



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1953988 B

(45) 授权公告日 2013.02.13

(21) 申请号 200580015689.4

C07K 14/47(2006.01)

(22) 申请日 2005.03.18

C07K 14/435(2006.01)

C07K 16/00(2006.01)

(30) 优先权数据

04290754.3 2004.03.19 EP

(56) 对比文件

EP 1216707 A1, 2002.06.26, 全文.

WO 9837100 A2, 1998.08.27, 全文.

Beate Firla et al. Extracellular cysteines define ectopeptidase (APN, CD13) expression and function.

Free Radical Biology & Medicine 32 7. 2002, 32(7), 584-595.

Dickinson DP, Thiesse M. cDNA cloning of an abundant human lacrimal gland mRNA encoding a novel tear protein. Current Rye Resarch 15 4. 1996, 15(4), 377-386.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.11.16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2005/000700 2005.03.18

(87) PCT申请的公布数据

W02005/090386 EN 2005.09.29

审查员 潘浩

(73) 专利权人 巴斯德研究院

地址 法国巴黎

(72) 发明人 卡特琳·鲁若

让-弗朗索瓦·休奥米

马里-诺埃勒·尤恩格霍尔

安妮·维内尔 埃弗利娜·杜富尔

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

(51) Int. Cl.

C07K 7/06(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 27 页

序列表 3 页 附图 12 页

(54) 发明名称

衍生自人 BPLP 蛋白的肽、编码所述肽的多核苷酸和针对所述肽的抗体

(57) 摘要

本发明涉及一种肽,所述肽是碱性富脯氨酸泪液蛋白(BPLP)的成熟产物或所述成熟产物的肽衍生物或模拟物,其中所述肽或其肽衍生物或模拟物表现出对金属外肽酶(特别是NEP和/或APN)的抑制性能。本发明也涉及编码所述肽的多核苷酸以及涉及针对所述肽的抗体。此外,本发明涉及人BPLP蛋白及其所衍生的抑制肽、编码人BPLP蛋白或其所衍生的肽的多核苷酸以及针对BPLP蛋白或其所衍生的肽的抗体的诊断性及治疗性的用途。

1. 一种肽,其是碱性富脯氨酸泪液蛋白(BPLP)的成熟产物或所述成熟产物的肽衍生物,其中:(i)所述成熟产物由序列 QRFSR 组成;并且(ii)所述肽衍生物由序列 YQRFSR 组成。
2. 权利要求 1 的肽,其中所述由序列 QRFSR 组成的成熟产物表现出对 NEP 和 / 或 APN 的抑制性能。
3. 权利要求 1 的肽,其中所述由序列 YQRFSR 组成的肽衍生物表现出对 NEP 的抑制性能。
4. 编码权利要求 1 到 3 中任一项所定义的肽的核酸。
5. 用于克隆和 / 或表达的载体,所述载体包括权利要求 4 的核酸。
6. 包括权利要求 4 的核酸或权利要求 5 的载体的宿主细胞。
7. 一种用于抑制 NEP 和 / 或 APN 的药物组合物,其包括权利要求 1 中的 (i) 或权利要求 2 所定义的肽,以及药用可接受的载体。
8. 一种用于抑制 NEP 的药物组合物,其包括权利要求 1 中的 (ii) 或权利要求 3 所定义的肽,以及药用可接受的载体。
9. 一种用于抑制 NEP 和 / 或 APN 的药物组合物,其包括编码权利要求 1 中的 (i) 或权利要求 2 所定义的肽的核酸,或表达所述核酸的载体。
10. 一种用于抑制 NEP 的药物组合物,其包括编码权利要求 1 中的 (ii) 或权利要求 3 所定义的肽的核酸,或表达所述核酸的载体。
11. 权利要求 1 到 3 中任一项的肽在制备用于预防或治疗疼痛的药物中的用途。
12. 权利要求 11 的用途,其中所述疼痛是慢性疼痛、急性疼痛、内脏炎性疼痛或神经性疼痛。
13. 权利要求 4 的核酸在制备用于预防或治疗疼痛的药物中的用途。
14. 权利要求 13 的用途,其中所述疼痛是慢性疼痛、急性疼痛、内脏炎性疼痛或神经性疼痛。
15. 特异性识别权利要求 1 到 3 中任一项的肽的抗体在制备用于检测生物学样品中的 BPLP 或由序列 QRFSR 组成的肽的产生的改变的制剂中的用途。

## 衍生自人 BPLP 蛋白的肽、编码所述肽的多核苷酸和针对所述肽的抗体

[0001] 本发明涉及 BPLP 蛋白所衍生的作为新的金属外肽酶抑制剂的肽。本发明也涉及编码所述肽的多核苷酸以及涉及针对所述肽的抗体。此外,本发明涉及人 BPLP 蛋白、其所衍生的肽及其模拟物、编码人 BPLP 蛋白或其衍生的肽的多核苷酸以及针对 BPLP 蛋白或其衍生的肽的抗体的诊断性和治疗性的用途。

[0002] 在基因组研究中,已经鉴定出了一种主要在成熟大鼠的颌下腺 (SMG) 和前列腺中表达的受雄激素调节的基因 (Rosinski-Chupin 等,1988 和欧洲专利 0394 424)。基因编码前体蛋白颌下腺大鼠<sub>1</sub>蛋白 (submandibular rat<sub>1</sub> protein, SMR<sub>1</sub>),其生成了三种结构上相关的肽,通过与成对碱性氨基酸转化酶 (paired basic amino acid-converting enzyme) 对前体蛋白中的多个碱性位点的裂解可以在体内选择性地生成所述肽 (Rougeot 等,1994)。

[0003] 在后基因组和生命组学的研究中,已经发现了为哺乳动物体内存在进行细胞间联络的激素信使 (即从 SMR1 前激素原所生成的最终的成熟肽,现在称作为 Sialorphin (序列 QHNPR)) 提供证据的分子及功能基础。因此,在雄鼠中,Sialorphin 是一种外分泌的和内分泌的肽信号,它的表达受活化作用的雄激素的调控,并且其的分泌是受应答于环境应激的雄激素介导的应答所诱发的 (Rougeot 等,1997)。

[0004] 在性成熟的雄鼠中,事实是应答于环境急性应激而急性地分泌受雄激素调节的 Sialorphin,这就形成了一种假说,即该信号传导介质可能在一些与生殖有关的生理和行为整合中起到了一定的作用。因此,相同的作者研究了 Sialorphin 在雄性性行为模式方面所诱导的影响,其包括发动交配、插入和射精的频率及潜伏期、以及社会-性 (socio-sexual) 的交互作用。所获得的数据显示 Sialorphin 具有在与生理循环水平相关的剂量上调控雄鼠的交配模式的能力,即以剂量依赖性模式实现了对性行为的双重的促进/抑制作用,虽然在所有的剂量上都能刺激表观的性唤醒或冲动。因此,提出了受内源性雄激素调节的 Sialorphin 有助于调控作用于适当的雄鼠性应答的刺激和抑制机制之间的平衡,这依据于背景情况。

[0005] 国际专利申请 WO 01/00221 描述了 SMR1 的成熟产物用于治疗人际关系和行为障碍性疾病的用途,所述疾病包括性障碍。

[0006] 此外,这些作者发现 SMR1 成熟产物识别器官上的特异的靶向位点,这与矿物质离子浓度紧密相关。国际专利申请 WO 98/37100 描述了 SMR1 的成熟产物用于预防或治疗与人体内的或动物体内的金属离子失衡相关的疾病的用途。

[0007] 作为对应激性背景的应答,Sialorphin 被急性释放、快速分布并被其全身性的膜相关靶点持续地摄取 (Rougeot 等,1997)。作者已经证实 Sialorphin 在体内所结合的主要细胞表面分子是膜锚定的金属外-内肽酶 NEP (神经内肽酶、Neprilysin EC 3.4.24.11)、或脑啡肽酶 (Rougeot et al.,2003)。此外,Sialorphin 表现出是 NEP 活性的体外的生理拮抗剂;在利用可溶性的纯化的肾 NEP 和人工的产荧光的 DGNPA (Dansyl-Gly-(pNO<sub>2</sub>) Phe-β Ala) 作为底物的体外检测法中所测定到的 NEP 和 Sialorphin 之间的直接的相互作用为 Sialorphin 抑制 NEP 活性 (Sialorphin 的 IC<sub>50</sub> 为 0.6 μM) 提供了直接证据。

Sialorphin 是至今在啮齿类动物中所鉴定到的第一个 NEP- 脑啡肽酶活性的生理抑制剂 (Rougeot 等, 2003 和欧洲专利申请 EP 1 216 707)。

[0008] NEP 位于神经组织和全身组织的细胞表面, 其中它起到了作为外酶的重要功能, 即催化大量神经肽和调节肽的分泌后加工或代谢。NEP 的主要的生理相关底物是脑啡肽、P 物质和心房利钠肽 (ANP)。这些哺乳动物信号肽主要涉及中枢性和周围性痛觉、炎症现象、动脉张力和矿物质稳态的调节。从生理的以及生理病理的和治疗的观点看, 它们的生理重要性以及 NEP 外酶在调控其功能效力中的关键作用使得通过内源性抑制物来研究并获知它们的可能的保护作用是重要的。

[0009] 通过使用不同的分子和行为药物学的模型, 作者已经显示出生理介质 Sialorphin 在体外能阻止脊髓和肾脏的 NEP 降解其两种生理相关底物 (P 物质和甲硫氨酸脑啡肽)。Sialorphin 抑制 P 物质降解的  $IC_{50}$  值为  $0.4-1 \mu M$ , 并具有源自神经组织 (脊髓) 或源自全身组织 (肾脏、骨、牙齿、胎盘、前列腺、GSM、肠) 的膜结合性 NEP 的竞争性抑制物的作用。在体内, 静脉内 Sialorphin 在两种损伤诱导的急性和张力性疼痛的行为鼠模型 (针刺痛觉测试 (机械性痛觉) 和福尔马林测试 (化学性痛觉)) 中都能引发出了强的抗伤害应答。Sialorphin 所诱导的镇痛作用要求激活  $\mu$  和  $\delta$  阿片受体, 这与脑啡肽能转运过程中要涉及到内源性阿片受体相一致。事实上, 这些受体参与了内源性阿片能信号例如脑啡肽 (NEP 和氨肽酶 APN 可以灭活这些脑啡肽) 以及外源性阿片例如吗啡 (主要与  $\mu$  阿片受体相互作用) 的转运。结论是, Sialorphin 通过在体内抑制外 - 脑啡肽酶而保护了在伤害性刺激之后所释放出的内源性脑啡肽, 并因此强化了它们的镇痛作用。另外, 内源性阿片系统 (具体地是  $\delta$  - 阿片介导的途径) 也与抑郁行为的发生有关, 例如通过使用分析绝望行为的模型 (强迫游泳试验), 作者表明 Sialorphin 在雄鼠中展示出了明显的抗抑郁活性。Sialorphin 是至今在哺乳动物中所鉴定出的 NEP 活性的第一个天然的具有全身活性的调节剂。此外, 还提供了它作为损害后痛觉的新的生理调控剂、以及可能作为假定的新的抗伤害剂和抗抑郁剂的新型治疗分子的前体的证据 (Rougeot 等, 2003、EP 1, 343, 519 和 EP 1, 343, 520)。

[0010] Sialorphin 的强镇痛作用与其完全阻止了脑啡肽降解酶对脑啡肽的灭活有关。在体内, 两种外肽酶 NEP 和 APN 都以极高的效率 (在数秒钟内) 灭活脑啡肽。与此相一致的是, 第一个开发出的合成抑制剂仅仅是 NEP 特异的 (例如 Thiorphan) 或者是 APN 特异的 (例如 Bestatin) 抑制剂。它们只表现出不明显的或弱的抗伤害作用。因此, 大鼠 Sialorphin 是 NEP 和 APN 金属外肽酶 NEP 和 APN 的生理的双重抑制剂, 此外, 这个对应激有着适应性应答的内分泌性信号信使是鼠痛觉的强抑制剂, 并且它的镇痛作用比合成的双重 NEP/APN 抑制剂 (例如 Kelatorphan, 通过造型方法所开发出的抑制剂) 的镇痛作用更强。所以, 从特异性和生物可利用性上看, Sialorphin 非常适合于其靶点的构象的和分布的特征, 因此从一体化的观点看, 它是更为有效的。结合这些观察, 从功能性的和生理病理的以及治疗的观点看, 鼠 Sialorphin 所调节的功能的生物学重要性使得研究和鉴定出人体内的鼠 Sialorphin 的内源性功能类似物是非常关键的。

[0011] Sialorphin 是唯一一种在哺乳动物中所能鉴定出的膜结合的脑啡肽酶活性的生理性具有全身活性的调节剂。这就提出了在人体唾液和血液中是否存在着这样的内源性 NEP- 外肽酶的抑制剂。利用高敏感性和特异性的放射免疫检测法在男性人体唾液中检测到了无免疫反应性的 QHNPR 肽 (Sialorphin) (Rougeot 等, 1994)。但是, 综合的数据使

得我们推测在人体内（特别是在人唾液内）存在着抑制 NEP 外肽酶活性的低分子量物质（ $\leq 3000\text{Da}$ ）。尽管没有生化表征出这种（这些）唾液组分，但是在这种（这些）人脑啡肽降解外酶的抑制物的唾液生成上观察到了性别相关的差异 (Marini and Roda, 2000)。令人惊讶的是，这种情况非常类似于发明者在雄鼠中所鉴定到的情况，其中颌下腺和唾液分别代表着 Sialorphin 的主要合成和分泌的部位。

[0012] 编码 Sialorphin 的  $\text{SMR}_1$  前体的基因属于多基因家族，在人体中已经鉴定出了该家族的成员。但是，在人体中还没有发现与鼠  $\text{SMR}_1$  基因（编码  $\text{SMR}_1$  的  $\text{VCSA1}$ ）同源的人类基因 *stricto sensu* (cDNA 克隆和人基因组分析)。此外，存在着鼠 Sialorphin 抗膜锚定的人 NEP（人前列腺细胞株 (LNCaP) 所表达的）的抑制效力，但是比在抗啮齿类动物 NEP（鼠、兔）所获得的效力要低约 10 倍。考虑到鼠和人 NEP 具有相当高的氨基酸序列的类似性（约 85%）的事实，鼠 Sialorphin 和 NEP 外酶之间的功能相互作用中的表观选择性至少是令人惊讶的。另外，编码鼠 Sialorphin 的前体 ( $\text{SMR}_1$ ) 的基因所属的多基因家族中的人类基因的特征显示出在人体内存在着该家族的一些基因，其中已经表征出了三种基因即基因 hPB、hPBI 和 BPLP，它们簇集在相同的染色体区域（即第 4 号染色体的 q13-21 区）(Isemura, 2000) (Isemura and Saitoh, 1997) (Dickinson and Thiesse, 1996)。

[0013] 本发明者现在已经鉴定出了新的肽，其被认为是  $\text{SMR}_1$ -五肽 Sialorphin 的功能性的人类类似物。

[0014] 本发明者所收集到的大量数据都支持新肽（序列 QRFSR）源自 BPLP 蛋白（“碱性富脯氨酸泪液蛋白 (Basic Proline-rich Lacrimal Protein)”）。

[0015] 从 Dickinson 等 (Dickinson and Thiesse, 1996) 所克隆并表征到的 cDNA 中可以预测出编码 201 个氨基酸（具有潜在的分泌信号肽）的多肽序列的人类基因 BPLP。人泪腺和颌下腺都表达基因 BPLP。在所附的序列表中，SEQ ID No. 1 表示编码 BPLP 的 cDNA 序列，SEQ ID No. 2 表示 BPLP 的氨基酸序列。

[0016] 本发明者依据对来自  $\text{SMR}_1$  前体的鼠 Sialorphin 的成熟加工处理可以确定分泌型 BPLP 蛋白的最保守的 N 末端区（大鼠、小鼠和人之间）中的共同位点。

[0017] 例如，这些共同位点被确定为具有信号肽酶所需序列的区域中的信号肽裂解位点，以及在具有 R-R 键的成对碱性残基上的共同位点被识别为成对碱性氨基酸转化酶的加工处理信号。

[0018] 在这些共同位点上，本发明者已经找到了结构上与大鼠 QHNPR Sialorphin 紧密相关的序列 QRFSR。

[0019] 合成该肽，并分析了其抑制生理性 NEP 底物（即 P 物质）的降解的能力。

[0020] 然后该肽被鉴定为 Sialorphin 的人类的功能类似物。

[0021] 本发明将人 BPLP 蛋白衍生的肽作为新的金属外肽酶的抑制剂。

[0022] 更具体地，本发明涉及 BPLP 蛋白的成熟产物，特别是 QRFSR 肽及其肽衍生物和模拟物，所述肽及其衍生物和模拟物能增强神经内分泌肽信使的作用，所述信使控制疼痛的传递（例如脑啡肽）、健康和 / 或  $\text{Na}/\text{Pi}/\text{Ca}/\text{H}_2\text{O}$  的主要的稳态交换（例如利钠肽）。

[0023] 本发明也涉及编码所述肽和肽衍生物的多核苷酸，以及涉及针对所述肽或其肽衍生物的抗体。

[0024] 此外，本发明涉及人 BPLP 蛋白、人 BPLP 蛋白衍生的肽、和其肽衍生物及模拟物的

诊断性和治疗性用途,以及编码人 BPLP 蛋白、人 BPLP 蛋白衍生的肽和其肽衍生物及模拟物的多核苷酸以及针对人 BPLP 蛋白、人 BPLP 蛋白衍生的肽和其肽衍生物的抗体的诊断性和治疗性用途。

[0025] 应当明白本发明的肽、蛋白、或核酸是分离的或纯化的形式。

[0026] 当指的是蛋白或肽(包括抗体)或核苷酸序列时,“纯化的和分离的”意味着所指示的分子基本上不和其它的生物分子一起存在。术语“纯化的”在此优选地表示存在至少 75%重量的相同类型的生物分子,更优选地至少 85%重量、仍更优选地至少 95%重量、以及最优选地至少 98%重量。“分离的”或“纯化的”编码特殊多肽的核酸分子指的是基本上不含其它不编码目标多肽的核酸分子的核酸分子。但是,所述分子可以包括一些不会负面地影响组合物的基本特征的附加碱基或部分。

[0027] 肽

[0028] 对于本发明的目的,“肽”是一种由经肽键彼此线性排列连接的氨基酸残基的线性阵列所构成的分子。这些线性阵列可以任选地是环状的,即例如通过化学键可以连接线性肽的末端或肽内的氨基酸的侧链。本发明的这些肽可以包括从约 3 个到约 500 个氨基酸,优选地从约 3 个到 100 个氨基酸,以及更优选地从约 3 个到约 50 个氨基酸,特别是从约 3 个到 15 个氨基酸,并且还可以包括二级、三级或四级结构以及与其它肽或其他非肽分子的分子间结合。这些分子间的结合可以通过,但不限于,共价键(例如通过二硫键)、或通过整合、静电相互作用、疏水性相互作用、氢键、离子偶极相互作用、或上述的任何组合。

[0029] 在这些肽中,通过 N 末端的环化/去环化,可以互换 Glp 和 GlN。

[0030] 本发明的一个目的是肽,其衍生自人 BPLP 蛋白,并且对金属外肽酶具有调节活性,特别是抑制活性。

[0031] “衍生自人 BPLP 蛋白”表示其包括 BPLP 蛋白片段、或基本上由 BPLP 蛋白片段构成、或由 BPLP 蛋白片段构成。在优选的实施方式中,所述肽是由 3 到约 150 个氨基酸构成。最优选地,所述肽是由少于 100 个氨基酸构成。

[0032] 具体地,本发明的一个目标是 BPLP 蛋白的成熟产物及其肽衍生物。

[0033] 更具体地,本发明涉及肽,所述肽是碱性富脯氨酸泪液蛋白(BPLP)的成熟产物或所述成熟产物的肽衍生物,其中肽或肽衍生物表现出对金属外肽酶(优选地是 NEP 和/或 APN,以及更优选地是 NEP)的抑制性能。

[0034] “成熟产物”是经天然成熟酶或激素原转化酶或相关的单个或成对碱性氨基酸裂解酶(例如 furin、PC 转化酶或例如 PACE4(Seidah, 1995))对 BPLP 蛋白前体的裂解所得到的肽。

[0035] 本发明的肽包括“肽衍生物”。

[0036] “肽衍生物”是具有对亲本肽的氨基酸取代的肽,优选地具有对亲本肽的一个到两个氨基酸取代,特别是当所述亲本肽含有少于 15 个氨基酸,以及优选地含有少于 10 个氨基酸,但是其仍保留了亲本肽的结合特异性和/或生理学活性。“保留亲本肽的结合特异性”在此表示能与单克隆的或多克隆的能与 BPLP 成熟产物中的一种或 BPLP 成熟产物受体结合的抗体结合,其亲和力至少是作为 BPLP 成熟产物的一种肽的亲力的十分之一,更优选地至少是一半,以及更优选地至少相同。优选地在标准的竞争性结合免疫检测条件下实施对这些亲和力的测定。“保留亲本肽的生理学活性”表示保留了任一 BPLP 成熟产物结合并调

控金属外肽酶（具体地是 NEP 和 / 或 APN, 更具体地是 NEP), 据此优化局部的和全身的疼痛、炎症、抗抑郁、和 / 或对应激的离子内环境稳态应答的能力。在本说明书的下文中, 更详细地描述了对是否调控了这些活性的测定。

[0037] 本发明的肽包括肽或肽衍生物, 其包括序列 X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg、基本上由序列 X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg 构成、或由序列 X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg 构成。其中, X1 代表 H 原子或 Tyr 氨基酸, X2 代表 Gln 或 Glp (当 X1 是 H 时), 或者 X2 代表 Gln (当 X1 是 Tyr 或 Cys 时)。当本发明的肽包括或基本上由序列 X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg 构成时, 所述序列是本发明的肽的 C 末端部分。

[0038] 本发明的优选的肽包括序列 QRFSR, 基本上由序列 QRFSR 构成, 或由序列 QRFSR 构成。

[0039] 更具体地, 本发明的肽是由序列 QRFSR (SEQ ID No. 3) 构成的肽。

[0040] 本发明的另一种肽是由序列 YQRFSR (SEQ ID No. 4) 构成的肽。

[0041] 本发明的仍另一种肽是由序列 CQRFSR 构成的肽。

[0042] 在全文中,

[0043] Glp 是焦谷氨酸;

[0044] Tyr 或 Y 是酪氨酸;

[0045] Gln 或 Q 是谷氨酰胺;

[0046] Arg 或 R 是精氨酸;

[0047] Phe 或 F 是苯丙氨酸;

[0048] Ser 或 S 是丝氨酸;

[0049] Cys 或 C 是半胱氨酸。

[0050] 通过在液相或固相中的经所需整合的不同氨基酸残基的连续连接 (在液相中从 N 末端到 C 末端, 或者在固相中从 C 末端到 N 末端) 的肽合成, 用常用方式制备出了本发明的肽, 其中用常用基团预先封闭了 N 末端和反应性侧链。

[0051] 对于固相合成而言, 具体地可以使用 Merrifield 所述的技术。或者, 也可以使用 Houbenweyl 在 1974 年所述的技术。

[0052] 更多的细节可以参考 WO 98/37100。

[0053] 利用遗传工程方法也可以获得本发明的肽。

[0054] 优选的模拟物 (包括肽模拟物) 保留了如上所述的亲本肽 (包括肽衍生物) 的结合特异性和 / 或生理学活性。“模拟物”在此是模拟了天然肽的一些性能 (优选地是其结合特异性和生理学活性) 的分子。通过对本发明的肽的结构修饰获得了优选的模拟物, 优选地使用非天然的氨基酸、D 氨基酸取代 L 氨基酸、构象限制、电子等排取代、环化作用、或其它修饰。其它优选的修饰包括, 但不限于那些其中用非酰胺键取代一个或多个酰胺键、和 / 或其中用不同的化学部分取代一个或多个氨基酸侧链、或其中用保护基团保护了 N 末端、C 末端中的一个或多个末端或一个或多个侧链, 和 / 或其中往氨基酸链中引入双键和 / 或环状作用和 / 或立体特异性以增加刚性和 / 或结合亲和力的修饰。

[0055] 根据本发明的肽所靶向的金属外肽酶的结合区的晶体结构, 用计算机辅助药物设计开发系统也可以得到模拟物 (Oefner 等 (2000); Gomeni 等 (2001); Jones 等 (2002); Kan (2002))。

[0056] 仍其它优选的修饰包括那些打算增强对酶降解的抗性、提高特别是神经和性腺组织的生物利用度以及更普遍地改善药物代谢动力学性能的修饰，其特别包括：

[0057] 一通过亲脂醇的酯化作用 (COOH) 或通过酰胺化作用 (COOH) 和 / 或乙酰化作用 (NH<sub>2</sub>) 或在 NH<sub>2</sub> 末端添加羧烷基或芳香族的疏水链保护 NH<sub>2</sub> 和 COOH 亲水基团；

[0058] 一CO-NH 酰胺键的反向倒位异构体或酰胺功能团的甲基化作用（或酮亚甲基、甲氧基、羟乙烯基）；

[0059] 一L 氨基酸对 D 氨基酸的取代。

[0060] 所有的这些变体在本领域都是已知的。因此，给定在此所述的肽序列，本领域人员能设计并生成具有与这些性能类似的或更优越的结合特征和 / 或生理学活性的模拟物（见例如，Horwell 等，(1996)、Liskamp 等，(1994)、Gante 等，(1994)、Seebach 等，(1996)）。

[0061] 术语“BPLP 肽”在此指的是本发明的 BPLP 蛋白、衍生于 BPLP 的肽、BPLP 成熟肽、和肽衍生物及模拟物（包括肽模拟物）。

[0062] 本发明也涉及分子复合物，其包括：

[0063] 一金属外肽酶受体、特别是 NEP 受体或 APN 受体、特别是 NEP 受体的 BPLP 蛋白或其成熟产物（例如 QRFSR）的结合位点；

[0064] 一BPLP 蛋白或其成熟产物，例如 QRFSR。

[0065] 核酸、表达方法和检测方法

[0066] 当考虑到遗传密码的简并性时，编码如上定义的肽（包括肽衍生物）的核酸（也称作多核苷酸）例如 DNA 或 RNA 分子也是本发明的一部分。

[0067] 因此，本发明提供了编码衍生自人 BPLP 蛋白的肽及其肽衍生物的核酸。

[0068] 具体地，本发明提供了编码肽的核酸，所述肽包括如上定义的序列 X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg、基本上由序列 X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg 构成、或由序列 X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg 构成。当本发明的肽包括或基本上由序列 X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg 构成时，所述序列是本发明的肽的 C 末端部分。在优选的实施方式中，本发明提供了编码肽的核酸，所述肽包括序列 QRFSR、或基本上由序列 QRFSR 构成、或由序列 QRFSR 构成。在最优选的实施方式中，本发明提供了编码 QRFSR 的核酸或编码 YQRFSR 的核酸。

[0069] 本发明的核酸包括在标准的杂交条件（优选地为高严格性条件）下可杂交于任一上述序列或其互补序列的序列。

[0070] 当单链形式的核酸分子能在合适的温度和溶液离子强度的条件（见 Sambrook 等，1989）下与其它核酸分子退火在一起时，认为核酸分子“可杂交于”另一种核酸分子。温度和离子强度的条件确定了杂交的“严格性”。对于初筛同源核酸，可以使用对应于 T<sub>m</sub>（解链温度）为 55°C 的低严格的杂交条件，例如是 5xSSC、0.1% SDS、0.25% 奶粉、以及没有甲酰胺；或者是 30% 甲酰胺、5xSCC、0.5% SDS。中等严格的杂交条件对应于更高的 T<sub>m</sub>，例如 40% 甲酰胺和 5x 或 6xSSC。高严格的杂交条件对应于最高的 T<sub>m</sub>，例如 50% 甲酰胺、5x 或 6xSCC。SCC 是 0.15M NaCl、0.015M 柠檬酸钠。杂交还需要两种核酸含有互补序列，尽管依赖于杂交的严格性，碱基之间的错配是可能的。杂交核酸的合适的严格性依赖于核酸的长度以及互补的程度，变异在本领域是公知的。两个核苷酸序列之间的相似性或同源性的程度更大，具有这些序列的核酸分子的杂交的 T<sub>m</sub> 值就更高。核酸杂交的相对稳定性（对应于更高的 T<sub>m</sub>）依照下面的次序减低：RNA:RNA、DNA:RNA、DNA:DNA。对于长度超过 100 个核苷酸的杂交，



已经得到了计算  $T_m$  的公式（见 Sambrook 等，见上，9.50-9.51）。对于更短核酸（即寡核苷酸）的杂交，错配的位点变得更为重要，并且寡核苷酸的长度决定了其特异性（见 Sambrook 等，见上，11.7-11.8）。可杂交核酸的最小长度为至少约 10 个核苷酸，优选地至少约 15 个核苷酸。

[0071] 在特异的实施方式中，术语“标准杂交条件”指的是  $T_m$  为 55°C，并使用上面所设定的条件。在优选的实施方式中， $T_m$  是 60°C。在更优选的实施方式中， $T_m$  是 65°C。在特异的实施方式中，“高严格性”指的是在 68°C、0.2xSSC 下，在 42°C、50% 甲酰胺、4xSSC 下，或者在赋予等价于那些在这两种条件下所观察到杂交水平的条件下的杂交和 / 或洗涤条件。

[0072] 本发明还涉及用于克隆和 / 或表达的包括本发明的核酸序列的载体，以及涉及包括本发明的核酸或所述载体的宿主细胞，即其中转移了其中至少一种载体的宿主细胞。本发明的表达载体包括编码本发明的肽（包括肽衍生物）或蛋白的核酸序列，所述核酸序列与容许其表达的元件可操纵地连接。所述载体优选含有启动子序列，用于启动和终止翻译的信号、以及调节翻译的合适区域。其在宿主细胞内的插入可以是临时的或稳定的。所述载体也可以含有用于分泌所翻译蛋白的特异信号。

[0073] 根据宿主细胞可以选择出这些不同的信号，并且可以将其插入到在所选宿主细胞内能自我复制的载体内，或插入到可以整合到所述宿主的基因组内的载体内。

[0074] 宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞，包括但不限于细菌、酵母菌、植物细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞，包括商品化可获得的细胞株。宿主细胞的优选实例是 COS-1、HEK 细胞、293 细胞或 CHO 细胞。

[0075] 本发明的一个目的也是用于生成重组 BPLP 肽的方法，其中用所述表达载体转染所述宿主细胞，并且在容许 BPLP 肽表达的条件下培养所述宿主细胞。利用任何标准技术例如电穿孔或磷酸钙沉淀或脂染®可以进行对宿主细胞的转染。

[0076] 然后用熟知的纯化方法可以收集并纯化蛋白或肽：用方法例如 HPLC 色谱法、特异抗体的免疫亲和技术等可以从裂解液或细胞提取液、从培养基的上清液中纯化出重组肽或蛋白。

[0077] 本发明还涉及体外预测和 / 或诊断的方法，其中用本发明的核酸序列或衍生于此的探针或引物检测异常合成，包括异常的高合成或低合成，或 BPLP 基因水平上的遗传异常。

[0078] 本发明因此提供了用于预测和 / 或诊断涉及 BPLP 或它的任一成熟产物的产生的改变的病变，所述方法包括检测测试对象的生物学样品中的 BPLP 基因或其转录物的质量和 / 或数量的异常。

[0079] 术语“预测”指的是确定或确认发生疾病或病变的可能性。

[0080] 本发明更具体地涉及检测 BPLP 基因的异常的方法，其包括以下步骤：

[0081] 一在容许生物学样品中所含的 DNA 与引物杂交的条件下，将含有 DNA 的生物学样品与容许扩增全部或部分 BPLP 基因的特异的寡核苷酸接触，其中已经使得样品中所含的 DNA 成为可接近的，适当是时是可杂交的；

[0082] 一扩增所述 DNA；

[0083] 一检测扩增产物；

[0084] 一将所得到的扩增产物与用正常对照的生物学样品所得到的扩增产物进行比较，

据此检测出 BPLP 基因中的可能的异常。

[0085] 本发明的方法也被应用于检测 BPLP 基因的转录物中的异常,通过例如用 RT-PCR 扩增出生物学样品中所含有的 mRNA。

[0086] 因此,本发明的另一个目的是用于检测 BPLP 转录物中的异常的方法,如先前所定义的,其包括步骤:

[0087] 一从生物学样品中所含的 mRNA 中生成 cDNA;

[0088] 一在容许引物与所述 cDNA 杂交的条件下,将所述 cDNA 与容许扩增所有或部分 BPLP 基因的转录物的特异寡核苷酸接触;

[0089] 一扩增所述 cDNA;

[0090] 一检测扩增产物;

[0091] 一将所得到的扩增产物与用正常对照的生物学样品所得到的扩增产物进行比较,据此检测出 BPLP 基因转录物中的可能的异常。

[0092] 从生物学样品中所获得的扩增产物与从正常生物学样品中所获得的扩增产物之间的这种比较是定量的比较和/或定性的比较。在后一种情况中,例如通过特异探针杂交、通过测序或通过限制性位点分析可以实施比较。

[0093] 本领域技术人员非常清楚地知道用于分析生物学样品所含有的 DNA 以及用于诊断遗传疾病的方法。可以得到多种进行基因型分析的策略。

[0094] 优选地,可以用 DGGE 方法(变性梯度凝胶电泳)、或 SSCP 方法(单链构象多态性)检测 BPLP 基因中的异常。优选地,紧跟在这些方法之后的是直接测序。可以优先用 RT-PCR 法检测 BPLP 转录物中的异常,因为它能观察到剪切突变例如外显子跳跃或隐含位点的激活所造成的混乱剪切的后果。同样,在该方法之后的是直接测序。最近开发的利用 DNA 芯片的技术也可以被优先地应用于检测 BPLP 基因中的异常。

[0095] 用于检测 BPLP 基因或其转录物中的异常的这些方法特别适用于鉴定造成无功能的 BPLP 蛋白或成熟产物的突变,以及优先地适用于体外预测和/或诊断疾病,其中所述疾病涉及 BPLP 基因。

[0096] 这些疾病的实例是在“治疗应用”章节中所引用的疾病。

[0097] 抗体和检测方法

[0098] 本发明还提供了特异地针对(即特异性识别)BPLP 蛋白的抗体。本发明还提供了特异地针对(即特异性识别)上面所述的肽(包括肽衍生物)的抗体。

[0099] 因此,本发明提供了针对衍生自人 BPLP 蛋白的肽及其肽衍生物的抗体。

[0100] 更具体地,本发明提供了针对肽的抗体,所述肽包括如上定义的序列 X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg、基本上由序列 X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg 构成、或由序列 X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg 构成。当本发明的肽包括或基本上由序列 X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg 构成时,所述序列是本发明的肽的 C 末端部分。在优选的实施方式中,本发明提供了针对(即特异性识别)肽的抗体,所述肽包括序列 QRFSR、或基本上由序列 QRFSR 构成、或由序列 QRFSR 构成。在最优选的实施方式中,本发明提供了针对(即特异性识别)QRFSR 的抗体或针对(即特异性识别)YQRFSR 的抗体或针对(即特异性识别)CQRFSR 的抗体。

[0101] 不同形式的术语“抗体”在此指的是免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性部分,即含有抗体结合位点或互补位的分子。示例的抗体分子是完整的免疫球蛋白分

子、基本上完整的免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的一部分,包括本领域已知的部分例如 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 和 F(v)。

[0102] 抑制 BPLP 成熟产物或其肽衍生物与其受体的相互作用的抗体是特别有用的。

[0103] 虽然可以使用多克隆抗体,但是优选地使用单克隆抗体,因为它们在长期的使用中具有更高的可重复性。

[0104] 用于生成多克隆抗体的方法也是公知的。一般地,通过给新西兰白兔皮下施用本发明的蛋白或肽(包括缀合肽)可以生成这些抗体,所述白兔先前已经被放血以便获得免疫前血清。可以在十个不同的部位或者至少 5 个不同的部位,注射每个部位总体积为 50 μl 的抗原。然后在首次注射后 5 周,给兔子放血,并且根据免疫应答的质量,每 6 周给兔子皮下施用比初次注射的最大量低 5 倍浓度的相同抗原进行定期强化 3 次。然后在强化后的每 10 天收集血清样品。然后利用相应的捕获抗体的抗原,通过亲和色谱法从血清中回收多克隆抗体。在 E. Harlow, et. al., editors, *Antibodies :A Laboratory Manual*, ColdSpring Harbor Laboratory, New York(1988) 中阐述了这种用于生成多克隆抗体的方法和其它方法。

[0105] 不同语法形式的“单克隆抗体”指的是仅含有一种能与特殊表位免疫反应的抗体结合位点的一群抗体分子。单克隆抗体因此常常表现出与其所免疫反应的任一表位的单一的结合亲和力。单克隆抗体因此可以含有具有多个抗体结合位点的抗体分子,每个结合位点免疫特异于不同的表位(即双特异的单克隆抗体)。

[0106] 用于制备单克隆抗体的实验室方法在本领域是公知的(见,例如 Harlow 等,见上)。通过免疫哺乳动物例如小鼠、鼠、兔、山羊、人等可以制备针对纯化 BPLP 蛋白、BPLP 成熟产物或其肽衍生物(包括缀合的 BPLP 肽)的单克隆抗体(Mab)。分离出免疫哺乳动物体内的产抗体的细胞,并将其与骨髓瘤或异骨髓瘤细胞融合,以便生成杂交细胞(杂交瘤)。产单克隆抗体的杂交瘤细胞被当作所需单克隆抗体的来源。

[0107] 虽然用杂交瘤培养可以生成 Mab,但是本发明并不受此限制。也预期的是通过表达从杂交瘤中克隆到的核酸所产生的 Mab 的用途。即,表达杂交瘤所分泌的分子的核酸可以被转移到另一种细胞株内,以生成转化体。转化体在基因型上不同于最初的杂交瘤,但是它也能生成本发明的抗体分子,包括整个抗体分子的免疫活性片段,其对应于杂交瘤所分泌的分子。另外,文献提供了形成嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体等基于基础的免疫反应性抗体片段的变体的方法。所有的这些都被认为是在本发明的范围之内,并被作为一种类型,阐述并要求了抗体的特异性,无论本领域人员所能构建出的精确的变异结构。

[0108] 本发明还涉及一种用于体外诊断、预测或确定病变的进展的方法,所述病变涉及 BPLP 或它的任一成熟产物产生的改变(即产生比对照对象减少或增加)。方法包括检测或定量测试对象的生物学样品中的 BPLP 蛋白或其成熟产物(特别是 QRFSR),并将其与对照对象的生物学样品中的相同物质进行比较。

[0109] 这些病变的实例是在“治疗性应用”章节中所提到的疾病。

[0110] “生物学样品”是对象的一种液体,包括血清、血液、脊髓液、脑脊液、尿液、乳汁、唾液或组织提取物,或者是组织或器官活检例如脑、脊髓、骨组织、肾脏、前列腺、胎盘、牙组织、胃的腺体粘膜、肠、唾液腺组织、乳腺等。

[0111] “对象”或“患者”是脊椎动物,例如哺乳动物,优选地是人,不论其年龄、性别和一

般状况。也包括儿童和婴儿。测试对象可以没有症状,可以被认为可能发生疾病或病变。也可以测试被怀疑患有靶疾病的对象或者已经显示出疾病或病变的症状的对象。

[0112] “对照对象”可以是健康对象或没有任何表现疾病的对象,所述疾病可以涉及 BPLP 蛋白或其成熟产物中的一种。为了确定涉及 BPLP 或其成熟产物中的一种的病变的进展,测试对象的 BPLP 蛋白或其成熟产物的表达以及通过例如在数周之后第二次测试对象来监视药物的疗效或病变的播散都是特别有用的。对于第二个测试结果与第一次测试结果比较,以及一般也就是与在“健康”对象中所得到的结果的比较的情况。“对照对象”指的是相同的测试对象或者指的是“健康对象”。

[0113] 术语“诊断”指的是确定或确认对象体内的疾病或病变。

[0114] 术语“预测 (prognosis)”指的是确定或确认生成疾病或病变的可能性。

[0115] 通过检测 BPLP 蛋白或其成熟产物可以确定“BPLP 蛋白或其成熟产物的表达或产生”。

[0116] 这些检测方法包括将生物学样品与能选择性地与样品中所含有的 BPLP 蛋白或其成熟产物(特别是 QRFSR)相互作用的结合伴侣接触。结合伴侣通常是抗体,其可以是多克隆或单克隆抗体,优选地是单克隆抗体。

[0117] 用于生产如上所述的基于治疗的抗体的方法也可以被轻易地适用于生成能用于本发明的诊断或预测方法中的抗体。

[0118] 例如,通过将生物学样品与特异性识别 BPLP 蛋白的抗体或者特异性识别其成熟产物(特别是 QRFSR)的抗体一起孵育可以检测出 BPLP 蛋白或它的任一成熟产物、或蛋白的成熟形式或成熟产物的存在或产生,例如使用标准的电泳或液体的或固体的免疫诊断技术,其包括免疫检测法例如竞争型、直接反应型、或三明治型检测法。这些检测法包括,但不限于 Western 印迹法、凝集试验、酶标记的和介导的免疫检测法例如 ELISA、生物素/抗生物素蛋白型检测法、放射免疫检测法例如利用放射性碘标记的或氘标记的 BPLP 蛋白或它的任一成熟产物(特别是 QRFSR)的免疫检测法、免疫电泳、免疫沉淀等。反应通常包括显示标记例如荧光、化学发光、放射性、酶标记或染料分子、或其它用于检测抗原和与之反应的抗体之间的复合物的形成的方法。

[0119] 前面所提及的检测法通常涉及将未结合的 BPLP 蛋白或它的未结合的成熟产物(特别是未结合的 QRFSR)与和固定于固相中的特异抗体相结合的 BPLP 蛋白或成熟产物(特别是 QRFSR)分离开。可以用于本发明实践的固相支持物包括支持物例如硝基纤维素(例如膜或微量滴定孔形式)、聚氯乙烯(例如片或微量孔)、聚苯乙烯乳胶(例如珠或微量滴定板)、聚偏二氟乙烯、重氮化纸、尼龙膜、活化珠、磁反应珠等等。

[0120] 因此,在一个特殊的实施方式中,用本领域人员已知的方法,利用第二种结合物可以从生物学样品中容易地检测出结合 BPLP 蛋白或其成熟产物(特别是 QRFSR)的存在,所述第二种结合物包括另一种抗体,所述抗体被缀合于可检测的酶标记例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或尿素酶。然后用合适的酶底物生成可检测信号例如发色的或产荧光的信号。在其它的相关实施方式中,利用本领域人员已知的方法可以实施竞争型 ELISA 技术。

[0121] 为了实施上面所述的免疫检测法,可以提供具有合适的说明书和其它试剂的包括上面所述的检测试剂(包括抗体)的试剂盒。根据所用的具体的免疫检测法,试剂盒也可以含有合适的标记物和其它包装好的试剂和材料(例如洗涤缓冲液等)。利用这些试剂盒

可以实施上面所述的标准免疫检测法。

#### [0122] 基因治疗

[0123] 根据本发明,通过修饰(即增加或减少)患者细胞中的以及从中所释放出的 BPLP 蛋白、其成熟产物的量,或者表达及可能释放出如上面所定义的肽(包括肽衍生物)可以实现对膜金属外肽酶的调控。通过用 BPLP 表达载体或表达 BPLP 蛋白、BPLP 成熟产物或如上定义的肽(包括肽衍生物)的载体(例如裸 DNA 或病毒载体的形式)可以实现患者细胞内的以及从中可能释放出的 BPLP 蛋白或成熟产物的量的增加、表达及可能释放出如上面所定义的肽(包括肽衍生物)

[0124] 优选地,本发明的核酸形成了载体的一部分。这些载体是包括与序列可操纵地连接的编码序列的核酸,所述序列控制了载体所转染的细胞内的蛋白或肽的表达。

[0125] 这样一种载体的应用使得它可能提高核酸向对象细胞内(特别是所处理的细胞内)的转移,并且能增加核酸在所述细胞内的稳定性,这使得获得持久的治疗作用成为可能。此外,可能将一些核酸序列引入到相同的载体内,这也增加了治疗的疗效。

[0126] 所用的载体可以是不同来源的,只要它能转化动物细胞(优选地是人类细胞)。在本发明的一个优选的实施方式中,所用的病毒载体可以选自腺病毒、逆转录病毒、腺相关病毒(AAV)、慢病毒、疱疹病毒、巨细胞病毒(CMV)、痘苗病毒等。在文献中已经描述了整合了异源核酸序列的源自腺病毒、逆转录病毒或 AAV、HIV 衍生的逆转录病毒载体的载体。

[0127] 本发明因此也涉及任一重组病毒,其包括被插入到其基因组内的编码 BPLP 蛋白、BPLP 成熟产物或如上所定义的肽(包括肽衍生物)的核酸序列。

[0128] 优选地,本发明的重组病毒是缺陷病毒,其至少缺乏在感染细胞内复制所述病毒所必需的序列。

[0129] 特别优选地施用整合于腺病毒、AAV 或缺陷重组逆转录病毒内形式的本发明的核酸序列。

[0130] 在 1995 年 10 月出版的国际专利文献 WO 95/28494 中描述了靶向基因转运。

[0131] 或者,通过脂染可以将体内引入载体。在过去的十年间,已经增加了脂质体在体外包装和转染核酸方面中的应用。在本发明的“药物组合物”章节也提供了关于脂质体的信息。

[0132] 在体内引入裸 DNA 质粒形式的载体也是可能的。

[0133] 用本领域已知的方法可以将用于基因治疗的裸 DNA 载体引入到所述的宿主细胞内,例如转染、电穿孔、微注射、转导、细胞融合、DEAE 葡聚糖、磷酸钙沉淀、Lipofectamine®、使用基因枪、或使用 DNA 载体转运体。

#### [0134] 药物组合物

[0135] 可以将 BPLP-肽(即指的是 BPLP 蛋白、衍生于 BPLP 的肽、成熟产物、如上定义的肽、包括肽衍生物和模拟物)或编码这些 BPLP-肽的核酸以及针对所述 BPLP-肽的抗体与药用可接受的载体一起制剂成药物组合物。例如,药物组合物适合于局部、口服、舌下、肠外、鼻内、肌肉内、皮下、经皮或经眼给药等。

[0136] 本发明的一个主题也是包括所述 BPLP-肽或其模拟物的聚合物的药物组合物。

[0137] 优选地,核酸形成了表达所述核酸的载体的一部分。

[0138] 优选地,药物组合物含有可被药用地用于能被注射的剂型中的载体。

[0139] 合适的药物组合物具体地是等张的、无菌的、盐溶液（磷酸氢一钠或二钠、氯化钠、钾、钙或镁等或这些盐的混合物）、或干的（特别是冻干的）组合物，在这种情况下，需要加入无菌水或生理盐水以便容许形成可注射溶液。

[0140] 能用于施用的 BPLP- 肽、抗体或核酸的剂量可以作为不同参数的函数，特别是作为所用的施用模式、相关病理、或所需治疗的持续时间的函数。

[0141] 为了制备用于肽治疗的药物组合物，可以将有效量的 BPLP- 肽溶解或分散于药用可接受的载体或水介质中。

[0142] 下面提供了药物配方的实例。

[0143] 药物组合物包括药用可接受的载体或水介质中的有效量的 BPLP- 肽、核酸或抗体。

[0144] “药用的”或“药用可接受的”指的是当按需施用给动物（包括人）时不会产生不良的、过敏的或其它不利的反应的分子实体和组合物。

[0145] “药用可接受的载体”在此包括任何的和所有的溶剂、分散介质、涂层剂、抗菌剂和抗真菌剂、等张剂和延迟吸收剂等。这些介质和试剂作为药用活性物的用途在本领域是已知的。本发明预期了除任何与活性组分不相兼容的常用介质或试剂外的试剂在药物组合物中的应用。可以将辅助的活性组分整合到组合物内。

[0146] 适用于注射用途的药物形式包括无菌的水溶液或分散相，制剂包括芝麻油、花生油或水性丙二醇、以及临时制备无菌注射溶液或分散相的无菌粉末。在所有情况中，制剂必须是无菌的，必须被液体化到出现容易注射器化的程度。它在生产和储存的条件下必须是稳定的，并且可以被抗微生物例如细菌和真菌污染地保藏。

[0147] 可以在与表面活性剂例如羟丙纤维素适当混合的水中制备出作为游离碱或药用可接受的盐的活性化合物的溶液。也可以在甘油、液态聚乙二醇、和其混合物以及油中制备出分散相。在一般的储存和应用条件下，这些制剂含有防止微生物生长的防腐剂。

[0148] 载体电可以是含有例如水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、和液态聚乙二醇等）、其合适混合物、以及植物油的溶剂或分散媒介。通过使用涂层（例如卵磷脂）、通过保持所需的颗粒大小（对于分散相而言）以及通过使用表面活性剂可以保持合适的流动性。用各种抗菌剂和抗真菌剂例如尼泊金、三氯叔丁醇、苯酚、山梨糖醇酐、硫柳汞等可以预防微生物的行为。在多种情况中，优选地包括等张剂例如蔗糖或氯化钠。通过在组合物中使用延迟吸收剂例如单硬脂酸铝和凝胶可以延长注射组合物的吸收。

[0149] 通过在合适的溶剂中整合所需量的活性化合物以及各种上面所列的其它组分，以及随后的过滤消毒可以制备出无菌的注射溶液。通过将各种无菌的活性组分整合到含有基本的分散介质以及所需的上面所列的其他组分的无菌载体内可以制备出分散相。对于用于制备无菌的注射溶液的无菌粉末而言，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术，其生成了活性组分加上前面的它的无菌过滤溶液中的任一附加的所需组分的粉末。

[0150] 在配制之后，可以以与剂量制剂相适合的方式以及以治疗有效的量施用溶液。可以容易地施用各种剂量形式的制剂，例如上面所述的注射溶液类型，但是也可以采用药物释放胶囊等。

[0151] 对于水溶液的肠外施用，例如如果需要，应当将溶液适当地缓冲化，并且首先用足够的盐或葡萄糖使得液态稀释剂成为等张溶液。这些特殊的水溶液特别适合于静脉内、

肌肉内、皮下和腹腔内给药。在这种情况下,可以采用的无菌的水介质对于与本说明书相关的领域中的熟练人员是已知的。例如,可以将1个剂量溶解于1ml等张的NaCl溶液中,并且可以将其加入到1000ml皮下灌注液中或者注射到输注的目标位置上,(见,例如“Remington's Pharmaceutical Sciences”,15版,第1035到1038页和第1570到1580页)。根据所治疗的对象的病变,必然会发生剂量上的一些变异。无论如何,负责给药的人将为个体对象确定合适的剂量。

[0152] 相关的BPLP-肽可以被制剂成治疗混和物,每个剂量包括约0.0001到100毫克、或约0.001到0.1毫克、或约0.1到1.0或甚至约1mg到10mg或甚至约10到100mg。也可以施用多个剂量。优选的剂量是从约0.1 $\mu$ g/kg到约1mg/kg,更优选地从1 $\mu$ g/kg到约100 $\mu$ g/kg,以及最优选地从约10 $\mu$ g/kg到100 $\mu$ g/kg。

[0153] 除了用于肠外给药(例如静脉内或肌肉内注射)的剂型,其他药用可接受的形式包括例如用于口服给药的片剂或其他固体、脂质体剂型、缓释胶囊、或任何其他常用的形式包括乳膏。

[0154] 预期了其他的给药途径,包括鼻溶液或喷雾剂、气雾剂或吸入剂、或阴道或直肠栓剂以及阴道栓剂或乳膏、以及长效转运聚合物。

[0155] 在某些实施方式中,预期了脂质体和/或毫微粒用于将BPLP-肽试剂以及核酸载体或抗体引入到宿主细胞内的用途。

[0156] 本发明也涉及上面所定义的药物组合物,其包括与BPLP-肽协同作用的第二种药剂。

[0157] 治疗性应用

[0158] 上面所述的BPLP-肽、抗所述BPLP-肽的抗体或编码所述BPLP-肽的核酸能用于预防或治疗疾病或病症,其中寻求对膜金属外肽酶活性的调控,更具体地是对膜-锌金属肽酶(例如NEP和APN)的活性的调控。

[0159] 天然的NEP底物主要是肽激素:脑啡肽、P物质、缓激肽、血管紧张素II和心房利钠肽,它们在控制中枢性和周围性痛觉、炎症现象、矿物质交换和/或动脉张力方面都起到了关键作用(Roques等,1993)。

[0160] 更具体地,神经内肽酶NEP<sub>24-11</sub>分布于哺乳动物的神经组织和周围组织中,在周围组织中,其主要分布在肾脏和胎盘。在这些组织中,细胞表面的金属肽酶NEP参与了神经肽、全身性免疫调节肽和肽激素的分泌后加工和代谢。通过控制循环的或分泌的调节肽的活性水平,NEP调控了它们的生理性受体介导的作用。因此,膜锚定的NEP参与调控了下面物质的活性:强的血管活性肽例如P物质、缓激肽(BK)、心房利钠肽(ANP)、和血管紧张素II(AII);强的炎性/免疫调节肽例如P物质和BK和fMet-Leu-Phe(fMLP);强的阿片类神经肽例如Met和Leu-脑啡肽(Enk)以及强的矿物质交换和液体稳态调节肽例如ANP、C型利钠肽(CNP)和B型利钠肽(BNP)。但是,仅仅在强烈释放出这些肽或者其中刺激触发了肽的释放的这些区域内,通过NEP诱导的形成/降解可以改变这些肽的水平。

[0161] 从一体化的观点看,NEP生物学活性是控制涉及动脉张力调节、炎症显像和水-矿物质稳态、以及控制疼痛加工处理的肽能形态的活性水平。从临床观点上看,这证实了NEP是各种疾病状态中的一种重要的药物靶点的事实。例如,通过抑制NEP,据此增加了中枢性或周围性内源性阿片的作用的水平和持续时间,就可以获得镇痛作用或抗抑郁作用。或者

通过抑制内源性 AII 的形成和 P 物质、BK 和 ANP 灭活,就可以获得抗高血压、利钠和利尿的药物。通过使用 NEP 抑制剂来修饰内源性肽的浓度的主要优点是仅仅在天然效应物所刺激的受体上才会诱导药理作用,并且它主要依赖于在环境、行为和病理生理的应激状态之后所发生的天然效应物的张力或刺激诱发的释放 (Roques 等,1993)。

[0162] 除了 NEP 以外的哺乳动物膜金属肽酶的实例是 ECE (内皮素转化酶) (特别是 ECE1 和 ECE2)、红细胞细胞表面受体抗原 KELL 和与 X 连锁的低磷酸盐血症性佝偻病相关的 PEX 基因的产物、以及 ACE (血管紧张素转化酶) 和 APN (氨肽酶 N)。

[0163] 对 ACE 和 / 或 ECE 的抑制在治疗高血压和预防及治疗动脉粥样硬化方面有着重要应用。

[0164] 对 APN 联合 NEP 的抑制在治疗疼痛和抑郁症方面有着重要应用。

[0165] 对相关膜金属肽酶的抑制在治疗肿瘤 (如卵巢、直结肠、脑、肺、胰腺、胃和黑色素瘤)、减少转移、动脉粥样硬化和 / 或高血压的发生率方面有着治疗作用。对相关膜金属肽酶的抑制在疼痛控制方面也有治疗作用。对急性疼痛的这些抗伤害作用是镇痛作用,但是对慢性炎性疼痛例如关节炎或炎性肠病也有作用。

[0166] 此外,对细菌或病毒金属肽酶的抑制预期具有抗感染作用。

[0167] 金属肽酶在病原体对宿主组织的侵袭以及免疫和炎性过程方面都起到了重要作用,例如化脓性链球菌、铜绿假单胞菌、牙龈卟啉单胞菌和嗜肺性军团菌。

[0168] 此外,细菌金属肽酶 (特别是锌金属肽酶) 在蛋白裂解性毒素所引起的疾病方面有着重要作用,所述毒素例如是炭疽杆菌的毒素 (炭疽致死因子) 和破伤风及肉毒菌的神经毒素。

[0169] 其他金属肽酶在各种感染例如 HIV 所引起的感染方面起到了重要作用 (FR 2 707 169)。

[0170] J. Potempa 和 J. Travis 可能发现了蛋白酶抑制剂在治疗细菌或病毒性在疾病中的重要性。

[0171] 在 Turner 等,2001、Kenny 等,1977、Kenny 等,1987、Beaumont 等,1996 中阐述了金属肽酶的各种作用。

[0172] 本发明的一个目的是上面所述的治疗性肽或核酸作为镇痛剂或抗抑郁剂的用途,其通过抑制周围的、脊髓和 / 或脊髓上水平中的 NEP 和 APN,据此增加了中枢性或周围性内源性阿片 (包括脑啡肽) 的作用的水平及持续时间。

[0173] 本发明预期了对疼痛的预防或治疗,特别是急性和慢性疼痛、内脏炎性及神经性疼痛。

[0174] 对任何水 - 矿物质失衡的预防或治疗也是本发明的目标。在靶向疾病中,可以包括由水 - 矿物质失衡所引起的骨、牙、肾脏、甲状旁腺、胰腺、肠、胃粘膜、前列腺和唾液腺疾病。

[0175] 具体地,疾病可以选自高或低甲状旁腺血症、骨质疏松、胰腺炎、颌下腺结石、肾结石和骨营养不良。

[0176] 对人际关系及行为障碍性疾病的预防或治疗也是相关的。在 W002/051434 中描述了各种精神疾病。

[0177] 具体地,本发明涉及任何选自以下的疾病:回避障碍 (avoidance disorder)、感



知减退障碍 (decreased awareness disorder)、孤独症、儿童多动症 (attention deficit hyperactivity disorder)、Hospitalism、人际关系功能障碍以及与外界的关系障碍 (impaired interpersonal functioning and relationship to the external world)、精神分裂样人格障碍、精神分裂症、对环境的兴趣降低 (decreased interest in environment)、与性相关的社交活动障碍、和性行为障碍 (包括早泻和性欲亢进) 构成。

[0178] 所寻求的疾病 (其中调控膜金属肽酶的疾病) 也包括高血压、动脉粥样硬化、肿瘤、炎性关节炎和肠病。

[0179] 也包括对感染的治疗。特别是, 在 J. Potempa 和 Travis 中可以发现蛋白酶抑制剂在治疗细菌和病毒性疾病中的重要性。

[0180] 上面所述的 BPLP- 肽、抗体或核酸也能用于控制免疫 - 炎症应答。

[0181] 如上定义的 BPLP- 肽、抗体或核酸也能用作利钠剂或利尿剂。

[0182] 本发明的另一个目的是上面所定义的肽或核酸作为治疗药物滥用 (主要是吗啡类药物滥用) 中的替代品的用途。

[0183] 事实上, 研究已经表明药物滥用的易感性以及奖赏 (reward) 和药物依赖性的发生至少部分是内源性阿片系统的先前存在的或诱导的改变和 / 或缺陷的结果。在这个方面, 利用能增强内源性脑啡肽的作用的 BPLP- 肽或核酸将减少因阻断慢性吗啡或海洛因给药所产生的各种副作用 (药物撤退的躯体体征)。

[0184] 根据本发明, 需要减少 BPLP- 肽对 NEP 的抑制作用, 例如通过使用抗 BPLP 蛋白或肽的抗体。这种 NEP 活性的增强在治疗神经退行性疾病例如与淀粉样变性病相关的疾病或病症方面是特别有利的。事实上, 已经显示合成抑制剂如 Neprilysin (神经内肽酶, NEP 或脑啡肽) 的抑制剂增加了淀粉样蛋白  $\beta$  水平 (Newell 等, 2003)。Leissring 等, 2003 还报道了 Neprilysin 在神经元中的转基因的过度表达显著地降低了 A $\beta$  水平, 延迟或完全阻止了淀粉样蛋白斑的形成以及与之相关的细胞病理, 并且解救了在淀粉样蛋白前体蛋白转基因小鼠中所具有的早死现象。

[0185] 当在疾病所影响的组织中或其邻近部位发现了淀粉样蛋白的沉积或淀粉样蛋白斑时, 或者疾病的特征是不可溶性的或可成为不可溶性的蛋白的过量产生时, 认为疾病或病症与淀粉样变有关。淀粉样蛋白斑通过已知的或未知的机制可以直接地或间接地引发病理作用。淀粉样变疾病的实例包括但不限于全身性疾病例如慢性炎性病、多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症、家族性淀粉样变多神经病 (Portuguese) 和心肌病变 (Danish)、全身性老年型淀粉样变、家族性淀粉样变多发肾脏病变 (Iowa)、家族性淀粉样变 (Finnish)、Gerstmann-Straussler-Scheinker 综合征、伴荨麻疹和耳聋的家族性淀粉样变神经病 (Muckle-Wells 综合征)、甲状腺髓样癌、孤立性心房淀粉样变、和血液透析相关的淀粉样变 (HAA)、和神经退行性疾病。

[0186] 术语“神经退行性疾病”指的是神经系统的疾病或病症, 具体地涉及到脑部, 其表现未脑或神经功能不全的症状特征, 例如短期或长期的记忆遗忘或缺陷、痴呆、认知功能缺陷、平衡和协调问题、情绪和行为缺陷。本发明更具体地涉及与淀粉样变相关的神经退行性疾病。当从表现出这些症状的对象的脑组织的组织病理 (活检) 样品中发现淀粉样蛋白斑形成时, 就认为这些疾病是“与淀粉样变相关”。因为从活体对象中取得脑的活检标本 (特别是人脑) 非常苦难, 或者根据就不可能, 症状或神经退行性疾病的症状与淀粉样变的相

关性常常依据于不同于活检样品中存在淀粉样蛋白沉积例如蛋白斑或纤维的标准。

[0187] 在本发明的特异的实施方式中,神经退行性疾病是阿耳茨海默病(AD)。在其他的实施方式中,疾病可能是罕见的 Swedish 病,特征是淀粉样蛋白前体蛋白(APP)中邻近 APP 的 PAP 部分的氨基末端的两个 KM 到 NL 突变。另一个这种疾病是伴有淀粉样变的遗传性脑出血(HCHA 或 HCHWA)-荷兰型。本领域已知的以及在本发明的范围内的其他这种疾病包括,但不限于散发性大脑淀粉样血管病、遗传性大脑淀粉样血管病、Down 综合征、关岛的帕金森-痴呆、以及年龄相关的无症状的淀粉样变血管病。

[0188] 在另一个方面,神经退行性疾病是亚急性海绵状脑病,例如但不限于疯羊病、Creutzfeldt-Jakob 病、Gerstmann-Straussler 病、库鲁病、长耳鹿和麋鹿的慢性废用性疾病、牛的牛海绵状脑病、以及貂的可传染性脑病。

[0189] 本发明还涉及调控内源性 BPLP 蛋白或其成熟产物(例如 QRFSR)和膜金属肽酶之间的相互作用的药物在制备用于预防或治疗疾病的治疗性组合物的用途,在所述疾病中,需要调控所述膜金属肽酶的活性。

[0190] 筛选方法

[0191] 下面描述了容许本领域技术人员选择并纯化出与相同的靶点结合并具有 BPLP 蛋白或其成熟产物(例如 QRFSR 肽)的激动剂或拮抗剂的生物学活性的候选化合物的方法。

[0192] 候选组合物可以是蛋白、肽、激素、抗体或合成组合物,它可以是肽或非肽分子,例如用常规的有机化学方法所能合成的任一化合物。

[0193] 本发明提供了一种用于在体外筛选化合物的结合 NEP 上的结合 BPLP 蛋白或其成熟产物(例如 QRFSR 肽)的结合位点的能力的方法,其包括以下步骤:

[0194] a) 在存在 BPLP 蛋白或其成熟产物(例如 QRFSR 肽)、或任一保留了 BPLP 蛋白或其成熟产物(例如 YQRFSR 肽)的结合特异性或生理学活性的肽时,将候选化合物与表达 NEP 的细胞孵育;

[0195] b) 确定候选化合物与 BPLP 蛋白或其成熟产物(例如 QRFSR 肽)或保留了 BPLP 蛋白或其成熟产物(例如 YQRFSR 肽)的结合特异性或生理学活性的肽竞争性结合 NEP 的能力。

[0196] 通常在 4°C 到 25°C 或 37°C 进行候选化合物的结合检测。

[0197] 表达 NEP 的细胞可以是细胞培养物例如融合的单层的靶细胞培养物、或靶向器官标本或组织样品(例如冰冻切片、切片、膜制品或粗匀浆液),其含有 NEP 上的结合 BPLP 蛋白或其成熟产物(例如 QRFSR 肽)的结合位点。

[0198] 在本发明的筛选方法中所用的优选的组织样品是哺乳动物脊髓的膜制品或切片,它是已知的适用于 NEP 活性测定的组织。

[0199] 在本发明的筛选方法中所用的其他优选的组织样品是已知富含 NEP 肽酶和/或作为 BPLP 蛋白或其成熟产物(例如 QRFSR 肽)的靶点的所有周围组织制备物。例如,可以使用哺乳动物肾脏的外髓、胎盘、睾丸、前列腺和骨、例如,这些方法可以应用于小鼠、大鼠或人来源的组织 and / 或细胞或经金属外肽酶 cDNA(特别是 NEP cDNA,特别是人 NEP cDNA)所转染的细胞株。

[0200] 例如用放射性的(<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I 等)或非放射性的标记(异羟基洋地黄毒甙元、CyDye- 钼、萤光素等)优选地标记 BPLP 蛋白或其成熟产物(或保留了 BPLP 蛋白或其成熟

产物的结合特异性或生理学活性的肽)。然后在能发生特异性结合的条件下,将其与表达 NEP 的细胞孵育一段足以发生特异性结合的时间。

[0201] 然后定量在不同浓度的所述候选化合物(例如从  $10^{-10}$  到  $10^{-5}$ M)时的与细胞特异性结合的标记。

[0202] 因此,本发明还提供了用于筛选与 NEP 上的结合 BPLP 蛋白或其成熟产物的结合位点特异性结合的化合物的方法,其包括以下步骤:

[0203] a) 制备含有 NEP 上的结合 BPLP 蛋白或其成熟产物的结合位点的细胞培养物或器官标本或组织样品(例如冰冻切片或切片或膜制品或粗匀浆液);

[0204] b) 加入待测试的候选化合物,以测试其与半饱和浓度的标记蛋白或其成熟产物(或保留了 BPLP 蛋白或其成熟产物的结合特异性或生理学活性的肽)的竞争性;

[0205] c) 在存在候选化合物时,在能发生特异性结合的条件下,将步骤 a) 的细胞培养物、器官标本或组织样品孵育一段足以发生特异性结合的时间;

[0206] d) 定量在不同浓度(从  $10^{-10}$  到  $10^{-5}$ M)的候选化合物时的与细胞培养物、器官标本或组织样品特异性结合的标记。

[0207] 在所述的上面的方法中,半饱和浓度是标记的 BPLP 蛋白或其成熟产物(例如 QRFSR 肽)(或保留了 BPLP 蛋白或其成熟产物的结合特异性或生理学活性的肽)与 50% NEP 结合位点结合时的浓度。

[0208] 该方法也容许确定候选化合物与 BPLP 蛋白或其成熟产物(例如 QRFSR 肽)的亲合力(或保留了 BPLP 蛋白或其成熟产物的结合特异性或生理学活性的肽)相比较的相对亲合力。

[0209] 本发明的另一个目的是一种用于确定与 NEP 上的结合 BPLP 蛋白或其成熟产物(或保留了 BPLP 蛋白或其成熟产物的结合特异性或生理学活性的肽)的结合位点特异性结合的配体化合物的相对亲和力的方法,所述方法包括上面用于每种候选化合物的方法中的步骤 a)、b)、c) 和 d),以及还包括步骤 e) 比较在步骤 d) 中所定量的每种候选混和物与其他一种候选化合物的亲合力。

[0210] 本发明的另一个目的是一种用于确定与 NEP 上的结合 BPLP 蛋白或其成熟产物的结合位点特异性结合的化合物的亲和力的方法,其包括以下步骤:

[0211] a) 制备含有 NEP 上的结合 BPLP 蛋白或其成熟产物的结合位点的细胞培养物或器官标本或组织样品(例如冰冻切片或切片或膜制品或粗匀浆液);

[0212] b) 加入先前已经标记了放射性或非放射性标记的候选化合物;

[0213] c) 在存在标记的候选化合物时,在能发生特异性结合的条件下,孵育步骤 a) 的细胞培养物、器官标本或组织样品一段足以发生特异性结合的时间;和

[0214] d) 定量在不同浓度(从  $10^{-10}$  到  $10^{-5}$ M)的候选化合物时的与细胞培养物、器官标本或组织样品特异性结合的标记。

[0215] 例如用放射性的( $^{32}$ P、 $^{35}$ S、 $^3$ H、 $^{125}$ I 等)或非放射性的标记(异羟基洋地黄毒甙元、CyDye- 钼、萤光素等)优选地标记候选化合物。然后在能发生特异性结合的条件下,将其与表达 NEP 的细胞孵育一段足以发生特异性结合的时间。

[0216] 还可以比较所定量的每种候选化合物与其他一种候选化合物的亲合力,使得确定与 NEP 上的结合 BPLP 蛋白或其成熟产物(例如 QRFSR 肽)结合位点特异性结合的候选化

合物的相对亲和力。

[0217] 本发明还提供了一种在体外筛选化合物作为 BPLP 蛋白或其成熟产物对 NEP 活性的激动剂或拮抗剂的能力的方法,所述方法包括步骤:

[0218] a) 在存在 (i)BPLP 蛋白或其成熟产物(例如 QRFSR 肽)、或任一保留了 BPLP 蛋白或其成熟产物(例如 YQRFSR 肽)的结合特异性或生理学活性的肽和 (ii)NEP 底物时,将候选化合物与表达 NEP 的细胞孵育;

[0219] b) 确定 NEP 对 NEP 底物的内切蛋白酶解作用,其中如果存在候选化合物时的内切蛋白酶解与不存在候选化合物时的内切蛋白酶解相比是增加的,说明所述化合物具有拮抗剂活性;而如果存在候选化合物时的内切蛋白酶解与不存在候选化合物时的内切蛋白酶解相比是减少的,说明所述化合物具有激动剂活性。

[0220] BPLP 蛋白或其成熟产物的激动剂在此是一种具有抑制金属外肽酶活性(特别是 NEP 或 APN 活性)的能力的分子。

[0221] BPLP 蛋白或其成熟产物的拮抗剂在此是一种具有增加金属外肽酶活性(特别是 NEP 或 APN 活性)的能力的分子。

[0222] 此外,在确定该候选化合物所诱导的代谢改变中,可以评价候选化合物的激动剂或拮抗剂活性,所述代谢改变是例如作为经蛋白激酶或腺苷酸环化酶的传导信号的结果的初级或二级信使代谢的合成和/或释放、以及 G 家族蛋白的活化。

[0223] 在具体的实施方式中,本发明也涉及一种筛选作为 BPLP 蛋白或其成熟产物的激动剂的化合物的方法,其包括以下步骤:

[0224] a) 制备含有 NEP 上的结合 BPLP 蛋白或其成熟产物的结合位点的细胞培养物或器官标本或组织样品(例如冰冻切片或切片或膜制品或粗匀浆液);

[0225] b) 孵育步骤 a) 中的细胞培养物、器官标本和组织样品(浓度为容许在存在候选化合物时能检测到 NEP 酶活性(优选为地从  $10^{-10}$  到  $10^{-5}$ M)、半饱和浓度的 BPLP 蛋白或其成熟产物(或任一保留了 BPLP 蛋白或其成熟产物的结合特异性或生理学活性的肽)和 NEP 底物一段足以在初始速度条件下发生 NEP 底物的内切蛋白酶解的时间;

[0226] c) 分别通过测定在存在或不存在候选化合物以及在存在或不存在 BPLP 蛋白或其成熟产物或保留了 BPLP 蛋白或其成熟产物的结合特异性或生理学活性的肽时 NEP 底物内切蛋白酶解的水平,以便定量步骤 a) 中的生物学材料中所具有的 NEP 活性。

[0227] 在所述的上面的方法中,半饱和浓度是造成 NEP 底物的降解减少一半的 BPLP 蛋白或其成熟产物的浓度。

[0228] 本发明的另一个目的包括一种筛选作为 BPLP 蛋白或其成熟产物的拮抗剂的化合物的方法,其包括以下步骤:

[0229] a) 制备含有 NEP 上的结合 BPLP 蛋白或其成熟产物的结合位点的细胞培养物或器官标本或组织样品(例如冰冻切片或切片或膜制品或粗匀浆液);

[0230] b) 孵育步骤 a) 中的细胞培养物、器官标本和组织样品(浓度为容许在存在次最大浓度的 BPLP 蛋白或其成熟产物(或任一保留了 BPLP 蛋白或其成熟产物的结合特异性或生理学活性的肽)时,在初始速度条件下检测到 NEP 酶活性的浓度)、NEP 底物和候选化合物一段足以在初始速度条件下发生 NEP 底物的内切蛋白酶解的时间;

[0231] c) 分别通过测定在存在或不存在候选化合物以及在存在或不存在 BPLP 蛋白或其

成熟产物或保留了 BPLP 蛋白或其成熟产物的结合特异性或生理学活性的肽时的 NEP 底物内切蛋白酶解的水平,以便定量出步骤 a) 中的生物学材料中所具有的 NEP 活性。

[0232] 在所述的上面方法的优选的实施方式中,次最大浓度是造成底物降解减少至少 50% 或优选地至少 75% 的肽的浓度。

[0233] 下面的实施例和附图举例说明了本发明,其不限制本发明的范围。

#### 附图说明

[0234] 图 1 显示了  $^3\text{H}$ -YQFRSR 标记物加入到对应于 2.5ml 人唾液的 2.5ml 唾液甲醇-酸提取物中所得到的代表性的阳离子交换 HPLC 谱。主要的放射性峰的回收率被测定为 75-84% (点状栏)。

[0235] 图 2 显示了从 7ml 人唾液中获得的唾液甲醇-酸提取物的代表性的阳离子交换 HPLC 谱。分析了各个级分的抑制人外-内肽酶活性对 P 物质的内切蛋白酶解的能力 (LNCaP 细胞株)。

[0236] 图 3 是主要 HPLC-EC 活性 13-14 级分的代表性的反相 HPLC 谱 (点状栏)。分析了该级分抑制人外-内肽酶活性内切蛋白酶解 P 物质的能力 (LNCaP 细胞株)。

[0237] 图 4 是主要 HPLC-RP 活性级分的代表性的反相 HPLC 谱 (点状栏)。分析了该级分抑制人外-内肽酶活性内切蛋白酶解 P 物质的能力 (黑栏),以及它们在 274nm 处的吸光度 (黑线)。

[0238] 图 5 显示了 BPLP-QRFSR 肽对人外-内肽酶活性降解 P 物质的影响 (LNCaP 细胞株), QRFSR 肽的有效浓度范围是从 1 到 25  $\mu\text{M}$ , 半最大浓度为 11  $\mu\text{M}$ 。

[0239] 图 6 显示了 hBPLP-QRFSR 肽的 YQFRSR 衍生物对人外-内肽酶活性降解 P 物质的影响 (LNCaP 细胞株), YQFRSR 肽的有效浓度范围是从 5 到 50  $\mu\text{M}$ , 半最大浓度为 30  $\mu\text{M}$ 。

[0240] 图 7 显示了 hBPLP-QRFSR 肽的 YQFRSR 衍生物对鼠 NEP 外-内肽酶活性降解 P 物质的影响 (肾脏组织), YQFRSR 肽的有效浓度范围是从 5 到 75  $\mu\text{M}$ , 半最大浓度为 38  $\mu\text{M}$ 。

[0241] 图 8 是对 YQFRSR 肽的 RP-HPLC 色谱分析。YQFRSR 肽 (175  $\mu\text{M}$ ) 在体外不受人细胞表面内肽酶的代谢,同时它抑制了 70% 的人外内肽酶所介导的 P 物质的内切蛋白酶解。RP-HPLC 色谱特征发现:

[0242] 1/YQFRSR 肽不受含有 NEP 的人细胞膜的代谢,回收了 93% 的完整肽,在没有代谢膜时,回收了 94%。

[0243] 2/ 在相同的试验条件下, YQFRSR 肽抑制了 70% 的这些人细胞膜对 P 物质的内切蛋白酶解。

[0244] 图 9 显示了 QRFSR 肽对重组人 NEP 降解 P 物质的抑制作用。QRFSR 肽对可溶性重组人 NEP 活性的浓度依赖性的抑制作用,以及 QRFSR 肽对可溶性重组 hDPPIV 活性对 P 物质的内切蛋白酶解没有作用。

[0245] 图 10 显示了 QRFSR 肽对细胞表面人 APN 降解 APN 合成底物的抑制作用。QRFSR 肽浓度依赖性地抑制了细胞表面的 HEK-hAPN 对 Ala-pNA 显色底物的降解。

[0246] 图 11 显示了 QRFSR 肽对细胞表面人 NEP 降解 NEP 合成底物的抑制作用。QRFSR 肽浓度依赖性地抑制了细胞表面的 HEK-hAPN 对 Mca-BK2 产荧光底物的降解。

[0247] 图 12 显示了 YQFRSR 肽在体内对鼠花费在舔爪 (经福尔马林注射过的后爪) 上的

时间的影响。平均值  $\pm$  SEM。

[0248] 图 13 显示了 YQRFSR 肽在体内对后爪注射福尔马林之后的痛性痉挛的次数的影响。平均值  $\pm$  SEM。

[0249] 图 14 显示了 YQRFSR 肽在体内对在注射福尔马林后 60 分钟后的痛性痉挛指数的影响。QRFSR 衍生肽所诱导的镇痛作用需要激活内源性阿片受体。

[0250] 实施例

[0251] 本研究被设计用于搜索天然金属外肽酶（特别是 NEP 和 / 或 APN）的抑制物，特别是在人体唾液分泌物中。对该产物的检测和分离的策略是依据于对唾液低分子量组分的分离，该组分抑制了表达膜锚定人 NEP 的人体细胞对 NEP 敏感性底物的内切蛋白酶解。本发明者已经开发出了功能检测（表达 NEP 的 LNCaP 和 HEK 人类细胞的膜制品）和分子分离（HPLC 色谱系统）的模型，其被用于通过序列分析人体中的天然的内源性 NEP 外肽酶抑制物即鼠 Sialorphin 的内源性的唾液功能类似物所进行的鉴定。

[0252] 实施例 1：人体唾液制剂

[0253] 建立了临床研究方案，其为巴斯德研究院的“centre de recherche Vaccinale et Biomedicale”，编号为 2045，该研究方案获得了 CCPRB 委员会（PARIS-COCHIN）的同意，并得到了 10 名健康男性志愿者的人体唾液，该研究开始于 2003 年 5 月，继续进行于 2003 年 10 月。将唾液收集到先前冷却的含有抑肽酶（1000KIU/ml）、Pefabloc（0.4mM）和 HCl（0.1N）（终浓度）的“microsorp”管内，预期该培养基能抑制蛋白裂解活性。因此，将唾液样品储存于  $-80^{\circ}\text{C}$ ，直到进行甲醇提取操作。

[0254] 实施例 2：NEP 抑制的材料和试验模型

[0255] 1- 人外肽酶 NEP 和 APN 的来源：

[0256] 已经描述了一些表达 NEP 和金属外肽酶家族的其它成员的人细胞株，其中这些细胞株是成骨细胞细胞株 MG-63（骨肉瘤）、滋养细胞细胞株 BeWo（胎盘绒毛膜癌）、前列腺上皮细胞株 LNCaP（腺癌）、和肠细胞细胞株 Caco-2（结肠癌）。首先开发出给定培养基中的用于细胞药理学分析的培养条件。其次，本发明者已经用 Northern 印迹和免疫细胞化学分子确定 LNCaP 和 BeWo 是唯一能在给定的培养条件下（即含有胰岛素、转铁蛋白和硒的 RPMI, GIBCO）以及分别在 DHT（二氢睾酮）和 forskolin 的诱导之后能表达 NEP（ARNm 和细胞表面蛋白）的细胞株。最后，在静态孵育源自这些细胞的膜制品的试验模型中，本发明者已经确定了容许在初始速度测定的条件（即  $100\text{pM}/\text{分钟}/\mu\text{g}$  LNCaP 细胞膜蛋白）下分析人 NEP 介导的对 P 物质的内切蛋白酶解的参数（比 BeWo 的特异活性低 10 倍）。在存在特异的合成 NEP 抑制物（例如 thiorphan）时，抑制了 LNCaP 膜活性（500nM 达到了 62% 的最大抑制力）。相反的，分别阻断氨肽酶（APN、APB）和血管紧张素转化酶（ACE）活性的 bestatin（ $25\mu\text{M}$ ）和卡托普利（ $10\mu\text{M}$ ）不能抑制细胞表面外肽酶对 P 物质的水解，因此说明在试验条件下，P 物质的细胞外降解主要是由位于这些细胞表面上的 NEP 内肽酶活性所引起的。

[0257] 另外，也已经开发出了利用经人 NEP cDNA 或人 APN cDNA（HEK 细胞不表达这些金属外肽酶）转染的 HEK 细胞的膜制品或可溶性重组人 NEP 或可溶性重组人 DPP IV（二肽基氨基肽酶 IV）（没有 N 末端的胞浆和跨膜片段）的体外模型。

[0258] 2- 底物和抑制剂

[0259] 在体外,通过在体外测定下面的合成及天然底物的降解可以检测出人细胞膜的膜氨基-和内-外肽酶活性:

[0260] a/ 合成的特异的产荧光的或显色的底物:

[0261] —Mca-R-P-P-G-F-S-A-F-K(Dnp)-OH 和 / 或 Suc-A-A-F-Amc (NEP) (R&Dsystems and Bachem)

[0262] —Ac-A-Amc 或 Ala-pNA (APN) (Bachem)

[0263] b/ 生理底物:

[0264] —修饰的氘标记的 P 物质 [(3, 4<sup>3</sup>H)Pro<sup>2</sup>-Sar<sup>9</sup>-Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-P 物质 (DuPont-NEN) 和天然的 P 物质:R-P-K-P-Q-Q-F-F-G-L-M(NEP-DPPIV-ACE) (Peninsula-Biovalley);

[0265] —天然的甲硫氨酸脑啡肽:Y-G-G-F-M(NEP-APN) (Peninsula-Biovalley)

[0266] 在存在或不存在不同的可获得的选择性的合成肽酶抑制剂时,用细胞膜肽酶测定这些底物的水解可以检测出肽检测法的特异性:

[0267] —Thiorphan, Phosphoramidon(NEP) (Sigma and Roche)

[0268] —Bestatin, Amastatin(APN) (Calbiochem)

[0269] —DPPIV 抑制剂 (DPPIV) (Calbiochem)

[0270] —Captopril(ACE) (Sigma)

[0271] 3- 肽酶活性的测定

[0272] 根据对鼠 Sialorphin 的功能表征中所开发及建立出的方案测定外肽酶活性 (Rougeot 等, 2003)。简单地,对于膜制品,将细胞在 4°C 下匀浆于 10 份体积 (体积 / 重量) 的 50mM Tris/HCl (缓冲于 pH 7.1) 中。在 1000xg 和 5°C 下进行第一次离心 5 分钟,以便去除细胞碎片和沉淀物中的细胞核。在 100000xg 和 5°C 下进行第二次离心 30 分钟,以便浓缩沉淀物中的膜级分,将其在冷 Tris/HCl 缓冲液中轻轻地洗涤三次,重悬于新鲜缓冲液内,取样并将其储存于 -80°C,直到被用作酶源。利用以牛血清白蛋白 (BSA) 作为标准物的 Bio-RadDC 蛋白检测法进行蛋白测定。

[0273] 在存在或不存在特异性抑制剂时,通过监测初始速度测定值条件下的代谢率测定出底物的水解。将抑制物加入到预孵育培养基中。标准的反应混合物包括终体积为 200 μL 50mM Tris-HCl (pH 值 6.5-7.2) 内的细胞膜。在预孵育 10 分钟之后,加入底物,并在 25°C 的持续摇晃水箱中进行消化 20 分钟。通过冷却到 4°C 并加入 HCl (终浓度为 0.3N) 来终止反应。然后离心反应管 (4700xg, 4°C, 15 分钟),并测定出剩余的完整底物及其代谢物。

[0274] 对于天然底物 (P 物质和 Met- 脑啡肽) 的应用,根据它们的不同的疏水特征分离并定量出反应产物:

[0275] —用 C-18 Sep-Pak cartridges (Waters) 分析放射性标记的 P 物质的水解。用 H<sub>2</sub>O-0.1% TFA 以及 25% 甲醇 -0.1% TFA (每种 4ml) 洗脱分离出 <sup>3</sup>H 代谢物。用 75-100% 甲醇 -0.1% TFA (4ml) 洗脱出完整的氘标记的底物。

[0276] —用 RP-HPLC 结合分光光度计分析 Met- 脑啡肽的水解 (C-18LUNAcolumn, AIT)。用线性梯度为 0.1% TFA 的水溶液到 0.1% TFA 的 100% 乙腈溶液 (1ml/min) 洗脱 30 分钟,可以分离出两种 Met- 脑啡肽代谢物 (YGG:5.8±0.2; FM:12.8±0.1 分钟滞留时间) 和完整底物 (YGGFM:18.8±0.2 分钟)。通过监测在 264nm (L3000Merck) 处的柱流出物可以检测它们的身份和相对数量 (峰高)。

[0277] 一也用放射免疫检测法 (RIA) 定量处初始 Met- 脑啡肽底物的缺失。检测使用抗 Met- 脑啡肽抗血清 (Gros 等, 1978) 和  $^{125}\text{I}$ -Met- 脑啡肽 (80TBq/mmol, NEN); 它可检测出微摩尔浓度的 Tyr-Gly-Gly 和 Phe-Met 代谢物终的纳摩尔浓度的 Met- 脑啡肽。用液闪光谱法可以测定出每个级分的放射性强度。

[0278] 对于合成底物的应用, 可以用多孔荧光分光光度计直接分析出现荧光信号 (强度和偏振) 的动力学; 信号的强度直接与反应期间所形成的代谢物的量成比例。

[0279] 实施例 3: 人唾液纯化和色谱法

[0280] 人唾液组分的提取及纯化方案类似与为分子表征大鼠唾液中的 Sialorphan 所开发和建立的方案 (Rougeot 等, 1994), 分析了提取物和色谱级分抑制含 NEP 的人细胞膜对生理底物 P 物质的水解的能力。

[0281] 提取并纯化作为脑啡肽活性的强调节剂的人唾液组分。简单地, 在  $4^{\circ}\text{C}$  下冻融之后, 根据下面的方案处理唾液样品:

[0282] 一甲醇-酸提取方案:  $4^{\circ}\text{C}$  下提取甲醇-酸中的的分子量组份; 将 1 体积的唾液加入到 4 体积的含有 0.1% 四氟乙酸 (TFA) 溶液的甲醇中。第一步要实现去除高分子量的蛋白 (包括降解酶), 所述蛋白分别在酸和甲醇介质中被灭活和沉淀, 并容许溶解小分子量的唾液成分 ( $10 \leq \text{Kda}$ )。快速地涡旋甲醇混合物, 并在 12000g 和  $4^{\circ}\text{C}$  下离心 15 分钟, 经在  $-110^{\circ}\text{C}$  下冻干从上清液中去除甲醇。

[0283] 一 HPLC 阳离子交换色谱法 (HPLC-EC): 将甲醇提取的唾液溶解于溶剂 A (即 10mM 醋酸铵, pH 值为 4.3) 中, 并将其注射到 HEMA-IEC B10-1000 羧甲基柱 (Alltech) 中。根据它们的阳离子特征, 分别用两步线性梯度 10-500mM 和 500-900mM 醋酸铵 (pH 值 4.7) (流速为 1ml/min) 洗脱并分离出组分。收集 2ml 级分, 并在冻干后测试其抑制人外肽酶活性 (LNCaP) 的能力。

[0284] 如图 1 所示, 利用加入到代表性唾液样品中的内在标准物 (氘标记的肽:  $^3\text{H}$ -YQRFSR) 评价提取和连续色谱的质量和回收率; 加入到对应于 2.5ml 人体唾液所提取到的样品中的标记物的回收率是 75-84%。对甲醇提取的唾液的 HPLC 阳离子交换色谱法 (图 2, 对应于 7ml 人体唾液的唾液提取物的代表性色谱) 清楚地显示出存在着两种主要的分子唾液组分, 其被洗脱于第一步的醋酸铵梯度值 (10-500mM), 滞留时间分别为 26-28 分钟和 36-38 分钟, 该组分抑制了 90% 的人膜结合肽酶对 P 物质的内切蛋白酶解 (图 2 中可见的两个滞留时间为 6 和 48 分钟的活性峰分别对应于洗脱液和柱的总体积)。

[0285] 一 HPLC 反相色谱法 (RP-HPLC)。将先前 HPLC-EC 的活性级分溶解于溶剂 A [0.1% TFA 的水溶液] 中, 并将其注射到 Synergi Max-RP 柱 (Phenomenex) 内。用线性梯度 1-99% 溶剂 B [乙腈-TFA 的体积比为 100-0.1] 洗脱样品组分。收集 1ml 级分, 并在冻干后分析其抑制细胞表面的人外肽酶活性 (LNCaP) 的能力。内标记物的回收率为 61%。RP-HPLC (图 3) 对从先前 HPLC-EC 的 13-14 级分 (滞留时间为 26-28 分钟) 中所分离到的活性分子形式的分离显示出存在两种主要的抑制人外肽酶活性的分子群, 并且其被洗脱于乙腈梯度值内, 滞留时间分别为 23-25 和 28-30 分钟。

[0286] 将这些级分在经线性梯度 1-99% 溶剂 B [100% 甲醇-0.1% TFA] 洗脱的 synergi Max-RP-HPLC 柱中进行进一步的纯化。在 1 分钟的间隔内, 将柱洗脱液收集于 microsorb 管内, 并在冻干后测试这些级分的抑制抑制 NEP 的活性。如图 4 所示, 分离出了滞留时间分别



为 20-21 以及 29-30 分钟两种抑制人外肽酶对 P 物质的内切蛋白酶解的形式,并且确定了它们的氨基酸序列。

[0287] —CIPHERGEN 蛋白芯片和氨基酸序列分析。利用 Applied Biosystems 肽测序仪 (plate-forme d'Analyse et deMicrosequen age des Prot ines, Institut Pasteur), 通过自动化的 Edman 降解进行 N 末端的序列分析。从最后的 RP-HPLC 中在滞留时间为 10 分钟时所洗脱下的分子形式 (级分 20) 对应于 690 和 769.5Da 分子量,并且对应于下面的 5 个氨基酸残基的序列:QRFSR。在 26 分钟滞留时间所洗脱下的级分 (级分 28) 分别对应于两种分子组分 622-666Da 和 6495Da;对最高分子量的氨基酸的测定显示它对应于唾液的碱性富脯氨酸的多肽序列,是人的 61 个氨基酸序列的 PRP-E (Isemura 等,1982)。

[0288] 通过与大鼠唾液 Sialorphin 的类比,这些数据为人唾液 Sialorphin 样肽的存在提供了直接证据,所述肽是五肽 QRFSR,其在结构与功能上都与大鼠的五肽 QHNPR 非常接近,并且被分泌到人唾液分泌物内。它们支持了 QRFSR 是前体蛋白经蛋白裂解加工处理后的成熟产物,加工的方式类似于 SMR1 和肽激素前体的成熟途径。此外,至于 QHNPR 大鼠肽,所分泌的 QRFSR 肽似乎以不同的形式蓄积于人唾液分泌物内,其中游离形式可能包括乙酸盐形式,以及复合形式包括了与唾液 PRP-E 的高疏水性的相互作用。

[0289] 实施例 4:QRFSR 肽的合成和测试

[0290] 合成 QRFSR 肽,并在人 LNCaP 细胞膜静态孵育物的试验模型中,体外分析 QRFSR 抑制生理的 NEP 底物 (P 物质) 的降解的能力。QRFSR 肽抑制了人前列腺上皮细胞表面上所表达的 NEP 介导的对 P 物质的细胞外的内切蛋白酶解。QRFSR 的有效浓度为 1 到 25  $\mu$ M, 半最大 (IC50) 浓度为 11  $\mu$ M (图 5)。令人惊讶的是,在所观察的鼠 Sialorphin 对人 NEP 活性的抑制作用不同的是,人 QRFSR 肽对鼠肾脏 NEP 活性的抑制作用比对人细胞表面 NEP 活性的抑制作用至少低 10 倍。衍生肽 YQRFSR (被合成用于开发抗体和免疫检测测定系统中的氘标记的以及免疫原性的缀合物) 明显地表现出对人和鼠外-内肽酶活性的相似的抑制作用 (图 6 和 7)。

[0291] 表:天然的和衍生的人及鼠肽对人和鼠外内肽酶活性的抑制能力

[0292]

外内肽酶来自	人类细胞	大鼠组织
QHNPR	4 到 40 $\mu$ M	0.4 到 4 $\mu$ M
QHNP	未确定	$\geq$ 50 $\mu$ M
QRFSR	2.5 到 25 $\mu$ M	$\geq$ 100 $\mu$ M
YQRFSR	5 到 50 $\mu$ M	5-75 $\mu$ M
QRGPR	$\geq$ 90 $\mu$ M	未确定
QRGPRGP	$\geq$ 90 $\mu$ M	未确定

[0293] 除了可能成熟于 hPB 基因产物的 QRGPR 肽 (20-90  $\mu$ M) 对 LNCaP 人细胞膜所诱导的 P 物质内切蛋白酶解没有影响外,该结果使得本发明者推测天然 NEP 抑制物五肽中的三

个中心氨基酸（常见的是 Q-N 末端和 R-C 末端）是它们与 NEP 外内肽酶的功能性相互作用的亲和力和 / 或特异性的决定性信号。此外,除了鼠和人 NEP 之间的强的初级氨基酸类似性 (#85%) 之外,本发明者观察到了两种天然抑制物五肽（分别是鼠 QHNPR 和人 QRFSR）的功能性相互作用的相对特异性。所有的这些结果都为存在两种外酶的二级及三级结构的构象特异性提供了证据,对 Sialorphin 或其衍生物与人 NEP 所形成的二元复合物的晶体结构的测定,容许进一步了解这些天然抑制物的结合模式。

[0294] 本发明者利用氚标记的  $^3\text{H}$ -YQRFSR 肽在成熟雄鼠体内建立了鼠 Sialorphin 的这种人类功能性肽模拟物的药物动力学和药效学的参数（生物分布 - 生物利用度 - 清除率），以及确定了它在体内和体外的代谢机制和转化（图 8）。RP-HPLC 色谱特征发现：

[0295] —YQRFSR 肽不受含 NEP 的人细胞膜的代谢,事实上,回收了 93% 完整肽,而没有代谢膜时,回收了 94%；

[0296] —在相同的试验条件下,YQRFSR 肽抑制了 70% 的这些人细胞膜对 P 物质的内切蛋白酶解。

[0297] 因此,YQRFSR 能用于研究 BPLP 成熟产物在急性疼痛（例如针刺疼痛试验和福尔马林试验）的鼠行为模型中的镇痛活性,这些模型已经被用于研究 Sialorphin 在体内的功能特征 (Rougeot 等,2003)。

[0298] 实施例 5 :在体外进一步表征 QRFSR 肽

[0299] 通过在利用纯化的可溶性人 NEP 和人 DPPiV (没有 N 末端的胞浆和跨膜片段) 的体外酶检测法中测定 P 物质 (SP) 的内切蛋白酶解,可以评价 QRFSR 肽的抑制特异性。利用选择性的重组 hNEP 检测法,建立了人 QRFSR 肽与 hNEP 的分子相互作用,这给肽抑制 hNEP 活性提供了直接证据,如图 9 所示,QRFSR 肽阻止了 90% 的 NEP 介导的 SP 的内切蛋白酶解,它的抑制力确实是浓度依赖性的 ( $r^2 = 0.99$ ,  $n = 18$ ), 范围从 5 到 50  $\mu\text{M}$ , 半最大浓度是  $29 \pm 1 \mu\text{M}$ 。相反,25 到 50  $\mu\text{M}$  的 QRFSR 肽都不能阻止重组 hDPPiV 对 SP 的降解,说明 QRFSR 肽在体外对分解代谢 SP 的细胞表面外酶的抑制力仅仅是因为它们与 NEP 外肽酶的特异的相互作用。此外,从监视 SP 的体外代谢的研究中,显示出 QRFSR 肽和鼠 QHNPR-Sialorphin 一样都不能完全地阻止脊髓的 SP 灭活外肽酶对内源性 SP 的降解,因此在体内不能完全阻止 SP 介导的伤害作用。

[0300] 外肽酶 (NEP 和 APN) 在体内以惊人的效率（在数秒钟内）灭活脑啡肽。因为 NEP 和 APN 在脑啡肽灭活中的互补作用,仅仅合成的 NEP/APN 合成抑制物可以在不同的疼痛模型中诱导出抗伤害应答。

[0301] 因此,在利用选择性地表达人膜锚定的 NEP 或 APN 的重组 HEK 人类细胞的膜制品的酶检测法中,评价了 QRFSR 肽的抑制特异性。在实验室中开发出了这些转染的细胞模型。通过测定人工的特异性产荧光底物的降解可以在体外检测出人细胞膜的膜氨基 - 和内 - 外肽酶活性,所用的 NEP 底物是 Mca-R-P-P-G-F-S-A-F-K-(Dnp)-OH (Mca-BK2) 以及 APN 底物是 Ala-pNA。利用选择性的膜锚定 hNEP 检测法,本发明者发现 QRFSR 肽对 NEP 对 Mca-BK2 的内切蛋白酶解的抑制作用是浓度依赖性的 ( $r^2 = 0.88$ ,  $n = 29$  个测定点), 以及有效剂量范围是从 5 到 50  $\mu\text{M}$ 。利用选择性的膜锚定的 hAPN 检测法,本发明者已经证实 QRFSR 肽抑制了 hAPN 对 Ala-pNA 的降解,有效剂量是 10 到 90  $\mu\text{M}$  ( $r^2 = 0.93$ ,  $n = 22$  个测定点) (见图 10 和 11)。

[0302] 表 1 :QRFSR 在体外和体内对 NEP 和 APN 外酶活性的抑制作用 ( $IC_{50}$ ) 的总结。

[0303]

酶来源	底物	IC50 值 QRFSR 肽
HEK-hNEP	P 物质 (60nM)	14 $\mu$ M
	McaBK2 (5 $\mu$ M)	33 $\pm$ 6 $\mu$ M
LNCaP	P 物质	11 $\pm$ 3 $\mu$ M
	McaBK2	25 $\pm$ 1 $\mu$ M
hNEP 可溶性	P 物质	29 $\pm$ 1 $\mu$ M
HEK-hAPN	Ala-pNA (100 $\mu$ M)	65 $\pm$ 9 $\mu$ M

[0304] 这些结果说明人 QRFSR 五肽在体外是一种 NEP 和 APN 外肽酶活性的有效的双重抑制剂。此外,因为 NEP 和 APN 在脑啡肽灭活中的互补作用,以及与表现出强的镇痛活性的鼠 Sialorphin 的类似性,组合的生物学信息和所获得的基因组信息使得本发明者推测 QRFSR 肽在体内通过抑制灭活脑啡肽的 NEP-APN 外肽酶而实现了脑啡肽依赖性的抗伤害的机制。

[0305] 实施例 6 :QRFSR 肽在体内的功能表征

[0306] 尽管在大鼠和人 NEP 之间存在着强的初级氨基酸序列的同源性 ( $\approx 85\%$ ),本发明者在两种抑制剂五肽 (分别是大鼠 QHNPR 和人 QRFSR) 的抑制力上观察到了相对的物种选择性。所合成的氘标记的衍生肽 YQRFSR 表现出了对人和大鼠外内肽酶的相对相似的抑制效率 (有效浓度范围在 5 到 50  $\mu$  M 之间)。因此,在急性疼痛的行为鼠模型 (即福尔马林试验) 中研究了 QRFSR 衍生肽的抗伤害作用,该模型也被用于对鼠 Sialorphin 作用的体内表征 (Rougeot 等, 2003)。全身施用 0.5 和 1mg/kg 的 YQRFSR 肽抑制了早期 (注射福尔马林后的头 20 分钟) 的舔爪 (福尔马林注射过的后爪)。例如,它明显地减少了治疗鼠在舔爪上所花费的时间,从 144 $\pm$ 17s, n = (载体) 到 97 $\pm$ 14s, n = 8 (0.5mg/kg) ( $p = 0.05$ ) 以及到 84 $\pm$ 13s, n = 8 (1mg/kg) ( $p = 0.02$ , Dunnett t 检验)。令人惊讶的是,与大鼠 Sialorphin 处理过的大鼠不同的是, YQRFSR 处理过的大鼠在福尔马林试验的后期 (福尔马林注射后 40 到 60 分钟) 在舔爪上所花费的时间更少 (载体处理过的大鼠 :63 $\pm$ 13s 对 1mg/kg 处理过的大鼠 :9 $\pm$ 3s,  $p = 0.001$ )。在福尔马林诱导的疼痛模型中,尽管在有效剂量上不如大鼠 Sialorphin 强 (100-200  $\mu$  g/kg),但是 QRFSR 衍生肽似乎有着与合成的混合 NEP-APN 抑制物 RB101 (2.5-5mg/kg, IV) 同样有效的疼痛抑制力 (1mg/kg, IV)。

[0307] 这些数据 (如图 12、13 和 14 所示) 清楚地说明 YQRFSR 肽抑制了急性和长期化学刺激所诱导的伤害作用。

[0308] 它的镇痛能力与 3mg/kg 剂量吗啡几乎一样有效。

[0309] 此外,在存在阿片受体拮抗剂 thenalaxone 时,可以完全逆转 QRFSR 衍生肽在化学激发的疼痛行为中所诱导的镇痛作用,这与其镇痛作用涉及到内源性阿片能途径是相一致的。

[0310] 参考文献：

[0311] Beaumont et al, (1996) zinc metallopeptidases in health and disease, 105-129).

[0312] Dickinson, D.P., Thiesse, M., 1996. cDNA cloning of an abundant human lacrimal gland mRNA encoding a novel tear protein. *Curr Eye Res.* 15(4), 377-386.

[0313] Ganteet et al, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33 :1699 (1994)

[0314] Gomeni R. et al, Computer-assisted drug development; an emerging technology for designing first-time-in-man and proof-of-concept studies from preclinical experiments. *Eur. J. of Pharmaceutical Sciences* (2001) 261-270.

[0315] Horwell et al, *Bioorg. Med. Chem.* 4 :1573 (1996).

[0316] Isemura, S., Saitoh, E., 1997. Nucleotide sequence of gene PBI encoding a protein homologous to salivary proline-rich protein P-B. *J Biochem(Tokyo)*. 121(6), 1025-1030.

[0317] Isemura, S., 2000. Nucleotide sequence of gene PBII encoding salivary proline-rich protein P-B. *J Biochem(Tokyo)*. 127(3), 393-398.

[0318] Isemura, S., Saitoh, E., Sanada, K., 1982. Fractionation and characterization of basic proline-rich peptides of human parotid saliva and the amino acid sequence of proline-rich peptide P-E. *J Biochem(Tokyo)*. 91(6), 2067-2075.

[0319] Jones E. et al, Drug discovery technology. Start-up show case and structure-based drug design. *Drugs*, Sept. 2002 ;5(9) :894-895.

[0320] Kan, impact of recombinant DNA technology and protein engineering on structure-based drug design: case studies of HIV-1 and HCMV proteases (2002).

[0321] Kenny et al, (1977) Proteinases in mammalian cells and tissues.

[0322] Kenny et al, (1987) Mammalian ectoenzymes.

[0323] Leissring et al, (2003) Enhanced Proteolysis of (3-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death, *Neuron.* ,40, 1087-1093.

[0324] Liskampetal, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 1 :113 (1994).

[0325] Marini, M., Roda, L. G., 2000. Enkephalin-degrading enzymes and their inhibitors in human saliva. *Peptides*. 21(1), 125-135.

[0326] Newell et al, (2003) Thiorphan-induced neprilysin inhibition raises amyloid levels in rabbit cortex and cerebrospinal fluid, *Neuroscience letters* 350, 178-180.

[0327] Oefner C. et al Structure of human Neutral Endopeptidase (Neprilysin) complexed with Phosphonamidon, *J. Mol. Biol.* (2000), 296, 341-349.

[0328] Potempa J. and Travis. J., Proteinases as virulence factors in bacterial

diseases and as potential targets for therapeutic interaction with proteinase inhibitors. In proteases as targets for therapy. 99, 159-188, Eds K. Helm, B. D. Korant and J. C. Cheronis-Spinger Handbook Exp. Pharm. 140.

[0329] Roques et al (1993) Pharmacological Reviews 45, 87-146.

[0330] Rosinski-Chupin, I., Tronik, D., Rougeon, F., 1988. High level of accumulation of amRNA coding for a precursor-like protein in the submaxillary gland of male rats. Proc Natl Acad Sci USA. 85(22), 8553-8557.

[0331] Rougeot, C., Messaoudi, M., Hermitte, V., Rigault, A. G., Blisnick, T., Dugave, C., Desor, D., Rougeon, F., 2003. Sialorphan, a natural inhibitor of rat membrane-bound neutral endopeptidase that displays analgesic activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(14), 8549-8554.

[0332] Rougeot, C., Rosinski-Chupin, I., Njamkepo, E., Rougeon, F., 1994. Selective processing of submandibular rat 1 protein at dibasic cleavage sites. Salivary and bloodstream secretion products. Eur J Biochem. 219(3), 765-773.

[0333] Rougeot, C., Vienet, R., Cardona, A., Le Doledec, L., Grognet, J. M., Rougeon, F., 1997. Targets for SMR1-pentapeptide suggest a link between the circulating peptide and mineral transport. Am J Physiol. 273(4 Pt 2), R1309-1320.

[0334] Sambrook et al, (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

[0335] Seebach et al, Helv. Chim. Acta 79 :913 (1996).

[0336] Seidah et al, (1995) the mammalian family of subtilisin/Kexin-like, Pro-protein Convertases. Intramolecular chaperones and Protein folding; 9, 181-203.

[0337] Turner et al (2001) Bioessays, 23, 261-9.

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; 巴斯德研究院

&lt;120&gt; 衍生自人BPLP蛋白的肽、编码所述肽的多核苷酸和针对所述肽的抗体

&lt;130&gt; BET 06P0888

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 5

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 947

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (81)..(686)

&lt;400&gt; 1

```

aattgagtat ctggcaagag taagattaag cagtaatttg ttccaaagaa gaatcttcta 60
ccaaggagca actttaaaga atg aaa tta act ttc ttc ttg ggc ctg ttg gct 113
Met Lys Leu Thr Phe Phe Leu Gly Leu Leu Ala
      1              5              10

ctt att tca tgt ttc aca ccc agl gag agt caa aga ttc tcc aga aga 161
Leu Ile Ser Cys Phe Thr Pro Ser Glu Ser Gln Arg Phe Ser Arg Arg
      15              20              25

cca tat cta cct ggc cag ctg cca cca cct cca ctc tac agg cca aga 209
Pro Tyr Leu Pro Gly Gln Leu Pro Pro Pro Pro Leu Tyr Arg Pro Arg
      30              35              40

tgg gtt cca cca agt ccc cca cct ccc tat gac tca aga ctt aat tca 257
Trp Val Pro Pro Ser Pro Pro Pro Pro Tyr Asp Ser Arg Leu Asn Ser
      45              50              55

cca ctt tct ctt ccc ttt gtc cca ggg cga gtt cca cca tct tct ttc 305
Pro Leu Ser Leu Pro Phe Val Pro Gly Arg Val Pro Pro Ser Ser Phe
      60              65              70              75

tct cga ttt agc caa gca gtc att cta tct caa ctc ttt cca ttg gaa 353
Ser Arg Phe Ser Gln Ala Val Ile Leu Ser Gln Leu Phe Pro Leu Glu
      80              85              90

tct att aga caa cct cga ctc ttt ccg ggt tat cca aac cta cat ttc 401
Ser Ile Arg Gln Pro Arg Leu Phe Pro Gly Tyr Pro Asn Leu His Phe
      95              100              105

cca cta aga cct tac tat gta gga cct att agg ata tta aaa ccc cca 449
Pro Leu Arg Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Ile Arg Ile Leu Lys Pro Pro
      110              115              120

ttt cct cct att cct ttt ttt ctt gct att tac ctt cct atc tct aac 497
Phe Pro Pro Ile Pro Phe Phe Leu Ala Ile Tyr Leu Pro Ile Ser Asn
      125              130              135

cct gag ccc caa ata aac atc acc acc gca gat aca aca atc acc aca 545
Pro Glu Pro Gln Ile Asn Ile Thr Thr Ala Asp Thr Thr Ile Thr Thr

```

[0002]

140	145	150	155	
aat ccc ccc acc act gca aca gca acc acc agg cac ttc cac aaa acc				593
Asn Pro Pro Thr Thr Ala Thr Ala Thr Thr Arg His Phe His Lys Thr				
	160	165	170	
cac aat gac gat cag ctc ctc aac agt acc tat ctc ttc aac acc aga				641
His Asn Asp Asp Gln Leu Leu Asn Ser Thr Tyr Leu Phe Asn Thr Arg				
	175	180	185	
gcc tgc cac ctc cat atc agc agc aac ccc cgc agc atc tac tga				686
Ala Cys His Leu His Ile Ser Ser Asn Pro Arg Ser Ile Tyr				
	190	195	200	
aaatactact caaattctcg ccaaccgtcc tcacacagta ttgctcaatg ccaactgtcca 746				
agttacgact tocaaccaa ctatattaag cagcccagcc tttaaaagtt tttggcaaaa 806				
actctttgcc atttttgggtt gaacatgcaa taaatgatat tttccaaact gctctgatat 866				
ttagaagaa ataaactgca atgattttga tggaaccaac cctgatctaa ccagcacact 926				
aaataaagta tttgagcaat a 947				
<210> 2				
<211> 201				
<212> PRT				
<213> Homo sapiens				
<400> 2				
Met Lys Leu Thr Phe Phe Leu Gly Leu Leu Ala Leu Ile Ser Cys Phe				
1	5	10	15	
Thr Pro Ser Glu Ser Gln Arg Phe Ser Arg Arg Pro Tyr Leu Pro Gly				
	20	25	30	
Gln Leu Pro Pro Pro Pro Leu Tyr Arg Pro Arg Trp Val Pro Pro Ser				
	35	40	45	
Pro Pro Pro Pro Tyr Asp Ser Arg Leu Asn Ser Pro Leu Ser Leu Pro				
	50	55	60	
Phe Val Pro Gly Arg Val Pro Pro Ser Ser Phe Ser Arg Phe Ser Gln				
	65	70	75	80
Ala Val Ile Leu Ser Gln Leu Phe Pro Leu Glu Ser Ile Arg Gln Pro				
	85	90	95	
Arg Leu Phe Pro Gly Tyr Pro Asn Leu His Phe Pro Leu Arg Pro Tyr				
	100	105	110	
Tyr Val Gly Pro Ile Arg Ile Leu Lys Pro Pro Phe Pro Pro Ile Pro				
	115	120	125	
Phe Phe Leu Ala Ile Tyr Leu Pro Ile Ser Asn Pro Glu Pro Gln Ile				
	130	135	140	
Asn Ile Thr Thr Ala Asp Thr Thr Ile Thr Thr Asn Pro Pro Thr Thr				
	145	150	155	160
Ala Thr Ala Thr Thr Arg His Phe His Lys Thr His Asn Asp Asp Gln				
	165	170	175	
Leu Leu Asn Ser Thr Tyr Leu Phe Asn Thr Arg Ala Cys His Leu His				

[0003]

180 185 190  
Ile Ser Ser Asn Pro Arg Ser Ile Tyr  
195 200

<210> 3  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 3  
Gln Arg Phe Ser Arg  
1 5

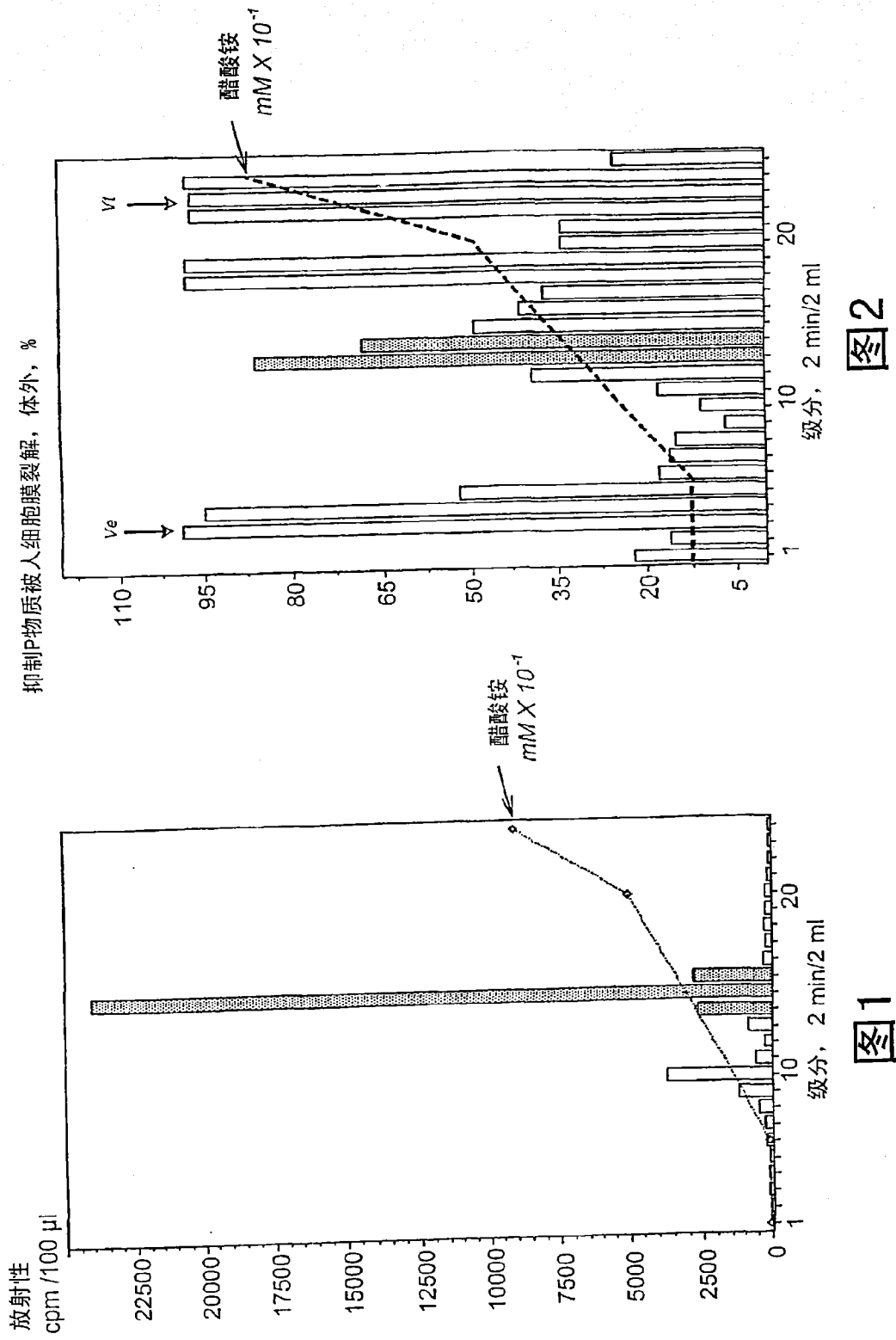
<210> 4  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

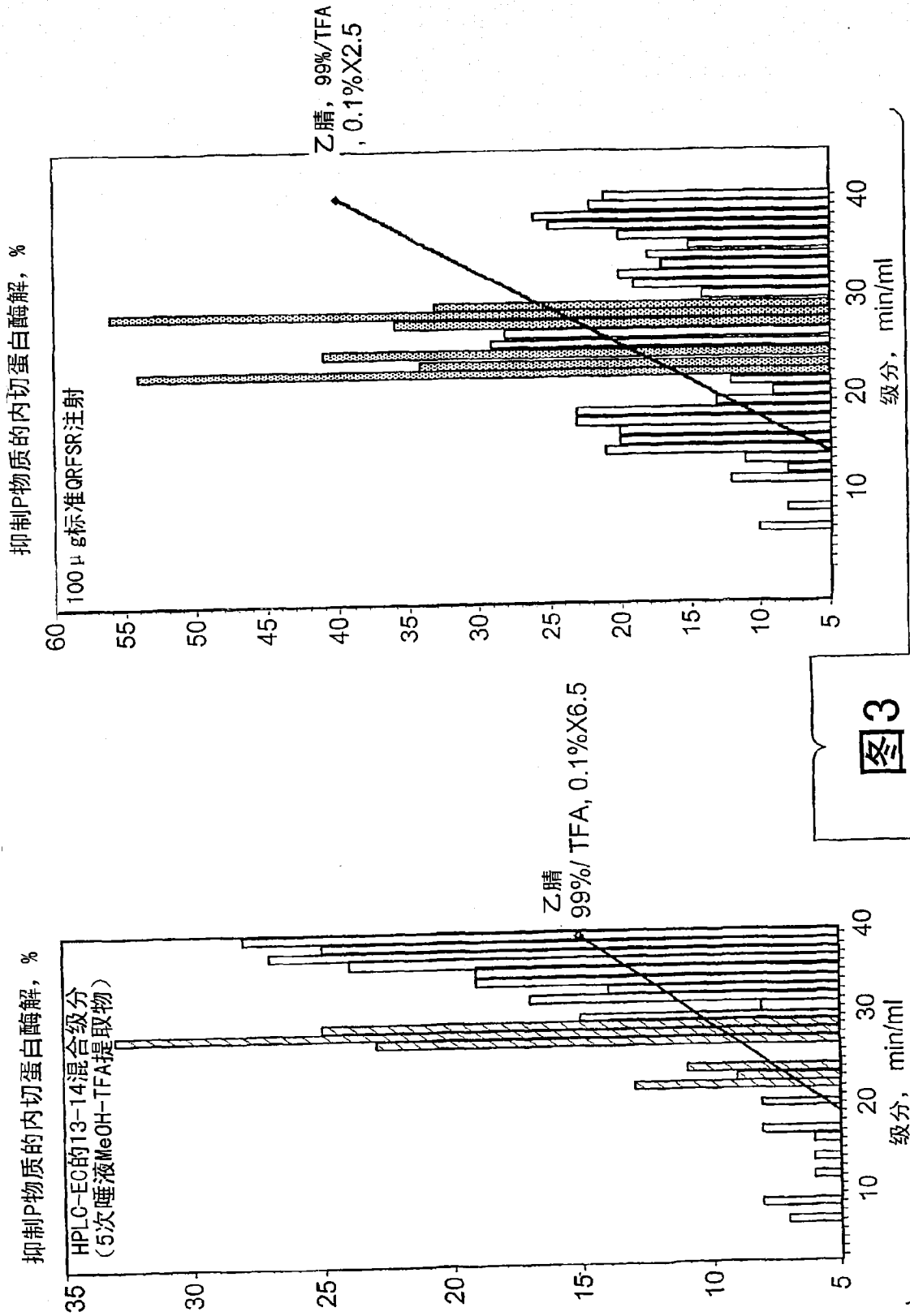
<400> 4  
Tyr Gln Arg Phe Ser Arg  
1 5

<210> 5  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
Cys Gln Arg Phe Ser Arg  
1 5







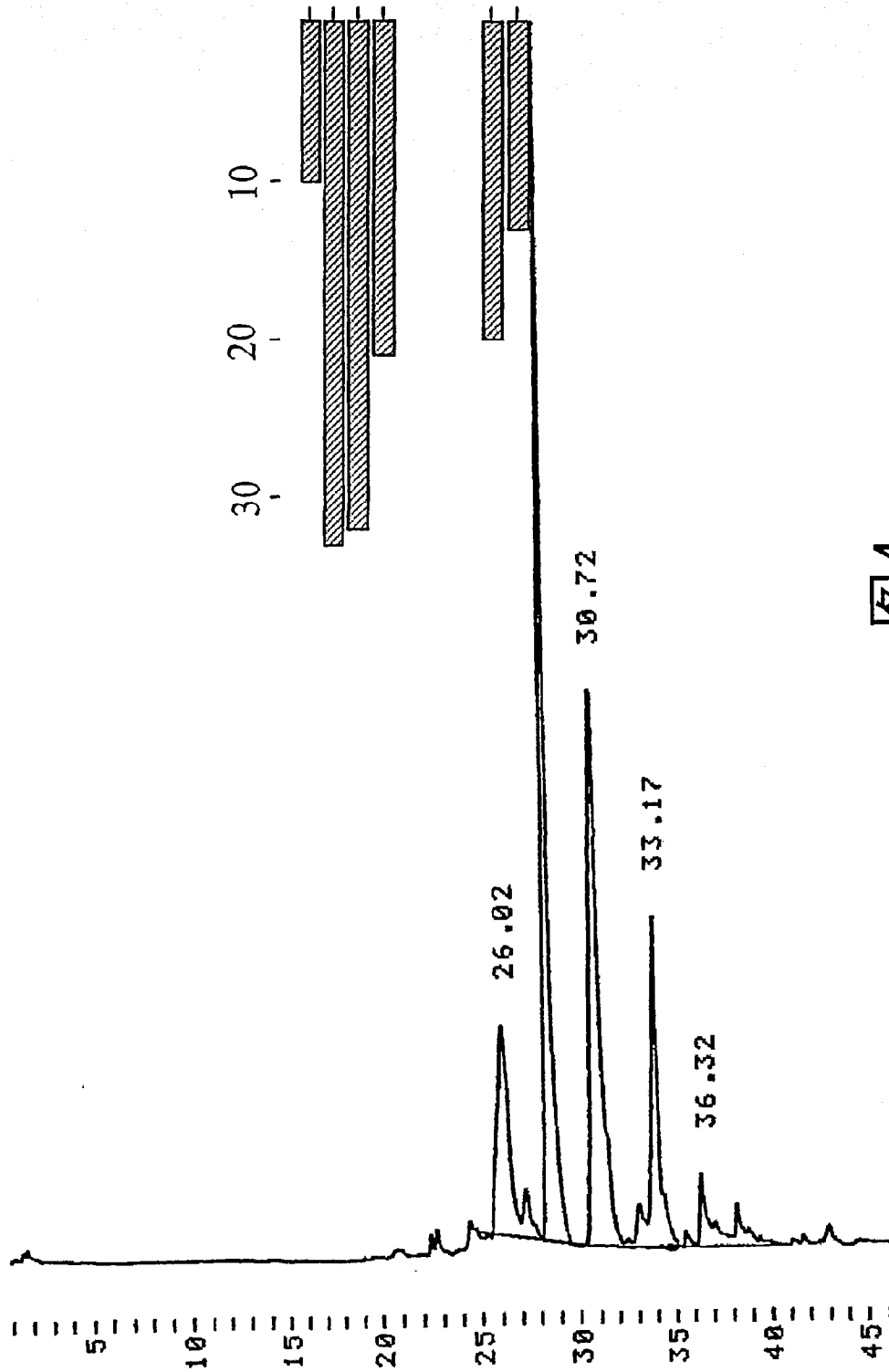


图4

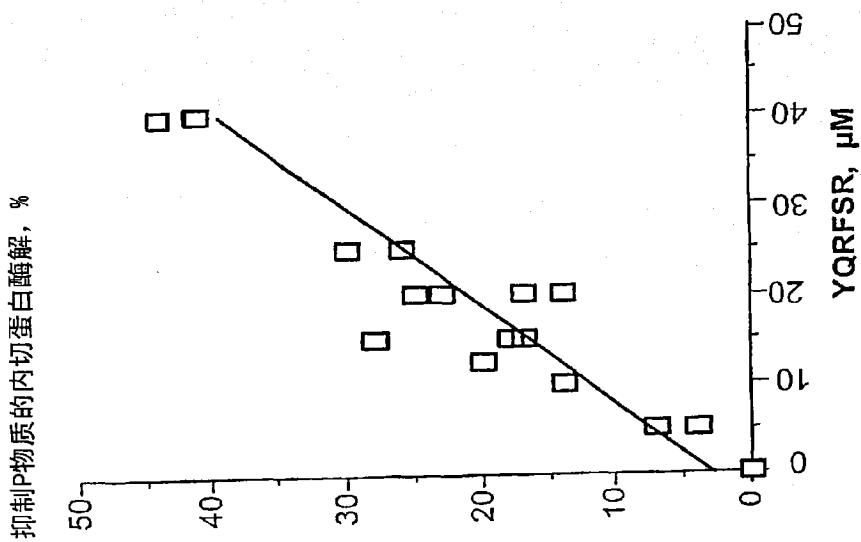


图6

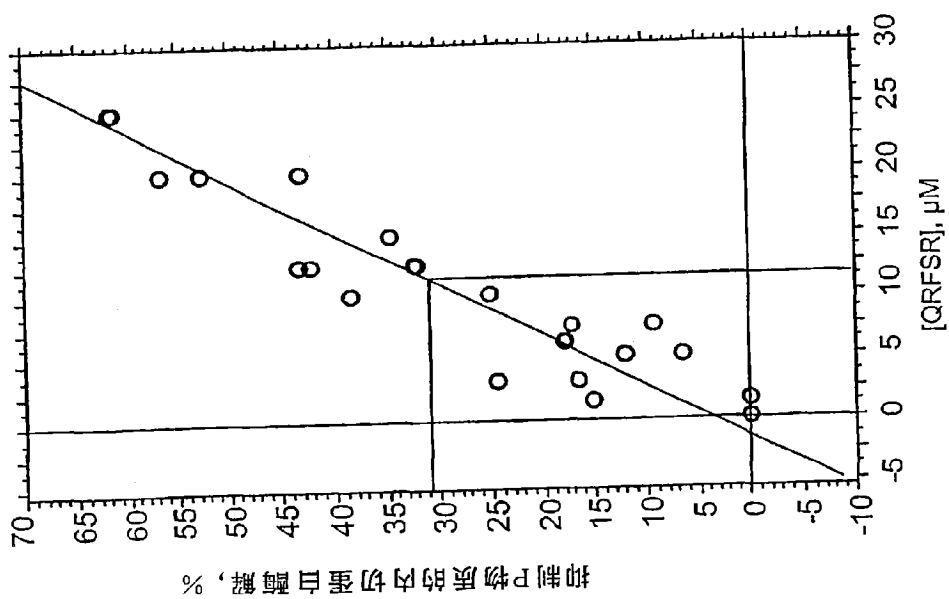
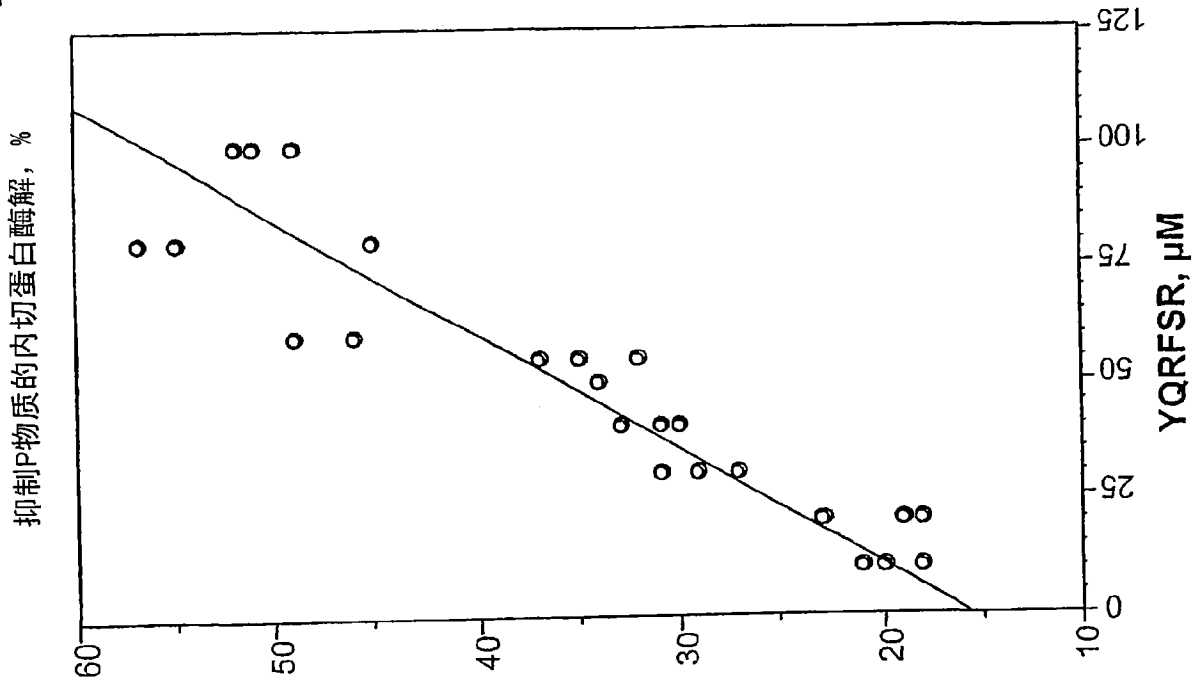


图5

图7



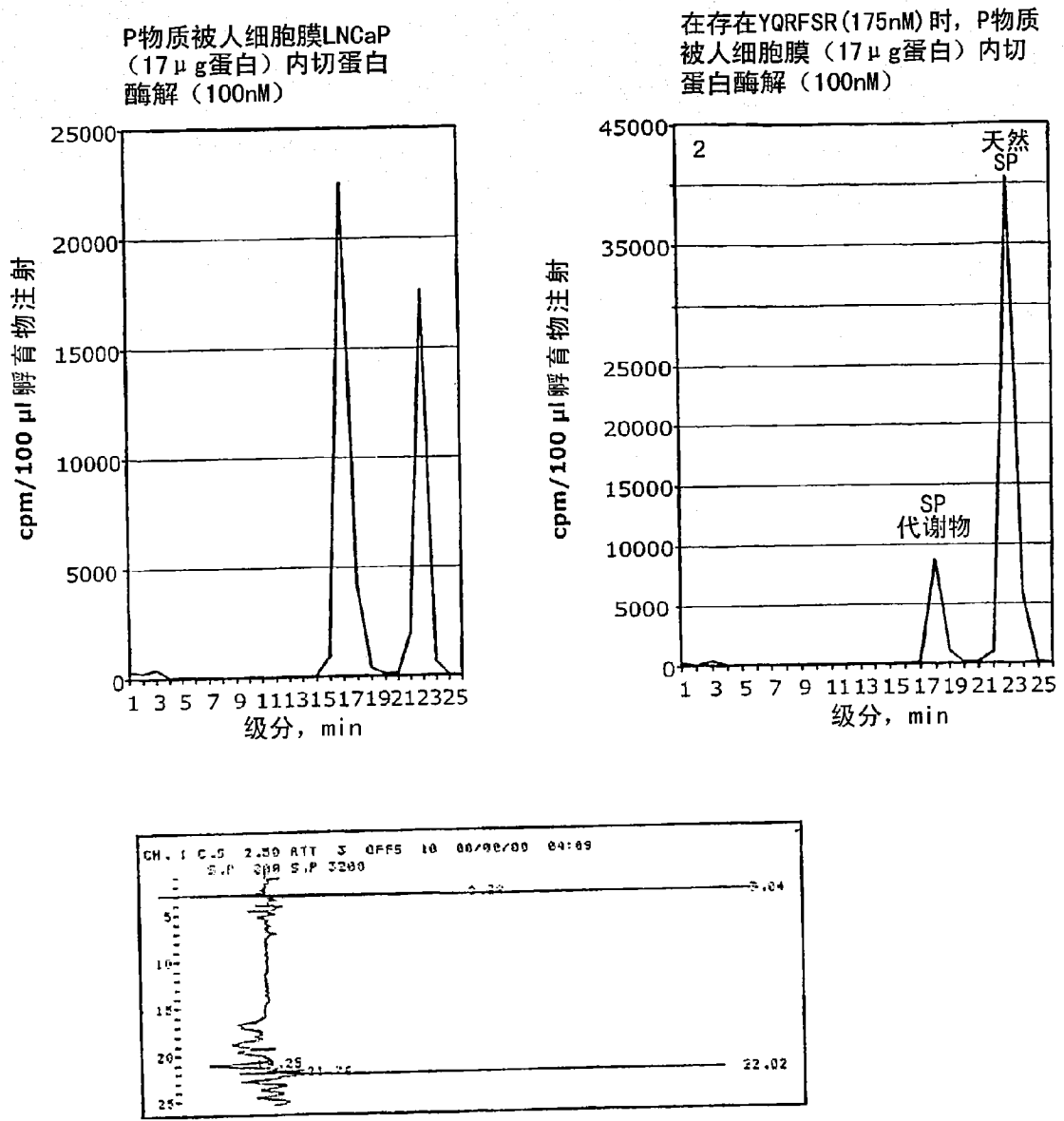


图 8

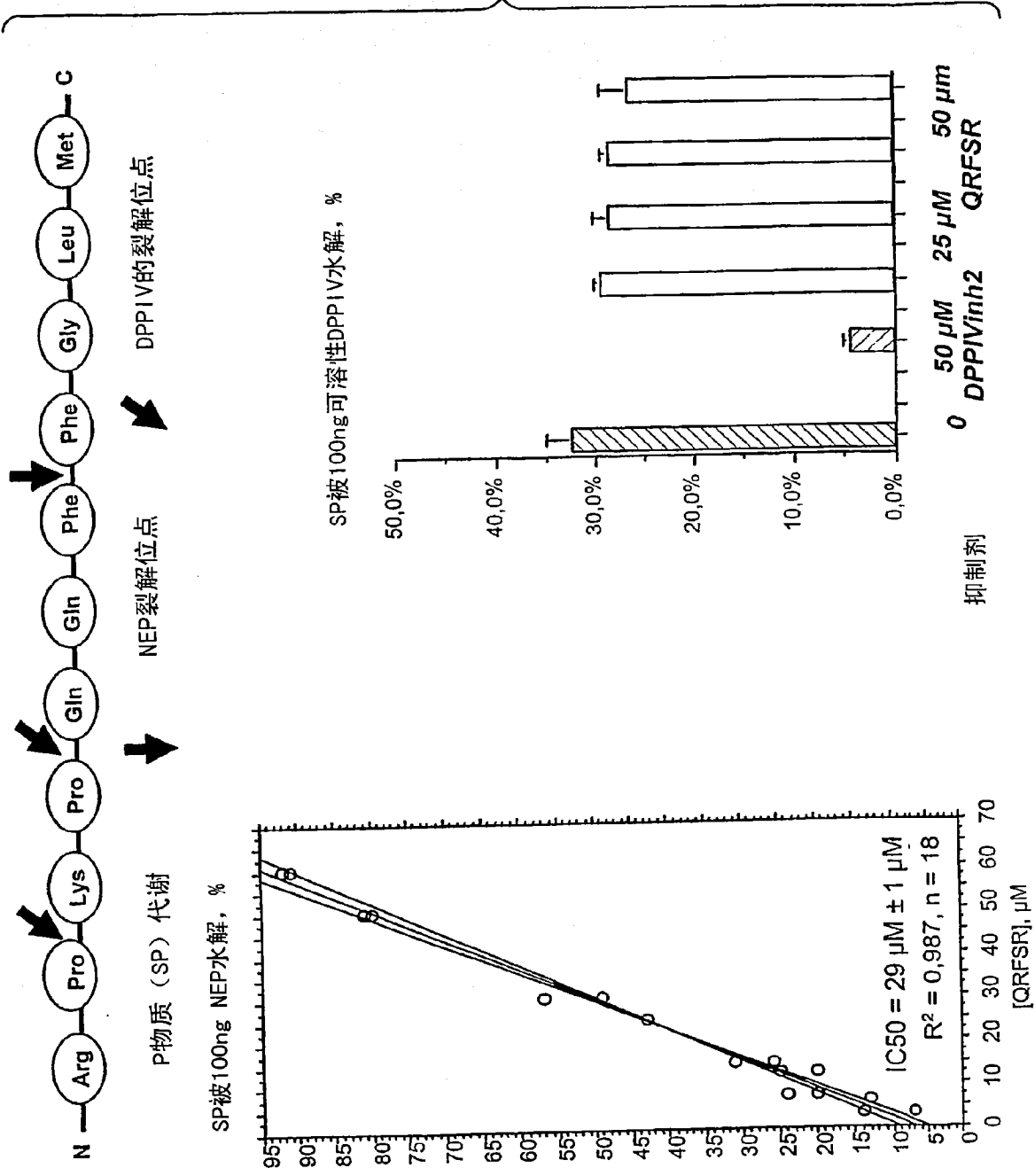


图9

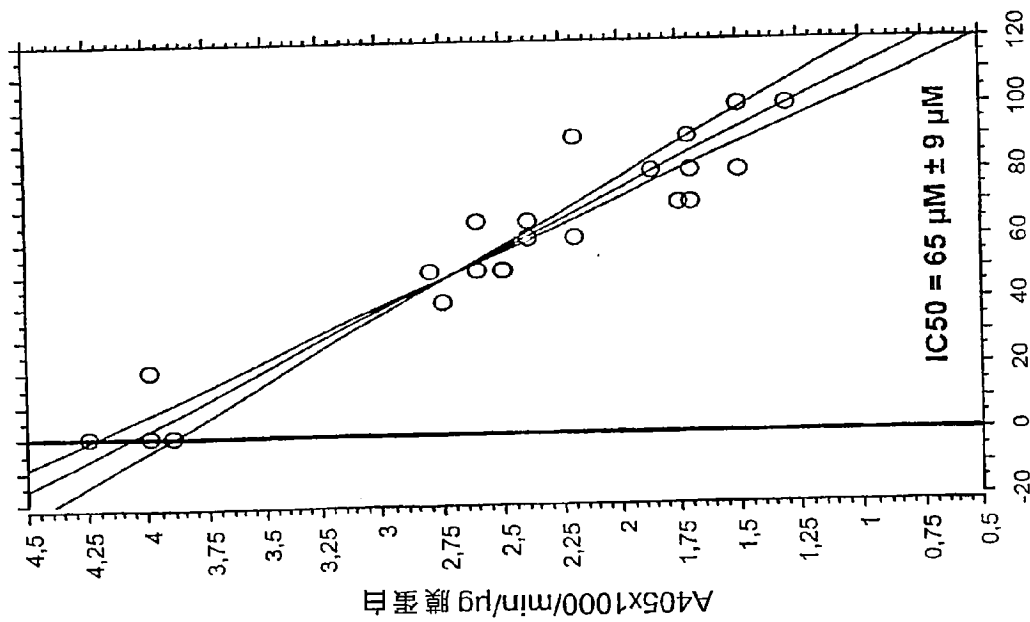


图10

A405x1000/min/μg 膜蛋白 = 4,066 - ,028 \* [QRFSR], μM; R<sup>2</sup> = 0,926, n = 22



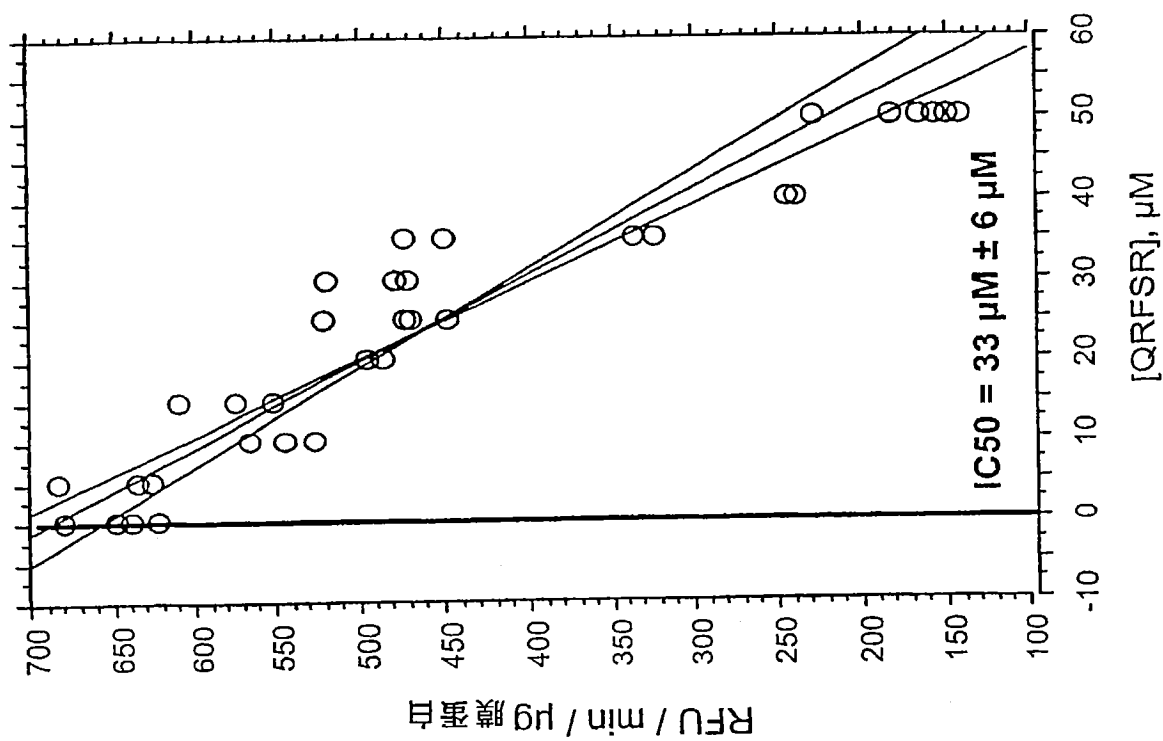


图 11

RFU / min / μg 膜蛋白 = 686,972 - 9,404 \* [QRF5R], μM; R² = 0,884, n = 29

疼痛行为: 舔爪时间	载体 (n = 8)	0.5 mg/kg LV. (n = 8)	1 mg/kg i.V. (n = 8)
福尔马林试验的0-20min F(2,21) = 4.42; p = 0.025	144.13 ± 17.42	97.13 ± 13.70* t = 2.12; p = 0.052	84.25 ± 13.53* t = 2.71; p = 0.017
20-40min F(2,21) = 3.36; p = 0.054	175.13 ± 10.45	123.50 ± 15.04* t = 2.82; p = 0.014	121.13 ± 22.26* t = 2.20; p = 0.045
40-60min F(2,21) = 15.37; p = 0.0001	63.00 ± 12.65	12.13 ± 3.44* t = 3.88; p = 0.002	8.75 ± 2.90* t = 4.18; p = 0.001

(\*) Dunnett' t test vs vehicle

舔爪时间, 秒

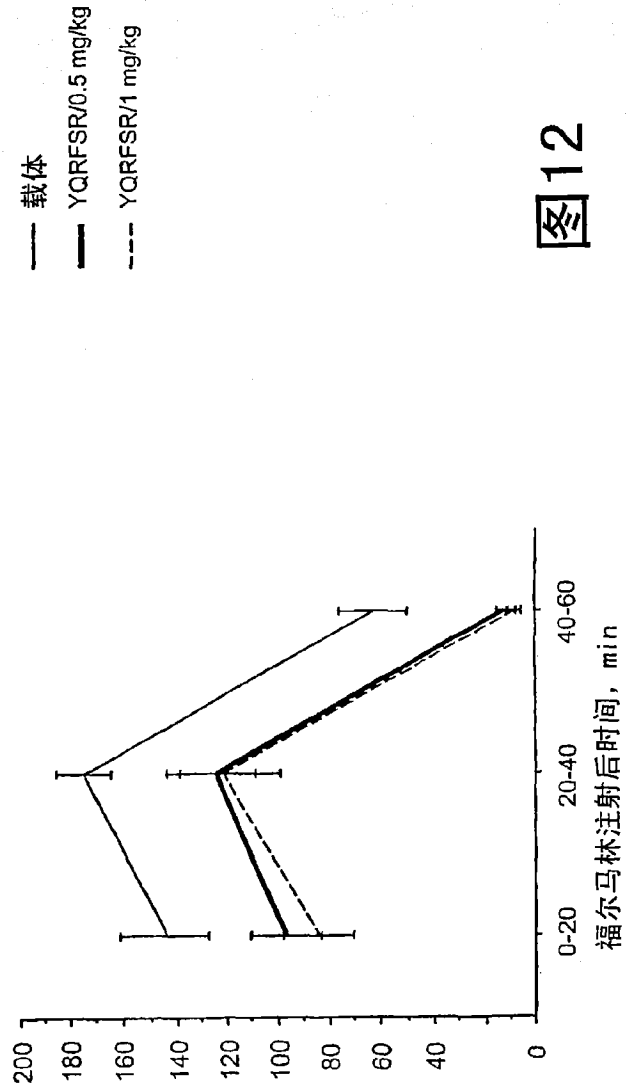


图12

疼痛行为: 痉挛数	载体 (n = 8)	0.5 mg/kg (n = 8)	1 mg/kg (n = 8)
福尔马林试验的0-20min F(2,21) = 1.07 ; p = 0.361	23.75 ± 5.15	33.13 ± 11.25	18.13 ± 2.77
20-40min F(2,21) = 4.39 ; p = 0.026	91.50 ± 18.67	79.75 ± 9.59	39.13 ± 8.67* t = 2.54 ; p = 0.023
40-60min F(2,21) = 8.29 ; p = 0.002	126.38 ± 13.69	103.75 ± 13.86	60.88 ± 4.60* t = 4.54 ; p = 0.005

(\*) Dunnett' t test vs vehicle

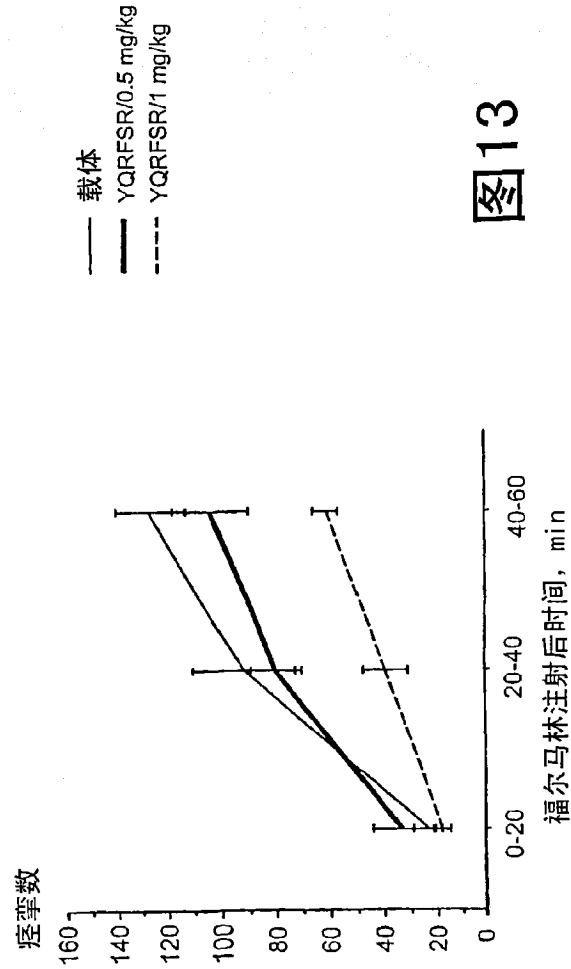


图13

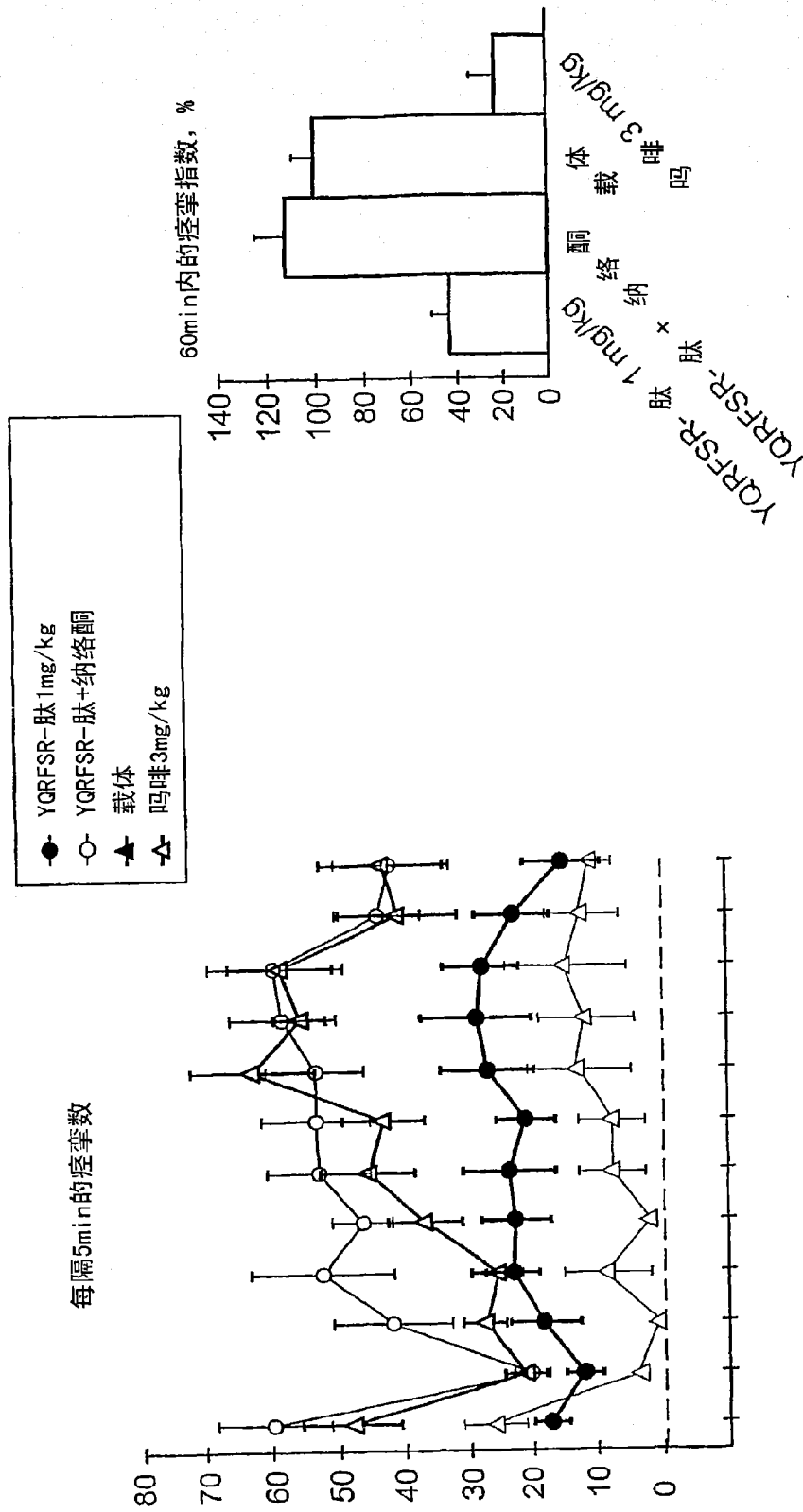


图14