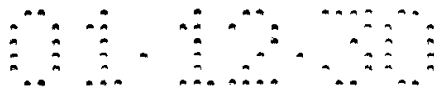




权 利 要 求 书

1. 一种多肽、其酰胺、其酯、或其盐，所述多肽含有与 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列。
- 5 2. 权利要求 1 所述多肽、其酰胺、其酯、或其盐含有与 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列。
3. 权利要求 1 所述多肽、其酰胺、其酯、或其盐，其中所述与 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列基本相同的序列为 SEQ ID NO:26 所示氨基酸序列。
4. 权利要求 2 所述多肽、其酰胺、其酯、或其盐，其中所述与 SEQ ID
10 NO:6 所示氨基酸序列基本相同的序列为 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列。
5. 权利要求 1 所述多肽、其酰胺、其酯、或其盐，其中所述与 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列基本相同的序列为 SEQ ID NO:49 所示氨基酸序列。
6. 权利要求 2 所述多肽、其酰胺、其酯、或其盐，其中所述与 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列基本相同的序列为 SEQ ID NO:47 所示氨基酸序列。
- 15 7. 一种 DNA，其包含编码权利要求 1 所述多肽的碱基序列的 DNA。
8. 权利要求 6 所述的 DNA，其中所述编码权利要求 1 多肽的碱基序列为 SEQ ID NO:23 所示的碱基序列。
9. 权利要求 6 所述的 DNA，其中所述编码权利要求 1 多肽的碱基序列为 SEQ ID NO:4 所示的碱基序列。
- 20 10. 权利要求 6 所述的 DNA，其中所述编码权利要求 1 多肽的碱基序列为 SEQ ID NO:25 所示的碱基序列。
11. 权利要求 6 所述的 DNA，其中所述编码权利要求 1 多肽的碱基序列为 SEQ ID NO:10 所示的碱基序列。
12. 权利要求 6 所述的 DNA，其中所述编码权利要求 1 多肽的碱基序
25 列为 SEQ ID NO:48 所示的碱基序列。
13. 权利要求 6 所述的 DNA，其中所述编码权利要求 1 多肽的碱基序列为 SEQ ID NO:46 所示的碱基序列。
14. 一种重组载体，其含有权利要求 6 所述的 DNA。
15. 一种转化体，其用权利要求 14 所述重组载体转化而成。
- 30 16. 一种生产权利要求 1 所述多肽、其酰胺、其酯、或其盐的方法，其包含培养权利要求 15 的转化体，并从中生成该多肽。



说明书

新型多肽及其 DNA

5

发明领域

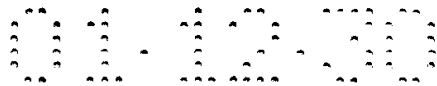
本发明涉及调节细胞分泌机能的新型蛋白及其 DNA。

发明背景

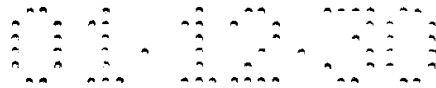
10

不论是原核细胞还是真核细胞，其细胞本身都具有分泌各种蛋白的功能。尤其是多细胞生物体(机体)其分泌蛋白在细胞间传递着各种信息以维持机体的分化、增殖及其个体的恒常性。然而这里起着重要作用的各种液体因子它们大多数都是分泌蛋白或具有一定功能的质体。如果从其结构、功能特征等可将其分为激素、神经递质、细胞因子、增殖因子等。近年来，随着重组 DNA 技术和细胞培养技术的发展，阐明编码所述分泌蛋白的基因及其蛋白结构正在稳步地发展。另一方面，这些因子的发现加速了对受体蛋白在细胞表面上表达的研究，并进一步能够阐明各细胞之间信息传递的机制，同时给予其细胞生理机能之特征。本应保持其自身稳定的某种液体因子，却因其异常表达而导致人类多种疾病，或者在各种疾病动物模型上模拟病态原因，使之病情恶化，除此之外，例如，所谓肿瘤标记等在癌症上认为是一种特异性表达的亢进，它可适用于诊断各种疾病，同时在研发新药的的基础上可成为控制表达机制的一个重要的指标。

1994 年 Blesch 等发表了一种抑制黑素瘤蛋白质 MIA(melanoma inhibitory activity)该蛋白属于所述范畴的一种分泌蛋白。当时，如其名称一样，将抗黑素瘤细胞的增殖活性作为指标分离了黑素瘤细胞培养物上清液，并得到该基因[「癌症研究」 54,5695—5701,1994]。其后，在 1996 年 Sabdell 等将本蛋白质的相同基因再次鉴定为由牛软骨细胞产生的视黄酸敏感蛋白质 CD-RAP(cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein)，该蛋白质在生理学上对关节的发育和维持起着一定的作用(生物化学杂志 271, 3311-3316, 1996)。MIA-CD-RAP 基因在人、小鼠、大鼠、牛的种间虽然在氨基酸水平



- (2) (1)中1所述多肽、其酰胺、其酯、或其盐,该多肽含有与 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列相同或基本相同的序列;
- (3) (1)中所述多肽、其酰胺、其酯、或其盐,其中所述与 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列基本相同的序列为 SEQ ID NO:26 所示氨基酸序列;
- 5 (4) (2)中所述多肽、其酰胺、其酯、或其盐,其中所述与 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列基本相同的序列为 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列;
- (5) (1)中所述多肽、其酰胺、其酯、或其盐,其中所述与 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列基本相同的序列为 SEQ ID NO:49 所示氨基酸序列;
- (6) (2)中所述多肽、其酰胺、其酯、或其盐,其中所述与 SEQ ID NO:6 10 所示氨基酸序列基本相同的序列为 SEQ ID NO:47 所示氨基酸序列;
- (7) 一种 DNA, 其包含编码(1)中所述多肽的碱基序列的 DNA;
- (8) (6)中所述的 DNA, 其中所述编码(1)中多肽的碱基序列为 SEQ ID NO:23 所示的碱基序列;
- (9) (6)中所述的 DNA, 其中所述编码(1)中多肽的碱基序列为 SEQ ID 15 NO:4 所示的碱基序列;
- (10) (6)中所述的 DNA, 其中所述编码(1)中多肽的碱基序列为 SEQ ID NO:10 所示的碱基序列;
- (11) (6)中所述的 DNA, 其中所述编码(1)中多肽的碱基序列为 SEQ ID NO:25 所示的碱基序列;
- 20 (12) (6)中所述的 DNA, 其中所述编码(1)中多肽的碱基序列为 SEQ ID NO:48 所示的碱基序列;
- (13) (6)中所述的 DNA, 其中所述编码(1)中多肽的碱基序列为 SEQ ID NO:46 所示的碱基序列;
- (14)一种重组载体, 其含有(6)所述的 DNA;
- 25 (15) 一种转化体, 其用(14)所述重组载体转化而成;
- (16) 一种生产(1)所述的多肽、或其酰胺或其酯或其盐的方法, 其包含培养(15)所述转化体, 并从中产生多肽;
- (17) 一种抗体, 其针对(1)中所述多肽、其酰胺或其酯或其盐;
- (18) 一种筛选化合物或其盐的方法, 所述化合物或其盐能够促进或抑 30 制(1)中所述多肽或其盐的活性, 该方法包括使用(1)中的多肽或其酰胺或其酯、或其盐;



(19) 一种用于筛选化合物或其盐的试剂盒，所述化合物或其盐能够促进或抑制(1)中所述多肽或其酰胺或其酯、或其盐的活性，该试剂盒包括(1)中所述多肽或其盐；

5 (20) 一种能够促进或抑制(1)中所述多肽或其酰胺或其酯、或其盐活性的化合物或其盐，所述化合物或其盐可通过使用(18)中所述筛选法或(19)中所述筛选试剂盒而获得；

(21) 一种药物，其包含能促进或抑制(1)中所述多肽或其酰胺或其酯、或其盐活性的化合物或其盐，所述化合物或其盐可通过使用(18)中所述筛选法或(19)中所述筛选试剂盒而获得；

10 (22) 一种药物，其含有(1)中所述多肽或其酰胺或其酯、或其盐；

(23) 一种预防和/或治疗骨疾病或关节疾病或者有病的血管新生药物，所述药物含有(1)中所述多肽、其酰胺、其酯、或其盐；

(24) 一种诊断试剂，其含有权利要求 17 的抗体；

本发明又进一步提供：

15 (25)(1)中所述多肽、其酰胺、其酯、或其盐，其中与 SEQ ID NO: 24 所示氨基酸序列基本相同的序列是与 SEQ ID NO: 24 所示氨基酸序列至少具有约 50%同源性的氨基酸序列(优选同源性至少约 60%，进一步优选至少约 70%，较优选至少约 80%，更优选至少约 90%，最优选至少约 95%)；

20 (26)(1)中所述多肽、其酰胺、其酯、或其盐，其中与 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列基本相同的序列是：①SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列，其中有 1 或 2 个以上氨基酸(优选 1~30 个氨基酸)被缺失；②SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列，其中有 1 或 2 个以上氨基酸(优选 1~40 个氨基酸，更优选 1~30 个氨基酸)被添加；③SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列，其中有 1 或 2 个以上氨基酸(优选 1~30 个氨基酸)被其它氨基酸所取代；或者④上述氨基酸序列组合形成的序列。

25 又，本发明的 DNA 以及多肽、其酰胺、其酯、或其盐等可用于基础性研究如，分子量标记、组织标记、染色体作图、遗传病鉴定、引物和探针的设计等。

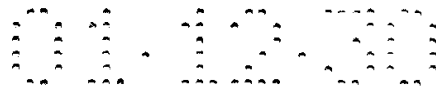


图 1 为人 MLP 前体(hMLP)、小鼠 MLP 前体(mMLP)、人 MIA 前体(hMIA)、小鼠 MIA 前体(mMIA)、大鼠 MIA 前体(rMIA)、以及牛 MIA 前体(bMIA)的氨基酸序列。

图 2 为通过实施例 6 进行的蛋白质印迹分析结果。所用第一抗体为抗 FLAG 抗体。

图中表示,在 COS-7 细胞中各自转染了下列物质培养物上清液的电泳泳道,泳道 1 为转染小鼠 MLP(无 FLAG 标记)、泳道 2 为转染小鼠 MLP-FLAG、泳道 3 为转染小鼠 MIA(无 FLAG 标记)、泳道 4 为转染小鼠 MIA-FLAG、泳道 5 为转染人 MLP(无 FLAG 标记)、泳道 6 为转染小鼠 MLP-FLAG。

图 3 为通过实施例 6 进行的蛋白质印迹分析结果。所用第一抗体为抗 MLP 抗血清。

图中表示,在 COS-7 细胞中各自转染了下列物质培养物上清液的电泳泳道,泳道 1 为转染小鼠 MLP(无 FLAG 标记)、泳道 2 为转染小鼠 MLP-FLAG、泳道 3 为转染小鼠 MIA(无 FLAG 标记)、泳道 4 为转染小鼠 MIA-FLAG、泳道 5 为转染人 MLP(无 FLAG 标记)、泳道 6 为转染小鼠 MLP-FLAG。

图 4 为通过实施例 6 进行的免疫染色结果。左图为对照实验结果,免疫前采用了家兔血清,右图为实验结果,为采用了抗 MLP 抗血清。

本发明实施方案的最佳形式

在本发明中,含有 SEQ ID NO: 24 所示氨基酸序列的多肽(下文通常称为"人型多肽")、SEQ ID NO: 26 所示氨基酸序列的多肽(下文通常称为"小鼠型多肽")、SEQ ID NO: 49 所示氨基酸序列的多肽(下文通常称为"大鼠型多肽")、以及含有基本与人型多肽相同的氨基酸序列的多肽(下文通常将"人型多肽及含有基本与人型多肽相同的氨基酸序列的多肽统称为本发明多肽")均可来自人或温血动物(例如,豚鼠、大鼠、小鼠、家鸡、兔子、猪、绵羊、牛、猴子等)细胞中的多肽,还有重组多肽,或者合成多肽。所述细胞如肝细胞、脾细胞、神经细胞、神经胶质细胞、胰腺 β 细胞、骨髓细胞、肾小球膜细胞、朗格罕氏细胞、表皮细胞、上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、纤维细胞、肌细胞、脂肪细胞、免疫细胞(例如,巨噬细胞、T 细胞、B 细

MLP 前体或小鼠 MLP 前体蛋白，将含有 SEQ ID NO: 47 所示氨基酸序列的多肽称为大鼠 MLP 前体或大鼠 MLP 前体蛋白，再将这些蛋白统称为 MLP 前体。

5 所述含有与本发明中的 SEQ ID NO: 24 所示氨基酸序列基本相同的序列的多肽，优选这样一种多肽，例如具有与所述 SEQ ID NO: 24 所示氨基酸序列基本相同的序列，并且具有与该多肽性质基本相同。

又，所述含有与 SEQ ID NO: 6 所示氨基酸序列基本相同的序列的多肽，优选这样一种多肽，例如具有与所述 SEQ ID NO: 6 所示氨基酸序列基本相同的序列，并且具有与该多肽性质基本相同。

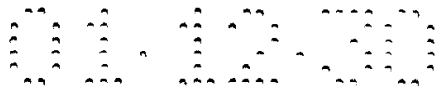
10 所述性质基本相同的例子有，如由分泌而形成的具有液体因子功能。所谓性质基本相同是指，它们的性质在定性上相同。因此，优选其分泌作用或溶解性等相同(例如，约 0.1-100 倍，优选约 0.5-10 倍，更优选 0.5-2 倍)。然而，这些性质的强弱或多肽分子量等其量化要素可以不尽相同。

15 本发明的多肽可以包括所谓的突变蛋白，如包含下述的多肽：(i)SEQ ID NO: 24 或 6 所示氨基酸序列，其中的 1 或 2 个以上氨基酸(优选 1~30 个氨基酸，更优选 1~10 个氨基酸，最优选 1~5 个氨基酸)被缺失；(ii)SEQ ID NO: 24 或 6 所示氨基酸序列，其中的 1 或 2 个以上氨基酸(优选 1~40 个氨基酸，更优选 1~30 个氨基酸，更优选 1~10 个氨基酸，最优选数个(1-5)氨基酸)被添加；(iii)SEQ ID NO: 24 或 6 所示氨基酸序列，其中的 1 或 2 个以上氨基酸(优选 1~30 个氨基酸，更优选 1~10 个氨基酸，最优选数个(1-5)氨基酸)被插入；(iv)SEQ ID NO: 24 或 6 所示氨基酸序列，其中的 1 或 2 个以上氨基酸(优选 1~30 个氨基酸，更优选 1~10 个氨基酸，最优选数个(1~5)氨基酸)被其他氨基酸所取代；以及(v)上述氨基酸序列的组合。

20

25 如上在氨基酸序列中插入、缺失或取代时，其插入、缺失或取代的位置不作特别限定。但下面的例子除外，与 SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26 及 SEQ ID NO: 49 所示氨基酸序列相同的位置，与 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 12 及 SEQ ID NO: 47 所示氨基酸序列相同的位置。

30 本说明书中的多肽可以用本领域已知的描述肽的方法来定义。即，左末端为 N-末端(氨基端)，右末端为 C-末端(羧基端)。本发明多肽中包括 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列，C-末端通常为羧基(-COOH)或羧酸根(-COO⁻)，但是 C-末端也可为酰胺(-CONH₂)或酯(-COOR)。



R 代表的酯如 C_{1-6} 烷基包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、或正丁基等； C_{3-8} 环烷基包括环戊基和环己基等； C_{6-12} 芳基包括苯基和 α -萘基等；以及 C_{7-14} 芳烷基包括苯基- C_{1-2} 烷基如苯甲基、苯乙基等；或 α -萘基- C_{1-2} 烷基如 α -萘甲基，还有通常用作口服给药的酯的三甲基乙酰氧甲基。

5 当本发明多肽在 C-末端以外的位置上包括一个羧基(或羧酸酯)时，它可以酰胺化或酯化，则这类酰胺或酯也可以包括在本发明所述多肽的范围之内。所述酯基可以与上述 C-末端的酯基相同。

另外，本发明多肽可以包括下述衍生物，其中 N-末端氨基酸残基(如甲硫氨酸)的氨基用保护基(C_{1-6} 酰基，如甲酰基、乙酰基等 C_{1-6} 烷酰基)保护；
10 所述 N 末端在体内切割，形成的谷氨酰基焦谷氨酸化；所述多肽分子中氨基酸侧链上的取代基(例如，-OH, -SH, 氨基、咪唑基、吡啶基、胍基等)受适当基团(C_{1-6} 酰基，如甲酰基、乙酰基等 C_{1-6} 烷酰基)保护，或结合多肽如通过糖链连接的糖多肽等。

作为本发明的多肽或其盐，可以使用与生理上可接受的碱(如碱金属盐)
15 或酸(如无机酸或有机酸)形成的盐，尤其优选生理上可接受的酸加成盐。这样的盐有，与无机酸(例如，盐酸、磷酸、氢溴酸、硫酸)形成的盐，与有机酸(例如，乙酸、甲酸、丙酸、延胡索酸、马来酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸、苹果酸、草酸、苯甲酸、甲磺酸、苯磺酸)形成的盐等。

本发明多肽或它们的盐既可用公知的从人或其它温血动物细胞或组织
20 中纯化多肽(蛋白质)的方法来制备。又可以通过培养含有编码多肽的 DNA 转化体而制备(如下述)，也可用下述肽合成法来制备。

当从人或哺乳动物组织或细胞中制备多肽或它们的盐时，首先将人或哺乳动物组织或细胞匀浆，然后用酸等抽提，通过反相层析、离子交换层析等多种层析技术的联用来分离纯化该抽提物。

25 为了合成本发明多肽、或其盐或其酰胺物，可以使用可用于多肽(蛋白质)合成的商用树脂。这类树脂的实例包括氯甲基树脂、羟甲基树脂、二苯胺树脂、氨甲基树脂、4-苄氧基苯甲醇树脂，4-甲基二苯胺树脂，PAM 树脂，4-羟甲基苯乙酰胺甲基树脂，聚丙烯酰胺树脂，4-(2',4'-二甲氧基苯羟甲基)苯氧基树脂以及 4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨乙基)苯氧基树脂。使用
30 这些树脂时，将那些 α -氨基及侧链上官能团受到相应保护的氨基酸，在树脂上按目标多肽的序列顺序，用本领域公知的各种缩合方法缩合。反应结

束时，将多肽从树脂上切除下来，同时除去保护基团。然后在高度稀释的溶液中进行分子内二硫键的形成反应，以获得目标多肽、或其酰胺物。

5 进行上述受保护氨基酸的缩合反应时，可使用多肽合成的多种活化试剂，但优选使用碳二亚胺。所述碳二亚胺有 DCC、N,N'-二异丙基碳二亚胺以及 N-乙基-N'-(3-二甲基氨基脯氨酰基)碳二亚胺。用这些试剂活化时，直接在树脂上添加受保护的氨基酸及外消旋抑制剂(例如，HOBt, HOObt)，或先将受保护的氨基酸活化为对称酸酐、HOBt 酯或 HOObt 酯，然后添加到树脂上。

10 适用于受保护氨基酸的活化反应或适用于与树脂的缩合反应的溶剂选自己知可用于多肽(蛋白质)缩合反应的溶剂。这样的溶剂有酰胺类如 N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺以及 N-甲基吡咯烷酮等；卤化烃类如亚甲基盐酸盐和氯仿等；醇类如三氟乙醇等；亚砷类如二甲亚砷等；醚类如吡啶、二恶烷和四氢呋喃等；腈类如乙腈和丙腈等；酯类如乙酸甲酯和乙酸乙酯等；以及这些溶剂的适当混合物。反应温度从已知适用于多肽(蛋白质)
15 成键反应的范围中选取，通常选约-20℃ - 50℃。活化的氨基酸衍生物通常以过量 1.5~4 倍的量使用。用茚三酮反应检验所述缩合反应；当所述缩合不充分时，可通过不除去保护基团而重复缩合反应来完成。当即使重复反应后仍未充分缩合时，用乙酸酐或乙酰咪唑将未反应的氨基酸乙酰化，以消除对后续反应的可能负影响。

20 用于保护初始氨基的保护基团有 Z、Boc、叔戊氧基羰基、异冰片基氧羰基、4-甲氧苄氧羰基、Cl-Z、Br-Z、金刚烷(adamantyl)氧基羰基，三氟乙酰基、邻苯二甲酰基、甲酰基、2-硝基苯基亚硫酰基、二苯硫磷基，以及 Fmoc 等。

25 羧基可用如下的酯化作用保护，例如烷基酯化(烷基如甲基、乙基、丙基、丁基、叔丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基和 2-金刚烷基等的直链、支链或环状烷基酯)，芳烷基酯化(例如酯化为苄酯、4-硝基苄酯、4-甲氧苄酯、4-氯苄酯以及二苯甲基酯等)，苯甲酰甲基酯化，苄氧羰基酰肼化，叔丁氧羰基酰肼化以及三苯甲基酰肼化等。

30 丝氨酸的羟基可以通过例如酯化作用或醚化作用来保护。适于酯化作用的基团有低级 C_{1~6} 烷酰基如乙酰基，芳酰基如苯甲酰基，以及来自碳酸



的基团如苄氧羰基和乙氧羰基。适于醚化的基团有苯甲基、四氢吡喃基和叔丁基等。

适于保护酪氨酸中酚羟基的基团有 Bzl, Cl₂-Bzl, 2-硝基苄基、Br-Z 和叔丁基等。

5 适于保护组氨酸中咪唑基的基团有 Tos, 4-甲氧-2,3,6-三甲基苯磺酰基、DNP、苄氧甲基、Bum、Boc、Trt 和 Fmoc 等。

10 初始氨基酸中的活化羧基有相应的酸酐、叠氮化物、活化酯(带有醇的酯(如五氟苯酚、2,4,5-三氟苯酚、2,4-二硝基酚、氰甲基醇、对硝基苯酚、HONB, N-羟基琥珀酰亚胺、N-羟基邻苯二甲酰亚胺、HOBt)。将初始物质中待活化氨基酸的氨基活化时, 可以使用其相应磷酰胺。

15 为了除去(脱离)保护基, 在氢气流下用 Pd-黑或 Pd-碳等催化剂进行催化还原; 用氢氟酸酐、甲磺酸、三氟甲磺酸或三氟醋酸, 或这些酸的混合液进行酸处理; 用二异丙基乙胺、三乙胺、哌啶或哌嗪等碱进行碱处理; 以及用液态氨中的钠还原。用上述酸处理除去所述保护基团的反应通常在
20 约-20℃~40℃进行。在酸处理中, 添加阳离子清除剂以使反应有效进行, 例如使用甲氧基苯、苯酚、硫代甲氧基苯、间甲酚、对甲酚、二甲基硫化物、1,4-丁二硫醇或 1,2-乙二硫醇。此外, 用苯硫酚处理以除去已知可作为组氨酸中咪唑的保护基团的 2,4-二硝基苄基。用作色氨酸中吲哚的保护基团的甲酰基用下述方法去除: 在 1,2-乙二硫醇或 1,4-丁二硫醇存在时用上述
25 酸进行处理, 以及用氢氧化钠稀溶液和稀氨水等碱进行处理。

与起始物质之反应无关的官能团的保护、保护基的选择、该保护基的消除、以及与上述反应有关的官能团的活化, 从公知的基团和公知的方法中适当选择。

25 获得酰胺化多肽的其它方法有, 如先将羧基末端氨基酸的 α-羧基酰胺化而加以保护; 然后, 将肽(多肽)链从氨基侧延伸至预期长度。然后, 制备只将其中 N-末端 α-氨基的保护基团除去的多肽以及只将其中 C-末端羧基的保护基团除去的多肽。将这两种多肽浓缩在上述溶剂的混合液中。浓缩反应的细节同上。对浓缩所得被保护多肽进行纯化后, 通过上述方法除去所有的保护基团, 获得所需粗制多肽。该粗制多肽可用各种已知的纯化方
30 法进行纯化。冻干主要级分获得所需多肽的酰胺物。



等。选择标记的例子包括，二氢叶酸还原酶(下文通常缩写为 dhfr)基因[甲氨喋呤(MTX)抗性]、氨苄青霉素抗性基因(下文通常缩写为 Amp^r)、新霉素抗性基因(下文通常缩写为 Neo^r, Geneticin 抗性)等。尤其是，当 CHO(dhfr)细胞缺少 dhfr 基因并用 dhfr 基因作为选择标记时，使用无胸腺嘧啶脱氧核
5 苷的培养基可以筛选充足的体细胞。

根据需要，可在本发明多肽的 N-端加上同宿主匹配的信号序列。在用大肠杆菌属细菌作宿主时，可以使用的信号序列为 Pho A 信号序列、OmpA 信号序列等；当用枯草杆菌属的细菌作宿主时，可以使用的信号序列为 α -淀粉酶信号序列、枯草杆菌蛋白酶信号序列等；在用酵母作宿主时，可以
10 使用的信号序列为 MF α 信号序列、SUC2 信号序列等；在用动物细胞作宿主时，可以使用的信号序列为胰岛素信号序列、 α 干扰素信号序列、抗体分子信号序列等。

使用含有如此构建的编码本发明多肽的 DNA 序列的载体，可获得转化体。

15 可以使用的宿主的实例有，属于大肠杆菌属的细菌、属于枯草杆菌属的细菌、酵母、昆虫细胞、昆虫以及动物细胞等。

大肠杆菌属的细菌有，大肠杆菌(*Escherichia coli*)K12 DH1(美国国家科学院院刊, 60, 160(1968))、JM103(核酸研究, 9, 309(1981))、JA221(分子生物学杂志, 120, 517(1978))、HB101(分子生物学杂志, 41, 459(1969))、C600(遗传学, 39, 440(1954))等。
20

枯草杆菌属的细菌有，枯草杆菌 MI 114(基因, 24, 255(1983))、207-221(生物化学杂志, 95, 87(1984))等。

酵母有，酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)AH22、AH22R、NA87-11A、DKD-5D、20B-12、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)
25 NCYC1913、NCYC2036、巴斯德毕赤酵母(*pichia pastoris*)KM71 等。

就昆虫细胞而言，病毒为 AcNPV 时有草地夜蛾幼虫(*Spodoptera frugiperda*, Sf)的细胞株、粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)中肠的 MG1 细胞、粉纹夜蛾卵的 High FiveTM 细胞、甘蓝夜蛾(*Mamestra brassicae*)的细胞、*Estigmena acrea* 的细胞等；病毒为 BmNPV 时有家蚕(*Bombyx mori*)的 N 细胞(BmN 细胞)等。可用的 Sf 细胞有 Sf9 细胞(ATCC CRL1711)和 Sf21 细胞(这两种细胞
30 均由 Vaughn, J.L.等在 In Vivo, 13, 213-217(1977)中描述)。



作为昆虫的例子，可以使用家蚕的幼虫(前田等，自然, 315, 592(1985))。

动物细胞包括猴 COS-7 细胞、Vero、中华仓鼠细胞 CHO(以下简称 CHO 细胞)、dhfr 基因缺陷的中华仓鼠细胞 CHO(以下简称 CHO(dhfr)细胞)、小鼠 L 细胞、小鼠 AtT-20 细胞、小鼠骨髓瘤细胞、大鼠 GH3、人 FL 细胞等。

5 大肠杆菌属的细菌可以根据美国国家科学院院刊, 69, 2110(1972)或基因, 17, 107(1982)中描述的方法进行转化。

枯草杆菌属的细菌可以根据分子及普通遗传学, 168, 111(1979)中描述的方法进行转化。

10 酵母可以根据酶学方法, 194, 182-187(1991)或美国国家科学院院刊, 75, 1929(1978)中描述的方法进行转化。

昆虫细胞或昆虫可以根据生物/技术, 6, 47-55(1988)中描述的方法进行转化。

15 动物细胞的转化可以根据《细胞工程学增订版 8, 细胞工程学实验最新方法》秀润出版社, 263-267(1995)或病毒学, 52, 456(1973)中描述的方法进行。

由此，可以获得用含有本发明多肽之编码 DNA 的表达载体转化的转化体。

20 当培养宿主为大肠杆菌或枯草杆菌的转化体时，用于培养的培养基为液体培养基，该培养基含有转化体生长所必需的物质例如碳源、氮源、无机物等。碳源包括葡萄糖、糊精、可溶性淀粉、蔗糖等。氮源包括无机或有机物质如铵盐、硝酸盐、玉米浆、蛋白胨、酪蛋白、酵母提取液、肉汁、黄豆饼粉、马铃薯抽提物等。无机物又包括氯化钙、磷酸二氢钠、氯化镁等。此外，在培养基中也可加入酵母提取液、维生素、促生长因子等。培养基的 pH 值优选约 5-8。

25 用于培养大肠杆菌属细菌的培养基优选为，加有葡萄糖和酪蛋白水解物的 M9 培养基(Miller, 分子遗传学实验杂志, 431-433, 冷泉港实验室, 纽约, 1972)。必要时可以在培养基中加入试剂如 3 β -吲哚基丙烯酸，来有效激活启动子。

30 当用大肠杆菌属的细菌作为转化宿主时，转化体通常在大约 15-43 $^{\circ}$ C 培养约 3-24 小时。必要时培养物可以进行充气或搅拌。

当用枯草杆菌属的细菌作为转化宿主时，转化体通常在大约 30-40 $^{\circ}$ C 培



养约 6-24 小时。必要时培养物可以进行充气或搅拌。

当用酵母作为宿主时，转化体培养在，例如 Burkholder 氏基本培养基 (Bostian, K.L.等，美国国家科学院院刊, 77, 4505(1980))或加了 0.5% 酪蛋白水解物的 SD 培养基(Bitter, G.A.等，美国国家科学院院刊, 81, 5330(1984))
5 上。优选培养基 pH 值调节到大约 5-8。转化体通常在大约 20-35℃培养约 24-72 小时。根据需要，培养物可以进行充气或搅拌。

当用昆虫细胞或昆虫作为宿主时，转化体培养在，例如 Grace' s 昆虫培养基(Grace, T.C.C., 自然, 195, 788(1962))上，其中添加有固相化 10%牛血清等适当添加剂。优选培养基 pH 值调节到大约 6.2-6.4。转化体通常在大约
10 27℃培养大约 3-5 天。根据需要，培养物可以进行充气或搅拌。

当用动物细胞作为宿主时，转化体培养在，例如含有大约 5-20%牛胎血清的 MEM 培养基(科学, 122, 501(1952))、DMEM 培养基(病毒学, 8, 396(1959))、RPMI 1640 培养基(美国医学会杂志, 199, 519(1967))、199 培养基(Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1(1950))等中。优
15 选培养基 pH 值调节到大约 6-8。转化体通常在大约 30-40℃培养大约 15-60 小时。根据需要，培养物可以进行充气或搅拌。

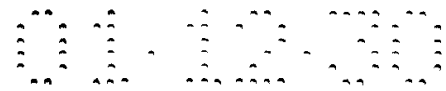
如上所述，本发明的多肽可以产生在转化体的细胞外或细胞内。

可以根据下述方法从上述培养物中分离纯化本发明的多肽。

在培养后，用众所周知的方法收集转化体或细胞，悬浮在一合适的缓
20 冲液中，从中抽提本发明的多肽。然后用众所周知的方法破碎转化体或细胞，如超声处理、溶菌酶处理和/或反复冻融等，然后离心、过滤，获得本发明多肽的粗提物。此过程的缓冲液可包含蛋白变性剂如尿素或盐酸胍、或表面活性剂如 Triton X-100™等。当所述多肽分泌在培养液中时，在培养结束后，用众所周知的方法从转化体或细胞中经分离而收集上清。

25 上清或包含在所获抽提物中的多肽可通过将已知的分离和纯化方法适当组合来进行纯化。这些众所周知的分离纯化方法包括，利用溶解性差异的方法如盐析、溶剂沉淀等；主要利用分子量差异的方法如透析、超滤、凝胶过滤、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳等；利用电荷差异的方法如离子交换层析等；利用特异性亲和力差异的方法如亲和层析等；利用疏水性差异的方法例如反相高效液相色谱等；利用等电点差异的方法如等电聚焦电泳。
30

当如此获得的多肽为游离形式时，可用众所周知的方法或其改良法将



其转换为盐。相反，当获得的多肽为盐时，可用众所周知的方法或其改良法将其转换为游离形式或另一种盐形式。

重组产生的多肽，在纯化前或纯化后，可用相应蛋白修饰酶处理，从而使多肽经适当修饰，部分去除一段多肽。其中所述蛋白修饰酶的例子包括胰酶、胰凝乳蛋白酶、精氨酸内肽酶、蛋白激酶、糖苷酶等。

由此产生的本发明多肽或它们的盐的存在，可通过利用特异性抗体的酶免疫分析法或蛋白质印迹法等进行测定。

针对本发明的多肽或其盐的抗体，只要所述抗体能够识别本发明多肽或其盐，可为多克隆抗体或单克隆抗体。

10 针对本发明多肽或其盐的抗体可使用本发明多肽作为抗原，根据本领域公知的抗体或抗血清的生产法制备。

[单克隆抗体的制备]

(a) 产生单克隆抗体细胞的制备

15 将本发明的多肽或其盐，单独或与载体或稀释剂一起给药于温血动物体内能产生抗体的部位。为了增加给药后抗体的产量，可给予福氏完全或不完全佐剂。有效给药通常约为每 2-6 周一次，一共 2-10 次。使用的温血动物包括猴子、兔子、狗、豚鼠、小鼠、大鼠、绵羊、山羊、家鸡，优选小鼠和大鼠。

20 在制备产生单克隆抗体细胞时，从抗原免疫的温血动物如小鼠中选择抗体滴度比较明显的动物，在最后一次免疫的 2-5 天后取脾脏或淋巴结，使其中产生抗体的细胞与同种或异种动物的骨髓瘤细胞融合，获得产生单克隆抗体的杂交瘤细胞。抗血清中抗体滴度的测定可以通过使抗血清与标记的随后所述的多肽反应，然后测定标记试剂同抗体的结合活性。可以根据 Koehler 和 Milstein(自然, 256, 495, 1975)的方法进行融合。融合加速剂的例子为聚乙二醇(PEG)、仙台病毒等，优选 PEG。

25 温血动物骨髓瘤细胞的例子包括 NS-1、P3U1、SP2/0 和 AP-1，优选 P3U1。所用抗体产生细胞(脾脏细胞)同骨髓瘤细胞的比例优选约为 1:1 到 20:1，加入浓度约为 10%-80%的 PEG(优选 PEG 1000-6000)。然后在 20-40℃保温。为了有效实施细胞融合，优选 30-37℃保温约 1-10 分钟。

30 可以用各种方法筛选产生单克隆抗体的杂交瘤。这些方法有：将作为抗原的多肽直接或与载体一起吸附至一种固相(如微量反应板)，将杂交瘤上



清加入到该固相中，然后加入标记的放射性物质或酶的抗免疫球蛋白抗体(如果用小鼠细胞作融合，则用抗小鼠的免疫球蛋白抗体)或蛋白 A，检测结合到固相上的单克隆抗体；另一方法为，将杂交瘤上清加入到吸附有抗免疫球蛋白抗体或蛋白 A 的固相中，加入标记的放射性物质或酶的多肽，

5 检测结合到固相上的单克隆抗体。

单克隆抗体的筛选可以根据众所周知的方法或其改进方法进行。一般地，在含有 HAT(次黄嘌呤、氨基喋呤和胸腺嘧啶)的动物细胞培养基中进行筛选。可以使用任何筛选和生长培养基，只要杂交瘤可以在其中生长。例如，可以使用含有 1%-20%，优选 10-20%牛胎血清的 RPMI 1640 培养基、

10 含有 1%-10%牛胎血清的 GIT 培养基(和光纯药工业株式会社)、无血清的杂交瘤培养基(SFM-101, 日水制药株式会社)作为筛选或生长培养基。通常在含 5%CO₂ 的条件下于 20-40℃(优选 37℃)培养约 5 天-3 周(优选 1-2 周)。杂交瘤培养上清液中抗体滴度的测定同上述抗血清中抗体滴度测定方法相同。

15 (b)单克隆抗体的纯化

单克隆抗体的分离和纯化可根据公知方法，例如免疫球蛋白的分离和纯化方法(如盐析、乙醇沉淀、等电点沉淀、电泳、离子交换剂(如 DEAE)吸附和去吸附、超离心、凝胶过滤、或一种特异性纯化方法，其包括仅收集与结合了抗原的固相、蛋白 A 或蛋白 G 等已活化吸附剂相结合的抗体并使之分离以获得该抗体)。

20

[多克隆抗体的制备]

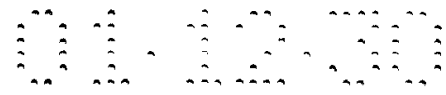
本发明多克隆抗体的制备用众所周知的方法或其改进方法进行。例如，用与上述生产单克隆抗体相似的方法生产免疫原(多肽抗原)或配制免疫原与载体蛋白形成的复合物并用其免疫温血动物。从已免疫的动物收集产物，

25 其中含有本发明多肽或其盐的抗体，分离和纯化该抗体。

在由免疫原和载体蛋白组成的用于免疫温血动物的复合物中，对载体蛋白的类型和载体同半抗原的混合比率无限定，只要能针对与载体一起免疫的半抗原有效产生抗体。例如，牛血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或匙孔虫咸血蓝蛋白与半抗原以载体比半抗原重量比约 0.1-20(优选约 1-5)的比率偶联。

30

不同的缩合剂可用于偶联载体和半抗原。戊二醛、碳二亚胺、马来酰



亚胺活化的酯和含有巯基或二硫代吡啶基的活化的酯试剂可用于偶联。

将缩合产物单独或与载体或稀释剂一起给药于温血动物体内能产生抗体的部位。为了增加给药后抗体的产量，可给予福氏完全或不完全佐剂。大约每 2-6 周给药一次，共 3-10 次。

5 多克隆抗体从用上述方法免疫的温血动物的血液、腹水等(优选血液)中收集。

抗血清中多克隆抗体滴度的测定同上述测定血清抗体滴度的方法相同。可以根据上述用于分离和纯化单克隆抗体的免疫球蛋白分离纯化方法来分离和纯化多克隆抗体。

10 具有与编码本发明多肽的 DNA (下文，有时称作本发明 DNA)互补或基本互补的碱基序列的反义 DNA 可为任一种反义 DNA，只要其含有与本发明 DNA 互补或基本互补的碱基序列，并能抑制该 DNA 的表达。

与本发明 DNA 基本互补的碱基序列，包括具有与互补于本发明 DNA 之碱基序列(即本发明 DNA 互补链)的全部或部分碱基序列至少约 70%，优选至少约 80%，更优选至少约 90%，最优选至少约 95%同源性的 DNA。尤其是

15 尤其是在本发明 DNA 互补链的全部碱基序列中，反义 DNA 具有与编码本发明多肽上 N-末端区的部分碱基序列(如起始密码子附近的碱基序列等)的互补链至少约 70%同源性，优选至少约 80%同源性，更优选至少约 90%，最优选至少约 95%。这些反义 DNA 可以使用公知的 DNA 合成装置生产合成。

20 当本发明多肽包含信号肽时，它能有效地分泌到细胞外，并作为一种液体因子发挥着重要生物活性的作用，如信息传递或自我防御等。

下面阐述：本发明多肽或其盐(以下通常称为本发明多肽)；编码本发明多肽的 DNA(以下通常称为本发明 DNA)；针对本发明多肽或其盐的抗体(以下通常称为本发明抗体)以及反义 DNA 的用途。

25 (1)由于本发明多肽在软骨组织中能够进行特异性表达，所以可将其用作组织标记。也就是说，它作为一种标记可来检测组织的分化、病变、癌转移等。也可用来提取相应的受体、配体、结合多肽等。另外，它作为本领域公知的用于高产量筛选的组群，可用来研究生物活性。它可进行染色体作图，进而适用于遗传病的研究。

30 (2)与本发明多肽相关的各种疾病的预防药物与治疗药物

因为本发明多肽它是以液体因子形式存在于生物体内(尤其是软骨组织)



并具有抑制软骨分化的功能，所以当本发明多肽，或本发明 DNA 等发生异常或缺陷，或者当表达水平异常减少或亢进时，将导致各种疾病的发生。

5 当发明 DNA 等缺陷或其表达水平异常减少时，将导致各种疾病的发生。如变形性关节炎、慢性关节风湿、大理石病等的骨疾病和/或关节疾病、有病的血管新生等。

因此，本发明多肽以及本发明 DNA 都可作为上述各种疾病的治疗药物或预防药物使用。如变形性关节炎、慢性关节风湿、大理石病等的骨疾病和/或关节疾病、有病的血管新生等。

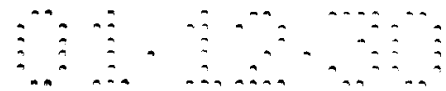
10 例如，当生物体内本发明多肽很少或缺失时，当患者不能使其细胞内信息传递充分或正常地发挥作用时，本发明 DNA 可以通过以下 3 种方式充分地或正常地为该患者提供本发明多肽的作用：(a)给予该患者本发明 DNA，以便体内表达本发明多肽；(b)将本发明 DNA 插入细胞中，表达本发明多肽，或(c)直接将本发明多肽投药于该患者体内。

15 当本发明 DNA 用作上述预防/治疗药物时，该 DNA 本身可单独使用，或插入合适载体如反转录病毒载体、腺病毒载体或腺伴随病毒载体后按常规方法给药于人或其它温血动物。本发明 DNA 也可以以裸露 DNA 的形式给药，或与生理学上承认的用于促进吸收的辅助剂等的载体一起制成药剂并给药以便于其被基因枪摄入或通过含有水凝胶的导管。

20 当本发明多肽用作所述治疗或预防药物时，优选所用纯度至少 90%，优选 95%以上，更优选 98%以上，最优选 99%以上。

25 例如，本发明的多肽或受体蛋白可以以片剂(必要时加糖衣)、胶囊、酏剂、微胶囊等剂型口服，或以可注射型制剂如，与水或其它可药用液体形成的无菌溶液或悬浮制剂经非胃肠道给药。例如，将本发明的多肽与生理学上可接受的已知载体、调味剂、赋形剂、载色剂、防腐剂、稳定剂、粘合剂等制成符合制药规定的要求的常用单位剂型。控制制剂中的活性成分使得在给定范围内获得合适剂量。

30 可与片剂、胶囊等混合的添加剂包括，粘和剂如明胶、玉米淀粉、西黄耆胶和金合欢胶；赋形剂如结晶纤维素；膨胀剂如玉米淀粉、明胶和藻酸；润滑剂如硬脂酸镁；甜味剂如蔗糖、乳糖和糖精；加味剂如薄荷、akamono oil 和樱桃。当单位剂型为胶囊形式时，可进一步将液体载体如油和脂肪同上述添加剂一起使用。可根据常规制药方法制备注射用无菌组合物，例如



将活性成分与天然植物油如芝麻油和椰子油等溶解或悬浮在载体，如注射用的水中来制备药物。

用于注射的液体介质的例子包括，生理盐水、及包含葡萄糖和其它辅助制剂(如 D-山梨醇、D-甘露醇和氯化钠等)的等渗溶液，并可以进一步同
5 合适的助溶剂如醇(如乙醇等)、聚醇(如丙二醇和聚乙二醇等)、非离子表面活性剂(如聚山梨酸酯 80™ 和 HCO-50 等)等结合使用。油性介质有芝麻油和大豆油，它们可与助溶剂如苯甲酸苄酯和苯甲醇结合使用。此外，上述的治疗/预防制剂可进一步与缓冲液(例如磷酸盐缓冲液和乙酸钠缓冲液等)、镇静剂(例如苯扎氯胺和盐酸普鲁卡因等)、稳定剂(如人血清白蛋白、
10 聚乙二醇等)、防腐剂(例如苯甲醇、酚等)、抗氧化剂等结合使用。由此制备的注射液体一般装在合适的安瓿中。

本发明 DNA 所插入的载体用与上述类似的方法制成制剂，这类制剂通常经非胃肠道途径给药。

如此所获制剂安全、低毒，因此可用于人或其它温血动物(例如，大鼠、
15 小鼠、豚鼠、兔子、鸡、绵羊、猪、牛、马、猫、狗、猴等)。

本发明多肽的剂量依赖于病症、受试者和给药方法等而异；例如口服给药治疗骨疾病和/或关节疾病时，一般成年人(体重 60kg)的正常剂量为大约 1-1000mg/天，优选大约 10-500mg/天，更优选 10-200mg/天。当非胃肠道给药时，该多肽一次投药量依赖于给药受体、症状等而变，例如在治疗
20 骨疾病和/或关节疾病时，成年人(体重 60kg)优选活性成分静脉注射，剂量为大约 1-1000mg/天，优选大约 1-200mg/天，更优选大约 1-100mg/天。对于其它动物种类，可以按每 60kg 体重换算相应给药剂量。

(2) 筛选可作为疾病治疗药物的候选化合物

由于本发明多肽它是以液体的因子形式存在于生物体内(尤其是软骨组织)并具有抑制软骨分化的机能，因此能促进本发明多肽功能的化合物或其盐可作为以下各种疾病的治疗·预防药物而使用：例如变形性关节炎、慢性
25 关节风湿、大理石病等的骨疾病和/或关节疾病、有病的血管新生等。

另一方面，能够抑制本发明多肽机能的化合物或其盐可作为药物用于以下疾病的治疗，该疾病起因于本发明多肽的过量产生，例如变形性关节炎、慢性
30 关节风湿、骨发育不全、骨质粗松、骨折、大腿骨头坏死、软骨发育不全等的骨疾病和/或关节疾病、有病的血管新生等。



因此，本发明多肽可作为一种试剂，用于筛选能促进或抑制本发明多肽功能的化合物或其盐。

即，本发明提供

5 (1)一种筛选方法，其用于筛选能促进本发明多肽或其盐的功能的化合物或其盐(下文通常简称为促进剂)，或者其用于筛选能抑制本发明多肽或其盐的功能的化合物(下文通常简称为抑制剂)，其特征为，该筛选法包括应用本发明多肽或其盐。

本发明筛选用试剂盒包含本发明多肽或其盐。

10 通过使用本发明筛选法或筛选用试剂盒获得的化合物或其盐是从，例如肽、蛋白、非肽化合物、合成化合物、发酵产物、细胞提取液、植物提取液、动物组织提取液、血浆等中筛选出来的。它是一种具有促进或抑制本发明多肽的功能。

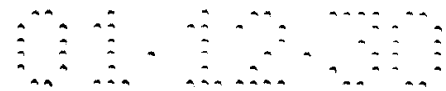
所述该化合物之盐可以使用与所述本发明多肽的盐相同。

15 当将通过使用本发明筛选法或筛选用试剂盒获得的化合物用作上述治疗或预防药物时，可以按照常规方法进行实施。例如，含有本发明多肽的药物可以制成片剂、胶囊、酏剂、微胶囊、无菌溶液、悬浮液剂型等。

如此所获制剂安全、低毒，因此可对人或其它温血动物(例如，大鼠、小鼠、兔子、鸡、绵羊、猪、牛、马、猫、狗、猴等)经胃肠道给药或非胃肠道给药。

20 本发明多肽或其盐的剂量依赖于该化合物的作用、病症、受试者和给药方法等而异；例如口服给药能够抑制治疗骨疾病和/或关节疾病的本发明多肽之机能时，一般成年人(体重 60kg)的正常剂量为大约 0.1-100mg/天，优选大约 1.0-50mg/天，更优选 1.0-20mg/天。当非胃肠道给药时，该化合物一次投药量依赖于给药受体、症状等而变，例如在给药能够促进治疗骨疾病和/或关节疾病之机能时，成年人(体重 60kg)优选静脉注射，剂量为大约
25 0.01-30mg/天，优选大约 0.1-20mg/天，更优选大约 0.1-10mg/天。对于其它动物种类，可以按每 60kg 体重换算相应给药剂量。

另一方面，当口服给药能够抑制本发明多肽之机能时，一般成年人(体重 60kg)的正常剂量为大约 0.1-100mg/天，优选大约 1.0-50mg/天，更优选
30 1.0-20mg/天。当非胃肠道给药时，该化合物一次投药量依赖于给药受体、症状等而变，例如在给药能够抑制本发明多肽机能时，成年人(体重 60kg)



优选静脉注射，剂量为大约 0.01-30mg/天，优选大约 0.1-20mg/天，更优选大约 0.1-10mg/天。对于其它动物种类，可以按每 60kg 体重换算相应给药剂量。

(3)本发明多肽或其盐的定量

5 针对本发明多肽的抗体(下文通常简称为本发明抗体)能特异性识别本发明的多肽，因此可用于定量测试样品溶液中的本发明多肽，尤其是通过夹心免疫分析进行定量。因此，本发明提供了下述的定量方法：

(i)一种定量待测样品液中本发明多肽的方法，其包括，使本发明的抗体与待测样品液以及标记的本发明多肽进行竞争反应，测定与该抗体结合
10 的本发明标记性多肽的比率；和，

(ii) 一种定量待测样品液中本发明多肽或本发明受体蛋白的方法，其包括，同时或先后使所述待测样品液与固定在固相载体上的本发明抗体以及标记的本发明其它抗体反应，测定固相载体上标记试剂的活性。

在上述方法(ii)中，优选一种抗体能识别本发明多肽或本发明受体蛋白
15 的 N-末端区域，而另一抗体能识别本发明多肽或本发明受体蛋白的 C-末端区域。

针对本发明多肽的单克隆抗体(下文，通常称作本发明单克隆抗体)可用于定量本发明多肽。此外，也可通过组织染色来检测本发明多肽。为此，可用抗体本身或使用抗体分子的 F(ab')₂、Fab' 或 Fab 片段。

20 对使用本发明多肽的抗体进行的定量方法没有特别的限制；可以使用任何方法，只要它涉及以下方法，即根据待测样品液中相应抗原含量(例如多肽的量)，用化学或物理方法检测抗体、抗原或抗体-抗原复合物的量，然后根据含已知量抗原的标准溶液制备的标准曲线来计算。优选的方法为，例如比浊法、竞争法、免疫测定法和夹心法；就敏感性和特异性而言，特别
25 优选后面将要描述的夹心法。

用于分析方法的标记试剂的例子为放射性同位素、酶、荧光物质和化学发光物质等。同位素的例子包括^[125I]、^[131I]、^[3H]、^[14C]等。优选酶的例子为稳定、具有高比活的酶，包括β-半乳糖苷酶、β-葡萄糖苷酶、碱性磷酸酶、过氧化物酶和苹果酸脱氢酶。荧光物质的例子包括荧光胺、异硫氰酸荧光素等。化学发光物质的例子包括鲁米诺、鲁米诺衍生物、萤光素、
30 光泽精等。此外，也可使用生物素-链霉素系统来对抗原或抗体标记。



在固定抗原或抗体时，可以使用物理吸附。作为替代方法，也使用传统上来固定多肽或酶的化学结合。载体的例子包括，固相多糖如琼脂糖、葡聚糖和纤维素；合成树脂如聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、硅；或玻璃等。

5 在夹心法中，待测样品溶液与本发明的固定化单克隆抗体反应(第一反应)，然后与本发明的标记的其它单克隆抗体反应(第二反应)，测定固相载体上的标记试剂活性，由此可以测定待测样品中本发明多肽的量。第一和第二反应可以以相反次序进行，或同时或有间隔的先后进行。标记试剂的类型和固定的方法同上述的相同。在夹心法免疫分析中，用于标记的抗体和用于固相的抗体未必是一种类型或一个种类的抗体，也可使用两种或多种抗体的混合物来改善测定的灵敏度等。

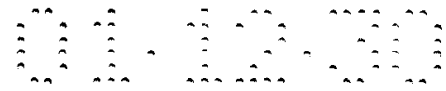
15 在根据本发明的夹心方法测定本发明多肽时，优选用于第一和第二反应的单克隆抗体与本发明多肽的结合位点彼此不同。也就是说，在第一和第二反应用的抗体为，当第二反应的抗体识别本发明多肽的 C 端区域时，优选在第一反应中使用能识别除 C 端区域以外的位点，如 N 端区域的抗体。

15 本发明的单克隆抗体可用于除夹心法以外的其它分析方法，例如竞争法、免疫测定法和比浊法。

20 在竞争法中，待测溶液中的抗原和标记抗原竞争与抗体反应，然后将未反应的标记抗原(F)及结合于抗体的标记抗原(B)分离(即 B/F 分离)，测定 B 或 F 的标记量，从而可以测定待测溶液中的抗原量。在此类方法的反应中，有一种液相方法和一种固相方法，前者使用可溶性抗体，加入针对第一抗体的第二抗体后，用聚乙二醇来有效分离 B/F；后者可用固定的抗体作为第一抗体，或用可溶性抗体作为第一抗体但第二抗体为固相抗体。

25 在免疫测定法中，待测溶液中的抗原和固相抗原竞争性地与一定量的标记抗体反应，然后使液相与固相分离；或待测溶液中的抗原与过量标记抗体反应，然后加入固相抗原，使未反应的标记抗体与该固相结合，然后使液相与固相分离。随后，测定两相的标记量，来测定待测溶液中的抗原量。

30 在比浊法中，测定抗原-抗体在凝胶或溶液中反应产生的固相沉淀的量。即使待测溶液中抗原量很少且仅获得小量的沉淀，利用激光散射的激光比浊法也可以实施。



本发明应用这些免疫分析方法中任何一个进行分析时，不需要任何特殊条件和操作。除了每种方法的常规条件和操作外，本领域技术人员可构建测定本发明多肽的分析系统。所述常规技术的细节，参见如入江宽(编)：“放射免疫分析” (1974, 讲谈社, 日本); 入江宽(编): “放射免疫分析, 续编” (1979, 讲谈社, 日本); 石川荣治等(编): “酶免疫分析”(医学书院, 1978); 石川荣治等(编): “酶免疫分析, 第二版”(医学书院, 1982); 石川荣治等(编): “酶免疫分析, 第三版”(医学书院, 1987); “酶学方法” 卷 70(免疫化学技术(A)); 同上, 卷 73(免疫化学技术(B)); 同上, 卷 74(免疫化学技术(C)); 同上, 卷 84(免疫化学技术(D: 选择性免疫分析)); 同上, 卷 92(免疫化学技术(E: 单克隆抗体及普通免疫分析方法)); 同上, 卷 121(免疫化学技术(I: 杂交瘤技术及单克隆抗体))(Academic Press 出版)等)。

如上所述，使用本发明的抗体可高度敏感地定量本发明多肽或本发明受体蛋白。

此外，使用本发明的抗体可定量本发明多肽的浓度，(1)从而当检出本发明多肽浓度的增加时，能够诊断出如下各种疾病或者将来对这些疾病的高度易感性：例如骨疾病和/或关节疾病(如变形性关节炎、慢性关节风湿、骨发育不全、骨质粗松、骨折、大腿骨头坏死、软骨发育不全等)、有病的血管新生(如肿瘤血管新生)等。还有，(2)从而当检出本发明多肽浓度的减少时，能够诊断出如下各种疾病或者将来对这些疾病的高度易感性：例如骨疾病和/或关节疾病(如变形性关节炎、慢性关节风湿、大理石病等)、有病的血管新生(如肿瘤血管新生)等。

本发明抗体可用于检出体液或者组织等待检标本液中存在的本发明多肽。又可用于抗体柱的制作，该抗体柱可用于纯化本发明多肽；检出各纯化组分中的本发明多肽；对被检细胞内本发明多肽的行踪进行分析等。

(4)基因诊断制剂

例如，本发明的 DNA 作为一种探针可以检出人或温血动物(例如，大鼠、小鼠、豚鼠、兔子、鸡、绵羊、猪、牛、马、猫、狗、猴等)中编码本发明多肽的 DNA 或 mRNA 的异常(基因异常)，因此，本发明的 DNA 可用作基因诊断制剂，用于诊断 DNA 或 mRNA 的损伤、突变，或其表达量的减少、和/或该 DNA 或 mRNA 的增加或 DNA 或 mRNA 的过表达。



上述基因诊断通过使用编码本发明多肽的 DNA, 用众所周知的 Northern 杂交分析或 PCR-SSCP 分析来完成(Genomics, 5, 874-879(1989); 美国科学院学报, 86, 2766-2770(1989))、DNA 微列阵等。

例如, 当用 Northern 杂交分析和 DNA 微列阵检出表达量的减少时和
5 PCR-SSCP 分析和 DNA 微列阵检出 DNA 突变时, 能够很大程度地诊断出如下各种疾病: 例如骨疾病和/或关节疾病(如变形性关节炎、慢性关节风湿、大理石病等)、有病的血管新生(如肿瘤血管新生)等。

(5)含有反义 DNA 的药物

反义 DNA 能与本发明 DNA 互补地结合并抑制该 DNA 的表达, 因此
10 反义 DNA 能够抑制生物体内中本发明多肽或本发明 DNA, 因此它可用作治疗或预防以下各种疾病的药物: 例如, 骨疾病和/或关节疾病(如变形性关节炎、慢性关节风湿、骨发育不良、骨质疏松、骨折、大腿骨头坏死、软骨发育不良等)、有病的血管新生(如肿瘤血管新生)等。

当将所述反义 DNA 用作上述各种疾病的治疗或预防药物时, 同前所
15 述含有本发明 DNA 的各种疾病的治疗或预防药物一样可以实施。

例如, 当反义 DNA 用作上述预防/治疗药物时, 反义 DNA 可单独使用, 或插入合适载体如反转录病毒载体、腺病毒载体或腺伴随病毒载体后按常规方法给药。该反义 DNA 可以以裸露 DNA 的形式给药, 或与生理学上承认的用于促进吸收的辅助剂等的载体一起制成药剂并给药以便于其被基因
20 枪摄入或通过含有水凝胶的导管。

该反义 DNA 也可用于诊断寡核苷酸探针, 其目的是检查组织或细胞中是否有本发明 DNA 的存在或者该 DNA 的表达。

(6)含有本发明抗体的药物

本发明抗体具有中和本发明多肽活性的作用, 例如, 如果下列疾病起
25 因于本发明多肽的过量表达时, 该抗体可用作治疗或预防以下各种疾病的药物: 例如, 骨疾病和/或关节疾病(如变形性关节炎、慢性关节风湿、骨发育不良、骨质疏松、骨折、大腿骨头坏死、软骨发育不良等)、有病的血管新生(如肿瘤血管新生)等。

上述各种疾病的治疗药物或预防药物含有本发明抗体, 其可直接以原
30 始液体制剂或以适当剂型的药用组合物, 对人或哺乳动物(例如, 大鼠、兔子、绵羊、猪、牛、猫、狗、猴等)经过口服或非口服形式给药。本发明抗

本发明提供一种非人哺乳动物，其具有编码外源性本发明多肽的 DNA(以下简称为本发明外源性 DNA)或其 DNA 变体(通常简称为本发明外源性 DNA 变体)。

即，本发明提供：

- 5 (1)一种非人哺乳动物，其具有本发明外源性 DNA 或其 DNA 变体；
(2)(1)中所述非人哺乳动物，其为啮齿动物；
(3)(2)中所述啮齿动物，其为小鼠或大鼠；以及
(4)一种重组载体，其含有本发明外源性 DNA 或其 DNA 变体，并能在哺乳动物中表达。

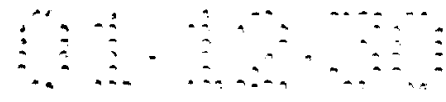
10 具有本发明外源性 DNA 或其 DNA 变体的非人哺乳动物(以下简称为本发明转基因动物)可如下产生：将所需 DNA 转染至未受精卵、受精卵、精子以及含有相应原始细胞的胚细胞等，优选它们处于非人哺乳动物发育过程中胚胎发生期(更优选单细胞或受精卵细胞期，一般在 8 细胞期以前)，可用方法有磷酸钙法、电脉冲法、脂转染技术、凝集法、显微注射法、粒子枪法、DEAE-葡聚糖法等。可根据这些转基因法将本发明外源 DNA 转移至体细胞、活器官、组织细胞，对转化体进行组织培养或细胞培养。可以进一步地根据公知细胞融合法使这些细胞与所述胚细胞或本领域公知的细胞融合法而产生本发明的转基因动物。

20 非人哺乳动物的例子有：牛、猪、绵羊、山羊、兔子、狗、猫、豚鼠、仓鼠、小鼠、大鼠等，就构建人类疾病的动物模型而言，优选个体发育以及生命周期比较短，容易繁殖的啮齿动物，主要是小鼠(例如，其纯种系有 C57B1/6 系、DBA2 系等；杂种系有 B6C3F₁ 系、BDF₁ 系、B6D2F₁ 系、BALB/c 系、ICR 系等)或大鼠(例如，Wistar，SD 等)等。

25 能够在哺乳动物中进行表达的重组载体中的[哺乳动物]除了所述非人哺乳动物外还有人等。

所说本发明外源性 DNA 不是非人哺乳动物本来具有的 DNA，而是指从哺乳动物中分离并提取的本发明 DNA。

30 所述本发明的 DNA 变体包括因本发明原始 DNA 的碱基序列发生变异(例如，突变等)产生的 DNA，具体地说，包括碱基添加、缺失、用其它碱基置换产生的 DNA，还有异常 DNA。



该异常 DNA 是指能表达异常的本发明多肽的 DNA，例如，所述 DNA 表达的多肽可抑制本发明多肽的正常功能。

5 本发明外源性 DNA 可以来自任一哺乳动物，不论是与靶动物同种还是异种均可。当把本发明 DNA 转移至靶动物体中时，优选使用 DNA 构建体，其中使该 DNA 连接在能于该靶动物中表达该 DNA 的启动子下游。例如，转移本发明的人源 DNA 时，以高水平表达本发明 DNA 的转基因动物可如下制备：选择携有与所述人源 DNA 高度同源的本发明 DNA 的非人哺乳靶动物，以及能在该靶动物中对来源于各种哺乳动物(如兔、狗、猫、豚鼠、仓鼠、大鼠、小鼠等)的 DNA 进行表达的各种启动子，将所述本发明人源 DNA 连接于所述各种启动子的下游形成 DNA 构建体(如载体等)，然后显微注射至所述靶动物的受精卵中，如小鼠受精卵。

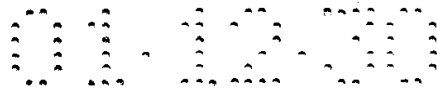
本发明多肽的表达载体有：大肠杆菌质粒、枯草杆菌质粒、酵母质粒、噬菌体如 λ 噬菌体、反转录病毒如鼠白血病病毒、动物病毒如痘苗病毒或杆状病毒。其中优选使用大肠杆菌质粒、枯草杆菌质粒、或酵母质粒。

15 进行上述 DNA 表达调节的启动子通常使用如下的启动子：①来自病毒(如，人类猿病毒、巨细胞病毒、鼠白血病病毒、JC 病毒、乳腺癌病毒、脊髓灰质炎病毒等)DNA 的启动子；②来自各种哺乳动物(人、兔子、狗、猫、豚鼠、仓鼠、大鼠、小鼠等)的启动子，例如下述蛋白启动子：白蛋白、胰岛素 II、尿空斑蛋白(uroplakin)II、弹性蛋白酶、促红细胞生成素、内皮素、肌酸激酶、胶原原纤维酸性蛋白、谷光甘肽 S-转移酶、血小板衍生的生长因子 β 、角蛋白 K1、K10 以及 K14、胶原蛋白 I 型及 II 型、cAMP 依赖性蛋白激酶 β I 亚单位、肌营养不良蛋白、抗酒石酸碱性磷酸酶、心房利钠激素、内皮受体-酪氨酸激酶(缩写为 Tie2)、Na/K-ATP 酶、神经微丝轻链、金属硫蛋白 I 及 IIA、金属蛋白酶 1 组织抑制剂、MHC I 类抗原(H-2L)、H-ras、肾素、多巴胺 β -羟化酶、甲状腺过氧化物酶(TPO)、多肽链延伸因子 1 α (EF-1 α)、 β -肌动蛋白、 α 及 β -肌球蛋白重链、肌球蛋白轻链 1 及 2、髓磷脂基质蛋白、甲状腺球蛋白、Thy-1、免疫球蛋白、H 链可变区(VNP)、血清淀粉样蛋白 P 成分、肌红蛋白、肌钙蛋白 C、平滑肌、 α -肌动蛋白、前脑啡肽原 A、加压素等。其中最好使用能在全身高效表达的巨细胞病毒启动子、人多肽链延伸因子 1 α (EF-1 α) 启动子、人及家鸡 β -肌动蛋白启动子等。

20

25

30



优选上述载体在转基因动物中有终止目标 mRNA 转录的序列(一般称为终止子), 例如, 可以使用来自病毒以及各种哺乳动物的各种 DNA 的序列, 优选使用类人猿病毒的 SV40 终止子。

此外, 为了更进一步提高外源目标 DNA 的表达, 可根据不同目的将
5 各种 DNA 的剪接信号、增强子区、真核 DNA 内含子的一部分连接在该启动子区的 5'上游、或启动子区和翻译区之间或翻译区的 3'下游。

该翻译区可以通过常规基因工程方法构建成能在转基因动物中进行表达的 DNA 构建体, 其中将所述 DNA 连接至所述启动子下游, 必要时还同时位于转录终止位点的上游。

10 在受精卵细胞阶段转移本发明外源 DNA 必须保证靶动物的所有胚细胞及体细胞中都存在该外源 DNA。在转基因 DNA 之后产生的动物的胚细胞中所述本发明外源性 DNA 的存在表明该动物的所有后代均在其胚细胞及体细胞中含有本发明外源性 DNA。继承了这种本发明外源性 DNA 的动物后代在其所有胚细胞及体细胞中应携有本发明外源性 DNA。

15 已转移有正常的本发明外源性 DNA 的非人哺乳动物通过杂交证实该外源 DNA 的稳定维持后, 可作为携有该 DNA 的动物在一般饲养环境下传代。

在本发明受精卵细胞阶段中外源 DNA 的转移必须保证靶动物的所有胚细胞及体细胞中都存在过量外源 DNA。在转移 DNA 之后产生的动物胚
20 细胞中所述本发明外源性 DNA 的过量存在意味着产生的动物后代均在其所有胚细胞及体细胞中含过量本发明外源性 DNA。继承了这种本发明外源性 DNA 的动物后代在所有胚细胞及体细胞中应保持有过量的本发明外源性 DNA。

通过获得一对同源染色体上都有导入的 DNA 的纯合体动物, 再通过
25 它们的雌雄动物杂交其所有的后代就可以维持过量的该 DNA。

在具有正常本发明 DNA 的非人哺乳动物体内正常的本发明 DNA 高效表达, 通过促进内源性正常 DNA 的功能最终将导致本发明多肽发生功能亢
30 进病, 这时, 该动物可以作为这种疾病的病理模型动物使用。例如, 使用本发明的正常 DNA 转基因动物, 可以阐明本发明多肽发生功能亢进病症以及
30 及与本发明多肽有关的疾病的病理机制, 研究这些疾病的治疗方法。



又，由于含有正常的本发明外来 DNA 的哺乳动物具有游离的本发明多肽增加症状，因此这种动物也可用于筛选与本发明多肽有关的疾病的治疗药物。

5 另一方面，具有异常的本发明外源性 DNA 的非人哺乳动物通过杂交确定外源性 DNA 的稳定维持之后，可以在一般饲养环境下传代。可通过将外源目标 DNA 重组到所述质粒中而将该 DNA 作为起始材料使用。带有启动子的 DNA 构建体可以通过一般 DNA 工程学方法制备而成。在受精卵细胞阶段中本发明的异常 DNA 的转基因必须保证靶动物的所有胚细胞及体细胞中都存在该异常 DNA。在转基因 DNA 之后产生的动物的胚细胞中所述
10 本发明异常 DNA 的存在表明该动物的所有后代均在其胚细胞及体细胞中保持本发明异常 DNA。继承了这种本发明外源性 DNA 的动物后代在其所有胚细胞及体细胞中应携有本发明异常 DNA。通过获得一对同源染色体上都有导入的 DNA 的纯合体动物，再通过它们的雌雄动物杂交，其所有的后代就可以维持该 DNA。

15 由于具有本发明异常 DNA 的非人哺乳动物可使该异常 DNA 高效表达，通过抑制内在的正常 DNA 功能，最终将导致该动物发生本发明多肽的功能失活型不适应病症，因而该动物可作为相应疾病的模型动物使用。例如，使用本发明的异常 DNA 转基因动物，可以阐明本发明多肽的功能失活型不适应病症并研究这些疾病的治疗方法。

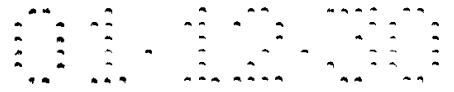
20 又，本发明异常 DNA 高效表达的转基因动物还可能用于阐明本发明多肽的功能失活型不适应病症中本发明异常多肽对正常多肽的功能的抑制(显性失活作用)作用。

25 由于携有本发明之异常外源 DNA 的哺乳动物中游离形式的本发明多肽增加，因此这类动物也可用于筛选本发明多肽的功能失活型不适应症的治疗药物。

上述 2 种转基因动物的其它可能应用包括：

①作为组织培养的细胞来源；

②通过直接分析本发明转基因动物组织中的 DNA 或 RNA，或者间接分析该 DNA 所表达的多肽组织，来阐述它们与被本发明多肽或本发明受体
30 蛋白特异性表达或活化的多肽的关连性；



③用标准组织培养技术培养的含有所述 DNA 的组织细胞，研究难以培养的组织中细胞的功能；

④用上述③中细胞筛选能够提高该细胞功能的药物；

⑤分离纯化本发明多肽的变体并制备其抗体。

5 用本发明的转基因动物可以研究与本发明多肽有关的疾病的临床症状，其中包括本发明多肽或本发明受体蛋白的功能失活型不适应症，同时在与本发明多肽有关的疾病模型中还能得到各器官中更详细的病理学发现，从而开发新治疗方法，以及用于研究和治疗与该疾病相关的继发性疾病的方法。

10 从本发明转基因动物中取出各种器官，切碎后，用胰蛋白酶等多肽酶(蛋白)分解可以得到游离的转基因细胞，然后建立培养细胞系。本发明的转基因动物还可用于鉴定能产生本发明多肽，研究这些细胞的特殊性、其与细胞凋亡、分化或增殖的关系，或者这些特性中的信号传导机制，从而研究其中的任何异常性，因此本发明的转基因动物可以为研究本发明多肽并阐明其作用提供有用的研究材料。

15 为了利用本发明转 DNA 基因动物，开发与本发明多肽相关的疾病(包括本发明多肽的功能失活型不适应症)的治疗药物，可利用上述检查法以及定量法提供有效而快速的药物筛选法。还可利用本发明转基因动物或能表达本发明外源性 DNA 的载体，研究并开发与本发明多肽有关的疾病的基因
20 治疗方法。

(8)基因敲除实验动物

本发明提供携有无活性的本发明 DNA 的非人哺乳动物胚胎干细胞及在本发明 DNA 的表达中有缺陷的非人哺乳动物。

即，本发明提供

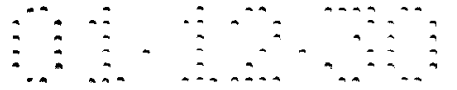
25 (1)携有无活性的本发明 DNA 的非人哺乳动物胚胎干细胞；

(2)第(1)所述胚胎干细胞，其中通过导入报道基因(例，大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶基因)使该 DNA 灭活；

(3)第(1)所述胚胎干细胞，其为抗新霉素；

(4)第(1)所述胚胎干细胞，其中所述非人哺乳动物为啮齿动物；

30 (5)第(4)所述胚胎干细胞，其中所述啮齿动物为小鼠；



(6)对本发明 DNA 的表达有缺陷的非人哺乳动物，其中本发明 DNA 不具活性；

(7)第(6)所述非人哺乳动物，通过导入报道基因(例，大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶基因)使该 DNA 灭活，该报道基因能在本发明 DNA 的启动子控制
5 下表达；

(8)第(6)所述非人哺乳动物，其为啮齿动物；

(9)第(8)所述非人哺乳动物，其中所述啮齿动物为小鼠，以及

(10)一种对本发明 DNA 的启动子活性具有促进或抑制作用的化合物或其盐的筛选方法，包括给第(7)所述动物投与待测化合物，并检测报道基因
10 的表达。

所谓携有无活性本发明 DNA 的非人哺乳动物胚胎干细胞是指，通过对本发明 DNA 进行人工突变而抑制该非人哺乳动物表达所述 DNA，或通过使该 DNA 编码的本发明多肽活性基本丧失，从而使该 DNA 基本上不具有表达本发明多肽的能力(下文有时称本发明的基因敲除 DNA)的胚胎干细
15 胞(简称 ES 细胞)。

非人哺乳动物可以用与前述同样的动物。

对本发明 DNA 进行人工突变的方法包括，该 DNA 序列的一部分或全部缺失，插入或用其它 DNA 置换。通过这些变异，可以利用诸如读码框的移动，或启动子或外显子功能的破坏来制备本发明的基因敲除 DNA。

20 携有无活性本发明 DNA 的非人哺乳动物胚胎干细胞(下文简称携有无活性本发明 DNA 的 ES 细胞或本发明的基因敲除 ES 细胞)可如下获得：分离所选非人哺乳动物所具有的本发明 DNA，在其外显子部分插入抗药基因如抗新霉素基因、抗潮霉素基因，或插入报道基因如 lacZ(β -半乳糖苷酶基因)、cat(氯霉素乙酰转移酶基因)以破坏外显子的功能，或在外显子之间的
25 的内含子上插入能够终止基因转录的 DNA 序列(如，polyA 加尾信号等)以抑制完整 mRNA 的合成，将如此构建的含有被破坏的上述 DNA 的序列(下文简称为靶载体)通过同源重组整合至该动物的染色体上。对如此获得的 ES 细胞用本发明 DNA 上或其附近的 DNA 序列作为探针进行 Southern 杂交分析，或用上述靶载体上的 DNA 序列和另一种位于本发明 DNA 附近但不包
30 括在上述靶载体中的 DNA 序列作为引物进行 PCR，从而筛选本发明的基因敲除 ES 细胞。

通过同源重组使本发明 DNA 失活的亲本 ES 细胞可以是上述已建立的细胞株，也可以是根据 Evans 及 Kaufma 方法的改良法建立的细胞株。例如，目前常用的小鼠 ES 细胞是 129 系 ES 细胞，但其免疫学背景不十分清楚，故优选使用遗传免疫学背景清晰的纯系 ES 细胞等，例如，其中所述 BDF₁ 小鼠(C57BL/6 和 DBA/2 的 F₁ 代)是使 C57BL/6 通过与 DBA/2 杂交而改良其卵数少的特点。BDF₁ 小鼠其优点卵数多且卵饱满，具有 C57BL/6 小鼠的背景，因此用其 ES 细胞产生病理模型小鼠时，通过再与 C57BL/6 小鼠进行回交可以使其遗传背景恢复为 C57BL/6 小鼠的背景。

当建立 ES 细胞时，一般使用受精后第 3.5 天的胚泡，本发明优选在 8 细胞胚期采集胚胎并培养至胚泡，通过使用此胚泡可以更有效地获得大量的初期胚。

虽然可以利用的 ES 细胞无所谓性别，但是通常雄性 ES 细胞比较容易形成生殖细胞系的嵌合体。为了减少培养时的繁杂过程最好尽快判断雌雄性。

ES 细胞的雌雄判断方法有，用 PCR 法扩增并检测 Y 染色体上性决定区的基因。如果使用这种方法，只需一个菌落(约 50 个)的 ES 细胞就足以进行性别分析，而进行核型分析则需要约 10⁶ 个细胞；因此可在培养初期根据对性别的鉴定对 ES 细胞进行第一次筛选，及早选出雄性细胞，从而大大缩短培养初期的时间。

可用 G 带法确定染色体数而完成第二次选择。优选所获得的 ES 细胞染色体数为正常数的 100%，但经物理操作建立细胞系很难获得具有正常染色体数的细胞时，优选对 ES 细胞的基因实施基因敲除后，再克隆成正常细胞(如，染色体数为 2n=40 的小鼠体细胞)。

这样所得的胚胎干细胞通常繁殖能力强，但个体发育能力低，因此必须传代。例如，在适当饲养细胞如 STO 成纤维细胞上，在有 LIF (1-10000U/ml) 的情况下，在 CO₂ 培养箱(优选约 5% CO₂ 和约 95% 空气，或约 5% CO₂、约 5% O₂ 和 90% 空气)内约 37℃ 培养所述胚胎干细胞系，传代时，可用胰酶/EDTA 溶液(通常约 0.001-0.5% 胰酶/约 0.1-5mM EDTA，优选约 0.1% 胰酶/1mM EDTA)处理以获得单细胞，然后接种至新鲜制备的饲养细胞。通常每 1-3 天传代一次，并在传代时观察细胞，将形态异常的细胞除去。



ES 细胞在适当条件下，在单层培养中长至高密度，或在悬浮培养中形成细胞集团后，它们可自发分化成各种类型的细胞，如头顶肌细胞、内脏肌细胞、心肌细胞等[M. J. Evans 及 M. H. Kaufman, 自然, 292, 154(1981); G. R. Martin, 美国国家科学院院刊, 78, 7634(1981); T. C. Doetschman 等, 5 胚胎学和实验形态学杂志 87, 27(1985)], 从本发明分化的 ES 细胞得到对本发明 DNA 的表达有缺陷的细胞，它们可用于体外进行本发明多肽的细胞生物学研究。

可用公知方法测定所选动物的 mRNA 量，并间接比较表达量，从而使本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物与正常动物有所区别。

10 非人哺乳动物的例子如前述。

对本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物而言，可将如上制备的靶载体导入小鼠胚胎干细胞或小鼠卵细胞，然后通过同源重组使小鼠胚胎干细胞或小鼠卵细胞染色体上的本发明 DNA 被靶载体上的已失活的本发明 DNA 序列所取代，从而完成对本发明 DNA 的基因敲除。

15 以位于本发明 DNA 内或附近的一段 DNA 序列作为探针通过 DNA 杂交分析，或以靶载体上的一段 DNA 序列以及不包含在该靶载体中的另一 DNA 序列为引物通过 PCR 分析，可以鉴定携有本发明已破坏的 DNA 的基因敲除细胞。当使用非人哺乳动物胚胎干细胞时，对其中所含本发明 DNA 已失活的一个细胞系通过同源重组进行克隆；在适当时期如 8 细胞期将所得已克隆的细胞注射至，例如非人哺乳动物胚胎或胚泡中。将所得嵌合体胚胎移植到非人哺乳动物的假妊娠子宫。所得动物是由具有正常的本发明 DNA 位点的细胞和具有人工突变的本发明 DNA 位点的细胞构成的嵌合体。

20 当该嵌合体动物的部分生殖细胞中本发明 DNA 位点发生突变后，可从这种嵌合动物与正常动物交配得到的子代群体中，通过毛色(coat color)鉴定等方法，筛选以下个体，其所有组织均由具有突变的本发明 DNA 位点的细胞组成。所得个体通常在本发明多肽的杂合子表达中有缺陷。通过这些杂合体的交配后代可获得本发明多肽的纯合子表达有缺陷的个体。

25 使用卵细胞时，可将 DNA 溶液显微注射至细胞核内，获得一种非人哺乳类转基因动物，其中已将靶载体导入其染色体上。可根据同源重组从 30 这些非人哺乳类转基因动物中筛选本发明 DNA 位点上有变异的个体。

如上述，针对本发明 DNA 的基因敲除个体的杂交后代在证实了带有此基因敲除后，可通过常规培养条件进行繁衍。

5 可按照常规方法获得并维持繁殖系。即通过含有所述非活性 DNA 的雌雄动物交配，可以获得两条同源染色体上都具有该非活性 DNA 的纯合体。对于母本动物来说，在 1 个正常个体、多个纯合体的状态下饲养，就能更有效地得到这种纯合体动物。通过雌雄杂合体的杂交，可繁殖并传代具有该非活性 DNA 的纯合体以及杂合体动物。

本发明 DNA 已失活的非人哺乳动物胚胎干细胞在产生本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物方面十分有用。

10 由于本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物丧失了由本发明多肽衍生所得的各种生物活性，故可作为本发明多肽的生物活性失活的疾病模型，并因此有利于阐明这些疾病的原因及研究其治疗方法。

(8a) 对本发明 DNA 之缺失或损伤等所致疾病能进行有效预防/治疗的化合物的筛选方法

15 可用本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物筛选对本发明 DNA 之缺失或损伤所致疾病(骨疾病和/或关节疾病(如变形性关节炎、慢性关节风湿、大理石病等)、有病的血管新生(如肿瘤血管新生)等)进行有效预防/治疗的化合物。

20 即，本发明提供对本发明 DNA 之缺失或损伤等所致疾病能进行有效预防/治疗的化合物的筛选方法，其特征为，对本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物施用一种待测化合物，观察和测定该动物的变化。

可用于所述筛选方法的本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物实例如上述。

25 所述待测化合物如多肽、蛋白质、非多肽化合物、合成化合物、发酵产物、细胞提取液、植物提取液、动物组织提取液、血浆等，它们既可为新化合物也可为已知化合物。

具体地，用待测化合物处理本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物，与未处理的对照动物比较，以动物的各个器官、组织、疾病的症状变化为指标，可以评价此待测化合物的治疗/预防效果。

30 所述用待测化合物处理对象动物的方法，可以口服给药、静脉注射，可以根据待测动物的症状和待测化合物的性质等适当地进行选择。另外，

待测化合物的给药量还可以根据投药途径、待测化合物的性质等进行适当选择。

当筛选针对肿瘤血管新生具有治疗/预防效应的化合物时，对本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物进行癌细胞移植，在移植前或移植后给予待测化合物，经常地测定该动物的肿瘤标记值以及肿瘤块大小的变化等。

用该筛选法得到的化合物是从上述的待测化合物中选出的化合物，对因本发明多肽的缺陷、损伤引起的疾病(骨疾病和/或关节疾病(如变形性关节炎、慢性关节风湿、大理石病等)、有病的血管新生(如肿瘤血管新生)等)具有治疗和预防效应，所以这种化合物可以用作治疗和预防这些疾病的药物，既安全又毒性低。另外，如上述筛选的化合物所衍生的化合物也可以使用。

用上述筛选法得到的化合物可以与生理上可接受的碱(如碱金属盐)或酸(如无机酸或有机酸)形成盐而使用，优选为生理上可接受的酸加成盐。这样的盐有，与无机酸(例如，盐酸、磷酸、氢溴酸、硫酸)形成的盐，与有机酸(例如，乙酸、甲酸、丙酸、延胡索酸、马来酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸、苹果酸、草酸、苯甲酸、甲磺酸、苯磺酸)形成的盐等。

含有用上述筛选法所得的化合物或其盐的药物，可以用类似于制备含上述本发明多肽的药物的方法进行制备。

如此得到的制剂安全、低毒，因此可以对人或哺乳动物投药，例如大鼠、小鼠、豚鼠、兔子、绵羊、猪、牛、马、猫、狗、猴子等。

该化合物或其盐的剂量依赖于病症、受试者和给药方法等而异；例如经口投药用于治疗骨疾病和/或关节疾病时，一般成年人(体重 60kg)的正常剂量为大约 0.1-100mg/天，优选大约 1.0-50mg/天，更优选 1.0-20mg/天。非胃肠道给药时，一次投药量依赖于给药受体、症状等而变，例如，以针剂注射该化合物用于治疗骨疾病和/或关节疾病时，成年人(体重 60kg)的剂量为大约 0.01-30mg/天，优选大约 0.1-20mg/天，更优选大约 0.1-10mg/天。对于其它动物种类，可以按每 60kg 体重换算相应给药剂量。

(8b) 筛选能促进或抑制本发明 DNA 中启动子之活性的化合物的方法

本发明提供筛选能促进或抑制本发明 DNA 中启动子之活性的化合物或其盐的方法，其特征为，对本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物给予待测化合物，并检测报道基因的表达。

在上述筛选方法中，本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物选自上述本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物，该动物中通过导入报道基因使本发明 DNA 失活，而该报道基因是在本发明 DNA 的启动子控制下表达。

用于筛选的具体化合物实例同上。

- 5 报道基因实例同上，优选 β -半乳糖苷酶基因(lacZ)、可溶性碱性磷酸酶基因或荧光素酶基因等。

由于本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物之中，本发明 DNA 以报道基因取代，而报道基因又受本发明 DNA 启动子的调控而出现，因此追踪报道基因编码物质的表达可以检测启动子活性。

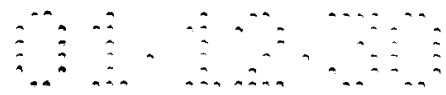
- 10 例如，当用大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因(lacZ)取代编码本发明多肽的 DNA 区的一部分时，原本表达本发明多肽的组织中，表达了 β -半乳糖苷酶以代替本发明多肽。因此，用试剂 β -半乳糖苷酶的底物如 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -半乳糖吡喃糖苷(X-gal)染色可以很容易地观察到本发明多肽在动物体内的表达状态。具体地，选取本发明多肽缺陷型小鼠或其经戊二醛等固定的
- 15 组织切片，用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后，用含有 X-gal 的染色液在室温或 37℃左右反应约 30 分至 1 个小时，之后将组织标本用 1mM EDTA/PBS 溶液洗涤，观察 β -半乳糖苷酶产生的颜色。或者，可按照常规法检测编码 lacZ 的 mRNA。

- 20 用该筛选法得到的化合物或其盐是从上述待测化合物中选出，具有促进或抑制本发明 DNA 启动子活性的化合物。

- 用上述筛选法得到的化合物可以形成盐，所述盐可以优选使用与生理上可接受的碱(如碱金属盐)或酸(如无机酸或有机酸)形成盐，尤其优选为生理上可接受的酸加成盐。这样的盐有，与无机酸(例如，盐酸、磷酸、氢溴酸、硫酸)形成的盐，与有机酸(例如，乙酸、甲酸、丙酸、延胡索酸、马来
- 25 酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸、苹果酸、草酸、苯甲酸、甲磺酸、苯磺酸)形成的盐等。

- 由于具有促进本发明 DNA 启动子的活性的化合物或其盐，可促进本发明多肽的表达，或可促进本发明多肽的功能，因此它们可作为安全、低毒性药物用于治疗 and 预防骨疾病和/或关节疾病(如变形性关节炎、慢性关节风湿、大理石病等)、有病的血管新生(如肿瘤血管新生)等。
- 30

再者，由上述筛选得到的化合物进而衍生的化合物同样可以使用。



含有用上述筛选法所得的化合物或其盐的药物，可以用类似于制备含上述本发明多肽或其盐的药物的方法进行制备。

如此得到的制剂安全、低毒，因此可以对人或哺乳动物投药，例如大鼠、小鼠、豚鼠、兔子、绵羊、猪、牛、马、猫、狗、猴子等。

5 该化合物或其盐的剂量依赖于病症、受试者和给药途径等而异；例如经口投药促进本发明 DNA 启动子活性的化合物用于治疗骨疾病和/或关节疾病时，一般成年人(体重 60kg)的正常剂量为大约 0.1-100mg/天，优选大约 1.0-50mg/天，更优选 1.0-20mg/天。非胃肠道给药时，一次投药量依赖于给药受体、症状等而变，例如，以针剂注射促进本发明 DNA 启动子活性的化
10 合物用于治疗骨疾病和/或关节疾病时成年人(体重 60kg)的剂量为大约 0.01-30mg/天，优选大约 0.1-20mg/天，更优选大约 0.1-10mg/天。对于其它动物种类，可以按每 60kg 体重换算相应给药剂量。

相反，经口服给予抑制本发明 DNA 启动子活性的化合物时，一般成年人(体重 60kg)正常剂量为大约 0.1-100mg/天，优选大约 1.0-50mg/天，更
15 优选 1.0-20mg/天。非胃肠道给药时，一次投药量依赖于给药受体、症状等而变，例如，以针剂注射抑制本发明 DNA 启动子活性的化合物时，成年人(体重 60kg)的剂量为大约 0.01-30mg/天，优选大约 0.1-20mg/天，更优选大约 0.1-10mg/天。对于其它动物种类，可以按每 60kg 体重换算相应给药剂量。

20 根据上述，本发明 DNA 表达缺陷型非人哺乳动物可有效用于筛选能促进或抑制本发明 DNA 启动子活性的化合物或其盐，可以阐明本发明 DNA 表达缺陷的各种疾病的病因，和开发针对这些疾病的预防和治疗药物。

进一步地，编码本发明多肽的基因由于在小鼠和人中尤其是在软骨组织中能够进行大量表达，因此该基因的启动子序列最适合在非人温血动物的软骨组织中用于大量表达目标蛋白质(任意有用的基因产物等)。所述非人
25 温血动物例如，类似于上述所举出的温血动物之例等。

也就是说，本发明提供一种使目标蛋白质能在非人温血动物的软骨组织上进行最佳表达的方法，所述目标蛋白质是根据在编码多肽基因的启动子区的下游(3' 末端区)连接目标蛋白质(任意有用的基因产物等)并导入至
30 非人动物中，所述多肽具有 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 47 所示氨基酸序列的特征。



该目标蛋白质(任意的有用基因产物等)为下面所述有用的基因产物等, 如细胞因子(例如, 白介素、干扰素、化学因子、造血因子)、增殖因子(例如, EGF(epidermal growth factor))或者是具有基本相同活性的物质(例如, EGF、ハレグリン(HER2 配体)等)、胰岛素或者是具有基本相同活性的物质

5 (例如, 胰岛素、IGF(insulin-like growth factor)-1、IGF -2 等)、FGF(fibroblast growth factor) 或者是具有基本相同活性的物质(例如, aFGF、bFGF、KGF (Keratindcyte growth factor)、HGF (Hepatocyte growth factor)、FGF-10)、以及其他细胞增殖因子(例如, CSF(colony stimulating factor)、EPO(erythropoietin)、IL-2(interleukin-2)、NGF(nerve growth factor)、

10 PDGF(platelet-derived growth factor)、TGF β (transforming growth factor β) 等)、激素(促黄体激素释放激素(LH-RH)、生长激素、生长素释放激素(GH-RH)、催乳素、黑素细胞刺激激素、甲状腺激素释放激素、甲状腺刺激激素、促黄体激素、黄体激素、卵泡刺激激素、胃液素、胃动素、生长抑素、胰泌素、高血糖素、PACAP、VIP 等、消化酶(如, 淀粉酶、胃蛋白酶原、脂肪酶等)、

15 针对病原体的抗体(例如, 针对病原性沙门氏菌等的病原性细菌的抗体、针对流感等病原性病毒的抗体、针对棘球绦虫等的寄生虫的抗体等)、抗菌多肽(例如, 杀菌肽、ヒスタチン、白细胞内容素、プロテグリン、防御素、溶菌酶等))。

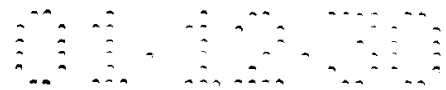
在上述目标蛋白中,

20 ①通过在软骨组织中特异性表达细胞因子, 进而可以调节并加强非人温血动物的免疫活性等;

②通过在软骨组织中特异性表达增殖因子, 进而可以保护非人温血动物的软骨组织等。

25 下面就目标蛋白质能在非人温血动物的软骨组织中表达最佳的方法, 将详细地叙述。也就是说, 所述目标蛋白质是根据在编码多肽基因的启动子区的下游(3'末端区)连接编码目标蛋白质(任意有用的基因产物等)的DNA 或RNA 并导入非人动物中, 所述多肽具有 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 47 所示氨基酸序列的特征。

30 首先, 编码具有 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 47 所示氨基酸序列的特征的多肽基因启动子可以通过菌落杂交、噬菌斑杂交和 PCR 等公知方法(根据《分子克隆》第二版(J. Sambrook 等, 冷泉港实验



室出版社, 1989)获得。还有, 鉴定含有启动子活性区域可以通过报道分析法等获得(如, 《分析生物化学》188, p245(1990)所述方法等)。

其次, 为了将目标蛋白质(任意有用的基因产物等)连接于通过上述方法得到的引物下游(3'末端区), 使用 T4DNA 连接酶根据本领域公知的方法(根据《分子克隆》第二版(J. Sambrook 等, 冷泉港实验室出版社, 1989)描述的方法)可以构建质粒而完成连接。

为了将上面所述的连接产物导入非人温血动物之中, 所述连接产物是在引物下游(3'末端区)连接了编码目标蛋白质(任意有用的基因产物等)DNA。所采用的导入方法有: 电穿孔法、基因枪法、转录病毒载体法(如, 《血细胞》(Blood Cells) 17,p407,(1991)描述的方法等)、腺病毒载体法(如, 《病理学》(Pathology) 30, p335, (1998) 描述的方法等)。

在说明书和附图中, 碱基和氨基酸的代码使用 IUPAC-IUB 生化命名委员会规定的或本领域通用的代码, 如下述例示。对于有光学异构体的氨基酸, 除非特别说明, 均指 L 形式。

- 15 DNA : 脱氧核糖核酸
- cDNA : 互补的脱氧核糖核酸
- A : 腺嘌呤
- T : 胸腺嘧啶
- G : 鸟嘌呤
- 20 C : 胞嘧啶
- RNA : 核糖核酸
- mRNA : 信使核糖核酸
- dATP : 脱氧腺苷三磷酸
- dTTP : 脱氧胸腺嘧啶三磷酸
- 25 dGTP : 脱氧鸟苷三磷酸
- dCTP : 脱氧胞嘧啶三磷酸
- ATP : 腺苷三磷酸
- EDTA : 乙二胺四乙酸
- SDS : 十二烷基硫酸钠
- 30 Gly : 甘氨酸
- Ala : 丙氨酸



- Z : 苄氧羰基
Cl-Z : 2-氯苄氧羰基
Br-Z : 2-溴苄氧羰基
Boc : 叔丁氧基羰基
5 DNP : 二硝基苯酚
Trt : 三苯甲基
Bum : 叔丁氧基甲基
Fmoc : N-9-芴基甲氧基羰基
HOBt : 1-羟基苯并三唑
10 HOObt : 3,4-二羟基-3-羟基-4-氧基-1,2,3-苯并三唑
HONB : 1-羟基-5-降冰片烯基-2,3-二羧基亚胺
DCC : N,N'-二环己基碳二亚胺

本说明书序列表中的序列编号(SEQ ID NO:)分别表示如下:

- 15 [SEQ ID NO:1]
表示实施例 1 中反义链引物的碱基序列。
[SEQ ID NO:2]
表示实施例 1 中有义链引物的碱基序列。
[SEQ ID NO:4]
20 表示编码人 MLP 前体的 DNA 碱基序列, 该前体含有 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列。
[SEQ ID NO:5]
表示在人 MLP 前体中所包含的氨基酸信号序列, 该前体含有 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列。
25 [SEQ ID NO:6]
表示人 MLP 前体的氨基酸序列。
[SEQ ID NO:7]
表示实施例 2 中反义链引物的碱基序列。
[SEQ ID NO:8]
30 表示实施例 2 中有义链引物的碱基序列。
[SEQ ID NO:10]



表示编码小鼠 MLP 前体的 DNA 碱基序列，该前体含有 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列。

[SEQ ID NO:11]

表示在小鼠 MLP 前体中所包含的氨基酸信号序列，该前体含有 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列。

[SEQ ID NO:12]

表示小鼠 MLP 前体的氨基酸序列。

[SEQ ID NO:13]

表示实施例 3 中 G3PDH 特异性寡 DNA 的碱基序列。

10 [SEQ ID NO:14]

表示实施例 3 中 G3PDH 特异性寡 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:15]

表示实施例 3 中 Aggrecan 特异性寡 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:16]

15 表示实施例 3 中 Aggrecan 特异性寡 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:17]

表示实施例 3 中 II 型胶原特异性寡 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:18]

表示实施例 3 中 II 型胶原特异性寡 DNA 的碱基序列。

20 [SEQ ID NO:19]

表示实施例 3 中 X 型胶原特异性寡 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:20]

表示实施例 3 中 X 型胶原特异性寡 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:21]

25 表示实施例 3 中小鼠 MLP 特异性寡 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:22]

表示实施例 3 中小鼠 MLP 特异性寡 DNA 的碱基序列。

[SEQ ID NO:23]

30 表示编码人 MLP 的 DNA 碱基序列，该人 MLP 含有 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列。

[SEQ ID NO:24]

表示人 MLP 的氨基酸序列。

[SEQ ID NO:25]

表示编码小鼠 MLP 的 DNA 碱基序列,该小鼠 MLP 含有 SEQ ID NO:26 所示氨基酸序列。

5 [SEQ ID NO:26]

表示小鼠 MLP 的氨基酸序列。

[SEQ ID NO:27]

表示实施例 4 及实施例 6 中引物的碱基序列。

[SEQ ID NO:28]

10 表示实施例 4 中引物的碱基序列。

[SEQ ID NO:29]

表示实施例 1 中所得 cDNA 片段的碱基序列。

[SEQ ID NO:30]

表示实施例 2 中所得 cDNA 片段的碱基序列。

15 [SEQ ID NO:31]

表示实施例 6 中合成肽的氨基酸序列。

[SEQ ID NO:32]

表示实施例 6 中用作 PCR 引物的寡 DNA 碱基序列。

[SEQ ID NO:33]

20 表示实施例 6 中用作 PCR 引物的寡 DNA 碱基序列。

[SEQ ID NO:34]

表示实施例 6 中用作 PCR 引物的寡 DNA 碱基序列。

[SEQ ID NO:35]

表示实施例 6 中用作 PCR 引物的寡 DNA 碱基序列。

25 [SEQ ID NO:36]

表示实施例 6 中用作 PCR 引物的寡 DNA 碱基序列。

[SEQ ID NO:37]

表示实施例 6 中用作 PCR 引物的寡 DNA 碱基序列。

[SEQ ID NO:38]

30 表示实施例 6 中用作 PCR 引物的寡 DNA 碱基序列。

[SEQ ID NO:39]



表示由实施例 9 所得 DNA 编码的大鼠 MLP 前体的部分氨基酸序列。

[SEQ ID NO:40]

表示编码实施例 9 所得部分大鼠 MLP 前体的 DNA 碱基序列。

[SEQ ID NO:41]

- 5 表示 DNA 碱基序列，其包含编码实施例 9 所得部分大鼠 MLP 前体的 DNA。

[SEQ ID NO:42]

表示实施例 9 中用作 PCR 引物的寡 DNA 碱基序列。

[SEQ ID NO:43]

- 10 表示实施例 9 中用作 PCR 引物的寡 DNA 碱基序列。

[SEQ ID NO:44]

表示实施例 9 中用作 PCR 引物的寡 DNA 碱基序列。

[SEQ ID NO:45]

表示实施例 9 中用作 PCR 引物的寡 DNA 碱基序列。

- 15 [SEQ ID NO:46]

表示编码大鼠 MLP 前体的 DNA 碱基序列，该前体含有 SEQ ID NO:47 所示氨基酸序列。

[SEQ ID NO:47]

表示大鼠 MLP 前体的氨基酸序列。

- 20 [SEQ ID NO:48]

表示编码大鼠 MLP 的 DNA 碱基序列，该大鼠 MLP 含有 SEQ ID NO:49 所示氨基酸序列。

[SEQ ID NO:49]

表示大鼠 MLP 的氨基酸序列。

- 25 [SEQ ID NO:50]

表示在大鼠 MLP 前体中所包含的氨基酸信号序列，该前体含有 SEQ ID NO:47 所示氨基酸序列。

- 30 随后实施例 1 描述的大肠杆菌转化体 (*Escherichia coli*)XL10-Gold/pDRL128vH 于 1999 年 6 月 11 日保藏位于日本国茨城县茨城市东 1-1-3 的 通商产业省工业技术院生命工学工业技术研究所(NIBH)，保藏编号为

FERM BP-6750, 于 1999 年 6 月 25 日保藏位于日本国大阪府大阪市淀川区十三本町 2-17-85 的财团法人发酵研究所(IFO), 保藏编号为 IFO 16292。

5 随后实施例 2 描述的大肠杆菌转化体 (*Escherichia coli*)XL10-Gold/pDRL128vM 于 1999 年 6 月 9 日保藏于通商产业省工业技术院生命工
学工业技术研究所(NIBH), 保藏编号为 FERM BP-6747, 于 1999 年 6 月 25
日保藏于财团法人发酵研究所(IFO), 保藏编号为 IFO 16293。

10 随后实施例 9 描述的大肠杆菌转化体 (*Escherichia coli*)XL10-Gold/pDRL128vR 于 2000 年 5 月 19 日保藏于通商产业省工业技术院生命工
学工业技术研究所(NIBH), 保藏编号为 FERM BP-7167, 于 2000 年 5 月 26
日保藏于财团法人发酵研究所(IFO), 保藏编号为 IFO 16439。

下面, 用参考实施例详述本发明, 但并非限制本发明的范围。使用大
肠杆菌(*Escherichia coli*)进行基因操作按“分子克隆”的方法进行。

实施例 1 克隆编码人 MLP 前体蛋白质的 cDNA

15 通过使用人胎儿脑 poly(A)⁺RNA 按照以下要领实施 5' RACE(Rapid
Amplification of cDNA End) 和 3' RACE 对编码人 MLP 前体蛋白质的 cDNA
进行克隆。取 1 μg 人胎儿脑 poly(A)⁺RNA(Clontech 公司)用锚定引物
(anchored primer)(该引物具有位于限制酶位点之后的 poly(T))和 Superscript
II MMLV 反转录酶(Gibco BRL 公司)合成 1st.strand cDNA, 然后用 RNA 连
20 接酶(宝酒造)将锚定引物(anchored primer)连接于 1st.strand cDNA 3' 末端。
其次, 将 SEQ ID NO: 1 所示的寡 DNA 作为反义链引物进行 5' RACE, 同
样将 SEQ ID NO: 2 所示的寡 DNA 作为有义链引物进行 3' RACE, 从而得
到在以各自引物为起点的 5' 上游区序列和 3' 下游区序列。当对所得的各自
双链 DNA 碱基序列进行测定时, 由于在碱基序列上有相同重叠的序列, 从
25 而可知这两条序列是来自于同一基因。故, 用相同序列部分将通过所述 5'
RACE 和 3' RACE 所得的各自 cDNA 片断进行结合, 最终获得由 SEQ ID
NO: 29 所示并包含 poly(A)⁺的全长为 923 个碱基对(bp)的 cDNA 片断。在
这个 cDNA 片断上编码一种新的人 MLP 前体蛋白质, 该蛋白质由 SEQ ID
NO: 6 所示 128 个氨基酸所组成, 并包含一个由 SEQ ID NO: 5 所示 18 个
30 氨基酸残基的典型信号序列。所述新的人 MLP 前体蛋白质与人 MIA 前体

蛋白质具有最高的同源性，其 4 个半胱氨酸残基的位置也一致(图 1)。但是这两者之间的同源性在氨基酸水平上只有 23.4%。

将携带编码本实施例所得人 MLP 前体蛋白质的 DNA 质粒 pDRL128vH 导入大肠杆菌 (*Escherichia coli*)XL10-Gold，从而获得大肠杆菌转化体
5 (*Escherichia coli*)XL10-Gold/pDRL128vH。

实施例 2 克隆编码小鼠 MLP 前体蛋白质的 cDNA

克隆编码小鼠 MLP 前体蛋白质的 cDNA 与克隆编码人 MLP 前体蛋白质的 cDNA 方法相同，使用 17.5 天的胎鼠 poly(A)⁺RNA，通过实施 5 RACE
10 和 3 RACE 来进行。根据硫氰酸胍法从 17.5 天的胎鼠中分级分离总 RNA，将该总 RNA 上样于寡(dT)离心柱(Spun-column)(Pharmacia)，制备 poly(A)⁺RNA。取同一 17.5 天 1 μg 的胎鼠 poly(A)⁺RNA，用锚定引物(anchored primer)(该引物具有位于限制酶位点之后的 poly(T))和 Superscript II MMLV 反转录酶(Gibco BRL 公司)合成 1st.strand cDNA，然后用 RNA 连接酶(宝酒
15 造)将锚定引物(anchored primer)连接于合成的 1st.strand cDNA 3'末端。用于 5 RACE 和 3 RACE 的引物序列基于一种被认为是唯一的 EST 即 AA222797 序列制备而成的，其中包括编码小鼠 MLP 前体蛋白质 cDNA 的 3'区，并且假设一个在实施例 1 中得到的编码人 MLP 前体蛋白质 cDNA 的碱基序列并在公知的 EST(Expressed Sequence Tag)数据库中求得。分别以 SEQ ID
20 NO: 7 所表示的寡 DNA 为反义链引物，SEQ ID NO: 8 所表示的寡 DNA 为有义链引物，进行 5 RACE 和 3 RACE，从而获得以它们各自引物为起点的 5'上游序列和 3'下游序列。当对所得各自双链 DNA 碱基序列进行测定时，由于在碱基序列上存在相同重叠的序列，从而可知这两条序列是来自于同一基因。故，用该相同序列部分将通过所述 5 RACE 和 3 RACE 得
25 到的各自 cDNA 片断进行结合，最终获得包含 poly(A)⁺的全长为 947 个碱基对(bp)的 cDNA 片断(SEQ ID NO: 30)。在这个 cDNA 片断上与人 MLP 前体蛋白质相同的方法，编码一种新型蛋白质，该蛋白质由 SEQ ID NO: 12 所示 128 个氨基酸所组成，并包含一个由 SEQ ID NO: 11 所示 18 个氨基酸残基的典型信号序列。所述新的小鼠 MLP 前体蛋白质其 4 个半胱氨酸残
30 基的位置与在人及小鼠 MIA 前体蛋白质，以及在人 MLP 前体蛋白质上的位置均一致(图 1)。并且小鼠 MLP 前体蛋白质和人 MLP 前体蛋白质它们在



氨基酸的水平上其同源性达到 84.3%，而小鼠 MIA 前体蛋白质和小鼠 MLP 前体蛋白质之间的同源性仅停留在 22.6%水平上。

将携带编码本实施例所得小鼠 MLP 前体蛋白质的 DNA 质粒 pDRL128vM 导入大肠杆菌(*Escherichia coli*)XL10-Gold，从而获得大肠杆菌
5 转化体(*Escherichia coli*)XL10-Gold/pDRL128vM。

实施例 3 在体外软骨分化模型中进行 MLP 的表达

小鼠胚性肿瘤细胞株 ATDC5 可以用作体外软骨分化模型(Cell Diff. Dev., 30:109-116, 1990, J. Cell Biol., 133:457-468, 1996, J. Bone Min.Res, 10:S234,
10 1995)，其理由为，它能极好地保持前体软骨细胞的性质，在胰岛素存在的培养下，可以高效诱导软骨的分化，其后在骨发育过程中可以模拟整个软骨分化的过程。至此，按照以下要领根据 RT-PCR 法，研究每个分化过程中的各种基因的表达情况。首先，从在分化模型培养系的各阶段 ATDC5 细胞中，通过将同一细胞溶解于含有苯酚和硫氰酸胍均一的液体 ISOGEN(日本基因)中，加入氯仿离心分离收集含有 RNA 的水相级分，通过加入异丙醇搅拌离心沉淀以获得纯化的总 RNA。其次，通过使用 TAKARA RNA PCR
15 Kit(AMV)Ver.2.1(宝酒造)中的 AMV Reverse Transcriptase XL 和 Random 9 mers，将每个待测总 RNA 进行反转录得到 cDNA，再其次，以所得的 cDNA 为 DNA 模板，G3PDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)特异性寡 DNA(SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14)为看家基因，或用软骨分化标记基因特异性寡 DNA(Aggrecan(SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16)、II 型胶原(SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18)、X 型胶原(SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20))作为 DNA 引物，在 TaKaRa Ex Taq™(宝酒造)的反应系中进行 PCR 反应。所得反应产物进行琼脂凝胶电泳并分离，比较它们的形成量。每种基因都可
25 如表 1 所示对应于各自软骨细胞分化阶段的表达类型进行检测。对于 cDNA 相同样品组来说，除了将对于编码小鼠 MLP 前体蛋白质的 cDNA 具有特异性寡 DNA(SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22)作为 DNA 引物外，其它 PCR 反应条件均相同，从第 2 阶段到第 4 阶段发现小鼠 MLP 前体 mRNA 的量产生显著的亢进。故可表明，MLP 前体的基因在软骨分化的初期过程中其
30 表达程度增加。



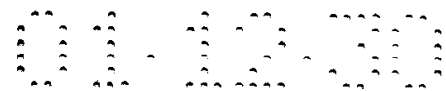
表 1

STAGE	1	2	3	4	5	6	7
MLP	+	+++	+++	+++	++	++	+
Aggrecan	+	++	++	++	+++	++	++
II 型胶原	+	++	+++	+++	+++	++	++
X 型胶原	+	+	++	++	+++	+++	+++
G3PDH	++	++	++	++	++	++	++

(表中+的数目表示为在每个分化阶段上它们各自基因表达水平的差异，其数目越多表示表达水平越高。)

5 实施例 4 在 COS7 细胞中小鼠 MLP-FLAG 融合蛋白质的表达及其检测

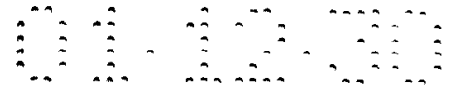
为了证明 MLP 是否为分泌蛋白，以小鼠 MLP 为材料，按照以下要领在 COS7 细胞中对小鼠进行 MLP-FLAG 融合蛋白质的表达及其检测。首先，依据实施例 2 得到的编码小鼠 MLP 前体多肽 cDNA 碱基序列，对以下 2 种引物的 DNA 进行化学合成。一个引物是 5'-CGAATTCCCACCATGGCAAGG
 10 ATATTGATTCTTTTGCTTG-3'(SEQ ID NO: 27)，这是一个含有有义序列的寡 DNA，该序列为+1~+28(翻译起始位点为+1)并在 5'末端具有包含限制酶 EcoRI 识别位点的锚定序列。另一个引物是 5'-GTACAGTCGATTCAC
 15 AGAAGAAGTCAATATCCGTGGTTG-3'(SEQ ID NO: 28)，这是一个寡 DNA，在含有限制酶 EcoRI 识别位点的锚定序列 3'侧连接了+355~+378 的反义序列。以实施例 2 的质粒 pDRL128vM 为模板，使用这 2 种引物 DNA 及 TaKaRa LA Taq™(宝酒造)，用热循环仪 GeneAmp™PCR system9700 (Perkin-Elmer)，最初在 98℃ 静止 30 秒后，再以 98℃ 10 秒、55℃ 20 秒、72
 20 ℃ 2 分为一个反应周期，扩增 25 个周期循环，最后在 72℃ 延长 5 分钟。纯化所得 DNA 片断再用限制酶 EcoRI 和 Sal I 进行末端消化并纯化，插入并连接至用于动物细胞表达载体 pCAN618FLAG 的 EcoRI、Sal I 位点上。pCAN618FLAG 源于质粒载体 pCAN618 并具有选择标记抗新霉素基因，同时将编码目标蛋白的 DNA 片断插入该克隆部位的 EcoRI、Sal I 位点上，不仅在巨细胞病毒极初期基因增强子及其下游的 β -肌动蛋白启动子的调控下可以使该蛋白质表达，而且还可通过编码位于 Sal I 位点之后的 8 个氨基酸
 25 FLAG 抗原表位序列(Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys)的碱基序列和终止



密码匹配的读码框将所述目的蛋白表达为 FLAG 融合蛋白。用于表达小鼠 MLP 前体全长和 FLAG 抗原表位的融合蛋白质(其间插入 1 个残基 Val), 可将 pCAN618FLAG 插入到上述 PCR 克隆 DNA 片断中, 从而获得表达载体质粒 pMMLP-F。

5 其次, 使用 6 孔平板将 1.2×10^5 的 COS7 细胞培养在含有 10%胎牛血清(FBS)Dulbecco 改良的必需极限培养基(DMEM), 培养 24 个小时。用脂质转染胺试剂(リポフェクトアミン)(Gibco BRL)将所述的表达质粒 pMMLP-F(每孔为 $0.4 \mu\text{g}$)导入该细胞中。转染 24 小时之后, 将培养基换成新鲜的培养基, 再培养 5 个小时, 换成不含 FBS 的 Opti-MEM(Gibco BRL)培养基, 10 培养 36 个小时, 获得该培养物的上清液和细胞提取液。将细胞提取液用含有细胞的生理盐水磷酸缓冲液(PBS)洗涤 2 次, 用 Tris-SDS 样品缓冲液溶解抽提, 而另一方的培养物上清液经适当超过滤(分子量 3000 开特)浓缩再与等体积的 Tris-SDS 样品缓冲液混合。这些样品经过热处理之后, 再进行 15%-25%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 进一步从该凝胶上转移到 PVDF 15 (Amersham pharmacia biotech)膜上。然后, 用封闭剂(雪印乳业)封闭处理该 PVDF 膜 1 个小时, 在含有 0.05%Tween20 的 PBS(PBS-T)中与抗 FLAG 单克隆抗体($10 \mu\text{g/ml}$; Kodak)反应 2 小时。用 PBS-T 洗涤 3 次后, 在 PBS-T 中与西洋辣根过氧化酶标记的抗小鼠 IgG 山羊抗体(Amersham pharmacia biotech; 稀释 5000 倍)反应 1 个小时。用 PBS-T 洗涤 5 次后, 用 ECL plus 20 显色试剂盒(Amersham pharmacia biotech)及 ECL film(Amersham pharmacia biotech)检测化学发光程度。其结果, 在含有细胞提取液的培养物上清液中检测出约 14kDa 基因产物, 进而表明在 COS7 细胞中有分泌蛋白并表达小鼠 MLP-FLAG 融合蛋白。

25 以下分析了该小鼠 MLP-FLAG 融合蛋白质 N-末端氨基酸的序列。首先基于上述方法将含有表达的小鼠 MLP-FLAG 的 COS7 细胞并从该细胞培养物上清液中通过使用 Anti-FLAG™ M2-Agarose Affinity Gel (Sigma) 亲和性色谱法获得酸性洗脱级分(用 Glycine-HCl 缓冲液(pH3.5)洗脱)。浓缩该级分后, 进行与本实施例相同的方法 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, CBB 染色, 此时, 只观察到一条带它相当于目标蛋白质小鼠 MLP-FLAG。用相同级分的 30 浓缩材料同样地进行电泳, 将该蛋白质从凝胶上转录至 PVDF 膜上, 然后在 パルスリキッド氨基酸序列分析仪 Procise CLC491(PE Bio systemes)



上分析 N-末端氨基酸的序列。从 N-末端起依次检测出氨基酸残基：1.组氨酸、2.甘氨酸、3.缬氨酸、4.苯丙氨酸，该末端与 SEQ ID NO：26 所示小鼠 MLP 的 N-末端序列相一致。从以上所得结果可知，小鼠 MLP-FLAG 蛋白质是其小鼠 MLP-FLAG 前体蛋白质的 N-末端 18 个氨基酸残基信号序列被切割以后从第 19 个组氨酸残基开始以小鼠 MLP-FLAG 成熟蛋白质通过 COS7 细胞被分泌至培养基中的。

实施例 5 建立能表达小鼠 MLP-FLAG 融合蛋白的 CHO-K1 细胞株

按照以下要领建立能表达小鼠 MLP-FLAG 融合蛋白的 CHO-K1 细胞株。取 3.3×10^4 个 CHO-K1 细胞，于直径为 10cm 的塑料平板上，用含有 10% 胎牛血清(FBS)的 F-12 培养基(Gibco BRL)培养 24 小时，通过磷酸钙法 (CellPfect Transfection Kit(Amersham Pharmacia Biotech))将实施例 4 中的表达质粒 pMMLP-F(每个平板为 $1.5 \mu\text{g}$)导入至这些细胞中。转染 12 个小时后，用不含 FBS 的 F-12 培养基洗涤细胞 2 次，用含有 15%的甘油等渗溶液 HEPES(pH7.5)3ml 进行甘油刺激 3 分钟。然后再用不含 FBS 的 F-12 培养基洗涤细胞 2 次，进一步用含有 FBS 的 F-12 培养基培养 12 小时，并换成含有 500mg/L Geneticin(Gibco BRL) 和 10%FBS 的 F-12 选择培养基(以下为选择培养基)。10 天后，将平板中所形成的抗 Geneticin 菌落，分别移至 24 孔板中，再用选择培养基培养 3 天。将在新的选择培养基中增殖的细胞移至 6 孔板中，用选择培养基培养 4 天，再换成包含 0.02%CHAPS、0.1mM p-ABSF(和光纯药工业)的 Opti-MEM(Gibco BRL)培养基 1 ml，培养 48 小时，回收该培养物的上清液。使用 Geneticin YM-3 超过滤膜(Amicon)浓缩所得培养物的上清液再与等容积的 Tris-SDS 样品缓冲液混合。在 95°C 下热处理 5 分钟，然后用 18%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，将凝胶上的电泳蛋白质转录至尼龙膜上。用封闭剂(雪印乳业)封闭该尼龙膜 1 小时，在含有 0.05%Tween20 的 PBS(PBS-T)中与抗 FLAG 抗体(1/2000 稀释、SIGMA)反应 1 小时。用 PBS-T 洗涤 5 次后，在 PBS-T 中与 HRP 标记的抗小鼠 IgG 绵羊抗体(1/2000 稀释、Amersham Pharmacia Biotech)反应 1 个小时。用 PBS-T 洗涤 5 次后，使用 ECL 显色试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech)及 Hyperfilm ECL(Amersham Pharmacia Biotech)检测化学发光程度。其结果，在来自于 CHO-K1/mMLP.FLAG#2-1 株的细胞培养物上清液中约 16 kDa 目的基因产

物被检测得最多，因此该细胞株即可选作能表达小鼠 MLP-FLAG 融合蛋白的 CHO-K1 细胞株。

实施例 6 制备抗 MLP 血清和使用该抗血清来检测重组 MLP 蛋白质

5 按照以下要领制备抗 MLP 抗血清。首先，通过公知方法在小鼠 MLP 前体蛋白质中，从第 105 位缬氨酸残基至第 124 位天冬氨酸残基之间与其氨基酸序列相对应的肽链在其 C-末端上加上 1 个半胱氨酸进行化学合成使之成为 SEQ ID NO: 31 所示的合成肽(Val-Lys-Glu-Gln-Arg-Val-Tyr-Gln-Glu-Ala-Thr-Lys-Glu-Ile-Pro-Thr-Asp-Ile-Asp-Cys)。合成链作为一种载体结合了
10 KLH(Keyhole limpet hemocyanin)使其作为抗原，对日本白兔(SPF Japanese White Rabbit)进行免疫。共计免疫 7 次，然后采血，根据公知方法制备血清级分，保存可加入叠氮钠(最后浓度为 0.1%)作为保存剂，该样品即为抗 MLP 抗血清。

 其次，对该抗血清的每种重组蛋白质进行蛋白质印迹反应分析。首先，
15 除了实施例 4 所述的小鼠 MLP-FLAG 融合蛋白外，又构建了各种表达载体质粒：小鼠 MLP 蛋白(无标记 FLAG)、人 MLP-FLAG 融合蛋白、人 MLP 蛋白(无标记 FLAG)、小鼠 MIA-FLAG 融合蛋白、小鼠 MIA 蛋白(无标记 FLAG)。构建方法同实施例 4 相同。即在 pCAN618FLAG 克隆部位的 EcoRI、SalI 位点上插入已用 PCR 预克隆的目的 DNA 片断。用于每个 PCR 反应的
20 成套引物 DNA 的碱基序列它们分别为：若小鼠 MLP 蛋白(无标记 FLAG)则为 SEQ ID NO: 27 和 32 所表示的碱基序列；若人 MLP-FLAG 融合蛋白则为 SEQ ID NO: 33 和 34 所表示的碱基序列；若人 MLP 蛋白(无标记 FLAG)则为 SEQ ID NO: 33 和 35 所表示的碱基序列；若小鼠 MIA-FLAG 融合蛋白则为 SEQ ID NO: 36 和 37 所表示的碱基序列；若小鼠 MIA 蛋白(无标记
25 FLAG)则为 SEQ ID NO: 36 和 38 所表示的碱基序列。小鼠 MLP 蛋白(无标记 FLAG)的模板 DNA 与实施例 4 一样采用 pDRL128vM，人 MLP-FLAG 融合蛋白和人 MLP 蛋白(无标记 FLAG)以实施例 1 中的 pDRL128vH 为模板，而小鼠 MIA-FLAG 融合蛋白和小鼠 MIA 蛋白(无标记 FLAG)采用的 cDNA 是通过小鼠黑素瘤细胞株 B16 制备而来。如此所得各种表达载体质粒向 COS7 细胞中
30 转染并依据实施例 4 的方法对收集得到各种培养物上清液使用抗 FLAG 抗体进行了蛋白质印迹分析。并且利用抗 MLP 抗血清进行

蛋白质印迹分析以该抗血清(稀释 1000 倍)作为第一抗体, 第二抗体采用西洋辣根过氧化酶标记的抗家兔 IgG 抗体(Amersham Pharmacia Biotech; 稀释 5000 倍), 除此之外, 均依据抗 FLAG 抗体蛋白质印迹法分析。

图 2 显示抗 FLAG 抗体蛋白质印迹法分析结果, 图 3 显示抗 MLP 抗血清蛋白质印迹法分析结果。抗 MLP 抗血清对抗原肽来源的蛋白质即小鼠 MLP 和人 MLP 均显示交叉性反应, 其反应性几乎不变。还有小鼠 MLP-FLAG 融合蛋白和人 MLP-FLAG 融合蛋白都参与了该抗血清反应, 进而对标记 FLAG 的也没有带来影响。另一方面, 关于小鼠 MIA-FLAG 融合蛋白和小鼠 MIA 蛋白(无标记 FLAG)完全没有检测出信号序列, 进而可知, 该抗血清对原分子 MLP 是特异的。

进一步, 用该抗血清依据公知方法对实施例 5 中的表达小鼠 MLP-FLAG 的 CHO 细胞株进行免疫染色其结果于图 4 所示。以免疫前使用家兔血清作为对照组, 在这个对照组中, 细胞均未被染色, 而使用该抗血清免疫时所有的细胞均被染色, 进而表明该抗血清同时参与未变性的 MLP 蛋白质反应。

实施例 7 MLP 蛋白质在软骨组织中的表达

利用实施例 6 中得到的抗 MLP 抗血清在软骨组织中检测到 MLP 蛋白质。所用检测材料是将小鼠(BALB/c)大腿股骨头软骨用液氮冷冻破碎, 再用 TRIS SDS β ME SAMPLE BUFFER(第一化学药品)抽提离心除去残渣而成。每个泳道相当于 1 只小鼠的材料, 将这部分的量用 SDS-PAGE(15-25%)电泳之后, 方法同实施例 6 一样, 进行抗 MLP 抗血清蛋白质印迹分析。分析结果表明, MLP 蛋白质同小鼠 MLP 重组蛋白质一样几乎在同一泳道位置上检测出了信号, 说明 MLP 蛋白质在软骨组织中进行了表达。

为了研究人 MLP 的 mRNA 在包括软骨组织的各种组织中进行表达, 使用实施例 1 中的编码人 MLP 前体蛋白质的 DNA 片断[α -³²P]dCTP (Amersham Pharmacia Biotech; 6000Ci/mmol)根据 Multiprime DNA labelling system(Amersham Pharmacia Biotech; RPN.1601Y)的方法制备探针, 用该探针(比活性为 1.3×10^{10} cpm/ μ g)进行 Human MTE™ Array(CLONTECH: #7775-1)杂交。所述杂交条件按照该阵列膜所附说明书的要求, 最后一次洗涤采用 55℃下, 0.1×SSC、0.1%SDS, 用 BAS-2000(富士胶片)进行检测。



从检测结果判断，在该阵列上得到的信号是与对照组人染色体DNA(100ng,500ng)一起仅有的黑质，为胎儿脑斑点，每个信号检测都处于界限附近，其表达水平在转录阶段中极低。因此，它预示 MLP 蛋白质在软骨组织中具有很强的特异性表达。

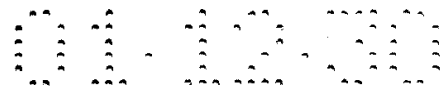
5

实施例 8 添加 MLP 重组蛋白质对体外软骨分化模型中的每个基因表达的影响效果

10 在所用实施例 3 中 ATDC5 细胞体外软骨分化模型中，评价了添加 MLP 重组蛋白质对每个基因表达影响的效果。所用 MLP 重组蛋白质是经下述方法纯化浓缩的样品，该方法与实施例 4 相同，用公知的方法从 COS7 细胞培养物上清液中通过使用抗 FLAG 抗体进行亲和柱色谱分析，所述 COS7 细胞已表达了小鼠 MLP-FLAG 融合蛋白。从该模型体系中设定的第一天起每隔 2 天将该蛋白质加入 ATDC5 细胞，培养 10 天后回收细胞，根据实施例 3 所述的 RT-PCR 方法研究每个基因的表达情况。其结果确证，在添加该蛋白质细胞群中，随着 Aggrecan、II 型胶原、X 型胶原等的分化其表达水平增加，每个标记基因的表达受到抑制。另外，对软骨分化起着抑制作用的 PTH/PTHr 受体表达来说，其变化没有明显的差异。由此可知，MLP 蛋白质在使用了 ATDC5 本模型体系中对软骨分化具有抑制作用。

20 实施例 9 对编码大鼠 MLP 前体蛋白质(rMLP)基因的分析

首先，按照下述 PCR 法获取编码部分 rMLP 的 DNA 片断。也就是说，制备一种 20 μ l 的混合液，该混合液不仅包含 4pml 的 SEQ ID NO: 21 所示的有义引物寡 DNA 和 4pml 的 SEQ ID NO: 22 所示的无义引物寡 DNA，而且，它们还含有 2 μ l 的 10 \times AdvantageTM 2 PCR 缓冲液(Clontech)、0.4 μ l 的 50 \times dNTP mix(Clontech)、0.4 μ l 的 50 \times Advantage 2 Polymerase Mix(Clontech)、以及 2 μ l 的来自 SD(IGS)大鼠垂体 cDNA 溶液作为模板 DNA，再使用热循环仪(GeneAmpTM PCR system model 9700 (Perkin-Elmer))循环 35 个周期，即先在 95 $^{\circ}$ C 下进行 1 分钟，然后在 95 $^{\circ}$ C 10 秒、54 $^{\circ}$ C 10 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分钟进行。进一步在 72 $^{\circ}$ C 延长 3 分钟反应，在这样一种程序中进行 PCR 反应。用 2.0%琼脂糖凝胶使最后反应液电泳，然后用 SYBRTM Green I nucleic acid gel stain (モレキュラープローブ) 染色，观察到一种染色带其对



应于通过 PCR 扩增形成的 DNA 其位置正好位于通过分子量标记换算之后的 300bp 附近。使用 QIA quick Gel Extraction Kit(Qiagen)回收该 DNA 片断，用 pCRTM2.1-Topo(In Vitrogen)克隆 TA，将该质粒导入大肠杆菌(*Escherichia coli*) Epicurian Coli XL10-GoldTM株(ストラタジーン)的感受态细胞以测定碱基序列。在含有氨苄青霉素 LB 琼脂培养基上出现的抗氨苄青霉素转换体菌落中，选择来自外源 DNA 片断插入的质粒克隆，再从同一克隆中制备该质粒 DNA pDRL128vR。以 pDRL128vR 为 DNA 模板，以市售的引物 DNA(Bca BEST Primer RV-P, 宝酒造)为序列引物，按照所附商品说明 ABI PRISMTM BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer) 的条件在热循环仪(GeneAmpTM PCR system model 9700(Perkin-Elmer)) 上测定插有 DNA 的碱基序列，然后用 DNA 测序仪 ABI PRISMTM 377(Perkin-Elmer)分析反应材料。

其结果，在 pDRL128vR 中不仅包含编码新型大鼠 MLP 前体蛋白质的一部分的 DNA 片断，该 DNA 片断为 SEQ ID NO: 40 所示 261 个碱基对构成，其中所述一部分蛋白质由 SEQ ID NO: 39 所示的 87 个氨基酸组成；而且还包含由 SEQ ID NO: 41 所示 307 个碱基对的 DNA 片断。

接着，关于编码该蛋白质的基因，通过所述碱基序列进一步进行 genome walking 以研究 5' 上游区和 3' 下游区的构造。用 Rat Genome WalkerTM Kit(Clontech)作为被检材料，其操作方法遵循该试剂盒所附说明书，但是其中用于 PCR 反应的酶要使用 TaKaRa Ex TaqTM(宝酒造)。首先分别进行 gene specific primer 的化学合成，它包括相当于 SEQ ID NO: 40 所示碱基序列一部分的 2 种寡 DNA(rMLPGWF1(SEQ ID NO: 42)、rMLPGWF2(SEQ ID NO: 43))和与该序列一部分 DNA 互补的 2 种寡 DNA (rMLPGWR1(SEQ ID NO: 44)、rMLPGWR2(SEQ ID NO: 45))。为了获得 3' 下游区 DNA，在 1st PCR 反应中先使用 rMLPGWF1，然后在 nested PCR 反应中使用 rMLPGWF2，同样为了获得 5' 上游区 DNA，在 1st PCR 反应中先使用 rMLPGWR1，然后在 nested PCR 反应中使用 rMLPGWR 2。就这些反应所得各种扩增的 DNA 片断来说，起点部位为所述引物序列，并在比较编码人和小鼠 MLP 前体蛋白的 cDNA 碱基序列的同源性的同时分析各自的碱基序列。结果表明，从判断的基因组一级构造上来看，大鼠 MLP 前体蛋白质为由 SEQ ID NO: 47 所示的 128 个氨基酸残基组成的蛋白质，所述蛋白质是

由 SEQ ID NO: 46 所示 384 个碱基 DNA 编码的。大鼠 MLP 前体蛋白质与人 MLP 前体蛋白质以及小鼠 MLP 前体蛋白质它们在氨基酸水平上的同源性各自为 84.3%、96.0%。然而大鼠 MIA 前体蛋白质与大鼠 MLP 前体蛋白质之间的同源性仅为 26.5%。故此，大鼠 MLP 为由 SEQ ID NO: 49 所示的
 5 110 个氨基酸残基组成的蛋白质，其中所述蛋白质是由 SEQ ID NO: 48 所示 330 个碱基 DNA 编码形成的，并且在大鼠 MLP 前体蛋白质中与 SEQ ID NO: 50 所示小鼠 MLP 相同并经过 18 个氨基酸残基组成的信号肽而生成。

将具有编码本实施例中的大鼠 MLP 前体蛋白质的一部分之 DNA 的质粒 pDRL128vR 导入大肠杆菌(*Escherichia coli*) XL10-Gold 中，从而获得大
 10 肠杆菌转化体(*Escherichia coli*) XL10-Gold/pDRL128vR。

产业上的利用性

本发明多肽以及编码该多肽的 DNA 可用作治疗、预防和诊断骨疾病
 15 或关节疾病以及有病的血管新生等。本发明多肽又可作为试剂有效筛选能够促进或抑制本发明多肽活性的化合物或其盐。本发明多肽的抗体能进一步特异地识别本发明的多肽，因此它可用于检测、定量和中和待测溶液中的本发明多肽等。

通过使用本发明启动子还可在非人温血动物软骨组织中使蛋白质(任意
 20 有用基因产物等)处于最(优选特异性)大量的表达，因此可为基因治疗做出贡献。

序列表

<110> 武田药品工业株式会社 (Takeda Chemical Industries, Ltd.)

<120> 新型多肽及其 DNA

<130> 2622W00P

<150>1999-06-30

<151>JP 11-186718

<160> 48

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

cgcagaagaa gtcaatatcc gtggtg

26

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

cagcgtgtgt accaggaagc taccaa

26

<210> 4

<211> 384

<212> DNA

<213> 人

<400> 4

atggcaagaa tattgttact tttcctcccg ggtcttgtgg ctgtatgtgc tgtgcatgga 60

atatttatgg accgtctagc ttccaagaag ctctgtgcag atgatgagtg tgtctatact 120

atttctctgg ctagtgtca agaagattat aatgccccgg actgtagatt cattaacgtt 180
 aaaaaagggc agcagatcta tgtgtactca aagctggtaa aagaaaatgg agctggagaa 240
 ttttgggctg gcagtgttta tggatgatggc caggacgaga tgggagtcgt gggttatttc 300
 cccaggaact tggtaagga acagcgtgtg taccaggaag ctaccaagga agttcccacc 360
 acggatattg acttctctctg cgag 384

<210> 5
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 5
 Met Ala Arg Ile Leu Leu Leu Phe Leu Pro Gly Leu Val Ala Val Cys
 1 5 10 15
 Ala Val
 18

<210> 6
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 6
 Met Ala Arg Ile Leu Leu Leu Phe Leu Pro Gly Leu Val Ala Val Cys
 1 5 10 15
 Ala Val His Gly Ile Phe Met Asp Arg Leu Ala Ser Lys Lys Leu Cys
 20 25 30
 Ala Asp Asp Glu Cys Val Tyr Thr Ile Ser Leu Ala Ser Ala Gln Glu
 35 40 45
 Asp Tyr Asn Ala Pro Asp Cys Arg Phe Ile Asn Val Lys Lys Gly Gln
 50 55 60
 Gln Ile Tyr Val Tyr Ser Lys Leu Val Lys Glu Asn Gly Ala Gly Glu
 65 70 75 80
 Phe Trp Ala Gly Ser Val Tyr Gly Asp Gly Gln Asp Glu Met Gly Val
 85 90 95
 Val Gly Tyr Phe Pro Arg Asn Leu Val Lys Glu Gln Arg Val Tyr Gln
 100 105 110
 Glu Ala Thr Lys Glu Val Pro Thr Thr Asp Ile Asp Phe Phe Cys Glu
 115 120 125 128

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 7

cacacagcac gtagtcgcag ttgg

24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 8

aacttggtga aggagcagcg tgta

24

<210> 10

<211> 384

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 10

atggcaagga tattgattct tttgcttggg ggccttgtgg ttctatgtgc cgggcatggt	60
gtatttatgg ataaactttc ttctaagaag ttgtgtgcgg atgaggagtg tgtctatact	120
atttctctgg caagagcaca ggaagattac aatgccccag actgtaggtt catcgaatgc	180
aagaaagggc agcagatcta tgtttactcc aagctggtaa cagaaaacgg agctggagag	240
ttttgggctg gcagtgttta tggtgaccac caggatgaga tgggaattgt aggttatctc	300
cccagcaact tggatgaagga gcagcgtgta taccaggagg ccaccaagga gatcccaacc	360
acggatattg acttctctg tgaa	384

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 11

Met Ala Arg Ile Leu Ile Leu Leu Leu Gly Gly Leu Val Val Leu Cys

1 5 10 15

Ala Gly

18

<210> 12

<211> 128
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 12

```

Met Ala Arg Ile Leu Ile Leu Leu Leu Gly Gly Leu Val Val Leu Cys
  1           5           10           15
Ala Gly His Gly Val Phe Met Asp Lys Leu Ser Ser Lys Lys Leu Cys
           20           25           30
Ala Asp Glu Glu Cys Val Tyr Thr Ile Ser Leu Ala Arg Ala Gln Glu
           35           40           45
Asp Tyr Asn Ala Pro Asp Cys Arg Phe Ile Asp Val Lys Lys Gly Gln
           50           55           60
Gln Ile Tyr Val Tyr Ser Lys Leu Val Thr Glu Asn Gly Ala Gly Glu
           65           70           75           80
Phe Trp Ala Gly Ser Val Tyr Gly Asp His Gln Asp Glu Met Gly Ile
           85           90           95
Val Gly Tyr Phe Pro Ser Asn Leu Val Lys Glu Gln Arg Val Tyr Gln
           100          105          110
Glu Ala Thr Lys Glu Ile Pro Thr Thr Asp Ile Asp Phe Phe Cys Glu
           115          120          125          128

```

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

<220>
 <223>

<400> 13

accacagtcc atgcatcac

20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223>

<400> 14

tccaccaccc tgttgctgta

20

- <210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223>
- <400> 15
ctaccgctg cgccatcat caga 24
- <210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223>
- <400> 16
gggaggccgg tttggtggg gtaga 25
- <210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223>
- <400> 17
cacactggta agtggggcaa gaccg 25
- <210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223>
- <400> 18
ggattgtgtt gtttcagggt tcggg 25

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223>

<400> 19
 accccctggc ccctctgga 20

<210> 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223>

<400> 20
 atctcacctt tagcccctgg aatg 24

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223>

<400> 21
 gccgggcatg gtgtatttat 20

<210> 22
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223>

<400> 22
 gatctccttg gtggcctcct ggtat 25

<210> 23
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 23

```

catggaatat ttatggaccg tctagcttcc aagaagctct gtgcagatga tgagtgtgtc 60
tatactatatt ctctggctag tgctcaagaa gattataatg ccccggactg tagattcatt 120
aacgttaaaa aagggcagca gatctatgtg tactcaaagc tggtaaaaga aaatggagct 180
ggagaatattt gggctggcag tgtttatggt gatggccagg acgagatggg agtcgtgggt 240
tatttcccca ggaacttggt caaggaacag cgtgtgtacc aggaagctac caaggaagtt 300
cccaccacgg atattgactt cttctgcgag                                     330

```

<210> 24
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 24

```

His Gly Ile Phe Met Asp Arg Leu Ala Ser Lys Lys Leu Cys Ala Asp
          5                10                15
Asp Glu Cys Val Tyr Thr Ile Ser Leu Ala Ser Ala Gln Glu Asp Tyr
          20                25                30
Asn Ala Pro Asp Cys Arg Phe Ile Asn Val Lys Lys Gly Gln Gln Ile
          35                40                45
Tyr Val Tyr Ser Lys Leu Val Lys Glu Asn Gly Ala Gly Glu Phe Trp
          50                55                60
Ala Gly Ser Val Tyr Gly Asp Gly Gln Asp Glu Met Gly Val Val Gly
          65                70                75                80
Tyr Phe Pro Arg Asn Leu Val Lys Glu Gln Arg Val Tyr Gln Glu Ala
          85                90                95
Thr Lys Glu Val Pro Thr Thr Asp Ile Asp Phe Phe Cys Glu
          100                105                110

```

<210> 25
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 25

```

catggtgtat ttatggataa actttcttct aagaagttgt gtgcggatga ggagtgtgtc 60
tatactatatt ctctggcaag agcacaggaa gattacaatg ccccagactg taggttcatt 120
gatgtcaaga aagggcagca gatctatggt tactccaagc tggtaacaga aaacggagct 180
ggagagttttt gggctggcag tgtttatggt gaccaccagg atgagatggg aattgtaggt 240

```

tatttcccca gcaacttggt gaaggagcag cgtgtatacc aggaggccac caaggagatc 300
 ccaaccacgg atattgactt cttctgtgaa 330

- <210> 26
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> 小鼠

<400> 26
 His Gly Val Phe Met Asp Lys Leu Ser Ser Lys Lys Leu Cys Ala Asp
 5 10 15
 Glu Glu Cys Val Tyr Thr Ile Ser Leu Ala Arg Ala Gln Glu Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Ala Pro Asp Cys Arg Phe Ile Asp Val Lys Lys Gly Gln Gln Ile
 35 40 45
 Tyr Val Tyr Ser Lys Leu Val Thr Glu Asn Gly Ala Gly Glu Phe Trp
 50 55 60
 Ala Gly Ser Val Tyr Gly Asp His Gln Asp Glu Met Gly Ile Val Gly
 65 70 75 80
 Tyr Phe Pro Ser Asn Leu Val Lys Glu Gln Arg Val Tyr Gln Glu Ala
 85 90 95
 Thr Lys Glu Ile Pro Thr Thr Asp Ile Asp Phe Phe Cys Glu
 100 105 110

- <210> 27
- <211> 40
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223>

<400> 27
 cgaattccca ccatggcaag gatattgatt cttttgcttg 40

- <210> 28
- <211> 40
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223>

<400> 28

gtacagtcga cttcacagaa gaagtcata tccgtggtg

40

<210> 29

<211> 923

<212> DNA

<213> 人

<400> 29

gtcagagttc	aagttaaac	agaaaaaagg	aagatggcaa	gaatattggt	acttttcctc	60
ccgggtcttg	tggctgtatg	tgctgtgcat	ggaatattta	tggaccgtct	agcttccaag	120
aagctctgtg	cagatgatga	gtgtgtctat	actatttctc	tggctagtgc	tcaagaagat	180
tataatgcc	cggactgtag	attcattaac	gttaaaaaag	ggcagcagat	ctatgtgtac	240
tcaaagctgg	taaaagaaaa	tggagctgga	gaattttggg	ctggcagtg	ttatgggtgat	300
ggccaggacg	agatgggagt	cgtgggttat	ttccccagga	acttgggtcaa	ggaacagcgt	360
gtgtaccagg	aagctaccaa	ggaagtccc	accacggata	ttgacttctt	ctgagagtaa	420
taaattagtt	aaaactgcaa	atagaaagaa	aacaccaaaa	ataaagaaaa	gagcaaaagt	480
ggccaaaaaa	tgcattgtctg	taattttgga	ctgacgtttt	aagaatttgt	taccttacag	540
aagagcaagg	gcttaggggt	tggaggtggc	agataaaaga	ggattttcaa	ctcaaatctt	600
gtttcctgct	ggcctggtct	gcccacgagc	tagagcgggg	aaatgttgag	ctcaaatggg	660
taaattgaga	ccagaaaatt	atTTTTTcaa	cctagagaat	ctcctcttac	aggggatg	720
atataacaga	tcatgtatgt	gtagttattt	ctaagtagta	attcttccca	gctctttgat	780
ttgccatata	taaaataggt	gggtcgtatg	tcttcccttt	agacatgatg	tttctactc	840
attgtctctc	ctggccaatt	gaattattaa	taaaaggtct	gtattatcaa	agaaaaaaa	900
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaa				923

<210> 30

<211> 947

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 30

aagaaggaag	atggcaagga	tattgattct	tttgcttggg	ggccttgtgg	ttctatgtgc	60
cgggcatggt	gtatttatgg	ataaactttc	ttctaagaag	ttgtgtgcgg	atgaggagtg	120
tgtctatact	atTTTctctg	caagagcaca	ggaagattac	aatgccccag	actgtaggtt	180
catcgatgtc	aagaaagggc	agcagatcta	tgtttactcc	aagctggtaa	cagaaaacgg	240
agctggagag	ttttgggctg	gcagtgttta	tggtgaccac	caggatgaga	tgggaattgt	300
aggttatttc	cccagcaact	tgggtgaagga	gcagcgtgta	taccaggagg	ccaccaagga	360
gatcccaacc	acggatattg	acttcttctg	tgaataagaa	attaattaaa	acagcagata	420
aacagaaac	accagtgatg	aagaagagaa	gaagtggaaa	taactgaacc	tgtgtatccg	480
taccttctctg	gctttatttg	gtggcaggag	gttggagctt	gaaggtgcta	agatatggaa	540
attgtcaact	cagtcttgtt	tactcttgcc	ccggtctttc	caccaactgc	gactaagtgc	600
tgtgtgaatc	atataggtca	tttataacc	aatacttagc	tttcagcgag	gagaatcttt	660
atttactcag	tgatgaacat	ataaggtgtt	ttatctgtag	ttatttctaa	atggtcattc	720
tccccagctc	tgactccatg	tccttaagct	tgctgagtta	gaagtctgac	ttttgggtgt	780

gttttctgtt attgtctct ctggatcatgt gaagtcttaa taatgtattt gtcataataa 840
 cttcctattg ttacttttta tatctgatgc ccttggatag aagaatgta ggtataaaac 900
 aagtttttgt actcccaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 947

<210> 31
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 31
 Val Lys Glu Gln Arg Val Tyr Gln Glu Ala Thr Lys Glu Ile Pro Thr
 5 10 15
 Thr Asp Ile Asp Cys
 20

<210> 32
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223>

<400> 32
 gtacagtcga cttattcaca gaagaagtca atatccgtgg t 41

<210> 33
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223>

<400> 33
 cgaattccca ccattggcaag aatattgtta cttttcctc 39

<210> 34
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223>

- <400> 34
gtacagtcga cctcgcagaa gaagtcaata tccgtggt 38
- <210> 35
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223>
- <400> 35
gtacagtcga ctactcgca gaagaagtca atatccgtgg t 41
- <210> 36
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223>
- <400> 36
cgaattccca ccatggtgtg gtccccagtg etcctt 36
- <210> 37
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223>
- <400> 37
gtacagtcga cctggcagta gaaatcccat tgatcggg 38
- <210> 38
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223>

ggagctgggg cattctgggc tggcagtgtt tatggtgacc accaggatga gatgggaatt 240
gtgggttatt tccccagcaa cttgggttaga gagcaacgag tataccagga gggccaccaa 300
ggagatc 307

<210> 42
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 42
caccaggatg agatgggaat tgtgggttat

<210> 43
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 43
gggttatttc cccagcaact tggtagaga

<210> 44
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 44
agacacactc ctcatctgca cacaacttc

<210> 45
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 45

ctcctcatct gcacacaact tcttagaaga

<210> 46

<211> 384

<212> DNA

<213> 大鼠

<400> 46

atggcaagaa tattgattct ttgcttggg ggccttgtgg ctctctgtgc cgggcatggc 60
 atgtttatgg ataaactttc ttctaagaag ttgtgtgcag atgaggagtg tgtctataacc 120
 atttctctgg caagagcaca ggaagactac aatgccccgg actgtaggtt catcaatgtc 180
 aagaaagggc agcagatcta tgtttattcc aagctggtaa cagaaaatgg agctggggca 240
 ttctgggctg gcagtgttta tggtgaccac caggatgaga tgggaattgt gggttatttc 300
 cccagcaact tggttagaga gcaacgagtg taccaggagg ccaccaagga gattccaacc 360
 acggatattg acttcttctg tgaag 384

<210> 47

<211> 128

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 47

Met Ala Arg Ile Leu Ile Leu Leu Leu Gly Gly Leu Val Ala Leu Cys
 5 10 15
 Ala Gly His Gly Met Phe Met Asp Lys Leu Ser Ser Lys Lys Leu Cys
 20 25 30
 Ala Asp Glu Glu Cys Val Tyr Thr Ile Ser Leu Ala Arg Ala Gln Glu
 35 40 45
 Asp Tyr Asn Ala Pro Asp Cys Arg Phe Ile Asn Val Lys Lys Gly Gln
 50 55 60
 Gln Ile Tyr Val Tyr Ser Lys Leu Val Thr Glu Asn Gly Ala Gly Ala
 65 70 75 80
 Phe Trp Ala Gly Ser Val Tyr Gly Asp His Gln Asp Glu Met Gly Ile
 85 90 95
 Val Gly Tyr Phe Pro Ser Asn Leu Val Arg Glu Gln Arg Val Tyr Gln
 100 105 110
 Glu Ala Thr Lys Glu Ile Pro Thr Thr Asp Ile Asp Phe Phe Cys Glu
 115 120 125

<210> 48

<211> 330

<212> DNA

<213> 大鼠

<400> 48

```

catggcatgt ttatggataa actttcttct aagaagttgt gtgcagatga ggagtgtgtc 60
tataccattt ctctggcaag agcacaggaa gactacaatg ccccggactg taggttcac 120
aatgtcaaga aagggcagca gatctatgtt tattccaagc tggtaacaga aaatggagct 180
ggggcattct gggctggcag tgtttatggt gaccaccagg atgagatggg aattgtgggt 240
tatttcccca gcaacttggg tagagagcaa cgagtgtacc aggaggccac caaggagatt 300
ccaaccacgg atattgactt cttctgtgaa 330
    
```

<210> 49

<211> 110

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 49

```

His Gly Met Phe Met Asp Lys Leu Ser Ser Lys Lys Leu Cys Ala Asp
          5                10                15
Glu Glu Cys Val Tyr Thr Ile Ser Leu Ala Arg Ala Gln Glu Asp Tyr
          20                25                30
Asn Ala Pro Asp Cys Arg Phe Ile Asn Val Lys Lys Gly Gln Gln Ile
          35                40                45
Tyr Val Tyr Ser Lys Leu Val Thr Glu Asn Gly Ala Gly Ala Phe Trp
          50                55                60
Ala Gly Ser Val Tyr Gly Asp His Gln Asp Glu Met Gly Ile Val Gly
          65                70                75                80
Tyr Phe Pro Ser Asn Leu Val Arg Glu Gln Arg Val Tyr Gln Glu Ala
          85                90                95
Thr Lys Glu Ile Pro Thr Thr Asp Ile Asp Phe Phe Cys Glu
          100                105                110
    
```

<210> 50

<211> 18

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 50

```

Met Ala Arg Ile Leu Ile Leu Leu Leu Gly Gly Leu Val Ala Leu Cys
          5                10                15
Ala Gly
          18
    
```

说 明 书 附 图

hMLP	M A R I L L L F L P G L V A V C A V H G I F - - - -	M D R L A S S K K L C A D D E C V Y T	40
mMLP	M A R I L L L L G G L V L C A G H G V F - - - -	M D K L S S K L C A D E E C C V Y T	40
hMIA	M A R S L V - C L L G V I L L S A F S G P G V R G - - - -	M P K L A D R K L C A D Q E C S H P	44
mMIA	M V W S P V - L L G G I V V L - S V F S G P S R A D R A M P K L A D R K L C A D E E C S H P	M P K L A D R K L C A D E E C S H P	43
hMIA	M V C S P V - L L G G I V V L - S V F S G L S R A D R A M P K L A D R K L C A D E E C S H P	M P K L A D R K L C A D E E C S H P	43
bMIA	M A W S L V - F L L G V - L L S A F P G P S A G G R P M P K L A D R K L C A D E E C S H P	M P K L A D R K L C A D E E C S H P	43
hMLP	I S L A S A Q E D Y N A P D C R F I N V K K G Q Q I Y V Y S S K L V K E N G A G E - F W A G	I S L A S A Q E D Y N A P D C R F I N V K K G Q Q I Y V Y S S K L V K E N G A G E - F W A G	84
mMLP	I S L A R A Q E D Y N A P D C R F I D V K K G Q Q I Y V Y S S K L V T - - - -	I S L A R A Q E D Y N A P D C R F I D V K K G Q Q I Y V Y S S K L V T - - - -	84
hMIA	I S M A V A L Q D D Y M A P D C R F L T I H R G Q V V Y F S S K L - - - -	I S M A V A L Q D D Y M A P D C R F L T I H R G Q V V Y F S S K L - - - -	86
mMIA	I S M A V A L Q D D Y V A P D C R F L T I Y Y R G Q V V Y F S S K L - - - -	I S M A V A L Q D D Y V A P D C R F L T I Y Y R G Q V V Y F S S K L - - - -	85
hMIA	I S M A V A L Q D D Y V A P D C R F L T I Y Y R G Q V V Y F S S K L - - - -	I S M A V A L Q D D Y V A P D C R F L T I Y Y R G Q V V Y F S S K L - - - -	85
bMIA	I S V A V A L Q D D Y V A P D C R F L T I H Q G Q V V Y I F S S K L - - - -	I S V A V A L Q D D Y V A P D C R F L T I H Q G Q V V Y I F S S K L - - - -	85
hMLP	S V Y G D G Q D E M G V - V G Y F P R N L V K E Q R V Y Q E A T K R E V P T T D I D P F C E	S V Y G D G Q D E M G V - V G Y F P R N L V K E Q R V Y Q E A T K R E V P T T D I D P F C E	128
mMLP	S V Y G D H Q D E M G I - V G Y F P S N L V K E Q R V Y Q E A T K E I P T T D I D F F C B	S V Y G D H Q D E M G I - V G Y F P S N L V K E Q R V Y Q E A T K E I P T T D I D F F C B	128
hMIA	S V Q G D Y Y G D L A A R L G Y P P S S I V R E D L T L K P G K V D V K T D D K W D F Y C Q	S V Q G D Y Y G D L A A R L G Y P P S S I V R E D L T L K P G K V D V K T D D K W D F Y C Q	131
mMIA	S V Q G D Y Y G D L A A R L G Y P P S S I V R E D L T L K P G K I D M K T D D Q W D F Y C Q	S V Q G D Y Y G D L A A R L G Y P P S S I V R E D L T L K P G K I D M K T D D Q W D F Y C Q	130
hMIA	S V Q G D Y Y G D L A A H L G Y P P S S I V R E D L T L K P G K V D M K T D D Q W D F Y C Q	S V Q G D Y Y G D L A A H L G Y P P S S I V R E D L T L K P G K V D M K T D D Q W D F Y C Q	130
bMIA	S V Q G D Y Y G D G A A R L G Y P P S S I V R E D Q T L K P A K T D V K T D I W D F Y C Q	S V Q G D Y Y G D G A A R L G Y P P S S I V R E D Q T L K P A K T D V K T D I W D F Y C Q	130

图 1

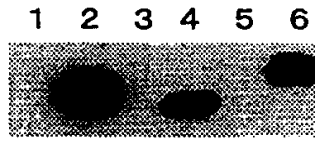


图 2

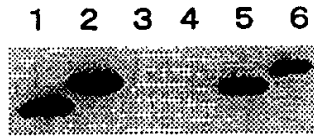
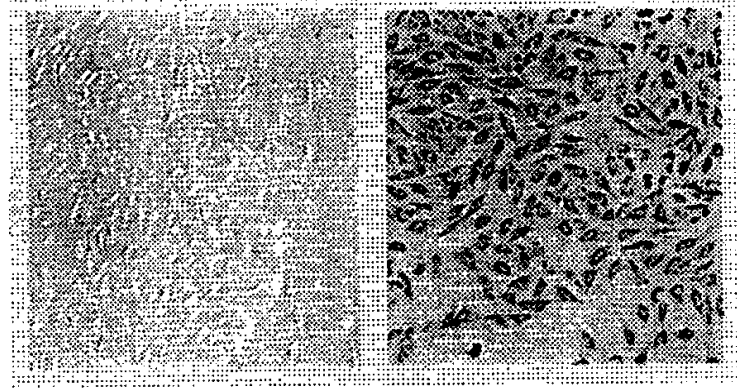


图 3



免疫前

抗 MLP 抗血清

图 4