

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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

G01N 33/68

C12N 15/10 G06F 19/00

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01802673.7

[43] 公开日 2003 年 1 月 1 日

[11] 公开号 CN 1388898A

[22] 申请日 2001.8.31 [21] 申请号 01802673.7

[30] 优先权

[32]2000.9.4 [33]DE [31]10043470.3

[86] 国际申请 PCT/EP01/10075 2001.8.31

[87] 国际公布 WO02/21137 德 2002.3.14

[85] 进入国家阶段日期 2002.5.8

[71] 申请人 马尔泰克多表位配体技术有限公司

地址 德国马格德堡

[72] 发明人 瓦尔特·舒伯特

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 1 页 说明书 3 页

[54] 发明名称 识别细胞特异性蛋白的方法

[57] 摘要

本发明涉及识别细胞特异性蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:(a)确定 n 个细胞的细胞特异性蛋白组合模式 (protein combination pattern); (b) 比较一种细胞类型的健康和病理或生理修饰细胞的蛋白组合模式,或比较具有相同临床特征的不同细胞类型的细胞的蛋白组合模式;(c1) 扣除在步骤(b)中比较的一种细胞类型的健康和病理或生理修饰细胞的蛋白组合模式的一致部分,并确定从其获得的细胞特异性蛋白;或(c2) 扣除在步骤(b)中比较的具有相同临床特征的不同细胞类型的细胞的蛋白组合模式的不一致部分,并确定从其获得的细胞特异性蛋白;(d) 从分子和立体结构角度识别所得的细胞特异性蛋白。

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

1. 识别细胞特异性蛋白的方法，所述方法包括以下步骤：
  - (a) 确定  $n$  个细胞的细胞特异性蛋白组合模式；
  - (b) 比较一种细胞类型的健康和病理或生理修饰细胞的蛋白组合模式，或比较具有相同临床特征的不同细胞类型的细胞的蛋白组合模式；
    - (c1) 扣除在步骤(b)中比较的一种细胞类型的健康和病理或生理修饰细胞的蛋白组合模式的一致部分，并确定从其获得的细胞特异性蛋白；或
    - (c2) 扣除在步骤(b)中比较的具有相同临床特征的不同细胞类型的细胞的蛋白组合模式的不一致部分，并确定从其获得的细胞特异性蛋白；以及
  - (d) 从分子和立体结构角度识别所得的细胞特异性蛋白。
2. 权利要求 1 的方法，其特征在于，所述方法包括选择抑制所识别的细胞特异性蛋白的活性的物质。
3. 权利要求 2 的方法，其特征在于，所述物质是抗体。
4. 前述权利要求之一的方法，其特征在于，病理修饰细胞为侵袭性的。

## 识别细胞特异性蛋白的方法

本发明涉及识别细胞特异性蛋白的方法。

细胞与细胞间的相互作用可能在器官内产生数不清的效应，识别细胞特异性蛋白组合模式(protein combination pattern)对于阐明细胞与细胞间的相互作用而言是关键因素。尤其是对有关疾病特异性靶结构的知识，对于开发有效并仅伴随极少副作用的药物是决定必要条件。

已知免疫细胞(淋巴细胞)将表达特异性蛋白组合——也称为蛋白组合模式或(缩写为)PCP，它负责与脑和肌肉组织中的血管内皮细胞结合。相比而言，其它蛋白结合不引起与这些内皮细胞的这种结合。令人吃惊的是，这些特异性结合在个体间是恒定的，总是显示相同的结合功能。因此，对于器官特异性内皮表面细胞而言，特异性蛋白组合模式似乎是细胞表面的个体间恒定的淋巴细胞结合密码，其构成细胞特异性靶结构。因此，细胞特异性靶结构可能包括非常特异性的蛋白组合模式。

侵袭性肿瘤细胞在其细胞表面还显示导致特异性，即器官选择性侵袭行为的特异性蛋白组合模式。因此，这种蛋白组合模式构成潜在药物的靶结构。

但是，开发这样高选择性药物的绝对必要条件是对这些靶结构分子组成的知识。

识别靶结构的方法在已有技术中是已知的，其基于与健康组织或细胞的基因表达谱相比的对疾病组织或细胞的基因表达谱的分析，蛋白表达谱和信使 RNA (mRNA)表达谱提供疾病组织或细胞中的新蛋白、失调或异常修饰蛋白的外观信息(例如，在 F. Lottspeich/H. Zorbas; Bioanalytik; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, 1998 中)。

但是，这些方法都使用通常由成千上万的细胞产生的细胞匀浆，因为只有如此大量的细胞才使上述类型的表达谱得以建立。包含在细胞匀浆中的细胞已经被溶解以允许通过生化方法提取和分离蛋白或 mRNA 分子。

但是，这些已有技术方法的缺点是，它们不适于识别蛋白组合模式，因为这种蛋白组合模式的单个蛋白成份将会被细胞匀浆的产生和其后的提取过程完全分离，与它们的细胞和组织拓扑位置相关的基本信息将会丢失。而且，由于细胞小室的破坏，不能再获得有关这些细胞小室内的蛋白组合以及它们彼此间的相对拓扑关系的信息。

另外，已有技术方法的另一缺点是，在个体水平不能作任何分析，使得就各细胞的蛋白组合模式而言，不可能检测各细胞间的区别。这些缺点被 DE 197 09 348 C2 和 DE 100 01 685 A1 中公开的方法克服，所述方法用于确定、识别和绘图细胞特异性的靶结构。这些方法可以用于比较性地检测单个细胞的蛋白组合模式或不同细胞或组织样品的细胞膜的蛋白组合模式。这样做可以识别标记分子，所述标记分子结合于例如某种蛋白组合模式或结合于来源于第一组织或细胞样品的第一目标(object)的蛋白组合模式的某一区域，同时所述标记分子不结合于来源于第二组织或细胞样品的第二目标。通过这些所识别的标记分子，使用第一组织和/或细胞样品的样品部分，现在可以定位和/或选择并随后表征这些蛋白组合模式的被所识别的标记分子结合的分子区域(分子或分子复合物)。这将允许检测并了解蛋白组合模式的分子组成，以及所述蛋白组合模式内的分子排列及组织或细胞内蛋白组合模式的排列。

但是，这样得到的细胞特异性蛋白组合模式仍将是高度复杂的，这显然将阻碍高选择性药物的开发。

因此，本发明的目的是进一步改善及提供上述类型的方法，所述方法将进一步加工(process)所识别的且高度复杂的蛋白组合模式，从而促进高选择性药物的开发。

该目的通过本发明的用于识别细胞特异性蛋白的方法实现，所述方法包括以下步骤：(a) 确定  $n$  个细胞的细胞特异性蛋白组合模式；(b) 比较一种细胞类型的健康和病理或生理修饰细胞的蛋白组合模式，或比较具有相同临床特征的不同细胞类型的细胞的蛋白组合模式；(c1) 扣除在步骤(b)中比较的一种细胞类型的健康和病理或生理修饰细胞的蛋白组合模式的一致部分，并确定从其获得的细胞特异性蛋白；或 (c2) 扣除在步骤(b)中比较的具有相同临床特征的不同细胞类型的细胞的蛋白组合模式的不一致部分，并确定从其获得的细胞特异性蛋白；(d) 从分子和立体结构角度识别所得的细胞特异性蛋白。

将这样确定的高度复杂的蛋白组合模式还原为简单的高选择性和细胞特异性的蛋白显然将促进同样高选择性药物的开发，同时显著缩短这种开发所需的时间。这样，在药物开发中将不再需要研究高度复杂而又细胞特征性的蛋白组合模式。

本发明只需要选择用于抑制所识别的细胞特异性蛋白的活性的物质。这种抑制将导致细胞特异性蛋白网络萎陷，因此导致细胞功能受损。例如，对肿瘤细胞的细胞特异性蛋白的切断将抑制这些细胞的迁移，因为在这一过程中所识别的蛋白控制并调节肿瘤细胞的迁移行为。在该例中的抑制物质可以是抗体。

如果病理修饰细胞是侵袭型的，将获得本发明方法的特别的优点。

另外，对蛋白组合模式内的这些，例如疾病特异性蛋白的知识将允许高特异性药物的开发，所述药物将由于该高特异性而几乎没有不期望的副作用。

根据本发明要加工的细胞特异性蛋白组合模式将通过 DE 197 09 348 C2 和 DE 100 01 685 A1 中公开的方法确定，所述方法用于确定、识别和绘图细胞特异性靶结构。