



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104254543 B

(45)授权公告日 2018.06.05

(21)申请号 201380013092.0

(22)申请日 2013.03.08

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104254543 A

(43)申请公布日 2014.12.31

(30)优先权数据
12158939.4 2012.03.09 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.09.09

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2013/054722 2013.03.08

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/132063 EN 2013.09.12

(73)专利权人 瑞士杰特贝林生物制品有限公司
地址 瑞士伯尔尼
专利权人 伯尔尼大学

(72)发明人 C·艾比 S·C·鲁尔 A·绍布
S·梅斯舍尔 A·祖尔舍尔
C·P·沃纳尔伯格

(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 11038

代理人 罗菊华

(51)Int.Cl.
C07K 16/06(2006.01)
C07K 16/12(2006.01)
A61P 1/00(2006.01)

(56)对比文件
US 6300104 B1,2001.10.09,
US 6300104 B1,2001.10.09,
WO 2009/046168 A1,2009.04.09,
Sonja Luer et al.Topical curcumin can
inhibit deleterious effects of upper
respiratory tract bacteria on human
oropharyngeal cells in vitro: potential
role for patients with cancer therapy
induced mucositis?.《Support Care Cancer》
.2010,第19卷799-806.

审查员 王婷

权利要求书1页 说明书16页
序列表3页 附图17页

(54)发明名称

用免疫球蛋白治疗粘膜炎

(57)摘要

本发明涉及包含免疫球蛋白的组合物,所述免疫球蛋白用于由局部应用治疗粘膜炎。尤其是,本发明涉及用于治疗粘膜炎的包含含有J链的IgA和分泌组分的组合物。

1. 包含多克隆免疫球蛋白A的组合物在制备用于通过在受试者中局部施用多克隆免疫球蛋白A来预防或治疗食道粘膜炎的用途,其中多克隆免疫球蛋白A获自血或其组分,并且其中多克隆免疫球蛋白A不是纯化自用TNF- α 免疫的人或动物供体。

2. 权利要求1的用途,其中食道粘膜炎是口腔粘膜炎。

3. 权利要求1或权利要求2的用途,其中免疫球蛋白还包含IgM。

4. 权利要求1或权利要求2的用途,其中免疫球蛋白包含含有J链的IgA。

5. 权利要求4的用途,其中组合物也包含分泌组分。

6. 权利要求5的用途,其中分泌组分是重组体分泌组分。

7. 权利要求5或权利要求6的用途,其中组合物包含分泌-样IgA。

8. 权利要求7的用途,其中组合物包含与另一免疫球蛋白组合的分泌-样IgA。

9. 权利要求1、2、5、6或8之任一项目的用途,其中组合物被配制为提供与受粘膜炎影响的或处于受粘膜炎影响的风险的粘膜区的长接触时间。

10. 权利要求9的用途,其中制剂选自:霜剂,凝胶,糖浆,胶冻剂,接近受影响的粘膜溶解的固体形式,或其组合。

11. 权利要求1、2、5、6、8或10之任一项目的用途,其中局部施用于粘膜减少一种或更多微生物的附着和/或侵入。

12. 权利要求11的用途,其中微生物是细菌和/或真菌。

13. 权利要求1、2、5、6、8、10或12之任一项目的用途,其中局部应用于粘膜促进粘膜创伤治愈。

14. 权利要求1、2、5、6、8、10或12之任一项目的用途,其中局部应用于粘膜发挥抗-炎性效应。

15. 权利要求14的用途,其中抗-炎性效应是

(a) 抑制促-炎性细胞因子表达;和/或

(b) 刺激抗-炎性细胞因子的表达。

16. 权利要求1、2、5、6、8、10、12或15之任一项目的用途,其中受试者是处于发展食道粘膜炎的风险的受试者。

17. 权利要求16的用途,其中处于发展食道粘膜炎的风险的受试者是经历或即将经历化学治疗和/或放射治疗的癌患者。

18. 权利要求16的用途,其中处于风险的受试者是作为之前化学治疗和/或放射治疗法治疗的结果而发展粘膜炎的癌患者。

19. 权利要求16的用途,其中当受试者的嗜中性粒细胞计数开始降低时开始施用组合物。

20. 权利要求17或权利要求18的用途,其中当受试者的嗜中性粒细胞计数开始降低时开始施用组合物。

21. 权利要求19的用途,其中治疗在患者的嗜中性粒细胞计数在正常以下的时期维持。

22. 权利要求20的用途,其中治疗在患者的嗜中性粒细胞计数在正常以下的时期维持。

23. 权利要求1、2、5、6、8、10、12、15、17、18、19、21或22之任一项目的用途,其中组合物被施用给受试者达6次/天。

用免疫球蛋白治疗粘膜炎

【技术领域】

[0001] 本发明涉及包含免疫球蛋白的组合物,所述免疫球蛋白用于由局部应用治疗粘膜炎。尤其是,本发明涉及用于治疗粘膜炎的包含含有J链的IgA和分泌组分的组合物。

【背景技术】

[0002] 癌患者患各种治疗-相关的后遗症。食道粘膜炎化学治疗和放射是最致衰弱的不良效果之一(Sonis ST(2009)Oral Oncol 45,1015-20)。疼痛,粘膜溃疡形成,及需要肠胃外营养的食品摄取困难严重影响患者舒适性及增加局部以及系统性感染的风险(Elting, LS et al(2003)Cancer 98:1531-9)。此外,粘膜炎造成随后化学治疗或放射治疗周期延迟。其可使需要化学治疗的治疗中断或剂量减小,其可对总体存活具有有害效应。粘膜炎也作为经济问题新出现,由于其管理需要昂贵的治疗及延长的住院。

[0003] 粘膜炎的当前标准治疗主要依赖于控制减轻疼痛程度,但不致粘膜炎中涉及的病理机制。

[0004] 理解粘膜炎的复杂的病理生理学对于作出预防性和/或治疗性策略是关键。当前概念涉及5个重叠期(Sonis ST(1998)Oral Oncol 34:39-43):(1)粘膜炎在施用细胞毒性药物或放射期间起始。损伤在第1次可见和临床可定量的可能由DNA损伤和/或活性氧导致的变化发生(例如粘膜红斑)之前的天开始。(2)损伤应答通路和促-炎性级联被活化。(3)随这些信号传导通路的扩增的恶性循环,例如TNF- α 释放,NF- κ B活化,及活性氧,其被认为增强细胞死亡和由此介导粘膜损伤。(4)可见溃疡形成发展,受粘膜表面上多种微生物性菌群的存在负面地影响,增强促炎细胞因子释放(Ratner,AJ等人(2005)Proc Natl Acad Sci USA 102:3429-34)。口腔和消化道的共生或兼性病原体侵袭溃疡和可导致菌血症。(5)粘膜屏障的再生会仅在毒性刺激和促炎信号减弱,及嗜中性粒细胞计数恢复了之后发生。

[0005] 这些阶段和病理生理事件中的一些可用体外研究及在动物模型中再造。上皮细胞暴露于放射或一般用于化学治疗的化学品(例如甲氨喋呤)是模拟抗-癌治疗对局部存在的上皮细胞的效应和潜在侧损伤的适当的方法。此对应于口腔粘膜炎的早期/起始阶段(上述阶段1,2和3)。可用于此的上皮细胞包括角质化的上皮细胞系(例如,底特律532)和非-角质化的上皮细胞系(例如.H376)。类似地,上皮细胞暴露于存在于口腔小型生物群的机会性病原体模拟口腔粘膜炎的晚期阶段(阶段3和4),尤其由局部存在的微生物导致的发炎永存可在该系统中研究。存在于口腔微生物群系的典型机会性病原体包括链球菌属(*Streptococcus*)物种,特别缓症链球菌(*S.mitis*)及肺炎链球菌(*S.pneumoniae*)及也在某种程度上包括莫拉菌属(*Moraxella*)物种,包括粘膜炎莫拉菌(*M.catarrhalis*)(*The Human Microbiome Project Consortium*(2012)*Nature* 486:207-214)(*Dewhirst FE*(2010)*J.Bacteriol* 192:5002-5017)。

[0006] 此外,仓鼠,大鼠和小鼠中的各种体内模型被良好建立,常使用及也被调控机构接受。最通常使用的模型基于暴露于放射或放射和化学治疗的组合的金色叙利亚仓鼠;已在模型中描述预防性和治疗性干预(Watkins B(2010)*Oral Dis* 16:655-660)。

[0007] 在癌治疗强度和粘膜炎发展风险之间有直接关联。已在之前治疗周期中,在发展粘膜炎的患者中观察到增加的风险。应激因素诸如焦虑也增加风险。粘膜微生物区系的性质和程度和存在的微生物区系由癌治疗的可能的修饰也可增强炎性刺激。

[0008] 促-炎性信号的破坏和微生物负荷的减小已被鉴定为治疗和/或预防粘膜炎的潜在靶。在多于一个比较性,随机化的试验中测试的仅7种剂被发现具有显著效应,但观察的改善微小。含有多粘菌素,妥布霉素和两性霉素B的口腔锭剂被发现具有有利的效应(Stokman MA et al(2003)Br J Cancer 88:1012-6;Wijers OB et al(2001)Int J Radiat Oncol Biol Phys 50:343-52),尽管在粘膜炎中使用局部抗微生物剂不被常规建议(Donnelly JP et al(2003)Lancet Infect Dis 3:405-12)。目前认为,微生物可不导致粘膜炎起始,但可在随后阶段起到作用。最近,重组角质形成细胞生长因子(KFG)被显示显著地改善粘膜炎(Blijelevens N&Sonis,S(2007)Ann Oncol 18:817-26)。

[0009] 因此,对于由癌-相关的治疗方案导致的粘膜炎的有效治疗有强需求。迫切地需要预防和治疗食道粘膜炎,尤其是口腔粘膜炎的新方法。

[0010] 【发明概述】

[0011] 本发明人意外地发现,食道粘膜炎,尤其是口腔粘膜炎,可由局部施用免疫球蛋白,尤其是IgA和/或IgM有效治疗。

[0012] 因此,本发明的一方面是包含免疫球蛋白的组合物,所述免疫球蛋白用于通过在受试者中局部施用预防或治疗食道粘膜炎,尤其是口腔粘膜炎。

[0013] 优选地,免疫球蛋白包含IgA和/或IgM,更优选地,免疫球蛋白包含含有J链的IgA或含有J链的IgM或其组合。优选地,免疫球蛋白可获自血或其组分,诸如血浆或血浆级分。更优选地,本发明的组合物也包含分泌组分。优选分泌组分是重组体分泌组分。

[0014] 在本发明的优选的方面,组合物包含分泌-样IgA。组合物也可包含与另一免疫球蛋白组合的分泌-样IgA,优选组合IgM,优选分泌-样IgM。

[0015] 本发明的再一方面上述组合物,其被配制以提供与受粘膜炎影响的(或处于受影响的风险的)粘膜区的长接触时间。优选地,组合物被制成霜剂,凝胶,糖浆,胶冻剂,在受影响的粘膜附近溶解的固体形式,或其组合。另一优选的组合物是被配制成为适宜于在吞咽或吐出之前在口中保留几分钟的液体组合物。优选地,液体制剂包含调味物质,从而味道是舒适的。该物质可赋予水果诸如草莓,苹果,桃,蓝莓的味道;焦糖,巧克力的味道;也可使用香味道,诸如干酪或番茄。组合物也可包含其他适合的赋形剂,例如增强免疫球蛋白的稳定性的稳定化剂。

[0016] 本发明的仍另一方面是上述组合物,其中局部应用于粘膜减少微生物,诸如细菌或真菌的附着和/或侵入。微生物可为粘膜表面上微生物区系的部分。

[0017] 本发明的再一方面上述组合物,其中局部应用于粘膜促进粘膜创伤治愈。优选地,本发明的组合物刺激上皮细胞以分泌生长因子,例如角质形成细胞生长因子。

[0018] 本发明的仍再一方面是本发明的组合物,其中局部应用于粘膜发挥抗-炎性效应。抗-炎性效应可为:

[0019] (a) 抑制促-炎性细胞因子表达;和/或

[0020] (b) 刺激抗-炎性细胞因子的表达。

[0021] 本发明的另一方面是上述组合物,其中受试者是处于发展食道粘膜炎的风险,诸

如经历或即将经历化学治疗和/或放射治疗的癌患者。尤其是,处于发展粘膜炎的风险的受试者是作为之前化学治疗和/或放射治疗法治疗的结果而发展粘膜炎的癌患者。之前化学治疗和/或放射治疗法治疗可为在接收化学治疗和/或放射治疗之后缓解,但其中癌已再现及显示另一系列化学治疗和/或放射治疗的患者中一系列治疗周期中治疗的早先周期,或一系列治疗周期的治疗部分。优选地,当患者的嗜中性粒细胞计数开始降低时开始施用组合物。优选地,治疗在患者的嗜中性粒细胞计数在正常以下的时期维持。

[0022] 本发明的组合物被施用给受试者达6次/天,优选达5次/天,更优选达4次/天,甚至更优选达3次/天,最优选2次/天或甚至更低频度。

[0023] 在本发明的另一方面,组合物包含用于治疗粘膜炎的另外的有效剂,诸如生长因子或防腐剂。也包括在本发明中的是包含本发明的组合物和第2活性剂的产品,其作为用于在食道粘膜炎治疗中同时,分离或连续使用的组合的制备物。该第2活性剂可为,例如,促进创伤治愈的剂,诸如生长因子,抗微生物剂诸如防腐剂,例如防腐漱口水,或抗-炎性剂。

[0024] 【发明详述】

[0025] 如上所述,癌患者中的粘膜炎,尤其是口腔粘膜炎,仍被认为是主要医疗问题,及有对有效治疗的需求。本发明人现在意外地发现,食道粘膜炎,尤其是口腔粘膜炎,可由局部施用免疫球蛋白,尤其是IgA和/或IgM来有效治疗。

[0026] 因此,本发明的一方面是包含免疫球蛋白的组合物,所述免疫球蛋白通过在受试者中局部施用而用于预防或治疗食道粘膜炎,尤其是口腔粘膜炎。优选免疫球蛋白是人免疫球蛋白。

[0027] 优选地,免疫球蛋白包含IgA或IgM或其组合,更优选地,免疫球蛋白包含含有J链的IgA或含有J链的IgM或其组合。优选地,免疫球蛋白可获自血或其组分,诸如血浆,冷冻的浆的血浆或血浆级分。更优选地,免疫球蛋白纯化自在为纯化其他血浆蛋白,例如免疫球蛋白G而处理血浆期间获得的侧级分。优选免疫球蛋白不获自乳或初乳。优选地,免疫球蛋白在纯化之后未通过体外改变糖基化,例如由糖残基,例如甘露糖或唾液酸或半乳糖的酶促添加或去除来修饰。优选地,免疫球蛋白不是纯抗-TNF抗体或就抗-TNF富集的或纯化自用TNF- α 免疫的人或动物供体的免疫球蛋白。

[0028] 在本发明的另一方面,组合物也包含分泌组分。优选分泌组分是重组体分泌组分,优选在哺乳动物细胞系中产生的分泌组分。

[0029] 本文所用的术语“分泌组分”指称特异性结合于含有J-链的免疫球蛋白的蛋白,及涉及或可源于或相同于多聚体免疫球蛋白受体(pIgR),优选哺乳动物pIgR,更优选灵长类动物pIgR,最优选人pIgR的细胞外部分。优选地,分泌组分赋予含有J-链的免疫球蛋白增加的稳定性。分泌组分以其传统,狭义(在本文被称为“天然的分泌组分”)是多聚体免疫球蛋白受体(pIgR)的细胞外部分,其通常在分泌期间与包含J链的二聚体或多聚体IgA或五聚体IgM结合。含有J链的IgA/IgM在上皮细胞的基底外侧表面结合于多聚体免疫球蛋白受体及由胞吞转运被摄入细胞。此受体复合物然后在运输到上皮细胞的腔表面之前通过细胞隔室运输。胞吞转运的IgA/IgM-pIgR复合物然后通过蛋白水解释放,及多聚体免疫球蛋白受体(pIgR)的部分(被称为天然的分泌组分)保持与含有J链的IgA/IgM结合,释放分泌IgA/IgM。但是,有证据表明,IgA的反向胞吞转运(即从腔表面到基底外侧表面)也可发生。

[0030] 人pIgR被克隆及测序,其序列作为SwissProt登录号P01833可利用,及显示于SEQ

ID NO:1。人pIgR是具有764个氨基酸残基的糖蛋白,其含有信号肽(残基1~18),细胞外部分(残基19~638),跨膜区(残基639~661),及细胞质区(残基662~764)。残基19~603被认为结合于上述含有J链的IgA或含有J链的IgM,及此糖蛋白的此部分通常被称为分泌组分(“天然的分泌组分”)。

[0031] 在本发明的组合物中使用的分泌组分可包含任何能与含有J链的IgA结合的细胞外pIgR序列。例如,分泌组分可包含来自哺乳动物源,例如来自灵长类动物,牛,马,猫,狗,兔,豚鼠,大鼠或小鼠的pIgR的细胞外结构域,或其变体。也涵盖来自几种哺乳动物物种的细胞外结构域或其变体的功能杂交体以在本发明中使用,例如通过将来自不同物种的免疫球蛋白-样结构域融合进分泌组分-样蛋白而制备的。功能分泌组分也可通过融合一系列正常存在的免疫球蛋白-样结构域而形成,例如兔分泌组分是仅由结构域1,4和5组成的有功能的。但是,优选使用人分泌组分或其功能变体。

[0032] 因此在本发明的组合物中使用的分泌组分优选包含SEQ ID NO:1的残基19~603或其功能变体。功能变体可包括缺失,插入和/或取代,优选取代是保守性取代,例如碱性氨基酸残基用另一碱性氨基酸代替,疏水氨基酸用另一疏水氨基酸代替,等。变体分泌组分在序列上与SEQ ID NO:1的残基19~603具有至少50%同一性,优选与SEQ ID NO:1的残基19~603具有至少55%,60%,65%,70%,75%,80%,更优选至少85%或甚至90%,甚至更优选至少92%,94%,95%,97%,98%或甚至99%同一性。最优选,分泌组分包含SEQ ID NO:1的残基19~603或甚至由SEQ ID NO:1的残基19~603组成。

[0033] 本领域技术人员熟知如何由重组技术产生分泌组分。CHO细胞中人分泌组分的表达的一例已被Phalipon等人(Phalipon A等人(2002) *Immunity* 17:107-115)描述,但本发明不限于由此系统产生的分泌组分。例如,期望的cDNA序列可合成产生或使用从表达pIgR的细胞或组织分离的RNA作为模板经RT-PCR克隆。然后可将cDNA插入哺乳动物表达载体诸如pcDNA3-许多替代性的表达载体是可利用的及为本领域技术人员熟知。然后将重组表达载体导入适合的宿主细胞系,诸如CHO, Cos, HEK293或BHK。其他细胞系是可利用的和也可使用。将该载体导入细胞系的方法包括脂转染,电穿孔和本领域技术人员熟知的其他技术。通常然后选择及克隆带有表达载体及表达目标蛋白的细胞。也可使用病毒表达系统,例如,痘苗病毒可用于在哺乳动物细胞中以高水平表达蛋白,杆状病毒表达系统可用于在昆虫细胞中以高水平表达蛋白。也可采用酵母或细菌表达系统,及该表达系统已由本领域技术人员所知。植物表达系统也可使用及已由本领域技术人员所知。

[0034] 在本发明的组合物中使用的分泌组分或其变体也可包含标签,诸如六-组氨酸标签,其可辅助纯化得到的蛋白。如果该标签经可切割的接头附接,标签可在本发明中使用之前切割下。类似地,分泌组分可作为融合蛋白产生。再次,可使用可切割的接头,从而融合偶体可在本发明中使用之前自分泌组分切割下。

[0035] 本领域技术人员可然后用标准方法纯化表达的蛋白。

[0036] 分泌组分也可从天然的源,优选从乳,唾液或粘液得到。优选分泌组分具有人来源,但来自其他物种的分泌组分也可在本发明中使用。

[0037] 组合物之中分泌组分和J链之间的摩尔比在1:10和10:1之间,优选在1:5和5:1之间,更优选在1:2和2:1之间。

[0038] 在组合物中使用的分泌组分的量可为在组合物中1部分(以重量计)分泌组分比至

少50部分(以重量计)蛋白,优选在组合物中1部分比至少40,30,20,15,10,最优选1部分分泌组分比至少5部分蛋白。

[0039] 在本发明的优选的方面,组合物包含分泌-样IgA。组合物也可包含与另一免疫球蛋白组合的分泌-样IgA,优选组合IgM,优选分泌-样IgM。在另一优选的本发明的方面,组合物也可单独包含分泌-样IgM或组合其他免疫球蛋白。

[0040] 本发明的再一方面上述组合物,其被配制为提供与受粘膜炎影响的(或处于受影响的风险的)粘膜区的长接触时间。“接触时间”指称组合物或其部分在受影响的粘膜表面或处于风险的粘膜表面保持有活性的时间量。优选地,接触时间相比几分钟,更优选几小时,甚至更优选几天更久,最优选对于发挥预防或治疗粘膜炎的生物学效应足够长。优选,组合物制成霜剂,凝胶,糖浆,胶冻剂,在受影响的粘膜附近溶解的固体形式,或其组合。组合物也可制成片剂,以单独或组合形式包含一种或更多适合的赋形剂诸如蔗糖,乳糖,麦芽糊精,淀粉(例如来自玉米的),纤维素衍生物,例如羟乙基纤维素,甲基纤维素,或丙烯酸酯,甲基丙烯酸树脂,油(例如,橄榄油),蜂蜡或类似剂。其也可包含泡腾组分。凝胶可,例如,使用猪明胶或基于淀粉的材料,丙二醇,PEG 40,山梨酸钾,苯甲酸钠,苯扎氯铵,蔗糖,透明质酸钠,羟乙基纤维素或类似剂形成。糖浆可通过添加一种或更多糖,糖多元醇如甘油或山梨糖醇,防止糖的再结晶的酸,缓冲剂,螯合剂,调味剂和香料增强剂,着色剂来形成。胶冻剂可,例如,通过使用明胶,例如猪明胶形成。

[0041] 或者,使用液体组合物,其被配制为适宜于在吞咽或吐出之前在口中保留几分钟。优选地,液体制剂包含调味物质,从而味道是舒适的。该物质可赋予水果诸如草莓,苹果,桃,蓝莓的味道;焦糖,巧克力,坚果或类似味道;也可使用香味,诸如干酪或番茄。组合物也可包含其他适合的赋形剂,例如增强免疫球蛋白的稳定性的稳定化剂,着色剂,缓冲剂物质等。

[0042] 组合物可直接应用于口中,如果受试者处于发展口腔粘膜炎的风险,其也可以被设计为在食道的其他部分释放的制剂经口摄取。其也可经肛门递送,及可以用于此递送形式的适合的制剂供给。其可以控制其在食道的特定区释放的制剂递送。本领域技术人员能如期望配制本发明的组合物而达到与粘膜期望的接触时间。

[0043] 本发明的仍另一方面是上述组合物,其中局部应用于粘膜减少微生物,诸如细菌或真菌的附着和/或侵入。微生物可为粘膜表面上微生物区系的部分,例如口腔小型生物群或肠小型生物群。优选地,组合物包含与微生物和/或由微生物产生的毒素结合的免疫球蛋白。优选地,由微生物附着和/或侵入完整或损伤的粘膜表面降低至少25%,优选至少30%,35%,40%,45%,更优选至少50%,理想地至甚至更大程度诸如至少60%,70%,80%,90%,例如,以阻止细胞内促-炎性下游级联的活化,其在特定微生物表面组分(例如,PAMP,病原体关联的分子模式)与暴露的表面或细胞内PRR(模式识别受体,例如,Toll-样受体)结合后发生。

[0044] 本发明的再一方面上述组合物,其中局部应用于粘膜促进粘膜创伤治愈。优选地,本发明的组合物刺激上皮细胞分泌一种或更多生长因子,例如角质形成细胞生长因子(KGF),或其他创伤治愈促进因子诸如上皮生长因子(EGF),成纤维细胞生长因子(例如,bFGF),粒细胞-巨噬细胞集落-刺激因子(GM-CSF),转化生长因子(例如.TGF- α 或 β),源于血小板的生长因子(PDGF)和血管内皮生长因子(VEGF)。组合物可由此刺激上皮细胞和固有

层的成纤维细胞分泌细胞外基质组分,诸如胶原,层粘连蛋白或纤连蛋白及促进血管发生。

[0045] 优选地,刺激分泌生长因子是生物学显著的,例如生长因子的分泌被刺激达到对靶细胞的显著效应的程度。

[0046] 本发明的仍再一方面是本发明的组合物,其中局部应用于粘膜发挥抗-炎性效应。本发明的组合物的抗-炎性效应可还表征为:

[0047] (a) 抑制促-炎性细胞因子表达;和/或

[0048] (b) 刺激抗-炎性细胞因子的表达。

[0049] 优选地,粘膜中一种或更多关键促-炎性细胞因子的表达被本发明的组合物减少,更优选地,2种或更多关键促-炎性细胞因子的表达减少,甚至更优选,3种或更多促-炎性细胞因子的表达减少。优选地,促-炎性细胞因子选自IL-1,IL-6,IL-8,IL-17,IFN- γ ,TNF- α ,MCP-1,IP10。优选地,表达的减小是减小至少25%,优选至少30%,35%,40%,45%,更优选至少50%,理想地至甚至更大程度诸如至少60%,70%,80%,90%或甚至更高。

[0050] 优选地,一种或更多关键抗-炎性细胞因子的表达被本发明的组合物刺激,更优选地,2种或更多抗-炎性细胞因子的表达被刺激,甚至更优选,3种或更多抗-炎性细胞因子的表达被刺激。优选地,抗-炎性细胞因子选自IL-1Ra,IL-4,IL-10,IL-11,IL-13,TGF- β 。优选地,表达的刺激是刺激至少2倍,更优选至少5,10,20,50倍甚至更优选至少100倍,最优选高于500倍或甚至更高。

[0051] 更优选地,通过本发明的组合物提供促-炎性细胞因子的表达的减小和抗-炎性细胞因子的表达的刺激。

[0052] 本发明的另一方面是上述组合物,其中处于发展食道粘膜炎的风险的受试者是经历或即将经历化学治疗和/或放射治疗的癌患者。尤其是,处于发展粘膜炎的风险的受试者是作为之前化学治疗和/或放射治疗法治疗的结果而发展粘膜炎的癌患者。之前化学治疗和/或放射治疗法治疗可为一系列治疗周期中的早先治疗周期,或在接收化学治疗和/或放射治疗之后缓解,但其中癌已再现及另一系列的化学治疗和/或放射治疗被指示的患者中一系列治疗周期的治疗部分。

[0053] 本发明的组合物可预防性地或作为对有活性的,存在的粘膜炎的治疗而给出。优选地,治疗在粘膜炎症状发生之前起始。治疗可在开始化学治疗和/或放射治疗之前,同时或之后起始。优选地,在接收化学治疗的患者中,当患者变得中性粒细胞减少(即,绝对嗜中性粒细胞计数(ANC) $<0.5 \times 10^9/L$),从而处于发展粘膜炎的风险时开始施用组合物。优选地,贯穿中性粒细胞减少时期持续治疗,直到ANC开始恢复或达到 $0.5 \times 10^9/L$ 和粘膜炎临床上消退。常诱导粘膜炎的化学治疗剂包括,尤其是,甲氨蝶呤,蒽环类抗生素,5-氟尿嘧啶和骨髓摘除化学治疗方案。优选地,在接收局部放射治疗的患者中,在治疗的整个持续时间期间施用组合物和直到粘膜炎消退。

[0054] 本发明的组合物被施用给受试者达6次/天,优选达5次/天,更优选达4次/天,甚至更优选达3次/天,最优选2次/天或甚至更低频度。

[0055] 在本发明的另一方面,组合物包含用于治疗粘膜炎的另外的有效剂,诸如生长因子或防腐剂。也包括在本发明中的是产物,其包含本发明的组合物和第2活性剂作为组合的制备物,所述第2活性剂用于在治疗食道粘膜炎中同时,分离或连续使用。该第2活性剂可为,例如,促进创伤治愈的剂,诸如生长因子,抗微生物剂诸如防腐剂,例如防腐漱口水,或

抗-炎性剂。

[0056] 本发明会在以下非限制性例中,参照以下图例证:

【附图说明】

[0057] 图1.用0.5 μ g/ml的蛋白/mm凝胶槽免疫印迹分析(10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳),随后蛋白印迹转移和使用mAb17C7(特异于三聚体和单体UspA1和UspA2)[小图A],mAb24B5(特异于单体UspA1)[小图B],及mAb10F3(特异于CopB)[小图C]检测OMP。缀合了HRP的第二山羊抗-小鼠IgG抗体用于第一抗体检测。

[0058] 图2.用0.4 μ g/ml的蛋白/mm凝胶槽免疫印迹分析(10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳),随后蛋白印迹转移和作为第一抗体源使用人合并的唾液(0.3g/l)[小图A],血浆IgA F4[小图B]或合并的血浆IgG(**Privigen®**)[小图C],及用于使用化学发光可视化的适当的缀合了HRP的第二抗体来检测抗体结合。

[0059] 图3.使用IgA F4的附着抑制测定。将MEM和MEM-PBS用作阴性对照。将补充5mg/ml的IgA F4的O35E.1和O35.1用作阳性对照。总体p值(单因素ANOVA)是 <0.0001 ; *指示显著性水平 <0.05 。

[0060] 图4.使用IgA F5A的附着抑制测定。将MEM和MEM-PBS用作阴性对照。将补充5mg/ml的IgA F5A的O35E.1和O35.1用作阳性对照。总体p值(单因素ANOVA)是 <0.001 ; *指示显著性水平 <0.05 。

[0061] 图5.使用IgG(**Privigen®**)的附着抑制测定。将MEM, MEM-脯氨酸和MEM-PBS用作阴性对照。将补充10mg/ml的IgG的O35E.1和O35.1用作阳性对照。总体p值(单因素ANOVA)是0.009;柱间差异未达到统计学意义。

[0062] 图6.使用IgM F5A的附着抑制测定。将MEM和MEM-PBS用作阴性对照。将补充5mg/ml的IgM F5A的O35E.1和O35.1用作阳性对照。总体p值(单因素ANOVA)是 <0.001 ; *指示显著性水平 <0.05 。

[0063] 图7.展示10mg/ml浓度的IgA F4显著地抑制细菌穿透上皮细胞的粘膜莫拉菌(*M. catarrhalis*)侵入测定。总体p值(单因素ANOVA)是0.014; *指示显著性水平 <0.05 。无法利用显示细胞侵入的完全抑制的可靠的对照。

[0064] 图8.展示10mg/ml浓度的合并的人血浆IgG(**Privigen®**)显著地抑制细菌穿透上皮细胞的粘膜莫拉菌(*M. catarrhalis*)侵入测定。总体p值(单因素ANOVA)是0.015; *指示显著性水平 <0.05 。无法利用显示细胞侵入的完全抑制的可靠的对照。

[0065] 图9.展示5和2.5mg/ml浓度的IgM F5A显著地抑制细菌穿透上皮细胞的粘膜莫拉菌(*M. catarrhalis*)侵入测定。总体p值(单因素ANOVA)是 <0.0001 ; *指示显著性水平 <0.05 。无法利用显示细胞侵入的完全抑制的可靠的对照。

[0066] 图10.通过使用用粘膜莫拉菌(*M. catarrhalis*)外膜蛋白(OMP)刺激的底特律562细胞评定IgA F4的抗-炎性活性。在OMP刺激时,将增加的浓度的IgA应用于细胞。在刺激起始时($t=0$)和24h后($t=24$),使用多重悬浮液阵列(Luminex technology)测量由底特律562细胞分泌MCP-1(A), IL-8(B)和IL-6(C)。阴性对照是未添加OMP的样品。

[0067] 图11.通过使用H376和HGF-1细胞评定IgA F4的抗-炎性活性。增加浓度的IgA应用

于静止H376和HGF-1细胞或在刺激时应用(HGF-1细胞)。在刺激之后24h,使用多重悬浮液阵列(Luminex technology)测量由H376分泌IP-10(A)和G-CSF(B)和由HGF-1(C)细胞分泌IP-10。

[0068] 图12.使用IgA F4的附着抑制测定。IgA F4干扰肺炎链球菌(*S. pneumoniae*) R6(A)和缓症链球菌(*S. mitis*) (B)向H376细胞的附着能力。

[0069] 图13.使用IgA F4的细胞毒性测定。对H376细胞的 γ -辐射-诱导的细胞死亡的IgA F4的剂量效应减小。(A)如在时间线上描绘实施实验。(B)在辐射之后24h,通过使用CytoTox-Glo™细胞毒性测定(Promega)测量细胞死亡。数对应于在用毛地黄皂苷处理的H376细胞样品中测量的与总细胞毒性相关的比细胞死亡。

[0070] 图14.使用IgA F4的创伤治愈测定。(A)如在时间线中描绘实施实验。(B,C,D)通过以不同时间间隔捕获划痕的像记录单层细胞中人工间隔的闭合,和测量间隔尺寸。100%创伤表皮细胞再生对应于人工间隔的全恢复。

[0071] 图15.上皮细胞系上IgA受体的分析。对H376和底特律细胞实施CD71和CD89(或关联同种型对照)的染色及通过使用流式细胞仪分析。

[0072] 图16.由ELISA评定IgA F4和IgG制备物中的抗-TNF活性。将来自ELISA板的孔用TNF α (1 μ g/ml)包被和进一步阻断。将递增浓度的IgA F4,IgG和抗-TNF α 抗体(单克隆,英利昔单抗)应用于孔。在一些孔中,加入游离的TNF α 以抑制测试的抗体的特异性结合(竞争测定;条)。在洗涤之后,结合TNF α 的免疫球蛋白用HRP-标记的特定第二抗体揭示。

【实施例】

[0073] 实施例中包括的研究显示,免疫球蛋白可具有组合的抗微生物和抗-炎性/促-创伤治愈效应,及因此是有效预防和治疗食道粘膜炎,尤其是口腔粘膜炎的有吸引力的选项。

[0074] 为了模拟口咽腔的粘膜上皮细胞层,使用上皮细胞系。用于该研究的适合的细胞系的一例是人咽细胞系底特律562(ATCC CCL 138)。使用的其他适合的细胞系是H376,源于口底的鳞状癌细胞系,及HGF-1,牙龈成纤维细胞细胞系。作为粘膜微生物区系的部分的微生物的一例,我们使用了粘膜炎莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*),其是典型鼻-及口咽病原体,以及口腔小型生物群中发现的其他细菌,诸如链球菌属(*Streptococcus*)物种。此模型实验系统被认为对于初步体外实验适合,因为该细胞系的来源对应于经口施用的免疫球蛋白的旨在的(优选的)作用位点。此外,底特律细胞已之前显示在暴露于细菌(活的或灭活的全细菌或细菌表面组分)后呈现促炎活化。选择粘膜炎莫拉菌(*M. catarrhalis*),其是兼性病原体,其唯一的天然的栖息地是人咽,,因为其体外粘附于及穿透底特律细胞的能力,及因为其诱导促炎介质诸如IL-6,IL-8,TNF α ,MCP-1和GM-CSF分泌。此外,粘膜炎莫拉菌(*M. catarrhalis*)的特定外膜蛋白(例如,UspA1和UspA2)均通过与CEACAM1和TLR2结合来介导附着和侵入及引发促炎级联。这些外膜蛋白的等基因敲除突变体是可利用的。粘膜炎莫拉菌(*M. catarrhalis*)的UspA1和UspA2是被人免疫系统识别的知道的免疫原及在健康个体中诱导特定血浆和唾液IgA和IgM。此外,将链球菌属(*Streptococcus*)物种,尤其是缓症链球菌(*S. mitis*)及肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)用作存在于口腔中的典型机会性病原体。由此,此体外模型适合于评定人免疫球蛋白制备物对细菌附着和侵入及对发炎的细菌诱导的效应。

[0075] 【实施例1:源于血浆和源于唾液的免疫球蛋白制备物包含识别粘膜炎莫拉菌 (*M. catarrhalis*)的抗体】

[0076] 为了测试是否我们的免疫球蛋白制备物可具有抗-微生物效应,我们首先要建立是否它们含有识别在口-咽道的粘膜表面上发现的潜在病原体的抗体。作为该微生物的一例,我们使用了粘膜炎莫拉菌 (*M. catarrhalis*)。

[0077] 1.1.细菌株和人细胞系。粘膜炎莫拉菌 (*M. catarrhalis*) 株25238购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC)。实验室株035E是自患中耳炎的儿童的中耳分离物。在脑-心脏输注 (BHI) 琼脂板 (Difco, 底特律, MI) 上,于37℃,在5%CO₂气氛中或于37℃和200旋转/分钟 (rpm),在BHI肉汤中培养细菌。在一些实验中,通过将活细菌重悬浮于PBS和于60℃温育60min来将细菌热-灭活。在补充10%的热灭活的胎牛血清 (FCS), 2mM的L-谷氨酰胺, 1mM丙酮酸钠 (Sigma, St. louis, MO), 1×非必要氨基酸 (Sigma), 100U/ml青霉素, 及100μg/ml链霉素的Eagle氏最小必要培养基 (MEM; Invitrogen, Basel, Switzerland) 中,于37℃,在5%CO₂中维持人咽细胞系底特律562 (ATCC CCL 138)。

[0078] 【1.2.试剂】合并的人免疫球蛋白同种型 (IgA (“IgA F4” [50mg/ml], “IgA F5A” [50mg/ml]) IgG (**Privigen**® [100mg/ml] 和 IgM (“IgM F5A” [10mg/ml]), 分别) 获自 CSL Behring, Bern, Switzerland。IgG制备物是可商购的人静脉内 IgG (IVIg) 制备物 (**Privigen**®)。纯化的人血浆 IgA 和 IgM 级分是实验产物。由 MPHQ 柱的连续洗脱和由亲和层析的随后分离从血浆产生 IgA。自 CSL Behring AG (Berne, Switzerland) 的 IVIg 制备过程的 AIEX 层析步骤, 在用 pH6.5 的 10mM 磷酸盐/30mM 乙酸盐进行 Macro-Prep High Q (Bio-Rad, Hercules, CA) 柱的后洗涤之后, 通过用 pH7.6 的 55mM 酒石酸盐/5mM 乙酸盐洗脱获得级分 F4。将级分 F5 随后用 pH5.0 的 50mM 磷酸盐/25mM 柠檬酸盐洗脱。使 F4 和 F5 在 PBS 中由超滤/渗滤达到大致 1mg/mL, 然后由亲和层析, 使用 IgSelect 树脂 (GE Healthcare, Glattbrugg, Switzerland) 耗尽 IgG。在 F4 负荷的 IgSelect 层析的流通物中直接收获 IgA F4。为了获得 IgA F5, 由亲和层析, 使用 CaptureSelect 人 IgM 树脂 (Bioaffinity Company BAC) 使 F5 负荷的 IgSelect 流通物耗尽 IgM。此 CaptureSelect 人 IgM 树脂的洗脱产生这里使用的 IgM F5 级分。使 IgA F4, IgA F5 和 IgM F5 由超/渗滤达到终浓度。

[0079] 【1.3.免疫印迹分析】由 EDTA-缓冲剂方法 (Murphy TF&Loeb MR (1989) Microb Pathog 6:159-74) 制备株 25238 和 035E 的外膜蛋白 (OMP) 制备物, 及分别以图 1 和 2 中 0.5 和 0.4μg/mm 的凝胶槽的蛋白浓度由 SDS-PAGE (10% 聚丙烯酰胺) 解析。随后将凝胶电转移至 PVDF 膜 (**Immobilon-P**®, Millipore 公司, Bedford, MA)。通过使用单克隆抗体 (17C7 (Aebi C 等人 (1997) Infect Immun 65:4367-77), 24B5 (Cope LD 等人 (1999) J Bacteriol 181:4026-34), 10F3 (Aebi C 等人 (1998) Infect Immun 66:3113-9) [0.5% 的 mAb 上清液, 不知道绝对浓度]) 和唾液或上述的合并的人 IgA 或 IgG (0.4μg/ml) 作为第一抗体和 1:4000-稀释的用辣根过氧化物酶 (Sigma Corp., St. louis, MO) 标记的山羊-抗-人 IgA 或 IgG 作为第二抗体实施免疫印迹分析。将 SuperSignal West Pico 化学发光底物 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) 用于抗体结合的检测。

[0080] 图 1 展示, 类似于株 035E (Helminen ME 等人 (1993) Infect Immun 61:2003-10; Helminen ME 等人 (1994) J Infect Dis 170:867-72; Cope LD 等人 (1999) J Bacteriol

181:4026-34),株ATCC 25238的OMP与针对主要OMP UpA1 (mAb 17C7和mAb24B5),UspA2 (mAb17C7)和CopB (mAb10F3)的3种单克隆抗体强烈反应,从所述株产生这些mAbs,且其是粘膜炎莫拉菌 (*M.catarrhalis*)的主要和更临床关联种系发生系1的标准代表 (Meier PS等人 (2005) *Vaccine* 23:2000-8)。

[0081] 我们随后使用标准免疫印迹测定 (Stutzman等人 (2003) *Infect Immun* 71:6793-8) 确认,人血浆和唾液含有与来自株ATCC 25238和035E的粘膜炎莫拉菌 (*M.catarrhalis*) OMP反应的抗体。图2展示,人唾液和OMP含有被人IgA (唾液,OMP) 和/或IgG识别的多种抗原。

[0082] 重要的是首先确定,株ATCC 25238在表达上皮细胞粘附素 (mAbs 17C7和25B4) 中与标准035E种系发生组1株 (其在世界上用作粘膜炎莫拉菌 (*M.catarrhalis*) 的参照小儿中耳分离物) 类似地发挥作用 (Bootsma HJ等人 (2000) *J Infect Dis* 181:1376-87),及用于可利用的单克隆抗体的产生。图1显示这是事实。此外,如显示于图2,血浆来源的IgA和IgG识别相同的ATCC 25238外膜表位,其还确证此株在我们的实验系列中的有用性。这里已注意到,UspA1主要粘附素 (与mAbs 17C7和24B5具有反应性) 含有与人纤连蛋白反应及与CEACAM 1反应的结构域 (Brooks MJ等人 (2008) *Infect Immun* 76:5322-9) 和应由此能结合广泛的人上皮细胞系。免疫印迹中不同条带的产生支持抗体通过使用它们的特异性抗原-结合 (Fab) 结构域结合外膜囊泡的观点。

[0083] 【实施例2:细菌粘接于上皮细胞的抑制】

[0084] 为了进一步证实我们的免疫球蛋白制备物的抗-微生物效应,测试是否免疫球蛋白制备物在抑制粘膜炎莫拉菌 (*M.catarrhalis*) 粘接于咽上皮细胞系底特律562中有效。

[0085] 如之前描述,用以下修改,体外测量粘膜炎莫拉菌 (*M.catarrhalis*) 粘附于人上皮细胞的能力 (Aebi C等人 (1998) *Infect Immun* 66:3113-9)。将底特律562细胞 ($\sim 3 \times 10^5$ 细胞/孔) 在24孔组织培养板中,在补充0.1%FCS但无抗生素的MEM中生长过夜至铺满单层,之后在MEM中洗涤3次。使细菌生长过夜及调整至适当的感染复数 (MOI)。将活细菌加入孔中的无FCS、补充适当的浓度的免疫球蛋白 (如以上段落1.2描述制备的) 或对照 (例如对于IgG测定是脯氨酸),但无抗生素的MEM中,以1,500rpm离心5min,及随后于37°C温育30分钟。然后将孔在MEM中洗涤5次,经胰蛋白酶处理,及将悬浮液定量培养,以测定附着的细菌数。将株035E.1 (即,由等位基因取代产生的等基因uspA1粘附素敲除突变体 (Aebi C等人 (1998) *Infect Immun* 66:3113-9)) 用作阳性 (即,附着抑制) 对照。数据表示为粘附于上皮细胞的原接种物的细菌的比例。各测定以一式三份进行和实施至少3次实验,导致每研究的条件至少9个数据点。由锥虫蓝排除及商业LDH测定 (BioChain Institute, Inc., Hayward, CA) 在形态学上查明细胞活力。

[0086] IgA F4 (图3) 和IgA F5 (图4) 均以5mg/ml的浓度显著地抑制附着。阳性对照035.1和补充5mg/ml的IgA的035.1的附着显著地更低。由合并的人血浆IgG的附着的抑制是总体上显著的,但柱间差异未达到的统计学意义,尽管图5提示IgG浓度-依赖性抑制性效应。IgM F5A级分,另一方面,如显示于图6展示强附着-抑制效应。

[0087] 5mg/ml的浓度的IgA F4和IgA F5被发现显著地抑制向底特律细胞附着 (见图3和图4)。似乎有剂量-效应曲线。阳性对照株035.1 (缺少主要粘附素UspA1表达的等基因突变体) 的附着也显著地更低 (未示出显著性)。这些发现指示,血浆IgA大致在生理学唾液浓度一个 \log_{10} 以上的浓度能抑制粘膜炎莫拉菌 (*M.catarrhalis*) 与咽上皮细胞体外结合。这些

数据支持其作为中和“粘膜”抗体阻止细菌表面组分(例如,OMP,LOS)的促-炎性效应的潜力。对纯化的血浆IgM F5A记载了类似发现(图6)。对血浆IgG(**Privigen®**)也观察到类似趋势(图5),尽管未获得统计学意义。值得一说的是,结合的IgG(以及IgM)强烈活化人补体及细菌结合随后杀灭或调理素作用可在防止粘膜炎中是不期望的。但是,未知补体是否及以何程度在人腔中活动。

[0088] **【实施例3:上皮细胞的细菌侵入被免疫球蛋白抑制】**

[0089] 如之前显示(Spaniol V等人(2008) *Microbes Infect* 10:3~11),粘膜炎莫拉菌(*M. catarrhalis*)能在儿童和年轻成年中穿透上皮细胞和甚至体内定位进粘膜下咽软组织(Heiniger N等人(2007) *J Infect Dis* 196:1080-7)。由此,我们研究了人免疫球蛋白体外抑制咽上皮细胞穿透的潜力,以进一步展示免疫球蛋白制备物的潜在益处。

[0090] 如之前描述,加以下修饰,通过使用庆大霉素保护测定估计细菌侵入(Spaniol V et al(2008) *Microbes Infect* 10:3-11)。在无抗生素的培养基中制备细胞。在洗涤之后,以30的MOI添加细菌以及指示的浓度的如以上段落1.2描述制备的各免疫球蛋白,以1,500rpm离心5min及于37°C,在5%CO₂中温育3h。为了测定细胞内细菌数,将感染的单层在PBS中洗涤3次,及于37°C用硫酸庆大霉素(200µg/ml)处理2h。在洗涤之后,细胞通过用0.25%胰蛋白酶-EDTA处理而自塑料表面分开,通过添加1%皂苷裂解,及在PBS中连续稀释,用于定量细菌培养。通过在庆大霉素暴露之后恢复的cfu数除以接种的cfu数来计算侵入比。

[0091] 图7展示,相比0.1mg/ml,10mg/ml浓度的IgA F4显著地抑制底特律562咽细胞的穿透。10mg/ml与阴性对照(MEM-PBS)的比较未达到显著性。类似地,相比MEM-PBS阴性对照,10mg/ml的人合并的血浆IgG(**Privigen®**)显著地抑制侵入。血浆IgM F5也是如此,其相比MEM-PBS对照和0.1mg/ml的最低IgG浓度,以5mg/ml展示显著的侵入抑制。作为图7~9中的分散量度,我们使用了平均值(SEM)的标准误差。我们也被迫克制不表示“阳性”对照在底特律细胞穿透中完全失效,因为得不到那样的细菌。

[0092] 越来越多的典型的细胞外病原体最近已被发现能穿透粘膜上皮细胞层或穿过粘膜上皮细胞层胞吞转运,例如,非可分型的流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*) (Eldika,N&Sethi S(2006) *Curr Opin Pulm Med* 12:118-24),金黄色葡萄球菌属(*Staphylococcus aureus*) (Que YA等人(2005) *J Exp Med* 201:1627-35)等。细胞内存留可为避免粘膜免疫及接近宿主的上皮下及-最终-血管空间的手段。此可在患者中与发热中性粒细胞减少症和粘膜炎具有特定关联。我们使用建立的庆大霉素保护测定测量了上皮穿透的免疫球蛋白-介导的抑制,并发现,全部3种同种型能抑制底特律细胞的穿透。在IgA F4(图7)和IgM F5A(图9)的情况中,分别以10mg/ml和5mg/ml观察到显著抑制。再次,血浆IgG(图8)也发现类似趋势,尽管不统计学地显著。

[0093] **【实施例4:上皮细胞因子/趋化因子释放由免疫球蛋白的调节】**

[0094] 为了显示免疫球蛋白的抗-炎性效应的潜力,研究是否免疫球蛋白制备物对由上皮细胞的细胞因子/趋化因子释放具有效应。

[0095] 制备底特律单层细胞及在增加的浓度的IgA F4的存在下,用不同浓度的粘膜炎莫拉菌(*M. catarrhalis*) OMP(关于OMP制备,见实施例1.3)刺激。阴性对照由含或不含OMP的培

培养基组成。在刺激之后0和24小时时间收集个体上清液,然后保持于-80℃直到分析。在本实验中,在检测之前,将样品温育16小时过夜。作为基质溶液,我们使用了含0.1%FCS的RPMI-1640细胞培养基(Sigma,R8758)。在制备样品之后,用Bioplex 200分析仪(BioRad)获取数据。使底特律细胞的制备物暴露于各种浓度的免疫球蛋白,和在Bern大学的感染性疾病学会实施OMP。在CSL Behring,Bern进行细胞因子/趋化因子的测定。

[0096] 在0时间,底特律细胞接收补充或未补充OMP的新鲜培养基和不同浓度的IgA F4。由于此原因,及如显示于图10A,B,C,在此时间,在上清液中几乎检测不到细胞因子。在24h,无任何OMP,底特律562细胞分泌可检测的水平水平的MCP-1,IL-8和IL-6(图10A,B,C)。MCP-1是调控单核细胞/巨噬细胞募集的关键趋化因子。其涉及许多疾病(Deshmane SL等人(2009) *J. Int. & Cyt. Res.* 29, 6, 313~326)。IL-8(或嗜中性粒细胞趋化因子)是向组织募集嗜中性粒细胞的趋化因子。其也与口腔前庭中的发炎关联(Ertugrul AS等人(2013) *J Periodont Res*; 48:44~51)。最后,还有,IL-6是发炎的重要介质,及已显示在照射的成纤维细胞中被诱导(Brach MA等人(1993) *J. Biol. Chem.* 268:8466-8472; Rincon M(2012) *Trends Immunol.* 33(11) 571-577)。重要的是,培养基中添加OMP分别增加MCP-1,IL-8和IL-6产生约10,3及7倍。而且,尽管低量的IgA F4对OMP-诱导的趋化因子/细胞因子产生几乎无效应,10mg/ml IgA醒目地减少MCP-1,及在较少程度上,IL-8和IL-6分泌。

[0097] 为了支持这些结果,我们旨在测试对另外的细胞系的IgA F4活性。口腔组织代表在口腔粘膜炎症过程期间损伤的组织之一。我们发现了新细胞系,H376(人口腔鳞状细胞癌;HPACC 06092005),其来源于口底。除了H376之外,我们选择研究牙龈成纤维细胞(HGF-1细胞系; **ATCC**®CRL-2014™),由于它们位于颊上皮细胞下,和会在口腔粘膜炎症过程中感觉发炎。

[0098] 在以下实验中,我们分析了H376和HGF-1细胞的细胞因子特征。

[0099] 在2种浓度的IgA F4(在MEM中制备的5和10mg/ml)存在下制备单层细胞。阴性对照由培养基单独(纯MEM细胞培养基,Life technologies,51200-046)组成。在24小时收集个体上清液。将HGF-1细胞用已知刺激成纤维细胞的促-炎性细胞因子(例如重组IL-1 β 和TNF α ,均在50ng/ml;分别获自Milteni(130-093-893)和Peprotech(300-01A))刺激。在刺激之后,然后使上清液保持于-80℃直到分析。作为基质溶液,我们使用了MEM。在制备样品之后,用Bioplex200分析仪(BioRad)获取数据。

[0100] H376细胞分泌IP-10,其是与发炎关联的IFN- γ -诱导的蛋白(Liu M等人(2011) *Cytokine growth Factor Rev.* 22(3), 121-130)和分泌G-CSF,其代表能在炎性位点募集嗜中性粒细胞的炎性介质(Suzuki S(2002) *Blood* 99:1863-1865)(图11A,B)。在图11A和B中,我们显示,用IgA 5mg/ml治疗H376细胞强烈减少IP-10和G-CSF产生约50%。增加IgA浓度至10mg/ml未进一步减少G-CSF产生,但相比5mg/ml的IgA稍微更佳地减少IP-10产生(图11A,B)。H376细胞是肿瘤细胞和可具有活化的表型。我们不可排除,IP-10和G-CSF水平无法如在原代颊上皮细胞中那么高。

[0101] HGF-1是牙龈成纤维细胞。它们未以稳定状态产生任何IP-10(图11C)。但是,当将炎性分子诸如IL-1 β 和TNF α 应用于它们的培养基(纯MEM)时,有清楚的IP-10产生的诱导。以相当的浓度,相比IL-1 β ,TNF α 在IP-10诱导中更有力。在两个条件下,在刺激时添加IgA强烈减少IP-10产生,最高IgA F4浓度显示最强减小。然而,5mg/ml的IgA F4显示非常近似的

免疫抑制效应(图11c)。

[0102] 总之,我们的数据首次显示,IgA F4对不是骨髓样细胞的细胞(例如上皮细胞)发挥免疫抑制效应。这是非常有价值的信息,由于在口腔粘膜炎症过程期间,会由上皮细胞和成纤维细胞响应电离辐射和/或细菌定居而上调促-炎性趋化因子和细胞因子。这些结果指示,在口腔粘膜炎症过程期间,IgA可潜在地将其免疫抑制效应靶向广范围的细胞子集(例如嗜中性粒细胞,巨噬细胞,上皮细胞,等)。

[0103] **【实施例5:由免疫球蛋白抑制由除粘膜莫拉菌(*M.catarrhalis*)之外的细菌诱导的附着,侵入和上皮细胞因子/趋化因子释放的调节】**

[0104] 在类似实验中,如描述于实施例1~4,研究了其他微生物诸如除粘膜莫拉菌(*M.catarrhalis*)之外的细菌,或真菌。它们包括但不限于病原性和机会性病原性物种,如大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),草绿色链球菌(*Streptococcus viridans*)组,肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*),粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)/屎肠球菌(*Enterococcus faecium*),肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*),产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*),流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*),嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*),酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*),缓症链球菌(*Streptococcus mitis*),白色假丝酵母(*Candida albicans*)和许多厌氧细菌物种。获得了如在实施例1~4中描述的类似结果:IgA制备物含有针对上述的细菌或真菌的特异性抗体;上皮细胞的附着和侵入被抑制;炎性细胞因子应答被抑制。用其他上皮细胞系(胃肠道和结肠的粘膜衬的代表)获得类似结果。

[0105] **【实施例6:动物模型中粘膜炎的防止】**

[0106] 在口腔粘膜炎的动物模型中测试适当配制的免疫球蛋白制备物。在自Ryu等人适应的CD89-转基因小鼠模型中预防性地应用免疫球蛋白及随后由同时化学-及放射治疗(CCRT)诱导粘膜炎(*J.radiat.Res.*, 51, 595~601, 2010)。我们测量了免疫球蛋白治疗对口腔粘膜炎的程度和严重性,而且对与创伤-治愈和从CCRT得到的组织损伤的消退关联的因素的效应。口腔粘膜炎严重性的实际指标是体重减轻,舌及颊粘膜萎缩(上皮厚度)。此外,通过测量上皮层厚度,粘膜中基底细胞数,增殖标志物KI-67,mRNA转录物的组织定量(由组织样品的原位杂交和RT-PCR)和生长因子如KGF,上皮生长因子,纤维细胞生长因子,血管内皮生长因子A等的蛋白表达来评定治疗效果。该分析会产生关于作为免疫排除的结果和潜在地也由于IgA与表达CD89的细胞的直接相互作用的细胞内促炎级联下调的信息。相比非-处理的动物,用IgA处理的小鼠失更少体重和它们的舌和颊粘膜被欠严重影响。用分泌-样IgA处理的小鼠甚至被更佳地保护。

[0107] 或者,使用口腔粘膜炎的仓鼠模型,类似于描述于Watkins等人(*Oral Dis* 2010, 16:655-660)。给叙利亚金色仓鼠每天3次预防性地施用(例如起始于第-3天)适当配制的IgA制备物(或对照是媒质溶液)经研究的整个持续时间达第28天。在急性放射-诱导的粘膜炎模型中,在第0天照射(40Gy)一个外翻的颊囊,另一颊囊保持未处理用于对照。或者,在分次的放射-诱导的粘膜炎模型中,应用60Gy的累积剂量,分为7.5Gy的8个部分,如描述于(Watkins,*Oral Dis* 2010, 16:655-660)。在组合顺铂和急性放射-诱导的粘膜炎的又一模型中,通过第0天组合顺铂(5mg/kg)和35Gy放射来诱导疾病。从第6天起始直到研究结

束(一般在第28天)每天进行口腔粘膜炎的临床评估及体重监测。评分系统描述于(Watkins Oral Dis, 2010 16:655-660)。此外,收集组织和血浆样品及贯穿组织分析的研究,测定血浆中的炎性标志物及为各种组织的基因表达研究而适当加工。未处理的/媒质处理的动物发展口腔粘膜炎,疾病峰约第16~18天,自发治愈,通过粘膜炎消退证明,约第18~20天起始。用IgA治疗的动物相比对照动物具有显著地更低粘膜炎分值及体重减轻更少,并行欠严重的组织发现及减少的炎性标志物(包括但不限于炎性细胞因子和趋化因子)水平。由基因-表达分析技术在mRNA表达水平确认了发炎减小和促进创伤-治愈。用分泌-样IgA治疗甚至更有效。

[0108] 【实施例7:机会性病原体附着于颊上皮细胞的抑制】

[0109] 为了确证及进一步加强我们的在实施例2中提供的我们的免疫球蛋白制备物的抗-微生物效应的数据,我们测试了IgA干扰细菌附着于H376上皮细胞的能力。

[0110] 颊微生物区系由对于硬壁菌门(Firmicutes)优势的广泛的细菌株组成(The Human Microbiome Project Consortium(2012) Nature 486:207-214)(Dewhirst FE(2010) J. Bacteriol 192:5002-5017)。重要的是,非-包裹的肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)及缓症链球菌(*Streptococcus mitis*) (均来自硬壁菌门(Firmicutes))是遗传上非常接近的。缓症链球菌(*S. mitis*)已知代表主要口腔机会性病原体 and 当上皮屏障破裂(如可一般在患口腔粘膜炎的患者中发生)时,可潜在地导致感染。非-包裹的肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)良好粘附于上皮和可导致粘膜感染包括结膜炎,但不是侵袭性疾病。由此,在此工程的情景中,肺炎链球菌(*S. pneumoniae*) R6和缓症链球菌(*S. mitis*) 是对于研究细菌和口腔粘膜上皮之间的相互作用有用的模型生物。

[0111] 体外测量细菌分离物粘附于人上皮细胞的能力,如之前在实施例2中描述及在文献(Aebi C等人(1998) Infect Immun 66:3113-9)描述,具有以下修饰。使H376细胞($\sim 3 \times 10^5$ 细胞每孔)在24孔组织培养板中,在补充0.1%FCS,但无抗生素的MEM中生长过夜至铺满单层,之后在MEM中洗涤3次。使细菌生长过夜及调整至适当的感染复数(MOI)。将活细菌加入孔中的无FCS、补充适当的浓度的免疫球蛋白(如以上段落1.2描述制备的)或对照(例如对于IgG测定是脯氨酸),但无抗生素的MEM中,以1,500rpm离心5min,及随后于37°C温育30分钟。然后将孔在MEM中洗涤5次,经胰蛋白酶处理,及将悬浮液定量培养,以测定附着的细菌数。数据表示为粘附于上皮细胞的原接种物的细菌的比例。各测定以一式三份进行和实施至少3次实验,导致每研究的条件至少9个数据点。由锥虫蓝排除及商业LDH测定(BioChain Institute, Inc., Hayward, CA)在形态学上查明细胞活力。

[0112] 如显示于图12A,肺炎链球菌(*S. pneumoniae*) R6非常良好地粘附于来源于口底的H376细胞。在洗涤之后,多于60%的细菌仍附着于细胞。重要的是,添加2mg/ml的IgA F4足以醒目地阻断上皮细胞上肺炎链球菌(*S. pneumoniae*) R6的附着。大致75%的细菌可被预防粘附于细胞。增加的IgA剂量显示,细菌附着的稍微更多抑制。在图12B中,测试了H376上缓症链球菌(*S. mitis*)的附着。我们发现,缓症链球菌(*S. mitis*)以相比肺炎链球菌(*S. pneumoniae*) R6更少程度结合于上皮细胞。但是,IgAF4以5mg/ml的最大效应明显抑制缓症链球菌(*S. mitis*)附着。由此,在显示口腔粘膜炎症状的患者的口腔前庭中施用IgA F4可保护颊上皮免于条件致病菌病原体定居。

[0113] 【实施例8: IgA保护上皮细胞免于 γ -离子化照射诱导的细胞毒性】

[0114] 用于治疗带有肿瘤的患者放射治疗靶向增殖细胞(例如肿瘤细胞)。通过产生DNA断裂和活性氧, γ -电离辐射通常诱导肿瘤细胞死亡。尽管相信, 颊上皮细胞更耐受放射, 因为它们的低周转, 重复的放射仍可对这些细胞诱导细胞毒性。为了研究是否在电离辐射之后, IgA对细胞存活具有影响, 我们照射了H376及在24h之后测量了细胞毒性。

[0115] 如描绘于图13A, 将H376以 3×10^4 细胞/孔(96孔板)接种于MEM(80 μ l)中, 及于37 $^{\circ}$ C保持2小时。然后将IgA F4(5或10mg/ml)和/或MEM加入孔, 以达到100 μ l的最终体积(一式三份)。一天后, 将细胞用4Gy照射, 及返回37 $^{\circ}$ C。在辐射之后24h, 通过使用CytoTox-GloTM细胞毒性测定试剂盒(Promega, G9291)评定细胞毒性。此试剂盒测量在细胞死亡过程期间释放的细胞内蛋白酶的量。

[0116] 如显示于图13B, 多于30%的H376在接收电离辐射之后死亡。H376细胞用IgA F4的预防性治疗以剂量依赖性方式减少此细胞毒性。10mg/ml的IgA在24h抑制细胞死亡几乎50%, 和5mg/ml的IgA抑制几乎30%。因此, 向上皮细胞添加IgA提供存活优势, 和可减少重复的放射对患者上皮的效应。

[0117] **【实施例9: 对创伤表皮细胞再生的有益效应】**

[0118] 尽管在口腔粘膜炎症期间控制细菌定居和炎症信号具有关联, 逐渐明白口腔粘膜炎症症状的减小需要在颊上皮溃疡形成之后快速伤口闭合。KGF在创伤表皮细胞再生中起到重要作用。此是为何KGF是目前用于治疗口腔粘膜炎症的少数的被许可的药物之一的的原因之一。为了进一步描绘在口腔粘膜炎症期间IgA的潜在作用, 我们在受伤的上皮上测试IgA。为了再现放射对细胞上皮的潜在体外损伤效应, 我们在划痕测定中使用它们之前照射了单层细胞。

[0119] 用来测试创伤治愈的主要测定是常见的划痕测定。其由划单层细胞及经时捕获图像以便测量人工创伤的闭合组成。如显示于图14A, 我们在MEM(500 μ l最终体积)中接种 $\sim 3 \times 10^5$ H376细胞/孔(24孔板), 和将板于37 $^{\circ}$ C保持2h。然后将免疫球蛋白(例如IgA或IgG或培养基对照)加入孔, 和将板于37 $^{\circ}$ C再放置22小时。在此步骤, 将板以2Gy, 4Gy照射, 或保持未处理, 及返回到37 $^{\circ}$ C。24h后, 用P1000端, 通过各孔的单层细胞制造划痕。为了防止划的细胞落入人工间隔, 移出培养基, 将单层细胞用MEM洗涤一次, 然后将补充或未补充免疫球蛋白的MEM加入孔。在不同时间点, 使用显微镜捕获像, 和测量间隔尺寸。100%创伤表皮细胞再生对应于人工创伤的全恢复。

[0120] 以2个剂量(10mg/ml和5mg/ml)测试IgA F4, 而以10mg/ml使用IgG。有趣的是, 以稳定状态, IgA对人工间隔闭合显示稍微正面效应(图14B)。相反, IgG似乎减慢伤口闭合。当划照射的单层细胞时, IgA的作用变得更清楚(图14C和D)。IgA F4维持照射的H376细胞的迁移和分裂, 而未处理的照射的细胞未以相同的速度覆盖人工间隔。而且, 当将细胞用4Gy照射时, IgA效应更强。当以2Gy和4Gy照射细胞时, 在上皮细胞上观察到IgG的负面效应(图14C, D)。

[0121] **【实施例10: IgA与上皮细胞的特异性结合】**

[0122] 为了获得IgA在细菌刺激和创伤表皮细胞再生过程中调控上皮细胞功能的潜在机理的信息, 我们分析了底特律562和H376上皮细胞上IgA受体的细胞表面表达。

[0123] 几种受体已被描述结合IgA。它们是CD89, CD71(转铁蛋白受体), ASGP-R, FCAMR(Fca/mR, CD351)和pIgR(CD300e)(Monteiro等人(2003)Annu.Rev.Immunol.21:177-204)。

CD89在骨髓样细胞上表达,而ASGP-R,FCAMR和pIgR分别存在于肝细胞上,B-淋巴细胞和巨噬细胞上,及肠上皮细胞上。仅CD89以高特异性结合IgA。

[0124] 因为许多细胞类型需要由转铁蛋白的铁摄取,其被转铁蛋白与其受体(例如CD71)的结合驱动,由此CD71在许多细胞类型(除了高度分化的细胞外)上潜在地表达(Pomka P等人(1999) IJBCB 31,1111-1137)。但是,其水平在细胞间显著地改变。至今,CD71已被显示结合单体IgA和分泌IgA(Moura等人(2001) J.Exp.Med.194,4,417-425)。因此,其是颊上皮细胞上IgA的潜在靶。

[0125] 为了控制此受体的表达,我们于37°C用ACUTASE(eBioscience)轻轻分开PBS 1×-洗涤的H376和底特律562细胞10分钟,用1×PBS洗涤它们,及在1×PBS中,在冰上,使用抗-人CD71(BD Biosciences,克隆A59)抗体将它们染色30分钟。同种型对照抗体用于评定背景荧光的水平。将CD89(仅在骨髓样细胞上表达)用作阴性对照(BD Biosciences,克隆M-A712)。在2个洗涤步骤之后,在FACS Canto II流式细胞仪(Becton Dickinson)上运行样品。

[0126] 如显示于图15,我们发现底特律562和H376上皮细胞明显表达转铁蛋白受体。相反,及如预期,在上皮细胞上未检测到CD89。

[0127] **【实施例11: IgA F4制备物不与TNF α 反应】**

[0128] 在最近几年,靶向和/或抑制负责发炎或促进肿瘤发展的关键蛋白的免疫球蛋白(例如单克隆抗体)的产生强烈增加。在慢性疾病以及自免疫疾病中,抗-TNF α -特异性抗体已显示减缓被治疗的患者中的发炎。

[0129] 如显示于实施例4(图10和11),IgA下调由上皮细胞的促-炎性分子产生。为了排除观察的IgA的抗-炎性效应中抗-TNF活性的涉及,我们测定了我们的多克隆IgA和IgG制备物中TNF α 特异性抗体的水平。

[0130] 于37°C,在96-孔板(样品板)(Nunc Maxisorb)中以及在PBS(pH7.4)中1 μ g/ml(50 μ L/孔)包被TNF- α 经2h。然后将孔用300 μ l洗涤缓冲剂(1×PBS,0.05%(v/v)吐温-20)洗涤一次,及于37°C用Smart Block(Candor Bioscience)阻断2小时。平行地,制备无包被的TNF- α 的结合对照板(空白板)。洗涤步骤后,将Ig样品(IgA F4/IgG Privigen/英利昔单抗)稀释于LowCrossBuffer(LCB)(Candor Bioscience)。在一些孔中,添加游离的TNF- α ,以抑制抗体结合。将样品(100 μ l)移液到板中,及于37°C温育2小时。温育后,将孔洗涤3次,和将板于37°C用关联第二抗体(多克隆兔抗-人IgG-HRP(Dako;0.5 μ g/ml)或多克隆兔抗-人IgA HRP(Dako;0.5 μ g/ml)),在抗体缓冲剂(LCB)中温育30分钟。如之前所述将孔洗涤4次,和随后用超-敏感TMB(Fitzgerald)显影。用1M盐酸(Merck)停止反应,和在450nm处由EnVision Multilabel读取器(Perkin Elmer)测量吸光度。

[0131] 图16展示,我们的IgG和IgA F4制备物均含有可忽略量的抗-TNF α 抗体。以相当的浓度,IgA和IgG对TNF α 的反应性分别是抗-TNF α 特异性抗体(英利昔单抗)的 1.2×10^6 和 1.1×10^5 分之一,由此,IgA免疫抑制活性是不依赖于TNF α 的抗-TNF α 活性。

序列表

- <110> CSL Behring AG et al
- <120> 用免疫球蛋白治疗粘膜炎
- <130> A194
- <150> EP2012158939.4
- <151> 2012-03-09
- <160> I
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> I
- <211> 764
- <212> PRT
- <213> 智人 (Homo sapiens)
- <400> I

```

Met Leu Leu Phe Val Leu Thr Cys Leu Leu Ala Val Phe Pro Ala Ile
1           5           10          15

Ser Thr Lys Ser Pro Ile Phe Gly Pro Glu Glu Val Asn Ser Val Glu
20          25          30

Gly Asn Ser Val Ser Ile Thr Cys Tyr Tyr Pro Pro Thr Ser Val Asn
35          40          45

Arg His Thr Arg Lys Tyr Trp Cys Arg Gln Gly Ala Arg Gly Gly Cys
50          55          60

Ile Thr Leu Ile Ser Ser Glu Gly Tyr Val Ser Ser Lys Tyr Ala Gly
65          70          75          80

Arg Ala Asn Leu Thr Asn Phe Pro Glu Asn Gly Thr Phe Val Val Asn
85          90          95

Ile Ala Gln Leu Ser Gln Asp Asp Ser Gly Arg Tyr Lys Cys Gly Leu
100         105         110

Gly Ile Asn Ser Arg Gly Leu Ser Phe Asp Val Ser Leu Glu Val Ser
115         120         125

Gln Gly Pro Gly Leu Leu Asn Asp Thr Lys Val Tyr Thr Val Asp Leu
130         135         140

Gly Arg Thr Val Thr Ile Asn Cys Pro Phe Lys Thr Glu Asn Ala Gln
145         150         155         160

Lys Arg Lys Ser Leu Tyr Lys Gln Ile Gly Leu Tyr Pro Val Leu Val
165         170         175

Ile Asp Ser Ser Gly Tyr Val Asn Pro Asn Tyr Thr Gly Arg Ile Arg
180         185         190

Leu Asp Ile Gln Gly Thr Gly Gln Leu Leu Phe Ser Val Val Ile Asn
195         200         205

Gln Leu Arg Leu Ser Asp Ala Gly Gln Tyr Leu Cys Gln Ala Gly Asp
210         215         220
    
```

[0001]

Asp Ser Asn Ser Asn Lys Lys Asn Ala Asp Leu Gln Val Leu Lys Pro
 225 230 235 240
 Glu Pro Glu Leu Val Tyr Glu Asp Leu Arg Gly Ser Val Thr Phe His
 245 250 255
 Cys Ala Leu Gly Pro Glu Val Ala Asn Val Ala Lys Phe Leu Cys Arg
 260 265 270
 Gln Ser Ser Gly Glu Asn Cys Asp Val Val Val Asn Thr Leu Gly Lys
 275 280 285
 Arg Ala Pro Ala Phe Glu Gly Arg Ile Leu Leu Asn Pro Gln Asp Lys
 290 295 300
 Asp Gly Ser Phe Ser Val Val Ile Thr Gly Leu Arg Lys Glu Asp Ala
 305 310 315 320
 Gly Arg Tyr Leu Cys Gly Ala His Ser Asp Gly Gln Leu Gln Glu Gly
 325 330 335
 Ser Pro Ile Gln Ala Trp Gln Leu Phe Val Asn Glu Glu Ser Thr Ile
 340 345 350
 Pro Arg Ser Pro Thr Val Val Lys Gly Val Ala Gly Gly Ser Val Ala
 355 360 365
 [0002] Val Leu Cys Pro Tyr Asn Arg Lys Glu Ser Lys Ser Ile Lys Tyr Trp
 370 375 380
 Cys Leu Trp Glu Gly Ala Gln Asn Gly Arg Cys Pro Leu Leu Val Asp
 385 390 395 400
 Ser Glu Gly Trp Val Lys Ala Gln Tyr Glu Gly Arg Leu Ser Leu Leu
 405 410 415
 Glu Glu Pro Gly Asn Gly Thr Phe Thr Val Ile Leu Asn Gln Leu Thr
 420 425 430
 Ser Arg Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Leu Thr Asn Gly Asp Thr Leu
 435 440 445
 Trp Arg Thr Thr Val Glu Ile Lys Ile Ile Glu Gly Glu Pro Asn Leu
 450 455 460
 Lys Val Pro Gly Asn Val Thr Ala Val Leu Gly Glu Thr Leu Lys Val
 465 470 475 480
 Pro Cys His Phe Pro Cys Lys Phe Ser Ser Tyr Glu Lys Tyr Trp Cys
 485 490 495
 Lys Trp Asn Asn Thr Gly Cys Glu Ala Leu Pro Ser Gln Asp Glu Gly
 500 505 510
 Pro Ser Lys Ala Phe Val Asn Cys Asp Glu Asn Ser Arg Leu Val Ser
 515 520 525

Leu Thr Leu Asn Leu Val Thr Arg Ala Asp Glu Gly Trp Tyr Trp Cys
 530 535 540

Gly Val Lys Gln Gly His Phe Tyr Gly Glu Thr Ala Ala Val Tyr Val
 545 550 555 560

Ala Val Glu Glu Arg Lys Ala Ala Gly Ser Arg Asp Val Ser Leu Ala
 565 570 575

Lys Ala Asp Ala Ala Pro Asp Glu Lys Val Leu Asp Ser Gly Phe Arg
 580 585 590

Glu Ile Glu Asn Lys Ala Ile Gln Asp Pro Arg Leu Phe Ala Glu Glu
 595 600 605

Lys Ala Val Ala Asp Thr Arg Asp Gln Ala Asp Gly Ser Arg Ala Ser
 610 615 620

Val Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Gln Gly Gly Ser Ser Arg Ala Leu
 625 630 635 640

[0003] Val Ser Thr Leu Val Pro Leu Gly Leu Val Leu Ala Val Gly Ala Val
 645 650 655

Ala Val Gly Val Ala Arg Ala Arg His Arg Lys Asn Val Asp Arg Val
 660 665 670

Ser Ile Arg Ser Tyr Arg Thr Asp Ile Ser Met Ser Asp Phe Glu Asn
 675 680 685

Ser Arg Glu Phe Gly Ala Asp Asp Asn Met Gly Ala Ser Ser Ile Thr
 690 695 700

Gln Glu Thr Ser Leu Gly Gly Lys Glu Glu Phe Val Ala Thr Thr Glu
 705 710 715 720

Ser Thr Thr Glu Thr Lys Glu Pro Lys Lys Ala Lys Arg Ser Ser Lys
 725 730 735

Glu Glu Ala Glu Met Ala Tyr Lys Asp Phe Leu Leu Gln Ser Ser Thr
 740 745 750

Val Ala Ala Glu Ala Gln Asp Gly Pro Gln Glu Ala
 755 760

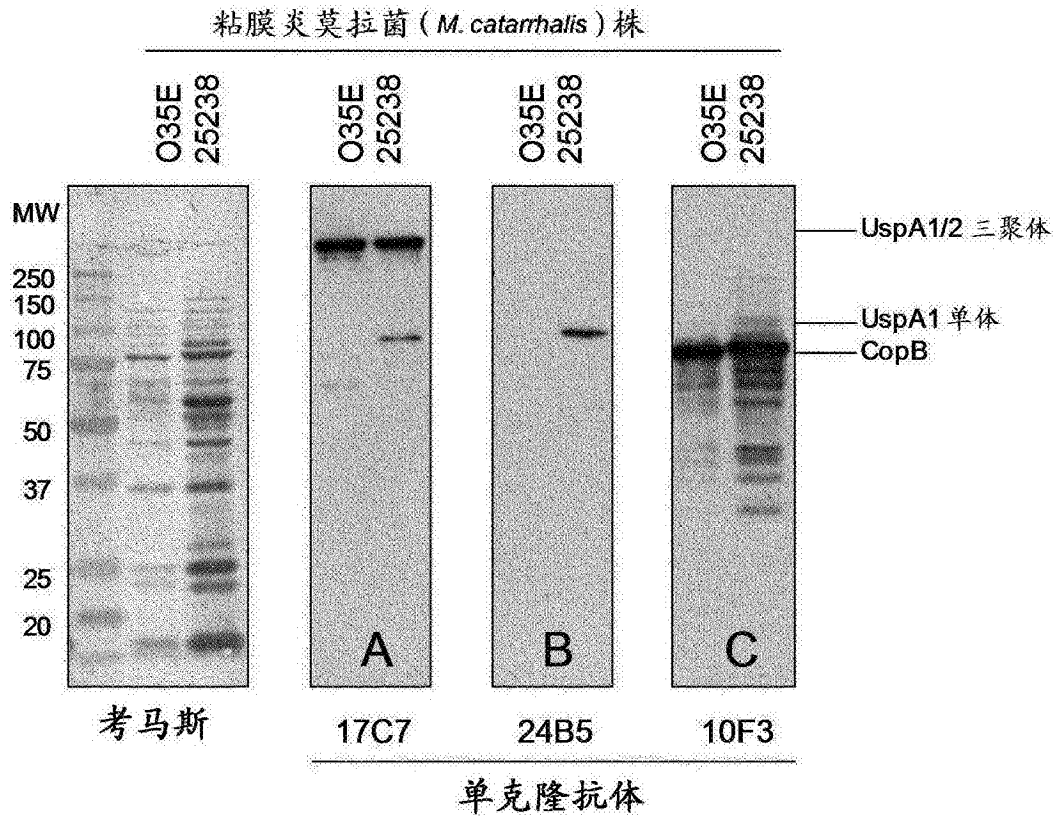


图1

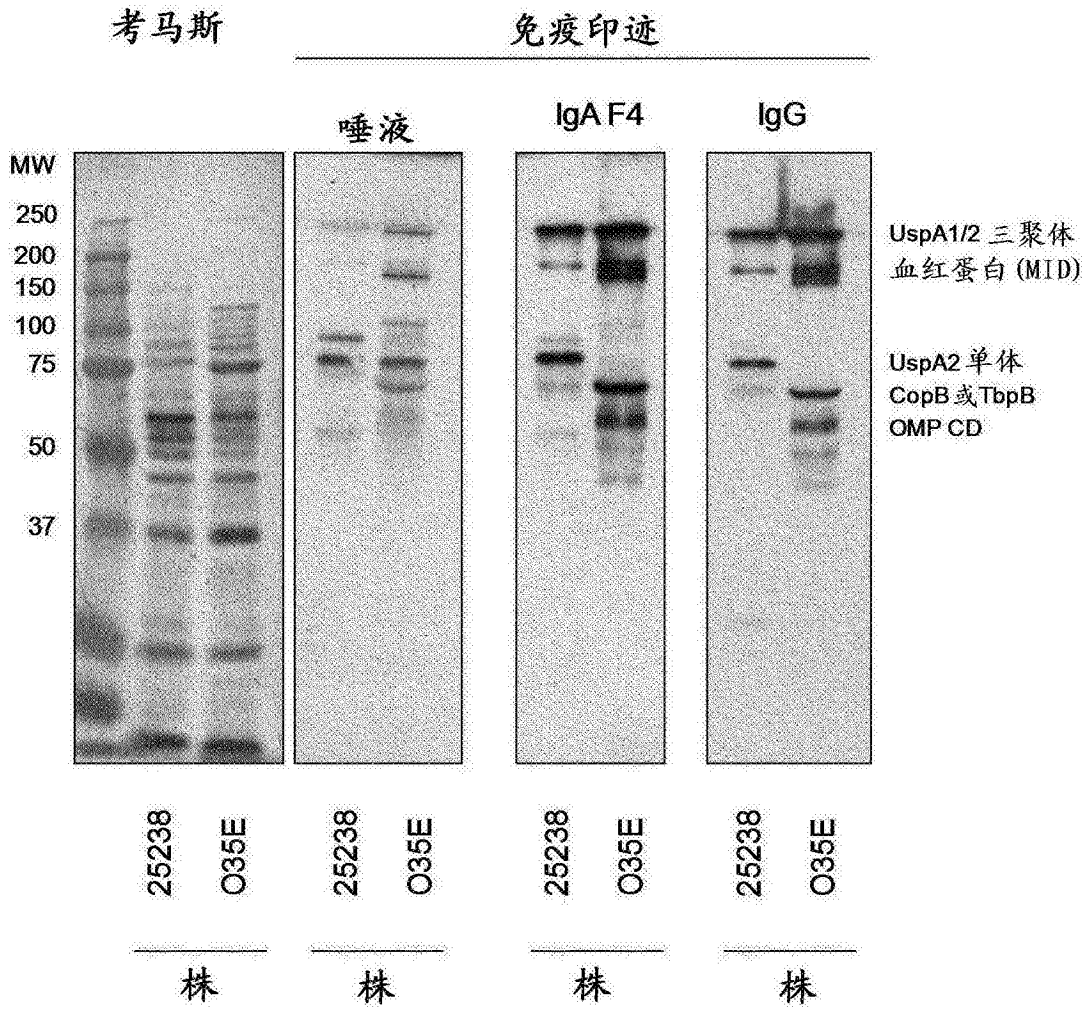


图2

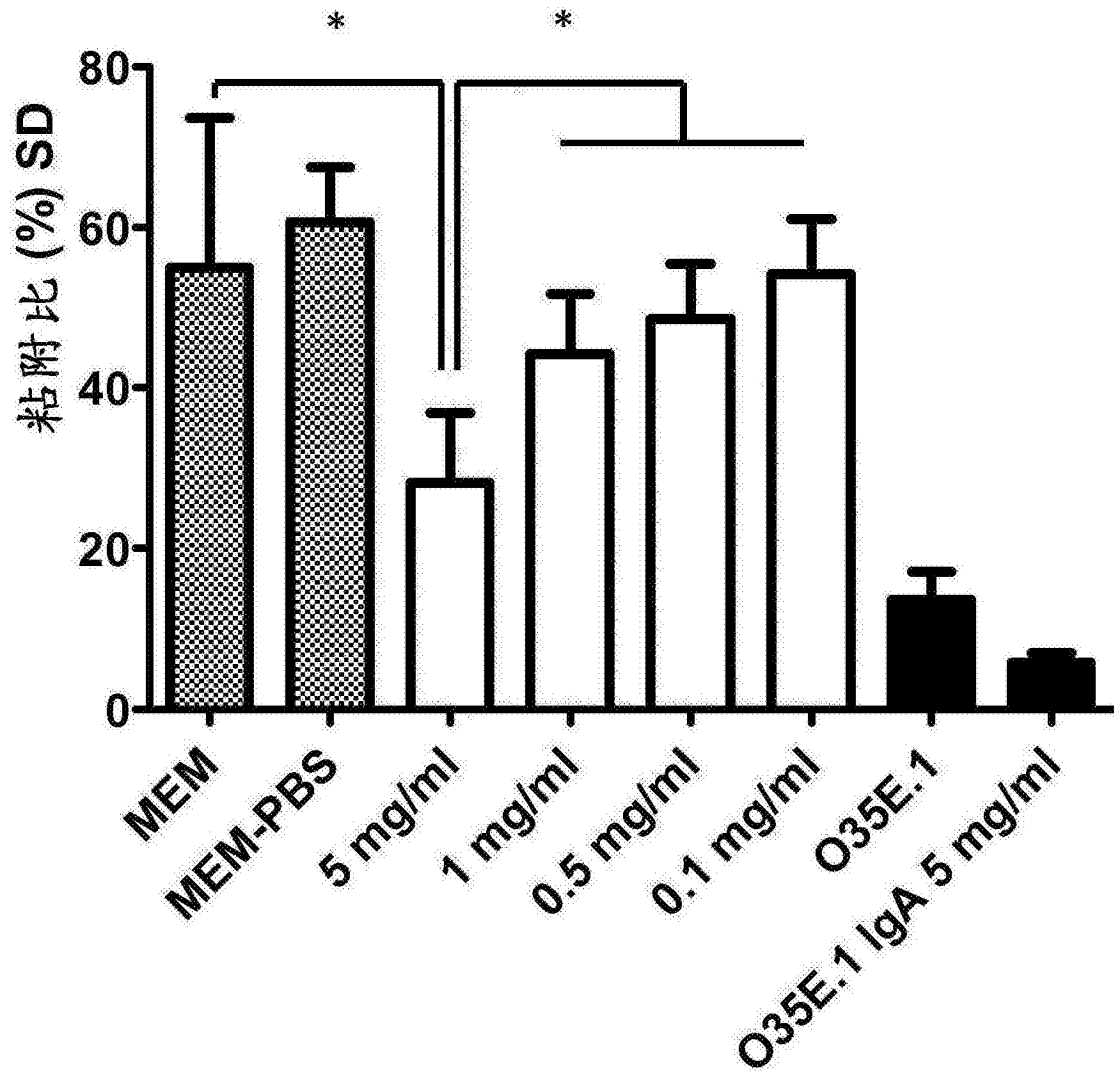


图3

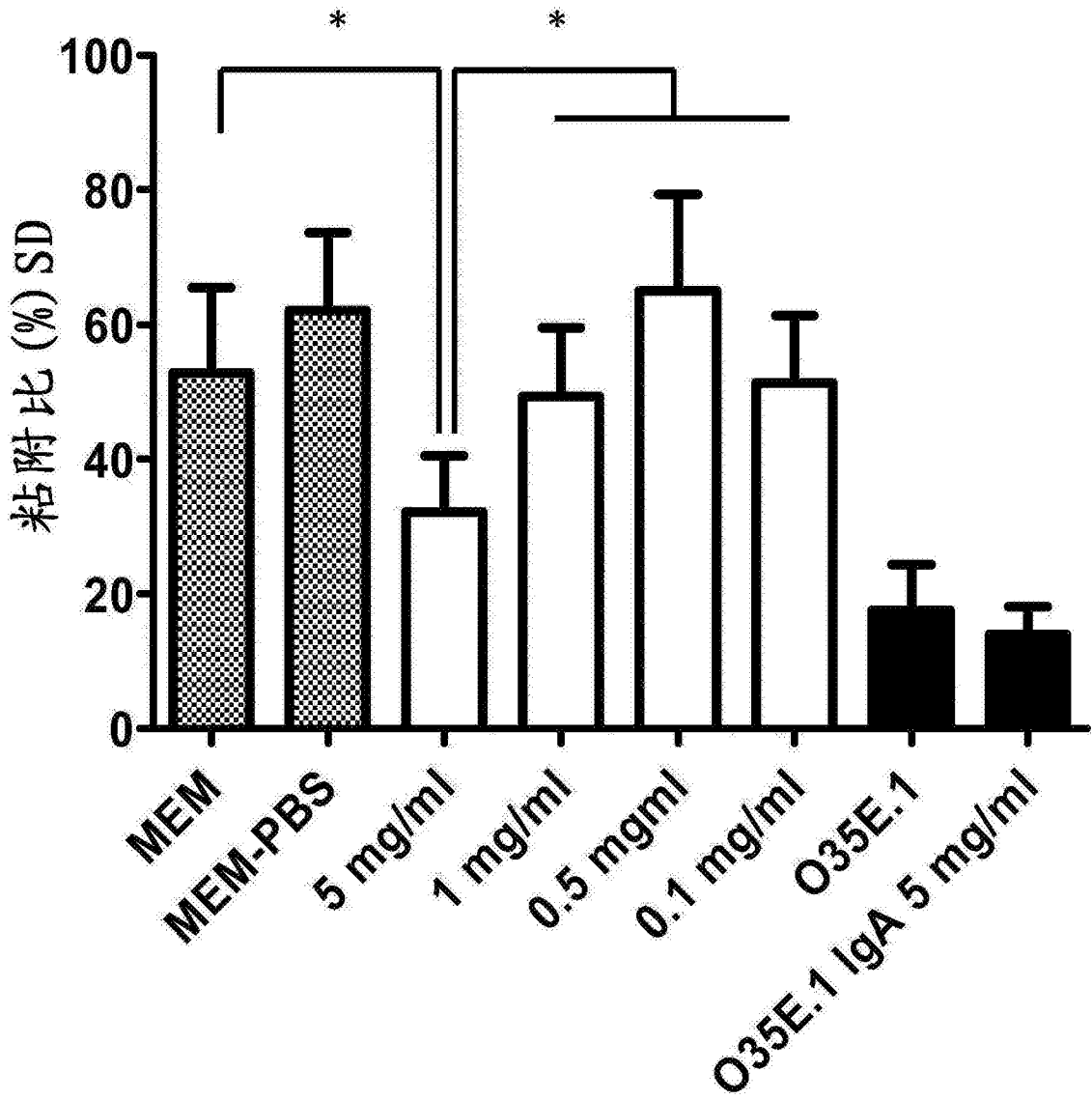


图4

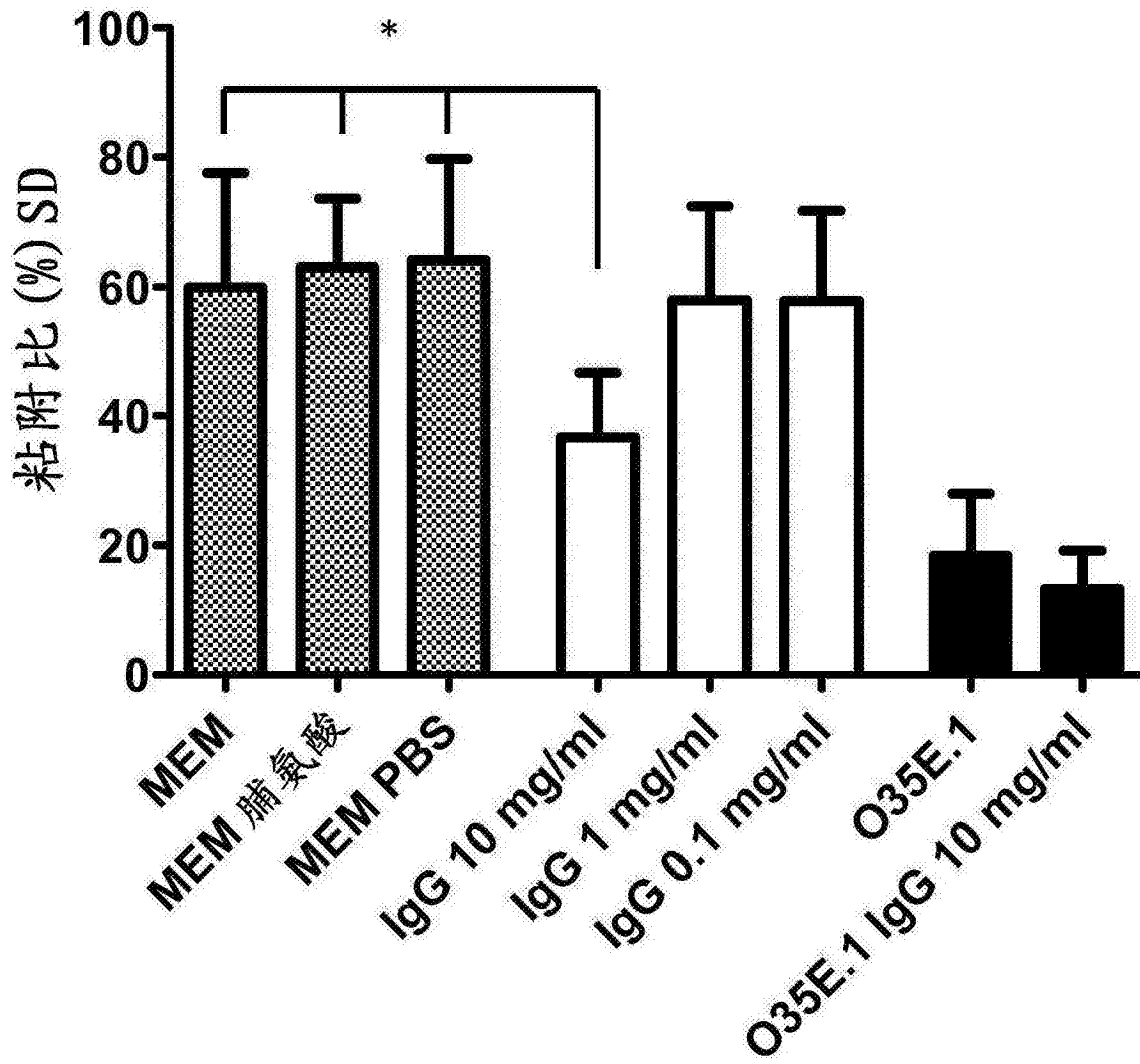


图5

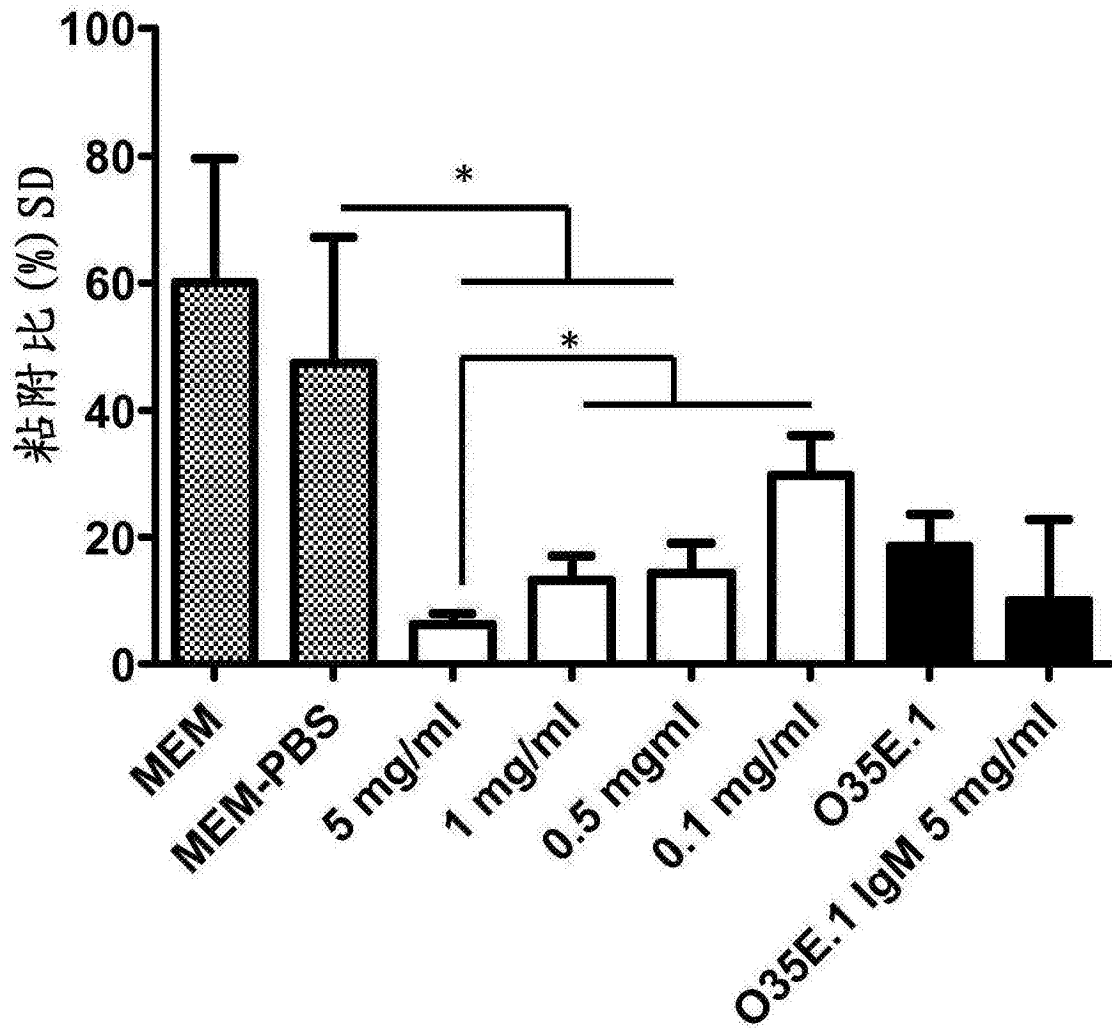


图6

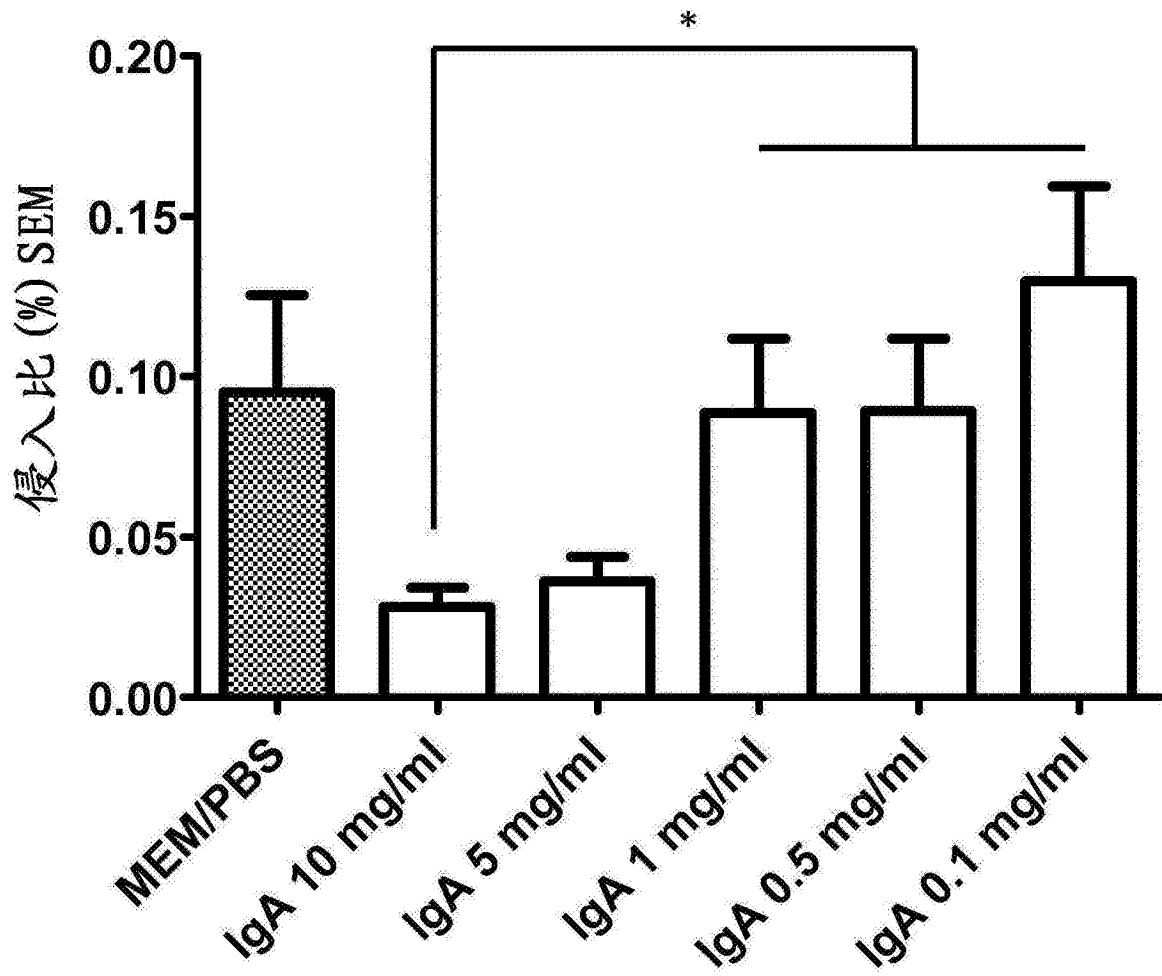


图7

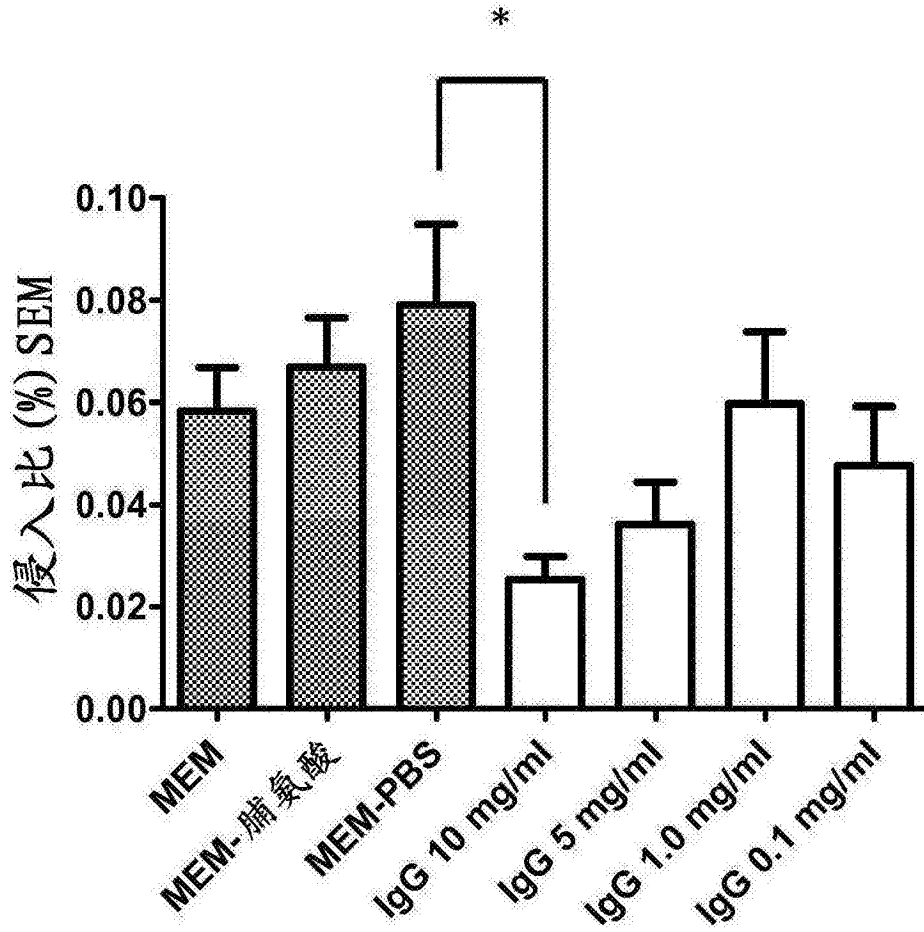


图8

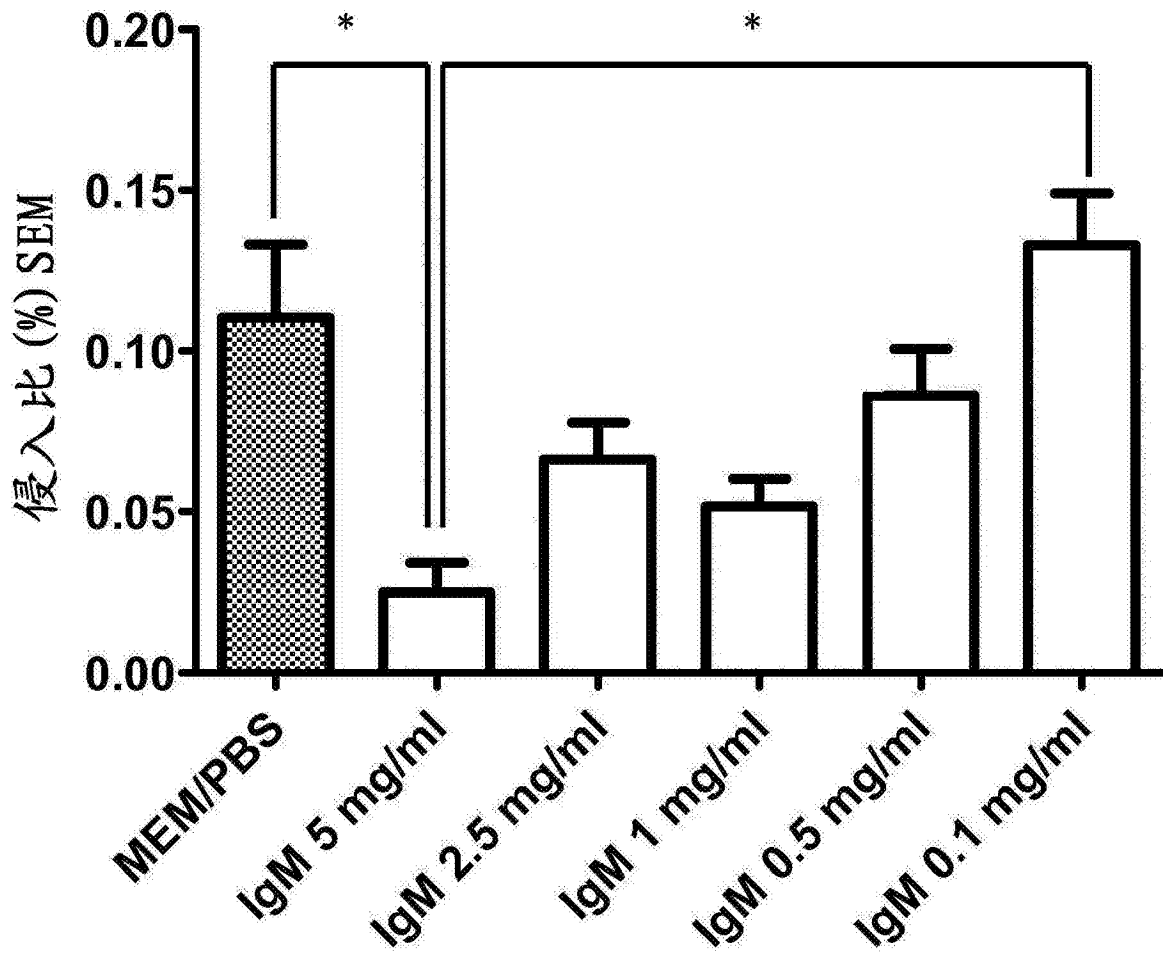


图9

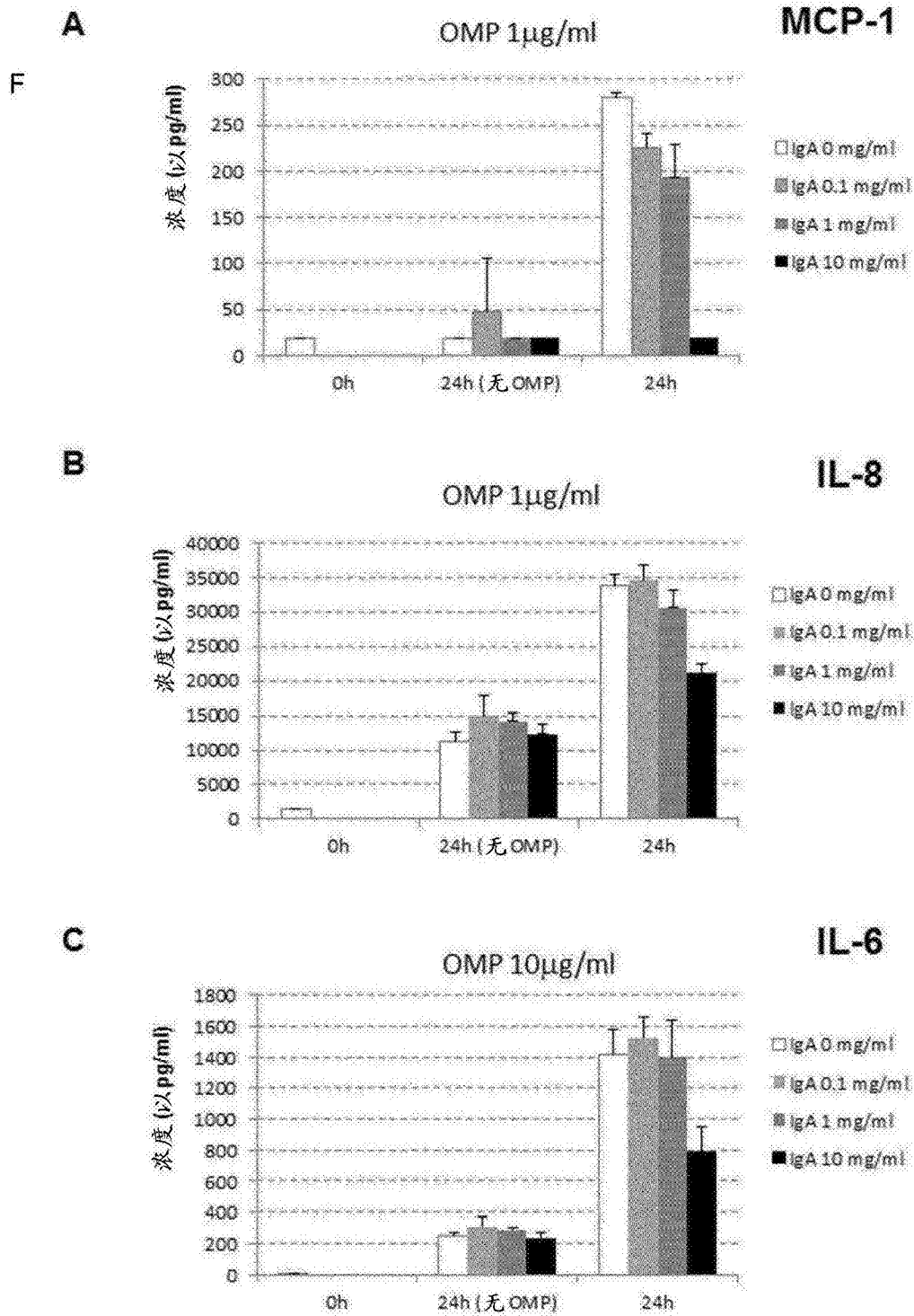
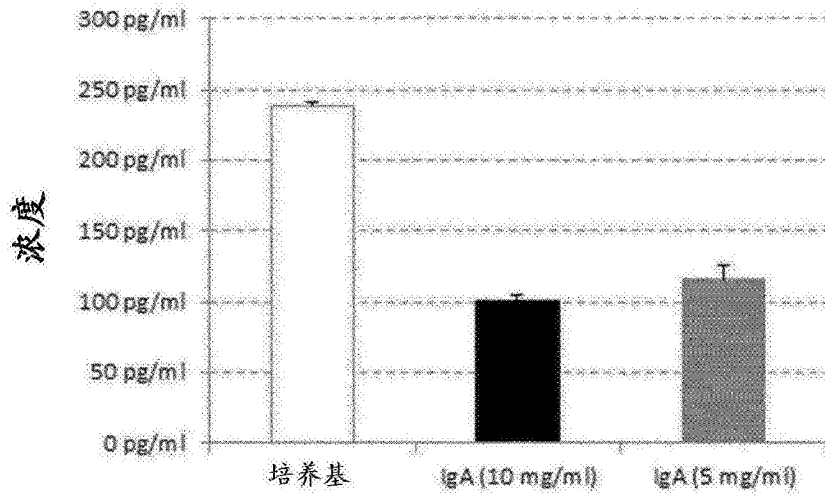


图10

A

H376

IP-10



B

H376

G-CSF

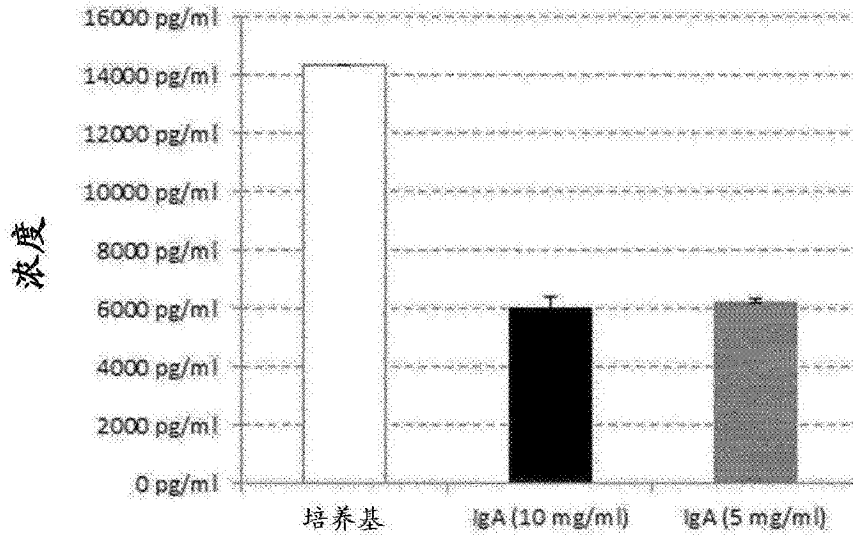


图11

C

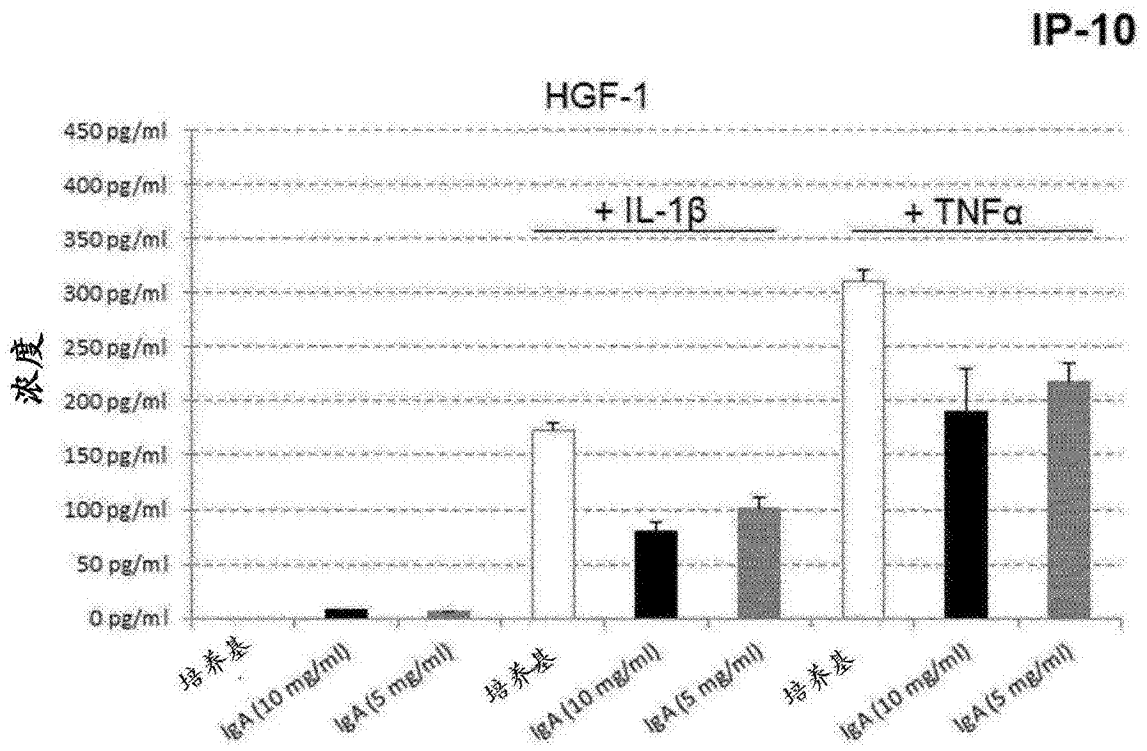
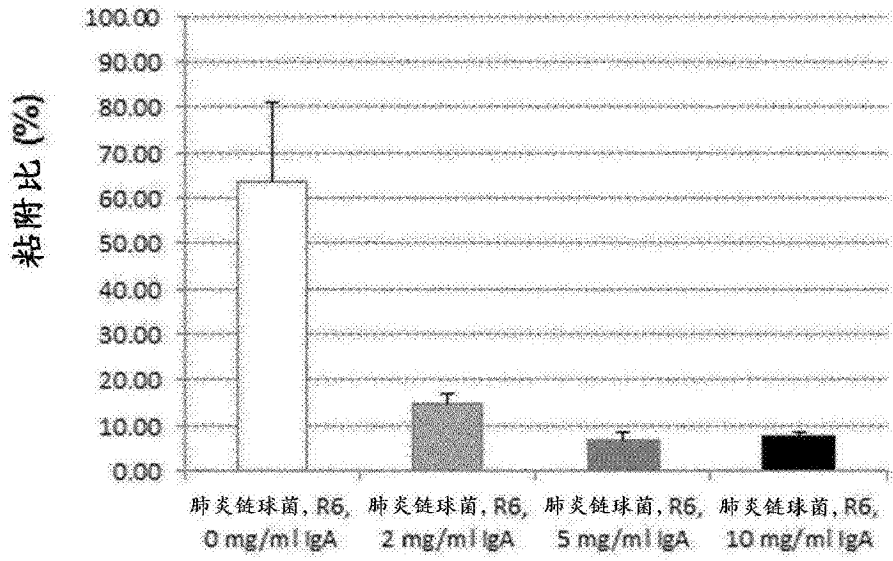


图11续

A



B

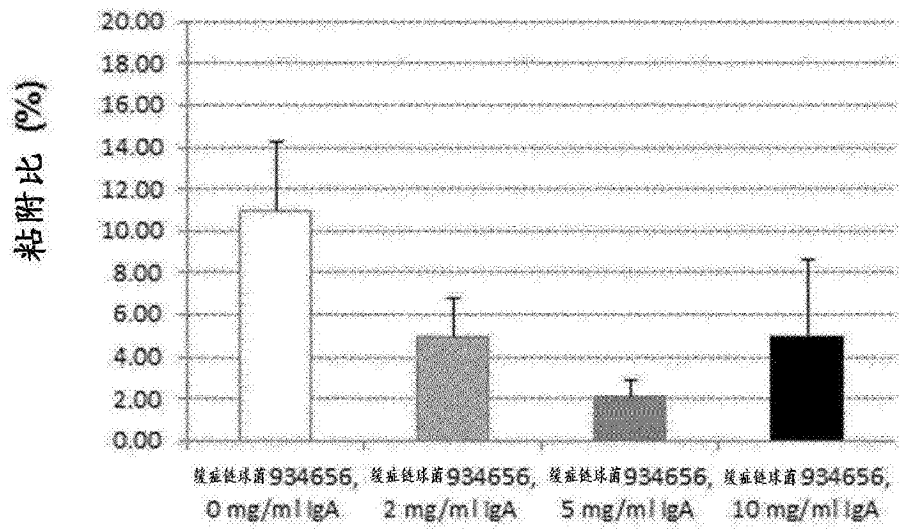
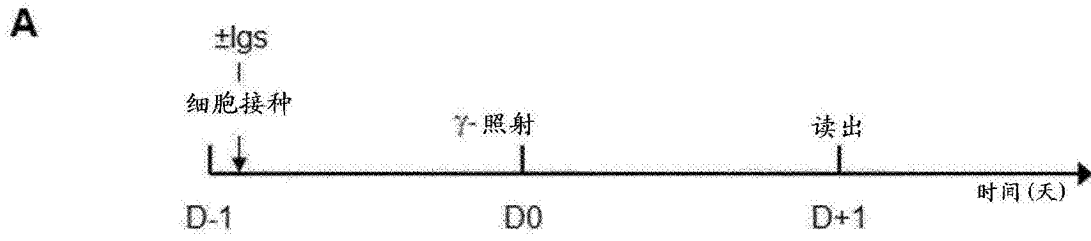


图12



B

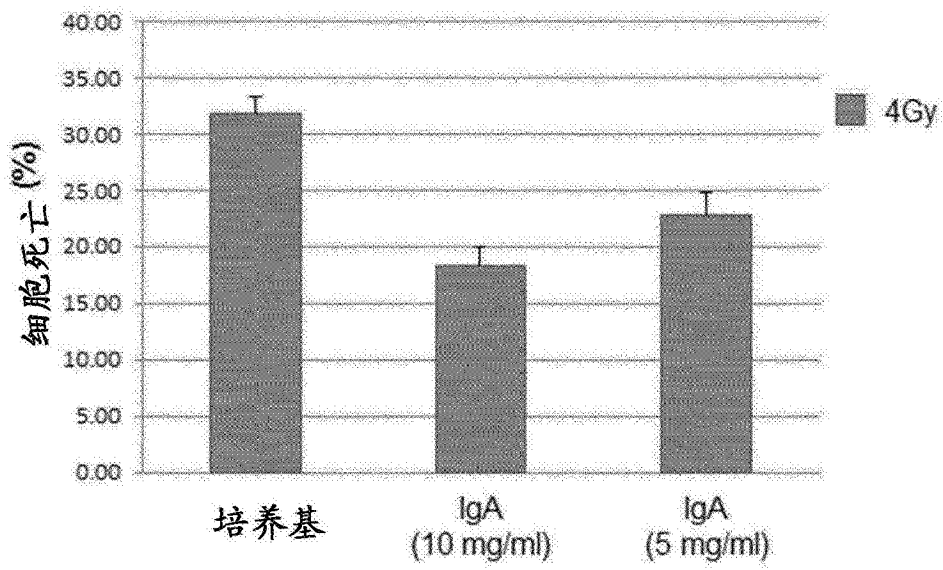


图13

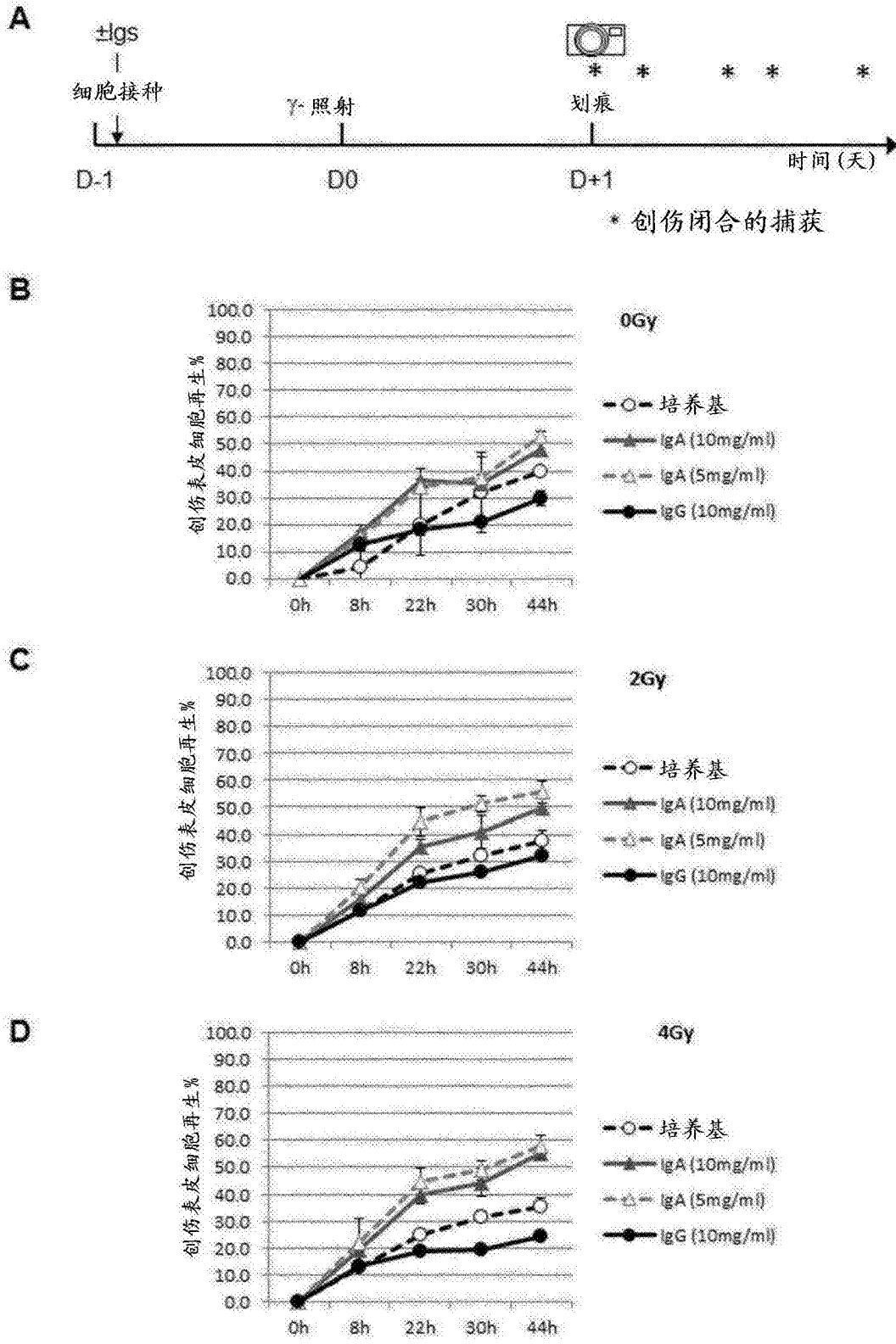


图14

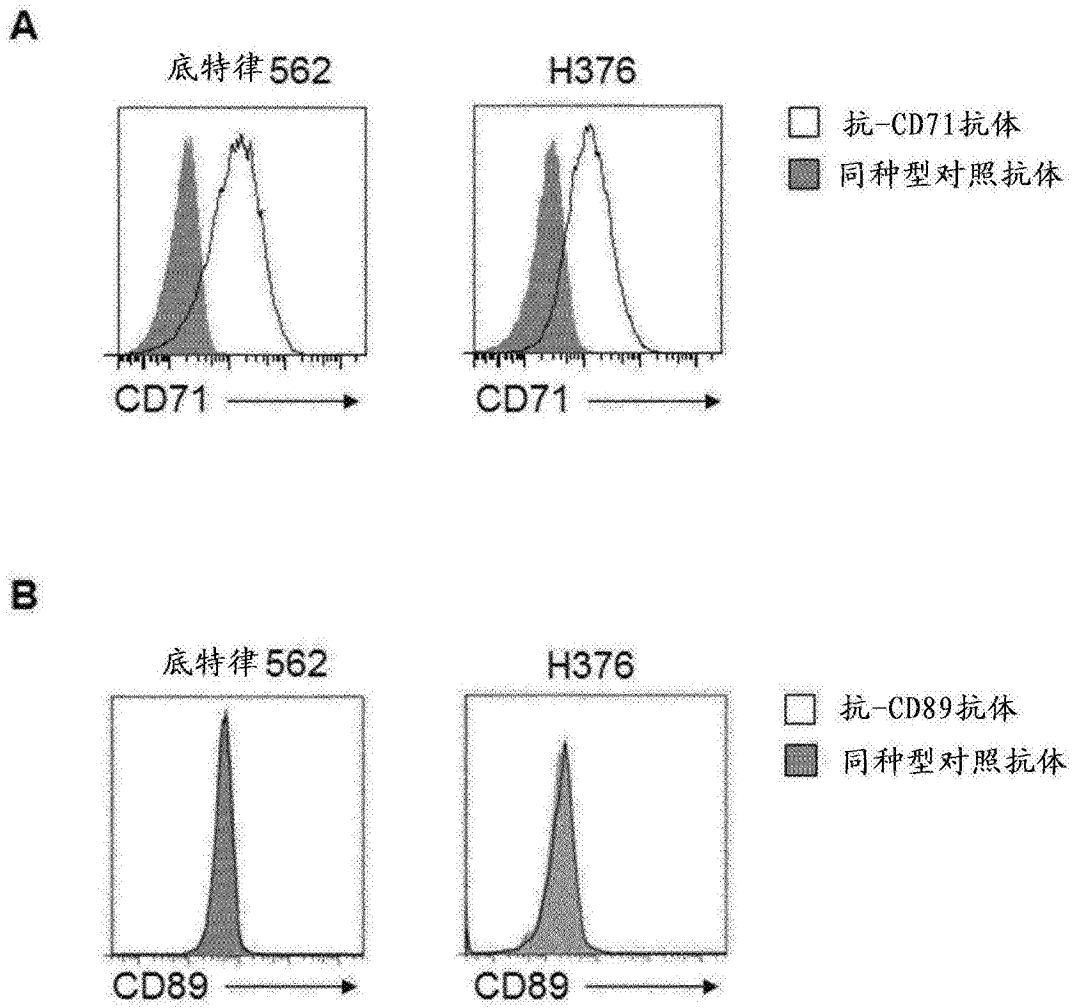


图15

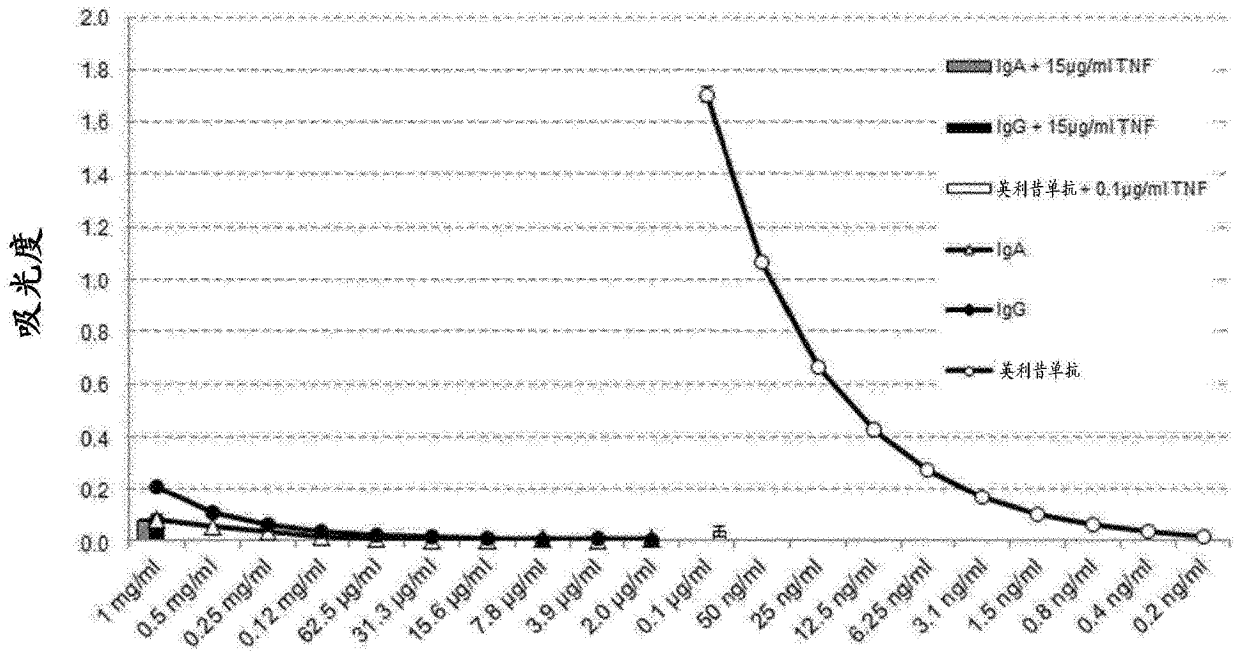


图16