

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98811934. X

C12N 15/81  
C07K 14/78 C12N 9/68  
C12N 15/12 A61K 38/39  
C12N 15/62 C07K 16/18  
C12N 15/52 A61K 38/48  
C07K 16/40

[43]公开日 2001 年 2 月 14 日

[11]公开号 CN 1284134A

[22] 申请日 1998. 12. 8 [21] 申请号 98811934. X  
[30] 优先权  
[32]1997. 12. 8 [33]US [31]60/067,888  
[32]1998. 4. 22 [33]US [31]60/082,663  
[32]1998. 11. 16 [33]US [31]60/108,536  
[86] 国际申请 PCT/US98/25892 1998. 12. 8  
[87] 国际公布 WO99/29878 英 1999. 6. 17  
[85] 进入国家阶段日期 2000. 6. 8  
[71] 申请人 贝斯以色列护理医疗中心  
地址 美国马萨诸塞州  
[72] 发明人 维卡斯·P·萨克哈特姆

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司  
代理人 程 伟

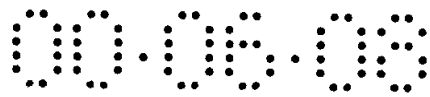
权利要求书 9 页 说明书 58 页 附图页数 27 页

[54] 发明名称 利用毕赤氏酵母表达系统生产抗生血管  
蛋白质: 制管张素, 内抑制素或静息蛋白  
的方法

[57] 摘要

公开了制备具有抗生血管特性的蛋白质包括制管张  
素(angiostatin), 内抑制素(endostatin)和静息蛋白(静息  
蛋白)。利用的系统是生产高效价生物活性蛋白质的酵  
母表达系统, 特定地是巴期德毕赤氏酵母的酵母系统。

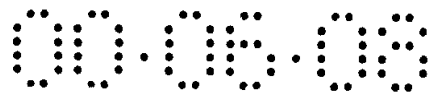
I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



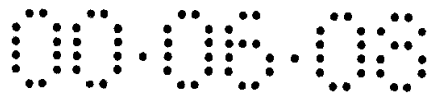
## 权 利 要 求 书

---

1. 一种生产具有生物活性的抗血管生成蛋白质，或具有生物活性的突变体，片段，衍生物或融合蛋白质的方法，该方法包括：
  - (a)在酵母表达载体中插入含有编码抗血管生成蛋白质或其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质的聚核苷酸序列的据核苷酸，其中载体含有多个克隆位点；  
和
  - (b)利用步骤(a)的载体转化适当的酵母菌株，并且在适当的条件下培养酵母菌株生成抗血管生成蛋白质，  
从而生产了具有生物活性的抗血管生成蛋白质，或其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中酵母菌株是巴斯德毕赤氏酵母。
3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中表达载体包括 pPICZ $\alpha$ A 载体。
4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中通过下面的一个或几个测试方法测定生物活性：内皮细胞迁移；哺乳动物中肿瘤生长的抑制；细胞周期中 G<sub>1</sub> 期内皮细胞的抑制；在内皮细胞中诱导细胞程序死亡。
5. 编码抗血管生成蛋白质，其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质的多肽，其中蛋白质选自包括内抑制素，制管张素或静息蛋白，或其任何突变体，衍生物，片段或融合蛋白质或任何其中的联合的组。



6. 根据权利要求 1 所述的方法，其中生产的本发明的蛋白质，其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质的产量是每升培养液 1 - 20 微克或更多的浓度。
7. 权利要求 1 所述的方法生产的具有生物活性的抗血管生成蛋白质，其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质。
8. 权利要求 1 所述的方法，其中步骤(a)的分离的聚核苷酸另外含有聚核苷酸接头，步骤(b)生产的抗血管生成蛋白质，其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质另外含有产生接头聚核苷酸的至少一个氨基酸残基。
9. 权利要求 8 所述的方法，其中产生的抗血管生成蛋白质，其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质含有另外两个氨基末端氨基酸残基。
10. 其中氨基酸残基是谷氨酸(E)或苯丙氨酸(F)的权利要求 9 的蛋白质，突变体，衍生物，片段，或融合蛋白质。
11. 权利要求 8 所述的方法生产的具有生物活性的抗血管生成蛋白质，突变体，衍生物，片段或融合蛋白质。
12. 编码抗血管生成蛋白质，其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质的权利要求 8 的多肽，其中该蛋白质选自包括内抑制素，制管张素或其任何联合的组。
13. 包括权利要求 8 的方法生产的抗血管生成蛋白质，突变体，衍生物，片段或融合蛋白质的和药物可接受载体的组合物。



14. 权利要求 1 所述的方法，其中步骤(a)的载体包括 pPICz $\alpha$ A 的质粒，其中质粒含有多个克隆位点，克隆位点包括 His.Tag 基序，其中步骤(b)生产的抗血管生成蛋白质，突变体，衍生物，片段或融合蛋白质含有组氨酸标记基序。
15. 权利要求 14 所述的方法，其中酵母菌株是 巴斯德毕赤氏酵母。
16. 权利要求 14 所述的方法，其中通过下面的一个或几个测试方法测定生物活性：内皮细胞迁移；在哺乳动物中肿瘤生长的抑制；在细胞周期的 G<sub>1</sub> 期的内皮细胞的抑制；或内皮细胞的程序死亡的诱导。
17. 权利要求 14 所述的方法，其中生产的蛋白质，突变体，衍生物，片段或融合蛋白质的浓度是每升培养液 10-20 微克或更多。
18. 权利要求 14 的方法生产的具有生物活性的抗血管生成的蛋白质，突变体，衍生物，片段或融合蛋白质。
19. 编码抗血管生成蛋白质，其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质的权利要求 14 的多肽，其中蛋白质选自包括内抑制素，制管张素，静息蛋白或其任何联合的组。
20. 包括权利要求 1 的方法生产的抗血管生成蛋白质，突变体，衍生物，片段和融合蛋白质和药物可接受载体的组合物。
21. 利用权利要求 1 的方法生产的抗血管生成蛋白质，突变体，衍生物，片段或融合蛋白质抑制哺乳动物中不需要的血管生成的方法，包括多哺乳动物给药有效量的抗血管生成蛋白质，其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质。

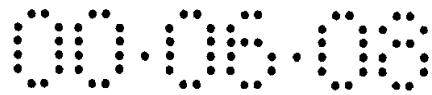
22. 一种生产具有生物活性的抗血管生成蛋白质，或具有生物活性的其突变体，片段，衍生物，或融合蛋白质的方法，该方法包括：

- (a) 在含有 pPICZ $\alpha$ A 质粒的酵母表达载体中插入含有编码抗血管生成蛋白质，其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质的聚核苷酸的分离的聚核苷酸，其中聚核苷酸另外含有接头，其中聚核苷酸接头至少编码一个氨基酸，其中质粒含有多个克隆位点；和
- (b) 利用步骤(a)的载体转化巴斯德毕赤氏酵母酵母菌株并在适当的条件下培养酵母菌株生产含有接头聚核苷酸产生的至少一个氨基酸残基的抗血管生成蛋白质，

从而生成具有生物活性的抗血管生成蛋白质，或其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质。

23. 权利要求 22 所述的方法，其中的聚核苷酸编码制管张素，内抑制素，静息蛋白或其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质，或同它们的任何联合。

24. 权利要求 22 的方法生产的具有生物活性的抗血管生成蛋白质。



25. 一种生产具有生物活性的抗血管生成蛋白质或其具有生物活性的突变体，片段，衍生物，或融合蛋白质的方法，该方法包括：

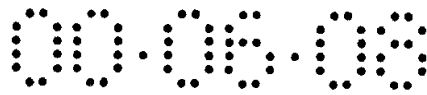
(a) 在酵母表达载体中插入含有编码抗血管生成蛋白质，或其突变体，衍生物，片段，或融合蛋白质的据核苷酸的分离的聚核苷酸，其中聚核苷酸另外含有接头，其中聚核苷酸接头编码至少一个氨基酸，其中质粒含有多个克隆位点，其中克隆位点另外含有组氨酸标记基序；和

(b) 利用步骤(a)的载体转化巴斯德毕赤氏酵母菌株，并在适当条件下培养酵母菌株生产至少含有接头聚核苷酸产生的一个氨基酸残基的抗血管生成蛋白质，其中蛋白质另外含有组氨酸标记基序，

从而生产具有生物活性的抗血管生成蛋白质，或其突变体，衍生物，片段，或融合蛋白质。

26. 权利要求 25 所述的方法，其中的聚核苷酸编码内抑制素，制管张素，或静息蛋白，或其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质，或它们的任何联合。

27. 权利要求 25 的方法生产的生物活性抗血管生成蛋白质。



28. 一种生产具有生物活性的制管张素，或其生物活性突变体，片段，衍生物或融合蛋白质的方法，该方法包括：

(a) 在包括 pPICZ $\alpha$ A 质粒的酵母表达载体中插入含有编码制管张素，或其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质的聚核苷酸序列的分离的聚核苷酸，其中聚核苷酸另外含有聚核苷酸接头，其中聚核苷酸接头编码至少一个氨基酸，其中质粒含有多个克隆位点；和

(b) 利用步骤(a)的载体转化巴斯德毕赤氏酵母菌株，并在适当的条件下培养酵母菌株生产含有接头聚核苷酸产生的至少一个氨基酸残基的制管张素，

从而生产具有生物活性的制管张素，或其突变体，衍生物，片段，或融合蛋白质。

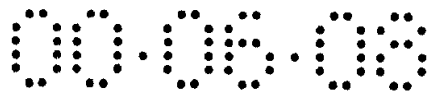
29. 权利要求 28 所述的方法生产的生物活性制管张素。

30. 一种生产生物活性制管张素，其生物活性突变体，片段，衍生物或融合蛋白质的方法，该方法包括：

(a) 在含有 pPICZ $\alpha$ A 质粒的酵母表达载体中插入含有编码制管张素，或其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质的聚核苷酸序列的分离的聚核苷酸，其中聚核苷酸另外含有接头，其中接头编码至少一个氨基酸，其中质粒含有多个克隆位点，其中克隆位点另外含有组氨酸标记基序；和

(b) 利用步骤(a)的载体转化巴斯德毕赤氏酵母菌株，并在适当的条件下培养酵母菌株生产其中蛋白质至少含有接头聚核苷酸产生的一个氨基酸残基和组氨酸标记基序的制管张素。

31. 权利要求 30 所述的方法生产的生物活性制管张素。
32. 一种生产生物活性内抑制素，或其生物活性突变体，片段，衍生物或融合蛋白质的方法，该方法包括：
- (a) 在含有 pPICz $\alpha$ A 质粒的酵母表达载体中插入含有编码内抑制素，或其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质的聚核苷酸序列的分离的聚核苷酸，其中聚核苷酸另外含有聚核苷酸接头，其中聚核苷酸接头至少编码一个氨基酸，其中质粒含有多个克隆位点；和
  - (b) 利用步骤(a)的载体转化巴斯德毕赤氏酵母菌株，并在适当的条件下培养酵母菌株生产至少含有接头聚核苷酸产生的一个氨基酸残基的内抑制素，
- 从而生产生物活性内抑制素，或其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质。
33. 权利要求 32 的方法生产的生物活性内抑制素。



34. 一种生产生物活性内抑制素，或其生物活性突变体，片段，衍生物或融合蛋白质的方法，该方法包括：

(a) 在含有 pPICZ $\alpha$ A 质粒的酵母表达载体中插入含有编码内抑制素，或其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质的聚核苷酸序列的分离的聚核苷酸，其中聚核苷酸另外含有聚核苷酸接头，其中聚核苷酸接头编码至少一个氨基酸，其中质粒含有多个克隆位点，其中克隆位点另外含有组氨酸标记基序；和

(b) 利用步骤(a)的载体转化巴斯德毕赤氏酵母菌株，在适当条件下培养酵母菌株生产至少含有接头聚核苷酸产生的一个氨基酸残基，其中蛋白质另外含有组氨酸标记基序，

从而生产生物活性内抑制素，或其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质。

35. 权利要求 34 所述的方法生产的生物活性内抑制素。

36. 一种生产生物活性静息蛋白，其生物活性突变体，片段，衍生物或融合蛋白质的方法，该方法包括：

(a) 在含有 pPICZ $\alpha$ A 质粒的酵母表达载体中插入含有编码静息蛋白，或其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质的聚核苷酸序列的分离的聚核苷酸，其中聚核苷酸另外含有聚核苷酸接头，其中聚核苷酸接头编码至少一个氨基酸，其中质粒含有多个克隆位点；和

(b) 利用步骤(a)的载体转化巴斯德毕赤氏酵母菌株，在适当条件下培养酵母菌株生产至少含有接头聚核苷酸产生的一个氨基酸残基，

从而生产生物活性静息蛋白，或其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质。

37. 根据权利要求 36 的方法生产的生物活性静息蛋白。

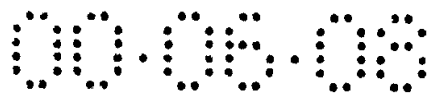
38. 一种生产生物活性制管张素，或其生物活性突变体，片段，衍生物或融合蛋白的方法，该方法包括：

(a) 在含有 pPICz $\alpha$ A 质粒的酵母表达载体中插入含有编码制管张素，或其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质的聚核苷酸序列的分离的聚核苷酸，其中聚核苷酸另外含有接头，其中接头编码至少一个氨基酸，其中质粒含有多个克隆位点，其中克隆位点另外含有组氨酸标记基序；和

(b) 利用步骤(a)的载体转化巴斯德毕赤氏酵母菌株，并在适当的条件下培养酵母菌株生产其中蛋白质至少含有接头聚核苷酸产生的一个氨基酸残基和组氨酸标记基序的制管张素，

从而生产生物活性制管张素或其突变体，衍生物，片段或融合蛋白质。

39. 权利要求 38 所述的方法生产的生物活性静息蛋白。



## 说明书

---

### 利用毕赤氏酵母表达系统生产抗生血管蛋白质： 制管张素，内抑制素或静息蛋白的方法

#### 相关申请

本申请 6 要求保护 1997 年 11 月 8 日递交的申请 60/067,888，1998 年 4 月 22 日递交的 60/082,663，1998 年 12 月 16 日递交的 60/108,536 的优先权，这些申请的全部内容引入本文作为参考。

#### 发明背景

预测癌症转移仍然是相当困难的。虽然在放射性治疗和化学治疗上有了很大进步，但过去几十年表明在治疗的病人的长期生存方面只有很小的进步。转移癌症缺乏可得的显著的治疗方法越发体现了需要集中开发新的治疗方案。在这点上，最近在几个动物模型系统中显示，靶击固体肿瘤的肿瘤微管结构的结果很有前途(Baillie 等人(1995)，英国癌症杂志，72: 257 - 67; Bicknell, R.(1994)癌症学年评(增刊)4: 45 - 50; Fan 等人(1995)药学科学进展 16: 57 - 66; Thorpe, P.E 和 Burrows, F.J.(1995)肺癌治疗研究 36: 237 - 51; Burrows,F.J.和 Thorpe, P.E.(1994)药理学理论 64: 155 - 74)。在裸鼠模型中，例如在 786 - 0 细胞，RCC 肿瘤细胞系，中导入野生型 VHL 基因，抑制肿瘤生长(Iliopoulos 等人(1995)Nat.Med.1:822-26)和血管发生。

小于几立方毫米的固体肿瘤的生长取决于新血管的形成(Folkman, J.(1971) N.Engl. J.Med.285:1182-86)。许多研究表明初级肿瘤和转移生长都是依赖于血管发生的(Folkman,

J.(1971)N.Engl. J.Med.285:1182-86; Folkman, J.(1972)外科学年评 175: 409 - 16; Folkman, J.和 Shing,Y.(1992)生物化学杂志 267: 10931 - 34; Folkman, J.(1996)Sci.Am.275:150-54)。许多血管发生抑制剂已经得到鉴定。有一些如血小板因子-4(Maione 等人(1990)科学 247: 77 - 79; Gupta 等人(1995)美国科学院院刊 92: 7799 - 7803), 干扰素, 干扰素可诱导蛋白质-10, 和 PEX(Angiolillo 等人(1995)实验医学杂志 182: 155 - 62; Strieter 等人(1995)生物化学生物活体研究通信 210: 51 - 57; Brooks 等人(1998)细胞 92: 391 - 400)不是“相关肿瘤”, 而其它两个, 制管张素和内抑制素是“肿瘤相关的”(O'Reilly 等人(1994)细胞 79: 315 - 28; O'Reilly 等人(1997)细胞 88: 277 - 85)。制管张素, 上调基质金属弹性蛋白酶的渗滤肿瘤的巨噬细胞产生的制管张素的潜在的内源抑制剂(Dong 等人(1997)细胞 88: 801 - 10), 抑制许多种类的初级和转移肿瘤的生长(Lannutti 等人(1997)癌症研究, 57: 5277 - 80; O'Reilly 等人(1994)Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.59:1329-34;Wu 等人(1997)生物化学生物活体研究通信 236: 651 - 54)。最近, O'Reilly,等人((1997)细胞 88:277-85)已经分离内抑制素,来自小鼠血管内皮瘤细胞系(EOMA)的制管张素抑制剂。在患有慢性肾衰竭而没有可检测的肿瘤的病人中已经检测到循环水平的人内抑制素的片断(Wu 等人(1997)生物化学生物活体研究通信 236: 651 - 54)。

内抑制素的氨基末端序列对应的是胶原 XVIII 的羧基末端部分。内抑制素是内皮增殖和制管张素的特定的抑制剂。系统给药在大肠杆菌中表达的非再折叠沉淀蛋白质在异种移植模型中导致 Lewis 肺癌, T241 纤维瘤, B16 黑素瘤和 EOMA 细胞的生长退化(O'Reilly 等人(1997)细胞 88: 277 - 85)。另外, 注意到在研究的三个肿瘤类型中没有药物抗性。已经有报道: 将内抑制素重复循环给药可导致肿瘤休眠(Boehm 等人(1997)自然 390: 404 - 407)。

研究这些制管张素和内抑制素的结果是打开了治疗癌症的新途径，和提供了大有希望克服化学治疗中经常遇到的药物抗性的新途径。但是，在所有这些研究中，非再折叠沉淀形式的抑制剂蛋白质是以悬浮液的形式对患肿瘤的动物给药的。另外，导致肿瘤退化和导致肿瘤休眠需要大量的蛋白质。正如 Kerbel 在(1997)自然 390: 335 - 36)中指出，导致肿瘤退化和肿瘤休眠需要这些蛋白质的口服药物等当物。如果获得了这些蛋白质的重组形式的可溶形式，可以进行机制的研究。另外，在体内研究蛋白质的效能之前可以首先在体外进行可溶蛋白质的测试。

另外，已经有报道，虽然这些蛋白质很有前途，由于难于生产足够的蛋白质用于测试和与它们的抗血管生成特性如抗血管生成活性相矛盾的测试结果，评估它们的临床潜力处于困境(King, R.T., Wall Street J., 第 1 页, 1998 年 12 月 12 日; Leffe, D.N. 今日生物世界, 9: 1, 1998 年 10 月 20 日)。目前显然存在的巨大需求是生产临床有效的具有足够的生物活性的可溶形式的抗血管生成蛋白质和可靠而不会失去关键活性的高产量生产这些蛋白质的生产方法。

## 发明概要

本发明涉及生产具有足以有效临床的生物活性的抗血管生成的蛋白质的生产方法的发现。正如本文所述，本方法中抗血管生成的蛋白质可以可再生地高产量生产(例如 10 到 20 毫克/升培养基)。重要的是，本文叙述的方法生产的抗血管生成的蛋白质保留了高的生物活性。

抗血管生成蛋白质是本领域技术人员已知的。例如制管张素，内抑制素，16 千道尔顿催乳素片断，RNAisn，TNP470，2-甲氧基雌二醇，和肝素命名的几个。正如本文所用，术语“抗

血管生成蛋白质”不仅指完整的蛋白质，而且指突变体(例如，具有附加，删除或更改的氨基酸)，片断(例如，特定的具有删除的氨基酸)，衍生物(例如，为了降低蛋白酶降解修饰的蛋白质或肽)和融合蛋白质，其中融合蛋白质包括结合的两个或单个已知的抗血管生成的蛋白质(例如，制管张素和内抑制素，或制管张素和内抑制素的生物活性片断)或与靶试剂结合的抗血管生成的蛋白质[例如，具有表皮生长因子(EGF)或 RGD 肽的内抑制素]，或与免疫球蛋白分子结合的抗血管生成蛋白质(例如，特定地具有除去的 Fc 部分的内抑制素和 IgG)。本文所用的术语“融合蛋白质”也可以包括例如用于递送化学治疗试剂的其它成分，其中编码化学治疗试剂的聚核苷酸与编码抗血管生成的蛋白质的聚核苷酸连接在一起。融合蛋白质也可以包括抗血管生成蛋白质例如，内抑制素的二聚体或三聚体的多聚体。

人们同样认识到，本文叙述的抗血管生成蛋白质是可以翻译后修饰而包括靶成分的，例如，血管内皮生长因子(VEGF)，或化学治疗试剂如蓖麻毒或放射性同位素。翻译后的其它修饰包括多聚体化，例如通过本领域技术人员已知的技术化学交联多聚体化。但是，为了简明，本文所用的术语“抗血管生成蛋白质”没有特定地指突变体，衍生物，片断和融合蛋白质。

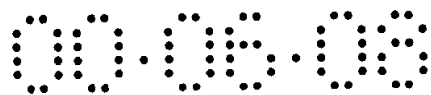
本发明涉及了利用原核或真核表达系统生产生物活性抗血管生成蛋白质，或其生物活性突变体，片断，衍生物或融合蛋白质。本发明还特定地涉及酵母表达系统，更具体地说是巴斯德毕赤氏酵母表达系统的用途。

本方法的步骤包括在适当的表达载体如原核生物的或真核生物的表达载体中插入编码抗血管生成蛋白质，或其突变体或衍生物或片断或融合蛋白质的聚核苷酸序列。本发明特定地涉及酵母表达载体。适当的酵母表达载体是本领域技术人员已知的。

用于本文叙述的方法的特定的适当表达载体是可市购获得的含有 pPICZαA 质粒的毕赤氏酵母载体，其中该质粒含有多个克隆位点。抗血管生成的蛋白质的聚核苷酸序列是本领域已知的，本文中和 Vikas P.Sukhatme 1998 年 11 月 8 日递交的专利申请 U.S.S.N.: XX/XXX,XXX “静息蛋白和其利用的方法”和 1998 年 11 月 8 日 Vikas P.Sukhatime 递交专利申请的“抗血管生成肽和其利用的方法”中也叙述了新的抗血管生成蛋白质序列已经已知的抗血管生成蛋白质的突变序列。这两个专利申请的内容引入本文作为参考。在载体中插入选择的聚核苷酸序列是技术人员的常用技术，也在本文叙述了。

在载体中插入选择的聚核苷酸后，将该载体转化进入适当的酵母菌株，和在生产生物活性抗血管生成蛋白质的适当培养条件下培养(例如，维持)酵母菌株，从而生产生物活性的抗血管生成蛋白质，或其突变体，衍生物，片断或融合蛋白。通常，生成的抗血管生成蛋白质的量约为每升培养液 10-20 微克，或更多。

在一个实施方案中，编码抗血管生成蛋白质的分离的聚核苷酸另外还包括了编码肽的聚核苷酸接头。这样的接头是本领域已知的，例如，接头至少可以含有至少编码另外一个氨基酸的另外一个密码子。通常接头含有 1 到 20 或 30 个氨基酸。通常，接头附着于编码抗血管生成蛋白质的聚核苷酸的 5'末端，但也可以附着于 3'末端。正如编码抗血管生成的蛋白质的聚核苷酸，聚核苷酸接头也是翻译的，导致表达出在抗血管生成蛋白质的氨基或羧基末端至少具有另外一个氨基酸残基的抗血管生成蛋白质。例如，本文所述，利用本文所述的方法表达的内抑制素在内抑制素的 5'末端具有另外两个氨基酸残基。(参见图 5)这另外两个氨基酸残基是谷氨酸(E)和苯基丙氨酸(F)。另外，其它氨



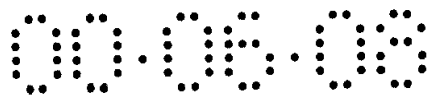
基酸残基可以含有抗血管生成蛋白质(参见图 5 和 25)。重要的是,其它的氨基酸或其它的多个氨基酸没有危及抗血管生成蛋白质的活性。事实上,本文叙述的方法生产的抗血管生成蛋白质显示了比其它表达方法生产的抗血管生成蛋白质更良好的生物活性。通常,在这一实施方案中生产的抗血管生成的蛋白质的浓度约为每升培养基 10-20 毫克。

在本发明的另一个实施方案中,真核载体包括具有组氨酸标记基序的酵母载体。正如本文所述的一个方法其中利用了 pPICZ $\alpha$ A,其中质粒含有具有 His.Tag 基序的多个克隆位点(在本文中,该质粒也称为 pPICZ $\alpha$ A/HIS)。另外也可以加入 NdeI 位点或其它适当的限制位点修饰该载体。这样的位点是本领域已知的。这一实施方案生产的抗血管生成蛋白质包括具有一个或多个组氨酸通常约 5-20 个组氨酸的组氨酸标记基序(His.tag)。令人吃惊的是,这一 His.tag 没有危及抗血管生成活性。事实上,本文叙述的方法生产的抗血管生成蛋白质具有比其它表达方法生产的抗血管生成蛋白质更优越的生物活性。再次,生产的生物活性蛋白质的浓度通常约为每升培养基(液体)10-20 毫克。

本发明也包括了结合起来的上面的实施方案。例如,选择的聚核苷酸可以包括接头,并且可以插入含有 his.Tag 基序的载体(参见图 5 和 25)。

本发明也涉及本文叙述的方法生产的抗血管生成蛋白质,令人吃惊的是,本文叙述的方法生产的蛋白质是高产量生产的,并且具有足以测试这些蛋白质(完全地)抑制(或基本减少)不需要的血管生成活性的临床效力的生物活性。

本发明另外涉及的是本文叙述的方法生成的抗血管生成蛋白质的利用方法。例如,本文叙述的抗血管生成蛋白质可以用于



测试治疗人恶性肿瘤的效力，其中这样的治疗将导致部分或整个肿瘤的退化。这些蛋白质也可以用于治疗如本文所述的不能令人满意的生成血管的其它疾病。

本发明另外涉及的是含有有效量的本文叙述的方法生产的抗血管生成蛋白质和可药用载体的组合物。本文叙述了有效量的抗血管生成蛋白质，通常是足以抑制内皮活性如内皮细胞迁移，抑制肿瘤生长，在细胞周期的  $G_1$  期抑制内皮细胞和在皮细胞中诱导细胞程序死亡的量。本文叙述了确定这些活性的测试方法。“ $ED_{50}$ ”是降低缺乏抗血管生成蛋白质时观察到的生物影响一半时抗血管生成蛋白质的量。比较例如在内皮细胞增殖测试方法中降低生物影响一半需要的抗血管生成的浓度是有用的生物活性测试方法，并且允许比较各个组合物。

本发明同时涉及的是利用本文叙述的抗血管生成蛋白质抑制不需要的血管生成活性的方法。本发明涉及的该方法可以抑制内皮细胞迁移，抑制哺乳动物中肿瘤生长，抑制细胞周期的  $G_1$  期中的内皮细胞，和诱导内皮细胞中的细胞程序死亡。本发明的抗血管生成蛋白质特定地和可逆地抑制内皮细胞增殖。本发明的抑制剂蛋白质分子也可用于生育控制药物，和用于治疗其它有关血管生成的疾病，特别是依赖血管生成的癌症和肿瘤。

作为本文叙述的发明的结果，目前可以获得具有足够的生物活性的抗血管生成蛋白质，其突变体，衍生物和片断以及抗血管生成融合蛋白，用于研究和治疗血管生成疾病。这些抗血管生成化合物的出乎意料和惊人的治疗和减轻依赖血管生成癌症和肿瘤的能力给医学领域长期未满足的需要一个答案，并且给人类提供了重要的益处。

## 附图的简要说明

图 1 是巴斯德毕赤氏酵母表达载体的图解说明。

图 2 是修饰的巴斯德毕赤氏酵母表达载体的图解说明。

图 3 是利用本发明的巴斯德毕赤氏酵母表达载体系统克隆内抑制素的方案的图解说明。

图 4 描述了小鼠内抑制素序列和内抑制素突变 EM1 和 EM2 的序列。

图 5 是表示酵母构建体名称，引物序列，克隆位点，生产内抑制素的载体的图。同时表示了生产的蛋白质的蛋白质序列。HTH→endo 表明了小鼠内抑制素氨基酸序列。AHSH→endo 表明了人内抑制素氨基酸序列。

图 6A 表示利用 Ni-NTA 柱纯化重组小鼠内抑制素。在变性条件下纯化了蛋白质。在 Ni-NTA 柱上加载了含有 8M 脲的可溶蛋白质。并且通过降低洗脱缓冲液的 pH 洗脱结合的蛋白质。(i) 洗脱缓冲液的 pH。(o) 在 280 纳米的吸光值。

图 6B 表示了利用 10% SDS - PAGE 分析纯化的小鼠内抑制素蛋白质。千道尔顿标记低分子量蛋白质标准。分析了来自每个洗脱点的 101 个选择的组分。除了观察到预期的 22 - 24 千道尔顿的蛋白质，也观察到了对应于 46 和 69 千道尔顿的相当量的高分子量复合物。当利用 DTT 还原蛋白质时，所有高分子量复合物转化成对应于 22 - 44 千道尔顿的单体亚单位。

图 7A 表示了利用肝素琼脂糖柱纯化酵母中表达的可溶小鼠内抑制素。分批加载来自一升培养物的浓缩的上清液。利用从 0.3,

0.6, 1 和 2M 的 NaCl 的逐步的梯度从柱中洗脱结合的内抑制素。以每管 2 毫升收集洗脱的组分。(i)NaCl 的浓度。(o)280 纳米处的吸光值。

图 7B 表示了利用 12% 的 SDS - PAGE, 千道尔顿标记低分子量标准电泳分析从肝素 - 琼脂糖柱纯化的重组可溶小鼠内抑制素。纯化的蛋白质成对应于 20 千道尔顿的单一带迁移。利用 10 微升选择的组分的等分试样分析洗脱的蛋白质的纯度。

图 8A 表示了利用 Ni-NTA 柱纯化在酵母中表达的可溶 His. 内抑制素, 来自 Ni-NTA 柱的洗脱方案。利用逐步的咪唑梯度 (10,25,50 和 100 毫摩尔/升)从柱中洗脱结合的蛋白质。(i)咪唑的浓度。(o)在 280 纳米处的吸光值。

图 8B 表示了选择的组分的 12% 的非还原 SDS - PAGE。千道尔顿标记 - 低分子量标准。纯化的重组 His.内抑制素成对应于 22 - 24 千道尔顿的单一带在 50 毫摩尔/升的咪唑中迁移, 而 100 毫摩尔/升的咪唑的洗脱显示出具有对应于 44 - 46 千道尔顿的痕量的高分子量复合物。

图 9 表示了内皮细胞增殖测试的结果。测试了酵母中表达的纯化的小鼠内抑制素的抑制在 C - PAE 细胞中掺入(甲基 - <sup>3</sup>H)胸腺嘧啶的能力。利用 3 纳克/毫升的 bFGF 作为刺激物。每个值是来自代表实验的三份培养物的平均值, 误差条表示标准偏差。在对照培养物中的 DNA 合成认作 100%。在相同的条件下重复实验 4 - 5 次。

图 10 表示了利用不同浓度的内抑制素抑制内皮细胞的迁移。每个实验进行两次。在每个孔中, 在三个不同的面积中计算迁移的细胞的数目, 获得平均值。每个值是来自代表实验的平均值, 误差条代表标准偏差。

图 11A 和 11B 表示了内抑制素抑制了 VEGF(11A)和 BFGF(11B)介导的血管生成应答。在尼龙网上加不同浓度的内抑制素，如本文所述确定微管的生长。对照阴性对照将所有计数标准化。

图 12 表示了在内皮增殖测试中利用多克隆抗血清中和小鼠内抑制素的抑制效果。将 C-PAE 细胞以 24,500 个细胞/孔播种到 24 孔纤连蛋白包衣的平板中。将重组内抑制素(10 微克/毫升和 5 微克/毫升)与过量的内抑制素的多克隆抗血清或免疫前或对照的 IgG 在 RT 时混合 1 小时。然后，在存在 3 克/毫升 bFGF 时在 C-PAE 细胞中加入混合物。加入 1 居里/孔  $^3\text{H}$ -胸腺嘧啶测量 DNA 合成。每个值是来自三份培养物的平均值。误差条代表标准偏差。

图 13A 表示利用重组内抑制素系统治疗抑制 786-0 肿瘤生长。当肿瘤体积大约 350-400 立方毫米时，利用重组内抑制素治疗携带 786-0 肿瘤的无胸腺裸鼠。每天以 10 毫克/公斤给予腹膜内注射内抑制素。在另外的日子对尾缺测量肿瘤大小，利用标准公式宽度平方  $\times$  长度  $\times$  0.52 计算肿瘤体积。在每组中每个时间点代表来自 5 个不同小鼠的平均值，误差代表平均标准偏差 (S.E.M.)。 (o)对照 PBS; (i)来自细菌的 His.内抑制素; (-)来自细菌的 His.EM I; (●)来自细菌的 His.内抑制素。

图 13B 显示了带有 780-0 肿瘤细胞的无胸腺裸鼠，在肿瘤体积大约 150-200 立方毫米时，利用重组内抑制素治疗的结果。每天以 20 毫克/公斤给予腹膜内注射内抑制素。在另外的日子对尾缺测量肿瘤大小，利用标准公式宽度平方  $\times$  长度  $\times$  0.52 计算肿瘤体积。在每组中每个时间点代表来自 5 个不同小鼠的平均值，误差代表平均标准偏差 (S.E.M.)。 (o)对照 PBS; (i)来自细

菌的 His.内抑制素; (É)来自细菌的 His.EM I; (●)来自细菌的 His.EM2。

图 14A 表示了利用肝素琼脂糖柱纯化在巴斯德毕赤氏酵母中表达的可溶人内抑制素。X 轴是组分的号, Y 轴是 280 纳米处的吸光值。利用 0.2M 到 1.0M 的 NaCl 的梯度逐步从柱中洗脱结合的 endistatin。箭头表示用于洗脱的 NaCl 的浓度(在组分 1 开始为 0.2MNaCl,在约组分 15 - 16 开始为 1M)。有 2 毫升每个组分收集洗脱的蛋白质。观察到两个明显的峰, 一个约在组分 4, 另一个约在组分 20 - 23。

图 14B 表示了利用 12% SDS - PAGE 凝胶电泳分析从肝素琼脂糖柱洗脱的纯化重组人内抑制素。千道尔顿大小标记在左边。表示了 6 道。道 1 含有标记; 道 2, 粗蛋白质; 道 3, 洗液; 道 4, 利用 0.2M NaCl 洗脱的组分 3; 道 5 和 6, 分别是从小组分 19 和 20 的洗脱物, 它们是利用 1MNaCl 洗脱的。

图 15A 和 15B 是表示在 HUVE 细胞(图 15A)和 HMEV - L 细胞(图 15B)中内抑制素介导的内皮细胞生长的抑制的条块图。每个图的 X 轴表示纳克/毫升的重组蛋白质的浓度, Y 轴表示与对照比较的 <sup>3</sup>H 胸腺嘧啶的掺入百分数。亮的和阴影条块分别表示人和小鼠内抑制素。

图 16A 表示人内抑制素处理 HUVE 细胞特定地影响 S 期的细胞。利用范围 0.5 毫克/毫升到 20 毫克/毫升的不同浓度的人内抑制素处理生长停滞的 HUVE 细胞。在 1%FCS 中生长细胞, 并且利用 3 纳克/毫升 bFGF 刺激细胞。

图 16B 和 16C 表示利用 10 微克/毫升人内抑制素处理非内皮 IMR - 90(b)和 Wi-38(c)细胞, 并且如本文的方法进行。

图 16D 表示利用 10 微克/毫升人内抑制素处理 HUVE 细胞，并且在处理后 15, 18, 24 和 32 小时收集处理的细胞。

图 17 是表示接触不同浓度的内抑制素对内皮细胞迁移的抑制的条块图。X 轴是不同的处理(对照, 对照 + bFGF, 10, 5, 2.5, 1, 0.5 和 0.1 微克/毫升的内抑制素), Y 轴表示关于表示的各个实验的细胞数。每个值是来自表示的各个实验的平均值, 误差条表示标准偏差。

图 18A - B 表示在赖氨酸琼脂糖 4B 柱上纯化小时制管张素的结果。

图 19 表示利用小鼠制管张素测试内皮增殖的结果。

图 20 是重组小鼠制管张素对肾癌细胞系 786 - 0 的生长的影响。在 X 轴表示了时间(在处理后的天数), Y 轴表示肿瘤的体积。相对重组小鼠制管张素处理的肿瘤(实心线), 对照肿瘤的生长(点线 I)表示出生长增强。

图 21A - B 表示了赖氨酸琼脂糖柱上人制管张素的纯化。

图 22 描述了静息蛋白和静息蛋白 M2 的核苷酸序列。

图 23 描述了静息蛋白氨基酸序列。

图 24 是在毕赤氏酵母表达系统中克隆静息蛋白的图解说明。

图 25 是表示构建体名称, 引物序列, 克隆位点, 和生产静息蛋白和静息蛋白突变体的图, 静息蛋白的氨基酸和突变的静息蛋白(Apomigre, 本文也称为静息蛋白-M2)序列也表示了。“....静息蛋白”表示静息蛋白氨基酸序列。



图 26 表示了在迁移测试中静息蛋白的影响结果。

图 27 表示在肿瘤生长中静息蛋白的影响的结果。利用的静息蛋白和内抑制素的浓度是 10 毫克/公斤。

### 本发明的详细描述

根据本发明，提供了有效地调节血管生成，和抑制不需要的血管生成，特定地有关肿瘤生长的血管生成的组合物和方法。

本发明特定地包括生产抗血管生成蛋白质，特定地包括制管张素，内抑制素和静息蛋白，其突变体，衍生物，片断和融合蛋白质的方法。当在大肠杆菌中生产时，制管张素，内抑制素，和静息蛋白可能污染内毒素或可能变性(即，蛋白质可能不恰当地折叠)。从血清分离或在哺乳动物细胞中生产这些蛋白质的天然形式导致蛋白质可变，并且抗血管生成活性水平经常非常低，同时导致这些蛋白质的产量较低。但是，正如本文所述，在本发明的酵母表达系统中生产这些蛋白质导致每升培养物中的蛋白质产量为 10 - 20 毫克。

本发明的酵母表达系统利用的是毕赤氏表达系统(InVitrogen, 圣迭戈, CA)。巴斯德毕赤氏酵母是能够利用甲醇作为碳源的甲烷营养酵母菌株。该表达系统具有真核表达系统的优点，包括蛋白质加工，蛋白质折叠，翻译后修饰，并且适用于大规模发酵过程。这一系统能够高水平表达异源蛋白质。在一个实施方案中，该系统利用了含有组氨酸标记基序的载体。但是，也可以利用其它适当的酵母表达系统，并且可以利用标准技术修饰载体使含有组氨酸标记基序。或者，利用本文所述的接头修饰待表达的选定蛋白质。在编码蛋白质的聚核苷酸序列中加入接头是本领域已知的。在实施例 1 中详细描述了本发明的方法的特定步骤。

本文所用的术语“载体”指可能含有或结合特定核苷酸序列(聚核苷酸)的载体，它的功能是将特定的核酸序列转移进入细胞。载体的例子包括质粒和感染性微生物，如病毒，非病毒载体如配体-DNA 共轭物，脂质体，脂 DNA 复合物。令人满意的是含有抗血管生成的蛋白质抑制剂 DNA 序列的重组 DNA 分子可操作地连接表达控制序列形成了能够表达蛋白质的表达载体。

“载体”在本文也指复制子，其中连接了另一个聚核苷酸区段，以致引起连接的区段的复制和/或表达。正如本文所用，“复制子”指行为如细胞内的聚核苷酸复制的自动单位的任何遗传元素如质粒，染色体或病毒。

术语“控制序列”指达到控制序列连接的编码序列的表达必须的聚核苷酸序列。这样的控制序列的特性根据寄主生物体的不同而不同。在真核生物中，这样的控制序列通常包括启动子，终止子和在一些情况中的增强子。所以，术语“控制序列”打算包括表达必须存在的最少的所有成分，并且也可以包括其存在是有利的其它成分如引导序列。

“可操作地连接”指其中所述的成分处于允许它们以打算利用的方式起作用的关系中的情况。所以，例如，“可操作地连接”编码序列的控制序列是以在与控制序列相容的条件下达到编码序列的表达的方式连接。

术语“开放读码框架”或“ORF”指编码多肽的聚核苷酸序列的区域。这一区域可以代表部分编码序列或整个编码序列。

“编码序列”是当放置于适当的调节序列的控制下，转录成 mRNA 并且翻译成多肽的聚核苷酸序列。通过在 5'末端的翻译起始密码和 3'末端的翻译终止密码确定编码序列的边界。编码序列可以包括，但不限于 mRNA，cDNA 和重组聚核苷酸序列。

术语“转化”指无论插入利用的方法如何，在寄主细胞中插入外源聚核苷酸。例如，包括直接吸入，转导或 f 匹配。作为非整合载体例如质粒可以维持外源聚核苷酸，或者可以整合进入寄主基因组。

“重组寄主细胞”，“寄主细胞”，“细胞”，“细胞系”，“细胞培养物”和其它这样的关于作为单细胞整体培养的微生物或高等真核细胞系的术语指，可以或已经用作重组整体或其它转移 DNA 的受体，并且包括已经转染的原始细胞的原始子代。

正如本文所用的术语“分离”指从原始环境(例如，如果它是天然存在的天然环境)中移取的物质。例如，在活动物中存在的天然存在的聚核苷酸或多肽不是分离的，但从天然系统中的一些或所有共存物质中分离的同样的聚核苷酸或 DNA 或多肽是分离的。这样的聚核苷酸可以是部分载体，和/或这样的聚核苷酸或多肽可以是部分组合物，并且仍然是分离的，因为载体或组合物不是天然环境的部分。

“纯化”或“分离”的聚核苷酸指基本游离的，即含有少于约 50%，优选地少于约 70%，更优选地少于约 90% 的聚核苷酸天然结合的蛋白质的需要的聚核苷酸或其片断。纯化需要的聚核苷酸的技术是本领域已知的，包括例如利用离液剂裂解含有聚核苷酸的细胞，和通过离子交换层析，亲和层析，或密度沉降分离聚核苷酸和蛋白质。

术语“引物”指与靶核苷酸序列互补并且用于与靶核苷酸序列杂交，和作为 DNA 聚合酶，RNA 聚合酶或逆转录酶催化的核苷酸多聚化的起始点的特定的低聚核苷酸序列。

如本文所用的“重组多肽”至少指没有通过它本身或操作结合天然中结合的多肽的全部或部分和/或连接不是它在天然时连接的多肽的多肽的多肽。重组或派生的多肽不必定从指定的核酸序列翻译而成。它也可以以任何方式包括化学合成或重组表达系统的表达生产。

本文所用的“多肽”指氨基酸的分子链，而没有指产物的特定长度。所以，在多肽的定义中包括了肽，低聚肽和蛋白质。这一术语也打算指多肽的表达后修饰，例如，糖基化，乙酰化，磷酸化等。“纯化的多肽”指基本游离，即含有少于约 50%，优选地少于约 70%，和更优选地少于 90% 需要的多肽天然结合的细胞成分的需要的多肽或其片断。纯化的方法是本领域已知的。

本发明特定地包括生产已经命名为“制管张素”的蛋白质的方法，其中该蛋白质是通过它体外克服内源生长因子如 bFGF 的血管生成活性，和它与约在纤溶酶原氨基酸 98 开始的纤溶酶原的内部部分的氨基酸序列同源性和结构相似性定义的(参见，例如，美国专利 5,801,012，美国专利 5,837,682，美国专利 5,733,876，美国专利 5,776,704，美国专利 5,639,725，美国专利 5,792,845，WO96/035774，WO95/29242，WO96/41194 和 WO97/23500)。制管张素含有具有如还原聚丙烯酰胺凝胶电泳确定的约 38 千道尔顿和 45 千道尔顿之间的分子量并且具有基本相似于完整小鼠纤溶酶原分子的氨基酸 98 开始的小鼠纤溶酶原的片断的氨基酸序列的蛋白质(O'Reilly, M.S., 等人，细胞 79: 315 - 328(1994)，全部内容引入本文作为参考)。

制管张素的氨基酸序列在种类之间轻微变化。例如，在人制管张素中，其氨基酸序列基本相似于上面叙述的小鼠纤溶酶原片断的序列，虽然有活性的人制管张素序列可以在完整的人纤溶酶原氨基酸序列的氨基酸 97 或 99 开始。另外，如在小鼠肿

瘤模型中所示，人纤溶酶原的片断具有相似的抗血管生成活性。有待理解的是活性制管张素分子的氨基酸的数目可以有变化，并且涉及了具有内皮抑制活性的所有氨基酸序列，这些序列包括在本发明中(参见，例如，美国专利 5,801,012，美国专利 5,837,682，美国专利 5,733,876，美国专利 5,776,704，美国专利 5,639,725，美国专利 5,792,845，WO96/035774，WO95/29242，WO96/41194 和 WO97/23500)。

制管张素也定义为具有约 38 到 45 千道尔顿的分子量，能够体外克服内源生长因子的血管生成活性的蛋白质。制管张素是具有如还原聚丙烯酰胺凝胶电泳确定的约 38 千道尔顿和 45 千道尔顿之间的分子量并且具有基本相似于完整小鼠纤溶酶原分子的氨基酸 98 开始的小鼠纤溶酶原片断的氨基酸序列的氨基酸序列的蛋白质。

术语“基本相似于”当参照制管张素氨基酸序列使用时，指具有抗血管生成活性和具有约 38 到 45 千道尔顿分子量的氨基酸序列，该氨基酸序列与小鼠纤溶酶原的氨基酸 98 开始的小鼠纤溶酶原的肽片断具有高度的序列相似性或同一性，分子量约为 38 到 45 千道尔顿。

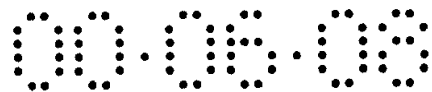
如本文所用，“序列同一性”指两个多聚体分子例如两个聚核苷酸或两个多肽之间的亚单位序列相似性。当在两个分子的亚单位位置是由相同的单体亚单位占据，例如，如果在两个肽的中的相同位置占据的都是丝氨酸，那么它们在那个位置相同。两个序列的同一性是匹配的或相同位置的数的直接函数，例如，在两个肽或化合物序列中的一半(例如，在多聚体的 10 个亚单位的长度中的 5 个位置)位置是相同的，那么两个序列是 50% 相同；如果 90% 的位置例如 10 个的 9 个匹配，两个序列拥有 90% 的序列同一性。例如，氨基酸序列 VRGLQP 和 HAFLQP 的 6 个位



置中 3 个相同，所以具有 50% 的序列同一性，而序列 VRGLQP 和 AFLQP 的 5 个位置具有 3 个相同，所以具有 60% 的序列同一性。两个序列之间的同一性是匹配或相同位置的数的直接函数。所以，如果在特定的肽中缺失了参照序列的一部分，为了计算序列同一性，缺失的部分不计算在内，例如，VRGLQP 和 VRGLP 的 6 个位置中 5 个相同，所以具有 83.3% 的序列同一性。

经常利用序列分析软件例如，BLASTN 或 BLASTP(在网址 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 可得到)测定同一性。通过 BLASTN(核苷酸序列)比较两个序列(例如，“Blast”两个序列，<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>)获得的缺席参数是匹配 = 1，错配的罚分 = 0，开放的裂口 = 5 和延长的裂口 = 2。当将 BLASTP 用于蛋白质序列时，缺席参数是，匹配 = 0，错配的罚分 = 11，开放的裂口 = 11，和延长的裂口 = 1。

当两个序列拥有“序列同源性”时，指两个序列只有通过保守取代相互区别。对于多肽序列，这样的保守取代包括利用该序列中给定位置的一个氨基酸取代相同类别的序列的另一个氨基酸(例如，拥有疏水性，电荷，pK 或其它构型或化学特性的氨基酸，例如，缬氨酸取代亮氨酸，精氨酸取代赖氨酸)，或利用定位于不改变多肽的构型或折叠到破坏多肽的生物活性的程度的序列的位置上利用一个或多个非保守氨基酸取代，缺失非保守氨基酸或插入一个或多个非保守氨基酸。假如多肽具有需要的生物活性，“保守取代”的例子包括一个非极性(疏水)残基如异亮氨酸，缬氨酸，亮氨酸或甲硫氨酸取代另一个；一个极性(亲水)残基取代另一个如在精氨酸和赖氨酸之间取代，在谷氨酰胺和天冬酰胺之间取代，在甘氨酸和丝氨酸之间取代；或利用一个酸性残基，如天冬氨酸或谷氨酸取代另一个；或利用化学衍生残基取代非衍生残基。拥有序列同源性的两个序列可以称为



“序列同系物”。含有化学派生残基的多肽是参照多肽的“化学衍生物”。

通常利用序列分析软件(例如,基因计算机集团,威斯康星大学生物技术中心,大学大道 1710,麦迪生, WI53705 的序列分析软件包)测定多肽的同源性。蛋白质分析软件通过测定相似序列的各种取代,缺失和其它修饰指定同源性的测定匹配相似序列。保守取代通常包括在下面基团内的取代;甘氨酸,丙氨酸;缬氨酸,异亮氨酸,亮氨酸;天冬氨酸,谷氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺;丝氨酸,苏氨酸;赖氨酸,精氨酸;和苯丙氨酸,酪氨酸。

同样,本发明包括制造内抑制素的方法。术语“内抑制素”指如非还原和还原凝胶电泳分别测定的大小优选地是 18 千道尔顿到 20 千道尔顿的蛋白质(O'Reilly, M.S.,等人,细胞, 88: 277 - 285(1997),全部内容引入本文作为参考)。术语内抑制素也包括 18 千道尔顿到 20 千道尔顿蛋白质的前体形式。内抑制素也包括 18 到 20 千道尔顿蛋白质的和修饰蛋白质和具有基本相似的氨基酸序列的肽的片断,并且它能够抑制内皮细胞的增殖。例如,其中利用结构或化学相似的氨基酸取代氨基酸没有明显改变蛋白质的结构,构型或活性的沉默氨基酸取代是本领域已知的。这样的沉默取代是在本发明的范围内的。

内抑制素的 N 末端氨基酸序列对应于小鼠胶原 $\alpha 1$  型 XVIII 中发现的在氨基酸 1105 开始和在氨基酸 1124 结束的 20 个内部氨基酸的肽片断(参见,例如,美国专利: 5,801,012, 美国专利: 5,837,682, 美国专利: 5,733,876, 美国专利: 5,776,704, 美国专利: 5,639,725, 美国专利: 5,792,845, WO96/035774, WO95/29242, WO96/41194 和 WO97/23500)。抑制剂的 N 末端氨基酸序列也对应于人胶原 $\alpha 1$  型 XVIII 中发现的氨基酸 1132 开始

和氨基酸 1151 结束的 20 个内部氨基酸肽片断。同样包括在本发明是如美国专利申请 U.S.S.N.:XX/XXX, XXX 和 1998 年 11 月 8 日 Vikas P. Sukhatme 递交的专利“抗血管生成肽和其利用的方法”中所述的内抑制素突变体, 这些专利的全部引入本文作为参考。如本文所述可以测定这些突变体的生物活性, 并且将这些突变体的生物活性与“野生型”内抑制素, 或其它方法产生的内抑制素的生物活性比较。

从小鼠血管内皮瘤 EOMA 可以分离内抑制素。从重组来源, 从移植入动物的遗传上改变的细胞, 从肿瘤, 从细胞培养物以及其它来源可以生产内抑制素。从体液包括, 但不限于血清, 尿和腹水可以分离或通过化学或生物的方法(例如, 细胞培养, 重组基因表达, 肽合成, 和体外前体分子的酶催化生产活性内抑制素)可以合成内抑制素。重组技术包括来源聚合酶链式反应 (PCR) 从 DNA 来源基因扩增和来源逆转录酶从 RNA 来源基因扩增。

同样包括在本发明中的是生产静息蛋白的方法。本申请人已经发现 U.S.S.N.:XX/XXX, XXX 和 Vikas P. Sukhatme 1998 年 11 月 8 日递交的美国专利申请“静息蛋白和其利用方法”中所述的新的蛋白质分子类型, 这些专利全部引入本文作为参考, 静息蛋白当体外加入增殖的内皮细胞时具有抑制内皮增殖的能力。因此, 这些蛋白质分子和静息蛋白突变体已经在功能上定义为静息蛋白, 但是, 应当理解的是这一功能性定义没有限制静息蛋白在体外或体内都抑制内皮细胞生长的生物活性。静息蛋白的许多其它的功能是可能的。静息蛋白是蛋白质水解片断, 和胶原 XV 家族的部分。(参见图 22-23)。静息蛋白蛋白质约为 20 千道尔顿胶原 XV 的 C 末端片断, 并且没有肝素亲和力。同样, 本发明特定的包括了这些片断或静息蛋白突变体。

如标准测试中确定的，我们发现命名为“Apomigren”的一个这样的片断具有等同于或超过人或小鼠内抑制素的抗血管生成活性。apomigren 含有 SEQ ID NO:20 的从约氨基酸 97 到约氨基酸 181 的静息蛋白本身的最后约 85 个氨基酸残基，序列 20 如下：

IYS GDG RKI MTD PSW POK VIW HGS SPH GVR LVD  
NYC EAW RTA DTA VTG LAS PLS TGK ILD QKA YSC ANR  
LIV LCI ENS FMT DAR K

所以，编码 Apomigren 的聚核苷酸序列对应于 SEQ ID NO: 的约核苷酸 289 到约核苷酸 543，并且利用正向引物 5' - AAG AAT GCG GCC GCT TAC TTC CTA GCG TCT GTC ATG AAA CTG TTT TCG AT - 3'(SEQ ID NO: )和与静息蛋白(SEQ ID NO: )利用的相同的反向引物可以扩增出 SEQ ID NO: 。如静息蛋白本身进行的，进行 Apomigren 的克隆和表达，其说明在下面的实施例。Apomigren 在治疗血管生成疾病中提供的优点因为根据重量原理，较小的肽日义具有潜力，并且可以更好地渗透组织。

令人满意的是术语“制管张素，内抑制素和静息蛋白”包括更短的蛋白质或肽，本文称为突变体或片断，其中从内抑制素的两个末端或从蛋白质的内部区除去一个或多个氨基酸，得到的分子仍然保留了内皮增殖抑制活性。术语“制管张素，内抑制素和静息蛋白”也包括其中在内抑制素的两个末端，或在蛋白质的内部位置加入一个或多个氨基酸，得到的分子仍然保留内皮增殖抑制活性的加长的蛋白质或肽。对于用于测试的如 <sup>125</sup>I 的放射性碘化的标记，例如在第一个位置具有加入的酪氨酸的这样的分子是有用的。利用其它放射性同位素的标记可以用于提供破坏含有内抑制素受体的靶细胞的分子工具。利用如蓖麻

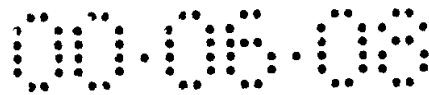
蛋白的分子的其它标记可以提供破坏具有抗血管生成蛋白质受体的细胞。

同样包括在术语“制管张素，内抑制素和静息蛋白”的定义中的有蛋白质，它的亚单位和肽片断的修饰。这样的修饰包括利用其它分子包括但不限于天然或非天然存在的氨基酸在特定的位点取代天然存在的氨基酸。这样的取代可以修饰抗血管生成蛋白质的生物活性，并且生产生物或药物拮抗剂或拮抗物。修饰也可以包括在蛋白质序列内的修饰的氨基酸，或抑制蛋白酶活性，或修饰成增强蛋白质的稳定性和降低蛋白质降解的完整蛋白质序列。这样的修饰是本领域技术人员已知的。参见例如，U.S.S.N.08/988,842,全部引入本文作为参考。

本文中修饰的蛋白质也指派生蛋白质或类似物。术语“衍生物”或“类似物”包括具有与本文特定地表示的序列基本相同的氨基酸残基的序列的蛋白质/多肽，在该蛋白质/多肽中，已经利用功能相似的残基保守地取代一个或多个残基，并且该蛋白质/多肽具有本文描述的活性。保守的取代的例子包括一个非极性(疏水)残基如异亮氨酸，缬氨酸，亮氨酸或甲硫氨酸取代另一个，一个极性(亲水)残基取代另一个，如在精氨酸和赖氨酸之间，在谷氨酰胺和天冬酰胺之间，在甘氨酸和丝氨酸之间，一个碱性残基如赖氨酸，精氨酸或组氨酸取代另一个，或一个酸性残基如天冬氨酸或谷氨酸取代另一个。

假如这样的多肽具有需要的抑制活性，术语“保守取代”也包括利用化学派生的残基取代非派生残基。

“化学衍生物”指具有一个或多个功能性侧基团的反应化学派生的残基的主体多肽。这样派生的分子包括例如其中游离氨基酸已经派生形成盐酸胺，对甲苯磺酰基团，苄氧羰基基团，



正丁氧羰基基团，氯乙酰基基团或甲酰基基团的那些分子。游离羧基可以派生形成盐，甲基和乙酯或其它类型的酯或酰肼。游离的羧基基团可以派生形成 O-酰基或 O-烷基衍生物。组氨酸的咪唑氮可以派生形成 N-im 苯基组氨酸。同时作为化学衍生物包括其中的含有 20 个标准氨基酸的一个或多个天然存在的氨基酸衍生物的那些肽。例如：4-羟基脯氨酸可以取代脯氨酸；5-羟基赖氨酸可以取代赖氨酸；3-甲基组氨酸可以取代组氨酸；高丝氨酸可以取代丝氨酸；和鸟氨酸可以取代赖氨酸。本发明的多肽也包括相对于本文表示了序列的多肽的序列具有一个或多个残基的加入和/或缺失的多肽，只要保持了需要的活性。

本发明也涉及与本文所示的蛋白质的序列类似的氨基酸残基序列，和编码这些蛋白质的核酸序列。本领域已知，没有基本改变蛋白质的生物学功能修饰和变化是允许的。在进行这样的变化时，可以在侧链的取代基的例如，它们的大小，电荷，疏水性，亲水性等等相对相似的基础上进行氨基酸残基的取代。可以改变所述的类型增强肽的酶解或药物动力学的潜力或稳定性。所以，本发明的范围确认的序列包括其中变化没有改变前面提到的抗血管生成蛋白质，衍生物，突变片断和/或融合蛋白质的功能特性和生物活性的氨基酸残基序列或类型中的变化为特征的那些类似序列。

本发明的抗血管生成融合蛋白质包括含有本文所述的一个或多个蛋白质，突变体，衍生物或片断以及其它本领域已知的抗血管生成的分子。例如，编码与静息蛋白连接的内抑制素的聚核苷酸可以编码本发明包括的融合蛋白质，其中表达的融合蛋白质具有内抑制素和静息蛋白的活性，导致融合蛋白质的生物活性比单体野生型内抑制素或静息蛋白都增强许多。本发明包括的另一类型的融合蛋白质可以是编码串联，通过接头非强制



如，通常在伤口愈合，胎的和胚的发育，和黄体，子宫内膜和胎盘的形成时观察到血管生成。术语“内皮”指位于浆液腔，淋巴管，血管的扁平上皮细胞的薄层。

正如本文所用，术语“血管生成相关因子”指抑制或促进血管生成的因子。血管生成相关因子的一个例子是血管生成生长因子，如基本成纤维细胞生长因子(bGFG)，它是血管生成促进剂。血管生成相关因子的另一个例子是血管生成抑制因子如制管张素。正如本文所用，术语“生长因子”指刺激细胞的生长，再生，或合成活性的分子。

血管生成介导的疾病包括但不限于，固体肿瘤；血液产生的肿瘤如白血病；肿瘤转移；良性肿瘤，例如血管瘤，听觉神经瘤，神经纤维瘤，粒性结膜炎，脓性肉芽瘤；类风湿关节炎；牛皮癣；眼的血管生成疾病，例如，糖尿病性视网膜病，早熟的视网膜病，斑点退化，角膜移植排斥，新血管性青光眼，晶状体后的纤维组织形成，发红；Osler-Webber 综合症；心肌的血管生成；斑新血管化；毛细血管扩张；血友病患者的关节；血管纤维瘤；和伤口发生肉芽。过量或正常刺激内皮细胞，制管张素可以用于治疗疾病。这些疾病也包括，但不限于，肠粘连，局限性回肠炎病，动脉粥样硬化，硬皮病和肥大性伤疤，即疤痕疙瘩。通过预防胚移植需要的血管化，本文叙述的抗血管生成的蛋白质也可以用作生育控制剂。这些蛋白质也可以用于治疗血管生成为病理结果的疾病如猫抓伤病(Rochele minalia quintosa)和溃疡(幽门螺旋杆菌)。

正如本文所用，术语“癌症”指依赖血管生成的癌症和肿瘤，即生长(体积和/或重量的扩增)需要供应它们血液的血管的数目和密度的增加的肿瘤。更具体地说，如本文所用，术语“癌症”指不正常细胞发育的肿瘤性生长，增生性或增殖性生长或病理状

态，并且包括固体肿瘤，非固体肿瘤，和任何不正常细胞增殖如白血病中可见的。“退化”指如利用标准技术测定的肿瘤重量和大小的减少。

## 给药和剂量

本发明的方法生产的抗血管生成蛋白质可以组合物使用，其中蛋白质结合药学可接受载体。这样的组合物也可以含有(除了蛋白质和载体)稀释剂，填充剂，盐，缓冲液，稳定剂，增溶剂和其它本领域已知的其它物质。术语“药学可接受”指不干扰活性成分的生物活性的效力的非毒性物质。载体的特征将取决于给药的途径。

本发明的组合物也可以含有其它抗血管生成蛋白质或化学组合物如内抑制素，制管张素，静息蛋白，突变体，衍生物，片断或其类似物。该组合物可以进一步含有增强蛋白质的活性或维护它的活性或用于治疗的其它试剂，如化学治疗或放射性试剂。这样的附加因子和/或试剂可以包括在组合物中，产生协同本发明的蛋白质的影响，或减少副作用。另外，本发明的组合物的给药可以与其它治疗共同施用，例如与化学治疗或放射性治疗方中结合给药。

本发明的蛋白质在多聚体(例如杂合二聚体或同型二聚体)或与她本身或其它蛋白质的复合物中可以是活化的。结果，本发明的组合物可以含有多聚体或复合物形式中的本发明的蛋白质。这样的多聚体或复合物在延长循环中抗血管生成蛋白质的半衰期中特别有用。两者必具其一地，因为副作用，系统地给药抗血管生成蛋白质可能不能令人满意也可能令人满意。在这种情况下，将抗血管生成蛋白质与靶试剂结合对于将抗血管生成蛋白质递送(靶击)到特定的组织或器官是有用的。例如，抗血

管生成蛋白质可以含有靶击特定细胞表面受体的肽(例如, 靶击微管结构的 VEGF)。这样的靶击分子是本领域技术人员已知的。

本发明的组合物可以是脂质体的形式, 其中除了结合其它药理学可接受载体, 本发明的蛋白质结合了两亲性试剂如以共聚形式如水溶液中的微团, 不溶的单层, 液晶或多层存在的脂。脂质体配方中的适当的脂包括但不限于甘油单酯, 甘油二酯, 硫酯, 溶血卵磷脂, 磷脂, 皂苷, 胆酸等等。这样的脂质体配方的制备如美国专利 4,235,871; 美国专利 4,501,728; 美国专利 4,837,028; 和美国专利 4,737,323 公开的是本领域的水平内的, 这些专利引入本文作为参考。

如本文所用, 术语“治疗有效量”指足以显示出对病人的明显益处即治疗, 治愈, 预防或改善有关的医学症状或增强治疗, 治愈, 预防或改善这样的病症的药物组合物的每种活性成分或方法的总量。当用于单独给药的单个活性成分时, 该术语指那个单独的成分。当用于联合的成分时, 不管结合起来, 顺序或同时给药, 该术语指这些活性成分的总共的量。

在本发明的治疗或使用方法的实践操作中, 本发明的蛋白质是以治疗有效量对具有待治疗的病症的哺乳动物给药的。根据本发明的方法, 单独或结合其它治疗可以给药本发明的抗血管生成蛋白质。这样的给药可以是同时的或按顺序的。如果按顺序给药, 参加治疗的医护人员将决定给药本发明的蛋白质和其它因子的适当顺序。

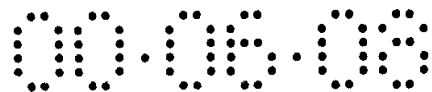
正如本文所用, 术语“原药物”指通过血液中的酶解, 在体内快速转化产生亲本化合物的化合物。在 T.Higuchi 和 V.Stella, 作为新递送系统的原药物, ACS 座谈会系列讨论的 14 卷, 和在 Edward B.Roche, 在药物设计中的生物可逆载体, 美国药学会

和 Permagon 出版社, 1987 中提供了完全的讨论, 这两篇文章引入本文作为参考。同样如本文所用, 原药物可以包括为了变成活化的, 需要在哺乳动物中加工的抗血管生成蛋白质, 例如需要蛋白酶裂解产生具有抗血管生成活性的蛋白质的抗血管生成蛋白质。

在药物组合物中利用的本发明的蛋白质的给药或本发明的方法的实施可以各种常规方法, 如口服摄食, 吸入, 局部应用或皮肤的, 皮下的, 腹膜内的, 肠胃外的或静脉内注射进行。对病人静脉内给药是优选的。

当治疗有效量的本发明的蛋白质口服给药时, 本发明的蛋白质的形式将是片剂, 胶囊, 粉末, 溶液或配剂。当以片剂形式给药时, 本发明的药物组合物可以另外含有固体载体如明胶或佐药。这些片剂, 胶囊或粉末含有约 5 到 95% 的本发明的蛋白质, 优选地含有约 25 到 90% 的本发明的蛋白质。当以液体形式给药时, 可以加入液体载体如水, 石油, 动物或植物来源的油如花生油, 矿质油, 大豆油, 或芝麻油或合成油。药物组合物的液体形式可以进一步含有生理盐溶液, 葡聚糖或其它多糖溶液, 或乙二醇如乙二醇, 丙二醇或聚乙二醇。当以液体形式给药时, 药物组合物含有 0.5 到 90% 重量的本发明的蛋白质, 优选地含有约 1 到 50% 的本发明的蛋白质。

当通过静脉内, 皮肤或皮下注射给药治疗有效量的本发明的蛋白质时, 本发明的蛋白质将是无致热源, 肠胃外可接受的水溶液形式。具有适当 pH, 等渗性, 稳定性等等的肠胃外可接受的蛋白质溶液的制备是本领域的技术范围内的。优选的静脉内, 皮肤, 或皮下注射的药物组合物除了含有本发明的蛋白质, 应该含有等渗载体如氯化钠注射液, 林格注射液, 葡聚糖注射液, 葡聚糖和氯化钠注射液, 乳化林格注射液或本领域已知的其它



载体。本发明的药物组合物也可以含有稳定剂，防腐剂，缓冲液，抗氧化剂或其它本领域已知的添加剂。

在本发明的药物组合物中的本发明的蛋白质的量将取决于治疗的病症的特点或严重性，和取决于病人已经进行的过去的治疗的性质。最终，将由参加治疗的医护人员决定治疗每个病人的本发明的蛋白质的量。开始，参加治疗的医护人员将对病人给药低剂量的本发明的蛋白质并且观察病人的反应。可以增加本发明的蛋白质的给药剂量直到病人获得了最适的治疗效果，并且到那点，剂量不再进一步增加。应当提到的是，用于本发明的方法的实践中的各种药物组合物的给药剂量应该是每公斤体重 0.01 微克到 100 毫克(优选地约 0.1 毫克到约 10 毫克，更优选地约 0.1 毫克到约 1 毫克)的本发明的蛋白质。

根据正在治疗的疾病的严重性和每个病人的条件和潜在的特异的体质反应，来源本发明的药物组合物静脉内治疗的时间是不同的。我们注意到连续静脉内给药本发明的蛋白质的应用的时间的范围是 12 到 24 小时。最终将由参加治疗的医护人员决定来源本发明的药物组合物静脉内治疗的适当时间。

如本文所用，术语“肠胃外”指给药的方式，包括静脉内，肌肉内，腹膜内，胸内，皮下和关节内的注射和侵入。肠胃外注射的药物组合物包括用于在使用之前再构成无菌可注射溶液或分散体的药学可接受无菌水溶液或非水溶液，分散体，悬浮液或乳化剂。适当的水状和非水状载体，稀释剂，溶剂或载体包括水，乙醇，多元醇(如甘油，丙二醇，聚乙二醇等等)，羧甲基纤维素和其适当的混合物，植物油(如橄榄油)，和可注射有机酯如乙油酸。例如利用包被物质如卵磷脂，在分散体的情况中维持需要的颗粒大小和利用表面活性剂可以维持适当的液体性。这些组合物也可以含有佐药如防腐剂，加湿剂，乳化剂，

分散剂。通过包入各种抗细菌和抗真菌剂，如对甲苯，氯丁醇，苯基抗坏血酸等等可以保证防止微生物作用。包含等渗试剂如蔗糖，氯化钠等等也是令人满意的。通过包入如延迟吸收的单硬脂酸铝和明胶的可以产生吸收延长的可注射药学形式。通过在可生物降解的多聚体如聚交酯-polyglycolide，聚(原酸酯)和聚(酸酐)中形成药物的微胶囊基质可以制造可注射的储存形式。根据药物与多聚体的比例和利用的特定的多聚体的特性，可以控制药物释放的速度。通过在与人体组织相容的脂质体乳化剂中埋入药物也可以制备可储存的可注射配方。通过在滞留细菌的过滤器上过滤或通过掺入在使用之前可以在无菌水或其它无菌可注射介质中溶解或分散的无菌固体组合物形式的无菌试剂可以灭菌可注射的配方。

本发明的化合物可以从无机或有机酸派生的药物可接受盐的形式使用。“药物可接受盐”指在医学判断的范围内，适用于与人和低等动物接触而没有毒性，刺激，变应性反应等等并且与合理的益处/危险比例相称的那些盐。药物可接受盐是本领域已知的。例如，S.M.Berge,等人在药理学科学杂志(1977)66: 1et seq中详细叙述了药物可接受盐该文献引入本文作为参考。在本发明的化合物的最后分离和纯化的过程中原位地或独立地通过将游离碱基官能团与适当的有机酸反应可以制备盐。代表性的酸加成盐包括但不限于，乙酸盐，己二酸盐，海藻盐，柠檬酸盐，天冬氨酸盐，苯甲酸盐，苯磺酸盐，酸式硫酸盐，丁酸盐，樟脑氨酸盐，樟脑磺酸盐，二葡萄糖酸盐，甘油磷酸盐，半硫酸盐，庚酸盐，己酸盐，富马酸盐，盐酸盐，溴酸盐，碘酸盐，2-羟基甲基磺酸盐(羟乙磺酸盐)，乳酸盐，苹果酸盐，甲基磺酸盐，烟酸盐，2-萘基磺酸盐，草酸盐，扑酸盐，果胶酯酸盐，果胶酸盐，3-苯丙炔酸盐，苦味酸盐，新戊酸盐，丙炔酸盐，琥珀酸盐，酒石酸盐，硫氰酸盐，磷酸盐，谷氨酸盐，二碳酸盐，

对苯磺酸盐和十一酸盐。同样，碱性含氮基团可以利用下面的试剂四位一体化：低级烷基卤化物，如甲基，乙基，丙基和丁基氯化物，溴化物和碘化物；二烷基硫酸盐如二甲基，二乙基，二丁基和二戊基硫酸盐；长链卤化物如葵基，月桂基，肉豆蔻基和硬脂基氯化物，溴化物和碘化物；芳基烷基卤化物如苯基和苯乙基溴化物和其它。从而获得了水或油溶性的或可分散的产物。可以用于形成药物可接受酸加成盐的酸的例子包括如盐酸，氢溴酸，硫酸和磷酸这样的无机酸和如草酸，马来酸，琥珀酸和乙酸这样的有机酸。

局部给药可以适用于伤口愈合和组织修复。除了本发明的蛋白质，也可以非强制性地包括在如上所述的组合物中的治疗有用的试剂可以与本发明的方法中的组合物同时地或顺序地轮流或另外给药。

编码本发明的抗血管生成蛋白质，突变体，衍生物，片断和融合蛋白质的聚核苷酸也可以用于基因治疗。固定供应令人满意的抗血管生成的蛋白质(令人，慢性供应)支持了基因治疗的应用。为了在哺乳动物受试者中表达，这样的聚核苷酸可以在体内或来自体内地导入细胞。例如，含有编码抗血管生成蛋白质的适当载体可以导入骨髓，肌肉，肝或关节(在类风湿关节炎的情况下，蛋白质将在滑液中表达)。基因治疗的方法是本领域已知的(参见例如，美国专利 5, 398, 346，内容全部引入本文作为参考)。

为了在细胞或生物体中导入核酸(包括，但不限于病毒载体或裸 DNA)，本发明的聚核苷酸也可以通过其它已知的方法给药。或者，为了增殖或在这样的细胞中的活性产生需要的影响，来自体内的细胞也可以在存在本发明的蛋白质时培养。然后，

在哺乳动物中导入处理的细胞，在哺乳动物中表达了看血管生成蛋白质用于治疗。

本发明的蛋白质也可以用于免疫动物获得特异地与蛋白质反应的多克隆和单克隆抗体。这样的抗体可以利用整个蛋白质或其片断作为免疫原获得。肽免疫原另外可以在羧基末端含有半胱氨酸残基，并且与半抗原如钥孔戚血蓝蛋白(KLH)接合。合成这样的肽的方法是本领域已知的，例如 R.P. Merrifield, J.Amer.Chem.Soc.85,2149-2154(1963); J.L.Krstenansky 等人，FEBS Lett.211,10(1987)中所述。结合本发明的蛋白质的单克隆抗体可能是用于免疫检测本发明的蛋白质的有用的诊断试剂。结合本发明蛋白质的中和单克隆抗体对于与本发明的蛋白质相关的病症和在治疗包括本发明的蛋白质的不正常表达的一些形式的癌症也是有用的治疗剂。在癌细胞或白血病的情况中，中和抗本发明的蛋白质的单克隆抗体可能在检测和预防本发明的蛋白质介导的癌细胞的转移扩散中是有用的。

上面的使用方法是本领域已知的。公开这样的方法的参考文献包括但不限于“分子克隆：实验室手册”第二版，冷泉港实验室出版，Sambrook, J.E.F.Fritsch 和 T.Maniatis 编辑，1989，和“酶学方法：分子克隆技术的指导”，学术出版社，Berger, S.L.和 A.R.Kimmel 编辑，1987。

本发明由下面的实施例说明，这些实施例不以任何方式限制本发明。

## 实施例

### 实施例 1: 细胞系

C - PAE, 小牛肺动脉内皮细胞系, 和 ECV304, 人内皮细胞系是从 ATCC 获得的(美国典型培养物保藏中心, 10801 大学大道, Manassas, VA, 20110-2209, 美国)获得的。在利用 10 % 胎牛血清(FCS), 100 单位/毫升青霉素, 100 克/毫升链霉素, 和 2 毫摩尔/升的 L - 谷氨酰胺的 M199 中的 DMEM 和 ECV34 中维持 C - PAE 细胞系。HUVE(人脐静脉内皮细胞系)和 HMVE - L(人微管内皮细胞(肺)细胞系)是从 Clonetics 公司(圣迭戈, 加利福尼亚, 美国)购买的。在含有小牛脑提取物(3 毫克/毫升), hEGF(10 克/毫升), 羟基可的松(1 克/毫升), 2 % FCS, 庆大霉素(50 毫克/毫升, 0.5 毫升), 和两性霉素(50 克/毫升)的 EGM 培养基中维持 HUVE 细胞。根据标准方法, 在含有制造商建议的生长因子的 EGM - 2 培养基中培养 HMVE - L 细胞(Clonetics, Inc., CA 制造商的指导)。酵母表达系统, 巴斯德毕赤氏酵母(pPICZ $\alpha$ A)是从 InVitrogen(圣迭戈, 加利福尼亚, 美国)购买的。限制酶和 Vent DNA 聚合酶是从新英格兰生物实验室(Beverly, Massachusetts, 美国)购买的。IMR - 90(ATCC:CCL-186)和 WI - 38(ATCC:CCL-75), 人成纤维细胞也是从 ATCC 购买的。

### 实施例 2: 在原核系统中克隆和表达小鼠内抑制素

内抑制素的序列表示在图 4 和 5。利用 Vent DNA 聚合酶, 通过 PCR 扩增编码小鼠胶原 XVIII 的羧基末端部分的序列。将内抑制素 pBACPak8 载体用作 PCR 扩增的模板。利用的引物如下: 5' - GGC - ATA - TGC - ATA - CTC - ATC - AGG - ACT - TT - 3(SEQ ID NO: )

5'-AAC-TCG-AGA-TTT-GGA-GAA-AGA-GGT-3'(SEQ ID NO: )

PCR 进行了 30 个循环，每个循环的参数如下：94℃变性，60%退火和 70℃延长，前面每个 1 分钟。利用 QIAquickPCR 纯化试剂盒纯化扩增的 DNA 片断(555bp)，然后利用 NdeI 和 XhoI 消化。将消化片断连接入预消化的表达载体 pET17bhis(Dhanabal, M., Fryxell, D.K. 和 Ramakrishnan, S. (1995)免疫方法杂志 182: 165 - 175)。最初的转化是利用 HMS174 寄主菌株进行的。对阳性克隆的两条链测序。最后，将需要的克隆转化进入 BL21(DE3)表达。如制造商所述在 pET 系统中进行重组蛋白质的表达。

将 Ni-NTA 琼脂糖柱用于纯化重组蛋白质(图 6A)。如 O'Reilly 等人所述，在 8M 脲中溶解内含体中存在的蛋白质并且在变性条件下纯化(O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R. 和 Folkman, J. (1997) 细胞 88: 277 - 285)。在非还原条件下，SDS - PAGE 分析显示在 22 - 24 千道尔顿有分离的带。合并在不同 pH 洗脱的峰蛋白质，对浓度下降的脲透析，在 PBS 缓冲液 pH7.4 进行最后的透析，这时大多数蛋白质从溶液中沉淀了。因为从相同系统表达的非再折叠沉淀蛋白质已经在体内显示生物活性，我们已经根据利用的准确方法“再折叠蛋白质”(如 O'Reilly 等人所述(O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R. 和 Folkman, J. (1997) 细胞 88: 277 - 285)。体内实验中利用的沉淀蛋白质的形式只为悬浮液，通过 BCA 方法测定蛋白质的浓度(在脲中溶解，以及适当的空白测定)，以小的等分试样储存在 -70℃。在 O'Reilly 等人(O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R. 和 Folkman, J. (1997) 细胞 88: 277 - 285)中引证的未公开观察结果表明内抑制

素 C 末端的 His.Tag 破坏了内抑制素的生物活性。所以，产生了 C 末端缺失了 11 个氨基酸的内抑制素突变体，EM1，19 千道尔顿的蛋白质，留下所有 4 个半胱氨酸残基是完整的。内抑制素突变体 EM2 是进一步删除大多数 C 末端半胱氨酸的 8 个氨基酸缺失的内抑制素。

设计引物使 EM1 和 EM2 的内抑制素的 C 末端分别缺失 9 和 17 个氨基酸。纯化扩增的 DNA 片断(EM1 的 525 bp, EM2d 501 bp)，利用 NdeI 和 NotI 消化，连接进入预消化的 pET28(a)表达载体。如上所述进行方案的其余部分。诱导条件和细菌小丸的加工如其它所述进行(O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birhead, J.R., Olsen, B.R. 和 Folkman, J. (1997) 细胞 88:277-285)。重组蛋白质的纯化是利用 Ni-NTA 柱，在存在 8M 脲，如 QIAexpressionist 手册中所述进行的。简要地说，将细菌小丸在“平衡缓冲液”(8M 脲，10 毫摩尔/升 Tris 和 100 毫摩尔/升磷酸钠缓冲液，pH8.0)中，在室温下溶解 1 小时。超声波处理悬浮液 3-4 次，在  $10,000 \times g$  离心，并且在 Ni-NTA 上加载可溶的部分，用于体内研究。EM1 和 EM2 是利用 Ni-NTA 柱纯化的。结合于柱上的非特异蛋白质是利用平衡缓冲液洗涤，接着 10 毫摩尔/升咪唑洗涤液除去的。在含有 10 % 甘油和 0.2 摩尔/升的乙酸的平衡缓冲液洗脱结合的蛋白质。根据上述方法再折叠纯化的蛋白质。

### 实施例 3：在 PICHIA PASTORIS 中表达小鼠内抑制素

pPICZ $\alpha$ A 表示在图 1 和 2。利用 Vent DNA 聚合酶的 PCR 进一步修饰了编码小鼠内抑制素的序列。在预消化的酵母表达载体中亚克隆含有 EcoRI 和 NotI 限制位点的扩增片断。(图 3)。pPICZ $\alpha$ A 载体携带含有用于抗生素选择的 Zeocin 标记的  $\alpha$  因子分泌信号序列。初步的转化是在 Top 10 寄主菌株中进行的。筛

选含有插入片断的阳性克隆，并将阳性克隆测序。然后利用 *SacI* 将质粒线性化，并且用于在酵母寄主寄主 GS115 中的同源重组。转化是利用如 Pchia 表达手册所述的氯化锂方法进行的。在含有 100 克/毫升 Zeocin 的 YPD 平板上涂布选择重组体。检测在 YPD/Zeoicin 平板上生长的克隆的表达。

大规模表达小鼠内抑制素是在 2 升的带挡板的摇瓶中进行的。利用过夜生长培养物( $A_{600}$ , 2-6)接种 2 升的烧瓶。在每个 2 升的烧瓶中加入 500 毫升缓冲甘油培养基。在 30℃, 250 rpm 生长细胞直到  $A_{600}$ , 16 - 20(2 天)。在 2 天后，在 5000 rpm 离心细胞 10 分钟。将酵母再悬浮于 300 - 400 毫升缓冲甲醇诱导培养基中。在诱导后的第二，第 3，第 4 天收集含有分泌的重组蛋白质的上清液。在收集结束后，立即加工无细胞上清液。

甲醇营养酵母菌株，巴斯德毕赤氏酵母具有许多高等真核表达系统的优点：(a)  $\alpha$  因子信号序列的存在简化的表达蛋白质分泌到培养基的过程，(b) 酵母菌株(GS115)只分泌非常低水平的内源寄主蛋白质，进一步简化了纯化过程，和(c) 没有内毒素的污染。选择载体 pPICZ $\alpha$ 用于小鼠内抑制素的表达。初步筛选可以鉴定具有高水平表达的酵母克隆。内抑制素表达为可溶蛋白质(20 千道尔顿)，在诱导的第二天可以观察到峰表达水平。

#### 实施例 4: 小鼠内抑制素的纯化: 肝素琼脂糖层析

如 O'Reilly 等人报道，小鼠内抑制素结合于肝素柱的肝素结合区(O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R. 和 Folkman, J. (1997) 细胞 88: 277 - 285)，所以，肝素琼脂糖柱可用于纯化。利用硫酸铵沉淀(70%)浓缩含有重组蛋白质的粗上清液。在含有 150 毫摩尔/升 NaCl 的 10 毫摩尔/升 Tris 缓冲液 pH7.4 溶解沉淀

的蛋白质，并且在 4℃，在 6-8 小时的间隔中利用三个变化透析蛋白质。利用 Amicon 浓缩器(YM10)超滤进一步浓缩透析的样品。在用后可处置的聚戊烯柱(Bio-Rad)中填充肝素琼脂糖树脂，并且利用 10 毫摩尔/升 Tris, 150 毫摩尔/升 NaCl(pH7.4)平衡。利用蠕动泵以 20 毫升/小时的流速在柱上加载浓缩的样品。利用平衡缓冲液洗涤柱直到  $A_{280} < 0.001$ 。利用逐步 NaCl 梯度(0.3, 0.6, 1.0 和 2.0 摩尔/升 NaCl)洗脱结合的蛋白质。合并来自 0.6 到 1.0 摩尔/升洗脱时的峰蛋白质，并且对 PBS pH7.4 透析。通过 BCA 测试(Pierce)测定蛋白质的浓度。在 4℃的冷室中进行纯化过程。

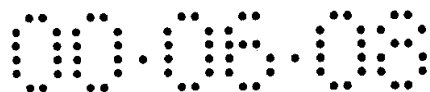
图 7A 和 7B 表示了纯化蛋白质的洗脱方案和 SDS - PAGE 分析。利用浓度增加的 NaCl 洗脱获得了两个明显的峰(图 7A)。比较在 0.6 摩尔/升 NaCl 洗脱的主要峰，利用 0.3 摩尔/升 NaCl 的第一个洗脱峰是小的。利用 1 摩尔/升 NaCl 洗脱时没有明显的峰。大多数内抑制素蛋白质结合于柱的表现是流动通过的组分中没有蛋白质(图 7B)。重组蛋白质紧密结合柱，利用低盐 Tris 缓冲液洗涤除去了其它酵母衍生蛋白质。在 0.3 摩尔/升 NaCl 时，从柱中洗脱了少量内抑制素(图 7B)。在 0.6 摩尔/升 NaCl 时，洗脱了所有结合的蛋白质(图 7B)。来自 0.3 摩尔/升 NaCl 组分洗脱的蛋白质具有痕量的内抑制素，但污染了其它寄主衍生的高分子量蛋白质。纯化的蛋白质蛋白质迁移到 20 千道尔顿，并且在还原基础上迁移到 22 千道尔顿。合并 0.6 摩尔/升 NaCl 单独洗脱蛋白质组分，浓缩，对 PBS pH7.4 透析。利用 Superose12 大小分离柱，通过 FPLC 进一步分离纯化的蛋白质。从这一柱的洗脱方案显示获得单一峰。SDS - PAGE 分析表明存在对应于内抑制素的单一分离带。估计表达的水平在 15-20 毫克/升培养基的范围。重组蛋白质结合于肝素琼脂糖柱，并且在 0.6-1M NaCl

浓度范围内洗脱。这些数据表明酵母表达的蛋白质适当地折叠了，因为它的特性与杆状病毒表达的内抑制素可比较。

#### 实施例 5: 在 PICHIA 表达系统克隆和表达 his.内抑制素

在 pET 表达载体中的小鼠内抑制素构建体的编码区的前面是 His.tag(10 个组氨酸残基)。通过 DNA - PCR, 含有 His.Tag 序列的编码区穿梭进入 pPICZ $\alpha$ A 载体中。如上所述进行线性化和在酵母寄主菌株 GS115 中的重组。利用硫酸铵(70%饱和)测定无细胞培养基。将测定的蛋白质溶解于含有 300 纳摩尔/升 NaCl 的 50 毫摩尔/升的磷酸钠缓冲液 pH8.0, 并且在同样的缓冲液中, 在 4℃, 在 6 - 8 小时的间隔变化 3 次透析。利用镍琼脂糖柱(Ni-NTA)纯化 His.内抑制素重组蛋白质。如 QIA 表达工作人员的手册中所述进行纯化。利用逐步咪唑梯度(10 毫摩尔/升, 25 毫摩尔/升, 50 毫摩尔/升, 和 100 毫摩尔/升)洗脱结合的蛋白质。

从 Ni-NTA 柱洗脱 His.内抑制素的方案表明重组蛋白质紧密地结合与柱(图 8A 和 8B)。在培养物上清液中酵母派生的寄主蛋白质没有结合在柱上, 并且在洗涤过程中除去。通过逐步的咪唑梯度洗脱了结合的蛋白质(图 8A)。加入 10 毫摩尔/升咪唑洗脱非特异结合的寄主派生蛋白质。在 25 毫摩尔/升咪唑时, 小部分重组蛋白质与高分子量蛋白质一起洗脱了。利用 100 毫摩尔/升咪唑最后洗脱显示出了一个明显的峰。洗脱的蛋白质的 SDS - PAGE 分析(图 8B)表明流过的部分没有含有任何内抑制素, 表明大多数蛋白质结合于柱上。浓度增加到 10 毫摩尔/升和 25 毫摩尔/升的咪唑的洗脱导致了非特异蛋白质的洗脱。在 100 毫摩尔/升时观察到 22 千道尔顿分子量的蛋白质, 以及对应于 44 - 46 千道尔顿的小量蛋白质。利用 BCA 方法测定了纯化的蛋白质的浓度。表达的水平估计为 15 毫克/升培养物。



### 实施例 6: 重组内抑制素的鉴定

为了进一步鉴定重组蛋白质, 在 Harvard 微测序设备中进行几个循环的 N 末端微测序。另外, 利用 10 微克起源于毕赤氏酵母表达系统的纯化蛋白质免疫兔产生了小鼠重组内抑制素的多克隆抗血清。在 12% SDS - PAGE 上分离从细菌和酵母系统表达的重组内抑制素。通过半干转移(Trans-blot, Bio-Rad), 将蛋白质转移到 PVDF 膜上。将初级抗血清在含有 5% 无脂肪干牛奶的 1 × TBS 缓冲液中稀释到 1: 4000。将山羊抗兔 IgG/HRP 共轭物用作次级抗体(1:5000)。通过化学荧光(Pierce)检测免疫反应活性。

序列分析显示酵母  $\alpha$  因子信号肽是加工的并且在丙氨酸处裂解。在信号肽裂解后的纯化蛋白质的开始 7 个残基(EFHTHQD)准确地与内抑制素蛋白质的已知序列匹配(Rehn, M., Hintikka, E., 和 Pihlajaniemi, T. (1994) 生物化学杂志, 269: 13929 - 13935)。

### 实施例 7: 内抑制素多克隆抗体和 Western 影印分析

本发明产生了抗起源于酵母表达系统的纯化的小鼠内抑制素的多克隆抗体。在还原和非还原条件下电泳从细菌和酵母表达系统的表达的纯化的内抑制素。从 Western 影印估计的蛋白质的大小范围是 22 - 24 千道尔顿。另外, 利用 Penta His. 单克隆抗体(QIAGEN, CA)检测来自酵母和细菌的重组 His. 内抑制素。该单克隆抗体只对 His. 内抑制素显示有阳性应答, 而活化的内抑制素没有显示任何免疫反应性。检测证明了在重组蛋白质中存在 His.Tag。抗血清与人或小鼠制管张素没有任何交叉反应性, 证明抗血清具有一定程度的特异于内抑制素的免疫反应性。EM1 和 EM2 蛋白质也观察到了与多克隆抗体的免疫反应性。

### 实施例 8: 内皮增殖测试

体外确定重组内抑制素的生物活性。利用小牛肺动脉内皮细胞(C-PAE), 通过掺入  $^3\text{H}$ -胸腺嘧啶测定酵母系统中产生的内抑制素的抗增殖效果。

在 24 孔纤连蛋白包衣的平板(10 微克/毫升)以 0.5 毫升含有 2% FBS 的 DMEM 中每孔 12, 500 个细胞涂布细胞。在 37°C 温育 24 小时后, 利用新鲜的 DMEM 和含有 3 纳克/毫升 bFGF(R 和 D 系统), 有或没有重组小鼠内抑制素的 2% 的 FBS 替代培养基。利用 1 居里  $^3\text{H}$ -胸腺嘧啶脉冲细胞 24 小时。抽出培养基, 并且利用 PBS 洗涤细胞 3 次。然后加入 1.5 当量浓度 NaOH(100 微升/孔)溶解细胞, 并且在 37°C 温育 30 分钟。利用液体闪烁计数器确定细胞结合的放射活性。

利用纯化的内抑制素观察到了依赖剂量地抑制 bFGF 诱导的增殖(图 9)。随着内抑制素的浓度的增加(0.1 微克/毫升到 10.0 微克/毫升)观察到了抑制范围(30 - 94% 对照),  $\text{ED}_{50}$  值的范围是 600 - 700 纳克/毫升。当如本文所述测试来自酵母的 His. 内抑制素时, 观察到它对 C-PAE 细胞具有相同的抑制效果。

从  $\text{ED}_{50}$  的值可知, 从酵母系统表达的重组内抑制素的生物活性与从杆状病毒系统表达的蛋白质的生物活性是相当的。杆状病毒起源的内抑制素的最大抑制在 600 纳克/毫升或更大。酵母起源的内抑制素的  $\text{ED}_{50}$  的值是 600 - 700 纳克/毫升。同时, 高剂量(>100 微克/毫升)的内抑制素没有抑制 786-0 细胞系的生长。

### 实施例 9: 内皮迁移测试

为了确定重组内抑制素阻止 ECV304 细胞朝 bFGF 迁移的能力, 利用不同浓度的内抑制素以及 bFGF 作为刺激物进行迁移测试。利用了 12 孔 Boyden 趋化性室(Neuro Probe 公司)以及聚碳酸酯膜(25 × 80 毫米无 PVD, 8 孔, Poretics 公司, Livermore, CA)。利用含有 0.5% 明胶, 1 毫摩尔/升  $\text{CaCl}_2$  和 150 毫摩尔/升 NaCl 的溶液在 37℃ 过夜包衣, 预防生长因子与室的非特异结合。在含有 5 纳克/毫升 DiI(1,1,'-双十八烷基 - 3, 3, 3', 3' - 四甲基吲哚碳菁高氯酸盐 DiIC18, 分子探测, Eugene, OR) 的 10% FBS 过夜生长 ECV304 细胞, 并且利用含有 0.5% BSA 的 PBS 洗涤。在胰蛋白酶消化后, 利用 Coulter-Counter Z1 (Luton, U.K.) 计数细胞, 并且在含有 0.5% FBS 的培养基 199 中稀释细胞到 300, 000 个细胞/毫升。下面的室利用含有 25 纳克/毫升 bFGF 的培养基 199 填充。上面的室利用 15, 000 细胞/孔以及不同浓度的重组内抑制素涂布。允许细胞在 37℃ 迁移 4 小时。然后, 用细胞刮刀除去膜的上表面的细胞, 在 3% 的福尔马林中固定下表面上的迁移细胞, 并用 PBS 洗涤。利用 550 纳米处的荧光显微镜以及数码相机获得固定的膜的成象, 并且利用 OPTIMAS(6.0 版本)软件确定每个膜上的细胞数。

加入内抑制素导致依赖剂量的增殖抑制, 最大剂量是 20 微克/毫升(图 10)。在小于 1 微克/毫升的浓度时, 观察到了迁移的临界抑制。在 10 微克/毫升浓度时, 内皮细胞迁移的抑制是 60%。

### 实施例 10: CAM 测试

利用尿囊绒毛膜(CAM)测试方法测定小鼠内抑制素阻止 bFGF 体内诱导血管生成的能力。将已孵化的白色 Leghorn 鸡蛋

(SPAFAS 公司, NorwichCT)在 100 平方毫米的石盘上打开, 允许在 38℃的潮湿温育器中生长到 11 天。含有 0.73 毫克/毫升浓度的 vitrogen(Collagen 生物材料, Palo Alto,CA)和补充了: a)单独载体; b)VEGF(250 纳克/小丸); c)VEGF 和内抑制素(分别是 20 和 0.5 微克/小丸); d)bFGF(50 纳克/小丸);和 e)bFGF 和内抑制素(分别 20 和 0.5 微克/小丸)的小丸在 37℃多聚体化 2 小时。将小丸放置于尼龙膜上, 位于 CAM 的周边。将胚胎回到温育器 24 小时。在鸡胚胎的循环系统中注入 FITC 葡聚糖测定新的毛细血管侵入胶原网。在实验结束时, 分解网, 利用程序 NIHImage 1.59 测定血管的密度。进行三次测试, 和四次独立的实验。

内抑制素能够抑制 bFGF 和 VEGF 介导的血管生成反应(图 11A 和 11B)。在 5 微克/网的平台, 抑制是依赖剂量的。有时, VEGF 应答的阻止(47%)比 bFGF 应答的抑制(39%)更有效。在 CAM 测试中, 在 20 微克/盘浓度的内抑制素抑制了 bFGF 诱导的血管生成。在摩尔基础上, 在相同的测试中, 内抑制素对 CAM 测试的影响显示比抑制剂血小板反应蛋白 - I(35), 烟曲霉素 (AGM1470)或抗整联蛋白  $\alpha_3$  的抗体更具有更强的潜力。在提供内抑制素作用的其它机制和新的体外效力测试方面, 我们对内皮细胞迁移的研究是新的。

#### 实施例 11: 内抑制素抑制效果的中和

利用内皮增殖和 CAM 测试的中和研究证明了内抑制素抑制效果具有特异性。简要地说, 在内皮增殖测试中, 利用多克隆抗血清预温育内抑制素, 然后加入 C-PAE 细胞。利用预免疫血清作为阴性对照。另外, 也利用纯化的 IgG 作为对照。然后, 利用  $^3\text{H}$ -胸腺嘧啶脉冲细胞 24 小时, 如上所述测定细胞结合的放射活性。在 CAM 测试中, 在制备小丸之前, 在 4℃, 尾对尾地过夜预温育内抑制素(10 微克)和抗血清(50 微克)。这些实验的

对照包括 IgG 单独和预免疫血清单独。如上确定血管生成应答的评估。

图 12 证明了与特异的抗血清一起温育能够抑制内抑制素的抑制影响。抗内抑制素阻止 95 % 的抑制影响。预免疫血清单独和正常兔 IgG 都没有刺激影响。

#### 实施例 12: 在裸小鼠模型中初级 786-0 肿瘤的抑制

在右侧空白皮下，利用 100 微升体积的 2 百万个 786-0 细胞注射 6 到 8 星期大的雄性米色裸鼠。在细胞植入后约 2 星期出现肿瘤。利用卡钳测量肿瘤大小，利用标准公式计算肿瘤体积。肿瘤体积范围 350 立方毫米到 400 立方毫米。任取动物，每组 5 个小鼠，在组内和组之间肿瘤的大小是相当的。利用重组内抑制素(细菌或酵母版本)开始处理，每个小鼠每天接受 10 毫克/公斤体重的重组蛋白质，通过腹膜内注射给药 10 天。对照动物每天接受 PBS。在另外的日期测量所有组的肿瘤大小，并计算肿瘤体积。在这一时期检测动物的活性和行为。在 10 天的时候终止处理，杀死动物，移取每个小鼠的肿瘤，在 10 % 的缓冲福尔马林中固定。

对于突变体研究，每个小鼠在 2 星期中每天腹膜内接受 20 毫克本发明的蛋白质/公斤体重。肿瘤体积范围是 150 - 200 立方毫米。在实验中，给予每公斤体重 20 毫克 pET28(a)载体生产的野生型内抑制素作为阳性对照，并且将给予 PBS 的小鼠作为阴性对照。

在处理 15 天后，在对照(963 立方毫米)和处理(酵母内抑制素，405 立方毫米；细菌内抑制素，442 立方毫米，和 His.内抑制素，462 立方毫米)之间存在差异。在处理 15 天后，在对照

和处理之间观察到肿瘤体积下降 2.5 倍(图 13A)。在所有处理组中, 肿瘤的生长受抑制: 比较对照组观察到了更慢的生长速度。剂量 10 毫克/公斤的细菌(His.Tag)或酵母衍生(有或没有 His.Tag)内抑制素作用同样好。在处理后的第 10 天, 肿瘤体积在对照动物中是 1490 立方毫米, 而在处理组中发现是 480 - 570 立方毫米( $p < 0.005$ )。给药内抑制素没有完全抑制肿瘤的生长, 但肿瘤的生长慢了, 在该时期, 肿瘤体积保持了勉强的生长。

在 RCC 模型中进行利用 20 毫克/公斤体重的内抑制素和突变体 EM1 和 EM2 的第二套实验。在图 13B 中表示了在处理 11 天后的肿瘤体积。在处理后的 9 天, 在组之间出现了差异。在处理后的 11 天, 在对照组中的肿瘤体积(397 立方毫米)大约 2 倍于两个内抑制素(182 立方毫米)或 EM1(259 立方毫米)的处理组。但是, 在同样的天数, EM2 处理组的肿瘤体积(389 立方毫米)相同于对照组(397 立方毫米)。意义在于 EM2 和内抑制素组之间的 90 % 的置信水平和在内抑制素和对照组之间 95 % 的置信水平。在 11 天时, 在每组中最大和最小肿瘤的值下降增加了 EM2 和 EM1 之间和 EM2 和内抑制素之间的置信水平到 95 %。所以, EM1 蛋白质保留了内抑制素的天然生物活性, 而 EM2 没有。在两个突变的内抑制素蛋白质之间效力的明显差异也表明内抑制素而不是可能的污染是给出抗血管生成影响的活性分子。另外, 突变蛋白质的数据指出了作为内抑制素活性的关键的围绕和包括最后的半胱氨酸的 8 个残基(SYIVLCEE)的重要性。

关于抑制初级肿瘤生长的能力方面, 不管蛋白质的来源, 非再折叠或天然蛋白质都具有可比较的抑制方案。另外, 在酵母起源的蛋白质中存在 His.Tag 序列没有影响生物活性。虽然在对照和处理小鼠之间, 肿瘤体积有明显的差异, 在处理时期, 处理组中的肿瘤也连续地慢慢生长。在处理后的 10 天, 当终止给药

内抑制素时，肿瘤快速生长，在 1 个星期内，肿瘤的平均大小即相当于对照。在相当大肿瘤体积的第一个研究中，我们不能诱导肿瘤休眠。随后，在肿瘤范围 150 - 200 立方毫米并且增加剂量到 20 毫克/公斤体重测试内抑制素(和它的突变体)的影响。在这些条件下，肿瘤生长抑制了，虽然没有观察到肿瘤休眠。

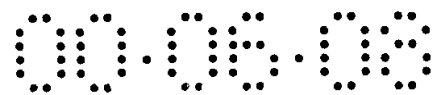
### 实施例 13: 在巴斯德毕赤氏酵母中的人内抑制素的克隆，表达和纯化

利用 Vent DNA 聚合酶从人胎肾(HFK) cDNA 文库扩增编码人胶原 XVIII 的羧基末端部分的序列。利用的引物是：基于人胶原 XVIII 序列的 5' - TTT GAA TTC GCC CAC AGC CAC CGC GAC TTC CAG CCG GTG CTC CAC - 3'(SEQ ID NO: )和 5' - AAA AGC GGC CGC CTA CTT GGA GGC AGT CAT GAA GCT GTT CTC AAT - 3'(SEQ ID NO: )(Oh 等人(1994) 基因组 19: 494 - 499)。根据下面的参数进行 30 个循环的扩增：94℃变性，60℃退火，和 72℃延长，每个 1 分钟。利用 QIAquick 纯化试剂盒(Qiagen,Hilden,德国)纯化扩增的 549bp 的片断，利用 EcoRI 和 NotI 消化(在上面的引物中这些限制位点下面划线了)。将得到的片断连接进入预消化的酵母表达穿梭质粒(pPICZαA,图 1)，并且转化进入巴斯德毕赤氏酵母。对阳性克隆的两条链测序。如 Dhanabal 等人(1999)(癌症研究，在出版中)，和在 Vikas P.Sukhatme, 1998 年 11 月 8 日递交的美国专利申请，U.S.S.N.:XX/XXX,XXX,“抗血管生成肽和其应用方法”中所述对小鼠内抑制素进行转化，重组和选择，上面的文献全部引入本文作为参考。

如上对小鼠内抑制素所述在 2 升带挡板的摇瓶中进行大规模的人内抑制素的表达，如 Dhanabal 等人(1999)(癌症研究，出版中)，和 Vikas P.Sukhatme1998 年 11 月 8 日递交的美国专利申请，

U.S.S.N.:XX/XXX,XXX, “抗血管生成肽和其应用方法”中所述加工含有分泌的重组蛋白质的上清液，上面文献全部引入本文作为参考。利用 70 % 硫酸铵沉淀浓缩蛋白质。在含有 50 毫摩尔/升 NaCl 的 50 毫摩尔/升磷酸钠缓冲液，pH7.4 中透析沉淀的蛋白质。利用肝素琼脂糖柱进行人内抑制素的纯化。在柱上利用蠕动泵加载蛋白质样品。利用含有 50 毫摩尔/升 NaCl 的 50 毫摩尔/升的磷酸缓冲液，接着利用含有 100 毫摩尔/升 NaCl 的同样的缓冲液洗涤柱。利用 0.2 摩尔/升和 1 摩尔/升 NaCl 的逐步洗脱液洗脱结合的蛋白质。合并 1MNaCl 洗脱的峰组分，在 PBS 缓冲液(pH7.4)中透析。通过 BCA 测试测定蛋白质的浓度(Pierce 化学公司，Rockford,Illinois,美国)。

在诱导后 2 天，起初的小规模表达显示了最大的表达水平。内抑制素表达成可溶的 20 千道尔顿蛋白质。利用肝素琼脂糖柱纯化内抑制素。图 14A 和 14B 表示了纯化蛋白质的洗脱方案和 SDS - PAGE 分析。在这一研究中，与小鼠内抑制素相比，人内抑制素与肝素琼脂糖柱的结合效果更小。所以，在 50 毫摩尔/升 NaCl 中进行结合，接着利用 0.1 摩尔/升 NaCl 洗涤，最后利用 0.2 摩尔/升 NaCl 和 1 摩尔/升 NaCl 进行洗脱。观察到了两个明显的洗脱峰。利用 10 毫升来自选择的组分的等分试样进行洗脱蛋白质的纯度分析。该粗蛋白质相对纯净，含有一些寄主起源的蛋白质污染。在 0.1 摩尔/升 NaCl,从柱中洗脱了痕量的蛋白质。不考虑  $A_{280}$  的读数，在 0.2 摩尔/升的 NaCl 洗脱的组分中的蛋白质也含有痕量内抑制素。1MNaCl 洗脱的蛋白质是相对纯净的，并且在 12 % SDS - PAGE 凝胶上迁移到 20 千道尔顿，它在还原 SDS - PAGE 上迁移更慢。合并 1 摩尔/升 NaCl 单独洗脱的蛋白质组分，浓缩，和在 PBS,pH7.4 透析。利用 Superose12 柱(FPLC)进一步分离这一合并液，从中获得了单一的洗脱峰。通过 BCA 测试测定表达的水平约为 10 毫克/升培养物。



#### 实施例 14: 人内抑制素的鉴定

通过微测序 N 末端 8 个循环进行人内抑制素的初步鉴定, 显示了酵母  $\alpha$  因子信号肽的适当加工。开始的 8 个残基 (EFAHSHRD) 准确地匹配了公开的内抑制素蛋白质的序列, 开始的两个残基 (EF) 起源于接头肽。两条链的序列完全匹配公开的人胶原 XVIII 的序列。在氨基酸水平, 人和小鼠内抑制素蛋白质表现出 85% 同一性和 93% 的相似性, 证明了两者之间具有高度的同源性和内抑制素的结构保守性 (Sasaki 等人 (1998) *Embo J.* 17:4249-56)。并且所有的半胱氨酸残基完全保守。

#### 实施例 15: Western 影印分析

通过 Western 影印分析人内抑制素与纯化的兔多克隆抗体的免疫反应性。利用产生的小鼠内抑制素的纯化的多克隆抗体 (IgG) 测定它与人内抑制素的反应性。通过利用 10 微克起源于毕赤氏表达系统的纯化的蛋白质免疫小鼠产生了小鼠重组内抑制素的多克隆抗血清。在 12% SDS - PAGE 凝胶上分离从酵母系统表达的重组内抑制素。通过半干转移 (Trans-blot, Bio-Rad) 将蛋白质转移到 PVDF 膜。利用含有 5% 无脂肪干牛奶的  $1 \times$  TBS 缓冲液稀释初级抗血清到 1: 4000。利用山羊抗兔 IgG/HRP 共轭物作为次级抗体 (1:5000)。通过化学荧光检测免疫反应性 (Pierce 化学公司, Rockford, Illinois, 美国)。

结果表明免疫反应的带对应于小鼠和人内抑制素。从 300 纳克人内抑制素检测到的信号相当于 100 纳克小鼠内抑制素检测到的信号。从 Western 影印测定的蛋白质大小是 20 千道尔顿。从 Western 影印测定的蛋白质的大小是 20 千道尔顿。直接抗小鼠制管张素的抗体没有观察到信号。另外, 内抑制素抗体是特异于小鼠和人内抑制素的, 并且该抗体与人和小鼠制管张素没有交叉反应性, 证明了抗体对内抑制素的特异性。

## 实施例 16: 内抑制素对内皮细胞增殖的影响

如 Dhanabal 等人(1999)(癌症研究, 出版中), 和在 Vikas P.Sukhatme, 1998 年 11 月 8 日递交的美国专利申请, U.S.S.N.:XX/XXX,XXX, “抗血管生成的肽和其应用方法” 中对小鼠内抑制素的叙述, 利用  $^3\text{H}$  胸腺嘧啶测试人内抑制素抑制 C-PAE 细胞的增殖的能力。上面文献全部引入本文作为参考。随后, 利用 HUVE 和 HMVE-L 细胞评估人内抑制素的抗增殖效果。在 24 孔纤连蛋白(10 微克/毫升)包衣的平板上以每孔 1% FCS 中  $2 \times 10^4$  个细胞播种人内皮细胞。利用 bFGF(3 纳克/毫升)刺激细胞, 同时加入不同浓度的人内抑制素。在  $37^\circ\text{C}$  温育细胞 24 小时, 接着利用 1 微居里的  $^3\text{H}$ -胸腺嘧啶脉冲细胞 24 小时。抽出培养基, 利用 PBS 洗涤细胞 3 次, 然后加入 1.5 当量浓度 NaOH(100 微升/孔)溶解细胞, 在  $37^\circ\text{C}$  温育 30 分钟。利用闪烁计数器测量细胞结合的放射活性。

人内抑制素对 C-PAE 细胞没有表现抑制效果, 而小鼠内抑制素对同样这些细胞表现了依赖剂量的抑制。然后, 利用了人内皮细胞(HUVE 和 HMVE-L), 图 13A 和 13B 表示, 小鼠和人内抑制素存在对 bFGF 诱导的增殖的依赖剂量的抑制。对于两个细胞类型, 都利用了 3 纳克/毫升的 bFGF 作为刺激物。每个值是代表实验的三份培养物的平均值, 误差条代表标准偏差。将对照培养物中 DNA 的合成认为是 100%。阴影和空白的条块代表分别代表小鼠和人内抑制素。

在这些条件下, 小鼠内抑制素比人内抑制素的潜力更小。在 HUVE 和 HMVE-L 细胞中, 10 微克/毫升的人内抑制素分别抑制它们的  $^3\text{H}$  胸腺嘧啶的掺入为 40% 和 36%。计算在这些细胞中人内抑制素的  $\text{ED}_{50}$  值的范围是 5.0 到 7.5 微克/毫升。浓度范围 0.5 微克/毫升到 10 微克/毫升的重组人内抑制素没有抑制人 786-0 肾细胞癌细胞或人 WI-38 成纤维细胞的增殖。

### 实施例 17: 细胞周期分析

通过 48 小时的接触抑制, HUVE 和 HMVE-L 细胞在完全培养基中的生长抑制了。通过胰蛋白酶消化收集细胞, 并播种在纤连蛋白(10 微克/毫升)包衣的 6 孔平板中。每个孔播种利用补充了 3 纳克/毫升 bFGF 的 1%FCS 中的  $0.2 \times 10^6$  个细胞。在剂量应答研究中, 加入不同浓度的人内抑制素, 并且在处理后的 24 小时收集细胞。利用 PBS 缓冲液洗涤细胞, 并在 70% 的冰冷乙醇中固定。在含有 2%FCS 和 0.1%吐温-20 的 PBS 缓冲液中, 在室温下再水合固定的细胞 30 分钟, 在  $1500 \times g$  离心 10 分钟, 在加入 RNase(5 微克/毫升)的 0.5 毫升的上面的缓冲液中再悬浮。在  $37^\circ\text{C}$  进行 RNase 消化 1 小时, 接着利用碘化丙锭(5 微克/毫升)染色。利用贝克通迪克生 FACStar Plus 流动细胞计(Beckton Dickinson, Waltham, Massachusetts, 美国)分析细胞。为了计算细胞周期的不同时期的细胞的百分数, 利用了 ModFit 软件。在时间过程的研究中, 加入了 10 微克/毫升的人内抑制素, 在不同的时间点(15, 18, 24 和 32 小时)收集细胞。为了测试人内抑制素的特异性, 在细胞周期的分析中利用了非内皮成纤维细胞系 IMR-90 和 WI-38。

在开始时, 4.5%的“生长抑制”的接触抑制细胞是在 S 期(图 16A)。当利用 bFGF(3 纳克/毫升)单独刺激细胞 24 小时时, 在 S 期的细胞的百分数增加了 3.5 倍。在利用 20 克/毫升的内抑制素处理后, 在 S 期的细胞的百分数减少到基线。利用浓度增加的内抑制素(0.5 克/毫升到 20 克/毫升)观察到了该蛋白质的依赖剂量的抑制性。在利用人内抑制素处理非内皮细胞(IMR-90 和 WI-38)时, S 期细胞的百分数未受影响(图 16B 和 16C)。

为了确定内抑制素对内皮细胞产生抑制效果的最早的时间点, 利用 10 微克/毫升的人内抑制素进行了时间过程的研究。图

16D 表示了人内抑制素的时间过程影响, 表明在 HUVE 细胞处理后 15 小时时, 可以看到人内抑制素的效果。

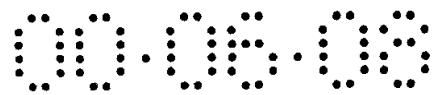
#### 实施例 18: 在 MATRIGEL® 中内皮细胞管的形成

利用 0.5 毫升 MATRIGEL® (Collaborative Biomedical Product, Bedford, Massachusetts, 美国) 包衣 24 孔组织培养平板。在 37℃ 温育平板 1 小时 (Gately 等人, (1996) 癌症研究, 56: 4887 - 90)。在凝胶上部加入 0.5 毫升 M199 培养基中浓度为  $5 \times 10^4$  的 ECV304 细胞, 接着加入不同浓度的重组人内抑制素。在 37℃, 在 5% CO<sub>2</sub> 的潮湿大气中温育培养物 8 到 10 小时。利用尼康相机对管网的代表区域照相, 最后放大 200 倍。

利用 10 微克/毫升的内抑制素处理明显抑制了内皮细胞管的形成。在对照细胞中, 形成的管是明显的, 连续的, 六角型结构, 没有中断。相反, 内抑制素处理的管的平均直径更小, 并且明显地经常中断, 表明人内抑制素对内皮细胞管的形成有影响。

#### 实施例 19: 膜连蛋白 V - FITC 测试

在启动细胞程序死亡后, 大多数细胞类型将膜磷脂磷脂酰丝氨酸(PS)从质膜的内表面转移到外侧 (van Engeland 等人 (1998) 细胞计量术, 31: 1 - 9; Zhang 等人 (1997), 生物技术 23: 525 - 31; Koopman 等人 (1994) 血液 84: 1415 - 20)。利用 Annexin V 的 FITC 共轭物, 高 PS 亲和力的 38 千道尔顿的钙依赖磷脂结合蛋白染色可以检测 PS 和由此的细胞程序死亡。通常可以在泡沫形成和 DNA 片断化之前检测 PS。



简要地说, 将在含有 1% FCS 和 3 纳克/毫升 bFGF 的 EGM 培养基中的 200, 000 个细胞涂布在纤连蛋白包衣的 6 孔平板上。在孔中加入不同浓度的人和小鼠内抑制素, 收集细胞并在处理后加工 18 小时。利用人重组 TNF- $\alpha$ (40 纳克/毫升)作为阳性对照。在 PBS 中洗涤细胞, 再悬浮于结合缓冲液(10 毫摩尔/升 HEPES/NaOH, pH7.4, 140 毫摩尔/升 NaCl, 2.5 毫摩尔/升  $\text{CaCl}_2$ )。加入的 Annexin V-FITC 的最后浓度为 100 纳克/毫升, 在黑暗中温育细胞 10 分钟, 在 PBS 中再次洗涤, 并且再悬浮于 300 升结合悬浮液。在流动细胞计分析之前, 在每个样品中加入 10 微升碘化丙锭(PI)。利用标准的 Cell Quest 软件(贝克通-迪克生, Waltham, Massachusetts, 美国)进行数据分析。设定了四分体设置, 允许阴性对照小于 1% 阳性率。利用人内抑制素(10 微克/毫升)处理非内皮细胞 IMR-90 和 WI38, 并且如上所述进行。

10 微克/毫升的内抑制素在 Annexin 荧光密度上显示了一个明显的改变, 在 HMEV-L 细胞中观察到了更明显的效果。10 微克/毫升的内抑制素对对照和处理细胞之间的平均荧光密度差异是明显的( $p=0.01$ )。10 微克的内抑制素和阳性对照 TNF- $\alpha$ (40 纳克/毫升)对荧光密度的改变是相似的。低于 1 微克/毫升浓度的内抑制素没有显示出任何明显的 AnnexinV 阳性率。有趣的是, 在这些细胞中, 小鼠内抑制素在 Annexin 阳性率上没有显示任何增加, 但在 C-PAE 和 BAE 细胞中, 正如 HUVE 细胞在存在人内抑制素时观察到的, 小鼠内抑制素表现出可比较的荧光染色(Dhanabal 等人(1998), 生物化学杂志)。对于非内皮细胞 IMR-90 和 WI-38, 没有观察到 annexin 阳性。根据这些结果对于内皮细胞, 内抑制素的作用似乎是选择性的。利用小鼠内抑制素在 C-PAE 细胞中已经得到了同样的数据(Dhanabal 等人(1998)生物化学杂志)。

## 实施例 20: 细胞迁移测试

前面的实验表明 C-PAE 细胞没有应答 bFGF 和 VEGF 迁移, 所以利用 ECV304 细胞测定人内抑制素阻止 bFGF 介导的迁移的能力。利用 12 孔 Boyden 趋化室(Neuro-probe 公司, Cabin John,MI)以及聚碳酸酯膜(25×80 毫米, 无 PVD, 8 孔, Poretics 公司, Livermore, 加利福尼亚, 美国)进行迁移测试。利用含有 0.5% 明胶, 1 毫摩尔/升  $\text{CaCl}_2$ , 和 150 毫摩尔/升 NaCl 的溶液在 37℃ 过夜包衣室预防了生长因子与室的非特异结合。在含有 5 纳克/毫升 DiI(1,1'-二十烷基-3,3,3',3'-四甲基吲哚碳菁高氯酸盐 DiIC18, 分子探测, Eugene, Oregon, 美国)的 10% FBS 生长 ECV304 细胞过夜, 并且利用含有 0.5% BSA 的 PBS 洗涤。在胰蛋白酶消化后, 利用 Coulter-Counter Z1 (Luton, U.K.) 计数细胞, 在含有 0.5% FBS 的培养基 199 中稀释到 300,000 个细胞/毫升。利用含有 25 纳克/毫升 bDFD 的培养基 199 填充下面的室。利用 15,000 个细胞/孔以及不同浓度的重组内抑制素播种上面的室。允许细胞在 37℃ 迁移 4 小时。然后, 利用细胞刮刀除去膜的上表面上的细胞, 在 3% 的福尔马林中固定下面表面上的迁移细胞, 并利用 PBS 洗涤。利用荧光显微镜在 550 纳米以及数码相机获得了固定膜的象, 利用 OPTIMAS 6.0 版本软件确定每个膜上的细胞数。每个处理进行 2 次, 利用重组的小鼠内抑制素作为阳性对照。

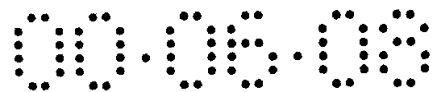
观察到了依赖剂量的迁移的抑制。在每个孔中, 在三个不同的区域计数迁移的细胞数, 获得平均值。图 17, 一个条块图表示了结果。每个值是来自代表实验的平均值, 误差条代表标准偏差。在 10 微克/毫升和 5 微克/毫升观察到了明显的抑制水平。在小于 0.1 微克/毫升的浓度时, 观察到只有临界迁移抑制。然后, 在相同的条件下测试 HIVE 细胞, 同样显示了可比较的应答方案。在 HUVE 细胞的情况中, 细胞允许迁移 16 到 20 小时。

## 实施例 21: 制管张素的 ELISA 效价测定

利用 10 微克/毫升纯化的制管张素抗原包衣 96 孔平板, 在室温下温育 1 小时, 并且利用磷酸缓冲盐/0.05%吐温 20 洗涤 3 次。然后, 在室温下, 利用 5% 牛奶粉末和 0.01%BSA 封闭平板 1 小时, 然后利用 PBS/0.05% TWEEEN20 洗涤 3 次。将不同稀释度的测试血液抗血清稀释 10 倍, 一式三份加到孔中, 然后在室温下温育 1 小时。然后利用 PBS/0.05%TWEEEN20 洗涤它们三次, 加入次级抗体(抗兔 IgG/碱性磷酸酶), 并且在室温下温育 1 小时, 然后洗涤 3 次。加入磷酸酶底物, 并且温育 20-30 分钟, 读取 405 纳米处的吸光值。小鼠和人制管张素表现了基本等同的结果。

## 实施例 22: 在内皮细胞增殖测试中制管张素的影响

如本文所述生产小鼠制管张素(参见图 18A 和 18B)。通过硫酸铵沉淀(70%)浓缩含有重组制管张素蛋白质的粗上清液。在 50 毫摩尔/升磷酸钠缓冲液 pH7.4 中溶解沉淀的蛋白质, 在 4℃过夜透析(在 608 小时的间隔有 3 材 chantes)。利用 Amicon 浓缩器(YM10)通过超滤进一步浓缩透析的样品。利用赖氨酸-琼脂糖 4B 树脂(Pharmacia,新泽西)填充 Bio-Rad 柱, 并且利用 50 毫摩尔/升磷酸钠缓冲液, pH7.4 平衡。利用蠕动泵在柱上加载浓缩的样品。利用平衡缓冲液洗涤柱直到  $A_{280}$  是 0.001。利用 10 个柱体积的含有 200 毫摩尔/升的 NaCl 的磷酸钠缓冲液, pH7.4 再次洗涤柱。利用 0.2 Mε-氨基-N 己酸, pH7.4 洗脱重组的制管张素蛋白质。合并吸光值和 SDS-PAGE 分析测量的含有明显量的蛋白质的组分, 在 PBS, pH7.4 中透析 24-36 小时。通过 BCA 测试(Pierce)测量蛋白质浓度。在冷室(4℃)中进行所有的纯化过程。利用 Superdex-75 柱, 在 FPLC 上分离大小进一步纯化重组的蛋白质。



在低血清中，在明胶包衣的平板上每孔播种 12,500 个 C-PAE 细胞。允许细胞在 37℃ 粘连过夜。除去过度培养基，加入含有 3 纳克/毫升 bFGF 的新低血清培养基。加入不同稀释度的纯化的重组制管张素，在 37℃ 温育 48 小时。然后，利用  $^3\text{H}$ -胸腺嘧啶(1 微居里/20 微升/孔)脉冲标记细胞 24 小时。然后收集细胞，并且测量胸腺嘧啶的掺入。图 20 表示了结果，在 Y 轴表示了 DNA 合成，X 表示了制管张素。通常，制管张素的浓度增加，DNA 合成下降。

#### 实施例 23: 在肾肿瘤模型中制管张素的影响

在无胸腺的裸鼠中皮下植入肾肿瘤细胞系 786-0。在每个小鼠的侧面接种 200 升磷酸缓冲盐中的约 5 百万个细胞。允许每个肿瘤长到约 200 立方毫米。

在 3 星期中，每天，在每个动物的腹膜内给予 20 微克纯化的重组小鼠制管张素(1 毫克/公斤)。

#### 实施例 24: 在毕赤氏酵母表达系统中表达制管张素

由 ATCC(美国典型培养物保藏中心)克隆 MPL8-2000(纤溶酶原编码质粒)提供了小鼠制管张素 cDNA 克隆和它的序列。从这一序列制造两个引物: 5'-AAG AAT TGC TGT TGT ATC TGT CAG AAT GT-3'(SEQ ID NO: )和 5'-AGC GGC CGC CTA CCC TCC TGT CTC TGA-3'(SEQ ID NO: )。

通过 ATCC(美国典型培养物保藏中心)克隆 PKSK067 提供了人制管张素 cDNA 克隆和它的序列。从这一序列制造两个引物: 5'-AAG AAT TCG TGT ATC TCT CAG AGT GC-3'(SEQ ID NO: )和 5'-AGC GGC CGC CTA TTC TGT TCC TGA GTA-3'(SEQ ID NO: )。

如本文所述在修饰的毕赤氏酵母表达系统中克隆和表达了两个制管张素(参见图 21A - B)。

### 实施例 25: 静息蛋白

胶原 XV 的羧基部分的分离:

将下面的 cDNA 文库用作 DNA - PCR 的模板。

K562 - erthyroid 文库

JMN - 人 mesothelioma

HFK - 人胎肾文库

786 - 0 人肾细胞癌

MAB - 人成年的脑

293 - 对照

从 GIBCO - BRL 合成了对应于 Collagen XV NC-1 区的 “C” 末端部分的引物(图 22, 图 23 表示了静息蛋白的氨基酸序列)。

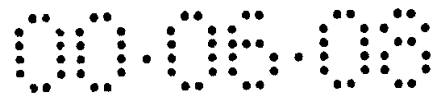
上游引物: TTT TTT GAA TTC ATT TCA AGT GCC AAT TAT  
GAG AAG CCT GCT CTG CAT TTG(SEQ ID NO: )

下游引物:

AAG AAT GCG GCC GCT TAC TTC CTA GCG TCT GTC  
ATG AAA CTG TTT TCG AT(SEQ ID NO: )

利用标准方案进行了 DNA - PCR。简要地说, 利用来自每个 cDNA 文库的 100 纳克 DNA 作为模板。扩增条件是 94°C 1 分钟, 65°C 1 分钟, 和 72°C 42 秒, 循环 30 次。

纯化了下文命名为 “静息蛋白” 的 540bp 的扩增片断, 并利用 EcoRI 和 NotI 消化。图 24 图解说明了将 Collagen XV 克隆进



入毕赤氏酵母表达载体(pPICZ $\alpha$ A,可从 Vitrogen,圣迭戈, CA 购买)。图 25 表示了构建体,载体,等等。利用上面的限制酶也消化了载体 pPICZ $\alpha$ A,并与静息蛋白片断连接。利用寄主菌株 Top 10F'进行初步转化。将阳性克隆测序证明了修饰。利用 SacI 酶将质粒线性化,通过氯化锂转化,在酵母寄主菌株 GS115 中同源重组。根据 Pichia 表达手册中所述进行重组。允许菌落在 30℃的 YPD/Zeocin 平板上生长 2 天。选择在 Zeocin 上生长的克隆用于小规模诱导。根据制造商的推荐进行诱导过程(In Vitrogen)。

### 在毕赤氏酵母表达系统中静息蛋白的表达

将来自 YPD/Zeocin 的单个菌落接种到 500 毫升带挡板烧瓶中的 25 毫升 BMGY/Zeo(100 微克/毫升)中。在 30℃的振摇温育器中培养培养物直到培养物的 OD<sub>600</sub> 达到 2-6(约 16-24 小时)。利用 1: 100 稀释度的对数生长期的细胞接种 1 升培养物。加入 500 毫升 BMGY 培养基,在 2 升的带挡板烧瓶中生长细胞,培养到 OD<sub>600</sub> 为 15-20(2-3 天)。在室温下,在 5000rpm 离心收集细胞 10 分钟。丢弃上清液,将细胞沉淀再悬浮于 300-400 毫升 BMMY 培养基中,诱导重组蛋白质的表达。为了保持诱导状态,每 24 小时加入 100%的甲醇直到最后浓度为 0.5%。在诱导后第 2,第 3,第 4 天收集上清液,通过考马斯染色的 SDS-PAGE 分析蛋白质的表达。

### 利用肝素-琼脂糖柱纯化静息蛋白:

利用 60-70%的硫酸铵沉淀浓缩上清液。在 10,000rpm 离心沉淀的蛋白质 10 分钟,将沉淀再悬浮于磷酸缓冲盐,在 4℃透析过夜。最后利用 10 毫摩尔/升 Tris 和 50 毫摩尔/升 NaCl,pH7.4 进行透析。利用 5 毫升肝素-琼脂糖(Pharmacia)树脂填充聚丙烯柱,并利用 10 毫摩尔/升的 Tris,50 毫摩尔/升的 NaCl,pH7.4 平衡。

以流速 10-15 毫升/小时, 20-30 毫升为一批将浓缩的粗蛋白质样品加载到柱上。利用平衡缓冲液洗涤柱直到 280 纳米的吸光值 $<0.001$ 。利用 NaCl 的逐步梯度(0.2M, 0.6M 和 1.0M)进行结合蛋白质的洗脱。洗脱方法没有显示任何明显的蛋白质峰, 当通过 SDS-PAGE 分析样品时, 发现大部分蛋白质没有结合到柱上。降低 NaCl 的浓度, 改变 pH 也没有改变结合的方式。所以重组蛋白质没有结合肝素柱。所以我们决定在静息蛋白分子的氨基末端加 His.Tag 基序简化纯化过程。

His.Tag 静息蛋白重组蛋白质的构建:

合成了侧接 EcoRI 限制位点的组氨酸残基(6 个组氨酸的跨度)的两个互补低聚核苷酸。利用 EcoRI 消化载体 pPICZ $\alpha$ A。混合每 50 微升的引物(100micorM), 在 95℃ 变性 5 分钟, 并且在冰上立即冷却。在 16℃ 过夜, 将退火的引物连接进入 EcoRI 消化的载体骨架。在 70℃ 热活化连接酶 10 分钟。利用 Glass Max 纯化柱除去过量的引物。利用寄主菌株 Top 10F' 转化连接的载体。通过 PCR 和限制酶分析筛选重组的克隆。通过测序进一步证明 His.Tag 基序的存在。

利用 SacI 线性化重组的 pPICZ $\alpha$ A/His. 静息蛋白, 利用菌株 GS115 和标准的方法进行重组。

静息蛋白的生物活性是在本文叙述的测试方法中测定的。图 26 表示了本文所述的细胞迁移测试中静息蛋白的活性, 图 27 表示了本文所述的肿瘤测试方法中静息蛋白的活性。

当如本文所述生产了静息蛋白后, 也可以生产静息蛋白的片段, Apomigren, 并且利用所述的方法测定它的活性。

## 同等意义

在参考优选的实施方案特定地表示和叙述了本发明后，本领域技术人员应该理解，不脱离附加的权利要求定义的本发明的精神和范围，其中是可以做各种形式和细节上的变化的。

## 说明书附图

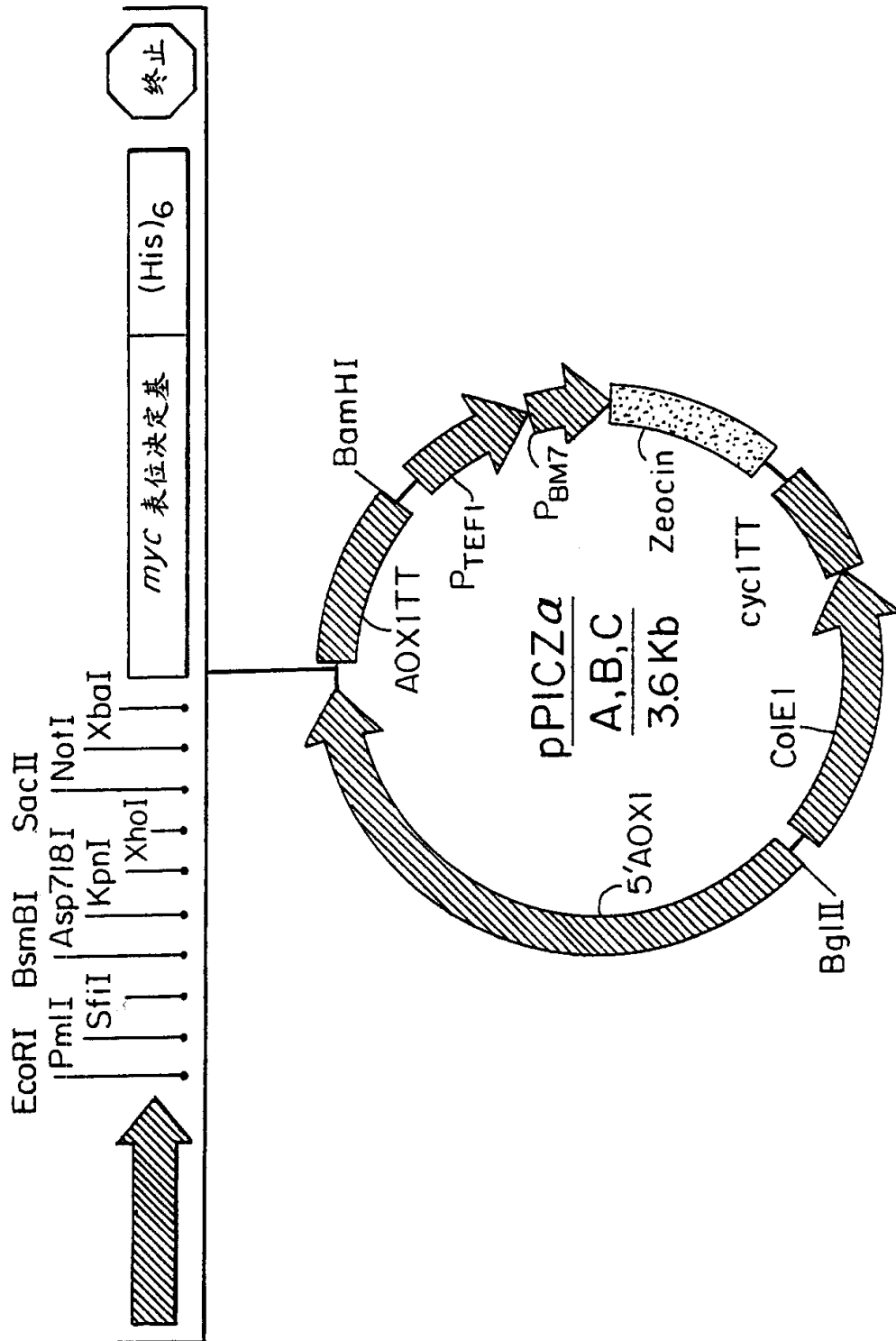
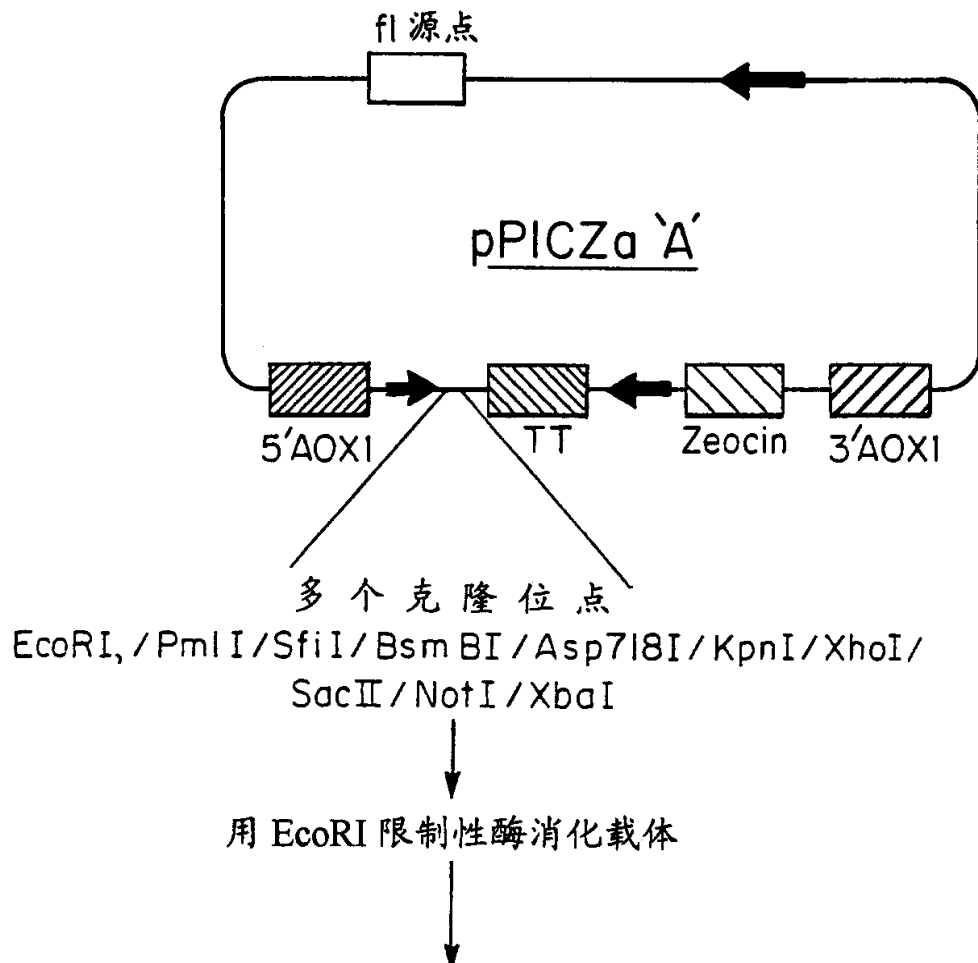


图 1



将两个互补寡聚体变性和退火，这可以掺入 His.Tag 基序和 NdeI, NheI 限制性位点

(His.Tag 有助于使纯化简化并且 NdeI, NheI 限制性位点的存在有助于在不通过 PCR 扩增过程的情况下 PCR 从原核表达相同穿梭到酵母表达)

5' AAT TCC ATC ACC ATC ACC ATC ACC ATA TGG CTA GCA 3'  
5' AAT TTG CTA GCC ATA TGG TGA TGG TGA TGG TGA TGG 3'

修饰的毕赤氏表达系统(pPICZ.His.A)

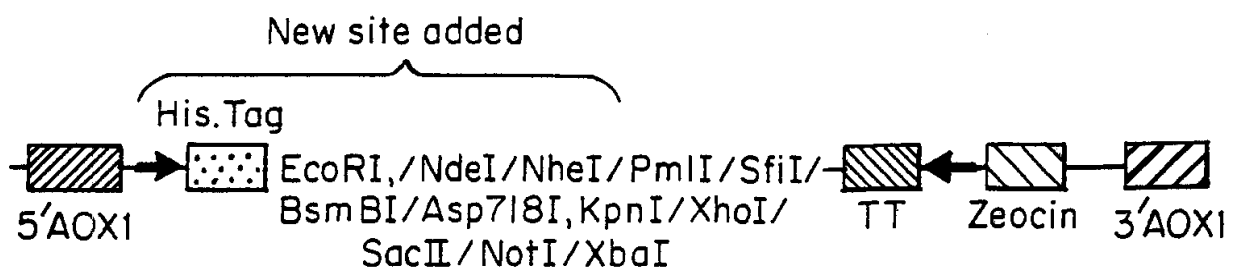


图 2

将 Endostatin(小鼠)克隆到毕赤氏表达系统的图

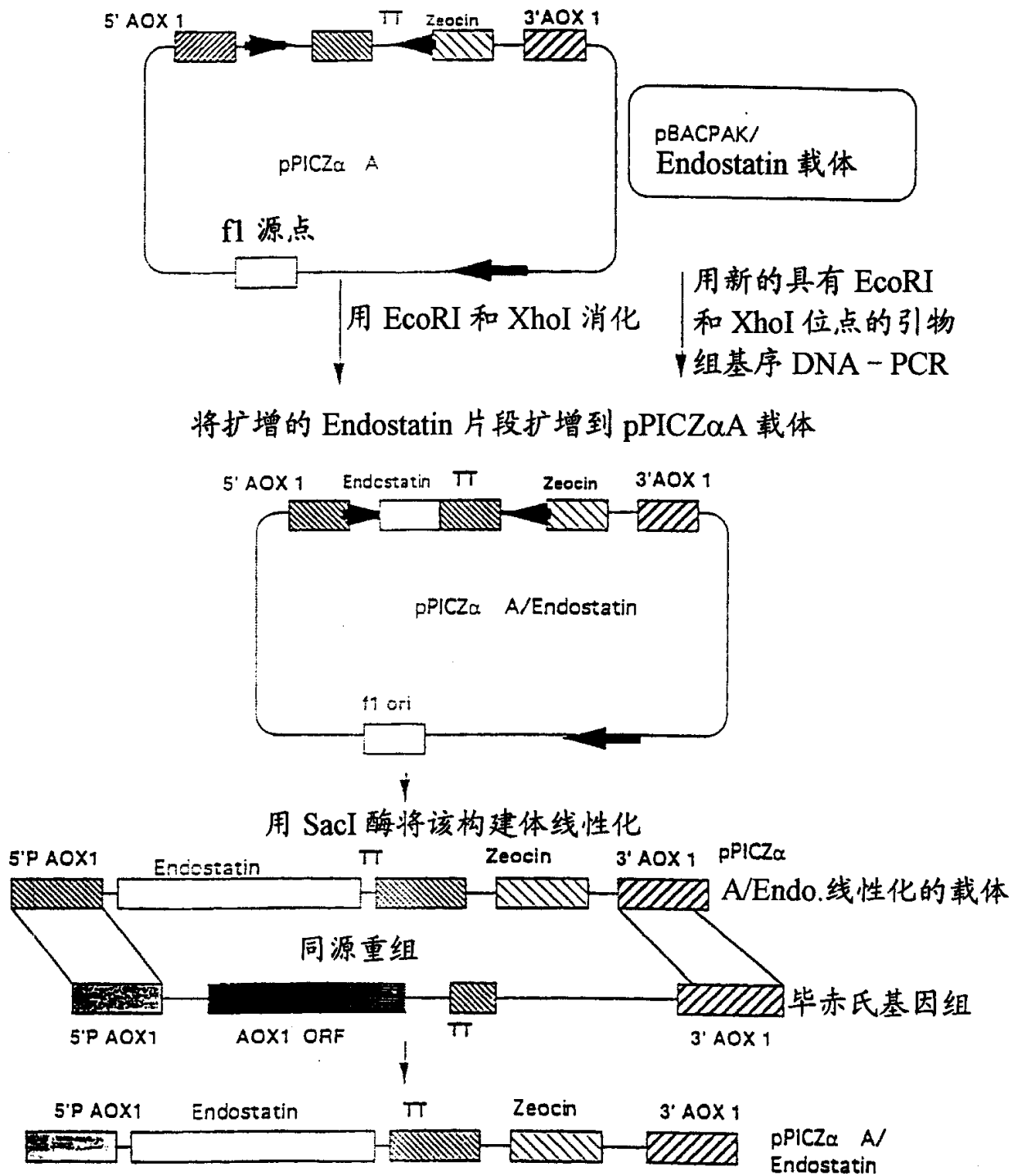


图 3

# 胶原质 XVIII 的 endo 序列

序列范围: 1-555

核苷酸 1 = N 内抑制素和片段 EM1 和 EM2 的起始

EM1 片段结束在核苷酸 525, EM2 片段结束在核苷酸 501.

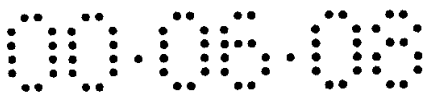
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 5   | 10  | 15  | 20  | 25  | 30  | 35  | 40  | 45  |     |     |     |     |     |     |     |
| CAT | ACT | CAT | CAG | GAC | TTT | CAG | CCA | GTG | CTC | CAC | CTG | GTG | GCA | CTG | AAC |
| GTA | TGA | GTA | GTC | CTG | AAA | GTC | GGT | CAC | GAG | GTG | GAC | CAC | CGT | GAC | TTG |
| 50  | 55  | 60  | 65  | 70  | 75  | 80  | 85  | 90  | 95  |     |     |     |     |     |     |
| ACC | CCC | CTG | TCT | GGA | GGC | ATG | CGT | GGT | ATC | CGT | GGA | GCA | GAT | TTC | CAG |
| TGG | GGG | GAC | AGA | CCT | CCG | TAC | GCA | CCA | TAG | GCA | CCT | CGT | CTA | AAG | GTC |
| 100 | 105 | 110 | 115 | 120 | 125 | 130 | 135 | 140 |     |     |     |     |     |     |     |
| TGC | TTC | CAG | CAA | GCC | CGA | GCC | GTG | GGG | CTG | TCG | GGC | ACC | TTC | CGG | GCT |
| ACG | AAG | GTC | GTT | CGG | GCT | CGG | CAC | CCC | GAC | AGC | CCG | TGG | AAG | GCC | CGA |
| 145 | 150 | 155 | 160 | 165 | 170 | 175 | 180 | 185 | 190 |     |     |     |     |     |     |
| TTC | CTG | TCC | TCT | AGG | CTG | CAG | GAT | CTC | TAT | AGC | ATC | GTG | CGC | CGT | GCT |
| AAG | GAC | AGG | AGA | TCC | GAC | GTC | CTA | GAG | ATA | TCG | TAG | CAC | GCG | GCA | CGA |
| 195 | 200 | 205 | 210 | 215 | 220 | 225 | 230 | 235 | 240 |     |     |     |     |     |     |
| GAC | CGG | GGG | TCT | GTG | CCC | ATC | GTC | AAC | CTG | AAG | GAC | GAG | GTG | CTA | TCT |
| CTG | GCC | CCC | AGA | CAC | GGG | TAG | CAG | TTG | GAC | TTC | CTG | CTC | CAC | GAT | AGA |
| 245 | 250 | 255 | 260 | 265 | 270 | 275 | 280 | 285 |     |     |     |     |     |     |     |
| CCC | AGC | TGG | GAC | TCC | CTG | TTT | TCT | GGC | TCC | CAG | GGT | CAA | CTG | CAA | CCC |
| GGG | TCG | ACC | CTG | AGG | GAC | AAA | AGA | CCG | AGG | GTC | CCA | GTT | GAC | GTT | GGG |
| 290 | 295 | 300 | 305 | 310 | 315 | 320 | 325 | 330 | 335 |     |     |     |     |     |     |
| GGG | GCC | CGC | ATC | TTT | TCT | TTT | GAC | GGC | AGA | GAT | GTC | CTG | AGA | CAC | CCA |
| CCC | CGG | GCG | TAG | AAA | AGA | AAA | CTG | CCG | TCT | CTA | CAG | GAC | TCT | GTG | GGT |
| 340 | 345 | 350 | 355 | 360 | 365 | 370 | 375 | 380 |     |     |     |     |     |     |     |
| GCC | TGG | CCG | CAG | AAG | AGC | GTA | TGG | CAC | GGC | TCG | GAC | CCC | AGT | GGG | CGG |
| CGG | ACC | GGC | GTC | TTC | TCG | CAT | ACC | GTG | CCG | AGC | CTG | GGG | TCA | CCC | GCC |
| 385 | 390 | 395 | 400 | 405 | 410 | 415 | 420 | 425 | 430 |     |     |     |     |     |     |
| AGG | CTG | ATG | GAG | AGT | TAC | TGT | GAG | ACA | TGG | CGA | ACT | GAA | ACT | ACT | GGG |
| TCC | GAC | TAC | CTC | TCA | ATG | ACA | CTC | TGT | ACC | GCT | TGA | CTT | TGA | TGA | CCC |
| 435 | 440 | 445 | 450 | 455 | 460 | 465 | 470 | 475 | 480 |     |     |     |     |     |     |
| GCT | ACA | GGT | CAG | GCC | TCC | TCC | CTG | CTG | TCA | GGC | AGG | CTC | CTG | GAA | CAG |
| CGA | TGT | CCA | GTC | CGG | AGG | AGG | GAC | GAC | AGT | CCG | TCC | GAG | GAC | CTT | GTC |
| 485 | 490 | 495 | 500 | 505 | 510 | 515 | 520 | 525 |     |     |     |     |     |     |     |
| AAA | GCT | GCG | AGC | TGC | CAC | AAC | AGC | TAC | ATC | GTC | CTG | TGC | ATT | GAG | AAT |
| TTT | CGA | CGC | TCG | ACG | GTG | TTG | TCG | ATG | TAG | CAG | GAC | ACG | TAA | CTC | TTA |
| 530 | 535 | 540 | 545 | 550 | 555 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| AGC | TTC | ATG | ACC | TCT | TTC | TCC | AAA | TAG |     |     |     |     |     |     |     |
| TCG | AAG | TAC | TGG | AGA | AAG | AGG | TTT | ATC |     |     |     |     |     |     |     |

图 4

抑制剂

| 构建体名称                | 引物序列                                                                    |                                                                                    | 克隆位点           | 载体                                         | 蛋白质序列                                           |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 鼠内抑制素                |                                                                         |                                                                                    |                |                                            |                                                 |
| pET17b/<br>his.mendo | 5'-GGC ATA TGC ATA CTC ATC AGG- ACT<br>TT-3'(上游)(SEQ ID NO:4)           | 5' AAC TCG AGC TAT TTG GAG AAA- GAG<br>GT-3' (下游) (SEQ ID NO:5)                    | NdeI &<br>XhoI | 原核表达 pET<br><br>( <i>E. coli</i> his.endo) | MGHHHHHHHHSSGHIDDDDKH<br>M-mendo (SEQ ID NO:14) |
|                      |                                                                         |                                                                                    |                |                                            |                                                 |
| pET28a/<br>mendo     | 5'-GGC ATA TGC ATA CTC ATC AGG- ACT<br>TT-3'(上游)(SEQ ID NO:4)           | 5'-AAG CCG CCG CCT ATT TGG AGA-<br>AAG AGG T-3' (下游) (SEQ ID NO:6)                 | NdeI &<br>NotI | 原核表达 pET<br><br>( <i>E. coli</i> his.endo) | MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHM-<br>mendo (SEQ ID NO:15)  |
|                      |                                                                         |                                                                                    |                |                                            |                                                 |
| pET28a/<br>EM-1      | 5' TTC CAT ATG CAT ACT CAT CAG- GAC<br>TTT CAG CCA-3'(上游) (SEQ ID NO:7) | 5' TTA GCG GCC GCC TAC TCA ATG- CAC<br>AGG ACG ATG TA-3' (下游) (SEQ ID NO:8)        |                | 原核表达 pET<br><br>( <i>E. coli</i> EM1)      | MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHM-me<br>ndo (SEQ ID NO:15)  |
|                      |                                                                         |                                                                                    |                |                                            |                                                 |
| pET28a/<br>EM-2      | 5' TTC CAT ATG CAT ACT CAT CAG- GAC<br>TTT CAG CCA-3'(上游) (SEQ ID NO:7) | 5' TTA GCG GCC GCC TAG TTG TGG- CAG<br>CTC GCA GCT TTC TG-3' (下游) (SEQ ID<br>NO:9) |                | 原核表达 pET<br><br>( <i>E. coli</i> EM2)      | MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHM-me<br>ndo (SEQ ID NO:15)  |
|                      |                                                                         |                                                                                    |                |                                            |                                                 |

图 5A



| 构建体名称                                        | 引物序列                                                                                    |  | 克隆位点         | 载体                                                       | 蛋白质序列                                             |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--|--------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| pPICZαA/<br>mendo<br><i>(yeast mus endo)</i> | 5' GGG AAT TCC ATA C TC A TC A GG- ACT TT-3'(上游) (SEQ ID NO:10)                         |  | EcoRI & NotI | 真核表达酵母<br>pPICZαA<br><i>(yeast mouse endostatin)</i>     | EF-mendo                                          |
|                                              | 5' AAG CGG CCG CCT A TT TGG AGA- AAG AGG T-3' (下游) (SEQ ID NO:6)                        |  |              |                                                          |                                                   |
| pPICZαA/<br>His.mendo                        | 5' AAG AAT TCC ATC ATC ATC ATC- ATC ACA GCA GC-3'(上游)(SEQ ID NO:11)                     |  | EcoRI & NotI | 真核表达酵母<br>pPICZαA<br><i>(yeast mouse his.endostatin)</i> | EFMGHHHHHHHHSSGHIDDDD<br>KHM-mendo (SEQ ID NO:17) |
|                                              | 5' AAG CGG CCG CCT ATT TGG AGA- AAG AGG T-3' (下游) (SEQ ID NO:16)                        |  |              |                                                          |                                                   |
| 人的抑制素                                        |                                                                                         |  |              |                                                          |                                                   |
| pPICZαA/<br>Hendo                            | 5' TTT GAA TTC GCC CAC AGC CAC- CGC GAC TTC CAG CCG GTG CTC- CAC-3' (上游) (SEQ ID NO:12) |  | EcoRI & NotI | 真核表达酵母<br>pPICZαA<br><i>(yeast human endostatin)</i>     | EF-hendo (SEQ ID NO:18)                           |
|                                              | 5' AAA AGC GGC CGC CTA CTT GGA- GGC AGT CAT GAA GCT GTT CTC- AAT-3' (下游) (SEQ ID NO:13) |  |              |                                                          |                                                   |

图 5B

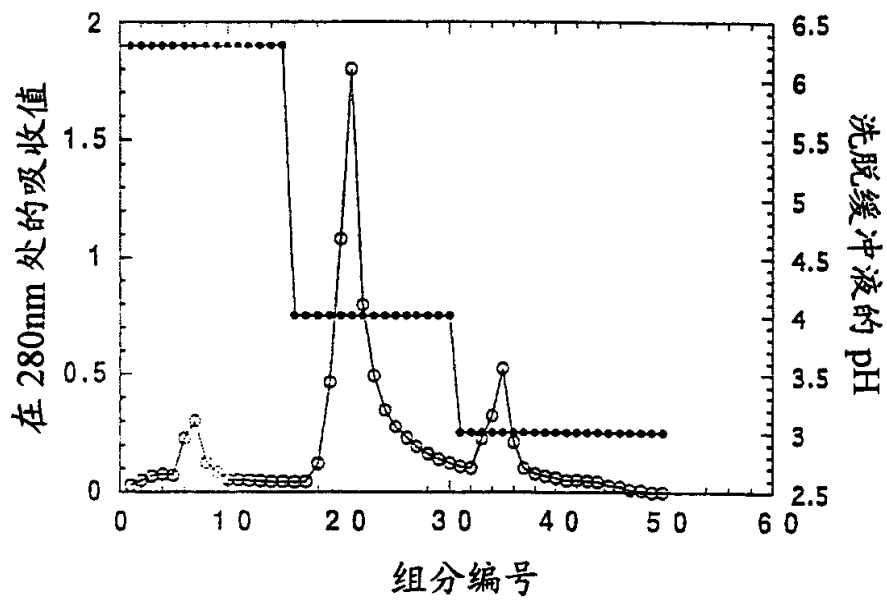


图 6A

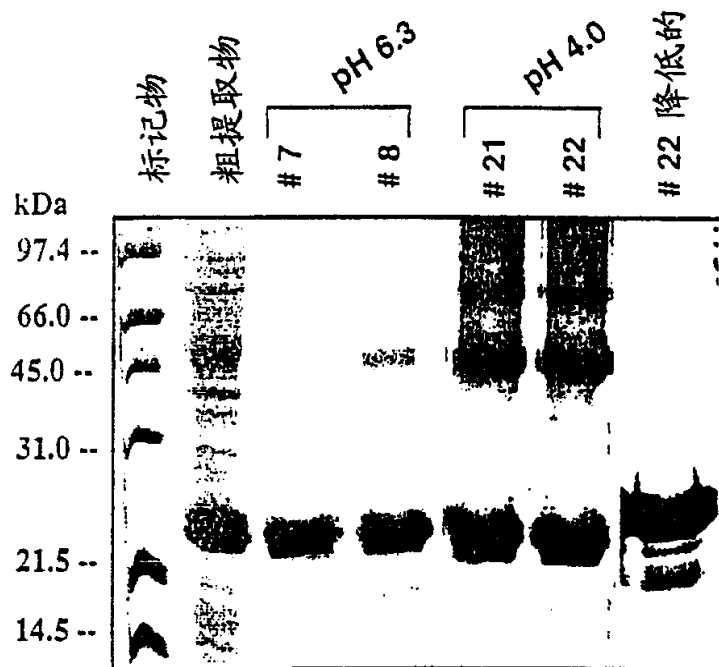


图 6B

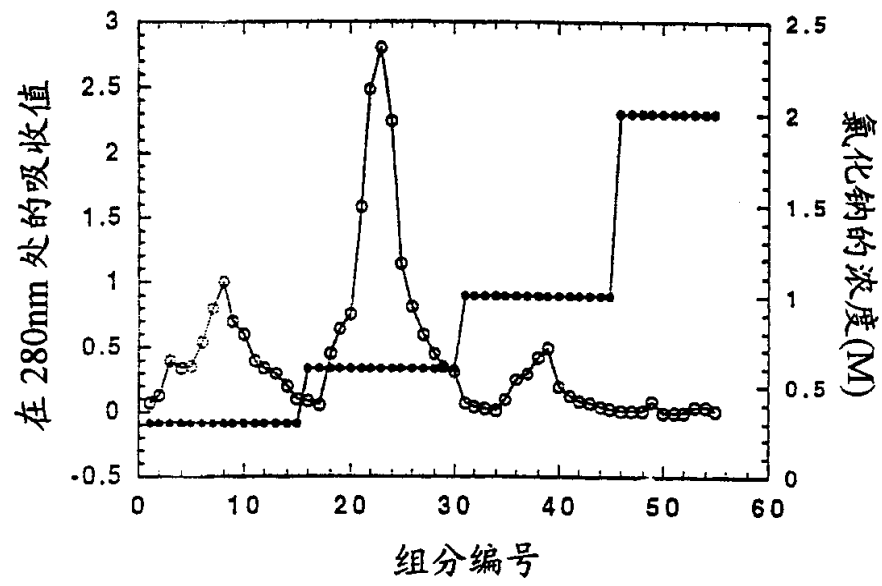


图 7A

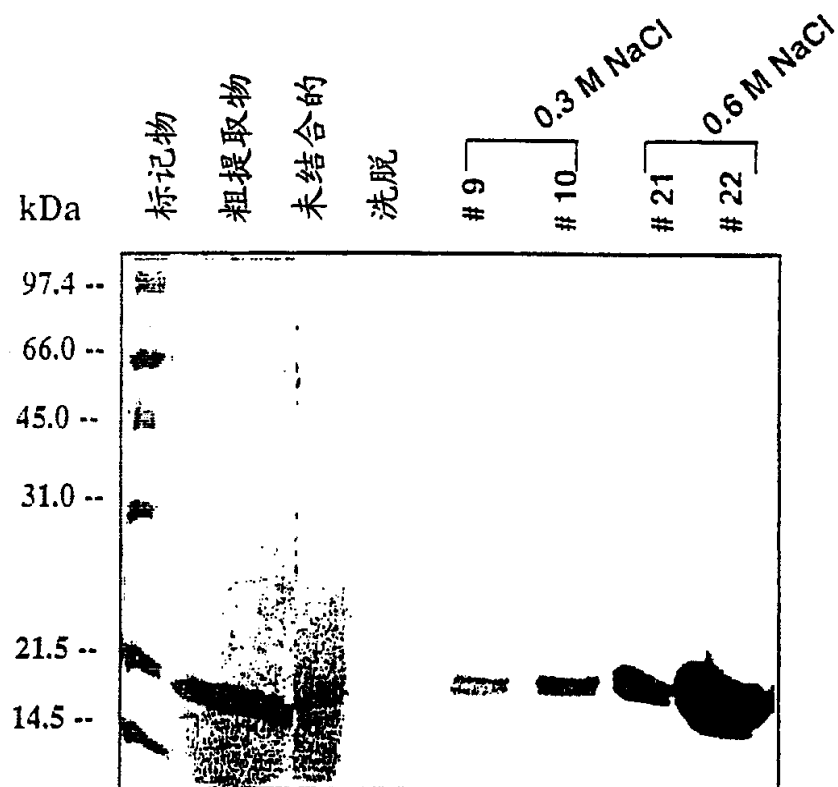


图 7B

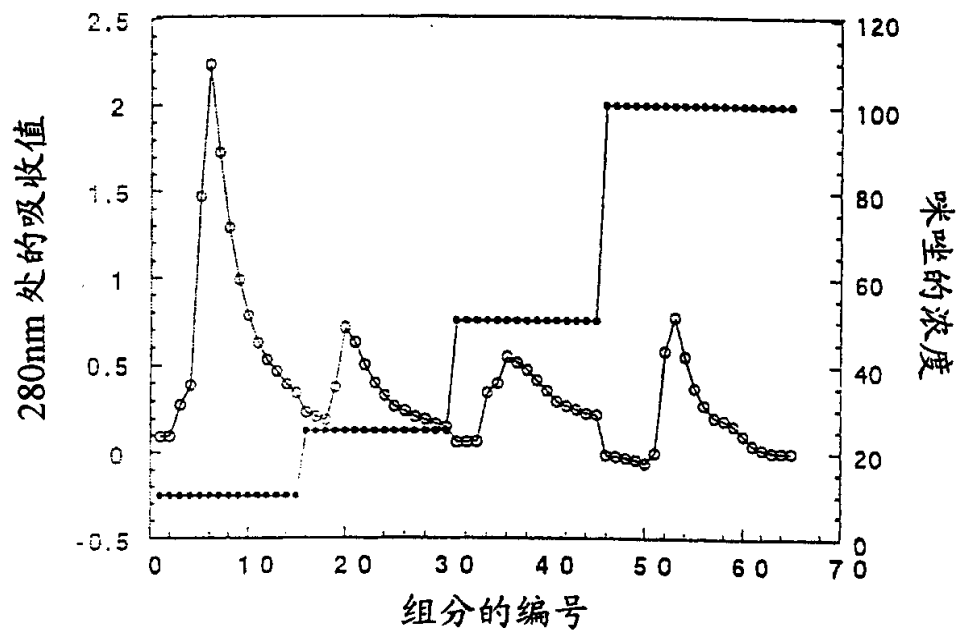


图 8A

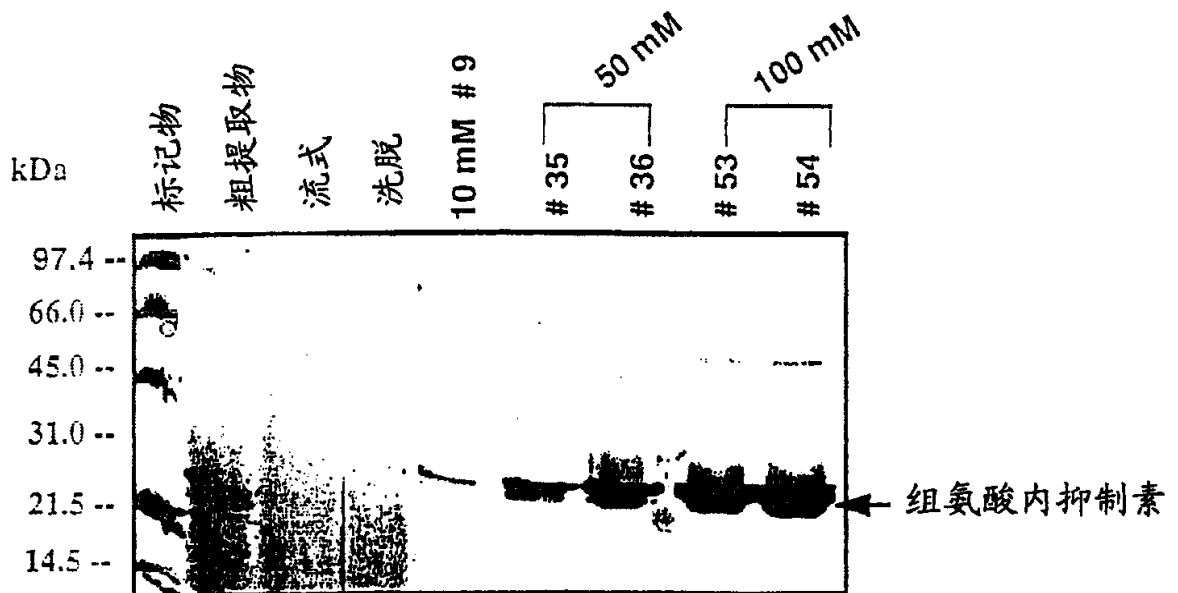


图 8B

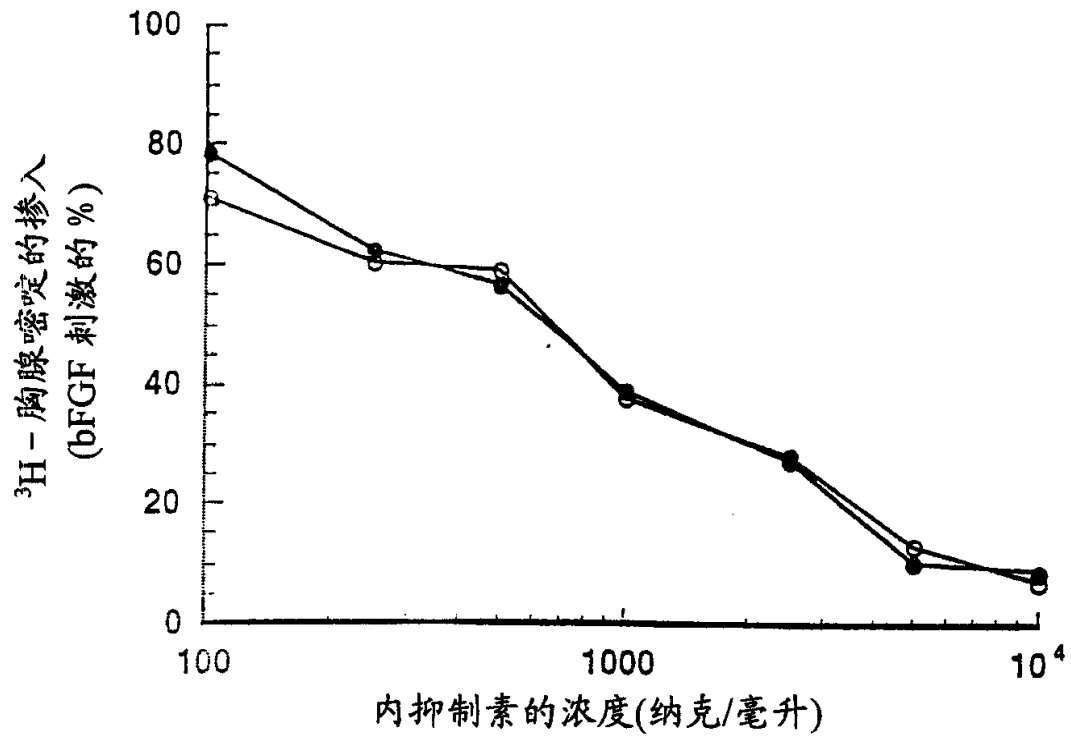


图 9

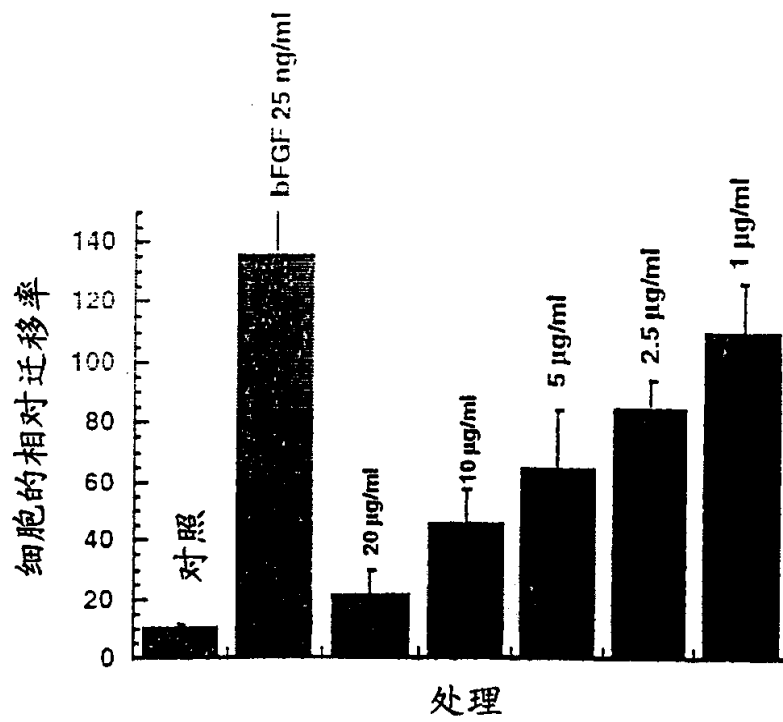


图 10

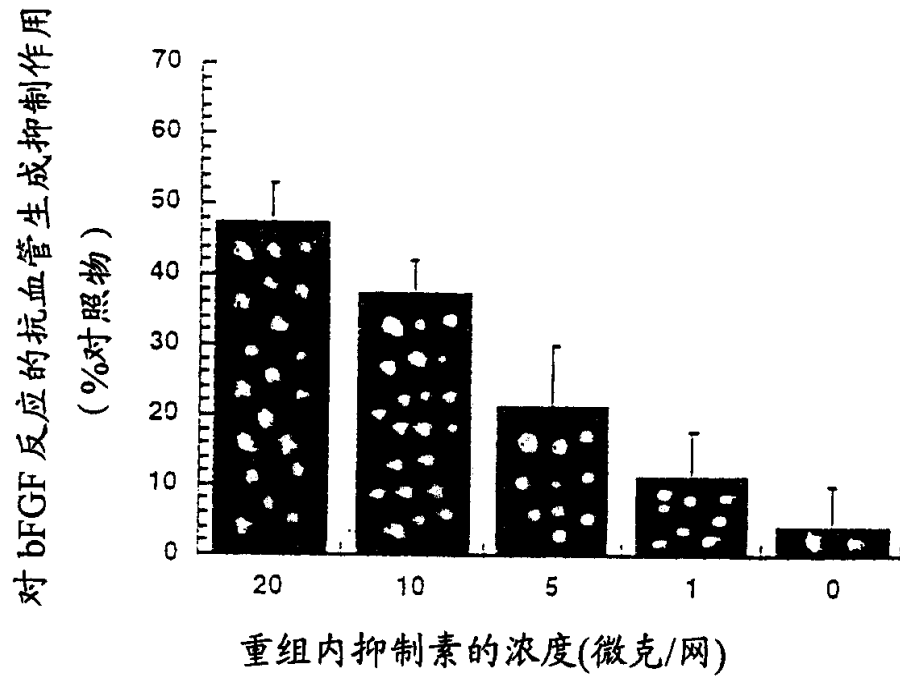


图 11A

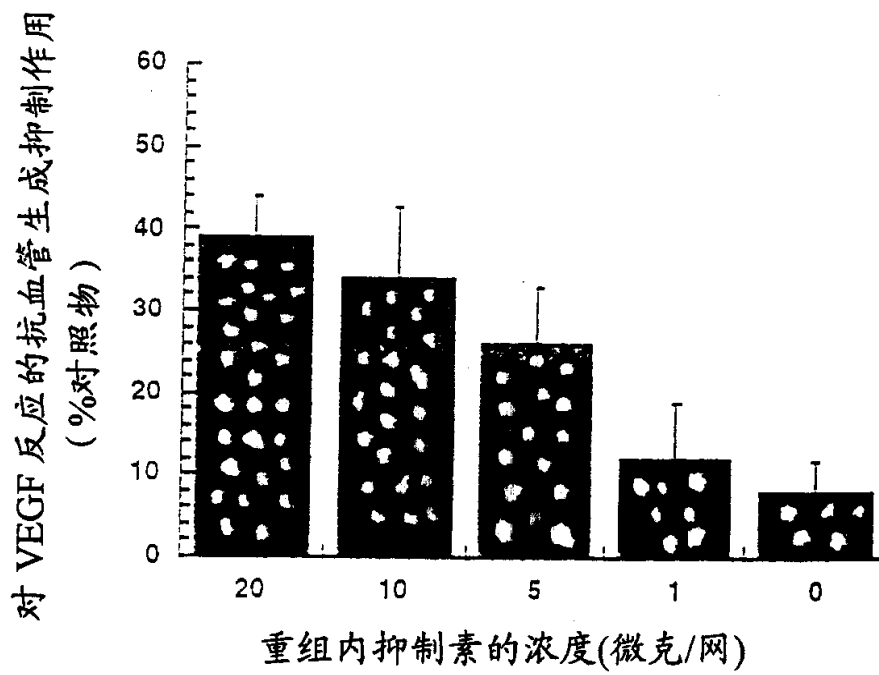


图 11B

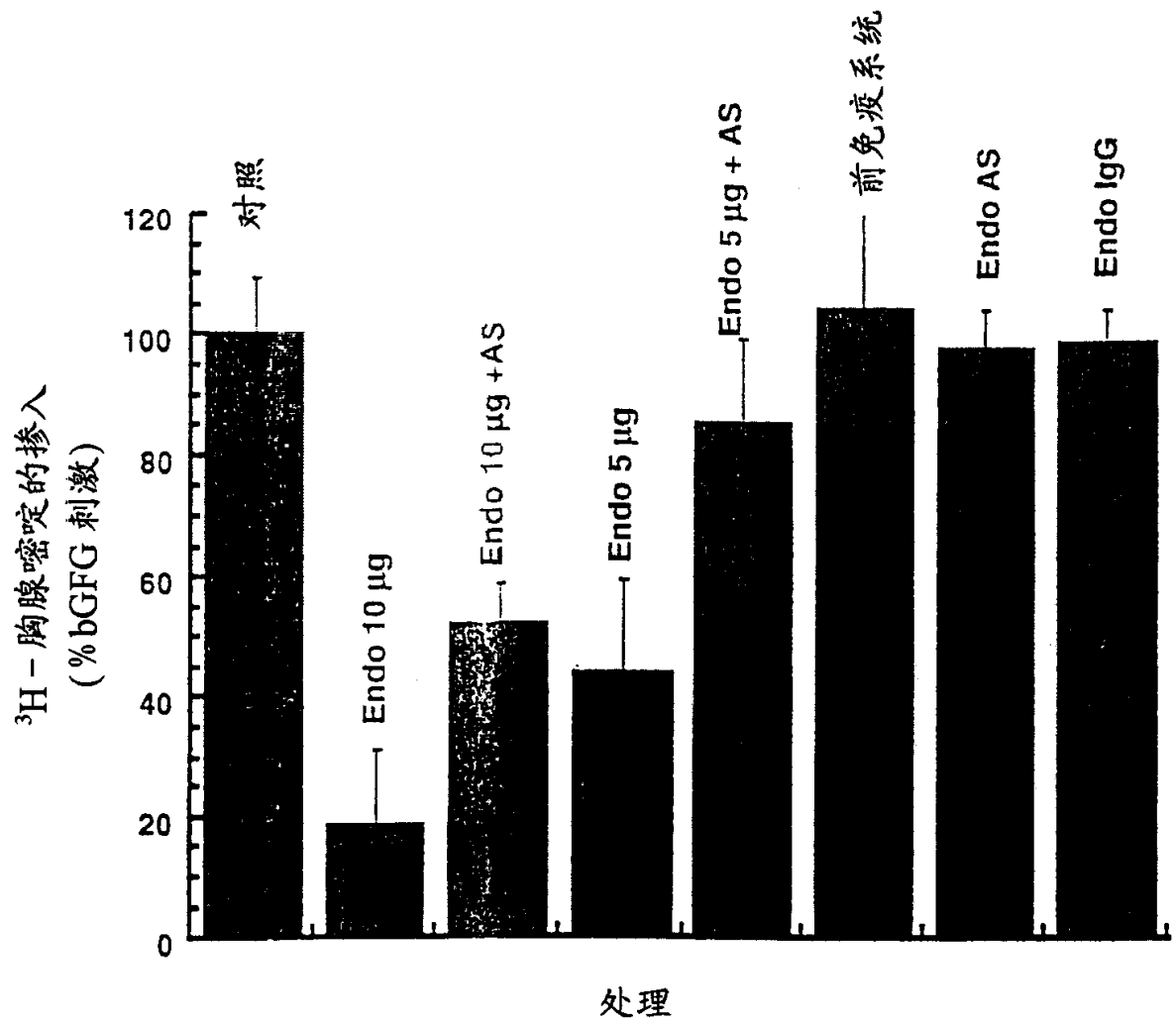


图 12

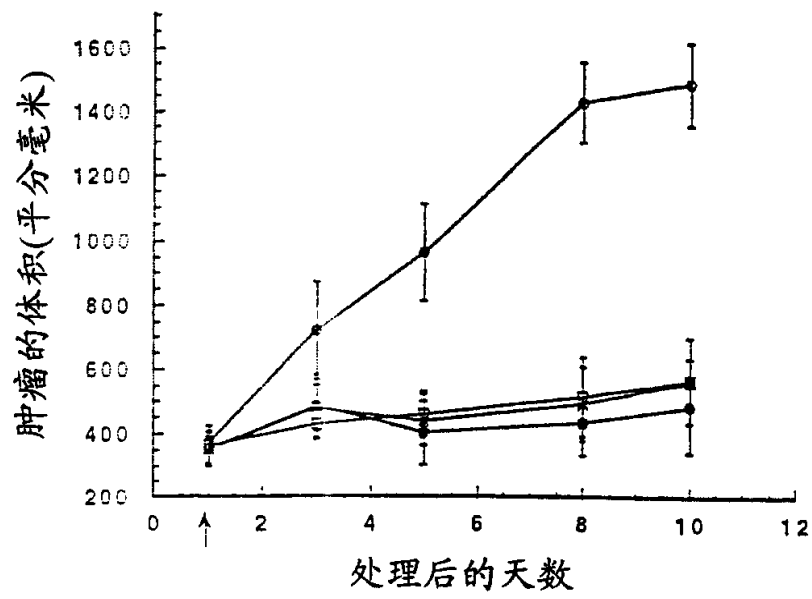


图 13A

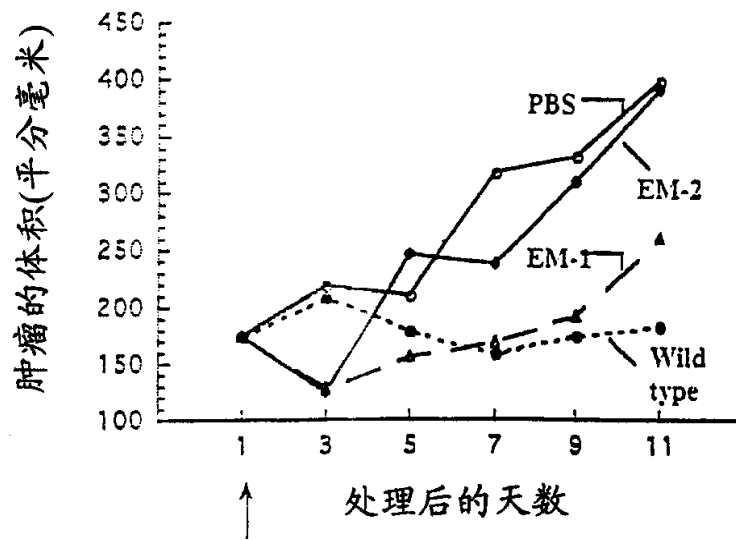


图 13B

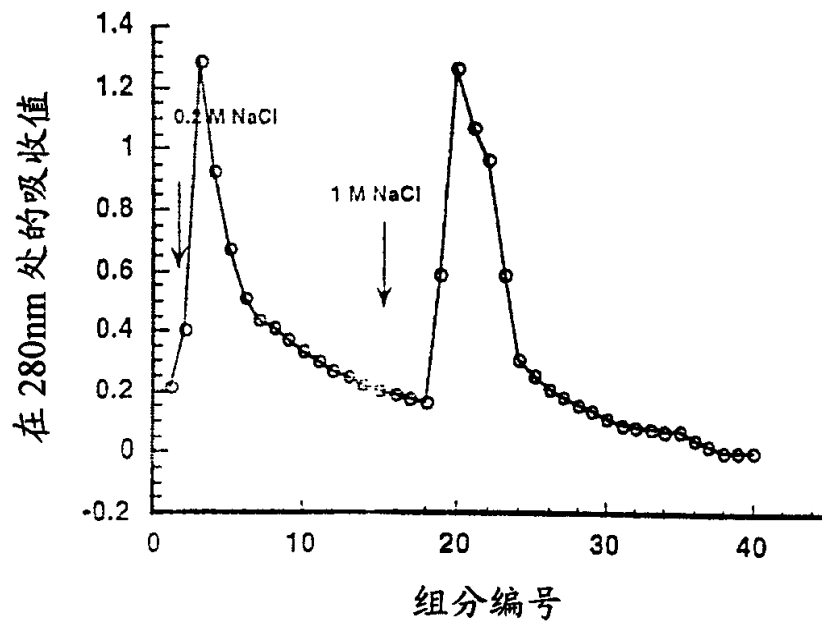


图 14A

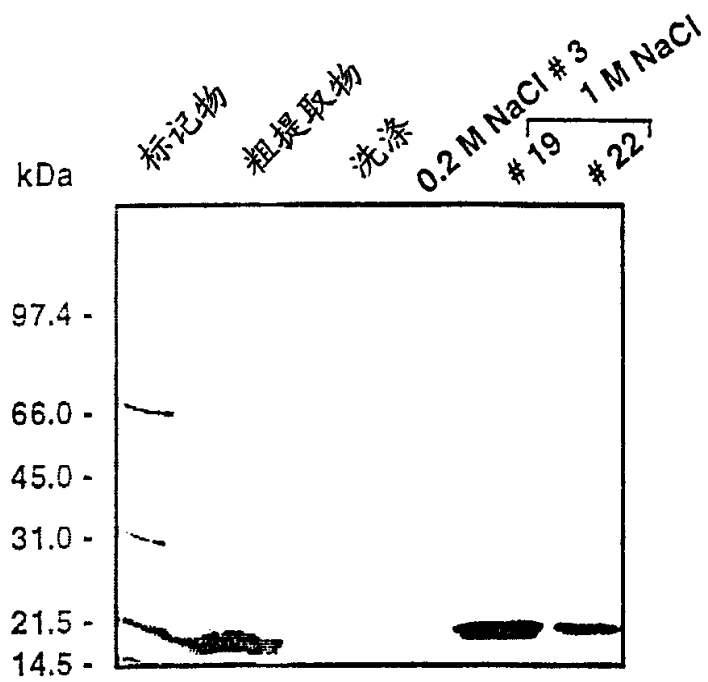


图 14B

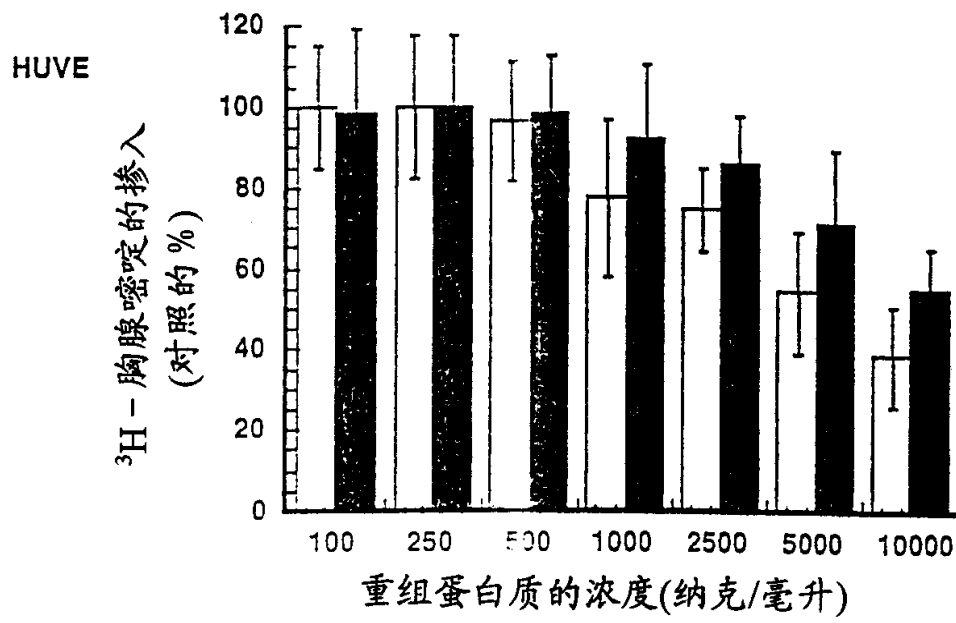


图 15A

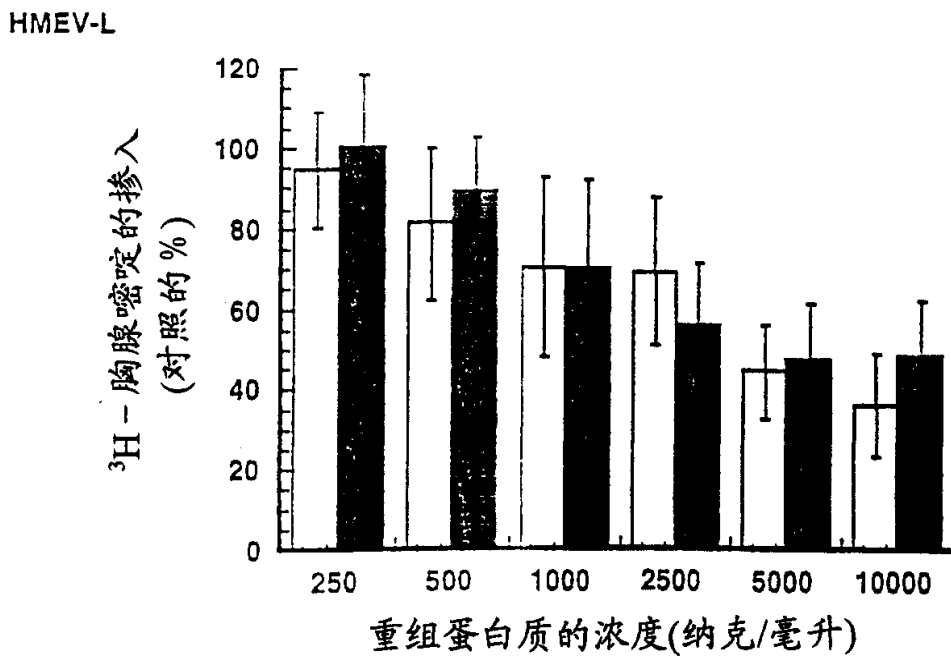


图 15B

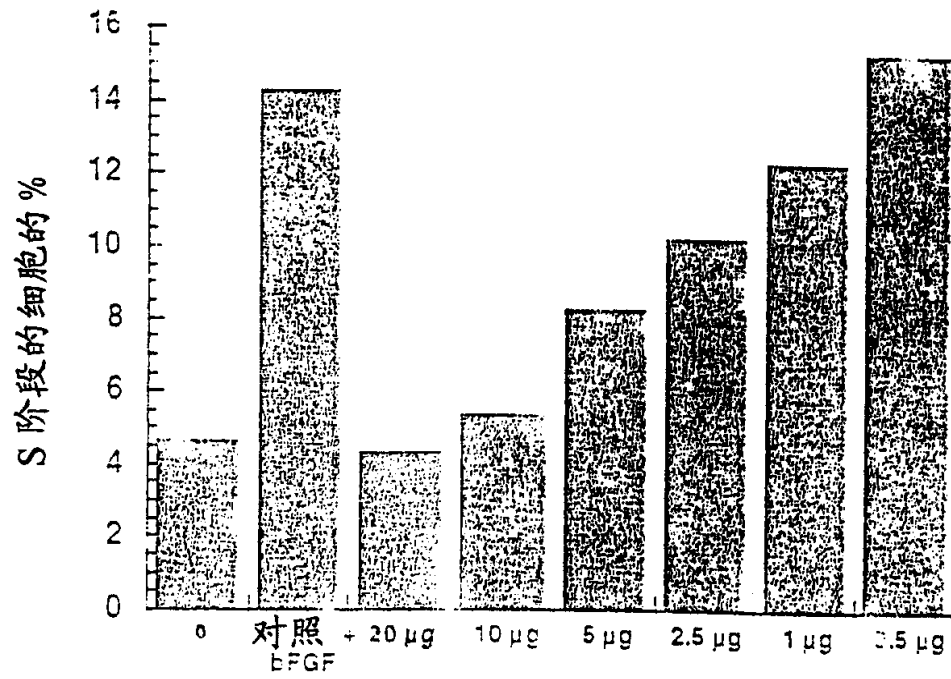


图 16A

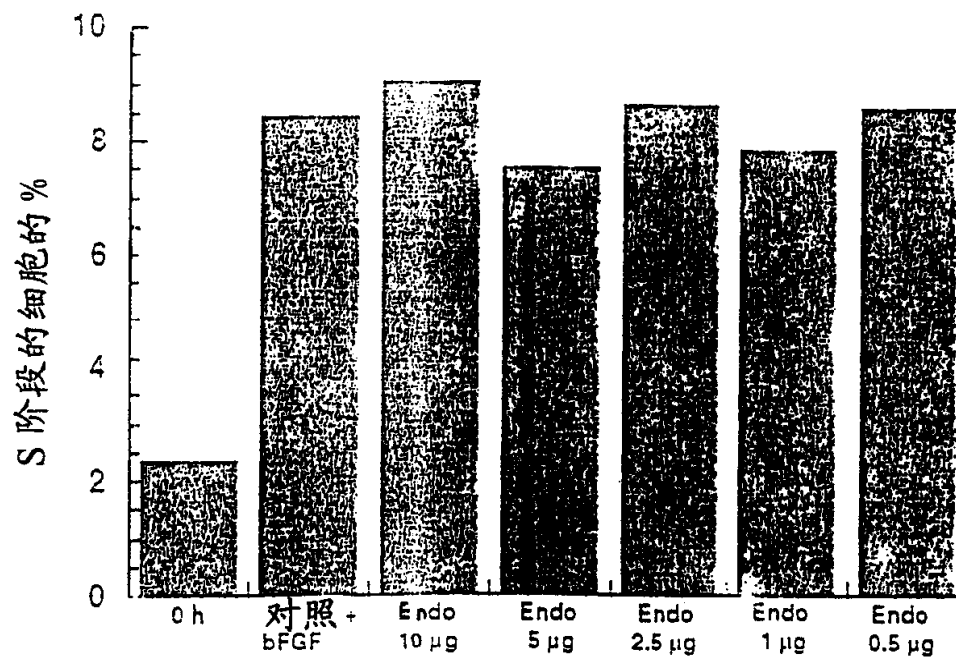


图 16B

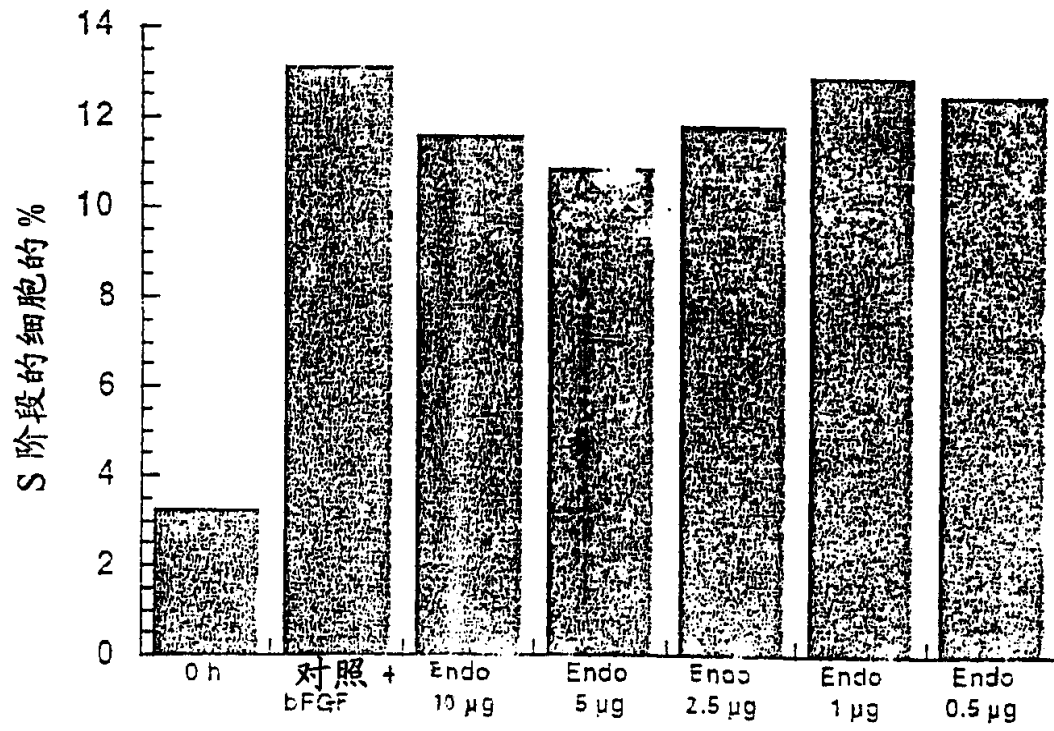


图 16C

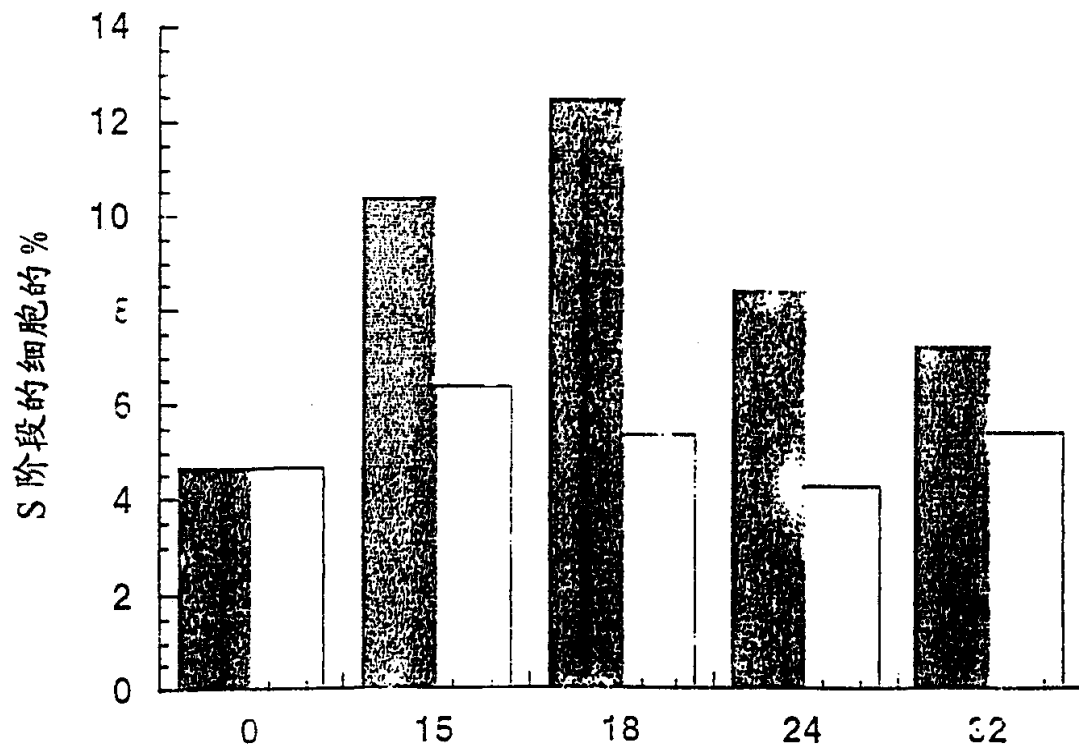


图 16D

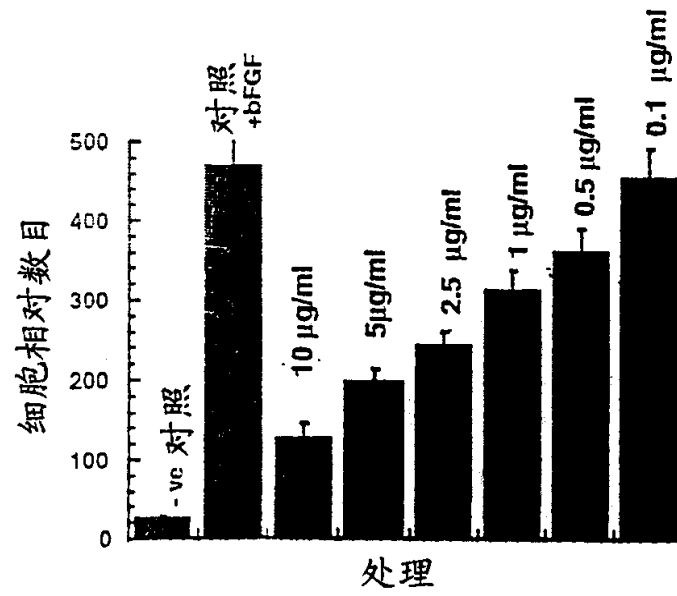


图 17

制管张素(小鼠)的纯化: 赖氨酸琼脂糖 4B 柱

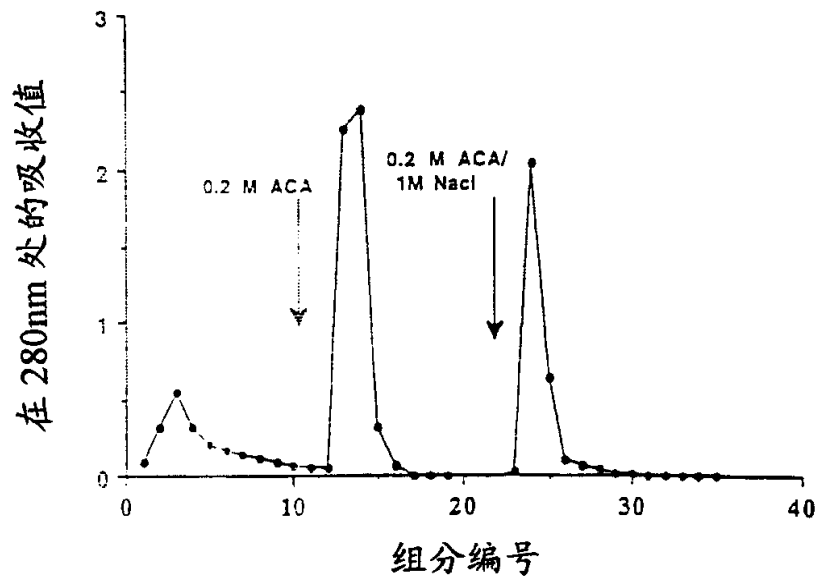


图 18A

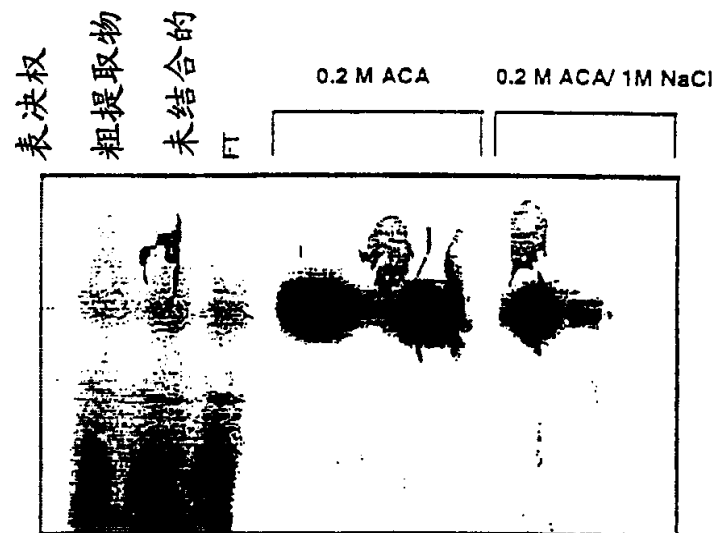


图 18B

表皮增殖的测试: 制管张素(小鼠)

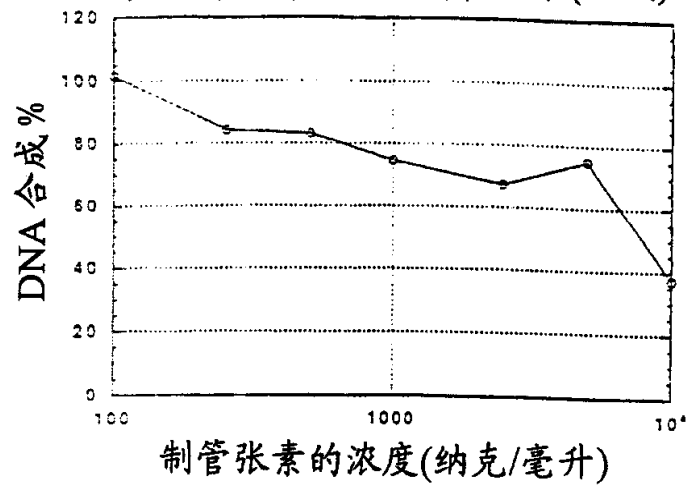


图 19

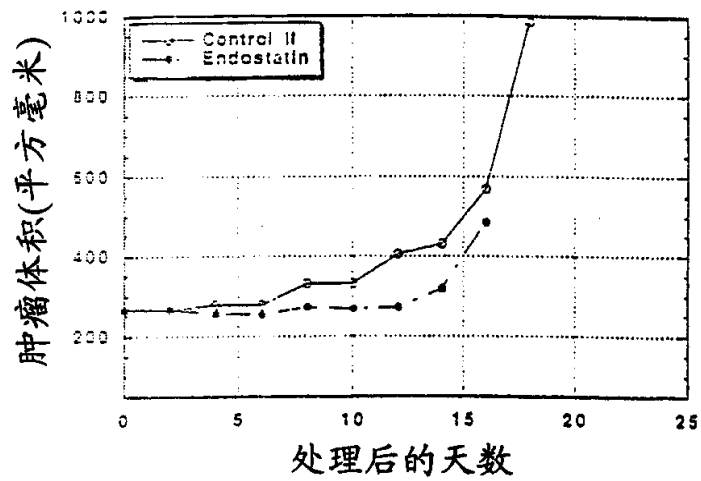
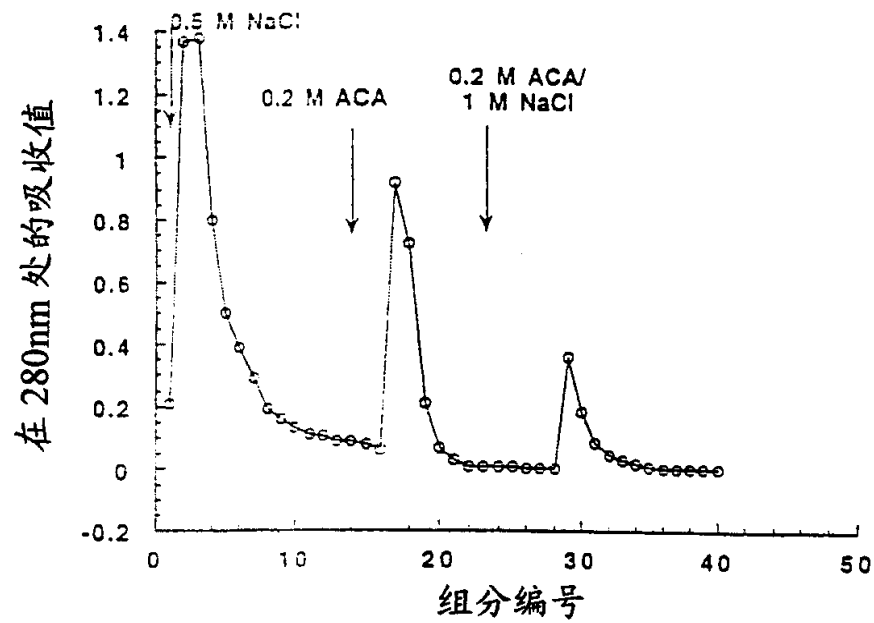
重组内抑制素(小鼠)对肿瘤的生长所影响  
(肾脏癌症细胞系 786-0)

图 20

## 制管张素(人)的纯化: 赖氨酸琼脂糖柱



纯化的重组制管张素(人)的 SDS - PAGE 分析: 赖氨酸琼脂糖柱

图 21A

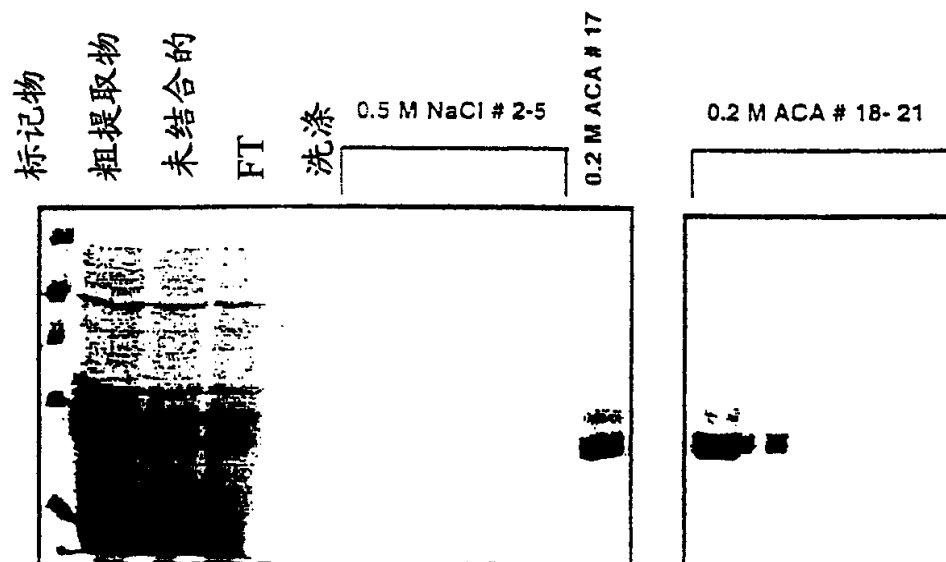


图 21B

序列范围: 1-546

静息蛋白和 apomigren 的上游引物是划线部分, 其下游引物是双划线部分。  
不在静息蛋白序列中的引物核苷酸以小写显示。

```

ttt ttt gaa ttc->
      5      10      15      20      25      30      35      40      45
->ATT TCA AGT GCC AAT TAT GAG AAG CCT GCT CTG CAT TTG GCT GCT CTG
   TAA AGT TCA CGG TTA ATA CTC TTC GGA CGA GAC GTA AAC CGA CGA GAC

   50      55      60      65      70      75      80      85      90      95
   AAC ATG CCA TTT TCT GGG GAC ATT CGA GCT GAT TTT CAG TGC TTC AAG
   TTG TAC GGT AAA AGA CCC CTG TAA GCT CGA CTA AAA GTC ACG AAG TTC

   100     105     110     115     120     125     130     135     140
   CAG GCC AGA GCT GCA GGA CTG TTG TCC ACC TAC CGA GCA TTC TTA TCT
   GTC CGG TCT CGA CGT CCT GAC AAC AGG TGG ATG GCT CGT AAG AAT AGA

145     150     155     160     165     170     175     180     185     190
   TCC CAT TTG CAA GAT CTG TCC ACC ATT GTG AGG AAA GCA GAG AGA TAC
   AGG GTA AAC GTT CTA GAC AGG TGG TAA CAC TCC TTT CGT CTC TCT ATG

   195     200     205     210     215     220     225     230     235     240
   AGC CTT CCC ATA GTG AAC CTC AAG GGC CAA GTA CTT TTT AAT AAT TGG
   TCG GAA GGG TAT CAC TTG GAG TTC CCG GTT CAT GAA AAA TTA TTA ACC

   245     250     255     260     265     270     275     280     285
   GAC TCA ATT TTT TCT GGC CAC GGA GGT CAG TTC AAT ATG CAT ATT CCA
   CTG AGT TAA AAA AGA CCG GTG CCT CCA GTC AAG TTA TAC GTA TAA GGT

ttt cca tat g->
290     295     300     305     310     315     320     325     330     335
->ATA TAC TCC TTT GAT GGT CGA GAC ATA ATG ACA GAT CCT TCT TGG CCC
   TAT ATG AGG AAA CTA CCA GCT CTG TAT TAC TGT CTA GGA AGA ACC GGG

   340     345     350     355     360     365     370     375     380
   CAG AAA GTC ATT TGG CAT GGC TCC AGC CCC CAT GGC GTC CGC CTT GTG
   GTC TTT CAG TAA ACC GTA CCG AGG TCG GGG GTA CCG CAG GCG GAA CAC

385     390     395     400     405     410     415     420     425     430
   GAT AAC TAC TGT GAA GCA TGG CGA ACC GCG GAC ACA GCG GTC ACG GGA
   CTA TTG ATG ACA CTT CGT ACC GCT TGG CGC CTG TGT CGC CAG TGC CCT

   435     440     445     450     455     460     465     470     475     480
   CTT GCC TCC CCG CTG AGC ACG GGG AAG ATT CTG GAC CAG AAA GCA TAC
   GAA CGG AGG GGC GAC TCG TGC CCC TTC TAA GAC CTG GTC TTT CGT ATG

   485     490     495     500     505     510     515     520     525
   AGC TGT GCT AAT CGG CTA ATT GTC CTA TGT ATC GAA AAC AGT TTC ATG
   TCG ACA CGA TTA GCC GAT TAA CAG GAT ACA TAG CTT TTG TCA AAG TAC

530     535     540     545
   ACA GAC GCT AGG AAG TAA
   TGT CTG CGA TCC TTC ATT cgc cgg cgt aag aa

```

图 22

序列范围: 1 to 181

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 5   | 10  | 15  | 20  | 25  | 30  | 35  | 40  | 45  |     |     |     |     |     |     |     |
| ISS | ANY | EKP | ALH | LAA | LNH | PFS | GDI | RAD | FQC | FKQ | ARA | AGL | LST | YRA | FLS |
| 50  | 55  | 60  | 65  | 70  | 75  | 80  | 85  | 90  | 95  |     |     |     |     |     |     |
| SHL | QDL | STI | VRK | AER | YSL | PIV | NLK | GQV | LFN | NWD | SIF | SGH | GGQ | FNM | HIP |
| 100 | 105 | 110 | 115 | 120 | 125 | 130 | 135 | 140 |     |     |     |     |     |     |     |
| IYS | FDG | RDI | MTD | PSW | PQK | VIW | HGS | SPH | GVR | LVD | NYC | EAW | RTA | DTA | VTG |
| 145 | 150 | 155 | 160 | 165 | 170 | 175 | 180 |     |     |     |     |     |     |     |     |
| LAS | PLS | TGK | ILD | QKA | YSC | ANR | LIV | LCI | ENS | FMT | DAR | K   |     |     |     |

图 23

将静息蛋白(ColXV)克隆到毕赤氏表达系统的图

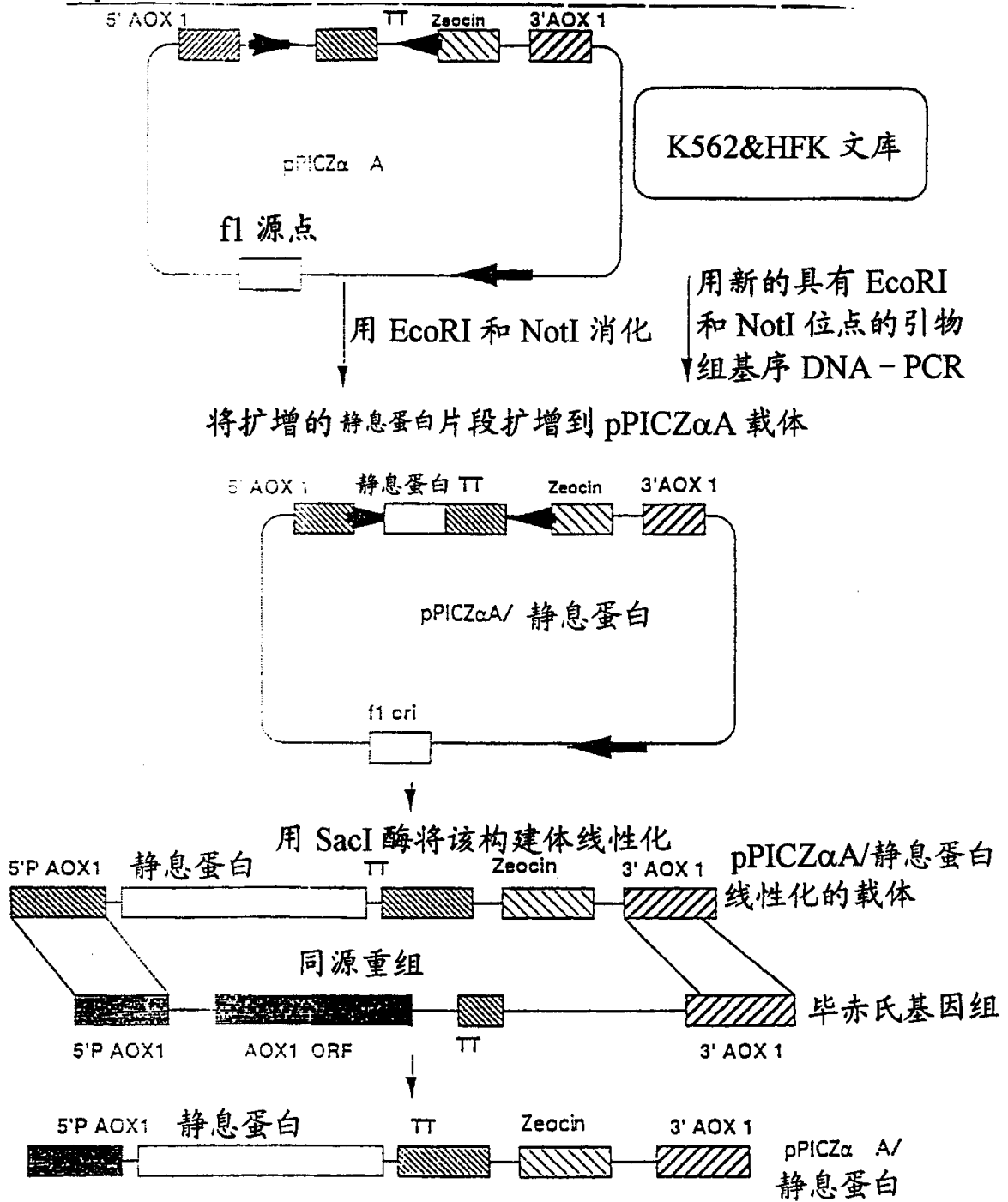


图 24

人的静息蛋白

| 构建体名称                  | 引物序列                                                                                                 | 克隆位点                          | 载体                                                              | 蛋白质序列                                                |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| pPICZαA/<br>Restin     | 5' TTT TTT GAA TTC ATT TCA AGT- GCC<br>AAT TAT GAG AAG CCT GCT- CTG CAT-<br>TTG-3'(上游)(SEQ ID NO:21) | EcoRI &<br>NotI               | 真核(酵母)<br>毕赤氏 pPICZαA<br>( <i>yeast human restin</i> )          | EF-restin                                            |
|                        | 5' AAG AAT GCG GCC GCT TAC TTC- CTA<br>GCG TCT GTC ATG AAA CTG- TTT TCG<br>AT-3' (下游) (SEQ ID NO:22) |                               |                                                                 |                                                      |
| pPICZαA/<br>His.Restin | 5' AAT TCC ATC ACC ATC ACC ATC- ACG-<br>3'(上游)(SEQ ID NO:23)                                         | EcoRI<br>(oligo<br>insertion) | 真核(酵母)<br>毕赤氏 pPICZαA<br>( <i>yeast human<br/>his. restin</i> ) | EFHHHHHH-restin (SEQ ID NO:24)                       |
|                        | 5' AAT TCG TGA TGG TGA TGG TGA-<br>TGG-3' (下游) (SEQ ID NO:24)                                        |                               |                                                                 |                                                      |
| pET28a/<br>apomigren   | 5' TTT CAT ATG ATA TAC TCC TTT- GAT<br>GGT CGA GAC ATA ATG ACA-3'(上游)(SEQ<br>ID NO:25)               | NdeI &<br>NotI                | 原核表达 pET 系统<br>( <i>E.coli human<br/>apomigren</i> )            | MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHM-apo<br>migren (SEQ ID NO:11)   |
|                        | 5' AAT GCG GCC GCT TAC TTC CTA- GCG<br>TCT GTC ATG AAA CTG TTT- TCG AT-3'<br>(下游) (SEQ ID NO:26)     |                               |                                                                 |                                                      |
| pPICZαA/<br>apomigren  | 5' AAG AAT TCC ATC ATC ATC ATC- ATC<br>ACA GCA GC-3'(上游)(SEQ ID NO:11)                               | EcoRI &<br>NotI               | 真核(酵母)<br>毕赤氏 pPI 系统<br>( <i>yeast human<br/>apomigren</i> )    | EFMGSSHHHHHHSSGLVPRGSHM-<br>apomigren (SEQ ID NO:27) |
|                        | 5' AAT GCG GCC GCT TAC TTC CTA- GCG<br>TCT GTC ATG AAA CTG TTT- TCG AT-3'<br>(下游) (SEQ ID NO:26)     |                               |                                                                 |                                                      |

图 25

3.3.3.3

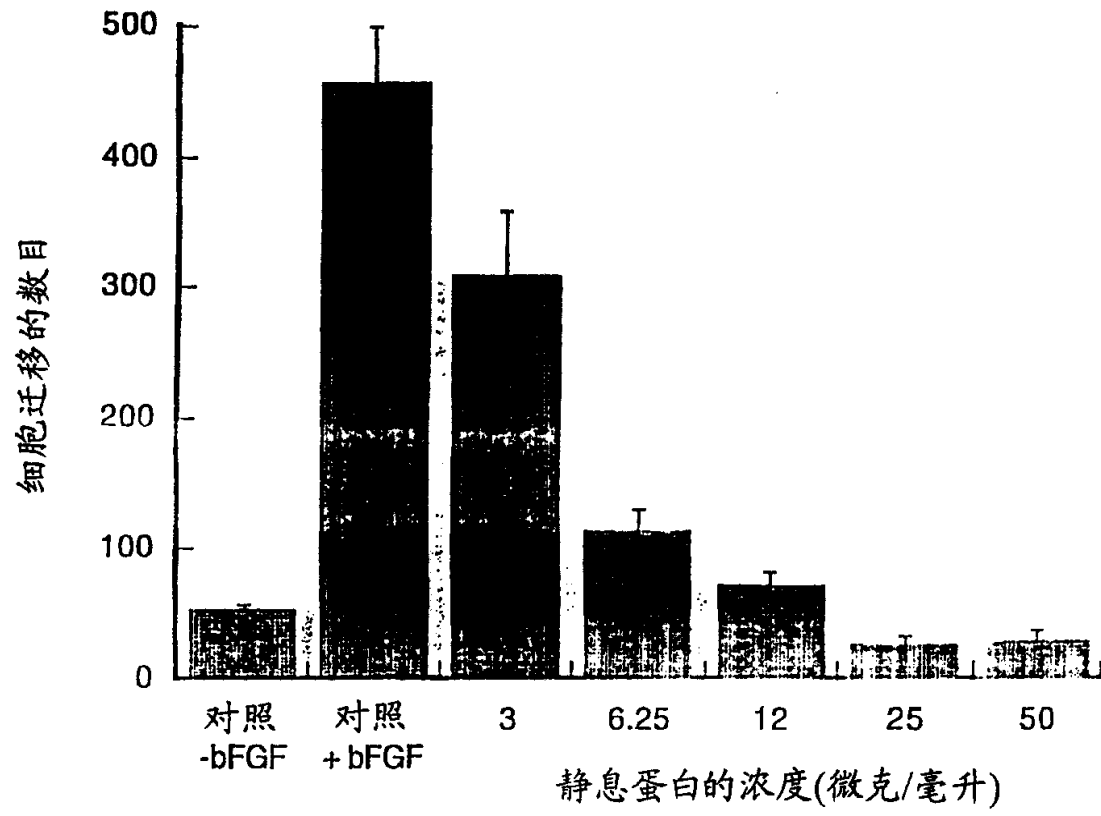


图 26

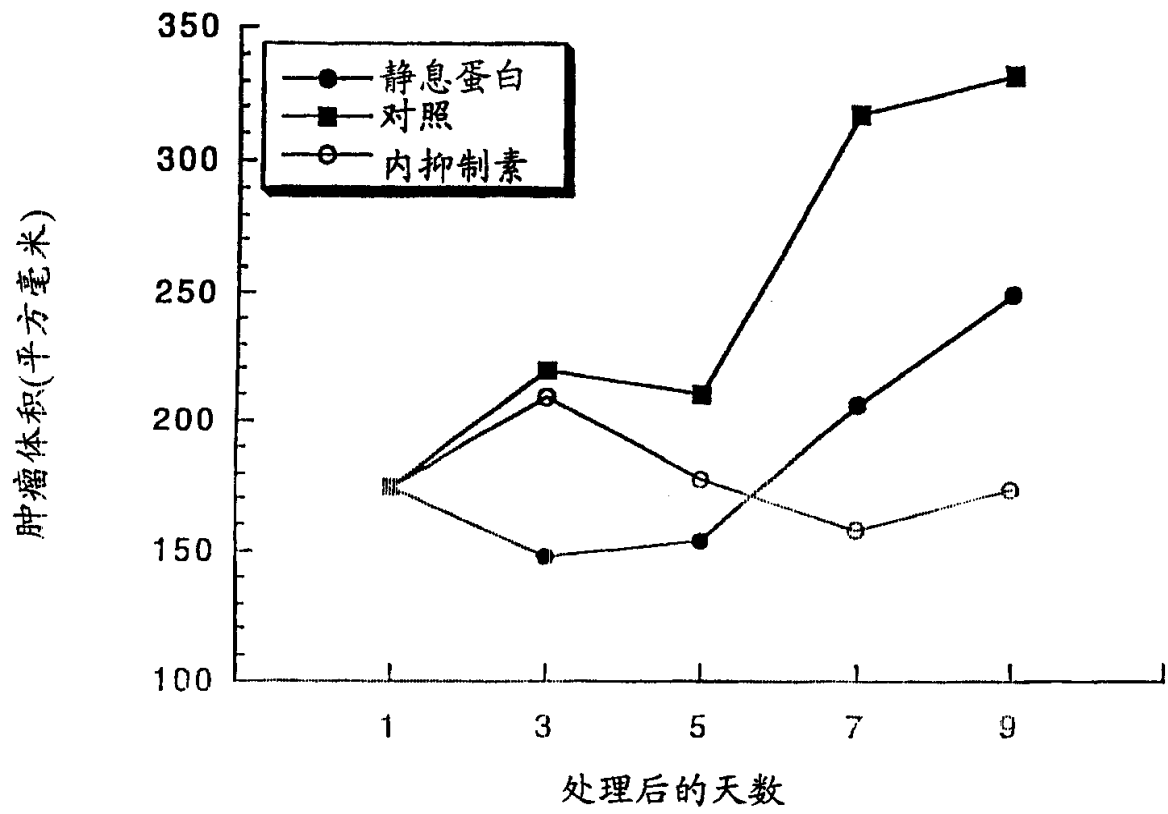


图 27