

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480025362.0

[51] Int. Cl.

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2006年10月11日

[11] 公开号 CN 1845752A

[22] 申请日 2004.7.23

[21] 申请号 200480025362.0

[30] 优先权

[32] 2003.7.23 [33] EP [31] 03077316.2

[86] 国际申请 PCT/EP2004/051596 2004.7.23

[87] 国际公布 WO2005/011728 英 2005.2.10

[85] 进入国家阶段日期 2006.3.3

[71] 申请人 应用研究系统 ARS 股份公司

地址 荷属安的列斯群岛库拉索市

[72] 发明人 Y·奇韦提克

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 范征

权利要求书 2 页 说明书 35 页 序列表 17 页
附图 7 页

[54] 发明名称

可溶性 CD164 在炎性和/或自身免疫性疾病中的应用

[57] 摘要

本发明涉及包含人 CD164 的细胞外区域的可溶蛋白新的治疗用途，特别是用于治疗炎性和/或自身免疫性疾病。

1. 一种可溶蛋白在制备治疗和/或预防炎性或/和自身免疫性疾病的药物中的应用, 其特征在于, 所述可溶蛋白包括一与人 CD164 (SEQ ID NO: 1)的细胞外区域的成熟形式至少 85%同源的序列。
2. 如权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, 所述的可溶蛋白选自:
 - a) SEQ ID NO: 1; 或
 - b) 融合于人 CD 164 信号序列的 SEQ ID NO: 1。
3. 如权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, 所述的可溶蛋白是一种活性突变蛋白或一种 SEQ ID NO: 1 的异构体。
4. 如权利要求 3 所述的应用, 其特征在于, 所述的可溶蛋白选自:
 - a) MGC-24 (SEQ ID NO: 6); 或
 - b) 任何如下的人 CD164 异构体的细胞外区域的成熟形式: CD164-delta 4 (SEQ ID NO: 4)、CD164-delta 5 (SEQ ID NO: 5)。
5. 如上述权利要求中任何一项所述的应用, 其特征在于, 所述的可溶蛋白是糖基化的。
6. 如权利要求 5 所述的应用, 其特征在于, 所述的可溶蛋白糖基化位点在如 SEQ ID NO: 1 中规定的任何位置。
7. 如上述权利要求中任何一项所述的应用, 其特征在于, 所述的可溶蛋白是磷酸化的。
8. 如权利要求 7 所述的应用, 其特征在于, 所述的可溶蛋白磷酸化位点在如 SEQ ID NO: 1 中规定的任何位置。
9. 如上述权利要求中任何一项所述的应用, 其特征在于, 所述的可溶蛋白是豆蔻酰化的。
10. 如权利要求 9 所述的应用, 其特征在于, 所述的可溶蛋白豆蔻酰化位点在如 SEQ ID NO: 1 中规定的任何位置。
11. 如上述权利要求中任何一项所述的应用, 其特征在于, 所述的可溶蛋白是一可溶的融合蛋白。
12. 如权利要求 11 所述的应用, 其特征在于, 所述的可溶的融合蛋白包含一信号序列。
13. 如权利要求 11 或 12 所述的应用, 其特征在于, 所述的可溶的融合蛋白含有一组氨基酸标记。
14. 如权利要求 13 所述的应用, 其特征在于, 所述的可溶融合蛋白是 SEQ ID NO: 2。

15. 如权利要求 11 或 12 所述的应用, 其特征在于, 所述的可溶的融合蛋白包括一免疫球蛋白的 Fc 区域。

16. 如上述权利要求中任何一项所述的应用, 其特征在于, 所述的可溶蛋白是一活性衍生物, 一抗蛋白水解的修饰形式, 一结合物, 一复合物, 一片段, 一前体和/或一盐。

17. 编码一可溶蛋白的一多核苷酸序列在制备治疗和/或预防炎性或/和自身免疫性疾病的药物中的应用, 其特征在于, 所述蛋白包含一与人 CD164 (SEQ ID NO: 1)的细胞外区域的成熟形式至少 85%同源的序列。

18. 如上述权利要求中任何一项所述的应用, 其特征在于, 所述的炎性和/或自身免疫性疾病选自如下疾病组成的组: 多发性硬化、系统性红斑狼疮、风湿性关节炎、青少年自发性关节炎、银屑病关节炎、骨关节炎、脊椎关节病、炎症性肠病、内毒素血症、克隆病、斯蒂尔氏病、眼色素层炎、韦格纳肉芽肿病、贝赫切特病、硬皮病、舍格伦综合症、肉状瘤病、坏疽性脓皮病、多肌炎、皮肌炎、心肌炎、牛皮癣、系统性硬化症、C 型肝炎、变态反应、变应性炎症、变应性气道炎症、慢性梗阻性肺病(COPD)、肠系膜梗塞、中风、溃疡性结肠炎、变应型哮喘、支气管哮喘、肠系膜梗塞、中风、纤维症、肌肉中的缺血后炎症、肾和心、皮肤炎症、血管球性肾炎、青少年糖尿病 I 型、超敏性疾病、病毒或急性肝脏疾病、酒精性肝衰竭、结核病、败血病休克、HIV 感染、移植物抗宿主病(GVHD)和动脉硬化症。

19. 一种抑制一个或多个细胞因子在个体中表达的方法, 其特征在于, 所述的方法包括施加给所述个体一种包含一可溶蛋白的组合物, 所述可溶蛋白包括一与人 CD164 (SEQ ID NO: 1)的细胞外区域的成熟形式至少 85%同源的序列。

20. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述的细胞因子是 TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-5 或 IL-10。

21. 一种治疗炎性和/或自身免疫性疾病的药物组合物, 其特征在于, 所述组合物包括一可溶蛋白, 所述的可溶蛋白包括一与人 CD164 (SEQ ID NO: 1)的细胞外区域的成熟形式至少 85%同源的序列, 以及一个或多个制药上可接受的赋形剂。

22. 作为细胞因子分泌和表达抑制剂的化合物特性的鉴别和比较的包括一可溶蛋白的筛检方法, 其特征在于, 所述的可溶蛋白包含一与人 CD164 (SEQ ID NO: 1)的细胞外区域的成熟形式至少 85%同源的序列。

23. 作为细胞因子分泌和表达抑制剂的化合物特性的鉴别和比较试剂盒, 其特征在于, 所述的试剂盒包括一可溶蛋白, 所述的可溶蛋白包含一与人 CD164 (SEQ ID NO: 1)的细胞外区域的成熟形式至少 85%同源的序列。

可溶性 CD164 在炎性和/或自身免疫性疾病中的应用

技术领域

本发明涉及炎症和自身免疫疾病的领域，特别是涉及炎性和/或自身免疫疾病的预防和/或治疗用的新蛋白质的发现。

背景技术

以下讨论是为了易于对本发明的理解，而不是意指或者认为其为本发明的现有技术。

CD164 是糖蛋白中的类粘蛋白受体或涎粘蛋白总科的成员之一。涎粘蛋白是跨膜糖蛋白，其分子量为 50-3000 千道尔顿，在 cDNA 和氨基酸水平上呈现出有限相似性。类粘蛋白表达的蛋白质有共同的特性，即大量的 O 糖基化连接在丝氨酸和苏氨酸残基上，它可以推断出多种细胞-细胞或细胞-细胞外质之间的相互作用。O 交联侧链的密集排列特征为：一使许多类粘蛋白分子足够长的延伸结构，其突出在多聚糖远端的围绕着细胞的多糖包被，以及末梢糖的最佳显露和高度多样性。基于结构构象以及所带负电荷的优点，类粘蛋白糖蛋白在细胞对粘蛋白(附着)无特殊受体时可以作为一排斥性屏障。粘蛋白受体的功能依赖于与核心粘蛋白肽以及糖基转移酶的细胞特异性表达相关的细胞类型和活动状态，依次调节 O 交联的低聚糖侧链的结构和呈递，膜的固定，信号转导能力和/或粘蛋白到正确细胞内片段的运输。

人 CD164 是一种鼠科的 MGC-24v(*M. musculus*)和大鼠内溶素(*R. norvegicus*)的异物种同源蛋白，一种在哺乳动物细胞溶体和内涵体的间隔里发现的膜蛋白。不同异构体与功能上重要的片段和 CD164/内涵体在亚细胞的分布之间的关系已有所描述(Chan YH 等人, *J Biol. Chem.*, 276:2139-2152, 2001)。

在天然状态下，人 CD164 是一个二硫化物交联的两个 80-85 千道尔顿的亚单位的同型二聚体。CD164 高度糖基化，含有 O-和 N-交联的多聚糖。细胞外区域包括被一含有二硫化物内桥以及一富有半胱氨酸的基序的非粘蛋白片段连接的 2 个粘蛋白区域(I 和 II)，此基序类似一个之前在生长因子和细胞因子受体里发现的一致模式。CD164 也含有一单途径跨膜区域和一包含一可将蛋白送到内涵体和溶体的 C 末端基序(即，YHTL)的 13 个氨基酸细胞内区域。

有人已描述了4种人CD164的mRNA,其由一位于人染色体6q21的单个基因组转录单位有选择地剪接6个真实的外显子而产生。(Zannettino A, *J Biol Regul Homeost Agents*, 15: 394-396, 2001; Watt and Chan, *Leuk Lymph*, 37(1): 1-25, 2000)。可能存在4种选择性的启动子、2个无互相重叠的可选择的最后外显子和一个并不剪接的内在内含子。主要的CD164(E1-6)异构体代表了一178个氨基酸I型跨膜糖蛋白。所描述的其它异构体是一含有178个氨基酸的涎粘蛋白CD164或CD164异构体 Δ 5;一184个残基的CD164异构体 Δ 4;以及一200千道尔顿主要可溶的异构体称为MGC24(即24千道尔顿的多糖基化的核心蛋白质),此蛋白质缺少跨膜固定的基序,有189个残基。所有异构体都是具有O-或N-交联的糖基化位点的高度糖基化的蛋白质(附图1)。

CD164功能包括介导或调节造血祖细胞粘连以及负性调节它们的生长和/或分化。CD164通常为CD34⁺和CD34^{lo}/⁻造血干细胞和联合微环境细胞所表达(Watt等人, *Blood*, 92: 849-866, 1998)。CD164也被定向骨髓细胞和红细胞集落形成细胞在骨髓间质和内皮细胞表达,在淋巴细胞和间充质干细胞有较弱表达。CD164在血细胞形成中起重要作用,它作为一个潜在的信号分子,使人CD34⁺细胞较易附着于骨髓间叶,抑制了CD34⁺和CD38^{lo}/⁻造血祖细胞的增殖(Zannettino等人, *Blood*, 92: 2613-2628, 1998)。

这些结果包括了被单克隆抗体(mAbs) 105A5和103B2/9E10识别的CD164 I类和/或II类抗原决定部位。此抗原决定部位依赖于碳水化合物,位于N末端的粘蛋白片段I(Watt等人, *Blood*, 95, 3113-3124, 2000; Doyonnas等人, *J Immunol*, 165: 840-851, 2000)。

在直接微环境中造血细胞和间叶/内皮细胞之间的交互作用被认为在造血干细胞的自我更新、静止、定向和移动中起主要作用。这些交互作用包括附着受体、它们所识别的配体和细胞因子之间的合作。参与这些过程的一些细胞附着分子(CAMS)包括免疫球蛋白、整联蛋白、钙黏着蛋白、选择蛋白和类粘液素蛋白家族。

在体外,CD164起肌源分化的作用(Lee等人, *Mol Cell Biol*, 21: 7696-7706, 2001)。CD164在成肌细胞系的过量表达加速了分化的生化标记的表达,增强了多核肌管的形成,而反义CD164或者CD164可溶的细胞外区域抑制肌细胞生成。

可溶的MGC-24花生凝集素(PNA)结合位点代表了一在很多恶性肿瘤中表达的肿瘤联合碳水化合物标记。在人结肠直肠癌中MGC-24的总mRN被发现低于正常的毗连粘膜组织(Matsui等人, *J Biochem*, 127: 1103-1107, 2000)。在结肠癌中,肿瘤淋巴导管的侵入与低水平的MGC-24的mRNA有相互关系,而高水平的MGC-24的mRNA与较少导管侵入和较少远处转移有相互关系。CD164特异性的单克隆抗体可以证明对癌症的诊断或治疗以及对造血细胞抑制有作用(EP889054, EP761814)。

已经发现有其它的类 CD164 蛋白质(NOV25, WO 02/098917; SEQ ID NO: 7852, EP1033401; 附图 1), 但是尚未分析它们的生化特性。

发明概述

令人惊讶的是, 业已发现一含有人 CD164 细胞外区域的成熟的形式可溶蛋白质, 当用介质如伴刀豆球蛋白 A 刺激的时候, 会对一般产生细胞因子的细胞中的细胞因子表达起抑制作用(称为干扰素- γ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10 和 TNF- α)。而且, 在与炎性和/或自身免疫疾病相关的动物模型中, 这种 CD164 可溶的片段抑制相关的生理反应(如淋巴细胞或巨噬细胞移动)。

因此, 含有一与人 CD164 细胞外区域的成熟的形式有至少 85%同源的可溶蛋白, 可用于治疗和/或预防炎性和/或自身免疫疾病的药物生产。包括这些可溶蛋白质中任何一种的药物组合物适合于治疗和/或预防炎性和/或自身免疫疾病, 以及一般可用于个体给药抑制细胞因子的表达。

从下面的详细描述中, 本发明的其它特性和优点将更为清楚。

附图说明

图 1: (A)全长氨基酸排列, 人 CD164 (hCD164; NCBI Acc. No. NP_006007; SEQ ID NO: 3), 人 CD164-delta4 (hCD164-DELTA4; NCBI Acc. No. AAG53908; SEQ ID NO: 4), CD164-delta5 (hCD164-DELTA5; NCBI Acc. No. AAG53907; SEQ ID NO: 5), 以及 MGC-24 (hMGC-24; NCBI Acc. No. Q04900; SEQ ID NO: 6)。信号系列在方框中。细胞外区域的末端用箭头指示。糖基化位点用星号指示。(B) CD164 的细胞外区域的成熟形式的氨基酸排列(氨基酸 1-140 of SEQ ID NO: 1, 对应于 SEQ ID NO: 3 的氨基酸 24-163 和 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 1-140), MGC-24 (SEQ ID NO: 6 的氨基酸 24-163), CD164-delta4 (SEQ ID NO: 4 的氨基酸 24-150), CD164-delta5 (SEQ ID NO: 5 的氨基酸 24-145), SEQ ID NO: 7852 (EP1033401; SEQ ID NO: 7 的氨基酸 24-163)和 NOV25 (WO 02/098917; SEQ ID NO: 8 的氨基酸 24-161)。在不同于 SEQ ID NO: 1 的 NOV25 的位置下划线。

图 2: 在 ConA 刺激的人 PBMC 细胞混合物中施加 sf-CD164 对 IL-2 (A) 和 TNF- α (B) 表达的影响。X 轴代表 sf-CD164 的浓度 $\mu\text{g/ml}$ 。Y 轴代表经分泌释放的细胞因子百分比。

图 3: 在 ConA 刺激的人 CD4 T 细胞中施加 sf-CD164 对 IL-2 (A) 和 TNF- α (B) 表达的影

响。X轴代表 sf-CD164 的浓度 $\mu\text{g/ml}$ 。Y轴代表经分泌释放的细胞因子百分比。

图 4: 在 LPS 诱导的 TNF- α 释放的动物模型中施加 sf-CD164 对 TNF- α 释放的影响。星号表示统计学数据。

图 5: 胍基乙酸盐诱导(A)或 LPS 诱导(B)在腹膜中的细胞征集的动物模型中施加 sf-CD164 对细胞移动的影响。Y轴代表每 μl 细胞浓度(巨噬细胞在 A 中, 激活的淋巴细胞在 B 中)。星号表示统计学数据。

图 6: 施加 sf-CD164 对自身抗原 MBP 特异性 T 细胞的增殖效果。Y轴代表放射活性 (CPM, 每分钟计数), 其涉及结合有放射性标记的核苷酸 (^3H 胸腺嘧啶)来划分细胞。星号表示统计学数据。

图 7: 在 ConA 诱导的肝炎动物模型中施加 sf-CD164 对转氨酶水平(ALAT; A)、IL-6 (B) 和 IFN- γ (C) 释放的影响。Dexa 代表地塞米松。星号表示统计学数据。

发明详述

根据本发明, 业已发现人 CD164 的细胞外区域的成熟形式(SEQ ID NO: 1)在受到这些细胞对介质如伴刀豆蛋白 A 的刺激后, 对细胞的各种细胞因子的表达有抑制效果(称为干扰素- γ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10 和 TNF- α)。可以在动物疾病模型进一步证实这种蛋白质序列的治疗效用, 其中可溶蛋白证实了有价值的体内生物特性如淋巴细胞移动减少或者抑制 MBP(髓鞘碱性蛋白)特异性 T 细胞增殖。

现有技术中并没有表明, 人 CD164 的细胞外区域, 当作为一可溶蛋白从分子的剩余部分分离时, 对细胞因子表达或对其它与自身免疫和/或炎性疾病相关的现象有任何作用。

本发明的主要目的是将一含有与人 CD164 的细胞外区域的成熟形式(SEQ ID NO: 1)有 85%同源的序列的可溶蛋白用于制备一种治疗和/或预防炎性和/或自身免疫疾病的药物。

根据本发明, 在适用的可溶蛋白中最佳可溶蛋白是人 CD164 的细胞外区域的成熟形式(SEQ ID NO: 1), 或者后一序列融合到人 CD164 信号序列中。

根据本发明, 其它适用较佳可溶蛋白是活动的突变蛋白或 SEQ ID NO: 1 的异构体形式的 SEQ ID NO: 1 变量。

在文献中已知与人 CD164 的细胞外区域的成熟形式(SEQ ID NO: 1)有至少 85%同源的人 CD164 异构体(Chan YH 等人, J Biol Chem, 276: 2139-2152, 2001; 图 1)。其中一个称为 MGC-24 (SEQ ID NO: 6)已知是可溶的, 因为它缺少一功能的跨膜区域, 其它两个

称为 CD164-delta 4 (SEQ ID NO: 4)和 CD164-delta 5 (SEQ ID NO: 5), 仍然保留跨膜区域。因此, 根据本发明, 可以考虑利用这些后面的连接膜的异构体细胞外区域的成熟形式。

对于“可溶蛋白”, 本发明意指蛋白质序列, 不包含任何允许在细胞膜整合的序列, 如在人全长 CD164 的跨膜区域。因此, 当细胞表达这些可溶蛋白时, 要求位于细胞内, 或者如果融合到一个信号序列, 最好分泌到细胞外间隙。

文献中已公布, 包含一与人 CD164 的细胞外区域的成熟形式(SEQ ID NO: 1)有至少 85%同源的序列的可溶蛋白(Lee YN 等人, Mol Cell Biol, 21: 7696-7706, 2001), 但并没有指出其可用于治疗和/或预防炎性和/或自身免疫疾病。

在本发明中所限定的可溶蛋白序列还明显地与其它有或者推测有相同特性的人序列不同, 其用于治疗 and/或预防炎性和/或自身免疫疾病。

WO 02/098917 公开了蛋白质 NOV25 (SEQ ID NO: 8; 图 1B)包含一与人 CD164 的细胞外区域的成熟形式(SEQ ID NO: 1)有至少 80%同源的序列, 并建议可以用于各种各样的疾病中, 包括自身免疫性疾病。然而, 这种应用仅仅是推测的, 而且此申请并没有考虑到可溶性片段的治疗效用, 其可自预计位于细胞膜上的这个蛋白质潜在细胞外区域分离。

EP1033401 公开了一蛋白质(SEQ ID NO: 7582), 其包含一与人 CD164 的细胞外区域的成熟形式(SEQ ID NO: 1; 图 1B) 相同的序列。即使该申请推测这种蛋白质假定用在药物上可治疗某些疾病, 但没有考虑到这种可从这个蛋白质潜在细胞外区域分离出的可溶性片段的治疗效用。

本发明把与人 CD164 的细胞外区域的成熟形式(SEQ ID NO: 1)有至少 85%同源的序列的任何变型定义为“活性的”, 根据在实施例中的任何测定, 当和 SEQ ID NO: 1 相比, 这种变型有相当的或者甚至增加的活动性, 并且也应该为权利要求中的应用和方法所接纳。

“相当的”活性意味着在任何以可溶蛋白质的变型进行测量的所述方法中所测得的活动性与一由 SEQ ID NO: 1 所限定的可溶蛋白质所测得的活动性至少是同一数量级, 最好是后者活动性的 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%, 而且不超过其 101%、102%、103%、104%、105%、110%、115%、120% 或 125%。

活性“增加”意味着在任何以可溶蛋白质的变型的测量的所述方法所测得的活动性至少是与一由 SEQ ID NO: 1 所限定的可溶蛋白质所测得的活动性的 125%、130%、135%、140%、145%、150%、155%、160%、170%、180%、190%、200%、225%、250%、

275%、300%、325%、350%、375%、400%、450%或 500%。

本说明书所用的术语“突变蛋白”是指与人 CD164 的细胞外区域的成熟形式(SEQ ID NO: 1)有至少 85%同源的任何序列,这可以由插入,缺失和/或取代在 SEQ ID NO: 1 中一个或多个氨基酸残基生成。相似活动的突变蛋白可以是天然的,如那些对应于一个直向同源蛋白(即,编码一从 CD164 的共同祖细胞进化的非人类基因)或者从人类基因组中多形性而来的蛋白质。如果核苷酸取代导致了一个或多个氨基酸变化,最好可溶蛋白包括那些保留一个或多个抗炎性和/或抗自身免疫性相关的活性。

另外,这些序列是合成的或者人为的,可通过已知化学合成、重组 DNA 技术、直接位点突变形成或其它已知的合适技术制备,这些技术可提供一组限定的充分对应的突变或缩短的肽或多肽,在现有技术和本发明的实施例的指导下,可以由所属技术领域普通的技术人员经常规得到和测试。

在这些有活性的突变蛋白中,最好的变化一般称为“保守性”或“安全”取代。保守性氨基酸取代是以那些有足够相似的化学特性的氨基酸的取代,以保留分子的结构和生物功能。很明显,氨基酸的插入和缺失在不影响它们的功能的情况下,也可以在以上定义的序列中,特别是如果插入和缺失仅仅涉及几个氨基酸,例如,少于 10 个,最好少于 3 个,且不移动或置换对一蛋白或肽的功能构象起重要作用的氨基酸。

文献中提出了很多模型,在根据这些模型可以基于有关天然蛋白质的序列和/或结构的统计和物理化学研究选择保守性氨基酸取代(Rogov SI and Nekrasov AN, *Protein Eng*, 14: 459-463, 2001)。蛋白质设计实验表明,用特异的氨基酸亚类可以生产出可折叠的和有活性的蛋白质,以帮助氨基酸“同义”取代的分类,此种取代可以更容易地顺应蛋白质结构(Murphy LR 等人, *Protein Eng*, 13:149-52, 2000)。表 I 中所限定的是那些同义氨基酸组和较佳同义氨基酸组。

此外,在本发明的可溶蛋白中的氨基酸,对功能来说其是不可少的,还可用已知技术中公知的方法鉴别,如定点诱变或丙氨酸分区诱变(参见,如, Cunningham, 等人, *Science*, 244:1081-5, 1989)。令人特别感兴趣的是用其它带电荷的或中性氨基酸取代带电荷的氨基酸,前者可以产生具有改进且十分需要的特性的蛋白质,如较少聚集。当制备药物或生理学上可接受的制剂时,聚集不仅降低活性也带来问题,因为聚集可能产生免疫性(Cleland 等人, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 10: 307-77, 1993)。

蛋白质中氨基酸取代的其它生产实例,这些实例可以用于得到本发明中采用的可溶蛋白的突变蛋白,其包括任何已知的方法步骤,如公开于美国专利号 4,959,314、4,588,585、4,737,462、5,116,943、4,965,195、4,879,111、5,017,691 和 4,904,584。

活性的突变蛋白可以由序列变换得到,当施加给哺乳动物时此序列变换可以减少所述可溶蛋白的免疫原性。文献提供了很多关于这些序列变换的实例,其可以在此范围或者为其它功能最优化设计和介绍,这使治疗蛋白的给药安全有效,尤其是当药物是非人类、非哺乳动物或者非天然蛋白质(Vasserot AP 等人, Drug Disc Today, 8: 118-126, 2003; Marshall SA 等人, Drug Disc Today, 8: 212-221, 2003; Schellekens H, Nat Rev Drug Disc, 1: 457-462, 2002; Gendel SM, Ann NY Acad SCI, 964: 87-98, 2002; Graddis TJ 等人, Curr Pharm Biotechnol, 3: 285-97, 2002; WO 03/104263; WO 03/006047; WO 02/98454; WO 02/96454; WO 02/79415; WO 02/79232; WO 02/66514; WO 01/40281; WO 98/52976; WO 96/40792; WO 94/11028)。

很明显,氨基酸的插入和缺失还可以在上述定义的序列中进行,而不改变其功能,特别是如果插入或缺失仅仅涉及数个氨基酸,如,少于三十,最好少于十个,且不删除或置换对功能性构象很重要的氨基酸,如半胱氨酸或脯氨酸。这些改变可以发生在氨基末端或羧基末端或两个末端之间的任何位置,分别散布在序列的残基中或以一个或多个毗连成组散布在序列中。

在实践中,通常用公知的计算机程序可以确定任何特定的多肽是否与人 CD164 细胞外区域的成熟形式(SEQ ID NO: 1)有同源的百分比。这种运算法则和程序包括,但不限于, TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA 和 CLUSTALW (Pearson and Lipman, (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85(8):2444-8; Altschul 等人, (1990) J Mol Biol 215(3):403-410; Thompson 等人, (1994) Nucleic Acids Res 22(2):4673-4680; Higgins 等人, (1996) Meth Enzymol 266:383-402; Altschul 等人, (1997) Nuc Acids Res 25:3389-3402; Altschul 等人, (1993) Nature Genetics 3:266-272)。在一特别优选的实施例中,蛋白质和核酸序列同源性可以用基本对位排列搜索工具来评价(“BLAST”),这在现有技术领域中是公知的(参见,如, Karlin and Altschul (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87(6): 2264-8; Altschul 等人, 1990, 1993, 1997, all supra)。

BLAST 程序根据鉴别相似的片段来鉴别同源序列,本文称之为查询的氨基酸或核酸序列与一待测序列之间的“高评分片段对”,此待测序列优选从一蛋白或核酸序列数据库中得到。高评分片段对最好根据评分矩阵鉴别(即,排列),其中很多在现有技术中是公知的。所用的评分矩阵最好是 BLOSUM62 矩阵(参见, Gonnet 等人, (1992) Science 256(5062):1443-5; Henikoff and Henikoff (1993) Proteins 17(1):49-61)。其次,也可以用 PAM 或 PAM250 矩阵(参见,如, Schwartz and Dayhoff, eds, (1978) Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National

Biomedical Research Foundation)。BLAST 程序评价鉴别出来的所有高评分片段对的统计数据, 优选那些满足用户规定的界限的片段, 如一用户规定的同源性百分比。高评分片段对的统计数据最好用 Karlin 的统计数据公式来评价(参见, 如, Karlin and Altschul, (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87(6): 2264-8)。BLAST 程序可以和默认参数或由用户提供的修正参数一起使用。此参数最好是默认参数。

一种确定一查询序列(一本发明中的序列)和一目标序列之间全部相配的较佳方法, 也称之为全域序列比对, 可以用 FASTDB 计算机程序来决定, 此算法基于 Brutlag 等人 (1990) Comp. App. Biosci. 6:237-245。在序列比对中, 查询序列和目标序列都是氨基酸序列。所述全域序列比对结果以相同性百分比表示。一 FASTDB 氨基酸比对中所用的较佳参数是: 基质=PAM 0, k-tuple=2, 错配罚分=1, 加入罚分=20, 随机组=25 长度=0, 截断分数=1, 窗口大小=序列长度, 间隔罚分=5, 间隔大小罚分=0.05, 窗口大小=247 或目标序列的氨基酸长度, 选取较短的一个。

如果目标序列因为 N 末端或 O 末端缺失而不是因为中间缺失而比查询序列短, 则以相同百分比表示的结果必须用人工纠正, 因为当计算全域相同性百分比时, FASTDB 程序并没有考虑目标序列的 N 末端或 O 末端切断。对于相对于查询序列, 在 N 末端或 O 末端切断的目标序列, 相同性百分比需要计算查询序列的残基数目, 其是目标序列的 N 末端或 O 末端, 与一个相应的目标残基不相配/比对, 作为查询序列的总碱基百分比来修正。一残基是否相配/比对可由 FASTDB 序列比对的结果来确定。然后, 这个百分比从相同性百分比中减去, 用规定参数以上述 FASTDB 程序来计算, 以作出最后相同性百分比的分数。这个最后相同性百分比分数就是本发明要用的。仅仅目标序列的 N 末端或 O 末端的残基且与查询序列不相配/比对时, 才考虑用人工调整相同性百分比分数。也就是说, 只有查询氨基酸序列残基超出了最远的目标序列的 N 末端或 O 末端的残基。

例如, 一个 90 氨基酸残基的目标序列与一个 100 残基的查询序列比对来确定相同性百分比。缺失出现在目标序列的 N 末端, 因此, FASTDB 比对与第一个 N 末端的残基不相配/比对。10 个不配对的残基代表序列的 10%(不相配的 N 末端或 O 末端的残基数目/查询序列的总残基数目)所以 10%要从由 FASTDB 程序计算出的相同性百分比分数中减去。如果剩下的 90 个残基完全相配合则最后相同性百分比就是 90%。

在较佳实施例中, 可用于治疗和/或预防炎性和/或自身免疫性疾病的药物的是可溶蛋白的翻译后修饰形式。其包含一与人 CD164 的细胞外区域的成熟形式(SEQ ID NO: 1)有 85%同源的系列。具体来说, 这些蛋白质可以乙酰化、酰胺化、糖基化、磷酸化和/或豆蔻酰化。

已知人 CD164 是用以下基团修饰和一系列的特定位置, 可如在 SEQ ID NO: 1 中提出的那样来表示:

- a) 可能的 N-糖基化位点位于残基 3、9、18、49、54、71、81、98 和 123;
- b) 可能的 O-糖基化位点位于残基 11、12、17、20、21、25、26、31、32、89、90、92、96、99、100、104、108、110、111、112、113、115、117、118、119、121、122、125、127、129、130、136;
- c) 可能的依赖 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点位于残基 134 到 137;
- d) 可能的蛋白激酶 C 磷酸化位点位于残基 100 到 102 以及 112 到 114;
- e) 可能的酪蛋白激酶 II 磷酸化位点位于残基 73 到 76 以及 136 到 139;
- f) 可能的 sf-CD164 N-豆蔻酰化位点位于残基 119。

很明显, 如此修饰也可以发生在以上所限定的同源可溶蛋白的相应的位置, 如序列比对(图 1)所鉴别。

在另一较佳实施例中, 可溶蛋白是一可溶的融合蛋白, 其包含一与人 CD164 的细胞外区域的成熟形式(SEQ ID NO: 1)有 85%同源的序列。

这些可溶的融合蛋白可以经克隆一多聚核苷酸编码一与人 CD164 的细胞外区域的成熟形式(SEQ ID NO: 1)有 85%同源的系列的可溶蛋白而得到, 此序列在阅读框里编码一异种的蛋白质序列。

本文使用的术语“异种”意指任何不同于人 CD164 多肽的多肽。

可以包括在 N 末端或 O 末端的可溶的融合蛋白里面的异种序列的例子有如下: 膜结合蛋白的细胞外区域、免疫球蛋白的恒定区(Fc 区)、多聚化区域、细胞外蛋白区域、信号序列、输出序列或者允许亲和层析纯化的序列。

很多这些以表达质粒的异种序列在市场上可以买到, 为了提供额外的特性而不太大损伤融合于其中蛋白的特异的生物活性, 这些序列一般都包括在融合蛋白中(Terpe K, Appl Microbiol Biotechnol, 60: 523-33, 2003)。这种额外的特性的例子是, 在体液中半衰期较长、细胞外定位或者较易纯化步骤, 如由形成所谓的“组氨酸拖尾”的组氨酸延长达到(Gentz 等人, Proc Natl Acad Sci USA, 86: 821-4, 1989)或者由“HA”拖尾得到, 从流行性感红血球凝聚素蛋白而来的抗原决定部位(Wilson 等人, Cell, 37: 767-78, 1994)。如果需要, 异种序列可由蛋白水解剪切消除, 例如在可溶蛋白和异种序列之间插入一个蛋白水解剪切位点, 以及将纯化的可溶融合蛋白暴露给适合的蛋白水解酶。这些特征对可溶蛋白特别重要, 因为促进了在药物组合物制剂中的生产和使用。例如, 实施例(sf-CD164; SEQ ID NO: 2)中所用的可溶蛋白由融合的可溶 CD164 的 C 末端六个组氨酸肽纯化。当

可溶的融合蛋白包括一免疫球蛋白区域,融合可以直接形成或者通过连接肽形成,此连接肽可以是一长度短至1到3个氨基酸残基或较长,如长达13个氨基酸残基。所述的连接体可以是一三肽序列例如 E-F-M (Glu-Phe-Met),或是一包括 Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met 的13个氨基酸连接体序列,此序列于本发明的实质序列和免疫球蛋白序列之间引入。所得的融合蛋白提高了特性,如,延长了在体液中的停留时间(半衰期)、增加了特异活性、增加了表达水平或改善了融合蛋白的纯化。

在又一较佳实施例中,可溶蛋白融合于一免疫球蛋白分子的恒定区。较佳融合于重链区,如人 IgG1 的 CH2 和 CH3 区域。根据本发明,其它 Ig 分子的异构体也适合形成融合蛋白,如, IgG₂ 或 IgG₄ 的异构体,或其它 Ig 类,如 IgM 或 IgA。融合蛋白可以是单体的或多聚体的,也可以是异种或同种多聚体的。

在再一较佳实施例中,功能衍生物包含至少接合于一个或多个功能基团的一部分,此功能基团作为一个或多个在氨基酸残基上的侧链出现。这部分最好是一个聚乙烯(PEG)部分。聚乙烯化可以经已知方法完成,如在 WO99/55377 中所描述。

可溶蛋白和可溶的融合蛋白可以从天然表达这些蛋白的人或哺乳动物的体液、细胞或组织中提取和分离,其包含一与人 CD164 的细胞外区域的成熟形式(SEQ ID NO: 1)有 85%同源的序列。具体来说,是否直接分离或培养的细胞可以表达并分泌这些蛋白(天然或随后暴露在一诱导溶剂中)。现有技术中所公知的蛋白的纯化方法包括用去污剂和离液剂使粒子碎裂,然后用离子交换层析、亲和层析、根据密度的沉降以及凝胶电泳来进行多肽的差异提取和分离。

一般来说,可溶蛋白和可溶的融合蛋白可以采用现有技术中所公知的任何方法来制备,包括重组 DNA 相关技术和化学合成技术。

重组 DNA 相关技术能用第一次生成的编码这些蛋白的多聚核酸生产可溶蛋白和可溶的融合蛋白。这些核酸可以经 PCR 技术从基因组 DNA 得到,或更有效地,从一含有人 CD164 (SEQ ID NO: 3)完全序列的载体或其它相关同源序列得到。与所需序列互补的寡核苷酸引物含有限制性核酸内切酶序列,此序列为进一步克隆由特殊限制性核酸内切酶进行消化且小心确保编码可溶蛋白的序列相对于表达质粒中其它序列的 ployA 信号和剩余部分作适当安置。

用一般的基因工程技术,这些多核苷酸可以在源于病毒或质粒可复制的表达载体中克隆,使用游离型或非/同源整合型载体以及用基于转化、感染、沉淀或转染的技术,用这些多核苷酸转化一原核或真核宿主细胞。这些载体应该允许原核或真核宿主细胞中的

重组蛋白在其自身转录开始/终止调节序列的控制下表达，且在所述的细胞中有固有的活性或可被诱导。随后可以分离—这种细胞中充分富集的细胞系以提供—稳定的表达感兴趣的蛋白的细胞系。

很多书和评论均教导如何使用载体和原核或真核宿主细胞克隆和生产重组蛋白，如牛津大学出版社出版的系列“A Practical Approach”中的一些标题(“DNA Cloning 2: Expression Systems”, 1995; “DNA Cloning 4: Mammalian Systems”, 1996; “Protein Expression“, 1999; “Protein Purification Techniques”, 2001)。

一种典型的表达载体应包含:

a) 一编码—可溶蛋白或可溶的融合蛋白的 DNA 序列包含—与人 CD164 的细胞外区域的成熟形式(SEQ ID NO: 1)有 85%同源的序列; 和

b) 一个表达盒;

其中所述的序列(a)和一个组织特异性的或包括在序列(b)里的结构启动子可行地相关联。

表达载体是现有技术中所公知的任何哺乳动物、酵母、昆虫或细菌表达系统。市售的载体和表达系统可以从很多供应商得到，包括 Genetics Institute (Cambridge, MA)、Stratagene (La Jolla, California)、Promega (Madison, Wisconsin)和 Invitrogen (San Diego, California)。如果需要，为了增强表达和促进适当的蛋白折叠，对于表达载体引入的特殊表达特殊，上下文的密码子和序列的配对密码子可以进行最优化(US Patent No. 5,082,767; Gustafsson C 等人, Trends Biotechnol, 22: 346-53, 2004)。

选择特殊质粒或病毒载体时的重要因素包括：可以很容易地从那些不含有载体的受体细胞中被识别和选择含有载体的受体细胞；在特殊的宿主中可以得到载体的复制数目；以及是否要求载体能够在不同种类的宿主细胞之间“穿梭”。根据本发明，一个重组载体包括，但不限于，— YAC (酵母人工染色体)、— BAC (细菌人工染色体)、—噬菌体、—噬菌粒、—黏粒、—质粒、或者甚至—包含—染色体的、非染色体的、半合成或合成 DNA 的线性 DNA 分子。

一般地，重组表达载体包括复制起点、允许宿主细胞转化的选择性标记和一个从—高度表达的基因到—下游结构序列的直接转录得到的启动子。异种结构序列在合适阶段与以下序列装配在一起：翻译开始与终止序列，以及最好能够使翻译后蛋白分泌到壁膜间隙或细胞外介质的一前导序列。在一特殊的实施例中，其中载体调节到哺乳动物宿主细胞中转染和表达所需的序列，较佳的载体将包含—在所需宿主细胞中的复制起点、—合适的启动子和增强子、以及任何所需的核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、剪接供

体和受体位点、转录终止序列和 5' 旁侧非转录序列。来自 SV4 病毒基因组的 DNA 序列, 如 SV40 起点、早期启动子、增强子、剪接和聚腺苷酸化位点可以用于提供所需非转录基因组件。

选择本发明的表达载体中所用的适合启动子区域, 要考虑异种基因表达的宿主细胞。只要特殊的启动子可以使核酸在目标细胞中表达, 用它来控制感兴趣的核酸序列的表达被认为是不重要的。因此, 当一个人类细胞作为目标, 最好将核酸编码区放在接近一启动子并在其控制之下的位置, 此启动子能够在人类细胞里表达, 例如, 一人类或病毒启动子。所用启动子可以是固有的或可诱导的。

一个合适的启动子, 为了其控制的表达, 可以相对于核酸是异种的, 或者对含有待表达的编码序列的天然多核苷酸可以是内源性的。另外, 此启动子对于重组载体序列一般是异种的, 此序列已经插入所构建的启动子/编码序列。

启动子区域可以选自任何所需基因, 如, 用 CAT(氯霉素转移酶)载体以及更适宜的 pkk232-8 和 pCM7 载体。较佳细菌启动子有 LacI、LacZ、T3 或 T7 噬菌体 RNA 聚合酶启动子、gpt、λ PR、PL 和 trp 启动子 (EP 0036776)、多角体蛋白启动子、或者杆状病毒中 p10 蛋白启动子(Kit Novagen) (Smith 等人, (1983) Mol Cell Biol 3(12): 2156-65; O'Reilly 等人, 1992)、lambda PR 或者 trc 启动子。真核细胞启动子包括 CMV 立即早期启动子、HSV 胸苷激酶、早期和晚期 SV40、反转录病毒中的 LTRs 以及鼠金属硫蛋白-L。另外, 可以选择对一特殊细胞类型的特异启动子, 如那些在脂肪组织、肌肉组织或肝中的促进表达的启动子。本领域的一个普通的技术人员能适当选择方便的载体和启动子。

当用一 cDNA 插入时, 一般要求包括一聚腺苷酸化信号来达到基因转录的适当聚腺苷酸化。聚腺苷酸化信号特性在本发明的成功实践中被认为是不重要的, 且可以使用任何这样的序列, 如人生长激素和 SV40 聚腺苷酸化信号。一个终止基因也作为表达盒的组件。这些组件可以增强信息水平, 将表达盒到其它序列的阅读减到最少。

载体也可以含有附加的、非编码的序列, 包括但不限于, 如, 非编码 5' 和 3' 序列、载体序列、用于纯化、探针或引物的序列。例如, 异种序列包括在转录中起重要作用但转录后未翻译的序列以及 mRNA 的加工, 如, 核糖体的结合和 mRNA 的稳定。

选择性标记给予细胞一可以识别的变化, 容易识别含有表达构建物的细胞。选择转化宿主细胞的选择性标记基因最好是二氢叶酸还原酶或对真核细胞培养的新霉素抗性、酿酒酵母或四环素酵母的 TRP1、大肠杆菌中利福平或氨苄青霉素抗性、或分支杆菌的果聚糖蔗糖酶, 后者是一种阴性选择性标记。

作为一代表但不限于此的例子,用于细菌的有用的表达载体包括一个可选择的标记和来自市售的含有基因组件的质粒 Pbr322(ATCC37017)的细菌复制起点。这些商用载体包括但不限于, pKK223-3 (Pharmacia、Uppsala、Sweden)和 pGEM1 (Promega Biotec、Madison、WI、USA)。

很多其它适合的载体对本领域的技术人员来说是公知的,同时可以从市场上买到,如以下的细菌载体: pTrc-His、pET30-His、pQE70、pQE60、pQE-9(Qiagen)、pbs、pD10、phagescript、psiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16A、pNH18A、pNH46A (Stratagene); ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia); pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG (Stratagene); pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL (Pharmacia); pQE-30 (QIAexpress)。

一多肽表达的适合载体是一杆状病毒载体,其可以在昆虫细胞和昆虫细胞系里繁殖。一特异的适合宿主的载体系统是 pVL1392/1393 杆状病毒转移载体(Pharming),其可以用于转染从草地夜蛾得到的 SF9 细胞系(ATCC N°CRL 1711)。本领域的技术人员所公知的更适合的杆状病毒载体如 FastBacHT。在一杆状病毒表达系统表达一 APM1 的球形头多肽的其它适合载体包括,但不限于,由 Chai 等人(1993; Biotechnol Appl Biochem. Dec;18 (Pt 3):259-73); Vlasak 等人(1983; Eur J Biochem Sep 1; 135(1): 123-6); 和 Lenhard 等人(1996; Gene Mar 9; 169(2): 187-90)所描述的那些载体。

表达多肽的更适合的载体是哺乳动物载体。本领域的技术人员所公知的大量适合的载体系统如, pcDNA4HisMax、pcDNA3.1Hygro-His 和 pcDNA3.1Hygro。

表达多肽的更适合的载体是病毒载体,如从腺病毒得来的载体。根据本发明,较佳的腺病毒载体是由 Feldman and Steg (1996; Semin Interv Cardiol 1(3):203-8)或 Ohno 等人(1994; Science 265(5173):781-4)描述的那些载体。

一般认为,反转录载体和腺伴随病毒载体为选择外援性多核苷酸的体内转移的重组基因传递系统,特别是对哺乳动物,包括人类。这些载体给细胞提供了有效的基因传递,以及转移的核酸稳定地整合在宿主细胞的染色体上。

表达多肽的另一个可能性是根据以同源重组把调节性序列引入基因组正确的基因座来内源性激活基因,因此可行地连接调节序列与基因,要求此基因的表达被引导(WO 91/09955; WO 02/10372)。

宿主细胞是原核细胞或真核细胞。较佳的是真核宿主,如,哺乳动物细胞,如,人类细胞、猴、鼠和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,因为它们给蛋白质分子提供了翻译后修饰,包括在正确的位点正确的折叠或糖基化。酵母细胞也可以进行包括糖基化的翻译后肽

修饰。大量重组 DNA 策略在于用较强的启动子序列和质粒的高拷贝数目,这在酵母中可以用来生产所预期的蛋白。酵母可以识别克隆的哺乳动物基因产物中的前导序列,分泌具有前导序列的肽(如,前肽)。

用于受体表达可溶蛋白的较佳宿主细胞列如下:

a) 原核宿主细胞:大肠杆菌株(即 DH5- α 株)、枯草芽孢杆菌、鼠伤寒杆菌以及从如假单胞杆菌属、链霉菌属和葡萄球菌属种类中得来的株;

b) 真核宿主细胞: HeLa 细胞(ATCC N^oCCL2; N^oCCL2.1; N^oCCL2.2)、Cv 1 细胞(ATCC N^oCCL70)、COS 细胞(ATCC N^oCRL1650; N^oCRL1651)、Sf-9 细胞(ATCC N^oCRL1711)、C127 细胞(ATCC N^oCRL-1804)、3T3(ATCC N^oCRL-6361)、CHO(ATCC N^oCCL-61)、人肾 293(ATCC N^o45504; N^oCRL-1573)、BHK(ECACC N^o84100501; N^o84111301)、PLC 细胞、HepG2 和 Hep3B。

对真核细胞宿主(如酵母、昆虫或哺乳动物细胞),可依据宿主的特性应用不同的转录和翻译调节序列。它们可以从在调节信号联合有高水平表达的特殊基因处的病毒导出,如腺病毒、牛乳头瘤病毒、猴病毒或其类似物。例子有疱疹病毒的 TK 启动子、SV40 早期启动子、酵母 gal4 基因启动子等。可以选择转录起始调节信号,其可以供阻遏和激活之用,以便可以调整基因表达。根据同样引导一个或多个可以供选择含有表达载体的宿主细胞之用的标记,可以选择由引导 DNA 业已稳定转化的细胞。此标记也可以提供光色互变现象给培养宿主,抗微生物抗剂,如抗生素,或重金属如铜或类似物。选择性标记基因可以直接连接在待表达,或由共同转染的 DNA 基因序列上或待引导到相同的细胞。本发明的最佳蛋白合成可能也需要另外的要素。

如果编码可溶蛋白的核酸缺乏一作为起始位点的蛋氨酸,用常规技术可以将一起始的蛋氨酸引导到相邻于核酸的第一个密码子。同样,如果从人 CD164 肽的 cDNA 的插入缺乏一多 A 信号,这个序列可以用一些方法添加到构建物上,例如,用 BglI 和 SalI 限制性内切酶将多 A 从 pSG5(Stratagene)剪接下来,并将它合并到哺乳动物表达载体 pXT1(Stratagene)。pXT1 包含 LTR 和莫洛尼鼠类白血病病毒中的 gag 基因的一部分。在构建物中 LTR 的位置允许有效稳定的转染。载体包括单纯疱疹胸苷激酶启动子和可选择的新霉素基因。

依据在重组产物程序中所用的宿主,本发明的多肽可以糖基化或非糖基化。另外,在某些情况下作为宿主介导过程的结果,可溶蛋白也可以包括一个起始修饰的蛋氨酸残基。因此,众所周知,在所有真核细胞中,翻译起始密码子编码的 N 末端蛋氨酸一般高效地从任何已翻译的蛋白质中删除。而大部分蛋白质的 N 末端蛋氨酸也在大部分原核

细胞中有效地删除,对一些蛋白质,这种原核删除方法是无效的,这取决于对 N 端氨基酸共价结合蛋白的氨基酸的特性。

也可以经化学合成技术,例如,固相合成和液相合成,生成长度受限制的可溶蛋白。对于固相合成,例如,把对应于待合成的肽的 C 末端的氨基酸结合在一在有机溶剂中不可溶的支架上,以及根据反应的交替重复一反应,其中氨基酸与其氨基基团以及用合适的保护基团保护的侧链功能基团从 C 末端到 N 末端一个接一个顺序缩合,以及一反应,其中释放结合在树脂或肽的氨基基团的受保护基团的氨基酸,肽链因此以这种方式延伸。

依据所用的保护基团类型,固相合成方法主要用 tBoc 和 Fmoc 方法分类。典型所用的保护基团包括 tBoc (t-丁氧羰基)、Cl-Z (2-氯苄羰基)、Br-Z (2-溴苄氧羰基)、Bzl (苄甲基)、Fmoc(9-芴基甲氧羰基)、Mbh (4,4'-二甲氧基二苄甲基)、Mtr (4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺酰基)、Trt(三苄甲基)、Tos (甲苯磺酰基)、Z (苄氧苄基)和氨基基团的 Cl₂-Bzl (2,6-二氯苄甲基); 胍基团的 NO₂ (硝基)和 Pmc (2,2,5,7,8-五甲基色烷-6-磺酰基); 以及羟基基团的 tBu(t-丁基)。所需蛋白质合成后,进行去保护反应,把蛋白从固体支架上切除。这种肽剪切反应在 Boc 方法中与氟化氢或三氟甲烷磺酸一起进行,在 Fmoc 方法中与 TFA 一起进行。在文献中提示了总合成蛋白长度,其可与本发明的蛋白质之一相比(Brown A 等人, *J Pept Sci* 2 :40-46, 1996; Muir TW, *Annu Rev Biochem*, 72: 249-89, 2003; Casi G and Hilvert D, *Curr Opin Struct Biol*, 13: 589-94, 2003)。

可溶蛋白的化学合成通过用非天然氨基酸使蛋白质结构和功能的所有天然组成成分扩大(Anthony-Cahill SJ and Magliery TJ, *Curr Pharm Biotechnol*, 3: 285-97, 2002)。为了选择在氨基酸侧链、氨基酸手性和/或肽主链水平上可进行化学修饰的残基,可以按在可溶蛋白的序列和/或结构设计这些分子,然后提高相关特性,如势能、纯化容易程度、半衰期。表 II 所限定为包括在内的较佳供选择氨基酸“同义”组。这些组合物的合成和发展技术在本技术领域是众所周知的(Hruby VJ and Balse PM, *Curr Med Chem*, 7:945-70, 2000; Golebiowski A 等人, *Curr Opin Drug Discov Devel*, 4: 428-34, 2001; Villain M 等人, *Chem Biol*, 8: 673-9, 2001, WO 02/10195;)。文献也揭示了用体外和体内翻译系统将非天然的氨基酸结合到蛋白质的各种方法,以探测和/或提高蛋白质结构和功能(Dougherty DA, *Curr Opin Chem Bio*, 4: 645-52, 2000)。

为此,采用任何一种公知的方法都可进行根据本发明可用的合成或重组可溶蛋白质的纯化,即,任何常规方法,包括沉淀、层析(阳离子火印离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水作用层析、亲和层析、羟化磷灰石层析和外源凝集素层析)、电泳、差异提取、盐分级分离/、离心或类似方法。参见,如, *Methods in Enzymology* 中各种各样的纯化蛋白的方法。

可以优先选用的纯化方法是使用单克隆抗体或任何其它结合目的蛋白的化学基团的亲和层析法,此目的蛋白(直接可溶 CD164 或一可溶的融合蛋白的如一组氨酸标签的异种序列)有充分亲和性和特异性。在同一层析柱中所包含的凝胶基质上生成和固定结合基团,使含有蛋白质的不纯的制剂通过此层析柱。可溶蛋白将根据亲和性结合在柱上,而不纯物质则通过层析柱。洗掉残留的不纯物质,在 pH 或离子强度的变化下可溶蛋白从凝胶上洗脱。另外,也可以选择性地用 HPLC(高压液相层析)。可以用一般用于蛋白质纯化的水-氰化甲烷-碱溶剂进行洗脱。

或者,可溶蛋白也可以从表达这种可溶蛋白的转基因动物乳汁分离,文献中揭示了所采用的许多方法中的任何一种(Protein Purification Applications, A Practical Approach (New Edition), Edited by Simon Roe, AEA Technology Products and Systems, Biosciences, Harwell; Clark (1998) J Mammary Gland Biol Neoplasia 3:337-50; U.S. Patent Nos. 6,140,552)。

可溶蛋白,其包含一与人 CD164 的细胞外区域的成熟形式(SEQ ID NO: 1)有 85% 同源的序列,可以生产、配制、给药或者一般用于制备以一种活性衍生物、一种抗蛋白水解的修饰形式、一种结合物、一种复合物、一种片段、一种前体和/或一种盐来作为治疗和/或预防炎性和/或自身免疫性疾病的药物。

本说明书所用的术语“衍生物”是指根据已知方法,可以由氨基酸部分侧链上或在 N 末端或 O 末端基团上存在的功能基团来制备的衍生物。这种衍生物包括如羧基基团的酯或酯族胺和游离氨基的 N 酰基衍生物的酯或脂族胺或游离羟基基团的 O 酰基衍生物,以及与酰基基团如烷酰基或芳酰基形成。

术语“片段”指化合物的多肽链本身或与相关分子或连接在其上的残基结合的任何片段,如,糖或磷酸盐的残基,或原始多肽或肽的聚合物。这种分子可以从其它一般不影响初级序列的修饰中得到,如,体内或体外肽的化学衍生化作用(乙酰化或羧化),以及那些在合成和处理过程中或进一步处理步骤中,修饰一个肽的磷酸化(磷酸酪氨酸、磷酸色氨酸、磷酸酪氨酸残基的引导)或糖基化(将肽暴露给影响糖基化的酶,如,哺乳动物糖基化或去糖基化酶)模式所造成的修饰。

“前体”是一些能在施加给一细胞或人体之前或之后根据新陈代谢和酶处理转变成本发明的化合物的化合物。

本说明书中术语“盐”是指羧基基团盐和本发明的肽、多肽或其类似物的氨基基团的酸加成盐。羧基基团盐可以用本技术领域公知的方法制备,其包括无机盐,如钠、钙、铵、铁或锌盐及其类似物,与有机碱形成的盐,如与胺形成的盐有,三乙醇胺、精氨酸或

赖氨酸、哌啶、普鲁卡因及其类似物。酸加成盐包括,如与无机酸加成的盐,如盐酸或硫酸,与有机酸加成的盐包括,如乙酸或草酸。任何一种这样的盐应该对本发明的肽和多肽或其类似物有本质上相似的活性。

结合物或复合物可以与一个选自放射性标记、生物素、荧光标记、细胞毒性介质、药物输送介质的分子形成。这些结合物或复合物可以用所属技术领域公知的分子和方法生成,例如,为了允许与其它蛋白质(放射性或荧光标记、生物素)相互作用的检测,为了提高治疗效率(细胞毒性介质),或者用如聚乙烯乙二醇以及其它天然或合成的聚合体提高药物的输送效率(Pillai O and Panchagnula R, *Curr Opin Chem Biol*, 5: 447-451, 2001)。

聚合物可以是任何分子量大小,可以是分枝的或不分枝的。对于聚乙烯乙二醇,较佳分子量大约在 1 千道尔顿到 100 千道尔顿之间(术语“大约”是指制备聚乙烯乙二醇中,一些分子将重于所述的分子量,而另一些则轻于所述的分子量),这样容易操作和生产。根据预期的治疗情况(如,预期的释放持续时间、有关生物学活性的效果、操作容易程度、抗原性的程度或缺乏以及其它所知的聚乙烯乙二醇对治疗蛋白或类似物的效果),也可以使用其它大小的分子量。

聚乙烯乙二醇分子(或其它化学组成成分)应该附着在多肽上,同时考虑对多肽的功能域或抗原域的影响。对本领域的技术人员来说可以采用很多附着方法,如,EP0401384,本文引用作参考(将 G-CSF 偶联在 PEG 上),也参见 Malik 等人(1992) *Exp Hematol* 20(8):1028-35, reporting pegylation of GM-CSF using tresyl chloride)。例如,聚乙烯乙二醇可以通过一个反应基团,如,一游离氨基或羧基基团,与氨基酸残基共价结合。反应基团是那些可以与激活的聚乙烯乙二醇分子结合的基团。有一游离氨基基团的氨基酸残基可以包括赖氨酸残基和 N 末端氨基酸残基;那些有一游离羧基基团的残基可以包括天冬氨酸残基、谷氨酸残基和 C 末端残基。腓基基团也可以作为一个反应基团结合在聚乙烯乙二醇分子上。对于治疗目的,较佳结合是在一氨基基团上的结合,如在 N 末端或赖氨酸基团上的结合。

一抗蛋白水解的多肽,可以经这样生成,即用以下一个或多个的键:一(CH₂NH)还原键;一(NHCO) retro inverso 键;一(CH₂-O) 亚甲基-氧键;一(CH₂-S) 硫代亚甲基键;一(CH₂CH₂) carba bond;一(CO-CH₂) cetomethylene 键;一(CHOH-CH₂)羟乙基键);一(N-N) 键;一 E-alcene 键或一 -CH=CH- 键替换-CONH 肽键。因此,本发明也包括了一可溶的 CD164 或其变型,其中至少一个肽键如上所述业已被修饰。另外,氨基酸在体内有 L 或 D 手性。在一些实施例中,为了延长在体内的半衰期,最好改变氨基酸的手性。因此,在一些实施例中,一个或多个氨基酸较佳手性是 L 构象。在另一些实施例

中,一个或多个氨基酸较佳手性是 D 构象。

本发明的多肽以及相关试剂的治疗应用可以通过体内或体外测定来评价(在安全性、药代动力学和效率方面),采用检测细胞因子释放和/或表达抑制的动物细胞、组织和模型,这种抑制的检测也是体内或体外测定,如,细胞征集的抑制。在本发明中所述的进一步的生物和治疗活性特性可以应用各种各样的分子生物学技术得到,如二维电泳或 RNA 干扰。

一可溶蛋白向一在体脊椎动物的一细胞内部的输送方法的一特殊的实施例 包括如下步骤:将一制剂引入到一个含有细胞的组织空隙间,该制剂含有生理学上可接受的载体和一个可行地编码所需多肽的裸露的多聚核苷酸,籍此把裸露的多聚核苷酸吸收到细胞内部并起生理学作用。这是体外传递的具体应用,但也可以用于体内传递。

一个可溶蛋白编码的多聚核苷酸序列包含一至少与人 CD164 (SEQ ID NO: 1)的细胞外区域的成熟形式有 85%同源的序列,其可用于制备治疗和/或预防炎性和/或自身免疫性疾病的药物。这些多聚核苷酸也可用于生产表达重组 CD164 多肽的非人类动植物。此动物或植物可以是转基因的,即,它们每个细胞都含有一编码 CD164 多肽的基因,或一编码可以引导至此动物或植物的体细胞内的多肽的多聚核苷酸,如,到一哺乳动物乳腺分泌上皮细胞。在一种较佳的实施例中,此非人类动物一种哺乳动物如,牛、绵羊、山羊、猪或兔。生产转基因动物如哺乳动物的方法为所属技术领域的技术人员所公知,任何这种方法都可用于本发明中。而且,生产转基因哺乳动物可用于在乳汁中分泌重组可溶蛋白多肽。一般,所编码的多肽包括一个信号序列来保证这种蛋白分泌到乳汁中。

现有技术中叙述了一些在体外或体内用的组合物,其含有一“裸露”的多聚核苷酸(WO 90/11092; WO 95/11307; Tascon 等人, Nature Medicine 2: 888-892, 1996)。在本发明的另一个实施例中,将一裸露的多聚核苷酸转运到细胞可以与一粒子碰撞(biolistic)一起进行,所述粒子是 DNA 覆盖的微抛射体,加速至一高速度,刺穿细胞膜,进入细胞且不杀死细胞,如 Klein 等人((1990) Curr Genet Feb;17(2):97-103)描述。在进一步的实施例中,本发明的多聚核苷酸可被脂质体所俘获(Ghosh and Bacchawat, (1991) Targeted Diagn Ther 4:87-103; Wong 等人, (1980) Gene 10:87-94; Nicolau 等人, (1987) Methods Enzymol 149:157-76)。这些脂质体可以进一步通过结合瘦蛋白、甘油三酸酯、ACRP30 或其它已知的 LSR 配体到脂质体膜上指向表达 LSR 的细胞。注射到所预期的宿主体的载体量根据注射部位而变化。作为一种指示剂量,在动物体内载体注射量一般在 0.1 到 100 μg 之间,较佳在哺乳动物体,如一小鼠体。根据本发明,在另一载体的实施例中,载体可以体外引导到宿主细胞,较佳在之前从动物体内收获并经过处理的一宿主细胞,更佳的是

一体细胞如肌肉细胞。在以下步骤中，将随编码所需的 CD164 多肽的载体或其所需片段一起转化的细胞，重新引导到动物体内，以便把重组蛋白局部或系统地输送到体内。

对于体内给药，多聚核苷酸可以任何适合的制剂、以任何范围的浓度(如，1-500 $\mu\text{g/ml}$ ，较佳 50-100 $\mu\text{g/ml}$)、以任何体积(如，1-100 ml，较佳 1-20 ml)、以及可以任何次数给药(如，1、2、3、5、10 次)、以任何频率(如，每 1、2、3、5、10 或任何天数)。适合的浓度、频率、给药方式等都取决于具体的多聚核苷酸、载体、动物等，以及可以容易由一所属领域的技术人员确定。

包含一至少与人 CD164 (SEQ ID NO: 1)的细胞外区域的成熟形式有 85%同源的序列的可溶蛋白能够抑制炎症前期和/或与免疫相关的细胞因子的表达，因此相信有预防和/或治疗“炎性和/或自身免疫性疾病”的作用。

免疫系统的主要功能是保护个体抵抗外来侵入者如微生物的感染，它可能发生免疫系统攻击个体自身组织，导致称为自身免疫疾病的病理状态，这种状态经常和炎性过程相关联。

具体来说，CD4+T 细胞可以分成两种不同的子集，根据不同的、没有互相交集的细胞因子表达形式，称为 T 辅助 1 型细胞(Th1)和 T 辅助 2 型细胞(Th2)。Th1 的特征是分泌 IL-2、干扰素- γ 、IL-12 和 TNF- α ，Th2 的特征是分泌 IL-4、IL-5、IL-9、IL-10 和 IL-13。不过，没有明确的子集，因为 IFN- γ 和 IL-10 可以抑制与 Th1 和 Th2 响应相关联的效果，且 IL-4 和 IL-13 也可以促进 IL-12 的产生，由此促进 Th1 且潜在抑制 Th2 的响应。Th1 T 细胞能够介导巨噬细胞活性和延迟型超敏反应(DTH)，引起炎症前期或细胞介导的反应，而 Th2 T 细胞促进 IgG1 和 IgE 分泌，导致早期超敏反应(激素免疫；刺激抗体介导反应，激活柱状细胞以及引出组织嗜嗜红细胞过多)。Th1 在如风湿性关节炎、肉状瘤病和肺结核的疾病发病机理中起重要作用，而 Th2 涉及过敏、抗寄生虫反应和在哮喘的气道(如，纤维症中的作用)起作用。

一包括一至少与人 CD164 (SEQ ID NO: 1)的细胞外区域的成熟形式有 85%同源的序列的可溶蛋白作为药物或药物制剂可用于一些没有限定的疾病，包括：多发性硬化、系统性红斑狼疮、风湿性关节炎、青少年自发性关节炎、银屑病关节炎、骨关节炎、脊椎关节病、炎症性肠病、内毒素血症、克隆氏病、斯蒂尔氏病、眼色素层炎、韦格纳肉芽肿病、贝赫切特病、硬皮病、舍格伦综合症、肉状瘤病、坏疽性脓皮病、多肌炎、皮肌炎、心肌炎、牛皮癣、系统性硬化症、C 型肝炎、变态反应、变应性炎症、变应性气道炎症、慢性梗阻性肺病(COPD)、肠系膜梗塞、中风、溃疡性结肠炎、变应型哮喘、支气管哮喘、肠系膜梗塞、中风、纤维症、肌肉中的缺血后炎症、肾和心、皮肤炎症、

血管球性肾炎、青少年糖尿病 I 型、超敏性疾病、病毒或急性肝脏疾病、酒精性肝衰竭、结核病、败血病休克、HIV 感染、移植物抗宿主病(GVHD)和动脉硬化症。

风湿性关节炎是一种与关节炎的信号和病征有关的疾病。系统性红斑狼疮(SLE)的特征是皮肤上有红色鳞片状小片,是因为此病的晚期阶段肾脏的故障所引起,并与血管中特别是在肾脏中免疫复合物沉积引发的炎症反应相关。多发性硬化是一种人类疾病,其特征是复发、导致虚弱的发炎情况、身体颤动,在有些极端例子甚至瘫痪,并与免疫系统攻击保护性的包围周围神经细胞的髓鞘相关联。变应性炎症与基于 Th2 细胞的遗传性过敏症的病原一致。例如,在缺乏 IL-4 时,致敏有缺陷的 Th2 细胞导致在随后的气道测试后不产生变态炎性反应。业已证明,IL-5 和 IL-13 对特有的嗜嗜红细胞渗透和粘膜分泌过多有更直接的关系。

对于多发性硬化, Th1 介导的免疫反应被认为促进了疾病的发展,而 Th2 介导的免疫反应被认为对疾病的进程有改善作用。业已证明,表达 IL-10 的 T 细胞抑制实验性自身免疫脑脊髓炎(EAE),这是一种多发性硬化的大鼠模型。TNF- α 被假设为与诱发 EAE 相关(Th1 和 Th2 培养物都可以分泌 TNF- α)。

人系统性红斑狼疮(SLE)被认为是一 Th2 的反应所诱发。然而,在小鼠模型中,业已证明,IFN- γ 对疾病进程起主要作用,而 IL-4 被认为是介导疾病的维持。

心肌炎定义为心脏肌肉的炎症,被认为是在急性上呼吸道感染后一种对心脏特异性抗原的自身免疫反应介导的疾病。在实验性自身免疫性心肌炎的小鼠模型(EAM),其严重性随着施加抗 IL-4 后降低,显示了 IL-4 在疾病进展中的作用。

本发明的一进一步的实施例是在一个体中抑制一个或多个细胞因子表达的方法,其包括施加一种组合物给所述个体,此组合物包括一种含有一与人 CD164 (SEQ ID NO: 1)的细胞外区域成熟形式至少 85%同源序列的可溶蛋白。细胞因子可以是 TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-5 或 IL-10。这些方法包括提供或施加给个体需要时所述制药上或生理上可接受的如下组合物,并可考虑作为预防和/或治疗炎性和/或自身免疫性疾病的方法。

包含一种含有一与人 CD164 (SEQ ID NO: 1)的细胞外区域成熟形式至少 85%同源序列的可溶蛋白的药物组合物代表了本发明的另一个实施例,组合物里存在一个或多个制药上接受的赋形剂,是为了治疗炎性和/或自身免疫性疾病。这些组合物可以进一步包括附加的免疫抑制剂或抗炎物质。或者,含有可溶的药物组合物可以结合制成一种“鸡尾酒”用于各种治疗方案。

本发明的药物组合物也可以含有任何适合的制药上可接受的载体,生物学上兼容的

赋形剂和添加剂,其适合一动物给药(如生理盐水)以及包括辅助剂(如赋形剂,稳定剂或稀释剂),其易于把活性化合物加工成可在制药上使用的制剂。药物组合物可以以一种可接受的方法来配制,以满足给药模式不同的需要。例如,文献中揭示了输送药物的生物材料和其它聚合体在药物输送的应用以及,证实一种特异给药模式的不同的技术和模式。(Cleland JL 等人, *Curr Opin Biotechnol*, 12: 212-9, 2001; Luo B and Prestwich GD, *Exp Opin Ther Patents*, 11: 1395-1410, 2001)。

“制药上可接受的”意味着包括任何载体,其不干扰活性成分的生物学活性的效力并且对所给药的宿主无毒。例如,对于非消化道给药,以上活性成分可以配制成单位剂量形式以赋形剂来注射,如生理盐水、葡萄糖溶液、血清白蛋白和林格氏液。

所属领域的技术人员可以使用和决定任何可接受的给药模式来确定所预期的活性成分血液水平。例如,经各种非消化道途径给药,如皮下、静脉内、硬膜外、局部的、皮内、鞘内、直接心室内、腹膜内、经皮进入(如,以缓慢释放的制剂)、肌肉内、腹膜内、鼻内、肺内(吸入的)、眼内、口服或口含途径。非消化道给药可以是快速浓注或一段时间内逐步灌注。其它特别适宜的给药途径是气雾剂和贮存制剂。人们特别注意本发明的药物的持续释放制剂,特别是贮存的制剂。

非消化道给药的制备包括无菌水溶液或非水溶液、悬浮液和乳液,可以含有现有技术已知的辅助溶剂或赋形剂,且可根据常规方法制备。另外,可以施加作为适当的油性注射悬浮液的活性混合物悬浮液。适合的亲脂溶剂或赋形剂包括脂肪油,例如,芝麻油,或合成脂肪酸酯,如,油酸乙酯或甘油三酸酯。水性注射悬浮液可以含有增强悬浮液粘性的物质,包括,例如,羧甲基钠纤维素、山梨醇和/或右旋糖。悬浮液也可以选择地包含稳定剂。药物组合物包括适合的注射给药溶液,包含与赋形剂一起,活性成分占大约0.01%到99%,较佳占大约20%到75%。可以直肠给药的组合物包括栓剂。

对于非消化道(如,静脉内、皮下、肌肉内)给药,活性蛋白可以配制成溶液、悬浮液、乳液或冻干粉末,其溶于并联合制药上可接受的非消化道赋形剂(如,水、盐水、葡萄糖溶液)和维持等渗性的添加剂(如,甘露醇)或化学稳定剂(如,防腐剂和缓冲液)。制剂用常用技术消毒。对于经粘膜给药,将透过屏障的适当渗透剂用于制剂中。这种渗透剂一般为所属领域公知。

制药上或生理上接受的且可以口服的制剂包括凝胶制成的推入配合胶囊,也可以是凝胶和可塑剂制成的软而封口的胶囊,如甘油或山梨醇。推入配合胶囊可以在化合物和装填物如乳糖中含有活性成分,结合剂如淀粉和/或润滑剂如滑石或硬脂酸镁,以及任选稳定剂。在软胶囊中,活性化合物可以溶解于或悬浮于适合的液体中,如,脂肪油、液

体石蜡或液体聚乙二醇。另外,可加入稳定剂。所有口服制剂应该用适合于此种给药的剂量。

对于口含给药,组合物可以制成片剂或按传统方法制成的止咳糖。对于吸入给药,根据本发明,所用化合物很方便地以气雾剂喷雾的形式输送,此喷雾剂以加压包装或喷雾器加上适合的气体推进剂,如,二氧化碳。加压气雾剂剂量单位可经提供一阀门输送计量的数量来确定。在吸入器或吹入器中所用的如凝胶的胶囊和药筒可以制成含有一种由化合物和适合的粉末碱如乳糖或淀粉混合的粉末混合物。

化合物可以制成非消化道给药注射剂,如,快速浓注或持续灌输。注射制剂可以与防腐剂一起以单位剂量形式制备,如,安瓿或多剂量容器。组合物可制成如悬浮液、溶液或乳液在水性赋形剂中的形式,以及可以含有如悬浮、稳定和/或分散溶剂的配制剂。或者活性成分可以以粉末或冻干粉末的形式在使用之前与一适合的赋形剂如无菌,无热原的水相结合。

除了上述的制剂之外,化合物也可以制成制剂库。这种长期制剂可以植入给药(如,皮下或肌肉内植入)或肌肉内注射给药。因此,例如,化合物就可以与适合的聚合或疏水材料一起配制(如,以一种在可接受的油里的乳液)或离子交换树脂,或作为保守地可溶衍生物,如,保守地可溶盐。化合物也可以选择地用持续释放系统来输送,如含有治疗剂的固体疏水聚合体半透性基质。已经建立了各种持续释放材料且为所属领域的技术人员所公知。持续释放胶囊可以根据其化学性质在几周到100天内释放化合物。

当然,给药剂量根据接受者的年龄、性别、健康和体重、如果同时治疗则其类型、治疗频率、所期望的效果的性质而不同。剂量根据个体不同而不同,这可以为所属领域的技术人员理解和测定。

每次治疗所需总剂量可以多次给药也可以单次给药。本发明的药物组合物可以单独给药,或联合其它对症或针对疾病的其它症状的疗法。通常活性成分一天的剂量在每千克体重0.01到100mg之间或更多。通常每千克体重每天给予1到40mg以分开剂量或持续释放形式可以有效达到预期结果。第二次或随后的个体给药可以与初始剂量或之前的剂量相同、较少或较多。

“有效数量”是指一种活性成分的数量足够影响疾病的进程和严重程度,达到疾病病理上的减轻或免除。有效数量根据给药途径和病人的状况而不同。

剂量间隔可以用最小有效浓度值来确定。化合物给药应该用在10-90%的时间内维持血浆水平超过最小有效浓度的方案,较佳在30-90%之间,最佳在50-90%之间。在局部给药或选择性摄取时,药物的有效局部浓度与血浆水平无关。

组合物给药数量,当然因所治疗的个体在个体的体重、痛苦的严重性、给药方式和处方医生的判断而不同。作为单剂量或多剂量个体给药的剂量,根据各种因素而变化,包括药代动力学特性、给药途径、病人状况和特性(性别、年龄、体重、年龄、高矮)、症状的程度、同时进行治疗、治疗的频率和所期望的效果。

本发明的物质可以每天给药或较少频率地每二天给药。较佳地,本发明的一种或多种物质每周给药一次、二次或三次。通常每天剂量以分开剂量或持续释放形式以有效达到所预期的结果。第二次或随后的个体给药可以与初始剂量或之前的剂量相同、较少或较多。第二次或随后的个体给药可以在疾病发作时或之前进行。

根据本发明,本发明的物质可以以一种治疗上有效的数量个体,同时或相继与其它治疗方案或溶剂一起(如,多种药物方案)提前预防给药或治疗给药。与其它治疗剂同时给药的活性剂可以在相同或不同的组合物里给药。

对于任何用于本发明的方法的化合物,治疗上有效的剂量可以根据细胞培养测定初步估计。例如,一可以在动物模型中制成的剂量达到了血液循环中浓度范围包括或包含一个浓度点或范围,其显示出降低在体外系统的细胞因子表达。这些信息可以用于更精确地测量人类的有效剂量。一治疗上有效的剂量是指化合物的数量可达到病人症状的改善。这种化合物的毒性和治疗效率可以通过在细胞培养或实验动物中的标准药物程序来测定,如,测定 LD50(所测种群 50%的致死剂量)和 ED50%(种群 50%的治疗有效剂量)。在毒性和治疗效果之间的剂量比率作为剂量指数,可表达为 LD50 和 ED50 之间的比率。表现出高治疗指数的混合物较佳。从这些细胞培养和动物研究中所得到的数据可用于配制人类用药的剂量范围。这种化合物的剂量较佳位于血液循环浓度的范围,包括 ED50,且很少有或没有毒性。根据所应用的剂量以及给药途径,剂量可能在此范围内变化。精确的制剂、给药途径和剂量可以让医生根据病人的情况自己选择(参见,如, Fingl 等人, 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1)。

本发明也提供了新的筛选测定和包括可溶蛋白的试剂盒,此可溶蛋白含有一与人 CD164 (SEQ ID NO: 1)的细胞外区域成熟形式至少 85%同源序列,可用于鉴别和对比作为细胞因子分泌和表达抑制剂的化合物的特性。此试剂盒和测定应该包括一种含有一与人 CD164 (SEQ ID NO: 1)的细胞外区域成熟形式至少 85%同源序列的可溶蛋白,且最后标记和固定在固体支架上。

以下列出的定义是用于说明及限定本文中剑术本发明所用的术语的意思和范围。

如本文中交替地使用的那样,术语“低聚核苷酸”和“多核苷酸”及核酸,包括在单链或双链上的 RNA、DNA 或多于一个核苷酸的 RNA/DNA 杂交序列。术语包含“修饰的

核苷酸”，其包含至少一种修饰，包括，作为例子，但不限于：(a)一可选择的连接基团，(b)一类似形式的嘌呤，(c)一类似形式的嘧啶，或(d)一类似的糖。类似的连接基团、嘌呤、嘧啶和糖的例子在现有技术中已公知(WO95/04064)。编码可溶蛋白的多核苷酸可用已知方法制备，包括合成、重组、先体外后体内生产或其结合，以及用任何现有技术已知的纯化方法。

本文所用的术语多核苷酸构建物、重组多核苷酸和重组多肽与它们在所属技术领域中的用法一致。在本说明书中使用的术语“上游”和“下游”也和它们在所属技术领域中的用法一致。本文中交替使用的“碱基对”和“Watson & Crick 碱基对”与它们在所属技术领域中的用法一致。同样，本文中交替使用的术语“互补的”、“其补体”、“补体”、“互补多核苷酸”、“互补核酸”和“互补核苷酸序列”与它们在所属技术领域中的用法一致。

相似地，本说明书中所用的术语“纯化的”用于描述可溶蛋白已经从其它化合物分离出来，这些混合物包括但不限于核酸、脂质、碳水化合物和其它蛋白质。在一些较佳的实施例，当一样品中的多肽分子至少有 50%、60%、75%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 99.5%有单链氨基酸序列，多肽才是充分纯化。在一些较佳的实施例，一充分纯化的多肽与其蛋白质样品的重量/重量一般包括大约 50%、60%、75%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.5%。多肽纯度或均一性可经以下许多所属技术领域公知的方法显示，如，样品的琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳，然后进行凝胶染色来显示单链多肽。对于一些需要达到较高的分辨率的目的，可以用 HPLC 或其它所属技术领域公知的方法。

本文所进一步使用的术语“纯化的”不要求绝对纯度；它更相当于一个相对定义。很明显，开始材料或天然材料的纯化预期到至少一个数量级，较佳到2或3个数量级，更佳到4或5个数量级。相对于不均的多核苷酸(DNA、RNA 或两者)或多肽，纯化可选择地表达为“至少”一个百分比纯度。作为一较佳的实施例，CD164 多核苷酸或多肽相对于不均的多核苷酸或多肽，其纯度至少为 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、96%、98%、99%、99.5%或 100%。作为一进一步较佳的实施例，此多核苷酸或多肽纯度范围相对于不均的多核苷酸或多肽“至少”从任何数目到数千位置的范围在 90%到 100%之间(如，至少 99.995%的纯度)。另外，相对于除载体溶液外的所有材料和化合物，多核苷酸或多肽可以表达为一百分比(如上所述)。每个数目到数千位置，可以表明是个体种类的纯度。

术语“分离的”要求材料从它的初始环境中移除(如，如果天然产生则是天然环境)。例如，在活体动物体内的天然产生的多核苷酸或多肽是没有分离的，但是同样的多核苷

酸或 DNA 或多肽, 从一些或整个的天然系统中共同存在的材料上分开, 就是分离。这些多核苷酸可以是载体的一部分和/或这些多核苷酸或多肽可以是一种组合物的一部分, 在不是其天然环境中的一部分的载体或组合物中仍然被分离。

术语“引物”表示与一个目标核苷酸序列互补的一特殊低聚核苷酸, 用于杂合到目标核苷酸序列中。在被 DNA 聚合酶、RNA 聚合酶或反转录酶催化的核苷酸聚合反应中, 一引物作为起始点。

术语“蛋白质”或“多肽”是指一个与聚合体长度无关的氨基酸聚合体。因此, 肽、低聚肽和蛋白质都包括在多肽的定义中。这个术语不指定或排除多肽的表达后修饰。例如, 包括共价结合的糖基基团、乙酰基基团、磷酸基团、豆蔻酰基基团及其类似物的多肽很清楚地包含在术语多肽中。磷酸化或去磷酸化多肽也包括在定义中。含有一个或多个氨基酸类似物的多肽(包括, 例如, 非天然产生的氨基酸、只在无关生物系统中天然产生的氨基酸、从哺乳动物系统中修饰的氨基酸等等)、替代连接的多肽、以及在所属技术领域公知的天然产生或非天然产生的其它修饰, 也包括在定义中。

术语“包括”、“由...组成”和“实质上由...组成”根据它们的标准含义定义。在专利审查基准(M.P.E.P)中提出的规定的含义, 管束所属技术领域所规定的含义, 而一在适用的联邦巡回法院案例法中所规定的含义则管束在专利审查基准中所规定的含义。在这种情况下, 为了将特殊的含义与每一个术语联系起来, 术语在本申请中可互相替代。

本文所用的术语“治疗”是指在临床症状发作后施加一种化合物。

本文所用的术语“预防”是指在临床症状发作前施加一种化合物。

在本发明上下文中的术语“预防”不仅是指疾病或疾病的一个或多个症状的完全预防, 而且也指在疾病发作之前或早期任何部分的或实质的预防、衰减、减少、降低或减弱效果。

在本发明上下文中的术语“治疗”是指在疾病进展中的任何有益效果, 包括在疾病发作后病理发展的衰减、减少、降低或减弱。

本文所引用的所有参考资料包括杂志文章或摘要、公开的或未公开的美国或外国的专利申请、已颁发的美国或外国专利或其它文献, 都完全引入作为参考, 包括所引用的参考文献中的所有数据, 表格, 图例和文字。另外, 本文所引用的参考文献的完整内容也全部纳入本文作为参考。

参考已知方法步骤、常规方法步骤、已知方法或常规方法无论如何并不是认为, 本发明的任何方面、描述或实施例在相关技术领域内被揭示、教导或建议。

以下通过实施例将对本发明作叙述, 这无论如何不应当理解为对本发明的限定, 这

些实施例将涉及规定的图例。

以下所述的具体实施例将如此全面地阐述本发明的基本特性,以致于其它的人在实验方法适当、没有偏离本发明的基本概念的情况下,可以运用所属技术领域(包括本文中引用的参考文献的内容)的通常技术知识很容易为不同的应用对这样一些具体实施例作出变型和/或改型。因此,这样的一些变型和改型应当确定为基于本文中所提出的指导和指引的揭示的实施例的等同物的含义和范围之内。应当认为本文中的措辞或术语是为了方便叙述而并不是限定,本说明书的术语和措辞将可以由一般技术人员按照本文中所提出的指导和指引并结合所属技术领域的通常知识来解释。

实施例

实施例 1: 组氨酸标记的 sf-CD164 在哺乳动物细胞中的克隆、高生产量表达以及纯化

编码人 CD164 的全部细胞外区域的 cDNA 序列(NCBI Acc. No. NP_006007 中残基 1-163; SEQ ID NO: 3)用 Gateway™ 克隆技术(Invitrogen)亚克隆以生成一表达质粒。此表达质粒允许人 CD164(140 个氨基酸)细胞外区域的成熟形式作为一可溶融合蛋白的表达与分泌,此可溶融合蛋白具有 7 个组氨酸标记融合于其 C 末端(146 个氨基酸; sf-CD164; SEQ ID NO: 2),然后用于亲和纯化。天然 CD164 信号序列启动分泌(NCBI Acc. No. NP_006007 中残基 1-23; SEQ ID NO: 3)。

选择作为高生产量表达的哺乳动物细胞是人胚胎肾 293 细胞,它表达埃-巴二氏病毒核抗原(HEK293-EBNA, Invitrogen)。

细胞在 Ex-cell VPRO 无血清培养基中以悬浮液维持(种子储备,维持培养基, JRH Biosciences)。转化之前 16 到 20 小时(转化日 -1),将细胞种在(密度 2×10^5 细胞/ml) 2 个 T225 的长颈瓶里,每瓶含有 50 ml DMEM (Dulbecco 改进的 Eagle 培养基) / F12 (1:1) 与 2% FBS (胎牛血清)种植培养基(JRH Biosciences)。第二天(转化日 0)用 JetPEI™ 试剂 ($2 \mu\text{l}/\mu\text{g}$ 质粒; PolyPlus-转化)进行转化。每瓶中 $113 \mu\text{g}$ 的 sf-CD164 表达质粒与 $2.3 \mu\text{g}$ 的表达绿色荧光蛋白(GFP)的质粒一起转化。转化混合物然后加到 2 个 T225 的长颈瓶里并在 37°C ($5\% \text{CO}_2$)温育 6 天。在第 1 天和第 6 天用显微镜(Axiovert 10 Zeiss)证实阳性转化,根据 GFP 质量上评估荧光。在第 6 天(收集日),两长颈瓶中的上清液(100ml)汇集在一起并离心 (4°C , 400g),然后放进带有独特标签符号的罐中。

纯化过程可以从 100 和 500 ML 培养液样品开始,此样品为表达 C 末端的组氨酸标记重组蛋白质的细胞。样品用相同量的冷缓冲液 A ($50 \text{mM NaH}_2\text{PO}_4$; 600mM NaCl ; 8.7% (重量/体积)甘油, pH 7.5)分别稀释到最终容量 200 和 1000 ml。样品通过一 $0.22 \mu\text{m}$

无菌过滤纸 (Millipore, 500 ml 过滤单位)过滤, 并用无菌方形培养瓶保存于 4°C (Nalgene)。

在 4°C 时, 纯化在连接于一自动加样机(Labomatic)上的 VISION 工作平台(Applied Biosystems)上进行。纯化过程由两个相继的步骤组成, 先在一 Poros 20 MC (Applied Biosystems)柱上进行带电荷的镍离子(4.6 x 50 mm, 0.83 ml)的金属亲和层析, 然后在一 Sephadex G-25 介质(Amersham Pharmacia)柱(1,0 x 10 cm)里进行凝胶过滤。

对于第一次层析步骤金属亲和层析柱(镍柱)用 30 柱量的 EDTA 溶液(100 mM EDTA; 1 M NaCl; pH 8.0)再生, 通过用 15 柱量的 100 mM NiSO₄ 溶液洗涤, 用镍离子产生电荷, 用 10 柱量的缓冲液 A 洗涤, 然后用 7 柱量的缓冲液 B (50 mM NaH₂PO₄; 600 mM NaCl; 8.7 % (重量/体积)甘油, 400 mM; 咪唑, pH 7.5), 最后用 15 柱量的含有 15 mM 咪唑的缓冲液 A 平衡。样品用 Labomatic 加样机转移到一个 200 ml 样品圈, 之后用镍金属亲和柱以 10 ml/min 的流速使之带电荷。对于 1000 ml 样品, 充电过程需要重复 5 次。镍柱用 12 柱量的缓冲液 A, 然后用含有 20 mM 咪唑的 28 柱量的缓冲液 A 洗涤。在洗涤过程中, 松散结合的污染蛋白质将从柱上洗脱。重组组氨酸标记的蛋白质最后用 10 柱量的缓冲液 B 以 2 ml/min 的流速从镍柱上洗脱, 洗脱的蛋白质以 1.6 ml 馏分收集。

对于第二次层析步骤, Sephadex G-25 凝胶过滤柱用 2 ml 的缓冲液 D (1.137 M NaCl; 2.7 mM KCl; 1.5 mM KH₂PO₄; 8 mM Na₂HPO₄; pH 7.2) 再生, 之后用 4 柱量的缓冲液 C (137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 1.5 mM KH₂PO₄; 8 mM Na₂HPO₄; 20 % (重量/体积) 甘油; pH 7.4)平衡。从镍柱上所洗脱的峰值部分自动地通过 VISION 上的整合加样机加到 Sephadex G-25 柱里, 蛋白质随着缓冲液 C 以 2 ml/min 的流速洗脱。除去盐分的样品覆盖在一 2.2 ml 馏分上。此片段用一 0.22 μm 无菌离心过滤纸(Millipore)过滤, 分装, 冷冻并贮存在 - 80°C。样品的每一个小样用 SDS-PAGE (4-12 % NuPAGE 凝胶; Novex) 分析, 用抗组氨酸抗体进行考马斯染色和蛋白质印迹。

考马斯染色是将 NuPAGE 凝胶放在 0.1 % 考马斯蓝 R250 染色溶液(30 % 甲醇, 10 % 醋酸)里在室温下温育 1 小时。随后凝胶在 20%甲醇, 7.5%醋酸中去色, 直到背景清楚以及蛋白质带清晰可见。

对于蛋白质印迹, 在 4°C 蛋白质以 290 mA 从 NuPAGE 凝胶对一硝化纤维膜电转移 1 小时。此膜被含有 5 % 奶粉的缓冲液 E (137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 1.5 mM KH₂PO₄; 8 mM Na₂HPO₄; 0.1 % Tween 20, pH 7.4)在室温下封闭 1 小时, 随后在 4°C 下与 2 种兔多克隆抗组氨酸抗体(G-18 和 H-15, 每种 0.2 ug/ml; Santa Cruz)的混合物在含有 2.5 %奶粉

的缓冲液 E 中温育过夜。之后在室温下温育 1 小时,用缓冲液 E (3 x 10 分钟)洗涤此膜,然后与含有 2.5 %奶粉的缓冲液 E 中的第二抗体 HRP-偶联的抗兔抗体(DAKO, HRP 0399)稀释到 1/3000 在室温下温育 2 小时。用缓冲液 E (3 x 10 分钟)洗涤之后,膜用 ECL 试剂盒(Amersham Pharmacia)显影 1 分钟。之后将膜曝光在一超胶片上(Amersham Pharmacia),将胶片定影,可以在视觉上分析蛋白质印记的图像。

样品中的蛋白质浓度用 BCA 蛋白质测定试剂盒(Pierce)来测定,标准为牛血清白蛋白。

实施例 2: 基于细胞测定来测量的 sf-CD164 对细胞因子释放的效果

以下基于细胞的体外测定测量 sf-CD164 对受伴刀豆球蛋白 A (Con A)诱导的细胞因子分泌的效果,其根据对 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-5、IL-4 和 IL-10 进行细胞因子成珠排列(CBA)来测量。

使用以下装置和软件:

- 96 孔微量滴定板光度计 EX (Labsystem).
- Graph Pad 软件 (Prism)
- Excel 软件(Microsoft)
- 流式细胞仪(Becton-Dickinson)
- CBA 分析软件
- 用于细胞培养的空气罩
- 细胞培养温育箱
- 离心机
- 加样枪

使用以下材料和溶剂:

- 暗黄层
- DMEM (GIBCO)
- 人血清 AB 型(SIGMA)
- L-谷氨酰胺 (GIBCO)
- 青霉素-链霉素 (GIBCO)
- 菲可 (PHARMACIA)
- 96 孔微量滴定板,用于细胞培养 (COSTAR)

- 伴刀豆球蛋白 A (SIGMA)
- 人 Th1/Th2 细胞因子 CBA Kit (Becton-Dickinson)
- PBS (GIBCO)
- 50 ml 无菌管 (Becton-Dickinson)
- 牛血清白蛋白 (BSA; SIGMA)
- 甘油 (MERCK)
- 二甲基甲酰胺(DMSO; SIGMA)
- 96 孔微量滴定板圆锥形底板 (NUNC)
- 自动 MACS™ 分离机和 MACS 细胞分离试剂盒(Miltenyl Biotec)

将细胞分离出来, 用于以下基于细胞的测定。

人外周血单核细胞(PBMC)从 DMEM 稀释的暗黄层分离出来。25 ml 的稀释血液缓慢加到在一 50 ml 无菌管里的一 15 ml 菲可层, 然后将管离心 (2000 rpm, 20 分钟, 室温下不停)。收集界面间的细胞(环)并用 25 ml 的 DMEM 洗涤, 再离心 (1200 rpm, 5 分钟)。过程重复三次。一暗黄层大约有总细胞数 600×10^6 。

白细胞亚群(T 细胞, B 细胞, 单核细胞)根据分离试剂盒制造商(MACS; Miltenyl Biotec)的用法说明用 PBMC 制备。如上所述, PBMC 从暗黄层分离。过程中小心以保证单细胞悬浮液。对于制备 CD4+ T 细胞, 使用 CD4+ T 细胞分离试剂盒 II (目录号 130-091-155, Miltenyl Biotec)。PBMC 计数, 离心 10 分钟然后重新悬浮于冷 PBS 缓冲液 (磷酸盐缓冲液 pH 7.2, 另加 0.5% BSA 和 2mM EDTA), 每毫升含 2.5×10^8 个细胞 (每 10^7 个细胞 40 μ l 的缓冲液)。在 10 μ l 的生物素-抗体鸡尾酒(与试剂盒一起提供)中加入 10^7 总细胞。悬浮液混合均匀, 在 4-8 °C 温育 10 分钟。之后 30 μ l 的缓冲液加入 10^7 细胞, 每 10^7 总细胞用 20 μ l 的抗生物素微小颗粒。悬浮液再次混合均匀继续在 4-8 °C 温育另外 15 分钟。细胞加入 10-20x 所标记的量的缓冲液进行洗涤, 然后在 300xg 离心 10 分钟。完全弃上清液, 以 500 μ l 的缓冲液中不超过 10^8 重新悬浮细胞。用一自动 MACS™ 分离机进行磁性分离。自动 MACS™ 分离机根据制造商的用法说明准备。含有磁力标记的细胞的小管放置在自动 MACS™ 分离机, 选择程序 “耗尽”。收集阴性片段(输出端 “阴性 1”)。这个片段代表了 T 浓缩的 CD4+ T 细胞。根据要求, 之后收集阳性片段(输出端 “阳性 1”)。这个片段代表磁力标记的非 CD4+ T 细胞。

基于细胞的测定应用条件如下:

- 96 孔板中 2 % 甘油最终浓度 100 μ l 含 100 000 细胞/孔。
- 5 ng/ml 的促细胞分裂剂伴刀豆球蛋白 A (ConA)。

- 每个测定需 48 小时。

在每个孔里的细胞混合均匀。

- 80 μl 的 1.25×10^6 细胞/ml 稀释于 DMEM +2.5% 人血清 +1% L-谷氨酰胺 +1% 青霉素-链霉素。

- 10 μl 含有稀释于 PBS +20% 甘油(蛋白质最终稀释到 1/10)sf-CD164 的溶液;

- 10 μl ConA。

48 小时后, 收集细胞上清液, 用人 Th1/Th2 细胞因子 CBA 试剂盒(Becton-Dickinson) 测量人细胞因子。

混合的人 Th1/Th2 捕获珠悬浮液在和微孔板中的样品混合之前涡旋震荡几秒钟。对于每个需要分析的测定, 每 10 μl 捕获珠加到一标记“混合捕获珠”的单管中。捕获珠混合物充分混合。用测定稀释剂(20 μl 上清液 + 60 μl 测定稀释剂)稀释(1:4) 上清液。稀释的样品转移到一 96 孔微量滴定板圆锥形底板(Nunc)之前混合均匀。

50 μl 的稀释上清液加入到一 96 孔微量滴定板圆锥形底板(Nunc)进行人 Th1/Th2 细胞因子 CBA 测定。再加入 50 μl 的混合捕获珠, 然后加入 50 μl 的人 Th1/Th2 PE 检测溶剂。96 孔板在室温下温育 3 小时, 避光, 然后在 1500rpm 下离心 5 分钟。小心弃上清液。之后, 每个孔里两次加入 200 μl 的洗涤缓冲液, 在 1500rpm 下离心 5 分钟然后小心弃上清液。之后每个孔里加入 130 μl 的洗涤缓冲液重新悬浮捕获珠小球。样品最后在流式细胞仪中分析。用 CBA 应用软件、Activity Base 和微软 Excel 软件分析数据。

sf-CD164 对从人 PBMC 细胞(混合物)和分离的 T 细胞的细胞因子释放的效果, 测量六种细胞因子: TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-5 和 IL-10。在两种基于细胞的测定中, 这些细胞因子的释放以依赖 sf-CD164 的剂量的方式显著减少(IC₅₀ 总结于表格 III)。两种典型的人 PBMC 和分离的 CD4⁺ T 细胞的 IL-2 和 TNF- α 剂量依赖曲线分别示于图 2 和 3。

实施例 3: 使用 LPS 诱导的 TNF- α 释放动物模型测量施加 sf-CD164 对细胞因子释放的效果

在小鼠中脂多糖(LPS)诱导的 TNF- α 释放的模型根据专利 WO98/38179 建立。在 C3H/HeN 小鼠(Charles River, France)腹膜内注射 LPS(O111:B4;SIGMA) (0.3 mg/kg)。九十分钟后血液取样并用一 ELISA 试剂盒(R&D)测定血浆 TNF- α 。在施加 LPS 之前 15 分钟, sf-CD164 和地塞米松稀释于 PBS 中注射(sf-CD164 以 0.03、0.1 和 0.3 mg/kg, 静脉注射; 或地塞米松以 0.1 mg/kg, 皮下)。

用于阳性对照的抗炎混合物地塞米松显著($p < 0.001$)抑制 LPS 诱导的 TNF- α 释放达 72%。0.3 mg/kg 的 sf-CD164 显著($p < 0.01$) 抑制 LPS 诱导的 TNF- α 释放达 38% (图 4)。较低剂量 0.03 和 0.1 mg/kg 能够抑制 TNF- α 但在统计学上显著性较小。

实施例 4: 使用两种动物模型测量施加 sf-CD164 对免疫细胞征集的效果

施加 sf-CD164 对免疫细胞征集的效果首次用巯乙酸盐诱导的白细胞腹膜征集测定 (图 5)。

小鼠(C3H 株, 8 周龄, $n=6$; Elevage Janvier, 法国)注射稀释于含有 0.02% BSA 的 PBS 的 sf-CD164 (0.03、0.1 和 0.3 mg/kg, 静脉注射) 或地塞米松(1 mg/kg, 皮下)。在施加待测的分子 15 分钟后注射巯乙酸盐(1.5%, 40 ml/kg, 腹膜下注射; SIGMA)。24 小时后第二次施加待测分子。与巯乙酸盐作用四十八小时后, 处死小鼠, 用 2 x 5 ml PBS-1mM EDTA (+4°C)进行腹腔灌洗。离心(10 分钟, 3000 rpm)后, 细胞小球重新悬浮于 1 ml PBS。用一 Beckman/Coulter 计数器进行腹腔细胞计数。

地塞米松显著抑制($p < 0.001$)巨噬细胞的征集达 69%。这个效果是有剂量依赖的。Sf-CD164 (0.03、0.1 和 0.3 mg/kg)显著抑制巯乙酸盐诱导的腹膜巨噬细胞征集分别达 5%、26% ($p < 0.05$)和 43% ($p < 0.001$), 淋巴细胞(分别达 14%、18% 和 34%)和中性粒细胞腹膜征集(分别达 3%、9% 和 23%)也一样。

在 LPS 诱导的中性粒细胞和淋巴细胞征集中得到相同的结果(图 5)。

对于 LPS (O111:B4, Sigma; 0.9 mg/kg, 40 ml/kg, 腹膜下注射)使用如上所述的相同的给药流程。sf-CD164 (0.03、0.1 和 0.3 mg/kg) 显著抑制 LPS 诱导的中性粒细胞腹膜征集分别达 9%、35% ($p < 0.001$)和 43% ($p < 0.001$)。相同剂量下也显著抑制激活的淋巴细胞征集分别达 8%、26% ($p < 0.05$)和 47% ($p < 0.001$)。地塞米松(0.1 mg/kg)显著($p < 0.001$)抑制激活的淋巴细胞征集。

实施例 5: 在基于细胞测定中 sf-CD164 对 MBP 特异性抗原加工和呈递的效果

发展一种测定方法来检测 sf-CD164 在髓鞘碱性蛋白(MBP)特异性 T 细胞受髓鞘碱性蛋白肽 Ac1-11 (MBP(Ac1-11))诱导后增殖的效果。已经显示外皮免疫(ECi)和髓鞘碱性蛋白(MBP)的免疫优势肽, Ac1-11, 保护 Ac1-11 特异性 T 细胞受体转基因小鼠对抗诱导式和自发式实验性过敏性脑脊髓炎(EAE)。

收集并匀化 B10.PL 和 MBP 转基因小鼠的脾脏以得到单细胞悬浮液。用盖氏(Gay's)溶液溶解红细胞后, 脾细胞重新悬浮于 PBS, 洗涤并计数。

在分离程序后,用苔盼兰染色显示细胞存活率超过 90%。B10.PL 抗原呈递细胞(APCs)经 25 Gy 的 g-照射(刺激物)照射,洗涤并以 1.9×10^6 细胞/ml 重新悬浮于完全培养基。在完全培养基里反应细胞总数调节在 3.8×10^6 细胞/ml。在 96 孔板里每孔混合细胞悬浮液 80 μ l。然后以体积比 20 μ l: 10 μ g/ml 的 MBP 鼠科或 1 μ g/ml 的 Ac 1-11 MBP 肽(适当的阴性对照分别是 BSA、MSA 和一无关 MBP-衍生的肽)加入抗原。加入 20 μ l 的蛋白或小分子,然后在 37 $^{\circ}$ C 含有 5% CO₂ 的潮湿环境里温育。培养 3 天后,收集上清冷冻于 - 80 $^{\circ}$ C 直到检测细胞因子产物或加入 1 μ Ci 的 ³H 胸苷温育 14-16 小时后进行放射性计数。

sf-CD164 (50 μ g/ml)显著抑制受 Ac1-11 (1 μ g/ml; 图 6)诱导的 MBP 特异性 T 细胞的增殖。因此,sf-CD164 或可溶 CD164 可能治疗多发性硬化有用。

实施例 6: 在暴发型肝炎动物模型中施加 sf-CD164 的效果

根据 ConA 刺激的人外周血单核细胞(PBMC),体外已经显示 sf-CD164 蛋白抑制某些细胞因子的分泌。既然细胞因子在 T 细胞诱导 ConA 诱导的肝炎起重要作用(Seino 等人 2001, *Annals of surgery* 234, 681; Kusters S, *Gastroenterology* 111(2):462-71, 1996; Toyonaga 等人 1994, *PNAS* 91, 614-618),我们在这个模型中检测 sf-CD164。

使用 C57/BL6 雌性小鼠(8 周龄; IFFA CREDO)。一般地,每个实验组用 7 只动物。小鼠在 12 小时光-暗周期,提供经过照射的食物和水标准条件下随意喂养。

以 18mg/kg 静脉注射伴刀豆球蛋白 A (ConA; Sigma 参考 C7275),在注射后 1.30 and 8 小时抽取血样。ConA 注射前 30 分钟注射 sf-CD164。阳性对照注射地塞米松(0.1 mg/kg),阴性对照注射含 1.8% 甘油的 PBS-BSA。处死时从心脏抽取血液。ConA 注射 1.5 小时后用 TH1/TH2 CBA 测定来测量 IL-6 和 IFN- γ 细胞因子水平。血液转氨酶参数用 COBAS 仪器(Hitachi)测定。

实验显示,皮下注射 sf-CD164 后,sf-CD164 (1 mg/kg)在模仿暴发型肝炎的小鼠模型中保护肝脏免受损害,它降低了相关参数如转氨酶水平(ALAT)、IFN- γ 和 IL-6 细胞因子水平(图 7)。ALAT 水平的降低可能由于 IFN- γ 和 IL-6 水平的降低。注射 ConA 后肝脏损坏涉及不同的细胞因子。例如,抗 TNF- α 抗体具有保护细胞抵抗疾病的功能(Seino 等人 2001, *Annals of surgery* 234, 681)和抑制 NKT 细胞产生 IL-4 显示出在小鼠的 T 细胞介导的肝炎中有保护肝细胞的作用(Ajuebor 等人 2003 *J. Immunology* 170, 5252-9)。

表 1

氨基酸	同义组	更佳同义组
Ser	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Arg	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Leu	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Pro	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Pro
Thr	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala, Ser	Gly, Ala
Val	Met, Phe, Ile, Leu, Val	Met, Ile, Val, Leu
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly	Gly, Ala
Ile	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Phe	Trp, Phe, Tyr	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Tyr	Phe, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys	Cys
His	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Gln	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Asn	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Lys	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Asp	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Glu	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp, Phe, Tyr	Trp

表 2

氨基酸	同义组
Ser	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Arg	D-Arg, Lys, D-Lys, 人-Arg, D-人-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Leu	D-Leu, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Pro	D-Pro, L-I-硫代氮杂环戊烷-4-羧基酸, D-或 L-1-1,3-噁唑烷-4-羧基酸
Thr	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
Ala	D-Ala, Gly, Aib, B-Ala, Acp, L-Cys, D-Cys
Val	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met, AdaA, AdaG
Gly	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, .beta.-Ala, Acp
Ile	D-Ile, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Phe	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, 反式-3,4, or 5-苯基脯氨酸, AdaA, AdaG, 顺式-3,4, or 5-苯基脯氨酸, Bpa, D-Bpa
Tyr	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Cys	D-Cys, S--Me--Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Gln	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Asn	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Lys	D-Lys, Arg, D-Arg, 人-Arg, D-人-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Asp	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Glu	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Met	D-Met, S--Me--Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val

表 3

细胞因子	PBMC 的 IC50	CD4+ T 细胞 的 IC50
TNF- α	0.66 $\mu\text{g/ml}$	1.6 $\mu\text{g/ml}$
IFN- γ	0.84 $\mu\text{g/ml}$	1.6 $\mu\text{g/ml}$
IL-2	0.46 $\mu\text{g/ml}$	1.2 $\mu\text{g/ml}$
IL-4	0.52 $\mu\text{g/ml}$	1.5 $\mu\text{g/ml}$
IL-5	1.19 $\mu\text{g/ml}$	3.3 $\mu\text{g/ml}$
IL-10	0.53 $\mu\text{g/ml}$	3.0 $\mu\text{g/ml}$

序列表

- <110> 应用研究系统 ARS 股份公司 (Applied Research Systems ARS Holding N.V.)
- <120> 可溶性 CD164 在炎性和/或自身免疫性疾病中的应用
- <130> PCT883
- <160> 8
- <170> PatentIn 版本 3.2
- <210> 1
- <211> 140
- <212> PRT
- <213> 智人
- <220>
- <221> 推定-粘液素-核心-蛋白-24
- <222> (1).. (140)
- <220>
- <221> N-交联-GLCNAC
- <222> (3).. (3)
- <220>
- <221> N-交联-GLCNAC
- <222> (9).. (9)
- <220>
- <221> O-交联
- <222> (11).. (11)
- <220>
- <221> O-交联
- <222> (12).. (12)
- <220>
- <221> O-交联
- <222> (17).. (17)
- <220>
- <221> N-交联-GLCNAC
- <222> (18).. (18)

<220>

<221> O-交联

<222> (20).. (20)

<220>

<221> O-交联

<222> (21).. (21)

<220>

<221> O-交联

<222> (25).. (25)

<220>

<221> O-交联

<222> (26).. (26)

<220>

<221> O-交联

<222> (31).. (31)

<220>

<221> O-交联

<222> (32).. (32)

<220>

<221> N-交联-GLCNAC

<222> (49).. (49)

<220>

<221> N-交联-GLCNAC

<222> (54).. (54)

<220>

<221> N-交联-GLCNAC

<222> (71).. (71)

<220>

<221> CK2-磷酸化-位点

<222> (73).. (76)

<220>

<221> N-交联-GLCNAC

<222> (81).. (81)

<220>

<221> O-交联

<222> (89)..(89)

<220>

<221> O-交联

<222> (90)..(90)

<220>

<221> O-交联

<222> (92)..(92)

<220>

<221> O-交联

<222> (96)..(96)

<220>

<221> N-交联-GLCNAC

<222> (98)..(98)

<220>

<221> O-交联

<222> (99)..(99)

<220>

<221> O-交联

<222> (100)..(100)

<220>

<221> PKC-磷酸化-位点

<222> (100)..(102)

<220>

<221> O-交联

<222> (104)..(104)

<220>

<221> O-交联

<222> (108)..(108)

<220>

<221> O-交联

<222> (110)..(110)

<220>

<221> O-交联

<222> (111)..(111)

<220>

<221> O-交联

<222> (112)..(112)

<220>

<221> PKC-磷酸化-位点

<222> (112)..(114)

<220>

<221> O-交联

<222> (113)..(113)

<220>

<221> O-交联

<222> (115)..(115)

<220>

<221> O-交联

<222> (117)..(117)

<220>

<221> O-交联

<222> (118)..(118)

<220>

<221> O-交联-粘多糖

<222> (119)..(119)

<220>

<221> 肉豆蔻基

<222> (120)..(125)

<220>

<221> O-交联

<222> (121)..(121)

<220>

<221> O-交联

<222> (122)..(122)

<220>

<221> N-交联-GLCNAC

<222> (123)..(123)

<220>

<221> O-交联

<222> (125)..(125)

<220>

<221> O-交联

<222> (127)..(127)

<220>

<221> O-交联

<222> (129)..(129)

<220>

<221> O-交联

<222> (130)..(130)

<220>

<221> CAMP-磷酸化-位点

<222> (134)..(137)

<220>

<221> O-交联

<222> (136)..(136)

<220>

<221> CK2-磷酸化-位点

<222> (136)..(139)

<400> 1

Asp	Lys	Asn	Thr	Thr	Gln	His	Pro	Asn	Val	Thr	Thr	Leu	Ala	Pro	Ile
1				5					10					15	

Ser	Asn	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Val	Thr	Ser	Leu	Pro	Leu	Val	Thr	Thr
			20					25					30		

Pro	Ala	Pro	Glu	Thr	Cys	Glu	Gly	Arg	Asn	Ser	Cys	Val	Ser	Cys	Phe
		35					40					45			

Asn Val Ser Val Val Asn Thr Thr Cys Phe Trp Ile Glu Cys Lys Asp
50 55 60

Glu Ser Tyr Cys Ser His Asn Ser Thr Val Ser Asp Cys Gln Val Gly
65 70 75 80

Asn Thr Thr Asp Phe Cys Ser Val Ser Thr Ala Thr Pro Val Pro Thr
85 90 95

Ala Asn Ser Thr Ala Lys Pro Thr Val Gln Pro Ser Pro Ser Thr Thr
100 105 110

Ser Lys Thr Val Thr Thr Ser Gly Thr Thr Asn Asn Thr Val Thr Pro
115 120 125

Thr Ser Gln Pro Val Arg Lys Ser Thr Phe Asp Ala
130 135 140

<210> 2

<211> 146

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Asp Lys Asn Thr Thr Gln His Pro Asn Val Thr Thr Leu Ala Pro Ile
1 5 10 15

Ser Asn Val Thr Ser Ala Pro Val Thr Ser Leu Pro Leu Val Thr Thr
20 25 30

Pro Ala Pro Glu Thr Cys Glu Gly Arg Asn Ser Cys Val Ser Cys Phe
35 40 45

Asn Val Ser Val Val Asn Thr Thr Cys Phe Trp Ile Glu Cys Lys Asp
50 55 60

Glu Ser Tyr Cys Ser His Asn Ser Thr Val Ser Asp Cys Gln Val Gly
65 70 75 80

Asn Thr Thr Asp Phe Cys Ser Val Ser Thr Ala Thr Pro Val Pro Thr
85 90 95

Ala Asn Ser Thr Ala Lys Pro Thr Val Gln Pro Ser Pro Ser Thr Thr

Thr Asn Asn Thr Val Thr Pro Thr Ser Gln Pro Val Arg Lys Ser Thr
145 150 155 160

Phe Asp Ala Ala Ser Phe Ile Gly Gly Ile Val Leu Val Leu Gly Val
165 170 175

Gln Ala Val Ile Phe Phe Leu Tyr Lys Phe Cys Lys Ser Lys Glu Arg
180 185 190

Asn Tyr His Thr Leu
195

<210> 4

<211> 184

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Met Ser Arg Leu Ser Arg Ser Leu Leu Trp Ala Ala Thr Cys Leu Gly
1 5 10 15

Val Leu Cys Val Leu Ser Ala Asp Lys Asn Thr Thr Gln His Pro Asn
20 25 30

Val Thr Thr Leu Ala Pro Ile Ser Asn Val Thr Ser Ala Pro Val Thr
35 40 45

Ser Leu Pro Leu Val Thr Thr Pro Ala Pro Glu Thr Cys Glu Gly Arg
50 55 60

Asn Ser Cys Val Ser Cys Phe Asn Val Ser Val Val Asn Thr Thr Cys
65 70 75 80

Phe Trp Ile Glu Cys Lys Asp Glu Ser Tyr Cys Ser His Asn Ser Thr
85 90 95

Val Ser Asp Cys Gln Val Gly Asn Thr Thr Asp Phe Cys Ser Ala Lys
100 105 110

Pro Thr Val Gln Pro Ser Pro Ser Thr Thr Ser Lys Thr Val Thr Thr
115 120 125

Ser Gly Thr Thr Asn Asn Thr Val Thr Pro Thr Ser Gln Pro Val Arg
 130 135 140

Lys Ser Thr Phe Asp Ala Ala Ser Phe Ile Gly Gly Ile Val Leu Val
 145 150 155 160

Leu Gly Val Gln Ala Val Ile Phe Phe Leu Tyr Lys Phe Cys Lys Ser
 165 170 175

Lys Glu Arg Asn Tyr His Thr Leu
 180

<210> 5

<211> 178

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Met Ser Arg Leu Ser Arg Ser Leu Leu Trp Ala Ala Thr Cys Leu Gly
 1 5 10 15

Val Leu Cys Val Leu Ser Ala Asp Lys Asn Thr Thr Gln His Pro Asn
 20 25 30

Val Thr Thr Leu Ala Pro Ile Ser Asn Val Thr Ser Ala Pro Val Thr
 35 40 45

Ser Leu Pro Leu Val Thr Thr Pro Ala Pro Glu Thr Cys Glu Gly Arg
 50 55 60

Asn Ser Cys Val Ser Cys Phe Asn Val Ser Val Val Asn Thr Thr Cys
 65 70 75 80

Phe Trp Ile Glu Cys Lys Asp Glu Ser Tyr Cys Ser His Asn Ser Thr
 85 90 95

Val Ser Asp Cys Gln Val Gly Asn Thr Thr Asp Phe Cys Ser Val Ser
 100 105 110

Thr Ala Thr Pro Val Pro Thr Ala Asn Ser Thr Gly Thr Thr Asn Asn
 115 120 125

Thr Val Thr Pro Thr Ser Gln Pro Val Arg Lys Ser Thr Phe Asp Ala

130	135	140	
Ala Ser Phe Ile Gly Gly Ile Val Leu Val Leu Gly Val Gln Ala Val			
145	150	155	160
Ile Phe Phe Leu Tyr Lys Phe Cys Lys Ser Lys Glu Arg Asn Tyr His			
	165	170	175

Thr Leu

<210> 6
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> 信号
 <222> (1)..(23)

<220>
 <221> 推定-粘液素-核心-蛋白-24
 <222> (24)..(189)

<220>
 <221> N-交联-GLCNAC
 <222> (26)..(26)

<220>
 <221> N-交联-GLCNAC
 <222> (32)..(32)

<220>
 <221> O-交联
 <222> (34)..(34)

<220>
 <221> O-交联
 <222> (35)..(35)

<220>
 <221> O-交联
 <222> (40)..(40)

<220>

<221> N-交联-GLCNAC

<222> (41).. (41)

<220>

<221> O-交联

<222> (43).. (43)

<220>

<221> O-交联

<222> (44).. (44)

<220>

<221> O-交联

<222> (48).. (48)

<220>

<221> O-交联

<222> (49).. (49)

<220>

<221> O-交联

<222> (54).. (54)

<220>

<221> O-交联

<222> (55).. (55)

<220>

<221> N-交联-GLCNAC

<222> (72).. (72)

<220>

<221> N-交联-GLCNAC

<222> (77).. (77)

<220>

<221> N-交联-GLCNAC

<222> (94).. (94)

<220>

<221> N-交联-GLCNAC

<222> (104).. (104)

<220>

<221> O-交联

<222> (112)..(112)

<220>

<221> O-交联

<222> (113)..(113)

<220>

<221> O-交联

<222> (115)..(115)

<220>

<221> O-交联

<222> (119)..(119)

<220>

<221> N-交联-GLCNAC

<222> (121)..(121)

<220>

<221> O-交联

<222> (122)..(122)

<220>

<221> O-交联

<222> (123)..(123)

<220>

<221> O-交联

<222> (127)..(127)

<220>

<221> O-交联

<222> (131)..(131)

<220>

<221> O-交联

<222> (133)..(133)

<220>

<221> O-交联

<222> (134)..(134)

<220>

<221> 0-交联

<222> (135).. (135)

<220>

<221> 0-交联

<222> (136).. (136)

<220>

<221> 0-交联

<222> (138).. (138)

<220>

<221> 0-交联

<222> (140).. (140)

<220>

<221> 0-交联

<222> (141).. (141)

<220>

<221> 0-交联-粘多糖

<222> (142).. (142)

<220>

<221> 0-交联

<222> (144).. (144)

<220>

<221> 0-交联

<222> (145).. (145)

<220>

<221> N-交联-GLCNAC

<222> (146).. (146)

<220>

<221> 0-交联

<222> (148).. (148)

<220>

<221> 0-交联

<222> (150).. (150)

<220>

<221> O-交联

<222> (152)..(152)

<220>

<221> O-交联

<222> (153)..(153)

<220>

<221> O-交联

<222> (159)..(159)

<400> 6

Met Ser Arg Leu Ser Arg Ser Leu Leu Trp Ala Ala Thr Cys Leu Gly
 1 5 10 15

Val Leu Cys Val Leu Ser Ala Asp Lys Asn Thr Thr Gln His Pro Asn
 20 25 30

Val Thr Thr Leu Ala Pro Ile Ser Asn Val Thr Ser Ala Pro Val Thr
 35 40 45

Ser Leu Pro Leu Val Thr Thr Pro Ala Pro Glu Thr Cys Glu Gly Arg
 50 55 60

Asn Ser Cys Val Ser Cys Phe Asn Val Ser Val Val Asn Thr Thr Cys
 65 70 75 80

Phe Trp Ile Glu Cys Lys Asp Glu Ser Tyr Cys Ser His Asn Ser Thr
 85 90 95

Val Ser Asp Cys Gln Val Gly Asn Thr Thr Asp Phe Cys Ser Val Ser
 100 105 110

Thr Ala Thr Pro Val Pro Thr Ala Asn Ser Thr Ala Lys Pro Thr Val
 115 120 125

Gln Pro Ser Pro Ser Thr Thr Ser Lys Thr Val Thr Thr Ser Gly Thr
 130 135 140

Thr Asn Asn Thr Val Thr Pro Thr Ser Gln Pro Val Arg Lys Ser Thr
 145 150 155 160

Phe Asp Ala Ala Ser Phe Ile Gly Gly Ile Val Leu Val Leu Glu Ile
 165 170 175

Arg Cys His Thr Arg Asn Tyr Ile Pro Asp Leu Lys Lys
 180 185

<210> 7
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> 各种特征
 <222> (174)..(174)
 <223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
 <221> 各种特征
 <222> (177)..(177)
 <223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
 <221> 各种特征
 <222> (186)..(186)
 <223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
 <221> 各种特征
 <222> (189)..(189)
 <223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 7

Met Ser Arg Leu Ser Arg Ser Leu Leu Trp Ala Ala Thr Cys Leu Gly
 1 5 10 15

Val Leu Cys Val Leu Ser Ala Asp Lys Asn Thr Thr Gln His Pro Asn
 20 25 30

Val Thr Thr Leu Ala Pro Ile Ser Asn Val Thr Ser Ala Pro Val Thr
 35 40 45

Ser Leu Pro Leu Val Thr Thr Pro Ala Pro Glu Thr Cys Glu Gly Arg

A)

hCD164	MSRLSRSLWAATCLGVLCVLSA	DKNTTQHPNVTTLAPISNVTSAPVTSPLPLVTTTPAP
hCD164-DELTA4	MSRLSRSLWAATCLGVLCVLSA	DKNTTQHPNVTTLAPISNVTSAPVTSPLPLVTTTPAP
hCD164-DELTA5	MSRLSRSLWAATCLGVLCVLSA	DKNTTQHPNVTTLAPISNVTSAPVTSPLPLVTTTPAP
hMGC-24	MSRLSRSLWAATCLGVLCVLSA	DKNTTQHPNVTTLAPISNVTSAPVTSPLPLVTTTPAP
		* * * * *
hCD164	ETCEGRNSCVSCFNVSVVNTTCFWIECKDESYCSHNSTVSDCQVGNITDFCSVSTATP	
hCD164-DELTA4	ETCEGRNSCVSCFNVSVVNTTCFWIECKDESYCSHNSTVSDCQVGNITDFCS-----	
hCD164-DELTA5	ETCEGRNSCVSCFNVSVVNTTCFWIECKDESYCSHNSTVSDCQVGNITDFCSVSTATP	
hMGC-24	ETCEGRNSCVSCFNVSVVNTTCFWIECKDESYCSHNSTVSDCQVGNITDFCSVSTATP	
	* * * * *	
hCD164	VPTANSTAKPTVQPSPTTSKTVTTSGTTNNTVTPTSQPVKSTFDAASFIGGIVLVL	
hCD164-DELTA4	-----AKPTVQPSPTTSKTVTTSGTTNNTVTPTSQPVKSTFDAASFIGGIVLVL	
hCD164-DELTA5	VPTANST-----GTTNNTVTPTSQPVKSTFDAASFIGGIVLVL	
hMGC-24	VPTANSTAKPTVQPSPTTSKTVTTSGTTNNTVTPTSQPVKSTFDAASFIGGIVLVL	
	* * * * *	
hCD164	GVQAVIFFLYKFCKSKERNYHTL	
hCD164-DELTA4	GVQAVIFFLYKFCKSKERNYHTL	
hCD164-DELTA5	GVQAVIFFLYKFCKSKERNYHTL	
hMGC-24	EIRCHTRNYIPDLKK	



B)

hMGC-24	DKNTTQHPNVTTLAPISNVTSAPVTSPLPLVTTTPAPETCEGRNSCVSCFNVSVVNTTCFWI
hCD164-DELTA5	DKNTTQHPNVTTLAPISNVTSAPVTSPLPLVTTTPAPETCEGRNSCVSCFNVSVVNTTCFWI
hCD164-DELTA4	DKNTTQHPNVTTLAPISNVTSAPVTSPLPLVTTTPAPETCEGRNSCVSCFNVSVVNTTCFWI
SEQ ID NO: 1	DKNTTQHPNVTTLAPISNVTSAPVTSPLPLVTTTPAPETCEGRNSCVSCFNVSVVNTTCFWI
SEQ ID NO: 7852	DKNTTQHPNVTTLAPISNVTSAPVTSPLPLVTTTPAPETCEGRNSCVSCFNVSVVNTTCFWI
NOV25	DKNTTQHPNVTTLAPISNV <u>KLISLISIP</u> NS---PETCEGRNSCVSCFNVSVVNTTCFWI
hMGC-24	ECK--DESYCSHNSTVSDCQVGNITDFCSVSTATPVPTANSTAKPTVQPSPTTSKTVTT
hCD164-DELTA5	ECK--DESYCSHNSTVSDCQVGNITDFCSVSTATPVPTANST-----
hCD164-DELTA4	ECK--DESYCSHNSTVSDCQVGNITDFCS-----AKPTVQPSPTTSKTVTT
SEQ ID NO: 1	ECK--DESYCSHNSTVSDCQVGNITDFCSVSTATPVPTANSTAKPTVQPSPTTSKTVTT
SEQ ID NO: 7852	ECK--DESYCSHNSTVSDCQVGNITDFCSVSTATPVPTANSTAKPTVQPSPTTSKTVTT
NOV25	EC <u>P</u> TDESYCSHNSTVSDCQVGNITDFCS <u>SGKYSYWLLGSIP</u> -AKPTVQPSPTTSKTVTT
hMGC-24	SGTTNNTVTPTSQPVKSTFDA
hCD164-DELTA5	-GTTNNTVTPTSQPVKSTFDA
hCD164-DELTA4	SGTTNNTVTPTSQPVKSTFDA
SEQ ID NO: 1	SGTTNNTVTPTSQPVKSTFDA
SEQ ID NO: 7852	SGTTNNTVTPTSQPVKSTFDA
NOV25	SGTTNNTVTPTSQPVKSTFDA

图 1

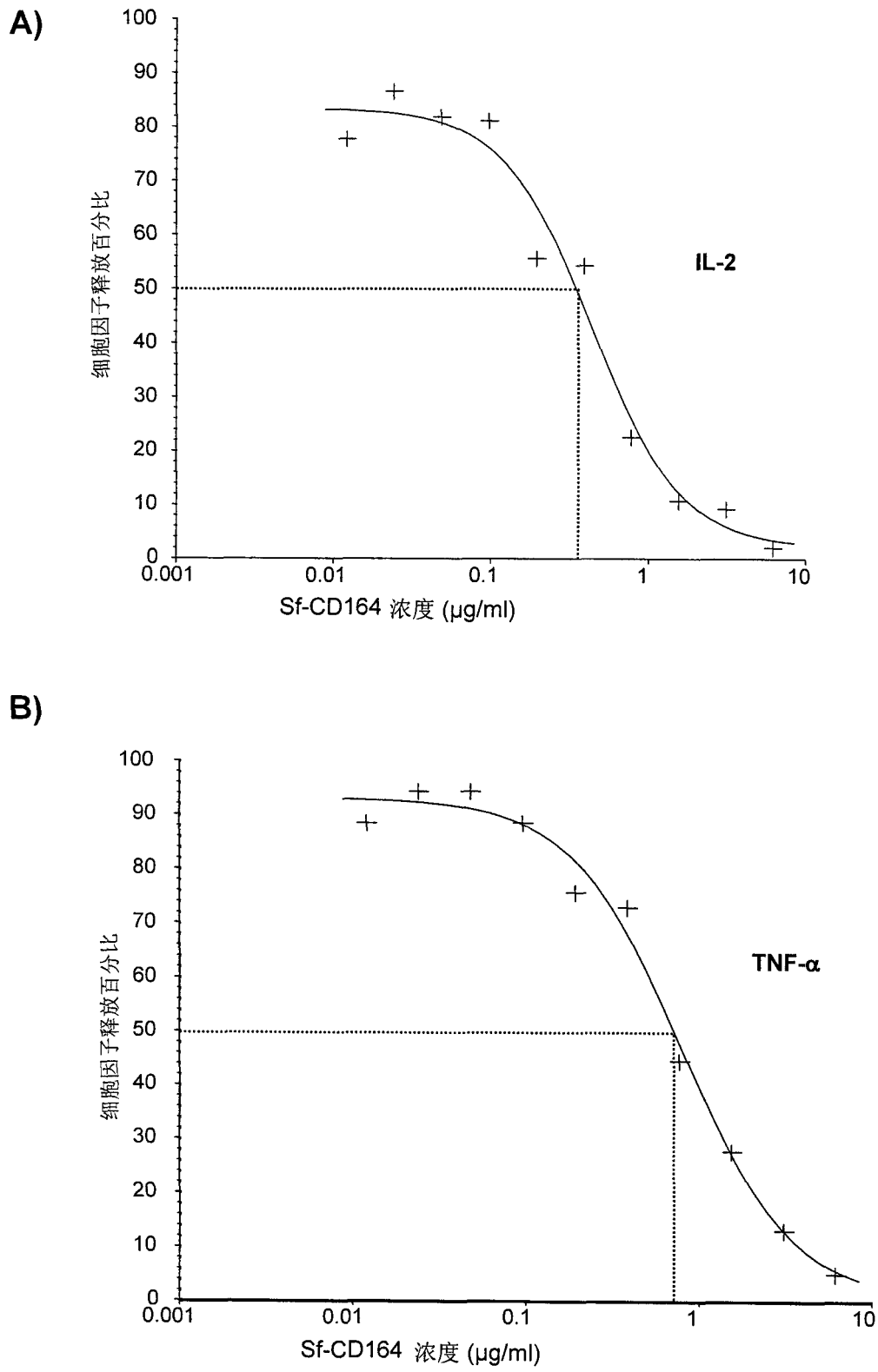


图 2

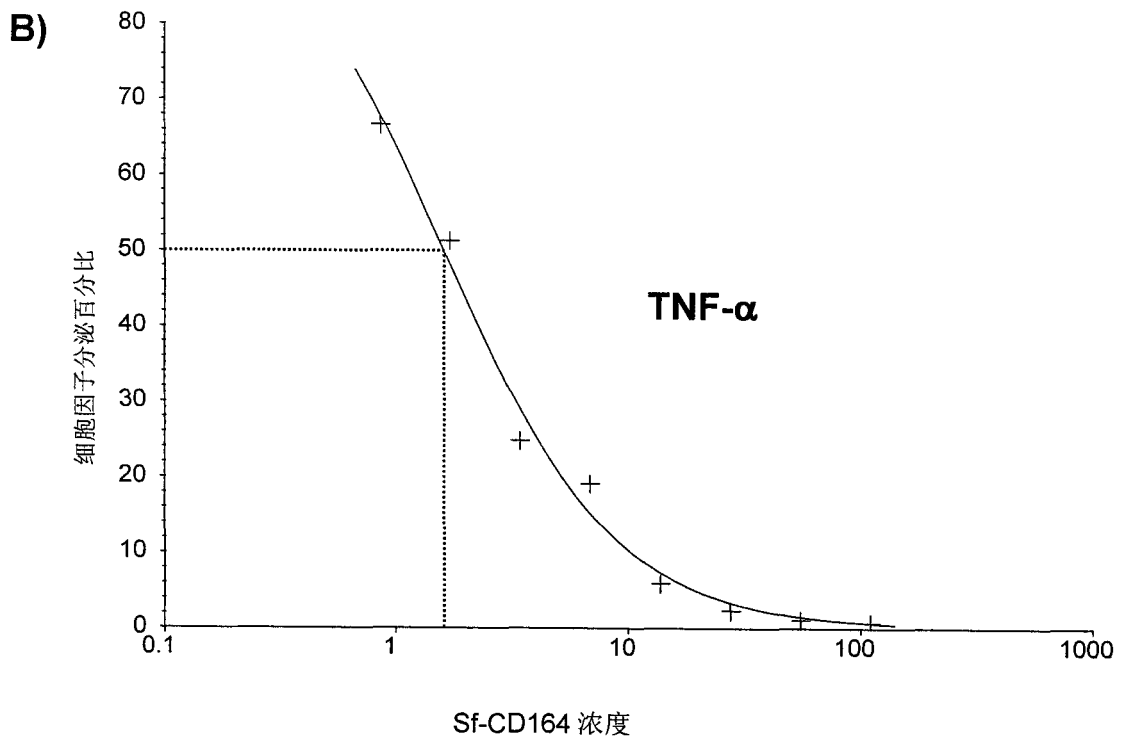
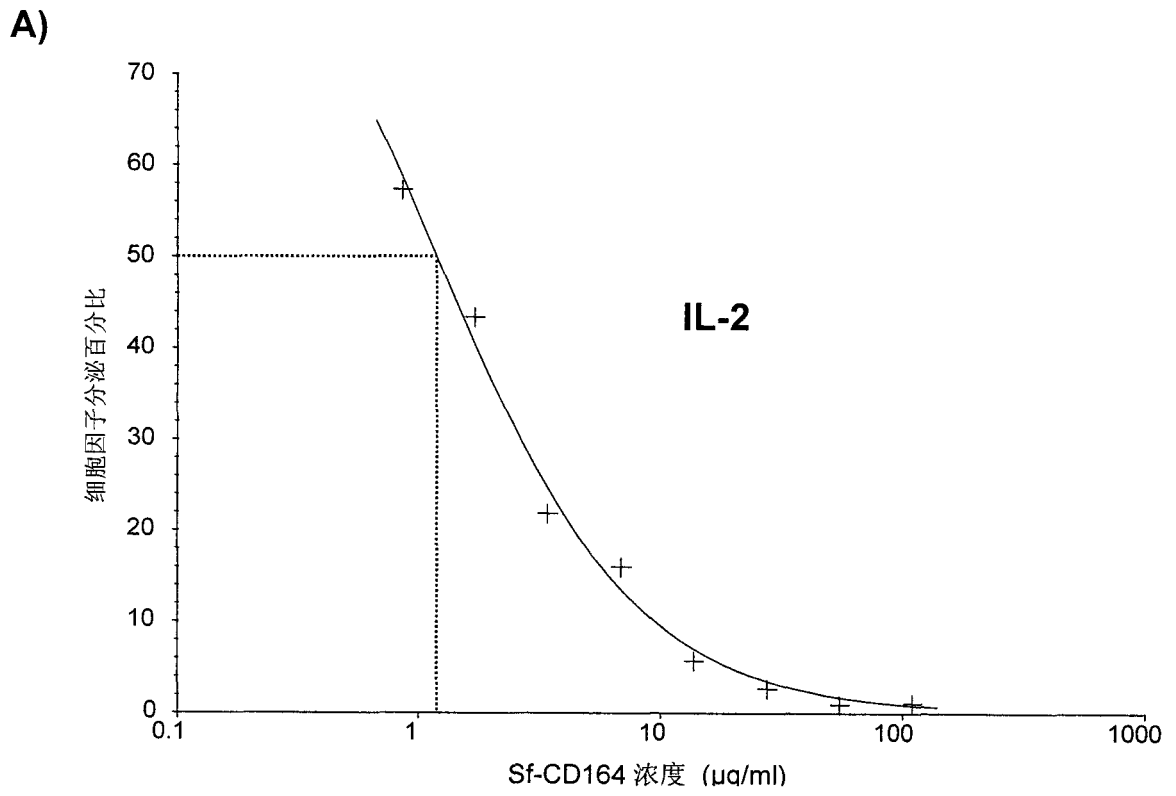


图 3

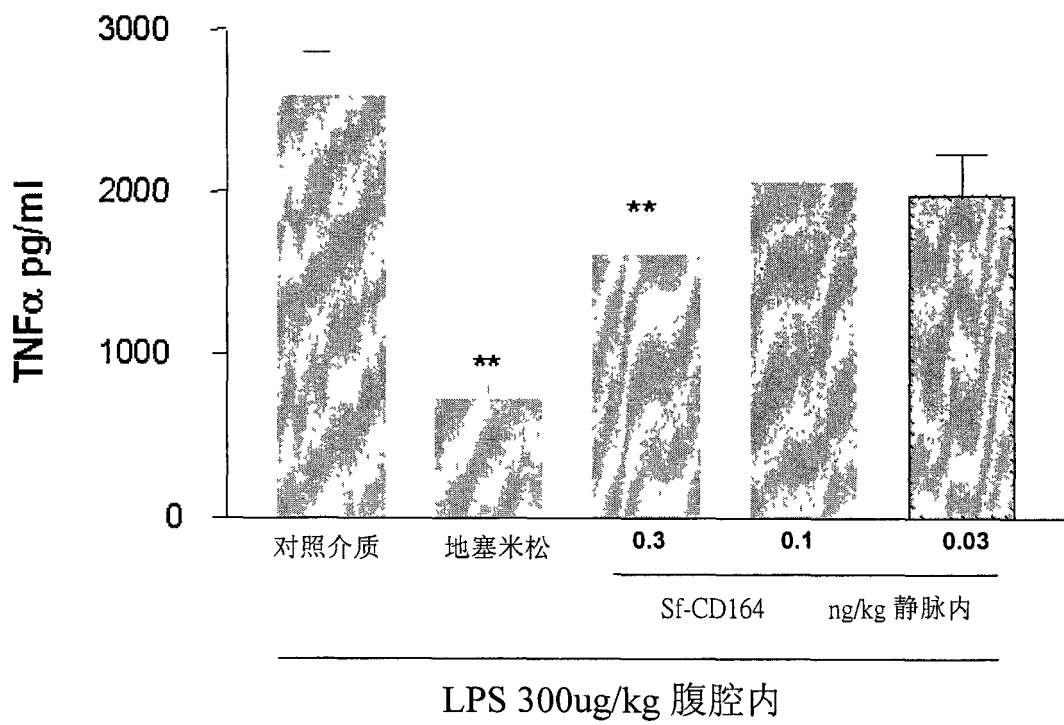


图 4

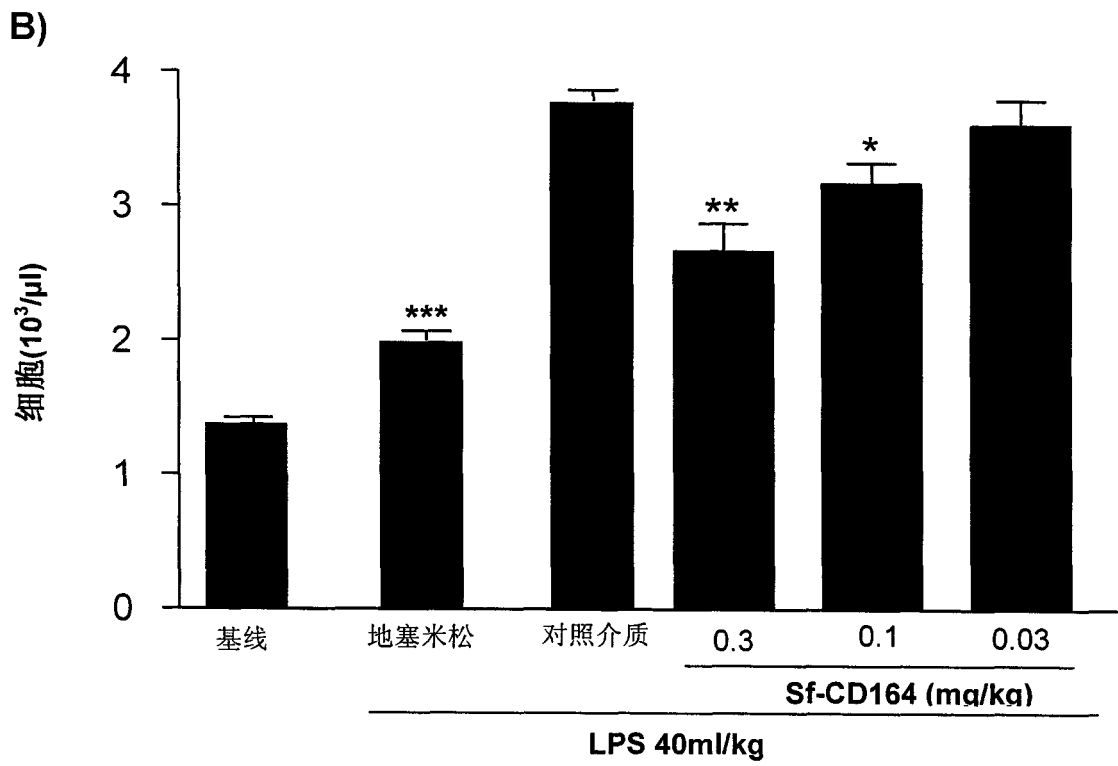
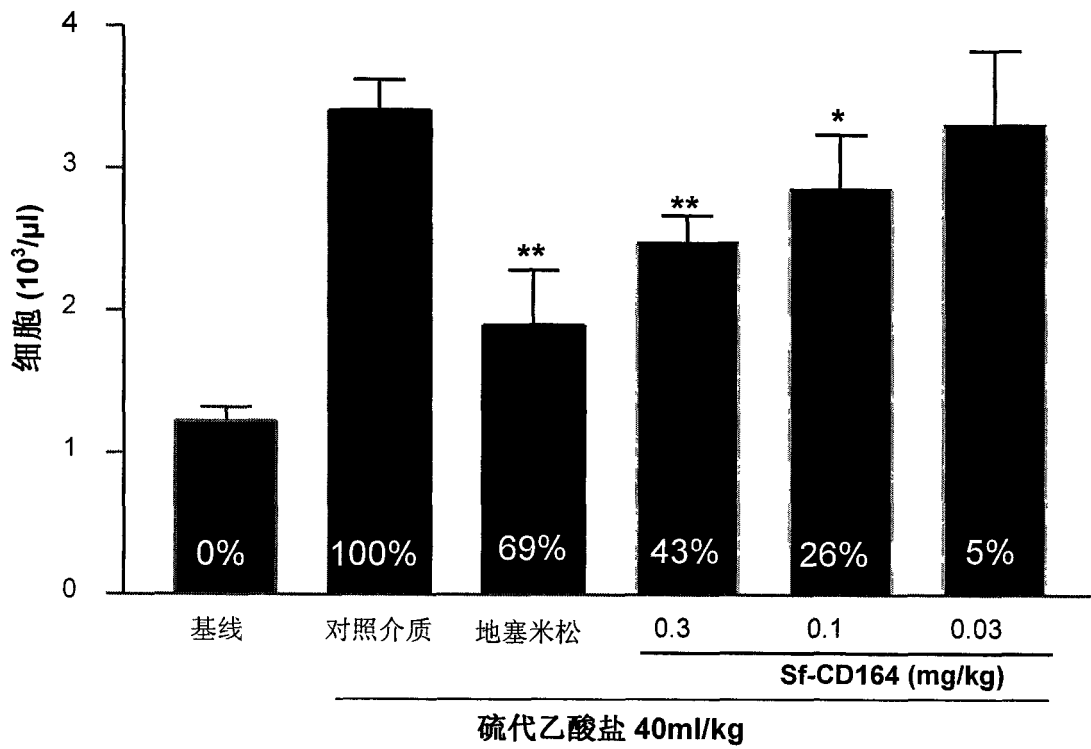


图 5

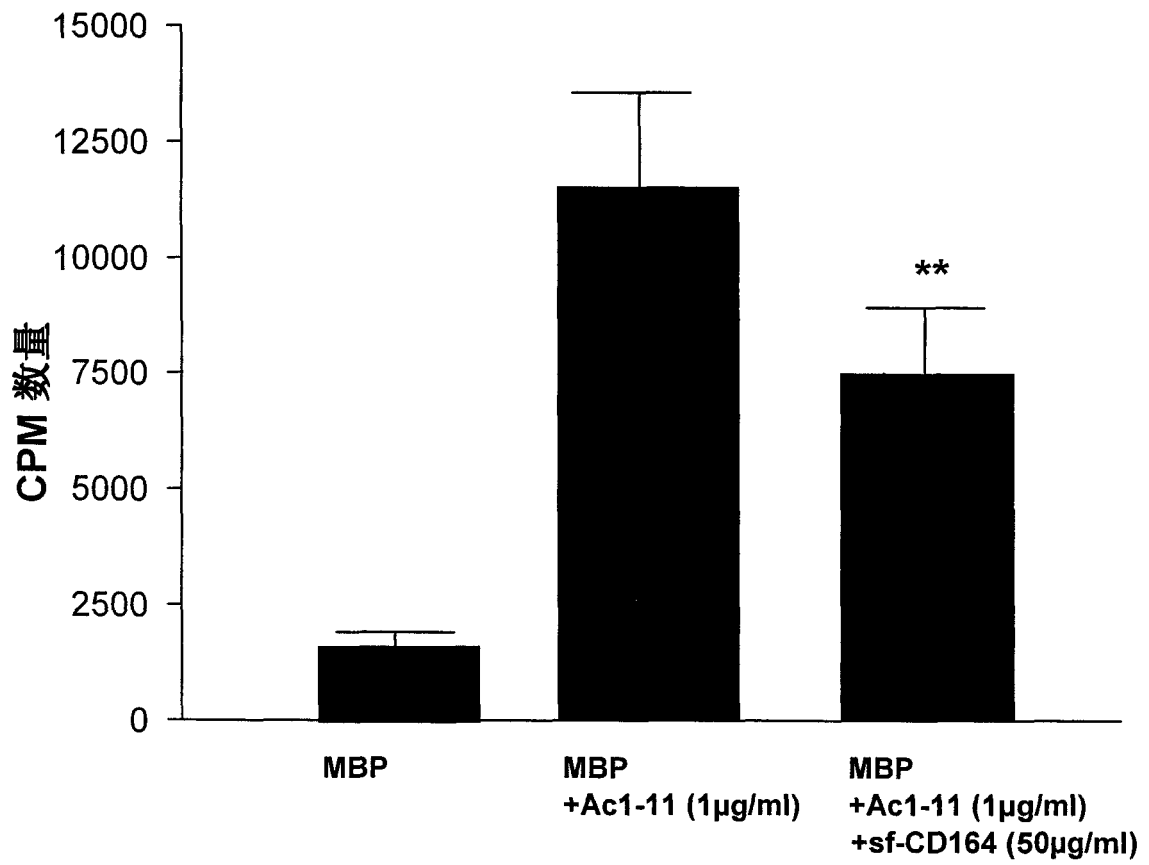


图 6

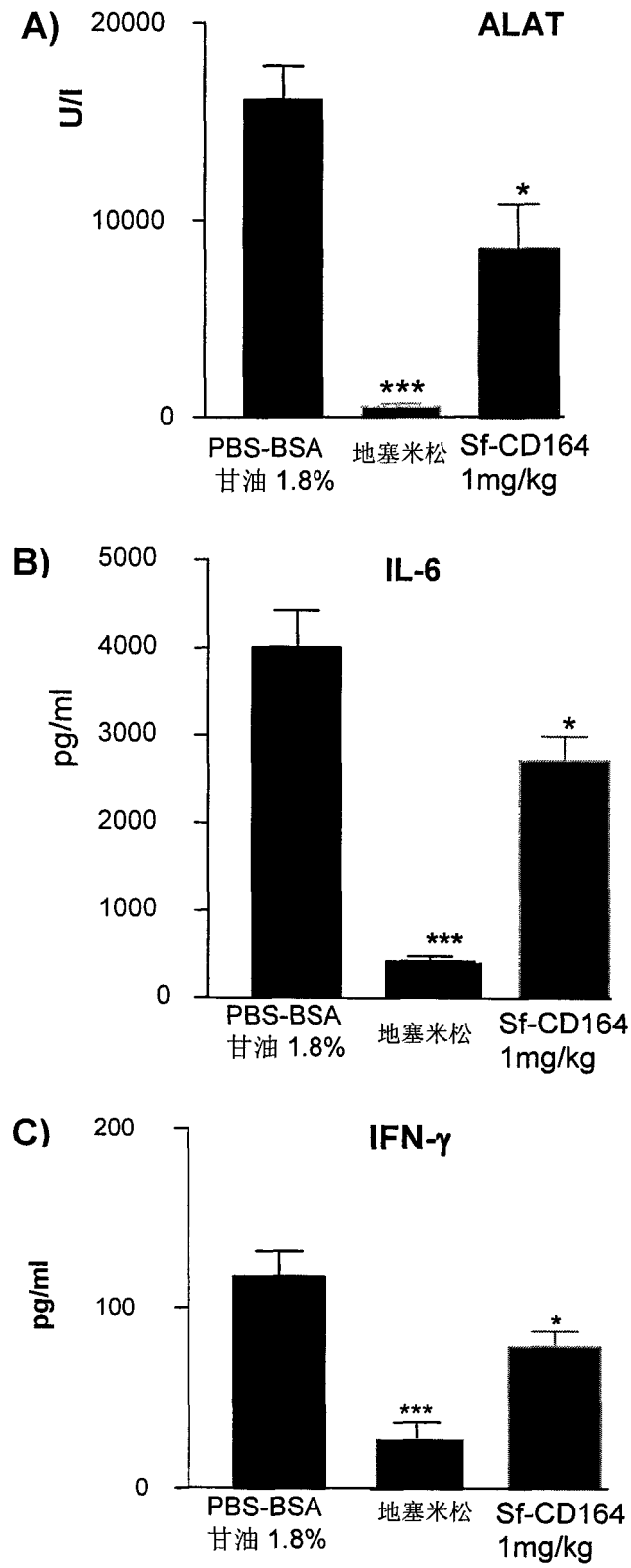


图 7

