

1. 一种在活组织中防止和/或抑制细胞死亡和/或组织坏死的方法，其特征在于，所述方法包括使活组织接触至少一种 NTP 区段，所述 NTP 区段的存在量足够防止和/或抑制细胞死亡和/或组织坏死。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述至少一种 NTP 区段含有以下氨基酸序列：

- a) T H A R L I L ; H H A R L C L ; M F A R L I L ; H H F A R L I F ;
 b) H H A R L ; H A R L ; H A R L I ; H A R L I L ; H H A R L C L ; A R L I
 10 L ; H H A R L I F ; T H A R L I L ; A R L I ; A R L ; H A R L C L ; A R L C L ;
 A R C L ; M F A R L I L ; F A R L I L ; F A R L I ; F A R L ; H A R L I F ;
 A R L I F ;
 c) L H A R L C L A N F C G R N R V ;
 d) L A R L C L A N F C G N N N V ;
 15 e) C A R Y R T G H H A R L M ;
 f) H H A R L P L A N F C G ;
 g) R T G H H A R L C L A N F C ;
 h) C E S A R Y R T G H H A R L C) ;
 i) D N T H H A R L I L ;
 20 j) S H H A R L I L ; 和
 k) H A R L M L ; H A R L V L 和 H A K L I L

及其变体、同源物、衍生物和模拟物。

3. 一种治疗与细胞死亡和/或组织坏死有关病症的方法，其特征在于，所述方法包括使活组织接触至少一种 NTP 区段，所述 NTP 区段的存在量足够防止和/或抑制细胞死亡和/或组织坏死。

4. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述至少一种 NTP 区段含有以下氨基酸序列：

- a) T H A R L I L ; H H A R L C L ; M F A R L I L ; H H A R L I F ;
 b) H H A R L ; H A R L ; H A R L I ; H A R L I L ; H H A R L C L ; A R L I
 30 L ; H H A R L I F ; T H A R L I L ; A R L I ; A R L ; H A R L C L ; A R L C L ;
 A R C L ; M F A R L I L ; F A R L I L ; F A R L I ; F A R L ; H A R L I F ;

A R L I F;

c) L H A R L C L A N F C G R N R V;

d) L A R L C L A N F C G N N N V;

e) C A R Y R T G H H A R L M;

5 f) H H A R L P L A N F C G;

g) R T G H H A R L C L A N F C;

h) C E S A R Y R T G H H A R L C);

i) D N T H H A R L I L;

l) S H H A R L I L; 和

10 m) H A R L M L, H A R L V L 和 H A K L I L

及其变体、同源物、衍生物和模拟物。

5. 一种在活哺乳动物脑组织中防止和/或抑制细胞死亡和/或组织坏死的方法，其特征在于，所述方法包括使活哺乳动物脑组织接触含有至少一种 NTP 区段的组合物，所述组合物还含有能使 NTP 区段穿过血脑屏障的组分。

15 6. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述至少一种 NTP 区段含有以下氨基酸序列：

a) T H A R L I L; H H A R L C L; M F A R L I L; H H A R L I F;

b) H H A R L; H A R L; H A R L I; H A R L I L; H H A R L C L; A R L I L; H H A R L I F; T H A R L I L; A R L I; A R L; H A R L C L; A R L C L;

20 A R C L; M F A R L I L; F A R L I L; F A R L I; F A R L; H A R L I F;

A R L I F;

c) L H A R L C L A N F C G R N R V;

d) L A R L C L A N F C G N N N V;

e) C A R Y R T G H H A R L M;

25 f) H H A R L P L A N F C G;

g) R T G H H A R L C L A N F C;

h) C E S A R Y R T G H H A R L C);

i) D N T H H A R L I L;

n) S H H A R L I L; 和

30 o) H A R L M L, H A R L V L 和 H A K L I L

及其变体、同源物、衍生物和模拟物。

7. 一种治疗神经变性疾病的方法，其特征在于，所述方法包括使活哺乳动物脑组织接触含有至少一种 NTP 区段的组合物，所述组合物还含有能使 NTP 区段穿过血脑屏障的组分。

8. 如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述至少一种 NTP 区段含有以下
5 氨基酸序列：

a) T H A R L I L ; H H A R L C L ; M F A R L I L ; H H A R L I F ;

b) H H A R L ; H A R L ; H A R L I ; H A R L I L ; H H A R L C L ; A R L I
L ; H H A R L I F ; T H A R L I L ; A R L I ; A R L ; H A R L C L ; A R L C L ;
A R C L ; M F A R L I L ; F A R L I L ; F A R L I ; F A R L ; H A R L I F ;

10 A R L I F ;

c) L H A R L C L A N F C G R N R V ;

d) L A R L C L A N F C G N N N V ;

e) C A R Y R T G H H A R L M ;

f) H H A R L P L A N F C G ;

15 g) R T G H H A R L C L A N F C ;

h) C E S A R Y R T G H H A R L C ;

i) D N T H H A R L I L ;

p) S H H A R L I L ; 和

q) H A R L M L , H A R L V L 和 H A K L I L

20 及其变体、同源物、衍生物和模拟物。

9. 如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述神经变性疾病是阿尔茨海默病。

10. 如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述神经变性疾病是阿尔茨海默病。

11. 用于治疗与细胞死亡和/或组织坏死有关病症的组合物，其特征在于，所述
25 组合物含有 NTP 区段和能使 NTP 区段穿过血脑屏障的组分。

12. 如权利要求 11 所述的方法，其特征在于，所述至少一种 NTP 区段含有以下
氨基酸序列：

a) T H A R L I L ; H H A R L C L ; M F A R L I L ; H H A R L I F ;

b) H H A R L ; H A R L ; H A R L I ; H A R L I L ; H H A R L C L ; A R L I
30 L ; H H A R L I F ; T H A R L I L ; A R L I ; A R L ; H A R L C L ; A R L C L ;
A R C L ; M F A R L I L ; F A R L I L ; F A R L I ; F A R L ; H A R L I F ;

A R L I F;

c) L H A R L C L A N F C G R N R V;

d) L A R L C L A N F C G N N N V;

e) C A R Y R T G H H A R L M;

5 f) H H A R L P L A N F C G;

g) R T G H H A R L C L A N F C;

h) C E S A R Y R T G H H A R L C;

i) D N T H H A R L I L;

r) S H H A R L I L; 和

10 s) H A R L M L, H A R L V L 和 H A K L I L

及其变体、同源物、衍生物和模拟物。

13. 一种在活组织或出于治疗目的已给予 NTP 的邻近部位中防止、调节、控制、改善和/或抑制细胞死亡和/或组织坏死的方法，其特征在于，所述方法包括使活组织接触至少一种 NTP 区段，所述 NTP 区段的存在量足够防止、调节、控制、改善和
15 /或抑制由治疗给予 NTP 而造成的细胞死亡和/或组织坏死。

14. 如权利要求 13 所述的方法，其特征在于，所述至少一种 NTP 区段含有以下氨基酸序列：

a) T H A R L I L; H H A R L C L; M F A R L I L; H H A R L I F;

20 b) H H A R L; H A R L; H A R L I; H A R L I L; H H A R L C L; A R L I
L; H H A R L I F; T H A R L I L; A R L I; A R L; H A R L C L; A R L C L;
A R C L; M F A R L I L; F A R L I L; F A R L I; F A R L; H A R L I F;
A R L I F;

c) L H A R L C L A N F C G R N R V;

d) L A R L C L A N F C G N N N V;

25 e) C A R Y R T G H H A R L M;

f) H H A R L P L A N F C G;

g) R T G H H A R L C L A N F C;

h) C E S A R Y R T G H H A R L C;

i) D N T H H A R L I L;

30 t) S H H A R L I L; 和

u) H A R L M L, H A R L V L 和 H A K L I L

及其变体、同源物、衍生物和模拟物。

用神经丝状蛋白的区段防止细胞死亡的方法

- 5 本申请要求题为“用神经丝状蛋白的区段防止细胞死亡的方法”的美国临时专利申请号 60/290, 971 的优先权，在此将其全文并入以供参考。

发明背景

1. 发明的技术领域

- 10 本发明涉及防止细胞死亡的方法，涉及治疗需要防止、抑制和/或改善细胞死亡和组织坏死的病症的方法。本发明包括给予经历细胞死亡的哺乳动物神经丝状蛋白(NTP)或其同源物、衍生物、变体或其模拟物的区段。所述区段可通过肌肉内、口服、静脉内、腹膜内、脑内(实质内)、脑室内、肿瘤内、病灶内、皮内、鞘内、鼻内、眼内、动脉内、局部、透皮、通过气雾剂、输注、推注、植入装置、缓释系统
15 等，或单独或结合于载体给药。另外，通过给予表达此区段的基因，给予诱导如此产生的疫苗，或者引入在体内表达此区段的细胞、细菌或病毒可使该区段在体内表达，这是由于遗传修饰或其它方式。

2. 相关技术的描述

- 20 阿尔茨海默氏病(AD)是一种复杂的神经退化疾病，其特征是记忆、行为、语言和视觉-空间能力的渐进性损害，最终以死亡为结束。易受损区域内的 Hallmark 病理特征包括细胞外 β -淀粉样沉积、细胞内神经纤维缠结、突触丧失和广泛的神经元细胞死亡。对阿尔茨海默氏病病因和治疗的研究为研究人员带来了多种途径。相当多的证据表明在疾病的病因学中 β 淀粉样前体蛋白(APP)的产生和加工发生
25 改变。然而研究证明 AD 是一种有着许多不同也许重叠病因的多因素疾病。

- 由于本领域的人员进行了重要的研究和临床调查，研究了脑内和不同神经细胞群内的结构缺陷、化学变化和功能异常。这种调查和研究的深度由下列出版物为代表，它们仅代表本领域大量报导的一小部分：《阿尔茨海默氏病的神经生物学》(*Neurobiology of Alzheimer's Disease*, D. Dawbarn 和 S. J. Allen 编, Bios, Oxford 1995); 《痴呆》(*Dementia*, J. Whitehouse 编, F. A. Davis Company,
- 30

Philadelphia, 1993); 《阿尔茨海默氏病: 老年性痴呆和相关疾病》(*Alzheimer's Disease: Senile Dementia and Related Disorders*, Katzman, R, 和 R.L. Bick 编, Raven Press, New York, 1994, 47-51 页); 《阿尔茨海默氏病和相关疾病, 病因、发病机理和治疗》(*Alzheimer's Disease and Related Disorders, Etiology, Pathogenesis and Therapeutics*, Iqbol, K. 等编, Wiley, Chichester, 1999); 《阿尔茨海默氏病: 临床和基础研究进展》(*Alzheimer's Disease: Advances in Clinical and Basic Research*, Corain, B 编辑, Wiley, New York, 1993); 《阿尔茨海默氏病: 临床和治疗展望》(*Alzheimer's Disease: Clinical and Treatment Perspectives*, Cutler, N.R. 等编, Wiley, Chichester, 1995); 《阿尔茨海默氏病: 治疗策略》(*Alzheimer's Disease: Therapeutic Strategies*, Giacobini, E., Becker, R. 编, Birkhauser, Boston, 1994); Paykel 等, *Arch. Gen. Psychiat.*, 51:325-332(1994); Amaducci, 等, *Neurology* 36:922-931(1986); McKhann, 等, *Neurology* 34:939-944(1984), Heston 等, *Arch. Gen. Psychiatry.*, 38:1085-1090(1981); 《大脑老化》(*Aging of the Brain*, Gispen 和 Traber 编), Elsevier Science Publisher, Amsterdam, 1983, 275-282 页); Heyman 等, *Ann. Neurol* 15:335-341(1984); Brayne C. 和 P. Calloway, *Lancet* 1:1265-1267(1988); Roth 等, *Br. J. Psychiatry* 149:698-709(1986); 医学研究委员会, NRC 阿尔茨海默氏病研讨会的报告(*Report from the MRC Alzheimer's Disease Workshop*, London, England, 1987); Morris 等, *Neurology* 41:469-478(1991); 以及各个这些出版物所引用的参考文献。

迄今阿尔茨海默氏病是美国第三种最昂贵的疾病, 每年使社会花费约一千亿美元。它是老人中最普遍的疾病之一, 且随着社会的老龄化变得更显著。与 AD 相关的花费包括直接医药费用如疗养院护理、直接非医药费用如家中日间护理和间接费用如失去病人和护理者的生产力。医学治疗和行为矫正可通过减慢认知衰退的速度、延迟收容入院、减少护理时间和提高生活质量来获得经济利益。药物经济学评估显示药物治疗和行为矫正对护理院布置、认知和护理时间的效果为正结果。

神经丝状蛋白(NTP)是最近才特征鉴定的一个脑蛋白质家族。此家族成员之一 AD7C-NTP 是 41kD 功能与神经芽生有关的膜结合磷蛋白(de la Monte 等, *J. Clin. Invest.*, 100:3093-3104(1997); de la Monte 等, *Alz. Rep.*, 2:327-332(1999); de la Monte SM 和 Wands JR, *Journal of Alzheimer's Disease*,

3:345-353 (2001)。编码 AD7C-NTP 的基因和 AD7C-NTP 的预测蛋白质序列已鉴定和描述(de la Monte 等, *J. Clin. Invest.*, 100:3093-3104(1997))。除了这种的 41kD 磷蛋白外, 其它种类的神经丝状蛋白(约 26kD、~21kD、~17kD 和~15kD)也已鉴定并与神经外胚层瘤、星形细胞瘤和成胶质细胞瘤以及缺氧、局部缺血或
5 脑梗塞引起的损伤相关联(Xu 等, *Cancer Research*, 53:3823-3829(1993); de la Monte 等, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55(10):1038-50(1996), de la Monte 等, *J. Neurol. Sci.*, 138(1-2):26-35(1996); de la Monte 等, *J. Neurol. Sci.*, 135(2):118-25 (1996); de la Monte 等, *J. Clin. Invest.*, 100:3093-3104(1997); de la Monte 等, *Alz. Rep.*, 2:327-332(1999))。

10 对神经丝状蛋白的种类已有描述和权利要求, 见美国专利号 5, 948, 634; 5, 948, 888 和 5, 830, 670 中所有关于“阿尔茨海默氏病的神经丝状蛋白基因表达和检测”和美国专利号 6, 071, 705 关于“检测神经疾病或功能不良的方法”。这些专利的方法和说明书全部纳入本文供参考。如其中所述, NTP 在细胞死亡中上调和产生。因此, 死亡和垂死的神经细胞描述为过度产生 NTP, 因而它的存在表明神
15 经细胞死亡和阿尔茨海默氏病(AD)发作。

已将其它种类的神经丝状蛋白鉴定为 AD7c-NTP 基因的其它产物(如描述于 NCBI Entrez-蛋白质数据库登录号#XP_032307 PID g15928971 的一种 112 个氨基酸的蛋白质)或类似于神经丝状蛋白(如描述于 NCBI Entrez-蛋白质数据库登录号#AAH14951 PID g15928971 的一种 106 个氨基酸的蛋白质, 描述于 NCBI Entrez-
20 蛋白质数据库登录号#XP_039102 PID g18599339 的另一种 106 个氨基酸的蛋白质和描述于 NCBI Entrez-蛋白质数据库登录号#AAH02534 PID g12803421 的一种 61 个氨基酸的蛋白质)。

尤其是有令人信服的证据将 AD7C-NTP 种类的神经丝状蛋白和 AD 连接且它在 AD 的细胞死亡中上调。与对照相比 AD7C-NTP mRNA 在 AD 大脑中上调; AD 大脑和
25 CSF 中的 AD7C-NTP 蛋白水平高于对照; AD7C-NTP 的免疫反应性发现于 AD 和唐氏综合症大脑中的老年斑、神经纤维缠结(NFT)、退化神经元、神经毡丝(neuropil thread)和营养不良性神经芽生中(Ozturk 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:419-423(1989); de la Monte 等, *J. Clin. Invest.*, 86(3):1004-13(1990); de la Monte 等, *J. Neurol. Sci.*, 113(2):152-64(1992); de la Monte 等, *Ann. Neurol.*, 32(6):
30 733-42(1992); de la Monte 等, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55(10):1038-50 (1996), de la Monte 等, *J. Neurol. Sci.*, 138(1-2):26-35(1996); de la Monte

等, *J. Neurol. Sci.*, 135(2):118-25(1996); de la Monte 等, *J. Clin. Invest.*, 100:3093-3104(1997); de la Monte 等, *Alz. Rep.*, 2:327-332(1999)。免疫细胞化学证明 AD7C-NTP 蛋白定位于细胞内、神经毡内的精细加工中, 或 AD 和唐氏综合症大脑中的细胞外。de la Monte 等, *Ann. Neurol.*, 32(6):733-42(1992)。

- 5 两种细胞含有 AD7C-NTP: 神经元和星形细胞 (*Id.*)。受影响的神经元是通常包含在 AD 大脑中熟知的神经纤维缠结中的大锥体型神经元。

在 AD 病人的 CSF 和尿中都发现 AD7C-NTP 蛋白水平升高, 显示它作为此破坏性疾病生化标志的准确性(de la Monte 和 Wands, *Front Biosci* 7:989-96(2002); de la Monte 和 Wands, *Journal of Alzheimer's Disease*, 3:345-353(2001);
10 Munzar 等, *Alzheimer's Reports* 4:61-65(2001); Kahle 等, *Neurology* 54:1498-1504(2000) 和 Averbach *Neurology* 55:1068(2000); Munzar 等, *Alzheimer's Reports* 3:155-159(2000); de la Monte 等, *Alzheimer's Reports* 2:327-332(1999); Ghanbari 等, *J Clin Lab Anal* 12:285-288(1998); Ghanbari 等 *J Clin Lab Anal* 12:223-226(1998); Ghanbari 等, *Journal of Contemporary Neurology*
15 1998;4A:2-6(1998); de la Monte 等, *J Clin Invest* 100:3093-3104(1997)。

过度表达 AD7C-NTP 基因也与阿尔茨海默氏病中的细胞死亡过程相联系(de la Monte 和 Wands, *J. Neuropathol. and Exp. Neuro.*, 60:195-207(2001); de la Monte 和 Wands, *Cell Mol Life Sci* 58:844-49(2001)。也在唐氏综合症大脑组织中鉴定了 AD7C-NTP (Wands 等, 国际专利出版号 WO 90/06993; de la Monte 等, *J Neurol Sci* 135:118-25(1996); de la Monte 等, *Alz. Rep.*, 2:327-332(1999))。有一些证据表明过度表达 AD7C-NTP 基因也可能与正常张力青光眼相关联 (Golubnitschaja-Labudova 等, *Curr Eye Res* 21:867-76(2000))。

本发明者近来发现释放的 AD7C-NTP 蛋白有细胞毒性, 且能引起组织中其他细胞发生细胞死亡(与垂死细胞本身产生的 AD7C-NTP 上调相比), 见待审批的美国专利申请序列号标题为“用神经丝蛋白治疗肿瘤和相关疾病的方法”, 其公布的内容全部纳入本文供参考。因此, 尤其需要在 AD 大脑中防止、抑制、调节或改进与神经丝状蛋白相关联的细胞死亡和组织坏死。

最近还发现, 如题为“优选的神经丝状蛋白的区段及其使用方法”的待批美国专利申请序列号第 09/697, 590 所述, NTP 区段可用于结合测定、NTP 纯化以及
30 代替 NTP 用于诊断, 在此将全文公开并纳入以供参考。

此描述包括前述相关领域、任何和所有本文所述的公开文件, 包括任何和所

有相关的美国专利全部纳入本文供参考。以上关于相关技术的描述不是要以任何方式承认这里描述的文件，包括待批美国专利申请，是本发明的现有技术。

发明概述

5 需要发展一种方法来防止、抑制、调节和/或改善细胞死亡和组织坏死。尤其是需要开发一种能在脑内防止、抑制和/或改善细胞死亡和/或组织坏死的方法。也需要开发治疗与细胞死亡和/或组织坏死有关的病症的方法。还需要发展一种通过防止、抑制和/或改善活的哺乳动物脑组织中细胞死亡和/或组织坏死治疗神经变性疾病的方法。同样需要开发一种控制、抑制、调节或改善活组织中由于给予
10 NTP 所引起的细胞死亡和组织坏死的方法以去除或破坏有害或不需要的组织或细胞成分，如人良性或恶性肿瘤。

因此，本发明实施方案的一个特征是提供防止、抑制和/或改善细胞死亡和/或组织坏死的方法。此方法包括使活组织接触至少一种 NTP(或其同源物、衍生物、变体或模拟物)的区段，其中此区段存在的量足以防止、抑制、减少、控制和/或
15 改善细胞死亡和/或组织坏死。

根据本发明实施方案的另一个特征，提供使活哺乳动物脑组织接触含有至少一种 NTP(或其同源物、衍生物、变体或模拟物)的区段的组分以在活哺乳动物脑组织中防止、抑制和/或改善细胞死亡和/或组织坏死的方法，所述区段存在的量足以防止、抑制和/或改善细胞死亡和/或组织坏死。所述组分能够穿过血脑屏障。

20 根据本发明实施方案的另一个特征，提供使活哺乳动物脑组织接触含有至少一种 NTP(或其同源物、衍生物、变体或模拟物)的区段的组分以治疗神经变性疾病的方法。所述组分能够穿过血脑屏障。

本发明实施方案的又一特征是提供治疗与细胞死亡和/或组织坏死有关的病症的方法，所述方法包括使活组织接触至少一种 NTP(或其同源物、衍生物、变体或模拟物)的区段。NTP 区段存在的量足以防止、抑制细胞死亡和/或组织坏死。根据此方法，将至少一种 NTP(或其同源物、衍生物、变体或模拟物)的区段给予患有与细胞死亡和/或组织坏死有关的疾病的哺乳动物，给予的量足以防止和/或抑制
25 细胞死亡和/或组织坏死。

本发明实施方案的另一个特征是提供含有至少一种 NTP(或其同源物、衍生物、变体或模拟物)的区段的组合物以及能使 NTP(或其同源物、衍生物、变体或模拟物)的区段穿过血脑屏障的组分。
30

本发明实施方案的另一特征是提供一种治疗与细胞死亡和/或组织坏死有关的病症的方法，所述方法包括给予需要治疗的哺乳动物一种基因，该基因表达至少一种 NTP(或其同源物、衍生物、变体或模拟物)的区段，给药导致至少一种 NTP(或其同源物、衍生物、变体或模拟物)的区段接触活组织。给予该基因的方式能使至少一种 NTP(或其同源物、衍生物、变体或模拟物)的区段存在的量足以防止和/或抑制细胞死亡和/或组织坏死。

本发明实施方案的另一特征是提供一种治疗与细胞死亡和/或组织坏死有关的病症的方法，所述方法包括给予需要治疗的哺乳动物一种疫苗，该疫苗诱导哺乳动物表达或产生至少一种 NTP(或其同源物、衍生物、变体或模拟物)的区段，给药导致至少一种 NTP(或其同源物、衍生物、变体或模拟物)的区段接触活组织。给予该疫苗的方式能使至少一种 NTP(或其同源物、衍生物、变体或模拟物)的区段存在的量足以防止和/或抑制细胞死亡和/或组织坏死。

本发明实施方案的另一特征是提供一种治疗与细胞死亡和/或组织坏死有关的病症的方法，所述方法包括将能体内表达至少一种 NTP(或其同源物、衍生物、变体或模拟物)的区段的细胞、细菌或病毒导入或给予或植入需要它的哺乳动物中，其中所述细胞、细菌或病毒表达至少一种 NTP(或其同源物、衍生物、变体或模拟物)的区段，给药导致至少一种 NTP(或其同源物、衍生物、变体或模拟物)的区段接触活组织。细胞、细菌或病毒的导入、给予或植入的方式能使至少一种 NTP(或其同源物、衍生物、变体或模拟物)的区段存在的量足以防止和/或抑制细胞死亡和/或组织坏死。

本发明的这些和其它特征对于阅读了以下详细描述的本领域技术人员是显而易见的。然而应理解的是，详细描述和具体实施例说明了本发明的较佳实施方案，它们仅用于阐明，因为本发明的精神和范围内的各种变化和修饰通过此叙述对于本领域技术人员显然是明白的。除非另有说明，本文所引用文件的各个内容全部纳入本文供参考。

附图简述

图 1 显示完整的 AD7C-NTP 序列和完整的 AD7C-NTP 序列中 Harlil 序列的位置 (de la Monte 等, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55:1038-1050(1996))。

图 2 显示 122 个氨基酸神经丝状蛋白(美国专利号 5, 948, 634 的序列 40; NCBI Entrez-蛋白质登录号#AAE25447) 的整个氨基酸序列。

图 3 显示 112 个氨基酸神经丝状蛋白 (NCBI Entrez-蛋白质登录号 #XP_032307) 的整个氨基酸序列。

图 4 显示在 NCBI Entrez-蛋白质登录号 #AAH14951 PID g15928971 中列出的 106 个氨基酸神经丝状蛋白。

5 图 5 显示在 NCBI Entrez-蛋白质登录号 #XP_039102 PID g18599399 中列出的 106 个氨基酸神经丝状蛋白。

图 6 显示 98 个氨基酸神经丝状蛋白 (来自美国专利号 5, 830, 670 的序列 30; NCBI Entrez-蛋白质登录号 #AAE13612) 的整个氨基酸序列。

10 图 7 显示 75 个氨基酸神经丝状蛋白 (来自美国专利号 5, 948, 634 的序列 48; NCBI Entrez-蛋白质登录号 #AAE25448) 的整个氨基酸序列。

图 8 显示 68 个氨基酸神经丝状蛋白 (来自美国专利号 5, 948, 634 的序列 36; NCBI Entrez-蛋白质登录号 #AAE25446) 的整个氨基酸序列。

图 9 显示 61 个氨基酸神经丝状蛋白样蛋白质 (NCBI Entrez-蛋白质登录号 #AAH02534) 的整个氨基酸序列。

15

较佳实施方案的详细描述

术语“AD7C-NTP”是指约 41kD 蛋白质和基因以及编码它的核酸序列, 它描述在 de la Monte 等, *J. Clin. Invest.*, 100:3093-104(1997), 美国专利 5, 948, 634; 5, 948, 888 和 5, 830, 670 的序列 120 和 121 以及 NCBI Entrez-Protein 数据库登录
20 号 #AF010144 中。

在此描述中, 术语“NTP”或“神经丝状蛋白质”指神经丝状蛋白质和相关分子 (包括胰丝状蛋白) 和编码这些蛋白质的核酸序列, 且包括 (但不限于) 下列蛋白质和编码这些蛋白质氨基酸序列的核酸序列:

- (a) AD7C-NTP;
- 25 (b) ~42、~26、~21、~17、~14 和 ~8kD 种类的神经丝状蛋白质, 描述见于美国专利号 5, 948, 634; 5, 948, 888; 5, 830, 670 和 6, 071, 705 和 de la Monte 等, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55(10):1038-50(1996), de la Monte 等, *J. Neurol. Sci.*, 138(1-2):26-35(1996); de la Monte 等, *J. Neurol. Sci.*, 135(2): 118-25(1996); de la Monte 等, *J. Clin. Invest.*, 100:3093-3104(1997);
30 de la Monte 等, *Alz. Rep.*, 2:327-332(1999);

(c) 由单克隆抗体 #2 特异性识别的蛋白质保存于美国模式培养物保藏所,

Manassa, Va., 登录号 HB-12546, 或由单克隆抗体 5 特异识别的蛋白质保存于美国模式培养物保藏所, Manassa, Va., 登录号 HB-12545;

(d) 由 AD7C-NTP 基因编码的蛋白质;

5 (e) 122 个氨基酸神经丝状蛋白, 描述见来自美国专利号 5, 830, 670、5, 948, 634 和 5, 948, 888 的序列 40, 并在 NCBI Entrez-蛋白质登录号#AAE25447, PID g10048540 中列出, 氨基酸序列示于图 2;

(f) NCBI Entrez-蛋白质登录号#XP_032307, PID g14725132 中列出了 122 个氨基酸神经丝状蛋白, 氨基酸序列示于图 3;

10 (g) NCBI Entrez-蛋白质登录号#AAH14951 PID g15928971 中列出了 106 个氨基酸神经丝状蛋白, 氨基酸序列示于图 4;

(h) NCBI Entrez-蛋白质登录号#XP_039102 PID g18599399 中列出了 106 个氨基酸神经丝状蛋白, 氨基酸序列示于图 5;

15 (i) 98 个氨基酸神经丝状蛋白, 描述见来自美国专利号 5, 830, 670、5, 948, 634 和 5, 948, 88 的序列 30, 并在 NCBI Entrez-蛋白质登录号#AAE13612, PID g10048538 中列出, 氨基酸序列示于图 6;

(j) 75 个氨基酸神经丝状蛋白, 描述见来自美国专利号 5, 830, 670、5, 948, 634 和 5, 948, 888 的序列 48, 并在 NCBI Entrez-蛋白质登录号#AAE25448, PID g10048541 中列出, 氨基酸序列示于图 7;

20 (k) 68 个氨基酸神经丝状蛋白, 描述见来自美国专利号 5, 830, 670、5, 948, 634 和 5, 948, 888 的序列 36, 并在 NCBI Entrez-蛋白质登录号#AAE25446, PID g10048539 中列出, 氨基酸序列示于图 8;

(l) 在 NCBI Entrez-蛋白质登录号#AAH02534, PID g12803421 中列出了 61 个氨基酸蛋白样蛋白质, 氨基酸序列示于图 9;

(m) 胰腺线状蛋白;

25 (n) 在美国专利号 6, 071, 705 中描述了神经胰丝状蛋白(nPTP);

(o) 由杂交瘤产生的抗体特异性识别的蛋白质, 杂交瘤为保存于美国模式培养物保藏所的 HB9934、HB9935 和 HB9936。

术语“NTP”也包括来源于哺乳动物组织或用重组技术产生的 NTP, 并包括 NTP 的区段、变体、衍生物和同源物。

30 这里所描述的氨基酸和氨基酸残基可参考下表提供的被接受的一个字母或三个字母的编码。除非另有说明, 这些氨基酸或残基是天然产生的 L 立体异构体形

式。

氨基酸	一个字母符号	三个字母符号
丙氨酸	A	Ala
精氨酸	R	Arg
天冬酰胺	N	Asn
天冬氨酸	D	Asp
半胱氨酸	C	Cys
谷氨酰胺	Q	Gln
谷氨酸	E	Glu
甘氨酸	G	Gly
组氨酸	H	His
异亮氨酸	I	Ile
亮氨酸	L	Leu
赖氨酸	K	Lys
甲硫氨酸	M	Met
苯丙氨酸	F	Phe
脯氨酸	P	Pro
丝氨酸	S	Ser
苏氨酸	T	Thr
色氨酸	W	Trp
酪氨酸	Y	Tyr
缬氨酸	V	Val

5 当用在这里时，术语“Harlil 序列”或“Harlil 肽”是指包含或含有一个或多个以下序列的生物活性肽：

1. 图 1 所示的 THARLIL; HHARLCL; MFARLIL; 和 HHARLIF;

2. HHARL; HARL; HARLI; HARLIL; HHARLCL; ARLIL; HHARLIF; THARLIL; ARLI; ARL; HARLCL; ARLCL; 10 ARL; MFARLIL; FARLIL; FARLI; FARL; HARLIF 和 ARLIF;

3. LHARLCLANFCGRNRV (“NTP-1”);

4. LARLCLANFCGNNAV (“NTP-2”);

15 5. CARYRTGHHARLM (“NTP-3”);

6. H H A R L P L A N F C G (“NTP-4”);
 7. R T G H H A R L C L A N F C (“NTP-5”);
 8. C E S A R Y R T G H H A R L C (“NTP-6”);
 9. D N T H H A R L I L (“NTP-7”);
 5 10. S H H A R L I L (“NTP-8”); 和
 11. H A R L M L, H A R L V L 和 H A K L I L

当用在这里时,术语“Harlil 序列”或“Harlil 肽”包括 Harlil 序列或 Harlil 肽的生物活性变体、同源物、衍生物和肽模拟物,还包括含有上面 1-11 小段所列任何序列的生物活性肽,所述肽在 Harlil 序列前或后的连接肽上具有额外的氨基
 10 酸残基。

当用在这里时,术语“NTP 的区段”是指一种 NTP,优选 AD7C-NTP 的生物活性区段,特别包括(但不限于)Harlil 序列和 Harlil 肽。

术语“生物活性”是指能够结合 NTP 或其它分子的蛋白质、肽、Harlil 肽或 NTP 的区段。

15 术语“片段”是指由 NTP 蛋白或 NTP 区段的氨基酸序列的连续亚序列构成的蛋白质或多肽,包括天然产生的片段,如剪接变体和体内由分解蛋白活性天然产生的片段。这种片段可在氨基末端、羧基末端和/或中间(如自然剪接)被截短。这种片段可以用或不用氨基末端甲硫氨酸制备。术语“片段”包括来自相同 NTP
 20 蛋白或 NTP 区段的片段,可以相同或不同,共有或没有毗连的氨基酸序列,直接或通过接头连在一起。

术语“变体”指一种蛋白质或多肽,其中与 NTP 蛋白或 NTP 区段的氨基酸序列相比存在一个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入,包括天然产生的 NTP 蛋白或 NTP 区段的等位基因变体或者交替剪接变体。术语“变体”包括在肽序列中的一个或多个氨基酸用类似或同源氨基酸或不相似氨基酸置换。氨基酸可在许多等级上
 25 分为类似或同源氨基酸(Gunnar von Heijne,《分子生物学的序列分析》(*Sequence Analysis in Molecular Biology*, 123-39 页 Academic Press, New York, NY 1987.) 优选的变体包括一个或多个氨基酸位置的丙氨酸取代。其它优选的取代包括对蛋白质的整体净电荷、极性或疏水性影响小或没有影响的保守性置换。保守性置换列于下表 2 中。

表 2

保守性氨基酸取代		
5	碱性: 精氨酸 赖氨酸 组氨酸	
	酸性: 谷氨酸 天冬氨酸	
	无电荷极性: 谷氨酰胺 天冬酰胺	
10	丝氨酸 苏氨酸 酪氨酸	
	非极性: 苯丙氨酸 色氨酸	
	15	半胱氨酸 甘氨酸 丙氨酸
		缬氨酸 脯氨酸
20		甲硫氨酸 亮氨酸 异亮氨酸

表 3 列出氨基酸取代的另一种方案

25

表 3

	原始残基	取代
	丙氨酸	甘氨酸; 丝氨酸
	精氨酸	赖氨酸
5	天冬酰胺	谷氨酰胺; 组氨酸
	天冬氨酸	谷氨酸
	半胱氨酸	丝氨酸
	谷氨酰胺	天冬酰胺
	谷氨酸	天冬氨酸
10	甘氨酸	丙氨酸; 脯氨酸
	组氨酸	天冬酰胺; 谷氨酰胺
	异亮氨酸	亮氨酸; 缬氨酸
	亮氨酸	异亮氨酸; 缬氨酸
	赖氨酸	精氨酸; 谷氨酰胺; 谷氨酸
15	甲硫氨酸	亮氨酸; 酪氨酸; 异亮氨酸
	苯丙氨酸	甲硫氨酸; 亮氨酸; 酪氨酸
	丝氨酸	苏氨酸
	苏氨酸	丝氨酸
	色氨酸	酪氨酸
20	酪氨酸	色氨酸; 苯丙氨酸
	缬氨酸	异亮氨酸; 亮氨酸

其它变体可由保守性较小的氨基酸取代组成, 如选择的残基更显著不同在于它们对维持(a)取代区域中多肽主链的结构的作用, 例如片层或螺旋构型, (b)分子靶位占的电荷或疏水性, (c)侧链大小。预期通常对功能有更显著作用的取代是

25 (a)甘氨酸和/或脯氨酸被另一种氨基酸取代或缺失或插入; (b)亲水性残基如丝氨酸或苏氨酸取代(或被)疏水性残基, 如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸或丙氨酸; (c)半胱氨酸残基取代(或被)任何其它残基; (d)具有正电荷侧链的残基如赖氨酸、精氨酸或组氨酸取代(或被)具有负电荷的残基如谷氨酸或天冬氨酸;

30 或(e)具有大侧链的残基如苯丙氨酸取代(或被)没有这种侧链的残基如甘氨酸。其它变体包括设计为产生新的糖基化和/或磷酸化位点的, 或设计为缺失现有糖基化

和/或磷酸化位点的残基。变体包括糖基化位点、蛋白酶裂解位点和/或半胱氨酸残基上的至少一个氨基酸取代。变体还包括在接头肽上 NTP 或 NTP 区段氨基酸序列之前或之后具有其它氨基酸残基的 NTP 蛋白或 NTP 区段。例如, 可将半胱氨酸残基加在 NTP 区段的氨基和羧基末端以形成二硫键使 NTP 区片段环化。术语“变体”还包括具有 Harlil 肽的氨基酸序列的多肽, 它在 Harlil 肽 3' 或 5' 末端侧翼上有至少 1 个最多 25 个额外的氨基酸。

术语“衍生物”指化学修饰的蛋白质或多肽, 它们通过天然过程如加工和其它翻译后修饰而被化学修饰, 也可通过化学修饰技术如加入一个或多个聚乙二醇分子、糖、磷酸和/或其它这种分子, 其中这类分子不是天然结合于野生型 NTP 蛋白或区段的分子。衍生物包括盐。这种化学修饰详述可见基础教材和更详细的专论以及大量研究文献中, 它们是本领域技术人员所熟知的。将会理解的是, 相同类型的修饰可能以相同或不同程度存在于给定蛋白质或多肽的一些位点上。同样, 给定蛋白质或多肽可包含许多种类的修饰。这些修饰可发生在蛋白质或多肽的任何地方, 包括肽主链、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。这些修饰包括例如乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素的共价结合、血红素部分的共价结合、核苷酸或核苷酸衍生物的共价结合、脂质或脂质衍生物的共价结合、磷脂酰肌醇的共价结合、交联、环化、二硫键形成、脱甲基化、形成共价交联、形成半胱氨酸、形成焦谷氨酸、甲酰化、 γ -羧基化、糖基化、GPI 锚形成、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、蛋白酶解加工、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、糖基化、脂质结合、硫酸化、谷氨酸残基的 γ -羧基化、羟基化和 ADP-核糖基化、硒基化 (selenoylation)、硫酸化、转运 RNA 介导的氨基酸加入蛋白质, 如精氨酰化和泛素化。参见例如《蛋白质-结构和分子性质》(*Proteins-Structure And Molecular Properties*), 第二版, T. E. Creighton, W. H. Freeman 和 Company, New York (1993) 和 Wold, F., “翻译后蛋白质修饰: 观点和前景” (*Posttranslational Protein Modification: Perspective and Prospects*), 《蛋白质的翻译后共价修饰》(*Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, 1-12 页, B. C. Johnson 编, Academic Press, New York (1983)); Seifter 等, *Meth. Enzymol.* 182:626-646 (1990) 和 Rattan 等, “蛋白质合成: 翻译后修饰和衰老” (*Posttranslational Modification and Aging*), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 663:48-62 (1992)。术语“衍生物”包括化学修饰导致蛋白质或多肽变成分支状或者有或没有分支的环状。环状、分支状和分支环状蛋白质或多肽可能由翻译后的天然加工产生并也可完全由合成方

法产生。

术语“同源物”指蛋白质，如 NTP 蛋白、AD7C-NTP 或 NTP 区段的氨基酸序列，根据常用于比较两种多肽的氨基酸位置类似性的标准方法测定至少有百分之 75 相同。两种蛋白质之间的相似性或同一性程度可不用已知方法计算，包括但不限于以下所描述的那些方法：《计算分子生物学》(*Computational Molecular Biology*)，Lesk, A.M. 编，Oxford University Press, New York, 1988；《生物计算：信息和基因组计划》(*Biocomputing: Informatics and Genome Projects*)，Smith, D.W. 编，Academic Press, New York, 1993；《序列数据的计算机分析》(*Computer Analysis of Sequence Data*)，Part I, Griffin, A.M. 和 Griffin, H.G. 编，Humana Press, New Jersey, 1994)；《分子生物学序列分析》(*Sequence analysis in Molecular Biology*)，von Heinje, G., Academic Press, New York, 1987)；《序列分析引物》(*Sequence analysis Primery*)，Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编，M Stockton Press, New York, 1991；Carillo H. 和 Lipman, D., *SIAM, J. Applied Math.*, 48:1073(1988)。设计了确定同一性的优选方法来测试序列之间的最大匹配。在公众可得到的计算机程序中编辑有确定相同性和同一性的方法。

用于确定两种序列之间同一性和相似性的优选计算机程序方法，包括但不限于 GCG 程序包(Devereux, J. 等, *Nucleic Acids Research*, 12(1):387(1984))，BLASTP, BLASTN 和 FASTA, Atschul, S. F. 等, *J. Molec. Biol.*, 215:403-410(1990)。**BLASTX** 程序公众可从 NCBI 和其它来源获得(**BLAST** 手册, Altschul, S. 等, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S. 等, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410(1990)。例如采用计算机算法如 GAP(遗传学计算机组, University of Wisconsin, Madison, Wis.)，排列对比两种待测定的蛋白质或多肽的序列同一性百分比用于最佳匹配它们各自的氨基酸(“匹配范围”通过算法确定)。空格开放罚分(gap opening penalty)，计算为 3x 倍平均对角线；“平均对角线”是所用比较矩阵的对角线平均值；“对角线”是通过具体比较矩阵赋予各优选氨基酸的评分或数值)和间隙延伸罚分(gap extension penalty)通常是间隙开放罚分的 1/10 倍以及比较矩阵例如 PAM250 或 BLOSUM 62 可与此算法结合使用。标准的比较矩阵(参见 Dayhoff 等, 《蛋白质序列和结构图谱集》(*Atlas of Protein Sequence and Structure*)，第 5 卷, supp. 3[1978]；PAM250 比较矩阵参见 Henikoff 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915-10919 [1992]；也可采用该算法的 BLOSUM 62 比较矩阵)。然后用该算法计算同一性百分比。同源物与 NTP、AD7c-NTP、NTP 区段或 Harlil 序列相比，

通常具有一个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入。

术语“肽模拟物”或“模拟物”指能模拟肽或蛋白质的生物活性但在化学性质上不再是肽的生物活性化合物，即它们不再含任何肽键(即氨基酸间的酰胺键)。这里术语肽模拟物用于更广泛含义，包括性质上不再完全是肽的分子如假肽、半肽和拟肽(peptoid)。此广泛含义上的肽模拟物的例子(其中肽的一部分被缺乏肽键的结构取代)在以下描述。无论完全是或部分是非肽，本发明的肽模拟物提供了反应性化学组成成分的空间排列，肽模拟物所依据的这些组成成分非常类似于抗体、抗体衍生物或抗体片段中活性基团的三维排列。由于这种相似的活性位点的几何结构，肽模拟物对生物系统的作用类似于肽的生物活性。

10 本发明的肽模拟物在三维形状和生物活性上优选基本上类似于本文所述的NTP区段。结构上修饰本领域已知的肽以产生肽模拟物的方法的例子包括倒置主链手性中心产生D-氨基酸残基结构，具体是在N-末端，使对蛋白酶降解的稳定性提高而没有不良活性。在论文“含氘D-丙氨酸¹-肽T结合”，Smith C. S.等，*Drug Development Res.*，15，371-379页(1988)中给出了一个例子。第二种方法是改变稳定性所需的环状结构，如N到C链间的二酰亚胺和内酰胺(Ede等，Smith和Rivier主编《肽：化学和生物学》(Peptides:Chemistry and Biology)，Escom，Leiden，1991，268-270页)。例子见构型限制的胸腺五肽样化合物，如美国专利号4,457,489(1985)，Goldstein, G.等所公开的那样，其内容全部纳入本文供参考。第三种方法是用对蛋白水解有抗性的假肽键替换NTP区段中的肽键。

20 所述的一些假肽键一般不影响肽的结构和生物活性。此方法的一个例子是取代逆转化假肽键(“胸腺五肽的生物活性逆转化同源物”)(Biologically active retroinverso analogue of thymopentin)，Sisto A等，Rivier, J. E.和Marshall, G. R.主编辑“肽、化学、结构和生物学”(Peptides, Chemistry, Structure and Biology)，Escom, Leiden, 1990, 722-773页)和Dalpozzo等(1993)，*Int. J. Peptide Protein Res.*，41:561-566，纳入本文供参考)。根据此修饰，肽的氨基酸序列可能与上述NTP区段的序列相同，除了一个或多个肽键被逆转化假肽键所取代。优选大部分N-末端肽键被取代，由于这种取代是通过外肽酶作用于N-末端而赋予对蛋白水解的抗性。也可用其它类似结构的化学基团替代氨基酸的化学基团进行修饰。另一种已知可提高对酶裂解的稳定性而生物活性没有或很少损失的合适的假肽键是还原型电子等排物(isostere)假肽键(Couder等(1993)，*Int. J. Peptide Protein Res.*，41:181-184，全部纳入本文供参考)。

因此, 这些肽的氨基酸序列可能与 NTP 区段或 Harlil 序列相同, 除了一个或多个肽键被电子等排物假肽键替代外。优选大部分 N-末端肽键被取代, 由于这种取代是通过外肽酶作用于 N-末端而赋予对蛋白水解的抗性。合成具有一个或多个还原型电子等排的假肽键的肽是本领域已知的(Couder 等, 上面所引用)。另一个例子包括导入酮亚甲基键或甲硫化物键来替代肽键。

NTP 区段或 Harlil 序列的拟肽衍生物代表了另一类肽模拟物, 拟肽保留了生物活性的重要结构决定簇, 但去除肽键, 从而赋予对蛋白水解的抗性(Simon 等, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:9367-9371, 全部纳入本文供参考)。拟肽是 N-取代的甘氨酸的寡聚物。已报道了一些 N-烷基基团, 各对应于天然氨基酸的侧链(Simon 等, 1992, 上面所引用)。NTP 区段或 Harlil 序列的一些或所有氨基酸用对应于替代氨基酸的 N-取代甘氨酸所替代。

术语“肽模拟物”或“模拟物”还包括反-D 肽和下面定义的对映异构体。

术语“反-D 肽”指与 NTP 区段或 Harlil 序列的 L-氨基酸序列相比, 由反向顺序排列的 D-氨基酸组成的生物活性蛋白质或肽。因此, NTP 的 L-氨基酸区段的羧基末端残基成为 D-氨基酸肽的氨基末端。例如, AD7c-NTP 片段、HARLIL, 变成 $L_dI_dL_dR_dA_dH_d$, 其中 A_d 、 H_d 、 I_d 、 L_d 和 R_d 分别是对应于 L-氨基酸 A、H、I、L 和 R 的 D-氨基酸,

术语“对映异构体”指一种生物活性蛋白质或肽, 其中所述 NTP 区段氨基酸序列中的一个或多个 L-氨基酸残基被相应的 D-氨基酸残基替代。

通过这些描述, 术语“神经变性疾病”是指

1. 特征为以下一种或多种的病理症状: 脑萎缩、细胞减少、神经纤维缠结、淀粉样斑块和/或组织和/或体液中存在 NTP;

2. 阿尔茨海默氏类的疾病, 即阿尔茨海默病(老年前期痴呆、老年痴呆); 与唐氏综合征有关的阿尔茨海默病; 家族性阿尔茨海默病; 由于早老蛋白 1、早老蛋白 2 或其它蛋白质突变引起的遗传性阿尔茨海默病; 与其它中枢神经系统疾病, 如帕金森病、卢伊体病和脑血管疾病有关的阿尔茨海默病;

3. 嗜刚果红血管病(congophilic angiopathy)(与阿尔茨海默病有关或无关, 家族性或非家族性的);

4. 特征为异常原纤维(淀粉样原纤维)沉积和/或与非纤维状淀粉样蛋白前体或非前体分子有关的病理症状;

5. 特征为异常 tau 沉积的病理症状, 包括额颞痴呆(frontotemporal

dementia)、进行性核上性麻痹(PSP)、皮质基底神经节变性(corticobasal ganglionic degeneration)(CBD), 以及与 tau 基因突变有关的症状; 和/或

6. 其它疾病以及如美国专利 6, 001, 331 所述的那些疾病, 在此将该专利全文并入以供参考。

5 在本文中, 表述“淀粉样斑块”和“淀粉样原纤维”指老年斑、神经炎性斑块、淀粉样斑块、淀粉样星体、淀粉样核心、原始斑、典型性斑块、耗尽斑、扩散斑、暗斑、神经纤维缠结、淀粉样原纤维、双螺旋丝等。

在本文中, 术语“哺乳动物”指所有的哺乳动物, 优先指羊、母牛、狗、猫、猿、猴、小鼠、大鼠和人, 最优选指人。

10 在本文中, 表述“NTP 区段”、“Harlil 序列”和“Harlil 肽”可以互换使用。应该理解, 当使用“NTP 区段”、“Harlil 序列”或“Harlil 肽”时, 本发明包括其合适的同源物、变体、衍生物和肽模拟物。

在本文中, 表述“含有 NTP 的组织”是指含有所有或部分 NTP 的组织, 含或不

15 NTP 的组织, 以及可在某点与 NTP 及时接触的组织。

本发明涉及防止细胞死亡和/或组织坏死的方法。尽管已知道 NTP 并在文献中有所描述, 但迄今为止不知道 NTP 可引起除产生 NTP 细胞之外的细胞死亡。尽管不受任何理论的束缚, 本发明人相信活组织中存在 NTP, 不仅如先前报道那样, 表明有一些神经细胞死亡, 而且也具有毒性因为它能引起其它活组织细胞死亡。本

20 发明人相信哺乳动物脑组织中存在 NTP 是阿尔茨海默氏病(AD)的标志, 它通过在其存在的活组织中引起细胞死亡和/或组织坏死使 AD 恶化。

因此, 相信患 AD 的哺乳动物, 神经细胞死亡上调了状选产生 AD7C-NTP 的细胞, 从而在该部位产生 AD7C-NTP。产生的 AD7C-NTP 然后开始破坏它附近的其它活组织(如其它神经细胞、胶质细胞等), 因而加剧疾病的进展。因此本发明人相信,

25 中和例如 AD7C-NTP 的作用将有助于在含有例如 AD7C-NTP 的活组织中防止、抑制和/或改善细胞死亡和/或组织坏死。我们惊奇的发现, NTP 区段可与 AD7C-NTP 结合并能在含有 AD7C-NTP 的活组织中防止、抑制和/或改善细胞死亡和/或组织坏死。

已知 NTP 且在例如美国专利号 5, 948, 634、5, 948, 888、5, 830, 670 和 6, 071, 705 中描述所述, 所公开的内容全部纳入本文供参考。用重组方法生产 NTP 的

30 方法也描述在上述文献中。培养抗 NTP 的抗体这样可诊断 AD 和其它相关病症和疾病的方法也描述在这些文献中。本领域技术人员知道, 可采用 NTP 同源物、衍生

物、模拟物和变体以及多种来源的 NTP(如天然、胰腺、纯化的、合成的或来自体外不同表达系统的)来制备对本发明有用的任何区段

本发明涉及防止和/或抑制细胞死亡和/或组织坏死的方法。所述方法包括使活组织接触至少一种 NTP 区段,所述区段存在的量足以防止和/或抑制细胞死亡和
5 /或组织坏死。所述 NTP 区段优选在 AD7C-NTP 之后,最好含有至少一种下列 AD7C-NTP 的重复序列:

- | | |
|----------------|---------------|
| (a) 45-51 | T H A R L I L |
| (b) 90-96 | H H A R L C L |
| (c) 263-269 | M F A R L I L |
| 10 (d) 291-297 | H H A R L I F |

见图 1。

本发明包括具有任一区域(a)、(b)、(c)、(d)或它们的同源物、衍生物、变体和模拟物(包括但不限于“H A R L M L”)的序列的肽。所述 Harlil 肽在接头肽上的 Harlil 序列之前或之后还可有额外的氨基酸残基。额外的氨基酸残基或接
15 头肽可以是在 Harlil 序列之前或之后在 NTP 序列中发现的那些残基。例如,在 NTP 序列中,在残基 46 之前出现氨基酸残基 G I T G M C T,在氨基酸残基 51 之后出现氨基酸残基 Y F F L V。因此,在本发明中作为 NTP 区段的 Harlil 肽可包括 NTP 肽 G I T G M C T H A R L I L Y F F L V。对于(b)、(c)和(d)中列举的 Harlil 肽,所述额外的氨基酸残基优选是在 NTP 序列中出现在 Harlil 序列侧翼的那些残
20 基。优选的是,所述 Harlil 肽有长度不超过 25 个总氨基酸残基的额外的氨基酸残基。

Harlil 重复序列优选具有与 NTP 结合的独特特性。这种与 NTP 结合的能力表明,Harlil 重复序列在含有 NTP 的活组织中可有效防止、抑制或改善细胞死亡和/或组织坏死。

25 本发明涉及作为 NTP 和其它分子亲和结合伴侣(affinity binding partner)的 Harlil 序列肽及其同源物、衍生物、变体和肽模拟物在治疗与细胞死亡和/或组织坏死有关的症状中的应用。本发明还涉及治疗与细胞死亡和/或组织坏死有关病症的方法以及含有 Harlil 肽或其能够穿过血脑屏障的同源物、衍生物、变体和组合物。

30 可用常规的肽合成技术生产 Harlil 肽及其同源物、衍生物和变体。可用组合化学技术开发 Harlil 肽的模拟物。

例如，可用(a)标准重组法，(b)合成技术，或(c)这两种方法的组合来生产对应于 Harlil 肽的核酸。

Harlil 序列结合 AD7C-NTP 和其它分子。见题为“优选的神经丝状蛋白的区段及其使用方法”的待批美国专利申请序列号第 09/697, 590，在此全文并入以供
5 参考。

本发明包括令人惊奇的发现，即可与 AD7C-NTP 结合的 Harlil 序列在含有 AD7C-NTP 的活组织中可防止或抑制细胞死亡和/或组织坏死。

有证据表明，AD7C-NTP 参与神经变性级联(neurodegenerative cascade)。通过靶定 AD7C-NTP 打断级联或使级联改道的能力提供了治疗机会。例如，可利用
10 Harlil 肽与 AD7C-NTP 结合位点相互作用的能力干涉治疗，而阻断 AD7C-NTP 上潜在的反应位点的。

另外，本发明的 Harlil 肽可将药物靶向表达 Harlil 序列的细胞，或产生可在体内诱导 Harlil 序列表达的基因或疫苗。

尽管 Harlil 序列操作的实际机制还不知道，但本发明者发现，将 Harlil 序
15 列给与含有 AD7C-NTP 的活组织可防止和/或抑制和/或改善细胞死亡和组织坏死，这一情况是在没有 Harlil 序列时发生的。

“HARLIL”位点可能与其它脑蛋白质相互反应，并且能在 AD7C_NTP 和/或其它 NTP 或其它分子的功能性中发挥作用。

生产和检测这种 Harlil 序列或其功能性同源物或同源物的方法描述在题为
20 “优选的神经丝状蛋白区段及其使用方法”的待批美国专利申请序列号第 09/697, 590，在此全文并入以供参考。

对于本发明特别有用的 NTP 肽区段是上述那些，它包括至少部分 AD7C-NTP 的 HARLIL 氨基酸序列。有用的 Harlil 序列包括以下氨基酸序列：

- (a) H H A R L;
- 25 (b) H A R L;
- (c) H A R L I;
- (d) H A R L I L;
- (e) H H A R L C L;
- (f) A R L I L;
- 30 (g) H H A R L I F;
- (h) T H A R L I L;

- (i) A R L I;
 (j) A R L;
 (k) H A R L C L;
 (l) A R L C L;
 5 (m) A R C L;
 (n) M F A R L I L;
 (o) F A R L I L;
 (p) F A R L I;
 (q) F A R L;
 10 (r) H A R L I F;
 (s) A R L I F;

及其同源物、衍生物、变体和模拟物。

选自上述的各种肽及其同源物、衍生物、变体和模拟物可作为 NTP 区段用于本发明。例如，所述肽可有氨基酸序列 A R L I 并在该肽的 3' 或 5' 末端侧翼有至少 1 个和最多 25 个额外氨基酸。所述肽也可有氨基酸序列 H A R L 并在该肽的 3' 或 5' 末端侧翼有至少 1 个和最多 25 个额外氨基酸。此外，所述肽可有氨基酸序列 F A R L 并在该肽的 3' 或 5' 末端侧翼有至少 1 个和最多 25 个额外氨基酸。所述肽还可选自具有氨基酸序列 A R L 的肽并在该肽的 3' 或 5' 末端侧翼有至少 1 个和最多 25 个额外氨基酸。另一种对本发明有用的肽包括那些具有氨基酸序列 A R L C 并在该肽的 3' 或 5' 末端侧翼有至少 1 个和最多 25 个额外氨基酸的肽。最后，NTP 区段可以是含有肽的至少两个重复的 Harlil 肽序列的聚合物。

在本发明中更加优选的是具有以下氨基酸序列的肽的 Harlil 序列。

1. (NTP-1) L H A R L C L A N F C G R N R V
2. (NTP-2) L A R L C L A N F C G N N N V
- 25 3. (NTP-3) C A R Y R T G H H A R L M
4. (NTP-4) H H A R L P L A N F C G
5. (NTP-5) R T G H H A R L C L A N F C
6. (NTP-6) C E S A R Y R T G H H A R L C
7. (NTP-7) D N T H H A R L I L
- 30 8. (NTP-8) S H H A R L I L

上述序列可通过半胱氨酸与载体蛋白结合。因此，由于多个半胱氨酸残基的

存在得到了肽 NTP-1 和 NTP-2 产生的混合结合物。因此，对肽 NTP-5 和 NTP-6 而言，二级半胱氨酸(secondary cysteine)被乙酰氨基甲基(C₃H₆NO) (ACM) 阻断。

在图 1 中可看见 AD7C-NTP 中鉴定序列的位置。尽管所有 Harlil 同源物都具有一些反应性，特别优选的 Harlil 同源物是选自 NTP-1、NTP-3 和 NTP-7 的那些。
5 应注意的是，在 Harlil 类似物 NTP-1 中，第一个氨基酸“L”可被赖氨酸即“K”代替。

Harlil 序列，或 NTP 区段优选与含有 NTP 的活组织接触。含有 NTP 的任何活组织与 NTP 接触且 NTP 不再存在或不以原始形式存在，或可能在某些时间段含有 NTP 的活组织都包括在本发明之内。优选的活组织是选自哺乳动物组织的组织。

10 本发明的一个实施方案包括治疗由含有 NTP 的活组织坏死形起的症状的方法。上下文中，活组织坏死和细胞死亡是指除了产生 NTP 的死亡细胞以外的细胞死亡和/或细胞的组织坏死。在此方法中，对患有这种症状的哺乳动物施用 NTP 的区段或 Harlil 序列。施用 Harlil 序列的量 and 施用时间足以防止和/或抑制活组织坏死。

15 本领域技术人员会明白，可通过基因表达(如基因治疗)或通过疫苗使哺乳动物产生或表达 Harlil 序列或其同源物、衍生物、变体或模拟物来代替直接施用 Harlil 序列。本领域技术人员运用本文提供的指南能产生、分离和纯化用于诱导 Harlil 序列或其同源物、衍生物、变体或模拟物表达的合适基因或疫苗。

例如，基因治疗作为治疗各种哺乳动物疾病和提高特异蛋白质产生或其它细胞产物的方法受到广泛注意。基因治疗一般通过将外源遗传物质导入哺乳动物患病细胞中而完成。可设计导入的遗传物质来取代患病哺乳动物的异常(缺陷)基因(“基因取代治疗”)，或可设计用于表达编码的蛋白或其它治疗产品而不取代任何缺陷基因(“基因增大”)。因为许多先天性和获得性医学疾病是由于多种基因产物的不适当产生，基因治疗通过暂时或稳定性表达编码治疗产物的外源核酸提
20 供了治疗这些疾病的方法。

基因治疗可通过直接转化哺乳动物内的靶细胞(体内基因治疗)或体外转化细胞随后植入转化的细胞到哺乳动物中(先体外后活体内基因治疗)来完成。体内基因治疗特别优选用于本发明。除了修复体细胞外，一般知道体内基因治疗也可用于全身治疗，在此领域中基因治疗有广泛用途。全身治疗包括用感兴趣的 DNA 转
30 染靶细胞，在此细胞中表达编码的蛋白质和转化细胞随后分泌产生蛋白质到血液中的能力。

开发了各种方法来完成体内转化,包括机械方法(如直接注射核酸入靶细胞或粒子轰击)、重组病毒、脂质体和受体-介导的内吞作用(RME)(综述参见 Chang 等 1994 *Gastroenterol.* 106:1076-84; Morsy 等 1993 *JAMA* 270:2338-45; Ledley 1992 *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 14:328-37)。

- 5 开发和给予适于诱导 Harlil 序列或 NTP 区段或其同源物、衍生物、变体或模拟物体内表达的基因和疫苗的合适方法见例如美国专利号 6, 210, 919 和 6, 225, 290 所述。这些专利所公布的内容全部纳入本文供参考。

与细胞死亡和组织坏死有关的任何疾病可根据本发明治疗。优选的是疾病选自神经退化疾病如 AD、皮克病、卢伊(Lewy body)病、帕金森氏病等,或选自中
10 风、脑肿病和其它脑疾病,或青光眼。

根据本发明的较佳实施方案,方法包括使活组织以足以防止细胞死亡和/或组织坏死的量与至少一种 NTP 区段(或其同源物、衍生物、变体或模拟物)接触。给予 NTP 区段的方法包括肌肉内、口服、静脉内、腹膜内、大脑内(实质内)、脑室内、瘤内、病灶内、皮内、鞘内、鼻内、眼内、动脉内、局部、透皮、通过气溶
15 胶、灌输、推注、植入装置、缓释系统等,可以单独给予或和载体一起给予。此外,如上所述,可通过给予表达蛋白质的基因,通过给予能诱导这种产生的疫苗,或通过引入体内表达此区段的细胞、细菌或病毒以在体内表达或产生 NTP 的区段。

治疗神经系统疾病或其它脑相关疾病可通过给予能影响动物或病人的神经系统功能或功能不良的药物来实现。通常这种药物通过外周应用,经口或全身途径
20 给予。虽然一些药物能穿过血脑屏障(bbb),但另一些不能有效穿过 bbb 或根本不能穿过,只有直接给入脑内才有效。如本文所用,术语“血脑屏障”或“bbb”指 bbb 本身和血液-脊髓屏障。血脑屏障由脑血管的内皮、基底膜和神经胶质细胞组成,作用是限制物质渗透入脑内。有时可将 bbb 的结构再分成两种组分:内皮或毛细血管屏障和室管膜屏障。Banks, W. A., Kastin, A. J. Barrera, “传递肽到中枢
25 神经系统:进退两难和策略”(Delivering peptides to the central nervous system:Dilemmas and strategies), *Pharm. Res.* 8:1345-1350(1991)。

能穿透过 bbb 的质的性质还没有确定,但知道许多脑功能的调节物如细胞因子、运铁蛋白、脑啡肽(encephalins)和内啡肽可从血管穿过 bbb 进入脑内。Raeissi, S., Audus, J., “ δ -睡眠诱导肽血脑屏障通透性的体外特征”(In vitro
30 characterization of blood-brain barrier permeability to delta sleep-inducing peptide) *J. Pharm. Phy.* 41:848-852(1989); Zlokovich, B., Susie, V. T.,

Davson, H. Begley, D. J., Jankov, R. M., Mitrovic, B. M., Lipovac, M. N., “血管灌注豚鼠脑的血脑屏障处的 δ -睡眠诱导肽 (DSIP) 的饱和机制” (Sturable mechanism for delta sleep-inducing peptide (DSIP) at the blood-brain barrier of vascularly perfused guinea pig brain) *Peptides* 10:249-154(1989);

5 Zlokovich, B., “研究血脑屏障处肽相互作用的体内方法” (*In vivo* approaches for studying peptide interaction at the blood-brain barrier) *J. Control. Rel* 13:185-201(1990)。然而许多物质可影响中枢神经系统(CNS)如腺苷、 β -内啡肽、内源肽的合成类似物, Houghten, R. A. Swann, R. W., Li, C. H. “ β -内啡肽: 大鼠和兔静脉注射氘化肽后的稳定性、清除行为和进入中枢神经系统” (β -

10 Endorphin: Stability, Clearance behavior and entry into the central nervous system after intravenous injection of the tritiated peptide in rats and rabbits) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4588-4591(1980); Levin, E. R., Frank, H. J. K., Weber, M. A., Ismail, M., Mills M., “心钠素穿透血脑屏障的研究” (Studies on penetration of the blood-brain barrier by atrial natriuretic

15 factor) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147:1226-1231(1987) Sakane, T., Tanaka, C., Yamamoto, A., Hashida, M., Sesaki, H., Ueda, H., Takagi, H., “聚山梨醇酯 80 对脑摄入的作用和 D-kyoto 的镇痛效果” (The effect of polysorbate80 on brain uptake and analgesic effect of D-kyoto) *Int. J. Pharm.* 57:77-83(1989) 以及一些刺激性和抑制性氨基酸和营养因子穿透

20 bbb 较差或根本不穿透。现在, 无 bbb 穿透或较差 bbb 穿透的药物仅可通过直接 CNS 灌输或植入控释聚合物来给予(参见如美国专利号 4, 883, 666, Sabel 等)

一种克服传统药物治疗的某些局限性的方法是增加通过 bbb 的药物相对量。相信如果在减少给定药物或诊断物质的外周剂量的同时能增加穿过 bbb 的药物量, 药物的外周副作用严重性也会更小, 同时维持脑中所需效果。已描述了一些有效

25 提高药物穿透 bbb 的方法。

一种方法是改变 bbb 本身的功能。例如当外周给予渗透剂时(如通过静脉内注射), 导致 bbb 打开。此外, 一些作用于 CNS 的药物可改变 bbb 对其它物质的渗透性; 例如已报道拟胆碱能的槟榔碱诱导改变药物穿透 bbb。Saija, A., Princi, P., De Pasquale, R., Costa, G., “槟榔碱而不是氟哌啶醇使大鼠血脑屏障的透

30 透性产生变化” (Arecoline but not haloperidol produces changes in the permeability of the blood-brain barrier in the rat. *J. Pharm. Pha.* 42:135-

138(1990)。

给予可改变 bbb 通透性的其它药物见授于 E. A. Neuwelt 的美国专利号 5,059, 415 和 5, 124, 146 所述。缓激肽是有这种作用的一种特殊药物(美国专利号 5, 112, 596, 授于 Malfroy-Camine)。另一种方法包括给予渗透剂肽如 A-7 或其构象类似物(WO 92/18529, J. W. Kozarich 等申请)。A. Tomasz 和 E. Tuomanen 提出了一种相对入侵性方法(WO 91/16064), 采用肠胃外注射真细菌如肺炎链球菌的纯化细胞壁或细胞壁片段来打开 bbb。

授于 L. L. Rubin 等的美国专利号 5, 260, 210 公开了一种方法, 其中通过给予能减少或干扰环腺苷酸浓度或提高环鸟苷酸浓度的制剂增加血脑屏障的通透性。

另一种方法是修饰药物分子本身。例如大分子如蛋白质根本不能通过 bbb 或通过有困难或有不利影响蛋白质功效的改变。例如可先分离出大分子活性位点即触发生物学所需活动的分子部分, 然后只使用此活性位点。由于分子大小是 bbb 允许透过的因素之一, 可采用减小的尺寸从而较小分子现在可通过 bbb。因此在本文中采用抗体片段是理想的。对大分子进行其它修饰以试图通过 bbb, 包括糖化蛋白质从而提高它们的 bbb 通透性或形成前体药物。授于 J. F. Podusio 和 G. L. Curran 的美国专利号 5, 260, , 308 讨论了糖化蛋白质, 而 V. E. Shashoua 申请的美国专利号 4, 933, 324 和 WO 89/07938 公开了一种前体药物的形成。这些前体药物由脂肪酸载体和不能自己穿过 bbb 的神经活性药物形成。一种类似的系统公开于 WO 89/07938。

另一种方法是植入控释聚合物, 该聚合物可将基质系统的活性成分直接释放到神经组织中。然而, 此方法具有侵入性且如果直接植入到脑或脊髓中需要手术干预(参见 Sabel 等美国专利号 4, 883, 666; Sabel 等美国专利申请序列号 07/407, 930)。同样已知如美国专利号 5, 800, 390 所述可将组合物直接给予脑内部, 该专利所公布的内容全部纳入本文供参考。这些方法能将缓释的固体制剂和半固体制剂直接递送到脑组织中。

为克服这些局限性, 尝试了另一种方法, 其中采用了药物载体系统如脂质体、红细胞血影、抗体偶联物和单克隆抗体偶联物。靶向药物递送中一个主要问题是网状内皮系统(RES)特别是肝和脾中巨噬细胞对注射的载体的迅速调理作用和摄取。在脂质体中掺入所谓的“秘密”脂质, 如磷脂酰肌醇、单唾液神经节苷脂或硫代半乳糖神经酰胺可部分克服这个障碍。

授于 P. M. Friden 的美国专利号 5, 182, 107 和 5, 154, 924 教授了偶联药物与抗体的方法, 其中所述抗体与运铁蛋白受体反应。运铁蛋白受体位于脑毛细管内皮细胞上, 因此脑毛细管内皮细胞可转运药物如神经生长因子穿过 bbb。美国专利号 5, 004, 697 (授于 Pardridge) 通过提供有特殊等电点的阳离子化抗体改进了这种抗体偶联方法 (也参见 Pardridge 的 WO 89/01343)。

另一种方法是产生活性制剂与之偶联的嵌合肽 (同样授于 Pardridge 的美国专利号 4, 801, 575)。这种系统也在授于 Pardridge 和 Schimmel 的美国专利号 4, 902, 505 中进一步讨论, 其中嵌合肽如组蛋白能通过胞吞转运作用穿过 bbb。

授于 N. S. Bodor 的美国专利号 5, 187, 158 和 5, 017, 566 公布了一种脑-特异性药物传送方法, 其中中枢作用药物与二氢吡啶反应-吡啶盐氧化还原载体的还原性生物可氧化类脂形式一起给予, 如多巴胺 (也参见授于 Bodor 的美国专利号 4, 880, 816)。

采用一种相当入侵性的方法来传送遗传物质到脑中。这可通过例如化学破坏 bbb 然后用病毒来传送基因穿过 bbb 而完成 (参见授于 E. A. Neuwelt 的美国专利号 4, 886, 042)。这里将一种矫正性遗传物质掺入到病毒中, 然后将病毒注射入血流。

最后, 另一种传送药物穿过 bbb 的载体系统是使用脂质体, 如 F. D. Collins 和 R. C. Thompson 所述 (WO 91/04014)。这里脂质体可靶向运输特异性配基穿过 bbb 的特殊内源性脑运输系统。

另外一种方法公开于 Kreuter 等的美国专利号 6, 117, 454。Kreuter 专利的主题包括采用表面活性剂包被的纳米粒子作为药物载体 (或靶向分子) 的方法、组合物和药物靶向系统, 用于广泛范围的药物以提高药物或诊断试剂穿过 bbb。

另一种方法是鼻内施用药物, 使其直接进入大脑而不经血流。这在试验模型中已对三种神经肽—黑皮素、加压素和胰岛素取得了成功: Born 等, “吸入神经肽: 一种到人脑的经鲁方法 (Sniffing Neuropeptides: a transnasal approach to the human brain)” *Nature Neuroscience* 高级在线出版物: 2002 年 5 月 6 日, DOI:10.1038/nn849。

口服给药的固体剂型包括胶囊、片剂、药丸、粉末和颗粒。在这些固体剂型中, 活性化合物通常与下列至少一种混合: (a) 一种或多种惰性赋形剂 (或载体), 如柠檬酸钠或磷酸二钙; (b) 填充剂或膨胀剂, 如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸; (c) 粘合剂, 如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、

蔗糖和阿拉伯树胶；(d) 湿润剂，如甘油；(e) 崩解剂，如琼脂-琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些复杂硅酸盐和碳酸钠；(f) 溶液滞留剂，如石蜡；(g) 吸收加速剂，如季铵化合物；(h) 润湿剂，如乙酰醇和甘油单硬脂酸；(i) 吸附剂，如白陶土和皂土；(j) 润滑剂，如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂酰硫酸钠或它们的混合物。对于胶囊、片剂和药丸，剂型也可包括缓冲剂。

口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、溶液、悬浮液、糖浆和酞剂。除了活性 Harlil 序列化合物，液体剂型可包括本领域常用的惰性稀释剂，如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂。示范性乳化剂是乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油如棉子油、花生油、玉米胚油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇、山梨聚糖的脂肪酸酯或这些物质的混合物等。除了这些惰性稀释剂，该组合物也可包括佐剂，如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、增甜剂、调味剂和香味剂。

另一种给予 NTP 区段的方法是通过透皮或经皮途径。这种实施方案的一个例子是使用小贴片。具体说，小贴片可用例如二甲亚砜(DMSO)或 DMSO 和棉花子油的混合物配的 NTP 区段的精细悬浮液制备，使小贴片接触远离治疗部位的哺乳动物皮肤。可将该组合物放在皮肤袋(pouch)内。其它介质和它与其它溶剂和固体支持物的混合物也可同样起作用。小贴片可含有溶液或悬浮形式的 NTP 区段。可将小贴片施加于病人的皮肤，例如通过将它插入病人的皮肤袋中，皮肤袋是用针、夹子或其它压紧装置折叠和使皮肤保持在一起而形成的。此袋使用的方式应确保持续接触皮肤而不干扰哺乳动物。除了使用皮肤袋外，可使用任何保证小贴片牢固放置与皮肤接触的装置。例如可使用粘合绷带使小贴片保持在皮肤位置上。

本发明组合物中活性成分的实际剂量水平可不同，以使含 NTP 区段的组合物有效获得具体组合物和给药方法所需的抑制组织坏死的治疗反应。因此所选剂量水平取决于所需的治疗效果、给药途径、治疗需要的持续时间和其它因素。

对于哺乳动物包括人，有效量可根据身体表面积施用。多种大小、种类的动物和人的剂量之间的相互关系(根据 mg/M^2 身体表面积)见 E. J. Freireich 等, *Cancer Chemother. Rep.*, 50(4):219(1966)所述。身体表面积可从个体的身高和体重大致确定(参见科学表格(Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardsley, N. Y. 537-538 页(1970))。

给予宿主的 NTP 区段的每日总剂量可以是单剂量或均分剂量。剂量单位组合

物可含有这种量，如它的药量可用于形成每日剂量。然而要理解任何具体病人的具体剂量水平取决于各种因素，包括体重、总体健康、性别、饮食、用药时间和途径、施用药物的效力、吸收和排泄的速度、与其它药物的组合和治疗具体疾病的严重性。

- 5 本发明的含 NTP 区段的组合物优选含有能使 NTP 区段穿过血脑屏障的成分以治疗活的脑组织。上述任何各种成分可用来使 NTP 区段穿过血脑屏障。例如，NTP 区段可足够小以穿过血脑屏障。在时情况下不需另外的成分。

如美国专利号 5, 260, 308 所述，NTP 区段可被糖化以提高 bbb 的通透性，或如美国专利号 4, 933, 324 和 WO 89/07938 所述形成前体药物。这些前体药物优选
10 地由脂肪酸载体和本身不能穿过 bbb 的 NTP 区段形成。

另一种方法是植入控制释聚合物，该聚合物可将 NTP 区段从基质系统直接释放到神经组织中(参见 Sabel 等美国专利号 4, 883, 666; Sabel 等美国专利申请序列号 07/407, 930)。也可使用药物载体系统如脂质体、红细胞血影、抗体偶联物和单克隆抗体偶联物。根据本发明的这个实施方案，所谓“秘密”脂质如磷脂酰肌
15 醇、单唾液神经节苷脂或硫代半乳糖神经酰胺可用于形成含前述抗体和抗体偶联物的脂质体。

如美国专利号 5, 182, 107 和 5, 154, 924 所述，可将 NTP 区段与能与运铁蛋白受体反应的抗体偶联。运铁蛋白受体位于脑毛细管内皮细胞上，内皮细胞因此可转运药物如神经生长因子或 NTP 区段穿过 bbb。如美国专利号 5, 004, 697 和 WO
20 89/01343 所述，上述 NTP 区段-抗体偶联物可进一步通过提供具有特殊等电点的阳离子化抗体来提高。

发明的另一个实施方案包括产生偶联于活性 NTP 区段的嵌合肽，见美国专利号 4, 801, 575 所述。如美国专利号 4, 902, 505 所述，嵌合肽优选能通过胞吞转运作用穿过 bbb 的组蛋白。如美国专利号 4, 880, 816、5, 187, 158 和 5, 017, 566 所述，
25 本发明另一实施方案包括提供与二氢吡啶反应-吡啶盐氧化还原载体的还原性生物可氧化类脂形式，如多巴胺给合在一起的 NTP 区段。

也可采用另一种传送 NTP 区段到脑中的方法。如美国专利号 4, 886, 042 所述，这可通过化学破坏 bbb，然后用病毒来传送 NTP 区段穿过 bbb 而完成。这里优选将一种矫正性遗传物质掺入到病毒中，然后将病毒注射入血流。另一种可用于
30 传送 NTP 区段穿过 bbb 的载体系统是使用脂质体，如 F. D. Collins 和 R. C. Thompson 所述(WO 91/04014)。这里脂质体优选靶向能运输特殊配基穿过 bbb 的特殊内源性

脑运输系统。表面活性剂包被的纳米粒子也可作为药物载体(或靶向分子)用于发明的 NTP 区段以提高其渗透穿过 bbb, 如美国专利号 6, 117, 454 所述。

另一种方法是使用 L-氨基酸氧化酶来减少 NTP 区段的血浆水平使运输 NTP 区段能穿过 bbb。这种方法更详细地描述于美国专利号 5, 695, 751, 所公布的内容全部纳入本文供参考。

本发明的又一种方法是局部给予包含 NTP 区段的组合物。用于将组合物施用于脑内部的装置见例如美国专利号 5, 800, 390 所述, 其所公布的内容全部纳入本文供参考。缓释性固体制剂和半固体制剂可直接施用到脑组织中。这种施用可通过插入一种针样脑内装置来完成, 将此装置任选地植入头部从而引导末梢定位于给药部位。

本发明用于患与细胞死亡和/或组织坏死有关疾病的哺乳动物的优选组合物, 含有 NTP 区段以及能使 NTP 区段穿过血脑屏障的成分。本发明的其它优选组合物包括表达 NTP 区段的基因以及能使该基因穿过血脑屏障的成分。本发明另一个优选组合物包括诱导 NTP 区段表达的疫苗以及能使疫苗穿过血脑屏障的成分。

本发明中优选的接触活组织的 NTP 区段的量足以抑制、防止和/或改善细胞死亡和/或组织坏死。具体量可由本领域技术人员用本文所提供的指南确定。优选给予足够的 NTP 区段使细胞死亡或组织坏死与对照相比减少 50%以上, 此对照中没有 NTP 区段存在且细胞死亡未受抑制。更优选与对照相比, 给予 NTP 区段使细胞死亡或组织坏死减少 60%以上, 更优选超过 70%, 最优选超过 75%, 此对照中没有 NTP 区段存在且细胞死亡或组织坏死未受抑制。

此用量总是取决于组织的具体类型, 所用 NTP 区段以及 NTP 或其它靶分子的量。采用任何上述美国专利号 5, 948, 634、5, 948, 888、5, 830, 670 和 6, 071, 705 中所述方法, 可估计 NTP 存在的相对量, 然后用获自各种来源的哺乳动物组织进行一系列体外实验, 如上述美国专利所述那样, 确定组织中 NTP 或其它分子靶的量, 然后确定获得所需程度防止细胞死亡或组织坏死(即与对照相比优选超过 60%)所需的 NTP 区段的量。采用本领域已知技术以及本文所提供的指南, 本领域技术人员能进行这些实验。

然后给哺乳动物施用 NTP 区段的量不难根据哺乳动物体重和预期输送到该组织的量来确定。预期输送到哺乳动物脑组织的 NTP 区段的量取决于所用的使 NTP 区段能穿过 bbb 的具体机制。对于给予表达 NTP 区段的基因或给予诱导 NTP 区段表达或产生的疫苗同样如此。采用上述(全部内容纳入本文供参考)专利中所述

技术和本文所提供的指南，本领域技术人员能够确定给予哺乳动物的基因、疫苗、NTP 区段的适当剂量。

提供下列实施例以阐明本发明。然而应理解本发明不限于这些实施例所述的具体情况或细节。

5

实施例 1

此实施例证明活组织(体内)中因 AD7C-NTP 存在所引起的细胞死亡。

AD7C-NTP 根据美国专利号 5,948,634、5,948,888、5,830,670 和 6,071,705 中任一所概括的步骤获得。

10 给 8 只正常大鼠皮肤和皮下注射，盐水浓度为 0.1-1.0 μ g/mL 的纯化重组 AD7C-NTP，每只大鼠 3 个不同病灶，用塑料注射器通过 26 号不锈钢针头注入。

观察动物 24 小时，在 24 小时时无痛处死动物。切取 24 个浸润病灶、以 10% 福尔马林固定、石蜡包埋、染色和用标准组织病理学方法检查。

15 类似的对照组大鼠注射(1) 盐水配的牛血清白蛋白、(2) 正常人血清、(3) 生理盐水，并如上所述检查和处死，如上切取注射处理的病灶。

在所有实施例中注射 AD7C-NTP 在注射部位产生了急性组织坏死。AD7C-NTP 注射部位的肌肉组织、皮下结缔组织和真皮中明显坏死。在 24 小时时，细胞变得暗淡、缩小和坏死，炎性细胞渗入。坏死与注射区域相关且似乎不扩散到远离注射部位以外。

20 对照没有显示坏死或细胞损失的迹象。对照注射部位具有针头引起的温和至最小的急性炎症和病灶性微出血。

实施例 2

25 这个实施例的目的是鉴定 AD7C-NTP 神经丝状蛋白的几种 Harlil 序列，并确定它们与 AD7C-NTP 的反应性。

合成了以下 Harlil 序列(Synpep, Dublin CA)，使其与马来酰亚胺活化的兔 IgG(Jackson Immunoresearch, West Grove PA)结合，并测定其 NTP 免疫反应性。加入接头，它是在 AD7C-NTP 的 90-96 位序列 H H A R L C L 之前或之后出现的蛋白质序列的重复。

30 1. (NTP-1) L H A R L C L A N F C G R N R V
2. (NTP-2) L A R L C L A N F C G N N N V

3. (NTP-3) C A R Y R T G H H A R L M
 4. (NTP-4) H H A R L P L A N F C G
 5. (NTP-5) R T G H H A R L C L A N F C
 6. (NTP-6) C E S A R Y R T G H H A R L C
 5 7. (NTP-7) D N T H H A R L I L
 8. (NTP-8) S H H A R L I L

上述序列可通过半胱氨酸与载体蛋白结合。因此，由于有多个半胱氨酸残基得到了肽 NTP-1 和 NTP-2 产生的混合结合物。因此，对肽 NTP-5 和 NTP-6 而言，二级半胱氨酸(secondary cysteine)被乙酰氨基甲基(C₃H₆NO) (ACM) 阻断。

- 10 在图 1 中可看见 AD7C-NTP 中鉴定序列的位置。如上所述，Harlil 肽的同源物、衍生物、模拟物和变体都包括在本发明范围内。为构建该实施例的同源肽，使用了类似的氨基酸。所用取代标准是电荷和/或大小。因此，根据两种氨基酸之间的总相似性选择用甲硫氨酸替代 NTP 肽 3 中的半胱氨酸，并需要从这一段特定延伸的氨基酸中除去反应性半胱氨酸。用脯氨酸替代半胱氨酸来观察当它在蛋
 15 白质中是否能模拟肽的构象形式以及二硫键中的半胱氨酸。

- 其它精通此领域的技术人员熟知的用来影响或研究亲和相互作用的变化包括但不限于，例如，用其它疏水氨基酸如异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸或甘氨酸代替亮氨酸；替代酸性或碱性氨基酸；用苯丙氨酸替代组氨酸以确定电荷对空间的影响；用天冬氨酸替代天冬酰胺或用谷氨酸替代谷氨酰胺以确定电荷对空间影响；
 20 以及用苏氨酸替代丝氨酸，用半胱氨酸替代苏氨酸，用谷氨酸替代天冬氨酸，用赖氨酸或组氨酸替代精氨酸，以及用色氨酸或苯丙氨酸替代酪氨酸。在侧翼序列中引入这些变化可使肽的碱性或疏水性减弱。

实施例 3

- 25 此实施例证明给予将 NTP 结合到含 NTP 的组织中的 NTP 区段或其同源物、变体、模拟物或衍生物可防止和/或抑制活组织的坏死(体内)。

如实施例 1 所述获得 AD7C-NTP。

按上述实施例 2 制备的 Harlil 序列 NTP-1、NTP-3 和 NTP-7 用于本实施例。

- 30 将 100ng/mL-10 μg/mL 重组 AD7C-NTP 样品室温与上述 Harlil 序列培育 5 分钟到 1 小时，然后如实施 1 所述注射入大鼠。

或者，Harlil 序列溶液的浓度为 1 微克/mL-1 毫克/mL。按上述方法制备含有

重组 AD7C-NTP 的溶液，无需加入 Harlil 序列。对动物注射约 100 微升 AD7C-NTP 溶液，然后注射约 100 微升 Harlil 溶液。

观察动物 24 小时且在 24 小时时无痛处死动物。切取 24 个浸渍病灶、以 10% 福尔马林固定、石蜡包埋、染色和用标准组织病理学方法检查。

- 5 类似的对照组大鼠注射 (1) 如实施 1 所述单用 AD7C-NTP、(2) 盐水配的牛血清白蛋白、(3) 正常人血清、(4) 生理盐水，并如上所述检查和处死，切取注射处理的病灶。

- 单独注射 AD7C-NTP 的对照产生了组织坏死，如实施 1 所述。注射牛血清白蛋白 (BSA)、正常人血清和生理盐水的对照都没有显示坏死或细胞损失的迹象。上述
10 对照注射部位具有针头引起的温和至最小的急性炎症和病灶性微出血。

- 与单独注射 AD7C-NTP 的对照样品相比，和 Harlil 序列 NTP-1、NTP-3 和 NTP-7 一起注射的 AD7C-NTP 样品显示组织坏死减少超过 95%。偶然有炎性细胞病灶形成的病灶结节，炎性细胞病灶有微小结节形成，这似乎可能是 AD7C-NTP 和 Harlil 序列的凝聚。与仅注射 AD7C-NTP 的对照相比，给予 NTP 区段(或 Harlil 序列)的
15 总组织损伤减少 95%以上。

虽然本发明通过特别优选的实施方式和实施例作了详细描述，然而本领域技术人员将会明白可对本发明作出各种修改而不背离本发明的精神和范围。

1	cccccccccttgag	ATG GAG TTT TCG CTC TTG TTG CCC AGG CTG GAG TGC AAT GGC GCA ATC	62
1		M E F S L L L P R L E C N G A I	16
63	TCA GCT CAC CGC AAC CTC CGC CTC CCG GGT TCA AGC GAT TCT CCT GCC TCA GCC TCC CCA	122	
17	S A H R N L R L P G S S D S P A S A S P	36	
123	GTA GCT GGG ATT ACA GGC ATG TGC ACC CAC GCT CGG CTA ATT TTG TAT TTT TTT TTA GTA	182	
37	V A G I T G M C T H A R L I L Y F F L V	56	
183	GAG ATG GAG TTT CTC CAT GTT GGT CAG GCT GGT CTC GAA CTC CCG ACC TCA GAT GAT CCC	242	
57	E M E F L H V G Q A G L E L P T S D D P	76	
243	TCC GTC TCG GCC TCC CAA AGT GCT AGA TAC AGG ACT GGC CAC CAT GCC CGG CTC TGC CTG	302	
77	S V S A S Q S A R Y R T G H H A R L C L	96	
303	GCT AAT TTT TGT GGT AGA AAC AGG GTT TCA CTG ATG TGC CCA AGC TGG TCT CCT GAG CTC	362	
97	A N F C G R N R V S L M C P S W S P E L	116	
363	AAG CAG TCC ACC TGC CTC AGC CTC CCA AAG TGC TGG GAT TAC AGG CGT GCA GCC GTG CCT	422	
117	K Q S T C L S L P K C W D Y R R A A V P	136	
423	GGC CTT TTT ATT TTA TTT TTT TTA AGA CAC AGG TGT CCC ACT CTT ACC CAG GAT GAA GTG	482	
137	G L F I L F F L R H R C P T L T Q D E V	156	
483	CAG TGG TGT GAT CAC AGC TCA CTG CAG CCT TCA ACT CCT GAG ATC AAG CAT CCT CCT GCC	542	
157	Q W C D H S S L Q P S T P E I K H P P A	176	
543	TCA GCC TCC CAA GTA GCT GGG ACC AAA GAC ATG CAC CAC TAC ACC TGG CTA ATT TTT ATT	602	
177	S A S Q V A G T K D M H H Y T W L I F I	196	
603	TTT ATT TTT AAT TTT TTG AGA CAG AGT CTC AAC TCT GTC ACC CAG GCT GGA GTG CAG TGG	662	
197	F I F N F L R Q S L N S V T Q A G V Q W	216	
663	CGC AAT CTT GGC TCA CTG CAA CCT CTG CCT CCC GGG TTC AAG TTA TTC TCC TGC CCC AGC	722	
217	R N L G S L Q P L P P G F K L F S C P S	236	
723	CTC CTG AGT AGC TGG GAC TAC AGG CGC CCA CCA CGC CTA GCT AAT TTT TTT GTA TTT TTA	782	
237	L L S S W D Y R R P P R L A N F F V F L	256	
783	GTA GAG ATG GGG TTC ACC ATG TTC GCC AGG TTG ATC TTG ATC TCT GGA CCT TGT GAT CTG	842	
257	V E M G F T M F A R L I L I S G P C D L	276	
843	CCT GCC TCG GCC TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA GGC GTG AGC CAC CAC GCC CGG CTT ATT	902	
277	P A S A S Q S A G I T G V S H H A R L I	296	
903	TTT AAT TTT TGT TTG TTT GAA ATG GAA TCT CAC TCT GTT ACC CAG GCT GGA GTG CAA TGG	962	
297	F N F C L F E M E S H S V T Q A G V Q W	316	
963	CCA AAT CTC GGC TCA CTG CAA CCT CTG CCT CCC GGG CTC AAG CGA TTC TCC TGT CTC AGC	1022	
317	P N L G S L Q P L P P G L K R F S C L S	336	
1023	CTC CCA AGC AGC TGG GAT TAC GGG CAC CTG CCA CCA CAC CCC GCT AAT TTT TGT ATT TTC	1082	
337	L P S S W D Y G H L P P H P A N F C I F	356	
1083	ATT AGA GGC GGG GTT TCA CCA TAT TTG TCA GGC TGG TCT CAA ACT CCT GAC CTC AGG tgac	1143	
357	I R G G V S P Y L S G W S Q T P D L R	375	
1144	ccacctgcctcagccttccaaagtctgggatcacaggcgtgagccacctcaccagccggctaatttagatataaaaaat	1223	
1224	atgtagcaatgggggctcttgctatgttcccaggctggtctcaaacctcttgcttcatgcaatccttccaaatgagcca	1303	
1304	caacaccagccagtcacatTTTTTaaacagttacatcttttatttttagtataactagaaagtaatacaataaacatgtcaa	1383	
1384	acctgcaaatcagtagtaacagagttcttttataacttttaaacaaagctttagagca	1442	

图

1

NTP[122]

1 Met-Met-Val-Cys-Trp-Asn-Arg-Phe-Gly-Lys-
M M V C W N R F G K

11 Trp-Val-Tyr-Phe-Ile-Ser-Ala-Ile-Phe-Asn-
W V Y F I S A I F N

21 Phe-Gly-Pro-Arg-Tyr-Leu-Tyr-His-Gly-Val-
F G P R Y L Y H G V

31 Pro-Phe-Tyr-Phe-Leu-Ile-Leu-Val-Arg-Ile-
P F Y F L I L V R I

41 Ile-Ser-Phe-Leu-Ile-Gly-Asp-Met-Glu-Asp-
I S F L I G D M E D

51 Val-Leu-Leu-Asn-Cys-Thr-Leu-Leu-Lys-Arg-
V L L N C T L L K R

61 Ser-Ser-Arg-Phe-Arg-Phe-Trp-Gly-Ala-Leu-
S S R F R F W G A L

71 Val-Cys-Ser-Met-Asp-Ser-Cys-Arg-Phe-Ser
V C S M D S C R F S

81 Arg-Val-Ala-Val-Thr-Tyr-Arg-Phe-Ile-Thr-
R V A V T Y R F I T

91 Leu-Leu-Asn-Ile-Pro-Ser-Pro-Ala-Val-Trp-
L L N I P S P A V W

101 Met-Ala-Arg-Asn-Thr-Ile-Asp-Gln-Gln-Val-
M A R N T I D Q Q V

111 Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-
L S R I K L E I K R

121 Cys-Leu
C L

图 2

NTP[112]

1 Met-Ala-Gln-Ser-Arg-Leu-Thr-Ala-Thr-Ser-
M A Q S R L T A T S

11 Ala-Ser-Arg-Val-Gln-Ala-Ile-Leu-Leu-Ser-
A S R V Q A I L L S

21 Gln-Pro-Pro-Lys-Gln-Leu-Gly-Leu-Arg-Ala-
Q P P K Q L G L R A

31 Pro-Ala-Asn-Thr-Pro-Leu-Ile-Phe-Val-Phe-
P A N T P L I F V F

41 Ser-Leu-Glu-Ala-Gly-Phe-His-His-Ile-Cys-
S L E A G F H H I C

51 Gln-Ala-Gly-Leu-Lys-Leu-Leu-Thr-Ser-Gly-
Q A G L K L L T S G

61 Asp-Pro-Pro-Ala-Ser-Ala-Phe-Gln-Ser-Ala-
D P P A S A F Q S A

71 Gly-Ile-Thr-Gly-Val-Ser-His-Leu-Thr-Gln-
G I T G V S H L T Q

81 Pro-Ala-Asn-Leu-Asp-Lys-Lys-Ile-Cys-Ser-
P A N L D K K I C S

91 Asn-Gly-Gly-Ser-Cys-Tyr-Val-Ala-Gln-Ala-
N G G S C Y V A Q A

101 Gly-Leu-Lys-Leu-Leu-Ala-Ser-Cys-Asn-Pro-
G L K L L A S C N P

111 Ser-Lys
S K

图 3

NTP[106]

1 Met-Trp-Thr-Leu-Lys-Ser-Ser-Leu-Val-Leu-
M W T L K S S L V L

11 Leu-Leu-Cys-Leu-Thr-Cys-Ser-Tyr-Ala-Phe-
L L C L T C S Y A F

21 Met-Phe-Ser-Ser-Leu-Arg-Gln-Lys-Thr-Ser-
M F S S L R Q K T S

31 Glu-Pro-Gln-Gly-Lys-Val-Pro-Cys-Gly-Glu-
E P Q G K V P C G E

41 His-Phe-Arg-Ile-Arg-Gln-Asn-Leu-Pro-Glu-
H F R I R Q N L P E

51 His-Thr-Gln-Gly-Trp-Leu-Gly-Ser-Lys-Trp-
H T Q G W L G S K W

61 Leu-Trp-Leu-Leu-Phe-Ala-Val-Val-Pro-Phe-
L W L L F A V V P F

71 Val-Ile-Leu-Lys-Cys-Gln-Arg-Asp-Ser-Glu-
V I L K C Q R D S E

81 Lys-Asn-Lys-Val-Arg-Met-Ala-Pro-Phe-Phe-
K N K V R M A P F F

91 Leu-His-His-Ile-Asp-Ser-Ile-Ser-Gly-Val-
L H H I D S I S G V

101 Ser-Gly-Lys-Arg-Met-Phe
S G K R M F

图 4

NTP [106]

1 Met-Phe-Phe-Val-Leu-Tyr-Arg-Phe-Cys-Phe-
 M F F V L Y R F C F

11 Cys-Phe-Phe-Glu-Thr-Glu-Ser-His-Ser-Leu-
 C F F E T E S H S L

21 Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-Cys-Glu-Leu-
 T Q A G V Q W C E L

31 Gly-Ser-Pro-Gln-Pro-Leu-Pro-Ser-Gly-Phe-
 G S P Q P L P S G F

41 Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Leu-Ser-
 K R F S C L S L L S

51 Ser-Trp-Asp-Tyr-Ser-His-Glu-Pro-Pro-His-
 S W D Y S H E P P H

61 Pro-Val-Ile-Cys-Ser-Phe-Leu-Met-Glu-Lys-
 P V I C S F L M E K

71 Cys-Leu-Ile-Leu-Tyr-Lys-Pro-Asn-Gly-Asp-
 C L I L Y K P N G D

81 Thr-Ile-Gly-Pro-Ile-Leu-Val-Gln-Gln-Gly-
 T I G P I L V Q Q G

91 Lys-Arg-Gln-Lys-Leu-Tyr-Ile-Ser-Ala-Asp-
 K R Q K L Y I S A D

100 Leu-Val-His-Leu-Ile-Ala
 L V H L I A

图 5

NTP[98]

1 Glu-Ala-Tyr-Tyr-Thr-Met-Leu-His-Leu-Pro-
E A Y Y T M L H L P

11 Thr-Thr-Asn-Arg-Pro-Lys-Ile-Ala-His-Cys
T T N R P K I A H C

21 Ile-Leu-Phe-Asn-Gln-Pro-His-Ser-Pro-Arg-
I L F N Q P H S P R

31 Ser-Asn-Ser-His-Ser-His-Pro-Asn-Pro-Leu-
S N S H S H P N P L

41 Lys-Leu-His-Arg-Arg-Ser-His-Ser-His-Asn-
K L H R R S H S H N

51 Arg-Pro-Arg-Ala-Tyr-Ile-Leu-Ile-Thr-Ile-
R P R A Y I L I T I

61 Leu-Pro-Ser-Lys-Leu-Lys-Leu-Arg-Thr-His-
L P S K L K L R T H

71 Ser-Gln-Ser-His-His-Asn-Pro-Leu-Ser-Arg-
S Q S H H N P L S R

81 Thr-Ser-Asn-Ser-Thr-Pro-Thr-Asn-Ser-Phe-
T S N S T P T N S F

91 Leu-Met-Thr-Ser-Ser-Lys-Pro-Arg
L M T S S K P R



图 6

NTP[75]

1 Ser-Ser-Ser-Leu-Gly-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-
S S S L G L P K C W

11 Asp-Tyr-Arg-His-Glu-Leu-Leu-Ser-Leu-Ala-
D Y R H E L L S L A

21 Leu-Met-Ile-Asn-Phe-Arg-Val-Met-Ala-Cys
L M I N F R V M A C

31 Thr-Phe-Lys-Gln-His-Ile-Glu-Leu-Arg-Gln-
T F K Q H I E L R Q

41 Lys-Ile-Ser-Ile-Val-Pro-Arg-Lys-Leu-Cys-
K I S I V P R K L C

51 Cys-Met-Gly-Pro-Val-Cys-Pro-Val-Lys-Ile-
C M G P V C P V K I

61 Ala-Leu-Leu-Thr-Ile-Asn-Gly-His-Cys-Thr-
A L L T I N G H C T

71 Trp-Leu-Pro-Ala-Ser
W L P A S

图 7

NTP[68]

1 Met-Phe-Val-Phe-Cys-Leu-Ile-Leu-Asn-Arg-
M F V F C L I L N R

11 Glu-Lys-Ile-Lys-Gly-Gly-Asn-Ser-Ser-Phe-
E K I K G G N S S F

21 Phe-Leu-Leu-Ser-Phe-Phe-Phe-Ser-Phe-Gln-
F L L S F F F S F Q

31 Asn-Cys-Cys-Gln-Cys-Phe-Gln-Cys-Arg-Thr-
N C C Q C F Q C R T

41 Thr-Glu-Gly-Tyr-Ala-Val-Glu-Cys-Phe-Tyr-
T E G Y A V E C F Y

51 Cys-Leu-Val-Asp-Lys-Ala-Ala-Phe-Glu-Cys-
C L V D K A A F E C

61 Trp-Trp-Phe-Tyr-Ser-Phe-Asp-Thr
W W F Y S F D T



8

NTP[61]

1 Met-Glu-Pro-His-Thr-Val-Ala-Gln-Ala-Gly-
M E P H T V A Q A G

11 Val-Pro-Gln-His-Asp-Leu-Gly-Ser-Leu-Gln-
V P Q H D L G S L Q

21 Ser-Leu-Leu-Pro-Arg-Phe-Lys-Arg-Phe-Ser-
S L L P R F K R F S

31 Cys-Leu-Ile-Leu-Pro-Lys-Ile-Trp-Asp-Tyr-
C L I L P K I W D Y

41 Arg-Asn-Met-Asn-Thr-Ala-Leu-Ile-Lys-Arg-
R N M N T A L I K R

51 Asn-Arg-Tyr-Thr-Pro-Glu-Thr-Gly-Arg-Lys-
N R Y T P E T G R K

61 Ser
S

图 9