

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00815686.7

[51] Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 38/07 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年6月10日

[11] 授权公告号 CN 100497374C

[22] 申请日 2000.10.12 [21] 申请号 00815686.7

[30] 优先权

[32] 1999.10.15 [33] US [31] 60/159,677

[86] 国际申请 PCT/US2000/028183 2000.10.12

[87] 国际公布 WO2001/029069 英 2001.4.26

[85] 进入国家阶段日期 2002.5.14

[73] 专利权人 莫维克借贷有限责任公司

地址 美国亚利桑那州

[72] 发明人 J·A·克拉格特 C·帕尔默

[56] 参考文献

WO9925372A1 1999.5.27

COMPARISON OF STIMULATION BY CHEMOTACTICFORMYL PEPTIDE ANALOGS BETWEEN GTPASEACTIVITY IN NEUTROPHIL PLASMA - MEMBRANES ANDGRANULE ENZYME - RELEASE FROM INTACTNEUTROPHILS. TORRES M 等. JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY, Vol. 47 No. 5. 1990

Chemoattractant receptor cross - desensitization. ALI H 等. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 274 No. 10. 1999

审查员 汪波莉

[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4页 说明书27页 附图9页

[54] 发明名称

与 G 蛋白激酶信号途径修饰剂形成的 N - 甲酰基肽受体复合物

[57] 摘要

本发明描述了抑制人外周血单个核细胞或多形核细胞、或固定的组织细胞的促炎反应的方法。使细胞和促炎剂接触，以刺激促炎反应。然后，使细胞与 G 蛋白激酶信号途径修饰剂接触，籍此抑制 G 蛋白介导的炎症反应信号转导途径。本发明描述了受体复合物，其中 G 蛋白激酶信号途径修饰剂与经促炎剂刺激的人外周血单个核细胞或多形核细胞的细胞表面受体结合。

1. G 蛋白激酶信号途径修饰剂在制备用于抑制细胞对促炎剂的促炎反应的药物中的用途，所述细胞选自人外周血单个核细胞、多形核细胞、和固定的组织细胞，所述固定的组织细胞选自肥大细胞、树突细胞、星形胶质细胞或巨噬细胞，而所述 G 蛋白激酶信号途径修饰剂是 f-Met-Leu-Phe-Phe，所述细胞被使得和所述 G 蛋白激酶信号途径修饰剂接触，籍此抑制经由 G 蛋白介导的信号转导途径的炎症反应。
2. 权利要求 1 的用途，其中人外周血单个核细胞选自淋巴细胞和单核细胞，或者多形核细胞选自粒细胞。
3. 权利要求 1 的用途，其中人外周血单个核细胞或多形核细胞选自嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和激活的 T 细胞。
4. 权利要求 1 的用途，其中促炎剂选自细胞因子、趋化物、和促分裂原。
5. 权利要求 1 的用途，其中促炎剂选自 fMLP、激活的补体片段、白细胞三烯 B<sub>4</sub>、血小板活化因子、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13 和 TNF  $\alpha$ 。
6. G 蛋白激酶信号途径修饰剂在制备用于抑制细胞对促炎剂的促炎反应的药物中的用途，所述细胞选自人外周血单个核细胞、多形核细胞、和固定的组织细胞，所述固定的组织细胞选自肥大细胞、树突细胞、星形胶质细胞或巨噬细胞，而所述 G 蛋白激酶信号途径修饰剂是 f-Met-Leu-Phe-Phe，所述 G 蛋白激酶信号途径修饰剂和甲酰基肽受体形成复合物，籍此抑制所述促炎反应。

7. 权利要求 6 的用途，其中促炎反应包括抑制下游受体，其中下游受体是 FC 受体，该 FC 受体是选自免疫球蛋白的药剂、选自 IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13 和 TNF $\alpha$  的细胞因子、或选自 C5a、FMLP、PAF、LTB<sub>4</sub> 的趋化因子的受体。
8. 权利要求 6 的用途，其中人外周血单个核细胞选自淋巴细胞和单核细胞，或者多形核细胞选自嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞。
9. 权利要求 6 的用途，其中人外周血单个核细胞或多形核细胞选自嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和激活的 T 细胞。
10. 权利要求 6 的用途，其中促炎剂选自细胞因子、趋化因子、趋化物和促分裂原。
11. 权利要求 6 的用途，其中促炎剂选自 fMLP、激活的补体片段、白细胞三烯 B<sub>4</sub>、血小板活化因子、或 IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13 和 TNF $\alpha$ 。
12. 受体复合物，其包含 G 蛋白激酶信号途径修饰剂和经促炎剂刺激的人外周血单个核细胞或多形核细胞、或固定的组织细胞的甲酰基肽受体，所述固定的组织细胞选自肥大细胞、树突细胞、星形胶质细胞或巨噬细胞，而所述 G 蛋白激酶信号途径修饰剂是 f-Met-Leu-Phe-Phe。
13. 权利要求 12 的受体复合物，其中人外周血细胞是选自淋巴细胞和单核细胞的单个核细胞，或是选自嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞的多形核细胞。
14. 权利要求 12 的受体复合物，其中固定的组织细胞选自肥大细胞、树突细胞、星形胶质细胞和巨噬细胞。

15. 权利要求 12 的受体复合物, 其中促炎剂选自细胞因子、趋化因子、趋化物和促分裂原。

16. 权利要求 12 的受体复合物, 其中促炎剂选自 fMLP、激活的补体片段、白细胞三烯 B4 和血小板活化因子、或 IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13 和 TNF  $\alpha$ 。

17. 包含 G 蛋白激酶信号途径修饰剂的细胞表面受体复合物, 其中该修饰剂是与选自激活的 T 淋巴细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞的促炎剂介导细胞的表面受体结合的, 藉此提供对促炎细胞的促炎细胞反应的抑制, 所述 G-蛋白激酶信号途径修饰剂是 f-Met-Leu-Phe-Phe。

18. 细胞表面受体复合物, 其包含:

人外周血单个核细胞或多形核细胞表面上表达的细胞表面受体, 和 G 蛋白信号途径修饰剂, 所述 G-蛋白信号途径修饰剂是 f-Met-Leu-Phe-Phe, 所述细胞表面受体能够结合所述 G-蛋白信号途径修饰剂,

其中, 与没有展示所述细胞表面受体复合物的所述人外周血单个核细胞或所述多形核细胞相比, 该细胞中蛋白激酶分布的结果是: PLC $\gamma$ 、Pp60 Src 和 ERK-1 的量不变, 具有 113Kd 分子量的 PI3 和具有 83Kd 分子量 PI3 的量增加, Raf、Ras、G 蛋白  $\alpha$  和 G 蛋白  $\beta$  激酶的量减少。

19. 权利要求 18 的细胞表面受体复合物, 其中该细胞表面受体是 FPR 受体。

20. 权利要求 18 的细胞表面受体复合物, 其中 IL-4 刺激人外周血单个

核细胞或多形核细胞提供了所述细胞产生的蛋白激酶的分布,其中,与未展示所述受体复合物的受刺激细胞相比,PLC $\gamma$ 、具有102Kd分子量的PI3和具有83Kd分子量的PI3的量增加,Ras和G蛋白 $\gamma$ 激酶的量减少。

21. 权利要求18的细胞表面受体复合物,其中促炎剂IL-13刺激人外周血单个核细胞或多形核细胞提供了所述细胞产生的蛋白激酶的分布,其中,与未展示所述受体复合物的受刺激细胞相比,PLC $\gamma$ 、具有113Kd分子量的PI3和具有83Kd分子量的PI3的量增加,Raf、Ras、Pp60 Src、G蛋白 $\alpha$ 和G蛋白 $\beta$ 激酶的量减少。

22. 权利要求18的细胞表面受体复合物,其中促炎剂C5a刺激人外周血单个核细胞或多形核细胞提供了所述细胞产生的蛋白激酶的分布,其中,与未展示所述受体复合物的受刺激细胞相比,具有83Kd分子量的PI3和Raf的量增加,PLC $\gamma$ 、具有113Kd分子量的PI3、G蛋白 $\alpha$ 和G蛋白 $\beta$ 激酶的量减少。

23. 权利要求18的细胞表面受体复合物,其中促炎剂TNF $\alpha$ 刺激人外周血单个核细胞或多形核细胞提供了所述细胞产生的蛋白激酶的分布,其中,与未展示所述受体复合物的受刺激细胞相比,Raf、ERK-1、Ras、G蛋白 $\alpha$ 、G蛋白 $\beta$ 和G蛋白 $\gamma$ 的量增加,PLC $\gamma$ 、具有113Kd分子量的PI3和Pp60 Src激酶的量减少。

## 与 G 蛋白激酶信号途径修饰剂形成的 N-甲酰基肽受体复合物

### 发明领域

本发明涉及在外周血细胞表面上发现的 N-甲酰基肽受体, 尤其涉及该受体与改变或破坏 G 蛋白信号途径的药剂 (尤其是某些 N-甲酰基肽) 形成的复合物, 并涉及通过促炎剂的共刺激改变信号转导的方法。

### 发明背景

人体进化形成了通过使用细菌产生的 N-甲酰甲硫氨酰基肽作为吞噬细胞, 尤其是嗜中性粒细胞和单核细胞, 的化学引诱物, 防御细菌感染的机制。N-甲酰基肽中, f-Met-Leu-Phe (FMLP) 被鉴定为具有最强的募集吞噬细胞和刺激嗜中性粒细胞释放溶酶体酶的能力 (Showell 等, *J. Exp. Med.* 143:1154-1169, 1976)。随后显示, 合成的四肽, 尤其是 f-Met-Ile-Phe-Leu 和 f-Met-Leu-Phe-Ile, 也可以引起嗜中性粒细胞应答 (Rot 等, *Proc. Natl. Acad. Scie. USA* 84:7967-7971, 1987)。最初这些肽的效力被归因于: (1) N 端甲酰基、(2) 甲硫氨酸侧链、和 (3) 亮氨酸和苯丙氨酸侧链。

N-甲酰基肽受体 (FPR) cDNA 的克隆和之后 FPR 蛋白一级结构的描绘使 N-甲酰基肽作用机制的理解获得重大突破 (Boulay 等, *Biochemistry* 29: 11123-11133, 1990; Boulay 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168:1103-1109, 1990)。FPR 最初是在嗜中性粒细胞和单核细胞上发现的, 但随后显示 FPR 也在人脑、肝细胞、树突细胞、和星形胶质细胞中表达 (Lacy 等, *J. Neuroimmunol.* 61:71-78, 1995; Sozzani 等, *J. Immunol.* 155: 3292-3295, 1995)。之后分离到另外两种 FPR 基因, FPR2 (又称 FPRL1 和 FPRH1) (Bao 等, *Genomics* 13:437-440, 1992; Murphy 等, *J. Biol. Chem.* 267:7637-7643, 1992; Ye 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184:582-589, 1992) 和 FPRL2 (Bao 等, 同上)。FPRL1 由 351 个氨基酸组成, 与 FPR 有 70% 的一致性, 但

发现它比最初的 FPR 对 FMLP 的亲合力低 400 倍 ( $K_d = 1\text{nM}$ )。FPRL2 与 FPR 有 56% 一致性, 与 FPRL1 有 83% 一致性。然而, 与在单核细胞和嗜中性粒细胞中均表达的 FPRL1 不同, FPRL2 被发现在单核细胞中表达但不在嗜中性粒细胞中表达 (Durstin 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201:174-179, 1994)。

FPR 含有 7 个跨质膜疏水结构域, 它们通过暴露在细胞外区或细胞内区的亲水序列相连接 (Murphy, *Annu. Rev. Immunol.* 12:593-633, 1994)。第一个和第三个胞内环相对较小, 分别由 5 和 16 个氨基酸组成。羧基端暴露在细胞内区, 而 N 端暴露在细胞外区。细胞内序列还含有 G 蛋白偶联域 (受体发挥功能所必需的域, 见下述) 和潜在的磷酸化域。

FMLP 结合域似乎定位在 FPR 的第一个和第三个胞外域中 (Quehenberger 等, *J. Biol. Chem.* 268:18167-18175, 1993)。此外, 有人还提出了 FPR 的可相互转化状态, 即结合 FMLP 的高亲和结合状态和低亲和结合状态间的交替 (Kermode 等, *Biochem. J.* 276:715-723, 1991)。G 蛋白被认为可以调节这些可相互转化状态。不与 G 蛋白相连的单独 FPR 是低亲和状态, 而与 G 蛋白结合的 FPR 表现为高亲和结合状态。该模型进一步将与 G 蛋白结合的 FPR 分解为三个不同的状态, 这些状态说明了通过不同肽观察到的不同效力。状态 I 是低亲和结合状态, 其中 FPR 不与 G 蛋白相连, 但它可以在结合 G 蛋白后转变为高亲和状态, 即状态 II。状态 III 是高亲和中间步骤, 其中受体与配体结合, 同时释放 G 蛋白的  $G_\alpha$  亚基。状态 IV 是瞬时的低亲和状态, 其中剩下的 G 蛋白亚基 ( $G_\beta$  和  $G_\gamma$ ) 与受体解离。G 蛋白亚基  $G_\alpha$  的解离导致 G 蛋白发挥效应子功能, 引起细胞激活。Sklar 等 (*J. Biol. Chem.* 264:8483-8486, 1989) 也提出了相似的模型。

根据以上模型, 通过状态 III 的停留时间可以确定肽的效力 (Kermode 等, 同上)。这些作者提出, 最有效的甲酰基肽如 fMet-Leu-Phe-Phe 和 fMet-Leu-Phe-MHBzl 可以暂时稳定住并维持状态 III, 这就引发了立即的细胞脱粒反应 (degranulation response), 而状态 III 的持续使得可以产生持续的趋化反应信号, 造成最大的迁移。

效力较低的甲酰基肽介导高亲和状态 III 向低亲和状态 IV 的快速转变。尽管状态 III 时的最初脱粒反应不受影响，但趋化信号传导能力被最小化并由此限制了细胞的迁移。因此，一般地，可以认为高效力配体通过结合 FPR 的高亲和状态实现趋化反应，而较低效力的配体通过结合 FPR 的低亲和状态实现脱粒反应。

还可以使用该模型定义激动剂活性和拮抗剂活性。激动剂稳定激活的受体状态 III，其效力反映了稳定的程度。另一方面，拮抗剂与受体结合，但造成激活的状态 III 不稳定并使受体失活。该模型并不限于 FPR。

而且，当配体与受体结合而相同或不同的受体对相同或不同配体的随后刺激出现不应性时，则认为发生了脱敏作用。在细胞激活的正常过程中该脱敏状态可以在受体占据后形成，从而导致状态 III 不稳定；或在受体占据前形成，这样根本不形成状态 III。当一种刺激剂诱导的不应状态或受体失活影响到多个未与配体结合的受体时，这种情况被称作异源性脱敏作用。

研究得最清楚的 N-甲酰基肽是 f-Met-Leu-Phe (FMLP 或 fMLP)。然而，体外采用兔嗜中性粒细胞上的受体已经表征了更有效力的肽，尤其是 fMet-Leu-Phe-Phe、fMet-Leu-Phe-NHBzl (fMet-Leu-Phe 苯甲酰胺)、和 fNle-Leu-Phe-Tyr (N-甲酰基-L-正亮氨酸-Leu-Phe-Tyr) (Kermode 等, 同上)。这些肽显示出最大的迁移 (20 - 35  $\mu\text{m}$  左右) 和脱粒作用 (大约  $10^{-10}$  -  $10^{-11}$  的  $\text{ED}_{50}$ )。较为近来的研究提示，非甲酰基化的肽也可以和 FPR 结合并能够充当嗜中性粒细胞功能的有力激活剂。例如，Met-Met-Trp-Leu-Leu 是一种有效力的五肽，在活性方面可以和 FMLP 相比 (Chen 等, J. Biol. Chem. 270:23398-23401, 1995)。该五肽向 N-甲酰基化形式的转变可以增强其效力 100 - 500 倍，这说明尽管生物活性似乎并不严格由 N-甲酰基化确定，但 N-甲酰基化对肽的效力仍有显著的作用。

对肽的其它修饰显示，一些肽可以被转变成 FPR 的有力激动剂 (Derian 等, Biochemistry 35:1265-1269, 1996; Higgins 等, J. Med.

Chem. 39:1013-1017, 1996)。这些修饰包括氨基端基团的脲取代和氨基甲酸酯修饰。而且,已显示,正如通过超氧阴离子的释放和嗜中性粒细胞与血管内皮的粘着所确定的,改变 MLF 肽的氨基酸组成也可以将 FPR 的激动剂转变为拮抗剂。

人们已深入研究了 N-甲酰基肽通过 FPR 刺激的嗜中性粒细胞的趋化性。甚至在 N-甲酰基肽刺激前,嗜中性粒细胞也可以瞬时与内皮细胞上表达的 P-选择蛋白结合。由炎症部位产生的 N-甲酰基肽所介导的嗜中性粒细胞激活将导致嗜中性粒细胞在该部位的聚积。N-甲酰基肽上调嗜中性粒细胞上的 L-选择蛋白,并引导嗜中性粒细胞沿着内皮滚动,之后上调嗜中性粒细胞表面的整联蛋白。整联蛋白介导细胞-细胞和细胞-细胞外基质的相互作用,并与内皮上发现的层粘连蛋白、纤连蛋白、victronectin、以及 ICAM(细胞间细胞粘着分子)和 VCAM(血管细胞粘着分子)结合。当整联蛋白和 ICAM 及 VCAM 结合后,通过与细胞骨架的相互作用,信号被转导至嗜中性粒细胞的内部。然后嗜中性粒细胞脱掉 L-选择蛋白,并开始沿内皮扩散。之后内皮细胞表面的 E-选择蛋白和 ICAM-1 的上调将介导嗜中性粒细胞迁移跨过内皮(Luscinskas 等, J. Immunol. 146:1617-1625, 1991)。当跨过内皮障碍后,嗜中性粒细胞通过感知 N-甲酰基肽的浓度梯度向炎症部位迁移。一旦达到含有高浓度的该肽的目的地后,嗜中性粒细胞就发动其抗微生物作用。

受激的嗜中性粒细胞快速地激活呼吸爆发氧化酶,该酶催化超氧化物自由基  $O_2^-$  生成。该超氧化物自由基与其它分子反应产生过氧化氢和次氯酸,两者均是强反应剂,因此可以有效地干扰微生物的功能。脱粒也是一种有效破坏外源微生物的手段。然而,脱粒也会损伤宿主组织。吞噬作用是嗜中性粒细胞清除外源微生物所采用的另一机制。这些功能中的许多都是通过 G 蛋白、使用磷脂酶(其中的三种已获得表征)作为第二信使而被激活的。

磷脂酶 C,  $PLC_{\beta 2}$ , 产生两种第二信使,即 1,4,5-肌醇三磷酸( $IP_3$ )和二酰甘油(DG)。FPR 激活过程中产生的 G 蛋白  $\beta \gamma$  亚基激活  $PLC_{\beta 2}$ 。 $IP_3$  与某些钙通道结合,刺激钙自细胞内储存库释放,导致胞质钙浓度

增加,这可以在用化学引诱物刺激的过程中观察到。与释放的钙一致, DG 也激活蛋白激酶 C (PKC)。近来文献(Beaven 等, *J. of Immunology* 160:5136-5144, 1998)报道, G 蛋白激活的 PLC 激酶是体外大鼠腹膜细胞中肥大细胞脱粒的主要途径,而且这与  $Ca^{2+}$  的增加有关。

磷脂酶 A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) 催化质膜内表面的磷脂生成花生四烯酸。花生四烯酸为炎症介质,如白细胞三烯和前列腺素,提供了前体。PLA<sub>2</sub> 通过促分裂原活化蛋白 (MAP) 激酶的磷酸化作用被激活。

第三种磷脂酶是磷脂酶 D (PLD), 其催化磷脂酰胆碱生成磷脂酸和胆碱。磷脂酸可能参与激活呼吸爆发氧化酶,并在 DG 的产生中起作用,而 DG 又激活 PKC。然而, PLD 的激活需要钙,且 FMLP 不能在钙耗竭的细胞中刺激 PLD (Kessels 等, *J. Biol. Chem.* 266:23152-23156, 1991)。此外,似乎 G 蛋白 Arf 和 G 蛋白 Rho 能调节 PLD 活性 (Brown 等, *Cell*, 75:1137-1144, 1993; Cockcroft 等, *Science* 263:523-526, 1994; Singer 等, *J. Biol. Chem.* 270:14944-14950, 1995)。

蛋白磷酸化在 FMLP 起始的信号转导中有着中心作用。有三种主要的蛋白激酶参与 FMLP 刺激引起的蛋白质磷酸化。

如上讨论的, PKC 由 PLC 所产生的 DG 激活。PKC 起到磷酸化丝氨酸和苏氨酸残基的作用。PKC 由 6 种不同的同工型组成,其中三种对细胞内钙敏感 ( $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  型),而三种不敏感 ( $\delta$ 、 $\epsilon$  和  $\zeta$  型)。嗜中性粒细胞含有  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\zeta$  型,但不含  $\gamma$  型。钙依赖性和 DG 依赖性 PKC (PKC- $\beta$ ) 通过从胞质向膜转移来响应 FMLP 和佛波酯的刺激。然后,它使大量胞质蛋白磷酸化,如使参与呼吸爆发氧化酶系统的那些胞质蛋白磷酸化。FMLP 还可以激活不依赖钙但依赖 DG 和磷脂酰丝氨酸的 PKC 形式,但他们的功能不清。

据报道, MAP 激酶 (MAPK) 可以被 Ras 和 Raf 的活性由 G 蛋白  $\beta\gamma$  亚基激活。最近的文献提示,高强度的 Ras 信号转导参与诱导细胞凋亡 (Bar-Sagi 等, *J. Mol. Cell Biol.* 19(9):5892-901, 1999) 和促进内皮细胞的粘着 (Finkel, 等, …… )。目前提出 Raf 在包括细胞存活、生长和分化在内的生长信号中起着重要作用 (Rapp, 等, …… )。

C5a 和 IL-8 也可以刺激此激酶途径 (Buhl 等, *J. Biol. chem.* 270:19828-19832, 1995; Knall 等, *J. Biol. Chem.* 271:2832-2838, 1996)。MAP 激酶诱导几种调节蛋白, 如胞外信号调节激酶(ERK)-1, 的酪氨酸磷酸化。最近的文献提示, MAPK 途径负责细胞因子的产生; 但是, TH-1 和 TH-2 细胞因子、及其它促炎分子如 C5a、IL-8 和 FMLP 的激活作用均依赖于 G 蛋白三聚体信号转导。

磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)负责 FMLP 刺激下观察到的 PI 三磷酸( $PIP_3$ )的形成。升高的  $PIP_3$  水平似乎有助于呼吸爆发氧化酶系统的激活、和嗜中性粒细胞中肌动蛋白的聚合(这被认为在调节细胞骨架的改变和细胞的迁移中是重要的)。最近的文献(Rankin 等, *J. Exp. Med.* 188(9):1621-32, 1998)报道, 升高的 PI3 激酶水平还可以促进以 IL-5 激活的 G 蛋白信号转导为基础的嗜酸性粒细胞的脱粒。而且, Sagi-Eisenberg 等, *Eur. J. Immunol*, 1998, 28:3468-3478 提示, 使用 PKC 和 PI3 激酶作为中间途径的 G 蛋白信号转导可以通过 IgE 激活  $FC\epsilon R$  受体, 以释放组胺和其它参与变应性呼吸道过敏反应的促炎细胞因子。Uckun 等, *J. of Biolog. Chemistry*, 第 274 卷, 第 38 期, 1999 年 9 月, 第 27028-27038 页报道, 通过 IgE- $FC\epsilon R$  的交联, JAK3 激酶途径中的 G 蛋白信号转导导致肥大细胞脱粒。Beaven 等, *J. of Immunology*, 1998, 160:5136-5144 报道, 通过 PKC 的激活和所导致的  $Ca^{2+}$  摄取, G 蛋白信号转导也会造成肥大细胞分泌和脱粒。因此, G 蛋白可能是 IgE 抗原攻击时  $FC\epsilon R1$  的下游激活作用所必需的, 而干扰 G 蛋白信号转导的相应能力可能是抑制  $FC\epsilon R$  受体的下游激活作用的重要基础。

兔嗜中性粒细胞 FPR 的几种拮抗剂已得到鉴定, 但造成某些分子成为拮抗剂的性质仍不清楚。FMLP 的某些丁氧基羰基类似物表现出可以竞争性抑制趋化肽诱导的细胞激活, 其中 BocPLPLP 被发现最为有效 (Schiffman 等, *FEBS Lett.* 117:1, 1980; Freer 等, *Biochemistry* 19:2404, 1980; Kanaho 等, *J. Leukocyte Biol.* 47:420, 1990)。环孢菌素 H, 一种环十一肽, 是环孢菌素 A 的类似物, 也显示出对甲酰基

肽受体具有拮抗活性(Wenzel-Seifert 等, J. Immunol. 150:4591-4599, 1993)。此外还鉴定到一种天然存在的甲酰基肽受体拮抗剂, 其是一种来源于逆转录病毒的六肽(Oostendorp 等, J. Immunol. 149:1010, 1992)。然而, 这些拮抗剂均不能以高亲和力与甲酰基肽受体结合, 因此不能实际用作研究工具或抗炎药物。

有趣的是, Inflammation, 第5卷, 第1期, 第13-16页(1981)中报道, N-甲酰基-甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酸可以抑制肥大细胞的脱粒。该文献报道, 两种结构不同的趋化肽, 即胃酶抑制剂和N-甲酰基-甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酸, 可以抑制由于皮内注射40/80抗大鼠IgE血清、或分离自小牛肺的大分子阴离子透性因子引起的大鼠皮肤血管透性增加。据报道, 这些肽似乎直接作用于肥大细胞。因为FPR从未被报道过在肥大细胞上表达, 所以该抑制的机制不清。

明显地, 关于FPR的功能和作用机制, 有许多问题仍未有答案。而且, FPR在非白细胞如在脑和树突细胞中表达的这一发现提示, FPR可能在其它细胞类型中有着新的功能, 而这些仍有待阐明。因此就需要可抑制细胞促炎反应的其它药剂、以及研究细胞促炎反应的方法。

#### 发明概述

目前已发现, 在促炎剂刺激人外周血单个核细胞或多形核细胞、或固定的组织细胞后, 用G蛋白激酶信号途径修饰剂处理这些细胞可以抑制常规促炎反应, 尤其是促炎剂(如C5a、FMLP、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13和TNF $\alpha$ )或FC $\epsilon$ 受体诱导的下游促炎反应。改变G蛋白的细胞产生可以抑制G蛋白介导的炎症反应信号转导途径。尤其有用的G蛋白激酶信号途径修饰剂是具有式f-Met-Leu X的N-甲酰基-甲硫氨酰-亮氨酰("f-Met-Leu")肽, 其中X选自: Tyr、Tyr-Phe、Phe-Phe和Phe-Tyr, 最优选f-Met-Leu-Phe-Phe。

人外周血单个核细胞或多形核细胞、或固定的组织细胞可以是淋巴细胞和粒细胞, 优选嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和激活的T细胞, 以及肥大细胞。

在本发明优选实施方案中, G蛋白激酶信号途径修饰剂与这些细胞

上存在的细胞表面受体, 优选甲酰基肽受体(“FPR”), 形成复合物, 其在促炎剂存在时抑制G蛋白 $\gamma$ 亚基的磷酸化。进而, 通过抑制或阻断G蛋白的下游磷酸化作用, 依赖于三聚体G蛋白成分的各种途径将阻断或下调细胞对促炎剂的反应。

在本发明一个优选实施方案中, IgE存在时, 此G蛋白激酶信号途径修饰剂在FC $\epsilon$ 受体(FC $\epsilon$ R)水平上抑制IgE对FC $\epsilon$ R的激活。

根据本发明, 用于刺激人外周血单个核细胞和多形核细胞、或固定的组织细胞的促炎剂优选是细胞因子、趋化物(chemotaxins)、或促分裂原。尤其优选的促炎剂是N-甲酰基肽如FMLP、激活的补体片段(C5a)、白细胞三烯B<sub>4</sub>(LTB<sub>4</sub>)、血小板活化因子(PAF)、和细胞因子如TNF $\alpha$ 、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10和IL-13、以及与抗原交联的IgE、IgG或IgA。

在本发明另一实施方案中, 提供抑制人外周血单个核细胞或多形核细胞的促炎反应的方法, 该方法包括将细胞和G蛋白激酶信号途径修饰剂接触, 并使该药剂与细胞上的受体结合。促炎介导细胞(pro-inflammatory mediating cell)可以是淋巴细胞或粒细胞。优选地, 该细胞首先接受促炎剂如上述促炎剂的刺激。

在本发明一个优选实施方案中, 与配体结合的受体是甲酰基肽受体。下游阻断FC $\epsilon$ R受体的G蛋白激活可以提供类似的治疗益处。

本发明还提供鉴定G蛋白激酶信号途径修饰剂的方法, 该方法包括步骤:

- a) 将选自激活的T淋巴细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞的促炎介导细胞与选自细胞因子、趋化物和促分裂原的已知促炎介质(pro-inflammatory mediator)接触, 并引起促炎反应;
- b) 向步骤a)加入候选的G蛋白信号途径修饰剂; 和
- c) 检测(i)同时与所述候选药剂和所述促炎介质接触的促炎细胞, 与(ii)仅接触所述促炎介质的促炎细胞相比, 细胞中G蛋白激酶量的减少、或G蛋白激酶的解离失败。

优选的G蛋白激酶是G蛋白 $\gamma$ 激酶。

在本发明另一实施方案中，通过促炎介导细胞与 G 蛋白激酶信号途径修饰剂的接触，在促炎介导细胞表面提供与 G 蛋白激酶信号途径修饰剂形成复合物的受体，藉此抑制促炎反应，其中所述促炎介导细胞选自：激活的 T 淋巴细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞。

在本发明再一实施方案中，鉴定 G 蛋白激酶信号途径修饰剂的方法包括步骤：

使选自激活的 T 淋巴细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞的促炎介导细胞与候选 G 蛋白信号途径修饰剂接触；和

测定所述细胞产生的蛋白激酶的分布，

其中与未接触候选 G 蛋白信号途径修饰剂的细胞相比，PLC $\gamma$ 、Pp60 Src 和 ERK-1 的量不变，PI3 (102 Kd) 和 PI3 (83 Kd) 的量增加，Raf、Ras、G 蛋白  $\alpha$  和 G 蛋白  $\beta$  激酶的量减少。

因此，本发明还提供包含细胞表面受体和 G 蛋白信号途径修饰剂的人外周血单个核细胞或多形核细胞的新受体复合物，其中与没有所述受体复合物的细胞相比，这些细胞中的蛋白激酶分布如下：PLC $\gamma$ 、Pp60 Src 和 ERK-1 的量不变，PI3 (102 Kd) 和 PI3 (83 Kd) 的量增加，Raf、Ras、G 蛋白  $\alpha$  和 G 蛋白  $\beta$  激酶的量减少。优选地，细胞表面受体是 FPR 受体。也优选继发阻断 FC $\epsilon$ R 受体的 G 蛋白激活。

IL-4 刺激具有与 G 蛋白信号途径修饰剂形成复合物的细胞表面受体的人外周血单个核细胞或多形核细胞，提供了所述细胞产生的蛋白激酶的分布，其中与没有所述受体复合物的受激细胞相比，PLC $\gamma$ 、PI3 (102 Kd) 和 PI3 (83 Kd) 的量增加，Ras 和 G 蛋白  $\gamma$  激酶的量减少。

IL-6 刺激具有与 G 蛋白信号途径修饰剂形成复合物的细胞表面受体的人外周血单个核细胞或多形核细胞，提供了所述细胞产生的蛋白激酶的分布，其中与没有所述受体复合物的受激细胞相比，PLC $\gamma$ 、PI3 (102 Kd)、Raf、Pp60 Src、ERK-1 和 G 蛋白  $\alpha$  的量增加，PI3 (83 Kd)、G 蛋白  $\beta$  和 G 蛋白  $\gamma$  激酶的量减少。

IL-10 刺激具有与 G 蛋白信号途径修饰剂形成复合物的细胞表面受体的人外周血单个核细胞或多形核细胞，提供了所述细胞产生的蛋白激

酶的分布, 其中与没有所述受体复合物的受激细胞相比, PI3 (102 Kd)、ERK-1 和 G 蛋白  $\gamma$  的量增加, PLC $\gamma$ 、PI3 (83 Kd)、Ras、和激酶的量减少。

促炎剂 IL-13 刺激具有与 G 蛋白信号途径修饰剂形成复合物的细胞表面受体的人外周血单个核细胞或多形核细胞, 提供了所述细胞产生的蛋白激酶的分布, 其中与没有所述受体复合物的受激细胞相比, PLC $\gamma$ 、PI3 (102 Kd)、PI3 (83 Kd)、ERK-1 和 Raf 的量增加, Ras、Pp60 Src、G 蛋白  $\alpha$ 、G 蛋白  $\beta$  和 G 蛋白  $\gamma$  激酶的量减少。

促炎剂 C5a 刺激具有与 G 蛋白信号途径修饰剂形成复合物的细胞表面受体的人外周血单个核细胞或多形核细胞, 提供了所述细胞产生的蛋白激酶的分布, 其中与没有所述受体复合物的受激细胞相比, Pp60 Src 和 Raf 的量增加, PLC $\gamma$ 、PI3 (102 Kd)、G 蛋白  $\alpha$ 、G 蛋白  $\beta$  和 G 蛋白  $\gamma$  激酶的量减少。

促炎剂 TNF $\alpha$  刺激具有与 G 蛋白信号途径修饰剂形成复合物的细胞表面受体的人外周血单个核细胞或多形核细胞, 提供了所述细胞产生的蛋白激酶的分布, 其中与没有所述受体复合物的接受刺激的细胞相比, Raf、Ras 和 Pp60 Src 的量增加, PLC $\gamma$ 、PI3 (83 Kd)、G 蛋白  $\alpha$ 、G 蛋白  $\beta$  和 G 蛋白  $\gamma$  激酶的量减少。

#### 附图简述

图 1 显示了 FITC 标记的 HK-X (f-Met-Leu-Phe-Phe) 与人外周血具核细胞的结合。

图 2A - 图 2C 是 FITC 标记的 HK-X 与激活的淋巴细胞结合的点图。图 2A 显示了在与 100nM FITC 标记的 HK-X 一起培养 24 小时后, 用 6  $\mu$ g 伴刀豆凝集素 A (ConA) 刺激的淋巴细胞。图 2B 显示了在没有 FITC 标记的 HK-X 时培养 120 小时后, 用 6  $\mu$ g ConA 刺激的淋巴细胞。图 2C 显示了与 100nM FITC 标记的 HK-X 一起培养 120 小时后用 6  $\mu$ g ConA 刺激的淋巴细胞。

图 3A - 图 3B 是图 2A - C 的淋巴细胞的 DNA 含量直方图。图 3A 是图 2A 细胞的直方图, 图 3B 是图 2B 和 2C 的细胞的直方图。

图 4 是从人嗜中性粒细胞总裂解物和各种树脂回收的  $^{35}\text{S}$ -甲硫氨酰标记蛋白的放射自显影图。

图 5A - 图 5B 显示, 通过针对磷酸酪氨酸的单克隆抗体检测到在载体 (0.3% DMSO) 处理的单个核细胞中存在磷酸化蛋白质。图 5A 是正常细胞的 SDS-PAGE 的光密度测定, 图 5B 是仅用载体 (DMSO) 处理的正常细胞的 SDS-PAGE 凝胶照片。

图 6A - 图 6B 显示通过针对磷酸酪氨酸的单克隆抗体检测, 在 HK-X 处理的单个核细胞中存在磷酸化蛋白质。图 6A 是 HK-X 处理的细胞的 SDS-PAGE 的光密度测定, 图 6B 是仅用 HK-X 处理的正常细胞的 SDS-PAGE 照片。

图 7A - 图 7B 显示了通过针对磷酸酪氨酸的单克隆抗体检测, 在 IL-8 处理的单个核细胞中存在磷酸化蛋白质。图 7A 是 IL-8 处理的细胞的 SDS-PAGE 的光密度测定, 图 7B 是仅用 IL-8 处理的正常细胞的 SDS-PAGE 照片。

图 8A - 图 8B 显示了通过针对磷酸酪氨酸的单克隆抗体检测, 在 HK-X 和 IL-8 处理的单个核细胞中存在磷酸化蛋白质。图 8A 是 HK-X 和 IL-8 处理的细胞的 SDS-PAGE 的光密度测定, 图 8B 是用 HK-X 和 IL-8 处理的正常细胞的 SDS-PAGE 照片。

图 9A - 图 9B 显示通过针对磷酸酪氨酸的单克隆抗体检测, 在新鲜收集自外周血的单个核细胞中存在磷酸化蛋白质。图 9A 是新鲜收集的细胞的 SDS-PAGE 的光密度测定, 图 9B 是新鲜收集的细胞的 SDS-PAGE 凝胶照片。

#### 发明详述

根据本发明, 发现 G 蛋白激酶信号途径修饰剂可以使经促炎剂或分子刺激的人外周血细胞的某些促炎反应失活。

根据本发明, 优选的 G 蛋白激酶信号途径修饰剂可以与促炎介导细胞如淋巴细胞 (尤其是激活的 T 细胞)、粒细胞 (如嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞)、及固定的组织细胞 (如肥大细胞) 上的受体结合。

当 G 蛋白激酶信号途径修饰剂与其受体结合后, 促炎反应被抑制。

根据本发明的优选实施方案，G 蛋白亚基  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  被修饰，而且这些亚基的磷酸化也受到抑制。能够被该修饰剂-受体复合物抑制的促炎反应有受体携带细胞的分泌、脱粒和迁移，以及其它促炎分子的合成和分泌。

优选地，本发明 G 蛋白激酶信号途径修饰剂能够使先前被促炎分子刺激的受体失活，但对未接受刺激的细胞没有作用。对刺激细胞有用的促炎剂的例子是 IL-8、N-甲酰基肽、激活的补体片段 (C5a)、白细胞三烯 B4 (LTB4) 和血小板活化因子 (PAF)。优选地，本发明修饰剂-受体复合物还可以使受体脱敏，不再应答相同促炎剂或不同促炎剂的刺激。

可以将所观察到的 G 蛋白激酶信号途径修饰剂-受体复合物对受体携带细胞的作用应用于鉴定 G 蛋白激酶信号途径修饰剂。可以通过以下方式筛选这些药剂：使促炎介导细胞和已知促炎介质接触以引发促炎反应，然后加入候选药剂，并检测和仅接触促炎分子的促炎介导细胞相比，同时与候选药剂和促炎分子接触的促炎细胞中 G 蛋白激酶量的减少。

尤其有用的 G 蛋白激酶信号途径修饰剂是 f-Met-Leu-Phe-Phe。使用上述程序之一通过常规测试可以鉴定出其它有用的药剂。

本文所用促炎反应包括促炎介导细胞的分泌或脱粒以及白细胞三烯、组胺和其它细胞因子的释放。该反应还包括由于淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞和嗜中性粒细胞的趋化粘附、迁移和聚集，嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞在炎症组织中的浸润。炎症部位血管的通透性、和 IgE、IgG 和 IgA 及它们各自的 FC 受体产生的增加，也可能与促炎反应有关。

因此，抑制促炎反应可以包括在根据本发明的肽-受体结合后，减少，或在优选实施方案中完全终止，促炎介导细胞的脱粒和白细胞三烯、组胺和其它细胞因子的释放。还可以极大地降低，或完全抑制，促炎介导细胞的浸润和迁移。还可以降低炎症部位的血管通透性、和 IgE 的水平。

为了可以更全面地理解本文所描述的本发明，我们给出以下实施例。应当理解，这些实施例仅用于举例说明，而不应理解为以任何方式

限制本发明。

### 实施例 1: 标记的 HK-X 与外周血具核细胞的结合

测定外周血具核细胞上 HK-X (“f-Met-Leu-Phe-Phe”) 的 Kd 和 Bmax (饱和结合)。在含有 0.1% 叠氮化钠的 1% BSA-PBS 溶液中预先洗涤 100  $\mu$ l 溶液中来自密度离心制备的各种组分(单核细胞、淋巴细胞、粒细胞)的  $2 \times 10^5$  个细胞。根据表 1, 向各组试管中加入 100  $\mu$ l 以下摩尔浓度的 FITC 标记 HK-X (溶于 1% BSA-PBS 溶液中):

表 1

管号	FITC 标记的 HK-X 摩尔浓度
1	$9.06 \times 10^{-12}$
2	$2.71 \times 10^{-11}$
3	$5.43 \times 10^{-11}$
4	$7.25 \times 10^{-11}$
5	$9.06 \times 10^{-11}$
6	$2.71 \times 10^{-10}$
7	$5.43 \times 10^{-10}$
8	$7.25 \times 10^{-10}$
9	$9.06 \times 10^{-10}$

混合这些试管并涡旋 30 秒。然后将试管置于 4-8 $^{\circ}$ C 30 分钟。然后加入 100  $\mu$ l Cal-Lyse, 孵育 5 分钟, 或加入 500  $\mu$ l 1% 甲醛。如果加入 Cal-Lyse, 则加入 1ml 水并再孵育 5 分钟。然后在流式细胞仪 (Coulter Epics Elite) 上分析细胞。图 1 显示了结合结果。测定的 Bmax 为 47.66, Kd= $1.674 \times 10^{-10}$ M。因此, 这些结果显示 HK-X 可以和外周血具核细胞如单核细胞、淋巴细胞及粒细胞结合。

通过相似的方法学, 还确定了 HK-X 可以和激活的 T 细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、及嗜碱性粒细胞结合、以及 HK-X 和嗜中性粒细胞的已知结合。

### 实施例 2: HK-X 与激活的受体结合

在培养的第 24 或 120 小时, 用促分裂原伴刀豆凝集素 A (ConA) 刺激外周血淋巴细胞。然后将这些细胞或者暴露或者不暴露于 100nM FITC 标记的 HK-X。并用 DAPI 染色细胞以确定细胞周期。然后通过流式细胞仪分析细胞。

图 2A-2C 显示了 ConA 激活的淋巴细胞和 FITC 标记的 HK-X 的结合位点出现之间的关系。这四个象限显示了以下特征:

左上象限代表 DNA 含量超过  $1n$ , 且具有背景水平(使用图 1 的分布曲线确定的)以上的增加的 FITC HK-X 结合水平的细胞;

右上象限代表 DNA 含量超过  $1n$ , 且 FITC-配体的结合高于背景的细胞;

右下象限包含具有  $1n$  DNA 含量、但结合的 FITC-配体高于背景水平的细胞; 和

左下象限包含具有  $1n$  DNA 含量和背景水平的 FITC-配体的细胞。

正如图 2B 和 2C 的检测结果显示的, 暴露于该植物凝集素或促分裂原可以刺激细胞进入细胞周期并表达 FITC 标记的 HK-X 的结合位点。120 小时的更长培养期允许更大部分的细胞进入细胞周期(与图 2A 相比)。通过使用与 ConA 一起培养但未用 FITC 标记的 HK-X 染色的细胞设定阈值(象限), 极为准确测定了内源性荧光的背景水平(见图 2B)。

统计学分析证实了通过这些点图测量提供的定性观察结果。图 2C 中大约 25% 的细胞含有超过  $1n$  的 DNA 含量并具有高于背景水平的 FITC-配体结合。这分别与图 2A 和 2B 右上象限中的细胞数量形成鲜明对比。

我们使用 Phoenix Software (Phoenix, AZ) 的软件包“MultiCycle”, 更正规地检测了细胞周期各相中细胞的分布。该软件将该 DNA 直方图去卷积(deconvolute), 并统计分析这些成分以确定适合度和显著性程度。

图 3A 显示图 2A 所包含的相同样品, 图 3B 显示图 2B 和 2C 中所包含的样品。正如二倍体( $>1n$  DNA 含量)细胞百分数的检测结果显示的, 该分数从图 2A 的 2.2% 增加至图 2B 和 2C 的 29%。

因此, 明显地, 促分裂原刺激人外周血淋巴细胞可以起始它们的 DNA 复制, 而且在此过程的同时还引起 FITC 标记的 HK-X 的结合位点表达。DNA 含量为  $1n$ 、或处于细胞周期 G0/G1 相的细胞仅小部分表现出该配体结合位点的表达增加。相反, 具有二倍体 DNA 含量( $>1n$ )的所有细胞

都含有该配体的结合位点。

### 实施例 3: HK-X 受体的鉴定和表征

从鼠腹膜肥大细胞、人多形核细胞和单个核细胞群分离和表征结合 HK-X 和其它 N-甲酰基肽的受体。而且,  $FC\epsilon R$  受体的 G 蛋白激活作为 PKC、PI3 增加和  $Ca^{2+}$  动员的下游结果, 使得  $FC\epsilon$  受体成为干扰 G 蛋白的下游效应受体。

正如由暴露于 HK-X 后生物反应性的改变、和与荧光或放射活性标记的 HK-X 的结合所证实的, 结合 HK-X 的细胞包括肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞。尚未鉴定到 HK-X 的受体。相反, 嗜中性粒细胞在其表面表达甲酰基肽受体。然而, 血液淋巴细胞和单核细胞似乎比嗜中性粒细胞与 HK-X 结合较少。

#### 详细材料和方法

1. 分离细胞 -- 通过将 35ml Tyrode 氏溶液注入麻醉大鼠的腹腔中, 分离大鼠腹膜肥大细胞。然后注射过量麻醉剂以处死大鼠。收获腹膜细胞, 将之放入 15ml 离心管中。通过室温  $250\times g$  离心 10 分钟沉淀细胞。

从由正常供体获得的外周血中分离人外周血单个核细胞和多形核细胞。在肝素中收集血液。通过在 Ficoll-Hypaque 上室温  $500\times g$  离心 60 分钟, 分离各种细胞类型。分别收获并汇集各个组分, 在含有抗生素的 RPMI 1640 中洗涤 1 次。

2. 用  $^{35}S$ -甲硫氨酸代谢标记细胞 -- 将细胞调节至每 ml 含有  $10\mu Ci$   $^{35}S$ -甲硫氨酸的无甲硫氨酸 RPMI 1640 培养基中有  $1\times 10^7$  个细胞, 然后  $37^\circ C$  在 5%  $CO_2$  中放置过夜。

3. 收获细胞并制备粗细胞膜 -- 在 PBS 中洗涤细胞 3 次, 之后在含有 0.3% NP40 和蛋白酶抑制剂鸡尾酒的 HEPES 缓冲液 (pH7.2) 中作超声破碎。所获细胞制品在  $600\times g$  下离心 10 分钟, 收集上清液用于进一步分析。

4. Sepharose 和 Sepharose HK-X 层析分离各种细胞蛋白质 -- 使

细胞制品通过未经取代的 Sepharose 树脂柱、或通过 Sepharose HK-X 树脂并分为两个部分 A 和 B。

部分 A: 通过 HK-X 取代的 Sepharose 柱。洗涤柱子, 并用含有 HK-X (5mg/ml) 的缓冲液, 之后用 0.1M 甘氨酸 (pH 2.5), 进行洗脱。

部分 B 在存在可溶性 HK-X 时与 HK-X 取代的柱结合, 然后洗脱蛋白质。浓缩并冻干各个组分。

此步骤中采取的方法涉及 HK-X 与 Sepharose 树脂结合以制备 HK-X 取代的树脂。在暴露于 HK-X 取代的树脂之前, 使标记的细胞蛋白质混合物通过未经 HK-X 取代的树脂以除去与天然树脂反应的任何蛋白种类。由此, 当包含受体蛋白的细胞蛋白在适当的离子环境下通过 HK-X 取代的树脂时, 存在于其它蛋白质中的受体蛋白质 (HK-X 的受体) 与 HK-X 紧密结合。用温和的试剂如中性 pH 的磷酸缓冲液洗涤树脂, 以除去所有的低亲和结合蛋白。随后, 将该树脂暴露于过量的游离 HK-X, 以竞争性地洗脱与树脂结合的受体蛋白。对所有这些步骤中释放的放射性蛋白进行浓缩并在 12% SDS-PAGE 系统上分析, 详见以下步骤。

5. 12% SDS-PAGE - - 将含有 250 cpm 至 2000 cpm 放射活性的  $25 \mu\text{l}$  放射活性细胞制品加在凝胶的各泳道上。90 V、30mA 电泳凝胶, 直到可以良好分辨带色的标准物为止。该标准物是磷酸酶 b (MW= 94,000); 牛血清白蛋白 (MW= 68,000); 卵白蛋白 (MW= 43,000); 碳酸酐酶 (MW= 30,000); 和大豆胰蛋白酶抑制剂 (MW= 21,000)。

6. 估计分离出的放射性蛋白质的分子量 - - 计算标准物和凝胶上观察到的所有不同分子量蛋白种类的相对迁移率。就标准物的 log 分子量对各标准物的相对迁移率作图。在 PRISM 软件中键入数据, 从标准曲线程序预测未知蛋白质的分子量。结果与文献 (Goetz 等, *Biochemistry* 20:5717-5722, 1981) 公开的 FPR 受体蛋白质作比较。

图 4 显示了代表性实验的结果。泳道 A 显示了细胞裂解物中存在的所有蛋白质。泳道 B 中, 来自无 HK-X 取代的 Sepharose 柱的未结合物质显示出类似于整个细胞裂解物的蛋白条带分布情况。泳道 C 含有洗脱前物质。泳道 D 是空白泳道。泳道 E 中, 当在 1mg HK-X (竞争物) 存在

下洗脱柱子时，可见到三条蛋白带。估计分子量分别是~94,000、~68,000和~40,000道尔顿。该实验的条件确立了该结合的特异性。

将本实验中所洗脱的条带的相对丰度与 Goetzl 等报道的作比较，揭示出令人感兴趣的差异（见表2）。对受体标化比例的检测结果显示，从 FMLP 柱 (Goetzl) 回收的三种蛋白和从 HK-X 柱 (本实验) 回收的三种蛋白在分布上有实质性的不同。68Kd 蛋白种类是 Goetzl 等从 FMLP 亲和柱回收到的优势种类，而 40Kd 蛋白种类是从 HK-X 亲和柱回收到的主要种类。

表 2

报道的从 FMLP-Sephrose 回收的甲酰基受体与从 HK-X-Sephrose 回收的甲酰基受体的差异

分子量	含甲硫氨酸的总残基数	由 FMLP 得到的总受体群的比例	由 HK-X 得到的总受体群的比例	受体蛋白的标化比例	
				FMLP	HK-X
94,000	14	15	26	1.07	1.8
68,000	11	80	28	7.27	2.54
40,000	4	5	41	1.25	10.25

图 4 的放射自显影图清楚地显示，通过加入 1mg HK-X 从大鼠腹膜肥大细胞中洗脱了 3 种分子。这些蛋白质的计算分子量与 Goetzl 等报道的分子大小一致。用 HK-X 或酸竞争后从大鼠腹膜肥大细胞和嗜中性粒细胞回收到的蛋白质的分子量与 Goetzl 报道的从人嗜中性粒细胞得到的相同。

尽管 40Kd 分子中甲硫氨酸残基总平均数是 5.1，但它比每分子分别含有 11 和 14 个残基的 68,000 和 94,000 分子种类具有更强的放射显影图像。在本实施例中，用  $^{35}\text{S}$ -甲硫氨酸通过生物合成放射标记确定了所回收的各蛋白质的相对丰度。通过对来自放射自显影图的曲线下面积进行积分，确定从亲和层析回收到的相对比例。Goetzl 通过使用化学方法测定蛋白质来测量各种蛋白的相对丰度。因此，为了更准确地比较两

个研究中回收的蛋白质的分布,用各种类的相对丰度除以甲硫氨酸残基的数目,标化分布值。该比值校正了由于方法学不同造成的潜在数值差异。校正后的比值揭示出,Goetzl 报道的数值与本实施例获得的数值之间有极为不同的结合和/或回收分布情况。一种可能是去污剂解离的受体复合物选择性结合 FMLP 取代的 Sepharose 的方式与选择性结合 HK-X 取代的 Sepharose 的方式不同。

总之,在本实施例中,在用  $^{35}\text{S}$ -甲硫氨酸体外标记蛋白质后,使用 HK-X 可以选择性地从得到的细胞裂解物中回收结合蛋白。分离到分子量不同的 3 种分子,它们与以前报道的 FMLP 受体复合物相关肽的大小是一致的。

通过本实施例所用技术,我们还阐明, HK-X 可以与人多形核细胞和单个核细胞,尤其是激活的 T 细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞,结合。

#### 实施例 4: 信号转导和作用机制

白细胞可以对大量化学引诱物和其它促炎介质产生应答。一些介质引起趋化性、酶系统的激活和病理方面重要的介质的释放。典型的 N-甲酰基肽(原型 - FMLP)、激活的补体片段(C5a)、白细胞三烯 B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>)、血小板活化因子(PAF)、和一些趋化细胞因子(如 IL-8)是熟知的趋化和促炎剂。这些药剂与 G 蛋白偶联受体(GPCR)结合,随后通过蛋白激酶系统介导多种信号转导产生。这些初始事件导致的级联事件是复杂的并相互关联,还负责所有具核细胞的整个行为。程序化细胞死亡(细胞凋亡)、免疫应答的产生、自身识别 T 细胞的去除、和对细胞外基质合成的控制仅是信号转导途径作用的几个例子。

根据其将磷酸基团从磷酸供体转移至位于蛋白质内的受体氨基酸上的能力,鉴定蛋白激酶。通常,供体是 ATP 的  $\gamma$  磷酸。蛋白质内的三种主要受体氨基酸残基是酪氨酸、丝氨酸和苏氨酸。到 1999 年,已在文献中鉴定和描述了超过 115 种蛋白激酶。

文献(Prosnitz 等, Pharmacol. Ther. 74:73-102, 1997)极好地描述了细胞应答 FMLP 刺激的行为。FMLP 与吞噬细胞结合刺激与细胞功

能有关的磷酸化发生。FMLP 和其它化学引诱物刺激磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K), 而这又激活蛋白激酶 (PKC)。在嗜中性粒细胞中, FMLP 的结合引起胞外调节激酶 (ERK-1) 的磷酸化, 该激酶属于称作促分裂原活化蛋白激酶 (MAP 激酶) 的一个总激酶家族。MAP 激酶家族的一些成员是: Raf-1 和 Ras。

这些蛋白激酶家族的成员一般在分子量上有一定程度的差异, 以致通过 SDS-PAGE 它们可以彼此分开。而且, 可以通过仅识别磷酸酪氨酸表位的单克隆抗体从全部细胞内蛋白质集合中鉴定出磷酸酪氨酸蛋白质 (Ross 等, Nature (London) 294:654, 1981; Frackleton 等, Mol. Cell Biol. 3:1343, 1983)。

为了阐明 HK-X 的作用机制, 我们分析了加入 HK-X 所介导的人外周血单核和多形核细胞中蛋白激酶的改变。单独加入 HK-X, 以及此外还加入已知的趋化和促炎剂 FMLP 或 IL-8。

详细的材料和方法:

1. 分离细胞 - 从获自正常供体的外周血中分离人外周血单核和多形核细胞。在肝素中收集血液。通过在 Ficoll-Hypaque 上  $500 \times g$  室温离心 60 分钟, 分离各种细胞类型。分别收集并汇集各个组分, 然后在含有抗生素的 RPMI 1640 中洗涤 1 次。

2. 培养和处理细胞 - 为了使细胞可以在磷酸化的蛋白质库中达到稳态, 在加入刺激剂前将每 ml 培养基  $10^7$  个细胞置于  $37^\circ\text{C}$  30 分钟。然后向每 ml 细胞中加入以下刺激剂:

- A.  $100 \mu\text{l}$  载体 (培养基中的 0.3%DMSO 溶液),
- B.  $100 \mu\text{l}$  含有  $20 \mu\text{g}$  HK-X 的 HK-X,
- C.  $100 \mu\text{l}$  含有  $0.1 \mu\text{g}$  FMLP 的 FMLP,
- D.  $100 \mu\text{l}$  含有  $0.1 \mu\text{g}$  IL-8 (重组人 IL-8) 的 IL-8,
- E.  $100 \mu\text{l}$  含有  $20 \mu\text{g}$  HK-X 的 HK-X 加上  $100 \mu\text{l}$  含有  $0.1 \mu\text{g}$  FMLP 的 FMLP,
- F.  $100 \mu\text{l}$  含有  $20 \mu\text{g}$  HK-X 的 HK-X 加上  $100 \mu\text{l}$  含有  $0.1 \mu\text{g}$  IL-8 的 IL-8,

### G. 无任何刺激剂的细胞培养基。

细胞在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 中再孵育 30 分钟。

3. 收获细胞和 SDS-PAGE 分析 - 室温 250 ×g、5 分钟沉淀细胞。去除上清液并加入 25 μl 2 ×SDS-PAGE 起始缓冲液。煮沸沉淀 15 分钟并 10,000 ×g 离心 5 分钟。取出少量样品在 12% 丙烯酰胺凝胶上作凝胶电泳。

4. 免疫印迹检测磷酸蛋白 - 13V、30 分钟将蛋白质转移至尼龙膜上，之后用 1% BSA 封闭 12 小时。加入溶于 0.3% BSA 的与 HRP 偶联的抗体，60 分钟。对膜进行洗涤、固定和拍摄。

5. 数据分析 - 将照片带到专业实验室，使用极高反差和低颗粒胶片制备每块凝胶的负片。随后以 600 dpi 扫描照片，并使用 Image Pro Plus 软件，SPSS 进行光密度分析。计算每一条带的分子量。

为了标化 SDS-PAGE 每个泳道上加入的细胞蛋白质量，每次处理均使用相同数量的细胞，每一泳道均加上几乎相同体积的样品。在图 5 至图 9 中，显示了抗磷酸酪氨酸的单克隆抗体所检测到的磷酸蛋白的化学发光图像。为了获得最大程度的条带分辨率以及它们相应的化学发光强度，由专业摄像师制作这些化学发光像的负片。例如，在图 5A 中，暴露于载体 30 分钟的细胞中存在的蛋白激酶显示出 9 种不同的蛋白质，如凝胶的光密度测量分析中的峰所示。为了清楚起见，用箭头标出了光密度测量分析中的峰，并用同样的箭头标出了凝胶上相应的分子种类。（凝胶的起始端在凝胶的右边，此处定位的是具有较大分子量的种类）。

图 6 中描述了细胞对 HK-X 的蛋白激酶应答。检测到约 83Kd 分子量的种类明显增加，而这在其它处理中没有被观察到。用 20 μg HK-X 和 0.1 μg IL-8、以及 20 μg HK-X 和 0.1 μg FMLP 同时处理细胞后，观察到显著差异（数据未显示）。较小分子量的种类极大地减少（凝胶的左边大部分）。峰的面积定量地反映了此减少。光密度测量图中的此面积用水平双箭头作了显示。图 9 中显示了新鲜单个核细胞的蛋白激酶含量和分布。这些细胞与载体处理的细胞（图 5）和 HK-X 处理的细胞（图 6）在激酶分布上极为相似。没有显示对单独的 FMLP 刺激和对 HK-X 加上

FMLP 的刺激出现的激酶应答情况。然而，所有这些情况均分别与单使用 IL-8 和使用 HK-X 加上 IL-8 时所观察到的情况基本上一致。

外周血多形核细胞的蛋白激酶情况和分布与单个核细胞的基本相同。两种细胞类型间的主要差异是单个核细胞比多形核细胞代谢更为活跃。

使用光密度测量分析方法，计算每种分子量分子的峰下面积。由此，定量评价总激酶含量中各激酶的百分数。此外，还将已知激酶的分子量和本实验中从相对迁移率(Rf)计算得出的分子量作了比较。

表 3 显示了人外周血细胞在暴露于 HK-X 后蛋白激酶分布的定量改变。

表 3

蛋白激酶	分子量	使用 HK-X 后改变的 %
PLCy	150 Kd	NC
PI3	102 Kd	+57
PI3	83 Kd	+55
Raf	65-68 Kd	-42
Pp60 Src	62 Kd	NC
G-蛋白 $\alpha$	56 Kd	-49
ERK-1	44-49 Kd	NC
G-蛋白 $\beta$	33-35 Kd	-25
Ras	21 Kd	-32
G-蛋白 $\gamma$	9 Kd	NC

表 4 显示了各种实验的 G 蛋白  $\gamma$  激酶的数量，这验证并扩展了前面的定性数据。尽管我们尝试每次处理使用相同数量的细胞而且每个泳道加上几乎等量的回收的细胞内蛋白质，但正如通过这些面积所观察到的，激酶的总量是不同的。

表 4

从暴露于 HK-X 和 IL-8 及 FMLP 后的外周血细胞得到的蛋白激酶总结

蛋白激酶	MW (kd)	载体	单独的 HK-X	单独的 FMLP	单独的 IL-8	HK-X + FMLP	HK-X + IL-8	新鲜的正常细胞
G 蛋白 $\gamma$	9	10	11.4	10.1	14.8	2.7	3.4	11.9
总面积		164,413	246,023	189,169	170,985	98,097	128,937	176,442

表 5 描述了另一实验的结果, 该实验显示了与共刺激暴露于(1) HK-X 及(2) fMLP 或 IL-8 比较, 暴露于 HK-X 后人外周血细胞中蛋白激酶的分布改变。

表 6 和 7 描述了再一实验的结果, 该实验显示了与共刺激暴露于(1) HK-X 及(2) Ca5、TNF $\alpha$ 、IL-4、IL-6、IL-10 或 IL-13 相比, 暴露于 HK-X 后人外周血细胞的蛋白激酶分布改变。

表5 外周血细胞中酪氨酸蛋白激酶的鉴定和分布总结

-----百分数分布-----

蛋白激酶	分子量	载体	单独的HK-X	HK-X + fMLP	HK-X + IL-8	新鲜正常细胞
PI3 激酶	102 Kd	5	4	5.1	4	3
PI3 激酶	83 Kd	5.2	7.7	11	10.4	4.9
Raf	65-68 Kd	7	7.8	9.5	8.9	5
Ras	21 Kd	18	12.7	5.7	11.3	18.9
Pp60 Src	62 Kd	6.3	5	6.6	8.8	8.7
ERK-1	44-49 Kd	6.6	6.9	4.8	8.6	8.5
G 蛋白 $\alpha$	56 Kd	6.9	6.3	7.8	8.2	12.3
G 蛋白 $\beta$	33-35 Kd	6.6	7	4.4	5.3	9.3
G 蛋白 $\gamma$	9 Kd	10	11.4	2.7	3.4	11.9

表 6 外周血细胞中酪氨酸蛋白激酶的鉴定和分布总结  
-----百分数分布-----

蛋白激酶	分子量	C5a Plus HK-X	TNF $\alpha$ Plus HK-X	IL-4 Plus HK-X	HK-X
PLCy	150 Kd	2.2	2.4	7.7	4.2
PI3 激酶	102 Kd	2.7	3.1	6.0	3
PI3 激酶	83 Kd	6.9	5.5	7.7	6.8
Raf	65-68 Kd	6.4	5.7	3.1	3
Ras	21 Kd	16.5	20.9	9.9	16.4
Pp60 Src	62 Kd	5.8	7.4	4.5	5.1
ERK-1	44-49 Kd	6.5	5.9	6.4	6.0
G 蛋白 $\alpha$	56 Kd	5.5	6.3	7.9	7.5
G 蛋白 $\beta$	33-35 Kd	6.2	6.2	8.0	8.2
G 蛋白 $\gamma$	9 Kd	<u>8.0</u>	<u>7.4</u>	<u>5.8</u>	<u>9.4</u>

表7 外周血细胞中酪氨酸蛋白激酶的鉴定和分布总结

-----百分数分布-----

蛋白激酶	分子量	IL-6 Plus HK-X	IL-10 Plus HK-X	IL-13 Plus HK-X	载体
PLCy	150 Kd	5.0	3.8	11.2	5.8
PI3 激酶	102 Kd	3.5	3.4	13.3	4.0
PI3 激酶	83 Kd	4.3	5.7	7.2	7.6
Raf	65-68 Kd	6.7	2.6	5.7	3.6
Ras	21 Kd	17.6	15.8	9.8	13.3
Pp60 Src	62 Kd	6.7	4.7	4.4	4.8
ERK-1	44-49 Kd	8.9	8.8	6.9	5.7
G 蛋白 $\alpha$	56 Kd	8.7	8.1	4.9	7.9
G 蛋白 $\beta$	33-35 Kd	6.6	8.5	5.2	7.2
G 蛋白 $\gamma$	9 Kd	<u>4.4</u>	<u>11.1</u>	<u>3.4</u>	<u>6.7</u>

带有甲酰基肽受体的细胞在接受刺激的过程中,发生了许多重要事件。这些事件包括:

- A. 当与 FMLP 或其它类似物结合后, FPR 与 G 蛋白库相互作用, 该蛋白库是其它化学引诱物的受体如 LTB<sub>4</sub> 和 C5a 受体所共同的 (Jacobs 等, *J. Leukoc. Biol.* 57:679-686, 1995; Mcleish 等, *Mol. Pharm.* 36:384-390).
- B. 在用 FMLP 或其它化学引诱物刺激后, 细胞对再次或随后的相同或其它化学引诱物产生不应。当一种刺激剂诱导的不应状态或受体失活影响到多种未结合配体的受体时, 该情况是异源性脱敏。据推测, 此种形式的脱敏可能是由于下游激活的激酶磷酸化这些未结合配体的受体所致的, 如 FC $\epsilon$ R 受体的情形。
- C. IL-8、C5a 和 FMLP 使彼此的受体脱敏。这些研究被扩展到包括 PAF 和 LTB<sub>4</sub> 受体。起始该过程的机制可能涉及 PKC 对受体的磷酸化。然而, FPR 不含有能够被 PKC 磷酸化的细胞内域, 而似乎由另一激酶负责。
- D. 缺少 FPR 磷酸化时出现下游 FPR 应答的脱敏。

单独 HK-X 处理不会特异地下调激酶。HK-X 和 IL-8 或 HK-X 和 FMLP 同时刺激单个核细胞后, 造成 G 蛋白  $\gamma$  激酶选择性地显著降低。这些观察结果提示了以下 HK-X 的作用机制, 见下述。

HK-X 和潜在的促炎分子如 IL-8 和 FMLP 能够一起存在。下调 G 蛋白三聚体复合物中的一个。具体地, 在稳态条件下, G 蛋白  $\gamma$  磷酸化被减少。因此, 当 IL-8 或 FMLP 存在时 HK-X 似乎可以起始直接或间接地抑制 G 蛋白  $\gamma$  亚基磷酸化的受体脱敏。

从此处给出的数据和以前的报道可以推出许多推论。它们是:

1. HK-X 表现出对能够应答特异促炎受体介导的促炎刺激的细胞具有特异性。
2. 如果炎症事件过程中在系统中保持 HK-X, 则 HK-X 将维持潜在应答细胞的脱敏。
3. 使用本报道描述的体外培养系统, 可以根据对 HK-X 作用的灵敏性, 筛选其它细胞靶标和其它促炎介质。因此, 可以使用一个简单的测定快

速地甄别潜在的治疗效力并建立治疗的可预测性。

部分地，HK-X似乎通过使促炎介质受体的脱敏来介导其治疗效力。通过直接或间接地抑制G蛋白 $\gamma$ 亚基磷酸化，可以从该事件的下游介导和维持促炎细胞的失活。

我们已对本发明作了详细描述，包括其优选实施方案。然而，应当理解，本领域技术人员可以在权利要求书所述的本发明精神和范围内进行改动和改进。

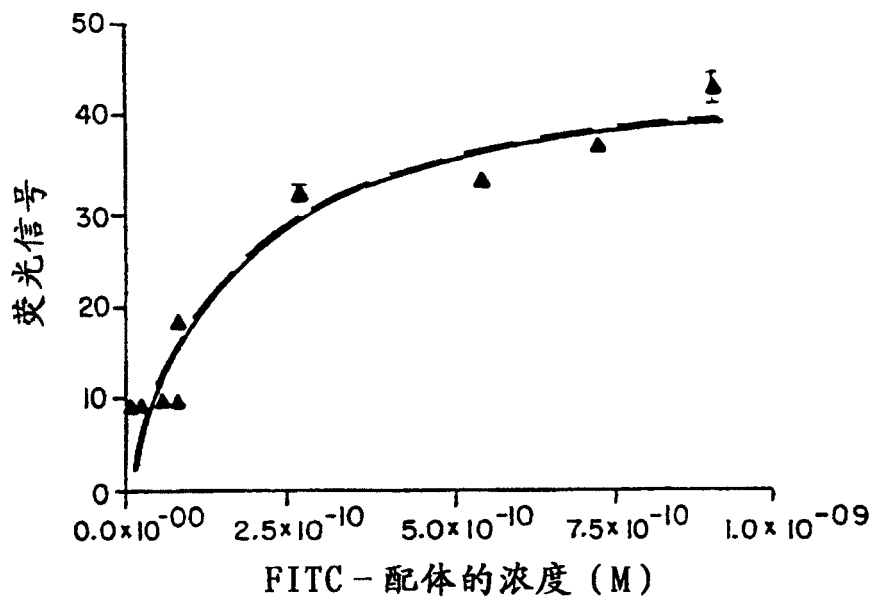


图 1

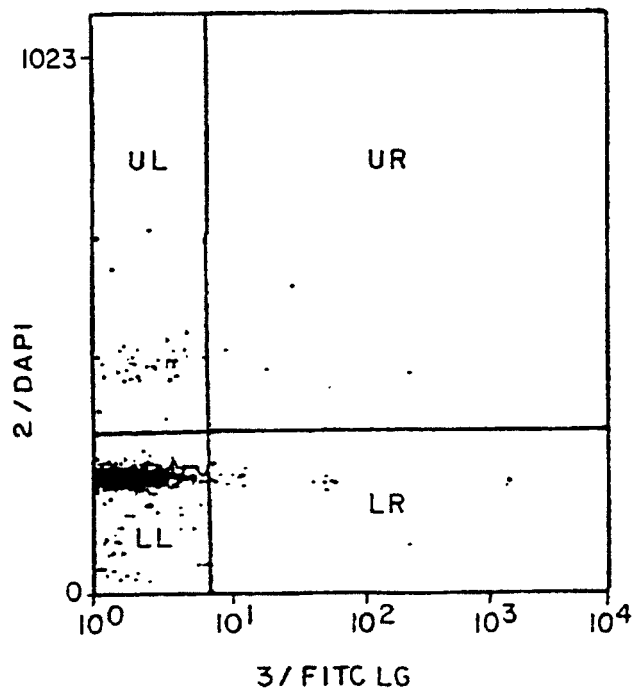
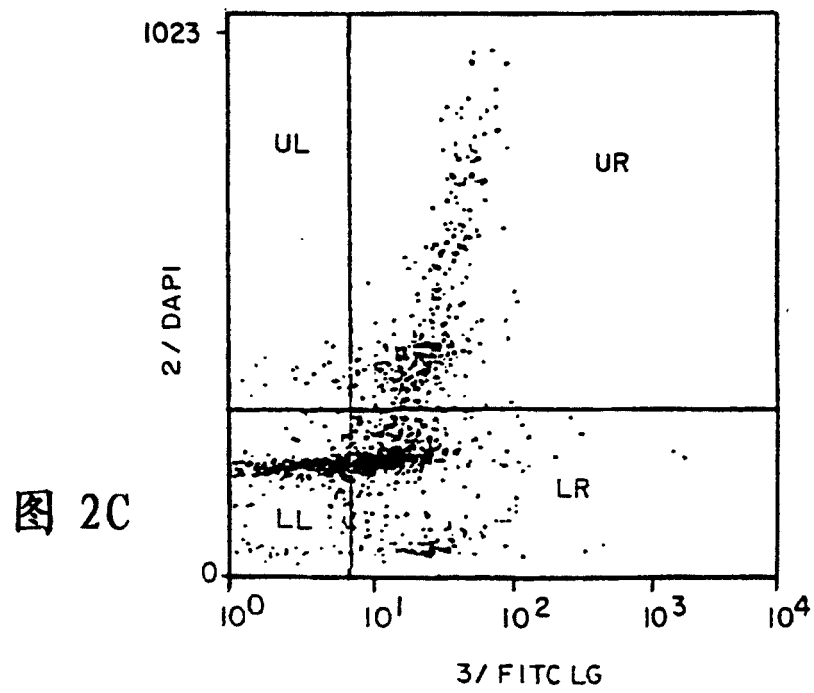
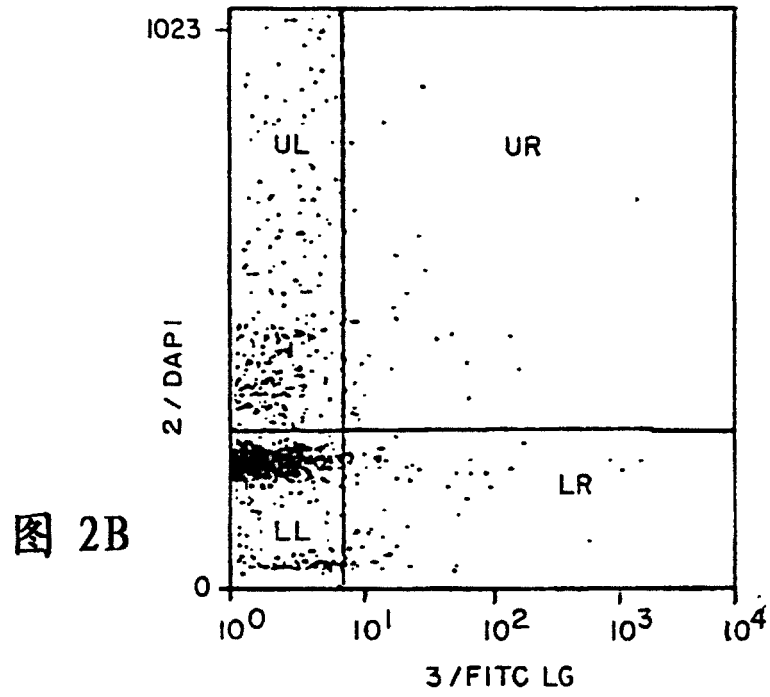


图 2A



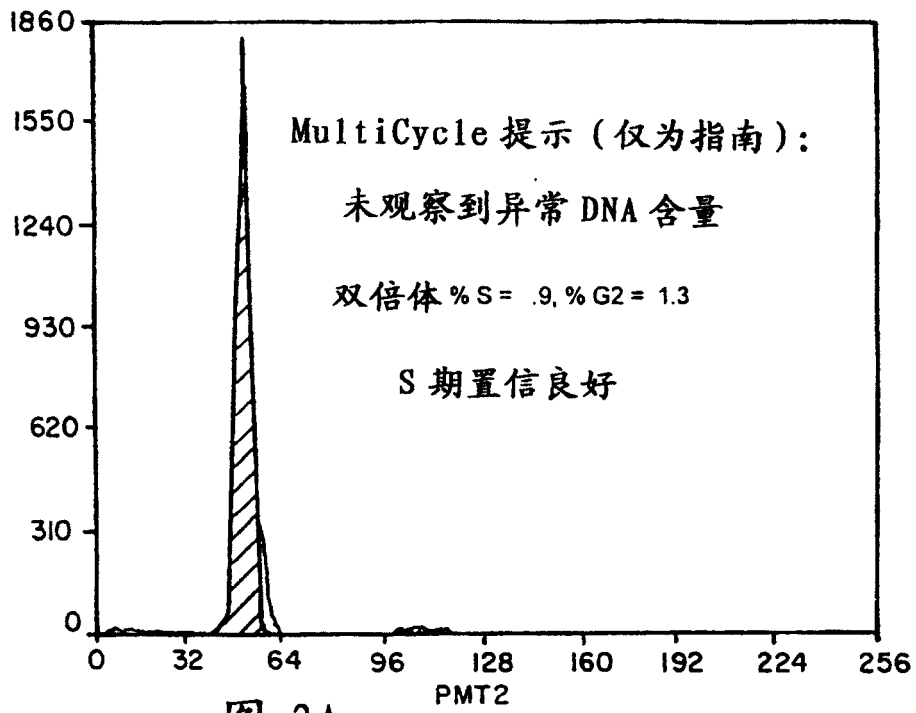


图 3A

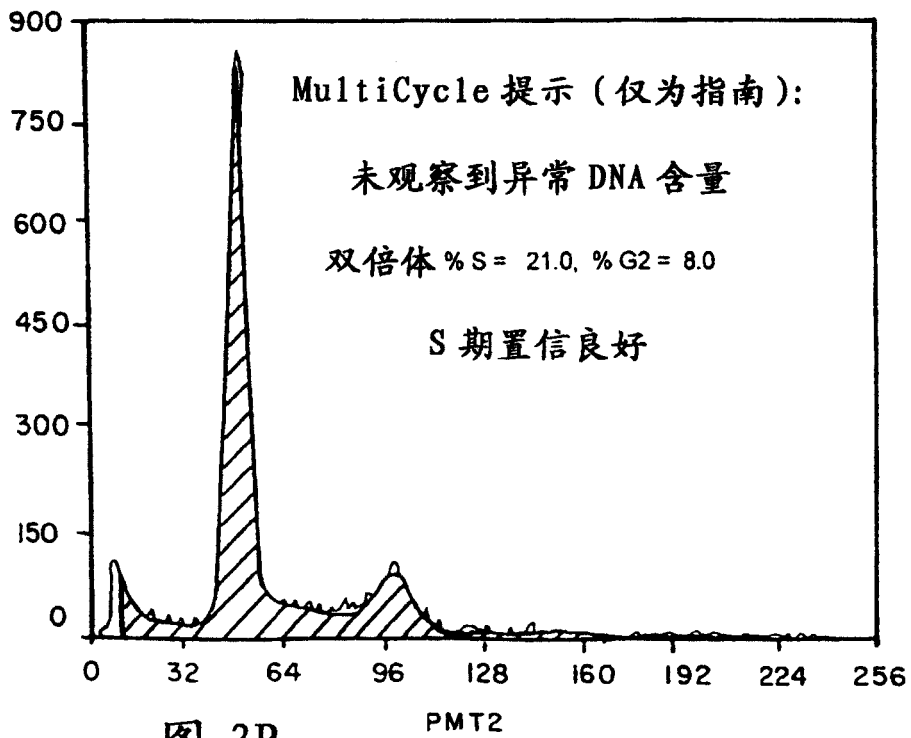


图 3B

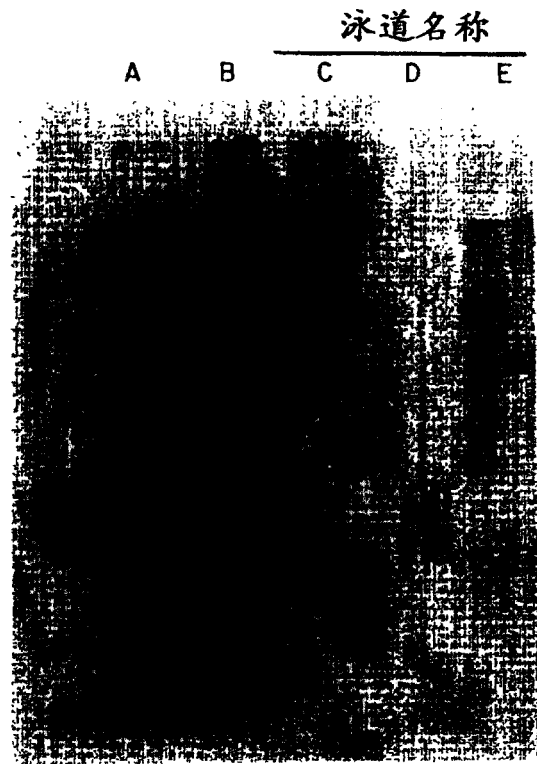


图 4

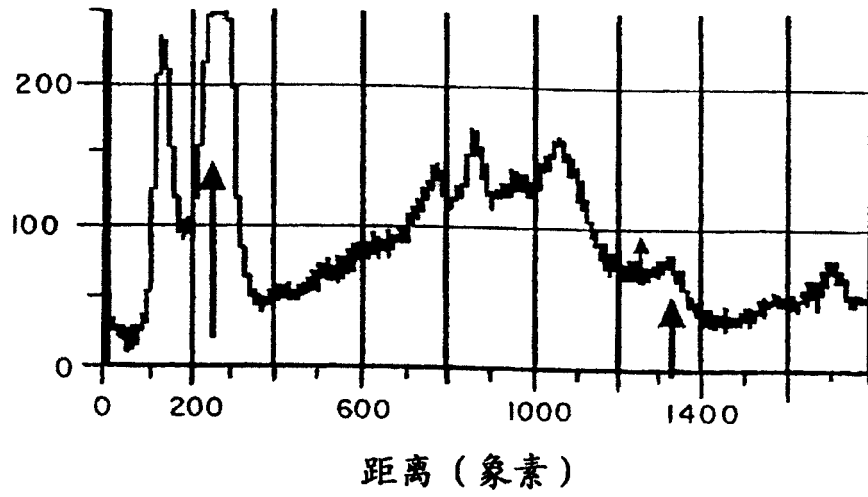


图 5A



图 5B

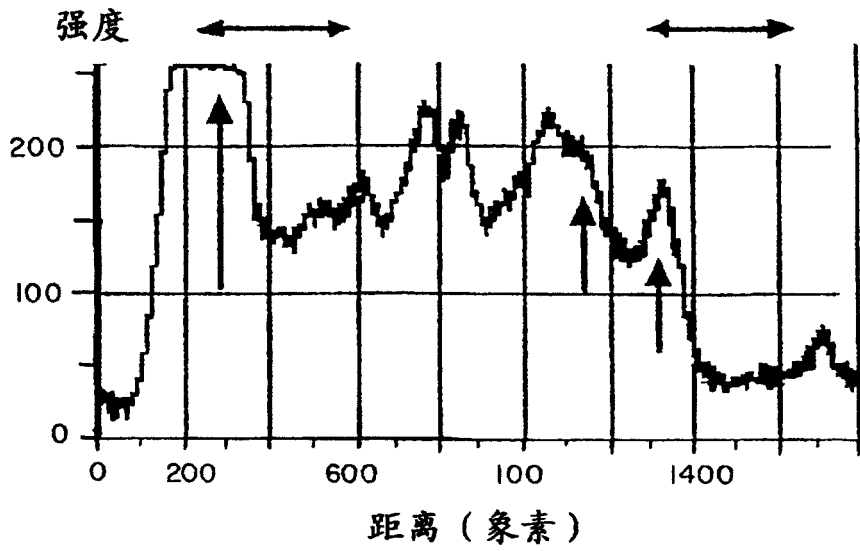


图 6A

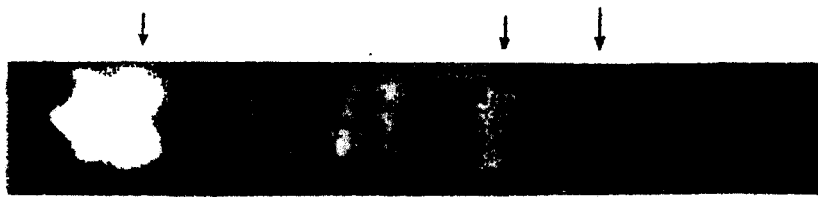


图 6B

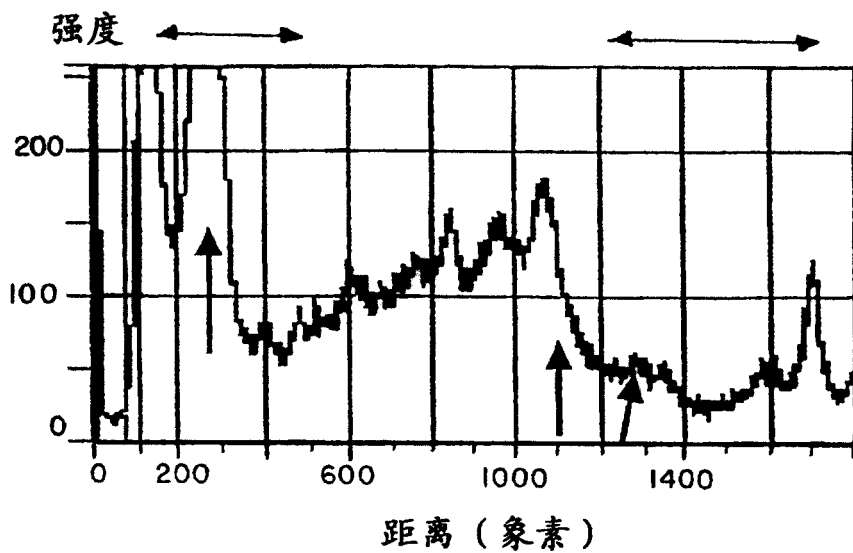


图 7A

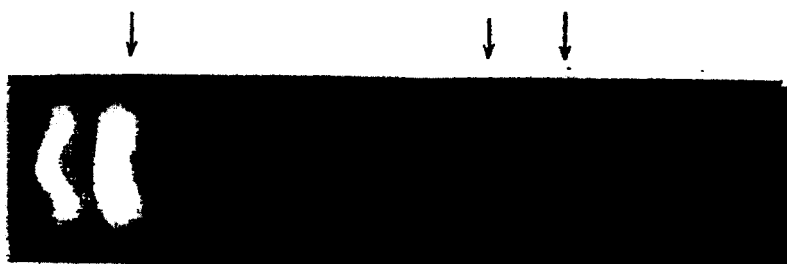


图 7B

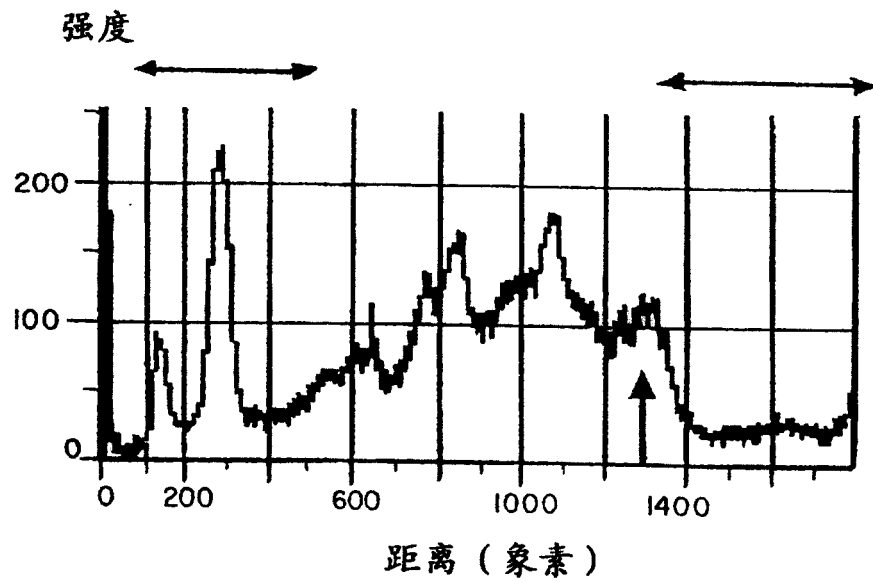


图 8A



图 8B

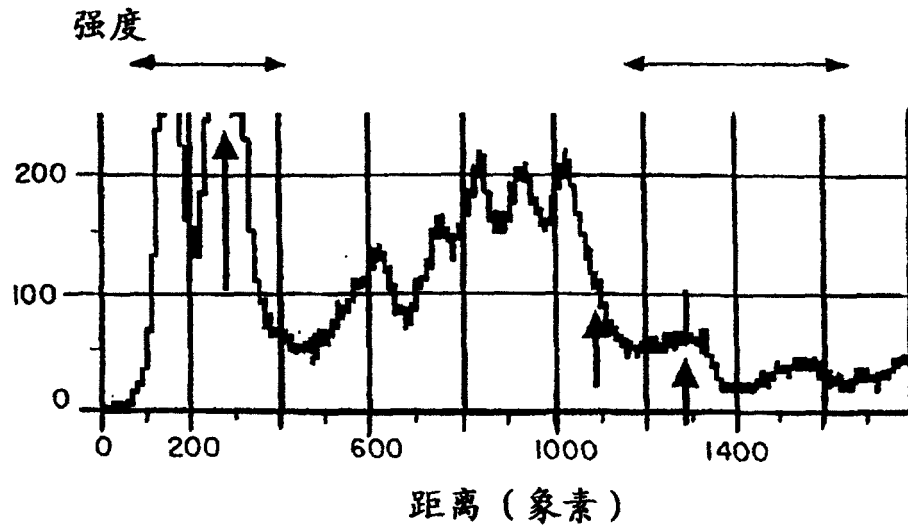


图 9A

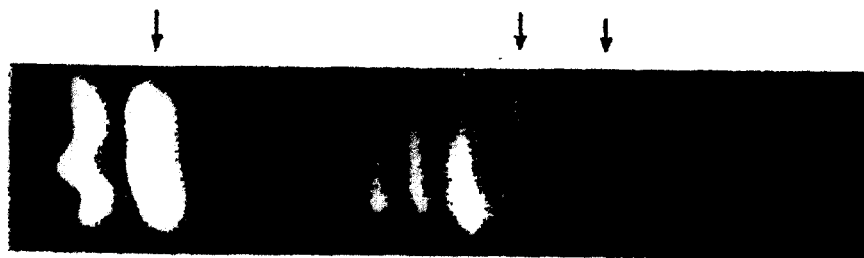


图 9B

专利名称(译)	与G蛋白激酶信号途径修饰剂形成的N-甲酰基肽受体复合物		
公开(公告)号	<a href="#">CN100497374C</a>	公开(公告)日	2009-06-10
申请号	CN00815686.7	申请日	2000-10-12
[标]申请(专利权)人(译)	海斯塔泰克有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	海斯塔泰克有限责任公司		
[标]发明人	J A 克拉格特 C 帕尔默		
发明人	J·A·克拉格特 C·帕尔默		
IPC分类号	C07K14/00 G01N33/53 A61K38/07 A61P29/00 G01N33/50 A61K38/00 A61K38/05 C07K5/083 C07K5/103 C07K14/705 C07K14/72 C12N5/06 C12Q1/02 G01N33/15		
CPC分类号	C07K14/723 A61K38/05 C07K5/081 C07K5/1013 A61K38/07 A61P37/06		
代理人(译)	唐伟杰		
优先权	60/159677 1999-10-15 US		
其他公开文献	CN1633447A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明描述了抑制人外周血单个核细胞或多形核细胞、或固定的组织细胞的促炎反应的方法。使细胞和促炎剂接触，以刺激促炎反应。然后，使细胞与G蛋白激酶信号途径修饰剂接触，籍此抑制G蛋白介导的炎症反应信号转导途径。本发明描述了受体复合物，其中G蛋白激酶信号途径修饰剂与经促炎剂刺激的人外周血单个核细胞或多形核细胞的细胞表面受体结合。