

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/12

C07K 14/47 C12N 15/85

A61K 38/17 C12N 5/10

C12Q 1/68 G01N 33/68



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01812623.5

[43] 公开日 2003 年 9 月 10 日

[11] 公开号 CN 1441843A

[22] 申请日 2001.7.9 [21] 申请号 01812623.5

[30] 优先权

[32] 2000. 7. 13 [33] EP [31] 00202495.8

[86] 国际申请 PCT/EP01/07888 2001.7.9

[87] 国际公布 WO02/06478 英 2002.1.24

[85] 进入国家阶段日期 2003.1.10

[71] 申请人 阿克佐诺贝尔公司

地址 荷兰阿纳姆

[72] 发明人 H·C·休斯 R·L·H·奈里森

C·M·L·缪维斯

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 3 页 说明书 20 页 序列表 17 页
附图 4 页

[54] 发明名称 细胞外基质蛋白

[57] 摘要

本发明描述用于防止炎症，更具体地用于在患有类风湿性关节炎的患者体内诱导 T 细胞对其耐受的蛋白。

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

1. 编码含 SEQ ID NO: 2 中氨基酸编号从 1 延伸到 598 的氨基酸序列的多肽的多核苷酸。
2. 根据权利要求 1 的多核苷酸, 其编码 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20 或 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列。
3. 根据权利要求 1 或 2 的多核苷酸, 其包含 SEQ ID NO: 1 中从核苷酸 59 延伸到 1852 的序列。
4. 根据权利要求 1-3 的多核苷酸, 其包含序列 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17 或 SEQ ID NO: 18 或从 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 59 延伸到 2017 的序列, SEQ ID NO: 16 中核苷酸 59 到 1969 的序列, SEQ ID NO: 17 中核苷酸 59 到 1912 的序列或 SEQ ID NO: 18 中核苷酸 59 - 1894 的序列。
5. 包含根据权利要求 1-4 的 DNA 的重组表达载体。
6. 由根据权利要求 1-4 的多核苷酸、根据权利要求 5 的表达载体或 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20 或者 SEQ ID NO: 21 的免疫调节片段所编码的多肽。
7. 包含根据权利要求 6 的多肽和药学可接受的载体的药物组合物。
8. 根据权利要求 6 的多肽的治疗用途。
9. 根据权利要求 6 的多肽在生产抗炎药物制剂中的用途。
10. 根据权利要求 6 的多肽在生产用于在患有自身免疫病更具体为类风湿性关节炎的患者中诱导对自身抗原免疫耐受的制剂中的用途。
11. 用根据权利要求 1-4 的 DNA 或根据权利要求 5 的表达载体转染的细胞。
12. 根据权利要求 11 的细胞, 其为表达根据权利要求 6 的多肽的稳定转染的细胞。
13. 根据权利要求 1-4 的 DNA 或根据权利要求 5 的表达载体, 根

据权利要求 11 或 12 的细胞或者根据权利要求 6 的多肽，在鉴定耐受原性（多）肽的筛选分析中的用途。

14. 鉴定耐受原性肽的方法，该方法包括以下步骤

a) 将根据权利要求 1-4 的多核苷酸的片段引入到合适的宿主细胞中；

b) 在允许所引入的序列表达的条件下培养宿主细胞；

c) 使表达产物与淋巴细胞接触；并且

d) 确定淋巴细胞的活性。

15. 鉴定耐受原性肽的方法，该方法包括以下步骤

a) 将根据权利要求 1-4 的多核苷酸的片段引入到合适的宿主细胞中；

b) 在允许所引入的 DNA 序列表达的条件下培养宿主细胞；

c) 分离表达产物；

d) 使表达产物与抗原呈递细胞和 T 细胞接触；并且

e) 确定 T 细胞的活性。

16. 鉴定耐受原性肽的方法，该方法包括以下步骤

a) 化学合成 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20 或 SEQ ID NO: 21 的片段；

b) 使该肽片段与抗原呈递细胞和 T 细胞接触；并且

c) 确定 T 细胞的活性。

17. 配制药物组合物的方法，该方法包含权利要求 14-16 的方法和将上述肽与药学可接受的载体混合。

18. 权利要求 14-16 的方法所鉴定的肽在制备适于作为耐受原性剂的药物中的用途。

19. 包含一或多种根据权利要求 6 的多肽和检测剂的诊断组合物。

20. 用于检测活化的自身反应性的 T 细胞的诊断方法，该方法包含以下步骤：

a) 从个体血液样品中分离外周血液单核细胞（PBMC）；

- b) 在适合条件下培养上述 PBMC;
- c) 在 SCIM-1、其片段和/或根据权利要求 6 的一或多种肽存在下孵育上述 PBMC 培养物, 并且
- d) 检测 T 细胞反应, 表明个体中活化的自身反应性的 T 细胞的存在。

21. 检测活化的自身反应性的 T 细胞的测试试剂盒, 该测试试剂盒包含 SCIM-1 或根据权利要求 6 的一或多种肽。

细胞外基质蛋白

本发明涉及分离编码新的细胞外基质蛋白质，即 SCIM-1 的多聚核苷酸。编码的蛋白质及其衍生物用于诊断、预防和治疗疾病状况。它们可用作调节剂，治疗自身免疫病，更具体为类风湿性关节炎。

免疫系统的基本功能是保护个体免受带有外来，即非自身抗原的病原体的入侵。为了安全有效地实现这个功能，必然需要机制来辨别外来抗原和源自个体身体的自身抗原。该自身-非自身辨别过程的失效，即对自身抗原免疫耐受的丧失，可能引起对自身抗原的免疫反应而导致自身免疫病，并伴随组织损伤和器官功能丧失。

自身免疫病是人类卫生保健的重要问题。一些自身免疫病可能是导向一种抗原或抗原复合物的免疫学过程的结果，而在其他自身免疫反应中可能涉及存在于多种器官中的许多种抗原。一些证据显示自身免疫病的病理学涉及免疫系统。首先，个体形成自身免疫病的机会与他们的遗传背景密切相关：编码主要组织相容性复合体（MHC）II 类分子的基因表现出与疾病易感性有重大的遗传关联，而 MHC II 类分子将（自身）抗原呈递给识别 MHC-肽复合物的应答 T 细胞。其次，免疫系统细胞，比如单核细胞/巨噬细胞和 T 细胞能渗透进入目标器官。其三，自身免疫病患者的 T 细胞应答于潜在相关的自身抗原而激增。其四，对自身免疫性动物模型的研究已明确证明免疫系统细胞，比如单核细胞/巨噬细胞和 T 细胞与疾病活动的诱导和表达有关。

像类风湿性关节炎（RA）这样的疾病能说明可能在任何自身免疫病的情况下发生的免疫病理学。RA 自身是慢性多系统的疾病，普通临床显示为持续发炎的滑膜炎，并伴有滑膜细胞增殖、血管翳形成、软骨降解和骨侵蚀，并且最终关节变形导致功能丧失。

目前对免疫系统产生不合需要的并且有害的炎症反应的自身免疫紊乱，比如 RA 的治疗方法是不够的。治疗集中于减轻自身免疫病的

症状而不是针对其原因。大多数用于自身免疫病治疗的药品，比如类固醇类和非甾类抗炎化合物，是非特异性的而且具有显著的毒副作用。由于自身免疫病是慢性状况，需要延长用药，这就尤其存在问题。

抗原驱动、无毒性的免疫调节疗法为非特异的免疫抑制提供了非常诱人的另一种选择。抗原特异的疗法包括对患者用靶（自身）抗原或者由（自身）抗原衍生的合成的 T 细胞反应肽进行治疗。这些合成的肽应答于 T 细胞（自身）抗原决定簇，可用来诱导特异的 T 细胞对肽本身和（自身）抗原的耐受。有控制的使用靶（自身）抗原可对免疫系统进行非常有效的脱敏作用。免疫系统的脱敏或免疫耐受基于长期观察到的下述现象：人们发现被投喂或是已吸入抗原或抗原决定簇的动物当由全身路线引入上述抗原或抗原决定簇时较不易形成对其的全身免疫反应。

关于应用抗原进行免疫疗法，最近报导人类软骨（HC）gp-39 蛋白可对关节炎治疗有效诱导全身性免疫耐受（Joosten 等人，*Arthritis Rheum.*, 43: 645-655, 2000）。在小鼠中一但鼻内给药，HC gp-39 阻碍 II 型胶原蛋白诱导的关节炎的形成。治疗结果是疾病活性和关节毁坏都得到改善。

在寻找与自身免疫病比如类风湿性关节炎相关的蛋白质中，我们确定了新基因 SCIM-1（滑膜/软骨炎症连锁信使 1）。由 SCIM-1 mRNA 编码的蛋白质没有前人报导。鉴定 SCIM-1 后，已确定在公开领域数据库中只有作为表达序列标签（ESTs）的该 mRNA 的片段存在。通过公开的 ESTs 不可能重建已鉴定的 SCIM-1 cDNA。

已发现 SCIM-1 蛋白最好的同源物是具有 EGF 样结构域的 fibulin-1，后者是含有 9 个 EGF 样结构域的细胞外蛋白。Fibulin-1 能将血管壁的胞外基质和血小板上的整合蛋白- α IIb β 3 通过与纤维蛋白原的反应桥连起来（Godyna 等人，*Blood*, 88: 2569-2577, 1996）。通过其 EGF 样结构域 fibulin-1 与巢蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白、纤维蛋白原、NOVH、聚集蛋白聚糖和多功能蛋白聚糖结合

(Tran 等人, *J. Biol. Chem.* 272: 22600-22606, 1997; Perbal 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 869-874, 1999; Barth 等人, *Matrix Biol.*, 17: 635-646, 1998)。Fibulin-1 的高表达似乎干涉到肿瘤形成和入侵 (Qing 等人, *Oncogene*, 15: 2159-2168, 1997)。可以想象包含其 EGF 样结构域中 RGD 基元的 SCIM-1 也具有相似的功能。

根据 Sarkissian 和 Lafyatis 的报导 (*J. Immunol.* 162: 1772-1779, 1999), SCIM-1 和整合蛋白间推测的相互作用可能与 RA 相关, 因为比如源自 RA 患者, 成纤维细胞样滑膜细胞 (FLS) 的增殖除需要促有丝分裂细胞因子, 比如 PDGF 之外, 还需要由结合整合蛋白的细胞外基质蛋白提供的信号。Wang 等人 (*Arthritis Rheum.*, 40: 1298-1307, 1997) 提出整合蛋白 αv 、 $\alpha 4$ 和 $\alpha 5$ 在 IL-1 β 激发的 RA-FLS 关节软骨入侵中是必需的。

SCIM-1 基因似乎在滑膜和软骨组织中的表达相对较高。根据部分 cDNA 序列, 从人类软骨细胞中分离到了全长的 cDNA。检测多种组织 northern 印迹表明 SCIM-1 在健康人类供体的初级软骨细胞中有表达, 而在大脑和肺中也观察到了一些表达, 尽管这些组织中 SCIM-1 的 mRNA 似乎长度不同。在其他人类组织比如心脏、胎盘、肝脏、骨骼肌、脾脏、肾脏和结肠, 以及单核细胞、动脉内皮细胞和培养的滑膜成纤维细胞的细胞系中观察到只有低水平表达或不表达。

SCIM-1 表达似乎确实与分化的软骨细胞表型正相关, 因为只在初级软骨细胞中检测到了表达, 而在经 SV40 转化的人类初级软骨细胞中没有。此外, 资料表明 SCIM-1 基因在人类软骨细胞中的表达在 RA 相关的细胞因子 TNF α 和 IL β 存在时得到提高。在软骨细胞中, SCIM-1 基因的转录形成 2.7kb 编码有 653 个氨基酸的蛋白质的 mRNA。根据多种组织 northern 印迹数据以及 Incyte 和公开领域数据库的序列, 已发现 SCIM-1 转录物在关节、大脑和肺组织中经历不同的剪接过程。

根据预期的蛋白质基元, 人们认为 SCIM-1 是细胞外基质蛋白

质，或是定位于软骨细胞、滑膜细胞和其他可能种类细胞表面的蛋白质。

(自身)免疫病(比如 RA)的主要问题是免疫系统对其发生有害反应的精确的靶点或抗原大多未知，暗示仅由抗原特异的方式调节疾病可能行不通。

然而，如果能在无需知道(自身)免疫反应中作为靶点的抗原的情况下运用抗原驱动的、无毒形式的免疫调节疗法，这将会具有重要的优势。这样的抗原驱动的治疗法会涉及用预计在自身免疫过程中释放或产生的抗原来产生抗原特异调节细胞。该抗原能在炎症或是组织破坏时获得。如果在自身免疫病中，局部产生的自身抗原应该能活化或重新活化由这种抗原诱导的调节细胞。

为了有效地利用耐受诱导疗法来治疗 T 细胞介导的软骨破坏，极需要鉴定 T 细胞反应(多)肽，它能减少患者对激活负责炎症反应过程 T 细胞的自身抗原的敏感性。

本发明的目的是提供能诱导全身性免疫耐受的(多)肽，尤其是特异的 T 细胞耐受的(多)肽，该耐受优先针对于患有 T 细胞介导软骨破坏的患者中的有关的(responsible)软骨抗原。已经发现 SCIM-1 满足上述要求并能作为调节免疫系统的有效耐受原。

本发明中系统免疫耐受诱导的过程应理解为：抗原呈递细胞(APC)激活抗原特异淋巴细胞，而使淋巴细胞获得产生抗炎细胞因子的状态。抗炎细胞因子可以是例如 IL-4、IL-10 和/或 TGF- β 。由 APC 带来耐受的淋巴细胞能将其抗炎状态施加于身体的其他部位，比如正在发炎的部位。

免疫系统保护个体免于外来抗原的侵害，并在暴露于外来抗原时通过活化特异细胞如 T-和 B-淋巴细胞并产生可溶的因子比如白细胞介素、抗体和补体因子来作出反应。引起免疫系统反应的抗原通过抗原呈递细胞(APCs)降解且抗原片段暴露于细胞表面，与 II 类主要组织相容性复合物(MHC)糖蛋白相联系。MHC 糖蛋白-抗原-片段复

合物呈递给 T 细胞, T 细胞依靠其 T 细胞受体识别与它自身结合的 MHC II 类蛋白相结合的抗原片段。T 细胞从而活化, 也就是增殖和/或产生白细胞介素, 受攻击时导致扩增导向抗原的活化的淋巴细胞。

(Grey 等人, *Sci. Am.*, 261: 38-46, 1989)。

自身抗原也持续的得到处理和作为抗原片段由 MHC 糖蛋白呈现给 T 细胞 (Jardetsky 等人, *Nature*, 353: 326-329, 1991)。自我识别从而是免疫系统固有的。在正常情况下免疫系统对自身抗原具有耐受性并且避免由这些自身抗原活化免疫反应。当丧失自身抗原耐受时, 免疫系统对一或多种自身抗原活化, 导致活化自身反应性的 (autoreactive) T 细胞, 有时还产生自身抗体。该现象被称为自身免疫性。通常免疫反应具有破坏性, 即破坏侵入的外来抗原, 所以自身免疫反应便能造成身体自身组织的破坏。

因而可以清楚知道 SCIM-1 蛋白的片段会由 APC 表达, 且因此 SCIM-1 蛋白的片段能激发免疫反应。具有相似功能的其他种类的蛋白或至少与人类 SCIM-1 蛋白结构非常接近的蛋白也可能表现同样的耐受原效应。因此, 本发明也包括同源多肽及其部分。

根据本发明的蛋白包括含有 SEQ ID NO:2 的多肽以及具有 70% 相似性, 优选 90% 相似性、更优选 95%、98% 和最优选 99% 相似性的多肽。并且这些多肽中仍然能具有耐受原效应的部分也包含在本发明中。这些部分本身可能就具备功能, 例如在溶解状态中或者通过生物技术或化学合成与其他多肽相连得到的嵌合蛋白。

这里用到的术语相似性如 NCBI-BLAST 2.0.10 中所定义 [Aug-26-1999] (Altschul 等人, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, 1997)。

SCIM-1 蛋白或同源多肽的片段理解为蛋白的亚序列。这些亚序列能调节淋巴细胞的功能。它们优选具有如下免疫调节功能特征: i) 这些多肽可以同疾病相关的 MHC 分子结合, 后者优选 HLA-DRB1*0101、DRB1*0401、DRB1*0404、DRB1*0408、DRB1*0405、DQB*0301、DQB*0302; 以及 ii) 多肽必须能在人体内激发 T 细胞反

应，优选自身免疫病患者，更优选在 RA 患者中。该反应可以由例如体外 T 细胞增殖实验或检测 T 细胞细胞因子产量的实验来进行测量（例如 ELISA 或 ELISPOT）（Coligan 等人，*Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons Inc., 1998）。优选用 SCIM-1（多）肽进行免疫接种之后，该多肽必须也能被含上述相关的人类 MHC II 类分子和人类 CD4 的转基因动物体中的 T 细胞识别。

只要亚序列包含有被相关 MHC 分子识别的抗原决定簇，则这些亚序列的长度并不重要。优选这些多肽氨基酸序列长度为 9-55 氨基酸残基。优选多肽含氨基酸 9-35，特别是含 9-25 个氨基酸残基。更优选多肽有 9-15 个氨基酸残基。高度优选的多肽的氨基酸序列为 13 和 14 个残基。

可以通过在上述序列中删除、替换、插入、颠换或增加一到几个氨基酸或者通过整个序列上氨基酸的差异构成序列中可以发生的变异，尤其在小肽中。已描述了预计不会从本质上改变生物学和免疫学活性的氨基酸替换。在相关氨基酸间或是在演化中常见的氨基酸替换有：Ser/Ala, Ser/Gly, Asp/Gly, Asp/Asn, Ile/Val 及其他（见 Dayhof, M. D., 蛋白序列和结构图集, *Nat. Biomed. Res. Found.*, Washington D.C., 1978, 第 5 卷, 第 3 期增刊）。根据该信息 Lipman 和 Pearson 开发了快速而灵敏的蛋白质比较（*Science*, 227: 1435-1441, 1985）和测定同源多肽间功能相似性的方法。

这些多肽的多聚体，如根据本发明的多肽的二聚体或三聚体也在本发明的范围内。根据本发明的多聚体可以是由多条相同肽组成的同聚体，也可由不同肽组成的异聚体。

本领域技术人员可清楚地了解可在该（多）肽任意一端或两端延长而该肽仍能发挥相同的免疫功能。延长的部分可以是与天然蛋白序列相似的氨基酸序列。但是（多）肽也可用非天然序列延长。很显然该（多）肽并不需要发挥其原有功能而这样可能没有活性但仍能执行其根据本发明的免疫功能。根据本发明的（多）肽可以与 MHC 分子连接，这样结合槽就由该肽占据。弹性连接分子，优选也由氨基酸序列

组成，可以连接该肽。MHC 分子不需要有稳定区并可以只由其可变区组成，能直接互相连接或通过弹性连接分子连接。这种复合物的优势在于它能以可溶的状态存在并可直接由 T 细胞识别。

因此，根据本发明，类似于 MHC II 类所限制的 T 细胞抗原决定簇的（多）肽、该抗原决定簇出现于包含多肽 SEQ ID NO: 2 的抗原或其包含这些抗原决定簇的片段中，适用于在哺乳动物，特别是人类中治疗来诱导对上述抗原的系统免疫耐受，患者患有淋巴细胞或 T 细胞介导的软骨破坏，如关节炎，尤其是类风湿性关节炎。该疗法可选同其他药剂一起使用，如 DMARDs（疾病调节抗风湿病药物，例如磺胺吡啶、抗疟疾药物（氯喹，羟基氯喹）可注射或口服的黄金（gold）、甲氨喋呤、D-青霉胺、咪唑硫嘌呤、环孢菌素 A、霉酚酸盐），NSAIDs（非甾体抗炎药物），皮质类固醇或其他已知可以影响自身免疫病患者病情进展的药物。

根据本发明的多肽还可以用于调节淋巴细胞，这些细胞对同上述抗原即包含 SEQ ID NO: 2 多肽的蛋白质或其部分处于相同组织中的其他抗原反应。通过诱导抗原特异性 T 细胞耐受，自身免疫紊乱可以通过系统免疫耐受治疗。更通常的情况下，要调节的细胞是造血细胞。通常要具有耐受原的功能，多肽就必须满足至少两个条件，即它必须具有免疫调节能力以及它必须在局部表达，通常作为一个大蛋白质的部分。

因此，本发明为患有炎症自身免疫疾病的患者提供了治疗方法，通过施用含有根据本发明的（多）肽的药物制剂实现。该（多）肽含有可被自身反应的 T 细胞识别并可激活该 T 细胞的 T-细胞抗原决定簇。这些 T 细胞存在于例如炎症患者的血液中。这些患者可能患有像突眼性甲状腺肿、青年关节炎、初级肾小球肾炎、多关节炎、骨关节炎、Sjögren's 综合征、重症肌无力、类风湿性关节炎、Addison's 病、初级胆硬化、葡萄膜炎、全身红斑狼疮、肠炎疾病、多发性硬化

或糖尿病这类的病征。因而根据本发明的多肽可用于药物制备以防治炎症疾病。施用 SCIM-1 可以诱导系统免疫耐受。更具体地，该多肽可用于药物制备，治疗患有炎症疾病，优选免疫细胞介导的软骨破坏的患者，诱导特异的免疫耐受。所说免疫细胞优选为 T 细胞。而最优选的疾病为关节炎，更优选类风湿性关节炎。

用根据本发明的多肽进行自身免疫病的治疗利用了系统免疫耐对相关但是共定位的抗原所诱导的事实。调节细胞以抗原特异方式分泌如细胞因子这样的多效性蛋白质，它们可以降低免疫反应水平。

根据本发明的多肽可通过重组 DNA 技术制备。

本发明提供编码根据本发明的蛋白或多肽的 DNA 序列。

本发明还包含完整的 mRNA 序列，其部分序列在 SEQ ID NO: 1 中给出。完整编码的 DNA 序列在 SEQ ID NO: 1 核苷酸 59-2017 中出示。此外，为适应密码子可变性，本发明还包括编码与这里公开的氨基酸序列相同的序列。除其等位基因和物种变异体之外，编码个别具有相同免疫功能的多肽的部分编码序列也是本发明的部分。有时，基因在特定组织中以剪接变异体表达，形成 5'或 3'端改变了的 mRNA 或是包含额外的外显子序列。这些预计序列以及由这些序列编码的蛋白质具有相同或相似功能，也是本发明的部分。

具体地，SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 18 代表特异的剪切变异体，与 SEQ ID NO: 1 序列在其核苷酸 1852 下游部分序列不同。该剪切变异体的翻译产生 SEQ ID NO: 2 蛋白质的截短形式，分别由 SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 21 出示。后面这几种核酸的编码序列位置分别为 59-1969、59-1912 和 59-1894，并且都含有 SEQ ID NO: 2 中的前 598 个氨基酸。完全的蛋白质优选为成熟蛋白质。其信号序列很可能为 19 个氨基酸但长度可有微小的不同。

不应将这里提供的序列信息狭义的解释为要求包含错误鉴定的碱

基。这里公开的特异序列可以很容易地用于分离完全的基因，而全基因接下来可以很容易地进行进一步的序列分析从而鉴定测序的错误。

因而，本发明还提供了分离的编码 SCIM-1 及其截短版本或其片段的多核苷酸。

根据本发明的 DNA 可从 cDNA 得到。组织优选为人源。优选，核糖核酸从胎儿大脑、胎儿肝脏、胎儿脾脏、胎盘或其他组织中分离得到。或者，编码序列可以为基因组 DNA 或由 DNA 合成技术制得。多聚核苷酸也可为 RNA 形式。如果多聚核苷酸为 DNA，则可为单链或双链形式。而单链可能为编码链或是非编码链。

本发明进一步涉及有微小变异或多态位点 (polymorphic sites) 的多聚核苷酸。具有微小变异的多聚核苷酸编码的多肽保留与天然、成熟的蛋白质相同的生物功能或活性。多态位点可用于诊断目的。通过在优选的高严紧条件下杂交可以鉴定这些多聚核苷酸。根据本发明术语“严紧”指在 65°C 下采用 1 ×SSC、0.1% SDS 的洗涤条件；高度严紧的条件指 SSC 减量至 0.3 ×SSC，更优选的为 0.1 ×SSC。优选前两步洗涤相继进行两次，每次为 15-30 分钟。如果需要高度严紧条件下洗涤，则再用 0.1 ×SSC 进行 15 分钟的洗涤。杂交可以在如下条件：pH7.5 的 0.5M 磷酸盐缓冲液/7% SDS，65°C，过夜进行。

或者，上面提到编码具有相同免疫功能多肽的多聚核苷酸的片段也收录在本发明中。同时从这些蛋白质衍生的编码的蛋白质或多肽也是本发明的组成部分。

将编码根据本发明的蛋白质、多肽、所述多肽多聚体或嵌合多肽的核苷酸序列插入到表达载体上。适当的表达载体包含必需的复制和表达控制区。表达载体可以在宿主细胞中表达。合适的宿主细胞有例如细菌、酵母细胞和哺乳动物细胞。这些是本领域熟知的技术，参见 Sambrook 等人所著，分子克隆：实验室手册，冷泉港实验室出版社，冷泉港，1989。

根据本发明（更小的）（多）肽也可以通过众所周知的有机化学肽合成方法来制备，如在 J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149 (1963) 和 Int. J. Peptide Protein Res. 35: 161-214 (1990) 中描述的固相肽合成法。

通过 C-和/或 N-末端修饰可以使（多）肽稳定，减少外肽酶催化的水解作用。修饰包括有：C-末端酰基化（例如：酰基化 = Ac-肽）、N-端引入氨基（例如：肽-NH₂）、酰基化和氨基引入的结合（例如：Ac-肽-NH₂）以及引入 D-氨基酸替代 L-氨基酸（Powell 等人，J. Pharm. Sci., 81: 731-735, 1992）。

其他修饰集中于防止外肽酶的水解作用。这类修饰的例子有：引入 D-氨基酸替代 L-氨基酸，引入修饰了的氨基酸，肽内环化作用，引入修饰后的肽键，如减少的肽键 ψ [CH₂NH] 和 peptoid（N-烷基化甘氨酸衍生物）（Adang 等人，Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 113: 63-78, 1994 和 Simon 等人，Natl. Acad. Sci. USA, 89: 9367-9371, 1992）。

根据本发明耐受原肽可通过包含以下步骤的方法得以鉴定：

- a) 将编码 SCIM-1 肽片段的 DNA 片段引入到合适的宿主细胞中；
- b) 在允许所引入 DNA 序列表达的条件下培育宿主细胞；
- c) 将表达产物与淋巴细胞接触，并
- d) 确定淋巴细胞的活性。

优选，如通过将表达产物施用于动物而使表达产物与淋巴细胞在体内接触。淋巴细胞的活性可以比如通过对抗炎细胞因子的检测来测量。

或者，在 b 步骤中宿主细胞的表达产物可以先分离，接下来接触抗原呈递细胞和 T 细胞，然后可以确定 T 细胞的活性。

很显然在上述描述的筛选方法中被检测的肽可以是化学合成的。

得到鉴定的肽可用于含肽与药学可接受载体混合物的药物组合物的配制。

根据本发明，患有 T 细胞介导关节软骨破坏的患者可以用包含本发明的一或多种肽及药学可接受的载体的治疗组合物来进行治疗。根据本发明该药物组合物的施用能诱导系统免疫耐受，特别是这些患者特异的自身活性的 T 细胞的耐受，该耐受针对于疾病发作时关节软骨种的自身抗原性蛋白质以及其他显示已知的能结合 MHC II 类的 T 细胞抗原决定簇的自身抗原，该抗原决定簇为根据本发明的一或多种肽的氨基酸序列所表征或模拟。诱导的耐受从而导致疾病发作的关节软骨中炎症反应的减轻。

根据本发明（多）肽和免疫抑制药物的非特异抑制效应相比较的优势在于它们对自身反应性的 T 细胞有特异的作用效应，因此使免疫系统其他组分保持完好。

通过施用高或者低剂量根据本发明的肽可以获得系统免疫耐受。肽的量除了取决于患者基本健康条件和饮食以外，还依赖于用药途径、用药时间、患者年龄。

一般而言，每公斤体重的肽剂量为 0.01 至 10000 μg ，优选为 0.05 至 500 μg ，更优选施用的肽量为 0.1 至 100 μg 。

本领域技术人员熟知药学可接受的载体包括有：如无菌盐，乳糖，蔗糖，磷酸钙，白明胶，糊精，琼脂，果胶，花生油，橄榄油，芝麻油和水。如果需要包埋在脂质体中，其他载体可以是例如 MHC II 类分子。

另外根据本发明的药物组合物可以包含一或多种佐剂。合适的佐剂其中包括：氢氧化铝，磷酸铝，amphigen，生育酚，单磷脂酰甘油脂 A (monophosphoryl lipid A)，胞壁酰二肽和皂角苷比如 Quill A。优选地，用于根据本发明的耐受疗法的佐剂为如霍乱毒素 B-亚基或 carbomers 的粘膜佐剂，它们可以和粘膜上皮结合。佐剂的量取决于佐剂自身的特性。

另外根据本发明的药物组合物可含一或多种稳定剂，比如例如包括山梨糖醇，甘露醇，淀粉，蔗糖糊精（sucrodedextrin）和葡萄糖的碳水化合物，例如清蛋白或酪蛋白之类的蛋白以及像碱性磷酸盐这样的缓冲液。

适当的用药途径有：比如肌肉注射、皮下注射、静脉内注射或腹腔内注射、口服和如喷雾剂的鼻腔施用。

几种鼠模型表现出适于进行对（多）肽调节（自身）免疫反应的能力的测试，这些模型比如：在小鼠中由胶原蛋白诱导的关节炎（CIA），大鼠中的佐剂关节炎，小鼠的实验性（experimental）过敏脑脊髓炎和小鼠或转基因小鼠中的非肥大（non-obese）糖尿病（NOD）。在这些模型中抗原可由静脉内，腹腔内，口内或鼻腔内施用（Liblau 等人所著的综述，Immunol. Today, 18: 599-603, 1997）。为了利于这些模型的结果读出，增加置信区间就很重要。根据本发明已经发现在关节炎模型中的发病率和临床得分可以通过与将关节炎的最初引发物如 CIA 中的 II 型胶原蛋白和从细胞外基质蛋白聚蛋白聚糖衍生的肽结合而得到提高。尽管也可能进行分别的施用，该肽可能优选与原始引发物同时施用。

SCIM-1 或根据本发明的肽也都很适合用于诊断方法来检测参与慢性关节软骨炎的活化的自身反应性的 T 细胞的存在。

根据本发明该诊断方法包含以下步骤：

- a) 从个体血样中分离外周血液单核细胞（PBMC）；
- b) 在适合条件下培育上述 PBMC；
- c) 在自身抗原或其一或多种根据本发明的衍生肽存在时解育上述 PBMC 培养物，并且

d) 检测 T 细胞的反应，比如增殖反应，表明个体中存在活化的自身反应性的 T 细胞。

假如要通过测量自身反应性的 T 细胞的增殖反应来检测反应时，反射性同位素如 ^3H -胸苷的整合便是增殖反应的量度。PBMC 中存在的自身反应性的 T 细胞的反应也可由通过用细胞因子特异的 ELISA 测量细胞因子的释放，或是用 ^{51}Cr (铬) 释放测量细胞毒性来进行检测。另一种检测方法是通过 FACS 分析测量活化标记的表达量，例如 IL-2R 的。因而包含一或多种根据本发明的肽和合适的检测剂的诊断组合物也形成本发明的一部分。取决于检测的类型，检测试剂可以为放射性同位素、酶或是对细胞表面或活化标记特异的抗体。

同样含根据本发明的一或多种肽的测试试剂盒也在本发明的范围内。这些测试试剂盒适于用于根据本发明的诊断方法。

因此本发明提供了检测方法，检测与 SCIM-1 反应的自身攻击性的 T 细胞是否存在于患有 T 细胞介导的软骨破坏比如关节炎，尤其是类风湿性关节炎患者的体内。如果存在 SCIM-1 特异的 T 细胞，则用包含 SCIM-1 或是根据本发明的肽又或其组合物使这些 T 细胞的耐受能延迟或抑制关节炎的发展。

下面的实施例是对本发明的说明，决不能解释为对本发明范围有任何限定性。

图例

图 1

人类软骨 cDNA 的 RT-PCR，使用 SCIM-1 和 GAPDH 特异的寡核苷酸。图中出示了在健康软骨（膝盖，男性；交通事故；1 泳道）和来源于 4 位 RA 患者的软骨（膝盖/髌部，3 位女性和一位男性；2-5 泳道）中对 SCIM-1 基因表达的检测。对相同的 4 个 RA 样品进行的 GAPDH 基因表达检测在 7-10 泳道中出示。6 泳道为平行进行的 100bp 间隔阶梯的 DNA 片段长度标记（Gibco-BRL）（电泳中道的主条带对应长度为 600bp）。

图 2

SCIM-1 探针 (SEQ ID NO: 1 中核苷酸序列号 560-1048) 在特制关节 Northern 印迹 (上方栏) 上的杂交。所代表的人类细胞/组织: U937 单核细胞 + PMA-离子霉素 (1 泳道), HAEC 内皮细胞 - / + TNF α (分别对应 2-3 泳道), SCRO14.SF 初级滑膜成纤维细胞 + TNF α (4 泳道), PCG SV40.04 转化的软骨细胞 - / + TNF α (5-6 泳道, 分别对应), 和初级软骨细胞 - / + TNF α (分别对应 7-8 泳道)。每泳道加入 1-2 μ g 多聚 (A+) RNA。作为对照用 32 P 标记源于人类 β -肌动蛋白基因的 cDNA 探针检测该印迹 (下面的栏)。

图 3

由 4 个不同 SCIM-1 mRNA 种类, 即变异体 A-D 编码的不同的羧基末端。编码的 C-末端已指出并且氨基酸用单字母代码表示。序列从氨基酸 599 开始有所不同。变异体 A-D 编码的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO: 20-23 表示, 并且对应的核酸分别由 SEQ ID NO: 16-19 表示。

图 4

在转染的 CHO 细胞中检测 SCIM-1 变异体 A/His6 的表达。转染 pNGV1 (1 泳道) 或 pNGV1.SCIM1. 变异体 A (His6) (2 和 3 泳道) 的 CHO 细胞培养物上清液的样品在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上分离然后进行 Western 印迹。含有 (His6) 尾部的蛋白质可以通过抗 (His6) - 标签的单克隆抗体 (Dianova GMBH) 检测。4 泳道 (M) 为蛋白质分子重量标记。

实施例

实施例 1: SCIM-1 基因的鉴定

在 LifeSeq 数据库 (Incyte Pharmaceuticals) 能得到的 cDNA 文库根据其基因内容分组, 从而定义代表 RA 相关组织比如关节组织的专门组织类别。cDNA 文库间的距离用平方欧氏几何距离测量法 (squared Euclidian distance measurement) 计算, 而且结果利用未加权的平均连接方法 (unweighted average linkage method) 分组成树形 (Fry 1993, Biological Data Analysis, 牛津大学出版社, 纽约)。两个所得组包含 5 个分别从非肿瘤的滑膜或软骨组织衍生来的 cDNA 文库。每个滑液 cDNA 文库中能得到 4038 到 5627 序列反应的数据, 而每个软骨 cDNA 文库中能得到 1554 到 7231 的。检测这些序列数据来寻找其表达相对限于这些组的基因。两部分 cDNA 片段均由重叠的 Incyte-est 序列和 SEQ ID NO: 1 的部分组成, 经鉴定确定为阳性结果。由于它们的表达模式相似, 因此假定它们衍生于同一基因。

实施例 2: SCIM-1 基因在 RA 软骨中的表达

SCIM-1 基因在患病组织中的表达通过在 cDNA 上用 SCIM-1 特异的寡聚核苷酸 (SEQ ID NO: 3, 5'TTGCCAATTACGCCTACGGT 和 SEQ ID NO: 4, 5'CCTGGTCATTGTCAAAGTCGG) 进行 RT-PCR 得到检测, 该 cDNA 源于 4 个 RA 患者和一个健康捐献者的软骨样品。关节炎软骨通过膝盖的关节替换手术得到。从软骨中酶解分离得到软骨细胞 (Cornelissen 等人, 1993, J. Tiss. Cult. Meth. 15: 139-146), 并从中使用 Trizol (Gibco-BRL) 和 RNazol B (Campro Scientific) 分离 RNA。以 1 μ g 总 RNA 使用 SuperscriptTMII (Gibco-BRL) 在 20 μ l 总体积下进行 cDNA 合成。在对 SCIM-1 和作为正对照的持家基因 GAPDH 的 RT-PCR 中, 每反应使用 0.5 μ l cDNA。PCR 在 Perkin Elmer 9600 中进行: 94 $^{\circ}$ C 5 分钟 1 个循环, 94 $^{\circ}$ C 30 秒/55 $^{\circ}$ C 30 秒/72 $^{\circ}$ C 1 分钟 35 循环, 72 $^{\circ}$ C 5 分钟 1 循环, 在 25 μ l 总体积中加入 50ng/引物、200 μ M dNTPs、2.5u Taq 聚合酶 (Pharmacia, # 27-0799)。对 GAPDH 特异的寡核苷酸为 SEQ ID

NO: 5 (5'CCCTTCATTGACCTCAACTACATGG) 和 SEQ ID NO: 6 (5'GGTCCACCACCCTGTTGCTGTAGCC)。在琼脂糖凝胶上分析 PCR 样品 (图 1)。1-5 泳道清楚地给出了具有预期长度的来自于健康软骨 (宏观地) 和 4 个关节炎患者的 SCIM-1 cDNA 扩增产物的信号, 同时 GAPDH 特异扩增信号与 RA cDNA 制备物具有相同的数量级 (7-10 泳道)。RT-PCR 数据表明 SCIM-1 基因在患病组织, 即在检测的 4 个 RA 患者中, 所有 4 个遭受疾病的膝盖软骨中表达。SCIM-1 基因确实有可能在至少相当大比例的 RA 患者的患病关节软骨中表达。因此, 可以预计 SCIM-1 蛋白在 RA 患者患病的软骨中合成。

实施例 3: SCIM-1 基因在关节相关细胞中的表达

为了测定 SCIM-1 基因表达的组织分布, 使用 SCIM-1cDNA 片段为探针进行多种组织 Northern 印迹检测。通过使用 Ready-To-Go 珠 (Pharmacia) 和 ^{32}P - α -dCTP (Amersham), 对 SCIM-1cDNA nt (560-1048) 和 (1983-2427) (编号对应 SEQ ID NO: 1) 的片段随机引导标记产生探针。标记的探针在 1ml 的 Sephadex G50 介质柱上与游离核苷酸分离, 杂交混合物 (0.5M 磷酸盐缓冲液 pH7.0, 7% SDS, 1mMEDTA) 中加入约 3×10^6 cpm/ml 的标记探针, 并且在约 65°C 左右进行 16 小时的 Northern 印迹杂交。65°C 下用 0.5 \times SSC 洗涤印迹, 并将印迹在 STORM840TM 磷光屏下曝光。与 SEQ ID NO: 1 相关的 nt560-1048 探针与大脑中约 2.4kb 的 mRNA 和肺中约 3.0kb 的 mRNA (分别为 Clontech 人类多种组织 Northern 印迹 H2 和 H1, cat # 7759-1 和 7760-1) 杂交信号弱。除了在初级软骨细胞中有约 2.6kb 的明显信号外 (图 2, 上方栏 7-8 泳道), 在其他关节相关的培养细胞中没有观测到信号。根据以作为持家基因对照 (图 2, 下方栏) 的 β -肌动蛋白杂交信号的修正, SCIM-1 mRNA 的信号似乎由 TNF α (24 小时, 10ng/ml) 提高了 3-4 倍。利用另一 SCIM-1 探针, 即 nt (1983-2427), 在 Clontech 多种组织 Northern 印迹 H3 (cat # 7767-1) 和 H2 中没有观测到信号。用探针 nt (1983-2427) 在初级

软骨细胞 RNA 上杂交产生与用探针 nt (560-1048) (未出示) 相同的 2.6kb mRNA 的信号, 并包括 TNF α 对 SCIM-1 基因表达 3-4 倍的上调。用来源于有或未用 IL-1 孵育的软骨细胞的探针与 cDNA 微阵列杂交结果表明 SCIM-1 的表达有依赖于 IL-1 的 3 倍上调效应。同样用探针 nt (1983-2427) 对可能代表去分化细胞的 SV40 转染的人类细胞进行 Northern 印迹, 没有观察到信号存在。推断如下: i) SCIM-1 基因表达显示有限的组织分布; ii) 在大脑、肺和软骨细胞中检测到的不同长度的 mRNA 可能代表剪接变体; 而且 iii) 促炎症因子如 TNF 和 IL-1 增强 SCIM-1 的基因表达。

实施例 4: SCIM-1 全长 cDNA 的分离

在 TNF α 激活的初级人类软骨细胞 1 μ g 的总 RNA 产生的 RACE-cDNA 上用 SCIM-1 特异的寡核苷酸通过 SMART-RACE (# K1811-1, Clontech) 鉴定了人类 SCIM-1 的完整编码序列。软骨细胞从健康软骨 (膝盖) 中由酶法 (胶原酶) 分离得到, 单层培养 (Hamm's/F12, 10% FCS) 生长约 3 周后用 10ng/ml TNF α 激活 24 小时。寡核苷酸是根据从 Incyte 数据库中鉴定的两个基因片段 (实施例 1) 的序列而设计的。对第一个基因片段的引物为: 5'RACE 引物 SEQ ID NO: 7 (5'GGGTCCATTGTACCCCGCGACGACG) 和嵌套引物 SEQ ID NO: 8 (5'CTCAAAGTCCCCATCATGGTCC), 3'RACE 引物 SEQ ID NO: 9 (5'CTCAGCCGCTGTCCGTCTTCCGG) 和嵌套引物 SEQ ID NO: 10 (5'GCTTCAACAACAACACTGGCTGCG)。对第二个基因片段的引物为: 5'RACE 引物 SEQ ID NO: 11 (5' GGATGGGCTTGGGGAGGGTCTAGCTC) 和嵌套引物 SEQ ID NO: 12 (5'GCAGCAGCACAAGCCCACTTTC), 3'RACE 引物 SEQ ID NO: 13 (5'GTGCCCAGGGAGGTGGTGTCACTG) 和嵌套引物 SEQ ID NO: 14 (5'GCACAGGAAGTATGAGGACTTTAGTG)。根据 Clontech 手册 PT3269-1 (1999 年 3 月) 进行 SMART-RACE PCRs。对许多 RACE cDNA 克隆的测序产生 SEQ ID NO: 1 的重叠群 cDNA, 表明如实施例 1 中所鉴定的两个基因片段对应于称为 SCIM-1 的同一基因。在 nt59 处发

现翻译起始密码子，并且发现一个编码 653 个氨基酸的开放读码框。关于在软骨细胞中观察到长度为 2.6kb 的 mRNA，认为已鉴定 2589bp 的 SCIM-1 cDNA 很可能包含该对应基因的完整编码区。

一旦可以得到完整的 SCIM-1 cDNA，通过 blastsearches (NCBI-BLAST 2.0.10, 1999 年 8 月 26 日; Altschul 等人, *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402, 1997) 用 Incyte 和公开领域数据库的核酸和蛋白质序列进行比较。已发现几个公开序列和专利申请 W099/58660 中 1100bp 的 cDNA 序列和 SCIM-1 cDNA 的部分相同。由于不完全重叠，不能由这些公开 cDNA 片段重建完整的 SCIM-1 基因。根据我们完整的编码的 SCIM-1 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2)，做出了对 SCIM-1 功能蛋白结构域的预测。氨基酸 1-19 或 1-21 鉴定为信号序列，氨基酸 263-265 为结合整合蛋白的 RGD 基元，氨基酸 551-598 为结合钙的 EGF 样结构域，氨基酸 614-635 为推测的疏水区，以及氨基酸 12-20、39-47、149-157 和 323-331 为 MHC II 类 DR4Dw4 结合基元。

实施例 5: SCIM-1 剪接变异体和它们的组织分布

从涉及 SCIM-1 全长 cDNA 和所有包含与 SCIM-1 相同的序列的 Incyte 的和公开的 cDNA 的多重比对中发现 cDNA 群在核苷酸 1852 的下游 (编号根据 SEQ ID NO: 1) 是异质性的。该下游区编码直接跟随 EGF 样结构域的蛋白质 C-末端。根据对来源于不同组织 cDNA (分别对应 SEQ ID NO: 16-18; 3'-末端的不同从核苷酸位置 1853 开始) 的推论，鉴定出 SCIM-1 的四个不同的 C-末端区，即变异体 A-D (表格 1; 分别对应 SEQ ID NO: 19-21, C-末端的不同从氨基酸位置 599 开始)，这被认为是可变剪切事件造成的结果。对变异体 A、B 和 C, SEQ ID NO: 16-18 很可能分别包含相应 mRNA 的 3'末端，因为每一个都在推断的多聚-腺苷化信号 AATAAA 之后包含 3'poly (A) 尾部。变异体 A 和 B 中 3'UTR 区不同的长度与分别对软骨和大脑组织的 Northern 印迹中检测到的 SCIM-1 mRNA 长度是一致的 (见实施例

3)。在不同数据库中发现编码每个变异体 A-D 的 cDNA 克隆数目有力地表明 SCIM-1 变异体 A 主要在关节组织（软骨/滑膜）中表达，某种程度上在肿瘤和其他组织中有一定程度的表达，而变异体 B 的表达似乎限定于中枢神经系统组织（主要为大脑）。通过对所有大脑 cDNA（Clontech 人类大脑 Quick-clone cDNA, cat. 7187-1/lot 9070843）和初级软骨细胞（用 TNF- α 培养 24 小时，见实施例 4）cDNA 进行 RT-PCR，其中采用对 SCIM-1 变异体 B 特异的寡核苷酸引物，结果确证了这种推测的组织限定表达。合成 cDNA 和 PCR 的条件如实施例 2 中所描述。对照 PCR 用对持家基因 GAPDH（SEQ ID NO: 5 和 6）特异的寡核苷酸进行。在大脑组织中可以看到预期长度的 SCIM-1 变异体 B 的 mRNA 的强扩增信号，而在软骨细胞中几乎观测不到表达。对 GAPDH 基因表达进行的对照 PCR 在两种组织中都产生相似的信号，说明 PCR 中相应 cDNA 的加入量相当。发现由一约 2.4kb mRNA 表示的变异体 B 的表达在初级软骨细胞（24 小时/TNF- α ）中几乎检测不到，这与实施例 3 和 4 中的数据相符。在初级软骨细胞（24 小时/TNF- α ）（图 2, 8 泳道）中 Northern 印迹结果只检测到一条约 2.6kb 的 SCIM-1 变异体，推断其代表变异体 A，因为在对软骨细胞 cDNA 的 3'RACE 扩增中只产生变异体 A 序列（见 SEQ ID NO: 1）。

实施例 6: 重组 SCIM-1 的表达

将 SCIM-1（变异体 A）cDNA 克隆到克隆载体 pCR2.1TOPO（Invitrogen）中并作为 EcoR I 片段亚克隆到真核表达载体 pNGV1（EMBL 登记号 X99274）。随之，将 cDNA 置于 SV40 早期启动子和 Kozak 翻译起始序列之后。在翻译终止密码子上游插入编码 His6 标签的 18 个核苷酸。为了在真核细胞中产生重组 SCIM-1（His6）蛋白，将 CHO 细胞（ATCC CCL61）在含有 5% FCS（Harlan sera lab）的 DMEM/Hamm's F12 中培养。用 Transfectam（Promega）和含有 5% FCS 和 0.8mg/ml 新霉素的 DMEM/Hamm's F12 选择性培养基培养

(G418 sulfate Gibco BRL Life technology , 用 0.22 μ M Millipore SLGV025BS 滤膜过滤除菌) 将 pNGV1-SCIM-1 (His6) 构建体转染到 CHO-K1 细胞中。为了检测重组蛋白, 将细胞在无血清培养基 (含有 0.8mg/ml 新霉素) 上过夜培养并允许连续表达 1 天。无血清培养基上清用 SDS-PAGE 分析, 然后进行 Western 印迹并用抗-His6 单克隆抗体随后进行检测。印迹用以 PBS/0.05% Tween-20 配制的 5% 脱脂牛奶封闭, 并用鼠-抗 (His6) -标签抗体显示结果 (Dianova GMBH cat. no. Dia 900)。在室温用 PBST 每次 5 分钟地洗涤三次, 将印迹与抗-鼠-IgG-HRP (Promega cat no3624512) 孵育。在室温用 PBST 每次 5 分钟地洗涤三次, 用 HRP 的生色底物, 即 PBS 溶解的二氨基联苯胺四氢氯化物 (tetrahydrochloride), 2.5mM CoCl₂ 和 0.006% H₂O₂ 进行检测。

<110> Akzo Nobel N.V.

<120> 细胞外基质蛋白

<130>

<140>

<141>

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2589

<212> DNA

<213> 人类

<400> 1

```

aagcagtggg aacaacgcag agtacgcggg ggtataaagc gagcgcgctg accccggcat 60
gtccaggatg ttaccgttcc tgctgctgct ctggtttctg cccatcactg aggggtccca 120
gcgggctgaa cccatgttca ctgcagtcac caactcagtt ctgcctcctg actatgacag 180
taatcccacc cagctcaact atgggtgtggc agttactgat gtggaccatg atggggactt 240
tgagatcgtc gtggcggggg acaatggacc caacctgggt ctgaagtatg accgggcca 300
gaagcggctg gtgaacatcg cggtcgatga gcgcagctca ccctactacg cgctgcggga 360
ccggcagggg aacgccatcg gggtcacagc ctgcgacatc gacggggacg gccgggagga 420
gatctacttc ctcaacacca ataatgcctt ctgggggggt gccacgtaca ccgacaagtt 480
gttcaagttc cgcaataacc ggtgggaaga catcctgagc gatgaggtca acgtggcccg 540
tggtgtggcc agcctctttg ccggacgctc tgtggcctgt gtggacagaa agggctctgg 600
acgctactct atctacattg ccaattacgc ctacggtaat gtgggccctg atgccctcat 660
tgaaatggac cctgaggcca gtgacctctc ccggggcatt ctggcgctca gagatgtggc 720
tgctgaggct ggggtcagca aatatacagg gggccgaggc gtcagcgtgg gccccatcct 780
cagcagcagt gcctcggata tcttctgca caatgagaat gggcctaact tccttttcca 840
caaccggggc gatggcacct ttgtggacgc tgcgccagc gctggtgtgg acgaccccca 900
ccagcatggg cgaggtgtcg ccctggctga cttcaaccgt gatggcaaag tggacatcgt 960
ctatggcaac tggaatggcc cccaccgcct ctatctgcaa atgagcacc atgggaaggt 1020
ccgcttccgg gacatcgcct cacccaagtt ctccatgcc tcccctgtcc gcacggatcat 1080
caccgcccac tttgacaatg accaggagct ggagatcttc ttcaacaaca ttgcctaccg 1140
cagctcctca gccaaaccgcc tcttccgcgt catccgtaga gagcacggag acccctcat 1200
cgaggagctc aatcccggcg acgccttggg cctgagggc cggggcacag ggggtgtgg 1260
gaccgacttc gacggagacg ggatgctgga cctcatcttg tccatggag agtccatggc 1320
tcagccgctg tccgtcttcc ggggcaatca gggcttcaac aacaactggc tgcgagtgg 1380
gccacgcacc cggtttgggg cctttgccag gggagctaag gtcgtgctct acaccaagaa 1440
gagtggggcc cacctgagga tcatcgacgg gggctcaggc tacctgtgtg agatggagcc 1500
cgtggcacac tttggcctgg ggaaggatga agccagcag gtggaggtga cgtggccaga 1560
tggcaagatg gtgagccgga acgtggccag cggggagatg aactcagtgc tggagatcct 1620
ctacccccgg gatgaggaca cacttcagga cccagcccca ctggagtgtg gccaaagatt 1680

```

```

ctcccagcag gaaaatggcc attgcatgga caccaatgaa tgcattccagt tcccattcgt 1740
gtgccctcga gacaagccccg tatgtgtcaa cacctatgga agctacaggt gccggaccaa 1800
caagaagtgc agtcggggct acgagcccaa cgaggatggc acagcctgcg tggggactct 1860
cggccagtca ccgggcccc gccccaccac cccacecget gctgctgcca ctgccgctgc 1920
tgctgccgct gctggagctg ccaactgctgc accggtcctc gtagatggag atctcaatct 1980
ggggtcggtg gttaaggaga gctgagagcc cagctgctga gcaggggtgg gacatgaacc 2040
agcggatgga gtccagcagg ggagtgggaa agtgggcttg tgctgctgcc tagacagtag 2100
ggatgtaaag gcctgggagc tagaccctcc ccaagcccat ccatgcacat tacttagcta 2160
acaattaggg agactcgtaa ggccaggccc tgtgctgggc acatagctgt gatcacagca 2220
gacagggctg ctgccctgat ggcgcttaca ttccagtggg tctaatagacc atatcttagg 2280
acacagatgt gcccagggag gtggtgtcac tgcacaggaa gtatgaggac tttagtgtcc 2340
tgagttcaaa tcctgattca ggaactcaca aagctatgtg accttacacc agtcacttaa 2400
cttgtagcc atccattatc gcatctgcaa aatggggatt aagaatagaa tcttggggtt 2460
agtgtggaga ttagattaa tgtatgtaag acacttanca caaacctgg cacatagtaa 2520
aggctcaata aaaacaagtg cctctcactg ggctttgtca acacgtcaaa aaaaaaaaaa 2580
aaaaaaaaa 2589

```

<210> 2

<211> 653

<212> PRT

<213> 人类

<400> 2

```

Met Ser Arg Met Leu Pro Phe Leu Leu Leu Leu Trp Phe Leu Pro Ile
  1              5              10              15

```

```

Thr Glu Gly Ser Gln Arg Ala Glu Pro Met Phe Thr Ala Val Thr Asn
      20              25              30

```

```

Ser Val Leu Pro Pro Asp Tyr Asp Ser Asn Pro Thr Gln Leu Asn Tyr
      35              40              45

```

```

Gly Val Ala Val Thr Asp Val Asp His Asp Gly Asp Phe Glu Ile Val
      50              55              60

```

```

Val Ala Gly Tyr Asn Gly Pro Asn Leu Val Leu Lys Tyr Asp Arg Ala
      65              70              75              80

```

```

Gln Lys Arg Leu Val Asn Ile Ala Val Asp Glu Arg Ser Ser Pro Tyr
      85              90              95

```

```

Tyr Ala Leu Arg Asp Arg Gln Gly Asn Ala Ile Gly Val Thr Ala Cys
      100             105             110

```

```

Asp Ile Asp Gly Asp Gly Arg Glu Glu Ile Tyr Phe Leu Asn Thr Asn
      115             120             125

```

```

Asn Ala Phe Ser Gly Val Ala Thr Tyr Thr Asp Lys Leu Phe Lys Phe

```


Val Thr Asp Phe Asp Gly Asp Gly Met Leu Asp Leu Ile Leu Ser His
 405 410 415

Gly Glu Ser Met Ala Gln Pro Leu Ser Val Phe Arg Gly Asn Gln Gly
 420 425 430

Phe Asn Asn Asn Trp Leu Arg Val Val Pro Arg Thr Arg Phe Gly Ala
 435 440 445

Phe Ala Arg Gly Ala Lys Val Val Leu Tyr Thr Lys Lys Ser Gly Ala
 450 455 460

His Leu Arg Ile Ile Asp Gly Gly Ser Gly Tyr Leu Cys Glu Met Glu
 465 470 475 480

Pro Val Ala His Phe Gly Leu Gly Lys Asp Glu Ala Ser Ser Val Glu
 485 490 495

Val Thr Trp Pro Asp Gly Lys Met Val Ser Arg Asn Val Ala Ser Gly
 500 505 510

Glu Met Asn Ser Val Leu Glu Ile Leu Tyr Pro Arg Asp Glu Asp Thr
 515 520 525

Leu Gln Asp Pro Ala Pro Leu Glu Cys Gly Gln Gly Phe Ser Gln Gln
 530 535 540

Glu Asn Gly His Cys Met Asp Thr Asn Glu Cys Ile Gln Phe Pro Phe
 545 550 555 560

Val Cys Pro Arg Asp Lys Pro Val Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Tyr
 565 570 575

Arg Cys Arg Thr Asn Lys Lys Cys Ser Arg Gly Tyr Glu Pro Asn Glu
 580 585 590

Asp Gly Thr Ala Cys Val Gly Thr Leu Gly Gln Ser Pro Gly Pro Arg
 595 600 605

Pro Thr Thr Pro Thr Ala Ala Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 610 615 620

Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Pro Val Leu Val Asp Gly Asp Leu Asn
 625 630 635 640

Leu Gly Ser Val Val Lys Glu Ser Cys Glu Pro Ser Cys
 645 650

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<400> 3
ttgccaatta cgctacggt 20

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> 人类

<400> 4
cctggtcatt gtcaaagtcg g 21

<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> 人类

<400> 5
cccttcattg acctcaacta catgg 25

<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> 人类

<400> 6
ggtccaccac cctggtgctg tagcc 25

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> 人类

<400> 7
gggtccattg tacccegccca cgacg 25

<210> 8
<211> 22
<212> DNA

<213> 人类

<400> 8

ctcaaagtcc ccatcatggt cc 22

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> 人类

<400> 9

ctcagccgct gtccgtcttc cgg 23

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> 人类

<400> 10

gcttcaacaa caactggctg cg 22

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> 人类

<400> 11

ggatgggctt ggggagggtc tagctc 26

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> 人类

<400> 12

gcagcagcac aagcccactt tc 22

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> 人类

<400> 13

gtgccaggg aggtggtgtc actg 24

<210> 14
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人类

<400> 14
 gcacaggaag tatgaggact ttagtg 26

<210> 15
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人类

<400> 15
 gggatttaaa gtgcatataa ctgaagg 27

<210> 16
 <211> 2039
 <212> DNA
 <213> 人类

<400> 16
 aagcagtggg aacaacgcag agtacgcggg ggtataaagc gagcgcgctg accccggcat 60
 gtccaggatg ttaccgttcc tgctgctgct ctggtttctg cccatcactg aggggtccca 120
 gcgggctgaa cccatgttca ctgcagtcac caactcagtt ctgcctcctg actatgacag 180
 taatcccacc cagctcaact atgggtgtggc agttactgat gtggaccatg atggggactt 240
 tgagatcgtc gtggcggggg acaatggacc caacctgggt ctgaagtatg accgggcccc 300
 gaagcggctg gtgaacatcg cggtcgatga gcgcagctca ccctactacg cgctgcggga 360
 ccggcagggg aacgccatcg gggtcacagc ctgcgacatc gacggggacg gccgggagga 420
 gatctacttc ctcaacacca ataatgcctt ctcggggggtg gccacgtaca ccgacaagtt 480
 gttcaagttc cgcaataacc ggtgggaaga catcctgagc gatgaggtca acgtggcccg 540
 tggtgtggcc agcctctttg ccggacgctc tgtggcctgt gtggacagaa agggctctgg 600
 acgctactct atctacattg ccaattacgc ctacggtaat gtgggcccctg atgccctcat 660
 tgaaatggac cctgaggcca gtgacctctc ccggggcatt ctggcgctca gagatgtggc 720
 tgctgaggct ggggtcagca aatatacagg gggccgaggc gtcagcgtgg gccccatcct 780
 cagcagcagt gcctcggata tcttctgca caatgagaat gggcctaact tccttttcca 840
 caaccggggc gatggcacct ttgtggacgc tgcggccagt gctgggtgtgg acgaccccc 900
 ccagcatggg cgaggtgtcg cctgggctga cttcaaccgt gatggcaaag tggacatcgt 960
 ctatggcaac tggaatggcc cccaccgcct ctatctgcaa atgagcacc atgggaaggt 1020
 ccgcttccgg gacatgcct cacccaagtt ctccatgcc tcccctgtcc gcacggatcat 1080
 caccgccgac tttgacaatg accaggagct ggagatcttc ttcaacaaca ttgcctaccg 1140
 cagctcctca gccaaaccgc tcttccgcgt catccgtaga gagcacggag acccctcat 1200
 cgaggagctc aatcccggcg acgccttggg gcctgagggc cggggcacag ggggtgtggg 1260
 gaccgacttc gacggagacg ggatgctgga cctcatcttg tccatggag agtccatggc 1320
 tcagccgctg tccgtcttcc ggggcaatca gggcttcaac aacaactggc tgcgagtggg 1380

```

gccacgcacc cggtttgggg cctttgccag gggagctaag gtcgtgctct acaccaagaa 1440
gagtggggcc cacctgagga tcatcgacgg gggctcaggg tacctgtgtg agatggagcc 1500
cgtggcacac tttggcctgg ggaaggatga agccagcagt gtggaggtga cgtggccaga 1560
tggcaagatg gtgagccgga acgtggccag cggggagatg aactcagtgc tggagatcct 1620
ctacccccgg gatgaggaca cacttcagga cccagcccca ctggagtgtg gccaaaggatt 1680
ctcccagcag gaaaatggcc attgcatgga caccaatgaa tgcattccagt tcccattcgt 1740
gtgccctcga gacaagcccg tatgtgtcaa cacctatgga agctacaggt gccggaccaa 1800
caagaagtgc agtcggggct acgagcccaa cgaggatggc acagcctgcg tggctcaagt 1860
ggccttttta ggtgggtatt cttcagccgc ctctagaatc tctctcgggc 1920
ctcatatctt tctctaggcc ttggactttg ccttcagtta tatgcacttt aaatcccattc 1980
aataaaggaa aaaacaaaac aaaactaaca gcctttgtgg aaaactaaaa aaaaaaaaa 2039

```

<210> 17

<211> 2089

<212> DNA

<213> 人类

<400> 17

```

aagcagtggg aacaacgcag agtacgcggg ggtataaagc gagcgcgctg acccggcat 60
gtccaggatg ttaccgttcc tgctgctgct ctggtttctg cccatcactg aggggtccca 120
gcgggctgaa cccatgttca ctgcagtcac caactcagtt ctgcctcctg actatgacag 180
taatcccacc cagctcaact atggtgtggc agttactgat gtggaccatg atggggactt 240
tgagatcgtc gtggcggggg acaatggacc caacctgggt ctgaagtatg accgggcccc 300
gaagcgggctg gtgaacatcg cggtcgatga gcgcagctca ccctactacg cgctgcggga 360
ccggcagggg aacgccatcg gggtcacagc ctgcgacatc gacggggacg gccgggagga 420
gatctacttc ctcaacacca ataatgcctt ctcggggggtg gccacgtaca ccgacaagtt 480
gttcaagttc cgcaataacc ggtgggaaga catcctgagc gatgaggtca acgtggcccc 540
tgggtgtggcc agcctctttg ccggacgctc tgtggcctgt gtggacagaa agggctctgg 600
acgctactct atctacattg ccaattacgc ctacggtaat gtgggcccctg atgccctcat 660
tgaaatggac cctgaggcca gtgacctctc ccggggcatt ctggcgctca gagatgtggc 720
tgctgaggct ggggtcagca aatatacagg gggccgaggg gtccagcgtgg gccccatcct 780
cagcagcagt gcctcggata tcttctgcca caatgagaat gggcctaact tccttttcca 840
caaccggggc gatggcacct ttgtggacgc tgcggccagt gctggtgtgg acgaccccca 900
ccagcatggg cgagggtgctg ccctggctga cttcaaccgt gatggcaaag tggacatcgt 960
ctatggcaac tggaatggcc cccaccgcct ctatctgcaa atgagcacc atgggaaggt 1020
ccgcttcggg gacatcgctt caccacaagt ctccatgccc tcccctgtcc gcacggctcat 1080
caccgcccagc tttgacaatg accaggagct ggagatcttc ttcaacaaca ttgcctaccg 1140
cagctcctca gccaacgcc tcttccgctg catccgtaga gagcacggag acccctcat 1200
cgaggagctc aatcccggcg acgccttggg gcctgagggc cggggcacag ggggtgtggg 1260
gaccgacttc gacgggagacg ggatgctgga cctcatcttg tccatggag agtccatggc 1320
tcagccgctg tccgtcttcc ggggcaatca gggcttcaac aacaactggc tgcgagtggg 1380
gccacgcacc cggtttgggg cctttgccag gggagctaag gtcgtgctct acaccaagaa 1440
gagtggggcc cacctgagga tcatcgacgg gggctcaggg tacctgtgtg agatggagcc 1500
cgtggcacac tttggcctgg ggaaggatga agccagcagt gtggaggtga cgtggccaga 1560
tggcaagatg gtgagccgga acgtggccag cggggagatg aactcagtgc tggagatcct 1620
ctacccccgg gatgaggaca cacttcagga cccagcccca ctggagtgtg gccaaaggatt 1680
ctcccagcag gaaaatggcc attgcatgga caccaatgaa tgcattccagt tcccattcgt 1740
gtgccctcga gacaagcccg tatgtgtcaa cacctatgga agctacaggt gccggaccaa 1800

```

caagaagtgc	agtcggggct	acgagcccaa	cgaggatggc	acagcctgcg	tgggctggtg	1860
gagccctgtg	ttgaagatag	tgacaccaca	agttgggaag	agccttggtc	cctgaatcac	1920
tgaatcactg	ccttgaatca	ccgcctggaa	tacctgttga	tcaggaacac	ttacctggaa	1980
cttcaactgag	caggatacaa	acttctattg	tattaagcta	ttaatacatt	aagatattggg	2040
ggtgctacct	tacataataa	attcccattt	cctcttgaaa	aaaaaaaaaa		2089

<210> 18

<211> 2145

<212> DNA

<213> 人类

<400> 18

aagcagtggc	aacaacgcag	agtacgcggg	ggtataaagc	gagcgcgctg	accccgccat	60
gtccaggatg	ttaccgttcc	tgctgctgct	ctggtttctg	cccatcactg	aggggtccca	120
gcgggctgaa	cccatgttca	ctgcagtcac	caactcagtt	ctgcctcctg	actatgacag	180
taatcccacc	cagctcaact	atgggtgtggc	agttactgat	gtggaccatg	atggggactt	240
tgagatcgtc	gtggcggggc	acaatggacc	caacctgggt	ctgaagtatg	accgggcccc	300
gaagcggctg	gtgaacatcg	cggtcgatga	gcgcagctca	ccctactacg	cgctgcggga	360
ccggcagggg	aacgccatcg	gggtcacagc	ctgcgacatc	gacggggacg	gccggggagga	420
gatctacttc	ctcaacacca	ataatgcctt	ctcgggggtg	gccacgtaca	ccgacaagtt	480
gttcaagtcc	cgcaataacc	ggtgggaaga	catcctgagc	gatgaggcca	acgtggcccc	540
tggtgtggcc	agcctctttg	ccggacgctc	tgtggcctgt	gtggacagaa	agggctctgg	600
acgctactct	atctacattg	ccaattacgc	ctacggtaat	gtggggcctg	atgccctcat	660
tgaaatggac	cctgaggcca	gtgacctctc	ccggggcatt	ctggcgctca	gagatgtggc	720
tgctgaggct	ggggtcagca	aatatacagg	gggcccaggg	gtcagcgtgg	gccccatcct	780
cagcagcagc	gcctcggata	tcttctgcga	caatgagaat	gggcctaact	tccttttcca	840
caaccggggc	gatggcacct	ttgtggacgc	tgccggccagt	gctgggtgtg	acgaccccc	900
ccagcatggg	cgagggtgctg	ccctggctga	cttcaaccgt	gatggcaaac	tggacatcgt	960
ctatggcaac	tggaatggcc	cccaccgcct	ctatctgcaa	atgagcacc	atgggaaggt	1020
ccgcttccgg	gacatcgctc	cacccaagtt	ctccatgccc	tcccctgtcc	gcacggtcac	1080
caccgcccac	tttgacaatg	accaggagct	ggagatcttc	ttcaacaaca	ttgcctaccg	1140
cagctcctca	gccaaccgcc	tcttccgctg	catccgtaga	gagcacggag	acccctcat	1200
cgaggagctc	aatcccggcg	acgccttggc	gcctgagggc	cggggcacag	ggggtgtggt	1260
gaccgacttc	gacggagacg	ggatgctgga	cctcatcttg	tcccatggag	agtccatggc	1320
tcagccgctg	tccgtcttcc	ggggcaatca	gggcttcaac	aacaactggc	tgcgagtggc	1380
gccacgcacc	cggtttgggg	cctttgccag	gggagctaac	gtcgtgctct	acaccaagaa	1440
gagtggggcc	cacctgagga	tcatcgacgg	gggctcaggg	tacctgtgtg	agatggagcc	1500
cgtggcacac	tttggcctgg	ggaaggatga	agccagcagt	gtggaggatg	cgtggccaga	1560
tggcaagatg	gtgagccgga	acgtggccag	cggggagatg	aactcagtgc	tggagatcct	1620
ctacccccgg	gatgaggaca	cacttcagga	cccagcccc	ctggagtgtg	gccaaggatt	1680
ctcccagcag	gaaaatggcc	attgcatgga	caccaatgaa	tgcatccagt	tcccattcgt	1740
gtgccctcga	gacaagcccg	tatgtgtcaa	cacctatgga	agctacaggt	gccggaccaa	1800
caagaagtgc	agtcggggct	acgagcccaa	cgaggatggc	acagcctgcg	tggaaaagaac	1860
cttgctactt	ggtctctgca	atctccttgg	aaaatagaat	gctcctgtag	ccagaacact	1920
ctttggaaat	gatgtaacgc	cacagaatat	gctcacgacc	agcctcagta	gtgaaggctt	1980
gttataaaac	atagatctat	tcttcatggg	gaaaaaaagt	catcccagga	tataataaaa	2040
ttacacttaa	gaatgcagca	acccttttaa	aaacatattc	aacaaaaaaa	agcccctgcc	2100
gttttctgat	atcatagtaa	tactccta	aatcacaaa	atatg		2145

<210> 19
 <211> 637
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 19
 Met Ser Arg Met Leu Pro Phe Leu Leu Leu Leu Trp Phe Leu Pro Ile
 1 5 10 15
 Thr Glu Gly Ser Gln Arg Ala Glu Pro Met Phe Thr Ala Val Thr Asn
 20 25 30
 Ser Val Leu Pro Pro Asp Tyr Asp Ser Asn Pro Thr Gln Leu Asn Tyr
 35 40 45
 Gly Val Ala Val Thr Asp Val Asp His Asp Gly Asp Phe Glu Ile Val
 50 55 60
 Val Ala Gly Tyr Asn Gly Pro Asn Leu Val Leu Lys Tyr Asp Arg Ala
 65 70 75 80
 Gln Lys Arg Leu Val Asn Ile Ala Val Asp Glu Arg Ser Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Tyr Ala Leu Arg Asp Arg Gln Gly Asn Ala Ile Gly Val Thr Ala Cys
 100 105 110
 Asp Ile Asp Gly Asp Gly Arg Glu Glu Ile Tyr Phe Leu Asn Thr Asn
 115 120 125
 Asn Ala Phe Ser Gly Val Ala Thr Tyr Thr Asp Lys Leu Phe Lys Phe
 130 135 140
 Arg Asn Asn Arg Trp Glu Asp Ile Leu Ser Asp Glu Val Asn Val Ala
 145 150 155 160
 Arg Gly Val Ala Ser Leu Phe Ala Gly Arg Ser Val Ala Cys Val Asp
 165 170 175
 Arg Lys Gly Ser Gly Arg Tyr Ser Ile Tyr Ile Ala Asn Tyr Ala Tyr
 180 185 190
 Gly Asn Val Gly Pro Asp Ala Leu Ile Glu Met Asp Pro Glu Ala Ser
 195 200 205
 Asp Leu Ser Arg Gly Ile Leu Ala Leu Arg Asp Val Ala Ala Glu Ala
 210 215 220

Gly Val Ser Lys Tyr Thr Gly Gly Arg Gly Val Ser Val Gly Pro Ile
 225 230 235 240

Leu Ser Ser Ser Ala Ser Asp Ile Phe Cys Asp Asn Glu Asn Gly Pro
 245 250 255

Asn Phe Leu Phe His Asn Arg Gly Asp Gly Thr Phe Val Asp Ala Ala
 260 265 270

Ala Ser Ala Gly Val Asp Asp Pro His Gln His Gly Arg Gly Val Ala
 275 280 285

Leu Ala Asp Phe Asn Arg Asp Gly Lys Val Asp Ile Val Tyr Gly Asn
 290 295 300

Trp Asn Gly Pro His Arg Leu Tyr Leu Gln Met Ser Thr His Gly Lys
 305 310 315 320

Val Arg Phe Arg Asp Ile Ala Ser Pro Lys Phe Ser Met Pro Ser Pro
 325 330 335

Val Arg Thr Val Ile Thr Ala Asp Phe Asp Asn Asp Gln Glu Leu Glu
 340 345 350

Ile Phe Phe Asn Asn Ile Ala Tyr Arg Ser Ser Ser Ala Asn Arg Leu
 355 360 365

Phe Arg Val Ile Arg Arg Glu His Gly Asp Pro Leu Ile Glu Glu Leu
 370 375 380

Asn Pro Gly Asp Ala Leu Glu Pro Glu Gly Arg Gly Thr Gly Gly Val
 385 390 395 400

Val Thr Asp Phe Asp Gly Asp Gly Met Leu Asp Leu Ile Leu Ser His
 405 410 415

Gly Glu Ser Met Ala Gln Pro Leu Ser Val Phe Arg Gly Asn Gln Gly
 420 425 430

Phe Asn Asn Asn Trp Leu Arg Val Val Pro Arg Thr Arg Phe Gly Ala
 435 440 445

Phe Ala Arg Gly Ala Lys Val Val Leu Tyr Thr Lys Lys Ser Gly Ala
 450 455 460

His Leu Arg Ile Ile Asp Gly Gly Ser Gly Tyr Leu Cys Glu Met Glu
 465 470 475 480

Pro Val Ala His Phe Gly Leu Gly Lys Asp Glu Ala Ser Ser Val Glu
485 490 495

Val Thr Trp Pro Asp Gly Lys Met Val Ser Arg Asn Val Ala Ser Gly
500 505 510

Glu Met Asn Ser Val Leu Glu Ile Leu Tyr Pro Arg Asp Glu Asp Thr
515 520 525

Leu Gln Asp Pro Ala Pro Leu Glu Cys Gly Gln Gly Phe Ser Gln Gln
530 535 540

Glu Asn Gly His Cys Met Asp Thr Asn Glu Cys Ile Gln Phe Pro Phe
545 550 555 560

Val Cys Pro Arg Asp Lys Pro Val Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Tyr
565 570 575

Arg Cys Arg Thr Asn Lys Lys Cys Ser Arg Gly Tyr Glu Pro Asn Glu
580 585 590

Asp Gly Thr Ala Cys Val Ala Gln Val Ala Phe Leu Gly Gly Tyr Ser
595 600 605

Ser Ala Ala Ser Arg Ile Ser Glu Pro Leu Ser Arg Ala Ser Tyr Leu
610 615 620

Ser Leu Gly Leu Gly Leu Cys Leu Gln Leu Tyr Ala Leu
625 630 635

<210> 20

<211> 618

<212> PRT

<213> 人类

<400> 20

Met Ser Arg Met Leu Pro Phe Leu Leu Leu Leu Trp Phe Leu Pro Ile
1 5 10 15

Thr Glu Gly Ser Gln Arg Ala Glu Pro Met Phe Thr Ala Val Thr Asn
20 25 30

Ser Val Leu Pro Pro Asp Tyr Asp Ser Asn Pro Thr Gln Leu Asn Tyr
35 40 45

Gly Val Ala Val Thr Asp Val Asp His Asp Gly Asp Phe Glu Ile Val
50 55 60

Val Ala Gly Tyr Asn Gly Pro Asn Leu Val Leu Lys Tyr Asp Arg Ala
 65 70 75 80
 Gln Lys Arg Leu Val Asn Ile Ala Val Asp Glu Arg Ser Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Tyr Ala Leu Arg Asp Arg Gln Gly Asn Ala Ile Gly Val Thr Ala Cys
 100 105 110
 Asp Ile Asp Gly Asp Gly Arg Glu Glu Ile Tyr Phe Leu Asn Thr Asn
 115 120 125
 Asn Ala Phe Ser Gly Val Ala Thr Tyr Thr Asp Lys Leu Phe Lys Phe
 130 135 140
 Arg Asn Asn Arg Trp Glu Asp Ile Leu Ser Asp Glu Val Asn Val Ala
 145 150 155 160
 Arg Gly Val Ala Ser Leu Phe Ala Gly Arg Ser Val Ala Cys Val Asp
 165 170 175
 Arg Lys Gly Ser Gly Arg Tyr Ser Ile Tyr Ile Ala Asn Tyr Ala Tyr
 180 185 190
 Gly Asn Val Gly Pro Asp Ala Leu Ile Glu Met Asp Pro Glu Ala Ser
 195 200 205
 Asp Leu Ser Arg Gly Ile Leu Ala Leu Arg Asp Val Ala Ala Glu Ala
 210 215 220
 Gly Val Ser Lys Tyr Thr Gly Gly Arg Gly Val Ser Val Gly Pro Ile
 225 230 235 240
 Leu Ser Ser Ser Ala Ser Asp Ile Phe Cys Asp Asn Glu Asn Gly Pro
 245 250 255
 Asn Phe Leu Phe His Asn Arg Gly Asp Gly Thr Phe Val Asp Ala Ala
 260 265 270
 Ala Ser Ala Gly Val Asp Asp Pro His Gln His Gly Arg Gly Val Ala
 275 280 285
 Leu Ala Asp Phe Asn Arg Asp Gly Lys Val Asp Ile Val Tyr Gly Asn
 290 295 300
 Trp Asn Gly Pro His Arg Leu Tyr Leu Gln Met Ser Thr His Gly Lys
 305 310 315 320
 Val Arg Phe Arg Asp Ile Ala Ser Pro Lys Phe Ser Met Pro Ser Pro

			325						330				335			
Val	Arg	Thr	Val	Ile	Thr	Ala	Asp	Phe	Asp	Asn	Asp	Gln	Glu	Leu	Glu	
			340					345					350			
Ile	Phe	Phe	Asn	Asn	Ile	Ala	Tyr	Arg	Ser	Ser	Ser	Ala	Asn	Arg	Leu	
			355				360					365				
Phe	Arg	Val	Ile	Arg	Arg	Glu	His	Gly	Asp	Pro	Leu	Ile	Glu	Glu	Leu	
			370			375					380					
Asn	Pro	Gly	Asp	Ala	Leu	Glu	Pro	Glu	Gly	Arg	Gly	Thr	Gly	Gly	Val	
385					390					395					400	
Val	Thr	Asp	Phe	Asp	Gly	Asp	Gly	Met	Leu	Asp	Leu	Ile	Leu	Ser	His	
				405					410						415	
Gly	Glu	Ser	Met	Ala	Gln	Pro	Leu	Ser	Val	Phe	Arg	Gly	Asn	Gln	Gly	
			420					425					430			
Phe	Asn	Asn	Asn	Trp	Leu	Arg	Val	Val	Pro	Arg	Thr	Arg	Phe	Gly	Ala	
			435				440					445				
Phe	Ala	Arg	Gly	Ala	Lys	Val	Val	Leu	Tyr	Thr	Lys	Lys	Ser	Gly	Ala	
			450			455					460					
His	Leu	Arg	Ile	Ile	Asp	Gly	Gly	Ser	Gly	Tyr	Leu	Cys	Glu	Met	Glu	
465					470					475					480	
Pro	Val	Ala	His	Phe	Gly	Leu	Gly	Lys	Asp	Glu	Ala	Ser	Ser	Val	Glu	
				485					490						495	
Val	Thr	Trp	Pro	Asp	Gly	Lys	Met	Val	Ser	Arg	Asn	Val	Ala	Ser	Gly	
			500					505					510			
Glu	Met	Asn	Ser	Val	Leu	Glu	Ile	Leu	Tyr	Pro	Arg	Asp	Glu	Asp	Thr	
		515					520					525				
Leu	Gln	Asp	Pro	Ala	Pro	Leu	Glu	Cys	Gly	Gln	Gly	Phe	Ser	Gln	Gln	
		530				535					540					
Glu	Asn	Gly	His	Cys	Met	Asp	Thr	Asn	Glu	Cys	Ile	Gln	Phe	Pro	Phe	
545				550						555					560	
Val	Cys	Pro	Arg	Asp	Lys	Pro	Val	Cys	Val	Asn	Thr	Tyr	Gly	Ser	Tyr	
				565					570						575	
Arg	Cys	Arg	Thr	Asn	Lys	Lys	Cys	Ser	Arg	Gly	Tyr	Glu	Pro	Asn	Glu	
			580					585						590		

Asp Gly Thr Ala Cys Val Gly Trp Trp Ser Pro Val Leu Lys Ile Val
595 600 605

Thr Pro Gln Val Gly Lys Ser Leu Gly Pro
610 615

<210> 21

<211> 612

<212> PRT

<213> 人类

<400> 21

Met Ser Arg Met Leu Pro Phe Leu Leu Leu Leu Trp Phe Leu Pro Ile
1 5 10 15

Thr Glu Gly Ser Gln Arg Ala Glu Pro Met Phe Thr Ala Val Thr Asn
20 25 30

Ser Val Leu Pro Pro Asp Tyr Asp Ser Asn Pro Thr Gln Leu Asn Tyr
35 40 45

Gly Val Ala Val Thr Asp Val Asp His Asp Gly Asp Phe Glu Ile Val
50 55 60

Val Ala Gly Tyr Asn Gly Pro Asn Leu Val Leu Lys Tyr Asp Arg Ala
65 70 75 80

Gln Lys Arg Leu Val Asn Ile Ala Val Asp Glu Arg Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

Tyr Ala Leu Arg Asp Arg Gln Gly Asn Ala Ile Gly Val Thr Ala Cys
100 105 110

Asp Ile Asp Gly Asp Gly Arg Glu Glu Ile Tyr Phe Leu Asn Thr Asn
115 120 125

Asn Ala Phe Ser Gly Val Ala Thr Tyr Thr Asp Lys Leu Phe Lys Phe
130 135 140

Arg Asn Asn Arg Trp Glu Asp Ile Leu Ser Asp Glu Val Asn Val Ala
145 150 155 160

Arg Gly Val Ala Ser Leu Phe Ala Gly Arg Ser Val Ala Cys Val Asp
165 170 175

Arg Lys Gly Ser Gly Arg Tyr Ser Ile Tyr Ile Ala Asn Tyr Ala Tyr
180 185 190

Gly Asn Val Gly Pro Asp Ala Leu Ile Glu Met Asp Pro Glu Ala Ser
 195 200 205

Asp Leu Ser Arg Gly Ile Leu Ala Leu Arg Asp Val Ala Ala Glu Ala
 210 215 220

Gly Val Ser Lys Tyr Thr Gly Gly Arg Gly Val Ser Val Gly Pro Ile
 225 230 235 240

Leu Ser Ser Ser Ala Ser Asp Ile Phe Cys Asp Asn Glu Asn Gly Pro
 245 250 255

Asn Phe Leu Phe His Asn Arg Gly Asp Gly Thr Phe Val Asp Ala Ala
 260 265 270

Ala Ser Ala Gly Val Asp Asp Pro His Gln His Gly Arg Gly Val Ala
 275 280 285

Leu Ala Asp Phe Asn Arg Asp Gly Lys Val Asp Ile Val Tyr Gly Asn
 290 295 300

Trp Asn Gly Pro His Arg Leu Tyr Leu Gln Met Ser Thr His Gly Lys
 305 310 315 320

Val Arg Phe Arg Asp Ile Ala Ser Pro Lys Phe Ser Met Pro Ser Pro
 325 330 335

Val Arg Thr Val Ile Thr Ala Asp Phe Asp Asn Asp Gln Glu Leu Glu
 340 345 350

Ile Phe Phe Asn Asn Ile Ala Tyr Arg Ser Ser Ser Ala Asn Arg Leu
 355 360 365

Phe Arg Val Ile Arg Arg Glu His Gly Asp Pro Leu Ile Glu Glu Leu
 370 375 380

Asn Pro Gly Asp Ala Leu Glu Pro Glu Gly Arg Gly Thr Gly Gly Val
 385 390 395 400

Val Thr Asp Phe Asp Gly Asp Gly Met Leu Asp Leu Ile Leu Ser His
 405 410 415

Gly Glu Ser Met Ala Gln Pro Leu Ser Val Phe Arg Gly Asn Gln Gly
 420 425 430

Phe Asn Asn Asn Trp Leu Arg Val Val Pro Arg Thr Arg Phe Gly Ala
 435 440 445

Phe Ala Arg Gly Ala Lys Val Val Leu Tyr Thr Lys Lys Ser Gly Ala
 450 455 460

His Leu Arg Ile Ile Asp Gly Gly Ser Gly Tyr Leu Cys Glu Met Glu
 465 470 475 480

Pro Val Ala His Phe Gly Leu Gly Lys Asp Glu Ala Ser Ser Val Glu
 485 490 495

Val Thr Trp Pro Asp Gly Lys Met Val Ser Arg Asn Val Ala Ser Gly
 500 505 510

Glu Met Asn Ser Val Leu Glu Ile Leu Tyr Pro Arg Asp Glu Asp Thr
 515 520 525

Leu Gln Asp Pro Ala Pro Leu Glu Cys Gly Gln Gly Phe Ser Gln Gln
 530 535 540

Glu Asn Gly His Cys Met Asp Thr Asn Glu Cys Ile Gln Phe Pro Phe
 545 550 555 560

Val Cys Pro Arg Asp Lys Pro Val Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Tyr
 565 570 575

Arg Cys Arg Thr Asn Lys Lys Cys Ser Arg Gly Tyr Glu Pro Asn Glu
 580 585 590

Asp Gly Thr Ala Cys Val Glu Arg Thr Leu Leu Leu Gly Leu Cys Asn
 595 600 605

Leu Leu Gly Lys
 610

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

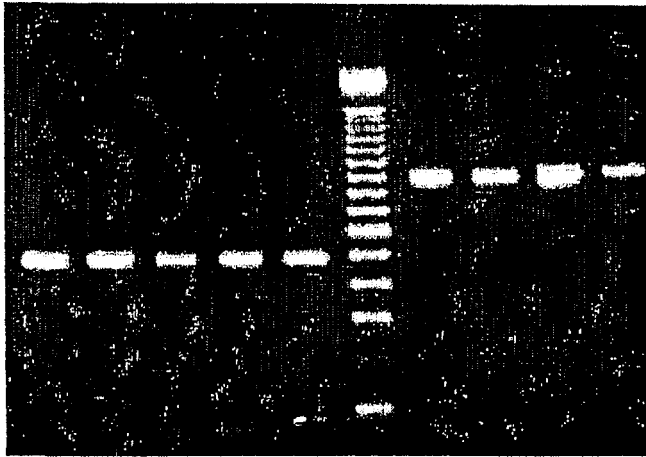


图 1

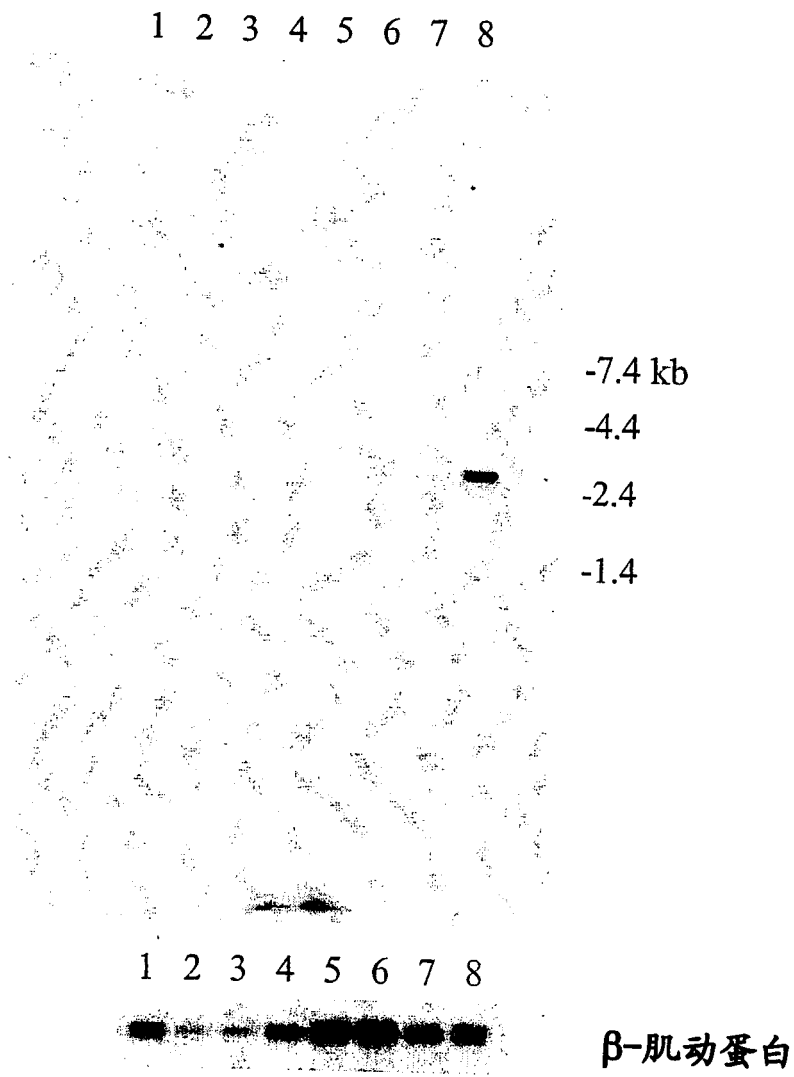


图 2

编码的 SCIM-1 多肽羧基末端
<p>变异体 A</p> <p>↓ aa598</p> <p>...NEDGTACV GTLGQSPGPRPTTPTAAAATAAAAAA AGAATAAPVLVDGDLNLGSVVKESCEPSC (aa653)</p>
<p>变异体 B</p> <p>...NEDGTACV AQVAFLGGYSSAASRISEPLSRASYLSLGLGLCLQLYAL aa637)</p>
<p>变异体 C</p> <p>...NEDGTACV GWWSPVLKIVTPQVGKSLGP (aa618)</p>
<p>变异体 D</p> <p>...NEDGTACV ERTLLLGLCNLLGK (aa612)</p>

图 3

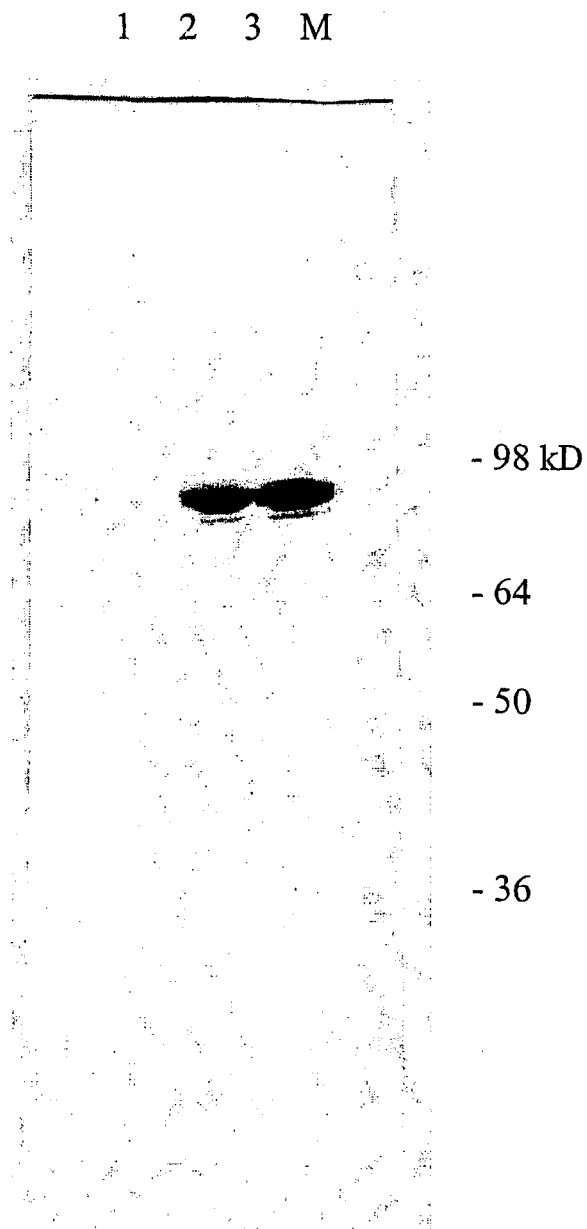


图 4

专利名称(译)	细胞外基质蛋白		
公开(公告)号	CN1441843A	公开(公告)日	2003-09-10
申请号	CN01812623.5	申请日	2001-07-09
[标]申请(专利权)人(译)	阿克佐诺贝尔公司		
申请(专利权)人(译)	阿克佐诺贝尔公司		
当前申请(专利权)人(译)	阿克佐诺贝尔公司		
发明人	H·C·休斯 R·L·H·奈里森 C·M·L·缪维斯		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K38/17 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/06 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12N15/85 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 C07K14/4713 A61P19/02 A61P29/00		
代理人(译)	唐伟杰		
优先权	2000202495 2000-07-13 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明描述用于防止炎症，更具体地用于在患有类风湿性关节炎的患者体内诱导T细胞对其耐受的蛋白。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

