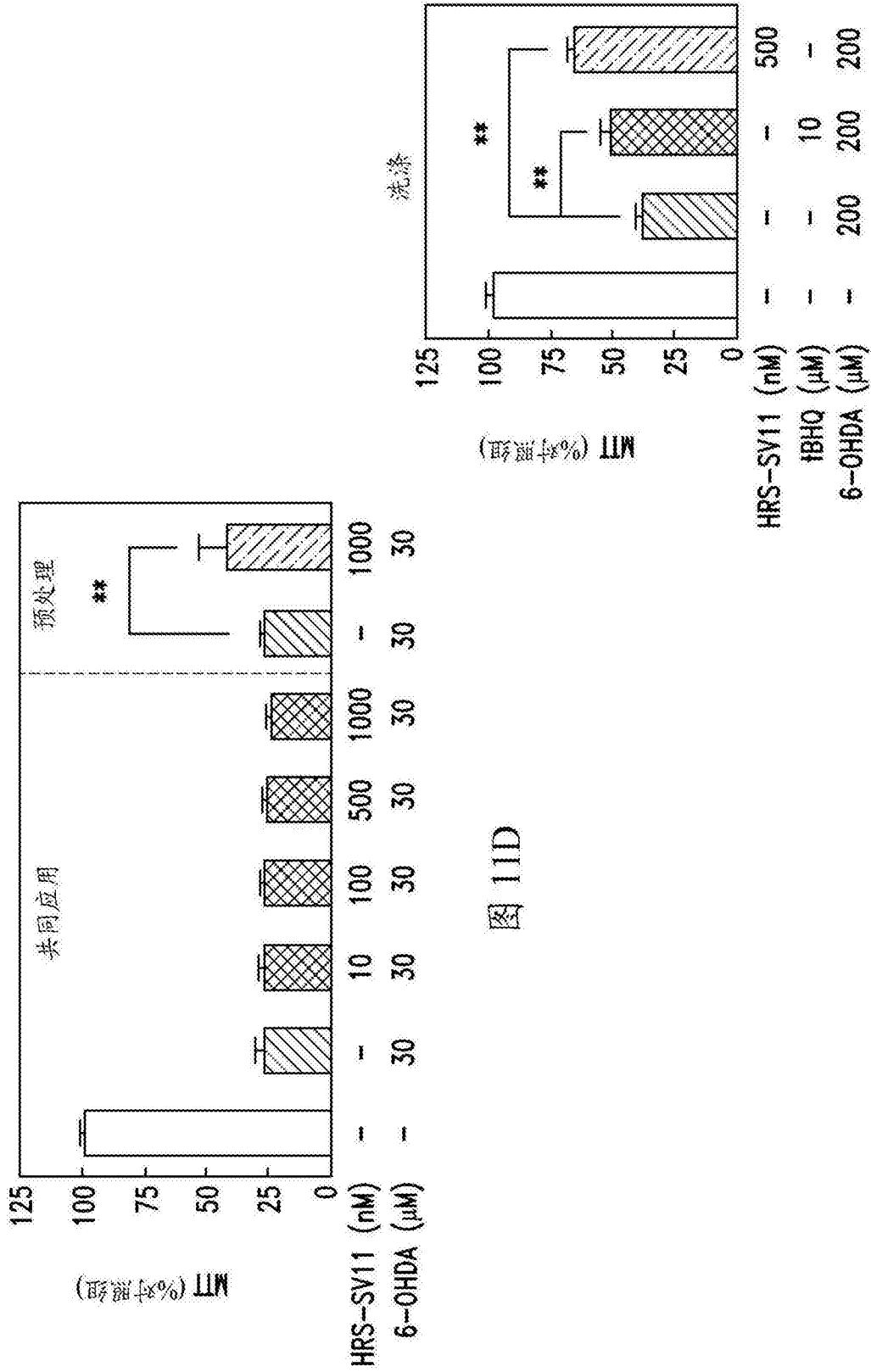


图 11D

图 11E

图11D图11E

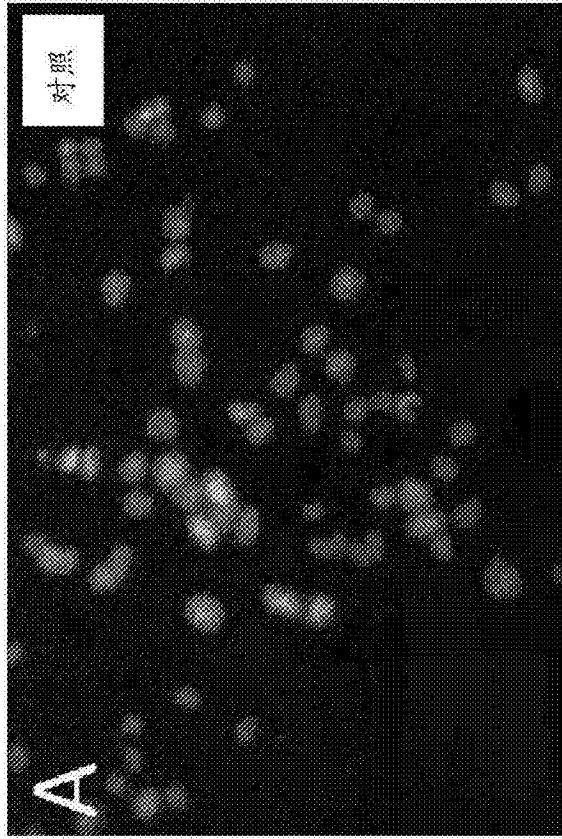


图12A

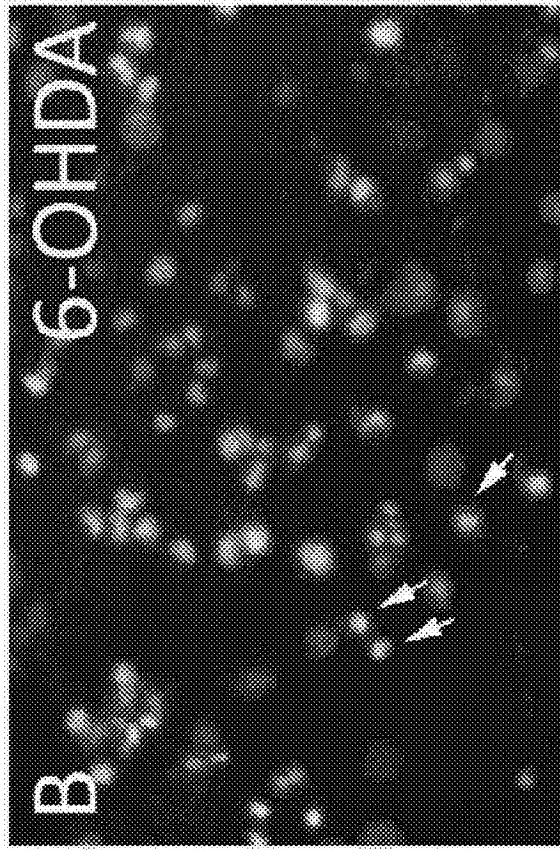


图12B

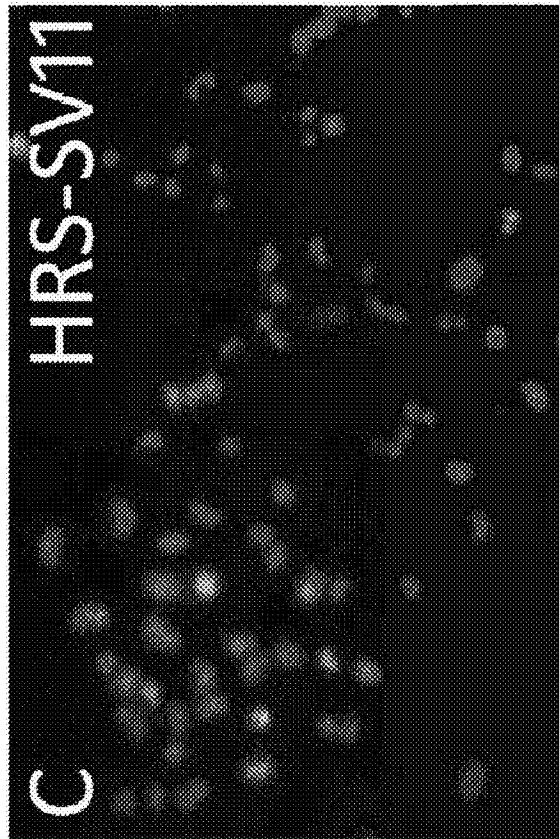


图12C

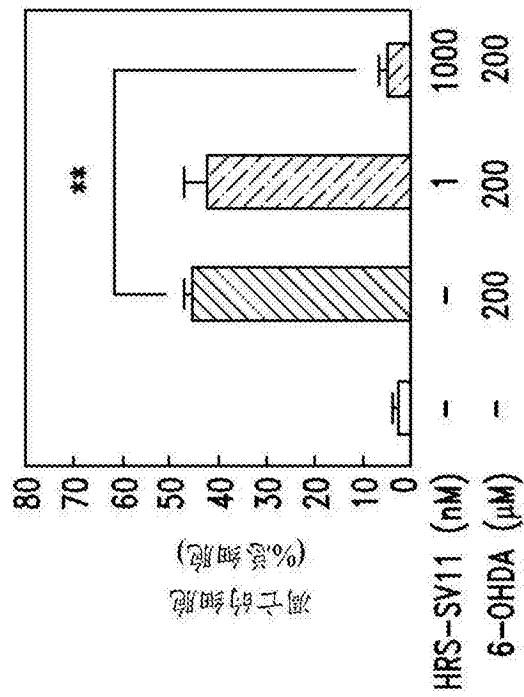


图12D

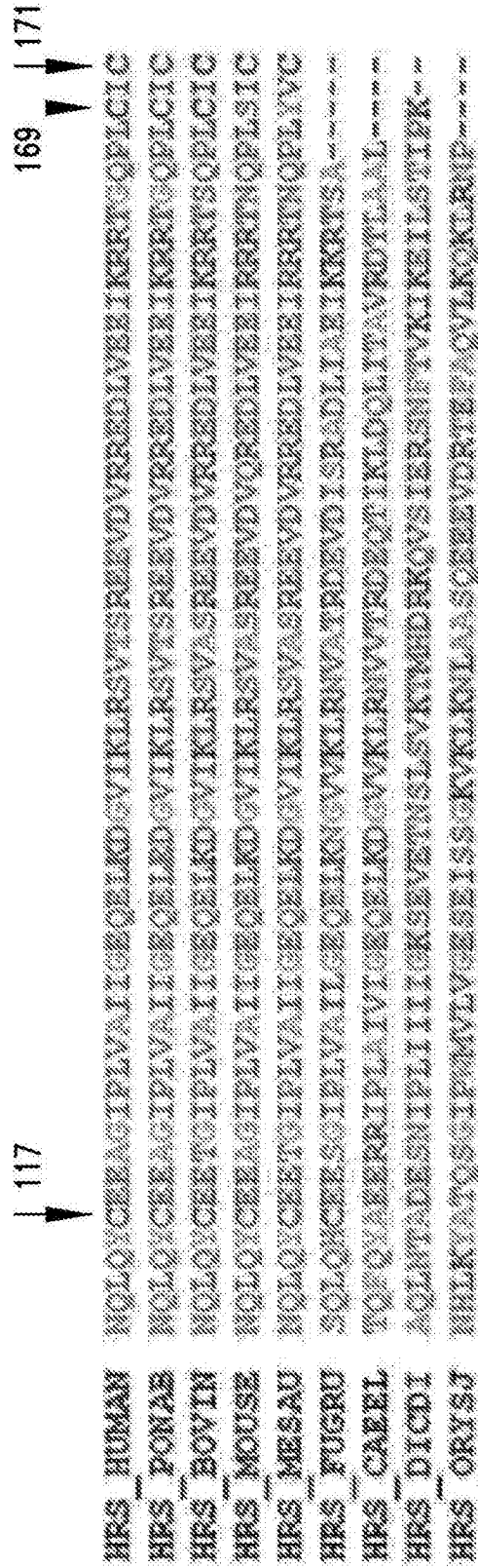


图13A

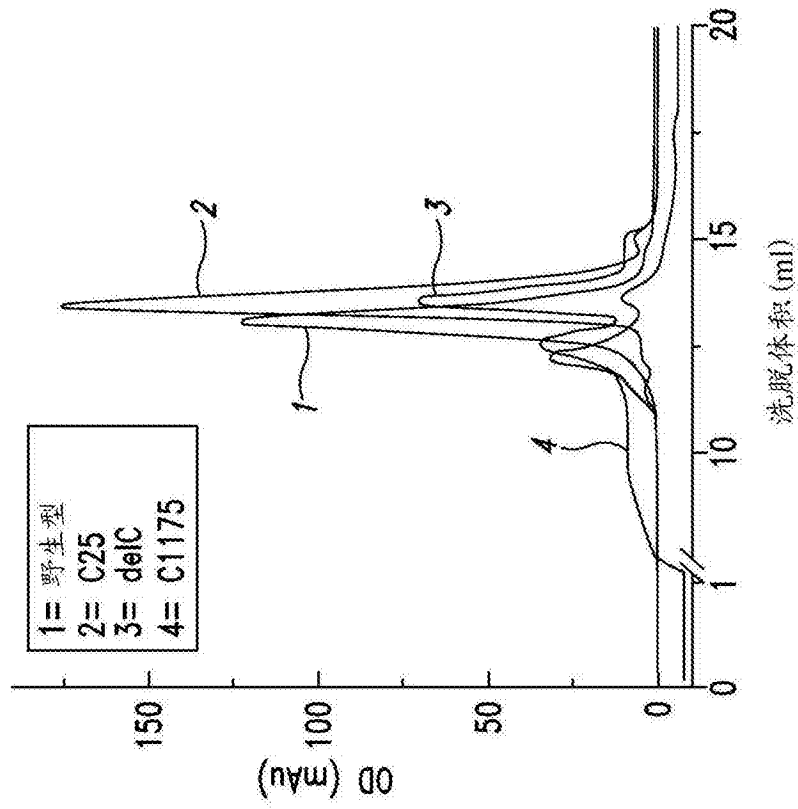


图13B

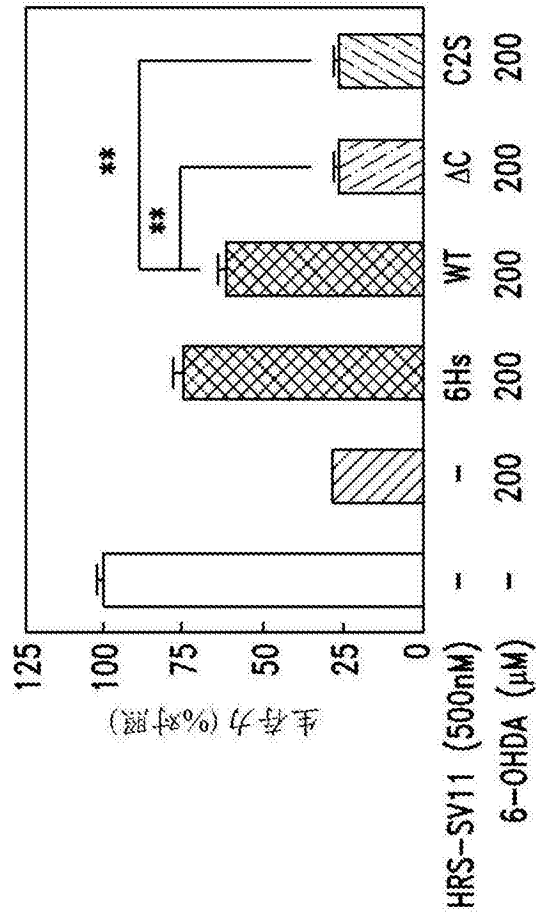


图13C

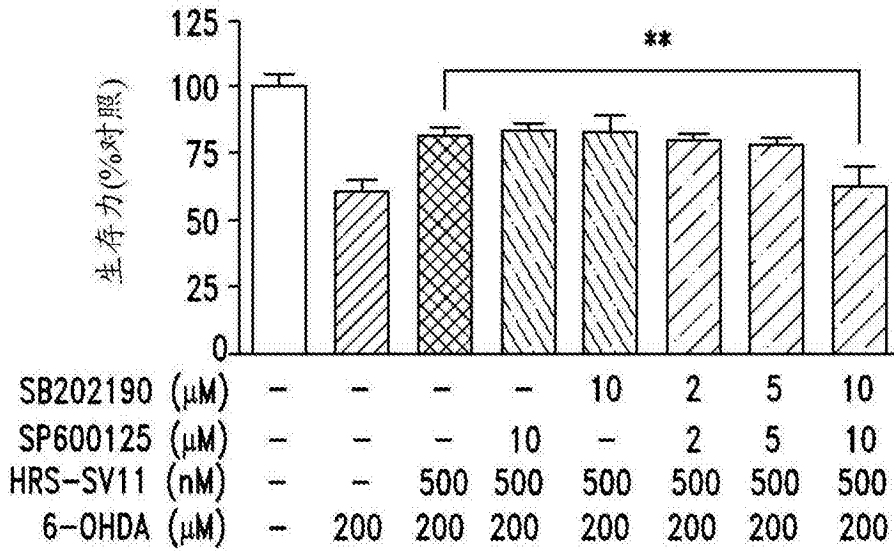


图14A

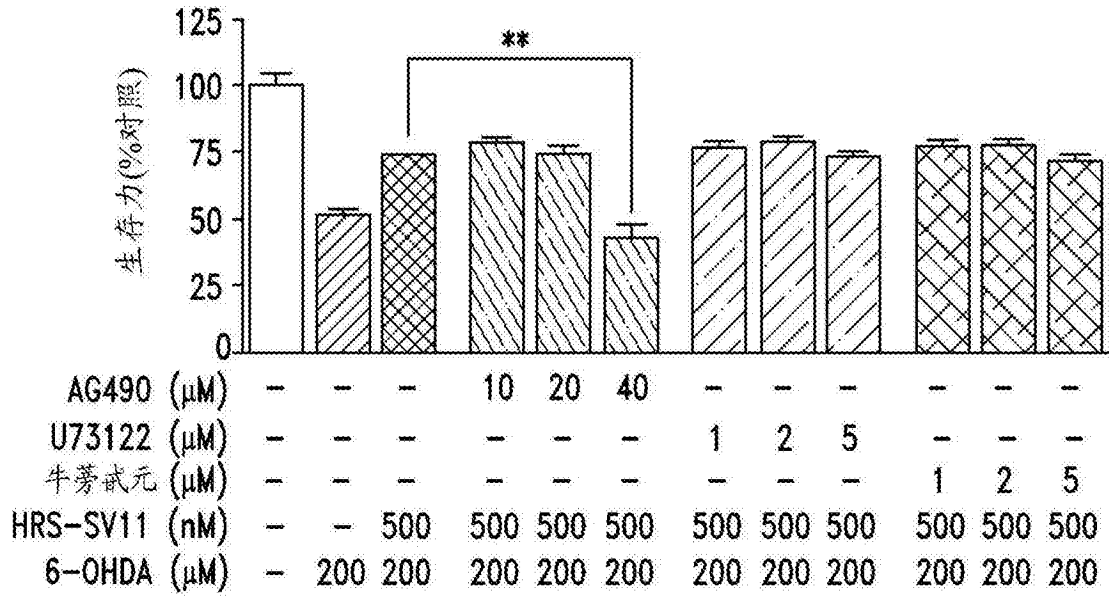


图14B

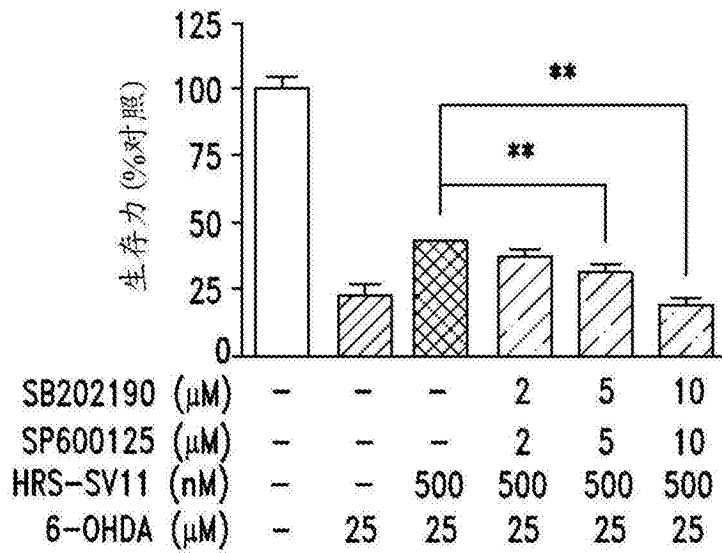


图14C

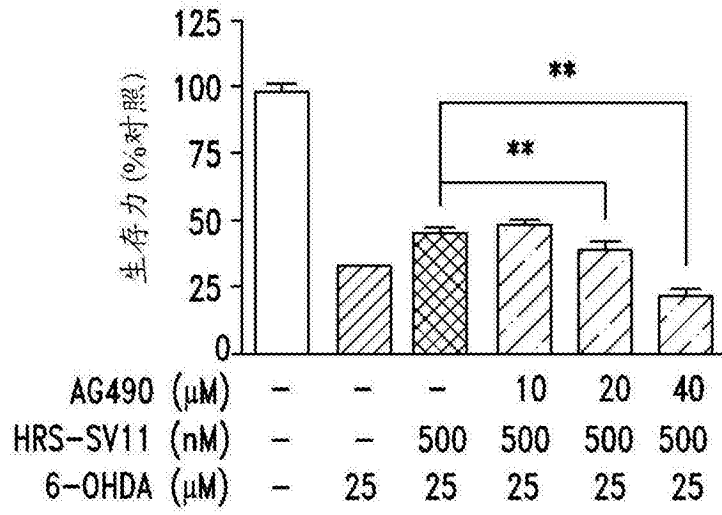


图14D

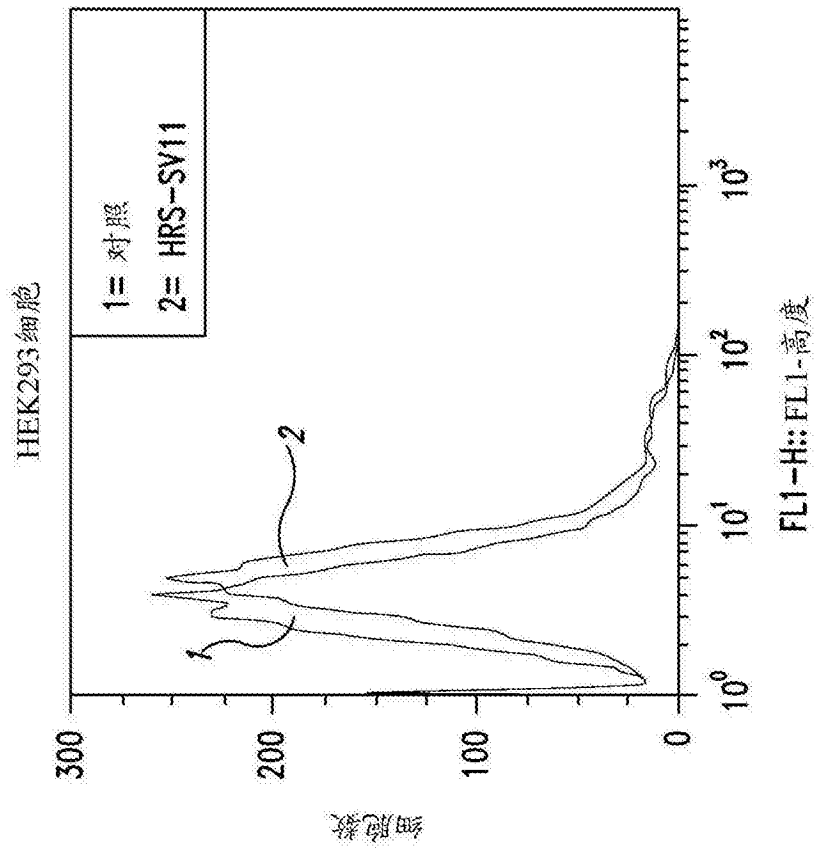


图15A

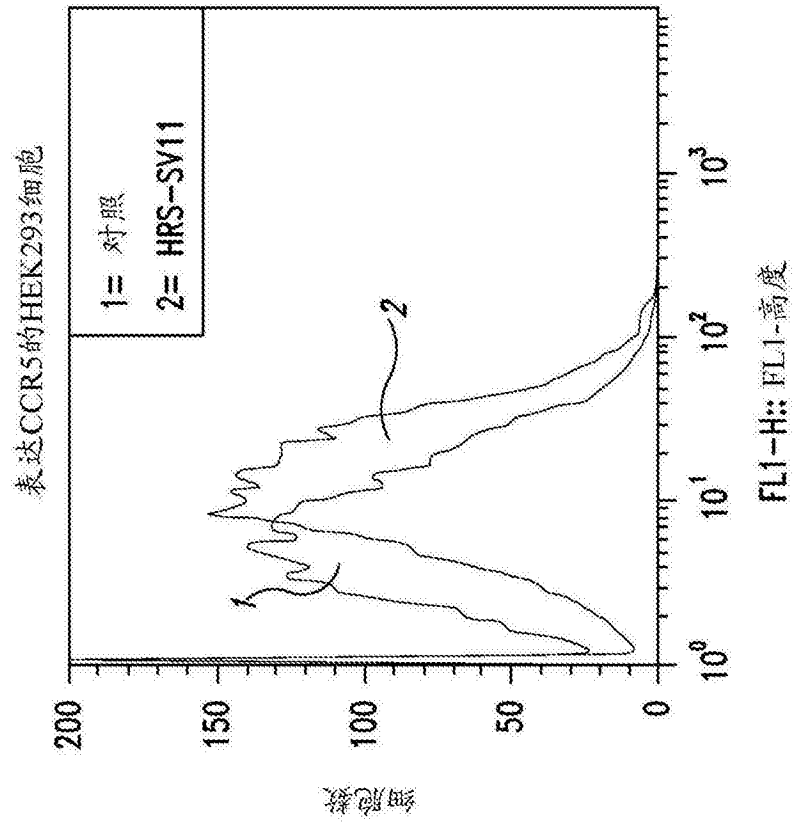


图15B

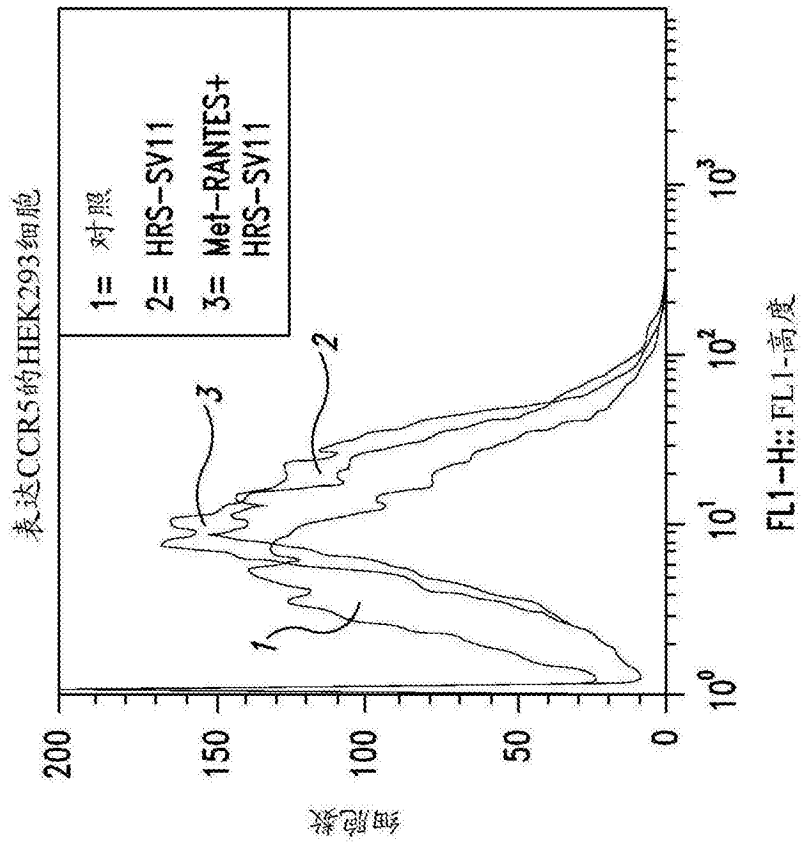


图15C

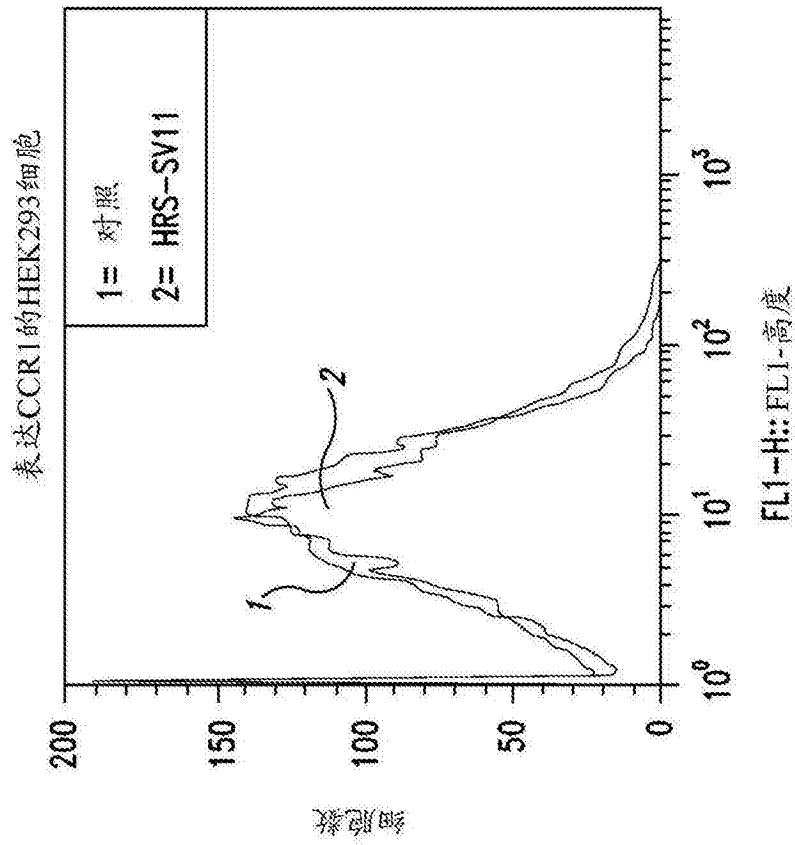


图15D

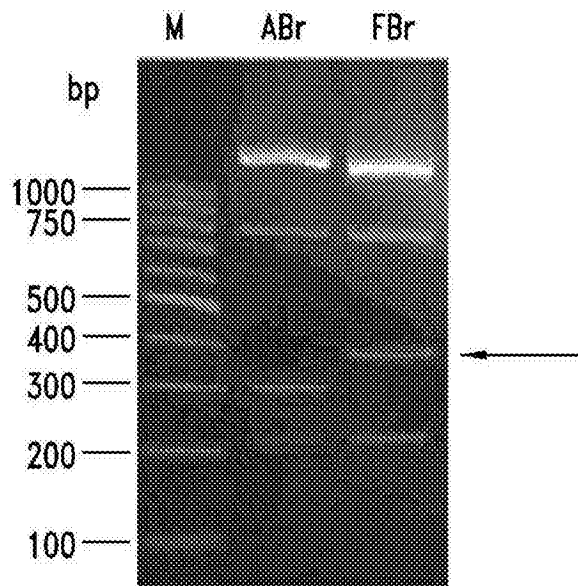


图16A

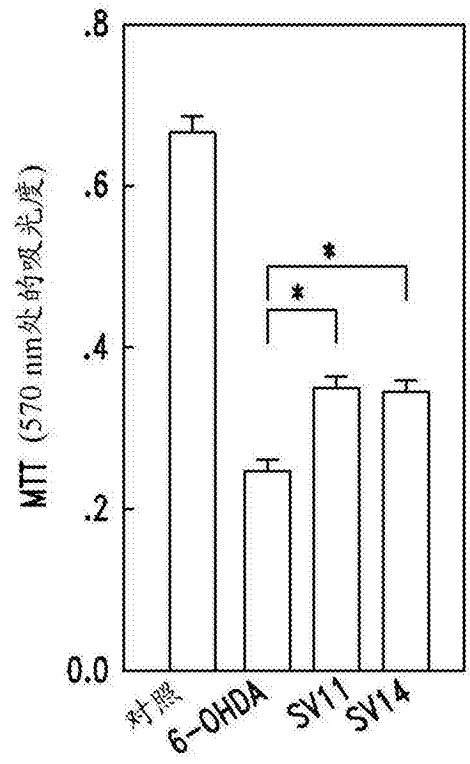


图16D

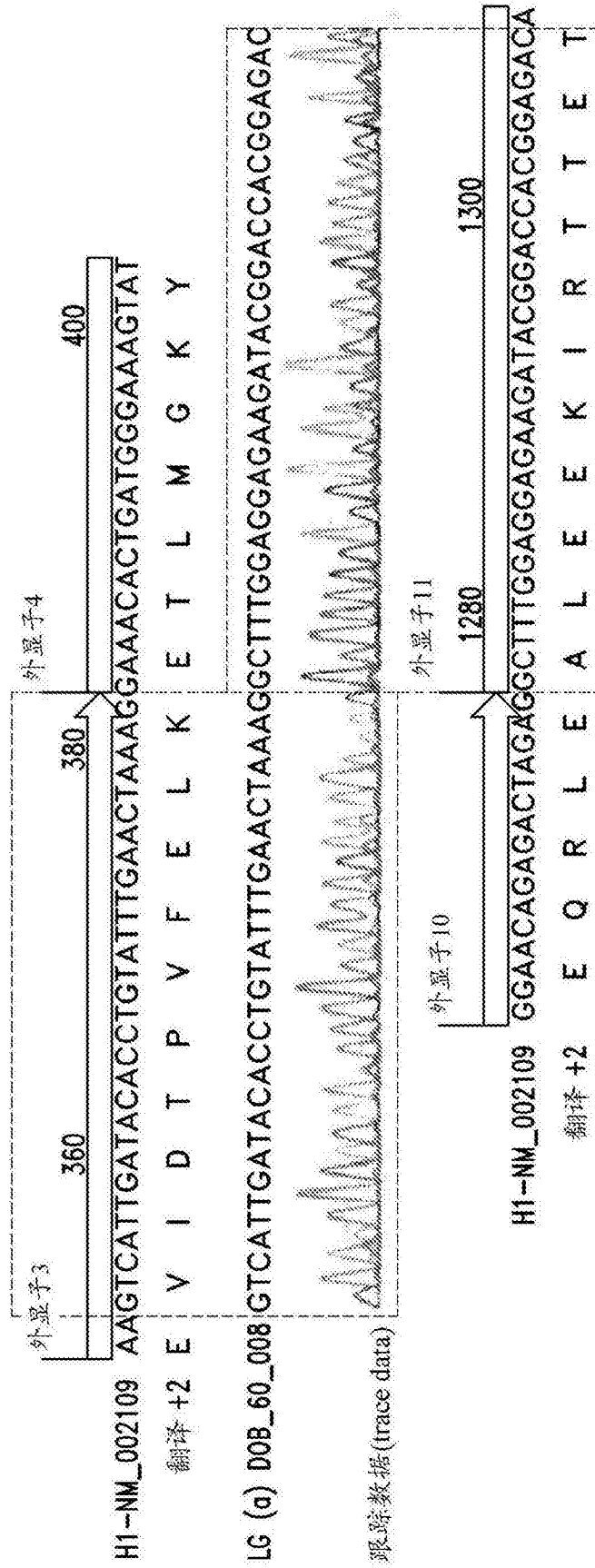


图16B

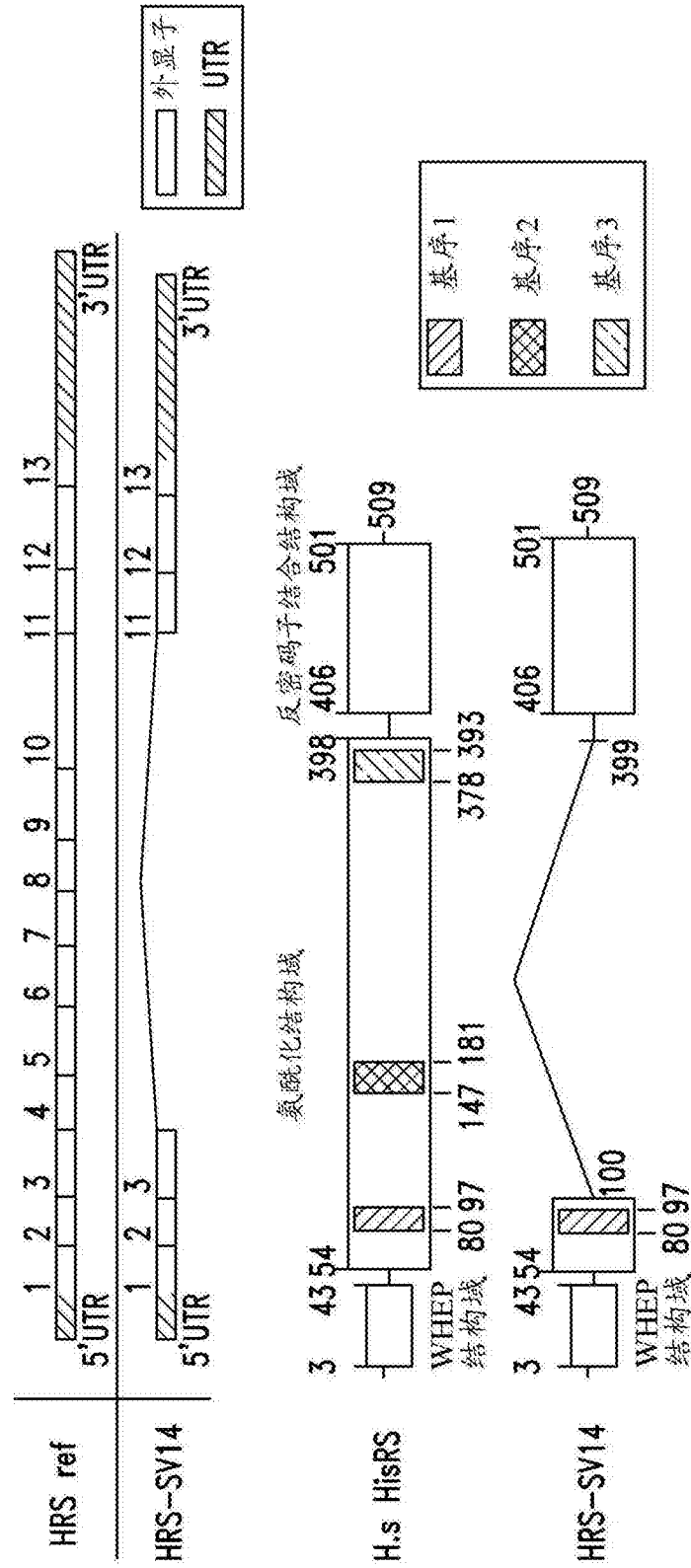


图16C

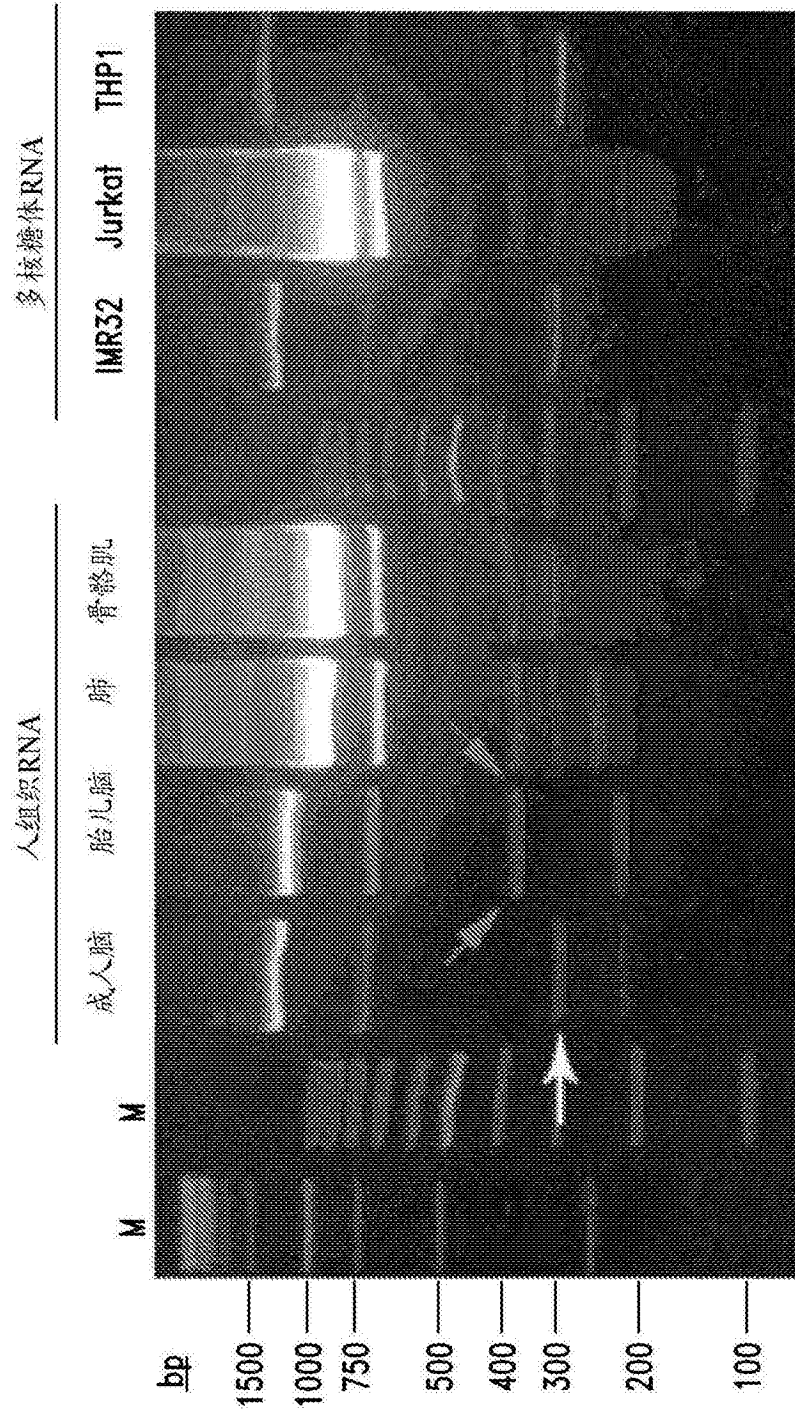


图17

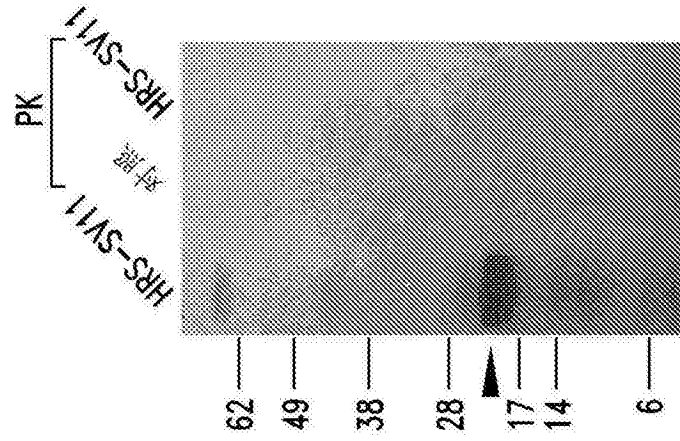


图18A

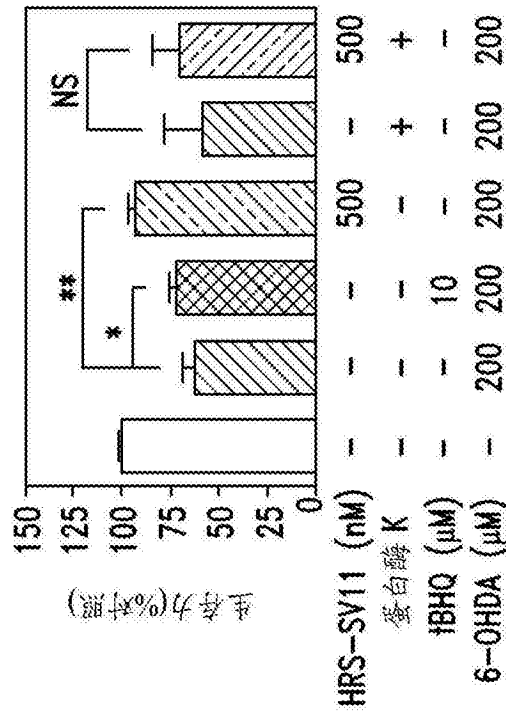


图18B

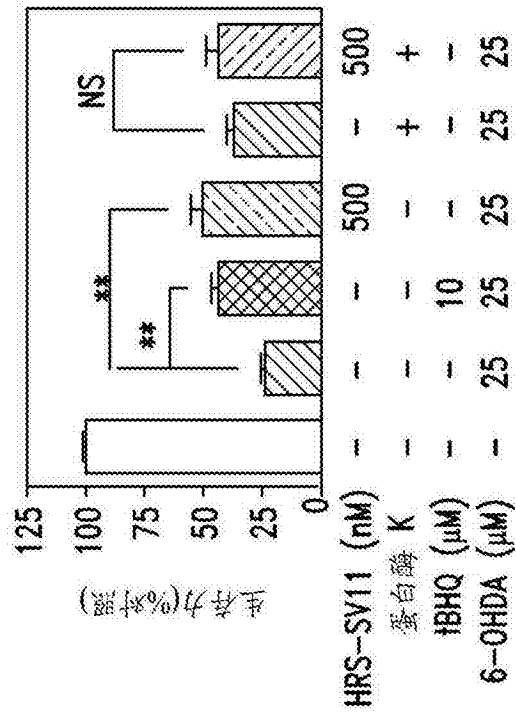


图18C

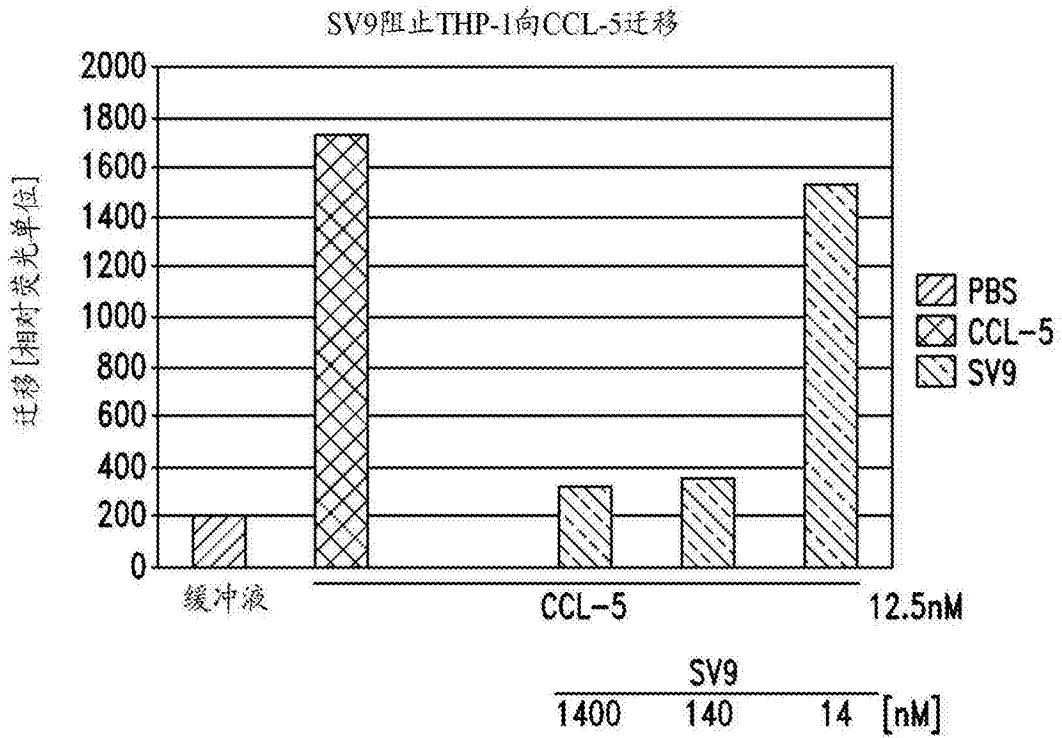


图19

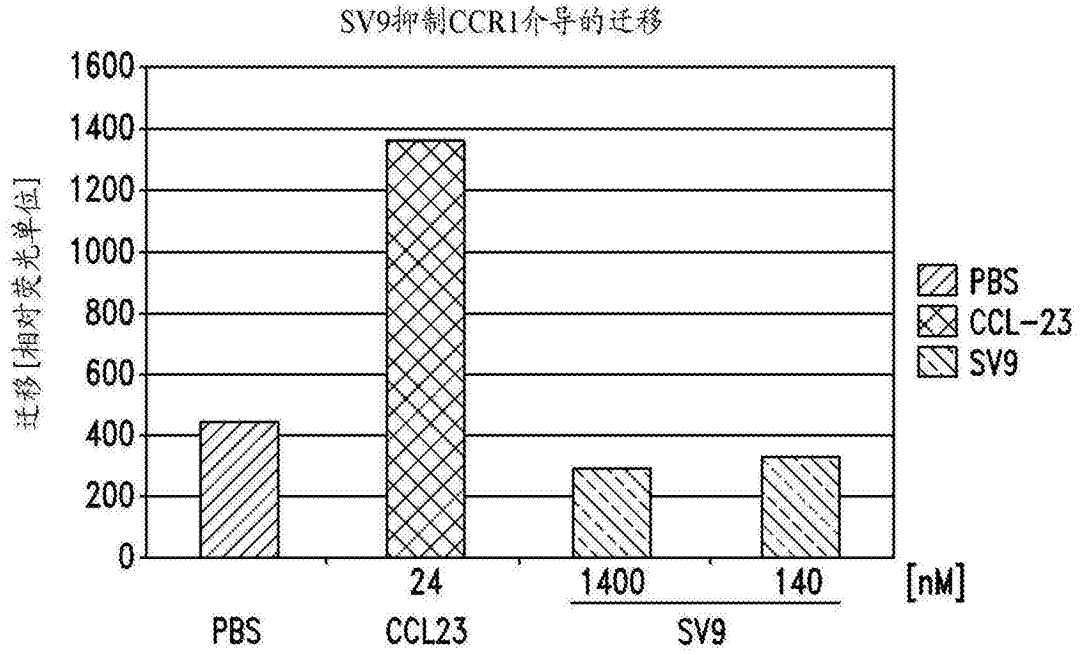


图20

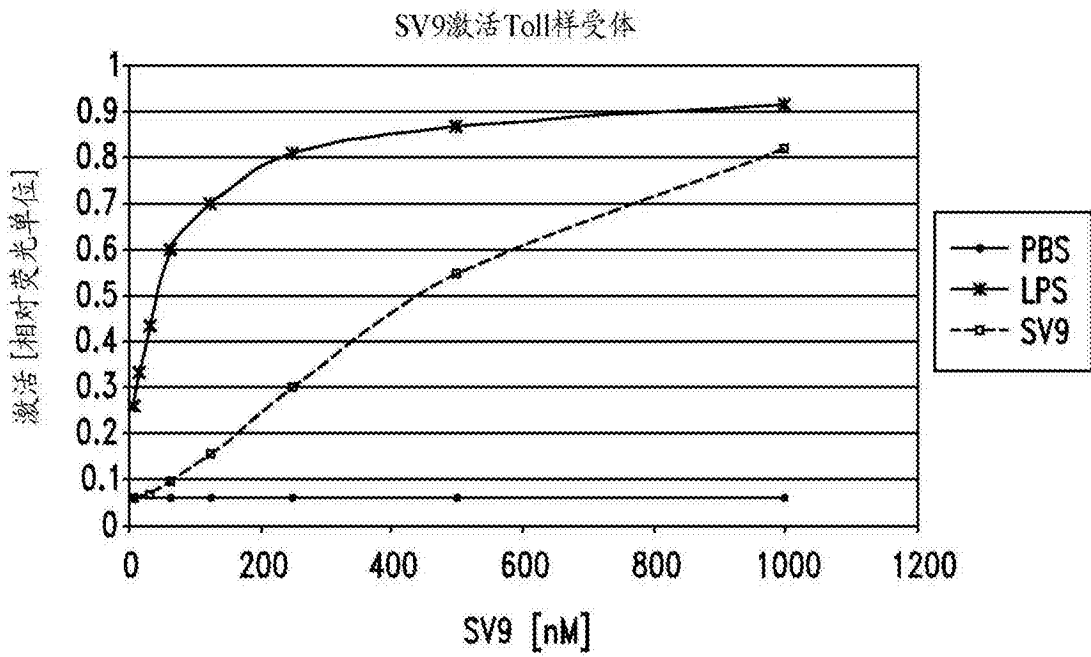


图21

HRS-SV9优先结合TLR-4

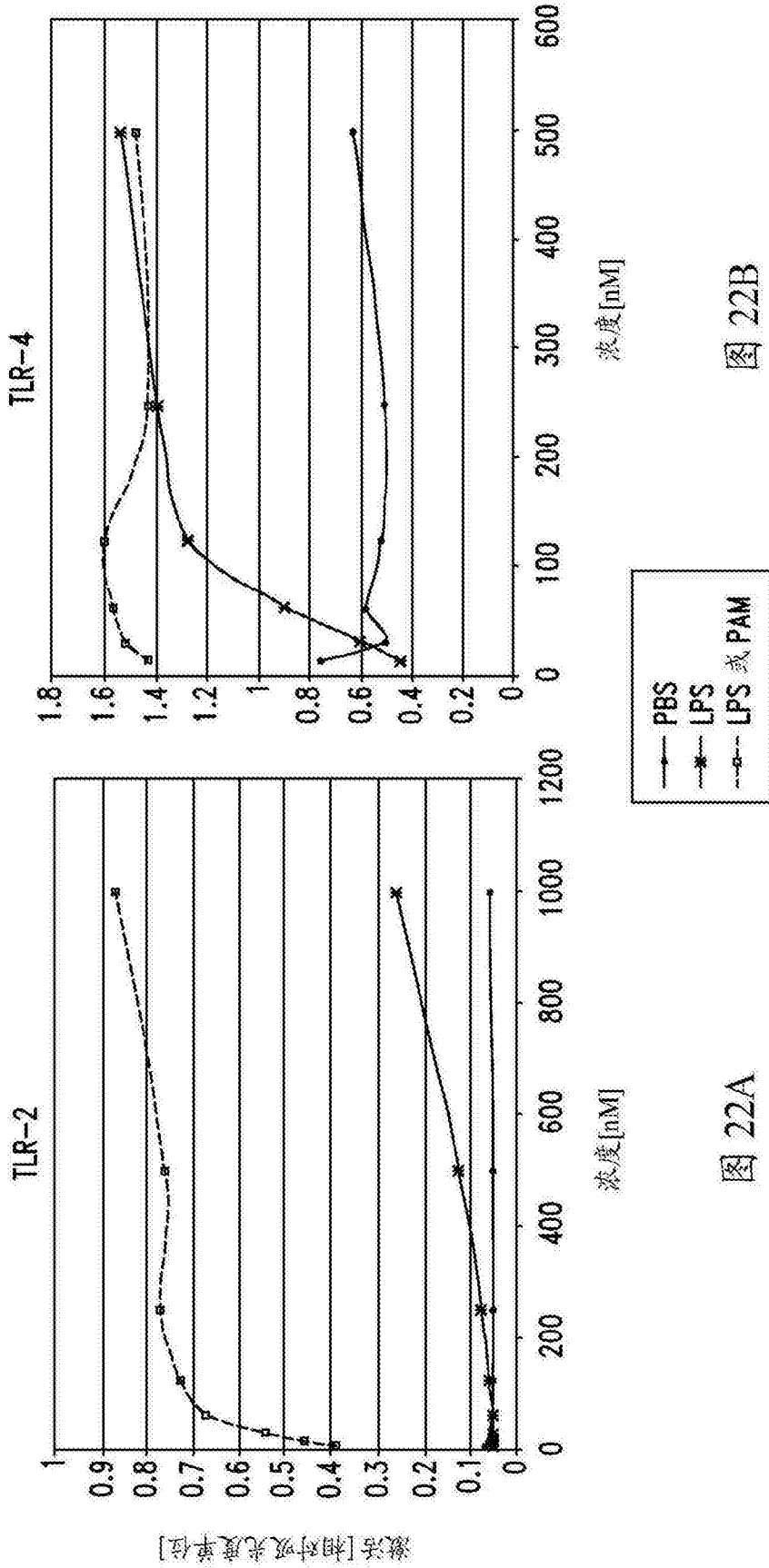


图 22B

图 22A

图22A图22B

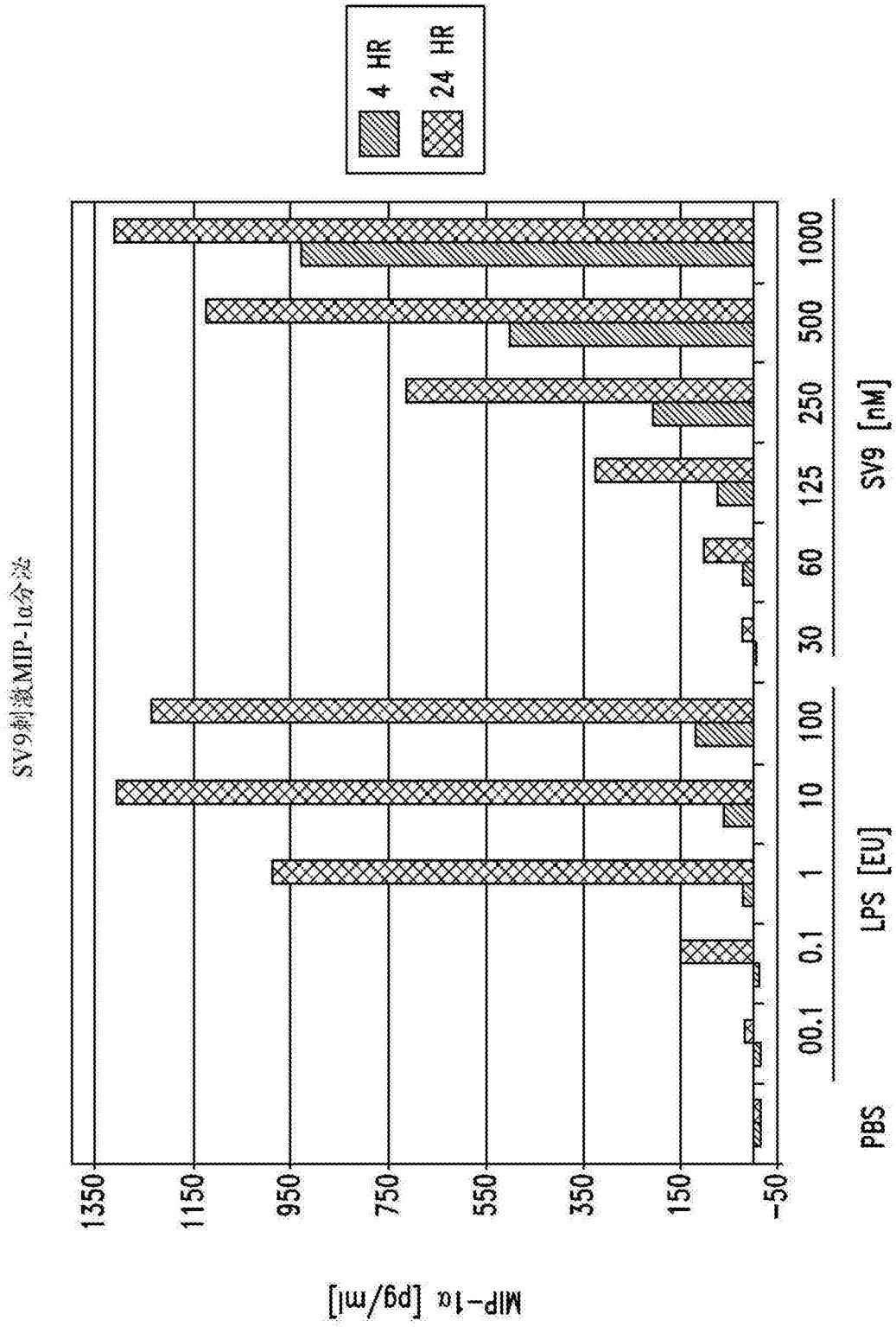


图23