

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 17/00

G01N 33/567

G01N 33/53



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03812446.7

[43] 公开日 2005 年 8 月 17 日

[11] 公开号 CN 1656123A

[22] 申请日 2003.5.30 [21] 申请号 03812446.7

[30] 优先权

[32] 2002.5.31 [33] US [31] 60/384,077

[86] 国际申请 PCT/US2003/016780 2003.5.30

[87] 国际公布 WO2003/102031 英 2003.12.11

[85] 进入国家阶段日期 2004.11.29

[71] 申请人 尤尼特尔药品公司

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 R·F·巴林特 J·P·库克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 谭明胜

权利要求书 2 页 说明书 25 页 附图 3 页

[54] 发明名称 用于评估心血管疾病危险性的蛋白
和方法

[57] 摘要

本发明涉及包含至少突变二甲基精氨酸二甲氨基水解酶(DDAH)的片段的突变蛋白,其中所述片段具有对不对称 N,N-二甲基精氨酸(ADMA)和/或血浆水平比 ADMA 低的 L,N-单甲基精氨酸(LNMMA)的亲合性,且不足以将 ADMA 或 LNMMA 水解为瓜氨酸、释放瓜氨酸或二者并存。

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

1. 包含至少突变二甲基精氨酸二甲氨基水解酶 (DDAH) 的片段的分离的或纯化的突变蛋白, 其中所述片段具有对不对称 N,N-二甲基精氨酸 (ADMA) 的亲合性, 且其中所述突变蛋白不足以将 ADMA 水解为瓜氨酸和/或释放所述瓜氨酸, 或二者并存。
5
2. 权利要求 1 的突变蛋白, 其中所述突变 DDAH 酶具有对不对称 L,N-单甲基精氨酸 (LNMMA) 的亲合性, 其中所述突变蛋白不足以或者将 LNMMA 水解为瓜氨酸或者释放所述瓜氨酸, 或二者并存。
3. 权利要求 1 的突变蛋白, 其中所述片段具有高于野生型 DDAH
10 的对 ADMA 的亲合性。
4. 权利要求 1 的突变蛋白, 其中所述突变 DDAH 来源于动物细胞的野生型 DDAH。
5. 权利要求 4 的突变蛋白, 其中所述动物细胞是哺乳动物的。
6. 权利要求 5 的突变蛋白, 其中所述哺乳动物细胞是人的。
7. 权利要求 1 的突变蛋白, 其中所述对 ADMA 的亲合性具有至少
15 约为 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 的 K_A , 或不高于 10^{-7} M 的 K_D 。
8. 权利要求 1 的突变蛋白, 其还包含可检测的标记物。
9. 权利要求 8 的突变蛋白, 其中所述可检测的标记物是光吸收剂、荧光剂、化学发光剂、酶、或放射性同位素。
10. 测定生物样品中 ADMA 水平的方法, 所述方法包括将所述生物
20 样品与突变蛋白接触和测定与所述突变蛋白结合的 ADMA 的量, 其中所述突变蛋白是包含至少突变二甲基精氨酸二甲氨基水解酶 (DDAH) 的片段的分离的或纯化的突变蛋白, 其中所述片段具有对不对称 N,N-二甲基精氨酸 (ADMA) 的亲合性, 其中所述突变蛋白不足以将 ADMA 水解
25 为瓜氨酸和/或释放所述瓜氨酸, 或二者并存。
11. 权利要求 10 的方法, 其中将所述生物样品中的所述 ADMA 用可检测的标记物进行标记。
12. 权利要求 11 的方法, 其中所述可检测的标记物是光吸收剂、
荧光剂、化学发光剂、酶、或放射性同位素。
13. 权利要求 11 的方法, 其中对与所述突变蛋白结合的 ADMA 的
30 量的所述测定包括荧光免疫测定。
14. 权利要求 11 的方法, 其中对与所述突变蛋白结合的 ADMA 的

量的所述测定包括酶免疫测定。

15. 权利要求 10 的方法，其中将所述突变蛋白用可检测的标记物进行标记。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述可检测的标记物是光吸收剂、
5 荧光剂、化学发光剂、酶、或放射性同位素。

17. 权利要求 15 的方法，其中对与所述突变蛋白结合的 ADMA 的量的所述测定包括荧光免疫测定。

18. 权利要求 15 的方法，其中对与所述突变蛋白结合的 ADMA 的量的所述测定包括酶免疫测定。

10 19. 测定生物样品中 ADMA 水平的方法，所述方法包括将所述生物样品与权利要求 7 的突变蛋白接触和测定与所述突变蛋白结合的 ADMA 的量。

20. 权利要求 19 的方法，其中将所述突变蛋白与选自荧光剂和酶的可检测的标记物结合。

15 21. 权利要求 20 的方法，其中将与所述突变蛋白结合的分子结合到固体表面且对与所述突变蛋白结合的 ADMA 的量的所述测定包括检测与所述表面结合的所述标记物的量。

22. 权利要求 10 的方法，其中所述突变 DDAH 酶具有对不对称 L, N-单甲基精氨酸 (LNMA) 的亲合性，其中所述突变蛋白不足以或者将所述 LNMA 水解为瓜氨酸或者释放所述瓜氨酸，或二者并存。
20

23. 检测生物样品中 ADMA 的量的试剂盒，其包括突变蛋白和至少一种试剂，其中所述突变蛋白是包含至少突变二甲基精氨酸二甲氨基水解酶 (DDAH) 的片段的分离的或纯化的突变蛋白，其中所述片段具有对不对称 N, N-二甲基精氨酸 (ADMA) 的亲合性，其中所述突变蛋白
25 不足以将 ADMA 水解为瓜氨酸和/或释放所述瓜氨酸，或二者并存。

24. 权利要求 23 的试剂盒，其还包含抗- (突变蛋白) 抗体。

25. 权利要求 23 的试剂盒，其还包含可检测的标记物。

26. 权利要求 25 的试剂盒，其中所述标记物选自荧光剂和酶。

用于评估心血管疾病危险性的蛋白和方法

政府权利声明

5 开发本发明期间实施的部分工作使用了美国政府经费。美国政府具有此处所描述的本发明的一些权利。

相关专利申请的交叉引用

10 本申请要求提交于 2003 年 5 月 31 日的美国临时申请号. 60/384, 077 的优先权。

发明背景

发明领域

15 本发明涉及包含至少突变二甲基精氨酸二甲氨基水解酶 (dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH)) 的片段的突变蛋白, 其中所述片段具有对不对称 N,N-二甲基精氨酸 (ADMA) 的亲合性且不足以将 ADMA 水解为瓜氨酸和/或释放游离瓜氨酸。所述测定法还可用于检测血浆水平低于 ADMA 的 L,N-单甲基精氨酸 (LNMA)。

20 发明背景

动脉粥样硬化是本国内主要的致病原因而每年由于冠状动脉疾病和脑血管疾病发作导致 500,000 人死亡。因为一氧化氮 (NO) 具有对促进动脉粥样硬化的多个关键过程 (单核细胞粘附、血小板聚集、血管平滑肌增殖) 的抑制作用, 血管 NO 生成的慢性增强证实可用于抑制或防止动脉粥样化形成。

25 高胆固醇血症, 高血压, 糖尿病, 烟草, 脂蛋白 (a) (“Lp(a)”) 和高半胱氨酸水平的增高能加速动脉粥样硬化。所有这些疾病在人类中的特征均为在出现任何动脉粥样硬化临床表现之前的内皮舒张功能障碍 (Cooke 和 Dzau, 1997)。在所有这些疾病中, 异常状况大部分归因于一氧化氮合成 (NOS) 途径的扰动。在大多数这些疾病中, 心血管异常可通过给予 L-精氨酸 (NO 前体, 其经 NOS 代谢而生成瓜氨酸和 NO) 而得以逆转或改善 (Cooke 和 Dzau, 1997)。

ADMA (不对称二甲基精氨酸) 和 LNMMA 是 L-精氨酸对 NOS 的内源竞争性拮抗物。LNMMA 和 ADMA 作为 NOS 抑制剂效果相当, 但 LNMMA 的血浆水平低于 ADMA。因此, 大多数研究都针对 ADMA 的检测。ADMA 水平的提高还可见于高胆固醇血症和动脉粥样硬化患者中 (Bode-Böger 等, 1996; Yu 和 Xiong, 1994); 且在尿毒症大鼠和肾衰竭患者中血浆 ADMA 水平比正常值提高了 5~10 倍 (Valiance 等, 1992a, b)。

事实上本领域中还已知与加速的动脉粥样硬化相关的所有危险因子能够减少与 ADMA 的增高相关的内皮源性 NO 的合成和/或活性。ADMA 或许是内皮血管扩张功能障碍的重要决定子, 且有可能是检测动脉粥样硬化的重要的新的危险因子。近年来, 已有报道显示 ADMA 是心血管性死亡的独立预报因子。

虽然其它方法也是可用的, 但目前用于检测如血液, 血浆和尿的生理液中 ADMA 的方法包括提取、化学衍生、采用反相 HPLC 的分离, IC-质谱分析法和荧光 (Chen 等, 1997)。但是, 生物样品中 ADMA 或 LNMMA 的测定很烦琐的, 这是由于存在两种接近的相关化合物, 所述化合物在检测中表现出相似的行为和/或交叉反应性, 所述化合物称为精氨酸和对称二甲基精氨酸 (SDMA)。ADMA 与精氨酸的不同仅在于一个胍基氮上的两个甲基 (参见图 1)。此外, 在正常人血清中, 精氨酸的浓度大约是 ADMA 浓度的 100 倍。SDMA 比精氨酸更近似于 ADMA, 不同之处仅在于一个甲基的位置。在正常人血清中, SDMA 的浓度与 ADMA 的浓度相当, 其大约为 $1\mu\text{M}$ 。

因此, 需要发展一种能够不受与 ADMA 或 LNMMA 竞争的交叉反应物质干扰的准确检测生物样品中 ADMA 和 LNMMA 的测定法。循环 NO 合酶抑制剂的准确测定将成为在动脉粥样硬化和其它心血管疾病的早期检测和治理中的有价值的工具。

发明概述

本发明涉及包含至少突变二甲基精氨酸二甲氨基水解酶 (DDAH) 的片段的突变蛋白, 其中所述片段具有对不对称 N,N-二甲基精氨酸 (ADMA) 的亲性和不足以将 ADMA 水解为瓜氨酸和/或释放游离瓜氨酸。在某些实施方案中, 本发明关于其对 LNMMA 的亲性和代谢具有相同的特性。本发明还涉及在生物样品中检测 ADMA 和 LNMMA 的方法及

用于该用途的试剂盒。

附图简介

5 图 1 显示了精氨酸，不对称二甲基精氨酸（ADMA）和对称二甲基精氨酸（SDMA）的分子结构。

图 2 显示了人类志愿者中血浆 ADMA 水平和血管功能（尤其是内皮依赖性血管舒张）间的关系。显示出血浆 ADMA 水平和颞动脉的血流介导的血管扩张间的反相关。迟发反应依赖于内皮源性一氧化氮合酶的激活。

10 图 3 显示了人血浆中 ADMA 和 LNMA 的 HPLC 检测的原始图。已将高精氨酸加入血浆中以便标准化。首先用精氨酸酶处理样品而除去精氨酸。正常情况下精氨酸峰非常接近于高精氨酸峰，精氨酸峰通常拖尾至 LNMA（在该图中标记为 MMA），ADMA 和 SDMA 的峰。注意到在该患者中，ADMA 水平提高，因为正常情况下，ADMA 和 SDMA 峰值相似。
15 在该图中 SDMA 很好地与 ADMA 分开，但我们的大多数 HPLC 记录由于 SDMA 峰拖尾至 ADMA 峰而并没有这么明显。

优选实施方案详述

20 本发明提供了包含至少突变二甲基精氨酸二甲氨基水解酶（DDAH）的片段的突变蛋白，其中所述片段具有对不对称 N,N-二甲基精氨酸（ADMA）的亲合性且不足以将 ADMA 水解为瓜氨酸和/或释放游离瓜氨酸。

DDAH 酶是一种含锌（II）的酶，该酶能结合并将 ADMA 和/或 N-单甲基精氨酸（NMMA）水解为 L-瓜氨酸，由此灭活 ADMA 和 NMMA 对
25 一氧化氮合酶的抑制特性。此外，野生型 DDAH 酶与很多酶一样还包含 Cys-His-Glu 催化三联体。近年来，DDAH 的特征描述揭示了其是具有功能上独立的催化位点的二聚体（Murray-Rust J, 等. Nat Struct Biol. 8 (8): 679- 83 (2001)）。

如此处所使用的，术语蛋白是指成熟，全长蛋白、未加工的蛋白
30 （例如，包含信号序列）或其任何片段或部分。

如此处所使用的，蛋白的片段是指来自全长蛋白的任何部分或片段的至少 10 个连续氨基酸。

在一个实施方案中，所述片段为至少 20 个连续氨基酸。在其它实施方案中，所述片段为至少 25、30、40 或 50 个连续的氨基酸。如本说明书所述，所述片段可以是完整全长，成熟蛋白减去一个氨基酸。所述片段还可以是另一蛋白的部分。其可与例如氨基酸、核酸、多核苷酸、糖类、脂质、糖蛋白、蛋白聚糖、聚合物或化学物的另一蛋白或分子融合或结合。所述片段可以是融合蛋白的部分或可被移入另一蛋白中。此外，可在所述片段的任一末端添加任何数量的氨基酸。

如此处所使用的，术语突变蛋白是指不具有野生型蛋白的全部特性或功能高于或低于野生型蛋白的蛋白。例如，与野生型相比，所述突变体具有特定功能上的缺陷，或与野生型相比，所述突变体具有实现相同功能的增加的或提高的功能或能力。野生型 DDAH 蛋白或片段中任何数量氨基酸的突变事件（例如，缺失、添加、改变或取代等）的产物并不一定被定性为 DDAH 的突变（如此处所使用的），除非该突变事件与 DDAH 或片段特性或功能的改变相关，如本文所述。所述突变蛋白或片段可以是多于一个特性或功能的突变体。突变体还可以是指，与野生型相比，具有额外或不同特性的蛋白。此外，所述突变体无须是全长蛋白，而还可以是，例如，不具有相应野生型片段的所有特性或表现出与相应野生型片段相同功能的片段。例如，与能水解 ADMA 的 DDAH 的相应野生型片段（催化部分或位点）相比，本发明的突变 DDAH 片段不足以将 ADMA 水解为瓜氨酸。

如此处所使用的，“突变 DDAH”可指全长突变 DDAH 蛋白或突变 DDAH 蛋白的片段。

所述突变 DDAH 酶在负责结合和代谢 ADMA 或 LNMMA 的结构域上的氨基酸序列具有与野生型酶的序列至少 80% 的同一性。在某些实施方案中，所述突变 DDAH 酶具有与野生型酶至少 85% 的序列同一性。在某些实施方案中，所述突变 DDAH 酶具有与野生型酶至少 90% 的序列同一性。在某些实施方案中，所述突变 DDAH 酶具有与野生型酶至少 95% 的序列同一性。在某些实施方案中，所述突变 DDAH 酶具有与野生型酶至少 96% 的序列同一性。在某些实施方案中，所述突变 DDAH 酶具有与野生型酶至少 97% 的序列同一性。在某些实施方案中，所述突变 DDAH 酶具有与野生型酶至少 98% 的序列同一性。在某些实施方案中，所述突变 DDAH 酶具有与野生型酶至少 99% 的序列同一性。在某些实施方案中，

所述突变 DDAH 酶具有与野生型酶 100% 的序列同一性。

序列同一性可用任何方法测定。两个氨基酸序列间的差异可存在于对照氨基酸序列的 C 或 N 末端位置或那些末端位置间的任何位置，或者独立分散于对照序列中的氨基酸间或者分散在对照序列中的一个或多个连续基团中。

事实上，任何特定氨基酸分子是否具有与参照氨基酸序列的至少给定的百分比同一性涉及采用标准算法通过手算或机器作出的两个分子间的比较。算法是本领域众所周知的且可按常规采用公众可获得的计算机程序例如 BLAST 算法族进行确定。(Altschul 等, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, 1997)。

多肽序列的相似性可采用 BLASTP 算法进行检测。BLASTP 程序可获自 NCBI 匿名 FTP 服务器 (<ftp://ncbi.nlm.nih.gov>) 的 /blast/executables 下，以及获自国家医学图书馆国家生物技术信息中心 (NCBI)，38A 楼，8N805 室，Bethesda, MD 20894，美国。BLASTP 算法可用于确定根据本发明的多肽序列同一性。BLAST 算法族 (包括 BLASTP) 描述于 NCBI 的国际互网站中，其 URL 为 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/newblast.html> 以及计算机算法 FASTA 的公开中，其可获自国际互联网的 ftp 站点 <ftp://ftp.virginia.edu/pub/fasta/>，以及可通过 David Hudson (Assistance Provost for Research, University of Virginia, PO Box 9025, Charlottesville, VA.) 而从弗吉尼亚大学获得，Version 2.0u4 [1996 年 2 月] (Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444-2448, 1988 ; and Pearson, *Methods in Enzymol.* 183: 63-98, 1990.)。

除了与本发明的多核苷酸或多肽序列具有特定百分比的同一性外，变体多核苷酸和多肽优选具有与本发明的多核苷酸或多肽相同的附加结构和/或功能特性。与本发明的多肽具有特定同一性的多肽在其一级结构上具有高度相似性且基本具有相似的功能特性。除了其一级结构与本发明的多核苷酸具有高度相似性以外，与本发明的多核苷酸具有特定同一性的或能与本发明的多核苷酸杂交的多核苷酸优选具有至少一种下述特性：(i) 它们由基因编码，所述基因包含当翻译时能提供基本上与本发明的多核苷酸相同的功能特性的多肽的开放读码框

或部分开放读码框；或(ii)它们具有相同的结构域。

如此处所使用的，DDAH 水解 ADMA 能力的不足可以是部分的或全部的。在一个实施方案中，所述突变 DDAH 完全不能水解 ADMA，因此其不能将 ADMA 水解为任何能检测到的程度。所述不足可通过在适宜酶致水解的条件下，无论在体内、体外或原位将样品暴露于 DDAH，或其片段后检测样品中瓜氨酸的水平或浓度（采用标准比色测定）进行测定。可选地，可将已知量的 ADMA 加入含有突变 DDAH 的溶液中，然后通过 HPLC 或毛细管电泳检测 ADMA 随时间的降低。

一般来说，酶催化反应的能力可通过米氏常数 (K_m) 以本领域众所周知的方法来判断。 K_m 小意味着该酶能在低底物浓度下达到半-最大速度（催化反应的速度），这提示该酶是有效或快速的酶。与具有较低 K_m 的酶相比，具有较高的 K_m 的酶，在催化反应中具有较高的不足性（即，较低的有效性）。例如，如果酶 A (K_m 为 $1 \times 10^{-2} M$) 的 K_m 值高于酶 B (K_m 为 $1 \times 10^{-5} M$)，则在相同条件下（例如，时间，pH 等），催化相同反应时酶 A 的不足性要比酶 B 高 1000 倍。

DDAH 作为 ADMA 敏感子仅具有如下两个局限，对 SDMA 的结合亲和性低，即， K_m 高 ($> 1.00 \mu M$) 和 释放出分析物水解产物。然而，这两个局限可在单工程化步骤中通过两种机制中的至少一种而得以减少。

通过诱变处理 DDAH，在噬菌体表面显示突变体文库，和在存在可溶性精氨酸和 SDMA 的条件下对固定化 ADMA 淘选，可获得具有对 ADMA 高特异亲和性的 DDAH 突变体。由于直接增加对 ADMA 亲和性的突变或抑制了反应产物（瓜氨酸）释放的突变，所述变体应具有更高的亲和性。在消耗过渡态亲和性的情况下通常必须实施增加底物亲和性的突变，所述过渡态亲和性的消耗降低了所需的酶的催化速度。

选择性地，突变可阻断产物解离。因为反应中间产物是经由底物的胍基碳在所述酶的 Cys249 上的共价硫醚加成物，在产物释放前水解该加成物需要水 (Murray-Rust 等, 2001, Nature Structural Biology 8: 679-683)。因此突变可以或者阻断水至活性位点的通路或者空间阻断产物瓜氨酸从活性位点袋向外扩散。在任一方式中，所述分析物将被酶以可用于检测的方式保留，即使后者类型的突变并非抑制水解实质上必须的。

为利于选择具有对游离 ADMA 高亲和性而对精氨酸或 SDMA 低亲和

性（或不存在的）的突变 DDAH 蛋白，修饰标准淘选（强制进化）策略是有益的。例如，可将可溶性精氨酸和 SDMA 加到噬菌体悬液中来抑制具有对这些化合物高亲和性的突变 DDAH 与固定化 ADMA 的结合。

本发明的突变 DDAH 至少具有部分（若非全部）对 ADMA 的亲合性。与野生型 DDAH 相比，本发明的突变 DDAH 还可具有对 ADMA 增高的亲和性。在一个实施方案中，所述突变 DDAH 保留了与野生型 DDAH 相同的对 ADMA 的亲合性。在另一个实施方案中，与野生型 DDAH 相比，所述突变 DDAH 还可具有对 ADMA 增高的亲和性。

一般来说，酶（DDAH）对其底物（ADMA）的亲合性可通过检测所述酶关于所述底物的米氏常数（Michaelis constant (K_m)）进行测定。检测 K_m 的方法是本领域众所周知的。例如， K_m 可通过利-伯二氏方程式（Lineweaver-Burke plots）或 Hofstee-Eadie 方程式进行计算，所述方程式描述于任何普通生物化学教材中，如 Lehninger 或 Abeles, Frey, 和 Jencks。 K_D （平衡解离常数），可通过多种方法检测，所述方法例如为，竞争抗体捕捉 ELISA（Harlow and Lane, Antibodies A Laboratory Manual 1988 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor）。在该方法中，例如，将半抗原化的 ADMA 固定于固体支持物上然后用标记的或加标记物的突变 DDAH 的悬液平衡化。冲洗掉未结合的物质，然后定量测定结合的 DDAH。当用悬液中增加竞争性 ADMA 的量重复该方法时，DDAH 结合将减少与 ADMA 浓度和 K_D 成比例量。当 DDAH 浓度小于或等于 10% K_D 时，背景-校正信号降低 50% 时的游离 ADMA 的浓度等于 K_D 。

与 K_D 值相似，则酶对其底物的亲合性随着 K_m 值降低而增加。 K_m 值越高，酶和其底物彼此间的亲合性就越低。例如，如果酶 A (K_m 为 1×10^{-4} M) 具有高于酶 B (K_m 为 1×10^{-7} M) 的 K_m 值，则对于相同的底物而言酶 B 的亲合性比酶 A 高 1000 倍。在某些实施方案中，所述突变 DDAH 的平衡解离常数 (K_D) 不高于 10^{-7} M。

K_D 是解离速率常数和结合速率常数（分别是 k_d/k_a ）的比率。所述 k_a 不能高于 $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ ，因此在该假设下所述 k_D 最大应为 $10^{-2} - 10^{-3} \text{ 秒}^{-1}$ 。这比野生型酶的可能 k_{CAT} 低 $10^4 - 10^6$ 倍。为达到 k_{CAT} 的这一降低，所述突变可以或者降低这些量的水解速率或者降低这些量的产物离解速率或者二者联合。例如，一个突变可以增加底物亲合性，

即降低 K_M ，而这将降低水解速率与突变对底物 k_A 的作用成反比的系数。即，如果 k_A 未被作用，则水解速率将降低与 K_M 相同的量，但如果 k_A 增加，水解速率将降低按比例减少的量。其它突变可抑制产物离解，而任何能够降低 K_M 的突变能增加这一作用。

5 在一个实施方案中，突变 DDAH，或其片段，和 ADMA 的 K_D 至少约为 $1 \times 10^{-7} M$ 。在另一个实施方案中，所述突变 DDAH 对 SDMA 的亲合性低于野生型 DDAH 对 SDMA 的亲合性。

本发明的突变 DDAH 可源自在动物细胞中的野生型 DDAH。优选地，所述动物细胞是哺乳动物的。更优选地，所述动物细胞是人类的。

10 如此处所使用的，“衍生的”是指用于从野生型 DDAH 氨基酸序列获得或分离和纯化所述突变 DDAH 氨基酸序列的任何技术。“衍生”的实例包括（但不限于）经由编码所述野生型 DDAH 的 DNA 的多聚酶链式反应（PCR）的定向诱变和通过在 DNA 复制发生时使用已知化学诱变剂或放射的随机诱变。“衍生”还可使用如相关蛋白的“强制进化”的标准噬菌体展示技术（噬菌体展示）来改变其结合特性。此外，可将
15 Cadwell 和 Joyce（PCR Primer A Laboratory Manual, Dieffenbach and Dveksler, Eds., 1995, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 583-590）所述的易错聚合酶链式反应用于诱变。Phage Display of Peptides and Proteins A Laboratory Manual,
20 Kay, Winter, and McCafferty, Eds., 1996, Academic Press, San Diego 中描述了噬菌体展示技术。衍生不是必须是试验操作的结果但还可以是天然存在的具有本发明所述特性的 DDAH 的突变体的发现和随后的分离和纯化。

25 分离的和纯化的是指将蛋白或其它分子从其天然环境中提出。只要该蛋白或其它分子经过操作（或其环境作用）而不再存在于其天然环境中即可，纯化无须是 100%。

在一个实施方案中，本发明的突变体蛋白包含可检测的标记物。在另一个实施方案中，所述突变体蛋白和标记物经由一个或多个连接分子或化合物而彼此结合。

30 可检测的标记物的实例（其是本领域所熟知的）包括但不限于，酶、荧光剂、化学发光剂、放射性同位素和能够不透明或透明的微粒，或能与其它标记物结合的微粒。

5 本发明还提供了测定生物样品中 ADMA 水平的方法，所述方法包括将所述生物样品与突变 DDAH 蛋白或其片段接触，然后测定与所述突变蛋白结合的 ADMA 的量。在一个实施方案中，所述生物样品用可检测的标记物标记。在另一个实施方案中，所述突变蛋白用可检测的标记物

10 如此处所使用的，生物样品可指组织、器官或体液的任何样品（完整或部分）。所述方法可在体内、体外或原位环境实施。样本的实例包括，但不限于，全血或其任何成分，尿，唾液，胃液，脑脊液、胆汁、器官或其任何部分、血管，或其部分，肌肉组织、神经组织，和恶性和良性肿瘤组织。此外，样本还包括从生物样品中分离的个体细胞和细胞培养物。细胞和细胞培养物包括原代培养物，以及原代培养物的任何随后的子代。

15 此外，根据样品特性和检测法特性，在本发明的方法之前可对所述生物样品进行处理、保存、浓缩、稀释、操作（例如，调整 pH，加入缓冲液）或改变（例如，沉淀出颗粒）。例如，可将抗本底干扰因子加入全血，或选择性地，可除去红细胞，血液可被枸橼酸化或半抗原化等。然后将未处理或处理的样品与其它适于检测的试剂联合或进行适宜的孵育，然后实施检测。

20 本发明说明书中可使用任何能够准确检测与突变 DDAH 蛋白结合的 ADMA 的相对或绝对水平的测定法。这些测定法可用有效分析物或所述结合蛋白分别取代 ADMA 或 DDAH 的测定法作为模型。这些测定法包括（但不限于）光谱光度测量法、荧光检测法、视觉检测法和放射性检测法，可使用任何种类繁多的试剂，所述试剂可是商业获得或用本领域中所述的方法学制备。

25 可采用多种试剂实施用于免疫测定法的多种步骤。例如，ADMA 模拟物（与 ADMA 竞争结合突变 DDAH 蛋白的化合物）和生物样品中任何 ADMA 间的竞争，随后检测与 ADMA 模拟物结合的突变 DDAH 蛋白的量。这可通过将所述 ADMA 模拟物结合在例如，如管壁或微量滴定板或能从培养基分离的微粒的固体表面上得以实施。

30 还可使用通道化（Channeling）由此将两个结合蛋白置于一起，一个获得不同的信号。例如，荧光能量转移实验过程使用多表位试剂，所述多表位试剂具有至少两个与 ADMA 竞争的表位，和两个不同的突变

DDAH 蛋白，一个带有荧光剂（作为供体），而一个带有荧光剂（作为受体）。当两个不同突变体蛋白与多表位试剂结合时，将发生能量转移，因此通过采用激发光来激发供体，可发射出可检测波长的光。

对由所述突变体蛋白和结合的 ADMA 形成的复合物的抗体是检测样本中 ADMA 的另一途径。然后可采用通常为 ELISA 或反向 ELISA 技术的标准技术检测所述抗体。一类或另一种酶联免疫吸附试验（ELISA）在超过 25 年的时间里已经广泛的应用于体液中分析物的检测和测量（Harlow 和 Lane, 1988）。其根本优势在于单克隆抗体（mAb）对标记分析物的优良亲和性和特异性，以及酶对信号扩增的优良催化能力。近年来，操作步骤少于 ELISA 同时具有改进的动力学和敏感性的均质液相测定法的发展扩展了免疫测定法领域（Kopetzki 等, 1994; Coty 等, 1994; Henderson 等, 1986）。

在常规 ELISA 中，将半抗原化突变 DDAH 固定在微量滴定板孔的表面上（Harlow 和 Lane, 1988）。例如，可通过与固定的半抗原的结合可从溶液中吸附出 ADMA，冲洗后，通过结合第二抗体-酶结合物检测结合的 ADMA，所述结合物与显色底物反应，产生与结合的 ADMA 成比例的信号。

荧光偏振免疫测定（Fluorescence Polarization Immunassay (FPIA)）是用于小分子分析物的另一种均质液相测定法，其具有独特的优势，即通过竞争产生阳性信号。当由平面偏振光激发时，FPIA 检测作为发射光的偏振的结合的突变 DDAH 和游离荧光标记的配体间的差异。处于激发态的小分子配体快速振动，发射出的管接近均质，而，在整个激发态期间较大的结合突变 DDAH 的配体很难滚动因此发射出高度偏振或各向异性的光。分析物可根据其与标记物竞争与突变 DDAH 结合的能力得以检测，因此发射光较低的偏振，其以特定角相对入射光的强度增加。敏感性是突变 DDAH 亲和性和结合的和游离的配体间差异的函数。具有纳摩尔亲和性和游离的和突变 DDAH-结合的分析物间的大尺寸差异，可检测亚-皮摩尔浓度。ADMA 可通过 ADMA 的游离伯氨基与荧光团如异硫氰酸荧光素（FITC）的荧光团的活化衍生物的反应而与如荧光素的多种荧光团结合。游离 ADMA 可作为其浓度依赖性的与荧光素-ADMA 竞争与突变 DDAH 结合并由此降低了偏振性发射的能力的函数而得以检测。

可使用本发明的突变 DDAH 的另外的免疫检测法形式包括,但不限于,放射免疫测定法 (RIA; Lauritzen 等, 1994), 克隆酶供体免疫测定法 (cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA; Coty 等, 1994)), 生物分子交叉分析 (BIA; Fagerstam 等, 1992), 和荧光共振能量转移免疫测定法 (FRET; Youn 等, 1995)。如 ELISA 一样, 用于小、单价分子的大多免疫测定时竞争抑制测定法, 其中样本分析物与标记的配体竞争结合突变 DDAH。在 RIA 中, 所述配体具有放射性。在 CEDIA 中, 所述配体与 β -半乳糖苷酶的 α -片段结合, 因此突变 DDAH 结合抑制酶的活性。因此, 样本分析物对突变 DDAH-配体相互作用的竞争性抑制导致显色酶活性的增加。在 FRET 免疫测定法中, 所述配体用荧光团标记, 所述荧光团能可检测地将其能量转移至结合于突变 DDAH 的荧光团, 所述能量转移仅在两个荧光团非常接近时发生。BIA 不是通过结合的竞争性抑制进行检测, 而是使用称为表面等离子共振的现象直接监测样本分析物和固定化突变 DDAH 间的相互作用, 由此当分析物结合所述突变 DDAH 时在结合抗体的表面的屈光指数发生可检测的改变。

如果适宜, 所述检测法可使用荧光激活细胞分类器以及使用荧光颗粒。该测定法将提供如下事实, 计数的荧光微粒的数量与 ADMA 存在量相关。例如, 通过在 ADMA 结合的微粒和样品中 ADMA 在用突变 DDAH 进行荧光标记上实施竞争性测定法, 用荧光性突变 DDAH 标记的微粒的程度将与样品中的 ADMA 的量成比例。然后可将样品计数的荧光微粒的数量与对照值比较。

下表显示了可用于本发明主题的各种测定法。

免疫测定法类型		基本定量剂	实例
竞争性-分析物对基本定量剂的非线性比例	反向	与竞争剂的复合物中的标记的突变 DDAH	ELISA ¹
		与突变 DDAH 的复合物中的标记的竞争剂	FPIA ²
	正向	未结合的标记的竞争剂与结合的的标记的竞争剂的比率	FRET' ²
		未结合的标记的竞争剂	CEDIA ⁴
非-竞争性-分析物对基本定量剂的线性比例		与分析物的复合物中的标记的突变 DDAH	APEIA ⁵
		未标记的突变 DDAH-分析物复合物	BIA ⁶

1. 竞争剂是固定化抗原且结合的标记物与分析物成反比。
2. 荧光标记物的偏振与分析物成反比。
3. 供体荧光与分析物成正比，可选择的受体荧光与分析物成反比。
- 5 4. 竞争剂是酶-分析物结合物。仅游离竞争子为活性的且与分析物成反比。
5. 分析物受保护的酶免疫测定法；仅分析物-结合的酶-抗体融合物是活性的。获自 Panorama Research, Inc., Mountain View, CA.
6. 双分子干涉分析法。

10

本发明的方法还包括使用能结合所述突变 DDAH 的分子，如抗体。将 DDAH-特异性分子结合在固体表面，如微量滴定板上，而检测生物样品中的 ADMA 的量包括检测与结合在表面的 DDAH 特异性分子结合的标记的突变 DDAH 的量。

15

本发明还提供了检测生物样品中 ADMA 的量的试剂盒，所述试剂盒包括突变 DDAH 和至少一种试剂。所述试剂盒种可包括任何适用于检测生物样品中 ADMA 量的试剂。

20

如此处所使用的，试剂还可包括适用于实施检测的器械（例如，注射器），辅助材料（例如，微量滴定板）或装置。试剂的实例包括（但不限于）抗体、拮抗剂（竞争性和非-竞争性）、激动剂、缀合物、比色分子或溶液、酶、二级信使、放射性同位素、溶液、注射器、微

量滴定板和冻干化合物。在其它实施方案中，所述试剂盒包括抗-（突变体蛋白）抗体，和可检测的标记物。

应用于本发明的方法和试剂盒的抗体可以是来自如下任何适宜来源的抗血清，例如牛、山羊、羊、犬、马、啮齿类等，其中可通过选择出能与突变 DDAH 或由突变 DDAH 和 ADMA 形成的复合物有力结合的抗体来纯化抗血清。可通过在 α -氨基或羧基结合突变 DDAH 制备用于制备抗体的免疫原，尤其在后者的情况下要使用结合抗原的交联剂。可根据包括重组方法的已知方法制备单克隆抗体，代替抗血清。特别地，使用小鼠，可用 DDAH 结合物，分离的和永生化的脾细胞免疫小鼠，然后筛选针对突变 DDAH 的亲合性，以及可能的额外特性。可扩增和生长兴趣克隆或分离和操作编码抗-DDAH 重和轻链的基因用于在适宜的宿主细胞或宿主中进行表达。事实上，如下所述，可突变所述基因以便进一步增强结合亲和性。

15 实施例

1. 分离具有对 ADMA 高度、特异亲和性的 DDAH 突变体

可以采用克隆自内皮细胞（DDAH 2 同工型）或神经细胞（DDAH 1 同工型）的 DDAH 的噬菌体显示文库（bacteriophage display library）作为突变 DDAH 蛋白或片段的来源。使用包含编码人类 DDAH 的 5' 和 3' 序列的兼并引物通过逆转录和多聚酶链式反应（RT-PCR）从分离自这些培养细胞的 RNA 扩增人类 DDAH 酶。然后将该 DDAH-编码序列连接至噬菌粒载体中以便在 *E. coli* 周质中表达融合至噬菌体次要衣壳蛋白（gIIIp）的氨基端的 DDAH。然后通过 Cadwell 和 Joyce（PCR Primer A Laboratory Manual, Dieffenbach and Dveksler, Eds., 1995, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 583-590）所描述的易错聚合酶链反应（Error-Prone PCR）实施 DDAH 序列的诱变。该方法能产生平均 ~1.5 突变/克隆。将诱变处理的序列连接回噬菌体表达载体，然后收集至少 1 千万个克隆以确保文库中存在全部可能的双击（two-hit）突变体。

在表达产物中 DDAH 和 gIIIp 之间，由所述载体编码三个额外元件：（1）用于通过抗-表位抗体的 ELISA 检测的 12-残基附加表位（c-myc），（2）用于通过亲合色谱法的纯化的六-组氨酸标记

(histidine tag), 和 (3) 用于在非抑制型宿主无需亚克隆而产生游离 DDAH 片段的可抑制的终止密码子 (琥珀型 (amber))。通过定量感染含有辅助噬菌体的表达 DDAH-gIIIp 融合体的 *E. coli* 菌株 TGI 细胞 (琥珀抑制型宿主) 制备噬菌体文库, 所述辅助噬菌体基本上是包含抗生素抗性基因的野生型噬菌体。由感染细胞产生的噬菌体颗粒在其表面包含 DDAH 突变体而在其内部包含编码 DDAH-突变体的噬菌粒。一般来说, 所使用的文库包括存在 $\sim 4 \times 10^{10}$ 独立 DDAH 突变体克隆的噬菌体。

按照已经确立的方法以固定化 ADMA 淘选噬菌体 (McCafferty and Johnson, 1996; McCafferty, 1996)。在牛血清白蛋白 (BSA) 上经由辛二酸盐交联剂将 ADMA 经 α -氨基结合至暴露的赖氨酸的 ϵ -氨基, 然后将该结合物固定在聚苯乙烯表面上。在淘选步骤中, 将包含 $\sim 10^{13}$ 噬菌体颗粒的悬液暴露于固定化 ADMA 结合物 1-2 小时以便实现结合平衡。该悬液应包含大约 10 微摩尔精氨酸和 100 纳摩尔 SDMA 以便抑制对具有对这些 ADMA 类似物高亲和性的 DDAH 片段的捕捉。选择这些浓度是基于辨别具有所需 KD (例如, 10^{-8} M) 的突变 DDAH 片段或蛋白的所需水平。用三乙胺冲洗并洗脱结合的噬菌体。从第一轮操作中, 大约回收 6.5×10^{10} 噬菌体, 然后将其在 *E. coli* 菌株 TGI 再扩增至 $\sim 10^{13}$ 然后再实施两轮淘选, 即, 结合, 冲洗, 洗脱和扩增。从最后一轮淘选中回收 1.6×10^{10} 噬菌体。将该噬菌体种群的等分等份用于感染 *E. coli* 菌株 HB2151。该菌株不会抑制 DDAH 和 gIIIp 间的琥珀型终止密码子, 因此所述 DDAH 突变体能在无 gIIIp 结构域时以可溶形式在细菌周质中表达。

可在固定化 ADMA-辛二酸盐-BSA 结合物上通过 ELISA 筛选来自克隆的游离 DDAH 突变体。

为进一步鉴定和用于临床检测中, DDAH 突变体可从克隆的大规模细菌培养物的上清中纯化。使用超滤将浓度增加大约 40 倍并用磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) 代替细菌生长培养液。然后采用位于由表达载体编码的每个突变体的羧基末端的六-组氨酸标记以固定化金属离子亲和色谱法对 DDAH 突变体进行亲和纯化 (IMAC; Janknecht 等, 1991)。

然后可实施 ELISA 再次检测纯化的 DDAH 突变体并优化条件。当用 1 微克 ADMA-辛二酸盐-BSA 包被微量滴定孔时, 1×10^{-9} M 突变 DDAH 将

产生适宜抗-myc-标记小鼠抗体，辣根过氧化物酶结合的（HRP）兔抗小鼠抗体，和 ABTS（HRP 的显色底物）的信号（30' 内 1-2 OD405，环境 OD 0.1-0.2）。在这些条件下，即，当所述 DDAH 浓度低于或等于所述 K_D 的 10% 时，游离 ADMA 的浓度（此时本底-校正信号减少 50%）
5 等于 K_D 。当用 10^{-9} M 突变 DDAH 检测 ADMA 浓度范围（ 10^{-7} M 和 10^{-8} M）时，在检测的范围中某些位置证实了至少 50% 的抑制作用，这证实了 K_D 的最初估计。当分析物浓度等于 K_D ，即 50% 抑制，而所述 ADMA 浓度相应于健康血清 10-100 倍稀释度时，竞争 ELISA 最敏感，。

通过对吸光度数据的 Scatchard 分析可获得 K_D 的附加证实。当以
10 突变 DDAH-ADMA 复合物的浓度与游离 ADMA 的浓度的比率对复合物的浓度绘图时， K_D 可获自斜率（ $-1/K_D$ ）。复合物浓度等于总突变 DDAH 浓度乘 $(A - A_b) / (A_r - A_b)$ ，其中， A 是欲测定的复合物的 A405， A_r 是在不存在 ADMA 时突变 DDAH 的 A405，而 A_b 是在存在过量 ADMA 时突变 DDAH 的 A405。游离 ADMA 等于总 ADMA 减去所述复合物。

15

2. 采用突变 DDAH 片段通过竞争 ELISA 测定血清 ADMA

使用来自健康人类受试者的血样。从血清中除去细胞后，通过标准方法测定 ADMA，所述标准方法包括除去血清蛋白，采用邻苯二醛的
20 荧光标记，反相高效液相色谱法（HPLC），和柱后，在线（in-line）荧光检测（Chen 等，1997）。通过基本上如实施例 1 中所述的竞争 ELISA 采用浓度 1×10^{-9} 的突变 DDAH 对相同的样本进行测定。以三等份检测每个样本的 1:10 至 1:100 的系列稀释液，然后将这些结果与 10^{-9} 至 10^{-7} M 的纯 ADMA 的标准方法和标准曲线的结果相比较。在标准测定法和竞争 ELISA 之间可以观察到非常好一致性。

25

3. 优化荧光偏振免疫测定

将 ADMA 经其 α -氨基结合至 Oregon Green(OG) 然后通过反相 HPLC 纯化。以偏振荧光 498nm 激发最大值和 524nm 发射最大值在 10^{-10} 至
30 10^{-8} M 的浓度范围内的偏振荧光测定游离结合物的荧光偏振。ADMA-OG 的偏振应在整个范围内保持相当恒定，其值通常是 10^{-9} M 时 20 ± 5 。在 10^{-9} M ADMA-OG 时，在用 10^{-10} M - 10^{-6} M 的多种浓度的突变 DDAH 平衡之后测定偏振。最小值应等于游离结合物的最小值。在 10^{-7} M 和 10^{-6} M

之间达到 (150-200) 的最大值。因此拐点可出现在 $10^{-7}M$ 和 $10^{-8}M$ 之间, 这于 K_D 的预先估计一致, 这可通过荧光偏振数据的 Scatchard 分析证实。在这一情况下, 以突变 DDAH-ADMA-OG 复合物与游离突变 DDAH 的比率对复合物再次作图, K_D 获自斜率 ($-1/K_D$)。复合物的浓度应等于总 ADMA-OG 浓度乘上 $(P-P_f)/(P_b-P_f)$, 其中 P 是浓度要测量的复合物的偏振, P_f 是游离 ADMA-OG 的偏振, 而 P_b 是存在过量突变 DDAH 的情况下 ADMA-OG 的偏振。游离突变 DDAH 等于总突变 DDAH 减去所述复合物。还可在 $10^{-7}M$ 游离 ADMA 情况下, 检测偏振, $10^{-7}M$ 游离 ADMA 相当于健康血清的 10 倍稀释度, 其将大约按比例减去最大偏振。优选地, 在精氨酸 100 倍高浓度或 SDMA 的相等浓度情况下, 不应观测到可检测到的抑制。

4. 采用突变 DDAH 片段通过 FPIA 测定血清 ADMA

如上所述, 当抗体浓度等于 K_D 而荧光配体浓度大约为 K_D 的 10% 时产生荧光偏振对竞争抑制的最佳灵敏度。在这些条件下, 未抑制的偏振位于其范围的中点, 而在 100 倍过量游离分析物情况下可实现 ~80% 抑制。将实施例 2 中分析的相同样品用 FPIA 以浓度为 K_D 的突变 DDAH 和浓度为 10% K_D 的 ADMA-OG 再次分析。测定 1:2 ~ 1:100 的稀释液然后在与 $10^{-6}M$ ~ $10^{-8}M$ 的范围内与标准曲线对比。该结果可同样与标准测定法以及竞争 ELISA 一致。

本说明书所提及的全部出版物和专利申请均以如同各独立出版物或专利申请被具体且独立地引入作为参考的相同的范围而被引入本文作为参考。

25 引用的文件

Balint RF and Larrick JW (1993) Antibody engineering by parsimonious mutagenesis. Gene 137: 109-118

Balint RF and Plooy I. (1995) Protease-dependent streptomycin sensitivity in E. coli: a method for identifying protease inhibitors. Bio/Technology 13: 507-510

Bates PC, Grimble GK, Sparrow MP, Millward DJ. Myofibrillar protein turnover. Synthesis of protein-bound

3-methylhistidine, actin, myosin heavy chain and aldolase in rat skeletal muscle in the fed and starved states. *Biochem J* 1983 Aug 15; 214(2) : 593-605

5 Bode-Böger SM, Böger RH, Creutzig A, Tsikas D, Gutzki FM, Alexander K, Frolich JC. L-arginine infusion decreases peripheral arterial resistance and inhibits platelet aggregation in healthy subjects. *Clin Sci* 1994; 87(3) : 303-10

10 Bode-Böger SM, Böger RH, Thiele W, Junker W, Frolich JC. Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Biophys Res Comm* 1996; 219(2) : 598-603

15 Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frölich JC: Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1997a; in press

20 Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP: ADMA: A novel risk factor for endothelial dysfunction, its role in hypercholesterolemia. *N Engl J Rev* 1997b; submitted for review

Burke T, Bolger R, Checovich W, and Lowery R. In: *Phage Display of Peptides and Proteins, A Laboratory Manual*, Kay B, Winter J, McCafferty J, Eds., Academic Press, San Diego, 1996, pp. 305-326

25 Candipan RC, Wang B-Y, Tsao PS, Cooke JP. Regression or progression: dependency upon vascular nitric oxide activity. *Arter, Throm, Vas Bio* 1996; 16: 44-50

30 Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, Cohen RA. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial- function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 753-759

Chen BM, Xia LW, Zhao RQ. Determination of N(G) ,N(G) - dimethylarginine in human plasma by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed. Sci Appl 1997 May 9; 692(2) : 467-471

5 Cooke JP, Rossitch E, Andon N, Loscalzo J, Dzau VJ: Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. J Clin Invest 1991a ; 88 : 1663-1671

Cooke JP, Stamler JS, Andon N, Davies PF, Loscalzo J: Flow
10 stimulates endothelial cells to release a nitrovasodiator that is potentiated by reduced thiol. Am J Physiol [Heart Circ Physiol] 1990; 28: H804-H812, 1990

Cooke JP, Andon NA, Girerd XJ, Hirsch AT, Creager MA:
15 Arginin restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. Circulation 1991b ; 83: 1057-62

Cooke JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME: Anti- atherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. J Clin Invest 1992; 90:1168-1172

20 Cooke JP, Dzau VJ: Nitric oxide synthase: Role in the genesis of vascular disease. Annu Rev Med 1997; 48: 489-509

Coty WA, Loor R, Powell MJ, Khanna PL(1994) CEDIA homogeneous immunoassays: current status and future prospects. J ClinImmunoassay 17: 144. 150

25 Cox DA, Vita JA, Treasure CB, Fish RD, Alexander RW, Ganz P, Selwyn AP: Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans. Circulation 1989; 80: 458-465

Creager MA, Girerd XJ, Gallagher SJ, Coleman S, Dzau VJ,
30 Cooke JP: L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. J Clin Invest 1992; 90: 1248-1253

Dananberg J, Sider RS, Grekin RJ: Sustained hypertension induced by orally administered nitro-L-arginine. Hypertension 1993; 21: 359-363

5 den Hartog M, Balint R, Larrick J, deBoer M. Generation of a humanized anti-CD40 MAb for treatment of autoimmune diseases. Keystone Antibody Engineering Meeting, Taos, NM. (1996)

Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolemic patients by L-arginine, Lancet 1991; 10 338: 1546-1550

Fägerstam LG, Frostell-Karlsson A, Karlsson R, Persson B, Rönnerberg I. (1992) J Chromatog 597: 397-410

Gaboury J, Woodinan RC, Granger DN, Reinhardt P, Kubes P. 15 Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. Am J of Physio 1993; 265(3 Pt 2) : H862-7

Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo- cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth 20 muscle cells, J Clin Invest 1989; 83: 1774-1777

Girerd XJ, Hirsch AT, Cooke JP, Dzau VJ, Creager MA. L-arginine augments endothelium-dependent vasodilation in cholesterol-fed rabbits. Circ Res 1990; 67:1301-1308

Harlow E and Lane D Antibodies A Laboratory Manual Cold 25 Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988

Henderson DR, Friedman SB, Harris JD, Manning WB, Zoccoli MA. CEDIA, a new homogeneous immunoassay system. (1986) Clin Chem 32: 1637- 1641

Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, 30 Hudson P, Winter G. (1991) Nucl. Acids Res. 19: 4133-4137

Hoogenboom HR Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. Trends

Biotechnol 1997 Feb ; 15(2) : 62-70

Jacobson RH, Zhang XJ, Dubose RF, Matthews BW (1994) Three-dimensional structure of beta-galactosidase from *E. coli*. *Nature* 369: 761.

5 Janknecht R, de Martynoff G, Lou J, Hipskind RA, Nordheim A, Stunnenberg HF. (1991) Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 88: 8972-8976

Kalnins A, Otto K, Ruther U, Muller-Hill B. (1983) Sequence
10 of the *lacZ* gene of *Escherichia coli*. *EMBO J* 2: 593-597

Kay B, Winter J, McCafferty J *Phage Display of Peptides and Proteins, A Laboratory Manual* Academic Press, San Diego, 1996

Kopetski E, Lehnert K, Buckel P (1994) Enzymes in
15 diagnostics: achievements and possibilities of recombinant DNA technology. *Clin, Chem.* 40: 688-704

Larrick JW, Truitt KE, Raubitschek AA, Senyk G, Wang JCN
(1983) Characterization of human hybridomas secreting
20 antibody to tetanus toxoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 80: 6376

Larrick JW, Graham D, Chenoweth DE, Kunkel S, Fendly BM, Deinhart T. (1986) Murine monoclonals recognizing neutralizing epitopes on human C5a. *Immun.* 55: 1867

Larrick JW, Wallace EF, Coloma MJ, Bruderer U, Lang AB,
25 Fry KE. (1993) Therapeutic human antibodies derived from PCR amplification of B cell variable regions. *Immunological Reviews* 130: 69-85

Larrick JW and Balint, RF Recombinant therapeutic human monoclonal antibodies. In: *The Pharmacology of Monoclonal
30 Antibodies. Handbook of Experimental Pharmacology.* M. Rosenberg and G. Moore (eds). Academic Press, New York, 1993

Lauritzen E, Flyge H, and Holm A. In: *Antibody Techniques.*

VS Malik and E Lillehoj, Eds. , Academic Press, San Diego, 1994, pp. 227-258

5 Lefer AM, Siegfried MR, Ma XL. Protection of ischemia-reperfusion injury by sydnonimine NO donors via inhibition of neutrophil-endothelium interaction. J of Card Pharm 1993; 22 Suppl 7: S27-33

Lerman A, McKinley L, Higano ST, Holmes DR: Oral chronic L- arginine-administration improves coronary endothelial function in humans. JACC 1997; 29(2) Liu Q, Dreyfuss G. In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins. Mol Cell Biol 1995 May; 15(5) : 2800-2808

10 MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, Whitley GSJ, Vallance P: Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Br. J. Pharmacol. 1996 ; 119: 1533-1540

Marks JD, Tristem M, Karpas A, and Winter G. 1991a. Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes. Eur. J. Immunol. 21, 985-991

20 Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, and Winter G. 1991b. By-passing immunization : Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. J. Mol. Biol. 222, 581-597

25 Marui N, Offerman MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-I) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. J Clin Invest 1993; 92:1866-1874

30 McCafferty J. Phage Display: Factors Affecting Panning Efficiency. In: Phage Display of Peptides and Proteins, Kay B, Winter J, McCafferty J, eds. Academic Press, San Diego, 1996,

pp. 261-276

McCafferty J and Johnson K. Construction and screening of antibody display libraries. In: Phage Display of Peptides and Proteins, Kay B, Winter J, McCafferty J, eds. Academic Press, 5 San Diego, 1996, pp. 79-112.

Mizobuchi M, Inoue R, Miyaka M, Kakimoto Y. Accelerated protein turnover in the skeletal muscle of dystrophic mice. Biochim Biophys Acta 1985 Nov 22; 843(1-2) : 78-82

Moffatt BA and Studier FW(1986) J Mol Biol 189: 113-130

10 Moncada S, Higgs EA: The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med 1993; 329: 2002-2012

Naruse K, Shimizu K, Muramatsu M, Toki Y, Miyazaki Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T. Prostaglandin H2 does not contribute to impaired endothelium-dependent relaxation and 15 long-term inhibition of nitric oxide synthesis promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. Arterioscler Thromb 1994; 14: 746-752

Petros A, Bennett D, Vallance P: Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic 20 shock. Lancet 1991; 338 : 1557

Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide, and prostacyclin in platelets. Br J Pharmacol 1987 ; 92: 181-187

25 Rees DD, Celletk S, PalmerRMJ :, Moncada S: Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. Biochem and Biophys Res Com 1990; 173: 541-547

30 Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T, Molecular Cloning A Laboratory Manual 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1189

- Schier R, Balint RF, McCall A, Apell G, Larrick JW, Marks JD. (1996) Identification of functional and structural amino-acid residues by parsimonious mutagenesis *Gene* 169: 147-155
- 5 Scott JK and Smith GP (1990) Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249: 386-390
- Shesely EG, Maeda N, Kinm HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC, Smithies O: Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Nat*
- 10 *Acad Sci USA* 1996; 93(23) : 13176-81
- Short J et al. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 7583-7600
- Sparks AB, Adey NB, Cwirla S, Kay BK Screening phage-displayed random peptide libraries. In: *Phage Display of Peptides and Proteins*, Kay B, Winter J, McCafferty J, eds.
- 15 *Academic Press, San Diego, 1996, pp. 227-254*
- Stamler JS, Mendelsohn ME, Amarante P, Smick D, Andon N, Davies PF, Cooke JP, Loscalzo J: N-acetylcysteine potentiates platelet inhibition by endothelium-derived relaxing factor. *Circ Res* 1989; 65: 789-795
- 20 Theilmeier G, Zalpour C, Ma A, Anderson B, Wang B-Y, Wolf A, Candipan RC, Tsao PS, Cooke JP. Adhesiveness of mononuclear cells in hypercholesterolemic humans is normalized by dietary arginine. *Arter, Throm, Vas Bio* (submitted)
- Tojo A, Welch WJ, Bremer V, Kimoto M, Kimura K, Omata M,
- 25 Ogawa T, Valiance P, Wilcox CS. Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Int* 1997 Dec; 52(6) : 1593-1601
- Tsao P, McEvoy LM, Drexler H, Butcher EC, Cooke JP:
- 30 Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation* 1994; 89: 2176-2182
- Tsao PS, Lewis N, Alpert S, Cooke JP. Exposure to shear

stress alters endothelial adhesiveness: Role of nitric oxide.
Circulation 1995; 92: 3513-3519

Tsao P, Buitrage R, Chan JS, Cooke JP. Fluid flow inhibits
endothelial adhesiveness: NO and transcriptional regulation
5 of VCAM-1. Circulation (in press)

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S:
Endogenous dimethyl-arginine as an inhibitor of nitric oxide
synthesis. J Cardiovasc Pharmacol 1992a; 20 (Suppl. 12) :
S60-S62

10 Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S.
Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide
synthesis in chronic renal failure. Lancet 1992b;
339 (8793) : 572-5

von der Leyen HE, Gibbons GH, Morishita R, Lewis NP, Zhang
15 L, Nakajima M, Kaneda Y, Cooke JP, Dzau VJ: Gene therapy
inhibiting neointimal vascular lesion: In vivo transfer of
endothelial cell nitric oxide synthase gene. Proc Natl Acad
Sci USA 1995; 92: 1137-41

Wang B-Y, Singer A, Tsao P, Drexler H, Kosek J, Cooke JP:
20 Dietary arginine prevents atherogenesis in the coronary
artery of the hypercholesterolemic rabbit. J Am Coll Cardiol
1994; 23; 452-58

Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR (1994)
Making antibodies by phage display technology. Ann. Rev.
25 Immunol, 12: 433-456

Wolfe A, Theilmeier G, Zalpour C, Ma A, Anderson B, Wang
B-Y, Candipan RC, Tsao PS, Cooke JP: Platelet
hyperaggregability in hypercholesterolemic humans: Reversal
by dietary L-arginine. Annals of Int Med (under review) 1995

30 Youn HJ, Terpetschnig E, Szmanski H, Lakowicz JR
Fluorescence energy transfer immunoassay based on a long-
lifetime luminescent metal-ligand complex. Anal Biochem 1995

Nov 20; 232(1) : 24-30

Yu X, Li Y, XiongY : Increase of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in serum of high cholesterol fed rabbits. Life Sci. 1994 ; 54: 753-758

- 5 Zeiher AH, Drexler H, Wollschl ger H, Saurbier B, Just H: Coronary vasomotion in response to sympathetic stimulation in humans: Importance of the functional integrity of the endothelium. J Am Coll Cardiol 1989; 14: 1181-1190

DMA的结构

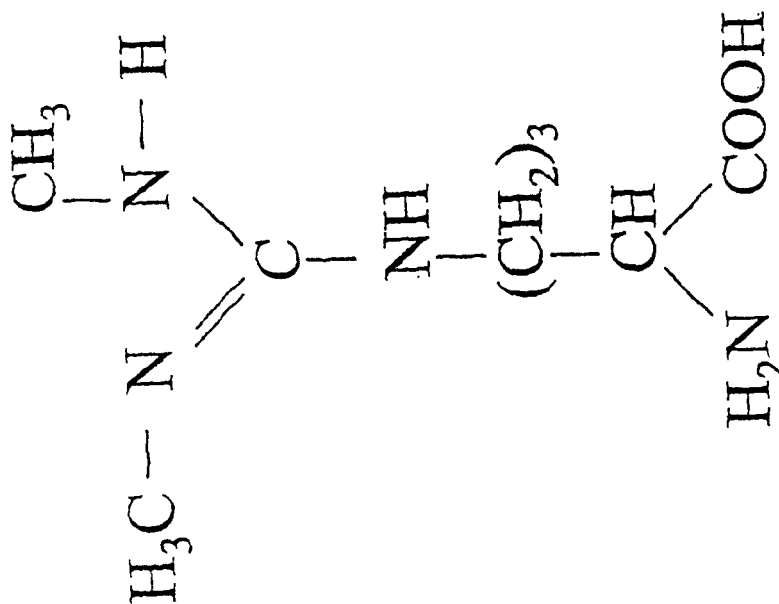
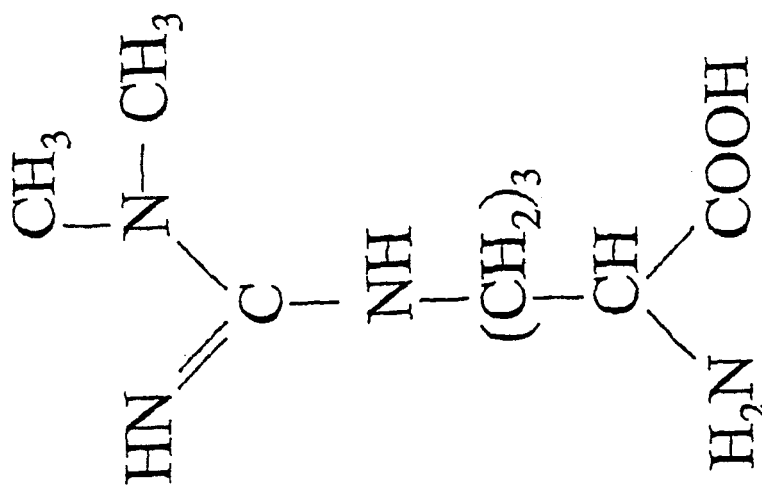
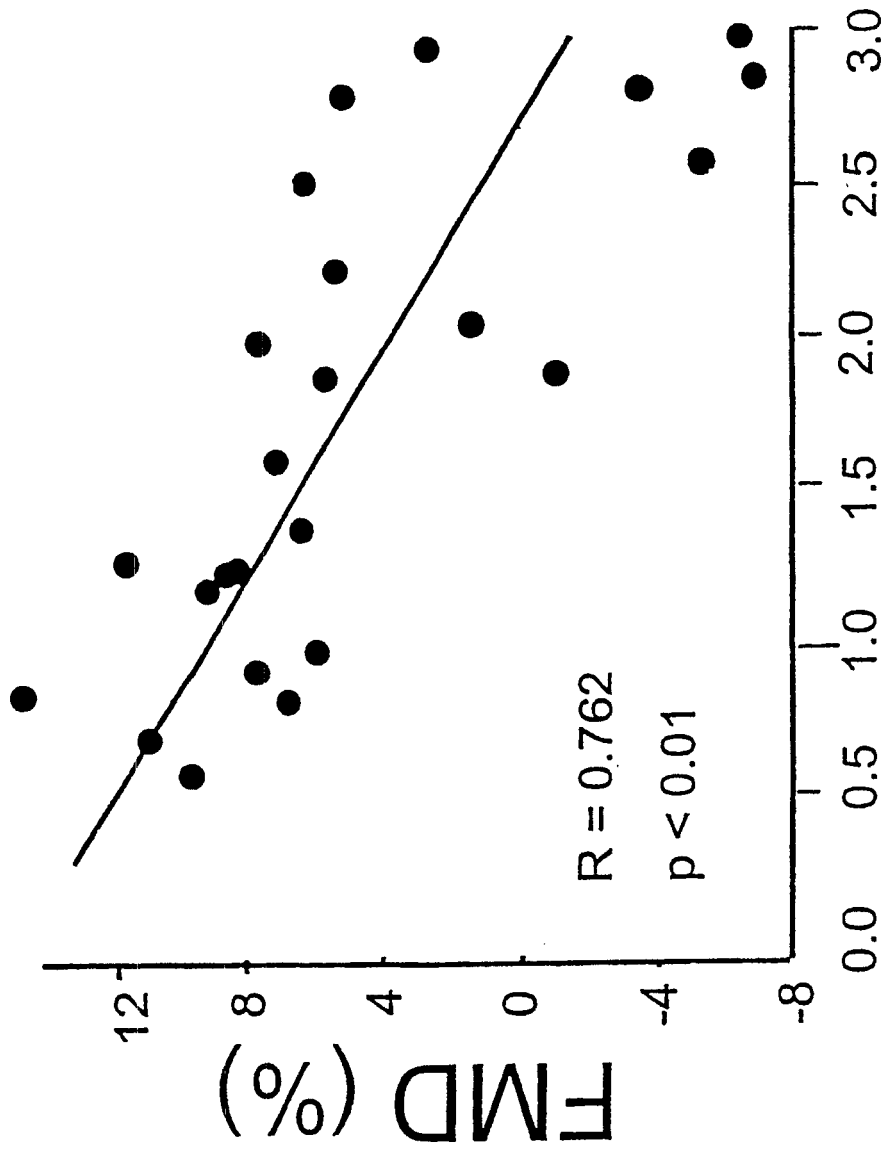


图 1

血浆ADMA的血流介导的扩张作用



Boger 等人,
Circulation. 1998; 98: 1842

ADMA (µM)

图 2

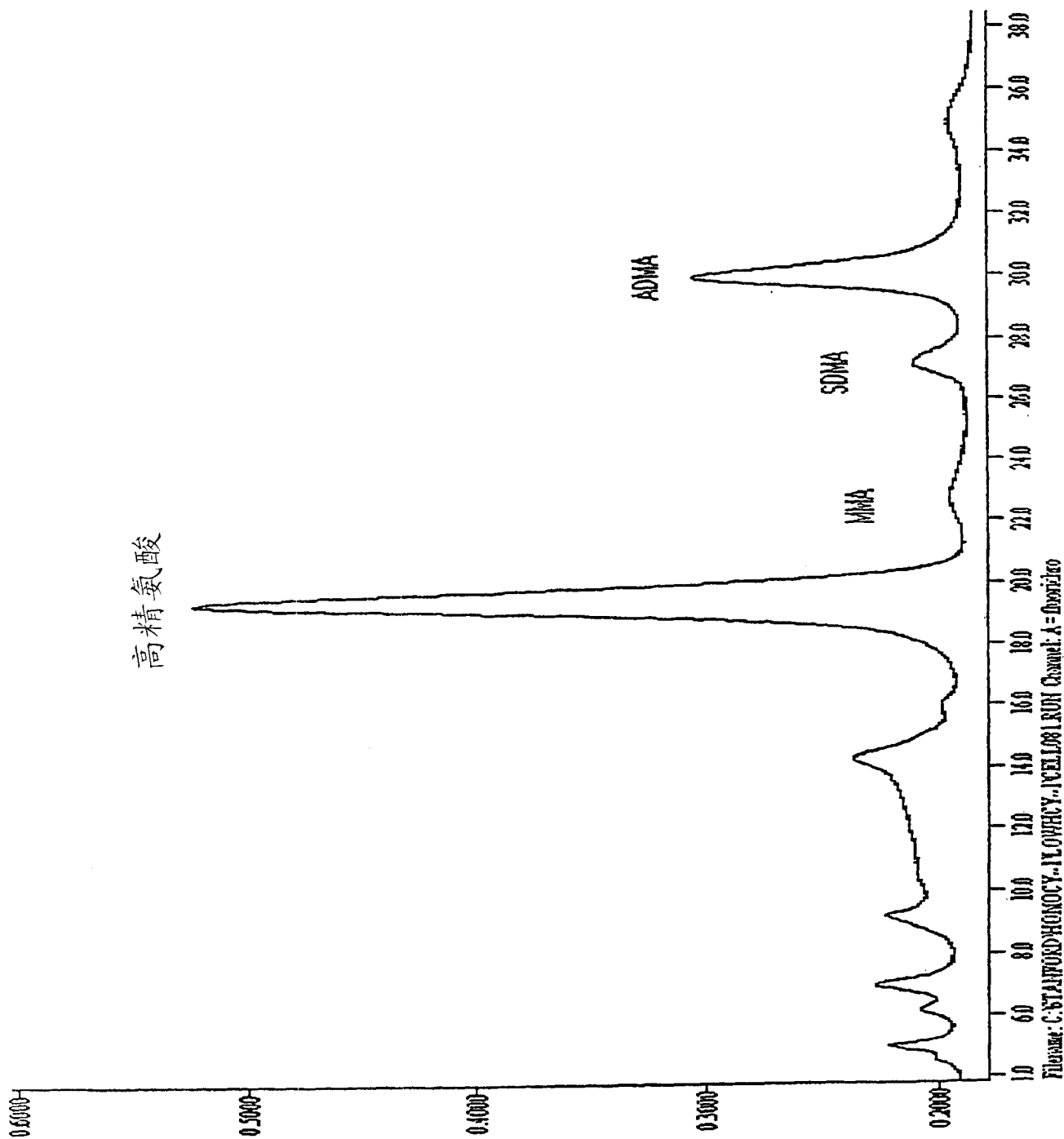


图 3

专利名称(译)	用于评估心血管疾病危险性的蛋白和方法		
公开(公告)号	CN1656123A	公开(公告)日	2005-08-17
申请号	CN03812446.7	申请日	2003-05-30
[标]申请(专利权)人(译)	尤尼特尔药品公司		
申请(专利权)人(译)	尤尼特尔药品公司		
当前申请(专利权)人(译)	尤尼特尔药品公司		
[标]发明人	RF巴林特 JP库克		
发明人	R· F· 巴林特 J· P· 库克		
IPC分类号	C12N9/78 C12Q1/34 C07K17/00 G01N33/567 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/34 G01N2333/98 C12N9/78 C12Y305/03018		
代理人(译)	谭明胜		
优先权	60/384077 2002-05-31 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及包含至少突变二甲基精氨酸二甲氨基水解酶(DDAH)的片段的突变蛋白，其中所述片段具有对不对称N，N - 二甲基精氨酸(ADMA)和/或血浆水平比ADMA低的L，N - 单甲基精氨酸(LNMMA)的亲合性，且不足以将ADMA或LNMMA水解为瓜氨酸、释放瓜氨酸或二者并存。

